

花生水解蛋白液的浓缩及体外活性研究

王瑛瑶, 王 璋

(江南大学食品学院 江苏 无锡 214036)

摘 要: 本文对水酶法工艺中得到的花生水解蛋白采用纳滤分离技术进行浓缩, 确定操作压力为 0.9 MPa, 操作温度为 35℃。经 60 min 纳滤浓缩水解液中蛋白质浓度由 30.2 提高到 92.1 g/L, 浓度提高了 3.05 倍。对纳滤前后的花生水解蛋白的还原能力、抗氧化能力、对·OH 与 DPPH 的清除作用及抑制血管紧张素转化酶(ACE)活性进行研究, 结果表明花生水解蛋白具有相当的还原力和清除·OH 与 DPPH 能力; 具有抗 Fe²⁺ 引发的卵磷脂脂质体过氧化、抑制 ACE 活性的功能。

关键词: 花生水解蛋白; 纳滤; 抗氧化; 清除作用; ACE

Study on Concentration of Peanut Protein Hydrolysates and Its *Vitro*-activities

WANG Ying-yao, WANG Zhang

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In this paper the peanut protein hydrolysates obtained with aqueous enzymatic process were concentrated by nanofiltration. At the conditions of pressure drop 0.9 MPa and temperature 35℃, the protein concentration of the peanut protein hydrolysates is increased from 30.2 to 92.1 g/L after 60 min concentration. The reducing power, the antioxidant activity, the radical·OH and DPPH scavenging activities and the ACE inhibitory activity of the peanut protein hydrolysates were studied. The results showed that the peanut protein hydrolysates have the property of reduction, and the antioxidant in lecithin liposome system is very good. They have the function of both hydroxyl radicals activities and DPPH scavenging activities. The peanut protein hydrolysates have also the ACE inhibiting activity.

Key words: peanut protein hydrolysis; nanofiltration; antioxidant activity; scavenging activity; ACE (angiotensin converting enzyme)

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)01-0179-05

收稿日期: 2005-06-16

作者简介: 王瑛瑶(1978-), 女, 博士研究生, 研究方向为食品科学。

析表可知, 在 0.05 水平上 pH、T 和 t 三因素对共轭亚油酸的产量的影响都是显著的。

3 结 论

本实验用紫外线、硫酸二乙酯诱变处理德氏乳杆菌细胞悬液经初筛、复筛最终得到一株共轭亚油酸产量较高的菌株 1616u, 其产量可达 11.61 μg/ml 发酵液; 经产 CLA 稳定性试验, 结果表明稳定性良好; 对发酵培养条件进行优化得出, 发酵液 pH 为 5, 培养温度为 37℃, 培养时间为 30 h 时最有利于共轭亚油酸的合成。

参考文献:

[1] KRAMER J K G, PARODI P W, TENSEN R G, et al. Rumenic acid: A proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer

formed in nature products[J]. *Lipids*, 1998, 3(8): 835.

[2] HA Y L, GRIMM N K, PARIZA M W. Anticarcinogenic from ground beef heat-altered derivatives of linoleic acid[J]. *Carcinogenesis*, 1998, 8(12): 1881-1887.

[3] HUANG Y C, LUEDECKE L O, SHULTZ T D. Effect of cheddar cheese consumption on plasma conjugated linoleic acid in man[J]. *Nutrition Research*, 1999, 14(3): 373-386.

[4] 易昌华, 贺建华. 共轭亚油酸的免疫调节功能概述[J]. *广东畜牧兽医科技*, 2004, 29(1): 23.

[5] CHIN S F, STORKSON J M, ALBRIGHT K J, et al. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency[J]. *Nutrition Research*, 1994, 124: 2344-2349.

[6] LIN T Y, LIN C W, LEE C H. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lacticulturalures and linoleic acid[J]. *Food Chemistry*, 1999, 67: 1-5.

[7] 章名春. 工业微生物诱变育种[M]. 北京: 科学出版社, 1984.

[8] 梁惠珍, 赵树欣, 程丽娟, 等. 共轭亚油酸的微生物转化及检测方法[J]. *油脂工程*, 2004(8): 42-45.

花生仁水酶法提取油脂与水解蛋白技术是在水剂法提取花生油和花生蛋白的基础上发展起来的一项新技术, 该技术的最大特点在于从花生中提取油的同时能回收营养价值高的花生水解蛋白。经酶作用得到的花生水解蛋白在一定程度上弥补了花生蛋白质必需氨基酸组成不平衡、限制性氨基酸较多等营养弱点, 提高了其营养价值和附加值。

纳滤膜分离是近十年来发展起来的一种新型膜分离技术, 具有设备简单、常温操作、无相变及化学变化、选择性高及能耗低等优点, 特别适用于热敏性生物产品的分离纯化, 被广泛应用于食品、医药、水处理等领域中。纳滤膜表面的分离层由聚电解质构成, 其截留分子量介于超滤膜和反渗透膜之间, 约为 200~2000, 并对无机盐有一定的截留率^[1]。采用纳滤膜进行分离主要利用筛分效应以及离子与荷电膜之间的 Donnan 效应。

本文对水酶法工艺得到的花生水解蛋白液采用截留分子量为 150 的聚酰胺膜进行浓缩纳滤操作, 对纳滤后的蛋白水解液进行喷雾干燥。研究了纳滤膜分离过程操作参数对纳滤膜分离性能的影响。通过选取几种常见的检验抗氧化活性的体系对花生水解蛋白的抗氧化活性进行研究, 为开发以花生水解蛋白为原料的功能性食品, 提高花生水解蛋白的利用价值提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 水解蛋白的制备工艺

粉碎的花生 加入5倍体积的水 碱提 酶解 离心 水解液 灭酶 水解蛋白液

纳滤浓缩

油相

喷雾干燥

水解蛋白

碱提条件为: pH8.50, 温度, 提取时间 30min;

酶解条件: 在 60℃, pH 为 8.50 的情况下, 加入

1.5%(酶体积与蛋白质质量之比)Alcalase 酶解 5h;

离心条件: 3000r/min, 离心 10min;

灭酶条件: 85~90℃下加热 10min。

喷雾干燥: 进风温度 170~180℃, 出风温度 75~85℃。

1.2 材料

去皮花生仁 山东五莲食品厂; 纳滤膜材料 芳香族聚酰胺(APA); 硫代巴比妥酸(AR) 上海试剂工厂; 卵磷脂 华东师范大学化工厂(上海); ACE及Hippuryl-L-His-L-Ieu(HHL) Sigma公司。

1.3 方法

1.3.1 花生水解蛋白粉的制备

水解蛋白液用截留分子量为 150Da 的聚酰胺膜进行纳滤浓缩操作。研究纳滤膜分离过程操作参数(操作压力与温度)对纳滤膜分离性能的影响。在确定的纳滤操

作压力与温度下对样品进行浓缩。浓缩得到的液体经喷雾干燥得到花生水解蛋白粉。

1.3.2 花生水解蛋白还原能力的测定^[2]

取花生水解蛋白粉, 用 2.5ml 0.2mol/L 磷酸缓冲液配成一定浓度的溶液, 加入 2.5ml 1% 铁氰化钾, 置于 50℃ 水浴中反应 20min, 加入 2.5ml 10% TCA, 混合后以 3000r/min 离心 10min。取上清液 2.5ml, 加入 2.5ml 蒸馏水和 0.5ml 0.1% 氯化铁, 混合均匀, 静置 10min 后, 测定 A_{700nm} 。吸光值越大, 表示还原能力越强。

1.3.3 对脂质体抗氧化活性的测定^[3]

试液的配制: 脂质体 PBS 分散系(LLS): 300mg 卵磷脂冰浴震荡溶解于 30ml 10mmol/L pH7.4 PBS。三氯醋酸(TCA)-硫代巴比妥酸(TBA)-盐酸(HCl)混合液: 15g TCA, 0.37g TBA, 2.1ml 浓盐酸依序放入 100ml 水中。

测定步骤: 于样品管中依次加入 1ml 卵磷脂溶液(LLS)、1ml 400μmol/L 三氯化铁溶液($FeCl_3$)、1ml 400μmol/L 抗坏血酸和 1ml 样品, 混匀。避光于 37℃ 水浴 60min, 再加入 2ml TCA-TBA-HCl 混合液, 90~100℃ 水浴 15min, 迅速冷却, 以 2000r/min 转速离心 10min, 取上清液在 535nm 测吸光值 A_s 。空白管以 1ml 重蒸水代替 1ml 样品, 操作方法同样品管, 可测得空白管的吸光度 A_c 。

数据处理: 抑制率 IC(%) = $(A_c - A_s) \times 100 / A_c$

1.3.4 花生水解蛋白粉清除·OH 效果的测定

参照贾之慎^[4]的方法, 以比色法测定样品清除·OH 效果, 清除率的计算公式如下:

$$\text{清除率 } I(\%) = \frac{A_{\text{样}} - A_{\text{顺}}}{A_{\text{未}} - A_{\text{顺}}} \times 100$$

1.3.5 ACE 抑制活性的测定^[5]

样品溶于超纯水中, 离心(7200 × g, 15min), 取上清液进行 ACE 抑制活性测定。取 10μl 样品和 40μl 2.17mmol/L 底物(hippuryl-His-Leu溶于pH8.30.05mol/L 硼酸缓冲液, 其中含 0.3mol/L NaCl)在 37℃ 保温 6min, 加入 20μl ACE(0.1U 溶于相同的缓冲液中), 37℃ 下反应 30min 后, 加入 80μl 1mol/L 的 HCl 终止反应, 至室温取出 10μl 反应产物进样, 通过 RP-HPLC 洗脱图谱定量马尿酸生成量, 以马尿酸的生成量来判断样品对 ACE 活性的抑制作用, 同时做空白对照。

$$\text{ACE 抑制率}(\%) = \frac{\text{空白对照的马尿酸的峰面积} - \text{样品的马尿酸面积}}{\text{空白对照的马尿酸的峰面积}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 水解蛋白液的纳滤操作参数的确定

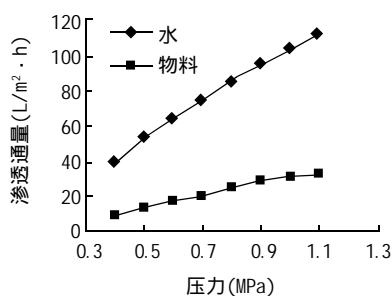


图1 压力与渗透通量的关系(T=35)

Fig.1 Relationship between pressure drop(0.9MPa) and flux (T=35)

纳滤膜分离过程操作参数不同,纳滤膜的分离性能也不同。压差是纳滤过程的推动力,是纳滤膜最重要的运行参数之一。料液温度为35℃下,采用全循环的方式(即浓缩液与透过液都循环回到原料液储罐内,物料保持恒定的体积与浓度)测定渗透通量与压力的关系,结果见图1。从中可以看出,物料与水的渗透通量随压力增大而增加。但压力过高会对膜造成不可逆污染和不可逆压缩等损伤。为此,选用纳滤膜使用说明书上推荐的压力数值0.9MPa为操作压力。

固定纳滤的操作压力为0.9MPa,采用全循环的方式测定渗透通量与压力的关系,结果见图2。从中可以看出,随着温度提高,膜的渗透通量相应提高。这是因为温度高,料液粘度小,流动状态好,水和溶质的扩散及传质系数高,但操作温度太高料液中的有效成分有可能被破坏,且对膜也有损伤,所以操作温度不宜太高也不宜太低。聚酰胺膜的最高耐受温度为45℃,为此,选择35℃为操作温度。

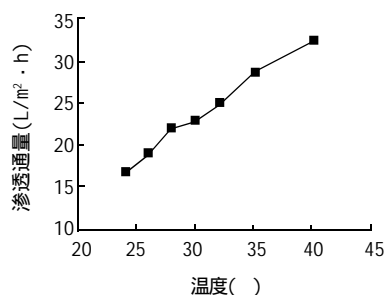


图2 温度与渗透通量的关系(P=0.9MPa)

Fig.2 Relationship between temperature and flux(P=0.9MPa)

2.2 花生水解蛋白的浓缩及水解蛋白纳滤前后成分比较
在操作压力为0.9MPa,纳滤温度为35℃下,对水解液进行浓缩,纳滤中通量随时间的变化如图3。经60min的浓缩后,42L蛋白质浓度为30.2g/L的料液中浓缩为12.5L蛋白质浓度为92.1g/L的溶液,蛋白质浓度提高3.05倍。28L透过液中蛋白质的浓度为0.432g/L,透过液中蛋白质含量仅占原料液中总蛋白质含量的1%,纳滤操作中花生水解蛋白的回收率达到99%。上述结果

说明:纳滤操作中透过液的排弃并不会造成料液中有有效成分诸如含氮物质的大量损失,且由于含氮物质浓度很低,不会造成环境的污染。纳滤操作对水解蛋白液起到了很好的浓缩作用,且浓缩过程中有效物质的回收率高、对肽的破坏性小。

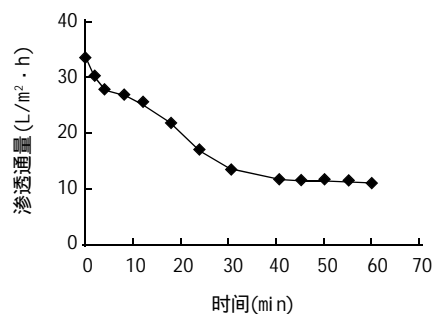


图3 时间与渗透通量的关系(P=0.9MPa, T=35)

Fig.3 Relationship between time and flux(P=0.9MPa, T=35)

纳滤前后的样品组成见表1。纳滤后部分小分子量单糖透过纳滤膜,使得产品中糖含量有所下降;蛋白质含量略有提高。

表1 纳滤前后花生水解蛋白的成分分析(除水外,以干基计)

Table 1 The composition of the protein hydrolysates

	蛋白质(%)	总糖(%)	灰分(%)	水分(%)
纳滤前	62.22	30.08	5.260	4.944
纳滤后	65.12	28.51	5.246	3.930

2.3 花生水解蛋白还原能力

还原能力的测定以样品是否为一良好的电子供应者为指标。还原力大的样品,是良好的电子供应者,其供应的电子可使 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} 。花生水解蛋白粉的还原能力测定结果见图4,花生水解蛋白的还原能力随其浓度的增加而增大,说明花生水解蛋白的抗氧化能力随浓度的增加而增强。

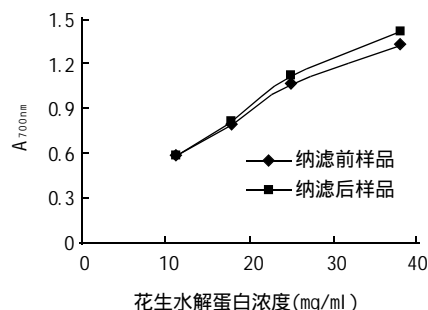


图4 花生水解蛋白浓度与还原能力的关系

Fig.4 Relationship between concentration of protein hydrolysates and reducing power

2.4 花生水解蛋白抗脂质体过氧化能力

细胞膜含有丰富的不饱和脂类,是自由基进攻的主

要靶物质。脂类的过氧化随老化及致癌作用而显著上升^[6]。卵磷脂通常被用作细胞模型而进行体外脂质过氧化的研究,卵磷脂中c-2位上所含的极低密度脂蛋白(VLDL)和低密度脂蛋白(LDL)中的不饱和脂肪酸在铁离子的催化作用下,会发生过氧化,由此可以建立以铁离子诱发卵磷脂中c-2位上所含的VLDL和LDL中的不饱和脂肪酸的过氧化模型。花生水解蛋白在由 Fe^{2+} 引发的卵磷脂脂质体体系中表现出较好的抗氧化性能。

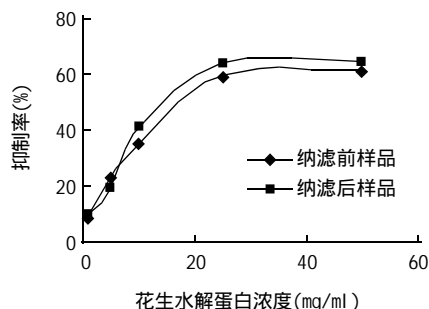


图5 花生水解蛋白在脂质体系中的抗氧化作用

Fig.5 The antioxidative activity of peanut protein hydrolysates in lecithin liposome system

2.5 花生水解蛋白清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基能力

$\cdot\text{OH}$ 自由基是体内最活泼、进攻性最强的活性氧,其危害性很大,可介导许多病理变化。邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法的效果比较好,该法在抗氧化研究中检测离体实验体系中羟基自由基的氧化效应,特别是对于抗氧化剂的选择有重要的价值。

在本文所选的实验体系中,花生水解蛋白表现出较强的清除羟基自由基的能力。从图6可知,随样品浓度的增大对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除能力也呈增大的趋势。纳滤前,水解蛋白清除 $\cdot\text{OH}$ 自由基的 IC_{50} 为12mg/ml。

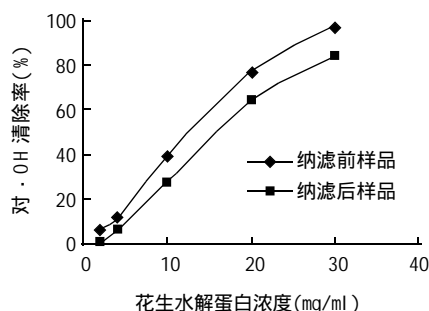


图6 花生水解蛋白对 $\cdot\text{OH}$ 清除作用

Fig.6 The scavenging effect of protein hydrolysates on $\cdot\text{OH}$

2.6 花生水解蛋白清除DPPH自由基能力

DPPH是一种稳定的自由基。从图7可看出,花生水解蛋白有很强的清除DPPH自由基的能力。对DPPH的清除能力随水解蛋白浓度的提高而上升,水解蛋白浓度在0~25mg/ml范围内对DPPH清除能力随浓度增加而

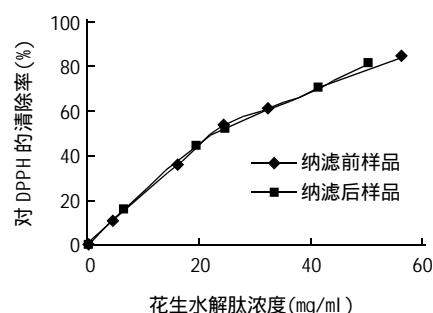


图7 花生水解蛋白对DPPH的清除能力

Fig.7 The scavenging effect of protein hydrolysates on DPPH

上升的趋势比在25~60mg/ml范围内的更快速。

2.7 抑制ACE活性

近几年,人们从大豆、玉米、明胶、酪蛋白、金枪鱼等食品中成功的分离出具有抑制血管紧张素转化酶(ACE)活性的降压肽^[7-8],这类降压肽具有安全、无副作用、人体易吸收、对血压正常者无降压作用等优点。从表2可看出,水酶法得到的产品之一花生水解蛋白也具有抑制ACE活性,水解蛋白对ACE抑制活性随水解产物浓度的增加而上升,纳滤前后样品的ACE活性抑制率基本没有差别。有关肽结构与抑制ACE活性的研究表明^[9]:C末端是Pro、Phe、Tyr或序列中含有疏水性氨基酸是维持高ACE活性抑制率所必需的。为进一步明确花生水解蛋白中具有抑制ACE活性的肽与其氨基酸组成、结构间的相互关系,有必要在后续的工作中对其进行研究。

表2 不同浓度花生水解蛋白的ACE活性抑制率

Table 2 ACE inhibitory activity of protein hydrolysates with different concentration

样品浓度(mg/ml)	ACE抑制率(%)	
	纳滤前样品	纳滤后样品
0.2	42.50	36.26
0.5	52.10	49.83
1.0	71.29	72.93
2.0	76.06	77.12
4.0	83.21	83.71

3 结 论

纳滤操作可以使花生水解液的浓度提高,降低后续喷雾干燥所需能耗。纳滤操作中采用0.9MPa操作压力,料液温度为35℃,经过60min的浓缩,可以使水解液中蛋白质浓度由30.2g/L提高到92.1g/L。得到的花生水解蛋白在还原能力、对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力、抗由 Fe^{2+} 引发的卵磷脂脂质体过氧化的能力、清除DPPH自由基及抑制ACE活性中均表现出相当的活性,可以作为食品中抗氧化以及降压的功能因子。

参考文献:

苦荞蛋白质的低消化性研究

—— 酶解产物的超微结构分析和分子量分布

郭晓娜, 姚惠源, 陈正行

(江南大学食品学院, 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 苦荞麦蛋白质氨基酸组成平衡, 生物价高, 并且具有独特的生理功能。体外消化实验表明其蛋白质的消化率较低, 通过扫描电镜对四种蛋白质组分酶解产物的超微结构进行观察发现, 胃蛋白酶作用于四种组分的方式是不同的, 胃蛋白酶不仅可以作用与清蛋白和球蛋白的表面, 而且随着水解进程的延长胃蛋白酶还可以作用与清蛋白和球蛋白的内部结构, 因此其体外消化率相对较高。而对于醇溶蛋白和谷蛋白, 其高级结构相对较为稳定, 胃蛋白酶只能作用于其表面, 很难作用其内部结构, 所以这两种蛋白组分的体外消化率相对较低。此外还通过高效液相对其酶解物的分子量分布进行研究, 结果表明, 清蛋白和球蛋白的酶解产物分子量相对较低, 组分多, 酶解程度高。醇溶蛋白酶解物的组成较为简单, 这可能是由于被胃蛋白酶作用的位点较少所造成的。而谷蛋白, 其酶解物的分子量分布广, 高分子量的组分所占比例大, 这表明其被酶解的程度相对较低。

关键词: 苦荞麦; 蛋白质; 扫描电镜(SEM); 高效液相(HPLC); 体外消化

Study on Microstructure and Molecular Weight Distribution and Digestibility *in vitro* of Tartary Buckwheat Protein Hydrolysates

GUO Xiao-na, YAO Hui-yuan, CHEN Zheng-xing

(Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Tartary buckwheat protein consists of well-balanced amino acids with higher biological value, and it has some special physiological properties. *In vitro* pepsin digestibility assay showed that its digestibility was rather low. Scanning electron microscopy (SEM) was used to examine the microstructure of four protein fractions hydrolysates. The results showed that the four protein fractions were digested by pepsin with different patterns. Albumin and globulin are more digestible, since they are digested by being hydrolyzed from the outer surface to the inner part. Prolamin and glutelin were rather resistant to pepsin digestion because of their complex structure. High performance liquid chromatography was used to determine the molecular weight distribution of the four protein fractions hydrolysates. The results revealed that the hydrolysates of albumin and globulin are

收稿日期: 2005-08-29

作者简介: 郭晓娜(1978-), 女, 博士研究生, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。

- | | |
|---|---|
| [1] 汪伟宁, 王大新, 王晓琳, 等. 无机盐水溶液体系的纳滤膜分离实验研究[J]. 高校化学工程学报, 2002, 16(3): 257-262. | [7] KOHMURA M, NIO N, KUBO K, et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme by synthetic peptides of human α -casein[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53(8): 2107-2114. |
| [2] 饶家麟, 柯文庆. 鲢鱼蒸煮液蛋白质水解物之抗氧化特性[J]. 台湾农业化学与食品科学, 2001, 39(5): 363-369. | [8] MILYOSHII S, TANAKA H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from Ficus Carica[J]. Agric Biol Chem, 1989, 53(10): 2763-2767. |
| [3] 姜平平, 吕晓玲, 姚秀玲, 等. 紫心甘薯花色苷抗氧化活性体外实验研究[J]. 中国食品添加剂, 2002(6): 8-11. | [9] MATSUFUJI H, MATSUI T, SEKI E, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline hydrolyzate derived from Sardine muscle[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(12): 2244-2245. |
| [4] 贾之慎, 邬建敏, 唐孟成. 比色法测定Fenton反应产生的自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(2): 184-186. | |
| [5] 倪莉, 王璋, 许时婴. 血管紧张素转化酶抑制剂-丝素肽的分离、纯化和结构鉴定[J]. 色谱, 2001, 19(3): 222-225. | |
| [6] 翁瑞光. 萝葡婴萃取物于模式系统之抗氧化性[J]. 食品科学(台), 1998, 25(3): 268-270. | |