

发酵小麦制酒精残渣中寡肽的抗氧化及免疫活性

康连虎¹, 卞宝国², 李吕木^{1,2,*}, 许发芝², 丁小玲², 李彬³, 郭文杰³, 穆华³

(1.安徽农业大学茶与食品科技学院, 安徽 合肥 230036; 2.安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036;

3.安徽瑞福祥食品有限公司, 安徽 亳州 236000)

摘要: 研究从发酵小麦制酒精残渣中提取分离出的寡肽抗氧化和免疫活性。将112只4周龄雌性健康昆明小鼠随机分成14组, 基础对照组和实验1~6组饲喂正常基础料的同时分别灌胃生理盐水、低、中、高3个剂量的寡肽(五肽和七肽), 高脂对照组和实验7~12组饲喂高脂料的同时分别灌胃生理盐水、低、中、高3个剂量的寡肽(五肽和七肽), 连续灌胃28 d后, 测定基础对照组和实验1~6组血清中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, 肝匀浆中MDA含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性, 脾脏中淋巴T细胞CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺数量, 测定基础对照组、高脂对照组和实验7~12组十二指肠、空肠和回肠中MDA含量、SOD、CAT、GSH-Px活性。结果显示, 与高脂对照组相比, 灌胃寡肽后, 血清、肝脏和肠道中MDA含量显著下降($P < 0.05$), SOD、CAT、GSH-Px活性显著升高($P < 0.05$), CD4⁺/CD8⁺显著升高($P < 0.05$)。结果表明寡肽均具有体内抗氧化能力和免疫活性, 而且能够清除高脂饮食带来的氧化损伤。

关键词: 发酵小麦制酒精残渣; 寡肽; 高脂饮食; 抗氧化; 免疫活性; 小鼠

Antioxidant Activity and Immunoregulatory Activity of Oligopeptides from Wheat Residue Left after Solid-State Fermentation for Alcohol Production

KANG Lianhu¹, BIAN Baoguo², LI Lümu^{1,2,*}, XU Fazhi², DING Xiaoling², LI Bin³, GUO Wenjie³, MU Hua³

(1. School of Tea and Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

3. Anhui Ruifuxiang Food Co. Ltd., Bozhou 236000, China)

Abstract: The antioxidant activity and immunoregulatory activity of oligopeptides from wheat residue left after solid-state fermentation for alcohol production were studied *in vivo*. Totally 112 healthy Kunming mice (4 weeks old) were randomly divided into 14 groups. The mice in the normal control group and experimental groups 1–6 were fed a normal diet and gavaged with normal saline and oligopeptides (penta and hepta peptides each at different doses (4, 8, and 12 mg)), respectively, while those in the high-fat control group and experimental groups 7–12 were fed a high-fat diet and orally administrated with normal saline and the oligopeptides (each at different doses (2, 4, and 8 mg)), respectively. After continuous intragastric administration for 28 days, the levels of malondialdehyde (MDA) in serum and liver, and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in liver were determined in the mice in the normal control group and experimental groups 1–6, and the populations of T-lymphocytes such as CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ in spleen were determined by flow cytometry. Also, the tissue homogenates of duodenum, jejunum and ileum of the mice in the normal control group, high-fat control group and experimental groups 7–12 were determined for the levels of MDA and the activities of SOD, CAT and GSH-Px. The results showed that MDA contents in liver, duodenum, jejunum and ileum of the high-fat diet-fed mice declined significantly ($P < 0.05$) in response to administration of the oligopeptides, and SOD, CAT and GSH-Px activities increased significantly ($P < 0.05$). CD4⁺/CD8⁺ ratio also significantly increased ($P < 0.05$). These experimental findings suggest that the oligopeptides from fermented wheat residue have antioxidant capacity and can enhance immune function, as well as can inhibit oxidative damage caused by high-fat diets in the intestine of mice.

Key words: wheat residue left after alcohol fermentation; oligopeptide; high-fat diet; antioxidant activity; immunoregulatory activity; mice

收稿日期: 2015-04-02

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD14B13); 安徽省教育厅自然科学研究重大项目(KJ2014ZD15)

作者简介: 康连虎(1990—), 男, 硕士研究生, 研究方向为粮食油脂及植物蛋白工程。E-mail: 645615576@qq.com

*通信作者: 李吕木(1956—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为粮食油脂及植物蛋白工程。E-mail: llm56@ahau.edu.cn

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201605032

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2016) 05-0180-06

引文格式:

康连虎, 卞宝国, 李吕木, 等. 发酵小麦制酒精残渣中寡肽的抗氧化及免疫活性[J]. 食品科学, 2016, 37(5): 180-185.

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201605032. <http://www.spkx.net.cn>

KANG Lianhu, BIAN Baoguo, LI Lümu, et al. Antioxidant activity and immunoregulatory activity of oligopeptides from wheat residue left after solid-state fermentation for alcohol production[J]. Food Science, 2016, 37(5): 180-185. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201605032. <http://www.spkx.net.cn>

在制酒精的过程中会产生大量的残渣, 经测定, 浮渣中含有大量的蛋白质, 丢弃处理实属浪费。我国蛋白质饲料严重短缺, 每年需从国外进口大量的蛋白质饲料填补空缺^[1]。因此, 将此残渣发酵作为蛋白质饲料, 对实现浮渣的无害化处理和资源化利用具有重要意义。有研究证明蛋白质并不是全部以氨基酸的形式被机体吸收, 有一部分是以寡肽的形式被吸收且效果优于氨基酸的形式^[2]。此外, 寡肽还具有一些独特的生物活性功能, 如抑制血压升高^[3]、抗疲劳^[4]、增强免疫功能^[5]及降低胆固醇^[6]等作用, 这些功能都与其具有的抗氧化能力有关。有研究利用胰蛋白酶^[7]、中性蛋白酶^[8]和固定化碱性蛋白酶^[9]等对小麦蛋白进行水解, 可以得到小麦肽, 小麦肽具有降血压^[10]和抗氧化^[11]等活性, 但具体是哪一种肽或哪几种肽起活性作用并不明确。直接使用小麦蛋白和专用的蛋白酶, 生产成本较高。在微生物固态发酵浮渣和沼渣进行饲料开发过程中发现其发酵产物中也富含小麦寡肽, 而且这些寡肽是在发酵过程中由微生物产生的蛋白酶在自然条件下分解得到, 与小麦肽相比, 生产成本十分低廉。前期实验证明经分离提取得到的五肽和七肽, 在体外具有较强的抗氧化能力^[12], 但其是否具有体内抗氧化及免疫增强能力尚不明确。为此, 本实验选取发酵小麦制酒精残渣中分离提取到的具有较强体外抗氧化能力的两种寡肽——五肽和七肽, 研究其是否具有体内抗氧化和免疫增强能力, 以及在高脂状态下的肠道抗氧化能力, 为揭示发酵小麦制酒精残渣的生物学功能提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物、材料与试剂

4 周龄纯系雌性健康昆明小鼠 112 只, 购自安徽医科大学动物中心, 体质量 (16±2) g, 颗粒饲料自由采食, 清洁饮水不断, 饲养于 23℃ 空调动物房。

微生物固态发酵浮渣的产物中粗提寡肽, 经葡聚糖凝胶 G-15 层析柱分离得到五肽和七肽^[12]。

考马斯亮蓝 G-250 试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide

dismutase, SOD) 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 试剂盒 南京建成科技有限公司; 冰乙酸 (分析纯) 上海市振企化学试剂有限公司; 流式荧光抗体 CD3⁺-APC、CD4⁺-PE、CD8⁺-FITC 美国 eBioscience 公司。

1.2 仪器与设备

FACSCalibur 流式细胞仪 美国 BD 公司; HC-2518 高速离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司; 快速混匀器 江苏金坛江南仪器厂; 紫外分光光度计、数显控温水浴锅 上海浦东新区电仪仪器厂; 电子天平 上海精密科学仪器有限公司; 手提式压力蒸汽灭菌锅 上海华线医用核子仪器公司; 安捷伦 1100 高效液相色谱系统 美国安捷伦公司。

1.3 方法

1.3.1 寡肽的粗提及分离纯化

准确称取发酵完成且已烘干粉碎的发酵小麦制酒精残渣样品 20 g 加 180 mL 纯水, 搅拌混匀浸提 20 min, 滤纸过滤后取滤液 8 000 r/min 离心 15 min, 取上清液过 0.45 μm 滤膜, 取滤液过 1 000 D 纳滤膜, 得到分子质量小于 1 000 D 部分浓缩备用。采用 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶层析柱对寡肽粗提液进行分离纯化, 纯化条件: 层析柱 2.6 cm×60 cm, 寡肽粗提液质量浓度为 30 mg/mL, 上样量为 1.0 mL, 使用双蒸水做洗脱液, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 280 nm。对分离出的不同组分进行收集, 即得到不同分子质量的寡肽。通过绘制标准曲线^[13-14], 计算各组分寡肽的分子质量。对收集到的各个寡肽溶液进行低温浓缩, 浓缩到一定浓度后, 4℃ 保存备用。

1.3.2 动物实验

将 112 只小鼠标准饲喂 3 d 之后, 随机分成 14 组, 每组 8 只, 具体分组情况见表 1。基础料对照组饲喂基础日粮, 高脂料对照组饲喂高脂日粮, 基础日粮和高脂日粮的配方及其营养水平见表 2; 实验 1~3 组在饲喂基础日粮的同时, 分别灌胃 4 mg (低剂量)、8 mg (中剂量) 和 12 mg (高剂量) 的五肽溶液; 实验 4~6 组在饲喂基础日粮的同时分别灌胃 4 mg (低剂量)、8 mg (中剂量) 和 12 mg (高剂量) 的七肽溶液; 实验 7~9 组在饲喂高脂日粮的同时, 分别灌胃 2 mg (低剂量)、4 mg (中剂

量)和8 mg(高剂量)的五肽溶液;实验10~12组在饲喂高脂日粮的同时分别灌胃2 mg(低剂量)、4 mg(中剂量)和8 mg(高剂量)的七肽溶液,五肽和七肽溶液质量浓度均为24.0 mg/mL,灌胃时根据每组不同灌胃量补充一定的双蒸水,使灌胃总体积均调整为0.50 mL/d。基础料对照组和高脂料对照组则灌胃与其他实验组等体积的生理盐水,具体灌胃情况见表1。灌胃于每日早上9时进行,每天一次,连续灌胃28 d。各组自由饮水和摄食。末次灌胃后禁食12 h,基础料对照组和实验1~6组称体质量后摘眼球取血,分离得到血清,测定其中的MDA含量;摘取肝脏、脾脏和胸腺并称质量,计算脏器系数,同时将肝脏制备成肝匀浆,测定其中的MDA含量和SOD、CAT与GSH-Px活性;脾脏经处理后使用流式细胞仪测定其中淋巴T细胞CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺的数量。基础料对照组、高脂料对照组和实验7~12组断脊椎处死后摘取十二指肠、空肠和回肠,将其制备成组织匀浆,分别测定MDA含量和SOD、CAT、GSH-Px酶活力。

表1 小鼠分组及其灌胃情况

Table 1 Gavage treatment groups and corresponding feeding conditions

组别	日粮类型	灌胃物质	灌胃体积/质量
基础料对照组	基础日粮	生理盐水	0.5 mL
高脂料对照组	高脂日粮	生理盐水	0.5 mL
实验1组	基础日粮	五肽	0.5 mL/4 mg
实验2组	基础日粮	五肽	0.5 mL/8 mg
实验3组	基础日粮	五肽	0.5 mL/12 mg
实验4组	基础日粮	七肽	0.5 mL/4 mg
实验5组	基础日粮	七肽	0.5 mL/8 mg
实验6组	基础日粮	七肽	0.5 mL/12 mg
实验7组	高脂日粮	五肽	0.5 mL/2 mg
实验8组	高脂日粮	五肽	0.5 mL/4 mg
实验9组	高脂日粮	五肽	0.5 mL/6 mg
实验10组	高脂日粮	七肽	0.5 mL/2 mg
实验11组	高脂日粮	七肽	0.5 mL/4 mg
实验12组	高脂日粮	七肽	0.5 mL/6 mg

表2 小鼠日粮配方及其营养水平

Table 2 Mouse diet components and nutritional contents

成分及营养水平	高脂日粮	常规日粮
玉米	44.6	62.9
豆粕	24	20.7
猪油	16	1
鱼粉	10	10
食盐	0.4	0.4
预混料	5	5
粗蛋白	20.05	20.06
粗脂肪	18.7	4.57
粗纤维	2.21	2.31
钙	1.43	1.43
磷	0.72	0.75

1.3.3 测定方法

寡肽含量的测定采用Folin-酚法^[15];脏器(肝脏、

脾脏、胸腺)系数为脏器的质量占体质量的百分比;肝匀浆中蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法^[16];MDA含量测定采用硫代巴比妥酸比色法^[17];SOD活力的测定采用黄嘌呤氧化酶法^[18];CAT活力测定采用钼酸铵显色法^[19];GSH-Px活力的测定采用2-硝基苯甲酸比色法^[20];高效液相色谱分析条件:柱温30℃,C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),流动相:V(水):V(乙腈)=85:15,检测器:二极管阵列检测器(diode array detector, DAD),波长338 nm,流速:1 mL/min,检测波长:215 nm。

1.3.4 流式细胞检测

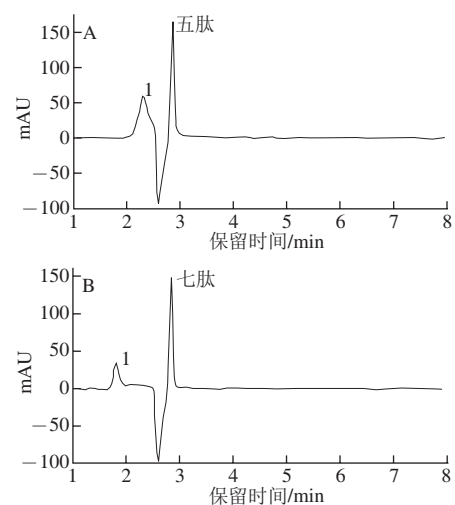
每只小鼠脾脏全部取出,在200目的不锈钢筛网上研磨出白色组织,用约3 mL磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗,底部用培养皿盛接,将得到的脾细胞悬液放入10 mL离心管中,保存在冰盒内。将收集到的脾细胞悬液1 500 r/min离心5 min,弃上清,将离心管底部的细胞团振荡均匀,每50 μL加入3 mL的PBS;1 500 r/min离心5 min,弃上清液,加入1 mL红细胞裂解液,反应10 min后,1 500 r/min离心5 min,将细胞团振荡均匀,分别加入荧光抗体CD3⁺-APC 4 μL, CD4⁺-PE 4 μL, CD8⁺-FITC 1.5 μL,避光孵育30 min,加入1 000 μL生理盐水并过200目细胞膜后上机测试。测定参数:FSC增益为2.42;SSC电压为429 V,增益为1.00;FL1、FL2、FL3和FL4电压分别为547、499、825、775 V^[21]。

1.4 统计分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Microsoft Excel软件对数据进行整理,采用SAS 9.1对数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 寡肽的纯度



A.五肽; B.七肽; 1.溶剂峰。

图1 五肽、七肽高效液相色谱检测图谱

Fig.1 HPLC profiles of purified penta and hepta peptides from wheat residue

经高效液相色谱仪检测五肽和七肽浓缩液的纯度均在95%以上(图1), 这给研究其功效提供了有价值的实验材料, 克服了普通小麦肽是多种寡肽混合物, 难以确定活性小麦肽具体种类的困难。

2.2 五肽、七肽对小鼠脏器系数的影响

灌胃五肽及七肽后小鼠脏器系数见表3, 五肽、七肽各组脏器系数与基础料对照组相比均无明显差异。表明在实验添加的剂量范围内, 灌胃寡肽对小鼠无明显的毒副作用。

表3 灌胃寡肽对小鼠脏器系数的影响
Table 3 Effect of oral oligopeptides on organ coefficients of mice

组别	肝脏系数/%	脾脏系数/%	胸腺系数/%
基础料对照组	4.89±0.56	0.55±0.07	0.39±0.03
实验1组	5.12±0.56	0.61±0.11	0.41±0.02
实验2组	5.02±0.21	0.58±0.05	0.40±0.02
实验3组	4.78±0.70	0.55±0.05	0.41±0.05
实验4组	4.89±0.37	0.56±0.06	0.40±0.04
实验5组	4.95±0.52	0.54±0.05	0.39±0.05
实验6组	4.64±0.41	0.50±0.07	0.38±0.04

2.3 寡肽对基础日粮小鼠抗氧化方面的影响

灌胃五肽及七肽对基础日粮小鼠抗氧化能力的影响见表4, 灌胃不同剂量的五肽和七肽后, 与基础料对照组相比实验组血清MDA及肝脏MDA含量均有所降低, SOD、CAT、GSH-Px酶活力均有所升高, 且在一定的剂量范围内, 随着剂量增加酶活力也随之升高。五肽中剂量组、高剂量组以及七肽中剂量组与基础料对照组相比, 都有显著差异。在灌胃相同剂量的状态下五肽所起的效果比七肽要好。表明在饲喂基础日粮的情况下, 通过灌胃一定浓度的寡肽溶液, 可以降低小鼠血清MDA及肝脏MDA含量, 增加SOD、CAT、GSH-Px活力, 起到增强小鼠抗氧化能力的作用。

表4 灌胃五肽、七肽对基础日粮小鼠抗氧化作用的影响
Table 4 Effect of oral oligopeptides on antioxidant parameters in mice

组别	血清MDA含量/ (nmol/mg pro)	肝脏MDA含量/ (nmol/mg pro)	肝脏SOD活力/ (U/mg pro)	肝脏CAT活力/ (U/mg pro)	肝脏GSH-Px活力/ (U/mg pro)
基础料对照组	8.51±0.29 ^a	5.37±0.16 ^a	79.41±3.71 ^a	9.38±0.60 ^a	179.86±6.81 ^a
实验1组	8.35±0.30 ^a	5.22±0.35 ^a	82.19±3.78 ^{ab}	9.88±0.60 ^{ab}	186.57±7.75 ^{ab}
实验2组	7.18±0.32 ^b	4.48±0.30 ^b	85.56±4.35 ^b	10.38±0.53 ^{bc}	194.49±6.20 ^{bc}
实验3组	6.95±0.37 ^{bc}	4.19±0.12 ^c	92.41±4.72 ^c	11.19±0.93 ^c	198.61±9.38 ^c
实验4组	8.30±0.33 ^a	5.18±0.27 ^a	80.06±3.95 ^a	9.73±0.88 ^{ab}	181.08±8.18 ^{ad}
实验5组	7.73±0.24 ^d	4.58±0.12 ^b	83.93±4.41 ^{ab}	10.39±0.71 ^{bc}	188.54±5.96 ^{cd}
实验6组	8.20±0.38 ^a	5.23±0.25 ^a	81.86±4.53 ^{ab}	10.07±0.75 ^{ab}	184.31±6.71 ^{ad}

注: 同列小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

2.4 寡肽对基础日粮小鼠免疫作用的影响

灌胃五肽及七肽后小鼠CD4⁺/CD8⁺、CD3⁺含量百分比和CD4⁺含量百分比见表5, CD4⁺/CD8⁺五肽中、高剂量组比基础料对照组和低剂量组显著增高 ($P < 0.05$), 七肽低、高剂量组与基础料对照组无明显差异, 中剂量

组比其他几组明显增高 ($P < 0.05$), 五肽高剂量组显著高于七肽高剂量组 ($P < 0.05$)。五肽、七肽各组CD3⁺百分比和CD4⁺百分比与基础料对照组相比均无明显差异。

表5 灌胃寡肽对基础日粮小鼠免疫作用的影响
Table 5 Effect of oral oligopeptides on immune function in basal diet-fed mice

组别	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD3 ⁺ 含量/%	CD4 ⁺ 含量/%
基础料对照组	2.02±0.03 ^a	22.67±4.35	14.78±4.81
实验1组	2.09±0.14 ^a	19.30±2.12	11.50±2.11
实验2组	2.24±0.02 ^b	21.65±4.52	12.50±2.25
实验3组	2.36±0.08 ^c	22.83±6.34	13.97±4.40
实验4组	2.03±0.07 ^a	17.48±5.44	11.55±2.52
实验5组	2.21±0.02 ^b	22.73±6.61	13.10±3.42
实验6组	2.02±0.03 ^a	22.95±4.47	12.05±2.37

2.5 寡肽对高脂日粮小鼠十二指肠抗氧化能力的影响

灌胃五肽及七肽对高脂日粮小鼠十二指肠抗氧化能力的影响见表6, 高脂料对照组与基础料对照组相比MDA含量明显升高, SOD、CAT、GSH-Px酶活力均显著降低 ($P < 0.05$), 饲喂高脂日粮的小鼠在灌胃五肽及七肽后, 与高脂料对照组相比, MDA含量都有所降低, SOD、CAT、GSH-Px酶活力升高, 且五肽中剂量组和七肽高剂量组均已恢复到正常水平。在灌胃相同剂量的状态下五肽低、中剂量组所起的效果比七肽要好, 而高剂量组七肽要优于五肽。

表6 灌胃寡肽对高脂日粮小鼠十二指肠抗氧化能力的影响
Table 6 Effect of oral oligopeptides on antioxidant parameters in duodenum of high-fat diet-fed mice

组别	MDA含量/ (nmol/mg pro)	SOD活力/ (U/mg pro)	CAT活力/ (U/mg pro)	GSH-Px活力/ (U/mg pro)
基础料对照组	1.24±0.19 ^a	141.48±10.75 ^a	43.67±4.21 ^a	254.84±13.90 ^a
高脂料对照组	2.88±0.22 ^b	82.82±7.57 ^b	31.05±5.20 ^b	214.90±10.72 ^b
实验7组	1.85±0.20 ^c	106.72±10.64 ^c	35.04±4.40 ^{bc}	226.40±10.19 ^{bc}
实验8组	1.35±0.22 ^a	133.11±8.38 ^a	42.45±2.93 ^{cd}	245.92±8.74 ^{cd}
实验9组	1.57±0.13 ^d	131.50±8.11 ^a	41.58±3.85 ^{cd}	237.95±10.58 ^{cd}
实验10组	2.27±0.13 ^c	90.02±8.68 ^b	34.13±3.68 ^{bc}	223.57±12.49 ^{cd}
实验11组	1.60±0.11 ^d	117.17±10.71 ^c	38.01±3.88 ^{cd}	230.52±11.95 ^{cd}
实验12组	1.34±0.11 ^a	131.50±9.10 ^a	42.20±2.89 ^{cd}	243.86±12.83 ^{cd}

2.6 寡肽对高脂日粮小鼠空肠抗氧化能力的影响

灌胃五肽及七肽对高脂日粮小鼠空肠抗氧化能力的影响见表7, 高脂料对照组与基础料对照组相比MDA含量明显升高, SOD、CAT、GSH-Px酶活力均显著降低, 饲喂高脂日粮的小鼠在灌胃五肽及七肽后, 与高脂料对照组相比, MDA含量都有所降低, SOD、CAT、GSH-Px酶活力升高, 且五肽中剂量组和七肽高剂量组的MDA、CAT、GSH-Px活力均已恢复到正常水平。同等剂量的状态下, 灌胃五肽低、中剂量所起的效果比七肽要好, 而高剂量组七肽要优于五肽。

表7 灌胃寡肽对高脂日粮小鼠回肠抗氧化能力的影响
Table 7 Effect of oral oligopeptides on antioxidant parameters in jejunum of high-fat diet-fed mice

组别	MDA含量/ (nmol/mg pro)	SOD活力/ (U/mg pro)	CAT活力/ (U/mg pro)	GSH-Px活力/ (U/mg pro)
基础料对照组	0.50±0.07 ^a	131.89±6.58 ^a	41.09±2.88 ^a	257.86±13.24 ^a
高脂料对照组	1.23±0.08 ^b	109.83±5.49 ^b	35.99±2.77 ^b	215.50±12.28 ^b
实验7组	0.76±0.08 ^c	114.16±6.47 ^{bc}	37.46±3.10 ^{bc}	226.48±11.58 ^{bc}
实验8组	0.55±0.07 ^a	122.78±4.97 ^d	39.37±2.07 ^{cd}	245.28±13.48 ^{ad}
实验9组	0.64±0.07 ^d	118.13±6.72 ^{abc}	39.11±3.39 ^{ab}	248.43±13.10 ^b
实验10组	0.96±0.05 ^c	110.31±6.05 ^b	36.63±2.67 ^{bd}	219.32±10.43 ^{bc}
实验11组	0.67±0.06 ^d	115.10±6.52 ^{def}	38.38±2.95 ^{ab}	232.92±12.50 ^{cdef}
实验12组	0.57±0.06 ^{ad}	119.47±5.60 ^{def}	40.00±2.25 ^{ac}	247.18±11.77 ^{af}

2.7 寡肽对高脂日粮小鼠回肠抗氧化能力的影响

灌胃五肽及七肽对高脂日粮小鼠回肠抗氧化能力的影响见表8, 高脂料对照组与基础料对照组相比MDA含量明显升高, SOD、CAT、GSH-Px酶活力均显著降低, 饲喂高脂日粮的小鼠在灌胃五肽及七肽后, 与高脂对照组相比, MDA都有所降低, 酶活力有所升高, 但均未恢复到正常水平。同等剂量的状态下, 灌胃五肽和七肽差异不显著。

表8 灌胃寡肽对高脂日粮小鼠回肠抗氧化能力的影响
Table 8 Effect of oral oligopeptides on antioxidant parameters in ileum of high-fat diet-fed mice

组别	MDA含量/ (nmol/mg pro)	SOD活力/ (U/mg pro)	CAT活力/ (U/mg pro)	GSH-Px活力/ (U/mg pro)
基础料对照组	1.79±0.23 ^a	140.15±7.92 ^a	47.24±4.85 ^a	238.24±12.70 ^a
高脂料对照组	3.32±0.34 ^b	79.62±8.98 ^b	39.7±4.96 ^b	186.81±13.10 ^b
实验7组	3.21±0.37 ^{bd}	86.32±9.09 ^b	40.66±4.56 ^b	192.70±10.79 ^{bc}
实验8组	2.79±0.34 ^c	102.07±8.96 ^c	41.84±4.75 ^{ab}	203.48±10.45 ^c
实验9组	2.83±0.38 ^{cd}	103.43±9.63 ^c	42.48±4.03 ^{ab}	204.21±9.87 ^c
实验10组	3.15±0.34 ^{bc}	82.11±9.07 ^b	40.85±3.51 ^b	193.67±9.94 ^{bc}
实验11组	2.94±0.34 ^{bc}	89.80±10.30 ^b	41.84±3.33 ^{ab}	203.97±10.62 ^c
实验12组	2.84±0.33 ^{cd}	111.15±10.37 ^c	42.23±1.32 ^b	217.52±10.22 ^d

3 讨论与结论

血清、肝脏和肠道是机体内易生成过氧化脂质和自由基的场所。脾脏和胸腺是机体重要的免疫器官。实验结果表明, 分别给小鼠灌胃五肽和七肽, 对小鼠的正常生长和器官无毒害和不良影响。

MDA是氧自由基攻击细胞导致脂质过氧化反应的产物, 间接反映细胞膜受损伤的程度。含量越高表示过氧化程度越高, 损伤越大^[22]。SOD是一种能够催化超氧化物通过歧化反应转化为氧气和过氧化氢的酶。是生物体内清除自由基的首要物质, 是一种重要的抗氧化剂, 保护暴露于氧气中的细胞^[23]。CAT是催化过氧化氢分解成氧和水的酶, 存在于细胞的过氧化物体内。是过氧化物酶体的标志酶, 存在于所有已知的动物的各个组织中。GSH-Px是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解

酶, 它能催化谷胱甘肽变为氧化型谷胱甘肽, 使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害^[24]。这几种酶共同协作进行细胞内的抗氧化活动, 保持机体内自由基的平衡, 维持细胞膜的结构, 确保细胞功能的完整性。实验结果表明, 在饲喂基础日粮的条件下, 灌胃不同剂量的五肽和七肽, 都可以在一定程度上降低MDA含量, 提高SOD、CAT和GSH-Px酶活力, 其中五肽中、高剂量组, 七肽高剂量组能够显著降低体内MDA含量, 显著提高SOD、CAT、GSH-Px酶活性, 说明灌胃合适剂量的寡肽可以提高小鼠抗氧化能力。

免疫细胞是白细胞的俗称, 包括淋巴细胞和各种吞噬细胞等, 也特指能识别抗原、产生特异性免疫应答的淋巴细胞等, 淋巴细胞是免疫系统的基本成分。淋巴细胞包括T淋巴细胞(CD3⁺)、B淋巴细胞(CD3⁻CD19⁺)、NK细胞(CD3⁻CD16⁺CD56⁺), 其中, T细胞是淋巴细胞的主要组成。CD3⁺淋巴细胞代表全T淋巴细胞, 它包括CD4⁺和CD8⁺细胞。CD4⁺/CD8⁺比值是评价机体免疫状态的重要指标, CD4⁺/CD8⁺比值高, 表明机体处于高的免疫状态^[25]。本实验中五肽和七肽灌胃组CD4⁺/CD8⁺均有所增大且差异显著, 表明五肽和七肽对小鼠的免疫系统具有增强作用。

小肠是消化和吸收营养物质的主要场所, 食物在摄入、消化和吸收过程中, 在肠道这样的代谢部位会产生自由基。所以小肠抗氧化水平是评价体内抗氧化水平的又一重要指标。研究表明, 饲喂高脂日粮会引起动物氧化应激, 使动物机体的抗氧化能力降低, 本实验中, 与基础日粮对照组相比, 高脂日粮对照组MDA含量显著增高, SOD、CAT、GSH-Px酶活性显著下降, 说明高脂造成的氧化应激已经形成, 这和前人的报道一致^[23]。在饲喂高脂料的情况下, 灌胃不同剂量的五肽和七肽, 都可以不同程度地降低肠道氧化损伤, 在十二指肠、空肠中, 五肽中剂量组和七肽高剂量组可以使MDA含量, SOD、CAT、GSH-Px酶活性恢复到正常水平。由于十二指肠与胃紧紧相连, 其次是很长一段的空肠, 再是回肠, 因此可能灌胃的寡肽在十二指肠和空肠中已被大部分吸收, 所以在回肠中所起的作用不是太明显。

总之, 在灌胃相同剂量的条件下, 五肽的抗氧化能力要优于七肽, 这与范远景等^[26]关于小分子质量多肽的抗氧化活性要明显高于大分子质量的多肽的研究结果一致。这主要是因为抗氧化活性肽含有某些能与自由基反应的特殊基团即供氢基团, 只有当小肽在适当分子质量时, 这些特殊的供氢基团才能得到最大的暴露充分与自由基作用, 此时才具有较强的抗氧化性。

发酵小麦制酒精残渣中的五肽、七肽可以显著提高小鼠的体内抗氧化能力, 增强免疫能力。同时, 在高脂

条件下,还可以有效抵抗高脂饮食带来的氧化损伤。小麦制酒精过程中产生的残渣通过发酵作为一种饲料,其中富含的寡肽作为一种天然的抗氧化剂存在于饲料中,可以起到安全有效的作用,今后在饲料领域将有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 李树明, 黄治国, 罗惠波, 等. 白酒丢糟发酵生产蛋白质饲料的菌种筛选[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2011, 33(10): 27-30. DOI:10.13718/j.cnki.xdzk.2011.10.032.
- [2] CLEMENTE A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition[J]. Trends in Food Science & Technology, 2000, 11(7): 254-262. DOI:10.1016/S0924-2244(01)00007-3.
- [3] BHUYAN B J, MUGESH G. Antioxidant activity of peptide-based angiotensin converting enzyme inhibitors[J]. Organic Biomolecular Chemistry, 2012, 10(11): 2237-2247. DOI:10.1039/c2ob06533a.
- [4] PAN D D, GUO Y Y, JIANG X Y. Anti-fatigue and antioxidative activities of peptides isolated from milk proteins[J]. Journal of Food Biochemistry, 2011, 35(4): 1130-1144. DOI:10.1111/j.1745-4514.2010.00440.x.
- [5] MIKAMI N, MATSUSHITA H, KATO T, et al. Calcitonin gene-related peptide is an important regulator of cutaneous immunity: effect on dendritic cell and T cell functions[J]. Journal of Immunology, 2011, 186(12): 6886-6893. DOI:10.4049/jimmunol.1100028.
- [6] BIELICKI J K, ZHANG H Y, CORTEZ Y, et al. A new HDL mimetic peptide that stimulates cellular cholesterol efflux with high efficiency greatly reduces atherosclerosis in mice[J]. Journal of Lipid Research, 2010, 51(6): 1496-1503. DOI:10.1194/jlr.M003665.
- [7] BONG K, KYUNG A. Effects of trypsin-hydrolyzed wheat gluten peptide on wheat flour dough[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008, 88: 2445-2450. DOI:10.1002/jsfa.3359.
- [8] 刘立芳, 徐怀德, 王青林. 中性蛋白酶解谷朊粉制备抗氧化多肽研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(6): 281-285. DOI:10.1004-1389(2008)06-0281-05.
- [9] 吴定, 刘长鹏, 路桂红, 等. 固定化碱性蛋白酶制备麦胚降压肽研究[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 255-258. DOI:10.7506/spkx1002-6630(2009)23-0255-04.
- [10] NOGATA Y, NAGAMINE T, SEKIYA K. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wheatbran in spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 2011, 58(2): 67-70. DOI:10.1016/0014-2999(96)00146-X.
- [11] 陈英, 朱科学, 彭伟, 等. 小麦胚活性肽对D-半乳糖衰老模型小鼠抗氧化作用研究[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 325-328. DOI:10.7506/spkx1002-6630(2010)19-0325-04.
- [12] 康连虎, 李吕木, 司雄元, 等. 小麦制酒精残渣发酵菌种筛选及其产物小肽的抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(7): 72-76. DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.2014.07.015.
- [13] 任颖, 柳春. 生物化学与分子生物学实验教程[M]. 北京: 清华大学出版社, 2012: 65-66.
- [14] 彭惠惠, 李吕木, 钱坤, 等. 发酵芝麻粕中芝麻寡肽的分离纯化及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 66-69. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201309015.
- [15] BROWN R A. An appreciation of the Folin-Lowry protein assay[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1992, 44(4): 369. DOI:10.1111/j.2042-7158.1992.tb03625.x.
- [16] LU T S, YIAO S Y, LIM K, et al. Interpretation of biological and mechanical variations between the Lowry versus Bradford method for protein quantification[J]. North American Journal of Medical Sciences, 2010, 2(7): 325. DOI:10.4297/najms.2010.2325.
- [17] LOVRIC J, MESIC M, MACAN M, et al. Measurement of malondialdehyde (MDA) level in rat plasma after simvastatin treatment using two different analytical methods[J]. Periodicum Biologorum, 2008, 110(1): 63-68. DOI:10.5038/2008.1101.
- [18] KRAUS T E, FLETCHER R A. Paclobutrazol protects wheat seedlings from heat and paraquat injury is detoxification of active oxygen involved[J]. Plant Cell and Physiology, 1994, 35(1): 45-52. DOI:10.1007/BF00024383.
- [19] MASAYASU M, HIROSHI Y. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use[J]. Clinica Chimica Acta, 1979, 92(3): 337-342. DOI:10.1016/0009-8981(79)90211-0.
- [20] ROTRUCK J T, POPE A L, GANTHER H E, et al. Selenium biochemical role as a component of glutathione peroxidase[J]. Science, 1973, 179: 588-590. DOI:10.1126/science.179.4073.588.
- [21] 李旻, 张莉, 陈文帮, 等. 发酵芝麻粕小肽体内抗氧化和免疫活性[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 251-254. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201419050.
- [22] KANKOFER M. Antioxidative defence mechanisms against reactive oxygen species in bovine retained and not-retained placenta: activity of glutathione peroxidase, glutathione transferase, catalase and superoxide dismutase[J]. Placenta, 2001, 22(5): 466-472. DOI:10.1053/plac.2001.0650.
- [23] WANG H, JOSEPH J A. Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells[J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 27(5): 683-694. DOI:10.1016/S0891-5849(99)00119-7.
- [24] KORUK M, TAYSI S, SAVAS M C, et al. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis[J]. Annals of Clinical and Laboratory Science, 2004, 34(1): 57-62. DOI:10.1055/s-2007-981457.
- [25] 董光辉, 郑丽, 金一和, 等. 全氟辛酸磺酸(PFOS)经口染毒对C57BL/6小鼠脾脏T细胞亚群CD4⁺/CD8⁺的影响[J]. 环境科学学报, 2009, 29(1): 181-185. DOI:10.3321/j.issn:0253-2468.2009.01.028.
- [26] 范远景, 高海成, 孟凡莉. 抗氧化活性花生肽的氨基酸组成及质谱分析[J]. 食品科学, 2011, 32(13): 32-36.