

黑龙江小麦麦胚多肽的制备及抗氧化功能研究

超滤法精制抗氧化麦胚多肽工艺条件的优化

张洪微^{1,2,3}, 杨铭铎^{1,2,*}, 吴莹莹^{1,2}, 张玲⁴, 贾庆胜⁵

(1.哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2.哈尔滨商业大学中式快餐研究发展中心博士后科研基地, 黑龙江 哈尔滨 150076; 3.黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319; 4.黑龙江生物科技职业学院, 黑龙江 哈尔滨 150025; 5.黑龙江北大荒丰缘麦业集团有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要: 采用3ku和6ku的超滤膜对麦胚多肽进行分级分离, 考察3种分离产物对DPPH·的清除能力, 发现分子质量在3ku以下的麦胚多肽对DPPH·的清除率可达75.32%, 高于其他分离产物。采用响应面试验方法对麦胚多肽的超滤条件进行优化试验, 结果表明, 最佳超滤条件为超滤压力0.08MPa、超滤时间23min、超滤pH6.83、溶液质量分数2%, 此时膜通量为4.85L/(m²·h)。所得分子质量小于3ku的麦胚多肽在质量分数11%时, 其DPPH·清除率为78.93%。超滤法精制的麦胚多肽具有良好的DPPH·的清除能力。

关键词: 麦胚多肽; DPPH·清除作用; 超滤法

Preparation and Antioxidant Activity of Germ Peptides from Helongjiang Wheat II: Optimization of Ultra-filtration Separation of Wheat Germ Peptides

ZHANG Hong-wei^{1,2,3}, YANG Ming-duo^{1,2,*}, WU Ying-ying^{1,2}, ZHANG Ling⁴, JIA Qing-sheng⁵

(1. Institute of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Postdoctoral Research Base of the Chinese Fast Food Research and Development Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 3. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China; 4. Heilongjiang Vocational College of Biology Science and Technology, Harbin 150025, China; 5. Heilongjiang Beidahuang Fengyuan Wheat Industry Group Co. Ltd., Harbin 150076, China)

Abstract: Wheat germ protein hydrolysate prepared by enzymatic hydrolysis was separated with ultra-filtration membranes with a molecular weight cutoff (MWCO) of 3 ku and 6 ku, respectively. Four ultra-filtration parameters such as pressure, time, pH and sample concentration were optimized by response surface methodology to be 0.08 MPa, 23 min, 6.83 and 2%, respectively. Under these conditions, the ultra-filtration membrane flux of was 4.85 L/(m²·h). The obtained fraction of less than 3 ku in molecular weight exhibited a DPPH free radical scavenging rate of 78.93% at the concentration of 11%.

Key words: wheat germ peptide; DPPH free radical scavenging activity; ultra-filtration

中图分类号: TS210.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)14-0171-05

小麦胚芽因含有丰富的蛋白质、油脂、碳水化合物、维生素等人体需要的营养素及谷胱甘肽、黄酮类物质和二十八烷醇等生理活性物质而被营养学家誉为“人类天然营养宝库和人类的生命资源”^[1-2]。小麦胚芽中的蛋白质含量高达30%, 而且氨基酸比例合理, 是一种优质的蛋白质资源^[3]。麦胚蛋白在酶的作用下多肽链被打断, 释放各种肽类化合物, 使其功能性质得到

改善, 并具有一定的生物活性。有研究表明^[4], 小麦蛋白经过水解后的多肽具有抗氧化活性, 多肽的抗氧化活性还同分子质量有关^[5-6]。

超滤技术是在0.05~0.1MPa的静压差推动下, 截留蛋白质、酶等相对分子质量大于500u的大分子及胶体, 形成浓缩液, 达到溶液的净化、分离及浓缩目的^[7]。采用超滤技术对酶解后的麦胚多肽进行分级分离, 可以得

收稿日期: 2010-12-17

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(C201041)

作者简介: 张洪微(1975—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为食品科学。E-mail: fcwei_2004@126.com

*通信作者: 杨铭铎(1956—), 男, 教授, 博士, 研究方向为传统食品工业化。E-mail: yangmingduo5663@163.com

到具有较高抗氧化活性的多肽产品^[8]。本实验对麦胚蛋白的酶解产物进行超滤,得到具有较高 DPPH·清除能力的麦胚多肽,并采用响应面分析方法对超滤条件进行优化,为麦胚多肽的生产提供一定参考。

1 材料与方

1.1 材料与试剂

小麦胚芽 黑龙江北大荒丰源麦业;碱性蛋白酶 Alcalase F G、木瓜蛋白酶 诺维信酶制剂公司;DPPH· (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) 日本 Wako 公司。

1.2 仪器与设备

3、6ku 圆片平板聚醚砜超滤膜、MSC300 型杯式超滤器 上海摩速科学器材有限公司;R-205 型旋转蒸发仪 上海申胜生物技术有限公司;ZDO-2 型真空冷冻干燥箱 宁夏亚麻技术设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 麦胚多肽的制备工艺流程

小麦胚芽→粉碎→过 100 目筛→脱脂→碱提(pH 10.0)→酸沉(pH4.0)→离心→弃上清液→冷冻干燥→麦胚蛋白粉→酶解→麦胚蛋白酶解物→超滤→冷冻干燥→麦胚多肽

1.3.2 清除 DPPH·能力的测定

取一定浓度的样品 1mL,加入 1×10^{-4} mol/L DPPH· 无水乙醇溶液 1mL,混匀后在室温避光保存 30min,在 517nm 波长条件下测定吸光度,空白组以等体积无水乙醇溶液代替 DPPH· 溶液,对照组以等体积蒸馏水代替样品溶液,并以等体积蒸馏水和无水乙醇混合液空白调零,所有测定值均为 3 次结果的平均值,清除率计算^[9]公式如下:

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率}/\% = (1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 为对照组吸光度; A_i 为样品组吸光度; A_j 为空白组吸光度。

1.3.3 膜通量的确定

$$L = \frac{V}{S \times t}$$

式中: V 为透过液的体积/L; S 为膜的有效面积/ m^2 ; t 为运转时间/h; L 为膜通量/ $(\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h}))$ 。

1.4 试验设计

1.4.1 超滤膜的选择

将麦胚蛋白酶解物依次通过 6ku 和 3ku 的超滤膜,将麦胚蛋白酶解物分级为 < 3、3~6、> 6ku,将分级后的麦胚多肽水溶液进行冷冻干燥,测其对 DPPH·清

除效果,选择抗氧化效果最好的组分进行超滤条件的确定。

1.4.2 超滤条件的优化

1.4.2.1 单因素试验

超滤时膜通量的大小主要受超滤压力、超滤时间、pH 值和溶液质量分数的影响,因此选择以上 4 个因素进行超滤条件优化的单因素试验,试验水平设计见表 1。

1.4.2.2 响应曲面法对超滤条件的优化

根据单因素试验结果,采用 Box-behnken 试验设计方法对超滤条件进行优化,选取超滤压力、超滤时间、pH 值、溶液质量分数 4 个因素为自变量,以膜通量为响应值,因素水平见表 1。

表 1 响应曲面分析因素水平设计表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in the response surface analysis

水平	因素			
	A 超滤压力/MPa	B 超滤时间/min	C pH	D 溶液质量分数/%
-1	0.06	20	6.5	2.0
0	0.07	30	7.0	3.0
1	0.08	40	7.5	4.0

2 结果与分析

2.1 超滤膜的选择结果分析

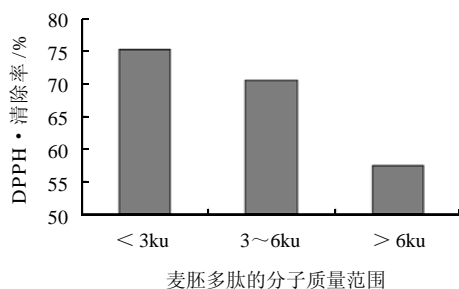


图 1 不同分子质量范围的麦胚多肽对 DPPH·清除率的影响

Fig.1 DPPH free radical scavenging rates of wheat germ peptides with different molecular weights

由图 1 可知,经过分级后的麦胚多肽,其清除 DPPH·的能力有所不同。随着麦胚多肽分子质量的降低,其清除 DPPH·的能力逐步提高,当分子质量在 3ku 以下时,其清除能力达到 75.32%,比 6ku 以上的麦胚多肽清除能力提高了 17.74%。这是因为经过 3ku 膜超滤处理的麦胚多肽,除去了大部分的大分子蛋白,使得其疏水性氨基酸含量大大增加,而这些疏水氨基酸对体外抗氧化有着很好的效果。此结论与大豆多肽^[10]、鸡胚多肽^[11]、鸡骨胶原蛋白肽^[12]结论相同。

2.2 超滤条件优化的结果分析

2.2.1 超滤压力对膜通量的影响

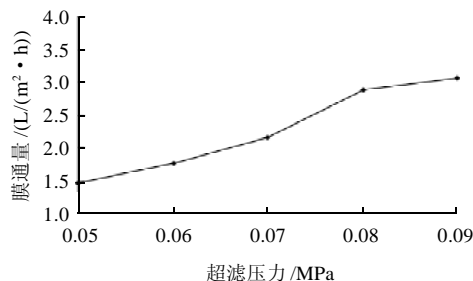


图2 超滤压力对膜通量的影响

Fig.2 Effect of pressure on membrane flux

由图2可以看出,随着超滤压力的增加,膜通量呈上升趋势,超滤压力由0.05MPa上升到0.07MPa过程中,膜通量上升迅速,而由0.07MPa上升到0.09MPa时,膜通量趋于平稳。这是因为,超滤压力增大的初期,随着超滤压力的增加,膜两侧的压力逐步加大,使得膜通量迅速增加;当超滤压力继续增加时,会很快造成浓差极化现象,而当压力过大时,反而会造成组分中物质的沉积,造成膜通量下降^[13]。因此,超滤压力的选择不宜过大,本试验中,选择0.07MPa作为单因素试验中的最佳超滤压力。

2.2.2 超滤时间对膜通量的影响

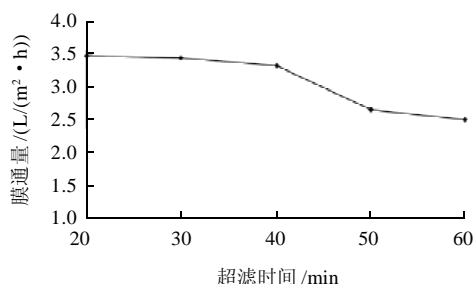


图3 超滤时间对膜通量的影响

Fig.3 Effect of time on membrane flux

由图3可以看出,随着超滤时间的增加,膜通量呈下降趋势,在20~30min内,膜通量下降缓慢,在40~50min时,膜通量下降迅速。这是因为,当超滤时间增加时,造成溶液中组分沉积,浓差极化现象严重,因此,选择适当的工作周期,可以有效地防止膜通量下降,本试验选择30min作为一个工作周期。

2.2.3 超滤pH值对膜通量的影响

麦胚蛋白在pH4时达到等电点,在等电点时,未被酶解的蛋白从溶液中沉淀出来,会造成超滤膜的堵塞,膜通量下降,随着pH值向中性偏移,溶液中的

麦胚蛋白不再析出,膜通量上升,而当pH值过高时,碱性环境会造成蛋白的变性^[14],溶液黏度增加,反而不利于超滤的进行。因此,选择pH7作为超滤单因素试验中的最佳pH值。

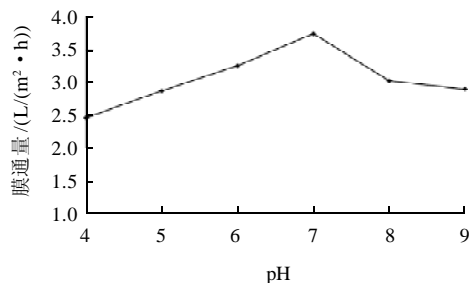


图4 pH值对膜通量的影响

Fig.4 Effect of pH on membrane flux

2.2.4 溶液质量分数对膜通量的影响

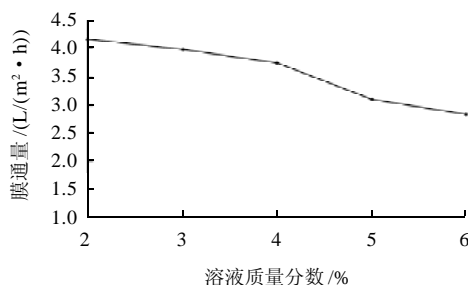


图5 溶液质量分数对膜通量的影响

Fig.5 Effect of wheat germ hydrolysate concentration on membrane flux

由图5可以看出,随着溶液质量分数的增加,超滤的膜通量逐渐下降,这是因为溶液质量分数越大,超滤时会造成过多的组分沉积在超滤膜上,影响超滤效果。但是,过小的质量分数,会造成超滤过程中的实际膜效能降低^[15],增加后期冷冻干燥的工作量,因此超滤单因素试验中的最佳质量分数为3%。

2.2.5 响应曲面法对超滤条件的优化

2.2.5.1 响应曲面试验设计及结果(见表3)

2.2.5.2 响应曲面试验结果分析

应用Design expert 7.0 统计分析软件对表3试验结果进行分析,得到回归方程为:

$$Y = 4.7 - 0.078A + 0.017B + 0.1C + 2.5 \times 10^{-3}D - 0.028AB - 0.1AC - 0.03AD - 0.02BC + 0.068BD + 0.06CD + 0.02A^2 - 0.051B^2 - 0.13C^2 - 0.013D^2$$

对所得数据进行方差分析,得到结果见表3。由表3可知,模型项、A、AC影响显著,C、C²影响极显著,失拟项不显著。说明模型的拟合性良好,可以

用于模型分析。决定系数和校正决定系数分别为 0.7765 和 0.5531, 说明该模型的拟合性良好, 可以用于模型分析。本模型的信噪比为 7.539, 说明该模型可以用于生产应用当中。

表 3 麦胚蛋白酶解物超滤条件优化响应曲面试验设计及结果
Table 3 Experimental design and corresponding results for response surface analysis

试验号	A	B	C	D	膜通量/(L/(m ² ·h))
1	1	-1	0	0	4.74
2	-1	-1	0	0	4.57
3	1	1	0	0	4.70
4	-1	1	0	0	4.64
5	0	0	-1	1	4.42
6	0	0	1	1	4.77
7	0	0	-1	-1	4.45
8	0	0	1	-1	4.56
9	1	0	0	1	4.74
10	-1	0	0	1	4.54
11	1	0	0	-1	4.87
12	-1	0	0	-1	4.55
13	0	-1	-1	0	4.38
14	0	1	-1	0	4.42
15	0	-1	1	0	4.59
16	0	1	1	0	4.55
17	1	0	-1	0	4.67
18	-1	0	-1	0	4.38
19	1	0	1	0	4.69
20	-1	0	1	0	4.80
21	0	-1	0	1	4.56
22	0	1	0	1	4.78
23	0	-1	0	-1	4.70
24	0	1	0	-1	4.65
25	0	0	0	0	4.52
26	0	0	0	0	4.81
27	0	0	0	0	4.62
28	0	0	0	0	4.74
29	0	0	0	0	4.79

由于 AC 影响显著, 作响应面图见图 6。由图 6 可以看出, 随着超滤压力的增大, 超滤膜通量呈逐渐增加的趋势, 在超滤压力达到 0.08MPa 时, 膜通量达到 4.72L/(m²·h); 而超滤膜通量随 pH 值的变化先增大后减小, 这是因为麦胚蛋白酶解物在酸性环境中, 由于接近其等电点, 会造成沉积物析出, 而当其处于碱性环境中时, 又会造成蛋白的变性。因此, 选择中性的 pH 值超滤效果最好。

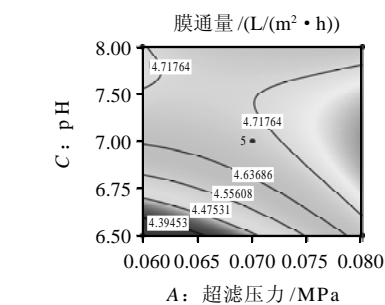
通过对回归方程的分析, 得到超滤条件的优化结果为超滤压力 0.08MPa、超滤时间 22.68min、超滤 pH6.83、溶液质量分数 2.00%。

表 4 响应曲面方差分析表

Table 4 Variance analysis of the established regression model

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.41	14	0.030	3.48	0.0131*
A	0.072	1	0.072	8.49	0.0113*
B	3.333×10^{-3}	1	3.333×10^{-3}	0.39	0.5410
C	0.13	1	0.13	15.09	0.0017**
D	7.500×10^{-4}	1	7.50×10^{-4}	8.834×10^{-3}	0.9265
AB	3.025×10^{-3}	1	3.025×10^{-3}	0.36	0.5601
AC	0.040	1	0.040	4.71	0.0477*
AD	3.600×10^{-3}	1	3.600×10^{-3}	0.42	0.5255
BC	1.600×10^{-3}	1	1.600×10^{-3}	0.19	0.6708
BD	0.018	1	0.018	2.15	0.1650
CD	0.014	1	0.014	1.70	0.2138
A ²	4.027×10^{-3}	1	4.027×10^{-3}	0.47	0.5023
B ²	0.017	1	0.017	2.01	0.1788
C ²	0.10	1	0.10	12.19	0.0036**
D ²	1.027×10^{-3}	1	1.027×10^{-3}	0.12	0.7332
残差	0.12	14	8.490×10^{-3}		
失拟项	0.058	10	5.834×10^{-3}	0.39	0.8990
误差项	0.061	4	0.39		
总和	0.53	28			
标准差	0.092				
均值	4.63				
变异系数	1.99				
R ² (决定系数)	0.7765				
R ² _{Adj} (校正决定系数)	0.5531				
预测 R ² (预测决定系数)	0.1905				
R _{SN}	7.539				

注: *. $P < 0.05$, 差异显著; **. $P < 0.01$, 差异极显著。



固定水平: 超滤时间 30min; 质量分数 3.0%。

图 6 超滤压力与超滤 pH 值交互作用的等高线与响应曲面图
Fig.6 Response surface and contour plots showing the effects of pressure and pH on membrane flux

2.3 验证实验

根据响应面分析结果进行验证实验, 但在超滤时间

的选择上考虑实验的可操作性, 将最佳的超滤时间修正为 23min。在此条件下, 膜通量可达到 $4.85\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$, 较为理想。同时对超滤精制后的麦胚多肽进行 DPPH·清除能力的测定, 实验发现, 精制后的麦胚多肽其 DPPH·清除能力较高, 质量分数 11% 的麦胚多肽溶液对 DPPH·清除率达到 78.93%, 说明麦胚多肽有较强的清除 DPPH·的能力。

3 结 论

3.1 分级分离后的麦胚多肽, 其抗氧化性能有所不同, 其中分子质量在 3ku 以下的麦胚多肽组分抗氧化活性最高, 其 DPPH·清除能力可达到 75.32%。

3.2 通过单因素及响应曲面法对 3ku 以下的麦胚多肽超滤条件进行优化, 得到最佳超滤条件为超滤压力 0.08MPa、超滤时间 23min、超滤 pH6.83、溶液质量分数 2%, 此时膜通量为 $4.85\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 。

3.3 精制后的麦胚多肽具有较好的 DPPH·清除能力, 麦胚多肽质量分数为 11% 时, 其 DPPH·清除率达 78.93%。

参考文献:

- [1] 周惠明, 朱科学. 小麦胚中谷胱甘肽的纯化与富集的研究[J]. 中国粮油学报, 2003, 18(1): 20-23.
- [2] 金善宝. 中国小麦学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [3] 程云辉, 王璋, 许时樱. 麦胚蛋白的研究进展[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 105-108.
- [4] 程云辉, 王璋, 许时樱. 酶解麦胚蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(6): 147-151.
- [5] CHEN Huaming, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin[J]. J Agric Food Chem, 1995, 43(3): 574-578.
- [6] ZHENG Xiqun, LI Lite, LIU Xiaolan, et al. Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 73(4): 763-770.
- [7] 王湛. 膜分离技术基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [8] 殷微微. 麦胚蛋白提取及其酶解产物抗氧化活性研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2008.
- [9] 赵艳红, 李建科, 李国秀. 天然抗氧化物体外活性评价方法的优选与优化[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 65-66.
- [10] CHEN Huaming, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein[J]. J Agric of Food Chem, 1996, 44(9): 2619-2623.
- [11] 马丽娜, 张培正, 李坤, 等. 鸡胚多肽的分级膜分离[J]. 中国食物与营养, 2007(7): 43-44.
- [12] 符群. 鸡骨胶原蛋白肽的酶法制备及其抗氧化性研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2009.
- [13] 任海伟, 王常青. 超滤法分离黑豆抗氧化活性肽[J]. 食品科学, 2009, 30(12): 123-126.
- [14] 谢笔均. 食品化学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [15] 严瑞萱. 水处理应用手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.