

谷朊蛋白源抗氧化肽的活性研究

吴雷¹, 陈瑞², 徐光伟², 饶胜其^{2*}

(1. 江苏旅游职业学院 烹饪工艺与营养学院, 江苏 扬州 225127; 2. 扬州大学 食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225127)

摘要: 以总抗氧化能力(FRAP)、DPPH 和 OH 自由基清除能力为评价指标, 采用木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶分步水解谷朊蛋白, 并采用超滤、DA201-C 大孔树脂和凝胶 Sephadex G-15 富集谷朊蛋白水解液中的高活性抗氧化肽。实验结果显示, 谷朊蛋白经酶解及进一步的初步分离获得了组分 GF2, 其 FRAP 值、DPPH·清除和·OH 清除 IC₅₀ 值分别达到 0.893 mmol/L、6.13 mg/mL 和 0.472 mg/mL。结果表明: 超滤、DA201-C 大孔树脂和凝胶 Sephadex G-15 分离有效富集了酶解液中的高抗氧化活性肽。

关键词: 谷朊蛋白; 酶解; 分离纯化; 抗氧化

中图分类号: TS 972.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-8730(2018)04-0057-03

谷朊粉是小麦淀粉生产的副产物, 其蛋白质含量达 80% 以上, 氨基酸组成较齐全, 是营养丰富的植物性蛋白来源,^[1] 但谷朊蛋白由于缺乏亲水性氨基酸残基而导致水溶性不高, 使其应用存在较大局限性。^[2] 通过酶法改性, 能使部分原来包埋在谷朊蛋白内部的疏水性氨基酸暴露出来, 大大提升其溶解性, 同时将谷朊蛋白水解成具有抗氧化活性的肽链。^[3] 赵源等^[4] 采用碱性蛋白酶水解小麦谷朊粉制备的谷朊蛋白多肽、刘树兴等^[5] 采用木瓜蛋白酶水解谷朊粉制备的抗氧化肽, 均具有较强的抗氧化活性。此外, 有研究表明, 对于同一蛋白原料, 单酶水解的效果往往次于双酶或多酶水解。^[6] 本研究以谷朊粉为原料, 采用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶复合酶解法制备谷朊蛋白源抗氧化肽, 并采用超滤、树脂和凝胶色谱初步分离高活性抗氧化肽, 以提高谷朊粉的附加值, 拓展其应用范围。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

谷朊粉(蛋白质含量 ≥ 80%) 购自江苏联海生物科技有限公司; 木瓜蛋白酶(> 200 U/mg)、碱性蛋白酶(> 200 U/mg) 购自国药集团化学试

剂有限公司。

1.2 仪器与设备

TGL-20M 高速台式冷冻离心机: 湘仪实验室仪器开发有限公司; UV-7504 紫外可见分光光度计: 上海欣茂仪器有限公司; HD 2004 紫外检测仪: 上海骥辉科学分析仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 谷朊蛋白酶解液的制备

参照饶胜其等^[6] 的研究方法: 各取 4 g 谷朊粉配制成 2% (m/v) 的悬浊液, 95℃ 温育 10 min, 分别采用木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶进行单酶酶解以及双酶分步酶解, 酶解条件按下页表 1 方式进行。待酶反应结束后, 95℃ 温育 10 min 终止酶反应, 并于 4℃、8 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, -20℃ 冻存。

1.3.2 大孔吸附树脂分离抗氧化肽

参照饶胜其等^[6] 的方法, 酶解液 HY 先经超滤离心管(膜截留分子量 3 kDa) 4℃、4 000 g 离心, 收集滤过液, 进一步采用 DA201-C 大孔吸附树脂于 25℃、160 r/min 条件下振荡吸附 4 h, 4 000 g 离心 15 min 后收集树脂沉淀, 依次加入体积分数 25%、50% 和 75% 的乙醇洗脱, 收集洗脱峰, 旋转蒸发去除乙醇和水分, 最后用 pH 7.0 的

收稿日期: 2018-09-20 * 通信作者

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20140479)

作者简介: 吴雷(1985-), 男, 江苏宿迁人, 江苏旅游职业学院烹饪工艺与营养学院讲师, 从事餐饮食品加工技术研究;

饶胜其(1981-), 男, 湖北鄂州人, 扬州大学食品科学与工程学院副教授, 博士, 从事食品微生物与生物技术应用研究。

PBS 缓冲液溶解, -20℃ 冻存。

表1 单酶及双酶分步酶解条件

酶解方式	pH	温度 (°C)	[E]/[S] (%)	酶解时间 (h)	酶解液命名
木瓜蛋白酶	5.0	37	2	4	MY
碱性蛋白酶	8.0	55	2	4	JY
木瓜蛋白酶 → 碱性蛋白酶	5.0 → 8.0	37 → 55	2 → 2	4 → 4	HY

注: YY 为谷朊粉原液; MY 为木瓜蛋白酶解液; JY 为碱性蛋白酶解液; HY 为先木瓜蛋白酶后碱性蛋白酶解液。

1.3.3 凝胶过滤层析色谱分离抗氧化肽

将经预处理 Sephadex G-15 凝胶填料装入 1.6 cm × 100 cm 玻璃层析柱, 用 pH 7.0 的 PBS 缓冲液将大孔树脂分离组分配制成 50 mg/mL 溶液, 上样量 2 mL 然后用蒸馏水以 0.4 mL/min 流速洗脱, 每 5 min 收集一管, 280 nm 下检测其吸光度, 收集各洗脱峰, 真空旋转蒸发浓缩, 冷冻干燥得各分离组分。

1.3.4 抗氧化活性测定

总抗氧化能力 (FRAP) 值、DPPH· 和 ·OH 清除活性参照饶胜其等^[6]的方法测定。

2 结果与讨论

2.1 谷朊蛋白酶解

谷朊粉原液经木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶分别单独酶解后, 多肽浓度有所提升; 经木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶分步酶解后, 与单酶水解效果相比, 分别提高了 6.1 倍和 2.2 倍 (图 1. A), 说明双酶水解的效果显著优于单酶水解。当多肽浓度为 1 mg/mL 时, 双酶水解液 HY 的 FRAP 值达到 0.303 mmol/L, 相比单酶水解液 MY 和 JY, 分别提高了 2.8 倍和 2.3 倍 (图 1. B)。

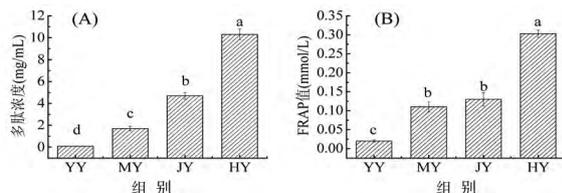


图1 各样品多肽浓度及 FRAP 值

注: 图中标注不同小写字母代表柱状间组内差异显著 ($P < 0.05$) 相同小写字母代表组内无显著性差异 ($P > 0.05$), 下图同。

2.2 DA201-C 大孔树脂动态分离抗氧化肽

如图 2 所示, 水解液 HY 经超滤处理后采用 DA201-C 大孔树脂吸附分离, 去离子水和 25%、50% 的乙醇溶液洗脱所获得的洗脱峰分别记为 RF1、RF2 和 RF3, 75% 的乙醇溶液洗脱未获得明显洗脱峰 (图 2), 由大孔树脂纯化的原理可知, 其疏水性由弱到强, 吸附能力由弱到强。^[7]

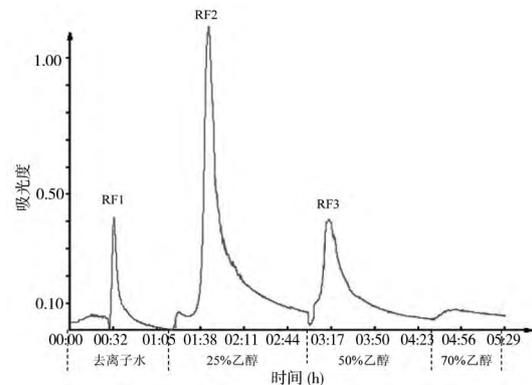


图2 DA201-C 大孔树脂分离 UF1 的洗脱曲线

水解液 HY 经超滤及 DA201-C 大孔树脂处理后, 多肽吸附率达到了 83.46%; 进一步采用 25% 乙醇和 50% 乙醇洗脱时多肽解析率分别为 60.13% 和 23.65%, 而 75% 乙醇洗脱时基本无多肽洗脱出峰。蒸馏水洗脱峰 RF1 的收集液的电导率显著高于其他乙醇洗脱组分的电导率 (图 3. A), 说明溶解盐类随洗脱液逐渐流出, 且在蒸馏水去除未吸附多肽时, 有大量盐类流出。将各组分样品调整至同一多肽浓度 (1 mg/mL) 并测定 FRAP 值, 结果显示, RF3 的 FRAP 值显著高于其他组分 (图 3. B), 说明 RF3 组分的抗氧化能力较高。因此, 将组分 RF3 作为进一步凝胶层析分离的样品。

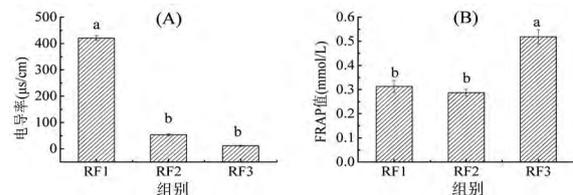


图3 各样品的电导率及 FRAP 值

2.3 Sephadex G-15 凝胶层析分离抗氧化肽

通过 Sephadex G-15 凝胶层析分离, 出现 6 个洗脱峰 (下页图 4), 分别记为 GF1、GF2、GF3、GF4、GF5、GF6, 分子量由大到小。

凝胶层析分离的 6 个组分将 Fe^{3+} -三吡啶基三嗪 (TPTZ) 还原为 Fe^{2+} 的能力接近, 其中组分 GF2

的 FRAP 值为 0.893 mmol/L, 略高于其他 5 个组分 (下页图 5. A)。6 个层析分离组分中, GF2 对 DP-PH 和 OH 自由基的清除能力最强, IC₅₀ 值分别达到 6.13 mg/mL 和 0.472 mg/mL (图 5. B 和图 3. B)。综上所述, 组分 GF2 的抗氧化活性最强。

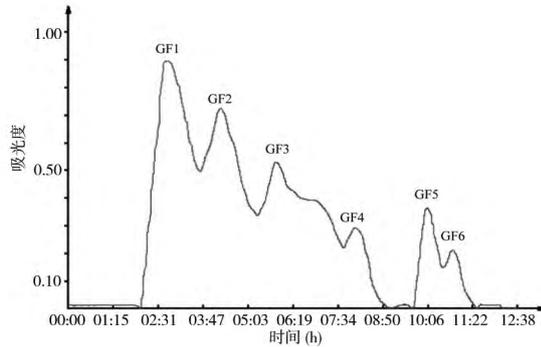


图 4 Sephadex G-15 凝胶柱分离 RF3 洗脱曲线

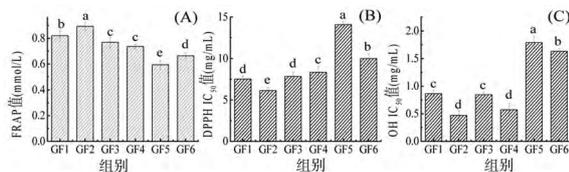


图 5 Sephadex G-15 分离各组分的抗氧化分析

3 结论

本文以谷朊粉为原料, 采用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶分别进行单酶和双酶水解, 并采用大孔树脂和琼脂糖凝胶富集水解液中的高抗氧化活性

组分。结果显示, 相对碱性蛋白酶解液 JY 和木瓜蛋白酶解液 MY, 双酶水解液 HY 中的多肽含量分别提高了 6.1 倍和 2.2 倍, 同时抗氧化活性分别提高 2.8 倍和 2.3 倍; 双酶水解液 HY 经超滤、DA201-C 大孔树脂和 Sephadex G-15 初步分离获得的 GF2 组分显示了较强的抗氧化活性。结果表明: 谷朊粉经碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶分步酶解后进一步采用常规分离手段可获得高抗氧化活性组分, 该方法具有一定应用价值。

参考文献:

- [1] 钟晨滑, 贞婷婷, 张琳, 等. 谷朊粉应用及深加工技术研究进展[J]. 粮油食品科技, 2015, 23(1): 17-20.
- [2] 王岸娜, 陈丛丛, 吴立根. 小麦面筋蛋白研究进展[J]. 粮油食品科技, 2017, 25(5): 19-23.
- [3] 孟丹阳, 赵伟, 杨瑞金, 等. 小麦面筋蛋白酶解过程中功能性质的变化规律研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(5): 115-119.
- [4] 赵源, 刘爱国, 吴子健, 等. 碱性蛋白酶酶解谷朊粉制备谷朊粉蛋白多肽的研究[J]. 食品工业科技, 2014, 35(18): 216-220.
- [5] 刘树兴, 乔晓林. 木瓜蛋白酶酶解谷朊粉制备抗氧化多肽的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(21): 167-170.
- [6] 饶胜其, 臧祥玉, 穆青, 等. 鸡蛋清蛋白酶解肽的抗氧化活性[J]. 美食研究, 2015(2): 56-60.
- [7] 毛跟年, 贺磊, 周亚丽, 等. 大孔吸附树脂分离魔芋飞粉中 ACE 抑制肽工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2017, 30(10): 93-96.

A study on the antioxidant activities of peptide from gluten protein

WU Lei¹, CHEN Rui², XU Guangwei², RAO Shengqi^{2*}

(1. College of Cuisine Technology and Nutrition, Jiangsu College of Tourism, Yangzhou, Jiangsu 225000, China;

2. College of Food Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225127, China)

Abstract: In order to obtain the highly active antioxidant peptides, gluten protein was hydrolyzed by papaya protease and alkaline protease. FRAP (total antioxidant capacity), DPPH· and ·OH scavenging activities were used as evaluation index. Ultrafiltration, macroporous resin DA201-C and gel Sephadex G-15 were used to enrich the peptides with high antioxidant activity in the hydrolysates obtained from gluten protein. The results showed that the component GF2 with strong antioxidant capacity was obtained, and the value of FRAP, the IC₅₀ of DPPH· and ·OH scavenging activity were 0.893 mmol/L, 6.13 mg/mL, and 0.472 mg/mL, respectively.

Key words: gluten protein; enzymolysis; separation and purification; antioxidant

(责任编辑: 赵勇)