

大米蛋白酶解制备抗氧化肽的研究*

张君慧, 张 晖, 王兴国, 姚惠源

(江南大学食品学院, 江苏无锡, 214122)

摘 要 以大米蛋白为研究对象, 比较了几种酶对大米蛋白的水解作用效果, 确定了一种合适的酶源——精制中性蛋白酶。同时通过单因素试验和响应面分析, 确定了采用精制中性蛋白酶制备大米蛋白抗氧化肽的最佳酶解条件为: [S] 5.0%, [E]/[S] 2.0%, pH 7.0、温度 37.5 °C、时间 4.16 h, 该条件下制备的大米蛋白抗氧化肽对 DPPH 自由基的清除率为 60.54%。

关键词 大米蛋白, 酶解, 抗氧化肽, 响应面分析法, 工艺优化

许多研究证实, 氧化与人类及其他动物的许多疾病诸如癌症、老化、动脉硬化等的发病机理有关^[1~5]。人体通过适当摄入具有抗氧化活性的物质可以降低体内自由基水平, 防止脂质过氧化, 帮助机体抵御疾病^[3~12, 20~22]。同时随着现代食品工业的发展, 食品加工中的油脂氧化问题亟待解决, 通过添加具有抗氧化活性物质的方法也可以增加食品体系的稳定性。目前采用的化学合成类抗氧化剂如 BHT、BHA、TBHA、TBHQ 等虽然能抑制油脂氧化, 却带来食品的安全性问题^[6, 9, 12, 14]。天然抗氧化剂除了具有较强抗氧化活性还有很高的安全性, 因此目前人们把研究重点逐步转向天然抗氧化剂, 着手从各种植物、动物组织中提取^[18~22]。

生物肽由于其特殊的结构特点, 与氨基酸和大分子蛋白质等相比较, 食用安全性更高, 具有极强的活性和多样性, 且其抗氧化性更为显著, 被称为抗氧化活性肽(简称抗氧化肽)^[12~15]。由于这些肽类在天然原料中存在的含量较低, 寻找更广泛来源的抗氧化肽引起了各国食品科学家的普遍关注^[16, 19, 20]。酶水解可以提高蛋白质的功能特性, 得到的肽具有一些蛋白质无法比拟的物理化学特性^[7]。

本文利用单因素和响应面分析法优化了制备大米蛋白抗氧化肽的酶解条件, 为进一步开发利用大米蛋白提供了可能, 同时为之后进一步对大米蛋白抗氧化肽的功能性质及结构研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

第一作者: 在读博士研究生(张晖教授为通讯作者)。

* 国家十一五支撑计划(No. 2006BAD05A01)新世纪优秀人才支持计划资助

收稿日期: 2007-08-06

大米蛋白, 通过碱提酸沉法制备(干基蛋白质含量 69.87%); DPPH (1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), 美国 Sigma 公司; 其他均为分析纯试剂; 蛋白酶, 杰能科酶制剂公司; 超级恒温水浴, 上海市实验仪器厂; PHS-2 型酸度计, 上海第二分析仪器厂; JXL 型沉淀离心机, 上海医用分析仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 制备方法

1.2.1.1 大米蛋白的制备

大米粉碎过 80 目筛, 取筛下物 1:12(w/v) 加入 0.1 mol/L NaOH 溶液, 室温下(20~25 °C)充分搅拌浸提 2 h, 4 000 r/min 条件下离心分离 20 min。所得残渣按料水比 1:6 的比例按上述方法重复浸提 1 次, 合并 2 次浸提的上清液, 调节上清液的 pH 值为 5.5, 4 °C 静置 1 h, 倾去上清液, 然后 4 000 r/min 离心分离 20 min, 沉淀用蒸馏水洗涤 2 次, 离心收集沉淀。所得沉淀冷冻干燥制得大米分离蛋白。置于干燥器中保存备用。

1.2.1.2 制备大米蛋白酶解肽的工艺路线

5% 脱脂大米蛋白悬浮液 → 调 pH 值 → 一定温度下超级恒温水浴酶反应器中溶解 30 min → 按不同底物浓度、加酶量、pH、温度进行酶解(pH-stat 法使体系 pH 稳定) → 85 °C/10 min 灭酶 → 3 500 r/min 离心 15 min → 上清液 → 真空浓缩 → 冷冻干燥 → 大米蛋白肽

酶解反应的具体条件如表 1 所示。反应过程中以 0.1 mol/L 的 NaOH 标准溶液维持酶解液 pH 恒定, 采用 pH-Stat 法测定水解度的变化。

1.2.2 分析方法

1.2.2.1 水解度(DH)测定^[11]

$$DH/\% = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

式中, B 为碱液体积, mL; N 为碱液浓度 mol/L; α 为 α -氨基的解离度; M_p 为底物中蛋白质的总量, g; h_{tot} 为底物中蛋白质的肽键总数, mmol/g(蛋白质)。

1.2.2.2 大米蛋白抗氧化肽 DPPH 自由基清除能力测定^[14]

采用 Chen 等人的方法测定自由基清除活力。将干燥的水解产物和过滤产物溶解在 4 mL 蒸馏水中, 制得浓度为 0%, 0.04%, 0.08%, 0.12%, 0.16%, 0.2% 和 0.24% (m/v) 蛋白质溶液。添加 1 mL 的 40 μ mol/L DPPH 自由基的乙醇溶液至各样品溶液中。25 $^{\circ}$ C 下静置 30 min, 于 517 nm 测定吸收值。计算样品中残留的自由基:

剩余的 DPPH 自由基/% = $100 - [(DPPH \text{ 空白} + \text{对照样品}) - DPPH \text{ 样品} / (DPPH \text{ 空白})] \times 100$

DPPH 空白指 1 mL 的 40 μ mol/L DPPH 自由基的乙醇溶液加入到 4 mL 蒸馏水中测得的吸收值; DPPH 样品指 1 mL 的 40 μ mol/L DPPH 自由基的乙醇溶液加入到 4 mL 样品溶液中测得的吸收值; 对照样品指 4 mL 样品溶液加入 1 mL 乙醇溶液中测得的吸收值。

EC50 即自由基清除能力达到 50% 时所需酶解样品的浓度。

1.2.3 试验设计

1.2.3.1 单因素影响试验

主要考察 $[E]/[S]$ 、反应温度及反应时间对酶解产物的 DPPH 自由基清除能力的影响。

1.2.3.2 响应面分析法试验设计

选择因素时主要选择单因素试验中对响应值 (DPPH 自由基清除率) 有显著影响的因素。根据 SAS 系统 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理, 采用 SASreg 程序对实验数据进行回归分析。

2 结果与分析

2.1 酶源的确定及酶解条件的单因素试验

因不同蛋白酶的底物特异性及作用位点的差异, 不同蛋白酶作用于大米蛋白的水解程度不同, 而且不同蛋白酶水解得到的酶解产物的功能性也将有所不同。因此, 文中选用了木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶、精制中性蛋白酶及高效水解蛋白酶 5 种蛋白酶进行酶解试验, 在各种酶的推荐温度和 pH 下酶解, 并对其冻干样品的体外抗氧化活性进行了评价。试验结果见表 1。

由表 1 及图 1 结果可知, 精制中性蛋白酶具有作

用条件温和, 作用于大米蛋白水解度高, 而且酶解产物体外抗氧化活性强 (EC_{50} 值较低) 的优点, 因此, 试验结果确定精制中性蛋白酶为酶解大米蛋白的合适酶源。

表 1 不同蛋白酶的酶解反应条件及大米蛋白酶解产物的

DPPH 清除能力比较			
蛋白酶	温度/ $^{\circ}$ C	pH 值	DPPH 清除能力 $EC_{50}/\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
木瓜蛋白酶	50~65	6.0~7.0	—
胰蛋白酶	45~50	7.0~8.0	0.24
风味蛋白酶	50	5.0~7.0	—
精制中性蛋白酶	30~50	7.0~8.0	0.08
高效水解蛋白酶	40~50	7.0~8.0	0.12
α -生育酚	—	—	0.10

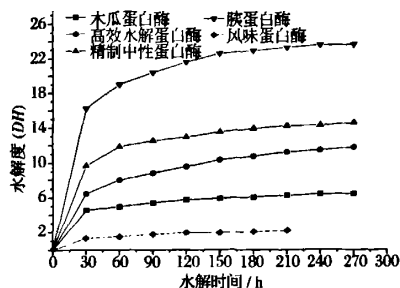


图 1 不同蛋白酶水解大米蛋白的工作曲线

在酶源确定的前提下, 影响蛋白质酶解的因素主要有底物浓度、酶浓度、反应温度、反应 pH 及反应时间等, 因而下面进行单因素试验分别讨论了上述因素对酶解效果的影响。

2.1.1 不同底物浓度 $[S]$ 对 DH 的影响

考虑工业化生产及其经济效益, 本研究从 2.5% 开始逐步加大 $[S]$, 在 $[E]/[S]$ 2%、pH 7.0 及 37 $^{\circ}$ C 的条件下考察了 $[S]$ 对 DH 的影响。由图 2 可知, 5.0% 为最适 $[S]$, $[S]$ 为 7.5% 和 10.0% 时, 水解度很低, 是由于 7.5%~10.0% 的 $[S]$ 会产生显著的底物抑制作用; 而 $[S]$ 为 5.0% 和 2.5% 时的水解进程曲线在 200 min 左右有交叉点, 此后前者的 DH 比后者稍高, 可能是由于后者底物浓度太低, 酶解产物抑制作用明显造成的。

2.1.2 不同酶与 $[E]/[S]$ 对 DH 的影响

在 $[E] \ll [S]$ 时, 一般认为酶反应速度正比于 $[E]$ 。本研究从 1.0% 开始逐步加大 $[E]/[S]$, 在 $[S]$ 5.00%、pH 7.0 及 37 $^{\circ}$ C 的条件下考察了不同 $[E]/[S]$ 对 DH 的影响。由图 3 可见, 随着 $[E]/[S]$ 的增加, 精制中性蛋白酶 Neutrase 水解大米蛋白的初速度加快, DH 增大, 但 DH 的提高并不随 $[E]/[S]$ 的

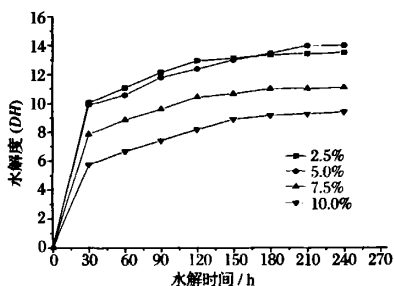


图2 不同[S]精制中性蛋白酶水解大米蛋白的进程曲线

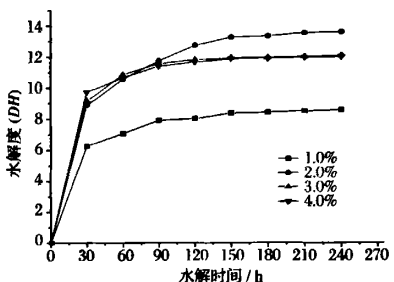


图3 不同[E]/[S]时精制中性蛋白酶水解大米蛋白的进程曲线

加倍而加倍,从节约成本的角度考虑, $[E]/[S]$ 为 2% 比较适宜。

2.1.3 不同 pH 值对 DH 的影响

在 $[S] 5.0\%$ 、 $[E]/[S] 2.0\%$ 及 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下考察了不同 pH 对 DH 的影响。由图 4 可见, pH 8.0 时,酶的活性较低, DH 增加较慢;在 pH 7.5 时, DH 作用初期增加较快,但 90 min 后逐渐平缓; pH 6.5 时,作用后期 DH 下降很快;而 pH 7.0 时, DH 作用初期增加快,而且整个水解过程中, DH 逐渐增加,而且中性条件在工业上很容易实现。综合考虑,精制中性蛋白酶水解大米蛋白的最适 pH 为 7.0。

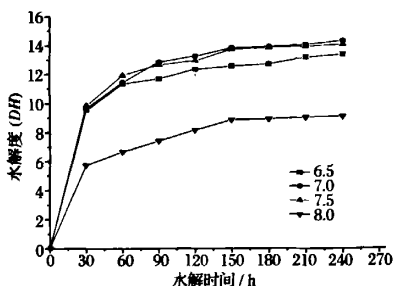


图4 不同 pH 下精制中性蛋白酶水解大米蛋白的进程曲线

2.1.4 温度对 DH 的影响

在 $[S] 5.0\%$ 、 $[E]/[S] 2.0\%$ 及 pH 7.0 的条件下考察了不同温度对 DH 的影响。由图 5 可见,在酶解过程的前 35 min, DH 随温度的升高而增大;以后

35~40 $^{\circ}\text{C}$ 的 DH 一直高于 45 $^{\circ}\text{C}$ 的; 35 $^{\circ}\text{C}$ 和 40 $^{\circ}\text{C}$ 的水解进程曲线在 2 h 左右有交叉点,此后两者的 DH 相差不大。这说明精制中性蛋白酶不能较长时间耐受 45 $^{\circ}\text{C}$ 的温度,其最适温度为 35~40 $^{\circ}\text{C}$ 。

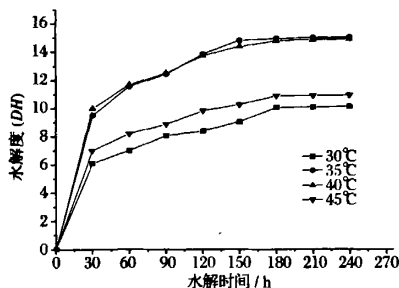


图5 不同温度下精制中性蛋白酶水解大米蛋白的进程曲线

2.2 酶解工艺参数的优化

为了获得高活性的大米蛋白抗氧化肽,在单因素试验的基础上,以 $[E]/[S]$ 、反应温度及反应时间为因素, DPPH 自由基清除率为响应值,设计三因素三水平的二次回归方程来拟合因素和指标(响应值)之间的函数关系,采用响应面分析法 (Response Surface Analysis, RSA) 来寻求酶解最优工艺参数。试验设计和结果见表 2。

表2 RSA 试验的设计和结果

试验次数	$[E]/[S]/\%$	温度/ $^{\circ}\text{C}$	时间/h	DPPH 清除率 $Y_1/\%$
1	1	35	4	48.45
2	1	45	4	23.56
3	3	35	4	49.85
4	3	45	4	30.81
5	2	35	3	59.98
6	2	35	5	39.35
7	2	45	3	26.83
8	2	45	5	30.26
9	1	40	3	30.78
10	3	40	3	52.79
11	1	40	5	28.25
12	3	40	5	36.96
13	2	40	4	61.52
14	2	40	4	61.24
15	2	40	4	61.79

2.2.1 回归分析

采用回归方程: $Y = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_{11}X_1^2 + a_{22}X_2^2 + a_{33}X_3^2 + a_{12}X_1X_2 + a_{13}X_1X_3 + a_{23}X_2X_3$ 对试验结果用 SASrereg 程序进行分析,计算出回归方程中各系数(见表 3),各因素经回归拟合后,选择对响应值显著的各项,并用 t 检验其显著性,剔除不显著因子,得到大米蛋白抗氧化肽的

DPPH 自由基清除率 Y 对自变量(提取温度、时间和液料比)的二次多项回归方程为:

$$Y = 61.52 + 4.92X_1 - 10.77X_2 - 4.45X_3 - 12.63X_1^2 - 10.72X_2^2 + 6.02X_2X_3 - 11.70X_3^2$$

对大米蛋白酶解物 DPPH 自由基清除率 Y 回归方程的方差分析(见表 3)表明:交互项的 F 检验也呈高度显著性,说明 3 因素之间存在相互影响;失拟项 F 检验不显著,表明用方程 Y 拟合 3 个参数与 DP-

PH 自由基清除率之间的关系是可行的;回归方程各项的方差分析结果还表明方程的一次项、二次项的影响都是高度显著的,并且交互项中 X_2 与 X_3 项显著,因此各个具体试验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。并且该模型的 $R^2 = 0.978\ 4$, $R_{Adj}^2 = 0.960\ 0$,说明该模型与实际试验拟合较好,自变量与响应值之间线性关系显著,试验误差小,故可用回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析。

表 3 回归方程系数及其显著性检验

模型项	系数估计	平方和	t 值	F 值	$Pr > F$
X_1	4.92	193.749 6	3.967	15.74	0.010 669
X_2	-10.77	928.158 6	-8.682	75.38	0.000 335
X_3	-4.45	158.062 4	-3.583	12.84	0.015 825
X_1^2	-12.63	588.946 6	-6.916	47.83	0.000 969
X_1X_2	1.46	8.555 6	0.834	0.69	0.442 498
X_1X_3	-3.33	44.222 5	-1.895	3.59	0.116 583
X_2^2	-10.72	424.281 1	-5.870	34.46	0.002 035
X_2X_3	6.02	144.720 9	3.428	11.75	0.018 667
X_3^2	-11.70	504.756 2	-6.403	40.99	0.001 378

根据回归分析结果(表 3),作出相应曲面图,如图 6 所示。可以看出,酶解温度对 DPPH 自由基清除率的影响最大,温度在 35~40 °C 时,随着温度的增加, DPPH 自由基清除率也随之增加,而低于 35 °C 或超过 40 °C, DPPH 自由基清除率较低;其次是时间,但是如果提取时间超过 4 h, DPPH 自由基清除率会降低。采用 SAS 软件的 Rsreg 语句对试验模型进行典型性分析,获得大米蛋白抗氧化肽的酶解最佳条件为:提取温度 37.5 °C、时间 4.16 h,在此条件下, DPPH 自由基清除率理论值达到 61.56%。

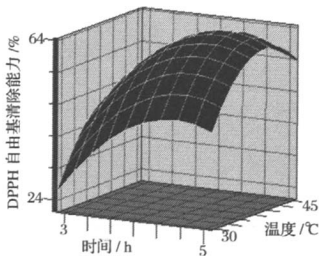


图 6 温度与时间对大米蛋白抗氧化肽 DPPH 自由基清除率影响的响应面图

2.2.2 验证试验

按照最佳提取条件进行试验验证,重复 3 次, DPPH 自由基清除率为 60.54%。DPPH 自由基清除率试验值(60.54%)与模型的理论值(61.56%)的差值仅占理论值的 1.02%,可见该模型可以较好地

反映出酶解大米蛋白的条件。

3 结 论

(1)采用不同的蛋白酶水解大米蛋白,通过观察其水解曲线及其酶解产物的 DPPH 自由基清除能力,确定了水解大米蛋白的最佳酶源为精制中性蛋白酶。

(2)通过单因素试验初步确定酶解大米蛋白抗氧化肽的条件为:[S]5.0%、[E]/[S]2.0%、pH7.0、35.0 °C、4 h。

(3)通过响应面分析优化的大米蛋白抗氧化肽的最佳酶解条件为:[S]5.0%、[E]/[S]2.0%、pH7.0、温度 37.5 °C、时间 4.16 h,该条件下制备的大米蛋白抗氧化肽对 DPPH 自由基的清除率为 60.54%。

参 考 文 献

- 1 陈炳卿主编. 营养与食品卫生学(第 4 版)[M]. 北京, 人民卫生出版, 2002. 63~66, 115~116, 130
- 2 陈君石, 闻之梅主编. 食物、营养与癌症预防[M]. 上海, 上海医科大学出版社, 1999. 455~457
- 3 李胜利主编. 营养与膳食[M]. 北京, 人民卫生出版社, 2004. 44
- 4 方允中. 自由基、抗氧化剂、营养素与健康的关系[J]. 营养学报, 2003, 25(4): 337~341
- 5 顾景范主编. 现代临床营养学[M]. 北京, 科学出版社, 2003. 120~122, 139, 145, 94~104, 275~278, 631

- 6 彭德翔. 抗衰老活性肽的研究进展[J]. 现代食品科技, 2006, 22(2): 267~270
- 7 Makoto Hattori, Kaori Yamaji Tsukamoto, Hiroto Kumagai, et al. Antioxidative activity of mluble elastin peptides [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 2 167~2 170
- 8 Hattori M, Yamaji Tsukamoto K, Kumagai H, et al. Antioxidative activity of soluble elastin peptides[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46 (6): 2 167~2 170
- 9 Jeon You Jin. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultifiltration membranes [J]. Process Biochemistry, 1999, 35 (5): 471~478
- 10 Kansci G, Genot C, Meynier A, et al. The antioxidant activity of carnosine and its conquences on the volatile profiles of liposomes during irordascorbate induced phospholipid oxidation[J]. Food Chemistry, 1997, 60 (2): 165~175
- 11 Aadler Nissen. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986
- 12 Panyam Dinakar, Kilara Arun. Enhancing the functionality of food proteins b. enzymatic modification[J]. Trends in Food Science & Technology, 1996, 7(4): 120~125
- 13 郑建仙. 功能性食品(第2卷)[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1995
- 14 Chen H M, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Anti-oxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digest of a soybean protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(2): 49~53
- 15 中华人民共和国卫生部卫生与法制监督司. 保健食品功能学评价程序和检验方法[M]. 北京, 人民卫生出版社, 1996. 20~34
- 16 Moure A, Domínguez H, Carlos J P. Antioxidant properties of ultra-filtration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(2): 447~456
- 17 任国谱. 蛋白质及其衍生物的抗氧化性能[J]. 中国油脂, 1997, 22(4): 47~50
- 18 Wang Jinshui, Zhao Mouming, Zhao Qiangzhong, et al. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems[J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1 658~1 663
- 19 Parrado J, Miramontes E, Jover M, et al. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food[J]. Food Chemistry, 2006, 98(4): 742~748
- 20 Hayshi Y, Nishikawa Y, Mori H, et al. Prevention of brain protein and lipid oxidation elicited by a water soluble oryzanol enzymatic extract derived from rice bran[J]. European Journal of Nutrition, 2003, 42(1): 307~314
- 21 Suetsuna K. Antioxidant Peptides from the Protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle [J]. Mar Biotechnol, 2000, 2: 5~10
- 22 Wu Hui Chun, Chen Hua Ming, Shiao Chyuan Yuan. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. Food Research International, 2003, 36 (9-10): 949~957
- 23 林琳. 鲑鱼皮胶原蛋白水解肽抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2006, 25(4): 48~51

Preparation of Antioxidant Peptide from Rice Protein by Enzymatic Hydrolysis

Zhang Junhui, Zhang Hui, Wang Xingguo, Yao Huiyuan

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT 5 different proteases were applied to hydrolyze the rice protein, and Neutrase was chosen to be the best one for the enzymatic hydrolysis. The Response Surface Methodology (RSM) was used to optimize the factors affecting Neutrase hydrolysis. The optimal hydrolytic conditions for preparing antioxidant peptide from rice protein by protease Neutrase were: [S] 5.0%, [E]/[S] 2.0%, pH 7.0, temperature 37.5°C, and time 4.16h. Furthermore, the antioxidant peptide from rice protein prepared under this condition showed strong scavenging activities of DPPH radical as 60.54%.

Key words rice protein, enzymatic hydrolysis, antioxidant peptide, RSM, the optimum condition

信息窗

姜研究表明菠菜能强健肌肉

科学家通过实验证明,菠菜中的化学物质能强健肌肉,加快人体将蛋白质转化为肌肉组织的速度。科学家估计,如果想靠它让肌肉块变大,每天至少要吃 1kg 菠菜。

美国拉特格斯大学的伊利亚·拉斯金等研究人员从菠菜中提取出植物甾皮类固醇,并对其功效进行了实验。在添加植物甾皮类固醇后,人类肌肉样本的生长速度加快了 20%。连续一个月注射植物甾皮类固醇的老鼠变得更加强壮,握力也有所增强。