

固态发酵大豆制备的抗氧化肽的活性分析

刘 明,罗远栩,倪 辉 ,吴永沛

(集美大学生物工程学院,厦门 361021)

摘要 综合评价用固态发酵法制备的大豆抗氧化肽的抗氧化活性。通过 T-AOC 方法测定总抗氧化能力、通过水杨酸法测定 $\cdot\text{OH}$ 、通过邻苯三酚法测定 O_2^- 、通过卵磷脂法测定脂质体过氧化、通过 POV 值法测定抗油脂自氧化。大豆抗氧化肽的总抗氧化能力为 50.07U、对羟基自由基的清除率达到 85.68%、抑制邻苯三酚自氧化能力达到 23.61 U/mL、抑制脂质体过氧化率为 34.58%、对油脂过氧化抑制抑制率为 30%。用固态发酵法制备出的大豆抗氧化肽具有较强的还原能力、能清除羟基自由基、抑制邻苯三酚自氧化,并能够对脂质体过氧化和油脂过氧化具有一定的清除作用能力。

关键词 大豆抗氧化肽;固体发酵;总抗氧化性

中图分类号 Q815 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)03-0381-05

ACTIVE ANALYSIS OF SOYBEAN ANTIOXIDATIVE PEOTIDE FROM SOLID STATE FERMENTATION

LIU Ming,LUO Yuan-xu,NI Hui,WU Yong-pei

(College of Bioengineering,Jimei University,Xiamen 361021)

Abstract Synthesis analysed the antioxidative activity of soybean antioxidative peptide from solid state fermentation. Used the T-AOC method to measure the total antioxidative activity,used the salicylic acid method to measure $\cdot\text{OH}$,and utilize the pyrogallic acid to measure O_2^- ,made use of lecithin method to determine liposome oxidation and used the POV method to measure axunge oxidation. The total antioxidative activity as 50.07U,the ability of cleaning $\cdot\text{OH}$, O_2^- is 85.68% and 23.61 U/mL,the ability of restraining liposome oxidation and axunge oxidation is 34.58% and 28.52%. Soybean antioxidative peptide have the stronger deoxidize ability,it can clean away O_2^- and $\cdot\text{OH}$,and can also restrain liposome oxidation and axunge oxidation.

Key words Soybean antioxidative peptide;Solid state fermentation;Antioxidant activity

大豆抗氧化活性肽(Soybean Antioxidative Peptide)是大豆蛋白水解产物中具有抗氧化功效的多肽,溶解度高、粘度低及稳定性好。能在一定程度上消除机体内多种生理功能的障碍,延缓机体的衰老,

减少各种老年性疾病的发生,并且可以阻止食品的氧化变质,提高食品稳定性和延长食品贮存期,因此可作为食品添加剂和保健食品因子。

自从 1956 年 Harman 完善了自由基理论,认为

收稿日期:2006-10-13
基金项目:本项目获集美大学创新团队基金资助
作者简介:刘明(1980-),男,硕士研究生,研究方向食品发酵工程。
通讯作者:吴永沛,从事食品酶工程方向研究。

自由基攻击生命大分子造成组织细胞损伤,是引起机体衰老、肿瘤和一些其它疾病的根本原因以来^[1],国内外很多学者都在不断的寻找优良的抗氧化剂,Bishov等^[2]在1972年发现大豆蛋白对脂肪过氧化或脂肪酸的水解具有一定的抑制作用,表现了抗氧化活性。Chen等^[3]也在上个世纪90年代研究发现具有抗氧化性质的大豆蛋白是由5~16个氨基酸残基所组成,包括N-末端的疏水氨基酸缬氨酸或亮氨酸,在肽段顺序上是脯氨酸、组氨酸或酪氨酸,其中分子量最小的是一个5肽(Leu-Leu-Pro-His-His)。沈蓓英^[4]认为大豆抗氧化肽的分子量范围在700~1000Da左右。荣建华等^[5]用中性蛋白酶AS1.398酶解大豆蛋白,发现其酶解物具有较强的抗氧化活性,在浓度0.1~250mg/mL范围内对·OH都有明显的清除作用。然而,目前国内研究的大豆抗氧化肽均是从实验室的角度,采用价格高昂的蛋白酶水解,其制造成本较高;另外,抗氧化活性测定方法较多,相互之间难以比较。本试验利用豆粕为主要原料,采用产量大、成本低的固态发酵方法生产大豆抗氧化活性肽,并采用较标准的方法测定总抗氧化、清除羟基自由基、抑制邻苯三酚自氧化、抑制脂质体过氧化和油脂过氧化能力。

1 材料与方法

1.1 菌种

Jb009为集美大学生物工程学院微生物实验室保存菌株。

1.2 培养基

斜面种子培养基:牛肉膏0.3g,蛋白胨1.0g,NaCl0.5g,自来水100mL;琼脂20g,pH7.4~7.6,121℃灭菌20min;摇瓶种子扩大培养基:KH₂PO₄0.03g,豆饼粉4.0g,Na₂CO₃0.1g,Na₂HPO₄0.4g,自来水100mL,pH9.0(灭菌前)。

1.3 试验药品

市售豆粕、麸皮,粉碎过30目筛;新鲜猪油、新鲜猪肉脂肪购自厦门集美农贸市场,实验室炼制;Na₂HPO₄·10H₂O、Tris、HCl、KH₂PO₄、EDTA·2Na、H₂O₂、Na₂CO₃、FeSO₄、三氯乙酸、水杨酸、冰乙酸、甲醇、碘化钾、邻苯三酚、抗坏血酸、卵磷脂、硫代巴比妥酸、三氯化铁、三氯甲烷、硫代硫酸钠等所有试剂均为分析纯;T-AOC试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.4 试验仪器

720型可见分光光度计(上海,UNIC)、Cary 50

Probe紫外分光光度计(美国,Varian),PHS-2C型精密酸度计(上海雷磁)、HQ45B恒温摇床(中科院武汉科学仪器厂)、Avanti J-25高速冷冻离心机(美国,Beckman)、10000Da超滤系统(美国,Millipore)、SNL冷冻干燥机(美国,Sanant)、灭菌涂布培养基全套设备、SP-DJ垂直净化工作台(上海浦东伟普)、固体样品粉碎机(荣华仪器公司)、HZS-H型水浴振荡器(哈尔滨东联)、超纯水制作装置 RiOs(美国,Millipore)

1.5 试验方法

1.5.1 摇瓶种子扩大培养 将菌种活化,取1~3环接入已灭菌的装有100mL液体培养基的250mL三角瓶中,在37℃、160rpm摇床中培养48h。

1.5.2 大豆抗氧化活性肽的制备 4g豆粕与1g麸皮混匀,加10mL水混匀,调节pH值8.5,在121℃下,灭菌30min,接入7mL种子液,34℃培养箱中发酵36h。发酵结束后将发酵产物在沸水浴中灭酶5min,冷却后加入100mL蒸馏水,30℃下水浴浸提30min,在4℃下12000r/min高速离心20min后,用10000Da超滤膜超滤,取分子量小于10000部分冻干待测。

1.5.3 抗氧化性的测定

1.5.3.1 总抗氧化能力 抗氧化物质能将Fe³⁺还原为Fe²⁺,而Fe²⁺能使菲啉类物质形成稳固的络合物,在520nm下通过比色测出其抗氧化能力的高低。定义为每分钟每毫升抗氧化物质使反应体系得吸光度(OD)值每增加0.01时,为一个总抗氧化能力单位(U)。操作方法根据南京建成公司总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒说明书,每个样品作三个平行试验。

1.5.3.2 清除羟基自由基(·OH)^[6] H₂O₂和Fe²⁺混合发生Fenton反应,生成具有很高反应活性的·OH,其能被水杨酸有效的捕捉,并生成有色物质;但若加入具有清除作用的物质,便会与水杨酸竞争,从而使有色产物生成量减少。在10mL的试管中依次加入6mmol/L的FeSO₄溶液1mL,不同浓度的多肽溶液1mL,6mmol/L的H₂O₂溶液1mL,摇匀,静置10min,再加入6mmol/L的水杨酸溶液1mL,摇匀,静置30min后于510nm处测其吸光值。清除率计算公式为:

$$\text{清除率}(S)\% = [1 - (A_i - A_j)/A_0] \times 100\%$$

其中 A₀为空白对照;

A_i为某质量浓度多肽的吸光值;

A_j为无水杨酸时多肽的吸光值。

1.5.3.3 抑制邻苯三酚自氧化速率^[7] 在碱性条

件下,邻苯三酚会发生自氧化,因此可根据大豆抗氧化活性肽抑制邻苯三酚自氧化能力测定抗氧化能力。采用 Marklund 方法,在 25 ℃ 时抑制邻苯三酚自氧化速率 50% 时所需抗氧化肽的量为一个活力单位。在 25 ℃ 左右,于 10 mL 比色管中依次加入 A 液 (pH8.2 0.1 mol/L Tris - HCl 缓冲溶液,内含 1 mmol/L EDTA · 2Na) 2.35 mL,蒸馏水 1.80 mL,样品 0.2 mL, B 液 (4.5 mmol/L 邻苯三酚盐酸溶液) 0.15 mL。加入 B 液立即混合并倾入比色皿,分别测定在 325nm 波长条件下初始时和 1min 后吸光值,二者之差即邻苯三酚自氧化速率 ΔA_{325} (min^{-1}),空白组用蒸馏水代替。

$$\text{SOD 活力}(\text{U/mL}) = \frac{\frac{\Delta A_{225} - \Delta A'_{325}}{\Delta A_{325}} \times 100\%}{50\%} \times 4.5 \times \frac{1}{V} \times D$$

U/mL—抗氧化单位;
 ΔA_{325} (min^{-1})—邻苯三酚自氧化速率;
 ΔA_{325} (min^{-1})—样液抑制邻苯三酚自氧化速率;
V—所加酶液或样液体积,单位为毫升 (mL);
D—酶液或样液的稀释倍数;
4.5—反应液总体积,单位为毫升 (mL)。
计算结果保留三位有效数字。

1.5.3.4 抗脂质体过氧化活性的测定^[8]

卵磷脂中的 C - 2 位上所含的极低密度脂蛋白 (VLDL) 和低密度脂蛋白 (LDL) 中含有的 PUFA,在铁离子 (Fe^{2+}) 的催化作用下,经振荡能诱发过氧化,由此可以建立以铁离子诱发卵磷脂 C - 2 位上的极低密度脂蛋白 (VLDL) 和低密度脂蛋白 (LDL)、过不饱和脂肪酸的氧化模型,卵磷脂的氧化产物 - 过氧化物经分解产生的二级产物丙二醛 (MDA) 来衡量脂质体的氧化程度。在酸性条件下 MDA 与硫代巴比妥酸 (TBA) 缩合成的红色物质 TBARS,在 535 nm 的特征吸收值。用以评价样品的抗氧化活性^[9]。

脂质体 PBS 分散系 (LLS):300 mg 卵磷脂溶解于 30 mL 10 mmol/L pH7.4 的磷酸缓冲液中,冰浴震荡。三氯乙酸 (TCA) - 硫代巴比妥酸 (TBA) - 盐酸 (HCl) 混合液:15 g TCA,0.375 g TBA,2.1 mL 浓盐酸依序放入 100 mL 水中。

在 10 mL 试管中依次加入 1.0 mL 卵磷脂溶液 (LIS)、1.0 mL 400 $\mu\text{mol/L}$ 三氯化铁溶液 (FeCl_3)、1.0 mL 400 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸和 1.0 mL 样品,混匀,

避光,于 37 ℃ 水浴 60 min,再加入 2.0 mL TCA - TBA - HCl 混合液,90 ~ 100 ℃ 水浴 15 min,迅速冷却,以 2 000 r/min 转速离心 10 min,取上清液在 535 nm 测吸光值 A_s 。空白管以 1.0 mL 重蒸水代替 1.0 mL 样品,操作方法同样品管,可测得空白管的吸光度 A_c 。

$$\text{抑制率 IC}(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\%$$

1.5.3.5 抗油脂过氧化能力^[10] 试样用三氯甲烷 - 甲醇混合溶剂溶解,试样中的过氧化物将二价铁离子氧化成三价铁离子,三价铁离子与硫氰酸盐反应生成橙红色硫氰酸铁配合物,在波长 500 nm 处测定吸光度,与标准系列比较定量。

精密称取约 1.0 g 试样 (准确至刻度 0.000 1 g) 于 10 mL 容量瓶内,加三氯甲烷 + 甲醇 (7 + 3) 混合溶剂溶解并稀释至刻度,混匀分别精密吸取铁标准使用溶液 (10.0 $\mu\text{g/mL}$) 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL (各自相当于铁浓度 0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0 μg) 于干燥的 10 mL 比色管中,用三氯甲烷 + 甲醇 (7 + 3) 混合溶剂稀释至刻度混匀。加 0.05 mL 硫氰酸钾溶液 (300 g/L) 混匀。室温下准确放置 5 min 后,移入 1 cm 比色皿中,以三氯甲烷 + 甲醇 (7 + 3) 混合溶剂为参比,于波长 500 nm 处测定吸光度,以标准各点吸光度减去零管吸光度后绘制标准曲线,计算直线回归方程 $y = 0.3183x - 0.0118$, $R^2 = 0.9991$ 。

精密吸取 1.0 mL 试样溶液于干燥的 10 mL 比色管内,加 1 滴 (约 0.05 mL) 氯化亚铁 (3.5 g/L) 溶液,用三氯甲烷 + 甲醇 (7 + 3) 混合溶剂稀释至刻度,混匀。加 0.05 mL 硫氰酸钾溶液 (300 g/L) 混匀。室温下准确放置 5 min 后,移入 1 cm 比色皿中,以三氯甲烷 + 甲醇 (7 + 3) 混合溶剂为参比,于波长 500 nm 处测定吸光度,试样吸光度减去零管吸光度后与曲线比较或代人回归方程求得含量。

$$X = \frac{c - c_0}{m \times \frac{V_2}{V_1} \times 55.84 \times 2}$$

式中: X—试样中过氧化值的含量,单位为 meq/kg
c—由标准曲线上查得试样中的铁的质量,单位为 μg

c_0 —由标准曲线上查得零管铁的质量,单位为 μg

V—试样稀释总体积,单位为 mL
 V_2 —测定时取样体积,单位为 mL
m—试样质量,单位为 g

55.84 – Fe 的原子量
2 – 换算因子

1.5.4 数据处理 数据采用统计均数(平均数) ± 标准差来表示,用 t 检验进行显著性分析。样本方差 $SD^2 = X^2 - (X)^2$,样本标准差 $SD = \sqrt{SD^2}$

2 结果与分析

2.1 总抗氧化能力

不同浓度的抗氧化多肽的总抗氧化能力是不同的,试验以 400 umol/L Vc 为对照考察了浓度对总抗氧化能力的影响(见图 1)。

图 1 大豆抗氧化肽浓度对总抗氧化能力的影响
Fig.1 The effect of different peptide concentrations on the total antioxidant activity

从图中可以看到大豆抗氧化活性肽的总抗氧化能力较强,而浓度又对总抗氧化能力的影响较大,当浓度增加到 1.6% 时,总抗氧化能力达到 50.07U,比 0.1% 时的 8.43U 提高了近 5.94 倍,是等浓度 Vc 总抗氧化能力的 3.71 倍。

2.2 清除羟自由基(·OH)作用

不同浓度的抗氧化多肽的清除羟自由基能力有所分别,试验考察了不同浓度多肽和 400 umol /L Vc 对照的清除羟自由基能力(见图 2)。

从图 2 中可以看到大豆抗氧化活性肽具有一定的羟基自由基清除能力,该能力随活性肽浓度的增加而有所增加,0.1% 的大豆抗氧化活性肽就具有 50.23% 的清除能力,当浓度增加到 1.6% 时,羟基自由基的清除率达到 84.68%,是等浓度 Vc 清除羟基自由基能力的 1.65 倍。

2.3 抑制邻苯三酚自氧化速率能力

不同浓度的抗氧化多肽对于邻苯三酚自氧化的抑制能力也有所不同,试验考察了不同浓度多肽和 400umol/L Vc 对照抑制邻苯三酚自氧化速率的能力(见图 3)。

图 2 大豆抗氧化肽浓度对清除羟基自由基能力的影响
Fig.2 Effect of different peptide concentrations on the activity against hydroxyl radical

图 3 大豆抗氧化肽浓度对抑制临苯三酚自氧化能力的影响
Fig.3 Effect of different peptide concentrations on the activity against the pyrogallic acid auto – oxidation

从图 3 中可以看到大豆抗氧化活性肽对于邻苯三酚自氧化速率具有一定的抑制作用,其抑制能力在浓度为 0.1% 和 0.8% 之间变化不大,当浓度增加到 1.6% 时,抑制能力迅速增加达到 23.61 U/mL,比 0.1% 浓度多肽提高了 1.35 倍;是等浓度对照 Vc 抑制能力的 1.33 倍。

2.4 抗脂质体过氧化活性的测定

本试验采用 400 umol/LVc 作为标准抗氧化剂对照,比较不同浓度的大豆抗氧化活性肽和抗坏血酸在 Fe^{2+} 引发的脂质体过氧化体系中抑制 TBARS (TBA Reaction Substance) 生成的作用(见图 4)。

由图 4 可知,0.2% 以上的大豆抗氧化活性肽对由 Fe^{2+} 引发的卵磷脂分散系过氧化具有一定的抑制能力,且在所测定的浓度范围内随其浓度的增大而增大,当浓度为 1.6% 时达到 34.58%,是等浓度对照 Vc 抑制能力的 1.23 倍。

2.5 抗油脂过氧化能力

油脂的过氧化值(POV)是衡量油脂酸败程度的较敏感指标,常用来表征油脂中过氧化物含量。

十分理想。

图4 大豆抗氧化肽浓度对抑制脂质体过氧化能力的影响

Fig.4 Effect of different peptide concentrations on the activity against hydroxyl radical

一般来说,油脂的过氧化值越大,说明其中所含的过氧化物越多,油脂发生酸败变质的情况就越严重。本试验在 10 mL 离心管中,加入 1 mL 自制猪油,1 mL 抗氧化肽,0.5 mL 乙醇,密闭置于转速为 240 r/min的水浴振荡器中,在 60 ℃放置 120 h,并在一定时间里取出样品测定 POV 值来考察了不同浓度多肽和 Vc 对照抗油脂过氧化能力随时间的变化(每个样品测定三组平行)(见图 5)。

图5 不同浓度大豆抗氧化肽抑制油脂过氧化能力随时间变化情况

Fig.5 Effect of different peptide concentrations on the POV value in different time

加入抗氧化剂的组分 POV 值越低,其抗氧化能力也就越强。从图 5 中看到,各组 POV 随时间的增加而不断上升,随浓度的增加也具有一定的量效关系。加入 1.6% 多肽组在 120 h 时低于对照组 Vc 7.89 meq/kg,因此油脂抗氧化能力也优于 Vc。另外大豆抗氧化肽浓度越高的样品组中抗氧化能力也越高,因此证实了大豆抗氧化活性肽具有一定的抑制油脂过氧化能力。但是由于本试验所制备的抗氧化肽为水溶性肽,在抑制油脂过氧化过程中仅能阻断系统中的氧气与油脂的接触,因此抑制效果并不

3 结论

从实验结果可知,大豆抗氧化活性肽总抗氧化能力较强,浓度为 1.6% 时达到 50.07U,是等浓度 Vc 的 3.71 倍;对羟基自由基的清除率达到 85.68%,是相同浓度 Vc 的 1.65 倍,其 IC50 浓度小于 0.1%;抑制邻苯三酚自氧化能力达到 23.61U/mL,是等浓度对照 Vc 的 1.33 倍。而在抑制脂质体过氧化上,抗氧化肽只有达到一定的浓度(0.15% 左右)才能有此作用,1.6% 浓度的大豆抗氧化肽的抑制率为 34.58%,为 Vc 的 1.23 倍。但对油脂过氧化抑制作用较差,在 120hr 时,高浓度的多肽抑制率达到 30%,比对照组 Vc 降低 7.89meq/kg。因此大豆抗氧化活性肽具有良好的抗氧化活性,在食品工业中具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

[1] Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation

chemistry[J]. Gerontology. 1956,11:298-300.

[2] Bishov, S. J, Henick, A. S. Antioxidant effect of protein Hydrolysates in a freeze-dried model system[J]. Food, Science, 1972, 37:873-875.

[3] Hua-Ming Chen, Koji Muromoto, Fumio Yamauchi. Structural Analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin[J]. Agricultural and Food Chemistry 1995,43:574-578.

[4] 沈蓓英. 大豆蛋白抗氧性肽的研究[J]. 中国油脂, 1996, 6: 21-24.

[5] 荣建华, 李小定, 谢笔钧. 大豆肽抗氧化效果的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11):118-120.

[6] Smirnoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28:1057-1060.

[7] GB/T 5009.171-2003. 保健食品中超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定[S]. 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会, 2003, 8, 1.

[8] Ock-Sook Yi, Annes S. Meyer, Edwin N. Frankel. Antioxidant Activity of Grape Extracts in a Lecithin Liposome System[J]. JAOCS, 1997, 74(10):1301-1306.

[9] 晏文洁, 李家璞. 类黄酮抗氧化力与其结构之关系[J]. 台湾农业化学与食品科学, 2000, 38(1):80-88.

[10] GB/T 5009.37-2003 食用植物油卫生标准的分析方法[S]. 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 2003, 8, 11.