

两步水解法制备玉米-大豆复合抗氧化肽及其稳定性研究

王晓杰¹, 刘晓兰¹, 曲悦¹, 夏春荣¹, SUKHIKH Stanislav², ANDREYEVA Anna²

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室, 黑龙江齐齐哈尔 161006;

2. 康德波罗的海联邦大学生命系统研究所, 微生物学和生物技术实验室, 俄罗斯加里宁格勒 236016)

摘要: 采用麦芽粉和碱性蛋白酶 Alcalase 两步水解玉米醇溶蛋白和大豆分离蛋白的混合物(质量比 1:1) 制备复合抗氧化肽, 以水解度、可溶性蛋白含量和抗氧化活性为指标, 对第二步 Alcalase 的水解条件进行优化, 确定两步水解法制备复合抗氧化肽的最适条件。另外, 对复合抗氧化肽相对分子质量分布、稳定性和氨基酸组成进行了研究。结果表明, 制备复合抗氧化肽的最适条件为在底物质量分数 10%、pH 5.5、50℃、酶(麦芽粉)底质量比 30% 条件下水解 3 h 后, 再在底物质量分数 10%、pH 8.5、60℃、酶(Alcalase)底质量比 0.75% 条件下继续水解 3 h。在最适条件下, 水解度、可溶性蛋白含量、羟自由基清除率和亚铁离子螯合率分别为 36.32%、36.83 mg/mL、40.01% 和 86.83%, 相对分子质量主要分布在 300 ~ 6 500 Da (含量 92.44%) 范围内, 必需氨基酸指数 (EAAI) 值为 8.02 ($n=9$), 属于优质蛋白源。复合抗氧化肽具有热稳定性, 在中性及碱性条件下稳定, 但不耐受酸性 (pH 3 ~ 5)、4℃ 贮存和反复冻融的加工条件。

关键词: 麦芽粉; 两步水解; 玉米醇溶蛋白; 大豆分离蛋白; 玉米-大豆复合肽; 抗氧化活性; 稳定性
中图分类号: TS229; TQ936 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2021)03-0039-09

Preparation of compound antioxidant peptide from zein-soy protein isolated by two-step hydrolysis and evaluation on its stability

WANG Xiaojie¹, LIU Xiaolan¹, QU Yue¹, XIA Chunrong¹,
SUKHIKH Stanislav², ANDREYEVA Anna²

(1. Heilongjiang Key Laboratory of Corn Deep Processing Theory and Technology, College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China; 2. Department of Microbiology and Biotechnology, Life System Institute, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad 236016, Russia)

Abstract: The compound antioxidant peptide was prepared by two-step hydrolysis of zein-soy protein isolate (mass ratio of 1:1) with malt flour and alkaline protease Alcalase. The second stage hydrolysis conditions of Alcalase were optimized by determining hydrolysis degree, soluble protein content and antioxidant activities. Moreover, the relative molecular weight distribution, stability and the amino acid composition of compound antioxidant peptide were investigated. The results showed that the optimal conditions for the preparation of compound antioxidant peptide were obtained as follows: the first stage

hydrolysis conditions of substrate mass fraction 10%, pH 5.5, temperature 50℃, and mass ratio of enzyme (malt flour) to substrate 30%, hydrolysis time 3 h; the second stage hydrolysis conditions of substrate mass fraction 10%, pH 8.5, temperature 60℃, mass ratio of enzyme (Alcalase) to substrate 0.75% and hydrolysis

收稿日期: 2020-06-19; 修回日期: 2020-11-20

基金项目: 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费青年创新人才科研项目(135309345); 植物性食品加工技术黑龙江省优势特色学科资助项目(YSTSXK201819)

作者简介: 王晓杰(1980), 女, 教授, 博士, 主要从事粮食、油脂与植物蛋白工程方面的研究工作(E-mail) wangxiaojie80@163.com。

time 3 h. Under these conditions, the hydrolysis degree, soluble protein content, hydroxyl radical scavenging rate and ferrous ion chelation ability were 36.32%, 36.83 mg/mL, 40.01% and 86.83%, respectively. Meanwhile, the relative molecular weight of the compound antioxidant peptide was mainly distributed in the range of 300 – 6 500 Da (92.44%), and the essential amino acid index value was 8.02 ($n = 9$), which indicated that the peptide prepared was a high – quality protein source. The compound antioxidant peptide had thermal stability, and it was stable in neutral and alkaline conditions. However, acidic condition (pH 3 – 5), 4 °C storage and repeated freezing – thaw reduced the antioxidant activity of the compound antioxidant peptide.

Key words: malt powder; two – step hydrolysis; zein; soy protein isolate; compound peptide form zein – soy protein isolate; antioxidant activity; stability

玉米肽是玉米醇溶蛋白经蛋白酶水解或微生物发酵后得到的相对分子质量小的短肽聚合物。与玉米醇溶蛋白相比,玉米肽的水溶性显著增加,而且具有多重生物活性,包括抑制血管紧张素转换酶^[1]、促进乙醇代谢^[2]、抗氧化^[3]、抗炎^[4]、护肝^[5]、抗菌^[6]等,在食品工业具有潜在的应用价值。但是,玉米肽与玉米醇溶蛋白的氨基酸组成相似,均缺乏人体必需的 Lys 和 Trp^[7-8],导致玉米肽虽然生物活性很高,但营养价值相对于其他肽类产品来说偏低。另外,目前玉米生物活性肽的制备主要采用商用酶制剂,用量主要在 1% ~ 3% 范围内,有的甚至高达 9.13%^[9]。由于商用酶制剂价格偏高,大大提高了玉米肽的生产成本,制约了玉米肽的工业化生产和产品推广。

多种原料的综合利用可以有效地提高和拓展生物活性肽的生理功能,且原料的营养特性可以得到优势互补。何慧^[10]、王进^[11]等用大豆分离蛋白和玉米醇溶蛋白按一定比例复配,利用碱性蛋白酶水解获得了玉米 – 大豆复配肽,复配肽的降血压能力和营养价值优于玉米肽和大豆肽。但是,相对于玉米肽和大豆肽的研究而言,复合肽的研究还未引起广泛关注。

本实验将大豆分离蛋白和玉米醇溶蛋白以质量比 1:1 混合,采用酶系丰富的麦芽粉和对玉米蛋白酶解效率较高的碱性蛋白酶 Alcalase 进行两步水解,以制备营养均衡、具有高抗氧化活性的复合抗氧化肽。利用第一步麦芽粉的作用,将复合底物蛋白质的高级结构破坏,使埋藏在分子内部的活性位点暴露出来,为第二步水解创造有利条件,在保证酶解效率的同时,降低第二步商业酶制剂的用量。同时,对玉米 – 大豆复合抗氧化肽的稳定性进行了研究,以期复合抗氧化肽的工业化生产及更好地开发利

用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

玉米醇溶蛋白, Sigma – Aldrich 公司; 大豆分离蛋白, 临沂山松生物有限公司; 碱性蛋白酶 Alcalase (酶活力 6.28×10^5 U/mL), Novozymes 公司; 大麦芽, 齐齐哈尔华润雪花啤酒厂; 硫代巴比妥酸、菲洛嗪、氧化型谷胱甘肽 (612 Da)、还原型谷胱甘肽 (307 Da), 上海生工生物有限公司; 2 – 脱氧 – D – 核糖、蓝色葡聚糖 2000、aprotinine (6 500 Da)、杆菌肽 (1 400 Da), Sigma 公司; 其他试剂均为国产色谱纯或分析纯。

1.1.2 仪器与设备

PC/PLCLD – 53 真空冷冻干燥机, 美国 Millrock 公司; NDA 701 全自动凯氏定氮仪, VELP 公司; TDL – 5 – A 离心机, 上海安亭科学仪器厂; Purifier100 蛋白质纯化色谱仪, 美国 GE 公司; DF – 1 集热式磁力加热搅拌器, 常州市荣华仪器制造有限公司; Superdex Peptide 10/300 GL 凝胶层析柱, 美国 GE 公司; PB – 10 pH 计, 北京赛多利斯仪器有限公司; TU – 1901 双光束紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; L – 8900 全自动氨基酸分析仪, 日本日立公司; FW177 小型粉碎机, 天津市泰斯特仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 麦芽粉的制备

用小型粉碎机在转速 16 000 r/min、时间 10 s 的条件下反复多次将大麦芽磨成粉, 磨粉时要时刻注意温度的变化, 防止温度过高使蛋白酶变性。粉碎后过孔径 0.38 mm (80 目) 筛, 得到麦芽粉 (根据 GB/T 28715—2012 测定麦芽粉的蛋白酶总活力为

(268.27 ± 6.11) U/g), 在 4 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 玉米-大豆复合抗氧化肽的制备

采用两步水解法制备。

第一步水解:取 5 g 玉米醇溶蛋白和 5 g 大豆分离蛋白于 250 mL 烧杯中,加入蒸馏水制成底物质量分数 10% 的悬浮液,调节 pH 至 5.5,按酶底质量比 30% 加入麦芽粉,搅拌均匀,加入转子后,将烧杯放入 50 °C 水浴磁力搅拌器中央,开始水解反应。水解过程中通过滴加 0.5 mol/L NaOH 使 pH 维持在 5.5,记录滴加 NaOH 的体积,计算水解度,水解 3 h 后获得第一步水解液。

第二步水解:调节第一步水解液 pH 至 8.5,温度至 60 °C,按一定的酶底质量比加入 Alcalase 开始第二步水解反应,水解过程中通过不断滴加 0.5 mol/L NaOH 使 pH 维持在 8.5,记录水解 0.5、1、1.5、2 h 时滴加 NaOH 的体积,计算水解度,并在每个时间点取样 2 mL 于离心管,放入沸水浴中灭酶 5 min,再于 4 000 r/min 下离心 10 min,取上清液测定可溶性蛋白含量和抗氧化活性。

1.2.3 蛋白质含量的测定

可溶性蛋白含量采用 Folin-酚法测定^[12],总蛋白含量采用微量凯氏定氮法测定。

1.2.4 水解度的测定

采用 pH-stat 法^[13]测定。

1.2.5 抗氧化活性的测定

在蛋白质质量浓度为 2 mg/mL 条件下测定样品的抗氧化活性,检测指标包括羟自由基清除活性和亚铁离子螯合能力,测定方法参考文献^[14]。

1.2.6 相对分子质量分布的测定

参考文献^[15]采用凝胶色谱法测定相对分子质量分布。将样品溶解在含有 0.15 mol/L NaCl 的 pH 7.0 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.02 mol/L)中,配制成蛋白质质量浓度为 2 mg/mL 的溶液,于 4 °C、10 000 r/min 下离心 10 min,上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤待测。Superdex Peptide 10/300 GL 凝胶层析柱用含有 0.15 mol/L NaCl 的 pH 7.0 的 PBS(0.02 mol/L)进行平衡和洗脱。样品的上样体积 100 μL,流速 0.25 mL/min,检测波长 214 nm。在测定样品前,色谱柱先用蓝色葡聚糖 2000 测定外水体积,用标准蛋白(apolinine, 杆菌肽,氧化型谷胱甘肽,还原型谷胱甘肽)进行校正,建立标准蛋白相对分子质量对数(lgM_r)与有效分配系数(K_{aw})的线性回归方程(y = -3.734 7x + 4.815 3, R² = 0.982)。根据标准曲线回归方程计算蛋白的相对分子质量。

1.2.7 稳定性的研究

用 pH 分别为 3、5、7、9、11 的缓冲液将复合抗氧化肽样品配成蛋白质质量浓度为 2 mg/mL 的溶液,在 25 °C 下保温 60 min 后测定羟自由基清除率和亚铁离子螯合率,以调节 pH 前的样品为对照,表征 pH 对复合抗氧化肽稳定性的影响。

将复合抗氧化肽样品配成 10 mL 蛋白质质量浓度为 2 mg/mL 的溶液,测定 -20 °C 冷冻 24 h, 25 °C 解冻 1 h(反复冻融 0、1、2、3、4、5 次)时的羟自由基清除率和亚铁离子螯合率,表征冻融次数对复合抗氧化肽的影响。

将复合抗氧化肽样品配成 10 mL 蛋白质质量浓度为 2 mg/mL 的溶液,分别在 4、25、37、100 °C 下放置 2 h,测定羟自由基清除率和亚铁离子螯合率,表征温度对复合抗氧化肽的影响。

1.2.8 氨基酸组成的测定及必需氨基酸指数(EAAI)的计算

以 Alcalase 单酶水解制备的玉米肽为对照,研究复合抗氧化肽的氨基酸组成。采用离子交换色谱茚三酮柱后衍生法对氨基酸组成进行分析。0.5 g 样品与 6 mol/L HCl 混合,在氮气环境下于 110 °C 下水解 22 h 后用全自动氨基酸分析仪测定各氨基酸的含量。在测定样品前,氨基酸分析仪用 17 种标准氨基酸进行标定。必需氨基酸指数参照文献^[16]采用公式(1)计算。

$$I_{\text{EAA}} = n \times \frac{C_1}{C'_1} \times \cdots \times \frac{C_n}{C'_n} \times 100 \quad (1)$$

式中: I_{EAA} 为必需氨基酸指数值; n 为比较的必需氨基酸数量,本文中 $n = 9$; C_n 为样品中第 n 个必需氨基酸含量, g/100 g; C'_n 为标准蛋白中必需氨基酸含量, g/100 g。

1.2.9 数据处理

每个实验均平行 3 次,所有数据均以“平均值 ± 标准差”表示,用 SPSS Statistics 19.0 进行统计学分析。采用 Duncan 检验进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果与讨论

2.1 玉米-大豆复合抗氧化肽制备条件的优化

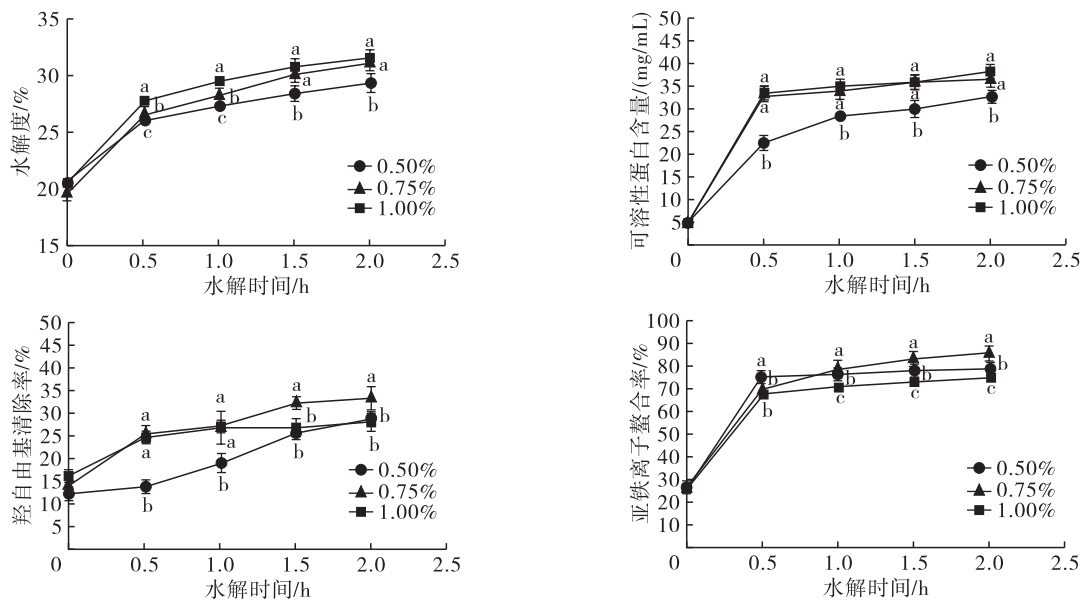
2.1.1 酶底质量比的确定

按 1.2.2 的方法,研究第二步 Alcalase 水解条件。在底物质量分数 10% 的条件下,研究不同酶底质量比对水解度、可溶性蛋白含量及产物抗氧化活性的影响,结果如图 1 所示。

由图 1 可以看出,随着酶底质量比的增加和水解时间的延长,水解度和可溶性蛋白含量均逐渐增

大。这是因为在底物质量分数一定的条件下,酶促反应速率和酶浓度呈正比,随着加酶量增加,水解速率加快,水不溶性的复合蛋白在蛋白酶的作用下逐渐被切割成小分子肽段,导致可溶性蛋白含量增加。Kong 等^[17]以玉米醇溶蛋白为原料,在底物质量分数 5%、酶(Alcalase)底质量比 2% 条件下水解,玉米醇溶蛋白的水解度为 12.1%。本实验在底物质量分数 10%、酶(Alcalase)底质量比 0.75%、水解时间 2 h 条件下,第二步的水解度为 11.42%,说明虽然底物质量分数提高,且 Alcalase 用量减少 1.25 个百

分点,但酶解效率却没有降低。可能是因为第一步加入的麦芽粉中包含比较丰富的酶系,如内肽酶、羧肽酶、氨肽酶、二肽酶等,不同蛋白酶的酶切位点及作用方式的不同,导致麦芽粉的水解可以破坏复合底物中蛋白质的高级结构,降低反应空间位阻的同时,为第二步水解提供了丰富的酶切位点。但是,当酶底质量比由 0.75% 增加至 1.00% 时,可溶性蛋白含量之间差异不显著($P > 0.05$),可能的原因是当酶底质量比超过 0.75% 时,酶相对过量,发生了底物的竞争性抑制^[18-19],阻碍了酶与底物的结合。



注:同一水解时间下不同的肩标字母表示差异具有显著性($P < 0.05$)。下同

图1 酶底质量比对玉米-大豆复合蛋白酶解效率及产物抗氧化活性的影响

由图1还可以看出,不同酶底质量比对产物抗氧化活性的影响相对较大。与酶底质量比 0.50% 和 1.00% 相比,酶底质量比 0.75% 制备的复合抗氧化肽具有更高的抗氧化活性,可能是因为不同加酶量影响了水解产物中的肽段长度及结构^[20],进而影响了复合抗氧化肽的抗氧化活性。在酶底质量比为 1.00% 条件下,复合底物的酶解效率高,随着水解度的增大,具有抗氧化活性的多肽继续水解为无抗氧化活性的短肽或游离氨基酸,导致清除羟自由基和螯合亚铁离子的能力降低。而在酶底质量比为 0.50% 时,由于酶解效率低,具有抗氧化活性的复合抗氧化肽产量较少或活性位点暴露较少。

本实验采用两步水解法是利用麦芽粉的初步水解作用降低 Alcalase 的用量,同时制备出高抗氧化活性的复合抗氧化肽。综合以上分析,确定第二步水解最适酶底质量比为 0.75%。

2.1.2 底物质量分数的确定

按 1.2.2 的方法,研究第二步 Alcalase 水解条

件。在酶底质量比 0.75% 的条件下,研究不同底物质量分数对水解度、可溶性蛋白含量及产物抗氧化活性的影响,结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出,随着底物质量分数的增加,水解度逐渐下降,而可溶性蛋白含量逐渐上升。在高底物质量分数条件下,Alcalase 与复合蛋白充分接触,且酶切位点丰富,从而有利于酶切反应的进行,酶对肽段切割程度较大,可溶性蛋白含量也随之上升。在整个水解期间,当底物质量分数由 5% 增加至 10% 时,水解产物的羟自由基清除率和亚铁离子螯合率均增大,但是继续增加底物质量分数,抗氧化活性降低。在底物质量分数低于 10% 时,抗氧化活性的提高可归因于 Alcalase 对底物的有效水解,从而产生更多具有抗氧化活性的肽。但是,随着底物质量分数的继续增加,水解效率降低,具有抗氧化活性的多肽释放出来的量少,导致清除羟自由基和螯合亚铁离子的能力降低。

综合以上分析,选择最适的底物质量分数为 10%。

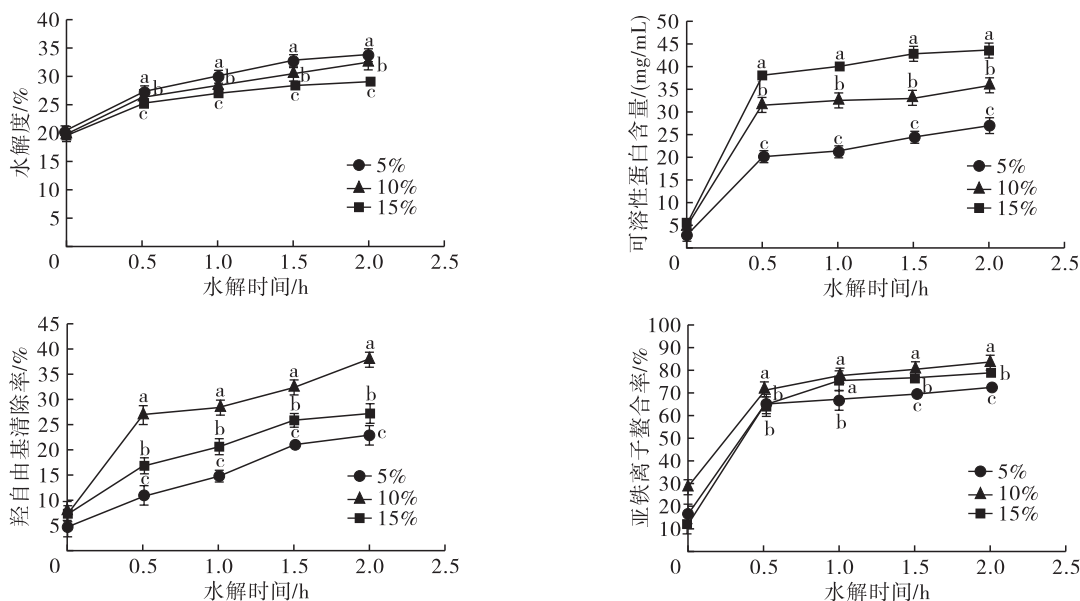
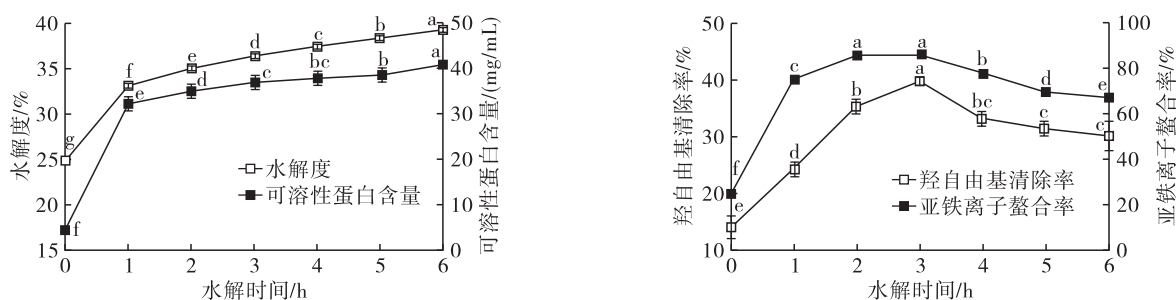


图2 底物质量分数对玉米-大豆复合蛋白酶解效率及产物抗氧化活性的影响

2.1.3 水解时间的确定

按1.2.2的方法,研究第二步Alcalase水解条件。在底物质量分数10%、酶底质量比0.75%的条

件下,研究水解时间对水解度、可溶性蛋白含量及产物抗氧化活性的影响,结果如图3所示。



注:同一曲线不同的肩标字母表示差异具有显著性($P < 0.05$)。

图3 水解时间对玉米-大豆复合蛋白酶解效率及产物抗氧化活性的影响

由图3可以看出,随着水解时间的延长,水解度和可溶性蛋白含量均呈逐渐增加的趋势。第一步水解时,麦芽粉中蛋白酶的水解作用可以将埋藏在复合底物分子内部的Alcalase的催化位点暴露出来,加入Alcalase进行第二步水解时,由于加酶量低,所以酶切速度较慢,酶切反应持续进行,水解度持续增加,产生了更多的可溶性蛋白。

综合以上分析,确定Alcalase的最适水解时间为3h。在此条件下,玉米-大豆复合蛋白两步水解的水解度、可溶性蛋白含量、羟自由基清除率及亚铁离子螯合率分别为36.32%、36.83 mg/mL、40.01%和86.83%,减去第一步的水解效果后,第二步的水解度和可溶性蛋白含量分别为11.55%和32.20 mg/mL。Li等^[21]采用Alcalase水解玉米醇溶蛋白时,当底物浓度5%、酶加量2.5%、水解时间1h时,水解度仅为8.7%,进一步说明本实验采用的麦芽粉与Alcalase的两步水解方式,既保证了酶解效率,又降低了Alcalase的用量。

由图3还可以看出,随着水解时间的延长,水解产物的羟自由基清除率和亚铁离子螯合率均呈先升高后降低的变化趋势,在Alcalase水解3h时,羟自由基清除率和亚铁离子螯合率均达到最高值,分别为40.01%和86.83%,此后继续延长水解时间,羟自由基清除率和亚铁离子螯合率开始下降。多肽的抗氧化活性与其肽段长度、构象以及氨基酸组成等因素有关^[16],随着水解时间的延长,Alcalase持续水解影响了水解产物中肽段的氨基酸组成和构象,进而影响了复合肽的抗氧化活性。

2.2 玉米醇溶蛋白-大豆分离蛋白水解产物的相对分子量分布

食物和动物来源的抗氧化活性肽,通常含有2~30个氨基酸残基,相对分子量在500~1800 Da范围内,该相对分子量范围的肽通常具有较高的抗氧化活性,而且容易被人体消化吸收^[22-23]。将样品

配成蛋白质质量浓度为 4 mg/mL 的溶液,测定麦芽粉水解 3 h 和 Alcalase 继续水解 1、2、3 h 时水解产物的相对分子质量分布,凝胶洗脱图谱如图 4 和图 5 所示,相对分子质量分布的计算结果如表 1、表 2 所示。

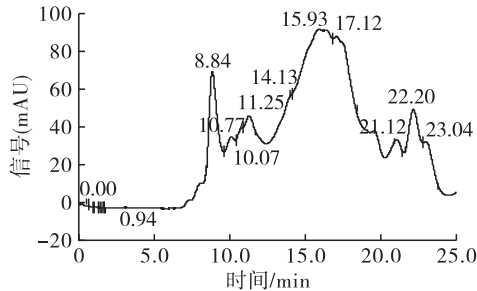
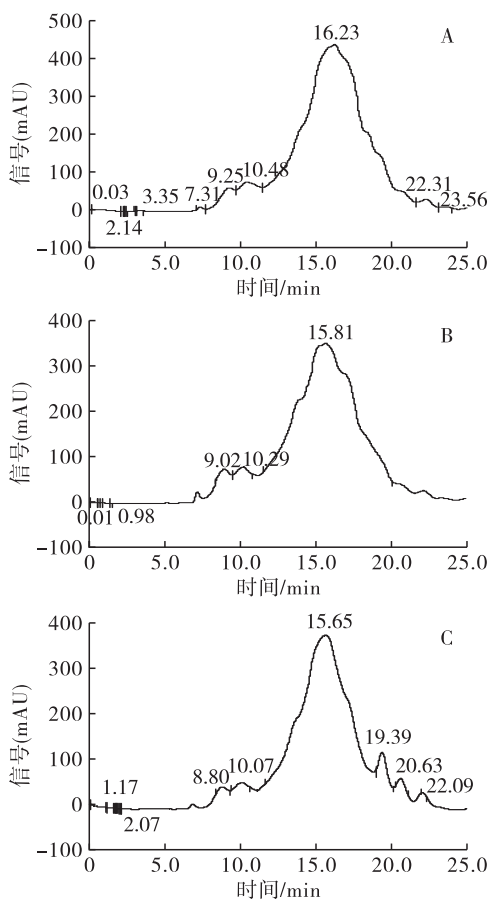


图 4 麦芽粉水解 3 h 时样品的凝胶洗脱图谱

表 1 麦芽粉水解 3 h 时样品的相对分子质量分布

洗脱体积/mL	相对分子质量/Da	含量/%
< 10.77	> 6 500	19.99
11.25	2 349 ~ 6 500	3.42
14.13	2 237 ~ 2 349	0.04
15.93	527 ~ 2 237	30.95
17.12	300 ~ 527	17.75
> 21.12	< 300	20.56



注:A. 麦芽粉水解 3 h + Alcalase 水解 1 h; B. 麦芽粉水解 3 h + Alcalase 水解 2 h; C. 麦芽粉水解 3 h + Alcalase 水解 3 h。

图 5 麦芽粉与 Alcalase 复合水解时样品的凝胶洗脱图谱

表 2 麦芽粉水解 3 h 与 Alcalase 水解不同时间时样品的相对分子质量分布

水解时间/h	洗脱体积/mL	相对分子质量/Da	含量/%
1	< 10.48	> 6 500	7.73
	16.23	300 ~ 6 500	90.54
	> 22.31	< 300	1.36
2	9.02	> 6 500	1.79
	10.29	> 6 500	1.40
	15.81	300 ~ 6 500	95.95
3	< 10.07	> 6 500	1.36
	15.65	300 ~ 6 500	92.44
	> 19.39	< 300	5.25

由图 4 和表 1 可以看出,在麦芽粉水解 3 h 时,水解产物的相对分子质量范围分布得比较宽,说明麦芽粉的水解产物中,以中等大小的肽段为主要组分,体现了麦芽粉中内切蛋白酶的性质,为第二步的蛋白酶提供作用位点的同时,降低了反应底物的空间位阻。

由图 5A 可以看出,在麦芽粉水解 3 h 的基础上,加入 Alcalase 继续水解 1 h 后,样品的洗脱峰向右移动,说明水解产物的相对分子质量进一步减小,其中相对分子质量大于 6 500 Da 组分的含量仅为 7.73%,与麦芽粉水解 3 h 时相比减少了 12.26 个百分点,而相对分子质量 300 ~ 6 500 Da 组分的含量高达 90.54%,表明在麦芽粉水解的基础上,Alcalase 继续水解,将玉米-大豆复合蛋白底物水解成相对分子质量低的肽段。

由图 5B 和图 5C 可知,随着 Alcalase 水解时间的进一步延长,水解产物的相对分子质量逐渐减小,进一步说明在麦芽粉水解的基础上,虽然降低了 Alcalase 的用量,但仍然可获得相对分子质量低的活性肽。

另外,第二步 Alcalase 水解后,水解产物中相对分子质量小于 300 Da 组分的含量均小于麦芽粉水解 3 h 时,可能是形成了一些聚集体。一些研究表明,水解产物的聚集是谷氨酰内切蛋白酶水解的结果^[24]。Alcalase 同时具有枯草杆菌蛋白酶和谷氨酰胺内切蛋白酶活性,因此可以释放 C 末端具有 Glu 的肽段和疏水性补丁序列,从而导致生成的肽具有高聚集趋势^[25],即相对分子质量小于 300 Da 短肽在水解物中的比例降低可能是因为它们与大肽段发生了聚集。

2.3 复合抗氧化肽的稳定性

2.3.1 pH 的影响

按 1.2.7 方法,研究 pH 对复合抗氧化肽抗氧

化活性的影响,结果如图6所示。

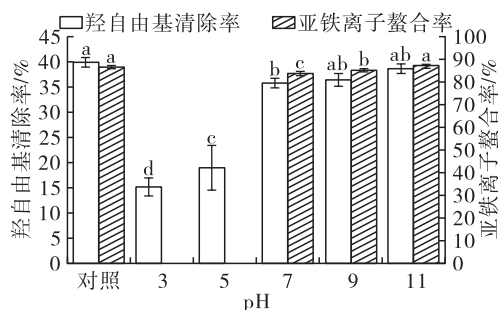


图6 pH对复合抗氧化肽羟自由基清除率和亚铁离子螯合率的影响

由图6可以看出,与对照相比,中性和酸性pH导致复合抗氧化肽的羟自由基清除率显著降低($P < 0.05$),而碱性pH对复合抗氧化肽的羟自由基清除率没有显著性影响($P > 0.05$)。除在pH 11时,复合抗氧化肽的亚铁离子螯合率没有显著性变化外,pH < 9的条件均使复合抗氧化肽的亚铁离子螯合率显著降低($P < 0.05$),尤其是在pH 3~5条件下,复合抗氧化肽不具有螯合亚铁离子的能力。蛋白质和肽的金属离子螯合能力可以通过与带电荷氨基酸残基间的静电相互作用完成^[26]。随着pH的变化,溶剂介质中的氢离子浓度发生变化,影响了复合抗氧化肽的带电荷性质,进而影响了复合肽的亚铁离子螯合能力以及供氢的能力。因此,将复合抗氧化肽应用于食品工业时,应该选择保持其高抗氧化活性的条件,即可以制备成弱碱性食品。

2.3.2 冻融次数的影响

按1.2.7方法,研究不同冻融次数对复合抗氧化肽抗氧化活性的影响,结果如图7所示。

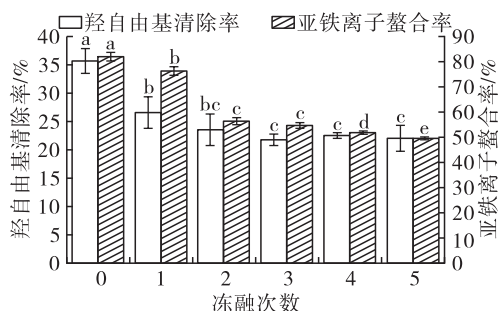


图7 冻融次数对复合抗氧化肽羟自由基清除率和亚铁离子螯合率的影响

由图7可以看出,与冻融次数为0时相比,随着冻融次数的增加,复合抗氧化肽的羟自由基清除率和亚铁离子螯合率均逐渐降低,可能是因为复合抗氧化肽是一种蛋白质,反复冻融会使肽链上活性氨基酸残基的结构遭到破坏,从而导致抗氧化活性降低。

2.3.3 温度的影响

按1.2.7方法,研究不同温度对复合抗氧化肽抗氧化活性的影响,结果如表3所示。

表3 温度对复合抗氧化肽抗氧化活性的影响

温度/℃	羟自由基清除率/%	亚铁离子螯合率/%
4	33.00 ± 1.16 ^c	69.77 ± 0.59 ^e
25	35.76 ± 2.31 ^{bc}	82.24 ± 1.77 ^b
37	37.39 ± 2.73 ^b	83.78 ± 0.39 ^{ab}
100	41.68 ± 1.25 ^a	84.94 ± 1.16 ^a

注:同一列不同的肩标字母表示差异具有显著性($P < 0.05$)。

由表3可以看出,与室温25℃相比,4℃不能破坏复合抗氧化肽的羟自由基清除能力,而使亚铁离子螯合率显著降低($P < 0.05$),37℃对复合抗氧化肽的抗氧化活性没有显著性影响,100℃使复合抗氧化肽的羟自由基清除率和亚铁离子螯合率均显著上升($P < 0.05$),说明复合抗氧化肽具有一定的热稳定性,可能是因为复合底物经两步水解被降解成相对分子量低的活性肽,肽的空间结构简单,主要具有肽链一级结构及少量的二级结构,高温处理没有导致肽的聚集和肽链断裂,仅使肽链部分二级结构展开,暴露一些活性位点于分子表面,从而使复合抗氧化肽的抗氧化活性增大。这与Zayas^[27]提出的高温相对难以引起小肽聚集的观点相一致。因此,将复合抗氧化肽应用于食品工业时,可以耐受食品加工中巴氏杀菌和干燥等高温处理。

2.4 复合抗氧化肽的氨基酸组成及EAAI值

必需氨基酸水平是影响蛋白质营养价值的主要因素,EAAI反映了蛋白源的必需氨基酸组成与标准蛋白必需氨基酸组成的拟合程度。因此,可用必需氨基酸水平和EAAI评价蛋白源的营养质量。玉米肽和复合抗氧化肽的氨基酸组成如表4所示。

表4 玉米肽和玉米-大豆复合抗氧化肽的

氨基酸	氨基酸组成			g/100 g
	玉米肽	复合抗氧化肽	鸡蛋蛋白	
Leu*	13.85	13.59	8.10	5.90
Thr*	1.82	1.68	4.50	2.30
Val*	2.66	1.81	5.40	3.90
Ile*	2.86	1.84	4.90	3.00
Phe*	4.68	4.25		
Tyr*	3.45	3.50		
Phe + Tyr	8.13	7.75	4.70	3.80
Met*	1.21	2.44		
Cys*	0.15	0.17		
Met + Cys	1.36	2.61	8.60	2.20

续表 4

氨基酸	玉米肽	复合抗氧化肽	鸡蛋蛋白	成人日需求量 ^[28]
Lys*	0.13	1.49	6.60	4.50
His	1.02	0.86		
Arg	0.98	0.90		
Asp	3.59	3.42		
Glu	16.11	14.67		
Ser	3.22	3.59		
Gly	0.97	0.88		
Ala	6.46	6.21		
Pro	5.55	6.01		
EAA	30.81	30.77	42.80	25.60
NEAA	37.90	36.54		

注:EAA为必需氨基酸,NEAA为非必需氨基酸;*为FAO模式的必需氨基酸。

由表4可以看出,与玉米肽相比,复合抗氧化肽中Lys和Met含量显著增加,分别是玉米肽的11.46倍和2.02倍,且含硫氨基酸(Cys和Met)的含量高于FAO/WHO(2013)的成人日需求量。

用EAAI评价蛋白源时,当 $n=6\sim 12$,提出的实用评价标准为:EAAI值 >0.9 为优质蛋白源, $0.8\leq EAAI$ 值 <0.9 为良好蛋白源,EAAI值 ≤ 0.7 为不适蛋白源^[29]。经计算,玉米-大豆复合抗氧化肽的EAAI值为8.02($n=9$),是玉米肽(EAAI值为0.96)的8.35倍,属于优质蛋白源,进一步说明了大豆分离蛋白与玉米醇溶蛋白复合可以改善玉米肽的营养品质。

3 结论

为了解决玉米肽氨基酸组成不平衡以及制备过程中商业酶制剂用量偏高等问题,本研究以玉米醇溶蛋白和大豆分离蛋白的混合物(质量比1:1)为原料,先利用麦芽粉进行第一步水解,再利用Alcalase进行第二步水解制备抗氧化活性肽,确定了两步水解法制备营养均衡、高抗氧化活性复合抗氧化肽的最适条件为:第一步在底物质量分数10%、pH 5.5、50℃、酶(麦芽粉)底质量比30%条件下水解3h;第二步在底物质量分数10%、pH 8.5、60℃、酶(Alcalase)底质量比0.75%条件下水解3h。所制备的复合抗氧化肽属于优质蛋白源,具有热稳定性,在中性及碱性环境中稳定,但不耐受酸性(pH 3~5),4℃贮存和反复冻融的加工条件。因此,在食品加工过程中,应该尽量避免使用酸性及低温贮藏环境。本实验采用的两步水解法既降低了商品酶制剂的用量,又保证了产物复合抗氧化肽的营养价值和抗氧化活性,为生物活性肽的制备、工业化生产及推

广应用提供了新的方法。

参考文献:

- [1] GUO Y T, WANG K, WU B G, et al. Production of ACE inhibitory peptides from corn germ meal by an enzymatic membrane reactor with a novel gradient diafiltration feeding working - mode and in vivo evaluation of antihypertensive effect[J/OL]. J Funct Foods, 2020, 64: 103584[2020 - 06 - 19]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464619305080>.
- [2] MA Z L, ZHANG W J, YU G C, et al. The primary structure identification of a corn peptide facilitating alcohol metabolism by HPLC - MS/MS[J]. Peptides, 2012, 37(1): 138 - 143.
- [3] JIN D X, LIU X L, ZHENG X Q, et al. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides[J]. Food Chem, 2016, 204: 427 - 436.
- [4] MOCHIZUKI M, SHIGEMURA H, HASEGAWA N. Anti - inflammatory effect of enzymatic hydrolysate of corn gluten in an experimental model of colitis[J]. J Pharm Pharmacol, 2010, 62(3): 389 - 392.
- [5] GUO D J, ZHANG Y, ZHAO J J, et al. Selenium - biofortified corn peptides: attenuating concanavalin A - induced liver injury and structure characterization[J]. J Trace Elem Med Biol, 2019, 51: 57 - 64.
- [6] LIANG Q, CHALAMAIAH M, REN X, et al. Identification of new anti - inflammatory peptides from zein hydrolysate after simulated gastrointestinal digestion and transport in Caco - 2 cells[J]. J Agric Food Chem, 2018, 66(5): 1114 - 1120.
- [7] GIOIA L D, CUQ B, GUILBERT S. Effect of hydrophilic plasticizers on thermomechanical properties of corn gluten meal[J]. Cereal Chem, 1998, 75(4): 514 - 519.
- [8] TRAN P H L, DUAN W, LE B J, et al. The use of zein in the controlled release of poorly water - soluble drugs[J]. Int J Pharm, 2019, 566: 557 - 564.
- [9] JIANG Y, ZHANG M D, LIN S Y, et al. Contribution of specific amino acid and secondary structure to the antioxidant property of corn gluten proteins[J]. Food Res Int, 2018, 105: 836 - 844.
- [10] 何慧, 谢笔均, 杨卓. 大豆蛋白和玉米蛋白酶解及其活性研究[J]. 粮油食品科技, 2002, 10(1): 14 - 16.
- [11] 王进, 何慧, 隋玉杰, 等. 玉米肽、大豆肽及其复配肽的降血压活性比较[J]. 中国粮油学报, 2007, 20(1): 45 - 47, 72.
- [12] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994: 160 - 168.
- [13] JENS A N. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. London: Elsevier, 1986: 122 - 144.
- [14] WANG X J, ZHENG X Q, KOPPARAPU N K, et al. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate[J]. Process Biochem,

- 2014, 49(9): 1562 - 1569.
- [15] ZHENG X Q, LI L T, LIU X L, et al. Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 73(4): 763 - 770.
- [16] 刘素稳. 马铃薯蛋白质营养价值评价及功能性质的研究[D]. 天津:天津科技大学, 2008.
- [17] KONG B, XIONG Y L. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(16): 6059 - 6068.
- [18] ZHENG Z J, SI D Y, AHMAD B, et al. A novel antioxidative peptide derived from chicken blood corpuscle hydrolysate[J]. Food Res Int, 2018, 106: 410 - 419.
- [19] PHONGTHAI S, D'AMICO S, SCHOENLECHER R, et al. Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by in vitro gastrointestinal digestion[J]. Food Chem, 2018, 240: 156 - 164.
- [20] 徐飞, 成向荣, 施用晖, 等. 双酶水解玉米醇溶蛋白制备抗氧化肽的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2015, 37(11): 218 - 227.
- [21] LI Y Y, KONG B H, LIU Q, et al. Improvement of the emulsifying and oxidative stability of myofibrillar protein prepared oil - in - water emulsions by addition of zein hydrolysates [J]. Process Biochem, 2017, 53: 116 - 124.
- [22] JIN J E, AHN C B, JE J Y. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed ark shell (*Scapharca subcrenata*) [J]. Process Biochem, 2018, 72: 170 - 176.
- [23] BERNARDINI R D, HARNEDY P, BOLTON D, et al. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by - products [J]. Food Chem, 2011, 124: 1296 - 1307.
- [24] CREUSOT N, GRUPPEN H. Enzyme - induced aggregation and gelation of proteins [J]. Biotechnol Adv, 2007, 25: 597 - 601.
- [25] XIA Y C, BAMDAD F, GÄNZLE M, et al. Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis [J]. Food Chem, 2012, 134(3): 1509 - 1518.
- [26] BAMDAD F, WU J, CHEN L. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein [J/OL]. J Cereal Sci, 2011, 54: 20 - 28.
- [27] ZAYAS J F. Functionality of proteins in food [M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 1997: 1 - 5.
- [28] SHI L F, HAO G X, CHEN J, et al. Nutritional evaluation of Japanese abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) muscle: mineral content, amino acid profile and protein digestibility [J/OL]. Food Res Int, 2020, 129: 108876 [2020 - 04 - 19]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996919307628>.
- [29] 胡国宏, 刘英. 利用必需氨基酸指数(EAAI)评价鱼饲料蛋白源[J]. 中国饲料, 1995(15): 29 - 31.
- (上接第33页)
- [11] BAHAROM Z, IDRIS M I, LEE T C, et al. Effects of surfactant concentration on microencapsulated waste vegetable oil [EB/OL]. [2020 - 03 - 25]. <https://doi.org/10.1063/1.5089404>.
- [12] ROJAS V M, DA COSTA BAPTISTA MARCONI L F, GUIMARÃES - INÁCIO A, et al. Formulation of mayonnaises containing PUFAs by the addition of microencapsulated chia seeds, pumpkin seeds and baru oils [J]. Food Chem, 2019, 274: 220 - 227.
- [13] CARVALHO G R, DE BARROS FERNANDES R V, DE CASTRO E SILVA P, et al. Influence of modified starches as wall materials on the properties of spray - dried lemongrass oil [J]. J Food Sci Technol, 2019, 56(11): 4972 - 4981.
- [14] ZHANG S, CHEN J, YIN X, et al. Microencapsulation of tea tree oil by spray - drying with methyl cellulose as the emulsifier and wall material together with chitosan/alginate [J/OL]. J Appl Polym Sci, 2017, 134(13): 44662 [2020 - 04 - 01]. <https://doi.org/10.1002/app.44662>.
- [15] LEE W J, TAN C P, SULAIMAN R, et al. Microencapsulation of red palm oil as an oil - in - water emulsion with supercritical carbon dioxide solution - enhanced dispersion [J]. J Food Eng, 2018, 222: 100 - 109.
- [16] ZHENG H, MAO L, YANG J, et al. Effect of oil content and emulsifier type on the properties and antioxidant activity of sea buckthorn oil - in - water emulsions [J/OL]. J Food Quality, 2020, 2020: 1540925 [2020 - 04 - 01]. <https://www.hindawi.com/journals/jfq/2020/1540925>.
- [17] 白静, 冯彩霞, 赵琳, 等. 乳液稳定性不同检测方法的应用 [J]. 当代化工, 2011(10): 1095 - 1097.
- [18] 邝婉湄, 赵谋明, 赵强忠. 单甘酯对酪蛋白乳浊液稳定性的影响 [J]. 食品工业科技, 2012(16): 131 - 133, 137.
- [19] MCBAIN J W, MARTIN H E. XCII. - Studies of the constitution of soap solutions: the alkalinity and degree of hydrolysis of soap solutions [J]. J Chem Soc, Trans, 1914, 105: 957 - 977.
- [20] 杨立志, 赵琳, 罗根祥. 浊度比法测定乳化蜡稳定性研究 [J]. 石油炼制与化工, 2011(8): 93 - 96.