

油料蛋白

芝麻多肽的特性及其抗氧化活性对 乳酸菌生长影响的研究

钱森和, 杨超英, 薛正莲, 魏明, 刘艳, 赵世光

(安徽工程大学生物与化学工程学院, 微生物制药产业共性研究院, 安徽芜湖 241000)

摘要:通过超声波辅助酶法制备芝麻多肽,在分析芝麻多肽的氨基酸组成、相对分子质量分布及抗氧化活性的基础上,研究芝麻多肽抗氧化活性对乳酸菌生长的影响。结果表明:芝麻多肽中谷氨酸、精氨酸、异亮氨酸和亮氨酸的含量较高;其相对分子质量分布主要集中在600~800之间;芝麻多肽羟自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率和ABTS自由基清除率分别为74.65%、62.41%和66.8%;添加1.0 mg/mL的芝麻多肽能够明显促进乳酸菌的生长,提高乳酸菌的活菌数和乳酸的生成量;相关分析表明,乳酸菌活菌数与芝麻多肽超氧阴离子自由基清除率和ABTS自由基清除率的相关系数分别为0.88和0.81;乳酸含量与芝麻多肽羟自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率、ABTS自由基清除率的相关系数分别为0.82、0.89和0.83。可见,芝麻多肽抗氧化活性对乳酸菌生长具有一定的影响。

关键词:芝麻;多肽;抗氧化活性;乳酸菌

中图分类号:TS207;Q517

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)10-0041-05

Characteristics of sesame polypeptide and effects of its antioxidant activity on growth of lactic acid bacteria

QIAN Senhe, YANG Chaoying, XUE Zhenglian, WEI Ming,
LIU Yan, ZHAO Shiguang(Research Institute of Microbial Pharmaceutical Industry, Department of Biochemistry,
Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, Anhui, China)

Abstract: Sesame polypeptide was prepared by ultrasound-assisted enzymatic method. By analyzing the amino acid composition, relative molecular weight distribution and antioxidant activity of sesame polypeptide, the effects of antioxidant activity of sesame polypeptide on the growth of lactic acid bacteria were studied. The results showed that the contents of glutamic acid, arginine, isoleucine and leucine in sesame polypeptide were higher. The relative molecular weight distribution was mainly between 600 and 800. The hydroxyl radical scavenging rate, superoxide anion scavenging rate and ABTS free radical scavenging rate of sesame polypeptide were 74.65%, 62.41% and 66.8%, respectively. The addition of 1.0 mg/mL sesame polypeptide could promote the growth of lactic acid bacteria, increase the viable counts of lactic acid bacteria and lactic acid production. Correlation analysis showed that the correlation coefficients between the viable counts of lactic acid bacteria and the superoxide anion scavenging rate, ABTS free

收稿日期:2018-02-09

基金项目:安徽省高校自然科学基金提升计划(TSKJ2017B17);
安徽工程大学微生物制药产业共性研究院开放课题(ZYYJY
201502)

作者简介:钱森和(1978),男,副教授,博士,主要从事生物
技术和生物工程方面的研究工作(E-mail) qiansenhe@163.
com。

radical scavenging rate of sesame polypeptide were 0.88 and 0.81 respectively. The correlation coefficients between the lactic acid content and the hydroxyl radical scavenging rate, superoxide anion scavenging rate and ABTS free radical scavenging rate of sesame polypeptide were 0.82, 0.89 and 0.83, respectively. Therefore, the an-

tioxidant activity of sesame polypeptide had certain effect on the growth of lactic acid bacteria.

Key words: sesame; polypeptide; antioxidant activity; lactic acid bacteria

芝麻多肽是由芝麻蛋白经蛋白酶消化后获得的短链氨基酸化合物,由2~50个氨基酸组成,与游离氨基酸相比,多肽具有多种生物学活性,如抗氧化、抗血栓形成、抗高血压、免疫调节、抗肿瘤、促进矿物质吸收等^[1-3]。其中,抗氧化作用是多肽的一种重要的生理活性,具有清除机体自由基、抑制脂质过氧化以及提高抗氧化酶活性的能力^[4-5]。研究表明,芝麻多肽能有效抑制猪油的氧化,0.02%的芝麻多肽能使猪油过氧化值从126.6 mmol/kg降低至45.5 mmol/kg^[6];灌胃芝麻三肽和四肽,能够降低小鼠血清和肝脏中丙二醛含量,提高肝脏中超氧化物歧化酶活性和谷胱甘肽过氧化物酶活性^[7]。

乳酸菌作为世界公认安全的食用细菌(General regard as safety, GRAS),其生长代谢过程中产生的各种有机酸、胞外多糖、乳酸菌素等不仅对乳制品的品质有着重要影响^[8-9],而且对提高乳制品的感官特性及营养价值、延长货架期等方面具有重要作用^[10-11]。然而,乳酸菌对蛋白的水解能力有限,需要补充多种外源的营养物质和生长因子促进其生长^[12]。另外,乳酸菌是一种兼氧厌氧微生物,其抗氧胁迫能力较差,在实际培养过程中,很难做到绝对厌氧,环境中存在的活性氧以及菌株自身代谢过程中产生的活性氧,严重威胁菌株的生长^[13]。研究表明,植物蛋白经水解后产生的多肽能够促进乳酸菌的生长^[14-16],而有关多肽本身具有的抗氧化活性与乳酸菌生长之间的关系目前还不清楚。因此,本文在制备芝麻多肽的基础上,研究芝麻多肽抗氧化活性对乳酸菌生长的影响,为蛋白质类多肽在乳制品发酵中的广泛应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

乳酸菌菌种:保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌,安徽工程大学生物技术实验室;芝麻粕:安徽华安食品有限公司提供;牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖、硫酸镁、乙酸钠、吐温80、柠檬酸三胺、磷酸氢二钾、邻二氮菲、苯酚、3,5-二硝基水杨酸、碱性水解酶、铁氰化钾、三氯乙酸、邻苯三酚等,分析纯。

FW100微型高速粉碎机,JY92-2D型超声波细胞粉碎机,TGL-16G高速冷冻离心机,PHS-25酸度计,TA-214电子天平,TU-1800紫外可见分光光度计,GHP-9050隔水式恒温培养箱。

1.2 试验方法

1.2.1 芝麻多肽的制备

称取50 g芝麻粕,研磨破碎后,用0.1 mol/L NaOH溶液在40℃恒温水浴搅拌提取1 h,高速离心机离心后,取上清液为芝麻蛋白液。取一定量的芝麻蛋白液,在超声功率210 W、超声温度52℃下超声预处理15 min。之后采用2%碱性蛋白酶,在pH 8.0、酶解温度40℃条件下酶解2 h。反应结束后沸水浴灭酶,高速离心后收集上清液为芝麻多肽溶液^[17]。

1.2.2 芝麻多肽氨基酸组成与含量测定

取1 mL芝麻多肽溶液,加入2 mL三氯乙酸沉淀蛋白后离心,经0.22 μm膜过滤后采用HPLC法进行氨基酸组成及含量的测定。

1.2.3 芝麻多肽相对分子质量测定

取1 mL芝麻多肽溶液的超滤液(截留相对分子质量大于1 000),利用Sephadex G-25进行分离,以蒸馏水为洗脱液,洗脱速度为40 mL/h,采用自动部分收集器收集洗脱液(3 mL/管),在214 nm处检测流出液。以辅酶I、核黄素、谷胱甘肽为标准相对分子质量参照物,计算芝麻多肽相对分子质量。

1.2.4 芝麻多肽抗氧化活性测定

分别配制0.125、0.25、0.50、1.0 mg/mL和1.5 mg/mL的芝麻多肽溶液,并分别测定其羟自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率和ABTS自由基清除率。每个处理均做3次重复。

羟自由基清除率测定:采用邻二氮菲-Fe氧化法^[18]检测羟自由基清除率。

超氧阴离子自由基清除率测定:采用邻苯三酚法^[19]测定超氧阴离子自由基清除率。

ABTS自由基清除率测定:参照文献^[20]进行。

1.2.5 芝麻多肽对乳酸菌生长的影响

在MRS培养基中分别添加0.125、0.25、0.50、1.0 mg/mL和1.5 mg/mL的芝麻多肽溶液,以添加去离子水为空白对照,在高压灭菌锅中121℃灭菌20 min,待其冷却后放在无菌操作台中紫外杀菌30 min,然后向其中接入2%的保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌(1:1),置于40℃恒温培养箱培养。从0 h开始,每隔3 h测定菌液OD₆₀₀值,绘制乳酸菌生长曲线。

1.2.6 乳酸菌活菌数计算

将培养30 h菌液充分混匀,采用10倍稀释法

稀释至适当稀释度,然后于 37℃ 培养 48 h 后观察记录菌落数,试验设置 3 次重复。

1.2.7 乳酸含量测定

取一定量培养 30 h 的菌液于 8 000 r/min 下离心 15 min,取上清,采用对羟基联苯法^[21]测定发酵液中乳酸含量,试验设置 3 次重复。

1.2.8 数据处理

采用 Excel 2010 软件进行数据整理作图,用 SAS

9.1 统计分析软件进行差异显著性分析和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 芝麻多肽的基本特征分析

图 1 为芝麻多肽的氨基酸组成。由图 1 可以看出,芝麻多肽中共检出 13 种氨基酸,其中 7 种为必需氨基酸(色氨酸除外)。另外,谷氨酸(Glu)、精氨酸(Arg)、异亮氨酸(Ile)和亮氨酸(Leu)的含量较高,分别为 1.52、0.72、1.60、0.60 mg/mL,而其他氨基酸含量相对较低。



图 1 芝麻多肽的氨基酸组成

采用 Sephadex G-25 分离芝麻多肽溶液,得到相对分子质量不同的 3 个峰。根据标准曲线和出峰管数推测出其相对分子质量分布主要集中在 600 ~ 800 之间;采用面积归一化法对不同肽的含量进行定量分析,其芝麻多肽含量分别为 20.6%、28.4% 和 36.7% (见表 1)。

表 1 芝麻多肽相对分子质量分布

产物	平均相对分子质量	多肽含量/%
峰 1	786	20.6
峰 2	712	28.4
峰 3	645	36.7

2.2 芝麻多肽的体外抗氧化活性

图 2 为芝麻多肽的羟自由基清除率。由图 2 可以看出,芝麻多肽对羟自由基具有明显的清除能力;当芝麻多肽质量浓度在 0 ~ 0.25 mg/mL 之间,清除率随着多肽质量浓度的增加而迅速增加,当芝麻多肽质量浓度大于 0.25 mg/mL 时,其羟自由基清除率增幅不明显。在试验浓度范围内,芝麻多肽对羟自由基的最大清除率为 74.65%,低于对照(V_c)的清除率(85.35%)。

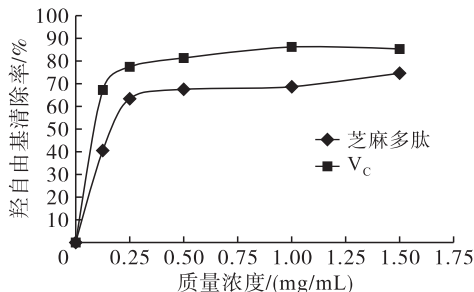


图 2 芝麻多肽对羟自由基的清除率

芝麻多肽对超氧阴离子自由基的清除率见图 3。由图 3 可以看出,当芝麻多肽质量浓度在 0 ~ 0.5 mg/mL 之间,随着多肽质量浓度的增加,其对超氧阴离子自由基的清除率明显增加;当多肽质量浓度大于 0.5 mg/mL,其超氧阴离子自由基清除率增幅不大。当芝麻多肽质量为 1.5 mg/mL 时,其超氧阴离子自由基清除率(62.41%)与 V_c (65.02%) 相当。由此可见,芝麻多肽对超氧阴离子自由基具有很好的清除作用。

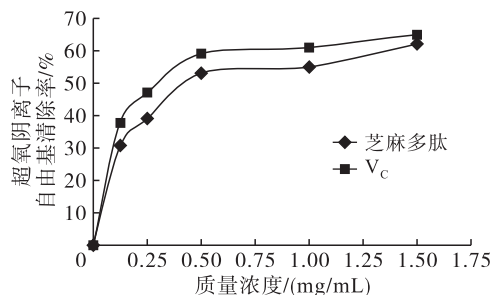


图 3 芝麻多肽对超氧阴离子自由基的清除率

芝麻多肽对 ABTS 自由基的清除率如图 4 所示。由图 4 可以看出,芝麻多肽对 ABTS 自由基清除率虽然低于 V_c ,但仍具有明显的 ABTS 自由基清除能力,其对 ABTS 自由基最大清除率为 66.8%。当多肽质量浓度在 0 ~ 0.5 mg/mL 之间时,其对 ABTS 自由基清除能力随着多肽质量分数的增加而迅速增强;多肽质量浓度大于 0.5 mg/mL 时,其自由基清除能力增幅较小。

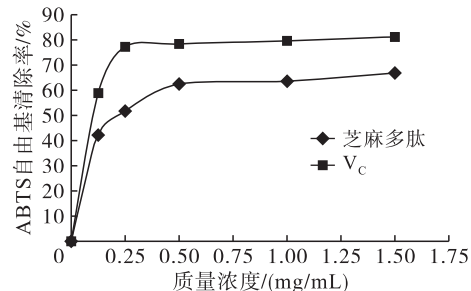


图 4 芝麻多肽对 ABTS 自由基的清除率

2.3 芝麻多肽对乳酸菌生长的影响

研究了 4 种芝麻多肽质量浓度对乳酸菌生长的影响,其乳酸菌生长曲线如图 5 所示。由图 5 可以

看出,添加适量质量浓度的芝麻多肽能够促进乳酸菌生长。在0~9 h,乳酸菌生长较为缓慢,在9~21 h,乳酸菌进入对数生长期。与对照相比,芝麻多肽可以缩短乳酸菌生长的延迟期,使其提前进入对数生长期,从而提高菌体的生长速率。在乳酸菌生长的整个过程中,随着芝麻多肽质量浓度的增加,乳酸菌的生长速率逐渐增加;但当芝麻多肽质量浓度为1.5 mg/mL时,其对乳酸菌生长的影响与质量浓度1.0 mg/mL的芝麻多肽相差不大。因此,在乳酸菌生长过程中添加1.0 mg/mL的芝麻多肽较为适宜。

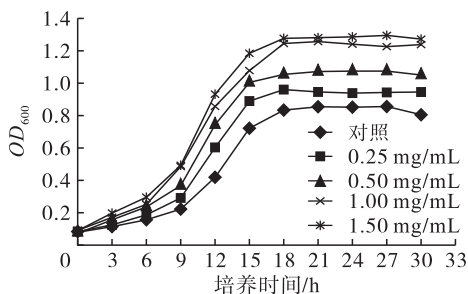


图5 芝麻多肽对乳酸菌生长的影响

2.4 芝麻多肽对乳酸菌活菌数的影响

图6为芝麻多肽对乳酸菌活菌数的影响。由图6可以看出,芝麻多肽对乳酸菌的活菌数具有重要的影响,随着芝麻多肽质量浓度的增加,乳酸菌活菌数逐渐增加;当芝麻多肽质量浓度为1.0 mg/mL时,活菌数达到最大值。另外,添加0.5、1.0 mg/mL和1.5 mg/mL芝麻多肽的乳酸菌活菌数显著高于对照组($P=0.012, 0.014, 0.014$)。

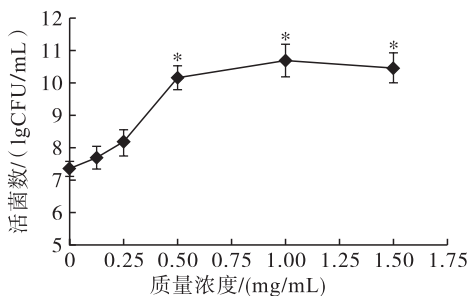


图6 芝麻多肽对乳酸菌活菌数的影响

2.5 芝麻多肽对乳酸菌产乳酸的影响

图7为芝麻多肽对乳酸菌产乳酸的影响。

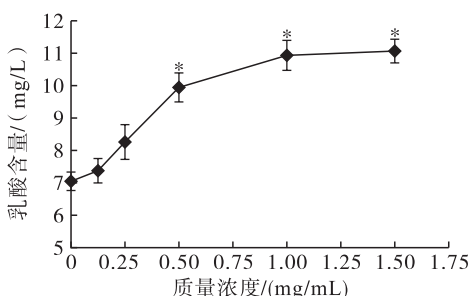


图7 芝麻多肽对乳酸菌产乳酸的影响

由图7可以看出,芝麻多肽能够促进乳酸菌产生乳酸,随着芝麻多肽添加量的增大,乳酸含量也逐渐增加。当添加的芝麻多肽质量浓度为0.5、1.0 mg/mL和1.5 mg/mL时,其乳酸含量显著高于对照组($P=0.040, 0.023, 0.019$)。

2.6 芝麻多肽抗氧化活性与乳酸菌生长的相关性

芝麻多肽抗氧化活性与乳酸菌生长的相关性见表2。由表2可以看出,芝麻多肽抗氧化活性对乳酸菌的生长具有重要影响。乳酸菌活菌数与超氧阴离子自由基和ABTS自由基清除率呈显著正相关,其相关系数分别为0.88和0.81;乳酸含量与羟自由基、超氧阴离子自由基、ABTS自由基清除率均呈显著正相关,其相关系数分别为0.82、0.89和0.83。

表2 芝麻多肽抗氧化活性与乳酸菌生长的相关性

项目	羟自由基清除率	超氧阴离子自由基清除率	ABTS自由基清除率
活菌数	0.79	0.88 *	0.81 *
乳酸含量	0.82 *	0.89 *	0.83 *

注: *表示5%显著水平。

3 结论

研究表明,通过超声波辅助酶法制备的芝麻多肽具有较高的谷氨酸、精氨酸、异亮氨酸和亮氨酸含量;其相对分子质量分布主要集中在600~800之间。芝麻多肽具有一定的羟自由基清除率、超氧阴离子自由基清除率和ABTS自由基清除率。乳酸菌活菌数与超氧阴离子自由基和ABTS自由基的清除率均呈显著正相关;乳酸含量与3种自由基清除率均呈显著正相关。表明芝麻多肽能够促进乳酸菌的生长、提高乳酸的生成量,并与其抗氧化活性有关。

参考文献:

- [1] MEISEL H, FITZGERALD R J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects [J]. Curr Pharm Design, 2003, 9 (16): 1289 - 1296.
- [2] LOÓPEZFANDINÑO R, OTTE J, VAN CAMP J. Physiological, chemical and technological aspects of milk - protein - derived peptides with antihypertensive and ACE - inhibitory activity [J]. Int Dairy J, 2006, 16(11): 1277 - 1293.
- [3] 彭惠惠, 李吕木, 钱坤, 等. 发酵芝麻粕中芝麻小肽的分离纯化及其体外抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2013, 34(9): 66 - 69.
- [4] 张晖, 唐文婷, 王立, 等. 抗氧化肽的构效关系研究进展 [J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(7): 673 - 679.
- [5] 王芳, 丁红军, 段玉峰, 等. 芝麻蛋白酶解物的抗氧化

- 活性研究[J]. 中国油脂, 2009, 34(4):27-30.
- [6] 邵元龙, 董英. 芝麻蛋白水解工艺优化及芝麻多肽组分抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(1):69-73.
- [7] 李旻, 张莉, 陈文帮, 等. 发酵芝麻粕小肽体内抗氧化和免疫活性[J]. 食品科学, 2014, 35(19):251-254.
- [8] STALL S. Considering greek yogurt for chronic kidney disease[J]. J Renal Nutr, 2012, 22(6):57-62.
- [9] ZHANG X, ZHAO Y, ZHANG M, et al. Structural changes of gut microbiota during berberine-mediated prevention of obesity and insulin resistance in high-fat diet-fed rats[J]. Plos One, 2012, 7(8):425-429.
- [10] SOLIERI L, BIANCHI A, MOTTOLESE G, et al. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by in vitro screening and principal component analysis [J]. Food Microbiol, 2014, 38(4):240-249.
- [11] MAJCHRZAK D, LAHM B, DÜRRSCHMID K. Conventional and probiotic yogurts differ in sensory properties but not in consumers' preferences[J]. J Sens Stud, 2010, 25(3):431-446.
- [12] HAYEK S A, IBRAHIM S A. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review[J]. Food Nutr Sci, 2013, 4(11):73-87.
- [13] 付龙云. 乳酸菌抗氧胁迫及有氧生长的研究[D]. 济南:山东大学, 2013.
- [14] 韦慧娟, 陈树兴, 李丽丽, 等. 乳清蛋白水解物对乳酸菌生长影响的研究综述[J]. 农产品加工(学刊), 2013(7):43-45.
- [15] ZHANG Q, REN J, ZHAO M, et al. Isolation and characterization of three novel peptides from casein hydrolysates that stimulate the growth of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(13):7045-7053.
- [16] 谭允冰, 赵强忠. 大豆蛋白酶解产物对不同发酵剂酸奶品质的影响[J]. 现代食品科技, 2017, 33(8):103-109.
- [17] 钱森和, 葛言顺, 赵世光, 等. 超声波预处理芝麻粕制备芝麻多肽的研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(11):105-108.
- [18] CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI F, et al. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(1):49-53.
- [19] 劳斐, 孔令明, 李芳, 等. 响应面法优化杏仁蛋白酶解工艺及其抗氧化活性研究[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(3):54-59.
- [20] LI X, LIN J, GAO Y, et al. Antioxidant activity and mechanism of *Rhizoma Cimicifugae* [J]. Chem Cent J, 2012, 6(1):1-10.
- [21] 梁琼, 鲁明波, 卢正东, 等. 对羟基联苯法定量测定发酵液中的乳酸[J]. 食品科学, 2008, 29(6):357-360.
-
- (上接第40页)
- [7] LI C, XUE H, CHEN Z, et al. Comparative studies on the physicochemical properties of peanut protein isolate-poly-saccharide conjugates prepared by ultrasonic treatment or classical heating[J]. Food Res Int, 2014, 57:1-7.
- [8] 林伟静, 刘红芝, 刘丽, 等. 不同类糖接枝改性对花生蛋白膜物理性质的影响[J]. 农业工程学报, 2014, 30(11):261-267.
- [9] 赵冠里. 酶解与多糖接枝改性花生蛋白及其构效机理研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2012.
- [10] 管军军. 微波合成大豆蛋白-糖接物机理、结构及功能性[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2005.
- [11] BRANDS C M J, WEDZICHA B L, VAN BOEKEL M A J S. Quantification of melanoidin concentration in sugar-casein systems[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50:1178-1183.
- [12] CHEVALIER F, HOBERT J M, POPINEAU Y, et al. Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar[J]. Int Dairy J, 2001(11):145-152.
- [13] SHEPHERD R, ROBERTSON A, OFMAN D. Dairy glycoconjugate emulsifiers casein-maltodextrins [J]. Food Hydrocoll, 2000, 14:281-286.
- [14] HE S D, SHI J, WALIDA E, et al. Reverse micellar extraction of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*): optimisation of extraction conditions by response surface methodology [J]. Food Chem, 2015, 166(1):93-100.
- [15] JUAN C, XIONG Y L, SUAREZ R. Rheological properties of mixed muscle/nonmuscle protein emulsions treated with transglutaminase at two ionic strengths [J]. Int J Food Sci Tech, 2003, 38:777-785.
- [16] WU H L, WANG Z Q, HAN C, et al. Factors affecting the maillard reaction[J]. Modern Food Sci Tech, 2010, 26(5):440-444.
- [17] 赵卓, 袁媛, 肖志刚, 等. 超声辅助合成玉米醇溶蛋白-糖接枝物的研究[J]. 农产品加工, 2016(4):1-5.
- [18] WIHODO M, MORARU C I. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: a review [J]. J Food Eng, 2013, 114(3):292-302.