

燕麦麸皮蛋白 在不同蛋白酶作用下的水解研究

冯冰, 王昌涛, 雷芳, 董银卯*

(北京工商大学北京市植物资源研究开发重点实验室, 北京 100037)

摘要:以燕麦麸皮为原料,研究了燕麦麸皮中蛋白质在Akalase酶和Protamex酶的作用下的水解,测定了其在不同水解时间下的水解产物的分子量,并对燕麦麸皮水解产物去除羟自由基能力进行了初步测定。结果表明,用Akalase酶和Protamex酶水解燕麦麸皮,水解时间越长,水解产物分子量越小。在同样的水解条件下,Protamex酶水解产物的分子量大于Akalase酶水解产物的分子量,而且Protamex酶水解产物去除羟自由基能力大于Akalase酶的水解产物。本实验为燕麦麸皮水解产物应用于食品提供了一定的理论基础。

关键词:燕麦麸皮,酶解,凝胶色谱,羟自由基

Abstract Using oat bran as raw material, the protein hydrolyzed by the Akalase and Protamex was studied, and then the molecular weight of hydrolysate and its ability of eliminated hydroxyl radical were determined. The results showed that the molecular weight of oat peptide was decreasing with time growing by gel chromatography. The molecular weight of hydrolysate by Protamex was higher than hydrolyzed by Akalase, and also eliminated hydroxyl radical ability of hydrolysate by Protamex was better than hydrolyzed by Akalase. This research provided primary theory basis for hydrolyzed of oats bran using in food.

Key words oat bran, enzymatic hydrolysis, gel chromatography, hydroxyl radical

中图分类号: TS201.2⁺ 1 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2007)10-0120-03

近年来,研究发现植物蛋白质酶解产物中的一些短肽除营养功能以外,还具有广泛的生理调节功能,如降血压,降低胆固醇,促进免疫以及促进营养物质的消化吸收,且其在体内的消化吸收性能明显优于单个氨基酸。可以促进钙吸收的酪蛋白磷酸

肽、降血压肽、免疫促进肽等多种具有生物活性的功能肽引起了人们的高度关注,成为生物活性肽研究领域最引人注目的方向之一^[1,2]。大豆、玉米等常见粮食作物被人研究的较多,其活性肽的制备及其生理功效已经被人们了解^[3,4]。而作为人类八大粮食作物之一的燕麦,尽管早被医学专家和营养专家证明具有降低机体胆固醇等生理功效,但研究较多的主要是燕麦中的 β -葡聚糖,对于燕麦蛋白质水解后的产物——燕麦活性肽却少有文献可查,因此关于燕麦肽的性质和功效的研究无疑会成为今后研究的新热点^[5,6]。本文研究了燕麦麸皮在不同蛋白酶作用下水解产物分子量的分布,并对水解产物清除羟自由基能力进行了初步研究,为进一步开发燕麦肽奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

燕麦麸皮 20~60目筛,作为水解原料;牛血清蛋白、氧化性谷胱甘肽、Sephadex G-15 Fine、牛胰岛素、维生素B₁₂ 北京拜尔迪生物公司;碱性蛋白酶(Akalase酶)、复合蛋白酶(Protamex酶)Novozymes公司。

DSHZ—300多用途水浴恒温振荡器 江苏太仓实验设备厂;DHL—A电脑恒流泵、HD—2核酸蛋白检测仪、DBS—100电脑全自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂有限公司;3057型便携式记录仪 重庆川仪总厂有限公司执行器记录仪分公司;752 PC紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司。

1.2 Akalase酶和 Protamex酶水解工艺

料液比为1:10即称取10g燕麦麸皮,量100mL蒸馏水,加入250mL的锥形瓶中。将燕麦麸皮液调至酶水解合适pH,在55℃摇床转速200r/min预处理1h,之后加入5%的Akalase酶(Protamex酶)水解,使之在摇床中反应一定时间后,在8000r/min的条件下离心15min,所得上清液即为燕麦麸皮的水解液。

1.3 燕麦肽分子量的测定方法

采用凝胶色谱分析法测燕麦肽的分子量, 选择可分离范围在 1000~ 5000的葡聚糖凝胶 Sephadex G-25F in e 分别取水解一定时间的燕麦水解液 5mL, 以 0.8mL /m in 的洗脱速度洗脱并按每管 5m in 收集洗脱液, 洗脱液为磷酸缓冲液 (pH 7.8)。用紫外分光光度计逐管测定其吸光度 A_{280} , 并确定各水解液的洗脱峰最高点, 然后量出其洗脱体积。

1.4 燕麦麸皮水解产物清除羟自由基能力测定
采用结晶紫法^[7]。

2 结果与讨论

2.1 凝胶色谱分子量标准曲线的制作

将已知分子量的标准品物质牛血清白蛋白、牛胰岛素、氧化型谷胱甘肽及维生素 B₁₂ 分别配成 1% 的溶液, 经微孔滤膜过滤后分别进样 3mL, 分子量与洗脱体积见表 1。

表 1 标准物质的分子量与洗脱体积

	牛血清白蛋白	牛胰岛素	维生素 B ₁₂	氧化型谷胱甘肽
分子量 (Da)	67000	5700	1335	614
分子量的对数	4.826	3.756	3.125	2.788
洗脱体积 (mL)	78	114	136.5	145.5

以分子量的对数为纵坐标, 洗脱体积为横坐标, 做出标准曲线如图 1 所示。

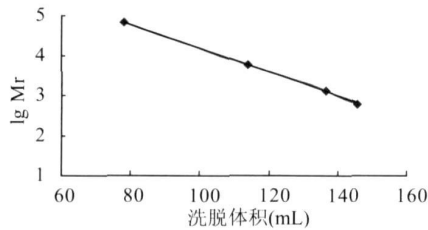


图 1 分子量对数与洗脱体积关系图

采用最小二乘法, 求出直线的回归方程为:
 $Y = -0.0298X + 7.1547$, 其回归系数 $R = 0.999$ 。
式中 X 代表洗脱体积, Y 代表分子量对数。采用该回归方程可以根据某物质的洗脱体积估算出该物质的分子量。

2.2 Alcalase 酶水解燕麦麸皮产物的凝胶色谱分析
分别对燕麦 Alcalase 酶水解 1、2、3h 的水解物进行 G-25 凝胶分离, 洗脱曲线见图 2。

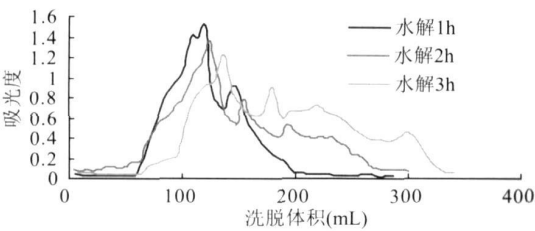


图 2 Alcalase 酶水解不同时间的凝胶洗脱图谱

图 2 表明, Alcalase 碱性蛋白酶作用不同时间后, 都出现洗脱高峰, 说明得到的水解产物分子量相对集中。随着水解时间的延长, 水解产物的吸光度的高峰出现的越来越晚, 且吸光度的最大值也逐渐

减小, 说明水解时间越长, 水解所得多肽的分子量就越小, 且洗脱高峰也逐渐降低。从图中还可以看出, 水解产物还有一个较小的洗脱高峰, 且水解时间越长的物质, 洗脱体积在 200mL 以上的吸收峰面积占的比例越大, 这说明水解时间越长所得的小分子量的物质越多, 也越难被分离。也证明了随着水解时间增加, 后面出现小分子量洗脱高峰, 所以随着时间增加, 前面大的洗脱逐渐降低。

从图中还可以得出一个结论, 水解所得的多肽分子是连续分布的, 即水解物存在着各种分子量大小不等的肽分子。从总体上看, Alcalase 碱性蛋白酶水解的产物, 分子量分布较为集中, 在水解 3h 以内, 水解物中多肽主要分布在洗脱体积 100~ 200mL 之间, 说明多肽的分子量的范围均在 5000Da 以下。

2.3 Protamex 酶水解燕麦麸皮产物的凝胶色谱分析

分别对燕麦 Protamex 酶水解 1、2、3h 的水解物进行 G-25 凝胶分离, 洗脱图见图 3。

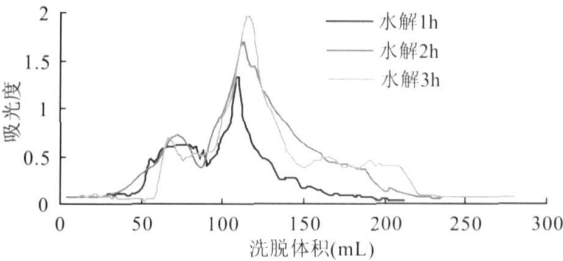


图 3 Protamex 酶水解不同时间的凝胶洗脱图谱

由图 3 可知, Protamex 酶水解燕麦所得的产物中多肽分子也是连续分布的, 该酶水解的产物分子量分布较为集中, 这点与 Alcalase 碱性蛋白酶作用所得的产物的洗脱图谱相同。不同水解时间的产物的洗脱高峰随时间先后依次到来, 说明水解物的分子量也在逐渐减小。与 Alcalase 酶水解不同的是, 随着时间的增加, 水解产物的吸光度的高峰出现的越来越晚, 但是吸光度的最大值却逐渐增大。这可能是因为洗脱峰前面还有一个小的洗脱高峰, 随着时间延长, 分子量较大的产物继续水解, 导致洗脱峰值的增大。

由图 3 还可知, Protamex 酶的水解物中多肽主要分布在洗脱体积在 60~ 200mL 之间, 水解 3h 后, 其洗脱峰对应的分子量为 5700Da 而 Alcalase 酶水解 3h 后, 分子量在 1000Da 左右。说明水解产物中有相当一部分物质的分子量远大于 Alcalase 碱性蛋白酶水解产物的分子量。

2.4 燕麦麸皮酶解后去除羟自由基能力

分别对用 Alcalase 酶和 Protamex 酶水解不同时间所得的燕麦肽进行抗氧化性的测定, 可得每种样品的表观抗羟自由基氧化率 S 该值越大, 说明样品的抗氧化性越好。 $S(\%) = (A_s - A_b) / (A_0 - A_b) \times 100\%$, 实验结果如图 4。

由图 4 可以得出, 无论是 Alcalase 酶还是

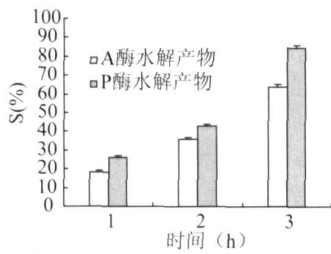


图 4 A-lactase酶和 Protamex酶水解产物清除羟自由基能力

Protamex酶作用于燕麦麸皮,都是水解时间越长的产物,清除羟自由基的能力越强。而在同样的水解时间下,总是 Protamex酶水解出的产物清除羟自由基能力更好,说明用 Protamex酶水解燕麦可以得到更多的具有清除自由基功能的多肽。这种结果的产生是由于 A-lactase酶和 Protamex酶对蛋白质具有不同的作用位点,因此产生的多肽才有不同程度的功效。

3 结论

本文对碱性蛋白酶 A-lactase 和复合蛋白酶 Protamex 水解燕麦麸皮做了初步研究,发现随着水解时间的延长,水解产物洗脱高峰逐渐延后,说明小分子的肽类逐渐增多。不同蛋白酶水解燕麦麸皮所得产物不同,Protamex酶水解的产物总是在洗脱体积为 60mL 左右有个小的洗脱高峰,然后出现大的洗脱高峰,说明产物中有些分子量较大的物质很早就被洗脱出来,而 A-lactase酶所得产物所得洗脱峰大的在前,小的在后。这是 Protamex酶和 A-lactase酶特异性作用的结果。而且水解时间越长,产物的吸光度的最高峰越大,这说明水解时间的延长使得产物中小分子的含量在增多,且分子量相对集中。

不同蛋白酶水解燕麦麸皮所得水解产物分子量有差异,而且水解产物的功能也不同,本文研究发现 A-lactase酶与 Protamex酶水解燕麦麸皮,随着时间的延长去除羟自由基能力逐渐增强。相同水解条件下,Protamex酶水解产物去除羟自由基能力强于 A-lactase

酶的水解产物。薛照辉^[8]曾对菜籽肽的制备及其生物活性做过研究,利用复合酶水解菜籽清蛋白,对菜籽肽的抗氧化活性做了研究,显示它们可以有效减弱脂质过氧化反应。汪建斌^[9]研究了大豆多肽在非油脂体系中和油脂体系中的抗氧化性,发现肽液与亚油酸体系的反应时间越长,且肽液本身的水解度越高,则肽液表现出的相对抗氧化力越强。这些研究与本文研究结果基本一致。

参考文献:

- [1] Russell J Molyneux Research opportunities for bioactive natural constituents in agriculture and food [J]. Journal of Agricultural and food Chemistry, 2002 50: 6939-6942.
- [2] Gill J, Fandino R L, Joeba X, Vullson E N. Biological active peptides and enzymatic approaches to their production [J]. Enz Microbio Technol 1996 18: 162-183.
- [3] 沈蓓英. 大豆蛋白 抗氧化性肽的研究 [J]. 中国油脂, 1996 21(26): 21-26.
- [4] 金英姿. 玉米蛋白生物活性肽的开发 [J]. 新疆师范大学学报(自然科学版), 2004, 23(2): 40-42.
- [5] Carol F Klopfenstein. The role of cereal beta- glucans in nutrition and health [J]. Cereal Foods World 1988 33(10): 865~869.
- [6] 汪海波, 谢笔钧, 刘大川. 燕麦中抗氧化成分的初步研究 [J]. 食品科学, 2003, 24(7): 62-67.
- [7] 高瞩, 姚惠源, 郭贯新. 燕麦可溶性膳食纤维降糖机理的初步探讨 [J]. 粮食与饲料工业, 2001(2): 47-48.
- [8] 郭亚力, 等. 3种分光光度法对天然抗氧化物质抗自由基性能的分析检测 [J]. 分析实验室, 2004, 23(10): 43-47.
- [9] 薛照辉. 菜籽肽的制备及其生物活性的研究 [D]. 华中农业大学博士学位论文, 2004.
- [10] 汪建斌. 大豆蛋白酶法水解产物抗氧化特性及产品的研究与开发 [D]. 中国农业大学硕士学位论文, 2002.

(上接第 119 页)

保湿剂可以有效结合配方中的水分,保持产品的柔软度、弹性、口感没有变化,使 ERH 降低,延长无霉货架期。添加 0.6%~0.8% 保湿剂可以有效控制 ERH,获得最佳无霉货架期。纳他霉素可有效抑制铜锣烧及糯米糍产品中霉菌和酵母的生长。常温贮藏条件下,浓度为 10~15mg/kg 的纳他霉素可显著抑制霉菌和酵母的滋生,延长保质期。添加保湿剂及纳他霉素不会影响产品的感官特征。

参考文献:

- [1] Owen R Fennema 食品化学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.
- [2] 杜克生. 食品生物化学 [M]. 化学工业出版社, 2002.
- [3] E B Bennion. 蛋糕加工工艺 (第六版) [M]. 2004.
- [4] Richardson T. ERH of confectionery products.
- [5] Cooper R M, Knight Equilibrium relative humidity of cakes

- [6] 李东, 等. 生物食品抗真菌剂-纳他霉素 [J]. 中国食品添加剂, 1995(4): 26-27.
- [7] 方金瑞主编. 抗生素 [M]. 北京: 科学出版社, 1988. 45-53, 93.
- [8] 凌华庭主编. 食品添加剂手册 (第三版) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 660-661.
- [9] 李东, 等. 纳他霉素的抑菌谱及最小抑菌浓度 [J]. 食品工业科技, 2004(7): 143-144.
- [10] 《化学化工大辞典》编委会, 化学工业出版社辞书编辑部. 化学化工大辞典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003. 1659.
- [11] AVIDSON P M, et al Natamycin [J]. Antimicrobial in Foods 1993(7): 395-407.
- [12] GB/T4789.15-2003. 中华人民共和国国家标准 食品卫生微生物学检验 霉菌和酵母计数 [S].
- [13] 黄伟坤等编著. 食品检验与分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 425.