

具有抗氧化活性乳清发酵物的组分分析

王 昕¹,侯聚敏¹,丛宪玲²

(1. 吉林大学 生物与农业工程学院,长春 130022;2. 吉林大学 中日联谊医院,长春 130033)

摘要:利用乳酸菌对乳清蛋白进行发酵,检测发酵物的抗氧化能力。以DPPH自由基清除率为指标,测得其对DPPH自由基清除率为66.95%,经5 kDa超滤后,分级产物对DPPH自由基的清除率提高至79%。经Tricine-SDS-PAGE电泳分析可知,具有抗氧化活性的乳清肽相对分子量小于2 kDa。对发酵产物的氨基酸分析发现,与抗氧化活性关系密切的疏水性氨基酸、芳香族氨基酸的含量占总含量的70.17%,表现出显著的抗氧化活性。同时,其营养成分丰富,富含人体所需的必需氨基酸,适宜作为功能性食品开发。

关键词:乳清蛋白;抗氧化肽;DPPH自由基;超滤;电泳;氨基酸分析

中图分类号:TS252.54 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-5497(2012)Sup. 1-0444-05

Composition analysis of the whey fermentation product with the antioxidant activity

WANG Xin¹, HOU Ju-min¹, CONG Xian-ling²

(1. College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022, China; 2. Sino-Japanese Friendship Hospital, Jilin University, Changchun 130033, China)

Abstract: Using Lactobacillus to ferment whey protein, the antioxidant capacity of the fermentation product were analyzed. For the fermentation products, the DPPH radical scavenging rate adopted as the evaluation standard of the antioxidant capacity was 66.95%. The DPPH radical scavenging rate of graded product increased to 79% after 5kDa ultrafiltration. Tricine-SDS-PAGE electrophoresis analysis showed that, the molecular weight of the whey peptides which had antioxidant activity clearly was concentrated in less than 2kDa . Amino acid analysis of fermentation products demonstrated that, the content of the hydrophobic amino acids and aromatic amino acid closely related to the antioxidant activity were more than 70.17%. At the same time, these fermented products were full of the essential amino acids, and were suitable to develop new functional food.

Key words: whey protein; antioxidant peptide; DPPH; ultrafiltration; electrophoresis; amino acid analysis

抗氧化肽属于生物活性肽的一种,具有清除有害自由基,抑制脂质过氧化的能力,可在疾病的预防和治疗,延缓机体衰老等方面发挥重要作用。

以乳蛋白为原料制备抗氧化肽在得到其抗氧化功能的同时还可获得额外的营养价值和其他功能特性^[1-2]。因此,乳源抗氧化肽及其相关功能保健食

收稿日期:2012-03-21.

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项基金项目(CARS-37);科学前沿与交叉学科创新项目(200903276).

作者简介:王昕(1970-),女,副教授,研究方向:食品生物技术. E-mail:wx@jlu.edu.cn

通信作者:丛宪玲(1967-),女,副教授,研究方向:皮肤抗衰老医学. E-mail:congxl888@hotmail.com

品的开发成为食品行业最具潜力的产业之一。乳清蛋白因所含氨基酸的种类全、质量高而被誉为最佳蛋白^[3]。乳清作为干酪生产中的副产物, 产量巨大。若能将乳清中的蛋白成分加以充分利用制备乳清活性肽, 不仅可变废为宝, 减少环境污染, 同时还可提高乳品的附加价值, 赋予产品更高的健康效益和经济效益。乳酸菌一直被公认为最安全的微生物而长期用于多种发酵食品工业^[4]。此外它还能保持肠内微生物菌群生态平衡, 改善肠道菌群结构, 具有保健效果^[5]。因此, 利用乳酸菌发酵乳清蛋白制备具有生物活性的多肽对于功能性食品的研发具有较强的现实意义。

本文利用乳酸菌对乳清蛋白进行发酵, 获得具有抗氧化活性的发酵物; 经超滤得到抗氧化活性较高的分离物; 通过电泳分析和氨基酸分析明确发酵物中具有抗氧化活性多肽的分子量分布及其氨基酸组成, 从而为研发一种具有抗氧化功效的发酵乳保健食品提供一定的科学依据。

1 材料、试剂及设备

1.1 材料与试剂

WPC80 浓缩乳清蛋白粉, 美国 glanbia 公司; 德式保加利亚乳杆菌亚种; 嗜热链球菌, 广州微生物研究所; MRS 培养基, 杭州天和微生物试剂有限公司; DPPH, 日本和光纯药工业株式会社; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

SPX-250B-Z 型生化培养箱, 超净工作台, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 不锈钢手提式灭菌器, 上海申安医疗器械厂; 高速冷冻离心机, 美国 Kendro 公司; TU-1810 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; JA3003A 电子天平, 上海精天电子仪器有限公司; pH-25 数字酸度计, 杭州东星仪器设备厂; MSC 超滤杯, 上海模速科学器材有限公司; JY600C 电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; SYKAM 433D 全自动氨基酸分析仪, 德国塞卡姆公司。

2 实验方法

2.1 乳清蛋白发酵产物的制备

WPC80 浓缩乳清粉加蒸馏水按 10% 复原后, 在 105 °C 下灭菌 20 min, 冷却后在超净台中按 1:1 的比例接入体积分数为 4% 的德式保加利亚乳杆菌亚种与嗜热链球菌的菌种, 调节 pH

至 6.8 后, 置于 37 °C 培养箱中, 静止发酵 24 h。

2.2 DPPH 自由基清除率的测定

将 2 mL 样品与 2 mL 浓度为 1×10^{-4} mol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液于具塞试管中混合均匀, 置于室温下避光反应 30 min 后在 517 nm 处测定吸光度值 A_i 。DPPH 自由基的清除率公式为

$$A = \left[1 - \frac{A_i - A_0}{A_0} \right] \times 100$$

式中: A_i 为 2 mL 样品加 2 mL DPPH 溶液的吸 OD 值; A_0 为 2 mL 样品加 2 mL 蒸馏水的 OD 值; A_0' 为 2 mL DPPH 溶液加 2 mL 乙醇溶液的 OD 值。

2.3 产物的超滤分离

将乳清蛋白发酵产物经 8000 r/min 离心 30 min 去除不溶性物质后, 在 1.0 MPa 压力、25 °C 室温条件下, 选用截留相对分子质量为 10、5、1 kDa 的聚砜类中空纤维膜对乳清蛋白发酵物进行超滤, 分别收集不同分子量肽段的分级产品, 并采用 DPPH 自由基清除法测定分级产物的抗氧化性。

2.4 Tricine-SDS-PAGE 电泳分析

按表 1 和表 2 配制缓冲液和凝胶储存液。

表 1 Tricine-SDS-PAGE 电泳缓冲液

Table 1 Buffer solution of Tricine-SDS-PAGE

缓冲液	Tirs/ (mol · L ⁻¹)	Tricine/ (mol · L ⁻¹)	SDS /%	pH
正极缓冲液	0.2	—	—	8.90
负极缓冲液	0.1	0.1	0.1	8.25
凝胶缓冲液	3.0	—	0.3	8.45

表 2 Tricine-SDS-PAGE 凝胶储存液

Table 2 Gel liquid storage of Tricine-SDS-PAGE

混合物	丙烯酰胺 /(g · mL ⁻¹)	甲叉双丙烯酰胺 /(g · mL ⁻¹)
AB-3 储存液 (49.5%T, 3°C)	0.480	0.015
AB-6 储存液 (49.5%T, 3°C)	0.465	0.030

按表 3 配制分离胶和浓缩胶, 依次灌注于在垂直电泳槽中。

表 3 胶的制备

Table 3 Gel preparation

	4%积层胶	10%分离胶
AB-3/mL	0.25	—
AB-6/mL	—	1.60
凝胶缓冲液/mL	0.75	2.67
甘油/mL	—	0.63
H ₂ O/mL	2.00	3.10
10%过硫酸铵/μL	22.5	40.00
TEMED/μL	2.25	4.00
最终体积/mL	3.00	8.00

取 5 μL 样品溶解于样品溶解液中 (0.4% SDS、12% g 甘油、50 mol/L Tris、20 mol/L 硫基乙醇、0.1 g/L 考马斯亮蓝 R-250, 用 HCl 调节 pH 值至 7.0), 沸水浴 5 min。分别按表 1 的组成加正、负极缓冲溶液, 进入分离胶之前 30 V, 之后 100 V, 跑至分离胶底部之前可以适当调高电压,

注意温度不能超过 35~40 $^{\circ}\text{C}$ 。电泳结束后, 小心将胶取出, 置于一大培养皿中, 在染液(甲醇:乙醇:水=9:2:9, 含 1% 考马斯亮蓝 R-250)中

震荡浸泡 1 h 后转至脱色液(甲醇:乙醇:水=1:1:3), 震荡脱色 2 h 或过夜, 直至凝胶背景清晰为止。

2.5 氨基酸分析

氨基酸分析中所用各溶液的配比见表 4。

色谱条件如下: 分析柱为 $\varnothing 150 \times 4.6 \text{ mm}$ 钠离子交换柱, 10% 交联; 流速为 1.0 mL/min; 进样量为 10 μL ; 柱压为 3.5 MPa; 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长为 570 nm。

表 4 溶液的配制

Table 4 Preparation of the solutions

	缓冲 A	缓冲 B	再生液	样品稀释液	清洗液
pH 值	3.45	10.85	—	2.20	
当量浓度	0.12	0.20	0.30	0.12	
柠檬酸三钠(二水)/g	11.8	19.6	—	11.8	异丙醇(或甲醇)
柠檬酸/g	6.0	—	—	6.0	与去离子蒸馏水
NaOH/g	—	3.1	12.0	—	混合
甲醇/mL	65	—	—	—	
25% 硫二甘醇溶液/mL	—	—	—	14	6:4
HCl32%/mL	6.5	—	—	12	~
硼酸/g	—	5.0	—	—	4:6
苯酚/g	0.5	—	—	2.0	
总体积/L	1	1	1	1	

3 结果与分析

3.1 乳清发酵产物抗氧化活性的测定

根据 2.1 节制备乳清发酵产物进行离心去不溶物后, 按 2.2 节方法测定乳清发酵产物对 DPPH 自由基的清除率为 66.95%。

3.2 超滤分级产物抗氧化活性的比较

在 1.0 MPa 压力、25 $^{\circ}\text{C}$ 室温条件下, 选用截留相对分子质量分别为 10、5、1 kDa 的聚砜类中空纤维膜, 利用超滤设备将乳清蛋白发酵产物分成 $\text{Mr} \geqslant 10 \text{ kDa}$, $5 \text{ kDa} \leqslant \text{Mr} \leqslant 10 \text{ kDa}$, $1 \text{ kDa} \leqslant \text{Mr} \leqslant 5 \text{ kDa}$, $\text{Mr} \leqslant 1 \text{ kDa}$ 四个组分, 分别测定这四个组分对 DPPH 自由基的清除率和多肽的体积浓度, 结果见表 5。

表 5 不同组分的抗氧化活性的对比

Table 5 Antioxidant activity with different components

组分	DPPH 自由基清除率/%	多肽体积浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
$\text{Mr} \leqslant 1 \text{ kDa}$	40.15	3.78
$1 \text{ kDa} \leqslant \text{Mr} \leqslant 5 \text{ kDa}$	79.00	12.89
$5 \text{ kDa} \leqslant \text{Mr} \leqslant 10 \text{ kDa}$	65.58	21.32
$\text{Mr} \geqslant 10 \text{ kDa}$	42.01	2340

由表 5 可以看出, $1 \text{ kDa} \leqslant \text{Mr} \leqslant 5 \text{ kDa}$ 组分的清除 DPPH 自由基活性明显高于其他 3 个组分,

可达 79%。由此可见, 乳清抗氧化肽的活性都主要集中在相对分子质量在 1~5 kDa 之间的低分子量范围内, 这与研究发现低分子量的乳清蛋白酶解物($<6 \text{ kDa}$)具有较好的抗氧化活性^[6]的结论基本一致。

3.3 电泳结果分析

由图 1 可知, 经过沸水浴前处理的乳清蛋白发酵液的电泳条带颜色更为清晰, 其相对分子量主要集中于 4 个谱带。前两个带子的相对分子质量通过标准曲线计算分别在 35 kDa 和 17.5 kDa, 而后两个谱带相对较宽, 颜色也较深, 其分子量小于 2 kDa。说明具有抗氧化活性功能的乳清多肽多为小

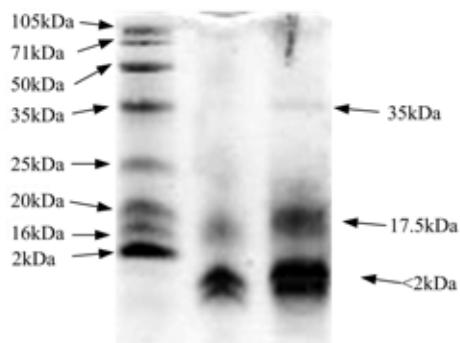


图 1 乳清抗氧化肽电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of the antioxidant peptide

分子肽,其分子量主要分布 2 kDa 以下。

3.4 氨基酸分析

对混合氨基酸标准溶液、乳清发酵产物进行衍生处理后,分别进样,记录色谱图,得到各氨基酸对应的峰位如图 2 和图 3 所示。

根据各个组分的保留时间进行定性分析,乳清发酵产物的氨基酸分析结果显示,在实验条件下检测出 17 种氨基酸,其中包括多种人类必需氨基酸和儿童必需氨基酸组氨酸。采用外标法,根

据各个组分的色谱峰峰面积进行定量分析,实验结果见表 6。

图 2 和图 3 中色谱峰依次为:天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、色氨酸、赖氨酸、精氨酸。从图中可以看出,氨基酸各组分之间的分离度良好,各个组分的峰形呈现良好的对称性,分离效果基本满意。分析周期为 45 min。

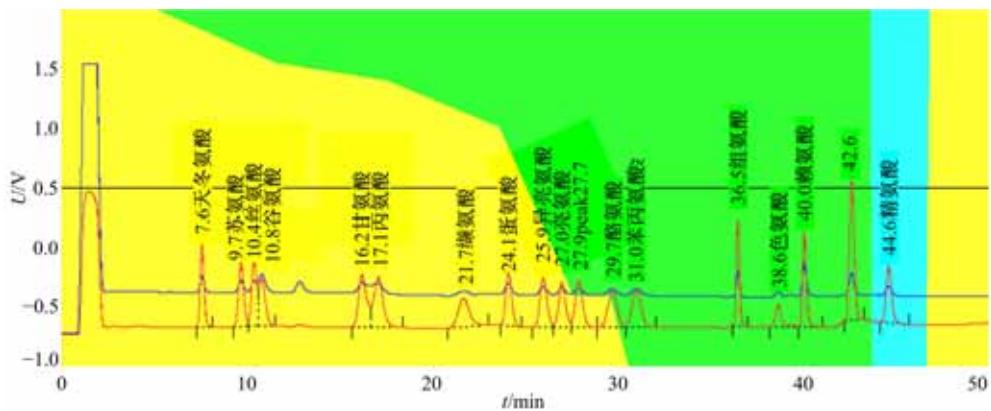


图 2 混合氨基酸标准溶液定性分析色谱图

Fig. 2 Chromatogram of amino acids' qualitative analysis

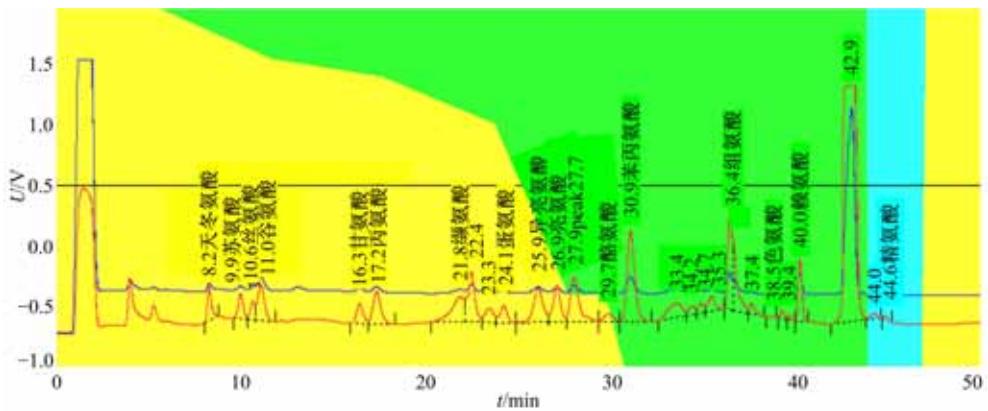


图 3 乳清发酵物的定性分析色谱图

Fig. 3 Chromatogram of the whey fermentation

由表 6 可知,乳清抗氧化肽的总氨基酸的体积浓度为 652.08 μg/mL,其中人体必需氨基酸占总氨基酸的 61.80%,高于 WHO/FAO 提出的必需氨基酸占总氨基酸的 40% 左右的标准以及必需氨基酸与非必需氨基酸之比为 0.6 的参考蛋白模式,营养成分丰富。与乳清蛋白抗氧化有密切关系的疏水性氨基酸、芳香环氨基酸的体积浓度

达到 457.57 μg/mL,占总氨基酸的 70.17%。研究表明,这些氨基酸的含量越高,乳清蛋白的抗氧化活性越显著^[7]。其中含量最高的两种氨基酸为苯丙氨酸和组氨酸。已有研究^[8]证实,当肽链中含有组氨酸残基时,这类肽能够鳌合金属离子、淬灭活性氧和清除羟基自由基。苯丙氨酸同样可与金属离子鳌合,是良好的辅助抗氧化剂。

表 6 乳清抗氧化肽各种氨基酸含量

Table 6 Content of amino acid

氨基酸种类	英文缩写	分子量	体积浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
天冬氨酸	Asp	133.1	26.04
* 苏氨酸	Thr	119.1	21.41
丝氨酸	Ser	105.1	11.83
谷氨酸	Glu	147.1	56.39
甘氨酸	Gly	75.1	9.73
丙氨酸	Ala	89.1	26.33
* 缬氨酸	Val	240.3	52.84
* 蛋氨酸	Met	149.2	21.02
* 异亮氨酸	Ile	131.2	56.68
* 亮氨酸	Leu	131.2	52.26
酪氨酸	Tyr	181.2	15.13
* 苯丙氨酸	Phe	165.2	153.56
组氨酸	His	155.2	76.54
* 赖氨酸	Lys	146.2	43.58
精氨酸	Arg	174.2	4.51
脯氨酸	Pro	115.1	22.6
* 色氨酸	Trp	204.2	1.63
总氨基酸:	652.08	人体必需氨基酸:	402.98

注:“*”表示在构成蛋白质的氨基酸中,人体不能合成,必须依靠食物供给的必需氨基酸。

4 结果与讨论

乳清蛋白经乳酸菌发酵,其产物具有自由基清除能力,测得 DPPH 自由基清除率为 66.95%,经 5 kDa 超滤后分离产物的清除率提升至 79%,说明具有抗氧化活性的多肽分子量在 1~5 kDa。经电泳分析,进一步证明抗氧化肽为分子量小于 2 kDa 的小肽。发酵产物的氨基酸种类丰富,富含人体所需的必需氨基酸,且与抗氧化活性关系密切的疏水性氨基酸、芳香族氨基酸的含量占总含量的七成左右,故具有显著的抗氧化活性。

由研究结果可见,乳清发酵产物营养成分丰富且抗氧化活性显著,作为功能性食品的开发

是非常具有潜力的。

参考文献:

- [1] 姚婷婷,赵培城,吕立获. 乳源活性肽的研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2005, 6:29-32.
Yao Ting-ting,Zhao Pei-cheng,Lü li-buo. Process of study on milk-derived bioactive peptides[J]. China Food Additives,2005,6:29-32.
- [2] Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications[J]. Current Opinion in Biotechno Logy, 2007, 18(2): 163-167.
- [3] Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(11): 1306-1314.
- [4] 陈庆森,赵林森,刘爱国,等. 益生菌在酸奶新品种研究中的作用与研发趋势[J]. 中国食品添加剂, 2003, 4(增刊): 336-341.
Chen Qing-sen,Zhao Lin-sen,Liu Ai-guo, et al. Research and development trend on new type of yogurt [J]. China Food Additives,2003,4(Sup.):336-341.
- [5] Gregor R. Probiotics and probiotics progress and challenges[J]. International Dairy Journal, 2008, 18(10): 969-975.
- [6] Pena-ramos E A, Xiong Y. Antioxidative activity of when protein hydrolysates in liposomal system[J]. Journal of Dairy Science, 2001, 84(12):2577-2583.
- [7] Seronei Chelulei C, Zhang W. Preparation of whey protein hydrolysates using a single-and two stage enzymatic membrane reactor and their immuno logical and antioxidant properties: characterization by multivariate data analysis [J]. Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(10): 3896-3904.
- [8] Chen H M, Muramoto K, Yamauci F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide derived from digests of a soybean peptide[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(9): 2619-2623.