

曹梦笛,周浩纯,李赫,等.半固态酶解法制备全谷物多肽及其抗氧化、ACE抑制活性的研究[J].食品工业科技,2021,42(15):9-16.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100205

CAO Mengdi, ZHOU Haochun, LI He, et al. Study on Preparation of Whole Grain Polypeptides by Semi-solid Enzymatic Hydrolysis and Their Antioxidant and ACE Inhibitory Activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(15): 9-16. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100205

· 研究与探讨 ·

半固态酶解法制备全谷物多肽及其抗氧化、ACE抑制活性的研究

曹梦笛^{1,2},周浩纯¹,李赫^{1,*},张健¹,章期博¹,刘新旗¹,刘宇³

(1.北京工商大学,食品与健康学院,国家大豆加工产业技术创新中心,北京100048;

2.中国检验检疫科学研究院,综合检测中心,北京100123;

3.北京协同创新研究院,北京100094)

摘要:以燕麦、荞麦为原料,通过半固态酶解法制备谷物多肽并以液态酶解作为对照组研究其抗氧化、降血压能力。通过凯氏定氮法测定酶解产物中多肽含量,通过总抗氧化能力(Ferric ion reducing antioxidant power, FRAP法)、羟自由基清除能力及体外血管紧张素转换酶(Angiotensin I converting enzyme, ACE)活性抑制实验测定酶解产物抗氧化及降血压能力。结果表明,以酶解产物中多肽含量、抗氧化和ACE抑制活性为指标确定了燕麦、荞麦半固态酶解最佳工艺参数分别为:酶解时间3h,酶添加量为3.75%;酶解时间为1h,酶添加量为2.50%,在此条件下,燕麦、荞麦所得酶解产物中多肽含量为7.03%和6.35%。1mg/mL燕麦、荞麦多肽(半固态酶解组)羟自由基清除率为61.34%、69.33%,总抗氧化能力相当于(0.53±0.03)mmol/L和(0.48±0.01)mmol/L的FeSO₄,ACE抑制率为80.27%、77.60%。半固态酶解组的多肽含量及抗氧化、ACE抑制能力均显著高于液态酶解组。采用半固态酶解工艺,既可以提高谷物肽含量,又可提高其抗氧化、ACE抑制活性,为谷物高值化加工和功能性食品配料领域的应用提供理论支持。

关键词:燕麦肽,荞麦肽,半固态酶解,抗氧化,降血压

中图分类号:TS213

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2021)15-0009-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100205

Study on Preparation of Whole Grain Polypeptides by Semi-solid Enzymatic Hydrolysis and Their Antioxidant and ACE Inhibitory Activities

CAO Mengdi^{1,2}, ZHOU Haochun¹, LI He^{1,*}, ZHANG Jian¹, ZHANG Qibo¹, LIU Xinqi¹, LIU Yu³

(1.College of Food and Health, National Soybean Processing Industry Technology Innovation Center, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China;

2.Chinese Academy of Inspection and Quarantine Comprehensive Test Center, Beijing 100123, China;

3.Beijing Institute of Collaborative Innovation, Beijing 100094, China)

Abstract: Cereal polypeptides were prepared by semi-solid enzymatic hydrolysis with oat and buckwheat as substrates and their antioxidant and hypotensive abilities were studied, liquid enzymatic hydrolysis was used as the control group. Kjeldahl method was used to determine the content of peptides in the enzymatic hydrolysate, reducing antioxidant power (FRAP), hydroxyl radical scavenging capacity, and Angiotensin I converting enzyme (ACE) activity inhibition experiments were used to determine the antioxidant and blood-pressure lowering properties of enzymatic products. The results showed that the hydroxyl radical scavenging rates of 1 mg/mL oat and buckwheat polypeptide (semi-solid enzymolysis group) were

收稿日期:2020-10-26

基金项目:“十三五”国家重点研发计划重点专项(2016YFD0400401)。

作者简介:曹梦笛(1995-),女,硕士研究生,研究方向:蛋白质加工,E-mail:cao_mengdi@163.com。

*通信作者:李赫(1981-),男,博士,副教授,研究方向:功能性食品,E-mail:lihe@btbu.edu.cn。

61.34% and 69.33%, the total antioxidant capacity was equivalent to (0.53 ± 0.03) mmol/L and (0.48 ± 0.01) mmol/L FeSO_4 , and the inhibition rates of ACE were 80.27% and 77.60%, respectively. Based on the peptide content, antioxidant and ACE inhibitory activity of the enzymatic hydrolysis products, the optimum technological parameters of semi-solid enzymatic hydrolysis was as follows: oats with the enzymatic hydrolysis time 3 h, enzyme added 3.75%, and buckwheat with enzymatic hydrolysis time 1 h, enzyme added 2.50%. At the optimum enzymatic hydrolysis parameter, the content of polypeptides in the enzymatic hydrolysis products of oat and buckwheat was 7.03% and 6.35%, respectively. The yield of polypeptide and antioxidant and ACE inhibition ability of semi-solid enzymatic hydrolysis group were significantly higher than those in liquid enzymatic hydrolysis group. The semi-solid enzymatic hydrolysis process can not only improve the efficiency of hydrolysis, but also improve the antioxidant and ACE inhibitory activity of cereal peptide. It also can provides theoretical support for high-value processing of grain and application of functional food ingredients.

Key words: oat peptide; buckwheat peptide; semi-solid enzymolysis; antioxidant; hypotensive

燕麦中营养物质含量丰富,含有大量可溶性膳食纤维、维生素、矿物质及生物活性成分,蛋白质含量约占 20%,在粮食作物中最高且必需氨基酸含量高出其他粮食作物两倍左右^[1]。荞麦中蛋白质含量约占 12%,蛋白质成分优质且有独特的氨基酸组成比,含有人体必需的 8 种氨基酸^[2]。燕麦和荞麦与其它谷物相比,蛋白质含量较高且氨基酸种类丰富,因此,其营养价值引起了学者们的关注。

谷物肽是以谷物中的蛋白质为原料,经过蛋白酶酶解、食品加工或者微生物发酵等方法制备的具有特殊生理功能的生物活性肽,是谷物蛋白水解的中间产物,一般少于 20 个氨基酸,分子量 <5800 Da^[3]。已有研究表明谷物肽具有抗氧化^[4-5]、抗高血压^[6]、降血糖^[7]、抗肿瘤^[8]、抗炎及降低胆固醇^[9]等生理活性。ACE 在肾素-血管紧张素系统中通过催化血管紧张素-1 转化为血管紧张素-2,加强心肌收缩,引起血压升高。因此,通过抑制体内 ACE 来降低血管紧张素-2 的浓度具有重要意义。Hernández-Ledesma 等^[10]研究表明,低分子量的 ACE 抑制肽具有强降血压活性。谷物肽可作为 ACE 抑制剂,通过与 ACE 活性位点结合,发挥降血压作用^[11]。抗氧化活性被认为是谷物肽的另一基本功能,体内的氧化应激反应会对蛋白质和 DNA 等生物分子造成不同程度的损害,从而导致多种疾病如:炎症、心血管疾病和癌症等^[12-13],因此研究具有抗氧化作用的天然谷物肽具有重要的意义。已有研究表明,低分子量生物活性肽可直接被人体肠道吸收,从而能更好的发挥生物活性^[14]。

饮食中的谷物蛋白消化利用率低,特别是老年人和胃肠道疾病患者,通过消化谷物蛋白获取营养能力较弱,提高谷物中蛋白质营养的利用率成为谷物加工的关注点。固态发酵或液态酶解谷物蛋白是获取谷物肽的普遍方式,半固态酶解蛋白工艺研究鲜有报道。半固态酶解谷物蛋白是以谷物面团为底物,经调制搅拌器捏合及控温酶解等步骤,可得含多肽的酶解谷物粉。相对于液态酶解,半固态酶解后的谷物面团更易烘干,有利于谷物、谷物蛋白的大规模生产加工。

本实验以燕麦和荞麦两种谷物作为研究对象,以酶解产物中多肽含量、抗氧化活性和 ACE 抑制活性为指标确定了半固态酶解最佳工艺参数,以研究酶

解产物的抗氧化、降血压作用,为谷物高值化加工和功能性食品配料领域的应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

燕麦及荞麦 均为市售商品;碱性蛋白酶(200 U/mg) 帝斯曼公司;中性蛋白酶(100 U/mg) 丹尼斯克;凯氏定氮消化片 德国福斯公司;三吡啶基三嗪(tripyridyltriazine, TPTZ) 博奥拓达科技有限公司;谷胱甘肽、马尿酸-组氨酸-亮氨酸、马尿酸 上海源叶生物科技有限公司;血管紧张素 I 转换酶(ACE) 美国 Sigma 公司。其他试剂 均为 AR 级别。Milli-Q Integral 5 纯水仪 美国 Millipore 公司;KJELTEC 8000 全自动凯氏定氮仪 丹麦 FOSS 公司;Cary 60 UV-Vis 紫外-可见分光光度计 美国 Agilent 科技有限公司;1260 Infinity 高效液相色谱 美国 Agilent 科技有限公司;THZ-92B 旋涡振荡器 上海博讯实业有限公司;HH.S11-4 电热恒温水浴锅 上海博讯实业有限公司;X-30R 台式高速离心机 美国 Beckman 公司;cientic EASY-nLC 1000 System(Nano HPLC) 高效液相色谱 美国 Thermo 公司;NH 1500L 调制搅拌器 山东旺林机械有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 两种谷物粉半固态酶解工艺的优化 燕麦及荞麦分别经粉碎机粉碎,过 200 目筛;在调质搅拌机内加水 and 碱性蛋白酶与中性蛋白酶以 2:1 的比例配制的复合酶,捏合形成谷物面团,50 °C 控温酶解;酶解结束后,将酶解面胚放入隧道炉中(温度 80 °C)进行烘干;最后,用粉碎机对其进行粉碎得到含多肽的半固态酶解谷物粉并过 200 目筛。在半固态酶解过程中,复合酶添加量分别为 1.25%、2.50% 和 3.75%,酶解时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 及 4.0 h。

1.2.2 半固态酶解产物肽含量的测定

1.2.2.1 半固态酶解物中多肽液的提取与纯化 称取酶解后谷物粉 5.000 g,溶于 125 mL 蒸馏水中,在气浴恒温振荡器中 37 °C 恒温振荡 30 min;将振荡后的谷物粉溶液在 4000 r/min,25 °C 恒温离心

30 min 并收集上清液; 将第 1 次离心所得沉淀添加 125 mL 蒸馏水进行二次浸提, 将两次离心所得上清液混合并经 MD34-5M(300 Da)膜过滤提纯, 可得多肽提取液, 测其多肽含量及抗氧化和 ACE 抑制活性。

1.2.2.2 多肽含量的测定 参考 GB/T 6432-2018^[15] 并加以改进。称取 20.000 g 多肽提取液用 22.5% 三氯乙酸溶液定容至 50 mL, 摇匀后静置 10 min, 使用中速滤纸过滤以除去提取液中的谷物蛋白。取 10 mL 滤液至消化管, 加入 12 mL 浓硫酸及两片消化片, 于消化器中 180 °C 消化 30 min 除去样品中的水分, 再调至 420 °C 消化 60 min。消化结束后冷却至室温并用凯氏定氮仪检测样品中的氮含量, 通过公式 1 计算可得多肽含量。

$$M = \frac{\omega \times K \times m_1}{m_2} \times 12.5 \quad \text{式 (1)}$$

式中: M 为每 100 g 谷物粉中的多肽含量(g/100 g); ω 为提取液中的多肽含量(mg/mL); m_1 为两次提取所得上清液总质量(g); m_2 为两次提取所得离心液总质量(g); K 为蛋白转化系数(燕麦为 5.83, 荞麦为 6.25)。

1.2.3 两种谷物粉液态酶解工艺方法 参考文献 [16-18] 并略作修改。将谷物粉 200 目过筛, 加水配制成蛋白含量为 8% 的溶液, 用 1 mol/L NaOH 及 1 mol/L HCl 调 pH 至 7.0, 加入复合蛋白酶, 50 °C 恒温酶解 4 h, 在整个酶解过程中对酶解液进行恒速搅拌, 酶解完成后, 将温度升至 85 °C 灭酶 10 min。液态酶解液在 4000 r/min, 25 °C 恒温离心 30 min, 收集上清液。

1.2.4 酶解方式对酶解产物肽的蛋白转化率的影响

肽的蛋白转化率是一定质量谷物粉中多肽含量与蛋白质含量的比值。在酶添加量为 3.75%, 酶解时间为 3 h 的酶解条件下用液态酶解和半固态酶解的方式酶解燕麦粉, 在酶添加量为 1.25%, 酶解时间为 1 h 的条件下酶解荞麦粉, 通过测定蛋白转化率比较两种酶解方式对谷物蛋白酶解效果的差异。

1.2.5 酶解产物分子量分布测定 参考 GB/T 22492-2008 的方法并加以改进^[19]。燕麦在酶解时间为 3 h, 荞麦酶解时间为 1 h 的条件下, 研究酶添加量及酶解方式对酶解产物分子量分布的影响。将标准品配制成 1 mg/mL 的溶液, 样品和标品均需过 0.22 μ m 微滤膜, 随后在 HPLC-DAD 系统中过 TSKgelG2000swxL 300 mm \times 7.8 mm 色谱柱进行检测分析。流动相为乙腈:水:三氟乙酸=45:5:0.1, 进样体积为 10 μ L, 流速为 30 mL/h, 检测波长为 220 nm。用峰面积归一法可计算到不同肽段相对分子质量的分布情况, 按式 2 进行计算:

$$X(\%) = \frac{A}{A_{\text{总}}} \times 100 \quad \text{式 (2)}$$

式中: X 为试样中某相对分子质量肽段所占总

肽段的质量分数, %; A 为某相对分子质量肽段的峰面积; $A_{\text{总}}$ 为各相对分子质量肽段的峰面积之和。

1.2.6 酶解产物中多肽抗氧化活性测定

1.2.6.1 总抗氧化能力(FRAP 法)测定方法 参考文献 [18] 并略作修改。燕麦在酶解时间为 3 h, 荞麦酶解时间为 1 h 的条件下, 研究酶添加量及酶解方式对酶解产物总抗氧化能力的影响。配制 0.3 mol/L pH=3.6 醋酸缓冲液、20 mmol/L FeCl₃ 溶液以及 10 mmol/L TPTZ 溶液, 并以 10:1:1 的比例混合。配制不同浓度(0.2、0.5、1.0、1.5、1.8、2.0 mmol/L)的 FeSO₄·7H₂O 标品, 绘制标准曲线。取 30 μ L 样品溶液加入 4 mL FRAP 试剂, 加 1 mL 水, 充分混合并于 37 °C 静置 15 min, 在 593 nm 波长测其吸光度。以谷胱甘肽做参照, 图 4 样品多肽浓度及谷胱甘肽浓度均为 1 mg/mL。

1.2.6.2 羟自由基清除能力测定方法 参考文献 [20] 并略作修改。燕麦在酶解时间为 3 h, 荞麦酶解时间为 1 h 的条件下, 研究酶添加量及酶解方式对酶解产物羟自由基清除能力的影响。取 0.5 mL 样品溶液依次加入 1 mL 6mmol/L FeSO₄、1 mL 6mmol/L H₂O₂ 混匀, 静置 10 min; 加入 1 mL 6 mmol/L 水杨酸混匀静置 30 min, 510 nm 波长下测吸光度即 A_1 。按式 3 计算谷物肽羟自由基清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_c}\right) \times 100 \quad \text{式 (3)}$$

式中: A_c 为空白组, 使用蒸馏水替代样品; A_1 为样品组, 加入标品或者样品的吸光度。

1.2.7 酶解产物中多肽 ACE 抑制活性测定 参考 Boschini 等^[21] 和 Wu 等^[22] 的方法加以改进。燕麦在酶解时间为 3 h, 荞麦酶解时间为 1 h 的条件下, 研究酶添加量及酶解方式对酶解产物 ACE 抑制能力的影响。配制缓冲液一(100 mmol/L Tris-HCOOH, 300 mmol/L NaCl, pH=8.3), 缓冲液二(100 mmol/L Tris-HCOOH, 300 nmol/L NaCl, 10 mol/L ZnCl₂, pH=8.3), 配制 1 mmol/L HHL 溶液, 1 mU ACE 溶液。取 100 μ L HHL 加入 1.5 mL 离心管中, 加入 10 μ L 样品, 37 °C 水浴反应 15 min; 预反应结束后加入 15 μ L ACE 溶液反应 1 h 后加 125 μ L 0.1 mol/L HCl 中断反应。样品过 0.22 μ m 水相膜, 滤液备进样用。仪器自动进样后, 可根据马尿酸标品出峰时间以及峰面积确定马尿酸的生成量, 计算样品的 ACE 抑制活性大小, 同时做空白对照。图 6 样品多肽浓度为 1 mg/mL。按式 4 计算谷物肽 ACE 抑制率:

$$\text{ACE抑制率}(\%) = \frac{A_c - A_s}{A_c - A_N} \times 100 \quad \text{式 (4)}$$

式中: A_c 为不加抑制剂, 用缓冲液一代替样品测得的峰面积; A_N 为不加 ACE, 用缓冲液二代替 ACE 酶测得的峰面积; A_s 为样品组测得的峰面积。

色谱条件: HPLC 系统: HPLC-DAD; 色谱柱:

Eclipse Plus C₁₈ 分析用色谱柱(5 μm, 4.6 mm×150 mm); 流速: 30 mL/h; 检测波长: 228 nm; 进样量: 10 μL; 流动相: 水: 乙腈=80:20。

1.3 数据处理

数据均 $\bar{x}\pm SD(N=3)$ 表示。采用 SPSS Statistics 软件进行统计分析。多组均数进行相关性分析、方差齐性检验和单因素方差分析(ANOVA)和多重比较(Duncan's 法), $P<0.05$, 差异显著。

2 结果与分析

2.1 谷物粉半固态酶解参数对酶解产物肽含量的影响

本课题选用碱性蛋白酶与中性蛋白酶以 2:1 的比例配制的复合酶。复合酶比单一酶有更多的酶切位点, 可更充分地水解谷物蛋白, 且碱性蛋白酶和中性蛋白酶酶切位点为疏水性氨基酸和芳香族氨基酸, 对多肽的抗氧化及 ACE 抑制活性均有积极影响。

为避免不同样品中蛋白含量差异的影响, 试验中酶添加量为加酶量与谷物粉中蛋白质含量之比。由图 1 可得, 相比酶添加量为 1.25% 及 2.50% 组, 燕麦粉中酶添加量为 3.75% 时, 所得多肽含量较高且在酶解时间为 3 h 达到最高, 随着酶解时间增加, 多肽含量增加不显著($P>0.05$)。酶解时间 0~1.0 h 时, 荞麦粉中多肽含量迅速上升, 且当酶解时间为 1 h, 酶添加量为 1.25%、2.50%、3.75% 时酶解所得多肽含量无显著差异($P>0.05$), 继续延长酶解时间荞麦粉中肽含量呈平衡趋势, 当蛋白酶达到一定量时, 暴露的谷物蛋白质基本达到完全水解, 加大添加量并不会

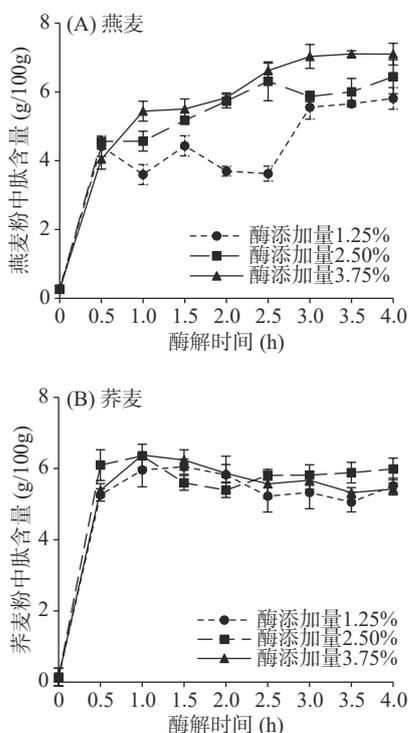


图 1 半固态酶解工艺参数对(A)燕麦和(B)荞麦酶解产物肽含量的影响

Fig.1 Effect of semi-solid enzymatic hydrolysis process parameters on peptide content of (A) oat and (B) buckwheat enzymatic hydrolysis products

对多肽含量产生明显影响^[23]。综上可得, 以酶解产物中多肽含量为标准, 燕麦最佳半固态酶解条件为: 酶解时间 3 h, 酶添加量 3.75%; 荞麦为: 酶解时间 1 h, 酶添加量 1.25%。林洋等^[24]以豆粕为原料, 设计单因素试验确定复合酶的组成, 结果表明在碱性蛋白酶: 中性蛋白酶=2:1、温度 45 °C、时间 4.5 h 酶解条件下大豆蛋白酶解效果最好。

2.2 酶解方式对酶解产物肽的蛋白转化率的影响

液态酶解是提高谷物蛋白转化率的主要方式, 实验对半固态酶解能否获得相同的蛋白转化率进行了探讨, 分析半固态酶解工艺的可行性。由图 2(A)和(B)可得燕麦和荞麦的半固态酶解蛋白转化率显著高于($P<0.05$)液态酶解。半固态酶解底物中的部分蛋白被淀粉包裹, 复合酶会集中酶解裸露出的谷物蛋白, 相比液态酶解, 不仅半固态酶解底物浓度相对较高, 而且调制搅拌器多方向不断捏合酶解谷物面团, 也能够促进酶与底物蛋白接触。相同酶添加量时, 半固态酶解显示出更高的蛋白转化率。

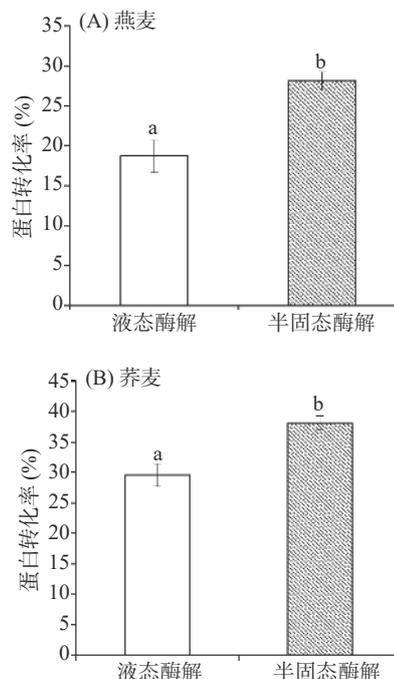


图 2 酶解方式对(A)燕麦和(B)荞麦的蛋白转化率的影响

Fig.2 Effect of enzymatic hydrolysis on the protein conversion rate of (A) oat and (B) buckwheat

注: 图中不同字母表示差异显著($P<0.05$), 图 3~图 6 同。

2.3 酶解产物分子量分布的测定

谷物蛋白酶解产物功能活性不仅与其浓度有关, 还受分子量大小的影响, 已有研究表明具有 2~10 个氨基酸组成的低分子量肽生物活性较强, 且其更容易穿过肠屏障发挥生理作用^[25]。表 1 在最佳酶解时间条件下研究复合酶添加量对多肽分子量分布的影响, 可得: 酶解时间为 3 h, 燕麦半固态酶解产物中分子量<1000 Da 的低分子量肽多肽占比约 95%; 酶解时间为 1 h, 荞麦酶解产物中分子量<1000 Da 的低分子量肽多肽占比大于 85%, 可得燕麦与荞

表 1 半固态酶解酶添加量对酶解产物分子量的影响

Table 1 Effect of the amount of semi-solid enzymatic hydrolysate on molecular weight of polypeptide in hydrolysate

分子量(Da)	所占比例(%)		
	酶添加量1.25%	酶添加量2.50%	酶添加量3.75%
燕麦			
≥ 1000	5.1	3.9	4.2
<1000	94.9	96.1	95.8
500~1000	57.8	20.3	22.6
150~500	21.0	54.5	51.1
<150	16.1	21.3	22.0
荞麦			
≥ 1000	14.0	6.3	9.0
<1000	86.0	93.7	91.0
500~1000	23.0	21.3	25.9
150~500	44.8	55.5	44.7
<150	18.2	16.9	20.4

麦中的蛋白经半固态酶解均可得到较多的低分子量肽。燕麦酶添加量为 3.75% 的条件下多肽含量最高(图 1A), 且与酶添加量为 1.25% 组相比, 酶解产物中<1000 Da 低分子量肽占比也明显提高; 荞麦在酶解时间为 1 h, 酶添加量为 1.25% 时多肽含量较高(图 1B), 但酶解产物中<1000 Da 低分子量肽占比低于酶添加量为 2.50% 及 3.75% 组。这是由于半固态酶解底物中的部分蛋白被淀粉包裹, 复合酶会集中酶解裸露出的谷物蛋白, 随着酶添加量的增多, 酶切位点水解越完全, 低分子量肽占比更大。

通过液态酶解和半固态酶解的方式, 在酶解时间为 3 h, 酶添加量为 3.75% 的条件下酶解燕麦粉, 在酶解时间为 1 h, 酶添加量为 1.25% 的条件下酶解荞麦粉。由表 2 可得, 燕麦和荞麦液态酶解产物中分子量<1000 Da 的多肽占比分别为 66.0% 和 76.3%, 远低于半固态酶解产物的 94.9% 和 86.0%。在半固态酶解反应体系中, 复合酶集中酶解暴露出的谷物蛋白, 从而生成较多低分子量的肽。因此, 相对于液态酶解, 燕麦在酶解时间为 3 h, 酶添加量为 3.75% 酶解条件下, 荞麦在酶解时间 1 h, 酶添加量为 1.25%

表 2 酶解方式对谷物蛋白酶解产物分子量的影响

Table 2 Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight of semi-solid enzymatic hydrolysates of grain protein

分子量(Da)	所占比例(%)	
	液态酶解	半固态酶解
燕麦		
≥ 1000	34.0	5.1
<1000	66.0	94.9
500~1000	20.7	57.8
150~500	26.5	21.0
<150	18.8	16.1
荞麦		
≥ 1000	23.7	14.0
<1000	76.3	86.0
500~1000	38.2	23.0
150~500	22.4	44.8
<150	15.7	18.2

酶解条件下, 半固态酶解谷物蛋白不仅所得多肽含量高, 而且酶解产物中<1000 Da 的低分子量肽占比更高。

2.4 酶解产物中多肽抗氧化活性的比较

由图 3 可得, 燕麦经半固态酶解所得多肽的总抗氧化能力及羟自由基清除能力均显著高于谷物原料且均随着酶添加量的增多而增强, 荞麦酶添加量为 2.50% 组抗氧化活性显著高于酶添加量为 1.25%

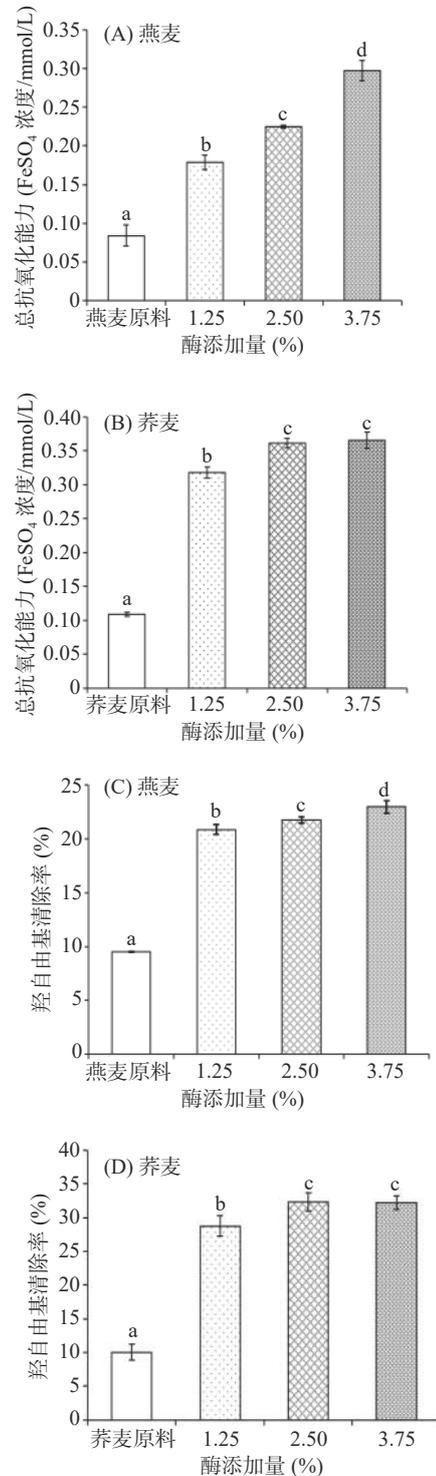


图 3 半固态酶解酶添加量对酶解产物中多肽抗氧化活性的影响

Fig.3 Effect of the amount of enzyme added in semi-solid enzymatic hydrolysis on antioxidant activity of polypeptides in enzymatic hydrolysates

组($P<0.05$)且与及 3.75% 组无显著差异($P>0.05$)。实验选用的复合酶由碱性蛋白酶和中性蛋白酶复配而成,其酶切位点包括羧基侧是芳香族或疏水性氨基酸构成的肽键及氨基侧是疏水性氨基酸构成的肽键。已有研究表明芳香族氨基酸残基易向缺电子基团提供质子,从而提高氨基酸残基的自由基清除能力,疏水氨基酸残基如 Val 或 Leu 可以促进多肽清除自由基^[26]。因此,半固态酶解所得多肽越多,即可暴露更多抗氧化氨基酸残基,蛋白酶解产物抗氧化活性可能越强。燕麦在酶解时间为 3 h 时(图 1A),随着酶添加量的增加,所得多肽浓度增加,对其抗氧化能力有显著增强作用($P<0.05$)。由此可得,燕麦在酶解时间为 3 h,酶添加量为 3.75% 条件下,半固态酶解所得燕麦肽含量最高且抗氧化活性最强。

荞麦在酶解时间为 1 h 时(图 1B),酶添加量为 1.25% 组与 2.50% 和 3.75% 组所得谷物肽的含量无显著差异($P>0.05$),酶添加量为 2.50% 组及 3.75% 组在酶解产物肽的分子量分布上较为相似(表 1),相应的酶解产物肽在总抗氧化能力及羟自由基清除能力上均未有显著差异($P>0.05$)。酶添加量为 1.25% 组酶解产物肽的分子量分布的低分子量占比低于另外两组(表 1),其抗氧化能力及羟自由基清除能力均显著低于另外两组($P<0.05$)。因此,荞麦在酶解时间为 1 h,酶添加量为 2.50% 或 3.75% 条件下,半固态酶解所得荞麦肽含量较高且抗氧化活性较强。

多肽的抗氧化活性还与其氨基酸组成有关,氨基酸是肽的基本组分,它们的类型、含量和序列对肽的抗氧化活性具有很大的影响^[27]。相同浓度肽含量时低分子量肽占比较高其抗氧化活性更强。Herrera Chalé 等^[28]研究了豇豆蛋白酶解产物中不同肽级分的抗氧化能力,得出分子量最小的肽级分,即<1000 Da 的肽级分抗氧化能力最强。

由图 4 可得,在多肽质量浓度均为 1 mg/mL 时,燕麦和荞麦半固态酶解所得多肽的总抗氧化能力和羟自由基清除能力均显著高于液态酶解组($P<0.05$),结合表 2 分子量分布实验结果可得:分子量是影响谷物肽抗氧化活性的重要因素,低分子量肽的抗氧化活性更强。半固态酶解产物中,<1000 Da 的低分子量肽占比远大于液态酶解,所以半固态酶解所得多肽抗氧化活性显著高于相同质量浓度液态酶解所得多肽。

2.5 酶解产物中多肽 ACE 抑制活性的比较

比较相同质量谷物粉经半固态酶解后所得多肽的 ACE 抑制能力。结果由图 5 所示,燕麦和荞麦原料经半固态酶解后 ACE 抑制活性显著提高($P<0.05$)。燕麦随着酶添加量的增多酶解产物中多肽含量增高(图 1A),则其 ACE 抑制活性增强。Asoodeh^[29]等人的研究表明,ACE 的 C 末端是疏水环境,ACE 抑制肽采用阻止底物与 ACE 活性位点相结合降低其催化活性,ACE 抑制肽通常在 N-或 C-末端位置含有

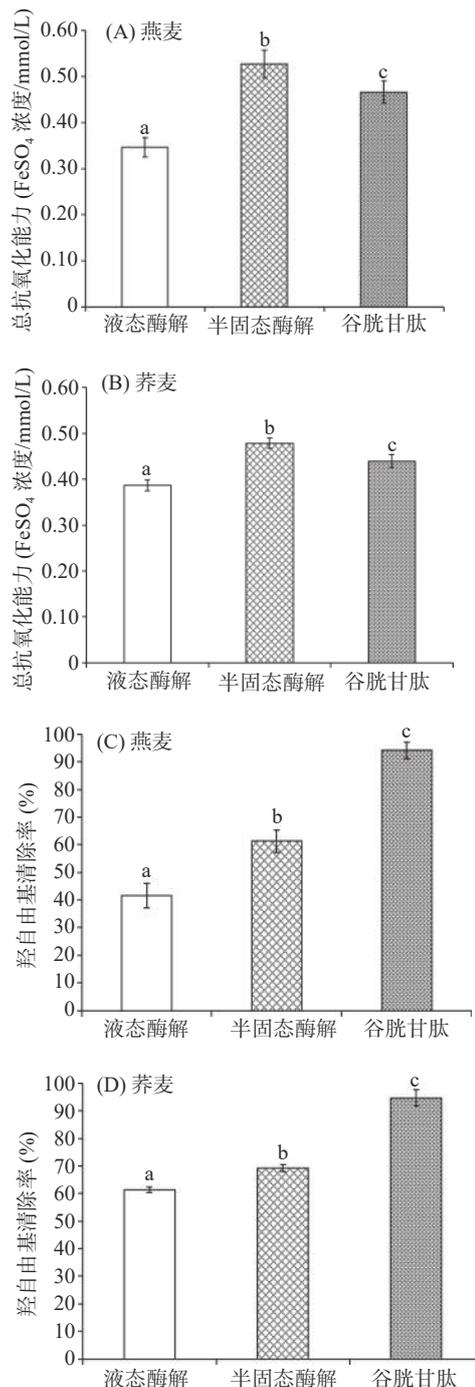


图 4 酶解方式对酶解产物中多肽抗氧化活性的影响

Fig.4 Effect of enzymatic hydrolysis process on the antioxidant activity of polypeptides in hydrolysis products

注:各图中均为相同质量浓度的肽。

疏水性氨基酸残基。本实验选用碱性蛋白酶及中性蛋白酶复配的复合酶,因此,半固态酶解所得多肽越多,即可暴露更多疏水性氨基酸残基,蛋白酶解产物 ACE 活性更可能越强。

由图 5 可得,荞麦在酶添加量为 2.50% 及 3.75% 组,酶解所得多肽 ACE 抑制活性无显著差异($P>0.05$),但均显著高于酶添加量 1.25% 组($P<0.05$)。Anne 等^[30]研究表明,低分子量的肽更容易接近 ACE 的活性位点,所以<1000 Da 的肽具有更高的 ACE 抑制活性。荞麦酶添加量为 1.25% 组酶解产物中低分子量肽占

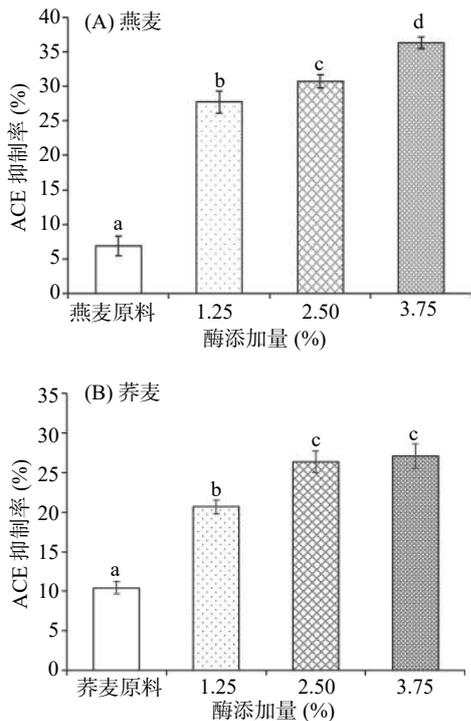


图 5 半固态酶解酶添加量对酶解产物中多肽 ACE 抑制效果的影响

Fig.5 Effect of the amount of enzyme added in semi-solid enzymatic hydrolysis on ACE inhibition of polypeptides in Hydrolysates

比低于另外两组(表 1), 相应的酶解产物肽的 ACE 抑制能力低于另外两组。

因此, 结合半固态酶解产物中谷物肽含量及其 ACE 抑制活性分析可得燕麦在酶解时间为 3 h, 酶添加量为 3.75%, 荞麦在酶解时间为 1 h, 酶添加量为 2.50% 或 3.75% 条件下酶解效果最好。

在多肽质量浓度均为 1 mg/mL 条件下, 比较燕麦、荞麦分别经半固态、液态酶解后所得多肽的 ACE 抑制活性差异, 研究酶解方式对多肽 ACE 抑制能力的影响。由图 6 可得燕麦和荞麦半固态酶解产物中多肽的 ACE 抑制活性显著高于液态酶解组 ($P < 0.05$)。燕麦和荞麦半固态酶解所得 <1000 Da 的低分子量肽占比高于液态酶解(表 2), 所以半固态酶解所得多肽的 ACE 抑制活性比液态酶解更强。

Herrera Chalé^[28] 等用超滤膜将虎爪豆蛋白酶解产物分离成 >10000, 5000~10000, 3000~5000, 1000~3000, <1000 Da 的不同组分, 比较它们的抗氧化及 ACE 抑制活性, 结果表明各组分均有一定的抗氧化及 ACE 抑制活性且 <1000 Da 的低分子量肽活性最强。多肽序列中的疏水性氨基酸和芳香族氨基酸有助于增强其抗氧化活性; 芳香族氨基酸占比高的多肽, 尤其是羧基末端是芳香族氨基酸的三肽, ACE 抑制活性较强, 疏水性氨基酸更易与 ACE 活性位点结合从而抑制其活性^[31-33], 从而达到实现降低血压。实验选用复合酶由碱性蛋白酶和中性蛋白酶复配而成, 识别位点为疏水性氨基酸及芳香族氨基酸, 随着酶解反应的进行, 暴露出更多的疏水性及芳香族氨基酸残

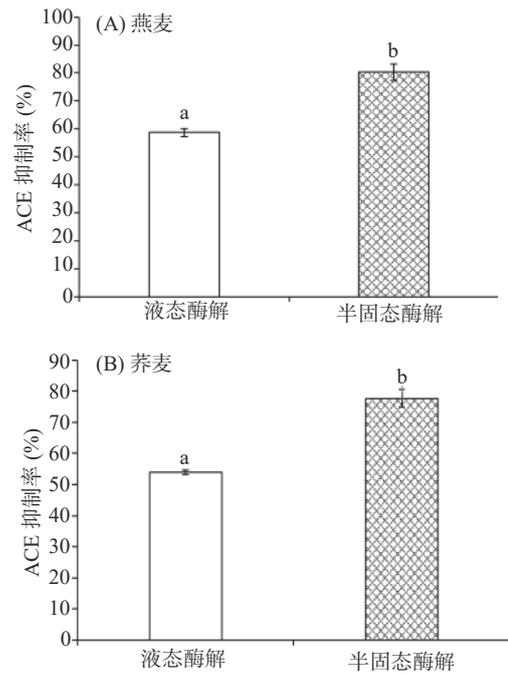


图 6 酶解方式对酶解产物中多肽 ACE 抑制效果的影响
Fig.6 Effect of enzymatic hydrolysis process on the inhibitory activity of ACE of polypeptides in hydrolysis products

基, 从而增强酶解所得谷物肽的抗氧化及 ACE 抑制活性。

3 结论

本文以燕麦及荞麦为原料, 通过新型半固态酶解工艺得到具有生物活性的酶解产物, 以酶解产物中多肽含量为指标进行了酶解时间和复合蛋白酶酶添加量的实验, 结合酶解产物抗氧化、ACE 抑制活性以及酶解效率可得燕麦、荞麦最佳半固态酶解工艺参数分别为: 燕麦酶解时间 3 h, 酶添加量 3.75%; 荞麦酶解时间 1 h, 酶添加量 2.50%。对比液体酶解工艺, 半固态酶解工艺的酶解产物中低分子量肽占比较高, 且其抗氧化活性、ACE 抑制活性均显著高于相同条件下液态酶解所得谷物肽 ($P < 0.05$)。综上说明谷物蛋白半固态酶解工艺具有更佳效果, 半固态酶解工艺应用于谷物高值化加工具有可行性。

参考文献

- [1] 韩杨. 燕麦中活性肽实用价值研究现状[J]. 生命科学仪器, 2008, 6(12): 10-15.
- [2] 李相沂. 荞麦蛋白质的提取及其酶解物的 ACE 抑制活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- [3] 丛峰松. 神奇的小分子活性肽[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2015: 1-136.
- [4] Torres-Fuentes C, María del Mar, Recio I, et al. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2015, 180: 194-202.
- [5] Wattanasiritham L, Theerakulkait C, Wickramasekara S, et al. Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein[J]. Food Chemistry, 2016, 192: 156-162.
- [6] Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, et al. A fermented milk high

- in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects[J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2003, 77(2): 326–330.
- [7] Oseguera-Toledo M E, Elvira G D M, Amaya-Llano S L. Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress[J]. *Food Research International*, 2015, 76(3): 839–851.
- [8] Lima A I G, Mota J, Monteiro S A V S, et al. Legume seeds and colorectal cancer revisited: Protease inhibitors reduce MMP-9 activity and colon cancer cell migration[J]. *Food Chemistry*, 2016, 197: 30–8.
- [9] Lule V K, Garg S, Pophaly S D, et al. Potential health benefits of lunasin: A multifaceted soy-derived bioactive peptide[J]. *Journal of Food Science*, 2015, 80(3): 485–494.
- [10] Hernández-Ledesma B, Quirós A, Amigo L, et al. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin[J]. *International Dairy Journal*, 2007, 17(1): 42–49.
- [11] Setayesh-Mehr Z, Asoodeh A. The inhibitory activity of HL-7 and HL-10 peptide from scorpion venom (*Hemiscorpius lepturus*) on angiotensin converting enzyme: Kinetic and docking study[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2017, 75: 30–37.
- [12] Mendis E, Kim M M, Rajapakse N, et al. An *in vitro* cellular analysis of the radical scavenging efficacy of chitoooligosaccharides[J]. *Life Sciences*, 2007, 80(23): 2118–2127.
- [13] Karla C G, Daniel L C, Holger H. CVD and oxidative stress[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2017, 6(2): 1–22.
- [14] Ziegler F, Ollivier J M, Cynober L, et al. Efficiency of enteral nitrogen support in surgical patients: Small peptides v non-degraded proteins[J]. *Gut*, 1990, 31(11): 1277–1283.
- [15] 全国饲料工业标准化技术委员会. GB/T 6432—2018 饲料中粗蛋白的测定凯氏定氮法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019, 1–4.
- [16] Karamać M, Kosińska-Cahnazzo A, Kulczyk A. Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(7): 1027–1039.
- [17] Malomo S, Onuh J, Girgih A, et al. Structural and antihypertensive properties of enzymatic hemp seed protein hydrolysates[J]. *Nutrients*, 2015, 7(9): 7616–7632.
- [18] Silva F G D E, Hernández-Ledesma B, Amigo L, et al. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by alcalase hydrolysis: Antioxidant activity[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 76: 140–146.
- [19] 全国粮油标准化技术委员会. GB/T 22492—2008 大豆肽粉[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009: 1–3.
- [20] 鹿小一, 王静, 张慧娟, 等. 燕麦肽的制备、抗氧化性及其对 α -淀粉酶抑制作用的研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(20): 163–168.
- [21] Boschin G, Scigliuolo G M, Resta D, et al. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes[J]. *Food Chemistry*, 2014, 145: 34–40.
- [22] WU J, Aluko R E, Muir A D. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 950(1-2): 125–130.
- [23] Bamdad F, Wu J P, Chen L Y. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein[J]. *Journal of Cereal Science*, 2011, 54(1): 20–28.
- [24] 林洋, 刘再胜, 汲全柱, 等. 酶解法制备大豆小肽的工艺研究[J]. *大豆科学*, 2016, 35(5): 824–829.
- [25] Ma Y, Xiong Y L, Zhai J, et al. Fractionation and evaluation of radical scavenging peptides from *in vitro* digests of buckwheat protein[J]. *Food Chemistry*, 2010, 118(3): 582–588.
- [26] Ranathunga S, Rajapakse N, Kim S K. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*) [J]. *European Food Research and Technology*, 2006, 222(3-4): 310–315.
- [27] Kou X H, Gao J, Xue Z, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2013, 50(2): 591–598.
- [28] Herrera Chaléf G, Ruiz Ruiz J C, Juan José A F, et al. ACE inhibitory, hypotensive and antioxidant peptide fractions from *Mucuna pruriens* proteins[J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49(10): 1691–1698.
- [29] Asoodeh A, Homayouni-Tabrizi M, Shabestarian H, et al. Biochemical characterization of a novel antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Struthio camelus* egg white protein hydrolysis[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016, 24(2): 332–342.
- [30] Anne P L, Päivi K, Kati P, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: Concentration and characterization of active peptides[J]. *The Journal of Dairy Research*, 2000(67): 53–64.
- [31] Sivananthan M, Suriza S A, Noorlidah A. Structural characteristics and antihypertensive effects of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides in the renin-angiotensin and kallikrein kinin systems[J]. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, 2017, 14(2): 383–406.
- [32] Mirzaei M, Mirdamadi S, Ehsani M R, et al. Production of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysates: Purification and molecular docking[J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2018, 26(2): 696–705.
- [33] Nwachukwu I D, Aluko R E. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(1): 1–13.