

米蛋白肽锌对油脂稳定性的影响 及其抑菌活性的研究

李庭¹, 熊华^{1,*}, 史苏华¹, 张全才¹, 谢明勇¹, 邓泽元¹, 郑为完¹, 陈振林^{1,2}

(1.南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047;

2.广西贺州学院生化系, 广西贺州 542800)

摘要:以米渣为原料通过限制性酶水解制备酶解液,与硫酸锌整合后,制取米蛋白肽锌,初步研究了整合产物对油脂稳定性的影响和抑菌功能特性。结果表明,通过硫化钠法及红外光谱法分析,确认所得产物是米蛋白肽锌螯合物;以过氧化值和酸价指标,研究了实验所得的米蛋白肽锌对猪油、菜籽油、玉米油和蛋糕中油脂稳定性的影响,以硫酸锌作对照,表明米蛋白肽锌对纯油脂和蛋糕中油脂的氧化催化作用较小,而硫酸锌对油脂的氧化催化作用显著;米蛋白肽锌对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌及大肠杆菌的生长都有较强的抑制作用。

关键词:米蛋白肽锌, 油脂, 蛋糕体系, 抑菌活性

Effect of rice peptided-zinc on stabilization of edible oil and study on the antibacterial activity

LI Ting¹, XIONG Hua^{1,*}, SHI Su-hua¹, ZHANG Quan-cai¹, XIE Ming-yong¹,

DENG Ze-yuan¹, ZHENG Wei-wan¹, CHEN Zhen-lin^{1,2}

(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2.Department of Chemistry and Biology Engineering, Hezhou University, Hezhou 542800, China)

Abstract:Rice peptided-zinc was produced by hydrolysed rice protein chelating with ZnSO₄. Effect of rice peptided-zinc on stabilization of edible oil and antibacterial activity of rice peptided-zinc were investigated. The result showed that: A construction of zinc chelating with peptides was confirmed by a Na₂S chemical method and infrared spectrum analysis. The stabilization of edible oils and cake with rice peptided-zinc was significantly improved comparing the edible oils and cake with ZnSO₄, when the peroxide value and acid value were used as indicator. The rice peptided-zinc showed a great antibacterial activity to *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Colibacillary*.

Key words:rice peptided-zinc; edible oil; cake; antibacterial activity

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)06-0065-04

米渣是生产大米糖浆的副产品,米渣蛋白质的含量高达50%~70%(干基),是大米中蛋白质含量的5~8倍,高于大豆中蛋白质含量。米渣蛋白经限制酶水解,水解得到分子链不等的肽及部分游离氨基酸。氨基酸螯合物是一个或多个氨基酸基团与金属离子发生配合反应形成的具有环状结构的化合物。当配位体由氨基酸改为小肽时,则产物为小肽螯合盐。它具有稳定性好、吸收率高、生物效价高、毒性小等

优点^[1]。微量元素Fe、Cu和Zn等对于促进动物的生长,保证动物的健康具有积极的作用,但同时这些金属离子又是脂类自动氧化的良好催化剂和抗氧化剂的拮抗因子。本研究以米渣为原料通过限制性酶水解制备大米蛋白肽酶解液,与硫酸锌整合后,制得米蛋白肽锌,并考察了其对食用油和蛋糕中油脂稳定性的影响及抑菌活性,为米蛋白肽锌的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

米渣 江西恒天实业有限公司;猪油、菜籽油、玉米油 市售;枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌 由南昌大学微生物教研组提供;无水乙醇、硫酸锌、氢氧化钠、EDTA、冰醋酸、氯仿、碘化钾等 均为分析纯。

收稿日期:2008-08-14 *通讯联系人

作者简介:李庭(1983-),女,硕士研究生,主要从事营养保健与功能食品开发。

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006BAD27B00);教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0540);2006年南昌市中心攻关及产业化项目资助。

WX-4000 微波快速消化系统 上海屹尧仪器公司; NICOLET 5700 FT-IR 美国热力公司; 756PC 型紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司; FSH- II 型高速电动匀浆器 江苏金坛市环宇科学仪器厂; 电子天平, 电热恒温培养箱, 万能搅拌机, 食品电烤炉, 无菌工作台, 电热式压力蒸汽消毒器, 恒温振荡器等。

1.2 实验方法

1.2.1 米蛋白肽锌制备

1.2.1.1 工艺流程

米渣 → 加酶 → 加水 → 调节 pH → 调温 → 酶解(调 pH)
 → 灭酶 → 离心 → 酶解液 → 调节 pH → 加 ZnSO₄ → 调温
 → 螯合 → 浓缩 → 乙醇析出沉淀 → 干燥 → 米蛋白肽锌粉
 → 喷雾干燥 → 米蛋白肽锌粉

1.2.1.2 工艺说明 米渣酶解工艺说明: 温度 50℃, 固液比为 1:5, pH 为 8, 采用复合胰蛋白酶酶解时间 4h; 螯合工艺说明: 蛋白肽与锌的摩尔比为 2:1, pH 5.5, 温度 70℃, 时间 90min。

1.2.2 米蛋白肽锌对油脂的氧化催化作用 采用 60℃ 烘箱法^[2]。将所有油样置于 60℃ 恒温箱中保存, 每 2d 测定过氧化值。

1.2.2.1 加锌猪油、加锌菜籽油、加锌玉米油的制备 准确称量猪油 3 份, 每份 60g, 分别添加米蛋白肽锌和硫酸锌, 用不加锌源的猪油作对照。米蛋白肽锌和硫酸锌均按 0.025% 的比例添加(以锌计)。用高速匀浆机分散后, 备用。

菜籽油、玉米油样品制备方法同猪油的制备。

1.2.2.2 加锌蛋糕样品的制备 首先是油样处理, 准确称量菜籽油 3 份, 每份 60g, 分别添加米蛋白肽锌和硫酸锌, 用不加锌源的菜籽油作对照。按 0.025% 的比例添加锌源(以锌计), 用高速匀浆机分散后, 备用。蛋糕中鸡蛋、糖、面粉的质量比为 2:1:1。然后, 蛋糕制作采用蛋白液和蛋黄分开搅打法^[3]。制备好的蛋糕放于 4℃ 冰箱中贮存, 每天定时测定蛋糕的过氧化值、酸价的变化情况。

1.2.3 分析方法

1.2.3.1 米蛋白肽锌中锌含量的测定 米蛋白肽锌中锌含量测定采用 EDTA 滴定法^[4]。

1.2.3.2 米蛋白肽锌的定性分析 采用硫化钠法^[4]和红外光谱法^[5,6]鉴定。

1.2.3.3 过氧化值的测定 采用 GB/T5009.37-2003 测定猪油、菜籽油、玉米油中的 POV 值; 蛋糕 POV 值测定采用 GB/T5009.56-2003 糕点卫生标准的分析方法。

1.2.3.4 酸价的测定 采用 GB/T5009.56-2003 糕点卫生标准的分析方法。

1.2.3.5 抑菌圈实验 采用滤纸片法^[7,8]。操作步骤: 将 5mm 直径的滤纸片灭菌后在样液中浸泡 12h, 移到含菌平板, 培养一定时间, 观察是否有抑菌圈。

1.2.3.6 最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定 采用微量液体稀释法^[9]。

1.2.3.7 抑菌活性的测定 添加 5mL 至其最低抑菌浓度的样液到 250mL 摇瓶中, 再加入 5mL 菌悬液, 置

摇瓶于恒温摇床中(37℃)以 180r/min 进行振荡, 隔一段时间取样 5mL, 与不加样液的菌液作对照, 以去离子水作为空白参比样, 用紫外分光光度计于 600nm 波长下测定培养液的浊度(OD), 并以此表征样品的抑菌活性。

2 结果与讨论

2.1 硫化钠法鉴定分析的结果

氨基酸螯合物是氨基酸基团中的 C 和 N 原子与金属离子配位, 形成环状的螯合分子结构。金属硫化物的稳定常数远大于螯合物的稳定常数, 当加入硫化钠时, S²⁻ 与稳定螯合物中的金属离子反应, 生成了更稳定的金属硫化物沉淀, 从而使螯合物中的氨基酸或肽游离出来, 与茚三酮发生显色反应, 可以利用这一性质来对样品进行定性鉴定^[4]。

将不加硫化钠的样液加热至沸腾, 用茚三酮试剂检测, 溶液颜色没有发生改变; 加入过量的硫化钠用玻璃棒搅匀静置一段时间后, 溶液中有白色沉淀生成; 过滤后滤液用茚三酮试剂检测, 滤液变为蓝紫色。即原待测物质的溶液中没有游离的蛋白肽, 在生成金属无机盐沉淀后, 又有了游离的蛋白肽。这说明待测物质是蛋白肽和金属形成的一种特殊物质, 它不像蛋白肽金属盐那样在水中以离子状态存在, 也不像无机沉淀那样不溶于水, 即其稳定性大于可溶性无机盐, 小于无机沉淀。初步判断该物质为米蛋白肽锌螯合物。

2.2 红外光谱法分析的结果

米渣酶解液经冷冻干燥后得到的肽粉和经乙醇析出纯化干燥后得到的米蛋白肽锌的红外光谱图分别见图 1、图 2。

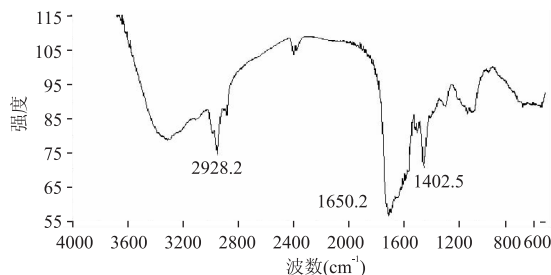


图 1 米蛋白肽的红外图谱

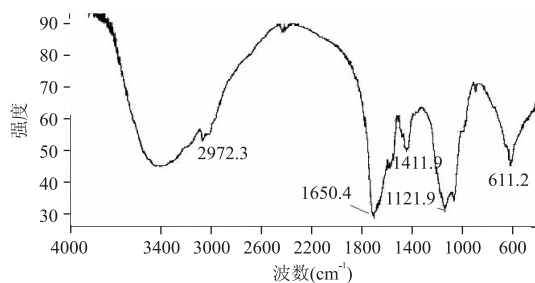


图 2 米蛋白肽锌的红外图谱

从图 1 和图 2 对比可以看出, 米蛋白肽与其螯合物的吸收峰相比, 在强弱和位置上有明显的变化, 米蛋白肽锌在 1120cm⁻¹左右出现了(PtNH₂)强吸收峰, 在 611cm⁻¹左右(PrNH₂)的特征吸收峰非常明显, 证明 Zn²⁺ 与 -NH₂ 有较强的结合, 多肽与锌形成了螯合物, 与文献报道一致^[10]。羧基离子的反对称振动在

1650 cm^{-1} 附近,羧基离子的对称振动在 1400 cm^{-1} 附近,这两处吸收峰在螯合前后均出现强弱变化,推测羧基可能也以共价键的方式与锌离子结合。

硫化钠法和红外光谱分析结果均表明,实验所得的产物为米蛋白肽锌螯合物。

2.3 样品的锌含量

由喷雾干燥和乙醇析出干燥两种工艺得到的米蛋白肽锌的锌含量如表 1 所示。

表 1 各样品的锌的百分含量

样品	锌(%)
样品 1	14.57
样品 2	15.33

注:样品 1:喷雾干燥得到的米蛋白肽锌;样品 2:乙醇析出纯化后的米蛋白肽锌。

2.4 不同锌源对油脂的氧化催化作用

2.4.1 不同锌源对猪油稳定性的影响 添加不同锌源的猪油过氧化值随贮藏时间的变化见图 3。

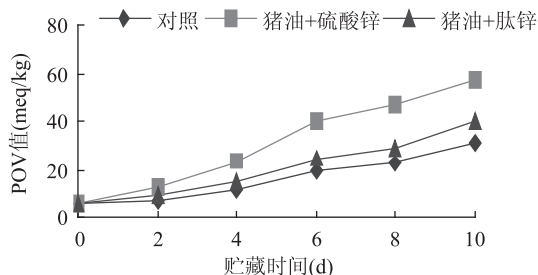


图 3 猪油过氧化值随贮藏时间的变化曲线

从图 3 可看出,添加了硫酸锌的猪油 POV 值升高很快,贮藏 6d 后,POV 值就迅速上升到 39.6meq/kg,而添加米蛋白肽锌的猪油 POV 值在 25.6meq/kg 附近,与对照组的 POV 值接近。

油脂在贮藏期间,其中水分、氧气、金属离子等的存在为单线态氧和自由基的产生提供条件,从而导致脂质的氧化酸败。油脂中痕量的金属离子的存在会导致羟基自由基的产生,羟基自由基是强氧化剂,几乎可以和油脂中存在的所有成分发生反应。油脂中或多或少都存在脂质过氧化氢,锌离子可以加速脂质过氧化物的分解速率。并且与脂质过氧化氢反应使得 O-O 键断裂,产生脂氧自由基 RO·和脂过氧自由基 ROO·^[11]。添加硫酸锌的猪油中可同时产生羟基自由基和脂氧自由基,这两种自由基共同作用使油脂自动氧化加剧,过氧化值在很短时间内急速上升,而由于螯合物中锌以更稳定的非离子态存在,使得添加的螯合锌对猪油的催化氧化作用明显弱于硫酸锌。

2.4.2 不同锌源对菜籽油稳定性的影响 添加不同锌源的菜籽油的过氧化值随贮藏时间的变化如图 4 所示。在 60℃ 烘箱中贮藏 6d 后,对照组的过氧化值为 10.2meq/kg,添加米蛋白肽锌的菜籽油过氧化值为 13.4meq/kg 左右,而添加硫酸锌的菜籽油过氧化值为 22.8meq/kg,接近对照组的 2 倍,且随着贮藏时间的延长,添加硫酸锌的菜籽油过氧化值与其它组的过氧化值相差越大,油样加速氧化趋势越明显。

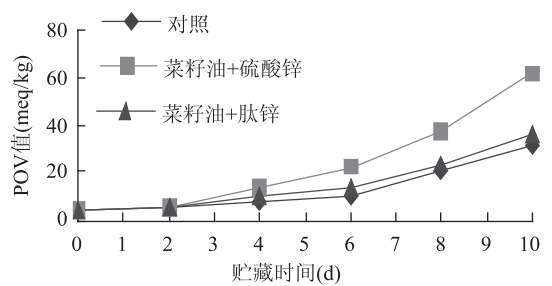


图 4 菜籽油过氧化值随贮藏时间的变化曲线

2.4.3 不同锌源对玉米油稳定性的影响 添加不同锌源的玉米油的过氧化值随贮藏时间的变化见图 5。

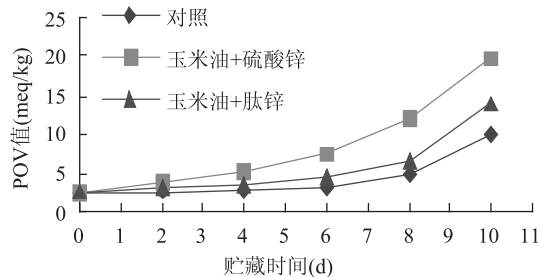


图 5 玉米油过氧化值随贮藏时间的变化曲线

图 5 表明,在 60℃ 烘箱中贮藏 6d 后,对照组的过氧化值为 3.4meq/kg,添加米蛋白肽锌的玉米油过氧化值为 4.5meq/kg 左右,而添加硫酸锌的玉米油过氧化值为 7.4meq/kg,超过了对照组的 2 倍。

图 3~图 5 的结果表明,硫酸锌对油脂的催化氧化作用显著,而处于螯合状态的米蛋白肽锌,由于锌是以非离子态存在,对油脂的催化氧化作用很小。图 3、图 4 和图 5 比较,添加米蛋白肽锌和硫酸锌的猪油其过氧化值均高于添加等量相同锌源的菜籽油和玉米油。这可能是由于市售的菜籽油和玉米油里添加了抗氧化剂,对金属离子的催化氧化反应有抑制作用。

2.5 米蛋白肽锌对蛋糕中油脂稳定性的影响

添加不同锌源的蛋糕的过氧化值和酸价随贮藏时间的变化如图 6、图 7 所示。

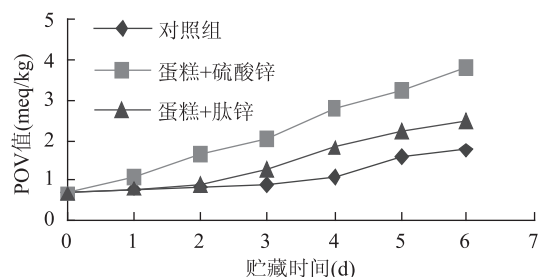


图 6 蛋糕过氧化值随贮藏时间的变化曲线

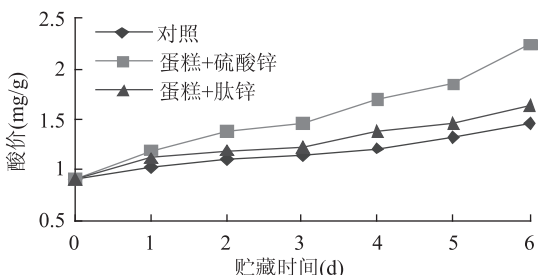


图 7 蛋糕酸价随贮藏时间的变化曲线

图6表明,蛋糕在贮存6d后,添加硫酸锌的蛋糕组过氧化值为3.82meq/kg,对照组的过氧化值为1.73meq/g,添加米蛋白肽锌的蛋糕过氧化值为1.80meq/kg。图7显示蛋糕在贮存3d后,对照组酸价为1.14mg/g,添加硫酸锌的蛋糕组酸价增长迅速,达到1.45mg/g,而添加米蛋白肽锌的蛋糕酸价为1.24mg/g左右,且随着贮藏时间的延长,添加硫酸锌的蛋糕组的酸价与其它组的酸价相差越来越大,蛋糕加速氧化趋势越明显。

图6、图7的结果都表明,硫酸锌极易催化不饱和脂肪酸氧化,导致油脂在贮藏期间酸败变质,而螯合态锌中由于螯合作用,游离的锌离子比较少,从而显著降低了油脂的自动氧化作用。

2.6 米蛋白肽锌的抑菌作用

用滤纸片法,将米蛋白肽、硫酸锌、米蛋白肽锌对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌进行实验。发现米蛋白肽锌对这三种菌均有较好的抗菌效果,而米蛋白肽样品和硫酸锌样品都没有抑菌圈出现。

最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC)的测定结果表明,米蛋白肽锌对金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的MIC和MBC均为3.50g/L,对大肠杆菌的MIC和MBC均为3.00g/L。

研究了米蛋白肽锌在其最低抑菌浓度下对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌及大肠杆菌的抑菌活性。图8~图10分别为3种菌在培养72h过程中,培养基浊度的变化情况。

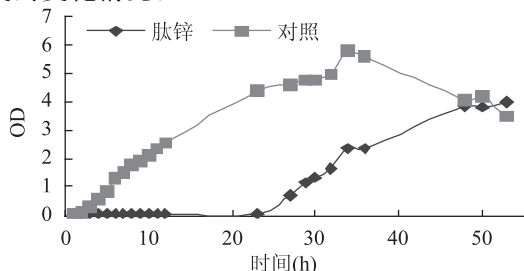


图8 肽锌对金黄色葡萄球菌的抑菌活性

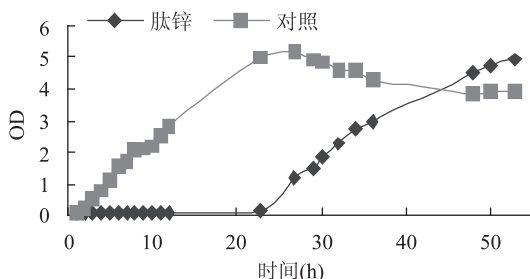


图9 肽锌对枯草芽孢杆菌的抑菌活性

从图8~图10可知,在实验浓度下,米蛋白肽锌对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌及大肠杆菌的生长都有很强的抑制作用。可以分别使三种菌延迟22、23、30h进入对数生长期,且在22h内可以起到有效的抑制作用,从23h起,菌生长才出现一个增长期。

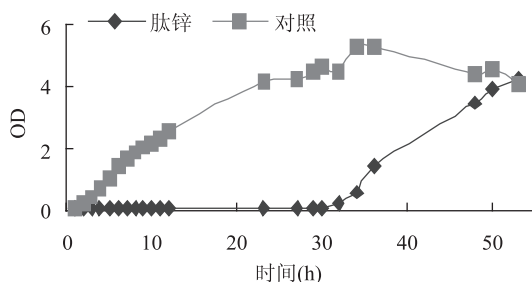


图10 肽锌对大肠杆菌的抑菌活性

目前对螯合物抗菌的作用机理尚无定论,邓尚贵等研究表明,螯合物的肽分子可能和细菌细胞膜受体蛋白结合,改变细胞质膜通透性,造成膜结构破坏,引起膜内水溶性物质大量渗出,从而导致细菌死亡^[10]。

3 结论

通过硫化钠法和红外光谱法分析,可以认定米蛋白肽确实可与锌形成螯合物。添加不同锌源到猪油、菜籽油、玉米油以及蛋糕体系的贮藏实验,表明硫酸锌对油脂的催化氧化作用显著,而处于螯合状态的蛋白肽锌,由于锌是以非离子态存在,对油脂的催化氧化作用很小。米蛋白肽锌对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌及大肠杆菌的生长都有较强的抑制作用。

参考文献

- [1] 吴茹怡,叶剑明. 氨基酸螯合矿物质的研究进展[J]. 四川食品与发酵,2004,40(123):28~31.
- [2] 严俊芳,张莉莉,王恬. 大豆蛋白酶解物抗油脂氧化性研究[J]. 粮油加工与食品机械,2006(3):45~46.
- [3] 陈芳烈,陶民强. 蛋糕制作工艺与基本理论(3) [J]. 食品工业,1997(2):46~48.
- [4] 吴茹怡,曾里,曾凡骏. 氨基酸螯合物鉴定方法的研究[J]. 食品科技,2006(3):104~108.
- [5] 中本一雄. 无机和配位化合物的红外和拉曼光谱[M]. 化学工业出版社,1981.
- [6] K Nakamoto. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds [M]. 2nd Ed. New York: Wiley, 1970. 226~244.
- [7] 吴传茂,吴周和. 迷迭香提取物的抑菌作用研究[J]. 广州食品工业科技,2000,16(3).
- [8] 李学红,马庆一,张昱. 果胶酶解液抑菌性能的研究[J]. 食品工业科技,2003,24(1):51~53.
- [9] 郑国兴,张春乐,黄浩,等. 水杨酸的抑酶与抑菌作用[J]. 厦门大学学报,2006,45:19~22.
- [10] 邓尚贵,杨柒,秦小明. 低值鱼蛋白多肽-铁螯合物的酶解制备及其抗氧化、抗菌活性研究[J]. 湛江海洋大学学报,2006,26(4):54~59.
- [11] 张晓鸣,林萍,黄玲,等. 甘氨酸螯合铁理化性质的研究[J]. 中国粮油学报,2005,20(5):21~26.

本刊已经开通了采编平台,投稿请登陆

www.spgykj.com