

琥珀酸脱酰胺对小麦面筋蛋白酶解产物抗氧化性的影响

陈楠楠,任娇艳,赵谋明*

(华南理工大学轻工与食品学院,广东广州 510640)

摘要:研究琥珀酸不同脱酰胺程度对小麦面筋蛋白胰酶的酶解产物抗氧化性的影响。在相同水解度下,以DPPH·清除率、·OH清除率、ORAC值为抗氧化指标,结果表明低脱酰胺程度(22.4%)的小麦面筋蛋白酶解产物的抗氧化性有较大幅度的提高,高脱酰胺程度(60.4%)的小麦面筋蛋白酶解产物的抗氧化性降低。水解度15%的酶解产物的肽分子量分布表明,低脱酰胺的小麦面筋蛋白酶解产物中分子量小于3000u的肽段增加,高脱酰胺的小麦面筋蛋白酶解产物中分子量小于3000u的肽段减少;在相同水解度下的氨基酸分析结果表明,脱酰胺后的小麦面筋蛋白酶解生成的肽的疏水性和抗氧化性的氨基酸含量提高。因此,低脱酰胺的小麦面筋蛋白酶解产物抗氧化性提高的主要原因是产物中含疏水性和抗氧化性氨基酸的小分子肽含量提高。

关键词:小麦面筋蛋白,琥珀酸,脱酰胺,酶解,抗氧化性

Effect of deamidation with succinic acid on the antioxidant activities of enzymatic hydrolysates of wheat gluten

CHEN Nan-nan, REN Jiao-yan, ZHAO Mou-ming*

(School of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Effects of deamidation with succinic acid on antioxidant activities of pancreatin enzymatic hydrolysates of wheat gluten were studied. Under the same degree of hydrolysis (DH), DPPH radical scavenging ability, OH radical scavenging ability and ORAC value of hydrolysates were investigated. Results indicated that the antioxidant abilities of hydrolysates of low succinic deamidized wheat gluten (SDG-L) increased; while the antioxidant abilities of hydrolysates of high succinic deamidized wheat gluten (SDG-H) decreased. Under 15% DH, the amount of peptides with molecule weight lower than 3000u in the SDG-L increased; while that of in the SDG-H decreased. The hydrophobic amino acids and antioxidative amino acids increased in both SDG-L and SDG-H. Therefore, the increase of low molecular peptides, hydrophobic amino acids and antioxidative amino acids contributed to the improvement of antioxidant activities of SDG-L.

Key words: wheat gluten; succinic-acid; deamidation; hydrolysates; antioxidant activity

中图分类号: TS210.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)11-0049-05

小麦面筋蛋白是小麦淀粉生产过程中的副产品,小麦面筋蛋白中谷氨酸主要以谷氨酰胺形式存在,它和天门冬酰胺在蛋白质的侧链结构中参与氢键形成,这些酰胺基团及一些疏水性氨基酸的存在,导致面筋蛋白溶解性差,应用范围受到限制^[1]。有机酸脱酰胺是对小麦面筋蛋白进行改性的有效方法。已有研究表明有机酸脱酰胺后的小麦面筋蛋白,对胰酶的酶解敏感性有所提高,风味特性也有所改善^[2-3]。但目前尚未有对脱酰胺改性后小麦面筋蛋白酶解产物抗氧化性研究的报道。琥珀酸在食品工业中作为酸味剂常用于调味品中,作用相对温和,改变脱酰胺条

件可以控制小麦面筋蛋白脱酰胺的程度。本文研究琥珀酸对小麦面筋蛋白脱酰胺后用胰酶酶解,脱酰胺程度对酶解产物抗氧化性的影响,并探讨抗氧化性发生变化的原因,为进一步拓宽小麦面筋蛋白的应用范围提供理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

小麦面筋蛋白 购买于河南莲花集团,含70.95% (干基)蛋白、6.96%水分、6.38%脂肪和9.61%碳水化合物; Pancreatin 北京诺维信酶制剂公司,酶活力 2×10^5 U/g; DPPH, 荧光素, AAPH, Trolox Sigma公司; 其它化学试剂 均为分析纯。

KDN-2C定氮仪, KDN-40消化炉 上海新嘉电子有限公司; PHS-25数显pH计 上海精密科学仪器有限公司; SHZ-82水浴恒温振荡器 金坛市恒丰仪器厂; GL-21M高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪

收稿日期: 2011-09-26 * 通讯联系人

作者简介: 陈楠楠(1988-),女,硕士研究生,研究方向:食品生物技术。

基金项目: 国家863计划项目(2006AA10Z326); 国家自然科学基金(20676044)。

器有限公司;可见紫外分光光度计 广州广一科学仪器有限公司有限公司;酶标仪 Thermo Fisher Scientific Oy, Finland; Amersham蛋白质纯化系统 美国Amersham公司; Waters510高效液相色谱仪 美国Waters公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小麦面筋蛋白脱酰胺处理工艺 琥珀酸与小麦面筋蛋白配制成混合溶液,其中琥珀酸含量0.6% (w/w),小麦面筋蛋白含量10% (w/w),32℃水化过夜后冰浴冷却制得低脱酰胺程度的酶解前处理样品。同样配制上述混合溶液,32℃水化过夜后放入灭菌锅中121℃加热10min,取出后冰浴冷却制得高脱酰胺程度的酶解前处理样品。

1.2.2 小麦面筋蛋白酶解工艺 按方法1.2.1制备的两种脱酰胺程度的小麦面筋蛋白悬浮液调到胰酶酶解最适pH9后,放于恒温水浴锅中,使温度保持在(50±2)℃,加酶量与底物质量比为1:100 (w/w)。水浴搅拌水解一定时间后,将酶解液于沸水浴中灭酶20min,离心(9500r/min,10min),收集所得上清液于4℃冷藏。

1.2.3 脱酰胺程度的测定 采用微量弥散皿法^[4]。

样品完全脱酰胺产生的氨的测定:准确称取0.5g蛋白质样品,加5mL 2mol/L的盐酸,抽真空封于硬质玻璃管中,在115~125℃下水解3h,水解完毕取出,待冷却后打开玻璃管,用20g/L的硼酸吸收氨并测定酰胺氮含量。

样品脱酰胺过程中产生的氨的测定:将3mL硼酸加入微量弥散皿中央,1mL样品加入皿外围。再将水溶性阿拉伯胶均匀涂抹于弥散皿边缘,盖上玻璃盖(留一定空隙),通过留出的空隙向已加入样品的弥散皿外围中加入饱和NaOH溶液3mL后,立即封上玻盖避免漏气;在室温下平放于桌面12h后,用0.02mol/L的标准盐酸溶液滴定至混合指示剂终点。

$$\text{脱酰胺程度}(\%) = \frac{\text{样品脱酰胺产生的氨}}{\text{样品完全脱酰胺产生的氨}} \times 100$$

1.2.4 蛋白质含量和水解度的测定 蛋白质含量使用凯氏定氮法测定^[9],氨基酸态氮使用甲醛滴定法测定^[6],蛋白质换算系数为5.7。

$$\text{水解度}(\%) = \frac{\text{酶解上清液氨基酸态氮的含量}}{\text{原料蛋白的总氮含量}} \times 100$$

1.2.5 DPPH·清除率的测定 参考Luo等人^[7]的方法,并作适当修改。吸取样品待测液将每一种酶解液做适当稀释,使其在同一浓度下测定517nm处的吸光度 $A_{\text{样品}}$ 。测定样品待测液2.0mL与无水乙醇2.0mL混合液在517nm处的吸光度 $A_{\text{对照}}$,再测定2.0mL DPPH溶液与2.0mL无水乙醇在517nm处的吸光度 $A_{\text{空白}}$ 。

$$\text{DPPH} \cdot \text{清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_{\text{样品}} - A_{\text{对照}})}{A_{\text{空白}}} \right] \times 100$$

1.2.6 ·OH清除率的测定 ·OH清除率的测定选用邻二氮菲法,反应以 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 体系通过Fenton反应产生羟自由基,总反应可用下式表示: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$ 。邻二氮菲- Fe^{2+} 水溶液被羟自由基氧化为邻二氮菲- Fe^{3+} 后,其536nm最大吸收峰消失,根据以上原理,以 A_{536} 变化反映羟自由基的氧化作用。

样品管:将每一种酶解液做适当稀释,使其在同一浓度下测定。取0.6mL邻二氮菲溶液(5mmol/L)加入0.4mL磷酸盐缓冲液(0.2mol/L, pH7.4)混匀后,加入0.6mL样品溶液及0.6mL EDTA(15mmol/L),再次混匀,后加入0.6mL FeSO_4 溶液(5mmol/L),以去离子水补至2.8mL,充分混匀后加入0.8mL H_2O_2 (0.1%),摇匀后于37℃保温1h,测536nm处吸光值 $A_{536(\text{样品})}$;损伤管:以去离子水代替样品,其余步骤同样品管,所测吸光值计为 $A_{536(\text{损伤})}$;未损伤管:以去离子水代替 H_2O_2 ,其余步骤同损伤管,所测吸光值计为 $A_{536(\text{未损伤})}$ 。

$$\cdot\text{OH清除率}(\%) = \frac{(A_{536(\text{样品})} - A_{536(\text{损伤})})}{(A_{536(\text{未损伤})} - A_{536(\text{损伤})})} \times 100$$

1.2.7 抗氧化能力指数ORAC值的测定 参考Ou等人的方法^[8]。反应在75mmol/L (pH7.4)的磷酸盐缓冲体系中进行,反应体系的总体积为200 μL 。样品和Trolox都用缓冲溶液稀释,Trolox的浓度梯度为0、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 。稀释后的样品和Trolox的加样量都为20 μL 。荧光素加样量为120 μL ,并使其终浓度为70nmol/L。所有的样品和试剂都加入到96孔板里。将96孔板放入酶标仪中,使上述混合物在37℃下,恒温预热15min。之后迅速加入AAPH 60 μL ,使其终浓度为12mmol/L。加样完成后,96孔板迅速放入酶标仪中读数,共读60次,每2min一次。计算曲线下的面积(AUC)。做出Trolox浓度-AUC标准曲线,再代入样品的AUC值,得出样品的Trolox当量(ORAC值)。

1.2.8 酶解液多肽分子量分布的测定 采用Amersham蛋白质纯化系统, Superdex peptide 10/300GL分离柱,洗脱液为0.25mol/L氯化钠, pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液,进样体积为50 $\mu\text{L}/\text{min}$,检测波长214nm,流速为0.5mL/min。标准肽样品与洗脱体积拟合直线方程为 $\log M_w = -0.0577R_v + 4.6288$ ($R^2 = 0.99$),其中 $\log M_w$ 为标准肽分子量的对数, R_v 为保留体积。

1.2.9 氨基酸含量的测定 氨基酸组成分析:采用Waters高效液相色谱,PICO.TAG氨基酸分析柱,温度38℃,检测波长254nm,流速1mL/min的条件,色氨酸分析是将样品液碱解后采用HPLC分析。

1.3 实验次数和数据统计分析

所有实验均进行平行实验,而且重复2~3次;样品的测定均重复3~5次,结果采用SPSS (version16.0)软件进行方差和显著性分析($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 脱酰胺程度的测定

由方法1.2.1可以得到脱酰胺程度分别为24.4%±0.5%和62.6%±0.6%的低高脱酰胺程度两种样品,之后这两种样品的酶解液各自记作SDG-L和SDG-H,未经琥珀酸脱酰胺直接酶解的对照样品记作CK。

2.2 不同脱酰胺程度的小麦面筋蛋白酶解产物抗氧化性的变化

2.2.1 脱酰胺程度对酶解产物清除DPPH·能力的影响 DPPH·是一个大分子相对稳定的自由基,被广泛用于自由基清除剂的筛选^[9-10]。当水解度为10%时,SDG-L的DPPH·清除率相对较高达到88.22%,CK的DPPH·清除率次之为85.53%,SDG-H的DPPH·清除

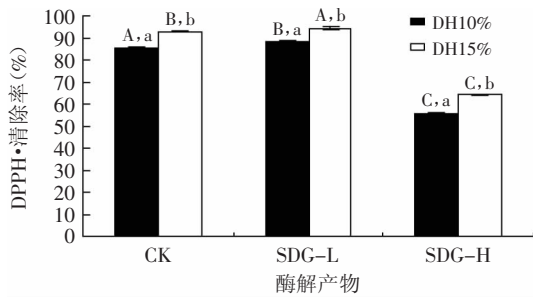


图1 脱酰胺程度对小麦面筋蛋白酶解产物清除DPPH·能力的影响

Fig.1 Effect of deamidation degree on the DPPH radical scavenging activities of hydrolysates

注:不同的大写字母代表不同脱酰胺程度的小麦面筋蛋白在同一水解度下的产物有显著性差异(P<0.05);不同的小写字母代表相同脱酰胺程度的小麦面筋蛋白在不同水解度下的产物有显著性差异(P<0.05);图2、图3同。

率最低为55.63%;当水解度提高到15%时,DPPH·清除率都有所提高。其中,SDG-L的DPPH·清除率最高为94.39%,CK的DPPH·清除率次之为92.91%,SDG-H的DPPH·清除率最低为64.32%。随着水解度的提高,相同脱酰胺程度的小麦面筋蛋白酶解产物的DPPH·清除率存在显著性差异(P<0.05)。

2.2.2 脱酰胺程度对酶解产物清除·OH能力的影响

在人体内所产生的多种活性氧中,·OH的危害性最大,它会和生物大分子如蛋白质、DNA反应^[11]。因此,清除·OH对人体防御各种疾病具有重要意义^[12-13]。当水解度为10%时,SDG-L的·OH清除率相对较高达到60.17%,CK的·OH清除率次之,为54.17%,SDG-H的·OH清除率最低,为46.33%;当水解度提高到15%时,·OH清除率都有所提高。其中,SDG-L的·OH清除率最高,为71.33%;CK的·OH清除率次之,为66.67%;SDG-H的·OH清除率最低,为53%。随着水解度的提高,相同脱酰胺程度的小麦面筋蛋白酶解产物的·OH清除率存在显著性差异(P<0.05)。

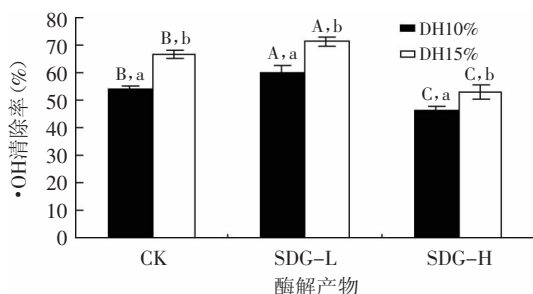


图2 脱酰胺程度对小麦面筋蛋白酶解产物清除羟基自由基能力的影响

Fig.2 Effect of deamidation degree on the ·OH radical scavenging activities of hydrolysates

2.2.3 脱酰胺程度对酶解产物ORAC值的影响 与其他方法相比,ORAC方法可以提供稳定可控的自由基,这些自由基与生命现象中的自由基具有高度的一致性^[14]。当水解度为10%时,SDG-L的ORAC值相对较高,达到1247.59μmol Trolox/g,CK的ORAC值次之,

为1158.59μmol Trolox/g,SDG-H的ORAC值最低为1008.35μmol Trolox/g;当水解度提高到15%时,各酶解产物的ORAC值都有所提高。其中,SDG-L的ORAC值最高,达到1468.80μmol Trolox/g,CK的ORAC值次之,为1430.38μmol Trolox/g,SDG-H的ORAC值最低,为1348.66μmol Trolox/g。随着水解度的提高,相同脱酰胺程度的小麦面筋蛋白酶解产物的ORAC值存在显著性差异(P<0.05)。

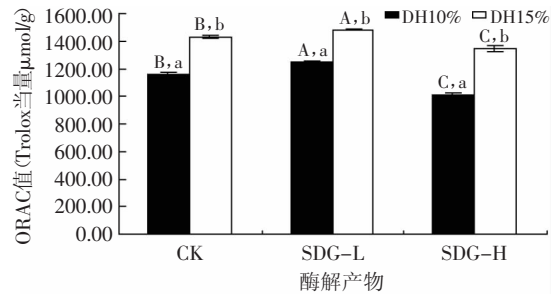


图3 脱酰胺程度对小麦面筋蛋白酶解产物ORAC值的影响

Fig.3 Effect of deamidation degree on ORAC value of hydrolysates

2.3 不同脱酰胺程度的小麦面筋蛋白酶解液肽分子量分布

表1 小麦面筋蛋白酶解产物分子量分布(%)

分子量(u)	CK (%)	SDG-L (%)	SDG-H (%)
>10000	10.16	5.30	5.20
5000~10000	56.29	47.38	59.73
3000~5000	21.48	28.49	26.18
1000~3000	9.27	15.41	7.25
<1000	2.80	2.92	1.34

表1是水解度为15%时,酶解产物肽分子量分布。从表1中可以看出,低脱酰胺程度下,小于3000u的肽段含量与对照相比增加了6.26%;高脱酰胺程度下,小于3000u的肽段减少到8.59%,而分子量在5000~10000u的肽段增多,此部分肽段比例达到59.73%。Adler-Nissen^[15]曾指出酶解前部分变性会产生更多中间分子量的肽段和较少的大分子量含量降低。因此高脱酰胺程度处理的酶解产物小于3000u的肽段含量降低和5000~10000u的肽段含量增多的现象可能是由高脱酰胺过程中的热处理对蛋白的部分变性引起的。

分子量小于3000u的多肽对生理功能具有重要影响。如Wu等人^[16]在研究肽的组成和抗氧化性关系时发现,分子量1400u左右的肽段具有很强的抗氧化性;Chiang等人^[17]发现,500~2000u的大豆肽有较强的抗氧化性,而3000u以上的肽的抗氧化性较低。SDG-L的抗氧化性较好可能是由于酶解生成了更多的小分子的肽;而SDG-H的抗氧化性有所降低是因为高温造成的部分变性使蛋白更不容易被酶解成小分子肽。

2.4 不同脱酰胺程度的小麦面筋蛋白酶解液肽氨基酸组成变化

表2 小麦面筋蛋白酶解产物肽氨基酸组成(%)

Table 2 Amino acid composition of wheat gluten hydrolysates

氨基酸种类	CK	SDG-L	SDG-H
天冬氨酸	2.55	2.78	2.42
谷氨酸	43.87	33.89	37.89
丝氨酸	2.02	3.04	3.21
甘氨酸	6.38	4.62	4.86
组氨酸	3.02	1.95	1.86
精氨酸	1.37	1.75	1.57
苏氨酸	3.09	3.02	2.98
丙氨酸	2.20	2.54	2.05
脯氨酸	22.32	16.48	17.52
酪氨酸	0.42	1.97	1.96
缬氨酸	2.67	3.84	3.58
甲硫氨酸	0.71	1.87	1.56
半胱氨酸	0.92	1.42	1.07
异亮氨酸	2.38	4.41	3.95
亮氨酸	2.08	6.32	5.39
色氨酸	0.24	2.02	1.24
苯丙氨酸	3.57	5.95	5.53
赖氨酸	0.19	2.15	1.35
总量	100.00	100.00	100.00
疏水性氨基酸含量	33.26	39.01	37.22
抗氧化性氨基酸含量	2.29	7.28	5.83

注:肽氨基酸含量=总氨基酸含量-游离氨基酸含量;疏水性氨基酸:亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、缬氨酸、脯氨酸;抗氧化性氨基酸:酪氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、色氨酸。

表2为水解度为15%时,不同脱酰胺程度小麦面筋蛋白酶解产物肽氨基酸组成。从疏水性氨基酸含量上看,SDG-L的疏水性氨基酸含量最高到达39.01%,SDG-H的为37.22%,CK的疏水性氨基酸含量相对较低,为33.26%。这是因为脱酰胺改性增加了分子间的静电斥力,使更多的疏水性氨基酸暴露出来,提高了小麦面筋蛋白的溶解性,使SDG-L和SDG-H的疏水性氨基酸含量有所提高。脱酰胺改性后,抗氧化性氨基酸的含量比对照的增加,其中SDG-L的抗氧化性氨基酸含量最高,为7.28%。

含疏水性氨基酸的肽对酶解产物的抗氧化活性有重要的影响^[8]。酪氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸和色氨酸被普遍认为是抗氧化氨基酸^[9]。这使得疏水性和抗氧化性氨基酸含量相对较高的SDG-L的抗氧化性有所增加,而SDG-H的疏水性和抗氧化氨基酸含量虽然也有所提高,但是小分子肽段含量的减少使其抗氧化性降低。这也说明了酶解产物肽分子量大小对抗氧化活性起着重要作用。

3 结论

研究表明,低脱酰胺程度下,酶解产物的抗氧化性增加,但高脱酰胺程度下,酶解产物抗氧化性降低。通过肽分子量和氨基酸组成分析表明,低脱酰胺条件下,酶解产物抗氧化性提高的原因是由于酶解产物中含有疏水性和抗氧化性氨基酸的小分子量肽的含量增加了;而高脱酰胺导致酶解产物抗氧化性降低的原因主要是高温造成的部分变性使具有生理活性的小分子肽段含量减少。

参考文献

- [1] 钟耕,陈宗道,闵燕萍,等. 小麦面筋蛋白及其化学改性研究[J]. 粮食与饲料工业,2009(5):41-47.
- [2] Liao L, Qiu CY, Liu TX, et al. Susceptibility of wheat gluten to enzymatic hydrolysis following deamidation with acetic acid and sensory characteristics of the resultant hydrolysates[J]. J Cereal Sci, 2010, 52(3): 1-9.
- [3] 仇超颖,廖兰,崔春,等. 琥珀酸脱酰胺对小麦面筋蛋白酶解特性的影响[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8): 74-78.
- [4] Kato A, Tanaka A, Matsudomi N, et al. Deamidation of food proteins by protease in alkaline pH[J]. J Agric Food Chem, 1987, 35(2): 224-227.
- [5] 大连轻工业学院, 华南理工大学. 食品分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1994: 223.
- [6] Nilsang S, Lertsiri S, Suphantharika M, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases[J]. J Food Engin, 2005, 70(4): 571-578.
- [7] Luo W, Zhao MM, Yang B, et al. Identification of bioactive compounds in *Phyllanthus emblica* L. fruit and their free radical scavenging activities[J]. Food Chem, 2009, 114(2): 499-504.
- [8] Ou B, Hampsch-Woodill M, L R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(10): 4619-4626.
- [9] Shahidi F, Liyana-Pathirana CM, Wall DS. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions[J]. Food Chem, 2006, 99(3): 478-483.
- [10] Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, et al. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type[J]. Food Chem, 2007, 102(4): 1317-1327.
- [11] Cacciutoola MA, Trinha L, Lumpkina JA, et al. Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells[J]. Free Radic Biol and Med, 1993, 14(3): 267-276.
- [12] Je JY, Park PJ, Kim SK. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate[J]. Food Res Int, 2005, 38(1): 45-50.
- [13] Miliauskasa G, Venskutonis PR, Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts[J]. Food Chem, 2004, 85(2): 231-237.
- [14] 续洁琨, 姚新生, 栗原博. 抗氧化能力指数(ORAC)测定原理及应用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(8): 1015-1021.
- [15] Adler-Nissen J. A Review of food protein hydrolysis-general issues. In enzymatic hydrolysis of food proteins[M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 30-35.
- [16] Wu HC, Chen HM, Shiau CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Suconber austrissicus*) [J]. Food Res Int, 2003, 36(9-10): 949-957.
- [17] Moure A, Dominguez H, Parajó JC. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial

二氢杨梅素与胰蛋白酶相互作用特性的研究

赵红辉, 韦庆益, 宁正祥, 袁尔东*, 陈磊
(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510641)

摘要: 研究二氢杨梅素与胰蛋白酶相互作用特性, 测定二氢杨梅素与胰蛋白酶反应前后胰蛋白酶催化活力、荧光光谱的变化和二氢杨梅素清除ABTS⁺能力的变化。二氢杨梅素与胰蛋白酶在37℃下反应10min后, 酶催化活力及二氢杨梅素清除ABTS⁺能力都有明显减弱。同时, 二氢杨梅素可使胰蛋白酶发生荧光猝灭, 猝灭类型为静态猝灭, 猝灭常数K_q是2.3180×10¹²(mol/L)⁻¹S⁻¹, 结合位点数n为0.6819。

关键词: 二氢杨梅素, 胰蛋白酶, 酶活性, 荧光, 抗氧化

Study on the interaction between dihydromyricetin and trypsin

ZHAO Hong-hui, WEI Qing-yi, NING Zheng-xiang, YUAN Er-dong*, CHEN Lei

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

Abstract: The interaction between dihydromyricetin (DMY) and trypsin was studied by measuring the catalytic activity, the change in the antioxidant activity and fluorescence spectra after being interacted with trypsin. After treatment for 10min at 37°C, dihydromyricetin led to the inhibition of catalytic activity. Trypsin could mask the total antioxidant capacity by scavenging ABTS⁺. DMY led the quenching of intrinsic fluorescence of trypsin in physiological condition. With fluorescence quenching method, the quenching constant K_q was found to be 2.3180×10¹²(mol/L)⁻¹S⁻¹ and the number of binding site N was 0.6819.

Key words: dihydromyricetin; trypsin; catalytic activity; fluorescent; antioxidant

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)11-0053-03

二氢杨梅素(3,5,7,3',4',5'-六羟基-2,3-双氢黄酮醇, Dihydromyricetin, DMY, 图1)是一种多酚羟基双氢黄酮醇, 具有抗氧化、抑菌、调节血糖、抗肿瘤、抗高血压、保肝护肝等诸多生物活性^[1-3], 在食品、保健食品等领域有广泛的应用。由于分子内多个酚

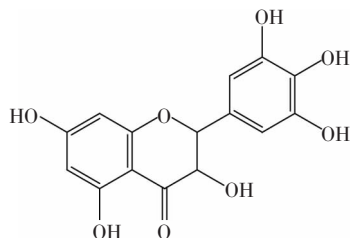


图1 二氢杨梅素的化学结构

Fig.1 Structure of dihydromyricetin

羟基的存在, DMY经口摄入之后, 在消化道内可能与其中的酶蛋白发生结合作用, 从而影响到其自身生物活性及酶催化活性的有效发挥。本文对DMY与胰蛋白酶的相互作用特性进行研究, 以期DMY在食品工业中的更合理有效利用提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胰蛋白酶 上海伯奥生物科技有限公司; 二氢杨梅素(98%) Sigma公司; 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS) 上海华蓝化学科技有限公司; 其余试剂均为国产分析纯, 所有溶液均用去离子水配制, 并用0.1mol/L的PBS缓冲液以保持生理条件。

TU-1810PC型紫外可见分光光度计; 4500荧光分光光度计 日本Hitachi; pH计, 离心机等。

1.2 实验方法

1.2.1 DMY对胰蛋白酶催化活性的影响 采用茚三酮比色法测定胰蛋白酶活力。胰蛋白酶催化水解酪

收稿日期: 2011-09-26 * 通讯联系人

作者简介: 赵红辉(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学。

基金项目: 国家自然科学基金项目(21002034)。

effluents and their hydrolysates[J]. Proc Biochem, 2006, 41(2): 447-456.

[18] 程云辉, 曾知音, 郭建伟, 等. 抗氧化肽的酶法制备及其构效关系的研究进展[J]. 食品与机械, 2009, 25(6): 174-180.

[19] Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44(4): 2619-2623.