

猪皮胶原蛋白抗氧化肽的分离纯化 及体外抗氧化活性研究

李 诚¹, 肖 岚^{1,2}, 付 刚¹, 陈代文¹, 张荣华¹, 余 霞¹

(1. 四川农业大学食品学院, 四川雅安 625014;

2. 四川旅游学院食品科学系, 四川成都 610100)

摘 要: 采用碱性蛋白酶对猪皮胶原蛋白进行酶解, 制备抗氧化肽。为了得到抗氧化活性高且纯度高的抗氧化肽, 本实验采用多种体外抗氧化评价体系研究超滤获得的各分子量段猪皮胶原蛋白抗氧化肽的体外抗氧化活性; 依次采用离子交换色谱、凝胶色谱对猪皮胶原蛋白酶解液进行分离纯化。结果显示: 超滤分离获得 5~10ku 的抗氧化肽较其他分子量范围的抗氧化肽具有较好的抗氧化活性; 采用离子交换色谱、凝胶色谱两种分离方法分步分离能达到较好的分离纯化效果, 离子交换色谱分离得到 7 个组分, 其中组分 P₁ 对 O₂⁻ 清除率最高, 多肽浓度为 0.85mg/mL 时, 清除率为 46.30%, IC₅₀ 值为 1.24mg/mL; 该组分经过凝胶色谱分离后得到 2 个组分, 其中组分 P_{1-B} 对 O₂⁻ 清除率最高, 多肽浓度为 0.9mg/mL 时, 清除率为 49.43%, IC₅₀ 值为 0.98mg/mL。

关键词: 抗氧化肽, 超滤, 离子交换色谱, 凝胶色谱, 抗氧化活性, 分离纯化

Study on separation and purification of antioxidant peptide from pigskin collagen protein and antioxidant activity *in vitro*

LI Cheng¹, XIAO Lan^{1,2}, FU Gang¹, CHEN Dai-wen¹, ZHANG Rong-hua¹, YU Xia¹

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

2. Department of Food Science, Sichuan Tourism University, Chengdu 610100, China)

Abstract: Alkaline protease were used to hydrolyze pigskin collagen protein to get antioxidant peptides. And to get the one with high antioxidant activity and purity, a variety of evaluative systems *in vitro* had been used to research the antioxidant activity of antioxidant peptides with different molecular weights which were obtained through ultra-filtration. At the same time, ion exchange chromatography and gel permeation chromatography were used to separate and purify the enzymolysis solution. It showed that: the antioxidant activity of antioxidant peptides with 5~10ku which were obtained through ultra-filtration was better compared to other molecular weights. Ion exchange chromatography and gel permeation chromatography could make a good effect on separation and purification, seven components had been separated by ion exchange chromatography, including the component P₁ with the highest scavenging rate on O₂⁻ of 46.30% and IC₅₀ of 1.24mg/mL when the concentration of polypeptide was 0.85mg/mL. And then, the component P₁ was purified into two components by gel chromatography, in which component P_{1-B} with the highest scavenging rate on O₂⁻ of 49.43% and IC₅₀ of 0.98mg/mL when the concentration of polypeptide was 0.9mg/mL.

Key words: antioxidant peptide; ultra-filtration; ion exchange chromatography; gel chromatography; antioxidant activity; separation and purification

中图分类号: TS251.92

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2014)15-0095-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.15.011

我国是一个畜牧业大国, 猪的生产和消费总量居世界前列, 每年大约产 6 亿张猪皮^[1], 资源量极为丰富。猪皮的蛋白质含量高达 33%, 其中胶原蛋白

含量占 87.8%, 具有很高的利用价值^[2]。但因其特殊异味、不良口感、消化率低、加工不便等不利因素使猪皮资源的营养及经济价值未得到充分的利用和体现。近年来, 人们发现水解胶原蛋白得到的肽具有良好的抗氧化活性, 并且抗氧化肽具有分子量小、低毒、易吸收、高效等特点; 目前国内外酶解鱼类胶原蛋白获得具有抗氧化功能多肽的研究报道较多, 对于酶解猪皮胶原蛋白获得具有抗氧化功能多肽的研究报道较少。

收稿日期: 2013-11-18

作者简介: 李诚(1964-), 男, 博士在读, 教授, 研究方向: 动物性食品加工与质量安全。

基金项目: 四川省教育厅项目——酶解猪皮制备抗氧化肽关键技术研究(12ZB102)。

为此,本实验在前期研究的基础上^[3-5],采用碱性蛋白酶对猪皮胶原蛋白酶解,利用超滤技术对最佳酶解条件下制备出的胶原蛋白酶解液进行分离,得到分子质量大于10、5~10、3~5ku和小于3ku的4个分子质量段的抗氧化肽,采用多种体外抗氧化评价体系分析各分子质量段抗氧化肽的体外抗氧化特性,从而确定抗氧化活性最高的抗氧化肽的分子质量范围;采用离子交换色谱对最佳酶解条件下制备出的胶原蛋白酶解液进行分离,以 O_2^- 清除率为指标,对抗氧化活性最强的肽段继续采用凝胶色谱进行分离,以 O_2^- 清除率为指标,分离出抗氧化活性最强的抗氧化肽,为新的抗氧化剂的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜猪皮 市售;SP-Sephadex C-25 Pharmacia公司;Sephadex G-25 Pharmacia公司;中性蛋白酶(酶活力 1.2×10^5 U/g)广西南宁庞博生物工程有限公司;Alcalase 2.4L碱性蛋白酶(酶活力 1.8×10^5 U/g)丹麦NOVO公司;其他试剂均符合国家有关标准。

UV-3200紫外可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司;超滤管(截留分子量分别为10000、5000、3000u)德国Sartorius公司;POWERDRY PL3000冻干机 Thermo公司;Duo Flow 5.2层析系统 Bio-Rad公司;BT-200B数显恒流泵 上海沪西分析仪器厂有限公司;BS-100A自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂有限公司;RE5203旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂;BR4i型多功能冷冻离心机 法国THERMO JOUAN公司。

1.2 实验方法

1.2.1 猪皮胶原蛋白酶解物的制备 将前期实验制备的胶原蛋白^[6]配制成浓度4%的溶液,90℃预热5min使其解聚,冷却至室温,在55℃和pH7.5的条件下,按酶与底物比6000U/g加入Alcalase 2.4L碱性蛋白酶启动水解反应,在反应过程中每隔0.5h,以1mol/L的NaOH或HCl调节pH以维持pH恒定,水解4h后,沸水浴灭酶10min,冷却后将水解液离心,取上清液冷冻干燥后即得胶原蛋白酶解物,并于-20℃条件下保存备用^[5]。

1.2.2 不同分子质量段酶解物的分离 将制得的胶原蛋白酶解液过截留分子量为10000u的超滤管;将其透过液过截留分子量为5000u的超滤管;继续将其透过液过截留分子量为3000u的超滤管,并收集各个分子质量段的酶解液,得到分子质量大于10ku(组分I)、5~10ku(组分II)、3~5ku(组分III)和小于3ku(组分IV)的4种不同分子质量段抗氧化肽,通过冷冻干燥后备用^[3]。

将4种不同分子质量段抗氧化肽分别配制成浓度5%、10%、15%、20%、25%、30%的样液,采用不同的抗氧化体系研究不同分子质量段抗氧化肽的体外抗氧化活性。

1.2.2.1 多肽浓度的测定 采用双缩脲法测定^[7]。

1.2.2.2 不同分子质量段抗氧化肽对 O_2^- 清除能力的测定 分别取不同浓度样液0.1mL,加入4.5mL 0.05mol/L Tris-HCl缓冲液(pH8.2),震荡混匀,置于25℃水浴中保温20min,加入0.1mL 3mmol/L的邻苯三酚溶液,混匀后于25℃水浴中反应并开始计时,在325nm处测定吸光度值,每隔30s读数,5min后结束;取0.1mL双蒸水加入2.8mL 0.1mol/L Tris-HCl缓冲液调零;作吸光度随时间变化的回归方程,其斜率为邻苯三酚的自氧化速率。空白对照组以相同体积的双蒸水代替样液, O_2^- 清除率的计算公式^[8]:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A_0 -空白对照组邻苯三酚自氧化速率($\Delta A/\text{min}$); A_i -试样组邻苯三酚自氧化速率($\Delta A/\text{min}$)。

1.2.2.3 不同分子质量段抗氧化肽对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力的测定 精密量取150mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液(PBS)2.0mL 7.5mmol/L邻二氮菲0.2mL 7.5mmol/L硫酸亚铁溶液0.2mL,不同浓度样液0.4mL,蒸馏水0.8mL,体积分数0.1%双氧水0.4mL于试管中,混匀做试样组,将各试管同时置于37℃水浴1h,测定536nm处吸光值。空白组以蒸馏水代替试样,其余步骤同试样组;空白对照组以蒸馏水分别代替试样和双氧水,其余步骤同试样组。 $\cdot\text{OH}$ 清除率的计算公式^[9]:

$$E_{(\cdot\text{OH})}(\%) = (A_{\text{试样}} - A_0) / (A_{\text{空白对照}} - A_0) \times 100$$

式中: $A_{\text{试样}}$ -试样组在波长536nm的吸光度值; A_0 -空白组在波长536nm的吸光度值; $A_{\text{空白对照}}$ 为空白对照组在波长536nm的吸光度值。

1.2.2.4 不同分子质量段抗氧化肽对DPPH \cdot 的清除能力的测定 精确称量0.0025g DPPH,溶解到100mL无水乙醇中,配制成浓度为 6.5×10^{-5} mol/L DPPH乙醇溶液。分别吸取2mL不同浓度的样液与2mL DPPH的无水乙醇溶液置于试管中,摇匀,在室温下反应30min后在波长517nm处测定吸光度(A_i);分别吸取2mL DPPH无水乙醇溶液与无水乙醇于试管中,摇匀,在室温下反应30min后在517nm波长处测定吸光度(A_c);最后分别吸取2mL样液和无水乙醇于试管中,摇匀,在室温下反应30min后在517nm波长处测定吸光度(A_j)。DPPH自由基清除率计算公式^[10]:

$$\text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_c}\right) \times 100$$

式中: A_i -2mL样液与2mL DPPH的无水乙醇溶液混合后在波长517nm的吸光度值; A_j -2mL样液与无水乙醇溶液混合后在波长517nm的吸光度值; A_c -2mL DPPH无水乙醇溶液与无水乙醇混合后在波长517nm的吸光度值。

1.2.2.5 不同分子质量段抗氧化肽的还原能力的测定 取不同浓度样液1mL,分别加入2.5mL 0.2mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)(pH6.6)和2.5mL 1%的铁氰化钾溶液于试管中混匀。混合物在50℃水浴中反应20min,迅速冷却并加入2.5mL 10%的TCA(三氯乙酸),混匀后在3000r/min转速下离心10min。取1mL上清液加入0.2mL 0.1%的三氯化铁溶液混匀,再加1mL蒸馏水摇匀,以蒸馏水调零,室温反应

10min 后在 700nm 处测定吸光度^[11]。

1.2.2.6 不同分子质量段抗氧化肽的抗脂质过氧化抑制能力的测定 取 7.2 mL 0.4% 的大豆卵磷脂溶液, 加入样液 0.8mL, 加入 0.8mL 10mmol/L 的 FeSO₄ 催化氧化反应, 混合后置于恒温水浴振荡器上, 37℃ 保温 15min, 然后加入 2mL 20% 的三氯乙酸, 5000r/min 下离心 10min; 取上清液 4mL, 加入 2mL 0.8% 的硫代巴比妥酸溶液, 摇匀后沸水浴 15min, 于 532nm 处测定吸光值。抗脂质过氧化能力的计算公式^[12]:

$$\text{抗脂质过氧化抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{A_s}{A_0}\right) \times 100$$

式中: A₀ - 空白对照液于 532nm 处的吸光度; A_s - 样品溶液于 532nm 处的吸光度。

1.2.3 胶原蛋白酶解液的离子交换色谱 SP-Sephadex C-25 分离

1.2.3.1 流速对分离效果的影响 根据试管小样法结果初步确定 SP-Sephadex C-25 分离猪皮胶原蛋白酶解液的色谱条件: 平衡液: 0.02 mol/L 醋酸缓冲液 (pH4.0), 用 0~1mol/L NaCl 溶液进行线性梯度洗脱。上层析柱的溶液均采用 0.45μm 的微孔滤膜过滤后脱气 30min 使用。采用离子交换层析柱 (柱型: 1.6cm × 20cm), 分别采用 0.5、1、2mL/min 的洗脱流速对样品进行洗脱, 每管收集 2mL 洗脱液, 于波长 214nm 下测量各管的吸光度, 根据吸光度绘制色谱图。根据色谱图的分离效果确定最佳洗脱流速。

1.2.3.2 胶原蛋白酶解液的分离 根据优化出的条件采用柱型为 2.5cm × 40cm 的离子交换层析柱对胶原蛋白酶解液进行分离。每管收集 9mL 洗脱液, 214nm 下测定吸光度; 合并同一分离峰的洗脱液, 浓缩即得各分子质量段的抗氧化肽, 测定其抑制 O₂⁻ 的活性。

1.2.4 抑制 O₂⁻ 的活性最强组分的凝胶过滤色谱分离 对离子交换色谱分离出的抑制 O₂⁻ 的活性最强的抗氧化肽采用 Sephadex G-25 进行分离。柱型: 1.6cm × 80cm; 洗脱液: 超纯水; 洗脱流速: 0.5mL/min; 上样量: 2.5mg; 每管收集 4mL 洗脱液, 214nm 下测定吸光度; 合并同一分离峰的洗脱液, 浓缩即得各分子质量段的抗氧化肽, 测定其抑制 O₂⁻ 的活性。

1.2.5 数据处理与分析 每个实验重复三次, 数据采用 SPSS18.0 软件和 Excel 2003 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同分子质量段猪皮胶原蛋白酶解物的体外抗氧化活性

2.1.1 不同分子质量段猪皮胶原蛋白酶解物对 O₂⁻ 的清除能力 不同分子质量段猪皮胶原蛋白酶解物组分对 O₂⁻ 的清除能力结果如图1和图2所示。

由图1可知, 在实验浓度范围内 (5~30mg/mL), 各分子质量段抗氧化肽对 O₂⁻ 均有一定的清除作用, 且随着浓度的增加其清除能力增大; 同时, 各分子质量段抗氧化肽对 O₂⁻ 的清除能力存在显著性 (p < 0.05) 差异; 由图2可知, 通过 IC₅₀ 值比较, 各分子质量段抗氧化肽清除 O₂⁻ 自由基能力顺序为: 酶解液 > 组分 II > 组分 III > 组分 IV > 组分 I。酶解液对

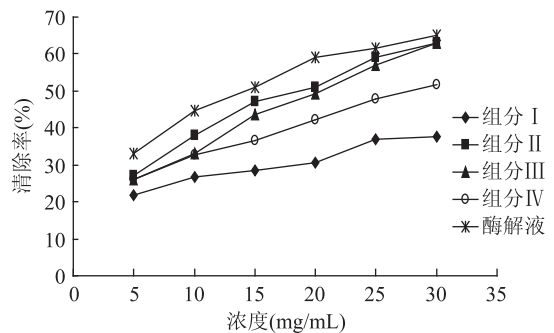


图1 不同浓度各分子质量段抗氧化肽对 O₂⁻ 的清除能力
Fig1 Scavenging capacity of antioxidant peptide with different molecular weights at different concentrations on O₂⁻

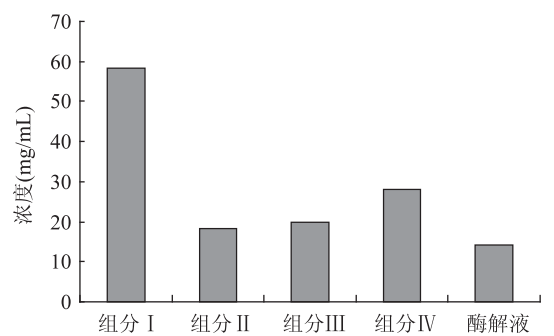


图2 不同分子质量段抗氧化肽清除 O₂⁻ 自由基能力的 IC₅₀ 值
Fig.2 IC₅₀ value of antioxidant peptide with different molecular weights on O₂⁻ scavenging capacity

O₂⁻ 的清除能力最高, 其 IC₅₀ 值为 14.25mg/mL。

2.1.2 不同分子质量段抗氧化肽对 ·OH 的清除能力 不同分子质量段抗氧化肽对 ·OH 的清除能力结果如图3和图4所示。

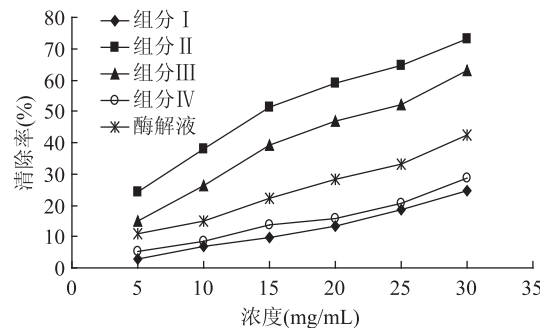


图3 不同浓度各分子质量段抗氧化肽对 ·OH 的清除能力
Fig3 Scavenging capacity of antioxidant peptide with different molecular weights at different concentrations on ·OH

由图3可知, 在实验浓度范围内 (5~30mg/mL), 各分子质量段抗氧化肽对 ·OH 均有一定的清除作用, 且随着浓度的增加清除能力增强; 同时, 各分子质量段抗氧化肽对 ·OH 的清除能力存在极显著性 (p < 0.01) 差异; 由图4可知, 通过比较 IC₅₀ 值, 各分子质量段抗氧化肽清除 ·OH 自由基能力顺序为: 组分 II > 组分 III > 酶解液 > 组分 IV > 组分 I。组分 II 即分子量 5~10ku 的抗氧化肽对 ·OH 的清除能力最高, 其 IC₅₀ 值为 15.35mg/mL。

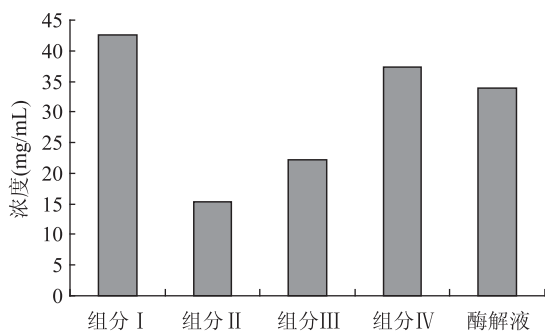


图4 不同分子质量段抗氧化肽清除·OH能力的 IC_{50} 值

Fig.4 IC_{50} value of antioxidant peptide with

different molecular weights on ·OH scavenging capacity

2.1.3 不同分子质量段抗氧化肽对 DPPH· 的清除能力 不同分子质量段抗氧化肽对 DPPH· 的清除能力结果如图5和图6所示。

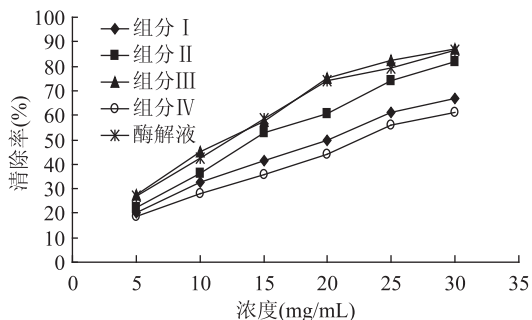


图5 不同浓度各分子质量段抗氧化肽对 DPPH· 的清除能力

Fig.5 Scavenging capacity of antioxidant peptide with different molecular weights at different concentrations on DPPH·

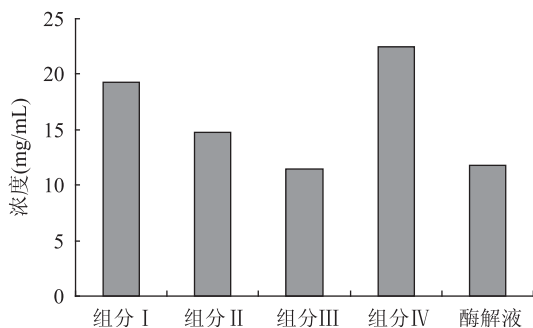


图6 不同分子质量段抗氧化肽清除 DPPH· 能力的 IC_{50} 值

Fig.6 IC_{50} value of antioxidant peptide with different molecular weights on DPPH· scavenging capacity

由图5可知,在实验浓度范围内(5~30mg/mL),不同分子质量段抗氧化肽对 DPPH· 均有一定的清除作用,且随着浓度的增加清除作用增强;但在浓度范围内不同分子质量段抗氧化肽的清除能力无显著差异($p > 0.05$);由图6可知,通过比较 IC_{50} 值,各分子质量段抗氧化肽清除 DPPH· 自由基清除能力顺序为:组分 III > 酶解液 > 组分 II > 组分 I > 组分 IV。组分 III 即分子质量段 3~5ku 的抗氧化肽对 DPPH· 的清除率最高,其 IC_{50} 值为 11.41mg/mL。

2.1.4 不同分子质量段抗氧化肽的还原能力 不同分子质量段抗氧化肽的还原能力结果如图7所示。

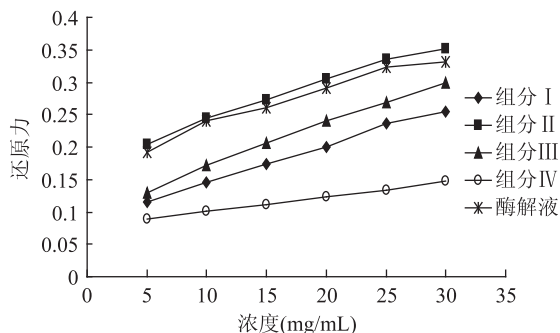


图7 不同浓度各分子质量段抗氧化肽的还原能力

Fig.7 Reducing capacity of antioxidant peptide with different molecular weights at different concentrations

由图7可知,在实验浓度范围内(5~30mg/mL),不同分子质量段抗氧化肽均具有一定的还原能力,且还原力随浓度的增加而增强;组分 II 与酶解液的还原力显著($p < 0.05$)大于组分 I、组分 III、组分 IV;组分 II 与酶解液的还原力无显著差异($p > 0.05$),而组分 I、组分 III、组分 IV 的还原力存在显著差异($p < 0.05$);不同分子质量段抗氧化肽的还原能力顺序为:组分 II > 酶解液 > 组分 III > 组分 I > 组分 IV。组分 II 即分子质量 5~10ku 的抗氧化肽还原力最高。

2.1.5 不同分子质量段抗氧化肽对脂质过氧化抑制能力 不同分子质量段抗氧化肽对脂质过氧化抑制能力结果如图8和图9所示。

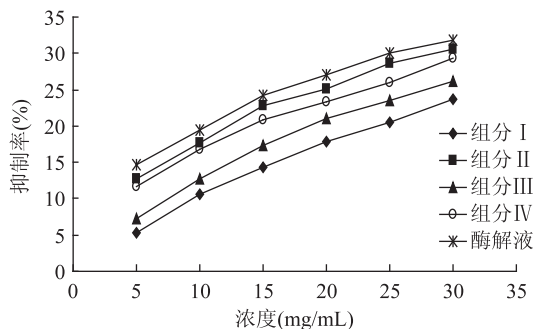


图8 不同浓度各分子质量段抗氧化肽对脂质过氧化抑制能力

Fig.8 Inhibition capacity of antioxidant peptide with different molecular weights at different concentrations on lipid oxidation

由图8可知,在实验浓度范围内(5~30mg/mL),不同分子质量段抗氧化肽均具有一定的对脂质过氧化抑制能力,且随浓度增加而增强,与浓度呈现明显的剂量关系;在浓度范围内不同分子质量段抗氧化肽对脂质过氧化抑制能力无显著差异($p > 0.05$);不同分子质量段抗氧化肽对脂质过氧化抑制能力顺序为:酶解液 > 组分 II > 组分 IV > 组分 III > 组分 I。

通过直线回归求得不同分子质量段抗氧化肽对脂质过氧化抑制能力的 IC_{50} 值,如图9所示,组分 II 即分子质量段 5~10ku 的抗氧化肽对脂质过氧化抑制率达到 50% 时的浓度最低,其 IC_{50} 值为 77.81mg/mL。

2.2 胶原蛋白酶解液的离子交换色谱 SP-Sephadex C-25 分离结果

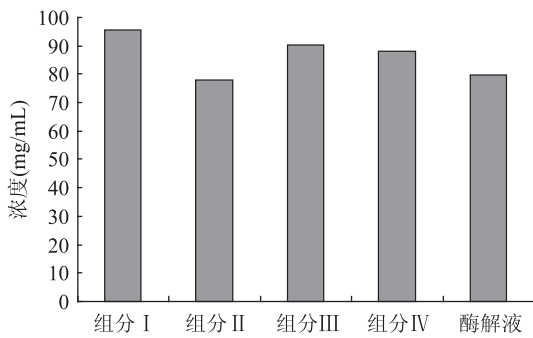


图9 不同分子质量段抗氧化肽对脂质过氧化抑制能力的 IC₅₀ 值

Fig.9 IC₅₀ value of antioxidant peptide with different molecular weights on inhibition capacity of lipid oxidation

2.2.1 流速对分离效果的影响 本实验根据参考文献^[13]采用试管法初步确定实验条件;适当的流速可以提高离子交换层析的分离效果,因此本实验对流速进行摸索,实验结果如图 10 所示。从图可以看出,流速为 2mL/min 时分离效果较好。

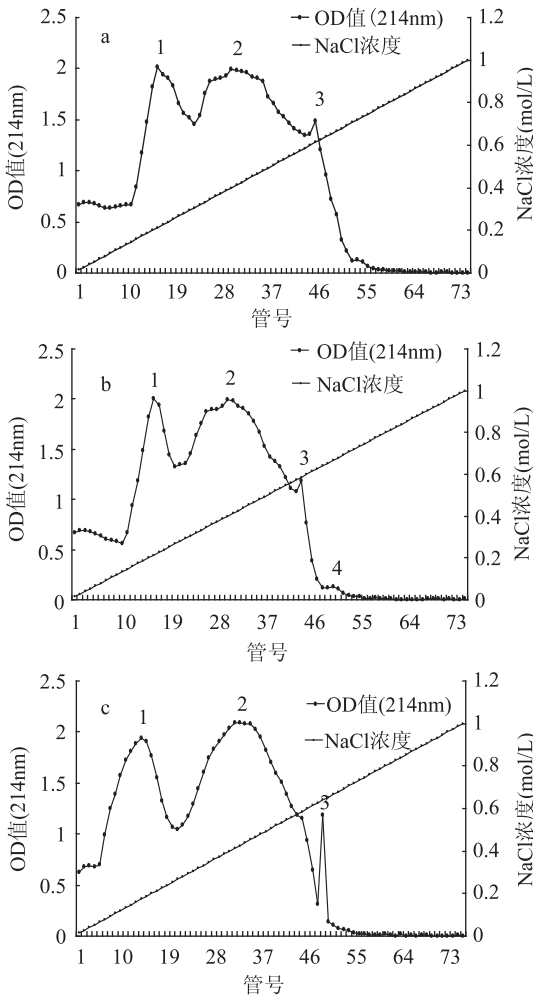


图 10 离子交换分离图谱

Fig.10 The separation pattern of Ion exchange chromatography

注:分别表示流速分别为 0.5、1、2 mL/min 时的离子交换分离图谱。

从图 10 可以看出,用 0~1mol/L NaCl 溶液进行线性梯度洗脱时,NaCl 浓度在 0.8mol/L 后基本上无

洗脱峰流出,因此选择 0~0.8mol/L NaCl 溶液进行线性梯度洗脱。色谱条件选择平衡液为 pH4.0 的 0.02mol/L 醋酸缓冲液,上样量 0.75mg/mL,流速为 2mL/min,上样浓度 1.5 mg/mL,在确定了 SP-Sephadex C-25 色谱条件后,实验采用柱型为 2.5cm × 40cm 的离子交换柱对猪皮胶原蛋白酶解液进行分离。

2.2.2 胶原蛋白酶解液的分离结果 如图 11 所示:猪皮胶原蛋白酶解物经过 SP-Sephadex C-25 离子交换色谱得到了 7 个峰形较好的峰,即组分 P₁~P₇;分别收集这 7 个组分进行抗氧化活性的测定,结果见图 12。

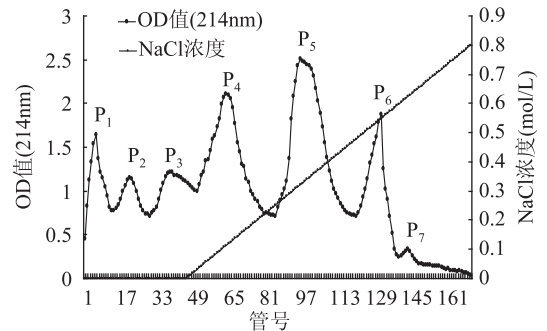


图 11 SP-Sephadex C-25 离子交换分离图谱

Fig.11 The separation pattern of Ion exchange chromatography on SP-Sephadex C-25

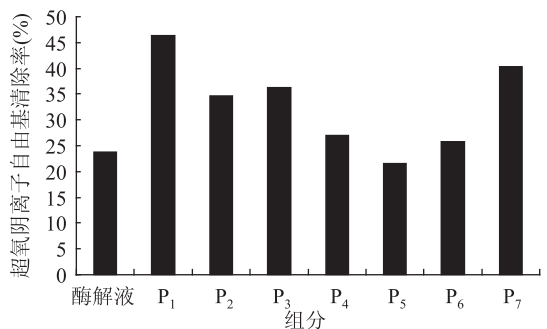


图 12 各组分抗氧化活性(流速:0.85mg/mL)

Fig.12 The antioxidant capacity of each component (flow rate:0.85mL/min)

由图 12 可知:经过 SP-Sephadex C-25 离子交换色谱后,部分组分活性提高,组分 P₁ 活性最高, O₂⁻ 清除率达到 46.30%;组分 P₂、组分 P₃ 和组分 P₇ 的抗氧化活性均远高于未经离子交换色谱分离的胶原蛋白酶解液;实验得出胶原蛋白酶解液清除 O₂⁻ 的 IC₅₀ 为 16.43mg/mL,组分 P₁ 清除 O₂⁻ 的 IC₅₀ 值为 1.24 mg/mL,相比于胶原蛋白酶解液其活性提高了 13.25 倍。

2.3 抑制 O₂⁻ 的活性最强组分的凝胶过滤色谱分离结果

对离子交换色谱分离所得组分 P₁ 进行 SephadexG-25 凝胶分离,洗脱图谱见图 13。组分 P₁ 过凝胶 SephadexG-25 层析柱后各组分得到了很好的分离,获得的 2 个组分分别命名为组分 P_{1-A} 和组分 P_{1-B}。

从表 1 中可以看出,组分 P_{1-B} 对 O₂⁻ 的清除率高

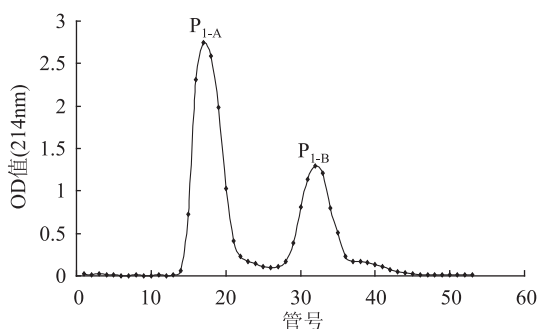


图 13 Sephadex G-25 凝胶分离图谱

Fig.13 The separation pattern of gel chromatography on Sephadex G-25

于组分 P_{1-A} , 说明分子质量小的肽段抗氧化活性较好, 进一步测定组分 P_{1-B} 清除 $O_2^- \cdot$ 的 IC_{50} 值为 0.98 mg/mL 。

表 1 各组分的抗氧化活性(流速: 0.9 mg/mL)Table 1 The antioxidant capacity of each component (0.9 mg/mL)

组分	P_1	P_{1-A}	P_{1-B}
$O_2^- \cdot$ 清除率(%)	46.77	41.25	49.43

3 结论

通过不同的体外抗氧化活性评价指标的测定结果可知, 经超滤后的不同分子质量段抗氧化肽均有一定的抗氧化活性, 但所具有的抗氧化活性不同; 在浓度范围内分子量 $5 \sim 10 \text{ ku}$ 的抗氧化肽对 $\cdot\text{OH}$ 的清除能力、还原力最高, 分子量 $3 \sim 5 \text{ ku}$ 的抗氧化肽对 $\text{DPPH}\cdot$ 的清除率最高, 酶解液对 $O_2^- \cdot$ 的清除能力、脂质过氧化抑制能力最高, 分子量小于 3 ku 的抗氧化肽的抗氧化活性不是很好, 这和部分研究报道不一致^[14-16], 但同时也有部分学者发现小分子量的抗氧化肽抗氧化效果不好^[17-20]。解释此结果的原因可能是不同分子量段的抗氧化肽包含特定类的氨基酸从而影响其抗氧化能力, 胥彩云^[21]等通过胰酶水解猪皮胶原蛋白并对其产物进行氨基酸分析发现, 胶原蛋白富含脯氨酸和羟脯氨酸, 但缺乏胱氨酸和色氨酸, 有报道疏水性氨基脯氨酸、色氨酸对抗氧化的影响最大^[22], 可见氨基酸的种类决定着抗氧化肽的抗氧化能力。当然, 不同分子量段的抗氧化肽在一级结构、构型等方面存在差异, 最终导致其抗氧化活性不同; 具体原因只有通过通过对不同分子量段的抗氧化肽进行构效关系研究才能阐明, 我们将在后续实验中进一步研究。

采用离子交换色谱、凝胶色谱两种分离方法逐步分离能达到较好的分离纯化效果。离子交换色谱对胶原蛋白酶解液分离纯化得到了 7 个新组分 $P_1 \sim P_7$, 其中组分 P_1 对 $O_2^- \cdot$ 清除率最高, 多肽浓度为 0.85 mg/mL 时, 清除率为 46.30% , IC_{50} 值为 1.24 mg/mL ; 组分 P_1 经过凝胶 Sephadex G-25 分离后得到 2 个组分, 其中组分 P_{1-B} 对 $O_2^- \cdot$ 清除率最高, 多肽浓度为 0.9 mg/mL 时, 清除率为 49.43% , IC_{50} 值为 0.98 mg/mL ; 这表明分子量低的多肽具有更强的自由

基清除活性, 这结果和以前的报道一致^[23-26]。

参考文献

- [1] 胡娜, 乔美靓, 刘毅, 等. 乳化型猪皮胶原蛋白的溶解性和乳化性研究[J]. 肉类研究, 2010(6): 10-14.
- [2] 韩德权, 金明姬, 吴桐, 等. 猪皮胶原粉的制备工艺及功能特性研究[J]. 食品科学, 2009(10): 60-64.
- [3] 余霞. 猪皮胶原蛋白肽的制备及其抗氧化活性的研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2011.
- [4] 张荣华. 猪皮胶原蛋白酶解物的抗氧化特性及应用研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2012.
- [5] 张荣华, 李诚, 余霞, 等. 猪皮胶原多肽的体外抗氧化特性研究[J]. 中国酿造, 2012(7): 177-120.
- [6] 李诚, 余霞, 付刚, 等. 猪皮胶原蛋白酶解物及其酶解产物的抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011(23): 147-151.
- [7] 邓成萍, 薛文通, 孙晓琳, 等. 超滤在大豆多肽分离纯化中应用[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 192-195.
- [8] 殷微微, 任学坤, 赵永焕. 麦胚蛋白酶解物清除自由基及抗氧化作用的研究[J]. 食品工业, 2010(3): 4-6.
- [9] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测 $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 553-555.
- [10] 朱夕波. 鲨鱼皮和猪皮胶原蛋白及其抗氧化活性肽的特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2008.
- [11] 刘昭明, 黄翠姬, 孟陆丽, 等. 核桃蛋白酶解物的抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(1): 58-61.
- [12] Chen Naifu. Study on the extraction of flavonoid compound in pteridium aquilinum and its antioxidant property[J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(11): 63-67.
- [13] 陈美珍, 余杰, 郭慧敏. 大豆分离蛋白酶解物清除羟自由基作用的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(1): 43-47.
- [14] Ren J Y, Zhao M M, Shi J, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization - mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2008, 108: 727-736.
- [15] Kong X Z, Zhou H M, Hua Y F. Preparation and antioxidant activity of wheat gluten hydrolysates (WGHs) using ultrafiltration membranes[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008, 88: 920-926.
- [16] 林琳, 李八方. 鲑鱼皮胶原蛋白水解酶解物抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2006, 25(4): 48-51.
- [17] 刘军. 棉籽蛋白的制备及其酶解物抗氧化与 ACE 抑制活性的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [18] 代衍峰. 抗氧化玉米肽的制备及其功能与结构关系的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [19] 吴娴静. 利用大豆低值蛋白开发大豆肽[D]. 金华: 浙江师范大学, 2010.
- [20] 梁汉荣. 鱼皮中生物活性酶解物的制备及性质研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- [21] 胥彩云, 童军茂, 周晓宏. 胰酶水解猪皮胶原蛋白及其产物氨基酸分析[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(9): 34-36.
- [22] 张晖, 唐文婷, 王立, 等. 抗氧化肽的构效关系研究进展

(下转第 106 页)

抑制能力、脂肪吸收能力和胰脂肪酶抑制能力都得到明显提高,其中微射流瞬时高压超微粉碎法处理的效果更佳。因此,利用微射流瞬时高压超微粉碎处理甘薯膳食纤维在食品及保健品领域具有更广阔的应用前景。

参考文献

- [1] FAO, 2012. < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, 2013-10-08 >.
- [2] 周虹,张超凡.甘薯膳食纤维的开发应用[J].湖南农业科学,2003(1):55-56.
- [3] Glacco R, Clemente G, Riccardi G. Dietary fiber in treatment of diabetes: myth or reality[J]. Digestive and Liver Disease, 2002, 34(2):140-144.
- [4] Lecumberri E, Goya L, Mateos R, et al. A diet rich in dietary fiber from cocoa improves lipid profile and reduces malondialdehyde in hypercholesterolemic rats[J]. Nutrition, 2007, 23(4):332-341.
- [5] Peters U, Sinha R, Chatterjee N, et al. Dietary fiber and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme[J]. The Lancet, 2003, 361(9368):1491-1495.
- [6] 刘成梅,熊慧薇,刘伟,等. IHP 处理对豆渣膳食纤维的改性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9):112-115.
- [7] 洪杰,张绍英.湿法超微粉碎对大豆膳食纤维素微粒结构及物性的影响[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(3):90-94.
- [8] 李凤生. 超细粉体技术[M]. 北京:国防工业出版社, 2000:121-122.
- [9] 刘成梅,刘伟,林向阳,等. Microfluidizer 对膳食纤维溶液物理性质的影响[J]. 食品科学, 2004(2):72-75.
- [10] 吴建明. 超微粉碎机组的特点及在中药生产中的应用[J]. 机电信息, 2005(18):34-37.
- [11] 蓝海军,刘成梅,涂宗财,等. 大豆膳食纤维的湿法超微粉碎与干法超微粉碎比较研究[J]. 食品科学, 2007, 28(6):171-174.
- [12] 吴雪,刘斌,冯涛. 微射流均质机的超微粉碎机理分析[J]. 食品与机械, 2009(3):65-68.
- [13] 刘伟,刘成梅,黎冬明,等. 瞬时高压作用对麦麸膳食纤维处理的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(11):82-85.
- [14] 曹媛媛,木泰华. 筛法提取甘薯膳食纤维的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(7):131-133.
- [15] 王玲平,周生茂,戴丹,等. 植物酚类物质研究进展[J]. 浙江农业学报, 2010, 22(5):696-701.
- [16] Femenia A, Lefebvre A C, Thebaudin J Y, et al. Physical and sensory properties of model foods supplemented with cauliflower fiber[J]. Journal of Food Science, 1997, 62(4):635-639.
- [17] Caprez A, Arrigoni E, Amadò R, et al. Influence of different types of thermal treatment on the chemical composition and physical properties of wheat bran[J]. Journal of Cereal Science, 1986, 4(3):233-239.
- [18] Sowbhagya H B, Suma P, Mahadevamma S, et al. Spent residue from cumin—a potential source of dietary fiber[J]. Food chemistry, 2007, 104(3):1220-1225.
- [19] Chau C F, Huang Y L, Lee M H. In vitro hypoglycemic effects of different insoluble fiber-rich fractions prepared from the peel of Citrus sinensis L. cv. Liucheng[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(22):6623-6626.
- [20] Chau C F, Huang Y L. Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of Citrus sinensis L. cv. Liucheng[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(9):2615-2618.
- [21] Shimura S, Tsuzuki W, Kobayashi S, et al. Inhibitory effect on lipase activity of extracts from medicinal herbs[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1992, 56(9):1478-1479.
- [22] Raghavendra S N, Ramachandra Swamy S R, Rastogi N K, et al. Grinding characteristics and hydration properties of coconut residue: A source of dietary fiber[J]. Journal of Food Engineering, 2006, 72(3):281-286.
- [23] Raghavendra S N, Rastogi N K, Raghavarao K, et al. Dietary fiber from coconut residue: effects of different treatments and particle size on the hydration properties[J]. European Food Research and Technology, 2004, 218(6):563-567.
- [24] Grigelmo - Miguel N, Gorinstein S, Martín - Belloso O. Characterisation of peach dietary fiber concentrate as a food ingredient[J]. Food chemistry, 1999, 65(2):175-181.
- [25] Robertson J A, Eastwood M A. An examination of factors which may affect the water holding capacity of dietary fiber[J]. Br J Nutr, 1981, 45(1):83-88.
- [26] Chau C F, Chen C H, Lin C Y. Insoluble fiber-rich fractions derived from Averrhoa carambola: hypoglycemic effects determined by in vitro methods[J]. LWT - Food Science and Technology, 2004, 37(3):331-335.
- [27] Bravo L, Saura-Calixto F. Characterization of dietary fiber and the in vitro indigestible fraction of grape pomace[J]. American Journal of Enology and Viticulture, 1998, 49(2):135-141.
- [28] Ou S, Kwok K, Li Y, et al. In vitro study of possible role of dietary fiber in lowering postprandial serum glucose[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(2):1026-1029.
- [29] 高荫榆,晁红娟,丁红秀,等. 毛竹叶特种膳食纤维制备及特性的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12):200-204.
- [30] 陈菊红,顾正彪,洪雁. 改性马铃薯渣的功能特性研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(1):130-132.
- (上接第 100 页)
- [J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(7):673-679.
- [23] 张东杰,马中苏. 凝胶过滤色谱分离大豆抗氧化肽活性的研究[J]. 中国酿造, 2010(6):41-44.
- [24] 王勇刚,朱锋荣,韩福森,等. 鲑鱼鱼精蛋白酶解产物中抗氧化活性肽的分离纯化研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6):70-72.
- [25] 张莉莉,严群芳,王恬. 大豆生物活性肽的分离及其抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5):208-210.
- [26] 范建凤,王泽南,杨柯,等. 蟹抗氧化肽的分离纯化及活性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(13):48-51.