

枯草芽孢杆菌发酵玉米肽供体的筛选

刘 奇,张 智*

(东北林业大学林学院,黑龙江哈尔滨 150040)

摘 要:为研究不同供体修饰玉米肽(Corn Peptide, CP)所得产物的抗氧化活性,以 CP 为底物,通过添加酸类(琥珀酸酐、乙二胺四乙酸、乙酸酐、乙酸、柠檬酸、草酸)、糖类(葡萄糖、乳糖、半乳糖、甘露糖、果糖)和金属离子(硫酸铁、硫酸铜、硫酸镁、硫酸锌、硫酸锰、硫酸钙)等供体,以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)1s-45 为菌种,DPPH 转化率为指标进行修饰供体的筛选,研究发酵后不同剂量(高、中、低)CP 修饰产物体内、体外抗氧化活性。结果表明:利用枯草芽孢杆菌发酵后,三类供体对 CP 修饰效果整体表现为:糖类>酸类>金属离子,经筛选修饰 CP 的最佳供体为葡萄糖,当投料比为 8:1 时,DPPH 转化率达到 79.84%。将发酵后得到的最优修饰产物(玉米肽-葡萄糖(CP-G))进行小鼠体内抗氧化活性实验发现,CP 中、高剂量组和 CP-G 低、中、高剂量组均显著($p < 0.05$)提高血清和肝脏中的 SOD 活性。CP 和 CP-G 低、中、高剂量组均显著($p < 0.05$)提高血清中的 GSH-Px 活性;CP 低、中、高剂量组,CP-G 中、高剂量组均显著($p < 0.05$)提高肝脏中的 GSH-Px 活性,说明经葡萄糖修饰后的 CP 具有较高的抗氧化活性。

关键词:枯草芽孢杆菌,发酵,供体,筛选

Screening of Corn Peptide Donor Fermented by *Bacillus subtilis*

LIU Qi,ZHANG Zhi*

(School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: In order to study the antioxidant activity of corn peptide modified with different donors, the acid (succinic anhydride, acetic anhydride, acetic acid, citric acid, oxalic acid), sugars (glucose, lactose, galactose, mannose, fructose) and metal ions (ferric sulfate, copper sulfate, magnesium sulfate, zinc sulfate, manganese sulfate, calcium sulfate) were added to corn peptide as substrate. Donors were screened with *Bacillus subtilis* 1s-45 as strain, and DPPH conversion rate was as index. The antioxidant activity of products modified by corn peptide with different doses (high, medium and low) after fermentation *in vivo* and *in vitro* was studied. The results showed that, the effect of corn peptide modification fermented by *B. subtilis* was as follows: Carbohydrate > acid > metal ion. The best donor of corn peptide chelate was glucose. When the feed ratio was 8:1, the conversion rate of DPPH reached 79.84%. The optimal modification product obtained after fermentation (corn peptide-glucose (CP-G)) was tested in mice for antioxidant activity. It was found that CP medium, high dose group and CP-G low, medium and high dose groups were significant ($p < 0.05$) increased SOD activity in serum and liver. The low, medium and high doses of CP and CP-G significantly ($p < 0.05$) increased serum GSH-Px activity, CP low, medium and high dose groups, CP-G medium and high dose groups were significant ($p < 0.05$) Increased GSH-Px activity in the liver, which indicated that the corn peptide-glucose modified product after fermentation could effectively improve the antioxidant activity in mice.

Key words: *Bacillus subtilis*; fermentation; donor; screening

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2019)14-0134-04

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.14.022

引文格式:刘奇,张智. 枯草芽孢杆菌发酵玉米肽供体的筛选[J]. 食品工业科技, 2019, 40(14): 134-137.

玉米肽(Corn Peptide, CP)是一种由氨基酸通过肽键以不同的连接方式而形成的具有特定空间结构和功能活性的短肽聚合物^[1-2]。研究表明 CP 具有抑制血管紧张素转换酶^[3]、降低血压^[4]、促进乙醇代谢、醒酒护肝^[5]以及抗氧化^[6-8]、缓解疲劳^[9]、抗癌^[10]等功能。张智等^[11]以 CP 为参照研究玉米肽锌(CP-Zn)螯合物的结构表征和体内抗氧化活性变化,结果表

明 CP-Zn 的抗氧化活性优于 CP,且能显著降低小鼠血清、肝脏中丙二醛含量,提高超氧化物歧化酶的活力。

目前常用的制备玉米肽螯合物的方法有酶解法、微生物发酵法和化学合成法^[12]。枯草芽孢杆菌发酵制备玉米肽螯合物是利用微生物发酵产生的胞外酶将供体镶嵌在两个肽分子之间形成一种稳定的

收稿日期:2018-11-16

作者简介:刘奇(1986-),男,博士研究生,研究方向:植物活性物质及功能性食品,E-mail:84702504@qq.com。

* 通讯作者:张智(1964-),女,博士,教授,研究方向:微生物转化与功能食品,E-mail:ldzhangzhi@163.com。

基金项目:黑龙江省应用技术与开发重大项目子课题(GA13B201)。

连接形式,可以提高 CP 功能活性的同时改善其适口性^[13],降低肽的苦味和抗营养因子含量。目前我国利用 CP 制备玉米肽-葡萄糖(CP-G)并研究其体内体外抗氧化活性的研究相对较少。为充分开发利用 CP,提高玉米副产物附加值,本研究以 CP 为底物,通过添加酸类、糖类和金属离子等供体,利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)ls-45 为发酵菌种,以 DPPH 转化率为指标进行供体的筛选和体内抗氧化活性的研究,为后续探讨 CP 修饰产物细胞免疫功能试验等提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

种子培养基(葡萄糖 0.5%、酵母膏 1%、蛋白胨 0.5%、氯化钠 0.2%) 本实验室自制;雄性 SPF 小鼠(体重为(20±2) g,合格证号:SCXK 黑 2013-004) 由黑龙江省中医药大学药物评价中心提供;CP 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院提供;枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)ls-45 东北林业大学食品微生物实验室保藏;蛋白胨、酵母膏、乳糖、半乳糖、甘露糖、果糖、葡萄糖 北京华美生科生物技术有限公司;DPPH、琥珀酸酐、乙二醇四乙酸(EDTA)、乙酸酐、乙酸、草酸、硫酸铁、硫酸铜、硫酸镁、硫酸锌、硫酸锰、硫酸钙 上海浩洋生物技术有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒 苏州卡尔文生物技术有限公司。

722S 可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;TU-1810 紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;5030-PVL 程控压力蒸汽灭菌器 长春百奥生物仪器有限责任公司;SW-CJ-IFD 超净台 苏州安泰空气技术有限公司;AR2140 型分析天平、S220 型 pH 计 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司;ZD-85 双功能气浴恒温振荡器 江苏金怡仪器科技有限公司;Tg16B 型台式离心机 上海安亭科学仪器厂制造;Dgg-9053A 型电热鼓风干燥箱 上海森信实验仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌发酵 CP 供体修饰方法 通过 Sephadex G-25 分级得到 CP 段,其平均分子质量为 572 Da,肽含量为 75.83%,将 CP 段配制成底物浓度为 4% 的溶液,调节 pH 至 7;取 50 mL CP 溶液,按 CP 与不同供体(见表 1)体积比为 10:1 的比例加入供体,再次调节 pH 至 7;121 ℃ 高压蒸汽灭菌 20 min,冷却至室温(20 ℃);在无菌条件下接入枯草芽孢杆菌菌液进行发酵,枯草芽孢杆菌接种量 4%,发酵时间 48 h;得到的发酵液再次灭菌,冷却后 4500 r/min 离心 10 min;流水透析 24 h,过滤后冷冻干燥得到最终修饰产物^[11]。

1.2.2 枯草芽孢杆菌发酵 CP 供体筛选 以枯草芽孢杆菌为菌种发酵,利用酸类的酰基化、糖类的糖基化和金属离子的螯合作用分别对 CP 进行修饰,以产物 DPPH·清除能力为依据,转化率为指标进行 CP 供体体外抗氧化能力的筛选。

表 1 各类修饰供体选择

Table 1 Selection of different modified donors

供体分类	供体选择
酸类	琥珀酸酐、EDTA、乙酸酐、乙酸、柠檬酸、草酸
糖类	葡萄糖、乳糖、半乳糖、甘露糖、果糖
金属离子	硫酸铁、硫酸铜、硫酸镁、硫酸锌、硫酸锰、硫酸钙

1.2.2.1 CP 修饰产物 DPPH·清除能力的测定 将 1.2.2 制得的 CP 修饰产物配制成 3 mg/mL 的乙醇溶液备用。用 95% 的乙醇溶解 DPPH 粉末,配成 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液。取待测样品溶液和 DPPH 各 2 mL 混匀,室温(20±2) ℃ 下避光放置 30 min 后,于 517 nm 处测吸光度值,记为 OD₁;对照组用 95% 的乙醇代替 DPPH 溶液,同样条件下室温避光放置 30 min 后,于 517 nm 处测吸光度值,记为 OD₂;空白组用蒸馏水代替样液,于 517 nm 处测定吸光值,记为 OD₀。

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{\text{D}_0}\right) \times 100$$

式(1)

式中:OD₁ 为样液加 DPPH 溶液的吸光度值;OD₂ 为样液加乙醇溶液的吸光度值;OD₀ 为乙醇加 DPPH 溶液的吸光度值。

1.2.2.2 CP 修饰产物 DPPH·转化率的测定 利用酸类、糖类和金属离子对 CP 进行修饰,得到修饰产物的 DPPH·转化率,并与 CP 的 DPPH·转化率进行比较,得出 DPPH·清除率提高的百分比,即转化率。

$$\text{转化率}(\%) = \frac{A - A_0}{A_0} \times 100$$

式(2)

式中:A 为修饰产物的 DPPH·清除率;A₀ 为 CP 的 DPPH·转化率。

1.2.3 CP 修饰供体比例的确定 按 CP 与供体投料质量比 1:1、2:1、3:1、4:1、8:1 和 10:1 加入筛选后的供体,其余过程采用 1.2.1 微生物法 CP 供体修饰方法,最终以产物的转化率为评价指标,考察投料比对修饰产物 DPPH 转化率的影响,从而确定最佳供体比例,转化率计算见式(2)。

1.2.4 动物实验模型建立与饲养 健康雄性 SPF 小鼠适应性饲养 7 d 后,称量小鼠体重,将小鼠按照体重指标随机分为 7 组,每组 12 只,采用基础饲料饲喂,自由饮水,室温环境(20±2) ℃,相对湿度 45%±3%,光照 12 h/d。空白组采用生理盐水灌胃,各组均每天上午 9 时灌胃,连续灌胃给药 30 d。给药剂量根据《保健食品功能学评价程序和检验方法-2003》拟定^[14],实验分组见表 2。

1.2.5 抗氧化酶活性的测定 末次灌胃给药并禁食 24 h 后,称量实验小鼠体重并记录,处死实验小鼠后,摘取脾脏、胸腺,利用氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒测定小鼠血清和肝脏组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)活性和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性水平。

表2 功能实验分组
Table 2 Groups of function test

组别	代号	小鼠数量 (只)	剂量 (mg/kg·d)
正常组	Control	12	同体积生理盐水
CP 高剂量	CP-H	12	250
CP 中剂量	CP-M	12	150
CP 低剂量	CP-L	12	50
CP-G 高剂量	CPG-H	12	250
CP-G 中剂量	CPG-M	12	150
CP-G 低剂量	CPG-L	12	50

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 20 统计学软件进行比较分析, $p < 0.05$ 差异显著, $p < 0.01$ 差异极显著, Origin 软件绘制相关图表。

2 结果与分析

2.1 CP 修饰供体筛选

由图1~图3可知,利用枯草芽孢杆菌发酵 CP 供体的修饰结果中,酸类、糖类和金属离子修饰后产物的 DPPH·转化率都大幅度提高。从酸类供体修饰效果来看,乙酸酐 > 柠檬酸 > 琥珀酸酐 > 草酸 > 乙酸 > EDTA, 乙酸酐 DPPH·转化率达到65.95%, 修饰效果最好;从糖类供体修饰效果来看,葡萄糖 > 乳糖 > 半乳糖 > 甘露糖 > 果糖, 修饰供体葡萄糖的 DPPH·转化率达到79.95%, 是所有修饰供体中效果最佳的;从金属离子类供体修饰效果来看, $\text{Fe}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, 其中经 Fe^{2+} 修饰后的 DPPH 转化率达到78.26%。综合图1~图3可知,三类供体对 C 修饰效果整体表现为:糖类 > 酸类 > 金属离子,因此本研究选取葡萄糖作为 CP 修饰的最佳供体。

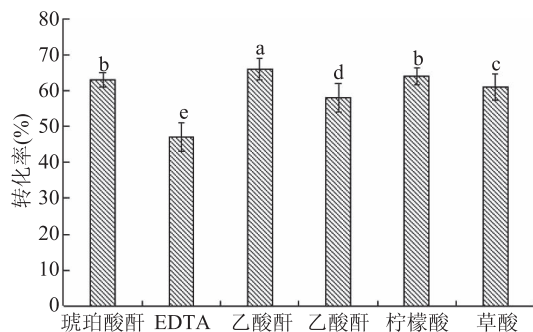


图1 酸类供体筛选

Fig.1 Screening the modified donors from acid groups

注:不同小写字母表示差异显著($p < 0.05$);图2、图3同。

2.2 CP 修饰供体比例的确定

由图4可以看出,随着 CP 与葡萄糖供体投料比的增加,即供体所占比例减少时,转化率整体呈先上升后平缓的趋势,这说明投料比对 CP 的 DPPH 转化率有一定影响。在投料比为 8:1 时,转化率达到 79.84%, 因此从实际生产的角度考虑本研究选择投料比为 8:1 作为 CP 与葡萄糖的最佳配比。

2.3 小鼠体内抗氧化活性实验结果

2.3.1 血清、肝脏中 SOD 活性 CP 和 CP-G 对小鼠

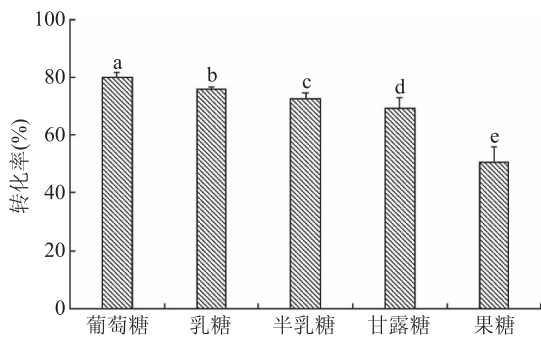


图2 糖类供体筛选

Fig.2 Screening the modified donor from saccharides groups

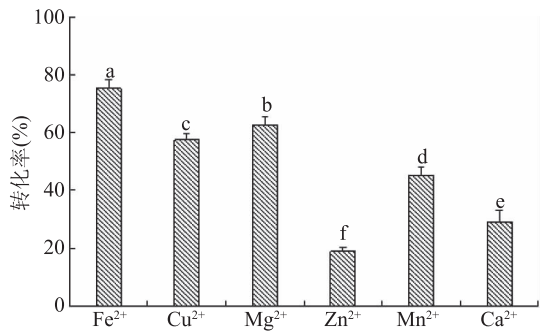


图3 金属离子供体筛选

Fig.3 Screening the modified donor from metal ion groups

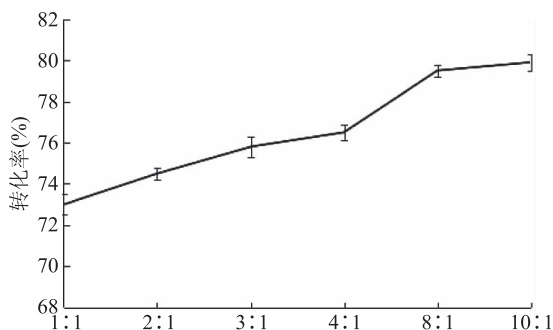


图4 葡萄糖比例的确定

Fig.4 Determination of proportion of donors to glucose

血清、肝脏中 SOD 活性的影响见图5。SOD 是体内重要的抗氧化酶,能有效清除氧自由基,降低或阻止其对机体细胞和组织的损害^[15]。超氧化物歧化酶对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,超氧化物歧化酶能清除机体内氧自由基,抑制脂质过氧化反应,保护细胞免受自由基损伤。由图5可知,与正常组相比 CP 中、高剂量组和 CP-G 低、中、高剂量组均显著 ($p < 0.05$) 提高血清和肝脏中的 SOD 活性。

2.3.2 血清、肝脏中 GSH-Px 活性 CP 和 CP-G 对小鼠血清、肝脏中 GSH-Px 活性的影响见图6。谷胱甘肽(GSH)是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的一种三肽,是甘油醛磷酸脱氢酶的辅基,又是乙二醛酶及磷酸丙糖脱氢酶的辅酶。而 GSH-Px 是机体广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶,它能特异催化还原型谷胱甘肽过氧化氢进行还原反应,清除体内低分子自由基、过氧化氢和脂质过氧化物等,进而起到保护细胞膜结构和功能完整的作用,减少氧自由基对机体细胞或组织的损伤^[16]。因此血清

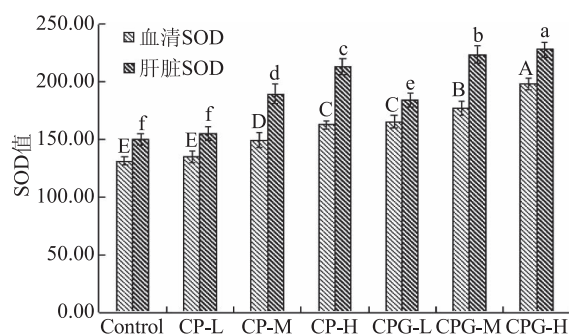


图5 CP、CP-G 对小鼠血清、肝脏中 SOD 活性的影响

Fig.5 Influence of CP、CP-G on activity of SOD in serum and liver of mice

注:不同大写字母表示各组血清指标差异显著($p < 0.05$),不同小写字母表示各组肝脏指标差异显著($p < 0.05$);图6同。和肝脏中 SOD 和 GSH-Px 是评价机体抗氧化应激能力的重要指标^[17]。由图6可知,与正常组相比,CP 和 CP-G 低、中、高剂量组均显著($p < 0.05$)提高血清中的 GSH-Px 活性;CP 低、中、高剂量组,CP-G 中、高剂量组均显著($p < 0.05$)提高肝脏中的 GSH-Px 活性。

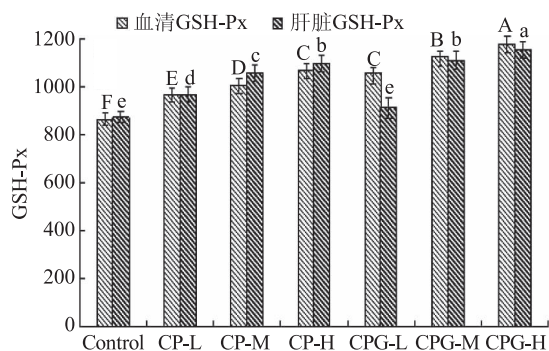


图6 CP、CP-G 对小鼠血清、肝脏中 GSH-Px 活性的影响

Fig.6 Influence of CP、CP-G on activity of GSH-Px in serum and liver of mice

3 结论

枯草芽孢杆菌发酵三类供体,分别为酸类(琥珀酸酐、乙二胺四乙酸(EDTA)、乙酸酐、乙酸、柠檬酸、草酸)、糖类(葡萄糖、乳糖、半乳糖、甘露糖、果糖)和金属离子(硫酸铁、硫酸铜、硫酸镁、硫酸锌、硫酸锰、硫酸钙),得到的 CP 修饰供体整体抗氧化效果为:糖类 > 酸类 > 金属离子,经筛选 CP 的最佳修饰供体为葡萄糖,当投料比为 8:1 时, DPPH 转化率达到 79.84%。体内抗氧化实验表明,同对照组相比 CP 中、高剂量组和 CP-G 低、中、高剂量组均显著($p < 0.05$)提高血清和肝脏中的 SOD 活性;CP 和 CP-G 低、中、高剂量组均显著($p < 0.05$)提高血清中的 GSH-Px 活性;CP 低、中、高剂量组和 CP-G 中、高剂量组均显著($p < 0.05$)提高肝脏中的 GSH-Px 活性。由此说明 CP-G 较 CP 而言可以有效提高体内 SOD 和 GSH-Px 含量,增强机体的自由基清除能力。本文为后续研究 CP-G 修饰产物细胞免疫机制提供理论及数据支持。

参考文献

- [1] Ranum P, Peña-Rosas J P, Garcia-Casal M N. Global maize production, utilization, and consumption [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2014, 1312(1): 105-112.
- [2] 赵新淮, 徐红华, 姜毓君. 食品蛋白质: 结构、性质与功能 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 270-273.
- [3] Yang Y, Tao G, Liu P, et al. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(19): 7891-7895.
- [4] Huang W H, Sun J, He H, et al. Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats [J]. Food Chemistry, 2011, 128(4): 968-973.
- [5] Guo H, Sun J, He H, et al. Antihepatotoxic effect of corn peptides against Bacillus Calmette-Guerin/lipopolysaccharide-induced liver injury in mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(10): 2431-2435.
- [6] Zhou K, Sun S, Canning C. Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration [J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1192-1197.
- [7] 周玲玲. 玉米花生复合蛋白酶解产物生物活性及加工性能的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [8] Liu H M, Shi G B, Ma Y F, et al. Optimization of the production of peanut antioxidative peptides and neutrase using liquid state fermentation [J]. Science & Technology of Food Industry, 2014, 35(18): 175-179.
- [9] 陈星星, 胡晓, 李来好. 抗疲劳肽的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(4): 365-369.
- [10] Li J T, Zhang J L, He H, et al. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 51: 297-305.
- [11] 张智, 刘慧, 刘奇, 等. C-锌螯合物结构表征及抗氧化活性分析 [J]. 食品科学, 2017, 38(3): 131-135.
- [12] 迟玉杰, 朱秀清, 李文滨, 等. 大豆蛋白质加工新技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 192-193.
- [13] 牟金秀. 微生物发酵法生产 C 的研究 [D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2015.
- [14] Zhuang H, Tang N, Dong S, et al. Optimisation of antioxidant peptide preparation from corn gluten meal [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(13): 3264-3270.
- [15] 孟繁磊, 陈瑞战, 张敏, 等. 刺五加多糖的提取工艺及抗氧化活性研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(10): 168-174.
- [16] Rodriguezcapote K, Tovell K, Holmes D, et al. Analytical evaluation of the diazyme glycated serum protein assay on the siemens Advia 1800: Comparison of results against HbA1c for diagnosis and management of diabetes [J]. Journal of Diabetes Science & Technology, 2015, 9(2): 192-199.
- [17] 姜苏薇, 潘利华, 徐学玲, 等. 水溶性大豆膳食纤维对高脂血症小鼠肾脏的抗氧化应激作用 [J]. 食品科学, 2011, 32(19): 240-243.