

文章编号: 1671-1513(2010)02-0006-04

酱渣多肽及其美拉德热反应产物的抗氧化性

沈 晗¹, 金志刚², 孙宝国¹, 肖 阳¹, 任文雅¹, 史雨鑫¹, 廖永红¹

(1. 北京工商大学 化学与环境工程学院, 北京 100048;

2. 北京二商金狮龙门食品有限公司, 北京 101407)

摘 要: 测定不同水解度(DH)时酱渣多肽及其美拉德反应产物(MRPS)的抗氧化性, 结果表明: 随反应物浓度增加, 两者抗氧化性增强; 两者的 DPPH·清除率与 DH 并非呈线性关系; DH < 14.2% 时, 两者的·OH 清除率随 DH 的升高而降低; 两者的还原力变化趋势不同, DH > 12.2% 时, 酱渣多肽还原力随 DH 增大逐渐减少, DH > 8.2% 时, MRPS 的还原力随 DH 提高逐渐增大. 与某些多肽类物质和 MRPS 相比, 酱渣多肽及其 MRPS 具有较高的抗氧化性和很好的应用价值.

关键词: 酱渣多肽; 美拉德热反应; 抗氧化性**中图分类号:** TS264.2⁺; TS201.2**文献标志码:** A

酱油的酿造过程中, 经多种微生物的协同作用, 原料中复杂的大分子有机物分解和重组, 并经过复杂的生物化学作用, 形成了各种活性物质, 这些物质也一定程度地残留在酱渣中. 王丽娟等就从酱渣饼中提取了大豆异黄酮, 该物质具有强烈的抗氧化作用, 酱渣中另一类具有抗氧化性的物质是蛋白质、多肽和氨基酸^[1-3]. 多肽经美拉德反应后生成的产物(MRPS)因含类黑精, 还原酮及 N、S 等杂环化合物而具有更强的抗氧化性, 被认为是最有前途的天然抗氧化物^[4-5]. 而合成的抗氧化剂, 例如丁基羟基茴香醚(BHA)、2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)、生育酚(AH2)等具有潜在的毒副作用, 许多国家已经禁止使用. 特丁基对苯二酚(TBHQ)的使用范围和使用量也受到严格限控^[6]. 天然的、安全的抗氧化剂越来越受到重视, 有一定的抗氧化性能的多肽及其 MRPS 应用于食品行业, 既能减少合成抗氧化剂带来的毒副作用, 使产品更安全, 又能节约成本. 本实验通过清除 DPPH 自由基、羟自由基的能力以及还原力, 考察酱渣多肽及其 MRPS 的抗氧化性, 国内外尚未见到相关报导.

1 实验部分

1.1 原料与主要试剂、仪器

原料: 从酱油酿造厂采得的酱渣, 经干燥、粉碎, 过 50 目筛备用.

主要试剂: 碱性蛋白酶(Alcalse)、诺维信风味酶(Novozymes Flavorase)、DPPH、邻二氮菲、FeSO₄·7H₂O、K₃Fe(CN)₆、三氯乙酸均为分析纯.

主要仪器: DSHZ-300 型恒温水浴振荡摇床、JXD-02 型超声提取仪、98-1-C 型加热套、W SK 11-40W 型电子搅拌器、T6 新世纪紫外分光光度计.

1.2 制备工艺

1.2.1 酱渣多肽的制备

酱渣 → 超声预处理 → Alcalse 酶解 → Novozymes Flavorase 酶解 → 离心取清液 → 旋转蒸发 → 冷冻干燥 → 酱渣多肽粗提物.

1.2.2 酱渣多肽 MRPS 的制备

取定量酱渣多肽、葡萄糖(100%)、半胱氨酸(0.14%)于 110℃, pH 值为 5 时反应 80 min, 产物冷冻干燥, 即得 MRPS.

收稿日期: 2009-12-29

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAK36B05).

作者简介: 沈 晗(1985-), 男, 湖南湘潭人, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术.

廖永红(1965-), 女, 四川自贡人, 副教授, 主要从事食品生物技术方面的研究. 通讯作者.

1.3 测定方法

测定样品抗氧化性的方法有很多, 通常采用 DPPH· 自由基、羟自由基清除法和 Fe^{3+} 还原能力大小的测定来评价样品的抗氧化效果。

1.3.1 DPPH· 清除率的测定^[7]

取不同质量浓度 (0.2 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 mg/mL) 的样品 0.1 mL 加入 1×10^{-4} mol/L 的 DPPH· 无水乙醇溶液 2.8 mL, 混合均匀后, 室温避光保存 20 min, 在 517 nm 处测定吸光度 A_i ; 空白组以等体积无水乙醇代替样品溶液, 对照组以等体积蒸馏水代替样品溶液, 并以等体积蒸馏水和无水乙醇混合液空白调零。每个样品做 3 次平行试验, 取平均值, 计算清除率。

$$\text{清除率 } I = [1 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%.$$

式中: A_0 为对照组吸光度; A_i 为样品组吸光度; A_j 为空白组吸光度。

1.3.2 $\cdot\text{OH}$ 清除率的测定^[8]

取 0.5 mL 0.75 mmol/L 邻二氮菲的无水乙醇溶液于试管中, 依次加入 1 mL 0.15 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 值为 7.40) 和 0.5 mL 蒸馏水, 混匀; 加入 0.5 mL 0.75 mmol/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液, 混匀, 加入 0.5 mL 0.01% 的 H_2O_2 , 于 37 °C 水浴反应 60 min, 在 536 nm 处测定吸光度 $A_{\text{损}}$, 未损伤管以蒸馏水代替损伤管中 H_2O_2 , 同等操作下测吸光值 $A_{\text{未}}$, 样品管以不同浓度样品代替损伤管中的蒸馏水, 同等操作下测吸光值 A , 每个样品做 3 个平行取平均值, 计算清除率。

$$\text{清除率 } I = (A - A_{\text{损}}) / (A_{\text{未}} - A_{\text{损}}) \times 100\%.$$

1.3.3 还原能力的测定^[9]

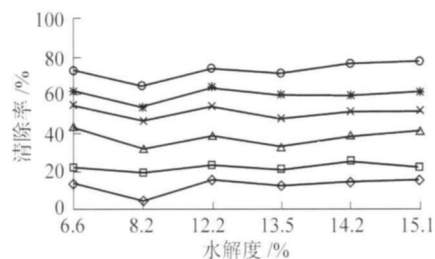
取不同质量浓度样品 1 mL, 分别加入 0.2 mol/L, pH 值为 6.6 的磷酸钠缓冲溶液 1 mL 及 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mL, 于 50 °C 水浴反应 20 min 后急速冷却, 加入 10% 三氯乙酸溶液 1 mL, 于 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 1 mL, 加入蒸馏水 2 mL 及 0.1% FeCl_3 溶液 1 mL, 混匀, 10 min 后于 700 nm 处测定其 A 值, 用 A 值表示还原力, A 值越大还原力越强, 每个样品做 3 次平行试验, 取平均值。

2 结果与讨论

2.1 酱渣多肽及其 MRPS 的 DPPH· 清除能力

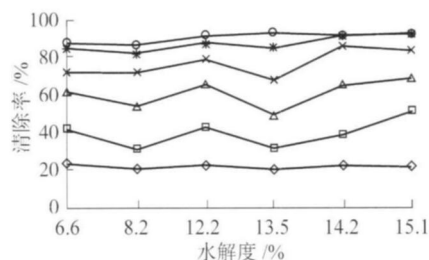
DPPH· 在结构上具有苯环的共轭位阻和硝基的吸电子作用, 是一种稳定的自由基, 在 517 nm 处有

强吸收, 当与提供电子的待测物反应时, 生成无色产物, 溶液褪色程度与其接受的电子数呈定量关系, 褪色程度越大, 则 DPPH· 清除率越高。按 1.2.1 的方法, 通过控制不同的酶解时间即可获得不同 DH 的酱渣多肽, 再分别按 1.2.2 的方法制得 MRPS。将得到的多肽及其 MRPS 分别配制成 0.2 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 mg/mL 溶液, 按 1.3.1 的方法分别测定不同质量浓度多肽及其 MRPS 样品的 DPPH· 清除率, 结果见图 1、图 2。



酱渣多肽质量浓度 ρ / (mg · mL⁻¹): $\diamond$ 0.2; $\square$ 0.5; $\triangle$ 1.0; $\times$ 1.5; $\star$ 2.0; $\circ$ 2.5.

图 1 不同 DH、不同浓度酱渣多肽的 DPPH· 清除率
Fig 1 DPPH· clearance of polypeptide at different DH and concentration



MRPS 质量浓度 ρ / (mg · mL⁻¹): $\diamond$ 0.2; $\square$ 0.5; $\triangle$ 1.0; $\times$ 1.5; $\star$ 2.0; $\circ$ 2.5.

图 2 不同 DH 酱渣多肽的不同浓度 MRPS 的 DPPH· 清除率

Fig 2 DPPH· clearance of MRPS at different DH and concentration

从图 1、图 2 可知, 酱渣多肽及其 MRPS 的 DPPH· 清除率随浓度的升高逐渐增大, 清除率与 DH 并非呈线性关系; MRPS 较多肽具有更高的 DPPH· 清除率; 质量浓度为 2.5 mg/mL 时, DH 为 12.2% 的酱渣多肽的清除率为 73.48%, 优于殷薇薇^[7]研究的麦胚蛋白酶解物 (5 mg/mL 时 60.4%) 和张尊听^[10]研究的芦荟提取物 (4 mg/mL 时 28.07%) 的清除能力。质量浓度为 1.5 mg/mL 时, DH 为 12.2% 的酱渣多肽 MRPS 的清除率为 78.99%, 相当于 0.5 mg/mL 的 Vc 的清除率 (79.23%), 高于项惠丹^[11]等研究的酪蛋白与还原

糖(40 mg/mL时 72.88%)以及大豆分离蛋白与还原糖(40mg/mL时 34.98%)反应产物的清除率. 所以酱渣多肽及其 MRPS具有较高的清除 DPH $\cdot$ 的能力.

2.2 酱渣多肽及其 MRPS的 $\cdot$ OH清除能力

$\cdot$ OH是一种氧化能力很强的自由基,研究表明,它是造成生物组织脂质过氧化、核酸断裂、蛋白质和多糖分解的重要活性基,可以导致许多病理变化. 按 1.3.2的方法分别测定不同 DH、不同浓度的酱渣多肽及其 MRPS的 $\cdot$ OH清除率,结果见图 3图 4

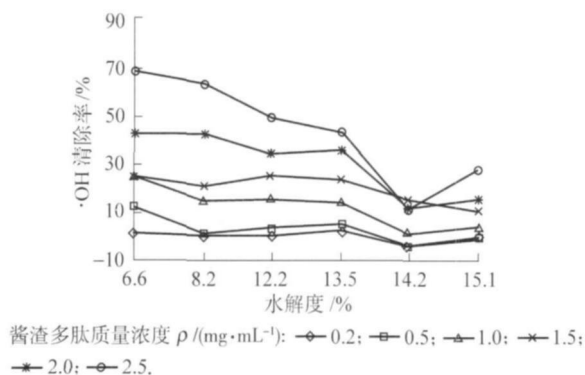


图 3 不同 DH、不同浓度的酱渣多肽 $\cdot$ OH清除率

Fig 3 $\cdot$ OH clearance of polypeptide at different DH and concentration

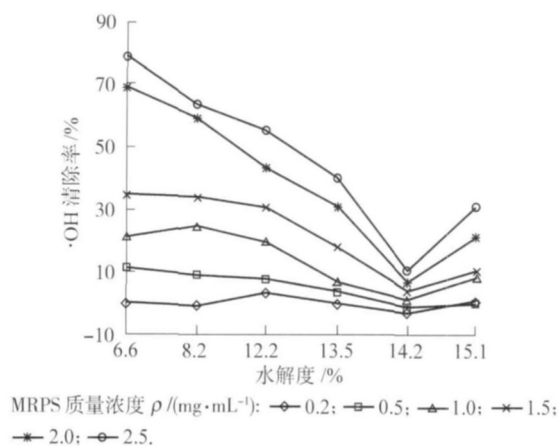


图 4 不同 DH 酱渣多肽的不同浓度 MRPS的 $\cdot$ OH清除率

Fig 4 $\cdot$ OH clearance of MRPS at different DH and concentration

从图 3 图 4可知, 酱渣多肽及其 MRPS的 $\cdot$ OH清除率随浓度的升高逐渐增大, 当 DH < 14.2% 时, $\cdot$ OH清除率随 DH 的升高而降低, DH > 14.2% 时又有所回升, MRPS较多肽具有更高的 $\cdot$ OH清除率. 浓度为 2.5 mg/mL时, DH 为 6.6%的酱渣多肽的 $\cdot$ OH清除率达 67.7%, 优于殷薇薇^[7]研究的麦胚蛋白酶解物(3.5 mg/mL时 50%)和蒋伟哲^[12]报道的

龙眼参(60mg/mL时 28.40%)的清除率. 同样条件下, 酱渣多肽 MRPS的 $\cdot$ OH清除率达 87.4%, 高于 4 mg/mL时 Vc(80.0%)的清除率, 也高于项惠丹等^[11]研究的酪蛋白与还原糖(80 mg/mL时 83.01%)以及大豆分离蛋白与还原糖(100 mg/mL时 65.32%)反应产物的清除率, 所以酱渣多肽及其 MRPS具有较高的清除 $\cdot$ OH的能力.

2.3 酱渣多肽及其 MRPS的还原能力

通常, 物质的还原能力与抗氧化能力正相关, 待测物供应的电子使 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 从而反映出体系氧化还原状态的改变. 按 1.3.3的方法分别测定不同 DH的不同浓度酱渣多肽及其 MRPS的吸光度值, 吸光度越大还原性越强, 结果见图 5图 6

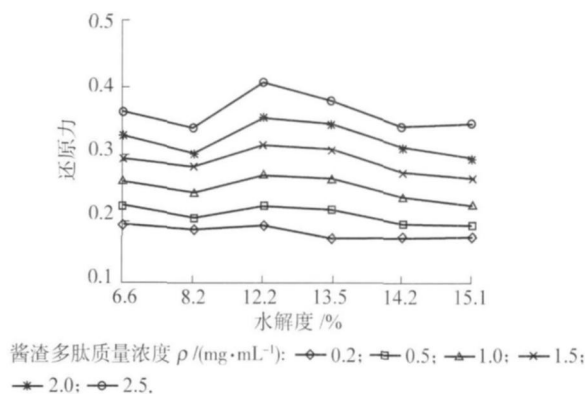


图 5 不同 DH、不同浓度酱渣多肽的还原力

Fig 5 Deoxidization capacity of polypeptide at different DH and concentration

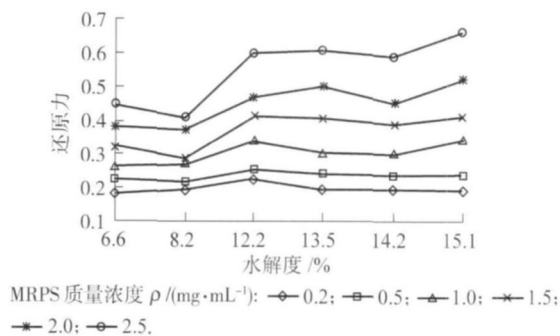


图 6 不同 DH 酱渣多肽的不同浓度 MRPS的还原力

Fig 6 Deoxidization capacity of MRPS at different DH and concentration

从图 5 图 6可知, 酱渣多肽及其 MRPS的还原力随着浓度升高逐渐增大, 当 DH > 12.2% 时, 酱渣多肽还原力随 DH 增大逐渐减小, 当 DH > 8.2% 时, 酱渣多肽 MRPS 的还原力随 DH 提高逐渐增大, MRPS较多肽具有更高的还原能力. MRPS质量浓度为 2.5 mg/mL时, DH 为 12.2%的酱渣多肽的还原力为 0.409 优于殷薇薇^[7]研究的麦胚蛋白酶解物

(5 mg/mL 时 0.312), 同样条件下酱渣多肽的 MRPS 的还原力高于王惠英等^[12]研究的 L-赖氨酸与 D-核糖美拉德反应产物的还原能力 (2.5~15.0 mg/mL 时均 < 0.02), 所以酱渣多肽及其 MRPS 具有较高的还原力。

3 结 论

不同 DH 时酱渣蛋白酶解产生的多肽组成及含量不同, 所以不同 DH 时的酱渣多肽及其 MRPS 的抗氧化性也不同。通过测定不同 DH 下的酱渣多肽及其 MRPS 的抗氧化性得知: 随着浓度升高, 抗氧化性增强; DPH• 清除率与 DH 并非呈线性关系; 当 DH < 14.2% 时, 多肽及 MRPS 的 •OH 清除率均随 DH 的升高而降低; 酱渣多肽及其 MRPS 的还原力变化趋势则有所不同, 当 DH > 12.2% 时, 酱渣多肽还原力随 DH 增大逐渐减少, 当 DH > 8.2% 时, MRPS 的还原力随 DH 提高逐渐增大。

酱渣多肽与麦胚蛋白酶解物、龙眼参等多肽类产物相比, 酱渣多肽 MRPS 与 V₆ 酪蛋白和大豆蛋白与还原糖等物质的 MRPS 相比, 可知: 酱渣多肽及其 MRPS 具有较强的抗氧化性。本实验结果为酱渣多肽及其 MRPS 用作天然抗氧化剂提供了直接依据, 有利于酱渣资源的综合利用和高值化发展。

参考文献:

[1] 王丽娟, 张永忠, 杨薇薇. 从酱渣饼中提取大豆异黄酮

的研究[J]. 食品工业科技, 2008(10): 167-169.

- [2] Esaki H, O sava T, K avak ishi S. Potent antioxidant or dihydroxyisoflavones in soy sauces and their antioxidant activities[J]. 日本食品科学工学会志, 2002(7): 476-483.
- [3] 吴建中. 大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2003.
- [4] Hayase F, Hirashina S, Okamoto G, et al. Scavenging of active oxygens by melanoidins[J]. Agric Biol Chem, 1989(53): 3383-3385.
- [5] Eiserich J P, Macku C, Shibamoto T. Volatile antioxidants formed from an L-cystein/D-glucose Maillard model system[J]. Agri Food Chem, 1992(10): 1982-1988.
- [6] Fankel E N. Antioxidants in food industry[J]. Sci Food Agric, 1991(54): 495-504.
- [7] 殷薇薇. 麦胚蛋白提取及其酶解产物抗氧化活性研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2008.
- [8] Chen H M, Muramoto K, Yamauchi E, et al. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein[J]. Agri Food Chem, 1998(46): 49-53.
- [9] He Yenhun, Fereidoun Shahidi. Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system[J]. Agri Food Chem, 1997(45): 4262-4265.
- [10] 张尊听, 杜勇军, 刘谦光, 等. 芦荟抗氧化作用的测定[J]. 天然产物研究与开发, 2001(6): 45-47.
- [11] 项惠丹, 许时婴, 王璋. 蛋白质与还原糖美拉德反应产物的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2008(7): 52-57.
- [12] 王惠英, 孙涛, 周冬香, 等. L-赖氨酸与 D-核糖的模式美拉德反应及其产物抗氧化性能研究[J]. 食品科学, 2008(5): 112-115.
- [13] 蒋伟哲, 李晓龙, 段小群, 等. 龙眼参对机体氧自由基清除作用的研究[J]. 中国药房, 2001(8): 453-454.

ANTIOXIDANT OF SAUCE RESIDUE POLYPEPTIDE AND ITS MRPS

SHEN Han¹, JIN Zhirang², SUN Bao-guo¹, XIAO Yang¹,
REN Wen-ya¹, SHI Yu-xin¹, LAO Yong-hong¹

(1 College of Chemical and Environmental Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China; 2 Beijing Er Shang Jin Shi Long Men Food Co Ltd, Beijing 101407, China)

Abstract By measuring the antioxidant of sauce residue polypeptide and its MRPS, under the conditions of different DH, conclusion as follow: with concentration increasing, antioxidant both enhanced; DPH• clearance was not linear with DH; when DH < 14.2%, the •OH clearance decreased with the increase of DH; the changing trend of the deoxidization capacity was different, when DH > 12.2%, the deoxidization capacity of the sauce residue polypeptide decreased when the DH increased, DH > 8.2%, the deoxidization capacity of MRPS was increased the same as DH; Compared with other polypeptides and MRPS, sauce residue polypeptide and its MRPS had high antioxidant and good appropriate value.

Key words sauce residue polypeptide, maillard reaction, antioxidant

(责任编辑: 叶红波)