

蛋白水解物的生产和抗氧化活性评价及其作用机理

孙 宏¹, 吴逸飞², 冯国强¹, 李丹丹¹, 汤江武², 冯 杰^{1*}

(1. 浙江大学动物科学学院, 浙江杭州 310029;

2. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 浙江杭州 310021)

摘要: 氧化应激是造成动物衰老和疾病的重要因素。近年来的研究表明, 动植物蛋白水解物具有清除体内过剩的活性氧自由基、抑制脂肪氧化等生物活性。蛋白水解物可作为天然抗氧化剂应用于食品和饲料行业, 具有广阔的市场前景, 并能为蛋白资源开发提供新的思路。本文从蛋白水解物生产工艺与抗氧化活性评价方法介绍出发, 着重探讨了蛋白水解物抗氧化活性的影响因素、作用机理及其安全稳定性问题, 并对其在未来研究中的发展方向和应用前景进行了展望。

关键词: 氧化应激; 蛋白水解物; 抗氧化机制; 抗氧化肽

中图分类号: S816.403

文献标识码: A

文章编号: 0258-7033(2012)05-0063-04

生物氧化是动物获得能量的重要生命过程。但氧化不完全会产生如超氧化物、过氧化氢和羟自由基等活性氧自由基(ROS)。这些自由基能攻击周围的生物大分子, 引起一系列链式反应, 最终造成细胞损伤或死亡^[1]。动植物主要依靠抗氧化酶(过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶)和一些天然抗氧化物质(谷胱甘肽, 维生素 A、E 等)来抵御氧化损伤^[2]。但当氧自由基含量超过机体抗氧化承受极限时, 将会造成机体的氧化应激^[3]。而动物脂肪氧化直接影响到肉色和货架时间, 造成商业损失^[4]。因此, 寻找外源性抗氧化剂已成为目前食品和饲料行业的研究热点。蛋白水解物是包含了肽类和氨基酸的混合物, 主要来源于酶解或微生物发酵。研究报告, 蛋白水解物多具有抗氧化活性, 易被肠道吸收, 可作为天然抗氧化剂使用^[5]。同时, 蛋白水解也为开发非常规蛋白资源提供了新的思路, 且具有广阔的应用前景。目前有关蛋白水解物抗氧化功能的综述报道较少, 本文在探讨其生产方式和抗氧化性能的基础上, 对其作用机理、安全稳定性等进行了总结, 并对当前研究存在的不足和未来发展进行了评价, 以期为蛋白水解物的进一步研究和推广应用提供借鉴。

用提供借鉴。

1 蛋白水解物的生产工艺

蛋白水解物的生产方式主要包括酶解法和微生物发酵法 2 类, 实质都是通过蛋白酶作用对原料蛋白进行水解。自然界中蛋白酶的来源很多, 可分为植物蛋白酶(如木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶)、动物蛋白酶(主要是消化酶, 如胃蛋白酶、胰蛋白酶)和微生物蛋白酶等^[6]。酶解法生产蛋白水解物的技术成熟, 一般工艺如图 1 所示。与微生物发酵法相比, 酶解法生产蛋白水解物的水解度较高, 肽链较短, 较适合工业化大规模生产; 但较易产生苦味肽。已有的研究表明, 苦味肽的产生与疏水性氨基酸的暴露程度有关。因此, 目前常采用复合酶酶解, 特别是通过外切酶作用, 降低末端出现疏水性氨基酸的比例, 从而降低蛋白水解物的苦味^[7]。

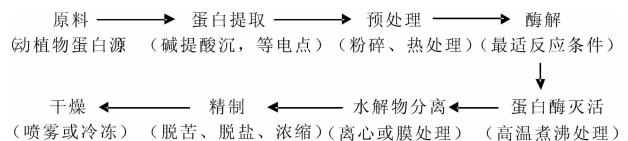


图 1 蛋白水解物的酶法制备步骤

微生物发酵法是为传统的食品加工手段, 包括液态发酵和固态发酵。其生产工序相对简单, 经发酵后可提升原料蛋白的溶解性、乳化性、起泡性等特性。同时, 发酵法也可去除大豆、花生中的抗原蛋白, 提高蛋白品质^[8]。与酶解法相比, 微生物发酵法对蛋白水解产生的苦味有掩盖作用, 适口性较好^[9]。

收稿日期: 2011-06-18; 修回日期: 2011-12-05

资助项目: 浙江省重大科技专项(2006C120971); 杭州市重大科技专项(20092112A41); 浙江省杰出青年基金(R3110085)

作者简介: 孙宏(1983-), 男, 浙江杭州人, 博士研究生

* 通讯作者

蛋白原料经过酶解或发酵作用,均可提高其生物活性,其中研究最多的为其抗氧化活性,并已在多种动植物蛋白和下脚料的水解物中报道(见表1)。与抗氧化酶的作用相比,这些蛋白水解物的活性较高、分子量较小且结构简单、较易吸收,具有补充营养和抗氧化功能的双重作用。此外,蛋白水解物内还含有寡糖、游离氨基酸等物质,对肽类在生物体内的吸收有促进作用^[10]。

表1 抗氧化蛋白水解物的来源和活性检测

| 来源 | 制备方式 | 抗氧化活性 | 资料来源 |
|--------|---------------|--|------|
| 鲑鱼肌肉 | 碱性蛋白酶 | 铁还原/抗氧化,清除超氧自由基 | [15] |
| 乌骨鸡肌肉 | 木瓜蛋白酶 | 清除2,2'-连氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)、1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH)自由基,超氧阴离子自由基 | [18] |
| 紫海胆 | 中性、木瓜、胃蛋白酶 | 清除DPPH自由基 | [19] |
| 鱼肌肉 | 胃蛋白酶 | 清除ABTS、DPPH自由基 | [21] |
| 飞鱼骨干 | 木瓜、胃、胰蛋白酶 | 清除DPPH自由基,羟自由基 | [23] |
| 水稻分离蛋白 | 碱性、风味、中性和胃蛋白酶 | 清除DPPH自由基,羟自由基 | [25] |

蛋白水解物的抗氧化活性主要是因其含有大量由5~16个氨基酸组成的抗氧化肽。其分离纯化和结构鉴定对系统研究蛋白水解物的抗氧化机理有很大帮助。目前,主要的分离策略是基于其抗氧化活性,采用凝胶过滤色谱等方式对特定的肽段进行分离,并结合MALDI-TOF或ESI-TOF质谱来确定其氨基酸一级序列(图2)。Contreras等^[11]通过制备型液相色谱串联质谱的方法,成功分离鉴定到具有抗氧化功能的段肽LQKW和LDTDYKK。值得注意的是,抗氧化肽序列的确定还需要经过化学再合成的验证。另一方面,随着生物信息学的发展,为研究者提供了搜索抗氧化肽来源的有效途径,例如通过搜索Uniprot蛋白数据库和相关的蛋白酶作用数据库ExPASy等^[12],可较方便的预测蛋白的酶切位点和可能的肽产物,可大大提高制备蛋白水解物的针对性。

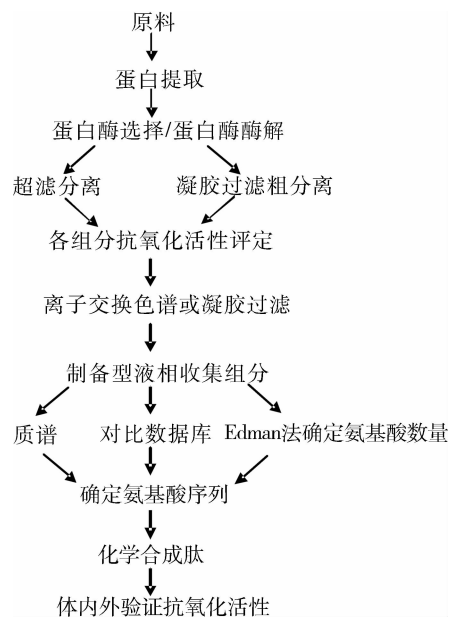


图2 抗氧化肽分离的一般步骤

2 蛋白水解物的抗氧化活性

2.1 蛋白水解物抗氧化活性的评价及影响因素 研究蛋白水解物抗氧化活性需要建立合适的评价手段。最为常见的是化学方法测定抗氧化物质对自由基的清除能力。虽然此类测定方法简单快速,但无法反映抗氧化物质在机体内的作用效果。因此,近几年研究多进行体外细胞水平的抗氧化活性评价。该手段主要是通过特殊的荧光反应来测定活细胞内ROS的动态变化,从而直观反映抗氧化物质的作用效果^[13]。此外,一些研究还进一步建立氧化应激动物模型,为系统研究抗氧化的机理,检测机体基因表达与蛋白水平等提供了有效手段^[14]。

蛋白水解物的化学基础是氨基酸,因此其抗氧化活性与原料蛋白的氨基酸组成紧密相关。Alemán等^[15]发现,氨基酸序列结构对蛋白水解产物的抗氧化活性影响较大,特别是亮氨酸、脯氨酸、组氨酸等疏水性氨基酸的含量^[16]。研究发现,这些疏水性氨基酸的侧链基团能够捕获电子,具有抗氧化能力^[17]。此外,含芳香基团氨基酸也能通过提供质子的方式来清除自由基^[18],因此,蛋白水解物中含苯环氨基酸含量的提高,可以提升蛋白水解物的抗氧化能力^[19]。另一方面,蛋白酶种类不同,获得的蛋白水解物的种类、数量和氨基酸组成也有差异,直接影响到蛋白水解物的抗氧化活性。研究发现,抗氧化活性随着蛋

白分子量降低而提高,特别是分子量低于1 ku以下时更为明显^[20-21]。此外,蛋白水解物的抗氧化活性也与其浓度正相关^[19-20]。

2.2 蛋白水解物抗氧化活性的稳定性 抗氧化蛋白水解物一般需要经过肠道屏障,到达特定作用部位才能发挥作用。研究表明,分子量大小直接影响到蛋白在肠道中的吸收速度,由2~3个氨基酸组成的肽类较容易通过肠道屏障而发挥作用;但超过20个氨基酸组成的多肽,在经过胃肠道消化酶的作用后,会受到不同程度地降解,使抗氧化活性发生改变^[22]。Nalinano等^[21]将鱼肉蛋白进行模拟胃肠液消化后发现水解物的抗氧化活性并不受到影响。You等^[22]则发现,蛋白水解物的抗氧化活性在经过模拟胃肠道系统的消化后,蛋白水解度提高,且抗氧化活力也显著提高,推测可能产生了新的具有更高抗氧化活力的肽类。

2.3 抗氧化蛋白水解物的安全性 与其他生物活性物质一样,抗氧化蛋白水解物的生物安全性评价必不可少。目前主要的评价方式是对体外培养细胞的活性影响^[23]。涉及的细胞系为Caco-2、肾上皮细胞、小鼠巨噬细胞等。考虑到部分植物源蛋白具有致敏作用(如大豆蛋白、花生蛋白等),当采用植物蛋白作为水解原料时,有必要对获得的蛋白水解物进行安全性研究,探讨其对动物是否存在致敏作用。目前,这些研究开展的较少。

3 蛋白水解物抗氧化活性的作用机理

虽然许多研究发现蛋白水解物可以有效抑制脂质氧化,去除机体自由基,但其作用机理尚未完全阐明。目前,抗氧化机理的研究主要在体外细胞培养上进行,有报道表明蛋白水解物对于改善ROS引起的细胞DNA损伤、抑制细胞的异常分裂状态等有明显作用^[24]。Zhang等^[25]发现,经过蛋白水解物处理后,肺成纤维细胞和小鼠巨噬细胞内ROS物质含量与对照相比,有显著的降低,表明其可控制细胞内的氧化水平。肠道作为动物最大的免疫器官,与抗氧化作用密不可分。此外,体内动物模型的研究表明,抗氧化水解物可降低猪肠道过敏性细胞因子IL-8的表达量,同时提高肠道中谷胱甘肽和抗氧化酶的含量^[14]。Roche等^[26]在小鼠上建立的动物模型表明,氧化应激条件下,动物肠道中能量物质的吸收,如葡萄

糖等都会受到影响。因此,通过建立相关动物抗氧化模型,对包括吸收功能在内的生理功能进行系统研究,是蛋白水解物未来研究的一个重点。

4 结语

目前,国内外涉及蛋白水解物抗氧化机理的研究较少,且主要以体外和细胞水平为主,缺少氧化应激的相关动物模型和体内消化吸收模型的研究。此外,考虑到植物蛋白原料多具有抗原蛋白,可引起动物过敏反应,急需开展抗氧化蛋白水解物在动物体内的安全性评价。随着各种新型分离技术的相继产业化应用,使能在工业化生产蛋白水解物的基础上,对抗氧化活性肽进行分离纯化和富集。包括应用基因工程技术生产重组抗氧化肽等,将是未来的发展方向。此外,利用非常规蛋白原料制备抗氧化肽,有助于提高其利用率,对促进我国食品和饲料工业发展具有重要的现实意义,也将成为抗氧化剂研究的重点。

参考文献:

- [1] Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence [J]. *Lancet*, 1994, 344(8924): 721-724.
- [2] Johansen J S, Harris A K, Rychly D J, *et al.* Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2005, 4: 5.
- [3] Maritim A C, Sanders R A, Watkins J B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review [J]. *J Biochem and Mol Toxic*, 2003, 17(1): 24-38.
- [4] Rajapakse N, Mendis E, Jung W K, *et al.* Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties [J]. *Food Res Int*, 2005, 38 (2): 175-182.
- [5] Di Bernardini R, Hamedy P, Bolton D, *et al.* Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products [J]. *Food Chem*, 2011, 124(4): 1296-1307.
- [6] Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins [J]. *Int Dairy J*, 2006, 16 (11): 1306-1314.
- [7] Singh T K, Young N D, Drake M A, *et al.* Production and sensory characterization of a bitter peptide form β -Casein [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53(4): 1185-1189.
- [8] Moure A, Domínguez H, Parajó J C. Fractionation and enzymatic hydrolysis of soluble protein present in waste liquors from soy processing [J]. *J Agr Food Chem*, 2005, 53 (19): 7600-7608.
- [9] Drenowski A, Careros C G. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review [J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 72(6): 1424-1435.
- [10] Pappenheimer J R, Volpp K. Transmucosal impedance of small

- intestine–correlation with transport of sugars and amino acids [J]. *Am J Phys*, 1992, 263(2): 480–493.
- [11] Contreras M D M, Hernández–Ledesma B, Amigo L, *et al.* Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology [J]. *LWT–Food Sci Technol*, 2011, 44(1): 9–15.
- [12] Di Bernardini R, Rai D K, Bolton D, *et al.* Isolation, purification and characterization of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate [J]. *Peptides*, 2011, 32(2): 388–400.
- [13] Wang J, Zhao M, Liang R, *et al.* Whey peptides improve wound healing following caesarean section in rats [J]. *Brit J Nutr*, 2010, 104(11): 1621–1627.
- [14] Young D, Fan M Z, Mine Y. Egg yolk peptides up–regulate glutathione synthesis and antioxidant enzyme activities in a porcine model of intestinal oxidative stress [J]. *J Agr Food Chem*, 2010, 58(13): 7624–7633.
- [15] Alemán A, Giménez B, Pérez–Santín E, *et al.* Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE–inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate [J]. *Food Chem*, 2011, 125(2): 334–341.
- [16] Chen H M, Muranmoto K, Yamauchi F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β –Conglycinin [J]. *J Agr Food Chem*, 1995, 43(3): 574–578.
- [17] Naqash S Y, Nazeer R A. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of *Nemipterus japonicus* and *Exocoetus volitans* Muscle [J]. *J Aquat Food Prod T*, 2010, 19(3–4): 180–192.
- [18] Liu J H, Tian Y G, Wang Y, *et al.* Characterization and in vitro antioxidation of papain hydrolysate from black–bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle and its fractions [J]. *Food Res Int*, 2011, 44(1): 133–138.
- [19] Sarmadi B, Ismail A, Hamid M. Antioxidant and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activities of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates [J]. *Food Res Int*, 2011, 44(1): 290–296.
- [20] Qin L, Zhu B W, Zhou D Y, *et al.* Preparation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad [J]. *LWT–Food Science and Technology*, 2011, 44(1): 1113–1118.
- [21] Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, *et al.* Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna [J]. *Food Chem*, 2011, 124(4): 1354–1362.
- [22] You L, Zhao M, Regenstein J M, *et al.* Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion [J]. *Food Chem*, 2010, 120(3): 810–816.
- [23] Naqash S Y, Nazeer R A. Evaluation of bioactive properties of peptide isolated from *Exocoetus volitans* backbone [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2011, 46(1): 37–43.
- [24] Wang Y G, Zhu F R, Chen J, *et al.* Effects of Pro–Arg, a novel dipeptide derived from protamine hydrolysate on H₂O₂–Induced oxidative stress in human diploid fibroblasts [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(3): 389–393.
- [25] Zhang J, Zhang H, Wang L, *et al.* Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI–TOF/TOF MS/MS [J]. *Food Chem*, 2010, 119(1): 226–234.
- [26] Roche M, Kemp F W, Agrawal A, *et al.* Marked changes in endogenous antioxidant expression precede vitamin A–, C–, and E–protectable, radiation–induced reductions in small intestinal nutrient transport [J]. *Free Radical Bio Med*, 2011, 50(1): 55–65.

Research Advances in Production of Protein Hydrolysates, Evaluation of Its Antioxidant Activity and Mechanism

SUN Hong¹, WU Yi–fei², FENG Guo–qiang¹, LI Dan–dan¹, TANG Jiang–wu², FENG Jie^{1*}

(1. College of Animal Science, Zhejiang University¹, Zhejiang Hangzhou 310029, China;

2. Zhejiang Academy of Agricultural Sciences², Zhejiang Hangzhou 310021, China)

Abstract : Oxidative stress is one of the major factors caused aging and disease in animals. Recent studies have shown that protein hydrolysates (PH) from animal and plant sources have bioactivity including clearing the excessive reactive oxygen species and suppressing the lipid oxidation. As native antioxidant of food and feed industry, it may have broad application prospects, and provide new ideas in the utilization of protein resource. Based on the introduction of production process of antioxidant PH and methods of anti–oxidant activity evaluation, this paper further summarized current progress of anti–oxidant PH, including influence factors and mechanism of antioxidant function, safety and stability concerns. The prospects of its research and application were also discussed.

Key words: oxidative stress; protein hydrolysates; antioxidant mechanism; antioxidant peptides