

草鱼抗氧化肽的美拉德反应特性研究

赵谋明, 刘洋, 孙为正, 苏国万

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本研究通过单独加热草鱼肽和添加木糖加热反应制备热降解产物(TDPs)和美拉德反应产物(MRPs), 运用DPPH·抑制率、肽分子量分析及氨基酸分析等方法评价不同反应时间草鱼肽热降解产物及美拉德反应产物的抗氧化性能、分子量分布以及氨基酸组成的变化规律, 深入探讨了反应时间对草鱼肽的美拉德反应产物特性的影响。研究发现, 单独加热草鱼肽对各时段热降解产物的总氨基酸含量无显著影响, 游离氨基酸含量显著增加, 而3000 Da以下肽段含量增多。美拉德反应体系样品随着反应时间的增加, 产物中总氨基酸及游离氨基酸含量下降, 其中精氨酸及赖氨酸减少尤其显著, 分子量大于3000 Da的肽段明显增多, 3000 Da以下的肽段含量降低, 此外, 美拉德反应产物中抗氧化活性显著增强。

关键词: 草鱼肽; 美拉德反应; 分子量; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2013)12-2805-2809

Characterization of Maillard Reaction Products Derived From Antioxidant Peptides of *Ctenopharyngodonidellus*

ZHAO Mou-ming, LIU Yang, SUN Wei-zheng, SU Guo-wan

(South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Thermal degradation products (TDPs) and Maillard reaction products (MRPs) were prepared by heating *Ctenopharyngodonidellus* peptide with or without addition of xylose. Antioxidant activity, molecular weight distribution and amino acid composition of MRPs and TDPs with different reaction time were evaluated. The results showed that when heating *Ctenopharyngodonidellus* peptide without adding xylose, the total amino acids content of TDPs had no significant change, while the free amino acid and peptides below 3000 Da increased. The degree of Maillard reaction enhanced by increasing the reaction time, while the total/free amino acids contents decreased. Moreover, arginine and lysine showed remarkable reduction; peptides which above 3000 Da from MRPs increased while below 3000 Da decreased. In addition, the antioxidant activity of peptides increased significantly after Maillard reaction.

Key words: *Ctenopharyngodonidellus* peptides; Maillard reaction; molecular weight; antioxidant activity

草鱼是我国“四大家鱼”之一, 其脂肪含量低, 含人体所需的8种必需氨基酸且氨基酸组成符合人体营养平衡的要求, 是一种营养丰富的优质蛋白。此外, 草鱼食性简单, 生长迅速, 产量相对较高, 作为我国主要的淡水养殖鱼类之一, 具有重要的经济价值。

美拉德反应是食品加工过程中广泛存在的一种非酶褐变反应, 于1912年由法国化学家Louis-Camille Maillard发现, 主要是指羰基化合物(还原糖)与氨基

化合物(氨基酸、肽和蛋白质)之间经过分子聚合、Amadori重排, Strecker裂解等一系列反应最终形成类黑精的复杂反应^[1], 该反应可生成大量的挥发性化合物和大分子量的聚合物^[2]。此外, 有研究表明美拉德反应可有效提高食品体系中蛋白质、肽或氨基酸的抗氧化活性^[3-5]。然而, 由于肽的结构和组成较为复杂, 且在高温条件下易发生裂解或聚合, 尤其是在美拉德反应中, 多肽除自身会发生热降解外, 还与还原糖类发生羰氨缩合反应, 甚至会与中间产物分子发生反应, 进而改变其分子结构。因此, 目前对于肽的美拉德反应特性, 以及采用美拉德反应提升多肽抗氧化活性的研究较少。

“天然、营养、健康”是我国调味料的发展趋势, 而美拉德反应不仅可以赋予食品天然的色泽和风味, 其产物更具有强抗氧化性, 能有效延长食品的货架期。本研究选用草鱼肽作为原料, 与木糖进行不同时间梯

收稿日期: 2013-06-25

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD37B08); 国家自然科学基金面上项目(31171783); 广东省科技计划农业攻关项目(2012B020312001)

作者简介: 赵谋明(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品生物技术、蛋白质化学与工程、海洋资源综合利用等

通讯作者: 苏国万(1981-), 男, 讲师, 主要从事食品生物技术、风味化学方面的研究

度的美拉德反应, 目的在于研究反应时间对美拉德反应产物的氨基酸组成、分子量分布以及抗氧化活性影响的规律, 深入探究肽的美拉德反应特性, 为进一步提升肽的抗氧化活性提供理论和方法的指导。

1 材料与方法

1.1 材料

草鱼: 购于华南理工大学菜市场(广州市五山路), 去头、尾、鱼骨、内脏, 清洗干净, 绞碎成肉糜, 置于-20℃冰箱保存, 备用。

酶制剂: 胰酶(酶活为258507 U/g)购于杭州三叶生物化工厂; Alcalase 2.4L(酶活为80436 U/g)购于诺维信公司; 木瓜蛋白酶(酶活为114460 U/g)购于广州裕立宝生物科技公司。

其他化学试剂均为分析纯; 去离子水为实验室自制。

1.2 主要实验仪器

KND-2C型蛋白质测定仪, 上海纤检仪器有限公司; SHA-C水浴恒温振荡器, 江苏省金坛市农仪器厂; Srtourius BP211D分析电子天平, 中科院化学研究所; 高压灭菌锅, 上海申安; Pellicon超滤系统, 德国赛多利斯集团; A300全自动氨基酸分析仪, 德国MembraPure公司; Waters高效液相色谱, 美国Waters公司; GL-21M高速冷冻离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; UV-754分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; 全波长扫描多功能读数仪, 美国热电; LABCONCO冻干机, 美国LABCONCO; Trac DSQ II GC/MS气相色谱-质谱联用仪, 美国Thermo fisher公司。

1.3 实验流程



图1 草鱼肽及其美拉德反应产物制备工艺流程

Fig.1 The flow chart of prepare *Ctenopharyngodonidellus* peptide and its MRPs

将胰酶、Alcalase 2.4L、木瓜蛋白酶按1:1:1(m/m/m)比例, 草鱼质量0.2%的加酶量对草鱼进行酶解, 冷冻离心取上清液, 通过分子通量为10000 Da的超滤膜, 取透过液进行冷冻干燥制成粉末。取2.5 g冻干肽粉末, 加入2.5 g木糖, 95 g 0.05 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0); 另外取2.5 g冻干肽粉末, 加入97.5 g 0.05 mol/L磷酸

缓冲液(pH 7.0), 两组样品分别在110℃下加热3 h, 中途每隔30 min取样进行分析。第一组得到美拉德反应产物(Maillard Reaction Products, MRPs), 第二组得到热降解反应产物(Thermal Degradation Products, TDPs), 冷冻保存备用。

1.4 分析测定

1.4.1 游离氨基酸含量测定

采用甲醛电位滴定法测定草鱼蛋白酶解液的游离氨基酸含量, 以蒸馏水为空白对照, 取2 g酶解液, 加入蒸馏水至80 g, 以0.1 mol/L NaOH滴定至pH=8.2, 加入10 mL甲醛, 继续滴定至pH=9.2, 得空白对照组合样品加入甲醛后消耗的NaOH体积 V_0 及 V_i 。酶解液游离氨基酸含量为:

$$\text{游离氨基酸}(\%) = [(V_i - V_0) \times 0.1 \times 0.014 \times 6.25 / 2] \times 100\%$$

1.4.2 DPPH自由基抑制率测定

以0.02~0.2 mg/mL谷胱甘肽(GSH)为阳性对照。将2 mL DPPH·溶液(0.2 mmol/L, 溶于95%乙醇)置于试管中, 加入2 mL酶解液, 振荡混匀, 室温放置30 min后, 在517 nm处测其吸光值(A_i), 以2 mL 95%乙醇加入2 mL蒸馏水调零, 对照为2 mL DPPH·溶液加上2 mL 95%乙醇在测定波长下的吸光值(A_c), 2 mL酶解液和2 mL 95%乙醇混合后在测定波长的吸光值为 A_j 。酶解液对DPPH·的清除能力用抑制率R表示:

$$R/\% = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

IC₅₀值是指当样品DPPH·自由基抑制率R为50%时样品的蛋白浓度, 单位为mg/mL, 本研究通过比较各样品IC₅₀值的大小来衡量各样品抗氧化性能的高低, IC₅₀值越低表示抗氧化性越强。

1.4.3 总氨基酸组成测定

采用A300氨基酸自动分析仪(membra Pure, Bodenheim, Germany)进行总氨基酸组成分析。取5 mL 6 M的盐酸在110℃条件下消化样品24 h, 定容至50 mL, 取2 mL溶液挥干后用稀释液稀释, 溶液经0.22 μm滤膜过滤后测定。氨基酸的含量用mmol/g表示。

1.4.4 肽分子量分布测定

采用凝胶色谱法测定肽的分子量分布, 检测条件: Waters高效液相色谱(Waters 600), TSK gel G2000 SWXL分析柱; 洗脱液0.04 mol/L磷酸缓冲液, 流速1 mL/min, 检测波长214 nm。标准肽样品: Conalbumin (75000 Da), Oralbumin (43000 Da), Cytochrome c (12384 Da), Aprotinin (6512 Da), Vitamin B12 (1855 Da), Glutathione (307 Da), 相对分子质量的对数值与洗脱体积拟合直线方程为 $y = -0.1547x + 5.6431$ ($R^2 =$

0.9957), 其中, y 为标准肽分子量的对数; x 为洗脱体积。

1.5 数据统计

每个数据均为三次测定的平均值, 采用 Excel 2010 及 SPSS 18.0 统计分析软件分析实验数据, 采用均值±标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 为表示方法, 不同样品间的差异采用单因素方差分析进行比较, 以 $p < 0.05$ 为有显著性。

2 结果与讨论

2.1 反应时间对体系游离氨基酸含量的影响

为研究美拉德反应及热降解反应对游离氨基酸含量的影响, 采取甲醛电位滴定法对不同反应时间的样品游离氨基酸含量进行检测, 结果如图 2 所示。

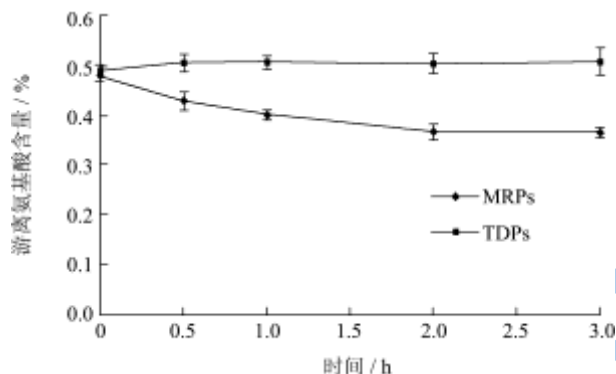


图 2 反应时间对游离氨基酸含量的影响

Fig.2 Effect of reaction time on the content of nitrogen in free amino acids in TDPs and MRPs

由图 2 可知, 单独加热草鱼肽, 其游离氨基酸含量变化不明显。这主要是因为加热会使得部分游离氨基酸发生热降解, 但是由于加热温度为仅为 110 °C, 氨基酸的降解程度较低, 另外, 加热也使得部分的小分子肽发生降解^[6], 生成游离氨基酸, 致使最终的游离氨基酸含量变化不显著。而添加木糖进行加热, 游离氨基酸的含量显著降低, 且随着的加热时间的延长, 游离氨基酸含量逐渐降低, 主要是发生美拉德反应损耗了大量的游离氨基酸, 当加热时间为 2 h 时, 游离氨基酸的含量降低了 23%, 然而继续延长加热时间, 其含量变化不显著, 可能是美拉德反应速率已达到终点。

2.2 反应时间对 DPPH·清除率的影响

DPPH·在自由基清除剂(氢供体)存在时, 其在 517 nm 处的吸收减弱或消失, 通过测定样品在 517 nm 波长处的吸收情况可评价样品抗氧化活性的高低。将

样品进行相应稀释后, 得到各样品 IC₅₀ 值如图 3 所示。

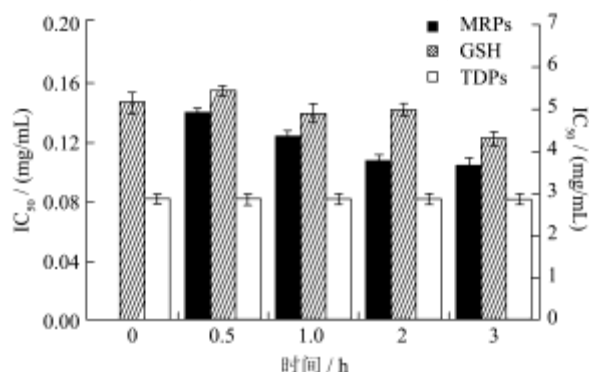


图 3 反应时间对 DPPH·清除率的影响

Fig.3 Effect of reaction time on DPPH· scavenging rate of TDPs and MRPs

由图 3 可发现, 改变反应时间, 热降解体系样品 IC₅₀ 值并不随着反应时间的延长呈规律性变化, 热降解反应 3 h 样品的 IC₅₀ 值为 4.287 mg/mL, 较未发生热降解反应样品显著减小 ($P < 0.05$)。而美拉德反应体系样品的 IC₅₀ 随美拉德反应而迅速降低, 当反应 0.5 h 时, 样品 IC₅₀ 值急速降低为 0.140 mg/mL, 远低于空白样品 (IC₅₀=4.796 mg/mL) 和热降解反应样品, 样品美拉德反应时间为 3 h 时 DPPH·清除率最高, 其 IC₅₀ 值为 0.105 mg/mL, 稍高于谷胱甘肽 GSH (IC₅₀=0.082 mg/mL)。综合热降解体系样品与美拉德体系样品 DPPH·清除率的变化情况可知: 美拉德反应可使得产物中的 DPPH·清除率迅速增强。

综上所述, 草鱼肽-木糖美拉德反应产物的抗氧化能力随反应时间的增加而逐步增强, 与唐杰等人^[7]研究结果相同。此外, 综合美拉德反应体系与热降解反应体系抗氧化指标变化情况可知: 导致草鱼肽-木糖美拉德反应样品抗氧化能力迅速提升的原因可能源于美拉德反应产物, 而非草鱼肽本身的热降解反应产物。

2.3 反应时间对体系氨基酸组成的影响

美拉德反应过程中, 由于发生了羰胺缩合导致了氨基酸含量的变化, 但由于不同的氨基酸具有不同的反应活性, 本研究通过对样品 MRP 中 15 种氨基酸总量进行分析, 发现各类氨基酸含量变化各有差异, 其中异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸等 6 种氨基酸变化较大, 见表 2; 各类氨基酸百分含量见图 4。

根据表 1 可知, 随着时间的增加 (0~3 h), 总氨基酸含量从 13.08 mmol/mL 逐渐低至 10.59 mmol/mL, 其中赖氨酸是 15 种氨基酸中损失最明显的氨基酸, 自 1.213 mmol/mL 减少至 0.544 mmol/mL, 降低率达到 55.15%, 而异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、

精氨酸等五种氨基酸共减少了 1.425 mmol/mL, 占总减少量的 58.10%。由此可知, 异亮氨酸、亮氨酸、苯

丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸等 6 种氨基酸易发生美拉德反应。

表 1 反应时间对部分氨基酸含量变化的影响

Table 1 Effect of reaction time on the partial amino acids contents of TDPs and MRPs

反应时间/h	Ile/(mmol/g)	Leu/(mmol/g)	Phe/(mmol/g)	His/(mmol/g)	Lys/(mmol/g)	Arg/(mmol/g)	Anti-AA/(mmol/g)	总量/(mmol/g)
0	0.59	1.10	0.60	0.59	1.21	0.47	0.96	13.04
0.5	0.58	1.07	0.60	0.56	0.93	0.42	0.87	11.92
1.0	0.57	1.03	0.55	0.53	0.83	0.34	0.83	11.66
2.0	0.53	0.97	0.52	0.48	0.65	0.31	0.81	11.39
3.0	0.50	0.91	0.49	0.43	0.54	0.26	0.77	10.59

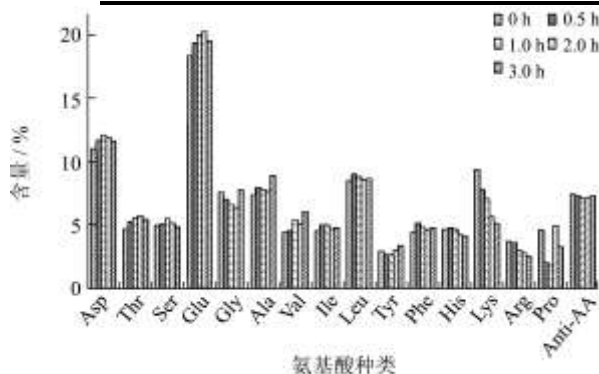


图 4 反应时间对美拉德体系总氨基酸含量的影响

Fig.4 Total amino acids content of the sample

根据图 4 可知, 从各氨基酸百分含量数来看, 赖氨酸、精氨酸及组氨酸所占百分数随时间的增加而减少(分别减少了 44.76%、31.46%及 11.46%), 其余 13 种氨基酸所占百分数并无明显变化趋势, 由此可知此三种氨基酸更易发生美拉德反应, 此结果与张凌燕等人^[8]研究结果一致。

此外, 在被检测的 15 种氨基酸中, 与抗氧化性相关的氨基酸 (Anti-AA) 有组氨酸 (His) 和酪氨酸 (Tyr), 两种氨基酸总量减少了 0.193 mmol/mL, 且所占总氨基酸的比例无明显变化, 说明草鱼肽-木糖美拉德反应体系抗氧化性能的增加可能是由于美拉德反应产生了具有强抗氧化物质^[9], 而非抗氧化氨基酸含量的变化所致。

2.4 反应时间对肽分子量分布的影响

为了研究不同反应时间对草鱼-木糖美拉德体系以及草鱼肽热降解反应体系反应产物特性的影响, 采用 HPLC 对 TDPs 和 MRPs 的肽分子量分布进行分析, 根据各个不同相对分子量肽段对美拉德反应的贡献, 将其分为 5 段, 分别为相对分子量小于 1000 Da 的组分、相对分子质量为 3000~1000 Da、相对分子质量 3000~5000 Da 的组分和相对分子质量大于 10000 Da 的组分, 各肽段的含量在各样品中所占比例

如表 2 及表 3 所示。

表 2 反应时间对草鱼热降解体系分子量分布的影响

Table 2 Effect of reaction time on the molecular weight distribution of TDPs

反应时间/h	9.72	10.48	11.03	11.11	12.50
	>10000 /%	10000~5000 /%	5000~3000 /%	3000~1000 /%	<1000 /%
0	0.50	4.66	28.03	48.47	18.34
0.5	0.47	4.55	26.73	48.38	19.87
1	0.48	4.54	26.52	48.64	19.83
2	0.44	4.34	25.25	49.67	20.30
3	0.42	4.17	24.49	50.29	20.63

表 3 反应时间对草鱼-木糖美拉德体系 MRPs 分子量分布的影响

Table 3 Effect of reaction time on the molecular weight distribution of MRPs

反应时间/h	9.72	10.48	11.03	11.11	12.50
	>10000 /%	10000~5000 /%	5000~3000 /%	3000~1000 /%	<1000 /%
0	0.48	4.67	28.06	48.46	18.33
0.5	0.50	6.02	26.38	50.73	16.37
1.0	0.78	6.54	25.80	50.78	16.10
2.0	0.79	7.46	24.15	51.11	16.49
3.0	1.01	8.03	23.35	51.15	16.46

从表 2 中可以看出随着反应时间的延长, 草鱼热降解体系中分子质量大于 3000 Da 的组分含量均随时间的延长而减小, 且降低速率与分子量大小呈正相关。而小于分子质量 3000 Da 的组分含量随时间的延长而增加, 说明热反应会使得大分子肽降解为小分子肽, 且随着时间的延长, 降解程度越高。

美拉德反应中, 肽与还原糖及其衍生物往往交联产生大分子量产物^[10], 在本实验美拉德体系样品中, 大于 10000 Da 和 5000~1000 Da 的大分子肽随着时间的增加而增多, 说明羰胺缩合生成了大分子量物质; 5000~3000 Da 的组份先增加后随着时间的推移逐渐

减少,说明多羧胺缩合和肽降解、聚结先后出现,且此肽段减少的速率大于增加速率,导致了总含量减少;3000~1000 Da 组分均随时间延长而增加,且含量增加幅度较热降解体系更大;分子质量小于 1000 Da 的组分中,美拉德反应体系中减少了 1.96%,而热降解体系反而样品增加了 2.29%,表明大分子肽段降解生成小分子肽段,其速度可能与美拉德反应消耗小分子肽速率平衡,因此表观上小于 1000 Da 肽的含量无明显变化,该现象与刘平^[11]等人研究一致。

综合上述肽分子量组分的变化情况可知,大于 10000 Da、5000~1000 Da 的组分热降解反应剧烈,美拉德反应体系中此段组分增多可能是由于小分子肽与木糖或其衍生物的缩合所导致;美拉德体系中小于 1000 Da 组分急剧减少,说明其具有良好的美拉德反应活性

3 结论

3.1 通过上述实验可知,不同氨基酸具有不同的美拉德反应活性,其中精氨酸与赖氨酸具有最佳的美拉德反应活性;美拉德反应中的羧胺缩合以及热降解引起了草鱼肽分子量分布的显著变化,主要体现为大分子量物质的增加和小分子肽的减少;此外,美拉德反应还显著增强草鱼肽 MRPs 的抗氧化性能,但其氧化性的变化与抗氧化氨基酸不具相关性。

3.2 美拉德反应是一个复杂的过程,其反应机制尚未明确,但反应赋予酶解产物强抗氧化性在诸多文章中已提及^[12]并在本实验中得到验证。本文通过探究美拉德反应对草鱼肽特性的影响规律,为利用草鱼肽及木糖制备天然抗氧化剂提供了一定的理论依据。

参考文献

[1] Yoo M A, Kim H W, Kang M H, et al. Antioxidant effect of brown substances separated from defatted roasted sesame dregs [J]. Food Science and Biotechnology, 2004, 13: 274-278

[2] Jing H, Kitts D D. Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems [J]. Archives of biochemistry and biophysics, 2004, 429(2): 154-163

[3] 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,2008,29(7):52-57

Xiang H D, Xu S Y, Wang Z. Antioxidant Activities of Maillard Reaction Products of Protein and Reducing Sugar [J]. Food Science, 2008, 29(7): 52-57

[4] 肖军霞,黄国清,孙萍,等.牡蛎酶解液的美拉德反应及抗氧化活性研究[J].食品科技,2011,36(4):211-214

Xiao J X, Huang G Q, Sun P. The Maillard Reaction of Oyster Hydrolyzate and Its Antioxidant Activity [J]. Food Science and Technology, 2011, 36(4): 211-214

[5] Gu F L, Kim J M, Abbas S, et al. Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein-glucose [J]. Food Chemistry, 2010, 120(2): 505-511

[6] Kim J S, Lee Y S. Study of Maillard reaction Products derived from aqueous model systems with different Peptide chain lengths [J]. Food Chemistry, 2009, 116(4): 846-853

[7] 唐杰,刘必谦,周湘池,等.虾蟹壳提取物氨基葡萄糖美拉德反应及其产物的抗氧化性能研究[J].海洋与湖沼, 2012, 43(4):741-747

Tang J, Liu B Q, Zhou X C, et al. Maillard Reaction of Shrimp Crab Glucosamine and Antioxidant Activities of Its MRPs [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(4): 741-747

[8] 张凌燕,李倩,尹姿,等.3 种氨基酸和葡萄糖美拉德产物的物理化学特性及抗氧化活性的研究[J].中国食品学报, 2008,8(3):13-22

Zhang L Y, Li Q, Yin Z, et al. Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Three Glucose-amino Acid Model Maillard Reaction Products [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(3): 13-22

[9] Yanagimoto K, Lee KG, Ochi H, et al. Antioxidative activity of heterocyclic compounds found in coffee volatiles Produced by Maillard reaction [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(19): 5480- 5484

[10] R Zamora, Francisco J H. Coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the nonenzymatic food browning [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2005, 45(1): 49-59

[11] 刘平,张晓鸣,大豆肽-木糖美拉德反应体系中肽降解与交联规律研究[J].食品工业科技,2011,32(4):91-96

Liu P, Zhang X M. Study on the degradation and cross-linking of soy peptides in Maillard reaction with xylose [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(4): 91-96

[12] Žilić S, Akilhoğlu G, Serpen A, et al. Effects of isolation, enzymatic hydrolysis, heating, hydration and Maillard reaction on the antioxidant capacity of cereal and legume proteins [J]. Food Research International, 2012, 49(1): 1-6