

酶解法制备花生粕高 F 值寡肽混合物及其缓解疲劳作用的研究

李润国, 庞文录

(沈阳师范大学 粮食学院, 辽宁 沈阳 110034)

摘要:利用 Alcalase 碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶水解花生粕制得高 F 值寡肽混合物(F 值为 24.6)。对此混合物进行缓解疲劳功能实验,结果表明:实验组与对照组相比,灌胃不同剂量花生粕高 F 值寡肽混合物 30 d 后,小鼠的转棒时间明显提高,血清尿素氮含量显著降低,肝糖原和肌糖原有一定程度的提高,花生粕高 F 值寡肽混合物具有明显的缓解疲劳作用。

关键词:花生粕;高 F 值寡肽;酶解;缓解疲劳

中图分类号:TS 202.1 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2015)01-0043-04

Preparation of high F value oligopeptide mixture from peanut meal by enzymatic hydrolysis and the relieve fatigue effect

LI Run-guo, PANG Wen-lu

(College of Grain Science and Technology, Shenyang Normal University, Shenyang Liaoning 110034)

Abstract: High F ratio oligopeptide mixture (F ratio 24.6) was prepared by enzymatic hydrolyzing peanut meal with alkaline protease Alcalase and papain. The function of relieve fatigue of the mixture was tested. The results showed that the rolling stick time of the mice which were given a dose of high F ratio oligopeptide by intragastric administration increased significantly, the content of serum urea nitrogen (SUN) decreased significantly, the content of hepatic glycogen and muscle glycogen increased in some degree. The high F ratio oligopeptide mixture from peanut meal had significant relieve fatigue effect.

Key words: peanut meal; high F ratio oligopeptide; enzymatic hydrolysis; relieve fatigue

高 F 值(Fischer ratio)寡肽混合物中的主要物质为 3~7 个氨基酸残基的短肽链物质,其 F 值为支链氨基酸(BCAA,即 Val、Ile、Leu)与芳香族氨基酸(AAA,即 Tyr、Phe)含量的比值。有研究表明,高 F 值寡肽可用于辅助治疗肝硬化和肝性脑病,纠正血浆及脑中氨基酸的病态模式,降低血氨。另外,高 F 值寡肽还具有抗疲劳、抗缺氧、降血脂以及醒酒等作用^[1-3]。近些年许多学者从不同角度对高 F 值寡肽的制取及功能进行了研究,主要对玉米黄粉来源的高 F 值寡肽研究较多。花生的蛋白含量丰富且氨基酸种类较全面,是制备肽类物质的优质原料之一,但是,由于花生本身含油脂量较高,且花生蛋白结构较致密,直接用酶法水解,难以达到较高的水解要

求,因此,通常需要利用强碱处理或超临界处理等手段预先去掉油脂并改变花生蛋白质的致密性,从而提高酶解效果,但是如果利用强碱处理,氨基酸的性质会受到破坏。

采用酶法水解花生制取高 F 值寡肽的效果很差,未见相应的研究报道。压榨法生产花生油的副产品—花生粕,经过压榨后,其蛋白质结构较疏松,一些基团外露,且大部分油脂已经去除,为酶法水解反应提供了有利的条件,能大幅度提高水解效果。本研究以植物油厂压榨法生产花生油的副产品—花生粕为原料,采用复合酶解法制备高 F 值寡肽混合物,对其缓解疲劳作用进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

压榨花生粕:沈阳圣金锣食品公司提供;Alcalase 碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶:北京奥博星生物技

收稿日期:2014-07-09

基金项目:辽宁省自然科学基金(201102197)

作者简介:李润国,1965 年出生,男,辽宁凤城人,教授。

术有限责任公司;实验动物:昆明种雄性小鼠,6~8周龄,体重 20 ± 2 g,沈阳医学院提供。其他试剂均为国产分析纯。

TD-5Z型离心机:湖南凯达科学仪器有限公司;DK-S26电热恒温水浴锅:上海精密实验设备有限公司;L-8800氨基酸自动分析仪:日立公司;凝胶电泳仪(comet-40):英国SCIE-PLAS;ZD-2自动电位滴定仪:上海精密科学仪器有限公司;尿素氮测定试剂盒(二乙酰一肟法):北京化工厂;B-490旋转蒸发仪:瑞士BUCHI;大小鼠转棒仪(DXP-2):中国医学科学院药物研究所;752PC型紫外—可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 花生粕高F值寡肽混合物的制备

将花生粕烘干后,粉碎,过100目筛,加入10倍的水,pH调至9.0,加入3%(E/S)的Alcalase碱性蛋白酶,45℃下水解5h,然后90℃水浴灭酶10min,离心除残渣,取上清液,调pH至6.5,温度40℃,加入木瓜蛋白酶4%(E/S),水解4h,水浴灭酶10min,加入活性炭吸附芳香族氨基酸,处理2h,离心、超滤,取清液,经浓缩、干燥、粉碎后制得高F值寡肽混合物,利用氨基酸自动分析仪进行分析鉴定^[2-4]。

1.2.2 缓解疲劳作用的研究

1.2.2.1 实验动物分组方法

将经3d适应性饲养后的50只雄性小鼠随机分为5组,即对照组、实验组I、实验组II、实验组III、实验组IV,每组10只,组间体重经检验无显著差异。每组每天喂食相同标准饲料,并采用灌胃法,实验组每只每天经口灌胃不同量的高F值寡肽混合物,各组每只灌入量依次为5mg/只、10mg/只、15mg/只、20mg/只,对照组每只每天经口灌胃等量生理盐水。连续饲养30d,进行缓解疲劳实验^[5]。实验分组情况见表1。

表1 实验组别设计

组别	小鼠数量/只	高F值寡肽浓度/(m/v)%	灌胃量/mL	高F值寡肽剂量/mg
对照组	10	0	1.0	0
实验组I	10	0.5	1.0	5
实验组II	10	1.0	1.0	10
实验组III	10	1.5	1.0	15
实验组IV	10	2.0	1.0	20

1.2.2.2 转棒实验

灌胃第24d时每只小鼠在2~5 r/min下,由低至高做适应性训练(10 min/d);第25~29d,转速由5 r/min调整至16 r/min,做调整训练,并初步记录每只小鼠跌落三次的累计时间;第30d,灌胃30min后,将小鼠放置在16 r/min转棒上,点击实验开始,接通DXP-2电源,用转棒仪记录每只小鼠跌落3次的累计时间^[6]。

1.2.2.3 血清尿素氮的测定方法

将各组小鼠(末次灌胃30min后)置于水深30cm以上、水温 25 ± 1 ℃的游泳箱内,游泳30min后,拔眼球取血,室温沉降20min后,冷却至4℃,在6000 r/min下离心20min,取血清,用血清试剂盒(二乙酰一肟法)测定血清尿素含量变化,于520nm处测吸光度并计算血清尿素含量。

1.2.2.4 肝糖原的测定

末次灌胃30min后将小鼠按1.2.2.3中方法游泳运动后,脱颈处死小鼠,取出肝脏,用生理盐水漂洗,并用滤纸吸干,称取200mg肝脏,置于匀浆器中,加入三氯乙酸(TCA)4mL,匀浆1min,3000 r/min离心15min,将上清液移至另一试管内;在沉淀中加入4mL的TCA,重复前面操作;将两次离心后的上清液合并,混匀后取1mL置于离心管内,加95%乙醇4mL,混匀至无界面,37℃恒温水浴4h,沉淀完全后,3000 r/min离心15min,倒掉上清液并将离心管倒置10min,用2mL蒸馏水溶解糖原,溶解后按蒽酮法测定小鼠肝脏糖原含量。

1.2.2.5 肌糖原的测定

在1.2.2.4处死的小鼠中,同时取出小鼠肌肉,用生理盐水漂洗后,用滤纸吸干,称取1g肌肉,匀浆,放入装有KOH(30%,3mL)的试管中,沸腾水浴20min,取出冷却,移至50mL容量瓶中,并用蒸馏水洗涤试管,并入容量瓶中,加水定量至50mL,摇匀,沸水浴10min,冷却后用蒽酮法在620nm波长处测吸光度,计算肌糖原含量。

1.2.2.6 数据统计方法

实验数据使用SPSS软件进行统计分析;数据用 $X \pm SD$ (平均值 \pm 标准差)表示,差异显著性检验采用独立样本的t检验。

2 结果与分析

2.1 花生粕高F值寡肽混合物氨基酸组成

按1.2.1方法制得花生粕高F值寡肽混合物,

用氨基酸自动分析仪对其进行氨基酸组成测定,结果见表2。

表2 花生粕高F值寡肽混合物氨基酸组成 mg/g

种类	含量	种类	含量
天门冬氨酸(Asp)	83.5	苏氨酸(Thr)	18.4
丝氨酸(Ser)	41.2	谷氨酸(Glu)	92.9
甘氨酸(Gly)	42.6	丙氨酸(Ala)	26.8
缬氨酸(Val)	32.8	蛋氨酸(Met)	9.8
异亮氨酸(Ile)	18.6	亮氨酸(Leu)	37.2
酪氨酸(Tyr)	1.3	苯丙氨酸(Phe)	2.3
赖氨酸(Lys)	31.6	组氨酸(His)	15.0
精氨酸(Arg)	91.2	脯氨酸(Pro)	19.6

由表2计算得该混合物BCAA含量为88.6 mg/g,AAA含量为3.6 mg/g,F值为24.6,大于20,经凝胶电泳分析,其寡肽分子量在200~1000 D之间,符合高F值寡肽的要求。

2.2 花生粕高F值寡肽混合物对小鼠体重的影响

实验动物按1.2.2.1方法分组后灌胃30 d,各组小鼠体重变化情况见表3。

表3 实验前后小鼠的体重变化

组别	实验前/g	实验第30 d/g	体重增长率/%	P
对照组	20.05 ± 1.04	37.42 ± 3.95	86.63	-
实验组 I	20.22 ± 0.85	38.27 ± 3.80	89.27	0.29
实验组 II	19.67 ± 1.72	36.79 ± 3.43	87.04	0.57
实验组 III	19.49 ± 1.66	36.54 ± 2.92	87.48	0.36
实验组 IV	19.86 ± 0.96	37.07 ± 3.07	86.66	0.47

注:P为各实验组与对照组的比较结果。-指没有数据。体重增长率=(各组第30 d小鼠平均体重-该组实验前小鼠平均体重)/该组实验前小鼠平均体重×100%。

由表3可知,实验前实验组与对照组的小鼠体重无显著性差异($P > 0.05$),说明分组正确;灌胃第30 d,各组小鼠体重明显增加,对照组、实验组 I、实验组 II、实验组 III、实验组 IV的体重增长率分别为:86.63%、89.27%、87.04%、87.48%和86.66%,经t-检验可知4个实验组与对照组之间无显著性差异($P > 0.05$),证明灌胃花生粕高F值寡肽混合物对受试小鼠的体重增长无显著影响。

2.3 花生粕高F值寡肽混合物对受试小鼠转棒时间的影响

运动耐力的改变是缓解疲劳功能的主要表现之一^[7-9]。转棒时间增长,表明耐疲劳能力增强。不同剂量高F值寡肽混合物对受试30 d小鼠转棒时

间的影响结果见表4。

表4 高F值寡肽混合物对小鼠转棒时间的影响

组别	转棒时间/s	转棒时间增长率/%	P
对照组	76.42 ± 86.81	-	-
实验组 I	131.73 ± 80.69	72.38	0.063
实验组 II	210.95 ± 79.20	176.04**	0.007
实验组 III	189.75 ± 91.26	148.30*	0.036
实验组 IV	176.58 ± 96.15	131.65	0.091

注:**指极显著,*指显著;P指各实验组与对照组的比较结果;-指没有变化。转棒时间增长率=(各组第30 d小鼠平均转棒时间-对照组小鼠平均转棒时间)/对照组小鼠平均转棒时间×100%。

由表4可知,与对照组相比,各实验组小鼠转棒时间均有明显延长,实验组 I、实验组 II、实验组 III、实验组 IV转棒时间增长率分别为72.38%、176.04%、148.30%和131.65%。经t检验可知,实验组 II与对照组比较差异极显著($P < 0.01$),实验组 III与对照组比较差异显著($P < 0.05$),且实验组 II增长率最大,即寡肽混合物浓度为1.0%,剂量为10 mg/d时,对转棒时间影响极显著,转棒时间明显延长。

2.4 花生粕高F值寡肽混合物对小鼠血清尿素氮的影响

当运动加剧、机体内糖原和脂肪供应不足时,肌肉蛋白质即可分解提供能量,产生尿素氮,血清尿素氮的含量可反映体内蛋白质的分解情况,是评价机体对运动及负荷承受能力的较灵敏指标^[7-9]。灌胃30 d后,受试小鼠运动后血清尿素氮含量变化见表5所示。

表5 高F值寡肽混合物对小鼠运动后血清尿素氮含量的影响

组别	血清尿素氮/(mg/L)	血清尿素氮含量降低率/%	P
对照组	239.46 ± 74.33	-	-
实验组 I	135.70 ± 39.02**	43.32	0.0016
实验组 II	162.82 ± 26.71**	32.00	0.0010
实验组 III	180.07 ± 41.60*	24.80	0.0210
实验组 IV	151.26 ± 42.85**	36.83	0.0009

注:**指极显著,*指显著;P指各实验组与对照组的比较结果;-指没有变化。降低率=(对照组血清尿素氮-实验组血清尿素氮)/对照组血清尿素氮×100%。

由表5可知,实验组 I、II、III、IV小鼠运动后血清尿素含量均低于对照组,其降低率分别为43.32%、

32.00%、24.80%和36.83%。经t检验得出,实验组I、II、IV的血清尿素氮含量与对照组相比差异极显著($P < 0.01$),实验组III与对照组相比差异显著($P < 0.05$),其中实验组I受试小鼠血清尿素氮含量降低幅度最大。实验结果表明高F值寡肽混合物能明显减少或抑制疲劳小鼠血清尿素的产生。

2.5 花生粕高F值寡肽混合物对小鼠肝糖原和肌糖原含量的影响

疲劳时机体在消耗肌糖原的同时,还需动用肝糖原来维持血糖的平衡,使肝糖原储备减少。肝糖原含量显著提高,说明受试物能够通过增加肝糖原的储备或减少运动时肝糖原的消耗达到抗疲劳的目的^[7-9]。灌胃30d后受试小鼠肝糖原和肌糖原变化结果如表6、表7所示。

表6 高F值寡肽混合物对小鼠运动后肝糖原含量的影响

组别	肝糖原/(mg/100g)	增加率/%	P
对照组	142.66 ± 43.58	-	-
实验组I	192.12 ± 45.54	34.67*	0.036
实验组II	165.39 ± 39.06	15.93*	0.022
实验组III	176.33 ± 38.70	23.6	0.130
实验组IV	155.96 ± 30.31	9.32	0.087

注:*指显著;P指各实验组与对照组的比较结果;-指没有变化。肝糖原含量增加率=(各组第30d小鼠肝糖原含量平均值-对照组小鼠肝糖原含量平均值)/对照组小鼠肝糖原含量平均值×100%。

由表6可以得出,实验组I、II、III、IV受试小鼠运动后肝糖原含量均高于对照组,其增长率分别为34.67%、15.93%、23.6%和9.32%。经t检验得出,实验组I、II运动后肝糖原的含量与对照组相比差异显著($P < 0.05$),其中实验组I增加率最大,为34.67%,由此可见灌胃0.5%浓度的高F值寡肽混合物更具有促进运动后小鼠肝糖原储备的作用。

由表7可以得出,实验组I、II、III、IV受试小鼠运动后肌糖原含量均高于对照组,其增长率分别为34.69%、14.94%、22.33%和8.22%。经t检验得出,4个实验组运动后肌糖原含量与对照组相比无显著差异($P > 0.05$),但都有升高趋势,其中实验组I升高最多。

表7 高F值寡肽混合物对小鼠运动后肌糖原含量的影响

组别	肌糖原/(mg/100g)	肌糖原增加率/%	P
对照组	48.05 ± 35.34	-	-
实验组I	64.72 ± 40.15	34.69	0.15
实验组II	55.23 ± 42.28	14.94	0.061
实验组III	58.78 ± 32.37	22.33	0.94
实验组IV	52.00 ± 27.64	8.22	0.16

注:**指极显著,*指显著;P指各实验组与对照组的比较结果;-指没有变化。肌糖原增加率=(各组第30d小鼠肌糖原平均值-对照组小鼠肌糖原平均值)/对照组小鼠肌糖原含量平均值×100%。

3 结论

(1)以花生粕为原料,按照1.2.1的方法制备的花生粕高F值寡肽混合物的F值为24.6,符合高F值寡肽的要求。

(2)抗疲劳实验结果表明,小鼠灌胃不同剂量花生粕高F值寡肽混合物30d后转棒时间明显提高,血清尿素氮含量显著降低,肝糖原和肌糖原有一定程度的提高,花生粕高F值寡肽混合物具有调节机体代谢、缓解疲劳的作用。

参考文献:

[1]王振英.六合氨基酸治疗肝性脑病[J].新药与临床,1992,11(5):316.
 [2]张铁华,殷涌光,刘静波,等.高F值寡肽抗疲劳作用的研究及其饮料的开发[J].食品科学,2007,28(5):308-312.
 [3]金宏,许志勤,王发远,等.支链氨基酸提高大鼠游泳耐力作用探讨[J].营养学报,2001,23(1):48-50.
 [4]韩继福,任建波,王海波,等.活性炭吸附芳香族氨基酸制备高F值寡肽混合物的研究[J].安徽农业大学学报,2005,32(1):77-80.
 [5]首都医学院.医用生物化学实验[M].天津:天津科学技术出版社,1987:96-99,133-134.
 [6]王莹,刘静波,林松毅,等.蛋清肽的体内生物活性评价[J].食品工业科技,2009,30(2):286-318.
 [7]王红燕,何祖新,刘鑫.疲劳产生的机制及抗疲劳中药的研究进展[J].现代中医药,2007,3(2):58-59.
 [8]杨少玲,李来好.抗疲劳功能肽的研究现状[J].湛江海洋大学学报,2006,26(6):77-78.
 [9]毛根年,徐牡丹.功能食品生理特性与检测技术[M].北京:化学工业出版社,2005:352-353. ㊟