

乳清蛋白水解产物中抗氧化肽的分离纯化及应用

王昊乾, 刘怡婷, 张静雯, 张和平, 孙天松, 姚国强*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业农村部奶制品加工重点实验室
内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室 呼和浩特 010018)

摘要 目的:从乳清蛋白水解物中筛选出一种具有较强抗氧化活性的多肽,减少真空冷冻干燥过程中对乳双歧杆菌 Probio-M8 的细胞损伤。方法:通过碱性蛋白酶水解乳清蛋白,经超滤分离后得到 3 种分子质量 $k_1(>8\text{ ku})$ 、 $k_2(3\sim 8\text{ ku})$ 和 $k_3(<3\text{ ku})$ 的多肽样品,以强阳离子交换色谱、反向高效液相色谱(RP-HPLC)、液相色谱质谱联用进行分离、纯化和鉴定,以 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)清除率、抗超氧阴离子自由基和对氧化自由基的吸收能力作为检测指标,筛选具有较强抗氧化能力的组分作为保护剂,应用于乳双歧杆菌 Probio-M8 的真空冷冻干燥过程中。结果:经超滤、蛋白层析及液相色谱分离后, k_3 样品中的 3-2 和 4-6 两个组分具有较强抗氧化活性,从组分 3-2 和 4-6 中分别鉴定出 5 条和 6 条潜在的抗氧化肽序列。在乳双歧杆菌 Probio-M8 真空冷冻干燥中的应用结果表明,多肽组分 3-2 能够显著提高菌种存活率至 $(88.31\pm 0.02)\%$,同时还能够降低胞内活性氧水平并保护细胞活力。结论:抗氧化多肽组分 3-2 能够作为冻干保护剂,在真空冷冻干燥过程中减少乳双歧杆菌 Probio-M8 受到细胞损伤。

关键词 乳清蛋白; 抗氧化肽; 分离纯化; 乳双歧杆菌; 真空冷冻干燥

文章编号 1009-7848(2023)04-0035-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.004

乳清蛋白是从牛乳中提取的一种具有多种生物活性成分的蛋白质^[1-2],其属于大分子蛋白,对热、酸等环境因素敏感,易发生变性和蛋白沉淀^[3-4];而通过酶解、生物发酵对乳清蛋白进行水解,产生短肽和氨基酸等主要成分,比乳清蛋白具有更强的抗氧化能力、抑菌性等生物活性,还能降低对热、酸等因素的敏感度^[5-6]。邵志芳等^[7]通过复合蛋白酶水解乳清蛋白,发现主要以 $<1\text{ ku}$ 分子质量的短肽为主,并具有较强的抗氧化活性。因此,乳清蛋白水解物具有广阔的开发、应用前景。

使用益生菌研发的功能食品对促进人类健康显示出巨大潜力,因此,在生产和贮藏过程中保证益生菌的含量及活性尤为重要^[8-9]。通常用于食品的益生菌培养物一般以冻干粉的形式提供,能更好地保持益生菌生物活性并延长储存时间^[10]。真空冷冻干燥是最常用于保存益生菌的方法^[11],冷冻

干燥通过升华从预冻的细胞中去除水分,然而,随着水分的流失以及升华温度的升高,导致细胞膜结构和 DNA 造成损伤;同时在冷冻干燥和贮藏过程中,受低温、冷冻、渗透和脱水等环境因素的胁迫,造成细胞活力降低、细胞膜完整性被破坏以及功能性丧失^[12-13]。Wang 等^[14]发现乳清蛋白能够用于降低嗜酸乳杆菌 LA-5 在真空冷冻干燥和随后的储存过程中的细胞损伤。Zhang 等^[15]通过使细胞内积累具有抗氧化活性的谷胱甘肽,能够提高旧金山乳杆菌 DSM20451 在真空冷冻干燥过程中的存活率及生物功能。目前,益生菌在真空冷冻干燥过程中受到的细胞损伤机制还不明确,主要是通过开发新型保护剂来提高益生菌的冻干存活率^[16]。

本研究通过碱性蛋白酶水解乳清蛋白,以 DPPH 清除率、氧自由基吸收能力(ORAC)以及羟自由基吸收能力作为评价指标,筛选乳清蛋白水解物中具有较高抗氧化能力的小分子肽,探究乳清蛋白和乳清蛋白水解物中所分离的抗氧化肽对乳双歧杆菌 Probio-M8 细胞活力的影响,为小分子多肽在真空冷冻干燥保护剂方面的开发与应用提供理论参考。

收稿日期: 2022-04-02

基金项目: 内蒙古自治区高等学校科学技术研究项目(NJZZ22488);内蒙古自治区自然科学基金项目(2022QN03021);财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS36)

第一作者: 王昊乾,男,博士生

通信作者: 姚国强 E-mail: yaoguoqiang1985@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳双歧杆菌 Probio-M8 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probio-M8), 内蒙古农业大学乳酸菌菌种资源库提供; 浓缩乳清蛋白粉(80%), 丹麦 Arla 公司; 碱性蛋白酶(20 000 U/g)、羟自由基检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 快速流 SP 琼脂糖凝胶(SP-Sepharose Fast Flow), 美国 GE 公司; 三氟乙酸(TFA), 西亚化学科技有限公司; 乙腈、甲醇(色谱级), 美国 Fisher 公司; 反向 C18 色谱柱, 美国 Agilent 公司; 5(6)-羧基二乙酸荧光素琥珀酰亚胺酯(cFDA), 美国 MedChem Express 公司; 碘化丙啶(PI)、2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA) 荧光染料, 大连美伦生物技术有限公司; 偶氮二异丁脒盐酸盐(APPH)、荧光素钠、水溶性维生素 E (Trolox), 上海源叶生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

HWS28 型水浴锅, 上海一恒科技有限公司; AKTA avant 150 全自动智能蛋白纯化仪、AKTA fluxs 切向流超滤系统, 美国 GE 公司; LC-20AR 半制备液相, 日本岛津公司; M2 多功能酶标仪, 美国美谷分子公司; DRC-1000 真空冷冻干燥机, 日本东京理化公司; 流式细胞仪, 美国贝克曼库尔特公司; pH 计(FE28), 梅特勒-托利多仪器上海有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 抗氧化肽的制备及分离纯化

1.3.1.1 抗氧化肽的制备 参考吴慧^[7]的方法进行适量修改, 称取 3 g 乳清蛋白溶于 100 mL 蒸馏水中, 90 °C 预热 5 min, 迅速降温至 50 °C, 使用 0.5 mol/L 的 HCl 调节 pH 值至 10.0, 保温 10 min, 按酶底比为 5% 加入碱性蛋白酶进行水解, 水浴 2 h, 水浴过程中通过不断滴加 0.5 mol/L 的 HCl/NaOH, 使 pH 值恒定, 待酶解完成后, 沸水浴加热 15 min 灭酶, 快速冷却至室温, 调节酶解液 pH 值至 4.6 并于 4 000×g 离心 10 min, 收集上清液冷藏保存。

1.3.1.2 超滤分离 使用 AKTA fluxs 切向流超滤系统, 通过 8 ku 和 3 ku 的超滤柱对乳清蛋白水解物进行分离, 分别获得 >8 ku, 3~8 ku, <3 ku 的 3 个

不同范围分子质量的多肽, 将其在 50 °C 条件下旋转蒸发, 通过真空冷冻干燥获得干粉, 于 -20 °C 保存备用。

1.3.1.3 蛋白层析分离纯化 根据 Nimalaratne 等^[18]的分离方法作出适当修改, 使用 AKTA avant 150 蛋白纯化系统对超滤所获得的上清液进行分离纯化, 将渗透液(3 ku)溶解在 0.01 mol/L 醋酸钠缓冲液中, 质量浓度为 100 mg/mL, 通过 0.2 μm 过滤器进行过滤, 并在阳离子交换柱(SP Seperdex Fast Flow, XK12/60)上进行阳离子交换层析, 检测波长 215 nm, 用 5 倍柱体积(CV)的 10 mmol/L 醋酸钠(pH 3.6)平衡色谱柱, 上样量为 1 mL。用 2 个 CV 的 10 mmol/L 醋酸钠(pH 3.6)洗涤柱子后, 用含有 1 mol/L 氯化钠的醋酸钠溶液作为洗脱液, 线性梯度为 0~50%, 洗脱体积为 5 CV 的柱体积, 以 10 mL/min 的流速洗脱样品, 将所洗脱的样品进行真空冷冻干燥, 并进行活性测试。

1.3.1.4 液相色谱分离纯化 根据 Yang 等^[9]的方法并做适当修改, 使用反向液相色谱, 通过 C18 色谱柱对 SPFF 强阳离子交换色谱柱中所获得的离子组分进行二次分离纯化, 试验条件如下: 流动相 A: 水+0.1% TFA, 流动相 B: 乙腈+0.8% TFA, 检测波长 215 nm, 上样量 1 mL, 流速 2 mL/min, 梯度: 0~25 min, B: 5%~60%, 25~30 min, B: 60%, 30~40 min, B: 60%~5%。

1.3.1.5 抗氧化肽的鉴定 使用 Q Exactive Plus 对 1.3.1.4 节中所分离的肽段样品进行鉴定, 色谱条件: 色谱柱 C18(3 μm, 120 Å, 100 μm×20 mm) 中进样后被洗脱至分析柱(2 μm, 120 Å, 75 μm×150 mm)进行分离。流动相: 流动相 A: 3% 二甲基亚砜, 0.1% 甲酸, 97% 水, 流动相 B: 3% 二甲基亚砜, 0.1% 甲酸, 97% 乙腈。液相的流速设置为 300 nL/min, 质谱 DDA 模式分析, 每个扫描循环中包含 1 个 MS 全扫描($R=70$ K, $AGC=3e6$, $max\ IT=20$ ms, $scan\ range = 350\sim 1\ 800\ m/z$), 以及随后的 15 个 MS/MS 扫描($R=17.5$ K, $AGC=2e5$, $max\ IT=100$ ms), HCD 碰撞能量设置为 28, 四极杆的筛选窗口设置为 1.6 u, 离子重复采集的动态排除时间设置为 35 s。

1.3.2 氧自由基吸收能力测定 将空白、样品和标准抗氧化物 Trolox 各 20 μL, 分别与 80 μL 的荧

光素钠溶液混合后,加入于 96 孔荧光板中,于 37 °C 混匀孵育 20 min 后,加入 100 μ L AAPH 开始反应,在激发与发射波长分别为 485 nm 和 525 nm 处,连续测定荧光强度(1 次/2 min),利用 Trolox (作为标准品)绘制标准曲线,根据样品测得的荧光值计算氧自由基清除能力^[20]。

1.3.3 DPPH 清除率的测定 利用 95% 的乙醇将 DPPH 粉配制成 0.1 mmol/L 溶液,呈深紫色。将 1.5 mL 待测样品加入 1.5 mL 的 DPPH 溶液作为试验组(A1),然后将 1.5 mL 待测样品与 8 mL 乙醇溶剂混合作为空白组(A2),用于消除样品本身和乙醇混合产生的误差,最后将 1.5 mL 的乙醇溶液(95%)加入 1.5 mL 的 DPPH 溶液中作为对照组(A3),试验组、空白组及对照组在暗处静置 30 min,于 517 nm 波长处测定吸光度^[21]。按式(1)计

算 DPPH 清除率:

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}) \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 羟自由基清除率的测定 将不同方式分离的样品冻干,使用北京索莱宝公司的羟自由基测定试剂盒进行羟自由基清除率的测定。

1.3.5 乳双歧杆菌 Probio-M8 活化及冻干 将 -80 °C 保存的乳双歧杆菌 Probio-M8 于改良 MRS 培养基(补加 0.05% L-半胱氨酸盐酸盐)中活化 3 代,每代于 37 °C 厌氧培养 24 h,4 000 \times g,离心 10 min,将获得的菌泥于磷酸盐缓冲液(pH 7.4)清洗 2 次后重悬于保护剂中(表 1),-80 °C 预冻 6 h 后,进行真空冷冻干燥,冻干程序从 -40~30 °C,耗时 36 h,真空度 15 Pa。

表 1 冻干保护剂组成

Table 1 The composition of freeze-drying protectants

组别	菌种	保护剂	灭菌方式
试验组 1	乳双歧杆菌 Probio-M8	组分 3-2(5 mg/mL)+10%海藻糖	抗氧化肽通过 0.22 μ m 滤膜过滤海藻糖,乳清蛋白 121 °C,15 min 灭菌
试验组 2	乳双歧杆菌 Probio-M8	组分 4-6(5 mg/mL)+10%海藻糖	
对照组	乳双歧杆菌 Probio-M8	乳清蛋白(5 mg/mL)+10%海藻糖	

1.3.6 活菌数测定 真空冷冻干燥后,细胞存活率的测定按照 Kramer 等^[22]描述的方法并做适当修改,取 10 g 冻干样品,与 90 mL 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)混匀,于摇床振荡 20 min 后进行梯度稀释,倾注于 MRS 固体培养基中(加入 0.05% 的半胱氨酸盐酸盐),37 °C 厌氧培养 72 h。

1.3.7 胞内酶活力测定 将冻干菌粉复水后,用磷酸盐缓冲液(pH 7.4)清洗菌体 2 次,4 000 \times g 离心 5 min,重悬在磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中,加入 cFDA 至终浓度为 10 μ mol/L,37 °C 避光孵育 15 min,再加入 PI 至终浓度为 10 μ mol/L,避光孵育 15 min,以未用荧光染料处理的细胞作为对照,通过流式细胞仪检测细胞的荧光强度(488 nm 和 653 nm 激发波长)^[23]。

1.3.8 活性氧测定 使用 DCFH-DA 分析检测细胞内活性氧的产生和积累,将菌体用磷酸盐缓冲液(pH 7.0)清洗 2 次,4 000 \times g 离心 5 min,然后重新悬浮在磷酸盐缓冲液(pH 7.4)中,加入 DCFH-DA 至终浓度为 10 μ mol/L,37 °C 避光孵育 30

min,以未用 DCFH-DA 处理的细胞作为对照,通过流式细胞仪检测细胞的荧光强度(488 nm 激发波长)^[24]。

1.3.9 统计学分析 所有试验均进行 3 次重复,结果以“平均值 \pm 标准差”(Mean \pm SD)表示,使用 Origin 2021 及 Graphpad Prism 9 软件进行多重比较和方差分析,Graphpad Prism 9 用于绘制图表,质谱数据通过 ProteinPilot(V4.5)进行检索,并通过 Bovine 的蛋白质组参考数据库进行定性。

2 结果与分析

2.1 超滤分离及各组分活性分析

分子质量大小对多肽的抗氧化活性具有重要影响,研究表明由小分子质量的氨基酸所组成的抗氧化肽具有较高的抗氧化活性^[25-26]。使用切向流对乳清蛋白水解物进行超滤分离,截留不同分子质量大小的肽段,经真空冷冻干燥后,在相同质量浓度条件下,对不同分子质量大小的 k1(>8 ku),k2(3~8 ku)和 k3(<3 ku)3 个区间组分的 DPPH 清

除率、抗超氧阴离子自由基和对氧化自由基的吸收能力测定(图1)。研究发现,k3组分与k1和k2的2个组分相比,在DPPH清除率为(85.00±0.00)%,抗超氧阴离子自由基为(16.49±3.99)U/

L,对氧化自由基的吸收能力为(316.46±24.00)μmol TE/g,显著高于其它各组($P<0.05$),这表明小分子质量的抗氧化肽具有更强的抗氧化能力,因此,选择k3组分进行后续分离纯化。

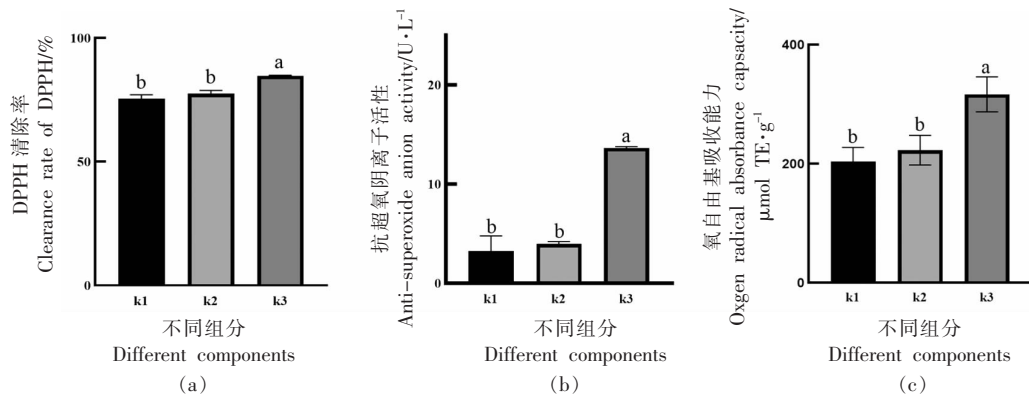


图1 超滤后不同分子质量大小的抗氧化活性

Fig.1 Antioxidant activity of different molecular weight sizes after ultrafiltration

2.2 阳离子交换层析分离及各组分活性分析

离子交换层析是在一定pH条件下,通过蛋白质所带的不同电荷从而进行分离纯化的方法。将超滤后的乳清蛋白水解物进行离子交换层析,通过QFF阳离子交换层析分离后,获得了9个组分峰(图2),分别标记为1~9。在相同质量浓度条件下,对QFF所分离9个组分的DPPH清除率、抗超氧阴离子自由基和对氧化自由基的吸收能力

进行测定(图3)。发现组分3和组分4的DPPH清除率为(91.81±1.40)%和(95.46±0.13)%、抗超氧阴离子自由基为(139.66±7.30)U/L和(159.02±8.58)U/L、氧化自由基的吸收能力为(4.87±0.64)μmol TE/g和(4.92±0.27)μmol TE/g,2个组分的抗氧化能力显著高于其它7个组分($P<0.05$)。因此,将组分3和组分4进行真空冷冻干燥后,进行下一步分离纯化。

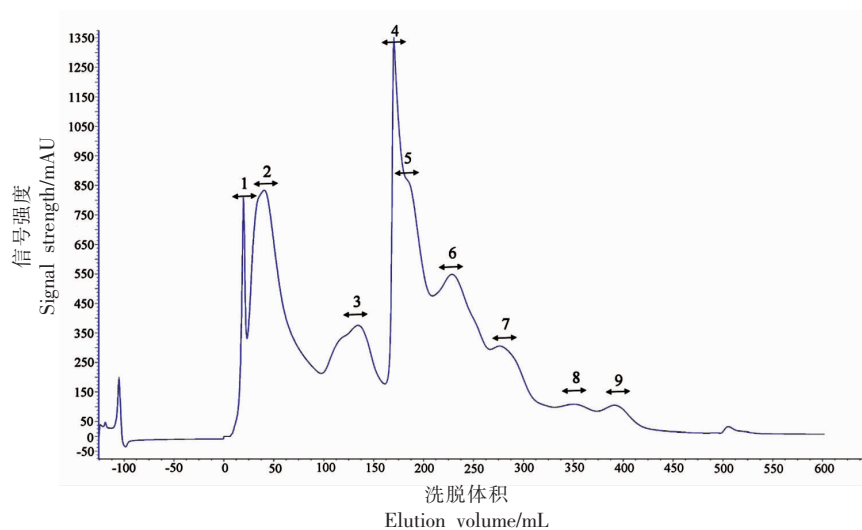


图2 QFF阳离子交换凝胶层析色谱图

Fig.2 QFF cation exchange gel chromatogram

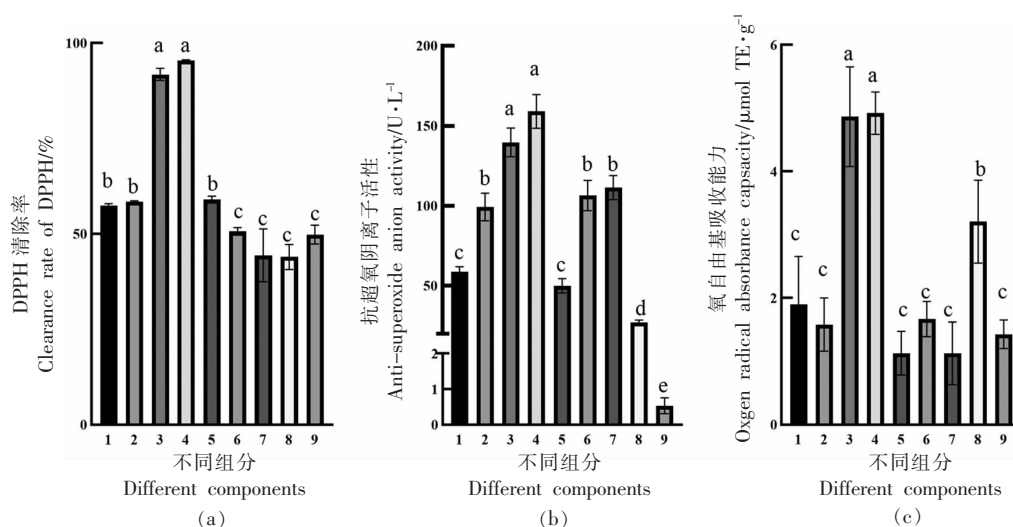


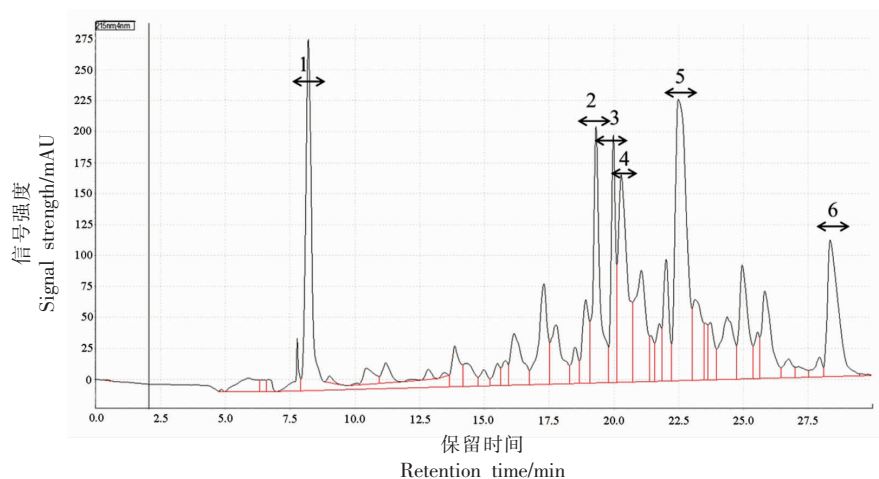
图 3 不同组分的 DPPH 清除率、ORAC 值和抗超氧阴离子自由基能力

Fig.3 DPPH scavenging rate, ORAC value and resistance to superoxide anion radicals of different fractions

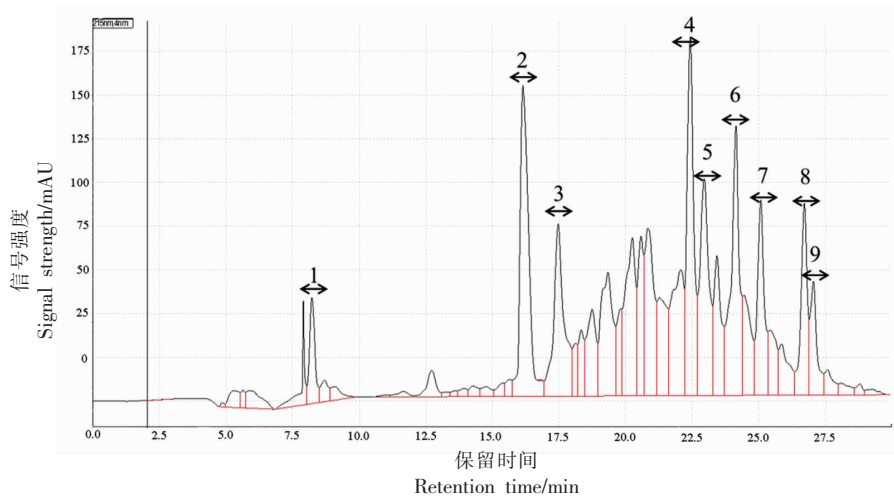
2.3 反向高效液相色谱 (RP-HPLC) 分离及活性分析

将经过 QFF 阳离子交换层析后所获得的组分 3 和组分 4 经真空冷冻干燥后, 组分 3 和组分 4 再通过 RP-HPLC 进行分离, 分别获得 6 个 (图 4a) 和 9 个 (图 4b) 色谱峰。通过真空冷冻干燥后并在相同质量浓度条件下, 对组分 3 和组分 4 所分离组分中的 DPPH 清除率、抗超氧阴离子自由基和对氧化自由基的吸收能力进行测定 (图 5)。结果表明, 组分 3 所分离的 6 个组分中, 组分 3-2 的 DPPH 清除率为 $(88.11 \pm 0.38)\%$, 显著高于其它组

分 ($P < 0.05$), 抗超氧阴离子自由基为 (62.54 ± 3.16) U/L, 氧化自由基的吸收能力为 (2.73 ± 0.10) $\mu\text{mol TE/g}$ 。组分 4 所分离的 9 个组分中, 组分 4-6 的 DPPH 清除率为 $(89.07 \pm 1.02)\%$, 显著高于其它组分 ($P < 0.05$), 抗超氧阴离子自由基为 (80.17 ± 1.17) U/L, 氧化自由基的吸收能力为 (3.08 ± 0.13) $\mu\text{mol TE/g}$, 综合对比 DPPH 清除率、抗超氧阴离子自由基和氧化自由基的吸收能力, 组分 3-2 和 4-6 这两个组分具有较强的抗氧化能力, 选择这两个组分进行后续试验。



(a) 经阳离子交换层析后得到的组分 3 进行 RP-HPLC 分离



(b) 经阳离子交换层析后得到的组分 4 进行 RP-HPLC 分离

图 4 RE-HPLC 分离色谱图

Fig.4 Separation chromatogram of RE-HPLC

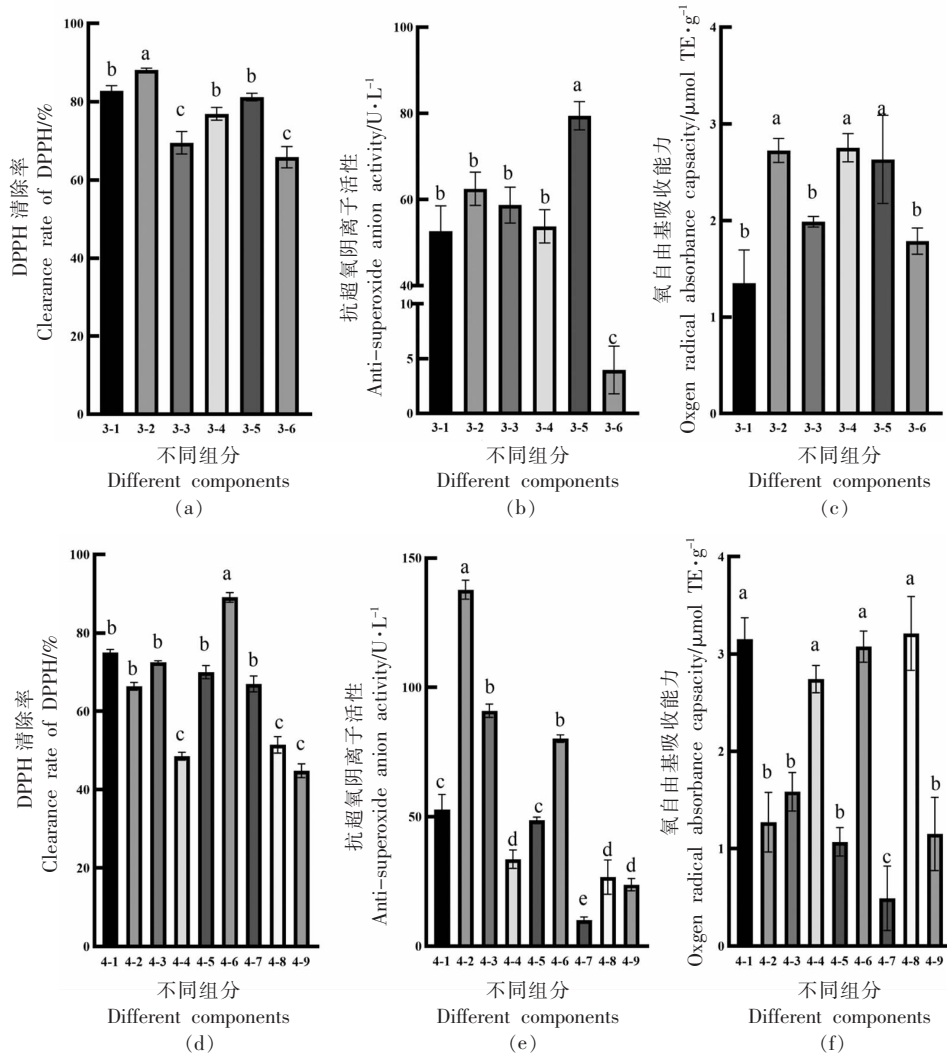


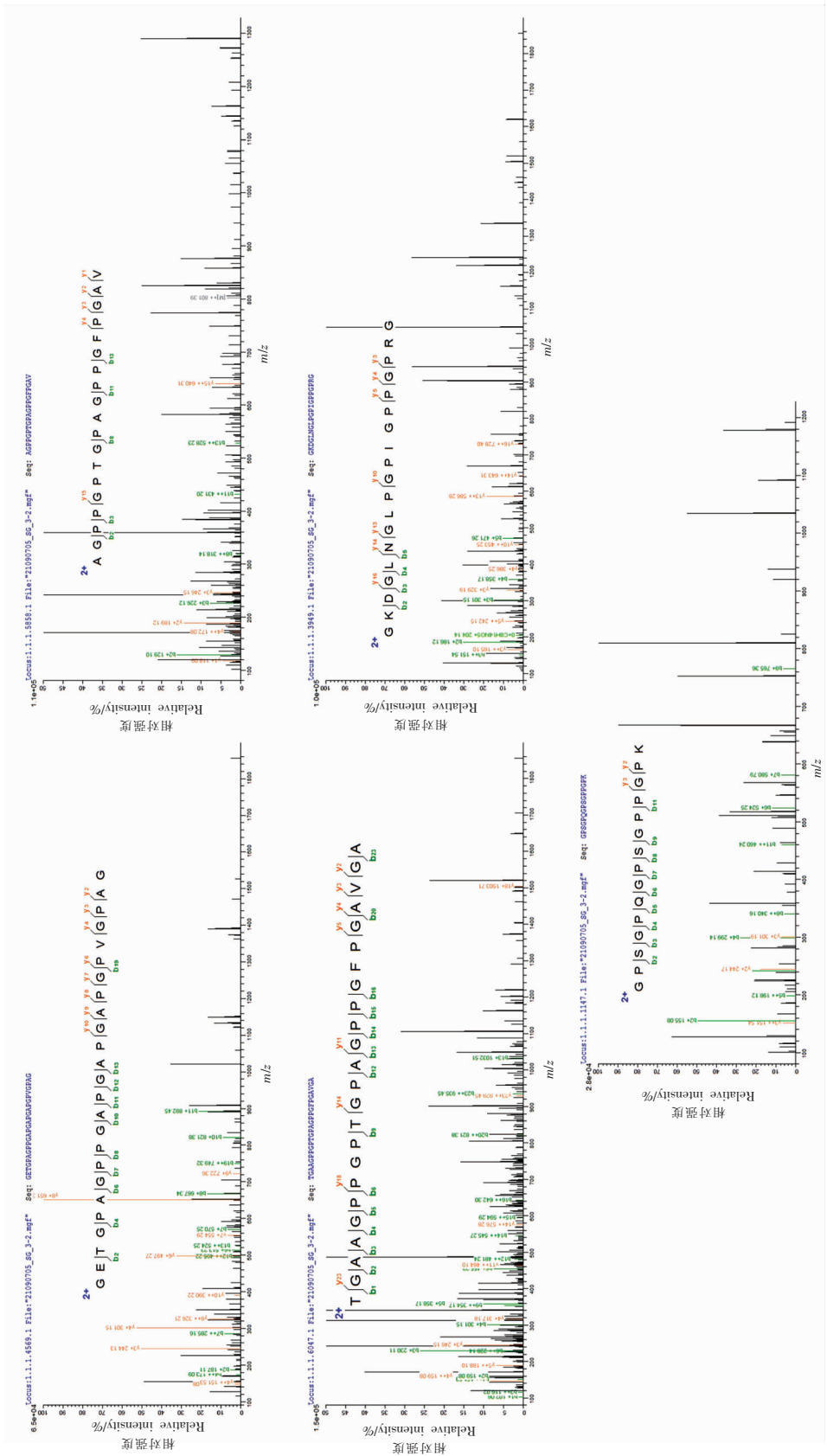
图 5 不同组分的 DPPH 清除率、ORAC 值和抗超氧阴离子自由基能力

Fig.5 DPPH scavenging rate, ORAC value and resistance to superoxide anion radicals of different fractions

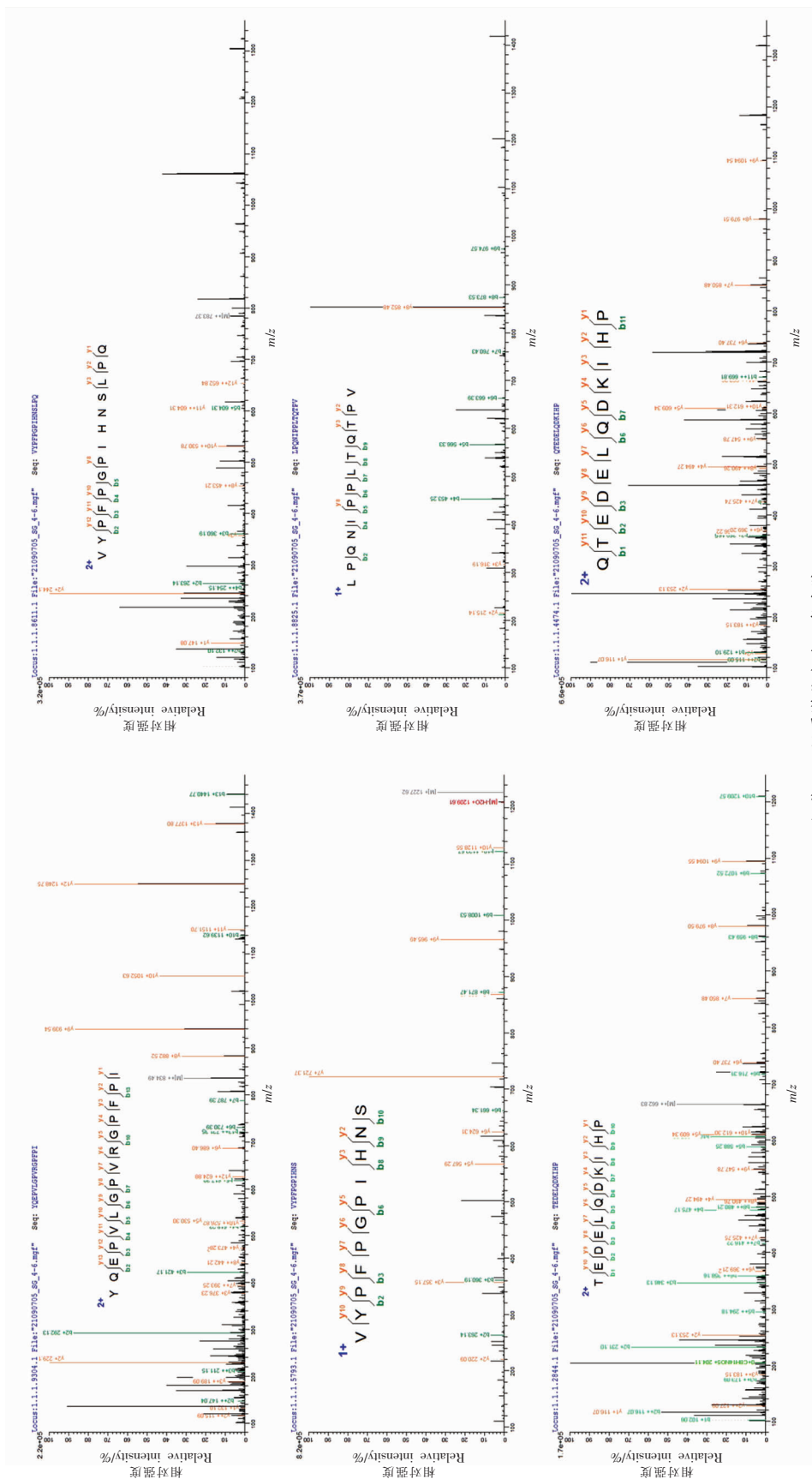
氨基酸为异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)、脯氨酸(Pro)和缬氨酸(Val)(表 3)。疏水性氨基酸能够提高多肽与脂质相中的自由基相互作用,降低脂质化对细胞的损伤^[27],例如,Pro 的吡咯烷环能对多肽的二级结构施加构象限制并淬灭单线态氧;Gly 的侧链由 1 个氢原子组成,可赋予主肽链高度的灵活性并提高抗氧化能力,此外,Val、Ile 和 Leu 均具有提高多肽抗氧化活性的能力^[25,27-28]。

2.4 乳清蛋白水解物中抗氧化肽的鉴定

经层析分离以及 RP-HPLC 分离纯化后所获得的 3-2 和 4-6 两个组分,经过质谱鉴定后,分别获得 5 条(图 6a)及 6 条多肽(图 6b)。组分 3-2 的分子质量分布在 1 500~2 000 u,含有 15~25 个氨基酸,其中疏水性氨基酸占 40%~78.94%,主要疏水性氨基酸为甘氨酸(Gly)和脯氨酸(Pro)(表 2);组分 4-6 的分子质量分布在 1 200~1 600 u,含有 11~15 个氨基酸,其中疏水性氨基酸占 18%~61.54%,主要疏水性



(a)组分 3-2 经质谱鉴定出 5 条多肽



(b)组分4-6 经质谱鉴定出6条多肽

图6 分离样品经质谱鉴定的二级色谱图
Fig.6 Secondary chromatogram for mass spectrometric identification of separated samples

表 2 组分 3-2 的氨基酸序列

Table 2 Amino acid sequence of group 3-2

氨基酸序列	分子质量/u	疏水性氨基酸占总分子质量的比例/%	疏水性氨基酸的分子质量/u
AGPPGPTGPAGPPGFPGAV	1 718.83	63.16	1 085.61
GETGPAGPPGAPGAPGAPGVPAG	2 039.97	56.00	1 142.38
GKDGLNGLPGPIGPPGPRG	1 803.92	78.947	1 424.14
GPSGPQGPSGPPGPK	1 574.74	40.00	629.90
TGAAGPPGPTGPAGPPGFPGAVGA	2 004.96	57.51	1 153.05

表 3 组分 4-6 的氨基酸序列

Table 3 Amino acid sequence of group 4-6

氨基酸序列	分子质量/u	疏水性氨基酸占总分子质量的比例/%	疏水性氨基酸的分子质量/u
LPQNIPPLTQTPV	1 416.80	61.54	871.87
QTEDELQDKIHP	1 434.67	25.00	358.65
TEDELQDKIHP	1 323.63	18.18	240.66
VYPFPGPIHNS	1 226.62	54.55	669.07
VYPFPGPIHNSLPQ	1 565.80	57.09	893.90

2.5 真空冷冻干燥对细菌活性的影响

将具有较强活力的乳酸菌与保护剂混合后进行真空冷冻干燥,使菌种能够长期保存^[29]。真空冷冻干燥过程分为预冻、初级干燥和次级干燥 3 个步骤^[30],菌体在冷冻干燥过程中会受到渗透、脱水和机械应力等多种外界环境的胁迫,对冻干乳酸菌的存活率和生物活性具有重大影响^[31-32]。因此,添加并筛选新型冻干保护剂尤为重要。

2.5.1 真空冷冻干燥前、后活菌数及存活率变化

将分离纯化后的抗氧化肽 3-2 和 4-6 两个组分作为保护剂加入到乳双歧杆菌 Probio-M8 中进行真空冷冻干燥,对乳双歧杆菌 Probio-M8 的活菌数变化进行分析(图 7)。结果表明,试验组 1 的冻干保护剂中加入 3-2 组分的抗氧化肽后,乳双歧杆菌 Probio-M8 具有较高的活菌数 (9.07×10^8 CFU/g),存活率能够达到 $(88.31 \pm 0.02)\%$,显著高于试验组 2 中添加 4-6 抗氧化肽组分 (7.47×10^8 CFU/g)和含有乳清蛋白的对照组 (7.70×10^8 CFU/g)的活菌数($P < 0.05$)。说明 3-2 作为冻干保护剂能够降低乳双歧杆菌 Probio-M8 在真空冷冻干燥期间受到的损伤,使其在冻干后仍保持较高的活菌数。

2.5.2 胞内酶活力变化 酯酶活性的测定是评估

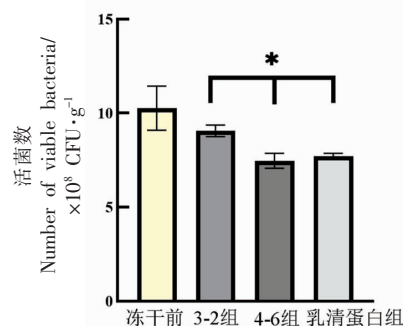


图 7 乳双歧杆菌 Probio-M8 在真空冷冻干燥后活菌数变化

Fig.7 Changes in the viable count of *B. lactis* Probio-M8 after vacuum freeze drying

乳酸菌胞内酯酶活性最常用的方法,cFDA 作为非荧光底物可进入细胞膜并在胞内酶作用下水解为荧光产物,并保留在完整的细胞膜内;PI 无法进入细胞膜,只能与有损伤的细胞膜中的核酸相结合并发出荧光,常用于细胞死活检测^[33-34]。同时使用 PI 和 cFDA 两种荧光染料对乳双歧杆菌 Probio-M8 真空冷冻干燥后细胞活力进行评估,验证抗氧化肽 3-2 和 4-6 两个组分对真空冷冻干燥期间乳双歧杆菌 Probio-M8 细胞活力及膜完整性的保护作用(图 8)。试验组 1 的保护剂中加入抗氧化肽组分 3-2 的 Q1-UL(死细胞-0.13%)和 Q1-UR(损

伤细胞-12.26%)的两个象限中,截留细胞的百分比低于含有4-6抗氧化肽的试验组和对照组,在Q1-LR(活细胞-85.26%)象限中的细胞百分比高于含有4-6抗氧化肽的试验组2和含有乳清蛋白的对照组,这表明冻干保护剂中加入3-2组分的抗氧化肽后,能够保护乳双歧杆菌 Probio-M8的

细胞膜完整性以及胞内酶活力。另外,与活菌计数对比后,发现对照组仍有较高的细胞活力,这可能是由于细胞膜破裂后,胞内酶泄漏后仍有水解cFDA的能力,导致对照组的胞内酶活力偏高。

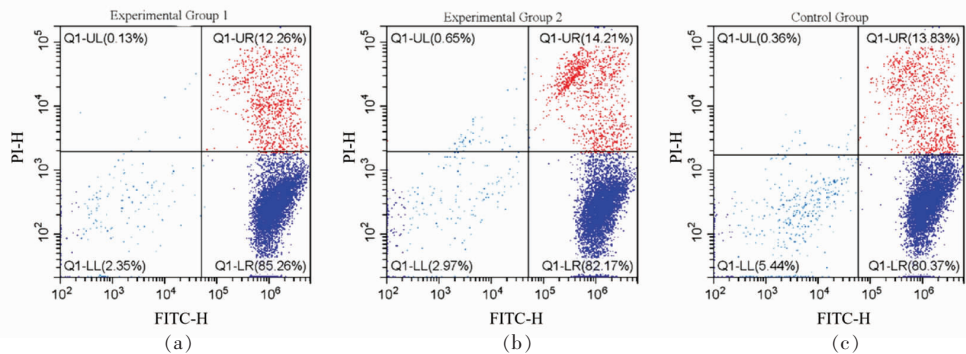


图8 乳双歧杆菌 Probio-M8 真空冷冻干燥后胞内酶活力

Fig.8 Bacterial viability after vacuum freeze-drying of *B. lactis* Probio-M8

2.5.3 真空冷冻干燥前、后细胞内活性氧含量变化 乳酸菌极容易受到活性氧的影响,尤其是细胞膜脂肪酸的自催化氧化,而干燥过程中的温度升高更能加速这种氧化过程,从而降低微生物存活率^[35]。使用流式细胞术验证抗氧化肽3-2和4-6两个组分对真空冷冻干燥期间乳双歧杆菌 Probio-M8 细胞内活性氧含量的影响,结果如图9所示。发现在冻干保护剂中加入3-2和4-6两个组分的抗氧化肽后,乳双歧杆菌 Probio-M8 的细胞胞内活性氧含量降低,并且低于对照组。谷胱甘肽作为小分子短肽已被发现在不同细胞水平上具有抗氧化活性,并且可以作为冷冻保护剂来保护益生菌的存活率^[36,14];本文所分离的小分子多肽组分3-2也有相似的表现,具有较强的抗氧化活性,且能够减少胞内活性氧的水平,进而提高乳双歧杆菌 Probio-M8 的生物活性。

3 结论

碱性蛋白酶水解乳清蛋白所产生的具有较强抗氧化活性的组分3-2和4-6,由于3-2中的疏水性氨基酸较多,抑制脂质过氧化的能力应强于组分4-2,能更有效的降低乳双歧杆菌 Probio-M8 在真空冷冻干燥过程中对细胞造成的损伤,并显

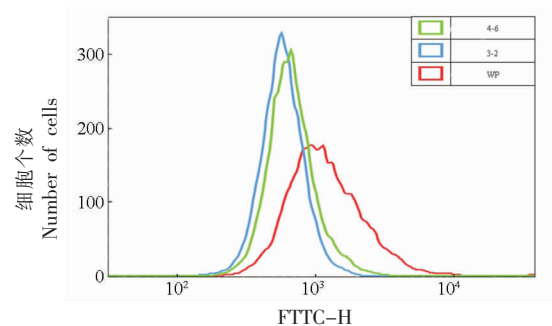


图9 乳双歧杆菌 Probio-M8 真空冷冻干燥后细胞内活性氧含量

Fig.9 Intracellular reactive oxygen content of *B. lactis* Probio-M8 after vacuum freeze-drying

著提高菌种存活率。因此,乳清蛋白水解物中的抗氧化肽组分3-2能够降低真空冷冻干燥对乳双歧杆菌 Probio-M8 造成的细胞损伤。

参 考 文 献

- [1] 刘永峰,张薇,刘婷婷,等. 乳蛋白中乳清蛋白与酪蛋白组成、特性及应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 41(23): 354-358.
LIU Y F, ZHANG W, LIU T T, et al. Research progress on composition, characteristics and applica-

- tions of whey protein and casein in milk protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(23): 354-358.
- [2] 李飞, 刘红娟, 王龙. 乳清蛋白功能活性的研究[J]. 中国酿造, 2015, 34(7): 20-23.
LI F, LIU H J, WANG L. Research of the functional activity of whey protein[J]. China Brewing, 2015, 34(7): 20-23.
- [3] 孙景珠, 赵丽双, 刘丽波, 等. 乳清蛋白水解物的研究进展及应用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(1): 316-320.
SUN J Z, ZHAO L S, LIU L B, et al. Research progress and application of whey protein hydrolysate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(1): 316-320.
- [4] WONG F C, XIAO J B, WANG S Y, et al. Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 99: 44-57.
- [5] 孙敏, 郭永泽, 李霜, 等. 乳清蛋白生物活性肽研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(12): 5428-5435.
SUN M, GUO Y Z, LI S, et al. Review on bioactive peptides of whey protein[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(12): 5428-5435.
- [6] 杜玲玲, 刘璐, 李晓东, 等. 美拉德反应对乳清分离蛋白及其水解物抗氧化性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(1): 177-182.
DU L L, LIU L, LI X D, et al. Effect of Maillard reaction on antioxidant activity of whey protein isolate and its hydrolysate[J]. Food Science, 2017, 38(1): 177-182.
- [7] 邵志芳, 皇甫洁, 刘文颖, 等. 基于乳清蛋白粉水解产物抗氧化活性优化酶解工艺[J]. 食品工业科技, 2020, 41(18): 143-149, 156.
SHAO Z F, HUANG P J, LIU W Y, et al. Optimization of enzymolysis technology of whey protein powder hydrolysate based on its antioxidant activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(18): 143-149, 156.
- [8] MARCIAL-COBA M S, CIEPLAK T, CAHU T B, et al. Viability of microencapsulated *Akkermansia muciniphila* and *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying, storage and *in vitro* simulated upper gastrointestinal tract passage[J]. Food & Function, 2018, 9(11): 5868-5879.
- [9] JDSG A, TCP B, DS A, et al. Protective effects of β -glucan extracted from spent brewer yeast during freeze-drying, storage and exposure to simulated gastrointestinal conditions of probiotic *Lactobacilli*[J]. LWT, 2019, 116: 108496-108505.
- [10] CHOI I S, KO S H, KIM H M, et al. Shelf-life extension of freeze-dried *Lactobacillus brevis* WiKim0069 using supercooling pretreatment[J]. LWT, 2019, 112: 108230-108249.
- [11] DIMITRELLOU D, KANDYLIS P, KOURKOUTAS Y. Effect of cooling rate, freeze-drying, and storage on survival of free and immobilized *Lactobacillus casei* ATCC 393[J]. LWT-Food Science & Technology, 2016, 69: 468-473.
- [12] LI H, ZHAO P, ZHANG S, et al. Protective effect of polysaccharides from *Pholiota nameko* on *Lactobacillus casei* ATCC 334 subjected to freeze-drying[J]. LWT, 2019, 115: 108463-108472.
- [13] GASALUCK P, MAHIDSANAN T. The consequences of implicit factors as cross-protective stresses on freeze-dried *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 with soybean flour during storage[J]. LWT, 2018, 90: 475-482.
- [14] WANG C, WANG M, WANG H, et al. Effects of polymerized whey protein on survivability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 during freeze-drying[J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(3): 2708-2715.
- [15] ZHANG J, DU G C, ZHANG Y, et al. Glutathione protects *Lactobacillus sanfranciscensis* against freeze-thawing, freeze-drying, and cold treatment[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(9): 2989-2996.
- [16] ISC A, SHK A, HMK A, et al. Shelf-life extension of freeze-dried *Lactobacillus brevis* WiKim 0069 using supercooling pretreatment[J]. LWT, 2019, 112: 108230.
- [17] 吴慧, 卢蓉蓉, 沈滢, 等. 乳清蛋白抗氧化肽的分离纯化及序列分析[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(10): 6-10.
WU H, LU R R, SHEN Y, et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from whey protein hydrolysate[J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(10): 6-10.
- [18] NIMALARATNE C, BANDARA N, WU J. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white[J]. Food

- Chemistry, 2015, 188: 467–472.
- [19] YANG J, HUANG J, DONG X, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from duck plasma proteins [J]. Food Chemistry, 2020, 319: 126534–126542.
- [20] FENG L, PENG F, WANG X, et al. Identification and characterization of antioxidative peptides derived from simulated *in vitro* gastrointestinal digestion of walnut meal proteins[J]. Food Research International, 2019, 116: 518–526.
- [21] HOU C, WU L, WANG Z, et al. Purification and identification of antioxidant alcalase-derived peptides from sheep plasma proteins[J]. Antioxidants, 2019, 8(12): 592–606.
- [22] KRAMER M, OBERMAJER N, MATIJAI B B, et al. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2009, 84(6): 1137–1147.
- [23] MARTIN-DEJARDIN F, EBEL B, LEMETAIS G, et al. A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry [J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, 2013, 49(2): 166–174.
- [24] TIAN H, QU S, WANG Y, et al. Calcium and oxidative stress mediate perillaldehyde-induced apoptosis in *Candida albicans*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(8): 3347–3348.
- [25] WEN C, ZHANG J, ZHANG H, et al. Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 105(1): 308–322.
- [26] ZOU T B, HE T P, LI H B, et al. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins[J]. Molecules, 2015, 21(1): 72–86.
- [27] LIN Z, HONGZHU D, GUOWAN S, et al. Radical scavenging activities of Tyr-, Trp-, Cys- and Met-Gly and their protective effects against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes [J]. Food Chemistry, 2015, 197: 807–813.
- [28] CHEN C, CHI Y J, ZHAO M Y, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate [J]. Amino Acids, 2011, 43(1): 457–466.
- [29] MORGAN C A, HERMAN N, WHITE P A, et al. Preservation of micro-organisms by drying: A review [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(2): 183–193.
- [30] ASSEGEHEGN G, EDMUNDO B D L F, FRANCO J M, et al. The importance of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process performance[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 108(4): 1378–1395.
- [31] FONSECA F, CENARD S, PASSOT S. Freeze-drying of lactic acid bacteria[J]. Methods in Molecular Biology, 2015, 1257: 477–488.
- [32] CARVALHO A S, SILVA J, HO P, et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria [J]. International Dairy Journal, 2004, 14(10): 835–847.
- [33] DÍAZ M, HERRERO M, GARCÍA L A, et al. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses [J]. Biochemical Engineering Journal, 2010, 48(3): 385–407.
- [34] GANDHI A, SHAH N P. Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry[J]. Food Microbiology, 2015, 49: 197–202.
- [35] YUAN F, MCMULLEN L M, GAENZLE M G. Effect of drying on oxidation of membrane lipids and expression of genes encoded by the Shiga toxin prophage in *Escherichia coli*[J]. Food Microbiology, 2020, 86: 103332–103339.
- [36] MARCÉN M, RUIZ V, SERRANO M J, et al. Oxidative stress in *E. coli* cells upon exposure to heat treatments[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 241: 198–205.

Isolation, Purification and Applications of Antioxidant Peptides from Whey Protein Hydrolysis

Wang Haoqian, Liu Yiting, Zhang Jingwen, Zhang Heping, Sun Tiansong, Yao Guoqiang*

(Inner Mongolia Agricultural University, Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010018)

Abstract Objective: A peptide with antioxidant activity was screened from whey protein hydrolysate and used to protect Probio-M8 during the freeze-drying process. The whey proteins were hydrolyzed by alkaline protease and separated by ultrafiltration and three different molecular weight peptide samples were obtained, k1 (>8 ku), k2 (3–8 ku), and k3 (<3 ku). The peptides were then purified and identified by strong cation exchange chromatography, reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). 1,1-Diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine (DPPH) scavenging, resistance to superoxide anion radicals, and absorption of oxidative radicals were used as assays to assess antioxidant activity and were screened. Results: Samples 3-2 and 4-6 showed high antioxidant activity. Five and six antioxidant peptide sequences were identified for samples 3-2 and 4-6, respectively. Sample 3-2 was able to protect *B. lactis* Probio-M8 in vacuum freeze-drying, increasing the survival rate of the strain to (88.31±0.02)% and also reducing intracellular reactive oxygen species levels and protecting cellular enzyme activity. Conclusion: Sample 3-2 was effective in reducing cell damage caused by the vacuum freeze-drying process of *B. lactis* Probio-M8.

Keywords whey protein; antioxidant peptides; isolation and purification; *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; freeze-drying