DOI:10.13652/j.issn.1003-5788.2016.02.032

小麦面筋蛋白酶解物对小鼠溃疡性结肠炎的影响

Effects of wheat gluten hydrolysate on ulcerative colitis of mice

方颂平[1]　严　斌[2]　朱本国[1]　刘丽娅[2]

FANG Song-ping[1]　*YAN Bin*[2]　*ZHU Ben-guo*[1]　*LIU Li-ya*[2]

周闲容[2]　周素梅[2]　程抱奎[1]

ZHOU Xian-rong[2]　*ZHOU Su-mei*[2]　*CHENG Bao-kui*[1]

(1. 安徽瑞福祥食品有限公司,安徽 亳州　236800;2. 中国农业科学院农产品加工研究所,北京　100193)

(1. *Anhui Ruifuxian Food Co., Ltd., Bozhou, Anhui* 236800, *China*; 2. *Institute of Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing* 100193, *China*)

摘要:以小麦面筋蛋白为原料,采用定向酶解工艺制备富含 Gln 的小麦面筋蛋白酶解物,并通过葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎模型,探讨酶解物对小鼠溃疡性结肠炎的调节作用。结果表明:小麦面筋蛋白酶解物能缓解 DSS 诱导的结肠炎小鼠体重降低和炎症临床症状,提高小鼠结肠组织的抗氧化能力,减轻结肠组织炎症因子分泌和炎症细胞的浸润。表明小麦面筋蛋白酶解物能有效缓解溃疡性结肠炎小鼠的肠道炎症。

关键词:小麦;面筋蛋白;酶解物;溃疡性结肠炎

Abstract: Wheat gluten was hydrolyzed by a specific enzymatic process for prepared Gln-rich wheat gluten hydrolysate(WGH), explored the regulatory effect of WGH on ulcerative colitis by dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis model in mice. The results showed that the WGH could alleviate the weight loss and clinical symptoms of DSS-induced colitis in mice, improved the antioxidant capacity of colonic tissue and alleviate the secretion of inflammatory cytokines and the infiltration of inflammatory cells in the colonic tissue of mice. The WGH can efficiently reduce the intestinal inflammation with ulcerative colitis in mice.

Keywords: wheat; gluten; hydrolysate; ulcerative colitis

小麦面筋蛋白,俗称谷朊粉,是小麦淀粉加工副产物之一。据统计[1-2],全球小麦年产量超过 6 亿 t,小麦面筋蛋白年产量已达 100 万 t;中国小麦年产量超过 1 亿 t,小麦面筋蛋白潜藏资源总量巨大。然而,中国小麦面筋蛋白主要应用在面粉强化和特色食品等附加值较低的食品加工领域,缺少附加值较高的工业化产品。研究[3]表明,蛋白质经适当蛋白酶水解后,可释放出大量具有生物活性的多肽片段。目前,采用蛋白酶水解小麦面筋蛋白,已获得多种具有生理活性的水解产物,如 ACE 抑制活性[4-5]、抗氧化性[6-7]、阿片样活性[8]和免疫活性[9-10]等。

谷氨酰胺(glutamine,Gln)是人体内含量最丰富的氨基酸,也是机体处在疲劳、疾病、感染等应激状态下的一种"条件性必需氨基酸"。由于 Gln 在胃溃疡、十二指肠溃疡等疾病方面具有很好的疗效,德国将其作为药物载入药典;日本将其作为胃肠类药物及健脑产品;美国将其划为治疗胃溃疡等疾病的保健药品[11]。但 Gln 单体在溶液中极其不稳定,受热易产生有毒的焦谷氨酸[12],使其应用范围受到限制。

研究[12]表明,小麦面筋蛋白氨基酸组成中 Gln 含量高达 30%,通过特殊的酶解工艺,可制备出富含 Gln 的活性短肽。这种富含肽结合型 Gln 的化合物,克服单体 Gln 的诸多不足,可作为游离 Gln 的有效载体。洪瑾芳[13]研究指出,日粮中添加小麦面筋蛋白酶解物能改善热应激小鼠小肠黏膜形态和肠道吸收功能,显著提高小肠组织的抗氧化能力;Yin Hong 等[14]发现以小麦面筋蛋白为原料制备的小麦肽能缓解非甾体类抗炎药物导致的大鼠小肠损伤;王延州等[15]研究表明富含 Gln 的小麦面筋蛋白水解物,能有效减轻化疗药物氨甲喋呤(MTX)诱导的小鼠小肠炎症。

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)是一种常见的慢性肠道疾病,近年来发病呈上升趋势[16]。据报道[17-18],Gln 对 UC 具有一定的修复作用,但迄今为止,富含 Gln 的蛋白酶解物对 UC 的影响和干预作用还未见报道。本试验以小

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(编号:1610092015002-03);国家自然科学基金项目(编号:31571768);农业部公益性行业(农业)科研专项(编号:201303071-04)

作者简介:方颂平,男,安徽瑞福祥食品有限公司工程师。

通讯作者:程抱奎(1969-),男,安徽瑞福祥食品有限公司工程师。E-mail:gjchbk@163.com

收稿日期:2015-12-14

麦面筋蛋白为原料，拟采用定向酶解工艺制备富含 Gln 的小麦蛋白酶解物，并通过葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎模型，探讨酶解物对小鼠溃疡性结肠炎的调节作用，旨在挖掘小麦面筋蛋白的潜在利用价值，为小麦面筋蛋白高值化利用寻找新途径，拓宽应用领域。

1　材料与方法

1.1　材料

小麦面筋蛋白：粗蛋白含量 74.10%(蛋白系数 5.7)，安徽瑞福祥食品有限公司；

胰蛋白酶：酶活 250 U/g，北京鸿润宝顺科技有限公司；

雌性 Balb/c 小鼠：6～8 周龄，18～22 g，北京维通利华实验动物技术有限公司；

葡聚糖硫酸钠(DSS)：Mw 36～50 kDa，美国 MP 公司；

总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒、微量还原型谷胱甘肽试剂盒：南京建成生物工程研究所；

Mouse TNF-α(IL-1β、IL-6) Sunny ELISA 试剂盒：联科生物技术有限公司；

分析天平：TB-214 型，美国 Denver 公司；

pH 计：pHS-3C 型，上海雷磁仪器厂；

凯氏定氮仪：Kieltec Analysister 型，丹麦 Foss 公司；

紫外可见分光光度计：TU-1900 型，北京普析通用仪器有限公司；

光吸收型酶标仪：SP-Max 2300A 型，上海闪谱生物科技有限公司；

高效液相色谱仪：1200 型，美国安捷伦公司。

1.2　方法

1.2.1　小麦面筋蛋白酶解物的制备　采用胰蛋白酶酶解小麦面筋蛋白，酶解反应条件为：底物浓度 10%(m/m)，胰蛋白酶与底物比为 2%(m/m)，pH 值 8.5，温度 50 ℃，水解时间 3 h。酶解结束后采用沸水浴灭酶 10 min，4 528×g 离心 10 min，上清液冷冻干燥得小麦面筋蛋白酶解产物。

1.2.2　小麦面筋蛋白酶解物性质分析

(1) 蛋白含量：按 GB/T 5009.5—2010 执行。

(2) 分子量分布：采用高效凝胶过滤色谱法[15]。

(3) Gln 含量：采用 BTI 衍生法[15]。

1.2.3　动物分组与处理　将小鼠饲养于 12 h 灯照、12 h 黑暗的环境下，给予充足的标准鼠粮和水。在适应环境 7 d 后，称重并随机分为 3 组(正常组、模型组、试验组)，每组 8 只。

从第 1 天开始，试验组小鼠每天灌胃小麦面筋蛋白酶解物 1 500 mg/(kg·d)(溶于水中)，正常组和模型组小鼠每天灌胃等体积蒸馏水，灌胃共计 14 d；第 8 天开始，试验组和模型组小鼠的饮用水换为 3% DSS 溶液，5 d 后造成急性结肠炎[19]，第 13 天把 DSS 溶液换回蒸馏水。第 15 天处死小鼠，进行相关指标测定。试验期间每天观察小鼠临床表现并记录小鼠体重。

1.2.4　小鼠结肠长度的测定　处死小鼠后，迅速取出小鼠结肠(从回盲肠部到肛门边缘)，测量长度。

1.2.5　组织学切片的制备及观察　取出盲肠下端 0.5 cm 结肠固定于 10%福尔马林溶液中，进行常规石蜡包埋，切片，进行 HE 染色。光学显微镜下观察。

1.2.6　小鼠结肠组织抗氧化能力指标的测定　将剩余结肠剪开后用生理盐水冲洗，滤纸吸干，用锡箔纸包好后于 −80 ℃下保存。采用总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒测定结肠组织总 SOD 活力，采用微量还原型谷胱甘肽试剂盒进行还原型谷胱甘肽(GSH)含量的测定[17]。

1.2.7　小鼠结肠组织炎症因子的测定　利用双抗体夹心酶联免疫吸附检测技术检测结肠组织炎症因子。采用 Mouse TNF-α(IL-1β 或 IL-6) Sunny ELISA 试剂盒检测小鼠结肠组织 TNF-α(IL-1β 或 IL-6) 含量。

1.2.8　数据处理与分析　所得数据均以 $X\pm SD$ 表示，采用 Microsoft Excel 进行数据整理，用 t 检验进行显著性检验。

2　结果与分析

2.1　小麦面筋蛋白酶解物性质分析

以细胞色素 C(Mw 12 327 Da)、抑肽酶(Mw 6 512 Da)、杆菌肽(Mw 1 423 Da)、甘氨酰—甘氨酰—酪氨酰—精氨酸(Mw 451 Da)和甘氨酰—甘氨酰—甘氨酸(Mw 189 Da)为标准品作相对分子质量校正曲线，得到相对分子质量与保留时间的回归方程 $\lg Mw = -0.234\,6\,t + 6.890\,7$($R^2=0.982\,4$)，小麦面筋蛋白酶解物分子量的分布见图 1。通过对分子量分布图进行积分，可计算出酶解物中肽分子量主要在 181～1 000 Da，占整体洗脱面积的 71.84%，分子量 181 Da 以下的组分含量为 8.81%，分子量 1 000～3 000 Da 的组分占 13.30%，而分子量 3 000 Da 以上的组分仅占 6.05%，表明该酶解物主要由低聚肽组成。此外，经测定该小麦面筋蛋白酶解物蛋白含量为 86.83%，并且 Gln 含量达到 21.4%，远高于其它蛋白酶酶解产物[20]。

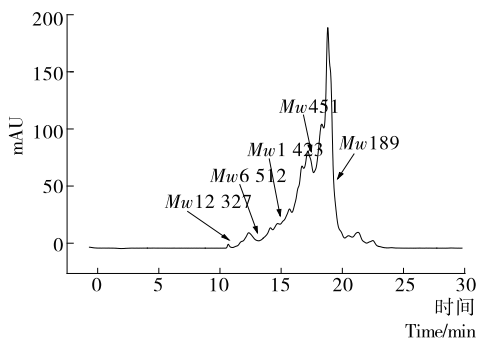


图 1　小麦蛋白酶解物分子量分布

Figure 1　Molecular weight distribution of wheat gluten hydrolysate

2.2　小鼠体重增长及临床表现

有报道指出，DSS 诱导的结肠炎模型与 UC 的临床症状相似[21]，表现为体重减轻、结肠缩短、黏膜溃疡、中性粒细胞浸润和血性腹泻等症状[22]。试验前 7 d 小鼠体重趋势变化不大，食量及活动状态正常。从第 8 天造模开始，模型组小鼠体重急剧下降，食欲骤降，神情怠倦，与正常组差异明显(见图 2)。试验组小鼠体重在第 13 天才出现下降趋势，状态明显优于模型组小鼠。试验第 13 天，模型组小鼠 50%出现

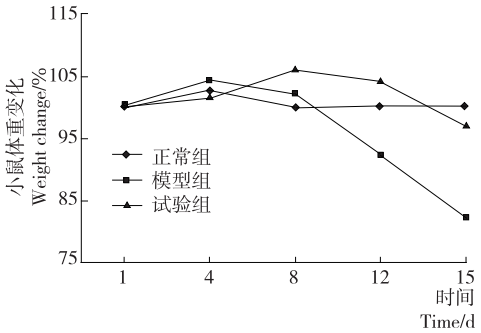


图 2　小鼠体重变化情况

Figure 2　Body weight in mice

血便,50%出现稀便现象;试验组小鼠 25%出现血便,37.5%出现稀便,37.5%未见血便或稀便现象,与模型组相比临床症状的严重程度明显减轻。说明小麦面筋蛋白酶解物能改善 DSS 诱导的结肠炎小鼠体重减轻和血性腹泻等临床表现。

2.3　小鼠结肠病理情况

光学显微镜观察(图 3)发现,正常组小鼠结肠未见炎症细胞浸润,无明显病理学变化;模型组小鼠肠黏膜下层和肌层可见大量炎性细胞浸润;试验组小鼠肠黏膜可见部分炎症细胞浸润,但浸润程度与模型组相比明显降低。说明小麦面筋蛋白酶解物能够改善溃疡性结肠炎小鼠结肠组织的炎症细胞浸润程度。

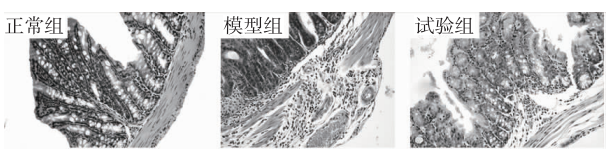


图 3　小鼠结肠病理结果

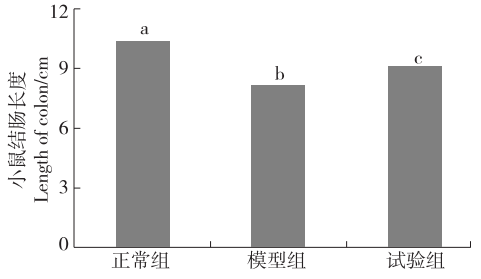
Figure 3　The colon pathology results in mice (400×)

2.4　结肠长度

肠道炎症,尤其是溃疡性结肠炎,会导致小鼠结肠发生应激反应,使其结肠缩短[21]。由图 4 可知,模型组小鼠结肠长度明显缩短,与正常组相比存在显著差异($P<0.05$)。试验组小鼠结肠长度与模型组相比显著提高($P<0.05$),说明小麦面筋蛋白酶解物对小鼠溃疡性结肠炎导致其结肠长度缩短有抑制作用。

2.5　结肠组织抗氧化能力

SOD 是生物体细胞内的主要抗氧化酶,其活力的高低可间接反映机体清除自由基的能力;GSH 是组织中主要的非蛋白类含巯基化合物,参与自由基和脂质过氧化物的清除[17]。由表 1 可知,与正常组相比,模型组小鼠结肠组织 T-SOD活力和 GSH 含量均显著降低($P<0.05$);给予小麦面筋蛋白酶解物后 T-SOD 活力和 GSH 含量相对于模型组明显提高($P<0.05$),均达到正常组水平。说明灌胃小麦面筋蛋白酶解物能够提高溃疡性结肠炎小鼠结肠组织的抗氧化能力。此结果与李金敏等[17]报道的 Gln 增强乙酸灌肠法造模的 UC 小鼠结肠抗氧化水平的结果相似。



不同字母表示差异显著($P<0.05$)

图 4　小鼠结肠长度

Figure 4　The length of colon in mice

表 1　小鼠结肠组织 T-SOD 和 GSH 水平†

Table 1　The T-SOD and GSH levels of colon tissues in mice

组别	T-SOD/(U·mg^{-1}·Prot)	GSH/(μmol·g^{-1}·Prot)
正常组	24.25±3.88^{a}	14.31±2.21^{a}
模型组	16.77±5.55^{b}	8.71±2.38^{b}
试验组	22.79±2.52^{a}	14.20±2.42^{a}

†　同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.6　结肠炎症因子水平

研究[18]发现,炎症细胞因子在肠黏膜局部的炎症和免疫反应中起重要作用,其中起主要作用的因子有 TNF-α、IL-1β和 IL-6 等。TNF-α 能激活中性粒细胞和淋巴细胞,是肠黏膜炎症反应的核心环节;IL-1 是重要的炎性介质之一,IL-1β 是 IL-1 的主要活性形式;IL-6 能诱导 B 细胞分化和产生抗体,是炎性反应的促发剂。由表 2 可知,与正常组相比,模型组小鼠结肠组织的 IL-1β 和 IL-6 水平明显上升,差异达到显著水平($P<0.05$),TNF-α 水平有所上升,但没有达到显著水平。与模型组相比,试验组小鼠结肠组织的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 3 种因子含量均有不同程度下降,其中 IL-6 达到显著水平($P<0.05$)。说明灌胃小麦面筋蛋白酶解物能够改善溃疡性结肠炎小鼠结肠组织炎症因子的分泌,能缓解小鼠肠道炎症的发生。

表 2　小鼠结肠组织 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平†

Table 2　The TNF-α, IL-1β and IL-6 levels of colon tissues in mice　　ng/g·Tissue

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
正常组	2.33±0.86^{a}	4.26±0.87^{b}	2.38±0.75^{b}
模型组	3.24±0.70^{a}	6.76±0.34^{a}	4.67±0.39^{a}
试验组	2.56±0.78^{a}	6.63±0.17^{a}	2.87±0.69^{b}

†　同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

3　结论

本试验研究了小麦面筋蛋白酶解物对小鼠溃疡性结肠炎的调节作用。结果表明,小麦面筋蛋白酶解物对 DSS 诱导的结肠炎小鼠体重减轻和炎症临床表现具有明显的改善作用,能减轻小鼠因溃疡性结肠炎导致的结肠长度缩短现象,提高肠粘膜组织中谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)的水平,可改善溃疡性结肠炎小鼠炎症因子的分泌和炎症细胞的浸润程度。小麦面筋蛋白经胰蛋白酶水解后可

产生具有肠道营养的活性肽段，但活性肽段的组成及作用机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 顾国达，尹靖华. 全球中长期粮食供需趋势分析[J]. 华中农业大学学报：社会科学版，2014(6)：6-16.

[2] 马文峰，马福廷，赵宝国，等. 2013 年中国小麦市场回顾及 2014 年展望[J]. 粮食加工，2014，39(3)：1-4.

[3] 张鸣镝，管骁，姚惠源. 玉米胚芽蛋白酶解物对小鼠免疫功能的影响[J]. 食品科学，2007，28(2)：302-305.

[4] Thewissen B G，Pauly A，Celus I，et al. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by wheat gliadin hydrolysates[J]. Food Chemistry，2011，127(4)：1 653-1 658.

[5] 王章存，王颖，曹芹，等. 谷朊粉酶解物的制备及其 ACE 抑制肽的分离鉴定[J]. 中国酿造，2015，34(2)：60-63.

[6] Wang Jin-shui，Zhao Mou-ming，Zhao Qiang-zhong，et al. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems[J]. Food Chemistry，2007，101(4)：1 658-1 663.

[7] 王章存，原媛，王许东，等. 谷朊粉酶解条件优化及其抗氧化活性[J]. 中国粮油学报，2014，29(11)：7-12.

[8] 孔祥珍，周惠明，钱海峰. 小麦面筋蛋白短肽的镇痛作用研究[J]. 食品与生物技术学报，2007，26(2)：26-29.

[9] 张亚飞，乐国伟，施用晖，等. 小麦蛋白 Alcalase 水解物免疫活性肽的研究[J]. 食品与机械，2006，22(3)：44-46.

[10] Wang Xiu-qi，Feng You，Shu Gang，et al. Effect of dietary supplementation with hydrolyzed wheat gluten on growth performance，cell immunity and serum biochemical indices of weaned piglets[J]. Agricultural Sciences in China，2011，10(6)：938-945.

[11] 张海华. 小麦面筋蛋白源谷氨酰胺肽的酶解准备、结构分析与生理活性研究[D]. 江苏：江南大学，2011：3-4.

[12] 马洪龙，韩飞，李爱科，等. 谷氨酰胺及其结合肽的研究进展[J]. 粮油食品科技，2014，22(3)：76-81.

[13] 洪瑾芳. 酶解小麦蛋白对热应激小鼠生理功能的影响[D]. 福建：福建农林大学，2009：31-34.

[14] Yin Hong，Pan Xing-chang，Wang Shao-kang，et al. Protective effect of wheat peptides against small intestinal damage induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs in rats [J]. Journal of Integrative Agriculture，2014，13(9)：2 019-2 027.

[15] 王延州，刘丽娅，钟葵，等. 高谷氨酰胺低聚小麦肽制备用酶的筛选[J]. 现代食品科技，2014，30(2)：177-181，187.

[16] 赵曼，高峰. 溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J]. 现代生物医学进展，2010，16(10)：3 160-3 165.

[17] 李金敏，贾海燕，王俊杰，等. 谷氨酰胺对溃疡性结肠炎小鼠结肠损伤的影响[J]. 中国应用生理学杂志，2009，25(2)：268-272.

[18] 李力，李弼民，蔡敏，等. 谷氨酰胺对实验性结肠炎 BABL/C 小鼠肠黏膜的修复作用[J]. 同济大学学报：医学版，2015，36(2)：11-15.

[19] Tsune I，Ikejima K，Hirose M，et al. Dietary glycine prevents chemical induced experimental colitis in the rat[J]. Gastroenterology，2003，125(3)：775-785.

[20] 马洪龙，韩飞，李爱科，等. 碱性蛋白酶水解小麦面筋蛋白制取谷氨酰胺肽的研究[J]. 粮油食品科技，2014，22(1)：54-57.

[21] Susana S F，Ana C，Marina S H，et al. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice[J]. Journal of Nutritional Biochemistry，2013，24(7)：1 401-1 413.

[22] Yan Yu-tao，Kolachala V，Dalmasso G，et al. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis[J]. PLoS One，2009，4(6)：e6 073.

(上接第 93 页)

① 脱粒转轴筢子转速：200 r/min；

② 皮带轮转速：30 r/min；

③ 划痕刀转速：100 r/min；

④ 微波功率：1 400 W；

⑤ 单个圆盘转速：300 r/min；

⑥ 生产率：100 kg/h；

⑦ 脱粒率：97.4%；

⑧ 去皮率：96.3%。

5 结束语

通过模拟试验，可以看到本试验设计的湿胡椒脱粒去皮机，在达到相关技术要求的前提下，能够很好地完成湿胡椒的脱粒和去皮工作，并且操作流程简单，生产效率高，需要投入的人力减少，可连续作业。通过推广机械化产品，可以使胡椒的生产更智能化，为胡椒生产区的农民带来更多的效益，这在胡椒产区有广阔的推广前景和利用价值。

参考文献

[1] 郑同政，张燕，曲高峰. 胡椒脱粒去皮机的设计[J]. 湖北农业科学，2014，53(21)：5 273-5 275.

[2] 万祝宁，窦志浩，张容鹄，等. 组合型太阳能干燥房的设计及在胡椒干燥中的应用[J]. 食品工业，2012，33(10)：144-147.

[3] 朱红英，初众，吴桂苹，等. 青胡椒真空冷冻干燥工艺研究[J]. 食品与机械，2012，28(4)：213-216.

[4] 姜勇，李善锋，谢卫标. AutoCAD 机械制图教程[M]. 北京：人民邮电出版社，2008：33-108.

[5] 宁涛，王飞，岳荣刚. 中文版 Pro/ENGINEER Wildfire4.0 中文版基础教程[M]. 北京：清华大学出版社，2008：81-316.

[6] 杨芙莲，梁萍，朱妞，等. 板栗去壳方法及设备的研究[J]. 食品工业科技，2006，27(10)：149-152.

[7] 张雪松. 基于线阵 CCD 的红枣分选技术[J]. 食品与机械，2008，24(3)：81-83.

[8] 陈明昌，魏敏，刘巧，等. 番茄收获机测产装置的设计[J]. 食品与机械，2014，30(5)：151-153.

[9] 朱张校，姚可夫. 工程材料[M]. 北京：清华大学出版社，2011：142-143.