文章编号: 1673-1689(2011)01-0060-05

肉味香基对人淋巴细胞的抗氧化作用

汪何雅, 于汐洋, 钱和*
(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 研究肉味香基的抗氧化效果, 并对抗氧化成分进行分离, 得到具有高抗氧化活性的组分。利用膜分离和硅胶柱对肉味香基进行分离, 用人淋巴细胞的谷胱甘肽和脂肪过氧化水平评价各组分的抗氧化能力。根据相对分子质量将肉味香基分离得到 3 个组分, 其抗氧化能力随相对分子质量的增加而增强, 即: 高相对分子质量组分(H-MRPs)> 中相对分子质量组分(M-MRPs)> 小相对分子质量组分(L-MRPs)。H-MRPs 被进一步分离得到极性由弱到强的三个组分 H-MA、H-MB、H-MC, 其抗氧化能力从高到低为: H-MA> H-MB> H-MC。因此, 肉味香基中主要抗氧化成分是高相对分子质量组分, 其抗氧化能力随极性增强而减弱。

关键词: 肉味香基; 美拉德反应产物; 抗氧化; 人淋巴细胞; 谷胱甘肽; 脂质过氧化
中图分类号: Q 26 文献标识码: A

Antioxidant Capacitiy of Meat Flavoring on Human Lymphocytes

WANG He-ya, YU Xi-Yang, QIAN He*
(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The antioxidant effects of meat flavoring were studied and the fraction with high antioxidant capacities was separated in this study. Meat flavoring was separated by membrane separation and silica gel column chromatography. The antioxidant capacities were evaluated by their effects on glutathione and lipid peroxidation of human lymphocytes. Three fractions with different molecular weight were prepared and the sequence of antioxidant capacity is: high molecular weight fraction (H-MRPs) > medium molecular weight fraction (H-MRPs) > low molecular weight fraction (L-MRPs). The H-MRPs were further fractionated to three fractions (H-MA, H-MB, H-MC) with different polarity. H-MA with the lowest polarity revealed the highest antioxidant capacity.

Key words: Meat flavoring, Maillard reaction products (MRPs), antioxidant, human lymphocytes, glutathione, lipid peroxidation

收稿日期: 2010-02-09
基金项目: 国家"十一五"科技支撑计划项目(2008BAD91B04-1)。
作者简介: 汪何雅(1980-), 女, 安徽安庆人, 医学博士, 副教授, 主要从事营养与食品安全研究。
Email: heyawang@163.com
* 通信作者: 钱和(1962-), 女, 江苏盐城人, 工学博士, 教授, 主要从事食品质量与安全研究。
Email: amtf168@126.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在我国,饮食传统的沿袭使得肉香味食品深受人们喜爱。因此,具有肉香味的咸味香精广泛地被用于方便面、汤料、肉制品、膨化食品、饼干、罐头、冷冻食品以及快餐等加工食品中,以增加或赋予食品肉风味,满足人们对肉风味的需要。通过氨基酸[1]或植物或动物蛋白水解物[2]与还原糖高温加热所发生的 Maillard 反应制备得到的反应型肉味香基香味逼真,成本低廉,是开发咸味香精必不可少的配料。许多研究表明,氨基酸-还原糖模拟体系的反应产物、面包皮/咖啡提取物或热处理的膳食中的美拉德反应产物(Maillard Reaction Products, MRPs)具有抗氧化功能[3-5],其中发挥抗氧化效果的组分主要来源于有色物类黑精、还原酮及一系列含 N、S 的杂环化合物[1]。尽管人们针对氨基酸-还原糖模拟体系的反应产物、面包皮/咖啡提取物或热处理膳食中的 MRPs 的抗氧化性展开了许多研究,但是,咸味香精作为一种用 Maillard 反应制备得到、在食品领域应用广泛的热反应型香精,其抗氧化功能的研究还未见报道。作者以咸味香精调配前的肉味香基为对象,研究其对人淋巴细胞氧化还原水平的影响,并利用膜过滤和色谱分离手段对肉味香基中抗氧化成分进行分离,得到具有高抗氧化活性的组分。

1　材料与方法

1.1　材料

肉味香基:购自国内某香精公司,以植物水解蛋白和还原糖高温反应制备得到;人血液:购于无锡市血库;透析袋(MWCO 8000-14000):购于国药集团化学试剂有限公司;超滤膜片:MWCO 1000,购于无锡赛普膜科技有限公司;淋巴细胞分离液:Ficoll-Hypaque,购于上海华精生物高科技有限公司;RPMI-1640(生化试剂):购于上海钰森生物技术有限公司;肝素钠(生化试剂)和谷氨酰胺(纯度 98%):购于上海生工生物工程技术服务有限公司;超级新生牛血清:购于杭州四季青生物工程材料有限公司;硫代巴比妥酸(TBA,生化试剂)、三氯乙酸(TCA,分析纯)、台盼蓝(纯度 98%)、噻唑蓝(MTT,纯度 98%)、二甲基亚砜(DMSO,分析纯)、谷胱甘肽(GSH,纯度 98%)、5,5'-二硫硝基苯甲酸(DNTB,纯度 99%)、GF254 薄层硅胶板、硅胶(100-200 目):均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2　实验方法

1.2.1　肉味香基的初步分离　称取肉味香基,稀释、抽滤得澄清液体。4 ℃去离子水透析,直到透出液呈无色透明。未透出液记为 H-MRPs(相对分子质量> 14 000),冷冻干燥备用。浓缩透出液,利用截留相对分子质量 1 000 的超滤膜进行超滤分离(使用压力 0.5 MPa),收集滞留液及滤液,分别记为 M-MRPs(1~ 14 000)、L-MRPs(< 1 000),冷冻干燥备用。

1.2.2　硅胶柱层析分离纯化高相对分子质量组分(H-MRPs)　称量 100~ 200 目硅胶 100 g,加入一定量的体积分数 95% 乙醇充分搅拌成匀浆。将硅胶边搅拌边缓缓倒入层析柱(D 25 mm × 200 mm)中,待硅胶沉积后,再加入体积分数 95% 乙醇使床层压实。用湿法上样 2~ 3 mL H-MRPs(10 mg/mL)。用体积分数 95% 乙醇溶液进行洗脱,洗脱液流量为 0.5 mL/min,每 5 min 收集一管洗脱液,420 nm 检测。H-MRPs 洗脱曲线见图 1,得到 H-MA、H-MB 和 H-MC 3 个洗脱组分,分别收集各组分,冷冻干燥。

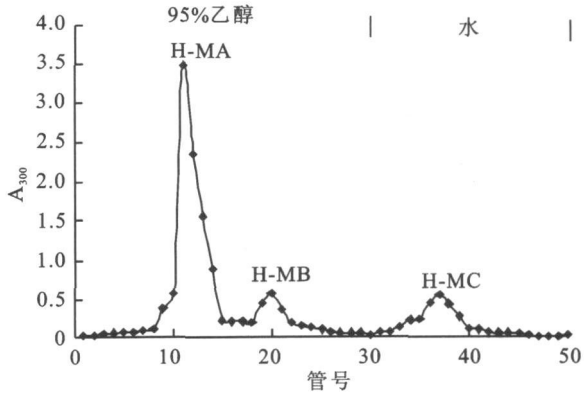


图 1　H-MRPs 的洗脱曲线

Fig. 1　The elution plot of H-MRPs

1.2.3　人淋巴细胞的分离　取抗凝血液 2.5 mL,加入 PBS(pH 7.2)溶液对倍稀释,混匀。将血液缓慢加入等量淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 20 min,小心吸取中层呈白色雾状的淋巴细胞层,用 PBS 溶液洗涤 2 次,每次于 1 500 r/min 离心 10 min。弃上清,加入适量 RPMI1640 完全培养液(含 10% 小牛血清),镜下台盼蓝测定细胞活力> 98%,用 RPMI1640 调整细胞浓度至 10×10^6 个/mL。

1.2.4　各组分对人淋巴细胞氧化还原水平的影响　将细胞悬液加入 96 孔板中,每孔 80 μL。用无血清 RPMI1640 培养液将受试物稀释成不同质量浓度,各取 20 μL 加入 96 孔板中,使其终质量浓度分别为 2、1、0.2、0.1、0.02、0 mg/mL。将培养板置于 CO_2 培养箱中,37 ℃培养 72 h。培养结束后用 DTNB 法[6]测定细胞 GSH 含量;用 TBA 法[7]测定细胞脂质过氧化水平,根据硫代巴比妥酸反应物(TBARS)的消光系数 $\varepsilon=1.56\times10^5(\mathrm{mol/L})^{-1}\cdot$

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

cm^{-1}, 计算脂质过氧化产物 TBARS 的含量。

1.2.5 统计学处理 采用 Excel 软件处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 T 检验进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为具有统计学显著差异。

2 结果与讨论

2.1 肉味香基对人淋巴细胞氧化还原水平的影响

肉味香基对人淋巴细胞 GSH 含量和 TBARS 水平的影响见表 1。0.02~2 mg/mL 的肉味香基对细胞 GSH 含量无明显影响($P > 0.05$)(表 1)。但是, 0.1 mg/mL 的肉味香基就能显著降低细胞的 TBARS 水平($P < 0.01$), 并且随着肉味香基浓度的增加, 细胞 TBARS 含量进一步下降。由此可见, 肉味香基对人淋巴细胞具有一定的保护作用, 可抑制细胞脂质的过氧化。

肉味香基为国内某外资香精公司提供, 是还原糖和蛋白水解物高温发生美拉德反应制备得到的。因此, 肉味香基中发挥抗氧化作用的物质很可能是美拉德反应产物(MRPs), 当然也有可能来源于还原糖或蛋白质水解物本身的高温反应产物。目前许多其他研究显示, 酪蛋白-还原糖、β-乳球蛋白与各种还原糖反应得到的美拉德反应产物具有抗氧化功能[8-9], 这些研究所得的结果与作者研究结果基本相似。

表 1 肉味香基对人淋巴细胞氧化还原水平的影响

Tab.1 Effect of meat flavoring on GSH and human lymphocytes lipid peroxidation levels

肉味香基质量浓度/(mg/mL)	GSH 浓度/($\times 10^{-9}$ mmol/L)	TBARS 浓度/(μmol/L)
0	138.56±28.67	2.186±0.136
0.02	125.85±30.87	2.233±0.043
0.1	135.46±24.36	1.904±0.053*
0.2	141.39±25.23	1.524±0.035*
1	139.35±36.45	1.054±0.075*
2	145.67±40.45	1.044±0.067*

* 注:* $P < 0.01$, 与阴性对照相比

2.2 不同相对分子质量的 **MRPs** 对人淋巴细胞氧化还原水平的影响

用透析和超滤法将肉味香基按相对分子质量分为 3 段: H-MRPs(相对分子质量>14 000)、M-MRPs(相对分子质量 1~14 000)和 L-MRPs(相对分子质量<1 000), 各相对分子质量段 MRPs 对人淋巴细胞氧化还原水平的影响见表 2~3。

由表 2 可见, 当 H-MRPs 质量浓度小于等于 1 mg/mL 时, 其对人淋巴细胞 GSH 含量无显著影响; 但 2 mg/mL 的 H-MRPs 能显著提高细胞 GSH 水平($P < 0.05$)。M-MRPs 在实验所选的浓度范围内对人淋巴细胞 GSH 含量无显著影响($P > 0.05$)。L-MRPs 在低浓度范围内也不影响细胞 GSH 水平, 但当质量浓度达到 2 mg/mL 时, 它反而显著降低了淋巴细胞 GSH 的含量。而且, 当各组分质量浓度均为 1 mg/mL 时, H-MRPs 处理组 GSH 含量显著高于 L-MRPs 处理组; 当各组分浓度均为 2 mg/mL 时, H-MRPs 处理组 GSH 水平显著高于 M-MRPs 和 L-MRPs 处理组, M-MRPs 处理组也显著高于 L-MRPs 处理组($P < 0.05$)(表 2)。因此, 高相对分子质量组分对人淋巴细胞起到更好的保护作用, 可以避免细胞长时间(72 h)培养下 GSH 含量的降低。

表 2 不同相对分子质量的 **MRPs** 对人淋巴细胞 **GSH** 含量的影响

Tab.2 Effects of H-MRPs, M-MRPs and L-MRPs on human lymphocytes GSH level of human lymphocytes

MRPs 质量浓度/(mg/mL)	GSH 浓度/($\times 10^{-9}$ mmol·L^{-1})		
	H-MRPs	M-MRPs	L-MRPs
0	138.56±28.67	138.56±28.67	138.56±28.67
0.02	144.78±19.56	128.45±34.53	135.45±45.45
0.1	139.42±24.34	130.23±37.45	129.35±35.46
0.2	149.23±31.56	137.56±49.87	137.35±37.45
1	201.56±40.34^{a}	140.94±32.12^{ab}	110.67±23.18^{b}
2	258.53±34.56^{a*}	135.57±42.67^{b}	74.12±18.06c*

* 注:* 与阴性对照相比, $P < 0.05$; ^{a,b,c}同剂量字母不同表示差异显著, $P < 0.05$。

在实验所选浓度范围内, H-MRPs 与 M-MRPs 都显著降低了人淋巴细胞 TBARS 的含量($P < 0.05$), 并且随着反应浓度的增大, 其效果增强。而 0.02~0.2 mg/mL 质量浓度范围的 L-MRPs 不影响 TBARS 含量, 只有质量浓度高于 1 mg/mL 时才显著抑制细胞脂质过氧化。另外, 比较相同质量浓度下 3 个组分对细胞脂质过氧化影响的差异, 发现在各种质量浓度下各组分之间都存在显著差异($P < 0.05$)(表 3)。

综上所述, 3 个组分对淋巴细胞脂质过氧化的抑制能力从大到小为: H-MRPs> M-MRPs> L-MRPs, 其中高相对分子质量组分(H-MRPs)具有最强的抗

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

氧化活性。目前许多研究已经证实,从氨基酸-还原糖反应体系[10]、咖啡[11,12]、面包[13]等这些美拉德反应得到的产品中,分离得到的高相对分子质量的类黑精具有显著的抗氧化活性,能降低细胞的氧化水平。这些研究结果与作者研究相似。类黑精广泛分布于人们的日常饮食之中,现在已经有学者尝试从食品(如咖啡、黑啤酒和豆酱)中分离和纯化类黑精,然而由于食品中类黑精组成的复杂性以及大量衍生化合物的生成,即使是最先进的分离手段和检测手段也不能完全确定所有类黑精的特性。

表 3　不同相对分子质量的 MRPs 对人淋巴细胞脂质过氧化的影响

Tab. 3　Effects of H-MRPs, M-MRPs and L-MRPs on lipid peroxidation of human lymphocytes

MRPs 质量浓度/(mg/mL)	TBARS 浓度/(μmol·L⁻¹)		
	H-MRPs	M-MRPs	L-MRPs
0	2.186±0.135	2.186±0.135	2.186±0.135
0.02	1.855±0.056^{a*}	1.993±0.031^{b*}	2.168±0.072^{c}
0.1	1.228±0.045^{a*}	1.639±0.058^{b*}	2.231±0.157^{c}
0.2	1.007±0.084^{a*}	1.349±0.121^{b*}	2.196±0.057^{c}
1	0.866±0.075^{a*}	1.186±0.159^{b*}	1.936±0.087^{c*}
2	0.830±0.034^{a*}	0.963±0.083^{a*}	1.904±0.053^{b*}

* 注:* 与阴性对照相比,$P<0.05$;^{a,b,c} 同剂量字母不同表示差异显著,$P<0.05$。

2.3　H-MRPs 分离后各组分对人淋巴细胞氧化还原水平的影响

用硅胶柱根据极性将 H-MRPs 进一步分离为 3 个组分(图 1),其极性由小到大分别为 H-MA、H-MB、H-MC。各组分对人淋巴细胞 GSH 含量的影响见表 4。由表 4 可见,当 H-MA 质量浓度在 1 mg/mL 以上时,能显著提高细胞 GSH 活性($P<0.05$);而在实验质量浓度范围内 H-MB 和 H-MC 均对细胞 GSH 水平无显著影响($P>0.05$)。比较相同质量浓度下 3 个组分之间的差异,发现当质量浓度在 1 mg/mL 和 2 mg/mL 时,H-MA 处理后细胞 GSH 水平显著高于 H-MB 和 H-MC 处理后细胞 GSH 水平(表 4)。

由表 5 可见,各组分对人淋巴细胞脂质过氧化均有抑制作用($P<0.05$),且随着反应浓度的增大,3 组分的抑制作用增强。同时,比较相同质量浓度下 3 组分抑制效果之间的差异,结果显示,在低质量浓度下,H-MA、H-MB 以及 H-MC 之间没有显著差异($P>0.05$),而当给样浓度增至 0.2 mg/mL 以上后,H-MA 组分的抑能力显著强于 H-MB,H-MB 组分显著强于 H-MC ($P<0.05$)(表 5)。

表 4　各组分对人淋巴细胞 GSH 含量的影响

Tab. 4　Effects of each fraction from H-MRPs on GSH level of human lymphocytes

MRPs 质量浓度/(mg/mL)	GSH 含量/(×10⁻⁹mmol·L⁻¹)		
	H-MA	H-MB	H-MC
0	121.56±20.57	121.56±20.57	121.56±20.57
0.02	120.58±39.59	128.45±29.67	125.37±30.14
0.1	123.67±24.33	123.95±18.73	128.26±33.36
0.2	155.58±15.56	127.09±25.83	130.43±38.64
1	222.78±35.42^{a*}	135.94±32.78^{b}	127.69±35.78^{b}
2	235.92±34.21^{a*}	128.65±35.38^{b}	135.12±40.04^{b}

注:* 与阴性对照相比,$P<0.05$;a, b, c 同剂量字母不同表示差异显著,$P<0.05$。

表 5　各组分对人淋巴细胞脂质过氧化的影响

Tab. 5　Effects of each fraction from H-MRPs on human lymphocytes lipid peroxidation

MRPs 质量浓度/(mg/mL)	TBARS 浓度/(μmol·L⁻¹)		
	H-MA	H-MB	H-MC
0	2.145±0.078	2.145±0.078	2.145±0.078
0.02	1.723±0.085*	1.803±0.052*	1.920±0.127*
0.1	1.156±0.137*	1.193±0.027*	1.276±0.125*
0.2	1.017±0.039^{c*}	1.120±0.048^{b*}	1.478±0.068^{a*}
1	0.698±0.053^{c*}	0.863±0.021^{b*}	1.139±0.043^{a*}
2	0.651±0.047^{c*}	0.812±0.017^{b*}	1.118±0.156^{a*}

注:* 与阴性对照相比,$P<0.05$;a, b, c 同剂量字母不同表示差异显著,$P<0.05$。

因此,不同极性的 3 种组分(极性由弱到强为:H-MA< H-MB< H-MC)其抗氧化效果由大到小为:H-MA> H-MB > H-MC。因此,MRPs 的极性越弱,抗氧化能力越强,该结果与秦礼康等[14]的研究结果较为一致。秦礼康等[13]采用大孔树脂将陈窖豆豉类黑精按极性分离成不同组分,并对各组分的抗氧化效果进行了研究,结果发现,无水乙醇洗

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

脱组分抗亚油酸氧化能力最强,已超过了类黑精粗提物。

3 结 语

咸味香精调配前的肉味香基是直接的美拉德反应产物,作者考察了肉味香基对人淋巴细胞的氧化还原水平的影响,并分离得到了具有高抗氧化活性的组分。结果显示,肉味香基对人淋巴细胞具有一定的保护作用,可抑制细胞脂质的过氧化。根据相对分子质量大小将肉味香基分离得到相对分子质量由大到小3个组分:H-MRPs、M-MRPs和L-MRPs,其抗氧化效果为H-MRPs>M-MRPs>L-MRPs。H-MRPs进一步分离得到极性由弱到强的3个组分H-MA、H-MB和H-MC,其抗氧化能力从高到低为:H-MA>H-MB>H-MC。

研究结果显示,肉味香基中大相对分子质量的、弱极性组分具有较大的抗氧化活性。然而,MRPs产物非常复杂,对于其中发挥抗氧化活性的组分的确切结构或结构单元尚不是很清楚,有待进一步的分离纯化和结构鉴定。

参考文献(References):

[1] 尤新. 氨基酸和糖类的美拉德反应——开发新型风味剂和食品抗氧化剂的新途径[J]. 食品工业科技, 2004, 25(7): 138-139.
YOU Xin. The Maillard reaction of amino acid and sugar——a new way for developing flavoring and food antioxidants[J]. **Science and Technology of Food Industry,** 2004, 25(7): 138-139. (in Chinese)

[2] 赵谋明,崔春,刘珊. 低值鱼蛋白酶解产物制备不同肉香型热反应物[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(3): 1-6.
ZHAO Mou-ming, CUI Chun, LIU Shan. Study on different meat flavor synthesis by Maillard reaction from low-valued-fish hydrolysates[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology,** 2006, 25(3): 1-6. (in Chinese)

[3] Kim J S, Lee Y S. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time[J]. **Food Chemistry,** 2009, 116: 227-232.

[4] Dittrich R, Dragonas C, Kannenkeril D, et al. A diet rich in Maillard reaction products protects LDL against copper-induced oxidation ex vivo, a human intervention trial[J]. **Food Research International,** 2009, 42: 1315-1322.

[5] Somaza V, Wenzel E, Lindenmeier M, et al. Influence of feeding malt, bread crust, and a pronylated protein on the activity of chemopreventive enzymes and antioxidative defense parameters in vivo[J]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry,** 2005, 53(21): 8176-8182.

[6] Hu M L, Dillard C J, Tappel A L. Aurothioglucose effect on sulfhydryls and glutathione-metabolizing enzymes: in vivo inhibition of selenium-dependent glutathione peroxidase[J]. **Research Communications in Chemical Ppathology,** 1988, 59: 147-160.

[7] Chirico S, Smith C, Marchant C, et al. Lipid peroxidation in hyperlipidaemic patients. A study of plasma using an HPLC-based thiobarbituric acid test[J]. **Free Radical Research Communications,** 1993, 19: 51-57.

[8] Jing H, Kitts D D. Chemical characterization of different sugar-casein Maillard reaction products and protective effects on chemical-induced cytotoxicity of Caco-2 cells[J]. **Food and Chemical Toxicology,** 2004, 42(11): 1833-1844.

[9] Jing H, Kitts D D. Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products[J]. **Food and Chemical Toxicology,** 2002, 40(7): 1007-1015.

[10] Valls B V, Torres M C, Muniz P, et al. The protective effects of melanoidins in adriamycin-induced oxidative stress in isolated rat hepatocytes[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** 2004, 84(13): 1701-1707.

[11] Luis G, Cristina D A, Laura B, et al. Effect of coffee Melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide[J]. **Molecular Nutrition & Food Research,** 2007, 51(5): 536-545.

[12] Goya L, Delgado-Andrade C, Rufian-Henares J A, et al. Effect of coffee melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide[J]. **Molecular Nutrition & Food Research,** 2007, 51(5): 536-545.

[13] Lindenmeier M, Faist V, Hofmann T. Structural and functional characterization of pronyl-lysine, a novel protein modification in bread crust melanoidins showing in vitro antioxidative and phase I/II enzyme modulating activity[J]. **Journal of Agriculture and Food Chemistry,** 2002, 50(24): 6997-7006.

[14] 秦礼康,丁霄霖. 陈窖豆豉粑类黑精组分体外抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(1): 88-92.
QIN Li-kang, DING Xiao-lin. Studies on in vitro antioxidant activities of the melanoidin fractions separated from long-ripened douchiba(DCB)[J]. **Food and Fermentation Industries,** 2006, 32(1): 88-92.

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net