

# 酪蛋白胃肠模拟水解液活性检测 及细胞吸收机制初步研究

薛海燕 李 珊 杜桢宣 韩 波 张 颖

(陕西科技大学食品与生物工程学院 陕西西安 710021)

**摘 要:** 目的: 研究牛乳酪蛋白在胃肠模拟水解条件下水解物的生物活性, 以及这些肽类在细胞水平的吸收机制, 为蛋白质生理作用机制研究奠定基础。方法: 以牛乳酪蛋白为原料, 对其进行体外模拟胃肠消化实验, 通过检测消化液的 DPPH 自由基清除率和抑菌圈大小, 分析其抗氧化和抗菌活性; 建立 Caco-2 单层细胞模型对水解液进行过膜吸收, RP-HPLC 分析过膜前后消化液组成, 研究吸收情况。结果: 模拟胃和肠消化时间均在 2 h 时, 牛乳酪蛋白消化液的 DPPH 自由基清除率达到最大, 分别为 46.40% 和 56.7%, 并且此时对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌性能最强; 细胞吸收实验表明 2 h 胃模拟水解液肽氮生物利用度达到 7.79%, 2 h 肠模拟水解液达到 15.11%, 之后基本持平; 亲水性的多肽能被成功吸收进入单细胞层下侧, 但疏水性多肽大部分不易通过, 易被降解或阻止。结论: 牛乳酪蛋白在模拟消化条件下能产生生物活性肽类, 并能被肠细胞吸收。

**关键词:** 酪蛋白, 胃肠模拟消化, 抗氧化活性, Caco-2 细胞

## The bioactive detection and mechanism of cell-based absorption on simulating gastrointestinal hydrolysis of casein

XUE Hai-yan, LI Shan, DU Rui-xuan, HAN Bo, ZHANG Ying

(Institute of Food Biotechnology, Shaanxi University of Science and Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** Objective: To study on bioactive detection and cell-based absorption mechanisms of gastrointestinal hydrolysis derived from bovine casein. It can further elucidate physiological mechanisms of food protein to human being. Methods: Bovine milk casein was hydrolyzed *in vitro* simulating gastrointestinal digestion. The hydrolysate's antioxidant and antimicrobial activity were detected through the DPPH free radical clearance rate analysis and the bacteriostatic ring size determination. In addition, Caco-2 monolayer cell model was optimized and established to simulate the membrane absorption of hydrolysate. RP-HPLC was used to analyze the digestive juices before and after across the membrane. Results: It showed the DPPH free radical clearance rates reached maximum 46.40% of 2 h-Gastric and 56.7% of 2 h-Gastrointestinal digestions from bovine casein. At the same time, the inhibition activity on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* also achieve maximum. Experiment results showed that hydrolyzed 2 h stomach simulation peptide absorption nitrogen bioavailability of 7.79%, 2 h hydrolyzed intestines simulation of 15.11% after the flat. The peptide can be successfully absorb water into single cell layer under the side, but most hydrophobic peptide by not easily, easy degradation or stop. Conclusion: The gastrointestinal hydrolysate of casein can produce bioactive peptides as well as absorb by intestinal cell monolayer.

**Key words:** casein; gastrointestinal digestion; antioxidant activity; Caco-2 cells

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)18-0014-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.18.003

蛋白质是人体必需的营养成分之一。近几年, 蛋白质分解后产生的活性多肽成为研究热点<sup>[1]</sup>。来源于食品的生物活性肽在动物进食消化后, 不只为机体提供基本营养成分, 还可能发挥一定的生理功能<sup>[2]</sup>。这些发现使得营养学家在评定蛋白质营养价值时, 不仅要考虑蛋白质中的必需氨基酸含量, 还应考虑在消化过程中是否会产生一些具有潜在生理功

能的活性肽<sup>[3]</sup>。而牛乳酪蛋白中包含多种人体必需的氨基酸<sup>[4]</sup>, 经体外酶可控水解后可以产生多种生理活性肽, 如免疫活性肽、肾素肽、抗氧化肽、酪蛋白磷酸肽(CPP)、血管紧张素转换酶(ACE抑制肽)等<sup>[5]</sup>。目前研究大多集中于体外酶解蛋白制备乳源生物活性肽方面<sup>[6]</sup>。如 Maruyama 等人使用胰蛋白酶水解牛乳酪蛋白, 在水解液中得到三种降血压的二肽其肽

收稿日期: 2017-02-28

作者简介: 薛海燕(1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品免疫检测技术, E-mail: xuehaiyan@sust.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301405); 陕西省科技统筹计划项目(2013KTZB02-02-05(2)); 陕西省教育厅专项项目(16JK1101)。

段分别为: PP、RP 及 AH<sup>[7]</sup>; 徐鑫等人用胰蛋白酶水解牛乳酪蛋白, 测定水解物对小鼠脾细胞的增殖促进作用达到 0.184<sup>[8]</sup>。但关于蛋白质经胃肠水解后是否会产生生理活性肽, 具有生理活性的多肽进入胃肠道后能否被吸收, 生理活性肽是否能完整通过小肠上皮细胞及通过的机制研究报道较少<sup>[9]</sup>。

利用动物实验可以很好地进行营养物质的吸收评价, 但结构完整性的维持是生理活性肽功能发挥的前提, 动物机体复杂, 体内多肽追踪困难<sup>[10]</sup>。而 Caco-2 细胞单层膜具有与肠上皮细胞相同的细胞极性和紧密连接, 并且表达出与肠上皮细胞的主动转运系统相同的转载体; 在细胞培养的 AP 侧生长出的刷状缘微绒毛也同样表达氨基酸酶、碱性磷酸酶和磺基转移酶等, 这些酶在小肠刷状缘也都存在<sup>[11]</sup>。Caco-2 肠道单层细胞模型由于其重复性好、操作简单等优点被广泛应用于药物或食物营养素在肠道中的吸收评价中<sup>[12]</sup>。

因此, 本研究通过模拟胃肠水解牛乳酪蛋白得到多肽水解液, 检测水解液中多肽的抗氧化活性和抑菌活性, 以 Caco-2 单层细胞膜为模型, 模拟体内肠道吸收、转运, 使水解多肽通过单层细胞, 采用 RP-HPLC 对 AP 侧和 BL 侧的样品进行检测, 对多肽的吸收进行初步研究, 从而为蛋白质营养生理作用机制提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与方法

酪蛋白、胃蛋白酶 (3000 U/mg)、胰蛋白酶 (3000 U/mg)、DPPH (分析纯) 美国 Sigma 公司; 牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉 北京奥博星生物技术有限责任公司; 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、Caco-2 细胞、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液 南京凯基生物发展有限公司; DMEM 高糖培养基、青霉素-链霉素混合溶液 美国 Hyclone 公司; Hank's 平衡盐溶液 (HBSS) 美国 Sigma 公司; 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶、12 孔透明 Transwell 板 (膜面积 0.33 cm<sup>2</sup>) 美国康宁公司。

1200LC 型高效液相色谱仪 美国安捷伦有限公司; 752 型紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司; HF90 CO<sub>2</sub> 培养箱 上海力申仪器有限公司; Ti-U 型倒置相差显微镜 大恒图像有限公司; 细胞电阻仪 美国 MILLIPORE MILLICELL-ER; MULTISKAN mk3 型酶标仪 赛默飞世尔上海仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 酪蛋白水解物的制备

1.2.1.1 人工胃液和人工肠液的制备 参照文献 [13] 中的方法。人工胃液: 1 g 胃蛋白酶溶解于 50 mg 超纯水中, 加入 1.64 mL 10% HCl 溶液, 定容至 100 mL 备用。

人工肠液: 称取 0.68 g 磷酸二氢钾加到 50 mL 超纯水中, 用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 至 6.8, 加入 1 g 胰蛋白酶, 定容至 100 mL 备用。

1.2.1.2 体外模拟胃消化 称取 12 g 酪蛋白溶于 500 mL pH 为 8 的 PBS 中, 振荡使其充分溶解后, 用 1 mol/L 的 HCl 调节溶液的 pH 至 2.0。将 20 mL 人

工胃液加入酪蛋白溶液中, 在 37 °C 恒温水浴振荡器中模拟消化, 在 0、1、2、3、4、5 h 分别取样 50 mL, 然后将所得样品在沸水中灭酶 10 min, 调节 pH 至等电点 4.6 以沉淀未消化的酪蛋白, 10000 r/min 离心 30 min, 分离获得上清, NaOH 调节上清溶液 pH 至 8.0, 将所得样品冻干储存于 4 °C 冰箱中备用, 其中 0 h 为对照。

1.2.1.3 体外模拟肠消化 按照 1.2.1.2 方法制备 2 h 酪蛋白胃消化液 500 mL, 用 1 mol/L 的 NaOH 调节溶液的 pH 至 8.0, 加 20 mL 的人工肠液, 在 37 °C 恒温水浴振荡器中继续模拟消化, 取样时间、取样量及保存方式同 1.2.1.2。

#### 1.2.2 酪蛋白水解液抗氧化及抗菌活性检测

1.2.2.1 酪蛋白水解液抗氧化检测 采用 DPPH 法<sup>[14]</sup>对水解液的 DPPH 自由基清除率进行测定。

将所有比色管均置于 25 °C 恒温水浴锅中避光反应 30 min 后于  $\lambda = 517 \text{ nm}$  处测定其吸光度, 每个浓度测定 3 次, 取平均值, 测定结果以清除率 (SR) 表示。用等体积无水乙醇作为空白调零。计算公式为:

$$\text{清除率 SR}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_0}{A_j}\right) \times 100$$

式中:  $A_0$ : DPPH ( $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ) 的吸光度;  $A_i$ : DPPH 与水解液混合液的吸光度;  $A_j$ : 水解液的吸光度。

1.2.2.2 酪蛋白水解液的抑菌活性检测 参照文献 [15] 中的方法, 选择不同类型微生物的典型代表进行抑菌活性实验, 大肠杆菌作为革兰氏阴性 ( $G^-$ ) 菌的典型代表进行抑菌活性实验。将  $1 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$  的菌液均匀涂布接种在琼脂平面上, 孔内加入不同水解时间的多肽液样品, 37 °C 无菌恒温培养 48 h 后测量抑菌圈直径。

#### 1.2.3 Caco-2 细胞的培养及吸收转运实验

1.2.3.1 Caco-2 细胞的培养 参照文献 [16] 中的方法, Caco-2 细胞培养液为加入 10% 胎牛血清和 2% 青-链霉素的 DMEM 高糖培养基, 将  $1 \times 10^4 \text{ CFU/mL}$  的第 7 代 Caco-2 细胞悬液接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 无菌培养箱中培养, 待其生长至 80% ~ 90% 时用 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 溶液进行消化并传代。选取其中两株, 浓度调整至  $2 \times 10^5 \text{ CFU/mL}$ , 将其接种于 Transwell 板上, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 无菌培养箱中培养, 开始培养的一周内隔天更换细胞培养液, 一周后每天更换培养液, 直至成膜, 检测单层膜模型的建立。所用单层膜细胞传代均在 20 代以内。

1.2.3.2 成膜完整性检测 细胞形态学检验: 培养至 21 d 时, 将细胞用 HBSS 缓冲溶液冲洗 3 次, 在电子显微镜下观察其形态学特征。跨膜电阻 TEER 值测定<sup>[17]</sup>: 用细胞电阻仪测定跨膜电阻 (在 700 ~ 1500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  之间符合要求), Caco-2 细胞膜细胞电阻值 ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) = (Caco-2 细胞膜电阻值 - 空白膜电阻值)  $\times$  膜面积。

荧光黄检漏实验<sup>[18]</sup>: 荧光黄标准曲线的制作: 用 HBSS 配制 10 mg/mL 的荧光黄溶液, 然后稀释至 1、

0.5、0.25、0.1、0.05、0.01 mg/mL, 用酶标仪在 495 nm 处检测其吸光度, 以浓度为横坐标 X, 吸光度为纵坐标 Y, 绘制标准曲线:  $Y = 124.79X + 0.12796$ ,  $R^2 = 0.997$ 。

Caco-2 单层细胞膜的渗透率和表观渗透系数 (Papp): 将 0.5 mL 0.4 mg/mL 的荧光黄溶液加入 Transwell 的 AP 侧, 然后向 BL 侧加入 1.5 mL 的 HBSS 缓冲溶液, 分别在 0、30、60、90、120、150 min 在 BL 取样 200  $\mu$ L, 然后添加同体积的 HBSS 缓冲溶液, 在 495 nm 处检测其吸光度, 利用标准曲线计算荧光黄的浓度。以未接种细胞的 Transwell 板做为空白组。荧光黄的渗透率公式及表观渗透系数计算公式如下:

$$\text{渗透率}(\%) = \frac{\text{BL 侧荧光黄浓度}}{\text{AP 侧荧光黄初始浓度}} \times 100$$

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{A \times C_0}$$

式中:  $P_{app}$ : 表观渗透系数,  $\mu\text{m/s}$ ;  $dQ/dt$ : 单位时间内荧光黄的转运量;  $A$ : 膜的表面积,  $\mu\text{m}^2$ ;  $C_0$ : AP 侧中荧光黄的初始浓度,  $\mu\text{mg/mL}$ 。

1.2.3.3 多肽水解液的吸收转运实验 参照文献 [19] 中的方法, Caco-2 细胞在 Transwell 板上形成紧密完整的单细胞层后, 用 HBBS 冲洗板中各孔室的细胞 3 次, 然后在每个孔室中都加入 1 mL 的 HBBS, 并放入 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 30 min, 除去细胞膜表面的附着物、培养基质和 HBBS 缓冲液。牛乳酪蛋白多肽水解液用 HBSS 稀释至 5 mmol/L。多肽水解液从 A 池至 B 池的过膜实验操作: 在 A 池加入 0.5 mL 水解液, B 池加 0.5 mL 的 HBSS, 放入  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养 1 h 后, 分别在 B 池中收集过膜液 0.5 mL, 平行 3 个孔。检测 AP 及 BL 多肽氮含量, HPLC 检测 2 h 水解液组成。

1.2.4 测定水解液中肽氮含量和生物利用率 用凯氏定氮法测定消化液中总氮含量<sup>[20]</sup>。TNBS 法测定消化液中游离氨基酸氮含量<sup>[21]</sup>。

肽氮含量(g) = 总氮含量 - 游离氨基酸氮含量

$$\text{生物利用率}(\%) = \frac{\text{BL 侧肽氮含量}}{\text{AP 侧初始肽氮含量}} \times 100$$

1.2.5 水解液 RP-HPLC 检测 将各酪蛋白水解液样品用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜微滤上样。色谱条件: 色谱柱: Diamonsil TMC<sub>18</sub> ( $\Phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$  5  $\mu\text{m}$ ); 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 220 nm; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 流动相 A: 含 0.1% TFA 乙腈, 流动相 B: 含 0.1% TFA 超纯水; 0~30 min, 10%~35% 流动相 A; 30~40 min, 35%~10% 流动相 A; 40~50 min, 10% 流动相 A<sup>[22]</sup>。

### 1.3 数据处理

用 Origin 软件作图并用 SPSS 9.0 进行统计学分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酪蛋白胃肠水解液抗氧化性分析

由图 1 可知, 酪蛋白胃水解液的 DPPH·自由基清除率先增大后减小。在水解 2 h 前抗氧化活性逐渐增强, 到 2 h 时 DPPH·自由基清除率达到最大值

46.40%; 随着反应的进行, DPPH·自由基清除率有所下降, 最后趋于平缓, 维持在 34.51% 左右。2 h 后分子变小, 抗氧化活性反而降低。食物蛋白质在胃内的停留时间为 4~5 h, 因此酪蛋白的模拟胃水解多肽在胃内具有抗氧化活性。酪蛋白肠水解液的 DPPH·自由基清除率先增大后减小, 2 h DPPH 自由基清除率达到最大 56.7%; 2 h 以后继续消化, 肽段被水解为更小分子的肽段或者氨基酸, 使部分肽段的抗氧化活性降低, DPPH 自由基清除率在 3、4、5 h 分别降至 53.50%、51.80%、50.68%, 但仍保持一定活性, 这是由于某些氨基酸的特殊结构使其具有抗氧化活性, 如组氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸、色氨酸等<sup>[23]</sup>, 所以水解时间内的 DPPH 自由基清除率与 0 h 相比均升高。并且人工肠液的消化物的 DPPH 自由基清除率明显高于人工胃液消化物 ( $p < 0.05$ ), 这可能是由于人工肠液消化的水解度较大, 生成了较多具有抗氧化活性的多肽。

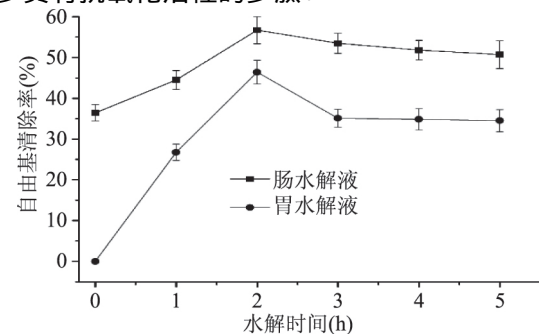


图 1 不同时间胃肠水解液对自由基清除率的影响

Fig.1 The influence of gastric and intestinal juice hydrolysis time on free radical clearance

### 2.2 酪蛋白水解液抗菌活性检测

由表 1 可知, 酪蛋白并没有显著抑菌作用。两种受试菌中均表现为抑菌圈直径大小随时间的延长先增大后减小, 直到最后不产生抑菌圈。其中水解 2 h 的多肽液抑菌圈直径最大, 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌都具有最强的抑菌效果, 即对革兰氏阴性菌与阳性菌均能产生抑制作用。当水解时间在 2~5 h 范围时, 具有抑菌活性的多肽进一步被水解成没有抗菌活性的小肽片段, 因此多肽液的抑菌圈直径随水解时间延长而逐渐减小, 当抗菌活性肽浓度低于最小抑菌浓度时就不再有抑菌圈出现。

由表 2 可知, 肠消化物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌活性在 2 h 时显著升高 ( $p < 0.05$ ), 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径均达到较高值, 随着反应时间的延长, 抑菌活性又明显降低。出现这种趋势是由于人工胃液消化产生的具有抑菌活性的肽段, 经过人工肠液再消化将进一步消化, 从而使其降解为活性较低的肽段, 但随着消化时间的延长, 又形成了一些新的小分子活性肽段, 从而使抑菌能力有所提高, 之后这些小分子的活性肽段又被进一步分解<sup>[6]</sup>。

### 2.3 Caco-2 单层细胞膜模型的建立

2.3.1 Caco-2 细胞形态学结果分析 细胞显微镜观察显示, 在经过 1 d 培养后, 细胞为不规则的扁状, 培



表1 不同时间胃水解液对两种菌的抑菌圈直径

Table 1 Different time stomach hydrolysate on bacteriostatic circle diameter of two kinds of bacteria

水解时间(h)	0	1	2	3	4	5
大肠杆菌(mm)	-	9.00 ± 1.02	19.5 ± 2.32 <sup>a</sup>	8.62 ± 1.15	-	-
金黄色葡萄球菌(mm)	-	-	36.72 ± 3.18 <sup>a</sup>	25.28 ± 2.82	16.23 ± 2.02	-

注: a 表示与 0 h 相比差异显著 ( $p < 0.05$ ); 表 2 同。

表2 不同时间肠水解液对两种菌的抑菌圈直径

Table 2 Different time of intestine hydrolysate on bacteriostatic circle diameter of two kinds of bacteria

水解时间(h)	0	1	2	3	4	5
大肠杆菌(mm)	19.50 ± 2.32	18.00 ± 1.98	23.50 ± 2.42 <sup>a</sup>	21.72 ± 1.76	20.96 ± 2.35	20.03 ± 1.95
金黄色葡萄球菌(mm)	40.47 ± 4.62	45.28 ± 5.07	44.23 ± 4.67 <sup>a</sup>	43.87 ± 4.46	43.19 ± 4.59	34.26 ± 3.20

养 21 d 时 细胞生长均匀 无白泡 可清楚看见 Caco-2 细胞形状为不规则的扁状 细胞形态完整 细胞之间紧密连接。但是无法证明单层膜的致密程度 其致密程度还需要进一步验证。

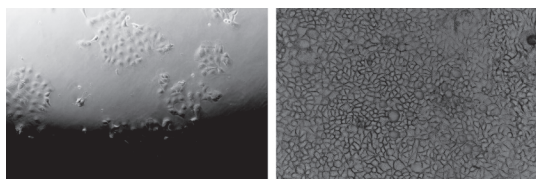


图2 Caco-2 细胞在 Transwell 板上  
培养单层膜形态图 (10 ×)

Fig.2 Caco-2 cells are grown on the Transwell board  
form figure monolayer film (10 ×)

注: 左图为培养 1 d, 右图为培养 21 d 的细胞单层膜。

2.3.2 细胞 TEER 结果分析 12 孔 Transwell 板上测得的 TEER 值如图 3 所示。Caco-2 细胞单层膜的致密性随着培养时间延长而呈递增趋势。前 8 d 细胞的跨膜电阻增长较慢, 到第 8 d 电阻达到 ( $321 \pm 25$ )  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , 之后快速增大, 第 21 d 时达到 ( $1086 \pm 50$ )  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , 最后 3 d 增长趋于平缓, 稳定在  $1100 \Omega \cdot \text{cm}^2$  左右 与其它组的电阻率存在显著性差异 ( $p < 0.05$ ), 说明 Caco-2 细胞形成了致密完整的单层膜 可以进行过膜实验。

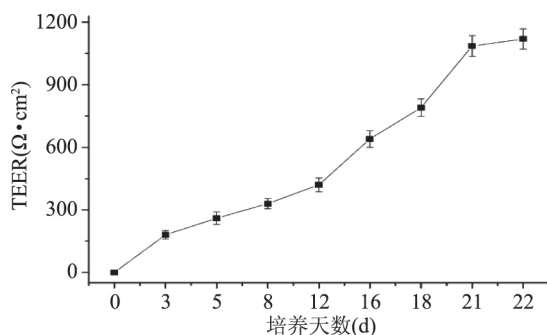


图3 Caco-2 细胞单层膜 TEER 值随时间变化图

Fig.3 Caco-2 cell monolayer TEER  
value variation over time

2.3.3 荧光黄通透性的结果分析 利用荧光黄来检测 Caco-2 单层膜表观通透性 (Papp), 由于离子经过细胞旁间隙透过的量恒定, 故用标记物荧光黄进行细胞间隙和致密性检测。细胞紧密完整, 则 Papp 值

要小于  $0.5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  值, 且 Papp 值还要处于  $10^{-6} \text{ cm/s}$  数量级上<sup>[24]</sup>。荧光黄浓度检测的标准曲线:  $Y = 124.79X + 0.12796$ ,  $R^2 = 0.997$ ; 荧光黄的 Papp 值为  $0.37 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ , 小于  $0.5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ , 达到相关文献报道中的范围<sup>[18]</sup>, 且平均透过率为 0.37%, 而空白对照组 Papp 值为  $5.9 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$ , 远远大于  $0.5 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ , 且平均透过率为 95%。结果表明: Caco-2 细胞在 Transwell 板中连续培养 21 d, 所建立的 Caco-2 单层膜致密、完整, 达到实验要求, 可以用于过膜实验。

## 2.4 水解液中肽氮含量和生物利用度

收集不同时间水解液分别过单层 Caco-2 细胞膜后 检测此时的肽氮生物利用率, 如图 4 所示, 消化 2 h 的胃液生物消化率达到 7.79%, 消化 2 h 的胃肠水解液达到 15.11%, 之后基本持平, 说明 2 h 后随着酶切位点减少, 蛋白酶的活性达到饱和, 生物利用度增加缓慢, 直到 5 h 才分别增加了 1.08% 和 1.77%。从图 4 中还可以看出, 胰蛋白酶的水解度显著高于胃蛋白酶的水解度 ( $p < 0.05$ ), 说明胰蛋白酶更易水解酪蛋白。

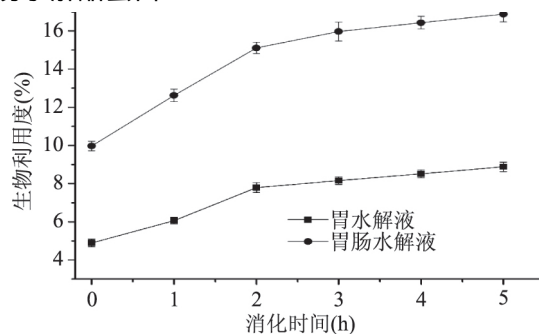


图4 不同消化时间胃肠液过膜前后生物利用度

Fig.4 Bioavailability of AP and BL of

casein hydrolysate at the different digestion time

## 2.5 酪蛋白在肠 Caco-2 细胞上的转运吸收

对 Transwell 的 A、B 池多肽水解液通过 RP-HPLC 检测进行对比分析, RP-HPLC 检测结果如图 5、图 6 所示。

从图 5 可知, 经 Caco-2 单层细胞吸收后, 在保留时间为 18.10、22.20、25.50、27.21、33.24 min 等的峰可以通过 Caco-2 单细胞层, 还有 26.04、31.00 min 等的峰未在 B、C 上出现。从图 6 可知 经 Caco-2 单层

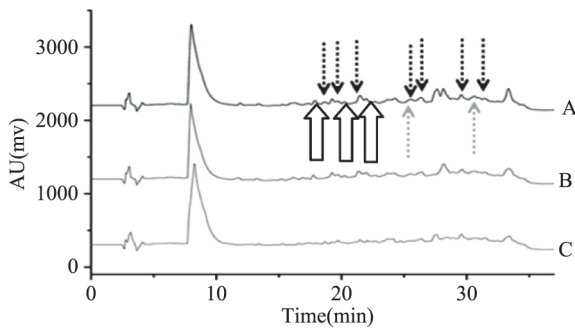


图5 胃水解多肽液过膜前后 HPLC 分析图

Fig.5 Stomach hydrolytic polypeptide liquid membrane before and after RP-HPLC analysis diagram

注: A 为体外胃水解 2 h 多肽液; B 为 A 侧剩余多肽液;  
C 为过膜后 B 侧多肽液; 上方箭头表示为通过部分;  
下方箭头为消失部分; 下方粗箭头为未通过部分, 图 6 同。

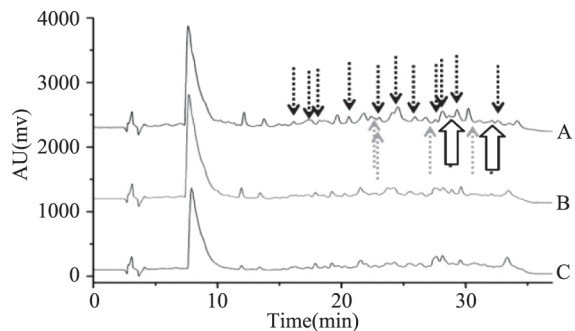


图6 肠水解多肽液过膜前后 HPLC 分析图

Fig.6 Pancreatic enzyme hydrolysis polypeptide liquid membrane before and after RP-HPLC analysis diagram

注: A 为体外肠水解 2h 多肽液; B 为 A 侧剩余多肽液;  
C 为过膜后 B 侧多肽液。

细胞吸收后,在保留时间为 18.11、19.00、22.03、24.11、25.50、27.13、33.20 min 等的峰可以通过 Caco-2 单层细胞层,28.00、33.01 min 的峰未能通过单层细胞膜,23.40、23.70、29.20、34.00 min 时的峰未在 B、C 上出现。推测多肽可能被膜上相关代谢酶水解。

据报道,当用 RP-HPLC  $C_{18}$  柱检测多肽液时,保留时间为 12~23 min 和 23~30 min 的峰分别为亲水性多肽和疏水性多肽,不能被单层膜吸收的多肽既有亲水性也有疏水性,亲水性多肽更易于通过,疏水性多肽不易通过,易被降解或阻止<sup>[25]</sup>,被膜上相关代谢酶水解的多肽同样为疏水性多肽,同时疏水性多肽未通过的时间段明显高于亲水性。如图 5 中 26.04、31.00 min 的峰,图 6 中 23.40、29.20 min 的峰。由于细胞有 3 种不同的运输路线,包括载体运输、细胞间连接的运输和胞吞胞吐,这三种方式选择性的参与到亲疏水多肽的运输中。每个多肽的结构性质不同,可能存在多种运输路线,而且在肠吸收时疏水性的多肽还有一定的过膜量,所以亲水性多肽大部分、疏水性小部分可以被成功吸收进入单细胞层下侧。

### 3 结论

酪蛋白的水解产物随着水解时间延长,使水解物中肽段进一步分解,导致其抗氧化活性在水解 2

h 后呈现降低趋势。胃肠水解液中的抗菌肽对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均具有抑制作用,对革兰氏阴性菌与阳性菌均能产生抑制作用,具有较广的抗菌谱。这与水解液中的多肽组成有关系,亟待进一步的研究。RP-HPLC 结果显示,亲疏水性的多肽能被成功吸收进入单细胞层下侧,但疏水性多肽大部分不易通过,易被降解或阻止,也证明多肽两极的肽段能被肠液优先消化水解,并且可以产生许多亲水性的多肽,而亲水性的多肽能够保持更多肽链不受肠消化的破坏,所以水解作用引起总的疏水性减少,一些肽键被分解为两个高亲水性的化学基团。

### 参考文献

- [1] Hogan S, Lei Z, Li J, et al. Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef [J]. Food Chemistry 2009, 117(3): 438-443.
- [2] Meisel H. Bioactive peptides from milk protein: a perspective for consumers and producers [J]. Austr J Dairy Technol, 2001 (56): 83-91.
- [3] 宫霞, 凌庆芝. 乳酪蛋白源抗高血压活性肽的制备及其生理活性[J]. 上海交通大学学报, 2009, 27(1): 53-56.
- [4] Plank J, Andres P, Krause I, et al. Gram scale separation of casein proteins from whole casein on a Source 30Q anion-exchange resin column utilizing fast protein liquid chromatography (FPLC) [J]. Protein Expression & Purification, 2008, 60(2): 176-181.
- [5] Silva S V, Malcata F X. Caseins as source of bioactive peptides [J]. International Dairy Journal 2005, 15(1): 1-15.
- [6] 庞广昌, 陈庆森, 胡志和, 等. 蛋白质的消化吸收及其功能评述[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 375-391.
- [7] Maruyama S, Mitachi H, Tanaka H, et al. Studies on the active site and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from casein [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1987, 51(6): 1581-1586.
- [8] 徐鑫, 何佳易, 刘国艳, 等. 响应曲面法优化胰蛋白酶酶解条件制备乳源免疫活性肽[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 174-179.
- [9] 刘珊珊, 敖静, 谢宁宁, 等. 酪蛋白抗氧化肽的胃肠消化稳定性研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(2): 47-53.
- [10] 吴军, 翁春梅, 刘晓东, 等. 外翻肠囊法研究灵仙新苷肠吸收动力学[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(5): 601-605.
- [11] 关溯, 陈孝, 黄民. Caco-2 细胞模型-药物吸收研究的有效“工具”[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(6): 609-614.
- [12] 丁龙. 蛋清源 ACE 抑制肽的结构与完整吸收关系研究[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 第二版. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 158.
- [14] Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. [J]. Food Chemistry 2009, 113(1): 238-245.

(下转第 24 页)

66-72.

[3] 曹稳根, 段红, 翟科峰, 等. 野生豆腐柴叶总黄酮抗氧化活性研究[J]. 滁州学院学报, 2016, 18(5): 40-43.

[4] Han H B, Li H, Hao R L, et al. One-step column chromatographic extraction with gradient elution followed by automatic separation of volatiles, flavonoids and polysaccharides from *Citrus grandis* [J]. Food Chemistry, 2014, 145: 542-548.

[5] 朱玲玲. 白鹃梅中黄酮类物质的分离纯化和生物活性研究[D]. 广州: 暨南大学, 2016.

[6] 胡予, 李旭升, 马楠, 等. 豆腐柴叶总黄酮的提取、纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 20: 268-273.

[7] Luo Y H, Li X R, He Isolation J, et al. characterisation, and antioxidant activities of flavonoids from chufa (*Eleocharis tuberosa*) peels [J]. Food Chemistry, 2014, 164: 30-35.

[8] 许树军, 朱琪, 于子惠, 等. 橙皮苷及橙皮素清除超氧阴离子自由基能力的研究[J]. 中国医药学报, 2015, 43(1): 56-58.

[9] Benzie Iris F F, Strain J J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.

[10] 袁佐云, 朱运平, 俞伟祖, 等. 蒸煮与发酵对全谷物粉甲醇提取物抗氧化活性的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(2): 25-32.

[11] Tan L H, Zhang D, Wang G. Comparative analyses of flavonoids compositions and antioxidant activities of Hawk tea from six botanical [J]. Industrial Crops and Products, 2016, 80: 123-130.

[12] Seeram N P, Aviram M, Zhang Y, et al. Comparison of

antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2008, 56(4): 1415-1422.

[13] 张华, 周志钦, 席万鹏. 种柑橘果实主要酚类物质的体外抗氧化活性比较[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 64-70.

[14] 程悦, 王志宇, 王冬梅, 等. 不同溶剂对鸡血藤提取物总黄酮含量及抗肿瘤活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(9): 142-144.

[15] Sivasothy Y, Sulaiman S F, Ooi K L. Antioxidant and antibacterial activities of flavonoids and curcuminoids from *Zingiber spectabile* Griff [J]. Food Control, 2013, 30: 714-720.

[16] Wang Y Q, Gao Y J, Ding H. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity [J]. Food Chemistry, 2017, 218: 152-158.

[17] Giese E C, Gascona J, Anzelmo G, et al. Free-radical scavenging properties and antioxidant activities of botryospheraen and some other-D-glucans [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 72: 125-130.

[18] 曾伟. 芒萁黄酮的纯化分离及抗氧化活性研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2013.

[19] 曾维才, 石碧. 天然产物抗氧化活性的常见评价方法[J]. 化工进展, 2013(6): 50-51.

[20] 李保同. 银杏叶总黄酮的提取纯化及其抗氧化性能研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2016.

[21] Re R, Nicoletta P, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Australian Tafe Teacher, 1999, 26(10): 1231-1237.

(上接第18页)

[15] 谢强, 林玉桓, 苗淑萍, 等. 香芹酚对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞膜的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(23): 54-58.

[16] Gianluca Picariello, Giuseppe Iacomino, Gianfranco Mamone, et al. Transport across Caco-2 monolayers of peptides arising from *in vitro* digestion of bovine milk proteins [J]. Food Chemistry, 2013(139): 203-212.

[17] Hosoya K-I, Kim K-J, Lee V H. Age-dependent expression of P-glycoprotein gp170 in Caco-2 cell monolayers [J]. Pharmaceutical Research, 1996, 13(6): 885-890.

[18] 尤青, 马增春, 谭洪玲, 等. 人参水提物在 Caco-2 模型的吸收特征[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(12): 1711-1716.

[19] Ranaldi G, Conaálvo R, Sambuy Y, et al. Permeability characteristics of parental and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum supplemented and serum-free media [J]. Toxicol In Vitro, 2003, 17(5-6): 76-767.

[20] 鲁健章, 孙丽华, 周彦钢. 凯氏定氮法测定鱼蛋白质含量的干扰因素分析[J]. 食品科学, 2010, 31(19): 453-456.

[21] Samaranayaka A G, Kitts D D, Li-Chan E C. Antioxidative

and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a Pacific Hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(3): 1535-1542.

[22] Ningning Xie, BoWang, Liangping Jiang, et al. Hydrophobicity exerts different effects on bioavailability and stability of antioxidant peptide fractions from casein during simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell absorption [J]. Food Research International, 2015(76): 518-526.

[23] 李东平. 酶解水牛乳蛋白制备降血压肽的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2012.

[24] 莫李立, 王素军, 杨本坤. 阿魏酸在 Caco-2 细胞模型的通透性及其在大鼠体内吸收特性研究[J]. 中草药, 2012, 43(5): 947-951.

[25] Parrot S, Degraeve P, Curia C, et al. *In vitro* study on digestion of peptides in Emmental cheese: analytical evaluation and influence on angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides [J]. Die Nahrung, 2003, 47(2): 87.