

豇豆籽肽的制备及抗氧化活性研究

杨晓童, 杜芹, 熊双丽 (西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621000)

摘要 [目的] 采用酶法制备豇豆籽蛋白肽, 并探讨其抗氧化活性。[方法] 先用碱提酸沉法制备豇豆籽蛋白, 然后分别用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶水解制备豇豆籽肽, 后者脱盐后进行 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子清除活性分析。[结果] 碱性蛋白酶水解能力强于木瓜蛋白酶, 2 种酶水解后的豇豆籽肽对 3 种自由基均具有较好的清除活性。在相应浓度范围内, 对 DPPH 自由基最大清除率分别为 63.92% (碱性蛋白酶) 和 63.06% (木瓜蛋白酶), 半数抑制浓度 IC_{50} 分别为 3.20 和 3.28 mg/ml; 对羟基自由基最大清除率分别为 87.66% (碱性蛋白酶) 和 85.88% (木瓜蛋白酶), 相应 IC_{50} 分别为 4.21 和 4.89 mg/ml; 对超氧阴离子自由基的最大清除率 64.06% (碱性蛋白酶) 和 47.92% (木瓜蛋白酶)。[结论] 研究可为豇豆籽蛋白肽的深度开发和综合利用提供一定的理论基础。

关键词 豇豆籽; 肽; 自由基

中图分类号 S643.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)01-00319-03

Preparation Of Cowpea seed peptide and Study on Its Antioxidation

YANG Xiao-tong et al (School of Life Science and Engineering, Southwest University of Technology, Mianyang, Sichuan 621000)

Abstract [Objective] To prepare cowpea seed protein peptide by using enzyme method and discuss its antioxidation. [Method] Prepare cowpea seed protein by alkali extraction and acid precipitation method. Then, prepare cowpea seed peptide with alkali protease and pawpaw protease, after desalinization, removal activity analysis by DPPH free radical, hydroxyl free radical and superoxide anion were carried out. [Result] The hydrolysis ability of alkali protease is stronger than pawpaw protease, cowpea seed peptide after hydrolysis all have scavenging ability on three free radicals. Within the corresponding concentration range, the maximum scavenging rate to DPPH free radicals are 63.92% (alkali protease) and 63.06% (pawpaw protease) respectively, IC_{50} are 3.20 and 3.28 mg/ml; the maximum scavenging rate to hydroxyl free radical are 87.66% (alkali protease) and 85.88% (pawpaw protease), IC_{50} are 4.21 and 4.89 mg/ml; the maximum scavenging rate to superoxide anion are 64.06% (alkali protease) and 47.92% (pawpaw protease). [Conclusion] The study provides theoretical basis for deeply development and comprehensive utilization of cowpea seed protein peptide.

Key words Cowpea seed; Peptide; Free radicals

豇豆籽蛋白质含量 20.42% ~ 34.60%, 脂肪 1.3% ~ 1.5%, 纤维素 3.9% ~ 4.6%, 碳水化合物 50% ~ 67%, 在印度农村多与大米、小米和高粱等一起作主食食用。豇豆蛋白与大豆蛋白有相似的氨基酸组分, 但豇豆蛋白质中天冬氨酸、赖氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、缬氨酸含量比大豆蛋白高, 可以作为一种优质的蛋白质资源进行开发利用。目前对其利用主要是将豇豆磨成面粉后与玉米或小麦面混合做成饼或糕点、用豇豆作豆羹或豆汤、炒后用作咖啡代用品^[1-2]。现代营养研究表明, 人体摄食的蛋白质不仅可以以氨基酸形式吸收利用, 还可以以寡肽形式吸收, 发挥抗氧化、增强免疫、降血脂等作用^[3]。天然抗氧化肽食用安全性高, 生物活性强, 已成为近年来国内外科学工作者的研究热点。笔者在前期研究的基础上, 进一步采用酶法制备豇豆籽蛋白肽, 并探讨其抗氧化活性, 为其深度开发和综合利用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 原料: 豇豆籽, 市售。试剂: 碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶, 生化纯, 北京奥博星生物技术有限责任公司; DPPH, Sigma 公司; 氢氧化钠、盐酸、甲醛、无水乙醇、Tris-HCl 缓冲溶液、邻苯三酚, 均为分析纯。仪器: 酸度计, 德国; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 郑州长城科贸有限公司; 真空冷冻干燥机, 美国 Thermo Electron 公司; UNICO 7200 分光光度计, 上海尤尼柯仪器有限公司。

基金项目 西南科技大学大学生创新基金项目 (CX11-044)。

作者简介 杨晓童 (1991-), 男, 山东菏泽人, 本科生, 专业: 食品科学与工程, E-mail: yxt_swust@163.com。

收稿日期 2012-11-01

1.2 方法

1.2.1 豇豆籽蛋白的制备^[1]。豇豆籽经浸泡、去皮、烘干、磨粉等处理, 制成豇豆籽粉备用。豇豆籽粉用 12 倍去离子水分散完全, 然后用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 8.0, 35 °C 条件下低速搅拌 3 h 后离心 (3 000 r/min, 15 min), 所得的上清液用 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 4.4, 室温下放置 2 h 之后离心 (3 000 r/min, 15 min), 所得沉淀经透析后真空冷冻干燥, 即为豇豆籽蛋白。

1.2.2 蛋白质水解度的测定^[2]。水解度是指蛋白质水解过程中被裂解的肽键数与给定蛋白质的总肽键数间的比值。采用甲醛滴定法^[4]测定水解度, 计算公式为:

$$DH = 5.93 W_1 / W_2 \times 100\%$$

式中, W_1 为水解液中酶解出的游离氨基氮的质量浓度 (g/ml); W_2 为底物质量浓度 (g/ml)。

1.2.3 豇豆籽肽的制备。利用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶水解豇豆籽蛋白得到豇豆籽肽。在表 1 条件下进行水解, 灭酶处理后离心 (4 500 r/min, 20 min), 所得上清液经真空冷冻干燥, 即为豇豆籽肽, 再采用截留分子量为 500 D 的透析袋对酶解后的肽产品进行透析脱盐, 最后冷冻真空干燥后进行自由基清除活性分析。

表 1 不同酶水解豇豆籽蛋白质的条件

酶	底物浓度/%	酶浓度/%	温度/°C	pH	时间/h
碱性蛋白酶	5.0	2.5	50	8.5	5
木瓜蛋白酶	5.0	2.5	55	5.5	5

1.2.4 豇豆籽肽的 DPPH 自由基清除活性^[5]。DPPH 自由基是一种稳定的以氮为中心的质子自由基, 其乙醇溶液呈紫

色,并在波长 517 nm 处有强烈吸收,在有自由基清除剂存在时,自由基清除剂提供一个电子与 DPPH 的孤对电子配对,而使其褪色。褪色程度与其接受的电子呈定量关系,在波长 517 nm 处的吸光度变小,其变化程度与自由基清除程度呈线性关系,即吸光度越小,自由基清除剂的清除自由基能力越强。1.5 ml 浓度为 30 mg/L DPPH 中加入 1 ml 不同浓度的豇豆籽肽,以时间和样品浓度对吸光值、以样品浓度对清除率作图,根据拟合方程求出清除率为 50% 时所需要样品的浓度,即半数抑制浓度 IC_{50} 。

$$K = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

式中, K 为 DPPH 自由基的清除率; A_i 为加试样反应后 DPPH 溶液吸光度; A_j 为不加 DPPH,只加试样的溶液的吸光度; A_c 为不加试样,加 DPPH 的溶液的吸光度。

1.2.5 豇豆籽肽的羟基自由基清除活性^[6]。羟基自由基体系中加入水杨酸,生成有色物质 2,3-二羟基苯甲酸,在此体系中加入具有清除羟基自由基的被测物,从而使有色产物生成量减少,在反应体系中依次加入 0.1 ml 浓度为 9 mmol/L 的 $FeSO_4$ 、1 ml 浓度为 9 mmol/L 的水杨酸,以及 1 ml 不同的浓度豇豆籽肽,最后加入 1 ml 浓度为 8.8 mmol/L 的 H_2O_2 启动反应,波长 510 nm 处测定吸光值。

$$K = [A_0 - (A_i - A_j)] / A_0 \times 100\%$$

式中, K 为羟基自由基的清除率; A_0 为以 1 ml 去离子水代替样品溶液时空白对照溶液的吸光值; A_i 为加入一定浓度的样品溶液时溶液的吸光值; A_j 为质量浓度为 i 时以 1 ml 去离子水代替水杨酸时该浓度样品溶液的吸光值。

1.2.6 豇豆籽肽的超氧阴离子清除活性^[7]。在恒温 25 °C 条件下,量取浓度 50 mmol/L、pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液 3 ml,加入浓度 30 mmol/L 的邻苯三酚溶液 10 μ l,迅速混匀,在波长 325 nm 处每隔 30 s 测定 1 次吸光度值,反应 4 min 结束,以吸光度值对时间做图,求得斜率即为邻苯三酚自氧化速率 A_0 ;量取浓度 50 mmol/L、pH 8.2 的 Tris-HCl 缓冲溶液 3 ml,加入豇豆籽肽溶液 10 μ l,用上述方法测定样品在波长 325 nm 处的邻苯三酚自氧化速率 A 。

$$K = (A_0 - A) / A_0$$

式中 K 为超氧阴离子清除率; A_0 为邻苯三酚自氧化速率; A 为样品在波长 325 nm 处的邻苯三酚自氧化速率。

2 结果与分析

2.1 豇豆籽蛋白的提取率与水解度 豇豆籽采用碱提酸沉法提取蛋白质,其提取率为 22.13%。碱性蛋白酶处理的豇豆籽蛋白的水解度为 22.97%,用木瓜蛋白酶处理的豇豆籽蛋白的水解度为 20.88%,前者略高于后者。

2.2 豇豆籽肽的 DPPH 自由基清除活性 由图 1、2 可见,无论是碱性蛋白酶还是木瓜蛋白酶水解得到的肽,在不同浓度时,其吸光值都随时间延长而呈现下降趋势,但是在 25 min 以后几乎都不再有变化,说明反应已经达到平衡。所以在测定自由基清除效果时,选择时间为 25 min。

由图 3 可以看出,DPPH 自由基的清除率随豇豆籽肽浓度的增加而增大,用碱性蛋白酶处理得到的豇豆籽肽对 DP-

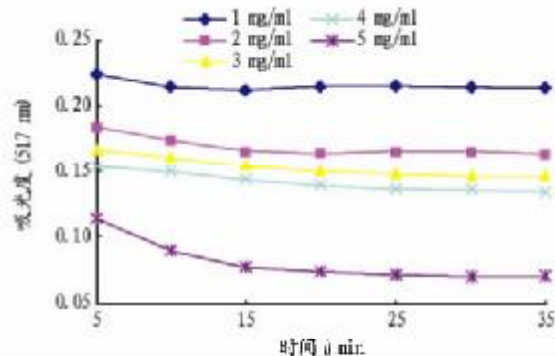


图1 不同浓度豇豆籽肽清除 DPPH 自由基反应曲线(碱性蛋白酶)

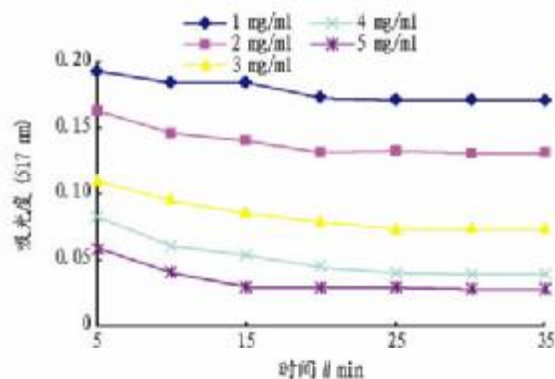


图2 不同浓度豇豆籽肽清除 DPPH 自由基反应曲线(木瓜蛋白酶)

PH 自由基清除活性的能力高于用木瓜蛋白酶处理的肽。在相应浓度范围内,DPPH 自由基最大清除率 63.92% (碱性蛋白酶)和 63.06% (木瓜蛋白酶),半数抑制浓度 IC_{50} 分别为 3.20 和 3.28 mg/ml。

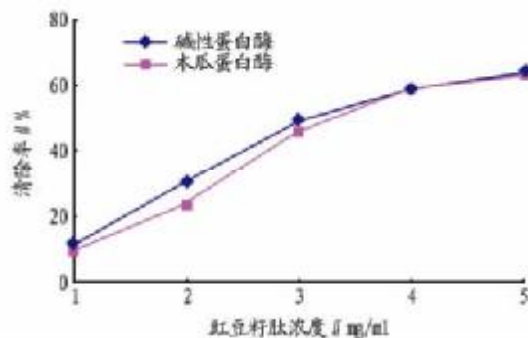


图3 豇豆籽肽对 DPPH 自由基的清除活性

2.3 豇豆籽肽的羟基自由基清除活性 在生命活动的氧化代谢过程中不断产生各种自由基,羟基自由基的反应活性最强,几乎可以和所有的细胞组分(核酸、蛋白质和脂质等)发生反应,对机体危害最大,常用于抗氧化物质的抗氧化性评价。由图 4、5 可以看出,不同浓度肽的吸光值随时间延长而逐渐下降,30 min 以后几乎都不再有变化,说明反应已经达到平衡。因此,加完反应物后 30 min 开始测定吸光值。

由图 6 可以看出,羟基自由基的清除率随豇豆籽肽浓度的增加而增大,用碱性蛋白酶处理得到的豇豆籽肽对羟基自由基清除活性的能力高于用木瓜蛋白酶处理的。羟基自由

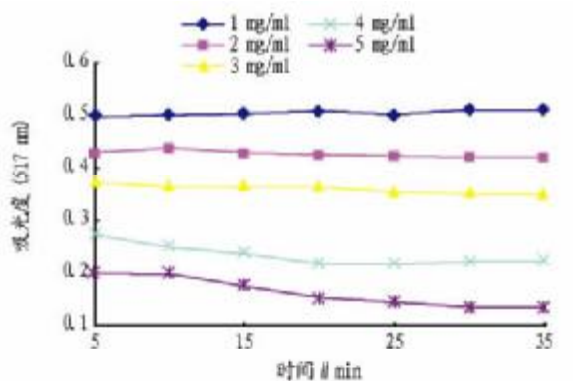


图4 不同浓度豇豆籽肽清除羟基自由基反应曲线(碱性蛋白酶)

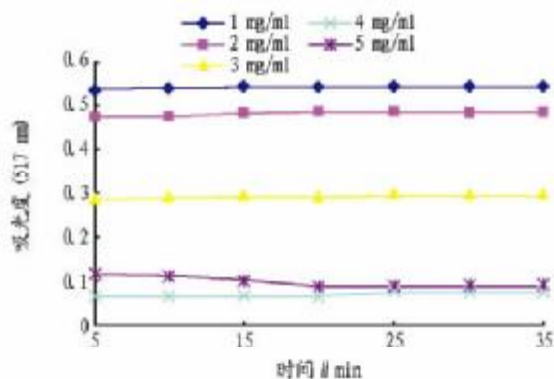


图5 不同浓度豇豆籽肽清除羟基自由基反应曲线(木瓜蛋白酶)

最大清除率分别为 87.66% (碱性蛋白酶)和 85.88% (木瓜蛋白酶), IC_{50} 分别为 4.21 和 4.89 mg/ml。

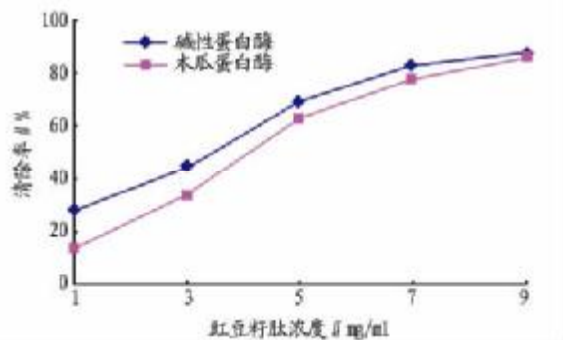


图6 豇豆籽肽对羟基自由基的清除活性

2.4 豇豆籽肽的超氧阴离子清除活性 由图7可以看出,使用碱性蛋白酶处理得到的豇豆籽肽的超氧阴离子自由基的清除活性,在豇豆籽肽浓度为 5 mg/ml 时达到峰值;而使用木瓜蛋白酶处理得到的豇豆籽肽的超氧阴离子自由基的清除活性随豇豆籽肽浓度的增加而增大。在相应浓度范围内,超氧阴离子自由基最大清除率 64.06% (碱性蛋白酶)和 47.92% (木瓜蛋白酶),其机理有待进一步分析。

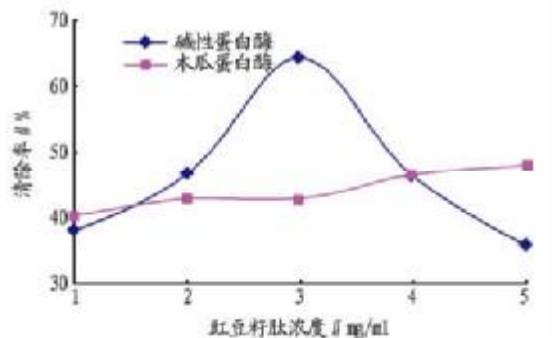


图7 豇豆籽肽对超氧阴离子自由基的清除活性

3 结论

用碱性蛋白酶处理的豇豆籽蛋白的水解度比用木瓜蛋白酶处理的高。DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基的清除率和半数抑制浓度等探究结果表明,碱性蛋白酶处理得到的豇豆籽肽的活性能力高于木瓜蛋白酶处理得到的豇豆籽肽。

参考文献

- [1] 李安林,熊双丽.豇豆籽蛋白的氨基酸含量与营养价值评价[J].营养健康,2008,25(4):147-149.
- [2] 马海乐,刘斌.酶法制备大米抗氧化肽的蛋白酶筛选[J].农业机械学报,2010,41(11):119-123.
- [3] 朱小聪,戴昱,云田田,等.酶解芥蓝籽蛋白制备抗氧化肽工艺的优化[J].食品工业科技,2008,29(6):238-241.
- [4] 侯曼玲.食品分析[M].北京:化学工业出版社,2011:128-129.
- [5] 李安林,熊双丽.接骨木茎总黄酮的提取及 DPPH 自由基清除活性[J].中国食品添加剂,2010(5):113-116.
- [6] 熊双丽,李安林.夏枯草多糖的清除自由基及抗氧化性[J].食品研究与开发,2010,31(11):61-64.
- [7] 朴珊善,王昕,侯聚敏.乳清蛋白酶解物抗氧化能力的研究[J].农产品加工:创新版,2011(5):59-64.

(上接第 180 页)

训,督促并组织他们学习我国的旅游政策法规,规范他们的服务操作水平,端正服务态度,使他们具备承担乡村旅游服务工作的基本能力,也要重视对乡村旅游经营管理人员的培训。

参考文献

- [1] 中国旅游出版社,中华人民共和国国家旅游局.中国旅游年鉴 2010 [M].北京:中国旅游出版社,2010.
- [2] 中华人民共和国旅游局.中国旅游年鉴 2011 [M].北京:中国旅游出版社,2011.
- [3] 李丹.农村剩余劳动力素质提升与就业途径——以发展乡村旅游为契机[J].闽江学院学报,2008(4):49-53.
- [4] 马伦姣.乡村旅游的就业效应分析及对策建议[J].经济研究导刊,2010(11):109-111.

- [5] 唐代剑,黎彦.乡村旅游对农民增收、就业实证研究[J].改革与战略,2009(12):122-125.
- [6] 冯淑华,沙润.乡村旅游中农村妇女就业与发展研究——以江西婺源为例[J].妇女研究论丛,2007(1):27-31.
- [7] 何可凝.以乡村旅游促进农村劳动力多元化就业问题探讨——基于长三角乡村旅游的基础数据分析[J].常州工学院学报,2008(4):96-99.
- [8] 周梅,崔峰,江文娟,等.乡村旅游就业效应的社区居民感知研究——以南京市江心洲为例[J].旅游论坛,2011(1):87-92.
- [9] 布仁呼,韩颖.关于发挥旅游业吸纳劳动力潜力的思考[J].技术经济,2001(4):13-15.
- [10] XIAO X. Research on the Marketing of Rural Tourism on the Basis of Market Segmentation[J]. Asian Agricultural Research,2011,3(8):1-4,7.
- [11] 郑菊花.农家乐休闲旅游的深度开发研究——以金华市为例[J].宁夏农林科技,2011,52(7):23-24.