

膜分离蚕豆蛋白酶解产物的理化性质及生物活性

邓永蓉¹, 韩丽娟^{1,2}, 杨希娟^{1,2}, 党斌^{1,2}, 周雯¹, 张雪¹, 代云礼¹

(1. 青海大学农牧学院, 西宁 810016; 2. 青海省农林科学院 青海省青藏高原农产品加工重点实验室, 西宁 810016)

摘要:以新鲜蚕豆为原料, 采用碱溶酸沉法提取蚕豆蛋白, 采用4种不同蛋白酶对蚕豆蛋白进行单酶或双酶酶解, 通过比较蚕豆蛋白水解度和多肽得率筛选出最优的两种酶复合酶解蚕豆蛋白, 将复合酶解液通过膜分离技术分离得到 BBPHs - I (< 1 kDa)、BBPHs - II (1 ~ 3 kDa)、BBPHs - III (3 ~ 5 kDa)、BBPHs - IV (5 ~ 10 kDa)、BBPHs - V (> 10 kDa) 5个不同分子质量的组分, 对5个组分的氨基酸组成、紫外光谱、红外光谱进行分析, 同时通过测定体外抗氧化活性及 α -葡萄糖苷酶抑制率表征其活性。结果表明: 选用菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶对蚕豆蛋白进行复合酶解; 与膜分离前比较, 膜分离后 10 kDa 以下的蚕豆蛋白酶解产物总氨基酸含量增加, BBPHs - II、BBPHs - III、BBPHs - IV 的疏水氨基酸含量较高, 此外 BBPHs - III 的总氨基酸、必需氨基酸、疏水氨基酸、芳香氨基酸含量均为最高, 分别为 65.304%、19.222%、20.762%、8.769%。不同分子质量的蚕豆蛋白酶解产物表现出一定体外抗氧化能力, 当质量浓度为 10 mg/mL 时, BBPHs - IV 的 ABTS 自由基清除率可达 (27.89 ± 0.01)%, BBPHs - II 的 DPPH 自由基清除率可高达 (57.70 ± 0.00)%; 当质量浓度在 2 ~ 32 mg/mL 范围内, 不同分子质量蚕豆蛋白酶解产物的 α -葡萄糖苷酶抑制活性呈剂量依赖关系, BBPHs - II、BBPHs - III、BBPHs - IV 表现出良好的 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 质量浓度为 32 mg/mL 时 BBPHs - III 的 α -葡萄糖苷酶活性抑制率最佳, 达到 (86.56 ± 1.23)%。因此, 通过膜分离技术得到的小分子质量的蚕豆蛋白酶解产物具有更好的抗氧化活性和 α -葡萄糖苷酶抑制活性, 具有良好的开发及应用前景。

关键词:蚕豆蛋白; 酶解产物; 膜分离; 体外抗氧化; α -葡萄糖苷酶

中图分类号: TS214.9; Q814.9 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2022)06-0092-08

Physicochemical properties and biological activity of broad bean protein hydrolysate obtained by membrane separation technology

DENG Yongrong¹, HAN Lijuan^{1,2}, YANG Xijuan^{1,2}, DANG Bin^{1,2}, ZHOU Wen², ZHANG Xue¹, DAI Yunli¹

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. Qinghai Tibetan Plateau Agricultural Processing Key Laboratory, Qinghai Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Xining 810016, China)

Abstract: Fresh broad beans were used as raw materials, broad bean protein was extracted by alkali solution and acid precipitation. Four different proteases were used for single enzyme or double enzyme hydrolysis of broad bean protein, and the best two enzymes were selected for the complex enzymatic hydrolysis of broad bean protein by comparing the hydrolysis degree and polypeptide yield of broad bean

protein. Then the broad bean protein hydrolysate (BBPHs) were fractionated by membrane separation into five fractions of BBPHs - I (< 1 kDa), BBPHs - II (1 - 3 kDa), BBPHs - III (3 - 5 kDa), BBPHs - IV (5 - 10 kDa), BBPHs - V (> 10 kDa). The amino acid composition, UV and IR spectra of the five fractions were analyzed,

收稿日期: 2021-04-28; 修回日期: 2022-02-02

基金项目: 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室自主课题(2018-ZZ-03)

作者简介: 邓永蓉(1998), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能性食品(E-mail) 2856057538@qq.com。

通信作者: 韩丽娟, 副教授, 博士(E-mail) hlj880105@163.com。

and their biological activities were characterized by in vitro antioxidant activity and α -glucosidase inhibition rate. The results showed that pineapple protease and papain were selected for the complex enzymatic hydrolysis of broad bean protein. The total amino acid content of broad bean protease hydrolysate below 10 kDa after membrane separation increased compared with that without membrane separation, and the hydrophobic amino acid contents of BBPHs - II, BBPHs - III and BBPHs - IV were higher. In addition, BBPHs - III had the highest content of total amino acid, essential amino acid, hydrophobic amino acid and aromatic amino acid with 65.304%, 19.222%, 20.762% and 8.769% respectively. Protein hydrolysate components with different molecular weights showed certain in vitro antioxidant capacity. The ABTS free radical scavenging rate of the BBPHs - IV could reach $(27.89 \pm 0.01)\%$, DPPH free radical scavenging rate of the BBPHs - II could reach $(57.70 \pm 0.00)\%$ at 10 mg/mL mass concentration. When the mass concentration ranged from 2 mg/mL to 32 mg/mL, the α -glucosidase inhibitory activities of different molecular weight broad bean hydrolysates showed a dose-dependent relationship. BBPHs - II, BBPHs - III and BBPHs - IV showed good α -glucosidase inhibitory activities, and BBPHs - III possessed the best α -glucosidase inhibition rate $[(86.56 \pm 1.23)\%]$ at 32 mg/mL mass concentration. Therefore, the small molecular weight broad bean protein hydrolysate obtained by membrane separation had higher antioxidant activity and α -glucosidase inhibitory activity, and had good development and application prospects.

Key words: broad bean protein; enzymatic hydrolysate; membrane separation; in vitro antioxidation; α -glucosidase

蚕豆(*Vicia faba* L.)又名胡豆、佛豆、罗汉豆等,作为一种可食性资源食用历史悠久。我国地域辽阔,种植蚕豆品种多、范围广,主要分布于四川、云南、湖南、湖北、青海等省,是世界上蚕豆种植大国之一^[1]。由于青海种植的蚕豆品质优、无虫害,深受市场欢迎^[2]。

蚕豆的蛋白质含量为25%~30%,是制作低脂高蛋白食品的理想原料^[3]。目前国内对蚕豆蛋白的研究主要集中在蛋白质的提取、蚕豆蛋白酶解多肽的制备及工艺优化方面^[4-6],对于不同分子质量蚕豆蛋白酶解产物的分离及生物活性研究较少。蚕豆蛋白酶解产物具有易吸收^[4]、降胆固醇^[7]、抗氧化^[8-9]、抗菌^[10]、降血压^[11]、抗糖尿病等作用,其分离纯化有多种方法,其中膜分离原理简单、操作方便,无化学污染^[12],且可以将酶解产物分离成不同分子质量的组分,从而可以进一步研究各组分的理化性质及生物活性,对酶解产物研究开发有应用价值^[13]。如:黄文凯^[14]采用膜分离富集具有免疫活性的大豆肽;吴红洋等^[15]使用超滤制备的花椒籽蛋白降血压肽ACE抑制率得到提高。

本课题组前期研究表明,蚕豆蛋白经不同蛋白酶处理后氨基酸的种类和含量有所增加,且酶解产物相对于蚕豆蛋白本身具有更高的体外抗氧化活性,在此基础上,本文利用不同蛋白酶酶解蚕豆蛋

白,筛选出两种最优的酶进行复合酶解,再采用膜分离技术分级分离蚕豆蛋白酶解产物,进一步研究酶解产物的抗氧化活性及 α -葡萄糖苷酶抑制活性,为蚕豆的精深加工奠定理论基础,对深层次开发蚕豆蛋白有一定的实际应用意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

新鲜蚕豆,采集于青海大通;菠萝蛋白酶(300 U/mg)、木瓜蛋白酶(800 U/mg)、胃蛋白酶(10 000 U/g)、胰蛋白酶(250 U/mg),福州飞净生物科技有限公司;标准牛血清白蛋白,南京都莱生物科技有限公司;V_C,南京奥多福尼生物科技有限公司;DPPH(1,1-二苯基-2-苦肟基自由基)、 α -葡萄糖苷酶,北京索莱宝科技有限公司;ABTS(2,2-联氨基双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐,梯希爱化成工业发展有限公司;过硫酸钾、碳酸钠、氢氧化钠、浓盐酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、无水乙醇、三氯乙酸等均为分析纯,天津市河东区红岩试剂厂。

1.1.2 仪器与设备

HHS-4S 电子恒温不锈钢水浴锅,上海仪器纱筛厂;JA1003 电子天平,上海良平仪器仪表有限公司;DC-350 高速多功能粉碎机,浙江武义鼎藏日用

金属制品厂;pHS-3C 实验室 pH 计,上海佑科仪器仪表有限公司;UV-2600 紫外可见分光光度计,岛津企业管理有限公司;LR10M 大容量冷冻离心机,湖南赫西仪器装备有限公司;GS55-9 冷冻干燥机,基因有限公司;K9840 自动凯氏定氮仪,山东海能科学仪器有限公司;FlowMem-0005-PN40 高压平板膜小试设备,厦门福美科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 蚕豆蛋白的提取

参考文献[4,16]对蚕豆蛋白进行提取,具体提取工艺为:新鲜蚕豆→去皮→冷冻干燥→粉碎过筛→碱溶(0.5 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0,50℃ 浸提 1 h)→离心(3 000 r/min,20 min)→酸沉(1 mol/L HCl 调节 pH 至 4.8)→离心(3 000 r/min,20 min)→沉淀冷冻干燥→蚕豆蛋白。

1.2.2 蚕豆蛋白酶解产物的制备

参考文献[4-5,17],称取 4 g 蚕豆蛋白配制成质量分数为 10% 的溶液,90℃ 预处理 10 min,调节 pH 至适宜的酶解环境,分别加入 0.08 g 胃蛋白酶、胰蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶或 0.08 g 胃蛋白酶+0.08 g 胰蛋白酶、0.08 g 菠萝蛋白酶+0.08 g 木瓜蛋白酶进行酶解(各酶酶解条件见表 1),酶解结束后取出于 90℃ 灭酶 10 min 终止反应,冷却后测定反应体系的 pH,并用 0.2 mol/L NaOH 标准溶液调节至酶解前体系的 pH,并记录 NaOH 的消耗体积^[18]。

表 1 蛋白酶酶解条件

蛋白酶	pH	温度/℃	时间/h
胃蛋白酶	2.0	45	4
胰蛋白酶	8.0	55	4
菠萝蛋白酶	6.5	45	4
木瓜蛋白酶	6.5	55	4
菠萝蛋白酶+木瓜蛋白酶	6.5	50	4
胃蛋白酶+胰蛋白酶	2.0/8.0	40/40	2/2

注:胃蛋白酶+胰蛋白酶采取先添加胃蛋白酶,再添加胰蛋白酶的分段酶解方式

将菠萝蛋白酶+木瓜蛋白酶酶解液于 3 000 r/min 离心 20 min 后倒出上清液。将上清液装入透析袋脱盐 48 h,冷冻干燥后置于 -80℃ 备用。

1.2.3 水解度及多肽得率的测定

1.2.3.1 水解度(DH)的测定

参考文献[5]采用 pH-stat 法测定蚕豆蛋白的水解度。计算公式如下:

$$H_D = B \times N_b \times \frac{1}{a} \times \frac{1}{M} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: H_D 为水解度; B 为 NaOH 的消耗体积, mL; N_b 为 NaOH 浓度, mol/L; M 为蛋白质的质量, g; h_{tot} 为蛋白质中肽键总数, mmol/g, 本试验取 7.75; a 为蚕豆蛋白氨基的平均解离度, 本试验取 0.89。

1.2.3.2 多肽得率的测定

参考文献[19-20],采用双缩脲法制作标准曲线,以吸光值(y)与牛血清白蛋白质量浓度(x)进行线性回归,得到回归方程 $y = 0.059x + 0.3448$, $R^2 = 0.999$ 。根据曲线计算得出样品溶液中的多肽质量浓度,按下式计算多肽得率(Y)。

$$Y = cV/m \times 100\% \quad (2)$$

式中: c 为酶解液多肽质量浓度; V 为酶解液体积; m 为蚕豆蛋白质量。

1.2.4 蚕豆蛋白酶解产物的分离

参考文献[15]并作改动,取冷冻干燥后的双酶酶解产物,用超纯水配制成质量分数为 5% 的蚕豆蛋白酶解液,于 4 000 r/min 离心 20 min 后取上清液,严格按照膜分离设备的操作要求,将上清液分别经过 1、3、5、10 kDa 滤膜分离,得到 5 个不同分子质量的酶解产物组分,再经过 RO 膜处理得到不同分子质量酶解产物组分的浓缩液,分别为 BBPHs-I (<1 kDa)、BBPHs-II (1~3 kDa)、BBPHs-III (3~5 kDa)、BBPHs-IV (5~10 kDa)、BBPHs-V (>10 kDa),冷冻干燥后于 -80℃ 保存,计算膜分离后各组分在酶解产物中所占比例。

1.2.5 蛋白质含量的测定

参照 GB 5009.5—2016 采用凯氏定氮法进行蛋白质含量测定。

1.2.6 氨基酸含量测定

按 GB/T 5009.124—2003 采用氨基酸自动分析仪测定未膜分离酶解产物与膜分离后的不同分子质量组分的氨基酸含量。

1.2.7 紫外光谱分析

准备 0.2 mg/mL 未膜分离与膜分离酶解产物溶液,使用紫外可见分光光度计在 200~800 nm 范围内扫描得到样品的紫外可见光谱。

1.2.8 红外光谱分析

取 2 mg 未膜分离与膜分离后的酶解产物,与 0.2 g KBr 粉末混合压片,在室温下使用红外分光光度计扫描记录样品的红外光谱,扫描范围为 500~4 000 cm^{-1} 。

1.2.9 蚕豆蛋白酶解产物抗氧化活性测定

1.2.9.1 蚕豆蛋白酶解产物 ABTS 自由基清除能力测定

将 7 mmol/L ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸

钾溶液等体积混合。吸取 1 mL ABTS 混合溶液,用无水乙醇稀释,使其在 734 nm 处的吸光值为 0.7 ± 0.1 ,以此为 ABTS 工作液。样品用蒸馏水稀释至质量浓度分别为 10.0、5.0、2.5、1.25、0.625 mg/mL 的溶液;分别与 ABTS 工作液混合后,置于室温反应 6 min,以无水乙醇为空白调零,于 734 nm 处测定吸光值,以相同质量浓度的 V_c 为阳性对照,按下式计算样品对 ABTS 自由基的清除率(Y_1)。

$$Y_1 = (1 - A'/A) \times 100\% \quad (3)$$

式中: A 为 ABTS 溶液吸光值; A' 为 ABTS 溶液加入样品后的吸光值。

1.2.9.2 蚕豆蛋白酶解产物 DPPH 自由基清除能力测定

样品用无水乙醇稀释至质量浓度分别为 10.0、5.0、2.5、1.25、0.625 mg/mL 的溶液;将不同质量浓度样品与 0.2 mmol/L DPPH 试剂混合,室温下反应 1 h,以无水乙醇为空白调零,于 517 nm 处测定其吸光值,以相同质量浓度的 V_c 为阳性对照,按下式计算样品对 DPPH 自由基的清除率(Y_2)。

$$Y_2 = (1 - A'/A) \times 100\% \quad (4)$$

式中: A 为 DPPH 溶液的吸光值; A' 为 DPPH 溶液加入样品后的吸光值。

1.2.10 蚕豆蛋白酶解产物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制能力测定

将不同组分的酶解产物用蒸馏水配制成不同质量浓度(32、16、8、4、2 mg/mL),参考文献[21]并按表 2 各组反应物体积加样,测定空白组、阴性对照组、样品空白组、样品组在 405 nm 处的吸光值,以阿卡波糖为阳性对照,按公式(5)计算样品对 α -葡萄糖苷酶的抑制率(Y_3)。

表 2 α -葡萄糖苷酶的活性抑制试验反应体系

试剂	添加量/ μ L			
	空白组	阴性对照组	样品空白组	样品组
PBS 溶液 (pH 6.8)	200	180	180	160
PNPG 溶液 (4.8 mmol/L)	40	40	40	40
样品溶液	0	0	20	20
酶溶液 (6 U/mL)	0	20	0	20
Na_2CO_3 终止液 (1.5 mol/L)	80	80	80	80

注:加入样品溶液后,充分混匀,37℃下孵化 15 min;加入酶溶液后充分混匀,37℃下反应 30 min

$$Y_3 = \frac{(A_3 - A_4) - (A_1 - A_2)}{A_3 - A_4} \times 100\% \quad (5)$$

式中: A_1 为样品组吸光值; A_2 为样品空白组吸光

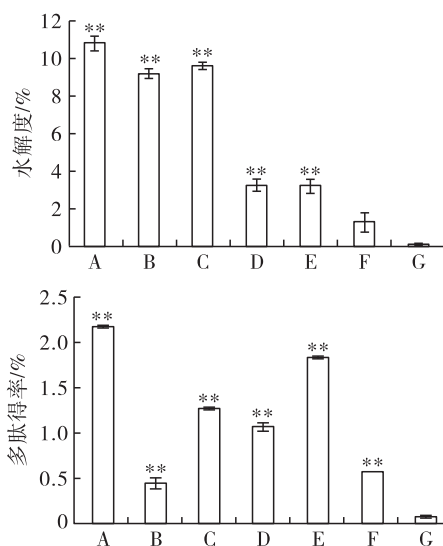
值; A_3 为阴性对照组吸光值; A_4 为空白组吸光值。

1.2.11 数据处理

所有试验数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS21.0 软件进行单因素方差分析,以 $p < 0.05$ 表示显著性差异, $p < 0.01$ 表示极显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶解能力的比较(见图 1)



注:A. 菠萝蛋白酶 + 木瓜蛋白酶;B. 胃蛋白酶 + 胰蛋白酶;C. 菠萝蛋白酶;D. 胃蛋白酶;E. 木瓜蛋白酶;F. 胰蛋白酶;G. 未处理组。与未处理比较,* $p < 0.05$,** $p < 0.01$

图 1 不同酶水解能力的比较

水解度(DH)是判断酶水解能力的重要指标。由图 1 可知,与未酶解比较,菠萝蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶处理的蚕豆蛋白水解度及多肽得率都极显著上升($p < 0.01$)。其中,菠萝蛋白酶酶解产物的水解度高达(9.61 ± 0.19)%,木瓜蛋白酶酶解产物的多肽得率高达(1.83 ± 0.01)%。通过复合酶解试验得出,菠萝蛋白酶与木瓜蛋白酶复合酶解蚕豆蛋白的水解度最高,且所得酶解产物的多肽得率高达(2.18 ± 0.01)%,与胃、胰蛋白酶复合酶解相比有极显著差异($p < 0.01$)。因此,综合考虑选用菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶作为双酶酶解最优水解酶。

2.2 膜分离后蚕豆蛋白酶解产物各组分所占比例

取 5 g 蚕豆蛋白酶解产物按 1.2.4 方法进行分离,得到的 5 个不同分子质量的组分所占比例见表 3。

表 3 膜分离后蚕豆蛋白酶解产物各组分所占比例

组分	质量/mg	占比/%
BBPHs - I (<1 kDa)	217.5	7.6
BBPHs - II (1~3 kDa)	432.1	15.1
BBPHs - III (3~5 kDa)	510.9	17.9
BBPHs - IV (5~10 kDa)	664.7	23.2
BBPHs - V (>10 kDa)	1 035.7	36.2

由表3可知, BBPHs - I (< 1 kDa)、BBPHs - II (1 ~ 3 kDa)、BBPHs - III (3 ~ 5 kDa)、BBPHs - IV (5 ~ 10 kDa)、BBPHs - V (> 10 kDa) 组分所占比例分别为 7.6%、15.1%、17.9%、23.2%、36.2%。

2.3 氨基酸含量

未膜分离与经膜分离所得不同分子质量蚕豆蛋白酶解产物组分的氨基酸含量见表4。

表4 未膜分离与膜分离后不同分子质量蚕豆蛋白酶解产物组分的氨基酸含量

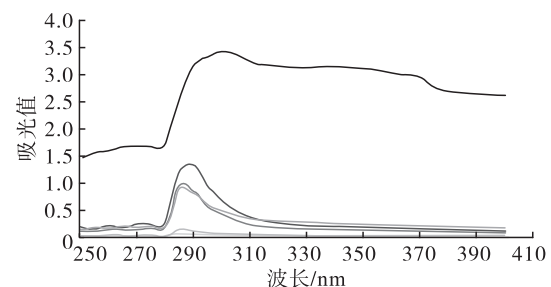
氨基酸	未膜分离 酶解产物	BBPHs - I (< 1 kDa)	BBPHs - II (1 ~ 3 kDa)	BBPHs - III (3 ~ 5 kDa)	BBPHs - IV (5 ~ 10 kDa)	BBPHs - V (> 10 kDa)	%
天冬氨酸(Asp)	3.010	2.139	4.056	3.011	4.377	2.686	
苏氨酸(Thr) *	1.027	0.534	2.016	0.975	3.260	0.825	
丝氨酸(Ser)	2.507	2.756	4.570	4.089	2.791	2.562	
谷氨酸(Glu)	3.515	6.792	6.033	4.051	5.729	3.567	
甘氨酸(Gly)	3.893	4.105	5.869	6.775	4.313	3.568	
丙氨酸(Ala) Δ	1.576	1.501	2.634	2.874	2.012	0.956	
半胱氨酸(Cys)	4.679	4.921	4.587	5.053	4.821	3.342	
缬氨酸(Val) * Δ	5.789	8.011	7.695	8.405	7.032	5.550	
蛋氨酸(Met) * Δ	0.521	0.347	0.482	0.632	0.102	0.417	
异亮氨酸(Ile) * Δ	1.332	1.508	1.960	2.579	1.717	1.859	
亮氨酸(Leu) * Δ	1.409	1.676	2.563	2.012	3.089	2.691	
酪氨酸(Tyr) \circ	5.992	5.565	2.343	8.227	7.052	3.450	
苯丙氨酸(Phe) * $\Delta\circ$	1.956	0.886	0.903	0.542	0.753	1.562	
组氨酸(His)	2.565	2.567	1.506	2.493	2.010	1.756	
赖氨酸(Lys) *	4.420	4.324	3.024	4.077	2.118	1.862	
精氨酸(Arg)	3.376	4.573	4.550	5.791	4.338	4.101	
脯氨酸(Pro) Δ	1.276	1.681	2.308	3.718	2.066	1.492	
TAA	48.843	53.886	57.099	65.304	57.580	42.246	
EAA	16.454	17.286	18.643	19.222	18.071	14.766	
HAA	13.859	15.610	18.545	20.762	16.771	14.527	
AAA	7.948	6.451	3.246	8.769	7.805	5.012	
EAA/TAA	33.688	32.079	32.650	29.435	31.384	34.952	

注: TAA. 总氨基酸; EAA. 必需氨基酸; HAA. 疏水氨基酸; AAA. 芳香氨基酸; * 为 EAA; Δ 为 HAA; \circ 为 AAA

由表4可看出, 蚕豆蛋白酶解产物共检出17种氨基酸, 其中7种必需氨基酸。经膜分离后10 kDa以下的蚕豆蛋白酶解产物的总氨基酸和必需氨基酸含量均增加。5种膜分离蚕豆蛋白酶解产物中, BBPHs - III的总氨基酸、必需氨基酸、疏水氨基酸、芳香氨基酸含量均为最高, 分别为65.304%、19.222%、20.762%、8.769%, 明显高于未膜分离的酶解产物; 6种蚕豆蛋白酶解产物中均含有Phe、Ile、Leu、Val、Pro等疏水氨基酸, 说明蚕豆蛋白酶解产物有较好的抗氧化活性; 而对于Tyr、Phe等芳香氨基酸, BBPHs - II中含量较少, 为3.246%, BBPHs - III中含量最高, 为8.769%, 芳香氨基酸可通过电子供体作用将自由基转化为稳定的分子, 因此推断BBPHs - III有较高的生物活性。

2.4 紫外光谱分析

图2为膜分离前后蚕豆蛋白酶解产物的紫外光谱。紫外吸收光谱法可以根据最大吸收峰的位置及强度判断其共轭体系的类型。



注: 285 nm 波长处紫外光谱由下到上依次为未膜分离、BBPHs - I、BBPHs - II、BBPHs - III、BBPHs - IV、BBPHs - V

图2 膜分离前后蚕豆蛋白酶解产物的紫外光谱

由图2可看出,在200~800 nm波长范围内,6种蚕豆蛋白酶解产物的紫外光谱在285 nm处都有最高吸收峰,判断是 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁所引起。而膜分离后酶解产物与未膜分离相比吸收强度有不同程度的升高,可能是膜分离后酶解产物的多肽链侧链发生变化导致紫外吸收强度发生了变化。

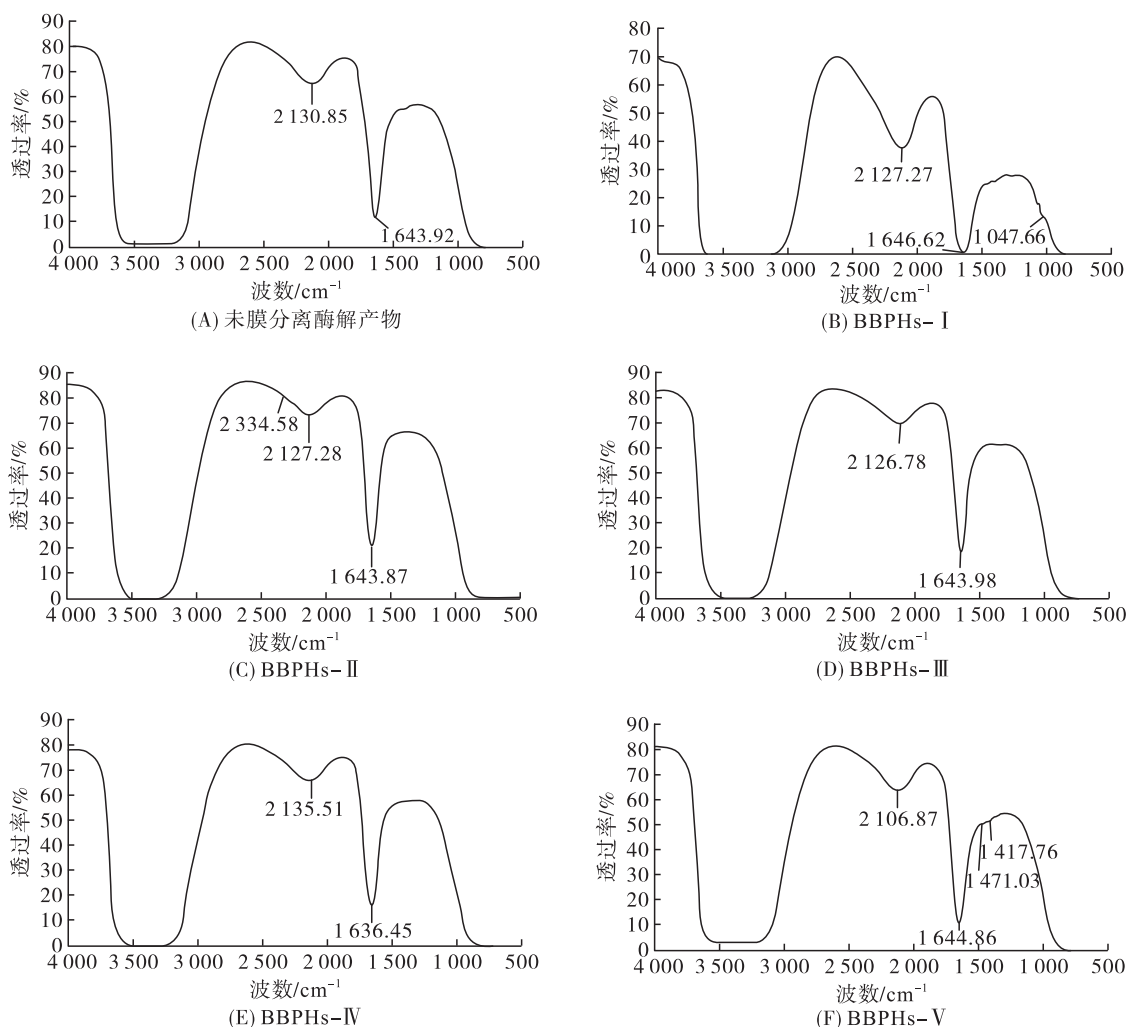


图3 膜分离前后蚕豆蛋白酶解产物的红外光谱

由图3可知,6种蚕豆蛋白酶解产物的蛋白质二级结构有所差异。其中:BBPHs-I在 1646.62 cm^{-1} 处的强吸收峰,是 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动而具有的 α -螺旋结构;BBPHs-II、BBPHs-III、BBPHs-V分别在 1643.87 、 1643.98 、 1644.86 cm^{-1} 处的强吸收峰为无规卷曲;BBPHs-IV在 1636.45 cm^{-1} 处的强吸收峰为 β -折叠;而未膜分离蚕豆蛋白酶解产物在 1643.92 cm^{-1} 处的强吸收峰为无规卷曲。

2.6 膜分离前后蚕豆蛋白酶解产物的抗氧化活性

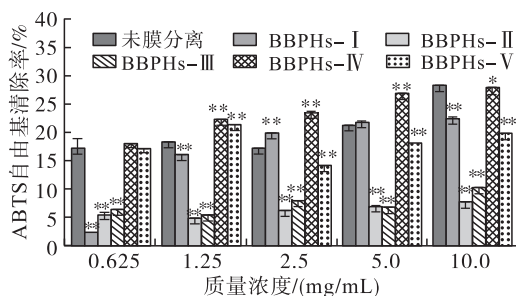
2.6.1 对ABTS自由基的清除能力(见图4)

由图4可看出,6种蚕豆蛋白酶解产物具有一定的ABTS自由基清除能力。在 $0.625\sim 5.0\text{ mg/mL}$ 质

2.5 红外光谱分析

图3为膜分离前后蚕豆蛋白酶解产物的红外光谱。红外吸收峰与化合物的官能团有关,可用于分子结构特征分析^[22]。酰胺I带波数范围为 $1600\sim 1700\text{ cm}^{-1}$,可以体现蛋白质的 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲等二级结构。

量浓度范围内,5种膜分离组分中BBPHs-IV表现出较高的ABTS自由基清除能力,均大于未膜分离的;此外,BBPHs-II和BBPHs-III的ABTS自由基清除能力趋势相近。当质量浓度为 10 mg/mL 时,BBPHs-IV对ABTS自由基的清除率达到 $(27.89 \pm 0.01)\%$,与BBPHs-II和BBPHs-III相比差异极显著($p < 0.01$),相较于BBPHs-V组分其ABTS自由基清除率高出6.35个百分点($p < 0.01$)。说明5种膜分离组分中BBPHs-IV的ABTS自由基清除能力强且具有稳定性,但质量浓度为 10 mg/mL 时低于未膜分离组分的ABTS自由基清除率,可能与未膜分离酶解产物中氨基酸组成有关。



注: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 与未膜分离酶解产物比较。下同

图4 蚕豆蛋白酶解产物的 ABTS 自由基清除活性

2.6.2 对 DPPH 自由基的清除能力(见图 5)

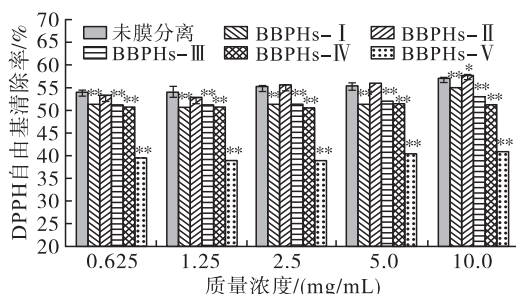


图5 蚕豆蛋白酶解产物的 DPPH 自由基清除活性

由图 5 可看出,与膜分离前比较,蚕豆蛋白酶解产物经过膜分离处理后 DPPH 自由基清除率有所降低(除 BBPHs - II),但各组分仍表现出良好的 DPPH 自由基清除能力。5 种膜分离组分中, BBPHs - II 组分表现较高的 DPPH 自由基清除能力,而 BBPHs - V 的 DPPH 自由基清除率最低;当质量浓度为 10 mg/mL 时, BBPHs - II 组分 DPPH 自由基清除率为 $(57.70 \pm 0.00)\%$ 。研究表明,氨基酸的疏水性与酶解产物抗氧化活性密切相关, BBPHs - I、BBPHs - II、BBPHs - III、BBPHs - IV 中疏水氨基酸含量较高,因此分子质量小于 10 kDa 的膜分离蚕豆蛋白酶解产物具有较好 DPPH 自由基清除能力,说明小分子质量的酶解产物清除自由基能力的优势值得进一步研究。

2.7 膜分离前后蚕豆蛋白酶解产物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制能力

未膜分离与膜分离后的蚕豆蛋白酶解产物对 α -葡萄糖苷酶活性抑制结果如图 6 所示。

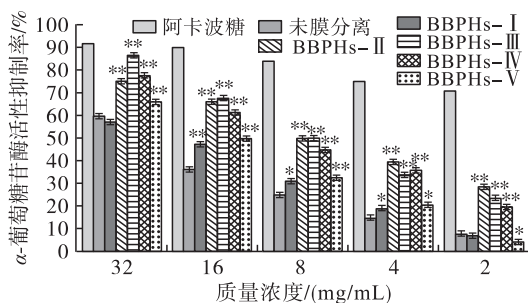


图6 蚕豆蛋白酶解产物对 α -葡萄糖苷酶活性的抑制率

由图 6 可看出,蚕豆蛋白酶解产物对 α -葡萄糖苷酶有一定的抑制作用,且 5 个膜分离组分在质量浓度 4 ~ 16 mg/mL 范围内的 α -葡萄糖苷酶抑制率均显著高于未分离酶解产物。在 2 ~ 32 mg/mL 质量浓度范围内,蚕豆蛋白酶解产物的 α -葡萄糖苷酶抑制率呈剂量依赖性。在 2 ~ 4 mg/mL 质量浓度下, BBPHs - II 的 α -葡萄糖苷酶抑制率高于其他组分。当质量浓度为 8 ~ 32 mg/mL 时, BBPHs - III 的 α -葡萄糖苷酶抑制率最高,且在 32 mg/mL 时可达 $(86.56 \pm 1.23)\%$,与阿卡波糖的抑制率 $(91.38 \pm 0.931)\%$ 相近,相比于未分离酶解产物增长了 26.83 百分点;32 mg/mL 质量浓度下 BBPHs - IV 的抑制率略高于 BBPHs - II 的,为 $(77.76 \pm 0.38)\%$ 。在质量浓度 2、32 mg/mL 时, BBPHs - I 组分的 α -葡萄糖苷酶抑制率与未膜分离相比差异均不显著。在 2 mg/mL 时, BBPHs - V 的 α -葡萄糖苷酶抑制率显著低于未膜分离蚕豆蛋白酶解产物的。综上,5 个膜分离组分中, BBPHs - II、BBPHs - III、BBPHs - IV 组分具有较好的 α -葡萄糖苷酶抑制效果,可能与此 3 个组分含有较多的 Ala、Val、Met、Ile、Pro 等疏水氨基酸有关,其机制还有待进一步研究。综上所述,1 ~ 10 kDa 的膜分离蚕豆蛋白酶解产物可能是治疗糖尿病的良好药物制剂。

3 结论

通过比较酶解蚕豆蛋白的水解度和多肽得率,选择菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶为复合酶对蚕豆蛋白进行酶解,通过膜分离得到不同分子质量的酶解产物组分并评价其生物活性。结果表明:膜分离后得到 BBPHs - I (< 1 kDa, 7.6%)、BBPHs - II (1 ~ 3 kDa, 15.1%)、BBPHs - III (3 ~ 5 kDa, 17.9%)、BBPHs - IV (5 ~ 10 kDa, 23.2%)、BBPHs - V (> 10 kDa, 36.2%) 5 个不同分子质量组分。通过氨基酸含量分析,膜分离后 10 kDa 以下的蚕豆蛋白酶解产物的总氨基酸相对于未膜分离酶解产物有所增加,且 BBPHs - II、BBPHs - III、BBPHs - IV 组分的疏水氨基酸含量较高。在质量浓度为 10 mg/mL 时, BBPHs - IV (5 ~ 10 kDa) 有较高的 ABTS 自由基清除能力,清除率达到 $(27.89 \pm 0.01)\%$, BBPHs - II (1 ~ 3 kDa) 有较高的 DPPH 自由基清除能力,清除率达到 $(57.70 \pm 0.00)\%$;在 2 ~ 32 mg/mL 质量浓度下,1 ~ 10 kDa 酶解产物的 α -葡萄糖苷酶抑制效果良好。因此,利用酶法水解蚕豆蛋白可以提高其生物活性,小分子质量的蚕豆蛋白酶解产物有更显著的 α -葡萄糖苷酶抑制作用,可能是预防有关氧化疾病的良好药物制剂或功能性食品添加剂,值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 宋庆明. 蚕豆肽制备及其生物活性的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2009.
- [2] 王吉福, 胡英忠. 青海蚕豆发展现状及技术对策探讨[J]. 农业科技通讯, 2017(10):20-21.
- [3] 宋晓敏, 李素芬, 刘建福, 等. 20种蚕豆样品蛋白质含量与其蛋白组分的分子质量[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(12):42-46.
- [4] 苏海玲, 张海英, 李红卫, 等. 蚕豆蛋白酶解工艺及响应面法的优化[J]. 中国食品学报, 2013, 13(5):39-46.
- [5] 陈丹阳, 韩涛, 杜斌, 等. 酶解蚕豆蛋白制备降胆固醇肽及其响应面优化[J]. 中国油脂, 2018, 43(10):46-52.
- [6] 叶婷, 康玉凡, 薛文通. 蚕豆蛋白的提取及加工利用研究进展[J]. 粮食与饲料工业, 2013(8):24-26,30.
- [7] 陈丹阳, 韩涛. 蚕豆蛋白酶解物分离纯化及降胆固醇活性[J]. 中国油脂, 2021, 46(1):61-64,104.
- [8] XIE J H, DU M X, SHEN M Y, et al. Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiate*) [J]. Food Chem, 2019, 270:243-250.
- [9] 王天明, 苏意钢, 马永钧, 等. 海地瓜多肽分离及抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(5):75-81,166.
- [10] ZHANG Y, LEWIS K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 149(1):59-64.
- [11] 张月圆. 醋豆降压肽的制备及其降压活性研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.
- [12] 谢丽平. 具有抗氧化、抗衰老活性的多肽筛选、分离纯化及结构鉴定[D]. 广州:华南理工大学, 2019.
- [13] 缪佳瑜, 林慧敏, 李颖杰, 等. 复合酶解结合膜分离技术制备秘鲁鱿鱼抗氧化肽的研究[J]. 食品科技, 2019, 44(12):131-139.
- [14] 黄文凯. 膜分离方法制备免疫活性大豆肽的研究[D]. 江苏 无锡:江南大学, 2007.
- [15] 吴红洋, 姜太玲, 申光辉, 等. 花椒籽蛋白降血压肽的加工适应性研究[J]. 中国油脂, 2015, 40(2):24-29.
- [16] 李雪琴, 苗笑亮, 裘爱泳. 蚕豆分离蛋白的制备及其功能性质研究[J]. 粮食与饲料工业, 2003(5):41-43.
- [17] 郑志强, 郝利民, 刘晋, 等. 小麦蛋白双酶解制备高抗氧化性小麦肽研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(8):78-88.
- [18] 刘淳, 张海英, 韩涛, 等. Alcalase 碱性蛋白酶酶解蚕豆蛋白的研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(12):29-33.
- [19] 张立娟, 姜瞻梅, 姚雪琳, 等. 双缩脲法检测大豆分离蛋白中蛋白质的研究[J]. 食品工业科技, 2008(7):241-242.
- [20] 俞晓玉, 王树成, 高娃, 等. 粮食中蛋白质含量的测定[J]. 广东化工, 2017, 44(4):114-115.
- [21] 乔杨波, 韩丽娟, 王树林, 等. 不同蛋白酶酶解对蚕豆蛋白生物活性的影响[J]. 中国油脂, 2020, 45(7):56-60.
- [22] 许鹭, 蓝木香, 杨继国, 等. 柚皮苷-卵磷脂包合物的制备及其理化性质研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(8):237-241,279.

(上接第76页)

- [17] ZOU X Q, HUANG J H, JIN Q Z, et al. Preparation of human milk fat substitutes from palm stearin with arachidonic and docosahexaenoic acid: combination of enzymatic and physical methods[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(37):9415-9423.
- [18] XU X, SKANDS A R H, HØY C E, et al. Production of specific-structured lipids by enzymatic interesterification: elucidation of acyl migration by response surface design [J]. J Am Oil Chem Soc, 1998, 75(12):1179-1186.
- [19] HITA E, ROBLES A, CAMACHO B, et al. Production of structured triacylglycerols (STAG) rich in docosahexaenoic acid (DHA) in position 2 by acidolysis of tuna oil catalyzed by lipases[J]. Process Biochem, 2007, 42(3):415-422.
- [20] LI W, DU W, LI Q, et al. Dependence on the properties of organic solvent: study on acyl migration kinetics of partial glycerides [J]. Bioresour Technol, 2010, 101(15):5737-5742.
- [21] MIYASHITA K, TAKAGI T. Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids [J]. J Am Oil Chem Soc, 1986, 63:1380-1384.