

# 大豆生物活性肽的分离及其抗氧化活性研究

张莉莉, 严群芳, 王 恬\*

(南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

**摘 要:** 为制备具有抗氧化活性的大豆生物活性肽, 本实验采用酶解处理大豆蛋白粉, 对酶解产物进行葡聚糖 Sephadex G-25 凝胶柱层析分离, 并对其各组分分子量分布及其抗氧化性进行了研究, 对抗氧化活性最佳的肽段进行氨基酸组成分析。结果显示, 大豆蛋白酶解物经 Sephadex G-25 分离后得到了六个肽片段, 其中平均链长为 4, 即含有 2~6 个氨基酸残基的大豆功能短肽 SPP<sub>4</sub>, 对羟自由基具有最佳的清除作用, 清除率达到 80.13%, 氨基酸组成分析发现该组分中缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸含量较高。结果表明, 含 2~6 个氨基酸残基的大豆生理活性短肽具有较好的抗氧化活性。

**关键词:** 大豆生物活性肽; 分子量; 羟自由基; 抗氧化活性; 氨基酸

## Study on Isolation and Antioxidant Activity of Soybean Bioactive Peptides

ZHANG Li-li, YAN Qun-fang, WANG Tian\*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** To prepare the soybean antioxidant peptides, various peptides in the soybean protein hydrolysates were fractionated by Sephadex G-25 gel filtration, then the scavenging capacity to hydroxyl free radical and the distribution of molecular weights of fractional peptides were determined and at the amino acids compositions of the optimal antioxidative peptide fractions were analyzed. The results showed that six fractional peptides are fractionated by Sephadex G-25 gel filtration from the soybean protein hydrolysates, SPP<sub>4</sub> has the maximum scavenging rate to hydroxyl free radical 80.13% and its APCL is 4. The main amino acids in SPP<sub>4</sub> are Val, Leu, Phe and Lys. The results indicated that soybean bioactive peptide composed of 2~6 amid acids has strong antioxidant activity.

**Key words** soybean bioactive peptides; molecular weight; hydroxyl free radical; antioxidation; amino acid

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0208-04

大豆生物活性肽是大豆蛋白的酶解产物, 由分子量小且具有很高生理活性的小肽分子组成。研究表明, 大豆生物活性肽具有许多生理功能, 如抑制血压升高<sup>[1]</sup>、抗疲劳<sup>[2]</sup>、增强免疫功能<sup>[3]</sup>及降低胆固醇<sup>[4]</sup>等, 而这些活性均与其抗氧化性质有关。近年来的研究表明大豆蛋白在体外具有抗氧化活性。荣建华等研究发现大豆分离蛋白经中性蛋白酶 AS1.398 酶解, 酶解物具有较强的抗氧化活性, 在浓度 0.1~250mg/ml 范围内对  $\cdot\text{OH}$  都有明显的清除作用, 且在上述浓度下无助氧化作用<sup>[5]</sup>。何慧等<sup>[6]</sup>和黄莉等<sup>[7]</sup>也发现大豆分离蛋白酶解物体外具有抗氧化作用。但这些研究仅是对大豆蛋白酶解物进行了抗氧化活性测定, 并未对酶解产物进行分离分析。本实验采用酶解处理大豆蛋白粉, 对酶解产物进行葡聚糖 Sephadex G-25 凝胶柱层析分离, 并对其各组分抗氧化性

进行了研究, 对抗氧化活性最佳的肽段进行氨基酸组成分析, 以期从氨基酸组成上对其抗氧化活性进行分析, 为大豆生物活性肽在食品、饲料等领域内的应用提供一些实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大豆浓缩蛋白(蛋白质含量 61.05%) 张家港东海粮油有限公司; 木瓜蛋白酶(活性 0.5~2U/g) Sigma 公司产品; 胰蛋白酶(10000IU/mg) AMRESCO 公司分装; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-25 Amersham 公司进口分装; 2619 树脂 日立公司; 2-脱氧核糖(D-Deox-D-Ribose) Fluka 公司进口分装; 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器

收稿日期: 2006-04-29

\*通讯作者

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(973 项目)(2004CB117500)

作者简介: 严群芳(1978-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向为植物源性生物活性物质对动物生长的调控。

J-6M型大容量冷冻离心机 贝克曼公司; SHY-2恒温水浴锅; 752型紫外光栅分光光度计; 葡聚糖凝胶柱层析装置(玻璃层析柱 $\phi$ 2.6cm $\times$ 80cm) 上海沪西分析仪器厂; RLPHR1-4 LSC型冷冻干燥机 CHRIST公司; HL-2恒流泵、BSZ-100自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂; 835-50型氨基酸自动分析仪 日立公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 大豆蛋白酶解物的制备

根据胡文琴的实验结果<sup>[8]</sup>, 筛选出了木瓜蛋白酶作为制备富含抗氧化活性肽的理想酶种, 并确定了大豆蛋白的最佳酶解条件。称取大豆蛋白12.5g, 溶于250ml蒸馏水中, 调pH至7.5, 加入6%的木瓜蛋白酶, 40℃水浴, 震荡水解30min。水解结束后, 立即用100℃灭活酶10min。冷却后, 3500r/min离心15min, 取上清液, 冷冻干燥制得大豆蛋白酶解物(soybean protein hydrolyses, SPH)。

#### 1.3.2 活性肽的分离

取一定量的SPH用蒸馏水制成一定浓度的大豆肽溶液, 过0.22 $\mu$ m的微滤膜。收集到的溶液再经Sephadex G-25凝胶层析柱(2.6cm $\times$ 80cm), 以蒸馏水为洗脱液进行洗脱, 控制恒定流速, 洗脱速度为0.5ml/min, 每管收集4~5ml洗脱液。测定各管的OD<sub>220</sub>, 作洗脱体积与OD值的关系图, 并将分离得到的各个峰合并, 冷冻干燥, 置-20℃保存。

#### 1.3.3 大豆生理活性肽的分子量分布的初步测定<sup>[9]</sup>

分别用蓝色葡聚糖(分子量2000kDa)、VB<sub>12</sub>(分子量1355Da)和谷胱甘肽(分子量307Da)溶液1ml上柱层析, 用蒸馏水洗脱, 以颜色和吸光值判断其洗脱体积, 再根据Sephadex G-25分子质量的测定范围可初步判定大豆生理活性肽的分子量范围。

#### 1.3.4 平均链长的测定 茚三酮显色法<sup>[10]</sup>。

#### 1.3.5 抗氧化活性测定 羟自由基清除能力的测定<sup>[11]</sup>。

#### 1.3.6 大豆活性肽的氨基酸组成分析 用氨基酸自动分析仪进行分析。

### 1.4 数据统计与分析

数据用SPSS软件统计, 用单因子方差分析(One-way ANOVA, LSD)进行差异显著性检验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

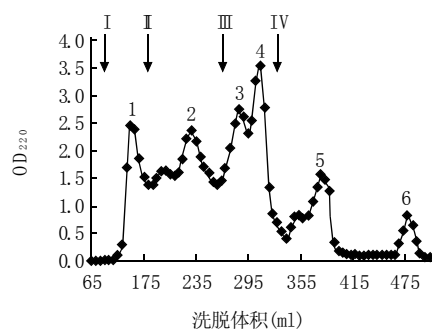
## 2 结果与分析

### 2.1 大豆活性肽的初步分离

对大豆蛋白酶解产物进行Sephadex G-25凝胶柱层析分离, 测定每管洗脱液OD<sub>220</sub>。所测得的吸光度值反映了多肽组分的分离情况。

从图1可以看出, 通过凝胶Sephadex G-25层析后各种肽组分得到了良好的分离, 并得到了六个肽片段分别命名为SPP<sub>1</sub>, SPP<sub>2</sub>, SPP<sub>3</sub>, SPP<sub>4</sub>, SPP<sub>5</sub>, SPP<sub>6</sub>。

先后用蓝色葡聚糖(分子量2000 kDa)、胰蛋白酶(分子量233 kDa)、VB<sub>12</sub>(分子量1355 Da)和谷胱甘肽(GSH)(分子量307 Da)上Sephadex G-25凝胶层析柱进行洗脱, 试验测得的洗脱体积分别为120、177、280和320ml, 通过以上实验结果并结合凝胶色谱分离原理, 说明洗脱体积在120ml之前洗脱出的物质分子量大于2000kDa, 洗脱体积在280ml之后洗脱出的物质分子量小于1355Da, 而洗脱体积在320ml左右洗脱出的物质就类似于GSH, 有三个氨基酸残基组成。由此可根据样品洗脱体积初步判断大豆活性肽片段的分子量分布。从图1可以看出峰1、峰2均为大分子量的物质; 峰3的分子量接近于VB<sub>12</sub>, 而后三个峰分子量都小于1355Da, 推测其基本上是一些小肽或氨基酸组成。



I. 蓝色葡聚糖(分子量2000kDa); II. 胰蛋白酶(分子量233kDa); III. VB<sub>12</sub>(分子量1355Da); IV. GSH(分子量307Da)。1、2、3、4、5、6分别代表分离得到的六个肽片段。

图1 大豆多肽在Sephadex G-25上的凝胶色谱图

Fig.1 Column chromatogram of soybean hydrolysates on Sephadex G-25

### 2.2 大豆多肽的平均链长

由于峰1和2的分子量较大, 而平均肽链长度通常所测对象为短肽混合物, 因此本实验只对后面四个峰进行了平均链长的测定, 结果见表1。

表1 大豆活性肽各片段平均链长的测定

Table 1 APCL of different components of soybean peptides

样品号	样品中总的氨基酸残基 ( $\mu$ mol)	样品中的肽链数 ( $\mu$ mol)	APCL
SPP <sub>3</sub>	312	40	8
SPP <sub>4</sub>	376	94	4
SPP <sub>5</sub>	184	118	1.5
SPP <sub>6</sub>	104	102	1

从表1中可以看出, 平均链长与上述分子量的测定结果非常吻合, 大豆蛋白酶解物经凝胶层析后得到的多肽在第三个峰后基本上都是一些小分子的肽, 峰4的

APCL 只有 4, 说明峰 4 为 2~6 个氨基酸组成的多肽混合物; 峰 5、6 的 APCL 为 1.5 和 1, 表明峰 5、6 的组分为一些二肽和游离氨基酸。

### 2.3 抗氧化活性测定

分别称取一定量的 10mg/ml SPH 及分离到的各个肽组分进行抗氧化活性测定, 结果见表 2。

表 2 大豆肽各组分对  $\cdot\text{OH}$  的清除作用 ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ )  
Table 2 Scavenging effects of soybean peptides on  $\cdot\text{OH}$  ( $\bar{X} \pm \text{SD}$ ,  $n=3$ )

	A <sub>532</sub>	清除率(%)
对照	1.750±0.041	
SPH	0.972±0.016*	65.82
SPP <sub>1</sub>	1.507±0.061*	20.71
SPP <sub>2</sub>	1.523±0.043*	19.28
SPP <sub>3</sub>	1.196±0.034*	46.93
SPP <sub>4</sub>	0.803±0.012*	80.13
SPP <sub>5</sub>	1.350±0.038*	33.67
SPP <sub>6</sub>	1.224±0.027*	44.55

注: 与对照相比, \*:  $p < 0.001$ 。

由表 2 可以看出, 大豆蛋白酶解物及分离得到的各肽组分对  $\cdot\text{OH}$  均有清除作用。分子量较大的肽片段 (SPP<sub>1</sub>、SPP<sub>2</sub>) 的抗氧化性较小, SPH 及小分子量的肽片段都显示了较好的抗氧化性, 其 SPP<sub>4</sub> 的  $\cdot\text{OH}$  清除率达到了 80.13%, 显示了良好的抗氧化活性。

### 2.4 SPP<sub>4</sub> 的氨基酸组成

SPP<sub>4</sub> 的氨基酸组成见表 3。由表 3 可见 SPP<sub>4</sub> 的氨基酸组成中亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、缬氨酸含量较高。

表 3 大豆活性肽 SPP<sub>4</sub> 的氨基酸组成与含量  
Table 3 Amino acid constitution and contents of SPP<sub>4</sub>

氨基酸	含量(%)	氨基酸	含量(%)
天门冬氨酸	4.36	蛋氨酸	4.28
苏氨酸	1.90	异亮氨酸	8.10
丝氨酸	1.75	亮氨酸	21.72
谷氨酸	5.11	酪氨酸	4.26
甘氨酸	3.87	苯丙氨酸	8.06
丙氨酸	3.12	赖氨酸	9.22
胱氨酸	1.05	组氨酸	1.59
缬氨酸	11.24	精氨酸	2.41

## 3 讨论

近年来研究表明, 大豆肽具有抗氧化作用, 且抗氧化活性与其分子量大小密切相关。Chen 等研究表明具有抗氧化性的多肽片段是由 5~16 个氨基酸残基组成, 分子量约在 600~1700Da 范围内<sup>[12]</sup>。张学忠等发现在反应体系中添加 40mg/ml 大豆多肽, 邻苯三酚自氧化速率被抑制 27%, 并发现抗氧化肽的分子量分布在 100~1300D<sup>[13]</sup>。大豆肽抗氧化能力还受构成肽的氨基酸种类、数量及氨基酸排列顺序的影响。据报道, 许多

氨基酸及其衍生物具有抗氧化能力, 如半胱氨酸、组氨酸、色氨酸、赖氨酸、精氨酸、亮氨酸、酪氨酸、缬氨酸、5-羟色氨酸等。张英等研究表明, 某些氨基酸如: 谷氨酸、蛋氨酸、酪氨酸、组氨酸、赖氨酸、脯氨酸、半胱氨酸等具有清除羟自由基的能力<sup>[14]</sup>。本实验发现 SPP<sub>4</sub> 具有较强的抗氧化能力, 可能就与其含有这些氨基酸有关。Chen 等<sup>[12]</sup>和 Niranjana 等<sup>[15]</sup>认为肽的抗氧化活性与其肽段中含有的疏水性氨基酸有关, 当 N-端为疏水性氨基酸缬氨酸或亮氨酸时, 抗氧化活性较高。这可能是因为疏水性氨基酸能使抗氧化肽与脂肪酸的相互作用增强, 提高了其脂质自由基的捕捉能力。此外, 氧化性还与肽中含有的某些能与自由基反应的特殊基团有关, 即供氢基团, 只有当这些肽在适当分子量时, 这些特殊的供氢基团才能得到最大的暴露充分与自由基作用, 此时才具有较强的抗氧化活性。本实验所得 SPP<sub>4</sub> 中还含有酪氨酸, 它具有酚羟基结构, 能提供质子从而猝灭自由基; 组氨酸含有咪唑环, 可以螯合金属离子, 从而发挥良好的抗氧化活性。

## 4 结论

采用 Sephadex G-25 凝胶对大豆蛋白酶解产物进行分离, 并收集到六个组分, 对各组分进行羟自由基清除活性测定发现: 平均链长为 4 的大豆活性肽片段 SPP<sub>4</sub> 具有最强的羟自由基清除活性, 其清除率为 80.13%, 表明 SPP<sub>4</sub> 可以作为一种良好的抗氧化剂, 但对该肽片段的进一步分离、纯化及鉴定工作有待完善。

## 参考文献:

- [1] 吴建平. 从大豆中提取降血压肽的研究[D]. 无锡: 无锡轻工大学学报, 2000.
- [2] 王启荣, 李肃反, 杨则宜, 等. 补充大豆多肽对中长跑运动员训练期生化指标的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2004, 23(1): 33-37.
- [3] 王世英. 免疫功能活性肽[J]. 生物学通报, 2001, 36(1): 5-7.
- [4] 赵秀娟, 王小雪, 吴博学, 等. 大豆活性肽对喂饲高脂饲料大鼠血脂的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(4): 421-422.
- [5] 荣建华, 李小定, 谢笔钧. 大豆肽抗氧化效果的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 118-120.
- [6] 何慧, 谢笔钧, 扬卓, 等. 大豆蛋白和玉米蛋白酶解物及其活性研究[J]. 粮油食品科技, 2002, 10(1): 14-16.
- [7] 黄莉, 江连洲, 朱秀清. 大豆蛋白抗氧化肽的研究[J]. 大豆通报, 2003(5): 20-21.
- [8] 胡文琴. 大豆蛋白与酪蛋白酶解物抗氧化作用比较研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2004.
- [9] 邓勇, 冯学武. 大豆多肽分子量分布与苦味的确定[J]. 中国农业大学学报, 2001, 6(4): 98-102.
- [10] PEARCE K N, KARAHALIOS D, FRIEDMAN M. Ninhydrin assay for proteolysis in ripening cheese[J]. Journal of Food Science, 1988, 53(2): 432-435.
- [11] 王海宽, 赵新淮, 姜岩. 甘草有效成分分离及其对自由基的清除能力[J]. 食品与机械, 2000(4): 23-24.
- [12] CHEN H M, KOJI M, FUMIO Y. Structural analysis of antioxidative

# 藏灵菇中高产胞外多糖乳酸菌的筛选 及其发酵性能的研究

刘 慧, 熊利霞, 易欣欣, 张红星\*, 张金永  
(北京农学院食品科学系, 北京 102206)

**摘 要:** 本研究采用高通量筛选技术和苯酚-硫酸法获得高产胞外多糖的乳酸菌菌株, 并对其发酵性能和酸奶品质进行测试。筛选的八株菌均具有高产胞外多糖和良好的发酵性能。其菌种鉴定结果是: 菌株KT<sub>x</sub>、KL<sub>1</sub>、J<sub>1</sub>为干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*), 菌株T<sub>x</sub>为嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*), 菌株KS<sub>4</sub>、J<sub>4</sub>、P<sub>1</sub>、P<sub>5</sub>为乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), 其中嗜热链球菌T<sub>x</sub>制备发酵剂的粘度最高, 凝乳时间最短, 感官综合评分最高, 可利用此菌株进一步开发研制具有良好稳定性的功能性酸奶。

**关键词:** 藏灵菇; 乳酸菌; 胞外多糖; 发酵性能

Study on Screening and Fermentation Capability of Lactobacter Yielding Exopolysaccharide from Kefir Grains

LIU Hui, XIONG Li-xia, YI Xin-xin, ZHANG Hong-xing\*, ZHANG Jin-yong  
(Department of Food Science, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China)

**Abstract:** In this paper, the strain of high yield exopolysaccharide was obtained by high throughput screening technology and phenol-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> method. These strains prosecution test were assayed for fermentation capability and yogurt quality. Eight strains were screened for high yield exopolysaccharide and good fermentation capability. The results of identified bacteria species are: strain KT<sub>x</sub>, KL<sub>1</sub> and J<sub>1</sub> as *Lactobacillus casei*, strain T<sub>x</sub> as *Streptococcus thermophilus*, strains KS<sub>4</sub>, J<sub>4</sub>, P<sub>1</sub>, P<sub>5</sub> as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. The viscosity of starter produced by *Streptococcus thermophilus* T<sub>x</sub> is the best, coagulating time is the shortest, and sensory evaluation is the highest. This strain to exploit can be used and manufacture functional kefir yogurt with good stability.

**Key words** kefir grains; Lactobacter; exopolysaccharide; fermentation capability

中图分类号: Q939.117

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0211-05

藏灵菇(又称开菲尔粒)是由数种乳酸菌与酵母菌等微生物之间的共生作用而形成的特殊粒状或片状结构。人们直接将开菲尔粒添加到经加热灭菌、冷却后的牛乳中, 使之发酵而生成具有爽快酸味和起泡性的酒精性保健饮料——开菲尔(Kefir)。最近研究证实, Kefir 饮品中含有抑制癌细胞增殖的乳酸菌胞外多糖

(exopolysaccharide, EPS)或荚膜多糖(Capsular polysaccharide), 可降低癌症的发病率。目前, 国内外对乳杆菌属、乳球菌属、链球菌属、明串珠菌属等乳酸细菌产生的EPS研究较多。乳酸菌在生长代谢过程中合成胞外多糖的机制非常复杂, 其生理功能也随营养条件和环境条件的改变而有差异。国外从分子水平上对

收稿日期: 2007-01-31

\*通讯作者

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(5062006)

作者简介: 刘慧(1963-), 女, 副教授, 研究方向为食品微生物学技术与发酵工程。

peptides from soybean  $\beta$ -Conglycinin[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1995, 43: 574-578.

[13] 张学忠, 王寰宇, 陈松明, 等. 大豆新加工技术原理与应用[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1999: 181-200.

[14] 张英, 董绍华. 氨基酸清除活性氧自由基作用的研究[J]. 科技通报,

1997(5): 312-315.

[15] NIRANJAN R, ERESHA M, WON KJ, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties[J]. Food Research International, 2005, 38: 175-182.