

花生发芽过程中主要生理指标及蛋白质代谢变化

张 浩¹, 张雅君¹, 丁 艳¹, 李广胜², 陈沁滨², 韩永斌^{1,*}

(1.南京农业大学 农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室, 江苏 南京 210095;

2.南京农垦生物技术有限公司, 江苏 南京 210000)

摘 要: 研究花生品种“百日红”(*Arachis hypogaea* L.)不同发芽阶段的主要生理生化变化和蛋白质降解变化。结果显示: 发芽96h时, 花生发芽率为98.33%, 芽长达到67.59mm; 发芽过程中, 花生干物质含量呈现下降的趋势, 发芽0~48h和60~84h干物质含量下降很快, 48~60h和 84~96h时干物质含量变化不显著($P>0.05$); 呼吸强度整体呈上升的趋势, 发芽12~24h时呼吸强度出现急剧增加, 之后增加幅度逐渐变小, 并趋于稳定; 发芽过程中可溶性糖在发芽36h和84h时分别出现最小值和最大值, 是未发芽种子含量的80.75%和121.24%; 可溶性蛋白含量呈现先降低后增加的趋势, 发芽48h时达到最小值, 比未发芽时降低了79.07%; 多肽和游离氨基酸的含量呈上升趋势, 在发芽96h后, 多肽和游离氨基酸含量与未发芽时相比分别增加了1.18倍和6.33倍, 其中人体必需氨基酸含量增加了7.18倍, 由28.69%增加为32.02%, 限制性氨基酸如苏氨酸和蛋氨酸的含量分别增加了6.88倍和9.27倍, 但未检测出色氨酸, 表明发芽可改善氨基酸组成, 部分提高花生蛋白的营养价值; 发芽0~96h蛋白酶和肽链内切酶活力逐渐增大, 其中肽链内切酶活性在发芽84h达到最大值; 各指标相关性分析表明花生发芽过程中主要生理变化对花生内源蛋白酶的影响很大, 进而影响蛋白质的代谢。

关键词: 花生; 发芽; 生理指标; 蛋白质; 代谢变化

Changes of Physiological Indicators and Protein Metabolism during Peanut Germination

ZHANG Hao¹, ZHANG Ya-jun¹, DING Yan¹, LI Guang-sheng², CHEN Qin-bin², HAN Yong-bin^{1,*}

(1. Key Laboratory of Food Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Nanjing Agriculture Biotechnology Co.Ltd., Nanjing 210000, China)

Abstract: In this study, the peanut variety BaiRiHong (*Arachis hypogaea* L.) was selected to investigate the changes of main physiological reactions and protein during germination. The results showed that the germination percentage was 98.33% and the average shoot length was 67.59 mm after 96 hours of germination. The content of dry matter showed an decreasing tendency: it decreased rapidly within the first 48 hours and from the 60th to the 84th hours while the changes were not significant ($P > 0.05$) within these hours: the 48th to the 60th hours and the 84th to the 96th hours. The respiration intensity tended to increase, that is, the increase was sharp between the 12th and the 24th hours, then slow and reached a plateau. The soluble sugar content reached minimum and maximum at the 36th and the 84th hour, respectively, which was 80.75% and 121.24% of non-germinated control. The soluble protein content followed a decrease-increase-decrease pattern and reached its minimum value at the 48th hour, which was 79.07% lower than that of non-germinated control. The contents of peptides and free amino acids showed an increasing tendency, and at the 96th hour were elevated 1.18 and 6.33 times, among which the human essential amino acid content increased 7.18 times while the proportion in total amino acids changed from 28.69% to 32.02%. The contents of the limiting amino acids Thr and Met increased 6.88 and 9.27 times while Try was not detected. These results showed that this germination process could alter the amino acid composition and improve the nutritional quality of peanut protein. The activities of protease and endopeptidase increased steadily throughout the germination period while the latter enzyme reached its maximum at the 84th hour. Correlation analysis of various parameters revealed that the major physiological changes led to a considerable effect on peanut endogenous protease and thus, affected protein metabolism.

Key words: peanut; germination; physiological indicators; protein; metabolism

中图分类号: TS210.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)19-0311-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201319064

收稿日期: 2012-09-19

基金项目: 江苏省优势学科建设工程资助项目(2012BAD28B01); 南京市321引进计划项目; 南京市江宁区科技创新专项基金项目

作者简介: 张浩(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: 2011108065@njau.edu.cn

*通信作者: 韩永斌(1963—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品加工与综合利用。E-mail: hanyongbin@njau.edu.cn

花生(*Arachis hypogaea* L.)为蝶形花科,落花生属植物,是我国最主要的经济作物之一。花生中含25%~36%的蛋白质,主要为花生球蛋白(14S, 68%)和伴花生球蛋白(2S, 25%)^[1-2]。花生蛋白是一种营养价值较高的油料蛋白,抗营养因子含量低,易为人体消化吸收,对维护人体健康和幼儿发育具有重要作用^[3]。但花生蛋白的营养也存在缺陷,必需氨基酸组成不平衡,限制性氨基酸种类较多,难以通过添加其他蛋白质来补充^[4];另外,花生蛋白的抑菌、抗病毒和免疫调节等功能特性表现不明显^[5]。目前常采用微生物发酵和外源蛋白酶酶解等生物技术方法提高花生蛋白的营养价值和利用价值^[6]。有研究表明,花生蛋白通过酶水解,得到花生多肽,其抗氧化^[7-8]和降血压^[9-10]的效果明显增强,花生多肽自身不会引起过敏反应,同时能够抑制蛋白质形成凝胶,作为食品添加剂可以减少由花生蛋白引起的过敏反应^[11], Jamdar等^[12]的研究发现适度的酶解可使花生蛋白具有更好的乳化性和起泡性。

发芽是一种改善种子营养品质和加工特性的有效手段,可以改变种子氨基酸组成,提高蛋白质的利用率^[13-15],增加B族维生素的含量并降低抗营养因子的水平^[16-17]。目前,关于花生发芽的研究主要集中在育种和大田栽培方面^[18-19],鲜见从食品和营养的角度来关注花生发芽过程中生理生化变化和蛋白质的代谢。花生种子在萌发过程中,蛋白酶被激活和释放,并从结合态转化为游离态;蛋白酶抑制剂降解,抑制效果快速下降甚至部分抑制作用消失^[20];大分子的贮藏物质分解,多肽和氨基酸等小分子活性物质生成^[21]。本实验对花生进行发芽处理,测定发芽花生的主要生理指标,旨在探索花生发芽过程中蛋白质的代谢规律,为评价发芽花生营养价值和开发相关的产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

供试花生为百日红(BRH),由徐州金农种子公司提供。

酪蛋白(分析纯) 美国Sigma公司;酪氨酸(生化试剂)、牛血清白蛋白(生化试剂) 上海蓝季科技发展有限公司;考马斯亮蓝G-250(生化试剂)、乙酸(分析纯) 中国医药集团上海化学试剂公司;苯酚(分析纯)、三氯乙酸(分析纯) 上海凌峰化学试剂有限公司。

UV-2802型紫外-可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司;TDL-40B离心机 上海安亭科学仪器厂;HH-6型数显恒温水浴锅 常州国华电器有限公司;DHG-9030A型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司;L8900自动氨基酸分析仪 日本日立公司。

1.2 花生发芽工艺

参照刘娟等^[22]的方法,根据花生的发芽特性,经过多次实验做出修改。花生经过筛选、除杂后,准确称取400g样品,于体积分数1%的次氯酸钠溶液中浸泡30min,用去离子水冲洗3次,于30℃黑暗条件下浸泡6h,用去离子水润洗数次后在30℃黑暗条件下发芽,每隔24h用去离子水清洗种子数次,每隔12h取样(发芽时间共96h),取样后用液氮速冻,存于-20℃冰箱中备用。

1.3 指标测定

1.3.1 常规指标测定(样品按干质量计)

含水量测定:采用AOAC^[23]法;呼吸强度测定:采用小篮子法;芽长测定:采用游标卡尺测定;发芽率测定:参照GB 3543—83《农作物种子检验规程》^[24]测定;可溶性糖(主要指溶于水和乙醇的单糖和寡聚糖)含量测定:采用苯酚-硫酸法测定;可溶性蛋白含量测定:采用考马斯亮蓝G-250法^[25];游离氨基酸含量测定:采用茚三酮比色法^[26];氨基酸种类和含量测定:自动氨基酸分析仪。

1.3.2 多肽含量测定(样品按干质量计)

多肽含量测定参照唐军涛^[27]的方法,取5.0g样品,以0.2mol/L的磷酸缓冲液(pH 7.0)研磨并定容至50mL,静置2h后,10000r/min离心15min,取3mL无脂上清液,加3mL 10%的三氯乙酸(TCA)沉淀上清液中的蛋白质;涡旋混匀并静置10min后,离心(同前);取3mL上清液,加2mL双缩脲试剂,涡旋混匀后静置10min,离心(同前),以还原性谷胱甘肽为标准品,测定上清液的 A_{540nm} 来计算多肽含量。实验重复3次,所得结果均以干基质量表示。

1.3.3 蛋白酶活力测定(样品按鲜质量计)

蛋白酶活力测定参照胡琼英等^[28]的方法,称取1.0g样品,加入8mL 0.05mol/L的Tris-HCl缓冲液(pH 7.4、含1% PVP、10mmol/L β -巯基乙醇和1mmol/L EDTA)于冰浴下研磨成匀浆,之后在4℃条件下10000r/min离心30min,测定上清液中蛋白酶活力测定。

以2%的酪蛋白溶液作为底物,取1mL的底物溶液和1mL的酶提取液在40℃条件下保温20min,之后在90℃水浴中保温5min灭酶,然后加入3mL 0.4mol/L TCA溶液于室温下静止15min沉淀未反应的蛋白质。蛋白酶活力是通过测定OD_{275nm}的增加量来计算的,以反应前加入TCA溶液的体系作为空白,以波长275nm下的OD值每小时增加0.01为1个酶活力单位。

1.3.4 肽链内切酶活力测定(样品按鲜质量计)

肽链内切酶活力参照宾金华等^[29]的方法,称取样品1.0g左右,按1:5(m/V)加入的磷酸缓冲液(pH 7.2, 20mmol/L, 含10mmol/L β -巯基乙醇),在冰浴中研磨成匀浆,4℃条件下浸提4h后离心(10000r/min, 30min)。在上清液中加入硫酸铵,使饱和度达80%,静置2h后再离心(10000r/min, 30min),所得蛋白质沉淀溶于醋酸缓冲

液(pH 5.4, 50mmol/L, 含 β -巯基乙醇10mmol/L), 并在4℃中对该液透析24h。经透析后的酶溶液离心(10000r/min, 30min)除去不溶物, 所得上清液即为酶提取液。

以苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基苯胺(BAPNA)为底物测定肽链内切酶活性(BAPNA溶于10mmol/L, pH7.5的磷酸缓冲液), 参照Harris等^[30]的方法, 取2mL底物溶液和1mL酶提取液, 在40℃条件下保温20min, 加入2mL 30%醋酸终止酶促反应, 反应结束后离心(10000r/min, 10min)。以不加入BAPNA的磷酸缓冲液为空白, 以波长410nm下的OD值每分钟增加0.01为1个酶活力单位。

1.4 数据统计与分析

实验设3次重复, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 采用SPSS 16.0进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 花生发芽过程中主要生理指标及可溶性糖含量的变化

表1 花生发芽过程中主要生理指标及可溶性糖含量的变化
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Changes of major physiological index and soluble sugar content during peanut germination ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 发芽时间/h | 发芽率/% | 芽长/mm | 干物质含量/% | 呼吸强度/(mg CO ₂ /(g·h)) | 可溶性糖含量/(mg/g) |
|--------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 62.44±0.01 ^a | 17.22±0.33 ^a | 13.56±0.11 ^a |
| 12 | 43.33±5.78 ^a | 3.78±0.41 ^a | 58.01±0.03 ^b | 18.89±0.18 ^b | 12.03±0.09 ^b |
| 24 | 58.33±2.89 ^b | 4.75±0.08 ^a | 55.40±0.03 ^{bc} | 34.93±0.73 ^c | 11.14±0.12 ^c |
| 36 | 85.00±8.67 ^c | 9.25±0.48 ^a | 52.48±0.45 ^c | 42.52±0.95 ^d | 10.95±0.06 ^d |
| 48 | 95.00±0.57 ^d | 28.14±0.88 ^b | 46.48±0.35 ^d | 44.04±2.06 ^c | 12.35±0.13 ^c |
| 60 | 95.00±2.00 ^d | 31.91±0.80 ^b | 46.31±0.42 ^d | 48.88±1.34 ^f | 14.91±0.08 ^f |
| 72 | 96.67±1.09 ^d | 36.17±0.75 ^c | 38.90±0.36 ^e | 52.60±1.41 ^e | 16.07±0.11 ^e |
| 84 | 98.33±0.89 ^d | 50.69±0.63 ^d | 34.80±0.54 ^f | 57.50±1.29 ^h | 16.44±0.04 ^d |
| 96 | 98.33±0.90 ^d | 67.59±0.59 ^e | 32.58±0.17 ^f | 59.53±0.89 ^j | 16.32±0.15 ^h |

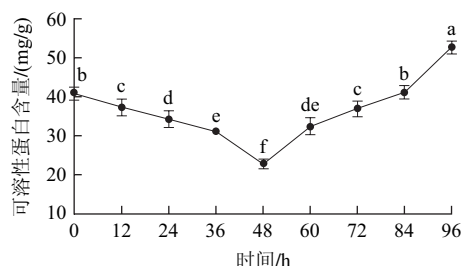
注: 同列字母不同表示在0.05水平上差异显著。表3同。

由表1可以看出, 随着发芽时间增加, 花生的发芽率和芽长均呈现不同程度的增加。发芽48h时, 花生的发芽率达到95%, 随后略有增加, 最终发芽率稳定在98.33%。在发芽前36h花生芽长增加不显著($P>0.05$), 之后生长迅速, 在发芽96h时, 花生芽平均长度达到67.59mm。在发芽过程中, 花生的干物质含量不断降低, 主要与自身的降解和种子发芽吸水相关。种子发芽过程中的吸水要经历“吸涨吸水期”、“缓慢吸水期”和“生长吸水期”3个阶段, 具有“快→慢→快”的特点^[31], 在本实验中, 发芽0~48h和60~84h, 干物质含量下降很快, 而在发芽48~60h和84~96h时干物质含量变化不显著($P>0.05$), 与种子发芽规律相符。呼吸强度是反映种子内部生理代谢的重要指标, 干种子的呼吸强度很低, 浸泡6h(发芽0h)的种子已具有较高的呼吸强度, 主要是因为内源酶系统激活, 而在发芽12~24h时由于胚根的长出, 呼吸强度出现急剧增加, 在整个发芽过程中, 呼吸强度不断增加,

但是增加幅度逐渐变小, 并趋于稳定。可溶性糖是种子发芽的主要供能物质, 其含量的变化趋势是先减少后增加, 最终稳定在一定水平, 这说明花生在发芽过程中优先利用小分子糖, 之后随着淀粉等分解使可溶性糖含量增加, 最终可溶性糖的利用和生成达到动态平衡, 含量趋于稳定^[32]。可溶性糖含量在发芽36h达到最小值, 与未发芽相比降低了19.25%, 在发芽84h达到最大值, 与未发芽相比增加了21.24%。

2.2 花生发芽过程中可溶性蛋白含量的变化

种子发芽时蛋白质的变化是最复杂的, 也是影响其营养价值的重要因素。在酶的作用下, 蛋白质水解为多肽和氨基酸, 这些产物又参与分解代谢或合成新的氨基酸, 从而使蛋白质和氨基酸含量发生变化。不同种子发芽过程中蛋白质含量的变化趋势并不相同, 大麦^[33]、糙米^[34]和葫芦巴籽^[35]等发芽一定时间后蛋白质含量增加, 而木豆^[36]发芽后蛋白质含量降低。由图1可以看出, 在花生发芽过程中, 可溶性蛋白含量呈现先降低后增加的趋势。发芽0~36h, 可溶性蛋白含量缓慢下降, 36~48h时下降速度加快, 发芽48h时达到最小值, 比未发芽时降低了79.07%, 随后逐渐上升, 在发芽时间达到96h时, 含量比未发芽时增加了28.98%。



字母不同表示差异显著($P<0.05$); 以干基计。下同。

图1 花生发芽过程中可溶性蛋白含量的变化

Fig.1 Changes of soluble protein content during peanut germination

花生中的蛋白质主要为贮藏蛋白, 可溶性蛋白含量较低, 在发芽初期, 随着种子吸水膨胀, 内源蛋白酶被激活, 可溶性蛋白分解为小分子的多肽和游离氨基酸, 因此在0~48h可溶性蛋白含量下降^[37]。在发芽48h后可溶性蛋白含量上升, 可能与花生贮藏蛋白溶解和新蛋白质合成有关^[38]。黄上志等^[39]研究表明, 花生种子吸胀48h后, 花生子叶中的盐溶蛋白和花生球蛋白含量迅速下降, 同时伴花生球蛋白中的亚基也开始降解。花生贮藏蛋白的降解不仅直接增加了可溶性蛋白的含量, 还为新蛋白的合成提供原料, 从而使花生中可溶性蛋白含量的变化趋势在发芽48h出现变化, 由降低转为增加。同时李卓杰等^[40-41]发现在花生发芽过程中蛋白质种类发生变化, 其中子叶中蛋白质种类减少, 胚轴中蛋白质种类增加, 蛋白质种类总数呈增加趋势, 也证明了有新的蛋白质的合成。

2.3 花生发芽过程中多肽和游离氨基酸含量的变化

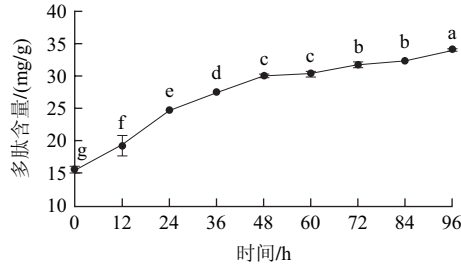


图2 花生发芽过程中多肽含量的变化

Fig.2 Changes of polypeptide content during peanut germination

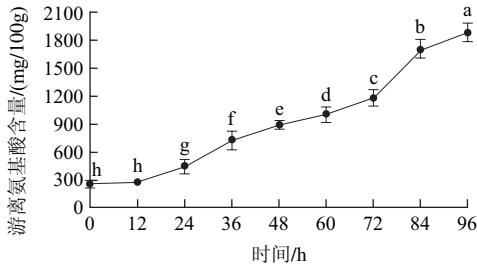


图3 花生发芽过程中游离氨基酸含量的变化

Fig.3 Changes of free amino acid content during peanut germination

由图2、3可知，发芽0~96h，多肽和游离氨基酸的含量均呈逐渐增加趋势，其中游离氨基酸含量增加更为明显，发芽96h后，多肽和游离氨基酸含量与未发芽时相比分别增加了1.18倍和6.33倍。发芽0~48h多肽含量增加显著($P<0.05$)，可能与花生蛋白酶催化可溶性蛋白降解有关^[27]，48h之后多肽含量增幅变小，原因是在此阶段，一方面随着蛋白质的降解有新的多肽生成，另一方面以多肽和游离氨基酸为原料合成新的蛋白质，二者彼此作用，使多肽含量增速变缓。发芽0~12h，游离氨基酸含量增加不显著($P>0.05$)，12~60h显著增加，60h增速加快，尤其在72~84h含量增加最明显，说明在这个时间段，花生羧肽酶和氨肽酶活性较高，对肽键的切割作用明显。黄上志等^[39]研究表明，羧肽酶在干种子中活性很低，但是在种子吸胀48h之后活性迅速增加，96h时活性达到峰值，这与游离氨基酸含量的变化相符。

2.4 花生发芽过程中不同种类氨基酸的变化

由表2可以看出，花生中氨基酸共有17种，包括除色氨酸之外的7种人体必需氨基酸，其中蛋氨酸和苏氨酸等限制性氨基酸含量较低。花生未发芽时，天冬氨酸、谷氨酸和精氨酸所占比例最大，分别达到了氨基酸总量的12.34%、23.15%和11.23%，发芽96h之后脯氨酸、天冬氨酸和谷氨酸所占比例最大，分别为11.76%、11.03%和16.03%，其中脯氨酸含量变化最为明显，增加了34.36倍。

表2 花生发芽过程中不同种类氨基酸的变化($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 2 Changes of amino acid composition during peanut germination ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 氨基酸种类 | 发芽时间/h | | | | |
|------------|------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 |
| 脯氨酸(Pro) | 6.25±0.72 | 14.91±2.33 | 45.69±3.71 | 92.61±6.35 | 221.08±11.15 |
| 酪氨酸(Tyr) | 10.51±1.20 | 18.43±2.88 | 37.51±3.05 | 54.91±3.76 | 79.02±3.99 |
| 组氨酸(His) | 5.80±0.66 | 9.87±1.54 | 19.44±1.58 | 23.87±1.64 | 34.68±1.75 |
| 天冬氨酸(Asp) | 31.63±3.62 | 57.28±8.94 | 109.45±8.90 | 139.96±9.59 | 207.21±10.45 |
| 丝氨酸(Ser) | 11.46±1.31 | 20.76±3.24 | 36.29±2.95 | 41.35±2.83 | 114.95±5.79 |
| 精氨酸(Arg) | 28.79±3.30 | 50.51±7.89 | 90.01±7.32 | 91.43±6.27 | 133.66±6.74 |
| 谷氨酸(Glu) | 59.34±6.79 | 97.63±15.24 | 176.04±14.31 | 201.3±13.81 | 301.15±15.19 |
| 甘氨酸(Gly) | 15.81±1.81 | 22.88±3.57 | 43.83±3.56 | 56.48±3.87 | 71.45±3.60 |
| 丙氨酸(Ala) | 9.53±1.09 | 17.48±2.73 | 39.37±3.20 | 48.39±3.32 | 71.87±3.63 |
| 半胱氨酸(Cys) | 3.68±0.42 | 6.98±1.09 | 15.64±1.27 | 25.17±1.73 | 42.45±2.14 |
| 蛋氨酸(Met)* | 5.38±0.62 | 9.76±1.52 | 21.23±1.73 | 34.17±2.34 | 55.27±2.79 |
| 亮氨酸(Leu)* | 16.28±1.86 | 28.59±4.46 | 61.16±4.97 | 77.99±5.35 | 117.89±5.95 |
| 异亮氨酸(Ile)* | 8.56±0.98 | 15.12±2.36 | 33.05±2.69 | 44.87±3.08 | 68.09±3.44 |
| 苏氨酸(Thr)* | 5.68±0.65 | 10.43±1.63 | 23.09±1.88 | 30.52±2.09 | 44.76±2.26 |
| 苯丙氨酸(Phe)* | 16.91±1.94 | 29.71±4.64 | 67.89±5.52 | 113.22±7.76 | 160.77±8.11 |
| 赖氨酸(Lys)* | 8.83±1.01 | 14.98±2.34 | 29.57±2.40 | 39.13±2.68 | 60.73±3.06 |
| 缬氨酸(Val)* | 11.92±1.37 | 19.67±3.07 | 43.26±3.52 | 62.99±4.32 | 94.15±4.75 |

注：*：人体必需氨基酸，以干基计。

氨基酸的组成对种子的营养品质有很大的影响。发芽可以有效地改善种子的氨基酸组成，糙米^[42]发芽24h后人体必需氨基酸含量增加18%，限制性氨基酸减少，而绿豆^[43]和燕麦^[44]在发芽过程中也有相似的变化。花生中的必需氨基酸在发芽过程中含量增加，由发芽前的73.56mg/100g增加到601.66mg/100g，增加了7.18倍，必需氨基酸的含量也由发芽前的28.69%增加为32.02%，限制性氨基酸如苏氨酸和蛋氨酸的含量分别增加了6.88倍和9.27倍。发芽提高了人体必需氨基酸的含量，改善了氨基酸的组成，缩小了各种氨基酸含量之间的差距，使氨基酸分布更加均衡，从而提升了花生的营养价值。

2.5 花生发芽过程中蛋白酶活力的变化

表3 花生发芽过程中总蛋白酶和肽链内切酶活力的变化
Table 3 Changes of protease and endopeptidase activities during peanut germination

| 发芽时间/h | 总蛋白酶活力/(U/g) | 肽链内切酶活力/(U/g) |
|--------|--------------------------|---------------------------|
| 0 | 63.63±0.50 ^a | 0.76±0.12 ^a |
| 12 | 135.10±0.85 ^b | 66.48±2.87 ^b |
| 24 | 154.86±1.37 ^c | 82.09±4.11 ^b |
| 36 | 165.64±2.71 ^d | 154.60±25.22 ^c |
| 48 | 179.80±0.28 ^e | 168.74±45.12 ^c |
| 60 | 217.27±3.28 ^f | 173.93±4.76 ^c |
| 72 | 221.70±2.56 ^g | 219.02±4.48 ^d |
| 84 | 235.99±1.47 ^h | 246.30±0.37 ^d |
| 96 | 265.05±1.40 ⁱ | 245.16±1.10 ^d |

注：以鲜质量计。

种子萌发过程中参与蛋白质水解的酶主要有肽链内切酶、羧肽酶和氨肽酶3种，本实验中总蛋白酶活力反映

了蛋白酶将蛋白质降解为游离氨基酸的能力,而肽链内切酶活力反映了蛋白酶将蛋白质切割成多肽的能力。由表3可以看出,虽然两种酶活力的定义方法不同,不能以具体的数值作比较,但是在花生发芽过程中,总蛋白酶和肽链内切酶的活力整体变化趋势相同,都是随着发芽时间的延长而增大,在0~96h发芽时间内,总蛋白酶保持稳定的增加,发芽96h时酶活力与未发芽时相比增加了3.16倍。肽链内切酶的活力变化则是具有一定的跳跃性,0~12h、24~36h和60~72h分别出现显著变化,在发芽96h又有略微的下降,酶活力最大值出现在发芽84h,黄上志等^[39]的实验也发现肽链内切酶活力在花生种子吸胀96h后达到最大值,与本实验结果相符。花生干种子中蛋白酶活力很低,但是浸泡6h(发芽0h)时,总蛋白酶已经表现出一定的活力,主要是因为氨肽酶在种子吸胀初期通过脱氨作用将蛋白质上的酰胺基切下,供萌发前期对氨基酸的需要^[45-46]。而在种子吸胀初期,肽链内切酶活力很低,发芽0~12h才被激活,说明羧肽酶和氨肽酶的启动先于肽链内切酶。

2.6 花生发芽过程中各指标的相关性分析

表4 花生发芽过程中各指标的相关性分析
Table 4 Correlation among various parameters during peanut germination

| 指标 | B芽长 | C干物质含量 | D呼吸强度 | E可溶性糖含量 | F可溶性蛋白含量 | G多肽含量 | H游离氨基酸含量 | I总蛋白酶活力 | J肽链内切酶活力 |
|----------|--------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| A发芽率 | 0.743* | -0.846** | 0.863** | 0.412 | -0.106 | 0.969** | 0.772* | 0.767* | 0.938** |
| B芽长 | | -0.967** | 0.451 | 0.875** | 0.480 | 0.856** | 0.981** | 0.974** | 0.899** |
| C干物质含量 | | | -0.589 | -0.780* | -0.351 | -0.932** | -0.978** | -0.980** | -0.969** |
| D呼吸强度 | | | | 0.124 | -0.434 | 0.808** | 0.507 | 0.444 | 0.728* |
| E可溶性糖含量 | | | | | 0.594 | 0.560 | 0.796* | 0.824* | 0.659 |
| F可溶性蛋白含量 | | | | | | 0.070 | 0.466 | 0.512 | 0.187 |
| G多肽含量 | | | | | | | 0.881** | 0.873** | 0.972** |
| H游离氨基酸含量 | | | | | | | | 0.981** | 0.931** |
| I总蛋白酶活力 | | | | | | | | | 0.925** |

注:*.在0.05水平上显著相关;**.在0.01水平上极显著相关。

由表4可知,在花生发芽过程中,发芽率与芽长、游离氨基酸含量和总蛋白酶活力呈显著正相关($R_{AB}=0.743$, $R_{AH}=0.772$, $R_{AI}=0.767$),与呼吸强度、多肽含量和肽链内切酶活力呈极显著正相关($R_{AD}=0.863$, $R_{AG}=0.969$, $R_{AJ}=0.938$),与干物质含量呈极显著负相关($R_{AC}=-0.846$);芽长与干物质含量呈极显著负相关($R_{BC}=-0.967$),与可溶性糖、多肽含量、游离氨基酸含量、总蛋白酶活力和肽链内切酶活力呈极显著正相关($R_{BE}=0.875$, $R_{BG}=0.856$, $R_{BH}=0.981$, $R_{BI}=0.974$, $R_{BJ}=0.899$);干物质含量与可溶性糖含量呈显著负相关($R_{CE}=-0.780$),与多肽含量、游离氨基酸含量、总蛋白酶活力和肽链内切酶活力呈极显著负相关($R_{CG}=-0.932$, $R_{CH}=-0.978$, $R_{CI}=-0.980$, $R_{CJ}=-0.969$),这表明在发芽过程中,酶系统激活,干物质含量下降,大分子蛋白质被降解为多肽和游离氨基酸,含氮物质种类和

含量发生变化;呼吸强度与肽链内切酶活力呈显著正相关($R_{DJ}=0.728$),与多肽含量呈极显著正相关($R_{DG}=0.808$);可溶性糖含量与游离氨基酸含量和总蛋白酶活力呈显著正相关($R_{EH}=0.796$, $R_{EI}=0.824$);多肽含量与游离氨基酸含量、总蛋白酶活力和肽链内切酶活力呈极显著正相关($R_{GH}=0.881$, $R_{GI}=0.873$, $R_{GJ}=0.972$);游离氨基酸含量与总蛋白酶活力和肽链内切酶活力呈极显著正相关($R_{HI}=0.981$, $R_{HJ}=0.931$)。由相关性分析可以看出,花生种子随着发芽时间的延长,与蛋白质代谢相关的酶活力逐渐加强,而干物质含量的下降则表明大分子的脂肪和蛋白质降解,一方面为种子发芽提供能量,另一方面也是多肽和游离氨基酸含量增加的根本原因。

3 结论

花生在发芽过程中,随着发芽时间的延长,发芽率和芽长均呈现不同程度的增加,呼吸强度呈上升趋势,干物质含量不断下降;可溶性糖和可溶性蛋白含量先降低后升高,可溶性糖含量在发芽84h达到最大值,与未发芽相比增加了21.24%,可溶性蛋白含量在48h时达到最小值,比未发芽时降低了79.07%,随后逐渐上升,在发芽96h时,含量比未发芽时增加了28.98%;多肽和游离氨基酸含量逐渐增加,但是在48h时多肽含量增幅变小。花生蛋白酶和肽链内切酶活力在发芽过程中不断增大,其中羧肽酶和氨肽酶先于肽链内切酶被激活。花生发芽48h是可溶性蛋白分解和合成的转折点,也是花生储藏蛋白降解加速的时间点,对研究花生发芽过程中蛋白质代谢变化具有重要意义。

发芽提高了花生蛋白的营养价值和加工特性。蛋白质的含量及氨基酸的组成是影响食品营养价值的重要因素,经过96h的发芽,花生可溶性蛋白质含量升高,游离氨基酸增加了6.33倍,必需氨基酸含量由发芽前的73.56mg/100g上升到601.66mg/100g,提高了7.18倍,必需氨基酸的比例也由发芽前的28.69%增加为32.02%,限制性氨基酸如苏氨酸和蛋氨酸的含量虽然仍未达到FAO和WHO的标准^[47],但是与未发芽时相比分别增加了6.88倍和9.27倍。花生蛋白在发芽过程中降解并合成新的蛋白质,进而影响自身的功能特性,随着分子质量降低,蛋白质溶解度、乳化稳定性和凝胶能力都有所增强^[48],使花生蛋白的加工特性有所改善。

发芽作为改良花生蛋白的一种手段,有着显著的效果,目前这方面的研究还比较少,发芽过程中花生蛋白主要组分和亚基的含量与组成变化尚不清楚。蛋白质的亚基的大小及其解离/聚合性质都会对其营养和功能特性产生重要的影响,因此发芽过程中花生蛋白代谢的研究可以深入到蛋白亚基的层次,探讨亚基组成和功能特

性的变化,能够从机理上为其在实际应用中提供理论依据。同时花生发芽过程中容易感染黄曲霉菌,虽然本实验中在发芽前通过一定浓度的次氯酸钠浸种来抑制黄曲霉菌,但是如何在实际生产中使发芽花生达到食用芽菜的卫生水平,还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 杨晓泉, 陈中, 赵谋民. 花生蛋白的分离及部分性质研究[J]. 中国粮油学报, 2001, 16(5): 25-28.
- [2] 张宇昊, 王强. 花生蛋白的开发与应用[J]. 花生学报, 2005, 34(4): 12-16.
- [3] 王瑛瑶, 王璋. 水酶法从花生中提取蛋白质与油-酶解工艺参数[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(4): 60-64.
- [4] 周雪松, 赵谋明. 我国花生食品产业现状与发展趋势[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(6): 84-89.
- [5] 董文宾, 杨兆艳, 郑丹, 等. 花生蛋白的研究进展[J]. 粮油加工与食品机械, 2005(3): 51-52.
- [6] 张健磊. 花生蛋白溶解性质改性的研究[D]. 济南: 山东轻工学院, 2011: 5-8.
- [7] 孟凡莉. 花生肽的酶法制备、分离纯化及其抗氧化活性[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2010: 61-62.
- [8] 熊治清. 连续酶解花生蛋白及其花生多肽抗氧化活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010: 47-48.
- [9] 张宇昊. 花生短肽制备及其功能活性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007: 99.
- [10] 张伟. 花生蛋白ACE抑制肽的制备和降血压效果的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007: 41.
- [11] 何雨青, 石艳宾. 花生多肽的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(5): 171-174.
- [12] JAMDAR S N, RAJALAKSHIMI V, PEDNEKAR M D. Influence of degree hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2010, 121(1): 178-184.
- [13] CHAVAN J K, KADAM S S. Nutritional improvement of cereals by sprouting[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1989, 28(5): 401-437.
- [14] ELMONEIM A, ELKHALIFA O, BERNHARDT R. Influence of grain germination on functional properties of sorghum flour[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 387-392.
- [15] 黄国平. 粮食种子萌发过程中营养特性的变化[J]. 中国食物与营养, 2005, 12(3): 26-27.
- [16] ARORA S, JOOD S, KHETARPAUL N. Effect of germination and probiotic fermentation on nutrient composition of barley based food mixtures[J]. Food Chemistry, 2010, 119(2): 779-784.
- [17] SRIPRIYA G, ANTONY U T, CHANDRA S. Changes in carbohydrate, free amino acids, organic acids, phytate and HCl extractability of minerals during germination and fermentation of finger millet (*Eleusine coracana*) [J]. Food Chemistry, 1997, 58(4): 345-350.
- [18] 郭峰, 万书波, 李国新, 等. NaCl胁迫对花生种子萌发的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2010, 28(3): 177-181.
- [19] 李林, 刘登望, 熊璟, 等. 花生生育早期耐阴性室内鉴定对大田期的意义[J]. 作物学报, 2008, 34(3): 477-485.
- [20] 方文德. 花生种子蛋白酶抑制剂及其与脱水耐性及活力的关系研究[D]. 广州: 中山大学, 1997: 46-48.
- [21] OHTSUBO K, SUZUKI K, YASUI Y, et al. Bio-functional components in the processed pre-germinated brown rice by a twin-screw extruder[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2005, 18(4): 303-316.
- [22] 刘娟, 史晓媛, 王庆南, 等. 玉米发芽过程中碳水化合物代谢变化的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 97-102.
- [23] AOAC. Official methods of analysis[S]. 15th ed. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists, 1990.
- [24] GB 3543—83农作物种子检验规程[S]. 北京: 中国标准出版社, 1983.
- [25] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.
- [26] ROSEN H. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids [J]. Arch Biochem and Biophys, 1957, 67(1): 1015.
- [27] 唐军涛. 发芽大豆多肽富集工艺及富肽豆乳开发研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 21-22.
- [28] 胡琼英, 狄浏, 聂理, 等. 生物化学实验[M]. 北京, 化学工业出版社, 2008: 59-61.
- [29] 宾金华, 傅家瑞. 去胚轴对花生子夜肽链内切酶和贮藏蛋白质降解的影响[J]. 植物生理学报, 2000, 26(6): 465-470.
- [30] HARRIS N, CHRISPEELS M J. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans[J]. Plant Physiol, 1975, 56(2): 292-299.
- [31] BOVE J, JULLIEN M, GRAPPIN P. Functional genomics in the study of seed germination[J]. Genome Biology, 2001, 3(1): 1002.1-1002.5.
- [32] DOMINGUEZ F, CEJUDO F J. Patents of starch endosperm acidification and protease gene expression in wheat grains following germination[J]. Plant Physiol, 1999, 119: 81-87.
- [33] SUNG H G, SHIN H T, HA J K, et al. Effect of germination temperature on characteristics of phytase production from barley[J]. Bioresource Technology, 2005, 96(11): 1297-1303.
- [34] 陈志刚, 顾振新, 汪志君, 等. 糙米的营养成分及其在发芽过程中的变化[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(3): 84-87.
- [35] HOODA S, JOOD S. Effect of soaking and germination on nutrient and antinutrient contents of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) [J]. Journal of Food Biochemistry, 2003, 27(2): 165-176.
- [36] ONIMAWO I A, ASUGO S. Effects of germination on the nutrient content and functional properties of pigeon pea flour[J]. Journal of Food Science and Technology, 2004, 41(2): 170-174.
- [37] WANASUNDARA P K J P D, SHAHIDI F, BROSNAN M E. Changes in flax (*Linum usitatissimum*) seed nitrogenous compounds during germination[J]. Food Chemistry, 1999, 65(3): 289-295.
- [38] OGBONNA A C, OBI S K C, OKOLO B N. Optimization of proteolytic activities in malting sorghum[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(6): 711-716.
- [39] 黄上志, 傅家瑞. 花生种子的储藏蛋白质[J]. 花生科技, 1992(1): 1-6.
- [40] 李卓杰, 刘蓉晖, 曾晓东, 等. 不同品种花生种子萌发中的蛋白质的研究[J]. 中山大学学报论丛, 1992(3): 124-129.
- [41] 李卓杰, 丘志勇, 傅家瑞. 不同品种花生种子萌发中蛋白质和酸性酶的研究[J]. 种子, 1990, 46(2): 12-15.
- [42] 郑艺梅, 李群, 华平. 发芽对糙米蛋白质及氨基酸组成特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(5): 7-11.
- [43] EL-ADAWY T A, RAHMA E H, EL-BEDAWAY A A, et al. Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2003, 58(3): 1-13.
- [44] 胡崇琳, 谢笔钧, 孙智达. 发芽前后燕麦蛋白质的组成变化及其营养评价[J]. 营养学报, 2012, 34(2): 193-195.
- [45] HUANG Shangzhi, FU Jiarui. The relation of storage protein to vigor and its mobilization pattern in germinating peanut seeds[J]. Acta Bot Sin, 1992, 34(7): 543-550.
- [46] YAMADA T, AIBARA S, MORITA Y. Isolation and some properties of arachin subunits[J]. Agricultural and Biological, 1979, 43(12): 2549-2556.
- [47] 黄国平. 粮食种子萌发过程中营养特性的变化[J]. 中国食物与营养, 2005(12): 25-27.
- [48] ZHAO Guanli, LIU Yan, ZHAO Mouming, et al. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1438-1443.