

大豆发芽过程中抗营养因子的变化*

郭 鸽¹, 霍贵成¹, 贾振宝², 张英华¹

1(乳品科学教育部重点实验室, 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨, 1500301)

2(中国计量学院生命学院, 浙江杭州, 3100182)

摘 要 大豆蛋白存在着胰蛋白酶抑制因子和凝集素等抗营养因子, 影响人类对其的利用。文中采用分光光度法和免疫火箭电泳法测定了发芽过程中东农 42、东农 823、71434、40567、黑农 40 五个大豆品种中胰蛋白酶抑制因子和凝集素的含量变化。结果发现: 发芽能明显改变大豆中抗营养因子的含量, 不同品种的抗营养因子变化程度不同, 5 种大豆在发芽过程中显示出较为一致的总体趋势。发芽温度对大豆中胰蛋白酶抑制因子的含量有影响。证实萌发的大豆中存在可失活大豆抗营养因子的内源酶。

关键词 大豆, 抗营养因子, 发芽

豆类等经适当发芽处理后, 其化学成分均有所改变, 营养价值得以提高, 并可形成独特风味和口感^[1,2]。然而, 大豆中各种抗营养因子的存在影响了大豆蛋白的营养价值和消化率。大豆中所含的几种主要的抗营养因子(ANFs, antinutritional factors)有蛋白酶抑制因子、致甲状腺肿素、血球凝集素、抗原蛋白和抗维生素因子等。其中胰蛋白酶抑制因子(TI, trypsin inhibitors), 血球凝集素(lectins)和抗原蛋白的含量或生物活性较高, 是大豆中重要的抗营养因子^[3]。它们的存在有碍营养素的吸收, 导致身体的不适或豆制食品感官上的缺陷, 严重时造成死亡。鉴于豆类种子在萌发后即丧失了胰蛋白酶的抑制活性, 文中研究了发芽过程中抗营养因子的变化情况, 为从萌发的大豆中分离纯化可降解大豆抗营养因子的蛋白酶, 进一步研究其酶学特性提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 大豆样品

本试验共测定了由东北农业大学大豆研究所提供的东农 42、东农 823、71434、40567、黑农 40 五个大豆品种。

1.2 主要化学试剂和仪器

N α -Benzoyl-DL-Arginine-p-Nitroanilide (BAPNA), 大豆胰蛋白酶抑制因子, 牛胰蛋白酶, 凝集素, 凝集素抗体等购自 Sigma 公司, 过硫酸铵, N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)购自宝泰克生物试剂公司。

电泳仪 DYY-III 8B 型(北京六一仪器厂), 紫外可见分光光度计 UV-2401PC 型(日本岛津公司)。

1.3 实验方法

分别称取大豆东农 42、东农 823、71434、40567、黑农 40 五个品种大豆 300 g, 分别置于铺有 2 层纱布的方盘内, 加入足够的水, 分别在 20、30℃ 及黑暗条件下发芽。每天浇水一次并取每种发芽大豆 10 g, 用捣碎机捣碎, -20℃ 冻结 12 h 后, 冻干贮存。测定 0、1、2、3、4、5、6、7d 时大豆中抗营养因子的含量。

1.3.1 胰蛋白酶抑制因子活性(TIA, trypsin inhibitors activity)测定方法

准确称取 1 g 样品于三角瓶中, 加入 50 mL Tris-CaCl₂ 缓冲液, 振荡 3 h 后, 2 700 r/min 离心 10 min, 取上清液依次按 2、4、10 倍稀释至 100 倍。取上述稀释好的样品浸提液 1 mL 于试管中, 加入 2.5 mL BAPNA 溶液, 将试管置于 37℃ 水浴锅中预热 10 min, 加入 1 mL 牛胰蛋白酶溶液, 准确计时, 反应 10 min 后, 加入 0.5 mL 体积分数 30% 醋酸终止反应。410 nm 比色。按同样方法同时测定空白溶液, 只是先加入 30% 醋酸, 然后加入牛胰蛋白酶溶液。胰蛋白酶标准溶液的吸光值应为 0.39~0.42, 样品溶液中胰蛋白酶 40%~60% 受抑制, 否则应重做^[4]。

$$TIA/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} = \frac{A_1 - A_2}{0.019} \times \frac{50}{1000} \times D$$

TIA, 胰蛋白酶抑制因子活性(mg/g); A_1 , 标准溶液 410nm 的吸光值; D , 稀释倍数; A_2 , 样品溶液 410nm 的吸光值; 0.019, 1 μ g 牛胰蛋白酶 410nm 吸光值。

1.3.2 凝集素含量的测定

准确称取 1g 样品于三角瓶中, 加入 50 mL Tris-

第一作者: 博士, 讲师。

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39970548)

收稿日期: 2007-10-18, 改回日期: 2008-02-19

CaCl₂ 缓冲液,振荡 3h 后,2 700r/min 离心 10min,取上清液以备分析。加热 0.1% 琼脂糖溶液至溶解,取 15 mL 于小烧杯中,和玻璃板一同放入烘箱内。胶液温度降至 50℃ 时,加入 0.2 mL 凝集素抗体溶液于半乳糖胶液中,混匀,迅速倒在平板上,铺匀全板。板冷却固化后,以间隔 1cm 距离打孔。通电后在孔内依次滴入凝集素标准溶液 20、40、80、160 ng/mL 各 10 μ L,制作标准曲线。样品待测液 10 μ L。电压 140 V,电泳 8 h。用考马斯亮兰染色 5~10 min,脱色 2 h,烤干胶面,测定峰高,绘制标准曲线^[5]。

$$\text{样品凝集素}/\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} = \frac{A}{m} \times D$$

表 1 发芽对大豆胰蛋白酶抑制因子活性的影响

大豆品种	发芽天数/d	30℃ 发芽胰蛋白酶抑制因子活性/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	20℃ 发芽胰蛋白酶抑制因子活性/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
东农 823	0	54.27±1.69 ^{Aa}	54.14±1.05 ^{Aa}
	1	54.25±1.81 ^{Aa}	54.36±2.10 ^{Aa}
	2	53.63±1.65 ^{ABa}	54.30±2.37 ^{Aa}
	3	51.51±2.35 ^{ABCab}	54.06±1.18 ^{AB}
	4	48.71±1.59 ^{BCbc}	53.03±1.77 ^{Aabc}
	5	48.29±2.64 ^{Cbc}	51.95±1.80 ^{Aab}
	6	48.21±1.59 ^{Cbc}	49.67±1.42 ^{Ab}
	7	47.26±1.75 ^{Cc}	50.11±1.68 ^{Aab}
71434	0	56.18±1.91 ^{Aa}	55.78±1.18 ^{Aa}
	1	55.87±2.11 ^{Aa}	55.69±2.03 ^{Aa}
	2	55.05±2.40 ^{ABa}	55.79±1.63 ^{Aa}
	3	54.16±3.41 ^{ABa}	55.73±1.78 ^{Aa}
	4	48.98±1.68 ^{Bb}	55.07±1.16 ^{Aab}
	5	48.86±2.11 ^{Bb}	53.42±1.78 ^{Bab}
	6	49.17±2.18 ^{Bb}	52.25±1.83 ^{Ab}
	7	49.33±2.38 ^{Bb}	52.46±2.05 ^{Aa}
黑衣 40	0	47.49±1.47 ^{Aa}	47.38±1.06 ^{Aa}
	1	47.74±1.56 ^{Aa}	47.42±1.43 ^{ABa}
	2	46.91±1.39 ^{Ab}	47.78±2.13 ^{ABa}
	3	47.30±1.49 ^{Ab}	47.21±1.83 ^{ABa}
	4	43.09±1.51 ^{Ac}	46.34±1.45 ^{ABab}
	5	43.59±2.20 ^{Ac}	43.62±1.30 ^{ABbc}
	6	43.51±1.51 ^{Ac}	43.28±1.41 ^{Bc}
	7	44.17±2.57 ^{Abc}	43.33±1.60 ^{Bc}
40567	0	36.90±2.10 ^{Aa}	36.58±1.16 ^{Aa}
	1	36.89±3.10 ^{Aa}	36.49±1.24 ^{Aa}
	2	36.89±2.13 ^{Aa}	36.38±1.37 ^{Aa}
	3	35.49±1.63 ^{Aa}	36.09±1.56 ^{Aa}
	4	33.83±1.48 ^{Aa}	35.62±1.75 ^{Aa}
	5	33.85±1.61 ^{Aa}	35.19±1.90 ^{Aa}
	6	33.60±2.45 ^{Aa}	35.16±1.50 ^{Aa}
	7	34.74±1.32 ^{Aa}	35.25±1.49 ^{Aa}
东农 42	0	31.15±1.03 ^{Aa}	31.42±1.63 ^{Aa}
	1	30.94±2.12 ^{ABa}	31.33±2.16 ^{Aa}
	2	30.41±1.74 ^{ABa}	31.46±2.24 ^{Aa}
	3	30.02±3.23 ^{Ba}	31.43±1.52 ^{Aa}
	4	24.72±1.75 ^{Bb}	30.65±1.63 ^{Ab}
	5	25.33±2.02 ^{ABb}	27.46±1.27 ^{Ab}
	6	24.66±1.46 ^{Bb}	27.19±1.07 ^{Ab}
	7	25.35±2.66 ^{ABb}	27.13±0.92 ^{Ab}

注:表 1 中同列中大写字母不同者表示差异极显著 $P<0.01$;同列中小写字母不同者表示差异显著 $P<0.05$ 。

5 种大豆在 30℃ 条件下经过 7d 发芽,结果发现,大豆在发芽前 3d 胰蛋白酶抑制因子活性基本未变化或变化程度较小。第 4 天时胰蛋白酶抑制因子和凝

A,样品峰高在标准曲线中查得的凝集素浓度 (ng/mL); m ,样品质量(g); D ,稀释倍数。

1.4 数据处理

用 SAS6.12 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 发芽对大豆中胰蛋白酶抑制因子活性的影响

从表 1 中可以看出,大豆中抗营养因子的含量与发芽时间密切相关,随着发芽时间的延长,抗营养因子的含量逐渐减少,但不同品种大豆中抗营养因子的降低程度和幅度不同。

集素含量与未发芽相比下降程度最大。东农 823、71434、黑衣 40 和东农 42 在发芽第 4 天时,胰蛋白酶抑制因子分别为 (48.71 ± 1.59) 、 (48.98 ± 1.68) 、

(43.09 ± 1.51) mg/g 和 (24.72 ± 1.75) mg/g, 活性与发芽第 1 天相比, 差异极显著 ($P < 0.01$)。40567 的胰蛋白酶抑制因子第 4 天降至 (33.83 ± 1.48) mg/g, 残余量为 91.7%。此后随着发芽时间的增加, 大豆中的胰蛋白酶抑制因子的含量与发芽第 1 天相比逐渐降低。

同一品种大豆采用不同的温度发芽, 使得发芽过程中胰蛋白酶抑制因子的变化程度不同。30℃ 条件下东农 823 发芽 7d 后, 残余胰蛋白酶抑制因子含量 87.1%; 20℃ 条件下发芽, 残余了 92.3%。71434 在 2 种处理条件下残余量相差 5.6%。与未发芽前相比, 胰蛋白酶抑制因子降低程度最大所需的时间不同。20℃ 发芽时, 最大程度减少胰蛋白酶抑制因子的时间分别为第 5 天或第 6 天。其他处理条件相同, 发芽温度升高 10℃, 5 种大豆在第 4 天时即表现出胰蛋白酶抑制因子显著性减少。

2.2 发芽对大豆中血球凝集素活性的影响

血球凝集素的含量变化与胰蛋白酶抑制因子的变化类似(见图 1~图 5), 5 种大豆均在第 4 天发芽时出现不同程度的改变。发芽第 4 天时, 40567 中凝集素含量降低了 16.5%; 东农 42 中凝集素含量降低了 12.6%; 而东农 823 仅降低 3.4%。凝集素含量随发芽天数的延长而降低, 但发芽 4d 后, 降低缓慢甚至有所回升。

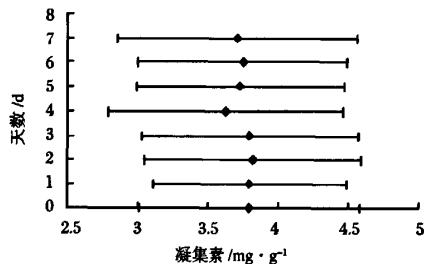


图 1 发芽对东农 823 凝集素含量的影响

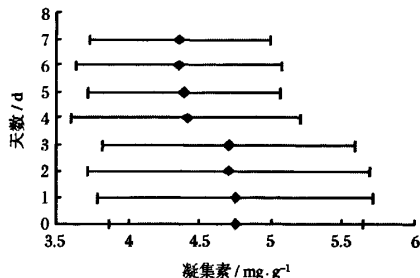


图 2 发芽对 71434 凝集素含量的影响

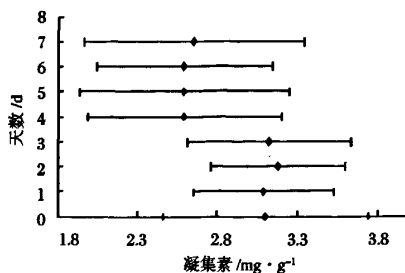


图 3 发芽对 40567 凝集素含量的影响

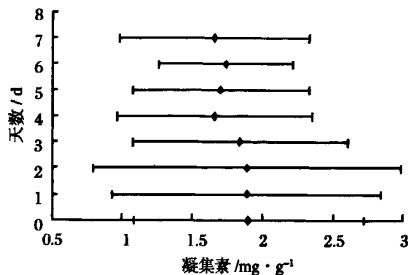


图 4 发芽对东农 42 凝集素含量的影响

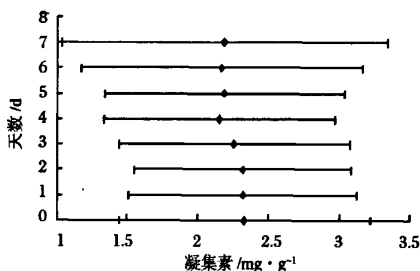


图 5 发芽对黑农 40 凝集素含量的影响

比较 5 种大豆抗营养因子在发芽过程中的变化情况可知, 东农 42 在 30℃ 条件下发芽第 4 天时, 抗营养因子变化最大。选择东农 42 作为提取失活抗营养因子的酶源。发芽条件为 30℃, 发芽 4d。

3 讨论

大豆胰蛋白酶抑制因子在发芽过程中出现了有限的但是线性的下降趋势。Wilson 报道, 当大豆萌发到第 13 天时, 子叶中的包曼伯克(Boroman-Brik)抑制因子活性降为零^[6]。库尼兹(Kunitz)抑制因子含量在发芽 8d 后下降, 而发芽 14d 后仍存在于子叶中^[7]。Rooken 测得大豆发芽 7d 后降低了 25.5%^[8]。Calland 种的大豆浸泡 12h 后发芽 6d, 胰蛋白酶抑制因子降低了 32%^[9]。浸泡 24h 发芽 3d, Kantich 种发芽大豆胰蛋白酶抑制因子减少 13%, Soylima 种下降 4%, Dane 种下降了 8%。Kingsoy

种大豆发芽 5d 胰蛋白抑制因子活性下降 12%。发芽还可有效降低大豆中凝集素含量,发芽 4d,其活力为未发芽大豆的 3.7%^[10]。

本研究结果证实了上述实验的趋势,发芽后大豆中抗营养因子的含量极显著低于发芽前($P < 0.01$) (30℃ 温度下发芽)。同时,5 种大豆发芽前 3d 抗营养因子的含量变化较小或基本没有变化均在发芽第 4 天或第 5 天显著减少抗营养因子的含量,但降低的程度不同。30℃ 条件下发芽,5 种大豆在发芽第 4 天的胰蛋白酶抑制因子减少量与没发芽大豆相比的顺序依次为,东农 42>71434>东农 823>黑农 40>40567,其中东农 42 在发芽过程中胰蛋白酶抑制因子降低了 20.6%,40567 仅下降了 8.3%。凝集素含量减少量与未发芽大豆相比的顺序为,40567>东农 42>黑农 40>71434>东农 823。20℃ 下发芽,5 种大豆在发芽第 5 天的胰蛋白酶抑制因子减少量与未发芽大豆相比的顺序依次为,东农 42>71434>东农 823>黑农 40>40567,其中东农 42 在发芽过程中胰蛋白酶抑制因子降低了 12.9%,40567 仅下降了 3.8%。

种子萌发过程中,贮存蛋白经过水解释放出能量供种子萌发和生长需要。同时蛋白酶的活性增加,以分解贮藏的蛋白质供生长所需。大豆中的抗营养因子多为蛋白质,它们存在于大豆的贮存器官中,作为贮存蛋白在种子萌发时参与种子的复杂的生理生化变化。抗营养因子也可被种子自身产生的酶系所作用,它们在发芽过程中含量的降低即说明是大豆本身的酶将其利用或降解,这种酶应属蛋白酶。而且,萌发时抗营养因子含量降低最大 1d 的大豆芽含有的酶活性也应最高。因此,可以利用这 1d 的豆芽来提取所希望的有效而特异性的失活抗营养因子的酶。

李清芳报道,大豆中蛋白酶活力在发芽初期较高,发芽第 4 天活力达最大^[11]。以后活性逐渐减少并趋于稳定。本试验中无论采用何种处理温度,大豆的抗营养因子含量在降低至一定程度内,即不再显著下降,而是在一定的水平内波动,微量下降甚至略有回升,如东农 42 在胰蛋白酶抑制因子下降 21.6% 后的第 2 天仅降低了 18.7%。这一现象也说明发芽中产生的失活抗营养因子的酶活力因不同的发芽时间而不同。

种子萌发需要一定的温度条件,因为萌发时种子内部所进行的生化反应是酶促反应,适宜的温度可以促进这些反应的速度。温度过高或过低对种子萌发

都是不利的。植物所能生存的最低温度在 0℃ 甚至 0℃ 以下。但植物能生长的温度范围却是比较狭窄的。生长过程的速度随温度的增加而加快。

本次试验发芽采用 2 种处理温度 20℃ 和 30℃。结果显示,发芽温度对大豆中胰蛋白酶抑制因子的含量有影响,升高温度使胰蛋白酶抑制因子含量提前 1 天发生显著的变化。东农 42 胰蛋白酶抑制因子含量下降率在 30℃ 条件下发芽比 20℃ 条件下发芽降低了 59.7%,40567 胰蛋白酶抑制因子含量下降率在 30℃ 条件下发芽比 20℃ 条件下发芽降低了 84.4%。因此,30℃ 的处理温度有利于大豆抗营养因子为酶所利用。这一温度也符合大豆的最适生长温度。本研究未对不同温度下凝集素含量变化进行比较,但凝集素的变化趋势可能与胰蛋白酶抑制因子一致。

比较 5 种大豆抗营养因子在发芽过程中的变化情况确定选择东农 42 在 30℃ 条件下发芽 4d 所得豆芽作为提取失活抗营养因子的酶源。发芽条件对萌发种子中抗营养因子的变化也有很大关系。因此,选取适当的品种,优化发芽条件,是今后提取失活抗营养因子内源酶的重要研究方向。

参 考 文 献

- 1 苗 颖,马 莺. 大豆发芽过程中营养成分变化[J]. 粮食与油脂, 2005, (5): 29~30
- 2 付红岩,孟广龙,马 莺. 大豆发芽过程中蛋白质变化的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(6): 41~46
- 3 Gueguen J. The composition, biochemical characteristics and analysis of proteinaceous antinutritional factors in legume seeds. A review[C]. Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds, Abbrdeen(UK): 1993. 9~30
- 4 Huo Guicheng. Inactivation of antinutritive factors in soya bean by proteolytic enzymes [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 1998, 5 (2): 128~137
- 5 Pusztai, A, Watt W B, Stewart J C. A comprehensive scheme for the isolation of trypsin inhibitors and agglutinins from soyabean seeds [J]. J Sci Food Agric, 1991, 39: 826~866
- 6 Wilson K A. Survey of the proteolytic activities degrading the kunitz trypsin inhibitor and glycinin in germination soybean Glycine max[J], Plant physiol, 1988, 88: 355~360
- 7 Rooke J A, Growth performance and gut function of piglets weaned of four weeks of age and feed protease-treated soybean meal [J], Anim Feed Sci Technol, 1998, 70: 175~190

- 8 Mostafa M M. Chemical and nutritional changes in soybean during germination [J]. Food chem, 1987, 23: 257~275
- 9 Bob Van den Hout. Inactivation Kinetics study of the Kunitz soybean trypsin inhibitor and the Bowman-Birk inhibitor [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 281~285
- 10 卢晓风, 夏玉先, 裴 炎. 植物蛋白酶抑制剂在植物抗虫与抗病中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(4): 328~331
- 11 李清芳, 范永红, 马成仓. 大豆种子萌发过程中蛋白质、脂肪和淀粉含量的变化[J]. 安徽农业科学, 1998, 5: 300~303

Changes of Antinutritional Factors in the Soybean Germination Process

Guo Ling¹, Huo Guicheng¹, Jia Zhenbao², Zhang Yinghua¹

1(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Food College, Northeast Agricultural University, Harbin 1500301, China)

2(College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 3100182, China)

ABSTRACT The use of soybean protein was influenced by antinutritional factors. This research using spectrophotometry and immunity rocket electrophoresis determined contents of trypsin inhibitors and lactins during the germination in Dongnong42, Dongnong823, 71434, 40567 and Heinong 40. The results were as follows; Germination could greatly change the contents of antinutritional factors in the soybean seeds. The changing extent was varied among cultivars. There are similar trends in five soybean cultivars. The temperature of germination effects on the contents of antinutritional factors in the soybean seeds. The endogenous proteinase of specially inactivating antinutritional factors in soybeans had been proved.

Key words soybean, antinutritional factors, germination

信息窗

美国利用牧草生产生物乙醇

美国科学家成功利用牧草作为原料生产出生物乙醇,而且生产成本低廉,出产的生物乙醇质量也比较理想。

这一研究由美国内布拉斯加大学和美国农业部研究中心的科学家历时5年合作完成,研究成果已发表在新一期的美国《国家科学院学报》上。

科学家对内布拉斯加州、南达科他州和北达科他州一些农场种植的牧草进行了试验,结果显示,平均1 km²牧草大约能生产2 800 L生物乙醇,而利用同等面积的玉米大约可提取3 270 L的生物乙醇。

沃格耳指出,以单位面积而言,从牧草提取的生物乙醇量少于玉米,但牧草成本比玉米低很多,而且所生产的生物乙醇质量也没有太大差别,因此这项研究成果对今后开发和利用新型生物燃料具有重要意义。

新型饮料奶啤酒全新上市

随着人们生活水平的提高,各种奶制品发展迅速,奶啤酒就是其中的一种。奶啤酒为发酵型低醇饮品(酒精度0.2°~6°),看上去呈现奶饮料的外观特色,开启时的丰富泡沫又不由使人想起它是啤酒。饮用时在感到奶香的同时又有啤酒的纯正香味,口味颇为特别。

奶啤酒作为一种新型饮料,兼具了奶与啤酒的营养和口感,它经过二轮纯生物发酵,使牛奶中的营养成分更利于人体吸收,也大大降低了乙醇对人体的刺激和伤害,富含人体所必需的全部氨基酸和维生素,钙含量也很丰富,适宜饮用的人群范围广泛,是一种男女老少皆宜的饮品。

自2003年小规模投产以来,奶啤酒(汉奥斯)以其概念新、品质高、口感好、时尚健康而得到广大消费者的喜爱,也得到广大经销商的青睐。4年来,汉奥斯产品依靠其良好的品质和口碑广为流传,遍布全国的32个省、市、自治区(包括香港特别行政区)。

鄂尔多斯市蒙元乳业有限责任公司成立于2003年3月,是以现代科技成果为依托的新型乳制品企业,是鄂尔多斯市“农牧业产业化重点龙头企业”。有奶白酒、奶啤酒、奶制品3条生产线。产品有“汉奥斯”奶啤酒,“八白室”系列奶白酒、奶油、奶酪、奶片。