

# 腐乳中低聚肽氨基酸组成及抗氧化活性研究

## Study on composition and antioxidant activity of amino acids in pickled tofu oligopeptides

唐杰

TANG Jie

(抚顺师范高等专科学校, 辽宁 抚顺 113006)

(Fushun Normal Technical College, Fushun, Liaoning 113006, China)

**摘要:**采用水溶法制备腐乳低聚肽,对其进行理化及氨基酸组成分析,通过与抗坏血酸对比 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{DPPH}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的清除能力,评价腐乳低聚肽抗氧化活性。结果表明:腐乳低聚肽总蛋白质含量为85.47%,氨基酸组成丰富,富含抗氧化性氨基酸,必需氨基酸含量为34.43%,具有抗氧化活性的氨基酸总量为30.5%;抗氧化试验结果显示,腐乳低聚肽具有一定的自由基清除能力,对 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{DPPH}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的半抑制浓度 $IC_{50}$ 值分别为5.8, 6.1, 9.7 mg/mL。因此,腐乳中低聚肽具有较强的抗氧化活性。

**关键词:**腐乳;低聚肽;氨基酸;抗氧化

**Abstract:** By water soluble preparation of oligo peptide of fermented bean curd, physico-chemical analysis and amino acid composition analysis, through and ascorbic acid comparison  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{DPPH}\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  free radical scavenging capacity, evaluation of fermented bean curd oligopeptides antioxidant activity of the oligopeptides. The results showed that the total protein content of fermented bean curd oligopeptides 85.47%. The amino acid composition of the rich, rich in antioxidant amino acids must amino acid content of 34.43%, with the total amino acid content of antioxidant activity was 30.5%; antioxidantation experiment results show, fermented bean curd oligopeptides with free radical scavenging capacity and of  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{DPPH}\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  free radical half inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) was 5.8, 6.1, 9.7 mg/mL respectively. Therefore, oligo peptide has strong antioxidant activity in pickled tofu.

**Keywords:** pickled tofu; oligopeptides; amino acids; antioxidant activity

腐乳是中国独具特色大豆发酵制品之一,在国内受到广大消费者喜爱。腐乳富含蛋白和脂肪,经过复杂生化酶解后,形成对人体具有特殊生理调节性能的低聚肽氨基酸,该

类氨基酸很容易被机体消化吸收,具有很好的营养价值和生物活性<sup>[1]</sup>。

王鹤霖等<sup>[2]</sup>研究表明克东腐乳分离提取的低聚肽具有一定的抗氧化活性,但是对于腐乳中低聚肽氨基酸组成分析以及抗氧化活性与氨基酸组成关系没有进行系统研究,而且研究的抗氧化活性未做通用的对照试验。因此,本试验主要分析酶解后腐乳中低聚肽的氨基酸组成并进行清除 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{DPPH}\cdot$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 抗氧化活性评价,旨在评价腐乳中低聚肽氨基酸潜在的抗氧化活性,进一步揭示腐乳中抗氧化肽的构效关系,为开发富含抗氧化活性的肽类食品提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料来源

腐乳:天津中天食品有限公司;

$\text{DPPH}$ :美国 Sigma 公司;

邻二氮菲:分析纯,天津市科威化学试剂公司;

三氯乙酸:分析纯,天津市光复化学试剂公司;

试验用所有蒸馏水为实验室独立制备。

### 1.2 仪器

分析天平:BT224S型,德国 Sartorius 公司;

pH计:pH3210,德国 WTW 公司;

超滤膜:3 000 U 与 10 000 U,德国 Sartorius 公司;

紫外-可见分光光度计:T1800型,北京普析通用仪器有限公司;

恒温干燥箱:ZFD-5090型,上海至诚分析仪器制造厂;

电热恒温水浴锅:HWS26型,上海一恒科技有限公司;

冷冻干燥机:RLPHR 1-4LSC型,德国 Christ 公司。

氨基酸自动分析仪:RART NO. 835-0200型,日本 Hitachi 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 腐乳低聚肽的制备 参照文献<sup>[2]</sup>。

1.3.2 腐乳低聚肽主要组成分析

作者简介:唐杰(1962—),男,抚顺师范高等专科学校副教授。

E-mail:tangjj31@126.com

收稿日期:2016-03-02

- (1) 蛋白质含量测定:按 GB/T 5009.5—2010 执行;
- (2) 脂肪含量测定:按 GB/T 5009.6—2008 执行;
- (3) 水分含量测定:按 GB/T 5009.3—2010 执行;
- (4) 氨基酸含量测定:按 GB/T 5009.124—2003 执行。

### 1.3.3 抗氧化活性测定

(1) 低聚肽清除  $\cdot\text{OH}$  能力测定:制备不同浓度待测溶液,  $\cdot\text{OH}$  由加入的等量硫酸铁和过氧化氢产生,进行清除  $\cdot\text{OH}$  能力测定<sup>[3]</sup>。加入上述溶液摇床 37 ℃ 反应 1 h, 于 510 nm 处测定吸光度值,由吸光度数值可以计算  $\cdot\text{OH}$  清除率。与此同时,测定半数抑制率 ( $IC_{50}$ ),其中  $IC_{50}$  表示清除 50% 自由基时需要抗氧化剂的量,  $IC_{50}$  是由不同浓度的样品对自由基清除率作图拟合得到<sup>[4]</sup>。 $\cdot\text{OH}$  清除率按式(1)计算:

$$R = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0}\right) \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

$R$ ——清除率, %;

$A_0$ ——无样品时吸光度值;

$A_1$ ——有样品时吸光度值;

$A_2$ ——无显色剂时样品吸光度值。

(2) 低聚肽清除 DPPH  $\cdot$  能力测定:配制浓度不同的样品溶液,加入 1.0 mg/mL 样品溶液和 2.0 mL  $3 \times 10^{-5}$  mol/L DPPH,摇床摇匀室温反应 1 h,在 517 nm 条件下测定吸光度。DPPH  $\cdot$  清除率按式(1)计算,其中: $A_1$  为 DPPH 溶液吸光度; $A_2$  为水解液吸光度; $A_0$  为未加水解液时 DPPH 溶液吸光度<sup>[5]</sup>。

(3) 低聚肽清除  $\text{O}_2^- \cdot$  清除能力测定:采用邻苯三酚自氧化法<sup>[6]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 腐乳低聚肽的基础理化成分组成分析

测定分离纯化后的腐乳低聚肽结果显示,腐乳低聚肽蛋白质总含量数值 85.47%,脂肪含量值为 0.24%,水分含量值为 6.33%,灰分含量值为 7.96%。说明腐乳低聚肽中蛋白质含量较高,而其它成分含量略低。因此,腐乳低聚肽是一种优质的蛋白质物质<sup>[7]</sup>。

### 2.2 腐乳低聚肽氨基酸组成分析

腐乳低聚肽氨基酸含量种类齐全,其中人体必须的 8 种氨基酸和 2 种半必需氨基酸(组氨酸和精氨酸)的含量分别达到 34.43% 和 8.45%,两类氨基酸占氨基酸总和为 42.75%。具体组成测定结果见表 1。

肽的抗氧化活性往往受到氨基酸组成影响。常见的氨基酸如:赖氨酸、精氨酸、丙氨酸、亮氨酸、色氨酸等多种氨基酸具有一定的抗氧化活性。腐乳低聚肽抗氧化性氨基酸含量较高,其中谷氨酸、天门冬氨酸、精氨酸含量较高。与此同时,肽的抗氧化活性更是受到疏水性氨基酸的影响,比如肽类富含亮氨酸和缬氨酸等疏水性氨基酸,其对应的抗氧化活性越高,该类氨基酸可以螯合金属离子,因此推断腐乳低聚肽抗氧化能力较强<sup>[3]</sup>。

表 1 低聚肽的氨基酸组成分析

Table 1 Analysis of amino acid composition of peptides

氨基酸名称	含量/ ( $10^{-2} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ )	氨基酸名称	含量/ ( $10^{-2} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ )
天门冬氨酸(Asp)	9.40	组氨酸(His)	3.26
苏氨酸(Thr)	3.29	赖氨酸(Lys)	3.24
苯丙氨酸(Phe)	4.45	精氨酸(Arg)	5.02
色氨酸(Trp)	4.40	甲硫氨酸(Met)	3.45
缬氨酸(Val)	3.50	异亮氨酸(Ile)	3.32
谷氨酸(Glu)	15.26	亮氨酸(Leu)	3.70

### 2.3 腐乳低聚肽清除 $\cdot\text{OH}$ 的能力

$\cdot\text{OH}$  十分活跃,对人体危害较大,因此对其的清除能力是衡量物质抗氧化性能的重要标准。由图 1 可知,腐乳低聚肽在 1~10 mg/mL 试验质量浓度范围内对  $\cdot\text{OH}$  的清除作用,随着浓度的增加对应的  $\cdot\text{OH}$  清除能力越强。计算拟合分析,腐乳低聚肽清除  $\cdot\text{OH}$  的  $IC_{50}$  值为 5.8 mg/mL,对照组(抗坏血酸)  $\cdot\text{OH}$  的  $IC_{50}$  值为 0.94 mg/mL,同等浓度下,抗坏血酸的  $\cdot\text{OH}$  清除率约是腐乳低聚肽的 6.2 倍。腐乳低聚肽活性位点或基团作为供氢体还原  $\cdot\text{OH}$ ,从而终止自由基连锁反应<sup>[8]</sup>,因此腐乳低聚肽具备一定的  $\cdot\text{OH}$  清除能力。

### 2.4 腐乳低聚肽清除 DPPH $\cdot$ 的能力

DPPH  $\cdot$  主要以氮为活性中心,在人体代谢过程中比  $\cdot\text{OH}$  稳定,也是衡量物质抗氧化能力的重要指标<sup>[9]</sup>。不同浓度的腐乳低聚肽和抗坏血酸对 DPPH  $\cdot$  的清除能力见图 2。在 1~10 mg/mL 腐乳低聚肽试验质量浓度范围区间均表现出较强的清除 DPPH  $\cdot$  的作用,清除率随着浓度增大逐渐增加。

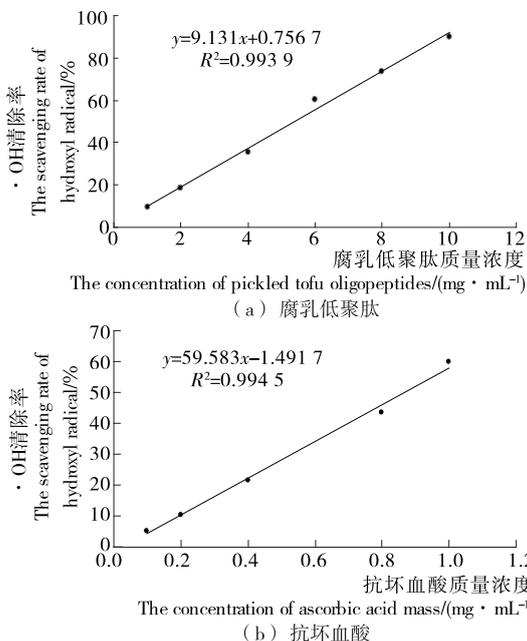


图 1 腐乳低聚肽和抗坏血酸对  $\cdot\text{OH}$  的清除作用

Figure 1 Pickled tofu oligopeptide and ascorbic acid scavenging effect on hydroxyl radical

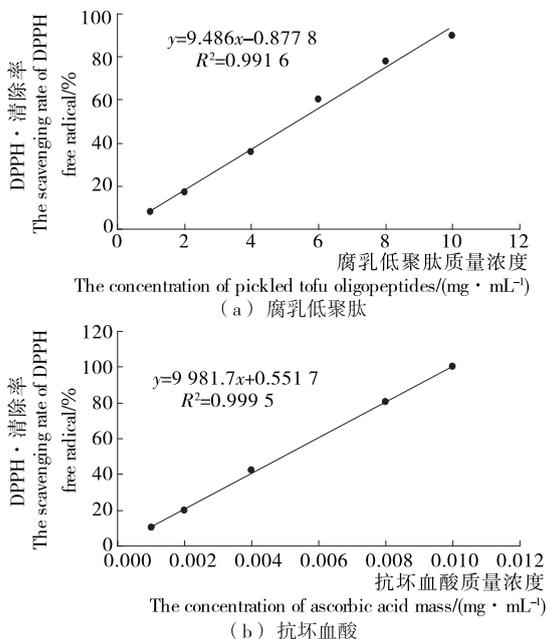


图 2 腐乳低聚肽和抗坏血酸对 DPPH· 的清除作用

Figure 2 Pickled tofu oligopeptide and ascorbic acid scavenging effect on DPPH free radical

计算拟合,腐乳低聚肽清除 DPPH· 的  $IC_{50}$  值为 6.1 mg/mL, 抗坏血酸清除 DPPH· 的  $IC_{50}$  值为 0.005 8 mg/mL,同等浓度下,抗坏血酸对 DPPH· 的清除能力约是腐乳低聚肽的 1 000 倍。腐乳低聚肽可以抑制脂质过氧化链反应,达到清除 DPPH· 的目的<sup>[11]</sup>。

### 2.5 腐乳低聚肽对 $O_2^-$ · 的清除能力

$O_2^-$ · 常作为代谢自由基的衍生自由基存在,对人体危害较大<sup>[11-12]</sup>,同时也需要测定对该自由基的清除能力,判定腐乳低聚肽抗氧化性能。不同浓度腐乳低聚肽和抗坏血酸对  $O_2^-$ · 清除能力见图 3。结果表明,在腐乳低聚肽质量浓度为 1~10 mg/mL 时,腐乳低聚肽对  $O_2^-$ · 清除率趋势是随着腐乳低聚肽浓度的提高而逐渐增强,但是最终的清除率低于  $\cdot OH$ 、DPPH· 清除率。计算拟合,腐乳低聚肽清除  $O_2^-$ · 的  $IC_{50}$  值为 9.7 mg/mL,抗坏血酸清除  $O_2^-$ · 的  $IC_{50}$  值为 0.05 mg/mL。腐乳低聚肽清除  $O_2^-$ · 能力相对较差,主要原因是  $O_2^-$ · 氧化能力弱于  $\cdot OH$ ,导致  $O_2^-$ · 和低聚肽氨基酸反应能力低于  $\cdot OH$  反应能力<sup>[13]</sup>,因此腐乳低聚肽对  $O_2^-$ · 抗氧化能力偏低。

## 3 结论

(1) 本研究说明腐乳低聚肽氨基酸含量十分丰富,种类齐全,具有较高的营养价值,可作为氨基酸的强化剂或高效的功能性食品添加剂,是对腐乳氨基酸的组成分析的完善和发展。

(2) 抗氧化活性评价结果表明,腐乳低聚肽具有较低的  $IC_{50}$  值,具有较强的抗氧化活性,这是对腐乳低聚肽氨基酸抗氧化活性评价的系统研究。

(3) 对抗氧化活性肽的氨基酸序列氧化作用机制需进一步研究,并且需要完善其他抗氧化活性对比。

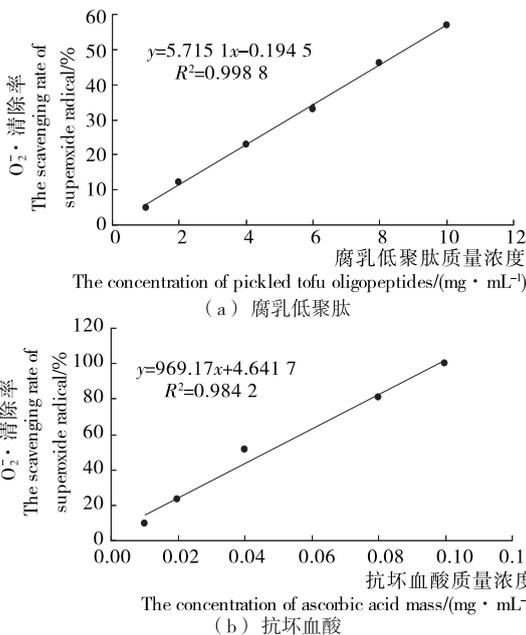


图 3 腐乳低聚肽和抗坏血酸对超氧阴离子自由基的清除作用

Figure 3 Pickled tofu oligo peptide and ascorbic acid scavenging effect on superoxide anion radical

## 参考文献

- [1] 李娟,程永强.腐乳抗氧化作用研究进展[J].大豆科技,2009,1(1):33-36.
- [2] 王鹤霖,阮长青.克东腐乳中低聚肽的分离及其抗氧化活性研究[J].中国粮油学报,2010,25(9):23-26.
- [3] 倪莉,饶平凡,王璋.腐乳中生理活性多肽的分离和表征[J].浙江农业大学学报,1997(S1):93-97.
- [4] 全明海,李里特,程永强,等.腐乳生产过程中自由基清除能力的变化[J].中国调味品,2006,10(4):22-26.
- [5] 王宁丽,徐月敏,刘毅,等.鱼皮低聚肽氨基酸组成及抗氧化活性研究[J].食品研究与开发,2016,37(2):31-35.
- [6] Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2000, 11(3): 128-131.
- [7] 张莉莉,严群芳,王恬.大豆生物活性肽分离及其抗氧化活性研究[J].食品科学,2007,28(5):208-210.
- [8] 任海伟,王常青.黑豆低聚肽的抗氧化活性评价及其氨基酸组成分析[J].食品与发酵工业,2009,35(9):47-50.
- [9] 张晓峰,李里特,程永强,等.腐乳抗氧化功能的研究[J].粮油加工与食品机械,2006,6(4):88-90.
- [10] Bonomi F, Fiocchi A. Reduction of immunoreactivity of bovine lactoglobulin upon combined physical and proteolytic treatment[J]. Dairy, 2003, 70(13): 51-59.
- [11] 田赛赛,何金城,韩燕,等.大豆及其发酵品的活性成分研究进展[J].药学服务与研究,2016,16(1):15-18.
- [12] 赵小青.大豆低聚肽的成分分析及体外抗氧化作用[J].食品工业,2015,36(4):200-203.
- [13] 唐文娟,赵红清.谷物蛋白分离纯化方法的研究进展[J].食品与机械,2016,32(2):200-203.