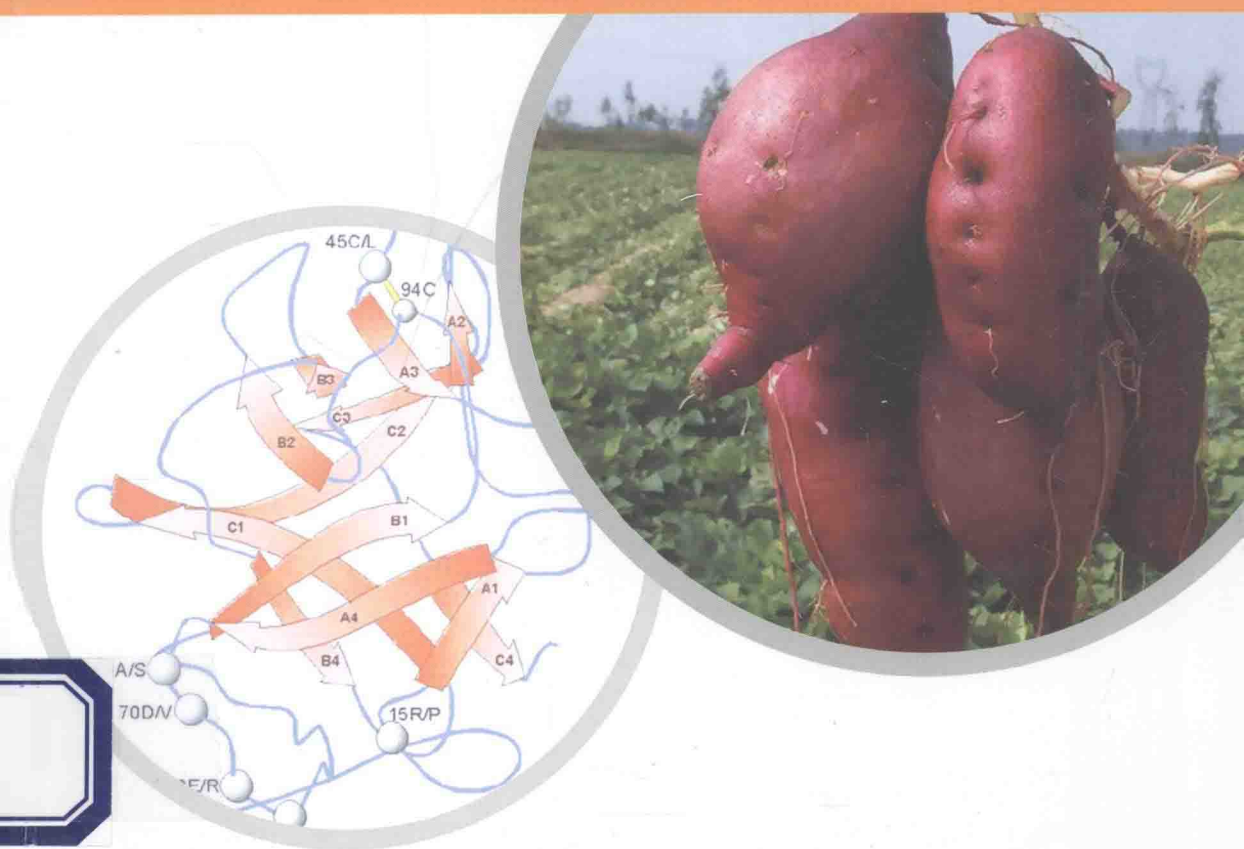


甘薯

蛋白及其酶解肽的营养代谢与生物活性

木泰华 张 苗 孙敏杰◎著



科学出版社

甘薯蛋白及其酶解肽的营养 代谢与生物活性

木泰华 张 苗 孙敏杰 著

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

甘薯俗称红薯、白薯、地瓜、番薯、红芋、红苕等,属旋花科一年生或多年生草本植物,富含蛋白质、可溶性糖、脂肪、膳食纤维、果胶、 β -胡萝卜素、维生素C、钙、磷、铁等多种营养物质。其中,甘薯蛋白含有18种人体所需氨基酸,具有抗氧化、抗肿瘤和降血脂等功能,是优质的植物源蛋白质。此外,甘薯蛋白酶解肽也发挥着一定的生物活性,如抗氧化活性和血管紧张素转化酶(ACE)抑制活性。本书共五章,内容包括甘薯及甘薯蛋白、甘薯蛋白的营养代谢、甘薯蛋白的降血脂功能、甘薯蛋白抗氧化活性肽和甘薯蛋白降血压肽。

本书适合食品科学相关专业的本科生、研究生,相关研究领域的专家、企业研发人员,以及其他爱好、关注营养与保健科学的读者参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

甘薯蛋白及其酶解肽的营养代谢与生物活性 / 木泰华, 张苗, 孙敏杰著. —北京: 科学出版社, 2014. 1

ISBN 978-7-03-039229-9

I. ①甘… II. ①木… ②张… ③孙… III. ①甘薯-植物蛋白-营养代谢-研究②甘薯-植物蛋白-生物活性-研究 IV. ①S531

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 284286 号

责任编辑: 岳漫宇 李秀伟 / 责任校对: 郭瑞芝

责任印制: 赵德静 / 封面设计: 北京铭轩堂广告设计有限公司

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京市文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014年1月第一版 开本: 720×1000 1/16

2014年1月第一次印刷 印张: 10 1/4 插页: 3

字数: 194 000

定价: 60.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

作者简介

木泰华, 男, 1964 年 3 月生, 博士, 博士生导师, 研究员。国家甘薯产业技术体系甘薯产后加工研究室岗位科学家, 中国农业科学院二级杰出人才, 中国淀粉工业协会甘薯淀粉专业委员会会长, *Journal of Integrative Agriculture* (JIA) 编委, 日本国农艺化学会国际会员。1994 年获日本东京水产大学食品生产专业硕士学位, 1998 年获日本东京农工大学联合农学研究科生物资源利用学科生物工学专业博士学位。1999~2003 年曾先后在法国蒙彼利埃第二大学食品科学与生物技术研究室及荷兰瓦赫宁根大学食品化学研究室从事科研工作。2003 年 9 月回国以来, 主持或参与科技部 863 计划项目等 10 余项, 完成省部级项目 5 项, 科技成果鉴定 3 项。此外, 在国内外核心期刊发表论文 80 余篇, 其中 SCI 文章 27 篇; 申报国家发明专利 12 项, 授权 6 项; 获省部级二等奖 2 项, 中国食品科学技术学会科技创新技术进步奖三等奖 1 项。共培养硕、博士研究生 49 名, 其中外籍留学生 3 名。主要研究领域: ①食品加工副产物及综合利用技术, 如以甘薯、马铃薯、大豆、甜菜、孜然等的加工副产物为对象, 研究蛋白质及其肽、膳食纤维、果胶、多酚等功效成分提取技术及其结构、物化、功能和保健特性分析。②超高压食品加工技术, 主要研究超高压食物蛋白质、淀粉改性技术及其机制, 特别是采用超高压处理制备高活性肽技术的研究。

张苗, 女, 1984 年 6 月生, 博士, 助理研究员。国家甘薯产业技术体系甘薯产后加工研究室综合利用研究团队队员。2007 年毕业于福州大学生物科学与工程学院, 获食品科学学士学位; 2012 年毕业于中国农业科学院研究生院, 获农产品质量与食品安全专业农学博士学位。毕业后留中国农业科学院农产品加工研究所工作至今。目前主要从事食品加工副产物综合利用方面的研究工作。先后参与国家甘薯产业技术体系、国际合作与交流项目、“十二五”国家科技支撑计划等项目。目前主要从事食物蛋白质及其多肽的生物活性研究。先后在 *International Journal of Food Science and Technology*、《农业工程学报》等杂志上发表论文 16 篇; 申报国家发明专利 3 项。

孙敏杰, 女, 1982 年 5 月生, 博士。2008 年毕业于东北农业大学食品科学与工程学院, 获农产品加工与储藏专业农学硕士学位; 2012 年毕业于中国农业科学院研究生院, 获农产品质量与食品安全专业农学博士学位。主要从事食物蛋白质精深加工及利用、蛋白质营养特性领域的研究。现在国家认证认可监督管理委员会认证认可技术研究所从事研究工作。先后参与国家甘薯产业技术体系、“十二五”国家科技支撑计划等项目。在 *Journal of Food Composition and Analysis*、《农业工程学报》等杂志上发表论文 10 篇, 参编书籍 4 部。

序

“国以民为本，民以食为天”。食品产业是关系到国民营养与健康的民生产业，是国民经济的支柱产业，是永远的朝阳产业。我国是世界上甘薯种植面积和产量最大的国家。甘薯不仅是粮食安全的重要保障、健康食品的重要来源，甘薯加工产业也是具有国际竞争力的新兴产业。

在 20 世纪五六十年代，我国“三年自然灾害”时期，甘薯曾作为主要的粮食作物拯救了一批人。到 20 世纪 80 年代，主要粮食作物如小麦、水稻、玉米等产量大幅度提高，甘薯逐渐淡出了人们的视野。直到 20 世纪 90 年代后，随着我国经济的高速发展，我国甘薯生产再次升温，人均消费量也迅速增加。而今，甘薯以其特有的营养及保健功效吸引了国内外研究者及消费者的青睐。可以预见，在不久的将来，甘薯势必在保障国家粮食安全、保障国民健康上发挥不可替代的作用。

中国农业科学院农产品加工研究所木泰华博士带领薯类加工研究团队，长期从事甘薯精深加工方面的研究。经过长期潜心钻研，突破和建立了我国甘薯系列高附加值产品精深加工关键技术和配套工艺，揭示了甘薯淀粉加工副产物中营养成分的功能与保健特性，所获研究成果对延长甘薯产业链、促进薯农增收、高效利用甘薯淀粉加工副产物、缓解甘薯淀粉加工废弃物造成的环境污染具有重要的意义。其中，在甘薯蛋白及其酶解肽的研究方面，木泰华博士带领其团队成员倾注了很大的精力和心血，经研究发现，甘薯蛋白包含 18 种人体所需氨基酸，氨基酸组成比例符合 WHO/FAO 推荐标准，而加热处理可以显著改善甘薯蛋白的营养特性；甘薯蛋白具有预防肥胖及减肥降脂的作用，而甘薯蛋白酶解肽则有保护 DNA 免受氧化破坏的功效，并能有效降低原发性高血压大鼠的血压。

该书就甘薯蛋白及其酶解肽方面的研究进行了较为详细地介绍，主要是针对甘薯蛋白及其酶解肽的营养代谢、降血脂功能、抗氧化活性、降血压功效等内容的阐述。这部书的面世，有利于增加人们对于甘薯的营养成分——甘薯蛋白的进一步了解，有利于促进我国甘薯加工综合利用技术的发展。

北京工商大学副校长、教授

中国工程院院士



2013 年 8 月 1 日于北京

前 言

甘薯俗称红薯、白薯、地瓜、番薯、红芋、红苕等，是旋花科一年生或多年生草本植物，原产拉丁美洲，于明代万历年间传入我国，至今已有 400 多年栽培历史。甘薯栽培具有低投入、高产出、耐干旱和耐瘠薄等特点，是仅次于水稻、小麦和玉米的主要粮食作物。

甘薯中富含多种人体所需的营养物质，如蛋白质、可溶性糖、脂肪、膳食纤维、果胶、钙、铁、磷、 β -胡萝卜素等。此外，还含有维生素 C、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 E、尼克酸和亚油酸等。在美国、日本和韩国等发达国家，甘薯主要用于鲜食和加工方便食品，比较强调甘薯的保健作用。在我国 20 世纪五六十年代，甘薯曾作为主要粮食作物，在解决粮食短缺、抵御自然灾害等方面发挥了重要作用。但是，随着人们生活水平的提高，甘薯作为单一的粮食作物已成为历史。进入 21 世纪以来，甘薯加工产品用途朝着多样化和专用型方向发展，已经成为重要的粮食、饲料及工业原料。

目前，我国甘薯在工业上主要用来生产淀粉及其制品，在淀粉生产过程中，往往会产生大量的废液，这些废液中含有大量蛋白质、糖类及矿物质等。如能将甘薯淀粉加工废液中的蛋白质提取出来，不仅可减少废液对环境的污染，也是对蛋白质资源的有效利用。研究表明，甘薯蛋白具有良好的物化及功能特性，还具有抗氧化、抗肿瘤等多种保健特性，是优质植物蛋白的良好来源。

2003 年，我在荷兰瓦赫宁根大学食品化学研究室 Harry Gruppen 教授那里完成了马铃薯蛋白及多肽保健特性方面的一个研究项目。回国后，怀着对薯类研究的浓厚兴趣，我带领团队成员对甘薯蛋白及多肽开展了较深入的研究。十年来，借助国家高技术研究发展计划（863 计划）和国家甘薯现代产业技术体系的资助，我们进行了甘薯蛋白提取技术、功能特性、营养代谢及生物活性的研究，在此基础上，我们还开展了对甘薯蛋白生物活性肽的制备、分离纯化和结构分析的探索，在甘薯蛋白抗氧化活性肽和降血压肽研究上取得了一些进展。

今天，我们编写本书的目的是希望向大家介绍一些甘薯及甘薯蛋白的知识，并将我们在甘薯蛋白及其酶解肽的营养代谢、降血脂功能、抗氧化活性及降血压功效等研究方面的最新发现奉献给大家。

限于作者的专业水平，加之时间相对仓促，书中难免有错误和遗漏之处，敬请广大读者提出宝贵意见及建议。

木泰华

2013 年 5 月 20 日于北京

目 录

序

前言

第一章 甘薯及甘薯蛋白	(1)
第一节 甘薯的生产及加工概况	(1)
第二节 甘薯蛋白的构成与结构	(2)
第三节 甘薯蛋白的胰蛋白酶抑制剂活性	(3)
第四节 甘薯蛋白的营养及保健特性	(4)
第二章 甘薯蛋白的营养代谢	(7)
第一节 蛋白质的营养价值评价概述	(7)
第二节 天然甘薯蛋白的营养价值评价	(16)
第三节 加工方式对甘薯蛋白营养特性的影响	(26)
第四节 加热及超高压处理对甘薯蛋白结构的影响	(37)
第五节 天然及加热甘薯蛋白在大鼠体内的营养代谢	(47)
第三章 甘薯蛋白的降血脂功能	(59)
第一节 甘薯蛋白对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖和分化的影响	(59)
第二节 甘薯蛋白预防肥胖的动物试验研究	(65)
第三节 甘薯蛋白减肥降脂的动物试验研究	(71)
第四章 甘薯蛋白抗氧化活性肽	(78)
第一节 生物活性肽介绍	(78)
第二节 甘薯蛋白酶解肽的抗氧化活性	(87)
第三节 甘薯蛋白抗氧化活性肽保护 DNA 免受氧化破坏	(90)
第四节 甘薯蛋白抗氧化活性肽的分离纯化及结构鉴定	(92)
第五章 甘薯蛋白降血压肽	(100)
第一节 高血压和血管紧张素转化酶(ACE)	(100)
第二节 甘薯蛋白 ACE 抑制肽的分离纯化及结构分析	(104)
第三节 甘薯蛋白 ACE 抑制肽对原发性高血压大鼠血压的影响	(107)
第四节 甘薯蛋白 ACE 抑制肽与卡托普利联用对原发性高血压大鼠血 压的影响	(114)

参考文献..... (120)

附录 A 英文缩略词表..... (135)

附录 B 甘薯蛋白的消化酶酶切位点分析..... (137)

附录 C 大鼠体内胃肠消化实验流程..... (149)

附录 D 大鼠平衡试验..... (151)

附录 E 甘薯蛋白抗氧化活性肽产品及生产设备流程..... (153)

彩图

第一章 甘薯及甘薯蛋白

甘薯 (*Ipomoea batatas* L.) 是旋花科 (Convolvulaceae) 一年生或多年生草本植物, 原产拉丁美洲, 也叫红薯、白薯、地瓜、番薯、红芋、红苕等。甘薯块根中富含蛋白, 其可以很容易地被人体利用, 具有很高的营养价值。本章就甘薯的生产及加工概况、甘薯蛋白的构成与结构、胰蛋白酶抑制剂活性、营养及保健特性进行简单介绍。

第一节 甘薯的生产及加工概况

甘薯是世界上最主要的块根作物之一, 年产量居世界第七位, 仅次于小麦、水稻、玉米、马铃薯、大麦和木薯 (Bovell-Benjamin, 2007)。目前, 世界甘薯主要产区分布在北纬 40° 以南。据联合国粮食及农业组织 (Food and Agriculture Organization of United Nations, FAO) 统计, 全世界共有 116 个国家和地区种植甘薯, 其收获面积和总产量均以亚洲最高, 非洲次之, 美洲居第三位 (图 1-1) (CIP, 2007)。2012 年, 我国甘薯种植面积达 347 万 hm^2 , 单产达 $21\text{t}/\text{hm}^2$, 总产量则达 7314 万 t, 占世界甘薯总产量的 90% 以上 (FAOSTAT, 2013)。

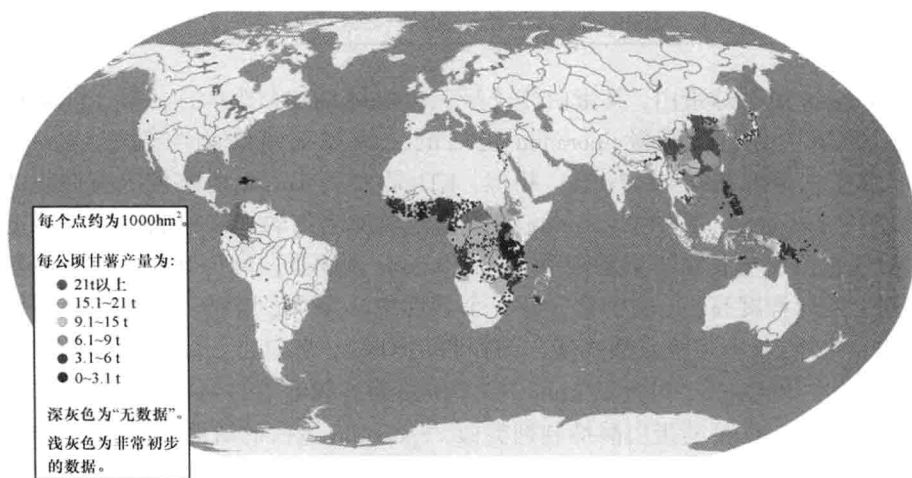


图 1-1 世界甘薯产区分布 (另见彩图)

目前, 我国甘薯总产量的约 40% 用于淀粉生产, 约 5%~10% 用于有机产品加

工(如乙醇、味精、柠檬酸、乳酸、丙酸、丁酸、丁醇、草酸和氨基酸),约 25%~30% 用于牲畜饲料(Zhang et al., 2009)。在淀粉生产过程中,往往会产生大量的废液,这些废液中含有大量蛋白质、糖类及矿物质等(Chiang and Pan, 1986)。与其他大部分植物蛋白相比,甘薯蛋白的必需氨基酸含量较高,化学评分为 82,具有很高的营养价值(FAO, 1990)。因此,如能从淀粉加工废液中将甘薯蛋白提取出来,不仅可减少废液对环境的污染,也是对蛋白质资源的有效利用。

第二节 甘薯蛋白的构成与结构

甘薯干基中约含有 1.73%~9.14% 粗蛋白,可以很容易地被人体利用(Purcell et al., 1972)。甘薯蛋白的主要成分是 Sporamin,属于变态根茎器官中的特异储藏蛋白质,其占甘薯块根中总蛋白的 60%~80%(Maeshima et al., 1985),其生理性质见表 1-1。

表 1-1 Sporamin 生理性质简介

名称	特点	参考文献
Sporamin	大多存在于块根中,茎和叶中含量极少;在非还原的 SDS-PAGE 条件下, Sporamin A 的相对分子质量约为 31 000,而 Sporamin B 的相对分子质量约为 22 000; Sporamin A 和 Sporamin B 在氨基酸的组成、多肽图谱和免疫特性上,都显示非常相似	Maeshima et al., 1985
	在还原的 SDS-PAGE 条件下, Sporamin A 和 Sporamin B 是同一种相对分子质量为 25 000 的蛋白质	Dehora and Wanda, 1989
	成熟后不含糖基,因而不是糖蛋白;且大多以单体形式存在	Matsumoto et al., 1990

Sporamin 属于球蛋白,其蛋白分子呈三维立体结构(图 1-2)。基于同源性建模原则的结构分析,预测 Sporamin 蛋白的二级和三级结构与刺桐(*Erythrina caffra*)胰蛋白酶抑制剂 DE-3(ETI)相似,ETI 是大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂的成员之一(Yao et al., 2001)。Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂的抑制机制是通过特定的蛋白酶催化位点与底物的相互作用。虽然 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂的成员在氨基酸序列上变异程度高,但它们都含有一个活性中心循环,该循环含有起抑制作用的残基。此外,4 个半胱氨酸残基(二硫键的形成),来自于 Sporamin 中的 Cys⁸³、Cys¹³³、Cys¹⁸⁶ 和 Cys¹⁹⁵,与大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂中的半胱氨酸残基密切相关。与其他 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂类似, Sporamin 蛋白的活性部位位于其 12 个 β 折叠结构中的 A4-B1 环路之间。这 12 个 β 折叠结构实际上是一种 β 三叶草折叠,由 3 个伪对称相关的三叶单元组成,每个单元有 4 个 β 折叠(Murzin et al., 1992),A4-B1 环路连接第一和第二个三叶单元(McLachlan, 1979)。然而,在假定活性位点的同源位置上具有抑制作用残基的变化表明, Sporamin 与其他 Kunitz

型胰蛋白酶抑制剂在抑制胰蛋白酶动力学上是有分歧的。除了氨基酸大于 3 个的肽段，Sporamin 的二肽组成被预测为 Ala⁶⁹ Asp⁷⁰ ~ Glu⁷²，其不同于 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂中一般的活性位点(图 1-2)。

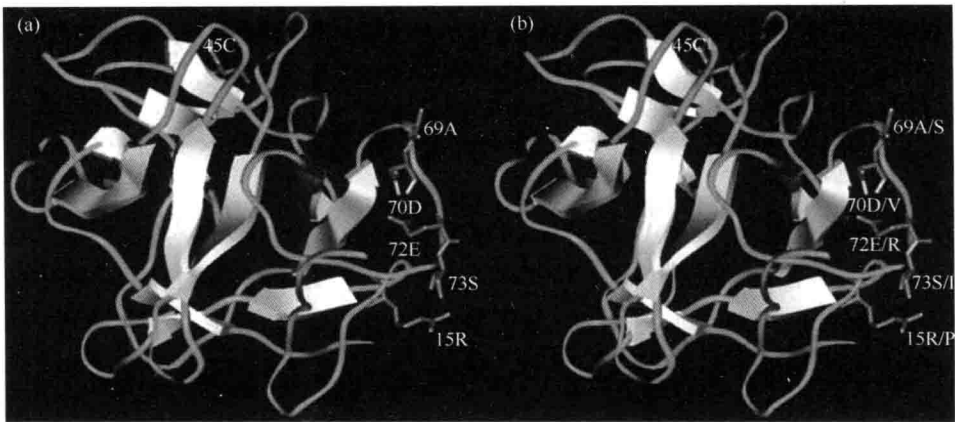


图 1-2 甘薯中 Kunitz 型 Sporamin 的结构构造模型(另见彩图)

(a) 野生型蛋白的结构模型代表 Sporamin 的 12 个 β 折叠, 用单字母标示; (b) 氨基酸突变体的结构模型, 将在不同程度上失去胰蛋白酶抑制活性, 代表氨基修饰后 Sporamin 的 12 个 β 折叠, 用斜线和标准单字母标示(Yao et al., 2001)

Sporamin A 含有 219 个氨基酸残基, Sporamin B 由 216 个氨基酸残基组成, 其氨基酸序列见表 1-2。

表 1-2 Sporamin 的氨基酸序列

Sporamin	基因库	序列
A(219AA)	AFR60857.1	1 mkaftlalfl alslyllpnp ahsrnpirl ptthepasse tpvldingde vraggnnymv 61 saiwgagggg lrlahldtms kcasdvivsp ndldngdpit itpatadpes tvvlasytqt 121 frfniatnkl cvnnvnwgiq hdsasgqyfl kagefvsdns nqfkievda nlnfyklytc 81 qfgsdkeynv grhdpmlrt trlalsnsfp vfvikptdv
B(216AA)	AAA33390.1	1 mkalalfll sllyllpnpah skfnpirlrp ahetaasetp vldingdevr agenyiyvsa 61 iwagaggggl lrvldssne casdvivsr dfdngdpiti tpadpestvv mpstftqtrf 121 niatnklevn nvnwgikhds esgqyfvkag efvsdnsnf kievnndln aykisyqcqg 181 tekcfvngry ydpltratl alsntpfvfv ikptdm

注:数据来源于美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)

第三节 甘薯蛋白的胰蛋白酶抑制剂活性

胰蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitor, TI)是指能和胰蛋白酶的必需基团发生化学反应,从而抑制胰蛋白酶与底物结合,使胰蛋白酶的活力下降甚至丧失的一类物

质。从营养角度来说,酶抑制剂同人体消化酶具有很强的结合专一性,会抑制人体对营养素的消化吸收,因而限制人体对营养物质的正常摄入,降低蛋白质利用率,甚至会对人体健康产生不利影响。

胰蛋白酶抑制剂根据分子质量大小和二硫键的含量可分为 Kunitz 型、Bowman-Birk 型和 Kazal 型。其中 Kunitz 型相对分子质量为 18 000 ~ 22 000, 含有 2 个二硫键, 其代表物是大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂; Bowman-Birk 型相对分子质量为 8 000 ~ 10 000, 含有大量二硫键, 热稳定性高, 代表物是大豆中 Bowman-Birk 型蛋白酶抑制剂和花生抑制剂 A-II; Kazal 型相对分子质量为 6000, 含有 3 个二硫键, 其代表物是牛胰蛋白酶抑制剂(Liu and Markakis, 1990)。

1954 年, Sohonne 和 Bhandarker 最先发现甘薯中存在 TI。随后, Sugura 等(1973)使用柱层析法从甘薯中分离到 3 种不同的 TI, 发现这 3 种化合物都具有对胰蛋白酶很强的抑制活性, 但不具有抑制胃蛋白酶和胰凝乳蛋白酶活性。抑制剂 II 和 III 被进一步分离纯化, 研究发现其相对分子质量分别为 23 000 和 24 000, 它们在 pH 2 ~ 11 范围内、70℃ 条件下稳定, 且活性位点含有一个精氨酸残基(Sugura et al., 1973)。研究发现甘薯中的 TI 活性与水溶性蛋白含量呈正相关, 甘薯块根中水溶性蛋白 Sporamin 可能就是一种 TI(Lin, 1993)。Yeh 等(1997)采用胰蛋白酶抑制剂亲和层析法从甘薯块根中分离出 TI, 并与通过大肠杆菌表达的 Sporamin 进行对比, 证明了从块根中纯化出的 TI 就是 Sporamin。Yao 等(2001)还报道了 Sporamin 内链间的两对二硫键对于稳定 TI 活性起着非常重要的作用, 并且位于 Sporamin A4-B1 环上的两个酸性残基——Asp⁷⁰ 和 Glu⁷² 对其抑制能力起关键作用。

此外, 越来越多的研究表明甘薯胰蛋白酶抑制活性受温度影响很大。Chein 和 Lee(1980)报道甘薯中 TI 在 70℃ 条件下具有热稳定性, 而在 130℃ 条件下保持 30min 能完全破坏鲜薯中 TI 的活性。1984 年, Dickey 研究了不同 TI 含量的 4 种甘薯的失活温度、在甘薯块根中的活性分布, 以及品种内和品种间 TI 的差别, 结果表明烘烤和蒸煮可以使甘薯中 TI 活性完全丧失, 在蒸煮 15min 后 4 个品种甘薯的 TI 活性均比加热前下降 10%。李郁(2007)的研究也证实了热处理会导致 Sporamin 的胰蛋白酶抑制剂活性下降, 80℃ 加热会使 Sporamin 部分失活, 但 100℃ 条件下 Sporamin 仍不会完全失活。邓乐(2009)发现 Sporamin 具有很高的耐热性, 只有在高压蒸煮 127℃ 条件下才可使其 TI 活性降至最低(抑制率 2%, 34TIU/mg)。

第四节 甘薯蛋白的营养及保健特性

近年来, 国内外学者对甘薯蛋白的营养及保健特性进行了初步研究, 使我们这类储藏蛋白有了更深层次的认识与了解。

一、甘薯蛋白的营养特性

甘薯蛋白中含有 18 种人体所需氨基酸,但不同品种甘薯蛋白中的氨基酸组成不同(薛友林等,2006)。1957 年,Nagase 对日本甘薯的氨基酸组成进行研究发现,甘薯中不含有限制性氨基酸。1981 年,Walter 和 Catignani 对 Jewel 型甘薯进行氨基酸组成分析时发现,含硫氨基酸是其第一限制性氨基酸,而赖氨酸是第二限制性氨基酸。Mu 等(2009)在对 55-2 型甘薯氨基酸组成进行分析时发现,赖氨酸是其第一限制性氨基酸。此外, Maeshima 等(1985)对 Sporamin A 和 Sporamin B 的氨基酸组成分别进行研究,结果表明 Sporamin A 中赖氨酸的氨基酸评分为 77%,而 Sporamin B 中蛋氨酸的氨基酸评分仅为 55%,说明 Sporamin A 是氨基酸更加平衡的一种蛋白质。

二、甘薯蛋白的保健特性

(一) 甘薯蛋白的抗氧化活性

Hou 等(1997)从甘薯块根中纯化得到胰蛋白酶抑制剂,发现它可降低脱氢抗坏血酸和丙二醛的含量,从而促进抗坏血酸的再生,阻止甘薯块根的氧化损伤。Hou 等(2001)从甘薯块根中纯化得到相对分子质量为 33 000 的胰蛋白酶抑制剂,并对其抗氧化活性进行研究,结果表明该胰蛋白酶抑制剂可有效清除 DPPH 自由基和羟基自由基,因此在甘薯块根抗氧化中扮演着重要的角色。并推测该胰蛋白酶抑制剂在被人体食用后可能会对健康有益,主要表现在两个方面:①食用后,甘薯胰蛋白酶抑制剂会降低胰蛋白酶的抑制活性;②烹饪后,甘薯胰蛋白酶抑制剂可能在消化前或消化吸收后以多肽的形式发挥抗氧化作用。Hou 等(2004)研究指出从甘薯块根中纯化得到相对分子质量为 33 000 的胰蛋白酶抑制剂具有谷胱甘肽过氧化物酶类似物活性,有利于甘薯块根免受环境氧化应激的损伤。Hou 等(2005)用胰岛素亲和柱从甘薯中纯化得到甘薯块根储藏蛋白,发现它是一种胰蛋白酶抑制剂,可有效地清除羟基自由基、DPPH 自由基和超氧阴离子自由基;可抑制人体低密度脂蛋白(LDL)发生 Cu^{2+} 诱导的过氧化反应,从而降低罹患动脉粥样硬化疾病的风险;并可保护牛胸腺 DNA 免受羟基自由基诱导的破坏,减少突变的发生。Huang 等(2007)测定了重组 Sporamin 及其合成肽的抗氧化活性,指出重组 Sporamin 具有良好的 DPPH 自由基清除活性、亚铁还原力、亚铁螯合能力及 DNA 损伤的保护作用;对其合成肽抗氧化活性的研究发现,丝氨酸残基对其自由基清除活性起着重要的作用。Huang 等(2008)测定了甘薯胰蛋白酶抑制剂对小鼠体内抗氧化酶活性、脂质过氧化水平和血脂水平的影响,发现口服高剂量甘薯胰蛋白

酶抑制剂的实验组显示出了最高的总抗氧化能力;与对照组相比,实验组小鼠血浆中的超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性显著提高,而丙二醛含量显著降低,高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、甘油三酯(TG)和总胆固醇的含量呈下降趋势,从而降低了炎症相关疾病的风险,使开发治疗心脏疾病和血管内皮功能障碍的新方法成为可能。

(二) 甘薯蛋白的抗肿瘤活性

Huang 等(2007)测定了甘薯块根胰蛋白酶抑制剂对白血病 NB4 细胞的抑制增殖和促凋亡作用。结果表明,甘薯块根胰蛋白酶抑制剂可抑制 NB4 细胞的增殖,并呈剂量依赖性;其可阻滞 NB4 细胞的细胞周期进程,并滞留在 G₁ 期;其可通过诱导肿瘤抑制基因 *p53* 和促凋亡因子 Bax 的表达上调,抗凋亡因子 Bcl-2 的表达下调,诱导细胞凋亡。此外,甘薯块根胰蛋白酶抑制剂可引发线粒体中细胞色素 C 释放到细胞质中,进一步活化半胱天冬酶 caspase-3 和 caspase-8,从而激活细胞凋亡的线粒体途径。木泰华研究团队发现,灌胃与腹腔注射甘薯储藏蛋白 Sporamin 均能显著抑制人结肠癌 HCT-8 细胞在裸鼠腹腔内的弥散性生长,使肿瘤结节数和腹水量显著减少;同时,还能显著抑制皮下接种的 Lewis 肺癌细胞在 C57 黑鼠体内自发性的肺转移(邓乐,2009)。

第二章 甘薯蛋白的营养代谢

目前,人们对诸多食物蛋白质(特别是大豆蛋白)的生物效价、蛋白酶降解情形已有了充分的认识,然而对甘薯蛋白在人体正常消化道条件下的消化情况却知之甚少。此外,天然甘薯蛋白因含有胰蛋白酶抑制剂,是否会降低其消化性还有待研究。而开发出高品质的甘薯蛋白,不仅能够减轻环境压力,还能在当今世界动物蛋白资源紧缺的情况下,提供新型可代替的蛋白资源,用于人类或动物膳食。本章就甘薯蛋白的营养价值评价、加工方式对甘薯蛋白结构及营养特性的影响,以及甘薯蛋白在大鼠体内的营养代谢进行阐述。

第一节 蛋白质的营养价值评价概述

一、蛋白质消化率的测定

评价食物营养价值的一个重要指标就是蛋白质的“质量”。所谓“质”是考察食物蛋白质必需氨基酸的含量、模式,以及机体对其消化、利用的程度;而“量”则是考察食物中蛋白质含量的多少。在以往对蛋白质的质量进行研究时,主要以蛋白质含量和必需氨基酸模式为主,常常忽略对其消化和吸收利用程度的研究。然而,某些蛋白质,即便其氨基酸组成符合 FAO/WHO 推荐的标准,但由于受到蛋白质来源(动物、植物)、非蛋白质成分(膳食纤维、胰蛋白酶抑制剂)及生理等因素的影响,这些蛋白质在体内消化、吸收和利用的程度可能会很低,从而导致营养价值偏低。蛋白质消化率是指人体从蛋白质中吸收的氮占摄入氮的比值,反映了食物蛋白质被消化酶分解、吸收的程度(邓泽元和乐国伟,2007)。因此,在对蛋白质的质量进行评价时,应该对其消化率进行测定和分析,这对全面评价食物营养具有重要的意义。目前测定食物蛋白质消化率主要包括体外蛋白质消化率和体内蛋白质消化率测定两种方法。

(一) 体外蛋白质消化率测定法

体外消化率测定法是模拟蛋白质在人体内消化过程的一种方法,该法不仅可以直接预测食物蛋白质的营养价值,还可以提供各种蛋白质在胃、肠内消化和吸收的情况。这种方法不需要活体动物,而且与体内消化率测定法有着很高的相关

性,可以人为准确地控制实验条件,不同实验室间测定的结果可比性好,测定效率和稳定性高,成本低。

体外蛋白质消化率测定法主要包括两个步骤,一是先利用蛋白酶水解蛋白质,然后再通过测定蛋白质的水解度来计算蛋白质的消化率或采用其他方法对蛋白质的消化程度进行评价。图 2-1 为蛋白质体外消化率测定法的一般步骤。

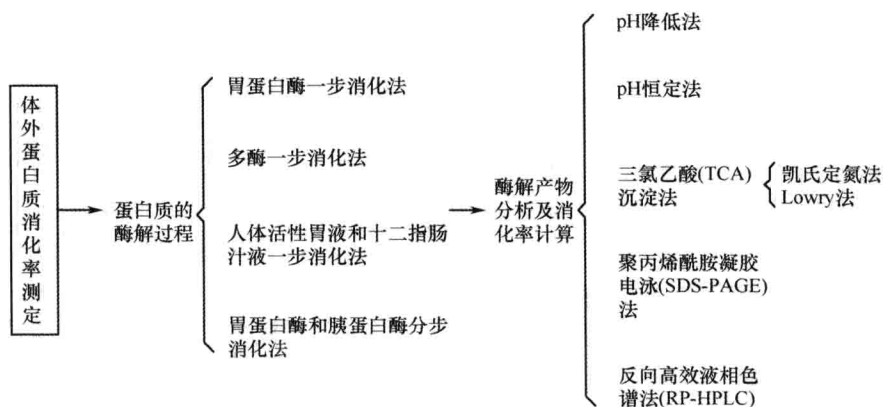


图 2-1 蛋白质体外消化率测定法的一般步骤

(二) 蛋白质的酶解过程

体外消化率测定法测定蛋白质消化率的第一步就是使用蛋白酶水解蛋白质来模拟食物在人体内的消化过程。主要包括:胃蛋白酶一步消化法、多酶一步消化法、人体活性胃液和十二指肠汁液一步消化法及胃蛋白酶和胰蛋白酶分步消化法等。

胃蛋白酶一步消化法采用胃蛋白酶直接进行水解,用酶单一,操作简单,但由于单一酶不能将某一蛋白质水解成所有可利用的氨基酸,所以此方法测得消化率偏低(Tanaka et al., 2002; Thomas et al., 2004; Del Toro et al., 2006; Tang et al., 2008)。

多酶一步消化法多采用的是胰蛋白酶、糜蛋白酶和肽酶的混合物直接进行水解,操作简便,此混合酶具有协同作用,可将蛋白质充分水解,测得消化率较高(Hsu et al., 1977; Adebawale et al., 2005; Cuevas-Rodríguez et al., 2006; Milan et al., 2007; Nergiz and Gokgoz, 2007; Abdel-Aal, 2008; Khat tab et al., 2009)。

人体活性胃液和十二指肠汁液一步消化法是使用三腔管收集人体活性胃液和十二指肠汁液,可直接对所测蛋白质进行消化(Secundino et al., 2005; Almaas et al., 2006)。此方法可以很好地模拟人体对蛋白质的消化,但是采用该法收集消化液的难度较大,胃液和十二指肠液中蛋白酶的种类和活力还会因受试者的年龄、

胃肠消化功能等因素存在差异,导致实验重现性差。

胃蛋白酶和胰蛋白酶分步消化法在体外消化模型研究中应用较广,其原理是:首先用胃蛋白酶在酸性条件模拟食物在胃内的消化过程,用碱中和将胃蛋白酶活力钝化后,再模拟营养成分在小肠的消化过程,用胰蛋白酶在中性条件下继续消化,最后将已消化的营养成分与未消化的营养成分分开后并分别进行测定(Nunes et al., 2004; Tang et al., 2008; Tedeschi et al., 2009)。该法能够很好地模拟食物在消化道内的消化过程,从而可以很好地反映食物蛋白质在不同消化阶段被消化的情况。此外,与人体胃液及肠液相比,胃蛋白酶及胰蛋白酶比较容易获得,而且各种酶的组分也较易分析,测定的结果重现性好。

(三) 蛋白质酶解产物分析及消化率计算的方法

1. pH 降低法

pH 降低法是通过测定一定消化时间后的 pH 降低值来测定蛋白质消化率的方法。一般使用胰蛋白酶、糜蛋白酶和肽酶的混合物对蛋白质样品进行消化。其原理是在蛋白酶消化样品的过程中,样品蛋白质肽键断裂,释放出氢离子,导致悬浊液的 pH 降低,在起始后第 10min,该法与体内大鼠粪氮平衡实验所测消化率的结果具有较高相关性($r>0.80$)(Hsu et al., 1977; Pedersen and Eggum, 1981)。

pH 降低法体外消化率的计算公式如下(Cuevas-Rodríguez et al., 2006):

$$Y=210.46-18.10X$$

Y—体外消化率(%), X—添加多酶溶液(胰蛋白酶、糜蛋白酶和肽酶的混合物)的样品消化第 10min 所测 pH。

2. pH 恒定法

pH 恒定法是通过测定一定消化时间后 pH 降低所产生氢离子的浓度从而计算出蛋白质消化率的方法。即在使用胰蛋白酶、糜蛋白酶、肽酶混合液对蛋白质进行消化过程中,采用恒 pH 自动滴定仪,向消化液中不断地滴入 0.1mol/L NaOH 溶液与蛋白质水解过程中产生的氢离子作用,并使样品消化液 pH 保持或恒定在 8.0,再根据水解第 10min 时所添加的碱量来计算蛋白质消化率(Boutrif, 1991)。此外,与 pH 降低法相比, pH 恒定法与体内消化法动物实验的结果具有高度的相关性($r=0.96$)。pH 恒定法体外消化率的计算公式如下(Pedersen and Eggum, 1981; Abdel-Aal, 2008; Tedeschi et al., 2009):

$$TD=76.14+47.77B_{10}$$

TD—蛋白质消化率(%), B_{10} —水解第 10min 所添加 NaOH 溶液的量(mL)。