

# 绿豆萌芽中生物活性成分及其制备工艺研究进展

孙丽丽, 李 丽, 董银卯

(北京工商大学 北京市植物资源重点实验室, 北京 100048)

**摘 要:** 绿豆及其萌芽含有多种营养与活性成分, 具有很好的食用、保健和美容方面的功效。现对绿豆及其萌芽中的主要活性成分及其制备工艺进行综述, 为其作为广谱健康食品、保健食品及化妆品原料的应用提供可靠依据。

**关键词:** 绿豆; 萌芽; 活性成分; 制备工艺

**中图分类号:** S 522 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)01-0194-07

绿豆(Mung bean)为豆科豇豆属绿豆(*Vigna radiatus* Linn.)的成熟种子。绿豆原产于我国, 在我国已有 2 000 多年的栽培史, 分布非常广泛, 产量极为丰富。绿豆具有广泛的用途, 营养十分丰富, 被誉为粮食中的绿色珍珠, 既是调节饮食的佳品, 又是食品工业的重要原料, 也是重要的药材和化妆品添加剂。

中医认为, 绿豆味甘, 性凉, 归心、胃经, 具有清热解毒、解暑除烦、利水消肿、清胆养胃、润肠通便、明目、降血糖、降血压、降血脂、抗肿瘤、抗过敏、保护肝脏和心血管、增强免疫力、排铅等功效, 适用于暑热烦渴、里热、小便不利、水肿、皮疹、食物及药物中毒等<sup>[1]</sup>。

绿豆营养成分全面, 每 100 g 绿豆中含有蛋白质 22.1 g, 脂肪 0.8 g, 糖 59 g, 纤维素 52 mg, 钙 155 mg, 磷 417 mg 以及铁及维生素等。绿豆的蛋白质比较完全, 特别是苯丙氨酸和赖氨酸比较多, 其中赖氨酸的含量远高于小麦; 且氨基酸种类齐全、配比均衡<sup>[2]</sup>。

绿豆除了含有人体所需的营养素以外, 还含有许多生物活性物质, 如功能性低聚糖、黄酮类、多酚类、苯丙氨酸氨解酶、香豆素、生物碱等。这些成分具有解毒、改善肠道菌群与润肠通便、降血脂、抗氧化、抗肿瘤、抗菌、提高免疫力等功效<sup>[3]</sup>。并且研究表明, 绿豆在萌芽过程中, 由于酶活性的启动, 导致活性成分及营养物质发生部分改变, 自 20 世纪 60 年代初至今, 人们不断从绿豆及其萌芽中寻找生物活性物质, 并对其进行分离纯化及性质研究。现主要从近 10 a 对绿豆及其萌芽活性成分制

备方法进行归纳整理, 以期作为食品、保健食品及化妆品原料应用提供依据。

## 1 黄酮类物质及其制备方式

黄酮类化合物指一类具有 2-苯基色原酮或 3-苯基色原酮结构的化合物, 具有抗氧化、抗癌、调节毛细血管通透性、改善微循环等功效<sup>[1]</sup>。绿豆富含黄酮类化合物, 已有研究表明, 绿豆种子、绿豆芽及绿豆皮中均含有黄酮类成分。黄酮类化合物的提取方法有水煮法、溶剂回流提取法、超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取法、超声波辅助提取法、微波辅助提取法等。

### 1.1 从绿豆种子中提取黄酮

李文芳等<sup>[4]</sup>研究水煮法提取绿豆中的总黄酮, 并通过单因素试验及正交实验对煮制绿豆时影响总黄酮提取率的主要因素: 料液比、沸腾时间和煮制次数等进行了研究。结果表明, 煮制绿豆时提取总黄酮的最佳条件为料液比 1:16, 沸腾时间 24 min, 煮制次数 3 次。影响因素的顺序为: 煮制次数 > 料液比 > 沸腾时间。经验证性实验得到最佳条件下的总黄酮的含量为 8.81 mg/g。

吕萍等<sup>[5]</sup>用超声波法提取绿豆种子中的黄酮类物质, 采用单因素试验及正交实验法确定了最佳的提取工艺, 研究结果表明, 固液比 1:4, 超声功率 500 W, 超时间 12 min, 浸泡时间 2 h, 此时总黄酮含量可达 14.92 mg/g, 从而为绿豆的综合利用及功能性食品的深入研究提供了可靠的依据。

### 1.2 从绿豆皮中提取黄酮

苏冰霞等<sup>[6]</sup>利用响应面实验设计研究乙醇浓度、浸提温度、时间和液固比对绿豆皮中黄酮类物质浸提效果的影响, 并建立数学模型, 优化得到了提取的最佳组合条件为: 乙醇浓度 16.4%, 浸提温度 93.9℃, 提取时间 2.83 h 和液固比 26.7:1。优化后绿豆皮中总黄酮的含

**第一作者简介:** 孙丽丽(1987-), 女, 硕士, 研究方向为植物源化妆品功效添加剂的开发。E-mail: wwwwww456@126.com.

**责任作者:** 董银卯(1963-), 男, 硕士, 教授, 现主要从事植物源化妆品功能成分研究与应用。E-mail: ymdong2008@163.com.

**收稿日期:** 2012-08-27

量为 55.5 mg/g,与模型预测值在  $\alpha=0.05$  水平无显著性差异,模型预测效果好。

张燕等<sup>[7]</sup>利用正交实验方法优化得到绿豆皮中总黄酮的最佳提取工艺:提取时间 150 min,乙醇体积分数 50%,提取温度 80℃,固液比 1:10,提取次数 2 次,绿豆皮中总黄酮的含量是 3.879 mg/g。

吴小勇等<sup>[8]</sup>通过正交实验确定了溶剂回流提取法的工艺条件,然后在此基础上进一步对超声波辅助溶剂提取法的工艺条件进行了优化,得到最佳的工艺条件为:乙醇体积分数为 30%、料液比为 1:60、提取温度为 70℃、超声功率为 200 W、提取时间为 30 min。最后采用 FRAP 法和 DPPH 法,测试了提取得到的产物的抗氧化能力。结果表明,提取物总黄酮的含量可以达到 42.90 mg/g 左右;与维生素 C 相比,提取得到的总黄酮的还原能力约为维生素 C 的 20%,但自由基清除率与维生素 C 相当。

陈婷婷等<sup>[9]</sup>研究了绿豆皮总黄酮的提取工艺。通过对固液比、乙醇体积分数、提取温度与提取时间的单因素试验确定水平点,设计 4 因素 3 水平试验,优选总黄酮的最佳提取工艺为固液比 1:50,乙醇体积分数为 40%,提取温度 70℃,提取时间 120 min。在此基础上得到提取物的总黄酮含量为 27.57 mg/g,且 5 次平行的相对标准偏差为 0.75%。

卫莉等<sup>[10]</sup>用正交实验探讨了绿豆皮中总黄酮的最佳提取工艺。研究结果表明,在 70℃下用 6 倍于绿豆皮重体积 30%的乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,绿豆皮黄酮类成分提取效果最好。样品用  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$  比色法于 510 nm 下测定,芦丁为标准计算含量,得到绿豆皮中总黄酮的平均含量为 1.459%。

范媛媛等<sup>[11]</sup>利用石油醚对绿豆皮进行脱脂,然后用一定浓度的乙醇溶液进行超声提取,并用比色法对绿豆皮粗提液进行定性分析,证明粗提液中含有黄酮类化合物。研究发现应用超声波提取绿豆皮中的黄酮类化合物,直接作用于细胞壁组织,大大提高了反应速度。通过正交实验确定了绿豆黄酮超声波提取的最佳工艺条件为:乙醇浓度为 60%,料液比为 1:20,提取温度为 70℃,提取时间为 90 min,预浸时间为 18 h,超声波功率为 200 W。

### 1.3 从绿豆芽中提取黄酮

王影等<sup>[12]</sup>选用 5~7 cm 的自制绿豆芽为试验材料,经过烘干、粉碎、过筛后对绿豆芽粉末进行脱脂,通过单因素试验分析了乙醇浓度、料液比、提取温度、提取时间对总黄酮得率的影响,在此基础上进行了正交实验。结果表明,乙醇浓度为 70%,料液比为 1:20,提取温度为 70℃,提取时间为 2.5 h 的条件下提取绿豆芽中总黄酮的工艺条件最好,此时总黄酮的含量为 6.8 mg/g。

董银卯等<sup>[13]</sup>在实验室自制绿豆芽,首先称取一定量的绿豆,浸泡 24 h,装入铺有纱布的篮子中,在绿豆上方也覆盖 1 层纱布,放入 24℃恒温培养箱中培养,光照时间 6 h/d,定期浇水。分别制备萌发 0~6 d 的绿豆芽 7 份样品。通过正交实验研究提取次数、提取时间、料液比、提取溶剂浓度 4 个因素对发芽 3 d 的绿豆芽中大豆异黄酮类成分牡荆素和异牡荆素含量的影响,确定其提取的最佳提取工艺为:提取次数 1 次,提取时间 90 min,提取溶剂为 50%乙醇,料液比为 1:50。确定提取工艺后,对 0~6 d 的绿豆芽进行提取,并用 HPLC 法测定牡荆素和异牡荆素在绿豆发芽过程中(0~6 d)的含量。结果发现,绿豆发芽第 4 天时,牡荆素和异牡荆素的含量最高,但均低于其在绿豆中的含量。

综上所述,绿豆黄酮的提取方式主要包括水煮法、超声法和乙醇溶剂萃取法。按照不同方式进行提取,绿豆种子中总黄酮的含量从 0.8%~1.4%;绿豆皮中总黄酮的含量从 1.4%~5.5%;绿豆萌芽过程中,总黄酮的含量相对减少。目前,对绿豆及其萌芽总黄酮的提取工艺研究较多,但是缺乏对总黄酮活性的深入研究,绿豆萌芽中的总黄酮类成分虽然降低,但活性并不一定降低,在今后的研究中,应该在对总黄酮类成分提取工艺进行改进的同时,以总黄酮的活性为参照指标,对绿豆及其萌芽中的黄酮类成分进行合理高效的应用。

## 2 蛋白质与多肽

绿豆中蛋白质含量因产地和品种的差别而不同,为 19.5%~33.1%,平均含量为 21.6%,低于大豆蛋白质,但高于其它常见谷物蛋白质。绿豆蛋白质主要是由球蛋白、清蛋白和醇溶蛋白组成,其中 80%为球蛋白。绿豆蛋白质是由 17 种氨基酸构成,其中包括 7 种必需氨基酸,尤其富含谷物普遍缺乏的第一限制氨基酸—赖氨酸。因此,绿豆与谷物搭配食用可提高谷物蛋白质的生物学价值。但绿豆蛋白质的蛋氨酸含量较低,不宜单独作为人体蛋白质的来源,需要与富含蛋氨酸的动物蛋白搭配使用,以充分发挥蛋白质的互补作用,提高蛋白质的营养价值<sup>[1]</sup>。

### 2.1 多肽及其提取工艺

绿豆多肽是用酶分解绿豆蛋白所得到的产物,其氨基酸组成与绿豆蛋白基本相同,含有丰富的人体必需氨基酸。相比绿豆蛋白质来讲,多肽的氨基酸组成与结构几乎没有变化,但相对分子质量较小,具有较好的水溶性、较低的黏度、稳定性很强等优点。多肽的吸收机制优于游离氨基酸<sup>[14]</sup>,具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗病毒、免疫调节、降血脂、降胆固醇等作用<sup>[15]</sup>。

李杨江等<sup>[16]</sup>、傅亮等<sup>[17]</sup>、卢珍华等<sup>[18]</sup>用传统的碱提酸沉法制备绿豆粗分离蛋白。再用不同的酶进行水解,通过正交实验或者响应面实验法研究 pH、酶解温度、底

物浓度、加酶量、酶解时间等对酶解的影响,得到最佳的酶解工艺。

李杨江等<sup>[16]</sup>利用 Design Expert 7.1.1 软件设计响应面对酶解条件进行优化分析,得到用碱性蛋白酶酶解的最佳工艺为 pH 9.37、酶解温度 55℃、底物质量分数 7.0%、加酶量 5 000.02 U/g 条件下酶解 4.76 h,多肽含量可达到 913.7 mg/g。傅亮等<sup>[17]</sup>用 Alcalase 碱性蛋白酶将得到的蛋白含量为 778.5 mg/g 的粗蛋白进行酶解,以水解度(DH%)为指标,得到酶解最佳条件为:酶与底物比([E]/[S])3.5%,温度 55℃,pH 值 9.0,底物浓度为 2%,酶解时间为 120 min。得到的绿豆多肽在 4 种抗氧化体系中均表现出较强的抗氧化性,具有良好的还原能力,其对羟自由基和超氧阴离子的清除作用的 IC<sub>50</sub> 分别是 13.96、12.67 mg/mL,抗脂质过氧化能力的 IC<sub>50</sub> 为 15.77 mg/mL。卢珍华等<sup>[18]</sup>通过单因素试验研究木瓜蛋白酶对绿豆分离粗蛋白的水解作用,确定了木瓜蛋白酶水解绿豆蛋白制备绿豆多肽的最佳水解条件:酶浓度 8%(E/S 质量比),底物浓度 7%(固液比),反应温度 65℃,反应时间 3 h,pH 在 6.5。并利用葡聚糖凝胶(Sephadex G-25)柱层析测定绿豆多肽分子量。结果表明,当水解度为 30%时,绿豆多肽分子量绝大多数在 1 000 Da 以下。

潘妍等<sup>[19]</sup>用绿豆种子为原料,用复合蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、NG 和酸性蛋白酶进行酶解,并测定其蛋白质含量和还原糖含量,综合比较出碱性蛋白酶更优于其它 4 种蛋白。通过单因素试验和正交优化实验得到最佳酶解条件为:加酶量 7%、料液比为 1:25、提取时间 1 h。对提取样品进行酪氨酸酶活性抑制试验、DPPH 清除试验和水杨酸法清除·OH 试验,对其美白和抗氧化功效进行初步研究。结果显示,在样品浓度为 10%时,酪氨酸酶抑制率为 49.98%,DPPH 清除率为 33.53%,·OH 清除率为 39.08%。利用高效液相色谱精确测定样品蛋白质分子量分布,其分子量主要分布在 408.41~1 830.64 之间。

2.1.1 ACE 抑制肽的制备 ACE(Angiotensin converting enzyme)指的是血管紧张素转化酶,ACE 在人体血压调节过程中起重要的生理作用,一是它能使降压物质(舒缓激肽)分解成失活片段,从而导致血压升高;二是它使无活性的血管紧张素 I 转化为升压物质—血管紧张素 II。因此,通过抑制血管紧张素转化酶的活性可以起到降血压的作用<sup>[20-21]</sup>。现阶段 ACE 抑制剂主要来源于食物蛋白,包括酪蛋白、乳清蛋白、鱼蛋白、猪鸡肌肉、鸡蛋蛋白、血红蛋白、血浆蛋白、胶原蛋白、荞麦蛋白、小麦蛋白、玉米蛋白、大豆蛋白、肾豆蛋白、小红豆蛋白、菜籽蛋白、酒糟蛋白、大蒜以及藻类蛋白等,由此可知,食物蛋白中存在着大量的并具有不同分子特性的 ACE 抑制肽分子片

段<sup>[22]</sup>。绿豆作为我国的主要经济作物,其种植面积大,产量高,从绿豆蛋白中提取出的 ACE 抑制肽安全性高,无副作用,且能提高绿豆的附加值。龚琴等<sup>[23]</sup>以市售绿豆蛋白粉为原料制备绿豆 ACE 抑制肽,主要选用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶,其中用碱性蛋白酶对绿豆进行酶解得到样品的水解度和 ACE 抑制率均最大,所以该试验最终选用碱性蛋白酶。确定所用的酶源后,主要从酶解时间、酶解温度、酶解 pH、底物浓度、加酶量对 ACE 抑制率和水解度的影响,通过单因素试验得到最佳条件为:酶解温度 55℃,酶解 pH 8,底物浓度 2%,加酶量 6 000 U/g。随后选取对 ACE 抑制率有显著影响的 4 个因素进行 4 因素 3 水平的响应面分析试验,经过优化得到最优条件为:酶解温度 55℃,酶解 pH 8.25,底物浓度 1.75%,加酶量 6 200 U/g。在此条件下,绿豆 ACE 抑制肽的抑制率为 84.83%。

2.1.2 抗氧化肽的制备 随着生命科学的不断发展,以及对人类疾病、衰老等机理研究的不断深入,氧化应激损伤和抗氧化保护作用的研究受到人们的普遍关注。抗氧化剂特别是天然存在于自然界的抗氧化剂成了研究者追逐的对象。抗氧化肽就是一类存在于生物体内,能够清除体内自由基、抑制生物大分子物质过氧化,具有极强的抗氧化活性的生物活性肽。孙键<sup>[24]</sup>采用传统碱提酸沉法制备绿豆蛋白。首先用多功能粉碎机将脱皮绿豆粉碎,过 100 目筛备用。称取一定量的脱皮绿豆粉,以 1:15 的料水比加入蒸馏水,用 NaOH 溶液调节 pH 值为 (9.0±0.02),在 40℃ 水浴锅中不断搅拌提取 20 min。碱提完成后,在 4 000 r/min 条件下离心 20 min,取上清液。用 HCl 溶液调节上清液的 pH 值为 (4.5±0.02),静置 30 min,使绿豆蛋白质在等电点处凝聚沉淀。酸沉过程中必须严格控制加酸及搅拌的速度,控制不当,即便是 pH 达到等电点时,蛋白质仍然呈现絮状漂浮状,不能完全沉淀。一次提取率可达 73.49%,所制备的绿豆蛋白粉中蛋白质的含量为 75.97%。接着用中性蛋白酶酶解制备绿豆抗氧化活性肽工艺,其最佳酶解工艺参数为:底物浓度 2%,酶解 pH 6.5,酶解温度 50℃,加酶量 5 000 U/g,酶解时间 120 min。绿豆酶解产物经超滤分离,被分离成分子量大小不同的 5 种组分,其中 1~5 kDa 的组分所占的质量比重最大,经 Sephadex G-25 凝胶柱色谱进一步分离纯化后,得到了 2 种分子量分别为 3 426 和 1 272 Da 的绿豆抗氧化活性肽 T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub>。T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 均有较强的抗氧化能力,T<sub>1</sub> 对羟自由基和 DPPH 自由基的清除率分别为 69.14%和 58.62%;T<sub>2</sub> 对羟自由基和 DPPH 自由基的清除率分别为 91.70%和 74.68%。采用 HPLC 法对绿豆抗氧化活性肽 T<sub>1</sub> 和 T<sub>2</sub> 的纯度进行了检测,T<sub>1</sub> 的纯度为 85.92%,T<sub>2</sub> 的纯度为 94.99%。用全自动氨基酸分析仪对纯化后的绿豆抗氧化活性肽 T<sub>1</sub>、

T<sub>2</sub>进行了氨基酸组成的检测,结果表明,绿豆抗氧化活性肽 T<sub>1</sub>、T<sub>2</sub>都含有 16 种相同的氨基酸,包括天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、脯氨酸,其氨基酸总量分别为 65.55% 和 85.11%,其中必需氨基酸的总量分别占 22.98% 和 27.22%。所测的 16 种氨基酸中,2 种样品中谷氨酸和天冬氨酸的含量最高。

**2.1.3 抗菌肽的制备** 近 10 a 来,随着动物及微生物抗菌肽理论与应用研究的逐渐深入,植物抗菌肽的抑菌特性使其具有抗生素所不具有的一系列优点,导致近年来对植物抗菌肽的研究十分活跃。与抗生素相比,抗菌肽具有不同的抑菌机理。抗生素是通过一系列酶合成的产物,而抗菌肽则是某个特定基因编码的产物。在抑菌机理上,抗生素一般是通过抑制细菌细胞壁、蛋白质或 DNA 等的合成来达到杀菌的目的,所以抗生素抗菌的一般是用特殊的受体,细菌容易通过变异对抗生素产生抗性,而抗菌肽一般没有特殊的受体,抗菌肽一般是通过物理作用造成细胞膜的穿孔而达到广谱的抗菌效果,因此抗菌肽的使用不会产生抗药性和交叉抗性。部分的抗菌肽还具有抗病毒,抗肿瘤的作用。抗菌肽这些独特的性质展示出广阔的应用前景。吴金鸿<sup>[25]</sup>在 4℃ 下用蒸馏水浸泡绿豆过夜,使绿豆充分溶胀,沥干蒸馏水,加少量 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.4),匀浆,经纱布过滤,去除绿豆残渣,得到滤液绿豆汁。将滤液在 4℃ 下经 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液加硫酸铵,使其饱和度达到 20%,磁力搅拌 30 min 后静置于 4℃ 冰箱中 4 h,然后在 4℃ 下以 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液。在上清液中加入硫酸铵使其饱和度达到 80%,磁力搅拌 30 min 后静置 4℃ 冰箱中 12 h,在 4℃ 下以 12 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀物,以 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.4)溶解沉淀,并在 4℃ 下用 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 5.4)充分透析,得到初分离样品。再利用 CM-Sephadex C-50 弱阳离子交换色谱和 POROS 20HS 高效液相强阳离子交换色谱等分离技术,从绿豆中分离纯化出一个抗菌肽——非特异性脂转移蛋白(pm-nsLTP1)。pm-nsLTP1 经质谱鉴定分子量为 9 292.97 Da;SDS-PAGE 电泳结果表明 pm-nsLTP1 是单倍体蛋白,具有分子内的二硫键;pm-nsLTP1 对真菌菜豆根腐病菌、棉花枯萎病菌、瓜果腐霉病菌、水稻白绢病菌具有明显的抑菌效果;pm-nsLTP1 对革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌也具有一定的抑制作用,最低抑菌浓度 MIC 值为 0.06 mmol/mL。

## 2.2 其它类蛋白质其制备方式

**2.2.1 凝集素及其制备方式** 凝集素在自然界中广泛存在,从动物、植物和微生物中都已分离到。在最原始

的病毒表面也已分离到凝集素。最先研究的凝集素是来自植物的种子。迄今已有近千种植物已被测得有凝集素活性。绿豆凝集素是豆科植物凝集素的一种,也是绿豆活性蛋白质的一种。绿豆凝集素除了具有豆科植物凝集素普遍的性质之外,还具有  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活性,这种特性在凝集素中比较少见。乃日斯克等<sup>[26]</sup>称取 40 g 绿豆(颗粒饱满,无病虫害侵蚀),浸泡在蒸馏水中,25℃ 恒温下静置 12 h。浸泡好的绿豆在 200 mL PBS 缓冲溶液(0.05 mol/L、pH 7.0,含 0.15 mol/L NaCl、0.03 mol/L  $\beta$ -巯基乙醇、5 g/L 聚乙烯吡咯烷酮)中充分捣碎,静置 1 h,使绿豆中的淀粉等不溶性杂质沉淀。取上清液,过 4 层纱布过滤,12 000 r/min 高速冷冻离心 20 min,收集上清液。取 40 mL 离心后的上清液,在冰浴条件下(0~4℃),往收集的上清液中加入固体硫酸铵,依次调至 30%、40%、50%、60% 和 70%。每次添加完硫酸铵后,再持续搅拌 20 min,12 000 r/min 冷冻离心 15 min。离心获得的沉淀用 0.05 mol/L PB 缓冲溶液充分溶解后,分别用 0.9% NaCl 溶液、0.05 mol/L PB(pH 7.0)缓冲溶液透析过夜,期间换 3 次透析溶液。采用硫酸铵沉淀试验发现,凝集素的血凝活力集中在 0%~50% 饱和度范围内。为了提高绿豆凝集素的提取率,在磨浆缓冲溶液中分别加入了  $\beta$ -巯基乙醇、蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和半乳糖为保护剂。结果发现,只有  $\beta$ -巯基乙醇能够明显地提高凝集素的提取率,蔗糖对凝集素没有明显的保护作用;硫酸铵沉淀后采用羧甲基纤维素阳离子交换分别进行了梯度洗脱和间歇式洗脱。

**2.2.2 酸性磷酸酶及其制备** 酸性磷酸酶(Acid Phosphatase,简称 ACP),是一组在酸性条件下可将底物中的磷酸单酯键水解释放出无机磷的巯基酶,在生物磷代谢中起着重要作用<sup>[27]</sup>。ACP 不仅与生物的生长调节、代谢调节及信号转导等方面的生理机能关系密切,亦能增强植物对缺磷、干旱、低温等逆境的抗性能力,因此近年受到广泛的重视<sup>[28-30]</sup>。高亚朋等<sup>[31]</sup>用成本低且耐旱、耐瘠、耐酸、耐碱的绿豆种子为研究材料,通过 48 h 催芽后,按 1:4 的比例加入预冷的 50 mmol/L HAc-NaAc 缓冲液(pH 5.0),匀浆过滤,抽提 2 h,滤液离心后收集上清液。经过硫酸铵分部盐析、DEAE-琼脂糖柱离子交换层析及 Superdex-200 凝胶过滤后,得到经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳为单一蛋白区带的酸性磷酸酶。分离纯化了 ACP,并对其部分酶学性质进行了研究,以期为进一步研究 ACP 提供理论参考及对作物遗传改良提供有益帮助。绿豆酸性磷酸酶为单亚基酶,该酶最适 pH 为 5.2,最适温度为 40℃。以 pNPP 作底物时  $K_m$  为  $4.28 \times 10^{-3}$  mol/L。 $Mg^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  对酶有激活作用,而  $Hg^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$  和  $Zn^{2+}$  对该酶有明显的抑制作用,依次为: $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+}$ 。 $K^+$ 、 $Ca^{2+}$  对酶影响

不明显。

**2.2.3 超氧化物歧化酶及其制备** SOD 是一类广泛存在于生物体内的金属酶类,专一清除体内  $O_2^-$ ,消除活性氧(ROS)毒性,保护机体不受  $O_2^-$  攻击<sup>[32]</sup>。3 种 SOD 催化同样的反应,但是性质有所不同。研究结果表明,植物 SOD 在抗衰老、预防和治疗心脑血管等疾病方面具有明显效果。董银卯等<sup>[33]</sup>以 0~6 d 的豆芽绿豆干粉为原料,按 1:2(W/V)加入 pH 7.8,25 mmol/L PBK,充分搅拌均匀,4℃静置过夜;4℃,10 000 r/min 离心 20 min,上清液即为 SOD 粗提液。测定 SOD 粗提液的酶活力及蛋白含量,筛选出绿豆种子萌发到第 3 天时 SOD 的比活力最高。对该时期的粗酶液进行热变性、硫酸铵分级、DEAE-Sepharose FF 阴离子交换层析和 Sephacryl S-100 HR 分子筛层析分离纯化,最终获得比活力为 2 256.4 U/mg 的 SOD。

**2.2.4 胰蛋白酶抑制剂** 从绿豆中可以提取得到天然的绿豆胰蛋白酶抑制剂(MBTI),MBTI 属于 BBI 类型抑制剂,被认为是自然界里胰蛋白酶最有效的抑制剂之一。目前已发现多肽类及蛋白类的一些前体加工酶抑制剂具有很好的抗细菌毒素、抗病毒感染及减慢恶性肿瘤迁移的活性。MBTI 相对于其它蛋白类抑制剂分子量较小,仅有 72 个氨基酸残基,十分有利于实验室阶段的研究工作,近年来 BBIs 类抑制剂和胰蛋白酶的复合物的晶体结构都已解出,而 MBTI 和登革热病毒 NS3 蛋白酶的复合物晶体结构的解出,更说明 MBTI 在药物研究领域有很高的应用前景。曲梅等<sup>[34]</sup>采用硫酸沉淀法得到的沉淀溶于适量 ddH<sub>2</sub>O 中。通过 Sephadex G250 分子筛层析分离,分部收集活性峰。收集样品用 DEAE 离子交换层析、亲和层析和反相高压液相等一系列层析方法,纯化了 MBTI;通过筛选得到 2 种蛋白质前体加工酶 Kexin 和 Furin 的高表达酵母菌株和 COS27 细胞,用硫酸铵沉淀和分子筛的方法纯化这 2 种前体加工酶,并测定和计算 MBTI 对其的抑制活性。结果表明,纯化的 MBTI 在 HPLC 上洗脱为单峰,在 SDS2PAGE 中为单一条带。MBTI 对 Kexin 的抑制常数达到  $3.9 \times 10^{-9}$  mol/L,对 Furin 有一定的抑制活性,但是抑制活性较弱。

综上所述,绿豆蛋白质类的提取主要是直接提取粗蛋白,或者是将粗蛋白进一步的酶解成多肽,多肽的分子量主要分布在 10 000 Da 以下。绿豆中蛋白或多肽的提取方式主要是用传统的碱提酸沉,或者是用不同 pH 值的缓冲溶液提取,再用硫酸铵逐级沉淀,得到粗蛋白,其中蛋白含量在 70%以上。对粗蛋白进行进一步的酶解就得到多肽,主要应用的酶源有酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、NG、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶和复合蛋白酶。在众多的酶源中,以碱性蛋白酶的水解度最好,得到的样品功效性很强。为了进一步分离纯化多肽,可

以利用高效液相色谱精确测定样品的蛋白分子量分布,也可以应用超滤法对粗蛋白进行分子量分段,得到具有功效性明显的分子段。再经过 Sephadex G-25 凝胶柱色谱、离子交换色谱、亲和层析和反相高压液相等层析方法进行进一步分离纯化,得到单一的多肽分子,并可用 SDS-PAGE 电泳确定该多肽为单一区带,并对其分子量、酶活力进行测定。

蛋白质及多肽的研究主要集中于绿豆中,而绿豆萌芽过程中,在酶活性增加的过程中,部分蛋白质随着时间的变化发生分解,活性可能相应提高,对不同萌芽天数蛋白质分子量变化、提取工艺及活性的研究尚处于起步阶段。因此,对于绿豆及其萌芽蛋白质的研究,一方面可以进一步优化和改进绿豆中蛋白质提取工艺,另一方面,可以对绿豆萌芽过程中蛋白质结构、活性变化及相应的蛋白质(多肽)提取工艺进行系统深入研究,为绿豆及其萌芽作为健康食品日常应用,提供合理依据。

### 3 其它成分及其制备

#### 3.1 纤维素及其制备

李积华等<sup>[35]</sup>研究分析了绿豆渣中的主要成分及其微量元素,采用 SAS 软件对 Viscozyme 酶解提取绿豆渣水溶性纤维素工艺进行响应面分析,得到优化后的工艺参数:酶解时间 25.4 h、温度 41.5℃、加酶量[E]/[S] 0.0223 mL/g 豆渣、pH 4.64、水体积/绿豆渣干重的 13.1 倍。并建立数学模型,分析了该工艺过程中各微量元素含量变化情况。结果表明,绿豆渣中 90%左右是纤维素,其微量元素含量比绿豆高很多。验证试验中纤维素提取率 49.39%,各微量元素提取率分别为:63.05%的 Mg、31.82%的 Fe、33.00%的 Cu、55.55%的 Ca、59.36%的 Zn 和 61.04%的 Mn。

#### 3.2 抗内毒素物质及其制备方式

内毒素即脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS),由保守的毒性脂质 A 部分、核心糖脂和特异的 O 侧链组成,是革兰阴性菌细胞壁的主要成分。内毒素侵入机体血流,可触发体内一系列病理生理过程而引起发热、脓毒性休克、弥漫性血管内凝血以致死亡,中医把 LPS 看成“热毒”、“邪毒”的物质基础。

李健等<sup>[3]</sup>研究得出绿豆提取液具有体外抗内毒素作用,并以内毒素的清除率为指标,探讨了不同提取因素对提取效果的影响,最终确定提取条件为乙醇浓度 70%,温度 60℃,提取时间 2 h,料液比 1:20,提取物中抗内毒素有效成分含量最高。最后通过两相萃取分离,发现绿豆中抗内毒素成分主要集中在正丁醇提取物中。

#### 3.3 色素及其制备

绿豆种皮又称绿豆衣,占绿豆总重量 7%~10%,由于在绿豆芽生产过程中会产生废弃的绿豆种皮,所以从综合利用的角度来讲,从绿豆芽生产所废弃的绿豆种皮

中提取食用色素,可以变废为宝、符合循环经济的要求,同时可以拓宽农产品应用范围、提高农产品附加值。

王传虎等<sup>[36]</sup>就是以绿豆芽生产中废弃的绿豆种皮为原料,采用微波-超声波协同提取绿豆种皮色素,得到绿豆皮色素提取的最佳工艺条件是:80%乙醇提取,提取温度 80℃,提取时间 15 min,微波功率 30 W,超声协同;初步判定绿豆皮色素的主要显色成分为叶绿素;绿豆皮色素在温度小于 80℃、pH 7~9 时比较稳定;Fe<sup>2+</sup>、Fe<sup>3+</sup>、Al<sup>3+</sup>等金属离子对绿豆皮色素稳定性影响较大,遇 Cu<sup>2+</sup>、Zn<sup>2+</sup>离子分别有沉淀生成;随氧化剂的增大,色素吸光度有变小趋势,这可能是氧化剂破坏绿豆皮色素中的不饱和键所致;还原剂对该色素吸光度的影响很小,常用食品添加剂对该色素无太大影响。

#### 4 展望

绿豆是一种营养较为全面的广谱食品,不仅含有淀粉、蛋白质、脂类以及多种维生素和矿物质等营养成分,而且含有黄酮类、多酚类、活性酶类、生物碱等多种活性成分,具有解毒、改善肠道菌丛与润肠通便、降血脂、抗氧化、抗肿瘤、抗菌、提高免疫力等多种药理活性。目前,对绿豆及其萌芽中的活性成分、制备方式及活性的研究日渐深入,该试验对以往活性成分及制备方式研究进行了归纳整理,使得人们对绿豆及其萌芽作为食品、保健品及化妆品原料的高效应用提供依据。

#### 参考文献

- [1] 张海均,贾冬英,姚开. 绿豆的营养与保健功能研究进展[J]. 食品与发酵科技,2012,48(1):7-10.
- [2] 汪少芸,叶秀云,饶平凡. 绿豆生物活性物质及功能的研究进展[J]. 中国食品学报,2004,4(1):98-102.
- [3] 李健,王旭,刘宁,等. 绿豆提取液的抗内毒素作用及提取工艺优化[J]. 食品工业科技,2001(3):310-311,315.
- [4] 李文芳,向宁,郑志兵,等. 水煮绿豆总黄酮提取最佳工艺条件研究[J]. 食品工业科技,2011,32(12):287-290.
- [5] 吕萍,刘景圣,蔡丹,等. 超声波法提取绿豆中的黄酮的最佳工艺研究[J]. 粮油加工,2010(9):117-119.
- [6] 苏冰霞,郑为完,李积华,等. 绿豆皮中黄酮类物质浸提条件的优化研究[J]. 食品研究与开发,2007,28(4):82-86,120.
- [7] 张燕,么杨,潘国清,等. 绿豆皮中总黄酮的提取工艺研究[J]. 中国粮油学报,2009,24(10):124-127.
- [8] 吴小勇,游耿,杨公明. 绿豆种皮总黄酮的提取及抗氧化能力研究[J]. 食品与发酵工业,2010,36(10):214-216.
- [9] 陈婷婷,徐娟,赵珺. 绿豆皮中黄酮类化合物提取工艺[J]. 生物加工过程,2008,6(1):60-64.
- [10] 卫莉,钟秀珍,张宝才. 绿豆皮中黄酮类化合物的提取及定量测定[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版),2001,16(1):58-62.
- [11] 范媛媛,李新华,刘兰英. 绿豆黄酮提取工艺研究[J]. 沈阳农业大学学报,2005,36(5):619-622.
- [12] 王影,陈晓平. 绿豆芽总黄酮的提取工艺研究[J]. 食品与发酵科技,2010,46(5):45-48.
- [13] 董银卯,唐冬雁,何聪芬,等. 绿豆芽中异黄酮类成分提取工艺的优化及含量测定[J]. 安徽农业科学,2011,39(10):5746-5747,5802.
- [14] 谢剑平. 烟草香料[M]. 北京:化学工业出版社,2009.
- [15] 田景州,金革,马亚萍. 用 CO<sub>2</sub> 溶剂从烟草(烟末)中萃取烟精的研究[J]. 中国烟草学报,1995,2(4):75-79.
- [16] 李杨江,连洲,王梅. 碱性蛋白酶酶解绿豆分离蛋白制备多肽的工艺研究[J]. 食品工业科技,2011,32(10):384-387,390.
- [17] 傅亮,何倩,陈勇. 绿豆多肽的制备工艺及抗氧化作用[J]. 食品与机械,2010,26(6):79-82.
- [18] 卢珍华,郭彩华. 木瓜蛋白酶水解绿豆蛋白制备可溶性肽的研究[J]. 食品工业科技,2005,26(11):56-58.
- [19] 潘妍,吕春健,谢传磊. 酶法提取绿豆蛋白及其功效的初步研究[J]. 食品工业科技,2010,31(9):238-241.
- [20] Byun H G, Kim S K. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from *Alaskan pollack* skin[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology,2002,35(2):239-243.
- [21] Mullally M M, Hans M, Fitzgerald R J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic protein-ase digests of whey proteins[J]. International Dairy Journal,1997,7(5):299-303.
- [22] 黎观红. 食物蛋白源血管紧张素转化酶抑制肽的研究[D]. 无锡:江南大学,2011.
- [23] 龚琴,吴莎,罗栋源,等. 响应面法优化酶解制备绿豆蛋白 ACE 抑制肽的研究[J]. 食品工业科技,2011,32(7):312-315.
- [24] 孙健. 绿豆抗氧化活性肽的制备及其抗氧化活性的研究[D]. 西安:陕西师范大学,2011.
- [25] 吴金鸿. 绿豆中抗菌肽的分离纯化与表征及其晶体培养[D]. 福州:福州大学,2004.
- [26] 乃日斯克,邹美丽,沈群. 绿豆凝集素提取工艺研究[J]. 食品科技,2007(9):72-75.
- [27] 陆珊. 麦芽酸性磷酸酶的部分性质研究[D]. 成都:四川大学,2006.
- [28] 杨杰,董登峰,王永峰. 木豆种子酸性磷酸酯酶 ACP I 的部纯化和动力学特性[J]. 广西农业科学,2007,38(4):386-389.
- [29] Duff S M, Lefebvre D D, Plaxton W C. Purification characterization of an acid phosphatase from black mustard cell-suspension cultures; comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase[J]. Arch Biochem Biophys,1991,286(1):226-232.
- [30] Dong D F, Peng X X, Yan X L. Organic acid exudation induced by phosphorus deficiency and/or aluminum toxicity in two contrasting soybean genotypes[J]. Physiol Plant,2004,122(2):190-199.
- [31] 高亚朋,苏莱,梁建荣. 绿豆酸性磷酸酶的分离纯化和部分性质研究[J]. 中国粮油学报,2011,26(5):92-95.
- [32] 方允中,李文杰. 自由基与酶[M]. 北京:科学出版社,1989:9-10.
- [33] 董银卯,唐冬雁,何聪芬. 绿豆萌发过程中 SOD 的分离纯化及性质研究[J]. 化学研究与应用,2011,23(6):726-730.
- [34] 曲梅,韩锦铂,孟延发. 绿豆胰蛋白酶抑制剂对蛋白质前体加工酶的抑制活性[J]. 第二军医大学学报,2006,27(3):258-262.
- [35] 李积华,郑为完,周德红. 酶法提取绿豆渣水溶性纤维素及过程中微量元素含量变化分析研究[J]. 食品工业科技,2006,27(9):106-108,119.
- [36] 王传虎,杨周生,秦英月. 微波-超声协同提取废弃绿豆种皮中的绿色素[J]. 中国粮油学报,2010,25(1):112-116.
- [37] 华晓东,尹春晖. 抗过敏中药及其作用机制研究进展[J]. 天津药学,2009,21(6):69-72.

# 葡萄天蛾在吉林松原地区的发生与防治

张东光<sup>1</sup>, 付晓颖<sup>2</sup>

(1. 吉林省乾安县林业局, 吉林 乾安 131400; 2. 吉林省乾安县第三机械林场, 吉林 乾安 131400)

中图分类号: S 436. 631. 2<sup>+</sup> 2(234) 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2013)01-0200-01

葡萄天蛾属鳞翅目, 天蛾科, 又名车天蛾。

## 1 分布与为害

葡萄天蛾分布在东北三省、河北、山东、江苏等省, 松原地区发生普遍。寄主为葡萄。

## 2 为害状

以幼虫食害叶片, 低龄幼虫将叶片咬成缺刻和孔洞, 稍大些可把叶肉吃光, 残留部分粗脉和叶柄, 发生严重时可将叶片全部吃光。

## 3 形态特征

葡萄天蛾是完全变态类葡萄害虫。一生可经历 4 个虫期。

成虫: 体长 45 mm 左右, 翅展 90 mm 左右, 肥大呈纺锤形, 土黄色。触角短栉齿状, 前翅茶褐色, 后翅周缘棕褐色, 中间黑色, 缘毛色稍红。翅中部和外部各有 1 条暗茶褐色横线, 翅展时前、后翅两线相接, 外侧略呈波纹状。

卵: 球形, 直径 1.5 mm 左右, 表面光滑。淡绿色, 孵化前淡黄绿色。

幼虫: 老熟时体长 80 mm 左右, 绿色。体表遍布横

条纹和黄色颗粒状小点。头部有 2 对近乎平行的黄白色纵线, 分别于蜕裂线两侧和触角之上, 均达头顶。胸足红褐色。气门 9 对, 生于前胸和 1~8 腹节, 气门片红褐色。化蛹前有的个体呈淡茶褐色。

蛹: 体长 50 mm 左右, 长纺锤形。初为绿色, 逐渐变为棕褐色。足和翅脉上出现黑点, 断续成线。头顶有 1 卵圆形黑斑。气门椭圆形黑色, 7 对, 位于 2~8 腹节两侧。

## 4 发生规律

该害虫在松原地区每年发生 1 代, 以蛹于表土层内越冬。次年 6 月中旬羽化, 7 月上旬为羽化末期。成虫白天潜伏, 夜间出来活动, 有趋光性。卵多产于叶背或嫩梢上, 单粒散产。6 月下旬田间始见幼虫, 幼虫多于叶背主脉或叶柄上栖息, 夜晚取食, 食量很大, 一片叶子吃光后转移至邻近枝的叶片上继续取食。幼虫期 40~50 d。8 月中、下旬幼虫陆续老熟入土化蛹越冬。

## 5 防治措施

挖蛹: 结合葡萄冬季埋土防寒和春季出土上架, 人工挖除越冬蛹。

捉幼虫: 结合夏季修剪等田间管理, 寻找、捕捉幼虫将其杀死。

药剂杀虫: 葡萄天蛾幼虫易患病毒病, 在田间取回自然死亡的幼虫虫体, 研磨制成 300 倍液喷布于葡萄枝叶上, 效果较好。在幼虫发生盛期, 用虫净、灭扫利、阿维菌素等药剂喷雾, 均有较佳效果。

第一作者简介: 张东光(1976-), 男, 助理研究员, 现主要从事森林管护工作。

收稿日期: 2012-11-01

## Research Progress of the Active Components and Preparation Technology of the Mung Beans and the Sprouts

SUN Li-li, LI Li, DONG Yin-mao

(Beijing Key Laboratory of Plant Resources Research and Development, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

**Abstract:** Mung beans and the sprouts contain various nutrients and biologically-active components and show various nutritional, health-promoting and cosmetology functions. The active components and preparation technology of the Mung beans and the sprouts were reviewed which may be helpful to the utilization of the raw materials on food, health food, and cosmetic.

**Key words:** Mung bean; sprout; biologically-active components; preparation technology