

## 油料蛋白

## 糖基化大豆蛋白体外消化产物的生物活性研究

宋春丽<sup>1</sup>,任 健<sup>1</sup>,陈佳鹏<sup>1</sup>,李墨君<sup>1</sup>,薛永国<sup>2</sup>

(1. 齐齐哈尔大学 食品与生物工程学院,齐齐哈尔大学农产品加工黑龙江省普通高校重点实验室,黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 中国农业科学院 大豆研究所,哈尔滨 150086)

**摘要:**为了分析体外消化作用及超滤处理对糖基化大豆蛋白抗氧化活性及抑菌活性的影响,分别利用胃蛋白酶及胰蛋白酶酶解糖基化大豆蛋白,在一定的条件下水解度分别达到了4.9%和6.4%,此时可溶性蛋白质含量分别为13.6、15.0 mg/mL;再经过超滤处理得到相对分子质量低于5 000的组分,两种超滤组分的可溶性蛋白质含量分别为9.65、10.65 mg/mL。糖基化大豆蛋白体外消化产物的抑菌活性没有发生显著变化,但是抗氧化活性下降;进一步的超滤处理能够获得具有较高生物活性的组分:胃蛋白酶消化产物超滤组分的亚铁离子螯合率提高了约1倍;胰蛋白酶消化产物超滤组分的还原力及羟基自由基清除率显著提高;同时,胃蛋白酶消化产物超滤组分对大肠杆菌具有抑制活性,而胰蛋白酶消化产物超滤组分则具有较强的抑制作用。结果表明,结合体外消化作用及超滤处理能够显著改善糖基化大豆蛋白的生物活性。

**关键词:**大豆分离蛋白;糖基化;体外消化;抗氧化;抑菌活性

中图分类号:TS229;TS201.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)07-0082-05

## Bioactivities of in vitro digestible products from glycosylated soybean protein

SONG Chunli<sup>1</sup>, REN Jian<sup>1</sup>, CHEN Jiapeng<sup>1</sup>, LI Mojun<sup>1</sup>, XUE Yongguo<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Processing Agricultural Products of Heilongjiang Province, College of Food and Bioengineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China; 2. Soybean Research Institute, Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

**Abstract:** The effects of in vitro digestibility and ultrafiltration on the antioxidant activity and antibacterial activity of glycosylated soybean protein (GSPI) were studied. Under certain enzymatic conditions of pepsin or trypsin, the corresponding degree of hydrolysis were 4.9% and 6.4%, and the soluble protein contents of hydrolysates were 13.6 mg/mL and 15.0 mg/mL, respectively. Two fractions from the pepsin hydrolysates and trypsin hydrolysates with relative molecular weight lower than 5 000 were obtained with the ultrafiltration treatment. Soluble protein contents of the two fractions were 9.65 mg/mL and 10.65 mg/mL respectively. The results showed that in vitro digestion had no significant effect on the antibacterial activity of GSPI and resulted in a decrease in antioxidant activity of GSPI. Subsequent ultrafiltration treatment could obtain the fractions with significant increase in the bioactivity.  $Fe^{2+}$ -chelating capacity of the ultrafiltration fraction from pepsin hydrolysates increased about one fold, the reducing power and hydroxyl radical scavenging activity of the ultrafiltration fraction from trypsin hydrolysates was significantly improved. At the same time, ultrafiltration fraction from pepsin hydrolysates exhibited the antibacterial activity on *E. coli*, and the ultrafiltration fraction from trypsin hydrolysates showed a strong inhibitory

effect on *E. coli*. Combining in vitro digestion with subsequent ultrafiltration treatment could significantly improve the bioactivity of GSPI.

**Key words:** soybean protein isolate; glycosylation; in vitro digestion; antioxidant activity; antibacterial activity

收稿日期:2018-03-12;修回日期:2018-05-02

基金项目:黑龙江省本科高等学校青年创新人才支持计划(UNPYSCT-2015094);齐齐哈尔市科学技术计划项目(SFGG-201577)

作者简介:宋春丽(1980),女,副教授,博士,研究方向为蛋白质化学(E-mail) songchunlilily@sina.com。

大豆蛋白是一种优质的蛋白质资源,来源广泛,价格低廉,是亚洲的传统食品,尤其在保障我国膳食蛋白质供给方面发挥着重要的作用。蛋白质的功能特性在食品加工中发挥着重要的作用,很多研究通过蛋白质改性技术改善蛋白质的功能特性,以满足食品加工的要求。糖基化反应是一种比较有前景的蛋白质改性技术,通过 Maillard 反应或酶交联反应(如转谷氨酰胺酶, E. C. 2.3.2.13)<sup>[1]</sup>制备蛋白质与多糖复合物,旨在将多糖的特性与蛋白质的特性相结合,赋予蛋白质新的功能特性。已有研究表明,在体外实验中,多糖与大豆蛋白的复合物具有抑菌及抗氧化作用。如大豆 7S 球蛋白与壳聚糖复合物通过对细菌细胞膜的静电排斥作用,可抑制微生物的生长<sup>[2]</sup>;大豆蛋白与葡聚糖的共聚物具有良好的抗氧化活性<sup>[3]</sup>,这对延长食品货架期及抑制脂质氧化等具有重要意义。

除了糖基化反应,酶解反应通过改变蛋白质的相对分子质量及二级结构等,能够显著地改变蛋白质的功能特性。而且酶反应具有反应条件温和、可控性强等优点,也是一种较好的蛋白质改性技术。大豆蛋白酶解后所得产物具有多种生理功能,如降胆固醇<sup>[4]</sup>、免疫调节<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>和抑菌作用<sup>[7]</sup>。利用超滤膜分离技术分离酶解产物,能够获得具有不同相对分子质量的组分,得到具有不同功能特性的酶解产物。Jiménez - Ruiz 等<sup>[8]</sup>报道,酶解产物经过超滤处理表现出不同的抗氧化活性,超滤所得的 3 个组分中,相对分子质量低于 3 000 的组分抗氧化活性最高;Wu 等<sup>[9]</sup>报道,相对于相对分子质量 200 ~ 900 组分,相对分子质量 900 ~ 1 400 的鲑鱼酶解产物具有较高的还原力。

利用转谷氨酰胺酶的催化作用,促使大豆分离蛋白(SPI)和壳寡糖发生糖基化反应,制备糖基化大豆蛋白(GSPI),该反应改善了大豆蛋白的流变性和乳化性等<sup>[10]</sup>。然而其酶解产物对生物活性的影响尚未研究。本研究模拟体外消化反应采用胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解糖基化大豆蛋白,随后采用超滤的方法分离得到相对分子质量低于 5 000 的组分,分析糖基化大豆蛋白的体外消化产物及其超滤组分的抑菌性及抗氧化活性,为酶法制备食源性生物活性糖肽提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

脱脂豆粉:哈尔滨市宾县禹王植物蛋白有限公司;转谷氨酰胺酶:江苏一鸣精细化工有限公司;壳寡糖:浙江金壳生物化学有限公司;胃蛋白酶、胰蛋

白酶:Sigma 公司;大肠杆菌 *Escherichia coli*:学院实验室提供,采用 LB 培养基培养。UFP-5-C-4MA 型中空纤维超滤柱(5000 NMWC):GE 公司;UV5100 型紫外可见分光光度计;DSX-280B 型手提式压力蒸汽灭菌器;GH4500 型隔水式培养箱;EnSpire 型全波长多功能酶标仪。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 糖基化大豆蛋白的制备

参照文献[10]的方法制备糖基化大豆蛋白。经热变性(90℃,10 min)的大豆分离蛋白(以脱脂豆粉为原料,经碱溶酸沉法制备)分散液与壳寡糖溶液混合,使体系的大豆蛋白质量浓度为 40 g/L,壳寡糖与大豆蛋白的摩尔比为 3:1。向混合体系中加入转谷氨酰胺酶(加入量为 10 U/g,以大豆蛋白质量计),在 37℃ 下反应 3 h。反应结束后加热灭酶(85℃,10 min),随后冷却至 25℃,调 pH 至 4.5,等电沉淀后离心,所得沉淀经水洗、冻干即为糖基化大豆蛋白。

#### 1.2.2 糖基化大豆蛋白体外消化产物及其超滤组分的制备

配制质量浓度为 35 g/L 的糖基化大豆蛋白分散液,90℃ 热处理 10 min 后,调 pH 至 2.0(用于胃蛋白酶酶解)或 6.5(用于胰蛋白酶酶解)。按照酶与蛋白质量比 1:100 的比例加入胃蛋白酶/胰蛋白酶,37℃ 酶解反应 3 h,期间每隔 15 min 取样,立即在 85℃ 灭酶 10 min,分别测定样品的水解度和可溶性蛋白质含量以确定最佳酶解时间。

优化条件下制备的糖基化大豆蛋白体外消化产物,利用超滤系统对其进行超滤处理制得相对分子质量低于 5 000 的组分,分析体外消化产物及其超滤组分的抗氧化活性及抑菌活性。

#### 1.2.3 水解度的测定

参照 Nielsen 等<sup>[11]</sup>的方法,采用邻苯二甲醛(OPA)法测定水解度。具体为:400 μL 丝氨酸标准溶液(0.1 mg/mL)或者样品稀释液与 3 mL OPA 试剂混匀,避光反应 5 min 后,立即在 340 nm 波长处测定其吸光度。以同体积的去离子水代替样品为对照。水解度(DH)计算公式如下:

$$DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

$$h = \frac{\text{Serine} - \text{NH}_2 - \beta}{\alpha}$$

$$\text{Serine} - \text{NH}_2 = \frac{A_{\text{Sample}} - A_{\text{Control}}}{A_{\text{Serine}} - A_{\text{Control}}} \times \frac{0.9516 \times 0.1 \times 10}{W \times P}$$

式中: $A_{\text{Sample}}$ 、 $A_{\text{Serine}}$ 和  $A_{\text{Control}}$  分别为样品、丝氨酸

标准样品和对照的吸光度; $W$ 为以100 mL为单位的样品的质量,  $g$ ;  $P$ 为样品中的蛋白质含量;  $h_{tot}$ 为每克蛋白质中肽键数( $h_{tot} = 7.8$ );  $\alpha$ 为常数( $\alpha = 0.970$ );  $\beta$ 为常数( $\beta = 0.342$ )。

#### 1.2.4 可溶性蛋白质含量分析

采用Lowry法<sup>[12]</sup>测定可溶性蛋白质含量,以每毫升样品中所含的蛋白质质量表示。

#### 1.2.5 抗氧化活性分析

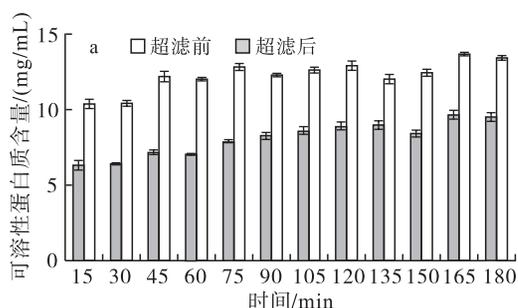
根据文献<sup>[13]</sup>的方法测定大豆蛋白体外消化产物及其超滤组分的抗氧化活性。

#### 1.2.6 抑菌活性分析

参照文献<sup>[14]</sup>采用滤纸片法分析抑菌活性。将大肠杆菌菌种接种到LB斜面培养基上,于37℃培养至对数生长期,梯度稀释大肠杆菌菌液,调整菌悬液的密度约为 $10^6$  CFU/mL,待用。吸取200  $\mu$ L制备的菌悬液( $10^6 \sim 10^7$ 个/mL),均匀涂布到培养皿上,随后放置圆形滤纸片,每个滤纸片加入定量待测样品(糖基化大豆蛋白体外消化产物及其超滤组分)。在37℃培养24 h,观察是否产生抑菌圈以及抑菌圈的大小,进而判断样品的抑菌活性。抑菌圈直径大于20 mm为极敏,15~19 mm为高敏,10~14 mm为中敏,10 mm以下为低敏;直径小于或等于7 mm为无抑菌作用<sup>[15]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 糖基化大豆蛋白体外酶解时间的确定



利用转谷氨酰胺酶的催化作用制备糖基化大豆蛋白,随后分别利用胃蛋白酶及胰蛋白酶在不同条件下酶解糖基化大豆蛋白,通过断裂肽键获得不同的酶解产物。不同酶解时间的酶解产物对应的水解度测定结果见图1。

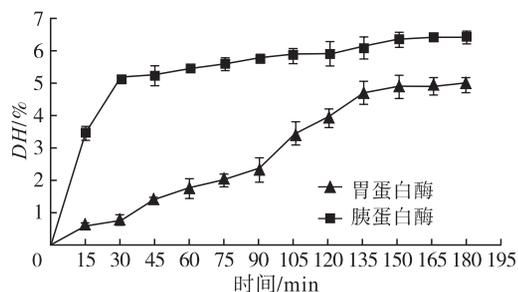


图1 糖基化大豆分离蛋白酶解产物的水解度

从图1可以看出,糖基化大豆蛋白酶解产物的水解度随着酶解时间的延长而增加,当酶解时间达到165 min后,水解度并未随着酶解时间的延长发生显著变化,因此酶解时间确定为165 min。此时胃蛋白酶和胰蛋白酶酶解产物水解度分别为4.9%和6.4%。

### 2.2 超滤处理对糖基化大豆蛋白体外消化产物可溶性蛋白质含量的影响

采用Folin酚法测定不同酶解时间的胃蛋白酶酶解产物、胰蛋白酶酶解产物以及超滤组分的可溶性蛋白质含量,结果分别见图2a、图2b。

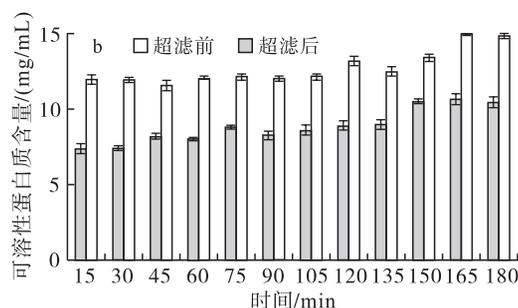


图2 超滤前后不同酶解时间的酶解产物的可溶性蛋白质含量

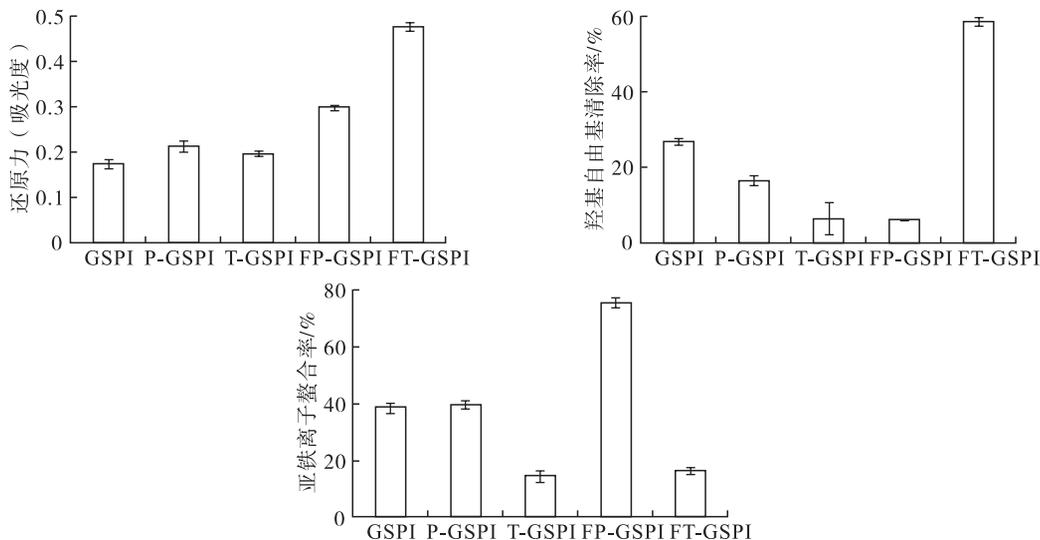
从图2可以看出,随着酶解时间的延长,所得体外消化产物的可溶性蛋白质含量增加,但是增加到一定程度后,可溶性蛋白质含量并未随着酶解时间发生显著变化。相对于胃蛋白酶酶解产物(图2a),胰蛋白酶酶解产物(图2b)中的可溶性蛋白质含量较高,当酶解时间为165 min时,胰蛋白酶酶解产物中的可溶性蛋白质含量达到15.0 mg/mL。

从图2还可以看出,超滤处理对酶解产物的可溶性蛋白质含量影响较大。超滤处理后,酶解产物中的可溶性蛋白质含量下降,这是因为酶解产物中含有部分相对分子质量大于5 000的组分,在超滤

过程中被分离出去。两种体外消化产物相对分子质量低于5 000的超滤组分的可溶性蛋白质含量随着酶解时间的延长总体呈增加趋势。当酶解时间为165 min时,胃蛋白酶和胰蛋白酶体外消化产物的超滤组分的可溶性蛋白质含量较高,分别达到了和9.65 mg/mL和10.65 mg/mL。此时,相对分子质量低于5 000的超滤组分分别占体外消化产物的70.7%和71.0%。此后超滤组分的可溶性蛋白质含量并未随着酶解时间的延长而显著增加。因而,本研究进一步分析酶解时间为165 min时所得体外消化产物及其超滤组分的抗氧化活性和抑菌活性。

### 2.3 糖基化大豆蛋白体外消化产物及其超滤组分的抗氧化活性评价

抗氧化剂通过自身的还原作用给出电子,进而清除自由基,还原能力越强,抗氧化性越强。研究



注:GSPI表示糖基化大豆蛋白;P-GSPI表示糖基化大豆蛋白的胃蛋白酶酶解产物;T-GSPI表示糖基化大豆蛋白的胰蛋白酶酶解产物;FP-GSPI表示胃蛋白酶酶解产物超滤组分;FT-GSPI表示胰蛋白酶酶解产物超滤组分。

图3 糖基化大豆蛋白体外消化产物及其超滤组分的抗氧化活性

从图3可以看出,糖基化大豆蛋白经过体外消化处理,其还原力没有发生显著的改变。然而,超滤组分的还原力显著提高,并且胰蛋白酶酶解产物超滤组分的还原力最高,显著高于糖基化大豆蛋白。

从图3还可以看出,糖基化大豆蛋白经过胃蛋白酶及胰蛋白酶酶解后,所得产物对羟基自由基的清除作用降低。超滤对酶解产物的羟基自由基的清除率影响较大,糖基化大豆蛋白胰蛋白酶酶解产物超滤处理后,羟基自由基的清除作用显著提高,而其胃蛋白酶酶解产物超滤后对羟基自由基的清除作用却有所降低。胃蛋白酶和胰蛋白酶的酶切位点不同,前者特异性作用于Phe、Trp、Tyr等疏水性氨基酸,后者则为Arg、Lys等<sup>[16]</sup>,导致产物的组分明显

中,通过测得700 nm处吸光度间接反映抗氧化剂还原能力的大小,吸光度越大,还原能力越强。糖基化大豆蛋白体外消化产物及其超滤组分的抗氧化活性测定结果如图3所示。

不同,因而表现出了不同的羟基自由基清除率。同样可以看出,体外消化作用及超滤处理对糖基化大豆蛋白的亚铁离子螯合率的影响也较大,糖基化大豆蛋白胰蛋白酶酶解产物及超滤组分的亚铁离子螯合率下降,而糖基化大豆蛋白胃蛋白酶酶解产物的超滤组分的亚铁离子螯合能力显著提高,达到了75.8%,增加了约1倍。

### 2.4 糖基化大豆蛋白体外消化产物及其超滤组分对大肠杆菌抑菌活性评价

采用滤纸片法直观地观察糖基化大豆蛋白体外消化产物及其超滤组分对大肠杆菌的抑菌效果,结果如表1所示。

表1 糖基化大豆蛋白体外消化产物及其超滤组分产生的抑菌圈直径

样品	不同加样量的抑菌圈直径/mm		
	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L	30 $\mu$ L
糖基化大豆蛋白	6.60	6.60	6.60
胰蛋白酶酶解产物	6.80	6.80	6.80
胃蛋白酶酶解产物	7.50	8.12	8.60
胃蛋白酶酶解产物超滤组分	8.15	8.85	9.15
胰蛋白酶酶解产物超滤组分	18.20	25.40	26.60

从表1可以看出,糖基化大豆蛋白及其胰蛋白酶酶解产物在加入量为10~30  $\mu$ L时,抑菌圈直径都小于7 mm,表明糖基化大豆蛋白及其胰蛋白酶酶解产物没有抑菌活性。糖基化大豆蛋白的胃蛋白酶

酶解产物及其超滤组分的抑菌圈直径在7.50~9.15 mm,表明糖基化大豆蛋白的胃蛋白酶酶解产物及其超滤组分具有抑菌活性,为低敏。然而,糖基化大豆蛋白的胰蛋白酶酶解产物的超滤组分,当待

测样品加样量为 10 ~ 30  $\mu\text{L}$  时, 抑菌圈直径在 18.2 ~ 26.6 mm 范围内, 可见其抑菌效果比较显著。

### 3 结 论

利用转谷氨酰胺酶催化大豆蛋白发生糖基化反应制备糖基化大豆蛋白, 随后模拟体外消化作用(胃蛋白酶酶解和胰蛋白酶酶解)获得水解度分别为 4.9% 和 6.4% 的酶解产物。该处理导致糖基化大豆蛋白的抗氧化活性下降, 同时未显著引起抑菌活性的变化。然而, 上述体外消化产物经过超滤处理(获得相对分子质量低于 5 000 的组分)后, 能够获得具有较高抗氧化活性及抑菌活性的组分, 具体表现为: 糖基化大豆蛋白胃蛋白酶酶解产物超滤组分的亚铁离子螯合率显著提高, 达到 75% 以上; 其胰蛋白酶酶解产物超滤组分的还原力和羟基自由基清除率显著提高; 胃蛋白酶酶解产物超滤组分对大肠杆菌能够起到抑制作用, 而胰蛋白酶酶解产物超滤组分具有较强的抑制作用。

### 参考文献:

- [1] KIELISZEK M, MISIEWICZ A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review[J]. *Folia Microbiol*, 2014, 59(3): 241 – 250.
- [2] YUAN Y, WAN Z, YIN S, et al. Stability and antimicrobial property of soy protein/chitosan mixed emulsion at acidic condition[J]. *Food Funct*, 2013, 4(9): 1394 – 1401.
- [3] JIN B, ZHOU X, LI B, et al. Structure and antioxidant activity of soy protein isolate – dextran conjugates obtained by  $\text{TiO}_2$  photocatalysis[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015(44): 1 – 7.
- [4] LOVATI M R, MANZONI C, GIANAZZA E, et al. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells[J]. *J Nutr*, 2000, 130(10): 2543 – 2549.
- [5] TSURUKI T, KISHI K, TAKAHASHI M, et al. Soy-metide, an immunostimulating peptide derived from soybean – conglycinin, is an fMLP agonist[J]. *FEBS Lett*, 2003, 540: 206 – 210.
- [6] DHAYAKARAN R, NEETHIRAJAN S, WENG X. Investigation of the antimicrobial activity of soy peptides by developing a high throughput drug screening assay[J]. *BB Reports*, 2016, 6: 149 – 157.
- [7] DE CASTRO R J S, SATO H H. Antioxidant activities and functional properties of soy protein isolate hydrolysates obtained using microbial proteases[J]. *Int J Food Sci Tech*, 2014, 49(2): 317 – 328.
- [8] JIMÉNEZ – RUIZ E I, CALDERÓN DE LA BARCA A M, SOTELO – MUNDO R R, et al. Partial characterization of ultrafiltrated soy protein hydrolysates with antioxidant and free radical scavenging activities[J]. *J Food Sci*, 2013, 78(8): C1152 – C1158.
- [9] WU H C, CHEN H M, SHIAU C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. *Food Res Int*, 2003, 36(9/10): 949 – 957.
- [10] SONG C L, ZHAO X H. Structure and property modification of an oligochitosan – glycosylated and crosslinked soybean protein generated by microbial transglutaminase[J]. *Food Chem*, 2014, 163(12): 114 – 119.
- [11] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C, et al. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. *J Food Sci*, 2001, 66(5): 642 – 646.
- [12] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265 – 275.
- [13] 宋春丽, 任健, 陈佳鹏, 等. 糖基化及限制性酶解对大豆蛋白结构和抗氧化活性的影响[J]. *中国油脂*, 2017, 42(11): 65 – 69.
- [14] CHEVALIER F, CHOBERT J M, GENOT C, et al. Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the maillard reaction products of  $\beta$  – lactoglobulin glycosylated with several sugars[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(10): 5031 – 5038.
- [15] 卫生部卫生法制与监督司. 消毒技术规范[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2002: 69 – 71.

**《中国油脂》微博已开通, 欢迎广大油友互动交流!**

新浪官方微博: 中国油脂 <http://e.weibo.com/2841983372/profile>