

高压均质辅助酶解豆乳对蛋白结构及抗营养因子的影响

齐宝坤 王 琪 钟明明 廖 一 孙禹凡
(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 以冷榨磨浆工艺所得豆乳为原料,研究高压均质辅助不同蛋白酶(碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶)水解豆乳对其结构及品质的影响。结果表明,随着均质压力的增加,酶解豆乳溶解度和水解度分别高达 91.9% 和 8.24%,同时豆乳粒径分布更加均匀,表面负电荷增加,稳定性明显提高;SDS-PAGE 电泳、红外光谱和荧光光谱研究豆乳中蛋白结构的变化,结果表明不同均质压力辅助酶解处理改变了蛋白质的线性表位,大分子量的抗营养蛋白因子条带呈变浅趋势,二级结构中 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲含量减少;测定抗营养因子含量揭示蛋白质结构与功能的关系,发现均质压力在 100 MPa 时,3 种酶对大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白、植酸、大豆凝集素、胰蛋白酶抑制剂和脂肪氧化酶 6 种抗营养因子达到最佳去除效果,抑制率分别高达 51.28%、57.83%、72.31%、71.4%、89.55% 和 82.96%,脲酶活性均呈阴性。研究结果可为营养健康豆乳的制备提供理论基础。

关键词: 豆乳; 酶解; 高压均质; 蛋白结构; 抗营养因子

中图分类号: TS214.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2023)02-0368-10 OSID: 

Effects of High-pressure Homogenization Assisted Enzymatic Hydrolysis of Soybean Milk on Protein Structure and Anti-nutritional Factors

QI Baokun WANG Qi ZHONG Mingming LIAO Yi SUN Yufan
(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The soybean milk was obtained by cold-pressing from commercially available soybeans, the obtained milk was then subjected to high-pressure homogenization pretreatment assisted by different proteases (alkaline protease, papain, bromelain) to hydrolyze soybean milk and assess the effect on its structure and quality. The results regarding physical properties revealed that with the increase of homogenization pressure the solubility and hydrolysis degree of soybean milk reached 91.9% and 8.24%, respectively. Meanwhile, there was a substantial improvement in stability, negative surface charge and uniform particle size distribution. SDS-PAGE electrophoresis, infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy confirmed the changes in protein structure of soybean milk under different homogeneous pressures assisted enzymatic hydrolysis, showing a decreased band depth anti-nutritional protein factors. There was reduction in secondary structure and the contents of α -helix, β -rotation. The anti-nutritional factors revealed the relationship between protein structure and function. When the homogenization pressure was set at 100 MPa, the inhibitory rates of the three enzymes on soybean globulin, β -concomitant soybean globulin, phytic acid, soybean lectin, trypsin inhibitor and lipoxygenase were up to 51.28%, 57.83%, 72.31%, 71.4%, 89.55% and 82.96%, respectively. The results showed that high pressure homogeneous pretreatment effectively improved the hydrolysis of protease anti-nutritional factor components. The obtained results might be fruitful for the preparation of nutritious and healthy soybean milk.

Key words: soybean milk; enzymolysis; high-pressure homogenization; protein structure; anti-nutritional factors

0 引言

豆乳的稳定性和抗氧化活性并不理想,并且含有多种抗营养因子 (ANF) 影响其为人提供营养健康^[1],包括热稳定性 ANF 植酸 (PA)、大豆球蛋白 (11S)、β-伴大豆球蛋白 (7S)、低聚糖等和热不稳定性 ANF 胰蛋白酶抑制剂 (TI)、脲素酶 (UA)、抗维生素因子、致甲状腺肿素、大豆凝集素 (SBA)。其中,脲酶作为抗营养因子组分的一种,是无毒的酰胺酶类物质,易分解成含氮化合物进一步产生氨,导致氨中毒或引起机体中氮代谢紊乱;大豆凝集素约占大豆蛋白质的 3%,是一种高度抗消化的糖蛋白;致甲状腺素是由硫代葡萄糖苷形成的,这种物质会引起甲状腺肿大;脂肪氧化酶 (LOX) 又称为抗维生素因子,约占大豆蛋白的 1%,催化脂肪氧化将脂溶性维生素和胡萝卜素破坏,引发维生素缺乏;胰蛋白酶抑制剂是一种高分子蛋白质,大豆约含 30 mg/g,严重影响消化过程;植酸与金属离子 (如钙、镁、锌、铜和铁) 形成螯合物降低矿物质的生物利用度;大豆抗原蛋白主要存在于 11S 和 7S 中,会引起动物机体发生过敏反应。这些抗营养因子的存在会导致食物利用率低、生长性能下降,甚至引发疾病^[2]。因此为了提高大豆的营养价值,钝化大豆中抗营养因子 (ANF) 含量具有重要的现实意义。

近 20 年来对去除大豆抗营养因子的相关研究十分广泛,研究方法包括热处理和非热处理物理手段、浸泡萌发、发酵、蛋白酶解改性、糖基化修饰及 pH 值调控化学方法等改变大豆蛋白的空间结构和分子特性,进一步影响 ANF 活性并对其功能性质进行研究。文献[3]研究高压均质与酶法联合改性对大豆蛋白抗原性及结构的影响;文献[4]采用碱性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶分别水解脱脂豆粕,并采用双抗体夹心酶联免疫反应 (ELISA) 测定其抗原活性。文献[5]进行酶促交联处理,采用酰基转移酶 MTGase 催化谷氨酰胺和赖氨酸残基之间的酰基转移反应,导致共价蛋白质交联^[6],促使大豆交联成高分子量聚合物,蛋白质氨基酸序列及空间结构发生改变引起抗原表位的隐藏或掩盖进而抑制了 11S 和 7S 的抗原性。此外,酶法改性蛋白可以提高抗氧化剂活性,文献[7]利用碱性蛋白酶制备大豆蛋白活性肽对抗氧化活性研究;文献[8]研究发现高压处理提高了酶的水解效率,在高压下水解可以增加小肽的产量,获得的水解物具有更高的生物活性。综上所述,目前关于酶改性抑制大豆蛋白抗原性的研究较多,但对酶解豆乳蛋白结构和分子特性的改变与大豆中 ANF 及其功能特性的影响研究相

对较少。

因此,本文以不同均质压力预处理的豆乳作为底物,分别采用碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶进行水解,研究高压均质辅助酶解豆乳对蛋白质结构与 ANF 的影响,通过豆乳前后溶解性、水解度和粒径、Zate 电位、储存稳定性、豆乳微观结构、线性表位、二三级结构的改变,对比分析豆乳抗营养因子含量的差异,以揭示高压均质辅助蛋白酶解豆乳过程中钝化抗营养因子的作用机理。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆 (东农 99),东北农业大学大豆研究所;木瓜蛋白酶 (酶活力为 8.0×10^5 U/g),碱性蛋白酶 (酶活力为 2.0×10^5 U/g),菠萝蛋白酶 (酶活力为 3.5×10^5 U/g),北京奥博星生物技术有限公司;植酸钠、牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 标准品、苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基苯胺 (BAPNA)、乙二胺四乙酸,购买于北京化工试剂厂;大豆球蛋白、β-伴大豆球蛋白、大豆凝集素双抗体夹心酶联免疫吸附试验 (ELISA) 定量检测试剂盒,上海酶联生物技术公司。

1.2 仪器与设备

ATS-BASIC 100 型高压均质机,德国 ATS 仪器公司;Multiskan FC 型酶标仪,赛默飞世 (上海) 仪器有限公司;LGJ-18 型高速冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;DYY-6D 型电泳仪,北京市六一仪器厂;FL8500 型荧光分光光度计,美国 Perkin Elmer 公司;ALPHA-T 型傅里叶变换红外光谱仪,美国 Bruker 公司;TU-1901 型紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程

工艺流程如下:大豆→筛选→清洗→浸泡 (料液比 3 g/mL、12 h)→冷榨磨浆 (料液比 6 g/mL)→过滤→高压均质 (30 ~ 120 MPa) 预处理→酶解 (酶最适温度、加酶量 0.2%、保持豆乳自然 pH 值 6.5)→喷雾干燥→过筛→成品。

1.3.2 高压均质辅助蛋白酶解豆乳工艺

取适量新鲜冷榨豆乳,等量分装,采用不同均质压力 (30、70、90、100、120 MPa) 预处理,每个样品均质 3 遍,再等量加入不同酶水解处理 (碱性蛋白酶 E1、木瓜蛋白酶 E2、菠萝蛋白酶 E3),加酶量参照文献[3]。本实验酶与底物质量百分比为 0.2%,酶解温度采用酶的最适反应温度 (E1: 50℃; E2: 55℃; E3: 45℃),水解时间为 20 min。

1.3.3 溶解度测定

将水解物在室温(20℃)下搅拌1 h,最后在20℃和9 000 g下离心20 min。上清液中的蛋白质含量通过Pierce BCA Protein Assay试剂盒测量,使用牛血清白蛋白作为标准。溶解度表示为存在于上清液中蛋白含量 A_1 与样品总蛋白质含量 A_2 的百分比。氮溶解指数(NSI)计算公式为

$$N_{SI} = \frac{A_1}{A_2} \times 100\% \tag{1}$$

1.3.4 水解度测定

参考文献[9]的方法,以丝氨酸作为标准,采用邻苯二甲醛(OPA)法测定,取160 mg OPA(纯度97%)溶于4 mL无水乙醇,加入0.2 g的SDS(十二烷基硫酸钠)、7.620 g的硼砂、0.175 g DTT(二硫苏糖醇,纯度99%)去离子水定容200 mL。混匀避光保存。400 μL样品与3.0 mL的OPA试剂混匀静置2 min后,在340 nm下测定吸光度。水解度计算公式为

$$D_H = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\% \tag{2}$$

式中 h ——水解过程中,每克豆乳蛋白被断裂的肽键数,mmol/g

h_{tot} ——大豆蛋白总肽键数,取7.8 mmol/g

1.3.5 粒径、电位测定

采用Mastersizer 2000型粒度仪测定豆浆的粒径分布。将样品稀释到合适倍数,设置颗粒折射率为1.46,分散剂折射率为1.33,吸收参数为0.001,测定温度为25℃,平衡时间为2 min,计算3次重复试验得到的平均值。

1.3.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

根据文献[10]的方法,使用SDS-PAGE法分析豆乳样品中抗原蛋白以及ANF组分分子量的分布模式。此方法采用5%的浓缩胶和12%的分离胶,在甘氨酸电极缓冲液进行跑胶,将豆乳样品用纯水稀释为合适倍数,并与样品缓冲液(含5% β-巯基乙醇)按照体积比3:1混合并在100℃加热约10 min,上样量为10 μL。

1.3.7 傅里叶变换红外光谱测定

参考文献[11]的方法,对酶解豆乳蛋白二级结构进行测定,傅里叶变换红外光谱仪检测参数为波数4 000 ~ 400 cm⁻¹,分辨率4 cm⁻¹,波数精度0.01 cm⁻¹,扫描次数64次。使用Peak Fit V4.12软件分析二级结构的变化。

1.3.8 荧光光谱测定

参考文献[12]的方法,利用FL8500型荧光光

度计测定豆乳蛋白的本征发射荧光光谱。将新制备的豆乳用0.2 mol/L磷酸盐缓冲溶液(pH值7.1~7.4)稀释至合适浓度,发射光谱仪的激发波长为290 nm,在300~400 nm扫描发射光谱,激发和发射的狭缝均为5 nm。

1.3.9 抗营养因子测定

1.3.9.1 脲酶活性测定

UA活性参考文献[13]的方法:将1.0 g样品与50 mL尿素溶液(在50 mL 0.05 mol/L磷酸钾缓冲液(pH值7.0)中加入1 g尿素)35℃搅拌40 min。UA活性表示为pH值的变化。

1.3.9.2 胰蛋白酶抑制剂活性测定

根据文献[14]对TI活性进行测定。称取1 g豆乳于50 mL Tris缓冲液(0.05 mol/L,pH值8.2)中,恒温摇床(150 r/min,25℃,3 h),7 000 r/min离心10 min,保留上清液。一个胰蛋白酶单位(1TU)被定义为10 mL反应混合物(2 mL等分试样、2 mL胰蛋白酶溶液、5 mL BAPNA溶液和1 mL乙酸溶液)在410 nm处增加0.01个吸光度单位。抗营养因子TI活性计算公式为

$$T_I = \frac{U_0}{U} \times 100\% \tag{3}$$

式中 U_0 ——豆乳样品中胰蛋白酶活力量

U ——生豆乳中胰蛋白酶活力量

1.3.9.3 脂肪氧化酶活性测定

将2 g样品与100 mL磷酸钠缓冲液(0.2 mol/L,pH值6.5)搅拌120 min,然后离心(10 000 g,在20℃下1 h),测定收集的上清液中的LOX活性提取物。将10 mL上清液与5.0 mL(0.2 mol/L硼酸钠缓冲液(pH值9.0)和0.02 mol/L亚油酸)混合。用234 nm处吸光度计算LOX活性^[15],脂肪氧化酶(LOX)活性计算公式为

$$L_{ox} = \frac{A_1}{A_2} \times 100\% \tag{4}$$

式中 A_1 ——豆乳样品在234 nm处吸光度

A_2 ——生豆乳在234 nm处吸光度

1.3.9.4 植酸测定

参考文献[16]采用三氯化铁比色法测定PA含量。以植酸钠标准品建立PA标准曲线,取1.000 g豆乳样品,加入50 mL 1.2% HCl,10% Na₂SO₄混合溶液于离心管中搅拌均匀,静置浸提2 h,选择离心机7 000 r/min,离心30 min,取全部上清液在4℃保存。取3.0 mL样品液于25 mL离心管中,7 000 r/min离心10 min,上清液即为测定液,加入1 mL 0.2% 磷基水杨酸-0.02% FeCl₃作为显色剂,涡旋混匀;不含样品溶液,即为比色空白溶液。空白液调零,在

500 nm 波长下测定吸光度。通过 PA 标准曲线查出 PA 含量。

1.3.9.5 大豆凝集素测定

取 10 mL 豆乳样品,置于 100 mL 烧杯中,加入 20 mL 0.85% NaCl 溶液,混匀,放入冰箱 4℃ 浸提 48 h,期间每隔 6 h 摇动 1 次。浸提完成的样品在 10 000 r/min、4℃ 离心 20 min,取上清液于 -10℃ 保存待用。按照购买的大豆凝集素 ELISA 试剂盒(96 孔)中的使用说明书进行实验。

1.3.9.6 ELISA 法测定大豆抗原蛋白含量

取 10 mL 待测样品,加入 20.0 mL、0.03 mol/L 的 Tris-HCl(pH 值 8.0,含有 0.01 mol/L β-巯基乙醇)缓冲液中,置于恒温摇床 28℃、180 r/min 浸泡 1 h,再经过 7 000 r/min 离心 15 min,取上清液 4.0℃ 保存备用^[17]。

抗原活性检测:按照购买的 β-伴大豆球蛋白和大豆球蛋白 ELISA 试剂盒(96 孔)中的使用说明书进行实验。在酶标板中加入 50 μL 稀释样、50 μL 的抗体工作液,37℃ 温育 0.5 h;弃液后加洗涤液 200 μL 洗涤 4 次;加入 HPR 标记二抗 100 μL,37℃ 温育 30 min;弃液洗涤 4 次,加入 100 μL 混匀的显色液,37℃ 温育 15 min,最后加入终止液 50 μL,轻晃混匀后,立即于酶标仪 450 nm 处读取吸光度。根据标准曲线计算抗原蛋白含量,抗原蛋白抑制率计算公式为^[17]

$$X = \frac{A'_1 - A'_2}{A'_1} \times 100\%$$

(5)

式中 A'_1 ——生豆乳中抗原蛋白含量
 A'_2 ——样品中抗原蛋白含量

1.4 数据分析

所有结果取 3 次平均值 ± 标准偏差(SD)。使用 IBM SPSS 25 软件对数据进行统计分析,显著性水平为 $P < 0.05$ 。采用 Image Lab 软件分析 SDS-PAGE 图谱,采用 Origin 8.5 作图。

2 结果与分析

2.1 高压均质辅助酶解对豆乳溶解性和水解度影响

溶解性是影响豆乳蛋白功能和结构的重要指标,由图 1a 可知,高压均质预处理过程中,豆乳的 NSI 随着均质压力的增大呈上升趋势,当均质压力为 100 MPa 时,豆乳蛋白的 NSI 最高,为 81.6%,这可能是均质处理可以将蛋白质的结构展开,亲水基团暴露,蛋白分子表面疏水基团分子间相互作用减小,增加了豆乳蛋白的水合作用。高压均质辅助酶解处理使豆乳的 NSI 进一步增加,这是因为高压均质处理促进酶与底物蛋白质充分接触,酶解导致豆

乳蛋白肽键断裂,暴露更多可电离氨基和羧基,从而提高其溶解性^[18]。其中,100 MPa 高压均质预处理条件下,E1、E2 和 E3 豆乳 NSI 分别为 88.1%、91.9% 和 90.8%,表明 E2 对豆乳蛋白的识别度高于 E1 和 E3,酶解效果最佳。

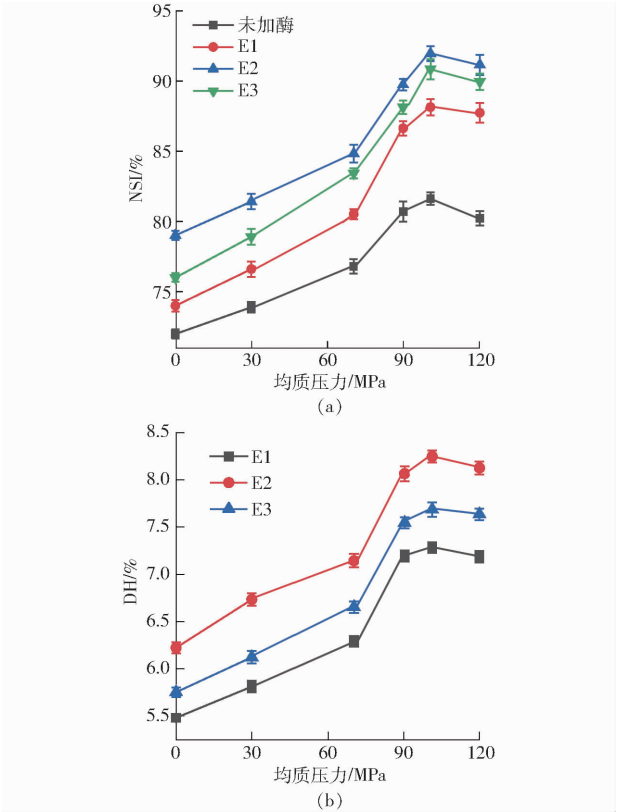


图 1 高压均质辅助酶解豆乳的 NSI 和 DH

Fig.1 NSI and degree of hydrolysis of soybean milk under high-pressure homogenization

水解度(DH)是衡量豆乳酶解程度的重要标准^[19]。图 1b 显示了不同均质压力下 3 种酶解豆乳的 DH 变化,高压均质预处理增加了豆乳的水解度,当均质压力增加到 100 MPa 时 DH 达到最大,这可能是高压均质的机械作用使蛋白质的结构被破坏,暴露更多蛋白酶结合位点,有效提高了酶解效率。结果显示 3 种酶解豆乳 DH 从大到小依次为 E2、E3、E1,E2 酶解豆乳的 DH 最大值为 8.24%,这可能是因为 E2 的酶活力较高,E2 的酶切位点是精氨酸、赖氨酸、甘氨酸的羧基端,与豆乳的特异性较高。当豆乳中更多的蛋白质发生降解时,ANF 组分同时也被降解,达到降低豆乳 ANF 的作用。DH 反映了酶的作用效果进而揭示了大豆 ANF 组分的变化关系^[20]。

2.2 粒径、电位分析

豆乳的粒径分布能反映豆乳中颗粒的大小和均匀性。如图 2(图中图例数字零表示生豆乳,下同)所示,生豆乳的粒径分布在 460 nm 左右。采用 E1、

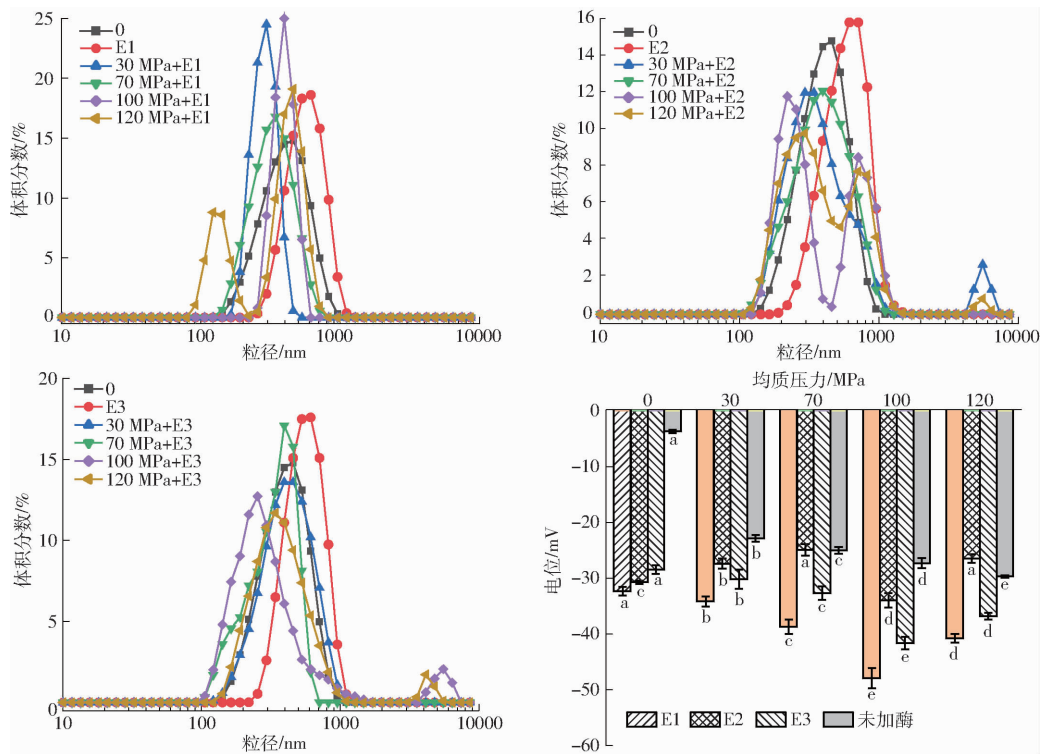


图2 高压均质辅助酶解豆乳的粒径和电位

Fig.2 Particle size and potential of soymilk under high-pressure homogenization assisted enzymatic hydrolysis

E2、E3 酶解处理后,导致豆乳粒径增大,大颗粒体积向右偏移至 600、700、620 nm 左右。随着均质压力的增加粒径开始减小,100 MPa 时体积分布向左移动至 300 nm 左右,达到最佳状态,粒径与蛋白质的溶解度和酶解程度直接相关,即当形成较小的豆乳颗粒时,蛋白质具有更好的溶解性,这种现象更有利于蛋白质的降解,从而达到较高的 DH。电位是判断豆乳稳定性的重要指标,豆乳颗粒越小则电势绝对值越大,粒子之间的排斥力越大,使系统越稳定。如图 2 显示,与生豆乳对比高压均质处理和酶解豆乳均使蛋白质表面带电荷量显著增加,这可能由于蛋白颗粒之间产生较大的静电斥力,导致蛋白的带电荷量增多从而使豆乳体系更加稳定^[21]。

2.3 表观稳定性及微观形态的分析

图 3 为豆乳在高倍显微镜下的微观形态图,可以看出蛋白质颗粒直径较大并容易聚集,分散性较差,由以上结果可知 E2 酶解豆乳的 DH 较高,因此进一步观察不同均质压力下 E2 酶解豆乳的微观变化。120 MPa-未加酶豆乳与生豆乳相比,结构变得松散,但颗粒大小并未发生明显变化,E2 水解使豆乳颗粒尺寸明显减小,30 MPa-E2 豆乳的粒径减小,但液滴分散并不均匀;随着均质压力继续增加,70 MPa-E2 豆乳的分散性逐渐变好,100 MPa-E2 豆乳蛋白颗粒尺寸达到最小并且液滴分散很均匀,当压力增加至 120 MPa 时,蛋白颗粒出现集聚现象形成一簇条形或球形的状态,这说明均质压力过大

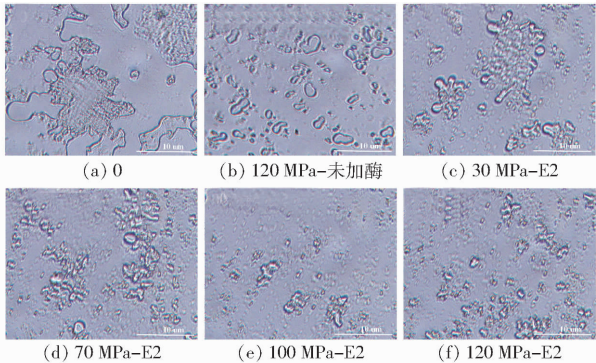


图3 豆乳显微结构图

Fig.3 Microstructural presentation of different samples of soybean milk

使豆乳蛋白受到剧烈的碰撞剪切,诱导蛋白分子重新结合导致少量蛋白出现堆积现象。说明适当压力处理(100 MPa)能够促进酶解豆乳中蛋白质肽链的断开,产生更多小分子多肽,从而改变豆乳蛋白的线性表位与结构特性。

图 4(图中 0~7 分别表示生豆乳,水解豆乳(E1、E2、E3),100 MPa 辅助(未加酶、E1、E2、E3)水解豆乳;a~c 表示 100 MPa 辅助(E1、E2、E3)豆乳粉)是豆乳在 4℃ 条件下贮藏 30 d 的表观图像,可以看出生豆乳产生了比较明显的沉淀,并伴有少量脂肪上浮的“乳析”现象产生^[22]。经 100 MPa 均质处理豆乳则无明显沉淀产生。E1、E2、E3 酶解豆乳在储藏 30 d 时间内均出现不同程度的分层现象,但明显低于未处理豆乳。采用高压均质 100 MPa 辅助

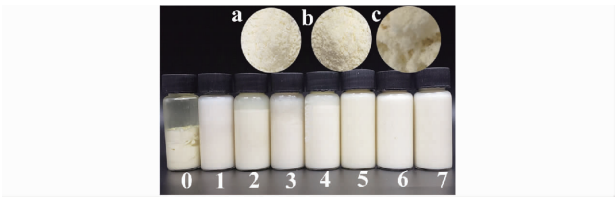


图 4 豆乳储存稳定性及豆粉表面观图

Fig. 4 Soybean milk storage stability and bean powder apparent diagram

E1、E2、E3 酶解,结果显示无明显沉淀和分层现象,说明高压均质辅助酶解可明显提高豆乳体系稳定性。此外,不同蛋白酶水解使豆乳粉的色泽发生改变,可以看出 E3 豆粉显淡黄色,颜色较 E1 和 E2 豆粉略深,所有豆粉颗粒较细且品质较好。

2.4 高压均质辅助蛋白酶解豆乳对大豆蛋白结构的影响

2.4.1 SDS-PAGE 电泳分析

豆乳中的 ANF 组分主要有 11S、7S 和 SBA 等。7S 的抗原表位主要在 α' 、 α 和 β 这 3 个亚基上,11S 的抗原表位存在于酸性亚基 A 和碱性亚基 B 两条肽链上,SBA 以四聚体糖蛋白的形式存在于大豆中,

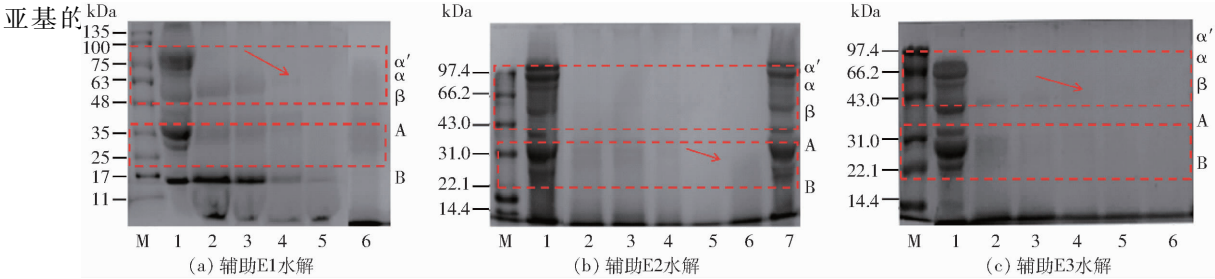


图 5 酶解豆乳 SDS-PAGE 图谱

Fig. 5 SDS-PAGE atlas of enzymolysis soybean milk

2.4.2 蛋白二级结构分析

通过红外光谱表征 100 MPa 均质压力预处理辅助酶解豆乳与未进行预处理酶解豆乳中蛋白质二级结构的含量(图 6),光谱的酰胺 I 带主要由 C=O 的伸缩振动引起,也与 N-H 的平面扭曲、C-N 的

marker;图 5a 中 1 ~ 6 表示 0、30、70、90、100、120 MPa 辅助 E1 水解;图 5b 中 1 ~ 7 分别表示生豆乳,30、70、90、100、120 MPa 辅助 E2 水解,120 MPa-未水解;图 5c 中 1 ~ 6 分别表示生豆乳,30、70、90、100、120 MPa 辅助 E3 水解)可知,与生豆乳相比,随着均质压力增大,豆乳蛋白与 3 种酶作用效果显著增强,豆乳蛋白水解度提高,分解产生大量小分子量肽段或氨基酸^[24]。研究表明,高压均质辅助酶解使豆乳蛋白的 7S 和 11S 亚基去除效率较高, α' 和 α 条带在较低均质压力条件则消失,表明大分子蛋白亚基条带首先被酶解成小分子亚基,随着均质压力提高至 100 MPa 时, β 、A 和 B 亚基条带进一步变浅或消失,表明此时豆乳蛋白被进一步分解。通过豆乳蛋白的分子量分布结果得出这 3 种蛋白酶对抗原蛋白的抑制作用从大到小依次为 E2、E3、E1,对 SBA 的抑制作用从大到小依次为 E2、E3、E1。相比之下 E2 对豆乳蛋白的特异性较高,此外,适当高压均质压力(100 MPa)可以促进蛋白酶的水解作用,对大豆抗营养蛋白亚基组分起到良好的降解作用。

伸缩振动有关,波数在 1 610 ~ 1 640 cm^{-1} 处可得到 β -折叠含量,1 640 ~ 1 650 cm^{-1} 处可得出无规则卷曲含量,1 650 ~ 16 508 cm^{-1} 处可得 α -螺旋含量,1 660 ~ 1 695 cm^{-1} 处可得 β -转角含量。有研究指出,11S 的抗原表位多位于 β -折叠和无规则卷曲结

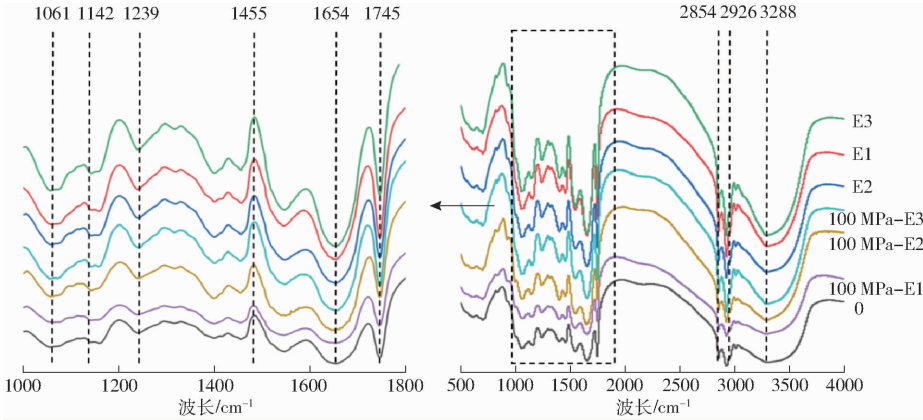


图 6 豆乳蛋白红外光谱图

Fig. 6 Infrared spectrum of soybean milk protein

构上,7S 的抗原表位多出现在 α -螺旋和 β -折叠的结构上^[25]。由此可以推断,大豆 ANF 与二级结构之间存在一定的关联。

利用 Peak Fit 拟合图谱计算,得出二级结构含量如表 1 所示,采用 E1、E2、E3 处理后 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲的含量呈减少趋势, β -转角含量呈增加趋势,E3 所得产物 α -螺旋含量最少,E2 对 β -折叠的影响较大,可能由于 E2 水解作用较强能

将蛋白内部的 β -折叠破坏导致减少,E1 水解使无规则卷曲含量最少;100 MPa 预处理辅助 E1、E2、E3 处理促进了二级结构的变化趋势,这可能是由于均质处理使其疏水位点暴露,增加了酶解效果,使豆乳中高级结构解聚,肽链被打断。通过对二级结构含量的分析发现蛋白酶解后的 α -螺旋、 β -折叠和无规则卷曲结构含量降低,从而使 ANF 表位尤其是抗原蛋白表位被掩盖,这与文献[26]的结果相一致。

表 1 豆乳蛋白二级结构相对含量

Tab.1 Soybean milk protein secondary structure content

%

样品	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
0	(16.15 $\pm$ 0.03) ^f	(39.82 $\pm$ 0.12) ^c	(20.02 $\pm$ 0.09) ^b	(30.79 $\pm$ 0.15) ^e
E1	(14.96 $\pm$ 0.05) ^e	(39.96 $\pm$ 0.14) ^c	(20.47 $\pm$ 0.06) ^c	(28.11 $\pm$ 0.11) ^b
E2	(14.04 $\pm$ 0.02) ^c	(38.77 $\pm$ 0.11) ^b	(20.67 $\pm$ 0.05) ^c	(28.93 $\pm$ 0.09) ^c
E3	(16.47 $\pm$ 0.04) ^d	(37.82 $\pm$ 0.08) ^a	(20.86 $\pm$ 0.07) ^d	(28.84 $\pm$ 0.10) ^c
100 MPa-E1	(14.31 $\pm$ 0.01) ^a	(39.79 $\pm$ 0.17) ^c	(20.48 $\pm$ 0.04) ^a	(25.11 $\pm$ 0.06) ^a
100 MPa-E2	(13.42 $\pm$ 0.02) ^b	(38.14 $\pm$ 0.09) ^b	(20.83 $\pm$ 0.08) ^b	(29.93 $\pm$ 0.12) ^d
100 MPa-E3	(15.76 $\pm$ 0.04) ^f	(37.13 $\pm$ 0.18) ^a	(20.89 $\pm$ 0.07) ^b	(27.84 $\pm$ 0.08) ^b

注:同列中不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.4.3 荧光光谱分析

图 7 为高压均质辅助酶解豆乳的荧光光谱图。可以看出,生豆乳的荧光强度显示最高,3 种酶水解豆乳的最大吸收峰发生红移且荧光强度降低的现象,并随着均质压力增加荧光吸收继续减少,这可能是由高压均质处理导致豆乳蛋白分子部分解折叠造成的,使蛋白柔性增加,三级结构变得更加舒展,色氨酸残基暴露于蛋白质分子表面,增加了酶的识别度,酶解后出现红移现象说明蛋白质的疏水区域局

部改变,发色基团(如色氨酸残基)所处环境由非极性向极性转化^[27],因此豆乳的极性增加从而吸收峰发生红移同时也使豆乳的基态更加稳定。这些结果表明,高压均质改变了豆乳蛋白的空间结构,促进了酶的水解作用,并一定程度上破坏抗原蛋白的构象表位,从而影响了 ANF 组分的活性,文献[28]研究表明,植物蛋白 ANF 多存在于其亲水区域,酶解后导致疏水区域暴露,11S、7S 和 SBA 蛋白亲水区域表位被掩盖或破坏,从而可能达到降低豆乳 ANF 的效果。

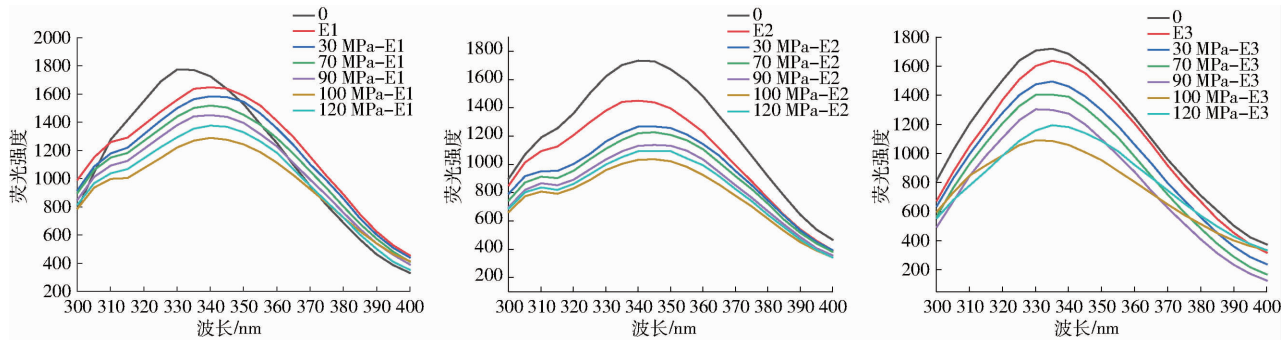


图 7 高压均质辅助酶解豆乳的荧光光谱图

Fig. 7 Fluorescence spectra of high-pressure homogenization assisted enzymatic hydrolysis of soybean milk

2.5 抗营养因子分析

图 8 显示,未酶解豆乳随着均质压力的增加 ANF 呈减少趋势,当压力为 120 MPa 时豆乳中的 11S、7S、PA、SBA、TI、LOX 的抑制率达到最大,实验结果分别为 14.37%、24.68%、38.05%、23.13%、32.69%、23.7%。高压均质处理使豆乳中 ANF 减少,这可能是因为高压均质处理使豆乳蛋白分子被降解以及空间结构发生改变,从而破坏或改变了

ANF 组分的抗原表位,压力越大就会使更多 ANF 蛋白表位被破坏。此外,PA 的失活机制还与高压均质触发了大豆内部植酸酶的活性有关,植酸酶可以去除豆乳中的植酸盐成分,从而使 PA 含量降低^[29]。这表明了高压均质预处理豆乳对 ANF 具有一定的抑制作用。

高压均质辅助 E1、E2、E3 酶解处理对 ANF 的影响如图 8 所示,实验结果表明,所有酶水解对

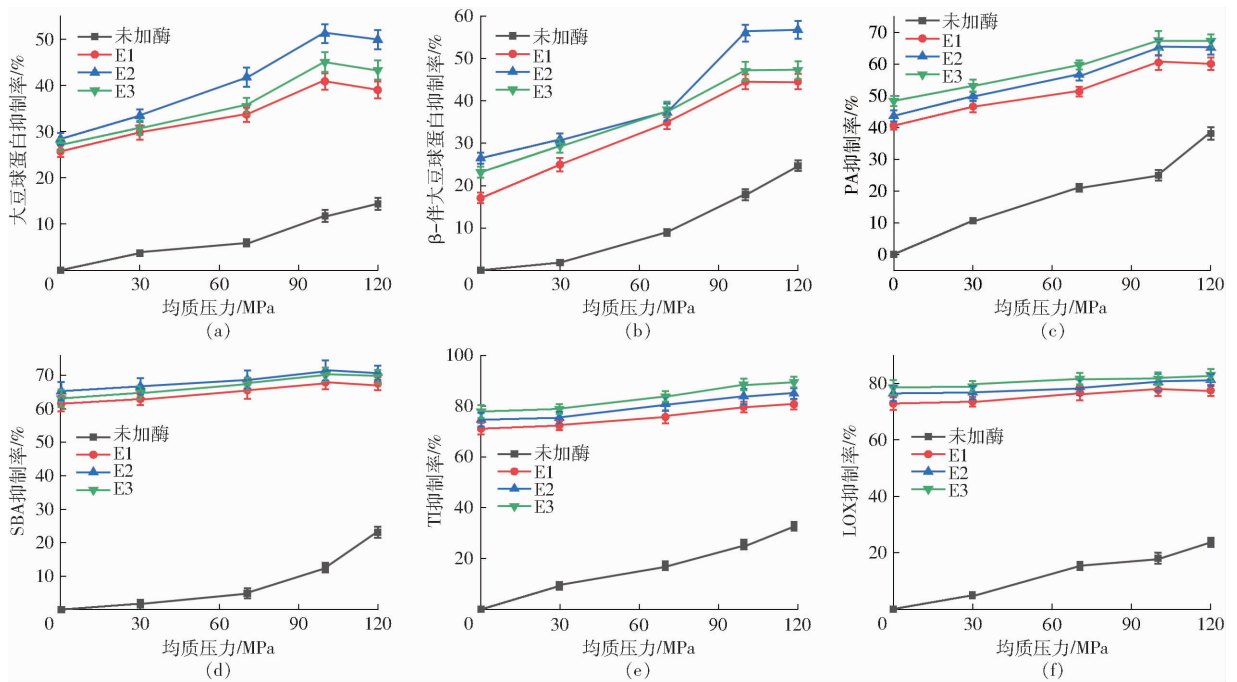


图 8 高压均质辅助酶解对抗营养因子抑制率

Fig. 8 High-pressure homogenization assisted enzymatic hydrolysates ANF inhibition rate

ANF 组分均具有良好的降解效果,其抑制率随着均质压力(0 ~ 100 MPa)的增大呈不断增加的趋势,当压力超过 100 MPa 时变化趋势逐渐平缓甚至减少。这表明了适度的均质压力预处理,可以使豆乳蛋白柔性增加,结构更加舒展,促进了蛋白酶对豆乳蛋白的水解作用,从而使豆乳 ANF 含量逐渐降低,但随着压力继续增大,蛋白发生重新凝聚,反而不利于蛋白酶的作用,因此选择最佳均质压力为100 MPa^[30]。其中热不稳定性 ANF 会受温度的影响,高压均质过程中产生的热量以及蛋白酶在沸水中的灭活处理,这都影响了 UA、TI、SBA 和 LOX 的活性。UA 受热极易失活,实验结果也表示所有酶水解豆乳中的 UA 均呈阴性;酶水解对 TI、SBA 和 LOX 组分也具有显著的抑制效果($P < 0.05$),尤其是 E2 和 E3 抑制率显著高于 E1,其中 100 MPa - E2 对 TI、SBA 和 LOX 的抑制率可达到 83.94%、70.4% 和 80.72%。E2 和 E3 对 PA 的抑制结果相近,最大抑制率为 72.26%,E2 对 11S 和 7S 的抑制率高于 E1 和 E3,这与豆乳蛋白的 DH 结果一致,即 DH 越大,高分子量蛋白颗粒的降解效果越好,对 ANF 抑制作用越强。豆乳蛋白二级结构中 α -螺旋和 β -折叠含量的减少,三级结构中疏水区域减少,以及电泳图谱显示 E2 水解豆乳中的 11S 和 7S 蛋白亚基条带最浅,都

表明了 E2 对 ANF 组分的抑制效果最好。ELISA 结果也验证了 E2 对 11S 和 7S 抑制率高于 E1 和 E3,100 MPa - E2 水解对 11S 和 7S 的抑制率为 51.28% 和 57.83%。综上所述,高压均质处理通过改变豆乳蛋白的结构在一定程度上抑制了豆乳蛋白的 ANF 活性,但并未完全消除,这归因于物理处理只是破坏了豆乳蛋白的构象表位。此外,E2 水解豆乳中的 ANF 含量小于 E1 和 E3,E2 对 7S 和 11S 的抑制作用较强,由此得出高压均质 100 MPa - E2 酶解豆乳对 ANF 抑制作用达到最佳效果。

3 结束语

对高压均质-蛋白酶解降低豆乳 ANF 工艺进行研究,结果表明,经 100 MPa 高压均质预处理辅助 E2 酶解豆乳的 NSI 和 DH 最大,豆乳的粒径均匀稳定,沉淀率变小,储存稳定性较好,并且蛋白质颗粒呈现均匀分散状态。同时改变了豆乳蛋白的分子量分布,7S、11S 以及 SBA 蛋白亚基发生降解;蛋白质二级结构中含有 ANF 表位的 α -螺旋和 β -折叠结构减少;蛋白荧光吸收强度降低并呈现红移现象,三级结构发生改变;通过测定豆乳中的脲酶呈阴性,其中 100 MPa - E2 所得豆乳中的 ANF 含量最少,因此得出 E2 对豆乳中 ANF 的抑制作用最强。

参考文献

- [1] 李德发. 大豆抗营养因子研究进展[J]. 饲料与畜牧,2019(1):52 - 58.
- [2] 高春霞,王凤忠,袁莉. 发芽过程中大豆活性物质、抗营养因子及抗氧化活性变化的综述[J]. 核农学报,2019,33(5):962 - 968. GAO Chunxia, WANG Fengzhong, YUAN Li. Summary of changes of bioactive substances, anti-nutritional factors and antioxidant activity of soybean during germination[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019,33(5):962 - 968. (in

Chinese)

- [3] 胡晓利,布冠好. 高压均质与酶法联合改性对大豆蛋白抗原性及结构的影响[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2018,39(6):29-35.
HU Xiaoli, BU Guanhao. Effects of combination of high pressure homogenization and enzymatic modification on the antigenicity and structure of soybean protein isolates[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2018, 39(6):29-35. (in Chinese)
- [4] 王章存,李乐静,赵学伟,等. 碱性蛋白酶水解对豆粕中大豆抗原蛋白的影响[J]. 中国粮油学报,2013,28(2):6-9.
WANG Zhangcun, LI Lejing, ZHAO Xuewei, et al. The influence of alcalase enzymatic hydrolysis on the soybean antigen proteins in soybean meal[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(2):6-9. (in Chinese)
- [5] FOTSCHKI B, JUŚKIEWICZ J, JURGOŃSKI A, et al. Raspberry pomace alters cecal microbial activity and reduces secondary bile acids in rats fed a high-fat diet[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2017, 46(7):13-20.
- [6] QAZANFARZADEH Z, KADIVAR M, SHEKARCHIZADEH H, et al. Secalin enzymatically cross-linked by either papain and N-acetyl-DL-homocysteine thiolactone or transglutaminase; improving of protein functional properties and film manufacturing[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 120: 106912.
- [7] 孙莉莉,王维宇,王振强,等. 酶法制备大豆蛋白活性肽的工艺优化、分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂, 2021, 34(8):38-42, 47.
- [8] GUAN H, DIAO X, JIANG F, et al. The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Corolase PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 89-96.
- [9] YIN Haicheng, ZHANG Xinrui, HUANG Jin. Study on enzymatic hydrolysis of soybean β -conglycinin using alkaline protease from *Bacillus subtilis* ACCC 01746 and antigenicity of its hydrolysates[J]. Grain & Oil Science and Technology, 2021, 4(1): 18-25.
- [10] ZHOU Hao, WANG C, YE J, et al. Effects of high hydrostatic pressure treatment on structural, allergenicity, and functional properties of proteins from ginkgo seeds[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 34: 187-195.
- [11] BU Guanhao, CHEN F, ZHANG N, et al. Effects of saccharide on the structure and antigenicity of beta-conglycinin in soybean protein isolate by glycation[J]. European Food Research and Technology, 2015, 240(2):285-293.
- [12] MEINLSCHMIDT P, UEBERHAM E, LEHMANN J, et al. The effects of pulsed ultraviolet light, cold atmospheric pressure plasma, and gamma-irradiation on the immunoreactivity of soy protein isolate[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 38(6):374-383.
- [13] YALCIN S, BASMAN A. Effects of infrared treatment on urease, trypsin inhibitor and lipoxygenase activities of soybean samples[J]. Food Chemistry, 2015, 169:203-210.
- [14] MA Meng, ZHANG H, XIE Y, et al. Response of nutritional and functional composition, anti-nutritional factors and antioxidant activity in germinated soybean under UV-B radiation[J]. LWT, 2020, 118(1):108709.
- [15] SUHAG R, DHIMAN A, DESWAL G, et al. Microwave processing: a way to reduce the anti-nutritional factors (ANFs) in food grains[J]. LWT, 2021, 150: 111960.
- [16] HU J, LIU Y, AN G, et al. Characteristics of molecular composition and its anti-nutrition of β -conglycinin during flavorzyme proteolysis[J]. Food Bioscience, 2021, 42(8):101039.
- [17] KASERA R, SINGH A B, LAVASA S, et al. Enzymatic hydrolysis: a method in alleviating legume allergenicity[J]. Food and Chemical Toxicology, 2015, 76:54-60.
- [18] 杨宁,宣丽,梁雨萍,等. 低水量蛋白酶酶解大豆浓缩蛋白工艺研究[J]. 中国果菜, 2021, 41(3):13-18, 33.
- [19] MEINLSCHMIDT P, BRODE V, SEVENICH R, et al. High pressure processing assisted enzymatic hydrolysis—an innovative approach for the reduction of soy immunoreactivity[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2017, 40:58-67.
- [20] MEDEIROS V, RAINHA N, PAIVA L, et al. Bovine milk formula based on partial hydrolysis of caseins by bromelain enzyme: better digestibility and angiotensin-converting enzyme-inhibitory properties[J]. International Journal of Food Properties, 2014, 17(4):806-817.
- [21] 许晶,韩东,王昱婷,等. 超声预处理对大豆蛋白酶解物结构及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(19):78-84.
XU Jing, HAN Dong, WANG Yuting, et al. Effect of ultrasound pretreatment on structure and antioxidant activity of soybean protein hydrolysates[J]. Food Science, 2018, 39(19): 78-84. (in Chinese)
- [22] 王章存,王佩,安广杰,等. 风味蛋白酶水解大豆分离蛋白的抗原性及功能特性变化[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(3): 48-52.
WANG Zhangcun, WANG Pei, AN Guangjie, et al. Changes in allergenicity and functional property of soy protein isolates hydrolyzed with flavourzyme[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2018, 33(3):48-52. (in Chinese)
- [23] 王鑫,江连洲,吴昉,等. 碱性蛋白酶水解大豆分离蛋白及其抗氧化活性的研究[J]. 大豆科技, 2019(增刊1):211-217.
- [24] LIU Z W, NIU D, ZHOU Y X, et al. Oxidation induced by dielectric-barrier discharge (DBD) plasma treatment reduces soybean agglutinin activity[J]. Food Chemistry, 2021, 340: 128198.
- [25] 李堂昊,布冠好,赵益菲,等. 超高压处理对 β -伴大豆球蛋白抗原性及结构的影响[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2020, 41(2):1-7.
LI Tanghao, BU Guanhao, ZHAO Yifei, et al. Effect of high hydrostatic pressure treatment on antigenicity and structure of

soybean β -conglycinin[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2020, 41(2): 1 – 7. (in Chinese)

[26] LATIF S, PFANNSTIEL J, MAKKAR H P S, et al. Amino acid composition, antinutrients and allergens in the peanut protein fraction obtained by an aqueous enzymatic process[J]. Food Chemistry, 2013, 136(1): 213 – 217.

[27] 杨明泉, 相欢, 王海萍, 等. 高固形物浓度对大豆分离蛋白酸性蛋白酶酶解产物功能特性的影响[J]. 食品工业科技, 2019, 40(2): 70 – 74, 80.

[28] 王盼盼. 食品中蛋白质的功能特性综述[J]. 肉类研究, 2010, 24(5): 62 – 71.

[29] LU Y, LIU C, ZHAO M, et al. Structure and activity changes of phytohemagglutinin from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) affected by ultrahigh-pressure treatments[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(43): 9513 – 9519.

[30] THEODOROPOULOS V C T, TURATTI M A, GREINER R, et al. Effect of enzymatic treatment on phytate content and mineral bioaccessibility in soy drink[J]. Food Research International, 2018, 108: 68 – 73.

(上接第 274 页)

[12] 施杰, 伍星, 柳小勤, 等. 变分模态分解结合深度迁移学习诊断机械故障[J]. 农业工程学报, 2020, 36(14): 129 – 137. SHI Jie, WU Xing, LIU Xiaoqin, et al. Mechanical fault diagnosis based on variational mode decomposition combined with deep transfer learning[J]. Transactions of the CSAE, 2020, 36(14): 129 – 137. (in Chinese)

[13] 杜柳青, 李仁杰, 余永维. 基于注意力机制的时空卷积数控机床热误差模型研究[J]. 农业机械学报, 2021, 52(5): 404 – 411. DU Liuqing, LI Renjie, YU Yongwei. Spatiotemporal convolution thermal error model of CNC machine tools based on attention mechanism[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2021, 52(5): 404 – 411. (in Chinese)

[14] DAI Chenggang, LIN Mingxing, GUAN Zhiguang, et al. Aquatic organism recognition using residual network with inner feature and kernel calibration module[J]. Computers and Electronics in Agriculture, 2021, 190: 106366.

[15] 张明华, 龙腾, 宋巍, 等. 基于改进 Cascade R – CNN 和图像增强的夜晚鱼类检测[J]. 农业机械学报, 2021, 52(9): 179 – 185. ZHANG Minghua, LONG Teng, SONG Wei, et al. Object detection of underwater fish at night based on improved Cascade R – CNN and image enhancement[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2021, 52(9): 179 – 185. (in Chinese)

[16] 张佳林, 徐立鸿, 刘世晶. 基于水下机器视觉的大西洋鲑摄食行为分类[J]. 农业工程学报, 2020, 36(13): 158 – 164. ZHANG Jialin, XU Lihong, LIU Shijing. Classification of Atlantic salmon feeding behavior based on underwater machine vision [J]. Transactions of the CSAE, 2020, 36(13): 158 – 164. (in Chinese)

[17] LI Chongyi, ANWAR S, HOU Junhui, et al. Underwater image enhancement via medium Transmission-Guided Multi-Color Space embedding[J]. IEEE Transactions on Image Processing: a Publication of the IEEE Signal Processing Society, 2021, 30: 4985 – 5000.

[18] 魏郭依哲, 陈思遥, 刘玉涛, 等. 水下图像增强和修复算法综述[J]. 计算机应用研究, 2021, 38(9): 2561 – 2569. WEI Guoyizhe, CHEN Siyao, LIU Yutao, et al. Survey of underwater image enhancement and restoration algorithms[J]. Application Research of Computers, 2021, 38(9): 2561 – 2569. (in Chinese)

[19] ZUIDERVELD K. Contrast limited adaptive histogram equalization[M]//Graphics Gems. Academic Press, 1994: 474 – 485.

[20] HE Kaiming, SUN Jian, TANG Xiaoou. Single image haze removal using dark channel prior[J]. IEEE Transaction on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 2011, 33(12): 2341 – 2353.

[21] JOBSON D J, RAHMAN Z, WOODDELL G. A multiscale retinex for bridging the gap between color images and the human observation of scenes[J]. IEEE Transactions on Image Processing, 1997, 6(7): 965 – 976.

[22] BOCHKOVSKIY A, WANG C Y, LIAO H. YOLO v4: optimal speed and accuracy of object detection[J]. arXiv, 2020: 2004. 20934.

[23] SANDLER M, HOWARD A, ZHU M, et al. Mobilenet v2: inverted residuals and linear bottlenecks[C]// IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, 2018: 4510 – 4520.

[24] CHOLLET F. Xception: deep learning with depthwise separable convolutions[C]//IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition, 2017: 1800 – 1807.

[25] 赵德安, 刘晓洋, 孙月平, 等. 基于机器视觉的水下河蟹识别方法[J]. 农业机械学报, 2019, 50(3): 151 – 158. ZHAO Dean, LIU Xiaoyang, SUN Yueping, et al. Detection of underwater crabs based on machine vision[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2019, 50(3): 151 – 158. (in Chinese)

[26] 李娟, 朱学岩, 葛凤丽, 等. 基于计算机视觉的水下海参识别方法研究[J]. 中国农机化学报, 2020, 41(7): 171 – 177. LI Juan, ZHU Xueyan, GE Fengli, et al. Research on underwater sea cucumber identification based on computer vision[J]. Journal of Chinese Agricultural Mechanization, 2020, 41(7): 171 – 177. (in Chinese)