

模拟酶解大豆7S、11S蛋白 及其抗氧化活性的研究

孙国威¹, 乐国伟^{1,2,*}, 施用晖^{1,2}

(1.江南大学食品学院, 营养与食品安全研究所, 江苏无锡 214122;

2.食品科学与技术国家重点实验室(江南大学), 江苏无锡 214122)

摘要:以“活性肽搜寻与蛋白模拟水解系统”为工具,选择碱性蛋白酶和中性蛋白酶对大豆7S、11S蛋白进行模拟水解,得到不同水平的抗氧化肽段,以重均分子量为手段,评价理论模拟与实验水解的相关性;以还原力、清除二苯代苦味酰基苯肼(DPPH·)自由基能力比较以上蛋白酶水解物的抗氧化活性。结果表明:模拟与实验水解得到的分子量分布在比例以及重均分子量方面有显著相关性($P < 0.01$);四种酶解产物均具有一定的抗氧化活性,其中,以7S蛋白的碱性蛋白酶产物表现出最高的还原力和DPPH·清除能力($P < 0.05$)。

关键词:模拟水解,大豆7S、11S蛋白,抗氧化肽,相关性

Study on simulative hydrolysis of soybean 7S and 11S protein and its antioxidant activity

SUN Guo-wei¹, LE Guo-wei^{1,2,*}, SHI Yong-hui^{1,2}

(1.Institute of Nutrition and Food Safety, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract:As tool of "the system of active peptide searching and simulative hydrolysis", the simulative hydrolysis effect of Alcalase and neutral protease on the soybean 7S/11S protein which can get different level antioxidant peptide segments was studied, and compared antioxidant activity of the different protease hydrolysates by determining the reducing power and the ability to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH·) radicals, and the correlation between simulation and experiment was evaluated by Weight-Average Molecular Weight. The results implied that the correlation between simulation and experiment was significant related to molecular weight distribution ($P < 0.01$), four hydrolysates were with certain antioxidant activity, and the Alcalase hydrolysate of 7S protein exhibited the highest reducing power and the highest DPPH· cleavage activity ($P < 0.05$).

Key words: simulative hydrolysis; soybean 7S and 11S protein; antioxidant peptide; correlation

中图分类号: TS201.2⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)07-0101-04

目前,对于蛋白酶水解蛋白生成活性肽的研究主要集中在对原料蛋白质以及水解用酶的筛选和水解工艺的优化上,而这种方法通常在蛋白质和蛋白酶的选择上是随机性的,从而存在很多盲目与不确定性,而且工作量较大。于是一些研究者开始探索新的方法,比如将现代生物信息学技术与计算机技术结合,目的使蛋白质水解生物活性肽的工作上升至定性、定量的水平。黎观红等2003年建立活性肽数据库^[1],Vanessa Vermeirssen等2004年建立蛋白质

数据库并进行了实验,取得初步成果^[2],陈征松等2007年建立了活性肽搜寻与蛋白模拟水解数据库^[3],但处于理论阶段,需要进一步实验验证,可以通过分子量分布或质谱比较,得到理论与实验相拟合的程度。天然抗氧化肽是最近被广泛研究的一类天然活性肽,由于它们具有较强抗氧化活性和很高安全性,因此在食品等领域已展现出极好应用前景。本文选择含有大量优质蛋白且氨基酸序列较为详细的大豆贮藏蛋白(7S、11S蛋白)为蛋白源,利用实验室自建的“活性肽搜寻与蛋白模拟水解系统”,以常用的碱性蛋白酶、中性蛋白酶模拟酶解大豆7S、11S蛋白,得到不同水平的抗氧化肽段,同时通过实验比较不同产物抗氧化活性,并通过重均分子量的比较得出理论模拟与实验水解的拟合情况。

收稿日期:2009-07-10 *通讯联系人

作者简介:孙国威(1984-),男,硕士生,研究方向:生物活性肽的研究。

基金项目:十一五支撑计划(2006BAD27B06);863高科技计划项目(2007AA10Z325)。

表1 大豆7S、11S蛋白亚基的部分氨基酸序列

	亚基	序列 ^[9]
7S 球蛋白	α	VEKEECEGEIPRPRPRPQ...KKKEEGNKGRKGPLSSILRAFV
	A'	VEEEEECEEGQIPRPRPQH...QQKEEGNKGRKGPLSSILRAFV
	β	LKVREDENNPFYFRSSNS...PQKKEEGSKGRKGFPPSILGALY
	A ₁ aB ₂	MAKLVFSLCFLFLSFGCCF...NNPRQIKFKFLVPPQESQKRAVA
11S 球蛋白	A _{1b} B _{1b}	MAKLVLSLCLFLFLSFGCCFA...VKNNNPFSFLVPPKESQRRVVA
	A ₂ B ₁ a	MAKLVLSLCLFLFLSFGCFAL...VKNNNPFSFLVPPQESQRRRAVA
	A ₃ B ₄	MGKPFFTLSLSSLCLLLLLS...LGQSQVRQLKYQGNPPLVNP
	A ₅ A ₄ B ₃	MGKPFFTLSLSSLCLLLLSS...SNWGPLVNPESQQGSPRVKVA

表2 蛋白酶酶切位点

俗名	酶切位点 ^[13]
碱性蛋白酶	Glu-Met-Leu-Tyr-Lys-Gln-Ala-Val-Phe-Trp-Asn-
中性蛋白酶	Tyr-Phe-Trp-Met-Leu-Ile-Val-

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆粕 南通光合生物技术有限公司;碱性蛋白酶 Alcalase Novo 公司;中性蛋白酶 夏盛公司;二苯胺苦味酰基苯肼(DPPH·) Sigma 公司;其它试剂 均为分析纯

高速大容量冷冻离心机 日本岛津公司;Multiskan MK3 酶标仪 美国 Thermo 公司;UV-2102 PSC 型紫外可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司;FD-1CE 冷冻干燥机 北京德天佑科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 利用分析系统模拟水解 陈征松^[3]建立的“活性肽搜寻与蛋白模拟水解系统”将蛋白质数据库、活性肽数据库、蛋白酶数据库与“定向酶法制备活性肽分析系统”程序配合,通过写入程序中的碱性蛋白酶、中性蛋白酶酶切位点,以大豆7S、11S蛋白为蛋白源进行酶切,酶切完成后再以酶切生成的蛋白质肽段逐个与抗氧化肽库中的肽段比对,随后程序生成结果文件,指出哪些水解片段证实具有活性功能,哪些预测具有活性功能。

1.2.2 大豆7S、11S球蛋白的提取 采用 Nagano 优化法^[4]。

1.2.3 水解工艺 根据本课题前期研究准备,用蒸馏水准确配制 3.0% 的蛋白质悬浮液,沸水加热 10min 使蛋白变性,搅拌均匀后转入酶反应器,调节温度至酶反应最适温度,调节溶液的 pH 至酶反应最适的 pH,然后按一定的 $[E]/[S]$ 加入蛋白酶,并立即计时,水解过程中不断加入 NaOH 溶液,维持 pH 在最适范围内,反应 5h 后立即在沸水浴中灭酶 10min,冷却,水解物在 4℃、10000r/min 离心 20min,收集上清液用于活性测定。

1.2.4 分子量分布的测定 采用高效液相仪测定。

1.2.5 水解度测定 采用完全水解液修正后的茚三酮比色法^[5]。

1.2.6 蛋白含量测定 采用微量凯氏定氮法。

1.2.7 抗氧化活性的测定

1.2.7.1 还原能力的测定 采用 Wu 等人的方法测定^[7]。

1.2.7.2 DPPH· 自由基清除能力的测定 DPPH· 清除活性测定参照 Suda I 的方法^[8]。

1.2.8 数据处理 采用数据软件 SPSS16.0 进行相关性分析。

2 结果与讨论

2.1 利用“活性肽搜寻与蛋白模拟水解数据库”模拟酶解大豆7S、11S蛋白

2.1.1 大豆7S、11S蛋白的部分氨基酸序列 抗氧化肽的活性取决于构成肽的氨基酸种类、数量及氨基酸排列顺序,当 N-端为疏水性氨基酸 Val 或 Leu 时,抗氧化活性较高(Chen 等)^[11],从发酵海洋蓝贝提取的 HFGBPFH 肽之所以具有抗氧化性,就与其肽段中含有这些疏水性氨基酸有关(Niranjan 等)^[12]。于是利用分析系统中的疏水性氨基酸含量计算程序分析抗氧化肽库,发现疏水性氨基酸在组成抗氧化肽的氨基酸中所占比例高达 56.5%,这更说明了抗氧化肽与疏水性氨基酸存在一定的相关性,而 7S、11S 蛋白中疏水性氨基酸分别占 41.35% 和 43.39%^[10]。所以预测以 7S、11S 蛋白为蛋白源进行水解可能获得较多的抗氧化肽。

2.1.2 两种蛋白酶的酶切位点 目前报道中酶法制备大豆抗氧化肽时选用的酶主要有木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶等植物蛋白酶;胰蛋白酶、胃蛋白酶等动物蛋白酶;以及枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等微生物蛋白酶。其中比较多使用的是中性蛋白酶与碱性蛋白酶^[6]。

中性蛋白酶倾向于水解疏水性大分子氨基酸 C 末端(如 Leu、Ile、Phe)。碱性蛋白酶 Alcalase 是一种专一性广泛的内切蛋白酶,尤其更倾向于催化裂解蛋白质中不带电荷侧链大的氨基酸(芳香族和脂肪族氨基酸,如 Ile、Leu、Val、Met、Phe、Tyr、Trp)的 C-端肽键,而且当 N-端为疏水性氨基酸时裂解更快,从而形成以疏水性氨基酸为末端的肽。

2.1.3 系统模拟蛋白酶水解 7S 蛋白的结果 表 3 中“证实肽段”指的是 7S 或 11S 蛋白的氨基酸序列,经蛋白酶水解后所得的肽片段与已证实具有抗氧化活性的片段相比,具有相同氨基酸序列的条数;“预测肽段”指的是经蛋白酶水解后的片段与已证实具有抗氧化活性的片段相比,具有相似的氨基酸组成

的片段条数。从结果可以看出,两种蛋白酶水解 7S、11S 蛋白获得抗氧化肽以碱性蛋白酶较多,中性蛋白酶较少,其原因可能是由于碱性蛋白酶较中性蛋白酶具有更广泛的专一性,即酶切位点更多,因此酶切片数也较多;至于酶解 11S 获得的抗氧化肽片段多于 7S,则是由于此分析系统中 11S 蛋白的肽链条数多于 7S 所致。

表3 模拟蛋白酶水解获得抗氧化肽结果

	证实肽段		预测肽段	
	7S 蛋白	11S 蛋白	7S 蛋白	11S 蛋白
碱性蛋白酶	91	192	588	1294
中性蛋白酶	17	79	1001	2249

2.2 7S、11S 水解产物的性质研究

2.2.1 7S、11S 水解产物的分子量分布 如图 1 所示,四种水解产物分子量分布都集中在 1000Da 以下,占总分子量的 80% 以上,说明水解进行得较为彻底。

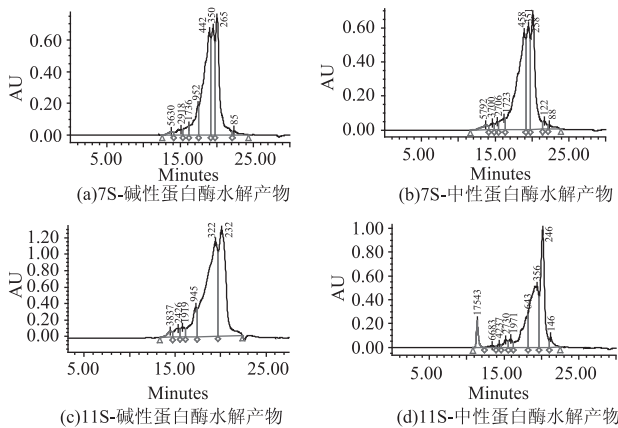


图1 实验所得水解产物分子量分布图

2.2.2 模拟与实验水解产物分子量分布比较 以 11S 蛋白-中性蛋白酶水解产物为例,利用“活性肽搜寻与蛋白模拟水解系统”模拟中性蛋白酶水解大豆 11S 蛋白,将水解后的片段保存在文本文档中,并利用水解片段分子量计算程序,对水解后的各个片段进行分子量计算。以中性蛋白酶水解产物分子量的分布区间为参考,筛选模拟水解所得水解物的分子量,并计算分布区间重均分子量 (Mw) 以及所占的比例,结果如表 4 所示。

表4 实验与模拟重均分子量的比较

实验结果			模拟结果		
分子量分布	重均分子量 Mw	比例 (%)	分子量分布	重均分子量 Mw	比例 (%)
10840~5049	7194	0.96	11000~5090	7124	0.7
5049~3530	4223	0.88	5090~3560	4311	0.8
3530~2220	2765	2.50	3560~2230	2763	7.3
2220~1643	1971	2.04	2230~1650	1881	4.2
1643~629	911	14.38	1650~630	1068	20.5
629~300	442	37.71	630~300	473	33.5
300 以下	246	34.63	300 以下	229	35.9

从表 4 中的比较可以看出,模拟与实验水解产物分子量在 11000~300 之间,重均分子量基本相似,以模拟水解产物的重均分子量为纵坐标,实验水解

产物的重均分子量为横坐标,做分子量全分布散点图,如图 2 所示。

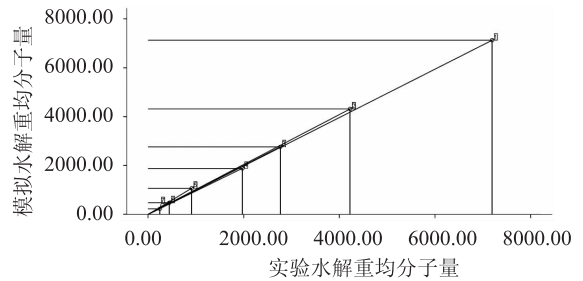


图2 模拟与实验水解产物分子量全分布散点图

从图 2 可以看出,模拟与实验水解重均分子量在分子量全分布图中所有点基本在一条直线上,说明模拟与实验水解产物重均分子量线性相关,利用 SPSS 软件分析重均分子量及所占比例相关性,结果显示,模拟与实验水解产物 Pearson 相关系数为 0.999,二者在 0.01 的显著水平下显著。用同样的方法分析另外三种水解产物,得到的结果为:7S-碱性蛋白酶相关系数 0.996、7S-中性蛋白酶相关系数 0.979、11S-碱性蛋白酶相关系数 0.996,均在 0.01 的显著水平显著,故可以认为,模拟与实验水解产物重均分子量相关性较好。重均分子量反映的是分子量分布中分子重量的平均,涉及到分子的个数以及分子量,从以上分析可以看出,模拟与实验水解得到的分子片段在个数以及分子量方面有显著相关性。

2.2.3 7S、11S 蛋白两种水解物水解度的比较 由图 3 可以看出,水解度 (DH) 均随着水解时间的增加而增大,且在前 1~2h 上升速率较快,2h 后变缓且趋于稳定。至 5h 水解结束,11S 蛋白的两种水解产物的 DH 均略高于 7S 蛋白的 DH,这可能与两种蛋白的氨基酸组成以及空间结构差异有关,如上文所述,11S 蛋白比 7S 蛋白含有更多的疏水性氨基酸;另外,可能由于碱性蛋白酶的作用位点相对与中性蛋白酶更多,因而碱性蛋白酶水解产物的 DH 略高于对应的中性蛋白酶水解产物。

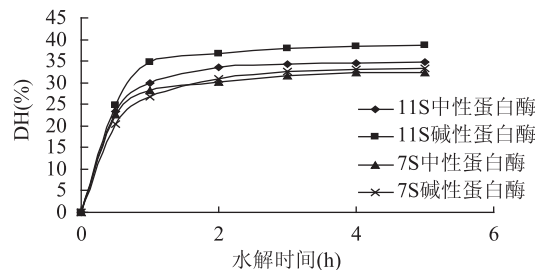


图3 水解产物水解度的比较

2.2.4 7S、11S 球蛋白酶解物抗氧化活性的比较 还原力是表征抗氧化物质提供电子能力的重要指标,研究已证实抗氧化活性同还原力之间有显著的相关性^[14-15]。还原力的高低可以间接反映抗氧化能力的高低。DPPH·是一种稳定的自由基,当遇到提供质子的物质如抗氧化剂时就会被清除,表现为吸光度的降低^[16]。基于这个原理,物质的抗氧化性可以用其清除 DPPH·自由基的能力来表示。从表 5 可知,四种水解产物的抗氧化活性差异显著,其中 7S 蛋白碱性蛋白酶产物在还原力和 DPPH·清除能力上均

显著高于另外三种产物 ($P < 0.05$)。综合比较可以看出,抗氧化活性从高到低排列为:7S-碱性蛋白酶 > 7S-中性蛋白酶 > 11S-碱性蛋白酶 \approx 11S-中性蛋白酶,与表3中的模拟结果相比不具有对应关系,可能是因为抗氧化活性的测定方法没有统一的标准,各种方法依据的原理不一定相同,因而不具有可比性,这说明模拟获得的抗氧化肽结果仅具有参考价值,与实际抗氧化活性大小并没有相关性。

表5 四种水解产物抗氧化活性的比较

组别	还原力(A_{700nm})	DPPH·清除率(%)
7S-碱性蛋白酶	0.864 ± 0.006^a	88.1 ± 2.3^a
7S-中性蛋白酶	0.797 ± 0.010^b	79.9 ± 1.3^b
11S-碱性蛋白酶	0.691 ± 0.009^c	79.8 ± 1.6^b
11S-中性蛋白酶	0.785 ± 0.009^b	72.1 ± 1.7^c

注:同列数据上角标字母不同表示差异显著, $P < 0.05$; $n = 3$ 。

3 结论

综上所述,以“活性肽搜寻与蛋白模拟水解系统”为工具,选用中性蛋白酶、碱性蛋白酶模拟水解大豆7S、11S蛋白,得到不同水平的抗氧化肽片段,同时通过实验对模拟水解与实验水解产物的重均分子量进行相关性分析,结果表明,二者线性关系显著 ($P < 0.01$),相关性较好,说明通过蛋白的氨基酸序列和蛋白酶的作用位点进行模拟水解是可行的,能对实验有一定的指导意义。以还原力和DPPH自由基清除率为抗氧化指标验证产物的抗氧化活性,结果表明,两种蛋白酶的水解产物均具有不同水平的抗氧化性,其中,以7S蛋白碱性蛋白酶产物表现出最高的还原力和DPPH·清除能力 ($P < 0.05$)。

参考文献

- [1] 黎观红,乐国伟,施用晖,等.利用自建的活性肽数据库搜寻食物蛋白质中潜在的生物活性肽[J].食品与发酵工业,2004,30(1):86-88.
- [2] Vermeirssen V, Bent A, Camp J V. A quantitative in silico analysis calculates the angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity in pea and whey protein digests[J]. Biochimie,

(上接第100页)

frozen storage of minced and intact hake (*Merluccius productus*) muscle [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1972, 20(5):1052-1054.

[5] Leelapongwattana K, Benjakul S, Visessanguan W, et al. Effect of trimethylamine-N-oxide demethylase from lizardfish kidney on biochemical changes of haddock natural actomyosin stored at 4 and -10°C [J]. European food research and technology, 2008, 226:833-841.

[6] Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M. Induced formation of dimethylamine and formaldehyde by lizardfish (*Saurida micropectoralis*) kidney trimethylamine-N-oxide Demethylase [J]. Food Chemistry, 2004, 84:297-305.

[7] Spinelli J, Koury B J. Some New Observations on the Pathways of Formation of Dimethylamine in Fish [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1981, 29:327-331.

2004, 86:231-239.

[3] 陈征松,施用晖,乐国伟,等.活性肽搜寻与蛋白模拟水解数据库的建立[J].计算机与应用科学,2007,24(3):331-334.

[4] Liu Ch, Wang HL, Cui ZM. Optimization of extraction and isolation for 11S and 7S globulins of soybean seed storage protein [J]. Food Chemistry, 2007, 102:1310-1316.

[5] 郭兴凤.蛋白质水解度的测定[J].中国油脂,2000,25(6):176-177.

[6] 刘明,倪辉,吴永沛.大豆抗氧化活性肽研究进展[J].食品科学,2006,27(12):897-901.

[7] Wu HC, Chen HM, Shiau CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). [J]. Food Res Intl, 2003(36):949-957.

[8] Suda. Antioxidative activity in the methods of food functions analysis [M]. Korin Tokyo Japan, 2000:218-220.

[9] <http://ca.expasy.org/cgi-bin/sprot-search-de?conglycinin>.

[10] 朱建华,杨晓泉,陈刚.7S球蛋白和11S球蛋白的研究[J].粮油加工与食品机械,2003(8):37-39.

[11] Chen HM, Koji M, Fumio Y. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean b-conglycinin [J]. Agric Food Chem, 1995, 43:574-575.

[12] Rajapakse N, Mendis E, Jung W K, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties [J]. Food Research International, 2005, 38:175-182.

[13] <http://ca.expasy.org/enzyme>.

[14] 夏向东,吕飞杰,台建祥.抗氧化剂的功效及体外抗氧化活性的评价[J].食品科学,2001,22(1):89-93.

[15] 程云辉.麦胚蛋白酶解物的制备、结构及其生物活性功能的研究[D].博士学位论文.

[16] Amarowicz R, Pegger B, Rahimi M P, et al. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies [J]. Food Chemistry, 2004, 84(4):551-562.

[8] Spinelli J, Koury B J. Nonenzymic Formation of Dimethylamine in Dried Fishery Products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1979, 27(5):1104-1108.

[9] Li F, Liu HY, Xue CH, et al. Simultaneous determination of dimethylamine, trimethylamine and trimethylamine-n-oxide in aquatic products extracts by ion chromatography with non-suppressed conductivity detection [J]. Journal of Chromatography A 2009, 1216(31):5924-5926.

[10] Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction [J]. Biochemistry Journal, 1953, 55:416-421.

[11] 盛文静.不同海参多糖提取分离及化学组成分析比较[D].中国海洋大学,2007.

[12] 孙丽平,汪东风,徐莹,等.pH和加热时间对美拉德反应挥发性产物的影响[J].食品工业科技,2009,30(4):122-125.