

模拟胃肠道消化对大豆低聚肽结构及抗氧化作用的影响

刘文颖^{1,2}, 冯晓文², 赵晓涵², 潘兴昌², 谷瑞增²

(¹ 中国农业大学工学院 北京 100083

² 中国食品发酵工业研究院有限公司 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心 北京 100015)

摘要 大豆低聚肽是一种有益健康的功能性配料,所呈现的健康益处高度依赖于肽结构。采用紫外全波长扫描法及圆二色光谱法分析其结构是如何受胃蛋白酶、胰蛋白酶以及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理的影响。为探讨消化处理前、后大豆低聚肽抗氧化能力的变化规律,分别计算消化前、后大豆低聚肽的 ABTS 自由基清除能力、DPPH 自由基清除能力、氧自由基吸收能力(ORAC)和铁离子还原能力(FRAP)。结果显示:大豆低聚肽主要为分子质量<1 000 u 的组分,经胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理后<1 000 u 的组分比例最大可达 88.46%。在波长 275 nm 处均有最大吸收峰。二级结构中,4 组大豆低聚肽中无规则卷曲所占比例均为 30%左右,约占总二级结构组成的 1/3,表明了大豆低聚肽无序性较高且结构疏松开放。大豆低聚肽的 ABTS 自由基清除能力和铁还原能力稳定性均较好。经胰蛋白酶消化后,DPPH 自由基清除率有所降低,氧自由基吸收能力极显著提高($P<0.01$)。

关键词 大豆;低聚肽;模拟胃肠道消化;结构;抗氧化能力

文章编号 1009-7848(2022)02-0049-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.02.006

大豆是一类蛋白质含量较高的植物原料,不仅富含色氨酸、苏氨酸等必需氨基酸,而且氨基酸的构成也符合联合国粮农组织和世界卫生组织所建议的基本食品氨基酸构成模式^[1]。大豆中富含许多生物活性成份,具有抗氧化、降低过敏性、降血压、提高矿物质吸收率、防肥胖性、耐疲劳、抗癌等生理功能^[2-4]。随着人们膳食观念的提高,有关大豆的科学研究日益深入。大豆蛋白酶水解产物——大豆低聚肽与大豆蛋白比较,更易于被机体消化吸收^[5],并且具有优异的吸湿性和润透性以及较好的流动性和水溶性等优点^[1]。

大豆低聚肽与大豆蛋白有类似的特性,其抗氧化活性在一定程度上可减少人体肿瘤和心血管疾病的发病率,同时作为天然抗氧化剂,在抗衰老食品、保健品及食品辅料的开发中具有广阔的前景^[6]。本研究使用胃蛋白酶、胰蛋白酶和先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理大豆低聚肽,并分析处理前、后的分子结构变化,如分子量分布、二级分子结构

组成等,以及其抗氧化活性,如 DPPH 自由基清除率、ABTS 自由基清除率等,探究胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理对大豆低聚肽结构和抗氧化活性的影响,为大豆低聚肽的多元化开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白,北京中食海氏生物技术有限公司;无水乙醇、氢氧化钠、浓盐酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、过硫酸钾、醋酸钠,北京化学试剂公司;胰蛋白酶(≥ 250 NFU/mg),美国 Solarbio 公司;胃蛋白酶(≥ 250 U/mg)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2-偶氮二(2-甲基丙基咪)二盐酸盐(AAPH)、荧光素(Fluorescein)、水溶性维生素 E(Trolox),色谱纯级,美国 Sigma 公司;2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS),分析纯级,南京森贝伽生物科技有限公司;2,4,6-三吡啶基-1,3,5-三嗪(TPTZ),酷尔化学科技(北京)有限公司;三氯化铁、硫酸亚铁,广东汕头市西陇化工有限公司。

YG30 型喷雾干燥机,无锡市阳光干燥设备厂;HH-4 数显恒温水浴锅,普瑞斯机械有限公司;FE20K 型 pH 计,瑞士梅特勒-托利多公司;J-

收稿日期:2021-02-06

基金项目:“十三五”国家重点研发计划项目(2016YFD0400604);北京市科技创新基地培育与发展工程专项(Z191100002819001)

作者简介:刘文颖(1984—),女,博士生,高级工程师
E-mail: wenylingliu888@126.com

810 圆二色谱仪, 美国 Jasco 公司; SpectraMax i3x 多功能酶标仪, 美国 MD 公司; LC-20AD 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; UV-1780 紫外-可见分光光度计, 日本 SHIMADZU 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆低聚肽的制备 基于本中心前期研究的大豆低聚肽制备工艺制备得到大豆低聚肽粉^[7]。

1.2.2 体外模拟胃肠道消化试验

1.2.2.1 胃蛋白酶消化试验 移取 0.05 g/mL 的大豆低聚肽溶液 0.04 L, 调节 pH 值至 2, 37 °C 水浴加热 2~3 min 为宜, 后边搅拌边加入 3% (E/S) 胃蛋白酶 (≥ 250 U/mg), 保持 37 °C 不变, 持续消化 3 h, 沸水浴灭酶活, 得胃蛋白酶消化组样品, 简称胃蛋白酶组样品。同时取 20 mL 不做任何处理的样品为未处理组样品^[8-9]。

1.2.2.2 胰蛋白酶消化试验 取与胃蛋白酶消化试验等质量浓度的大豆低聚肽溶液 0.02 L, 调节 pH 值至 6.8, 以 37 °C 的水浴加热 2~3 min 后边搅拌加入 3% (E/S) 胰蛋白酶 (≥ 250 NFU/mg), 其余试验步骤与胃蛋白酶消化试验操作相同, 得胰蛋白酶消化组样品, 简称胰蛋白酶组样品^[7]。

1.2.2.3 先胃后胰消化试验 取与 1.2.2.2 节等体积的胃蛋白酶消化组样品, 进行胰蛋白酶消化处理后, 得先胃蛋白酶消化后胰蛋白酶消化的样品, 简称先胃后胰组样品^[8]。

1.2.3 分子质量分布测定 参照蒋腾川等^[10]和 Liu 等^[11]的方法测定分子质量分布。

1.2.4 紫外全波长扫描 紫外-可见分光光度计扫描波长 200~330 nm, 狭缝 1.0 mm, 采样间隔 0.5 nm, 慢速扫描。于石英比色皿中加入 2/3 体积的 2.0 mg/mL 的试样溶液, 再进行紫外全波长扫描^[12]。

1.2.5 圆二色光谱扫描 圆二色谱仪光源为氙灯; 氮气输出压为 0.4 MPa; 带宽为 1.0 nm; 光谱测量范围为 180~260 nm; 步进 0.5 nm; 数据点的采集时间间隔为 0.25 s。

1.2.6 ABTS 自由基清除能力测定 在离心管中依次加入 1.5 mL 的 ABTS 储备液和 1.5 mL 的过硫酸钾溶液, 经遮光处理后, 静置一夜, 溶液稀释得 ABTS 工作液。在标准孔的对应孔依次添加 0.2 mL ABTS 工作液和预先配制的各种浓度的 Trolox

标准溶液; 在样品孔相应孔先后添加 0.2 mL ABTS 工作液和 10 μ L 1 mg/mL 样品溶液; 而空白孔对应孔按先后顺序添加 0.2 mL ABTS 工作液和 10 μ L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS)。25 °C 下遮光处理后反应 5 min, 立即测定波长 734 nm 处的光密度 (OD) 值。依据标准组数据先拟合绘制标准曲线, 而后计算样品的 ABTS 自由基清除能力^[13-14]。

1.2.7 DPPH 自由基清除能力测定 将不同组试样配成 5 个梯度质量浓度值, 即 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 15.0 mg/mL。在空白组对应的孔中分别依次添加 0.1 mL 的样品溶液和 0.1 mL 的无水乙醇溶液, 并标记为 A_0 ; 在样品组对应的孔中依次添加 0.1 mL 的样品溶液和 0.1 mL 的 DPPH-无水乙醇溶液, 标记为 A_x ; 在对照组对应的孔中依次添加 0.1 mL 的蒸馏水和 0.1 mL 的 DPPH-无水乙醇溶液, 标记为 A_1 。涡旋混匀 3 min, 于室温下遮光处理后反应 0.5 h, 测量波长 517 nm 处的吸光值, DPPH 自由基清除率按式 (1) 进行计算^[15-17]。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = (1 - \frac{A_x - A_0}{A_1}) \times 100 \quad (1)$$

1.2.8 氧自由基吸收能力测定 在避光条件下, 标准孔: 各孔分别依次加入 25 μ L 不同浓度梯度的水溶性维生素 E 标准溶液和 100 μ L 0.8 μ mol/L 的荧光指示剂; 空白孔: 各孔分别依次添加 25 μ L 75 mmol/L PBS 和 100 μ L 荧光指示剂; 对照孔: 各孔中分别依次添加 25 μ L 的 75 mmol/L PBS 和 100 μ L 荧光指示剂; 样品孔: 各孔分别依次添加 25 μ L 1 mg/mL 的样品和 100 μ L 荧光指示剂。各组重复 3 个平行。37 °C 遮光处理反应 20 min。反应结束后, 除在空白孔中添加 75 μ L PBS, 其它各孔迅速添加 75 μ L 150 mmol/L AAPH 溶液。测定各组样品的吸光值。基于标准品的吸光值得到各组样品的 ORAC 值^[18-19]。

1.2.9 铁还原能力测定 将 10 体积的醋酸钠缓冲液与 1 体积的 TPTZ 和 1 体积的氯化铁混合, 制备 FRAP 工作溶液。当天配制 FRAP 工作溶液, 使用前于 37 °C 加热 10 min。在空白组相应孔依次添加 5 μ L PBS; 标准组相应孔依次添加 5 μ L 不同浓度的 FeSO_4 标准溶液; 样品组对应各孔依次添加 5 μ L 1 mg/mL 的样品溶液。在每个试验孔中各加 0.18 mL FRAP 工作液。维持 37 °C 条件下反应

5 min, 593 nm 处测定并计算各孔平均 OD 值, 再根据标准孔数据可制得标准曲线, 最后计算试样的铁离子还原能力^[20-22]。

1.3 数据处理

各组重复 3 个平行, 将试验结果用平均值±标准偏差表示, 使用 Origin 8.5 软件作图。

2 结果与分析

2.1 处理前、后的分子质量分布结果

4 组的分子质量分布情况如表 1 所示。与未处理组相比, 经胃蛋白酶消化后, 不同范围的分子质量分布均未发生显著变化; 经胰蛋白酶消化之

后, 分子质量 5 000~10 000 u 的组分显著减少, 减少量高达 90.22%, 同时分子质量<1 000 u 的组分有所增加, 增加量可达 9.94%, 表明大豆低聚肽中的大部分大肽段含有够被胰蛋白酶特异识别的序列。经胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理后大豆低聚肽分子质量<1 000 u 的组分均有所增加, 并且 4 组样品主要由分子质量<1 000 u 的组分组成, 其中先胃后胰组比例可达 88.46%。Zhang 等^[23]研究了模拟胃肠道消化对大豆蛋白水解物抗氧化性能的影响, 其<1 000 u 的组分在经模拟胃肠道消化后有所增加, 与本试验结果一致^[24]。

表 1 不同处理的大豆低聚肽的分子质量分布

Table 1 Molecular weight distributions of soybean oligopeptides with different treatments

消化方法	分子质量分布/%						重均分子量/u
	5 000~1 0000 u	3 000~5 000 u	2 000~3 000 u	1 000~2 000 u	150~1 000 u	150 u 以下	
未处理组	4.2490	2.7612	3.0595	9.1604	74.1936	5.8271	1 008.9
胃蛋白酶组	3.1098	2.6930	3.3545	9.3638	75.1099	5.8704	905.4
胰蛋白酶组	0.4156	1.3408	1.9550	7.8674	81.1510	6.8211	583.9
先胃后胰组	0.4844	1.3878	2.0127	7.9465	81.5177	6.9414	576.1

2.2 处理前、后的紫外全波长扫描结果

如图 1 所示, 4 组样品在波长 275 nm 附近均有吸收峰, 其中先胃后胰组的大豆低聚肽的最大吸收峰峰值最大, 为 1.8677; 胃蛋白酶处理组的最大吸收峰峰值最小, 为 1.6284; 未处理组与胰蛋白酶处理组的最大吸收峰峰值几乎一致。已知色氨酸和酪氨酸的芳杂环 $\pi-\pi^*$ 跃迁与波长 280 nm 附

近峰值的改变有关, 4 组试样经胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理后, 不同组试样在波长 280 nm 附近峰值均不同, 表明溶液中色氨酸及酪氨酸残基上的芳杂环 $\pi-\pi^*$ 进行了跃迁, 由此使得不同处理组的峰值有所差异^[25]。

2.3 处理前、后的圆二色光谱扫描结果

图 2 为 4 组大豆低聚肽的圆二色光谱图。表

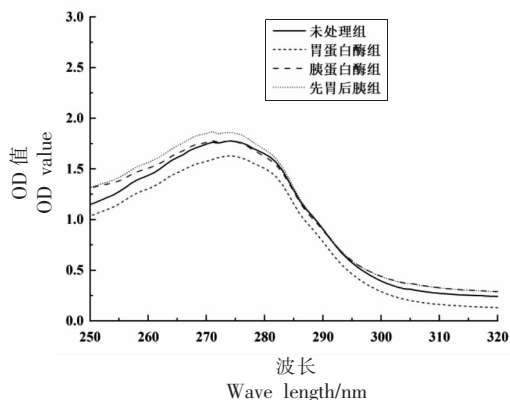


图 1 不同处理大豆低聚肽的紫外全波长扫描
Fig.1 UV full wave length scanning of soybean oligopeptides with different treatments

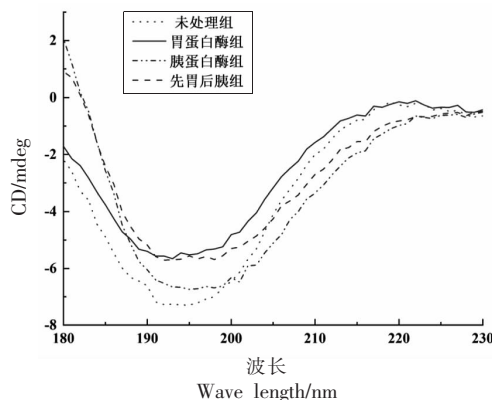


图 2 不同处理大豆低聚肽的圆二色光谱图
Fig.2 Circular dichroism spectrogram of soybean oligopeptides with different treatments

2 为 CDNN 2.1-Simple Spectra 软件分析大豆低聚肽的圆二色光谱图所得的二级结构组成。与未处理组相比,经胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理后,大豆低聚肽中 α -螺旋和反平行式 β -折叠所占比例虽增加,但所占比例较低;

平行式 β -折叠、 β -转角及无规则卷曲所占比例虽略微降低,但仍为主要组成部分。无规则卷曲较 α -螺旋和 β -折叠相比稳定性及结构紧密性较差,从而表明大豆低聚肽的分子无序性较高且结构疏松开放^[26]。

表 2 不同处理大豆低聚肽的二级结构

Table 2 Secondary structures of soybean oligopeptides with different treatments

组别	比例/%				
	α -螺旋	平行式 β -折叠	反平行式 β -折叠	β -转角	无规则卷曲
未处理组	11.7	2.3	35.0	21.3	31.4
胃蛋白酶组	12.1	2.3	37.6	20.9	30.2
胰蛋白酶组	14.0	1.9	37.0	21.2	30.2
先胃后胰组	13.6	2.0	38.5	20.9	29.7

2.4 处理前、后的 ABTS 自由基清除能力

图 3 是以不同浓度 Trolox 标准溶液及相应的 OD 值绘制的 ABTS 标准曲线,拟合得到标准方程 $y = -0.54192x + 1.13499$, $R^2 = 0.99509$ 。将 4 组大豆低聚肽的 OD 值代入标准曲线表达式可得对应的 ABTS 自由基清除率,结果如图 4 所示。通过分析可知,经胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰

蛋白酶处理后,大豆低聚肽的 ABTS 自由基清除能力具有极好的稳定性。ABTS 自由基的清除与某些能提供质子、还原具有氧化性自由基的氨基酸相关,消化前、后大豆低聚肽的 ABTS 自由基清除率未发生变化的原因可能是消化前、后溶液中能够起到提供质子、还原具有氧化性自由基的氨基酸前后变化量不大^[27]。

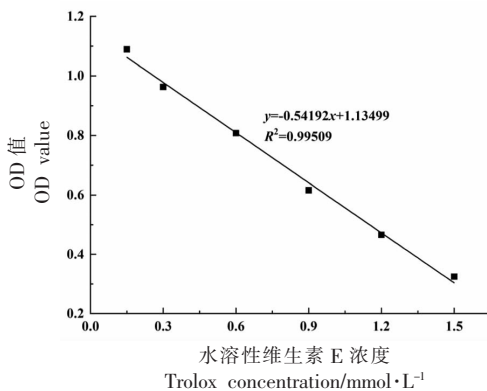


图 3 ABTS 标准曲线

Fig.3 ABTS standard curve

2.5 处理前、后的 DPPH 自由基清除能力

图 5 为各组大豆低聚肽的 DPPH 自由基清除率。结果显示,胃蛋白酶对 DPPH 自由基的清除活性几乎没有影响,只在质量浓度为 5 mg/mL 时略有提高,在其它质量浓度时无显著变化。而胰蛋白酶处理显著减少了大豆低聚肽的 DPPH 自由基清除率 ($P < 0.05$),这可能是因为酶解进一步将形成

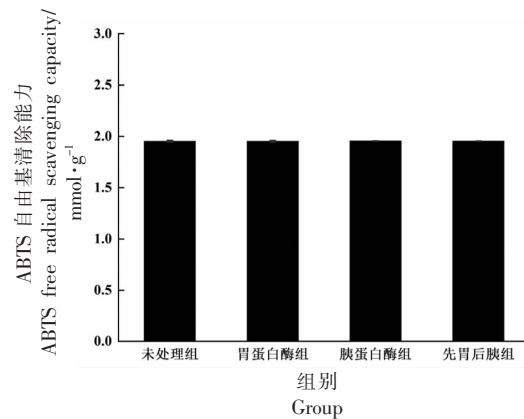


图 4 不同处理大豆低聚肽的 ABTS 自由基清除能力

Fig.4 ABTS free radical scavenging capacity of soybean oligopeptides with different treatments

的抗氧化肽分解为低或无抗氧化活性的小肽或氨基酸。Yang 等^[17]以酱油糟为原料,用碱性蛋白酶水解酱油渣中的蛋白质得水解产物,水解产物的 DPPH 自由基清除率大小与浓度呈正相关性,与本试验结果一致。

2.6 处理前、后的氧自由基吸收能力

不同浓度水溶性维生素 E 的动态荧光衰减曲

线如图 6 所示,经计算所得标准曲线见图 7,相应的表达式为 $y = 0.03548x + 0.62965$, $R^2 = 0.99765$ 。根据上述表达式可得 4 组大豆低聚肽的 ORAC 值,如图 8 所示。与未消化组相比,经胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理后,大豆低聚肽的 ORAC 值均极显著升高 ($P < 0.01$),这可能是由于胃、胰蛋白酶消化使得大豆低聚肽中的一

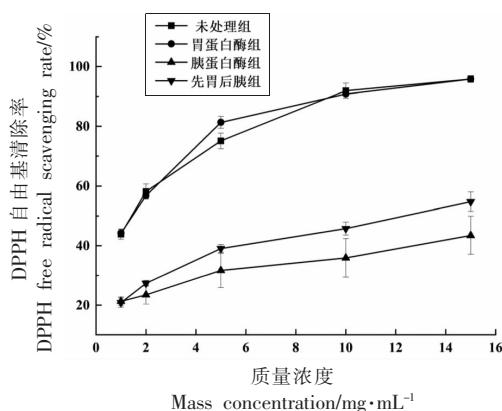


图 5 不同处理大豆低聚肽的 DPPH 自由基清除活性

Fig.5 DPPH free radical scavenging activities of soybean oligopeptides with different treatments

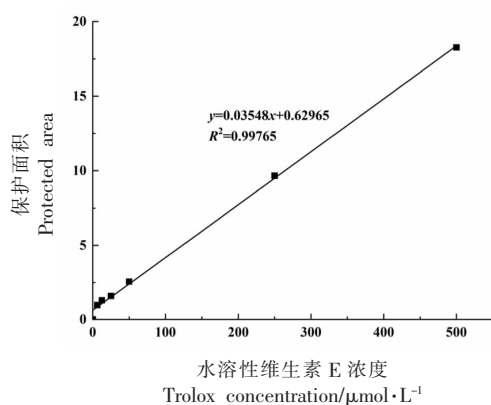


图 7 水溶性维生素 E 标准曲线

Fig.7 Trolox standard curve

2.7 处理前、后的铁离子还原能力

基于不同浓度 FeSO_4 标准溶液及所测得的 OD 值得到 FRAP 标准曲线,如图 9 所示,其表达式为 $y = 0.26247x + 0.026$ ($R^2 = 0.99197$),将不同处理组样品的 OD 值代入标准方程,即便得相应的 FRAP 值,如表 3 所示。与未处理组相比,经胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理后的大豆低聚肽的 FRAP 值均有所提高,造成这一结

果的原因可能是经胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理使得具有还原能力的氨基酸残基暴露出来,从而使得消化后大豆低聚肽 FRAP 值有一定程度的升高^[30]。吴丽英^[31]研究了玛咖蛋白体外消化产物的总还原能力,结果表明随着玛咖蛋白的消化时间增加,消化程度加深,分子质量变小,铁离子还原力增强,这一变化趋势与大豆低聚肽的试验结果一致。

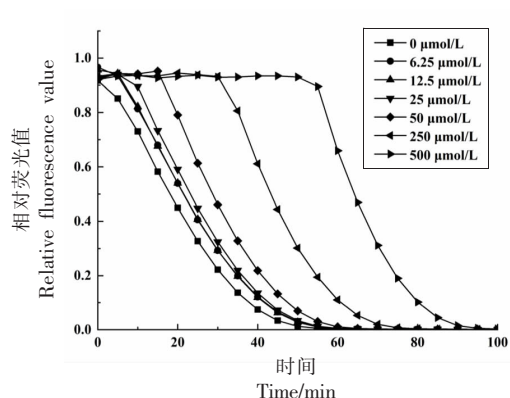


图 6 不同浓度水溶性维生素 E 的动态荧光衰减曲线

Fig.6 Dynamic fluorescence attenuation curves of trolox at different concentrations

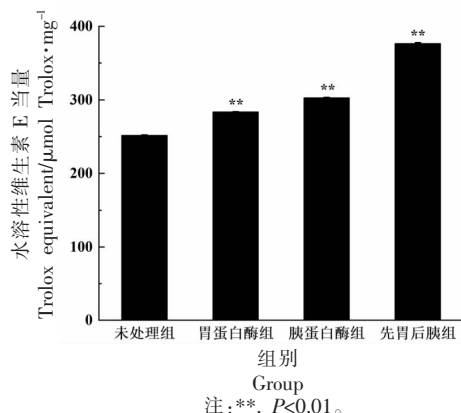


图 8 不同处理大豆低聚肽的 ORAC 值

Fig.8 ORAC values of soybean oligopeptides with different treatments

表3 不同处理大豆低聚肽的FRAP值
Table 3 FRAP values of soybean oligopeptides
with different treatments

组别	FRAP值/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$
未处理组	0.0233 ± 0.0039
模拟胃液组	0.0262 ± 0.0015
模拟胰液组	0.0326 ± 0.0041
先胃后胰组	0.0336 ± 0.0024

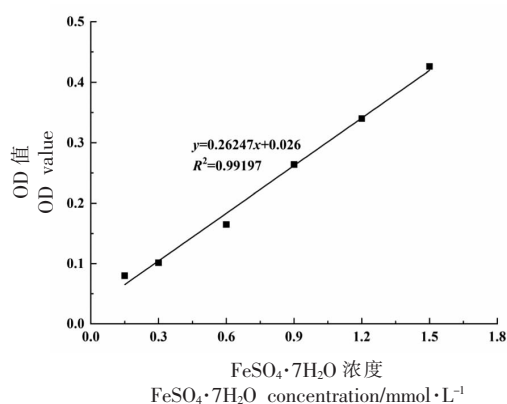


图9 FRAP标准曲线

Fig.9 FRAP standard curve

3 结论

本研究胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理对大豆低聚肽结构和抗氧化活性的影响。结果显示,胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理前、后,大豆低聚肽的分子质量分布主要为<1 000 u的组分(比例可达88.46%),且大豆低聚肽对胃蛋白酶消化具有较好的稳定能力,而经胰蛋白酶处理后,分子质量>5 000 u的肽段发生显著降低,表明在>5 000 u的肽段的组分中,含有了许多能被胰蛋白酶识别和水解的肽段序列;紫外全波长扫描结果显示,通过胃蛋白酶和胰蛋白酶消化作用,使得大豆低聚肽内部出现了电子跃迁;圆二色光谱扫描结果表明,大豆低聚肽的分子无序性较高,结构疏松开放。

测定大豆低聚肽的抗氧化能力发现,胃蛋白酶对DPPH自由基的清除活性几乎没有影响,而胰蛋白酶处理显著降低了大豆低聚肽的DPPH自由基清除率($P<0.05$)。推测造成这一现象的可能原因是酶解进一步将形成的抗氧化肽分解为低或无抗氧化活性的小肽或氨基酸,从而降低了DPPH自由基清除活性;ABTS自由基清除率结果

表明大豆低聚肽的ABTS自由基清除率几乎不受胰蛋白酶和胃蛋白酶的影响;胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理使铁还原能力和氧自由基吸收能力提高,其原因是:经胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理后分子质量小于1 000 u的组分均增加以及具有还原能力的氨基酸残基暴露出来,从而使得处理后的还原能力和氧自由基吸收能力增强。

上述结果说明了经胃蛋白酶、胰蛋白酶及先胃蛋白酶后胰蛋白酶处理虽使大豆低聚肽的结构发生了一定的变化,但仍表现出较好的抗氧化活性并且有一定程度的增强,这为大豆蛋白的多元化开发提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] 徐丽萍,邢超,王鑫,等.酶解法制备大豆低聚肽工艺的研究[J].哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2012,28(2):143-146.
XU L P, XING C, WANG X, et al. Study on preparation of soybean peptide by enzyme hydrolysis [J]. Journal of Harbin University of Commerce (Natural Sciences Edition), 2012, 28(2): 143-146.
- [2] 孙明明,王萍,李智媛,等.大豆活性成分研究进展[J].大豆科学,2018,37(6):975-983.
SUN M M, WANG P, LI Z Y, et al. Research progress of soybean active ingredients[J]. Soybean Science, 2018, 37(6): 975-983.
- [3] 豆康宁.酶解大豆分离蛋白制取大豆肽及其抗氧化性研究[D].郑州:河南工业大学,2007.
DOU K N. Preparation of soybean peptide by enzymatic hydrolysis of soybean protein isolate and its antioxidant activity[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2007.
- [4] 刘文颖,谷瑞增,鲁军,等.大豆低聚肽中抗氧化肽的分离纯化及结构鉴定[J].食品与发酵工业,2017,43(2):44-48.
LIU W Y, GU R Z, LU J, et al. Separation, purification and structural identification of antioxidant peptides derived from soybean oligopeptides[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(2): 44-48.
- [5] 王俊强,孔祥珍,华欲飞.大豆肽钙螯合物的制备、稳定性及表征[J].中国油脂,2019,44(10):46-50.
WANG J Q, KONG X Z, HUA Y F. Preparation,

- stability and characterization of calcium-binding peptides from soybean meal[J]. *China Oils and Fats*, 2019, 44(10): 46–50.
- [6] 戴媛, 冷进松. 大豆多肽的功能性质及应用前景[J]. *河南工业大学学报: 自然科学版*, 2019, 40(2): 132–139.
- DAI Y, LENG J S. Functional properties and application prospect of soybean polypeptide[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2019, 40(2): 132–139.
- [7] 刘文颖, 谷瑞增, 鲁军, 等. 大豆低聚肽的成分分析及体外抗氧作用[J]. *食品工业*, 2015, 36(4): 200–203.
- LIU W Y, GU R Z, LU J, et al. Composition analysis and antioxidant effects *in vitro* of soy oligopeptides[J]. *The Food Industry*, 2015, 36(4): 200–203.
- [8] 刘文颖, 谷瑞增, 林峰, 等. 海洋骨胶原低聚肽钙配合物的稳定性[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(4): 111–115.
- LIU W Y, GU R Z, LIN F, et al. Stability of calcium-chelating marine bone collagen oligopeptides[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(4): 111–115.
- [9] 常玮, 施用晖, 任建东, 等. 定向酶解大豆7S蛋白及其ACE抑制活性的研究[J]. *氨基酸和生物资源*, 2008, 30(2): 18–22.
- CHANG W, SHI Y H, REN J D, et al. Study on ACE inhibitory activity from soybean 7S protein with directed enzyme hydrolyzing[J]. *Amino Acids & Biotic Resources*, 2008, 30(2): 18–22.
- [10] 蒋腾川, 宋新波, 张丽娟. 凝胶过滤色谱法测定3种不同来源多肽的相对分子质量分布[J]. *食品科学*, 2014, 35(24): 312–315.
- JIANG T C, SONG X B, ZHANG L J. Determination of relative molecular weight distribution of polypeptides from three different sources by gel filtration chromatography[J]. *Food Science*, 2014, 35(24): 312–315.
- [11] LIU W Y, LU J, GAO F, et al. Preparation, characterization and identification of calcium-chelating Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ossein oligopeptides[J]. *European Food Research and Technology*, 2015, 241(6): 851–860.
- [12] 杨倩, 李波, 华绍广. 分光光度法测定工作场所空气中硫化氢含量[J]. *现代矿业*, 2017, 33(2): 193–195.
- YANG Q, LI B, HUA S G. Determination of hydrogen sulfide content in workplace air by spectrophotometry[J]. *Modern Mining*, 2017, 33(2): 193–195.
- [13] REZANEJAD R, HEIDARIEH M, OJAGH S M, et al. Values of antioxidant activities(ABTS and DPPH) and ferric reducing and chelating powers of gamma-irradiated rosemary extract [J]. *Radiochimica Acta*, 2019, 108(6): 477–482.
- [14] ZHANG H, YANG Y F, ZHOU Z Q. Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods[J]. *Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 17(1): 256–263.
- [15] SETHI S, JOSHI A, ARORA B, et al. Significance of FRAP, DPPH, and CUPRAC assays for antioxidant activity determination in apple fruit extracts[J]. *European Food Research and Technology*, 2020, 246(3): 591–598.
- [16] ALMEHIZIA A A, ABUELIZZ H A, TAIE H A A T, et al. Investigation the antioxidant activity of benzo [g]triazoloquinazolines correlated with a DFT study [J]. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2019, 27(1): 133–137.
- [17] YANG B, YANG H, LI J, et al. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees[J]. *Food Chemistry*, 2010, 124(2): 551–555.
- [18] BIER M C J, MEDEIROS A B P, KIMPE N D, et al. Evaluation of antioxidant activity of the fermented product from the biotransformation of R-(+)-limonene in solid-state fermentation of orange waste by *Diaporthe* sp. [J]. *Biotechnology Research and Innovation*, 2019, 3(1): 168–176.
- [19] EOM T, KIM E, KIM J S. *In vitro* antioxidant, antiinflammation, and anticancer activities and anthraquinone content from rumex crispus root extract and fractions[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(8): 726–739.
- [20] 杨建兴, 宋曙辉, 王文琪, 等. 几种特色蔬菜抗氧化作用的研究[J]. *安徽农学通报*, 2009, 15(3): 43–45.
- YANG J X, SONG S H, WANG W Q, et al. Antioxidant capacity of some specific vegetables[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2009, 15(3):

- 43–45.
- [21] AMJADI A, MIRMIRANPOUR H, SOBHANI S O, et al. Intravenous laser wavelength radiation effect on LCAT, PON1, catalase, and FRAP in diabetic rats[J]. *Lasers in Medical Science*, 2019, 35(1): 131–138.
- [22] SILVA F G D E, HERNÁNDEZ-LEDESMA B, AMIGO L, et al. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase hydrolysis: Antioxidant activity[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 76: 140–146.
- [23] ZHANG Q, TONG X, QI B, et al. Changes in antioxidant activity of alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport[J]. *Journal of Functional Foods*, 2018, 42: 298–305.
- [24] 汤国营, 戴军, 蔡木易, 等. 大豆低聚肽分子质量分布的测定及体外消化实验[J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(5): 131–133.
- TANG G Y, DAI J, CAI M Y, et al. Study on molecular weight distribution and digestion test *in vitro* of soy oligopeptides[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32(5): 131–133.
- [25] 张剑, 张博, 韩禄, 等. 紫外分光光度法测定维拉帕米与牛血清白蛋白相互作用结合常数[J]. *化学研究与应用*, 2019(7): 1347–1350.
- ZHANG J, ZHANG B, HAN L, et al. Determination of the interaction constant between verapamil and bovine serum albumin by UV spectrophotometry[J]. *Chemical Research and Application*, 2019(7): 1347–1350.
- [26] 李萌, 王娟, 魏子凯, 等. 圆二色光谱、红外光谱法解析羊乳和牛乳 β -酪蛋白结构及性质差异[J]. *光谱学与光谱分析*, 2020, 40(3): 770–776.
- LI M, WANG J, WEI Z K, et al. Analyzing structure and properties of goat milk and bovine milk β -casein by circular dichroism and fourier spectroscopy[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2020, 40(3): 770–776.
- [27] 任海伟, 石菊芬, 王曼琪, 等. 藏绵羊胎盘肽的抗氧化能力及结构表征[J]. *食品与机械*, 2020, 36(4): 162–169.
- REN H W, SHI J F, WANG M Q, et al. Antioxidant capacity of placental peptide from tibetan sheep and its structural characterization[J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(4): 162–169.
- [28] CAO W H, ZHANG C H, HONG P Z, et al. Optimising the free radical scavenging activity of shrimp protein hydrolysate produced with alcalase using response surface methodology[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2009, 44(8): 1602–1608.
- [29] 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(2): 175–182.
- [30] NIE X, XU D, ZHAO L, et al. Antioxidant activities of chicken bone peptide fractions and their Maillard reaction products: Effects of different molecular weight distributions[J]. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20(1): s457–s466.
- [31] 吴丽英. 玛咖蛋白的提取纯化、理化性质及模拟体外消化研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.
- WU L Y. Study on extraction and purification, physicochemical properties and simulated *in vitro* digestion of Maca protein[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.

Effects of Simulated Gastrointestinal Digestion on Structure and Antioxidant Activity of Soybean Oligopeptides

Liu Wenying^{1,2}, Feng Xiaowen², Zhao Xiaohan², Pan Xingchang², Gu Ruizeng²

¹College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083

²Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries Co. Ltd., Beijing 100015)

Abstract Soybean peptides (SOPs) are functional ingredients with good health benefits. The health benefits presented are highly dependent on the peptide structures. SOPs were prepared from soybean protein isolate by hydrolysis. Ultraviolet

full wavelength scanning method and circular dichroism spectrophotometry were used to analyze whether the structure of SOPs was affected by pepsin, trypsin and the sequential treatment of pepsin and trypsin. ABTS free radical scavenging ability, DPPH free radical scavenging ability, oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) of SOPs were measured in order to explore the changes of antioxidant capacity of SOPs before and after digestion. The results showed that SOPs were mainly composed of components with molecular weight less than 1 000 u, and the proportion of components less than 1 000 u increased after digestion, and the maximum proportion reached 88.46%. They all had maximum absorption peaks at 275 nm. In the secondary structure, the proportion of random curl in the four groups of SOPs was about 30%, accounting for about 1/3 of the total secondary structure composition, indicating high disorder and loose and open structure of SOPs. The ABTS free radical scavenging ability and iron reducing ability of SOPs were stable. After trypsin digestion, DPPH radical scavenging rate decreased and oxygen radical absorption capacity increased significantly ($P < 0.01$).

Keywords soybean; oligopeptides; simulated gastrointestinal digestion; structure; antioxidant activity