

## 不同胃肠消化阶段紫花芸豆蛋白的抗氧化活性和结构特征

贾 斌<sup>1</sup>, 毛小雨<sup>1</sup>, 许馨予<sup>1</sup>, 杨鹤隽<sup>1</sup>, 张慧敏<sup>1,3</sup>, 左 锋<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 黑龙江八一农垦大学食品学院 黑龙江大庆 163319

<sup>2</sup> 黑龙江八一农垦大学 国家杂粮工程技术研究中心 黑龙江大庆 163319

<sup>3</sup> 粮食副产物加工与利用教育部工程研究中心 黑龙江大庆 163319

**摘要** 以紫花芸豆蛋白为原料,通过胃肠模拟消化模型解析胃肠不同消化阶段芸豆蛋白水解物的抗氧化活性及结构变化。结果表明:经胃肠蛋白酶消化,芸豆蛋白的溶解度、水解度显著提高,与胃部消化相比,胃肠消化芸豆蛋白水解度增加 120.27%,溶解度下降 3.46%。电泳图谱及抗氧化活性分析表明,肠道消化期间,因胰蛋白酶作用,蛋白亚基水解作用增强,导致低分子质量肽段增加,分子质量<14.4 ku 的亚基条带加深,与胃部模拟消化相比,水解产物抗氧化能力显著增强,总抗氧化能力、Fe 还原能力、ABTS 清除率分别提高 25.31%,85.76%,53.80%。对胃肠连续消化 0.5,2,3 h 水解产物超滤分级,随着消化时间的延长,分子质量<10 ku 的消化产物增加,使水解产物表现出较强的抗氧化能力。傅里叶变换红外光谱分析表明,胃蛋白酶水解使蛋白质结构展开,空间结构较为紧凑的  $\beta$ -折叠被破坏,变为较松散的  $\beta$ -转角,继续肠道消化后芸豆蛋白稳定结构恢复, $\beta$ -折叠由 34.63%增至 41.29%。胃肠消化产物中暴露巯基、总巯基含量、含硫氨基酸总量随水解程度的加深持续下降,肠道消化后,消化产物的暴露巯基、总巯基含量、含硫氨基酸总量分别降低为  $(4.94\pm 0.23)\mu\text{mol/g}$ 、 $(6.14\pm 0.20)\mu\text{mol/g}$ 、 $2.08\mu\text{g/g}$ 。SEM 扫描分析结果表明,水解使芸豆蛋白呈絮状聚集,与胃部消化相比,肠道模拟消化后蛋白微观结构有序性增加,消化产物表面呈细密颗粒状。

**关键词** 芸豆蛋白; 抗氧化活性; 体外胃肠消化; 二级结构

**文章编号** 1009-7848(2022)09-0063-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.09.007

机体受生活环境、年龄等多因素的影响,体内自由基的产生与消除平衡逐渐被打破,多余的自由基会对生物大分子造成一定的损伤<sup>[1-2]</sup>。流行病学研究发现,食物源抗氧化剂对人体健康有积极的作用,比如紫花芸豆在体内消化后的蛋白质水解物可以改善或减少氧化还原状态标记,经常食用芸豆可缓解一些慢性疾病发生,如心脑血管疾病、II 型糖尿病和肥胖等<sup>[3]</sup>。来源丰富的植物蛋白原料经人体消化后,产生的肽段的抗氧化活性较高,其中较短的肽具有较强的自由基猝灭作用,易于人体吸收<sup>[4-5]</sup>。

人体摄入食物后,经过胃肠消化这一复杂过程中消化环境的变化以及组分间的相互作用,对食物中营养物质的消化吸收产生影响<sup>[6]</sup>。齐宝坤等<sup>[7]</sup>采用胃部模拟消化方式对大豆分离蛋白(SPI)进行处理,通过中红外光谱发现经胃蛋白酶的消

化后,SPI 的二级结构发生显著改变。石嘉怿等<sup>[8]</sup>以大米谷蛋白为原料,通过体外模拟胃部消化,比较不同消化时间下胰蛋白酶对大米谷蛋白内源荧光和二级结构的影响,结果发现胰蛋白酶作用于  $\beta$ -折叠使谷蛋白结构展开,内源荧光强度增加,蛋白质生物活性明显增强。Sarker 等<sup>[9]</sup>以红芸豆为原料,通过酶解发现水解液的抗氧化活性高于抗坏血酸(AA),能较好地抑制酸奶中氧化物质生成,与对照组相比,可延缓酸奶中 45.8%的氧化物质生成。Shan 等<sup>[10]</sup>报道豆科植物蛋白具有多样性,在人体内豆类蛋白水解物不仅以氨基酸的方式吸收,还以多肽的形式消化吸收,根据其结构性质、氨基酸组成和序列排序变化对蛋白水解物的抗氧化活性产生影响。有关芸豆蛋白及水解物具有较高的抗氧化活性已有大量报道,然而,经人体消化后,特别是胃肠不同消化时期,其蛋白水解物的抗氧化活性、氨基酸组成及结构变化鲜有报道。

本文采用体外模拟胃肠道消化模型,研究胃肠不同消化阶段芸豆蛋白的抗氧化活性、氨基酸含量、巯基含量、二级结构及微观结构,解析芸豆蛋白水解物的抗氧化及结构特征,为紫花芸豆蛋

收稿日期: 2021-09-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFE0206300)

作者简介: 贾斌(1997—),男,硕士生

通信作者: 左锋 E-mail: zuofeng-518@126.com

白(KPI)的精深加工及开发利用提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

紫花芸豆,黑龙江省林甸县。

胃蛋白酶、胰蛋白酶,赛国生物科技公司; DPPH、VC 标准品、ABTS,阿拉丁试剂公司;(T-AOC)检测试剂盒,北京索莱宝公司;氯化钾、铁氰化钾、溴化钾等其它试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

冷冻干燥机,德国 CHRISTA 公司;U-2019 型紫外-可见分光光度计,日本 HITACHI 公司;DY-CZ-24K 型电泳仪,北京六一生物科技有限公司; TENSOR27 傅里叶变换红外光谱仪,德国 Bruker 公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 紫花芸豆蛋白(KPI)的制备 参照马文鹏等<sup>[11]</sup>的方法略作修改。芸豆浸泡、去皮、烘干、粉碎过 60 目筛后,石油醚脱脂烘干。芸豆粉按 1:12 与水混合,pH 值调至 9 后搅拌 90 min,离心收集上清液,对沉淀 2 次提取。收集 2 次上清液 pH 值调至 4.5,离心后将沉淀去离子水水洗 3 次,将 pH 值调至中性,离心后冻干得 KPI。

1.3.2 体外模拟胃肠连续消化 将紫花芸豆蛋白(KPI)分散在去离子水中配置成 50 mg/mL 溶液,以中性磷酸盐缓冲液作溶剂,将 KPI 缓冲液与人工模拟胃液缓冲液<sup>[12]</sup>(6.9 mmol/L KCl 溶液,0.9 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液,25 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液,47.2 mmol/L NaCl 溶液,0.1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> 溶液,0.15 mmol/L CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> 溶液)等体积混合,pH 值调至 3.0 后添加胃蛋白酶,37 °C 恒温反应结束后加入等体积人工模拟小肠缓冲液(6.8 mmol/L KCl 溶液,0.8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液,85 mmol/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液,38.4 mmol/L NaCl 溶液,0.33 mmol/L MgCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> 溶液,0.6 mmol/L CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> 溶液),pH 值调至 7.0 后加入胰蛋白酶,消化期间维持温度 37 °C、pH 值 7.0 稳定。对不同时间(0.5,2,3 h)上清液进行取样,灭酶、冷却和低温高速离心后收集上清液冷冻干燥,部分沉淀用于电泳。

1.3.3 紫花芸豆蛋白及消化产物水解度及溶解度

测定 采用邻苯二甲醛(OPA)法对 KPI 消化过程的水解度<sup>[13]</sup>进行测定。将 0.1 mol/L 的中性磷酸缓冲液与不同消化阶段样品配制成 5 mg/mL 溶液(下同),与 OPA 试剂(1:20)混合后,避光 3 min,340 nm 处测吸光度值。水解度(DH)按式(1)计算。

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 \quad (1)$$

式中: $h$ ——样品水解肽键数; $h_{\text{tot}}$  取决于原料总肽键数(芸豆  $h_{\text{tot}}=7.72$ )。

溶解度测定参考 Mirmoghtadaie 等<sup>[14]</sup>报道的方法。

### 1.3.4 紫花芸豆蛋白及消化产物抗氧化活性

1.3.4.1 总抗氧化能力测定 总抗氧化能力(T-AOC)测定试验使用试剂盒,试验方法见说明书。

1.3.4.2 还原能力测定 将不同消化阶段的 KPI 在超纯水中配制成 5 mg/mL 的溶液。取 2 mL 配制好的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液和 2 mL 1% 铁氰化钾与 2 mL 蛋白样液 40 °C 下混匀,再加 2 mL 三氯乙酸溶液(10%)离心,将上清液 2 mL 与超纯水(2 mL)、氯化铁溶液(1%,0.6 mL)混匀,待测液颜色由黄转蓝时 700 nm 处测吸光度。以超纯水做空白对照<sup>[15]</sup>。

1.3.4.3 DPPH 自由基清除能力测定 取 KPI 消化液 0.5 mL 避光条件下与 3.5 mL DPPH (1×10<sup>-4</sup> mol/L,95%乙醇)混匀,静置 30 min,734 nm 处测吸光度  $A_1$ ,超纯水替换 KPI 消化液作对照组  $A_2$ ,乙醇替换 DPPH 作空白组  $A_3$ <sup>[16]</sup>。

DPPH 按公式(2)计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_3}{A_2}\right) \times 100 \quad (2)$$

1.3.4.4 ABTS 测定 参照 Pihlanto 等<sup>[17]</sup>的方法和步骤测定 ABTS。0.1 mL KPI(5 mg/mL)与 3.9 mL ABTS 工作液混匀,在 734 nm 处,6 min 内完成吸光度  $A_1$  测定,95%乙醇代替 KPI 溶液测空白值  $A_0$ 。

ABTS 采用公式(3)计算:

$$\text{ABTS+清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_0}\right) \times 100 \quad (3)$$

1.3.5 超滤分级及分级产物抗氧化活性测定 对胃肠连续消化样品超滤分级,选用不同分子质量大小超滤膜(100,50,30,10 ku)分段分级。

根据前期测定的抗氧化活性结果,选用胃肠连续消化 0.5, 2, 3 h 的冻干样品,适度稀释后进行超滤分级,分析不同分子质量 100~50 ku, 50~30 ku, 30~10 ku, <10 ku 的紫花芸豆蛋白模拟消化产物对抗氧化活性(测定方法同 1.3.4.1、1.3.4.2、1.3.4.3、1.3.4.4 节)的作用效果。

**1.3.6 SDS-PAGE** 参照 Yadav 等<sup>[18]</sup>的方法并适当调整。分别取 1.3.2 节中的 KPI 溶液和酶解液 1 mL,加入 1 mL 0.125 mol/L Tris-HCl 缓冲液,水浴煮沸 3 min,离心后收集上清液用于电泳。电泳条件:浓缩胶 5%,分离胶质 14%,上样量 10  $\mu$ L,恒压模式下进行。

**1.3.7 傅里叶变换中红外(MIR-FTIR)光谱测定** 取 200 mg 烘干后的 KBr 与 2 mg 冻干粉混匀研磨成细粉,压机机制透明薄片,设置参数为扫描次数 32 次,间隔 0.1 s,在 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$  范围内进行扫描。

**1.3.8 紫花芸豆蛋白及消化产物巯基含量测定**

采用 Ellman 法测定 KPI 及消化产物的巯基含量。参照 Tang 等<sup>[19]</sup>的方法稍加调整。取配制好的 1 mL 样品液(5 mg/mL)分别加入到 5 mL 无添加和添加尿素(8 mol/L)的 Tris-Gly 缓冲液中,对暴露巯基和总巯基含量进行测定。在缓冲液中加入 40  $\mu$ L Ellman's 试剂(5 mg/mL),412 nm 处测吸光度。

**1.3.9 紫花芸豆蛋白及消化产物氨基酸含量测定**

参照韩晶<sup>[20]</sup>的测定方法进行前处理,将处理好

的滤液利用氨基酸自动分析仪进行测定。

#### 1.4 扫描电镜(SEM)

将 KPI 及消化后的冻干样品真空下电镀喷金,适当调整位置和放大倍数后扫描观察。

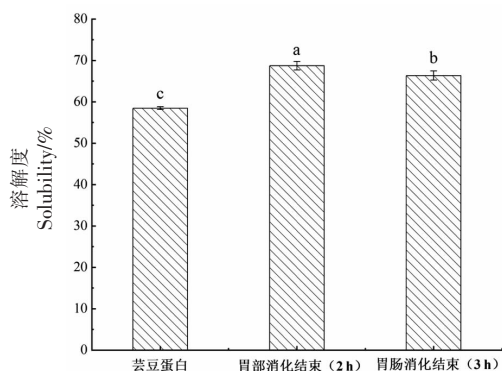
#### 1.5 数据统计

试验平行测定 3 次,数据按照  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 Origin2018 作图软件,Peak Fit v4.1.2 进行红外光谱数据分析,SPSS 20.0 进行数据方差分析,以  $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

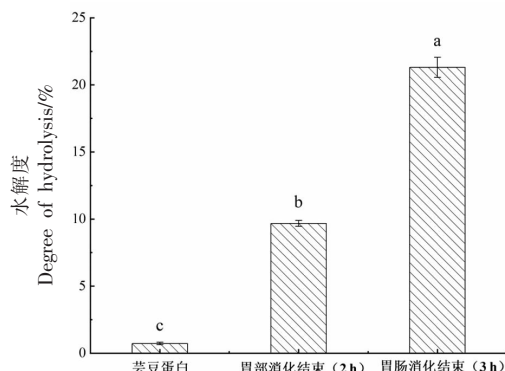
### 2.1 体外模拟消化期间消化产物溶解度、水解度分析

紫花芸豆蛋白模拟消化在不同时期的溶解度、水解度变化如图 1 所示。由图 1a 可知,天然芸豆蛋白溶解度为(58.47 $\pm$ 0.33)%。经胃部胃蛋白酶处理的蛋白样液溶解度为(68.72 $\pm$ 1.02)%,与天然紫花芸豆蛋白相比提升了 17.53%,这是因为芸豆蛋白分子结构致密,分子中亚基依靠二硫键、疏水相互作用相交联<sup>[21]</sup>,在胃蛋白酶水解作用下,使芸豆蛋白中巯基断裂,分子质量变小,肽链变得疏松,亲水基团更多被暴露,不溶性基团含量降低,促使胃部水解产物具有更好的溶解性;进一步经历肠部消化阶段后,芸豆蛋白水解物的溶解度为(66.34 $\pm$ 1.12)%,与胃部消化相比溶解度下降了 3.46%,这是因为随水解程度进一步加深,暴露出大量的疏水性和巯基基团,在疏水性基团与二硫



紫花芸豆蛋白经模拟消化在不同时期的变化  
Changes of kidney bean protein in different stages  
after simulated digestion/h

(a)



紫花芸豆蛋白经模拟消化在不同时期的变化  
Changes of kidney bean protein in different stages  
after simulated digestion/h

(b)

注:相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图 1 不同消化时期溶解度(a)及水解度(b)变化

Fig.1 The change of solubility (a) and degree of hydrolysis (b) in different digestion periods



键作用下,小分子肽链相互交联形成了大分子难溶性成分<sup>[22]</sup>。由图 1b 可知,芸豆蛋白初始水解度几乎为零,芸豆蛋白经过胃部消化后水解度为 $(9.67\pm 0.72)\%$ ,经肠道胰蛋白酶水解后,因胃蛋白酶与胰蛋白酶对肽链作用位点不同,在两种酶协同作用下,其水解度达到 $(21.30\pm 1.05)\%$ ,与胃部消化相比胃肠水解度增加了 120.27%。李鹏飞<sup>[23]</sup>研究表明,在酶解作用下随着植物蛋白 DH 增加,酶解产物平均分子量通常也会降低,并且低分子量水解产物具有更好的抗氧化性能。

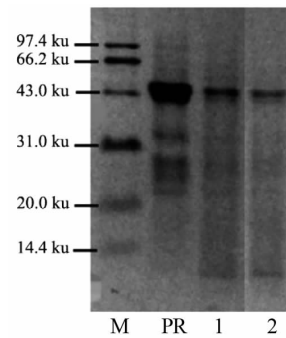
## 2.2 芸豆蛋白及消化产物 SDS-PAGE 电泳分析

芸豆蛋白及模拟胃肠消化产物电泳图谱如图 2 所示。芸豆蛋白分子量分布在 66 ku 以下,其中 45 ku 亚基条带主要是球蛋白<sup>[24]</sup>,31~20 ku 处存在的几条亚基条带,可能为芸豆蛋白中的小分子球蛋白和植物凝集素<sup>[25]</sup>。从图 2 可以看出:芸豆蛋白经过胃部模拟消化后,因酶解作用 45 ku 亚基条带明显减小,但仍然存在未被酶解的球蛋白,这可能是部分球蛋白在胃部酸性条件下,以二聚体或三聚体形式稳定存在,胃蛋白酶较难将其完全水解所致<sup>[26]</sup>;在 31~20 ku 处存在的几条亚基条带经胃蛋白酶水解成<20 ku 小分子肽段,但蛋白水解不完全仍有条带残留。在经历肠道消化后,在胃蛋白酶与胰蛋白酶协同作用下 45 ku 球蛋白亚基条带继续减小,并且胃部未完全消化的 31~20 ku 的亚基条带会继续发生水解作用,使<14.4 ku 亚基条带明显加深。由此可知,肠道消化产物平均分子量与胃部相比明显降低。

## 2.3 芸豆分离蛋白及消化产物抗氧化活性分析

不同酶作用的肽链位点不同,随着水解度与溶解度升高,肽链被酶切割变短,小分子肽段增加,水解液的抗氧化性能增强<sup>[27]</sup>。芸豆蛋白模拟消化在不同时期抗氧化活性变化如表 1 所示。

从表 1 可知,芸豆蛋白总抗氧化为 $(0.66\pm$



注:M 标准蛋白;PR 芸豆蛋白;1 胃部消化物;2 肠部消化物。

图 2 紫花芸豆蛋白及模拟胃肠消化产物 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE profile of purple kidney bean protein and simulated gastrointestinal digestion products

0.12)mg prot/mL,经胃部及胃肠消化后,总抗氧化能力呈现不断上升趋势。胃部消化过程中,总抗氧化能力达到 $(2.45\pm 0.36)$ mg prot/mL,与芸豆蛋白相比提升了 271.21%,经过肠道消化结束后,总抗氧化能力达到 $(3.07\pm 0.41)$ mg prot/mL,与胃部消化相比总抗氧化能力进一步提升了 25.31%。芸豆蛋白消化产物铁还原能力、ABTS 清除率在经历胃肠不同消化时期也呈现了上升趋势。这表明芸豆蛋白经历胃肠消化后,胃蛋白酶和胰蛋白酶对芸豆蛋白水解的位点不同,共同作用下水解芸豆蛋白使蛋白水解生成更多的小分子多肽并暴露了具有特异性酶切位点<sup>[28]</sup>,使消化产物中的小分子多肽与 ABTS<sup>+</sup>、铁离子更好的发生结合反应,提升了消化产物的铁还原能力、ABTS<sup>+</sup>清除率。

与胃部消化后的蛋白水解物相比,进一步肠道消化后芸豆蛋白水解物的 DPPH 清除能力略有降低,并且差异性显著。这是胃部消化水解后,一些肽被分解成小片段暴露出部分疏水性氨基酸残基,DPPH 自由基被稳定,而经过肠道消化后疏水性氨基酸减少,亲水性氨基酸增多,难以与脂溶性 DPPH 自由基结合<sup>[29]</sup>,这与表 3 疏水性氨基酸变化一致。

表 1 芸豆蛋白及消化产物抗氧化测定

Table 1 Antioxidant determination of kidney bean protein and digested products

样品/抗氧化指标	总抗氧化能力/mg prot·mL <sup>-1</sup>	Fe <sup>3+</sup> 还原能力	DPPH 清除率/%	ABTS 清除率/%
芸豆蛋白	$0.66\pm 0.12^c$	$0.187\pm 0.05^c$	$56.09\pm 0.72^c$	$27.24\pm 0.98^c$
胃部消化 2 h	$2.45\pm 0.36^b$	$0.288\pm 0.08^b$	$61.54\pm 0.74^b$	$39.16\pm 1.17^b$
肠部消化 3 h	$3.07\pm 0.41^a$	$0.535\pm 0.17^a$	$59.68\pm 0.89^a$	$60.23\pm 1.85^a$

注:进行同列比较,字母不同差异显著( $P<0.05$ )。

## 2.4 不同分子质量的芸豆蛋白模拟胃肠道消化产物的抗氧化能力分析

为深入研究经胃肠模拟消化后抗氧化能力的分布情况,通过超滤分级四种不同分子质量紫花芸豆蛋白消化的抗氧化能力如图 3 所示。从图 3a 可知,消化 0.5 h 时,分子质量在 100~50 ku 总抗氧化活性低于<10 ku 的多肽,随消化时间延长,两者差距减小,但分子质量<10 ku 消化产物仍表现出最强总抗氧化能力,即小分子肽段显示出较强抗氧化性。郭晓娟<sup>[30]</sup>对羽扇豆蛋白进行超滤分析研究酶水解产物的总抗氧化能力时也发现,在>10

ku、3~8 ku 和<3 ku 3 个组分中,发现<3 ku 分子质量的胰酶水解产物表现出最强的总抗氧化能力。从图 3b~3d 可知,随着分子质量的减小以及消化时间的延长,铁还原能力、DPPH 清除能力、ABTS 清除能力也持续增加。但是在 0.5 h 时,不同分子质量铁还原能力、DPPH 清除能力变化平缓,陈树俊等<sup>[31]</sup>对核桃粉酶解、超滤后也发现,≤5 ku 的多肽的铁还原能力、DPPH 清除能力均高于另外 3 种多肽(5~10、10~30 和 ≥30 ku),说明此时芸豆蛋白水解不完全,Fe<sup>3+</sup>、脂溶性 DPPH 与消化产物的螯合能力较弱。

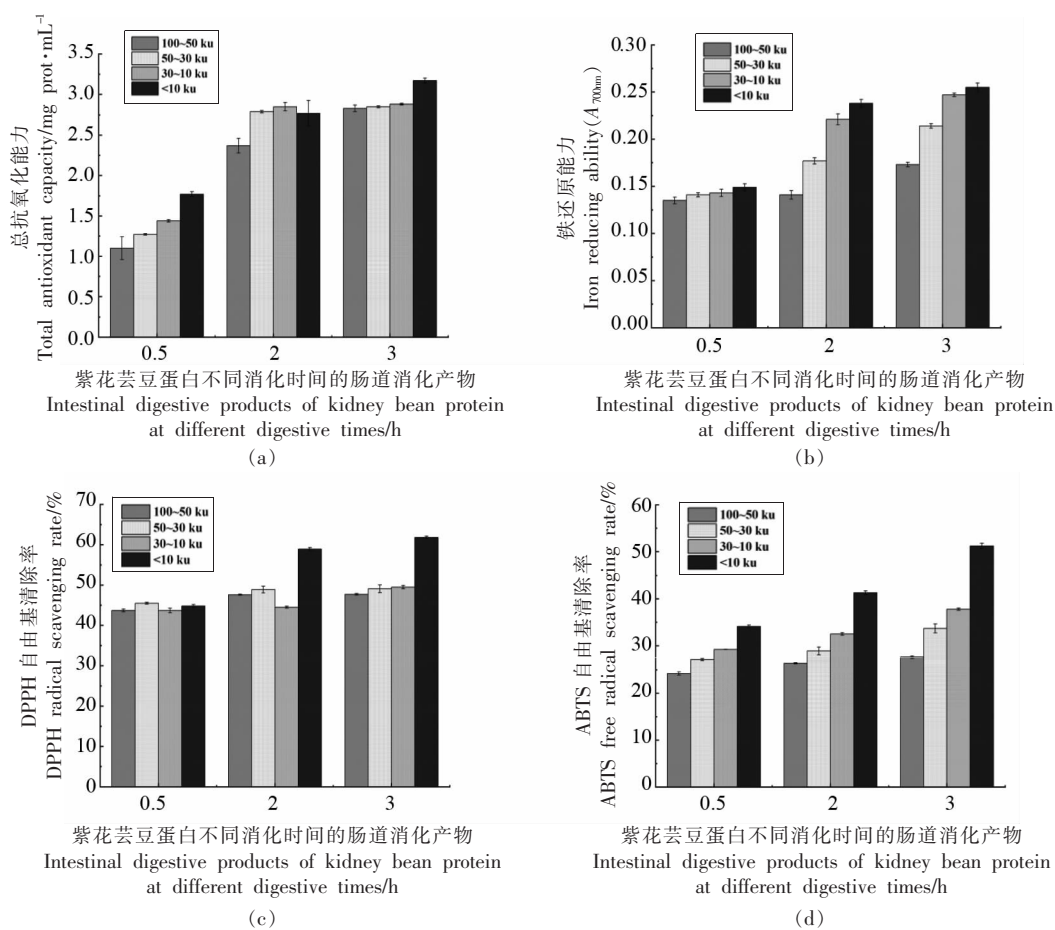


图 3 不同分子质量紫花芸豆蛋白模拟胃肠道消化产物的抗氧化能力

Fig.3 Different molecular weight purple kidney bean protein simulates the antioxidant capacity of gastrointestinal digestive products

## 2.5 芸豆蛋白及胃肠消化产物 MIR-FTIR 分析

经红外测定去卷积化处理后得芸豆蛋白及消化产物二级结构定量信息见表 2。

由表 2 知,KPI 二级结构中含有最高的是  $\beta$ -

折叠,Byanju 等<sup>[32]</sup>分析 4 种豆类蛋白的二级结构变化也发现  $\alpha$ -螺旋不作为芸豆蛋白的主要结构,而  $\beta$ -结构是芸豆蛋白的主要二级结构。经模拟胃肠道连续消化后,KPI 消化产物二级结构中  $\alpha$ -螺

旋 $\beta$ -转角含量先增加后减少, $\beta$ -折叠先减少后增加,无规则卷曲含量减少。其中,随着 KPI 在胃部消化期间酶解程度不断加深,与芸豆蛋白相比, $\beta$ -折叠变化显著,由 41.14%减少到 34.63%, $\beta$ -转角含量大幅增加,表明胃蛋白酶的水解使蛋白质结构被展开,空间结构上较为紧凑的 $\beta$ -折叠被破坏,转变为较松散的 $\beta$ -转角维持稳定蛋白质的三

级结构<sup>[33]</sup>。在肠部消化期间,随消化时间延长且消化环境由强酸性转变为中性,芸豆蛋白稳定结构重新恢复, $\beta$ -折叠由 34.63%增加到 41.29%。曾琪等<sup>[34]</sup>研究 pH 值处理对黑豆分离蛋白结构时也同样发现,pH 值由强酸性逐渐提升至近中性时,蛋白质中 $\beta$ -折叠含量显著上升,这与本文研究结果一致。

表 2 酰胺 I 带拟合芸豆蛋白及消化产物二级结构组成

Table 2 Amide I band fitting kidney bean protein and digestion product secondary structure composition

蛋白种类	$\alpha$ -螺旋结构/%	$\beta$ -转角结构/%	$\beta$ -折叠结构/%	无规则卷曲/%
紫花芸豆蛋白(KPI)	18.74 ± 0.03 <sup>b</sup>	19.05 ± 0.04 <sup>c</sup>	41.14 ± 0.02 <sup>b</sup>	21.06 ± 0.01 <sup>a</sup>
KPI 模拟胃部消化(2 h)	19.80 ± 0.01 <sup>a</sup>	25.25 ± 0.05 <sup>a</sup>	34.63 ± 0.05 <sup>c</sup>	20.32 ± 0.04 <sup>b</sup>
KPI 模拟肠道消化(3 h)	17.58 ± 0.02 <sup>c</sup>	21.63 ± 0.03 <sup>b</sup>	41.29 ± 0.01 <sup>a</sup>	19.51 ± 0.04 <sup>c</sup>

注:进行同列比较,字母不同差异显著( $P < 0.05$ )。

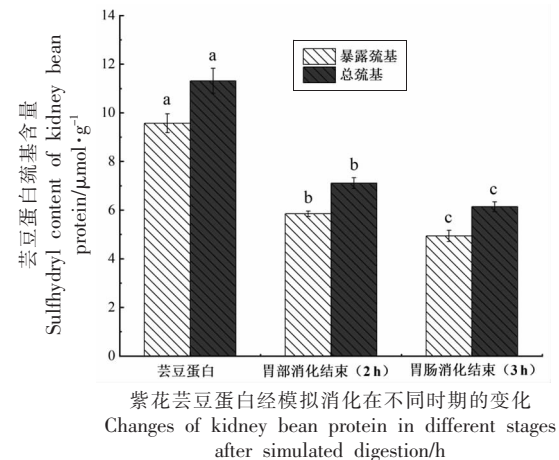
## 2.6 体外模拟消化期间芸豆蛋白消化产物巯基含量变化分析

由图 4 可知,与紫花芸豆蛋白相比,消化后的暴露巯基、总巯基含量不断下降。经胃部消化后的暴露巯基、总巯基含量为 (5.85 ± 0.29)  $\mu\text{mol/g}$ 、(7.11 ± 0.37)  $\mu\text{mol/g}$ ,与芸豆蛋白相比下降 40.12%,36.69%,这是由于在胃部消化期间,蛋白分子水解后相互聚集,部分巯基形成二硫键,形成较为稳定的结构,导致暴露巯基、总巯基含量下降;进一步经过肠道消化后,消化产物的暴露巯基、总巯基降至 (4.94 ± 0.23)  $\mu\text{mol/g}$ 、(6.14 ± 0.20)  $\mu\text{mol/g}$ ,这可能是在胰蛋白酶作用下,蛋白分子进一步舒展,巯基团间空间阻碍被解除,游离巯基之间易形成二硫键,进而导致巯基含量降低。也有研究表明,半胱氨酸(Cys)含有活性巯基,经过胃肠连续消化后半胱氨酸(Cys)含量降低也会导致巯基含量下降<sup>[35]</sup>,这与表 3 半胱氨酸含量变化相同。

## 2.7 模拟消化期间芸豆蛋白胃肠消化产物游离氨基酸含量变化分析

芸豆蛋白水解后,氨基酸从母体蛋白中释放出来,Chen 等<sup>[36]</sup>发现 His、Tyr、Cys 等许多氨基酸及其衍生物具有将电子转移到自由基的能力,对蛋白水解液的抗氧化性有一定的提升作用。KPI 及消化产物游离氨基酸含量变化如表 3 所示。

由表 3 可知,经胃部消化后,与芸豆蛋白相比,酶解作用水解出更多的游离氨基酸,必需氨基酸总量占总氨基酸含量的比例由 14.903%增加到



注:同一指标相同字母表示差异不显著,不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图 4 紫花芸豆蛋白及模拟消化期间消化产物的巯基含量变化

Fig.4 Changes in sulfhydryl content of purple kidney bean protein and digested products during simulated digestion

37.853%, 而含硫氨基酸总量由 2.73  $\mu\text{g/g}$  减少为 2.67  $\mu\text{g/g}$ ,这与巯基含量变化趋势(图 4)保持一致。疏水性氨基酸含量增幅明显,由 10.98  $\mu\text{g/g}$  增加到 21.59  $\mu\text{g/g}$ ,这些氨基酸能够使短肽与脂溶性自由基相互作用,进而提高消化产物的抗氧化能力。与胃部消化相比,经胰蛋白酶消化后,肠部消化产物含硫氨基酸总量由 2.67  $\mu\text{g/g}$  减少为 2.08  $\mu\text{g/g}$ ,必需氨基酸占比增多,这与肽键持续裂解导致较短肽(三肽和二肽)和游离氨基酸大量积累有关<sup>[37]</sup>。同时,胃部、肠部模拟消化的疏水性氨基酸

表 3 芸豆蛋白及消化产物游离氨基酸含量变化

Table 3 Kidney bean protein and digestive products free amino acid content

氨基酸种类	芸豆蛋白/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	模拟胃部消化 2 h/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	模拟肠道消化 3 h/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Asp 天冬氨酸	10.6925	0.1133	0.0825
Thr 苏氨酸	7.9574	23.6058	4.7650
Ser 丝氨酸	4.6807	3.8712	1.1876
His 组氨酸	3.9807	6.4714	2.2557
Ile 异亮氨酸	2.6268	2.0634	2.1391
Met 甲硫氨酸	1.9467	2.6556	2.0707
Pro 脯氨酸	1.8848	2.0868	0.0107
Arg 精氨酸	1.8538	4.2569	1.6722
Ala 丙氨酸	1.6927	12.1099	3.2986
Phe 苯丙氨酸	1.5895	1.4319	0.9640
Tyr 酪氨酸	1.0572	1.4279	0.8467
Val 缬氨酸	0.7825	1.0068	0.4700
Cys 半胱氨酸	0.7804	0.0158	0.0095
Glu 谷氨酸	0.2751	0.2321	0.1022
Gly 甘氨酸	0.2336	0.2378	0.1015
Leu 亮氨酸	0.2113	0.2235	0.2084
Lys 赖氨酸	0.2085	7.0896	6.8114
e/t (%)	14.9029	37.8530	39.4519
ST	2.7271	2.6714	2.0802
HAA	10.9824	21.5897	9.0537

注:e/t:必需氨基酸占总氨基酸含量的比例;ST:含硫氨基酸总量;HAA:疏水性氨基酸。

含量变化与脂溶性 DPPH 自由基清除变化趋势相同(表 1),表现为先增加后减少。

## 2.8 扫描电镜(SEM)图像分析

紫花芸豆蛋白及模拟消化产物的扫描电镜图如图 5 所示。由图 5 可以清晰直观的观察样品的微观外形构造特点,芸豆蛋白电镜图(图 5a)表面呈现密实光滑立体结构。经过胃部模拟消化后,芸豆蛋白在酸性条件下变得松散无序,且在表面形

成细密小孔,随着水解进行呈现絮状聚集现象(图 5b)。经肠道模拟消化后,与胃部消化相比,因在中性条件下蛋白微观结构有序性有所增加,消化产物表面呈现细密颗粒状(图 5c)。由此可知,经过胃部、肠道消化后,蛋白表面微观结构逐步发生明显变化,表面变得无序、松散、粗糙多孔,并且蛋白结构变化及小分子肽段产生从而改变了消化产物的抗氧化活性。

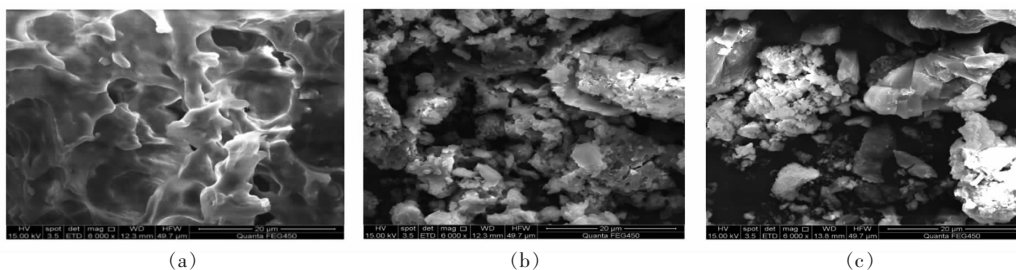


图 5 芸豆蛋白(a)、模拟胃部消化 2 h(b)及模拟肠道消化 3 h(c)SEM 图

Fig.5 Kidney bean protein, simulated stomach digestion 2 h and simulated intestinal digestion 3 h SEM absorption spectrum

## 3 结论

紫花芸豆蛋白在体外模拟消化过程中,芸豆蛋白消化产物的溶解度、水解度显著升高,肠道消

化结束后溶解度、水解度分别达到 $(66.34 \pm 1.12)\%$ 、 $(21.30 \pm 1.05)\%$ ,与胃部消化相比水解度增加了 120.27%,溶解度下降了 3.46%。经 SDS-



PAGE 图谱及抗氧化活性分析发现,芸豆蛋白在肠道环境中持续水解导致消化产物平均分子量明显降低,<14.4 ku 亚基条带明显加深,与胃部模拟消化相比水解产物抗氧化能力显著增强,总抗氧化能力、铁还原能力、ABTS 清除率分别提升 25.31%,85.76%,53.80%,而 DPPH 清除能力下降了 3.02%。对芸豆蛋白酶解、超滤分级后发现,分子量<10 ku 的多肽总抗氧化能力、铁还原能力、DPPH 和 ABTS 自由基清除能力显著高于其它 3 种多肽(100~50 ku、50~30 ku、30~10 ku)。经 MIR-FTIR 分析发现, $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角含量先增加后减少, $\beta$ -折叠先减少后增加,无规则卷曲含量减少。胃肠消化产物中暴露巯基、总巯基含量、含硫氨基酸总量随水解程度增加持续下降,与胃部消化相比,肠部消化产物的暴露巯基、总巯基含量、含硫氨基酸总量分别下降了 15.56%,13.64%,22.13%。SEM 扫描分析发现,经过体外模拟消化后,蛋白表面微观结构逐步发生明显变化,表面变得无序、松散、粗糙多孔,与胃部消化相比经肠道模拟消化后,蛋白微观结构有序性有所增加,消化产物表面呈现细密颗粒状。

### 参 考 文 献

- [1] AVILA-ESCALANTE M L, COOP-GAMAS F, CERVANTES-RODRIGUEZ M, et al. The effect of diet on oxidative stress and metabolic diseases—Clinically controlled trials[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(5): e13191.
- [2] ROY M, SARKER A, KALAM AZAD A, et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of dark red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* protein hydrolysates)[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2020, 14(1): 303–313.
- [3] YURCHENKO A, KRENYTSKA D, SAVCHUK O, et al. The evaluation of lipid peroxidation and oxidative modification of proteins in blood serum under obesity development and the consumption of aqueous kidney beans *Phaseolus vulgaris* pods extract[J]. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 2020, 33(1): 38–44.
- [4] ROCHA G F, KISE F, ROSSO A M, et al. Potential antioxidant peptides produced from whey hydrolysis with an immobilized aspartic protease from *Salpichroa organifolia* fruits[J]. *Food Chemistry*, 2017, 237: 350–355.
- [5] BING L, AISA H A, YILI A. Isolation and identification of two potential antioxidant peptides from sheep abomasum protein hydrolysates[J]. *European Food Research & Technology*, 2018, 244: 1615–1625.
- [6] TANZADEHPANAH H, ASOODEH A, MAHAKI H, et al. Bioactive and ACE binding properties of three synthetic peptides assessed by various spectroscopy techniques[J]. *Process Biochemistry*, 2016, 51(12): 2067–2075.
- [7] 齐宝坤, 江连洲, 李杨. 体外模拟消化对大豆蛋白组成及二级结构的影响[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(11): 44–49.  
QI B K, JIANG L Z, LI Y. Effects of in vitro simulated digestion on the composition and secondary structure of soybean protein[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2018, 18(11): 44–49.
- [8] 石嘉铎, 张太, 梁富强. 体外模拟消化对大米谷蛋白结构及水解产物生物活性的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(1): 59–66.  
SHI J Y, ZHANG T, LIANG F Q. Effect of in vitro simulated digestion on the structure of rice glutelin and the biological activity of hydrolysates[J]. *Food Science*, 2021, 42(1): 59–66.
- [9] SARKER A, CHARKRABORTY S, ROY M. Dark red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates inhibit the growth of oxidizing substances in plain yogurt[J]. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2020, 14: 303–313.
- [10] SHAN Y, SEN C, THOMPSON R, et al. An in vitro Raman study on compositional correlations of lipids and protein with animal tissue hydration[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2020, 107: 103022.
- [11] 马文鹏, 任海伟. 芸豆蛋白的提取及其营养价值评价[J]. *食品科技*, 2013, 38(1): 75–79.  
MA W P, REN H W. Extraction of kidney bean protein and evaluation of its nutritional value[J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38(1): 75–79.
- [12] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, et al. A standardized static in vitro digestion method suitable for food an international consensus[J]. *Food & Function*, 2014, 5(6): 1113–1124.
- [13] 江连洲, 胡继莹, 张潇元. 不同品种大豆分离蛋白



- 体外消化产物的结构特性[J]. 中国食品学报, 2019, 19(9): 21-36.
- JIANG L Z, HU J Y, ZHANG X Y. Structural characteristics of *in vitro* digestion products of different varieties of soybean protein isolate[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(9): 21-36.
- [14] MIRMOGHTADAIE L, KADIVAR M, SHAHEDI M. Effects of succinylation and deamidation on functional properties of oat protein isolate[J]. Food Chemistry, 2008, 114(1): 127-131.
- [15] YOUNG V R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition [J]. Journal of the American Dietetic Association, 1991, 91(7): 828-835.
- [16] WANG Z X, LIU Y, LI H. Rice proteins extracted by alkali and  $\alpha$ -amylase, differently affect *in vitro* antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2016, 206: 137-145.
- [17] PIHLANTO A, AKKANEN S, HANNU J, et al. ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*)[J]. Food Chemistry, 2008, 109(1): 104-112.
- [18] YADAV M P, PARRIS N, JOHNSTON D B, et al. Corn fiber gum and milk protein conjugates with improved emulsion stability [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(2): 476-483.
- [19] TANG C H, SUN X, YIN S W. Transglutaminase-induced cross-linking of vicilin-rich kidney protein isolate: Influence on the functional properties and *in vitro* digestibility [J]. Food Research International, 2008, 41(10): 941-947.
- [20] 韩晶. 黑龙江芸豆主栽品种蛋白质营养价值分析及抗氧化活性肽的研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2016: 12-18.
- HAN J. Analysis of protein nutritional value of main cultivated kidney bean varieties in Heilongjiang and research on antioxidant peptides [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2016: 12-18.
- [21] ZHENG X Q, WANG J T, Liu X L, et al. Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by protamex hydrolysis[J]. Food Chemistry, 2015, 172: 407-415.
- [22] YADAV R B, YADAV B S, CHAUDHARY D. Extraction, characterization and utilization of rice bran protein concentrate for biscuit making [J]. British Food Journal, 2011, 113(9): 1173-1182.
- [23] 李鹏飞. 水酶法提取花生油及蛋白质[D]. 无锡: 江南大学, 2017: 52-69.
- LI P F. Water enzymatic extraction of peanut oil and protein [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017: 52-69.
- [24] 陈振家, 王晓闻, 荆旭, 等. 不同温度处理对红芸豆蛋白热稳定性及结构的影响[J]. 农业工程学报, 2020, 36(19): 306-312.
- CHEN Z J, WANG X W, JING X, et al. Effects of different temperature treatments on the thermal stability and structure of red kidney bean protein[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2020, 36(19): 306-312.
- [25] RUI X, BOYE J, RIBEREAU S, et al. Comparative study of the composition and thermal properties of protein isolates prepared from nine *Phaseolus vulgaris* legume varieties[J]. Food Research International, 2011, 44(8): 2497-2504.
- [26] WANI I, SOGI D, SHIVHARE U, et al. Physicochemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates [J]. Food Research International, 2014, 76(8): 11-18.
- [27] 马晓雨, 陈先鑫, 胡振瀛, 等. 限制性酶解对大米蛋白结构、功能特性及体外抗氧化活性的影响[J]. 中国食品学报, 2020, 20(11): 53-62.
- MA X Y, CHEN X X, HU Z Y, et al. Effects of restriction enzymatic hydrolysis on rice protein structure, functional properties and *in vitro* antioxidant activity[J]. Chinese Journal of Food Science, 2020, 20(11): 53-62.
- [28] 焦宝利, 田少君, 毛小平, 等. 大豆蛋白酶解产物抗氧化活性与水解度相关性研究[J]. 粮食与油脂, 2015, 28(2): 28-32.
- JIAO B L, TIAN S J, MAO X P, et al. Study on the correlation between the antioxidant activity of soybean proteolysis products and the degree of hydrolysis[J]. Food and Oils, 2015, 28(2): 28-32.
- [29] ZHU L, CHEN J, TANG X, et al. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of *in vitro* digests of alcalase-treated zein hydrolysate[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2008, 56(8): 2714-2721.
- [30] 郭晓娟. 羽扇豆抗氧化肽制备及其对 HepG2 抗氧化损伤影响研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2018: 34-40.

- GUO X J. Preparation of lupin antioxidant peptide and its effect on HepG2 antioxidant damage [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018: 34-40.
- [31] 陈树俊, 李乐, 石玥, 等. 响应面法优化酶解制备核桃多肽工艺[J]. 食品工业科技, 2017, 38(16): 142-149, 158.
- CHEN S J, LI L, SHI Y, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis to prepare walnut peptides by response surface methodology[J]. Food Industry Science and Technology, 2017, 38(16): 142-149, 158.
- [32] BYANJU B, RAHMAN M, MILAGROS P, et al. Effect of high-power sonication pretreatment on extraction and some physicochemical properties of proteins from chickpea, kidney bean, and soybean[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 145: 712-721.
- [33] YONG Y H, S YAMAGUCHI, Y MATSUMURA. Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(16): 6034-6040.
- [34] 曾琪, 胡森, 王欢, 等. pH值处理对黑豆分离蛋白结构、流变特性及乳化性能的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(22): 15-21.
- ZENG Q, HU M, WANG H, et al. The effect of pH treatment on the structure, rheological properties and emulsification properties of black soybean protein isolate[J]. Food Science, 2020, 41(22): 15-21.
- [35] 林伟静. 糖基化改性对花生蛋白膜性能的影响及其作用机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015: 28-35.
- LIN W J. Study on the effect of glycosylation modification on the properties of peanut protein film and its mechanism[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015: 28-35.
- [36] CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI A F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1996, 44(9): 2619-2623.
- [37] 佟晓红, 王欢, 刘宝华, 等. 生物解离大豆蛋白酶解物体外模拟消化抗氧化活性变化[J]. 食品科学, 2019, 40(15): 50-56.
- TONG X H, WANG H, LIU B H, et al. Changes in *in vitro* simulated digestion and antioxidant activity of biologically dissociated soybean proteolysis[J]. Food Science, 2019, 40(15): 50-56.

### The Antioxidant Activity and Structural Characteristics of Purple Kidney Bean Protein during Different Digestive Stages of Gastrointestinal

Jia Bin<sup>1</sup>, Mao Xiaoyu<sup>1</sup>, Xu Xinyu<sup>1</sup>, Yang Hujun<sup>1</sup>, Zhang Huimin<sup>1,3</sup>, Zuo Feng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang

<sup>2</sup>National Cereals Engineering Technology Research Center, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang

<sup>3</sup>Engineering Research Center of Processing and Utilization of Grain By-products, Ministry of Education, Daqing 163319, Heilongjiang)

**Abstract** The antioxidant activity and structural changes of kidney bean protein hydrolysates during different digestive periods were analyzed by using kidney bean protein as raw material through gastrointestinal simulation model. The results showed that the solubility and hydrolysis degree of kidney bean protein were significantly increased after digestion with gastrointestinal protease. Compared with gastric digestion, the proteolysis degree of kidney bean was increased by 120.27% and the solubility was decreased by 3.46% in gastrointestinal digestion. It was found by electrophoresis pattern and antioxidant activity analysis. After intestinal digestion, the protein subunit hydrolysis was enhanced with the continued action of trypsin, resulting in an increase in low-molecular weight peptides. The subunit bands with molecular weight <14.4 ku were significantly deepened. Compared with simulated gastric digestion, the antioxidant capacity of hydrolysates was significantly enhanced. Total antioxidant capacity, Fe reduction capacity and ABTS clearance rate were increased by 25.31%, 85.76% and 53.80%, respectively. To classify hydrolysates by ultrafiltration, which are produced by the contin-

uous digestion of the gastrointestinal tract respectively for 0.5, 2 and 3 hours. With the prolonging of digestion time, the hydrolysates showed strong antioxidant capacity due to the increase of digestible products with molecular weight less than 10 ku. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis showed that the hydrolysis of pepsin unfolds the protein structure. The relatively compact  $\beta$ -fold in spatial structure is broken and transformed into a looser  $\beta$ -corner. The stable structure of kidney bean protein was restored after intestinal digestion, and the  $\beta$ -fold increased from 34.63% to 41.29%. The contents of sulfhydryl group, total sulfhydryl group and total sulfur-containing amino acids in gastrointestinal digestions decreased continuously with increasing degree of hydrolysis. After intestinal digestion, the content of exposed sulfhydryl group, total sulfhydryl group and total sulfur-containing amino acids decreased to  $(4.94 \pm 0.23) \mu\text{mol/g}$ ,  $(6.14 \pm 0.20) \mu\text{mol/g}$  and  $2.08 \mu\text{g/g}$ , respectively. SEM scanning analysis showed that flocculent aggregation occurred during hydrolysis of kidney bean protein. After simulated digestion through the intestines compared to gastric digestion. The order of the protein microstructure was increased and the surface of the digested product was fine and granular.

**Keywords** kidney bean protein; antioxidant activity; *in vitro* gastrointestinal digestion; secondary structure