

发酵麦胚球蛋白体外模拟消化

苑永建^{1,2}, 宇光海^{1,2,4}, 廖爱美^{1,2}, 潘龙^{1,2}, 黄继红^{1,2,3*}

(¹河南工业大学生物工程学院 郑州 450001

²小麦生物加工与营养功能河南省重点实验室 郑州 450001

³许昌学院 食品与药学院 河南许昌 461000

⁴河南飞天农业开发股份有限公司 河南鹤壁 458000)

摘要 基于体外模拟胃、肠消化的方式评估发酵麦胚球蛋白(FWG)在不同消化阶段消化率、微观结构、氨基酸组成、二级结构及其抗氧化活性的变化。结果表明,FWG经胃、肠消化后,其可消化率由55.43%分别降至34.33%和9.54%,平均粒径由100 nm分别降至50~70 nm和20~30 nm,未消化蛋白分子量稳定在15 ku附近。胃消化2 h后,FWG总游离氨基酸释放量达到原始样品的2.05倍,芳香族氨基酸和支链氨基酸含量显著增加;与 α -螺旋和 β -折叠稳定相关的赖氨酸、缬氨酸在这一阶段被解离出来,无序性增加。FWG经胃消化后羧基清除率显著升高32.76%,胃消化过程中ABTS自由基和DPPH自由基清除率呈下降趋势。肠消化后,FWG总游离氨基酸量趋于稳定,二级结构有序性增加。肠消化期间反映亲水性肽抗氧化能力的ABTS自由基清除率呈先下降再上升后下降的趋势,羧基清除率则和含羧基氨基酸相对含量的变化趋势呈正相关性,呈先下降再上升而后下降最后上升的变化趋势,DPPH自由基清除率变化趋势和疏水性氨基酸含量的变化密切相关。本研究为进一步了解FWG在肠、胃消化过程中理化性质及功能的变化机制提供理论参考。

关键词 发酵麦胚球蛋白; 体外模拟胃、肠消化; 氨基酸分析; 抗氧化活性

文章编号 1009-7848(2023)05-0049-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.05.006

麦胚中蛋白质含量约30%,以清蛋白和球蛋白为主,有着良好的氨基酸组成比例,营养价值高,是优质的天然植物蛋白资源^[1-2]。麦胚球蛋白为麦胚蛋白的重要成员之一,具有较好的免疫调节功能,作为植物源蛋白家族中的一员,相较于动物源免疫球蛋白具有更好的安全性^[3-4]。此外,麦胚球蛋白在改善亚硝酸盐致肝损伤,预防阿尔茨海默症以及抗炎抗氧化等方面有较高的生物活性^[5-8]。发酵麦胚球蛋白是麦胚经微生物作用发酵后,加入一定比例的氯化钠提取得到的一种功能性蛋白。相对于未发酵麦胚蛋白,在增强机体免疫、抗癌抗氧化等方面具有更高的活性^[9-11]。发酵麦胚球蛋白(FWG)在维持脑-肠轴稳态中表现出良好的功能活性,它可以提高肠道菌群多样性,增加拟杆

菌门丰度,进而发挥其潜在的抗衰老作用^[12-13]。将发酵麦胚球蛋白作为一种营养补充剂加入食品中,可以显著提高食品的抗菌能力^[14]。此外,研究表明发酵麦胚球蛋白在减轻慢性高血压、糖尿病引起的代谢异常等方面具有良好的功效^[15]。综上,发酵麦胚在蛋白作为一种功能性食品,在免疫调节、代谢调节、抗氧化辅助治疗方面具有较好的应用前景。

发酵麦胚蛋白食用后经由肠胃道消化,发挥其生物活性功能。然而,发酵麦胚球蛋白经胃肠道消化酶解后,其二级结构和微观结构、游离氨基酸释放情况、抗氧化活性变化尚未阐明。本研究以发酵麦胚球蛋白为试验材料,在模拟胃肠道消化环境的基础上研究其在消化过程中消化率、微观结构、二级结构、氨基酸组成以及抗氧化活性的变化,了解其消化特性,为进一步阐明发酵麦胚蛋白生物活性功能提供一定的理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

脱脂麦胚(食品级)购于河南鲲鹏生物技术有

收稿日期: 2022-05-01

基金项目: 河南省重大公益专项(科技攻关)(2021102310518); 中原学者工作站资助项目(214400510015); 河南省重大科技专项(221100110700); 中央引导地方科技发展资金项目(Z20221341069)

第一作者: 苑永建,男,硕士生

通信作者: 黄继红 E-mail: huangjih1216@126.com

限公司。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,其余试剂购自天津科密欧试剂有限公司,所有试剂均为分析纯级。

1.2 主要仪器与设备

SCIENTZ-10N型冷冻干燥机,新芝生物科技股份有限公司;Epoch酶标仪,Biotek公司;S-433D型氨基酸分析仪,德国Sykam;MOS-450/AF-CD型圆二色谱仪,Bio-logic公司;HT7700型透射电子显微镜,日本日立公司。

1.3 试验方法

1.3.1 发酵麦胚球蛋白的制备 参照Zhao等^[16]的制备方法并稍作改动,低温振荡采用全恒温摇床于4℃、120 r/min条件下盐提2 h后,倒入平板中,超低温冰箱过夜冻藏后于冷冻干燥机冷冻干燥、备用。

1.3.2 构建体外模拟胃肠消化体系 参照Minekus等^[17]和Chen等^[18]的方法并在此方法上稍作改动,模拟胃液中含有1%的胃蛋白酶和0.02%的氯化钠,pH值调整至1.20,加样前在37℃水浴中保持5 min。模拟肠液中包含1%的胰蛋白酶和0.7%的磷酸二氢钾,pH值为7.50。按照在胃体系中蛋白含量占4%的比例加入发酵麦胚球蛋白进行消化试验。终止消化:分别将pH值调至7.50并在收集时间点煮沸溶液以停止胃蛋白酶和胰蛋白酶的酶促作用。

1.3.3 测定蛋白质可消化率 蛋白质可消化率(Protein digestibility,PD)定义为消化样品上清液中所含已消化蛋白质的含量占原始样品蛋白质含量的百分比^[19]。蛋白质含量通过BCA法测定,并做平行。

$$PD(\%) = \frac{\text{原始样品总蛋白含量} - \text{上清液未消化蛋白含量}}{\text{原始样品总蛋白含量}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定 按试剂盒说明进行配胶,分离胶质量分数为10%,浓缩胶质量分数为5%。跑胶条件:浓缩胶电压80 V,45 min,分离胶电压120

V,2 h。

1.3.5 TEM观察蛋白质粒径变化 取不同消化时期的样品,稀释至浅色,吸取一滴约40 μL稀释液加至铜网,室温下干燥10 min,上机检测。

1.3.6 游离氨基酸的测定 利用水系0.45 μm的微孔滤膜将采集到的消化样品滤过,取400 μL滤液(蛋白含量4 g/100 g)加入100 μL 10%磺基水杨酸,充分混匀后在4℃下静置。静置1 h后低温离心5 min,保留上清液,用磷酸缓冲盐(PBS)稀释至合适的上机浓度(基于样品中的蛋白质含量估算),最后使用0.22 μm的微孔滤膜滤过,收集滤液,用全自动氨基酸分析仪进行分析。

1.3.7 二级结构的测定 将收集到的具有典型特征的消化产物用圆二色谱仪对其二级结构进行表征,水解产物的二级结构由它们在190~260 nm远紫外范围内的光谱确定。使用CD pro程序软件计算二级结构含量。

1.3.8 抗氧化活性的测定

1.3.8.1 DPPH自由基清除能力的测定 参照芦鑫等^[20]的方法,并在此基础上稍作修改:吸取一定量的水解产物加入到96孔板,然后向其中加入0.2 mmol/L的DPPH-甲醇溶液,室温避光反应30 min,于波长517 nm处测定其吸光度(OD)值作为A₁;取相同体积去离子水作为空白,测定其吸光度值作为A₀;用去离子水代替DPPH-甲醇溶液,测定其吸光度值作为A₂。

$$DPPH \text{ 自由基清除能力 } (\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

1.3.8.2 ABTS自由基清除能力的测定 参照芦鑫等^[20]的方法进行测定。

1.3.8.3 羟自由基清除能力的测定 参考李新明等^[21]的方法进行测定。

1.3.9 数据处理 所有数据均使用Excel软件处理,结果使用均值±标准差表示,并用Origin 2021进行绘图。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE表征及可消化率分析

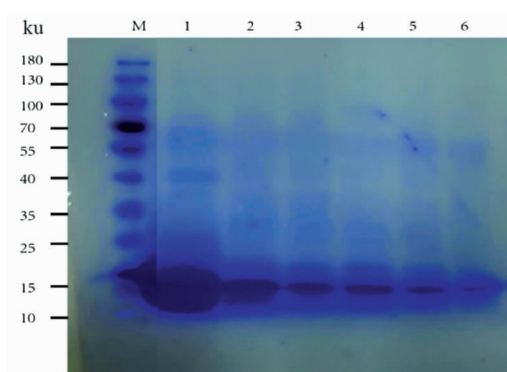
发酵麦胚蛋白(FWG)消化前,胃、肠消化后的消化产物的SDS-PAGE图谱,如图1所示,发

酵麦胚球蛋白(FWG)消化前样品主要存在以 15 ku 为中心较粗且颜色较深的蛋白条带,其相对分子质量以 15 ku 为中心分布于在 10~25 ku 范围之内;在 25~70 ku 范围内蛋白呈现弥散分布,仅在 55~70 ku、40 ku 处分布有较浅的蛋白条带。与消化前相比,胃消化后,以 15 ku 为中心的蛋白条带上下边缘明显收窄,说明此分子质量谱段大于或小于 15 ku 的蛋白被显著酶解;25~70 ku 弥散区的 55~70 ku、40 ku 分子质量较大的蛋白也被降解,主条带消失,完全呈弥散状。随着肠消化时间逐渐延长,以 15 ku 为中心的蛋白条带及其弥散背景逐渐收窄,25 ku~70 ku 弥散区背景颜色也逐渐变浅;在肠消化 4 h 后,FWG 主要在 15 ku 处存在较窄的线性条带,弥散背景区颜色显著变浅。综上所述,FWG 大幅度酶解主要发生于胃消化阶段,该阶段大分子质量的蛋白质被降解为小分子的蛋白、多肽及氨基酸;在肠消化阶段,分子质量谱段以 15 ku 为中心的蛋白被进一步酶解,未降解主要蛋白分子质量在 15 ku 左右。

经胃肠消化后,发酵麦胚球蛋白可消化率发生显著变化。如图 2 所示,随着消化时间的不断延长,发酵麦胚球蛋白在各点的可消化率呈现不断下降的趋势,总消化率不断增加。在发酵麦胚球蛋白消化过程中,经胃蛋白酶酶解后可消化率从最初的 55.45% 下降至 34.33%,当加入胰蛋白酶 15 min 后,可消化率继续下降到 14.62%,之后稳定在 10% 附近并在肠消化 240 min 时达到最低值 9.54%,与之相反,总消化率在胃消化和肠消化 15 min 时快速上升至 21.12% 和 40.83%,最终在肠消化 240 min 时达到最大值 45.91%。消化降解主要发生于胃部以及肠消化前期,此期间小分子肽及氨基酸被大量释放。肠消化 15 min 后可消化率和总消化率变化幅度减缓。消化过程中,可被酶作用的位点不断减少,酶解效率不断下降,可能是导致这一变化的主要原因,同时酶解产物的积累可能对酶解反应产生反馈抑制作用^[2]。综上,可消化率的显著变化发生于胃消化后和肠消化前期,这与上述 SDS-PAGE 图谱分析结果相一致。

2.2 透射电镜微观结构表征

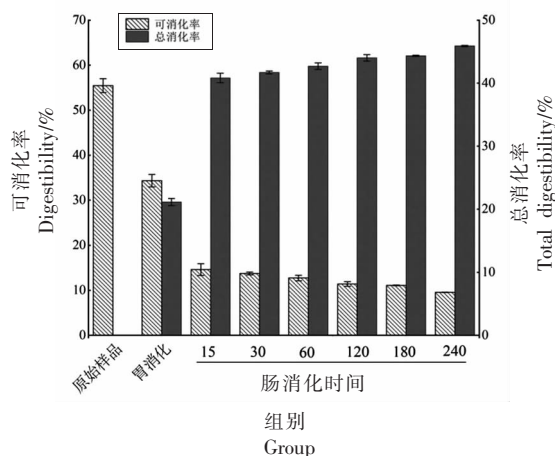
由图 3 可知,大多数蛋白质在胃消化期间能



注:M. 蛋白 Mark;1. 原始样品;2~6. 分别为 FWG 胃消化后、肠消化 1,2,3,4 h 后的消化产物。

图 1 FWG 消化产物 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of FWG digestion products



注:胃消化时间为 120 min。

图 2 发酵麦胚球蛋白消化率变化情况

Fig.2 Changes of digestibility of wheat germ globulin in fermentation

够保持稳定的圆形颗粒状,粒径约 100 nm 的发酵麦胚球蛋白粒子在胃消化后降解至 50~70 nm。肠消化开始后,蛋白质形状开始发生细微的变化,随着肠消化的不断进行,发酵麦胚球蛋白的形状开始变得不规则,大分子蛋白的浓度也在不断下降,而微小颗粒则不断增加,发酵麦胚球蛋白不断地酶解成小蛋白质或肽类,模拟消化结束时的平均粒子大小为 20~30 nm。总的来说,发酵麦胚球蛋白的消化是一个大分子逐步被酶解成小分子的过程。消化后仍有少量较大尺寸的粒子存在,这可能与酶解不充分或其本身具有抗消化性有关^[18]。

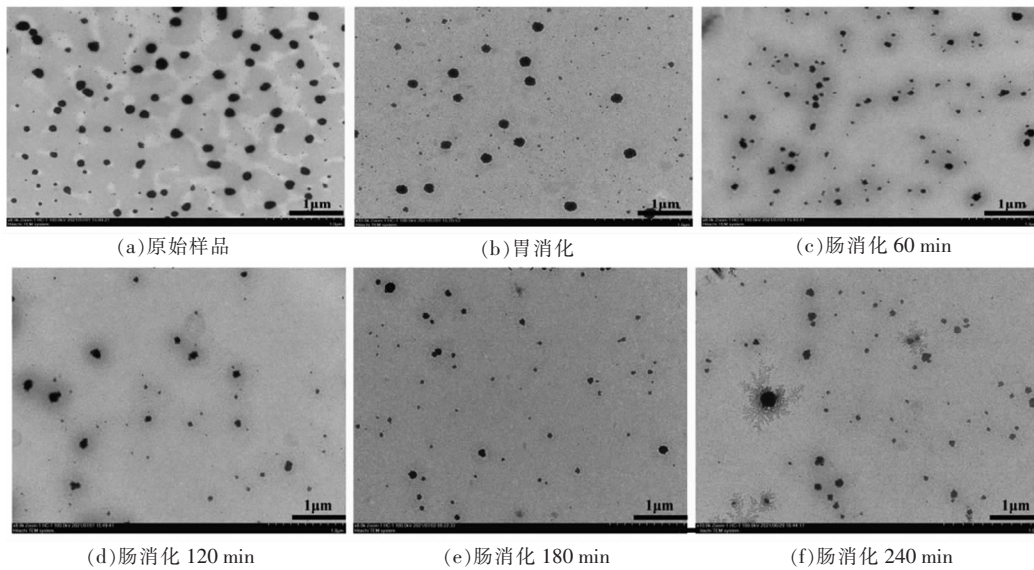


图3 FWG 消化的透射电镜图像

Fig.3 TEM images of digestion of FWG

2.3 游离氨基酸释放量分析

由图4可知,游离氨基酸在胃消化后被释放出来,胃消化后总游离氨基酸质量浓度为1.1846 mg/mL,是消化前(0.5767 mg/mL)的2.05倍;进入肠消化阶段后,氨基酸的释放量趋于稳定,较胃消化后仅增加了0.1116 mg/mL,这与上述SDS-PAGE图谱分析结论相一致:FWG大幅度酶解主要发生于胃消化阶段,此阶段酶解释放了大量游离氨基酸;肠消化阶段蛋白相对分子质量未发生显著变化,这与该阶段游离氨基酸的释放量未发生明显增加的结果一致。此外,在胃消化后FWG总游离氨基酸浓度在胃消化阶段大幅上升,还可能和模拟胃液较低的pH值有关,从而促使了蛋白质的分解。

水解产物中共得到17种氨基酸,按照其功能的差异对部分氨基酸进行了分类,结果见表1。胃消化后,天冬氨酸、缬氨酸、酪氨酸、组氨酸、赖氨酸等多种氨基酸相对含量显著增加,其中组氨酸相对含量增加最多为3.447%;肠消化1h后,苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸、色氨酸含量分别增加了2.518%,3.907%,8.971%,1.247%,2.154%,2.073%,而缬氨酸、异亮氨酸等含量减少,此外亮氨酸在这一消化节点骤降至0,可能是因为在这一消化节点该氨基酸经离子交换柱分离后与水合茚三酮反应发生了明显扩散,致使分辨率

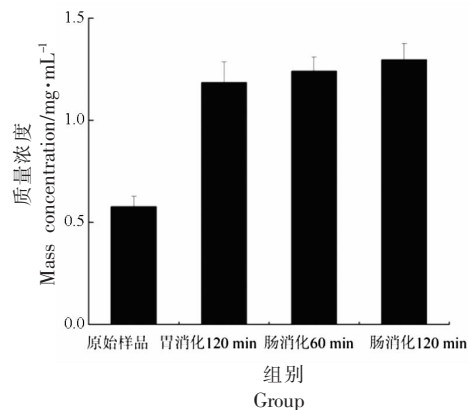


图4 消化期间总游离氨基酸的释放情况

Fig.4 Release of total free amino acids during digestion

降低,未能得到有效数据;肠消化2h后,天冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、蛋氨酸、缬氨酸等含量显著下降,其中谷氨酸下降最为显著为5.163%,而丙氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、酪氨酸分别增加了1.455%,5.32%,0.841%,2.8%,带正电荷氨基酸(PCAA)、芳香族氨基酸(AAA)、支链氨基酸(BCAA)在胃消化和肠消化后显著增加。研究发现,消化完成后天冬氨酸等多种氨基酸含量下降,同时异亮氨酸等氨基酸含量显著增加,说明在消化过程中氨基酸之间存在着动态结合与转化。

在不同的消化环境中氨基酸的存在形式差别很大,胃消化微环境中酪氨酸、组氨酸占有很大的比例,这2种氨基酸在增强机体抗氧化能力和提

表 1 消化过程中游离氨基酸释放种类及相对含量统计表

Table 1 Statistical table of the types and contents of free amino acids released during digestion

游离氨基酸	采样点			
	原始样品/%	胃消化 2 h/%	肠消化 1 h/%	肠消化 2 h/%
天冬氨酸(Asp)	3.202	4.989	5.091	3.292
苏氨酸(Thr)	2.850	1.816	4.334	1.640
丝氨酸(Ser)	1.290	1.630	5.537	0.413
谷氨酸(Glu)	10.690	5.793	14.764	9.601
甘氨酸(Gly)	6.253	4.592	5.839	3.610
丙氨酸(Ala)	7.788	6.020	4.168	5.623
半胱氨酸(Cys)	0.122	0.462	0.212	0.682
缬氨酸(Val)	6.059	7.082	4.394	5.235
甲硫氨酸(Met)	3.361	2.957	3.856	0.615
异亮氨酸(Ile)	3.174	4.044	1.681	7.001
亮氨酸(Leu)	10.145	10.049	—	9.989
酪氨酸(Tyr)	0.859	3.195	1.679	4.479
苯丙氨酸(Phe)	6.251	5.879	8.033	7.861
组氨酸(His)	12.529	15.976	16.350	14.534
色氨酸(Trp)	2.202	2.113	4.186	1.406
赖氨酸(Lys)	7.957	8.108	7.272	8.498
精氨酸(Arg)	15.268	15.293	12.603	15.522
芳香族氨基酸(AAA)	9.312	11.187	13.898	13.746
支链氨基酸(BCAA)	19.378	21.175	6.075	22.225
带正电荷氨基酸(PCAA)	35.754	39.377	36.225	38.554

高极端环境下人类的认知能力方面发挥着重要的作用^[23-24]。肠消化 1 h 后丝氨酸和谷氨酸的大量增加对止血、提高中枢神经系统兴奋和预防精神疾病有着直接或间接的益处^[25-26]。异亮氨酸在肠消化 2 h 后显著增加,研究表明其可以诱导宿主防御肽(β -防御素)的表达,从而调节宿主先天免疫和适应性免疫,此外异亮氨酸还可以通过增加 β -防御素的表达来恢复某些病原体对人畜健康的影响^[27]。

芳香族氨基酸(AAA)主要通过其代谢物来调控中枢神经系统、肝脏、胃肠道疾病发展进程,对机体健康有着重要的影响^[28],而支链氨基酸(BCAA)在机体糖代谢、减轻运动肌肉损伤中则扮演着重要的角色^[29-30]。带正电荷氨基酸(PCAA)主要存在于抗菌肽中,研究表明,带正电荷氨基酸可通过静电吸引直接作用于细菌细胞膜,破坏菌体结构,从而达到抗菌的目的^[31]。

消化后必需氨基酸与非必需氨基酸比例为 2.31%:1.69%(图 5),尽管消化过程中不同种氨基

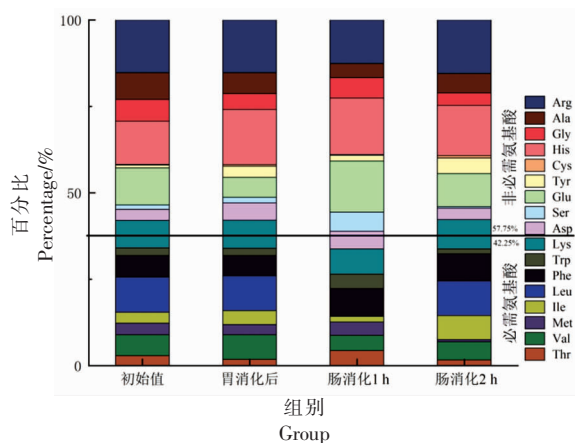


图 5 消化过程中必需氨基酸和非必需氨基酸分布情况

Fig.5 Distribution of essential and non-essential amino acids during digestion

酸的占比在不断发生变化,但该总体比率和初始值(29%:21%)并未发生明显变化。

2.4 二级结构分析

对消化不同时期的 FWG 的测定结果如图 6 所示,所测样品在 190 nm 附近均有正峰出现,说

明含有 α -螺旋构象,217 nm附近出现的负峰说明样品中含有 β -折叠构象。利用软件分析得出的结果如表2所示,模拟胃消化2 h后, α -螺旋和 β -折叠分别下降至12.22%和30.40%, β -转角、无规则卷曲分别上升至21.11%和36.36%,无序性增加;肠消化2 h后, α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲所占百分比分别为20.78%、38.87%、18.29%和22.17%,与原始样品组成相似,有序性有所恢复。 α -螺旋的稳定依赖于赖氨酸的维系,而 β -折叠结构的稳定则和缬氨酸、异亮氨酸等氨基酸密切相关^[32-33]。从游离氨基酸释放结果(表1)来看,缬氨酸、异亮氨酸、赖氨酸在胃消化后分别增加了1.023%、0.87%和0.151%,从而导致维系蛋白和肽二级结构中的相关氨基酸含量下降,造成了二级结构的改变。此外,多种极性氨基酸如丝氨酸、半胱氨酸、酪氨酸在胃消化后被释放,研究表明,具有极性基团的氨基酸残基对水分子屏蔽作用小,因而当大量极性氨基酸存在时会显著破坏 α -螺

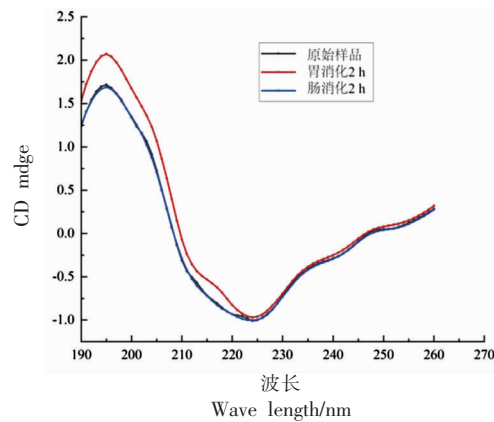


图6 消化过程中圆二色光谱分析曲线图

Fig.6 Analysis curve of circular dichroism spectrum during digestion

旋的稳定性^[34]。经过胃消化后,蛋白分子结构展开,包埋在分子内部的作用位点暴露出来,表现为总消化率的不断上升,使蛋白质发生解折叠,导致 β -折叠结构含量下降^[35]。

表2 消化过程中二级结构的变化情况

Table 2 Changes of secondary structure during digestion

采样时间	二级结构/%			
	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
原始样品	20.91	37.88	16.36	24.65
胃消化2 h	12.22	30.40	21.11	36.36
肠消化2 h	20.78	38.87	18.29	22.17

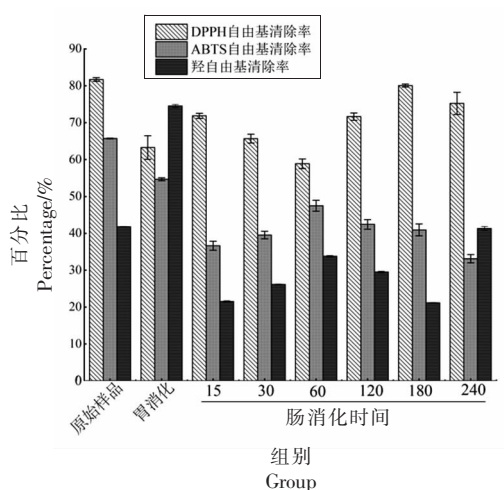
2.5 体外抗氧化活性分析

研究表明,肽的氨基酸组成以及序列结构是影响其抗氧化活性的主要因素^[36]。通过对ABTS自由基($ABTS^+$)清除率、DPPH自由基清除率以及羟自由基清除率的检测分析,得到了原始样品及消化产物体外抗氧化能力变化情况(图7)。3种自由基清除率受消化影响最大的是羟自由基清除率,其次是 $ABTS^+$ 清除率,最后是DPPH自由基清除率。

胃消化后,羟自由基清除率由原始样品的41.76%骤升至74.51%,其它2种自由基清除率都呈下降趋势,分别下降了11.06%($ABTS^+$)和18.44%(DPPH)。肠消化阶段变化最为显著的时期是肠消化初期,羟自由基清除率、 $ABTS^+$ 清除率

分别下降至36.64%和33.13%,而DPPH自由基的清除率则上升至71.84%;之后3种自由基的清除率都呈波动性变化。在整个消化过程中, $ABTS^+$ 清除率呈先下降再上升而后下降的趋势,羟自由基清除率呈先上升,之后下降再上升而后下降最后又上升的趋势,而DPPH自由基的清除率变化趋势则和羟自由基清除率恰好相反。

羟自由基清除率可能和含羟基氨基酸(酪氨酸)的改变有关,由表1可知酪氨酸在胃消化后含量显著增加,而在肠消化15 min时减少了1.516%,羟自由基清除率也随之下降,二者之间可能具有正相关性。 $ABTS^+$ 是一种水溶性自由基,反映了亲水性肽的总抗氧化能力^[37],结果表明FWG消化期间亲水性肽的抗氧化能力总体上是



注:胃消化时间为 120 min。

图 7 体外消化过程中抗氧化能力的变化

Fig.7 The changes in antioxidant capacity during *in vitro* digestion

下降的,可能和亲水性肽在消化过程中不断被酶解,含量下降有关。DPPH 自由基清除率下降主要与疏水性氨基酸或多肽的存在相关^[38],氨基酸结果显示疏水性氨基酸缬氨酸、异亮氨酸含量变化均出现波动性变化,这可能是造成 DPPH 自由基清除率波动的主要原因。

3 结论

通过对发酵麦胚球蛋白在体外模拟胃肠消化环境中结构、组成以及抗氧化活性的变化,发现发酵麦胚球蛋白的微观结构在胃消化后开始发生变化,最终降解至 20~30 nm,蛋白相对分子质量的变化主要发生于胃消化和肠消化前期;模拟胃消化 2 h 后, α -螺旋和 β -折叠显著下降, β -转角、无规则卷曲显著上升,肠消化 2 h 后这一趋势被逆转。大量氨基酸相关功能活性物质在胃消化后被释放,总氨基酸释放量增加了 1.05 倍。消化会显著影响 FWG 水解产物的抗氧化能力,3 种自由基清除率受消化影响程度依次是羟自由基清除率>ABTS 自由基清除率>DPPH 自由基清除率。研究初步表明发酵麦胚球蛋白在体内可能主要通过小肽和功能性氨基酸的释放来发挥其抗氧化、调节免疫、改善机体机能等这一机理。

参 考 文 献

- [1] 杨铭乾,黄继红,苏雪锋,等.麦胚球蛋白研究进展[J].粮食与饲料工业,2015,12(4):28-31.
YANG M Q, HUANG J H, SU X F, et al. Research progress of wheat germ globulin[J]. Cereals and Feed Industries, 2015, 12(4): 28-31.
- [2] 黄继红,纪小国,田青,等.基于蛋白质组学技术的麦胚蛋白研究进展[J].河南工业大学学报:自然科学版,2017,38(6):115-122.
HUANG J H, JI X G, TIAN Q, et al. Research progress of wheat germ protein based on proteomics technology[J]. Journal of Henan University of Technology: Natural Science Edition, 2017, 38(6): 115-122.
- [3] 陈朝喜,张配配.植物蛋白替代动物蛋白[J].国外畜牧学(猪与禽),2020,40(4):78-80.
CHEN C X, ZHANG P P. Plant protein replaces animal protein[J]. Foreign Animal Husbandry (Pig and Poultry), 2020, 40(4): 78-80.
- [4] SONG M, FUNG T T, HU F B, et al. Association of animal and plant protein intake with all-cause and cause-specific mortality[J]. JAMA Internal Medicine, 2016, 176(10): 1453-1463.
- [5] YU G H, JI X G, HUANG J H, et al. Immunity improvement and gut microbiota remodeling of mice by wheat germ globulin[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2021, 37(4): 1134-1142.
- [6] 毕振原,黄继红,刘娜,等.麦胚球蛋白的体外抗炎活性研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2017,38(2):63-68.
BI Z Y, HUANG J H, LIU N, et al. *In vitro* anti-inflammatory activity of wheat germ globulin[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2017, 38(2): 63-68.
- [7] 赵肃,吴兴泉,黄继红,等.麦胚球蛋白对亚硝酸盐急性中毒大鼠肝损伤的保护作用研究[J].食品研究与开发,2021,42(5):52-57.
ZHAO S, WU X Q, HUANG J H, et al. The protective effect of wheat germ globulin on liver injury in rats with acute nitrite poisoning[J]. Food Research and Development, 2021, 42(5): 52-57.
- [8] 吕行.麦胚球蛋白对 D-半乳糖诱导衰老小鼠多重保护作用研究[D].郑州:河南工业大学,2020.
LÜ X. Study on multiple protective effects of wheat

- germ globulin on *D*-galactose-induced aging mice [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2020.
- [9] LIU F R, CHEN Z X, SHAO J J, et al. Effect of fermentation on the peptide content, phenolics and antioxidant activity of defatted wheat germ[J]. Food Bioscience, 2017, 20(2): 141-148
- [10] ANDRAS T, MARTA H, CHANG H C, et al. Avemar (wheat germ extract) in cancer prevention and treatment[J]. Nutrition and Cancer, 2009, 61(6): 44-45.
- [11] 侯银臣, 宁梦茹, 黄继红, 等. 脱脂麦胚发酵过程中抗氧化活性变化研究[J]. 中国酿造, 2018, 37(11): 66-69.
- HOU Y C, NING M R, HUANG J H, et al. Study on the changes in antioxidant activity of defatted wheat germ during fermentation[J]. China Brewing, 2018, 37(11): 66-69.
- [12] 赵祎. 麦胚发酵物对 *D*-半乳糖诱导衰老小鼠肠道菌群损伤的修复机制研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2020.
- ZHAO Y. Research on the repair mechanism of fermented wheat germ on *D*-galactose-induced intestinal flora damage in aging mice [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2020.
- [13] ZHAO Y, LIAO A M, LIU N, et al. Potential anti-aging effects of fermented wheat germ in aging mice[J]. Food Bioscience, 2021, 42(5): 89-94.
- [14] RIZZELLO C G, CASSONE A, CODA R. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 789-795.
- [15] ABISHEK I, LINDSAY B. Fermented wheat germ extract (avemar) in the treatment of cardiac remodeling and metabolic symptoms in rats[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 30(2): 1-10.
- [16] ZHAO Y, HUANG J, LIAO A, et al. Optimization of wheat embryo globulin fermenting process and variation in properties during fermentation[J]. International Journal of Agriculture and Biology, 2019, 22(6): 1599-1606.
- [17] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus[J]. Food & Function, 2014, 5(6): 1113-1124.
- [18] CHEN W J, LIAO A M, HOU Y C, et al. Digestive characteristics and peptide release from wheat embryo proteins *in vitro*[J]. Food & Function, 2021, 12(5): 57-64.
- [19] HU Y, SUN W D, LIU L, et al. Modification of peanut protein isolate in glucose-containing solutions during simulated industrial thermal processes and gastric-duodenal sequential digestion[J]. Food Chemistry, 2019, 295(3): 120-128.
- [20] 芦鑫, 姜梦楠, 张丽霞, 等. 制备芝麻抗氧化肽的蛋白酶筛选[J]. 中国油脂, 2018, 43(11): 28-33.
- LU X, JIANG M N, ZHANG L X, et al. Screening of protease for preparing sesame antioxidant peptide [J]. China Oils and Fats, 2018, 43(11): 28-33.
- [21] 李新明, 李群. 枣黄酮的抗氧化活力研究[J]. 农产品加工, 2021(2): 24-25.
- LI X M, LI Q. Study on the antioxidant activity of jujube flavonoids[J]. Agricultural Products Processing, 2021(2): 24-25.
- [22] 黄沧海, 陈东晓. 几种蛋白质原料体外消化率测定方法的比较[J]. 饲料工业, 2005(20): 48-51.
- HUANG C H, CHEN D X. Comparison of determination methods of *in vitro* digestibility of several protein raw materials[J]. Feed Industry, 2005(20): 48-51.
- [23] BLOEMENDAAL M, FROBOSE M I, WEGMAN J, et al. Neuro-cognitive effects of acute tyrosine administration on reactive and proactive response inhibition in healthy older adults[J]. eNeuro, 2018, 5(2): 24-30.
- [24] HOLECEK M. Histidine in health and disease: Metabolism, physiological importance, and use as a supplement[J]. Nutrients, 2020, 12(3): 57-66.
- [25] HIROSHI H, NAMI M, HIROMI N, et al. Pharmacokinetics and toxicokinetics of *D*-serine in rats [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018, 162(5): 65-76.
- [26] JOHN T B, MARGARET E B. Glutamate: A truly functional amino acid[J]. Amino Acids, 2013, 45(3): 435-443.
- [27] GU C S, MAO X B, CHEN D W, et al. Isoleucine plays an important role for maintaining immune function[J]. Current Protein & Peptide Science, 2019, 20(7): 644-651.
- [28] 刘苹, 苏卫卫. 芳香族氨基酸及其衍生物的研究进展[J]. 廊坊师范学院学报(自然科学版), 2021, 21

- (2): 27-34.
- LIU P, SU W W. Research progress of aromatic amino acids and their derivatives [J]. Journal of Langfang Teachers College (Natural Science Edition), 2021, 21(2): 27-34.
- [29] WANG J, LIU X. BCAA catabolic defect alters glucose metabolism in lean mice[J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 1140.
- [30] KIM D H, KIM S H, JEONG W S, et al. Effect of BCAA intake during endurance exercises on fatigue substances, muscle damage substances, and energy metabolism substances[J]. Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry, 2013, 17(4): 1-10.
- [31] 王良, 马清泉, 单安山, 等. 利用亮氨酸和赖氨酸设计新型 α -螺旋抗菌肽[J]. 微生物学通报, 2014, 41(2): 312-318.
- WANG L, MA Q Q, SHAN A S, et al. Design of new α -helical antimicrobial peptides using leucine and lysine[J]. Microbiology Bulletin, 2014, 41(2): 312-318.
- [32] FEVZIOGLU M, OZTURK O K, HAMAKER B R, et al. Quantitative approach to study secondary structure of proteins by FT-IR spectroscopy, using a model wheat gluten system[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 164(3): 2753-2760.
- [33] 罗亚惠, 卢福堂, 李博. 丝胶蛋白的氨基酸组成、结构及功能性质[J]. 食品工业科技, 2021, 42(6): 73-78.
- LUO Y H, LU F T, LI B. Amino acid composition, structure and functional properties of sericin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(6): 73-78.
- [34] 谭德勇. 氨基酸残基的空间效应对蛋白质 α -螺旋中氢键(HHB)稳定性的影响[J]. 云南师范大学学报:自然科学版, 1992, 12(3): 107-113.
- TAN D Y. The influence of the steric effect of amino acid residues on the stability of the hydrogen bond (HHB) in the α -helix of protein[J]. Journal of Yunan Normal University: Natural Science Edition, 1992, 12(3): 107-113.
- [35] 王中江, 张潇元, 隋晓楠, 等. 热处理大豆蛋白体外消化产物结构特征分析[J]. 食品科学, 2017, 38(1): 20-26.
- WANG Z J, ZHANG X Y, SUI X N, et al. Structural characteristics analysis of *in vitro* digestion products of heat-treated soybean protein [J]. Food Science, 2017, 38(1): 20-26.
- [36] TANG B Z, TAI P H, HUA B L, et al. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins[J]. Molecules, 2016, 21(1): 72.
- [37] 王辉, 郑淋, 赵谋明, 等. 热处理对金枪鱼肉体体外消化产物特性和抗氧化活性的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 68-75.
- WANG H, ZHENG L, ZHAO M M, et al. Effects of heat treatment on the characteristics of *in vitro* digestion products and antioxidant activity of tuna meat[J]. Chinese Journal of Food Science, 2021, 21(7): 68-75.
- [38] 郭佳垚, 张伟, 李倩倩, 等. 基于模拟胃消化对小米黄酒抗氧化活性的影响[J]. 中国酿造, 2021, 40(6): 109-112.
- GUO J Y, ZHANG W, LI Q Q, et al. Effects of simulated gastric digestion on the antioxidant activity of millet rice wine[J]. China Brewing, 2021, 40(6): 109-112.

Simulated Digestion of Fermented Wheat Germ Globulin *in Vitro*

Yuan Yongjian^{1,2}, Yu Guanghai^{1,2,4}, Liao Aimei^{1,2}, Pan Long^{1,2}, Huang Jihong^{1,2,3*}

¹School of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001

²Key of Wheat Biological Processing and Nutritional Function in Henan Province Laboratory, Zhengzhou 450001

³School of Food and Pharmacy, Xuchang University, Xuchang 461000, Henan

⁴Henan Feitian Agricultural Development Co. Ltd., Hebi 458000, Henan)

Abstract The changes of digestibility, microstructure, amino acid composition, secondary structure and antioxidant activity of fermented wheat germ globulin (FWG) at different digestion stages were evaluated based on simulated gastric and intestinal digestion *in vitro*. The results showed that the digestibility of FWG decreased from 55.43% to 34.33% and

9.54%, respectively, and the average particle size decreased from 100 nm to 50–70 nm and 20–30 nm, respectively. The relative molecular weight of undigested protein was stable around 15 ku. After 2 h digestion, the release of total free amino acids of FWG was 2.05 times that of the original sample, and the contents of aromatic amino acids and branched amino acids were significantly increased. Lysine and valine, which were associated with the stability of α -helix and β -fold, were dissociated at this stage and disorder increases. The hydroxyl radical scavenging rate of FWG was significantly increased by 32.76% after gastric digestion, and ABTS free radical scavenging rate and DPPH free radical scavenging rate showed a decreasing trend during gastric digestion. After intestinal digestion, the total free amino acid content of FWG tended to be stable, and the order of secondary structure increased. ABTS free radical scavenging rate, which reflects the antioxidant capacity of hydrophilic peptides, first decreased, then increased and then decreased during intestinal digestion. Hydroxyl free radical scavenging rate was positively correlated with the relative content of hydroxyl amino acids, first decreased, then increased, then decreased and finally increased. The scavenging trend of DPPH free radical was closely related to the content of hydrophobic amino acids. This study provided a preliminary theoretical basis for further understanding the physicochemical properties and functional mechanisms of FWG during intestinal and gastric digestion.

Keywords fermented wheat germ globulin; *in vitro* gastric and intestinal digestion simulation; amino acid analysis; antioxidant activity