

发酵豆渣上清液对高脂 HepG2 细胞糖脂代谢的影响

肖宇仪¹, 李鹏程¹, 刘子琦¹, 王钰博¹, 王秀娟¹, 朴春红^{2*}

(¹吉林农业大学食品科学与工程学院 长春 130118

²梧州学院 食品与制药工程学院 广西梧州 543002)

摘要 为减少豆渣资源的浪费,研究发酵豆渣上清液(FOS)的功能活性。以马克斯克鲁维酵母 C21 为发酵菌株,发酵豆渣制备 FOS。在分析 FOS 活性成分的基础上,评价其抗氧化能力和体外改善糖脂代谢紊乱的效果及机制。结果表明,FOS 中可溶性总糖、游离氨基酸和总酚的含量显著升高,相较于未发酵豆渣上清液(NFOS)分别提高了 13.52%,507.95%和 16.67%,且总抗氧化能力为 8.57 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$,比发酵前提升了 39.15%。油酸诱导的高脂 HepG2 细胞试验结果表明,与 NFOS 相比,FOS 的干预显著降低了细胞中的脂滴数量以及甘油三酯(25.39%)和总胆固醇(26.90%)含量,提高了细胞的葡萄糖消耗量(46.77%)和胞内糖原(51.29%)含量。免疫印迹结果显示,400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FOS 能够显著上调糖脂代谢相关蛋白的表达,PPAR α 、IRS1 和 GLUT4 与 NFOS 相比分别上调了 30.89%,127.16%和 22.84%。结论:FOS 能够显著改善油酸诱导的 HepG2 细胞糖脂代谢紊乱,通过激活 PPAR α 、IRS1 和 GLUT4 蛋白的表达,减少细胞内的脂质蓄积并增强细胞的葡萄糖摄取能力,说明 FOS 在预防和改善肥胖引起的高脂血症和 2 型糖尿病方面具有潜在作用。

关键词 发酵豆渣上清液; 马克斯克鲁维酵母; 抗氧化; HepG2 细胞; 糖脂代谢

文章编号 1009-7848(2025)02-0079-13 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.02.007

随着经济水平的高速发展,人们的生活水平也得到极大改善,随之而来的是逐年升高的肥胖率。肥胖产生的主要原因为行为问题造成的能量不平衡,次要原因包括遗传、内分泌和药物医源性以及心理因素^[1]。据世界卫生组织统计,肥胖被列为全球第五大死亡原因,然而其致死原因是增加了患多种慢性疾病的风险,包括心血管疾病、血脂异常、2 型糖尿病、非酒精性脂肪肝和某些癌症,其中由血脂异常引起的高脂血症以及胰岛素抵抗诱发的 2 型糖尿病发病率普遍较高^[2]。目前用于治疗高脂血症的药物主要为他汀类药物和胆汁酸螯合剂^[3],治疗 2 型糖尿病的药物主要为二甲双胍、噻唑烷二酮类药物和罗格列酮等^[4]。然而,这些药物会对人体产生多种不良反应,包括肌炎、肠胃不适和认知功能受损等^[5],亟需从天然植物中提取出具有改善高脂血症和 2 型糖尿病的有效成分。

豆渣是大豆加工生产过程中产生的副产物,

含水量较高,易腐烂不易储存,一般被用作动物饲料或直接丢弃,造成了极大的经济损失和环境污染^[6]。然而,豆渣中保留了很大一部分营养物质,含有丰富的不溶性膳食纤维和异黄酮等多种生物活性成分^[7],说明豆渣作为高营养的食品资源,在食品行业具有广大的开发前景和利用价值。为了更好地开发利用豆渣资源,有研究以豆渣为基质,接种益生菌发酵,显著提高了豆渣的适口性,营养成分和抗氧化活性^[8-9]。有研究表明,益生菌发酵可以提高豆渣中蛋白质、膳食纤维、氨基酸和游离糖的含量,发酵后的豆渣上清液具有潜在的抗氧化活性和降血脂功效,可以改善高脂肪饮食小鼠的脂质代谢,显著减轻小鼠体质量和脂肪组织质量^[10-11]。

马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 被广泛应用于食品工业和生物技术领域,其发酵的食品感官较好,具有重要的经济意义和发展前景^[12]。前期研究表明,使用马克斯克鲁维酵母 C21(*K. marxianus* C21)发酵豆渣后,上清液中的可溶性膳食纤维和游离氨基酸含量显著增加,具有潜在的生物活性^[13-14]。然而,发酵豆渣上清液的降脂能力和降糖能力并不明确,目前对此的研究较少。本研究使用油酸诱导 HepG2 细胞,建立体外高脂 HepG2 细胞模型,探究马克斯克鲁维酵母

收稿日期: 2024-02-22

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20210202107NC); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-04)

第一作者: 肖宇仪,女,硕士生

通信作者: 朴春红 E-mail: piaochunhong9111@163.com

C21 发酵豆渣上清液的活性成分变化及其对高脂 HepG 细胞糖脂代谢的影响。本研究旨在为马克斯克鲁维酵母 C21 发酵豆渣上清液改善糖脂代谢提供理论依据,为其在功能性食品行业中的开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆(黑河 43 号,黑龙江),山东圣丰种业有限公司。马克斯克鲁维酵母 C21 酵母菌由中国微生物保藏管理委员会(CGMCC,编号:13907,中国北京)保藏。人肝细胞肝癌细胞(HepG2 cells),i-Cell Bioscience(中国上海)。总抗氧化能力试剂盒、总甘油三酯试剂盒、总胆固醇试剂盒,中国南京建成生物工程研究所;葡萄糖试剂盒、糖原试剂盒、油红染色液、苏木精染色液,北京索莱宝科技有限公司;BCA 蛋白试剂盒,北京鼎国生物技术有限公司;CCK-8 细胞增殖试剂盒,上海百塞生物技术有限公司;油酸,美国 Sigma-Aldrich 生物公司;胰蛋白酶、DMEM 培养基,美国 Grand Island 生物公司;胎牛血清,美国 Omnimabs 生物公司; β -actin、PPAR α 抗体,美国 Santa Cruz 生物技术有限公司。IRS1、GLUT4 抗体,美国 Abcam 生物公司。

1.2 仪器与设备

ZWYR-2102C 电热恒温箱,上海智城分析仪器制造有限公司;SX-500 型立式压力蒸汽灭菌锅,日本 Tomy Koqyo 公司;N-1300 型真空旋转蒸发仪,日本东京理化器械株式会社;3K15 型高速冷冻离心机,德国 SIGMA 公司;VICTOR Nivo 型酶标仪,美国 PekinElmer 公司;Leica DM IL LED 型荧光倒置显微镜,德国徕卡公司;150i 型恒温 CO₂ 细胞培养箱,iBright CL1000 型智能成像系统,美国 Thermo 公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备 在豆渣中按料液比 1:5 加入蒸馏水制备成 pH 值为 4 的豆渣培养基,然后将豆渣培养基在立式压力蒸汽灭菌锅中 121 °C 灭菌 20 min,冷却至室温后接种体积分数 10% 的马克斯克鲁维酵母 C21 (10⁷ CFU/mL),在 35 °C 下发酵 60 h。同时,将未接种马克斯克鲁维酵母 C21 的豆渣

在同一条件下进行培养。培养结束后 121 °C 灭菌 20 min,12 000 r/min 离心 10 min 后,收集发酵豆渣上清液(Fermented okara supernatant, FOS)和未发酵豆渣上清液(Non-fermented okara supernatant, NFOS),旋转蒸发至液体黏稠后冷冻干燥,制备成试验样品并计算得率。

1.3.2 活性成分检测 按照下列方法,对 NFOS 和 FOS 中可溶性总糖、还原糖、可溶性蛋白、游离氨基酸、总黄酮和总酚等活性物质含量进行检测。

1.3.2.1 可溶性总糖含量的测定 使用硫酸苯酚法测定 NFOS 和 FOS 中的可溶性多糖含量^[15]。在 2 mL 标准葡萄糖溶液和样品溶液中加入 1 mL 苯酚(6%)和 5 mL 浓硫酸,混合静置 30 min 后于波长 490 nm 处测量吸光度。

1.3.2.2 还原糖含量测定 使用 3,5 二硝基水杨酸比色法(DNS)测定 NFOS 和 FOS 中的还原糖含量^[16]。在 1 mL 标准葡萄糖溶液和样品溶液中加入 1 mL DNS 试剂,混匀后沸水浴 5 min,冷却后加入 8 mL 蒸馏水,于波长 540 nm 处测量吸光度。

1.3.2.3 可溶性蛋白含量测定 使用 BCA 试剂盒测定 NFOS 和 FOS 中的可溶性蛋白含量。

1.3.2.4 游离氨基酸含量测定 使用茚三酮法测定 NFOS 和 FOS 中的游离氨基酸含量^[17]。在 1 mL 样品溶液和标准氨基酸溶液中加入 3 mL 水合茚三酮和 0.1 mL 抗坏血酸,加塞密封沸水浴 15 min,取出后冷水浴至红色褪去,呈蓝紫色时用 60%乙醇定容至 20 mL,于波长 570 nm 处测定吸光度值。

1.3.2.5 总黄酮含量测定 使用 AlCl₃ 比色法测定 NFOS 和 FOS 中的总黄酮含量^[18]。在 1.0 mL 芦丁标准液和样品液中加入 0.15 mL NaNO₂ (5%),静置 6 min 后加入 0.15 mL AlCl₃ (10%),再次静置 6 min,加入 1 mL NaOH(4%)后用 95%乙醇定容至 5 mL,混匀静置 15 min 后于波长 510 nm 处测定吸光度。

1.3.2.6 总酚含量测定 使用 Folin-Ciocalteu 法测定 NFOS 和 FOS 中的总酚含量^[18]。在 0.5 mL 没食子酸标准液和样品溶液中加入 0.5 mL 福林酚试剂和 1 mL Na₂CO₃ (15%),静置 30 min 后 3 000 r/min 离心 3 min,吸取上清液于波长 760 nm 处测

定吸光度。

1.3.3 抗氧化活性测定 参考已发表报告^[19-20]中的方法,加以修改后对 NFOS(0.1~1 mg/L)和 FOS(0.1~1 mg/L)进行抗氧化活性检测,每组试验设置3组平行,以 VC 为阳性对照。

1.3.3.1 ABTS 阳离子自由基清除率 将 ABTS(7.4 mmol/L)溶液与 $K_2S_2O_8$ (2.6 mmol/L)溶液按体积比 1:1 混合,避光静置 12 h 后用 PBS(pH 7.4)稀释至溶液在波长 734 nm 处吸光度为 0.7 ± 0.02 ,得到 ABTS 工作液。将 0.5 mL 样品液与 0.5 mL ABTS 工作液混合后反应 6 min,于波长 734 nm 处测定吸光度值。按式(1)计算 NFOS 和 FOS 对 ABTS 阳离子自由基的清除率。

$$\text{ABTS 阳离子清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_3] \times 100 \quad (1)$$

式中: A_1 为试验组的吸光度; A_2 为等量 PBS 代替 ABTS 工作液的吸光度; A_3 为等量双蒸水代替样品溶液吸光度。

1.3.3.2 DPPH 自由基清除率 0.5 mL 样品溶液与 1.5 mL DPPH(80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)乙醇溶液混合后室温避光反应 30 min,于波长 517 nm 处测定吸光度值。按式(2)计算 NFOS 和 FOS 对 DPPH 自由基的清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (B_1 - B_2) / B_3] \times 100 \quad (2)$$

式中: B_1 为试验组的吸光度; B_2 为等量无水乙醇代替 DPPH 工作液的吸光度; B_3 为等量双蒸水代替样品溶液吸光度。

1.3.3.3 超氧阴离子清除率 0.4 mL 样品液中加入 1.2 mL Tris-HCl(pH 8.2, 50 mmol/L),混匀后 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 min,加入 0.2 mL 邻苯三酚(25 mmol/L)反应 5 min 后滴加 20 μL HCl(8 mol/L)终结反应,于波长 420 nm 处测定吸光度值。按式(3)计算 NFOS 和 FOS 对超氧阴离子的清除率。

$$\text{超氧阴离子清除率}(\%) = [1 - (C_1 - C_2) / C_3] \times 100 \quad (3)$$

式中: C_1 为试验组的吸光度; C_2 为等量双蒸水代替邻苯三酚溶液的吸光度; C_3 为等量双蒸水代替样品溶液吸光度。

1.3.3.4 羟自由基清除活性 0.5 mL 样品溶液中加入 0.5 mL FeSO_4 (9 mmol/L)、0.5 mL 乙醇-水杨

酸(6 mmol/L)和 0.5 mL H_2O_2 (8.8 mmol/L),混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min,于波长 517 nm 处测量吸光度值。按式(4)计算 NFOS 和 FOS 对羟自由基的清除率。

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = [1 - (D_1 - D_2) / D_3] \times 100 \quad (4)$$

式中: D_1 为试验组的吸光度; D_2 为等量无水乙醇代替乙醇-水杨酸溶液的吸光度; D_3 为等量双蒸水代替样品溶液吸光度。

1.3.3.5 总抗氧化能力测定 NFOS 和 FOS 的总抗氧化能力按照总抗氧化能力试剂盒说明书进行测定。

1.3.4 细胞培养 HepG2 细胞在完全培养基(DMEM,添加 10% FBS、1%青霉素和链霉素)中培养,培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 。当细胞生长至密度为 80%~90%时,弃去培养液,用 PBS 冲洗干净培养皿中剩余的细胞培养液。然后用含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶消化细胞 90 s,再用 2 倍体积的完全培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min 后传代。

1.3.5 细胞活性检测 细胞消化后计数,稀释成浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液,100 μL 每孔接种到 96 孔板中。细胞培养 24 h 后吸出培养基,用 PBS 清洗 2 次,并用不同剂量的样品处理 24 h(NFOS 和 FOS:50, 100, 200, 400, 800, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 油酸(OA):0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0 mmol/L)。对照组用 DMEM 培养基代替样品。培养 24 h 后弃去含有样品的培养基,在每个孔中加入 100 μL 含 10% CCK-8 的 DMEM 培养基并孵育 2 h。在波长 450 nm 处测量每个孔的吸光值(OD),每个浓度设置 6 个重复孔。

1.3.6 高脂 HepG2 细胞模型建立 高脂 HepG2 细胞模型由油酸耦合脂蛋白(OA-BSA)溶液诱导构建。在 6 mL NaOH(100 mmol/L)溶液中加入 38 μL 油酸(OA)并在 75 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴皂化 30 min,制备成 20 mmol/L 的 OA 溶液。在 5 mL PBS 中加入 1.2 g 牛血清白蛋白(BSA),55 $^{\circ}\text{C}$ 助溶 30 min,定容至 6 mL 制备成 20 mmol/L 的 BSA 溶液。将 20 mmol/L 的 OA 溶液和 20 mmol/L 的 BSA 溶液按体积比 1:1 混合,制备成 10 mmol/L 的 OA-BSA 溶液。建模时用 DMEM 培养基稀释至 0.3 mmol/L。

1.3.7 检测高脂 HepG2 细胞中与肝损伤和糖脂代谢有关的生物标记物 将 HepG2 细胞以 1×10^5 / mL 的密度接种到 6 孔板中培养 24 h, 然后用 0.3 mmol/L OA 诱导 24 h。建模成功后用含 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NFOS 和 FOS 的 DMEM 培养基干预 24 h。收集细胞后在冰浴条件下 400 W 超声破碎 5 s, 停顿 5 s, 重复 30 次。将细胞破碎液在 12 000 r/min 离心 30 min 后收集上清液。细胞中谷丙转氨酶、谷草转氨酶和乳酸脱氢酶的活性以及甘油三酯、总胆固醇、葡萄糖消耗量和胞内糖原含量按照试剂盒说明进行测定。按照 BCA 试剂盒的说明测定上清液中的蛋白质含量。

1.3.8 油红 O 染色 用油红 O 染液对细胞进行染色, 以观察细胞内的脂质积累。按照 1.3.5 节中的方法在 24 孔板中培养细胞, 干预结束后每孔细胞用 PBS 冲洗 3 次并用 60% 异丙醇快速冲洗 20 s, 然后用油红 O 染液在室温下避光染色 20 min。染色后弃去染色液, 每孔用蒸馏水冲洗 5 次, 每次 1 min。最后, 用 Mayer 苏木精染色液快速染色 30 s, 并用自来水冲洗 5 次, 去除多余水分后使用荧光倒置显微镜进行染色观察。此外, 每孔加入 1 mL 异丙醇 (100%), 在室温下静置 10 min, 充分溶解细胞中的油红 O 染液后在 510 nm 波长下测量各孔的吸光度。

1.3.9 蛋白表达水平检测 在收集好的各组细胞中加入 300 μL RIPA 裂解液, 冰上裂解 15 min 后 12 000 r/min 离心 30 min, 收集上清液。使用 BCA 试剂盒测定裂解上清液中蛋白质的含量。蛋白在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 上分离后转移到 PVDF 膜上。用 5% BSA 溶液室温封闭 1.5 h 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育一抗 12 h, 一抗结束后于 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育二抗 1.5 h。蛋白条带用智能成像系统曝光显影, 并用 Image J 软件量化蛋白表达。蛋白相对表达量是目标蛋白表达量与 β -actin 表达量之比。

1.4 数据处理

所有试验重复 3 次, 结果均以平均值 \pm 标准差表示, 使用 SPSS 27.0 软件进行数据处理。使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘制图表, 其中 $P < 0.05$ 表示样本间具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 发酵对豆渣上清液中活性成分的影响

本研究测定了 NFOS 和 FOS 中可溶性总糖、还原糖、可溶性蛋白、游离氨基酸、总黄酮和总酚 6 种基本活性成分的含量。结果显示, 发酵显著提高了豆渣上清液中可溶性总糖和游离氨基酸以及总酚的含量。其中总糖的含量变化较为显著, 这与之前的研究一致^[13], 说明马克斯克鲁维酵母 C21 的发酵降解了豆渣中的不溶性膳食纤维, 使其转化成可溶性膳食纤维。同时 FOS 中游离氨基酸含量的显著提高和还原糖含量的显著降低, 说明豆渣培养基为马克斯克鲁维酵母 C21 提供了良好的生长环境, 细胞代谢水平较高。成分含量的具体变化见表 1。

表 1 NFOS 和 FOS 基本活性成分含量
Table 1 Basic active ingredients content
in NFOS and FOS

	NFOS	FOS
得率/%	10.57 \pm 0.10 ^b	12.26 \pm 0.04 ^a
可溶性总糖/(mg/g)	435.53 \pm 0.25 ^b	494.42 \pm 1.22 ^a
还原糖/(mg/g)	138.30 \pm 0.40 ^a	39.61 \pm 0.78 ^b
可溶性蛋白/(mg/g)	105.13 \pm 1.21 ^a	97.23 \pm 0.91 ^b
游离氨基酸/(mg/g)	0.88 \pm 0.11 ^b	5.35 \pm 0.12 ^a
总黄酮/(mg RE/g)	9.14 \pm 0.46 ^a	8.81 \pm 0.64 ^a
总酚/(mg GAE/g)	3.24 \pm 0.11 ^b	3.78 \pm 0.12 ^a

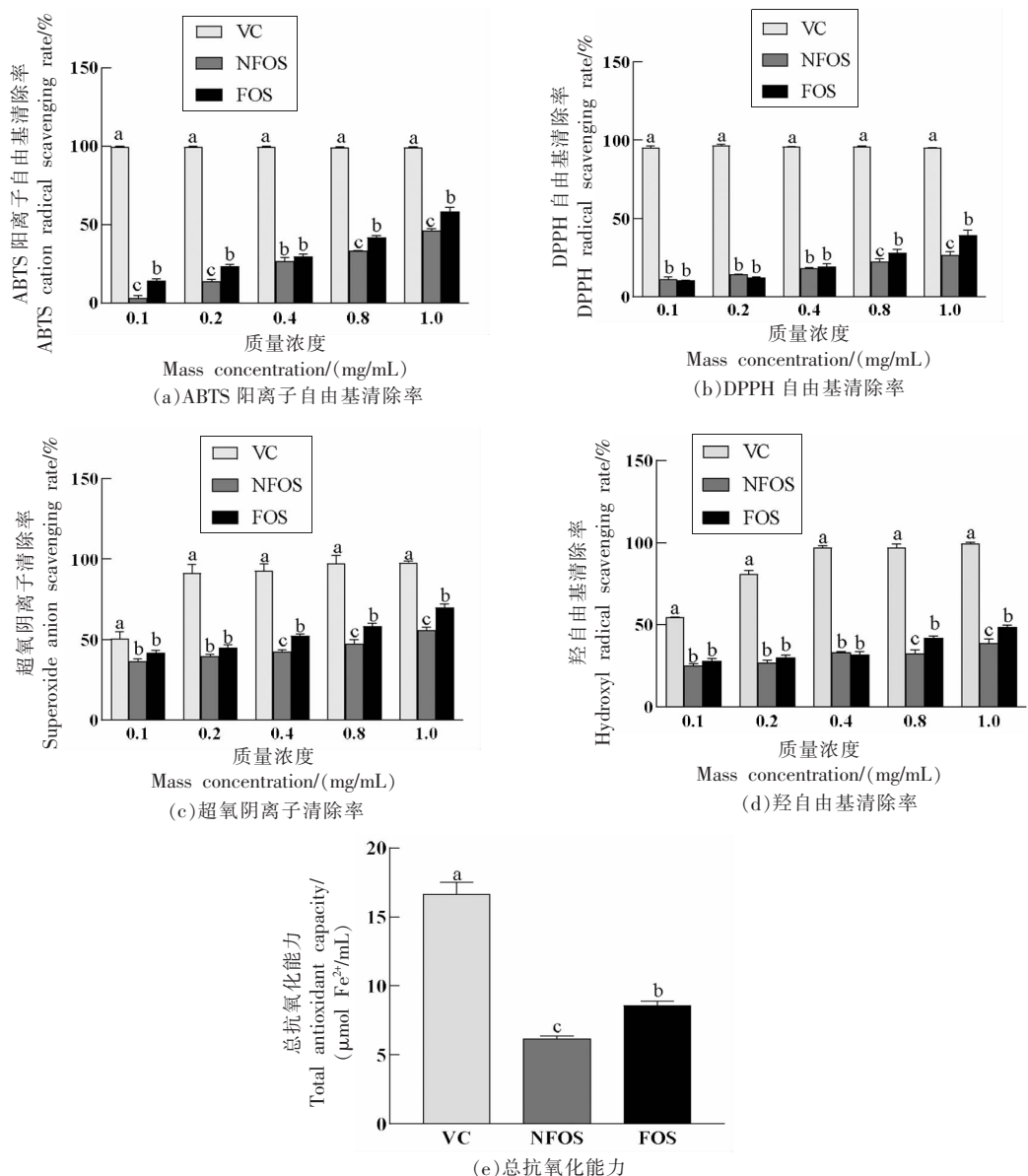
注: 数值以平均值 \pm 标准差表示 ($n=3$), 同一行中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 发酵提高了豆渣上清液的抗氧化活性

在表 1 所示的结果中可以看到发酵显著提高了 FOS 中的总糖, 游离氨基酸和总酚含量, 而这些成分均已被证实具有优异的抗氧化活性, 尤其是酚类化合物, 植物中的抗氧化活性通常得益于其中含有的酚类化合物^[21]。因此本研究测定了 NFOS 和 FOS 对 ABTS 阳离子自由基、DPPH 自由基、超氧阴离子和羟自由基的清除能力, 并测定了二者的总抗氧化能力。由图 1 可知, 随着 NFOS 和 FOS 质量浓度的增加, 其对自由基的清除率也在升高。与 NFOS 相比, 发酵显著提升了 FOS 的抗氧化活性 ($P < 0.05$), 这一变化在样品质量浓度大于 0.4 mg/mL 时表现得更为明显。在 FOS 质量浓度为 1 mg/mL 时, 对 ABTS 阳离子自由基、DPPH 自由

基、超氧阴离子和羟自由基的清除率分别为 58.26%, 39.34%, 69.88% 和 48.45%。同时, 本文还测定了 NFOS 和 FOS 的总抗氧化能力, 相较于于

NFOS, FOS 的总抗氧化能力提高了 39.15%, 为 $8.57 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mL}$ 。



注: 不同字母表示样本间差异显著 ($P < 0.05$); e 图中, VC、NFOS 和 FOS 的质量浓度为 1 mg/mL 。

图 1 NFOS 和 FOS 的抗氧化能力

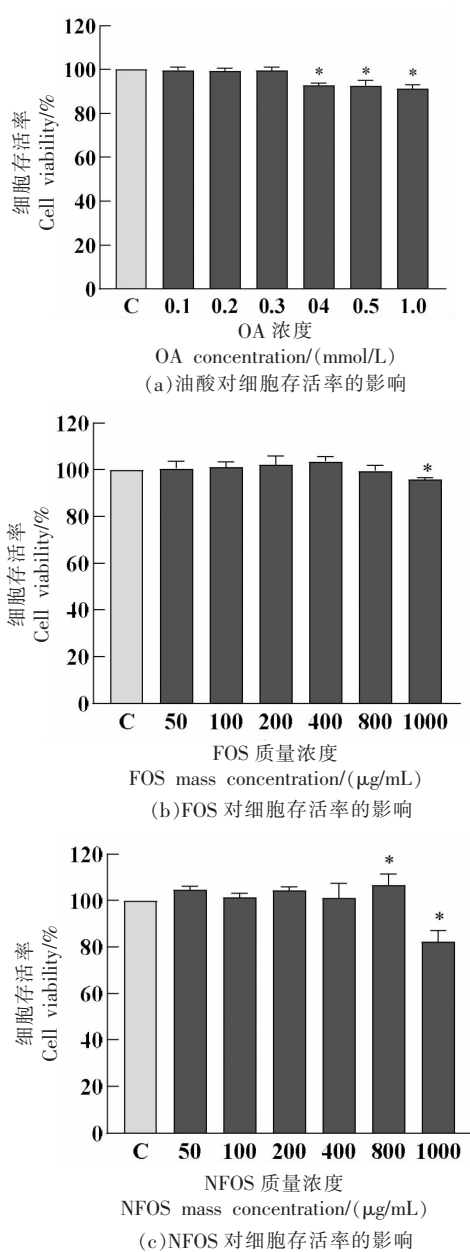
Fig.1 Antioxidant capacity of NFOS and FOS

2.3 NFOS 和 FOS 对 HepG2 细胞活性的影响

使用不同剂量的油酸、NFOS 和 FOS 干预 HepG2 细胞, 24 h 后用 CCK-8 检测法检测其对细胞存活率的影响。结果如图 2 所示, 0.3 mmol/L 以上的油酸会对细胞存活率产生微弱的影响, 因此,

选择浓度为 0.3 mmol/L 的油酸作为高脂 HepG2 细胞建模的浓度。同样的, NFOS 和 FOS 的干预质量浓度选择 $100, 200, 400 \mu\text{g/mL}$ 。

2.4 NFOS 和 FOS 对 HepG2 细胞肝功能的影响
谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 和乳酸



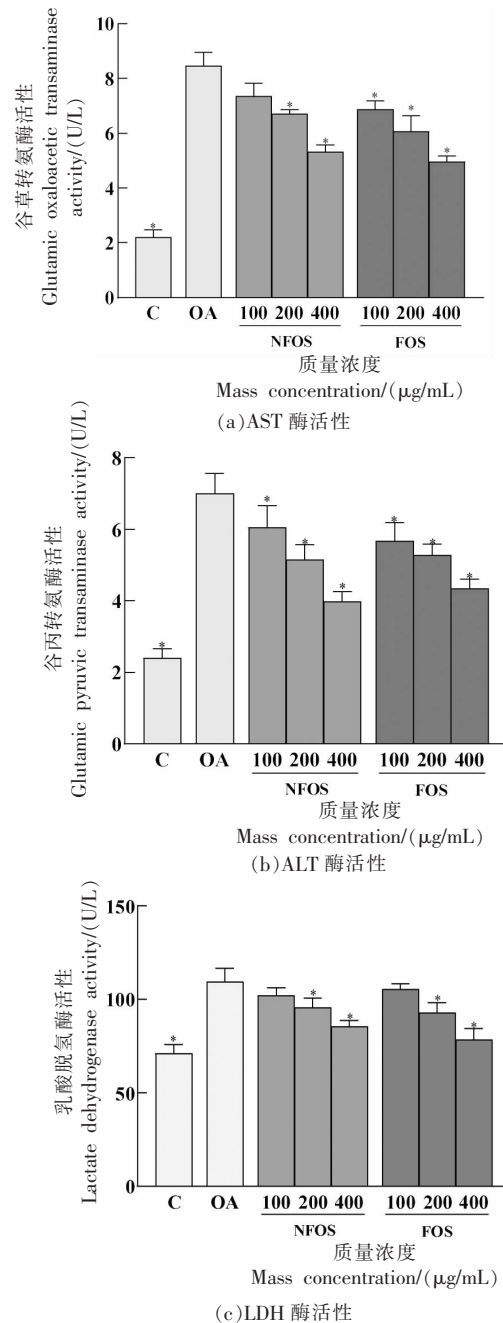
注:C为对照组;“*”表示组间差异显著($P < 0.05$)。

图2 OA、NFOS和FOS的细胞毒性

Fig.2 Cytotoxicity of OA, NFOS, and FOS

脱氢酶(LDH)的水平高、低是评价细胞肝功能是否受损的常规指标^[22]。在细胞受损时,细胞膜的通透性增加,细胞内的AST、ALT和LDH发生外溢会导致细胞培养基中这3种酶的酶活增高。图3中,油酸的干预显著升高了培养基中AST、ALT和LDH的含量($P < 0.05$),证明在油酸的诱导下,HepG2细胞发生了明显的细胞损伤。在经过

NFOS和FOS干预后,细胞损伤被修复,细胞培养基中AST、ALT和LDH的含量和酶活恢复到正常水平($P < 0.05$)。同剂量NFOS和FOS对细胞功能的修复效果没有显著性差异。



注:C为正常对照组;OA为模型对照组;“*”表示与模型对照相比, $P < 0.05$ 。

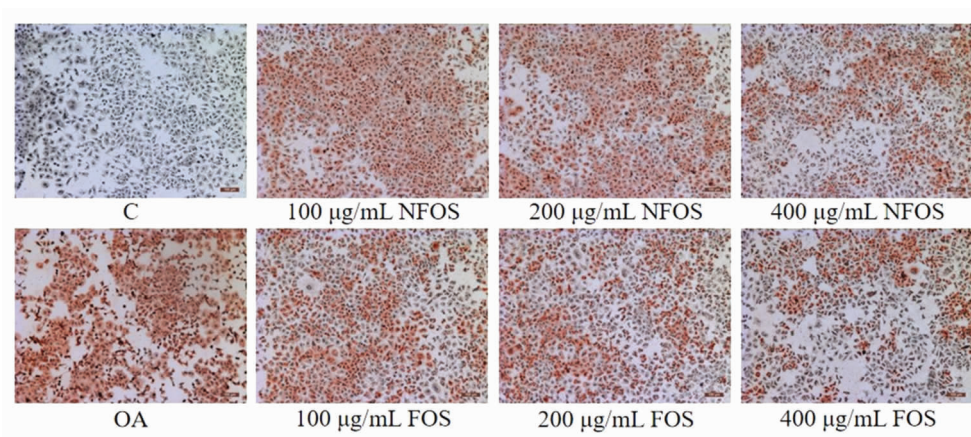
图3 NFOS和FOS对HepG2细胞肝功能的影响

Fig.3 Effects of NFOS and FOS on liver function in HepG2 cells

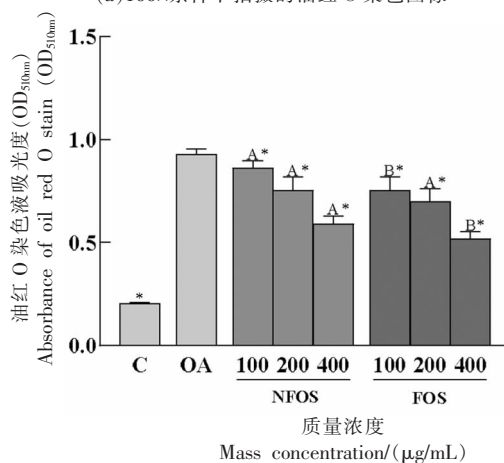
2.5 NFOS 和 FOS 对高脂 HepG2 细胞脂质蓄积的影响

使用油红 O 染液对 HepG2 细胞进行染色,观察细胞中脂质蓄积的情况。在图 4a 中可以观察

到,油酸干预后细胞中的脂质含量增加,油红染色面积增加。经过 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NFOS 和 FOS 的干预,细胞中的油红染色含量减少,并且在 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下,FOS 的改善效果显著优于 NFOS($P < 0.05$)。



(a)100 \times 条件下拍摄的油红 O 染色图像



(b)油红 O 染色吸光度

注:C 为正常对照组;OA 为模型对照组;“*”表示与模型对照相比, $P < 0.05$;不同的大写字母表示在相同质量浓度的不同样本中差异显著($P < 0.05$)。

图 4 NFOS 和 FOS 对 HepG2 细胞脂质蓄积的影响

Fig.4 Effects of NFOS and FOS on lipid accumulation in HepG2 cells

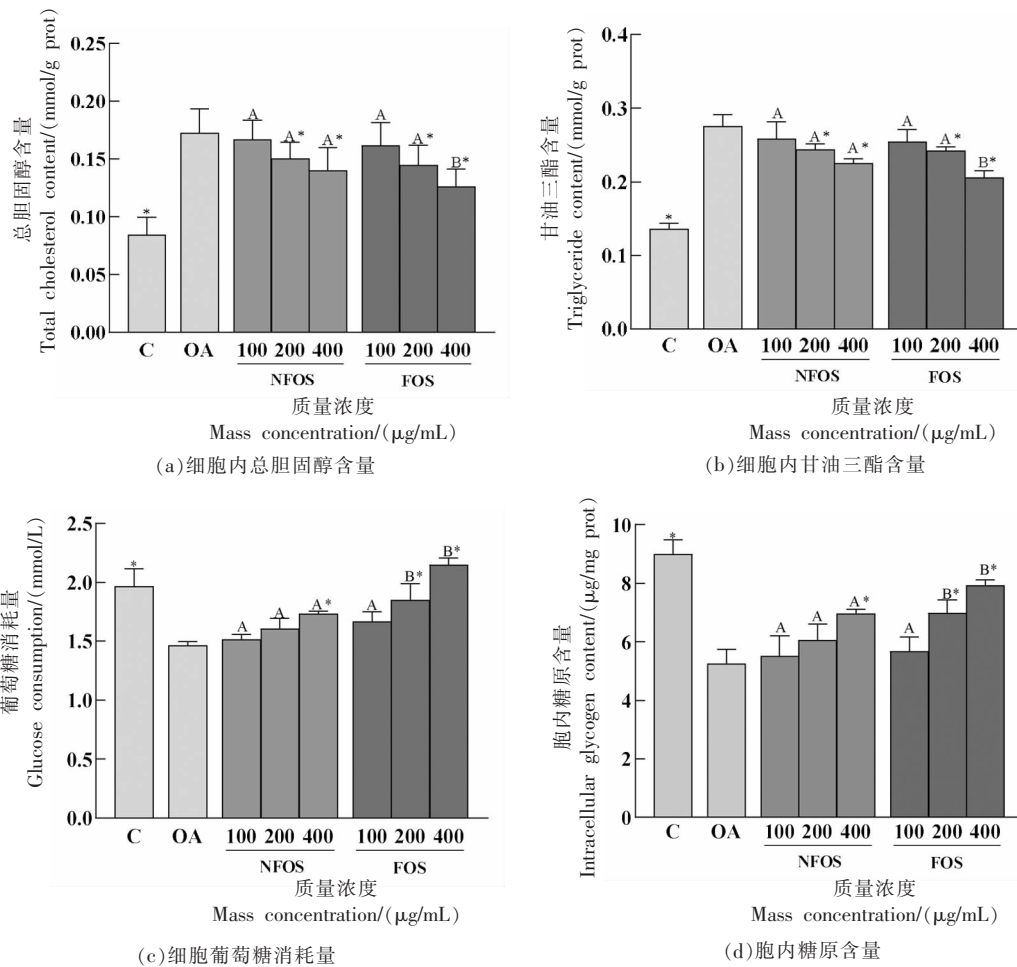
2.6 NFOS 和 FOS 对高脂 HepG2 细胞糖脂代谢相关指标的影响

NFOS 和 FOS 对油酸引起的 HepG2 细胞糖脂代谢紊乱的改善作用如图 5 所示。在油酸的诱导下,细胞脂肪酸生物合成增加,甘油三酯和总胆固醇的含量显著升高,与之相随的是,细胞糖代谢受损,脂质的蓄积阻碍了葡萄糖的氧化消耗,减少细胞中的糖原合成。由图 5 可知,NFOS 和 FOS 对细胞糖脂代谢相关指标的改善作用呈剂量依赖,在质量浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,NFOS 和 FOS 都表现

出了最佳的改善作用,其中 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FOS 的改善效果更为显著($P < 0.05$)。400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FOS 处理细胞的总胆固醇含量和甘油三酯含量分别下降了 26.90%和 25.39%,而细胞葡萄糖消耗量和糖原含量分别上升了 46.77%和 51.30%,证明 FOS 可以显著改善油酸导致的细胞糖脂代谢受损。

2.7 NFOS 和 FOS 对 HepG2 细胞糖脂代谢相关蛋白的影响

为了进一步探究 FOS 对细胞糖脂代谢的改善机制,对细胞糖脂代谢的相关蛋白如 PPAR α 、



注:C为正常对照组;OA为模型对照组;“*”表示与模型对照相比, $P < 0.05$;不同的大写字母表示在相同质量浓度的不同样本中差异显著($P < 0.05$)。

图5 NFOS和FOS对HepG2细胞糖脂代谢的影响

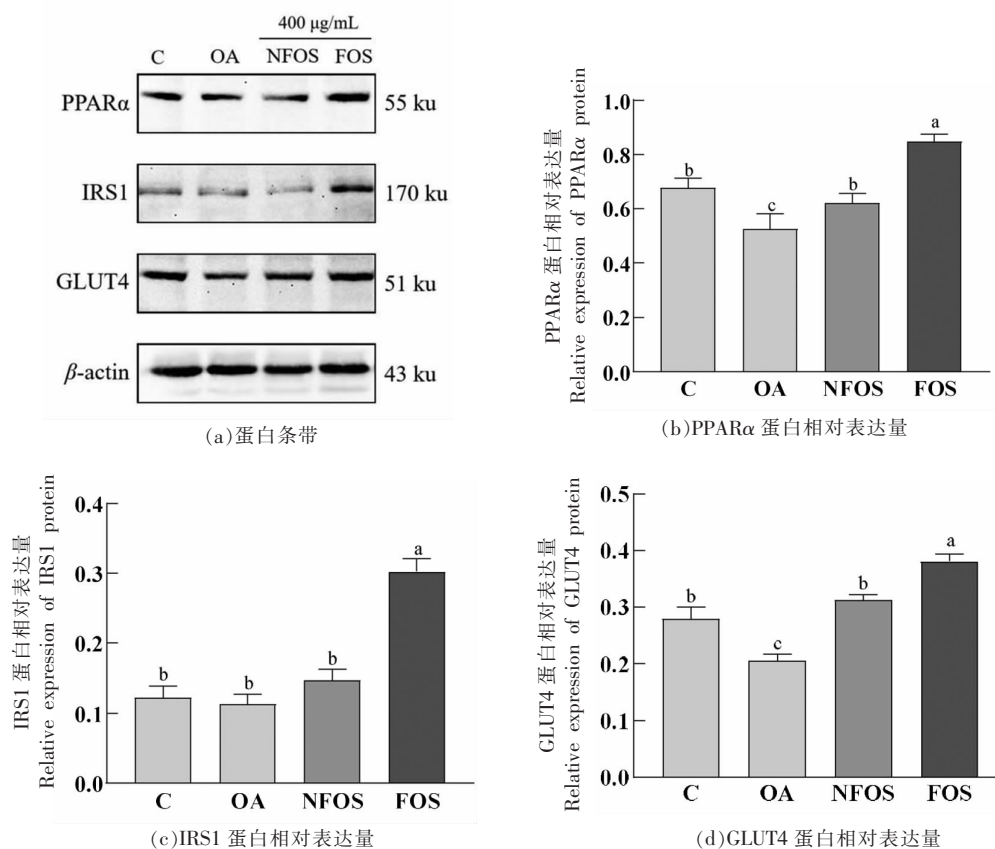
Fig.5 Effects of NFOS and FOS on glucose and lipid metabolism in HepG2 cells

IRS1和GLUT4的表达水平进行了检测,结果见图6。由图6可知,OA干预后,PPAR α 蛋白和GLUT4蛋白的表达显著降低,同时OA对IRS1蛋白并未产生显著的影响。并且在400 $\mu\text{g/mL}$ NFOS和400 $\mu\text{g/mL}$ FOS的干预下,PPAR α 和GLUT4蛋白的表达均有显著上调,然而400 $\mu\text{g/mL}$ NFOS对IRS1蛋白产生的影响微乎其微。与400 $\mu\text{g/mL}$ NFOS相比,400 $\mu\text{g/mL}$ FOS不仅更显著上调了PPAR α 和GLUT4蛋白的表达,还上调了IRS1的表达($P < 0.05$),这证明FOS在对糖脂代谢相关蛋白的调节上更胜一筹。

3 讨论

肝脏糖脂代谢紊乱被认为是多种慢性疾病发

病的关键因素之一,包括肥胖、血脂异常、胰岛素抵抗和2型糖尿病等^[23]。当肝脏长期处于糖脂代谢紊乱的状态时,会加速肝脏甘油三酯和胆固醇的合成,减少肝糖原合成和葡萄糖消耗,从而引发肝脏脂质累积、脂肪变性和肝糖代谢损伤^[24]。然而,目前用来治疗这些病症的药物对人体副作用大且成本高昂,因此需要从天然产物中开发出具有改善肝脏糖脂代谢紊乱的功能性成分。目前的研究表明,发酵豆浆^[25]、发酵辣木^[26]和发酵麦麸^[27]均能显著改善试验对象的肝脏脂质代谢异常,调节肝脏脂质代谢相关蛋白如PPAR α 、SREBP-1和FAS的表达。同时,发酵豆渣也被发现除了能改善小鼠便秘外,还具有改善高脂饮食小鼠肥胖的潜在功能^[28]。然而,目前对发酵豆渣改善糖脂代谢的



注: C 为正常对照组; OA 为模型对照组; 不同字母表示样本间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 NFOS 和 FOS 对 HepG2 细胞糖脂代谢相关蛋白的影响

Fig.6 Effects of NFOS and FOS on glucose and lipid metabolism related proteins in HepG2 cells

研究并不多见,其对肝脏糖脂代谢紊乱的改善作用并不明确。前期的研究表明豆渣在经过马克斯克鲁维酵母 C21 发酵后,豆渣中的可溶性多糖和游离氨基酸含量明显增加^[13],并且有研究发现米根霉菌发酵后,豆渣中的粗多糖含量与 γ -氨基丁酸含量有所增加,具有潜在的降血糖功能^[29]。本研究与此相似,在经过 60 h 的发酵后,豆渣上清液中的可溶性多糖和游离氨基酸的含量显著增加,相较于未发酵组分别增加了 13.52% 和 507.95%,并且发现,发酵显著提高了豆渣上清液的总抗氧化能力,与未发酵组相比提高了 39.15%。这些发现证明 FOS 可能具有潜在的生理功能,因此,本研究选择培养简单且遗传稳定 HepG2 细胞系,用 0.3 mmol/L 油酸诱导 HepG2 细胞建立体外高脂细胞模型,探究发酵豆渣上清液 (FOS) 对高脂 HepG2 细胞糖脂代谢紊乱的改善机制。

PPAR 家族在代谢和炎症中起着主要的调节作用,主要在肝脏和脂肪组织中表达。其中 PPAR α 是脂质代谢相关基因的主要调节因子,通过调节下游蛋白 SCD-1 和 LXR α 的表达调控脂肪酸代谢、胆汁酸生物合成和甘油磷脂代谢,与 PPAR β 和 PPAR γ 协同作用调控脂代谢^[30]。并且,PPAR α 的表达可以促进脂质利用,减少肝脏中的脂质生成,降低肝脏甘油三酯和胆固醇的水平^[31]。在本研究中,400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FOS 显著提高了 PPAR α 的表达,与 NFOS 相比提高了 30.89%,PPAR α 表达的增加减少了细胞的脂肪生成和脂质累积,具体表现为油红染色着色面积减少以及甘油三酯、总胆固醇含量降低。与本研究相似的是,番茄红素通过刺激 PPAR α 增强脂肪分解,抑制了棕榈酸诱导的 HepG2 细胞和高脂饮食小鼠肝脏的脂质累积^[32]。

肥胖致使的胰岛素抵抗是诱发二型糖尿病的重要原因,作为转接蛋白的重要一员,IRS1调控着细胞的生长与代谢,当机体处于正常生理状态时,胰岛素与其受体结合并激活 IRS1,增强 IRS1 表达和磷酸化,从而触发 GLUT4 易位,增加细胞内的葡萄糖摄取^[33]。因此 IRS1 在对细胞糖代谢的调控上发挥着重要作用。GLUT4 作为 GLUT 家族中的重要一员,易位后的 GLUT4 蛋白会在细胞膜上形成跨膜蛋白,将胞外葡萄糖运送至胞内,维持机体糖代谢平衡。此外,骨骼肌特异性 GLUT4 蛋白降解会损害细胞的葡萄糖摄取能力并促进肝脏糖异生^[34]。同时有研究发现,七叶苷通过激活 IRS1/PI3K/AKT/GLUT4 通路来改善肥胖诱导的胰岛素抵抗,增加 GLUT4 易位恢复肥胖小鼠受损的葡萄糖摄取能力^[35]。在本研究中油酸的诱导和 400 $\mu\text{g/mL}$ NFOS 的干预并未对 IRS1 蛋白的表达产生显著的影响,而 400 $\mu\text{g/mL}$ FOS 的干预显著上调了 IRS1 蛋白的表达,其表达与 NFOS 组相比增加了 127.16%,同样的,在 FOS 的干预下,细胞中 GLUT4 蛋白的表达与 NFOS 组相比提高了 22.84%,这证明 FOS 具备更优秀的糖代谢调节能力,可以更有效地改善油酸导致的 HepG2 细胞糖代谢异常。

研究表明,400 $\mu\text{g/mL}$ FOS 不论是抗氧化活性还是体外改善高脂 HepG2 细胞糖脂代谢紊乱,其效果都显著优于 NFOS。通过激活 PPAR α 、IRS1 和 GLUT4 蛋白表达,减少细胞中甘油三酯和胆固醇的含量,并恢复了细胞受损的葡萄糖摄取能力,增加了葡萄糖消耗量和胞内糖原含量。

4 结论

马克斯克鲁维酵母 C21 发酵豆渣上清液中,可溶性总糖、游离氨基酸和总酚的含量显著提高的同时,其抗氧化活性也显著提高。同时,FOS 显著改善了油酸诱导的高脂 HepG2 细胞的糖脂代谢紊乱,可能通过上调 PPAR α 的表达来减少细胞中甘油三酯和总胆固醇的堆积。此外,FOS 还可能通过激活 IRS1 致使 GLUT4 易位,从而恢复高脂细胞受损的葡萄糖摄取能力。本研究为豆渣资源的开发再利用提供了研究基础,并为拓宽发酵豆渣上清液在功能性食品行业中的应用提供了理论

依据。

参 考 文 献

- [1] TUTOR A W, LAVIE C J, KACHUR S, et al. Updates on obesity and the obesity paradox in cardiovascular diseases [J]. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2023, 78: 2–10.
- [2] SAFAEI M, SUNDARARAJAN E A, DRISS M, et al. A systematic literature review on obesity: Understanding the causes & consequences of obesity and reviewing various machine learning approaches used to predict obesity [J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2021, 136: 104754.
- [3] MAHAMUNI S P, KHOSE R D, MENAA F, et al. Therapeutic approaches to drug targets in hyperlipidemia [J]. *BioMedicine*, 2012, 2(4): 137–146.
- [4] 刘柔, 冷玉琳, 贾华楠, 等. 2 型糖尿病治疗药物对饥饿素影响的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(9): 2357–2361.
- [5] LIU R, LENG Y L, JIA H N, et al. Research progress on the effect of type 2 diabetes mellitus therapeutic drugs on starvation hormone [J]. *Modern Drugs and Clinics*, 2023, 38(9): 2357–2361.
- [6] PARASKEVAS K I, GLOVICZKI P, ANTIGNANI P L, et al. Benefits and drawbacks of statins and non-statin lipid lowering agents in carotid artery disease [J]. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 2022, 73: 41–47.
- [7] PRIVATTI R T, RODRIGUES C E D C. An overview of the composition, applications, and recovery techniques of the components of okara aimed at the biovalorization of this soybean processing residue [J]. *Food Reviews International*, 2023, 39(2): 726–749.
- [8] EZE O F, CHATZIFRAGKOU A, CHARALAMPOPOULOS D. Properties of protein isolates extracted by ultrasonication from soybean residue (okara) [J]. *Food Chemistry*, 2022, 368: 130837.
- [9] SHI H, ZHANG M, WANG W Q, et al. Solid-state fermentation with probiotics and mixed yeast on properties of okara [J]. *Food Bioscience*, 2020, 36: 100610.
- [10] CHAN L Y, TAKAHASHI M, LIM P J, et al. *Eurotium cristatum* fermented okara as a potential food

- ingredient to combat diabetes[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 17536.
- [10] MOK W K, TAN Y X, CHEN W N. Evaluating the potential of *Bacillus subtilis* fermented okara as a functional food ingredient through *in vitro* digestion and fermentation[J]. *Food Biotechnology*, 2021, 35(2): 136–157.
- [11] ICHIKAWA N, NG L S, MAKINO S, et al. Solid-state fermented okara with *Aspergillus* spp. improves lipid metabolism and high-fat diet induced obesity [J]. *Metabolites*, 2022, 12(3): 198.
- [12] 王靓贤, 贾曼, 李科先, 等. 酿酒酵母及马克斯克鲁维酵母生理特性及应用研究[J]. *云南农业科技*, 2023(3): 11–16.
- WANG L X, JIA M, LI K X, et al. Physiological characterization and application of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Yunnan Agricultural Science and Technology*, 2023(3): 11–16.
- [13] HU Y, PIAO C H, CHEN Y, et al. Soybean residue (okara) fermentation with the yeast *Kluyveromyces marxianus*[J]. *Food Bioscience*, 2019, 31: 100439.
- [14] ZHANG L, YUE Y, WANG X J, et al. Optimization of fermentation for γ -aminobutyric acid (GABA) production by yeast *Kluyveromyces marxianus* C21 in okara (soybean residue)[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2022, 45(7): 1111–1123.
- [15] 王彦平, 娄芳慧, 陈月英, 等. 苯酚-硫酸法测定紫山药多糖含量的条件优化[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(4): 170–174.
- WANG Y P, LOU F H, CHEN Y Y, et al. Optimization of conditions for the determination of polysaccharides in purple yam by phenol-sulfuric acid method [J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(4): 170–174.
- [16] 余丽梅, 向平, 叶丽娟, 等. 四种水果中还原糖含量的测定与分析[J]. *广东化工*, 2021, 48(16): 243–244.
- YU L M, XIANG P, YE L J, et al. Determination and analysis of reducing sugars in four kinds of fruits [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2021, 48(16): 243–244.
- [17] 涂云飞. 茚三酮法测定茶叶游离氨基酸总量研究[J]. *现代农业科技*, 2018(14): 235–238.
- TU Y F. Study on the determination of total free amino acids in tea by ninhydrin method [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2018(14): 235–238.
- [18] HAYAT J, AKODAD M, MOUMEN A, et al. Phytochemical screening, polyphenols, flavonoids and tannin content, antioxidant activities and FTIR characterization of *Marrubium vulgare* L. from 2 different localities of Northeast of Morocco [J]. *Heliyon*, 2020, 6(11): e5609.
- [19] 李爽, 刘小芳, 冷凯良, 等. 大西洋鳕鱼骨胶原蛋白肽的抗氧化活性及稳定性研究[J/OL]. *食品与发酵工业*, (2023-11-01)[2023-11-22]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=F7lgn8YeJrr3dhdBVSozKL3Ujb2sED_bS8sb8rkgLiFopoNG7iA_lKvbYaqDEcUb9swd7M2ewuLm1Mnkb_Ey_ghWRfeqevmqyGFUF-1rscGTLOcCNLDIHoEDsIlug5hNjBuPA17880cD_LLgzQgXw1GwlHL9a5&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- LI S, LIU X F, LENG K L, et al. Antioxidant activity and stability of collagen peptides from Atlantic cod [J/OL]. *Food and Fermentation Industry*, (2023-11-01)[2023-11-22]. https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=F7lgn8YeJrr3dhdBVSozKL3Ujb2sED_bS8sb8rkgLiFopoNG7iA_lKvbYaqDEcUb9swd7M2ewuLm1Mnkb_Ey_ghWRfeqevmqyGFUF-1rscGTLOcCNLDIHoEDsIlug5hNjBuPA17880cD_LLgzQgXw1GwlHL9a5&uniplatform=NZKPT&language=CHS&version=LYDG.
- [20] WANG M, WANG F, LI G, et al. Antioxidant and hypolipidemic activities of pectin isolated from citrus canning processing water [J]. *LWT*, 2022, 159: 113203.
- [21] TAEBI R, MIRZAIY M R, MAHMOODI M, et al. The effect of *Curcuma longa* extract and its active component (curcumin) on gene expression profiles of lipid metabolism pathway in liver cancer cell line (HepG2)[J]. *Gene Reports*, 2020, 18: 100581.
- [22] CHAI Z Y, YAN Y H, ZAN S Y, et al. Probiotic-fermented blueberry pomace alleviates obesity and hyperlipidemia in high-fat diet C57BL/6J mice [J]. *Food Research International*, 2022, 157: 111396.
- [23] YANG H Y, WANG Q, XI Y M, et al. AMPD2 plays important roles in regulating hepatic glucose and lipid metabolism [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2023, 577: 112039.
- [24] BIAN C, ZHANG H B, GAO J, et al. SIRT6 regulates SREBP1c-induced glucolipid metabolism in

- liver and pancreas via the AMPK α -mTORC1 pathway[J]. *Laboratory Investigation*, 2022, 102(5): 474-484.
- [25] KOBAYASHI M, HARADA T, TAKAGI N, et al. Effects of lactic acid-fermented soymilk on lipid metabolism-related gene expression in rat liver[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2012, 76(1): 19-24.
- [26] JOUNG H, KIM B, PARK H, et al. Fermented *Moringa oleifera* decreases hepatic adiposity and ameliorates glucose intolerance in high-fat diet-induced obese mice[J]. *Journal of Medicinal Food*, 2017, 20(5): 439-447.
- [27] MOHAMMADY E Y, ABOSEIF A M, SOAUDY M R, et al. Appraisal of fermented wheat bran by *Saccharomyces cerevisiae* on growth, feed utilization, blood indices, intestinal and liver histology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. *Aquaculture*, 2023, 575: 739755.
- [28] WU L, TANG C H, CHEN L L, et al. Modified dietary fiber from soybean dregs by fermentation alleviated constipation in mice[J]. *Food Chemistry: X*, 2023, 19: 100810.
- [29] HU C, CHIU M, CHRISTIANTY R A, et al. Enrichment of functional characteristics in the okara by the fermentation of *Rhizopus azygosporus*[J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2022, 13(5): 2531-2538.
- [30] MIRANDA C S, SILVA-VEIGA F M, SANTANA-OLIVEIRA D A, et al. PPAR α / γ synergism activates UCPI-dependent and -independent thermogenesis and improves mitochondrial dynamics in the beige adipocytes of high-fat fed mice[J]. *Nutrition*, 2024, 117: 112253.
- [31] HUANG Y Q, TANG Y X, QIU B H, et al. Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) induced lipid metabolism disorder in liver via activating the LXR/SREBP-1c/PPAR α / γ and NF- κ B signaling pathway[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2022, 165: 113119.
- [32] WANG J, GENG T H, ZOU Q H, et al. Lycopene prevents lipid accumulation in hepatocytes by stimulating PPAR α and improving mitochondrial function[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 67: 103857.
- [33] ZHOU J Y, SHI Y Y, YANG C, et al. γ -Glutamylcysteine alleviates insulin resistance and hepatic steatosis by regulating adenylate cyclase and IGF-1R/IRS1/PI3K/Akt signaling pathways[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2023, 119: 109404.
- [34] LEE S R, JEONG S H, MUKAE M, et al. GLUT4 degradation by GLUTFOURINH[®] in mice resembles moderate-obese diabetes of human with hyperglycemia and low lipid accumulation[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2023, 1869(5): 166668.
- [35] YANG Y Y, QI J J, JIANG S Y, et al. Esculin ameliorates obesity-induced insulin resistance by improving adipose tissue remodeling and activating the IRS1/PI3K/AKT/GLUT4 pathway[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2024, 319: 117251.

Effects of Fermented Okara Supernatant on Glycolipid Metabolism in High-fat HepG2 Cells

XIAO Yuyi¹, LI Pengcheng¹, LIU Ziqi¹, WANG Yubo¹, WANG Xiujuan¹, PIAO Chunhong^{2*}

¹College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118

²College of Food and Pharmaceutical Engineering, Wuzhou University, Wuzhou 543002, Guangxi)

Abstract To reduce the waste of okara resources and to investigate the functional activities of fermented okara supernatant (FOS). FOS was prepared from fermented okara with *Kluyveromyces marxianus* C21 as the fermentation strain. Based on the analysis of the active components of FOS, the antioxidant capacity and *in vitro* improvement of glycolipid metabolism disorders were evaluated, and the mechanism of FOS was also evaluated. The results showed that the contents of total soluble sugar, free amino acid, and total phenol in FOS were significantly increased compared with those of NFOS (non-fermented okara supernatant) by 13.52%, 507.95%, and 16.67%, respectively, and the total antioxidant capacity was 8.57 μ mol Fe²⁺/mL, which was enhanced by 39.15% compared with that before the fermentation. The experimental results of oleic acid-induced high-fat HepG2 cells showed that the intervention of FOS significantly reduced the lipid droplet number as well as the content of triglyceride (25.39%) and total cholesterol (26.90%), and increased the

glucose consumption (46.77%) and intracellular glycogen (51.29%) content of the cells, in comparison with that of NFOS. Western blot results showed that 400 $\mu\text{g/mL}$ FOS significantly up-regulated the expression of glycolipid metabolism-related proteins, and PPAR α , IRS1, and GLUT4 were up-regulated by 30.89%, 127.16%, and 22.84%, respectively, compared with NFOS. Overall, FOS significantly ameliorated oleic acid-induced glycolipid metabolism disorders in HepG2 cells, reducing intracellular lipid accumulation and enhancing cellular glucose uptake by activating the expression of PPAR α , IRS1, and GLUT4 proteins. The results showed that FOS has a potential role in preventing and ameliorating obesity-induced hyperlipidemia and type 2 diabetes.

Keywords fermented okara supernatant; *Kluyveromyces marxianus*; antioxidant; HepG2 cells; glycolipid metabolism