

利用乳酸乳球菌发酵大豆蛋白产低聚肽的研究

卢美欢, 仝泽方, 马英辉, 张美丽, 李利军

Production of Oligopeptide from Soybean Protein by *Lactococcus lactis* Fermentation

LU Meihuan, TONG Zefang, MA Yinghui, ZHANG Meili, and LI Lijun

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023030041>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

商业发酵剂中乳酸乳球菌发酵风味特性及其化学表征的研究

Fermentation Flavor Characteristics and Chemical Characterization of *Lactococcus lactis* in Commercial Starters

食品工业科技. 2021, 42(19): 152-162 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030196>

乳酸乳球菌LLY003的安全性评价

Safe assessment of *Lactococcus lactis* LLY003

食品工业科技. 2017(19): 105-108 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.19.020>

乳酸乳球菌噬菌体与宿主相互作用研究进展

Research Advances on Interaction between *Lactococcus lactis* Bacteriophage and Their Hosts

食品工业科技. 2019, 40(12): 331-334,340 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.12.053>

一株乳酸乳球菌的分离鉴定及其发酵豆汁工艺优化

Isolation and identification of *Lactococcus lactis* and process optimization in fermented beverage of mung bean

食品工业科技. 2017(11): 134-139 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.11.017>

8种乳酸菌发酵荔枝汁-大豆蛋白的氨基酸代谢特征研究

Study on Amino Acid Metabolism Characteristics of Litchi Juice-Soybean Protein Fermented by Eight Lactic Acid Bacteria

食品工业科技. 2020, 41(23): 106-113 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020030015>

亚基水平上大豆蛋白凝胶性的研究进展

Research Progress of Soybean Protein Gels at Subunit Level

食品工业科技. 2021, 42(7): 382-389 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050338>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

卢美欢, 仝泽方, 马英辉, 等. 利用乳酸乳球菌发酵大豆蛋白产低聚肽的研究 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 1-7. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030041

LU Meihuan, TONG Zefang, MA Yinghui, et al. Production of Oligopeptide from Soybean Protein by *Lactococcus lactis* Fermentation[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(5): 1-7. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030041

· 特邀主编专栏—食源性功能物质挖掘与评价 (客座主编: 王颖、郭慧媛) ·

利用乳酸乳球菌发酵大豆蛋白产 低聚肽的研究

卢美欢, 仝泽方, 马英辉, 张美丽, 李利军*
(陕西省微生物研究所, 陕西西安 710043)

摘要: 筛选可以发酵分解大豆蛋白的食源性微生物, 对分解产生的多肽进行分子量分析, 通过分离纯化获得低聚肽并研究其抗氧化活性。结果表明: 从自制泡菜中分离到一株食源性乳酸菌 PZ1, 经形态和 16S rDNA 鉴定为乳酸乳球菌; 全基因组分析 PZ1 菌株具有多种肽酶和蛋白酶基因, 具备分解蛋白的潜在能力; 利用 PZ1 发酵大豆分离蛋白, 采用凝胶渗透色谱分析发酵产生的多肽, 分子量 1000 Da 以下占比达 85%; 通过超滤纯化获得 300~1000 Da 的低聚肽; 研究大豆低聚肽的抗氧化活性, 发现低聚肽对 DPPH 自由基、羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$) 和超氧阴离子自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 均有较好的清除作用, 浓度为 2 mg/mL 时, 清除率分别为 79.31%、78.27% 和 84.62%。因此乳酸乳球菌 PZ1 能够高效降解大豆蛋白, 可作为益生菌应用于大豆功能产品的开发。

关键词: 乳酸乳球菌, 大豆蛋白, 低聚肽, 抗氧化活性

中图分类号: TS272.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)05-0001-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030041



本文网刊:

Production of Oligopeptide from Soybean Protein by *Lactococcus lactis* Fermentation

LU Meihuan, TONG Zefang, MA Yinghui, ZHANG Meili, LI Lijun*

(Shaanxi Institute of Microorganism, Xi'an 710043, China)

Abstract: In this study, foodborne microorganisms capable of fermenting and decomposing soy proteins were screened, and molecular weight analysis was performed for the peptides produced during decomposition. Subsequently, oligopeptides were obtained via isolation and purification, and their antioxidant activities were studied. The experiment results showed that a PZ1 strain was isolated from homemade kimchi and identified as *Lactococcus lactis* based on morphology and 16S rDNA sequence analysis. Whole genome analysis showed that the PZ1 strain contained a variety of peptidases and protease genes that had the potential to decompose proteins. Soybean proteins were then fermented by PZ1, and the polypeptides produced during fermentation were analyzed via gel permeation chromatography, revealing that 85% of polypeptides had a molecular weight below 1000 Da. The oligopeptides with molecular weight 300~1000 Da were obtained via ultrafiltration purification, and their antioxidant activity was studied. The oligopeptides demonstrated a good scavenging effect on DPPH, hydroxyl ($\cdot\text{OH}$), and superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radicals, at an oligopeptide concentration of 2 mg/mL, the clearance rates were 79.31%, 78.27%, and 84.62%, respectively. Therefore, *L. lactis* PZ1 could degrade soybean protein efficiently and could be used as a probiotic for developing functional soybean products.

Key words: *Lactococcus lactis*; soybean protein; oligopeptides; antioxidant ability

收稿日期: 2023-03-03

基金项目: 陕西省科学院项目 (2021k-34)。

作者简介: 卢美欢 (1981-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 微生物资源开发与利用, E-mail: lu_meihuan@sina.com。

* 通信作者: 李利军 (1962-), 女, 本科, 研究员, 研究方向: 食品微生物, E-mail: lijun_lji@163.com。

大豆是我国主要经济作物,含有丰富的油脂和植物蛋白等,蛋白含量达到35%~40%,具有很好的营养价值和生物活性^[1]。大豆蛋白肽是大豆蛋白经酸解或酶解作用后,通过分离、精制等特殊处理而得到的蛋白质水解产物,而低聚肽则通常是由3~6个氨基酸组成,且相对分子质量低于1000 Da的低肽混合物^[2]。大豆蛋白肽进入人体肠胃后不需要经过消化酶作用,可以直接被吸收,利用效果优于游离氨基酸,因此对于病弱人群是理想的蛋白营养源。同时大豆蛋白肽还具有较低的抗原性、调节免疫力、抗衰老、降低胆固醇、降血压、抗氧化等生物活性和生理功能^[3-4]。目前,常采用酶解法和微生物发酵法生产大豆蛋白肽,但酶制剂价格昂贵导致酶解法生产成本高,同时酶解后容易产生苦味肽,影响产品口感,微生物发酵法生产蛋白肽则可以把酶的生产和应用合二为一,成本更低,而且发酵生产过程中可以去除大豆肽苦味,具有更好的口感^[5-8]。目前报道可用于大豆蛋白水解的微生物有枯草芽孢杆菌^[9]、植物乳杆菌^[10]、蛹拟青霉^[11]、酵母^[12]、米曲霉^[13]、短小芽孢杆菌^[14]等。

乳酸乳球菌是常用的食品微生物,应用领域有乳品发酵、奶酪加工、泡菜和酸面团等^[15]。乳酸乳球菌应用于乳品发酵研究较成熟,它可以将乳品中的乳糖转化为乳酸,同时自身的肽酶和分泌的蛋白酶可以促进乳品的蛋白质水解^[16]。随着植物蛋白应用越来越广泛,乳酸乳球菌也开始逐渐用于植物蛋白的发酵分解,相对于其他发酵菌,利用乳酸乳球菌生产植物蛋白制品更安全,具有低免疫原性、降低大豆蛋白肽系酸力的优点,乳酸乳球菌在发酵过程中产生的乳酸菌素也可以起到天然防腐的作用^[17]。同时由于乳酸乳球菌良好的遗传稳定性,是产业化理想的生产菌株^[18-19]。

为深入开发大豆蛋白资源,从自制泡菜中筛选了一株蛋白转化能力好的菌株PZ1,经鉴定为乳酸乳球菌,对该菌进行了全基因组测定,并分析了该菌株的蛋白分解能力,利用该菌发酵大豆分离蛋白产低聚肽,对低聚肽进行了抗氧化活性研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)PZ1 从自制泡菜中分离获得,已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为 CCTCC NO. M 2022398;米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 本实验室保存菌种;MRS培养基 蛋白胨 10 g、牛肉膏 5 g、酵母粉 4 g、葡萄糖 2 g、吐温 80 1 mL、磷酸氢二钾 2 g、乙酸钠 5 g、柠檬酸三铵 2 g、硫酸镁 0.2 g、硫酸锰 0.05 g、琼脂 15~20 g、水 1000 mL, pH6;大豆分离蛋白培养基 大豆分离蛋白 2%,葡萄糖 0.5%;98%大豆分离蛋白、Gly-Gly-Tyr-Arg、维生素 C

(V_C) 上海源叶生物科技有限公司;DNA提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司;DPPH Sigma公司;硫酸亚铁、水杨酸、邻苯三酚、乙醇 天津市天力化学试剂有限公司;过氧化氢 成都市科龙化工试剂厂;盐酸 成都市科隆化学品有限公司;聚乙二醇标准品 上海子起生物科技有限公司。

FA2104N 电子天平 上海精其仪器有限公司;722 分光光度计 天津市普瑞斯仪器有限公司;DHP-9162 恒温培养箱 太仓科教仪器厂;TH2-C 恒温摇床 太仓市实验设备厂;GeneAmp PCR System 9700 基因扩增仪 美国 ABI 公司;HC-2518R 高速冷冻离心机 安徽中科中佳仪器有限公司;BONA-GM-011 超滤仪 山东博纳生物科技集团有限公司;PL-GPC 220 凝胶渗透色谱仪 美国 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株筛选 从自制泡菜中收集液体,对液体进行梯度稀释,分别将 10²、10³、10⁴ 倍稀释液 100 μL,涂布于 MRS 培养基中,32 °C 恒温培养 2 d,挑取单菌落继续在 MRS 培养基中划线纯化,获得纯菌株,在大豆分离蛋白培养基中培养,以大豆多肽含量为指标考察菌株对大豆分离蛋白的发酵分解效果,选取效果最好的一株菌命名为 PZ1。

1.2.2 菌株鉴定 形态鉴定:PZ1 菌株在 MRS 平板上培养,观察菌落形态,具体方法参照《常见细菌系统鉴定手册》^[20]。

16S rDNA 鉴定:利用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取菌株 PZ1 的总 DNA,采用 16S rDNA 通用引物 7F: 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3'和 1540R:5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'进行 PCR 扩增,扩增程序:94 °C 4 min,94 °C 45 s,55 °C 45 s,72 °C 1 min,72 °C 10 min,4 °C 保存。PCR 扩增产物送上海生工公司测序,获得的 16S rDNA 基因序列在 NCBI 网站上进行比对分析。

1.2.3 菌株 PZ1 全基因组测定及蛋白水解相关酶分析 将菌株 PZ1 送北京百迈克公司 Nanopore 测序技术平台进行全基因组测序。全基因组序列提交 GenBank,登录号为 PRJNA912843。利用基因和蛋白注释数据库对 PZ1 的蛋白酶和肽酶等蛋白水解相关基因进行分析。

1.2.4 不同微生物发酵大豆分离蛋白产多肽的比较

将米曲霉、植物乳杆菌、枯草芽孢杆菌(纳豆菌)和乳酸乳球菌 PZ1 分别接种至大豆分离蛋白培养基,32 °C 发酵 2 d,发酵液测大豆多肽含量和蛋白总量,计算多肽转化率,多肽转化率(%)=肽含量/蛋白总量×100。蛋白总量采用凯氏定氮法测定^[21]。

1.2.5 大豆多肽含量测定

1.2.5.1 标准曲线的制作 大豆多肽含量测定参照双缩脲法测定^[22]。称取 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽 20 mg,加入 10 mL 5% 的 TCA 溶解,即为四肽标准溶液。

用 5% TCA 分别配制浓度为 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 和 1.8 mg/mL 的 Gly-Gly-Tyr-Arg 标准溶液。分别取标准溶液 0.75 mL, 加入 0.5 mL 双缩脲试剂, 在漩涡混合器振荡混合均匀, 静置 10 min, 2000 r/min, 离心 10 min, 取上清液在 540 nm 下测定 OD 值, 以不加四肽标准溶液管为空白对照测吸光度值, 每个浓度做 2 个平行。以四肽的浓度作横坐标 x (mg/mL), 吸光度(OD 值)作纵坐标 y , 制作标准曲线。得到标准曲线方程为 $y=0.1026x-0.0086$, $R^2=0.9933$ 。

1.2.5.2 多肽的测定 大豆分离蛋白经微生物发酵后, 测定发酵液中多肽含量, 样品用蒸馏水配成一定浓度后, 取 1.0 mL, 加入 1.0 mL 10% 三氯乙酸 (TCA) 溶液, 混合均匀后静置 10 min, 离心机 4000 r/min 离心 15 min, 取 0.75 mL 上清液转移至 2 mL 离心管中, 加入 0.5 mL 双缩脲试剂, 后续操作同 1.2.5.1, 吸光值与标准曲线对照, 即可得到样品的多肽含量(mg/mL)。

1.2.6 大豆多肽的分子量分析 采用安捷伦 PL-GPC 220 凝胶渗透色谱仪进行大豆多肽的分子量分析, 检测器为 PL-GPC 50(RI), 色谱柱为 PL aquagel-OH MIXED 8 μm 两根串联, 洗脱液为超纯水, 流速 1 mL/min, 温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 样品用蒸馏水溶解后配成浓度 1 mg/mL, 用 0.22 μm 膜过滤, 取 10 μL 上样测试。以聚乙二醇分子量标准品进行分子量分析。

1.2.7 大豆低聚肽的制备 乳酸乳球菌 PZ1 转接至 MRS 斜面活化 24 h, 用接种环取 2 环接种至灭菌的大豆分离蛋白培养基中, 32 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 得大豆蛋白发酵液 PZ1, 将大豆蛋白发酵液放置在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 12~24 h, 取出室温解冻, 超声破碎 15 min, 超声功率为 800 W, 用离心管装超声后的溶液在离心机中以 10000 r/min, 离心 10 min。取上清液在超滤装置中进行超滤, 分别过 5000、1000 和 300 Da 的有机膜, 收集 300~1000 Da 之间的滤液, 得低聚肽粗品, 冷冻干燥后保存(-20 $^{\circ}\text{C}$)备用。采用 1.2.5 方法测定粗品中低聚肽含量, 并配成合适浓度进行活性测定。

1.2.8 低聚肽抗氧化活性测定 低聚肽、大豆分离蛋白和阳性对照维生素 C(V_C)分别用蒸馏水稀释, 配成浓度梯度为 2、1.6、1.2、0.8、0.4、0.1 mg/mL。参考卢美欢等^[23]测定低聚肽、大豆分离蛋白和 V_C 的抗氧化活性, 分别检测对 DPPH 自由基、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除效果。

1.3 数据处理

实验数据采用 Excel 2021 和 DPSv7.05 数据系统进行统计分析, 显著性水平分析采用 Duncan's 新复极差法。

2 结果与分析

2.1 菌株 PZ1 的鉴定

PZ1 菌株在 MRS 平板上培养, 观察菌落形态, 并进行革兰氏染色。菌落形态如图 1 所示, 菌落凸

起, 乳黄色, 表面光滑, 湿润, 革兰氏染色显紫色, 为阳性菌。显微观察菌株形态为圆球状, 大小约 0.5 μm 。

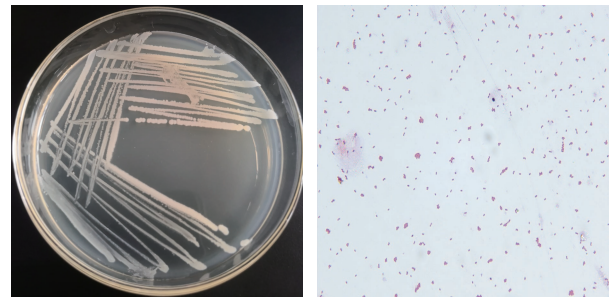


图 1 PZ1 菌株的菌落形态(左)和革兰氏染色显微图片($\times 1000$)(右)

Fig.1 Colony morphology of strain PZ1 (left) and Gram stain micrograph ($\times 1000$) (right)

提取 PZ1 菌株 DNA, 以该 DNA 为模板, 采用 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增, 电泳检测获得约 1400 bp 的单一特异性条带(图 2A)。PCR 产物进行测序, 序列长度为 1441 bp, 通过 NCBI 在线比对, 显示菌株 PZ1 与乳酸乳球菌基因序列同源性达 100%, 初步判定菌株 PZ1 为乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)。提取乳酸乳球菌 PZ1 的总 DNA, 利用 Nanopore 测序技术平台进行全基因组测序。对乳酸乳球菌 PZ1 的全基因组序列进行 Nr 同源物种分布分析, 结果显示与乳酸乳球菌的同源性为 98.34%(图 2B), 系统进化树分析显示菌株 PZ1 和乳酸乳球菌的亲缘最近(图 2C)。将乳酸乳球菌 PZ1 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏号为 CCTCC NO.M 2022398。

2.2 乳酸乳球菌 PZ1 的全基因组分析

乳酸乳球菌 PZ1 的全基因组测序共得到 4083885878 bp Clean Data, 组装后完整基因组总长 2136240 bp, GC 含量(鸟嘌呤 G 和胞嘧啶 C 所占的比率)为 34.86%。通过 Nr 数据库注释(表 1), 搜索和肽酶、蛋白酶相关基因, 发现 PZ1 含有肽酶 Peptidase、二肽酶 Dipeptidase、内肽酶 Endopeptidase、羧肽酶 Carboxypeptidase、氨肽酶 Aminopeptidase 等肽酶基因。通过 Swissprot 数据库注释, 乳酸乳球菌 PZ1 除了存在多种肽酶基因, 还发现了多种蛋白酶 protease 基因。已有研究表明, 蛋白酶的作用是将外源蛋白进行降解, 生成大分子肽, 肽酶则将大分子肽水解为小分子肽和氨基酸^[24]。内肽酶可以切除肽链内部的氨基酸, 氨肽酶和羧肽酶都属于外切蛋白酶, 氨肽酶在肽链 N-末端切除氨基酸, 羧肽酶则专一性从肽链的 C-末端切除氨基酸, 同时羧肽酶可以将短肽末端的疏水性氨基酸切除, 达到脱苦的目的^[25]。结合以上分析可见乳酸乳球菌 PZ1 既能产生蛋白酶和多种肽酶将大分子蛋白质分解成短肽, 也能产生羧肽酶达到脱苦的目的。

2.3 不同微生物发酵大豆分离蛋白产多肽的比较

分别采用 3 株米曲霉, 植物乳杆菌、枯草芽孢杆

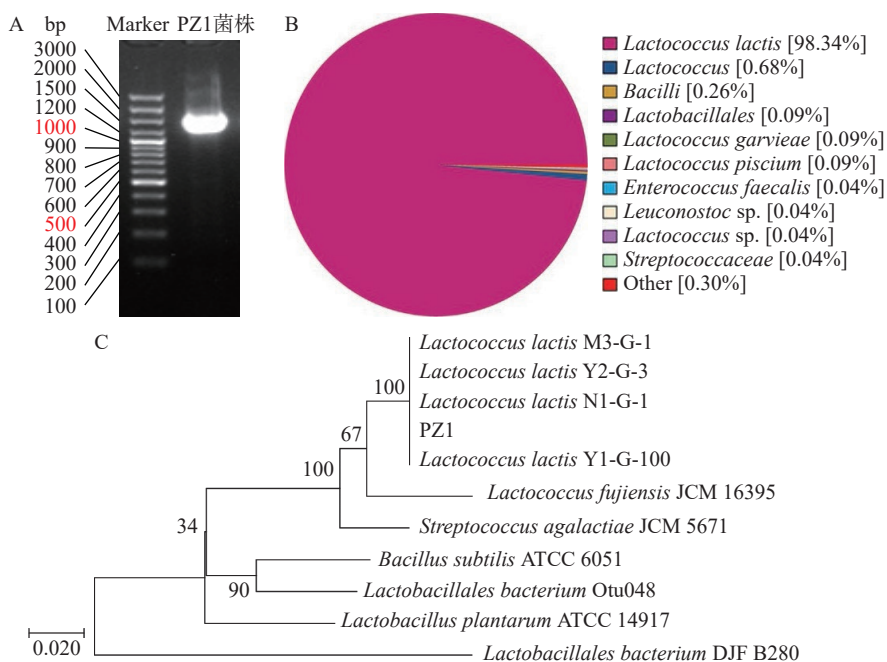


图2 PZ1菌株的16S rDNA PCR扩增结果(A)、Nr同源物种分布(B)和系统进化树分析(C)
Fig.2 PCR amplification of the 16S rDNA fragmen (A), Nr homologous species distribution (B) and phylogenetic tree analysis of strain PZ1 (C)

表1 菌株PZ1在Nr和Swissprot数据库注释的蛋白酶相关基因

Table 1 Protease-related genes in strain PZ1 annotated in Nr and Swissprot databases

类型	基因ID	Nr数据库注释	Swissprot数据库注释	基因
	GE000428	M24 family metallopeptidase	-	-
	GE000132	lipoprotein signal peptidase	Lipoprotein signal peptidase	<i>lspA</i>
	GE000716	M50 family peptidase	-	-
	GE000983	peptidase M13	Neutral endopeptidase	<i>pepO</i>
	GE000991	peptidase T	peptidase T	<i>pepT</i>
	GE001163	peptidase, M16 family	-	-
肽酶	GE001181	U32 family peptidase	Uncharacterized protease HI_0419	<i>HI_0419</i>
	GE001183	U32 family peptidase	-	-
	GE001251	prepilin peptidase	-	-
	GE001274	Xaa-Pro dipeptidyl-peptidase	Xaa-Pro dipeptidyl-peptidase	<i>pepX</i>
	GE001510	signal peptidase I	Signal peptidase I	<i>lepB</i>
	GE001792	peptidase	Aminopeptidase N	<i>pepN</i>
	GE001887	Signal peptidase-like protein	-	-
	GE001991	Multimodular transpeptidase-transglycosylase PBP 1A	-	-
	GE002123	peptidase	Nisin leader peptide-processing serine protease NisP	<i>nisP</i>
二肽酶	GE000649	C69 family dipeptidase	Probable dipeptidase B	<i>pepDB</i>
	GE001737	C69 family dipeptidase	Probable dipeptidase A	<i>pepDA</i>
	GE002330	dipeptidase PepV	Beta-Ala-Xaa dipeptidase	<i>pepV</i>
内肽酶	GE000078	peptidoglycan endopeptidase	-	-
	GE000339	ImmA/IrrE family metallo-endopeptidase	-	-
	GE000906	oligoendopeptidase F	Oligoendopeptidase F homolog	<i>pepF</i>
	GE001986	gamma-glutamyl-diamino acid-endopeptidase	Peptidoglycan DL-endopeptidase CwlO	<i>cwlO</i>
羧肽酶	GE000093	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase family protein	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	<i>vanY</i>
	GE000892	LD-carboxypeptidase	Putative carboxypeptidase TP_0688	<i>TP_0688</i>
	GE001515	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase DacA	<i>dacA</i>
	GE000828	aminopeptidase P family protein	Xaa-Pro dipeptidase	<i>pepQ</i>
氨肽酶	GE001071	Aminopeptidase C	Aminopeptidase C	<i>pepC</i>
	GE001874	glutamyl aminopeptidase	Glutamyl aminopeptidase	<i>pepA</i>
	GE002061	methionyl aminopeptidase	Methionine aminopeptidase	<i>map</i>
	GE002155	aminopeptidase P family protein	Uncharacterized peptidase SERP1271	<i>SERP1271</i>
	GE000234	-	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	<i>clpX</i>
蛋白酶	GE001348	-	Putative zinc metalloprotease LL2128	<i>LL2128</i>
	GE001354	-	Serine protease Do-like HtrA	<i>htrA</i>
	GE001540	-	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH	<i>ftsH</i>
	GE002005	-	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpE	<i>clpE</i>
	GE002104	-	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	<i>clpP</i>
	GE002123	-	Nisin leader peptide-processing serine protease NisP	<i>nisP</i>

注：“-”表示未在该数据库注释到。

菌(纳豆菌)和乳酸乳球菌 PZ1 发酵大豆分离蛋白,测发酵后的多肽含量,计算多肽转化率见图 3。3 株米曲霉对大豆分离蛋白的多肽转化率均低于 20%,枯草芽孢杆菌的转化率为 47.84%,植物乳杆菌的多肽转化率为 85.08%,乳酸乳球菌 PZ1 的转化率最高,为 88.27%,说明 PZ1 可以较好地分解大豆蛋白。该结果进一步证实了 PZ1 存在蛋白酶和肽酶基因,可以将蛋白分解为多肽。其他研究也表明乳酸菌可以有效分解大豆蛋白,如刘海燕^[26]利用乳酸菌发酵豆粕,可以将豆粕中大分子蛋白质降解为小分子肽,而且增加了豆粕中游离氨基酸含量。何勇锦等^[27]利用乳酸短杆菌 KLDS-1 降解豆粕粉,经生料厌氧发酵后小肽含量达 26.12%,比发酵前提高了 22.81%。聂庆杰等^[28]采用乳酸乳球菌 17 发酵豆粕取得良好的发酵效果,大豆球蛋白降解率为 37.29%。和现有研究相比,本研究乳酸乳球菌 PZ1 分解大豆蛋白的效率更高,值得进一步开发利用。

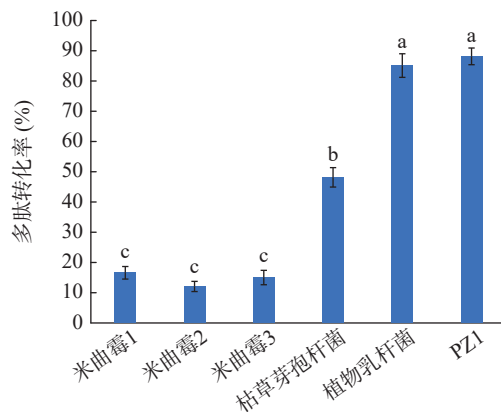


图 3 不同微生物发酵大豆分离蛋白产多肽的转化率

Fig.3 Conversion rate of polypeptides from soybean protein isolate fermented by different microorganisms
注: 图中不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.4 乳酸乳球菌 PZ1 发酵大豆分离蛋白的分子量分析

乳酸乳球菌 PZ1 在大豆分离蛋白培养基中发酵培养后,分别将发酵前和发酵后的蛋白溶液进行凝胶渗透色谱分析,色谱图见图 4(A)。经 PZ1 发酵后的大豆分离蛋白出峰时间更滞后,说明大豆分离蛋白被分解成小分子的多肽。将发酵前和发酵后的蛋白分子量分布进行统计分析,结果如图 4(B)所示。结果表明,发酵前的大豆蛋白分子量主要集中在 5000 Da 以上,占比为 76%,分子量 1000 Da 以下仅占 1%;经 PZ1 分解后大豆多肽分子量 ≤ 1000 Da 的比例达 85%,而分子量在 3000~5000 Da 的多肽则只有 1%,此外,分子量 1000~3000 Da 比例为 14%。WEN 等^[29]采用中性蛋白酶和碱性蛋白酶对大豆蛋白进行混合酶解,获得 87.92% 分子量 ≤ 1000 Da 的大豆肽,1000~3000 Da 的比例为 11.03%,和本研究的分解效果接近,说明采用乳酸乳球菌 PZ1 发酵大豆蛋白可以获得较好的降解效果。有资料表明,乳酸菌发酵过程中可以将外源蛋白水解为能直接利用的氨基酸,从

而维持自身的正常生长^[30]。本研究使用的大豆蛋白培养基只含少量的碳源,其余都是大豆蛋白,营养素匮乏促使乳酸乳球菌 PZ1 分泌大量的蛋白酶类对大豆蛋白进行水解,在维持自身生长的同时也产生了大量小分子低聚肽。

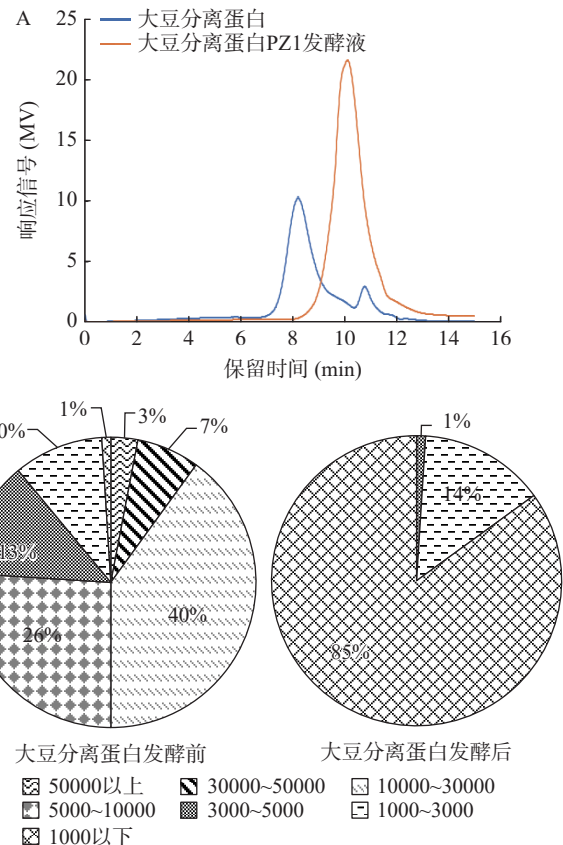


图 4 大豆分离蛋白发酵前和 PZ1 发酵后的凝胶渗透色谱分析(A)及分子量分布(B)

Fig.4 Gel permeation chromatography analysis (A) and molecular weight distribution (B) of soy protein isolate before and after fermentation of PZ1

2.5 低聚肽抗氧化活性测定

根据资料报道,分子量在多肽的生物活性中起着关键作用,分子量低于 1000 Da 的低聚肽具有更高的生物活性^[31],在增强免疫力、抗氧化作用、吸收性方面均优于分子量较大的多肽^[32]。本文通过微生物降解大豆分离蛋白为低聚肽,研究其抗氧化活性。乳酸乳球菌 PZ1 发酵大豆分离蛋白后,按照 1.2.7 方法进行低聚肽的制备。同时配制相同浓度的大豆分离蛋白和 V_C 测定抗氧化活性。结果显示,在 0.1~2 mg/mL 范围内,大豆低聚肽清除 DPPH 自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基能力均大于大豆分离蛋白(见图 5)。而且随着蛋白溶液浓度的增大,清除率也逐渐增大。浓度为 2 mg/mL 时,大豆低聚肽和大豆分离蛋白清除 DPPH 自由基能力分别为 79.31% 和 59.92%,清除羟自由基能力分别为 78.27% 和 60.18%,清除超氧阴离子自由基能力分别为 84.62% 和 66.49%,可见低聚肽的抗氧化活性优于大豆分离蛋白,说明低聚肽具有更好的保健功效。

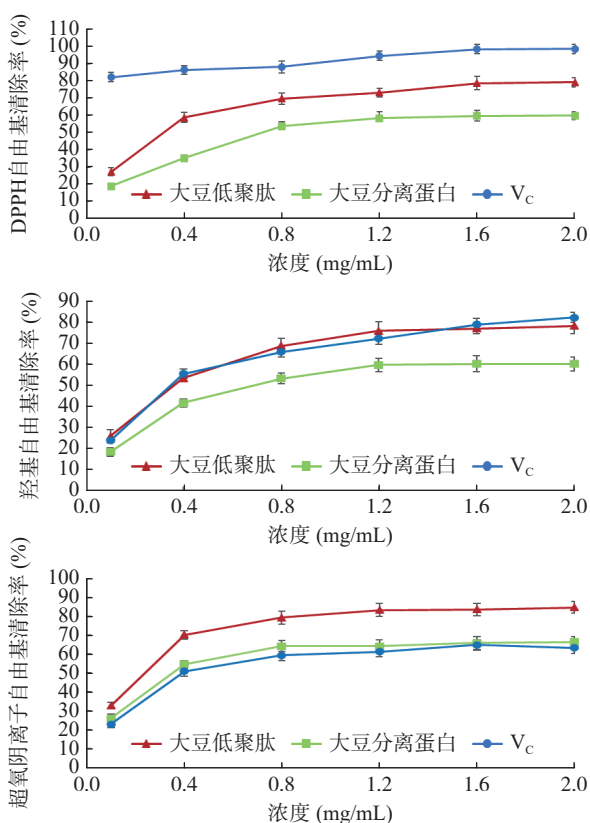


图5 大豆低聚肽和大豆分离蛋白对DPPH自由基、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除率

Fig.5 Scavenging rate of soy oligopeptide and soy protein isolate on DPPH free radical, hydroxyl free radical ($\cdot\text{OH}$) and superoxide free radical ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

大豆低聚肽清除 DPPH 自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基的 IC_{50} 分别为 0.32、0.36、0.26 mg/mL。与阳性对照维生素 C(V_C)相比,在 0.1~2 mg/mL 范围内, V_C 对 DPPH 自由基清除能力优于大豆低聚肽,对羟基自由基清除能力两者没有较大差别,对超氧阴离子自由基清除能力则大豆低聚肽优于 V_C 。

3 结论

本研究从泡菜中分离出一株乳酸乳球菌 PZ1,具有分解大豆蛋白的能力,全基因组分析 PZ1 菌株具有多种肽酶和蛋白酶基因,包括肽酶、二肽酶、内肽酶、羧肽酶、氨肽酶等基因。利用 PZ1 发酵大豆分离蛋白,产生的多肽分子量集中在 1000 Da 以下,达到 85%,分子量 1000~3000 Da 比例为 14%。通过对大豆分离蛋白发酵液的超滤纯化,获得了 300~1000 Da 的低聚肽。研究了大豆低聚肽的抗氧化活性,发现大豆低聚肽清除自由基能力均大于大豆分离蛋白,浓度为 2 mg/mL 时,大豆低聚肽对 DPPH 自由基、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除率分别为 79.31%、78.27% 和 84.62%。综上所述,乳酸乳球菌 PZ1 可作为大豆蛋白的降解菌株,在生产功能性低聚肽产品具有潜在的应用价值。

参考文献

[1] 陈雨生,江一帆,张瑛.中国大豆生产格局变化及其影响因素[J].经济地理,2022,42(3):87-94. [CHEN Y S,JIANG Y F,

ZHANG Y. Changes of soybean production pattern and its influencing factors in China[J]. Economic Geography, 2022, 42(3): 87-94.]

[2] WU J, DING X. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides[J]. Food Research International, 2002, 35(4): 367-375.

[3] DALIRI B M, OFOSU F K, CHELLIAH R, et al. Development of a soy protein hydrolysate with an antihypertensive effect[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(6): 1496.

[4] DONG Yifei, SUN Na, GE Qi, et al. Antioxidant soy peptide can inhibit xanthine oxidase activity and improve LO2 cell damage [J]. Food Bioscience, 2023, 52: 102455.

[5] 王阳,张景,陈聪,等.纳豆菌液态发酵产低分子大豆蛋白肽的工艺优化[J].大连工业大学学报,2012(3):161-164. [WANG Y, ZHANG J, CHEN C, et al. Optimization of *Bacillus natto* liquid fermentation to produce micromolecule soybean protein peptide[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2012(3): 161-164.]

[6] 李双,魏思雯,吴凤凤.植物活性肽的研究进展[J].食品科技,2022,47(11):85-92. [LI S, WEI S W, WU F F. Research progress of plant active peptides[J]. Food Science and Technology, 2022, 47(11): 85-92.]

[7] 黄磊,周其洋.大豆水解蛋白中苦味肽的研究进展[J].现代食品,2022,28(21):22-24. [HUANG L, ZHOU Q Y. Research progress of bitter peptides in hydrolysed soybean protein[J]. Modern Food, 2022, 28(21): 22-24.]

[8] 王露露,史茜茜,王雨桐,等.大豆肽的功能活性及其在食品加工中的应用[J].农产品加工,2021,520(2):59-63. [WANG L L, SHI Q Q, WANG Y T. Functional activities of soybean peptides and their applications in food processing[J]. Farm Products Processing, 2021, 520(2): 59-63.]

[9] 李锡阁,周成册,吴志新,等.微生物复合发酵对豆粕营养品质的影响[J].华中农业大学学报,2019,38(6):123-131. [LI X G, ZHOU C C, WU Z X, et al. Effect of microbial compound fermentation on nutritional quality of soy bean meal[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2019, 38(6): 123-131.]

[10] 杨紫璇,张宾乐,蒋慧,等.茅台酒曲植物乳杆菌大豆酸面团发酵面包的营养与抗氧化特性[J].食品与发酵工业,2018,44(6):37-42. [YANG Z X, ZHANG B L, JIANG H, et al. The nutrition and antioxidant properties of soybean sourdough and bread fermented by LAB screened from Maotai Qu starter[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(6): 37-42.]

[11] 朱蕴兰,陈宏伟,陈安徽,等.蛹拟青霉固态发酵法制备大豆渣小肽及其理化特性[J].中国油脂,2019,44(12):86-91. [ZHU Y L, CHEN H W, CHEN A H, et al. Preparation and characteristics of small peptides from soybean residue by solid-state fermentation with *Paecilomyces militaris*[J]. China Oils and Fat, 2019, 44(12): 86-91.]

[12] JEONG D M, YOO S J, JEON M S, et al. Genomic features, aroma profiles, and probiotic potential of the *Debaryomyces hansenii* species complex strains isolated from Korean soybean fermented food[J]. Food Microbiology, 2022, 105: 104011.

[13] WARA P S S, ADI R, NOVI A, et al. Changes in nutritional and antinutritional aspects of soybean meals by mechanical and solid-state fermentation treatments with *Bacillus subtilis* and *Aspergillus oryzae*[J]. Bioresource Technology Reports, 2022(17): 100925.

[14] 李杰,张姣锦,杨红玲,等.3种益生菌发酵豆粕的营养品质研究[J].饲料研究,2021,44(22):56-59. [LI J, ZHANG J J, YANG H L, et al. Study on nutritional quality of three probiotics ferm-

- ented soybean meal[J]. *Feed Research*, 2021, 44(22): 56–59.]
- [15] 倪珊珊, 黄丽英. 乳酸链球菌素和乳酸乳球菌在食品工业中的应用[J]. *食品工业*, 2015, 6(11): 244–247. [NI S S, HUANG L Y. Application of Nisin and *Lactococcus lactis* in the food industry[J]. *The Food Industry*, 2015, 6(11): 244–247.]
- [16] MIERAU I, KUNJI E, LEENHOUTS K J, et al. Multiple-peptidase mutants of *Lactococcus lactis* are severely impaired in their ability to grow in milk[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(10): 2794–2803.
- [17] 劳泰财, 余忠丽, 恽辉, 等. 一种富含活性乳酸菌的大豆肽的制备方法: 中国, CN111671006A[P]. 2020-9-18. [LAO T C, YU Z L, YUN H, et al. The invention relates to a preparation method of soybean peptide rich in active *lactic acid bacteria*: China, CN111671006A[P]. 2020-9-18.]
- [18] LIU Wenjun, LI Weicheng, ZHENG huijuan, et al. Genomics divergence of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from naturally fermented dairy products[J]. *Food Research International*, 2022, 155: 111108.
- [19] 张彦位, 杨玲, 路江浩, 等. 乳酸菌全基因组测序的应用进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(15): 444–450. [ZHANG Y W, YANG L, LU J H, et al. Application progress of lactic acid bacteria whole genome sequencing[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(15): 444–450.]
- [20] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001. [DONG X Z, CAI M Y. Handbook for the identification of common bacterial systems[M]. Beijing: Science Press, 2001.]
- [21] 马晓倩, 方玲, 袁月兰, 等. 凯氏定氮法测大豆粉中蛋白质含量的不确定度评定[J]. *现代食品*, 2021(22): 187–189. [MA X Q, FANG L, YUAN Y L, et al. Uncertainty evaluation of protein content in soybean flour by Kjeldahl method[J]. *Modern Food*, 2021(22): 187–189.]
- [22] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. *食品科学*, 2005, 26(7): 169–171. [LU W, REN G P, SONG J M. Determination of content of peptides in protein hydrolysates[J]. *Food Science*, 2005, 26(7): 169–171.]
- [23] 卢美欢, 马英辉, 王银存, 等. 荞麦醋的抑菌性能及其提取物的抗氧化性研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(9): 82–84. [LU M H, MA Y H, WANG Y C, et al. Study on bacteriostasis property of Buckwheat vinegar and antioxidant activity of its extract[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(9): 82–84.]
- [24] 王镜岩, 沈同, 朱圣庚, 等. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2017. [WANG J Y, SHEN T, ZHU S G, et al. *Biochemistry* [M]. Beijing: Higher Education Press, 2017.]
- [25] 管风波, 宋俊梅. 大豆肽的生产及其苦味脱除方法的研究[J]. *山东轻工业学院学报(自然科学版)*, 2008, 22(3): 18–20. [GUAN F B, SONG J M. Research progress on production and debitterness technology of soybean peptides[J]. *Journal of Shandong Institute of Light Industry*, 2008, 22(3): 18–20.]
- [26] 刘海燕. 乳酸菌发酵豆粕及其功效研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2012. [LIU H Y. Research on the functional characterization of soybean meal fermented by lactic acid bacteria[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2012.]
- [27] 何勇锦, 罗振达, 戴紫燕, 等. 乳酸菌生料固态发酵豆粕工艺的优化[J]. *贵州农业科学*, 2012(10): 151–153. [HE Y J, LUO Z D, DAI Z Y, et al. Process optimization of solid state fermentation of raw soybean meal by *Lactobacillus* [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2012(10): 151–153.]
- [28] 聂庆杰, 杨红玲, 张姣锦, 等. 水产功能性发酵豆粕用乳酸菌菌株的筛选研究[J]. *饲料研究*, 2022, 45(21): 74–77. [NIE Q J, YANG H L, ZHANG J J, et al. Screening of lactic acid bacteria for aquatic functional soybean meal fermentation[J]. *Feed Research*, 2022, 45(21): 74–77.]
- [29] WEN Lingrong, BI Huimin, ZHOU Xuesong, et al. Structure characterization of soybean peptides and their protective activity against intestinal inflammation[J]. *Food Chemistry*, 2022, 387: 132868.
- [30] 杜越欧, 侯俊财. 乳酸菌蛋白水解体系及相关基因表达的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(3): 383–386. [DU Y O, HOU J C. Research progress in proteolysis system of lactic acid bacteria and related gene expression[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(3): 383–386.]
- [31] 张连慧, 贺寅, 刘新旗. 大豆肽的研究进展及其发展前景[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(22): 406–413. [ZHANG L H, HE Y, LIU X Q. Research advance of soy peptide and its application in food industry[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(22): 406–413.]
- [32] 易维学. 大豆低聚肽的功能性质及其应用[J]. *中国食品工业*, 2001(2): 36–37. [YI W X. Functional properties and applications of soybean oligopeptide[J]. *China Food Industry*, 2001(2): 36–37.]