



# 大豆发酵食品中的活性肽及其生理功能研究进展

曾 艳, 朱玥明, 张建刚, 岳晓平, 孙媛霞

(中国科学院 天津工业生物技术研究所, 天津 300308)

**摘 要:** 来源于大豆发酵食品的活性肽, 被证实具有抗氧化、抗高血压、抗糖尿病、抗肿瘤等生理活性功效, 而其功能与大豆发酵时所用微生物菌株及发酵工艺密切相关。然而, 我国针对来源于大豆发酵的功能食品及活性肽的生产与应用的研究仍处于起步阶段。针对这一现状, 对国内外的大豆发酵食品加工现状及其来源的大豆活性肽在预防治疗新陈代谢疾病中的应用潜力进行了概述, 并对这一领域后续的研究方向进行了展望, 以期为我国大豆发酵食品及其活性肽的研究与开发提供参考。

**关键词:** 大豆食品; 发酵; 活性肽; 血管紧张素转化酶抑制肽; 保健功能

## Process in Bioactive Peptides During Soybean Fermentation and Their Potential Health Benefits

ZENG Yan, ZHU Yue-ming, ZHANG Jian-gang, YUE Xiao-ping, SUN Yuan-xia

(Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China)

**Abstract:** Peptides from fermented soybean products have been proved to possess many physiological activities, such as antioxidant, antihypertensive, antidiabetic, and anticancer potentials. Moreover, the bioactivity of these peptides are closely related to the microbial strains and fermentation process used in the fermented soybean products. However, the study and application of functional food and bioactive peptides derived from soybean fermentation in China is still in its infancy now. In view of this situation, this article reviews the production of fermented soybean products and the application potential of their bioactive peptides in prevention and treatment of several metabolic diseases, and also prospects the future research directions, which will provide some guidance for improving the research advance on fermented soybean products and their bioactive peptides in China.

**Keywords:** Soybean food; Fermentation; Peptides; Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI); Health benefits

大豆是最广为人知的植物蛋白质来源, 蛋白质占大豆干重的 35% ~ 40%。除蛋白质外, 大豆还含有脂肪、维生素、矿物质、糖类、异黄酮、皂苷等具有保健功能的物质。大豆发酵食品是指以大豆或大豆制品为发酵基质经微生物作用所形成的食品。大豆发酵食品发展历史悠久, 营养成分丰富, 在世界饮食文化中占有重要的地位。日本的纳豆、味噌, 韩国的大酱、清麴酱, 印度尼西亚的天培豆豉、昂巧豆豉, 以及中国的豆豉、豆腐乳等都是当地颇具特色的传统豆制发酵食品<sup>[1]</sup>。大豆发酵食品不仅香气浓郁、滋味鲜美, 对人类营养健康也具有突出贡献。随着大豆发酵食品的工业化规模生产应用水平不断提高, 生物活性成分、保健性、功能性的开发研究成为大豆发酵食品的国际发展趋势<sup>[2]</sup>。大豆发酵期间, 微生物在生长代谢过程中大量分泌胞外蛋白酶和羧肽酶, 水解原料中的大豆蛋白, 释

放出经移接和重排的小肽, 并脱除肽链末端疏水性氨基酸, 对某些苦味肽的基因进行修饰、转移和重组, 减少苦味。因此, 大豆发酵食品中的蛋白质主要以大豆多肽的形式存在。来源于大豆发酵食品的大豆肽, 与酶法水解制备的大豆肽相比, 具有收率高, 色泽风味优良、感官特性评价好等优点, 同时具有抗氧化、抗高血压、抗糖尿病、抗肿瘤等功效。并且, 相关研究表明大豆发酵食品中的活性肽其功能与发酵所用微生物菌株及发酵工艺密切相关<sup>[3,4]</sup>。然而, 我国大豆发酵食品的生产应用技术创新缺乏国际竞争力, 大豆肽的微生物发酵生产及其功能活性研究也仍处于起步阶段<sup>[2,5]</sup>。针对这一现状, 本文对国内外的大豆发酵食品加工现状及其来源的大豆活性肽在预防治疗新陈代谢疾病中的应用潜力进行了分析概述, 以期为国内大豆发酵食品及其活性肽的研究与开发提供参考。

收稿日期: 2018-08-13

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0400403); 天津市科技计划项目(16YFXTNC00160)。

第一作者简介: 曾艳(1982-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事功能食品配料的生物转化技术研制。E-mail: zeng\_y@tib.cas.cn。

通讯作者: 孙媛霞(1963-), 女, 博士, 研究员, 主要从事利用生物催化与转化技术研制功能糖及天然活性物质研究。E-mail: sun\_yx@tib.cas.cn。

## 1 大豆蛋白的结构特性及发酵对大豆蛋白的影响

储存蛋白是大豆蛋白的主体,约占大豆总蛋白的70%以上,主要包括大豆球蛋白(11S球蛋白)和 $\beta$ -大豆伴球蛋白(7S球蛋白)<sup>[6]</sup>。其中,大豆球蛋白的分子量为320~360 kDa,由非共价键连接的6个亚基对组成,几乎不含任何糖基。每个亚基对由1条N末端酸性的 $\alpha$ 链(分子量约为38 kDa)和1条末端碱性的 $\beta$ 链(分子量约为20 kDa)通过二硫键连接形成。 $\beta$ -大豆伴球蛋白分子量为140~180 kDa,由 $\alpha$ 、 $\alpha'$ 和 $\beta$ 亚基组成,3种亚基均包含氨基葡萄糖和甘露糖残基,相对分子质量分别为67,71和50 kDa<sup>[7]</sup>。大豆蛋白肽主要来源于大豆球蛋白。除储存蛋白外,大豆蛋白中还含有 $\beta$ -淀粉酶、细胞色素c、脂肪氧化酶、植物血凝素、脲酶、胰蛋白酶抑制剂等。

由于大豆蛋白的分子量较大、结构复杂,同时还含有大量蛋白酶抑制剂,导致大豆蛋白质的消化吸收利用率不高。微生物的内源酶中存在着广泛的肽酶谱系,可将大豆蛋白转化为小分子肽或氨基酸。如大豆经枯草芽孢杆菌发酵后游离氨基酸含量提高了10~20倍<sup>[8]</sup>。而且,通过微生物菌株选择和发酵条件控制,可生产氨基酸排序不同和分子量不同的大豆蛋白肽。如少孢子根霉和枯草芽孢杆菌的两步联合发酵能显著提高大豆蛋白的水解度,在不破坏大豆必需氨基酸组成的基础上,大幅度提高发酵产物中谷氨酸与天冬氨酸的含量,提高分子量小于20 kDa的大豆肽收率<sup>[9]</sup>。因此微生物发酵是提高大豆蛋白质消化利用率的有效途径,而蛋白质又主要以大豆多肽的形式存在于大豆发酵食品中。

## 2 大豆发酵食品加工

微生物菌株直接影响大豆发酵后的风味形态和营养保健价值,是大豆发酵食品多元化发展的主导原因。应用于大豆发酵食品的微生物主要包括芽孢杆菌、乳酸菌等细菌和毛霉、曲霉、根霉等真菌。大豆食品发酵可进行单菌或混菌接种,通过液体或固体发酵形式进行。

### 2.1 细菌参与的大豆发酵

不同的菌种所需的发酵条件不同,大豆的芽孢杆菌发酵通常在碱性环境进行,而大豆的乳酸菌发酵则需要酸性条件。纳豆富含纤溶酶和活性肽,可预防血栓类疾病,是将纳豆枯草芽孢菌等在较高温度下接种于蒸熟的大豆上,借助其蛋白酶生产出的大豆芽孢杆菌发酵代表性食品。除纳豆芽孢杆菌

外,大豆发酵食品中常用的芽孢杆菌还包括枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等<sup>[4]</sup>。

乳酸菌对大豆发酵食品主要风味前体物质在发酵过程中的积累具有重要作用,在豆酱、酱油和腐乳中,都能发现较高数量的嗜盐四联球菌和耐盐乳酸菌<sup>[10]</sup>。富含活性肽与异黄酮的大豆豆乳,也可通过乳酸菌制备。已报道可用于豆乳发酵的乳酸菌包括10种乳杆菌属菌种(嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、布氏乳杆菌、纤维素乳杆菌、发酵乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、瑞士乳杆菌、德氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌)、1种链球菌属菌种(嗜热链球菌)和5种双歧杆菌属菌种(动物双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、短双歧杆菌、假短双歧杆菌)<sup>[11]</sup>。

### 2.2 真菌参与的大豆发酵

除细菌外,丝状真菌也常应用于大豆发酵食品制备。腐乳、豆豉、酱油以及豆酱等都是常见的丝状真菌大豆发酵食品。腐乳具有降血压和降胆固醇作用,以大豆为原料加工成豆腐后,在豆腐坯上接种毛霉或根霉发酵、加盐及其他辅料腌制而成。其中,毛霉占腐乳工业生产发酵菌种的90%~95%。用于腐乳生产的毛霉菌包括五通桥毛霉、总状毛霉、腐乳毛霉和雅致放射状毛霉<sup>[12]</sup>。

豆豉以整粒大豆为原料,经浸泡、蒸煮、制曲、发酵等工序加工而成,具有抑菌抗癌、抗氧化、抑制 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性等功效。根据所用霉菌种类的不同,霉菌型豆豉可分为毛霉型豆豉、米曲霉型豆豉、根霉型豆豉和脉孢霉型豆豉等,相应代表有四川永川豆豉、湖南浏阳豆豉、印度尼西亚天培豆豉、印度尼西亚昂巧豆豉<sup>[13]</sup>。

味噌是将大豆、大米、小麦等原料蒸熟后,添加米曲霉制曲,然后与蒸熟的大豆及食盐混合,接种酵母菌和乳酸菌,经过发酵熟化而形成的半固态调味品,具有提高人体免疫力、预防胃癌和大肠癌的作用<sup>[14]</sup>。酱油由大豆、小麦、食盐经过制油、发酵等程序酿制而成,其发酵料中的主要霉菌为曲霉、毛霉和根霉,其中最重要的为米曲霉。

豆酱是一种以大豆为基础原料,在不同阶段经霉菌、酵母菌和乳酸菌等多种微生物协同发酵而成的发酵豆制品。豆酱生产所用丝状真菌包括米曲霉、黑曲霉、酱油曲霉和高大毛霉等,目前大多数厂家选用米曲霉和黑曲霉。研究表明,豆酱具有预防肝癌、抑制血清胆固醇上升、抑制脂肪肝积蓄、去除放射性物质、降血压、抗氧化等作用<sup>[15]</sup>。

## 3 大豆发酵食品中的活性肽及其作用

在大豆发酵过程中,微生物可分泌蛋白酶作用

于大豆蛋白直接水解生成小肽,也可通过吸收大豆营养物质进行自身的生长代谢,产生次级代谢产物小肽。尽管生成途径可能不同,大豆发酵食品中的

蛋白肽却都显示出降血压、抗氧化、降血糖、降胆固醇等功效。大豆发酵食品中的主要活性肽功效、来源及发酵菌种的概况见表 1。

表 1 大豆发酵食品中的活性肽  
Table 1 Bioactive peptides from soybean fermented food

功效 Healthy benefits	来源 Source	发酵菌株 Starter culture	参考文献 References
降血压 Antihypertensive	纳豆	纳豆芽孢杆菌	[17]
	豆豉	埃及曲霉	[18]
	中国腐乳	雅致放射毛霉	[20]
	韩国豆酱	酱油曲霉	[23]
	豆乳	屎肠球菌	[25]
抗氧化 Antioxidant	霉豆渣	枯草芽孢杆菌	[30]
	印尼豆豉	根霉	[31]
	韩国清麴酱	枯草芽孢杆菌	[35]
	豆乳	鼠李糖乳杆菌	[36]
抑菌 Antimicrobial	纳豆	纳豆芽孢杆菌	[40]
	味噌	乳酸乳球菌	[41]
	韩国清麴酱	枯草芽孢杆菌	[45]
	豆酱	屎肠球菌	[46]
抗糖尿病 Antidiabetic	韩国豆酱	地衣芽孢杆菌	[48]
抗癌症 Anticancer	韩国豆酱	枯草芽孢杆菌	[51]

3.1 血管紧张素转化酶抑制肽

血管紧张素酶 ACE( EC. 3. 4. 15. 1 )是一种二肽酰羧肽酶,它能促进血管紧张肽 I 型转变为 II 型,同时抑制血管舒缓素的活性,并刺激肾上腺皮质,使其分泌醛固酮,引起血压升高,引发心血管疾病风险。合成 ACE 抑制剂虽然具有药效快而强的特点,但对肾功能有一定的损伤。由于降压效果的副作用小,从天然食物中分离可抑制 ACE 活性的蛋白肽,已成为生物活性肽研究领域的热点。研究表明,如果蛋白肽片段存在疏水氨基酸残基( Try、Phe、Trp、Ala、Ile、Val 和 Met)或碱性氨基酸残基( Lys 和 Arg),肽链 C 末端含 Pro 残基,均可增加肽与 ACE 的结合亲和力,提高肽对 ACE 活性的抑制效果<sup>[16]</sup>。

Ibe 等<sup>[17]</sup>从纳豆芽孢杆菌 O9516 发酵的日本纳豆中分离纯化出 ACE 抑制肽,发现在 1 mg·kg<sup>-1</sup>·bw 的口服低剂量下,该蛋白肽 5 h 即可对自发性高血压大鼠产生显著的降压效果。张建华等<sup>[18]</sup>对埃及曲霉纯种发酵豆豉曲和成品豆豉的 ACE 活性抑制作用进行了研究,发现发酵 48 和 72 h 的豆豉曲提取液经不同的肠胃蛋白酶水解后对 ACE 的抑制活性均有较大的提高,由此推测来源于豆豉曲的 ACE 抑制剂为前药型或前药型与抑制型的混合物。而 Sephadex G-25 凝胶层析结果表明 48 h 豆豉制曲中 ACE 抑制剂的分子量分布较广,共有 4 个组分。其

中抑制 ACE 活性作用最高的组分为苯丙氨酸、异亮氨酸和甘氨酸以 1:2:5 摩尔比例组成的多肽。Kuba 等<sup>[19]</sup>从日本腐乳中提取分离出两种对 ACE 表现为非竞争性抑制作用的多肽 Ile-Phe-Leu 和 Trp-Leu,其在胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶的消化作用下仍可保留一定活性。马艳莉等<sup>[20]</sup>发现中国腐乳对 ACE 活性的抑制作用随着发酵与熟化时间的延长而增加,并与其多肽含量显著相关。汪立君等<sup>[21]</sup>收集了在日本冲绳地区 and 在中国北京生产的腐乳样品,发现中国腐乳的 ACE 活性抑制作用高于日本腐乳,而腐乳的 ACE 活性抑制作用可归功于腐乳中大量存在的分子量低于 10 kDa 的小肽。Li 等<sup>[22]</sup>对比了亚洲不同地区生产的各类发酵大豆产品的 ACE 抑制活性。结果发现印尼天培豆豉、日本腐乳、日本味噌以及中国豆酱对 ACE 半数抑制浓度 IC<sub>50</sub>值分别为 0. 51, 0. 660 ~ 1. 771, 1. 27 ~ 2. 38 和 0. 012 mg·mL<sup>-1</sup>,中国豆酱的 ACE 活性抑制作用表现出众。Nakahara 等<sup>[23]</sup>发现发酵酱油具有优良的 ACE 活性抑制作用,IC<sub>50</sub>值为 0. 45 mg·mL<sup>-1</sup>,可通过长期喂食降低自发性高血压大鼠的血压。进一步对发酵酱油进行分离得到多种具有 ACE 活性抑制作用的多肽,包括 Ala-Trp (IC<sub>50</sub>值:10 μmol·L<sup>-1</sup>)、Ala-Tyr (IC<sub>50</sub>值:48 μmol·L<sup>-1</sup>)、Gly-Trp (IC<sub>50</sub>值:30

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、Ser-Tyr ( $\text{IC}_{50}$ 值:  $67\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、Gly-Tyr ( $\text{IC}_{50}$ 值:  $97\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、Val-Pro ( $\text{IC}_{50}$ 值:  $480\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、Ala-Phe ( $\text{IC}_{50}$ 值:  $190\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、Ala-Ile ( $\text{IC}_{50}$ 值:  $690\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、Val-Pro ( $\text{IC}_{50}$ 值:  $1\ 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。Shin 等<sup>[24]</sup>从朝鲜大酱中分离具有抑制 ACE 效果的三肽 His-His-Leu, 其  $\text{IC}_{50}$  值为  $2.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。自发性高血压大鼠在被连续 3 次静脉注射  $5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{bw}$  的 His-His-Leu 后, 血压下降了 61 mmHg。除腐乳、豆豉和豆酱外, 乳酸菌发酵的豆乳同样含有抑制 ACE 活性的蛋白肽。Martinez-Villaluenga 等<sup>[25]</sup>从新鲜豆乳中筛选出 5 株屎肠球菌, 均具有发酵豆乳生产抑制 ACE 活性蛋白肽的作用。Tsai 等<sup>[26]</sup>使用干酪乳杆菌、嗜酸乳杆菌、嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌和长双歧杆菌在  $40^\circ\text{C}$  下发酵豆乳 30 h 后, 发现豆乳的游离氨基酸与多肽含量显著增加, 豆乳对 ACE 活性的  $\text{IC}_{50}$  值从  $9.28\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  下降至  $0.66\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  (按干重计)。Vallabha 和 Tiku<sup>[27]</sup>使用干酪乳杆菌假植物亚种发酵浓缩大豆蛋白, 从中分离出两种多肽, ACE 活性抑制  $\text{IC}_{50}$  值分别为 17 和  $30\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。进一步将 N 端序列为 Leu-Ile-Val-Thr-Gln 的多肽与其类似物进行 ACE 抑制活性对比, 发现肽链中的 Gln 与 Thr 残基对多肽的 ACE 抑制活性具有重大影响。Singh 和 Vij<sup>[28]</sup>使用植物乳杆菌发酵豆乳, 发现 3, 5 和 10 kDa 的发酵豆乳组分均显示出良好的 ACE 抑制活性, 后续又通过液相色谱-质谱/质谱联用技术从中分离出来自大豆球蛋白和  $\beta$ -大豆伴球蛋白的 17 种抑制 ACE 活性蛋白肽。

### 3.2 抗氧化肽

人体的各类生物化学过程均可诱导生物活性分子氧化, 而体内过多的自由基积蓄容易引发细胞死亡, 导致人体机能衰退。多种自由基, 包括超氧自由基、过氧化氢自由基、羟基自由基、脂质过氧化物、氧化自由基等, 被证实与人类的许多疾病诸如癌症、糖尿病、动脉硬化、关节炎、神经变性疾病等发病机理有关。抗氧化剂可以依据自身结构特点捕获清除自由基, 抑制氧化。研究发现大豆发酵食品的抗氧化性主要归功于其含有的多酚类物质, 如异黄酮、酚酸、黄烷醇等。大豆发酵食品含有的多酚含量越高, 其抗氧化性越强。此外, 游离氨基酸和多肽也可以对大豆发酵食品的抗氧化性做出贡献<sup>[29]</sup>。Zhu 等<sup>[30]</sup>使用枯草芽孢杆菌发酵豆渣制备中国传统食品霉豆渣, 发现发酵 24 h 后, 豆渣的抗氧化能力明显提高, 并与豆渣中的多肽含量具有正相关性。Watanabe 等<sup>[31]</sup>从根霉发酵的印尼豆豉中分离出水溶性抗氧化成分, 发现根霉厌氧发酵产生的氨基酸及多肽的含量增加, 相应的印尼豆豉水溶

性成分的抗氧化功效增强。大豆发酵抗氧化肽的氨基酸组成包括 Trp、His、Phe、Ala、Tyr、Met、Gly、Leu 和 Val。其中, 芳香族氨基酸以及 His 的残基由于含有酚类、吡啶和咪唑官能团, 能够将质子传递给缺电子的自由基, 螯合金属离子, 被认为是大豆发酵多肽抗氧化的主要功能成分<sup>[32]</sup>。

Yu 等<sup>[33]</sup>从枯草芽孢杆菌发酵大豆中分离出的抗氧化肽, 其在  $10\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的浓度下能够清除 62% 的超氧自由基和 96% 的羟基自由基。Fan 等<sup>[34]</sup>研究发现对于细菌型的豆豉而言, 发酵过程中, 蛋白水解产生抗氧化肽的速率要明显高于异黄酮的降解速率。随着发酵过程中蛋白酶活力增加, 蛋白质分解加速, 游离氨基酸增多, 豆豉的抗氧化能力增强。其中, 由疏水氨基酸、芳香性氨基酸、碱性氨基酸或酸性氨基酸组成的低分子量小肽在豆豉的抗氧化性方面发挥了重要作用, 而异黄酮的变化对豆豉抗氧化性没有明显影响。Kim 等<sup>[35]</sup>从韩国清麴酱中分离获得由 Asp、Thr、Ser、Glu、Gly、Lys、His 和 Arg 8 种氨基酸组成的蛋白肽, 具有清除自由基和抵御过氧化氢诱导氧化应激的作用。除发酵豆渣、豆豉和豆酱外, 乳酸菌发酵的豆乳也可产生抗氧化肽。Zhao 和 Shah<sup>[36]</sup>使用不同的乳酸菌发酵豆乳, 发现所得发酵豆乳的抗氧化性和其测得的蛋白酶活性正相关。其中, 鼠李糖乳杆菌发酵豆乳抗氧化活性最高, 表明在豆乳发酵过程中蛋白酶水解产生的多肽以及 Val、Leu、Phe 和 Trp 对发酵豆乳的抗氧化活性具有重要意义。

### 3.3 抑菌肽

抑菌肽可作为食品防腐剂或替代抗生素治疗由细菌或真菌诱导的疾病。蛋白类发酵食品中的抑菌肽可由种曲自身产生或由发酵所用蛋白底物水解产生。而大豆发酵食品中的抑菌肽大多数来源于种曲自身。芽孢杆菌特别是枯草芽孢杆菌是传统大豆发酵食品中产生各类抑菌物质, 用以抑制细菌和真菌生长的常见菌种。由芽孢杆菌生产的蛋白、酶、脂肽和细菌素等被报道能抑制包括弯曲杆菌、肉毒杆菌、单增李斯特菌、伤寒沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌等多种致病菌的生长<sup>[37-38]</sup>。大豆发酵食品中的黏液物质还能通过破坏细胞膜, 抑制有害酵母和革兰氏阳性菌与阴性菌的生长。经检测发现, 这种黏液由低分子量的肽、 $\gamma$ -D-聚谷氨酸以及 levan 型果聚糖组成<sup>[39]</sup>。

从纳豆中分离得到的纳豆芽孢杆菌 TK-1 可以生产一种具有强表面活性的脂肽, 其对灰葡萄孢菌、串珠镰刀菌、黄体球菌和伤寒肠球菌等病原菌具有抗黏附作用。而由纳豆芽孢杆菌 NK-1 产生的

脂肽也具有类似表面活性剂功效,能抑制细菌和真菌生长<sup>[40]</sup>。从味噌筛选的乳酸乳球菌 GM005,能生产有效抑制米酒乳杆菌 JCM1157 生长的细菌素,凝胶色谱和电泳分析显示该细菌素为 N 端封闭的蛋白四聚体,而氨基酸分析揭示该细菌素虽然含有大量的疏水氨基酸与羊毛硫氨酸,却与羊毛硫抗生菌的结构有差异<sup>[41]</sup>。Moreno 等<sup>[42]</sup>从马来西亚豆豉中获得由屎肠球菌生产、分子量分别为 3.4 和 5.4 kDa 的细菌素 *E. faecium* LMG 19827 和 *E. faecium* LMG 19828,可有效抑制单增李斯特菌的生长。后续在肠球菌素的编码基因表征中发现了与 3 种细菌素 enterocin P, enterocin L50A 和 enterocin L50B 相关的扩增基因片断。来自韩国传统发酵荞麦豆酱 soks-eongjang 的枯草芽孢杆菌 HJ18-4 可以产生一种抑菌肽,用于抑制食源性致病菌如蜡样芽孢杆菌的共生长。实时 PCR 试验显示与蜡样芽孢杆菌毒性相关的基因在枯草芽孢杆菌 HJ18-4 的存在下显著表达下调<sup>[43]</sup>。来自韩国传统发酵豆酱 kyeopjang 的枯草芽孢杆菌 SCK-2 可生产热稳定性和 pH 稳定性良好的抑菌肽 AMP IC-1,其分子量为 3.4 kDa,由 33 个氨基酸残基组成,含有 Cys、Asn(Asp)、Gln(Glu)、Ser、Ala、Phe、Gly、Arg、Thr、Val、Ile、Leu 和 Lys 13 种氨基酸<sup>[44]</sup>,可抑制蜡样芽孢杆菌的生长。Lee 等<sup>[45]</sup>从韩国清麴酱中分离的枯草芽孢杆菌 LM7,可生产由 4 个芽孢菌霉素 D 和 4 个表面活性素类似物组成的脂肽,热稳定性和 pH 稳定性良好,对蜡样芽孢杆菌和单增李斯特菌等革兰氏阳性菌具有广谱抑菌性,同时还可抑制部分真菌的生长,却不抑制植物乳杆菌和乳酸乳球菌乳酸亚种等乳酸菌的生长。王晓蕊<sup>[46]</sup>采集了辽宁省不同地区的农家发酵豆酱样品,进行产细菌素的乳酸菌筛选,获得了一株产细菌素的屎肠球菌 R1,其对常见抗生素均无抗性,基因组 DNA 不含有常见的肠球菌相关毒力基因,安全性良好。其所产细菌素在酸性条件下稳定,热稳定性好,抑菌谱较为广泛,对单增李斯特菌的抑制能力最强。

### 3.4 抗糖尿病肽

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性疾病,可分为 I 型糖尿病和 II 型糖尿病。其中, I 型糖尿病由胰腺无法分泌胰岛素、胰岛素绝对缺乏导致, II 型糖尿病由胰岛素分泌与血糖吸收之间的不平衡导致。Yang 等<sup>[47]</sup>发现韩国豆酱酱醅具有防治 II 型糖尿病的功效,芽孢杆菌和米曲霉联合发酵酱醅的多肽与异黄酮苷元含量越高,抗糖尿病效果越好。Kwon 等<sup>[48]</sup>发现随着发酵时间的延长,韩国豆酱酱醅水提物对 3T3-L1 脂肪细胞胰岛素刺激葡萄

糖摄取的促进效果增加,推测这种抗 II 型糖尿病功效是由酱醅中丰富的低分子量多肽造成的。地衣芽孢杆菌发酵的韩国豆酱对 II 型糖尿病模型小鼠具有促胰岛素活性作用,这与豆酱中的低分子量多肽及异黄酮苷元相关,其分子量小于 3 kDa 的多肽具有良好的 PPAR $\gamma$  受体激动剂活性,可促进胰岛素活性<sup>[49]</sup>。葛喜珍等<sup>[50]</sup>发现淡豆豉能抑制糖尿病模型小鼠动脉血管中的血清非酶糖化反应,而且抑制作用随浓度升高而增强。然而,尽管相关研究表明大豆发酵食品的抗糖尿病活性与其含有的多肽息息相关,但是目前报道还未见有关来源于大豆发酵食品、结构确定的抗糖尿病活性肽的分离纯化表征,相关研究仍有待进一步深入。

### 3.5 抗癌肽

大豆发酵食品的抗癌功效已被多次报道,但关于大豆发酵食品中的抗癌肽的研究并不多见。大豆发酵食品中的抗癌肽,多为由种曲自身或发酵期间大豆蛋白水解产生的表面活性肽(包括环状肽和脂肽)。Lee 等<sup>[51]</sup>从韩国豆酱 doenjang 中分离获得的枯草芽孢杆菌 CSY191,能发酵生产一类具有抗癌活性、由氨基酸序列 Gly-Leu-Leu-Tyr-Asp-Leu-Leu 和羟基脂肪酸等组成的表面活性肽,对乳腺癌细胞 MCF-7 具有呈量效关系的抑制作用。利用其发酵制备韩国清麴酱 48 h 后,其表面活性肽的含量增长到 0.3 ~ 48.2 g·kg<sup>-1</sup>,抗癌活性增长 2.6 ~ 5.1 倍。研究结果表明清麴酱通过激活转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 信号通路,下调与发炎机制相关的基因表达水平,抑制癌细胞的生长。Cao 等<sup>[40]</sup>在纳豆中发现由纳豆芽孢杆菌 TK-1 生成的脂肽类表面活性肽,不仅具有抑菌活性,还能在体外试验中抑制白血病细胞 K-562 和肝癌细胞 BEL-7402 的生长,半抑制浓度分别为 19.1 和 30.2 mg·mL<sup>-1</sup>。Song 等<sup>[52]</sup>从韩国豆酱中分离出多个含有大量疏水氨基酸如脯氨酸、亮氨酸和酪氨酸的多肽,发现其对 NIH/3T3 小鼠静止性成纤维细胞瘤细胞、P388D1 小鼠淋巴瘤细胞、MSB1 鸡 T 细胞淋巴瘤细胞、SNU C2A 人类结肠癌细胞系的生长具有抑制作用,遗憾的是,这些来自大豆发酵的抗癌疏水蛋白肽的结构没有得到进一步表征。

除发酵产生的大豆抗癌肽外,在大豆发酵食品包括豆豉、豆腐、豆奶等中,还发现了来自大豆本身的蛋白肽露那辛(lunasin)<sup>[53-54]</sup>。露那辛由 43 个氨基酸残基组成,可以预防结肠癌、前列腺癌、皮肤癌、肝癌及乳腺癌等多种癌症<sup>[55-56]</sup>。露那辛能抑制小鼠成纤维细胞在化学致癌物质(7,12-二甲苯并蒽和 3-甲基胆蒽)诱导下的癌症病灶形成,降低

癌症发生率<sup>[57]</sup>,对叔丁基过氧化氢诱导氧化应激下的人肝肿瘤细胞 HepG2 具有化学预防作用<sup>[58]</sup>。露那辛能以休眠或激活状态存在于人体不同器官组织中。但是在大豆发酵过程中露那辛可能面临被种曲分泌蛋白酶降解的风险。利用枯草芽孢杆菌和米曲霉制备的纳豆和味噌中没有发现露那辛<sup>[56]</sup>,而在利用少孢根霉发酵制备的印尼豆豉中存在露那辛,说明少孢根霉分泌的蛋白酶不会降解露那辛<sup>[54]</sup>。因此在需要保持大豆发酵食品由露那辛产生的抗癌活性时,应该谨慎选择发酵菌种,避免露那辛降解。

## 4 结论与展望

大豆的蛋白质丰富,其食用价值却容易受到植物凝集素、脲酶、蛋白酶抑制剂等抗营养因子与自身豆腥味的制约。大豆发酵可以大幅度提高大豆的食品生物利用率。发酵过程中,大豆抗营养因子会被破坏,豆腥味和苦味被弱化改良,同时会有包括蛋白肽在内的多种生理活性物质生成。大豆发酵食品中的蛋白肽可以由菌种自身代谢产生,也可来源于大豆蛋白在发酵过程中的降解。大豆发酵肽具有降血压、抗氧化、抑菌抗癌等功效,有望应用于替代部分药品,用于相关疾病治疗。然而,提升大豆发酵食品工业化水平、研发大豆低盐发酵新工艺,在保持发酵大豆食品风味的基础上提高其功能性,力求达到低盐化效果是大豆食品工业化发展的重要内容;同时,加速深入大豆发酵食品中生产蛋白活性肽的菌株筛选、大豆发酵蛋白肽的结构表征及其活性分析,仍是大豆发酵食品及其活性肽研究工作的重点方向。

## 参考文献

- [1] Samurailatpam S, Amit K R. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits[J]. Trends in Food Science and Technology, 2016, 50(1): 1-10.
- [2] 张梦涵,丁长河. 发酵大豆食品功能性研究现状[J]. 食品工业, 2018, 39(6): 241-245. (Zhang M H, Ding C H. Research of functionality in fermented soybean food [J]. The Food Industry, 2018, 39(6): 241-245.)
- [3] 姚小飞,石慧. 大豆多肽的功能特性及其开发应用进展[J]. 中国食物与营养, 2009(7): 21-24. (Yao X F, Shi H. Functional characteristics of soybean polypeptide and its development and application progress[J]. Food and Nutrition in China, 2009(7): 21-24.)
- [4] 张金兰,张建,纪凤娣,等. 传统大豆发酵食品中主要功能细菌的研究进展[J]. 中国酿造, 2011(1): 5-8. (Zhang J L, Zhang J, Ji F D, et al. Research progress on important functional bacteria in fermented soybean food [J]. China Brewing, 2011(1): 5-8.)
- [5] 杨福明,赵阳,侯静,等. 传统大豆发酵食品及其工业化开发关键技术[J]. 中国调味品, 2013, 38(8): 18-21. (Yang F M, Zhao Y, Hou J, et al. Key technology progress of traditional fermented soybean food industrialization [J]. China Condiment, 2013, 38(8): 18-21.)
- [6] 刘新旗,涂丛慧,张连慧,等. 大豆蛋白的营养保健功能研究现状[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2012, 30(2): 1-6. (Liu X Q, Tu C H, Zhang L H, et al. Research status of nutritional and health functions of soybean protein[J]. Journal of Beijing Technology and Business University (Natural Science Edition), 2012, 30(2): 1-6.)
- [7] 田琨,管娟,邵正中,等. 大豆分离蛋白结构与性能[J]. 化学进展, 2008(4): 565-573. (Tian K, Guan J, Shao Z Z, et al. Structural and functional study of soybean protein isolation[J]. Progress in Chemistry, 2008(4): 565-573.)
- [8] Sanjukta S, Rai A K, Muhammed A, et al. Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14: 650-658.
- [9] Weng T M, Chen M T. Effect of two-steps fermentation by *Rhizopus oligosporus* and *Bacillus subtilis* on protein of fermented soybean[J]. Food Science and Technology Research, 2011, 17: 393-400.
- [10] 梁恒宇,邓立康,林海龙. 传统发酵大豆食品中乳酸菌的分布、功能和应用[J]. 食品科学, 2013, 34(19): 381-385. (Liang H Y, Deng L K, Lin H L. Distribution, function and application of lactic acid bacteria in fermented soybean food [J]. Food Science, 2013, 34(19): 381-385.)
- [11] 李学莉,胡海娥,张金桃,等. 乳酸菌发酵豆乳研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(12): 385-390. (Li X L, Hu H E, Zhang J T, et al. Research progress on fermented soybean milk by lactobacillus [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(12): 385-390.)
- [12] 周锦绣,林奇,唐卿燕. 我国腐乳生产用菌的研究现状[J]. 食品科技, 2007(11): 20-23. (Zhou J X, Lin Q, Tang Q Y. Research status of bacteria used in humus production in China [J]. Food Science and Technology, 2007(11): 20-23.)
- [13] 蒋立文. 发酵豆豉的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(6): 1803-1809. (Jiang L W. Research progress on fermented black bean sauce [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2013, 4(6): 1803-1809.)
- [14] 吴海兰,吴春生,丁晓雯. 日本传统发酵食品味噌与中国豆豉的比较[J]. 中国调味品, 2014, 39(2): 134-138. (Wu H L, Wu C S, Ding X W. Comparison between miso and tempeh in Japanese traditional fermented food [J]. China Condiment, 2014, 39(2): 134-138.)
- [15] 贡汉坤,魏福华,徐大好. 豆酱曲霉及产酶特性[J]. 农产品加工(学刊), 2007(9): 21-23. (Gong H K, Wei F H, Xu D H. Aspergillus legume and its enzyme production characteristics [J]. Agricultural Products Processing (Academic Journal), 2007(9): 21-23.)
- [16] 周贺霞,马良,张宇昊. 食品中降血压肽的研究现状及应用[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(1): 11-15. (Zhou H X, Ma L, Zhang Y H. Research status and application of hypotensive

- peptide in food[J]. Food and Fermentation Technology, 2012, 48 (1): 11-15. )
- [17] Ibe S, Yoshida K, Kumada K, et al. Antihypertensive effects of natto, a traditional Japanese fermented food, in spontaneously hypertensive rats [J]. Food Science and Technology Research, 2009, 15: 199-202.
- [18] Zhang J H, Tatsumi E, Ding C H, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in douchi, a Chinese traditional fermented soybean product [J]. Food Chemistry, 2006, 98: 551-557.
- [19] Kuba M, Tanaka K, Tawata S, et al. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2003, 67: 1278-1283.
- [20] Ma Y, Cheng Y, Yin L, et al. Effects of processing and NaCl on angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and  $\gamma$ -aminobutyric acid content during sufu manufacturing[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 6: 1782-1789.
- [21] Wang L J, Saito M, Tatsumi E, et al. Antioxidative and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of sufu (fermented tofu) extracts[J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 2003, 37 (2): 129-132.
- [22] Li F J, Yin L J, Cheng Y Q, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of extracts from commercial Chinese style fermented soy paste [J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 2010, 44(2): 167-172.
- [23] Nakahara T, Sano A, Yamaguchi H, et al. Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-like seasoning and identification of its angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58 (2): 821-827.
- [24] Shin Z I, Yu R, Par S A, et al. His-His-Leu, an angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity *in vivo*[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(6): 3004-3009.
- [25] Martinez-Villaluenga C, Torino M I, Martín V, et al. Multifunctional properties of soy milk fermented by *Enterococcus faecium* strains isolated from raw soy milk[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2012, 60(41): 10235-10244.
- [26] Tsai J S, Lin Y S, Pan B S, et al. Antihypertensive peptides and  $\gamma$ -aminobutyric acid from prozyme 6 facilitated lactic acid bacteria fermentation of soymilk[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(6): 1282-1288.
- [27] Vallabha V S, Tiku P K. Antihypertensive peptides derived from soy protein by fermentation [J]. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2014, 20(2): 161-168.
- [28] Singh B P, Vij S. Growth and bioactive peptides production potential of *Lactobacillus plantarum* strain C2 in soy milk: A LC-MS/MS based revelation for peptides biofunctionality[J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 86: 293-301.
- [29] Sanjuktta S, Rai A K, Muhammed A, et al. Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation[J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14: 650-658.
- [30] Zhu Y P, Fan J F, Cheng Y Q, et al. Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2 [J]. Food Control, 2008, 19 (7): 654-661.
- [31] Watanabe N, Fujimoto K, Aoki H. Antioxidant activities of the water-soluble fraction in tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh) [J]. International Journal of Food Sciences & Nutrition, 2007, 58(8): 577-587.
- [32] 田明慧, 林亲录, 梁盈, 等. 植物源性食物中活性肽氨基酸组成的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(6): 110-116. (Tian M H, Lin Q L, Liang Y, et al. Advances in studies on the composition of active peptide amino acids in plant-based foods [J]. Food and Fermentation Industries, 2014, 40 (6): 110-116. )
- [33] Yu B, Lu Z X, Bie X M, et al. Scavenging and anti-fatigue activity of fermented defatted soybean peptides[J]. European Food Research and Technology, 2008, 226(3): 415-421.
- [34] Fan J, Zhang Y, Chang X, et al. Changes in the radical scavenging activity of bacterial-type douchi, a traditional fermented soybean product, during the primary fermentation process[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73 (12): 2749-2753.
- [35] Kim S L, Chi H Y, Kim J T, et al. Evaluation of antioxidant activities of peptides isolated from Korean fermented soybean paste, chungkukjang [J]. Korean Journal of Crop Science, 2011, 56 (4): 349-360.
- [36] Zhao D, Shah N P. Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation[J]. LWT - Food Science and Technology, 2014, 58 (2): 454-462.
- [37] Sumi C D, Yang B W, Yeo I C, et al. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: A new era for antibiotics [J]. Revue Canadienne De Microbiologie, 2015, 61(2): 93-103.
- [38] Yeo I C, Lee N K, Cha C J, et al. Narrow antagonistic activity of antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis*, SCK-2 against *Bacillus cereus* [J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2011, 112 (4): 338-344.
- [39] Schallmeyer M, Singh A, Ward O P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(1): 1-17.
- [40] Cao X H, Liao Z Y, Wang C L, et al. Evaluation of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2009, 40(2): 373.
- [41] Onda T, Yanagida F, Tsuji M, et al. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from Miso-paste [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 87(1-2): 153-159.
- [42] Moreno M R F, Leisner J J, Tee L K, et al. Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(1): 147-157.
- [43] Eom J S, Lee S Y, Choi H S. *Bacillus subtilis* HJ18-4 from traditional fermented soybean food Inhibits *Bacillus cereus* growth and toxin-related genes[J]. Journal of Food Science, 2014, 79(11): 2279-2287.

- [44] Yeo I C, Lee N K, Cha C J, et al. Narrow antagonistic activity of antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis*, SCK-2 against *Bacillus cereus*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2011, 112(4): 338-344.
- [45] Lee M H, Lee J, Nam Y D, et al. Characterization of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* sp. LM7 isolated from chungkookjang, a Korean traditional fermented soybean food[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 221: 12-18.
- [46] 王晓蕊. 豆酱中产细菌素屎肠球菌的筛选及特性分析[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2016: 23-30. (Wang X R. Screening and characteristic analysis of enterococcus enterococcus bacteriosa in soybean paste[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016: 23-30.)
- [47] Yang H J, Kwon D Y, Min J K, et al. Unsalted soybeans fermented with *Bacillus subtilis* and *Aspergillus oryzae*, potentiates insulinotropic actions and improves hepatic insulin sensitivity in diabetic rats[J]. Nutrition & Metabolism, 2012, 9(1): 1-12.
- [48] Kwon D Y, Sang M H, Ahn I S, et al. Isoflavonoids and peptides from meju, long-term fermented soybeans, increase insulin sensitivity and exert insulinotropic effects *in vitro*[J]. Nutrition, 2011, 27(2): 244-252.
- [49] Yang H J, Kim H J, Kim M J, et al. Standardized chungkookjang, short-term fermented soybeans with *Bacillus lichemiformis*, improves glucose homeostasis as much as traditionally made chungkookjang in diabetic rats[J]. Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition, 2013, 52(1): 49-57.
- [50] 葛喜珍, 刘海燕, 郑来丽, 等. 淡豆豉、黄大豆及黑大豆体内抗蛋白非酶糖化作用研究[J]. 食品科学, 2008(10): 557-559. (Ge X Z, Liu H Y, Zheng L L, et al. Studies on the effect of antiproteinase and non-enzymatic saccharification *in vitro* of tempeh, soybean and black soybean[J]. Food Science, 2008(10): 557-559.)
- [51] Lee J H, Nam S H, Seo W T, et al. The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells[J]. Food Chemistry, 2012, 131(4): 1347-1354.
- [52] Song E K, Pai T, Lee H J. Cytotoxic effects of the peptides derived from traditional Korean soy sauce on tumor cell lines[J]. Food Science and Biotechnology, 1998, 7(2): 1-5.
- [53] Cavazos A, Morales E, Dia V P, et al. Analysis of lunasin in commercial and pilot plant produced soybean products and an improved method of lunasin purification[J]. Journal of Food Science, 2012, 77(5): 539-545.
- [54] Blanca H, Chiachien H, Beno D L. Lunasin and Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) in US commercial soy foods[J]. Food Chemistry, 2009, 115(2): 574-580.
- [55] Hernández-Ledesma B, Hsieh C C, Lumen B O. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention [J]. Peptides, 2009, 30(2): 26.
- [56] Hsieh C C, Martínez-Villaluenga C, Lumen B O D, et al. Updating the research on the chemopreventive and therapeutic role of the peptide lunasin[J]. Journal of Science and Food Agriculture, 2017, 98(6): 2070-2079.
- [57] Hsieh C C, Hernández-Ledesma B, Lumen B O D. Soybean peptide lunasin suppresses *in vitro* and *in vivo* 7, 2-dimethylbenz[a]anthracene-induced tumorigenesis[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(9): 311-316.
- [58] Fernández-Tomé S, Ramos S, Cordero-Herrera I, et al. *In vitro* chemo-protective effect of bioactive peptide lunasin against oxidative stress in human HepG2 cells[J]. Food Research International, 2014, 62(1): 793-800.