



黑豆胰蛋白酶抑制剂性质分析及高温对其消化特性的影响

苏子健¹, 孙乐常^{1,2}, 颜龙杰¹, 张凌晶^{1,2}, 刘光明^{1,2}, 曹敏杰^{1,2}

(1. 集美大学 食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 水产品深加工技术国家地方联合工程研究中心, 福建 厦门 361021)

摘要:胰蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitor, TI)在食品科学和生物技术中具有重要的研究价值。为探讨黑豆胰蛋白酶抑制剂(black soybean trypsin inhibitor, BSTI)的性质及胃肠液消化特性,本研究通过脱脂、热处理、硫酸铵盐析以及阴离子柱层析等方法,从黑豆中纯化得到BSTI。SDS-PAGE显示BSTI呈单一条带,相对分子质量约为21 kDa。在60℃以下与pH2~11的范围内,BSTI呈现较高稳定性。当BSTI与胰蛋白酶的摩尔比达到1时,胰蛋白酶的活力被抑制在15%以下。抑制动力学结果表明,BSTI对胰蛋白酶的抑制属非竞争性抑制,其抑制常数 $K_i = 0.24 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。圆二色谱分析发现,在常温下BSTI的二级结构为: β -折叠43.4%,无规则卷曲29.0%, β -转角21.2%, α -螺旋8.1%。BSTI的变性温度为 $61 \pm 0.9^\circ\text{C}$ 。BSTI在模拟胃肠液消化过程中表现出很强的抗酶解作用,但经121℃热处理30 min后,其抗酶解作用显著降低,易被胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶等主要消化酶消化。

关键词:纯化;黑豆;胰蛋白酶抑制剂;抑制;消化

Purification, Characterization of a Trypsin Inhibitor from Black Soybean [*Glycine max* (L.) merr.] and Effect of High Temperature on Its Digestion

SU Zi-jian¹, SUN Le-chang^{1,2}, YAN Long-jie¹, ZHANG Ling-jing^{1,2}, LIU Guang-ming^{1,2}, CAO Min-jie^{1,2}

(1. College of Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. National & Local Joint Engineering Research Center of Processing Technology for Aquatic Products, Xiamen 361021, China)

Abstract: Trypsin inhibitor (TI) has significant research value in food science and biotechnology. In order to investigate the properties of black soybean trypsin inhibitor (BSTI) and the digestive properties of gastrointestinal fluids, BSTI was purified from black soybeans by degreasing, heat treatment, ammonium sulfate salting out and anion column chromatography. SDS-PAGE showed a single band of BSTI with a relative molecular mass of approximately 21 kDa. BSTI was stable below 60℃ and in the range of pH2-11. When the molar ratio of BSTI to trypsin reached 1, the activity of trypsin was suppressed to 15% or less. Inhibition kinetics indicated that the inhibition of trypsin by BSTI was non-competitive type, and its inhibition constant $K_i = 0.24 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The results of circular dichroism analysis showed that the secondary structure of BSTI at room temperature was β -sheet 43.4%, random coil 29.0%, β -turn 21.2%, α -helix 8.1% and its denaturation temperature was $61 \pm 0.9^\circ\text{C}$. BSTI was resistant to simulated gastrointestinal fluid digestion. However, after heat treatment at 121℃ for 30 min, the anti-enzymatic action of BSTI was significantly reduced, and was easily hydrolyzed by major digestive enzymes such as pepsin, trypsin and chymotrypsin.

Keywords: Purification; Black soybean; Trypsin inhibitor; Inhibition; Digestion

胰蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitor, TI)是一类能够显著抑制胰蛋白酶与类胰蛋白酶活性的蛋白质或多肽的总称,其广泛存在于动物血液、植物种子及微生物细胞中^[1]。TI通过与相应的靶酶相互作用,来控制生物体内蛋白水解的平衡,从而维持生物机体处于健康稳态^[2]。一些研究表明,TI除了具有抑制蛋白酶活性的功能之外,还具有抗菌、抗病毒与抗肿瘤等生物活性^[3,4],因此赋予了其在生物学以及现代医学中应用的潜力。在食品营养领域,TI因对热稳定、不易被主要消化酶胰蛋白酶等消化分解,从而影响食品中蛋白质的消化吸收利用,被认为是一种抗营养因子。因此,在食品加工中如何处理豆类TI并使其有效失活,以提高豆类蛋

白的消化性和营养价值显得尤为重要^[5-6]。

植物TI是目前较为熟知的胰蛋白酶抑制剂,而豆科植物种子中TI的储量最为丰富,在豆类中其通常有Kunitz与Bowman-Birk两种存在类型,这两种TI在分子量以及结构上具有较大差异。目前,随着研究的不断深入,不同豆类中的TI相继被发现,并且越来越多的证据表明,每种豆类中所含的TI均具有自身特有的性质^[7-9]。

豆科作物因其良好的营养价值而受到广泛食用,而作为豆类中主要的过敏原及抗营养因子,TI的消化特性同样引起关注。早在1996年,Astwood等^[10]对大豆中的胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibitor, STI)进行了消化特性表征,结果表明STI

收稿日期:2019-02-19

基金项目:国家自然科学基金(31772049);福建省科技计划(2017N5011)。

第一作者简介:苏子健(1993-),男,硕士,主要从事食品生物技术研究。E-mail:15959452032@163.com。

通讯作者:曹敏杰(1964-),男,博士,教授,主要从事蛋白质化学及水产加工研究。E-mail:mjcao@jmu.edu.cn。

虽然作为胰蛋白酶抑制剂,但对胃液消化酶也有极强的抗性。随后 Roychaudhuri 等^[11]进一步的研究发现,即使在 90~100℃ 下短暂处理 5 min,STI 仍不被胃蛋白酶消化。可见,豆类 TI 具有很高的消化稳定性。

黑豆[*Glycine max* (L.) Merr.],别名黑大豆,是我国主要的食用豆类之一。黑豆蛋白质含量丰富,有植物蛋白之王的美称^[12]。张瑞芬等^[13]的研究指出,黑豆中所含的必需氨基酸含量比大豆高 29%,营养价值优于大豆。此外,黑豆表皮中含有大量花青素,具有更好的保健功效。以往的研究对 STI 的报道较多,但对同为大豆科属的黑豆胰蛋白酶抑制剂(black soybean trypsin inhibitor, BSTI)的相关研究较少,尤其缺少对 BSTI 在模拟胃肠液中消化特性的探究。因此,本研究尝试从黑豆中分离纯化 BSTI,并对其生化性质、抑制动力学以及消化特性进行研究,以期对 BSTI 在食品及生物技术领域的开发应用提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

干制黑大豆(*Sojae Semen Nigrum*)购自厦门集美市场,经高速粉碎机研磨后过 40 目筛,取粉备用。

SDS-PAGE 用标准蛋白为 Fermentas 公司产品;胰蛋白酶、胃蛋白酶及胰凝乳蛋白酶均为美国 Sigma 公司产品;荧光合成底物 Boc-Gln-Arg-Arg-MCA 为日本 Peptide Institute 公司产品;层析树脂 Q-Sepharose 购于美国 GE Healthcare 公司;硫酸铵、丙酮及甲醇等试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

组织捣碎机 PT2500E,瑞士 Kinematica 公司;高速冷冻离心机 Avanti J-26S XP,美国 Beckman 公司;pH 计 ϕ -350,德国 Sartorius 公司;恒温水浴锅 WB-10L1,德国 Memmert 公司;蛋白质电泳装置 Mini-PROTEAN,美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像装置 G-BOX,英国 Syngene 公司;紫外分光光度计 Lambda 35,美国 Perkin Elmer 公司;荧光分光光度计 FP-6200,日本 Jasco 公司;圆二色谱仪 Chirascan,英国 Applied Photophysics 公司。

1.3 试验设计

将黑豆粉以 3 倍体积的丙酮浸泡搅拌 2 h,自然沉淀后倾去丙酮,并于通风橱中风干。向黑豆粉中加入 8 倍体积的 0.125 mol·L⁻¹ H₂SO₄,充分捣碎后搅拌 24 h,之后在 12 000 g 下离心 20 min,弃沉淀。上清液于 60℃ 下加热 90 min,以 1 mol·L⁻¹ 的 NaOH 调 pH 至 7.0,静置 30 min 后离心 30 min,弃沉淀。上清液用 40%~60% 饱和度 (NH₄)₂SO₄ 沉淀,将所

得沉淀溶于少量 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)并用该缓冲液中充分透析,得 BSTI 粗提液。将 BSTI 粗提液上样于 Q-Sepharose 阴离子交换层析柱,充分淋洗后,以含 0~0.5 mol·L⁻¹ NaCl 的缓冲液进行线性洗脱,收集抑制活性高的组分进行 SDS-PAGE 分析。测定纯化所得的 BSTI 蛋白浓度,并对 BSTI 的性质、二级结构、对胰蛋白酶的抑制作用和消化特性进行分析。

1.4 测定项目与方法

1.4.1 蛋白质浓度的测定 蛋白含量用紫外分光光度计在 280 nm 下测定吸光值;蛋白浓度定量测定参考 Lowry 等^[14]的方法,以牛血清蛋白(BSA)作标准曲线测定。

1.4.2 BSTI 抑制活性的测定 参考 Shen 等^[15]的方法稍作修改。将纯化所得的 BSTI 稀释至合适浓度,在含 50 μ L 胰蛋白酶的 850 μ L 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)中,加入 50 μ L BSTI,混合后在 4℃ 下放置 15 min 使充分反应。之后加入 10 μ mol·L⁻¹ 的荧光合成底物 Boc-Gln-Arg-Arg-MCA,37℃ 下反应 10 min。加入终止液[V(甲醇):V(水):V(异丙醇)=35:30:35]1.5 mL 终止反应,在激发波长 380 nm 和发射波长 450 nm 下用荧光分光光度计测定。对照组以 50 μ L 蒸馏水代替 BSTI。1 个酶活力单位(U)定义为每分钟释放 1 nmol 7-氨基-4-甲基香豆素(7-amino-4-methylcoumarin, AMC)的酶量;一个抑制活力单位(TLU)则定义为抑制 1 个单位胰蛋白酶活性的抑制剂量。

1.4.3 性质分析

(1)热稳定性测定 将纯化的 BSTI 稀释至 1 mg·mL⁻¹,分别在 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 和 100℃ 下热处理 30 min 和 1 h,之后立即置于冰上冷却,按 1.4.2 描述的方法测定其残余的抑制活性。

(2)pH 稳定性测定 将 BSTI 稀释至 1 mg·mL⁻¹ 后分别置于 pH2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 和 11.0 的缓冲液中处理 1 h,之后取少量 BSTI,在 pH8.0 下测定其抑制活性。

1.4.4 二级结构分析

(1)二级结构测定 在 30℃ 下,对浓度为 0.24 mg·mL⁻¹ 的 BSTI 溶液以圆二色谱仪扫描。比色皿厚度 0.1 cm,扫描波长范围为 190~260 nm,扫描速度 100 nm·min⁻¹,光谱间隔 1 nm,反应时间 2 s。以 CDNN 软件分析扫描得到的曲线,得到 BSTI 的二级结构数据。

(2)变性温度的测定 在 30~100℃ 范围内,以圆二色谱仪扫描 0.24 mg·mL⁻¹ 的 BSTI 溶液,每 10℃ 扫描一次。扫描完毕后以 Global 3 软件分析扫描得到的不同温度下 BSTI 的圆二色谱流出曲线,计

算得到 BSTI 的变性温度。

1.4.5 BSTI 对胰蛋白酶的抑制作用分析

(1)BSTI 对胰蛋白酶活性的影响 固定胰蛋白酶的浓度,测定不同浓度下的 BSTI 对 1.0 mg·mL⁻¹ 胰蛋白酶的抑制效果,并以 BSTI 与胰蛋白酶的摩尔质量比对胰蛋白酶的活性作图。

(2)抑制动力学参数的测定 以 Boc-Gln-Arg-Arg-MCA 为底物进行抑制动力学参数的测定。在不同抑制剂浓度下,改变底物浓度(10~40 μmol·L⁻¹),测定反应的平均速率,并以 1/v 对 1/[S]作图,绘制 Lineweaver-Burk 双倒数曲线。通过观察加入抑制剂后酶促反应的最大反应速度 V_{\max} 或米氏常数 K_m 的变化,计算出抑制常数 K_i 。

(3)BSTI-胰蛋白酶复合物的 SDS-PAGE 分析

将 1.0 mg·mL⁻¹浓度的 BSTI 及胰蛋白酶按相同体积充分混匀,于 4℃ 下静置 120 min 后进行 SDS-PAGE 分析。电泳须在 4℃ 下进行。

1.4.6 BSTI 的消化特性分析

(1)模拟胃液消化试验 模拟胃液(simulated gastric fluid, SGF)参照美国药典方法配置^[16],使用活性为 250 U·mg⁻¹的猪胃蛋白酶,1 L 模拟胃液中含 2 g 的 NaCl 并以 HCl 调至 pH1.2。体外模拟胃液消化实验参照万楚君等^[17]的方法并稍作修改。用作胃液消化的 BSTI 分为两份,一份未经加热处理;另一份于 121℃ 下加热 30 min。分别取 50 μL 2.0 mg·mL⁻¹浓度的 BSTI 溶液以及经加热处理后的 BSTI 溶液,在 37℃ 下预热后与 50 μL 模拟胃液充分混匀,之后加入胃蛋白酶使其与 BSTI 的比例为 1:50(W/W),于 37℃ 下分别反应 1,3,5,10,15,30,60 min,到达反应时间后以 NaOH 调至 pH8.0 终止反应,进行 Tricine-SDS-PAGE 分析。

(2)模拟肠液消化试验 模拟肠液(simulated intestinal fluid, SIF)参照美国药典配置^[16],试验用猪胰蛋白酶与牛胰凝乳蛋白酶的活性分别为 250 和 40 U·mg⁻¹。1 L 模拟肠液中含有 6.8 g 的 KH₂PO₄,并以 NaOH 调至 pH7.5。体外模拟肠液消化的步骤参照万楚君等^[17],略作修改。与模拟胃液消化试验相同,用作肠液消化的 BSTI 也分为非加热和 121℃ 下加热 30 min 两份。胰蛋白酶与 BSTI 的质量比为 1:50,于 37℃ 下反应 5,15,30,60,90,120,180 min,反应时间到达后在 95℃ 下加热 10 min 终止反应,进行 Tricine-SDS-PAGE 分析。胰凝乳蛋白酶消化反应体系与胰蛋白酶相同。

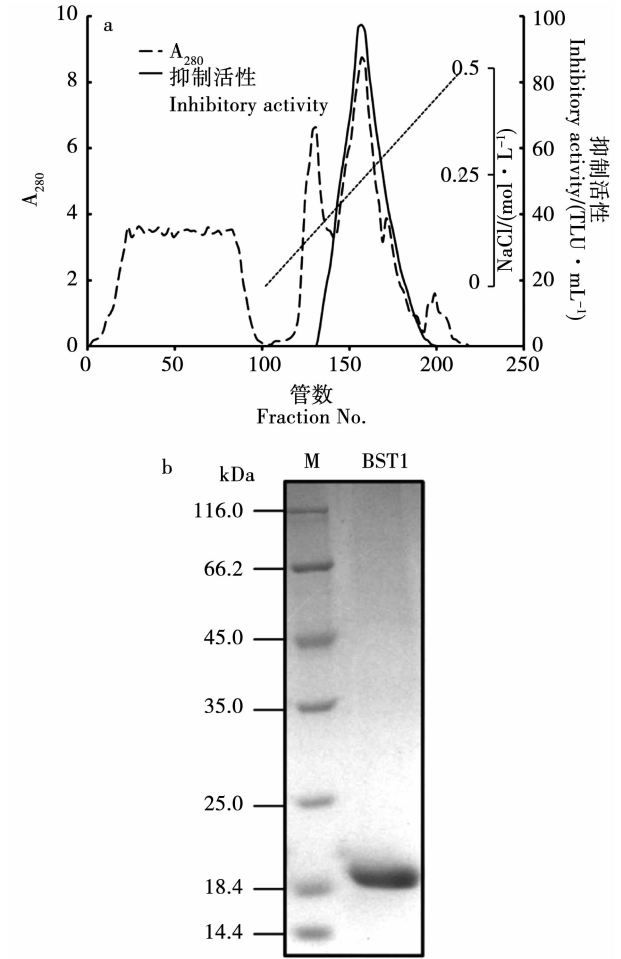
(3)模拟胃肠液连续消化试验 模拟胃肠液连续消化总体积为 600 μL,胃蛋白酶、胰蛋白酶与胰凝乳蛋白酶的添加量均为 1:50(W/W)。用以连续消化的 BSTI 同样分为两组,一份未经加热处理;另一份于 121℃ 下加热 30 min。各取 300 μL 2.0 mg·mL⁻¹

浓度的 BSTI 溶液与等体积的模拟胃液充分混匀,之后加入胃蛋白酶于 37℃ 下消化 60 min,到达反应时间后以 NaOH 调至 pH8.0 终止反应。然后,向其中加入胰蛋白酶与胰凝乳蛋白酶继续消化,反应 180 min 后于 95℃ 下加热 10 min 终止反应,进行 Tricine-SDS-PAGE 分析。

2 结果与分析

2.1 BSTI 的分离纯化

通过加热沉淀、调节 pH 及硫酸铵分级盐析等前处理,得到 BSTI 粗提液。经透析除盐后以 Q-Sepharose 阴离子交换层析柱进行分离。结果如图 1a 所示,BSTI 在 pH8.0 的条件下吸附于 Q-Sepharose 层析柱,同时大量杂蛋白在淋洗过程中被除去。对吸附蛋白采用含有 0~0.5 mol·L⁻¹ NaCl 的缓冲液线性洗脱,BSTI 在 0.25 mol·L⁻¹ NaCl 浓度下被洗脱下来。经 SDS-PAGE 分析可知,BSTI 呈单一条带,其相对分子质量约为 21 kDa(图 1b)。



a:BSTI 纯化层析图谱(每管 3 mL);b:BSTI 的 SDS-PAGE; M:标准蛋白。
a: Column chromatography purification of BSTI (3 mL per tube); b:SDS-PAGE of purified BSTI;M:Protein marker.

图1 BSTI 纯化层析图与 SDS-PAGE 分析
Fig.1 Column chromatography and SDS-PAGE of BSTI

2.2 BSTI 的性质分析

2.2.1 BSTI 的热稳定性 BSTI 具有良好的热稳定性。由图 2 可知,当温度在 60℃ 以下时,BSTI 的抑制活性基本不变。但当温度超过 60℃ 后,BSTI 的抑制活性开始出现快速下降,在温度达到 100℃ 时,其抑制胰蛋白酶的活性完全消失。

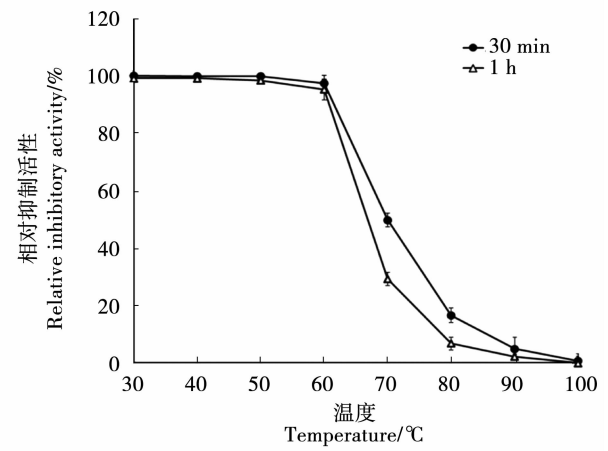
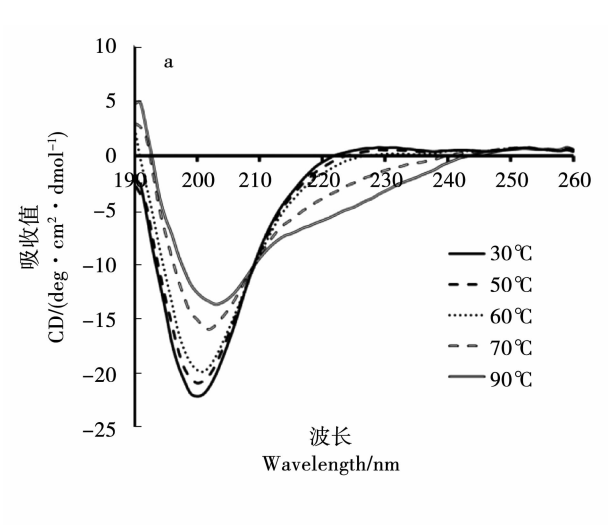


图 2 BSTI 的热稳定性
Fig. 2 Thermal stability of BSTI

2.3 BSTI 的二级结构

30℃ 下,在扫描波长 190 ~ 260 nm 的范围内 BSTI 基本呈负吸收峰,最大吸收波长出现在 200 nm (图 4a)。以 CDNN 软件分析 BSTI 二级结构含量,结果表明其二级结构中 β - 折叠为 43.4%,同时含有 29.0% 的无规则卷曲及 21.2% 的 β - 转角,并伴



2.2.2 BSTI 的 pH 稳定性 将 BSTI 在 pH2 ~ 11 条件下处理 1 h,之后测定其对胰蛋白酶的抑制活性。结果显示,BSTI 具有很高的 pH 稳定性,即使在极端 pH 下,抑制活性基本不受影响,说明其结构稳定 (图 3)。

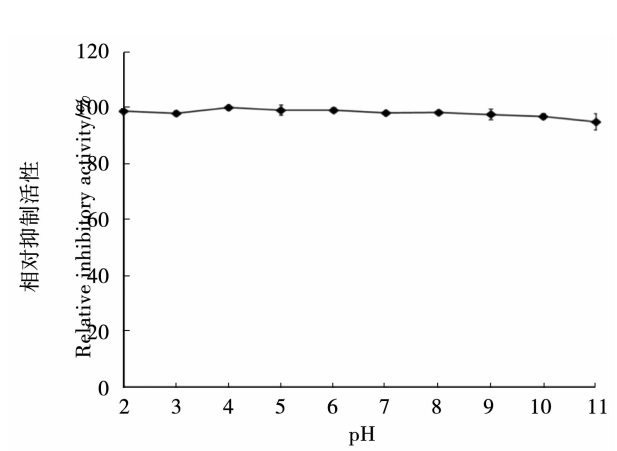
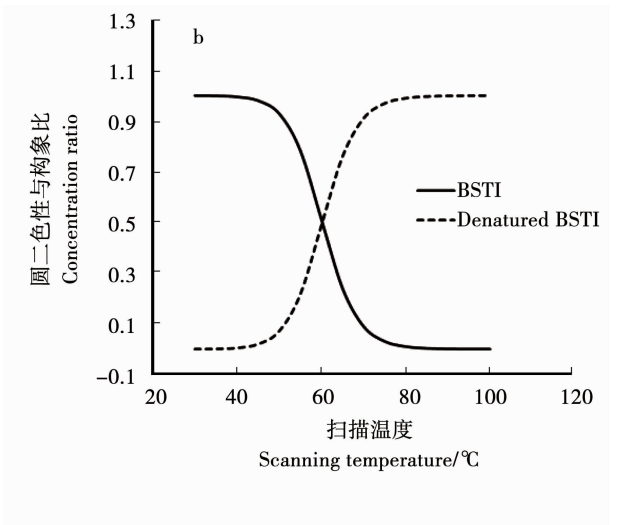


图 3 BSTI 的 pH 稳定性
Fig. 3 Stability of BSTI at different pH

有少量 α - 螺旋 (表 1)。不同温度对 BSTI 二级结构的影响如图 4a 所示,可以看出 BSTI 在 60℃ 以下其二级结构没有出现明显变化,但当温度超过 60℃ 后,其二级结构发生显著改变。BSTI 的变性温度为 $61.0 \pm 0.9^\circ\text{C}$ (图 4b)。



a:不同温度下 BSTI 的二级结构;b:BSTI 的热变性温度。
a:The secondary structure of BSTI at different temperatures; b:The denaturation temperature of BSTI.

图 4 温度对 BSTI 二级结构的影响
Fig. 4 The effect of temperature on the secondary structure of BSTI

表 1 不同温度下 BSTI 二级结构比例

Table 1 Secondary structure proportions of BSTI at different temperatures

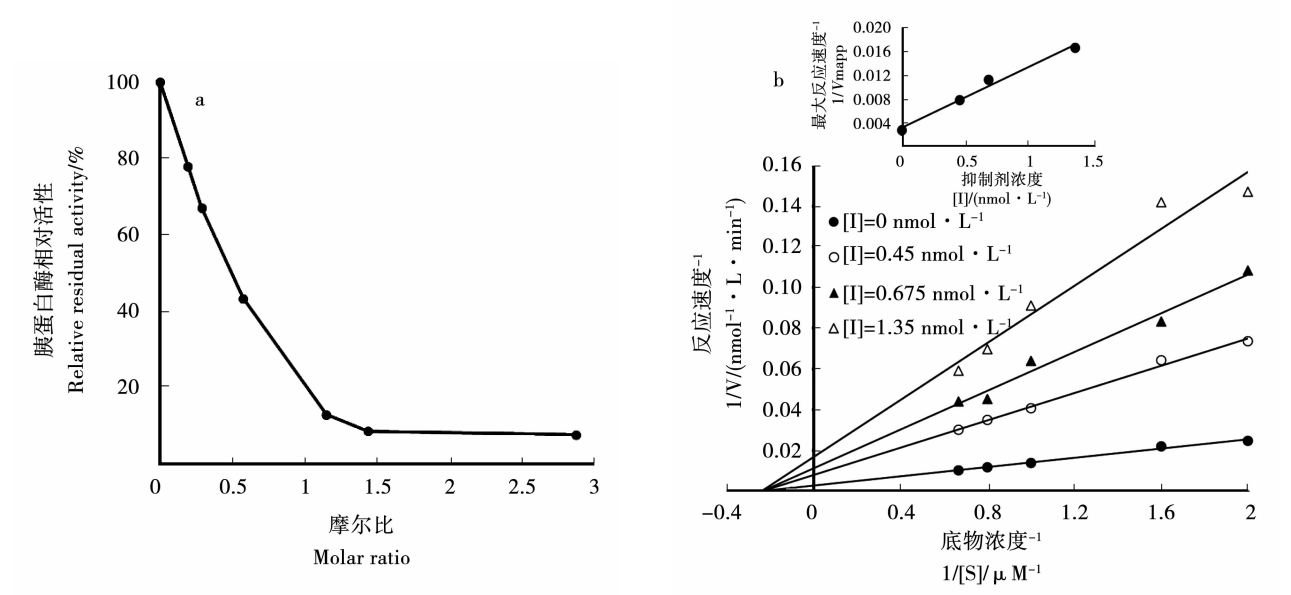
(%)

温度 Temperature/℃	α -螺旋 α -Helix	反向平行 Anti-parallel	平行 Parallel	β -折叠 Beta-Turn	无规则卷曲 Rndm. Coil	总量 Total
30	8.10	40.10	3.30	21.20	29.00	101.70
40	8.10	40.60	3.30	20.10	29.10	101.20
50	8.00	40.60	3.30	20.10	30.00	100.90
60	7.80	41.60	3.40	19.90	30.00	102.70
70	6.80	43.30	3.60	19.40	30.40	103.50
80	6.20	43.90	3.60	19.20	30.50	103.40
90	6.10	44.40	3.80	19.20	30.80	104.30
100	6.00	44.70	3.90	19.20	30.90	104.70

2.4 BSTI 对胰蛋白酶的抑制作用分析

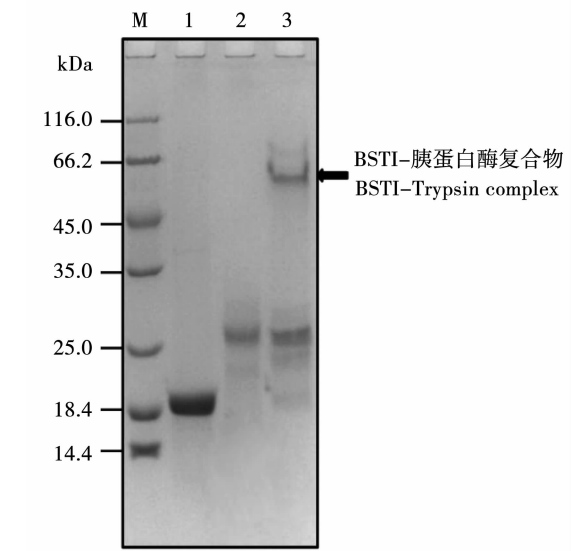
图 5a 为 BSTI 对胰蛋白酶的抑制效果,胰蛋白酶的活性随着 BSTI 添加量的增大而迅速降低,当 BSTI 与胰蛋白酶的摩尔比达到 1:2 时,胰蛋白酶的剩余活力为 50%;此时继续增大 BSTI 的添加量至摩尔比 1:1,则胰蛋白酶的活性被抑制至 15% 左右。Lineweaver-Burk 双倒数作图显示,随着 BSTI 浓度增大,酶的最大反应速度 V_{\max} 逐渐减小,但米氏常数 K_m 基本不受影响,其对胰蛋白酶的抑制类型表现为非竞争性抑制,即 BSTI 不与胰蛋白酶的活性中心结

合,而是与胰蛋白酶中其它部位结合进而降低胰蛋白酶整体与底物结合的能力(图 5b)。通过分析添加 BSTI 后最大反应速度 V_{\max} 的变化趋势,可求得 BSTI 对胰蛋白酶的抑制常数 $K_i=0.24\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,该数值远小于胰蛋白酶与底物反应的米氏常数($K_m=4.19\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),说明 BSTI 对胰蛋白酶的亲和力远高于底物。SDS-PAGE 结果表明,BSTI 能够与胰蛋白酶结合,形成稳定的酶-抑制剂复合物(图 6)。



a:不同摩尔比(BSTI:胰蛋白酶)下 BSTI 对胰蛋白酶活性的影响;b:BSTI 对胰蛋白酶的抑制动力学。
a: Inhibitory effect of BSTI on trypsin at different molar ratios(BSTI:Trypsin); b:Inhibitory dynamics of BSTI on trypsin.

图 5 BSTI 对胰蛋白酶的抑制作用
Fig.5 Inhibitory effect of BSTI on trypsin



M: 标准蛋白; 1: BSTI; 2: 胰蛋白酶; 3: BSTI - 胰蛋白酶复合物。
M: Protein marker; 1: BSTI; 2: Trypsin; 3: BSTI-trypsin complex.

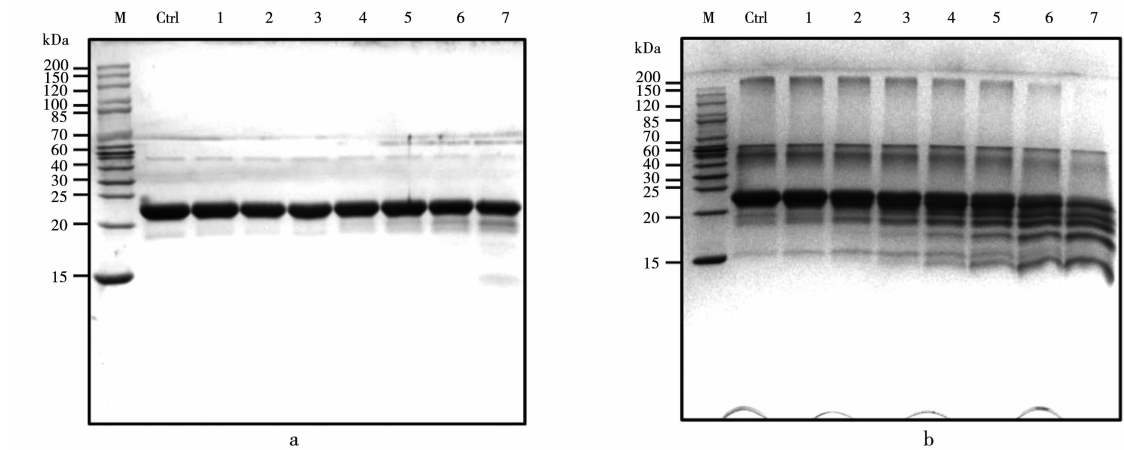
图6 BSTI - 胰蛋白酶复合物的 SDS-PAGE 分析
Fig.6 SDS-PAGE analysis of the BSTI-trypsin complex

2.5 BSTI 的消化特性研究

2.5.1 BSTI 模拟胃液消化分析 BSTI 的模拟胃液消化特性分析结果表明, 未经高温处理的 BSTI 几乎不被胃蛋白酶所消化, 即使消化时间延长到 60 min, BSTI 也只在被轻微降解(图 7a)。为确保 BSTI 完全失

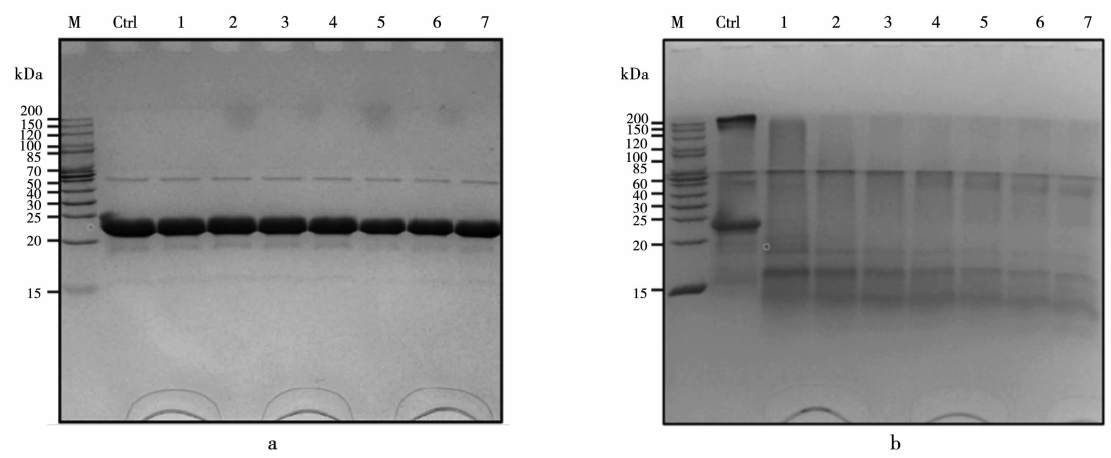
活, 采用 121℃ 加热 30 min 对 BSTI 进行灭活处理。高温处理后的 BSTI, 经胃蛋白酶消化 5 min 便出现降解, 且随着消化时间的延长, 其降解效果越来越明显。消化 60 min 后, BSTI 的主条带大部分已被胃蛋白酶分解成低分子量产物(图 7b)。说明高温加热能使 BSTI 变性, 引起空间构象发生改变, 易被胃蛋白酶所酶解。

2.5.2 BSTI 模拟肠液消化分析 BSTI 为胰蛋白酶抑制剂, 不会被胰蛋白酶分解(图 8a)。然而经过 121℃ 高温处理后, 胰蛋白酶能够在短时间内(5 min)将 BSTI 主条带及因加热生成的聚体消化完全, 当消化时间达到 180 min 时, 仅在 16 ~ 18 kDa 处残留少量低分子量降解产物(图 8b)。相同的情况在胰凝乳蛋白酶的消化体系中也观察到。由于自身稳定的结构, 未经热处理的 BSTI 同样不被胰凝乳蛋白酶分解(图 9a), 但胰凝乳蛋白酶对高温处理后的 BSTI 具有较高的消化速率, 如图 9b 所示, 胰凝乳蛋白对 BSTI 的降解速度虽稍慢于胰蛋白酶, 但在消化 180 min 后仅在 13 和 18 kDa 处残留低分子量消化产物。分析此结果, 说明 BSTI 虽然作为胰蛋白酶的特异性抑制剂, 但 121℃ 高温热处理导致的蛋白质变性使其丧失作为抑制剂的活性, 易被肠液消化酶所分解。



a: 未加热 BSTI; b: 121℃ 加热 30 min 后的 BSTI; M: 标准蛋白; Ctrl: 对照; 1 ~ 7 分别为消化后 1, 3, 5, 10, 15, 30 和 60 min。
a: BSTI without heat treatment; b: BSTI after heat treatment at 121℃ for 30 min; M: Protein marker; Ctrl: Control; 1-7 indicate 1, 3, 5, 10, 15, 30 and 60 min digestion respectively.

图7 模拟胃液对 BSTI 消化的 Tricine-SDS-PAGE 分析
Fig.7 Tricine-SDS-PAGE analysis of BSTI after simulated gastric fluid digestion



a;未加热 BSTI;b;121℃加热 30 min 后的 BSTI;M:标准蛋白;Ctrl:对照;1~7 分别表示消化 5,15,30,60,90,120 和 180 min。下同。

a;BSTI without heat treatment; b;BSTI after heat treatment at 121℃ for 30 min;M:protein marker; Ctrl:Control;1-7 indicate 5,15,30,60,90,120 and 180 min digestion respectively. The same below.

图 8 模拟肠液(胰蛋白酶)对 BSTI 消化的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 8 Tricine-SDS-PAGE analysis of BSTI after simulated intestinal fluid digestion(trypsin)

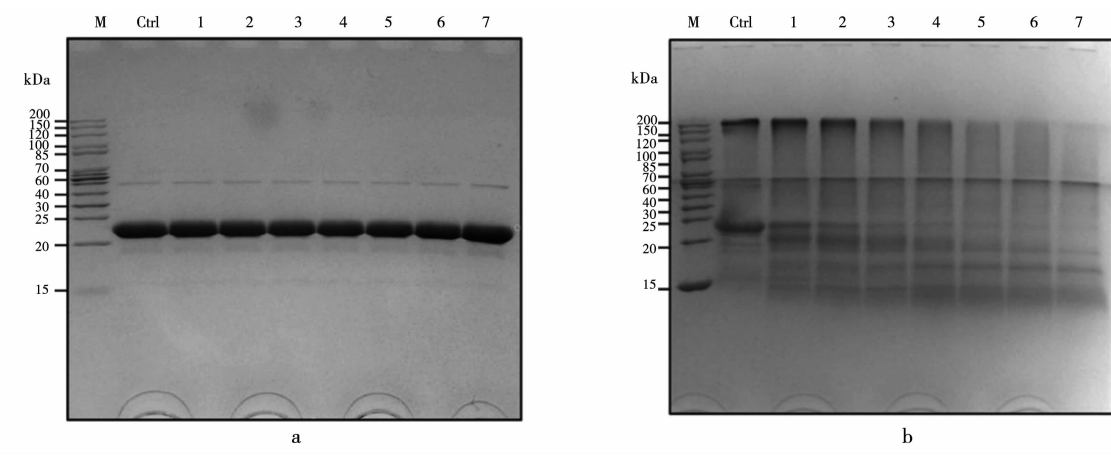
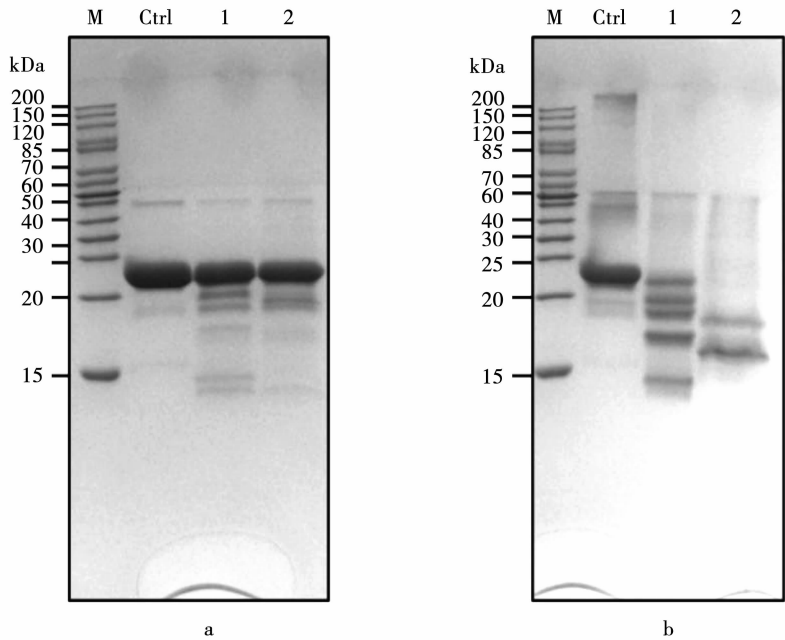


图 9 模拟肠液(胰凝乳蛋白酶)对 BSTI 消化的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 9 Tricine-SDS-PAGE analysis of BSTI after simulated intestinal fluid digestion(chymotrypsin)

2. 5. 3 BSTI 模拟胃肠液连续消化分析 在食物的实际消化过程中,是胃液和肠液共同作用完成的。因此,有必要进一步通过模拟体外胃肠液连续消化的过程,探讨 BSTI 的消化特性。结果表明,未经高温处理的 BSTI 在胃蛋白酶消化 60 min,以及胰蛋白酶与胰凝乳蛋白酶共同消化 180 min 后,其主条带基本没有变化(图 10a),说明胃肠液消化酶对未变性的 BSTI 没有分解效果。对于 121℃ 加热处理后

的 BSTI,经胃蛋白酶消化 60 min 后产生了分子量为 21,19, 18, 17 和 14 kDa 的 5 个条带。最后经胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶消化后,主条带基本被消化完全,但与前文中肠液消化酶分步消化的结果一样,仍有 16,18 kDa 两条明显的条带(图 10b)。可见,高温灭活后的 BSTI 即使有利于酶的分解,但消化产物已没有酶解位点,不能被胃肠液酶彻底消化。



a:天然 BSTI;b:121℃加热 30 min 后的 BSTI;M:标准蛋白;Ctrl:对照;1:胃蛋白酶消化 60 min;2:胃蛋白酶消化样品经胰蛋白酶及胰凝乳蛋白酶共同消化 180 min。

a: Digestion of native BSTI; b: Digestion of BSTI after heat treatment at 121℃ for 30 min; Lane M: Protein marker; Ctrl: Control; 1: Digestion by pepsin for 60 min; 2: Digestion by trypsin and chymotrypsin for 180 min after pepsin digestion.

图 10 BSTI 模拟胃肠液连续消化的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 10 Tricine-SDS-PAGE analysis of BSTI after digestion by simulated gastrointestinal fluids

3 讨论

豆类植物的种子中含有丰富的胰蛋白酶抑制剂,其一方面作为贮藏蛋白可调节种子休眠与萌发过程中内源性蛋白酶的活力,另一方面因其具有的抗虫、抗菌作用,亦能够保护豆类植物免受外界病原和昆虫的侵害。宋欣欣等^[18]提出,豆类种子中的胰蛋白酶抑制剂主要为 Kunitz 和 Bowman-Birk 两种类型,这两种胰蛋白酶抑制剂在分子量以及结构上有着较大差异。在本研究中,从黑豆中提取得到的 BSTI 约为 21 kDa,与 Kunitz 型大豆胰蛋白酶抑制剂的分子量相当^[19],推测 BSTI 同样为 Kunitz 家族的胰蛋白酶抑制剂。

不同来源的胰蛋白酶抑制剂在稳定性上可能存在较大差异。本研究表明,BSTI 的抑制活性在 60℃后出现了显著降低,然而 Romero 等^[20]从决明子中提取出的 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂在 90℃时其抑制活性才开始出现下降;此外,同为大豆科属的 Kunitz 型大豆胰蛋白酶抑制剂的热稳定性也要高于 BSTI^[21-22]。经分析是因为抑制剂的蛋白结构差异所导致的,特别是蛋白内部所包含的二硫键数量与稳定性呈正相关^[23-24]。赵伟伟^[25]的研究显示,BSTI 在 100℃下加热 1 h 后仍残留 80% 以上的活

性,这与本研究所得的结果有较大差异,分析原因是因为在测定热稳定性时没有将抑制剂稀释至合适浓度而导致的,过高的抑制剂浓度会使其在高温下具有更好的稳定性^[15]。Kuntiz 型胰蛋白酶抑制剂通常采取经典的“ β -三叶草”构象,因此二级结构中往往具有高含量的 β -折叠^[26-27]。袁燕等^[28]认为,蛋白质的二级结构含量可反应出蛋白的有序性, α -螺旋含量高而 β -折叠含量低,蛋白质的有序性高;若相反,则蛋白有序性降低,易被蛋白酶分解。本试验中,温度上升过程中 BSTI 的二级结构的含量变化表明其 α -螺旋含量降低, β -折叠与无规则卷曲的含量增加,说明 BSTI 随着温度的升高其蛋白结构的有序性逐渐下降,推测 BSTI 经高温处理后,可能会有利于被酶解。

Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂的结构中通常只含有一个抑制活性位点,因此能以摩尔比 1:1 的形式抑制蛋白酶^[8]。本研究表明,BSTI 在摩尔比 1:1 的条件下抑制了胰蛋白酶的活力,因此间接证明了 BSTI 为 Kunitz 型的胰蛋白酶抑制剂,这与 Peng 等^[29]研究黑豆胰蛋白酶抑制剂所得到的结果基本一致。竞争性抑制剂通常与底物具有相似的构象位点,因此其能与底物竞争结合酶的活性中心;而非竞争性抑制剂并不与底物竞争酶的催化中心,而是通过结

合酶结构中其他位点来降低酶与底物的结合能力^[30]。抑制动力学显示,BSTI 随着浓度的升高会使胰蛋白酶的最大反应速度降低,但并不影响胰蛋白酶的米氏常数,该现象表明 BSTI 是胰蛋白酶的非竞争性抑制剂。据杭虞杰等^[31]报道 STI 能够以竞争性的方式抑制胰蛋白酶及类胰蛋白酶。对比 BSTI 与 STI 对胰蛋白酶的抑制类型,BSTI 与 STI 虽均来源于大豆种子,但在蛋白质结构以及氨基酸序列上可能存在较大差异。另外,Ludovico 等^[32]从海红豆中分离提取的一种非竞争型的 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂,能够同时抑制胰蛋白酶以及木瓜蛋白酶的活性;Guo 等^[33]从土豆中分离得到的 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂也均能够对胰蛋白酶和组织蛋白酶 D 产生抑制效果。本研究获得的 BSTI 虽也属 Kunitz 型的非竞争性抑制剂,但仅能抑制胰蛋白酶的活性,特异性更好。

黑豆作为国内大宗食用豆类之一,因其丰富的蛋白质含量而深受人们喜爱。然而 BSTI 的存在可能会引起人体出现胰腺肿大等疾病^[34],从而在一定程度上降低了黑豆的营养价值。因此,对其消化特性进行表征是有必要的。天然 BSTI 具有很强的抗酶解作用,其不易被胃肠液消化酶分解,该结果与先前 STI 的消化特性一致^[10]。然而与 Roychaudhuri 等^[11]的结果不同的是,BSTI 经 121℃ 处理后能够显著被胃肠液消化酶分解,推测是由于更高的温度及更长的处理时间所导致,并且在升温至 100℃ 后同时伴随压力的增高,高温、高压的共同作用更易使豆类 TI 失活^[15]。高温对 BSTI 消化性的提升应归结于在该条件下 BSTI 空间结构的变化,其内部酶解位点暴露后促进了胃肠液消化酶对变性 BSTI 的分解。Yu 等^[35]研究表明,贝类中主要过敏原之一的原肌球蛋白在经过高温处理后,能显著提升其消化性。本研究表明 BSTI 与原肌球蛋白有着相似的消化特性,目前虽然没有相关报道证明 BSTI 具有致敏性,但根据以往对 STI 的研究^[10-11],推测 BSTI 可能为黑豆中的主要过敏原,高温处理后其消化性的提升也许能使其降低致敏性。

4 结 论

本研究经热处理、硫酸铵分级盐析、阴离子交换层析等分离方法,从黑豆种子中纯化获得了 1 种黑豆胰蛋白酶抑制剂 BSTI,其分子质量约为 21 kDa。BSTI 以非竞争性抑制方式对胰蛋白酶产生抑制作用。BSTI 在 30 ~ 60℃ 以及 pH2 ~ 11 活性稳定。天然 BSTI 的二级结构中含有 43.4% 的 β -折

叠,胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶难于对其有分解作用。BSTI 经 121℃ 热处理 30 min 后因蛋白变性,易被胃蛋白酶、胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶等主要消化酶所分解。

参考文献

[1] Kobayashi H. Prevention of cancer and inflammation by soybean protease inhibitors[J]. *Frontiers in Bioscience*, 2013, 5: 966-973.

[2] Rebecca C, Alexander V K, Jane F, et al. An unusual helix-turn-helix protease inhibitory motif in a novel trypsin inhibitor from seeds of veronica (*Veronica hederifolia* L.) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(38): 27760-27768.

[3] Ma T C, Guo L, Zhou R H, et al. Soybean-derived Bowman-Birk inhibitor (BBI) blocks HIV entry into macrophages[J]. *Virology*, 2018, 513: 91-97.

[4] Lanza A, Tava A, Catalano M, et al. Effects of the *Medicago scutellata* trypsin inhibitor(MsTI) on cisplatin-induced cytotoxicity in human breast and cervical cancer cells[J]. *Anticancer Research: International Journal of Cancer Research and Treatment*, 2004, 24(1): 227-233.

[5] Li J G, Xiang Q S, Liu X F, et al. Inactivation of soybean trypsin inhibitor by dielectric-barrier discharge (DBD) plasma[J]. *Food Chemistry*, 2017, 232: 515-522.

[6] 江连洲, 李佳妮, 邹晓霜, 等. 花青素对大豆蛋白体外胃消化结构的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(20): 34-42. (Jiang L Z, Li J N, Zou X S, et al. Effects of anthocyanin on *in vitro* digestibility of soy protein isolate[J]. *Food Science*, 2018, 39(20): 34-42.)

[7] 俞红恩, 康玉凡. 豆类胰蛋白酶抑制剂研究进展[J]. *食品工业*, 2017, 38(4): 265-269. (Yu H E, Kang Y F. Research progress in legume trypsin inhibitor[J]. *Food Industry*, 2017, 38(4): 265-269.)

[8] 王荣春, 孙建华, 何述栋, 等. 胰蛋白酶抑制剂的结构与功能研究进展[J]. *食品科学*, 2013, 34(9): 364-368. (Wang R C, Sun J H, He S D, et al. Recent advance in research on the structure and function of trypsin inhibitor[J]. *Food Science*, 2013, 34(9): 364-368.)

[9] 俞红恩, 康玉凡. 豆类胰蛋白酶抑制剂亚基特性研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(9): 133-138. (Yu H E, kang Y F. Subunit properties of legume trypsin inhibitor[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2017, 38(9): 133-138.)

[10] Astwood J D, Leach J N, Fuchs R L. Stability of food allergens to digestion *in vitro* [J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 1269-1273.

[11] Roychaudhuri R, Sarath G, Zeece M, et al. Stability of the allergenic soybean Kunitz trypsin inhibitor[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: Proteins and Proteomics*, 2004, 1699(1-2): 207-212.

[12] 秦琦, 张英蕾, 张守文. 黑豆的营养保健价值及研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2015(7): 145-150. (Qin Q, Zhang Y L, Zhang S W. The nutritional value and research progress of black soybean[J]. *China Food Additives*, 2015(7): 145-150.)

- [13] 张瑞芬, 池建伟, 丘银清, 等. 黑大豆的营养及保健功能研究进展[J]. 广东农业科学, 2006(11): 13-16. (Zhang R F, Chi J W, Qiu Y Q, et al. Research progress of the nutrition and health-promoting functions of black soybean[J]. Guangdong Agricultural Science, 2006(11): 13-16.)
- [14] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A J. Protein measurement with the folinphenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193: 265-275.
- [15] Shen J D, Cai Q F, Liu G M, et al. A comparison study of the impact of boiling and high pressure steaming on the stability of soybean trypsin inhibitor[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2013, 48: 1877-1883.
- [16] United States Pharmacopeial Convention, Committee of Revision. The United States Pharmacopeia USP23: The national formulary NF 18; national formulary supplements 1-9 [M]. Netherlands: Springer, 1987.
- [17] 万楚君, 游银川, 翁凌, 等. 四种加工方式对皱纹盘鲍制品消化特性的影响[J]. 水产学报, 2017, 41(6): 928-935. (Wan C J, You Y C, Weng L, et al. Comparison of the digestibility of abalone (*Haliotis discus hannai*) produced by four different processing treatments[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(6): 928-935.)
- [18] 宋欣欣, 段小娟, 徐颖, 等. 豆类种籽中胰蛋白酶抑制剂研究进展[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(6): 1-4. (Song X X, Duan X J, Xu Y, et al. Research progress of trypsin inhibitors of legume seeds[J]. Cereals & Oils, 2016, 29(6): 1-4.)
- [19] Jiang T L, Cai Q F, Shen J D, et al. Establishment of immunological methods for the detection of soybean proteins in surimi products [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 64: 344-349.
- [20] Romero M P, Brandao C, Vivianne F A, et al. CgTI, a novel thermostable Kunitz trypsin-inhibitor purified from *Cassia grandis* seeds: Purification, characterization and termiticidal activity[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018(118): 2296-2306.
- [21] Jiang X J, Zhang Z J, Cai H N, et al. The effect of soybean trypsin inhibitor on the degradation of myofibrillar proteins by an endogenous serine proteinase of crucian carp[J]. Food Chemistry, 2006, 94: 498-503.
- [22] 程芬芬, 刘春, 杨晓泉. 大豆胰蛋白酶抑制剂的制备及性质[J]. 食品科学, 2017, 38(3): 37-44. (Cheng F F, Liu C, Yang X Q. Preparation and properties of soybean trypsin inhibitor [J]. Food Science, 2017, 38(3): 37-44.)
- [23] Klomkiao S, Benjakul S, Kishimura H, et al. A heat-stable trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*): Effect of extraction media, purification and biochemical characteristics[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2010, 45: 163-169.
- [24] David U, Kathrin O, Kristin A, et al. Basic residues of β -sheet α contribute to heparin binding and activation of vaspin (Serp
- A12)[J]. Journal of Biological Chemistry, 2016, 292(3): 994-1004.
- [25] 赵伟伟. 黑豆胰蛋白酶抑制剂的分离纯化及活性鉴定[D]. 太原: 山西大学, 2016. (Zhao W W. Purification and bioactivities of trypsin inhibitor from black soybean[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2016.)
- [26] 罗玉娇, 李滨, 舒衡平, 等. Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2012, (3)3: 316-318. (Luo Y J, Li B, Shu H P, et al. Research advances in Kunitz trypsin inhibitor[J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2012, (3)3: 316-318.)
- [27] Guerra Y, Valiente P A, Pons T, et al. Structures of a bi-functional Kunitz-type STI family inhibitor of serine and aspartic protease: Could the aspartic protease inhibition have evolved from canonical serine protease-binding loop? [J]. Journal of Structural Biology, 2016, 195: 259-271.
- [28] 袁燕, 梅双喜. 蒜头果蛋白的红外光谱及圆二色谱分析[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(33): 116-117. (Yuan Y, Mei S X. Infrared spectroscopy and circular dichroism spectrum of *Malanin* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(33): 116-117.)
- [29] Peng L, Tzi B N. A stable trypsin inhibitor from Chinese dull black soybeans with potentially exploitable activities[J]. Process Biochemistry, 2008, 43: 992-998.
- [30] Cui Y, Hu Y H, Yu F, et al. Inhibition kinetics and molecular simulation of p-substituted cinnamic acid derivatives on tyrosinase [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 95: 1289-1297.
- [31] 杭虞杰, 李学英, 杨宪时, 等. 大豆胰蛋白酶抑制剂对南极磷虾类胰蛋白酶的抑制动力学[J]. 中国水产科学, 2012, 19(4): 635-640. (Hang Y J, Li X Y, Yang X S, et al. Kinetics of inhibition of trypsin-like enzyme from *Euphausia superba* by STI [J]. Journal of Fishery of Sciences of China, 2012, 19(4): 635-640.)
- [32] Ludovico M, Adeliana S d O, Elizeu A S, et al. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine- and cysteine-proteinases[J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2010, 29: 148-156.
- [33] Guo J X, Peter T E, Alun R C, et al. Structure of Kunitz-type potato cathepsin D inhibitor [J]. Journal of Structural Biology, 2015, 192: 554-560.
- [34] Bajpai S, Sharma A, Gupta M N. Removal and recovery of anti-nutritional factors from soybean flour[J]. Food Chemistry, 2005, 89(4): 497-501.
- [35] Yu H L, Cao M J, Cai Q F, et al. Effects of different processing methods on digestibility of *Scylla paramamosain* allergen (tropomyosin) [J]. Food & Chemical Toxicology, 2011, 49(4): 791-798.