

伴大豆球蛋白及其水解肽对沙门氏菌生长的影响

郭成东, 张源淑, 王国杰, 邹思湘*

(南京农业大学 农业部动物生理生化重点开放实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了进一步研究伴大豆球蛋白的生物学功能, 应用等电点沉淀和盐析的方法制备伴大豆球蛋白, 通过凝胶柱层析法进一步分离纯化, 得到单一组分, SDS-PAGE 电泳鉴定为纯化的伴大豆球蛋白。并对分离得到的伴大豆球蛋白及其胃蛋白酶水解肽对沙门氏菌生长的影响进行观察。结果表明: 高浓度(6mg/ml)的伴大豆球蛋白及其水解多肽可以抑制沙门氏菌的生长繁殖, 表现一定的抗沙门氏菌增殖的作用, 同样浓度水解多肽的抑制作用强于伴大豆球蛋白本身; 低浓度(1.5mg/ml及0.75mg/ml)的伴大豆球蛋白及其水解多肽则表现出轻微的促沙门氏菌增殖的作用。
关键词: 伴大豆球蛋白; 胃蛋白酶; 水解肽; 沙门氏菌

Effects of Conglycinin and Its Hydrolysate Peptide on Propagation of *Salmonella*

GUO Cheng-dong, ZHANG Yuan-shu, WANG Guo-jie, ZOU Si-xiang*

(Key Laboratory of Animal Physiology and Biochemistry, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Conglycinin, one of the main storage proteins in soybean, was prepared by isoelectric precipitation and salting-out followed by gel column chromatographic purification. SDS-PAGE analysis clearly indicated that the purification product was electrophoretically pure. The effects of conglycinin and its hydrolysate peptide prepared with pepsin on propagation of *Salmonella* were studied. The propagation of *Salmonella* was inhibited by high concentration (6 mg/ml) of conglycinin and its hydrolysate peptide and the peptide exhibited stronger inhibition effect than conglycinin at the same concentration. However, both conglycinin and its hydrolysate peptide at low concentration (1.5 and 0.75 mg/ml) displayed slight promotion effects.

Key words: conglycinin; pepsin; hydrolysate peptide; *Salmonella*

中图分类号: TS201.21

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)17-0030-04

大豆中约含 35%~40% 的蛋白质, 根据沉降系数的不同可分为四大类, 分别为 2S、7S、11S 和 15S 组分^[1]。β-伴大豆球蛋白(β-conglycinin, β-Con)是 7S 组分中的主要成分, 又称 7S 球蛋白, 约占大豆中蛋白质总量的 20%~30%^[2]。β-伴大豆球蛋白对大豆蛋白的功能特性和营养品质均有重要影响。大豆蛋白水解肽易被人体吸收, 具有降胆固醇^[3]、降血压^[4]、抗氧化^[5]、提高免疫力^[6]和影响微生物生长和代谢的作用^[7]。

研究表明, β-伴大豆球蛋白能促使体外培养的猪外周血淋巴细胞转化和增殖, 促使此淋巴细胞产生炎症细胞因子 IL-2、INF-γ、IL-6, 并产生特异的 IgA^[8]。还有研究证明伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对于人和动物胃肠道的益生菌——双歧杆菌具有促进生长的作用^[9]。

此外, 伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对病原性大肠杆菌生长有抑制作用^[10]。β-伴大豆球蛋白还能通过抑制脂肪酸合成以及促进脂肪酸 β-氧化的途径, 降低血浆总胆固醇和血浆甘油三脂含量^[11]。

沙门氏菌(*Salmonella*)属的成员可感染多种动物和人, 大部分具有很强的致病性。由沙门氏菌所致人和多种动物沙门氏菌病历史久远, 遍布世界各地。据统计, 在世界各国的细菌性食物中毒中, 沙门氏菌引起的食物中毒常列榜首^[12]。

国内外对大豆蛋白以及大豆蛋白水解肽的研究较多, 但对于单纯的伴大豆球蛋白及其水解肽的研究较少, 关于其影响沙门氏菌生长的研究尚未见报道。因此本实验拟通过对伴大豆球蛋白的制备, 并模拟机体内

收稿日期: 2008-08-25

基金项目: 教育部博士点基金资助项目(20060307007)

作者简介: 郭成东(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为营养生理生化。E-mail: 2006107020@njau.edu.cn

* 通讯作者: 邹思湘(1946—), 男, 教授, 研究方向为泌乳生物学与营养生物化学。

E-mail: sixiangzou@njau.edu.cn

环境,通过胃蛋白酶水解,经过体外培养沙门氏菌,研究伴大豆球蛋白及其胃蛋白酶水解肽(pepsin-hydrolysate conglycinin, PTC)对兔沙门氏菌增殖的影响,以期为进一步阐明食物源蛋白活性肽的生理功能提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

大豆 市售。

兔沙门氏菌由南京农业大学预防兽医组提供;胃蛋白酶(分析纯) Amresco 公司进口分装; Sepharose-CL-6B 凝胶 Pharmacia 公司进口分装;碱性 Tris- 饱和酚、茚三酮及其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

BioLogic LP 层析仪、Model 550 酶标仪 BIO-RAD 公司; SCR20BC 型高速离心机 Hitachi Koki Co.Ltd; PHS-3C 型精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; SJQ-80 自动部分收集器 上海沪西仪器厂; UV755B 紫外/可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;电泳槽、电泳仪 Bio-Rad 公司; SHZ-88 台式水浴恒温振荡器 太仓实验设备厂; VIRTIS 冷冻干燥机 美国 Sorvall 公司。

1.3 方 法

1.3.1 伴大豆球蛋白的制备

参照 Wu 等^[13]的方法,利用等电点沉淀和盐析的方法提取伴大豆球蛋白。

大豆磨粉后,用正己烷脱脂,制得脱脂大豆粉,按去离子水:大豆粉=15:1(V/m)的比例加入去离子水,用 2mol/L NaOH 调 pH 值至 8.5,搅拌 1h, 15℃, 14300 × g 离心 30min,取上清液,此为浸提出的大豆蛋白质。向上述上清液中加入 NaHSO₃ 晶体,使 NaHSO₃ 浓度达到 10mmol/L,调 pH 值至 6.4, 4℃ 静置 12~16h, 4℃, 7500 × g 离心 20min,取上清液,弃除的沉淀为 11S 组分。向上清液中加入 NaCl 晶体,使 NaCl 浓度达到 250mmol/L,调 pH 值至 5,搅拌 1h, 4℃, 14000 × g 离心 30min,取上清液,弃除的沉淀为混合的 7S 组分和 11S 组分。将上清液用 2 倍去离子水稀释,调 pH 值至 4.8, 4℃, 7500 × g 离心 20min,取沉淀,即为粗提的伴大豆球蛋白。将提取的伴大豆球蛋白通过 Sepharose-CL-6B 凝胶层析柱(1cm × 100cm)进行进一步纯化,上样浓度为 10mg/ml,平衡液与洗脱液均为磷酸盐缓冲液(2.6mmol/L KH₂PO₄, 32.5mmol/L K₂HPO₄, 0.4mol/L NaCl, 10mmol/L β- 巯基乙醇, pH7.6),流速为 1.5ml/min,检测波长为 280nm,收集洗脱大峰,取样用 SDS-PAGE 电泳法鉴定纯度,冻干后备用。

1.3.2 伴大豆球蛋白纯度测定

参照左伟勇的方法^[9],采用 SDS-PAGE 电泳法测定蛋白质纯度,分离胶浓度为 10%,浓缩胶为 5%。定

量电泳胶用考马斯亮蓝染色。将电泳胶所显示条带与标准分子质量的蛋白质对照,以各标准蛋白质相对迁移率对分子质量对数作标准曲线,求其相对分子质量。

1.3.3 伴大豆球蛋白水解肽(PTC)的制备

取冻干的伴大豆球蛋白 150mg,用双蒸水溶解,定容至 25ml,调 pH 1.4,按酶与底物 1:30(m/m)加入胃蛋白酶,37℃ 下水解 2h,水解完毕用 10mol/L 的 NaOH 终止反应(约加 1~2 滴 NaOH 溶液),70℃, 30min 灭活,调 pH 7.0, 4℃, 3000r/min,离心 30min,取上清液,冻干后备用。

1.3.4 胃蛋白酶水解物的水解度测定

水解度(DH)测定采用茚三酮法^[14]。计算公式为:

$$DH(\%) = \frac{h_1 - h_0}{h_{tot}} \times 100$$

式中: h_1 为水解后每克蛋白质所含的氨基量; h_0 为未水解时每克蛋白质所含氨基量; h_{tot} 为每克原料蛋白质所含的肽键。 h_{tot} 和 h_0 对于某一特定的蛋白质来讲是一个常数。大豆蛋白的 $h_{tot} = 7.8\text{mmol/g}$,大豆蛋白的 $h_0 = 0.33\text{mmol/g}$ 。

1.3.5 沙门氏菌的增殖实验

本实验采用营养琼脂斜面培养基保存菌种,用 LB 培养基作为沙门氏菌的增菌培养基,参照沈仓良^[15]的方法,用 96 孔细胞培养板进行沙门氏菌培养,用酶标仪检测培养基的 OD 值,以指示培养基中沙门氏菌生长的情况。实验分为试验组(50μl LB 培养基 + 50μl 待试样液 + 40μl 菌液)、阳性对照组(50μl LB 培养基 + 50μl 灭菌 dd H₂O + 40μl 菌液)、阴性对照组(50μl LB 培养基 + 90μl 灭菌 dd H₂O)。待测样品分别为 6、3、1.5、0.75mg/ml 伴大豆球蛋白以及 6、3、1.5、0.75mg/ml 伴大豆球蛋白水解肽。以上浓度均折合为蛋白质浓度。将上述培养板放入 37℃ 水箱培养,以阴性对照组调零,在培养 10h 后每 2h 测定一次各孔 OD_{490nm} 值。

2 结果与分析

2.1 伴大豆球蛋白的分离

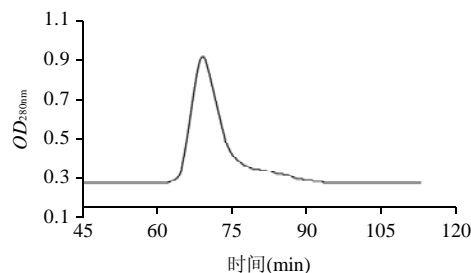
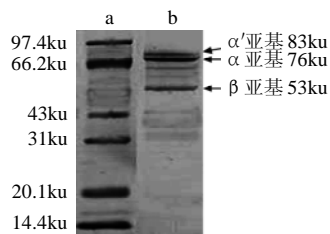


图1 伴大豆球蛋白初步纯化样品的 Sepharose-CL-6B 凝胶层析图谱
Fig.1 Elution profile of conglycinin extracted from soybean on Sepharose-CL-6B column

根据等电点沉淀和盐析的原理获得伴大豆球蛋白,而后经过凝胶柱层析进行纯化。图1为伴大豆球蛋白提取物经 Sepharose-CL-6B 柱凝胶过滤图,由图1可见一个单一洗脱峰,说明此方法可得到较纯的伴大豆球蛋白。

2.2 伴大豆球蛋白纯度鉴定



a. 标准分子质量蛋白; b. 伴大豆球蛋白提取物。

图2 伴大豆球蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.2 SDS-PAGE profile of conglycinin purified by Sepharose-CL-6B chromatography

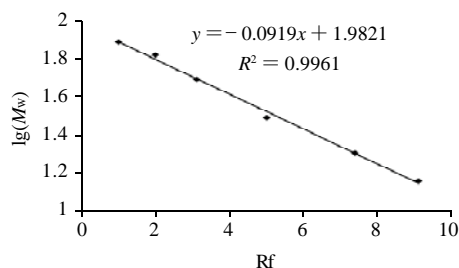


图3 低分子量标准蛋白迁移率曲线

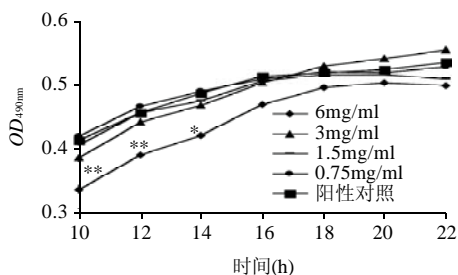
Fig.3 Migration rate curve of low-molecular-weight protein marker

由图2可见,伴大豆球蛋白经过 SDS-PAGE 后,显示出3条特征性染色带,与文献报道结果一致^[9],而后用其迁移距离与图3中标准分子量 Marker 比较,计算出其分子量分别约为53、76、83ku,分别为伴大豆球蛋白的 α 、 α' 、 β 亚基,这表明经过上述方法得到的伴大豆球蛋白已经得到纯化,可供生理功能的研究。

2.3 伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽的水解度

应用茚三酮法测定水解蛋白中短肽的氨基含量,并由水解计算公式可求得伴大豆球蛋白的水解度为23%。

2.4 不同浓度伴大豆球蛋白对沙门氏菌生长的影响



*. 差异显著($P < 0.05$); **. 差异极显著($P < 0.01$). 下同。

图4 不同浓度伴大豆球蛋白对沙门氏菌生长的影响($n=6$)

Fig.4 Effects of different concentrations of soybean conglycinin on propagation of *Salmonella* ($n=6$)

由图4可见,表示添加不同浓度的伴大豆球蛋白对沙门氏菌的增殖产生了影响,其中6mg/ml的伴大豆球蛋白在16h之前明显抑制了沙门氏菌的生长,3、1.5及0.75mg/ml的伴大豆球蛋白对沙门氏菌的生长表现一定的促进作用,但差异不显著。

2.5 不同浓度伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对沙门氏菌生长的影响

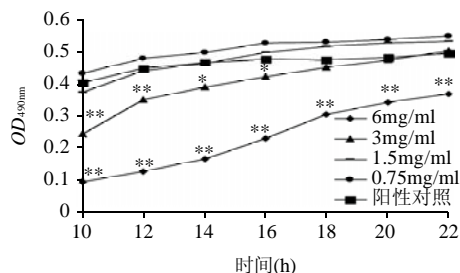


图5 不同浓度伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对沙门氏菌生长的影响($n=6$)

Fig.5 Effects of different concentrations of hydrolysate peptide of soybean conglycinin on propagation of *Salmonella* ($n=6$)

从图5可以看出,添加不同浓度的伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽可以影响沙门氏菌的生长,其中6mg/ml和3mg/ml的伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对沙门氏菌的生长产生明显的抑制作用,1.5mg/ml的伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽对沙门氏菌作用不明显,而0.75mg/ml的伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽表现出一定的促进作用。

与图4比较可以看出,6mg/ml的伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽与同浓度的伴大豆球蛋白均可以显著抑制沙门氏菌的生长繁殖,并且伴大豆球蛋白胃蛋白酶水解肽的抑制作用明显强于伴大豆球蛋白。

3 讨论

为了探讨大豆蛋白的抗菌功能,本实验对大豆主要贮藏蛋白之一的伴大豆球蛋白进行分离提纯,并且模拟体内环境使用胃蛋白酶水解伴大豆球蛋白,获得伴大豆球蛋白的水解多肽,在沙门氏菌的生长实验中分别添加不同浓度的伴大豆球蛋白及其水解液。经过Wu等^[13]方法提纯的伴大豆球蛋白具有较高纯度,可用于生理功能研究。本实验结果同样证明了高浓度的伴大豆球蛋白及其水解肽可以抑制沙门氏菌的生长,而且酶解多肽的抑菌效果明显优于伴大豆球蛋白;在低浓度时,伴大豆球蛋白及其水解肽对沙门氏菌均表现出一定的促生长作用,但作用不明显。伴大豆球蛋白及其水解肽抑制沙门氏菌生长的机理仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] PENG I C, QUASS D W, DAYTON W R, et al. The physicochemical and functional properties of soybean 11S globulin: a review[J]. *Cereal Chemistry*, 1984, 61: 480-489.
- [2] SETSOKO I, YAMAUCHI F. Electrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fraction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1987, 35: 206-209.
- [3] NAGAOKA S, MIWA K, ETO M, et al. Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells[J]. *Journal of Nutrition*, 1999, 129: 1725-1730.
- [4] 吴建平. 大豆降血压肽的研制[J]. *中国油脂*, 1998, 23 (5): 22-25.
- [5] CHEN H M, MURAMOTO K, YAMAUCHI F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43: 574-578.
- [6] YAMAICHI F, SUETSUNA K. Immunological effects of dietary peptide derived from soybean protein[J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1993, 4(8): 450-457.
- [7] 崔洪斌. 大豆生物活性物质的开发与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 241-264.
- [8] 李成贤. 大豆球蛋白、 β -伴球蛋白的分离提取及对猪外周血淋巴细胞增殖和免疫功能的影响[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [9] 左伟勇. 伴大豆球蛋白促双歧杆菌增殖肽的分离和鉴定及其对肠道细菌区系的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
- [10] 沈仓良. 伴大豆球蛋白水解肽对小鼠抗大肠杆菌感染和肠道微生物区系的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [11] FUKUI K, TACHIBANA N, KOJIMA M, et al. Effects of soybean [beta]-conglycinin on plasma lipid levels and hepatic lipid metabolism[J]. *Journal of Nutrition*, 2004, 134(5): 1239.
- [12] 贺奋义. 沙门氏菌的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2006, 33(11): 91-95.
- [13] WU S, MURPHY P, JOHNSON L, et al. Pilot-plant fractionation of soybean glycinin and β -conglycinin[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1999, 76: 285-293.
- [14] 赵新淮, 冯志彪. 大豆蛋白水解物水解度测定的研究[J]. *东北农业大学学报*, 1995, 26(2): 178-181.
- [15] 沈仓良. 伴大豆球蛋白水解肽对小鼠抗大肠杆菌感染和肠道微生物区系的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.