

doi:10.12301/spxb202200852

文章编号:2095-6002(2023)03-0116-11

引用格式:焦斐,杨倩,杨超,等. 陇藜1号藜麦清蛋白体外消化产物抗氧化活性及结构特征分析[J]. 食品科学技术学报, 2023,41(3):116-126.



JIAO Fei, YANG Qian, YANG Chao, et al. Antioxidant activity and structural characteristics of digestion products of Longli 1 quinoa albumin *in vitro*[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023,41(3):116-126.

# 陇藜1号藜麦清蛋白体外消化产物抗氧化活性及结构特征分析

焦斐<sup>1,2</sup>, 杨倩<sup>3</sup>, 杨超<sup>4</sup>, 高娟<sup>1,2</sup>, 张兆云<sup>4</sup>, 张志华<sup>4</sup>, 杨富民<sup>4,\*</sup>

(1. 金昌市食品检验检测中心, 甘肃 金昌 737100;

2. 甘肃省省级藜麦产品质量检验检测中心, 甘肃 金昌 737100;

3. 甘肃省商业科技研究所, 甘肃 兰州 730020;

4. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**为掌握陇藜1号藜麦(*Chenopodium quinoa*)清蛋白消化产物的抗氧化性及其结构特征,通过模拟胃、肠消化,借助红外光谱、扫描电镜等,分析清蛋白在体外消化过程中抗氧化活性及消化产物的结构变化。在胃、胰蛋白酶的作用下,藜麦清蛋白水解度及游离氨基酸释放量均显著升高,消化结束时分别达到39.60%、45.46 mg/L。清蛋白消化产物DPPH·、ABTS<sup>+</sup>·清除率分别为58.34%、79.51%,总还原力为0.280,Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>整合率分别为66.84%、15.74%,较未消化清蛋白,DPPH·、ABTS<sup>+</sup>·清除率分别提高了34.85%、68.62%,总还原力提高了0.179,Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>整合率分别提高了54.52%、7.76%。在整个模拟消化进程中,消化产物β-转角含量显著增加,α-螺旋及无规卷曲含量随着消化时间的推移先降低后升高,但β-折叠含量则先升高后降低。产物微观形貌扫描电镜观察发现,经胃蛋白酶酶解的消化物颗粒明显变小,致密结构呈无序排列,表面积增大,孔隙加大。研究结果旨在为陇藜1号藜麦清蛋白的进一步利用提供理论依据。

**关键词:**藜麦清蛋白; 体外消化; 水解度; 抗氧化活性; 结构变化

**中图分类号:** TS201.4

**文献标志码:** A

藜麦(*Chenopodium quinoa*),又称为藜谷,发源于南半球西部南美洲的安第斯山脉<sup>[1]</sup>。2020年,中国种植面积约2万公顷,产量约2.25万t<sup>[2]</sup>,其中甘肃种植约1万公顷,主栽品种为陇藜1号。藜麦中的蛋白质质量分数为13%~22%<sup>[3]</sup>,其主要的贮藏蛋

白为清蛋白及球蛋白<sup>[4]</sup>。植物清蛋白是一类分子质量为10~20 kDa、沉降系数为2的混合贮藏型蛋白质<sup>[5]</sup>,含有10~12个亚基<sup>[6]</sup>,含有大量的含硫氨基酸,可溶于稀盐、水、稀酸或稀碱溶液<sup>[7]</sup>。蛋白质要发挥营养价值,需经人体消化被胃肠道吸收后才

收稿日期:2022-09-06

基金项目:甘肃省市场监督管理局科技计划项目(SSCJG-SP-202101;SSCJG-SP-202113);甘肃农业大学科研项目(GSAU-ZL2015-048)。

Foundation: Science and Technology Project of Gansu Administration for Market Regulation(SSCJG-SP-202101;SSCJG-SP-202113);Science and Research Project of Gansu Agricultural University(GSAU-ZL2015-048).

第一作者:焦斐,女,工程师,主要从事食品安全检测方面的研究。

\*通信作者:杨富民,男,教授,主要从事食品加工方面的研究。

能参与到新陈代谢中。因此,研究蛋白质经胃肠道消化后的变化,对提高蛋白质利用率有着重要的意义<sup>[8]</sup>。

经消化的蛋白质可产生具有多种生物活性的小肽,具有抗癌、抗炎症及抗自由基氧化等活性,并可对人体炎症、氧化应激引发的相关疾病起到抑制作用<sup>[9]</sup>。史瑞婕<sup>[10]</sup>将杏鲍菇蛋白经3种不同方法处理后,探讨蛋白质体外消化性质的变化发现,加热、超声波和酸法脱酰胺3种处理方法均可提高杏鲍菇蛋白质的消化率和消化产物的抗氧化性。姜丰等<sup>[11]</sup>将卵白蛋白经体外模拟胃肠道消化,产物的体外抗氧化活性增强并具有浓度依赖性,其组分分子质量越小,抗氧化活性越强。Cho<sup>[12]</sup>研究米糠分离蛋白在体外模拟胃肠道消化进程中溶解度及抗氧化活性等的变化表明,模拟胃肠消化产物的抗氧化性能均高于未处理蛋白。目前,有关陇藜1号藜麦清蛋白体外消化的研究尚未见报道。

本研究以甘肃省主栽品种,陇藜1号为材料,通过体外模拟清蛋白的胃肠消化,研究其消化过程中清蛋白活性物质、结构及抗氧化活性的变化,旨在为陇藜1号藜麦清蛋白的开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

陇藜1号藜麦,甘肃藜美农业科技有限公司;胰蛋白酶、胃蛋白酶,北京索莱宝科技有限公司;中性吡啶、溴化钾、十二烷基硫酸钠(SDS)、DPPH、ABTS,上海源叶生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

LA-8080型全自动氨基酸分析仪,日本株式会社日立高新技术科学那珂事业所;TU-1810型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;GT10-1型高速台式离心机,北京时代北利离心机有限公司;JSM-5610型扫描电子显微镜,日本电子株式会社;JZP116型喷金机,天津轻工业学院与天津玻璃器皿厂联合研制;Nicolet iS50型傅里叶变换红外光谱仪,天津市拓普仪器有限公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 藜麦清蛋白的提取

藜麦粒经粉碎后过60目筛,石油醚(沸程30~60℃)回流脱脂8h,风干后加去离子水,调pH值至

7,控制料液比1:25.5(g/mL)、超声功率354W、时间40min、浸提温度36.9℃,水浴磁力搅拌1h,离心、收集上清液。考马斯亮蓝法测定清蛋白浓度,计算藜麦清蛋白提取量。

#### 1.3.2 藜麦清蛋白纯化

参考林凤英<sup>[13]</sup>的方法,并稍做调整。清蛋白提取液经硫酸铵盐析30min,pH值为7.0的PBS缓冲液复溶,分子截留量为3500Da透析袋4℃透析48h(每隔1h更换一次水),真空冷冻干燥。

#### 1.3.3 藜麦清蛋白含量测定

蛋白质、水分含量均依据相应国标进行测定。蛋白质含量测定依据GB5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》;水分含量测定依据GB5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》。

#### 1.3.4 模拟体外消化实验

参考秦晓佩等<sup>[14]</sup>的方法并适当调整。

人工模拟胃液:称取0.2g的NaCl、0.32g的胃蛋白酶,加入3mol/L浓盐酸0.7mL,用去离子水溶解后移至100mL容量瓶,调节pH值至 $1.2 \pm 0.1$ 。

人工模拟肠液:称取0.7g的 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,用25mL去离子水完全溶解,依次加入0.2mol/L的NaOH溶液及去离子水40mL,再加入胰蛋白酶4.0g(胰蛋白酶酶活力为2500U/g),溶解后转入100mL容量瓶定容,调节pH值至 $7.5 \pm 0.1$ 。

将冷冻干燥得到的藜麦清蛋白粉末分散于蒸馏水,制成质量浓度为40mg/mL的蛋白液。将蛋白液与模拟胃液在37℃水浴保温15min,取等体积的蛋白液及模拟胃液置于锥形瓶中,将锥形瓶放入37℃水浴摇床,控制反应时间分别为0.5、1.0、1.5、2.0h。取不同反应时间点的消化产物加入到试管中,于95℃水浴灭酶5min,迅速冰浴冷却备用。将锥形瓶中的溶液pH值调节至7.5,加入同等体积的模拟人工肠液,继续震荡水解,控制反应时间分别为2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0h,取不同反应时间点的消化产物进行灭酶、冷却备用。

#### 1.3.5 消化产物水解度的测定

参考何兴芬<sup>[15]</sup>的方法,采用邻苯二甲醛(OPA)法测定清蛋白的水解度。OPA试剂:将7.6g的十水合四硼酸钠、200mg的SDS溶于150mL的去离子水中,配置成A液;160mg的邻苯二甲醛(OPA)溶解于4mL乙醇,转移到A液中,加入176mg的二硫苏糖醇,用去离子水制成200mL溶液即得到

OPA 试剂。

取 400  $\mu\text{L}$  清蛋白消化液加入装有 3 mL OPA 试剂的离心管中,混匀后于室温反应 2 min,立即于 340 nm 波长处测定吸光值。以丝氨酸标准液 (0.951 6 mmol/L) 为参考,以去离子水为空白,按式(1)、式(2)计算水解度。

$$b = \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times 0.9516 \times \frac{N \times V}{m \times w} \quad (1)$$

式(1)中, $b$  为单位质量蛋白质含丝氨酸氨基的物质的量,mmol/g; $A_{\text{样品}}$  为待测样品的吸光值; $A_{\text{标准}}$  为丝氨酸标准液的吸光值; $A_{\text{空白}}$  为去离子水的吸光值; $N$  为稀释倍数; $V$  为上清液体积,L; $m$  为样品质量,g; $w$  是样品中蛋白质的质量分数,%。

$$\text{水解度} = \frac{(b - \beta) / \alpha}{h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad (2)$$

式(2)中, $b$  为单位质量原料蛋白的肽键物质的量,mmol/g;藜麦清蛋白的  $h_{\text{tot}}$  为 7.03; $\beta$  和  $\alpha$  分别为常数 0.4 和 1。

### 1.3.6 消化产物抗氧化活性测定

#### 1.3.6.1 DPPH 自由基清除能力测定

参考 Tai 等<sup>[16]</sup>的方法并作调整。取 2 mL 样品液,加入 0.15 mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液(体积分数为 95%)2 mL,混匀、避光反应 0.5 h 后 5 000 r/min 离心 15 min,于 517 nm 波长处测定吸光值  $A_1$ 。清除率按式(3)计算。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100\% \quad (3)$$

式(3)中, $A_2$  为对照组(体积分数为 95% 的乙醇溶液替代 DPPH 溶液)吸光度, $A_3$  为空白组(体积分数为 95% 的乙醇代替样品液)吸光度。

#### 1.3.6.2 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率测定

测定参考吴伟等<sup>[17]</sup>的方法并作修改。称取 0.1 g 的 ABTS、0.029 g 的过硫酸钾,溶解于 100 mL 磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,室温避光下放置 16 h。将储备液用 PBS 稀释至溶液于 734 nm 波长处吸光值为  $0.7 \pm 0.2$ ,作为 ABTS<sup>+</sup> 自由基工作液。吸取 0.5 mL 藜麦清蛋白酶解液,加入 2 mL 的 ABTS<sup>+</sup> 工作液,涡旋震荡混匀 15 s,25  $^{\circ}\text{C}$  静置反应 6 min,测定 734 nm 波长处吸光值。等体积无水乙醇替代样品溶液,测定的吸光值记为  $A_0$ 。ABTS<sup>+</sup> 自由基清除率按照式(4)计算。

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式(4)中, $A_0$  为等体积无水乙醇替代样品溶液的吸光值, $A_1$  为样品溶液的吸光值。

#### 1.3.6.3 总还原力测定

总还原力的测定参考 Chen 等<sup>[18]</sup>的方法并作修改。在试管中加入 1.5 mL 的酶解液,并与 1.5 mL 的 PBS 缓冲液(0.2 mol/L、pH 值为 6.6)及 1.5 mL 的铁氰化钾溶液(质量分数为 1%)混匀,在温度 50  $^{\circ}\text{C}$  条件下水浴 20 min,与 2.5 mL 的三氯乙酸溶液(体积分数为 10%)充分摇匀,室温静置 8 min,于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、6 500 r/min 条件下离心 12 min。取 2.5 mL 的上清液与 2.5 mL 的去离子水混匀,加入 0.5 mL 的  $\text{FeCl}_3$  溶液(质量分数为 0.1%),混匀后在室温下反应 10 min,8 000 r/min 离心 5 min,收集上清液并测定其在 700 nm 波长处的吸光度。还原力按式(5)计算。

$$\text{还原力} = A_1 - A_0 \quad (5)$$

式(5)中, $A_1$  为样品吸光值, $A_0$  为空白组(PBS 缓冲液代替样品液)吸光值。

#### 1.3.6.4 $\text{Fe}^{2+}$ 螯合能力测定

参考刘倩霞等<sup>[19]</sup>的方法。取 2 mL 的酶解液于离心管中,加入 2 mmol/L 的  $\text{FeCl}_3$  溶液 0.2 mL,室温静置 5 min,然后加入 5 mmol/L 的菲啰啉溶液 0.4 mL,于 4 000 r/min 条件下离心 5 min。收集上清液测 562 nm 波长处的吸光值。 $\text{Fe}^{2+}$  螯合能力按式(6)计算。

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 螯合率} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100\% \quad (6)$$

式(6)中, $A_s$  为样品吸光值; $A_c$  为对照组吸光值(去离子水代替样品液)。

#### 1.3.6.5 $\text{Cu}^{2+}$ 螯合能力测定

参考刘倩霞等<sup>[19]</sup>的方法。2 mL 的酶解液中依次加入 2 mmol/L 的  $\text{CuSO}_4$  溶液 2 mL,中性吡啶 2 mL,质量分数为 0.1% 的邻苯二酚紫溶液 40  $\mu\text{L}$ ,立即涡旋混匀,室温放置反应 5 min,立即于 632 nm 波长处测定吸光值。 $\text{Cu}^{2+}$  螯合能力按式(7)计算。

$$\text{Cu}^{2+} \text{ 螯合率} = \frac{A_b - A_s}{A_b} \times 100\% \quad (7)$$

式(7)中, $A_s$  为样品吸光值; $A_b$  为对照组(去离子水代替样品溶液)吸光值。

### 1.3.7 消化产物游离氨基酸的测定

参考秦晓佩等<sup>[14]</sup>的方法,吸取不同时间点的取样备用的待测消化液 0.4 mL 于离心管中,加入质量分数为 1% 的磺基水杨酸溶液 3.6 mL,静置沉淀

90 min, 温度4℃条件下8000 r/min离心10 min, 吸取管内上清液过孔隙为0.22 μm的水相滤膜, 滤液装入棕色液相小瓶, 采用氨基酸分析仪测定。

仪器条件: 柱温箱程序升温, 58℃(0~37 min)、70℃(37~44 min)、75℃(44~74 min)、58℃(74~85 min); 流动相流速为0.2 mL/min; 检测波长采用440 nm和570 nm双波长同时检测; 反应器温度为115℃; 流动相为pH值为2.2~4.6的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 洗脱时间为32 min, 进样量为20 μL。

### 1.3.8 消化产物蛋白质二级结构的测定

参考张忠慧等<sup>[20]</sup>和刘媛等<sup>[21]</sup>的方法, 采用红外光谱仪在500~4000 cm<sup>-1</sup>的波数内对消化产物进行扫描, 扫描次数为30次, 间隔0.1 s进行扫描。

### 1.3.9 消化产物微观结构观察

参照Gong等<sup>[22]</sup>的方法并修改。将冻干的清蛋白消化物粉末均匀地粘在导电胶上, 喷金机真空喷金处理后将固定在其载物台上, 进行观察。

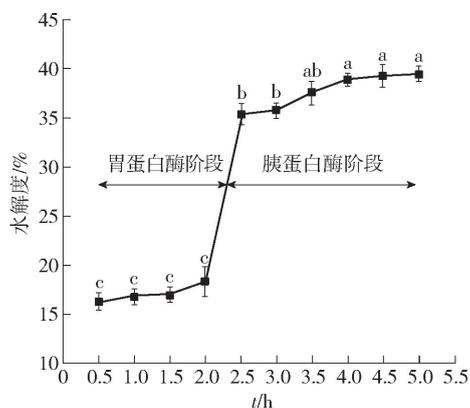
### 1.4 数据处理

实验重复3次, 采用SPSS 25.0及Excel进行分析, 单因素方差分析差异显著性, 采用Origin 2018软件作图, Peak Fitv 4.1.2进行红外光谱数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 消化时间对水解度的影响

陇藜1号藜麦清蛋白模拟体外消化不同时间水解度变化见图1。由图1可知, 在胃蛋白酶消化阶段(0.5~2.0 h), 随消化时间延长, 蛋白质的水解度逐渐升高, 但幅度不大。在进入胰蛋白酶消化阶段, 清蛋白水解度开始大幅度提升。在模拟肠消化的前30 min(2.0~2.5 h)内, 水解度显著提升至35.52%, 为模拟胃消化结束时的1.91倍。当模拟消化时间达到4.0 h时, 水解度达到39.13%, 说明蛋白质的消化程度逐渐增大。然而, 当蛋白质消化时间达到5.5 h时, 水解度变化差异不显著( $P > 0.05$ ), 说明蛋白质的消化速率减慢。其原因可能是由于消化进程的持续, 消化底物不断减少, 而消化产物不断增加, 产生了竞争抑制, 同时酶活性降低, 进而使蛋白质的消化速率减慢。付媛<sup>[23]</sup>的研究表明, 苦荞清蛋白经胰蛋白酶单一酶酶解3 h后, 水解



不同字母表示不同时间的数据差异显著( $P < 0.05$ )

图1 藜麦清蛋白不同时间模拟体外消化水解度

Fig. 1 Degree of hydrolysis of quinoa albumin at different time of simulated *in vitro* digestion

度为7.86%。本研究在模拟消化结束时的水解度可达到39.60%, 水解度呈逐渐增长趋势, 与江连洲等<sup>[24]</sup>的研究结果基本一致。

### 2.2 消化产物抗氧化活性变化

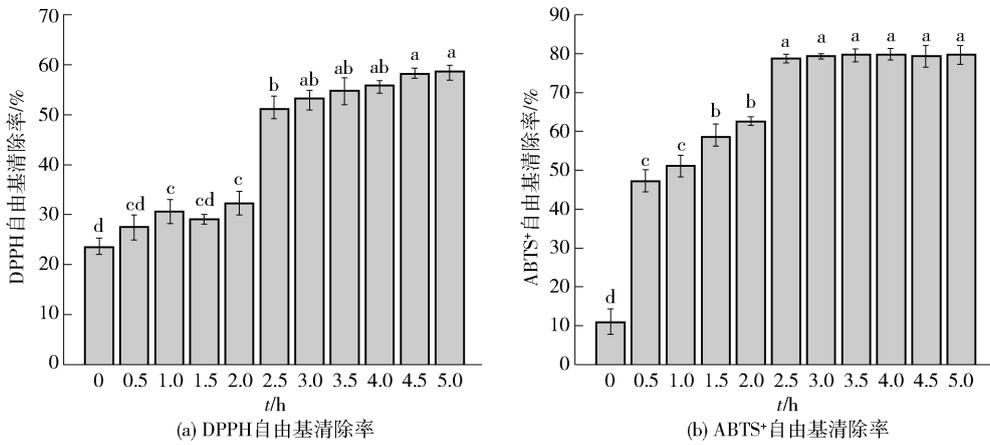
#### 2.2.1 DPPH和ABTS<sup>+</sup>自由基清除率的变化

模拟消化过程中, 藜麦清蛋白自由基清除率变化情况见图2。由图2可知, 清蛋白体外消化产物对DPPH自由基清除率变化大体趋势与其水解度相似。对照组清蛋白的DPPH自由基清除率为23.58%, 经模拟胃部消化2.0 h后, 水解产物对DPPH自由基清除率达到32.39%, 高于对照组8.81%。在消化2.0~2.5 h, 即胰蛋白酶消化前0.5 h内, 水解产物对DPPH自由基清除率显著提升( $P < 0.05$ ), 随后虽有上升, 但幅度相对较小。在模拟体外消化4.5 h时, DPPH自由基清除率达到最高值58.43%, 为清蛋白的2.48倍。

图2结果表明, 对照组藜麦清蛋白ABTS<sup>+</sup>自由基清除率为10.89%。在胃蛋白酶消化期间, 藜麦清蛋白消化产物对ABTS<sup>+</sup>自由基清除作用呈上升趋势, 2.0 h时为62.60%, 极显著高于对照组( $P < 0.05$ )。在模拟肠消化前期(2.5 h)时, 产物对ABTS<sup>+</sup>自由基清除率为79.51%, 之后其变化差异不显著( $P > 0.05$ )。

#### 2.2.2 总还原力变化

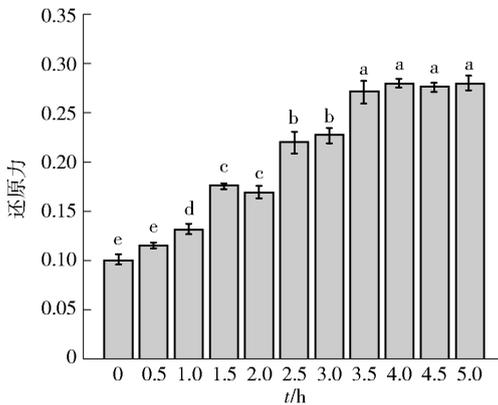
藜麦清蛋白在模拟体外消化过程中的总还原能力的变化情况见图3。由图3可知, 0~3.5 h的消化产物总体呈上升趋势, 之后其变化差异不显著( $P > 0.05$ )。胃蛋白酶消化期间总还原力达到了



不同字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ )。

图2 清蛋白DPPH和ABTS<sup>+</sup>自由基清除率变化

Fig. 2 Change of free radical scavenging rates of quinoa albumin during simulated *in vitro* digestion



不同字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

图3 模拟体外消化过程中藜麦清蛋白还原力变化

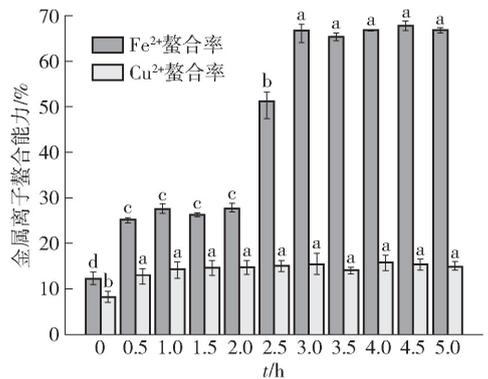
Fig. 3 Change of reducing power of quinoa albumin during simulated *in vitro* digestion

0.169, 高于对照组 6.90%; 胰蛋白酶消化前期(2.0~2.5 h)还原力显著提升( $P < 0.05$ ),但在2.5~3.0 h变化不显著,随时间延长(3.5 h)还原力值升至最大值,为0.280,之后差异不显著( $P > 0.05$ ),为对照组还原能力的2.77倍。这可能是由于消化产物中甲硫氨酸、甘氨酸及脯氨酸等的释放量增加,更有利于多肽链中其他氨基酸残基在抗氧化方面发挥其作用的缘故<sup>[25]</sup>。

### 2.2.3 金属离子螯合能力变化

清蛋白模拟体外消化过程中金属离子螯合能力的变化见图4。由图4可知,对照组Fe<sup>2+</sup>螯合率为12.32%,在模拟胃消化、胰腺消化的前30 min内,均呈显著升高趋势( $P < 0.05$ ),在消化0.5~2.0 h、3.0~5.0 h,Fe<sup>2+</sup>螯合率虽有所增加但增幅不显著( $P > 0.05$ );清蛋白在胃蛋白酶水解2.0 h后,Fe<sup>2+</sup>

螯合率升至27.85%,为对照组的2.26倍,在胰蛋白酶水解结束时(5.0 h)达到66.84%,分别高出对照组、模拟小肠消化前期(2.5 h)的54.52%和41.42%。



不同字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ )。

图4 模拟体外消化过程中藜麦清蛋白金属离子螯合能力变化

Fig. 4 Change of metal ion chelating capacity of quinoa albumin during simulated *in vitro* digestion

模拟消化产物的Cu<sup>2+</sup>螯合能力变化与Fe<sup>2+</sup>不同,对照组的Cu<sup>2+</sup>螯合率为7.98%,经过胃蛋白酶消化0.5 h后,Cu<sup>2+</sup>螯合率显著升高至12.88%,高于对照组4.90%,之后清蛋白水解产物的Cu<sup>2+</sup>螯合率略有增加,但在3.0~5.0 h差异不显著( $P > 0.05$ )。消化结束时,消化产物Cu<sup>2+</sup>螯合率为15.74%。通过对比2种金属离子螯合率,Cu<sup>2+</sup>螯合率远低于Fe<sup>2+</sup>螯合率,这可能是由于藜麦清蛋白经胃、胰酶水解后形成的肽链中Fe<sup>2+</sup>配位点要高于Cu<sup>2+</sup>配位点的原因<sup>[26]</sup>。

王正旋<sup>[27]</sup>研究大米蛋白经模拟胃消化

120 min、小肠消化 300 min 后,产物的还原力、过氧化氢清除力以及金属离子( $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Cu}^{2+}$ )螯合能力等的变化,结果表明:大米主要贮藏蛋白谷蛋白(RPG)消化性强于大米醇溶蛋白(RPP);经胃-胰两步水解,RPG在  $\text{ABTS}^+$ 、 $\text{O}_2^-$  自由基及  $\text{H}_2\text{O}_2$  清除, $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$  螯合方面均显著强于 RPP。

### 2.3 消化产物游离氨基酸分析

陇藜1号藜麦清蛋白经模拟胃肠消化后水解产物中的游离氨基酸含量及变化见表1和图5。

表1 藜麦清蛋白模拟体外消化过程中游离氨基酸含量

Tab.1 Contents of free amino acids of quinoa albumin during simulated *in vitro* digestion

氨基酸种类	$t$ (模拟消化)/h				
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
Asp	—	—	0.556	0.664	0.804
Thr	—	—	1.235	1.484	1.725
Ser	0.150	0.215	0.338	0.468	0.532
Glu	—	—	0.101	0.113	0.128
Gly	0.105	0.155	0.187	0.269	0.304
Ala	—	—	0.260	0.315	0.367
Tyr	—	0.342	0.285	0.240	0.291
Phe	—	0.151	0.110	0.081	0.102
Val	—	—	0.144	0.174	0.204
Ile	—	—	—	0.049	0.060
Lys	—	0.013	0.023	0.022	0.028
总氨基酸	0.255	0.876	3.238	3.879	4.546

“—”表示未检出。

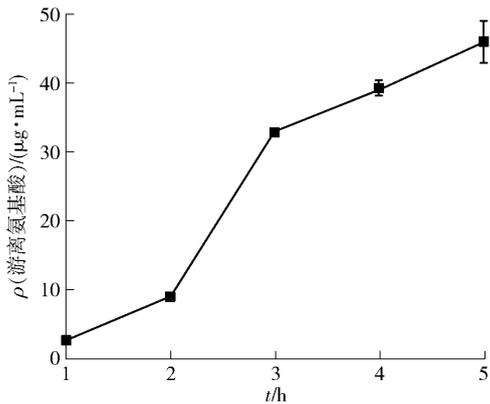


图5 清蛋白模拟体外消化过程中游离氨基酸含量

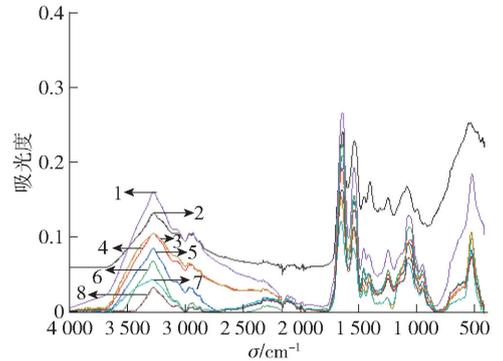
Fig.5 Free amino acids content of albumin during simulated *in vitro* digestion

由表1可知,在体外消化1~5h,随着消化时

间的延长,消化产物的疏水性氨基酸 Val 及 Ala 含量逐渐增加,分别从  $1.44$ 、 $2.60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  升至  $2.04$ 、 $3.67 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。图5可以看出,游离氨基酸含量呈上升趋势,与清蛋白水解度-时间曲线的大体趋势相似。在胃部消化结束(2.0 h)时的含量为  $8.76 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,经过胰蛋白酶水解后显著上升至  $5.46 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,其原因可能是酶解作用使得消化产物裂解出更多的游离氨基酸,Val、Ala 等疏水性氨基酸的存在提高了肽与自由基的相互作用及抗氧化性<sup>[25]</sup>。蛋白质经体外模拟消化能够产生一定量的游离氨基酸、大量生物活性肽<sup>[28]</sup>,对清除自由基具有良好的作用。

### 2.4 消化产物二级结构变化

消化产物及清蛋白红外光谱见图6。模拟消化产物酰胺I带( $1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ )经拟合,得到的不同时间点的消化产物二阶导数光谱,见图7。



1,3,4,5,6,7,8 分别为 2.0、3.0、0.5、1.0、1.5、4.0、5.0 h 的消化产物,2 为清蛋白

图6 藜麦清蛋白及模拟消化产物红外光谱

Fig.6 FTIR spectra of quinoa albumin and simulated digestion products

由图7可知,藜麦清蛋白的 FTIR 在  $1650 \text{ cm}^{-1}$  处有一个小峰,属蛋白质的一个特征峰<sup>[29]</sup>,主要由  $\text{C}=\text{O}$  的伸缩震动引起<sup>[26]</sup>。对各峰判定归属及指认后的百分含量见表2。各峰判定依据为:波数  $1650 \sim 1658 \text{ cm}^{-1}$  属于  $\alpha$ -螺旋结构,波数  $1610 \sim 1640 \text{ cm}^{-1}$  属于  $\beta$ -折叠结构,波数  $1660 \sim 1695 \text{ cm}^{-1}$  属于  $\beta$ -转角结构,波数在  $1640 \sim 1650 \text{ cm}^{-1}$  属于无规则卷曲结构。由表2可知,消化产物的各二级结构含量受消化阶段及消化时间的影响。在整个模拟消化进程中, $\beta$ -转角含量较未消化清蛋白显著增加( $P < 0.05$ ), $\alpha$ -螺旋及无规则卷曲含量随着消化时间的推移先降低后升高,而  $\beta$ -折叠含量的变化规律与之相反。 $\alpha$ -螺旋含量在胰蛋白酶消化结束时达到

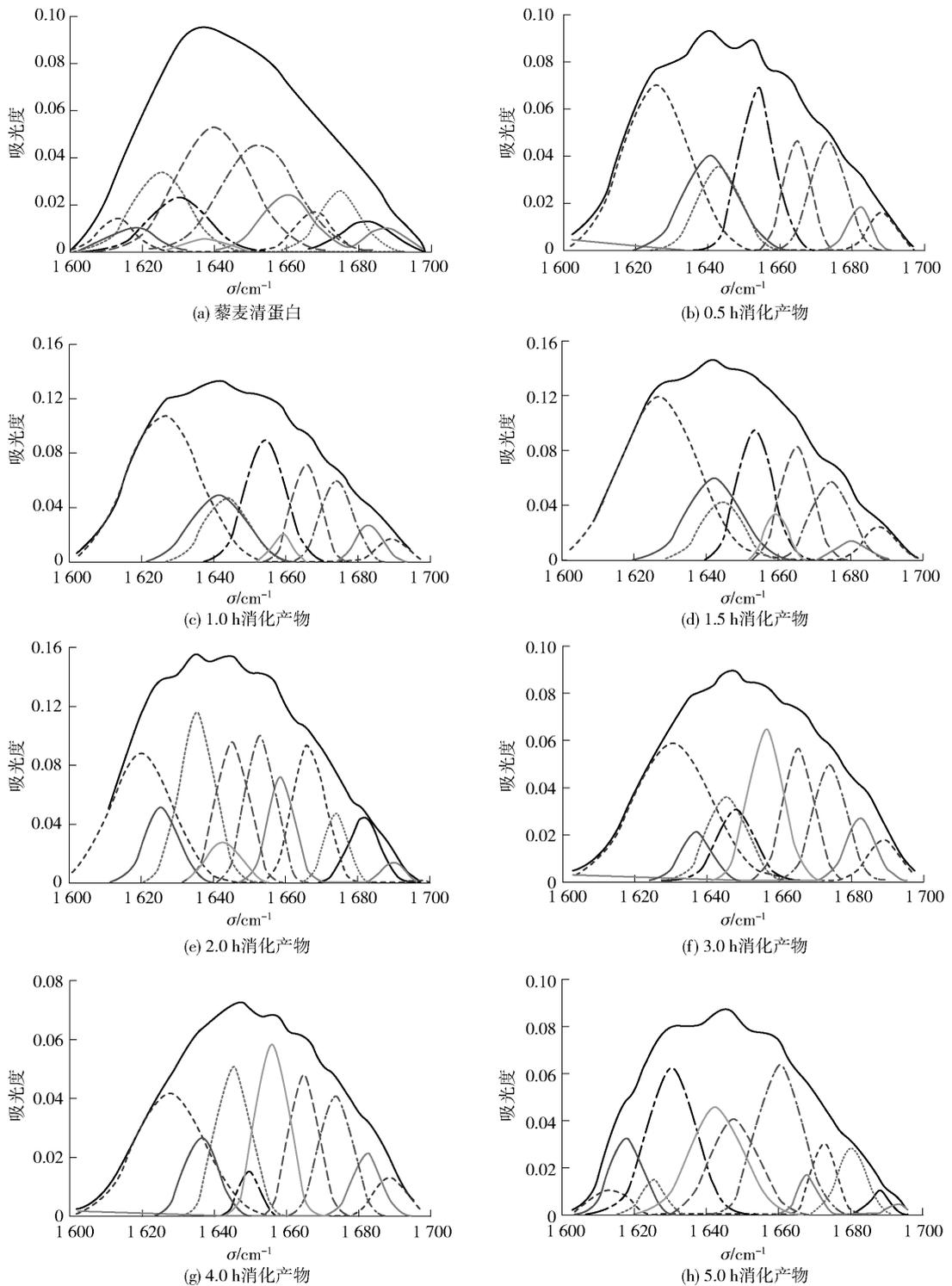


图7 藜麦清蛋白及模拟消化产物去卷积酰胺 I 带光谱

Fig. 7 Deconvolution amide I spectrum of quinoa albumin and simulated digestion products

34.57%, 高于未消化清蛋白的 12.06%。在模拟胃液消化过程中, 消化产物无规则卷曲含量从 24.69% 降至 15.34%。经过消化后, 蛋白质结构发生变化。江连洲等<sup>[24]</sup> 对不同品种大豆分离蛋白 (SPI) 消化产物的结构分析发现, 陕豆 125 号的 SPI

二级结构中  $\alpha$ -螺旋含量随消化时间推移总体上呈增加趋势。本研究在消化 1.5 ~ 5.0 h 的变化规律与江连洲等<sup>[24]</sup> 的研究结果一致, 而其他结构的变化存在一定差异, 这可能是因大豆蛋白与藜麦蛋白的组成及分子结构不同所致。

表2 藜麦清蛋白及消化产物二级结构组成

Tab.2 Secondary structure composition of quinoa albumin and digested products

<i>t</i> (消化)/h	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规则卷曲	%
0	30.85 ± 0.19 <sup>ba</sup>	30.58 ± 0.03 <sup>da</sup>	11.19 ± 0.09 <sup>dc</sup>	27.38 ± 0.13 <sup>ab</sup>	
0.5	19.05 ± 0.09 <sup>dc</sup>	36.67 ± 0.31 <sup>bea</sup>	19.58 ± 0.11 <sup>abc</sup>	24.69 ± 0.51 <sup>abb</sup>	
1.0	18.69 ± 0.48 <sup>dc</sup>	39.46 ± 2.77 <sup>ba</sup>	18.64 ± 0.74 <sup>ec</sup>	23.21 ± 1.55 <sup>bb</sup>	
1.5	16.42 ± 0.06 <sup>ec</sup>	41.49 ± 0.05 <sup>ba</sup>	24.35 ± 3.64 <sup>abb</sup>	17.69 ± 3.64 <sup>ec</sup>	
2.0	18.88 ± 0.56 <sup>db</sup>	49.48 ± 1.08 <sup>aa</sup>	16.30 ± 0.45 <sup>ec</sup>	15.34 ± 0.07 <sup>ec</sup>	
3.0	23.62 ± 1.78 <sup>cb</sup>	42.90 ± 3.75 <sup>ba</sup>	23.56 ± 0.92 <sup>abb</sup>	9.92 ± 1.06 <sup>dc</sup>	
4.0	32.84 ± 3.18 <sup>bb</sup>	37.86 ± 0.01 <sup>bea</sup>	14.39 ± 3.37 <sup>edc</sup>	14.92 ± 0.20 <sup>ec</sup>	
5.0	34.57 ± 0.53 <sup>aa</sup>	33.11 ± 0.84 <sup>edB</sup>	17.29 ± 5.27 <sup>bcB</sup>	15.02 ± 3.89 <sup>ea</sup>	

不同小写字母表示不同时间同一结构的数据差异显著( $P < 0.05$ );不同大写字母表示同一时间不同结构的数据差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.5 消化产物显微结构变化

藜麦清蛋白及其模拟消化产物在扫描电镜放大1 000倍和4 000倍时的观察结果见图8。由图8可知,藜麦清蛋白呈现较大的片层结构,表面较粗糙。经过胃蛋白酶酶解2.0 h,清蛋白发生解离,蛋白颗粒明显变小,在放大4 000倍时观察到无序排列呈致密结构,孔隙较多。经两步酶解,模拟体外消化结束(5.0 h)时,产物变为絮状颗粒。由此可知,经过

消化后,藜麦清蛋白表面微观结构发生了明显的变化。在模拟消化后,藜麦清蛋白结构由原来的片层结构变成絮状小颗粒,表面孔隙增加,使藜麦清蛋白在酶解过程中更易与酶接触进而发生相互作用,更加有利于酶进入藜麦蛋白内部结构,形成更多的小分子肽段及氨基酸等,进一步提高消化产物的水解度及抗氧化活性。这与毛小雨等<sup>[28]</sup>的研究结果一致。

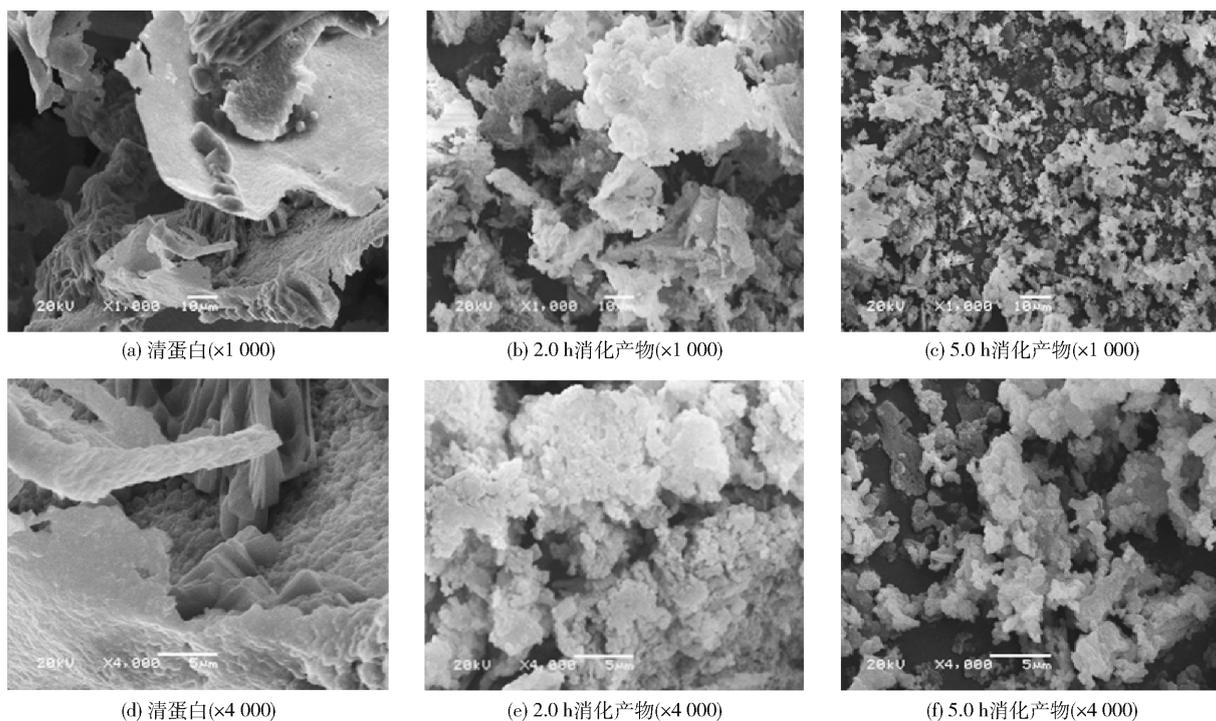


图8 藜麦清蛋白及模拟消化产物微观结构

Fig.8 Microstructure of quinoa albumin and stimulated digestion products

### 3 结 论

经胃-胰蛋白酶两步水解后,藜麦清蛋白的水解度不断增加。在模拟消化结束(5.0 h)时达到了39.60%。清蛋白消化产物具有很强的还原力以及DPPH、ABTS<sup>+</sup>自由基的清除作用、对Fe<sup>2+</sup>的螯合能力较强,但对Cu<sup>2+</sup>的螯合能力较小。游离氨基酸在消化结束时达到了 $4.546 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,氨基酸含量越高活性越强,酶解物抗氧化活性越强。模拟消化产物中 $\beta$ -转角含量显著增加, $\alpha$ -螺旋及无规则卷曲含量随着消化时间的推移先降低后升高,但 $\beta$ -折叠含量的变化与之相反。扫描电镜结果显示,经胃蛋白酶酶解,清蛋白颗粒明显变小,无序排列呈致密结构,孔隙较多。模拟体外消化结束时,产物变成更小的絮状颗粒,表面积进一步增大。研究结果表明,藜麦清蛋白水解度高、消化产物游离氨基酸大幅增加、抗氧化性好。

#### 参考文献:

- [1] ASHER A, GALILI S, WHITNEY T, et al. The potential of quinoa (*Chenopodium quinoa*) cultivation in Israel as a dual-purpose crop for grain production and livestock feed[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 272:109534.
- [2] 赵婧, 刘祎鸿, 李博文. 甘肃藜麦产业发展现状及对策建议[J]. *甘肃农业*, 2020(8):68-70.  
ZHAO J, LIU Y H, LI B W. Current situation and countermeasures of quinoa industry in Gansu province[J]. *Gansu Agriculture*, 2020(8):68-70.
- [3] 王雷, 董吉林, 申瑞玲. 藜麦蛋白的提取及功能性质与生物活性概述[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(7):188-193.  
WANG L, DONG J L, SHEN R L. Overview of the extraction, functional properties and biological activity of quinoa protein[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils*, 2020, 35(7):188-193.
- [4] MARTÍNEZ J H, VELÁZQUEZ F, BURRIEZA H P, et al. Betanin loaded nanocarriers based on quinoa seed 11S globulin. Impact on the protein structure and antioxidant activity[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 87:880-890.
- [5] RAJAPAKSE N, MENDIS E, JUNG W, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties[J]. *Food Research International*, 2005, 38(2):175-182.
- [6] 戴良香, 张岱, 闫彩霞, 等. 不同花生品种籽仁发育过程中蛋白质组分分析[J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(4):42-46.
- [7] DAI L X, ZHANG D, YAN C X, et al. Peanut protein fractions during seed development for different varieties[J]. *Food Research International*, 2011, 26(4):42-46.
- [7] NALINANON S, BENJAKUL S, KISHIMURA H, et al. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna[J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(4):1354-1362.
- [8] 郭顺堂, 吕莹, 陈辰, 等. 修饰作用导致大豆蛋白氨基酸低效化问题的研究进展[J]. *食品科学技术学报*, 2016, 34(6):12-16.  
GUO S T, LÜ Y, CHEN C, et al. Research progress on low amino acid bioavailability in soy protein due to modification[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2016, 34(6):12-16.
- [9] 潘佳静, 梁焱惠, 张敏, 等. 皮蛋模拟胃肠道消化物对HepG2细胞的影响[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(2):82-90.  
PAN J J, LIANG Y H, ZHANG M, et al. Effect of preserved eggs simulated gastrointestinal digests on HepG2 cells[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2022, 40(2):82-90.
- [10] 史瑞婕. 杏鲍菇蛋白质结构表征及功能特性研究[D]. 太原:山西农业大学, 2019.  
SHI R J. Research on structural characterization and functional properties of *Pleurotus eryngii* protein[D]. Taiyuan:Shanxi Agricultural University, 2019.
- [11] 姜丰, 刘静波, 马思彤, 等. 卵白蛋白体外模拟胃肠道消化产物的抗氧化活性及其结构表征[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(9):10-18.  
JIANG F, LIU J B, MA S T, et al. Antioxidant activity of ovalbumin from simulated gastrointestinal tract *in vitro* and its structure characterization[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(9):10-18.
- [12] CHO S. Changes in the antioxidant properties of rice bran protein isolate upon simulated gastrointestinal digestion[J]. *LWT Food Science & Technology*, 2020, 126:109-206.
- [13] 林凤英. 美藤果清蛋白的提取工艺及性质研究[D]. 广州:华南农业大学, 2016.  
LIN F Y. Study on extraction and property of sacha inchi albumin[D]. Guangzhou:South China Agricultural University, 2016.
- [14] 秦晓佩, 余筱洁, 杨华, 等. 菜籽饼粕蛋白模拟胃肠消化过程抗氧化研究[J]. *中国粮油学报*, 2016,

- 31(1):21-26.
- QIN X P, YU X J, YANG H, et al. Antioxidant activity of hydrolysate peptides from rapeseed meal digested with simulated gastrointestinal [J]. *Food Research International*, 2016, 31(1):21-26.
- [15] 何兴芬. 热处理对藜麦蛋白质功能特性、结构及体外消化的影响[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2020.
- HE X F. Effects of heat treatment on functional characteristics, structure and *in vitro* digestion of quinoa protein[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2020.
- [16] TAI A, IOMORI A, ITO H. Structural evidence for the DPPH radical-scavenging mechanism of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-I-ascorbic acid [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017, 25(20):5303-5310.
- [17] 吴伟, 蔡勇建, 吴晓娟. 不同贮藏期米糠制备的米糠蛋白酶解产物抗氧化性分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(3):227-231.
- WU W, CAI Y J, WU X J. Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates of rice bran proteins prepared from rice bran with different storage times [J]. *Food Science*, 2017, 38(3):227-231.
- [18] CHEN S, HUANG H, HUANG G. Extraction, derivatization and antioxidant activity of cucumber polysaccharide [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 140:1047-1053.
- [19] 刘倩霞, 刘东, 张俊, 等. 2种蛋白酶解曲拉干酪素条件优化及抗氧化性比较[J]. *食品科学*, 2019, 40(8):225-234.
- LIU Q X, LIU D, ZHANG J, et al. Optimization of hydrolysis conditions of qula casein with two proteases and comparative antioxidant activity of hydrolysates [J]. *Food Science*, 2019, 40(8):225-234.
- [20] 张忠慧, 华欲飞. 大豆分离蛋白与低浓度尿素相互作用红外光谱分析[J]. *粮食与油脂*, 2007, 135(7):20-21.
- ZHANG Z H, HUA Y F. Determination of interaction of urea and soybean protein isolate by Fourier transform infrared spectroscopy [J]. *Cereals and Oils*, 2007, 135(7):20-21.
- [21] 刘媛, 谢孟峡, 康娟. 三七总皂甙对牛血清白蛋白溶液构象的影响[J]. *化学学报*, 2003(61):1305-1310.
- LIU Y, XIE M X, KANG J. Influence of total saponins of *Panax notoginseng* on the conformation of BSA [J]. *Acta Chimica Sinica*, 2003(61):1305-1310.
- [22] GONG K, SHI A, LIU H, et al. Emulsifying properties and structure changes of spray and freeze-dried peanut protein isolate [J]. *Journal of Food Engineering*, 2016, 170:33-40.
- [23] 付媛. 酶法水解荞麦清蛋白、谷蛋白制备抗氧化活性肽的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2009.
- FU Y. Study on preparation of antioxidant peptides from buckwheat albumin and glutelin by enzyme hydrolysis [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2009.
- [24] 江连洲, 胡继莹, 张潇元, 等. 不同品种大豆分离蛋白体外消化产物的结构特性[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(9):21-36.
- JIANG L Z, HU J Y, ZHANG X Y, et al. Structural characteristics of *in vitro* digested products of different soybean protein isolates [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(9):21-36.
- [25] 林伟静. 糖基化改性对花生蛋白膜性能的影响及其作用机理研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2015.
- LIN W J. Study on the effects of glycosylation on the properties of peanut protein films and its mechanism [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015.
- [26] 叶林, 廖钰, 赵谋明. 花生分离蛋白氧化过程中的结构变化[J]. *食品与机械*, 2015, 31(2):3-6.
- YE L, LIAO Y, ZHAO M M. Structural evaluation of peanut protein isolates during oxidation by FTIR [J]. *Food and Machinery*, 2015, 31(2):3-6.
- [27] 王正旋. 大米蛋白体外消化及抗氧化作用效果的研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学, 2017.
- WANG Z X. Effects of rice protein on *in vitro* digestibility and antioxidation [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2017.
- [28] 毛小雨, 许馨予, 杨鸽隼, 等. 紫花芸豆蛋白体外消化产物的抗氧化活性及结构特征分析[J]. *食品科学*, 2021, 42(3):56-62.
- MAO X Y, XU X Y, YANG H J, et al. Antioxidant activity and structural characteristics of *in vitro* digestion products of purple speckled kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein [J]. *Food Science*, 2021, 42(3):56-62.
- [29] 胡扬. 不同氮肥对 *Arthrobacter* sp. DNS10 消减玉米农田黑土中阿特拉津残留的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2019.
- HU Y. Different nitrogen fertilizers on the reduction of atrazine by *Arthrobacter* sp. DNS10 in black soil of maize farmland [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.

# Antioxidant Activity and Structural Characteristics of Digestion Products of Longli 1 Quinoa Albumin *in Vitro*

JIAO Fei<sup>1,2</sup>, YANG Qian<sup>3</sup>, YANG Chao<sup>4</sup>, GAO Juan<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhaoyun<sup>4</sup>,  
ZHANG Zhihua<sup>4</sup>, YANG Fumin<sup>4,\*</sup>

(1. Jinchang Food Inspection and Testing Center, Jinchang 737100, China;

2. Gansu Quinoa Product Quality Supervision and Inspection Center, Jinchang 737100, China;

3. Gansu Institute of Business and Technology, Lanzhou 730020, China;

4. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** To study the antioxidant activity and its structural characteristics of albumin from Longli 1 quinoa seeds, quinoa albumin as raw material, the antioxidant activity and structural changes of quinoa albumin during *in vitro* simulated digestion were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscope. The results showed that the degree of hydrolysis of quinoa albumin and the release of free amino acids increased significantly with the digestion of pepsin and trypsin, reaching 39.60% and 45.46 mg/L respectively at the end of simulated digestion. After simulated gastrointestinal digestion, DPPH· and ABTS<sup>+</sup>· scavenging rate, total reducing power, Fe<sup>2+</sup> chelation rate and Cu<sup>2+</sup> chelation rate of albumin digestion products were 58.43%, 79.51%, 0.280, 66.84% and 15.74%, respectively, which were 34.85%, 68.62%, 0.179, 54.52% and 7.76% higher than those of undigested albumin. In the whole process of simulated digestion, the content of  $\beta$ -angle increased significantly, while the content of  $\alpha$ -helix and random coil decreased first and then increased with the passage of digestion time. The content of  $\beta$ -fold increased first and then decreased. Scanning electron microscope observation showed that after pepsin hydrolysis, the digested particles become significantly smaller and disorderly arranged in a dense structure. The surface area and the pore size of digested particles increased. The research results were aimed to provide a basis for the further utilization of quinoa albumin of Longli 1 quinoa seeds.

**Keywords:** quinoa albumin; external digestion; degree of hydrolysis; antioxidant activity; structural change

(责任编辑:郝一铭)