

糖基化反应改善大豆抗原蛋白功能特性的研究进展

卢家成, 孙泽威, 李婷琳

(吉林农业大学 动物科学技术学院, 吉林 长春 130118)

摘要:大豆含有丰富的营养成分,被广泛应用于食品和饲料行业,但大豆中的抗原蛋白对人和动物有一定的致敏作用而不利于吸收和利用,有时甚至导致幼龄动物的死亡。因而改善大豆抗原蛋白功能特性及去除抗原蛋白的致敏性便成为了研究的热点。该文围绕蛋白质糖基化方法可安全有效的改善蛋白质功能性质这一特性,综述了糖基化方法对大豆抗原蛋白功能特性影响的相关研究,以期对大豆抗原蛋白的后续深入研究提供理论参考。

关键词:糖基化;大豆抗原蛋白;功能特性

中图分类号:S816.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2012)03-0483-04

Research Advance on Improving Functional Characteristics of Soybean Antigenic Proteins by Glycosylation

LU Jia-cheng, SUN Ze-wei, LI Ting-lin

(College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: Soybean have abundant nutrient factors, and plays an important role in food and feed industry, however, the soybean antigenic proteins can produce allergization effect, sometimes even lead to death of young animals. Improving functional performance of soybean antigenic proteins and inactivating its sensitization have becoming the hot topic. Concentrating on the feature that glycosylation can improve protein function safely and effectively, this article summarized correlation studies about glycosylation effect on functional characteristics of soybean antigenic proteins, so as to offer reference for further study of soybean antigenic proteins.

Key words: Glycosylation; Soybean antigenic protein; Functional characteristics

鸡蛋、牛奶、小麦、花生、大豆、坚果、鱼和甲壳类食品被发达国家列为八大主要食物过敏源^[1],食物抗原已在很大程度上影响到人们的饮食健康^[2]。在所有具有过敏性抗原的食物中,大豆又是一个主要来源^[3]。众多研究表明,大豆抗原蛋白会引起婴儿腹泻^[4],仔猪、犊牛、鼠等幼龄动物以及妊娠母猪的过敏反应^[5~9]。这使人们充分认识到了改善大豆抗原蛋白功能特性及去除其免疫原性的重要性。

目前常用的蛋白质改性技术有物理改性、化学改性、酶改性和基因工程改性等^[10]。通过适当的改性技术,可以获得较好功能特性和营养特性的蛋白质,同时一定程度上拓宽了蛋白质在日常生活及工业中的应用范围^[11]。而化学改性^[12]中的糖基化改性是众多改性方法中的一种比较安全有效的手段。自20世纪80年代报道糖与蛋白之间有共价结合作用之后,就有部分学者利用这一结合特性展开了蛋白质糖基化改性的科学研究。目前,众多研究

结果表明,新合成的糖蛋白在溶解性、热稳定性、乳化性、抗菌性、抗氧化性等功能特性方面都有不同程度的改善。此外,对于一些致敏性的蛋白来说,糖基化修饰后还能在一定程度上降低或消除致敏性。

基于抗原蛋白带来的困扰以及糖基化改性方法的优点,文章围绕糖基化反应改善大豆球蛋白功能特性的研究进行综述,以期为改善大豆抗原蛋白性质的深入研究提供一定的理论依据。

1 大豆抗原蛋白的主要成分和结构性质

1.1 大豆抗原蛋白的主要成分

大豆中能引起动物发生过敏反应的蛋白质被称为大豆抗原。主要包括:大豆空泡蛋白、大豆疏水蛋白、大豆壳蛋白、大豆抑制蛋白、大豆球蛋白、伴大豆球蛋白、胰蛋白酶抑制因子等。其中大豆球蛋白和伴大豆球蛋白属于贮藏蛋白,是主要的致敏

收稿日期:2012-02-17

基金项目:国家自然科学基金项目(31072037)。

第一作者简介:卢家成(1985-),男,在读硕士,研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail:lujiacheng1985@163.com。

通讯作者:孙泽威(1974-),男,博士,副教授,主要从事饲料抗营养因子的研究。E-mail:sunzewei@jlau.edu.cn。

抗原。

1.2 主要抗原蛋白的结构性质

大豆球蛋白是一个六聚体蛋白,分子质量为350~360 kDa,含有3 000个氨基酸残基。一共包含6对亚基,每对亚基的分子质量约60 kDa,由一个酸性A肽链(35~40 kDa)和一个碱性B肽链(22 kDa)通过二硫键连接而成。酸性亚基A1、A2、A3的等电点分别为pH 5.15、pH 5.40、pH 4.75,碱性亚基B1、B2、B3的等电点分别为pH 8.0、pH 8.25、pH 8.5。另外,天然状态下的大豆球蛋白分子结构十分紧密,不容易被酶所催化水解^[13]。

β -伴大豆球蛋白为一个三聚体蛋白,分子质量为150~200 kDa,由 α 、 α' 、 β 3个亚基组成,分子质量分别为76、72、53 kDa^[14]。可低温溶解,其等电点为pH 4.8。目前认为, β -伴球蛋白含量可作为大豆蛋白营养价值的评判指标之一^[15]。

大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白都富含赖氨酸^[15],而糖基化反应中主要是还原性糖和赖氨酸残基之间的反应,所以这也为抗原蛋白的糖基化改性奠定了反应基础。

2 糖基化反应的机理

蛋白质糖基化研究已广泛应用于食品行业,还原糖与蛋白质分子上游离赖氨酸的 α -NH₂或 ϵ -NH₂共价连接(主要为Lys的 ϵ -氨基)而形成糖基化蛋白的过程,称为蛋白质的糖基化作用^[16]。蛋白质糖基化反应的实质是美拉德反应,关于美拉德反应的反应过程,一般认为可分为反应初期、反应中期和反应末期3个阶段。

2.1 初期阶段

该阶段反应包括还原糖的羰基碳首先与氨基氮上孤对电子的亲核加成,接着失去水和闭环而形成葡萄糖基胺,如果还原糖过量,就会进一步形成二葡基胺。葡基胺再经过Amadori重排而生成1-氨基-2-酮糖。

2.2 中期阶段

中期阶段的美拉德反应十分复杂,Amadori重排产物经过脱水、脱氨等一系列反应而生成3-脱氧己糖醛酮、奥苏烯糖和HMF等,这些化合物依次反应,进一步形成无氮和含氮的褐色可溶性化合物。

2.3 末期阶段

该时期被成为高级美拉德反应阶段,葡萄糖醛酮、3-脱氧、3、4-二脱氧、HMF、二还原酮类、不饱和醛亚胺等众多活性中间体均在此阶段内形成。同时,这些产物又能够继续与氨基酸反应,形成最终

的类黑精色素—褐色含氮色素,吡嗪和咪唑环等风味物质。整个过程包括了醇醛缩合、醛氨聚合、环化合反应等,也是一个比较复杂的反应阶段。

以上是对蛋白质糖基化反应机理(美拉德反应)的简单介绍,利用蛋白与多糖进行美拉德反应生成稳定的共价复合物,目的是要得到中期美拉德反应产物,依照固相反应机理,一些介稳中间物或动力学控制的化合物往往只能在较低温度下存在。所以在制备试验中最好选择比较温和的温度和相对湿度,既要保证美拉德反应进行又要求达到适宜的反应程度,从而得到所期望的,具有优越功能性质的糖-蛋白复合物。

3 糖基化反应对大豆抗原蛋白功能性质的影响

蛋白质的溶解性、热稳定性、乳化等功能特性是影响和评价蛋白质的营养及利用价值的重要指标。而根据以往的研究,糖基化反应恰恰就是主要影响了蛋白质的这几个方面的性质。对于大豆抗原蛋白的功能性质的改善而言,除了这几方面以外,对其抗原性的评价也是至关重要的。

3.1 溶解性

溶解性是蛋白质最重要的指标之一,它影响着蛋白质的凝胶、乳化和起泡作用等。糖类具有较多的亲水基团,如羟基、蛋白分子与糖发生糖基化反应后生成的蛋白质-糖复合物中会引入大量的羟基,使得整个分子的溶解性得到提高^[17]。Achouri等^[18]研究了含有大豆球蛋白的11S部分与葡萄糖在50℃,65%相对湿度条件下发生糖基化反应,结果表明反应初期到24 h,反应产物的溶解性有逐渐增加的趋势。苏志光^[19]将富含7S和11S组分的大豆分离蛋白与甘露聚糖进行糖基化反应并测定糖基化产物溶解度,结果表明糖基化后的糖蛋白溶解性有显著提高;同时,反应物中的糖含量相对增加时,反应产物的溶解性也相应提高。因此,糖基化反应有利于提高蛋白溶解性,进而会提高蛋白的吸收和利用效率。

3.2 热稳定性

目前,有关大豆抗原蛋白糖基化产物热稳定性的研究少见报道。其它蛋白如大麦蛋白与葡萄糖^[20],卵清蛋白与6-磷酸葡萄糖^[22],卵黄高磷蛋白与半乳甘露聚糖^[22],乳清蛋白与葡萄糖^[23]等研究报道显示,糖基化改性可以有效改善多种蛋白质的热稳定性。另有报道在水溶液中,热作用会使蛋白质分子展开而产生聚沉现象。蛋白质与糖在一定条件下发生糖基化反应后,会抑制相同条件下结构

展开的蛋白质与蛋白质之间的相互作用,因此可以很好的提高蛋白质的热稳定性^[24]。由此推断大豆抗原蛋白和还原性糖发生反应后,其反应产物的热稳定性也会有明显改善,但具体规律还需要进一步试验验证。

3.3 乳化性

Achouri 等^[18]研究表明在糖基化反应的早期和中期,富含 11S 的大豆球蛋白部分的乳化性在不断增强。齐军茹等^[25]通过研究大豆球蛋白与葡聚糖糖基化反应产物的乳化活性,得出在 60℃、79% RH 条件下,7S 球蛋白与葡聚糖干热反应 4 d 所得产物的乳化活性改善最明显;11S 球蛋白与葡聚糖干热反应 1 d 所得产物乳化活性最好。另外,7S 葡聚糖共价复合物在酸性和强碱性以及高温条件下乳化活性相当稳定;而 11S 与葡聚糖干热 1 d 所得共价复合物在碱性条件下乳化活性稳定。大豆球蛋白与葡聚糖的共价复合物在高盐条件下仍具有良好的乳化活性。赵剑飞^[26]将富含 7S 和 11S 组分的分离蛋白与葡萄糖进行糖基化反应,结果表明糖基化大豆分离蛋白在 pH 3~9 范围内乳化活性较高,约是大豆分离蛋白的 2 倍;糖基化大豆分离蛋白在酸性和高盐浓度体系中皆显示很好的乳化特性。蛋白质和糖类都有稳定的水包油乳化功能特性,乳化过程中蛋白质吸附在油水界面形成粘弹性的保护层,因此蛋白质-糖复合物应该具有很好的乳化特性^[24]。

乳化性是蛋白质的一项重要功能特性,与蛋白质的品质密切相关,直接影响蛋白质在食品、饲料行业中的有效利用。因此,改善抗原蛋白的乳化性对现实生活与实际生产具有重要意义。

3.4 免疫原性

Van de 等^[27]采用干粉和液体 2 种反应体系研究了 FOS 与大豆分离蛋白糖基化反应,结果发现糖基化蛋白的抗原性降低了约 90%。另外,该研究用果糖与不同比例的氨基酸反应,表明果糖参与的粉末和液体体系糖基化反应也降低了糖化蛋白的抗原性。以上结果表明,糖基化可以有效修饰 7S 与 11S 蛋白片段,使其结构与性能发生改变,从而极大地降低大豆蛋白的抗原性。抗原蛋白免疫原性的降低,极大地拓宽了大豆产品在生活生产中的应用范围,也提高了大豆蛋白的利用率和利用价值,尤其在饲料行业的发展将更具潜力。

3.5 其它特性

孙炜炜等^[28]研究表明 7S 球蛋白及其糖基化产物能够抑制 11S 球蛋白的热聚集,并且糖基化产物的抑制效果比未发生糖基化的 7S 球蛋白明显。许

彩虹^[29]探讨了糖基化方法分别对于大豆 7S 球蛋白自身热聚集、凝胶性和大豆 11S 球蛋白热聚集性质的影响。其中葡聚糖以非共价键接入蛋白质肽链中,其空间位阻效应有利于热致凝胶性质的提高;以共价键结合的葡聚糖的空间位阻效应有利于保护蛋白质发生热变性而形成凝胶。另外,糖基化能够提高大豆 7S 球蛋白对大豆 11S 球蛋白热聚集行为的抑制作用。

4 展望

长期以来,蛋白质糖基化改性备受科研工作者的关注,采用糖基化方法改善大豆抗原蛋白相关特性的研究也越来越受人们到重视。目前,这方面的研究取得了一定的进展。然而,当前大豆抗原蛋白糖基化改性相关的研究还不够全面和透彻,其反应条件、反应机理及反应后大豆抗原蛋白各方面功能性质的变化规律等还需要深入系统的研究。利用体外糖基化工艺的优化进一步改善大豆抗原蛋白的功能特性,降低或去除其免疫原性,并不断深入研究揭示其反应机理,对于大豆蛋白在营养学和功能学研究及实际生活与饲料工业中更加广泛的应用具有十分重要的指导意义。而且抗原蛋白糖基化产物在食品和饲料行业中的实际应用性还有待深入研究与开发。

参考文献

- [1] Lalles J P. Nutritional and antinutritional aspects of soyabean and field pea proteins used in veal calf production: A review[J]. *Live-stock Production Science*, 1993, 181-202.
- [2] Chandra R K. Food hypersensitivity and allergic diseases[J]. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 56: 54-56.
- [3] Herman E M, Helm R M, Jung R, et al. Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132: 36-43.
- [4] Duke W W. Soybean as a possible important source of allergy[J]. *Allergy*, 1934, 5: 300-304.
- [5] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Transient hypersensitivity to soybean meal in the early-weaned pig[J]. *Journal of Animal Science*, 1990, 68: 1790-1799.
- [6] 孙泽威,秦贵信,张庆华. 大豆抗原蛋白对犊牛生长性能,日粮养分消化率和肠道吸收能力的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2005, 41(11): 30-33. (Sun Z W, Qin G X, Zang Q H. Effects of soybean antigenic protein on growth performance, digestive of diet nutrients and the intestinal absorption ability[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2005, 41(11): 30-33.)
- [7] 孙泽威,秦贵信,高云航. 大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白对反刍前犊牛致敏作用的研究[J]. *中国畜牧杂志*, 2006, 42(15): 38-41. (Sun Z W, Qin G X, Gao Y H. Research of the allergization of glycinin and β -conglycinin on calves that before ruminant[J].

- 2006,42(15):38-41.)
- [8] Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, et al. Soybean β -conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of β -oxidation, down regulation of fatty acid synthase and inhibition of triglyceride absorption[J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2004, 68:352-359.
- [9] Li D F, Nelssen J L, Reddy P G, et al. Measuring suitability of soybean products for early-weaned pigs with immunological criteria [J]. *Journal of Animal Science*, 1991, 69:3299-3307.
- [10] 秦贵信, 孙泽威, 赵元, 等. 大豆中主要抗原蛋白的研究进展 [J]. *吉林农业大学学报*, 2008, 30(4):553-558. (Qin G X, Sun Z W, Zhao Y, et al. Research advance in study on allergen proteins in soybean [J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2008, 30(4):553-558)
- [11] 金哲, 崔成哲, 郭晓玉, 等. 蛋白质的改性技术及应用进展 [J]. *民营科技*, 2007(9):31. (Jin Z, Cui C Z, Guo X Y, et al. Advances on protein modification technology and application [J]. *Private Science and Technology*, 2007(9):31.)
- [12] 姚玉静, 杨晓泉, 邱礼平, 等. 食品蛋白质化学改性研究进展 [J]. *粮食与油脂*, 2006(7):10-12. (Yao Y J, Yang X Q, Qiu L P, et al. Research development chemical modification of food proteins [J]. *Cereals and Oils*, 2006(7):10-12.)
- [13] Castimpoos N. Isolation of α -, β -, and γ -conglycinins [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1969, 129:409-497.
- [14] 黄友如, 裴爱泳, 华欲飞. 大豆蛋白结构与功能关系 [J]. *中国油脂*, 2004, 29(11):24-27. (Huang Y R, Qiu A Y, Hua Y F. The relationship of structure and function of soybean protein [J]. *China Oils and Fats*, 2004, 29(11):24-27)
- [15] 周瑞宝, 周兵. 大豆 7S 和 11S 球蛋白的结构和功能性质 [J]. *中国粮油学报*, 1998, 13(6):39-42. (Zhou R B, Zhou B. The structure and functional properties of soybean 7S and 11S globulin proteins [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 1998, 13(6):39-42.)
- [16] 李丹, 崔凯. 食品蛋白质的改性技术 [J]. *食品与发酵工业*, 2000, 25(6):58-60. (Li D, Cui K. Modified technology of food protein [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2000, 25(6):58-60.)
- [17] 田其英, 华欲飞. 大豆蛋白溶解性研究 [J]. *粮食与油脂*, 2006(6):6-8. (Tian Q Y, Hua Y F. Study on the solubility of soybean protein [J]. *Cereals and Oils*, 2006(6):6-8)
- [18] Achouri A, Boye J I, Yaylayan V A, et al. Functional properties of glycosylated soy 11S glycinin [J]. *Food Chemistry and Toxicology*, 2005, 70:269-274.
- [19] 苏志光. 大豆蛋白的甘露聚糖糖基化研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2010. (Su Z G. A study of glycosylation of soy protein isolated and mannose [D]. Beijing: China Agricultural University, 2010.)
- [20] 王晓丹, 董学艳, 刘继超, 等. 大麦蛋白湿法糖基化反应研究 [J]. *分子科学学报*, 2011, 27(4):252-257. (Wang X D, Dong X Y, Liu J C, et al. Study of barley protein-glucose graft reaction by wet-heating [J]. *Journal of Molecular Science*, 2011, 27(4):252-257.)
- [21] Kato Y, Aoki T, Kato N, et al. Modification of ovalbumin with glucose 6-phosphate by amino-carbonyl reaction: Improvement of protein heat stability and emulsifying activity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995, 43(2):301-305.
- [22] Nakamura S, Ogawa M, Nakai S, et al. Antioxidant activity of a Maillard-type phosvitin-galactomannan conjugate with emulsifying properties and heat stability [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46:3958-3963.
- [23] 郑喆, 卢晶, 罗永康. 乳清蛋白-葡萄糖的制备及溶解性和热稳定性研究 [J]. *乳业科学与技术*, 2009(2):55-58. (Zheng Z, Lu J, Luo Y K. Study on preparation and solubility and heat stability of WPI-glucose conjugate [J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2009(2):55-58.)
- [24] 王延青, 郭兴凤. 蛋白-多糖共价复合物及其应用研究进展 [J]. *中国食品添加剂*, 2009(5):151-155. (Wang Y Q, Guo X F. Research advance of protein-polysaccharide conjugations and their application [J]. *China Food Additive*, 2009(5):151-155.)
- [25] 齐军茹, 杨晓泉, 廖劲松, 等. 大豆蛋白-多糖干热制备复合物及其反应机理研究 (I) 共价复合物的制备及生成机理探讨 [J]. *食品科学*, 2006, 27(1):165. (Qi J R, Yang X Q, Liao J S, et al. Preparation and reaction mechanism of soy protein-polysaccharide conjugate obtained by dry-heat medium temperature treatment (I) Preparation of protein-dextran conjugates and forming mechanism of protein-polysaccharide conjugate [J]. *Food Science*, 2006, 27(1):165.)
- [26] 赵剑飞. 大豆分离蛋白与糖基化分离蛋白乳化性的研究 [J]. *食品工业科技*, 2005(12):78. (Zhao J F. Study on emulsification of isolate protein and glycosylation isolate protein of soybean [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2005(12):78.)
- [27] Van de Lagemaat J, Manuel Silván J, Javier Moreno F, et al. In vitro glycation and anti-genicity of soy proteins [J]. *Food Research International*, 2007, 40:153-160.
- [28] 孙炜炜, 于淑娟. 7S 伴大豆球蛋白及其糖基化产物对大豆 11S 球蛋白热聚集的影响 [J]. *食品科学*, 2010, 31(15):159-162. (Sun W W, Yu S J. Study on the effect of β -conglycinin and glycosylated β -conglycinin on the thermal aggregation of glycinin [J]. *Food Science*, 2010, 31(15):159-162.)
- [29] 许彩虹. 大豆球蛋白糖基化接枝改性及其热聚集行为研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2010. (Xu C H. Research on the glycosylation and thermal aggregation of soybean globulin-polysaccharide [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.)