DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.027475
引用格式:王佳悦,董亚博,付元涛,等.利用表没食子儿茶素-3-没食子酸酯回收大豆蛋白酶解液中多肽的研究[J].食品与发酵工业,2021,47(16):78-83. WANG Jiayue,DONG Yabo,FU Yuantao, et al. Study on recovery of peptides from soybean proteolysis solution with epigallocatechin-3-gallate[J]. Food and Fermentation Industries,2021,47(16):78-83.

利用表没食子儿茶素-3-没食子酸酯回收大豆蛋白酶解液中多肽的研究

王佳悦,董亚博,付元涛,兰天,隋晓楠,王欢,江连洲*

(东北农业大学,黑龙江 哈尔滨,150030)

摘 要 在不同表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate,EGCG)添加量和不同 pH 值下,从大豆分离蛋白酶解液(soy protein hydrolysates,SPHs)中回收多肽,并对多肽的回收率、二级结构含量变化、表面疏水性、抗氧化活性进行表征。结果表明,增加酶解时间可提高中间肽含量。EGCG 的加入提高了 SPHs 的回收率,SPHs 的量与 EGCG 的添加量呈正相关;随着酶解时间的延长,肽回收率先降低后升高,且在 30 min 时回收率最高,表明 EGCG 可能与分子质量 5~10 kDa 的肽更容易生成沉淀。EGCG 的加入在一定程度上改变了蛋白肽的二级结构,蛋白肽被拉伸;EGCG 的加入会降低蛋白肽的表面疏水性,提高抗氧化活性。该研究通过构建并分析 SPHs-EGCG 的结构功能及对肽回收率的影响,为 EGCG 从 SPHs 中回收多肽提供了参考。

关键词 表没食子儿茶素-3-没食子酸酯;大豆多肽;肽回收率;表面疏水性;抗氧化活性

大豆蛋白作为一种重要的食品成分,是目前最丰富的具有重要商业价值的植物蛋白来源之一,由于其具有显著的营养和功能特性、对健康的积极作用且低成本容易获取而被广泛应用于食品加工中[1]。大豆蛋白的生理、功能和营养特性对加工利用具有重要意义,因此通常经由化学、物理和酶处理大豆蛋白以改善其特性[2]。其中,利用酶水解蛋白制备具有多种生物活性功能(抗氧化性[3]、血管紧张素转换酶抑制活性[4]、降血压、降胆固醇、细胞保护作用[5]等)的蛋白肽受到越来越多的关注和研究。因此,酶法生产大豆蛋白肽已成为功能性食品配料、化妆品和药品开发中公认的工艺[6-7]。蛋白质水解物通常是大量肽片段的混合物,因此需要进行分离以得到目标肽,目前几种有效的分离肽的技术包括:高效液相色谱法(HPLC)[8-9]、超滤法[10]、体积排阻色谱法(size exclusion chromatography,SEC)[11]。然而,这些技术在使用中存在一些问题,如膜污染、操作繁琐、成本高等[12]。

表没食子儿茶素-3-没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate,EGCG)是绿茶中含量最丰富的儿茶素,也是已知的能够捕获大多数活性氧,如超氧化物、单线态氧、羟基自由基最有效的的茶多酚[13]。同时,EGCG 还因其潜在的抗病毒、抗菌和神经保护等药理作用而引起人们的关注。流行病学研究表明,摄入 EGCG 可以降低心血管疾病、神经退行性疾病、糖尿病和肥胖的风险[14]。近年来,多酚-蛋白质相互作用被广泛研究,即多酚通过共价或非共价作用络合蛋白质,进而影响蛋白质的结构、功能及营养特性[15]。WEI 等[16]研究发现 EGCG 和乳球蛋白之间的相互作用改变了乳球蛋白的结构、功能和生物活性。DING 等[17]研究表明,EGCG 的加入使大豆蛋白油脂体的稳定性显著提高,并减缓油脂释放速率。此外,除了形成可溶的络合物,多酚与蛋白质相互作用也会形成不可溶的聚集体[18-19]。EGCG 与富含脯氨酸的蛋白质有很强的相互作用,导致蛋白质聚集[20-21]。

本研究是根据 EGCG 与大豆分离蛋白(soy protein isolate,SPI)酶解物复合会形成不溶性肽聚集物,考察利用 EGCG 从大豆分离蛋白酶解液(soy protein hydrolysate,SPHs)中回收多肽的作用,并对大豆多肽与 EGCG 复合物性质进行表征,考察了 EGCG 浓度和 pH 值对总肽提取率的影响,通过对复合物的结构、功能的变化以及抗氧化活性的分析进一步评估回收肽的质量。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SPI,实验室自制;EGCG(纯度 98%),西安通泽生

第一作者:硕士研究生(江连洲教授为通讯作者,E-mail:jlzname@163.com)
基金项目:山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2019JZZY010722);黑龙江省"百千万"工程科技重大专项项目(2019ZX08B01)
收稿日期:2021-03-23,改回日期:2021-04-15

物技术公司;碱性蛋白酶(Alcalase 2.4 L,2.4 AU/g),诺维信公司;盐酸、氢氧化钠(均为分析纯),天津基准化学试剂有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

CJJ-6 磁力搅拌器,纳丽雅有限公司;Eppendorf 5424R 冷冻离心机,Eppendorf 德国公司;PHS-25 数显台式酸度计,上海雷磁公司;HH420 光合水箱水浴锅,光合有限公司;2500C 高速研磨机,艾泽拉有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 SPI 的制备

参考 ZHANG 等[22]的方法稍加修改。将大豆磨粉过 60 目筛,与正己烷混合(质量比 1∶3)进行 3 次脱脂得到脱脂豆粉。将脱脂豆粉溶于去离子水中(质量比1∶10),并用 2 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0。所得浆液在 45 ℃条件下连续搅拌 2 h,并在 10 000 × g 离心 30 min 后收集上清液。用 2 mol/L HCl 调节上清液 pH 至 4.5 沉淀蛋白质,然后在 6 500 × g 下离心 20 min 收集沉淀。将得到的沉淀水洗 3 次,并用 2 mol/L NaOH 调节 pH 至中性后冷冻干燥得到大豆分离蛋白粉末。

1.3.2 SPI 酶解物的制备

将冻干大豆分离蛋白粉末溶于去离子水中(质量浓度为 40 g/L),于 50 ℃下加热搅拌 20 min 以达到碱性蛋白酶(Alcalase 2.4 L)最适温度。在 SPI 溶液中加入 Alcalase 2.4 L(质量浓度为 10 g/L)分别持续酶解 30、60、90 min,并在酶解过程中用 2 mol/L NaOH 始终保持 SPI 溶液的 pH 为 8.5。将所有样品在 85 ℃的水浴中加热 10 min,并立即在冰浴中冷却至室温终止反应。将酶解后的混合物调节 pH 至中性,然后在 3 000 × g 下离心 20 min。将含有大部分大豆分离蛋白酶解物的上清液分离。

1.3.3 SPHs 的分子质量分布

参考 ZHANG 等[3]的方法对大豆蛋白酶解产物的分子质量分布进行测定。采用岛津 LC 20 A 型高效液相色谱仪利用体积排阻色谱(SEC-HPLC)法进行测定,检测器为紫外检测器(ultraviolet detector,UVD),色谱柱为 AdvanceBio SEC 柱(300 mm × 4.6 mm,2.70 μm)。将样品溶于 PBS(0.01 mol/L,pH 7.0)中,配制质量浓度为1 mg/mL 的溶液,过 0.45 μm 微孔滤膜,进样体积 10 μL。流动相为磷酸盐缓冲溶液(0.1 mol/L,pH 7.0),洗脱速度 0.30 mL/min,检测波长为 220 nm。分别以牛 γ-血球蛋白(158 kDa)、牛血清白蛋白(66 kDa)、鸡卵白蛋白(44 kDa)、马肌红蛋白(17 kDa)和维生素 B_{12}(1.35 kDa)作为标准品得到各个蛋白的保留时间与相对分子质量间的回归方程,进而计算大豆蛋白酶解物的分子质量分布。

1.3.4 EGCG 沉降 SPHs

量取等量 SPHs 分别调节 pH 值至 4.5 和 7.0,将 0、0.05%、0.10%、0.20%(质量分数)EGCG 分别加入 SPHs 溶液(pH 4.5 和 7.0)中,并在室温下避光搅拌 30 min。随后,在 4 ℃下用去离子水透析 24 h 后将混合物以 10 000 × g 离心 20 min,收集沉淀冷冻干燥后进行分析。肽回收率根据公式(1)计算:

$$\text{肽回收率}/\% = \left(1 - \frac{P'}{P}\right) \times 100 \quad (1)$$

式中:P'为上清液中肽含量,P 为 SPHs 中肽含量。

1.3.5 SPHs-EGCG 的红外光谱分析

参考 JIANG 等[23]的方法,称取一定量的 SPHs-EGCG 复合物样品与溴化钾粉末混合后压片,两者配比为 1∶100(质量比),红外光谱仪分辨率设置为 4 cm^{-1},扫描次数设置为 32 次,扫描波数谱段范围设置为 400 ~ 4 000 cm^{-1}。随后用 Peakfit 4.12 软件对谱图进行分析,并通过积分面积来计算肽的二级结构组分的百分含量占比。

1.3.6 SPHs-EGCG 的表面疏水性分析

使用荧光探针 ANS^- 方法测量表面疏水[24]。在室温下用 10 mmol/L 的 PBS 稀释样品使其质量浓度达 0.04 ~ 0.2 g/L,将 4 mL 样品溶液与 20 μL ANS(0.008 mol/L)混合反应 15 min 后置于石英比色皿中进行荧光光谱测定光谱测定条件设置为:激发波长 390 nm,发射波长为 470 nm,激发狭缝为 5 nm,发射狭缝宽为 5 nm,重复扫描 3 次。

1.3.7 SPHs-EGCG 的抗氧化活性分析

样品溶液与等体积的 DPPH 原液(0.20 mmol/L,体积分数 95% 的乙醇溶液)混合。室温下在黑暗中孵育 30 min 后,用酶标仪(Tecan Infinite M200 酶标仪,Tecan Inc.,Maennedorf,Switzerland)在 517 nm 处测量混合物的吸光度。空白用乙醇代替 DPPH 溶液,对照用乙醇代替样品溶液。根据公式(2)计算自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_{样品} - A_{空白}}{A_{对照}}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中:$A_{样品}$,$A_{空白}$,$A_{对照}$ 分别为样品、空白和对照品的吸光度。

1.3.8 统计分析

每组试验至少需要进行重复 3 次。采用 SPSS 16.0

对数据进行 ANOVA 分析,结果以平均值 ± 标准差(SD)表示,当 $P<0.05$ 时为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 SPHs 的分子质量分布分析

通过排阻色谱测定的 SPHs 分子质量分布如表 1 所示。未进行酶处理的样品中,主要成分为分子质量为 5 ~ 10 kDa 的肽或蛋白小分子,占比 85.33%;分子质量 >10 kDa 的肽含量占 13.63%,此时分子质量为 1 ~ 5 kDa 内未发现肽。随着酶解时间的增加,分子质量 >10 kDa 的肽含量逐渐减少,形成更小的多肽。CHABANON 等[25]研究发现油菜籽蛋白在 Alcalase 2.4 L 酶解过程中,随着水解度的增加,完整的蛋白或大分子质量的多肽(>10 kDa)逐渐消失,形成更小的多肽。在酶解时间 60 min 及以后,分子质量 5 ~ 10 kDa 和分子质量 <1 kDa 的肽含量逐渐下降直至检测不到,而中间分子质量 1 ~ 5 kDa 的肽含量随时间延长而增加,这说明酶解作用在整个蛋白上,导致中间肽的出现比例很高(96.96%)[26]。

表 1 大豆分离蛋白酶解物的分子质量分布

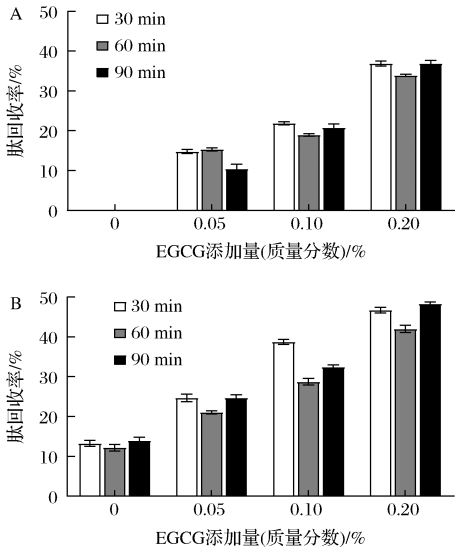
Table 1 Molecular weight distribution of SPHs

样品	分子质量分布/%			
	>10 kDa	5 ~ 10 kDa	1 ~ 5 kDa	<1 kDa
未处理	13.63 ± 0.15^{a}	85.33 ± 0.22^{b}	-	1.04 ± 0.07^{a}
30 min	5.26 ± 1.30^{b}	94.66 ± 0.06^{a}	-	0.08 ± 0.05^{b}
60 min	4.20 ± 0.07^{c}	-	95.78 ± 0.04^{b}	0.07 ± 0.01^{b}
90 min	3.02 ± 0.02^{d}	-	96.96 ± 0.23^{a}	-

注:所有样品均测定 3 次取平均值;不同字母表示样品间差异显著($P<0.05$)(下同)

2.2 肽回收率分析

不同 pH、EGCG 添加量、酶解时间条件下的肽回收率如图 1 所示。在 pH 4.5、7.0 时,EGCG 的加入使蛋白质回收率增加且聚集体的量与 EGCG 的浓度呈正相关。CHARLTON 等[27]表示多酚可以与肽相互作用形成聚集体并从水溶液中沉淀。当接近蛋白质等电点时,在 pH 4.5 的条件下,EGCG 更容易沉淀多肽。RAWEL 等[28]的研究得到相似的结论,在牛血清白蛋白(BSA)的等电点附近,阿魏酸与 BSA 之间的亲和力较高。当 EGCG 添加量为为 0.20% 时,pH 4.5 的条件下肽的最大回收率为 48.3%。在 pH 4.5 时,随着酶解时间的增加肽回收率呈先降低后升高趋势,且加入 EGCG 的 SPHs 在 30 min 时回收率比其他两个时间点较高,说明 EGCG 可能与分子质量 5 ~ 10 kDa 的肽更易生成沉淀。



A - pH 7.0;B - pH 4.5

图 1 不同 pH 值、EGCG 添加量、酶解时间的条件下肽回收率

Fig. 1 Peptide recovery rate under different pH value, EGCG concentration and enzymolysis time

2.3 SPHs-EGCG 红外光谱分析

表 2 展示了不同 pH 条件下生成的 SPHs-EGCG 复合物的二级结构含量变化。当 pH 值为 7.0 时,无论 EGCG 添加量为多少,SPHs-EGCG 复合物的 α-螺旋和 β-折叠含量仅发生轻微的变化。当 pH 值调为 4.5 时,随着 EGCG 量的增加,SPHs-EGCG 复合物的二级结构发生明显变化,表现出 α-螺旋和 β-转角含量升高,β-折叠含量降低的现象。与 ZHOU 等[13]研究一致,EGCG 的加入改变了蛋白质的二级结构,使其 α-螺旋和 β-转角含量升高,β-折叠含量降低。β-折叠含量的降低表明 EGCG 与蛋白质的结合可以改变蛋白质的构象,蛋白质肽链与多酚相互作用后发生松动,蛋白质被拉伸。同时,KANAKIS 等[29]报道多酚可以改变蛋白质的构象,主要体现在 α-螺旋、β-转角含量的增加,与本研究结果一致。

表 2 SPHs-EGCG 的二级结构变化

Table 2 Secondary structure content of SPHs-EGCG

样品	含量/%			
	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规则卷曲
pH 4.5, 0	18.86 ± 0.45^{d}	47.52 ± 0.77^{a}	13.85 ± 0.65^{d}	19.77 ± 0.21^{b}
pH 4.5, 0.05	21.41 ± 0.76^{c}	44.98 ± 0.82^{b}	15.58 ± 0.49c	18.03 ± 0.59^{b}
pH 4.5, 0.10	22.43 ± 0.69^{b}	40.45 ± 0.64^{c}	17.23 ± 0.73^{b}	19.89 ± 0.99^{b}
pH 4.5, 0.20	23.22 ± 0.75^{a}	38.56 ± 1.13^{d}	18.31 ± 0.71^{a}	19.91 ± 0.38^{b}
pH 7.0, 0.05	20.94 ± 0.88^{c}	41.90 ± 0.55^{c}	15.84 ± 0.38^{c}	21.32 ± 0.25^{a}
pH 7.0, 0.10	21.55 ± 0.33^{b}	41.78 ± 0.46^{c}	16.95 ± 0.66^{bc}	19.72 ± 0.63^{b}
pH 7.0, 0.20	21.72 ± 0.23^{b}	40.81 ± 0.67^{c}	17.24 ± 1.07^{b}	20.23 ± 0.04^{a}

2.4 SPHs-EGCG 表面疏水性分析

蛋白质表面疏水性的变化将明显影响蛋白质的界面性质,而界面性质在稳定食品配方(如分散剂、泡沫和乳剂)方面起着重要作用[30]。因此蛋白质的疏水基团的暴露(蛋白质三级结构的指示)使用荧光探针(ANS)的信号增强进行测量。图 2 为不同 EGCG 添加量、不同 pH 值条件生成的 SPHs-EGCG 复合物的表面疏水性。由图 2 可知,EGCG 的加入可使蛋白质的表面疏水性降低,且 EGCG 的添加量和蛋白质表面疏水性值成反比。这可以归因于酚类化合物内部的极性基团,EGCG 引入的亲水性羧基和羟基对蛋白质的疏水性产生了负面影响[28]。此外,SPHs-EGCG 表面疏水性的降低可能是由于 EGCG 交联蛋白中一些埋藏在肽链内部的疏水性基团,降低了荧光探针结合位点的可及性,由此也改变了蛋白质的空间结构[31]。此外。在 EGCG 添加量相同的条件下,pH 4.5的表面疏水性高于 pH 7.0,表明 SPHs-EGCG 在酸处理期间的暴露出疏水基团,表面疏水性增加。酸性 pH 处理促进蛋白质结构展开,导致蛋白质的表面疏水性显著增加[32]。

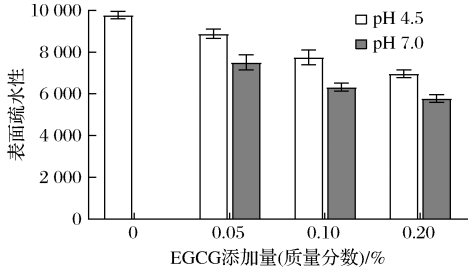
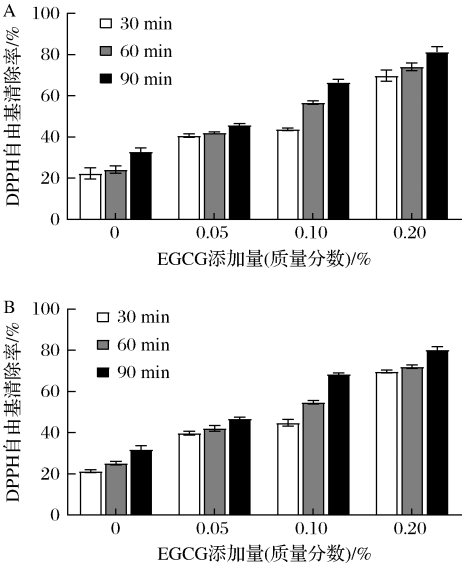


图 2 不同 pH 值、EGCG 添加量条件下 SPHs-EGCG 表面疏水性

Fig. 2 Surface hydrophobicity of SPHs-EGCG at different pH value and EGCG concentration

2.5 SPHs-EGCG 抗氧化能力分析

自由基清除能力是使用酚类化合物作为功能性添加剂的食品货架稳定性以及对健康有益的重要指标。本文采用 DPPH 自由基清除法检测 SPHs-EGCG,SPHs 的抗氧化活性。如图 3 所示,未结合 EGCG 的 SPHs 具有 20% ~40% 的自由基清除率,而 SPHs 的抗氧化活性归因于其组成部分多肽的抗氧化活性[33]。此外,SPHs 清除 DPPH 自由基的能力随水解时间的延长而提高。抗氧化能力的提高是由于大豆蛋白水解后暴露了隐藏的氨基酸残基和具有抗氧化能力的侧链(通常隐藏在蛋白质分子的三维结构中)[34]。YAN 等[35]的研究表明 EGCG 通过范德华力和疏水相互作用与蛋白质结合,保护其复合物免受降解,从而提高其抗氧化特性并提高生物利用度,与该研究结果一致。随着 EGCG 添加量的增加,SPHs-EGCG 复合物呈现出更高的抗氧化活性,这是由于 EGCG 的加入引入了许多酚羟基或者与多肽的协同作用[16]。



A – pH 7.0;B – pH 4.5

图 3 SPHs-EGCG 的自由基清除能力

Fig. 3 DPPHs scavenging ability of SPHs-EGCG

3 结论

本研究考察了利用 EGCG 从大豆分离蛋白酶解液中回收多肽的作用,并对大豆多肽与 EGCG 复合物性质进行了研究。结果表明,在大豆分离蛋白酶解物中,随着酶解时间的增延长,中间肽的出现比例增加(96.96%)。EGCG 的加入使多肽回收率增加,且聚集体的量与 EGCG 的添加量呈正相关。随着酶解时间的添加量,肽回收率先降低后升高,且在 30 min 时回收率最高,表明 EGCG 可能与分子质量 5 ~ 10 kDa 的肽更容易生成沉淀。通过红外光谱分析,EGCG 的加入使蛋白质的二级结构发生改变,其 α-螺旋和 β-转角含量升高,β-折叠含量降低。EGCG 的加入会降低蛋白质的表面疏水性,且 EGCG 的添加量与蛋白质表面疏水性值成反比。通过 DPPH 自由基清除法检测证明 EGCG 添加量的增加会提高 SPHs-EGCG 复合物的抗氧化活性。

参 考 文 献

[1] HU H, WU J H, LI-CHAN E C Y, et al. Effects of ultrasound on

structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2):647 – 655.

[2] LAMSAL B, JUNG S, JOHNSON L. Rheological properties of soy protein hydrolysates obtained from limited enzymatic hydrolysis[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(7):1 215 – 1 223.

[3] ZHANG Q Z, TONG X H, SUI X N, et al. Antioxidant activity and protective effects of alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate in human intestinal epithelial Caco-2 cells[J]. Food Research International, 2018, 111:256 – 264.

[4] ZHANG Y H, SUN W Z, ZHAO M M, et al. Improvement of the ACE-inhibitory and DPPH radical scavenging activities of soya protein hydrolysates through pepsin pretreatment[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2015, 50(10):2 175 – 2 182.

[5] COSCUETA E R, CAMPOS D A, OSÓRIO H, et al. Enzymatic soy protein hydrolysis:A tool for biofunctional food ingredient production [J]. Food Chemistry:X, 2019, 1:100006.

[6] SINGH B P, VIJ S, HATI S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean[J]. Peptides, 2014, 54:171 – 179.

[7] ZHAO G L, LIU Y, ZHAO M M, et al. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate[J]. Food Chemistry, 2011, 127(4):1 438 – 1 443.

[8] PARK S Y, LEE J S, BAEK H H, et al. Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysate[J]. Journal of Food Biochemistry, 2010, 34:120 – 132.

[9] PARK S Y, AHN C B, JE J Y. Antioxidant and anti-inflammatory activities of protein hydrolysates from *Mytilus edulis* and ultrafiltration membrane fractions[J]. Journal of Food Biochemistry, 2014, 38(5):460 – 468.

[10] ZHANG Q Z, TONG X H, QI B K, et al. Changes in antioxidant activity of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 42:298 – 305.

[11] BEERMANN C, EULER M, HERZBERG J, et al. Anti-oxidative capacity of enzymatically released peptides from soybean protein isolate [J]. European Food Research and Technology, 2009, 229(4):637 – 644.

[12] XU Z J, HAO N R, LI L W, et al. Valorization of soy whey wastewater:How epigallocatechin-3-gallate regulates protein precipitation [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019, 7(18):15 504 – 15 513.

[13] ZHOU S D, LIN Y F, XU X, et al. Effect of non-covalent and covalent complexation of (−)-epigallocatechin gallate with soybean protein isolate on protein structure and *in vitro* digestion characteristics[J]. Food Chemistry, 2020, 309:125718.

[14] DEKA A, VITA J A. Tea and cardiovascular disease[J]. Pharmacological Research, 2011, 64(2):136 – 145.

[15] BOSE A. Interaction of tea polyphenols with serum albumins:A fluorescence spectroscopic analysis [J]. Journal of Luminescence, 2016, 169:220 – 226.

[16] WEI Z H, YANG W, FAN R, et al. Evaluation of structural and functional properties of protein-EGCG complexes and their ability of stabilizing a model β-carotene emulsion[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 45:337 – 350.

[17] DING J, XU Z J, QI B K, et al. Physicochemical and oxidative stability of a soybean oleosome-based emulsion and its *in vitro* digestive fate as affected by (−)-epigallocatechin-3-gallate [J]. Food & Function, 2018, 9(12):6 146 – 6 154.

[18] KOSIŃSKA-CAGNAZZO A, HEEGER A, UDRISARD I, et al. Phenolic compounds of grape stems and their capacity to precipitate proteins from model wine[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 57(2):435 – 443.

[19] CHUNG S Y, CHAMPAGNE E T. Reducing the allergenic capacity of peanut extracts and liquid peanut butter by phenolic compounds [J]. Food Chemistry, 2009, 115(4):1 345 – 1 349.

[20] CANON F, PATÉ F, CHEYNIER V, et al. Aggregation of the salivary proline-rich protein IB5 in the presence of the tannin EgCG [J]. Langmuir, 2013, 29(6):1 926 – 1 937.

[21] JÖBSTL E, O'CONNELL J, FAIRCLOUGH J P A, et al. Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions [J]. Biomacromolecules, 2004, 5(3):942 – 949.

[22] ZHANG Y, CHEN S, QI B K, et al. Complexation of thermally-denatured soybean protein isolate with anthocyanins and its effect on the protein structure and *in vitro* digestibility[J]. Food Research International, 2018, 106:619 – 625.

[23] JIANG L Z, LIU Y J, LI L, et al. Covalent conjugates of anthocyanins to soy protein:Unravelling their structure features and *in vitro* gastrointestinal digestion fate [J]. Food Research International, 2019, 120:603 – 609.

[24] JU M N, ZHU G, HUANG G, et al. A novel pickering emulsion produced using soy protein-anthocyanin complex nanoparticles[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 99:105329.

[25] CHABANON G, CHEVALOT I, FRAMBOISIER X, et al. Hydrolysis of rapeseed protein isolates:Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(10):1 419 – 1 428.

[26] MOLINA ORTIZ S E, CRISTINA AN M. Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000, 77(12):1 293 – 1 301.

[27] CHARLTON A J, BAXTER N J, KHAN M L, et al. Polyphenol/peptide binding and precipitation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(6):1 593 – 1 601.

[28] RAWEL H M, MEIDTNER K, KROLL J. Binding of selected phenolic compounds to proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(10):4 228 – 4 235.

[29] KANAKIS C, HASNI I, BOURASSA P, et al. Milk β-lactoglobulin complexes with tea polyphenols[J]. Food Chemistry, 2011, 127(3):1 046 – 1 055.

[30] CHANDRAPALA J, ZISU B, PALMER M, et al. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18(5):951 – 957.

[31] LI D, ZHAO Y, WANG X, et al. Effects of (+)-catechin on a rice bran protein oil-in-water emulsion:Droplet size, zeta-potential, emulsifying properties, and rheological behavior[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 98:105306.

[32] JIANG J, CHEN J, XIONG Y L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(16):7 576 – 7 583.

[33] ZHANG Y H, ZHAO M M, NING Z X, et al. Development of a sono-assembled, bifunctional soy peptide nanoparticle for cellular

delivery of hydrophobic active cargoes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(16):4 208 – 4 218.

[34] TIAN R, FENG J R, HUANG G, et al. Ultrasound driven conformational and physicochemical changes of soy protein hydrolysates [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2020, 68:105202.

[35] YAN S Z, XU J W, ZHANG X Y, et al. Effect of pH-shifting treatment on the structural and functional properties of soybean protein isolate and its interactions with (–)-epigallocatechin-3-gallate [J]. Process Biochemistry, 2021, 101:190 – 198.

Study on recovery of peptides from soybean proteolysis solution with epigallocatechin-3-gallate

WANG Jiayue, DONG Yabo, FU Yuantao, LAN Tian, SUI Xiaonan, WANG Huan, JIANG Lianzhou*

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

ABSTRACT The recovery of peptides from soy protein hydrolysates (SPHs) under different epigallocatechin-3-gallate (EGCG) concentrations and pH values were studied. The recovery rate of the peptide, the change of the secondary structure content, the surface hydrophobicity and the antioxidant activity were characterized. The results showed that increasing the enzymatic hydrolysis time could increase the intermediate peptide content. And the addition of EGCG also increased the recovery rate of SPHs. In addition, the amount of SPHs was positively correlated with the concentration of EGCG. With the increase of enzymatic hydrolysis time, the recovery rate of the peptide first tend to decrease and then increase, and the recovery rate was the highest at 30 min. It was indicated that EGCG might be easier to precipitate with peptides with a molecular weight of 5 – 10 kDa. To a certain extent, the addition of EGCG changed the secondary structure of the protein peptide, and the protein peptide was stretched. The addition of EGCG would also reduce the surface hydrophobicity of the SPHs and increase the antioxidant activity. This study provided a reference for EGCG to recover peptides from SPHs by constructing and analyzing the structure and function of SPHs-EGCG and its influence on the recovery rate of peptides.

Key words epigallocatechin-3-gallate; soy peptides; peptide recovery rate; surface hydrophobicity; antioxidant activity

(上接第 77 页)

Regulation mechanism of arginine on the structure and gelling properties of myofibrillar protein treated with repeated freezing-thawing

DENG Wenhui[1], HAN Xinrui[2], CHANG Lu[2], LI Zhaorui[2], LIU Zimeng[2], CAO Yungang[2]*

1(College of Physical Education, Shaanxi University of Science and Technology, Hanzhong 723000, China)
2(School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science and Technology, Xi′an 710021, China)

ABSTRACT The effects of different concentrations of *L*-arginine (*L*-Arg, 0.0, 1.0, 3.0, 5.0 and 10.0 mmol/L) on the physicochemical properties and gelation behavior of repeatedly freeze-thawed myofibrillar protein (MP) were studied in order to provide a theoretical basis for the reasonable regulation of gelling properties of freezing damaged meat proteins. The effects of *L*-Arg at different concentrations on the secondary and tertiary structures of repeatedly freeze-thawed MP were investigated by circular dichroism spectroscopy and intrinsic tryptophan fluorescence of proteins, respectively. The changes of aggregation of MP with *L*-Arg treatments were analyzed via the test of particle size and solubility. And the effects of *L*-Arg treatments on the gelling properties of MP were investigated by rheometer and physical property tester. The results revealed that *L*-Arg significantly changed the spatial structure of repeated freezing thawing MP, mainly manifested as a significant increase in the content of alpha helix. The addition of *L*-Arg decreased the particle size of repeatedly freeze-thawed MP, significantly increased the solubility and cooking yield, and obviously reduced the storage modulus (G'), gel strength and gel whiteness. The higher the *L*-Arg concentration, the greater the impact of *L*-Arg on the gel performance of repeatedly freeze-thawed MP. Therefore, the treatment with *L*-Arg alone significantly improved the cooking yield of repeatedly freeze-thawed MP, while remarkably reduced the gel strength.

Key words myofibrillar protein; freezing-thawing; *L*-arginine; circular dichroism; rheological properties; gelling properties