

发酵大豆蛋白肽增强小鼠 机体免疫力及抗疲劳能力

方磊, 张瑞雪, 魏颖

(中国食品发酵工业研究院有限公司, 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心, 北京 100015)

摘要: 为研究发酵大豆蛋白肽对小鼠机体免疫力及抗疲劳能力的影响, 对小鼠脾淋巴细胞、T/B 淋巴细胞增殖、血清溶血素、NK 细胞杀伤力、运动能力及相关血清指标进行了测定。结果表明: 发酵大豆蛋白肽能显著提高小鼠脾淋巴细胞和 T/B 淋巴细胞的增殖能力, 显著提高血清溶血素水平和 NK 细胞杀伤力; 负重游泳试验发现服用了发酵大豆蛋白肽的小鼠负重游泳时间长于空白组 ($P < 0.05$), 发酵大豆蛋白肽组小鼠血液中尿素氮 (BUN) 的含量和乳酸脱氢酶 (LDH) 活力均降低 ($P < 0.05$)。适量摄入发酵大豆蛋白肽具有增强机体免疫力及抗疲劳的作用。

关键词: 发酵大豆蛋白肽; T/B 淋巴细胞; 血清溶血素; 抗疲劳

Fermented soybean protein peptide enhances immunity and anti-fatigue ability of mice

FANG Lei, ZHANG Rui-xue, WEI Ying

(Beijing Engineering Research Center of Protein & Functional Peptides,

China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015, China)

Abstract: In order to study the effects of fermented soybean protein peptides on the immunity and anti-fatigue ability of mice, spleen lymphocytes, T/B lymphocyte proliferation, serum hemolysin, NK cell killing ability, exercise ability and related serum indexes were carried out. The results showed that fermented soybean protein peptide could significantly increase the proliferation ability of mouse spleen lymphocytes and T/B lymphocytes, and significantly increase the serum hemolysin level and NK cell lethality. The weight-bearing swimming experiment found that the weight-bearing swimming time of the mice in the fermented soybean protein peptide group was longer than that of the blank group ($P < 0.05$). The blood urea nitrogen content and lactate dehydrogenase activity of the fermented soybean protein peptide group decreased ($P < 0.05$). Appropriate intake of fermented soybean protein peptides has the effect of enhancing immunity and anti-fatigue.

Key words: fermented soybean protein peptide; T/B lymphocyte; serum hemolysin; anti-fatigue

中图分类号: TS201.2 文献标志码: A 文章编号: 1008-9578(2022)12-0146-05

大豆含有丰富的优质蛋白质和油脂, 含有人体所必需的 8 种氨基酸, 富含多种对人体有益的生物活性物质, 包括异黄酮、大豆皂甙、大豆磷脂、大豆低聚糖、大豆植酸和甾醇, 是高营养的植物性食品, 是粮食作物中唯一接近全价蛋白质的作物。大豆肽是由大豆分离蛋白经现代酶解再经过分离和精制等处理得到的低聚肽混合物, 通常由 3~6 个氨基酸组成, 相对分子质量多低于 1 000, 具有免疫调节、

抗高血压、抗胆固醇、抗血栓形成、抗疲劳等诸多功能^[1]。研究表明, 大豆肽能增强免疫功能低下小鼠的机体免疫力, 提高免疫低下小鼠的脾脏指数和胸腺指数, 能促进脾淋巴细胞和 T 淋巴细胞的增殖^[2-3]; 大豆肽能提高小鼠自身的抗氧化能力, 阻止生物膜的脂质过氧化, 减少骨骼肌的损伤, 起到抗疲劳的功效^[4]; 大豆肽能延长小鼠游泳时间, 降低血清尿素氮和血乳酸含量, 提高肝糖原含量, 大豆

收稿日期: 2021-04-05

基金项目: 十三五国家重点研发计划(2016YFD0400604)

作者简介: 方磊(1993—), 男, 硕士, 助理工程师, 研究方向为功能食品。

通信作者: 魏颖(1981—), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向为功能食品。

肽的相对分子质量越小,缓解疲劳作用效果越明显^[5]。发酵大豆蛋白肽是由大豆分离蛋白经酶解、微生物发酵后再经分离精制处理得到的低聚肽混合物,目前关于发酵大豆蛋白肽免疫调节和抗疲劳方面的研究报道较少。因此,本试验探讨发酵大豆蛋白肽的免疫调节和抗疲劳潜在作用,以期对未来相关产品的开发以及其它生物活性的研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

KM 小鼠(SPF 级)雄性,北京维通利华实验动物技术有限公司;刀豆蛋白,美国 Sigma 化学公司;绵羊红细胞(SRBC)、补体(豚鼠血清),北京索莱宝科技有限公司;BUN 和 LDH 测定试剂盒,南京建成生物工程研究所。

1.2 仪器与设备

SpectraMax[®]iD5 型多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;UDK-159 全自动凯氏定氮仪,意大利 VELP 公司;L-8900 日立全自动氨基酸分析仪,天美(中国)科学仪器有限公司;3K-15 型冷冻离心机,德国 Sigma 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 受试样品的制备与检测

将大豆蛋白用蒸馏水以 1:10 质量比混合,并调 pH 至 8.0,然后以大豆蛋白质量为基准添加 1% Alcalase 2.4 L 和 0.5% Protex 7 L 置于 50℃ 水浴锅中酶解 40 min;在反应结束时,升温至 95℃ 灭酶 10 min,然后向蛋白水解物接种 *ff002*(嗜酸乳杆菌)继续发酵 20 h,发酵结束后,对发酵液进行浓缩和喷雾干燥得发酵大豆蛋白肽粉;利用反相高效液相色谱法对样品的相对分子质量进行测定;依据 GB5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》,对样品中氨基酸组成进行测定。

1.3.2 发酵大豆蛋白肽对小鼠淋巴细胞增殖的影响

1.3.2.1 小鼠脾淋巴细胞增殖能力的测定

小鼠脾细胞悬液的制备参考文献^[6]的方法。脾细胞悬液用 RPMI-1640 完全培养基调整细胞浓度为 2×10^6 个/mL,100 μ L/孔接种至 96 孔板。将细胞随机分为空白对照组、乳清蛋白组和发酵大豆蛋白组,其中空白组加入不完全培养基,样品组分别加入乳清蛋白和发酵大豆蛋白,并置于 CO₂ 培养箱内培养 72 h,用 CCK-8 试剂盒测定样品对脾淋巴细胞的增殖能力。

1.3.2.2 小鼠 T/B 淋巴细胞增殖能力的测定

参照张瑞雪^[6]等的试验方法并稍作修改,分别用刀豆蛋白 A(ConA)、脂多糖(LPS)诱导 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖,并通过 CCK-8 法测定细胞增殖率。

1.3.2.3 小鼠 NK 细胞杀伤力的测定

参考朱艳等^[7]的试验方法选取选取小鼠淋巴瘤细胞作为靶细胞,用 RPMI-1640 完全培养基调整脾细胞悬液,作为效应细胞,并通过 CCK-8 法测定 NK 细胞杀伤力。

1.3.3 血清溶血素的测定

参考尹利端等^[8]方法,按体重随机分为空白对照组、乳清蛋白组、发酵大豆蛋白肽组,8 只/组,共 3 组;试验组每只灌胃的剂量为 0.12 g,对照组给予和试验组等体积生理盐水,各组连续灌胃 24 d 后,每鼠腹腔注射质量分数 20% 压积 SRBC 生理盐水细胞混悬液 0.2 mL,连续给药 3 d,于最后一次给药后 1 h,从小鼠眼眶静脉丛取血,离心分离血清,取血清用生理盐水稀释 200 倍,取稀释血清 1 mL 置于试管中,加质量分数 10% SRBC 混悬液 0.5 mL,置于冰浴中,再加入 1 mL 补体溶液(补体与生理盐水质量比 1:10)混合,用生理盐水代替血清作为对照。移置 37℃ 恒温水浴保温 10 min 后,冰浴中终止反应。用 1 500 r/min 离心 10 min 后取上清 1 mL,加入都氏试剂 3 mL,混匀放置 10 min,取上清液于 540 nm 测吸光度,以生理盐水作为空白调零,结果用血清溶血素相对值表示。

1.3.4 小鼠抗疲劳能力的测定

根据 1.3.3 进行分组后灌胃 28 d,参考 ZHONG 等^[9]试验方法并稍作修改,试验期间小鼠每天进行适应游泳 30 min,28 d 后于尾根部负荷 6% 体重的铅丝,并置于水深不少于 30 cm 的游泳箱中游泳,水温控制 30℃ $\pm$ 3℃,直至小鼠的头部沉入水中,经 10 s 仍不能返回水面视为力竭,记录小鼠游泳开始至力竭时间作为小鼠的游泳力竭时间。

游泳时每箱放入小鼠不宜太多,小鼠游泳时需保持四肢运动,不能互相挤靠及漂浮,水要足够深,小鼠尾巴不能触碰箱底。休息 30 min 后处死力竭小鼠,摘眼球采血,分离血清,根据南京建成试剂盒说明书测定 BUN 的含量和 LDH 的酶活力。

1.3.5 统计学处理

试验数据采用 Origin 9.0 软件进行统计学处理,采用单因素方差分析。

2 结果与讨论

2.1 发酵大豆蛋白肽氨基酸组成和相对分子质量分布

由表 1 可知:发酵大豆蛋白肽的氨基酸组成相对完整,总氨基酸含量为 66.52 %,富含谷氨酸,天冬氨酸,亮氨酸和精氨酸。发酵大豆蛋白肽的所有必需氨基酸均符合 FAO/WHO 对成人的建议;发酵大豆蛋白肽含有 11.34 % 的支链氨基酸(BCAA),约占总氨基酸的 17.05 %。BCAA 是重要的能量供应氨基酸,特别是在特殊的生理条件下(疲劳,饥饿,疾病,运动)运动时补充 BCAA 可以减少肌肉糖原的分解,可以迅速增加血糖比率,有效抑制大量运动引起的乳酸积累,提高运动耐力缓解疲劳。

表 1 发酵大豆蛋白肽的氨基酸组成

氨基酸	含量/ %	氨基酸	含量/ %
天冬氨酸(Asp) ^a	7.95 ± 0.05	亮氨酸(Leu)	5.45 ± 0.09
谷氨酸(Glu) ^b	14.20 ± 0.12	酪氨酸(Tyr)	2.34 ± 0.18
苏氨酸(Thr)	2.11 ± 0.04	苯丙氨酸(Phe)	3.64 ± 0.11
丝氨酸(Ser)	3.60 ± 0.07	赖氨酸(Lys)	3.66 ± 0.13
甘氨酸(Gly)	2.46 ± 0.12	组氨酸(His)	1.78 ± 0.06
丙氨酸(Ala)	3.35 ± 0.07	精氨酸(Arg)	5.56 ± 0.04
缬氨酸(Val)	3.01 ± 0.08	脯氨酸(Pro)	3.01 ± 0.13
蛋氨酸(Met)	0.77 ± 0.13	胱氨酸(Cys)	0.75 ± 0.08
异亮氨酸(Ile)	2.88 ± 0.15	总氨基酸	66.52

注:缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸为支链氨基酸;a 天冬氨酸 + 天冬酰胺;b 谷氨酸 + 谷氨酰胺。

由表 2 可知:发酵大豆蛋白肽的相对分子质量主要集中在 1 000 以下,其含量达 86.62 %,说明发酵大豆蛋白肽中含有较多的小分子肽混合物。研究表明^[9-10]肽的吸收速率与其相对分子质量有关,相对分子质量小于 1 000 的大多数是二肽、三肽等,因二肽、三肽的转运吸收存在独立的系统以及相应的载体,所以肽比蛋白质和游离氨基酸的吸收效率高,消耗能量低。因此我们可以推断出发酵大豆蛋白肽具有良好的吸收效率。

表 2 发酵大豆蛋白肽相对分子质量分布

相对分子质量范围	峰面积比/ %
10 000 以上	0.69
5 000 - 10 000	1.67
3 000 - 5 000	1.95
2 000 - 3 000	2.25
1 000 - 2 000	6.83
150 - 1 000	55.81
150 以下	30.81
1 000 以下	86.62

2.2 发酵大豆蛋白肽对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

由图 1 可知:与空白组相比,乳清蛋白和发酵大豆蛋白肽均能促进正常脾淋巴细胞的增殖($P < 0.05$),发酵大豆蛋白肽对脾淋巴细胞增殖能力的促进作用要显著于乳清蛋白,上述结果表明发酵大豆蛋白肽有助于促进小鼠脾淋巴细胞增殖。

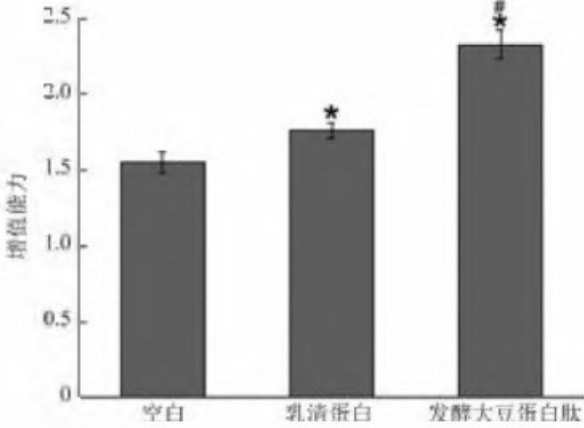


图 1 发酵大豆蛋白肽对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

注: * 表示与空白组相比差异显著($P < 0.05$), # 表示与乳清蛋白组相比差异显著($P < 0.05$),下同。

2.3 发酵大豆蛋白肽对小鼠 T/B 淋巴细胞增殖的影响

由图 2 可知:发酵大豆蛋白肽对 T/B 淋巴细胞增殖能力的促进作用要优于乳清蛋白,有助于提高细胞免疫和体液免疫功能。

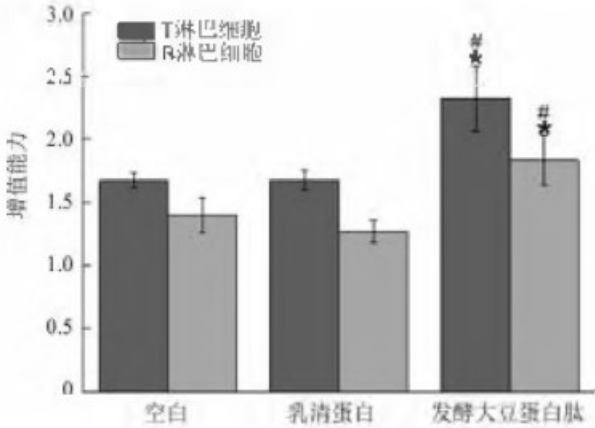


图 2 发酵大豆蛋白肽对小鼠 T/B 淋巴细胞增殖的影响

2.4 发酵大豆蛋白肽对小鼠 NK 细胞杀伤力的影响

NK 细胞被认为是机体天然免疫的第一道防线,连接非特异性免疫和特异性免疫,是机体内天然免疫防御系统中重要的效应细胞,能够非特异性清除机体内各种异物,直接杀伤寄生在细胞内的病原体;目前 NK 细胞被认为是免疫监视细胞中最理想的效应细胞^[11]。由图 3 可知:与空白组比较,乳

清蛋白组和发酵大豆蛋白肽组小鼠的 NK 细胞活性均具有明显差异 ($P < 0.05$), 分别提高 NK 细胞杀伤力 18.74 % 和 21.13 %; 与乳清蛋白组比较, 发酵大豆蛋白肽组 NK 细胞活性无明显差异 ($P > 0.05$); 说明发酵大豆蛋白肽可以增强小鼠的 NK 细胞活性。

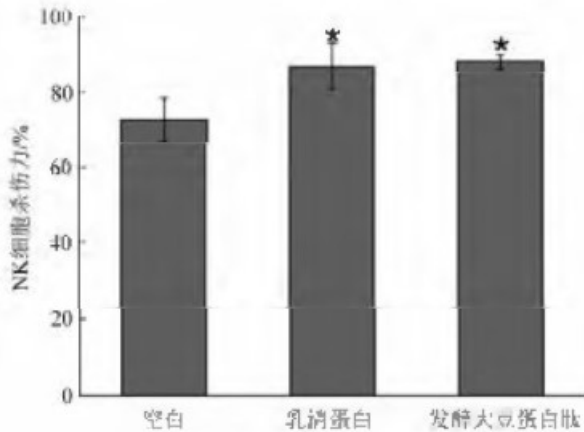


图3 发酵大豆蛋白肽对小鼠 NK 细胞杀伤力的影响

2.5 发酵大豆蛋白肽对小鼠血清溶血素的影响

血清溶血素是评价免疫功能的重要指标, 是 B 淋巴细胞接触到特异性抗原 SRBC 后产生的特异性抗体, 其含量多少体现了机体释放特异性抗体的能力^[7,12], 其溶血程度与分泌的抗体量相关^[13-14]。

由图 4 可知: 乳清蛋白组和发酵大豆蛋白组较空白组小鼠血清溶血素水平都显著增加 ($P < 0.05$), 且发酵大豆蛋白组和乳清蛋白组也具有明显差异 ($P < 0.05$), 这说明发酵大豆蛋白肽具有刺激 B 细胞分化增殖转变为浆细胞的功能, 促进小鼠溶血素抗体的生成, 提高抗体水平, 增强小鼠体液免疫功能。

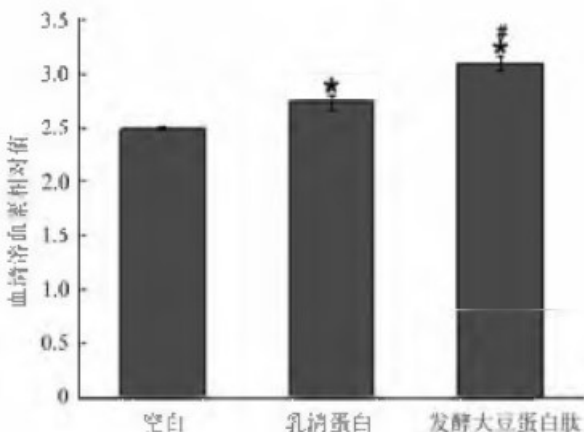


图4 发酵大豆蛋白肽对小鼠血清溶血素的影响

2.6 发酵大豆蛋白肽对小鼠游泳时间的影响

由图 5 可知: 小鼠服用乳清蛋白和发酵大豆蛋白肽后, 负重游泳时间均显著长于空白组 ($P < 0.05$), 分别延长了 25.74 % 和 49.08 %; 与乳清蛋白组相比, 发酵大豆蛋白肽组的负重游泳时间更长

($P < 0.05$), 增加了 18.56 %。上述结果表明发酵大豆蛋白肽有助于提高小鼠运动能力。

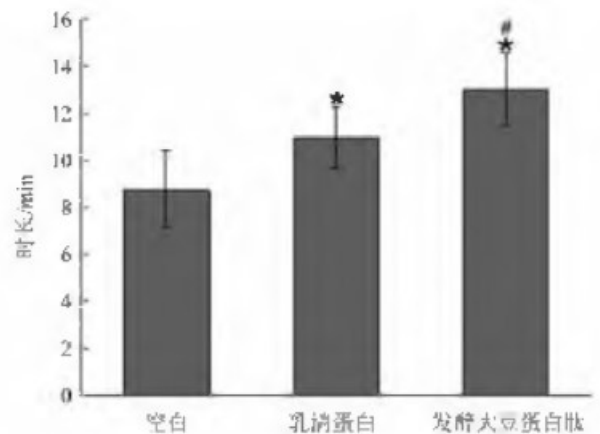


图5 发酵大豆蛋白肽对小鼠负重游泳时间的影响

2.7 发酵大豆蛋白肽对力竭游泳小鼠抗疲劳效应的影响

血清中 BUN 水平的升高通常代表肌肉收缩力的下降, 是疲劳有关的典型指标^[15]。

由图 6 可知: 与空白组相比, 乳清蛋白组和发酵大豆蛋白肽组的 BUN 和 LDH 的活性显著降低 ($P < 0.05$), 发酵大豆蛋白肽组与乳清蛋白组对 BUN 含量变化无明显差异 ($P > 0.05$), 对 LDH 含量变化却有明显差异 ($P < 0.05$)。结果表明, 发酵大豆蛋白肽对减少 BUN 和 LDH 积聚具有积极作用, 补充发酵大豆蛋白肽可以减轻疲劳引起的细胞损伤和肌肉损伤。

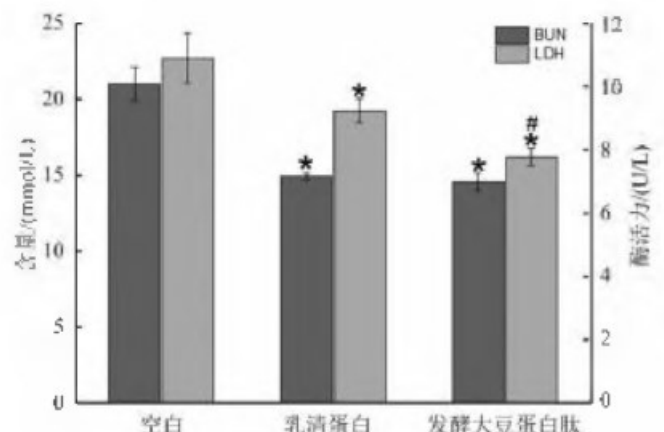


图6 发酵大豆蛋白肽对力竭游泳小鼠血清中相关指标的影响

3 结论

在细胞免疫中, 发酵大豆蛋白肽能显著提高小鼠脾淋巴细胞和 T 淋巴细胞的增殖能力, 且效果均优于乳清蛋白; 同时发酵大豆蛋白肽也能显著促进 B 淋巴细胞的增殖, 增加小鼠血清溶血素的水平, 因此对体液免疫也具有一定的调节作用; 在非特异性

免疫中,发酵大豆蛋白肽对 NK 细胞杀伤力也有一定的增强作用;服用发酵大豆蛋白肽能显著延长小鼠的负重游泳时间,显著降低小鼠血液中 BUN 的含量和 LDH 活力,且效果均优于乳清蛋白。综上,适量摄入发酵大豆蛋白肽具有增强机体免疫力及抗疲劳效应的作用,而关于发酵大豆蛋白肽免疫调节和抗疲劳的作用机制是下一步的工作重点,希望能够为未来相关产品和保健品的开发提供新的思路。

〔参考文献〕

- [1] 贾芳,陈复生,徐卫河,等.大豆肽的制备方法及其生理活性研究进展[J].粮食与油脂,2015,28(4):12-14.
- [2] 孟可爱,刘小飞,马玉勇,等.大豆肽对育雏鸡生产性能、免疫器官指数和血液生化指标的影响[J].河南农业科学,2019,48(12):128-132.
- [3] 朱振平,韩晓英,程东.大豆肽免疫调节作用实验研究[J].预防医学论坛,2017,23(9):709-711.
- [4] 李明亮,尹曼,凌空,等.大豆肽和小麦肽抗疲劳功能的实验研究[J].食品科技,2019,44(9):303-307.
- [5] 尹军杰.大豆肽分子量与缓解疲劳作用关系的研究[J].粮食与油脂,2017,30(7):42-44.
- [6] 张瑞雪,方磊,刘艳,等.三种果蔬发酵液抗氧化和免疫调节功能研究[J].粮油食品科技,2019,27(2):39-44.
- [7] 朱艳,姜盛,李明亮,等.紫苏籽蛋白对免疫力低下小鼠免疫调节功能的研究[J].食品工业科技,2020,41(21):322-327,337.
- [8] 尹利端,王桐,宋文山,等.不同分子量松花肽增强小鼠免疫力的功能研究[J].食品研究与开发,2019,40(3):61-65.
- [9] ZHONG L, ZHAO L Y, YANG F M, et al. Evaluation of anti-fatigue property of the extruded product of cereal grains mixed with *Cordyceps militaris* on mice [J]. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2017, 4(1): 1-10.
- [10] CHEN L, EJIMA A, GU R, et al. Presence of exopeptidase-resistant and susceptible peptides in a bacterial protease digest of corn gluten [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(43): 11948-11954.
- [11] 陈亮,王雨晴,冀峰,等.玉米低聚肽中焦谷氨酰亮氨酸(pEL)二肽的研究[J].食品与发酵工业,2021,47(3):49-52.
- [12] MANTOVANI A, LOCATI M. Macrophage metabolism shapes angiogenesis in tumors [J]. Cell Metabolism, 2016, 24(5): 653-654.
- [13] DA S J L, SOUZA-SILVA F, PEREIRA B A, et al. Exploring the association of surface plasmon resonance with recombinant MHC: Ig hybrid protein as a tool for detecting T lymphocytes in mice infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [J]. Biomed Research International, 2017, 2017(5): 9089748.
- [14] 庞艳华,郝福星,韩玲玲,等.茶树油提取物粉对小鼠免疫功能的影响[J].中国兽药杂志,2019,53(3):72-78.
- [15] LIU R, WU L, DU Q, et al. Small molecule oligopeptides isolated from walnut (*Juglans regia* L.) and their anti-fatigue effects in mice [J]. Molecules, 2018, 24(1): 45.

(上接第 145 页)

〔参考文献〕

- [1] 吴征镒,周太炎,肖培根,等.新华本草纲目.第3册[M].上海:上海科学技术出版社,1990.
- [2] 石磊岭,马晓玲,阿拉腾图雅,等.青龙衣的化学成分及应用研究进展[J].中医药导报,2020,26(5):122-125.
- [3] 王涛,许爱娥.白癜风氧化应激机制及抗氧化治疗进展[J].国际皮肤性病杂志,2010,36(2):101-103.
- [4] ESKANDANI M, GOLCHAI J, PIROOZNI N, et al. Oxidative stress level and tyrosinase activity in vitiligo patients [J]. Indian Journal of Dermatology, 2010, 55(1): 15-19.
- [5] SCHALLREUTER K U. Successful treatment of oxidative stress in vitiligo [J]. Skin Pharmacology & Physiology, 1999, 12(3): 132-138.
- [6] 范英姬.维生素C对过氧化氢诱导人A375黑素瘤细胞氧化损伤的保护[D].衡阳:南华大学,2015.
- [7] ZHENG S, DENG Z, CHEN F, et al. Synergistic antioxidant effects of petunidin and lycopene in H9c2 cells submitted to hydrogen peroxide: Role of Akt/Nrf2 pathway [J]. Journal of Food Science, 2020, 85(6): 1752-1763.
- [8] KOBUS-CISOWSKA J, SZULC P, SZCZEPANIAK O, et al. Variability of *hordeum vulgare* L. cultivars in yield, antioxidant potential, and cholinesterase inhibitory activity [J]. Sustainability, 2020, 12(5): 1938-1952.
- [9] 沈娟,高枫,郝琴,等.乙酰左旋肉碱减轻H₂O₂诱导的PC12细胞氧化损伤[J].中国病理生理杂志,2019,35(11):2020-2027.