

大豆抗原蛋白 Glycinin 及其对鱼类健康的影响

吴莉芳,赖红娥,杨 姝,赵 晗,王洪鹤,秦贵信

(吉林农业大学 动物科技学院,吉林 长春 130118)

摘要:大豆抗原蛋白既是大豆的主要营养成分,又是大豆抗营养因子的主要种类之一,是限制大豆蛋白源在食品及饲料行业广泛应用的关键因素。其中,大豆球蛋白(Glycinin)和 β -伴大豆球蛋白(β -Conglycinin)是免疫原性最强的大豆蛋白。Glycinin 具有较强的热稳定性,普通的热处理对其免疫原性的灭活能力较小。Glycinin 在鱼类饲料中含量过高,会引起鱼类肠道损伤,消化酶活力降低,生长缓慢,甚至死亡。文中简要介绍了大豆抗原蛋白 Glycinin 的理化性质、识别检测方法以及对鱼类健康的影响,并对该领域的研究方向进行了探讨与展望,旨在为大豆抗原蛋白的加工去除及合理开发利用大豆蛋白源提供依据。

关键词:Glycinin;免疫原性;抗营养作用;鱼类

中图分类号:S816.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2012)01-0145-04

Effects of Soybean Glycinin on the Health of Fishes

WU Li-fang, LAI Hong-e, YANG Hua, ZHAO Han, WANG Hong-he, QIN Gui-xin

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

Abstract: Soybean allergenic proteins, the main nutrient component, are identified as anti-nutritional factors in soybean, which limits their utilization in food and feed industries. Glycinin and β -Conglycinin, as two major allergens, have the highest immunoreactivity among all kinds of soybean anti-nutritional factors. Heating process has little effects on the immunoreactivity of Glycinin due to its strong heating stability. Too much Glycinin in feed lead to injured intestinal tissue, decreased activity of digestive enzyme, slow growth, and even death. The physicochemical property, detective methods of Glycinin, effects on healthy of fishes, and research prospect were reviewed, providing a basis for the inactive processing and reasonable exploitation of soybean proteins.

Key words: glycinin; immunoreactivity; anti-nutritional role; fishes

大豆及其产品因蛋白质含量高和氨基酸平衡性好而成为人和动物优质的植物蛋白源,并被广泛应用于食品及饲料行业。虽然大豆籽粒蛋白质含量高达40%,但是大豆中含有多种抗营养因子(Antinutritional factors, ANF),严重影响大豆蛋白源的开发和利用。其中,大豆抗原蛋白(Soybean antigen)是大豆中最主要的抗营养因子之一。大豆抗原蛋白是指大豆中能引起人和动物过敏反应的一些抗原性蛋白质或糖蛋白,又称为致敏因子。其中,大豆球蛋白(Glycinin)和 β -伴大豆球蛋白(β -Conglycinin)是免疫原性最强的大豆蛋白,约占大豆籽实蛋白质总量的70%^[1]。并且这2种蛋白具有较强的热稳定性,普通的热处理不能灭活大豆抗原蛋白的免疫活性,可引起婴儿和幼龄动物产生过敏反应,造成胃肠道的损伤,甚至导致动物死亡^[2]。因此,大豆抗原蛋白是制约大豆及其制品在饲料中广泛应用的真正瓶颈^[3]。Glycinin 在大豆蛋白质中含量最多,占大豆籽实总蛋白的19.5%~23.1%^[4],占总球蛋

白的40%^[5]。国内外学者分别从物理、化学、免疫学等角度对大豆抗原蛋白 Glycinin 做了相关的研究,研究的动物多集中在仔猪^[6]、犊牛^[7]、鼠^[8]、羔羊^[9]等陆生动物上。笔者结合近年来研究成果及查阅国内外相关报道的基础上,概述了大豆抗原蛋白 Glycinin 的理化性质、识别检测方法以及对鱼类健康的影响。旨在为大豆抗原蛋白的加工去除及合理开发利用大豆蛋白源提供依据。

1 大豆抗原蛋白 Glycinin 的理化性质

Glycinin 是11S组分的主要组成成分,由多个亚基组成,是大豆中的一种主要贮藏蛋白,也是大豆蛋白质中最大的单体成分,占球蛋白总量的40%。Glycinin 仅有很小一部分糖基,含糖量0.8%,相对分子量为320~360 kDa,其分子是由6个蛋白单体构成的六聚体,其单聚体亚基的结构形式为A-S-S-B, A为酸性多肽,酸性肽链有6种(A_{1a}、A_{1b}、A₂、A₃、A₄、A₅),分子量

收稿日期:2011-10-29

基金项目:吉林省自然科学基金资助项目(20101577);吉林省教育厅资助项目(2009360)。

第一作者简介:吴莉芳(1970-),女,博士,副教授,研究方向为水产动物营养与饲料学。E-mail:wulifang2915@yahoo.com.cn。

通讯作者:秦贵信(1956-),男,博士,教授,博士生导师。研究方向为饲料抗营养因子。E-mail:guixinpublic.cc.cn。

为34~44 kDa, B 为碱性多肽, 碱性肽链有5种(B_{1a} 、 B_{1b} 、 B_2 、 B_3 和 B_4), 分子量为20 kDa, S-S 是将A和B连接起来的二硫键, 构成 Glycinin 的主要亚基为G1(A_{1a} 、 B_{1b})、G2(A_2 、 B_{1a})、G3(A_{1b} 、 B_2)、G4(A_5 、 A_4 、 B_3)和G5(A_3 、 B_4)^[10]。Glycinin 酸性亚基的等电点为4.80~5.50, 碱性亚基的等电点为6.50~8.50。Glycinin 含有较多的含硫氨基酸, 一些化学试剂(强酸、强碱、巯基乙醇等)可以打开二硫键, 改变其结构, 并增加其溶解度。

Glycinin 在溶液中具有相对的稳定性, 温度对 Glycinin 的结构和溶解度有一定的影响, 在反复冻融情况下, 高浓度的 Glycinin 可能形成15S聚集体^[11]。低温贮存和冷冻干燥将降低 Glycinin 的溶解度, 加热能够增加其黏度, 并在冷却后形成凝胶。

2 大豆抗原蛋白 Glycinin 的识别检测方法

2.1 免疫组织化学技术

免疫组织化学技术是利用标记物标记的抗体与组织或细胞的抗原反应, 结合生态学检查, 对抗原做定性、定量、定位检测的技术。其特点是特异性强、灵敏度高。免疫组织化学标记时细胞阳性着色程度取决于抗原含量、分布密度和标记方法及其敏感性。一般而言, 抗原含量越多, 分布密度越高, 标记方法越敏感, 阳性结果显色则越强。利用免疫组织化学技术并结合图像采集与分析策略能够对饲料中大豆抗原蛋白 Glycinin 进行直接的定位和定量。朱丹^[12]对鲤鱼肠道不同部位的大豆抗原蛋白 Glycinin 进行了定位和定量。王洪鹤等^[13]对草鱼和埃及胡子鲶肠道不同部位的大豆抗原蛋白 Glycinin 进行了定位和定量。

2.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)

ELISA 用于检测包被于固相板孔中的待测抗原(或抗体), 即用酶标记抗体, 并将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面, 使抗原抗体反应在固相载体表面进行, 用洗涤法将液相中的游离成分洗除, 最后通过酶作用于底物后显色来判断结果。由于 ELISA 具有快速、敏感、简便、易于标准化等优点, 使其得到迅速的发展和广泛应用。其中夹心 ELISA 和竞争 ELISA 是食品工业及动物营养学研究中抗原定量检测的主要方法。已广泛应用于 Glycinin 等大豆抗原蛋白的检测^[14]。由于 ELISA 技术易操作且精确度高, 适于批量检测, 目前已成为生产及科研领域首选的抗原检测方法^[15]。

2.3 免疫印迹法

免疫印迹法(Western blotting)亦称酶联免疫电转移印迹法(Enzyme linked immunoelectrotransfer blot, EITB), 是一种将高分辨率凝胶电泳和免疫化学分析技术相结合的杂交技术, 是检测蛋白质特性、表达与分布的一种最常用的方法。免疫印迹(Immunoblotting test, IBT)是一种借助特异性抗体鉴定抗原的有效方法。由于免疫印迹法结合了 SDS-PAGE 的高分辨能力和 ELISA 的高特异性和敏感性, 是一个有效的分析手段, 不仅广泛应用于分析抗原组分及其免疫活性, 并可用于疾病的诊断。免疫印迹法可用于抗原的定性和半定量检测^[16]。

3 大豆抗原蛋白 Glycinin 对鱼类健康的影响

3.1 对鱼类肠道组织的影响

鱼类是低等的有颌, 变温, 适应水生生活的脊椎动物。鱼类肠道是一种行使消化、吸收功能的重要消化器官, 具有容纳、运输、消化食物、吸收营养物质、免疫等功能。鱼类肠道组织可分为四层, 即粘膜层、粘膜下层、肌层和浆膜。粘膜层由柱状细胞和杯状细胞组成。鱼类肠道粘膜形态结构正常是营养物质消化吸收和正常生长的基础, 肠道皱襞高度下降意味着吸收面积减少, 对营养物质吸收功能降低。大豆抗原蛋白 Glycinin 对不同食性鱼类肠道组织影响不同。吴莉芳等^[17]在鲤鱼、埃及胡子鲶和草鱼配合饲料中添加 $60.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的 Glycinin 进行了为期6周的饲养试验, 饲养试验结束后采用组织学方法研究了 Glycinin 对鲤鱼、埃及胡子鲶和草鱼肠道组织的影响, 结果表明, Glycinin 组鲤鱼前肠、后肠和埃及胡子鲶后肠及草鱼前肠绒毛均有不同程度损伤, 固有层组织较疏松而且断裂。这主要是由于不同食性鱼类消化道组成和结构不同, 对 Glycinin 的敏感性不同。Rumsey 等^[18]研究报道, 含有 $58.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的 Glycinin 和 $34.8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 的 β -Conglycinin 的豆粕会引起虹鳟前肠和后肠发生病理。

3.2 对鱼类消化酶活力的影响

在长期的自然选择过程中, 鱼类已经形成了其独特的摄食消化器官。鱼类消化器官的形态与其食性是统一的。鱼类的消化酶是反映鱼类消化机

能一项重要指标。鱼类的食性与其消化器官结构和消化机能相适应,并与消化酶活力具有直接关系。消化酶活力决定鱼类对营养物质消化和吸收的能力,从而决定鱼类生长和发育速度。鱼类食性不同,消化酶的种类和分泌量也是与此相对应,消化酶依消化对象不同大致可划分为蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等几种。钱曦等^[19]研究了豆粕替代鱼粉比例对翘嘴红鲌消化酶活性的影响,结果表明,当豆粕替代鱼粉比例为 40.5% 时,翘嘴红鲌的肠道和肝胰脏蛋白酶活性显著降低。吴莉芳等^[20]研究表明,当去皮豆粕替代鱼粉蛋白 45% 时,鲤鱼后肠和肝胰脏蛋白酶活力极显著下降。这主要是由于大豆蛋白中含有抗营养因子所致。为了研究大豆抗原蛋白 Glycinin 对不同食性消化酶活力的影响,在埃及胡子鲇、鲤鱼和草鱼幼鱼的配合饲料中,分别添加分离纯化的大豆抗原蛋白 Glycinin $60.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,进行为期 6 周的饲养试验。结果表明,大豆抗原蛋白 Glycinin 显著降低了埃及胡子鲇胃、肝胰脏及前肠、鲤鱼前肠、草鱼后肠和肝胰脏蛋白酶活力^[21]。这主要是由于大豆抗原蛋白 Glycinin 损伤了鱼类消化道结构,导致消化消化道内蛋白酶分泌量减少,蛋白酶活力降低。

3.3 大豆抗原蛋白 Glycinin 对鱼类生长的影响

生长是生物体通过同化作用进行物质积累、细胞分裂、增生、体积增大,动物生长是结构、组织器官的体积、蛋白质量的增加。关于大豆蛋白对鱼类生长方面的影响,国内外学者进行了大量研究,Dabrowski 等^[22]研究表明,在平均体重 0.4 g 的草鱼鱼苗配合饲料中,添加大豆粉 40% ~ 60% 来替代鱼粉,大豆粉组生长低于鱼粉组,生长速度随添加量的增加而降低。Chou 等^[23]在军曹鱼幼鱼的饲料中,添加 10% ~ 60% 大豆粉,结果表明,当大豆蛋白替代鱼粉蛋白由 40% 增加到 50% 时,鱼的体增重随着大豆粉替代比例的增加显著降低。张锦秀等^[24]研究表明,随着幼建鲤饲料中豆粕替代鱼粉比例的增加,对鱼体增重影响极显著。这说明大豆蛋白中抗营养因子含量过高会影响鱼类的生长。但大豆抗营养因子有 10 余种,各种抗营养因子在大豆蛋白中的含量各不相同,抗营养作用也有差异。吴莉芳等^[17]研究表明,鲤鱼、埃及胡子鲇和草鱼幼鱼配合饲料中 Glycinin 含量为 $60.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,其特定生

长率均下降。这主要是由于大豆抗原蛋白 Glycinin 能够引起鱼类肠道过敏,导致肠道组织结构的损伤,从而降低了肠道对营养物质的吸收能力,导致鱼类消化性能降低和生长性能下降。此外,大豆抗原蛋白 Glycinin 能够引起鱼类消化道酶活性降低,使鱼类消化性能降低,从而影响鱼类的生长及对饲料的利用。

4 展 望

目前,关于大豆抗原蛋白 Glycinin 的理化性质、识别检测方法等已取得了较大的进展,对大豆抗原蛋白的加工去除具有重要的理论和现实意义。但关于大豆抗原蛋白 Glycinin 对鱼类的影响及致敏机理方面尚有需要进一步研究的问题。未来的研究方向将可能集中于:(1)大豆抗原蛋白 Glycinin 结构与功能的关系及致敏机理方面的研究;(2)分类地位接近但食性不同的鱼类对大豆抗原蛋白 Glycinin 的敏感性之间的差异;(3)大豆抗原蛋白 Glycinin 在不同食性鱼类体内降解规律及检测方法。

参考文献

- [1] Tsukada Y, Kitamura K, Harada K, et al. Genetic analysis of two major subunits (β -Conglycinin and glycinin) in soybean seeds [J]. Japanese Journal of Breeding, 1986, 36: 390-400.
- [2] Montagne L, Toullec R, Savidge T C, et al. Influence of protein source and antigenicity of soyabean on morphology and enzyme activities of the proximal jejunum in preruminant calf [J]. Reproduction Nutrition Development, 1999, 39: 80-81.
- [3] 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, Zhang Q H. Effects of soybean protein antigen to the growth performance, diet digestibility, intestinal absorption of calf [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2005, 41(11): 30-33.)
- [4] Mujoo R, Trinh D T, Ng P K W. Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture [J]. Food Chemistry, 2003, 82: 265-273.
- [5] 李德发. 大豆抗营养因子 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2003. (Li D F. Soybean anti-nutritional factors [M]. Beijing: Chinese Science and Technology Press, 2003.)
- [6] 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.
- [7] Seegraber F J, Morrill J L. Effect of protein source in calf milk re-

- placers on morphology and absorptive ability of the small intestine [J]. *Journal of Dairy Science*, 1986, 69(2):460-469.
- [8] Christensen H R, Susanne W B, Frokiaer H. Antigenic specificity of serum antibodies in mice fed soy protein [J]. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 2003, 132(1):58-67.
- [9] Johnston C. Effect of injecting lambs with soyflour extract on serum soy protein antibody concentration and rate of gain [J]. *Small Ruminant Research*, 1996, 21(2):149-154.
- [10] Golubovic M, van Hateren S H, Ottens M, et al. Novel method for the production of pure glycinin from soybeans [J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53:5265-5269.
- [11] Wolf W J, Nelsen T C. Partial purification and characterization of the 15S globulin of soybeans, a dimer of glycinin [J]. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44:785-791.
- [12] 朱丹. 大豆主要抗原蛋白在鲤鱼肠道组织中分布规律的研究 [D]. 长春:吉林农业大学, 2008. (Zhu D. Research advance in study on allergen proteins in soybean [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2008.)
- [13] 王洪鹤. 大豆主要抗原蛋白对埃及胡子鲇肌肉营养成分的影响 [J]. *吉林农业大学学报* 2009, 31(6):741-745. (Wang H H. Effects of main soybean antigens on nutritional components of muscle in *Clarias leather* [J] *Journal of Jilin Agricultural University*, 2009, 31(6):741-745.)
- [14] 赵元. 大豆球蛋白及 β -伴大豆球蛋白在仔猪体内消化动力学的研究 [D]. 长春:吉林农业大学, 2006. (Zhao Y. A Study of digestion dynamics of Glycinin and β -conglycinin in piglets [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2006.)
- [15] Koppelman S J, Hefle S L. Detecting allergens in food [M]. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd CRC Press LLC, 2006.
- [16] 张胜正. 食物过敏原致敏组分的分析 [D]. 北京:中国协和医科大学, 2004. (Zhang S Z. Analysis of allergic components in food allergens [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2004.)
- [17] 吴莉芳, 孙泽威, 秦贵信, 等. Glycinin 和 β -Conglycinin 对不同食性鱼类生长及肠道组织的影响 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2011, 39(2):59-66, 74. (Wu L F, Sun Z W, Qin G X, et al. Effects of dietary Glycinin and -conglycinin on growth performance and intestinal tissue of fishes with different food habits [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2011, 39(2):59-66, 74.)
- [18] Rumsey G L, Siwicki A K, Anderson D P et al. Effect of soybean protein on serological response, non-specific defense mechanisms, growth, and protein utilization in rainbow trout [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1994, 41:323-339.
- [19] 钱曦, 王桂芹, 周洪琪, 等. 饲料蛋白水平及豆粕替代鱼粉比例对翘嘴红鲌消化酶活力的影响 [J]. *动物营养学报*, 2007, 19(2):182-187. (Qian X, Wang G Q, Zhou H Q, et al. Effect of dietary protein on the activities of digestive enzymes of topmouth culter [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2007, 19(2):182-187.)
- [20] 吴莉芳, 秦贵信, 刘春力, 等. 饲料大豆蛋白对鲤鱼消化酶活力和血液主要生化指标的影响 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2009, 37(8):63-69. (Wu L F, Qin G X, Liu C L, et al. Effects of dietary soybean protein on the activity of digestive enzyme and blood biochemical parameters of carp [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2009, 37(8):63-69.)
- [21] 孙玲. 大豆抗原蛋白对不同食性鱼类消化酶活性及血液指标的影响 [D]. 长春:吉林农业大学, 2008. (Sun L. Effects of soybean antigen on the activities of digestive enzyme and blood index of different fishes [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2008.)
- [22] Dabrowski K, Kozak B. The use of fish meal and soybean meal as a protein source in the diet of grass carp fry [J]. *Aquaculture*, 1979, 18:107-144.
- [23] Chou R L, Her B Y, Su M S, et al. Substituting fish meal with soybean meal in diets of juvenile cobia *Rachycentron canadum* [J]. *Aquaculture*, 2004, 229:325-333.
- [24] 张锦秀, 周小秋, 刘扬. 去皮豆粕对幼建鲤生长性能和肠道的影响 [J]. *中国水产科学*, 2007, 14(2):315-319. (Zhang J X, Zhou X Q, Liu Y. Effects of dehulled soybean meal on growth performance and intestine of juvenile *Cyprinus carpio* var. jian [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(2):315-319.)