

大豆糖蜜上清液中胰蛋白酶抑制剂的去除

石云,孔祥珍,华欲飞

(江南大学 食品学院/食品科学与技术国家重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:胰蛋白酶抑制剂是广泛存在于大豆及大豆制品中的抗营养剂,主要有 Kuntiz 型和 Bowman - Birk 型两种,为了得到高品质的产品,需要在加工过程中将其灭活或去除。通过研究大豆糖蜜上清液中胰蛋白酶抑制剂的活性、鉴定抑制剂的种类,采用超滤法将其去除。经测定,固形物含量约 10% 的大豆糖蜜上清液中胰蛋白酶抑制剂活性约为 5.05×10^5 TIA·g⁻¹ 蛋白,约为鲜豆奶的 5 倍。用截留分子量 3 kDa 的超滤膜将大豆糖蜜上清液中的大分子蛋白富集,通过还原-Tricine-SDS-PAGE 分析,截留部分在图谱上显示为分子量约 10 kDa 的模糊的条带。通过用 2% 巯基乙醇还原再用 NEM 封闭游离巯基的方式处理样品,使得截留部分在电泳图上显示为分子量约 7~8 kDa 的两条清晰的条带。综合判断,大豆糖蜜上清液中主要含有 Bowman-Birk 型胰蛋白酶抑制剂。通过对比超滤效果,选择用截留分子量 10 kDa 的超滤膜截留胰蛋白酶抑制剂,能够得到无抑制活性的透过液。

关键词:大豆糖蜜;胰蛋白酶抑制剂;肽凝胶电泳;超滤;大豆低聚糖

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2015.02.0298

Removal of Trypsin Inhibitor from Soy Molasses Supernatant

SHI Yun, KONG Xiang-zhen, HUA Yu-fei

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University/State Key Laboratory of Food Science and Technology, Wuxi 214122, China)

Abstract: Trypsin inhibitor is one kind of antinutrition factor widely spread in soybean and soybean products, which mainly consist of Kuntiz type and Bowman-Birk type. In order to get high-quality products, soybean trypsin inhibitor is better to be inactivated or removed. Through analyzing the activity and identifying the type of trypsin inhibitor in soy molasses supernatant, it was removed using ultrafiltration. The results showed that the trypsin inhibitor activity for soy molasses supernatant with about 10% solids content was approximately 5.05×10^5 TIA·g⁻¹ protein, which was nearly 5 times of fresh soy milk whose trypsin inhibitor activity was about 1.026×10^5 TIA·g⁻¹ protein. Protein with high molecular weight in soy molasses supernatant was concentrated by ultrafiltration using a membrane with a molecular weight cut-off of 3 kDa. The retentates showed one, unclear band with a molecular weight of about 10 kDa on the chromatogram of reduced Tricine-SDS-PAGE. After reduced by 2% mercaptoethanol and blocked thiol by NEM, the retentates of soy molasses supernatant showed two, clear bands with molecular weights of about 7-8 kDa. Combined the facts, it was reasonable to consider that there was mainly Bowman-Birk trypsin inhibitor in soy molasses supernatant. Finally, ultrafiltration membrane with a molecular weight cut-off of 10 kDa was chosen to retain the trypsin inhibitor in soy molasses supernatant, and therefore permeates without inhibitor activity could be obtained.

Keywords: Soy molasses; Tripsin inhibitor; Tricine-SDS-PAGE; Ultrafiltration; Soy oligosaccharides

大豆糖蜜是大豆浓缩蛋白生产过程中的副产物,用一定浓度的乙醇洗涤豆粕后,上清液去除乙醇,残余的棕色、粘稠物即为大豆糖蜜。大豆中的低聚糖和植物化学组分在大豆糖蜜中得以富集^[1-2]。大豆糖蜜经稀释、酸沉、离心后,可以得到澄清透明的上清液。其中的主要成分是大豆低聚糖(蔗糖、棉子糖和水苏糖),棉子糖和水苏糖由于具有促进乳酸菌生长等功能被视为功能性低聚糖^[3]。大豆乳清中低聚糖含量约为 12~35 mg·mL⁻¹^[4-5],大豆糖蜜上清液中低聚糖含量约为 65 mg·mL⁻¹^[6],因此大豆糖蜜是大豆低聚糖的良好来源。

胰蛋白酶抑制剂是一种广泛存在于豆类中的抗营养剂,大豆胰蛋白酶抑制剂(Soybean Trypsin

Inhibitor, STI)起到的抗营养作用占生大豆抗营养作用的 40%。当胰蛋白酶抑制剂进入生物体时,可以迅速与小肠内的胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶发生反应,形成稳定的复合物而失去活性,从而导致对蛋白的消化率降低^[7]。目前研究较多的 STI 主要分为两种, Kunitz 型(Kunitz Trypsin Inhibitor, KTI)和 Bowman-Birk 型(Bowman-Birk Trypsin Inhibitor, BBI)。KTI 分子量约 20~25 kDa,一个抑制剂分子能专一地钝化一分子胰蛋白酶(Trypsin),在大豆中含量最丰富,含量约为 1.4%;BBI 分子量约 6~10 kDa,能在两个不同的活性位置上同时抑制胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶(Chymotrypsin),在大豆中含量约为 0.6%^[8]。方伟辉等^[9]和崔希庆^[10]报道指出大豆糖蜜中含有胰蛋白酶抑制剂,但是关于大豆糖

收稿日期:2014-09-16

基金项目:国家高技术发展研究计划“863 计划”(2013AA102200)。

第一作者简介:石云(1984-),女,博士,主要从事大豆糖蜜相关研究。E-mail:shiyun0301@163.com。

通讯作者:华欲飞(1962-),男,博士,教授,主要从事植物蛋白相关研究。E-mail:yfhua@jiangnan.edu.cn。

蜜上清液中胰蛋白酶抑制剂的报道却较少。

本文主要测定了大豆糖蜜上清液中胰蛋白酶抑制剂的活性,通过超滤将大豆糖蜜上清液中的大分子蛋白富集,结合电泳分析鉴定了其中抑制剂的种类。最后用超滤法将大豆糖蜜上清液中的胰蛋白酶抑制剂去除,旨在得到无抑制活性的透过液,达到纯化大豆低聚糖的目的。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆糖蜜来源于山东万德福实业集团有限公司。

盐酸、氢氧化钠、冰醋酸、二甲亚砜、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、乙酸铵、甲醇、甘油、四甲基乙二胺、过硫酸铵、考马斯亮蓝 G250、十二烷基磺酸钠(SDS)均为分析纯,为国药集团化学试剂有限公司产品;Tricine [N-三(羟甲基)甲基甘氨酸]、二巯苏糖醇(DTT)、丙烯酰胺、NEM(N-乙基马来酰亚胺)、BAPNA(苯甲酰-DL-精氨酸-p-硝基酰替苯胺盐酸盐)为Sigma公司产品;胰蛋白酶(Trypsin)为Worthington公司产品。

1.2 仪器与设备

离心机(HITACHI, CR 21G II), pH计(METTLER-TOLEDO),天平(METTLER-TOLEDO),电泳仪(BIO CRAFT, MODEL BE-210),分光光度计(翱艺,UV-1500),超滤杯(上海摩速科学器材有限公司),超滤膜(截留分子量分别为10和3 kDa,无锡赛普膜科技发展有限公司),数显恒温水浴锅(江苏金坛市亿通电子有限公司),定氮仪(海能,K9840)。

1.3 实验方法

1.3.1 大豆上清液的制备 大豆糖蜜用直接干燥法测定固形物含量。加入去离子水调整固形物含量为10%。搅拌均匀后用HCl调节悬浊液pH至2.0~3.0,室温静置0.5 h后在3 200 g离心30 min。离心后得到棕黄色、透明的上清液。

1.3.2 超滤方法 超滤过程在室温条件下进行。超滤杯中加入50 mL大豆糖蜜酸沉上清液,密封后通入氮气,调整超滤系统压力为0.20 MPa。从出料口收集超滤透过液。

1.4 分析检测方法

蛋白含量测定采用凯氏定氮法^[11];总糖含量测定采用苯酚-硫酸法^[12];蛋白电泳参照Laemmli的方法^[13];肽电泳参照Hermann Schagger的方法^[14];胰蛋白酶抑制剂活性测定参照美国化学学会(AACC)推荐的方法^[15]。

2 结果与讨论

2.1 大豆糖蜜电泳分析

对大豆糖蜜进行还原蛋白电泳和还原肽电泳分析,大豆糖蜜的蛋白组成与大豆分离蛋白基本一致。但从条带着色来看,大豆糖蜜中的蛋白分子量大于15 kDa的较少,多数低于15 kDa。图1B显示大豆糖蜜在约21和17 kDa有两条条带,其余更多的则集中在分子量低于15 kDa的范围。这些条带对应的分子量均在KTI和BBI的分子量范围内。但是,大豆糖蜜上清液是糖蜜经稀释、酸沉得到的,STI是否在上清液中有所保留还需试验证明。

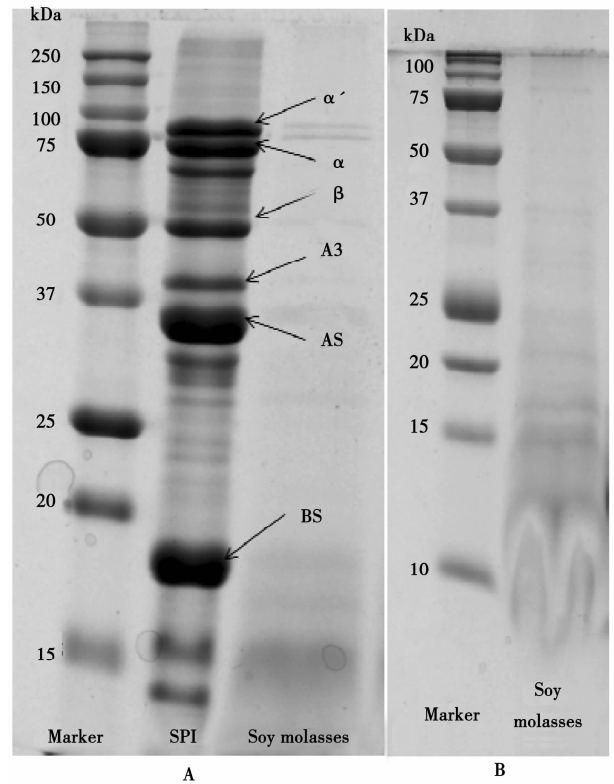


图1 大豆糖蜜还原蛋白电泳图谱(A)及肽电泳图谱(B)
Fig.1 SDS-PAGE (A) and tricine SDS-PAGE (B)
for soy molasses

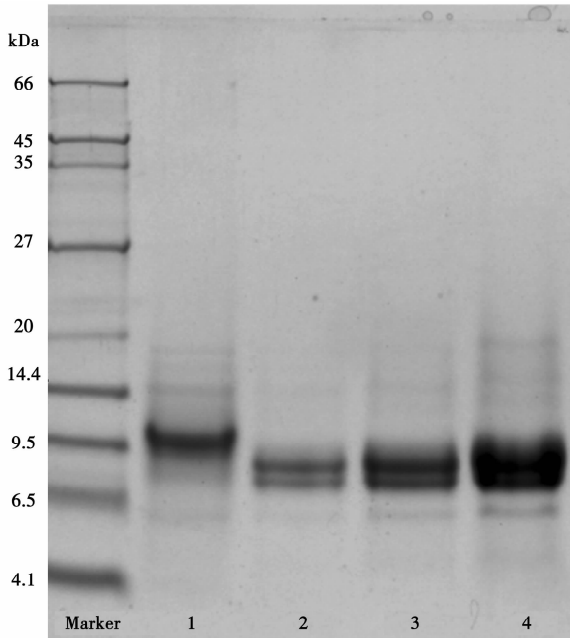
2.2 大豆糖蜜上清液中胰蛋白酶抑制剂活性

经测定,大豆糖蜜酸沉上清液中胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的抑制活性分别为 $2.525 \text{ TIA} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.410 \text{ CIA} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。根据固形物约10%的上清液中蛋白含量约为0.5%(干基),则大豆糖蜜上清液中胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的抑制活性分别为 $5.05 \times 10^5 \text{ TIA} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白和 $2.82 \times 10^5 \text{ CIA} \cdot \text{g}^{-1}$ 蛋白。即大豆糖蜜上清液同时具有胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶抑制活性,上清液中至少含有BBI。

2.3 大豆糖蜜上清液中胰蛋白酶抑制剂种类的鉴定

为了鉴定大豆糖蜜上清液中胰蛋白酶抑制剂

的种类,需对其进行电泳分析。由于上清液中蛋白含量很低,采用超滤法将大分子蛋白浓缩。选用截留分子量为 3 kDa 的超滤膜超滤大豆糖蜜上清液。超滤结束后对截留部分进行肽电泳分析(图 2)。



1:样品用 2% 巯基乙醇还原;2-4:样品用 2% 巯基乙醇还原后用 NEM 封闭,上样量分别为 2.5,5.0 和 7.5 μL

Lanes: 1, sample reduced by 2% mercaptoethanol; 2-4, samples reduced by 2% mercaptoethanol and thiol locked by NEM with loading volumes 2.5, 5.0 and 7.5 μL , respectively

图 2 大豆糖蜜上清液超滤截留部分肽电泳图谱

Fig. 2 Tricine SDS-PAGE for ultrafiltration of soy molasses supernatant

为了更好地观察蛋白的一级结构,采用 2% 巯基乙醇将样品还原(图 2 泳道 1)。样品在电泳图上显示为分子量 10 kDa 左右的一条模糊的条带。如果是单一蛋白分子或者肽链,那么分子在电泳图谱上应该呈现一条清晰的条带。条带模糊很可能是由于蛋白分子还原不充分造成。为了进一步排除二硫键对电泳分离造成的干扰,向还原后的样品中加入 NEM 封闭游离巯基,如图 2 中泳道 2~4 所示。结果显示电泳条带变成分子量约为 7~8 kDa 的两条清晰的条带。泳道 2~4 的上样量分别为 2.5、5.0 和 7.5 μL ,可以发现即使增大上样量,电泳条带始终为两条。

图 2 的结果说明截留液中的组分是一个由两条肽链经由二硫键连接组成的蛋白。并且分子内二硫键数目较多,在较低的还原剂浓度下比较活跃,不用试剂封闭会重新形成二硫键。类似的电泳分析结果也在大豆乳清蛋白分析中出现。经 SDS-PAGE 结合 MALDI-TOF/TOF-MS 分析,得到的氨基酸序列与 BBI 非常相近^[16]。

已知 KTI 不溶于乙醇,分子量为 20~25 kDa,分子内含有 2 个二硫键,不具有胰凝乳蛋白酶抑制活性;而 BBI 分子量为 6~10 kDa,分子内含有 7 个二硫键,同时具有胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶抑制活性^[7-8],因此推测大豆糖蜜上清液中主要含有 BBI。虽然 KTI 和 BBI 在大豆中的含量分别为 1.4% 和 0.6%,但是在醇洗豆粕时,难溶于乙醇的 KTI 被留在了豆粕中,而 BBI 却在大豆糖蜜中被富集。

2.4 超滤法去除上清液中的胰蛋白酶抑制剂

黄惠华等^[17]的报道指出,固形物含量 6.7%,蛋白含量 3.1% 的鲜豆奶中 STI 活性为 3180 TIA·mL⁻¹,即约为 1.026×10^5 TIA·g⁻¹ 蛋白。由结果对比可知,大豆糖蜜上清液中 STI 活性约为鲜豆奶的 5 倍。如果不将大豆糖蜜上清液中的 STI 钝化或去除,浓缩后固形物含量约为 70% 低聚糖浆将具有更高的抑制活性,严重影响低聚糖的品质。

常用的使胰蛋白酶抑制剂钝化的方法有热失活法和化学试剂失活法等。热失活法是利用加热使胰蛋白酶抑制剂变性,从而失去活性;而化学试剂失活法则是利用化学试剂与胰蛋白酶抑制剂的活性中心结合,或还原二硫键破坏分子结构达到失活的目的^[8]。黄惠华等^[17]的报道指出,使鲜豆奶中的胰蛋白酶抑制剂 90% 失活,需要在 120℃ 加热 7 min 或在 140℃ 加热 60 s。万娟等^[18]的研究结果显示,DTT、亚硫酸钠和半胱氨酸在一定的温度和 pH 条件下可使 STI 失活 70%~80%。

但是,以上两种方法却不适于纯化大豆低聚糖的过程中采用。首先加入化学试剂会引入杂质,其次较高的处理温度还可能会促进美拉德反应使上清液颜色更深。更重要的是以上方法均不能达到 100% 失活。结合 2.3 中超滤膜可将 STI 截留,因此,采用耗能低、无相变的超滤法去除大豆糖蜜上清液中的胰蛋白酶抑制剂。

按照 1.3.2 的方法对大豆糖蜜上清液进行超滤处理。分别测定了截留分子量为 10 和 3 kDa 的超滤膜处理后截留部分和透过液中 STI 活性(表 1)。

表 1 结果显示,无论超滤膜的截留分子量为 3 还是 10 kDa,超滤透过液均没有胰蛋白酶抑制活性,而截留部分的抑制剂活性非常高。根据截留液与原料液的体积比,可以发现原上清液的抑制活性全部来自于截留部分。说明超滤处理可以有效地去除上清液中的 STI。考虑到截留分子量 10 kDa 的超滤膜膜通量约为 3 kDa 的 3 倍,选用截留分子量 10 kDa 的超滤膜进行超滤。尽管如此,超滤大豆糖蜜上清液的膜通量仍较低,约为同样条件下纯水膜通量的 30%。在后续试验中,还要考虑能否通过调节 pH 或对上清液进行预处理的方式提高超滤膜通量。

表 1 超滤截留液与透过液中胰蛋白酶抑制剂活性

Table 1 The soybean trypsin inhibitor activities of ultrafiltration and permeation

	截留分子量 3 kDa		截留分子量 10 kDa	
	Molecular weight cut off 3kDa		Molecular weight cut off 10 kDa	
	截留液 Retentates	透过液 Permeates	截留液 Retentates	透过液 Permeates
胰蛋白酶抑制剂活性 Trypsin inhibitor activity/TIA·mL ⁻¹	120 625	无	120 312.5	无
胰凝乳蛋白酶抑制剂活性 Chymotrypsin inhibitor activity/CIA·mL ⁻¹	68 625	无	68 437.5	无

经凯氏定氮法和苯酚硫酸法测定,超滤透过液中氮含量为上清液的 90%,总糖含量为上清液的 95%。即仍有约 90% 的含氮组分残余在超滤透过液中,需要在纯化大豆低聚糖的过程中去除。

综上所述,超滤过程中糖分的损失很小,截留 STI 效率高,是一种很好地去除大豆糖蜜上清液中 STI 的方法。

3 结 论

大豆糖蜜上清液中的胰蛋白酶抑制剂主要是 BBI,未发现 KTI。大豆糖蜜中的胰蛋白酶抑制剂不能通过酸沉完全除去,而是在上清液中仍有残留。固形物含量约 10% 的大豆糖蜜上清液中胰蛋白酶抑制剂活性为 5.05×10^5 TIA·g⁻¹ 蛋白,约为固形物 6.7% 的鲜豆奶的 5 倍。通过超滤(超滤膜分子截留量 10 kDa)处理,可以将大豆糖蜜上清液中的胰蛋白酶抑制剂完全截留,透过液无抑制活性。

参考文献

[1] Hosny M, Rosazza P N. Novel isoflavone, cinnamic acid, and triterpenoid glycosides in soybean molasses [J]. *Journal of Natural Products*, 1999, 62: 853-858.

[2] Nash A M, Eldridge A C, Wolf W J. Fractionation and characterization of alcohol extractables associated with soybean proteins: Nonprotein components [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1967, 15: 102-108.

[3] Lan Y, Williams B A, Versteegen M W A, et al. Soy oligosaccharides *in vitro* fermentation characteristics and its effect on caecal microorganisms of young broiler chickens [J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 133: 286-297.

[4] 袁其朋,张恭孝,姜焱. 树脂及活性炭吸附技术回收大豆乳清中的异黄酮和低聚糖[J]. *大豆科学*, 2003, 22(1): 6-9. (Yuan Q P, Zhang G X, Jiang Y. Recovery of soya isoflavones and oligosaccharide from soybean whey wastewater by adsorption and desorption of resin and active carbon [J]. *Soybean Science*, 2003, 22(1): 6-9.)

[5] 高文宏,石彦国,高大维,等. 超滤法提取大豆低聚糖前处理的研究[J]. *中国粮油学报*, 2000, 15(5): 49-51. (Gao W H, Shi Y G, Gao D W, et al. Pretreatment of extracting soybean oligosaccharides by ultrafiltration [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2000, 15(5): 49-51.)

[6] Shi Y, Kong X Z, Hua Y F, et al. Adsorption of soy isoflavones by activated carbon: Kinetics, thermodynamics and influence of

soy oligosaccharides [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2013, 215-216: 113-121.

[7] 谷春梅,韩玲玲,曲洪生,等. 大豆胰蛋白酶抑制因子的研究进展[J]. *大豆科学*, 2012, 31(1): 149-151. (Gu C M, Han L L, Qu H S, et al. Extraction and purification of soybean trypsin inhibitor [J]. *Soybean Science*, 2012, 31(1): 149-151.)

[8] 金蓓,田少君. 大豆胰蛋白酶抑制剂研究概况[J]. *粮食与油脂*, 2005(6): 3-6. (Jin B, Tian S J. Research survey in soybean trypsin inhibitor [J]. *Journal of Cereals & Oils*, 2005(6): 3-6.)

[9] 方伟辉,华欲飞,陶冠军,等. 大豆粕酒精可溶物的成分分离与鉴定[J]. *中国油脂*, 2004, 29(1): 57-61. (Fang W H, Hua Y F, Tao G J, et al. Fractionation and identification in alcohol soluble of soybean meal [J]. *China Oils and Fats*, 2004(1), 29: 57-61.)

[10] 崔希庆. 大豆糖蜜中功能性低聚糖的纯化分离[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010. (Cui X Q. Purification and separation of functional oligosaccharides from soybean molasses [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2010.)

[11] 张水华. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004: 156-159. (Zhang S H. Food analysis [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2004: 156-159.)

[12] 刘立超,黄洪林,赖正权,等. 苯酚硫酸法测定梔子水溶性多糖含量[J]. *安徽医药*, 2005(9): 831-832. (Liu L C, Huang H L, Lai Z Q, et al. Determination of water soluble polysaccharide in fructus gardenia [J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2005(9): 831-832.)

[13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.

[14] Hermann Schägger. Tricine-SDS-PAGE [J]. *Nature Protocols*, 2006, 1: 16-22.

[15] 黄惠华,梁汉华,郭乾初. 两种大豆胰蛋白酶抑制剂的抑制活性及二级结构分析比较[J]. *食品科学*, 2005, 26(3): 46-49. (Huang H H, Liang H H, Guo Q C. Inhibitory activities and secondary structures of two types of soybean trypsin inhibitors [J]. *Chinese Food Science*, 2005, 26(3): 46-49.)

[16] Li X F, Dong, D Hua Y F, et al. Soybean whey protein/chitosan complex behavior and selective recovery of kunitz trypsin inhibitor [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2014, 62: 7279-7286.

[17] 黄惠华,周春晖. 热处理对鲜豆奶中胰蛋白酶抑制子活性的影响[J]. *食品科技*, 2001(3): 7-9. (Huang H H, Zhou C H. Effect of thermal treatment on trypsin inhibitor activity of soybean [J]. *Food Science and Technology*, 2001(3): 7-9.)

[18] 万娟,陈中,杨晓泉,等. 不同还原剂对大豆胰蛋白酶抑制剂的纯化研究[J]. *食品工业科技*, 2007, 28(3): 82-84. (Wan J, Chen Z, Yang X Q, et al. Study on the inactivation of soybean trypsin inhibitor by various reducing agents [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 28(3): 82-84.)