

大豆蛋白水解酶及产物测定方法研究进展

易明花,徐尔尼,汪金萍,史立康

(南昌大学食品科学教育部重点实验室,南昌 330047)

摘要 大豆多肽是大豆蛋白经水解所得的低聚肽混合物,其生产方式多种多样,其中酶法生产大豆多肽以其特有的优势得到了广泛的关注。本文对生产大豆多肽的几类蛋白酶的水解特性,如温度、时间、酶的用量以及产物特点进行阐述,同时对多肽产物的测定方法进行了分析比较。

关键词 大豆多肽;蛋白酶;水解度

中图分类号 Q565⁺.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)05-0766-05

PROGRESS ON DETERMINATION AND ANALYSIS OF SOYBEAN PEPTIDE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS

YI Ming-hua, XU Er-ni, WANG Jin-ping, SHI Li-kang

(Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang, 330047)

Abstract Soybean peptides is the hydrolysate of soybean protein and it is a mix of low peptides. There are many kinds of method can be used to produce soybean peptides. It is paid high attention to enzymatic hydrolysis, as it has more merits than other methods. This paper summarized the characteristics, such as temperatures, time of treatment, pH and production, of several kinds of proteinases in the process of enzymatic hydrolysis, mainly including those produced by plants, animals, microbial or multienzyme. The degree of hydrolysis (DH) and analysis of the soybean peptide were also summarized.

Key words Soybean peptides; Proteinase; Degree of hydrolysis

我国大豆资源丰富,价格低廉,是优质的植物蛋白质,但传统的大豆产品自身功能存在一些缺陷和不足,首先是大豆蛋白溶解度低,其次是具有一定的抗原性,因此在消化率和生物效价方面远不及牛奶、鸡蛋等动物性蛋白。与传统大豆食品蛋白相比,大豆多肽具有易消化吸收、能迅速供给机体能量、降血清胆固醇、降血压、低过敏性等独特的生理功能。大豆多肽是大豆蛋白经水解所得的低聚肽混合物,其生产方法多种多样,主要有化学法、基因工程法、化学合成法与酶解法。其中化学法反应条件剧烈、破坏氨基酸原有构型,产生有

毒物质^[1]。基因工程、化学合成法则需要相当大的投入,且安全性还需进一步研究。与上述方法相比较,酶法具有很多优点:如水解产物营养价值降低不显著、水解过程无不良副反应、反应条件易于控制、水解产物得率高、对设备要求不高等。本文对几种不同来源的蛋白酶的水解温度、时间、酶的用量以及产物特点进行了阐述,同时对大豆多肽产物测定方法进行了分析比较。

1 酶对大豆蛋白的水解

随着生物酶技术的发展,酶在大豆蛋白水解中的运用愈来愈广泛。目前用于水解大豆蛋白的酶,按其来源分主要有三大类:植物蛋白酶、动物蛋白酶和微生物蛋白酶;按组成酶的种类的多少可分为单酶和复合酶。

1.1 植物蛋白酶对大豆蛋白的水解

植物蛋白酶是来源于植物组织的蛋白酶,由于这类酶来源广泛、价格便宜、安全性高,因此常用于食品生产中,但它们的催化活性却普遍较动物蛋白酶和微生物蛋白酶低。目前在食品中常用的植物蛋白酶主要有木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶。

1.1.1 木瓜蛋白酶的水解作用 木瓜蛋白酶是一种特异性的氨基酸内切酶,能有效的酶解大豆分离蛋白中的丝氨酸、苏氨酸、脯氨酸、组氨酸、蛋氨酸。

黄惠华等^[2]研究表明木瓜蛋白酶的反应动力学参数 k_m 值为 0.34%,最适酶解 pH 值为 7.5。木瓜蛋白酶在水解过程中易被氧化失活,导致酶水解效率不高。吴建中等^[3]发现 0.25% 半胱氨酸对木瓜蛋白酶有较好的保护作用,能将水解度提高到 11% 左右。异 Vc 钠、亚硫酸钠对木瓜蛋白酶水解能力也有一定促进作用,但效果不如半胱氨酸明显。

采用木瓜蛋白酶法对大豆分离蛋白进行水解,大豆蛋白的水解度、乳化能力、发泡能力都能大大提高,并且豆腥味有所减弱,但是苦味会有所增加。

1.1.2 菠萝蛋白酶的水解作用 菠萝蛋白酶属于植物巯基蛋白酶。其活性中心为巯基(-SH),能进行蛋白质水解等多种生化反应,可广泛应用于食品行业。

顾仁勇等^[4]发现:在 pH 为 7.0,温度为 45℃ 的条件下,添加 15% 菠萝汁,水解 70 min,可使大豆蛋白的水解度达 18.60% 以上。在菠萝蛋白酶解液中添加适量的蔗糖和乳粉,再经乳酸发酵剂发酵可制得口感良好的大豆多肽发酵酸乳。但菠萝蛋白酶在贮藏和使用过程中不稳定,常温下的半衰期只有十几个小时。李兴等^[5]发现:50% 甘油能将菠萝蛋白酶的半衰期延长 8 倍;50% 葡萄糖能将菠萝蛋白酶的半衰期延长 10 倍;蔗糖、麦芽糖、棉子糖、松三糖等寡糖也能明显的提高其稳定性,且这些物质无毒无害,可安全有效的应用于食品加工业中。

1.2 动物蛋白酶对大豆蛋白的水解

动物蛋白酶来自于动物机体,常见的有胃蛋白酶、胰蛋白酶。这类酶安全性较好,催化活性较植物蛋白酶普遍要高。但由于动物蛋白酶来源于新鲜动物的体内,来源相对受到限制,价格也较高,且大豆中存在的抑制剂成分对动物蛋白酶水解蛋白也有一定的影响。

1.2.1 胃蛋白酶的水解作用 胃蛋白酶来源于哺乳动物的胃肠道中,属酸性蛋白酶,分子量约为 36000D,可优先切断苯丙氨酸、亮氨酸或谷氨酸的酸基侧的肽键。

钱方等^[6]研究表明胃蛋白酶最适 pH 值为 2.0,在 37℃ 条件下水解 24 h,大豆蛋白的水解度可达 68.45%,苦味最淡。针对胃蛋白酶的来源相对较少、市场价格较高等情况,赵江等^[7]采用壳聚糖吸附和戊二醛交联的方法将胃蛋白酶固定于壳聚糖上。经固定化后的胃蛋白酶热稳定性有很大的提高,最适酶解温度从 40℃ 可提高到 60℃;pH 作用的范围也变宽,由 pH2.0 移到 pH4.0;储存 6 周后,其酶活力仅下降 5.1%。

1.2.2 胰蛋白酶的水解作用 胰蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶,属肽链内切酶,对由碱性氨基酸,如精氨酸、赖氨酸等的羧基与其他氨基酸的氨基所形成的键具有高度的专一性。

张亚丽等^[8]用胰蛋白酶在 50℃ 时使豆粕高温变性,在酶用量 10 000 u/g、pH 值 8.0 的条件下水解 6h,变性豆粕中有 69.34% 蛋白质被水解溶出。大豆中的胰蛋白酶抑制成分严重的影响了胰蛋白酶对大豆蛋白的酶解作用,也影响了大豆蛋白在人体内的消化吸收,可以通过热变性的方法。曹志华等^[9]将大豆在温度为 110℃ 的条件进行湿热处理 5 min,可将 96% 的胰蛋白酶抑制成分的活力去处。而姚晓红等^[10]则在豆粕中同时接种 4% 酵母菌 Y-021、2% 酵母菌 Y-028 和 2% 乳酸菌 LC,30℃ 下发酵 72 h 后豆粕中胰蛋白酶抑制成分可被完全分解除去,有效的提高了大豆蛋白的水解度。

1.3 微生物蛋白酶对大豆蛋白的水解

由于动物蛋白酶价格昂贵、来源少,植物蛋白酶种类有限、催化效率不高等缺点,并且随着生物技术的进步,微生物蛋白酶随产酶技术日趋成熟,价格逐渐降低,而且来源广泛,因此微生物蛋白酶是比较理想的酶源。在食品中常用的几种微生物蛋白酶主要有,碱性 2709 蛋白酶、Alcalase 蛋白酶、Flavourzyme

风味蛋白酶等。

1.3.1 2709 碱性蛋白酶的水解作用 2709 碱性蛋白酶来源于地衣芽孢杆菌,最适 pH 为 9~10,主要运用于加酶洗衣剂,需要经纯化后才能运用于食品加工中。

胡爱军等^[11]发现用超声波对豆粕进行预处理可以有效的促进大豆蛋白的酶水解,在 40 kHz、128 W 的超声波处理下,大豆蛋白水解度平均提高了 21.18%。姚香菊等^[12]在 3 g 豆粕中加入 87.0 μL 的磷酸在 90℃ 处理 10 min,处理后的豆粕水解度约 30%,较不经磷酸处理前的豆粕水解度提高了约 20%。Fumio 等研究表明,热处理也利于提高大豆蛋白的水解度。这是因为大豆蛋白中 11S 球蛋白在 70℃ 下开始有解离,在 80℃ 时完全解离,7S 球蛋白在 75℃ 时开始解离^[13,14]。在 90~100℃ 时,原先被掩埋的-SH 基团完全暴露,使球蛋白分子完全展开,利于水解反应的进行。

1.3.2 Alcalase 蛋白酶的水解作用 Alcalase 蛋白酶是一种高效细菌蛋白酶,该酶的有效成分枯草杆菌蛋白酶 A 是一种非特异性碱性蛋白酶。它是一种丝氨酸蛋白酶,属于碱性内切肽酶,作用肽键的范围广泛,可作用蛋白质羧基端疏水性氨基酸的肽键^[15],是一种较好的低苦味多肽生产酶。

范宝庆等^[16]发现经 Alcalase 酶解后,酶解液中约 95% 大豆蛋白在 pH4.0 条件下有较好的溶解性。可以将其很好的应用于婴幼儿配方豆奶、儿童营养酸豆奶、功能性大豆蛋白肽饮料等食品的生产中。Hamada 等^[17]用 Alcalase 对大豆分离蛋白进行水解,发现酶解液的溶解性和乳化性均得到全面提高,尤其在酸性条件下效果更加显著。

1.3.3 风味蛋白酶(Flavourzyme)的水解作用 大豆蛋白水解后不可避免的会产生一些苦味肽,严重的影响了多肽的口感和风味,Novo-Nordisk 公司生产的 Flavourzyme 蛋白酶属真菌蛋白酶,是一种内切酶和外切酶混合的风味蛋白酶,在中性、酸性条件下均可有效的将疏水性氨基酸从蛋白质末端切除,降低多肽酶解液的苦味。

吴建中等^[18]在 Protamex 酶的水解液中,按酶与底物之比 40U/g 添加 Flavourzyme 酶,在温度为 50℃、pH 7.0 条件下反应 8 h,酶解液中氨基酸含量高达 0.16%。将这类酶水解得到的大豆多肽配制饮料,在大豆多肽含量 1%、pH5.0、糖浓度 6% 时,饮料感觉不到苦味且无沉淀产生。另有研究表明在

alcalase 蛋白酶大豆蛋白水解液中,添加 flavourzyme 复合风味酶可快速降低苦味值,直至苦味消失,因此,使用 flavourzyme 复合风味酶是大豆多肽脱苦的一个有效而简便的方法。

1.4 复合蛋白酶的水解作用

由于单酶水解法存在的一些缺陷和不足,如酶的水解度不高、多肽得率较低、水解过程中产生苦味肽,国内外学者逐渐将研究的重点转向了复合酶蛋白酶对大豆蛋白的水解。

陶红等^[19]对木瓜蛋白酶、碱性 2709 蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶、Protamex、flavourzyme、Alcalase 七种蛋白酶水解大豆蛋白情况进行了比较,发现 Promatex 复合蛋白酶对大豆蛋白质的水解性能最强,水解度可达 28.23%。张鹏等^[20]研究表明,大豆分离蛋白在底物浓度 4%、反应温度 50℃、pH8.5、酶用量 6% 的条件下,经中性蛋白酶水解 4 h,水解度达 21.46%。该酶解液再加入 3% Flavourzyme 酶水解 6 h,酶解液的水解度基本无变化但苦味明显降低。周利亘等^[21]将中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶以 1:2:4 的比例配制成三酶复合蛋白酶。在 pH7.0、温度 50℃、底物浓度为 4% 的条件下水解 9 h,水解度可高达 84.40%,表明复合酶的水解能力明显高于单酶。

2 大豆多肽的测定方法

在酶的水解过程中,蛋白质的水解度和多肽分子量分布的测定是控制的关键点。下文分别对大豆蛋白质水解度的测定方法和多肽分子量的分布的测定方法进行分析比较。

2.1 大豆蛋白水解度的测定方法

蛋白质水解程度的控制是个难点,因为过度的水解会产生苦味肽,使蛋白质的风味改变,影响水解蛋白在食品中的应用。1979,Nissen 等^[22]提出水解度(Degree of hydrolysis, DH)的概念,测定蛋白质水解度的方法主要有 TCA 沉淀法、pH-stat 法和茚三酮法。

2.1.1 TCA 沉淀法^[23] 酶解液中未水解的蛋白质在 10% 三氯醋酸(TCA)溶液能沉淀,经离心,上清液为可溶性氮。蛋白质的水解度可以根据氮的含量来计算。该法是测蛋白质水解度最常用的方法,但上清液可溶性氮由凯氏定氮法测得,耗时长,不适于快速检测的要求。

2.1.2 pH-stat 法^[24] 大豆蛋白溶液中添加适量的酶水解,调 pH 为 8.0,反应期间通过滴加 NaOH 溶液,使反应混合物 pH 值保持在 8.0 不变。蛋白水解度可根据水解过程中 NaOH 的消耗量来进行计算。该法操作简单、不需要复杂设备,但反应过程需要不停的滴加 NaOH,耗时较长,且只适用于利用碱性蛋白酶对大豆蛋白进行水解的过程,对酸性反映体系和需要微生物酶解环境则不适合。

2.1.3 茚三酮法^[25] 在酸性条件下,茚三酮能与氨基酸、肽、蛋白质作用形成蓝色化合物,此化合物在 580 nm 处有最大吸收值,蛋白质的水解度可以根据此波长下 A 值计算出来。该法较前两种方法灵敏度较高、耗时短,但易受显色剂茚三酮的影响,可通过加入乙二醇、正丁醇等提高试剂的灵敏度和稳定性。普遍适用于蛋白酶水解液水解度的测定,也适用于微生物发酵法产大豆多肽液水解度的测定。

2.2 多肽分子量分布的测定方法

酶水解液中大豆多肽分子质量无法用水解度来检测,目前国内外对大豆多肽分子量的分布状态测定多采用凝胶层析法和电泳法。

2.2.1 凝胶层析指示分子量分布^[26] 葡聚糖凝胶(sephadexG-25)柱,柱末端与核酸蛋白检测仪、记录仪相联。检测波长为 250 nm,根据记录仪记录的吸光值-洗脱时间曲线收集洗脱液,并以胰岛素为标品,测定大豆多肽分子量分布曲线,该法可粗略测定大豆多肽的分子量分布。

2.2.2 电泳测定分子量分布^[26] 通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定水解液的多肽物质分子量分布情况。利用已知分子量的标准蛋白质分子在电泳槽中的迁移率,可计算出未知肽链的分子量。试验中常选用胰岛素、细胞色素、抑肽酶、四肽或三肽等作为标准蛋白质分子。该法较凝胶层析法更精确的指示多肽的分布,但与所选择的标准分子量和所测样品的分子量之间的差距有关。

3 展望

大豆多肽因易为人体消化吸收利用、较好的稳定性和良好的物理加工特性以及诸多的功能特性而成为当前食品、药品及化妆品等行业研究的热点。关于大豆蛋白的酶水解问题国内外研究均较多,能够应用于酶法水解大豆蛋白的各种酶已经或正在被广泛关注,酶水解的方式也由单酶水解正逐渐转向

复合酶的分步水解,但是酶法水解过程中也存在一些问题,比如酶在反应过程中稳定性不高,易被氧化,受反应温度、pH、体系金属离子浓度的影响较大,且在水解过程中常常不可避免的会产生少量苦味物质,影响产品风味。但是随着制备工艺的不断改进,微生物酶技术的不断发展,多肽产物测定方法的不断完善,风味及生产成本得到了进一步的改善,可以预见大豆多肽也必将在食品、药品乃至化妆品等诸多领域中展示出更加广阔的开发前景。

参 考 文 献

- [1] Taylor S L. Allergic and sensitivity to food components in nutritional toxicology. Orlando: Hatchcock [J]. Hatchcock. N. Academic Press, 1987, 111: 173-198.
- [2] 黄惠华,何铁剑,许南燕. 木瓜蛋白酶对大豆分离蛋白的水解作用研究[J]. 食品工业, 1999, (3): 29-31.
- [3] 吴建中,赵谋明,宁正祥,等. 木瓜蛋白酶水解大豆分离蛋白研究[J]. 大豆科学, 2002, 21(3): 187-190.
- [4] 顾仁勇,刘春成,傅伟昌. 菠萝汁酶解大豆多肽发酵酸豆乳的研制[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(12): 117-119.
- [5] 李兴,林哲甫. 食品加工业中菠萝蛋白酶的热稳定性[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 38-40.
- [6] 钱方,刘海波,刘阳,等. 胃蛋白酶水解大豆蛋白的研究[J]. 中国乳品工业, 2001, 29(3): 10-13.
- [7] 赵江,程彦伟,郭建林. 胃蛋白酶固定化条件的研究[J]. 郑州工程学院学报, 2004, 25(2): 35-36.
- [8] 张亚丽,徐忠. 碱性蛋白酶提取变性脱脂豆粕中蛋白质[J]. 生物技术, 2002, 12, (3): 12-14.
- [9] 曹志华,罗静波,田晓霞,等. 湿热处理对大豆粉品质的影响[J]. 长江大学学报, 2005, 2(11): 52-54.
- [10] 姚晓红,吴逸飞,汤江武,等. 微生物混合发酵去除生豆粕中胰蛋白酶抑制剂的研究[J]. 中国饲料, 2005, 24: 16-18.
- [11] 胡爱军,郑捷. 大豆蛋白酶解技术比较[J]. 精细化工, 2005, 22(6): 461-463.
- [12] 姚香菊,王卫国. 酸预处理对碱性蛋白酶水解大豆粕蛋白的影响[J]. 饲料与畜牧, 2006(2): 12-15.
- [13] Peng I C. The physicochemical and functional properties of soybean 11s globulin-a review[J]. Cereal Chemistry, 1984, 61(6): 480-490.
- [14] Fumio Yamauchi. Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein [J]. Food Reviews International, 1991, 7(3): 283-322.
- [15] Walsh D J, Cleary D, McCarthy, et al. Modification of the nitrogen solubility properties of soy-protein isolated following proteolysis and transglutaminase cross-linking [J]. Food Research International, 2003, 36: 677-683.
- [16] 范宝庆,陈中. 酸性蛋白酶水解大豆蛋白的研究[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(3): 24-25.

- [17] Azizah Abdul-Hamada. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia [J]. Food Chemistry, 2002, 69 - 74.
- [18] 吴建中, 赵谋明, 宁正祥, 等. 双酶法生产低苦味大豆多肽研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(4): 24 - 26.
- [19] 陶红, 梁歧. 酶法制备大豆寡肽的研究[J]. 大豆科学, 2004, 23(1): 26 - 29.
- [20] 张鹏, 张春红, 常南, 等. 双酶法制备低苦味大豆寡肽的研究[J]. 食品科技, 2007(2): 51 - 53.
- [21] 周利洵, 陈新峰. 大豆多肽复合酶解工艺条件研究[J]. 食品科技, 2005, (7): 22 - 25.
- [22] J Adler Nissen, Determination of the hydrolysis of food Protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. Agricultural and Food Chemistry. 1979, 27: 1256 - 1262.
- [23] 李书国, 陈辉, 杜进民, 等. 大豆多肽的功能特性及加工工艺[J]. 粮油食品科技, 2000, 8(1): 14 - 15.
- [24] 徐力, 刘立, 李相鲁, 等. 玉米功能短肽的制备及其类超氧化物歧化酶活性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2002, 23(2): 78 - 80.
- [25] 余勃, 陆兆新. 微生物发酵法产大豆多肽液水解度的测定[J]. 食品科学, 2005, 26(4): 104 - 107.
- [26] 李建武, 萧能庵, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 第一版, 1994, : 216 - 223.

《核农学报》征稿及征订启示

《核农学报》(Journal of Nuclear Agricultural Sciences)于1980年由中国原子能农学会和中国农业科学院原子能利用研究所共同创办,是核技术和生物物理技术在农业和生物学应用研究领域唯一的学术期刊。主要刊登核技术(包括各种辐射源人工诱变遗传和育种技术、辐照加工技术和同位素示踪技术等)在农业科学中应用的学术论文、综述、专论、科技信息及知识介绍等。此外,还适当刊登其他相关技术,如农产品和食品贮藏加工、生态农业、农业生物技术、农业信息技术、节水农业、精品农业等方面的学术论文。

征稿细则及征订启事详见: hnxb.periodicals.net.cn

《核农学报》(ISSN 1000 - 8551, CN11 - 2265/S)为双月刊,每期定价10元,全年60元。国内为自办发行,国外发行代号:BM449。欢迎订阅,欢迎发布广告。

联系地址:北京5109信箱《核农学报》编辑部

联系人:邱爱枝;E-mail: hnxb5109@263.net

邮编:100094;电话/传真:010 - 62815961

欢迎订阅2008年《中国生态农业学报》

《中国生态农业学报》由中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国生态经济学会主办,科学出版社出版。中国科技核心期刊,被美国化学文摘、美国乌利希国际期刊指南以及中国科学引文数据库、中国期刊全文数据库等20多家检索系统和数据库收录。

《中国生态农业学报》是报道农业生态学、生态学、农业资源与环境保护以及农业生态经济学等领域创新性研究成果,以农业生态学为理论基础,研究农业生态系统及其稳定发展理论与技术的学术期刊。适于从事农业生态学、生态学、生态经济学以及环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生、农业及环境管理工作者和基层从事生态农业建设的广大技术人员等阅读与投稿。

《中国生态农业学报》国内外公开发行,国内刊号CN13 - 1315/S,国际刊号ISSN1671 - 3990,双月刊,国际标准大16开本,每期定价35元,全年210元。邮发代号:82 - 973,全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部补订(需另加邮资24.00元)。

地址:(050021)河北省石家庄市槐中路286号《中国生态农业学报》编辑部

电话:(0311)85818007;传真:(0311)85815093;E-mail: editor@sjziam.ac.cn