

文章编号:1009-038X(2004)03-0041-05

大豆生理活性肽的研究(I)

——酶法水解的工艺

刘健敏, 钟芳, 麻建国

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 研究了高水解度大豆多肽的制备和脱盐工艺, 采用两种蛋白酶 AS1. 398 和 Alcalase 水解大豆分离蛋白制得水解度为 10%~24% 的大豆多肽。结果显示: 在等电点沉淀分离多肽时, 相同水解度下, Alcalase 酶水解产物的水解得率比 AS1. 398 酶水解产物的水解得率高 20%。采用 DA201-C 大孔吸附树脂对水解液进行脱盐, 得到了优化的吸附和解吸的条件。该条件下大孔吸附树脂对水解液的吸附率为 89.71%, 解吸率为 72.30%。

关键词: 大豆分离蛋白; 酶法水解; 脱盐

中图分类号: O 629.72

文献标识码: A

Soybean Bioactive Peptides(I)

——Technology of Enzymatic Hydrolysis

LIU Jian-min, ZHONG Fang, MA Jian-guo

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The experiment was conducted to investigate the technology involving in utilizing AS1. 398 and Alcalase to hydrolyze SPI for preparing soybean polypeptides with DH of 10%~24%. The result shows that when separated peptides under isoelectric point precipitation, the yield of hydrolysates prepared by the action of Alcalase was 20% higher than that of AS1. 398 at the same DH. The optimal condition for desalting with DA201-C macroporous resins was determined. Under the optimal condition, adsorption ratio was 89.71% and desorption ratio was 72.30%.

Key words: soybean protein isolates; enzymatic hydrolysis; desalting

大豆蛋白质分子结构复杂, 其相对分子质量大多在 10 万以上, 大多数分子内部呈反向 β -helix 非有序结构, 分子高度压缩、折叠, 大豆蛋白的三级结构高度结构化, 从而使得大豆蛋白质消化率和生物效价不及牛奶、蛋等动物性蛋白^[1]。蛋白质的酶解是改善蛋白质特性的一种很好的方式, 大豆蛋白质经蛋白酶水解后生成大豆多肽和大豆寡肽, 其氨基

酸组成和大豆蛋白质基本相同, 但更易被人体消化吸收。另外, 大豆多肽还具有多种生理功能, 日本的一些学者现在已经从大豆蛋白水解产物中分离出具有抗氧化性、降血压、降低胆固醇和预防骨质疏松等疾病的肽段, 并对短肽的一级结构进行了鉴定^[2]。大豆多肽的这些生理活性取决于多肽的相对分子质量大小和氨基酸序列, 而多肽的相对分子质

收稿日期: 2003-09-09; 修回日期: 2003-10-17.

作者简介: 刘健敏(1979-)男, 安徽和县人, 食品科学与工程硕士研究生.

量大小和氨基酸序列又与蛋白质水解所用的蛋白酶种类和控制的水解度大小有关系. 因此大豆蛋白水解物通过选择不同种类的蛋白酶、控制水解度的大小, 可以得到具有不同生理活性的肽, 这一领域是目前国内外研究的热点.

在大豆蛋白酶解研究中, 可供选择的酶有动物蛋白酶、植物蛋白酶以及微生物蛋白酶三大类, 其中动物蛋白酶如胃蛋白酶、胰蛋白酶等价格昂贵、副反应多, 植物蛋白酶如木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶来源少, 效率低, 都不适合工业化生产. 而随着生物技术的进步, 微生物蛋白酶的生产技术日趋成熟, 价格逐渐降低, 而且来源广泛, 是一种比较理想的酶源^[3]. 本实验采用两种微生物蛋白酶, 即中性蛋白酶 AS1. 398 和碱性蛋白酶 Alcalase 作为水解大豆分离蛋白的酶源, 通过控制不同的水解度得到一系列大豆活性肽溶液. 本实验采用 DA201-C 大孔吸附树脂对水解液进行脱盐, 确定了脱盐的最佳工艺条件, 并初步试验了梯度洗脱对大豆多肽的分离效果.

1 材料与方 法

1.1 材 料

大豆分离蛋白: 黑龙江三江食品公司产品; AS1. 398 中性蛋白酶: 无锡杰能科酶制剂公司产品; ALCALASE 碱性蛋白酶: 丹麦 NOVO 公司产品; DA201-C 大孔吸附树脂: 江阴有机化工厂产品; 其它试剂均为分析纯

1.2 方 法

1.2.1 大豆分离蛋白的酶解方法 按一定的底物浓度准确称取大豆分离蛋白于酶反应器中, 加入适量蒸馏水搅拌均匀. 然后在 90 °C 下热处理 10 min, 冷却到酶反应温度后, 用 2 mol/L 的 NaOH 溶液调至酶反应所需 pH 值, 依据所用酶的活力单位加入一定蛋白酶, 反应过程中不断滴加 2 mol/L 的 NaOH 溶液, 使 pH 值稳定在最适 pH 值. 反应至一定水解度后, 用 2 mol/L 的 HCl 溶液调至 pH 值为 4.5, 沸水浴灭酶 10 min, 冷却后 3 000 r/min 离心 15 min 取上清液, 即得到黄褐色的大豆活性肽溶液. 该溶液经脱盐, 浓缩, 冷冻干燥后得到淡黄色的大豆活性肽粉末. 水解度的控制和计算采用 pH-Stat 法^[4].

1.2.2 水解液脱盐条件的优化

1) 大孔吸附树脂的预处理: 将一定量的树脂先用无水乙醇浸泡 24 h, 然后用无水乙醇洗至 220 nm 无吸收峰时, 再用去离子水洗净后备用.

2) 水解液的制备: 按前面所叙述的酶解工艺, 用 AS1. 398 酶制备 DH 为 12 的水解液, 其蛋白质质量浓度为 37.66 mg/mL. 之后进行的所有吸附实验均使用该水解液.

3) 静态吸附实验: 称取 25 g 湿树脂于 250 mL 的锥形瓶中, 加 100 mL 水解液, 25 °C 恒温摇床 180 r/min, 不同时间取样用滤纸过滤的方法将树脂和溶液分离, 测定吸附液的蛋白质质量浓度, 按下式计算吸附率和吸附量.

$$\text{吸附率} = \frac{(\text{原液蛋白质质量} - \text{吸附液蛋白质质量})}{\text{原液蛋白质质量}} \times 100\%$$

$$\text{吸附量}(\text{mg/g}) =$$

$$\frac{\text{原液蛋白质质量} - \text{吸附液蛋白质质量}}{\text{树脂质量}}$$

4) 动态吸附和解吸实验: 取洗净的吸附树脂 100 mL 装柱, 将水解液以 100 mL/h 的体积流量为上柱, 收集透过液, 计算吸附率和吸附量. 然后用去离子水淋洗除去树脂表面的盐分, 再用体积分数为 75% 的乙醇以同样的流速洗脱, 收集洗脱液, 按下式计算解吸率.

$$\text{解吸率} = \frac{\text{解吸液中蛋白质质量}}{(\text{原液蛋白质质量} - \text{吸附液蛋白质质量})} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 两种蛋白酶的最佳作用条件

作者在前期工作试验了 5 种常用的商品蛋白酶对大豆分离蛋白的水解效果, 初步筛选出两种蛋白酶: 中性蛋白酶 AS1. 398 和碱性蛋白酶 Alcalase. 中性蛋白酶 AS1. 398 是由枯草芽孢杆菌经深层发酵制得, 作用的肽键具有广泛的专一性, 碱性蛋白酶 Alcalase 是由地衣芽孢杆菌生产而得, 该酶的主要有效成分是一种内切酶. 由于同种蛋白酶对不同的底物具有不同的最适温度和 pH 值, 作者确定了两种蛋白酶作用于大豆分离蛋白的最佳作用条件^[5], 结果见表 1.

表 1 AS1. 398 和 ALCALASE 的最佳作用条件

Tab. 1 The best condition of AS1. 398 and Alcalase hydrolazing SPI

酶类	底物质量 浓度/(g/dL)	酶添加量/ %	最适 pH 值	最适 温度/°C
AS1. 398	8	1.25	7.0	40
Alcalac	8	1.25	8.5	55

2.2 两种蛋白酶不同水解度的水解得率比较

由于具有生理活性的大豆多肽都是一些相对分子质量较小的肽段, 所以在酶解制备活性肽的工

艺过程中,酶解之后将水解液的 pH 值调节到蛋白质的等电点 4.5,使没有水解的蛋白质和水解得到的一些较长的肽段沉淀下来,而留在上清液中的那些相对分子质量较小的肽段就是目标产物。由于不同的蛋白酶对大豆分离蛋白的水解模式不同,水解所得到的肽段大小也不同,这可能导致最后上清液中得到的多肽数量有所差异。作者按下式计算了两种蛋白酶不同水解度的产品的最终蛋白质得率,结果见表 2。

水解过程蛋白质得率的计算:

$$\text{蛋白质得率} = \frac{\text{水解液体积} \times \text{水解液蛋白质质量浓度}}{\text{大豆分离蛋白质量} \times \text{蛋白质质量分数}} \times 100\%$$

表 2 两种蛋白酶水解过程的蛋白质得率

Tab. 2 The yield of protein in course of hydrolysis

DH/%	蛋白质得率/%	
	AS1.398	Alcalase
10	35.78	56.01
12	42.71	63.18
14	47.66	62.99
16	50.88	69.11
18	57.54	78.21
20	59.11	79.88
22	63.42	85.38
24	68.69	89.37

由表 2 可以看出,随着水解度的增大,蛋白质的得率也增大,即水解液中相对分子质量较小的可溶性多肽增加了。而比较两种蛋白酶在同一水解度的蛋白质得率,Alcalase 系列比 AS1.398 高 20%。这可能是因为 Alcalase 是内切酶,它水解得到的肽段长度比较均匀,而 AS1.398 水解的肽键具有广泛的专一性,它水解得到的肽段长度不一,其中一部分相对分子质量较大而溶解度差,在离心过程中沉淀下来,使水解液的得率不高。

2.3 大孔吸附树脂的静态吸附动力学过程

由于在酶解过程中为了保证反应过程的 pH 值保持不变,需要不断加入 NaOH 溶液进行滴定。在分离工序中要除去未水解的蛋白质还需加入盐酸,溶液会产生一定量的盐分(主要是 NaCl),因此,需要进行脱盐处理。常用的脱盐方法有透析、纳滤等,它们都是根据盐离子和蛋白质分子的相对分子质量的差别进行分离的,而大豆多肽相对分子质量主要在 1 000 以下,和盐离子的相对分子质量差别较小,所以不适合用透析、纳滤等方法。目前较常用的方法有应用离子交换树脂和大孔吸附树脂进行脱盐,而其中大孔吸附树脂对多肽具有选择性的吸

附,用乙醇等有机溶剂洗脱也较为方便,而且利用不同浓度的洗脱剂的极性不同,对吸附的多肽分子能达到分步洗脱的效果。作者试用了几种常用的吸附树脂,初步筛选出一种效果较好的 DA201-C 大孔吸附树脂。

图 1 是 DA201-C 大孔吸附树脂静态吸附的动力学曲线。可以看出,该树脂对大豆活性肽溶液的吸附速率较快,在 1 h 内就达到总吸附量的 75% 左右,8 h 达到吸附平衡时的吸附量是 81.56 mg/g。大豆活性肽溶液是小相对分子质量多肽的混合物,其中含有大量的疏水性氨基酸,它们可以通过疏水性作用从水相吸附到树脂的疏水表面上。DA201-C 大孔吸附树脂属于非极性吸附树脂,对含有疏水性基团较多的大豆活性肽溶液吸附效果较好,而且它的比表面积比较大,为 1 000~1 300 m²/g,这也是影响吸附效果的重要因素。而溶液中的其它无机盐离子则不能吸附到树脂上,从而达到了对水解液脱盐的效果。

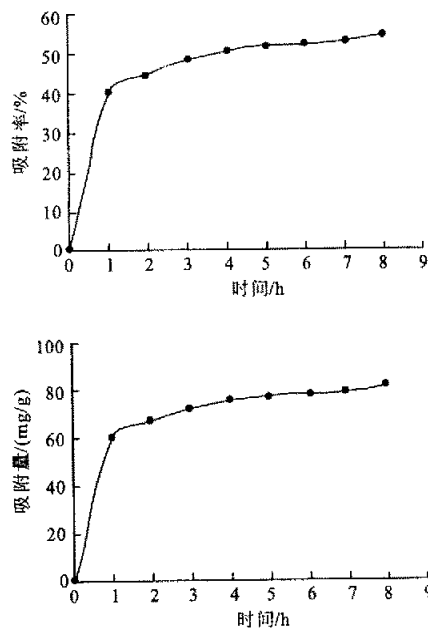


图 1 大孔吸附树脂静态吸附的动力学曲线

Fig. 1 The static state absorption dynamics curve of DA201-C macroporous resins

2.4 大孔树脂的动态吸附

大孔吸附树脂的静态吸附特点是吸附量较高,但需要足量的水解液,导致吸附率较低。而为了使蛋白质尽量得到回收又需要有较高的吸附率,作者试验了大孔吸附树脂对水解液的动态吸附,吸附曲线见图 2。可以看出,当树脂用量为 100 mL 时,穿

透点的通流量为 75 mL,即水解液的处理量小于 75 mL 时可以达到 100%的吸附率而不发生穿透;当处理量为 600 mL 时,树脂接近饱和状态.

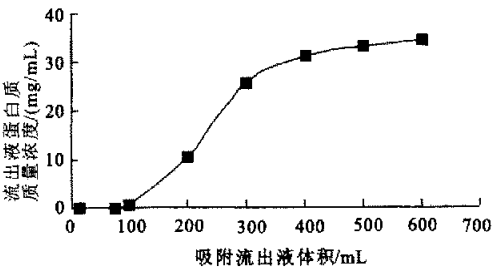


图 2 大孔吸附树脂的动态吸附曲线
Fig. 2 The dynamic absorption curve of DA201-C macroporous resins

在实际的脱盐工艺中,需要保持尽量高的吸附率,即在一定的树脂用量下,要选择一个合适的上样量.取 100 mL 吸附树脂装柱,分别取水解液 75, 100,125,150 mL 上柱,进行动态吸附实验;吸附完后再用去离子水淋洗去除树脂表面的盐分,计算吸附率和吸附量,结果见表 3.

表 3 不同上样量的吸附效果

Tab. 3 The absorption effect of varying ratio of hydrolysates solution to resin

上样量/mL	吸附率/%	吸附量/(mg/g)
75	89.71	30.12
100	84.30	37.74
125	76.17	42.63
150	71.84	48.24

从表 3 中可以看出,随着上样量的增加,树脂对水解液的吸附率减小,而单位质量树脂的吸附量增加.上样量为 75 mL 时的吸附率只有 89.71%,小于前面动态吸附时的 100%,这可能是在用去离子水淋洗时一部分与树脂结合力较弱的肽段已经被洗脱下来,使得吸附率有所下降.

2.5 大孔吸附树脂的动态洗脱

大孔吸附树脂主要是通过表面的范德华力进行物理吸附的,用极性溶剂乙醇作洗脱剂,被吸附的多肽很容易洗脱下来,洗脱过程也是吸附树脂的再生过程.采用体积分数 75%的工业乙醇,体积流量 100 mL/h,解吸曲线见图 3.

从洗脱曲线可以看出,体积分数 75%的乙醇可以较集中的在洗脱前期将大部分多肽洗脱下来,前

600 mL 洗脱液的解吸率为 72.30%,之后的洗脱速率较缓慢,可能是一部分相对分子质量较大的组分在乙醇中的溶解度较低而不容易被洗脱下来,这一部分洗脱液可以留待下一周期套用.

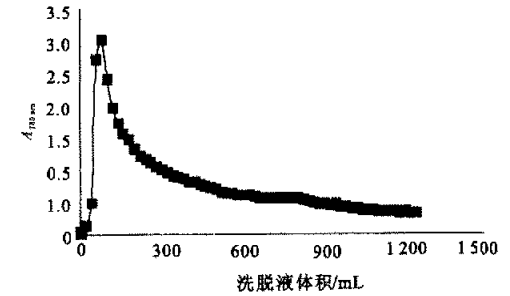


图 3 大孔吸附树脂的洗脱曲线
Fig. 3 The desorption curve of DA201-C macroporous resins

通过以上大孔吸附树脂的动态吸附和解吸实验,最终确定的脱盐条件为:水解液上样量 0.75 BV (倍柱体积),用 6 BV 的体积分数 75%乙醇洗脱,流量 1 BV/h.该条件下大孔吸附树脂对大豆活性肽溶液的吸附率为 89.71%,解吸率为 72.30%.

2.6 大孔吸附树脂的动态梯度洗脱

由于不同体积分数乙醇的极性不同,它们与不同疏水性的肽段亲和力不同,那么利用不同体积分数的乙醇进行梯度洗脱,就可能得到疏水性不同的肽段,而这些肽段的生理活性又与它们的疏水性是密切相关的.所以作者推测用不同体积分数进行梯度洗脱得到的不同组分可能具有不同的生理活性.为此,实验依次用体积分数 25%,50%,75%和 100%的乙醇溶液进行洗脱,洗脱曲线见图 4.

从图中看出,依次增加洗脱液乙醇的体积分数(25%~75%),可以得到 3 个不同的组分(洗脱曲线中的 3 个峰),将洗脱液浓缩,冻干,得到每个组分的质量,数据列见表 4.在以后的研究工作中,可以通过分析这 3 个组分的氨基酸组成和它们的活性大小,来确定梯度洗脱是否能根据肽段的疏水性达到分离的效果以及活性大小与肽段疏水性的关系.

表 4 梯度洗脱的 3 个组分的得率

Tab. 4 The yield of three portion by gradient desorption

乙醇体积分数/%	质量/g	组分质量分数/%	解吸率/%
25	1.32	59.19	43.56
50	0.68	30.49	22.44
75	0.23	10.31	7.59

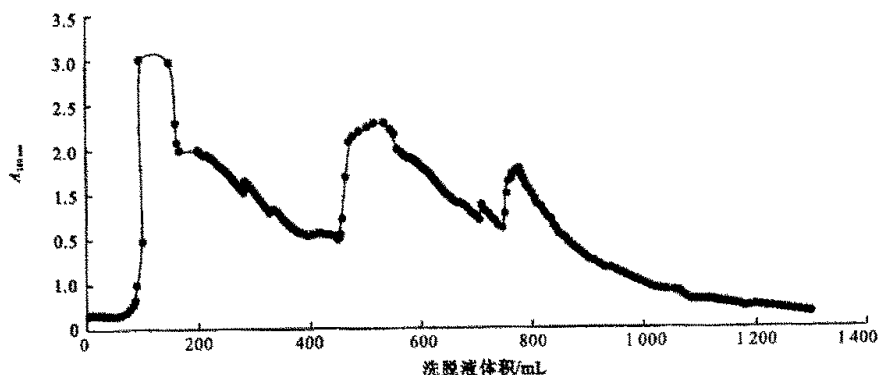


图4 大孔吸附树脂的梯度洗脱曲线

Fig. 4 The gradient desorption curve of DA201-C macroporous resins

2.7 大孔树脂的再生和循环

大孔树脂经过一个周期的吸附和解吸过程后,需要再生后才可以继续循环使用,再生的过程和预处理相同。作者考察了大孔树脂的循环使用效果,结果见表5。经过10次吸附和解吸的循环使用,树脂的吸附量下降幅度较小,基本趋于稳定,说明DA201-C大孔吸附树脂具有较好的吸附稳定性能,可以长期循环使用。

3 结 论

综上所述,实验中所试用的两种蛋白酶对大豆分离蛋白均有较强的水解能力,而Alcalase酶的水解得率更高。采用DA201-C大孔吸附树脂脱盐的最佳条件为:水解液上样量0.75 BV(倍柱体积),用6 BV的体积分数为75%乙醇洗脱,流量1 BV/h。该

条件下大孔吸附树脂对大豆活性肽溶液的吸附率为89.71%,解吸率为72.30%。利用不同体积分数的乙醇进行梯度洗脱,可以将酶解产物粗分为3个组分,为进一步的活性测定和分离纯化奠定了基础。

表5 大孔吸附树脂循环使用的吸附效果

Tab. 5 The cyclic absorption effect of DA201-C macroporous resin

实验次数	吸附量/(mg/g)	实验次数	吸附量/(mg/g)
1	39.54	6	39.69
2	36.80	7	35.11
3	40.00	8	34.71
4	34.30	9	39.49
5	34.22	10	37.00

参考文献:

- [1] 王尔惠. 大豆蛋白生产新技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [2] Hua-Ming Chen, Koji Muramoto, Fumio Yamauchi. Structural analysis of antioxidative peptides from Soybean β -conglycinin [J]. J Agric Food Chem. 1995, 43: 574-578.
- [3] 邓勇, 吴煜欢. 微生物蛋白酶对大豆分离蛋白水解作用的研究[J]. 食品科学, 1999, (6): 42-45.
- [4] Jens Adler-Nissen. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. J A gric Food Chem. 1979, 27(6): 280-285.
- [5] 王吉庄, 钟芳, 王璋. 高水解度大豆肽的制备[J]. 食品工业科技, 2003, (9): 40-42.

(责任编辑: 朱明)