

大豆小分子多肽制备工艺和质量标准的研究

葛盛东¹, 李茂辉², 高淑杰³, 卢桂华⁴, 刘颖平⁵

(¹ 沈阳医学院细胞生物与遗传学教研室, 辽宁 沈阳 110034; ² 沈阳医学院预防医学系卫生检验中心, 辽宁 沈阳 110034; ³ 沈阳体育学院运动生化教研室, 辽宁 沈阳 110031; ⁴ 辽宁省疾病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110001; ⁵ 沈阳天灵制药有限公司, 辽宁 沈阳 110003)

摘 要: 采用酶法水解脱脂豆粕制备具有生物活性的大豆小分子多肽, 确定了先以粗胰酶预酶解 5% 豆粕蛋白, 再以中性微生物蛋白酶进一步水解提取大豆小分子多肽的工艺流程。粗胰酶酶解最佳条件: 添加量为 $9\,000\text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 酶解温度 55°C , pH 8.5, 时间 6 h。中性微生物蛋白酶水解粗胰酶乳最佳条件为: 加酶量 $8\,500\text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, pH 7.5, 温度 45°C , 时间 2 h。在此条件下, 肽得率可达到 73.98%。同时还构建了大豆小分子活性多肽的质量检测标准。

关键词: 大豆小分子多肽; 粗胰酶乳; 中性蛋白酶; 肽得率; 质量标准

中图分类号: Q814

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)05-0863-03

Enzymatic Hydrolysis Technology and Quality Standards of Soybean Minor Peptides

GE Sheng-dong¹, LI Mao-hui², GAO Shu-jie³, LU Gui-hua⁴, LIU Ying-ping⁵

(¹ Department of Cellular Biology and Genetics of Shenyang Medical College, Shenyang 110034; ² Department of Preventive Medicine Shenyang Medical College, Shenyang 110034; ³ Department of Sport Biochemistry of Shenyang Sport College, Shenyang 110031; ⁴ Disease Control Center of Liaoning Province, Shenyang 110001; ⁵ Tianling Pharmaceutical Company of Shenyang, Shenyang 110003, Liaoning, China)

Abstract: In this study, the new extraction technique of soybean bioactive minor peptides from defatted soy flakes hydrolyzed by crude complex trypsinase and neutral proteinase was set up. Optimal condition of pretreatment and hydrolyzing by crude complex trypsinase was given by enzyme quantity of $9\,000\text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, temperature 55°C , pH 8.5, time 6 h, under the condition of 5.0% substrate concentration. And the optimum condition of neutral proteinase hydrolysis was given by enzyme quantity $8\,500\text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, pH 7.5; temperature 45°C ; treatment time 2 h. Under this condition, the ratio of soybean minor peptides reached 73.98%. And the quality standards of soybean bioactive minor peptides were also established.

Key words: Soybean minor peptides; Crude complex trypsinase; Neutral proteinase; Peptide yield; Qualitative standards

自 1902 年英国科学家 Buyliiss 和 Starling 在动物的胃肠内第一次发现活性多肽物质以来, 到现在人们已发现和分离出 100 多种存在于生物体内的多肽^[1]。特别是随着生物医学的发展和分离检测水平的提高, 对于多肽研究取得很大的进展。人们发现, 多肽物质除了具有一般蛋白质的营养作用外, 对人体还具有非常重要的不可替代的调节作用, 这种作用几乎涉及到人体的所有生理活动。例如: 神经、消化、吸收、代谢、循环、生长、生殖、内分泌等。近年来, 大豆蛋白产品的开发利用已受到食品工业的高度重视。大豆蛋白的乳化性及吸油性等功能特性, 已被人们广泛地接受和认识。为了进一步提高大豆产品的营养功能和加工特性, 提高大豆蛋白产品的

利用价值与附加值^[2], 大豆肽的开发研究已成为国内外研究的热点。

大豆多肽是大豆蛋白经水解而制成的低分子肽混合物, 无论是理化特性、营养特性还是功能特性都优于大豆蛋白质。研究表明这些低分子肽具有调节血压、降低胆固醇、促进脂肪代谢、提高机体免疫力、延缓衰老等功能, 其应用前景非常广泛, 市场潜力巨大^[3]。但目前在大豆多肽的研究中, 重要的是水解酶的选择, 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, 其中动物蛋白酶价格昂贵, 植物蛋白酶来源较少, 二者均不适合工业化生产。而随着微生物蛋白酶生产技术的日趋成熟, 将成为一种来源广泛, 价格低廉的理想酶源。采用粗

收稿日期: 2007-10-19

基金项目: 沈阳市自然科学基金资助项目(1053125-1-39)。

作者简介: 葛盛东(1963-)男, 副教授, 研究方向为大豆小分子肽开发与应用。E-mail: geshengd@126.com。

胰酶预处理脱脂大豆饼粕后,再用中性微生物蛋白酶做酶源,进行了大豆小分子多肽的实验室制备工艺和质量检测标准方面的工作。以确定在试验条件下粗胰酶,中性微生物蛋白酶的酶用量、pH 值、温度和酶解时间最佳条件。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆饼粕(蛋白质含量 55.55%),来自辽宁省昌图县;粗胰酶(11 555 U·g⁻¹):自制;中性蛋白酶(枯草杆菌蛋白酶 6.0 万 U·g⁻¹)购自北京奥博星生物工程公司。其它生物与化学试剂均为本地化学试剂公司生物纯和分析纯。

1.2 仪器

FSM-200-B 型多功能磨浆机(沈阳市友腾机械制造有限公司);恒温水浴锅(上海医疗器械厂);LD5—10 型低速大容量离心机(上海手术器械厂);722 分光光度计(上海精密科学仪器公司),日立 835—50 型氨基酸自动分析仪,HPLC 高效液相色谱仪(大连依立特色谱工作站),高效凝胶过滤色谱柱 TSK-Gel G2000SWXL(日本)。

1.3 方法

1.3.2 测定方法 豆饼总蛋白质含量测定^[5]:采用凯氏定氮法。

肽含量测定:采用 Folin-酚法^[6]。取 2.5 mL 样品溶液,加入 2.5 mL 10% (w/v) 的三氯乙酸(TCA)水溶液混合均匀,静置 10 min,然后在 3 000 r·min⁻¹下离心 15 min。将上清液全部转移到 50 mL 容量瓶中,并用 5% 的 TCA 定容至刻度,摇匀。加入 Folin 试剂混合均匀,静置 10 min,2 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液于 540 nm 下测定 OD 值。对照标准曲线求得样品溶液中的多肽浓度 C (mg·mL⁻¹),进而可求得样品中多肽含量。肽得率(%) = 上清液多肽含量/总蛋白质含量 × 100%。

1.3.3 试验方法 大豆饼粕乳制备:向大豆饼粕中加水,使其蛋白浓度控制在 5%,采用磨浆机磨浆。

粗胰酶乳制备条件的确定:用 4 mol·L⁻¹NaOH 将大豆饼粕浆,溶液调至最适 pH 值。分别加入定量的粗胰酶,恒温酶解。用 4.0 mol·L⁻¹NaOH 保持 pH 值恒定,结束后将酶解液迅速升温至 90℃ 中止反应,冷却至 50℃,3 000 r·min⁻¹离心 15 min 取上清测定肽得率。采用正交试验,对粗胰酶用量、pH

值、酶解温度与时间等条件进行筛选。
中性蛋白酶水解大豆粗胰酶乳的条件确定^[7]:大豆粗胰酶乳,用 4 mol·L⁻¹NaOH 溶液调至最适 pH 值,加入定量的中性蛋白酶,恒温酶解。用 4.0 mol·L⁻¹NaOH 保持 pH 值恒定。酶解结束后,将酶解液迅速升温至 90℃,保持 20 min,进行灭酶处理。然后迅速冷却至室温,3 000 r·min⁻¹离心 15 min,测上清液的肽得率。采用正交试验,对酶比例、pH 值、酶解温度和时间等条件进行试验筛选。

大豆小分子肽质量标准:

采用高效凝胶过滤色谱法 (HPGFC),测定产品中肽的分子量分布道尔顿区间,证明小分子肽。然后,采用测定氨基酸含量的方法来确定肽的含量,其检测原理是先测定样品中总氨基酸含量(根据 GB/T14965-1994),再测定样品中游离氨基酸的含量。将总氨基酸的含量减去样品中本身游离氨基酸含量除以总氨基酸即为样品中肽的含量。

大豆小分子肽含量(%) = 总氨基酸量 - 游离氨基酸量 / 总氨基酸量 × 100%

2 结果与分析

2.1 粗胰酶预酶解

为确定预酶解最佳酶解条件,以 5% 底物浓度,采用 L₉(3⁴) 正交表,进行试验设计,对粗胰酶用量、pH 值、温度和酶解时间等条件进行筛选,见表 1。

表1 粗胰酶水解试验因素表
Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments for crude complex trypsinase hydrolysis

水平 Level	因素 Factors			
	酶用量(A) Enzyme quantity/U·g ⁻¹	时间(B) Time/h	pH(C)	温度(D) Temperature/℃
1	7000	6	7.5	50
2	8000	7	8.0	55
3	9000	8	8.5	60

表 2 可知,试验 7 结果较好,即 A3B1C3D2 酶用量 9 000 U·g⁻¹,酶解时间 6 h, pH8.5, 酶解温度 55℃。同时由极差分析可知,影响酶促水解反应的主次因素依次为:C > D > A > B。

2.2 中性蛋白酶水解大豆粗胰酶乳试验

为确定中性蛋白酶水解大豆粗胰酶乳的酶解最佳条件,以 5% 大豆粗胰酶乳浓度,采用 L₉(3⁴) 正交

表2 粗胰酶水解正交试验与结果

Table 2 Results of orthogonal experiments for crude complex trypsinase hydrolysis

试验号 No.	因素 Factors				肽得率 Peptide yield/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	31.55
2	1	2	2	2	30.98
3	1	3	3	3	31.79
4	2	1	2	3	29.54
5	2	2	3	1	42.66
6	2	3	1	2	41.52
7	3	1	3	2	49.63
8	3	2	1	3	33.69
9	3	3	2	1	33.15
k ₁	94.32	110.72	106.76	107.36	
k ₂	113.72	107.33	93.67	122.13	
k ₃	116.47	106.46	124.08	95.02	
K1	31.44	36.90	35.59	35.79	
K2	37.90	35.77	31.22	40.71	
K3	38.82	35.48	41.36	31.67	
最佳水平 Optimum	A ₃	B ₁	C ₃	D ₂	
R	7.38	1.42	10.14	9.04	

表,进行试验设计,对粗胰酶用量、pH 值、温度和酶解时间等条件进行筛选。见表3。

表3 中性蛋白酶酶解因素水平

Table 3 Factors and levels of orthogonal experiments for neutral proteinase hydrolysis

水平 Level	因素 Factors			
	酶用量(A) Enzyme quantity/U·g ⁻¹	时间(B) Time/h	pH(C)	温度(D) Temperature/℃
1	5000	1.5	6.5	45
2	8500	2.0	7.0	50
3	10000	2.5	7.5	55

由表4可知,试验5结果较好,即A₂B₂C₃D₁酶用量8 500 U·g⁻¹,酶解时间2 h,pH7.5,酶解温度45℃。同时由极差分析可知,影响酶促水解反应的主次因素依次为:D>A>C>B,即酶解温度,酶用量,pH 值,酶解时间。

2.3 大豆小分子肽质量标准

确定3个指标作为大豆小分子肽质量标准。

2.3.1 分子量分布 采用HPLC(高效液相色谱)法测定产品中肽的分子量道尔顿区间分布作为定性指标。色谱条件如下:色谱柱:TSK- Gel G2000SWXL;流动相:三氟醋酸—乙腈—水(0.1:45:54.9);检测波长:210 nm;柱温:室温;流速0.9 mL·min⁻¹;检测灵敏度:0.006AUFS,进样20 μL。得到

3种组分(见图1)。

表4 中性蛋白酶水解正交试验与结果

Table 4 Results of orthogonal experiments for neutral proteinase hydrolysis

实验号 No.	因素 Factors				肽得率 Peptide yield/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	59.33
2	1	2	2	2	53.68
3	1	3	3	3	49.36
4	2	1	2	3	54.29
5	2	2	3	1	73.98
6	2	3	1	2	63.55
7	3	1	3	2	68.98
8	3	2	1	3	52.87
9	3	3	2	1	64.12
k ₁	162.37	182.60	175.75	197.43	
k ₂	191.82	180.53	172.09	186.21	
k ₃	185.97	177.03	192.32	156.52	
K ₁	54.12	60.87	58.58	65.81	
K ₂	63.94	60.18	57.36	62.07	
K ₃	61.99	59.01	64.11	52.17	
最佳水平 Optimum	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	
R	9.82	1.86	6.75	13.64	

2.3.2 氨基酸含量 采用实验室建立的通过日立835—50型氨基酸自动分析仪测定的方法:

大豆小分子多肽含量(%)=总氨基酸量-游离氨基酸量/总氨基酸量×100%

可以消除游离氨基酸含量的误差,生产的大豆小分子多肽纯度为93.33%。

2.3.3 功能检验 据动物的初步结果表明^[9],此工艺生产的大豆小分子肽具一定的抗疲劳与抗氧化功能。

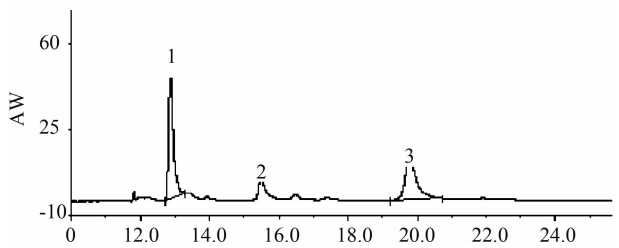


图1 大豆小分子多肽 HPLC 分析

Fig.1 HPLC(TSK-Gel G2000SWXL) chromatography of the soybean minor peptides

3 结论

通过单因素及正交试验,确定了粗胰酶预处理5%脱脂大豆饼粕与中性微生物蛋白酶解技术相结合

(下转第873页)

- modified by protein engineering[J]. Food Science and Biotechnology, 1999, 8 (3): 184-188.
- [43] 孙英. 转 *gala1* 基因大豆的培育及初步鉴定[D]. 南京农业大学, 2003: 33-43. (Sun Y. Transformation of soybean with gene *gala1* and primary characterization of transgenic plants[D]. Nanjing Agricultural University, 2003: 33-43.)
- [44] Bray E A, Naito S, Pan N S, et al. Expression of the β -subunit of β -conglycinin in seeds of transgenic plants[D]. Planta, 1987, 172 (3): 364-370.
- [45] Lawton M A, Tierney M A. Expression of a soybean β -conglycinin gene under the control of the Cauliflower Mosaic Virus 35S and 19S promoters in transformed petunia tissues[J]. Plant Molecular Biology, 1987, 9(3): 315-325.
- [46] Altenbach S B, Pearson K W, Meeker G, et al. Enhancement of the methionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding a methionine-rich protein in transgenic plants[J]. Plant Molecular Biology, 1989, 13(5): 513-522.
- [47] Clercq A D, Vandewiele M, Rycke R D. Expression and processing of an Arabidopsis 2S albumin in transgenic tobacco[J]. Molecular Journal of General Genetics, 1990, 221(3): 306-314.
- [48] Clercq A D, Vandewiele M, Damme J V, et al. Stable accumulation of modified 2S albumin seed storage proteins with higher methionine contents in transgenic plants[J]. Plant Physiology, 1990, 94 (3): 970-979.
- [49] Yagasaki K, Kaizuma N, Kitamura K. Inheritance of glycinin subunits and characterization of glycinin molecules lacking the subunits in soybean (*Glycine max* (L.) Merri.) [J]. Breeding Science, 1996, 46(1): 11-15.
- [50] Utsumi S. Improvement of nutritional value and functional properties of soybean proteins and protein engineering[J]. New Food Industry, 1990, 32 (5): 71-84.
- [51] Wright D J. The seed globulins part II. In "Developments in Food Proteins" [M]. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1998: 119-127.
- [52] Nakamura T, Utsumi S, Mori T. Effects of temperature on the different stages in thermal gelling of glycinin[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1985, 33 (6): 1201-1203.
- [53] Kato A, Yutani K. Correlation of surface properties with conformational stabilities of wild-type and six mutant tryptophan synthase α -subunit substituted at the same position[J]. Protein engineering, 1988, 2(2): 153-156.
- [54] 王大成. 蛋白质工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 94-105. (Wang D C. Protein engineering[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 94-105.)
- [55] 王培英, 许德春, 郭玉虹, 等. 人工诱变改良大豆品质的研究[J]. 核农学报, 2000, 14 (1): 21-23. (Wang P Y, Xu D C, Guo Y H, et al. Induced mutation for soybean quality[J]. Acta Agriculturae Nucleatae Sinica, 2000, 14 (1): 21-23.)

(上接第 865 页)

合制备大豆小分子多肽的工艺条件: 粗胰酶用量为 $9\ 000\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 水解温度 55°C , pH 值 8.5, 水解时间 6.0 h。中性微生物蛋白酶条件: 加酶量 $8\ 500\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$, pH 值 7.5, 温度 45°C , 时间为 2 h。此条件下, 多肽得率为 73.98%。同时还建立了大豆小分子活性多肽的质量检测标准。试验生产的大豆小分子多肽纯度为 93.33%, 平均分子量为 300 ~ 700D。

参考文献

- [1] Bernard F G, Alexandre Z, Robert M, et al. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food[J]. Food Research International, 2004, 37: 123-131.
- [2] 江志伟, 沈蓓英, 潘秋琴. 蛋白质加工技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 262-267. (Jiang Z W, Shen P Y, Pan Q Q. Manufacturing technology of proteins [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 262-267.)
- [3] 宋俊梅, 曲静然, 徐少萍. 大豆肽的研究进展[J]. 山东轻工业学院学报, 2002, 16(3): 1-3, 53. (Song J M, Qu J R, Xu S P. Advances in study on soy peptides [J]. Journal of Shandong Institute of Light Industry, 2002, 16(3): 1-3, 53.)
- [4] 赵小兰. 胰酶制备的工艺研究[J]. 青海医药杂志, 2000, 30(4): 56. (Zhao X L. Preparation technology of pancreatin [J]. Journal of Qinghai Medicine & Pharmacy, 2000, 30(4): 56.)
- [5] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1994: 142-147. (Zhao Y F. Application and principal biochemical technology [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 1994: 142-147.)
- [6] 天津轻工业学院等. 工业发酵分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 85-87. (Tianjin Institute of Light Industry et al. Industrial Fermentation Analysis [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 85-87.)
- [7] 李书国, 陈辉. 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. (Li S G, Chen H. Study on functions and technology of soy peptides [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods 2000, 8(1): 14-15.)
- [8] 郭红, 李茂辉, 高素杰, 等. 大豆小分子肽抗氧化效应的初步研究[J]. 中华医学研究杂志, 2007, 7(3): 196-198. (Guo H, Li M H, Gao S J. Preliminary study on anti-oxidative capability of soybean minor peptides [J]. Journal of Chinese Medicine Research, 2007, 7(3): 196-198.)