双酶法制备大豆降胆固醇活性肽的研究

王玲琴[1],王志耕[1],方玉明[2],赵伟华[1],陈美姣[1],马丽丽[1]

(1.安徽农业大学 茶与食品科技学院,安徽省乳品工程技术研究中心,安徽 合肥 230036;2.安徽康尔美油脂有限公司,安徽 六安 237200)

摘 要:通过比较4种酶对大豆分离蛋白的水解效果,并通过单因素及$L_9(3^4)$正交试验优化其水解工艺条件,研究其最佳水解工具酶及最佳酶解参数。结果表明:木瓜蛋白酶和植物蛋白酶联合应用可作为大豆分离蛋白的水解工具酶;其最佳酶解参数为:酶解温度55℃、初始pH7.0、底物浓度12%、酶添加量8%、植物蛋白酶与木瓜蛋白酶的质量之比为1:2,水解度可达14.20%;用双蛋白酶水解大豆分离蛋白,水解度为14.71%的产物降胆固醇活性最高,对胆固醇胶束溶解度的抑制率为61.67%。

关键词:大豆分离蛋白;水解度;多肽;降胆固醇

中图分类号:TS214.2 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9841(2010)01-0109-04

Preparation of Soybean Hypocholesterolemic Peptides by Double-protease Method

WANG Ling-qin[1], WANG Zhi-geng[1], FANG Yu-ming[2], ZHAO Wei-hua[1], CHEN Mei-jiao[1], MA Li-li[1]

(1. College of Tea and Food Science and Technology of Anhui Agricultural University, Anhui Engineering Technology Research Center, Hefei 230036; 2. Anhui Kangermei Margarine Limited Company, Liu'an 237200, Anhui, China)

Abstract: Plant protease and papain were regarded as the compound enzyme of soy protein isolate (SPI) in comparison with hydrolysis effects of four kinds of protease. The premium working conditions for enzymolysis were determined by means of single factor and $L_9(3^4)$ orthogonal experiments. The optimal enzymic hydrolysis parameters were as followes: hydrolysis temperature55℃, initial pH 7.0, substrate concentration 12%, proteinase quantity 8%, the mass ratio of plant protease to papain 1:2. Under the optimized conditions, the hydrolysis rate reached 14.2%. The hypocholesterolemic activity of the hydrolysate of SPI with 8.27 % ~16.57 % DH prepared by two protease was studied. The results indicated that the sample prepared by hydrolyzing SPI with two protease at DH = 14.71% shown highest hypocholesterolemic activity among all the samples, the inhibitory ratio of micellar solubility of cholesterol was 61.67% .

Key words: Soy protein isolate; Degree of hydrolysis; Peptides; Hypocholesterolemic activity

大豆多肽是大豆蛋白经过酶解、分离、脱盐、超滤、浓缩喷雾干燥等工艺精制而得的多肽混合物,主要以3~6个氨基酸组成的小分子肽为主,还含有少量大分子肽、游离氨基酸等成分[1]。大豆多肽无论从理化特性、营养特性都显著优于传统大豆蛋白,它的肽含量为80%,其氨基酸组成与大豆蛋白质相同,必需氨基酸平衡良好,且含量丰富,具有低过敏的特点,且由于其分子量小,可被人体直接吸收;另外,多肽还具有降胆固醇、降血压、抗氧化、能使人迅速恢复体力并提高耐力等保健功能,是一种非常有前途的功能性食品原料,在食品工业和医药界具有十分广泛的用途 ,市场潜力巨大[2-5]。

近年来关于大豆抗氧化肽以及血管紧张素转化酶抑制活性肽的研究较多,而大豆降胆固醇肽的相关研究报道较少。目前,大豆多肽的制备常选择单酶水解,这种方法虽然简单易行,但存在水解液苦味较重、水解度不高等问题。有文献报道多酶复合水解的水解度(DH)要显著高于单酶水解[6]。因此,该研究选择了包括内切酶和由内切蛋白酶和端肽酶所组成的植物蛋白水解复合酶等4种酶对大豆分离蛋白进行酶解,并最终确定2种蛋白酶作为水解大豆分离蛋白的工具酶,旨在提高水解度。同时探讨了双酶复合酶解大豆分离蛋白的工艺条件,并初步研究了双酶解大豆分离蛋白产物的降胆固醇活性。

收稿日期:2009-10-08

第一作者简介:王玲琴(1984-),女,在读硕士,现主要从事食品营养与卫生的相关研究。E-mail:dsy0818@yahoo.cn。

通讯作者:王志耕,教授。E-mail:wzhg56@yahoo.cn。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆分离蛋白 WDF-950F:山东万德福实业有限公司;中性蛋白酶(>60 000 U·g^{-1}):美国 Solarbio 公司;碱性蛋白酶(20 000 U·g^{-1}):南宁庞博生物工程有限公司;木瓜蛋白酶(>3 500 U·mg^{-1}):生工生物工程(上海)有限公司;植物蛋白酶(200 000 U·g^{-1}):南宁庞博生物工程有限公司;牛磺胆酸钠:美国 Kayon 公司;胆固醇:BIO BASICINC 公司;总胆固醇试剂盒、甘油三酯试剂盒、密度脂蛋白胆固醇试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇试剂盒:长春汇力生物技术有限公司。

1.2 主要仪器

BS224 S 电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;PHS-3B 精密 pH 计,上海精密科学仪器有限公司雷磁仪厂;DT51-1 低速平衡台式离心机,北京时代北利离心机有限公司;FD-1CE 冷冻干燥机,北京德天佑科技发展有限公司;TG16-W 微量高速离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;Optima MAX Ultracentrifuge, BECKMAN COULTER。

1.3 试验方法

1.3.1 水解体系调配 按一定的底物浓度准确称取大豆分离蛋白于烧杯中,加入适量蒸馏水搅拌均匀,然后在 90℃下热处理 15 min(有研究显示,经过预处理的蛋白比未处理的蛋白水解度高 7% ~ 8%[7]),冷却到酶反应温度后,用 0.5 mol·L^{-1}的 NaOH 溶液调至酶反应所需 pH 值,加入酶进行水解。反应一段时间后,将酶解液迅速水浴加热至 100℃,保持 5 min 灭酶,冷却。

1.3.2 大豆多肽的制备 大豆分离蛋白水解液 4 000 r·min^{-1}离心 10 min 取上清液,即得到黄褐色的大豆活性肽溶液。将其进行冷冻干燥,得到淡黄色的大豆肽粉末。

1.3.3 测定方法 游离氨基氮测定用甲醛滴定法[8];总氮测定用凯氏定氮法。

$$水解度(DH)=\frac{新增游离氨基\ N(甲醛滴定)}{参加反应总\ N(凯氏定氮)}\times 100\%$$

1.3.4 胆固醇胶束溶解度抑制率的测定 模拟胆汁胶束溶液用 10 mmol·L^{-1}牛磺胆酸钠,2 mmol·L^{-1}胆固醇,5 mmol·L^{-1}油酸,132 mmol·L^{-1} NaCl,50 mg·mL^{-1}大豆活性肽粉末,经高速分散乳化制得。将胶束置于 37℃培养 24 h,离心(40 000 r·min^{-1},60 min,20℃)后取上清液测定胆固醇含量,上清液中的胆固醇浓度即为胆固醇胶束溶解度(mmol·L^{-1})。以不加大豆活性肽的胶束溶液为空白,按下式计算大豆活性肽对胆固醇在模拟胆汁胶束溶液中的溶解度的抑制率[9]:

$$抑制率(\%)=\frac{空白溶液的胆固醇溶解度-样品溶液的胆固醇溶解度}{空白溶液的胆固醇溶解度}\times 100\%$$

1.3.5 试验步骤 依据水解度确定 2 种蛋白酶(按 1:1比例复合)为工具酶。以水解度为指标,探讨复合工具酶水解大豆分离蛋白时适宜的底物浓度、酶与底物浓度比,然后进行正交试验优化复配酶对大豆分离蛋白的水解条件。最佳酶解条件下水解大豆分离蛋白,每隔 1 h 取样,取 7 次样,测定其不同的水解度下降胆固醇的活性。正交试验因素水平表参见表 1。

表 1 正交试验因素水平

Table 1 The level of Orthogonal factors

水平 Level	A 温度 Temperature /℃	B 初始 pH Initial pH	C 植物酶:木瓜酶 Plant protease: Papain	D 酶添加量 Enzyme concentration/%
1	45	7.0	1:2	6
2	50	7.5	1:1	7
3	55	8.0	2:1	8

2 结果与分析

2.1 双酶的筛选

根据预试验结果,得出 4 种蛋白酶的最适酶解温度、pH 值。在此条件上,其它酶解条件相同(酶添加量 5%,底物浓度 12%,水解时间 3 h)时 4 种蛋白酶水解度结果参见表 2。

表 2 4 种蛋白酶的水解效果

Table 2 Hydrolysis effects of four kinds of protease

酶 Enzyme	pH	温度 Temperature/℃	水解度 DH/%
植物蛋白酶 Plant protease	7.0	50	10.53
碱性蛋白酶 Alkaline protease	8.0	50	7.04
中性蛋白酶 Neutral proteinase enzymiatic	7.0	50	9.10
木瓜蛋白酶 Papain	7.0	55	11.16

由表 2 可知植物蛋白酶和木瓜蛋白酶对大豆分离蛋白的水解能力比较强。因此,选用植物蛋白酶和木瓜蛋白酶配合使用作为水解大豆分离蛋白的工具酶。

2.2　双酶适宜的底物浓度

底物浓度为 6%、8%、10%、12%、14% 时,在温度 50℃、pH 7.0、酶与底物浓度比 5%、水解 180 min 条件下,双酶水解大豆分离蛋白的水解度见图 1。

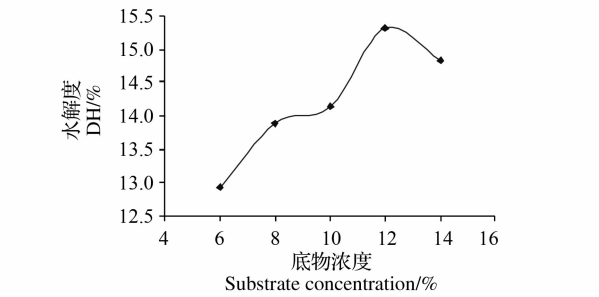

图 1　底物浓度与大豆分离蛋白水解度关系

Fig. 1　Relationship between the DH of soy protein isolate and substrate concentration

由图 1 可知,底物浓度小于 12% 时,水解度随着底物浓度的增大而增大。底物浓度达 12% 以后,水解度迅速下降。其原因可能是在试验所选定的蛋白浓度范围内,体系中复合酶的底物肽键始终处于过饱和态,增大大豆分离蛋白浓度时,水解体系中游离的氨基氮并没增加,而总氮量却增加,所以导致水解度降低。为此,根据图 1,确定复合酶水解大豆分离蛋白最适浓度为 12%。

2.2.2　双酶解适宜的酶与底物浓度比

酶与底物浓度比为 3%、4%、5%、6%、7%、8% 时,在温度 55℃、pH 值 7.0、底物浓度 12%、水解 180 min 条件下,双酶水解大豆分离蛋白的水解度参见图 2。

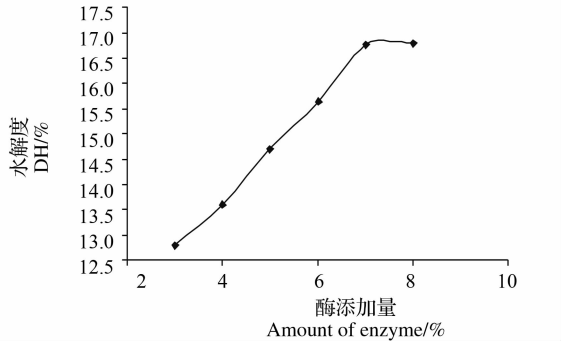

图 2　大豆分离蛋白水解度与酶添加量关系

Fig. 2　Relationship between the DH of soy protein isolate and the amount of enzyme added

由图 2 可以看出,增加酶量可以显著提高大豆分离蛋白的水解度,但当酶量达到 7% 以上时,大豆分离蛋白水解度曲线趋于平缓,为此确定适宜加酶量为 7%。

2.3　酶解条件的优化

根据单因素试验的结果,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,以确定植物蛋白酶与木瓜蛋白酶复配水解大豆分离蛋白的最佳工艺参数组合。结果见表 3。

表 3　正交试验结果

Table 3　Results of orthogonal experimental

序号 Number	A 温度 Temperature /℃	B 初始 pH Initial pH	C 植物酶:木瓜酶 Plant protease: Papain	D 加酶量 Enzyme concentration /%	水解度 DH/%
1	45	7.0	1:1	6	12.34
2	45	7.5	1:1	7	11.50
3	45	8.0	2:1	8	10.32
4	50	7.0	1:1	8	13.70
5	50	7.5	2:1	6	10.48
6	50	8.0	1:2	7	11.67
7	55	7.0	2:1	7	12.51
8	55	7.5	1:2	8	14.20
9	55	8.0	1:1	6	11.67
k1	11.387	12.850	12.737	11.497	
k2	11.950	12.060	12.290	11.893	
k3	12.793	11.220	11.103	12.740	
R	1.406	1.630	1.634	1.243	

由表 3 中极差分析结果看出,影响大豆分离蛋白水解度的因素主次关系为 C > B > A > D,最佳条件参数组合为 $A_3B_1C_1D_3$,即温度 55℃、初始 pH7.0、植物蛋白酶与木瓜酶质量比 1:2、加酶量 8%。

2.4　大豆多肽的降胆固醇活性

采用体外模拟人体肠道环境的方法测定大豆多肽的降胆固醇活性。将 7 个不同水解度下的大豆活性肽分别添加到模拟胆汁胶束溶液中,通过高速分散乳化、超速离心的手段制备出 1 种人造胆汁胶束溶液,来考察大豆活性肽对胆固醇胶束溶解度的影响,结果见图 3。

从图 3 可以看出,各个水解度的产品对胆固醇的溶解度都有一定的抑制作用,且随着水解度的增加而增加,当水解度达 14.71% 时抑制率达到最强(61.67%),水解度继续增大抑制率反而有所下降,这与刘建敏等的报道相似[10],证明抑制率和大豆多肽的相对分子质量大小呈非线性关系。

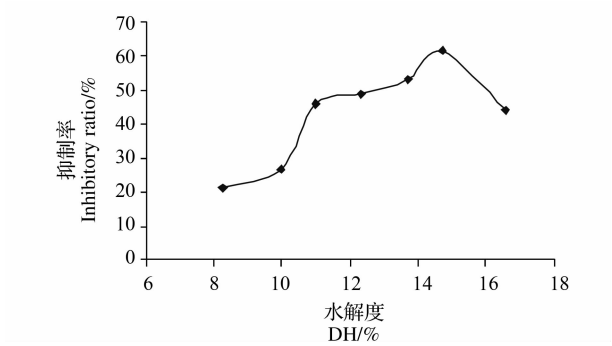

图 3 复合蛋白酶不同水解度产物对胆固醇胶束溶解度的抑制率

Fig. 3 Inhibitory ratio of micellar solubility of Cholesterol in different DH of protamex hydrolysis

3 结论与讨论

以植物蛋白酶和木瓜蛋白酶复配作为水解大豆分离蛋白的工具酶,正交优化后的双酶解最佳酶解条件为:酶解温度 55℃,酶解初始 pH 值 7.0,植物蛋白酶和木瓜蛋白酶的质量比1∶2,加酶量 8%;最佳酶解条件下植物蛋白酶和木瓜蛋白酶双酶水解大豆分离蛋白,水解度为 14.71% 的产物降胆固醇活性最高,对胆固醇胶束溶解度的抑制率可达到 61.67%。

该文虽然没有涉及到水解液苦味的研究,但是选择双酶水解的主要目的就是在显著提高水解度的同时降低水解液的苦味,这在吴建中等[11-12]的研究中有所论述。关于大豆多肽降胆固醇活性的测定,有报道采取通过测定 HMG-CoA 还原酶的活性来确定水解物的胆固醇抑制活性[13],但该方法的不足之处是 HMG-CoA 还原酶一般都是从动物体的肝脏中提取的,可能存在酶活丧失的问题从而使得测定结果不够准确。采取制备模拟胆汁胶束的方法来测定大豆多肽的降胆固醇活性,通过测定胶束中胆固醇的浓度得到大豆多肽对胆固醇在模拟胶束溶液中溶解度的抑制率即大豆多肽的降胆固醇活性,这种方法操作简便,同时在体外模拟人体的肠道环境来考察大豆多肽抑制胆固醇吸收的作用,结果比较可靠。尽管如此,在研究中也发现了一些问题,例如在高速分散制备模拟胶束时,各组样品之间的乳化程度有差异或者是乳化不够充分,这都会影响上机测量数据的精确性,需进行更加深入的研究,以期得到更好的结果。

参考文献

[1] 袁崇文. 中国天麻[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2002. (Yuan C W. China Tianma[M]. Guiyang:Guizhou Science and Technology Press,2002.)

[2] Pena Ramos E A,Xiong Y L. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system[J]. Journal of Food Science,2002,67(8):2952-2956.

[3] 豆康宁,董彬,王银满. 大豆蛋白活性肽的生物功能与应用前景[J]. 粮食加工,2007,32(2):52-54. (Dou K N,Dong B,Wang Y M. The biological function and application prospects of soy protein peptides[J]. Grain Processing,2007,32(2):52-54.)

[4] 曹玉华,杨慧萍,王肇慈. 应用双固定化酶制备大豆肽的研究[J]. 中国粮油学报,2003(5):40-43. (Cao Y H,Yang H P,Wang Z C. Producing soy peptides with pairs of immobilized enzyme[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,2003(5):40-43.)

[5] Cesar Mateo,JoseM Palomo,Gloria Fernandez-Lorente. Improvement of enzyme activity,stability and selectivity via immobilization techniques[J]. Enzyme and Microbial Technology,2007,40:1451-1463.

[6] 雷鸣,李志忠. 大豆多肽制备中蛋白酶的选择[J]. 甘肃农业大学学报,2006,41(4):122-126. (Lei M,Li Z Z. Selection of protease in the enzymatic hydrolysis for soybean peptide producing[J]. Journal of Gansu Agricultural University,2006,41(4):122-126.)

[7] 胡春林,潘月平. 大豆蛋白质酶解前处理方法的研究[J]. 食品与药品,2007(3):27-28. (Hu C L,Pang Y P. The enzyme pretreatment methods of soybean protein[J]. Food and Drug,2007(3):27-28.)

[8] 吴谋成. 食品分析与感官评价[M]. 北京:中国农业出版社,2002:77-78. (Wu M C. Food Analysis and sensory evaluation[M]. Beijing:China Agriculture Press,2002:77-78.)

[9] Nagaoka S,Futamura Y,Miwa K,et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β-Lactoglobulin[J]. Biochimical and Biophysical Research Communications,2001,281:11-17.

[10] 刘健敏,钟芳,麻建国. 大豆蛋白酶解产物降胆固醇活性的初步研究[J]. 河南工业大学报(自然科学版),2005,26(3):41-44. (Liu J M,Zhong F,Ma J G. The hypocholesterolemic activity of the hydrolysate of soybean protein[J]. Journal of Henan University of Technology(Natural Science Edition),2005,26(3):41-44.)

[11] 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):24-27. (Wu J Z,Zhao M M,Ning Z X,et al. Study on producing non-bitter soy peptides with dual-enzymatic[J]. Science and Technology of Food Industry,2003,24(4):24-27.)

[12] 朱海峰,班玉凤,周克仲. 大豆蛋白水解液脱苦的研究[J]. 广州食品工业科技,2004,20(1):32-35. (Zhu H F,Ban Y F,Zhou K Z. Studies on debitter of soybean protein hydrolyzate[J]. Guangzhou Food Science and Technology,2004,20(1):32-35.)

[13] Dansette P M,Jaouen M,Pons C. HMG-CoA reductase activity in human liver microsomes:compared vastatins inhibitions[J]. Toxicology Letters,1998,95(Supp1.1):118-122.