

大豆分离蛋白生产降血压肽酶解技术研究

胡少新¹, 江连洲², 许德春¹, 赵晓南¹, 付立新¹, 孟丽芬¹, 潘媛媛³

(1. 黑龙江省农业科学院 玉米研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学 食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 选用6种蛋白酶水解大豆分离蛋白, 根据ACE抑制率高低, 最终选择胰蛋白酶为最佳蛋白酶。通过单因素试验和 $L_{16}(4^5)$ 正交试验研究底物浓度、水解时间、酶与底物比、温度和pH值对酶解液降血压活性的影响, 确定了水解最优条件组合。结果表明: 底物浓度5%, 水解时间6 h, 酶和底物比为0.08, 温度为50℃, pH值为8.0时, 所得水解液ACE抑制率最高, 为76.8%。

关键词: 大豆分离蛋白; ACE抑制肽; 酶解; ACE抑制率

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)04-0643-05

Producing Technology of Antihypertensive Peptide Derived from Soybean Protein Isolated by Enzymatic Method

HU Shao-xin¹, JIANG Lian-zhou², XU De-chun¹, ZHAO Xiao-nan¹, FU Li-xin¹, MENG Li-fen¹, PAN Yuan-yuan²

(1. Maize Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086; 2. Food Science College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 3. Life Science College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: Trypsinase was selected from six proteinases according to the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory rate. Single factor experiments and orthogonal design $L_{16}(4^5)$ were adopted to investigate the effect of substrate concentration, hydrolysis time, E/S, temperature and pH value on ACE inhibitory activity of the product. The optimum trypsinase hydrolysis process for producing ACE inhibitory peptides was under 50℃, with pH 8.0, 5% substrate concentration, 0.08 E/S for 6 hours. After optimization, the ACE inhibitory activity reached 76.8%.

Key words: Soybean protein isolate; ACE inhibitory peptide; Enzymolysis; ACE inhibitory value

血管紧张素转换酶 (Angiotensin converting enzyme, ACE, EC3.4.15.1) 在人体血压调节过程中起重要作用。它催化血管紧张素 I 从 C-端裂解二肽形成血管紧张素 II (肾素-血管紧张素系统中已知最强的血管收缩剂), 同时, 它能钝化血管舒张剂-舒缓激肽, 抑制 ACE 的活性, 可使血管紧张素 II 的生成和激肽的破坏均减少, 从而达到治疗高血压的目的^[1]。自从 1965 年 Ferreira 首次从巴西蝮蛇蛇毒中分离出 ACE 抑制肽以来, 人们又从牛乳酪蛋白、沙丁鱼肉、酸奶、大蒜、大豆等食品蛋白质中发现 ACE 抑制肽^[2]。

大豆是一种优质的高蛋白作物, 含蛋白质 40%~45%, 可制成各种富有营养的食品。一般动物蛋

白质的消化率为 90%~98%, 而植物蛋白质的消化率为 73%, 但如果经过精深加工可提高到 90% 以上^[3]。大豆分离蛋白水解前需进行加热预处理, 由于大豆蛋白高度结构化, 多肽链紧密折叠在一起, 其二级结构中有 α -螺旋、反平行结构和 β -转角等, 疏水性氨基酸在其内部形成疏水区域, 外面被亲水外壳包裹, 形成坚实的球形结构, 这种牢固的结构难以被蛋白酶水解, 对大豆蛋白进行适当的加热变性处理, 可使大豆蛋白部分变性, 各亚基间分开, 那些原来包藏在分子内部, 不易与酶作用的部位由于分子结构的松散而暴露出来, 从而增加酶的作用位点^[4]。

酶解反应的反应条件温和, 并具有较高的底物

收稿日期: 2011-05-18

基金项目: 农业部大豆产业技术体系资助项目 (nycytx-004)。

第一作者简介: 胡少新 (1983-), 男, 研究实习员, 从事食品加工研究。E-mail: xinxin_future@126.com。

通讯作者: 江连洲 (1960-), 男, 教授, 从事大豆加工及食品科学方面研究。E-mail: jlzname@163.com。

及反应特异性,产物不产生消旋作用,而且不发生副反应^[5]。酶法水解大豆分离蛋白制备降血压肽是目前制备 ACE 抑制肽的一个主要途径,这种方法制备的 ACE 抑制肽比化工合成药物的具有更高的安全性。研究证明酶解制备的 ACE 抑制肽是一种竞争性抑制肽,并没有固定的结构,而是一些特殊短肽具有竞争性抑制作用,达到了降血压的功效。该研究使用 6 种常见的商业化蛋白酶制备 ACE 抑制肽,并使用正交分析寻求最优水解条件组合,得到较高 ACE 抑制率的水解肽。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白(SPI):哈高科大豆食品有限责任公司;ACE 和马尿酸-组胺酰-亮氨酸(HHL):Sigma 公司产品;碱性内切蛋白酶、中性蛋白酶:丹麦 novo 公司;胃蛋白酶、胰蛋白酶:中国惠世生化有限公司;木瓜蛋白酶:无锡杰能科生物工程有限公司;其它化学试剂为国产分析纯。

1.2 主要仪器与设备

精密电动搅拌机:江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;pHS-25 型酸度计:上海伟业仪器厂;电子分析天平:梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;离心机:北京医用离心机厂;漩涡混合器:姜堰市新康医疗器械有限公司;电热恒温水浴锅:余姚市东方电工仪器厂;722-型分光光度计:上海精密科学仪器有限公司;UV-2401PC 紫外可见分光光度计:上海瑞丽分析仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 水解度(DH)的测定 采用 pH-stat 法^[6],当蛋白质的酶解条件在 pH 7.0 以上进行时,释放的氨基酸使溶液 pH 值明显下降,用稀碱液将其滴定回起始 pH 值,可根据消耗碱量计算水解度。

1.3.2 酶解工艺流程 将一定浓度的大豆蛋白溶液在 90℃ 加热预处理 15 min,而后用 1 mol · L⁻¹ NaOH 或 1 mol · L⁻¹ HCl 溶液调节 pH 值至酶水解的适宜条件,依据酶底物的用量比,取蛋白酶加入水解反应容器中,使其在搅拌下水解大豆蛋白,反应过程中使温度始终保持在酶解的最适温度,反应

到预定时间,100℃ 水浴 10 min,钝化蛋白酶,终止酶解反应。将酶解液 4 000 r · min⁻¹ 离心 20 min,离心分离后去除沉淀,取上清液,按照 pH-stat 法计算水解度 DH,并测定上清液的 ACE 抑制活性。

1.3.3 ACE 抑制活性的测定 三肽马尿酸-组胺酰-亮氨酸(HHL)在 ACE 的催化下可快速分解产生马尿酸和二肽 His-Leu,当加入 ACE 抑制肽样品时,ACE 的活性受到抑制,马尿酸和二肽的生成量也会减少,因此可以通过测定马尿酸的生成量来评价 ACE 抑制肽对 ACE 活性的抑制。

酶活单位定义:1 单位酶活定义为在 37℃、1 min 内催化 HHL 形成 1 μmol 马尿酸的酶量。

ACE 溶液的配制:将 1 U 的 ACE 溶于 10 mL 0.1 mol · L⁻¹ 的硼酸缓冲液(pH 8.3,含 0.3 mol · L⁻¹ NaCl)制得,不用时低温保存。

HHL 溶液的配制:取适量 HHL,以 0.1 mol · L⁻¹ 的硼酸缓冲液(pH 8.3,含 0.3 mol · L⁻¹ NaCl)溶解配成 6.5 mmol · L⁻¹ HHL 溶液,不用时低温保存。

测定方法:取 1.3.2 中制备的上清液适量样重新溶于一定量的磷酸缓冲液中,依 Richard L 方法测定:试验在小试管中进行,每次测试的总体积为 0.35 mL:含 100 mmol · L⁻¹ pH 8.3 磷酸缓冲液,300 mmol · L⁻¹ NaCl,5 mmol · L⁻¹ HHL,在 37℃ 恒温水浴 5 min,然后加入适量的酶液(0.15 mL)启动反应,恒温保持 40 min 后,加入 0.25 mL 1 mol · L⁻¹ HCl 中止反应。再加入 1.5 mL 乙酸乙酯,用力混合 15 s,离心 15 min 后取出 1.0 mL 酯层转入另一试管中,在 100℃ 的烘箱中经 60 min 蒸干,再将它重新溶于 1.0 mL 的去离子水中,在 228 nm 处测定。

2 结果与分析

2.1 最佳水解蛋白酶的选择

选用木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶 6 种酶水解大豆分离蛋白,根据前期基础试验,采用各种酶的较优水解条件与大豆分离蛋白作用,测定各种蛋白酶水解液的 ACE 抑制率。从图 1 可以看出,胰蛋白酶水解大豆分离蛋白所得的水解液 ACE 抑制率最高,并且它是动物蛋白酶,水解得到分子量小的肽更有利于

人体吸收和利用,因此,采用胰蛋白酶为研究对象,获得胰蛋白酶水解大豆分离蛋白制备降血压肽的最佳工艺条件。

2.2 胰蛋白酶水解大豆分离蛋白条件优化

2.2.1 最适水解时间的确定 在水解反应的最初

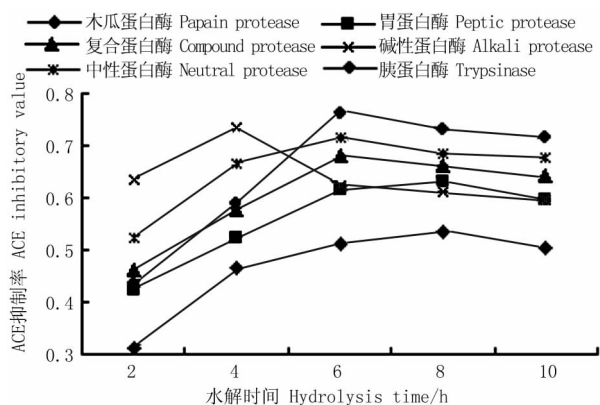


图1 不同蛋白酶水解大豆分离蛋白的 ACE 抑制率

Fig.1 ACE inhibitory value of SPI hydrolysed by six proteinases

阶段,蛋白质分子中可断裂的肽键很多,比较敏感的肽键快速断裂开,水解速度非常快,但随着水解的进行可供蛋白酶水解的肽键数目不断减少,水解的速度不断减慢,一段时间过后,体系中的酶活力下降或者丧失,或由于多个底物与酶结合会导致产物的竞争性抑制作用,到反应后期 ACE 抑制率基本不再升高^[7]。在底物浓度 5%, E/S 为 6%, 温度为 50℃, pH 为 8.0 条件下,测定水解时间对 ACE 抑制率的影响。

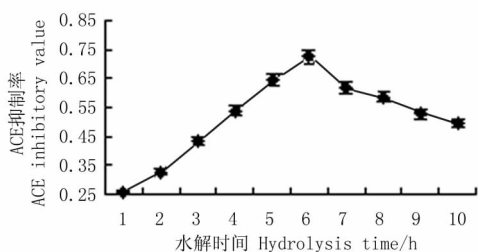


图2 水解时间对 ACE 抑制率的影响

Fig.2 Effect of time on ACE inhibitory value

从图2可以看出,在反应初始阶段,蛋白迅速水解,ACE 抑制率不断迅速升高,当水解到 6 h 时,水解度达到最大,因此该研究确定最佳的水解时间为 6 h。

2.2.2 最适底物浓度的确定 蛋白酶在水溶液中水解 SPI,底物浓度即大豆蛋白质量与水的体积比。

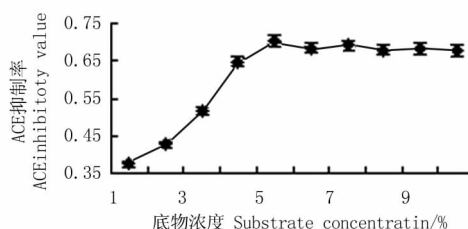


图3 底物浓度对 ACE 抑制率的影响

Fig.3 Effect of substrate concentration on hydrolysis

从图3可知,随底物浓度的增大 ACE 抑制率不断增大,当底物浓度达到 5% 时,ACE 抑制率达到最大值,再增加浓度,ACE 抑制率有下降趋势。这是由于底物浓度增大,在不断受热的情况下,大豆蛋白分子易产生交联聚合现象。使蛋白酶分子与底物蛋白分子之间的接触机会减少,且溶解性差,黏度增大,导致水解度下降,ACE 抑制率也会下降。因此单因素试验确定底物浓度为 5.0%。

2.2.3 最适酶与底物比的确定 酶的用量对大豆分离蛋白的水解有着重要作用,它的添加量对水解液的 ACE 抑制率有着很大的影响。图4是酶与底物比对 ACE 抑制率的影响。

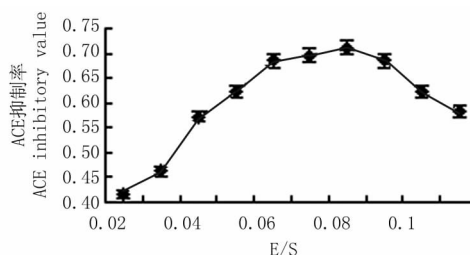


图4 酶与底物比对 ACE 抑制率的影响

Fig.4 Effect of ration of enzyme and substrate on hydrolysis

从图4酶用量对水解效果的影响可看出,ACE 抑制率先随酶的添加量增加而增加,当酶与底物比达到 0.08 时,ACE 抑制率达到最大值,然后逐渐下降。底物的转化率取决于酶的浓度,酶分子越多,与蛋白质分子肽链的接触机率越多,则底物转化为产物可溶性肽也就相应地增加。但当酶的添加量比较高时,底物的相对浓度较小,已经被酶饱和,有一部分酶分子将不能与大豆分离蛋白质分子结合,导致酶的浪费。因此单因素试验确定酶与底物比为 0.08。

2.2.4 最适温度的确定 温度对酶促反应速度的

影响主要从两方面考虑。一方面是当温度升高时,反应速度加快,这与一般的化学反应相同。另一方面,随温度升高而酶逐渐变性,其催化的反应速度下降^[8]。酶催化反应的最适温度就是这 2 种过程平衡的结果,低于最适温度时,前一种效应为主,高于最适温度时,则后一种效应为主。

由图 5 可以看出,酶水解的最适温度为 50℃。超过 65℃ 酶的活性迅速下降,这是因为水解温度超过酶的允许温度范围造成酶的变性失活,导致水解度下降。图 5 说明在 50℃ 时酶解反应速度和酶失活速度达到平衡,得到最大的 ACE 抑制率,所以单因素试验确定的最佳温度为 50℃。

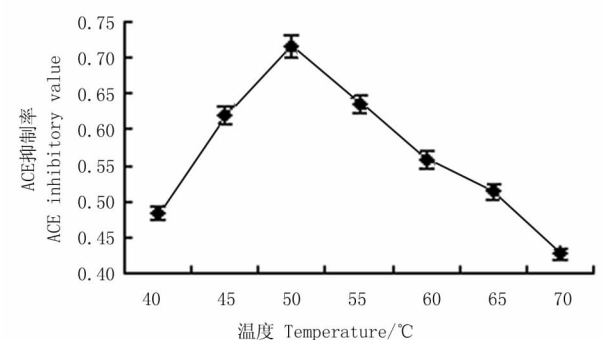


图 5 温度对 ACE 抑制率的影响

Fig. 5 Effect of temperature on ACE inhibitory value

2.2.5 最佳 pH 的确定 溶液 pH 值是决定酶催化活性的重要参数之一。pH 对酶促反应影响主要有两方面,首先过酸过碱可使酶空间构象改变,使酶失活。根据过酸过碱的程度不同,酶可遭受可逆或不可逆失活。其次 pH 还可改变底物的解离状态,影响它与酶的结合。从图 6 可以看出:ACE 抑制率都是先随 pH 值的增大而增大,当 pH 达到 8.0 时,ACE 抑制率达到最大值,而后随着 pH 的继续增加,ACE 抑制率反而降低。单因素试验确定的胰蛋白酶水解大豆分离蛋白的最适 pH 值为 8.0。

2.2.6 胰蛋白酶正交试验 考虑到各水解因素间可能存在着交互作用,所以在单因素试验的基础上,利用正交设计试验,以 ACE 抑制率为指标优化水解工艺参数。

根据文献和单因素试验,采用五因素四水平正交设计(表 1),进一步讨论水解时间、底物浓度、pH 值、温度和酶与底物比的最佳组合。用 pH-stat 法以

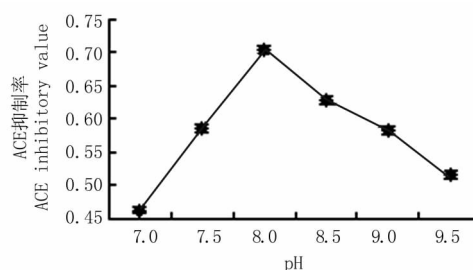


图 6 pH 对 ACE 抑制率的影响

Fig. 6 Effect of pH on ACE inhibitory value

ACE 抑制率作为水解效果评价指标。

表 1 胰蛋白酶水解大豆分离蛋白最佳条件试验

Table 1 SPI in optimal hydrolysis conditions of using trypsinase

水平	因素 Factor				
	A	B	C	D	E
Level	底物浓度 Substrate concentration/%	酶与底物比 E/S	反应时间 Time/h	反应温度 Temperature/°C	pH 值 pH value
1	3	0.04	4	45	7.5
2	4	0.06	6	50	8.0
3	5	0.08	8	55	8.5
4	6	0.10	10	60	9.0

从表 2 极差分析看出:胰蛋白酶水解 SPI 各因素对水解程度的影响顺序依次为:反应底物浓度 > 反应时间 > 温度 > 反应 pH > 反应酶与底物比。胰蛋白酶水解大豆分离蛋白制备 ACE 抑制肽的反应条件最佳组合为 A₂B₃C₃D₂E₂,由以上分析得出胰蛋白酶水解 SPI 的最佳条件是:温度 50℃,pH 8.0,水解时间 6 h,底物浓度 6%,酶与底物比为 0.08。按最佳反应条件最佳优化结果得到大豆蛋白酶解液的 ACE 抑制率为 76.8%。

3 结 论

根据 ACE 抑制率和所使用酶的经济价值确定了采用胰蛋白酶水解大豆分离蛋白制备 ACE 抑制肽。通过对温度、pH 值、水解时间、底物浓度和酶与底物的比作为单因素条件,并进行单因素试验,确定了胰蛋白酶水解大豆分离蛋白的水解条件为:温度 50℃,pH 8.0,水解时间 6 h,底物浓度 6%,酶与底物比为 0.08。并按最佳反应条件最佳优化结果得到大豆蛋白酶解液的 ACE 抑制率为 76.8%。

表 2 碱性蛋白酶水解大豆分离蛋白正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal design by using trypsinase to hydrolyze SPI

因素	水解时间	底物浓度	E/S	温度	pH	ACE 抑制率
Factor	Time/h	Substrate concentration/%		Temperature/℃	pH value	ACE inhibitory rate
1	4	3	0.04	45	7.5	0.624
2	4	4	0.06	50	8.0	0.756
3	4	5	0.08	55	8.5	0.724
4	4	6	0.10	60	9.0	0.656
5	6	3	0.06	55	9.0	0.647
6	6	4	0.04	60	8.5	0.682
7	6	5	0.10	45	8.0	0.723
8	6	6	0.08	50	7.5	0.745
9	8	3	0.08	60	8.0	0.671
10	8	4	0.10	55	7.5	0.641
11	8	5	0.04	50	9.0	0.721
12	8	6	0.06	45	8.5	0.672
13	10	3	0.10	50	8.5	0.635
14	10	4	0.08	45	9.0	0.621
15	10	5	0.06	60	7.5	0.658
16	10	6	0.04	55	8.0	0.667
K ₁	0.690	0.644	0.673	0.660	0.667	
K ₂	0.699	0.675	0.683	0.714	0.704	
K ₃	0.676	0.707	0.690	0.670	0.678	
K ₄	0.645	0.685	0.664	0.667	0.661	
R	0.054	0.063	0.026	0.054	0.043	
最优组合 Optimal combination	A ₂	B ₃	C ₃	D ₂	E ₂	
影响次序 Affect order	B > A > D > E > C					

参考文献

[1] Soffer R L. Angiotensin converting enzyme and there gulation of va-soactive peptides [J]. Annual Review Biochemistry, 1976, 45: 73-94.

[2] Yamamoto N. Antihypertensive peptides derived from food proteins [J]. Peptide Science. 1997, 43 (2) : 129-134.

[3] 刘宇峰,陈琪. 大豆蛋白水解多肽系列制品的研制[J]. 大豆通报, 2005 (5) : 19-20. (Liu Y F, Chen Q. Research of hydrolyzed soy protein peptides products [J]. Soybean Bulletin, 2005 (5) : 19-20.)

[4] 沈同,王镜岩. 生物化学(第二版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. (Shen T, Wang J Y. Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 1900.)

[5] 刘鄰. 酶法有限水解对大豆分离蛋白乳化性能的影响[J]. 中国粮油学报, 2000, 15 (1) : 26-29. (Liu L. Effect of enzymatic limited hydrolysis on emulsifying properties of soy protein isolate [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association. 2000, 15 (1) : 26-29.)

[6] Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food protein [M]. Essex: Elsevier Applied Science Publishers LTD, 1986: 122-144.

[7] Guan X, Yao H Y, Chen Z X, et al. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin [J]. Food Chemistry, 2007 (101) : 163-170.

[8] 韩飞,于婷婷,周孟良. 大豆降压肽的生产工艺研究[J]. 中国农业科技导报, 2008 (6) : 110-117. (Han F, Yu T T, Zhou M L. Studies on producing technology of antihypertensive peptide derived from soybean protein [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2008 (6) : 110-117.)