

文章编号: 1000-5013(2010)03-0302-05

# 蛋白酶解大豆多肽的理化特性

刘静<sup>1,2</sup>, 张光华<sup>2</sup>

(1. 咸阳师范学院 化学与化工学院, 陕西 咸阳 712000;

2. 陕西科技大学 省部共建教育部轻工助剂化学与技术重点实验室, 陕西 西安 710021)

**摘要:** 以大豆蛋白为原料,利用微波加热和碱性蛋白酶、胰蛋白酶和中性蛋白酶水解大豆蛋白,制备单酶、双酶、三酶联合水解的大豆多肽,用葡聚糖 G-50 排阻色谱法进行分离检测,确定各级分的分子量分布范围.凝胶层析分析结果表明,三酶联合水解得到的大豆肽相对分子质量分布主要在 1 100 u 以下,而双酶联合水解则在 2 000 u 以下,可见三酶联合水解效果优于双酶,更优于单酶.此外,物化特性研究表明,蛋白酶水解使得大豆蛋白溶解性、起泡性及起泡稳定性等大大改变.大豆多肽具有良好的溶解性,在蛋白质的等电点附近,不受 pH 值的影响,且具有高浓度、低粘度的特点,以及良好的吸湿性、保湿性和热稳定性和强起泡能力.

**关键词:** 大豆多肽;理化性质;蛋白酶;水解;凝胶渗透色谱

**中图分类号:** TQ 936.1<sup>+</sup>6; Q 556<sup>+</sup>.9

**文献标识码:** A

大豆多肽是由大豆蛋白质经水解而成的低分子肽混合物<sup>[1]</sup>,其必需氨基酸组成与大豆蛋白完全一致,含量平衡且丰富.与大豆蛋白和小分子氨基酸相比,大豆肽更易被人体和动物体吸收利用,具有广泛的生理药理作用,如降血压、降胆固醇、促进钙吸收,调节生理机能等功效,同时肽的物化特性良好,是一种很有前景的功能性食品原料<sup>[2]</sup>.随着生物技术的进步和生命科学的发展,大豆肽的理化特性和生理功能逐步被人们发现,并受到越来越多的重视,促进了大豆肽的研究与开发.在 20 世纪 70 年代,美国、日本等国的研究者利用大豆肽的物化和生物特性,成功地将大豆肽用于食品与生物技术产业<sup>[3,4]</sup>.我国对大豆肽研究开发起步较晚,基础和应用研究都较薄弱,近几年才逐步活跃并取得一定的进展<sup>[5]</sup>.但相对而言,对于小分子大豆肽的物化特性研究甚少.邓成萍等<sup>[6]</sup>采用 Alcalase 和 Neutrase 双酶水解法制备并研究不同分子量段大豆多肽功能特性.本文用单酶、双酶、三酶分别对大豆蛋白进行酶水解和分离纯化,并对其水解产物——大豆多肽的理化特性进行了研究和比较.

## 1 实验部分

### 1.1 主要试剂和仪器

大豆蛋白(蛋白质质量分数 89 %);中性蛋白酶(酶活力为  $3.517 \times 10^{-4}$  kat · g<sup>-1</sup>、碱性蛋白酶(酶活力为  $6.668 \times 10^{-4}$  kat · g<sup>-1</sup>,均为江苏无锡杰能科生物工程有限公司);胰蛋白酶(酶活力为  $4.168 \times 10^{-3}$  kat · g<sup>-1</sup>,Detroit Michigan,USA);牛胰岛素(生化纯,美国 Sigma 公司);溶菌酶(生化纯,上海国药化学试剂厂);葡聚糖 G-50、三羟甲基氨基甲烷(分析纯,上海长征试剂厂);其余均为分析纯.

Spcord 50 型紫外可见分光光度计(德国 Jena 公司);Freezone 4.5 型真空冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);SNB-1 型数字式粘度计(上海精科仪器公司);LG 型微波炉(天津乐金电子电器公司).

### 1.2 不同酶解的大豆多肽的制备

(1) 单酶水解.称取大豆蛋白按质量比( $m(\text{大豆}) : m(\text{水}) = 1 : 20$ )配成悬浮液,于 90 ℃ 恒温水浴中预处理 15 min.降温至 50 ℃、调节溶液 pH 值为 9,加入酶质量分数(酶质量与大豆蛋白质量的比

收稿日期: 2009-07-12

通信作者: 刘静(1962-),女,教授,主要从事天然产物的改性的研究. E-mail:liujing163@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(5037302);陕西省教育厅自然科学基金资助项目(09JK801)

值,下同)为 7 %的碱性蛋白酶,微波间歇式加热 10 min(保持 pH 值和温度恒定),可得到大豆蛋白的单酶水解产物。

(2) 双酶水解. 调整参数,温度为 55 ,pH 值为 8,加入质量分数为 11 %的胰蛋白酶,同样方法水解 20 min,可得到双酶水解的大豆多肽。

(3) 三酶水解. 再调节温度为 45 ,pH 值为 6.5,加入质量分数为 9 %的中性蛋白酶,水解 12 min,得到三酶水解的大豆多肽。

反应结束后,将不同酶水解液沸水浴中加热 10 min 使酶失活;过滤除渣,分别将滤液在 4 000 r · min<sup>-1</sup>下离心 10 min,取上清液在 - 51 ,1.8 kPa 的真空度冻干机中冷冻 23 ~ 25 h,即得到不同酶解的大豆多肽产品<sup>[7]</sup>,研细后置于干燥器中备用。

2 结果与讨论

2.1 标准蛋白的吸光度-洗脱液体积曲线绘制<sup>[8,13]</sup>

准确称量胰蛋白酶( $M = 23\ 300$ )、溶菌酶( $M = 14\ 400$ )、牛胰岛素( $M = 5\ 700$ )标准品各 5.000 mg,溶解于 1 mL 洗脱液中,得到标准蛋白混合液. 进样 50  $\mu$ L 混合液于葡聚糖 G-50 柱(柱径为 2 cm,填料高度为 30 cm);待其进入凝胶床后,用洗脱液(50 mmol · L<sup>-1</sup>三羟甲基氨基甲烷/ HCl + 0.1 mol · L<sup>-1</sup>氯化钠,pH = 8.0)洗脱并收集洗脱液,控制流速每 10 min 接 1 管(3 mL),在 280 nm 下测定吸光度。

以洗脱液体积( $V$ )为横坐标,吸光度( $A$ )为纵坐标,绘制标准蛋白质的吸光度-洗脱液体积关系的工作曲线,如图 1 所示. 以图 1 峰值所对应的洗脱液体积为横坐标,以标准蛋白的相对分子质量对数值为纵坐标,绘制曲线如图 2 所示. 洗脱液体积与标准蛋白相对分子质量的对数关系的线性方程为

$$\lg M = - 0.025\ 6\ x + 5.140\ 9.$$

其中: $x$  为洗脱液体积; $M$  为蛋白质的相对分子质量;相关系数  $r = 0.999\ 6$ .

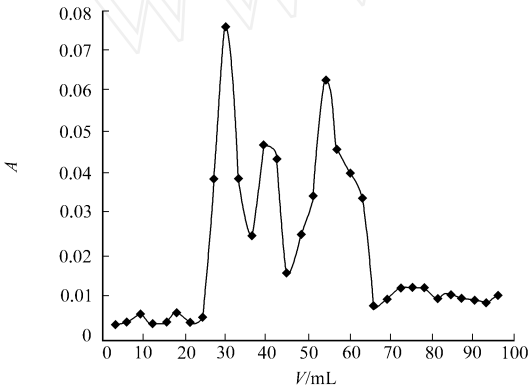


图 1 标准蛋白吸光度-洗脱液体积曲线  
Fig. 1 Absorbance-eluent volume curves of standard proteins

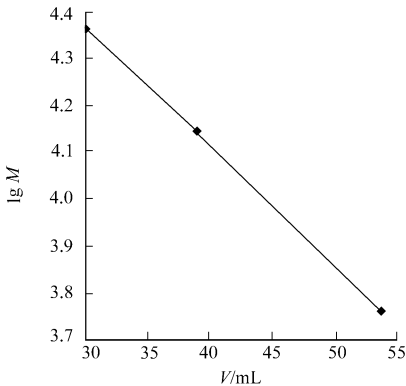


图 2 相对分子质量对数与进样体积关系  
Fig. 2 Relationship between molecular weight's logarithm and injection volume

2.2 大豆肽的凝胶层析法分离及分子量分布<sup>[9]</sup>

将不同酶水解物冻干粉溶解后,进入葡聚糖 G-50 柱,大豆多肽液的凝胶谱图如图 3 所示. 由图 3 (a),(b)可看出,大豆多肽液的凝胶谱图是连续的,水解物中存在各种大小不等的肽分子,酶促水解反应是连续的,故肽分子的分布也是连续的. 分别收集各级分洗脱液,由蛋白标准品相对分子质量分布的关系式计算出各级分对应的相对分子质量的分布范围. 通过与胰岛素、溶菌酶、胰蛋白酶标准品的凝胶层析分布图作出的  $\lg M - V$  线性方程,可以得到以下两种结论。

(1) 双酶水解得到的大豆多肽经凝胶层析可分成 4 个级分,肽段 的相对分子质量在 5 000 u 以上;肽段 的相对分子质量主要集中在 200 ~ 2 000 u 之间;肽段 , 的相对分子质量小于 200 u。

(2) 三酶水解得到的大豆多肽经凝胶层析可分成 4 个级分,肽段 的相对分子质量在 200 ~ 1 100 u 之间;肽段 , , 的相对分子质量都在 200 u 以下,水解物中小分子肽占多数。

由此说明,三酶联合水解效果优于双酶,更优于单酶。

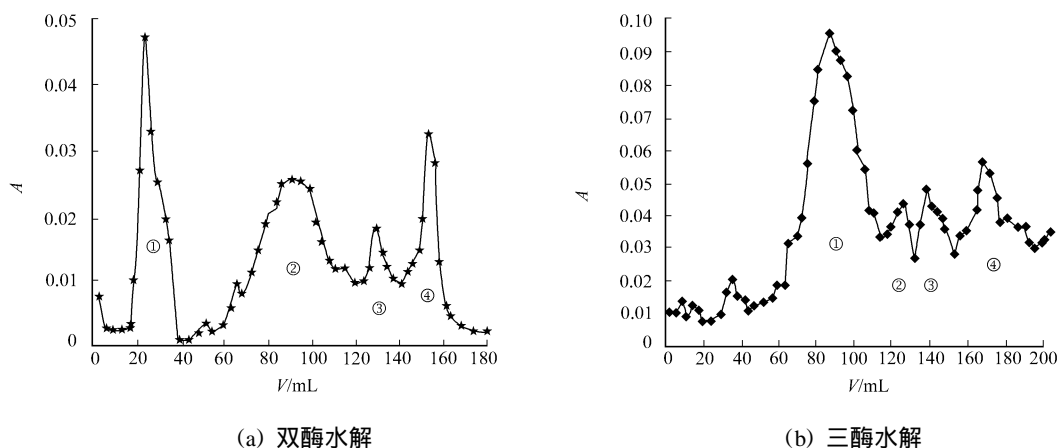


图 3 大豆肽的凝胶层析法分离

Fig. 3 Separation of soybean polypeptides by gel chromatography

### 2.3 表观粘度的测定<sup>[10]</sup>

在 25 ℃, pH 值为 7 时, 测定不同质量分数的大豆蛋白和单酶、双酶及三酶水解液的表观粘度 ( $\eta$ ), 如图 4 所示. 由图 4 可看到, 大豆蛋白的粘度随着质量分数的增加而迅速升高. 大豆蛋白的质量分数为 10 % 时, 其粘度为 90.60 Pa · s, 剪切率为 45.5 %; 质量分数为 15 % 时, 粘度高达 356 Pa · s; 而大豆蛋白的质量分数超过 15 % 时的溶液一经加热就凝固, 限制了大豆蛋白在流体食品中的添加使用. 经单酶、双酶、三酶水解得到大豆多肽具有较小的粘度、流动性好的特点, 60 % 大豆多肽的粘度只有 31 Pa · s.

大豆蛋白是高分子体系, 其溶液具有一定的凝胶性, 随着质量分数的增加而增加. 大豆蛋白 11s 成分含 18 ~ 20 个双硫键, 疏水基团也多于 7s 组分, 酸性亚单位和基本亚单位通过双硫键连接, 分子所形成的空间网状结构较复杂, 也比较牢固, 有利于蛋白质的膨胀, 使溶液粘度也随之增强<sup>[14]</sup>.

酶作用大豆蛋白后, 随着小分子肽类增多, 网状结构破坏, 膨胀性降低. 由于蛋白多聚体的解聚和离子基团的增加, 导致蛋白质分子的有序性增加, 使蛋白质的表观体积减少, 粘度下降, 且在酸性和中性条件下, 肽溶液的流动性无极大差异.

### 2.4 溶解度的测定<sup>[11-12]</sup>

准确称取 0.05 g 大豆蛋白、大豆多肽冻干粉, 分别用 50 mL, 不同 pH 值的缓冲溶液溶解, 于 50 水浴中浸提 30 min. 浸提完全后, 在 4 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 取上清液真空冷冻干燥, 称量, 计算溶解度 (S). pH 值对大豆蛋白和大豆多肽溶解度的影响, 如图 5 所示.

由图 5 可知, 大豆蛋白在酸性介质中溶解度较低, 特别在大豆蛋白等电点对应的 pH 值为 4.3 时, 溶解度很小, 几乎不溶解; 而大豆多肽在较宽的 pH 值范围内, 一直能保持良好的溶解状态. 这是因为大豆蛋白经酶水解后, 肽键断裂, 生成了多肽和小分子段肽类物质, 可离解的  $\text{NH}_2^+$ ,  $\text{COOH}^-$  数目逐渐增多, 导致净电荷增多, 从而使亲水性增强, 溶解度提高.

### 2.5 大豆肽吸湿性与保湿性分析

将单酶、双酶及三酶水解冻干粉置于称量瓶准确称量后, 在室温中放置, 每天记录其质量变化情况. 半年后, 以质量和放置时间作图, 观察不同酶解的大豆多肽的吸湿与保湿情况, 如图 6 所示.

由图 6 可知, 刚开始时, 大豆多肽吸收空气中水份很快, 质量增加迅速, 随后质量几乎保持不变; 3 个月后, 开始有点缓慢减少, 随后又保持质量不变. 表明, 大豆多肽具有很强的保湿性和吸湿性. 面包、蛋糕、饼干等焙烤食品易失水干燥的问题, 可以利用大豆多肽良好的吸湿性解决.

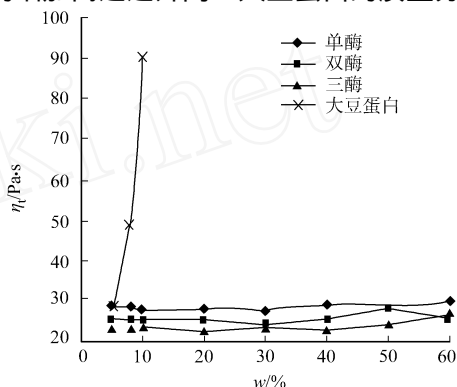


图 4 大豆蛋白与多肽的粘度比较

Fig. 4 Comparison of viscosities between soybean proteins and polypeptides

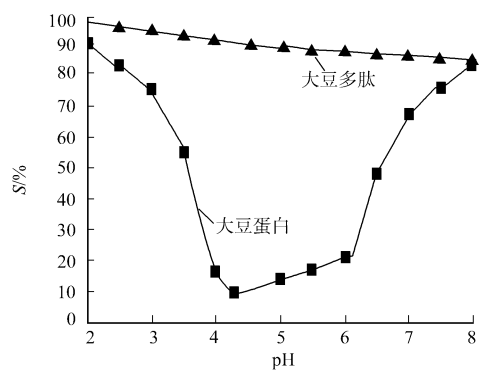


图 5 pH 值对大豆多肽与大豆蛋白溶解性影响  
Fig. 5 Effect of pH value on the solubility of soybean polypeptides and soy proteins

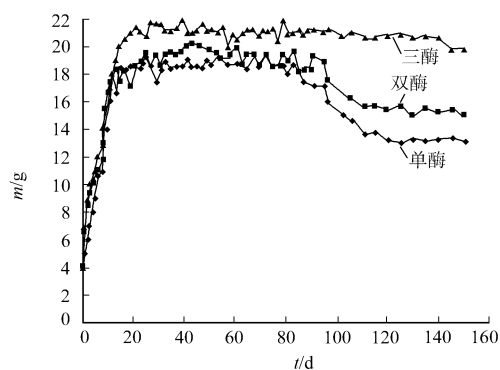


图 6 大豆多肽的吸湿与保湿性质  
Fig. 6 Properties of moisture absorption and maintenance of polypeptides

2.6 大豆肽的起泡性及起泡稳定性<sup>[6]</sup>

将大豆蛋白和单酶、双酶、三酶水解产物冻干粉,配成 5 %溶液,各量取 2 mL 置于 10 mL 量筒中,上下震荡 1 min,记下此时的初始起泡体积(高度)  $H_0$ ;然后静置 10 min,记下终止泡沫体积(高度)  $H_1$ .以  $H_0$  作为评价起泡能力大小的指标,以  $H_1/H_0$  作为评价泡沫稳定性的指标.比较大豆蛋白和单酶、双酶、三酶水解得到的大豆肽的起泡性( $H_0$ )及起泡稳定性( $H_1/H_0$ ),如图 7 所示.

由图 7 可知,大豆多肽的起泡能力强而泡沫稳定性差,相反大豆蛋白的起泡能力差而泡沫稳定性好.大豆多肽的起泡能力强是因为酶水解使大豆蛋白的肽链展开,疏水基充分暴露出来,导致疏水性增强,表面张力减弱,易形成坚韧的液膜,因而增强了大豆肽溶液的发泡力;但由于大豆多肽肽链短,粘度低,导致液膜脆,无法包裹气泡,因而泡沫稳定性差.

随着蛋白水解时加入的蛋白酶增多,起泡能力先增加后降低,而泡沫稳定性逐渐递减.这是因为大豆肽的起泡能力与其分子大小有关系,在一定范围内,酶加入多,生成的小分子肽越多,分子量越小溶解性越好,使得更多的肽分子参与到液膜的形成中来,使起泡性越强.但分子量小到某一范围,肽链越来越短,形成的液膜也越来越弱,最后导致起泡性反而降低.同时多酶使蛋白水解程度大,水解液粘度低,且随着分子量减小越来越低,导致其泡沫稳定性越来越差.

2.7 等电点测定

最大沉淀率所对应 pH 值即为等电点.等电点  $pI$  是氨基酸的重要常数之一,使溶液的氨基酸呈电中性所对应的 pH 值.其意义在于,物质在  $pI$  处的溶解度最小.测定不同 pH 值时大豆多肽及大豆蛋白的沉淀率( $\delta$ ),如图 8 所示.由图 8 可以看出,大豆蛋白在酸性乃至中性环境下沉淀率非常大,即溶解性不佳.尤其是在 pH 值为 4.3 时,沉淀率最大,此点所对应 pH 值即等电点.大豆多肽的沉淀率很小,即使在大豆蛋白的等电点对应的 pH 值为 4.3 附近,大豆多肽仍能保持良好溶解性,受 pH 值的影响小.

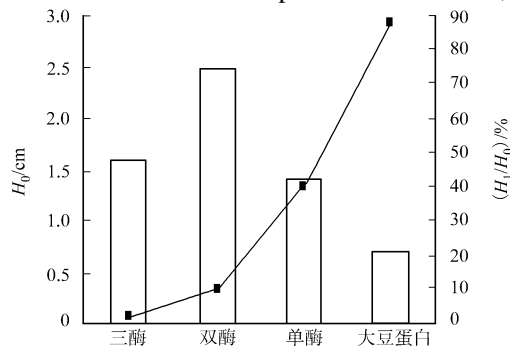


图 7 大豆多肽的起泡性和起泡稳定性  
Fig. 7 Foam property and foam stability of soybean polypeptides

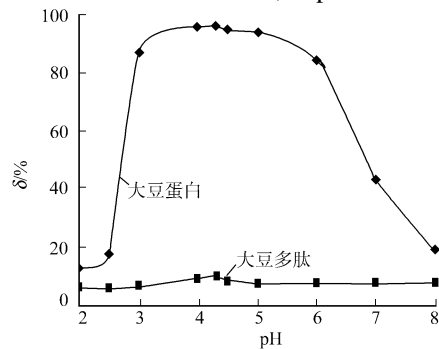


图 8 大豆蛋白和大豆多肽的等电点  
Fig. 8 Isoelectric point of soybean polypeptides and proteins

### 3 结束语

通过凝胶层析分析可知,三酶联合水解得到的大豆肽分子量分布主要在 1 100 u 以下,双酶联合水解在 2 000 u 以下,可见三酶联合水解效果优于双酶,更优于单酶.蛋白酶水解使得大豆蛋白溶解性、起泡性及起泡稳定性等大大改变.大豆多肽具有良好的溶解性,即使在蛋白质的等电点附近,也不受 pH 值的影响.而且,它具有高浓度、低粘度的特点,以及良好的吸湿性、保湿性、热稳定性和强的起泡能力等良好的物化特性,这为大豆多肽的加工和开发利用提供理论依据.

#### 参考文献:

- [1] 杨彩艳,宋俊梅.大豆肽研究进展[J].粮食与油脂,2009(1):43-45.
- [2] 郭顺堂,徐婧婷.大豆食品品质功能性与健康研究进展[J].大豆科技,2009(1):5-9.
- [3] LEE K A, KIM S H. Ssge and Dee, new peptides isolated from a soyprotein hydrolysate that inhibit platelet aggregation[J]. Food Chemistry, 2005, 90(3):389-393.
- [4] FENG J, XIONG Y L. Interaction and functionality of mixed myofibillar and enzyme-hydrolyzed soy proteins[J]. Journal of Science, 2003, 68(3):803-809.
- [5] 李善仁,陈济琛,胡开辉,等.大豆肽的研究进展[J].中国粮油学报,2009,24(7):142-147.
- [6] 邓成萍,薛文同,孙晓琳,等.不同分子量段大豆多肽功能特性研究[J].食品科学,2007,27(5):109-112.
- [7] 刘静,陈均志.微波双酶协同水解植物蛋白制备小分子肽的研究[J].食品研究与开发,2006,130(8):9-13.
- [8] 李建武,肖能庚,余瑞元,等.蛋白质分子量的测定:SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳[M].北京:科学出版社,1994:216-233.
- [9] 刘静,陈均志.大豆多肽分离纯化方法研究进展[J].食品工业科技,2006,27(9):171-174.
- [10] 刑小鹏,吴高峻,孙华.大豆分离蛋白质的功能特性[J].食品工业科技,2002,21(4):74-76.
- [11] 刘文辉.大豆分离蛋白酶水解制备多肽及应用研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2003.
- [12] 周利亘,陈新峰,王君虹,等.大豆多肽复合酶解工艺条件研究[J].食品科技,2005(7):22-25.
- [13] 孔毅,吴梧桐,吴如金.蛋白质分子量测定方法比较研究[J].分析仪器,2003(2):44-47.
- [14] 李志忠,袁惠君,张丙云,等.大豆多肽的功能与开发研究[J].甘肃科技,2006,22(4):179-181.

## Physical and Chemical Characteristics of Soybean Polypeptides Hydrolyzed by Proteases

LIU Jing<sup>1,2</sup>, ZHANG Guang-hua<sup>2</sup>

(1. College of Chemistry and Engineer, Xianyang Normal University, Xianyang 712000, China;

2. Key Laboratory of Auxiliary Chemistry & Technology for Chemical Industry, Ministry of Education Shanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** Soybean polypeptides were produced by combination of microwave heating and hydrolysis of soybean proteins by alcalase, trypsin and neutral protease. Molecular weight distribution was determined by sephadex-G50 gel filtration chromatography. It was shown by gel chromatography analysis that the molecular weigh of soybean peptides hydrolyzed by three enzymes distributed mainly below 1 100 u, while that by double enzymes below 2 000 u. It indicates that three enzymes hydrolysis is better than that by double enzymes, and more than a single enzyme. Results also showed that the solubility, foam property and foam stability improved greatly after protease hydrolysis of soybean proteins. Besides, soybean polypeptides exhibited low viscosity at high concentration, little effect on pH even in the vicinity of the isoelectric point of the proteins, as well as excellent moisture absorption, moisture maintenance, heat stability and strong foam property, which provide theoretical references for the development of soybean polypeptides as a new kind of materials.

**Keywords:** soybean polypeptides; physical and chemical characteristics; protease; hydrolysis; gel filtration chromatography

(责任编辑:黄仲一 英文审校:刘源岗)