

碱性蛋白酶水解豆粕制备大豆多肽

黄雅燕, 王文平, 肖美添

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 采用碱性蛋白酶水解豆粕制备大豆多肽,以蛋白质的转化率和水解度为指标,通过单因素试验,考察影响酶解工艺的主要因素,并利用正交试验确定最佳酶解条件.结果表明:在温度为 55 ℃,pH 值为 9.5,加酶量为 0.15%,底物质量分数为 7%的最佳条件下,水解豆粕 3 h,其转化率可达 75.73%,水解度为 49.30%.液相色谱分析表明:酶解液的大豆多肽相对分子质量分布主要集中在 5 000 以下,占比达 80.21%.

关键词: 豆粕;大豆肽;碱性蛋白酶;转化率;水解度

中图分类号: Q 516

文献标志码: A

豆粕是大豆加工生产豆油的副产品,约含 45%~50%的大豆蛋白质,有很高的开发和利用价值^[1]. 由于大豆蛋白分子量大、不易吸收,而且存在多种抗营养因子,目前主要用作饲料,在食品方面应用极少.大豆多肽是由大豆蛋白经蛋白酶水解生成的低分子肽混合物.研究表明:大豆多肽具有低黏度、高稳定性等优良加工特性,以及降低血清胆固醇、降血压和促进脂肪代谢等独特的保健功能,是一种比较理想的新型大豆深加工产品^[2-3].近年来,采用酶法水解豆粕制备大豆多肽的研究日渐增多,但大多以水解度为唯一考察指标,且水解度普遍不高^[4-5].本文采用碱性蛋白酶水解豆粕粉,以转化率和水解度为考察指标,通过单因素和正交实验,确定最佳酶解工艺条件,并测定大豆肽的相对分子质量分布.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豆粕(粗蛋白的质量分数为 43.4%,粗脂肪的质量分数 1.46%,水的质量分数 11.35%,福建省福海粮油公司提供);碱性蛋白酶(酶比活力为 7.42 mkat · g⁻¹,广西南宁庞博生物工程有限公司);细胞色素 C($M_r=12\ 500$)、抑肽酶($M_r=6\ 511.44$)、杆菌肽($M_r=1\ 422.69$)、Val-Tyr-Val($M_r=379.5$)和 Gly-Tyr($M_r=238.2$)(美国 Sigma 公司);三氟乙酸、乙腈均为色谱纯,其他试剂均为分析纯.

1.2 仪器

Waters LC-2998 型高效液相色谱仪(美国 Waters 科技有限公司);TP-214 型电子天平(美国丹佛仪器有限公司);UV-1800 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司).

1.3 方法

1.3.1 样品及其制备 将豆粕粉碎,过 60 目筛,备用.

1.3.2 碱性蛋白酶水解豆粕 按照一定的底物质量浓度准确称取豆粕于水解反应器中,加入适量蒸馏水,搅拌均匀.用 1.0 mol · L⁻¹ 的 NaOH 调节溶液酸碱度至所需的 pH 值,准确量取一定量的碱性蛋白酶加入水解反应器中,反应过程控制系统保持在要求的 pH 值.反应至预定时间后,调节酶解液的 pH 值至 4.5,使未水解的蛋白质沉淀.在沸水浴条件下,高温灭活 5 min,冷却,离心(4 000 r · min⁻¹, 20 min),取上清液,待测.

收稿日期: 2012-10-10

通信作者: 黄雅燕(1979-),女,讲师,主要从事生物转化和生物合成的研究. E-mail:yyhuang@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省泉州市科技计划项目(2010N11)

1.3.3 分析方法 蛋白酶活力测定按照 SB/T 10317—1999 福林-酚法；粗蛋白含量测定按照 GB 5009.5—2010 凯氏定氮法；蛋白质含量的测定按照紫外光吸收法^[6]；转化率(R)^[7]、水解度(DH)测定均按照茚三酮显色法^[8]。

1.3.4 相对分子质量分布

大豆肽相对分子质量分布采用高效液相色谱(HPLC)法测定. 色谱柱为 SRT SEC-100(7.8 mm×300 mm)；流动相为 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}):V(\text{TFA})=20:80:0.1$ ；UV 检测波长为 220 nm；流速为 $0.5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ；柱温为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$. 采用已知相对分子质量的细胞色素 C($M_r=12\ 500$), 抑肽酶($M_r=6\ 511.44$), 杆菌肽($M_r=1\ 422.69$), Val-Tyr-Val($M_r=379.5$), Gly-Tyr($M_r=238.2$)作为对照品, 进行 HPLC 分析. 相对分子质量校正的线性回归方程为: $\lg M_r=4.971-0.077\ 5\ t(r=0.995\ 5)$.

2 结果与讨论

2.1 最佳酶解条件

按照酶解工艺, 以蛋白质的转化率和水解度为指标, 考察温度(θ)、pH 值、底物质量分数($\omega(\text{底物})$)和加酶量($\omega(\text{酶})$)等因素对酶解过程的影响, 结果如图 1 所示. 由图 1 可以看出: 各个因素对酶解反应过程都有一定的影响, 温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 9.5、加酶量为 0.20%、底物质量浓度为 7%为最佳条件.

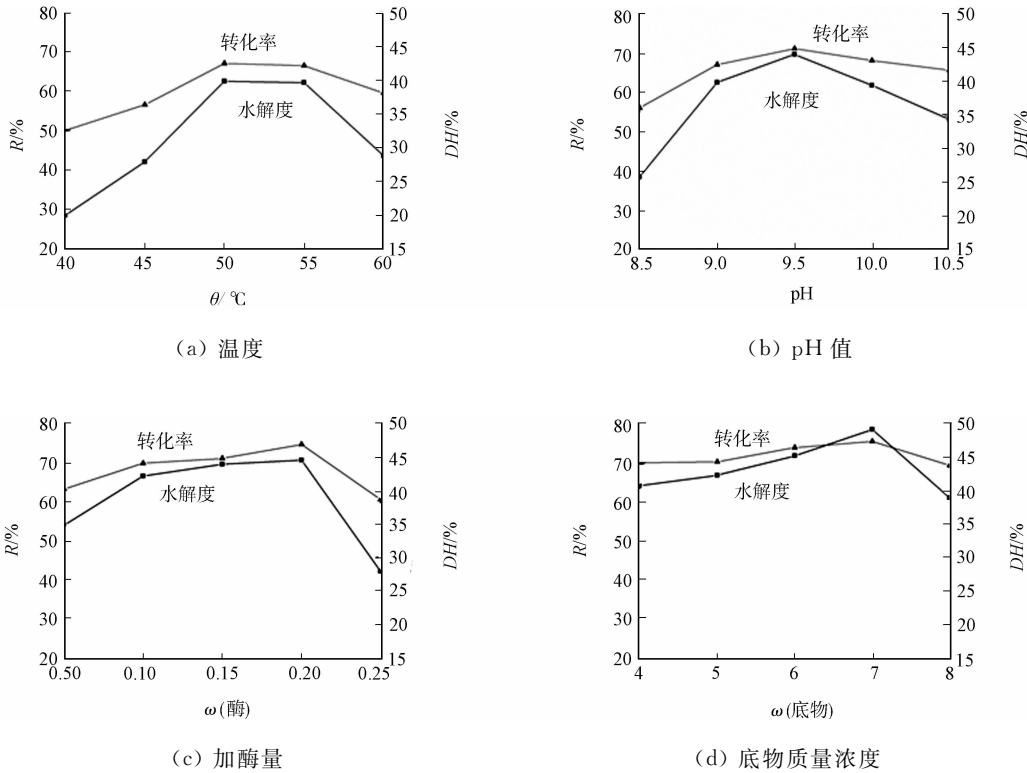


图 1 酶解条件对转化率和水解度的影响

Fig. 1 Influences of enzymolysis conditions on conversion rate and degree of hydrolysis

根据单因素试验的结果,设计 4 因素 3 水平的正交试验,并进行酶解工艺参数的优化,因素水平的选取如表 1 所示,正交试验结果如表 2 所示,极差分析表如表 3 所示.

表 1 因素水平安排表

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素			
	A (pH)	B ($\theta/^{\circ}\text{C}$)	C ($\omega(\text{底物})/\%$)	D ($\omega(\text{加酶量})/\%$)
1	9.0	45	6	0.10
2	9.5	50	7	0.15
3	10.0	55	8	0.20

表 2 正交试验结果
Tab.2 Results of the orthogonal test

水平	A (pH)	B ($\theta/^{\circ}\text{C}$)	C ($\omega(\text{底物})/\%$)	D ($\omega(\text{酶})/\%$)	R/%	DH/%
1	1	1	1	1	53.92	27.48
2	1	2	2	2	72.12	48.95
3	1	3	3	3	69.61	36.53
4	2	1	2	3	57.16	25.86
5	2	2	3	1	69.30	35.78
6	2	3	1	2	75.39	48.03
7	3	1	3	2	54.39	29.17
8	3	2	1	3	70.18	39.72
9	3	3	2	1	72.11	40.33

表 3 极差分析表
Tab.3 Table of range analysis

水平	R/%				DH/%			
	A (pH)	B ($\theta/^{\circ}\text{C}$)	C ($\omega(\text{底物})/\%$)	D ($\omega(\text{酶})/\%$)	A (pH)	B ($\theta/^{\circ}\text{C}$)	C ($\omega(\text{底物})/\%$)	D ($\omega(\text{酶})/\%$)
k_1	65.22	55.16	65.11	66.50	37.65	27.50	34.53	38.41
k_2	67.28	70.53	67.30	67.13	36.56	41.48	42.05	38.38
k_3	65.56	72.37	65.65	64.43	36.41	41.63	34.04	33.83
R	2.06	17.21	2.19	2.70	1.24	14.13	8.01	4.58

由表 3 极差分析可知:影响酶解过程转化率和水解度的因素排序不同,分别为 $B>D>C>A$ 和 $B>C>D>A$;综合各因素 k 值和直观比较,得出理论上最高转化率和水解度的酶解工艺条件也不尽相同,分别为 $B_3D_2C_2A_2$ 和 $B_3C_2D_1A_1$ 。两种优化组合中,因素 B 和 C 的取值是一致的,因素 A(pH)对转化率和水解度的影响最小,故可取 A_1 或 A_2 。加酶量 D 取 D_2 时,转化率比取 D_1 提高 0.95%,而水解度仅降低 0.07%,故 D 因素选择 D_2 。综合分析,最终确定碱性蛋白酶水解豆粕的最佳工艺条件为 $B_3D_2C_2A_2$,即温度为 55℃,加酶量为 0.15%,底物质量分数为 7%,pH 值为 9.5。在此条件下做验证实验,重复 3 次,转化率分别为 75.26%,75.60%和 76.33%,平均值达 75.73%;水解度分别为 48.52%,49.58%和 49.80%,平均值达 49.30%。

2.2 酶解液大豆肽相对分子质量分布的测定

为进一步确定碱性蛋白酶对豆粕的水解效果,将上述水解产物进行高效凝胶过滤色谱分析,观察豆粕水解产物的相对分子质量分布情况。豆粕酶解物的相对分子质量分布曲线,如图 2 所示。由图 2 可以看出:豆粕水解物中肽相对分子质量的分布是相对连续的,即水解物中存在各种大小不等的肽分子。

通过对比标准品的凝胶色谱图,标准品的相对分子质量分布如图 3 所示。由图 2,3 可以看出:绝大

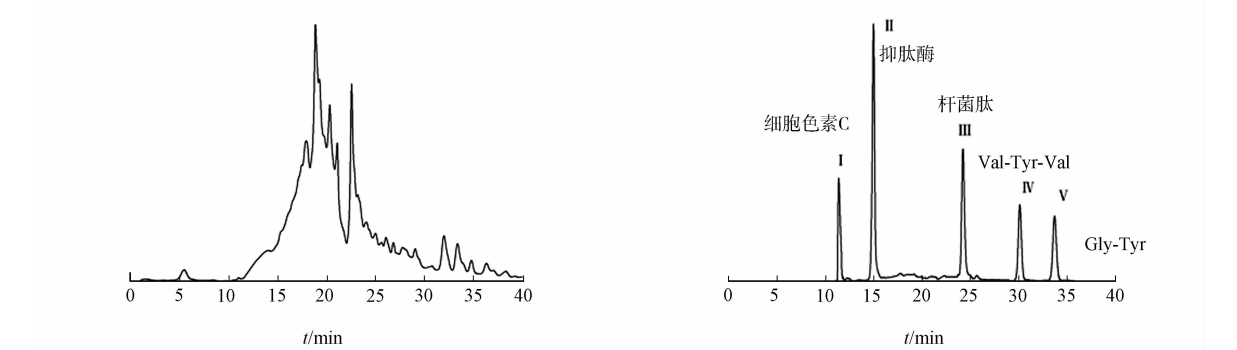


图 2 豆粕水解物的相对分子质量分布
Fig.2 Molecular weight distribution
profiles of soybean peptides

图 3 标准品的相对分子质量分布
Fig.3 Molecular weight distribution
profiles of standard samples

多数大豆多肽的相对分子量在 300~5 000 之间. 将样品的色谱数据代入校正曲线中进行计算, 经峰面积归一法计算可得, 大豆多肽相对分子质量在 2000~5 000 占 45.50%, 300~2 000 占 30.34%, 而大分子蛋白只占少数.

小分子肽易被人体吸收, 而且具有许多生理活性功能, 如抗氧化、降血脂、降血压等^[9], 因此所优化的酶解条件比较理想. 酶解液相对分子质量小于 5 000 的大豆多肽比例为 80.21%, 达到 3 级大豆肽粉的相对分子质量分布的标准. 酶解液相对分子质量的测定为大豆多肽的进一步分离纯化奠定基础.

3 结束语

对碱性蛋白酶水解豆粕的工艺条件进行研究, 获得最佳的酶解条件: 温度为 55 ℃; pH 值为 9.5; 加酶量为 0.2%; 底物质量分数为 7%. 在此条件下水解 3 h, 转化率和水解度分别为 75.73% 和 49.30%. HPLC 法检测, 酶解液大豆多肽相对分子质量分布在 5 000 以下为 80.21%, 符合国标 GB/T 22492—2008《大豆肽粉》中规定的 3 级大豆肽粉肽段的相对分子质量分布标准.

参考文献:

[1] 张亚丽, 徐忠. 变性脱脂豆粕酶解物的特性研究[J]. 中国食品学报, 2005, 5(4): 46-51.
[2] 范宝庆, 陈中. 酸溶性酶解大豆蛋白的研究[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(3): 24-25.
[3] MOLINA O S E, ANÓN M C. Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates[J]. J Am Oil Chem Soc, 2002, 77(12): 1293-1301.
[4] 张毅. 酶法制备大豆肽工艺条件的研究[D]. 江苏: 江南大学, 2009: 17.
[5] 屠春燕, 袁艳娟, 徐娟, 等. Alcalase 碱性蛋白酶酶解绿豆分离蛋白制备小分子肽的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(2): 23-27.
[6] 陈钧辉, 李俊, 张太平, 等. 生物化学实验[M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2008: 66-67.
[7] 夏宁, 高媛, 迟玉杰. 蛋白酶水解低温豆粕制备大豆寡肽的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 171-172.
[8] 余勃, 陆兆新. 微生物发酵法产大豆多肽液水解度的测定[J]. 食品科学, 2005, 26(4): 104-107.
[9] 丁丹华, 彭光华, 何东平. HPLC 法测定油茶籽多肽相对分子质量分布及氨基酸组成[J]. 中国油脂, 2010, 35(11): 68-71.

Production of Soybean Peptide by Alkaline Protease Hydrolysis of Soybean Meal

HUANG Ya-yan, WANG Wen-ping, XIAO Mei-tian

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The soybean meal was hydrolyzed to prepare soy peptide with alkaline protease. During the experiment, the conversion rate and degree of hydrolysis were selected as the main indexes to investigate the chief factors influencing enzymolysis technology with single-factor experiment, then the optimum conditions were studied using orthogonal test. It was shown that the optimum conditions of enzymatic hydrolysis were temperature 55 ℃, pH 9.5, protease concentration 0.15%, substrate concentration 7%. Under the optimum conditions, the conversion rate and degree of hydrolysis were 75.73% and 59.30% respectively when hydrolysis for 3 h. The relative molecular weight distribution of soybean peptides was determined by size exclusion chromatography. Result showed that there was 80.21% of soybean peptide with molecular weight less than 5 000.

Keywords: soybean meal; soybean peptide; alkaline protease; conversion rate; degree of hydrolysis