

水解条件对挤压膨化高温豆粕酶解物 免疫活性的影响

张智宇¹, 朱秀清^{1,2,*}, 任为聪¹

(1.东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2.国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 研究合理的水解工艺以有效提高高温豆粕的免疫活性。采用二次旋转回归法优化水解条件, 以水解温度、酶添加量、底物添加量、酶解时间为影响因素, 以淋巴细胞增殖指数(SI)为检测指标, 运用 SPSS13.0 软件分析, 最终用 Design Expert 7.0.0 软件优化出最优的水解条件。最优的工艺条件为: 胰蛋白酶添加量 7999.97U/g, 酶解温度 55.14℃, 水解时间 4.34h, 底物添加量(底物与加水之比)4.41%, 经 MTT 法测定, 此条件下酶解物对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞的免疫刺激指数最高, 为 1.1894。

关键词: 高温豆粕; 中心组合; 胰蛋白酶; 免疫活性

Effect of Hydrolysis Conditions on Immunoactivity of Enzymatic Hydrolysates from Extruded High-temperature Soybean Meal

ZHANG Zhi-yu¹, ZHU Xiu-qing^{1,2,*}, REN Wei-cong¹

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. National Soybean Engineering and Technique Research Center, Harbin 150030, China)

Abstract In order to improve the immunoactivity of enzymatic hydrolysates from extruded high-temperature soybean meal, the hydrolysis of the substrate by trypsin was optimized using central composite rotary design. Spleen lymphocyte proliferation (expressed as the stimulation index, SI) was investigated with respect to four variables including hydrolysis temperature, enzyme amount, substrate concentration and hydrolysis time. Using SPSS 13.0 and Design Expert 7.0.0, the experimental data were analyzed to determine the optimal hydrolysis conditions as follows: enzyme amount of 7999.97 U/g, hydrolysis temperature of 55.14 °C, hydrolysis time of 4.34 h, and substrate concentration of 4.41%. Under the optimal hydrolysis conditions, the ConA-induced spleen lymphocyte stimulation index was determined by MTT method to be 1.1894.

Key words: high-temperature denatured soybean meal; central composite design; trypsin; immunoactivity

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0161-04

中国是豆粕生产大国, 高温豆粕因其生产工艺, 蛋白质大部分变性, 纤维素含量高, 主要用于饲料, 影响了高温豆粕的进一步应用。

目前对于已知活性肽的研究主要集中在降胆固醇^[1]、抗高血压^[2-3]、抗氧化^[4-6]、抗癌^[7]、促脂肪代谢^[8-9]方面。肽的免疫作用也越来越受人们的关注, 它不但对免疫力低下下的仔畜乃至人类都有很高的研究价值和前景。

免疫活性肽的研究始于 1981 年, 随后文献报道了具有不同序列的从奶牛和牛奶及植物蛋白中提取的 39 种免疫活性肽^[10]。Jolles 等^[11]报道人乳蛋白经类胰蛋白酶酶解得到免疫刺激活性肽。Chen 等^[12]从大豆胃蛋白酶水解液中

纯化和分离分别得到的 Ala-Glu-Ile-Asn-Met-Pro-Asp-Tyr-Ile-Gln-Gln-Gly-Asn 和 Ser-Gly-Phe-Ala-Pro 能够刺激小鼠脾脏淋巴细胞的增殖。Yoshikawa 等^[13]从胰蛋白酶水解大豆蛋白的酶解物中可获得一种 6 肽, 其一级结构为 His-Cys-Gln-Arg-Pro-Arg(HCQRPR), 这种肽能刺激巨噬细胞和多核白细胞的吞噬作用, 具有免疫调节功能。进一步酶解 HCQRPR, 又获得了具有同样免疫调节作用的、一级结构为 Gln-Arg-Pro-Arg(QRPR)的 4 肽。近些年, Kong 等^[14]选用碱性蛋白酶水解地低温豆粕得到免疫活性肽, 并证明大豆肽免疫活性大小与正电荷肽含量的相关性较好, 而与平均分子质量的相关性不大。

收稿日期: 2011-01-07

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA10Z322); 黑龙江省科技厅科学技术计划项目(GB08B401-01)

作者简介: 张智宇(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为大豆精深加工。E-mail: a200401444@163.com

* 通信作者: 朱秀清(1968—), 女, 研究员, 硕士, 研究方向为大豆精深加工。E-mail: xqzhuwang@163.com

也有报道说大豆中许多非营养成分如植酸和其他激素类作物很有可能在调节人类免疫刺激起到非常重要的作用^[15]。本实验选用专一性强的胰蛋白酶将蛋白质从常规价格低廉的高温豆粕中降解,探讨免疫活性和胰蛋白酶酶解条件的关系,制备高生物活性的免疫肽,提高高温豆粕的附加值。

1 材料与方 法

1.1 实验动物、材料与试剂

清洁级 ICR 小鼠 18~22g 哈尔滨兽医研究所。

高温豆粕(过 80 目筛,水分 9.4%、脂肪 5.4%、蛋白质(干基)50.87%、灰分 5.3%、尿素酶活力 0.172U/g) 杨霖油脂集团。

胰蛋白酶(1.04×10^5 U/g) 美国 Amresco 公司; 刀豆蛋白(ConA)、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、小牛血清 美国 Sigma 公司; RPMI1640 细胞培养液 美国 Gibco 公司。

1.2 仪器与设备

DS56-III型双螺杆全膨化机 济南塞信公司; Büchi Spray Dryer B-290型喷雾干燥仪 瑞士Büchi Spray Dryer 公司; Nikon ECLIPSE TS100 倒置显微镜 日本 Nikon 公司; Bio-Rad-680 酶标仪 美国 Bio-Rad 公司; HF90 二氧化碳培养箱 力康发展有限公司; HD-1360 新型洁净工作台 哈尔滨东联公司; LDZ5-2 低速自动平衡离心机 北京医用离心机厂。

1.3 方法

1.3.1 样品的制备流程

高温豆粕→粉碎→挤压膨化预处理(温度 110℃, 转速 101.28r/min, 模孔 4mm, 水分 29.96%, 进料量 400g/min)→粉碎过 80 目筛→不同水解条件水解液的制备^[16]→灭酶(沸水浴 10min)→离心($5000 \times g$)→取上清液→喷雾干燥

1.3.2 免疫活性的测定

MTT 法过去经常用于测定水解液在体外对小鼠脾淋巴细胞增殖作用^[17]。无菌快速采取脾脏,用铜网(200 目)研磨挤压制成单细胞悬液,细胞悬浮于 RPMI1640 培养液(内含 200IU/mL 青霉素, 200 μg/mL 链霉素, 10% 灭活胎牛血清, 20mmol/L HEPES, 2mmol/L L-谷氨酰胺, 5×10^{-5} mol/L, β-巯基乙醇)。淋巴细胞分离液密度梯度离心法(1000r/min, 10min)分离脾淋巴细胞,再用 RPMI1640 培养液离心(1000r/min, 15min)洗涤 3 次,用台盼兰拒染法检测细胞活力 > 95%, 同时进行细胞计数,调细胞浓度至 5×10^6 个/mL。96 孔微量培养板,每孔加入 50 μL 含 25 μg/mL ConA 的 RPMI1640 培养液,对照孔只加 RPMI1640 培养液 50 μL,向每孔中加入 100 μL 混匀的淋巴细胞悬液,再按不同组分别加入完全培养液或肽液培养物 100 μL,总体积 250 μL, ConA 终质量浓度为 5 μg/mL 设 4 个重复孔。细胞置 40℃、5%

CO₂ 饱和湿度条件下培养 48h, 每孔加 5mg/mL MTT 溶液 20 μL, 培养 4h 后, 再加 100 μL DMSO 溶液, 至于 37℃ 培养箱恒温反应 15min, 用酶联免疫检测仪, 以空白对照孔调零, 检测 590nm 波长处 OD 值, 结果以 4 重复孔平均值表示。刺激指数用淋巴细胞增殖指数(expressed as the stimulation index, SI)表示, 计算公式如下。

$$SI = \frac{OD_{\text{细胞+样品+ConA}} - OD_{\text{培养液+ConA}}}{OD_{\text{细胞}} - OD_{\text{培养液}}}$$

1.4 样品质量浓度对小鼠体外淋巴细胞增殖效果实验
高温豆粕未酶解样品按照 1.3.1 节方法喷雾干燥作为空白, 酶解液分别用 RPMI1640 培养液配成 0.05~23.6mg/mL 不同质量浓度的溶液按照 1.3.2 节方法进行淋巴细胞增殖实验, 每组做 6 个平行样。

1.5 水解工艺优化

经过预实验和单因素试验中得到酶添加量、反应温度、反应时间、底物添加量 4 个因素对水解液免疫活性影响较大, 且相互间存在交互作用。采用中心旋转组合试验设计^[18]。共 32 个试验点。水平编码见表 1。每个试验点均做 4 个平行样, 取其平均值。

表 1 中心旋转组合试验因素水平编码表
Table 1 Coded values and corresponding actual values of variables involved in central composite rotary design

水平	X ₁ 酶添加量/(U/g)	X ₂ 反应温度/℃	X ₃ 反应时间/h	X ₄ 底物添加量/%
-2	2000	30	2	2
-1	4000	40	3	4
0	6000	50	4	6
1	8000	60	5	8
2	10000	70	6	10

1.6 统计分析

应用 Design-Expert 7.0.0 软件(Stat Ease, Inc, Minneapolis, USA); SPSS13.0 处理数据。

1.7 模型的验证

通过响应面分析法优化胰蛋白酶水解高温豆粕免疫活性最优的水解条件。在优化条件下水解出的豆粕进行酶解后小鼠淋巴细胞增殖的测定, 通过比较预测值和实验值来验证模型的有效性。

2 结果与分析

2.1 药物质量浓度对体外淋巴细胞增殖效果

按照 1.3.2 节方法用不同质量浓度样品刺激小鼠脾淋巴细胞, 经酶标仪测定其 OD 值, 计算免疫刺激指数(SI)值, 并以空白作对照, 结果见表 2。

由表 2 可知, 样品质量浓度在 0~1.6mg/mL 时 SI 值先增加, 到 0.2mg/mL 后逐渐平缓, 之后随药物质量浓度增加 SI 值明显增加。说明 0.2mg/mL 在 0~1.6mg/mL 区

表2 样品质量浓度与吸光度的关系

Table 2 Dependence of spleen lymphocyte proliferation upon soybean meal hydrolysate concentration

样品质量浓度(mg/mL)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	12.8	23.6
SI值	0.55 ± 0.07 ^a	0.71 ± 0.11 ^f	0.77 ± 0.12 ^e	0.89 ± 0.08 ^d	0.87 ± 0.09 ^d	0.86 ± 0.07 ^d	0.87 ± 0.13 ^d	0.92 ± 0.10 ^d	0.97 ± 0.08 ^c	1.75 ± 0.10 ^b	2.85 ± 0.07 ^a

注: a~g. SI值有显著性差异(P < 0.05)。

间对小鼠脾淋巴细胞增殖效果最明显。表明样品质量浓度在免疫刺激上起到非常重要的作用^[19]。但在质量浓度大于1.6mg/mL之后对样品存在强烈的剂量依赖性,因此选择0.2mg/mL为上样质量浓度。

2.2 模型的拟合

本实验应用响应面法(response surface methodology, RSM)建立一个模型来优化酶解条件提高免疫活性的制备工艺。试验条件和响应值见表3。通过分析自变量和因变量得到一个能够在给定的范围内预测响应值的回归方程。

表3 中心旋转组合试验的免疫刺激指数结果

Table 3 Central composite rotary design and corresponding SI

试验号	因素				Y
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
1	-1	-1	-1	-1	0.9045
2	1	-1	-1	-1	0.9974
3	-1	1	-1	-1	0.9536
4	1	1	-1	-1	1.1553
5	-1	-1	1	-1	0.8909
6	1	-1	1	-1	1.0627
7	-1	1	1	-1	0.9549
8	1	1	1	-1	1.1754
9	-1	-1	-1	1	0.8402
10	1	-1	-1	1	0.8536
11	-1	1	-1	1	0.9382
12	1	1	-1	1	1.0485
13	-1	-1	1	1	0.9073
14	1	-1	1	1	0.9083
15	-1	1	1	1	0.9386
16	1	1	1	1	1.0994
17	-2	0	0	0	0.8994
18	2	0	0	0	1.0258
19	0	-2	0	0	0.6789
20	0	2	0	0	0.9057
21	0	0	-2	0	0.9564
22	0	0	2	0	1.0536
23	0	0	0	-2	0.9986
24	0	0	0	2	0.9697
25	0	0	0	0	1.1421
26	0	0	0	0	1.1768
27	0	0	0	0	1.1639
28	0	0	0	0	1.1352
29	0	0	0	0	1.1275
30	0	0	0	0	1.0883

对表3在不同条件下所测得的刺激小鼠脾淋巴细胞增殖指数SI值,利用Design Expert 7.0.0统计软件进行回归拟合,得到酶解液免疫活性效果SI(Y)的回归方程:

$$Y=1.14 + 0.051X_1 + 0.056X_2 + 0.018X_3 - 0.026X_4 +$$

$$0.026X_1X_2 + 0.0085X_1X_3 - 0.025X_1X_4 - 0.0063X_2X_3 + 0.0082X_2X_4 + 0.0062X_3X_4 - 0.037X_1^2 - 0.080X_2^2 - 0.027X_3^2 - 0.032X_4^2.$$

2.3 模型方差分析

利用Design Expert 7.1统计软件进行二次多元回归拟合,得到回归方程模型的方差分析和回归方程系数估计值,结果见表4。

表4 回归方程的方差分析

Table 4 Variance analysis for the fitted regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	Prob > F
模型	0.392244	14	0.028017	17.06816	< 0.0001
X ₁	0.062546	1	0.062546	38.10312	< 0.0001
X ₂	0.07623	1	0.07623	46.43927	< 0.0001
X ₃	0.008089	1	0.008089	4.927602	0.0423
X ₄	0.015934	1	0.015934	9.707012	0.0071
X ₁ X ₂	0.010723	1	0.010723	6.532179	0.0219
X ₁ X ₃	0.001153	1	0.001153	0.702162	0.4152
X ₁ X ₄	0.01007	1	0.01007	6.13469	0.0257
X ₂ X ₃	0.000635	1	0.000635	0.386865	0.5433
X ₂ X ₄	0.001082	1	0.001082	0.659401	0.4295
X ₃ X ₄	0.000625	1	0.000625	0.380748	0.5465
X ₁ ²	0.038148	1	0.038148	23.23984	0.0002
X ₂ ²	0.174967	1	0.174967	106.5896	< 0.0001
X ₃ ²	0.019544	1	0.019544	11.90639	0.0036
X ₄ ²	0.027923	1	0.027923	17.01032	0.0009
线性	0.024623	15	0.001642		
失拟	0.019847	10	0.001985	2.077938	0.2171
残差	0.004776	5	0.000955		
误差	0.392244	14	0.028017	17.06816	< 0.0001
总和	0.062546	1	0.062546	38.10312	< 0.0001

注: Prob > F 小于0.0500表示差异显著; Prob > F 小于0.0100表示差异极显著; Prob > F 大于0.0500表示差异不显著。

回归方程中各变量对指标(响应值)影响的显著性,由F检验来判定,概率P的值越小,则响应变量的显著性越高。由表4可见,方差分析可以看出模型Prob > F值小于0.01,表明该模型方程高度显著,不同处理间的差异高度显著。模型失拟项的Prob > F值=0.2171 > 0.05,模型失拟项不显著,模型选择合适。由此可见,各具体试验因素对响应值的影响不是简单的线性关系。Joglekar等^[20]建议,一个好的模型,决定系数至少为0.80,本试验R²=0.9409 > 0.8,说明免疫活性效果(Y)实际值与预测值之间具有较好的拟合度,因此该模型可用于预测响应值蛋白水解液免疫活性效果(Y)的实际情况。

根据表4方差分析和回归方程系数显著性检验的结果,将差异不显著的因子剔除后得到的回归方程

为: $Y = 1.14 + 0.051X_1 + 0.056X_2 + 0.018X_3 - 0.026X_4 + 0.026X_1X_2 - 0.025X_1X_4 - 0.037X_1^2 - 0.080X_2^2 - 0.032X_4^2$ 。

对回归方程进行中心标准化处理,可直接从回归系数绝对值的大小来分析各因素的改变对挤压豆粕酶解水程度的影响大小。由回归方程得到: $X_2 > X_1 > X_4 > X_3$ 。说明影响免疫活性效果的因素从大到小依次为:温度、酶添加量、底物添加量、时间。其中影响最大的是温度,然后是酶添加量,酶添加量与温度、底物添加量与酶添加量间有交互作用。

2.4 最适条件的模型验证

综合考虑各项试验因素及其相互作用,根据二次多项回归方程,利用 Design-Expert 7.0.0 设计软件优化出得到酶解挤压膨化豆粕的最佳酶解条件(胰蛋白酶添加酶量 7999.97U/g,酶解温度 55.14℃,水解时间 4.34h,底物添加量 4.41%),并经 MTT 法测定,发现此酶解物对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞的免疫刺激指数达到 1.1894。而模型预测值为 1.1970,相对误差为 0.63%,差异不显著,说明用响应面法优化出的工艺参数合理可靠,实际应用价值高。

3 讨论

研究证明大豆蛋白质中有许多免疫活性的肽,适当的酶解,使肽链末端的活性基团暴露,得到具有生理活性的肽段,因此酶解条件直接影响酶解大豆蛋白质产生的肽组分。水解条件决定着这些高营养蛋白材料水解产物的功能性、低苦味,并且可以得到特定功能性的产品。可通过调节适当的 pH 值、酶与底物比、时间、温度和底物含量,来生产具有活体特征的免疫活性物质^[10]。酶解物的免疫调节活性与水解度之间没有直线相关性的^[21]。大豆肽的免疫活性高于酪蛋白肽^[22],本实验只研究了小鼠 T 淋巴细胞增殖情况,接下来将进行动物性实验,用酶解产物刺激小鼠脾脏细胞,从体液免疫和细胞免疫等方面进一步研究。

本课题组只能从实验结果推测在某一水解程度时,酶解产物的免疫活性最高。由于肽链末端暴露的氨基酸残基不同,水解产物的免疫活性由不同的组分决定着其功能性。不能通过可溶性肽含量来预测免疫活性^[23],其机理需要更深入的研究。

4 结论

在研究中,应用了二次回归旋转设计,利用 Design Expert 7.0.0 SPSS 软件进行结果检验分析,得到最高免疫活性的酶解条件为:胰蛋白酶添加量 7999.97U/g,酶解温度 55.14℃,水解时间 4.34h,底物添加量 4.41%。利用 MTT 法进行检测,发现 ConA 诱导的脾淋巴细胞免疫指数能够达到 1.1894。

参考文献:

- [1] NAGAOKA S, AWANO T, NAGATA N, et al. Serum cholesterol reduction and cholesterol absorption inhibition in Caco-2 cells by a soy protein peptic hydrolyzate[J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry A, 1997, 61: 354-356.
- [2] CORNELLY V V, HARRY G, DRIES B A, et al. Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology[J]. International Dairy Journal, 2002, 12: 813-820.
- [3] YANG Hsinyi, YANG Suhching, CHEB Shutzu, et al. Soy protein hydrolysate ameliorates cardiovascular remodeling in rats with L-NAME-induced hypertension[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2008, 19: 833-839.
- [4] MOURE A, DOMÍNGUEZ H, PARAJÓ J C. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(2): 447-456.
- [5] LI Xiuxia, HAN Lujia, CHEN Longjian. *in vitro* antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008, 88: 1660-1666.
- [6] YANG Bao, YANG Hongshun, LI Jing, et al. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees[J]. Food Chemistry, 2011, 124: 551-555.
- [7] KIM S E, KIM H H, KIM J Y, et al. Anticancer activity of hydrophobic peptides from soy proteins[J]. BioFactors, 2000, 12: 151-155.
- [8] GIBBS B F, ZOUGMAN A, MULLIGAN R M C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food[J]. Food Research International, 2004, 37(2): 123-131.
- [9] FRIEDMAN M, BRANDON D L. Nutritional and health benefits of soy proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(3): 1069-1086.
- [10] 王秋韞, 庞广昌, 陈庆森. 免疫活性肽的研究进展与展望[J]. 食品科学, 2002, 23(7): 136-139.
- [11] JOLLES P, PARKER F, FLOCH D, et al. Immunostimulating substances from human casein[J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 1981, 3: 363-370.
- [12] CHEN J R, SUETSUNA K, YAMAUCHI F. Isolation and characterization of immunostimulative peptides from soybean[J]. Nutritional Biochemistry, 1995(6): 310-313.
- [13] YOSHIKAWA M, TAKAHASHI M. Immunomodulating peptide derived from soybean protein[M]. New York: Annals New York: Acad. of Sci., 1993: 375-376.
- [14] KONG Xiangzhen, GUO Mingming, HUA Yufei, et al. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins[J]. Bioresource Technology, 2008, 99: 8873-8879.
- [15] CHERNG J M, CHIANG W, CHIANG L C. Immunomodulatory activities of edible beans and related constituents from soybean[J]. Food Chemistry, 2007, 104: 613-618.
- [16] 刘芳, 王遂. 酶法提取变性脱脂豆粕中蛋白质的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(3): 85-92.
- [17] TWENTYMAN P R, LUSCOMBE M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity [J]. Br J Cancer, 1987, 56: 279-285.
- [18] WANG Yong, LI Dong, WANG Lijun, et al. Optimization of extrusion of flaxseeds for *in vitro* protein digestibility analysis using response surface methodology[J]. Journal of Food Engineering, 2008, 85: 59-64.
- [19] KONG Xiangfeng, HU Yuanliang, RUI Rong, et al. Effects of Chinese herbal medicinal ingredients on peripheral lymphocyte proliferation and serum antibody titer after vaccination in chicken[J]. International Immunopharmacology, 2004(4): 975-982.
- [20] JOGLEKAR A M, MAY A T. Product excellence through design of experiments[J]. Cereal Foods World, 1987, 32(12): 857-868.
- [21] MAO X Y, YANG H Y, SONG J P, et al. Effect of yak milk caein hydrolysate on Th1/Th2 cytokines production by murine spleen lymphocytes *in vitro*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 638-642.
- [22] YAMAUCHI F, SUETSUNA K. Immunological effects of dietary peptide derived from soybean protein[J]. J Nutr Biochem, 1993, 8(4): 450-457.
- [23] 杨华, 刘玉花, 马丽珍, 等. 羊骨蛋白酶解物免疫活性及酶解条件的研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(10): 3214-3221.