

小黑豆多肽加工工艺的研究

王常青, 任海伟

(山西大学生命科学与技术学院, 山西 太原 030006)

摘 要: 本研究采用双酶分步水解法制备小黑豆多肽。最佳工艺条件为: 先用枯草杆菌碱性蛋白酶, 在 50℃、pH9.0 下水解经预处理的小黑豆分离蛋白 4h; 再用霉菌中性蛋白酶在 pH 7.0、50℃水解 4h, 加酶量均为 4000U/g。该工艺的多肽得率可以达到 80% 以上, 水解度(DH%)为 32.75%。凝胶色谱分析表明, 小于 10000D 的多肽可达到总多肽的 91.61%。

关键词: 小黑豆多肽; 双酶水解; 多肽得率; 分子量分布; 水解度

Study on Preparation Technology of Small Black-soybean Peptide

WANG Chang-qing, REN Hai-wei

(Institute of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The optimum conditions about sequentially hydrolyzing small black-soybean protein isolated were: the small black-soybean were hydrolyzed by alkaline proteinases in the condition of pH 9.0, 50 °C for 4 hours, and then, hydrolyzed continuously by neutral protease in the condition of pH7.0, 50 °C for 4 hours, and the quantity of pronase is 4000U/g. The peptide yield reached 80%, and the degree of hydrolysis (DH) of black-soybean protein isolate is 32.75%. The result of gel chromatography showed that the percentage of the component of black-soybean peptides with a molecular weight below 10000 D 91.61 %.

Key words small black-soybean peptide; double enzymolysis; peptide yield; molecular weight distribution; DH

中图分类号: TS214.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)05-0231-03

黑豆又称乌豆, 主要分布在东北、华北、西北和西南地区, 约占全国大豆栽培面积的 8% 左右。现代分析表明, 多数黑豆品种的蛋白质含量比黄豆高, 而且含有抗氧化和美容作用的黑色素。山西的小黑豆品种独特, 属高蛋白低脂肪型大豆, 经测定, 蛋白质含量高达 50% 左右, 氨基酸评分可以达到 70, 高于普通大豆, 是一种优质蛋白资源。但是, 小黑豆子叶坚硬, 蛋白质分子高度压缩折叠, 不易深加工和食用。

大豆多肽是由大豆蛋白水解成的分子量小于 10000D 的混合肽, 已有研究表明, 大豆多肽具有降血脂和降血压等多种保健作用^[1]。本研究用自制的小黑豆多肽进行动物实验, 发现它不仅具有以上保健作用, 还有抗氧化和抗衰老作用, 可以提高大鼠皮肤弹性, 是潜在的保健食品和美容抗皱护肤品原料。目前尚未见到关于小黑豆多肽的研究报道。本研究采用山西特有的腰型小黑豆为原料提取分离蛋白, 通过复合酶水解生产黑豆多肽, 为小黑豆的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小黑豆分离蛋白

选用山西省静乐县腰型小黑豆, 经过筛选、去皮、烘干后, 用正己烷回流脱脂 1h; 将脱脂豆粉与水按一定比例混合, 用 NaOH 调 pH8.5~9.0, 在 55℃ 的水浴中保温搅拌 1.0h, 然后离心取上清液; 沉淀物进行二次提取、离心; 两次上清液合并后, 调 pH 到 4.0~4.2 沉淀蛋白, 并水洗两次; 水洗蛋白用碱液调 pH 到中性, 然后喷雾干燥, 得到成品。

1.1.2 凝胶色谱材料与生化试剂

木瓜蛋白酶、2709 碱性蛋白酶、AS1.398 中性蛋白酶 广西庞博生物有限公司; 霉菌中性蛋白酶 山西大学生物工程室; 葡聚糖凝胶 G50、标准分子参照物蓝色葡聚糖-2000、核糖核酸酶、胰高血糖素、缩宫素等 上海蓝季科技有限公司。

1.2 仪器与设备

凝胶色谱系统(HD-003-C 紫外检测仪和 XWT-1044S 台式记录仪) 上海天成科技有限公司; 生物反应罐 江

收稿日期: 2007-09-20

基金项目: 山西省科技攻关项目(2006031074)

作者简介: 王常青 (1956-), 男, 教授, 研究方向为小杂粮深加工和功能食品。E-mail: wcq@sxu.edu.cn

苏东方生物工程设备公司; TDL-5 高速离心机 上海安亭科学仪器厂; ORION818 pH 计 美国奥立龙公司。

1.3 总氮测定和多肽得率计算方法

总氮采用半微量凯氏定氮法测定; 多肽得率按照样品中的总氮量与水解后离心上清液总氮量的比值进行计算:

$$\text{多肽得率}(\%) = \frac{\text{离心上清液中总氮量}}{\text{样品中的总氮含量}} \times 100$$

1.4 氨基酸态氮含量和肽链水解度(DH)测定

氨基酸态氮按照 GB/T5009.39-2003 的甲醛滴定法测定; 蛋白肽链水解度的计算。

$$\text{DH}(\%) = \frac{\text{水解后离心上清液中氨基酸态氮} - \text{样品中的氨基酸态氮}}{\text{样品中的总氮量}} \times 100$$

1.5 小黑豆分离蛋白水解试验

1.5.1 小黑豆分离蛋白的预处理温度试验

准确称取小黑豆分离蛋白, 配制成一定浓度(m/V)的蛋白溶液, 依次按 80、85、90、95、100℃恒温预处理 15min; 然后按每克蛋白加入 4000U 碱性蛋白酶, 在 pH9.0 和 55℃下分别水解 4h, 比较多肽得率, 确定最佳预处理温度。

1.5.2 水解用蛋白酶的筛选及加酶量比较

分别将碱性蛋白酶(A)、枯草杆菌中性蛋白酶(B)、霉菌中性蛋白酶(C)和木瓜蛋白酶(D)4种酶加入预处理的小黑豆分离蛋白溶液中, 各设置 2000、4000、6000U/g 三个加酶组, 调节到各酶的最佳温度和最佳 pH 值, 恒温水解 4h。其中碱性蛋白酶用 0.5mol/L NaOH 保持水解过程中的 pH 值。水解结束后, 95℃灭酶 10min 后冷却。调节水解液到 pH4.3, 在 4000r/min 离心 15min, 取上清液测总氮和氨基酸态氮含量, 比较不同条件的多肽得率、水解度及不同加酶量对应的多肽得率。

1.5.3 水解时间试验与双酶水解组合方案

根据前步试验筛选确定的两种效果好的蛋白酶, 用浓度 8% 的小黑豆分离蛋白溶液进行双酶同步或分步水解 4h, 观察双酶水解的效果, 并确定最适水解时间。

1.6 黑豆多肽分子量分析方法

用 0.1mol/L Tris-HCl 洗脱液平衡处理 Sphe dex G-50 凝胶柱后, 在 280nm 波长的条件下, 用蓝色葡聚糖-2000 测定凝胶柱的外水体积。在同样条件下按 4mg/ml 注入标准蛋白核糖核酸酶(13.7kD)、胰高血糖素(3483D)和缩宫素(1008D)各 1ml, 得到三个紫外吸收峰。根据标准蛋白分子量的对数(logMr)和出峰体积制作标准曲线和回归方程。将多肽样品在同样条件下的紫外吸收图谱与标准蛋白的图谱对比, 或带入回归方程计算, 确定样品多肽分子量分布。

2 结果与分析

2.1 小黑豆分离蛋白液预处理温度的确定

图 1 表明, 黑豆分离蛋白在 95℃水浴 15min, 多肽得率最高。可能是黑豆蛋白含有较多的二硫键, 在一定温度下热处理可破坏这些共价键, 降低黑豆蛋白溶液的黏度, 使黑豆蛋白致密的立体结构变的松散, 成为柔韧的直链状态, 易于被蛋白酶水解, 因此提高了多肽水解得率。当加热温度过高时, 蛋白质分子可能会通过疏水结合形成网状聚合物, 阻碍蛋白酶的酶解作用, 降低多肽得率^[2]。

2.2 水解用酶和加酶量的选定

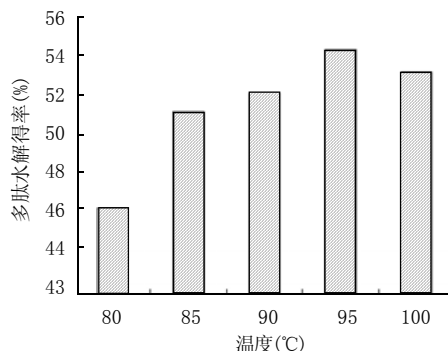


图 1 预处理条件对多肽得率的影响

Fig.1 Effects of processing conditions on peptide yield

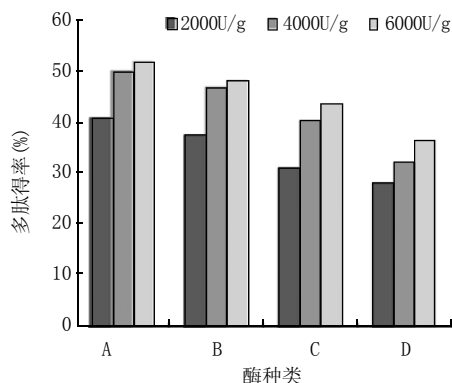


图 2 酶种类对多肽水解得率的影响

Fig.2 Effects of variety of enzyme on peptide yield

由图 2 可知, 相同加酶量时, 多肽得率高低顺序为: 碱性蛋白酶(A) > 枯草杆菌中性蛋白酶(B) > 霉菌中性蛋白酶(C) > 木瓜蛋白酶(D)。但由图 3 可以看出, 蛋白水解度 DH 的高低顺序为: C > A > B > D。在这四种酶中, 用碱性蛋白酶水解黑豆蛋白可以得到的多肽最多, 而霉菌中性蛋白酶水解肽键的效率最高。兼顾提高多肽得率和提高蛋白水解度(DH)两方面的因素, 最终选用枯草杆菌碱性蛋白酶和霉菌中性蛋白酶为双酶同步(或分步)水解试验用酶。从图 2、3 还可以看出, 随着加酶量的增加, 多肽得率与 DH 也在上升, 但是加酶量超过 4000U/g 后, 多肽得率上升幅度很小, 因此, 最终确定以上两种酶的最佳添加量为 4000U/g 蛋白。

2.3 水解时间的分析

实验表明, 无论是双酶同步水解还是分步水解, 多肽得率均随时间的延长而上升, 但 3.5h 后增幅很小;

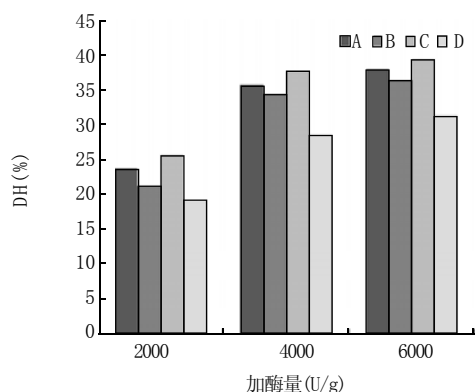


图3 酶种类和加酶量对水解度的影响

Fig.3 Effects of the variety of enzyme and optimal enzyme quantity on DH

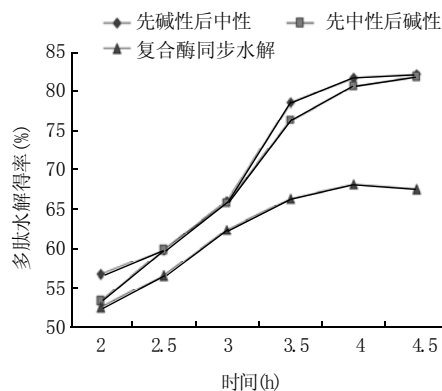


图4 酶组合方式对水解度的影响

Fig.4 Effects of mode of combination of enzyme on rate of peptides production

同步水解 4.5h 时得率反而下降(图4)。可能是因为随着时间延长,多肽之间通过非共价键(如疏水基作用、氢键和配位键)相互聚集,产生了聚合反应,导致多肽减少^[3]。所以最终确定水解最佳水解时间为 4h。

2.4 复合酶组合方式的比较

在双酶同步水解(组合1)、先碱性-后中性蛋白酶分步水解(组合2)和先中性-后碱性蛋白酶分步水解(组合3)三种组合试验中,组合1的多肽水解得率和DH最低,可能是因为该水解条件下所选的pH值不在双酶各自最佳活性范围,致使酶活性不能充分发挥(图4、表1);组合2和3的水解得率接近(图4),但是组合2水解产物的DH却比组合1高18.30%(表1),说明先用碱性蛋白酶、再用中性蛋白酶水解黑豆蛋白,切断肽链的效率相对较高;用凝胶色谱检测分析也表明(图5),在两种水解产物中,组合3中水解不完全的大分子比例较多(A处对应的分子量为10000D,B处为3100D),而组合2水解产物中大分子比例很小,对小分子多肽的水解有利。可能是先用碱性蛋白酶处理黑豆蛋白,能使其中的疏水基团更充分的破坏、外露,增大了蛋白质的水溶性,因而有利于霉菌中性蛋白酶的进一步作用^[4-5]。

根据标准蛋白得到的回归方程 $y = -124.61x + 570.15$ ($Vt = -124.611gMr + 570.15$) 和面积积分法计算得知:采

用先中性、后碱性蛋白酶水解黑豆多肽,分子量分布为:分子量大于10000D的为15.27%,10000~3100D的占64.39%,小于3100D占30.33%;而采用先碱性、后中性蛋白酶水解的分子量分布为:分子量大于10000D的多肽仅为8.39%,10000~3100D的占54.35%,小于3100D占37.25%,大分子明显减少。因此,从总体上看,双酶水解组合2(先碱性-后中性)的水解效果最好。

表1 蛋白酶不同组合方式的效果比较

Table 1 Effects comparison of different modes of combination of protease

组合方案	温度 (°C)	pH	水解时间 (h)	加酶量 (U/g)	DH (%)	多肽得率 (%)
组合1	50	7.54 (碱性+中性蛋白酶)	4	4000	14.45	68.25
组合2	50	9.0 4(碱性蛋白酶)	4	4000	32.75	81.69
组合3	50	7.0 4(中性蛋白酶)	4	4000	29.17	80.72
	50	9.0 4(碱性蛋白酶)	4	4000		

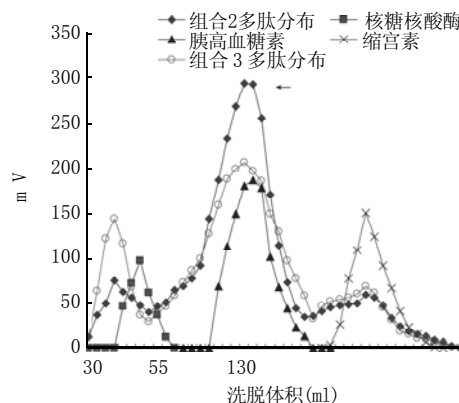


图5 黑豆多肽分子量分布

Fig.5 Molecular weight distribution of black-soybean peptide

3 结论

采用95℃预处理小黑豆分离蛋白15min,可使其致密的蛋白结构松散而易于水解,提高多肽得率。采用先用碱性蛋白酶、后用霉菌中性蛋白酶分步二次水解,效果好于该这两种酶的同步水解或先中性、后碱性酶分步水解。当碱性蛋白酶用量4000U/g,在pH9.0、50℃下水解4h后,再用等量的霉菌中性蛋白酶在pH7.0、50℃水解4h,可以使分子量小于10000D的多肽达到90%以上,其中小于3100D的占37.25%,水解度为32.75%。

参考文献:

- 蒋文强,孙显慧.大豆多肽的功能特性及其开发应用[J].粮油加工与食品机械,2004(7):39.
- 李书国,陈辉,庄玉亭,等.复合酶法制备活性大豆寡肽研究[J].粮食与油脂,2001(3):5-7.
- 于泓鹏,唐传核,曾庆孝,等.大豆分离蛋白水解多肽聚集物的组成及相互作用[J].华南理工大学学报:自然科学版,2006,34(8):105-109.
- 刘欣.食品酶学[M].北京:中国轻工业出版社,2006.
- TSUMURA K, SAITO T, TSUGE K, et al. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis[J]. LWT Food Science and Technology, 2005, 38(3): 255-261.