

Alcalase 水解大豆蛋白制备大豆蛋白寡肽的研究

班玉凤, 朱海峰, 孙明珠

(沈阳工业大学石油化工学院, 辽宁 辽阳 111003)

摘要: 研究了 Alcalase 水解大豆蛋白制备大豆蛋白寡肽时影响水解效果的各种因素, 在此基础上通过正交试验确定了 Alcalase 水解大豆蛋白的水解条件: 温度 70 ℃, 底物浓度 60 g/L, Alcalase 酶与底物比为 20 μL/g, pH 7.5, 水解时间为 4 h。在此水解条件下, 水解液水解度达到了 24.1%。

关键词: Alcalase; 大豆蛋白; 水解度

中图分类号: TS201.2; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)11-0051-03

Preparation of Soybean Oligopeptides by Alcalase-catalyzed Hydrolysis of Soybean Protein

BAN Yu-feng, ZHU Hai-feng, SHUN Ming-zhu

(College of Petrochemical Engineering, Shenyang University of Technology, Liaoyang 111003, China)

Abstract: The effects of several factors on the alcalase-catalyzed hydrolysis of soybean protein, such as the enzyme dosage, temperature, pH value and reaction time, were studied. The orthogonal test showed that the optimized hydrolysis conditions were as follow: pH value of 7.5, reaction temperature of 70 ℃, alcalase dosage of 20 μL/g protein, substrate concentration of 60 g/L, and total reaction time of 4 h. Under these conditions the hydrolysis degree of soybean protein reached 24.1%.

Key words: Alcalase; soybean protein; hydrolysis degree

大豆是蛋白质含量最丰富的植物之一, 含量为 40%, 若以干重计算几乎接近 50%, 这与动物食品中蛋白质含量很接近^[1]。大豆蛋白是植物性食物中氨基酸组成比例最合理、最接近于 FAO/WHO 理想模式的蛋白质。由于大豆蛋白质分子结构复杂, 分子量较大 (80%大豆蛋白质分子量均在 10 万以上), 所以其溶解度低、消化率和生物效价不及牛乳蛋白和鸡蛋蛋白等动物蛋白。近年来, 通过酶法水解大豆蛋白来提高大豆蛋白的营养保健价值及加工功能特性的研究得到人们的重视。大豆蛋白经酶解变成较小的肽还可以释放出降低胆固醇、抗过敏、抑制血压、提高机体耐力等生物活性作用。

文献中报道的蛋白质酶解过程多采用碱性蛋白酶^[2]。Alcalase^[4]是国内外研究最多的一种高效细菌蛋白酶, 它由选育出的地衣芽孢杆菌产生, 该酶的有效成分枯草杆菌蛋白酶是一种非特异性碱性内切蛋白酶, 主要作用于含疏水性羧基的肽键, 催化部位是丝氨酸。

1 实验

收稿日期: 2007-07-04

作者简介: 班玉凤(1969-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为生物酶催化

1.1 实验原料及药品

枯草杆菌 (Alcalase) 碱性蛋白酶 2.4 L: 食品级 (酶活力 2.4 AU/g), 丹麦 NOVO 公司出品; 大豆蛋白 (含水量 7.35%, 蛋白质含量 69.6%); 其它试剂为国产试剂。

1.2 实验仪器

精密酸度计: pHs-2 型, 上海雷磁仪器厂; 台式离心机: 80-1 型, 江苏省金坛市医疗仪器厂; 超级恒温水浴: 501 型, 上海市实验仪器厂; 水夹套式三口玻璃反应釜: 250 mL, 自加工; 磁力搅拌器: 78-1 型, 国华电器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酶解反应

将大豆蛋白在 105 ℃ 下干燥至恒重, 称取一定量上述原料加入发酵罐 (置于磁力搅拌器上), 按照设计的底物浓度向反应釜中补适量自来水。连接反应釜和超级恒温水浴, 然后启动磁力搅拌器和超级恒温水浴, 在反应釜上安装 pH 计电极, 在搅拌下以一定方式加入蛋白酶进行水解, 在反应过程中不断进行搅拌, 并滴加 2 mol/L NaOH 维持 pH 值不变。水解结束后, 水解液经过高温灭活 (95 ℃ 下加热 5 min), 在 4000 r/min

的条件下离心 10 min, 取适量上清液供分析用。

1.3.2 蛋白质水解度 (HD) 测定

根据文献^[4-6]介绍的甲醛滴定法测定。水解度的定义为在水解过程中打开的肽键占蛋白质肽键总数的百分比。

2 结果与讨论

2.1 单因素水解条件的考察

2.1.1 pH 值对水解度的影响

水解条件: 酶与底物比 15 $\mu\text{L/g}$; 底物浓度 60 g/L ; 水解时间 2 h; 温度 60 $^{\circ}\text{C}$ 。实验结果如图 1 所示。

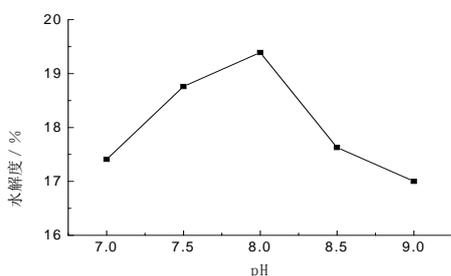


图 1 pH 值对 Alcalase 水解性能的影响

Fig.1 Effect of pH on hydrolysis performance of Alcalase

由图 1 可以看出, 水解度随着 pH 值的增大先升后降, 即存在着最佳的 pH 值, 可选择 pH=7.5~8.5 为适宜调控范围。

2.1.2 温度对大豆蛋白水解率的影响

水解条件: 酶与底物比 25 $\mu\text{L/g}$; 底物浓度 60 g/L ; 水解时间 2 h; pH 值 8.0。实验结果如图 2 所示。

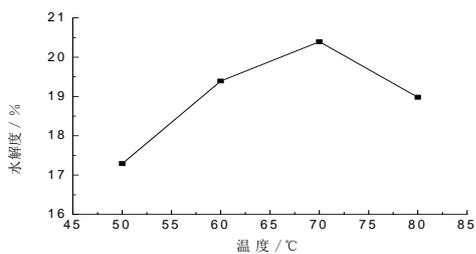


图 2 温度对 Alcalase 水解性能的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis temperature on Performance of Alcalase

由图 2 可以看出, 在 pH 值为 8.0 的条件下水解大豆蛋白时, 水解度随着温度值的增大先升后降, 即存在着最佳的温度, 可选择 60~80 $^{\circ}\text{C}$ 为 Alcalase 的适宜温度范围。

2.1.3 酶与底物比对大豆蛋白水解度的影响

水解条件: 水解温度 60 $^{\circ}\text{C}$; 底物浓度 60 g/L ; 水解时间 2 h; pH 值 8.0。实验结果见图 3。

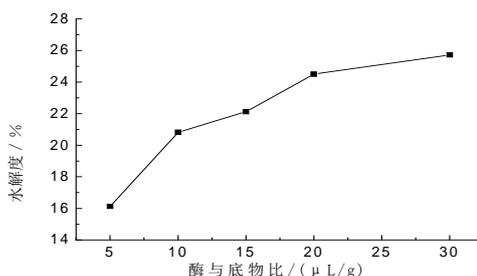


图 3 酶与底物比对 Alcalase 水解性能的影响

Fig.3 Effect of protease / substrate ratio on hydrolysis performance of Alcalase

由图 3 可以看出, 随着酶与底物比的增加, 水解度呈上升趋势, 但是当酶与底物比达到 20 $\mu\text{L/g}$ 以后, 再增加酶与底物比水解度的增加不是非常显著, 这可能是因为酶与底物比高于 20 $\mu\text{L/g}$ 以后酶在底物表面的吸附作用已达到饱和, 多出的酶不能在底物上起作用之故。考虑到成本问题, 我们选择酶与底物比为 10~20 $\mu\text{L/g}$ 。

2.1.4 底物浓度对大豆蛋白水解率的影响

水解条件: 水解温度 60 $^{\circ}\text{C}$; 酶与底物比 20 $\mu\text{L/g}$; pH 值 8.0; 水解时间 2 h。实验结果如图 4 所示。

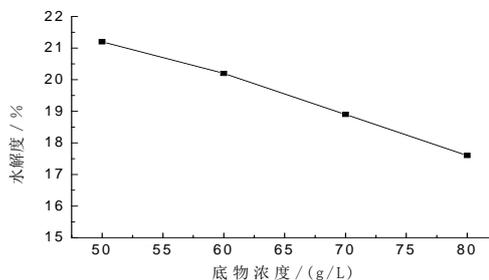


图 4 底物浓度对 Alcalase 水解性能的影响

Fig.4 Effect of concentration of substrate on performance of Alcalase

由图 4 可以看出, 随着底物浓度的增加, 水解度逐渐下降。而为了在单位时间里得到更多的产品, 底物浓度又不能太低, 所以底物浓度取为 50~70 g/L 。

2.2 正交试验确定大豆蛋白的最佳水解条件

考虑到各因素的相互依赖和相互制约, 导致对酶解效果的影响, 进行正交试验以确定各参数的最佳组合。

按正交表 $L_9(3^4)$ 设计试验, 以水解度测定指标, 拟定出实验方案(见表 1)来考查 4 个因素对水解效果的影响, 水解时间为 2 h。

从正交试验得到的最佳水解条件为: 底物浓度 50 g/L , 水解温度 70 $^{\circ}\text{C}$, 酶与底物比 20 $\mu\text{L/g}$, pH 值 7.5。

表 1 正交实验因素水平

Table 1 The factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	A(温度/°C)	B(pH)	C(酶与底物比, E/Se)	D(底物浓度/g/L)
1	65	7.5	10	50
2	70	8	15	60
3	75	8.5	20	70

表 2 正交实验结果

Table 2 The results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	水解度
1	1	1	1	1	15.3
2	1	2	2	2	18.2
3	1	3	3	3	16.9
4	2	1	2	3	16.7
5	2	2	3	1	22.1
6	2	3	1	2	15.6
7	3	1	3	2	19.8
8	3	2	1	3	11.3
9	3	3	2	1	16.4
k ₁	16.80	17.27	14.07	17.93	
k ₂	18.13	17.20	17.10	17.87	
k ₃	15.83	16.30	19.60	14.97	
R	2.30	0.90	5.53	2.90	
优方案	A ₂	B ₁	C ₃	D ₁	

由极差分析可知,酶与底物比对水解度的影响最大,所以取为 20 μL/g 为宜。对于底物浓度,一水平和二水平的水解度均值相差不大,所以拟取底物浓度为 60 g/L。因此以正交实验为基础,综合考虑以上原因,确定水解条件为:底物浓度 60 g/L,水解温度 70 °C,酶与底物比 20 μL/g, pH 值 7.5。测定了在此条件下大豆蛋白水解 2 h 的水解度为 24.1%。

2.3 水解时间考查

影响酶解蛋白水解程度的另一重要因素为反应时间,在以上最佳水解条件下,考察了大豆蛋白降解率和水解度随时间的变化情况,结果如图 5 所示。

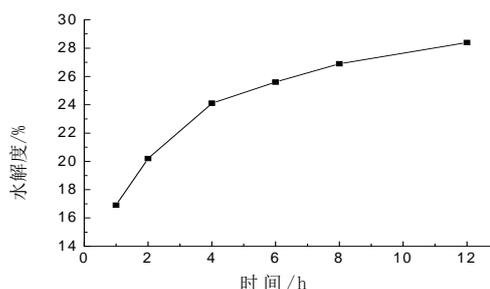


图 5 水解度随时间的变化

Fig.5 Progress of soybean protein hydrolysis with Alcalase

由图 5 可以看出,随着水解时间的延长,水解度不断增加,但当水解时间为 4 h 后,再延长水解时间,水解度增加很慢,所以水解时间可取为 4 h,此时水解度达到 24.1%。

3 结论

确定了大豆蛋白水解反应的较佳条件为:温度 60 °C,底物浓度 60 g/L,Alcalase 与底物比为 20 μL/g, pH 值为 7.5,水解时间为 4 h。在此水解条件下,水解液水解度达到了 24.1%。水解度越高,水解所生成的寡肽越多,越有利于人体吸收。

参考文献

[1] 崔洪斌.大豆生物活性物质的开发与应用[M].北京:中国轻工业出版社,2001,1-2

[2] 邓勇,等.微生物蛋白酶对大豆分离蛋白水解作用的研究[J].食品科学,1999 20(6):42-45

[3] 肖凯军.酶解大豆分离蛋白的特性的研究[J].广州食品工业科技,1995,6(2):1-6

[4] 赵新淮,等.蛋白质水解物水解度的确定[J].食品科学,1994(11):65-67

[5] Alder-Nissen J. Enzyme Hydrolysis of Food Protein[M]. London: Elsevier 1986,427

[6] 张龙翔,等.生化实验方法和技术(第二版),北京:高等教育出版社,1997.7

(上接第 57 页)

[4] Castillo Enrique, Conejo Antonio, Hadi Alis, A general method for local sensitivity analysis with application to regression models and other optimization problems [J].Technometrics,2004, 46(4):430-444

[5] 王静,沈立松.先天性心脏病患儿体外循环围术期凝血指标检测的临床意义[J].检验医学,2006,21(03):272-275

[6] Huang Ronghua, Du Yumin, Yang Jianhong. Influence of

functional groups on the in vitro anticoagulant activity of chitosan sulfate[J]. Carbohydrate Research,2003,338(6):483-489

[7] Yade Tohru, Nakano Tamaki. Anionic polymerization of 2,7-Di-t-butylidibenzofulvene: Synthesis, structure, and photophysical properties of the oligomers with a π-stacked conformation[J]. Journal of Polymer Science,2006,44(01):561-572