

文章编号: 1673 1689(2011)01-0101-05

氨肽酶与中性蛋白酶协同水解大豆分离蛋白的研究

吕广林, 田亚平*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以大豆分离蛋白为底物, 游离氨基酸含量、多肽分布、水解度为指标, 氨肽酶 ProteAXG 为对照, 开展中性蛋白酶和氨肽酶双酶协同水解的研究。在底物质量浓度 6 g/dL, 中性蛋白酶添加量 5 000 U/g, 氨肽酶添加量 9.75×10^5 U/g, pH 8.5, 温度 50 °C, 水解 4 h 后, 水解液中游离氨基酸含量 13.6 mg/mL, 多肽相对分子质量在 1 100 以下, 其中 600 左右的多肽约占 16%, 二肽三肽约占 75%, 水解度达 50.8%。氨肽酶与中性蛋白酶优化后, 水解度达 62%。结果表明: 该氨肽酶无论单独或与中性蛋白酶组合水解, 都能达到较为深度的水解效果。

关键词: 大豆分离蛋白; 氨肽酶; 中性蛋白酶; ProteAXG 酶; 水解

中图分类号: Q 55

文献标识码: A

Study on Hydrolysis of Soybean Protein Isolate by Aminopeptidase and Neutral Protease

LV Guang-lin, TIAN Yaping*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: This manuscript with soybean protein isolate as the substrate to study the optimum enzyme hydrolysis parameters of the combination of the neutral protease and aminopeptidase. with free amino acids, peptide distribution, the hydrolysis degree as indexes and aminopeptidase ProteAXG as the control, the optimum conditions were determined and listed as follows: temperature 50 °C, substrate concentration of 6%, neutral protease addition ratio E/S= 5000U/g, aminopeptidase addition ratio E/S= 9.75×10^5 U/g, pH 8.5 and 4h. Under the optimum conditions, the results of the hydrolyzate is that: the content of free amino acid in the hydrolyzate is 13.6 mg/mL, which is 1.95 times than that of ProteAXG hydrolysis, the molecular weight of the polypeptide is less than 1100D, which consist of by 16% of 600D and 75% of dipeptide and tripeptide. The hydrolysis degree achieved at 50.8%. Under the optimum conditions, the degree of hydrolysis is up to 62%. From the above results, we concluded that aminopeptidase from *Bacillus subtilis* either alone or in combination with the neutral protease, can hydrolyze the soybean isolated protein in depth.

Key words: soybean protein isolate, aminopeptidase, neutral protease, hydrolysis

收稿日期: 2010-01-16

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2008BAI63B06)。

* 通信作者: 田亚平(1964-)女, 安徽淮南人, 工学博士, 教授, 主要从事生物活性物质研究。Email: yapingtian@hotmail.com

蛋白质的彻底水解不仅需要内切酶, 还需要外切酶的参与。大豆分离蛋白经酶深度水解后, 产物主要为游离氨基酸和寡肽, 与大豆分离蛋白相比, 寡肽除氨基酸组成与大豆蛋白一样具有优质蛋白的特点以外, 还具有大豆蛋白所不具备的良好的溶解性、稳定性等理化性质^[1], 而且具有易吸收和低过敏性等多种功能。

蛋白质的水解度是在水解过程中打开的肽键占蛋白质肽键总数的百分比, 是描述蛋白质水解程度的一个非常重要的指标。随着水解度的增加, 蛋白水解产物的溶解性增大、肽链变短, 相对分子质量变小^[2]。目前国内酶法水解大豆分离蛋白^[3], 所用的酶主要有木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶 2.709、酸性蛋白酶、Alcalase、Promatex、Flavourzyme 等, 单酶的水解度一般在 30% 以下^[4,5], 水解后的肽相对分子质量大都在 500~1200 之间^[6]。

氨肽酶是一类从多肽链 N 末端顺序逐个水解氨基酸的酶^[7]。可用作蛋白质序列测定的分子工具, 在食品工业上通常与蛋白酶复合使用, 广泛应用于调味品和奶酪的生产、蛋白水解液脱苦、蛋白质深度水解和多肽的制备等方面^[8]。国外氨肽酶的研究主要在分子^[9,10], 基因克隆方面^[11], 并有成品氨肽酶生产, 如日本天野的肽酶, NOVO 公司的风味蛋白酶(Flavourzyme), 它们既含有外切酶活, 又有内切酶活。目前国内对氨肽酶研究较少, 产品化的氨肽酶还没有, 使用的少量氨肽酶大都是从动物类中提取制得^[12]。作者从豆腐乳中分离得到一株能产氨肽酶的枯草芽孢杆菌 Zj016, 该酶是一种金属酶, 主要含有外切酶活性, 因其最适 pH 值在 8~10, 有与碱性蛋白酶^[13]、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶组合水解的应用潜力。作者主要选择中性蛋白酶与氨肽酶开展单独与组合水解大豆分离蛋白的研究, 从而考察该枯草芽孢杆菌氨肽酶在蛋白质原料深度水解方面的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆分离蛋白: 黑龙江省三江食品公司产品(蛋白质质量分数 90%); 氨肽酶: 作者所在实验室制备; 中性蛋白酶: 夏盛实业集团有限公司提供; ProteAXG 酶: 日本天野公司产品。

1.2 主要仪器

氨基酸分析液相色谱仪: 美国安捷伦公司产品; 高效液相色谱仪 Waters 600; 配 2487 紫外检测

器和 Empower 工作站, Waters 公司产品; 酸度计 Delta320: 梅特勒托力多公司产品; 电光分析天平 TG-328A: 梅特勒公司产品; 高速冷冻离心机 Hima CR22G: 日本日立(HITACHI)公司产品; 电热恒温水浴锅: 上海医疗器械五厂产品。

1.3 主要方法

1.3.1 氨肽酶的制备 枯草芽孢杆菌 Zj016 发酵液 4℃, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液; 用质量分数为 18% 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 澄清; 离心取上清液用相对分子质量 50000 的超滤膜超滤浓缩; 得浓缩液用相对分子质量 30000 的超滤膜脱盐; 体积分数 68% 乙醇醇沉; 沉淀真空冷冻干燥得氨肽酶酶活为 4.0×10^5 U/g。

1.3.2 酶活测定方法 氨肽酶活力测定: L-PAN 法^[14]; 内切蛋白酶活力测定: Folin 酚试剂法^[15]。

1.3.3 甲醛滴定法测定水解度 参考文献[16-17]进行。

1.3.4 游离氨基酸含量测定 分析方法: OPA、FMOC 柱前衍生化法; 色谱条件: 色谱柱(D 46 mm×250 mm, 5 μm) ODS HYPERSIL; 柱温: 40℃; 流动相: A 相 称取 8.0 g 结晶乙酸钠, 加入 1000 mL 水搅拌至结晶溶解, 再加入 225 mL 三乙胺, 搅拌并滴加体积分数 5% 的醋酸, 将 pH 调到 7.20, 加入 50 mL 四氢呋喃, 混合后备用; B 相: 称取 8.0 g 结晶乙酸钠, 加入 400 mL 水搅拌至结晶溶解, 搅拌并滴加体积分数 2% 的醋酸, 将 pH 调到 7.20, 将此溶液加入 800 mL 乙腈和 800 mL 甲醇, 混合后备用。体积流量: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 338 nm 梯度洗脱。

1.3.5 大豆分离蛋白水解液中多肽分布的测定 色谱条件 色谱柱: TSKgel 2000 SWXL 300 mm×7.8 mm; 流动相: V(乙腈): V(水): V(三氟乙酸) = 45: 55: 0.1; 体积流量: 0.5 mL/min; 柱温: 30℃。

样品制备: 吸取样品 2 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 用微孔过滤膜过滤后供进。

相对分子质量校正曲线所用标准品: 细胞色素 C(MW12500); 杆菌酶(MW1450); 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(MW451); 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(MW189)。

1.3.6 酶水解大豆分离蛋白 首先对大豆分离蛋白预处理, 配成底物质量浓度为 6 g/dL 的溶液, 在 85℃恒温水浴 15 min, 冷却室温, 调到所需 pH 值, 在水浴锅中调到反应温度, 加入所需酶, 不断的搅拌, 用 2 mol/L NaOH 滴定, 维持反应 pH 值, 精确

到±0.1, 每隔 30 min 记录一次碱液消耗量, 达到预定反应时间使水解液迅速升至 90 ℃加热 10 min, 钝化水解液; 水解液离心 20 min, 取上清液冷冻保藏。

2 结果与分析

2.1 ProteAXG 酶水解大豆分离蛋白

以国外氨肽酶 ProteAXG 为对照, ProteAXG 外切酶活: 3.90×10^6 U/g、内切酶活: 55 000 U/g。水解条件: pH 8.5, 温度 60 ℃, 外切酶加量 9.75×10^5 U/g, 内切酶加量 4 500 U/g, 底物质量浓度为 6 g/dL, 水解 4 h。在此条件下水解后, 将水解液分别进行水解度、游离氨基酸、多肽分布分析, 结果见图 1、图 2。

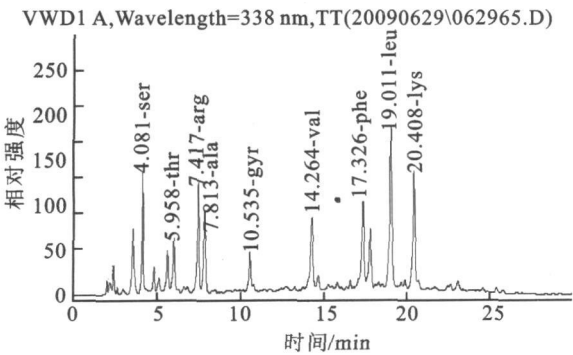


图 1 ProteAX 酶水解大豆分离蛋白液中游离氨基酸的图谱

Fig.1 ProteAX enzymatic hydrolysis of soy protein isolate solution of free amino acid pattern

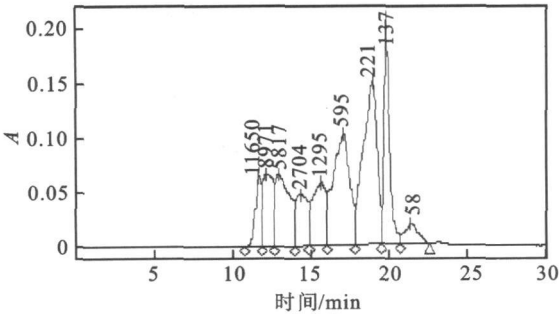


图 2 ProteAX 酶水解大豆分离蛋白液中的多肽分布图谱

Fig.2 ProteAX enzymatic hydrolysis of soy protein isolate solution of Peptide distribution

由图 1 可知, 蛋白水解液中游离氨基酸的质量浓度为 6.832 mg/mL, 由图 2 可知, 水解液中有大分子物质存在, 相对分子质量从 5 000~12 000 的大分子约占 12%, 在 600~5 000 左右的多肽约占 45.77%, 其中三肽二肽约占 40.76%, 甲醛法测得终水解度为 19.3%。

2.2 氨肽酶、中性蛋白酶单独水解大豆分离蛋白

氨肽酶水解, 在外切酶活添加量与 ProteAXG

的添加量相同, 氨肽酶的最适水解条件下, 水解液游离氨基酸含量为 13.379 mg/mL, 多肽相对分子质量在 6 000 以上的几乎没有, 在 5 000 左右约占 0.87%, 相对分子质量 600 左右的约占 28%, 三肽二肽约占 63.76%, 甲醛法测定水解度为 50%。

中性蛋白酶, 优化条件后, 在温度 45 ℃, pH 8.5, 酶加量 8 000 U/g, 底物质量浓度 6 g/dL 下水解 4 h, 蛋白水解液游离氨基酸的含量为 1.796 mg/mL, 水解液中还有大分子物质存在, 相对分子质量从 5 000~16 000 的大分子约占 2%, 在 600 左右的多肽约占 35%, 其中三肽二肽约占 54%, 甲醛法分析最终水解度为 15.6%。

2.3 氨肽酶和中性蛋白酶双酶协同水解大豆分离蛋白

与国外氨肽酶相比, 在温度 50 ℃, pH 8.5, 底物质量浓度 6 g/dL, 中性蛋白酶加量 5 000 U/g, 氨肽酶加量 8×10^5 U/g, 水解 4 h, 将水解液分别进行水解度、游离氨基酸、多肽分布分析, 结果见图 3、图 4, 大豆蛋白原液多肽分布如图 5。

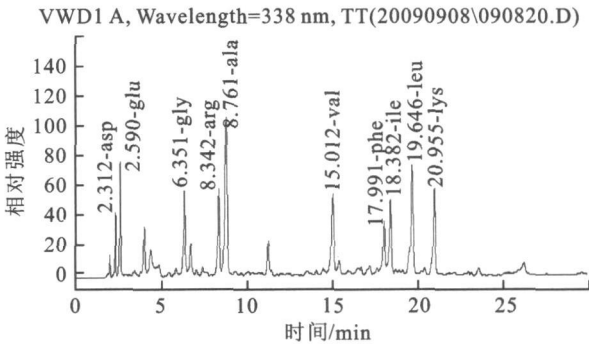


图 3 双酶复合水解大豆分离蛋白水解液中游离氨基酸的图谱

Fig.3 Pairs of enzymatic hydrolysis of soy protein isolate hydrolysates of free amino acids pattern

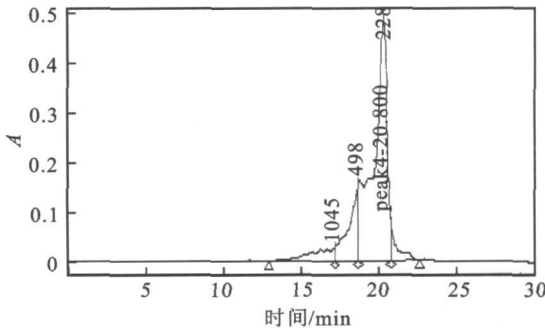


图 4 双酶协同水解大豆分离蛋白水解液中的多肽相对分子质量分布

Fig.4 Pairs of enzymatic hydrolysis of soy protein isolate hydrolysates of the Peptide weight distribution

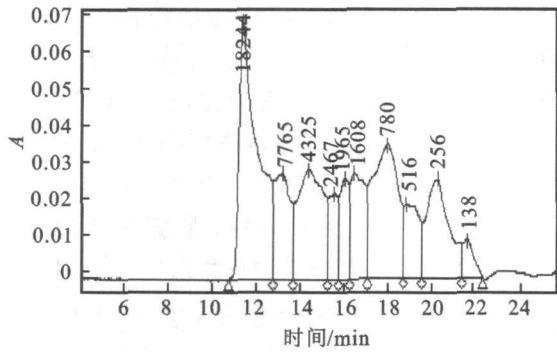


图5 大豆分离蛋白未水解的相对分子质量分布图

Fig.5 The molecular weight distribution of soy isolated protein

由图3可知,与国外氨肽酶 ProteAX 酶活添加量接近相同的条件下,由于国外的氨肽酶既有内切酶活性,又有外切酶活性,因此通过添加中性蛋白酶达到国外氨肽酶 ProteAX 的酶活条件,水解液中游离氨基酸含量为 13.6 mg/mL,与氨肽酶单独水解后游离氨基酸含量增加不明显,但与国外氨肽酶 ProteAX 水解相比,游离氨基酸含量增加了 1 倍;水解后的多肽与未水解大豆分离蛋白多肽相比,明显没有了大分子的存在,由图4可知,水解液中已没有大分子物质,主要是小肽物质,相对分子质量在 1100 以下,其中相对分子质量 600 左右的小肽占约 16%,二肽三肽约占 75%,比国外氨肽酶 ProteAX 酶水解后的肽段更集中,水解的更彻底。甲醛滴定法测得水解度达 50.8%。

2.4 氨肽酶和中性蛋白酶进一步优化水解大豆分离蛋白

在中性蛋白酶单独作用的最佳添加量($E/S = 8000 \text{ U/g}$)及双酶较优的水解条件下(温度 50°C , pH 8.5,底物质量浓度 6 g/dL),主要变化氨肽酶的加量,对其与中性蛋白酶的协同水解做进一步的优化,水解 2 h 后,得到的水解度如图6。

结果表明,当氨肽酶加量达 50000 U/g ,水解度已达 58% 左右,继续增加氨肽酶添加量,水解度仍然有所提高,但幅度较小,氨肽酶加量 80000 U/g ,水解度达 62%。

由于国内已有商品化的中性蛋白酶,价格相对较低,因此实际应用中要达较为深度的水解,水解

条件中增加中性蛋白酶的酶量,降低氨肽酶加量,反而有利于整体成本的降低。

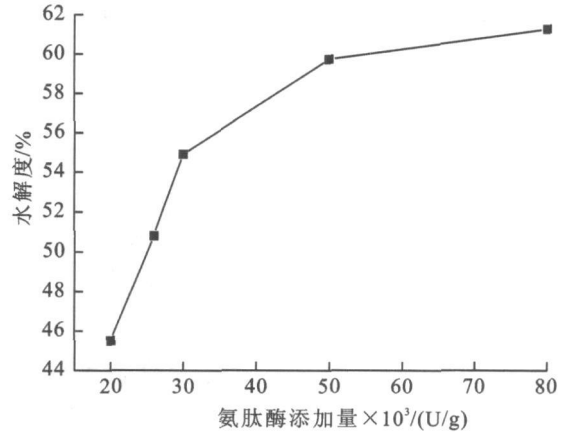


图6 在氨肽酶不同添加量下与中性蛋白酶协同水解大豆分离蛋白的水解度

Fig.6 Effect of the peptidase amount and neutral protease on the soy isolate protein hydrolysis degree

而氨肽酶与内切酶协同作用的另一个优势体现在:即使是控制蛋白原料相同水解度的前提下,水解时间都可比单独酶水解大大缩短,因此国内氨肽酶的进一步产业化及与各种内切酶的协同应用方面研究意义重大。

3 结 语

大豆分离蛋白经国外氨肽酶 ProteAXG 酶水解,水解度为 19.3%,水解液中游离氨基酸的质量为 6.832 mg/mL ,在外切酶活加量相同条件下,经氨肽酶水解后,水解液中游离氨基酸的含量增加了 0.95 倍,水解度有较大提高,通过中性蛋白酶与氨肽酶协同水解,使内外切酶活加量与国外氨肽酶 ProteAXG 酶相同时,与国外氨肽酶 ProteAXG 酶水解液相比,游离氨基酸的含量增加了 1 倍,水解度达 50.8%,水解液中已没有大分子物质,660 以下的肽占 93%,且二肽三肽所占比例高达 75%。

氨肽酶与中性蛋白酶协同水解大豆分离蛋白进一步优化后,最高水解度达 62%,时间也大大缩短,通过肽的分布和水解度的大小,说明该氨肽酶与中性蛋白酶协同水解后,具有很好的效果。

参考文献(References):

[1] 邓成萍,张惠,魏秀英.大豆寡肽的研究进展[J].食品科学,2004(4):237-240.

DENG Cheng ping, ZHANG Hui, WEI Xiur ying. Research progress of soybean oligopeptide[J]. Food Science, 2004(4): 237-240.

[2] 赵玉红,孔保华,张立钢,等.水解度对蛋白水解物的影响[J].肉类工业,2000(9):20-21.

ZHAO Yu hong, ZHANG Bao hua, ZHANG Li gang. Influence of the degree of hydrolysis of hth protein hydrolysates[J].

Meat Industry, 2000(9): 20– 21.

- [3] 张晓鸣, 高梅娟, 颜袅等. 酶解大豆蛋白制备风味增强肽[J]. 食品与生物技术学报. 2009(1): 8– 13.
ZHANG Xiao ming, GAO Mei juan, YAN Niao et al. Enzymatic preparation of soy protein flavor enhancing peptide[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009(1): 8– 13.
- [4] 卢楠, 雷莹, 郭立达. 酶法水解大豆分离蛋白的研究[J]. 河北师范大学学报. 2009(4): 510– 514.
LU Nan, LEI Ying, GUO Li da. Study on preparation techniques of soybean peptides through hydrolyzing soybean isolated proteins by enzyme[J]. **Journal of Hebei Normal University**, 2009(4): 510– 514.
- [5] 陶红, 梁歧. 酶法制备大豆寡肽的研究[J]. 大豆科学 2004(2): 26– 29.
TAO Hong, LIANG Qi. Study on preparation of soybean oligo peptide by enzyme[J]. **Soybean Science**, 2004(2): 26– 29.
- [6] 钱磊, 张业尼, 唐翔宇等. 双酶酶法制备大豆肽及其性质研究[J]. 现代食品科技, 2006(4): 6– 10.
QIAN Lei, ZHANG Ye ni, TANG Xiang yu deng. Study on the hydrolysis of denatured soybean cake via hydrolysis by two enzymes and the properties of the obtained peptides[J]. **Modern Food Science and Technology**, 2006(4): 6– 10.
- [7] 谷海先, 王建. 风味蛋白酶的开发与利用[J]. 中国酿造, 2003, 124(1): 26– 28.
GU Hai xian, WANG Jian. Exploitation and utilization of flavored proteinase[J]. **China Brewing**, 2003, 124(1): 26– 28.
- [8] 段刚, 赵振锋, 钱莹. 酶制剂在蛋白质加工行业的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(4): 104– 109.
DUAN Gang, ZHAO Zhen feng, QIAN Ying. Enzyme application in the protein processing industries[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(4): 104– 109.
- [9] Sina A, Dufour S L, Annabi B. Cell based evidence for aminopeptidase N/ CD13 inhibitor actinonin targeting of MT1-MMP mediated proMMP-2 activation[J]. **Cancer Letters**, 279 (2009) : 171– 176.
- [10] Hershcovitz Y F, Rabinovitch L, Shulami S, et al. The *ywaD* gene from *Bacillus subtilis* encodes a double zinc aminopeptidase[J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2005(1): 157– 163.
- [11] Shibata K, Ando H, Ino K, et al. Gene regulation and physiological function of placental leucine aminopeptidase oxytocinase during pregnancy[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1751 (2005): 19– 25.
- [12] Lin S J, Chen Y H. Large scale production and application of leucine aminopeptidase produced by *Aspergillus oryzae* LL1 for hydrolysis of chicken breast meat[J]. **Eur Food Res Technol**, 2008, 227(1): 159– 165.
- [13] 魏亚娟, 田亚平, 须瑛敏. 枯草芽孢杆菌脱羧氨肽酶在水解大豆分离蛋白中的应用研究[J]. 食品工业科技, 2008(4): 149– 151.
WEI Ya juan, TIAN Ya ping, XU Ying min. Study on hydrolysis of soybean protein isolate by *Bacillus subtilis* aminopeptidase[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008(4): 149– 151.
- [14] 田亚平, 须瑛敏. 一种枯草芽孢杆菌氨肽酶的纯化及酶学性质[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(3): 7– 9.
Tian Ya ping Xu Ying min. Purification and characteristic of a kind of aminopeptidase from *Bacillus subtilis*[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2006, 32(3): 7– 9.
- [15] 诸葛健, 王正祥. 工业微生物实验技术手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994, 205.
- [16] 赵新淮, 冯志彪. 大豆蛋白水解物水解度测定的研究[J]. 东北农业大学学报, 1995(2): 178– 181.
ZHAO Xin huai, FONG Zhi biao. A study on the determination of the degree of hydrolysis in soy protein hydrolysates[J]. **Journal of Northeast Agricultural University**, 1995(2): 178– 181.
- [17] 李晓东, 牛治霞, 张柏林. 乳清蛋白水解物水解度 3 种测定方法的比较[J]. 中国乳品工业, 2006(10): 59– 62.
LI Xiao dong, NIU Zhi xia, ZHANG Bo lin. Various methods available for the determination of hydrolyzed degree of whey protein[J]. **China dairy industry**, 2006(10): 59– 62.