

枯草杆菌蛋白酶对大豆胰蛋白酶抑制剂的水解钝化研究

万娟^{1,2}, 陈中^{1,2}, 杨晓泉^{1,2}, 周伟伟^{1,2}

1(华南理工大学轻工与食品工程学院, 广东广州, 510640)

2(华南理工大学食物蛋白工程研究中心, 广东广州, 510640)

摘要 研究了枯草杆菌蛋白酶(Subtilisin)对大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)酶解活性的影响。实验在 50℃, pH 7.5 条件下反应 1h, 并以 BAPNA 为底物, 采用改进的方法测定枯草杆菌蛋白酶对大豆胰蛋白酶抑制剂的水解钝化程度, 用 SDS-PAGE 方法和分子排阻色谱法研究其蛋白酶钝化敏感性。结果证明, 枯草杆菌蛋白酶可以水解大部分的抑制剂, 并通过 SDS-PAGE 进一步证实了比色法得出的结论。而由分子排阻色谱图可以分析得出抑制剂经枯草杆菌蛋白酶酶解后, 活性降低。分析认为, 可能是由于抑制剂中二硫键被打断使得其结构发生改变, 同时生成大量复杂的小分子多肽物质。因此, 可以推断大豆胰蛋白酶抑制剂的稳定性与二硫键的存在有关。

关键词 大豆胰蛋白酶抑制剂, 枯草杆菌蛋白酶, 水解

大豆是优质的植物蛋白源, 但其中含有的胰蛋白酶抑制剂等多种营养限制因子会危害人体健康, 使其营养价值下降^[1]。食用未完全除去胰蛋白酶抑制剂的豆制品, 不仅会抑制人体对蛋白质的消化吸收, 还会引起胰腺肿大等中毒症状。国内外研究人员对大豆中胰蛋白酶抑制剂的失活进行了大量的研究工作, 最早的是采用热处理方法, 虽然可以降低胰蛋白酶抑制剂活性, 但并不能使抑制剂完全失活, 同时也容易造成大豆中一些必需氨基酸的损失。研究还发现, 花生胰蛋白酶抑制剂经 100℃水浴 2h 仍有 85% 的残留活性, 且不具 SDS 的变性处理^[2]。因此采用加热处理方法不能彻底钝化豆类蛋白的蛋白酶抑制剂活性。近年来的研究证明, 在萌发的豆类种子中存在巯基还原酶及特殊的巯基蛋白酶, 其中 2 个例子是 NADP/硫氧还原蛋白还原酶(NTR)及蛋白酶 K1, 这些酶主要是在种子萌发时起到搬运及最终降解蛋白酶抑制剂的作用^[3]。Friedman 等发现巯基还原剂可以降低大豆蛋白的胰蛋白酶抑制剂活性, 并假定抑制剂的二硫键被还原是其活性降低的主要原因。

文中采用微生物蛋白酶来钝化大豆胰蛋白酶抑制剂, 以期找到一种能在较温和的条件下降解大豆胰蛋白酶抑制剂, 而不将豆类蛋白质的功能特性和营养价值破坏的酶。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

大豆胰蛋白酶抑制剂(soybean trypsin inhibi-

tor, STI, 活力为 10 000BAEE/mg), 枯草杆菌蛋白酶(subtilisin, 活力为 1 500 BAEE/mg), 胰蛋白酶(Trypsin, 活力为 5 000 U/mg), N-苯甲酰-DL-精氨酸-对硝基苯胺(BAPNA), 购自 Sigma 公司。各种化学试剂均为分析纯。

1.2 主要溶液

(1) Tris-HCl 缓冲液(50 mmol/L, pH7.5): 称取 0.606g Tris, 用适量蒸馏水溶解后, 用少量 HCl 调 pH 至 7.5, 然后定容至 100 mL。

(2) 大豆胰蛋白酶抑制剂溶液: 用 Tris-HCl 缓冲液溶解 STI 并配成浓度为 5 000BAEE/mL 的溶液。

(3) BAPNA 溶液: 用 Tris-HCl 缓冲液将 BAPNA 配成浓度为 0.4mg/mL 的溶液备用。

(4) 枯草杆菌蛋白酶溶液: 用 Tris-HCl 缓冲液将枯草杆菌蛋白酶配制成 1 000BAEE/mL 的溶液备用。

(5) 胰蛋白酶溶液: 胰蛋白酶用 Tris-HCl 缓冲液配成活力为 5 000BAEE/mL 的溶液备用。

(6) 体积分数 30% 的冰醋酸溶液: 量取 30 mL 冰醋酸, 用蒸馏水定容至 100 mL 备用。

1.3 枯草杆菌蛋白酶对 STI 的水解作用

在 400 μ L Tris-HCl 缓冲液中加入 500 μ L 枯草杆菌蛋白酶和 100 μ L STI, 50℃下水浴 1 h 后 100℃灭酶 5 min, 于-4℃储藏备用。

在 280 μ L Tris-HCl 缓冲液中加入 100 μ L 胰蛋白酶溶液和 20 μ L 上述 STI 反应液, 于 37℃下水浴 30 min, 然后加入 2mL BAPNA 溶液, 37℃水浴反应 10 min, 最后加入 100 μ L 30%冰醋酸中止反应, 在 410 nm 下比色。此法即是利用合成底物 BAPNA 测

第一作者: 硕士研究生(陈中为通讯作者)。

收稿日期: 2006-10-10, 改回日期: 2006-11-14

定胰蛋白酶活力的方法改进的^[4~8],可用于测定枯草杆菌蛋白酶水解抑制剂的水解程度。

对照样中除了不加蛋白酶溶液而用 Tris-HCl 缓冲液代替外,其余操作均与样液相同。

空白样为 400 μL Tris-HCl 缓冲液,加入 2 mL BAPNA 溶液及 100 μL 冰醋酸。

用空白样做参比,分别取样液及对照样溶液在 410 nm 下比色,通过比较加入与不加入蛋白酶反应得样品的吸光值,通过残留的胰蛋白酶活性可以间接地反映出蛋白酶对大豆胰蛋白酶抑制剂的水解程度。

另外,在 100 μL 胰蛋白酶溶液中加入 300 μL Tris-HCl 缓冲液,混匀后与 2 mL BAPNA 溶液 37℃ 水浴反应 10 min,然后加入 100 μL 30% 冰醋酸终止反应,在 410 nm 下比色,测定胰蛋白酶的活力(用 A_{410} 值表示)。

当枯草杆菌蛋白酶能完全水解 STI 时,胰蛋白酶表现出最高活力,反应液的吸光值最大;而当 STI 未被水解时,胰蛋白酶活力最低,这时反应液的吸光值最小。因此,蛋白酶水解 STI 的相对活力大小表达式如下:

$$\frac{\text{酶水解 STI 相对活力} / \%}{\frac{\text{样液的 } A_{410} \text{ 值} - \text{对照样的 } A_{410} \text{ 值}}{\text{胰蛋白酶活力}(A_{410})}} \times 100$$

数据分析采用 Microcal Origin V7.0 Software 进行方差分析和显著性分析。

1.4 SDS-PAGE 分析^[9]

电泳样品分别为 STI 标样、经热处理的 STI 及枯草杆菌蛋白酶与 STI 的反应液。电泳时分离胶浓度取 12.5%,浓缩胶浓度取 3%,电流先取 10 mA,待样品完全进入分离胶后改为 20 mA,电泳时间 3h。电泳结束后,剥胶、染色、脱色及拍照保存。染色采用考马斯亮蓝 R-250。

1.5 分子排阻色谱分析(size exclusive chromatographic, SEC)^[10~12]

1.5.1 SEC 测试条件

美国 Waters 公司 HPLC 系统,高压泵 1575 Binary HPLC pump;检测器 2487 Dual λ Absorbance Detector;色谱柱:Protein-Pak™ 60(7.8 mm×300 mm Column WAT085250);流动相:50 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl 的缓冲溶液,超声后使用;流速:0.6 mL/min;检测波长:220 nm;柱温:25℃;进样量:10 μL。

1.5.2 样品测试

$V(\text{体积溶液}) : V(\text{流动相}) = 1 : 1$ 配成相同浓度的溶液,在 $10\,000 \times g$ 转速下离心 10 min,再用 0.45 μL HA 型水溶性滤膜过滤,每次取 10 μL 注入色谱仪中,最后对色谱图谱进行分析。

1.6 枯草杆菌蛋白酶水解 STI 的过程分析

在 400 μL Tris-HCl 缓冲液中加入 500 μL 枯草杆菌蛋白酶和 100 μL STI,在 50℃ 下分别反应 0、15、30、45、60、90 和 120 min,然后 100℃ 灭酶 5 min。反应液在 -4℃ 储藏,用于 SEC 分析。

2 结果与讨论

2.1 枯草杆菌蛋白酶水解 STI 的结果

实验结果见表 1。对比对照样枯草杆菌蛋白酶可以水解大部分 STI,使得胰蛋白酶活力残存较高,从而能与 BAPNA 反应生成较多能在 410 nm 下显色的产物。枯草杆菌蛋白酶的酶解作用将大豆胰蛋白酶抑制剂中的二硫键打开,使得抑制剂结构改变,从而其活性下降。

表 1 用 BAPNA 改进法测得的实验结果

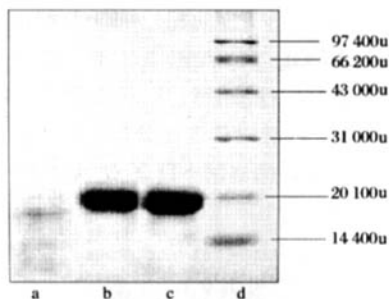
样 品	酶水解 STI 相对活力 / % ⁽¹⁾
胰蛋白酶	—
对 照	—
枯草杆菌蛋白酶水解 STI 反应液	80.88 ± 2.11 ^a
热处理的 STI 反应液	11.21 ± 0.82 ^b

注:1)数据经多次重复测得,($n \geq 5$)平均值加上标准偏差;a、b 表示同列中吸光值间的显著性差异($P \leq 0.05$)。

因为没有可直接测定抑制剂被降解程度的方法,故以 BAPNA 测定胰蛋白酶活力的方法作为基础,将未经钝化及经过钝化的抑制剂和胰蛋白酶作用,然后通过测定胰蛋白酶的剩余活力,来判断抑制剂被钝化的程度。实验测定时,未经钝化抑制剂的浓度以基本上刚好能将胰蛋白酶活力完全抑制为好,这样胰蛋白酶活力剩余多少,就是抑制剂被钝化了多少。这种方法操作简单,但是不能直接测定出抑制剂被钝化的情况。

2.2 SDS-PAGE 分析结果

电泳结果见图 1。从图 1 可以看出,反应液中相对应的 STI 可被枯草杆菌酶大部分水解,此结果很好地吻合了比色法测定的结果,由带 a 可以看出,由于枯草杆菌蛋白酶的水解作用,STI 被水解的同时还生成了一些复杂的小分子物质。从带 b 和带 c 相比较可以看出,热处理对 STI 影响不大。因此,从该图可以得出,STI 经枯草杆菌蛋白酶处理后溶液 A_{410} 的增大是由于枯草杆菌蛋白酶水解抑制剂作用的结果。

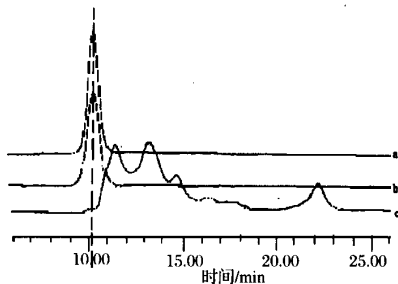


a—枯草杆菌蛋白酶水解 STI 的反应液, b—热处理的 STI 反应液, c—未经处理的 STI, d—蛋白质标样

图1 枯草杆菌蛋白酶水解 STI 的电泳图片

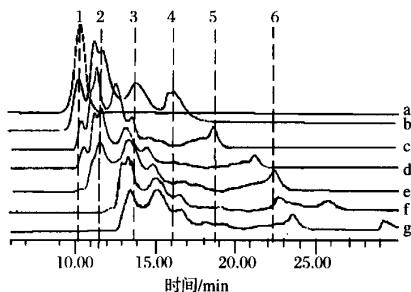
2.3 SEC 分析结果

SEC 结果见图 2。从图 2 曲线 a 可以看出, STI 在 10min 处出峰, 对比曲线 a, 曲线 b 在 10min 处有一个大峰出现, 因此可以得出热处理使得 STI 活性残留较高, 所以热处理对 STI 影响不大。而从曲线 c 可以看出酶解产物非常复杂, 枯草杆菌蛋白酶不仅将 STI 水解, 而且还生成了大量复杂的小分子物质。分析认为可能是由于枯草杆菌蛋白酶对 STI 的酶解作用使得 STI 中的二硫键断开, 从而导致大豆胰蛋白酶抑制剂结构发生改变, 活性下降, 具体对这些新生成的复杂的物质的分析有待笔者进一步研究。



a—未经处理的 STI, b—热处理的 STI 反应液, c—枯草杆菌蛋白酶水解 STI 的反应液

图2 枯草杆菌蛋白酶水解 STI 的分子排阻色谱图



a—水解 0 min 的 STI 反应液, b—水解 15 min 的 STI 反应液
c—水解 30 min 的 STI 反应液, d—水解 45 min 的 STI 反应液
e—水解 60 min 的 STI 反应液, f—水解 90 min 的 STI 反应液
g—水解 120 min 的 STI 反应液

图3 不同水解时间的分子排阻色谱图

2.4 枯草杆菌蛋白酶水解 STI 的 SEC 分析结果

大豆胰蛋白酶抑制剂分别用枯草杆菌蛋白酶在最适条件酶解反应 0、5、30、45、60、90 和 120 min, 取出酶解清液过色谱柱, 其分析结果见图 3。

从图 3 可知, 抑制剂经枯草杆菌蛋白酶酶解后产物非常复杂。在酶解最初 15min 内, 酶解反应非常迅速, 小分子多肽含量明显增加。随着酶解反应时间的延长, 抑制剂不断被水解并生成大量复杂的小分子肽物质, 酶解 90min 后, 抑制剂基本被水解完全。对比曲线 a 至曲线 g, 峰 1 的含量随着时间的延长不断减少。峰 2 和峰 4 等分子量较大的肽段在酶解 15min 后不断下降, 酶解 90min 后峰 2 已被酶解完全, 同时生成了少量的极小分子量的多肽物质。具体对于这些新生成的小分子多肽物质的分析有待笔者进一步分析。

3 结 论

目前, 清除大豆胰蛋白酶抑制剂方法常用热处理法, 适度加热处理在降低胰蛋白酶抑制剂活性的同时, 还可使蛋白质展开, 氨基酸残基暴露, 使之易于被体外蛋白酶水解吸收。并且事实上胰蛋白酶抑制剂具有较高的耐热特性, 并不能被彻底清除。利用微生物酶法可以在较温和的条件下水解大部分胰蛋白酶抑制剂, 并且对豆制品营养成分的破坏和影响较小。

文中选用枯草杆菌蛋白酶在 50℃, pH 7.5 条件酶解抑制剂, 发现其可以使抑制剂大部分被水解而失活, 同时又不破坏其中的其他氨基酸组成成分。采用酶解法钝化大豆胰蛋白酶抑制剂, 比加热法节约能源, 保护了热敏性必需氨基酸不被破坏, 并且由于水解的作用使得抑制剂中的二硫键被打断, 抑制剂结构被破坏, 活性下降, 同时生成了大量复杂的小分子多肽物质, 然而对于这些新物质的确定有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Bajpai S, Sharma A, Gupta M N. Removal and recovery of anti-nutritional factors from soybean flour[J]. Food Chemistry, 2005, 89 (4): 497~501
- 2 杨晓泉, 张水华, 文方德, 等. 花生胰蛋白酶抑制剂的纯化与钝化研究[J]. 营养学报, 1998, 20(3): 246~252
- 3 Koberhel K, Yee B C, Buchanan B B. Role of NADP/thioredoxin system in the reduction of α -amylase and trypsin inhibitor proteins[J]. J Biol Chem, 1991, 266: 16 135~16 140

- 4 Smith C , Megen W V, Hitchcock C. The determination of trypsin inhibitor levels in foodstuffs[J]. J Sci Food Agric, 1980, 31: 341
- 5 Nakata H. Substrate activation of trypsin and acetyl trypsin caused by α -N-Benjoyl-L-arginine-p-Nitroanilide[J]. J Biochem, 1972, 72: 281~290
- 6 Preiser H, Schmitz J, Maestracci D, et al. Modification of an assay for trypsin and its application for the estimation of enteropeptidase[J]. Clin Chim, 1975, 59:169~175
- 7 王重庆,李云兰编.高级生物化学实验教程[M].北京:北京大学出版社,1994.6
- 8 袁玉荪,朱婉华,陈钧辉编.生物化学实验(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1988.3
- 9 郭尧君编.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999. 123~160
- 10 Tadey, William C Purdy. Chromatographic techniques for the isolation and purification of lipoproteins [J]. Journal of Chromatography B, 1995, 671: 237~253
- 11 Karis E T , Marchon B, Hopper A D, et al. Perfluoropolyether characterization by nuclear magnetic resonance spectroscopy and pel permeation chromatography [J]. Journal of Fluorine Chemistry, 2002, 118: 81~94
- 12 Rong Lu, Takashi Yoshida. Structure and molecular weight of Asian lacquer polysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2003, 54: 419~24

Hydrolization of Soybean Trypsin Inhibitor by Subtilisin

Wan Juan^{1,2}, Chen Zhong^{1,2}, Yang Xiaoquan^{1,2}, Zhou Weiwei^{1,2}

1(Department of Food Science & Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

2(Research and Development Center of Food Proteins, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

ABSTRACT The aim of this paper was to study the inactivating of STI conducted by Subtilisin. Cubing at 50°C, pH 7.5, the STI was treated by subtilisin and the reaction lasted about 1h. Then it was measured by an improved BAPNA method after the STI was deactivated. The change of STI and the molecular weight of reactive STI were determined by size exclusive chromatographic (SEC) and SDS-PAGE, respectively. The results revealed that STI could be inactivated or hydrolyzed mostly by subtilisin, which also could be received by SDS-PAGE. Then by SEC, it seemed that the disulfide bonds of STI were unfolded, the structure of STI was changed, and lots of unknown small molecular weight compounds were made. Therefore, the stability of STI had relation to exist of disulfide bonds.

Key words soybean trypsin inhibitor, subtilisin, hydrolization

食品安全管理体系认证规则 2007 年 3 月 1 日起施行

由国家认证认可监督管理委员会制定的《食品安全管理体系认证实施规则》(以下简称《规则》)将于 2007 年 3 月 1 日起施行。

该规则是认证机构从事食品安全管理体系认证活动的依据,其规定了从事食品安全管理体系认证的认证机构实施食品安全管理体系认证的程序与管理的基本要求。规则适用于对直接或间接介入食品链中的一个或多个环节的组织的食品安全管理体系认证。

规则要求,从事食品安全管理体系认证活动的认证机构,应获得国家认证认可监督管理委员会批准,并符合中国合格评定国家认可委员会(CNAS)《食品安全管理体系认证机构通用要求》及其应用指南等认可规范的要求。鉴于食品安全的特殊性,认证机构应在获得国家认监委批准后的 12 个月内,通过中国合格评定国家认可委员会针对食品安全管理体系认证能力的认可。超期未获得认可的认证机构,国家认监委将暂停其从事食品安全管理体系认证活动的批准资质,直至获得认可。认证机构在未获得认可前,只能颁发满足认可需要数量的不带认可标志的认证证书。

规则还对认证人员、认证依据、认证程序等进行了明确要求,同时规定,食品安全管理体系认证证书有效期为 3 年。获证组织有下列情形之一的,认证机构应当撤销其认证证书:监督结果证明获证组织的体系或体系覆盖的产品不符合认证依据要求,需要立即撤销认证证书;认证证书暂停使用期间,获证组织未采取有效纠正措施;获证组织出现严重食品安全卫生事故;获证组织不接受认证机构对其实施的监督。