

## 天然大豆蛋白的选择性酶解\*

杨国龙<sup>1</sup> 赵谋明<sup>2</sup> 杨晓泉<sup>2</sup> 徐 香<sup>2</sup> 彭志英<sup>2</sup>

1(河南工业大学粮油食品学院,郑州,450052) 2(华南理工大学轻工与食品学院,广州,510640)

**摘 要** 研究了几种微生物蛋白酶水解天然大豆蛋白的选择性。用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析酶解过程中大豆蛋白各组分的变化,电泳结果显示  $\beta$ -conglycinin 比 glycinin 容易被蛋白酶水解, $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  亚基比  $\alpha$  亚基更容易水解, $\beta$ -conglycinin 的  $\beta$  亚基比  $\alpha'$  亚基和  $\alpha$  亚基更难水解;glycinin 的酸性亚基比其碱性亚基更容易被水解。

**关键词** 天然大豆蛋白,选择性酶解,脱脂豆粕,蛋白酶

大豆蛋白的主要组分是  $\beta$ -conglycinin 和 glycinin。 $\beta$ -conglycinin 是一种糖蛋白,它含有 3 个亚基,分别是  $\alpha'$ 、 $\alpha$  和  $\beta$  亚基;glycinin 是由酸性亚基和碱性亚基组成的六聚体,酸性亚基和碱性亚基间通过一个二硫键相连<sup>[1]</sup>。

大豆蛋白的酶水解特征不但与蛋白质的存在状态、酶的特性有关,还与反应体系的环境有关,即大豆蛋白的酶水解受大豆蛋白本身和酶的性质、反应的外部环境因素的制约<sup>[1,6~9]</sup>。由于大豆蛋白的主要组分  $\beta$ -conglycinin 和 glycinin 的物理化学性质不同,控制反应条件可以实现大豆蛋白的选择性水解<sup>[6~10]</sup>。

本研究采用几种新的蛋白酶对天然大豆蛋白的水解特性,以实现天然大豆蛋白的选择性水解。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

低温脱脂豆粕:蛋白质(N $\times$ 6.25),52.6%;山东万德福植物蛋白厂。

酶制剂:Alcalase<sup>®</sup> 2.4 L,诺维信;Protex<sup>™</sup> 6 L, Multifect<sup>®</sup> Neutral, Multifect<sup>®</sup> P-3000, Fungal Protease Concentrate, 杰能科。

超滤膜 Vifaflo 200, 平均截流分子量 30 ku。

### 1.2 方 法

脱脂大豆粕和水(1 g:15 mL)室温下混合搅拌 1 h,搅拌过程中用 2 mol/L NaOH 调节 pH 值 8.0;然后 20℃ 下 8 000 r/min 离心 30 min,除去不溶物,得到天然大豆蛋白提取液。

取 200 mL 大豆蛋白提取液加热到适当的温度,调节 pH 值到合适的值,加入适量的酶。按预先设定的时间取样做 SDS-PAGE 分析。

另取 2 000 mL 大豆蛋白提取液,酶解条件同上,酶解 1 h 后进行超滤,超滤 2.5 h。截留液做 SDS-PAGE 分析。

SDS-PAGE<sup>[11,12]</sup>:3% 浓缩胶,12% 分离胶。

## 2 结果与讨论

由图 1 可知,随着水解时间的延长,大豆蛋白中  $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  和  $\alpha$  亚基都被 Alcalase<sup>®</sup> 2.4 L 水解, $\alpha'$  亚基的水解速度大于  $\alpha$  亚基, $\beta$  亚基被水解的速度比  $\alpha'$  亚基、 $\alpha$  亚基慢;glycinin 的酸性亚基缓慢水解,而碱性亚基基本没有水解,至少在电泳图谱上没有表现出明显被水解的情况。同时水解过程中还出现了新的肽段(图 1 中箭头 a, b)。60 min 时, $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  和  $\alpha$  亚基都被 Alcalase 水解,而  $\beta$  亚基则部分水解;glycinin 的酸性亚基部分水解,碱性亚基基本没有水解。经酶解-超滤后,生成的新肽段都被水解,同时出现新的肽段(图 1 中箭头 c);SDS-PAGE 显示,截留液主要组分是 glycinin 的碱性亚基、部分 glycinin 的酸性亚基和少量的  $\beta$ -conglycinin 的  $\beta$  亚基。

Protex<sup>™</sup> 6L 水解天然大豆蛋白的 SDS-PAGE 如图 2。水解情况与 Alcalase 基本相似,随着水解的进行, $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  亚基、 $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基都有不同程度的水解,只是  $\alpha'$  亚基水解速度最大, $\alpha$  亚基次之, $\beta$  亚基最慢;glycinin 的酸性亚基和碱性亚基水解的速度很慢;水解过程中产生了新的肽段(图 2 中箭头 d, e)。60 min 时, $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  亚基、 $\alpha$  亚基基本被完全水解, $\beta$  亚基大部分被水解;glycinin 的酸性亚

第一作者:博士。

\*“十五”国家科技攻关计划项目(2001BA501A02)。广东“十五”攻关农产品重大资助项目(A20301)

收稿日期:2005-08-05,改回日期:2005-11-14



基和碱性亚基只有少部分被水解。经过酶解-超滤后,  $\beta$ -conglycinin 完全被水解, glycinin 仍然只是少部分被水解, 产生的新肽段也被水解。

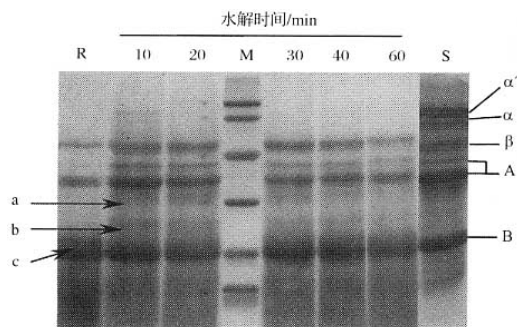


图1 Alcalase<sup>®</sup> 2.4L 水解天然大豆蛋白的水解产物电泳图

R-截留液; M-标准分子量蛋白; S-大豆蛋白;  $\alpha'$ 、 $\alpha$ 和 $\beta$ ,  $\beta$ -conglycinin 的亚基; A 和 B-glycinin 的酸性亚基和碱性亚基

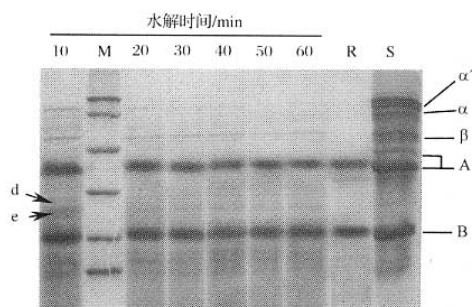


图2 Protex<sup>™</sup> 6L 水解天然大豆蛋白的水解产物电泳图(标注如图1)

Multifect<sup>®</sup> Neutral 水解天然大豆蛋白的 SDS-PAGE 如图3所示。随着水解的进行, 天然大豆蛋白中  $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  亚基缓慢被水解, 而  $\alpha$  和  $\beta$  亚基的水解速度很慢; glycinin 的酸性亚基和碱性亚基的水解速度都特别慢; 水解过程中产生了新肽段(图3中箭头 f, g)。到 60 min 时,  $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  和  $\alpha$  亚基绝大部分被水解,  $\beta$  亚基则部分被水解; glycinin 的酸性亚基和碱性亚基则基本没有被水解。酶解-超滤后,  $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  和  $\alpha$  被完全水解, 而  $\beta$  亚基仍有残留; glycinin 水解程度很小; 新肽段 g 被水解, f 仍然存在。

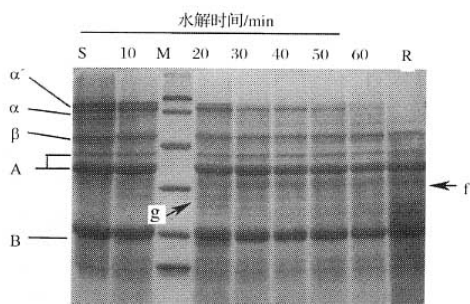


图3 Multifect<sup>®</sup> Neutral 水解天然大豆蛋白的水解产物电泳图(标注如图1)

图4是 Fungal protease concentrate 水解天然大豆蛋白的 SDS-PAGE 图。由图可以看出, 随着水解的进行,  $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  亚基、 $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基都逐渐地被水解, 只是  $\alpha'$  亚基水解速度最快,  $\alpha$  亚基次之,  $\beta$  亚基最慢; glycinin 的酸性亚基和碱性亚基的水解速度都很慢, 甚至看不出明显被水解的迹象; 水解过程中产生了新肽段(图4中箭头 h, i, j)。60 min 时, 天然大豆蛋白中  $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  和  $\alpha$  亚基被彻底的水解,  $\beta$  亚基大部分被水解; glycinin 的酸性亚基和碱性亚基也只是部分被水解, 但是水解的程度不大。酶解-超滤后, 截留物组分有  $\beta$ -conglycinin 的  $\beta$  亚基和 glycinin 的酸性和碱性亚基; 水解产生的新肽段 i 和 j 被水解, 还有新生成的肽段(图4中箭头 k, l)。

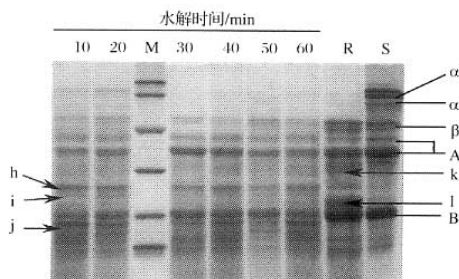


图4 Fungal protease concentrate 水解天然大豆蛋白的水解产物电泳图(标注如图1)

Multifect<sup>®</sup> P-3000 水解天然大豆蛋白的 SDS-PAGE 如图5所示。Multifect<sup>®</sup> P-3000 对天然大豆蛋白的水解情况与其他蛋白酶水解情况不同,  $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  亚基迅速被水解,  $\beta$  亚基慢慢地被水解, 而  $\alpha$  亚基虽然也被水解但速度比较慢; glycinin 的酸性亚基的水解情况与  $\beta$ -conglycinin 的  $\beta$  亚基相似, 也都是慢慢的被水解的。60 min 时,  $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  亚基和  $\beta$  亚基完全被水解; 而  $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha$  亚基、glycinin 的酸性亚基和碱性亚基则有少部分被水解。



酶解—超滤后,  $\beta$ -conglycinin 的  $\alpha'$  和  $\alpha$  亚基被完全水解, glycinin 部分被水解。

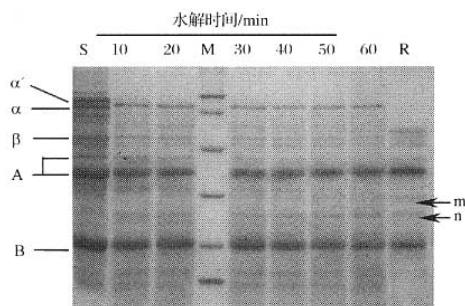


图5 Multifect® P-3000 水解天然大豆蛋白的水解产物电泳图(标注如图1)

不同时间的水解产物的 SDS-PAGE 表明(图1~图5),随着水解的进行,大豆蛋白的主要组分  $\beta$ -conglycinin 和 glycinin 被水解的速度和程度并不相同;即使是  $\beta$ -conglycinin 或 glycinin 组分,他们各亚基间被水解的速度和程度也不相同。由于各种蛋白酶的特性不同,导致它们在水解天然大豆蛋白时的选择性也不尽相同。就所研究的几种蛋白酶而言,对  $\beta$ -conglycinin 的水解速度和程度要比对 glycinin 的大。表观现象是在酶水解过程中  $\beta$ -conglycinin 先被水解,而 glycinin 则后被水解。Molina Ortiz 等在研究大豆分离蛋白的酶水解机理时也得到相同的结论,他们用木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、葫芦(cucurbita)蛋白酶、hiconymmin、pomiferin 水解大豆分离蛋白时发现,开始时水解主要集中在  $\beta$ -conglycinin 组分,而后才是 glycinin 被水解;而且  $\beta$ -conglycinin 的水解程度更大一些<sup>[8]</sup>。

Tsumura 等<sup>[9]</sup>在研究大豆蛋白  $\beta$ -conglycinin 和 glycinin 组分的选择性水解时发现了  $\beta$ -conglycinin 被水解,而 glycinin 未被水解的现象;同时还发现了  $\beta$ -conglycinin 未被水解,而 glycinin 被水解的现象。通过 DSC 研究表明,在酸性条件下( $\text{pH} < 3.5$ )  $\beta$ -conglycinin 的极大变性温度( $T_p$ )比 glycinin 高;在  $\text{pH}$  大于 3.5 时 glycinin 的  $T_p$  比  $\beta$ -conglycinin 高;在中性  $\text{pH}$  范围, glycinin 的  $T_p$  比  $\beta$ -conglycinin 高约  $15^\circ\text{C}$ 。这说明在中性  $\text{pH}$  范围, glycinin 的热稳定性比  $\beta$ -conglycinin 好。天然大豆蛋白分子结构十分紧密,天然状态的 glycinin 和  $\beta$ -conglycinin 只有在适当的条件下才能实现选择性的变性(酸性条件  $\text{pH}$  小于 3.5, glycinin 变性或中性  $\text{pH}$  值高温处理,  $\beta$ -conglycinin 变性),变性后的蛋白才容易被蛋白酶所水解。变性部

分容易被蛋白酶水解,未变性部分则被保留,这样就可以实现大豆蛋白不同组分的选择性水解。

与 glycinin 酸性亚基相比,碱性亚基中疏水性氨基酸含量比较高,所以在形成高级结构时碱性亚基在 glycinin 球形的内部,而酸性亚基处在 glycinin 球形结构的外部<sup>[13]</sup>。Lakemond 等<sup>[14]</sup>研究了室温下离子强度和  $\text{pH}$  对大豆 glycinin 结构的影响。结果表明, glycinin 的高级结构受  $\text{pH}$  值和离子强度的影响,在  $\text{pH} 7.6, I = 0.5$  时, glycinin 以 11S 形式存在;在  $\text{pH} 3.8, I = 0.03$  时, glycinin 以 7S 形式存在;在  $\text{pH}$  值  $3.8 \sim 7.6, I = 0.03 \sim 0.5$  时, glycinin 以 11S/7S 的混合形式存在,二者的比例受  $\text{pH}$  和离子强度的影响。虽然 glycinin 碱性亚基的相对暴露程度受离子强度的影响比较大,但是任何条件下 glycinin 酸性亚基的暴露程度都要比碱性亚基大。由于天然大豆蛋白结构的复杂性,开始水解的时候,蛋白酶首先水解暴露在蛋白质分子表面的部分。所以研究的 5 种酶对酸性亚基的水解程度和速度都不比碱性亚基的小。

水解产生了一些新的蛋白片断(如图1~图5)。Alcalase® 2.4L 在水解天然大豆时产生了 3 个新的蛋白片断,分子量大约是 32.8 ku, 24.3 ku 和 22.1 ku。Protex™ 6L 水解天然大豆蛋白时也产生了 2 个新的蛋白片断,分子量大约是 28.8 ku 和 25 ku。Multifect® Neutral 水解天然大豆蛋白时也产生了 2 个新的蛋白片断,分子量大约是 34.5 ku 和 29.3 ku。Fungal Protease Concentrate 水解天然大豆蛋白时也产生了 3 个新的蛋白片断,分子量大约是 26.6 ku, 24.0 ku, 18.6 ku, 33.7 ku 和 22.7 ku。Multifect® P-3000 水解天然大豆蛋白时也产生了 2 个新的蛋白片断(如图5中 m, n 所示),分子量大约是 35.5 ku 和 26.7 ku。

Kamata 等人<sup>[16]</sup>在研究  $\beta$ -conglycinin 的选择性水解时也发现了同样的现象,并提出了胰蛋白酶选择性水解  $\beta$ -conglycinin 时新蛋白片断产生的过程(图6)。虽然  $\beta$ -conglycinin 各亚基的分子量与以后的文献报道有很大的差别,但是提出的降解过程还是有借鉴意义的。

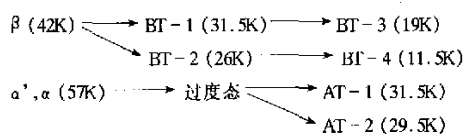


图6  $\beta$ -conglycinin 各亚基的胰蛋白酶酶解过程



Molina Ortiz 等<sup>[8]</sup>在研究大豆分离蛋白的酶水解机理时,发现在酶解的过程中产生了一些新的肽段。Tsumura 等<sup>[9]</sup>在研究大豆蛋白的选择性水解时也发现在水解的过程中产生了一些新的肽段,这些新碎片的分子量大约在 25 Kda 到 30Kda 之间。Surówka 等<sup>[5]</sup>用 Alcalase 和 Esperase 改性大豆蛋白,在大豆蛋白的 Alcalase 水解物中发现有分子量大约 23 Kda 和 19 Kda 的新肽段;Esperase 水解物中发现有分子量大约 29 Kda 和 23 KDa 的新肽段。

## 参 考 文 献

- 1 Utsumi S, Matsumura Y, Mori T. Structure-function relationships of soy proteins. In Damadarm S. and Paraf A. eds. Food protein and their applications[M]. Now York: Marcel Dekker Inc, 1997
- 2 Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food proteins[M]. London, New York: Elsevier Applied Science, 1986
- 3 Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility[J]. J Agric Food Chem, 1976, 24(6):1 090~1 093
- 4 Panyam D, Kilara S. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification[J]. Trends Food Sci & Technol, 1996, 7(4):120~125
- 5 Surówka K, Zmudzinski D, Surówka J. Enzymic modification of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components[J]. Trends Food Sci Technol, 2004, 15(1/2):153~160
- 6 Kamata Y S, Otsuka S, Shibasaki K. Limited proteolysis of soybean  $\beta$ -conglycinin[J]. Agric Biol Chem, 1982, 46(11):2 829~2 834
- 7 Shutov A D, Pineda J, Senyuk V I, et al. Action of trypsin on glycinin[J]. Eur J Biochem, 1991, 199(3):539~543
- 8 Molina Ortiz S E, Anón M C. Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates[J]. J Am Oil Chem Soc, 2000, 77(12):1 293~1 301
- 9 Tsumura K, Saito T, Kugimiya W, et al. Selective proteolysis of the glycinin and  $\beta$ -conglycinin fractions in a soy protein isolate by pepsin and papain with controlled pH and temperature[J]. J Food Sci, 2004, 69(5):C363~C367
- 10 Jung S, Roussel-Philippe C, Briggs J L, et al. Limited hydrolysis of soy proteins with endo- and exoproteases[J]. J Am Oil Chem Soc, 2004, 81(10):953~960
- 11 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999
- 12 王家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,1999
- 13 Catsimopoulos N, Kenny J A, Meyer E W, et al. Molecular weight and amino acid composition of glycinin subunits[J]. J Sci Food Agric, 1971, 22(4): 448~450
- 14 Lakemond C M M, de Jongh H H J, Hessing M, et al. Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility on solubility and molecular structure at ambient temperatures [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(6):1 985~1 990

## Selective Enzymolysis of Native Soy Protein

Yang Guolong<sup>1</sup> Zhao Mouming<sup>2</sup> Yang Xiaoquan<sup>2</sup> Xu Xiang<sup>2</sup> Peng Zhiying<sup>2</sup>

1(Faculty of Food Science and Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

2(College of Light Industry and Food Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**ABSTRACT** In this article, native soy protein was hydrolyzed by several microbial protease, and the component changes of soy proteins during hydrolysis were analyzed by Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE). The results showed that  $\beta$ -conglycinin was hydrolyzed easier than glycinin by protease. Subunit  $\alpha'$  of  $\beta$ -conglycinin was more sensitive to hydrolysis than subunit  $\alpha$  of  $\beta$ -conglycinin, subunit  $\beta$  of  $\beta$ -conglycinin seemed more resistant to hydrolysis than subunits  $\alpha'$  and  $\alpha$  of  $\beta$ -conglycinin. Acid subunits of glycinin are hydrolyzed slightly easier than base subunits of glycinin by protease.

**Key words** native soy protein, selective proteolysis, defatted soy meal, protease

信  
息  
窗

## 美法合作开发新型高甜度甜味剂 NTM

美国孟山都公司与法国里昂大学合作开发出新型高甜度甜味剂及风味增强剂 NTM(商品名),是天门冬氨酸与苯丙氨酸二肽化合物的衍生物,甜度为蔗糖的 7 000~13 000 倍。NTM 酸碱稳定性范围的 pH 为 3~5.5,甜度比糖精、三氯蔗糖等高,甜味清凉,近似纯糖溶液。可应用于可乐饮料、果汁饮料、布丁、可可、乳制品、巧克力、水果制品、烤肉酱、谷物食品等中,有改善口感与风味、提高食品质量等优点,在食品工业中应用广泛。