

DOI:10.13995/j.cnki.11-1802/ts.023300

引用格式:吴文煜,周婧,宗红,等.利用一种新型三肽酶制备低苦味大豆低聚肽及其功能研究[J].食品与发酵工业,2020,46(13):55-61. WU Wenyu, ZHOU Jing, ZONG Hong, et al. Functional properties of low-bitter soybean oligopeptides prepared by a novel tripeptidase[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(13): 55-61.

利用一种新型三肽酶制备低苦味大豆低聚肽及其功能研究

吴文煜^{1,2,3}, 周婧^{1,2,3}, 宗红^{1,2,3}, 陆信曜^{1,2,3}, 诸葛斌^{1,2,3*}

1(糖化学与生物技术教育部重点实验室(江南大学),江苏无锡,214122)

2(工业生物技术教育部重点实验室(江南大学),江苏无锡,214122)

3(江南大学 生物工程学院,工业微生物研究中心,江苏无锡,214122)

摘要 利用一种新型三肽酶结合碱性蛋白酶制备低苦味大豆低聚肽并进行功能特性分析,包括溶解性、水解度、苦味鲜味、抗氧化性能和抗血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)性能。结果表明,利用三肽酶结合碱性蛋白酶制备的大豆多肽的溶解度、水解度分别为80.6%和7.9%,与碱性蛋白酶单酶制备的大豆多肽相比,分别提高了60.4%和29.5%;分子质量分布主要区间为0.2~1 kDa,其中分子质量<1 kDa的组分含量达81.8%,提高了23.7%;游离氨基酸含量显著提高,其中呈鲜味氨基酸含量由22.7%提高到47.4%,苦味值降低7.3%,是低苦味的大豆低聚肽;DPPH自由基、羟基自由基和超氧阴离子自由基清除率分别提高了48.1%、100%和14.2%,且具有较强的还原力;ACE抑制率达到83.6%,提高了11.6%,具有一定的降血压功能。综上所述,结合三肽酶的双酶法可以显著提高大豆低聚肽的功能特性,该三肽酶在大豆功能肽加工制备中具有良好的应用前景。

关键词 三肽酶;大豆蛋白;低聚肽;抗氧化;抗ACE

Functional properties of low-bitter soybean oligopeptides prepared by a novel tripeptidase

WU Wenyu^{1,2,3}, ZHOU Jing^{1,2,3}, ZONG Hong^{1,2,3}, LU Xinyao^{1,2,3}, ZHUGE Bin^{1,2,3*}

1(The Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

2(The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, School of Biotechnology, Research Centre of Industrial Microbiology, Wuxi 214122, China)

3(Research Centre of Industrial Microbiology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT Soybean oligopeptides prepared by a novel tripeptidase and alkaline protease were analyzed. And its functional properties including solubility, degree of hydrolysis, bitterness, umami, antioxidant properties and anti-angiotensin converting enzyme (ACE) properties were deeply investigated. The results showed that the solubility and hydrolysis degree of soybean peptides prepared with tripeptidase and alkaline protease were 80.6% and 7.9%, respectively, which were 60.4% and 29.5% higher than that of the soybean peptides prepared with alkaline protease alone. The main molecular weight was 0.2-1 kDa and the component with a molecular weight of less than 1 kDa reached 81.8% which was 23.7% higher than the alkaline protease prepared-soybean peptides. Meanwhile, free amino acid content increased significantly. Furthermore, the content of sweet and umami amino acids in the free amino acids increased from 22.7% to 47.4%. However, 8.7% decline of bitter value was observed suggesting it was a low-bitter soybean oligopeptide. Moreover, DPPH, hydroxyl and superoxide

第一作者:硕士研究生(诸葛斌教授为通讯作者, E-mail: bzhuge@126.com)

基金项目:江苏省科技计划项目—苏北科技专项(SZ-SQ2018056)

收稿日期:2020-01-08, 改回日期:2020-02-26

free radical scavenging rates were increased 48.1%, 100% and 14.2% respectively compared with control. Meanwhile the soybean oligopeptides prepared by a novel tripeptidase and alkaline protease also exhibited good reducing power; the ACE inhibition rate reached 83.6%, which was 11.6% higher than that of soybean peptides prepared with alkaline protease. These results revealed that the double enzyme method (tripeptidase and alkaline protease) can significantly improve the functional properties of soybean oligopeptides, which indicating its potential application prospects of the tripeptidase in functional soybean peptide preparation.

Key words tripeptidase; soybean protein; oligopeptide; antioxidant; anti-ACE

大豆低聚肽是以大豆蛋白为原料,经生物技术酶处理获得的小分子肽^[1],具有抗氧化、抗血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)^[2]、增强免疫、延迟衰老^[3]等功效,同时由于其溶解性高且易于被人体吸收,常被用作优良的食品保健原料。目前大豆肽的制备多采用单酶水解^[2],即利用碱性蛋白酶^[3]对大豆蛋白进行水解,但该法制备的大豆肽仍含有一些大分子多肽,不利于人体吸收,且具有一定的苦味,造成口感较差。目前有采用双酶水解的方法制备大豆低聚肽,以进一步降低分子质量,减少多肽的苦味。何东平等^[4]采用碱性蛋白酶和中性蛋白酶复配,得到的大豆多肽分子质量均低于 1 kDa。SCHMIDT 等^[5]分别用碱性蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶水解大豆分离蛋白后,再利用风味蛋白酶进一步水解,获得了具有低致敏性和低苦味的大豆多肽,表明双酶法能更好地改善大豆多肽的功能。

有研究显示,大豆多肽苦味的主要物质是 2~10 肽等疏水性小肽,富含疏水性残基^[6]。ZHU 等^[7]从酱油中制备纯化苦味疏水性肽,发现分子质量越小,对口感的影响越大,并且从苦味成分中分离了多个 3 肽,均显示苦味和涩味。因此,采用内肽酶结合外肽酶共同水解大豆蛋白是降低大豆多肽分子质量、苦味及改善多肽功能的有效方法。课题组前期研究获得了一种新型的外肽酶——三肽酶^[8],能够有效地切割三肽等小分子多肽,尤其对酪氨酸、丙氨酸、脯氨酸等疏水性残基特异性较强。本研究采用碱性蛋白酶和三肽酶双酶法制备低苦味大豆低聚肽,并对其溶解性、苦味鲜味、抗氧化和抗 ACE 等功能方面进行研究,探究三肽酶在大豆低聚肽制备中的潜在能力,为大豆蛋白深加工提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 主要实验材料

大豆分离蛋白由江苏全盈生物技术有限公司提供;三氯乙酸、 Na_2HPO_4 和葡萄糖等化学试剂均为国产分析纯;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 自由基、碱性蛋白酶(200 000 U/g),北京索莱宝科技有限公司;马尿酸组胺酰亮氨酸(hippurate histamine leucine, HHL)、血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE), Sigma 公司。

1.1.2 主要实验设备

DKZ-2 型电热恒温振荡水槽,上海精宏实验设备有限公司;UV 2000 型分光光度计,美国尤尼柯公司;TG16-WS 型台式高速离心机,湖南湘仪离心机仪器有限公司;F-7000 荧光分光光度计,日立高新技术公司;Waters-1525 液相色谱仪,美国沃特公司;TS-5000Z 味觉分析系统(电子舌),日本 INSENT 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 三肽酶和大豆低聚肽的制备

三肽酶的制备:利用本实验室构建的 1 株三肽酶重组枯草芽孢杆菌 WB600 表达菌株^[8],将其在 TB 培养基中发酵表达,在 37 ℃、200 r/min 条件下培养发酵 20~24 h。发酵液通过盐析, Ni 柱纯化后得到三肽酶。

对大豆分离蛋白进行酶解处理,先用碱性蛋白酶酶解,酶解时间 1 h;酶解温度 50 ℃;底物质量浓度 70 mg/mL;酶底物比[E/S] 4:100(质量比),然后于 95 ℃水浴灭酶,冷却至室温后,样品冻干得到大豆多肽 ASPI。相同碱性蛋白酶酶解条件,再加入三肽酶进行 2 次酶解,酶解时间 1 h;酶解温度 40 ℃;酶底物比[E/S] 4:100 得到的样品冻干后保存,得到大豆低聚肽。

工艺流程:碱性蛋白酶酶解→三肽酶酶解→冷冻干燥→大豆低聚肽

1.2.2 大豆肽分子质量测定

采用 Waters 1525 高效液相色谱仪测定,参考文

献[9]。

色谱条件:色谱柱为 Ultrahydrogel™ Linear 300 mm × 7.8 mm × 2 μm。

流动相:0.1 mol/L NaNO₃;流速:0.9 mL/min;柱温:45 ℃。

1.2.3 溶解性和水解度(degree of hydrolysis, DH)测定

溶解性:准确称取 1 g 蛋白样品,100 mL 容量瓶定容,pH 7.0,混合振荡 2 h,转速 3 000 × g 离心 15 min,取上清液^[10]。

$$\text{溶解性}/\% = \frac{\text{上清液氮含量}}{\text{样品中总氮含量}} \times 100 \quad (1)$$

水解度是指蛋白裂解的肽键数与总肽键的比例,使用邻苯二甲醛 *o*-phthalaldehyde,OPA)法^[11]。按公式(2)计算:

$$\text{DH}/\% = \frac{\text{SerNH}_2 - \beta}{\alpha \times h_{\text{tot}}} \quad (2)$$

式中:SerNH₂,1 g 大豆分离蛋白的氨基当量,mmol;α,常数,0.97;β,常数,0.34;h_{tot},常数,7.80。

1.2.4 大豆低聚肽电子舌分析与感官评价

采用电子舌^[12]测定大豆多肽的苦味、鲜味,将各样品溶液倒入电子舌的专用烧杯中,蒸馏水用作清洁溶剂。采样时间约为 180 s,测量后清洁 2 ~ 3 min。每 1 s 收集 1 次样品数据,并将测量值的平均值用作每个样品 1 次测量的数据。为了减小测量误差,将每个平行测量重复 4 次,去除第 1 数据,并且将测量 3 次的每个传感器的平均值作为 1 个样本数据,用于随后的数据分析。

采用排序检验法^[13]对样品的苦味、鲜味进行排序,将样品按照苦味鲜味最强到最弱排序。感官评定小组由 9 位 20 ~ 30 岁的小组成员组成(4 男 5 女),这些小组成员都对苦味和鲜味有很好的辨别能力。感官评定温度控制在室温(25 ± 2)℃,不同样品间用清水漱口以恢复原感觉能力^[14]。

1.2.5 DPPH 自由基清除能力测定

取 2 mL 质量浓度为 2 mg/mL 的样品加入 2 mL 质量浓度为 0.04 mg/mL 的 DPPH 无水乙醇溶液,混合均匀避光反应 30 min,测其在波长 517 nm 处的吸光值(A_i)^[15-16];空白对照是用 2 mL 无水乙醇溶液代替 DPPH 溶液,操作同上,测得吸光度值为 A_j;用 2 mL 无水乙醇代替样品作为参比,操作同上,测得吸光度值 A₀。根据公式(3)计算样品的 DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad (3)$$

1.2.6 羟基自由基(·OH)清除能力测定

取 2 mL 质量浓度为 2 mg/mL 的样品,加 2 mL 浓度为 6 mmol/L 的 FeSO₄ 和 2 mL 浓度为 6 mmol/L 的 H₂O₂,混匀静置 10 min,然后再加 2 mL 浓度为 6 mmol/L 的水杨酸,混匀静置 30 min,在波长 510 nm 处测定吸光值为 A_i^[17];将去离子水代替水杨酸测定的吸光值定为 A_j;将去离子水代替样品测定的吸光值定为 A₀。根据公式(4)计算样品的羟基自由基清除率:

$$\text{羟基自由基清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad (4)$$

1.2.7 超氧阴离子自由基(O₂⁻·)清除能力测定

将 1 mL 的 2 mg/mL 的样品和 5 mL 的 Tris-HCl 溶液(50 mmol/L,pH 8.0)混合液在 25 ℃ 的水浴锅中温育 20 min,然后加入 50 μL 的 3 mmol/L 的焦性没食子酸溶液,在 25 ℃ 的水浴锅中反应 4 min,在波长 325 nm 处测定吸光值 A_i^[18];将去离子水代替焦性没食子酸测定的吸光值定为 A_j;将去离子水代替样品测定的吸光值定为 A₀。根据公式(5)计算样品的 O₂⁻·清除率:

$$\text{O}_2^- \cdot \text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100 \quad (5)$$

1.2.8 还原力测定

取 2 mg/mL 样品溶液、0.2 mol/L 的磷酸缓冲溶液(pH 6.6)和质量分数 1% 的铁氰化钾溶液各 2 mL 充分混合,于 50 ℃ 水浴锅中反应,然后加入质量分数 1% 的三氯乙酸终止反应。转速 3 000 × g 离心 10 min,取 2 mL 上清液,去离子水作对照组,分别加入 2 mL 的质量分数 0.1% 的 FeCl₃ 溶液,充分混合,在 50 ℃ 水浴下保温 10 min。在波长 700 nm 处测定吸光度,以吸光度表征还原力。

1.2.9 ACE 抑制活性测定

取 25 μL 样品,加入 125 μL 的马尿酸组胺酰亮氨酸溶液(5 mmol/L),在 37 ℃ 水浴锅中孵育 5 min,加入 20 μL 的 ACE(0.1 U/mL),在 37 ℃ 孵育 1 h,然后加入 350 μL 的 HCl 溶液(1 mol/L)以终止反应。然后加入 1.7 mL 乙酸乙酯萃取产生的马尿酸,振荡 30 s,在 3 000 × g 的条件下离心 5 min,然后取上层液 1 mL 在 120 ℃ 烘箱内烘干,冷却后加入 1 mL 去离子水溶解,超声 5 min,在波长 228 nm 处测吸光值,去离子水作为空白^[19]。根据公式(6)计算样品的 ACE 抑

制率:

$$\text{ACE 抑制率}/\% = \frac{A-B}{A-C} \times 100 \quad (6)$$

式中: A , 空白组(用缓冲液替代样品)的吸光度; B , 样品的吸光度; C , 失活组(先加入 HCl, 后加入 ACE)的吸光度。

1.2.10 游离氨基酸测定

采用氨基酸专用高效液相色谱仪测定, 参考文献[20]。

1.2.11 统计分析方法

对感官排序样品进行统计分析, 使用 Friedman 检验^[21] 计算出统计量 F 来分析样品之间的显著性差异, 同时利用 Kramer 检定法^[21] 对样品进行分组。根据公式(7)计算样品的统计量 F :

$$F = \frac{12}{jp(p+1)}(R_1^2 + \dots + R_p^2) - 3j(p+1) \quad (7)$$

式中: j , 评价员数; p , 样品数量; R_1, R_2, \dots, R_p , 各样品的秩和。

2 结果与分析

2.1 大豆低聚肽的溶解性和水解度

大豆蛋白的溶解性是对其加工利用的重要性能之一, 可能还会对后续加工处理产生影响, 所以溶解性也是其品质的一种体现^[22]。水解度可以从侧面反映小分子肽含量及其功能活性的变化, 如图 1 所示。

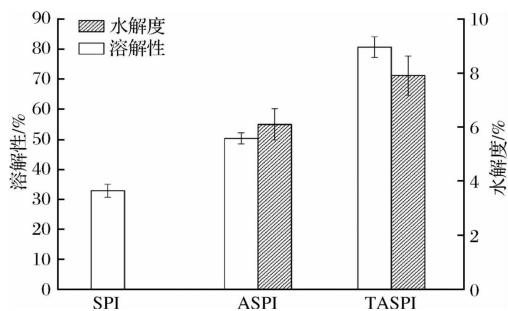


图 1 SPI、ASPI 和 TASPI 的溶解性和水解度分析

Fig. 1 Solubility and degree of hydrolysis analysis of SPI, ASPI and TASPI

大豆分离蛋白(soy protein isolates, SPI)的溶解度为 32.9%, 碱性蛋白酶水解制备得到的大豆多肽(soybean peptides, ASPI)溶解度为 50.3%, 水解度为 6.1%; 碱性蛋白酶复配三肽酶水解得到的大豆低聚肽(soybean oligopeptide, TASPI)溶解度为 80.6%, 水解度为 7.9%, 与单酶水解相比, 分别提高了 60.4% 和 29.5%。这是由于三肽酶可以将碱性蛋白酶水解获得的部分多肽进一步水解, 得到分子质量更小的

肽, 从而水解度提高, 而且这些小分子肽更易溶解, 溶解性亦相应提高^[23]。以上结果表明, 碱性蛋白酶和三肽酶复配水解大豆蛋白可以有效地提高其溶解性和水解度, 有利于其在溶液中发挥它的功能性质。

2.2 大豆低聚肽分子质量分布及游离氨基酸组成分析

大豆蛋白分子质量是评价大豆蛋白产品的关键指标, 小分子的物质易被人体吸收。如图 2 所示, SPI 中 95% 均是 >5 kDa 的组分, 小分子质量的组分很低。TASPI 中 <1 kDa 的组分占 81.8%, 与 ASPI (58.1%) 相比提高了 23.7%, 表明三肽酶双酶法制备小分子多肽优于单酶法。低聚肽的主要分子质量区间是 0.2~1 kDa, TASPI 中此组分含量占 69.3%, 与 ASPI 的 48.5% 相比, 提高了 20.8%; <0.2 kDa 的部分主要是游离氨基酸, ASPI 占比是 9.6%, TASPI 占比是 12.4%, 提高了 2.8%, 这与三肽酶的性质相关, 作为外切酶会释放游离氨基酸。综上所述, 结合三肽酶双酶法较单酶法可以更好地提高小分子肽含量, 会使更多的大分子蛋白水解成小分子物质, 含有更多的低聚肽能够更易被人体吸收, 有利于大豆多肽发挥功能。

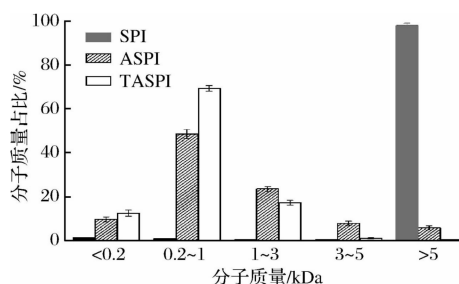


图 2 SPI、ASPI 和 TASPI 的分子质量分布

Fig. 2 Molecular weight distributions of SPI, ASPI and TASPI

由表 1 可以看出, TASPI 中游离氨基酸含量显著高于 ASPI, 这是由酶的性质所决定的, 碱性蛋白酶属于内切酶, 可将长的肽链切割成小的肽段, 释放的游离氨基酸较少, 而三肽酶属于外肽酶, 能够切割末端的氨基酸, 故 TASPI 中游离氨基酸含量较高, 其中 Arg、Glu、Gly、Tyr 含量明显提高, 这与三肽酶的酶切特性一致。另外, TASPI 中含有呈鲜味氨基酸^[24] (Glu、Asp、Gly、Ala) 约 5.67 g/100 g, 占总游离氨基酸的 47.4%, 呈苦味氨基酸^[24-25] (Leu、Ile、Tyr、Phe) 约 2.77 g/100 g, 占总游离氨基酸的 23.0%, 与 ASPI 相比, 呈鲜味氨基酸含量提高了 24.7%, 呈苦味氨基酸含量降低了 12.2%, 由此可以看出, 三肽酶水解后可降低大豆肽的苦味。

2.3 大豆低聚肽苦味、鲜味测定

苦味和鲜味是大豆多肽产品味觉的重要指标,利用电子舌技术将样品的苦味和鲜味数据化,如图3所示。

表1 SPI、ASPI和TASPI中的游离氨基酸含量

单位:g/100g

Table 1 Free amino acid content in SPI, ASPI and TASPI

氨基酸	SPI	ASPI	TASPI
Asp	0.076	0.125	0.975
Glu	0.072	0.26	2.311
Ser	0.006	0.112	0.12
His	0.030	0.062	0.07
Gly	0.008	0.021	1.762
Thr	0.015	0.059	0.061
Arg	0.119	0.305	2.632
Ala	0.022	0.13	0.622
Tyr	0.015	0.151	1.565
Cys-s	0.000	0.006	0.008
Val	0.007	0.098	0.26
Met	0.007	0.101	0.129
Phe	0.014	0.193	0.334
Ile	0.005	0.111	0.295
Leu	0.006	0.375	0.562
Lys	0.008	0.176	0.177
Pro	0.012	0.072	0.088
总量	0.423	2.357	11.971

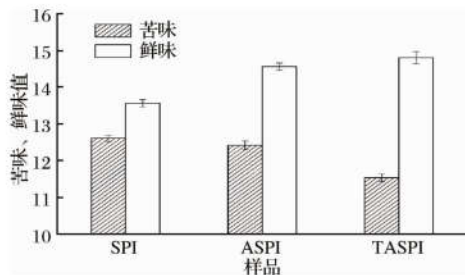


图3 SPI、ASPI和TASPI的苦味、鲜味测定分析

Fig.3 Bitterness and umami analysis of SPI, ASPI and TASPI

ASPI的苦味值和鲜味值分别是12.4和14.6, TASPI苦味值和鲜味值分别是11.5和14.8,苦味值较ASPI降低7.3%,鲜味值提高1.4%,苦味和鲜味均比ASPI有所改善。

通过感官评定对样品的苦味和鲜味进行排序,表2是9位评价人员对3种样品的苦味排序和鲜味排序,然后通过表3的样品苦味的秩和 R ,使用Friedman检验^[21]计算出统计量 $F = 10.1$,远大于检验近似临界值8.66(显著性水平 $\alpha = 0.01$),说明样品之间存在非常显著差异。用Kramer检定法^[21]对3个样品分组,根据评价人数9和样品数3,查阅《食品感官鉴别》^[14]书中附表,得到秩和临界值为12~24

($\alpha = 0.01$),SPI的秩和12.5和ASPI的秩和16都在临界值区间内被划分为一组,同组内无显著性差别, TASPI秩和25.5,大于临界最大值24, TASPI单独划为一组,与其他样品存在显著性差异,由此得出结论,在0.01显著水平上, TASPI苦味最低。同样对于鲜味,通过表3鲜味的秩和,计算统计量 $F = 12.3$,也远大于检验近似临界值8.66(显著性水平 $\alpha = 0.01$),样品之间也存在非常显著差异。分组发现SPI单独一组,ASPI和TASPI一组,2组存在显著性差异。得出结论,在0.01显著水平上,ASPI和TASPI鲜味最强,这与电子舌检测结果一致。

表2 SPI、ASPI和TASPI的排序结果

Table 2 Sorting results of SPI, ASPI and TASPI

评价员	苦味排序和秩次			鲜味排序和秩次		
	1	2	3	1	2	3
1	A	>	B > C	B	>	C > A
2	A	>	B > C	C	>	B > A
3	A	>	B > C	C	>	B = A
4	A	=	B > C	C	>	B > A
5	B	>	A > C	B	=	C > A
6	A	=	B > C	C	=	B > A
7	B	=	A = C	C	=	B > A
8	A	>	B = C	B	>	C > A
9	B	=	A > C	C	>	B > A

注:A代表SPI,B代表ASPI,C代表TASPI

表3 SPI、ASPI和TASPI苦味、鲜味的秩次和秩和

Table 3 Ranks and rank sums of bitterness and umami of SPI, ASPI, and TASPI

评价员	苦味秩次			苦味秩和	鲜味秩次			鲜味秩和
	SPI	ASPI	TASPI		SPI	ASPI	TASPI	
1	1	2	3	6	3	1	2	6
2	1	2	3	6	3	2	1	6
3	1	2	3	6	2.5	2.5	1	6
4	1.5	1.5	3	6	3	2	1	6
5	2	1	3	6	3	1.5	1.5	6
6	1.5	1.5	3	6	3	1.5	1.5	6
7	2	2	2	6	3	1.5	1.5	6
8	1	2.5	2.5	6	3	1	2	6
9	1.5	1.5	3	6	3	2	1	6
样品秩和 R	12.5	16	25.5	54	26.5	15	12.5	54

注:排序相同取平均秩次

通过以上电子舌检测和感官评定,结果表明,结合三肽酶的双酶法可以有效降低大豆多肽的苦味,适用于制备低苦味的大豆功能肽。

2.4 大豆低聚肽抗氧化能力分析

分别从DPPH自由基、羟自由基($\cdot\text{OH}$)、 $\text{O}_2^- \cdot$ 清除率和还原力4个方面综合评价大豆肽ASPI和

TASPI 的抗氧化能力。如图 4 所示, TASPI 的 DPPH 自由基清除率、 $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 清除率分别为 72.4%、78.4% 和 89.3%, 与 ASPI 相比, 分别提高了 48.1%、100% 和 14.2%。由此可以看出, 结合三肽酶双酶法制备的大豆多肽的抗氧化活性明显优于单酶法制备的大豆多肽。抗氧化活性在一定程度上取决于分子质量分布, 较小的肽具有较高的反应能力, 小分子肽的含量越多, 抗氧化性能越强。结合 2.2 的结果, TA-

SPI 中 <1 kDa 的组分占 81.8%, 与 ASPI 相比提高了 23.7%, 含有更多的十肽以下的小肽, 更容易形成良好的抗氧化物质; 而且三肽酶可以使 ASPI 进一步水解, 产生更多的小分子肽 (例如二肽, 三肽等) 来作为供体提供更多的电子, 与自由基反应将其转化为稳定的产物, 终止自由基的链式反应, 同时三肽酶水解释放一些疏水性氨基酸也会提高多肽的抗氧化能力。

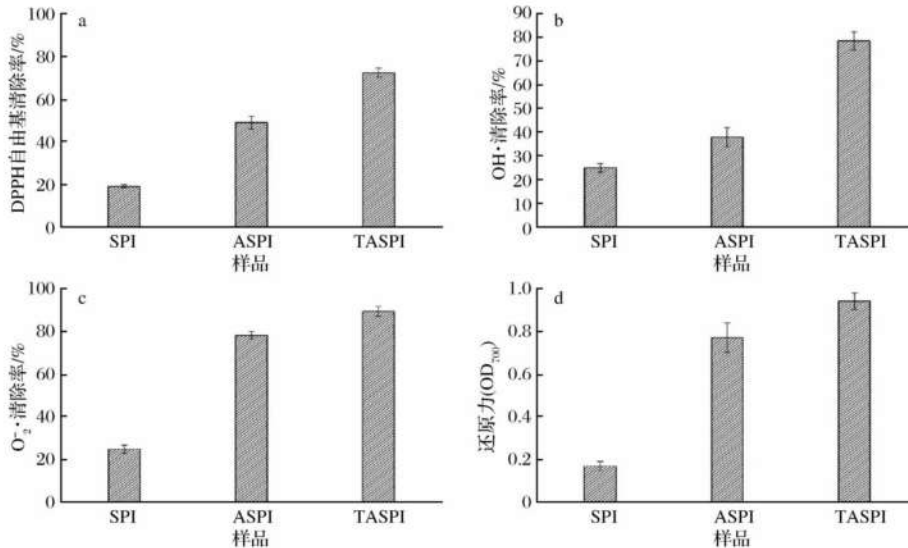


图 4 SPI、ASPI 和 TASPI 的抗氧化活性

Fig. 4 Antioxidant activity of SPI, ASPI and TASPI

从图 4-d 可以看出, TASPI 的还原能力最大, OD_{700} 值为 0.94, 比 ASPI 的 OD_{700} 值 0.77 提高了 22.1%。三肽酶可以进一步酶解使长肽链断裂成短肽产生 H^+ 增加了还原力, 因此 TASPI 的还原能力会高于 ASPI。

综上所述表明, 结合三肽酶双酶水解制备的大豆低聚肽 TASPI 在抗氧化性能上明显优于单酶水解的 ASPI, 抗氧化性能显著提升。

2.5 大豆低聚肽抗 ACE 能力分析

ACE 通过催化血管紧张素 II (ANG II) 的产生和抑制血管扩张剂缓激肽活性, 起到控制血压的作用。ACE 抑制率可以反映多肽的降血压功能的效果^[26], 如图 5 所示, TASPI 的 ACE 抑制率达到 83.6%, 有很强的 ACE 抑制效果, 比 ASPI 的 74.9% 提高了 11.6%。目前报道利用酶法制备的大豆 ACE 抑制肽的 ACE 抑制率在 50%~80%, 张焱^[27] 对比不同蛋白酶制备大豆多肽, 发现胃蛋白酶制备的小于 1 kDa 的大豆多肽 ACE 抑制活性最高可以达到 78.5%, 于胜男^[28] 利用碱性蛋白酶制备的大豆降血压肽的 ACE

抑制率达到 68.6%。

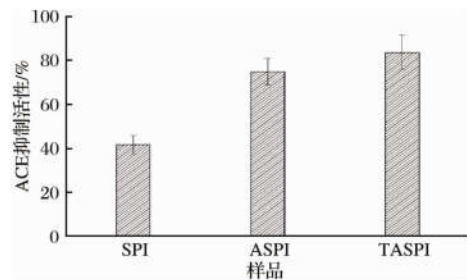


图 5 SPI、ASPI 和 TASPI 的 ACE 抑制率

Fig. 5 ACE inhibition rate of SPI, ASPI and TASPI

碱性蛋白酶结合三肽酶双酶水解能够提高大豆多肽的 ACE 抑制率, 主要是和三肽酶的酶切特性有关, 能特定地水解一些三肽等小肽产生二肽, 而很多二肽均具有较好的 ACE 抑制率, 例如 GU 等^[29] 采用 RP-HPLC 从酱油中分离纯化出多种 ACE 抑制肽, 经鉴定序列分别为 Gly-Tyr、Ser-Tyr、Ala-Tyr、Val-Pro、Val-Gly、Gly-Trp、Ala-Ile、Ala-Phe、Ala-Trp 这些二肽。综上所述, 碱性蛋白酶结合三肽酶双酶法制备的大豆低聚肽具有良好的抗 ACE 效果。

3 结论

本研究对结合一种新型三肽酶双酶法制备低苦味的大豆低聚肽进行了功能性质分析,结果表明,双酶水解制备的大豆低聚肽溶解性为 80.64%,是单酶水解制备大豆多肽的 1.53 倍,水解度达到 7.9%,提高了 30%; <1 kDa 的低聚肽占所有多肽的 81.8%,提高了 23.7%,降低了多肽的分子质量;苦味显著降低,适用于制备低苦味的大豆低聚肽;抗氧化性能提升显著,DPPH 自由基、·OH 和 O_2^- ·清除率分别提高了 48.1%、100% 和 14.2%;同时 ACE 抑制率达到 83.6%,具有较强的降血压功能。因此,结合三肽酶制备的大豆低聚肽不仅苦味降低,而且抗氧化性能及抗 ACE 功能均有提升,具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 徐天. 大豆低聚肽和低聚糖复合物生理功能的研究[D]. 大连: 大连工业大学, 2014.
- [2] WANG R, ZHAO H, PAN X, et al. Preparation of bioactive peptides with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of α -glucosidase inhibitory peptides from soy protein[J]. *Food Science & Nutrition*, 2019,7(5):1 848 - 1 856.
- [3] 徐天,刘艳,郭继强,等. 大豆低聚肽和低聚糖复合物对家蚕寿命的影响[J]. *大豆科学*, 2014,33(5):728 - 730.
- [4] 何东平,程雪,马军,等. 超声辅助复合酶酶解制备大豆多肽工艺的优化[J]. *中国油脂*, 2018,43(7):72 - 76.
- [5] MEINLSCHMIDT P, SCHWEIGGERT-WEISZ U, BRODE V, et al. Enzyme assisted degradation of potential soy protein allergens with special emphasis on the technofunctionality and the avoidance of a bitter taste formation[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016,68:707 - 716.
- [6] 刘伯业. 小麦蛋白低苦味肽的制备及其脱苦机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [7] ZHU X, ATERHOUSE D S, CHEN J, et al. Bitter-tasting hydrophobic peptides prepared from soy sauce using aqueous ethanol solutions influence taste sensation[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2019,55(1):146 - 156.
- [8] 诸葛斌,吴文煜,宗红,等. 一种表达三肽酶的重组枯草芽孢杆菌及其构建方法: 中国,CN110408583A[P]. 2019 - 11 - 05.
- [9] 谷中华,朱旭,杨凌霄,等. 小麦面筋蛋白酶解制备合适分子小肽的研究[J]. *食品工业科技*, 2013,34(24):105 - 109.
- [10] 王利国,刘锐,张民,等. 大豆分离蛋白酶解产物的理化性质研究[J]. *中国食品添加剂*, 2018,19(3):73 - 79.
- [11] 宋婷婷,吴珍珍,宗红,等. 米曲霉 AAP 新基因的异源表达及其酶学性质研究[J]. *食品与发酵工业*, 2019,45(5):38 - 44.
- [12] DANG Y, HAO L, ZHOU T, et al. Establishment of new assessment method for the synergistic effect between umami peptides and monosodium glutamate using electronic tongue[J]. *Food Research International*, 2019,121:20 - 27.
- [13] 魏永义,韩豪敏. 排序检验法在食醋感官指标重要性排序中的应用[J]. *中国调味品*, 2018,43(2):118 - 120.
- [14] 张水华,孙君社,薛毅. 食品感官鉴评(第二版)[M]. 广州: 华南理工大学出版社,1999.
- [15] 宋春丽,任健,陈佳鹏,等. 糖基化及限制性酶解对大豆蛋白结构和抗氧化活性的影响[J]. *中国油脂*, 2017,42(11):65 - 69.
- [16] 张翔,李星星,黄雪松. 澳洲坚果糖蛋白的分离纯化及其体外抗氧化能力[J]. *食品与发酵工业*, 2019,45(5):145 - 150.
- [17] 刘丹. 大豆抗氧化活性肽的生物制备技术及稳定性研究[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [18] 汪建红,吴维,韩平东. 荸荠皮多糖对自由基的清除作用[J]. *食品研究与开发*, 2017,38(20):16 - 20.
- [19] 谯飞. 大米蛋白 ACE 抑制肽制备及其膜高效分离技术的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.
- [20] 夏彦君. 大豆蛋白生物加工及功能研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- [21] 梁慧点,魏永义. 排序检验法在火腿肠感官评价中的应用[J]. *肉类工业*, 2019(3):53 - 55.
- [22] 周洋莹,郑红莉,杨文钰,等. 大豆分离蛋白-大豆低聚糖糖基化产物溶解性和乳化性分析[J]. *食品与发酵工业*, 2020,46(1):122 - 128.
- [23] 李占方,诸葛斌,宗红,等. 生物酶法改性提高植物组织化蛋白的产品特性[J]. *食品与发酵工业*, 2017,43(6):66 - 71.
- [24] 胡玲萍,张晓梅,张鸿伟,等. 南极磷虾自溶前后氨基酸和胰蛋白酶降解产物的变化[J]. *食品科学*, 2019,40(11):1 - 6.
- [25] 刘伯业. 小麦蛋白低苦味肽的制备及其脱苦机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- [26] LO W M Y, LI-CHAN E C Y. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from *in vitro* pepsin-pancreatin digestion of soy protein[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005,53(9):3 369 - 3 376.
- [27] 张焱. 大豆蛋白 ACE 抑制肽的酶法制备及分离纯化[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.
- [28] 于胜男,吴非. 制备大豆降血压肽最佳用酶的筛选[J]. *食品工业科技*, 2010,31(5):199 - 201.
- [29] GU Y, WU J. LC-MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins[J]. *Food Chemistry*, 2013,141(3):2 682 - 2 690.