

大豆多肽分子质量分布与苦味的确定

邓 勇 冯学武

(中国农业大学食品学院)

摘 要 利用葡聚糖凝胶(Sephadex G-25)柱层析和高压液相色谱(HPLC)测定大豆多肽分子质量与水解度以及分子质量与苦味之间的关系。试验结果表明,随着水解度的增加,大豆蛋白水解物分子质量变小,当水解度约为 25%时,其分子质量绝大多数在 500~ 1 000 u 之间。分子质量为 500~ 1 000 u 的大豆多肽苦味较强。

关键词 大豆多肽; 分子质量分布; 苦味

中图分类号 TS 214

Determination of Distribution of Molecular Weight and Bitterness of Soybean Peptides

Deng Yong Feng Xuewu

(College of Food Science and Engineering, CAU)

Abstract The relations between Degree of Hydrolysis and distribution of Molecular Weight, as well as the bitterness of soybean peptides, were determined by using Sephadex G-25 and HPLC. The result showed that the molecular weight of Soybean Protein Hydrolysates decreased with an increase in degree of hydrolysis. When degree of hydrolysis reached about 25%, the molecular weight of most SPH ranged from 500 to 1 000 u. The bitter peptides has the same range of molecular weight as the above.

Key words soybean peptides; distribution of molecular weight; bitterness

大豆多肽是由大豆蛋白质经水解而制成的低分子肽混合物,分子质量以低于 1 000 u 为主。与蛋白质和氨基酸相比,多肽更易被人体消化、吸收。大豆多肽具有低抗原性和抗氧化性,且具有降血压、提高免疫、促进发酵等诸多功能,因此其应用前景非常广阔。但是,大豆多肽的苦味问题长期困扰着食品科学家们,严重影响了其在食品工业中的利用^[1]。目前国内对于动态地测定大豆多肽分子质量分布随水解度变化的研究还不多,对不同分子质量大豆多肽苦味的研究还只限于理论分析,没有进行试验验证。

笔者利用葡聚糖凝胶(Sephadex G-25)柱层析和高压液相色谱(HPLC)分别测定大豆多肽的分子质量分布,利用柱层析对大豆蛋白水解物进行分离,再采用感官评定法确定不同多肽的苦味强度,从而找出多肽分子质量与苦味之间的关系,为研究多肽的功能特性和脱苦方法等提供一定的理论基础。

收稿日期: 2001-04-03

邓 勇,北京清华东路 17 号 中国农业大学(东校区)113 信箱, 100083

1 材料与装置

1.1 材料

- 1) 大豆分离蛋白, 粗蛋白质量分数为 91.9%, 吉林不二蛋白有限公司产品。
- 2) Alcalase 碱性内切蛋白酶, 酶活力为 $2.98 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 丹麦, Novo 公司产品。
- 3) 主要化学试剂。奎宁: 分析纯, 北京化学试剂公司; 蓝色葡聚糖凝胶: 分子质量 $m = 2 \times 10^6 \text{ u}$; 分析纯, 美国, Sigma 公司; 细胞色素 C (牛心): $m = 12\,327 \text{ u}$, 色谱纯, 美国, Sigma 公司; VB₁₂: $m = 1\,350 \text{ u}$, 色谱纯, 北京化学试剂公司; 酪氨酸-酪氨酸-亮氨酸(Y-Y-D): $m = 458 \text{ u}$, 色谱纯, 北京化学试剂公司; 乙腈: 色谱纯, 北京化学试剂公司。

1.2 主要仪器与装置

- 1) 酸度计。PHS-25 型, 上海雷磁仪器厂。
- 2) 分光光度计。721 型, 北京光学仪器厂。
- 3) 葡聚糖凝胶柱层析装置。a 玻璃层析柱 $d 15 \text{ cm} \times 40 \text{ cm}$, 北京来亨科贸公司; b 葡聚糖凝胶(Sephadex G-25 型), 分子质量测定范围为 100~5 000 u, Pharmacia 公司; c 部分收集器, BS-100 型, 上海沪西机电厂。
- 4) 高压液相色谱(HPLC)。a 色谱仪, DX300 型(P4000 低压梯度真空泵, UV 3000 高速扫描紫外检测器), 美国 TST 公司; b 色谱柱, Ultrahydrogel™ 120 型, $d 7.8 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$, 分子质量测定范围为 100~20 000 u, 美国, Waters 公司。

2 试验方法

1) 大豆蛋白的酶法水解工艺。在 500 mL 容量瓶中加入 25.0 g 大豆分离蛋白, 加蒸馏水配制成质量浓度为 $0.05 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大豆蛋白溶液。将溶液置于水解反应器中, 加热至 55°C , 调节其酸碱度至 pH 8.0; 按大豆蛋白质量的 8.0% 加入 Alcalase 碱性蛋白酶, 缓慢搅拌, 维持 pH 在 8 ± 0.1 范围内, 按一定的反应时间间隔记录碱液消耗量; 到预定时间后, 迅速升温到 85°C , 加热 15 min 钝化蛋白酶; 冷却后在 $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 速度下离心分离 15 min, 取上清液调节其酸碱度至 pH 7.0; 置冰箱中保存待用。

2) 苦味评定方法。感官评定小组由 5 人组成。评定员用蒸馏水漱口之后, 取待评定液 2~3 mL 置于口中, 10 s 后吐出; 漱口后取与之苦味程度相近的标准液品尝, 如确认两苦味相近, 即可将待评定液的苦味值定为该标准液的苦味值, 否则需取其他标准液再尝, 直至确定苦味值。结果取 5 人评定值的平均值^[2]。

以奎宁为基准物质, 按 L. Mogensén 和 J. Adler-Nissen^[3] 的方法配置标准液。经评定当标准液浓度为 c ($c = 3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 刚好无苦味, 定 c 值为下限, $32c$ 为上限(此时若再增加奎宁浓度, 苦味基本上不再增加), 在 $c \sim 32c$ 之间, 奎宁浓度成倍增加, 苦味值也相应增加。据此设定评分标准见表 1。

3) 水解度的控制。利用 pH-Stat 方法^[4]测定和控制蛋白质的水解度 D_H 。

4) 平均肽链长度的估计^[5]。设定 l_{PCL} 为酶水解后可得到的多肽的平均链长。本试验拟制备 3~6 个氨基酸残基的低肽混合物, 所以 D_H 的控制是水解过程的关键。由于 $l_{\text{PCL}} = 1/D_H \cdot 100\%$, 因此, 在本试验中, 选定 $D_H = 25\%$ 为所要达到的水解度, 此时 l_{PCL} 的理论计算值为 4, 大

豆蛋白水解液分子质量大部分应分布在 500~ 1 000 u 之间。

表 1 苦味值的评分标准

奎宁浓度	c	$2c$	$4c$	$8c$	$16c$	$32c$
苦味描述	无苦味	微苦	中度苦	较苦	苦	很苦
苦味分值	0	1	2	3	4	5

注: $c = 3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

3 结果与分析

3.1 标准物质洗脱体积的测定

分别用质量浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的蓝色葡聚糖凝胶 ($m = 2 \times 10^6 \text{ u}$), 细胞色素 C ($m = 12\ 327 \text{ u}$), VB_{12} ($m = 1\ 350 \text{ u}$), $\text{Y}^{\text{-}}\text{Y}^{\text{L}}$ ($m = 458 \text{ u}$) 溶液各 1.0 mL 上 Sephadex G-25 层析柱, 洗脱。根据颜色和吸光值判断, 上述标准物质的洗脱体积分别为 35.0, 35.0, 60.0 和 95.0 mL。

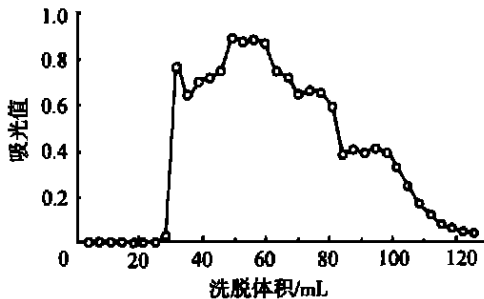
蓝色葡聚糖凝胶和细胞色素 C 的分子质量虽然相差很远, 但试验测得的洗脱体积均为 35.0 mL。因为试验所用的 Sephadex G-25 的分子质量测定范围为 100~ 5 000 u, 说明在洗脱体积 35.0 mL 之前洗脱出的物质其分子质量大于 5 000 u。同理, 洗脱体积 60.0 和 95.0 mL 所对应的标准物质的分子质量 1 350 和 458 u 可做为划分物质分子质量分布的另外 2 个分界线。

3.2 蛋白质的水解度与分子质量分布

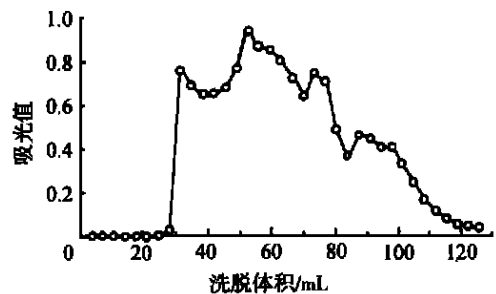
由图 1 中的色谱峰, 结合曲线与坐标轴围成的区域面积进行分析, 可以判断大豆多肽分子质量分布的大致范围。

由图 1(a) 可以看出, 当水解度大约为 10% 时, 曲线与坐标轴围成的面积绝大部分分布在洗脱体积 35 mL 之后, 说明大多肽混合物分子质量基本上已经在 5 000 u 以下。由(c)可见, 当水解度大约为 20% 时, 原先在洗脱体积为 55 mL 处的色谱峰后移, 在 60 mL 之后出现了较为突出的 2 个色谱峰, 说明分子质量在 1 350 u 以下的大豆多肽已经占多数。

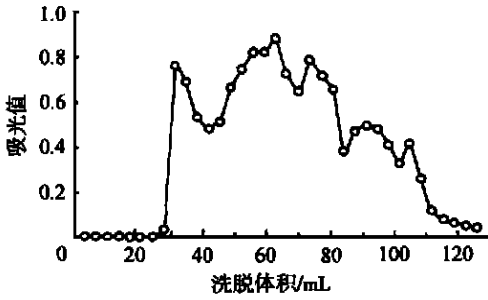
随着水解度的增加, 大豆多肽分子质量逐渐变小, 从图 1(a)~ (f) 可以看出色谱峰逐渐向后移动, 当水解度达到约 25% 时, 在洗脱体积 60~ 95 mL 之间的峰面积占了较大部分, 说明分子质量在 458~ 1 350 u 之间的大豆多肽占总的多肽数量的比例较大。根据理论计算, 当水解度为 25% 时, 大豆多肽的平均肽链长为 4, 分子质量大部分应分布在 500~ 1 000 u 之间。试验结果与理论计算基本一致, 即水解液的分子质量符合试验的预定要求。



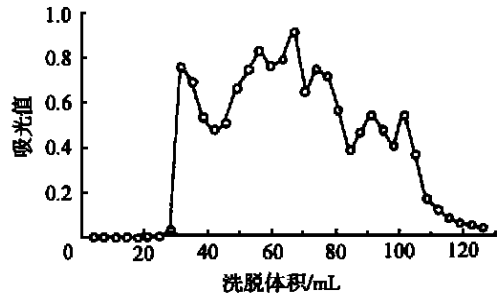
(a) 反应时间 5 min, D_H 为 10.1%



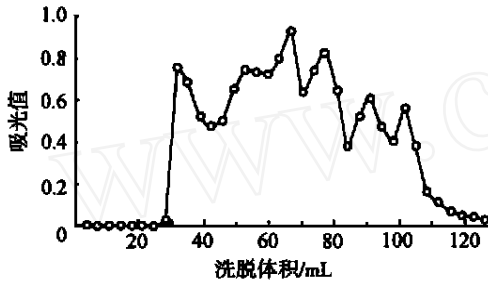
(b) 反应时间 10 min, D_H 为 15.4%



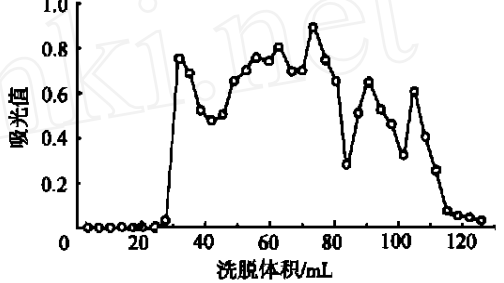
(c) 反应时间 20 m in, D_H 为 19.5%



(d) 反应时间 30 m in, D_H 为 21.6%



(e) 反应时间 60 m in, D_H 为 23.7%



(f) 反应时间 180 m in, D_H 为 24.9%

图 1 不同反应时间测得的大豆多肽混合溶液分子质量分布范围

3.3 苦味评定

将反应时间 180 m in, 水解度为 24.9% 的大豆蛋白水解液 10.0 mL, 上 Sephadex G⁻25 层析柱, 用 0.05 mol·L⁻¹ 乙酸溶液洗脱, 流速 0.6 mL·m in⁻¹, 用部分收集器按 3 mL·管⁻¹ 收集, 每 3 管合并为 1 管, 调 pH 为 7.0, 每管浓缩至 2 mL 后用感官评定法测定其苦味值, 结果见图 2。

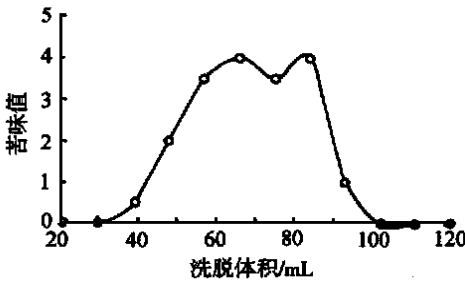


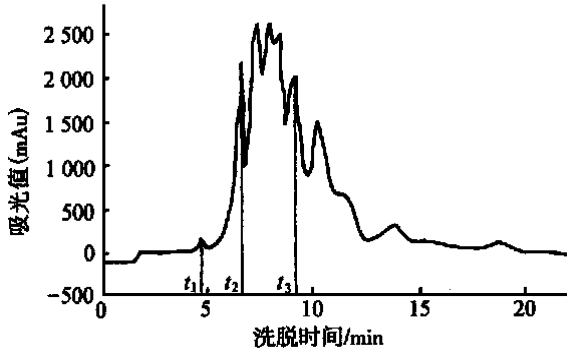
图 2 分段收集大豆蛋白水解液苦味值与洗脱体积的关系

可以看出, 当洗脱体积为 35 mL, 即分子质量为 5 000~ 6 000 u 时水解液开始出现苦味。根据 K. H. Ney 的 Q⁻规则^[6], 分子质量大于 6 000u 的多肽分子, 疏水性基团被包埋在分子的内部, 不能与味蕾接触, 因而苦味不能被感觉。洗脱体积为 60~ 85 mL, 即分子质量为 500~ 1 000 u 时, 大豆多肽苦味最强。随着洗脱体积增加, 分子质量继续减小, 苦味也逐渐减弱。当洗脱体积为 100 mL 左右时, 苦味完全消失, 其原因是这一段对应的组分基本上是单个氨基酸, 所以尝不出苦味。

3.4 HPLC 测定结果

将反应时间 180 m in, 水解度为 24.9% 的大豆蛋白水解液, 用 HPLC 进行分析测定, 结果见图 3。

对图 3 中较为突出的 6 个色谱峰的峰面积进行积分计算, 依次为 6.0, 49.5, 61.5, 39.1, 44.7 和 31.9。由此通过标准物质的标识可以大致计算出分子质量在 1 350~ 12 327 u 之间的



t_1 为细胞色素 C ($m = 12\ 327\ \text{u}$) 的洗脱时间, t_2 为 VB₁₂ ($m = 1\ 350\ \text{u}$) 的洗脱时间, t_3 为 Y⁻YL ($m = 458\ \text{u}$) 的洗脱时间。

图 3 反应时间 180min 的大豆蛋白水解液的高压液相色谱图

大豆多肽占总多肽的比率为 7.0%; 分子质量在 458~ 1 350 u 之间的比率为 70.7%; 分子质量小于 458 u 的比率为 22.3%。这说明, 水解度为 24.9% 的大豆蛋白水解液中大豆多肽混合物的分子质量全部在 10 000 u 以下, 其中绝大多数在 500~ 1 000 u 之间, 这与 Sephadex G-25 柱层析的试验结果基本一致。

4 结 论

1) 随着大豆蛋白水解度的增加, 大豆多肽混合物的分子质量变小。当水解度约为 25% 时, 大豆多肽混合物分子质量绝大多数在 500~ 1 000 u 之间, 与理论计算相符。

2) 分子质量大于 5 000u 的大豆多肽没有苦味, 分子质量在 500~ 1 000 u 的大豆多肽苦味最强。随着分子质量继续减小, 苦味逐渐减弱。

参 考 文 献

- 1 程竹青 蛋白水解液苦味之探讨. 食品工业(台湾), 1996(5): 32~ 39
- 2 孙君社, 薛毅编 食品感官鉴评. 广州: 华南理工大学出版社, 1994 52~ 88
- 3 Mogensen L, Adler-Nissen J. Evaluating bitterness masking principles by taste panel studies. In: Frontiers of flavor: Proceeding of the 5th International Flavor Conference Porto karras, Chalkidiki, Greece, 1987(7): 1~ 3
- 4 王璋编 食品酶学. 北京: 中国轻工业出版社, 1990 194~ 195
- 5 Adler-Nissen J. Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier: Appl Sci Pub, 1986 56~ 59
- 6 Ney K H. Voraussage der bitterkeit von peptiden aus deren amino saurezu-sammensetzung. Z Lebensm Unters Forsch, 1971(147): 64~ 71