

17. Kinugasa, Hitoshi. Processing and preservation of tea extract by hydrostatic pressure. 生物と食品の高圧科学 ,ed. by 林 力丸 ,さんえい出版 ,1993, 243.
18. Rovere, P. Modelling and calculation of the sterilizing effect in highpressure heat treatment. 1999 IFT Annual Meeting, USA, 1999, 18.
19. Knorr, Dietrich. Effects of High – Hydrostatic – Pressure Processes on Food Safety and Quality. Food Technology, 1993, 47 (6): 156 ~ 161.
20. Horie, Yu. Fruit preparation by pressurization: A high pressure resistant Candida yeast, identification and pressure – sterilization. 生物と食品の高圧科学 ,ed. by 林 力丸 ,さんえい出版 ,1993 229 ~ 236.
21. Takahashi, Kanjiro. Sterilization of bacteria and yeast by hydro – static pressurization at low temperature: Effect of temperature, pH, and the concentration of proteins, carbohydrates and lipids. 生物と食品の高圧科学 ,ed. by 林 力丸 ,さんえい出版 , 1993, 244 ~ 249.
22. 李汴生等. 超高压杀菌及其反应动力学. 食品科学, 1997 ,18(9) 3 ~ 9.
23. Lechowich, V. Richard. Food Safety Implications of High Hydro – static Pressure as a Food Processing Method. Food Technology, 1993, 47(6): 170 ~ 173.
24. Adegoke, G. O. Inhibition of Saccharomyces cerevisiae by combination of hydrostatic pressure and monoterpenes. Journal of Food Science, 1997, 62 (2): 404 ~ 406.
25. Rodriguez, J. Combination effect of high hydrostatic pressure and water activity on E. coli inhibition. 2000 IFT Annual Meeting, USA, 2000, 86H – 5.
26. Palou, E. High Hydrostatic Pressure as a Hurdle for Zygosaccharomyces bailii Inactivation. Journal of. Food Science, 1997, 62 (4): 855 ~ 857.

大豆胰蛋白酶抑制子失活方法的研究进展

周春晖 黄惠华 华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510640

摘 要 胰蛋白酶抑制子是大豆食品与饲料的主要抗营养因子, 这种抑制子的失活能明显提高大豆食品与饲料的营养价值和食用安全性。大豆胰蛋白酶抑制子的钝化方法有物理、化学、生物还原、酶解、发酵以及天然化合物络合法等。本文介绍了大豆胰蛋白酶抑制子失活诸方法与技术, 并对其发展前景作初步探讨。

关键词 大豆 胰蛋白酶抑制剂 失活

Abstract Trypsin inhibitor is one of the main antinutrition factors in soybean food and fodder. Inactivation of soybean trypsin inhibitor could obviously improve soybean and fodder's food nutritional value and edible security. A review on the advance in the inactivation methods of soybean trypsin inhibitor in recent years was presented in this article.

Key word Soybean Trypsin inhibitor Inactivation

1 豆类食品中胰蛋白酶抑制子的毒性

大豆胰蛋白酶抑制子 (soybean trypsin inhibitor, 简称 STI) 是大豆中的主要抗营养因子, 是一种分子量在 7975 ~ 21500 之间的多肽类或蛋白质。其中组成多肽的氨基酸残基在 72 ~ 197 个。氨基酸残基组成及性质的差异, 决定了大豆胰蛋白酶抑制子的差异。大豆中的胰蛋白酶抑制子约有 7 ~ 10 种。但是迄今为止, 只有两种大豆胰蛋白酶抑制子得到较详细的研究。这两种胰蛋白酶抑制子即 Bowman – Birk 型胰蛋白酶抑制子 (BBI 和 Kunitz 型胰蛋白酶抑制子 (KSTI)。生大豆中约含 1.4% 的 KSTI 和 0.6% 的 BBI。KSTI 的分子量是 21.384 道尔顿, 内有 181 个氨基酸残基, 含 2 个二硫键。活性中心是精氨酸 63 – 异亮氨酸 64 (Wolf, 1977), 一个 KSTI 分子抑制剂能钝化一个分子的胰蛋白酶。BBI 的分子量为 7861 道尔顿, 有 71 个氨基酸残基, 7 个

二硫键, 分子中有 2 个活性中心: 一个是赖氨酸 16 – 丝氨酸 17, 为胰蛋白酶的结合点; 另一个是亮氨酸 44 – 丝氨酸 45, 是胰凝乳蛋白酶的结合点。通过结合点的作用与胰蛋白酶络合, 可使胰蛋白酶失活, 起到对昆虫、动物及人类的抗营养作用。总的机理为: 大豆胰蛋白酶抑制子的氨基酸残基 (活性部位) 与胰蛋白酶中的氨基酸发生络合作用, 使蛋白酶失去酶解能力, 抑制了该酶的活性。大豆胰蛋白酶抑制子结构中活性部位的氨基酸是具有抑制活性的必要条件, 所以大豆胰蛋白酶抑制子中的二硫键、结构受到破坏时都能使其失活^[1]。

研究表明胰蛋白酶抑制子能抑制昆虫肠道蛋白酶的活性, 使昆虫生长发育不良而死亡, 从而提高大豆的抗虫能力^[2,3]。另外, 大豆胰蛋白酶抑制子抑制了病原菌蛋白酶对寄主细胞的降解, 使病原菌营养不足, 生长增殖受限, 浸染与扩展受阻, 从而达到抗病的目的^[4]。对于动物, 则抑制肠内胰蛋白酶的活性, 妨

碍了食物蛋白的消化、吸收和利用,并引起胰腺肿大,导致生长延缓或停滞。因此,从生物进化的角度看,胰蛋白酶抑制子的存在,有利于豆类植物的自身保护,使得物种得以繁衍、生存和发展。

2 胰蛋白酶抑制子的失活方法

2.1 物理失活

2.1.1 热失活法

大豆胰蛋白酶抑制子热失活是最早发现、研究,也是最常用的方法。研究中,发现大豆胰蛋白酶抑制子的失活可以分为耐热性不同的两个阶段(Vanden Hout et al, 1997)^[5]。一般认为,第一个阶段是KSTI的热失活,而第二个阶段则是BBI热失活。从分子组成与结构的研究表明:溶液中BBI的热稳定性之所以比KSTI强,是由于BBI的分子结构中含有7个二硫键而KSTI则只有2个二硫键(Brik, 1961; Obaro and Watanable, 1971)。Rouhana et al (1996)^[6]发现在豆奶中KSTI和BBI在低于137℃时先后失活,而Linder and Tomlinson (1981)的研究发现商业豆粉中二者的稳定性相差不大。但是Bob Vander (1998)^[7]发现商业豆粉胰蛋白酶抑制子的失活同样分两个阶段,但第一阶段同时存在着BBI和KSTI的失活,而第二阶段则是残留的KSTI的失活。其原因到目前为止还不甚清楚。

Anderson (1992)用蒸气处理大豆薄片^[8],然后分别用氮溶出指数(nitrogen solubility index, NSI)和胰蛋白酶抑制子的活性作为指标,研究了其失活率,结果表明足够的蒸气处理,NSI值从原来的80~90降到10~20,获得有90%的抑制子的失活。

2.1.2 超声波失活法

胰蛋白酶抑制子的超声波失活是近年的新技术。超声波是频率大于20Hz的声波,具有波动和能量的双重性。超声波在溶液的传递过程中,液体中微小气核随超声波声压变化而产生剧烈膨大、振荡和崩溃等过程,同时产生的极短暂的强压力脉冲及高温作用,对于溶液中悬浮的微粒(如蛋白质)产生声化效果(Ding D, 1992),从而引起某些蛋白质如酶的失活。杨汝德等(1998)用超声波钝化大豆制品的胰蛋白酶抑制子^[9]发现,超声波对生豆奶中天然大豆胰蛋白酶抑制子的钝化比钝化的大豆胰蛋白酶抑制子好得多:这可能是豆奶11S和7S蛋白质的存在,有助于使其失活。

2.1.3 其他物理失活法

Hafe (1985)发现用10Gy的 γ -射线照射大豆种子能使其抑制子活力降为原来的25%。Ann Josep H (1993)报道用42Gy的射线能使红花油饼的KSTI完全失活^[10]。

Cinkov (1993)^[11]发现用13.56~27.12MHz的射频(RP)加热大豆种子至120℃,能使其大豆胰蛋白酶抑制子活力降至10%。

利用浸泡和焙烤大豆种粒的方法,分别能使大豆胰蛋白酶抑制子活力降至原来的42.9%和32.9%(Kim et al, 1993)^[12]。

2.2 化学失活法

用化学试剂处理破坏KSTI和BBI分子结构中的二硫键

(R-S-S-R)结构,可破坏其活性,同时氨基酸的组成不发生明显变化。Wedzicha等(1984)^[13]研究了用偏重亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)和亚硫酸钠(Na_2SO_3)钝化大豆胰蛋白酶抑制子作用机理。据报道:使用1.5%的戊二醛溶液和0.6mmol/L的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 处理1小时,可分别钝化85%的BBI和98%的KSTI;先后使用0.6mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 和1.5%戊二醛进行处理,则能使99.5%的KSTI失活(Sessa, 1987)^[14]。加入0.3mol/L的 Na_2SO_3 于生豆粕中75℃处理1h,可以完全钝化胰蛋白酶抑制子并且亚硫酸的残留量极低(Mendal F, 1986);加入10mmol/L维生素C和0.8mmol/L CuSO_4 ,用27℃处理1h,可使40%以上的KSTI失活,65℃时则有90%失活,而BBI则有70%的失活(Sessa, 1990)^[15]。用30mmol/L的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$,65℃处理1h,可使95%的KSTI和98%的BBI失活;用20mmol/L的 H_2O_2 和0.8mmol/L的 CuSO_4 处理也能大大下降胰蛋白酶抑制子活力(Sessa, 1991)^[16]。但 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 的效果最理想。

2.3 生物化学还原失活法

大豆胰蛋白酶抑制子的生化还原失活也有了新的进展。Kobrehe (1991)提出在NADH(辅酶I)-氢化硫氧还蛋白体系中,还原型的NADPH和-硫氧还蛋白还原酶能够使KSTI和BBI活性丧失。Jin-an Jiao等(1992)证明了大豆胰蛋白酶抑制子能够被NADP-氢化硫氧还蛋白体系(NTS)-二巯基苏糖醇(DTT)以及硫辛酸-氢化氧还蛋白(LA-Trxh)还原而失活^[17]。生物还原剂的作用在于使KSTI和BBI中的二硫键还原成巯基,胰蛋白酶抑制子的活性中心受到破坏而失活。各种还原剂钝化作用见表1^[17]。

表1 各种还原剂钝化大豆胰蛋白酶抑制子活性的比较

处理方法	KSTI 相对活性	BBI 相对活性
无还原剂	100	100
^a NET	55.6	70.6
^b DTT	68.5	88.9
^c LA + Trxh	40.5	87.8
^d LA	20.0	12.5

a: 1mmol/L NET, 30℃, 2h; b: 1mmol/L DDT, 30℃, 1h; c: 0.4mmol/L LA + Trxh, 30℃, 1h; d: 0.4mmol/L LA, 30℃, 1h

2.4 大豆胰蛋白酶抑制子是一种多肽或简单的蛋白质,因此它也可以被蛋白酶水解,结果结构改变,尤其是其活性中心的改变而失活。早在1968年,Bowman-Birk便提出KSTI能被胃蛋白酶失活。胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶能够限制性地使KSTI水解成为多肽,影响KSTI的结构和活力(Laskowski et al, 1974)^[18]。Vaintran (1995)就木瓜蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶及胃蛋白酶对KSTI的降解失活作了详细的报道^[19]。

2.5 羰氨反应失活法

糖类能与蛋白质中的氨基酸发生羰氨反应或称美拉德反应。若使糖类与大豆胰蛋白酶抑制子活性部位中的氨基酸作用,便能使其活性降低。Richard E和Oste (1990)^[20]分别利用葡萄糖、乳糖、麦芽糖等使KSTI失活并发现随着羰氨反应的进行,分子中赖氨酸残基的被结合,KSTI活性下降。KSTI分子量

由原来的 22000 增至 31000 ,这表明大量的葡萄糖和 KSTI 活性中心中的赖氨酸结合 结果导致 KSTI 的钝化。羰氨反应对胰蛋白酶抑制子活性的影响见表 2。Yasuko. Kato 在以后的研究中 (1997)^[21] ,比较了 KSTI 分子中的 Lys 和 BBI 分子中的 Arg 与葡萄糖作用而导致其本身失活的情况。

表 2 纯化的 KSTI 相对活性在 120℃、50min 加热条件下随羰氨反应失活结果

样品	相对活性
KSTI	100
KSTI 加热	100
KSTI + 葡萄糖 加热	10
KSTI + 麦芽糖 加热	34
KSTI + 乳糖 加热	27

2.6 发酵失活法

Raneka(1992)^[22] 利用鹰嘴豆粉与大豆粗粉混合发酵 ,发现其胰蛋白酶所受到的抑制活性明显降低。原因是大豆粉中的乳酸菌原经过发酵后形成乳酸菌 (包括芽孢乳杆菌、乳酸链球菌、明串珠菌)。这些乳酸菌都能水解酪蛋白 ,这表明有一些新的不受胰蛋白酶抑制子抑制的蛋白酶产生 ,使胰蛋白酶抑制子失去抑制作用。Vidal - Valverde - C(1993)^[23] 也发现发酵能降低小扁豆中胰蛋白酶抑制剂的活性。

3 评述与展望

最常用的在大豆胰蛋白酶抑制子失活方法是热处理 ,操作方便 ,但常导致食品中必需氨基酸 (尤其是赖氨酸)的损失和食品物理化性质的改变 ,影响食品的营养价值和加工性能。近年的新方法中 ,超声波目前的水平能达到 70% 左右 ;化学失活法与生物还原往往存在试剂的残留 ,对原料有不良影响 ;由于蛋白酶的专一性 ,不同酶对大豆胰蛋白酶抑制子的钝化效果差别很大 ,同时由于蛋白酶的来源以及容易失活 ,因此其应用的成本是主要问题 ;羰氨反应会引起非酶促褐变 ,影响产品的感官 ;在发酵过程中 ,乳酸菌的产生导致成品口味上的变化 ,也导致了发酵失活法的局限性。所以 ,大豆胰蛋白酶抑制子失活的技术还有待于深入的研究与改进。黄惠华等人在近期对茶多酚的研究中发现 :茶多酚对大豆胰蛋白酶抑制子具有明显的失活作用 ;而对木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶则有稳定化的作用。当茶多酚 /大豆胰蛋白酶抑制子络和比达到 25 /16 时 ,KSTI 和 BBI 的失活率达到 89% 和 86%。已经证明茶多酚具有清除自由基和抗氧化的性能^[27 ,28] ,茶多酚具有天然无毒的特点 ,用于直接钝化大豆胰蛋白酶抑制子的失活是有其重要的意义。茶多酚对大豆胰蛋白酶抑制子的失活作用有待于进一步研究开发。

参考文献

1 Wolfram Bode and Robort Huber. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinaes. Journal of Biochem.

2 Ryan, C. A. Protease inhibitors in plant: gene for improving defenses against insects and pathogens. Ann. Rev Phytopathol. 1990, 28: 425 ~ 449.

3 Mcmanus, M. T., Burgess, E. P. J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and proteases of larvae of Spodoptera litura. J. Insect Physiol, 1995, 41(9): 721 ~ 738.

4 Baral, A., Fox, P. F., O'Connor, T. P. Isolation and characterization of an extra-cellular proteinase from Pseudomonas tolaasii. Phytochemistry, 1995, 39(4): 757 ~ 762.

5 Kwok, K. C., Qin, W. H & Tsang, J. C. Heat Inactivation of trypsin inhibitor in soymilk at ultra-high temperatures. Journal of Food Science, 1993, 58(4): 859 ~ 862.

6 Rouhana, A., Jens, A. N., Cogan, U. & Hanne, F. Heat inactivation kinetics of trypsin inhibitors during high temperature short time processing of soymilk. J. Food Sci. 1996, 61(2): 265 ~ 269.

7 Bob Van den Hout, Marieke Pouw, Harry Gruppen, and Klaus Van't. Inactivation Kinetics study of the Kunitz soybean trypsin inhibitor and the Bowman-Birk inhibitor. J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 281 ~ 285.

8 Anderson, R. L. Effects of steaming on soybean proteins and trypsin inhibitors. J. Agric. Food Chem. 1992, 69(12): 1170 ~ 1176.

9 杨汝德,梁汉华,郭乾初. 超声波钝化大豆胰蛋白酶抑制素的研究. 华南理工大学学报,1998,26(4): 66 ~ 71.

10 Anu Joseph and Madhurima Dikshit. Effect of irradiation on the proteinase inhibitor activity. Journal of the American-Oil-Chem-Society, 1993, 70(9): 935 ~ 937.

11 Czukur-B., Markus-Z., Petres-J., Joth-B. Dielectric heat treatment of soybean by 27Hz radio frequencies. Proceedings of the world conference on oilseed technology and utilization. 1993, pp. 466 - 469 ISBN 0 - 935315 - 45 - 4.

12 Kim, K. L., Qin, W. H. & Tsang, T. C. Heat inactivation of trypsin inhibitor in soymilk at Ultra-high temperatures. Journal of Food Science. 1993, 58(4): 859 ~ 862.

13 Wed Licha, B. L. Chemistry of sulfur dioxide in foods. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, 1984, 69.

14 Sessa, D. L. et al. Effect of mild chemical and enzymatic treatments of soybean meat and soybean trypsin inhibitor on the nutritive and biochemical properties. J. Ann. Oil Chem. Soci. 1987, 64: 1682 ~ 1691.

15 Sessa, D. L. and Nelson, T. C. Chemical inactivation of soybean protease inhibitors. J Agric. Food Chem. 1990, 38: 140 ~ 146.

16 Sessa, D., Nelse, T. C. Chemical inactivation of soybean protease inhibitors. Journal of the Ame. Oil chem Soci, 1991, 68(7): 463 ~ 470.

- 17 Jin - an Jiao, Boihon, C. Yee., Karoly Kobrebel, and Bob, B. Effect of thioredoxin - linked reduction on the activity and stability of the Kunitz and Bowman - Birk soybean trypsin inhibitor proteins. J. Agric. Food Chem. 1992, 40: 2333 ~ 2336.
- 18 Laskowski, M., Katio, J., Look, W. A. J., Sealock, R. W. Evaluation of specificity of proteinase inhibitor. Heidelberg, New York, 1974, 597 ~ 611.
- 19 Iosif, A. Vaintraub and Haram, B. Yattara. Proteolysis of Kunitz soybean trypsin inhibitor. influence on its activity. J. Agric. Food Chem. 1995, 43(4): 862 ~ 866.
- 20 Oste R. E., Brandon, D. L., Bates, A. H. and Friedman, M. Effect of Maillard browning reactions in the Kunitz soybean trypsin inhibitor on its interaction with monoclonal antibodies. J. Agric. Food Chem. 1990, 38(1): 258 ~ 261.
- 21 Yasuko Kato and Tsukasa Matsuda. Glycation of proteinous inhibitors: loss trypsin inhibitory activity by the blocking of arginine and lysine residues. J. Agric. Food Chem, 1997, 45(10): 3826 ~ 3831.
- 23 Ranekar - P., Joshi - N., Sarnaik - S., Kelkar - A. Effect of fermentation acid bacteria from soybean seeds on trypsin inhibitor activity, Food - Microbiology, 1992, 9(3): 245 ~ 240.
- 24 Vidal - Valverde - C., Frias - J., Prodanov - M., Tabera - J., Ruiz - R., Bacon - J. Effect of natural fermentation on carbohydrates, riboflavin and trypsin inhibitor activity of lentils. Zeitschrift - fuer - Lebensmittel - Untersuchung - und - Forschung, 1993, 197(5): 449 ~ 452.
- 25 Mikkelsen, A., Skibsted, L. H. Oxidative damage to protective enzyme: inactivation of papain and ficin by ferrihemoglobin. Food research and Technology, 1998, 206(3): 199.
- 26 Espin, N., Islam, M. N. Stabilization of papain from papaya peels. Food Science and Technology International, 1998, 4(3): 179.

浅述麦芽糊精

徐良增 许时婴 杨瑞金 无锡轻工大学食品学院 214036

摘 要 简述麦芽糊精的生产、组成、测定、功能性质及其在食品工业中的应用。

关键词 麦芽糊精

Abstract Both the production, composition, determination and functional properties of maltodextrin and its application in food industry were critically reviewed.

Key words Maltodextrin

淀粉通过热、酸或特异性的酶处理时可产生一大类主要由 D - 葡萄糖、麦芽糖、麦芽二糖、三糖等一系列低聚糖和多糖组成的降解产物。由于降解过程中还原端基的增加,其降解程度可以用 DE 值(Dextrose Equivalent,还原糖当量)表示。因此,高 DE 值的降解产物比低 DE 值的降解产物水解程度大。从理论上讲,纯淀粉的 DE 值为 0,而葡萄糖的 DE 值为 100。

麦芽糊精为 DE 值小于 20 的淀粉水解产物^[2]。它介于淀粉和淀粉糖之间,是一种没有任何味道的营养性多糖,可以是白色粉末,也可以是浓缩液体。

早在上世纪 50 年代,人们便开始研究麦芽糊精。W. J. Whelan^[1]将由 α -1,4-糖苷键连接而成的低聚糖称为麦芽糊精。1957 年,美国玉米工业研究基金会^[1]将麦芽糊精定义为玉米淀粉的不完全水解产物。现在公认的麦芽糊精的定义由 FDA 于 1983 年提出,已不局限于玉米淀粉的水解产物,属于多糖类型的大分子替代剂,被广泛用于食品、纺织行业。

本文将简要论述麦芽糊精的生产、组成、测定、物化性质及其应用以及最新研究进展。

1 麦芽糊精的生产

最早的商品化麦芽糊精是由美国玉米公司^[1]于 1959 年生产的 Frodex 15,后来称为 Lo - Dex 15。因为甜度不高,主要用在控制产品中的蔗糖用量上。

早期的麦芽糊精生产,按照作用机理来分,分为酸法和酶法两种;按照工艺流程来分,有单阶段加工工艺和双阶段加工工艺。

(1) 单阶段法:

淀粉浆 + 酶/酸 → 液化 → 反应至合适 DE 值 → 灭酶/中和 → 加硅藻土真空过滤 → 活性炭脱色 → 过滤 → 蒸发 → 喷雾干燥 → 包装。

(2) 双阶段法:

淀粉浆 + 酶/酸 → 液化至较低 DE 值 → 灭酶/中和 → 调 pH → 二次酶解 → 灭酶/中和 → 加硅藻土真空过滤 → 活性炭脱色 → 过滤 → 蒸发 → 喷雾干燥 → 包装。

双阶段法的优点在于可以精确控制产品的 DE 值。因为发