

# 双酶法制备大豆肽及其性质研究

钱磊, 张业尼, 唐翔宇, 路福平

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 为探讨脱脂豆粕在双酶作用下的水解效果及其酶解物的性质, 选用碱性蛋白酶和风味蛋白酶为水解酶, 采用单因素实验确定双酶水解豆粕的最佳条件, 并对脱脂豆粕酶解物的性质进行了初步研究。结果表明碱性蛋白酶和风味蛋白酶水解豆粕的最佳条件为: 底物质量分数5%, 先加入碱性蛋白酶用量为10000 U/g底物, 在55 ℃、pH 8.0下酶解0.5 h, 调节pH至7.5, 再加入风味蛋白酶5%, 双酶同时酶解3 h。脱脂豆粕蛋白酶解物的溶解度和吸水性比大豆分离蛋白有很大提高, 粘度明显降低, 水解物中肽的分子量主要集中在500~1200之间。

**关键词:** 脱脂豆粕; 碱性蛋白酶; 风味蛋白酶; 水解; 多肽; 性质

中图分类号: TS214.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)04-0006-05

## Study on the Hydrolysis of Denatured Soybean Cake via Hydrolysis by Two Enzymes and the Properties of the Obtained Peptides

QIAN Lei, ZHANG Ye-ni, TANG Xiang-yu, LU Fu-ping

(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Flavourzyme and alcalase was used for hydrolysis of the soybean cake and the properties of obtained peptides were examined here. The optimum conditions of the hydrolysis of the soybean cake were gotten by single factor experiment. Results showed that for the Alcalase-catalyzed hydrolysis, the optimum temperature, substrate concentration, ratio of Alcalase to substrate, pH value and time were 55 ℃, 5.0%, 10000U/g, 8.0 and 0.5h, respectively, and the optimal ratio of Flavourzyme to substrate, pH value and reaction time for the subsequently performed Flavourzyme-catalyzed hydrolysis, were 0.5%, 7.5 and 3h, respectively. The solubility of the obtained protein from the soybean meal was higher than that of the soybean separate, but its viscosity was lower than that of the soybean separate. The molecular weights of achieved oligo-peptide were within 500D and 1200D were predominated. This research can be helpful to the application of hydrolysis of soy protein.

**Key words:** the defatted soybean cake; alcalase; flavourzyme; alcalase; hydrolysis; polypeptide; properties

大豆多肽是脱脂豆粕或大豆蛋白经过酶解、分离、脱色、脱盐、超滤、浓缩、冷冻干燥等工艺精制而得的多肽混合物, 主要以3~6个氨基酸组成的小分子肽为主, 还含有少量大分子肽、游离氨基酸等成分<sup>[1]</sup>。大豆多肽的肽含量为80%左右, 其氨基酸组成与大豆蛋白质基本相同, 且含量丰富。与传统大豆蛋白相比, 大豆多肽具有高浓度、高溶解性、低黏度、高流动性和热稳定性等优良的物理性质<sup>[2]</sup>。

用酶解法获得大豆蛋白肽具有条件缓和、环境友好和不破坏营养等好处, 是大豆蛋白水解技术开发的方向。但水解后, 原来处于蛋白质内部的疏水性氨基

酸就会暴露出来, 使水解产物呈现出一定的苦味, 限制了水解产物的最终应用。研究表明, 大多苦肽含有较多的疏水性氨基酸, 而且主要位于苦肽的末端, 如果切除此类疏水性氨基酸, 苦肽的苦味将会明显下降, 游离出的疏水性氨基酸苦味也比原来的苦肽要低得多, 这就是采用外切多肽酶脱除苦味的基础, 虽然端肽酶可有效水解苦味肽, 但它们对于完整的蛋白大分子几乎没有作用, 因此必须与内切酶联合使用<sup>[3]</sup>。

本实验采用碱性蛋白酶(外切作用)和风味蛋白酶(内切/外切作用)对脱脂豆粕进行双酶水解, 通过单因素试验确定酶解的最佳工艺条件, 并对酶解物的性质进行了研究, 为大豆肽在食品或药物等相关行业的应用提供了一定的理论依据。

### 1 材料和方法

收稿日期: 2006-12-20

作者简介: 钱磊(1982-), 男, 汉族, 河北人, 在读硕士研究生, 研究方向微生物制药

通讯作者: 路福平

## 1.1 材料和试剂

脱脂豆粕：蛋白含量 43.12%、粗脂肪 1.65%、水分 11.23%。风味蛋白酶和碱性蛋白酶均由天津市诺奥科技发展有限公司提供，酶活力均为  $2 \times 10^5$  U/g。其它试剂均为分析纯。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 脱脂豆粕的酶解

将脱脂豆粕粉碎至40目，准确称量配制成5%的溶液，选用25 kHz的探头式超声仪在pH 8.5下处理10 min获得大豆蛋白浸提液<sup>[4]</sup>。浸提液经恒温80 °C水浴预处理20 min后，调节温度至50 °C并搅拌15 min，在pH 8.0时按10000 U/g底物的用量加入碱性蛋白酶水解一段时间，调节反应温度和pH，再加入风味蛋白酶，双酶同时水解，酶解过程中要不断搅拌。达到反应预定时间后，将大豆蛋白酶解液加热升温至100 °C，保温10 min使蛋白酶失活，然后在4 °C、8000 r/min离心15 min，去除未水解的大豆蛋白和其它非水溶性物质，上清液置于4 °C保存备用。

### 1.2.2 氨基酸成分的测定<sup>[5,6]</sup>

称量经过冷冻干燥的大豆多肽样品1.0000 g，加入10 ml 6 mol/L HCl(含2%苯酚)，抽真空，通N<sub>2</sub>封口，于105 °C下水解24 h。过滤后定容于250 ml，取5 ml用HPLC法测定。

### 1.2.3 溶解性<sup>[7,8]</sup>

称取大豆肽0.1000 g，以不同pH值的Tris-HCl缓冲液(pH 2.0~8.0)配制成100 mL溶液，8000 r/min离心10 min，在280 nm下测定上清液的蛋白浓度，换算成氮溶解指数，以此作为评价大豆肽在不同pH值下的溶解性的指标。

### 1.2.4 吸水性测定<sup>[6]</sup>

调节溶液的pH值为5、7、9，分别在0 °C、30 °C、60 °C、90 °C下测定大豆肽、大豆蛋白的吸水值。

### 1.2.5 粘度测定<sup>[5]</sup>

用NDJ-1型旋转粘度计测定25 °C、pH 7.0下大豆肽溶液的表现粘度，与大豆蛋白表现粘度相比较。

### 1.2.6 水解物肽相对分子质量分布测定

相对分子质量分布的测定采用葡聚糖凝胶层析方法。取1 mL水解物的离心上清液上凝胶柱(Sephadex G-25)，洗脱液为pH 8.0的磷酸盐缓冲溶液，用蠕动泵(DESAGA)控制流速为3.0 mL/min，流出液用样品馏分收集器(SF-2120)收集，每管收集体积为3.0 mL。然后用紫外光谱测定280 nm处的吸光度，并做出吸光度对馏分的关系图。用相对分子质量标准物标定水解液的相对分子质量分布。

## 1.2.7 测定方法

### 1.2.7.1 氮溶指数(NSI)的测定<sup>[4,5]</sup>

取经超声处理的分散液，在3000 r/min转速下离心10 min得上清，然后取20 mL上清液采用凯氏定氮法测定其蛋白质含量。对照样的制备如下：配制与超声处理浓度相同的分散液，混匀平衡后直接取20 mL用凯氏定氮法测定其蛋白质含量。氮溶指数以离心后上清液蛋白质含量与对照样蛋白质含量的比值表示。

### 1.2.7.2 苦味评定方法<sup>[9]</sup>

感官评定小组由五人组成，评定员用蒸馏水漱口后，取待评定液2~3 ml置于口中，10 s后吐出，取与之味道相近的标准液品尝，如确认两味道相近，即可将待评定液的苦味值定为该标准液的苦味值，否则需取其它标准液再尝，直至确定苦味值，苦味值为五人评定的平均值。

标准液：按L. Mogensen和J. Adler-Nissen的方法配置，以奎宁为基准物质，经评定a ( $a=3 \times 10^{-6}$  mol/l)为下限，刚好没有苦味；32a为上限，再增加浓度，苦味基本上不增加；中间溶液浓度成倍增加，苦味值也相应增加，因此设定评分标准如表1所示。

表1 苦味值的评分标准

奎宁溶液浓度	32a	16a	8a	4a	2a	a
苦味描述	很苦	苦	较苦	中度苦	微苦	不苦
苦味分值	5	4	3	2	1	0

### 1.2.7.3 氨基酸态氮的测定

甲醛滴定法<sup>[10-12]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 双酶酶法水解蛋白工艺的确定

Alcalase碱性蛋白酶对于大豆蛋白或脱脂豆粕有很好的水解能力，其水解工艺的最优条件已有相关报道<sup>[13]</sup>，本课题组也做过相应研究，结果表明底物浓度5% (m/v)、碱性蛋白酶用量10000 U/g底物、55 °C、pH 8.0下反应4 h，水解效果最好，不过其水解产物的苦味较重，不利于后续加工利用。本实验采用Flavourzyme风味蛋白酶进一步水解，以调整产品风味，同时研究其对水解效果的影响。

#### 2.1.1 水解pH的确定

为确定双酶水解的最适pH值，分别试验两种酶在pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5条件下各自水解脱脂豆粕2 h，以溶氮指数为指标来衡量水解效果。结果如图1所示，Alcalase碱性蛋白酶在pH 8.0时活性最高，Flavourzyme风味蛋白酶在pH 7.0时活性最高，而两者在pH 7.5时均有较高活性，故选择pH 7.5作为双酶

共同作用时的最适pH值。

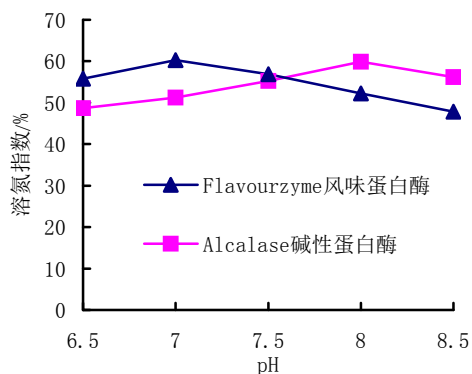


图1 pH与两酶水解能力的关系

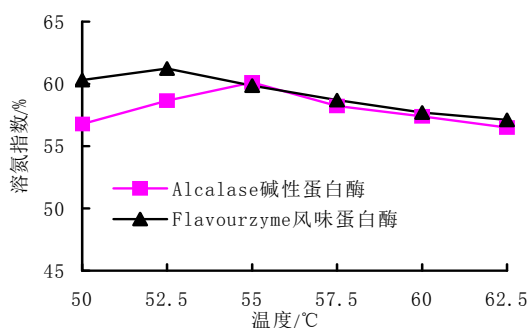


图2 温度与两酶水解能力的关系

### 2.1.2 水解温度的确定

为确定双酶水解的最适温度，分别试验两种酶在52.5 °C、55 °C、57.5 °C、60 °C、62.5 °C条件下各自水解豆粕2 h，以溶氮指数为指标来衡量水解效果。结果如图2所示，温度对Alcalase碱性蛋白酶和Flavourzyme风味蛋白酶的催化活性的影响都不大，两者在55 °C均有较高催化活性，故选择55 °C作为双酶共同作用时的最适温度。

### 2.1.3 Flavourzyme风味蛋白酶加酶方式的确定

分别试验了Alcalase碱性蛋白酶水解脱脂豆粕0.5 h、1 h、1.5 h、2 h之后加入Flavourzyme风味蛋白酶继续水解2.5 h、2 h、1.5 h、1 h和两酶同时加入水解脱脂豆粕3 h的水解效果。由实验可知，先加入Alcalase碱性蛋白酶，在55 °C、pH 8.0下水解0.5 h后调整pH 7.5，再加入Flavourzyme风味蛋白酶继续水解2.5 h，水解效果最好。

Alcalase碱性蛋白酶在其最适条件水解脱脂豆粕，前30 min反应极快，30 min之后速度下降，分析其原因可能是底物浓度的下降和产物浓度的升高，导致逆反应的增加，此时调整参数，加入Flavourzyme风味蛋白酶，可将Alcalase碱性蛋白酶水解的产物进一步水解，

促进Alcalase碱性蛋白酶水解大豆蛋白反应的平衡向正向移动，而Alcalase碱性蛋白酶又可持续向Flavourzyme风味蛋白酶提供底物，两酶的水解有互相促进的作用；两酶同时加入，因二者均不在最适条件，总的可溶性氮较低；Alcalase碱性蛋白酶在其最适条件水解脱脂豆粕2 h后再调整参数加入Flavourzyme风味蛋白酶，因此此时Alcalase碱性蛋白酶活力有所下降，Flavourzyme风味蛋白酶受到底物抑制，总的可溶性氮较低。

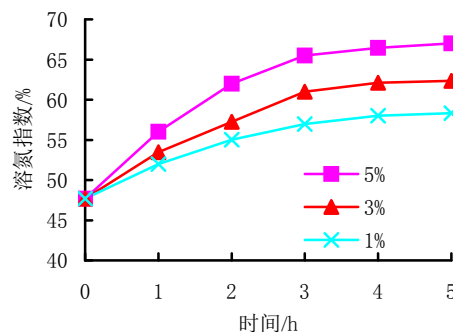


图3 Flavourzyme风味蛋白酶与底物比的影响

### 2.1.4 Flavourzyme风味蛋白酶与底物比的确定

用Alcalase碱性蛋白酶在55 °C、pH 8.0下水解大豆蛋白30 min之后，调整pH 7.5，分别添加1%、3%、5%的Flavourzyme风味蛋白酶继续水解5 h，以溶氮指数为指标来衡量水解效果。结果如图3，添加5%的Flavourzyme风味蛋白酶时，溶氮指数最高，反应3h后溶氮指数增长趋于平缓，因此选用5%作为Flavourzyme风味蛋白酶的最适添加量。

## 2.2 蛋白酶解物的性质研究

### 2.2.1 大豆分离蛋白和大豆肽的氨基酸组成

表2 大豆分离蛋白和大豆肽的氨基酸组成

名称	WHO推荐标准	大豆蛋白	大豆肽	名称	大豆蛋白	大豆肽
缬氨酸	5.0	3.8	3.7	半胱氨酸	1.1	1.0
蛋氨酸	3.5	3.2	1.2	酪氨酸	3.2	3.1
赖氨酸	5.5	5.0	5.5	天冬氨酸	9.3	10.1
异亮氨酸	4.0	4.2	4.0	丝氨酸	4.6	4.2
亮氨酸	7.0	6.5	5.9	谷氨酸	16.9	19.1
苯丙氨酸	6.0	4.7	4.4	甘氨酸	3.7	3.5
苏氨酸	4.0	3.3	3.1	组氨酸	2.3	2.4
色氨酸	1.0	1.3	1.1	精氨酸	7.0	7.3
脯氨酸	4.3	4.4		丙氨酸	3.2	3.1

由表2可见，大豆肽溶液经浓缩冷冻干燥后，经氨基酸组成分析，其氨基酸组成与大豆分离蛋白基本相同，含有人体必需的8种氨基酸，除蛋氨酸为限制氨基

酸外，其他氨基酸均接近WHO推荐标准。

### 2.2.2 溶解性

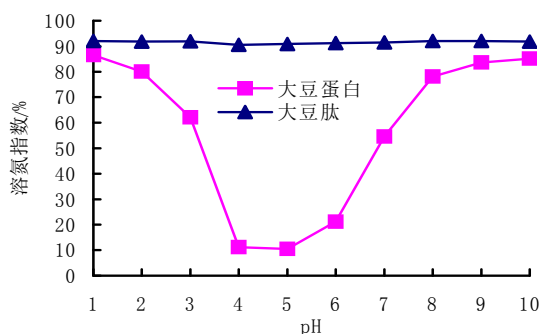


图4 大豆分离蛋白和大豆肽的溶氮指数和pH的关系

由图4可看出，大豆分离蛋白在酸性状态下溶解性降低，特别是在pH 4.5（大豆球蛋白的等电点）时，蛋白质基本上不溶解而沉淀。而蛋白水解后，肽链变短，功能性质发生了明显改变，大豆肽在较宽的pH范围内仍保持良好的溶解状态，溶液保持透明，溶解性增强是因为其体积变小，离子性增强，端基极性基团增加，使溶解度增加。

### 2.2.3 粘度

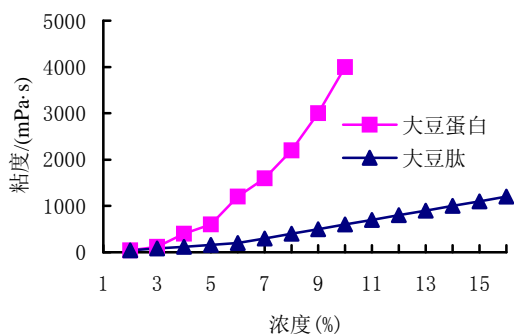


图5 大豆分离蛋白和大豆肽溶液的粘度

由图5可看出，浓度小于8%时，大豆分离蛋白和大豆肽的粘度差异不大；大豆分离蛋白的浓度超过8%后，粘度急剧升高；浓度达到15%时，基本上丧失流动性，形成凝胶状。但大豆肽的粘度随浓度的变化不大，即使在高浓度情况下粘度仍较低。大豆肽的粘度较大豆蛋白明显下降，可能是因为蛋白多聚体的解体和离子基团的增加，使蛋白分子有序性增加，从而使其表现体积减少，粘度下降。大豆肽在受热时不形成凝胶主要是由于疏水性下降，另外，蛋白质分子间形成的盐桥也在水解过程中被破坏。

### 2.2.4 吸水性

由图6可见，大豆肽的吸水性明显高于大豆分离蛋白，这主要是蛋白分子被水解后，大量亲水基外露的

缘故。从pH值对两种样品吸水性的影响看，变化趋势是不同的。大豆分离蛋白的吸水性随pH值增大而增大，这是因为pH值的改变影响到蛋白质分子的净电荷数，从而改变了蛋白质—蛋白质和蛋白质—水的相互作用力，导致吸水性的改变<sup>[6]</sup>。但是pH值变化所导致的净电荷变化不足以改变大豆肽分子与水的作用力，因此大豆肽的吸水性受pH改变的影响不大。从温度对两种样品的吸水性影响看，大豆分离蛋白的吸水性在30℃以内随温度升高而增大，这是由于热的作用，蛋白质分子离解和开键导致埋藏在球状分子内部极性基团转向表面从而提高了其吸水性；温度升到30℃以后，则吸水性随温度升高而下降，这可能是随温度升高，氢键减少而导致吸水性下降，也可能是蛋白质发生变性或聚集作用而引起吸水性下降。然而，大豆肽的吸水性在0℃~90℃的范围内却随温度的升高而增大。

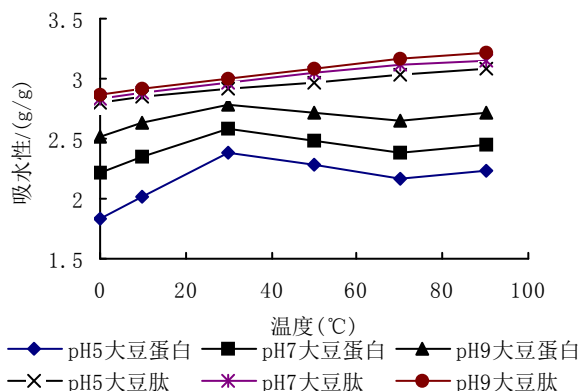


图6 大豆分离蛋白和大豆肽溶液的吸水性

### 2.2.5 水解物肽相对分子质量分布测定

采用已知分子量的谷胱甘肽（612.5），VB<sub>12</sub>（1350），牛血清白蛋白（6640.9）作为标准品，进行葡聚糖凝胶层析，绘制其层析曲线。标准品的分子量分布曲线见见图7，大豆肽水解液的分子量分布曲线见图8。

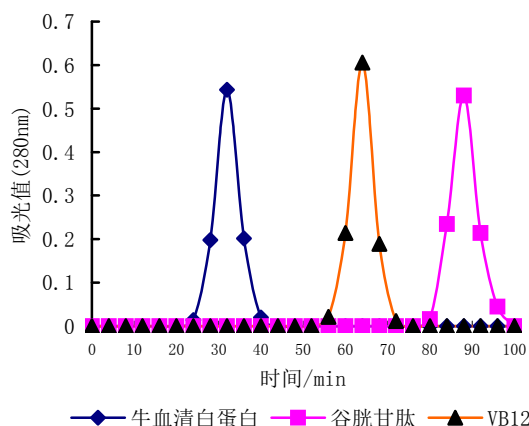


图7 标准品的分子量分布曲线

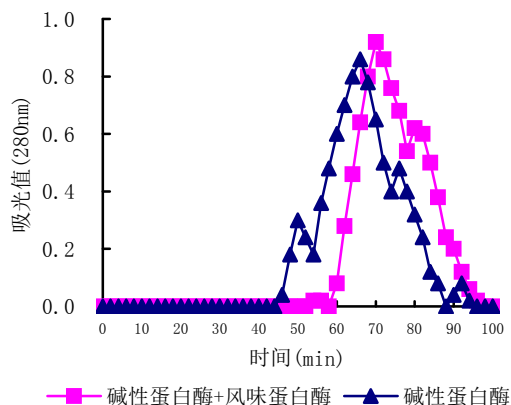


图8 大豆肽水解液的分子量分布曲线

由图8可看出,大豆蛋白水解物中肽分子的分布是连续的,即水解物中存在着各种大小不等的肽分子,说明大豆蛋白的酶促反应中水解反应是连续进行的,故此肽分子呈现连续分布。通过对比标准品的凝胶层析图可以看出,两种方式水解后酶解物中绝大多数肽的分子量在500~1800之间,低肽分子占相当大的比例,而大分子蛋白只占少数。双酶水解后酶解物中分子量在500~1200之间的肽的含量明显高于单酶水解,表明双酶的水解效果好于单酶,其更能有效地水解溶液中的大分子蛋白和大分子肽。

### 2.2.6 风味蛋白酶的脱苦试验

脱脂豆粕经Alcalase碱性蛋白酶水解0.5 h后,苦味值即达到5.0,之后添加Flavourzyme风味蛋白酶继续水解,在不同的反应时间分别评定水解液的苦味。

表3 Flavourzyme风味蛋白酶的脱苦效果

时间/min	0	30	60	90	120	150
苦味分值	5.0	4.5	3.0	1.0	0.5	0

表3可知用Alcalase碱性蛋白酶水解脱脂豆粕使水解液达到最大苦味值后,添加Flavourzyme风味蛋白酶,60 min苦味值下降为3.0,随后在120 min的时候已经基本尝不出苦味,到150 min左右苦味完全被脱除,这说明Flavourzyme风味蛋白酶对脱除苦味有很好的效果。

## 3 结论

3.1 Alcalase碱性蛋白酶和Flavourzyme风味蛋白酶双酶结合水解脱脂豆粕,可有效去除单酶水解后酶解物呈现的苦味,同时使水解度有所增加,其最佳水解工艺是:底物质量分数5%,先加入碱性蛋白酶用量为

10000 U/g底物,在55 °C、pH 8.0下酶解0.5 h,调节pH至7.5,再加入风味蛋白酶5%,双酶同时酶解3 h。水解结束后100 °C加热10 min使蛋白酶彻底失活,8000 r/min,4 °C下离心15 min,去除未水解的大豆蛋白和其它非水溶性物质得到混合肽,经冷冻干燥得到大豆肽粉末。

3.2 大豆肽溶液含有人体必需的8种氨基酸,除蛋氨酸为限制氨基酸外,其它氨基酸组成与大豆分离蛋白基本相同;在较宽的pH范围内大豆肽仍保持良好的溶解状态,好于大豆分离蛋白;吸水性明显高于大豆分离蛋白的吸水性;粘度随浓度的变化不大,即使在高浓度的情况下粘度仍较低;水解物中低肽分子占相当大的比例,绝大多数分布于为500~1200之间。

## 参考文献

- [1] 王静,郝再彬.大豆肽的特性和功能及研究进展[J].黑龙江农业科学,2004,5:32-36.
- [2] 周利亘,陈新峰,王君虹等.大豆多肽复合酶解工艺条件研究[J].食品科技,2005,7:22~25.
- [3] 朱海峰,班玉凤,赵惠.内切酶与端肽酶协同水解大豆蛋白的研究[J].食品科技,2004,4:29-32.
- [4] 朱建华,杨晓泉,熊健等.超声处理对低温脱溶豆粕蛋白质浸提率的影响[J].粮油加工与食品机械,2003,7:40-42.
- [5] 荣建华,李小定,谢笔钧.大豆肽的理化性质及其对脂肪氧合酶活性的影响[J].食品工业科技 2002,23(8), 19-21.
- [6] 刘大川,钟方旭.大豆肽的功能特性研究[J].中国油脂,1998, 23(3):8-11.
- [7] 张新会,杨晓泉,陈中等.大豆肽的分级膜分离及功能特性研究[J].中国粮油学报,2003,18(6):49-52.
- [8] 张亚丽,徐忠.变性脱脂豆粕酶解物的特性研究[J].中国食品学报,2005,5(4):46-51.
- [9] 吴建中,赵谋明,宁正祥等.双酶法生产低苦味大豆多肽研究[J].食品工业科技,2003,4:24-27.
- [10] 赵新淮,等.蛋白质水解物水解度的确定[J].食品科学, 1994, (11):65-67.
- [11] Alder-Nissen J. Enzyme Hydrolysis of Food Protein[M]. London: Elsevier, 1986:427.
- [12] 北京师范大学生物系生物化学教研室.基础生物化学实验[M].北京:高等教育出版社,1982:121-123.
- [13] 孙昶,陈光,刘艳秋.Alcalase碱性蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究[J].吉林农业大学学报,2005,27(2): 162-166.