

# 大豆肽的制备及其美拉德反应产物特性研究

赵谋明, 张佳男, 吴长平, 刘洋, 苏国万

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 本文以高温大豆粕为原材料, 模拟酱油制曲工艺, 通过发酵和酶解技术制备大豆肽, 研究大豆肽及其美拉德反应产物的特性。通过比较其蛋白质回收率、DPPH 自由基清除率等抗氧化指标、褐变程度及其肽分子量分布情况, 深入研究了发酵酶解工艺和酶解时间对大豆肽及其美拉德产物抗氧化特性的影响。研究发现, 发酵和酶解处理均可显著提升高温大豆粕的蛋白质回收率和抗氧化活性, 在酶解时间为 24 h 时大豆粕的回收率达到最大值 77.21%, 此时大豆粕酶解产物的 DPPH 自由基  $IC_{50}$  值和还原力( $A_{700}$ )分别为 0.77 mg/mL 和 0.16。而美拉德反应则可以进一步提升大豆肽酶解产物的抗氧化活性。另外美拉德反应过程中分子质量较大的组分热降解反应比较剧烈, 而小分子寡肽则比大分子多肽具有更高的美拉德反应活性。

**关键词:** 大豆肽; 抗氧化; 美拉德反应; 酱油发酵

文章编号: 1673-9078(2015)2-138-144

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.024

## Preparation of Soybean Peptides and Characteristic Study of Their Maillard Reaction Products

ZHAO Mou-ming, ZHANG Jia-nan, WU Chang-ping, LIU Yang, SU Guo-wan

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

**Abstract:** In this paper, the technique of using koji to produce soy sauces was simulated, soybean peptides were prepared by fermentation and enzymatic hydrolysis using high-temperature soybean meals as raw materials, and the properties of soybean peptides and their Maillard reaction products were studied. An in-depth analysis of the effects of fermentation, enzymolysis, and enzymolysis time on the antioxidant activities of soybean peptides and their Maillard reaction products was conducted through comparison of their protein recoveries, antioxidant indicators as DPPH scavenging capacities, degrees of browning and molecular weight distributions. The results showed that both fermentation and enzymolysis could significantly increase the protein recoveries and antioxidant activities of the soybean peptides prepared from soybean meals. The highest protein recovery was 77.21% after an enzymolysis time of 24 h, and the half-inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)-scavenging capacity and reducing power ( $A_{700}$ ) of the enzymatic hydrolysate of soybean were 0.77 mg/mL and 0.16, respectively. However, the antioxidant activity of the Maillard reaction products could be further enhanced. Additionally, the thermal degradation of higher-molecular-weight components during the Maillard reaction was more intense, while the small molecules (oligopeptides) had higher Maillard reactivity than the large molecules.

**Key words:** soybean peptides, antioxidant, maillard reaction, fermentation of soy sauce

大豆油是世界上主要食用油之一, 我国每年近 800 万吨大豆用于制备大豆油, 而大豆粕则是大豆油生产过程中产生的副产物。目前大豆油生产工艺主要有低温压榨脱溶和高温压榨脱溶两种方式, 分别对应

收稿日期: 2014-05-21

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(31301555); 广东省自然科学基金博士启动项目(S2013040015333); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20130172120022); 中央高校基本科研面上项目(2013ZM0069)

作者简介: 赵谋明(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品生物技术、蛋白质化学与工程、海洋资源综合利用等

通讯作者: 苏国万(1981-), 男, 博士, 讲师, 主要从事食品生物技术、风味化学方面的研究

得到低温大豆粕和高温大豆粕, 大豆蛋白在生产过程中发生了不同程度的变性, 而高温大豆粕由于经历了高温、压榨和溶剂浸提处理, 其蛋白质变性严重, 且有明显的焦臭味, 难以直接食用。然而, 高温大豆粕的粗蛋白含量高达 45%, 且必需氨基酸组成均衡, 矿物质含量也非常丰富, 是一种优质的蛋白质资源<sup>[1]</sup>。若采用传统的碱溶酸沉法提取高温大豆粕中蛋白质, 由于蛋白得率较低而实现大规模工业化生产<sup>[2]</sup>。目前, 我国的高温豆粕主要用作饲料, 其利用率极低, 造成了蛋白质资源的严重浪费。因此, 如何利用生物技术进一步利用高温大豆粕开发新产品, 提高其附加值, 具有较大的社会和经济价值。

酱油酿造是指用大豆或脱脂大豆等原料,采用微生物进行发酵的过程。酱油的酿造过程是多种酶系共同作用的结果,制曲的目的是在培养米曲霉生长的过程中,促进其分泌各种酶系,特别是蛋白酶和淀粉酶,为后面长时间的发酵过程中蛋白质和淀粉分解提供专用酶,使得原料中的蛋白质逐步降解成多肽和氨基酸<sup>[3]</sup>。

美拉德反应主要是指食品中的羰基化合物(糖类)与氨基化合物(蛋白质、肽类、氨基酸等)发生的复杂反应。反应通常分为三个阶段,第一阶段为羰基化合物和氨基化合物的缩合反应,缩合产物不稳定随即环化重排成

初级产物;第二阶段通过脱水、缩合、裂解或重排等方式初步形成无氮或含氮的褐色可溶性化合物;第三阶段则主要由前面两个阶段生成的活性中间产物进一步反应生成类黑精色素、褐色含氮色素等高分子物质<sup>[4]</sup>。美拉德反应不仅能赋予食品独特的风味和色泽,还能够对前体物蛋白质、多肽和氨基酸等物质的抗氧化活性产生影响。目前有关美拉德反应的研究主要集中在单一模型进行特性研究方面,而对于实际生产工艺中特性变化的探讨和应用研究还比较少。

在人机体内,适宜浓度的自由基能发挥有益的生理作用,过量积累则会对细胞和生物大分子造成损害<sup>[5]</sup>。近年来,天然抗氧化肽在高脂肪含量产品中作为抗氧化剂正引起越来越多科研工作者的关注。通过美拉德反应提升大豆肽的抗氧化活性,同时赋予独特的色泽和香气,将使得大豆肽产品更加符合我国食品添加剂“天然、营养、健康”的发展趋势。本文选用高温大豆粕作为原料,模拟酱油制曲工艺,通过大豆粕自身产生的多种酶系进行自身水解,然后将大豆粕酶解产物与木糖进行美拉德反应,目的在于探究发酵结合酶解生产工艺过程中大豆粕蛋白、多肽和氨基酸的变化及其与抗氧化活性的关系,深入探究肽的美拉德反应特性,为高效利用大宗低值蛋白开发提供理论和方法指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

高温大豆粕:由佛山市海天调味食品有限公司提供;酱油曲精沪酿3.042:购于上海酿造一厂;其他化学试剂均为分析纯;去离子水为实验室自制。

### 1.2 主要实验仪器

KND-2C 型定氮仪,上海纤检仪器有限公司;

SHA-C 水浴恒温振荡器,江苏省金坛市农仪器厂;Srtourius BP211D 分析电子天平,中科院化学研究所;高压灭菌锅,上海申安;Waters 高效液相色谱,美国 Waters 公司;GL-21M 高速冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;ZJP-A1430 霉菌培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司;TU-1810 紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Tim840 自动电位滴定仪,雷迪美特公司。

### 1.3 实验流程

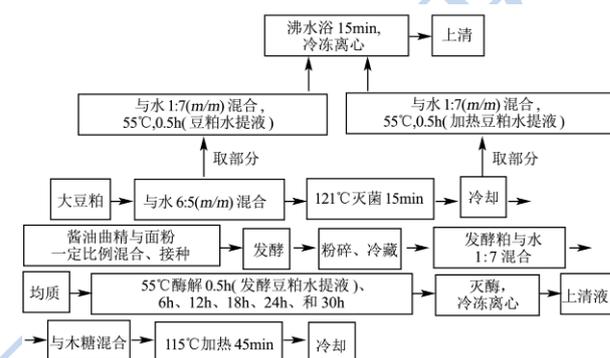


图1 大豆粕抗氧化肽及其美拉德反应产物制备工艺流程

Fig.1 Flow chart for the preparation of soybean meal and its MRPs

取高温大豆粕与去离子水按照 6:5 ( $m/m$ ) 的比例混合均匀,从混合均匀的湿润大豆粕中取出部分与去离子水按照 1:7 ( $m/m$ ) 的比例混合,用均质机处理 1 min (5000 r/min) 后放入摇床中 55 °C 水浴处理 0.5 h,再经沸水加热 15 min,冷却后离心 20 min (4 °C, 8000 r/min) 取上清液得豆粕水提液。将其余的湿润大豆粕放入灭菌锅中 121 °C 灭菌 15 min,冷却至室温后,从中取出部分与去离子水按照 1:7 ( $m/m$ ) 的比例混合、均质、摇床保温、沸水浴、离心等步骤同上得加热豆粕水提液。再将面粉(30%干豆粕重量)、酱油曲精(0.5%干豆粕重量)均匀接种至剩余的灭菌后的大豆粕中,按照酱油发酵一般工艺(30 °C 培养箱培养 44 h,全程湿度控制在  $92 \pm 2\%$ ) 进行发酵,产生酶系。将 6 份发酵好的大豆粕分别与去离子水按照 1:7 ( $m/m$ ) 的比例混合,均质机处理 1 min (5000 r/min) 后放入摇床中 55 °C 分别加热 0.5 h、6 h、12 h、18 h、24 h 和 30 h,使发酵豆粕利用其在发酵过程中分泌的酶系进行自身水解,然后沸水加热 15 min 进行灭酶,冷却后离心 20 min (4 °C, 8000 r/min) 取上清液得一份发酵豆粕水提液(0.5 h 样品),其他五份为豆粕酶解液。至此分别得到三种水提产物(豆粕水提液、加热豆粕水提液和发酵豆粕水提液)以及五种酶解产物(酶解液 6 h、酶解液 12 h,酶解液 18 h,酶解液 24 h 和酶解液 30 h)。

酶解产物按照其粗蛋白质与木糖质量比为 1:1 的比例混合均匀, 于 115 °C 中反应 45 min, 得美拉德反应产物 (Maillard Reaction Products, MRPs)。

## 1.4 分析测定

### 1.4.1 粗蛋白测定

凯氏定氮法测定/GB5009.5-85<sup>[6]</sup>

蛋白回收率/% = 上清液蛋白含量/原料中蛋白含量×100%

### 1.4.2 游离氨态氮含量测定

采用甲醛电位滴定法测定豆粕水提液、豆粕加热水提液、豆粕发酵水提液、酶解液以及美拉德产物的游离氨态氮含量, 以蒸馏水为空白对照, 取 2 g 酶解液, 加入蒸馏水至 80 g, 以 0.1 mol/L 的 NaOH 滴定至 pH 8.2, 加入 10 mL 甲醛, 继续滴定至 pH 9.2, 得空白对照组和样品加入甲醛后消耗的 NaOH 体积  $V_0$  及  $V_1$ 。水提液、酶解液以及美拉德产物的游离氨态氮含量为:

游离氨态氮/% =  $[(V_1 - V_0) \times 0.1 \times 0.014 / 2] \times 100\%$

### 1.4.3 DPPH 自由基抑制率测定

将 2 mL DPPH 自由基溶液 (0.2 mmol/L, 95% 乙醇溶解) 置于试管中, 加入 2 mL 酶解液, 振荡混匀, 室温避光放置 30 min 后, 在 517 nm 处测其吸光值 ( $A_i$ ), 用 2 mL 95% 乙醇混合 2 mL 蒸馏水调零, 对照为 2 mL DPPH 自由基溶液加上 2 mL 95% 乙醇在测定波长下的吸光值 ( $A_c$ ), 2 mL 酶解液和 2 mL 95% 乙醇混合后在测定波长的吸光值为  $A_j$ 。酶解液对 DPPH 自由基的清除能力用抑制率 R 表示:

$R/\% = [1 - (A_i - A_j)/A_c] \times 100\%$

注:  $IC_{50}$  值是指当样品 DPPH 自由基抑制率 R 为 50% 时样品的蛋白浓度, 单位为 mg/mL, 本研究通过比较各样品  $IC_{50}$  值的大小来衡量各样品抗氧化性能的高低,  $IC_{50}$  值越低表示抗氧化性越强。

### 1.4.4 还原力测定

采用铁氰化钾还原体系, 700 nm 处测定样品的还原力。将制备的豆粕水提液、酶解液以及美拉德产物稀释至蛋白含量 0.8 mg/mL, 取样品液 2 mL 于试管中, 加 2 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 6.6) 和 2 mL 1% (m/V) 的六合铁氰化钾溶液, 混合均匀于 50 °C 恒温水浴锅中保温 20 min, 加 2 mL 10% 的 TCA, 充分混匀。取上清液 2 mL 于试管中, 加 2 mL 蒸馏水及 0.4 mL 0.1% 的  $FeCl_3$ , 充分混匀后静置 10 min, 在波长为 700 nm 处测定其吸光度。每个样品按上述步骤操作, 平行测定三次。

### 1.4.5 褐变程度测定

将酶解液和酶解液 MRPs 分别都稀释 10 倍和 100

倍, 用 10 倍稀释液在 420 nm 处测定其吸光值, 用 100 倍稀释液在 294 nm 处测定其吸光值, 平行测定三次。

### 1.4.6 肽分子量分布测定

采用凝胶色谱法测定肽的分子量分布, 检测条件: Waters 高效液相色谱 (Waters 600), TSK gel G2000 SWXL 分析柱; 洗脱液 0.2 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6), 流速 1 mL/min, 检测波长 214 nm。标准肽样品: Conalbumin (75000 u), Oralbumin (43000 u), Cytochrome c (12384 u), Aprotinin (6512 u), Vitamin B12 (1855 u), Glutathione (307 u), 相对分子质量的对数值与洗脱体积拟合直线方程为  $y = -2.4391x + 19.349$  ( $R^2 = 0.9971$ ), 其中, y 为标准肽分子量的对数; x 为洗脱体积。

## 1.5 数据统计

每个数据均为三次测定的平均值, 采用 SPSS 19.0 统计分析软件分析实验数据, 采用均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm SD$ ) 为表示方法, 不同样品间的差异采用单因素方差分析进行比较, 以  $p < 0.05$  为有显著性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 加工工艺和酶解时间对豆粕酶解效率的影响

#### 2.1.1 加工工艺和酶解时间对蛋白质回收率的影响

蛋白回收率是指样品的上清液中蛋白质含量与原材料蛋白质含量的比值, 常用来检测反应产物对原料蛋白的利用率。三种水提液和不同时间段的酶解液蛋白回收率如图 2 所示。

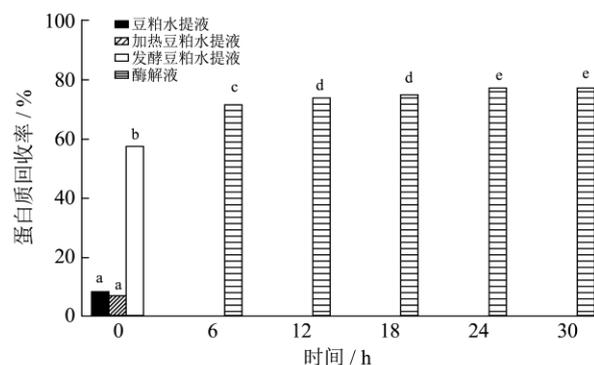


图 2 不同水提液和不同酶解时间条件下蛋白质回收率

#### Fig.2 Protein recoveries of the soybean meal water-extracts and the products obtained after different enzymolysis times

注: 不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

由图 2 可知, 发酵前豆粕蛋白回收率均较低, 豆

粕水提液和加热豆粕水提液的蛋白回收率分别为 8.42% 和 7.35%。加热豆粕水提液的蛋白回收率降低这主要是由于大豆粕在灭菌过程中高温处理使得蛋白质过度变性, 导致其溶解度降低。而发酵大豆粕水提液蛋白回收率有显著性提高 ( $p < 0.05$ ), 达到 57.65%, 是发酵之前的 7.3 倍。说明在发酵过程中已有部份大豆粕蛋白质发生降解, 或在发酵过程中分泌的蛋白酶可在短时间内 (0.5 h) 高效水解大豆粕蛋白。随着酶解时间的延长, 其蛋白回收率逐渐上升, 并在 24 h 时达到最大值 (77.21%), 继续延长水解时间, 蛋白回收率无显著性变化 ( $p > 0.05$ )。这可能是由于在发酵过程中, 微生物为了生长繁殖, 必须从大豆粕中吸取氮源营养素, 但大豆粕中蛋白质已高度变性, 难于直接利用, 迫使微生物自身分泌蛋白酶水解大豆粕蛋白生成容易利用的小分子肽和氨基酸, 因此, 米曲霉分泌的蛋白酶对水解大豆粕具有高度的专一性; 此外, 米曲霉在生长过程中分泌的其他酶类, 如糖化酶和纤维素酶等能够帮助水解与多糖接枝的蛋白质脱落, 降低酶解体系的粘度, 从而增加蛋白质与蛋白酶的接触机会, 加深酶解程度。但当水解到达一定时间后由于酶活力下降, 底物浓度降低, 产物增多, 使得蛋白回收率不再上升。

### 2.1.2 加工工艺和酶解时间对游离氨态氮的影响

游离氨态氮是指上清液中游离氨基酸的氮含量, 结合蛋白回收率, 两个指标共同用以判断加工和酶解过程中的水解效率。三种不同水提液、不同时间段的酶解液和美拉德产物的游离氨态氮结果如图 3 所示。

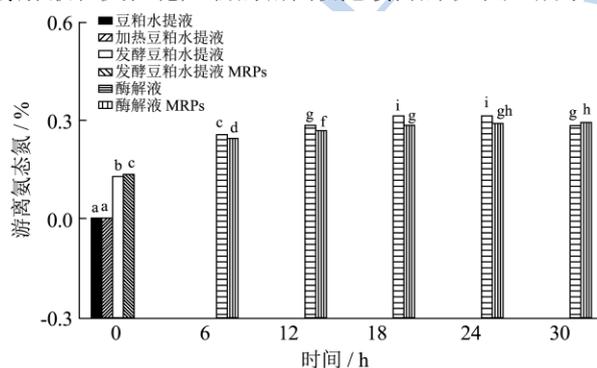


图 3 大豆粕水提液、不同酶解时间产物及美拉德产物游离氨态氮

Fig.3 Free amino acid content of the soybean meal water-extracts, products obtained after different enzymolysis times, and Maillard reaction products

注: 不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

由图 3 可知, 水提液和酶解液的游离氨态氮变化趋势与蛋白回收率类似, 发酵豆粕水提液和酶解产物

的游离氨态氮较豆粕水提液 (0.50%) 和加热豆粕水提液 (0.41%) 的游离氨态氮有显著性的增加 ( $p < 0.05$ ), 并且随着酶解时间的延长, 游离氨态氮含量先增加后降低, 在 24 h 时达到最大, 主要是因为酶解过程中蛋白酶不断将大分子蛋白质水解为小分子短肽, 又将小分子短肽继续水解为寡肽或游离氨基酸, 然而随着酶活力的下降和产物的增多, 酶解作用逐渐减弱。而当酶解效力降低时, 肽的降解和游离氨基酸的聚集成为主要动态平衡, 当游离氨基酸热聚集程度大于热降解程度, 因此其综合含量降低; 同时因酶解时间过长, 游离氨基酸发生美拉德反应也可能导致含量下降。将豆粕酶解产物与木糖混合在 115 °C 条件下加热反应, 除 30 h 酶解产物的美拉德反应产物外, 其它美拉德反应产物的游离氨态氮含量均显著降低, 这主要是因为木糖的存在促使了美拉德反应的发生, 消耗了小分子肽和游离氨基酸。而 30 h 美拉德反应产物的游离氨基酸含量稍有增加的原因是酶解液中氨基酸聚合成的小分子肽较多, 高温加热使得这部分小分子肽重新生产游离氨基酸。

### 2.2 酶解时间和美拉德反应对产物抗氧化活性的影响

DPPH 自由基清除能力和还原能力主要是通过还原物质供氢和供电子同自由基作用从而达到清除自由基的目的<sup>[7]</sup>。为了扩大大豆粕的利用领域, 现在考察发酵豆粕水提液、豆粕酶解液以及美拉德产物的抗氧化活性。

#### 2.2.1 酶解时间和美拉德反应对产物 DPPH 自由基清除能力的影响

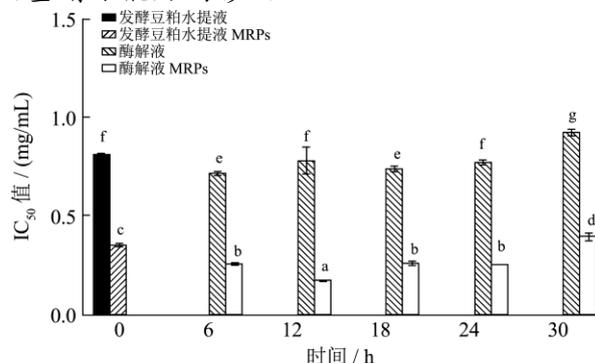


图 4 不同酶解时间对酶解产物和美拉德产物 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.4 Effect of enzymolysis time on the DPPH · scavenging rate of EPs and MRPs

注: 不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

DPPH 自由基清除法是一种建立在电子转移基础

上的抗氧化能力评价方法，它和还原力一起常被用于评价肽类物质的抗氧化活性。发酵豆粕水提液、豆粕酶解液及其美拉德反应产物的 DPPH 自由基清除能力如图 3 所示。

由图 4 可知，发酵豆粕水提液本身已具有一定的 DPPH 自由基清除能力，其 IC<sub>50</sub> 值为 0.81 mg/mL。在发酵过程中分泌的蛋白酶的作用下随着酶解时间的延长，酶解液的 IC<sub>50</sub> 值呈先减小后逐渐上升的趋势。这是因为随着酶解程度的加深，具有抗氧化能力的多肽和氨基酸不断被水解出来，使得酶解液整体的 DPPH 自由基清除能力提升。当酶解时间过长时，那些具有抗氧化能力的肽类又被水解，从而导致整体 DPPH 自由基清除能力下降。此外，热降解效应也可能会使得一些具有抗氧化活性的小分子肽或氨基酸发生聚集失去抗氧化能力。

往发酵豆粕水提液加入木糖进行美拉德反应，其产物的 IC<sub>50</sub> 值为 0.35 mg/mL，酶解液 MRP 的 IC<sub>50</sub> 较之有显著性变化 (p<0.05)，并且随着酶解时间的延长其 IC<sub>50</sub> 值呈现先迅速降低后逐渐增大的趋势。与水提液和酶解液相比，MRPs 的 IC<sub>50</sub> 值都有显著降低 (p<0.05)，其中水提液 MRP 的 IC<sub>50</sub> 值较水提液降低了 1.3 倍；6 h、12 h、18 h、24 h 和 30 h 时的酶解液 MRP 较对应的酶解液其 IC<sub>50</sub> 值分别降低了 1.8 倍、3.5 倍、1.9 倍、2.1 倍和 1.3 倍。说明美拉德反应能显著增加酶解液的 DPPH 自由基清除能力，并且只有适宜的酶解时间可以促进酶解产物的供电子能力，时间过短或过长都会影响其抗氧化性。

### 2.2.2 酶解时间和美拉德反应对产物还原力的影响

还原力是一种基于氧化还原反应的比色法。该法具有快速、简便、重复性好等优点。发酵豆粕水提液、酶解液及其相对应的美拉德反应产物的还原力如图 5 所示。

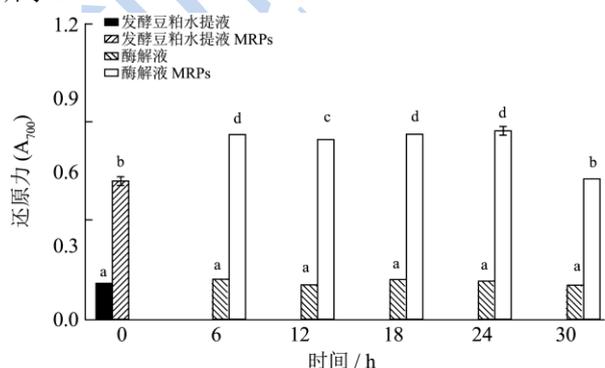


图 5 不同酶解时间对酶解产物和美拉德产物还原力的影响  
Fig.5 Effect of enzymolysis time on the reducing power of EPs and MRPs

注：不同字母表示差异显著 (p<0.05)。

由图 5 可知，发酵豆粕水提液的还原力和其他 5 个时间段的酶解液的还原力之间并没有显著差别 (p>0.05)。但是其相对应的 MRPs 的还原力则有显著性提升。其中发酵豆粕水提液 MRPs 的还原力 (A<sub>700</sub>=0.56) 较发酵豆粕水提液的还原力 (A<sub>700</sub>=0.15) 提升了 2.73 倍；其他时间段的酶解液 MRPs 则较酶解液本身分别提升了 3.49 倍、4.04 倍、3.55 倍、381 倍和 3.01 倍，平均上升 3.58 倍。酶解液 MRPs 的还原力较水提液 MRPs 的有一定显著增加，而不同水解时间的酶解液的美拉德反应产物还原力也不同，其变化规律与 DPPH 自由基清除力的情况一致。

综合图 4 和图 5 可以看出，美拉德反应产物比没有发生反应的酶解产物抗氧化活性有显著提高，这可能是由于酶解产物中的多肽等物质与木糖反应聚合生成了具有高抗氧化活性的物质（如类黑素等），这与黄桂梅等人的结果一致<sup>[8]</sup>。

### 2.3 酶解时间和美拉德反应对产物褐变程度的影响

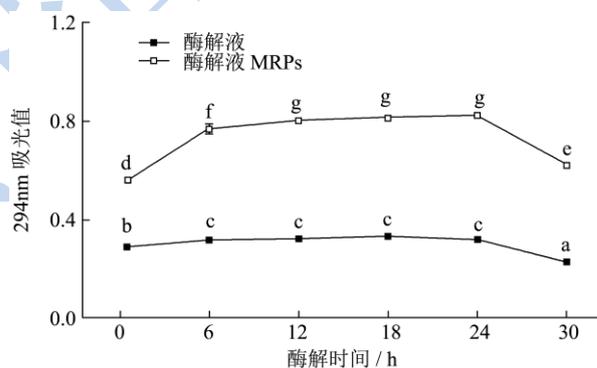


图 6 不同酶解时间大豆粕酶解产物和美拉德产物在 294 nm 处的吸收值

Fig.6 UV-absorbance values, at 294 nm, of the EPs and MRPs after different enzymolysis times

注：不同字母表示差异显著 (p<0.05)。

美拉德反应是一个极其复杂的反应过程，其反应产物种类繁多，且部分中间产物活性很高，难以用一般方法提取测量。现一般采用紫外分光光度计测定产物在 420 nm 处的紫外吸收值，可以反映美拉德反应的反应程度，一定程度上也可反应出类黑素的生成情况；测定其在 294 nm 处紫外光吸收值，可用来反映中间体的形成情况<sup>[9-10]</sup>，结果如图 6 和图 7 所示。

由图 6 可知，美拉德反应后产物在 294 nm 吸收值有明显提升，是反应之前产物的 2.43 倍。采用统计软件 SPSS 19.0 分析美拉德产物在 294nm 处的吸收值

变化趋势与还原力变化趋势的相关性, 结果表明两者之间有显著的相关性 (相关系数为 0.976,  $p < 0.05$ )。说明美拉德反应过程中生成的中间产物具有较强的抗氧化活性, 能明显提升美拉德产物的抗氧化性。而反应产物在 294 nm 处的吸光值在一定程度上可以显示出产物的抗氧化活性。Hwang (2001 年) 等人也研究认为美拉德反应初期的 Amadori 分子重排产物以及此阶段产生的杂环化合物具有良好的抗氧化活性<sup>[11]</sup>。另外, 酶解液和酶解液 MRPs 在 420 nm 处变化不具有明显规律性, 与其抗氧化活性相关性不显著。这是因为当加热时间过长或反应过于剧烈时, 产物颜色过深, 相互关系变得非常复杂, 所以仍不能以其褐变程度直接表征抗氧化活性。

#### 2.4 酶解时间和美拉德反应对肽分子量的影响

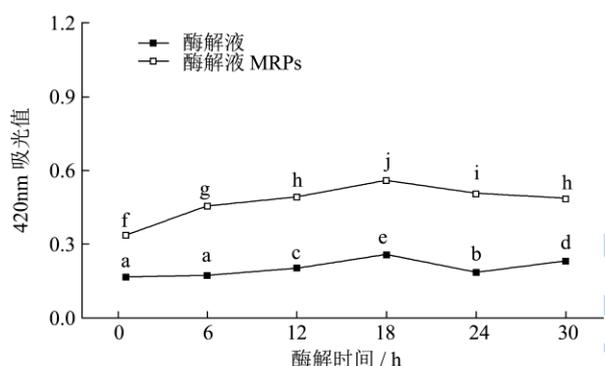


图 7 不同酶解时间大豆粕酶解产物和美拉德产物在 420 nm 处的吸收值

Fig.7 UV-absorbance values, at 420 nm, of the EPs and MRPs after different enzymolysis times

注: 不同字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ )。

表 1 酶解时间对酶解产物分子量分布的影响 (%)

酶解时间/h 分子量肽段/Da	>10000	10000~5000	5000~3000	3000~1000	<1000
0.5	2.70	5.11	9.11	39.58	43.50
6	1.31	3.67	6.74	35.04	53.24
12	1.30	3.88	7.05	32.38	55.39
18	1.25	3.75	6.83	30.74	57.42
24	1.44	4.14	7.41	31.08	55.93
30	0.71	3.34	8.19	36.23	51.52

为了研究不同酶解时间和美拉德反应程度对酶解产物及其美拉德反应产物特性的影响。本研究采用 HPLC 对这两组产物进行肽分子量的分析, 将所得

结果按照质量大小分成五组并计算每一组在各样品中的比例, 结果如表 1、表 2 所示。

表 2 酶解时间对酶解产物-木糖美拉德反应产物分子量分布的影响 (%)

酶解时间/h 分子量肽段/Da	>10000	10000~5000	5000~3000	3000~1000	<1000
0.5	2.46	6.06	10.57	39.93	40.98
6	1.25	4.60	9.49	40.07	44.59
12	1.04	4.32	9.31	40.05	45.27
18	1.12	4.31	9.21	38.37	46.99
24	1.05	4.27	9.31	39.96	45.40
30	0.57	3.16	8.44	40.03	47.80

由表 1 可知, 酶解产物中分子质量小于 1 ku 的组分比例呈先增加后降低的趋势, 在 18 h 处达到最大值 (57.42%), 延长酶解时间则又下降, 在 30 h 时降低到 51.52%, 而 1~3 ku 的组分比例随着酶解时间的增长呈先降低后升高的趋势, 在 18 h 处达到最小值 30.74%, 继续酶解则又增长, 在 30 h 时又上升了 5.49%。其他三个组分的比例随酶解时间变化较小, 只有一定程度的减少。这是因为大豆粕经过发酵后, 蛋白酶将大分子肽降解为小分子肽, 随着酶解程度的加深小分子肽又逐渐被水解为更小的寡肽或者氨基酸。酶解产物中以 <3 ku 的组分为主, 其含量超过 85%。在酶解时间超过一定范围时, 体系中热聚集和热降解效应明显, 在这个动态平衡中, <1 ku 的组分部分重新聚集成 1~3 ku 大小的物质, 其损耗量大于生成量。

由表 2 可知, 在酶解产物-木糖体系中, 分子质量小于 1 ku 的组分和分子质量在 1~3 ku 的组分其变化趋势与酶解液基本一致。其他三个组分的比例随酶解时间变化较小, 也是只有一定程度的减少。

将表 2 与表 1 进行比较可知, 酶解产物-木糖体系在 115 °C 反应 45 min 后其肽分子量分布发生了明显的变化。首先每个组分随酶解时间的延长增大或减小的变化幅度都减弱。其次未发生美拉德反应的酶解液其分子量 <1 ku 的组分平均含量在美拉德反应之后从原来的 52.84% 降低到了 45.17%, 平均降低了 7.67%; 1 ku~3 ku 的组分则从 34.18% 上升到了 39.74%, 平均升高了 5.56%; 3~5 ku 和 5~10 ku 的组分都有一定程度的增加, >10 ku 的组分则有略微减少。表明在美拉德反应中, 各组分都有一定程度的热降解, 从而变化趋势减弱。而 >10 ku 的组分则以热降解为主, 生成了较小的肽组分, 这与我们之前的研究结果相类似<sup>[21]</sup>。<1 ku 的组分容易与木糖等发生羰胺反应聚集生成分子

质量较大的组分,因此其含量减小,但也使得其他稍大的三个组分虽有不同程度的热降解但整体增加;说明在美拉德反应体系中小分子寡肽比大分子多肽具有更高的反应活性,这与曾晓房等人的研究结果相一致<sup>[13]</sup>。

综合表 1 和表 2, 还可知酶解液在经过美拉德反应后其抗氧化活性得到显著提升, 而 MRP 的分子量分布也发生了较大变化。分子量<1 kDa 的肽组分急剧减少说明其具有良好的美拉德反应活性, 并且聚集形成了更多的 1~3 ku 组分肽段。这与我们之前的研究结果认为 1~3 ku 肽段的组分有强抗氧化性一致<sup>[12]</sup>。也再次证明了不同分子量分布对产物抗氧化性有一定影响。Kim 等也在研究中认为肽链长度对其形成美拉德反应产物及其抗氧化活性起到重要作用<sup>[14]</sup>。

### 3 结论

3.1 本文采用大宗低值蛋白高温大豆粕作为原材料, 模拟酱油酱油制曲工艺, 直接利用高温大豆粕在发酵过程中分泌的蛋白酶进行自身水解, 探究酶解过程中高温大豆粕蛋白的利用情况及其酶解产物抗氧化活性等特性。结果表明发酵过程能大幅度提高对豆粕蛋白的利用率, 其中发酵豆粕水提液其蛋白回收率达到 57.65%, 较未发酵豆粕的蛋白回收率提高了 6.3 倍; 继续酶解可进一步提升利用效率达到 77.21%。在发酵和酶解过程中, 且产物的抗氧化性能得到一定程度提升, 且美拉德反应可显著提高酶解产物的抗氧化活性。

3.2 美拉德反应机制复杂、难以检测确定, 但反应能赋予多种酶解产物强效抗氧化性已在诸多文章中提及, 并在本实验中得到验证。本文通过探究美拉德反应对发酵豆粕酶解产物抗氧化活性和肽分子量分布的影响规律, 为利用高温大豆粕制备具有较强天然抗氧化活性的风味剂提供了一定的理论基础和方法指导。

### 参考文献

- [1] 宋国安.大豆资源的开发利用[J].山东食品科技,2004,11  
SONG Guo-an. The resource development and utilization of soybean [J]. Shandong Food Science and Technology, 2004, 11
- [2] 汤文利,门晓东.关于我国大豆粕质量的调查报告[J].饲料研究,2005,10:45-48  
TANG Wen-li, MEN Xiao-dong. Investigation report on the quality of China's soybean meal [J]. Feed Research, 2005, 10: 45-48
- [3] 陈敏,吴昊.酱渣再利用的研究进展[J].中国调味品,2011,8  
CHEN Min, WU Hao. Research development on the

- reutilization of soy sauce residue [J]. China Condiment, 2011, 8
- [4] Claudio Peteriella SLR, Roberto D, Lozano, JorigeChirife. Kinetics of deteriorative reactions in model food systems of high water activity: color changes due to nonenzymatic browning [J]. Journal of Food Science, 1985, 50(3): 622-626
- [5] Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, et al. Oxidative stress and cell signaling [J]. Current Medicinal Chemistry, 2004, 11(9): 1163-1182
- [6] 杨惠芬,李明元,沈文.食品卫生理化检验标准手册[M].北京:中国标准出版社,1998  
YANG Hui-fen, LI Ming-yuan, SHEN Wen. Physical examination of food hygiene standards manual [M]. Bei Jing: Standards Press of China, 1998
- [7] Thana P, Mahmudah S, Goto M, et al. Response surface methodology to supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8): 3110-3115
- [8] Meigui Huang, Ping Liu, Shiqing Song, et al. Contribution of sulfur-containing compounds to the color inhibition effect and improved antioxidative activity of Maillard reaction products of soybean protein hydrolysates [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 91(4): 710-720
- [9] Wedzicha Aseabl. Uptake of thiol anti-browning agents by cabbage on blanching and reactivity during dehydration [J]. Food Chemistry, 1997, 59(3): 453-457
- [10] UK Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685
- [11] Hwang J Y, Shue Y S, Chang H M. Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels [J]. Food Research International, 2001, 34: 639-647
- [12] Guowan Su, Jiaoyan Ren, Mouming Zhao, et al. Comparison of Superdex Peptide HR 10/30 column and TSK gel G2000 SWXL column for molecular weight distribution analysis of pure proteins/peptides and protein hydrolysate [J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 6:3620-3626
- [13] 赵谋明,曾晓房,崔春,王金水.鸡肉蛋白肽-葡萄糖 Maillard 反应中肽的降解研究[J].四川大学学报(工程科学版),2007, 39(2):77-81  
ZHAO Mou-ming, ZENG Xiao-fang, CUI Chun, et al. The study of degradation of the peptide in chicken peptide-glucose maillard reaction [J]. The Journal of Sichuan University (Engineering Science Edition), 2007,39(2): 77-81

- [14] JS Kim, Lee YS. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time [J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 227-232

现代食品科技