

## 复合方法抑制整粒大豆中脂氧合酶的活性

黄雨婷, 蒋肇样, 贾冬英, 迟原龙, 邓 莎, 姚 开

(四川大学 轻工科学与工程学院, 成都 610065)

**摘要:**研究了有机试剂蒸气处理与微波干燥相结合的方法对整粒大豆中脂氧合酶活性的抑制效果。结果表明,50% 甲醇、50% 异丙醇、5% 乳酸或 0.1 mol/L 柠檬酸溶液蒸气处理对整粒大豆中脂氧合酶活性均有一定的抑制作用,结合微波干燥可使脂氧合酶活性降低 98% 以上,蛋白质溶解度仍可分别保留 54.3%、59.3%、58.4% 和 66.1%,豆腥味成分总量分别降低了 88.7%、73.7%、89.4% 和 90.5%,其中己醛含量极显著降低,粗蛋白和粗脂肪含量及内部空隙率变化较小,籽粒硬度显著下降。综合来看,0.1 mol/L 柠檬酸溶液蒸气处理与微波干燥相结合是抑制整粒大豆脂氧合酶活性的适宜方法。

**关键词:**整粒大豆;脂氧合酶;抑制效果;复合方法;豆腥味

**中图分类号:**TS201.2;O629.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2020)03-0054-04

### Inhibitory effect of combined methods on the activity of lipoyxygenase in whole soybean

HUANG Yuting, JIANG Zhaoyang, JIA Dongying, CHI Yuanlong, DENG Sha, YAO Kai

(College of Biomass Science and Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

**Abstract:** Combined methods including the solvent steam treatment and microwave drying were used to inhibit the activity of lipoyxygenase in whole soybean. The results showed that steam treatment with 50% methanol, 50% isopropanol, 5% lactic acid or 0.1 mol/L citric acid solution could inhibit the enzyme to a certain degree. These treatments combined with microwave drying could reduce its activity by over 98%, while the solubility of the protein in treated soybean could remain 54.3%, 59.3%, 58.4% and 66.1%, respectively. The total content of beany odour substances in whole soybean treated by the combined methods decreased by 88.7%, 73.7%, 89.4% and 90.5%, respectively, of which its content of hexanal very significantly decreased, but its content of crude protein and crude fat, and internal voidage changed little and its seed hardness significantly decreased compared with those in the untreated soybean. In summary, the combined method of steam treatment with 0.1 mol/L citric acid solution and microwave drying was suitable to inhibit the activity of lipoyxygenase in whole soybean.

**Key words:** whole soybean; lipoyxygenase; inhibitory effect; combined method; beany odour

大豆制品豆腥味的产生主要是由于大豆加工过程中伴随组织结构的破坏和分子氧的存在,其中的

不饱和脂肪酸发生酶促氧化降解反应,生成了带有异味的醇、醛、酮等小分子物质<sup>[1]</sup>,该反应的关键酶是脂氧合酶。脂氧合酶是一种含非血红素铁的加双氧酶,可以催化含至少一个顺,顺-1,4-戊二烯结构的多不饱和脂肪酸发生过氧化反应<sup>[2]</sup>,而大豆组织中的脂氧合酶是不会与底物发生接触的,因此在大豆组织破碎前抑制脂氧合酶活性是避免大豆加工过程中豆腥味产生的有效途径之一。

收稿日期:2019-10-14;修回日期:2019-12-24

基金项目:国家自然科学基金项目(31371775);四川省重点研发项目(2019YFS0526)

作者简介:黄雨婷(1994),女,在读硕士,研究方向为食物资源开发利用(E-mail)1175817483@qq.com。

通信作者:姚 开,教授(E-mail)yaokai555@126.com。

目前,抑制整粒大豆脂氧合酶活性主要采用热处理法,如红外法<sup>[3]</sup>、连续漂烫和超高温处理法<sup>[4]</sup>等,但其易使大豆蛋白过度变性,严重影响其溶解度<sup>[5]</sup>。Kudre等<sup>[6]</sup>发现,60℃、氯仿和甲醇混合溶液浸泡花生粉,其脂氧合酶活性降低61.4%。单纯采用有机试剂处理不能完全抑制大豆中脂氧合酶活性,加之存在水分含量升高、试剂残留等问题,还需要对其进行干燥。相比于传统的干燥方式,微波干燥的效率,其热效应可进一步抑制脂氧合酶活性<sup>[7]</sup>。本文采用有机试剂蒸气处理与微波干燥相结合的方法对整粒大豆脂氧合酶进行灭活,并评价处理后的大豆豆腥味和质构特性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

大豆,黑龙江拜泉县;亚油酸,国药集团化学试剂有限公司;考马斯亮蓝 G250,成都市科龙化工试剂厂;牛血清白蛋白,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;对二氯苯(色谱纯),山东西亚化学试剂有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

UV-6000PC 紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;气相色谱-质谱联用仪,美国安捷伦公司;TA.XTplus 物性测试仪,北京微讯超技仪器技术有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 有机试剂蒸气处理整粒大豆

分别将适量的体积分数50%甲醇溶液、50%异丙醇溶液、5%乳酸溶液、0.1 mol/L 柠檬酸溶液、氯仿-乙醇(体积比1:1)溶液、正己烷-乙醇(体积比1:1)溶液、乙酸乙酯-乙醇(体积比1:1)溶液装入容器中,将定量的整粒大豆置于上层筛网,加盖并安装冷凝管,加热,使蒸气通过物料,收集冷凝液,蒸气持续处理整粒大豆30 min。

#### 1.2.2 复合方法处理整粒大豆

将经有机试剂蒸气处理30 min的整粒大豆,在160 W下微波干燥4 min。

#### 1.2.3 脂氧合酶活性测定

粗酶液制备:将20 g大豆与200 mL去离子水置于冰水浴中磨浆,100目双层滤布过滤,4℃、8 000 r/min离心30 min,上清液即为粗酶液。

底物溶液配制:将0.1 mL亚油酸和0.1 mL吐温20加入0.2 mol/L硼酸缓冲溶液(pH 9.0)中,定容至100 mL。

脂氧合酶活性测定<sup>[8]</sup>:用0.2 mol/L硼酸缓冲溶液(pH 9.0)稀释底物溶液5倍。将2.0 mL底物稀释液、0.9 mL 0.2 mol/L的硼酸缓冲溶液(pH 9.0)与0.1 mL稀释适当倍数的粗酶液混匀,间隔10 s测其234 nm的吸光度( $A_{234}$ )。将1 min内 $A_{234}$ 增加0.001定义为一个酶活力单位(U)。按下式计算脂氧合酶相对活力。

相对活力 = 处理后的大豆脂氧合酶活力/未处理的大豆脂氧合酶活力 × 100%

#### 1.2.4 蛋白质溶解度测定

参照SN/T 3926—2014的考马斯亮蓝法测定大豆试样中可溶性蛋白质含量。参照GB 5009.5—2016中凯氏定氮法测定大豆试样中总蛋白质含量(蛋白质折算系数为5.71)。按下式计算大豆试样的蛋白质溶解度。

蛋白质溶解度 = 大豆中可溶性蛋白质含量/大豆中总蛋白质含量 × 100%

#### 1.2.5 豆腥味成分测定

采用HS-SPME-GC-MS测定豆腥味成分。大豆试样粉碎,过40目筛,得到大豆粉。将2 g大豆粉和3 mL去离子水置于顶空瓶中,加入10 μL质量浓度为0.12 mg/mL的对二氯苯-甲醇溶液(内标物),混匀,50℃水浴30 min,萃取头吸附40 min,250℃解吸5 min。GC条件:SH-Rxi-5SiL MS色谱柱;升温程序为50℃保持1 min,以10℃/min升至150℃,保持3 min,以8℃/min升至290℃,保持2 min;进样口温度250℃;氦气为载气,流速1.0 mL/min;采用不分流的进样方式。MS条件:采用电子轰击离子源;电离方式EI;电离电压70 eV;电子源温度200℃;灯丝电流150 μA;扫描质量范围( $m/z$ )45~500;扫描方式为Scan。实验结果与NIST14/NIST14s数据库比对,并参考Lü等<sup>[9]</sup>研究结果对豆腥味成分进行确认,将其中相似程度大于80%的化合物认定为大豆试样的豆腥味成分。

#### 1.2.6 大豆主要化学成分测定

水分含量,参照GB 5009.3—2016的直接干燥法测定;粗蛋白含量,参照GB 5009.5—2016的凯氏定氮法测定;粗脂肪含量,参照GB 5009.6—2016的索氏抽提法测定。

#### 1.2.7 大豆内部空隙率测定<sup>[8]</sup>

随机取200粒大豆,准确称其质量。采用正己烷排积法测其体积,即将100 mL正己烷倒入量筒中,加入试样,静置20 s,记录总体积。以大豆试样的体积质量比表征内部空隙率。按下式计算空隙率。

空隙率 = (总体积 - 100)/试样质量

### 1.2.8 大豆籽粒硬度测定

采用 P-2N 型探头,测试前、中、后速度分别为 2.0、0.5、2.0 mm/s。大豆籽粒硬度以应力曲线最大的峰值表示。

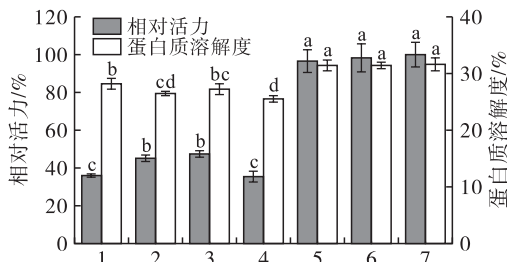
### 1.2.9 数据处理

采用 OriginPro 2017 软件绘制图形,使用 SPSS Statistics 23.0 软件统计分析数据,采用 Duncan test 进行显著性分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 有机试剂蒸气处理对大豆脂氧合酶活性和蛋白质溶解度的影响

热蒸气具有穿透力强、物料升温快、灭酶效果好等特点。为避免大豆中蛋白质过度变性导致其溶解度下降,选用低沸点的不同有机试剂对整粒大豆进行蒸气处理,结果如图 1 所示。



注:1.50% 甲醇溶液;2.50% 异丙醇溶液;3.5% 乳酸溶液;4.0.1 mol/L 柠檬酸溶液;5.氯仿-乙醇(体积比 1:1);6.正己烷-乙醇(体积比 1:1);7.乙酸乙酯-乙醇(体积比 1:1)。

图 1 有机试剂蒸气处理对大豆脂氧合酶活性和蛋白质溶解度的影响

由图 1 可见,50% 甲醇或 50% 异丙醇溶液蒸气处理的大豆脂氧合酶相对活力分别为 36.2% 和 45.2%,酶活降低明显,而氯仿-乙醇、正己烷-乙醇或乙酸乙酯-乙醇溶液蒸气处理的大豆脂氧合酶相对活力仍然较高,均在 90% 以上,可以认为溶液的极性是影响酶活性的重要因素,极性较强的甲醇和异丙醇会使酶失去结合水,而弱极性的氯仿、正己烷和乙酸乙酯的影响较小<sup>[10]</sup>。5% 乳酸或 0.1 mol/L 柠檬酸溶液蒸气处理的大豆脂氧合酶相对活力分别为 47.6% 和 35.7%,其作用机理主要是改变酶活性中心的构象或相关基团的解离状态<sup>[11]</sup>。与空白(未处理的大豆蛋白质溶解度为 32.2%)相比,50% 甲醇、50% 异丙醇、5% 乳酸或 0.1 mol/L 柠檬酸溶液蒸气处理大豆的蛋白质溶解度分别降低了 12.4%、18.0%、15.5% 和 20.8%,而氯仿-乙醇、正己烷-乙醇或乙酸乙酯-乙醇溶液蒸气处理大豆蛋白质溶解度无显著差异( $P > 0.05$ )。基于脂氧合酶灭活效果和蛋白质溶解度,选择体积分数 50% 甲醇溶液、50% 异丙醇溶液、5% 乳酸溶液和 0.1 mol/L 柠檬酸溶液进行后续研究。

### 2.2 复合方法处理对大豆脂氧合酶活性和蛋白质溶解度的影响

50% 甲醇、50% 异丙醇、5% 乳酸和 0.1 mol/L 柠檬酸溶液 4 种有机试剂溶液蒸气处理分别与微波干燥相结合的复合法(1~4)处理结果如图 2 所示。

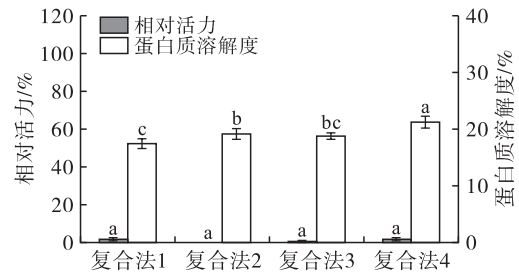


图 2 复合方法处理对大豆脂氧合酶活性和蛋白质溶解度的影响

由图 2 可见:4 种复合方法处理的大豆脂氧合酶活力降低明显,相对活力降低 98% 以上;大豆蛋白质溶解度仍可分别保留 54.3%、59.3%、58.4% 和 66.1%。结果表明,有机试剂蒸气处理结合微波干燥的复合处理方法对整粒大豆中脂氧合酶灭活效果明显好于单独有机试剂蒸气处理。

### 2.3 复合方法处理对豆腥味的成分的影响

豆腥味是大豆加工过程中产生的特殊气味,由不饱和脂肪酸氧化降解产生的醇、醛、酮等物质组成,其中己醛含量决定了大豆制品的豆腥味程度<sup>[12]</sup>。复合方法处理的大豆豆腥味成分及含量如表 1 所示。

表 1 复合方法处理的大豆豆腥味成分及含量  $\mu\text{g}/\text{kg}$

风味物质	气味特征	空白	复合法1	复合法2	复合法3	复合法4
己醛	青草味	4 785.9	685.8	911.3	392.0	330.3
反式-2-己烯醛	青叶味	219.5	6.2	13.2	nd	nd
1-辛烯-3-醇	蘑菇味	1 611.1	nd	695.3	363.1	nd
正己醇	青叶味	1 586.6	198.9	530.5	105.4	366.3
正戊醇	青豆味	34.1	32.8	19.3	nd	10.7
乙酸	醋酸味	nd	4.1	nd	6.2	71.9
苯甲醛	苦杏仁味	6.4	3.3	nd	4.4	6.9
总计	-	8 243.6	931.1	2 169.6	871.1	786.1

注:nd 表示未检出。

由表 1 可以看出,与空白相比,4 种复合方法处理的大豆豆腥味成分总量显著降低( $P < 0.05$ ),分别下降 88.7%、73.7%、89.4% 和 90.5%,其中己醛含量极显著降低( $P < 0.01$ )。

### 2.4 复合方法处理对大豆主要化学成分的影响(见表 2)

大豆的安全储藏水分含量通常控制在 13% 以内<sup>[13]</sup>。由表 2 可以看出:4 种复合方法处理的大豆水分含量均低于安全值,适宜长期储藏;粗蛋白和粗

脂肪含量略有降低。

表2 复合方法处理的大豆主要化学成分含量 %

样品	水分	粗蛋白	粗脂肪
空白	10.24 ± 0.04d	36.98 ± 2.12a	18.95 ± 0.91a
复合法1	10.68 ± 0.05c	32.25 ± 2.12b	18.10 ± 0.42b
复合法2	10.63 ± 0.01c	34.71 ± 1.04ab	18.59 ± 0.32ab
复合法3	11.23 ± 0.12b	32.65 ± 1.48b	18.69 ± 0.64ab
复合法4	11.91 ± 0.06a	33.48 ± 0.40ab	18.35 ± 0.16ab

注:同一列小写字母不同表示差异显著( $P < 0.05$ )。

## 2.5 复合方法处理对大豆质构特性的影响

### 2.5.1 大豆内部空隙率(见图3)

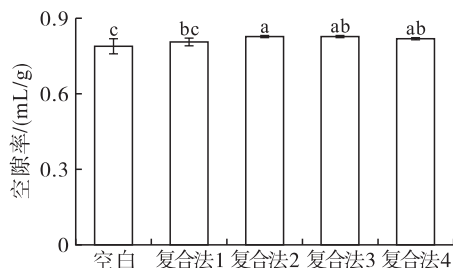


图3 复合方法处理对大豆内部空隙率的影响

由图3可以看出,4种复合方法处理的大豆内部空隙率较空白略有增加,表明复合方法处理的大豆内部并未出现较大空隙,不会由于氧的进入加速其油脂氧化而影响储藏期。

### 2.5.2 大豆籽粒硬度(见图4)

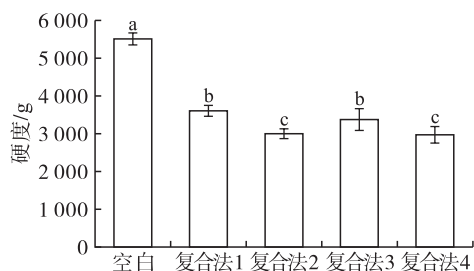


图4 复合方法处理对大豆硬度的影响

由图4可以看出,4种复合方法处理的大豆籽粒硬度较之空白显著下降( $P < 0.05$ ),原因是蒸气处理过程中水分的进入导致了淀粉和蛋白质的凝胶化<sup>[14]</sup>。大豆硬度的降低有利于改善大豆的加工性能,增强其吸水性,减少粉碎或磨浆过程的能量消耗和机械损伤<sup>[3]</sup>。

## 3 结论

50% 甲醇、50% 异丙醇、5% 乳酸或 0.1 mol/L 柠檬酸溶液蒸气处理对整粒大豆中脂氧合酶活性均有不同程度的抑制作用,结合微波干燥可使脂氧合酶活性进一步降低 98% 以上。复合方法处理的大豆豆腥味成分总量降低了 73% 以上,其中己醛含量极显著降低;经复合方法处理,大豆蛋白质溶解度仍可保留 54% 以上,粗蛋白和粗脂肪含量及内部空隙

率变化较小,水分含量低于安全储藏标准,籽粒硬度显著降低。综合比较,0.1 mol/L 柠檬酸溶液蒸气处理与微波干燥相结合是抑制整粒大豆中脂氧合酶活性的适宜方法。

## 参考文献:

- [1] CHONG W K, MAH S Y, EASA A M, et al. Thermal inactivation of lipoxygenase in soya bean using superheated steam to produce low beany flavour soya milk[J]. J Food Sci Technol, 2019, 56(9): 4371 - 4379.
- [2] IVANOV I, HEYDECK D, HOFHEINZ K, et al. Molecular enzymology of lipoxygenases [J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 503(2): 161 - 174.
- [3] YALCIN S, BASMAN A. Effects of infrared treatment on urease, trypsin inhibitor and lipoxygenase activities of soybean samples[J]. Food Chem, 2015, 169: 203 - 210.
- [4] YUAN S H, CHANG S K C, LIU Z S, et al. Elimination of trypsin inhibitor activity and beany flavor in soy milk by consecutive blanching and ultrahigh - temperature (UHT) processing[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(17): 7957 - 7963.
- [5] 王丽丽. 冷冻处理对大豆质构及豆浆品质特性的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [6] KUDRE T G, BENJAKUL S. Effects of binary organic solvents and heating on lipid removal and the reduction of beany odour in Bambara groundnut (*Vigna subterranean*) flour[J]. Food Chem, 2013, 141(2): 1390 - 1397.
- [7] WANG S H, TOLEDO M C F. Inactivation of soybean lipoxygenase by microwave heating: effect of moisture content and exposure time [J]. J Food Sci, 1987, 52(5): 1344 - 1347.
- [8] 王韧. 超高压对大豆脂肪氧合酶、营养抑制因子和蛋白性质的影响[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2008.
- [9] LÜ Y C, SONG H L, LI X, et al. Influence of blanching and grinding process with hot water on beany and non - beany flavor in soymilk[J]. J Food Sci, 2011, 76(1): 20 - 25.
- [10] LAANE C, BOEREN S, VOS K, et al. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents [J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 102(1): 1 - 8.
- [11] 陈石根, 周润琦. 酶学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2001.
- [12] SHI X D, LI J Y, WANG S M, et al. Flavor characteristic analysis of soymilk prepared by different soybean cultivars and establishment of evaluation method of soybean cultivars suitable for soymilk processing[J]. Food Chem, 2015, 185: 422 - 429.
- [13] 郑振堂, 刘忠强, 陈明峰, 等. 大豆安全储藏工艺与技术[J]. 粮食加工, 2011, 36(2): 70 - 74.
- [14] FABBRI A D T, CROSBY G A. A review of the impact of preparation and cooking on the nutritional quality of vegetables and legumes [J]. Int J Gastro Food Sci, 2015, 3: 2 - 11.