

## 油料蛋白

## 超声辅助复合酶酶解制备大豆多肽工艺的优化

何东平<sup>1</sup>,程雪<sup>2</sup>,马军<sup>2</sup>,李成辉<sup>2</sup>,刘军<sup>2</sup>

(1. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 山东禹王生态食业有限公司, 山东 禹城 251200)

**摘要:**以大豆分离蛋白为原料,采用超声辅助复合酶酶解制备大豆多肽,以单因素实验为基础,选择复合酶添加量、酶解时间、酶解温度以及酶解 pH 为自变量,大豆多肽得率为响应值,采用响应面分析法研究各自变量及其交互作用对大豆多肽得率的影响,并对大豆多肽的相对分子质量分布进行测定。结果表明,影响大豆多肽得率的各因素强弱顺序为:酶解温度 > 复合酶添加量 > 酶解时间 > 酶解 pH; 超声辅助复合酶酶解制备大豆多肽的最佳工艺条件为超声功率 180 W、超声时间 10 min、超声温度 35 ℃、碱性蛋白酶与中性蛋白酶质量比 3:1、复合酶添加量 2.04%、酶解时间 4.0 h、酶解温度 59 ℃、酶解 pH 8.0,在此条件下大豆多肽得率为 63.27%,相对分子质量大部分集中在 1 000 以下。

**关键词:**大豆多肽;超声波;复合酶酶解;响应面

中图分类号:TS201.1;TQ032 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)07-0072-05

### Optimization of enzymatic preparation process of soybean peptide by ultrasound – assisted complex enzyme

HE Dongping<sup>1</sup>, CHENG Xue<sup>2</sup>, MA Jun<sup>2</sup>, LI Chenghui<sup>2</sup>, LIU Jun<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Shandong Yuwang Ecological Food Industry Co., Ltd., Yucheng 251200, Shandong, China)

**Abstract:** With soybean protein isolate as raw material, soybean peptide was prepared by ultrasound – assisted complex enzyme enzymolysis. On the basis of single factor experiment, with dosage of complex enzyme, enzymolysis time, enzymolysis temperature, and enzymolysis pH as independent variable, soybean peptide yield as response value, the effects of every independent variable as well as their interaction on the soybean peptide yield were researched by response surface methodology. The relative molecular weight of the soybean peptide was determined. The results showed that the effect of enzymolysis temperature on soybean peptide yield was the strongest, followed by dosage of complex enzyme, enzymolysis time and enzymolysis pH. The optimal ultrasound – assisted complex enzyme enzymolysis conditions were obtained as follows: ultrasonic power 180 W, ultrasonic time 10 min, ultrasonic temperature 35 ℃, mass ratio of alkaline protease to neutral protease 3:1, dosage of complex enzyme 2.04%, enzymolysis time 4.0 h, enzymolysis temperature 59 ℃ and enzymolysis pH 8.0. Under these conditions, the soybean peptide yield was 63.27%, and the relative molecular weight of most soybean peptide was below 1 000.

**Key words:** soybean peptide; ultrasound; complex enzyme enzymolysis; response surface methodology

大豆多肽是指大豆蛋白经酶解或发酵处理得到

的水解产物,主要以 3~6 个氨基酸组成的小分子肽为主,同时还含有其他成分如少量的大分子肽、游离氨基酸、糖类和无机盐等<sup>[1]</sup>。近年来,随着生物技术的进步,一些活性肽的结构和生理功能逐渐明确,促进了大豆多肽的研究与开发。与大豆蛋白相比,大豆多肽具有消化吸收率高、降低胆固醇、降低血压

收稿日期:2017-11-18;修回日期:2018-04-20

作者简介:何东平(1957),男,教授,博士,研究方向为油脂及植物蛋白工程(E-mail)se1001@yuwangcn.com。

通信作者:刘军,工程师,硕士(E-mail)liujun@yuwangcn.com。

和促进脂肪代谢等生理功能<sup>[2-3]</sup>。因此,大豆多肽的开发将会对大豆产品深加工产生重大影响,为人类的健康提供优良的新物质资源<sup>[4]</sup>。

目前,大豆多肽的研制大多采用单一酶或复合酶处理,很少使用物理因子进行预处理,手段较为单一,多肽得率较低<sup>[5-7]</sup>。也有少部分研究关注于超声辅助单一酶酶解大豆多肽<sup>[8]</sup>,而鲜见针对超声辅助复合酶酶解工艺的研究。因此,本文利用超声波进行预处理,考察其是否能够提高复合酶酶解工艺的多肽得率,同时针对复合酶的种类、复配比例,复合酶添加量,酶解时间,酶解温度,酶解 pH 等进行实验,以多肽得率为指标,采用响应面法优化复合酶酶解工艺,同时对在此条件下得到的大豆多肽进行相对分子质量分布分析,为大豆多肽的工业化生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

大豆分离蛋白:山东禹王生态食业有限公司;碱性蛋白酶(250 kU/g):诺维信;中性蛋白酶(80 kU/g):杰能科;菠萝蛋白酶(75 kU/g)、木瓜蛋白酶(80 kU/g):南宁庞博生物工程;胰蛋白酶(50 kU/g):Sigma;其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器与设备

HH-6 数显恒温水浴锅;JJ-1 精密增力电动搅拌器;PHS-3C 型 pH 计;TD5A-WS 型台式离心机;KQ-500DB 型数控超声波清洗器。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 超声辅助复合酶酶解工艺

准确称取一定量的大豆分离蛋白于酶反应器中,调节底物质量分数至 10%,进行超声波预处理,本实验参照文献<sup>[8]</sup>采用的超声波预处理参数为超声功率 180 W、超声时间 10 min、超声温度 35℃。超声波预处理结束后调整温度、pH 至实验值,后加入所需酶量,开始计时,反应一定的时间后,停止酶解。将酶解液置于 100℃ 水浴锅中 10 min,使酶失活。4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,测定固形物含量,按下式计算大豆多肽得率<sup>[9]</sup>。

$$\text{大豆多肽得率} = \frac{\text{上清液质量} \times \text{上清液固形物含量}}{\text{大豆分离蛋白粉质量} \times (1 - \text{大豆分离蛋白含水量})} \times 100\%$$

#### 1.2.2 含水量及固形物含量测定

参照 GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》测定含水量及固形物含量。

#### 1.2.3 相对分子质量分布的测定

采用 Waters600 高效液相色谱仪测定相对分子质量。

色谱条件:TSKgel2000SWXL 色谱柱(300 mm × 7.8 mm);流动相为乙腈-水-三氟乙酸(体积比 45:55:0.1);紫外检测波长 220 nm;流速 0.5 mL/min;柱温 30℃;样品制备为吸取样品 2 g 于 10 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,用微孔滤膜过滤后供进样;进样量 20 μL;相对分子质量校正曲线所用标准品为细胞色素 C(12 500)、抑菌肽(6 500)、杆菌肽(1 450)、Gly-Gly-Arg-Tyr(451)、Gly-Gly-Gly(189)。

#### 1.2.4 数据处理

采用 Excel 2010 作图,Design Expert 7.0 软件进行响应面分析。

## 2 结果与分析

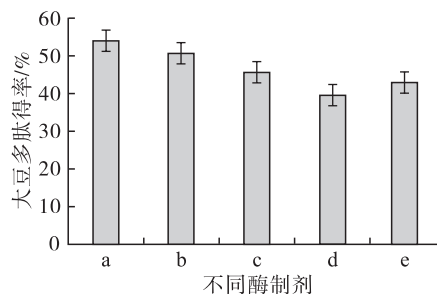
### 2.1 超声波预处理对大豆多肽得率的影响

酶解条件:2% 碱性蛋白酶,酶解温度 55℃,酶解 pH 9.8,酶解时间 4 h。在相同的酶解条件下以不超声处理为对照组,结果为:对照组大豆多肽得率(50.81 ± 0.97)%,实验组大豆多肽得率(53.91 ± 0.41)%,得出超声波预处理对提高大豆多肽得率有显著影响( $P < 0.05$ ),这是因为采用超声波预处理能够增加可溶性蛋白的含量,进而有效提高大豆多肽的得率<sup>[10]</sup>。

### 2.2 酶制剂的筛选

#### 2.2.1 单一酶制剂对大豆多肽得率的影响

按照 1.2.1 工艺,选择相应的酶制剂各加入 2.0%(以大豆分离蛋白质量计),反应条件为各酶的最适条件,其中碱性蛋白酶为酶解 pH 9.8,酶解温度 55℃;中性蛋白酶为酶解 pH 7.0,酶解温度 45℃;菠萝蛋白酶为酶解 pH 6.5,酶解温度 40℃;胰蛋白酶为酶解 pH 8.0,酶解温度 37℃;木瓜蛋白酶为酶解 pH 6.0,酶解温度 55℃;酶解时间均为 4 h。不同酶制剂对大豆多肽得率的影响如图 1 所示。



注:a. 碱性蛋白酶;b. 中性蛋白酶;c. 菠萝蛋白酶;d. 胰蛋白酶;e. 木瓜蛋白酶。

图 1 不同酶制剂对大豆多肽得率的影响

从图1可以看出,采用碱性蛋白酶的大豆多肽得率最高,其次为中性蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶,最后为胰蛋白酶,这是因为蛋白酶的酶解位点具有专一性,各种蛋白酶的酶解位点不同,所以采用这5种蛋白酶得出的大豆多肽得率差异较大<sup>[11]</sup>。为提高大豆多肽得率,可进一步将酶进行复配使用。

### 2.2.2 复合酶制剂对大豆多肽得率的影响

根据2.2.1实验结果,选择将碱性蛋白酶和中性蛋白酶进行复配使用,并对其比例进行筛选,反应条件为复合酶添加量2.0%、酶解温度55℃、酶解pH 8.0、酶解时间4 h,结果如图2所示。

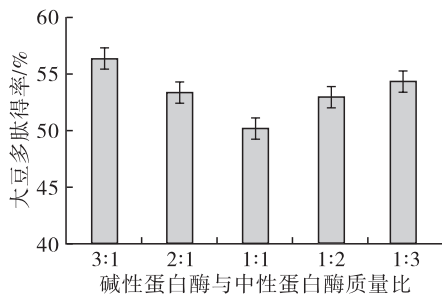


图2 复合酶质量比对大豆多肽得率的影响

从图2可以看出,复合酶的添加较单一酶能够有效地提高大豆多肽得率,最佳的复配比为碱性蛋白酶与中性蛋白酶质量比3:1,这是因为二者的蛋白切点相似,且在该比例下产生的协同作用最强<sup>[12]</sup>,因此后续实验均采用该种复合酶。

## 2.3 单因素实验

### 2.3.1 复合酶添加量对大豆多肽得率的影响

采用工艺参数为超声波预处理,酶解时间4 h、酶解pH 8.0、酶解温度55℃,考察复合酶添加量分别为1%、1.5%、2%、2.5%、3.0%对大豆多肽得率的影响,结果如图3所示。

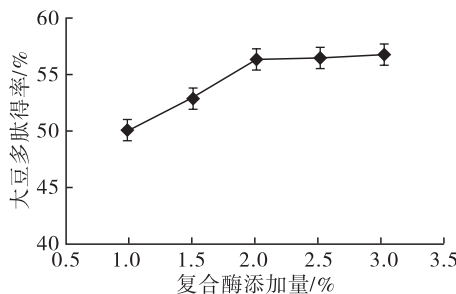


图3 复合酶添加量对大豆多肽得率的影响

从图3可以看出,大豆多肽得率随复合酶添加量的增加而升高,在复合酶添加量达到2.0%时最大,继续增加复合酶添加量,大豆多肽得率升高的趋势减缓。这是因为在底物质量分数一定的情况下,复合酶未使底物饱和,其添加量越大,对肽段的切割作用越大,大豆多肽得率越高<sup>[13]</sup>。但当复合酶添加

量增加到一定值时,底物被酶所饱和,可供酶切割的位点有限,再增加复合酶添加量,大豆多肽得率也不会有显著的变化。因此从成本考虑,选取复合酶添加量2.0%为最佳条件。

### 2.3.2 酶解时间对大豆多肽得率的影响

采用工艺参数为超声波预处理,复合酶添加量2.0%、酶解pH 8.0、酶解温度55℃,考察酶解时间分别为2、3、4、5、6 h对大豆多肽得率的影响,结果如图4所示。

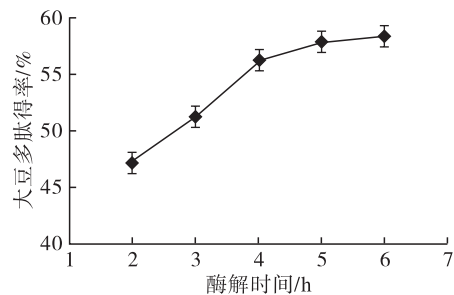


图4 酶解时间对大豆多肽得率的影响

从图4可以看出,随着酶解时间的延长,大豆多肽得率一直在增加,但酶解时间超过4 h后,大豆多肽得率的增加开始变得缓慢,这是因为底物的量是一定的,酶解反应在4 h时就已经基本结束<sup>[14]</sup>,继续延长酶解时间,大豆多肽得率也不会有显著的变化。因此,选择酶解时间4 h为最佳条件。

### 2.3.3 酶解温度对大豆多肽得率的影响

采用工艺参数为超声波预处理,复合酶添加量2.0%、酶解pH 8.0、酶解时间4 h,考察酶解温度分别为40、45、50、55、60℃对大豆多肽得率的影响,结果如图5所示。

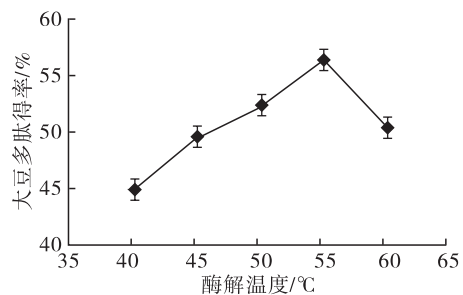


图5 酶解温度对大豆多肽得率的影响

从图5可以看出,大豆多肽得率在酶解温度为40~55℃时,随酶解温度升高呈增加的趋势,超过55℃开始下降,这是因为复合酶在酶解时有一个最适温度,不在最适温度范围内酶的活力就会受到影响,导致酶解不彻底,大豆多肽得率降低。因此,选择酶解温度55℃为最适温度。

### 2.3.4 酶解pH对大豆多肽得率的影响

采用工艺参数为超声波预处理,复合酶添加量

2.0%、酶解时间 4 h、酶解温度 55 ℃,考察酶解 pH 分别为 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 对大豆多肽得率的影响,结果如图 6 所示。

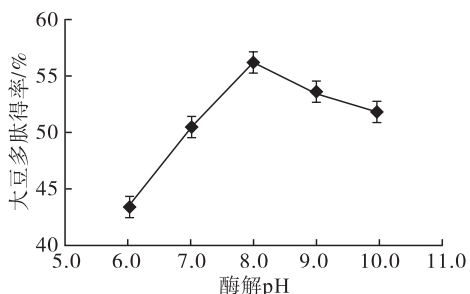


图 6 酶解 pH 对大豆多肽得率的影响

从图 6 可以看出,大豆多肽得率在酶解 pH 为 6.0~8.0 时,呈现随酶解 pH 增加而增加的趋势,超过 pH 8.0 开始下降,这是因为本实验采用的复合酶为中性蛋白酶和碱性蛋白酶,在 pH 中性偏碱性时酶活最大,大豆多肽得率最高。因此,选择酶解 pH 8.0 为最佳条件。

2.4 响应面法优化

2.4.1 响应面实验设计及结果

在单因素实验的基础上,以大豆多肽得率为响应值,选取复合酶添加量( $X_1$ )、酶解时间( $X_2$ )、酶解温度( $X_3$ )、酶解 pH( $X_4$ )为影响因素,采用 Box - Behnken 的实验设计,进行四因素三水平的响应面分析<sup>[15-16]</sup>。Box - Behnken 实验因素水平如表 1 所示,Box - Behnken 实验设计及结果如表 2 所示。

表 1 Box - Behnken 实验因素水平

水平	$X_1$ /%	$X_2$ /h	$X_3$ /℃	$X_4$
-1	1.8	3.5	50	7.5
0	2.0	4.0	55	8.0
1	2.2	4.5	60	8.5

表 2 Box - Behnken 实验设计及结果

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	大豆多肽得率/%
1	-1	0	1	0	53.37
2	-1	0	0	1	47.11
3	1	1	0	0	48.74
4	1	0	0	-1	52.41
5	0	-1	0	1	42.87
6	0	-1	-1	0	44.64
7	0	0	1	-1	59.70
8	1	0	1	0	59.90
9	0	1	0	1	55.91
10	-1	-1	0	0	44.06
11	0	0	0	0	59.57
12	0	0	1	1	58.64
13	1	0	-1	0	47.79

续表 2

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	大豆多肽得率/%
14	0	-1	0	-1	50.60
15	0	-1	1	0	58.20
16	0	1	-1	0	52.45
17	0	0	0	0	56.51
18	-1	1	0	0	51.63
19	0	1	1	0	55.78
20	0	0	-1	1	40.39
21	0	1	0	-1	52.19
22	1	-1	0	0	52.98
23	0	0	-1	-1	51.42
24	-1	0	-1	0	39.91
25	0	0	0	0	61.73
26	0	0	0	0	62.78
27	1	0	0	1	50.78
28	0	0	0	0	59.63
29	-1	0	0	-1	49.22

使用 Design Expert 7.0 软件,对表 2 数据进行处理、分析,利用软件进行非线性回归的二次多项式拟合,得到回归方程为: $Y = 60.04 + 2.27X_1 + 1.95X_2 + 5.75X_3 - 1.65X_4 - 2.95X_1X_2 - 0.34X_1X_3 + 0.12X_1X_4 - 2.56X_2X_3 + 2.86X_2X_4 + 2.49X_3X_4 - 6.15X_1^2 - 4.63X_2^2 - 3.11X_3^2 - 4.48X_4^2$ 。对模型方程进行方差分析,结果见表 3。

表 3 方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	1 042.019	14	74.430	12.790	<0.000 1	***
$X_1$	62.108	1	62.108	10.673	0.005 6	**
$X_2$	45.435	1	45.435	7.808	0.014 3	*
$X_3$	396.635	1	396.635	68.158	<0.000 1	***
$X_4$	32.802	1	32.802	5.637	0.032 4	*
$X_1X_2$	34.869	1	34.869	5.992	0.028 2	*
$X_1X_3$	0.456	1	0.456	0.078	0.783 7	
$X_1X_4$	0.058	1	0.058	0.010	0.922 2	
$X_2X_3$	26.163	1	26.163	4.496	0.052 3	
$X_2X_4$	32.776	1	32.776	5.632	0.032 5	*
$X_3X_4$	24.850	1	24.850	4.270	0.057 8	
$X_1^2$	245.062	1	245.062	42.111	<0.000 1	***
$X_2^2$	138.920	1	138.920	23.872	0.000 2	**
$X_3^2$	62.751	1	62.751	10.783	0.005 4	**
$X_4^2$	130.133	1	130.133	22.362	0.000 3	**
残差	81.471	14	5.819			
失拟项	58.258	10	5.826	1.004	0.546 7	
纯误差	23.210	4	5.802			
总和	1 123.490	28				

注:\*\*\* 差异极度显著( $P < 0.000 1$ ); \*\* 差异高度显著( $0.000 1 \leq P < 0.01$ ); \* 差异显著( $0.01 \leq P < 0.05$ )。



从表 3 可以看出,该模型回归极度显著( $P < 0.0001$ ),失拟项不显著,且  $R^2 = 0.93$ ,  $R_{adj}^2 = 0.855$ ,说明该模型与实际拟合度较好,自变参数与响应值之间关系显著,因此可以用于复合酶酶解制备大豆多肽的工艺预测。根据  $F$  检验可以得到各个因素影响的大小顺序为  $X_3 > X_1 > X_2 > X_4$ ,即酶解温度  $>$  复合酶添加量  $>$  酶解时间  $>$  酶解 pH。

$X_3$ 、 $X_1^2$  的偏回归系数差异极度显著; $X_1$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$ 、 $X_4^2$  的偏回归系数差异高度显著, $X_2$ 、 $X_4$ 、 $X_1X_2$ 、 $X_2X_4$  的偏回归系数差异显著,说明因素之间存在交互作用,因素对响应值不是简单的线性关系,复合酶添加量与酶解时间的交互作用显著;酶解 pH 与酶解时间的交互作用显著。

#### 2.4.2 最佳制备条件的确定

使用 Design Expert 7.0 软件,对拟合的回归方程进行计算,得出复合酶酶解制备大豆多肽的最佳条件为复合酶添加量 2.04%、酶解时间 3.99 h、酶解温度 59.3 °C、酶解 pH 8.02,此条件下大豆多肽得率为 62.86%。考虑实际操作,选择复合酶添加量 2.04%、酶解时间 4.0 h、酶解温度 59 °C、酶解 pH 8.0,经验证实验得大豆多肽得率为 63.27%,与预测值相比,其相对误差为 0.65%,说明实验优化得到的技术参数是可靠的。

#### 2.5 相对分子质量分布

将上述最佳条件下得到的大豆多肽进行相对分子质量分布测定,结果如图 7 所示。从图 7 可以看出,大豆多肽相对分子质量大部分集中在 1 000 以下。

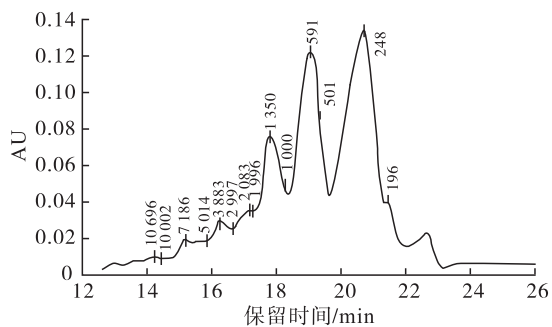


图 7 大豆多肽相对分子质量分布

### 3 结论

本文采用超声辅助复合酶酶解制备大豆多肽,通过单因素实验以及响应面分析法对其制备工艺进行优化。结果表明,影响大豆多肽得率的各因素强弱顺序为:酶解温度  $>$  复合酶添加量  $>$  酶解时间  $>$  酶解 pH。超声辅助复合酶酶解制备大豆多肽的最

佳工艺条件为超声功率 180 W、超声时间 10 min、超声温度 35 °C、碱性蛋白酶与中性蛋白酶质量比 3:1、复合酶添加量 2.04%、酶解时间 4.0 h、酶解温度 59 °C、酶解 pH 8.0,在此条件下经验证实验得到大豆多肽得率为 63.27%,与预测值 62.86% 相比,其相对误差为 0.65%,说明实验优化得到的工艺参数是可靠的。将最佳条件下得到的大豆多肽进行相对分子质量分布测定,结果表明其相对分子质量大部分集中在 1 000 以下。

#### 参考文献:

- [1] 李善仁,陈济琛,胡开辉,等.大豆肽的研究进展[J].中国粮油学报,2009,24(7):142-147.
- [2] YIMIT D, HOXUR P, AMAT N, et al. Effects of soybean peptide on immune function, brain function, and neurochemistry in healthy volunteers [J]. Nutrition, 2012, 28(2):154.
- [3] 周媛媛,周瑞宝.大豆多肽的分离纯化与抗氧化活性研究[J].中国油脂,2008,33(5):34-36.
- [4] 姚小飞,石慧.大豆多肽的功能特性及其开发应用进展[J].中国食物与营养,2009(7):21-24.
- [5] 邓成萍,薛文通,孙晓琳,等.双酶水解制备大豆多肽的研究[J].粮油食品科技,2006,14(1):23-24.
- [6] 张连慧,贺寅,刘新旗.大豆肽的研究进展及其发展前景[J].食品工业科技,2012,33(22):406-408.
- [7] 王龙,张少斌.大豆肽的制备及其营养功能研究进展[J].食品研究与开发,2011,32(11):186-188.
- [8] 刘政,胡丽菊,赵丽薇,等.超声波辅助分步酶解法制备大豆肽的研究[J].大豆科学,2013,32(3):402-405.
- [9] 张毅,华欲飞,孔祥珍,等. Alcalase 酶解制备大豆肽工艺条件的优化[J].粮食与食品工业,2009,16(6):40-44.
- [10] 胡爱军,郑捷.超声作用下蛋白酶解产生大豆肽的比较研究[J].食品科技,2005(3):27-30.
- [11] 陈星,李晓磊,吴琼.不同蛋白酶酶解产物活性大豆肽分子量分布状态的研究[J].西南大学学报(自然科学版),2010,32(7):1-7.
- [12] 邹东恢,梁敏,江成英,等.大豆多肽复合酶解及脱色工艺条件优化的研究[J].粮油加工,2007(11):89-92.
- [13] 周川农,刘飞,刘丹怡,等.酶法制备小分子大豆肽的蛋白酶筛选以及酶解条件优化[J].粮油加工(电子版),2014(6):40-42.
- [14] 豆康宁.酶解大豆分离蛋白制取大豆肽及其抗氧化性研究[D].郑州:河南工业大学,2007.
- [15] 丛建民.二次回归通用旋转组合设计酶解法制备大豆肽的研究[J].食品科学,2008,29(5):319-323.
- [16] 薛静玉,陈复生,丁长河,等.用响应面法优化碱性蛋白酶制备生物活性大豆肽的条件[J].河南工业大学学报(自然科学版),2012,33(2):19-24.