

超声波辅助酶法制备大豆抗氧化肽

刘莹¹,刘政¹,赵杰²,许琳²

(1. 辽宁工程技术大学 理学院,辽宁 阜新 123000; 2. 辽宁工程技术大学 材料学院,辽宁 阜新 123000)

摘要:以大豆分离蛋白为底物,利用碱性蛋白酶和胰蛋白酶酶解大豆蛋白制取大豆抗氧化肽。以还原力为指标,探讨了酶解制取大豆抗氧化肽的最佳工艺,并研究了超声波对酶解制取大豆抗氧化肽的影响。结果表明:超声波处理能提高大豆蛋白的还原力,并且在超声波和双酶同时处理条件下,最佳条件为底物浓度 5%,pH9.0,温度 50℃,时间 5 h。在该条件下,酶解液的吸光度为 0.124。

关键词:大豆分离蛋白;大豆抗氧化肽;超声波辅助;水解度;还原力

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2014)02-0281-03

Preparation of Soybean Antioxidant Peptide by Ultrasonic-assisted Enzymatic Method

LIU Ying¹, LIU Zheng¹, ZHAO Jie², XU Lin²

(1. College of Science, Liaoning Technical University, Fuxin 123000, China; 2. College of Material, Liaoning Technical University, Fuxin 123000, China)

Abstract: In this experiment, using isolated soybean protein as substrate, the alkaline protease and trypsin were used to hydrolyze soybean protein to prepare soybean antioxidant peptide. Taking reducing power as an indicator, the optimum of the preparation of soybean antioxidant by the enzymatic method was discussed, at the same time the impact of ultrasound on the preparation of the soybean antioxidant peptide by the enzymatic method was studied. The results showed ultrasonic could increase the reducing power of soybean protein, and under the condition of double enzymes and ultrasonic simultaneously, optimal conditions was reaction at pH9.0, 50℃ for 5 h with substrate concentration of 5%. In this condition, the absorbance was 0.124.

Key words: Soybean isolated protein; Soybean antioxidant peptide; Ultrasonic-assisted; Hydrolysis level; Reducing power

大豆抗氧化肽是大豆分离蛋白经蛋白酶作用后,再经特殊处理而得到的蛋白质水解产物,它可以有效改善原料蛋白的各项理化特性。大豆抗氧化肽易于被人体吸收、有较好的酸热稳定性和水溶性等物理特性^[1]。1975年日本学者山口直彦等在 Bishov 和 Henick 的研究基础上利用酶水解方法对大豆分离蛋白进行部分水解,对水解物进行色谱分离,并测定了各分离组分的抗氧化能力。我国雷鸣等^[2]对大豆抗氧化肽进行了研究,发现并不是水解度越高水解产物的抗氧化性就越强。本试验以抗氧化性为指标,研究了大豆分离蛋白经超声波预处理后,碱性蛋白酶和胰蛋白酶双酶酶解制备大豆抗氧化肽的最佳酶解工艺参数。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆分离蛋白:实验室自制,蛋白含量为 85.1%,总氮含量为 13.62%。

碱性蛋白酶、胰蛋白酶、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氢氧化钠、浓盐酸、浓硫酸、无水碳酸钠、硼酸、无水乙醇、邻苯二甲酸氢钾、甲醛、甲基红、溴甲酚

绿、冰醋酸、六氰合铁酸钾、三氯化铁均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

C型气流烘干机(河南省予华仪器有限公司), JYC-19BE2 电磁炉(山东九阳小家电有限公司), KDN-08 消化炉(上海新嘉电子有限公司),高速冷冻离心机 KDC-169HR(科大创新股份有限公司中佳分公司),752 紫外可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司),电子恒温不锈钢水浴锅 DZKW-4(上海路达实验仪器有限公司),85-2 数显磁力搅拌器(金坛市荣华仪器制造有限公司),Scientz-12N 冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司),JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),pHS-3C 精密 pH 计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆蛋白加热预处理 称取适量的大豆分离蛋白,按底物浓度 5% 加入一定量的蒸馏水于烧杯中,缓慢搅拌至蛋白均匀分散于水中,然后放入恒温水浴锅中,调节温度为 90℃,恒温搅拌 10 min。然后将大豆分离蛋白溶液冷却到 50℃,备用。

1.3.2 大豆蛋白超声预处理 称取适量的大豆分

离蛋白,按底物浓度 5% 加入一定量的蒸馏水,搅拌,利用超声波(功率 900 W,超声 4 s,间歇 2 s,温度 50℃,时间 20 min)对其进行超声预处理,保存备用。

1.3.3 酶解液处理 大豆蛋白酶解完成后,在 90℃ 水浴锅中灭酶 10 min,灭酶后 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,低温保存,以供还原力测定^[3]。

1.3.4 分光光度测还原力 取 2.5 mL 样品溶液于试管中,依次加入 0.2 mol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲溶液(pH6.6) 2.5 mL 和 1% 的六氰合铁酸钾溶液 2.5 mL 放入水浴锅中,50℃ 条件下恒温反应 20 min,冷却,加入 10% 的醋酸溶液 2.5 mL,混合均匀,3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取 2.5 mL 上清液,依次加入蒸馏水 2.5 mL、0.1% 的三氯化铁溶液 0.5 mL,振荡混匀,暗光下静置 10 min,利用分光光度计在 700 nm 下测定溶液的吸光度 A(以蒸馏水作对比),吸光度值与溶液的还原力成正比,即吸光度值越大,溶液的还原力越大^[4]。

2 结果与分析

2.1 最佳酶配比与酶用量的确定

2.1.1 最佳酶配比 在酶用量 6%、酶解温度 50℃、溶液初始 pH9、反应时间 5 h 的条件下,考察酶配比(碱性蛋白酶:胰蛋白酶)对还原力的影响。

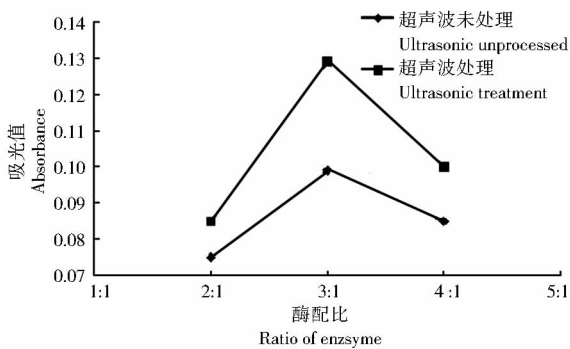


图 1 酶比对还原力的影响

Fig.1 The effect of the ratio of enzyme on reducing power

由图 1 可以看出,超声波处理大豆分离蛋白的还原力总是优于未超声波处理的大豆分离蛋白,且当酶配比为 3:1 时,超声波处理与否的还原力均达到最大值。所以,最佳酶配比为 3:1。

2.1.2 最佳酶用量 在酶配比为 3:1,酶解温度为 50℃,溶液初始 pH 为 9 的条件下,研究了酶用量对还原力的影响。

由图 2 可知,随着酶用量的增大,超声波处理与未超声波处理的还原力均随之增大,且超声波处理的大豆分离蛋白的还原力总是优于未超声波处理。当酶用量小于 6% 时,还原力增大迅速;当酶用量超

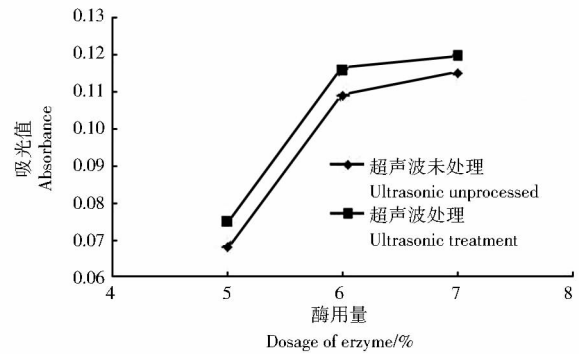


图 2 酶用量对还原力的影响

Fig.2 The effect of enzyme dosage on reducing power

过 6% 时,还原力上升缓慢。从成本考虑,酶用量为 6% 为最佳酶用量。

2.2 最佳酶解工艺条件单因素分析

2.2.1 底物浓度 在酶解温度为 50℃,溶液初始 pH 为 9,酶配比为 3:1,酶用量为 6% 的条件下,研究底物浓度对还原力的影响。

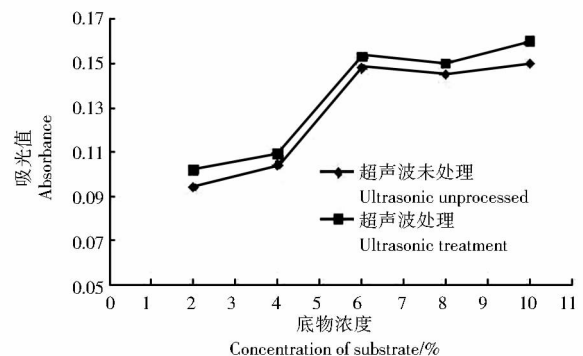


图 3 底物浓度对还原力的影响

Fig.3 The effect of substrate concentration on reducing power

由图 3 可知,随着底物浓度的增大,超声波处理与未超声波处理的还原力均随之增大,且超声波处理的大豆分离蛋白的还原力总是优于未超声波处理。当底物浓度小于 6% 时,还原力迅速升高;当底物浓度超过 6% 时,还原力上升缓慢。因此,最佳底物浓度为 6%。

2.2.2 初始 pH 在酶配比为 3:1,酶用量为 6%,底物浓度为 6%,酶解温度为 50℃ 的条件下,研究溶液初始 pH 对还原力的影响。

由图 4 可知,超声波处理的大豆分离蛋白的还原力总是优越于未超声波处理的大豆分离蛋白,且均随 pH 的增大,呈先增后减的趋,因此,最佳的初始 pH 为 9。

2.2.3 酶解温度 在酶配比为 3:1,酶用量为 6%,溶液初始 pH 为 9,底物浓度为 6% 的条件下,研究酶解温度对还原力的影响。

由图 5 可知,超声波处理的大豆分离蛋白的还原力总是优越于未超声波处理的大豆分离蛋白,且

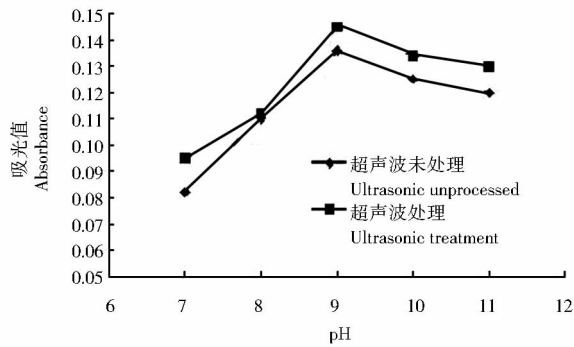


图 4 pH 对还原力的影响
Fig. 4 The effect of the pH on reducing power

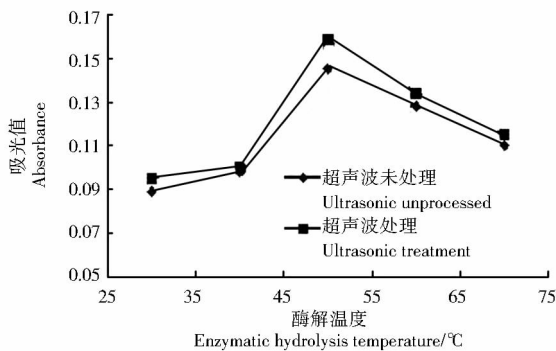


图 5 酶解温度对还原力的影响
Fig. 5 The effect of enzymatic hydrolysis temperature on reducing power

随酶解温度的升高而先增加后减少。当酶解温度为 50℃ 时,超声波处理与否两种处理的还原力达到最大值。因此,最佳的酶解温度为 50℃。

2.2.4 酶解时间 在酶配比为 3 : 1,酶用量为 6%,酶解温度为 50℃,底物浓度为 6%,溶液初始 pH 为 9 的条件下,研究酶解时间对还原力的影响。

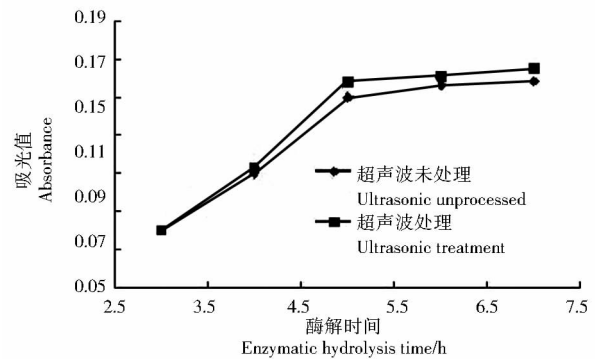


图 6 酶解时间对还原力的影响
Fig. 6 The effect of enzymatic hydrolysis time on reducing power

由图 6 可知,在整个酶解过程中,超声波处理的大豆分离蛋白的水解度总是优越于未超声波处理的大豆分离蛋白。还原力随着酶解时间的加长,不断增大,增大趋势随着时间的推移逐渐减小。因此,最佳酶解时间确定为 5 h。

2.3 正交试验

利用超声波(功率 900 W,超声 4 s,间歇 2 s,温度 50℃,时间 20 min)对材料进行预处理。以底物浓度、pH、酶解温度、酶解时间 4 个因素进行 L₉(3⁴) 正交试验,以确定大豆抗氧化肽制备的最佳工艺参数。

表 1 正交试验结果

Table 1 Orthogonal experimental results calculation and analysis

试验号 No.	因素 Levels				还原力 Reducing power
	A 底物浓度 Substrate concentration/%	B 初始 pH Initial pH	C 酶解温度 Enzymatic hydrolysis temperature/°C	D 酶解时间 Enzymatic hydrolysis time/h	
1	1(5)	1(8)	1(40)	1(4)	0.0838
2	1	2(9)	2(50)	2(5)	0.1198
3	1	3(10)	3(60)	3(6)	0.0838
4	2(6)	1	2	3	0.0910
5	2	2	3	1	0.0838
6	2	3	1	2	0.0918
7	3(7)	1	3	2	0.0880
8	3	2	1	3	0.0883
9	3	3	2	1	0.0978
K ₁	1.149	1.051	1.055	1.061	
K ₂	1.066	1.167	1.234	1.198	
K ₃	1.096	1.093	1.022	1.052	
R	0.02767	0.03867	0.07067	0.04867	

由表 1 可以看出,4 个因素的最优参数组合是 A₁B₂C₂D₂,即底物浓度 5%,初始 pH9、酶解温度

50℃、酶解时间 5 h。按上述条件进行酶解,测得酶解液吸光度为 0.124。

表1 不同氮肥处理对大豆产量及产量性状的影响

Table 1 Effect of N amount on yield and yield traits of soybean

处理 Treatment	单株荚数 Pods per plant	单株粒数 Seeds per plant	百粒重 100-seed weight/g	产量 Yield/kg·hm ⁻²
N0	34.4 b	83.6 bc	14.96 b	2419.5 c
N1	35.3 ab	85.1 b	15.65 b	2643.9 b
N2	36.7 a	87.8 a	16.87 a	2734.2 a
N3	33.5 bc	74.8 c	13.42 c	2241.3 d

同列后不同小写字母代表0.05水平差异显著。

Values within a column followed by different lowercase letters are significantly different at 0.05 probability level.

3 结论

氮肥的施用能增加土壤中细菌、真菌和放线菌的数量,且随着生育时期的推进,数量增加明显。随着氮素水平的增加,大豆产量性状及产量均呈先增加后下降的趋势,以60 kg·hm⁻²处理的产量最高且产量性状表现最好。说明氮素水平过低,不能满足大豆生长的需求,产量较低,而氮素水平过高,抑制了大豆的固氮作用,也不利于获得较高产量。

参考文献

- [1] Martin A. Introduction to soil microbiology [M]. New York: John Wiley & Sons Publishing, 1964:19-44.
- [2] Jenkinson D S, Ladd J N. Microbial biomass in soil; Measurement and turnover [J]. Soil Biochemistry, 1981, 5:415-471.
- [3] Doran J W. Defining soil quality for a sustainable environment [M]. Wisconsin: Soil Science Society of America, 1994:267.
- [4] Abbott L K, Murphy D V. Soil biological fertility [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003.
- [5] Krishnamoorthy K K. Review of soil research in India [M]. New Delhi: Indian Council Agricultural Research, 1982.
- [6] 孙瑞莲, 朱鲁生, 赵秉强, 等. 长期施肥对土壤微生物的影响及其在养分调控中的作用 [J]. 应用生态学报, 2004, 15 (10): 1907-1910. (Sun R L, Zhu L S, Zhao B Q, et al. Effects of long-term fertilization on soil microorganism and its role in adjusting and controlling soil fertility [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15 (10): 1907-1910.)

- [7] 许仁良, 王建峰, 张国良, 等. 秸秆、有机肥及氮肥配合使用对水稻土微生物和有机质含量的影响 [J]. 生态学报, 2010, 30 (13): 3584-3590. (Xu R L, Wang J F, Zhang G L, et al. Changes of microbe and organic matter content in paddy soil applied with straw manure and nitrogen fertilizer [J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, 30 (13): 3584-3590.)
- [8] 胡可, 李华兴, 卢维盛, 等. 生物有机肥对土壤微生物活性的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2010, 18 (2): 303-306. (Hu K, Li H X, Lu W S, et al. Effect of microbial organic fertilizer application on soil microbial activity [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2010, 18 (2): 303-306.)
- [9] 徐晶, 陈婉华, 孙瑞莲, 等. 不同施肥处理对湖南红壤中土壤微生物数量及酶活性的影响 [J]. 土壤肥料, 2003 (5): 8-11. (Xu J, Chen W H, Sun R L, et al. Effects of different fertilization systems on amount of soil microorganism and enzyme activity in red soil of Hunan [J]. Soil and Fertilizer Sciences, 2003 (5): 8-11.)
- [10] 林葆, 林继雄, 李家康. 长期施肥的作物产量和土壤肥力变化 [J]. 植物营养与肥料学报, 1994 (1): 6-18. (Lin B, Lin J X, Li J K. The changes of crop yield and soil fertility with long-term fertilizer application [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 1994 (1): 6-18.)
- [11] 史吉平, 张夫道, 林葆. 长期施肥对土壤有机质及生物学特性的影响 [J]. 土壤肥料, 1998 (3): 7-11. (Shi J P, Zhang F D, Lin B. Effect of long-term fertilization on soil organic matter and biological characteristics [J]. Soil and Fertilizer Sciences, 1998 (3): 7-11.)
- [12] 刘杏兰, 高宗. 有机-无机肥配施的增产效应及对土壤肥力影响的定位研究 [J]. 土壤学报, 1996, 33 (2): 138-147. (Liu X L, Gao Z. Effect of combined application of organic manure and fertilizers on crop yield and soil fertility in a location experiment [J]. Acta Pedologica Sinica, 1996, 33 (2): 138-147.)

(上接第 283 页)

3 结论

大豆抗氧化肽制备中碱性蛋白酶与胰蛋白酶的最佳配比为3:1;经超声波处理的大豆蛋白优于未经超声波处理的大豆蛋白;大豆抗氧化肽制备的最佳工艺参数为:底物浓度5%, pH9.0, 温度50℃, 时间5 h。在该条件下,酶解液的吸光度为0.124。

参考文献

- [1] 裴小平, 唐道邦, 肖更生, 等. 抗氧化肽制备的应用现状及趋势 [J]. 食品工业科技, 2009 (2): 319-322. (Pei X P, Tang D B, Xiao G S, et al. Application status and trends of antioxidative peptide preparation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2009

(2): 319-322.)

- [2] 雷鸣. 大豆多肽抗氧化性的初步研究 [D]. 兰州: 兰州理工大学, 2007. (Lei M. A preliminary study on the antioxidant activity of soybean peptide [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2007.)
- [3] 周存山, 余筱洁, 杨虎清, 等. 混合酶法制备紫菜蛋白降压肽 [J]. 中国食品学报, 2010, 10 (1): 156-160. (Zhou C S, Yu X J, Yang H Q, et al. Preparation of antihypertensive peptides with protein from *Porphyra yezoensis* by multiple enzyme hydrolysis technology [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2010, 10 (1): 156-160.)
- [4] 张春红, 许静. 制备花生抗氧化肽酶解工艺的研究 [J]. 食品工业, 2010 (3): 52-54. (Zhang C H, Xu J. Study on preparation of peanut peptides of enzymatic hydrolysis [J]. The Food Industry, 2010 (3): 52-54.)