

酶解法制备大豆小肽的工艺研究

林洋^{1,3}, 刘再胜², 汲全柱², 单春乔¹, 倪天赫¹, 刘秋晨¹, 王凤忠³, 江国托¹

(1. 大连三仪动物药品有限公司, 辽宁 大连 116036; 2. 辽宁省畜产品安全监察所, 辽宁 沈阳 110003; 3. 中国农业科学院 研究生院, 北京 100081)

摘要:以豆粕为发酵原料,利用复合酶酶解方法制备大豆小肽,筛选碱性、中性蛋白酶和胰蛋白酶进行复配酶解豆粕。结果表明:复合酶的最佳配比为碱性蛋白酶:中性蛋白酶:胰蛋白酶为3:2:1;酶解条件:pH8.5,反应温度50℃,反应时间4.5 h,水解度为94.55%,苦味值为3;小肽显示分子量分布范围:≤1 000 Da 可达74.67%以上,其中≤500 Da 占55.61%以上。综上试验结果可知,对比单酶、双酶及3种酶酶解豆粕的水解度和苦味值两项指标,3种酶组合使用更适用于制备水解度高、苦味低的大豆小肽。

关键词:复合酶;水解度;大豆小肽;制备工艺

中图分类号:S816.3

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2016.05.0824

Preparation Process of Soybean Small-peptide by Enzymatic Hydrolysis

LIN Yang^{1,3}, LIU Zai-sheng², JI Quan-zhu², SHAN Chun-qiao¹, NI Tian-he¹, LIU Qiu-chen¹, WANG Feng-zhong³, JIANG Guo-tuo¹

(1. Dalian Sanyi Animal Pharmaceutical Company Limited, Dalian, 116036; 2. Animal Product Safety Monitoring Institute of Liaoning Province, Shenyang, 110003; 3. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081)

Abstract: The purpose of this study was to investigate the preparation process of soybean small-peptide, soybean meal was used as raw materials in fermentation, and the compound enzyme preparation to conduct enzymolysis by certain proportions, further to improve the development and take advantage of the soybean meal resource. The study screened the alkaline protease, neutral protease and trypsin to conduct enzyme hydrolyzed the soybean meal. The result showed that the optimum ratio of alkaline protease:neutral protease:trypsin was 3:2:1, enzymolysis conditions was pH8.5, reaction temperature 50℃, reaction time 4.5 h, degree of hydrolysis 94.55% and the bitter taste value 3. The distribution range of small-peptide molecular weight: ≤1 000 Da up to more than 74.67%, of which ≤500 Da accounted for more than 55.61%. The test results showed Compared the hydrolysis degree and bitter taste value of single enzyme, double enzymes, and the compound enzymes, combination of three kinds of enzyme was more suitable for the preparation of a high hydrolysis degree and low bitter soybean small-peptide.

Keywords: Compound enzyme; Degree of hydrolysis; Soybean small-peptide; Preparation process

生物活性肽是指具有某些生理活性功能或调节生物机体的生命活动的肽类化合物。若在蛋白质的长链中一般没有活性,可通过采用生物技术手段,如酶解成适当的肽链长度,才能发挥出其生理活性^[1]。主要功能包括低抗原性、阻止胆固醇水平升高和降压作用^[2-4]、抗氧化作用、减肥作用、抗疲劳作用^[5-6]、促进消化吸收、调节血糖浓度的作用等功能。

蛋白质的水解有酸碱水解法、微生物发酵法及蛋白酶水解法等多种方式。酸碱水解法即强酸或强碱水解,方式简单、产物价格便宜,但反应条件不够温和,蛋白水解率不易控制,并且容易破坏产品中氨基酸。微生物发酵法虽然利用廉价的微生物进行反应发酵,但由于微生物的生长速度缓慢,生长条件要求严格,发酵时间较长,酸碱度不易控制,

产品成分复杂,分离纯化较困难,尤其发酵设备的设计和制造成本高,大规模生产还有一定的困难^[7]。蛋白酶水解法具有反应高效、简易、可控,反应条件不剧烈,使氨基酸成分稳定、不易发生消旋反应,并且反应产物容易纯化的特点^[8-9],Per 和 Mc-neil 等^[10-11]做了 Alcalase 和 Netrase 双酶分步水解制备大豆肽的研究。

目前国内对大豆蛋白质水解制备大豆肽的最佳方式是利用蛋白酶水解法,相对酸碱水解法等其他方法更容易控制,效果明显^[12-13]。因此本文通过研究大豆小肽的制备工艺,以豆粕为发酵原料,探索复合酶最佳配比,优化生产工艺,降低成本,提高水解度,并解决苦味的问题,为实际生产要求提供数据支持。

收稿日期:2016-04-08

第一作者简介:林洋(1984-),男,硕士,工程师,主要从事食品安全与加工研究。E-mail:linyangle1984@yeah.net。

通讯作者:江国托(1966-),男,教授,博导,主要从事动物药品研发研究。E-mail:jgt600@sina.com。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

试验用饲用豆粕购自赣榆县连香花生油厂,碱性蛋白酶购自南宁庞博生物有限公司,中性蛋白酶购自南宁东恒华道生物科技有限公司,胰蛋白酶购自济南亚康力诺生物工程有限公司,其它化学试剂均为分析纯。

主要仪器设备有 BS210S 电子天平(北京泰克仪器有限公司);DL-6M 大容量低速冷冻离心机(塞特湘仪离心机仪器有限公司);K9840 型自动凯氏定氮仪和消化炉(济南海能仪器有限公司);PHS-3C 精密 PH 计(上海虹益仪器仪表有限公司);THZ-25 大容量恒温振荡器(太仓市华美生化仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 大豆小肽制备方法 以低温豆粕为蛋白来源,通过酶制剂水解技术制成大豆小肽,技术路线如下:称取大豆豆粕→按照一定固液比与水混合→预处理后溶液→调至最适温度、pH→加酶水解→85℃,10 min 水浴灭酶→4 000 r·min⁻¹,20 min 离心取上清→测定水解度和苦味值。

1.2.2 蛋白质含量 按照 GB5009.5-2010 凯氏定氮方法测定蛋白质的含量。

1.2.3 水解度(DH) 采用 TCA 法,吸取 10 mL 酶制剂水解上清液加入 10 mL 30% TCA(三氯乙酸)溶液,混匀后振荡,静止 10 min 后,4 000 r·min⁻¹离心 10 min,取离心上清液。测定离心上清液中蛋白质的含量,最终算其水解度^[14](DH):

水解度(%) = TCA 法测定上清中蛋白质含量/上清液中的蛋白质含量 × 100

1.2.4 苦味评价方法 称盐酸奎宁 100 mg 于 95% 乙醇 100 mL 溶液中,吸取 10 mL 用纯净水稀释至 100 mL,配成 1.0 × 10⁻⁴ g·mL⁻¹ 的盐酸奎宁溶液,逐一稀释为浓度 9.0 × 10⁻⁵,8.0 × 10⁻⁵,7.0 × 10⁻⁵,6.0 × 10⁻⁵,5.0 × 10⁻⁵,4.0 × 10⁻⁵,3.0 × 10⁻⁵,2.0 × 10⁻⁵,1.0 × 10⁻⁵,其苦味值分别定为 10 ~ 1。将大豆水解液依次与各浓度的盐酸奎宁对比,确定其苦味值^[15]。

1.2.5 大豆小肽分子量的分布范围测定 按照 GB/T 22729-2008 中高效凝胶过滤色谱进行测定,大豆小肽分子量分布的测定委托江南大学分析测试中心进行检测。

1.2.6 单一酶制剂水解法 根据酶制剂厂家提供酶制剂的最佳水解条件,对不同厂家的碱性蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶按照其最佳酶解条件进行酶解试验后检测,以水解度和苦味值为指标,选

择最佳水解条件的单一酶制剂。

1.2.7 双酶组合水解法

I. 碱性蛋白酶与中性蛋白酶组合的水解条件:在碱性蛋白酶、中性蛋白酶单酶水解豆粕试验的基础上,加入两种酶制剂的总量为 5 000 U·g⁻¹,进行酶解。以影响双酶水解的加酶比、时间、温度和 pH 为试验因素,利用正交软件设计 L₉(3⁴) 正交试验(表 1),考察指标为水解度和苦味值,最终选择出最适的水解条件。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 The level of orthogonal factors

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	加酶比(碱:中) Enzyme ratio	pH	温度 Temperature/°C	时间 Time/h
1	1:1	8.5	45	3.5
2	1:2	9.0	50	4.0
3	2:1	9.5	55	4.5

II. 中性蛋白酶与胰蛋白酶组合的水解条件:在中性蛋白酶、胰蛋白酶单酶水解豆粕试验的基础上,加入两酶总量为 5 000 U·g⁻¹,以影响双酶水解的加酶比、时间、温度和 pH 为试验因素,利用正交软件设计 L₉(3⁴) 正交试验(表 2),以水解度和苦味值为考察指标,最终选择最适的水解条件。

表 2 正交试验因素水平表

Table 2 The level of orthogonal factors

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	加酶比(中:胰) Enzyme ratio	pH	温度 Temperature/°C	时间 Time/h
1	1:1	7.5	40	3.5
2	1:2	8.0	45	4.0
3	2:1	8.5	50	4.5

III. 碱性蛋白酶与胰蛋白酶组合的水解条件:在碱性蛋白酶、胰蛋白酶单酶水解豆粕试验的基础上,加入两种酶总量为 5 000 U·g⁻¹,以影响双酶水解条件的加酶比、pH、温度和时间作为试验因素,设计 L₉(3⁴) 正交试验(表 3),以水解度和苦味值为考察指标,选择最适的双酶水解条件。

表 3 正交试验因素水平表

Table 3 The level of orthogonal factors

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	加酶比(碱:胰) Enzyme ratio	pH	温度 Temperature/°C	时间 Time/h
1	1:1	8.5	45	3.5
2	1:2	9.0	50	4.0
3	2:1	9.5	55	4.5

1.2.8 三种蛋白酶组合水解制备大豆小肽 在碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶单一酶水解和双酶水解试验的基础上,选择将3种蛋白酶共同组合水解豆粕考察水解的效果,加入酶制剂的总量仍取 $5\ 000\ \text{U}\cdot\text{g}^{-1}$,分析影响这3种酶复合水解的条件:加酶比、pH、温度和时间,利用正交软件设计 $L_9(3^4)$ 正交试验(表4),以水解度和苦味值为考察指标,选择水解条件最佳的复合酶。

表4 正交试验因素水平表

Table 4 The level of orthogonal factors

水平 Level	因素 Factor			
	A	B	C	D
	加酶比(碱:中:胰) Enzyme ratio	pH	温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	时间 Time/h
1	1:1:2	8.0	40	3.5
2	1:2:3	8.5	45	4.0
3	3:2:1	9.0	50	4.5

1.3 数据分析

采用正交设计助手 II 共享版(Orthogonal exper-

imental design II V3.1)进行数据处理分析。

2 结果与分析

2.1 单酶水解法试验结果

对采购不同厂家的单一酶制剂逐一进行酶解试验,结果如表5所示,水解度最高的是碱性蛋白酶水解法,但其苦味值也最高,为9;中性蛋白酶的水解度居中,但苦味值最低,为7。

2.2 双酶组合水解法试验结果

2.2.1 碱性蛋白酶与中性蛋白酶双酶组合水解结果 通过对碱性蛋白酶与中性蛋白酶两种酶制剂组合水解豆粕,经 $L_9(3^4)$ 正交试验,测定水解度,结果如表6所示,对该双酶酶解豆粕条件的因素的主次顺序为: $A > D > B > C$,最适的酶解条件为 $A_3B_2C_1D_3$,即碱性蛋白酶:中性蛋白酶为2:1, pH8.5,温度 45°C ,时间4.5 h。对最佳酶解条件进一步进行验证试验,水解度可达90.19%,但是碱性蛋白酶与中性蛋白酶的水解液的缺点是苦味值高,苦味值为5。

表5 单酶水解法试验结果

Table 5 Results of single enzyme digestion experiment

种类 Type	加酶量 Enzyme amount / $\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$	pH	温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	时间 Time/h	水解度 DH/%	苦味值 Bitterness value
碱性蛋白酶 Alkaline protease	10000	10	55	4.5	91	9
中性蛋白酶 Neutral protease	7500	8.0	45	4.5	81	7
胰蛋白酶 Trypsase	7500	8.0	50	4.5	79	8

表6 正交试验结果

Table 6 Results of orthogonal experiment

序号 No.	因素 Factor				水解度 DH/%
	A	B	C	D	
	加酶比(碱:中) Enzyme ratio	pH	温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	时间 Time/h	
1	1	1	1	1	83.00
2	1	2	2	2	85.02
3	1	3	3	3	84.48
4	2	1	2	3	85.25
5	2	2	3	1	82.93
6	2	3	1	2	83.55
7	3	1	3	2	86.57
8	3	2	1	3	90.19
9	3	3	2	1	85.65
K_1	84.17	84.94	85.58	83.86	
K_2	83.91	86.05	85.31	85.05	
K_3	87.47	84.56	84.66	86.64	
R	3.56	1.49	0.92	2.78	

2.2.2 中性蛋白酶与胰蛋白酶双酶组合水解结果

中性蛋白酶与胰蛋白酶双酶组合水解豆粕后,经 $L_9(3^4)$ 正交试验,测定水解度,结果表明此双酶组合水解大豆粕条件的影响因素的主次顺序为:C > D

> B > A,则最佳的酶解条件为 $A_1B_3C_3D_3$ (表 7),即中性蛋白酶:胰蛋白酶为 1:1, pH8.5,反应温度为 50℃,反应时间为 4.5 h,进一步进行验证性试验,水解度为 87.67%,苦味值为 4。

表 7 正交试验结果

Table 7 Results of orthogonal experiment

序号 No.	因素 Factor				水解度 DH/%
	A	B	C	D	
	加酶比(中:胰) Enzyme ratio	pH	温度 Temperature/℃	时间 Time/h	
1	1	1	1	1	78.52
2	1	2	2	2	82.95
3	1	3	3	3	87.67
4	2	1	2	3	81.26
5	2	2	3	1	84.04
6	2	3	1	2	82.62
7	3	1	3	2	83.42
8	3	2	1	3	82.57
9	3	3	2	1	80.67
K_1	83.05	81.07	81.24	81.08	
K_2	82.64	83.19	81.63	83.00	
K_3	82.22	83.65	85.04	83.84	
R	0.83	2.59	3.81	2.76	

2.2.3 碱性蛋白酶与胰蛋白酶双酶组合水解结果

碱性蛋白酶与胰蛋白酶双酶组合水解豆粕,经 $L_9(3^4)$ 正交试验,测定水解度,结果表明,此双酶组合酶水解豆粕条件的影响因素的主次顺序为:C > B >

A > D,筛选得到最佳的酶解条件为 $A_3B_2C_1D_2$ (表 8),即碱性蛋白酶:胰蛋白酶为 2:1, pH9.0,温度 45℃,时间 4.0 h。进一步的验证试验结果表明,水解度为 92.50%,苦味值为 5。

表 8 正交试验结果

Table 8 Results of orthogonal experiment

序号 No.	因素 Factor				水解度 DH/%
	A	B	C	D	
	加酶比(碱:胰) Enzyme ratio	pH	温度 Temperature/℃	时间 Time/h	
1	1	1	1	1	88.51
2	1	2	2	2	89.13
3	1	3	3	3	85.47
4	2	1	2	3	86.88
5	2	2	3	1	85.31
6	2	3	1	2	87.59
7	3	1	3	2	87.86
8	3	2	1	3	91.80
9	3	3	2	1	86.32
K_1	87.70	87.75	89.30	86.71	
K_2	86.59	88.75	87.44	88.19	
K_3	88.66	86.46	86.21	88.05	
R	2.07	2.29	3.09	1.48	

2.3 复合酶水解法制备大豆小肽结果

碱性蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶3种酶制剂复合水解豆粕,经 $L_9(3^4)$ 正交试验法,测定水解度,结果表明,3种酶制剂复合水解豆粕条件的影响因素的主次顺序为:A>D>B>C,得出最佳的酶解

条件为 $A_3B_2C_3D_2$ (表9),即碱性蛋白酶:中性蛋白酶:胰蛋白酶的加酶比3:2:1,pH 8.5,温度 50°C ,时间4.0 h。进一步验证试验表明,水解度达94.55%,而苦味值为3。

表9 正交试验结果

Table 9 Results of orthogonal experiment

序号 No.	因素 Factor				水解度 DH/%
	A	B	C	D	
	加酶比(碱:中:胰) Enzyme ratio	pH	温度 Temperature/ $^\circ\text{C}$	时间 Time/h	
1	1	1	1	1	90.09
2	1	2	2	2	92.13
3	1	3	3	3	89.95
4	2	1	2	3	87.31
5	2	2	3	1	88.54
6	2	3	1	2	88.76
7	3	1	3	2	94.07
8	3	2	1	3	93.15
9	3	3	2	1	92.84
K_1	90.72	90.49	90.67	90.49	
K_2	88.20	91.27	90.76	91.65	
K_3	93.35	90.52	90.85	90.14	
R	5.15	0.78	0.19	1.52	

2.4 大豆小肽分子量的分布

酶制剂水解条件的影响因素很多,反应条件如温度、pH和时间,还有底物浓度、加酶比例等因素。通过本研究的探索,确定了酶解的最佳工艺条件,将所制备的大豆小肽样品送往江南大学分析测试

中心进行分子量分布检测,由表10可知,经3种复合酶制剂水解豆粕得出的小肽分子量74.67%在 ≤ 1000 Da,其中 ≤ 500 Da占55.61%以上,表明此种组合酶解条件对豆粕的酶解彻底,达到了小肽的分子量分布范围。

表10 大豆小肽的分子量分布

Table 10 MW-arranged of hydrolyzate of feeding soybean small peptide

分子量范围 Molecular weight range/Da	峰面积 Peak area / %	数均分子量 Number-average Molecular weight	重均分子量 Weight-average Molecular weight
> 10000	1.47	12566	13117
10000 ~ 5000	5.33	6649	6902
5000 ~ 3000	5.13	3923	4004
3000 ~ 2000	3.54	2400	2433
2000 ~ 1000	9.86	1322	1377
1000 ~ 500	19.06	663	690
500 ~ 180	33.86	281	306
< 180	21.75	/	/

3 结 论

通过研究大豆小肽的制备工艺,以豆粕为发酵原料,使用复合酶制剂按一定配比进行酶解,既提高水解度又很好地解决苦味的问题,并且工艺简单符合实际生产要求。确定复合酶的最佳配比为碱性蛋白酶:中性蛋白酶:胰蛋白酶比为3:2:1,酶解条件:pH8.5,反应温度50℃,反应时间4.5 h,水解度为94.55%,苦味值为3。综上试验结果可知,对比单酶、双酶及复合酶酶解豆粕的水解度和苦味值两项指标,3种复合酶组合使用更适合于制备水解度高、苦味低的大豆小肽,小肽显示分子量分布范围: $\leq 1\ 000$ Da 可达74.67%以上,其中 ≤ 500 Da 占55.61%以上,说明酶解比较彻底,达到了小肽的分子量范围,水解效果远远超过了文献报道中的单酶水解效果^[16-17],并且苦味值大大降低,为大豆小肽的制备提供数据支持与参考。

参考文献

- [1] 陈亮. 生物活性肽生产工艺及其生理活性研究[D]. 西安:西北大学,2006. (Chen L. Study on the production and bioactivities research of bioactive peptides[D]. Xi'an: Northwest University, 2006.)
- [2] 胡可心,陈光,孙旸. 大豆肽的功能特性的研究[J]. 酿酒,2004,31(6):33-34. (Hu K X, Chen G, Sun Y. Research of the physiology activity of soy peptide[J]. Liquor Making, 2004, 31(6):33-34.)
- [3] 赵秀娟,王小雪,吴博学,等. 大豆活性肽粉对喂饲高脂饲料大鼠血脂的影响[J]. 中国卫生检验杂志,2002,12(4):421-422. (Zhao X J, Wang X X, Wu B X, et al. The effect on soybean active peptide powder for feeding high-fat feed to the blood lipid of rats[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2002, 12(4):421-422.)
- [4] 李玉珍,林亲录,肖怀秋,等. 大豆多肽特性及其应用研究现状[J]. 中国食品添加剂,2005(6):91-94. (Li Y Z, Lin Q L, Xiao H Q, et al. Properties and application research state of soybean peptides[J]. China Food Additives, 2005(6):91-94.)
- [5] Ishihara K, Matsumoto K, Uohashi R, et al. Effects of soybean peptide on suppression of body fat accumulation during endurance swimming in mice[J]. Report of the Soy Protein Research Committee Japan, 1996, 17:94-97.
- [6] Niiho Y, Yamazaki T, Hosono T, et al. Pharmacological studies on small peptide fraction derived from soybean. The effects of

small peptide fraction derived from soybean on atigue, obesity and Glycemia in mice[J]. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 1993, 113(4):334-342.

- [7] 陈丽娟. 微生物发酵法生产大豆制品的研究[D]. 天津:天津科技大学,2006. (Chen L J. The research on preparation of soybean products by microorganism fermentation[D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2006.)
- [8] 吴建中,赵谋明,宁正祥,等. 双酶法生产低苦味大豆多肽的研究[J]. 食品工业科技,2002(4):24-27. (Wu J Z, Zhao M M, Ning Z X, et al. The study on preparation the low bitter of soy peptide by double enzymatic[J]. Science and Technology of Food Industry, 2002(4):24-27.)
- [9] 武莹浣. 大豆分离蛋白的碱性蛋白酶酶解条件研究[J]. 中国酿造,2012,31(5):141-143. (Wu Y H. Study on soy protein isolate hydrolysis by alkali protease[J]. China Brewing, 2012, 31(5):141-143.)
- [10] Per M N, Eriksen S, Hansen O R, et al. Method for production of vegetable protein hydrolyzate with protease; US:005716801A [P]. 1998-02-10.
- [11] Mcneil M C. Partially hydrolyzed protein nutrient supplement; US:2003022274 [P]. 2003-01-30.
- [12] 国明明. 大豆多肽的制备及免疫调节作用的研究[D]. 无锡:江南大学,2007. (Guo M M. Study on preparation and immunological regulation of soy peptides[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007.)
- [13] 陶红. 大豆寡肽的制备研究[D]. 长春:中国人民解放军军需大学,2001(11):831. (Tao H. Study on preparation of small peptides from soybean protein[D]. Changchun: Chinese Quartermaster University of PLA, 2001(11):831.)
- [14] Silvestre M P C. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 1997, 60(2):263-271.
- [15] 富校轶,陈武,许慧,等. 大豆功能肽的研究进展[J]. 大豆科技,2008(6):31-33. (Fu X Y, Chen W, Xu H, et al. The research advance on soybean function peptides[J]. Soybean Science & Technology, 2008(6):31-33.)
- [16] 黄雅燕,王文平,肖美添. 碱性蛋白酶水解豆粕制备大豆多肽[J]. 华侨大学学报,2013,34(6):674-677. (Huang Y Y, Wang W P, Xiao M T. Production of soybean peptide by alkaline protease hydrolysis of soybean meal[J]. Journal of Huaqiao University, 2013, 34(6):674-677.)
- [17] 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,2014(6):40-43. (Zhou C N, Liu F, Liu D Y, et al. Enzymatic preparation of small molecule soybean peptide protease screening and conditions optimization of enzymatic hydrolysis[J]. Cereals and Oils Processing, 2014(6):40-43.)