

# 酶水解高温豆粕制备高水解度大豆肽的研究\*

许晶, 江连洲, 李杨, 王金玲

(东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨, 150030)

**摘 要** 采用碱性蛋白酶水解高温豆粕制备高水解度大豆肽,通过单因素和响应面实验确定酶解高温豆粕的优化条件。以水解度为指标,考察温度、时间、pH、加酶量、底物浓度等因素对水解度的影响。优化的酶解条件为:温度 50℃、时间 5 h、pH 8.60、加酶量 17 700 U/g 底物、底物浓度 10.25%,该条件下得到大豆肽的水解度为 37.20%。

**关键词** 酶解,高温豆粕,大豆肽,响应面分析

高温豆粕是由大豆浸油后,经高温脱溶所得。豆粕中约含 45%~50% 的蛋白质,以及 10%~15% 的低聚糖、20%~25% 的多糖和纤维素,有很高的开发和利用价值<sup>[1]</sup>。由于高温豆粕蛋白质几乎全部变性,用物理方法很难分离出食用蛋白。目前高温豆粕主要用作饲料,在食品上的应用极少,只限于酿造食品<sup>[2]</sup>。酶水解豆粕是利用现代生物技术将大豆蛋白通过蛋白酶酶解为可溶性蛋白和小分子多肽的混合物。

大豆肽是以大豆蛋白为原料经蛋白酶水解并通过分离、精制所得的,通常由 3~6 个氨基酸组成的,相对分子质量低于 10 000u 的肽类混合物<sup>[3]</sup>。研究表明,大豆肽具有低黏度,良好的稳定性、乳化性、起泡性、保湿性等生理活性及降低血清胆固醇、降血压和促进脂肪代谢等独特的保健功能<sup>[4-6]</sup>;因此大豆肽是更为优质的、新型的大豆深加工产品及营养品,已在食品、医药、日用化工等领域中显示出了诱人的开发应用前景<sup>[7]</sup>。

为了提高大豆蛋白资源的利用率,降低大豆肽的生产成本,提高大豆肽的水解度,获得具有高溶解度、低黏度等优良加工特性的大豆肽,本研究以高温豆粕为原料,采用碱性蛋白酶水解豆粕粉,通过单因素和响应面实验<sup>[8]</sup>,系统地分析制备高水解度大豆肽的最佳酶解条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

第一作者:在读博士研究生,讲师(江连洲为通讯作者)。

\* 黑龙江省杰出青年科学基金(项目编号:C01040101)

收稿日期:2008-12-22

高温豆粕:黑龙江省九三油脂有限公司;碱性蛋白酶:丹麦诺维信公司;其它试剂:均为国产分析纯试剂。

电热恒温水浴锅:天津市泰斯特仪器有限公司;电动搅拌器:江苏省金坛市金城国胜实验仪器厂;PHS-3C 精密 pH 计:上海雷磁仪器厂;TU1901 双光束紫外可见分光光度计:北京普析通用仪器有限责任公司;Anke TDL80-2B 离心机:上海安亭科学仪器厂制造;LNK-871 型凯氏定氮仪:江苏省宜兴市科教仪器研究所。

### 1.2 测定方法

粗蛋白含量测定:按照 GB/T5009.5-2003 方法测定;粗纤维测定:按照 GB/T5009.10-2003 方法测定;粗脂肪测定:按照 GB/T5009.6-2003 方法测定;水分测定:按照 GB/T5009.3-2003 方法测定;灰分测定:按照 GB/T5009.4-2003 方法测定;总糖测定:按照蒽酮法进行;酶活力测定:按照福林-酚法进行;水解度(DH)测定:pH-stat 法<sup>[9]</sup>。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 样品及其制备

将高温豆粕粉碎过 40 目筛,备用。

#### 1.3.2 碱性蛋白酶水解高温豆粕工艺流程

过 40 目筛样品→加碱性蛋白酶→用 NaOH 调 pH 进行水解→酶解液→加热灭酶活→离心分离→大豆肽水解液<sup>[10]</sup>。

#### 1.3.3 操作方法

按照一定的底物浓度准确称取高温豆粕于水解反应器中,加入适量蒸馏水,搅拌至底物均匀分散于水中。用 1.00 mol/L 的 NaOH 调节溶液酸碱度至所要求的 pH,根据所用酶的活力单位,准确量取碱性蛋白酶后加入水解反应器,并慢慢搅拌。反应过程中及

时加入 1.00 mol/L 的 NaOH,使系统保持在要求的 pH。反应到预定时间,即停止加热搅拌,迅速升温到 90℃,灭酶活 10 min。冷却,4 000 r/min 离心 15 min,过滤,所得滤液为大豆肽水解液。记录水解过程消耗的碱液量,以此计算水解度。

2 结果与讨论

2.1 高温豆粕成分和酶活力的测定

经实验测得高温豆粕的成分为:粗蛋白 46.60%,粗纤维 3.49%,粗脂肪 1.02%,水分 11.10%,灰分 4.03%,总糖 32.78%。碱性蛋白酶酶活力为 120 000 U/mL。

2.2 碱性蛋白酶水解高温豆粕单因素实验

2.2.1 水解温度对水解度的影响

配制底物浓度为 8% 的高温豆粕溶液,控制溶液 pH 为 8.5,加酶量为 19 200 U/g(底物),水解时间 4h 的条件下,选取水解温度 45℃、50℃、55℃、60℃、65℃进行实验,结果如图 1。由图 1 可知,45~55℃,水解度增加较大;55~65℃,温度对水解度的影响不是很显著。

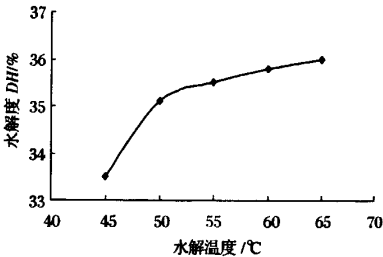


图 1 水解温度对水解度的影响

2.2.2 水解时间对水解度的影响

配制底物浓度为 8% 的高温豆粕溶液,控制溶液 pH 为 8.5,加酶量为 19 200 U/g 底物,温度 55℃条件下,分别水解 1h、2h、3h、4h、5h,结果如图 2。

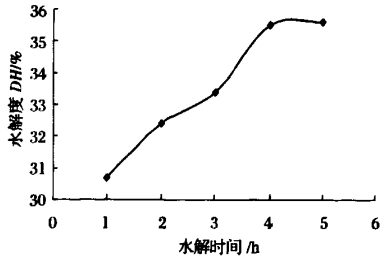


图 2 水解时间对水解度的影响

从图 2 可以看出,随着水解时间的增加,高温豆

粕的水解度也随之增加,当时间为 4h 时,水解度基本趋于稳定。

2.2.3 pH 对水解度的影响

pH 对酶的活力和底物蛋白的解离有影响,从而可直接影响酶与豆粕的水解反应。在底物浓度为 8%,加酶量为 19 200 U/g(底物),水解时间 4h,温度 55℃的条件下,控制水解液 pH 分别为 7.5、8、8.5、9、9.5、10,结果如图 3。从图 3 可以看出,pH 为 8.5 时,大豆肽水解液的水解度最高。

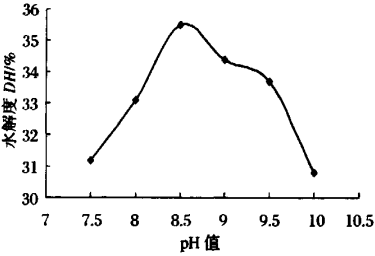


图 3 pH 对水解度的影响

2.2.4 加酶量对水解度的影响

配制底物浓度为 8% 的高温豆粕溶液,控制溶液 pH 为 8.5,水解时间 4h,温度 55℃,分别按酶和底物之比为 4 800、9 600、14 400、19 200、24 000 U/g(底物)加入不同量的碱性蛋白酶进行水解,结果见图 4。随着加酶量的增加,水解度不断提高,在加酶量为 19 200 U/g 底物时,水解度基本不变。

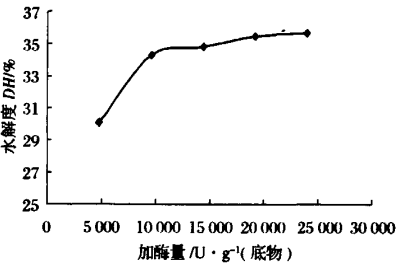


图 4 加酶量对水解度的影响

2.2.5 底物浓度对水解度的影响

在 pH 为 8.5,加酶量为 19 200 U/g(底物),水解时间 4h,温度 55℃的条件下,分别配制 4%、6%、8%、10%、12%、14% 的高温豆粕溶液进行酶解,结果如图 5。在底物浓度为 8% 时,所得大豆肽水解液具有最高的水解度。随着底物浓度进一步提高,溶液中固形物含量增大,流动性减弱,酶与底物接触的机会减少,水解度逐渐下降。

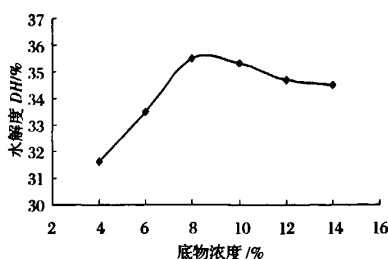


图5 底物浓度对水解度的影响

### 2.3 响应面分析法确定最佳酶水解条件

为得到高水解度的大豆肽,获得碱性蛋白酶水解高温豆粕的最佳工艺参数,在单因素实验的基础上,以水解温度、时间、pH、加酶量和底物浓度5个因素为自变量,大豆肽的水解度为响应值,设计5因素5水平的二次回归方程来拟合因素和指标(响应值)之间的函数关系,采用响应面分析法来寻求酶解最优工艺参数<sup>[11]</sup>。其实验因素水平选取见表1,实验方案与结果见表2。

表1 实验因素水平编码表

因素/水平	-2	-1	0	1	2
$X_1$ 温度/℃	45	50	55	60	65
$X_2$ 时间/h	1	2	3	4	5
$X_3$ pH	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5
$X_4$ 加酶量 /U · g <sup>-1</sup> (底物)	4 800	9 600	14 400	19 200	24 000
$X_5$ 底物浓度/%	6	8	10	12	14

表2 实验方案与结果

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	Y 水解度/%
1	-1	-1	-1	-1	1	18.26
2	-1	-1	-1	1	-1	38.68
3	-1	-1	1	-1	-1	20.99
4	-1	-1	1	1	1	27.61
5	-1	1	-1	-1	-1	40.36
6	-1	1	-1	1	1	30.89
7	-1	1	1	-1	1	37.28
8	-1	1	1	1	-1	32.39
9	1	-1	-1	-1	-1	35.45
10	1	-1	-1	1	1	31.07
11	1	-1	1	-1	1	36.28
12	1	-1	1	1	-1	37.23
13	1	1	-1	-1	1	34.87
14	1	1	-1	1	-1	28.78
15	1	1	1	-1	-1	26.94
16	1	1	1	1	1	40.49
17	-2	0	0	0	0	31.59
18	2	0	0	0	0	34.13
19	0	-2	0	0	0	25.69
20	0	2	0	0	0	32.69

实验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	Y 水解度/%
21	0	0	-2	0	0	28.84
22	0	0	2	0	0	32.75
23	0	0	0	-2	0	28.85
24	0	0	0	2	0	40.90
25	0	0	0	0	-2	32.30
26	0	0	0	0	2	33.93
27	0	0	0	0	0	35.89
28	0	0	0	0	0	36.05
29	0	0	0	0	0	39.99
30	0	0	0	0	0	40.01
31	0	0	0	0	0	35.95
32	0	0	0	0	0	36.03
33	0	0	0	0	0	35.97
34	0	0	0	0	0	36.08
35	0	0	0	0	0	35.98
36	0	0	0	0	0	36.06

以  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$  分别表示温度、时间、pH、加酶量、底物浓度,以  $Y$  表示响应值(水解度)。实验数据经 SAS8.0 软件进行二次回归分析,得到回归方程:

$$Y = 35.506\ 53 + 1.238\ 75X_1 + 1.684\ 583X_2 + 0.361\ 25X_3 + 1.700\ 417X_4 - 0.033\ 75X_5 - 2.770\ 625X_1X_2 + 1.293\ 125X_1X_3 + 2.043\ 125X_1X_5 - 1.679\ 479X_2X_2 - 1.906\ 875X_2X_4 + 2.136\ 875X_2X_5 - 1.278\ 229X_3X_3 + 3.268\ 125X_3X_5$$

通过进行方差分析来验证模型及各参数的显著度见表3。

表3 响应面方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方	F	Pr > F
$X_1$	1	36.83	36.83	8.43	0.010 9
$X_2$	1	68.11	68.11	15.58	0.001 3
$X_3$	1	3.13	3.13	0.72	0.410 6
$X_4$	1	69.39	69.39	15.88	0.001 2
$X_5$	1	0.027	0.027	0.0062	0.938 0
$X_1X_1$	1	18.58	18.58	4.25	0.057 0
$X_1X_2$	1	122.82	122.82	28.10	0.000 1
$X_1X_3$	1	26.75	26.75	6.12	0.025 7
$X_1X_4$	1	4.68	4.68	1.07	0.317 4
$X_1X_5$	1	66.79	66.79	15.28	0.001 4
$X_2X_2$	1	90.26	90.26	20.65	0.000 4
$X_2X_3$	1	0.79	0.79	0.18	0.677 2
$X_2X_4$	1	58.18	58.18	13.31	0.002 4
$X_2X_5$	1	73.06	73.06	16.71	0.001 0
$X_3X_3$	1	52.28	52.28	11.96	0.003 5
$X_3X_4$	1	15.50	15.50	3.55	0.079 2
$X_3X_5$	1	170.89	170.89	39.09	0.000 1
$X_4X_4$	1	2.134	2.134	0.49	0.495 4
$X_4X_5$	1	6.21	6.21	1.42	0.251 7
$X_5X_5$	1	15.60	15.60	3.57	0.078 4
模型	20	902.02	45.10	10.32	0.000 1
失拟项	6	39.95	6.66	2.34	0.121 3

从方差分析可看出,模型  $Pr > F$  小于 0.05,表明该模型是显著的。同时模型中的参数  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_4$ 、 $X_1X_2$ 、 $X_1X_3$ 、 $X_1X_5$ 、 $X_2X_2$ 、 $X_2X_4$ 、 $X_2X_5$ 、 $X_3X_3$ 、 $X_3X_5$  都是显著的 ( $Pr > F$  小于 0.05)。模型失拟项 (Lack of Fit) 表示模型预测值与实际值不拟合的概率<sup>[12]</sup>。表 3 中模型失拟项  $Pr > F$  为 0.121 3 > 0.05。因此,模型失拟项不显著,说明模型中不需要引入更高次数的项,模型选择合适;模型的相关系数  $R^2$  为 0.932 2,大于 0.9,模型拟合程度很好;同时,变异系数 (CV) 值为 6.23,说明模型方程能够很好的反映真实的实验值。所以,可以用该模型来分析响应值的变化。

经过回归分析得出因素水解温度  $X_1$  和水解时间  $X_2$ 、水解温度  $X_1$  和 pH  $X_3$ 、水解温度  $X_1$  和底物浓度  $X_5$ 、水解时间  $X_2$  和加酶量  $X_4$ 、水解时间  $X_2$  和底物浓度  $X_5$  及 pH  $X_3$  和底物浓度  $X_5$  对考察指标水解度交互作用影响显著,故此根据回归方程绘制  $Y=f(X_1, X_2)$ 、 $Y=f(X_1, X_3)$ 、 $Y=f(X_1, X_5)$ 、 $Y=f(X_2, X_4)$ 、 $Y=f(X_2, X_5)$  及  $Y=f(X_3, X_5)$  的响应面 (图 6 ~ 图 11)。

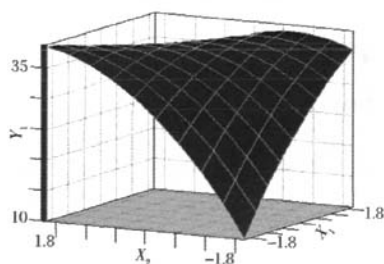


图 6  $Y=f(X_1, X_2)$  的响应面

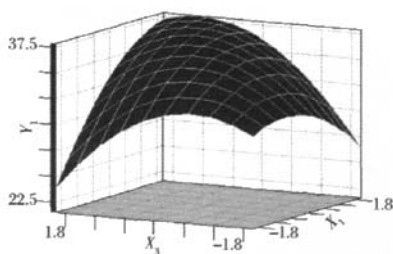


图 7  $Y=f(X_1, X_3)$  的响应面

从响应面分析法,得到水解度预测值最大时的条件:温度 50℃、时间 5 h、pH 8.60、加酶量 17 700 U/g 底物、底物浓度 10.25%,该条件下得到水解度为 37.51% 的大豆肽。

#### 2.4 验证实验

在预测条件下对实验结果进行验证实验,得到大

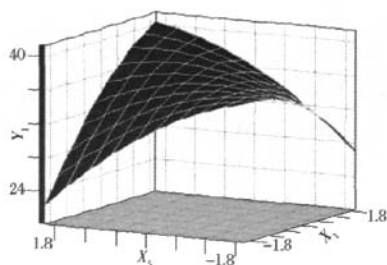


图 8  $Y=f(X_1, X_5)$  的响应面

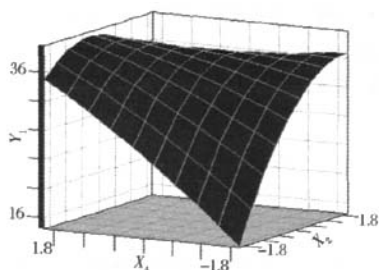


图 9  $Y=f(X_2, X_4)$  的响应面

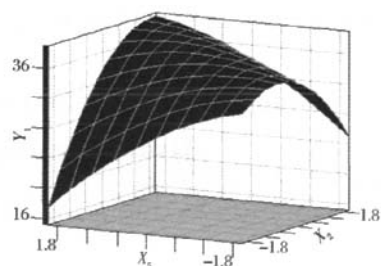


图 10  $Y=f(X_2, X_5)$  的响应面

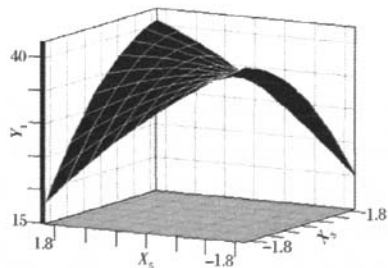


图 11  $Y=f(X_3, X_5)$  的响应面

豆肽的水解度为 37.20%,与回归方程预测值基本吻合,这表明模型是合理有效的。

### 3 结论

高温豆粕富含大豆蛋白,本工艺将豆粕粉碎过筛、进行酶解,制得大豆肽产品。一方面充分利用原料,使豆粕这种廉价物得以充分利用,提高豆粕的附

加值;另一方面可大大提高大豆肽的产率,降低大豆肽成本。通过响应面分析法得出最佳的酶解工艺参数为:温度 50℃、时间 5 h、pH 8.60、加酶量 17 700U/g(底物)、底物浓度 10.25%,在此水解条件下得到大豆肽的水解度为 37.20%。本实验仅是大豆肽的基础研究,本研究结果为在食品工业中生产大豆肽提供了一定理论依据。

#### 参 考 文 献

- 1 张亚丽,徐忠. 变性脱脂豆粕酶解物的特性研究[J]. 中国食品学报,2005,5(4):46~51
- 2 周瑞宝,周兵. 脱脂豆粕的加工和利用[J]. 中国油脂,2001(6):75~78
- 3 Jung S, Lamsal BP. Functionality of soy protein produced by enzyme-assisted extraction [J]. J AOCS,2006, 83(1):71~78
- 4 Hellersteinm. Antimitotic peptide characters from soybean: Rolein protection from cancer[J]. Nutr Rev,1999, 57(11): 359~361
- 5 范宝庆,陈中. 酸溶性酶解大豆蛋白的研究[J]. 广州食品工业科技,2004,20(3):24~25
- 6 Molina Ortiz S E, Anón M C. Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates [J]. J Am Oil Chem Soc,2002,77(12): 1293~1301
- 7 Surowka K, Zmudzinski D, Surowka J. Enzymic modification of extruded soy protein concentrates as a method of obtaining new functional food components[J]. Trends in Food Science & Technology,2004,(15):153~160
- 8 管风波,宋俊梅. 响应面法优化黑曲霉发酵豆粕产大豆多肽发酵条件的研究[J]. 中国调味品,2008(8):40~43
- 9 Jens Adler-Nissen. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins[J]. Journal of Food Engineering,1989,9(2):165~166
- 10 刘芳,王遂. 酶法提取变性脱脂豆粕中蛋白质的研究[J]. 食品科学,2004,25(3):89~92
- 11 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州大学出版社,2002. 135~142
- 12 Rastogi NK, Rashmi KR. Optimisation of enzymatic liquefaction of mango pulp by response surface methodology [J]. Eur Food Res Technol,1999,20:57~62

## Study on Preparation of High-DH Soy Peptides by Enzymatic Hydrolysis High-temperature Soybean Meal

Xu Jing, Jiang Lianzhou, Li Yang, Wang Jinling

(Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**ABSTRACT** The high-temperature soybean meal was hydrolyzed into high-DH soy peptides by Alkaline Protease method. The optimum condition of enzymatic hydrolysis high-temperature soybean meal was determined by the single factor and response surface experiment method. During experiment period, the degree of hydrolysis (DH) was used as an index and the influence of five factors on the degree of hydrolysis were studied. The five factors were Optimized and the optimum conditions were: temperature 50℃, time 5h, pH 8.60, proteases concentration 17 700 U per gram substrate, and substrate concentration 10.25%. Under these conditions, the resulted DH is 37.20%.

**Key words** enzymatic hydrolysis, high-temperature soybean meal, soy peptides, response surface analysis

市场  
动态

### 雪花啤酒销量跃居全球第一

据调研机构 Plato Logic 数据统计,中国雪花超越 Bud Light,成为世界销量第一的啤酒品牌。雪花啤酒由英国 SAB-Miler 与中方华润创业有限公司合资成立,其产品销量在 2008 年增长 19.1%,达到 61 亿 L,远远领先于 Bud Light 与其姊妹品牌——百威。

在销量方面,中国在 21 世纪初已取代美国成为全球最大的啤酒市场,雪花啤酒得益于此亦迅速成长。

Plato 在 2007 年的数据统计中,雪花仅次于 BudLight 位居第二大品牌,领先于百威。据中国华润集团公布该公司 2008 年业绩时表示,雪花系列啤酒占华润-SABMiler 合资公司总销量的 84%。