

# 超声波辅助酶法 制备大豆蛋白抗氧化肽的研究

吴进菊,张凯丽,周海燕,汤尚文

(湖北文理学院化学工程与食品科学学院,湖北襄阳 441053)

**摘要:**采用超声波辅助木瓜蛋白酶水解大豆蛋白的方法制备抗氧化肽。结果表明,大豆蛋白的最佳水解条件如下:90℃预处理 15min,pH 6.5,[E]/[S] 为 7%,超声波处理 30min,65℃水解 3h,水解度可达 19.2%。大豆蛋白肽抗氧化性的高低和水解度的大小没有直接的线性关系,采用此法制备大豆蛋白抗氧化肽的效果较好,具有良好的应用前景。

**关键词:**大豆蛋白肽,抗氧化,超声波,木瓜蛋白酶

## Preparation and antioxidant activity of soybean peptides by ultrasound-assisted enzymatic method

WU Jin-ju,ZHANG Kai-li,ZHOU Hai-yan,TANG Shang-wen

(College of Chemical Engineering and Food Science,Hubei University of Arts and Science,Xiangyang 441053,China)

**Abstract:**Antioxidant peptides were prepared by soybean protein using ultrasound-assisted papain enzymatic method.The optimum hydrolysis conditions of soybean protein were as follows: preliminary treated at 90℃ for 15min,pH 6.5,[E]/[S] 7%,ultrasonic treated for 30min,hydrolysis at 65℃ for 3h,and the hydrolysis degree reached 19.2%.The results investigated that the antioxidant activity and hydrolysis degree didn't have direct linear relation.This method was appropriate for producing soybean antioxidant peptides,which had a broad application prospects.

**Key words:**soybean peptides;antioxidant;ultrasonic wave;papain

中图分类号:TS201.2

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2012)17-0212-04

大豆蛋白肽是大豆蛋白经微生物或酶降解后形成的多肽混合物,分子量大部分在 1000u 以下,易于消化吸收。大豆蛋白肽具有多种生理活性功能,如降血脂、降血压、降低胆固醇、提高机体免疫力、抗氧化、抗疲劳等<sup>[1-4]</sup>,尤其抗氧化性备受人们关注,具有非常广阔的应用前景。目前,用于制备大豆蛋白肽的酶主要有 Alcalase 碱性蛋白酶、Protamex 蛋白酶、Flavourzyme 风味酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶等<sup>[5-9]</sup>。另外,适当强度的超声波产生的稳态空化作用和机械作用可促使酶与底物更好的接触,提高酶的活性。本文采用超声波辅助木瓜蛋白酶的方法水解大豆分离蛋白制备大豆蛋白肽,研究水解条件对大豆蛋白水解度(DH)的影响,同时考察其水解度与抗氧化性之间的关系,为制备高抗氧化活性的大豆蛋白肽提供一定的研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白 上海百奥特植物蛋白科技有限

公司,蛋白质含量 $\geq 88\%$ ;木瓜蛋白酶 南宁庞博生物工程有限公司,酶活为 $6 \times 10^4$ U/g;邻二氮菲、硫酸亚铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、双氧水等试剂均为分析纯。

DELTA 320 pH 计 瑞士梅特勒-托利多集团;AS20608 超声波清洗仪 天津奥特赛恩斯仪器有限公司;UV2550 紫外可见分光光度计 日本岛津公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 预处理温度和时间对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响** 配制 5% 的大豆分离蛋白溶液(0.5g 蛋白加入 10mL 蒸馏水中),分别在 60、70、80、90、100℃水浴中预热 15min,冷却后加入木瓜蛋白酶进行酶解,酶解条件为 pH6.5,酶与底物比[E]/[S] 为 5%,超声波处理 20min 后 60℃水解 3h,考察预处理温度对 DH 值和抗氧化性的影响。

配制 5% 的大豆分离蛋白溶液,在 90℃水浴中分别预热 5、10、15、20、25min,冷却后加入木瓜蛋白酶进行酶解,酶解条件为 pH6.5,[E]/[S] 为 5%,超声波处理 20min 后 60℃水解 3h,考察预处理时间对 DH 值和抗氧化性的影响。

**1.2.2 水解温度和时间对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响** 配制 5% 的大豆分离蛋白溶液,90℃水浴 15min,冷却后加入木瓜蛋白酶进行酶解,酶解条件

收稿日期:2012-03-06

作者简介:吴进菊(1983-),女,博士,讲师,研究方向:食品生物技术。

基金项目:湖北省教育厅科学技术研究计划优秀中青年人才项目(Q20122511)。

为 pH6.5, [E]/[S] 为 5%, 超声波处理 20min 后分别置于 50、55、60、65、70℃ 继续水解 3h, 考察水解温度对 DH 值和抗氧化性的影响。

配制 5% 的大豆分离蛋白溶液, 90℃ 水浴 15min, 冷却后加入木瓜蛋白酶进行酶解, 酶解条件为 pH6.5, [E]/[S] 为 5%, 超声波处理 20min 后 65℃ 分别水解 2、2.5、3、3.5、4h, 考察水解时间对 DH 值和抗氧化性的影响。

**1.2.3 超声波处理时间对大豆蛋白 DH 和大豆蛋白肽抗氧化性的影响** 配制 5% 的大豆分离蛋白溶液, 90℃ 水浴 15min, 冷却后加入木瓜蛋白酶进行酶解, 酶解条件为 pH6.5, [E]/[S] 为 5%, 超声波分别处理 0、10、20、30、40min 后 65℃ 水解 3h, 测定 DH 值和抗氧化性。

**1.2.4 [E]/[S] 对大豆蛋白 DH 和大豆蛋白肽抗氧化性的影响** 配制 5% 的大豆分离蛋白溶液, 90℃ 水浴 15min, 冷却后分别加入 20、25、30、35、40mg 木瓜蛋白酶, 使 [E]/[S] 分别为 4%、5%、6%、7%、8%, 酶解条件为 pH6.5, 超声波处理 30min 后 65℃ 继续水解 3h, 测定 DH 值和抗氧化性。

**1.2.5 pH 对大豆蛋白 DH 和大豆蛋白肽抗氧化性的影响** 配制 5% 的大豆分离蛋白溶液, 90℃ 水浴 15min, 冷却后加入木瓜蛋白酶, 调节溶液的 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5, [E]/[S] 为 6%, 超声波处理 30min 后 65℃ 继续水解 3h, 测定 DH 值和抗氧化性。

**1.2.6 木瓜蛋白酶活力测定** 采用中华人民共和国专业标准蛋白酶活力测定法 SB/T 10317-1999。

**1.2.7 蛋白质水解度 DH 的测定** 采用 pH-stat 法<sup>[10]</sup>, 水解开始时, 调节反应体系的 pH 为 6.5, 反应过程中用 0.5mol/L 的 NaOH 不断地调节 pH 为 6.5, 反应结束后, 记下所用碱液的数量。

$$DH(\%) = \frac{B \times N}{\alpha \times m \times h} \times 100$$

其中: B: 消耗碱量 (mL); N: 碱的摩尔浓度 (mol/L);  $\alpha$ : 大豆分离蛋白氨基的平均解离度, 在蛋白质的正常水解温度 (50℃)、中性 pH 下,  $\alpha = 0.44$ ; m: 被水解蛋白的质量 (g); h: 每克蛋白质底物具有的肽键毫摩尔数, 对于大豆分离蛋白  $h = 7.75$ 。

**1.2.8 大豆蛋白肽抗氧化性的测定—对 OH 自由基的清除** 参照金鸣等<sup>[11]</sup>的方法, 取 1mL 0.75mmol/L 的邻二氮菲溶液, 加入 2mL pH7.4 磷酸盐缓冲液和 1mL 蒸馏水, 充分混匀, 再加入 1mL 0.75mmol/L 硫酸亚铁溶液和 1mL 0.01% 过氧化氢, 37℃ 保持 60min, 于 536nm 处测得吸光度为  $A_p$ ; 用 1mL 乙醇代替 1mL 过氧化氢, 测得吸光度为  $A_b$ , 1mL 不同质量浓度的样液代替蒸馏水, 测得吸光度  $A_s$ 。采用下式计算大豆蛋白肽对 OH 自由基的清除率。

$$H(\%) = \frac{A_s - A_p}{A_b - A_p} \times 100$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 预处理温度和时间对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

大豆蛋白中含有大量的球蛋白, 分子结构高度

压缩、折叠, 使大量的功能区和酶作用位点包裹在分子结构的内部。通过加热的方式可以使含有功能区的片段和酶作用位点释放出来, 从而提高其功能特性和水解度。

图 1 显示了预处理温度对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响。在 60~90℃ 的范围内, 随着温度的升高, DH 值逐渐增大, 90℃ 时达到最大, 为 7.44%。当温度进一步升高到 100℃ 时, DH 值急剧下降, 仅为 2.18%。同样地, 在预处理温度为 90℃ 时大豆蛋白肽的抗氧化性最高, 而 60℃ 次之。实验结果表明, 预处理温度为 90℃ 时可以很好的打开大豆蛋白的分子结构, 提高其水解度和抗氧化性, 而当温度继续升高时可能会进一步破坏分子结构, 使蛋白变性, 从而不利于酶解的进行和抗氧化肽的形成。

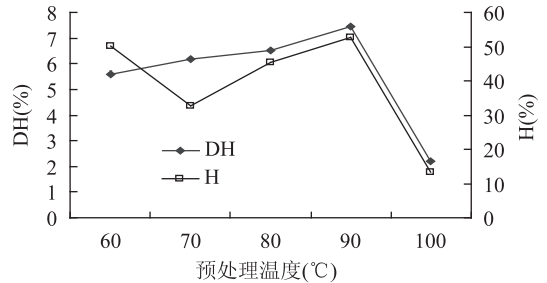


图 1 预处理温度对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

Fig.1 Effect of pretreatment temperature on degree of hydrolysis and antioxidant activity of soybean

预处理时间对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响如图 2 所示。当预处理时间为 15min 时 DH 最大, 而抗氧化性随着预处理时间的延长呈逐渐增高的趋势。因此, 水解度的大小与抗氧化性的高低没有直接的关系, 在研究过程中不能单纯的用水解度作为其他功能特性的评定标准。

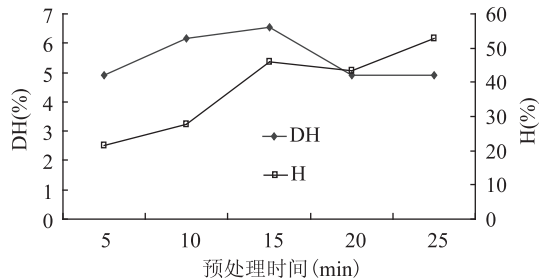


图 2 预处理时间对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

Fig.2 Effect of pretreatment time on degree of hydrolysis and antioxidant activity of soybean

### 2.2 水解温度和时间对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

在 50~65℃ 的范围内, 随着水解温度的升高, DH 值不断提高, 65℃ 时达到最大 (图 3)。而当温度进一步提高到 70℃ 时, DH 值最小 (1.68%)。大豆蛋白肽抗氧化性随水解温度呈现不规则的变化, 当温度为 55℃ 时, 抗氧化性最强。

水解时间对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响见图 4。DH 随着水解时间的延长逐渐增大, 水解时间为 3h 时达到最高, 继续延长水解时间, DH 值保持不

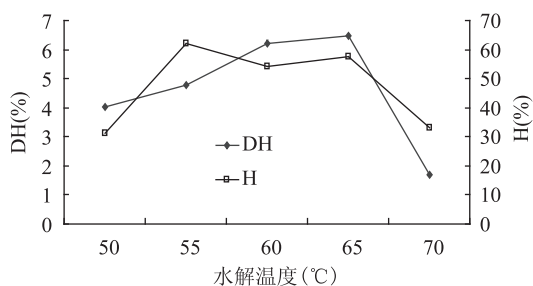


图3 水解温度对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis temperature on degree of hydrolysis and antioxidant activity of soybean

变,这表示水解 3h 时大豆蛋白水解过程已基本结束,水解度保持恒定。在 2~4h 范围内,大豆蛋白肽的抗氧化性先减小后增大,3h 时抗氧化性达到最低值,4h 时抗氧化性最高。这可能是由于在 2~3h 范围内,随着水解过程的进行,具有抗氧化活性的多肽进一步水解成小肽或氨基酸,从而降低了产物的抗氧化性;在 3~4h 范围内,随着时间的延长,虽然宏观上蛋白的水解度没有发生明显变化,但是小分子肽或氨基酸可能重新组合,蛋白内部的分子结构可能发生了某些变化,从而使抗氧化性增大。

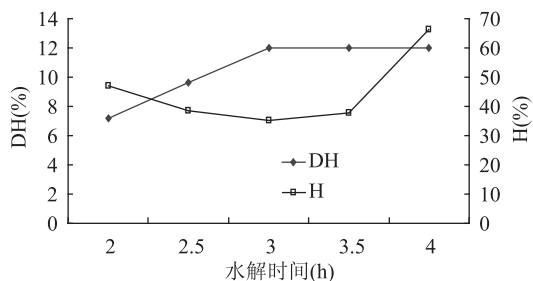


图4 水解时间对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis time on degree of hydrolysis and antioxidant activity of soybean

### 2.3 超声时间对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

在 0~40min 范围内,超声时间为 30min 时 DH 最大,为 10.77%,是未超声处理的大豆蛋白 DH 的 2.3 倍;而超声时间为 20min 时抗氧化性最大,是未超声处理的大豆蛋白抗氧化性的 5 倍(如图 5 所示)。超声波的空化作用和机械作用可以促使酶与底物更好的接触,加快反应进程。但超声时间过长可能会破坏酶的结构,影响酶的活性,使酶部分失活,从而影响作用效果。

### 2.4 酶与底物比对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

酶与底物比对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响如图 6 所示。随着比值的增大,DH 值逐渐提高,当酶与底物比为 7% 时 DH 值达到最大,而继续提高酶与底物比,DH 值保持不变。由图 6 可知,当酶与底物比为 5% 时大豆蛋白肽抗氧化性显著高于其他情况,酶量继续增大时可能导致过度水解,使抗氧化活性肽进一步水解为氨基酸,从而降低了抗氧化性。

### 2.5 pH 对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

大豆蛋白 DH 和抗氧化性随 pH 的变化如图 7 所示,当 pH 为 6.5 时 DH 最大,pH 为 6.0 时抗氧化性

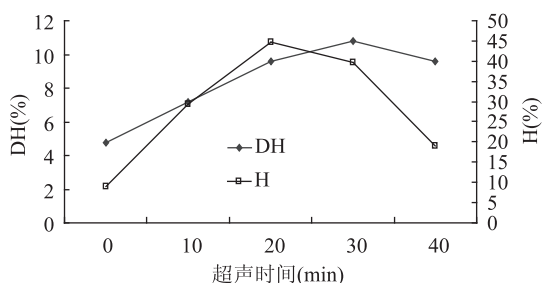


图5 超声时间对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

Fig.5 Effect of ultrasonic time on degree of hydrolysis and antioxidant activity of soybean

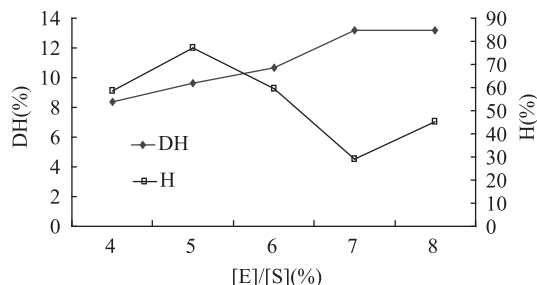


图6 [E]/[S] 对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

Fig.6 Effect of [E]/[S] on degree of hydrolysis and antioxidant activity of soybean

最高。结果表明,以大豆蛋白为底物时,木瓜蛋白酶的最适作用 pH 为 6.5,此时大量的抗氧化肽被进一步水解,丧失抗氧化性。

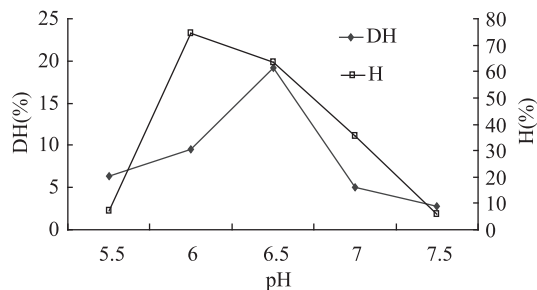


图7 pH 对大豆蛋白 DH 和抗氧化性的影响

Fig.7 Effect of pH on degree of hydrolysis and antioxidant activity of soybean

## 3 结论

超声波可以显著提高木瓜蛋白酶的作用效果,大大提高大豆蛋白的水解度和大豆蛋白肽的抗氧化性。采用超声波协同木瓜蛋白酶的方法水解大豆蛋白的最佳条件为 90℃ 预处理 15min, pH6.5, [E]/[S] 为 7%, 超声波处理 30min, 65℃ 水解 3h。

大豆蛋白水解后具有很强的抗氧化性,但是其抗氧化性的高低和水解度的大小没有直接的线性关系,如果在研究大豆蛋白肽抗氧化性的过程中直接采用水解度作为衡量标准,比较片面。采用超声波协同木瓜蛋白酶的方法制备大豆蛋白抗氧化肽的效果较好,所需酶量较少,对 OH 自由基的清除率可高达 76.92%,具有良好的应用前景。

(下转第 219 页)

表 4 优化提取方案中  $X_i$  取值频率分布表  
Table 4 The probability distribution of  $X_i$  in the combined application

| 水平       | $X_1$        |        | $X_2$         |        | $X_3$       |        | $X_4$        |        |
|----------|--------------|--------|---------------|--------|-------------|--------|--------------|--------|
|          | 次数           | 频率     | 次数            | 频率     | 次数          | 频率     | 次数           | 频率     |
| -2       | 1            | 0.0122 | 1             | 0.0122 | 0           | 0.0000 | 0            | 0.0000 |
| -1       | 25           | 0.3049 | 16            | 0.1591 | 10          | 0.1220 | 24           | 0.2927 |
| 0        | 33           | 0.4024 | 28            | 0.3415 | 29          | 0.3537 | 35           | 0.4268 |
| 1        | 22           | 0.2683 | 25            | 0.3049 | 29          | 0.3537 | 23           | 0.2805 |
| 2        | 1            | 0.0122 | 12            | 0.1463 | 14          | 0.1707 | 0            | 0.0000 |
| 加权均数     | -0.0370      |        | 0.3780        |        | 0.5730      |        | -0.0120      |        |
| 标准误      | 0.0900       |        | 0.1100        |        | 0.1010      |        | 0.0840       |        |
| 95% 置信区间 | -0.214~0.141 |        | 0.163~0.594   |        | 0.376~0.770 |        | -0.176~0.152 |        |
| 提取条件     | 189.3~207.05 |        | 10.163~10.594 |        | 50.64~56.55 |        | 44.12~45.76  |        |

反应温度为 45℃。在此条件下茶叶籽蛋白的实际提取率为 75.83%，与预测值 75.99% 较为接近，说明数学模型对茶叶籽蛋白的提取工艺是可行的。

参考文献

[1] 马跃青, 张正竹. 茶叶籽综合利用研究进展[J]. 中国油脂, 2010, 35(9): 66-69.  
[2] 麻成金, 黄群, 吴道宏, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 和微波萃取茶叶籽油工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 281-285.  
[3] 欧阳林, 麻成金, 黄群, 等. 混合溶剂浸提茶叶籽油的研究[J]. 四川食品与发酵, 2007, 43(4): 20-23.  
[4] 王武, 方红美, 刘京生, 等. 茶叶籽饼粕中茶皂素提取工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 230-233.  
[5] 王晓琴. 水酶法提取茶叶籽油及副产物茶皂素工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(11): 76-78.  
[6] 常银子, 王丽霞, 仲山民, 等. 酶法提取芋艿蛋白质工艺[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(3): 19-23  
[7] Sajid Latif, Farooq Anwar, Abdullah I Hussain, et al. Aqueous enzymatic process for oil and protein extraction from moringa oleifera seed [J]. European Journal of Lipid Science and Technology, 2011, 113(8): 1012-1018.  
[8] Shao Bing Zhang, Zhang Wang Shi, Ying Xu. Downstream processes for aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2007, 84(7): 693-700.  
[9] 袁建, 刘胜, 鞠兴荣, 等. 复合法提取高温菜籽粕中蛋白质

的研究[J]. 中国油脂, 2010, 35(1): 19-24.  
[10] Inthawoot Suppavorasatit, Elvira Gonzalez De Mejia, Keith R Cadwallader. Optimization of the enzymatic deamidation of soy protein by protein- glutaminase and its effect on the functional properties of the protein [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(10): 11621-11628.  
[11] Ping- Hsiu Huang, Hao- Te Lu, Yuh- Tai Wang, et al. Antioxidant activity and emulsion- stabilizing effect of pectic enzyme treated pectin in soy protein isolate- stabilized oil/water emulsion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(9): 9623-9628.  
[12] Saiyi Zhong, Changwei Ma, Young C Lin, et al. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by- product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry [J]. Food Chemistry, 2011, 126(4): 1636-1642.  
[13] 杨德. 实验设计与分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.  
[14] 聂芸, 周倩, 屈晓清, 等. 二次通用旋转组合设计优化茶皂素的提取工艺[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(12): 194-199.  
[15] 王家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 42-47.  
[16] 仵昱舟, 冯翠萍. 酶法提取葡萄籽中蛋白质工艺优化[J]. 食品科学, 2010, 31(2): 63-65.  
[17] Hamada J S. Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endo- proleases [J]. Food Science, 2000, 25(6): 113-115.

(上接第 214 页)

参考文献

[1] 孔繁东, 杨萌, 祖国仁, 等. 大豆蛋白肽降血压稳定性研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(7): 5-9.  
[2] Beermann C, Herzberg M E J. Anti- oxidative capacity of enzymatically released peptides from soybean protein isolate [J]. Eur Food Res Technol, 2009, 229: 637-644.  
[3] Yu B, Lu Z X, Bie X M, et al. Scavenging and anti- fatigue activity of fermented defatted soybean peptides [J]. Eur Food Res Technol, 2008, 226: 415-421.  
[4] 张智, 赵云财, 梁金钟, 等. 大豆蛋白活性肽的生理功能及产品开发[J]. 大豆通报, 2003(2): 25-26.  
[5] 吴琼, 程建军, 杨秋萍, 等. 碱性蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(10): 191-193.

[6] 吴建中, 赵谋明, 宁正祥, 等. 双酶法生产低苦味大豆多肽研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(4): 24-27.  
[7] 杜翠荣, 马荣山. 酶解高水解度大豆蛋白肽的研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2005(6): 57-59.  
[8] 吴瑕, 江连洲, 王鑫, 等. 大豆蛋白酶水解物抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报, 2010, 25(11): 37-49.  
[9] 周婷婷, 李燕, 宋斐. 抗氧化大豆多肽制备的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(3): 281-284.  
[10] 姚玉静, 崔春, 邱礼平, 等. pH- stat 法和甲醛滴定法测定大豆蛋白水解度准确性比较[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 68-70.  
[11] 金鸣, 蔡亚欣, 李金荣, 等. 邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup> 氧化法检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup> 产生的羟自由基[J]. 生物化学与生物物理学进展, 1996, 23(6): 553-555.