



## 不同酶解法水解豆粕蛋白的比较研究

宋永康<sup>1,2</sup>, 黄薇<sup>1,2</sup>, 林虬<sup>1,2</sup>, 姚清华<sup>1,2</sup>, 林香信<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>福建省农业科学院中心实验室, 福州 350003; <sup>2</sup>福建省精密仪器农业测试重点实验室, 福州 350003)

**摘要:**为研究不同的酶解方式对豆粕蛋白酶解过程及产物的影响, 采用 Alcalase 蛋白酶、Protex.7L 蛋白酶对豆粕蛋白进行单酶、双酶同步和双酶分步水解, 以水解度、蛋白质利用率、多肽得率、寡肽得率为指标对酶解过程进行分析。结果表明采用先加 Alcalase 蛋白酶后加 Protex.7L 蛋白酶组合水解豆粕蛋白的效果最佳, 最终水解液中水解度可达 23.5%, 蛋白质利用率、多肽得率、寡肽得率分别为 68.7%、51.0%、21.4%。双酶分步水解的效果优于单酶水解和双酶同步水解; 酶的加入顺序对豆粕的酶解过程有一定的影响。

**关键词:**豆粕; 蛋白; 酶水解; 双酶水解

**中图分类号:** S565.1

**文献标志码:** A

**论文编号:** 2012-0214

### Comparative Study of Soybean Protein Hydrolysates Prepared in Different Ways

Song Yongkang<sup>1,2</sup>, Huang Wei<sup>1,2</sup>, Lin Qiu<sup>1,2</sup>, Yao Qinghua<sup>1,2</sup>, Lin Xiangxin<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Central Laboratory, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China;

<sup>2</sup>Fujian Key Laboratory of Precision Measurement of Agriculture, Fuzhou 350003, Fujian, China)

**Abstract:** Comparative Studies on the effect of hydrolysis processes and products of soybean protein by different enzymic hydrolysis. In the present study, Alcalase protease and Protex.7L protease were utilized to hydrolyze soybean protein in different ways, such as single-enzyme hydrolysis and one-step and stepwise double-enzyme hydrolysis. After degree of hydrolysis, protein utilization, peptides yield, oligopeptides yield were measured to comparatively study soybean protein enzymolysis in different hydrolysis way. It was shown that the optimum hydrolysis way was sequential hydrolysis with Alcalase protease followed by Protex.7L protease. Under this way, the degree of hydrolysis, protein utilization, peptides yield, oligopeptides yield reached 23.5%, 68.7%, 51.0%, 21.4%. The stepwise double-enzyme hydrolysis was superior to single-enzyme hydrolysis and one-step double-enzyme hydrolysis, and that there was obvious relation between hydrolysis process of soybean protein and the order of adding enzymes.

**Key words:** Soybean; Protein; Enzymic Hydrolysis; Double-enzyme Hydrolysis

### 0 引言

大豆多肽是指大豆蛋白质经蛋白酶水解作用后, 再经分离、精制等处理过程得到的蛋白质水解产物, 由多种低分子肽组成, 其中还包含少量大分子肽、游离氨基酸等<sup>[1-2]</sup>。大豆多肽氨基酸组成与大豆蛋白质基本相同, 必需氨基酸平衡、含量丰富, 具有更好的理化性质, 如易消化吸收、低过敏性等, 且含有某些生理活性多肽在机体内有多种生理功能, 是一种比较理想的新型大

豆深加工产品<sup>[3]</sup>。在对酶解法生产大豆多肽的研究中, 单酶水解法依旧是当前研究的主要方向<sup>[4-5]</sup>。张静等<sup>[6]</sup>对 Alcalase 蛋白酶水解高温豆粕制备水溶性大豆多肽进行了研究。任为聪等<sup>[7]</sup>采用碱性蛋白酶改性提高豆粕的溶解性, 并通过单因素和响应面试验优化了酶解豆粕的工艺条件, 最终水解度为 15.86%。谢岩黎等<sup>[8]</sup>对胰蛋白酶酶解豆粕的工艺条件进行了优化, 并对其产物进行了分析研究。但随着研究的深入, 发现

**基金项目:** 福建省科技重大专项“利用生物技术进行饲料原料预处理的研究及应用”(2010NZ0002-1); 福建省农科院双百项目“寡肽蛋白在水产饲料中应用技术示范推广”(sbmd1226)。

**第一作者简介:** 宋永康, 男, 1963 年出生, 高级实验师, 主要从事化学分析与营养研究。通信地址: 350003 福建省福州市五四路 247 号福建省农科院中心实验室, Tel: 0591-87869394, E-mail: songlibby@sina.com。

**收稿日期:** 2012-05-10, 修回日期: 2012-07-06。



采用双酶法水解大豆蛋白质,蛋白质水解程度和效率更高,同时酶解的产物苦味明显弱于单酶水解法<sup>[9]</sup>。笔者采用 Alcalase 水解蛋白酶、Protex.7L 细菌中性蛋白酶对豆粕进行单酶、双酶同步和双酶分步水解,研究不同的酶解方法对豆粕蛋白水解的影响,为优化豆粕水解工艺以及提高豆粕水解产物品质提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

豆粕:市售,粗蛋白含量为46.12%,粉碎至80目以上;Alcalase 蛋白酶:丹麦 Novozymes 公司,活力380000 U/mL;Protex.7L 蛋白酶:美国 Genencor 公司,活力340000 U/mL,对苯二甲醛(OPA):国药集团化学试剂有限公司;十二烷基磺酸钠(SDS)、二硫苏糖醇(DTT):Biosharp 公司;甲醛、氢氧化钠、盐酸等其他试剂均为分析纯。

### 1.2 主要设备

自动定氮仪(瑞典 Foss KIELETEC ANALYSER),紫外分光光度计(日本 Hitachi U-3900),恒温磁力搅拌器(国华企业 HJ-3),恒温振荡器(国华企业 3HA-C),离心机(长沙湘仪离心机 TD5A-WS),万分之一电子分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO AL204),pH 酸度计(上海雷磁 PHS-3C)。

### 1.3 分析方法

1.3.1 水解度的测定 水解度(DH, degree of hydrolysis)的定义是指蛋白质水解过程中,被断裂的肽键数  $h$  (mmol/g 蛋白质)与给定蛋白质的总肽键数  $h_{\text{tot}}$  (mmol/g 蛋白质)之比。水解度的测定方法采用邻苯二甲醛(OPA)法<sup>[10]</sup>。

1.3.2 蛋白质利用率的测定 蛋白质利用率采用凯氏定氮法进行测定。

蛋白质利用率=(上清液中氮含量/酶解液总氮)×100%。

1.3.3 多肽得率的测定 多肽得率采用三氯乙酸可溶性氮法(TCA-SNI)<sup>[11]</sup>进行检测。

1.3.4 寡肽得率的测定 寡肽得率的测定方法采用单宁沉淀法<sup>[12]</sup>。

### 1.4 试验方法

1.4.1 酶解方案 影响蛋白酶水解大豆蛋白的因素很多,如pH、温度、酶用量、时间等,但对于特定的酶和底物,其最适的温度和pH是一定的<sup>[13]</sup>。根据有关资料和前期试验,确定Alcalase蛋白酶的最适酶解条件为pH 8.0,温度60℃,酶用量0.5%;Protex.7L蛋白酶的最适酶解条件为pH 7.0,温度45℃,酶用量0.5%;双酶分步与双酶同步水解两种酶用量分别各为0.25%,双酶同步酶解条件为pH 7.5,温度50℃。

1.4.2 酶解工艺 工艺流程:豆粕→按1:10(m/v)比例加水匀浆→预处理(90℃,15 min)→调最适温度→调最佳pH→蛋白酶恒温酶解→沸水浴灭酶15 min→5000 r/min 离心10 min→取上清酶解液进行测定。水解时间10 h(双酶分步各水解5 h),每隔1 h取样,测定其水解度、蛋白质利用率、多肽得率、寡肽得率。

## 2 结果与分析

### 2.1 Alcalase 蛋白酶与 Protex.7L 蛋白酶水解作用的比较

采用Alcalase蛋白酶以及Protex.7L蛋白酶在各自适合的酶解条件下对豆粕蛋白进行水解,测定其水解度、蛋白质利用率、多肽得率、寡肽得率,结果见图1~4。

豆粕蛋白酶解程度与时间呈正相关,但从上述指标来看,2种蛋白酶随着时间的增加,水解速率逐渐下降,上升速率趋缓。酶解过程首先是一个溶质的扩散过程,开始时,豆粕颗粒表面的可溶性蛋白较易扩散到

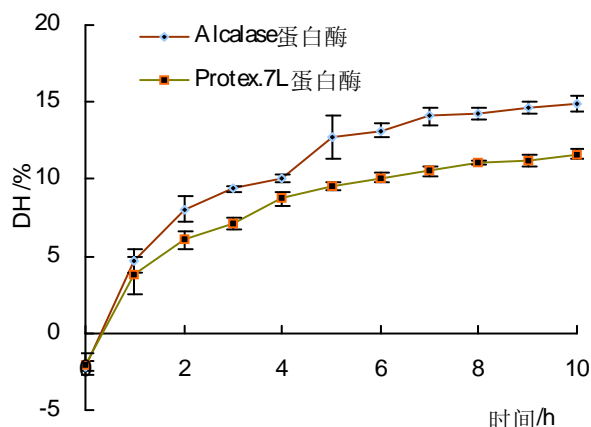


图1 单酶水解对水解度的影响

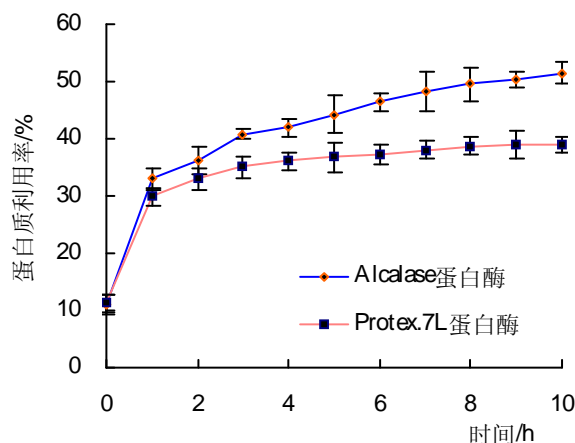


图2 单酶水解对蛋白质利用率的影响

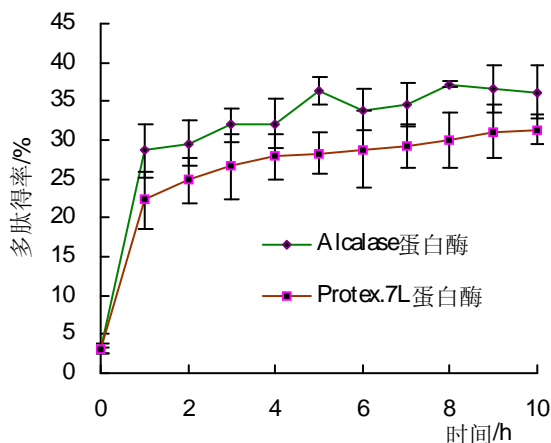


图3 单酶水解对多肽得率的影响

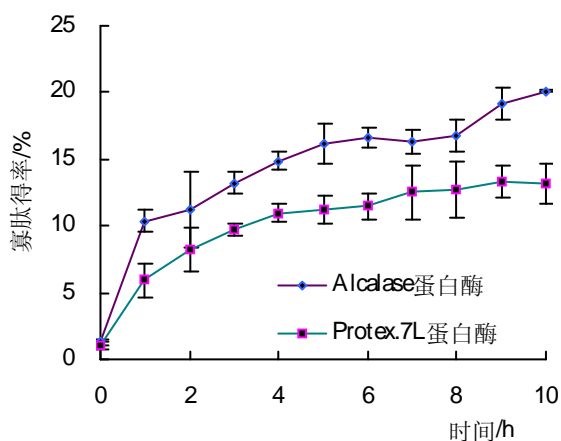


图4 单酶水解对寡肽得率的影响

溶液中去,水解反应剧烈,随着反应进行,扩散方式主要为颗粒内部的可溶性蛋白向外扩散,其速率远小于表面扩散速率,反映在曲线上,曲线逐渐趋缓。其次,酶解过程是一个水解肽链的过程,随着肽链不断水解,新的氨基,羧基等亲水基团不断暴露,因此产物在水中的分散溶解性迅速增加,随着酶解时间的延长,蛋白酶可水解的肽键减少,即使增加酶量,酶解速率亦趋缓。从水解度、蛋白质利用率、多肽得率、寡肽得率等4个检测指标来看,Alcalase蛋白酶酶解10 h的水解产物分别为14.9%、51.5%、36.2%和20.1%,明显高于Protex.7L蛋白酶水解产物11.6%、39.0%、31.3%和13.1%。

## 2.2 双酶分步水解与双酶同步水解作用的比较

不同蛋白酶具有不同的切割位点和催化特性,将Alcalase蛋白酶与Protex.7L蛋白酶对豆粕蛋白进行分步水解和同步水解。从图5~8可以看出,在双酶同步水解试验中,酶解前3 h内,反应剧烈,水解迅速,水解

度随着时间的延长而不断提高,当反应进行到4 h后就开始缓慢下来,水解度等虽然有继续增加,但幅度很小,最终水解液中水解度为17.1%,蛋白质利用率、多肽得率、寡肽得率分别为49.3%、39.3%、17.3%;在双酶分步水解试验中,Alcalase蛋白酶作用阶段初期虽然水解度等随着时间的延长而不断提高,但总体水平始终低于双酶同步水解,尤其是寡肽得率前3 h差别最大,当反应进行到5 h时,水解度等指标变化平缓,加入Protex.7L蛋白酶继续酶解,各指标再次迅速升高,并超过同步水解,最终水解液中水解度为23.5%,蛋白质利用率、多肽得率、寡肽得率分别达到68.7%、51.0%、21.4%。可见运用不同的蛋白酶分步接力水解达到的水解度和蛋白质利用率等指标均高于双酶同步水解,并且比单独运用单一蛋白酶的水解效果有显著提高。

## 2.3 双酶分步水解加酶顺序作用的比较

改变双酶分步水解中2种酶的作用顺序,反应结果如图9~12所示。由图可知,它们的趋势都是在第一

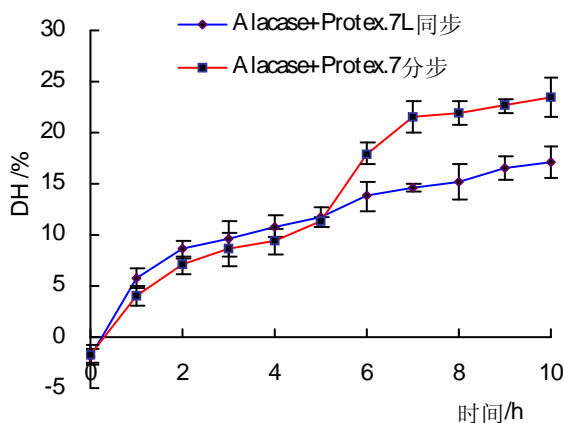


图5 双酶同步水解与分步水解对水解度的影响

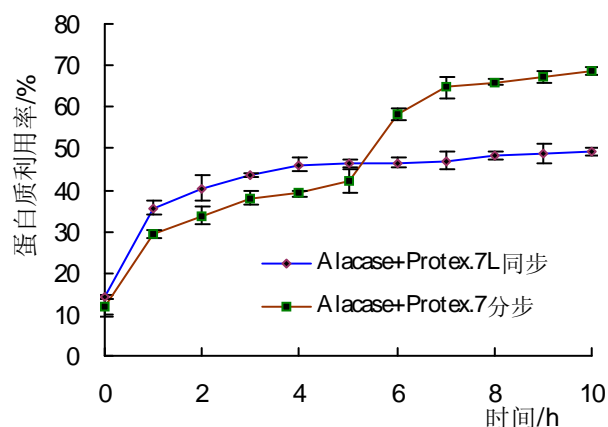


图6 双酶同步水解与分步水解对蛋白质利用率的影响

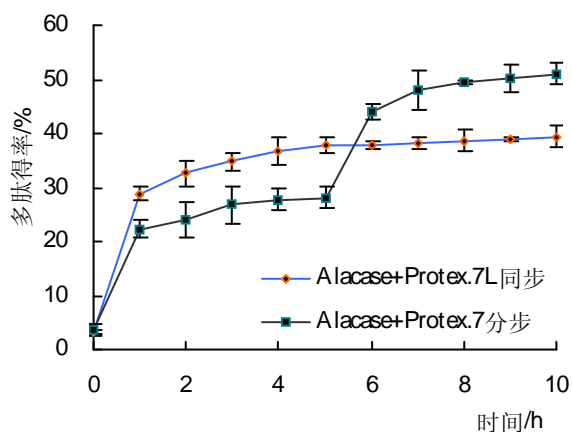


图7 双酶同步水解与分步水解对多肽得率的影响

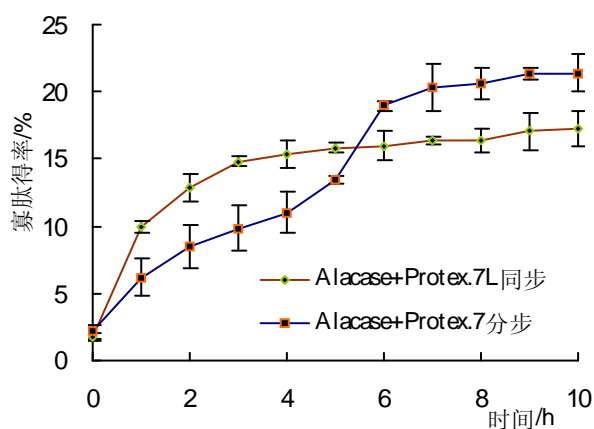


图8 双酶同步水解与分步水解对寡肽得率的影响

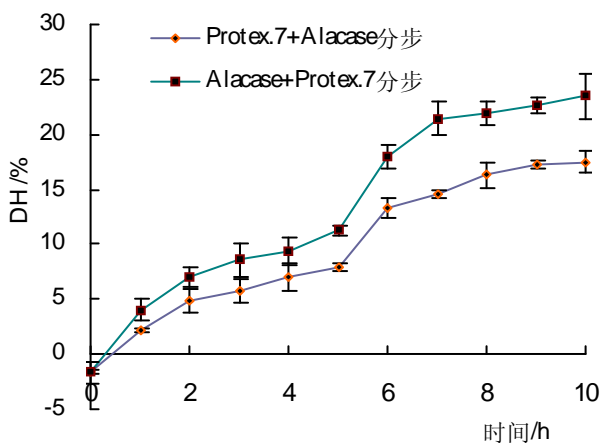


图9 不同加酶顺序对水解度的影响

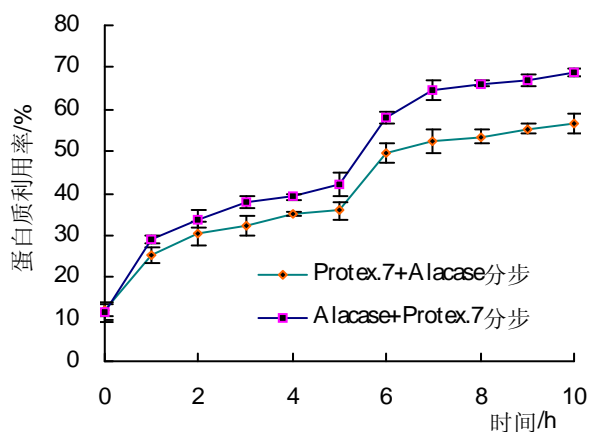


图10 不同加酶顺序对蛋白质利用率的影响

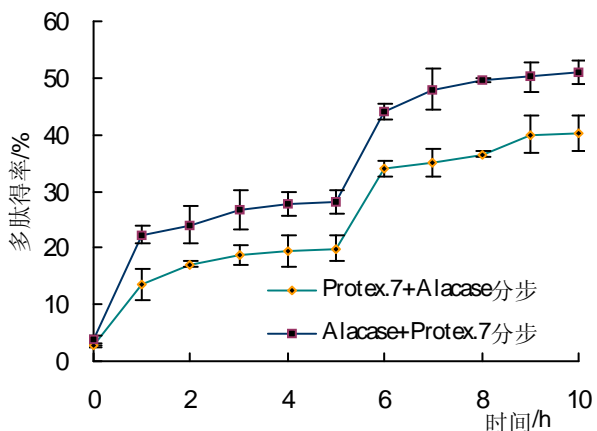


图11 不同加酶顺序对多肽得率的影响

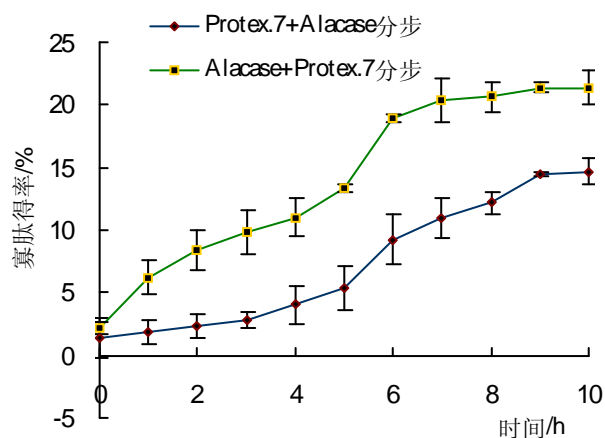


图12 不同加酶顺序对寡肽得率的影响

种酶水解作用至指标变化平缓时,加入第2种酶继续水解,能够使得水解度等指标再次迅速提高。比较2种加酶顺序,先加Alcalase蛋白酶后加Protex.7L蛋白酶水解效率要更高一些,水解度等指标的提幅度均

大于先加Protex.7L蛋白酶后加Alcalase蛋白酶。原因可能是2种酶的最适酶解条件不同。Alcalase蛋白酶反应条件为pH值8.0、温度60℃;Protex.7L蛋白酶反应条件为pH7.0、温度45℃。在碱性环境下,更多豆粕

碱性蛋白溶出,增加了蛋白酶与之的接触面积。蛋白质在溶解时必需破坏蛋白质之间的相互作用,提高温度能有助于蛋白质分子间和分子内的二硫键断裂,亚基伸展,加剧蛋白质分子的扩散,故而能更好酶解,从而提高酶解效率。

### 3 结论与讨论

单酶水解豆粕蛋白的结果表明,在各自最适条件下,Alcalase 蛋白酶水解豆粕的能力明显高于 Protex.7L 蛋白酶,这与董颖超<sup>[14]</sup>的研究结果一致。从酶解过程来看,两者有一共同特点,即酶解时间大于 4 h 后,随着反应时间的延长,单位时间内水解效率的增加幅度逐渐减小。张红梅等<sup>[15]</sup>用中性蛋白酶酶解大豆蛋白的蛋白制备大豆低分子肽的过程中也发现了相似的规律,其分析认为该现象是因为蛋白酶具有专一性,随着水解时间的延长,蛋白酶可水解的肽键逐渐减少,同时蛋白酶活力以半衰期方式下降的缘故。

研究 Alcalase 蛋白酶和 Protex.7L 蛋白酶对豆粕蛋白的酶解作用,结果表明,在总酶量为 0.5% (E/S) 时,采用双酶分步接力水解达到的水解度,蛋白质利用率、多肽得率以及寡肽得率均比双酶同步水解和采用单一蛋白酶水解时要高。这一结果与邓成萍等<sup>[13]</sup>的试验结果趋势一致,尽管加酶量相同,但双酶同步水解效果不如双酶分步水解。蛋白酶的催化反应的能力与环境 pH、温度等条件密切相关,它影响酶分子的构象和酶分子及底物分子的解离状态,从而影响酶的活性和酶促反应速度,同步酶解所选温度和 pH 不在各自蛋白酶的最佳范围,致使酶的活性不能得到充分发挥,这可能是分步水解效率比同步水解高的主要原因。此外,不同蛋白酶具有不同的切割位点和催化特性,随着水解时间的延长,水解度的升高趋于缓慢,蛋白酶可水解的肽键减少,酶解产物不断积累,对催化反应造成抑制,此时加入第 2 种酶继续水解,能够依其切割位点和催化特性继续酶解,使得水解度再次迅速提高。

对双酶分步水解豆粕过程中酶的加入顺序进行研究,结果显示双酶分步水解豆粕时,酶的加入顺序对水解度等指标具有显著的影响。先加 Alcalase 蛋白酶再加 Protex.7L 蛋白酶所得水解度等指标的提高幅度大于先加 Protex.7L 蛋白酶后加 Alcalase 蛋白酶,最终水解液中水解度可达 23.5%,蛋白质利用率、多肽得率、寡肽得率分别为 68.7%、51.0%、21.4%。笔者的试验结果同李绮丽等<sup>[16]</sup>研究结果一致,任海伟等<sup>[17]</sup>使用双酶法水解黑豆渣同样显示加酶顺序对豆渣中蛋白质溶出率及游离氨基酸含量有较大的影响。但有研究报

告显示<sup>[15,18]</sup>,双酶分步蛋白酶的加入顺序与最终水解度关系不大。蛋白质水解过程影响因素较多,这可能与酶的种类、酶的浓度以及酶解条件有关,并且蛋白质种类和构成蛋白质的氨基酸及其比例不同也决定了原料蛋白质的双酶水解程度。

### 参考文献

- [1] Kazunobu T, Tsutomu S, Keisuke T, et al. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis[J]. LWT-Food Science and Technology, 2005,38(3):255-261.
- [2] Gibbs B F, Alexandre Z, Masse R, et al. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food[J]. Food Rehash International, 2004,37: 123-131.
- [3] 赵芳芳,张日俊.大豆肽研究进展[J].中国饲料, 2004,1:22-23.
- [4] 陈敏,蔡会武,邵纪生,等.双酶解法提取大豆蛋白的工艺研究[J].大豆科学,2010,29(3):537-539.
- [5] Feng Y L. Interaction and functionality of mixed myofibrillar and enzyme hydrolyzed soy proteins[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(3):803-809.
- [6] 张静,李理.Alcalase 蛋白酶酶解高温豆粕制备水溶性大豆多肽[J].食品工业科技,2012,10:174-177.
- [7] 任为聪,程建军,张智宇,等.酶改性对高温变性豆粕溶解性的影响[J].食品科学, 2010,21:144-148.
- [8] 谢岩黎,马成业,王金水.胰蛋白酶酶解豆粕制取谷氨酰胺肽的响应面法优化[J].河南工业大学学报:自然科学版,2009,30(5):25-28.
- [9] 陈济琛,李善仁,蔡海松,等.大豆肽的制备及其在养殖业中的应用[J].大豆科学,2009,28(2):341-345.
- [10] Nielsen P M, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66: 642-646.
- [11] Antoine M, Erwin F, Albert R. Continuous Monitoring of Enzymatic Whey Protein Hydrolysis. Correlation of Base Consumption with Soluble Nitrogen Content[J]. Process Biochemistry, 1994, 29: 257-262.
- [12] 罗钦,陈人弼,宋永康.鱼粉中寡肽和游离氨基酸的测定方法[J].福建农业学报,2005,20(4):285-288.
- [13] 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):23-25.
- [14] 董颖超.蛋白酶对大豆蛋白的水解特性及动力学性质的研究[D].北京:中国农业大学,2001.
- [15] 张红梅,陶敏慧,刘旭等.双酶法酶解大豆蛋白制备大豆低分子肽的研究[J].中国粮油,2008,33(3):23-25.
- [16] 李绮丽,吴卫国,张喻等.双酶法水解米渣蛋白工艺研究[J].粮食与油脂, 2011,1:19-22.
- [17] 任海伟,王常青,苏槟楠.双酶法水解黑豆渣制备可溶性蛋白[J].农产品加工·学刊,2007,5:39-41.
- [18] 王章存,申瑞玲,章银良,等.大米蛋白的双酶法水解条件研究[J].中国农学通报,2006,22(11):347-349.