

# 酶法制备大豆寡肽的研究<sup>\*</sup>

陶 红 梁 歧

(解放军军需大学军需工程系, 长春 130062)

**摘要** 以 Promatex 为工具酶对大豆分离蛋白进行水解, 制备大豆寡肽。分别讨论了热处理温度和时间对 DH 值的影响, 确定了热处理条件为 90℃、10min。Promatex 的水解条件为: pH 值为 7.0, 酶用量为 0.53ml, 酶添加量为 E/S: 10.6%, 温度 50℃, 水解 6hr。制取的大豆肽的 DH 为 28.23%, PCL 在 2—4 之间为寡肽。

**关键词** 大豆寡肽; 酶水解; 分子量; DH

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2004)01—0026—04

经动物实验证明<sup>[1-3]</sup>, 在用合成肽做的实验中, 发现二肽和三肽的吸收速度, 比同一组成的氨基酸快。所以, 小分子大豆肽(由 2~4 个氨基酸组成的寡肽)比蛋白质和氨基酸更易消化吸收, 可作为肠吸收营养物, 由十二指肠和空肠吸收, 蛋白质利用效率高, 能增强体能和肌肉, 有促进肌红细胞复原, 帮助恢复疲劳功能; 不受温度和 pH 变化的影响, 具有很好的溶解性, 低粘度, 抗凝胶形成性<sup>[4]</sup>; 低抗原性、不会产生过敏反应<sup>[1]</sup>; 能促进脂肪代谢, 消除过多脂肪; 促进发酵作用, 产生有益分泌物; 具有生理活性(抗氧化性、降血脂与胆固醇、促进矿物质吸收)等特点<sup>[1, 5, 6]</sup>, 可作为蛋白质源, 应用于酸性饮料和保健食品中, 也可应用于各类食品和特殊军兵种食品和饮料中, 补充由于体能消耗而引起的蛋白质和氨基酸不足, 迅速消化吸收, 恢复和增强体力等特殊用途。

## 1 材料与方法

### 1.1 酶水解方法

大豆肽的生产主要是利用化学方法或酶法或发酵法将大豆蛋白质水解而成, 其关键是大豆蛋白水解过程的控制。由于酶的制取及提纯工艺日渐成熟, 能很好地控制生产, 且在比较温和的条件下进行的, 能很好地保存氨基酸的营养价值, 所以本研究采用酶法制备大豆寡肽。

### 1.1.1 工具酶的筛选

参照各厂家提供的酶最适反应条件(见表 1), 确定各自 pH 值及反应温度, 选定底物浓度为 5%(W/V), E/S 为 5%(W/V), 反应时间为 6hr, 用 2N NaOH 维持 pH 值保持恒定不变。反应结束后计算各酶的水解度(DH)。选取 DH 值高的为工具酶。

水解度(the degree of hydrolysis, DH)的计算方法根据 pH—Stat 法<sup>[7, 8]</sup>。

大豆肽平均肽链长度的计算(Peptide Chain Length, PCL)<sup>[7, 8]</sup>。

若一个蛋白质分子未被水解时肽链长度(即肽中的氨基酸的平均数目)为 PCL<sub>0</sub>, 则肽键总数目为 PCL<sub>0</sub>—1, 当被切开 n—1 个肽键而水解成 n 个肽时, J. Adler—Nissen 认为, 由于食品蛋白质的 PCL<sub>0</sub> 为 200—300(相当于亚基的分子量为 25000—40000), 在 DH 较高的情况下, 水解度与多肽段平均大小的关系大约表示如下:

$$DH = \frac{1}{PCL} \times 100\%, \text{ 则 } PCL = \frac{1}{DH} \times 100\%$$

1.1.2 预处理对水解反应的影响 采用经济、简便的热处理使大豆蛋白变性。处理过程为: 将 5%的大豆分离蛋白溶液, 分别在 60℃、70℃、80℃、90℃、100℃水浴中加热 15min, 然后用 Promatex 进行酶水解, 酶水解条件为 pH7.0, T: 50℃, E/S=5%, 水解 6hr 后, 比较其 DH 值大小。

1.1.3 Promatex 酶解条件的优化 根据 1.1.

\* 收稿日期: 2003—09—29

项目来源: 总后司令部课题: 大豆寡肽制备技术研究(编号: 需 990113)

作者简介: 陶红(1971—), 女, 讲师, 硕士, 研究方向大豆食品研究。

1 试验结果. 筛选出水解能力最强的酶 Promatex 作为工具酶。在影响酶解反应的诸多因素中, 选择反应温度、pH 值、酶浓度作为 3 个试验因子, 分别选取 3 个水平进行正交试验, 确定 Promatex 水解大豆分离蛋白的最佳工艺参数, 正交试验表见表 3。

1.2 指标测定方法

水解液分子量测定 在岛津 LC-6A 高效液相色谱仪上进行, 色谱条件为: 流动相: 0.02M pH7 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液; 紫外检测器, 检测波长: 280nm; 柱温: 25℃; 流速: 0.5ml/min; 进样量: 10<sup>μ</sup>l。

标准分子量: LEU-GLY; MW: 170; Trp-Met-Asp-phe, MW: 587.3。

粗蛋白的测定 GB9823-88 常量凯氏定氮法。  
水分测定 按 GB5497-85 测定。  
灰分测定 按 GB5505-85 测定。  
NSI(氮溶解指数)的测定 AACC 方法 46-23。

2 结果与讨论

2.1 酶水解方法

2.1.1 工具酶的筛选

使用七种蛋白酶对大豆分离蛋白进行水解, 反应结果 DH 值见表 1。

表 1 实验所用蛋白酶的性能及反应结果

Table 1 Protease and reactional result in the experiment

最适作用条件			来源	DH(%)
木瓜蛋白酶	pH7.0	T50℃	广州酶制剂	14.20
中性蛋白酶	pH7.2	T55℃	无锡星达	8.46
碱性蛋白酶 2.709	pH11.0	T55℃	无锡星达	17.21
酸性蛋白酶	pH3.0	T40℃	无锡星达	7.56
木瓜蛋白酶	pH7.0	T50℃	无锡酶制剂	15.25
Alcalase	pH8.0	T50℃	丹麦 NoVo	13.18
Promatex	pH7.0	T50℃	丹麦 NoVo	21.25
Flavourzyme	pH7.0	T50℃	丹麦 NoVo	4.41

根据对 7 种蛋白酶水解大豆分离蛋白的能力进行比较后, 筛选出 Promatex, 对大豆分离蛋白的水解能力最强, 水解度可达 21.25%, 因此, 本研究选择 Promatex 作为制备大豆肽的工具酶。

2.1.2 热处理对酶解效果的影响

2.1.2.1 加热温度对热处理效果的影响 将大豆蛋白进行 60℃、70℃、80℃、90℃、100℃热处理后, 对大豆蛋白水解液的 DH 值进行比较, 结果见图 1。

白的水解度略有增加, 80℃时, 水解度开始增加明

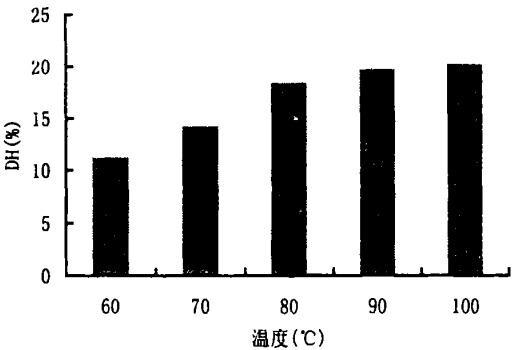


图 1 不同加热温度对大豆分离蛋白水解度影响

Fig. 1 Effects of different heating temperature on the DH of soybean hydrolysate

显, 90-100℃达到最高。这是因为在低离子强度下, 11S 在 70℃下开始有解离, 在 80℃时完全解离, 7S 在 75℃时开始解离<sup>[9,10]</sup>。因此, 在 90-100℃时, 原先被掩埋的-SH 基团完全暴露, 使球蛋白分子完全展开, 有利于水解反应的进行。

2.1.2.2 不同加热时间对热处理效果的影响

为了进一步确定加热时间对水解度的影响, 在 90℃、100℃分别处理 5min、10min、15min、20min、30min 测定其时间与 DH%的关系(酶解条件同上), 结果见表 2。

从表 2 可以看出, 在温度 90℃, 加热时间为 15min 的处理, 大豆分离蛋白, 酶解效果较佳。因为酶解效果受底物结构变化的影响较大, 底物蛋白分子的多肽链并不是特定的立体结构, 当成为松散而柔韧状态, 易于和蛋白酶结合时, 底物分子能迅速地被分解。加热时间过长或温度过高使 11S 的碱性亚基和 7S 的酸性亚基进一步聚合形成可溶性的聚合多肽, 从而导致了水解度的降低<sup>[9,10]</sup>。所以, 本研究采用 90℃, 15min 热变性处理。

表 2 不同加热时间对酶解效果的影响

Table 2 Effects of different heating time on the DH of soybean hydrolysate

温度	加热时间(min)				
	5	10	15	20	30
90℃	16.83	19.69	20.30	17.64	18.15
100℃	18.21	18.77	19.13	17.21	16.34

2.1.3 Promatex 酶解最佳反应条件的确定

2.1.3.2 三因素三水平正交实验确定 Promatex 酶反应最佳条件

实验结果见表 3, 水解度极差顺序分析见表 4, 方差分析见表 5。

从正交实验及极差分析结果可以看出, 在影响 DH 的三个因素中, A>B>C, 最佳反应条件为

表 3 Promatex 酶解正交实验结果

Table 3 Result of orthogonal designed experiment of hydrolysis with Promatex

试验序号	A	B	C	DH%
	pH 值	酶用量(ml)	温度(℃)	
1	6.5	0.27	40	14.89
2	6.5	0.4	50	16.49
3	6.5	0.53	60	20.95
4	7.0	0.27	50	22.64
5	7.0	0.4	60	24.30
6	7.0	0.53	40	26.17
7	7.5	0.27	60	18.78
8	7.5	0.4	40	20.12
9	7.5	0.53	50	27.63

A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>, 即: pH 值为 7.0, 酶用量为 0.53ml, 酶添加量为 E/S: 10.6%, 温度 50℃, 其中 pH 值对 DH 的影响最大, 温度对 DH 的影响最小, 无显著差异。因此, Promatex 是较理想的水解蛋白酶。在最适条件下, DH 可达 28.23%, PCL 为 3.54。

表 4 单酶酶解水解度极差顺序分析

Table 4 Result of range analysis of hydrolysis with Promatex

因子	A	B	C
K			
K <sub>1</sub>	52.33	56.31	61.18
K <sub>2</sub>	73.11	60.91	66.76
K <sub>3</sub>	66.53	74.75	64.03
k <sub>1</sub>	17.44	18.77	20.39
k <sub>2</sub>	24.37	20.30	22.25
k <sub>3</sub>	22.17	24.91	21.34
R	6.93	6.14	1.86

表 5 水解度方差分析

Table 5 Result of variance analysis of DH

方差来源	偏差平方和(S)	自由度(f)	均方和(S/f)	F <sub>比</sub>	显著性
A	73.83	2	36.92	11.87	*
B	61.42	2	30.71	9.87	*
C	5.19	2	2.60		
误差	6.22	2	3.11		

注: F<sub>0.05(2,2)</sub>=19; F<sub>0.1(2,2)</sub>=9

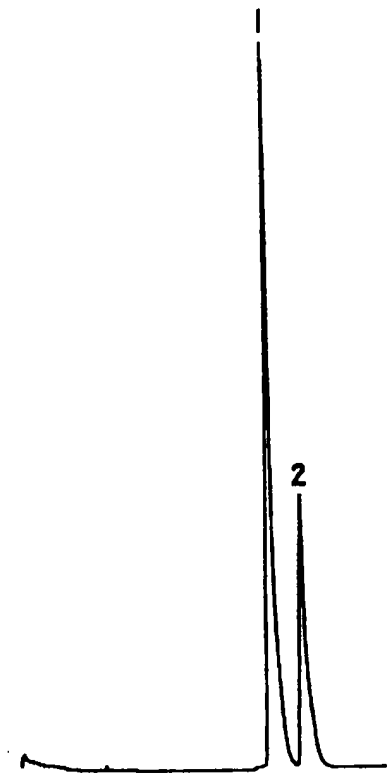


图 2 标准分子量的样品高效液相色谱图  
Fig 2 HPLC chromatography of the standard molecule sample

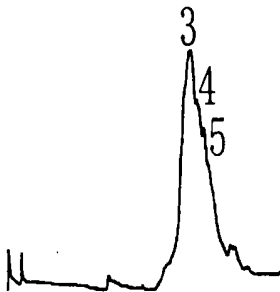


图 3 大豆肽样品 1 的高效液相色谱图  
Fig 3 HPLC chromatography of sample 1 of soybean peptide

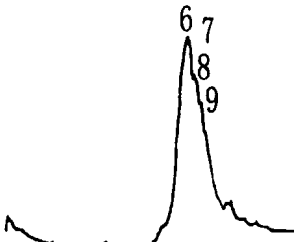


图 4 大豆肽样品 2 的高效液相色谱图  
Fig 4 HPLC chromatography of sample 2 of soybean peptide

结果见图 2、3、4。

经高效液相色谱测定, 水解液中 95% 以上的肽分子量在 170~587.3 之间, 符合研究目的 2 肽—4 肽的要求。高效液相色谱分离图显示, 标准分子量

2. 3 指标测定结果

2.3.1 水解液分子量测定

的标准样品的出峰时间分别为 37. 045min 和42. 183 min(图 2), 由此可得标准曲线的线性方程  $\lg MW=6.6507-0.1049T$ , 据此可算得大豆肽混合物的分子量(图 3、图 4), 主要集中在 268—512.1 之间, 二个样品的高效液相色谱分离图显示, 大豆肽分别约占总量的 91.44%和 98. 15%, 主要为 2—4 肽(氨基酸平均分子量按 120 计), 均为易吸收小肽。

3.2 各项指标测定结果

表 6 产品物化指标

Table 6 Physical and chemical characters of products

	1 号样	2 号样	平均值
粗蛋白(%)	87. 2	89. 1	88. 15
水分(%)	3. 7	3. 1	3. 4
灰分(%)	4. 1	3. 9	4. 0
糖及其它(%)	5. 0	3. 9	4. 45
NSI	104. 5	96. 3	100. 4
游离氨基酸(%)	10%	5%	7. 5%
10%溶液溶状	透明	透明	
15% TCA 可溶性氮(%)	109. 6	105. 2	107. 4
PCL	3. 0	3. 2	3. 1

3 结 论

3.1 本研究采用 Promatex 作为水解大豆分离蛋白的主要工具酶, 其水解能力强, 水解速度快, 是制备大豆寡肽的较理想的水解酶, 其 DH 可达28. 23%, PCL 为 3. 54。

3.2 水解前对大豆分离蛋白的预处理条件为: 90 ℃水浴, 15min, 可大大提高蛋白质与酶的契合, 提高 DH。

3.3 产品中 90%的肽分子量集中在 170—587. 3 之间, 符合 2 肽 ~ 4 肽的要求, 产品的 NSI> 99. 5%, 粗蛋白含量 88. 5 %。TCA 可溶性氮> 90 %, 符合产品质量要求。

参 考 文 献

1 葛文光. 大豆多肽的生理功能及作用效果[ J] . 无锡轻工业大学学报, 1996, 15(3): 272—276.

2 Neway, H, Smith, P. H. Inter cellular hydrolysis of dipeptides during intestinal absorption[ J] . Physiol. 1960, 152: 367—380.

3 Fairclough, P. D. Effece of peptide chain—length on amino acid and nitrogen absorption from two lactalbumin hydrolysates in the nomal human jejunum[ J] . Clin. Sci. 1986, 71: 65—69.

4 Kester J. J. , Richardson, T. Modification of whey proteins to improve functionality[ J] . Dairy Sci. 1984, 67: 2757—2774.

5 吴建平, 李丹, 丁霄霖. 大豆肽的功能特性及其应用. 大豆新加工技术原理与应用[ M] . 北京: 科学技术文献出版社, 1999. 3.

6 Kritchevsky, D. Dietary protein and athrosclerosis[ R] . JAOCS 1987, 64(8): 1167—1171.

7 崔继科, 刘景顺. 大豆分离蛋白酶解的研究(一)[ J] . 郑州粮食学院学报, 1998, 19(4)20—29.

8 Adler—Nissen, J., Olsen, H. S. The influnce of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. C.hpt. 7 in Functionality and Protein structure ed[ J] . A Pour—EL. 1979, PP125—126 Amila

9 Peng I C. . The Physicochemical and Functional Properties of Soy—bean 11S globulin— A Review[ J] . Cereal Chem, 1984, 61(6): 480—490.

10 Fumio Yamauchi. Molecular Understanding of Heat—induced Phenomena of Soybean Protein[ J] . Food Reviews International, 1991, 7 (3): 283—322.

STUDY ON PREPARATION OF SOYBEAN OLIGO—PEPTIDE BY ENZYME

Tao Hong    Liang Qi

( *The Quatermaster University of PLA, Changchun 130062* )

**Abstract** In this article the oligo—peptide was made by hydrolysis of soybean protein with promatex protease as tool enzyme. The effect of the tempratures and time of heating treatment on DH of the hydrolysis of soybean protein was studied respectively. The condition for heating treatment was 90 ℃ for 15minutes. The optimum conditions for hydrolysis of soybean protein with promates is pH7. 0, temperature: 50 ℃, substrate concentration: 5%, enzyme dosage: 0. 53ml, reaction time: 6hr . DH of soybean peptide prepaired can be up to 28. 23% at the optimum conditions , and PCL of it is between 2 and 4 . It is the oligo—peptide .

**Key words** Soybean oligo—peptide; Enzymatic hydrolysis; Molecular weight; The degree of hydrolysis