

# pH 值和热处理对大豆肽稳定性的影响

王若敏<sup>1,2</sup>, 陈杰<sup>1</sup>, 徐婧婷<sup>1</sup>, 郭顺堂<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 河北北方学院 食品科学系, 河北 张家口 075131)

**摘要:**分别采用 Folin-酚法、SE-HPLC、火焰原子吸收分光光度法研究了 pH 值和加热处理对大豆肽的稳定性(包括溶解性、分子量分布、可溶性钙结合量)的影响。结果表明:在 pH 值 3~11 时对大豆肽的溶解性和分子量分布均无显著影响,pH 值 9 时大豆肽的钙结合能力最大;高温热处理(温度为 80 ℃、100 ℃)对大豆肽的溶解度无显著影响,但都不同程度的增加了大分子(>20 KDa)的相对含量,100 ℃时肽的聚合速度更快;80 ℃加热 10 min 提高了大豆肽的钙结合能力,热处理温度升高或加热时间延长均会导致钙结合能力的下降。

**关键词:**大豆肽;pH 值;热处理;稳定性

**中图分类号:**TS214.2

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2009)06-1058-04

## Effect of pH and Heat Treatment on Stability of Soybean Peptides

WANG Ruo-min<sup>1,2</sup>, CHEN Jie<sup>1</sup>, XU Jing-ting<sup>1</sup>, GUO Shun-tang<sup>1</sup>

(1. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083; 2. Department of Food Science, Hebei North University, Zhangjiakou 075131, Hebei, China)

**Abstract:** Soybean peptides are capable of binding calcium, but it is still unclear if this ability will be affected in food-processing. In this paper, the effect of pH and heat treatment on stability of soybean peptides (solubility, molecular weights distribution, amount of soluble bind calcium) were studied by Folin-phenol, SE-HPLC and flame atomic absorption spectrometry. The results showed there were no significant differences of the solubility and molecular weights of soybean peptides between pH 3-11, calcium binding capacity of soybean peptides was highest at pH 9; heating treatment (80 ℃ and 100 ℃) have no significant influence on the solubility of soybean peptides while increased the content of high molecular weight. The amount of soluble bind calcium of soybean peptides improved in 80 ℃ for 10 min, whereas it decreased by the elevated temperature or prolonged heating time. Results suggest that pH and heat treatment have obvious influence on the stability of soybean peptides, so appropriate conditions should be selected in food processing.

**Key words:** Soybean peptides; pH; Heat treatment; Stability

大豆肽(soybean peptides)是大豆蛋白经酶水解后形成的具有一定分子量分布范围的肽混合物。与大豆蛋白相比,它具有广泛的 pH 值溶解性、保湿性和乳化性等<sup>[1-4]</sup>;还具有多种生理活性如抗氧化<sup>[5-6]</sup>、降血压<sup>[7]</sup>、降血脂和胆固醇<sup>[8-10]</sup>、促进微生物发酵<sup>[11]</sup>和钙结合能力<sup>[12-14]</sup>等等。包晓兰<sup>[14]</sup>利用 Protease M 和谷氨酰胺酶制备了具有钙结合能力的大豆肽,并明确了天冬氨酸和谷氨酸的羧基是大豆肽与钙结合的主要位点,分子量为 14.4 KDa 和 8~9 KDa 的组分与钙有较强结合能力。吕莹等进一步利用 Caco-2 细胞研究了不同分子量段(10~

30 KDa、3~10 KDa、1~3 KDa)的大豆肽促进钙吸收的能力,发现高分子量(10~30 KDa)的大豆肽表现出更高的促钙吸收效果<sup>[15]</sup>,这说明大豆肽促进钙吸收效果与其分子量段和钙结合量有关。

但大豆肽作为食品原料,加工条件是否影响其稳定性,其分子量分布和钙结合能力是否会发生变化尚不明确。为此,该试验从溶解性、分子量分布及可溶性钙结合量 3 个指标出发,研究 pH 值和热处理对大豆肽的稳定性的影响,从而为其在食品工业中的应用提供理论参考。

收稿日期:2009-04-24

第一作者简介:王若敏(1978-),女,硕士,现主要从事大豆肽的相关研究。E-mail:wanguomin@yahoo.cn。

通讯作者:郭顺堂,教授。E-mail:shuntang@cau.edu.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

低温脱脂豆粕(水分 8.4%,蛋白 55.2%,脂肪 0.8%,纤维 2.4%,灰分 6.0%,秦皇岛金海食品工业有限公司提供);Protease M(黄色粉体,  $51.5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ ,来源于米曲霉菌,内肽酶和外肽酶的复合酶)和谷氨酰胺酶(日本天野酶制剂株式会社提供);透析袋:24 nm-MWCO500(德国 Sorua 精密生物化学公司);Folin-酚试剂(北京鼎国生物技术有限责任公司);TrisBase(Promega 公司,美国);其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

Spectrum SP-2100 UV 型紫外可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司);TAS-986 型原子吸收分光光度计(北京普析通用有限责任公司);FD-1 型冷冻干燥机(北京博医康技术公司);TGL-16C 型离心机(上海安亭科学仪器厂);Agilent 1100 高效液相色谱系统(美国 Agilent 公司)色谱柱:Protein Pak 60 体积排阻色谱柱(Waters,  $7.8 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$ , bead size  $10 \mu\text{m}$ , fractionate on range 1~20 KDa)。

### 1.3 试验方法

1.3.1 大豆肽的制备 低温脱脂豆粕溶于 15 倍蒸馏水,用  $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 调 pH 值至 8,搅拌 1.5 h,离心( $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 20 min)去沉淀,将上清用  $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 调 pH 至 4.5,静置 30 min 后离心( $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 5 min)。将沉淀用蒸馏水洗 2 次,加蒸馏水搅匀后用 HCL 调 pH 至 3.0,于  $50^\circ\text{C}$  水浴中预热,按(E:S=1:100)加入 Protease M(按底物 2%计)酶解 1 h,  $90^\circ\text{C}$  水浴 10 min 灭酶,冷却至室温后离心( $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 20 min)去沉淀。上清调至 pH 7.0,于  $50^\circ\text{C}$  水浴中预热,按(E:S=1:50)加入谷氨酰胺酶(底物按 1%计),酶解 2.5 h,然后置于  $90^\circ\text{C}$  水浴中 10 min 灭酶,冷却至室温后离心( $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 20 min)。收集上清即为大豆肽(SPHs),真空冻干备用<sup>[14]</sup>。

1.3.2 大豆肽溶解度的测定 将大豆肽分别配成 5、10、30、50  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  不同浓度的溶液,充分搅拌后,  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,用 Folin-酚法<sup>[16]</sup>测上清液中肽的含量,公式如下:

$$\text{溶解度}/\% = \frac{\text{上清液中肽的质量}}{\text{样品中肽的质量}} \times 100\%$$

1.3.3 分子量分布测定 采用高效体积排阻色谱法(SE-HPLC)测定。分别称取 20 mg 大豆肽冻干粉溶于  $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液中,配制成浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,用直径为  $0.45 \mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤后进样。色谱条件:Agilent 1100 高效液相色谱系统,色谱柱:Protein Pak 60 体积排阻色谱柱(Waters,  $7.8 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$ , bead size  $10 \mu\text{m}$ , fractionate on range 1~20 KDa);流动相: $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲溶液;检测:214 nm;流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;柱温  $30^\circ\text{C}$ 。分子量校正曲线所用标准品为:胰蛋白酶抑制剂( $M_w 20100$ )、蛋清溶菌酶( $M_w 14400$ )、AB2-80( $M_w 7823$ )、AB2-81( $M_w 5856$ )、AB2-95( $M_w 3313$ )。根据标准品分子量的对数与保留时间作回归分析,获得的回归方程为  $T = 37.303 - 5.4083 \log MW$  ( $R^2 = 0.9814$ ,  $P < 0.05$ ),式中 MW 为分子量, T 为保留时间。根据标准品分子量的对数与保留时间之间的回归方程计算样品的分子量分布。

1.3.4 可溶性钙结合量的测定 称 20 mg 样品溶于 3 mL 蒸馏水中,溶解后加 1 mL 的  $0.06 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$  的  $\text{CaCl}_2$  溶液,室温下反应 30 min 后,  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,收集上清液,转移至透析袋(MWCO:500 Da)中,将透析袋用专用夹夹紧,移到 2000 mL 装有蒸馏水的烧杯中,用保鲜膜封严,在冰箱中( $4^\circ\text{C}$ )用磁力搅拌器搅拌流动透析,每 4 h 更换透析液 1 次,持续透析 24 h。透析结束后,采用空气-乙炔火焰原子吸收光谱法(FAAS 法)测定透析后样品的钙含量。

1.3.5 统计分析 所有设置 3 次平行,SPSS 方差分析(ANOVA),并用 Duncan Multiple-range test 进行多重比较分析,  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 pH 值对大豆肽稳定性的影响

由图 1 可以看出不同浓度的大豆肽除了 pH 5.0 时稍低外,在较宽的 pH 值范围内溶解度相差不大,很少受 pH 值的影响( $P > 0.05$ ),有利于其在食品中的应用。Qi 等<sup>[17]</sup>用 Pancreatin 酶解大豆分离蛋白时发现,浓度为  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的大豆肽在 pH 值 7.0 时其溶解度都达到了 90% 以上。钱磊等<sup>[18]</sup>在用碱性蛋白酶和风味蛋白酶联合制备大豆肽并对其进行性质研究时,也得出相同结论,  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度的

大豆肽在不同 pH 值范围内溶解度都达到了 90% 以上。结果显示,10 mg · mL<sup>-1</sup> 的大豆肽在不同 pH 值范围内溶解度为 90 % 左右,与 Qi<sup>[17]</sup> 和钟磊<sup>[18]</sup> 报道一致。作为具有促进钙吸收的肽类,良好的溶解性不仅有利于其在食品中的广泛应用,也能保证它最大限度地与钙结合以形成具有高含量可溶性钙的肽钙复合物。但高浓度下有部分大豆肽会产生絮凝反应而不溶解,因此在实际应用中要选择适宜的肽浓度,以防止肽不溶解。

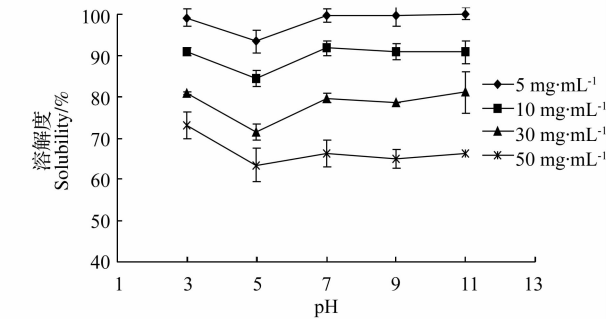


图 1 不同 pH 值对大豆肽溶解度的影响  
Fig. 1 Solubility of soybean peptides at different pH values

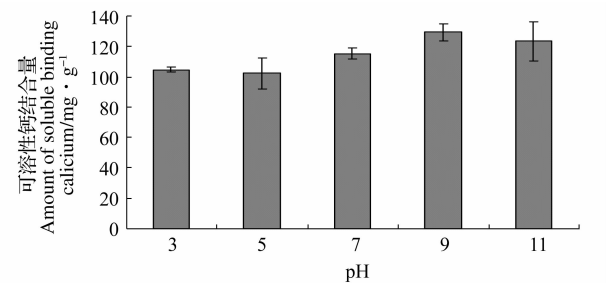


图 2 不同 pH 值对大豆肽的钙结合能力的影响  
Fig. 2 Amount of soluble bind calcium at different pH values

进一步地分析了大豆肽在不同 pH 值下的分子量分布和钙结合能力。结果表明,在不同 pH 值 (pH3 ~ 11) 肽的分子量分布没有显著性差异 (数据略),而钙结合能力有一定差异 (图 2)。pH 值为 3.0、5.0、7.0 时的钙结合量分别 104.2、102.2、115.1 mg · g<sup>-1</sup>, 而 pH 值 9.0 和 11.0 时为 129.2 mg · g<sup>-1</sup> 和 123.2 mg · g<sup>-1</sup>, 显著高于 pH 值 3.0、5.0、7.0 时的钙结合量 ( $P < 0.05$ )。分析原因可能是在碱性条件下,大豆肽的水合作用和带电性增强,使肽链得以充分舒展,增加了钙结合位点,从而使钙结合量略有增加。

2.2 热处理对大豆肽稳定性的影响

热处理是食品加工中常用的技术手段分析了不

同浓度肽在 80 ℃ 和 100 ℃ 条件下的溶解性。低浓度的肽溶解度在两种加热温度 and 不同加热时间 (0 ~ 30 min) 之间几乎没有变化,高浓度 (30、50 mg · mL<sup>-1</sup>) 肽溶解性随加热时间增加略有升高,但差异不显著 (数据略)。

从图 3 中可以看出,2 种加热处理均使肽中的大分子量组分比例增加。80 ℃ 和 100 ℃ 加热相比,80 ℃ 加热 20 min 后分子量为 5 ~ 20 KDa 组分比例降低,由加热前的 23.84% 降到 18% 左右,分子量大于 20 KDa 组分含量由加热前的 29% 增加到 36%。而这一结果在 100 ℃ 热处理时,时间缩短至 10 min,2 种热处理对低分子量组分 (< 5 KDa) 都没有显著影响。

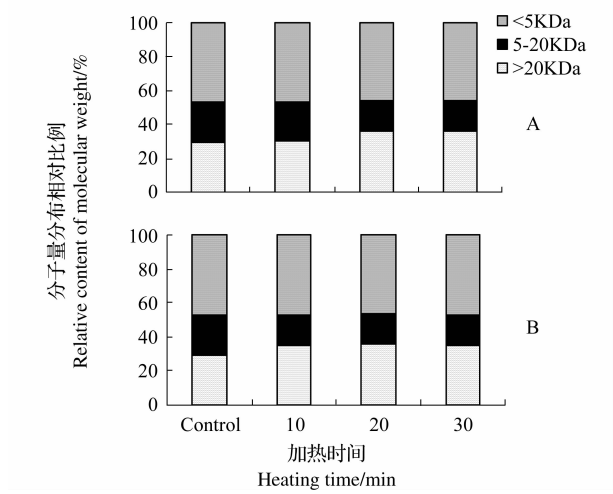


图 3 不同加热温度对大豆肽分子量分布的影响  
(A 为 80℃ 加热,B 为 100℃ 加热)

Fig. 3 Molecular weight distribution of soybean peptides at 80℃ (A) and 100℃ (B)

由图 4 可知,不同加热温度、不同加热时间对大豆肽的钙结合能力影响不同。加热温度为 80 ℃ 时,随着加热时间的增加,其钙结合量呈现先增加后下降的趋势。以加热 10 min 时钙结合量最大 (由对照的 114.6 mg · g<sup>-1</sup> 增加到 139.5 mg · g<sup>-1</sup>)。在加热温度为 100 ℃ 时,钙结合量均随加热时间的延长而下降。这说明一定程度的加热处理,使肽分子充分舒展,暴露了更多的钙结合位点,使钙结合量增多。但升高加热温度或延长加热时间,会造成大豆肽分子的卷曲聚合,减少了表面和钙结合的位点,导致其钙结合能力的下降。

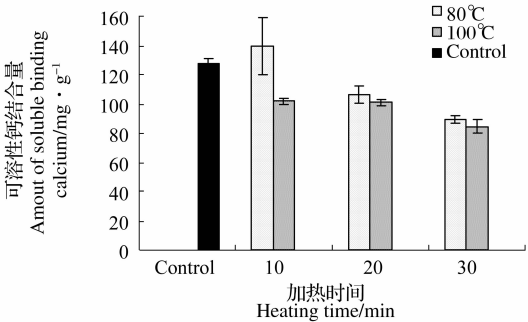


图4 不同加热温度对大豆肽的钙结合能力的影响

Fig.4 Amount of soluble binding calcium at different temperatures

3 结论

大豆肽(浓度 10 mg · mL<sup>-1</sup>)在广泛的 pH 值范围有良好的溶解性,加热对较高浓度 30、50 mg · mL<sup>-1</sup>的大豆肽表现出轻微的增溶效果,这种良好的特性非常有利于在食品加工中的应用。pH 值 3 ~ 11 范围均对大豆肽的分子量分布没有显著性差异,80 ℃加热 20 min 后和 100 ℃加热 10 min 增加了大分子(>20 KDa)的含量。pH 值为 9 时,钙结合能力最大,一定程度的加热处理可以提高结合钙能力,但高温长时加热导致了大豆肽聚合从而使钙结合能力下降。

参考文献

[1] 王静,郝再彬.大豆肽的特性和功能及研究进展[J].黑龙江农业科学,2004(5):32-36. (Wang J,Hao Z B. Advance in study on properties and function of soybean peptides[J]. Heilongjiang Agricultural Science,2004(5):32-36. )

[2] 孙群,阚健全,赵国华,等.大豆肽特性及其在食品工业中应用[J].粮食与油脂,2003(12):11-13. (Sun Q,Kan J Q,Zhao G H,et al. The properties of soybean peptides and its applications in food industry[J]. Cereals and Oil,2003(12):11-13. )

[3] 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. (Zhang Z,Zhao Y C,Li-ang J Z ,et al. The physiological function and product development of soybean peptides [J]. Soybean Bulltin,2003(2):25-26. )

[4] 严群芳,王恬.大豆源生物活性肽的研究[J].饲料研究,2006(8):25-27. (Yan Q F,Wang T. A study of bioactive peptides from soybean protein [J]. Feed Research,2006(8):25-27. )

[5] 荣建华,李小定,谢笔钧.大豆肽体外抗氧化效果的研究[J].食品科学,2002,23(11):118-120. (Rong J H,Li X D,Xie B J. A Study of the antioxidative activities of soybean peptides[J]. Food Science,2002,23(11):118-120. )

[6] Chen H M,Muramoto K,Yamauchi F. Structural analysis of antioxi-dative peptides from soybean β- conglycinin [J]. Journal of Agri-cultural and Food Chemistry,1995,43:574-578.

[7] Kawamura S. Peptide from soybean globulins with the action to in-hibit angiotensin- converting enzymes and their effects to blood pressure[J]. Food Industry,1997,40:73-82.

[8] 包乐媛,张业尼,钱磊,等.大豆肽对高血脂症大鼠的降脂作用[J].大豆科学,2007,26(5):752-756. ( Bao L Y,Zhang Y N,Qian L,et al. Effects of soybean peptides on blood lipids in hyperli-pldemia rats [J]. Soybean Science,2007,26(5):752-756. )

[9] 张晓梅,钟芳,麻建国.大豆降胆固醇活性肽的初步分离纯化[J].食品与机械,2006,22(2):33-37. (Zhang X M,Zhong F, Ma J G. Preliminary purification of hypocholesterolemic peptides from soy protein [J]. Food and Machinery,2006,22(2):33-37. )

[10] Lovati M R,Manzoni C,Gianazza E,et al. Soy protein peptides reg-ulate cholesterol homeostasis in HepG2 cells[J]. Journal of Nutri-tion,2000,130:2543-2549.

[11] 赵毅,马永强,石彦国.大豆蛋白水解物促进乳酸发酵的作用[J].食品与机械,2000(1):22-23. (Zhao Y, Ma Y Q, Shi Y G. The effect of proliferation of lactic acid bacteria by addition of SPH [J]. Food and Machinery,2000(1):22-23. )

[12] 包小兰,郭顺堂,焉华娟,等.脱酰胺化对大豆蛋白水解物可溶 性钙结合量的影响[J].农产品加工,2006(8):63-66. ( Bao X L,Guo S T,Yan H J,et al. Effect of deamidation of soybean protein hydrolysates on amount of soluble binding calcium [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing,2006(8):63-66. )

[13] Bao X L,Lü Y,Yang B C,et al. A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates [J]. Journal of Food Science,2008,73(4):117-121.

[14] 包晓兰.大豆肽与钙结合形成可溶性复合物的机制及其稳定 性的研究[D].北京:中国农业大学,2007:1-65. ( Bao X L. The forming mechanism and stability of the soluble complexes during calcium binding by soybean peptides [D]. Beijing: China Agricul-tural University,2007:1-65. )

[15] Lü Y,Bao X L,Yang B C,et al. Effect of soluble soybean protein Hydrolysate-calcium complexes on Calcium uptake by Caco-2 cells [J]. Journal of Food Science,2008,73(7):168-173.

[16] Lowry O H,Rosebrough N J,Farr A L,et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry,1951,193(1):265-275.

[17] Qi M,Hettiarachchy N S,Kalapathy U. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolate modified by pancreatin [J]. Food Science,1997,62(6):1110-1115.

[18] 钱磊,张业尼,唐翔宇,等.双酶酶法制备大豆肽及其性质研究[J].现代食品科技,2006,23(4):6-10. ( Qian L,Zhang Y N,Tang X Y,et al. Study on the hydrolysis of denatured soybean cake via hydrolysis by two enzymes and the properties of obtained peptides [J]. Modern Food Science and Technology,2006,23(4):6-10. )