

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2015.06.009

文章编号:2095-6002(2015)06-0051-06

引用格式:师广波,辛寒晓,马艳芳,等.固定化风味蛋白酶水解法生产高水解度大豆肽[J].食品科学技术学报,2015,33(6):51-56.



SHI Guangbo, XIN Hanxiao, MA Yanfang, et al. Production of soybean peptide with high degree of hydrolysis by immobilized Flavourzyme[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015,33(6):51-56.

固定化风味蛋白酶水解法生产高水解度大豆肽

师广波¹,辛寒晓²,马艳芳¹,孙中涛^{1,*}

(1. 山东农业大学 生命科学学院, 山东 泰安 271018;

2. 山东佐田氏生物科技有限公司, 山东 济南 250000)

摘要:采用固定化风味蛋白酶水解大豆蛋白生产大豆肽,以降低生产成本,同时提高水解度。通过单因素实验和响应面法对固定化风味蛋白酶法生产大豆肽的条件进行优化。结果表明,固定化风味蛋白酶法生产大豆肽的优化水解条件是65℃、pH值8.0、加酶量50g/L,酶解7h,水解度可达17.72%。固定化风味蛋白酶重复使用7次,相对酶活力仍高达79.1%。交联壳聚糖法制备的固定化风味蛋白酶具有良好的稳定性,可以重复多次使用,用于生产高水解度大豆肽是可行的,有利于降低生产成本。

关键词:大豆肽;风味蛋白酶;固定化酶;球形交联壳聚糖;响应面法

中图分类号:TS229;Q814.2

文献标志码:A

大豆肽是以大豆蛋白为原料,采用酶解法或发酵法生产的肽类混合物,其主要成分是由2~10个氨基酸组成的分子质量低于2000u的低聚肽^[1-2]。大豆肽不仅具有大豆蛋白的营养学特性,还具有易溶于水、流动性好等理化特性和容易消化吸收、缓解疲劳、提高免疫力、降血糖、降血脂、降血压、促进脂肪代谢等生理特性^[3-5],在功能性食品领域应用前景广阔,市场潜力巨大。

酶法生产大豆肽可采用单酶水解法或复合酶水解法。与单酶法相比,复合酶法具有收率高、水解度高、分子量低、生理活性强等优点,应用更为广泛。碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶与风味蛋白酶是最常用的蛋白酶,复合蛋白酶也是以其中两种或多种按一定比例配制而成,其中碱性蛋白酶与风味蛋白酶是最常用的组合^[6-8]。与单酶水解法相比,同时或依次使用碱性蛋白酶与风味蛋白酶进行水

解,不仅可提高收率和水解度,还可以减轻大豆肽的苦味。与碱性蛋白酶相比,风味蛋白酶价格昂贵。采用合适载体对风味蛋白酶进行固定化,制成固定化酶,反复多次使用,有利于降低大豆肽的生产成本^[9-11]。

本研究采用球形交联壳聚糖法制备固定化风味蛋白酶,并依次采用碱性蛋白酶和固定化风味蛋白酶对大豆蛋白进行水解制备高水解度大豆肽,优化其水解条件,希望能为固定化风味蛋白酶在大豆肽生产中的应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

大豆蛋白,山东万得福实业集团有限公司,蛋白质质量分数为90%;壳聚糖(脱乙酰度≥90.0%)与福林试剂,北京索莱宝科技有限公司;风味蛋白酶

收稿日期:2015-02-23

基金项目:国家海洋局海洋生物活性物质与现代分析技术重点实验室开放基金资助项目(MBSMAT-2014-05)。

作者简介:师广波,男,硕士研究生,研究方向为发酵工程与酶工程;

*孙中涛,男,副教授,博士,主要从事发酵工程与酶工程方面的研究。通信作者。

(Flavourzyme 500MG)与碱性蛋白酶(2.0×10^6 U/g),诺维信生物技术有限公司;戊二醛(25%水溶液),中国医药(集团)上海化学试剂公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

DHZ-D型恒温振荡器,苏州培英实验设备有限公司;PHSJ-4A型pH计,上海雷磁仪器厂;Spectrumlab S22型可见分光光度计,上海棱光技术有限公司;JA1003型电子天平,上海恒平科学仪器有限公司;循环水式真空泵,巩义市予华仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 固定化风味蛋白酶的制备

固定化风味蛋白酶的制备采用交联壳聚糖法^[12-13]。准确称取2.5 g壳聚糖,溶于100 mL体积比为2%的冰乙酸溶液中,逐滴滴入3%的NaOH溶液中,静置2 h使壳聚糖载体硬化,滤出并洗至中性,再置于质量比为0.5%的戊二醛溶液中反应6 h进行交联,滤出并洗去戊二醛残液,即制得活化的壳聚糖载体。将载体加入风味蛋白酶溶液中,于4℃固定化反应12 h,滤出并洗去残余酶液,即得固定化风味蛋白酶,置于4℃冰箱中保存备用。风味蛋白酶活力的测定采用福林酚法(GB/T 23527—2009)。

1.3.2 大豆蛋白的水解^[14]

准确称取10 g大豆蛋白,置于250 mL具塞三角瓶中,加入90 mL去离子水,搅匀,90℃水浴加热5 min使蛋白质适度变性,冷却后加入质量比为1% (以大豆蛋白的质量计)的碱性蛋白酶,放入摇床中于55℃、150 r·min⁻¹水解4 h,然后加热至90℃并保温10 min进行灭酶。酶解液真空抽滤,滤液采用固定化风味蛋白酶继续水解,水解结束后,滤出固定化风味蛋白酶,置于4℃冰箱中保存,以备重复使用,滤液用于测定水解度。

1.3.3 单因素实验

依次采用单因素实验设计对固定化风味蛋白酶的水解温度、pH值、时间、加酶量等参数进行优化,即每次改变一个参数,分别在不同的水解温度(35~85℃)、pH值(6.5~9.0)、时间(1~10 h)、加酶量(20~70 g/L)等条件下按照1.3.2进行水解,并测定水解度,以确定各参数的优化值。

1.3.4 Box-Behnken 实验

在单因素实验的基础上,采用Box-Behnken实验设计对固定化风味蛋白酶的水解时间、水解温度和加酶量等3个主要因素进一步优化。利用Design

Expert 8.0软件进行实验设计和分析,实验因素及其水平见表1。

表1 Box-Behnken 实验的因素与水平

Tab.1 Experimental factors and levels of Box-Behnken design

因素	代码	水平		
		-1	0	1
时间/h	X_1	2	6	10
温度/℃	X_2	35	60	85
加酶量/(g·L ⁻¹)	X_3	20	45	70

1.3.5 水解度的测定^[15]

水解度(degree of hydrolysis, DH)是指水解过程中蛋白质中肽键断裂的百分数,可通过测定水解产物的 α -氨基氮含量进行计算,见式(1)。

水解度(DH) =

$$\frac{\text{水解后生成的}\alpha\text{-氨基氮含量}}{\text{样品的总含氮量}} \times 100\% \quad (1)$$

α -氨基氮含量的测定采用茚三酮法^[16],总氮含量的测定采用凯氏定氮法^[17]。

1.3.6 重复使用次数对固定化风味蛋白酶活力的影响实验

在所优化的条件下,按1.3.2反复多次进行水解实验,每次反应结束后,将固定化风味蛋白酶滤出并洗净,重新置于新鲜的反应体系中进行下一次水解实验。每次水解实验结束后,对固定化风味蛋白酶进行酶活力测定,以评价其稳定性。

2 结果与分析

2.1 水解温度对水解度的影响

水解温度对大豆肽水解度的影响结果如图1。由图1可见,温度在35~65℃变化时,水解度随着温度的升高而增大,并在65℃时达到最大值,之后再提高水解温度,水解度反而降低,但水解温度为55~75℃均能保持较高的水解度,这说明固定化风味蛋白酶热稳定性较好,在工业应用中可承受较大的温度波动。固定化风味蛋白酶水解大豆蛋白的最适温度为65℃,这与李峰等^[18]报道的游离风味蛋白酶的最适温度55℃相比提高了10℃,其原因可能是酶分子与载体结合后,热稳定性提高,热失活速率下降。最适反应温度升高,使酶与底物结合频率提高,水解速度加快,有利于提高工业生产效率。

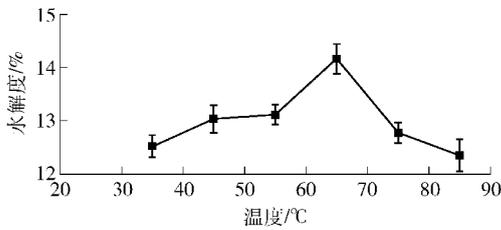


图1 水解温度与大豆肽水解度的关系

Fig.1 Effect of temperature on DH of soybean peptides

2.2 pH 值对水解度的影响

pH 值对大豆肽水解度的影响结果如图 2。在 pH 值为 6.5~8.0 时,随着 pH 值的升高,水解度增加,并在 pH 值为 8.0 时达到最大值。在 pH 值为 7.5~8.5 时,水解度均能保持较高水平。固定化风味蛋白酶水解大豆蛋白时最适 pH 值为 8.0,这与李峰等^[18]和蔡高峰等^[19]报道的游离风味蛋白酶的最适 pH 值相比提高了 0.5,且最适 pH 值范围更宽,这在工业生产中具有重要意义。

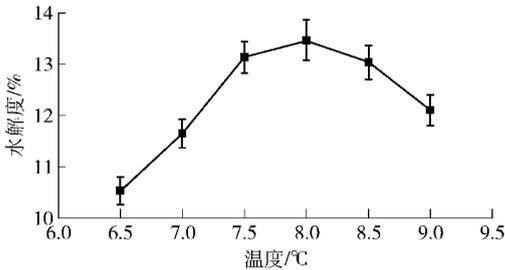


图2 pH 值与大豆肽水解度的关系

Fig.2 Effect of pH on DH of soybean peptides

2.3 加酶量对大豆肽水解度的影响

固定化风味蛋白酶的使用量对大豆肽水解度的影响结果如图 3。由图 3 可见,加酶量较小时,水解度随加酶量的增加而迅速增大,加酶量达到 50 g/L 后再增大加酶量,水解度不再明显增大。其原因是加酶量较低时,增加酶的用量可以提高酶与底物的结合频率,水解速度加快;随着加酶量的提高,酶与底物的结合趋于饱和,酶浓度不再是水解反应的限速因素。因此,宜选择 50 g/L 为最适加酶量。

2.4 水解时间与大豆肽水解度的关系

水解时间对大豆肽水解度的影响结果如图 4。由图 4 可见,随着水解时间的延长水解度逐渐增加,7 h 后,水解度的增加不再明显,酶解效率降低,因此,最适水解时间为 7 h。

2.5 Box-Behnken 实验结果及分析

Box-Behnken 实验结果如表 2。利用 Design Expert 8.0 软件对实验数据进行多元回归分析,仅考

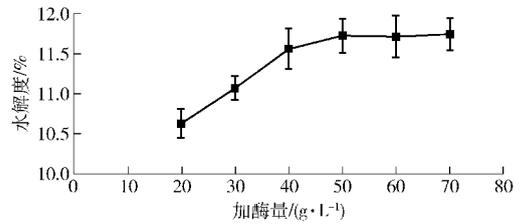


图3 加酶量与大豆肽水解度的关系

Fig.3 Effect of enzyme dosage on DH of soybean peptides

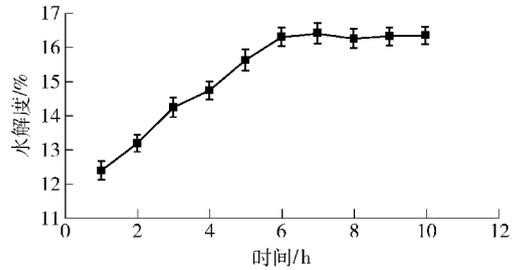


图4 水解时间与大豆肽水解度的关系

Fig.4 Effect of hydrolysis time on DH of soybean peptides

虑对响应值影响显著的各项,得到水解时间(X_1)、水解温度(X_2)及加酶量(X_3)与水解度(Y_1)间的二次多项回归方程,见式(2)。

$$Y_1 = 16.54 + 2.23X_1 + 0.9X_2 + 0.6X_3 - 0.045X_1X_2 + 0.16X_1X_3 + 0.49X_2X_3 - 2.28X_1^2 - 0.71X_2^2 - 0.45X_3^2 \quad (2)$$

表2 Box-Behnken 实验设计及结果

Tab.2 Box-Behnken design and experimental results

实验组别	X_1	X_2	X_3	水解度/%
1	-1	-1	0	10.12
2	1	-1	0	14.56
3	-1	1	0	12.63
4	1	1	0	16.89
5	-1	0	-1	11.03
6	1	0	-1	15.27
7	-1	0	1	12.03
8	1	0	1	16.91
9	0	-1	-1	14.75
10	0	1	-1	14.94
11	0	-1	1	14.85
12	0	1	1	16.98
13	0	0	0	16.87
14	0	0	0	15.96
15	0	0	0	17.01
16	0	0	0	16.87
17	0	0	0	15.98

对回归方程进行方差分析和显著性检验,结果见表3。由表3可知,该回归模型极显著($P < 0.01$),失拟项不显著($P > 0.05$),说明该模型有较

表3 回归模型的方差分析

Tab.3 Analysis of variance for fitted regression model

方差源	系数估计	标准差	平方和	均方	F值	P值
Model			76.38	8.49	30.69	<0.0001**
X_1	2.23	0.24	39.69	39.69	143.54	<0.0001**
X_2	0.90	0.19	6.41	6.41	23.17	0.0019**
X_3	0.60	0.19	2.86	2.86	10.33	0.0148*
X_1X_2	-0.045	0.19	0.0081	0.0081	0.029	0.8690
X_1X_3	0.16	0.26	0.10	0.1	0.37	0.5621
X_2X_3	0.49	0.26	0.94	0.94	3.40	0.1076
X_1^2	-2.28	0.26	21.87	21.87	79.08	<0.0001**
X_2^2	-0.71	0.26	2.12	2.12	7.65	0.0278*
X_3^2	-0.45	0.26	0.85	0.85	3.07	0.1232
失拟项			0.85	0.28	1.04	0.4663

*表示在95%置信区间内显著;**表示在99%置信区间内显著

著

好的拟合度。模型一次项中 X_1 与 X_2 影响极显著($P < 0.01$), X_3 影响显著($P < 0.05$);二次项中, X_1 影响极显著($P < 0.01$), X_2 影响显著($P < 0.05$), X_3 不显著($P > 0.05$);交互项均不显著($P > 0.05$)。模型的决定系数 $R^2 = 0.9753$,表明响应值的变化有97.53%来源于所选变量,这说明该模型能很好地反应水解温度、时间和加酶量对水解度的影响,能够准确描述与预测大豆蛋白的酶解过程。

利用 Design Expert 8.0 软件绘制出的响应面图可以更直观地描述 X_1 、 X_2 和 X_3 等3个因素对水解度的影响,结果如图5。通过响应面图可以对各因素的交互影响进行分析与评价,预测水解度的最大值,并确定各因素的最佳水平。模型预测的各因素最佳水平的编码值分别为 $X_1 = 0.32$, $X_2 = 0.21$, $X_3 = 0.38$,与其相对应的真实值分别为时间7.27 h、温度65.19 °C、加酶量54.63 g/L。在此最优条件下,模型预测的水解度最大值为17.39%。为验证模型预测结果的准确性,在圆整条件下进行了3次验证实验,即:水解时间7 h、温度65 °C、加酶量50 g/L。水

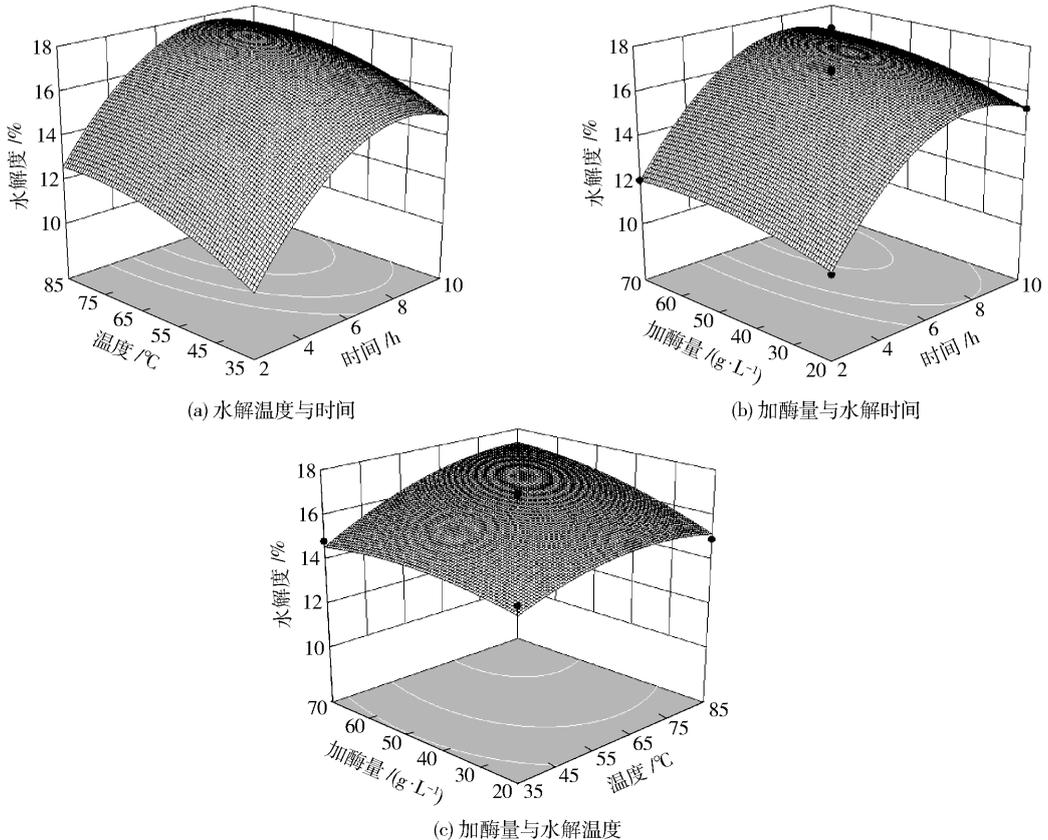


图5 温度、时间和加酶量等因素对大豆肽水解度的交互影响

Fig.5 Response surface plots showing interactive effect of temperature, hydrolysis time and enzyme dosage on DH of soybean peptides

解度的实测值为 $17.72\% \pm 0.31\%$, 与预测值相差较小, 这说明该模型是准确有效的。酶水解法生产的大豆肽, 水解度一般在 $5\% \sim 17\%$ [6,8,14,19-21], 相比之下, 碱性蛋白酶-固定化风味蛋白酶依次酶解也可以获得较高的水解度, 达到了碱性蛋白酶-风味蛋白酶同时或依次水解的生产水平。

2.6 重复使用次数对固定化风味蛋白酶活力的影响

酶解结束后, 固定化风味蛋白酶可以方便地从水解体系中回收并重复使用。重复使用次数对固定化风味蛋白酶活力的影响结果如图6。由图6可见, 随着使用次数的增加, 相对酶活力逐渐降低。重复使用7次, 相对酶活力仍高达79.1%, 这说明固定化风味蛋白酶具有良好的稳定性。重复使用7次之后, 如果再继续重复使用, 不仅相对酶活力下降较快, 球状载体的破碎率也越来越高, 因此, 在大豆肽生产中, 固定化风味蛋白酶以重复使用7次为宜。

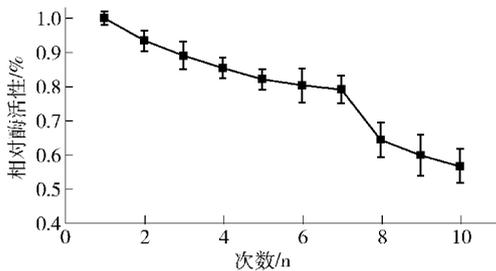


图6 重复使用次数与固定化风味蛋白酶活力的关系

Fig.6 Effect of reusing times on the activity of immobilized Flavourzyme

3 结论

碱性蛋白酶与风味蛋白酶是大豆肽生产中最常用的两种蛋白酶, 二者同时或依次水解可以提高大豆肽的水解度。采用交联壳聚糖法将风味蛋白酶制备成固定化酶, 可以重复多次使用, 有利于降低生产成本。大豆蛋白水溶性差, 直接采用固定化酶水解时, 底物分子不能进入固定化酶的内部, 反应速度很慢。依次采用碱性蛋白酶与固定化风味蛋白酶进行水解, 碱性蛋白酶将大豆蛋白水解成可溶性的胨和肽, 再采用固定化风味蛋白酶进行水解, 底物可扩散入固定化载体的内部, 水解速度提高。研究结果表明, 固定化风味蛋白酶的优化水解条件是 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 、pH 值 8.0、加酶量 50 g/L , 酶解 7 h , 水解度可达 17.72% 。固定化风味蛋白酶具有良好的稳定性, 重

复使用7次, 相对酶活力仍高达 79.1% 。因此, 固定化风味蛋白酶用于高水解度大豆肽的生产具有技术和经济上的可行性。

参考文献:

- [1] Weng T M, Chen M T. Effect of two-step fermentation by *Rhizopus oligosporus* and *Bacillus subtilis* on protein of fermented soybean [J]. Food Science and Technology Research, 2011, 17(5): 393-400.
- [2] Bernard F G, Alexandre Z, Robert M, et al. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food [J]. Food Research International, 2004, 27(2): 123-131.
- [3] Kazunobu T. Improvement of physicochemical properties of soybean proteins by enzymatic hydrolysis [J]. Food Science and Technology Research, 2009, 15(4): 381-388.
- [4] 李文, 陈复生, 丁长河, 等. 大豆肽生理功能的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2013(4): 360-362.
- [5] Dilshat Y, Parida H, Nurmhammat A, et al. Effects of soybean peptide on immune function, brain function, and neurochemistry in healthy volunteers [J]. Nutrition, 2012, 28: 154-159.
- [6] 梁秋丽, 方佳茂, 罗石柱, 等. 高水解度大豆寡肽专用复合酶的配方优化 [J]. 食品科学, 2012, 33(23): 254-258.
- [7] Tsou M J, Kao F J, Chiang W D, et al. Enhancing the anti-adipogenic activity of soy protein by limited hydrolysis with Flavourzyme and ultrafiltration [J]. Food Chemistry, 2010, 122: 243-248.
- [8] 孙勇. Alcalase 2.4 L 碱性内切酶和 Flavourzyme 风味酶酶解大豆分离蛋白及脱苦工艺优化 [J]. 中国酿造, 2014, 33(80): 38-42.
- [9] Benjakul S, Binsan W, Tanaka M, et al. Effects of Flavourzyme on yield and some biological activities of mungoong, an extract paste from the cephalothorax of white shrimp [J]. Journal of Food Science, 2009, 74(2): 73-80.
- [10] 曹玉华, 杨慧萍, 杨为民, 等. 应用双固定化酶制备大豆肽的研究 [J]. 中国粮油学报, 2003, 18(15): 40-43.
- [11] 曹玉华, 汪海峰, 杨慧萍, 等. 应用固定化木瓜蛋白酶制备大豆肽的研究 [J]. 中国粮油学报, 2009, 24(3): 113-116.
- [12] 师广波, 马艳芳, 郑明刚, 等. 壳聚糖固定化风味蛋白酶的制备及其酶学特性 [J]. 食品科学技术学报,

- 2014, 32(6): 5-10.
- [13] Mohd A G, Owais A W, Uma S G, et al. Immobilization of fructosyltransferase by chitosan and alginate for efficient production of fructooligosaccharides [J]. *Process Biochemistry*, 2014, 49: 840-844.
- [14] 梁秋丽, 方佳茂, 罗石柱, 等. 多酶复合水解法生产高水解度大豆寡肽的工艺优化[J]. *食品工业*, 2012, 33(9): 82-86.
- [15] 刘红梅, 师广波, 马艳芳, 等. 液态发酵法生产花生抗氧化肽和中性蛋白酶的工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(18): 175-179.
- [16] 中华人民共和国国家改革和发展委员会. QB/T 1686—2008 中华人民共和国轻工行业标准—啤酒麦芽[S]. 北京:中国轻工业出版社, 2008.
- [17] 王永华. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2011: 119-122.
- [18] 李峰, 潘瑶, 陈奇. 大豆活性肽酶解制备的工艺条件研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(10): 69-74.
- [19] 蔡高峰, 黄纪念, 孙强, 等. 大豆降压肽酶解制备工艺的优化研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2013(3): 26-29.
- [20] Marcuse R. The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester[J]. *The Journal of The American Oil Society*, 1962, 39: 97-103.
- [21] 石晓, 豆康宁. 木瓜蛋白酶水解大豆蛋白的工艺优化研究[J]. *粮油食品科技*, 2014, 22(5): 80-83.

Production of Soybean Peptide with High Degree of Hydrolysis by Immobilized Flavourzyme

SHI Guangbo¹, XIN Hanxiao², MA Yanfang¹, SUN Zhongtao^{1,*}

(1. *College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China;*

2. *Shandong Zuotianshi Biotechnology Company Limited, Jinan 250000, China*)

Abstract: Produce soybean peptides from soy protein using immobilized Flavourzyme for lower production costs and higher degree of hydrolysis. Single-factor experiment and response surface methodology were used to optimize the hydrolysis process. The results showed that the degree of hydrolysis reached 17.72% when soy protein was hydrolyzed by immobilized Flavourzyme at the optimum conditions: hydrolysis temperature of 65 °C, pH8.0, enzyme dosage of 50 g/L, hydrolysis time of 7 h. The immobilized Flavourzyme was stable enough to be reused for 7 times, and the relative activity still remained 79.1%. It was feasible to produce soybean peptides with high degree of hydrolysis using immobilized Flavourzyme, which was prepared with globular cross-linked chitosan and could be reused for several times.

Key words: soybean peptide; Flavourzyme; immobilized enzyme; globular cross-linked chitosan; response surface methodology

(责任编辑:叶红波)