

大豆发酵食品毛豆腐中活性肽的制备及功效评价

胡晓倩, 桂子康, 邓军伟, 王家政, 郑晓慧, 杜金金, 吴永祥
(黄山学院生命与环境科学学院 安徽黄山 245041)

摘要 为探究大豆发酵食品毛豆腐中活性肽的性能,研究酶解制备徽州呈坎罗氏毛豆腐活性肽的提取工艺,并对活性肽溶液进行分离纯化、体外抗氧化功效评价和氨基酸组成分析。结果显示:采用单酶酶解法制备毛豆腐活性肽,碱性蛋白酶制备的活性肽含量最高。响应曲面法优化酶解毛豆腐提取活性肽的最优工艺条件为料液比 1:50 g/mL、碱性蛋白酶用量 2 500 U/g、酶解温度 50.78 °C、pH 10.37、酶解时间 2.08 h,验证提取活性肽含量为(69.441±1.033)mg/g,比未加碱性蛋白酶提取活性肽含量提高 66.07%。碱性蛋白酶酶解毛豆腐活性肽溶液的总还原力,对 ABTS、DPPH 和羟基自由基的清除率,比未加酶的活性肽分别提高了 37.80%、22.91%、31.75%和 62.46%。超滤筛分获得分子质量<3 ku 和 3~10 ku 的活性肽溶液,对 ABTS 自由基的清除率比相同浓度酶解稀释原液分别提高了 145.26%、74.71%;对 DPPH 自由基的清除率,比相同浓度酶解稀释原液分别提高了 93.41%、72.44%。碱性蛋白酶酶解毛豆腐活性肽中蛋白质氨基酸占比 73.01%,必需氨基酸占比 37.74%,鲜味氨基酸占比 17.39%,药用氨基酸占比 43.67%。徽州呈坎罗氏毛豆腐是具抗氧化、营养和药用保健功能的食源性活性肽的优良来源,极具开发利用价值。

关键词 大豆发酵食品;毛豆腐;活性肽;提取工艺优化;抗氧化;氨基酸组成

文章编号 1009-7848(2023)03-0217-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.03.023

食源性活性肽是直接或间接来源于食物蛋白质水解并具有特定生理活性的一些特殊氨基酸序列^[1],具有高安全性、高吸收性、多且高的生理活性的优点^[2],是极具发展前景的功能因子,为目前国内外食品界的研究热点^[3-4]。

大豆发酵食品是以大豆或大豆制品为发酵基质,经微生物作用形成的食品^[5]。它因发酵过程产生了丰富的活性肽,故比非发酵大豆食品具有更强的生物活性^[6]。活性肽中的抗氧化肽在清除自由基,抑制脂质过氧化,提高机体抵抗衰老与疾病等方面具有重要的作用,在食品、化妆品、医学等领域具有极高的应用价值^[7]。

目前对大豆发酵食品毛豆腐的研究主要集中在发酵技术与化学成分的分析方面^[8],对其活性肽的制备、功能及作用机制研究匮乏。徽州呈坎罗氏毛豆腐为地方非遗产品,是典型的大豆发酵食品,

其营养成分的生化指标优于普通毛豆腐^[9]。本文以徽州呈坎罗氏毛豆腐为原料,以活性肽含量为评价指标,采用单酶酶解法和响应曲面法确定毛豆腐活性肽提取量最高的蛋白酶种类和最优工艺条件。对该条件下制备的毛豆腐活性肽以及超滤筛分纯化得到的不同分子质量活性肽溶液进行体外抗氧化性能评价和氨基酸组成分析。

1 材料与方法

1.1 材料、主要试剂、仪器和设备

毛豆腐,徽州呈坎罗氏。

Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准品(98.00%),Sigma 公司;中性蛋白酶(15 万 U/g)、碱性蛋白酶(50 万 U/g)、胰蛋白酶(20 万 U/g)、酸性蛋白酶(80 万 U/g)(4 种酶均为食品级),沧州夏盛酶生物技术有限公司;氢氧化钠、盐酸、三氯乙酸、硫酸铜、铁氰化钾、三氯化铁、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、过硫酸钾、无水乙醇、硫酸亚铁、水杨酸、过氧化氢、抗坏血酸等(均为分析纯),国药集团化学试剂有限公司。

电子天平,上海越平紫外-可见分光光度计,上海奥谱勒;pH 计,梅特勒-托利;氨基酸自动分

收稿日期:2022-03-06

基金项目:安徽省高校自然科学基金重大项目(KJ2021ZD0123);国家级大学生创新训练项目(202010375021);安徽省高校自然科学基金重点项目(KJ2021A1047)

第一作者:胡晓倩,女,硕士,教授

E-mail: 107014@hsu.edu.cn

析仪(L-8900),日本日立公司;高速冷冻离心机,上海贝克曼。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白酶酶解制备毛豆腐活性肽溶液 取适量毛豆腐,按料液比加入去离子水,4℃ 4 000 r/min 离心 20 min,取上清液 10 mL,加 0.4 mL 蛋白酶酶液(酶活力 2 500 U/g)酶解,90℃ 灭活 10 min,冷却至室温,4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液待用。

1.2.2 活性肽含量的测定

1.2.2.1 四肽标准曲线的制作 依照张庆等^[9]的试验方法,稍作修改。用 ddH₂O 配成 1.8 mg/mL Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准溶液,并分别稀释为 0,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2,1.4,1.6,1.8 mg/mL 的梯度溶液。取上述溶液各 4 mL,加入 400 μL 10% TCA 溶液,室温反应 10 min,4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 3 mL,加入 2 mL 现配双缩脲

试剂(1.7 mL 0.1 g/mL NaOH + 0.3 mL 0.01 g/mL CuSO₄ 溶液),室温反应 20 min,于波长 540 nm 处测定吸光值。以 0 mg/mL 四肽为对照,以不同浓度的四肽溶液为横坐标,A_{540nm} 为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.2.2 毛豆腐中活性肽含量的测定 在毛豆腐活性肽溶液中加入适量 TCA 去除大分子蛋白,按照 1.2.2.1 节测定 A_{540nm},代入四肽标准曲线求活性肽质量浓度(mg/mL),乘液料比换算成毛豆腐活性肽提取液中活性肽含量(mg/g)。

1.2.3 单酶酶解法确定提取毛豆腐活性肽的最适蛋白酶

1.2.3.1 4 种蛋白酶的单因素筛选 中性蛋白酶、碱性蛋白酶、酸性蛋白酶、碱性蛋白酶的用量均为 2 500 U/g,以料液比、酶解温度、酶解 pH 和酶解时间为筛选单因素,研究每种酶的最佳单因素条件(表 1)。

表 1 4 种蛋白酶水解毛豆腐制备活性肽的单因素条件筛选

Table 1 Single-variate setting for bioactive peptide extract from four kinds of proteases hydrolysis hairy tofu

酶的种类	料液比/g·mL ⁻¹	酶解温度/℃	酶解 pH 值	酶解时间/h
中性蛋白酶	1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60	35, 40, 45, 50, 55	5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0	1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0
碱性蛋白酶	1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60	35, 40, 45, 50, 55	8.0, 9.0, 10.0, 11.0, 12.0	1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0
胰蛋白酶	1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60	35, 40, 45, 50, 55	5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0	1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0
酸性蛋白酶	1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80	35, 40, 45, 50, 55	2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0	1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0

1.2.3.2 单酶酶解法确定提取毛豆腐活性肽的最适蛋白酶 在单因素筛选最适条件下分别制备不同蛋白酶酶解毛豆腐的活性肽,以活性肽含量为评价指标,确定酶解活性肽的最适蛋白酶。

1.2.4 响应曲面法优化毛豆腐活性肽提取工艺和验证 在酶用量 2 500 U/g,料液比 1:50 g/mL 的条件下,选取酶解的温度、时间和 pH 为响应面 3 个因素,设计三因素三水平响应曲面法优化酶解毛豆腐活性肽提取工艺(表 2),用 Box-Behnken 响应面设计原理确定最优提取条件并进行验证^[10]。

1.2.5 毛豆腐活性肽提取液体外抗氧化能力的测定 以验证的响应曲面法最优提取工艺制备毛豆腐加酶活性肽,以无菌水代替碱性蛋白酶制备毛豆腐未加酶活性肽。采用普鲁士蓝法^[11]、ABTS 法^[12]、DPPH 法^[13]以及水杨酸捕获羟自由基法^[13]测定毛豆腐加酶和未加酶活性肽的体外抗氧化能力,并换算成对应的 VC 浓度来评价体外抗氧化

表 2 响应面试验因素水平

Table 2 The factor levels of response surface methodology

水平	因素		
	温度/℃	pH	酶解时间/h
-1	45	9.0	1.0
0	50	10.0	2.0
+1	55	11.0	3.0

能力。

1.2.6 超滤筛分纯化毛豆腐活性肽及其抗氧化性能评价 将最优工艺制备的毛豆腐活性肽(酶解原液)超滤筛分纯化^[14],获得滤液 1(分子质量 < 3 ku 活性肽溶液)和滤液 2(分子质量在 3~10 ku 活性肽溶液)。将酶解原液分别稀释至与超滤筛分滤液 1 和 2 的相同的活性肽浓度,测定抗氧化性能,评价超滤筛分纯化效果。

1.2.7 毛豆腐活性肽氨基酸组成分析 取最优提

取工艺制备的毛豆腐活性肽溶液 1 mL, 加 1 mL 4% 磺基水杨酸, 4 °C 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 过 0.22 μm 滤膜, 置于全自动氨基酸分析仪(进样 20 μL), 测定毛豆腐活性肽提取液的氨基酸组成^[15]。

1.3 数据分析

所有试验均重复 3 次。单因素、验证工艺和抗氧化活性评价的数据用 Excel 和 SPSS 19.0 软件分析, 优化所得响应值用 Design-Expert 8.0 软件进行响应曲面分析^[16]。

2 结果与分析

2.1 活性肽标准曲线绘制

Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准曲线如图 1 所示。线性回归方程为 $y=0.1478x+0.0054$, 相关系数 R^2

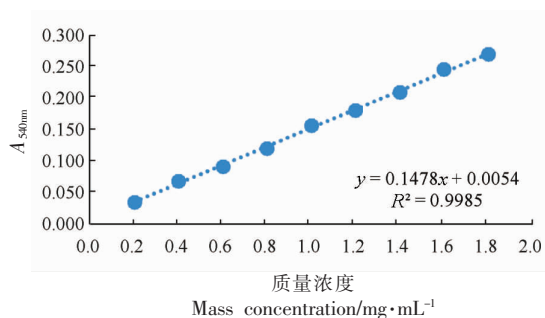


图 1 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准曲线

Fig.1 Gly-Gly-Tyr-Arg quad peptide standard curve

为 0.9985, 活性肽质量浓度在 0.2~1.8 mg/mL 范围与其吸光值呈良好的线性关系。

2.2 4 种蛋白酶的单因素筛选结果

4 种蛋白酶酶解毛豆腐制备活性肽的单因素筛选结果见图 2。

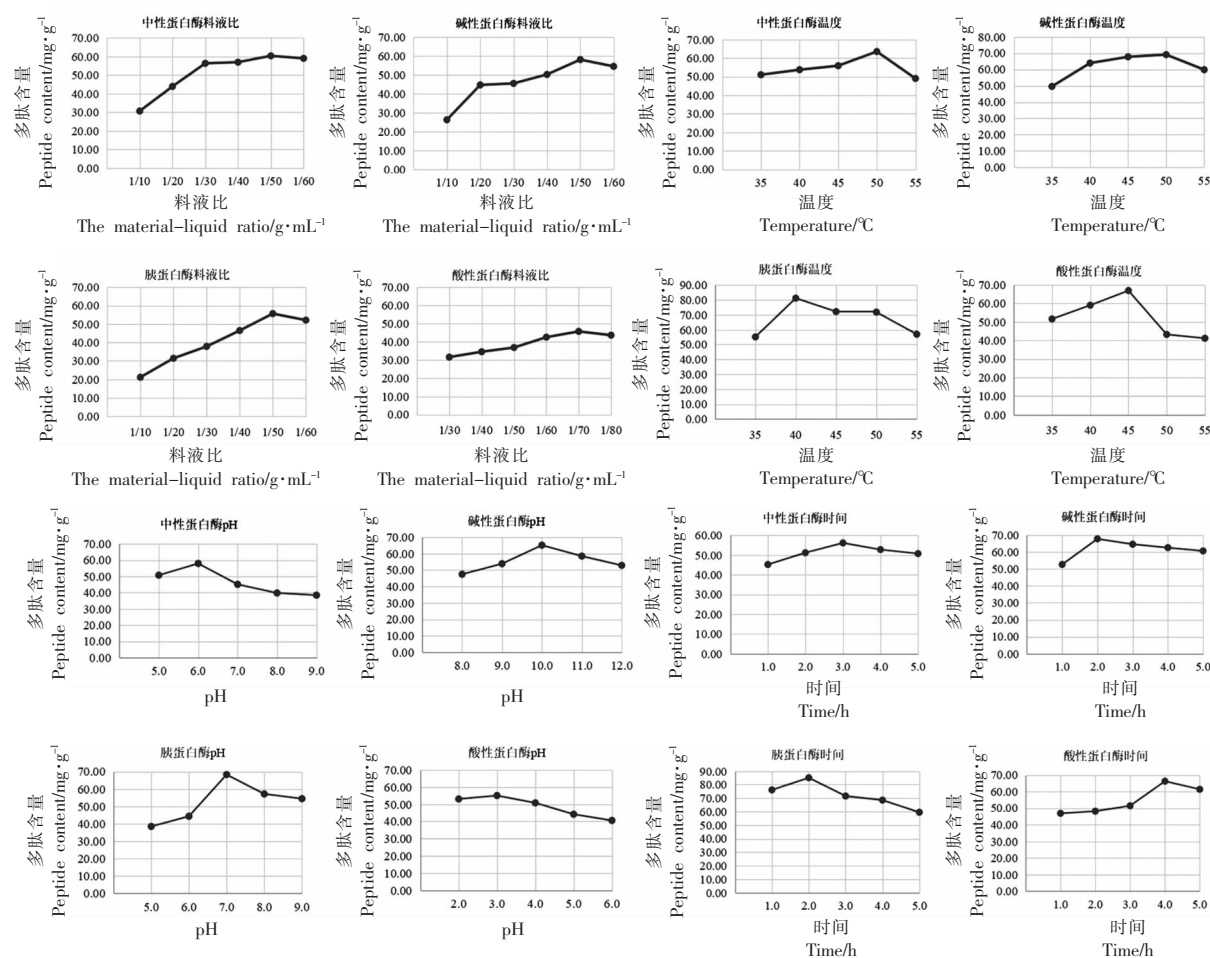


图 2 4 种蛋白酶单因素筛选结果

Fig.2 The results of the four kinds of proteases on single-variate setting

2.3 单酶酶解法确定提取毛豆腐活性肽的最适蛋白酶

由单因素筛选结果(图2)可知,4种蛋白酶水解毛豆腐提取多肽的单因素最适条件见表3。4种蛋白酶在相对适宜条件下酶解毛豆腐所得活性肽含量有所差异,其中获得活性肽含量最高的为碱

性蛋白酶。胰蛋白酶与之相近,然而,其酶解液中始终存在微量的很难去除的悬浊物,造成吸光值偏大的误差。为减少试验的客观误差,选取碱性蛋白酶进行响应曲面法优化酶解制备毛豆腐活性肽。

表3 单酶法酶解制备毛豆腐活性肽提取液的最优条件和最适蛋白酶

Table 3 The optimal condition and protease for the preparation of active peptide extract in Hairy Tofu by single enzyme method

酶种类	酶用量/ U·g ⁻¹	料液比/ g·mL ⁻¹	酶解 pH	酶解 温度/°C	酶解 时间/h	A _{540nm}			A _{540nm} 均值	多肽含量/ mg·g ⁻¹
						1	2	3		
中性蛋白酶	2 500	1:50	6.0	50.0	3.0	0.155	0.164	0.167	0.162	52.977
碱性蛋白酶	2 500	1:50	10.0	50.0	2.0	0.205	0.206	0.212	0.208	68.539
胰蛋白酶	2 500	1:50	7.0	40.0	2.0	0.179	0.183	0.244	0.202	66.509
酸性蛋白酶	2 500	1:70	3.0	45.0	4.0	0.120	0.126	0.126	0.124	56.171

2.4 响应曲面法优化酶解毛豆腐活性肽提取工艺

在碱性蛋白酶酶用量 2 500 U/g,料液比 1:50 (g/mL)条件下,选取酶解温度、酶解时间、酶解 pH 为响应面的 3 个试验因素,以活性肽含量为评价指标,设计碱性蛋白酶三因素三水平响应曲面法优化毛豆腐活性肽提取工艺。按照 Box-Behnken

响应面试验设计确定最优提取条件。试验设计因素编码水平见表 2,响应面试验组合及结果、方差分析模型可靠性分析见表 4、5 和 6。采用 Design-Expert 8.0 软件进行响应曲面分析(图 3a、3b、3c),得碱性蛋白酶水解毛豆腐活性肽提取的最优工艺参数见表 7。

表4 响应面试验组合及结果

Table 4 The experimental combinations and results of response surface methodology

处理号	酶解 温度/°C	酶解 pH	酶解 时间/h	A _{540nm}	多肽含量 /mg·g ⁻¹	处理号	酶解 温度/°C	酶解 pH	酶解 时间/h	A _{540nm}	多肽含量 /mg·g ⁻¹
1	50.0	10.0	2	0.208	68.539	10	50.0	11.0	3	0.202	66.509
2	55.0	10.0	1	0.189	62.111	11	55.0	11.0	2	0.189	62.111
3	55.0	9.0	2	0.192	63.126	12	50.0	10.0	2	0.211	69.553
4	50.0	10.0	2	0.213	70.230	13	50.0	10.0	2	0.209	68.877
5	50.0	9.0	1	0.180	59.066	14	45.0	11.0	2	0.200	65.832
6	55.0	10.0	3	0.191	62.788	15	45.0	9.0	2	0.155	50.609
7	50.0	10.0	2	0.205	67.524	16	45.0	10.0	3	0.164	53.654
8	50.0	11.0	1	0.179	58.728	17	50.0	9.0	3	0.150	48.917
9	45.0	10.0	1	0.184	60.419						

表5 响应面模型的方差分析表

Table 5 ANOVA table of the response surface model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	665.81	9	73.98	68.01	< 0.0001	**
A(温度)	48.13	1	48.13	44.25	0.0003	**
B(pH)	123.73	1	123.73	113.75	< 0.0001	**

(续表 5)

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
C(时间)	8.94	1	8.94	8.22	0.0241	*
AB	65.92	1	65.92	60.60	0.0001	**
AC	13.85	1	13.85	12.73	0.0091	**
BC	80.37	1	80.37	73.89	< 0.0001	**
A ²	52.87	1	52.87	48.61	0.0002	**
B ²	104.49	1	104.49	96.06	< 0.0001	**
C ²	134.79	1	134.79	123.92	< 0.0001	**
残差	7.61	7	1.09			
失拟项	3.40	3	1.13	1.08	0.453	
纯误差	4.21	4	1.05			
总方差	673.42	16				

表 6 响应面模型可靠性分析

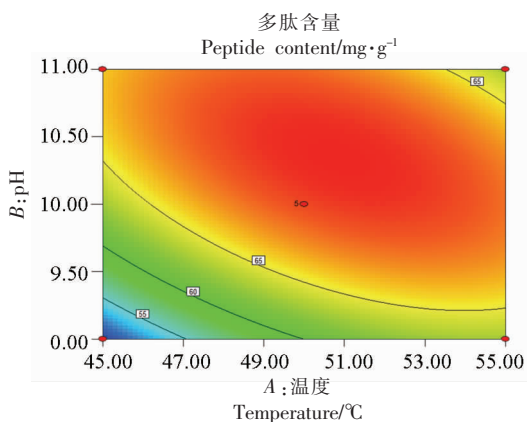
Table 6 The reliability analysis of the response surface model

参数	主模型
拟合度	0.9887
校正决定参数	0.9742
预测拟合度	0.9093
模型的精密度	25.1430
变异系数/%	1.670

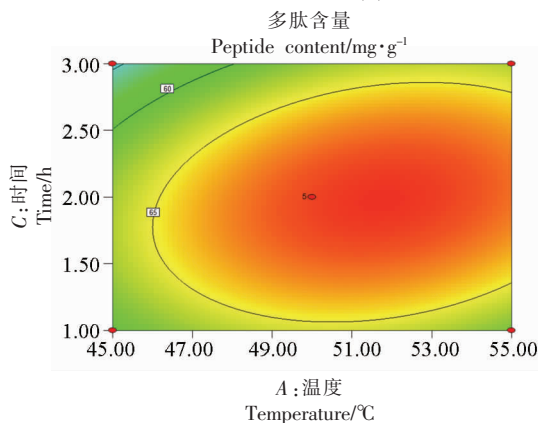
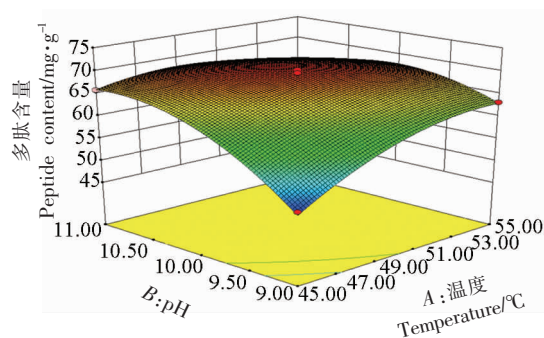
表 7 碱性蛋白酶酶解毛豆腐制备活性肽的最优提取工艺参数

Table 7 Optimum extraction conditions for bioactive peptide extract by alkaline protease

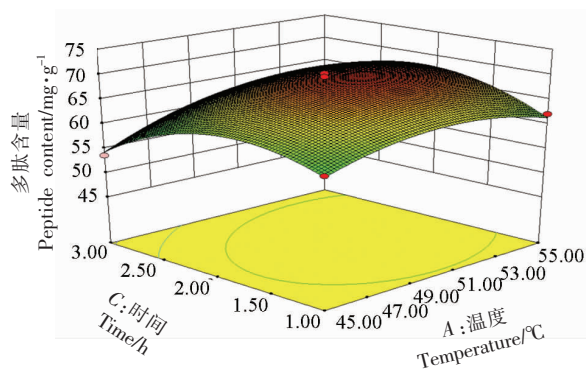
最优解	酶解温度/°C	酶解 pH	酶解时间/h	多肽含量/ mg·g ⁻¹	可信度
1	50.79	10.37	2.08	69.815	0.981

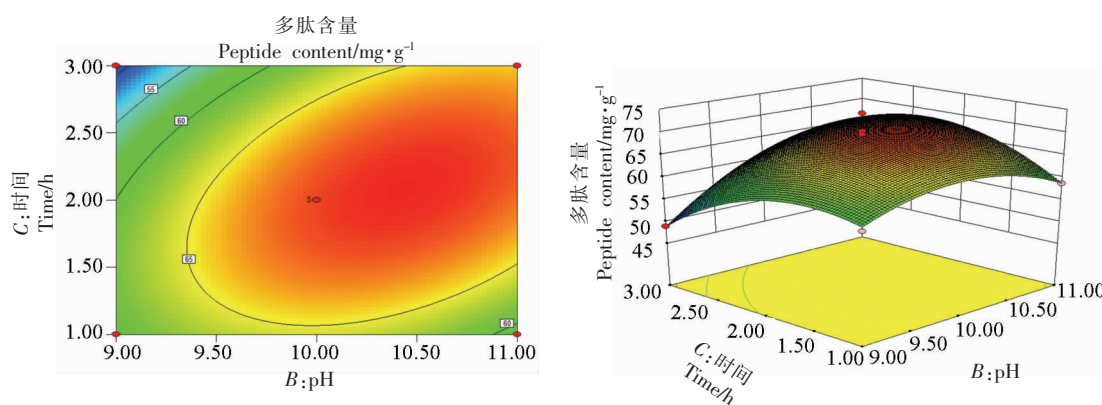


(a)碱性蛋白酶酶解温度和 pH 对活性肽浓度的影响



(b)碱性蛋白酶酶解温度和时间对活性肽浓度的影响





(c)碱性蛋白酶酶解 pH 和时间对活性肽浓度的影响

图 3 双因素交互作用曲面图和等高线图

Fig.3 Two-factor interaction surface plots and contour plots

由表 4、5、6 可知, 响应曲面法拟合方程 $Y = 68.94 + 2.45A + 3.93B - 1.06C - 4.06AB + 1.86AC + 4.48BC - 3.54A^2 - 4.98B^2 - 5.66C^2$, $R^2 = 0.9887$, 该模型显著值小于 0.0001, 表明线性关系优良。试验模型拟合度为 0.9887, 结果预测值与实际值高度相关; 校正决定系数为 0.9742, 模型的精密度为 25.1430, 变异系数为 1.670%, 说明试验结果可靠, 所建立模型能较好地描述活性肽含量随酶解条件的变化, 可用此模型对活性肽含量进行分析和预测。由图 3a、3b、3c 可知, 一次项碱性蛋白酶酶解温度影响极显著, 酶解 pH 值影响极显著, 而酶解时间影响显著; 二次项碱性蛋白酶酶解温度、pH 和时间差异极显著; 碱性蛋白酶酶解温度、时间、pH 两两间交互作用极显著。按照 Box-Behnken 响应面法试验设计原理得碱性蛋白酶水解毛豆腐活性

肽的最优工艺参数见表 7, 此条件下活性肽含量的预测值为 69.815 mg/g。

2.5 碱性蛋白酶酶解毛豆腐活性肽最优工艺的验证

验证工艺是对响应曲面法最优工艺稍作修改, 即: 碱性蛋白酶、酶量 2 500 U/g、料液比 1:50、酶解温度 51 °C、酶解 pH 10.4、酶解时间 2.08 h。制备毛豆腐加酶活性肽提取液, 以等量无菌水代替碱性蛋白酶制备未加酶活性肽(作为对比)。由表 8 可知, 验证活性肽含量为 (69.441 ± 1.033) mg/g, 与预测值 69.815 mg/g 相对偏差较小, 且加入碱性蛋白酶比未加酶毛豆腐活性肽含量提高了 66.07%。表 9 中 Sig.(双侧)值为 0.594(大于 0.01), 因此, 响应面法优化工艺条件科学合理, 准确可靠。

表 8 碱性蛋白酶酶解毛豆腐最优工艺验证结果及与未加酶提取活性肽含量比较

Table 8 The verification results of enzymatic optimal extraction conditions of alkaline protease on hairy tofu and the comparison of bioactive peptide extracted with unadded enzyme

样品	酶解温度/°C	酶解 pH	酶解时间/h	A_{540nm}	多肽含量/mg·g ⁻¹	多肽含量提高比例%	
验证(加酶)	验证 1	51	10.4	2.08	0.208	68.539	66.07
	验证 2	51	10.4	2.08	0.214	70.568	
	验证 3	51	10.4	2.08	0.210	69.215	
	均值					69.441 ± 1.033	
对比(未加酶)	未加酶 1	51	10.4	2.08	0.132	42.828	
	未加酶 2	51	10.4	2.08	0.135	43.843	
	未加酶 3	51	10.4	2.08	0.120	38.769	
	均值					41.813 ± 2.685	

表 9 最优提取工艺结果的均值分析和均值检验

Table 9 The mean analysis and mean test of the results of the optimal extraction conditions

多肽 含量/ mg·g ⁻¹	N	均值	标准差	均值标准误	检验值 = 69.815					
					t	df	Sig. (双侧)	均值 差值	差分的 99%置信区间	
									下限	上限
	3	69.44067	1.033153	0.596491	-0.628	2	0.594	-0.374333	-6.29441	5.54575

2.6 碱性蛋白酶酶解毛豆腐活性肽体外抗氧化能力

由表 10 可知, VC 在试验浓度范围, 与其总还原力、对 ABTS、DPPH 和羟基自由基清除率均呈良好线性关系。碱性蛋白酶酶解毛豆腐(加酶)活性肽比未加酶(等量无菌水代替碱性蛋白酶)活性肽总还原力提高了 37.80%, 分别相当于 14.86 μg/mL 和 9.56 μg/mL VC 总还原力; 加酶比未加酶活

性肽对 ABTS 自由基清除率提高了 22.91%, 分别相当于 11.33 μg/mL 和 9.30 μg/mL VC 清除率; 加酶比未加酶活性肽对 DPPH 自由基清除率提高了 31.75%, 分别相当于 19.11 μg/mL 和 13.41 μg/mL VC 清除率; 加酶比未加酶活性肽对羟基自由基清除率提高了 62.46%, 分别相当于 143.58 μg/mL 和 90.48 μg/mL VC 清除率。

表 10 毛豆腐加酶和未加酶多肽提取液体外抗氧化能力比较

Table 10 Comparison of *in vitro* antioxidant capacity of hairy tofu with enzyme and unenzyme polypeptide extracts

样品	总还原力 A _{700nm}	提高 比例/ %	VC 总还原力的 线性回归方程	VC 质量 浓度/ μg·mL ⁻¹	对 ABTS 自由基 清除率/%	提高 比例/%	VC 对 ABTS 清除 率的线性回归方程	VC 质量 浓度/ μg·mL ⁻¹
加酶多肽提 取液	0.226 ± 0.018	37.80	Y=0.0117X+0.0521 (R ² =0.9979)	14.86	70.11 ± 1.04	22.91	Y=0.0645X-0.0296 (R ² =0.9980)	11.33
未加酶多肽 提取液	0.164 ± 0.0004			9.56	57.04 ± 1.70			9.30
样品	对 DPPH 自 由基清除 率/%	提高 比例/ %	VC 对 DPPH 清除 率的线性回归方程	VC 质量 浓度/ μg·mL ⁻¹	对羟基自由 基清除率/%	提高 比例/%	VC 对羟基自由 基清除率的线性回 归方程	VC 质量 浓度/ μg·mL ⁻¹
加酶多肽提 取液	61.04 ± 0.63	31.75	Y=0.0258X+0.1174 (R ² =0.9962)	19.11	29.00 ± 0.42	62.46	Y=0.0021X-0.0115 (R ² =0.9905)	143.58
未加酶多肽 提取液	46.33 ± 0.86			13.41	17.85 ± 0.27			90.48

2.7 超滤筛分纯化毛豆腐活性肽及抗氧化性能评价

滤液 1 和滤液 2 为通过超滤筛分纯化获得的分子质量 < 3 ku 和 3~10 ku 的活性肽提取液。酶解稀释原液 1 和 2 分别与滤液 1 和 2 的活性肽含量相同, 分别为 16.10 mg/g 和 26.25 mg/g。由图 4 可知, 滤液 1 和滤液 2 对自由基的清除能力, 与相同浓度酶解稀释原液相比均大幅度提升。超滤筛分滤液 1 (< 3 ku) 对 ABTS 和 DPPH 自由基的清除率

分别提高了 145.26% 和 93.41%; 滤液 2 (3~10ku) 对 ABTS 和 DPPH 自由基的清除率分别提高了 74.71% 和 72.44%, 因此, 超滤筛分可有效提高毛豆腐酶解活性肽的体外抗氧化性能。

2.8 碱性蛋白酶酶解毛豆腐活性肽的氨基酸组成

以验证的响应曲面法最优提取工艺制备毛豆腐的碱性蛋白酶水解活性肽, 全自动氨基酸分析仪测定其游离氨基酸组成, 结果见图 5 和表 11。

由表 11 得其氨基酸组成主要特点见表 12。17 种蛋白质氨基酸(除 Asn、Gln 和 Trp 外)占总测得含量的 73.1%;7 种必需氨基酸(除 Trp 外)占比 37.74%;鲜味氨基酸^[5]占比 17.39%;药用氨基酸^[5]

占比 43.67%。从氨基酸组成的多指标评价^[5]来看,碱性蛋白酶酶解制备的毛豆腐活性肽极具营养和药用价值。

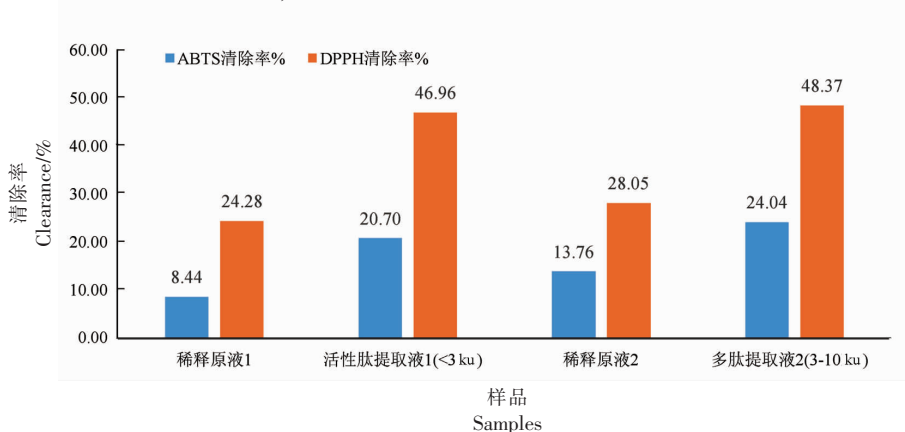


图 4 酶解稀释原液与超滤筛分活性肽对 ABTS 和 DPPH 自由基清除率

Fig.4 The free radical clearance ABTS and DPPH both with the raw and ultrafiltration of bioactive peptide extracts

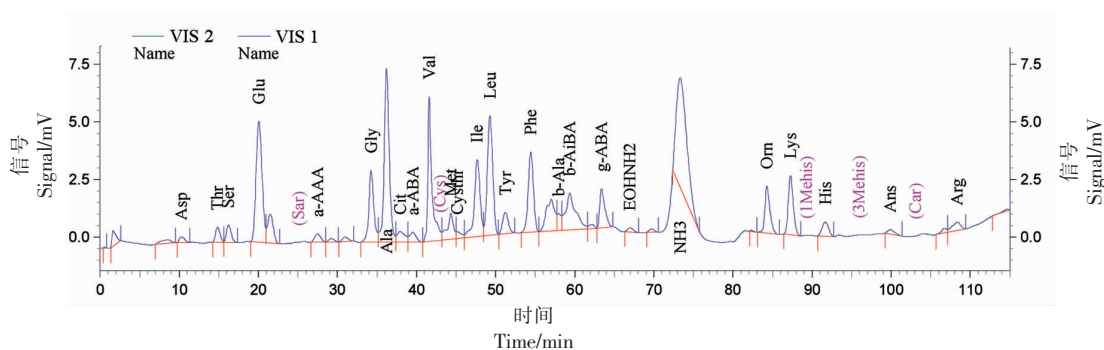


图 5 碱性蛋白酶水解毛豆腐水解液氨基酸分析图谱

Fig.5 The amino acid analysis of hairy tofu hydrolysis by alkaline protease hydrolysis

表 11 碱性蛋白酶酶解毛豆腐活性肽溶液的氨基酸组成

Table 11 The amino acid composition of bioactive peptide extract by alkaline protease on hairy tofu

VIS 1 结果				
峰 #	氨基酸	出峰时间/min	峰面积	含量/ng
4	Asp	10.273	167 129	14.011978
5	Thr	14.827	400 487	27.582443
6	Ser	16.227	477 867	29.517753
7	Glu	20.073	4 201 112	394.705804
	Sar			0.000000
9	a-AAA	27.467	282 594	34.548542
12	Gly	34.247	2 078 907	93.886449
13	Ala	36.200	5 059 793	257.174986
14	Cit	37.913	489 892	49.399879
15	a-ABA	39.513	368 708	22.517860
16	Val	41.593	3 407 392	223.605645
	Cys			0.000000

(续表 11)

VIS 1 结果				
峰 #	氨基酸	出峰时间	峰面积	含量/ng
17	Met	44.333	947 978	76.337359
18	Cysthi	45.133	202 140	20.899101
19	Ile	47.673	2 611 888	190.786215
20	Leu	49.273	3 726 885	274.160656
21	Tyr	51.220	704 998	76.224004
22	Phe	54.433	2 437 768	243.390940
24	b-Ala	57.993	355 721	37.236718
25	b-AiBA	59.353	2 141 623	285.092001
27	g-ABA	63.380	1 138 604	68.167251
28	EOHNH2	66.993	137 943	8.278133
30	NH3	73.313	6 579 564	112.562302
32	Orn	84.280	1 365 286	91.522695
33	Lys	87.260	1 702 339	127.263201
	1Mehis			0.000000
34	His	91.667	536 145	44.257974
	3Mehis			0.000000
35	Ans	99.847	181 453	101.765969
	Car			0.000000
37	Arg	108.353	418 869	46.070190
Totals			42 123 085	
VIS 2 结果				
	Hipro			0.000000
12	Pro	32.193	341 502	131.313355
Totals			341 502	

表 12 碱性蛋白酶酶解毛豆腐水解液的氨基酸组成分析

Table 12 The amino acid composition analysis of hairy tofu hydrolyed by alkaline protease

氨基酸/AA	含量/ng	蛋白质 AA 占比%	EAA 占比%	鲜味 AA 占比%	药用 AA 占比%
Asp	14.011978	0.45		0.45	0.45
Thr	27.582443	0.89	0.89		
Ser	29.517753	0.96			
Glu	394.705804	12.81		12.81	12.81
Gly	93.886449	3.05			3.05
Ala	257.174986	8.34			
Val	223.605645	7.25	7.25		
Cys	0	0.00			
Met	76.337359	2.48	2.48		2.48
Ile	190.786215	6.19	6.19		
Leu	274.160656	8.89	8.89		8.89
Tyr	76.224004	2.47			2.47
Phe	243.39094	7.90	7.90		7.90
Lys	127.263201	4.13	4.13	4.13	4.13
His	44.257974	1.44			
Arg	46.07019	1.49			1.49
Pro	131.313355	4.26			
蛋白质 AA 含量/ng	2 250.288952	73.01	37.74	17.39	43.67
总含量/ng			3 082.279403		

注:必需氨基酸为 Met、Trp、Lys、Val、Ile、Leu、Phe、Thr;鲜味氨基酸为 Lys、Glu、Asp;药用氨基酸 A 为 Glu、Asp、Arg、Gly、Phe、Tyr、Met、Leu、Lys^[5]。

3 结论

采用单酶酶解法确定酶解毛豆腐活性肽含量最高的是碱性蛋白酶。响应曲面法优化碱性蛋白酶酶解最优工艺参数为料液比 1:50 g/mL、酶用量 2 500 U/g、酶解温度 50.78 ℃、酶解 pH 10.37、酶解时间 2.08 h,此条件下活性肽含量为(69.441±1.033) mg/g,比未加碱性蛋白酶的活性肽含量提高了 66.07%。

目前国内外测定体外抗氧化活性主要使用的评价方法有 ABTS 法、DPPH 法、羟自由基法,超氧阴离子自由基法、总还原力法和氧自由基吸收量(ORAC)法等,其中,ABTS 法和 DPPH 法的变异系数和标准系数明显偏低,具有较高的重现性^[9]。本试验数据表明,未加蛋白酶水解的毛豆腐活性肽具有一定的体外抗氧化能力,加入碱性蛋白酶且在最优工艺条件下,不仅可提高提取液中活性肽含量,而且碱性蛋白酶酶解毛豆腐活性肽提取液的总还原力、对 ABTS、DPPH 和羟基自由基的清除率,分别是(0.226±0.018),(70.11±1.04)%,(61.04±0.63)%和(29.00±0.42)%,比未加酶活性肽分别提高了 37.80%,22.91%,31.75%和 62.46%,且对 ABTS 和 DPPH 自由基的清除能力是最强的。分离纯化获得超滤筛分滤液 1(<3 ku)和滤液 2(3~10 ku),其对 ABTS 和 DPPH 自由基的清除率,比相同浓度稀释酶解原液分别提高了 145.26%,93.41%和 74.71%,72.44%。碱性蛋白酶酶解毛豆腐活性肽具有优良的体外抗氧化能力,且超滤筛分能提高活性肽其抗氧化能力。毛豆腐活性肽提取液中蛋白质氨基酸占比 73.01%,必需氨基酸占比 37.74%,鲜味氨基酸占比 17.39%,药用氨基酸占比 43.67%。

从活性肽提取液抗氧化活性和氨基酸组成多指标评价来看,徽州呈坎罗氏毛豆腐是具抗氧化、营养和药用功能的食源性活性肽,极具开发价值。

参 考 文 献

- [1] 葛平珍,周才琼.食源性活性肽制备与分离纯化的研究进展[J].食品工业科技,2014,35(4):363-368.
GE P Z, ZHOU C Q. Research progress in the preparation, separation and purification of bioactive peptide derived from food[J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(4): 363-368.
- [2] 肖聪丽,李理,陈敏.大豆多肽的分离纯化及其体外降血脂功能研究[J].中国酿造,2020,39(7):30-35.
XIAO C L, LI L, CHEN M. Separation and purification of soybean peptides and its hypolipidemic function *in vitro*[J]. China Brewing, 2020, 39(7): 30-35.
- [3] NONGONIERMA A B, FITZGERALD R J. Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 50(4): 26-43.
- [4] 李维,兰海楠,付志玲,等.生物活性肽的生理功能及在动物生产中的应用[J].中国兽医杂志,2013,49(3):46-48.
LI W, LAN H N, FU Z L, et al. Physiological function of bioactive peptides and their application in animal production[J]. China Journal of Veterinary Medicine, 2013, 49(3): 46-48.
- [5] 刘欣.毛豆腐发酵过程中植物化学成分和免疫活性的变化[D].哈尔滨:东北农业大学,2017.
LIU X. Change of several phytochemical constituents and immune activities of Mao-tofu during its fermentation[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.
- [6] 曾艳,朱玥明,张建刚,等.大豆发酵食品中的活性肽及其生理功能研究进展[J].大豆科学,2019,38(1):159-166.
ZENG Y, ZHU Y M, ZHANG J G, et al. Process in bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits[J]. Soybean Science, 2019, 38(1): 159-166.
- [7] 汪少芸.功能肽的加工技术与活性评价[M].北京:科学出版社,2019.
WANG S Y. Processing technology and activity evaluation of functional peptides[M]. Beijing: Science Press, 2019.
- [8] 胡晓倩,李长江,吴永祥,等.徽州呈坎罗氏毛豆腐营养成分及浸提液抗氧化活性的研究[J].食品与发酵工业,2019,45(18):101-106.
HU X Q, LI C J, WU Y X, et al. Study on nutritional components and antioxidant activity of Luo's hairy tofu in Chengkan village of Huizhou[J].

- Food and Fermentation Industries, 2019, 45(18): 101-106.
- [9] 张庆, 袁源, 邓扬龙, 等. 运用 Box-Behnken 设计优化核桃多肽制备工艺[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(21): 180-186.
ZHANG Q, YUAN Y, DENG Y L, et al. Optimization of preparation technology of walnut peptide by Box-Behnken design[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(21): 180-186.
- [10] 汪建明, 胡峰, 耿媛, 等. 基于响应面分析法优化腐乳中大豆多肽提取条件[J]. 天津科技大学学报, 2013, 28(1): 5-9.
WANG J M, HU F, GEN Y, et al. Response surface methodology based optimization of soybean peptide extraction from sufu[J]. Journal of Tianjin University of Science & Technology, 2013, 28(1): 5-9.
- [11] 叶显辉. 近江牡蛎多肽的分离纯化及其抗氧化、抗光老化活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
YE Y H. Purification of *Ostrea rivularis* peptides and their antioxidant, antiphotaging activities [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [12] 赵芷芊, 王敏, 张志清. 植物多糖的提取及抗氧化功效的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(13): 337-342.
ZHAO Z Q, WANG M, ZHANG Z Q. Research progress of antioxidation efficacy and extraction of plant polysaccharide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 13(3): 252-254.
- [13] 唐思颖, 涂传海, 胡文秀, 等. 红茶菌发酵黄浆水的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2019, 40(17): 1-6.
TANG S J, TU C H, HU W X, et al. Antioxidant activity of fermented soy whey with kombucha consortium[J]. Food Science, 2019, 40(17): 1-6.
- [14] 冯彪, 倪晋仁, 毛学英. 超滤技术处理酪蛋白酶解液的研究[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(3): 32-34.
FENG B, NI J R, MAO X Y. Studies on application of ultrafiltration in disposal casein enzymatic hydrolysates[J]. China Dairy Industry, 2005, 33(3): 32-34.
- [15] 王侯娜, 赵莉莉, 魏安智, 等. 不同种质花椒氨基酸组成及营养价值评价[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 113-118.
WANG H N, ZHAO L L, WEI A Z, et al. Amino acid composition and nutritional quality evaluation of different germplasms of chinese prickly ash (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim)[J]. Food Science, 2017, 38(18): 113-118.
- [16] 魏祖晨, 赵顺鑫, 周浓, 等. 响应面法优化浙贝母氨基酸提取工艺及含量测定[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(8): 180-188, 196.
WEI Z C, ZHAO S N, ZHOU N, et al. The use of response surface methodology to optimize the extraction process and determine amino acids in *Fritillaria thunbergii* Mig[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(8): 180-188, 196.
- [17] 牛明福, 陈金帅, 李桃月, 等. 多指标评价酶解蚕蛹蛋白产物的抗氧化活性[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(13): 105-109.
NIU M F, CHEN J S, LI T Y, et al. Evaluation of antioxidant activity of protein products from enzymatic hydrolysis of silkworm pupae by multiple indicators[J]. Food Research and Development, 2019, 40(13): 105-109.
- [18] 张燕, 吴锦波, 何世明, 等. 阿坝藏鸡蛋品质及氨基酸组成分析与营养评价[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(11): 91-93, 108.
ZHANG Y, WU J B, HE S M, et al. The quality and amino acid composition analysis, nutritional evaluation of eggs of Aba Tibetan chicken[J]. Anhui Agricultural Science, 2021, 49(11): 91-93, 108.
- [19] 高涵. 常用测定抗氧化肽活性方法的比较[D]. 保定: 河北农业大学, 2019.
GAO H. Comparison of commonly used methods for measuring antioxidant peptide activity [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2019.

Preparation and Function Evaluation of Bioactive Peptides in Hairy Tofu of Fermented Soybean Curd

Hu Xiaoqian, Gui Zikang, Deng Junwei, Wang Jiazheng, Zheng Xiaohui, Du Jinjin, Wu Yongxiang
(College of Life and Environment Science, Huangshan University, Huangshan 245041, Anhui)

Abstract To explore the properties of active peptide in hairy tofu of fermented soybean curd, the process conditions, isolation and purification, antioxidant ability *in vitro* and amino acid composition of bioactive peptides in hairy tofu of fermented soybean curd were studied. The results showed that the highest content of bioactive peptide was from alkaline protease hydrolysis on the single enzyme method. The content of bioactive peptide from alkaline protease enzymolysis extraction was (69.441 ± 1.033) mg/g and 66.07% higher than that without alkaline protease, under the optimal extraction process conditions on response surface methodology as follows: material to liquid ratio 1:50(g/mL), enzyme amount 2 500 U/g, enzymolysis temperature 50.78 °C, enzymatic hydrolysis pH 5.5, enzymolysis time 2.08 h. The total reducing force, the clearance of the ABTS, DPPH and hydroxyl radicals of the bioactive peptide from alkaline protease enzymolysis extraction were increased by 37.80%, 22.91%, 31.75% and 62.46% than that without alkaline protease, respectively. The bioactive peptide extraction with molecular <3 ku and 3–10 ku were sieved by ultrafiltration, than the same concentration enzyme lysates with out ultrafiltration, the clearance of the ABTS radicals increased by 145.26% and 74.71% and clearance of the DPPH radicals increased by 93.41% and 72.44% than the same concentration with out ultrafiltration. The amino acid composition of bioactive peptide extraction with alkaline protease under the optimal process were standard AA accounted to 73.01%, essential AA accounted to 37.74%, flavor AA accounted to 17.39% and officinal AA accounted to 43.67%. Luo's hairy tofu in Chengkan village of Huizhou district was an excellent source of food origin bioactive peptides with good antioxidant, nutritional and medicinal health functions, so it had great value in development and utilization.

Keywords fermented soybean curd; hairy tofu; bioactive peptides; the optimal extraction process conditions; antioxidant activity; amino acid composition