

半固态酶解法制备豆粕肽工艺的优化

徐 康, 王远兴*

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室 南昌 330047)

摘要 为优化豆粕酶解工艺,得到分子质量适中,易于消化吸收的豆粕肽。以豆粕为原料,比较胰蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、角蛋白酶在半固态酶解过程中,对豆粕的水解度、豆粕肽得率、豆粕肽的分子质量和苦味值的影响差异。采用酶解效果较好的胰蛋白酶进行单因素实验,选取影响因子较强的 3 个条件(液固比、豆粕量、温度)进行响应面实验,优化制备工艺。结果表明:用胰蛋白酶酶解,加酶量 40 mg/g,酶解时间 36 h,液固比 1 mL/g,豆粕量 30 g,温度 50 °C,在此条件下制得的豆粕肽的得率较高(18.87%)。

关键词 豆粕; 半固态酶解; 胰蛋白酶; 分子质量测定; 响应面分析

文章编号 1009-7848(2023)07-0278-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.07.029

豆粕为一种植物源蛋白,具有高浓度的蛋白质和适宜的氨基酸比例,有着很高的开发利用价值^[1-2]。目前,豆粕主要作为饲料直接喂养动物,其中的大豆抗原蛋白和抗营养因子,大大限制了动物对豆粕蛋白的消化吸收^[3]。酶解豆粕克服了豆粕本身的缺陷,提高了蛋白质的消化率,降低其过敏性,并能生产出功能特性更好的大豆小肽。大豆小肽主要由 3~6 个氨基酸组成,分子质量约 1 000 u,主要分布在 300~700 u 范围,除易吸收外^[4],还具有调节血压^[5],抑制慢性肾病^[6],免疫调节^[7],抗癌活性^[8],抗菌、抗病毒^[9],改善肠道微生物活性^[10],降低胆固醇和抗糖尿病^[11]等生物活性。

酶解蛋白质已被广泛利用,与酸解和碱解等方式相比,酶解不仅反应温和,而且具有很强的特异性^[12]。现有研究主要以液态酶解豆粕肽为主,对半固态酶解豆粕的工艺鲜有报道。半固态酶解豆粕通过加入适当的水,使豆粕以固态存在,通过调节温度、时间、加酶量等条件优化酶解工艺^[13]。半固态酶解相对于液态酶解来说,半固态酶解豆粕易于烘干,有利于豆粕饲料的规模性生产。酶水解程度通常以水解度来量化,它表示被切割的肽键与初始肽键数的百分比。然而,水解度并不能完全反映酶水解情况,需以小肽含量和肽段长度共同

判断^[14-15]。

本试验以豆粕为原料,以豆粕水解度、豆粕肽含量、小肽分子质量和疏水值为半固态酶解的重要指标,筛选适合半固态酶解的蛋白酶,优化酶水解条件,旨在为豆粕的工业化生产提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

豆粕,中粮佳悦(天津)有限公司;碱性蛋白酶(200 U/mg)、中性蛋白酶(100 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg)、角蛋白酶(70 U/mg)、木瓜蛋白酶(800 U/mg),源叶生物科技有限公司;L-甘氨酸、杆菌肽,北京索莱宝科技有限公司;Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Try-Arg, Sigma 公司;胰岛素(猪胰腺),上海阿拉丁试剂有限公司;其它试剂均为 AR 级。

1.2 仪器与设备

AL104 电子天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;电热恒温鼓风干燥箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;多功能酶标仪,美国赛默飞世尔科技公司;Agilent Technologies 1290 infinity 高效液相色谱仪(配有 DAD 检测器),安捷伦科技(中国)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 半固态酶解方法 将豆粕粉碎过 60 目筛,准确称取适量的豆粕于反应器中,根据酶活力单位准确称取适量的蛋白酶加入反应器中,搅拌均匀后加入适量的蒸馏水,搅拌至水在豆粕中均匀

收稿时间: 2022-07-14

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目
(31960090, 32160562)

第一作者: 徐康,男,硕士生

通信作者: 王远兴 E-mail: yuanxingwang@ncu.edu.cn

分散,封上保鲜膜在恒温箱中反应。反应到预定时间,取出放置于 105 ℃烘箱中,灭酶 15 min。冷却,放到烘箱中 35 ℃低温烘干,得到半固态酶解的豆粕。

1.3.2 半固态酶解豆粕中多肽液提取 称取半固态酶解豆粕 0.5000 g,溶于 50 mL 的离心管中恒温振荡 6 h,将振荡后的豆粕酶解液置于冰箱中 4 ℃冷藏过夜。冷藏后的豆粕酶解液 4 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。

1.3.3 水解度的测定

1) 豆粕完全水解液制备 称取 7.5 g 豆粕于烧杯中,加入 75 mL 6 mol/L HCl 密封后放入 110~120 ℃烘箱中水解 24 h,取出后冷却。用滤纸过滤,滤液用蒸馏水定容 75 mL。吸取适量豆粕完全酶解液,用 40%和 2%的 NaOH 调 pH 值中性 (pH=6),定容。取完全水解液 2 mL 于 25 mL 比色管中,加入 1 mL 茚三酮溶液混匀,沸水浴加热 15 min,然后快速冷却,加入 5 mL 40%乙醇溶液反应 15 min,570 nm 测吸光度。

2) 工作曲线的绘制 取 100 mg 甘氨酸溶于蒸馏水后定容至 100 mL 作为标准溶液,取相应体积标准溶液,按上述方法测定吸光度。以甘氨酸的浓度与吸光度制作工作曲线,取线性部分做标准曲线。

3) 水解液水解度的测定 取多肽提取液,稀释至可测浓度,取水解液 2 mL 于 25 mL 比色管中,加入 1 mL 茚三酮溶液混匀,沸水浴加热 15 min,冷却,加入 5 mL 40%乙醇溶液反应 15 min,于波长 570 nm 处测吸光度,根据吸光度计算蛋白质含量^[16]。按下式计算水解度:

$$DH(\%) = \frac{AV_1 \times 100}{1000 \times MV_2} \times 100 \quad (1)$$

式中, A ——蛋白质质量 (mg); M ——样品质量 (g); V_1 ——水解液的总体积 (mL); V_2 ——显色时所用的稀释液的体积 (mL)。

1.3.4 小肽含量的测定 参考余勃等^[17]的方法。取等体积的三氯乙酸 (0.4 mol/L) 加入酶解液中,混匀反应 30 min,反应结束以 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1 mL 加入 4 mL 双缩脲试剂,混匀室温放置 30 min,于波长 540 nm 处测吸光度。

1.3.5 酶解液分子质量测定 参考文献[18]和[19]的方法。采用 Agilent Technologies 1290 infinity 高效液相色谱仪 (配置 Agilent Technologies 1200 series DAD 检测器) 对制备的豆粕酶解液进行分子质量分布的测定。色谱柱:TSKgeL2000 SWXL (300 mm×7.8 mm);流动相:水 (0.1%三氟乙酸);检测波长:214 nm;流速:0.6 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。

1.3.6 疏水值的测定 参考文献[20]和[21]的方法。用 0.01 mol/L pH 6.5 的磷酸缓冲液将豆粕酶解液稀释至质量分数 0.02%,0.04%,0.06%,0.08%,0.10%,并配制 8.0 mmol/L ANS 溶液。取 2 mL 上述配制稀释液,加入 10 μL ANS 立即混匀。在荧光分光光度计中于激发波长 390 nm、发射波长 470 nm 检测荧光强度,激发和发射夹缝宽均为 5 mm。以荧光强度为纵坐标,豆粕质量分数为横坐标进行线性回归,以线性回归斜率为疏水值指数。

1.3.7 蛋白酶的筛选 以豆粕肽的得率、水解度、分子质量分布和疏水值为指标,考察胰蛋白酶、角蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶 5 种蛋白酶在适宜的条件下酶的水解特性,确定最佳蛋白酶的类型。

表 1 5 种蛋白酶酶解条件

Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions of 5 proteases

编号	酶	豆粕量/g	温度/℃	酶解时间/h	液固比/mL·g ⁻¹	加酶量/g
1	胰蛋白酶	30	50	24	1	0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6
2	角蛋白酶	40	50	24	2	0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6
3	木瓜蛋白酶	40	60	24	2	0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6
4	碱性蛋白酶	40	50	24	1	0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6
5	中性蛋白酶	40	50	24	1	0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6

1.3.8 单因素实验 在豆粕质量 30 g, 酶解温度 50 ℃, 酶解时间 36 h, 液固比为 1 mL/g 的条件下, 考察加酶量(10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/g)对水解度的影响。

在豆粕质量 30 g, 酶解温度 50 ℃, 酶解时间 36 h, 加酶量 40 mg/g 的条件下, 考察液固比(0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mL/g)对水解度的影响。

在豆粕质量 30 g, 酶解温度 50 ℃, 液固比为 1 mL/g, 加酶量 40 mg/g 的条件下, 考察酶解时间(12, 24, 36, 48, 60, 72 h)对水解度的影响。

在豆粕质量 30 g, 酶解时间 36 h, 液固比为 1 mL/g, 加酶量 40 mg/g 的条件下, 考察温度(30, 40, 50, 60, 70, 80 ℃)对水解度的影响。

在酶解温度 50 ℃, 酶解时间 36 h, 液固比为 1 mL/g, 加酶量 40 mg/g 的条件下, 豆粕质量(10, 20, 30, 40, 50, 60 g)对水解度的影响。

1.3.9 响应面优化试验 在单因素实验基础上, 应用 Box-Behnken Design 进行响应面优化试验。选择试验中可优化因素(豆粕质量、酶解温度和液固比)进行优化, 因素与水平见表 2。

表 2 响应面设计因素水平表

Table 2 Level table of response surface design factors

因素	水平		
	-1	0	1
豆粕质量/g	20	30	40
酶解温度/℃	45	50	55
液固比/mL·g ⁻¹	0.5	1	1.5

随加酶量的增大, 水解度持续增大, 到达一定值后, 水解度上升趋于平缓, 可能是由于水解产物中氨基酸和小肽的不断增多, 酶被底物完全饱和。蛋白酶浓度增加, 豆粕中的蛋白质会被高度水解, 当酶浓度超过最佳浓度时, 酶活性会显著减弱, 过量的蛋白酶聚集导致底物扩散抑制增加, 反应速率饱和, 进而导致水解度降低^[20-22]。由图 1 可以看出, 木瓜蛋白酶的水解效果最好, 豆粕大部分被酶解成游离的氨基酸和不同链长的多肽, 胰蛋白酶和碱性蛋白酶的水解度比木瓜蛋白酶低, 而呈现上升的趋势, 胰蛋白酶水解度上升趋势明显, 随着加酶量升高, 水解度高于碱性蛋白酶, 与木瓜蛋白酶相接近。

2.1.2 不同蛋白酶对豆粕肽得率的影响 由图 2 可知, 随着加酶量的增大, 胰蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶均随着加酶量的增多, 豆粕肽得率呈递增趋势。图 1、图 2 结果显示木瓜蛋白酶的水解度较高, 呈现先增后减的趋势, 豆粕肽得率最低且持续增长, 这可能主要是由于木瓜蛋白酶在酶解过程中, 前期豆粕蛋白主要被酶解为

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的筛选

2.1.1 不同蛋白酶对水解度的影响 由图 1 可知, 木瓜蛋白酶和角蛋白酶随着加酶量的增大, 水解度先增大后降低, 在酶添加量为 30 mg/g 时达到顶点, 木瓜蛋白酶的水解效率最高, 角蛋白酶水解效率偏低。胰蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶均

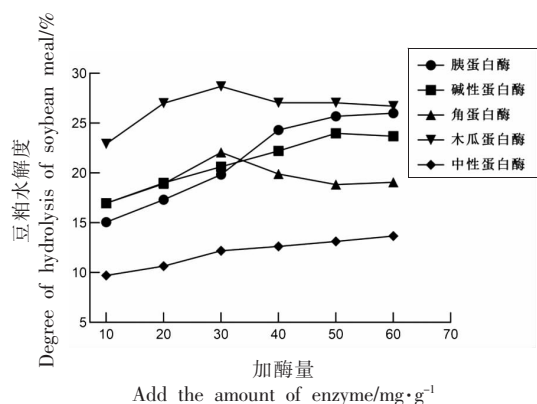


图 1 5 种蛋白酶对豆粕水解度的影响

Fig.1 Effects of 5 proteases on hydrolysis degree of soybean meal

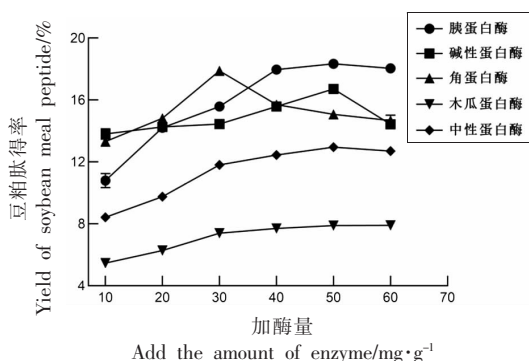


图 2 5 种蛋白酶对豆粕肽得率的影响

Fig.2 Effects of 5 proteases on peptide yield of soybean meal

长链肽。然而随着加酶量增多,底物抑制增强,形成长链肽的速率降低,短链肽形成速率增加,总体酶解速率降低。通过对豆粕肽得率的研究发现,胰蛋白酶、碱性蛋白酶、角蛋白酶酶解产物的豆粕肽得率较高,木瓜蛋白酶酶解产物中多肽浓度处于较低水平。

2.1.3 分子质量的测定 从表 3 可知,角蛋白酶酶解产物中分子质量>1 000 u 的肽占比较高,说明角蛋白酶酶解产物中含有大量的长链肽,其它蛋白酶酶解产物中分子质量<1 000 u 的低分子肽含量较高,其中胰蛋白酶、中性蛋白酶的酶解产物

中,分子质量在 150~500 u 的肽含量较高,主要为二肽和三肽的小肽,研究表明,短链的大豆肽具有特定的生物活性,其中二肽和三肽比完整蛋白或者游离氨基酸更容易消化,因此被认为是人类营养合适的蛋白质来源^[23]。木瓜蛋白酶的酶解产物中分子质量<150 u 的肽含量较高。结果表明,胰蛋白酶和中性蛋白酶的酶解产物中小肽含量高,可以有效增加产品品质,促进消化吸收。角蛋白酶酶解后大分子肽含量高,木瓜蛋白酶酶解产物主要以游离氨基酸为主,在制备豆粕肽的工艺中效果欠佳。

表 3 5 种蛋白酶最适条件下分子质量分布表

Table 3 Molecular weight distribution of 5 proteases in optimal conditions

蛋白酶	最适加酶量/ mg·g ⁻¹	不同分子质量肽的占比/%			
		>1 000 u	500~1 000 u	150~500 u	<150 u
胰蛋白酶	40	6.66	15.53	48.02	29.79
碱性蛋白酶	50	4.67	26.53	34.91	33.89
角蛋白酶	30	17.45	28.68	39.61	14.26
木瓜蛋白酶	20	3.95	17.4	32.51	46.14
中性蛋白酶	100	7.27	22.4	47.42	22.91

2.1.4 疏水值测定 ANS 荧光探针法测得的疏水性指数,可以在一定程度上反映肽链上疏水氨基酸的含量。表面疏水值越高,说明肽链中的疏水性氨基酸残基越多,所产生的苦味就越强^[24]。从表 4 可以看出,角蛋白酶的酶解产物表面疏水值为 60.47,是所有蛋白酶酶解产物中的最低水平。碱性蛋白酶作为一种内切酶,与疏水性和碱性残基 C 末端结合的特异性较差^[25],疏水性指数在 5 种蛋白酶中最高。胰蛋白酶主要作用于精氨酸和赖氨酸残基,具有很强的特异性,疏水性指数变化不大,中性蛋白酶是一种外源性蛋白酶,对肽键的专一性不强,疏水值变化明显。因此角蛋白酶的酶解产物苦味较淡,易于接受。胰蛋白酶和中性蛋白酶酶解产物的苦味适中,中性蛋白酶酶解产物受反应条件影响,口味差异大。碱性蛋白酶在水解过程中,非极性基团在蛋白质三级结构中暴露出来,酶解的产物苦味较重。

综合考虑蛋白酶酶解产物以上几种因素,胰蛋白酶的水解度较高,豆粕肽得率达到 18.06%,是几种蛋白酶中肽得率最高的,而且豆粕肽主要

表 4 5 种蛋白酶最适条件下的疏水值

Table 4 Hydrophobic values of 5 proteases under optimal conditions

蛋白酶	疏水性指数
胰蛋白酶	105.29 ± 1.47
碱性蛋白酶	153.83 ± 8.32
角蛋白酶	60.47 ± 8.54
木瓜蛋白酶	123.96 ± 15.52
中性蛋白酶	103.61 ± 15.09

为二肽、三肽,品质较优,苦味偏淡,故选择胰蛋白酶作为最优的水解酶。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 加酶量对酶解的影响 由图 3a 可知,当加酶量达到 40 mg/g 时,豆粕的水解度和豆粕肽得率的变化趋势都逐渐变缓。表明随着酶添加量的不断增多,豆粕蛋白转化为豆粕多肽的数量增加。然而,当酶添加量到达一定值时,酶与酶之间会产生竞争性抑制,随着酶添加量增加,酶解反应速率不会产生显著性变化。在图 3b 中随加酶量增加,分

子质量>1 000 u 和分子质量在 500~1 000 u 之间的豆粕肽占比逐渐减小,分子质量在 150~500 u 之间的占比逐渐增加。结合图 3a 的豆粕肽得率可以看出,随加酶量逐渐增加,酶解产生的长链肽增量逐渐减少,一方面,豆粕蛋白大分子大部分被酶

催化,另一方面,酶的浓度过大,一部分酶转移方向,开始酶解长链的豆粕肽。当酶添加量超过 40 mg/g 时,豆粕肽得率处于近乎停滞的状态,豆粕肽的分子质量分布也没有明显变化,从经济成本和效率综合考虑,胰蛋白酶的加酶量确定为 40 mg/g。

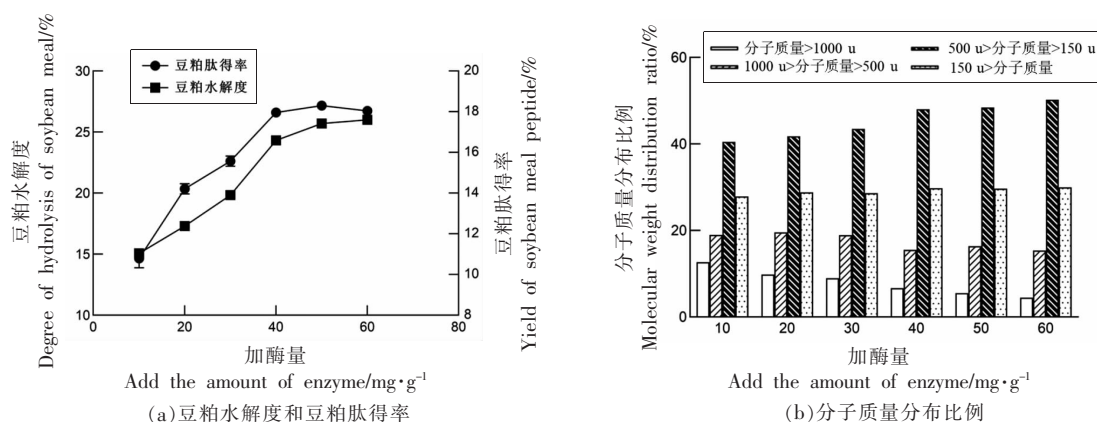


图 3 加酶量对酶解的影响

Fig.3 Effect of enzyme dosage on enzymatic hydrolysis

2.2.2 酶解时间对酶解的影响 如图 4a 所示,当酶解时间达到 36 h 时,豆粕的水解度和肽得率随酶解时间的延长,增长趋势明显。超过 36 h 后,一方面反应时间延长,参加酶促反应的底物减少,另一方面胰蛋白酶可能受到多肽和氨基酸的抑制,豆粕的水解度和肽得率增长趋于平缓甚至降低。从图 4b 可以看出,豆粕肽分子质量在 150~1 000 u 之间的占比处于一个相对稳定的状态,随酶解

时间的延长,只会产生更多氨基酸。这是由于胰蛋白酶具有广泛的特异性,主要切割精氨酸或赖氨酸的肽键,因此在 36 h 内,胰蛋白酶的酶解程度增加速率不断上升,酶解物主要与酶切位点的偏好有关。酶解时间超过 36 h,豆粕肽的得率逐渐减少,水解度上升,这是因为水解反应一直在进行,反应生成的豆粕肽一部分被降解成游离的氨基酸^[26],故酶解 36 h 是最优的酶解时间。

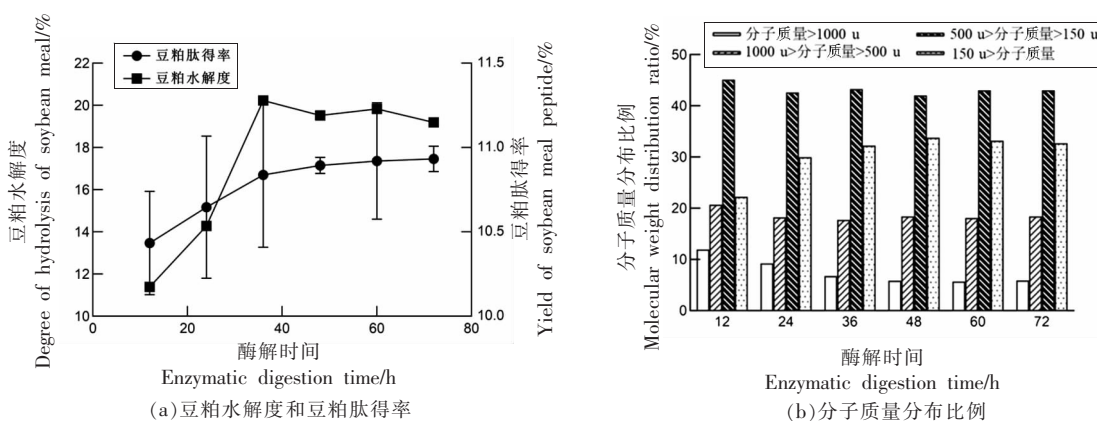


图 4 酶解时间对酶解的影响

Fig.4 Influence of enzymatic hydrolysis time on enzymatic hydrolysis

2.2.3 豆粕量对酶解的影响 如图 5a 所示,当豆粕添加量达到 30 g 时,豆粕的水解度和肽得率达到最高。在底面积相同的容器中,随着豆粕量的增加,豆粕的表面积和内部面积发生变化,表面易干燥内部水分迁移较弱,表面温度与内部温度不同等问题都会影响豆粕的酶解。当酶添加量超过 30

g 时,豆粕的水解度和肽得率降低,长链的豆粕肽占比不断增大,说明豆粕添加量的变化会对胰蛋白酶的作用产生影响,豆粕添加量为 40 g 时,小分子肽占比略高于豆粕添加量为 30 g,而肽得率明显下降。故确定豆粕量为 30 g。

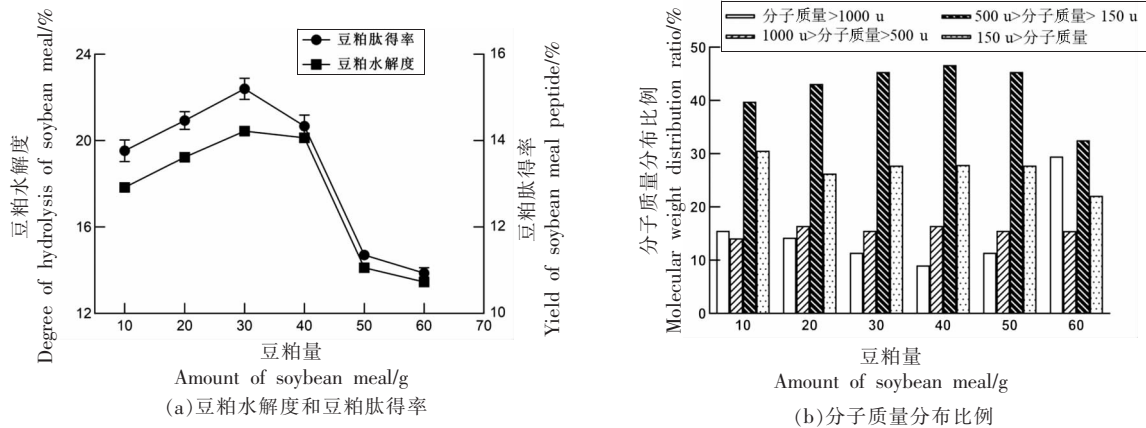


图 5 豆粕量对酶解的影响

Fig.5 Influence of soybean meal content on enzymatic hydrolysis

2.2.4 酶解温度对酶解的影响 如图 6a 所示,随着温度的升高,豆粕的水解度和肽得率不断上升,当温度达到 50 ℃时,豆粕的水解度和肽得率效果最好,分别达到 14.8%和 16.13%。升高温度,蛋白的活化能和酶的活性都会升高,豆粕的水解度和肽得率也会提高。然而随温度的进一步升高会导致酶失活,酶解的速度降低。在酶解温度为 50 ℃

的条件下,豆粕肽的二肽、三肽含量最高,说明适宜的温度有助于蛋白的解离,蛋白酶更容易到达适宜的酶切位点,酶解产物多为豆粕肽。当温度超过 50 ℃,解聚的蛋白亚基会重新聚集成团,不利于豆粕的酶解,而且酶解多发生在折叠的豆粕蛋白表面,产物中多为游离氨基酸,因此选择酶解温度 50 ℃为最适温度。

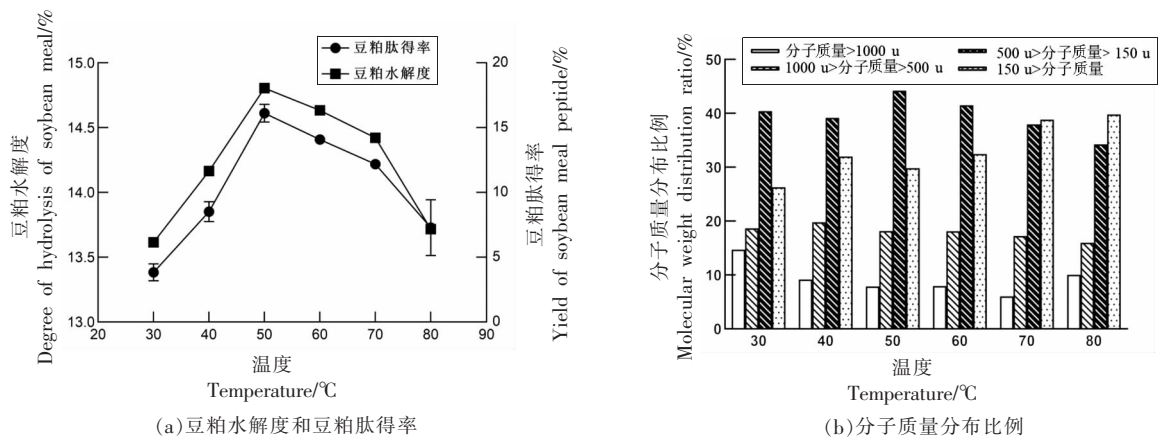


图 6 酶解温度对酶解的影响

Fig.6 Influence of enzymatic hydrolysis temperature on enzymatic hydrolysis

2.2.5 液固比对酶解的影响 如图 7a 所示,当液固比为 1 mL/g 时,豆粕的水解度、肽得率,还有二肽、三肽的含量占比均最高,胰蛋白酶来自动物的胰脏,其酶解特性更加接近于生物,当液固比不断增大,水解度和肽得率都会随之降低,豆粕被直接

酶解成游离的氨基酸,适宜的液固比,更容易得到酶解的中间产物豆粕肽。从生产成本角度而言,液固比越高,后续的干燥成本就越高,故液固比确定为 1 mL/g。

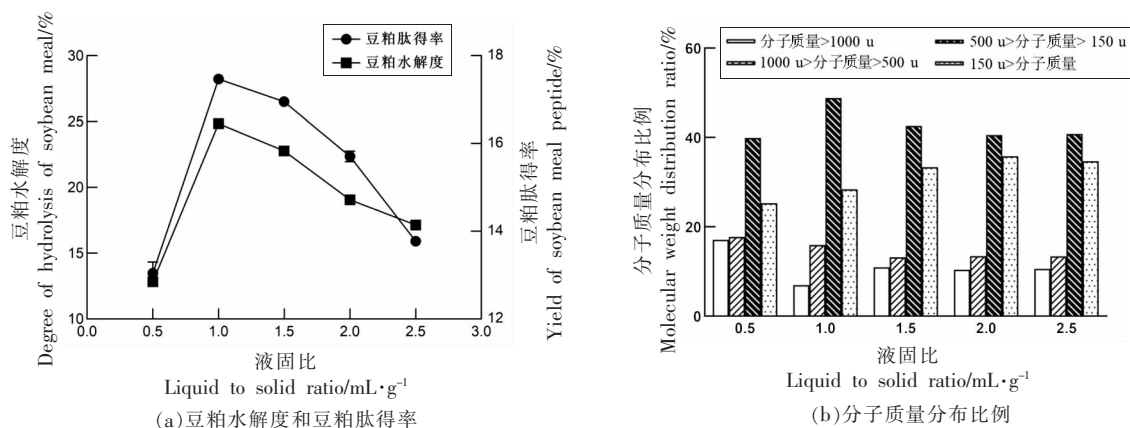


图 7 液固比对酶解的影响

Fig.7 Influence of liquid-solid ratio on enzymatic hydrolysis

2.3 响应面优化试验结果

2.3.1 响应面试验设计及回归模型的建立 以单因素实验结果为基础,以液固比(A)、豆粕量(B)、

温度(C)3个因素为相应变量,以肽得率(Y)为响应值,设计3因素3水平试验17组,结果见表5。

表 5 试验方案和结果

Table 5 Experimental scheme and results

编号	液固比/ mL·g ⁻¹	豆粕质量/ g	温度/°C	豆粕肽得 率/%	编号	液固比/ mL·g ⁻¹	豆粕质量/ g	温度/°C	豆粕肽得 率/%
1	0.5	20	50	14.11	10	0.5	30	45	10
2	1	30	50	18.49	11	1	40	45	11
3	1	20	55	16.38	12	1	30	50	18.93
4	1	20	45	15.28	13	1.5	20	50	13
5	1.5	40	50	15.35	14	1	40	55	14
6	1	30	50	18.57	15	1	30	50	15
7	1.5	30	55	16.03	16	1	30	50	16
8	0.5	40	50	13.6	17	0.5	30	55	17
9	1.5	30	45	9					

采用 Design-Expert 8.0.6 软件程序对以上试验数据进行二次多元回归拟合,分析结果得出胰蛋白酶酶解豆粕制备豆粕肽的回归方程为:

$$Y = 18.64 + 1.05A + 0.062B + 0.092C - 0.244AB - 0.068AC + 0.057BC - 2.30A^2 - 1.37B^2 - 1.32C^2$$

由表 6 可知,回归模型 $P < 0.001$,说明胰蛋白

酶酶解豆粕制备豆粕肽的模型极显著,同时失拟值 P 为 $0.4909 > 0.05$ 不明显,说明该模型合理,数据可信,且模型的 $R^2 = 0.9881$ 说明该模型与实际试验拟合较好,自变量与响应值之间的线性关系显著,可以进行分析与预测。

从回归分析的结果可以得出,一次项中 A 影

响极显著, *B* 影响显著, *C* 影响不显著, 说明单因素中液固比在豆粕肽得率的影响更加显著。根据

F 值的大小, 可以判断 3 个因素对豆粕肽得率的影响是液固比(*A*)>酶解温度(*C*)>豆粕量(*B*)。

表 6 回归模型方差分析及回归方程系数显著性检验

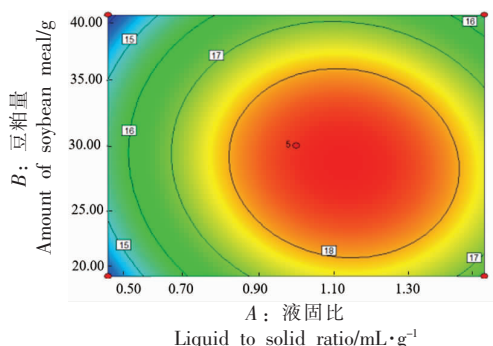
Table 6 Regression model variance analysis and regression equation coefficient significance test

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值> <i>F</i>	显著性
模型	53.48	9	5.94	64.77	< 0.0001	**
<i>A</i>	8.90	1	8.90	97.05	< 0.0001	**
<i>B</i>	0.97	1	0.97	10.60	0.0139	*
<i>C</i>	0.26	1	0.26	2.86	0.1344	
<i>AB</i>	0.23	1	0.23	2.46	0.1608	
<i>AC</i>	0.018	1	0.018	0.20	0.6693	
<i>BC</i>	0.29	1	0.29	3.18	0.1178	
<i>A</i> ²	19.30	1	19.30	210.36	< 0.0001	*
<i>B</i> ²	9.90	1	9.90	107.92	< 0.0001	*
<i>C</i> ²	9.27	1	9.27	101.00	< 0.0001	*
总残差	0.64	7	0.092			
失拟项	0.27	3	0.090	0.97	0.4909	
净误差	0.37	4	0.093			
总和	54.12	16				

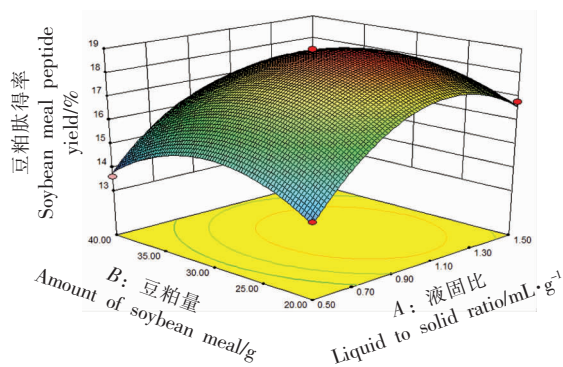
注: * 表示差异显著(0.001<*P*<0.05), ** 表示差异极显著(*P*<0.001)。

2.3.2 响应曲面分析图示 由图 8 可知, 设计的 3 个因素中对豆粕肽得率影响最大的是液固比,

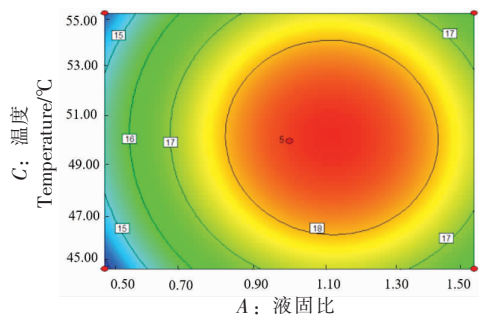
其次是酶解温度, 最后是豆粕量, 与表中方差分析的显著性结果一致。



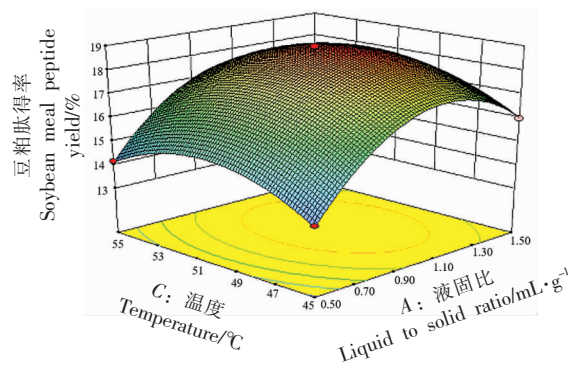
(a) *A* 与 *B* 的等高线图



(d) *A* 与 *B* 的曲线图



(b) *A* 与 *C* 的等高线图



(e) *A* 与 *C* 的曲线图

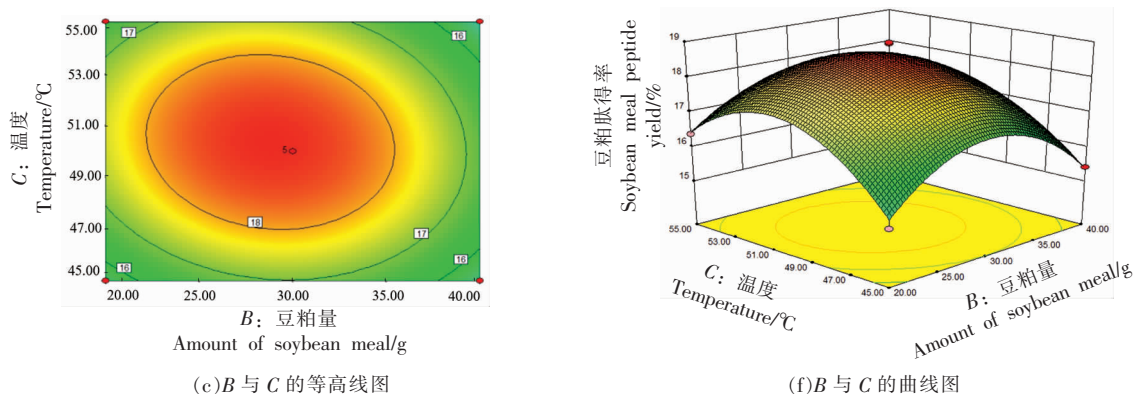


图8 各因子交互作用的等高线图和曲面图

Fig.8 Contour diagram and surface diagram of interaction of various factors

2.3.3 最佳酶解工艺确定 采用 Design-Expert 8.0.6 软件对上述回归方程进行分析, 确定最佳酶解工艺: 液固比为 1.13 mL/g, 豆粕质量为 28.61 g, 温度为 50.34 °C, 豆粕肽得率预测值为 18.81%。

2.3.4 试验可行性 考虑到试验的可行性和实际操作方便, 修正酶解工艺条件为: 液固比 1 mL/g, 豆粕量 30 g, 温度 50 °C。在此条件下经过 3 次平行试验, 测得豆粕肽得率为 18.87%, 与理论值基本吻合, 证明响应面分析法对豆粕酶解制备豆粕肽的条件优化是可行的。

3 结论

随着酶制剂的发展逐步成熟, 通过酶解手段提取豆粕肽将成为一种主流, 半固态酶解工艺相较于液态酶解操作简易, 生产成本低, 更容易被市场接受。曹梦笛等^[27]通过半固态酶解制备全谷物多肽, 其抗氧化、ACE 抑制活性显著高于液态酶解产物, 说明半固态酶解工艺具有可行性。碱性蛋白酶的水解能力较强^[28], 然而在本次试验中, 豆粕肽得率和水解度都低于胰蛋白酶, 主要原因可能是碱性蛋白酶具有一定的耐碱性, 可以在碱性水解液中酶解, 碱性水解液使碱性蛋白酶更容易接近蛋白分子内部的催化位点, 然而在固态酶解中碱性蛋白酶失去优势。胰蛋白酶作为一种内肽酶, 对蛋白质的肽键具有专一性, 酶解产物主要以多肽、小肽的形式存在, 风味趋于稳定。通过疏水值的测定, 反映出胰蛋白酶酶解产物具有较低的苦味, 适宜作为一种低苦味肽进行生产。在此基础上, 本试

验通过单因素实验中, 对豆粕肽分子质量分布的测定, 可以更加直观的看出各种因素对酶解产物的影响。在响应面优化试验中, 温度对酶解的影响不显著, 与液态酶解有差异^[29], 主要是因为固态酶解主要在烘箱中反应, 设置的温度差与酶解物感受到的温度差有一定差距。

本试验采用半固态酶解豆粕工艺, 通过豆粕肽得率、豆粕水解度、豆粕肽分子质量和荧光探针法确定的苦味值, 综合考虑选出酶解效果较佳的胰蛋白酶进行酶解。通过单因素实验选取对酶解影响较大的 3 个因素, 然后通过响应面分析优化豆粕肽得率, 得到最优的酶解条件: 液固比为 1 mL/g, 豆粕质量为 30 g, 温度为 50 °C。本试验工艺简单, 豆粕肽得率高, 小分子肽占比高, 操作成本低, 在规模化生产中起着重要作用, 为豆粕资源的合理开发利用提供理论参考。

参 考 文 献

- [1] HRCKOVA M, RUSNAKOVA M, ZEMANOVIC J. Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2002, 20(1): 7-14.
- [2] 孟阳, 香红星, 雷晓青. 酶解豆粕制备鲜味肽的研究进展[J]. 饲料研究, 2021, 44(1): 157-160.
MENG Y, XIANG H X, LEI X Q. Research progress on preparation of umami peptides from soy-

- bean meal by enzymatic hydrolysis[J]. *Feed Research*, 2021, 44(1): 157–160.
- [3] 张晓峰, 杨建平, 潘春梅, 等. 双酶法酶解豆粕蛋白最佳工艺条件研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(18): 184–186.
- ZHANG X F, YANG J P, PAN C M, et al. Study on the optimal technological conditions of double enzymatic hydrolysis of soybean meal protein[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017(18): 184–186.
- [4] TAVANO O L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 90: 1–11.
- [5] PEIGHAMBARDOUST S H, KARAMI Z, PATEIRO M, et al. A review on health-promoting, biological, and functional aspects of bioactive peptides in food applications[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(5): 631.
- [6] MAFRA D, BORGES N, ALVARENGA L, et al. Dietary components that may influence the disturbed gut microbiota in chronic kidney disease[J]. *Nutrients*, 2019, 11(3): 496.
- [7] TSURUKI T, KISHI K, TAKAHASHI M, et al. Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean β -conglycinin, is an fMLP agonist[J]. *FEBS Letters*, 2003, 540(1/2/3): 206–210.
- [8] KOJIMA-YUASA A, HUANG X, MATSUI-YUASA I. Synergistic anticancer activities of natural substances in human hepatocellular carcinoma[J]. *Diseases*, 2015, 3(4): 260–281.
- [9] DHAYAKARAN R, NEETHIRAJAN S, WENG X. Investigation of the antimicrobial activity of soy peptides by developing a high throughput drug screening assay[J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2016, 6: 149–157.
- [10] BAI G, TSURUTA T, NISHINO N. Dietary soy, meat, and fish proteins modulate the effects of prebiotic raffinose on composition and fermentation of gut microbiota in rats[J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2018, 69(4): 480–487.
- [11] NAGAOKA S, TAKEUCHI A, BANNO A. Plant-derived peptides improving lipid and glucose metabolism[J]. *Peptides*, 2021, 142: 170577.
- [12] CLEMENTE A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2000, 11(7): 254–262.
- [13] 刘静波, 王子秦, 于一丁, 等. 响应面法优化豆粕肽制备工艺[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(8): 216–223.
- LIU J B, WANG Z Q, YU Y D, et al. Optimization of soybean meal peptide preparation process by response surface methodology[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(8): 216–223.
- [14] BEAUBIER S, FRAMBOISIER X, IOANNOU I, et al. Simultaneous quantification of the degree of hydrolysis, protein conversion rate and mean molar weight of peptides released in the course of enzymatic proteolysis[J]. *Journal of Chromatography B*, 2018, 1105(15): 1–9.
- [15] 闫凯, 周玉岩, 陈子龙, 等. 豆粕固态发酵及酶解制备小分子肽的研究[J]. *广东饲料*, 2020, 29(6): 29–32.
- YAN K, ZHOU Y Y, CHEN Z L, et al. Research on preparation of small peptides from soybean meal by solid-state fermentation and enzymatic hydrolysis[J]. *Guangdong Feed*, 2020, 29(6): 29–32.
- [16] 郭兴凤. 蛋白质水解度的测定[J]. *中国油脂*, 2000, 25(6): 176–177.
- GUO X F. Determination of the degree of protein hydrolysis[J]. *China Oils and Fats*, 2000, 25(6): 176–177.
- [17] 余勃, 陆兆新. 发酵豆粕生产大豆多肽研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(2): 189–192.
- YU B, LU Z X. Research on fermented soybean meal to produce soybean peptides[J]. *Food Science*, 2007, 28(2): 189–192.
- [18] LEE K D, WARTHESEN J J. Mobile phases in reverse-phase HPLC for the determination of bitter peptides in cheese[J]. *Journal of Food Science*, 1996, 61(2): 291–294.
- [19] LIN X, LU Y, ZHANG T, et al. Accuracy and precision comparison for molecular weight distribution assay of fish collagen peptides: A methodology study between two gel permeation chromatography columns[J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(1): 246–257.
- [20] HASKARD C A, LI-CHAN E C Y. Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS-) fluorescent probes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(7): 2671–2677.

- [21] 高梅娟, 刘平, 兰小红, 等. 双酶酶解豆粕蛋白制备低苦味肽[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2): 193-197.
GAO M J, LIU P, LAN X H, et al. Preparation of low-bitter peptides by double enzymatic hydrolysis of soybean meal protein[J]. Food Industry Science and Technology, 2010, 31(2): 193-197.
- [22] SERRANO M P, REBOLLAR P G, SUEIRO S, et al. Influence of duration of storage on protein quality traits of soybean meals [J]. Journal of Applied Poultry Research, 2013, 22(3): 423-429.
- [23] SUN X D. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(12): 2447-2459.
- [24] 何慧, 王进, 裴凡, 等. 蛋白质水解物与苦味的构效关系及脱苦研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 571-574.
HE H, WANG J, PEI F, et al. Study on the structure-activity relationship between protein hydrolysate and bitterness and debittering[J]. Food Science, 2006, 27(10): 571-574.
- [25] 范彦令, 张士辉. 酶解豆粕和发酵豆粕的研究进展[J]. 今日畜牧兽医, 2007(7): 55-57.
FAN Y L, ZHANG S H. Research progress of enzymatic hydrolysis of soybean meal and fermented soybean meal[J]. Today Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2007(7): 55-57.
- [26] 许晶, 江连洲, 李杨, 等. 脱脂豆粕酶水解物抗氧化活性的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(9): 208-211.
XU J, JIANG L Z, LI Y, et al. Antioxidant activity of enzyme hydrolysate of defatted soybean meal[J]. Food Industry Science and Technology, 2009, 30(9): 208-211.
- [27] 曹梦笛, 周浩纯, 李赫, 等. 半固态酶解法制备全谷物多肽及其抗氧化、ACE抑制活性的研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(15): 9-16.
CAO M D, ZHOU H C, LI H, et al. Preparation of whole grain peptides by semi-solid enzymatic hydrolysis and their antioxidant and ACE inhibitory activities[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(15): 9-16.
- [28] TANG C, WANG X S, YANG X Q. Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2009, 4(114): 1484-1490.
- [29] ZHENG Z, HUANG Y, WU R, et al. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of duck blood corpuscle using commercial proteases[J]. Poultry Science, 2014, 10(93): 2641-2650.

Optimization of Preparation of Soybean Meal Peptides by Semi-Solid Enzymatic Hydrolysis

Xu Kang, Wang Yuanxing*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047)

Abstract In order to optimize the enzymatic digestion process of soybean meal, soybean meal peptides of moderate molecular mass and easy to digest and absorb were obtained. In this study, the effects of trypsin, alkaline protease, neutral protease, papain and keratinase on the hydrolysis degree, peptide yield, molecular mass and bitterness value of soybean meal during the semi-solid enzymatic digestion process were compared. A single-factor experiment was carried out using trypsin, which has a better enzymatic effect, and three conditions (liquid to solid ratio, soybean meal quantity and temperature) were selected to optimize the preparation process. The results showed that the peptide was produced in high yield (18.87%) by trypsin digestion at 40 mg/g, 36 h, 1 mL/g liquid to solid ratio, 30 g soybean meal and 50 °C.

Keywords soybean meal; semi-solid enzymatic hydrolysis; trypsin; molecular weight determination; response surface analysis