

# 酶解豆粕制备鲜味肽外切酶筛选与工艺优化

范海茹, 许斌, 高雅鑫, 张蒙冉, 王凤忠\*, 李淑英\*

(中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193)

**摘要:** 本试验以高温豆粕为原料, 以水解度和滋味稀释因子为筛选指标, 首先比较了外切酶 Flavourzyme 和复合蛋白酶的酶解效果, 筛选出最佳外切酶为 Flavourzyme。再采用单因素试验考察该酶的最适添加量、酶解 pH 和酶解时间。最后, 通过  $L_9(3^4)$  正交试验确定了 Flavourzyme 酶解高温豆粕的最佳工艺组合, 即加酶量 22 U/g, pH 5.8, 酶解时间 2.5 h, 在此条件下豆粕蛋白水解度高达 27.80%。

**关键词:** 高温豆粕; 外切酶; 水解度; 滋味稀释因子; 正交试验

中图分类号: TS229

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2020)02-0111-05

## Screening and Process Optimization of Umami Peptides Exonuclease for Enzymatic Hydrolysis of Soybean Meal

FAN Hairu, XU Bin, GAO Yaxin, ZHANG Mengran, WANG Fengzhong\*, LI Shuying\*

(Institute of Food Science and Technology, CAAS, Beijing 100193, China)

**Abstract:** In this experiment, high temperature soybean meal was used as raw material, hydrolysis degree and taste dilution factor were used as screening indexes. Firstly, the enzymatic hydrolysis effect of exonuclease Flavourzyme and complex protease was compared, and the best exonuclease was selected as Flavourzyme. Secondly, the single factor test was used to investigate the optimum enzyme concentration, pH and hydrolyzing time of hydrolysis. Finally, the best technology combination of Flavourzyme hydrolysis of high temperature soybean meal was determined by the  $L_9(3^4)$  orthogonal test, that is, adding 22 U/g of enzyme, pH 5.8, enzymatic hydrolysis time 2.5 h, under this condition, the degree of protein hydrolysis of soybean meal reached 27.80%.

**Key words:** High temperature soybean meal; Exonuclease; Hydrolysis degree; Taste dilution factor; Orthogonal experiment

豆粕是大豆提取油脂后得到的副产物, 其蛋白质含量约为 40%~45%、低聚糖 10%~15%、多糖和纤维素 20%~25%, 具有极高的研究利用价值<sup>[1]</sup>。根据脱溶温度不同, 豆粕分为低温豆粕和高温豆粕。高温豆粕产量约占豆粕总产量的 95%, 在工业生产中占有主要地位<sup>[2]</sup>。从加工成本角度来说, 高温豆粕比低温豆粕的成本更低, 但

是从处理手段方面考虑, 高温豆粕因经过高温处理, 其蛋白质发生变性, 致使溶解性能变差, 在食品领域应用较少<sup>[3]</sup>。目前, 国内外针对豆粕的研究大多是在动物饲料方面<sup>[4-6]</sup>, 深加工研究不常见。

鲜味肽在菜、乳、肉等食材增味方面具有突出效果<sup>[7]</sup>, 符合当今食品“天然、营养、安全”的发展趋势, 鲜味科学的研究及产品开发也成为食品领域的研究重点<sup>[8]</sup>。目前针对鲜味肽的研究多以动物蛋白为主<sup>[9-11]</sup>。我国鲜味调味品已发展至第四代, 即营养型鲜味调味料, 且发展最为迅速, 该类调味料添加了动植物蛋白酶解产物, 在为菜肴增鲜的同时, 可以补充人体所需的必需氨基酸、微量元素等<sup>[12]</sup>。目前尚且存在一定的问题亟待解决, 其中包括肽的来源种类、肽资源开发等。

豆粕含有大豆中的全部蛋白质<sup>[13]</sup>, 且氨基酸比例合理<sup>[14]</sup>, 是植物蛋白的优势资源<sup>[3]</sup>。本研究以水解度和滋味稀释因子为筛选指标, 确定最适蛋

收稿日期: 2019-09-09

基金项目: 大豆产业技术体系(CARS-04-PS29); 典型农产品品质指标体系构建与特征性指标筛选验证项目(GJFP2019043)

作者简介: 范海茹(1994-), 女, 在读硕士, 研究方向: 食品加工与安全。

通讯作者: 王凤忠, 男, 博士, 研究员, E-mail: wangfengzhong@sina.com

李淑英, 女, 博士, 副研究员, E-mail: lishuying2000@163.com

白酶、最佳水解条件和最佳工艺组合,以期为高温豆粕酶解制备鲜味肽奠定理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

材料:高温豆粕(市售);Flavourzyme( $\geq 500$  U/g, SIGMA);复合蛋白酶(120 U/mg,上海源叶生物科技有限公司);甲醛、NaOH、HCl(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

仪器:METTLER TOLEDO FiveEasy Plus 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);FA2004 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);HH-4 数显恒温水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);FW 100 型高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);3K15 型医用离心机(SIGMA);G136T 型灭菌锅(AUTOClave)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 样品制备

用高速万能粉碎机粉碎高温豆粕,过 80 目筛,备用。

#### 1.2.2 酶解工艺

参考张静等<sup>[15]</sup>的方法略作修改,具体为:取过 80 目筛的豆粕样品,用蒸馏水配制成 8% 的豆粕悬浊液,利用 1 mol/L NaOH 溶液调节酶解体系使 pH 值保持不变,确定酶的添加量,具体参见“1.2.3 外切酶的筛选”。

#### 1.2.3 外切酶的筛选

参考实验室前期检测数据,本批次所用高温豆粕中的蛋白质含量为 40.41%。选用外切酶有 Flavourzyme 和复合蛋白酶,分别酶解 8% 豆粕液。不同蛋白酶酶解条件不同,Flavourzyme 酶解温度 53℃,加酶量 25 U/g, pH 6.35;复合蛋白酶酶解温度 45℃,加酶量 900 U/g, pH 6.35。酶解结束后,沸水浴 10 min 终止酶切反应。

#### 1.2.4 单因素试验

配制 8% 豆粕悬浊液,以最佳外切酶为水解酶,以加酶量、水解 pH 和水解时间为单因素展开试验,测定水解度和滋味稀释因子,确定最适酶解条件。

#### 1.2.5 正交试验

根据单因素试验结果,确定正交试验中各因素范围,选择  $L_9(3^4)$  正交表,以水解度为指标,对加酶量、水解 pH、水解时间进行正交优化,因素水平见表 1,试验重复 3 次。

#### 1.2.6 水解度(degree of hydrolysis, DH)的测定

参考高梅娟等<sup>[16]</sup>的方法,采用 pH-Stat 法计算

水解度。

$$DH = \frac{B \times N_b}{\alpha \times M_p \times h_{tot}} \times 100\%$$

式中:B 为酶解过程中消耗 NaOH 溶液的体积, mL;  $N_b$  为 NaOH 溶液的浓度, mol/L;  $\alpha$  为氨基的解离度,  $\alpha = 10^{(pH-pK)} / [1 + 10^{(pH-pK)}]$ , 本实验  $pK=7$ ;  $M_p$  为底物蛋白质含量, g;  $h_{tot}$  为每克蛋白质底物具有的肽键毫摩尔数, 豆粕  $h_{tot}=8.38$ 。

表 1 Flavourzyme 正交试验因素水平表

蛋白酶	水平	因素		
		A. 加酶量(U/g)	B. pH	C. 时间(h)
Flavourzyme	1	22	5.8	2.5
	2	25	6	3
	3	28	6.2	3.5

#### 1.2.7 滋味稀释分析(taste dilution analysis, TD)

参考 LIU 和 SEO 的方法<sup>[17-18]</sup>,采用比较滋味稀释分析,通过等比例稀释豆粕酶解产物进行苦味稀释因子测定。

### 1.3 数据处理

每次试验重复 3 次,取平均值。试验数据以“平均值 $\pm$ 标准偏差”表示,用 Graphpad 软件做图,用 Design Expert 8.0.6 软件进行方差分析。

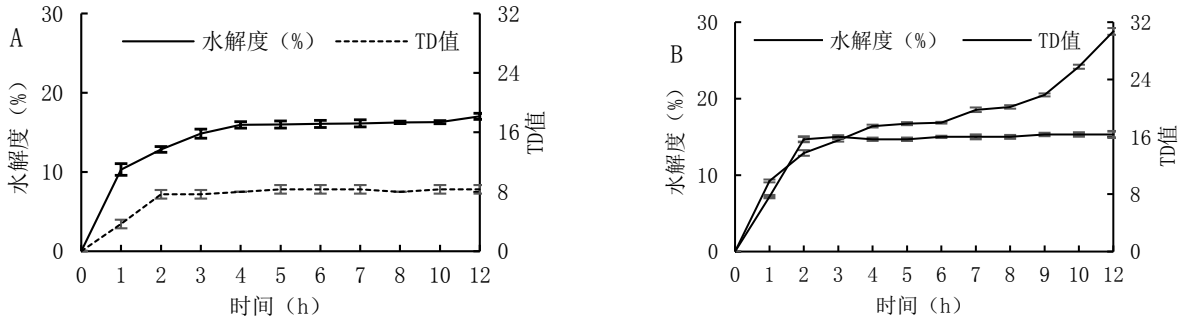
## 2 结果与分析

### 2.1 最适外切酶的筛选

本试验以高温豆粕为基料,以水解度和 TD 值为筛选指标,通过筛选外切酶制备鲜味肽。水解度反映豆粕中蛋白水解成肽段的百分比;TD 值即苦味值,反映肽段的苦味程度。如图 1 所示,高温豆粕在两种外切酶作用下水解度和 TD 值发生了不同变化。在酶解初期,酶与蛋白大分子充分结合,两种酶解产物的水解度随时间逐渐升高,Flavourzyme 酶解产物在 3 h 后进入稳定期并趋于平缓;复合蛋白酶酶解产物 4 h 开始变平稳,7 h 后又逐渐升高。Flavourzyme 对高温豆粕的水解度略低于复合蛋白酶。两种外切酶水解豆粕的 TD 值在 2 h 后均趋于平缓,但复合蛋白酶的 TD 值是 Flavourzyme 的两倍,即复合蛋白酶水解豆粕所得肽段的苦味值显著高于 Flavourzyme。综合考虑酶解工艺周期和多肽风味,本研究选用 Flavourzyme 为最适外切酶开展后续试验。

### 2.2 最佳酶解条件的优化

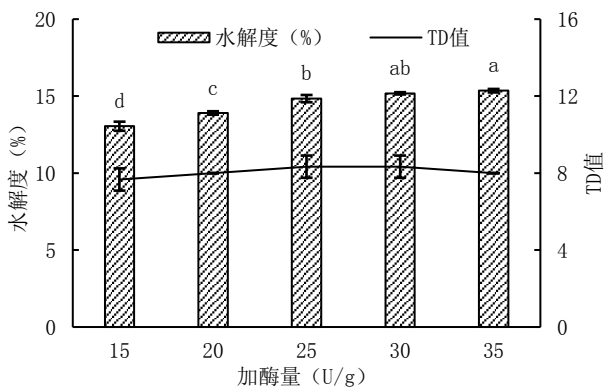
在确定 Flavourzyme 为最适高温豆粕水解酶的基础上,对加酶量、酶解 pH 值和酶解时间进行优



A. Flavourzyme; B. 复合蛋白酶

图1 不同酶解时间下豆粕蛋白外切酶酶解产物水解度和TD值的变化

化。以水解度和TD值为评价指标,对 Flavourzyme 的加酶量进行筛选。在 53℃, pH 6.35 的条件下酶解 3 h, 分别取样测水解度和TD值。如图2所示, TD值随加酶量升高基本保持不变, 水解度随着加酶量增加缓慢增加, 加酶量 25 U/g 和 30 U/g, 30 U/g 和 35 U/g 之间并无显著性差异, 考虑到酶的添加成本, 选取 25 U/g 作为最佳酶解浓度, 此时高温豆粕的蛋白水解度为 14.87%。



注: 不同字母表示参数具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 下同

图2 加酶量对水解度和TD值的影响

在 53℃、加酶量 25 U/g、pH 6.35 的条件下酶解豆粕, 每隔 2 h 取样一次, 测定不同时间的水解度和TD值。由图3可知, TD值在酶解 2 h 后变化平缓, 水解度在 3 h 后趋于稳定, 此时水解度为

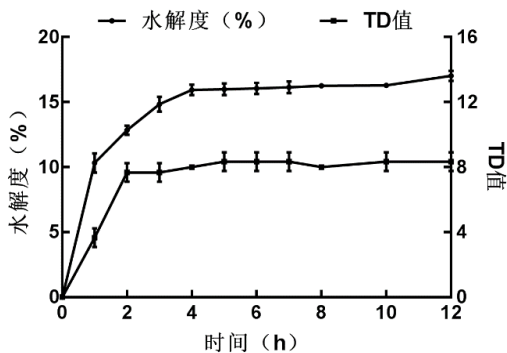


图3 酶解时间对水解度和TD值的影响

14.87%。故选择 3 h 为 Flavourzyme 水解豆粕蛋白的最适酶解时间。

以水解度为指标, 对 Flavourzyme 水解高温豆粕蛋白的 pH 值进行筛选。在豆粕原始 pH 值 6.35 的基础上, 又增加了 pH 值 5、6 和 7。在 53℃, 加酶量 25 U/g 条件下, 酶解 3 h。由图4可知, 在 pH 6 时, 高温豆粕蛋白的水解度最高 (高达 18.09%), 其次为 pH 5、6.35 和 7, 与 pH 6.35 时有显著性差异。综合考虑豆粕 pH 值调节成本, 选择 pH 6 为 Flavourzyme 水解豆粕蛋白的最适酶解 pH 值。

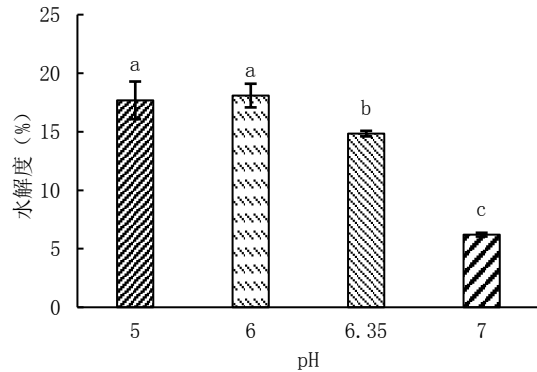


图4 pH对水解度的影响

### 2.3 最佳工艺组合的确定

在单因素试验的基础上, 以加酶量、酶解时间和酶解 pH 值为试验因素, 以水解度为考察指标, 参考  $L_9(3^4)$  正交试验因素水平表设计三因素三水平的正交试验, 确定 Flavourzyme 酶解高温豆粕的最佳工艺组合。由表2可知, 加酶量、酶解时间和酶解 pH 值对豆粕蛋白酶解效果的影响顺序依次为: 酶解 pH 值 > 酶解时间 > 加酶量。最优酶解组合为  $A_2B_1C_1$ , 即加酶量 25 U/g, pH 5.8, 酶解 2.5 h, 此时豆粕蛋白的水解度 27.05%, 低于表中酶解条件 1 和 4, 所以选择表中方案 1 作为 Flavourzyme 酶解豆粕蛋白的最优组合, 即加酶量 22 U/g, pH 值 5.8, 酶解时间 2.5 h, 经三次重复试验验证, 证实 Flavourzyme 酶解豆粕蛋白的水解度高达 27.80%。

表2 Flavourzyme 酶解条件正交试验结果

因素	加酶量	pH	时间	水解度(%)
1	1	1	1	27.99
2	1	2	2	18.29
3	1	3	3	13.84
4	2	1	2	27.18
5	2	2	3	19.43
6	2	3	1	16.34
7	3	1	3	25.18
8	3	2	1	18.82
9	3	3	2	16.17
均值1	20.040	26.783	21.050	
均值2	20.983	18.847	20.547	
均值3	20.057	15.450	19.947	
极差	0.943	11.333	1.567	

### 3 讨 论

本研究旨在筛选适合酶解高温豆粕的外切酶,通过对比 Flavourzyme 和复合蛋白酶发现,复合蛋白酶的酶解产物水解度高于 Flavourzyme 酶解产物,两者虽是外切酶,但均具有内切和外切活性,Flavourzyme 主要具有外切活性,可催化肽链末端的疏水性氨基酸,这可能是复合蛋白酶比 Flavourzyme 水解度高的原因。外切酶以多肽为底物,切割肽链末端氨基酸,不能显著提高苦味肽含量,致使酶解产物的苦味值产生不同的变化<sup>[19]</sup>。外切酶酶解产物中主要是游离氨基酸和多肽。复合蛋白酶在 7 h 后显示出较强的端解活性,其酶解产物的 TD 值较高,与 Flavourzyme 酶解产物 TD 值上有倍数级差异,可见不利于鲜味肽的开发。综合考虑,本研究选取 Flavourzyme 为最适外切酶,经酶解条件优化和最佳工艺组合,在苦味值保持稳定的基础上,水解度得到了显著提升,是优化前的 1.54~1.87 倍。

在酶解过程中,酶解产物的水解度受环境等因素的影响,不同的酶解时间、pH 和加酶量会使酶解产物的水解度发生不同变化。在适当的温度、加酶量和酸碱环境下,在酶解反应初期,水解度逐渐升高,随着时间的延长,水解度基本保持稳定,为节省时间,应选择合适的酶解时间。包美丽等研究表明,pH 会影响酶的活性部位上有关基团的解离,从而影响底物与酶的结合以及酶的催化功能<sup>[20]</sup>。孙敏等研究表明,反应体系的 pH 环境可以直接影响酶与底物的解离状态,所以会对酶与底物的结合状态产生影响,最终会影响到酶

解产物的多肽含量<sup>[21]</sup>。叶凯等研究表明,pH 的改变会影响酶的作用效果,进而终止酶解反应,过酸或过碱的极端环境会造成酶的失活或降解,使其分子结构受到破坏,酸碱环境对酶解效果至关重要<sup>[22]</sup>。因此,酶只有在其最适的 pH 环境下,才会有最佳的酶解效果<sup>[23-24]</sup>。根据酶促反应原理,在一定温度和 pH 下,底物浓度保持不变,加酶量较低时,随着加酶量增加,反应速度较快;当加酶量越来越多,反应速度变缓;如再继续增加,反应速度逐渐平稳,不再上升,趋向一个极限。研究表明,当底物的质量分数保持不变,增大蛋白酶的添加量,底物的蛋白会水解的很充分,酶解生成的多肽越多,再多添加酶量,过多的酶分子会抑制中间产物向酶解终产物的转化,抑制酶解反应<sup>[25-27]</sup>。与此同时,余敏等研究表明,蛋白酶自身也是一种蛋白,在酶解过程中也会发生酶解,随加酶量的增加会对酶解产物的组成造成干扰<sup>[28]</sup>。基于上述因素考虑,本研究对用于酶解高温豆粕的外切酶及其最适酶解条件进行筛选和优化,并取得了显著效果。

### 4 结 论

本研究以高温豆粕为原料,以水解度和 TD 值为筛选指标,比较了外切酶 Flavourzyme 和复合蛋白酶的酶解效果,筛选出最适外切酶为 Flavourzyme;并通过单因素试验考察了 Flavourzyme 添加量、酶解时间和酶解 pH 值 3 个因素对豆粕蛋白水解度和苦味 TD 值的影响,在此基础上,通过 L9(3<sup>4</sup>) 正交试验优化了酶解高温豆粕的酶解工艺,即 Flavourzyme 加酶量 22 U/g, pH 值 5.8,酶解

时间 2.5 h,在此条件下水解度为 27.80%。

### 参考文献:

- [1] 李良,周艳,邹智博,等.高温豆粕大豆分离蛋白射流空化辅助提取[J].农业机械学报,2019,50(9):373-380.
- [2] 李婷婷.超声辅助酶解高温豆粕制糖肽技术与构效分析[D].哈尔滨:东北农业大学,2017.
- [3] 于冬蕾,李婷婷,吴海波,等.超声辅助酶解高温豆粕制备抗氧化产物[J].食品科学,2018,39(20):268-277.
- [4] Xin D Z, Jian W Z, Heng Z W, et al. Evaluation of soybean meal as alternative to fish meal in diet for juvenile Asian red-tailed catfish ( *Hemibagrus wyckioides* ) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2019, 25(4): 1036-1049.
- [5] Choi D G, He M, Fang H, et al. Replacement of fish meal with two fermented soybean meals in diets for rainbow trout( *Oncorhynchus mykiss* ) [J]. *Aquaculture Nutrition*, 2019(4): 1-10.
- [6] 张磊,刘松鑫,刘畅,等.鹿骨胶原多肽螯合钙的制备[J].食品工业,2019,40(11):1-6.
- [7] 王虹,刘鑫,邹晓霜,等.蛋白鲜味肽复合调味品生产技术研究[J].中国食物与营养,2018,24(11):34-38.
- [8] 李学鹏,谢晓霞,朱文慧,等.食品中鲜味物质及鲜味肽的研究进展[J].食品工业科技,2018,39(22):319-327.
- [9] 莫加利,陈季旺,刘静泊,等.风干武昌鱼中鲜味肽的分离纯化及二级结构分析[J].食品科学,2019,40(14):23-28.
- [10] 谢晓霞.文蛤与蓝蛤鲜味肽的呈味特性及其与鲜味受体 T1R1/T1R3 的分子作用研究[D].锦州:渤海大学,2019.
- [11] 张宁龙,王文利,刘源.牛肉风味肽的研究进展[J].食品工业科技,2019,40(8):317-322.
- [12] 居乃琥.国际调味品工业发展的新动向与对策(上)[J].中国调味品,2006(12):4-8.
- [13] 刘玉兰,汪学德,丁莉.利用高温豆粕生产醇洗大豆浓缩蛋白的研究[J].中国油脂,2007(11):36-39.
- [14] 李莹,韩云胜,赵青余,等.豆粕与发酵豆粕中主要营养成分、抗营养因子及体外消化率的比较分析[J].中国饲料,2019(23):76-81.
- [15] 张静,李理. Alcalase 蛋白酶酶解高温豆粕制备水溶性大豆多肽[J].食品工业科技,2012,33(10):212-215.
- [16] 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.
- [17] LIU B Y, ZHU K X, PENG W, et al. Effect of sequential hydrolysis with endo- and exo-peptidase on bitterness properties of wheat gluten hydrolysates[J]. *RSC Advances*, 2016,6(33):27659-27668.
- [18] SEO W H, LEE H G, BAEK H H. Evaluation of bitterness in enzymatic hydrolysates of soy protein isolate by taste dilution analysis[J]. *Journal of Food Science*, 2008, 73(1):6.
- [19] 刘伯业.小麦蛋白低苦味肽的制备及其脱苦机理研究[D].无锡:江南大学,2017.
- [20] 包美丽,杨添植,张立钢,等.双酶法制备马鹿茸降血糖肽工艺优化及其对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果[J].食品科学,2017,38(6):88-95.
- [21] 孙敏,李诚,刘爱平,等.乳清蛋白抗氧化肽的制备及体外抗氧化活性研究[J].中国油脂,2019,44(8):22-27.
- [22] 叶凯,李小强,周金虎,等.响应面法酶解藜麦蛋白制备  $\alpha$ -淀粉酶抑制肽的工艺研究[J].中国调味品,2019,44(12):6-11.
- [23] 韩继福,任建波. Alcalase 酶水解玉米蛋白粉制备可溶性肽最佳条件的研究[J].吉林农业科学,2003(3):46-49.
- [24] 王广慧,李士慧,梁婷,等.响应面优化超声波辅助复合酶法提取杏鲍菇黄酮[J].东北农业科学,2018,43(1):45-50.
- [25] 赵欣锐,王秋阳,杨晰茗,等.木聚糖酶改性红松松仁膜衣膳食纤维工艺优化及结构分析[J].东北农业科学,2019,44(5):111-115,122.
- [26] 田志刚,孙洪蕊,刘香英,等.酶制剂对马铃薯面包品质的影响[J].东北农业科学,2019,44(5):103-106.
- [27] 任志龙,吕俊丽,王涵,等.酶-微波法协同提取苜蓿多酚类物质工艺的研究[J].东北农业科学,2019,44(4):89-93.
- [28] 余敏,黄晶晶,付瑞燕,等.响应曲面法优化酶解豆粕蛋白制备降糖肽的工艺[J].食品工业科技,2018,39(6):108-113.
- (责任编辑:王丝语)
- [24] Yozhizawa E. Microbial control of the rice water weevil with entomogenous fungi[A]. In: Hirai K. Establishment, spread, and management of the rice water weevil and migratory rice pests in east Asia[C]. *Narc, Tsukuba*, 1993: 265-274.
- [25] 陈建军,艾新龙,汤少波,等.白僵菌与两种化学药剂对稻水象甲成虫的药效试验[J].湖北植保,2018(6):33-34.
- [26] 王伟,吕梦娇,赵利霞,等.新型苦参碱衍生物的水相合成及其晶体结构(英文)[J].有机化学,2018,38(4):883-889.
- [27] 豆敏详,姚满,吴志凤,等.苦参碱在土壤中的环境行为研究[J].农药学报,2017,19(5):576-582.
- [28] 刘秀红,王小武,丁新华,等.新疆主要稻区不同稻水象甲地理种群对常用杀虫剂抗性测定[J].新疆农业科学,2018(10):1847-1853.
- [29] 徐进,杨茂发,狄雪源,等.球孢白僵菌 YS03 菌株对稻水象甲的田间防治效果[J].西南农业学报,2015,28(4):1630-1633.
- (责任编辑:王丝语)
- [16] 蒋明星,高晗武.球孢白僵菌对稻水象甲成虫的毒力测定[J].植物保护学报,2002,29(3):287-288.
- [17] 王鹏,司怀军,吴家和.不同球孢白僵菌株毒杀稻水象甲成虫的效果分析[J].生物学杂志,2016,33(1):17-20.
- [18] 徐进,杨茂发,师沛琼,等.球孢白僵菌 YS03 菌株对稻水象甲成虫取食的影响[J].广东农业科学,2013,40(20):73-76.
- [19] 徐进,杨茂发,杨大星,等.不同球孢白僵菌对稻水象甲成虫的致病力测定[J].贵州农业科学,2013,41(3):69-72.
- [20] 李春雨,谭长仁,魏雅娟,等.生物农药 1%苦参碱水剂防治蟹田稻水象甲技术研究[J].北方水稻,2008,38(6):74-75.
- [21] 李晓光,王立侠,刘影,等.应用生物农药防治稻水象甲的试验研究[J].吉林农业大学学报,2004,26(4):411-413.
- [22] 吕德久.苦参碱可溶性液剂在养蟹稻田应用的初步研究[J].农业研究,2010(2):107.
- [23] 狄雪源,杨茂发,徐进,等.贵州稻水象甲危害损失和防治指标研究[J].应用昆虫学报,2015,52(6):1474-1481.

(上接第 43 页)