

# 不同分子量段大豆多肽功能特性的研究

邓成萍<sup>1</sup>, 薛文通<sup>1,\*</sup>, 孙晓琳<sup>2</sup>, 全明海<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. 保定味群食品工业有限公司, 河北 保定 071000)

**摘要:** 采用Alcalase和Neutrase双酶分步水解法, 制备了水解度约为24%的大豆多肽, 用截留分子量分别为30000、10000、5000Da的超滤膜将其分离成4个分子量段, 对不同分子量段大豆多肽的溶解性、起泡性及起泡稳定性、乳化性及乳化稳定性、抗氧化性和ACE抑制活性进行了研究。

**关键词:** 大豆多肽; 超滤; 抗氧化性; ACE抑制活性

## Functional Properties of Different Molecular Weight Segments of Soybean Peptides

DENG Cheng-ping<sup>1</sup>, XUE Wen-tong<sup>1,\*</sup>, SUN Xiao-lin<sup>2</sup>, QUAN Ming-hai<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Baoding Way Chein Food Industrial Co. Ltd., Baoding 071000, China)

**Abstract:** Soybean peptides with DH of about 24% were produced by Alcalase and Neutrase, and were cut off into 4 parts by ultrafiltration membranes with 30000 MWCO (Molecular Weight Cutoff), 10000 MWCO, 5000 MWCO respectively. The solubility, foam property and foam stability, emulsify property and emulsify stability and antioxidative activity and ACE inhibitory activity of the different parts of soybean peptides were studied respectively.

**key words** soybean peptides; ultrafiltration; antioxidative activity; ACE inhibitory activity

中图分类号: 0623.736

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)05-0109-04

大豆多肽是以豆粕或大豆分离蛋白为原料经蛋白酶水解、分离并精制而成的蛋白质水解产物, 它由许多种小分子肽组成, 产品中还含有少量游离氨基酸、糖类、无机盐等成分。大豆多肽的氨基酸与大豆蛋白完全一样, 组成齐全, 比列合理, 必需氨基酸平衡且含量丰富, 具有较高的营养价值, 此外它还具有大豆蛋白所不具备的众多良好的加工功能特性和生理功能特性, 如高溶解度、低粘度、酸易溶性、吸水性、抗氧化性、降血压、降胆固醇和防骨质疏松症等, 是一种比较理想的新型大豆深加工产品<sup>[1,2]</sup>。

大豆多肽的功能特性与其相对分子量大小有关, 对于不同肽段的产品具有不同的加工功能特性和生理功能特性。本文着眼于研究不同分子量段大豆多肽的溶解性、起泡性及起泡稳定性、乳化性及乳化稳定性、热稳定性、抗氧化性和ACE抑制活性, 为大豆多肽在食品及相关行业的应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

低温脱脂豆粕 蛋白质含量≥48.78% 黑龙江金海粮油; Alcalase碱性蛋白酶 活力2.4AU/g 丹麦Novo Nodisk公司; Neutrase中性蛋白酶 活力0.5AU/g 丹麦Novo Nodisk公司; 1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH) 分析纯、MES 分析纯、α-生育酚(分析纯)、尿酰组氨酸亮氨酸(HHL)(分析纯)、血管紧张素转化酶(ACE)(分析纯)、邻苯二甲醛(OPA)(分析纯) Sigma公司; 氢氧化钠、盐酸等 北京化学试剂公司。

### 1.2 仪器

超滤装置(型号分别为CLS-K-I-A30000、CLS-K-I-A10000、CLS-K-I-A5000) 北京中科膜技术有限公司; 紫外可见分光光度计(Mini 1240) Shimadzu; 凯式定氮仪DDY-2A 北京真空仪表厂; 均质机(DZM-M) IKA-WERKE GMBH & CO. KG; 恒温水浴锅; 精密pH计; 搅拌器; 分析天平等。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 大豆多肽粉末的制备

收稿日期: 2005-07-29

\*通讯作者

作者简介: 邓成萍(1980-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学与工程。



将脱脂豆粕与去离子水以固液比 1:15 混合, 调节 pH7.5, 放入 50℃ 水浴中浸泡 1h; 90℃ 下加热预处理 15min 后, 调节温度和 pH 值至 Alcalase 碱性蛋白酶水解所需, 加酶水解, 15min 后调节温度和 pH 值至 Neutrase 中性蛋白酶水解所需, 加酶继续水解, 酶解过程中不断用 0.5mol/L NaOH 维持酶解所需 pH 不变; 反应结束后, 将酶液加热至 90℃, 保温 10min 使酶失活; 过滤除去滤渣, 将滤液在 10000r/min 下离心 10min, 取上清液依次过截留分子量为 30000、10000、5000Da 的超滤膜, 收集各阶段的大豆多肽液浓缩、冷冻干燥、粉碎得到大豆多肽粉。

### 1.3.2 水解度的测定 pH-stat法<sup>[3]</sup>。

1.3.3 粗蛋白含量的测定 微量凯氏定氮法, 参照 GB5009.5-85。

### 1.3.4 溶解性的测定

称取大豆分离蛋白及各分子量段的大豆多肽粉 0.05g, 以不同 pH 值的缓冲液 (pH3.0~8.0) 配制成 50ml 溶液, 10000r/min 下离心 10min, 取上清液测定氮含量, 并换算成氮溶解指数 NSI (参照 GB5511-85), 绘制出 NSI-pH 曲线, 作为不同分子量段大豆多肽在不同 pH 下的溶解性指标。

### 1.3.5 起泡性及起泡稳定性的测定<sup>[4]</sup>

将大豆分离蛋白及不同分子量段大豆多肽配制成浓度为 5% 的肽液, 各量取 2ml 置于 10ml 量筒中, 上下震荡 1min, 记下此时的初始泡沫体积  $H_0$ , 静置 10min, 记下终止泡沫体积  $H_1$ , 以  $H_0$  作为评价起泡能力大小的指标, 以  $H_1/H_0$  作为评价泡沫体积稳定性大小的指标。

### 1.3.6 乳化性及乳化稳定性的测定

将大豆分离蛋白及不同分子量段大豆多肽分别配制成浓度为 5% 的溶液, 各量取 50ml, 加入 3ml 食用油, 25℃ 下搅拌 1min, 制成乳状液; 在 5000r/min 下离心 5min, 用 0.1% SDS 溶液 (pH7.0) 将上清液稀释 250 倍, 以 SDS 溶液做为空白, 测定 500nm 处吸光度, 以乳化性指数 EAI 表示乳化性<sup>[5]</sup>; 将 EAI 测定中制备的乳状液在 25℃ 静置 30min, 再测定其乳化性指数 EAI', 以乳化性稳定性指数 ESI 表示乳化稳定性<sup>[6]</sup>。

乳化性指数:

$$EAI = \frac{2.303 \times 2 \times A_{500} \times \text{稀释倍数}}{C \times \Phi \times 10000} \quad (\text{cm}^2/\text{mg})$$

式中: C - 肽液中蛋白质质量, mg;

$\Phi$  - 油相体积, 0.0566。

乳化稳定性指数:

$$ESI = EAI \times \Delta t / (EAI - EAI')$$

$\Delta t$  为时间间隔。

### 1.3.7 抗氧化性的测定 DPPH法<sup>[7]</sup>

将不同分子量段大豆多肽配分别制成浓度为 5% 的溶液, 各取 0.3ml 加入 0.3ml 0.2mol/L MES 缓冲液, 0.6ml 乙醇和 1.2ml DPPH 溶液 (400 $\mu$ mol/L DPPH/ 无水乙醇溶液和 0.2mol/L MES 缓冲液 (pH6.0) 等量混合)。混合均匀, 室温下放置 20min 后在 520nm 下测定其吸光值。以  $\alpha$ -生育酚为标准, 自由基 DPPH 的清除能力表示为  $\mu$ g  $\alpha$ -生育酚 / mg 样品。

### 1.3.8 ACE 抑制活性 降血压机能评价法<sup>[8]</sup>。

将不同分子量段大豆多肽配分别制成浓度为 0.05% 的溶液, 分别再稀释 10、20 倍。在 96 孔酶标板中加入用 20 $\mu$ l 5mg/ml 的 HHL (用 1mg/ml pH8.5 的磷酸缓冲液配制) 和 10 $\mu$ l 的样品稀释液, 再加入 20 $\mu$ l 的 0.2U/8ml 的 ACE, 38℃ 保温反应 60min, 再加入 75 $\mu$ l 1.2N 的 NaOH 以及 20 $\mu$ l OPA, 室温反应 20min, 加入 20 $\mu$ l 6mol/L HCl 溶液室温反应 30min。将反应液取出 0.1ml 稀释 50 倍后在 340nm 发射波长、455nm 吸收波长下测定吸光值 A。

实验中做 3 个对照, 其中用等体积的  $H_2O$  代替样品稀释液加入的为阳性对照, 以等体积的  $H_2O$  代替样品稀释液以及 ACE 酶的为阴性对照, 以等体积的  $H_2O$  代替 ACE 酶液的为样品对照。

抑制率 (%) =  $100 \times (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品对照}}) / (A_{\text{阳性对照}} - A_{\text{阴性对照}})$ , 进而算出  $IC_{50}$ 。

$IC_{50}$  值—抑制 AChE 活力 50% 时所需要的样品提取液的浓度, 单位: mg 干基 / ml。 $IC_{50}$  越小, 说明样品对 ACE 的抑制能力越强。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同分子量段大豆多肽的溶解性

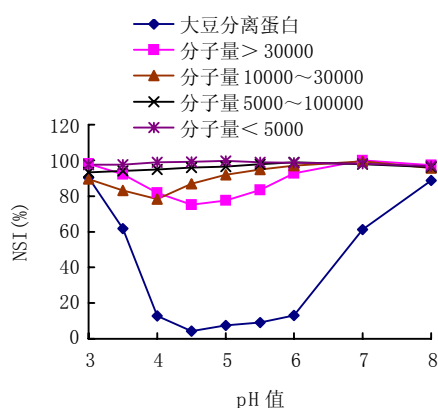


图1 不同 pH 值下不同分子量段大豆多肽的溶解性  
Fig.1 Solubility of different molecular weight segments of soybean peptides in different pH

由图 1 可以看出在不同 pH 值下, 各分子量段的大

豆多肽的溶解性均较大豆分离蛋白好,尤其是在大豆蛋白的等电点附近,大豆多肽仍能保持良好的溶解性。这是因为大豆蛋白经水解后断裂成小分子短链物质,使得 $-NH_2$ 和 $-COOH$ 的数目增多,极性增加,电荷密度增大,分子间相互排斥作用增加,亲水性增强,从而提高了溶解性和酸性溶液中的分散稳定性<sup>[9]</sup>。从图中可知,随着大豆多肽分子量的减小,其溶解性呈增加趋势,在不同pH值下溶解性的稳定性也越好。

## 2.2 不同分子量段大豆多肽的起泡性和起泡稳定性

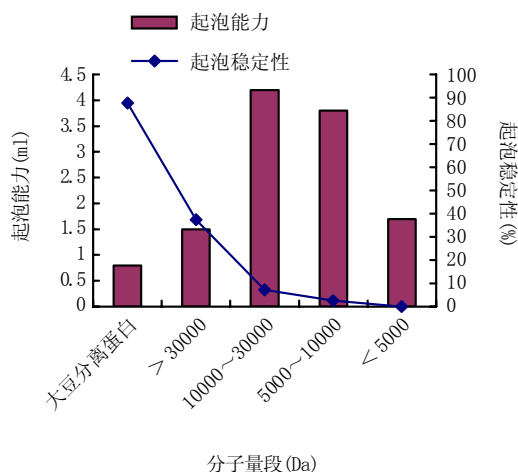


图2 不同分子量段大豆多肽的起泡性和起泡稳定性

Fig.2 Foam property and foam stability of different molecular weight segments of soybean peptides

由图2可以看出大豆多肽较大豆分离蛋白的起泡能力强,而泡沫稳定性却恰恰相反,这是由于大豆蛋白通过酶解使得肽链展开,许多疏水基被充分暴露,从而导致疏水性增强,表面张力减弱,为形成坚韧液膜创造了良好条件,增强了蛋白质溶液的发泡力<sup>[10, 11]</sup>;但由于大豆多肽肽链短,粘度低,导致液膜非常脆弱,无法包裹气泡,使得泡沫稳定性差。

从图中可知不同分子量段间的起泡性及起泡稳定性存在较大差异。对于起泡性来说,随着大豆多肽分子量段的减小,其起泡能力先升高后降低,这是因为大豆肽的起泡能力与其分子大小有密切关系,在一定范围内,分子量越小溶解性越好,使得更多的肽分子参与到液膜的形成中来,使起泡性越强,但当分子量小到超过某一范围时,肽链越来越短,形成的液膜会越来越弱,最终导致起泡性随分子量减小反而降低;对于起泡稳定性来说,是随着大豆多肽分子量段的减小而持续下降的,这是因为大豆多肽的粘性低,且随着分子量的减小越来越低,导致其泡沫稳定性越来越差。

## 2.3 不同分子量段大豆多肽的乳化性和乳化稳定性

由图3可以看出大豆蛋白通过适当的酶解之后乳化

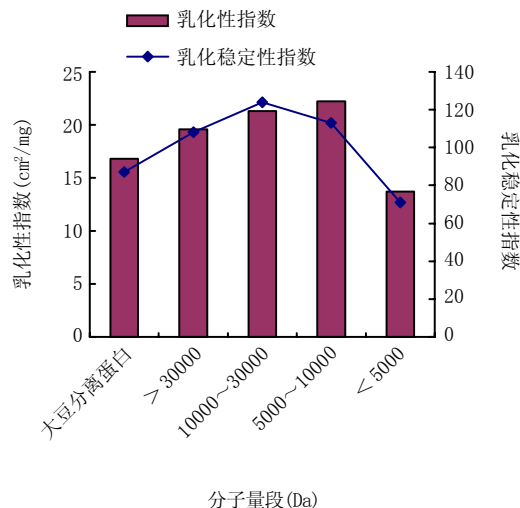


图3 不同分子量段大豆多肽的乳化性和乳化稳定性

Fig.3 Emulsify property and emulsify stability of different molecular weight segments of soybean peptides

性及乳化稳定性均有所提高,这可能是由于酶解暴露了分子内部掩蔽的疏水基团,改善了亲水-疏水平衡,从而提高了乳化能力,蛋白质表面失去亲水肽,导致表面疏水作用增强,有利于表面吸附<sup>[12]</sup>,使其在乳化体系的形成过程中也易于与脂类结合,从而有利于形成稳定的乳化体系。但对于分子量<5000的肽,其乳化性及乳化稳定性比不上大豆分离蛋白,这可能是由于这部分肽的水解度高,疏水基团过渡暴露,打破了形成表面活性层的平衡,并且小肽也无法象蛋白质一样在表面展开,无法减少界面张力,使乳化性能降低。

从图中还可以看出随着大豆多肽分子量段的减小,其乳化性及乳化稳定性呈先增加后下降的趋势,这可能是由于肽的乳化性受分子量分布的影响,中等分子量段的肽有助于界面膜流变学性质的改善,所以乳化性最好。

## 2.4 不同分子量段大豆多肽的抗氧化性

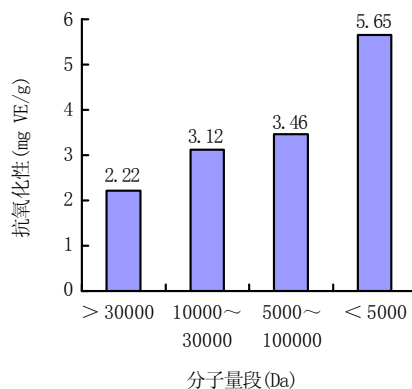


图4 不同分子量段大豆多肽的抗氧化性

Fig.4 Antioxidative activity of different molecular weight segments of soybean peptides

由图4可以看出大豆多肽具有很强的DPPH自由基清除能力,表明大豆多肽具有强抗氧化性。不同分子量段大豆多肽之间的抗氧化性存在一定差异,随着分子量段的减小,其抗氧化性明显增高,说明大多数具有抗氧化性的功能性肽主要集中在分子量小于5000Da的小肽中。

### 2.5 不同分子量段大豆多肽的ACE抑制活性

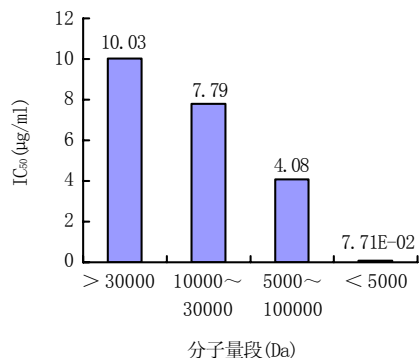


图5 不同分子量段大豆多肽的ACE抑制活性

Fig.5 ACE inhibitory activity of different weigh segments of soybean peptides

由图5可以看出大豆多肽具有很强的ACE抑制活性,表明大豆多肽具有很好降血压作用。其原因是:血管紧张转化酶(ACE)在人体血压调节过程中是至关重要的,血浆中的血管紧张素原被肾素水解成血管紧张素I,在ACE酶作用下,继续水解产生血管紧张素II,血管紧张素II致使血管强烈收缩,血压上升;大豆蛋白经特殊的酶水解后得到的大豆多肽可以抑制阻碍ACE酶催化水解血管紧张素I成为血管紧张素II,从而防止血管强烈收缩,降低血压<sup>[2]</sup>。由图可见不同分子量段大豆多肽之间的ACE抑制活性存在差异,随着分子量段的减小,其ACE抑制活性明显增高,说明大多数具有强ACE抑制活性的降压肽仍然主要集中在分子量小于5000Da的小肽中。

### 3 结论

本文研究了分子量>30000、10000~30000、5000~10000及<5000Da四个分子量段大豆多肽的溶解性、起泡性及起泡稳定性、乳化性及乳化稳定性、抗氧化性和ACE抑制活性。

研究结果表明,酶解使得大豆蛋白溶解性、起泡性及起泡稳定性、乳化性及乳化稳定性大大改变。大豆多肽具有良好的溶解性,即使是在蛋白质的等电点附近,也能较好的溶解;随着分子量的减小,其溶解性呈增加趋势,在不同pH值下溶解性的稳定性也越好。大豆多肽较大豆分离蛋白的起泡能力强,而泡沫稳定性却不如大豆分离蛋白;随着分子量段的减小,其起泡能力先升高后降低,起泡稳定性持续下降。分子量>5000Da的大豆多肽的乳化性及乳化稳定性均较大豆蛋白有所提高,而分子量<5000Da的大豆多肽的乳化性及乳化稳定性则不如大豆蛋白;随着大豆多肽分子量段的减小,其乳化性及乳化稳定性呈先增加后下降的趋势。

大豆多肽具有很强的DPPH自由基清除能力和ACE抑制活性,表明大豆多肽具有强抗氧化性和很好的降血压作用;随着分子量段的减小,大豆多肽的DPPH自由基清除能力和ACE抑制活性明显增高,说明大多数强抗氧化肽和降压肽主要集中在分子量小于5000Da的小肽中。

### 参考文献:

- [1] 刘传富,董海洲,刘晓婷.大豆多肽及其在食品工业中应用[J].粮食与油脂,2002,10:31-32.
- [2] 宋俊梅,曲静然,徐少萍,等.大豆肽的研究进展[J].山东轻工业学院学报,2002,16(3):1-3,53.
- [3] NOVO Industries. Use of food grade Alcalase or Neutrase for controlled enzymatic hydrolysis of protein. Information on tecnica, NOVO Industries, 1989.
- [4] 张维农,刘大川,胡小泓.花生蛋白产品功能特性的研究[J].中国油脂,2002,27(5):60-65.
- [5] 刘琳.酶法有限水解对大豆分离蛋白乳化性能的影响[J].中国粮油学报,2000,15(1):26-29.
- [6] 葛毅强,郑如力,蔡同一.脱脂麦胚蛋白功能特性的研究[J].中国油脂,2000,25(4):53-56.
- [7] K Shinohara, T Suzuki, S Kaminogaw. In "The methods of food functions analysis" [J]. Korin, Japan, 2000. 218-220.
- [8] Horie H. Handbook of functional evaluation on food [M]. Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. Agriculture, Forestry and Fishery Research Council. National Food Research Institute, Japan, 1999. 117-121.
- [9] 郭清泉,张兰威.食品中活性肽的研究[J].食品与机械,1999,74(6):12-14.
- [10] Akio Kato. Change in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation [J]. Agric Biol Chem, 1983, 47(1): 33.
- [11] Kinsella JE. Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams [J]. Food Chemistry, 1981, (7): 273-288.
- [12] 周瑞宝,周兵.蛋白质的生物和化学改性[J].中国油脂,2000,25(6):181-185.

ÑŒŒ»ÓëÑĐ³⁄₄ĲÉÚ¹⁄₂İÓýÖĐİÄÖØÒªÆÚĲ