

# 酶解时间对大豆分离蛋白结构及功能性质的影响

姚玉雪<sup>1</sup>, 谢莹<sup>1</sup>, 闫世长<sup>1</sup>, 关尧<sup>1</sup>, 马鸿飞<sup>1</sup>, 陈昊<sup>2</sup>, 孙树坤<sup>\*2</sup>

(1. 东北农业大学 食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省绿色食品科学研究院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 为探究不同酶解时间下大豆分离蛋白酶解产物 (soybean protein isolate enzymatic hydrolysate, SPIH) 结构与功能特性之间的构效关系, 通过测定不同酶解时间下的蛋白质水解度及多肽质量分数评估大豆分离蛋白 (SPI) 的水解情况; 通过傅里叶变换红外光谱、内源荧光光谱检测和表面疏水性、乳化性及抗氧化能力测定, 分析其结构与功能之间的关系。结果表明: SPI 的水解度随酶解时间的延长不断增加, 多肽质量分数随酶解时间的延长呈先增大后减小的趋势; 其次, 随着酶解时间的增加, 蛋白质发生解折叠, 酶解 2 h 时蛋白质结构逐渐舒展, 最大吸收波长发生红移且荧光强度增强; 此外, 酶解使 SPI 二级结构发生了改变, 酶解 2 h 时  $\beta$ -折叠面积分数最高。SPIH 的表面疏水性、乳化性、抗氧化能力、 $\zeta$ -电位及其乳液的粒径均在酶解 2 h 时呈现最佳状态。该研究为明确 SPI 在不同酶解时间下的结构与功能特性变化规律提供依据, 拓宽其在食品行业的应用范围。

**关键词:** 大豆分离蛋白; 酶解; 结构表征; 功能性质; 乳化性

中图分类号: TS 201.2 文章编号: 1673-1689(2024)06-0135-09 DOI: 10.12441/spyswjs.20230610001

## Effect of Enzymatic Hydrolysis Duration on Structure and Functional Properties of Soybean Protein Isolate

YAO Yuxue<sup>1</sup>, XIE Xuan<sup>1</sup>, YAN Shizhang<sup>1</sup>, GUAN Yao<sup>1</sup>, MA Hongfei<sup>1</sup>, CHEN Hao<sup>2</sup>, SUN Shukun<sup>\*2</sup>

(1. College of Food Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China; 2. Heilongjiang Green Food Science Research Institute, Harbin 150030, China)

**Abstract:** In order to investigate the structure-function relationship of soybean protein isolate enzymatic hydrolysate (SPIH) under different enzymatic hydrolysis time, the hydrolysis of soybean protein isolate (SPI) was evaluated by measuring the degree of hydrolysis and the mass fraction of polypeptide. The relationship between structure and function was characterized by Fourier transform infrared spectroscopy, endogenous fluorescence spectroscopy, surface hydrophobicity, emulsification, and antioxidant capacity. The results showed that the hydrolysis degree of SPI increased with the prolonged enzymatic hydrolysis duration, while the mass fraction of polypeptide initially increased and then decreased over the duration of enzymatic hydrolysis. Moreover, as the enzymatic hydrolysis time increased, protein unfolding occurred. The protein structure gradually unfolded after enzymatic hydrolysis at 2 h, leading to a red shift in maximum absorption wavelength and enhanced fluorescence

收稿日期: 2023-06-10 修回日期: 2023-12-20

基金项目: 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项项目(2020ZX08B01-3); 黑龙江省自然科学基金项目(LH2022C085); 黑龙江省省属科研院所科研业务费项目(CZKYF2021-2-B020)。

\* 通信作者: 孙树坤(1971—), 男, 博士, 正高级工程师, 硕士研究生导师, 主要从事食品科学与工程研究。E-mail: sunshukun@163.com

intensity. In addition, the secondary structure of SPI was changed by enzymatic hydrolysis, with the  $\beta$ -fold area fraction reaching its peak at 2 h. The surface hydrophobicity, emulsification, antioxidant capacity,  $\zeta$ -potential and the particle size of the SPIH emulsion were all optimized at 2 h of enzymatic hydrolysis. This study provides the theoretical basis for understanding the changes in structural and functional properties of SPI under different enzymatic hydrolysis durations, thereby expanding its applications in the food industry.

**Keywords:** soybean protein isolate, enzymatic hydrolysis, structural characterization, functional properties, emulsification

大豆蛋白是一种优质植物蛋白质,包含所有人体必需氨基酸,有利于维持良好的氨基酸平衡<sup>[1]</sup>。大豆蛋白还表现出优异的乳化性、保水性和凝胶性,由于其优良的营养价值和功能活性,被认为是蛋清蛋白和牛奶蛋白的替代品<sup>[2]</sup>。大豆蛋白作为一种高分子表面活性剂,可以稳定食品中的水包油乳液体系,如用于制作香肠、冰淇淋、酸奶和咖啡增白剂等<sup>[3]</sup>。然而,作为大豆加工产品的大豆分离蛋白,其溶解性相对较低,蛋白质消化率低于乳制品、蛋制品等,限制了其在食品中的应用<sup>[4-5]</sup>。因此需要对 SPI 进行改性,以获得更好的功能及营养特性,使其成为良好的乳化剂原料。

目前 SPI 的改性方法主要有物理改性、化学改性和酶法改性等。物理改性包括热处理、超声处理、高压处理等,可使蛋白质分子结构发生改变,改善 SPI 的功能特性,但改性效果不显著<sup>[6]</sup>。化学改性对 SPI 改性效果显著、反应简单,但产品具有安全隐患,反应过程中会产生有毒化学物质,且成本较高,在食品行业中不提倡使用这种改性方式<sup>[7]</sup>。而酶法改性不仅能改变蛋白质的功能特性,还能降解蛋白质,使其营养价值保持良好水平。酶解产生的大豆肽具有与 SPI 几乎相同的必需氨基酸,具有多种功能活性,如抗菌、降压、免疫调节和抗氧化等,并且大豆肽相对分子质量较小,吸收率及生物利用度较高<sup>[8]</sup>。例如,Rostammiry 等利用碱性蛋白酶和胰蛋白酶水解 SPI 得到大豆肽溶液,通过优化 pH、温度、底物浓度和酶浓度等工艺条件,获得了高水解度(20.471%)的 SPIH<sup>[9]</sup>。Galves 等评估酶解对马铃薯蛋白质乳化性能的影响,结果表明适度酶解提高了马铃薯蛋白质水解物的乳化能力<sup>[10]</sup>。目前对酶解 SPI 的研究主要集中在酶解工艺的优化上,有关酶解条件对 SPI 结构和功能性质的影响及其乳液的乳化性能研究较少。

作者在不同酶解时间下获得 SPIH,利用内源荧光光谱、傅里叶变换红外光谱表征其结构变化,通过测定水解度、多肽质量分数、表面疏水性、乳化性、抗氧化性、乳液粒径分布及  $\zeta$ -电位等指标,探究酶解时间对 SPI 结构及功能性质的影响。研究结果为明确不同酶解时间下 SPIH 的构效关系提供参考,有利于提高 SPI 的利用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大豆:东北农业大学大豆研究所;碱性蛋白酶:北京索莱宝科技有限公司;L-丝氨酸:上海麦克林生化科技有限公司;邻苯二甲醛(OPA)、双缩脲试剂、酪蛋白磷酸肽(CPP)、二硫代苏糖醇(DTT):上海源叶生物科技有限公司;1-苯胺基-8-萘磺酸盐(ANS):美国 Sigma 公司;十二烷基硫酸钠(SDS):北京博奥拓达科技有限公司。

### 1.2 仪器

AL204 型分析天平:梅特勒托利多仪器(上海)有限公司;电热恒温水浴锅:天津天泰仪器有限公司;FJ200 SH 型数显高速分散均质机:上海标本模型厂;GL-21 M 高速冷冻离心机:湖南湘仪离心机仪器有限公司;PHSJ-4A 型实验室 pH 计:中国上海雷磁公司;RF 6000 型荧光分光光度计:日本 Hitachi 公司;UV-1100 紫外-可见分光光度计:日本岛津公司;Mastersizer 2000 激光粒度仪、Zetasizer Nano ZS  $\zeta$ -电位分析仪:英国马尔文公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 SPI 的提取** 将新鲜大豆粉碎得到大豆粉,分别对一次冷榨、二次冷榨后形成的豆饼进行粉碎,得到一次冷榨豆粉和二次冷榨豆粉。参照姜永鹏的方法<sup>[11]</sup>并稍加修改。准确称取脱脂豆粉 50 g,以料液比 1 g:20 mL 溶于去离子水中,搅拌均匀使其

成为匀浆,调节 pH 至 8.5,放入水浴恒温振荡器中振荡 50 min 后取出,4 000 r/min 离心 15 min,保留上清液并将 pH 调至 4.5,静置 30 min,再以 4 000 r/min 离心 15 min,保留沉淀并将其 pH 调至 7.0,将获得的蛋白质冷冻干燥,得到 SPI 粉末。

**1.3.2 SPI 的酶解** 参照文献[12]的方法并稍加修改。将 SPI 以料液比 1 g:9 mL 分散在去离子水中形成悬浮液,搅拌使其充分溶解。将溶液置于 85 °C 水浴锅中水浴 15 min,达到反应温度后将 pH 调为 9,冷却至 50 °C 保温。向 SPI 溶液中加入质量分数为 2% 的碱性蛋白酶,在 50 °C 水浴锅中分别反应 0、1、2、3 h,水解过程中 pH 稳定为 9,取出后在沸水浴中加热 15 min 进行灭酶。冷却至 40 °C,以 4 000 r/min 离心 15 min。将上清液保存于 -20 °C 备用,储存 24 h 后取部分样品冷冻干燥,得到 SPI 酶解后的多肽粉末。

**1.3.3 水解度的测定** 参考文献[13]的方法并稍加修改,采取 OPA 法测定蛋白质水解度。以 L-丝氨酸 (0.1 mg/mL) 作为标准品,去离子水作为空白对照。称取 80 mg OPA 溶于 4 mL 体积分数为 95% 的乙醇,充分混合后加入 88 mg DTT,定容至 100 mL。分别取 800 μL 待测样品加入盛有 6 mL OPA 溶液的试管中,混合 5 s,室温下避光反应 2 min。用紫外分光光度计在 340 nm 处测定吸光度。按公式(1)~(3)计算水解度:

$$S = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times \frac{0.9516 \times V \times 100}{m_1 \times w_p} \quad (1)$$

式中: $S$  为丝氨酸氨基当量,mmol/L; $A_1$  为样品的吸光度; $A_2$  为标准品的吸光度; $A_0$  为空白对照的吸光度; $V$  为样品体积,L; $m_1$  为样品质量,g; $w_p$  为样品中蛋白质质量分数,%。

$$h = \frac{S - \beta}{\alpha} \quad (2)$$

式中: $h$  为水解键的数量,个; $S$  为丝氨酸氨基当量,mmol/L; $\alpha$  为 0.970; $\beta$  为 0.342。

$$S_{DH} = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\% \quad (3)$$

式中: $S_{DH}$  为水解度,%; $h$  为水解键的数量,个; $h_{tot}$  为 7.8。

**1.3.4 多肽质量分数的测定** 多肽的测定采取双缩脲法,参考马诗文的方法<sup>[14]</sup>并稍加修改。以 10 mg/mL CPP 为标准溶液,绘制标准曲线。得到标准曲线回归方程: $y = 0.0157\rho + 0.0384$ , $R^2 = 0.994$ ,式中  $y$  为吸光度; $\rho$  为 CPP 质量浓度,mg/mL。

取 1 mL 水解液于 10 mL 容量瓶中,加入 1 mL

双缩脲试剂 A 和 0.2 mL 双缩脲试剂 B,加去离子水定容至 10 mL 后摇匀静置 5 min,用紫外分光光度计于 540 nm 处测定吸光度。根据标准曲线计算稀释 10 倍后样品的质量浓度  $\rho_1$ ,按公式(4)~(5)计算多肽质量分数:

$$m = \rho_1 \times 10 \times V \quad (4)$$

式中: $m$  为样品中多肽质量,g; $\rho_1$  为稀释 10 倍后样品的质量浓度,g/L; $V$  为样品体积,mL。

$$w = \frac{m}{m_1} \times 100\% \quad (5)$$

式中: $w$  为多肽质量分数,%; $m$  为样品中多肽质量,g; $m_1$  为样品质量,g。

**1.3.5 傅里叶变换红外光谱分析** 称取冻干的样品与溴化钾粉末以质量比 1:100 进行研磨、混匀、压片。利用 Peakfit4.12 软件拟合  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲的特征峰,分析各结构面积分数。

**1.3.6 内源荧光光谱分析** 将冻干肽粉以 0.1 mg/mL 重新溶于去离子水中,使其充分溶解。采用荧光分光光度计测定样品的内源荧光光谱。激发波长为 290 nm,扫描波长范围为 300~500 nm,狭缝宽度为 5 nm。

**1.3.7 表面疏水性测定** 根据 Yuan 等的方法<sup>[15]</sup>并稍加修改,使用 ANS 荧光探针法测定表面疏水性。用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 连续稀释样品溶液,使蛋白质质量浓度为 0.02~0.10 mg/mL,用同样的缓冲液配制 8.0 mmol/L 的 ANS 溶液。向 4 mL 样品溶液中添加 20 μL ANS 溶液,混匀后避光静置 15 min,摇匀后迅速测定荧光强度。激发波长、发射波长分别设置为 390、470 nm,激发和发射狭缝宽度均为 5 nm。荧光强度与蛋白质质量浓度关系图的初始斜率(通过线性回归分析计算)用于表征蛋白质表面疏水性。

**1.3.8 乳化性的测定** 根据 Liang 等的方法<sup>[2]</sup>并稍加修改,采用浊度法测定乳化活性与乳化稳定性。制备 10 mg/mL 的 SPI 水解液作为水相,大豆油作为油相,油水体积比为 1:9,用高速剪切均质机在 10 000 r/min 下处理 2 min,连续处理 2 次。从上述制好的乳液底部用移液枪吸取 50 μL,加入 5 mL 提前制好的质量分数为 0.1% 的 SDS 溶液,在 500 nm 处测定吸光度,根据公式(6)计算乳化活性指数(EAI)。将均质后的乳液静置 10 min,以相同的方法测定样品的吸光度,根据公式(7)计算乳化稳定性指数(ESI)。

$$R_{\text{EAI}} = 2 \times 2.303 \times \frac{N \times A}{\rho_0 \times \Phi \times 10\,000} \quad (6)$$

式中： $R_{\text{EAI}}$ 为乳化活性指数， $\text{m}^2/\text{g}$ ； $A$ 为0 min的乳液吸光度； $N$ 为稀释因子(100)； $\rho_0$ 为样品溶液中的蛋白质质量浓度， $\text{g}/\text{mL}$ ； $\Phi$ 为用于形成乳液的油相体积分分数(10%)。

$$R_{\text{ESI}} = \frac{A \times 10}{A - A_{10}} \quad (7)$$

式中： $R_{\text{ESI}}$ 为乳化稳定性指数； $A$ 为0 min的乳液吸光度； $A_{10}$ 为静置10 min的乳液吸光度。

**1.3.9 乳液的平均粒径和 $\zeta$ -电位测定** 利用Zetasizer Nano ZS  $\zeta$ -电位分析仪测定制备乳液的平均粒径和 $\zeta$ -电位。测量前将新鲜乳液稀释100倍，设置测定温度为25℃，平衡时间为2 min，每个样品测定3次。

**1.3.10 抗氧化性的测定** 通过DPPH自由基清除率来表征SPIH的抗氧化性。取4 mL的1 mg/mL样品或缓冲溶液(对照)，加入4 mL的0.01 mmol/L DPPH溶液，混合均匀，将混合物在25℃的黑暗环境中放置30 min。用紫外分光光度计在517 nm处测定吸光度，根据公式(8)计算DPPH自由基清除率：

$$S_{\text{DPPH}} = \frac{A_s - A_c}{A_b} \times 100\% \quad (8)$$

式中： $S_{\text{DPPH}}$ 为DPPH自由基清除率，%； $A_s$ 为SPIH样品(即样品溶液与DPPH溶液混合)的吸光度； $A_c$ 为对照样品(即样品溶液与乙醇溶液混合)的吸光度； $A_b$ 为空白样品(即乙醇溶液与DPPH溶液混合)的吸光度。

## 1.4 数据统计与分析

所有试验进行3次，结果表示为平均值 $\pm$ 标准差。采用SPSS 26.0软件和Origin 2022软件进行数据处理，采用ANOVA对数据进行差异显著性分析( $P < 0.05$ )。

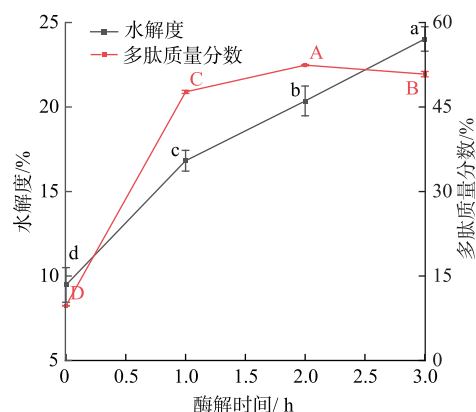
## 2 结果与分析

### 2.1 酶解时间对SPI水解度及多肽质量分数的影响

水解度可以表征蛋白质的水解速率，并测算蛋白质中肽键断裂的量。不同酶解时间下SPI的水解度及多肽质量分数见图1。加入碱性蛋白酶后发生轻微水解，之后蛋白质的水解度随时间延长而逐渐增大。酶解3 h达到24.03%，表明在有限水解时间内大量肽键被破坏<sup>[16]</sup>。吴琼等研究了碱性蛋白酶水解SPI，发现随酶解时间延长，水解度逐渐上升<sup>[17]</sup>。说明在一定的酶解时间内，酶作用于蛋白质，使其断

裂成大小不一的多肽分子，蛋白质中可被酶解的肽键逐渐增多，水解度随时间增加而变大。

随着酶解时间的延长，多肽质量分数呈现先增大后减小的趋势。在酶解2 h时多肽质量分数最大，达到52.43%，酶解3 h时多肽质量分数较2 h降低，原因可能是酶解时间的延长导致底物减少，同时产物浓度的增加对蛋白质水解产生抑制作用，因此多肽的产生速率下降<sup>[18]</sup>。长时间的水解会影响蛋白质的动态缔合和解离，导致先前通过水解暴露的官能团重新隐藏在蛋白质结构的内部<sup>[19]</sup>。郝晓华等研究了碱性蛋白酶酶解藜麦芽制备多肽的工艺，结果显示多肽质量分数随着时间增加呈现先上升后降低的趋势<sup>[20]</sup>，与本研究结果一致。



不同大小写字母表示同一指标下不同样品间差异显著( $P < 0.05$ )。

图1 酶解时间对SPI水解度及多肽质量分数的影响

Fig. 1 Influence of enzymatic hydrolysis time on the hydrolysis degree of SPI and the mass fraction of peptide

### 2.2 酶解时间对SPIH结构特性的影响

**2.2.1 傅里叶变换红外光谱分析** 傅里叶变换红外光谱是测定蛋白质二级结构的一种手段，能够检测酶诱导的蛋白质结构变化及蛋白质水解产物随时间的变化。蛋白质酰胺I带( $1\,700 \sim 1\,600 \text{ cm}^{-1}$ )和酰胺II带( $1\,600 \sim 1\,500 \text{ cm}^{-1}$ )的迁移与蛋白质二级结构紧密相关，这些红外光谱范围对应蛋白质的二级结构以及蛋白质的动态构象<sup>[21]</sup>。不同酶解时间下样品的傅里叶变换红外光谱见图2。4种酶解时间下主要峰带的波数不变，表明其基本结构未发生变化。但随着酶解时间增加，不同样品在蛋白质酰胺I带( $1\,700 \sim 1\,600 \text{ cm}^{-1}$ )和酰胺A带( $3\,700 \sim 3\,200 \text{ cm}^{-1}$ )的吸收峰强度变大，吸收峰分别从 $1\,532.17 \text{ cm}^{-1}$ 红移至 $1\,548.56 \text{ cm}^{-1}$ ，从 $3\,270.68 \text{ cm}^{-1}$ 蓝移至 $3\,268.27 \text{ cm}^{-1}$ ，

说明酶解时间对 SPIH 的结构产生了影响。

为观察蛋白质二级结构随酶解时间的变化,在酰胺 I 带进行去卷积,并计算  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规卷曲的面积分数<sup>[22]</sup>。不同酶解时间下蛋白质的二级结构变化见表 1。随酶解时间的增加, $\alpha$ -螺旋呈先减少后增加的趋势,酶解 2 h 时  $\alpha$ -螺旋面积分数最低,为 23.15%。 $\alpha$ -螺旋面积分数的降低使蛋白质分子内埋藏的疏水性位点的暴露程度增大,SPIH 表现出更强的表面疏水性<sup>[23]</sup>。而  $\beta$ -折叠、无规则卷曲呈现先上升后下降的趋势,酶解 2 h 时  $\beta$ -折叠、无规则卷曲的面积分数最高,分别为 19.54%、27.45%。随着酶解时间的延长,SPI 逐渐被酶解为更多的肽,促进了  $\alpha$ -螺旋向无规则卷曲的转变,无规则卷曲面积分数的增加也可能与疏水性氨基酸的暴露有关<sup>[24]</sup>。 $\beta$ -折叠面积分数提高表示氢键数目增

多,无规则卷曲和  $\beta$ -折叠的升高也与蛋白质结构的展开程度相关,说明适当的酶解时间会使蛋白质结构伸展<sup>[25]</sup>。

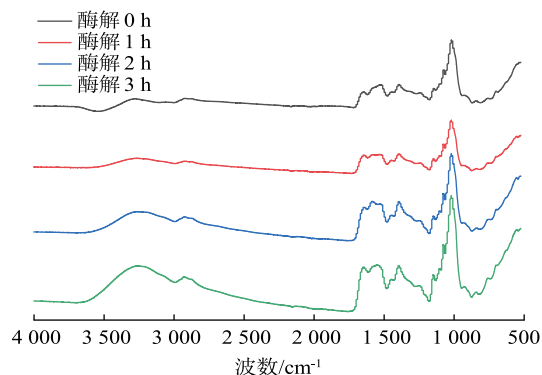


图 2 SPIH 的傅里叶变换红外光谱

Fig. 2 Fourier transform infrared spectrum of SPIH

表 1 不同酶解时间下蛋白质二级结构的变化

Table 1 Secondary structure changes of protein under different enzymatic hydrolysis time

酶解时间/h	面积分数/%			
	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规则卷曲
0	28.38±0.19 <sup>a</sup>	13.60±0.14 <sup>c</sup>	32.34±0.03 <sup>d</sup>	18.30±0.02 <sup>d</sup>
1	26.06±0.12 <sup>b</sup>	14.45±0.38 <sup>b</sup>	34.55±0.25 <sup>c</sup>	24.87±0.10 <sup>b</sup>
2	23.15±0.03 <sup>c</sup>	19.54±0.02 <sup>a</sup>	40.43±0.15 <sup>a</sup>	27.45±0.37 <sup>a</sup>
3	25.89±0.02 <sup>b</sup>	13.68±0.11 <sup>c</sup>	38.79±0.18 <sup>b</sup>	21.58±0.06 <sup>c</sup>

注:同列不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

**2.2.2 SPIH 的内源荧光光谱分析** 蛋白质的内源荧光来自分子内带芳香基团的氨基酸残基,可用于分析蛋白质的结构,内源荧光的变化可以直接反映不同酶解时间下蛋白质三级结构的变化。由图 3 可知,随着酶解时间的增加,SPIH 的荧光强度呈现先上升后下降的趋势。酶解时间增加到 2 h,最大吸收波长发生红移并且荧光强度增强,表明 SPI 经碱性蛋白酶酶解后,其蛋白质结构伸展,蛋白质中的发色基团暴露在溶液中,导致荧光增强<sup>[26]</sup>。酶解时间为 3 h 时,荧光强度下降,这可能是过度酶解导致肽表面和肽内部的一些疏水性氨基酸被重新隐藏。

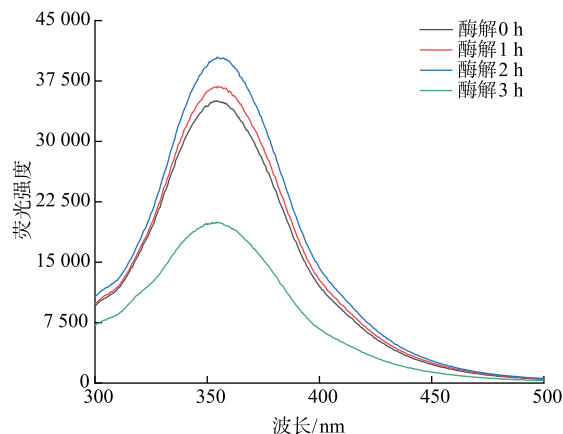


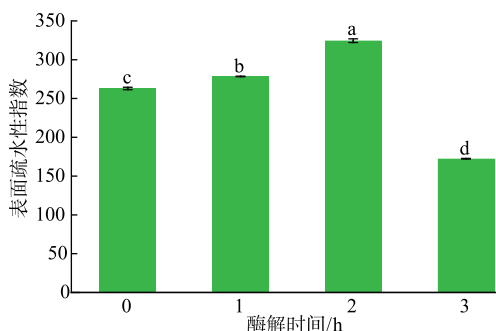
图 3 SPIH 的内源荧光光谱

Fig. 3 Endogenous fluorescence spectra of SPIH

**2.2.3 酶解时间对 SPIH 表面疏水性的影响** 表面疏水性指数可以直观表示蛋白质表面暴露的疏水基团的数量,不仅反映蛋白质的构象,还与蛋白质的一些功能特性(如溶解性、乳化性)密切相关<sup>[27]</sup>。不同酶解时间下 SPIH 的表面疏水性指数见图 4。SPIH 的表面疏水性指数随时间延长呈先增加后降低的趋势,随着酶解时间增加到 2 h,酶解产物的表

面疏水性增加,这可能是由于部分水解导致蛋白质结构展开,蛋白质内部的疏水基团暴露<sup>[28]</sup>。延长酶解时间至 3 h,SPIH 表面疏水性指数降低,这可能是由于多肽在疏水作用下发生聚集,重新折叠,疏水基团被埋入蛋白质内部,所以表面疏水性降低<sup>[29]</sup>。此趋

势与郭荣佳研究碱性蛋白酶酶解修饰后的 SPI 时, 其表面疏水性的变化趋势类似<sup>[30]</sup>。



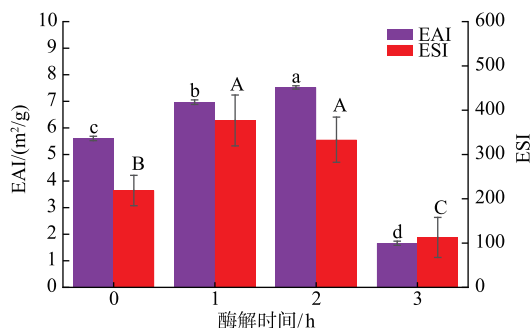
不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 4 SPIH 的表面疏水性指数

Fig. 4 Surface hydrophobicity index of SPIH

### 2.3 EAI 及 ESI 分析结果

乳化性是大豆蛋白重要的表面性质, 反映其形成乳液的能力。EAI 可反映蛋白质形成油水界面的能力。ESI 可反映乳液液滴抵抗应变的能力。不同酶解时间下 SPIH 的乳化性见图 5。SPIH 的乳化性随酶解时间的增加呈现先上升后下降的趋势, 该结果与江玉琴研究木瓜蛋白酶酶解大豆蛋白的结果类似, 即大豆蛋白产物的乳化性随酶解时间延长先上升后下降<sup>[31]</sup>。表明在适当酶解时间范围内, 酶解会提高 SPIH 的乳化性, 过度酶解则导致其乳化性降低<sup>[26]</sup>。EAI 和 ESI 在酶解 2 h 内逐渐升高, 可能是由于蛋白质水解导致肽链伸展, 增加了疏水性和亲水性基团的暴露, 它们吸附在油滴表面形成保护膜, 从而使多肽表现出更好的乳化性<sup>[32]</sup>。而酶解 2 h 后乳化性下降, 可能是由于蛋白质酶解过度, 改变了两亲分子的空间结构, 多肽在界面处相互作用的能力降低, 对乳化性产生负面影响<sup>[33]</sup>。



不同大小写字母表示同一指标下不同组间差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图 5 SPIH 的乳化性

Fig. 5 Emulsification of SPIH

### 2.4 SPIH 乳液的平均粒径、粒径分布及 $\zeta$ -电位

乳液的粒径大小及分布显示了乳液体系的分布状态, 直径越小的乳滴形成的乳液稳定性越好<sup>[34]</sup>。此外, SPIH 乳液的表面电荷对稳定乳液起到非常重要的作用, 常用  $\zeta$ -电位表示<sup>[35]</sup>。SPIH 乳液的平均粒径、粒径分布及  $\zeta$ -电位见图 6。从图 6(a)可知, 随着酶解时间的增加, SPIH 乳液的平均粒径呈先减小后增大的趋势。酶解 2 h 内 SPIH 乳液的平均粒径逐渐减小, 可能是逐渐增强的水解使 SPI 裂解成小分子多肽, 这些小分子多肽能够快速附着到油水界面形成液滴, 表现出更佳的乳化性<sup>[30]</sup>。酶解时间增加到 3 h, SPIH 乳液的平均粒径增大, 可能是由于过度酶解过程中产生的肽发生了强烈聚集, 水解后的小分子多肽迅速吸附到油水界面, 形成聚集的大液滴<sup>[35]</sup>。此外, 从图 6(b)可以看出, 酶解 2 h 的峰相对较窄, 酶解 0 h 和 1 h 的峰相对较宽。由此可以推断, 酶解 2 h 的 SPIH 乳液具有更好的稳定性。

由图 6(c)可知, 酶解 2 h 内  $\zeta$ -电位的绝对值呈上升趋势, 负电荷的增加可能是由于酶水解后蛋白质分子结构展开, 分子内的疏水基团暴露到分子表面,  $\zeta$ -电位绝对值增大, 乳液稳定性增加<sup>[36]</sup>。继续酶解到 3 h,  $\zeta$ -电位的绝对值下降, 这是因为过度酶解破坏了蛋白质结构, 产生的小分子多肽发生聚集, 同时这些小分子多肽的分子结构不具备稳定吸附的条件, 乳液开始絮凝<sup>[37]</sup>。

### 2.5 抗氧化能力测定结果

DPPH 自由基清除能力可反映样品的抗氧化能力。由于存在抗氧化肽, 许多蛋白质酶解产物可以通过清除自由基来延缓或抑制氧化过程<sup>[38]</sup>。不同酶解时间下 SPIH 的 DPPH 自由基清除率见图 7。随着酶解时间的增加, SPIH 的 DPPH 自由基清除率呈先上升后下降的趋势, Zheng 等研究水解时间对 protamex 蛋白酶水解玉米谷蛋白理化及功能特性的影响时也发现了类似结果, 即适当酶解可以增强 SPIH 的抗氧化能力<sup>[39]</sup>。酶解 2 h 时, DPPH 自由基清除率达到最高 (76.51%), 可能是由于随着酶解时间的增加, 水解度提高, 抗氧化肽含量增加, 所以整体抗氧化性增强。但酶解 2 h 后 DPPH 自由基清除率降低, 可能是由于酶解时间过长, SPIH 中小部分耐热性不佳的抗氧化物质被消耗, 最终导致 SPIH 的抗氧化性降低<sup>[40]</sup>。

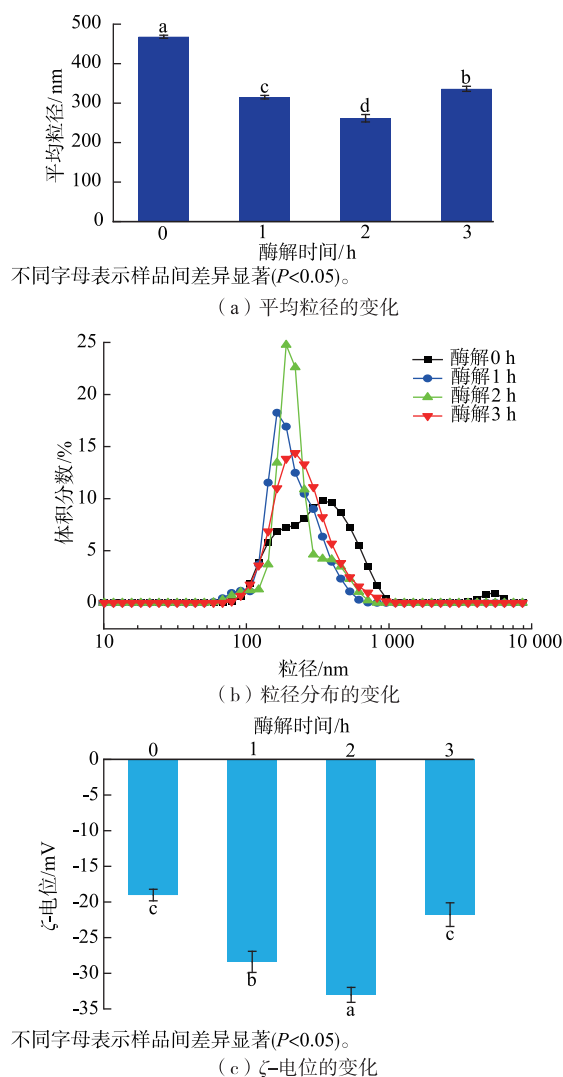
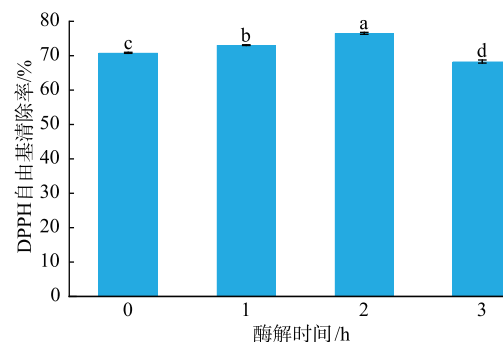


图6 SPIH乳液的平均粒径、粒径分布及 $\zeta$ -电位

Fig. 6 Average particle size, particle size distribution, and  $\zeta$ -potential of SPIH emulsion



不同字母表示样品间差异显著( $P<0.05$ )。

图7 SPIH的DPPH自由基清除率

Fig. 7 DPPH radical scavenging rate of SPIH

### 3 结语

在碱性蛋白酶作用下,探究了不同酶解时间(0、1、2、3 h)对SPI结构及性质的影响。结果表明,随着酶解时间增加,SPI的水解度呈上升趋势,多肽质量分数呈先增加后下降的趋势。适当酶解使SPI的分子结构展开,随着酶解时间的增加, $\beta$ -折叠、无规则卷曲呈先上升后下降的趋势,而 $\alpha$ -螺旋呈先下降后上升的趋势。SPIH的荧光强度呈先上升后下降的趋势。SPIH表面疏水性、乳化性及抗氧化性随着酶解时间的延长呈先增强后降低的趋势,均在酶解2 h时达到最高。不同酶解时间下SPIH所制乳液的平均粒径、粒径分布及 $\zeta$ -电位结果表明,酶解2 h时乳液最稳定。该研究结果表明,适当酶解时间有助于改善SPI的结构与功能性质,同时为SPI在不同酶解时间下的结构与功能性质研究及大豆蛋白产品的进一步应用提供参考。

### 参考文献:

- [1] 刘新旗,夏绍琪,张弛.大豆蛋白与大豆肽的生物活性及加工特性研究进展[J].食品科学技术学报,2020,38(3):1-10.  
LIU X Q, XIA S Q, ZHANG C. Research progress on biological activity and processing characteristics of soybean protein and peptides[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 38(3): 1-10. (in Chinese)
- [2] LIANG G J, CHEN W P, QIE X J, et al. Modification of soy protein isolates using combined pre-heat treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improving foaming properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 105: 105764.
- [3] DENG L. Current progress in the utilization of soy-based emulsifiers in food applications-a review[J]. *Foods*, 2021, 10(6): 1354.
- [4] 曾松荣,庞彦韬,柯野,等.大豆分离蛋白重组蛋白酶水解肽对小鼠免疫功能及抗氧化能力的影响[J].食品与生物技术学报,2021,40(7):97-102.  
ZENG S R, PANG Y T, KE Y, et al. Effects of soybean peptides from soybean protein isolate hydrolyzed by recombinant *Aspergillus sojae* alkaline protease on immune function and antioxidation in mice[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2021, 40(7): 97-102. (in Chinese)

- [ 5 ] 马福建. 酶法生产大豆抗氧化肽的工艺研究[D]. 长春: 长春大学, 2019.
- [ 6 ] SHARIF H R, WILLIAMS P A, SHARIF M K, et al. Current progress in the utilization of native and modified legume proteins as emulsifiers and encapsulants—a review[J]. **Food Hydrocolloids**, 2018, 76: 2-16.
- [ 7 ] 张文学. 超声辅助离子液体预处理对大豆分离蛋白结构及酶解特性的影响[D]. 镇江: 江苏大学, 2021.
- [ 8 ] 张芷萌, 倪策, 欧晓晖, 等. 食源性生物活性肽的免疫功能研究进展[J]. **食品与机械**, 2023, 39(5): 193-202.  
ZHANG Z M, NI C, OU X H, et al. Research progress on immune function of food-derived bioactive peptides[J]. **Food & Machinery**, 2023, 39(5): 193-202. (in Chinese)
- [ 9 ] ROSTAMMIRY L, SAEIDIASL M R, SAFAR R, et al. Optimization of the enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by alcalase and trypsin[J]. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, 2017, 14(1): 193-200.
- [10] GALVES C, GALLI G, MIRANDA C G, et al. Improving the emulsifying property of potato protein by hydrolysis: an application as encapsulating agent with maltodextrin[J]. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2021, 70: 102696.
- [11] 姜永鹏. 冷榨对大豆蛋白结构、特性的影响及冷榨豆粉在千叶豆腐中的应用[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2022.
- [12] MEINLSCHMIDT P, SUSSMANN D, SCHWEIGGERT-WEISZ U, et al. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties[J]. **Food Science & Nutrition**, 2016, 4(1): 11-23.
- [13] ABADÍA-GARCÍA L, CASTAÑO-TOSTADO E, OZIMEK L, et al. Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases[J]. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2016, 37: 84-90.
- [14] 马诗文. 复合酶法制备绿豆抗氧化活性多肽及其应用研究[D]. 鞍山: 辽宁科技大学, 2020.
- [15] YUAN B E, REN J Y, ZHAO M M, et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with pepsin and high-pressure homogenization on the functional properties of soybean protein isolate[J]. **LWT—Food Science and Technology**, 2012, 46(2): 453-459.
- [16] GARCÍA A V, APÉSTEGUI G M, MURANYI I, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on molecular weight distribution, techno-functional properties and sensory perception of pea protein isolates[J]. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2020, 65: 102449.
- [17] 吴琼, 程建军, 杨秋萍, 等. 碱性蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究[J]. **食品工业科技**, 2009, 30(10): 191-193.  
WU Q, CHENG J J, YANG Q P, et al. Study on soy protein isolate (SPI) hydrolyzed by alkaline protease[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2009, 30(10): 191-193. (in Chinese)
- [18] 王艳红, 张丽娜, 牛思思, 等. 亚麻籽多肽制备工艺优化及生物活性研究[J]. **食品研究与开发**, 2022, 43(13): 66-76.  
WANG Y H, ZHANG L N, NIU S S, et al. Optimization of the preparation process and biological activity of flaxseed polypeptide [J]. **Food Research and Development**, 2022, 43(13): 66-76. (in Chinese)
- [19] SHAHBAL N, JING X P, BHANDARI B, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on solubility and surface properties of pea, rice, hemp, and oat proteins: implication on high protein concentrations[J]. **Food Bioscience**, 2023, 53: 102515.
- [20] 郝晓华, 郑凯南, 刘可心. 碱性蛋白酶酶解藜麦芽制备多肽工艺的研究[J]. **中国饲料**, 2022(9): 104-107.  
HAO X H, ZHENG K N, LIU K X. Study on preparation of peptides from quinoa malt by alkaline protease[J]. **China Feed**, 2022(9): 104-107. (in Chinese)
- [21] GÜLER G, VOROB'EV M M, VOGEL V, et al. Proteolytically-induced changes of secondary structural protein conformation of bovine serum albumin monitored by Fourier transform infrared (FT-IR) and UV-circular dichroism spectroscopy [J]. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2016, 161: 8-18.
- [22] YAN S Z, XU J W, ZHANG S, et al. Effects of flexibility and surface hydrophobicity on emulsifying properties: ultrasound-treated soybean protein isolate[J]. **LWT—Food Science and Technology**, 2021, 142: 110881.
- [23] 张伟. 商业大豆分离蛋白酶解产物分析及其对肌原纤维蛋白凝胶特性的影响[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- [24] YAN S Z, YAO Y X, XIE X, et al. Comparison of the physical stabilities and oxidation of lipids and proteins in natural and polyphenol-modified soybean protein isolate-stabilized emulsions[J]. **Food Research International**, 2022, 162(Pt B): 112066.
- [25] 杨柳怡. 大米蛋白的酶解-超高压改性及其乳液稳定性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2021.
- [26] 李杨, 马召蕾, 郑丽, 等. 超声联合酶处理下 TG 酶交联大豆分离蛋白凝胶特性研究[J]. **农业机械学报**, 2022, 53(4): 394-402.  
LI Y, MA Z L, ZHENG L, et al. Effect of ultrasonic combined with enzyme treatment on glutamine transaminase cross-linked soybean protein isolate gels[J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**, 2022, 53(4): 394-402. (in Chinese)



- [27] 闫馨月,贾亦佳,孙诗艳,等. 大麻油复合纳米乳液的制备及稳定性研究[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(6):84-90.  
YAN X Y, JIA Y J, SUN S Y, et al. Preparation and stability of hemp seed oil composite nano-emulsion[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2022, 41(6):84-90. (in Chinese)
- [28] ZHANG J B, WU N N, YANG X Q, et al. Improvement of emulsifying properties of Maillard reaction products from  $\beta$ -conglycinin and dextran using controlled enzymatic hydrolysis[J]. **Food Hydrocolloids**, 2012, 28(2):301-312.
- [29] 贾聪. 大豆蛋白及其酶解产物复合阿拉伯胶的乳化性质研究[D]. 无锡:江南大学,2017.
- [30] 郭荣佳. 酶解对大豆蛋白结构功能性影响及高乳化起泡性蛋白制备[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2014.
- [31] 江玉琴. 大豆蛋白表面活性的酶法改善及其对稀奶油打发性的影响研究[D]. 无锡:江南大学,2022.
- [32] GOMES M H G, KUROZAWA L E. Improvement of the functional and antioxidant properties of rice protein by enzymatic hydrolysis for the microencapsulation of linseed oil[J]. **Journal of Food Engineering**, 2020, 267:109761.
- [33] MOKNI G A, MAKLOUF G I, SILA A, et al. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate[J]. **Food Chemistry**, 2015, 187:322-330.
- [34] 毕雅雯,刘晶,蒋艳,等. 超声处理辅助大豆分离蛋白改善蛋黄乳化性[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(1):60-67.  
BI Y W, LIU J, JIANG Y, et al. Emulsification of egg yolk improved by ultrasound-assisted soybean protein isolation[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2022, 41(1):60-67. (in Chinese)
- [35] 李伟伟. 高乳化性大豆蛋白的制备及其界面流变性质的研究[D]. 无锡:江南大学,2017.
- [36] WU L, ZHAO W, YANG R J, et al. Effects of pulsed electric fields processing on stability of egg white proteins[J]. **Journal of Food Engineering**, 2014, 139:13-18.
- [37] 江连洲,王欢,韩天翔,等. 限制性酶解大豆蛋白-磷脂乳液特性分析[J]. 中国食品学报,2018,18(3):269-277.  
JIANG L Z, WANG H, HAN T X, et al. Analysis on the characteristics of the emulsion prepared by restriction-enzyme soy protein-phospholipid[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2018, 18(3):269-277. (in Chinese)
- [38] ZHANG W H, JIA N, ZHU Z H, et al. Changes of antioxidative activities and peptidomic patterns of *Auxenochlorella pyrenoidosa* protein hydrolysates: effects of enzymatic hydrolysis and decoloration processes[J]. **LWT-Food Science and Technology**, 2021, 152:112306.
- [39] ZHENG X Q, WANG J T, LIU X L, et al. Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by protamex hydrolysis[J]. **Food Chemistry**, 2015, 172:407-415.
- [40] 郭浩彬,张陆燕,赵宇,等. 藜麦水解蛋白肽制备及其抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报,2022,13(21):7073-7082.  
GUO H B, ZHANG L Y, ZHAO Y, et al. Study on preparation and antioxidant activity of hydrolysate peptides derived from *Chenopodium quinoa* proteins[J]. **Journal of Food Safety & Quality**, 2022, 13(21):7073-7082. (in Chinese)

(责任编辑:史润东东)