

# 酶解大豆蛋白工艺及其对面团流变特性的影响

杜振亚, 陈复生, 张丽芬, 左贯杰

(河南工业大学 粮油食品学院, 河南 郑州 450001)

**摘要:**采用响应面优化中性蛋白酶酶解大豆分离蛋白工艺条件, 确定了最佳水解条件为加酶量6%、水解时间6 h、底物浓度3.7%、温度42 ℃、pH 7.0, 得到水解度为7.74%。酶解得到水解度为3.1%、4.4%、5.2%、6.2%、7.4%的五种样品, 并采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳来分析其分子量的变化规律。在小麦粉中分别添加2%的大豆分离蛋白和酶解样品, 通过粉质仪和拉伸仪研究其对面团流变特性的影响。结果表明, 大豆分离蛋白酶解后产生两条新的肽段, 其分子量约为30.5 ku和26.4 ku; 添加大豆分离蛋白的面团吸水率、稳定时间、面团拉伸能量、拉伸阻力、拉伸比例均有所增大; 而添加酶解样品则均有所降低, 并随着水解度的增加其对面团流变特性的破坏越严重。

**关键词:**大豆分离蛋白; 中性蛋白酶; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 流变特性

中图分类号: S 565.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2015)06-0099-06

## Study on enzymatic hydrolysis of soybean protein and its influence on dough rheological property

DU Zhen-ya, CHEN Fu-sheng, ZHANG Li-fen, ZUO Guan-jie

(College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou Henan 450001)

**Abstract:** The processing conditions of soy protein isolate with neutral protease were optimized by response surface, which were: enzyme dosage 6%, hydrolysis time 6 h, substrate concentration 3.7%, temperature 42 ℃ and pH 7.0. The degree of hydrolysis was 7.74%. Five samples with different degree of hydrolysis, 3.1%, 4.4%, 5.2%, 6.2% and 7.4%, were prepared. Their variations of molecular weights were analyzed by SDS-PAGE. 2% of soy protein isolate or the hydrolysate samples were added into wheat flour, and the influences of the additions on dough rheological properties were investigated by Brabender farinograph and extensograph. Results showed that two new peptide fragments emerged after enzymatic hydrolysis of soy protein isolate with molecular weight about 30.5 ku and 26.4 ku; the water absorption of dough, stability, tensile energy, resistance to extension and stretching ratio were all increased when adding soybean protein isolate; when adding the hydrolysates, they were all decreased, and the dough rheology property got worse and worse with the increase of hydrolysis degree.

**Key words:** soybean protein isolate; neutral protease; SDS-PAGE; rheological property

面团流变特性能够对面制品的品质有一个基本的预测, 一般而言流变特性良好的面团, 才能生产出高品质的面制品<sup>[1-3]</sup>。大豆蛋白是氨基酸平衡特性较好的一种植物性蛋白, 富含人体所需的8种必需氨基酸, 特别是谷物限制性氨基酸—赖氨酸含量丰

富。研究表明大豆蛋白可以提高面制品的营养价值并能在一定程度上改善其综合品质<sup>[4]</sup>, 目前有关大豆蛋白的改性手段主要是物理、化学、酶等手段, 而将改性的大豆蛋白应用到其他食品中的相关报道较少, 对大豆蛋白酶解后应用于面制品方面的研究更为罕见<sup>[5-7]</sup>。因此, 研究酶改性大豆蛋白对面团流变特性的影响具有重要意义。

大豆蛋白经过适度的酶解不但提高了蛋白利用

收稿日期: 2015-04-24

基金项目: 国家863项目(2013AA102208-5); 国家十二五科技支撑计划(2014BAD04B10)

作者简介: 杜振亚, 1988年出生, 男, 硕士研究生。

通讯作者: 陈复生, 1963年出生, 男, 博士生导师, 教授。

率,而且具有抑制肥胖、缓解骨质疏松、抗癌等生理保健功能特性<sup>[5,8-9]</sup>。为此,本研究采用中性蛋白酶水解大豆分离蛋白,在控制加酶量、酶解时间、pH、底物浓度、温度单因素的基础上,响应面优化中性蛋白酶酶解工艺条件;依据酶解工艺制备不同水解度的样品,同时利用 SDS-PAGE 电泳分析分子量的变化,研究酶解大豆分离蛋白对面团流变特性的影响,旨在为酶解大豆分离蛋白应用于面制品提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白,河南鲲鹏华生物技术有限公司;中性蛋白酶,诺维信;金苑特一粉,郑州金苑面粉有限公司;L-酪蛋白(分装进口),中国嘉兴生物试剂有限公司;凝胶制备试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司;低分子量标准蛋白(分装进口),上海纪宁实业有限公司。所用试剂均为分析纯。

茚三酮显色剂:2 g 茚三酮加入蒸馏水溶解定容至 100 mL,置于棕色试剂瓶中,4 °C 冰箱保存,有效期 3 d;缓冲溶液均以浓度为 0.1 mol/L 的磷酸二氢钠和磷酸氢二钠溶液进行配置。

#### 1.1.2 主要仪器与设备

粉质仪,Brabender Farinograph-AT;拉伸仪,Brabender Extensograph-E;TU-1901 双光束紫外可见分光光度计,北京浦西通用仪器有限责任公司;LGJ-18 型冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;计算机三恒电泳仪 DYY-6D,北京六一仪器厂;Biorad GelDoc XR 伯乐凝胶成像系统,伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 样品基本参数的测定

酶活力的测定参照 GB/T 23527—2009;粗蛋白含量测定参照 GB 5009.5—2010;水分的测定参照 GB/T 5009.3—2010;灰分的测定参照 GB/T 5009.4—2010。

### 1.2.2 甘氨酸标准曲线的绘制

精确称取 125 mg 甘氨酸溶于蒸馏水中,然后定容至 100 mL 的容量瓶中,得到浓度为 125 μg/mL 的甘氨酸标准溶液。分别移取 0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL 甘氨酸标准溶液于 25 mL 的试管中并补水至 2.0 mL,加入 0.5 mL 的茚三酮显色液和 0.5 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH 8.0),沸水浴中反

应 15 min,冷水冷却 5 min,570 nm 下测定吸光度值。

### 1.2.3 水解度的测定

酶解样品以 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液 1~2 mL,稀释适当的倍数,然后取稀释后溶液 2 mL 于 25 mL 的试管中,加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH 8.0)和 0.5 mL 茚三酮显色剂,沸水浴中加热 15 min,冷却稀释至 25 mL,570 nm 下测定吸光度值,相同条件下以未加酶的大豆蛋白上清液作参比<sup>[10]</sup>。水解度(DH)计算:

$$DH = \frac{\text{酶解后游离氮含量} - \text{酶解前游离氮含量}}{\text{样品总氮含量}} \times 100\%$$

### 1.2.4 单因素实验设计

#### 1.2.4.1 加酶量对水解度的影响

分别称取大豆分离蛋白 7 份,每份 2.00 g,溶解到 40 mL 的缓冲溶液中,配置成底物浓度为 5% 的样品溶液,在水解时间 2 h、温度 50 °C、pH 7.0 的条件下,中性蛋白酶加入量分别选取 0、1%、2%、3%、4%、5%、6%,酶解完后 90 °C 恒温水浴中灭酶 15 min,离心取上清液用于水解度测定。

#### 1.2.4.2 水解时间对水解度的影响

分别称取大豆分离蛋白 6 份,每份 2.00 g,溶解到 40 mL 的缓冲溶液中,配置成底物浓度为 5% 的样品溶液,在加酶量 5%、温度 50 °C、pH 7.0 的条件下,水解时间分别取 1、2、3、4、5、6 h,酶解完后 90 °C 恒温水浴中灭酶 15 min,离心取上清液用于水解度测定。

#### 1.2.4.3 底物浓度对水解度的影响

分别称取大豆分离蛋白 6 份,质量依次为 1.20、1.60、2.00、2.40、2.80、3.20 g,溶解到 40 mL 的缓冲溶液中,配置成底物浓度分别为 3%、4%、5%、6%、7%、8% 的样品溶液,在加酶量 5%、水解时间 5 h、温度 50 °C、pH 7.0 的条件下,酶解完后 90 °C 恒温水浴中灭酶 15 min,离心取上清液用于水解度测定。

#### 1.2.4.4 温度对水解度的影响

分别称取大豆分离蛋白 5 份,每份 1.60 g,溶解到 40 mL 的缓冲溶液中,配置成底物浓度为 4% 的样品溶液,在加酶量 5%、水解 5 h、pH 7.0 的条件下,温度分别取 35、40、45、50、55 °C,酶解完后 90 °C 恒温水浴中灭酶 15 min,离心取上清液用于水解度测定。

#### 1.2.4.5 pH 对水解度的影响

分别称取大豆分离蛋白 5 份,每份 1.60 g,溶解

到 40 mL 缓冲溶液中,配置成底物浓度为 4% 的样品溶液,在加酶量 5%、水解 5 h、温度 40 °C 的条件下,pH 分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,酶解完后 90 °C 恒温水浴中灭酶 15 min,离心取上清液用于水解度测定。

### 1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS - PAGE)

依据凝胶电泳试剂盒,配制浓缩胶 5%,分离胶 12%;采用恒电流的方法,预电泳恒流 28 mA,预电泳 35 min;浓缩胶电泳恒流 28 mA,间隔胶电泳恒流 50 mA,分离胶电流恒流 50 mA。电泳结束后,取出凝胶固定 2 h 后加入染色液 3 h,用清水洗涤后,放入脱色液中,每 3 h 换液一次,直到背景清晰,于凝胶成像系统下拍下电泳凝胶图像。

### 1.2.6 面团流变特性研究

粉质特性的测定参照 GB/T 14614—2006,拉伸特性测定参照 GB/T 14615—2006。

### 1.2.7 数据处理

数据分析和绘图分别采用 SPSS 16.0 和 Origin 8.5 软件,实验线性回归和方差分析采用 Design - Expert 8.05 软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品基本参数的测定

中性蛋白酶酶活力: $(3.07 \pm 0.08) \times 10^4$  U/g;大豆分离蛋白粗蛋白含量:91.1%  $\pm$  0.2%,水分含量:5.70%  $\pm$  0.05%;小麦粉粗蛋白含量:11.07%  $\pm$  0.04%,水分含量:14.1%  $\pm$  0.02%。

### 2.2 甘氨酸标准曲线及回归方程

将甘氨酸与茚三酮反应后的溶液经紫外吸收光谱扫描后,确定最大吸收峰为波长 570 nm,线性回归方程为: $y=0.0061x-0.4741$ , $R^2=0.9983$ ,甘氨酸含量在 100 ~ 225  $\mu$ g 范围内,线性关系良好(图 1)。

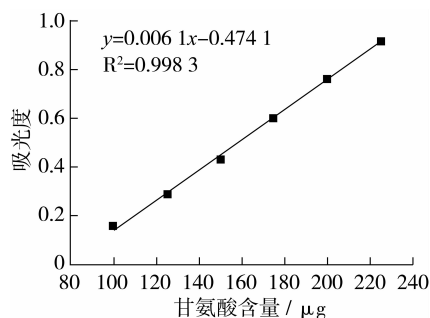


图 1 甘氨酸标准曲线

## 2.3 单因素实验结果

### 2.3.1 加酶量对水解度的影响

由图 2 可知,随着加酶量的增加水解度逐步上升,当加酶量为 1% 时,水解度达到 4.6%,之后随着加酶量的进一步增加水解度增速减慢,且加酶量为 5% 和 6% 时水解度增加趋势趋于平缓。原因可能是加酶量增加到一定程度时,大豆分离蛋白可水解的肽键大部分被水解,而余下的肽键水解非常缓慢。因此,基于酶成本考虑加酶量选用 5%。

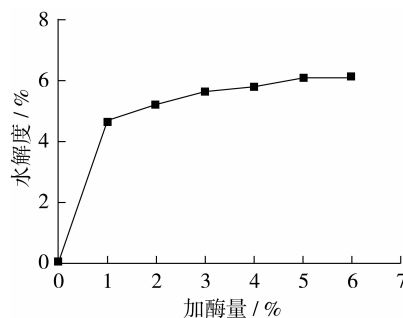


图 2 加酶量对水解度的影响

### 2.3.2 水解时间对水解度的影响

水解时间对水解度的影响如图 3 所示。由图 3 可知,随着水解时间的增加,水解度逐渐增大,刚开始 1 h 水解速度比较快,随后水解度随着水解时间的延长增长缓慢,且 5 h 后水解度基本不再增大。原因可能是此条件下水解时间超过 5 h 后水解速度非常缓慢或者水解趋于完全。因此,基于酶解周期考虑,酶解时间选用 5 h。

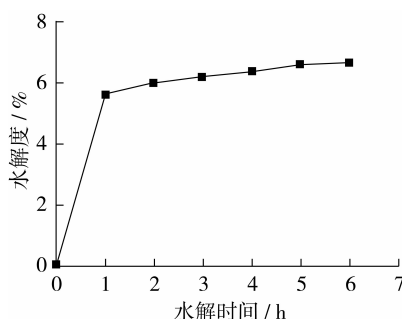


图 3 水解时间对水解度的影响

### 2.3.3 底物浓度对水解度的影响

底物浓度对水解度的影响如图 4 所示。由图 4 可知,随着底物浓度的增加,水解度呈先上升后下降的趋势,底物浓度为 4% 时水解度达到最大,原因可能是底物浓度低于 4% 时,酶与大豆分离蛋白接触的机会低,底物浓度高于 4% 时,酶解过程由于底物浓度过高而受到一定的限制。

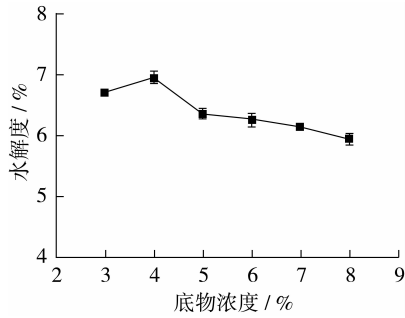


图4 底物浓度对水解度的影响

### 2.3.4 温度对水解度的影响

由图5可知,随着温度的上升,水解度先上升后下降,在温度为40℃时水解度达到7.0%,55℃时水解度最小,仅有6.1%。原因可能是此条件下,40℃是中性蛋白酶最适酶解温度,55℃时中性蛋白酶发生部分变性。因此,酶解温度选用40℃。

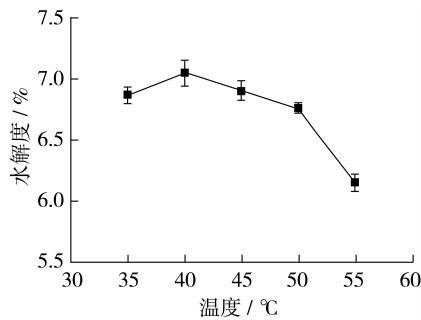


图5 温度对水解度的影响

### 2.3.5 pH对水解度的影响

由图6可知随着pH的变化,水解度呈先上升后下降的变化趋势,pH7.0时水解度为7.42%,明显高于其他几组,原因可能是中性蛋白酶最适pH为7.0,高于或低于这一值时,中性蛋白酶的活性均会受到不同程度的抑制。因此,响应面实验时不再作为一个影响因素考察。

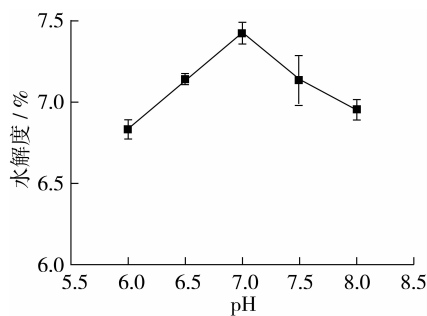


图6 pH对水解度的影响

## 2.4 响应面实验结果与分析

在单因素实验的基础上,采用 Design - Expert 8.05软件设计四因素三水平的响应面实验,主要影

响因素加酶量、水解时间、底物浓度、温度分别用A、B、C、D表示,实验结果见表1~表3。

表1 响应面实验因素水平

水平	A 加酶量/%	B 时间/h	C 底物浓度/%	D 温度/°C
-1	4	4	3	35
0	5	5	4	40
1	6	6	5	45

表2 响应面实验结果

实验编号	加酶量	时间	底物浓度	温度	水解度/%
1	1	0	0	-1	6.89
2	1	1	0	0	7.52
3	1	0	-1	0	7.36
4	0	0	0	0	7.38
5	0	1	1	0	6.58
6	0	-1	0	1	6.96
7	-1	0	1	0	6.02
8	0	-1	-1	0	6.72
9	0	0	0	0	7.47
10	0	0	1	1	6.31
11	0	0	0	0	7.29
12	-1	0	-1	0	6.82
13	0	-1	0	-1	6.43
14	0	0	-1	-1	6.73
15	0	1	0	1	7.40
16	0	0	1	-1	5.99
17	0	0	0	0	7.32
18	1	0	0	1	7.35
19	-1	0	0	1	7.01
20	-1	0	0	-1	6.66
21	0	0	0	0	7.25
22	-1	-1	0	0	6.56
23	1	-1	0	0	6.93
24	0	-1	1	0	6.01
25	0	1	0	-1	7.28
26	0	1	-1	0	7.48
27	1	0	1	0	6.46
28	0	0	-1	1	7.03
29	-1	1	0	0	7.41

表3 二次回归模型的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	6.24	14	0.45	73.15	<0.000 1	**
A	0.34	1	0.34	56.40	<0.000 1	**
B	1.37	1	1.37	225.61	<0.000 1	**
C	1.9	1	1.90	311.42	<0.000 1	**
D	0.36	1	0.36	59.22	<0.000 1	**
AB	0.017	1	0.017	2.78	0.117 9	
AC	$2.5 \times 10^{-3}$	1	$2.500 \times 10^{-3}$	0.41	0.532 0	
AD	$3.025 \times 10^{-3}$	1	$3.025 \times 10^{-3}$	0.50	0.492 5	
BC	$9.025 \times 10^{-3}$	1	$9.025 \times 10^{-3}$	1.48	0.243 5	
BD	0.042	1	0.042	6.90	0.019 9	*
CD	$1.0 \times 10^{-3}$	1	$1.000 \times 10^{-3}$	0.016	0.899 8	
A <sup>2</sup>	0.10	1	0.10	17.14	0.001 0	**
B <sup>2</sup>	0.053	1	0.053	8.74	0.010 4	*
C <sup>2</sup>	2.05	1	2.05	336.29	<0.000 1	**

续表						
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
$D^2$	0.39	1	0.39	64.25	<0.000 1	**
残差	0.085	14	$6.088 \times 10^{-3}$			
失拟项	0.056	10	$5.576 \times 10^{-3}$	0.76	0.673 1	
净误差	0.029	4	$7.370 \times 10^{-3}$			
总离差	6.32	28				
$R^2$	0.986 5					
$R_{Adj}^2$	0.973 0					

注：\* 指差异显著( $P < 0.05$ )，\*\* 指差异极显著( $P < 0.01$ )。

运用 Design - Expert 8.05 软件对实验数据进行多元回归拟合,由于 AB、AC、AD、BC 和 CD 之间交互作用的显著性在  $\alpha = 0.05$  水平以上,故在建立模型时去除,得到水解度与加酶量、水解时间、底物浓度和温度四因素的二次回归模型为:

$$Y = 7.340 + 0.170 \times A + 0.340 \times B - 0.400 \times C + 0.170 \times D - 0.100 \times B \times D - 0.130 \times A^2 - 0.091 \times B^2 - 0.560 \times C^2 - 0.250 \times D^2$$

由表 3 方差分析可以看出,模型的  $R^2 = 0.986 5$ ,该模型极显著( $P < 0.01$ )。失拟项在  $\alpha = 0.05$  水平以上不显著( $P = 0.673 1 > 0.01$ ),表明该模型能够对中性蛋白酶酶解大豆分离蛋白的水解度进行准确的预测和分析。调整确定系数  $R_{Adj}^2 = 0.973 0$ ,模型拟合程度良好,可以确定和预测大豆分离蛋白水解的工艺条件。根据回归方程来绘制交互作用比较明显的响应面立体分析图,见图 7。

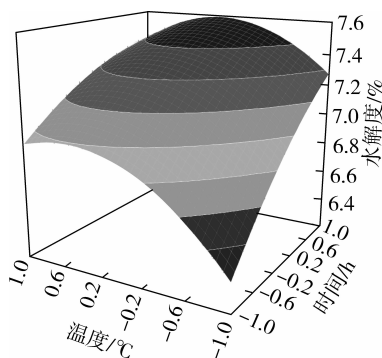


图 7 温度和时间交互作用对水解度的影响

由图 7 可知水解时间和温度对水解度均有显著性影响( $P < 0.05$ ),温度对水解度的影响比水解时间要大。对已有的工艺模型进行模拟和预测,得到中性蛋白酶水解大豆分离蛋白的最佳工艺为加酶量 5.95%、水解时间 5.85 h、底物浓度 3.69%、温度 41.8 °C、pH 7.0,在此条件下水解度为 7.63%。为了验证该方法的可靠性,同时基于实际操做条件,将酶解工艺修正为加酶量 6%、水解时间 6 h、底物浓度 3.7%、温度 42 °C、pH 7.0。通过三次验证实验得水解度为  $7.74\% \pm 0.06\%$ ,与理论预测值基本相符。

## 2.5 SDS - PAGE 凝胶电泳

由图 8 可知,中性蛋白酶对大豆分离蛋白 7S 组分的  $\alpha'$  和  $\alpha$  亚基的水解作用比较强,水解度为 3.1% 时,基本被彻底水解,而  $\beta$  亚基还有少量的未被水解;对于 11S 组分而言,A 亚基基本被彻底水解,B 亚基逐渐被水解,且随着水解度的增加 B 亚基有减少的趋势。各种水解度的样品在低分子量范围之内产生了两个新肽段,其分子量大约为 30.5 ku 和 26.4 ku。因此,可以预测中性蛋白酶酶切位点是构成 7S、11S 结构的关键位点,同时鉴于实验最大水解度仅为 7.4% 以及新生成的肽链片段变化不明显,可以推测中性蛋白酶仅对特定位置具有水解作用,对其他大部分肽键没有水解作用,原因可能是酶的专一性以及酶活受酶自身或者酶解后蛋白结构变化的影响。

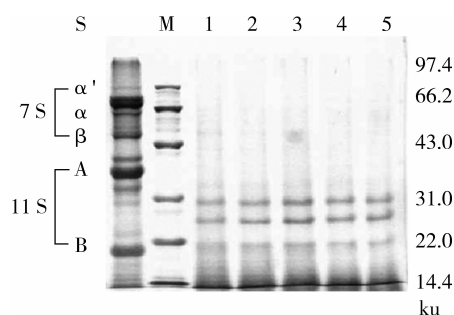


图 8 凝胶电泳图

注:泳道 S 为大豆分离蛋白;泳道 M 为低分子量标准蛋白;泳道 1、2、3、4、5 依次是水解度为 3.1%、4.4%、5.2%、6.2%、7.4% 的酶解样品。

## 2.6 面团流变特性

面团吸水率是指面团最大稠度处于 500B. U. 时所需的加水量,以 14% 湿基小麦粉质量分数表示;形成时间指开始加水直到面团稠度达到最大值时所需揉混的时间;稳定时间表示小麦粉形成面团时耐受机械搅拌的能力,稳定时间越长,韧性越好,面筋强度越大,加工性能越好;弱化度表示面团在搅拌过程中面团的破坏速率,即对机械搅拌的承受能力<sup>[2]</sup>。由表 4 可知,添加大豆分离蛋白后的面团形成时间、吸水率均有所提高,稳定时间、弱化度基本没有变化,原因可能是大豆分离蛋白具有较多的亲水基团,从而使面团的形成时间延长、吸水率增加;其次大豆分离蛋白使面团的部分巯基转变成二硫键进而达到增强面团筋力的效果<sup>[4-5,9]</sup>;添加酶解样品的面团的形成时间、吸水率、稳定时间均表现出了破坏作用,并且随着水解度的增大这种破坏作用呈增强的趋势,可能是由于酶解导致大豆分离蛋白部分疏水性基团暴露、酶解后蛋白结构的变化以及新产生的多肽对面筋的稀释作用<sup>[5]</sup>。

反映小麦粉特性的主要指标是拉伸能量、拉伸比、拉伸阻力。能量也称粉力,是指拉伸曲线与基线所包围的总面积;拉伸比值是将面团抗延展性和延伸性两个指标综合起来判断小麦粉品质,拉伸阻力表征面团的强度和筋力,阻力越大,表示面团越硬<sup>[2]</sup>。由表5可知,添加大豆分离蛋白的面团拉伸阻力、拉伸比均有所增大,拉伸能量有少许的增强趋势,而延伸度有下降趋势。这说明添加2%的大豆分离蛋白能够改善面团的拉伸特性,原因可能是大豆分离蛋白能提高面团二硫键的数量和强度<sup>[4-5,11]</sup>;添加不同水解度样品的面团的拉伸能量、拉伸阻力、拉伸比等均被削弱,并且随着水解度的增大这种削弱作用有所增强,原因可能是大豆分离蛋白经过酶解后,产生的小分子多肽稀释了面筋蛋白,从而导致面筋筋力下降,这与之前的粉质结果相互印证。由电泳与粉质、拉伸结果可以推测<sup>[12]</sup>,大豆

蛋白7S、11S对面团流变特性的影响显著,并且7S的 $\alpha'$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 亚基及11S的A亚基的变化对面团的流变特性影响效果更为明显;新生成的具有还原性的小分子多肽,能够还原面筋蛋白的二硫键,稀释面筋蛋白,进而削弱面筋筋力。

表4 粉质特性

面团	形成时间/min	吸水率/%	稳定时间/min	弱化度/PE
小麦粉	3.7	60.8	6.3	55
大豆分离蛋白	4.1	61.8	6.8	57
3.1	3.88	60.6	5.17	87
4.4	3.77	59.9	4.42	99
5.2	3.80	59.3	4.52	109
6.2	3.70	59.3	4.33	103
7.4	3.58	59.1	3.95	112

注:表中面团依次表示小麦粉面团、添加2%大豆分离蛋白的面团、添加2%酶解样品的水解度分别为3.1%、4.4%、5.2%、6.2%和7.4%。

表5 拉伸特性

面团	拉伸能量/cm <sup>2</sup>			拉伸阻力/BU			延伸度/mm			拉伸比/(BU·mm <sup>-1</sup> )		
	45 min	90 min	135 min	45 min	90 min	135 min	45 min	90 min	135 min	45 min	90 min	135 min
小麦粉	59.5±0.4 <sup>b</sup>	72.0±0.0 <sup>a</sup>	77.5±2.2 <sup>a</sup>	237.0±10.7 <sup>b</sup>	304.5±10.3 <sup>b</sup>	337.5±4.9 <sup>b</sup>	147.0±2.7 <sup>bc</sup>	144.5±4.9 <sup>a</sup>	137.5±1.3 <sup>abc</sup>	1.6±0.1 <sup>b</sup>	2.2±0.1 <sup>b</sup>	2.5±0.0 <sup>b</sup>
大豆分离蛋白	63.0±0.9 <sup>a</sup>	73.0±2.7 <sup>a</sup>	75.0±0.9 <sup>a</sup>	270.0±2.7 <sup>a</sup>	331.0±0.9 <sup>a</sup>	359.5±4.9 <sup>a</sup>	140.5±1.3 <sup>c</sup>	135.5±5.8 <sup>a</sup>	127.5±2.6 <sup>c</sup>	2.0±0.0 <sup>a</sup>	2.5±0.1 <sup>a</sup>	2.8±0.1 <sup>a</sup>
3.1	43.0±1.8 <sup>d</sup>	57.5±2.2 <sup>bc</sup>	60.5±4.0 <sup>bc</sup>	191.5±1.4 <sup>c</sup>	265.0±3.6 <sup>c</sup>	284.5±2.2 <sup>cd</sup>	137.5±4.5 <sup>c</sup>	135.5±5.8 <sup>a</sup>	135.5±6.7 <sup>abc</sup>	1.4±0.0 <sup>b</sup>	2.0±0.1 <sup>bc</sup>	2.1±0.1 <sup>c</sup>
4.4	43.0±0.9 <sup>d</sup>	55.5±0.4 <sup>bc</sup>	61.0±0.0 <sup>bc</sup>	197.5±1.3 <sup>c</sup>	259.5±4.0 <sup>cd</sup>	301.5±2.2 <sup>c</sup>	136.0±3.6 <sup>c</sup>	136.5±3.1 <sup>a</sup>	133.0±0.9 <sup>bc</sup>	1.5±0.1 <sup>b</sup>	1.9±0.1 <sup>bc</sup>	2.3±0.0 <sup>bc</sup>
5.2	49.0±0.0 <sup>c</sup>	59.5±1.3 <sup>b</sup>	62.0±0.9 <sup>b</sup>	183.5±1.3 <sup>cd</sup>	255.0±0.9 <sup>cd</sup>	284.0±10.7 <sup>cd</sup>	162.5±1.3 <sup>a</sup>	154.0±8.9 <sup>a</sup>	142.5±1.3 <sup>ab</sup>	1.1±0.0 <sup>c</sup>	1.8±0.0 <sup>cd</sup>	2.0±0.1 <sup>c</sup>
6.2	43.5±0.4 <sup>d</sup>	55.5±2.2 <sup>bc</sup>	58.0±0.9 <sup>bc</sup>	168.5±9.4 <sup>bc</sup>	242.5±4.9 <sup>d</sup>	275.0±2.7 <sup>d</sup>	156.5±4.0 <sup>ab</sup>	151.0±8.9 <sup>a</sup>	137.5±1.4 <sup>abc</sup>	1.1±0.1 <sup>c</sup>	1.7±0.0 <sup>cd</sup>	2.0±0.0 <sup>c</sup>
7.4	40.0±0.9 <sup>d</sup>	51.0±1.8 <sup>c</sup>	53.5±2.2 <sup>c</sup>	153.0±4.5 <sup>c</sup>	215.5±2.2 <sup>e</sup>	233.5±4.9 <sup>e</sup>	158.0±5.4 <sup>ab</sup>	154.0±8.9 <sup>a</sup>	147.0±1.8 <sup>a</sup>	1.0±0.1 <sup>c</sup>	1.5±0.0 <sup>d</sup>	1.6±0.0 <sup>d</sup>

注:表中同一列不含相同字母表示具有显著性差异(P<0.05)。

### 3 结论

(1)本研究通过响应面法优化中性蛋白酶水解大豆分离蛋白工艺条件,并建立多元回归模型。由Design-Expert 8.05软件分析确定了最佳工艺条件为加酶量6%、水解时间6h、底物浓度3.7%、温度42℃、pH7.0,得到水解度为7.74%。

(2)中性蛋白酶对大豆蛋白的7S和11S水解效果明显,水解后产生两条新的条带,它们的分子量分布约为30.5ku和26.4ku。

(3)大豆分离蛋白少量的添加能提高面团的流变特性,而经过中性蛋白酶酶解之后却大大削弱了面团的流变特性。

### 参考文献:

[1] Doo - Jee Shin, Wook Kim, Yookyung Kim. Physicochemical and sensory properties of soy bread made with germinated, steamed, and roasted soy flour[J]. Food Chemistry, 2013, 141(1): 517 - 523.  
 [2] 田建珍,温纪平. 小麦加工工艺与设备[M]. 北京:科学出版社, 2011.  
 [3] Maribel Rosales - Juárez, Beatriz González - Mendoza, Emigdio C. López - Guel, et al. Changes on Dough Rheological Characteristics and Bread Quality as a Result of the Addition of Germinated and Non - Germinated Soybean Flour[J]. Food and Bioprocess Technology,

2008, 1(2): 152 - 160.

[4] 杜振亚,陈复生,刘昆仑,等. 大豆蛋白及其在面制品中的应用[J]. 粮油食品科技, 2014, 22(6): 46 - 49.  
 [5] 陈复生,郭兴凤. 蛋白质化学与工艺[M]. 郑州:郑州大学出版社, 2012.  
 [6] Xiangyang Li, Chuanfu Liu, Haizhou Dong, et al. Semi - dry method for improving emulsification of soybean protein isolate[J]. Journal of Food Process Engineering, 2014, 37(2): 169 - 176.  
 [7] Lin Chen, Jianshe Chen, Jiaoyan Ren, et al. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre - treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 887 - 897.  
 [8] 杜振亚,陈复生. 大豆蛋白保健功能研究进展[J]. 食品与机械, 2014, 30(6): 247 - 250.  
 [9] 陈成. 大豆蛋白活性肽保健功能性的研究[J]. 大豆通报, 2005, 6(2): 22 - 24.  
 [10] 郭兴凤. 蛋白质水解度的测定[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 176 - 177.  
 [11] 王玲,朱秀清,李桂东,等. 低温冷冻条件对大豆分离蛋白分散液表面疏水性及二硫键的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(7): 28 - 32.  
 [12] 杨春华,石彦国. 大豆7S球蛋白对小麦粉流变特性及面包品质的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(17): 131 - 135. 完