

大豆肽-钙螯合物制备条件优化与质量评价

李国良<sup>1</sup> 侯俊财<sup>2,3</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319; 2. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030;  
3. 东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 采用碱性蛋白酶对大豆脱脂豆粕进行酶解,探究大豆肽-钙螯合物的最佳制备工艺参数,并对大豆肽-钙螯合物的性质进行分析。以钙结合量作为指标,研究肽钙比、反应温度、反应时间和 pH 值对钙结合量的影响,并通过 Box - Benhnken 中心组合试验以及响应面分析法对螯合工艺进行优化。结果表明,最佳螯合工艺为:肽钙比 1.6、反应温度 38℃、反应时间 44 min、pH 值 6.6,在此条件下制得的大豆肽-钙螯合物的钙结合量为 78.73 mg/g。经试验,测得大豆肽-钙螯合物的溶解度为 98.59%,分子量大于 5 000 Da 的大豆肽-钙螯合物占 1.76%,分子量小于 5 000 Da 的占 98.24%,分子量小于 1 000 Da 的大豆肽-钙螯合物占 80.24%,其中分子量 180~500 Da 的大豆肽-钙螯合物占比最大。本研究可为新型大豆营养保健产品及合成新型补钙制剂的研发提供新方法、新思路。

**关键词:** 大豆肽; 钙; 螯合; 响应面法

**中图分类号:** TS214.9; TS218      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-1298(2019)08-0379-07

Optimization of Parameters of Preparation of Calcium-chelated Soybean Peptides and Quality Evaluation

LI Guoliang<sup>1</sup> HOU Juncui<sup>2,3</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China  
2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China  
3. Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The defatted soybean meal was hydrolysed by alcalase to explore the optimal preparation parameters of calcium-chelated soybean peptides, and the properties of alcium-chelated soybean peptides were analyzed. The effects of mass ratio of peptide and calcium, chelating temperature, pH and chelating time on calcium binding capacity were studied, and the chelating process was optimized by Box - Benhnken experimental design and response surface methodology (RSM). The results showed that the optimum chelating conditions were as follows: ratio of peptide to calcium was 1.6, chelating temperature was 38℃, chelating time was 44 min, and pH value was 6.6. Under the optimal conditions, the calcium content was the highest (78.73 mg/g) in calcium-chelated soybean peptides. Moreover, it was concluded that the solubility of the finally obtained calcium-chelated soybean peptides was 98.59%. Furthermore, the molecular mass distribution of soybean peptide-calcium chelate was also determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). The proportion of peptides with a relative molecular weight higher than 5 000 Da was 1.76%, peptides with a relative molecular weight lower than 5 000 Da accounted for 98.24%, and peptides with molecular weight lower than 1 000 Da accounted for 80.24%. Among them, the peptides with the relative molecular weight of 180~500 Da accounted for the largest proportion. It provided a new method for the research and development of new soybean nutrition and synthesis of new calcium supplements.

**Key words:** soybean peptides; calcium; chelating; response surface method

收稿日期: 2019-05-13    修回日期: 2019-06-12

**基金项目:** 国家重点研发计划项目(2016YFD0400605)和黑龙江省自然科学基金项目(QC2016039)

**作者简介:** 李国良(1978—),男,副教授,主要从事植物活性成份提取及功能开发研究,E-mail: lgl3885@sina.com

**通信作者:** 侯俊财(1975—),男,教授,博士生导师,主要从事食品科学研究,E-mail: jchou@neau.edu.cn

## 0 引言

大豆及其新产品的开发越来越引起研究者的关注<sup>[1]</sup>。大豆蛋白作为一种优秀的膳食蛋白,被我国等亚洲国家视为最重要的可食用蛋白来源之一<sup>[2-3]</sup>。大豆蛋白中包含人体所需要的 8 种必需氨基酸,大豆蛋白消化率校正氨基酸评分为 1.0<sup>[4]</sup>。大豆肽通过蛋白酶水解获得,与传统的大豆蛋白相比,大豆肽具有分子量小、容易消化吸收、无豆腥味等优点<sup>[5-6]</sup>。除了具有良好的理化特性外,大豆肽还可以提供人体所需要的营养物质,同时具有调节人体生理机能、预防骨质疏松、降低心血管疾病和高血压的风险等保健功效<sup>[7-9]</sup>。

钙元素是人体生长发育的重要元素之一,约占人体质量的 1.5%~2%<sup>[10-11]</sup>。人体牙齿和骨骼中的钙约占钙总量的 99%,其余 1% 的钙位于人体软组织内和血液中<sup>[12]</sup>。人类日常饮食中若缺乏钙,则会增加多种疾病的发生风险<sup>[13]</sup>。螯合是指配位体与金属离子的一种特殊类型的络合,螯合物是指一个或多个基团与一个金属离子的配位反应所形成的环状结构<sup>[14-15]</sup>。大豆肽-钙螯合物是由可溶性的钙离子与大豆肽按一定物质的量比以共价键结合而成,从结构的角可以定义为:氨基酸的氨基端和羧基端与金属钙离子按一定的配比形成的环状结构产物<sup>[16]</sup>。

大豆脱脂豆粕是大豆提油后的副产物,其中的粗蛋白质量分数高达 30%~50%,然而其利用率却较低,多用作动物饲料<sup>[17]</sup>。豆粕的酶水解能够有效改善其功能特性,并拓宽其应用领域。大豆肽-钙螯合物是将钙元素与大豆肽结合起来制成的新一代补钙营养性食品,可同时补充给人体所必需的钙元素和氮源,具有钙元素的利用率高、溶解性强和容易被人体吸收等优点<sup>[18]</sup>。文献[19]利用碱性蛋白酶进行大豆分离蛋白的酶解以及类蛋白反应修饰,并在醇-水介质中对其进行类蛋白反应修饰。文献[20]研究了酶解时间以及酸法脱酰胺改性对于脱植酸大豆分离蛋白肽钙离子螯合能力的影响,并对钙螯合物的结构特性和营养特性进行了分析。

本文以国产大豆脱脂豆粕为主要原料,研究肽钙比、反应温度、反应时间和 pH 值对钙结合量的影响,经过单因素和响应面优化试验,筛选大豆肽-钙螯合物最佳制备工艺,旨在为新型大豆营养保健产品及合成新型补钙制剂的研发提供新方法、新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大豆脱脂豆粕来自哈高科大豆食品有限责任公

司;碱性蛋白酶来自诺维信(中国)生物技术有限公司;酒石酸钾钠、氢氧化钠、盐酸、硼酸、无水氯化钙、乙醇胺、邻甲酚酞、8-羟基喹啉、邻苯二甲醛、 $\beta$ -巯基乙醇、硫酸铜等均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪,上海伍丰科学仪器有限公司;ALC-310.3 型电子分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;DK-98-II 型电热恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;pHS-3C 型精密 pH 计,塞多利斯科学仪器(北京)有限公司;LD4-2A 型离心机,北京医用离心机厂;电动搅拌器,金坛市医疗仪器厂;DHG-9240 型电热恒温鼓风干燥箱,上海一恒科技有限公司;电磁炉,广东容声电器股份有限公司;721 型分光光度计,上海元析仪器有限公司;游标卡尺,上海量具刃具厂有限公司;S-3400N 型扫描电子显微镜,日立扫描电镜公司。

### 1.3 加工工艺及要点

大豆钙肽产品的加工工艺为:大豆蛋白→大豆蛋白液→加入蛋白酶,酶解→灭酶→离心取上清液→冷冻干燥→取一定量加入氯化钙→螯合→冷冻干燥→大豆钙肽产品。其工艺要点如下:

(1)大豆蛋白液制备:取大豆蛋白溶于水中,制成蛋白溶液,可加热加速其溶解。加入 1 mol/L 的氢氧化钠将蛋白溶液 pH 值调节至 7.0~8.0。

(2)酶解:向蛋白溶液中准确加入一定比例的碱性蛋白酶,将溶液调节至该蛋白酶最适条件(pH 值 8.0,最适温度 50℃)进行水解,pH 值保持恒定,偏差在  $\pm 0.01$  范围内。

(3)灭酶:待反应结束后,溶液迅速升温至 90℃,灭酶 10 min。

(4)离心、冷冻干燥:灭酶后冷却至室温(20℃),pH 值调到 7.0,离心(4 000 r/min,20 min),收集上清液,即大豆肽溶液,冷冻干燥。

(5)螯合:50 g/L 的肽溶液与 0.04 mol/L 氯化钙按一定肽钙比(肽溶液与氯化钙溶液质量比)进行混合,调节 pH 值,充分混合后,在一定温度下反应一段时间。

(6)成品:螯合后进行冷冻干燥,即得大豆肽-钙成品。

### 1.4 检测方法

钙结合量的测定采用邻甲酚酞比色法;溶解性的测定采用双缩脲法。

### 1.5 试验设计

#### 1.5.1 单因素试验

(1)肽钙比

选择 1、2、3、4、5、6 共 6 个肽钙比,固定 pH 值

6.0,反应时间 30 min,反应温度 35℃ 的条件下,对钙结合量进行测定,以研究肽钙比对钙结合量的影响。

(2)反应温度

选择 30、35、40、45、50℃ 共 5 个温度梯度,固定肽钙比为 2,pH 值 7.0,反应时间为 45 min 的条件下,对钙结合量进行测定,以研究反应温度对钙结合量的影响。

(3)反应时间

选择 25、30、35、40、45、50 min 共 6 个时间梯度,固定肽钙比为 2,pH 值 7.0,反应温度 35℃ 的条件下,对钙结合量进行测定,以研究反应时间对钙结合量的影响。

(4)pH 值

选择 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 共 5 个 pH 值,固定肽钙比为 2,反应时间 30 min,反应温度 35℃ 的条件下,对钙结合量进行测定,以研究 pH 值对钙结合量的影响。

1.5.2 大豆肽-钙合成工艺优化

在单因素试验的基础上,设计 Box - Benhnken 的中心组合试验,选取四因素三水平的响应面分析试验对大豆钙肽合成工艺进行优化。

1.6 大豆肽-钙螯合物的分子量分布测定

利用高效液相色谱法对大豆肽-钙螯合物的分子量分布情况进行表征<sup>[18]</sup>。采用乙腈-水-三氟乙酸(体积比 45:55:0.1)作为流动相,用于溶解大豆肽-钙螯合物样品,控制最终质量浓度为 5 mg/mL,通过滤膜过滤和超声后进样。试验参数设置:进样量为 20 μL,流速为 0.5 mL/min,柱温为 30℃,检测器波长为 214 nm,进样时间为 35 min。

1.7 试验数据处理

所有数据采用 Excel 2010 进行处理,并通过 SPSS 17.0 对数据进行单因素方差分析。采用 Design-Expert 7.0 软件,根据 Box - Benhnken 中心组合原理进行响应面试验设计和回归分析。

2 试验结果与分析

大豆分离蛋白在经过碱性蛋白酶水解后,形成小分子量的大豆肽,这些大豆肽在一定条件下可与钙离子结合,形成肽-钙螯合物。但在螯合过程中有许多因素制约着螯合物中的钙结合量<sup>[21]</sup>。因此,需要进一步讨论螯合工艺的最佳条件,确定最优螯合条件,从而达到高含钙量的目的。

2.1 螯合条件对钙结合量的影响

2.1.1 标准曲线的确定

邻甲酚酞与钙在 pH 值 11.0 ± 0.1 的缓冲液中

形成紫色络合物,利用可见分光光度计测定其吸光度,其最大吸收波长为 570 nm。用掩蔽剂(8-羟基喹啉)消除其他二价阳离子的干扰。反复测定 8 次,得出标准曲线如图 1 所示。

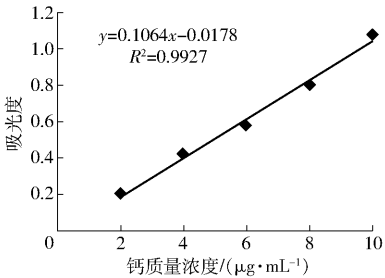


图 1 钙含量标准曲线

Fig.1 Standard curve of calcium content

2.1.2 肽钙比对钙结合量的影响

肽钙比是螯合工艺的重要参数,对钙结合量起着至关重要的作用。肽含量少,无法与钙完全结合;肽含量过多,与钙结合完仍有剩余,造成不必要的损耗<sup>[22]</sup>。在 pH 值 6.0、反应时间 30 min、反应温度 35℃ 的条件下,考察不同肽钙比对钙结合量的影响,试验结果如图 2 所示。

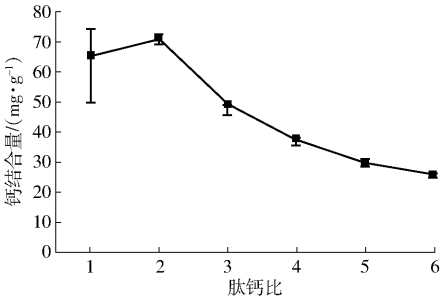


图 2 肽钙比对钙结合量的影响

Fig.2 Effect of peptide calcium ratio on calcium-binding capacity

从图 2 可以看出,当肽钙比为 2 时,钙结合量达到最大值 70.87 mg/g。继续增加肽钙比,钙结合量越来越低。呈现这种变化趋势主要是因为当肽钙比为 1 时,肽含量少,无法与钙完全结合;当肽钙比大于 2 时,与钙完全结合后,肽仍有剩余,导致每克中钙含量减少。因此,后续试验中选择肽钙比为 2 作为最适值。

2.1.3 pH 值对钙结合量的影响

pH 值是钙结合量的重要影响因素之一。在大豆肽与钙螯合反应中,—COO—有至关重要的作用。Ca<sup>2+</sup> 属于硬酸,易与氨基酸中的羧基发生配位作用,但与氮原子的配位作用较弱。在酸性条件下,大豆肽会发生解离生成—COO—,使得与 Ca<sup>2+</sup> 结合的—COO—增加,在 pH 值大于 6.5 时,由于质子化氨基的解离,可与 Ca<sup>2+</sup> 形成包括 O、N 配位原子的配合物,部分大豆肽与 Ca<sup>2+</sup> 通过吸附作用结合<sup>[23]</sup>,从

而使得钙结合量在 pH 值为 7 时达最大值。因在碱性条件下,OH<sup>-</sup>会与 Ca<sup>2+</sup> 反应产生 Ca(OH)<sub>2</sub>,影响大豆肽与钙的螯合,因此,本试验不研究碱性条件下的螯合。

在肽钙比为 2,反应时间 30 min,反应温度 35℃,分别在不同 pH 值的条件下进行螯合,然后测定钙结合量,试验结果如图 3 所示。通过此单因素试验可看出,在 pH 值为 7.0 时,钙结合量达到最大值,因此,在后续试验中选择 pH 值 7.0 作为最佳参数。

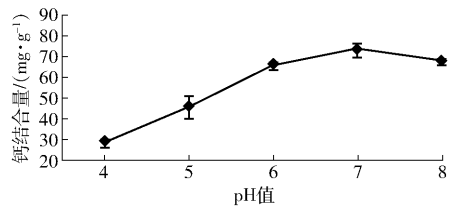


图 3 pH 值对钙结合量的影响

Fig. 3 Effect of pH value on calcium-binding capacity

2.1.4 反应时间对钙结合量的影响

在肽钙比为 2,控制 pH 值 7.0,反应温度 35℃的条件下,分别反应 25、30、35、40、45、50 min,然后测定钙结合量,考察反应时间对钙结合量的影响,结果如图 4 所示。

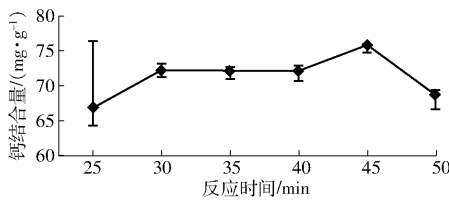


图 4 反应时间对钙结合量的影响

Fig. 4 Effect of reaction time on calcium-binding capacity

由图 4 可知,螯合反应是需要一定反应时间的,30 min 前反应较剧烈,30 min 后变化趋于平稳,当反应时间为 45 min 时,钙结合量达到最大值,即 75.89 mg/g。大豆肽与 Ca<sup>2+</sup> 通过吸附作用结合,随反应进行着动态的吸附和解析的过程,当 45 min 时整个过程达到动态平衡,因此,后续试验选择反应时间 45 min 为最佳参数。

2.1.5 反应温度对钙结合量的影响

在肽钙比为 2,pH 值 7.0,反应时间为 45 min 的条件下,选取反应温度为 30、35、40、45、50℃进行试验,然后测定钙结合量,考察反应温度对钙结合量的影响,结果见图 5。

从图 5 可看出,温度对钙结合量的影响也较明显,在反应温度为 40℃时,钙结合量达到最大值,而高于 40℃后钙结合量明显降低。由此可见,较高温度对大豆肽与钙结合是不利的。高温可能会使水分不断蒸发,部分氨基酸析出,螯合物分解或发生其它

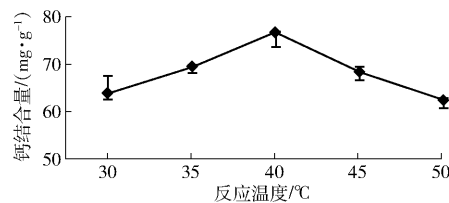


图 5 反应温度对钙结合量的影响

Fig. 5 Effect of reaction temperature on calcium-binding capacity

的反应;合适的温度有利于螯合向正方向发展,高于或低于这个温度都不利于螯合物生成<sup>[24]</sup>。因此,选择 40℃为最佳反应温度进行后续试验。

2.1.6 螯合工艺优化试验

根据单因素所得结果,以肽钙比、pH 值、反应时间、反应温度为响应变量,以钙结合量 Y 为响应值,采用响应面法中的中心组合设计进行大豆钙肽螯合最佳配比优化,响应面因素编码见表 1。

表 1 响应面因素编码

| Tab. 1 Factors and codes of response surface design |     |      |          |        |
|-----------------------------------------------------|-----|------|----------|--------|
| 编码                                                  | 因素  |      |          |        |
|                                                     | 肽钙比 | pH 值 | 反应时间/min | 反应温度/℃ |
| -1                                                  | 1.0 | 6.00 | 40       | 35     |
| 0                                                   | 1.5 | 6.75 | 45       | 40     |
| 1                                                   | 2.0 | 7.50 | 50       | 45     |

试验设计与结果见表 2,表 2 中 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub> 分别表示肽钙比、pH 值、反应时间、反应温度的编码值。采用 Design-Expert 软件对试验数据进行回归拟合分析,得到 4 个因素与响应值的模型回归方程为

$$Y = 76.2540 - 10.7483X_1 - 0.790833X_2 - 2.08333X_3 - 1.41083X_4 - 13.9099X_1^2 - 3.66867X_2^2 - 3.5199X_3^2 - 2.3137X_4^2 - 0.0100X_1X_2 - 0.4475X_1X_3 - 0.0325X_1X_4 + 0.1525X_2X_3 + 0.4850X_2X_4 - 0.0650X_3X_4$$

对建立模型进行方差分析和显著性检验,分析结果分别见表 3、4;响应面图见图 6~11。

由表 3 可以看出,响应面回归方程模型极显著, P<0.0001,表明试验数据与模型相符。模型的决定系数 R<sup>2</sup>=0.9953,调整决定系数 R<sup>2</sup><sub>adj</sub>=0.9905,变异系数为 1.45%,说明该二次模型能够拟合真实的试验结果,试验误差小。模型失拟项 P=0.056>0.05,表明失拟项不显著,模型与试验数据相符,模型拟合程度好,该模型可用于大豆肽-钙螯合制备工艺的理论分析与预测。

由表 4 可以看出,一次项 X<sub>1</sub>、X<sub>3</sub> 和 X<sub>4</sub> 的 P 值小于 0.0001,说明肽钙比、反应时间和反应温度对钙结合量的影响极显著,X<sub>2</sub> 的 P 值小于 0.05,说明 pH 值对钙结合量的影响显著;二次项 X<sub>1</sub><sup>2</sup>、X<sub>2</sub><sup>2</sup>、X<sub>3</sub><sup>2</sup> 和 X<sub>4</sub><sup>2</sup>



表 2 响应面试验结果

| Tab. 2 Experimental results of response surface |       |       |       |       |                                   |
|-------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-----------------------------------|
| 试验序号                                            | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | $X_4$ | $Y/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$ |
| 1                                               | -1    | -1    | 0     | 0     | 70.04                             |
| 2                                               | 1     | -1    | 0     | 0     | 48.37                             |
| 3                                               | -1    | 1     | 0     | 0     | 68.93                             |
| 4                                               | 1     | 1     | 0     | 0     | 47.22                             |
| 5                                               | 0     | 0     | -1    | -1    | 74.25                             |
| 6                                               | 0     | 0     | 1     | -1    | 69.79                             |
| 7                                               | 0     | 0     | -1    | 1     | 71.11                             |
| 8                                               | 0     | 0     | 1     | 1     | 66.39                             |
| 9                                               | -1    | 0     | 0     | -1    | 70.51                             |
| 10                                              | 1     | 0     | 0     | -1    | 50.08                             |
| 11                                              | -1    | 0     | 0     | 1     | 68.64                             |
| 12                                              | 1     | 0     | 0     | 1     | 48.08                             |
| 13                                              | 0     | -1    | -1    | 0     | 71.67                             |
| 14                                              | 0     | 1     | -1    | 0     | 69.14                             |
| 15                                              | 0     | -1    | 1     | 0     | 67.28                             |
| 16                                              | 0     | 1     | 1     | 0     | 65.36                             |
| 17                                              | -1    | 0     | -1    | 0     | 72.18                             |
| 18                                              | 1     | 0     | -1    | 0     | 50.77                             |
| 19                                              | -1    | 0     | 1     | 0     | 69.25                             |
| 20                                              | 1     | 0     | 1     | 0     | 46.05                             |
| 21                                              | 0     | -1    | 0     | -1    | 73.82                             |
| 22                                              | 0     | 1     | 0     | -1    | 71.46                             |
| 23                                              | 0     | -1    | 0     | 1     | 69.59                             |
| 24                                              | 0     | 1     | 0     | 1     | 69.17                             |
| 25                                              | 0     | 0     | 0     | 0     | 76.84                             |
| 26                                              | 0     | 0     | 0     | 0     | 75.62                             |
| 27                                              | 0     | 0     | 0     | 0     | 76.35                             |
| 28                                              | 0     | 0     | 0     | 0     | 76.47                             |
| 29                                              | 0     | 0     | 0     | 0     | 75.99                             |

表 3 方差分析

| Tab. 3 Variance analysis of regression equation |     |          |         |        |          |
|-------------------------------------------------|-----|----------|---------|--------|----------|
| 来源                                              | 自由度 | 平方和      | 均方      | $F$    | $P$      |
| 模型                                              | 14  | 2 739.92 | 195.709 | 210.35 | <0.000 1 |
| 线性                                              | 4   | 1 469.79 | 367.448 | 394.94 | <0.000 1 |
| 平方                                              | 4   | 1 268.27 | 317.068 | 340.79 | <0.000 1 |
| 交互作用                                            | 6   | 1.86     | 0.309   | 0.33   | 0.909    |
| 残差                                              | 14  | 13.03    | 0.930   |        |          |
| 失拟                                              | 10  | 12.15    | 1.215   | 5.58   | 0.056    |
| 纯误差                                             | 4   | 0.87     | 0.218   |        |          |
| 合计                                              | 28  | 2 752.95 |         |        |          |

的  $P$  值小于 0.000 1, 具有极高的显著性, 其他交互项的  $P$  值大于 0.05, 各交互作用对钙结合量的影响均不显著, 说明钙结合量的变化相对复杂, 各因素对钙结合量的影响不是简单的线性关系, 响应面效应显著。

由图 6 ~ 11 可以看出, 钙结合量随着肽钙比、pH 值、反应时间、反应温度的增加均呈现出先升高后降低的趋势, 但增加和降低都较缓慢。从等高线

表 4 回归方程系数显著性检验

| Tab. 4 Significance test for each coefficient in established regression model |         |          |     |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------|----------|-----|
| 项                                                                             | $T$     | $P$      | 显著性 |
| 常量                                                                            | 176.773 | <0.000 1 | **  |
| $X_1$                                                                         | -38.601 | <0.000 1 | **  |
| $X_2$                                                                         | -2.840  | 0.013    | *   |
| $X_3$                                                                         | -7.482  | <0.000 1 | **  |
| $X_4$                                                                         | -5.067  | <0.000 1 | **  |
| $X_1^2$                                                                       | -36.728 | <0.000 1 | **  |
| $X_2^2$                                                                       | -9.687  | <0.000 1 | **  |
| $X_3^2$                                                                       | -9.294  | <0.000 1 | **  |
| $X_4^2$                                                                       | -6.109  | <0.000 1 | **  |
| $X_1X_2$                                                                      | -0.021  | 0.984    |     |
| $X_1X_3$                                                                      | -0.928  | 0.369    |     |
| $X_1X_4$                                                                      | -0.067  | 0.947    |     |
| $X_2X_3$                                                                      | 0.316   | 0.757    |     |
| $X_2X_4$                                                                      | 1.006   | 0.332    |     |
| $X_3X_4$                                                                      | -0.135  | 0.895    |     |

注: \*\* 代表差异极显著 ( $P < 0.01$ ); \* 代表差异显著 ( $P < 0.05$ )。

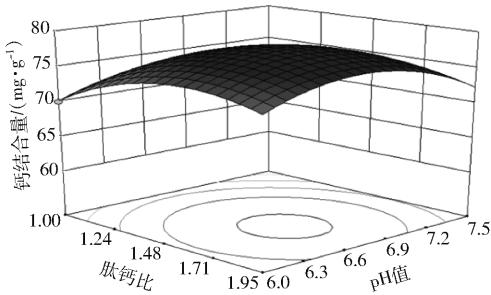


图 6 肽钙比和 pH 值对钙结合量影响的响应面图  
Fig. 6 Response surface plot for effect of peptide calcium ratio and pH value to calcium chloride on chelate ratio

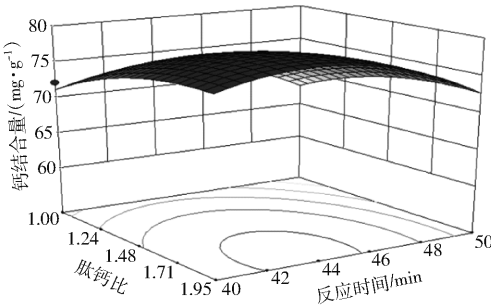


图 7 肽钙比和反应时间对钙结合量影响的响应面图  
Fig. 7 Response surface plot for effect of peptide calcium ratio and reaction time to calcium chloride on chelate ratio

形状可以看出, 各因素之间的交互作用均不显著。

利用 Design-Expert 软件计算得到大豆钙肽螯合的最佳工艺参数为: 肽钙比 1.62、pH 值 6.65、反应时间 43.64 min、反应温度 38.43℃, 钙结合量的预测值为 78.86 mg/g。从实际操作考虑其可行性, 最佳工艺参数修改为: 肽钙比 1.6、pH 值 6.6、反应时间 44 min、反应温度 38℃。在此条件下进行验证试

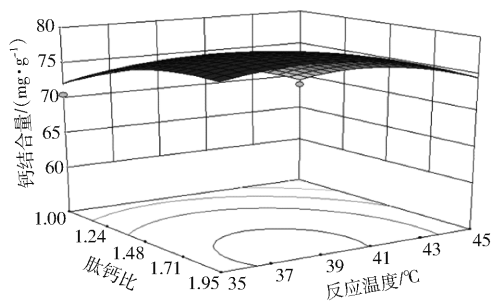


图 8 肽钙比和反应温度对钙结合量影响的响应面图  
Fig.8 Response surface plot for effect of peptide calcium ratio and reaction temperature to calcium chloride on chelate ratio

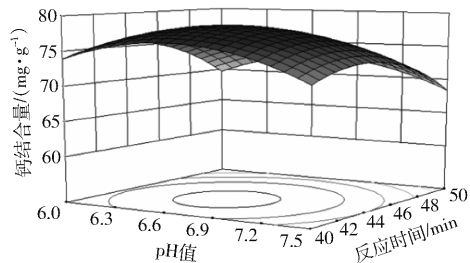


图 9 pH 值和反应时间对钙结合量影响的响应面图  
Fig.9 Response surface plot for effect of pH value and reaction time to calcium chloride on chelate ratio

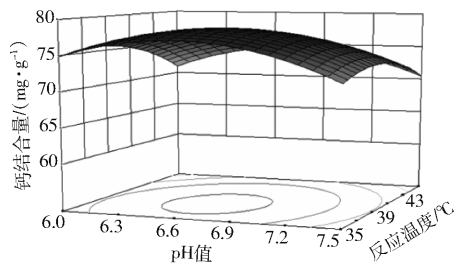


图 10 pH 值和反应温度对钙结合量影响的响应面图  
Fig.10 Response surface plot for effect of pH value and reaction temperature to calcium chloride on chelate ratio

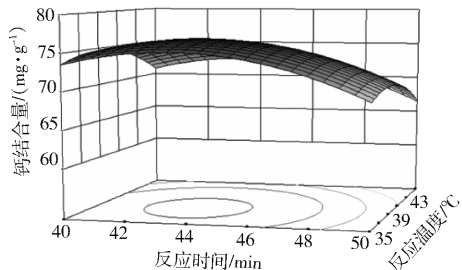


图 11 反应时间和反应温度对钙结合量影响的响应面图  
Fig.11 Response surface plot for effect of reaction time and reaction temperature to calcium chloride on chelate ratio

验,重复3次,最终得到钙结合量平均值为78.73 mg/g,与理论预测值相差0.13 mg/g,说明利用此优化方法得到的大豆肽-钙的制备工艺是可靠的。

2.2 大豆肽-钙的溶解性

采用双缩脲法测定大豆肽-钙溶解性,得到标准

曲线如图 12 所示。双缩脲法是基于铜离子与蛋白质之间的反应,溶解于碱性溶液中的硫酸铜加入蛋白质溶液中,二价的铜被还原成一价铜并在碱性环境中与蛋白质分子肽键中的氮形成络合物,该络合物呈紫红色,可在 540 nm 处进行检测,吸光度与蛋白质质量浓度成正比。

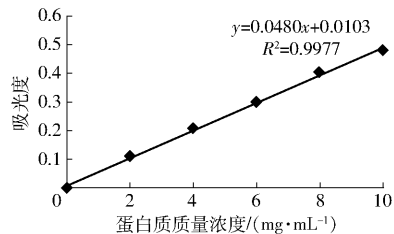


图 12 溶解性标准曲线  
Fig.12 Standard curve of solubility

标准曲线线性良好,可用于溶解性计算。经过 3 次重复实验,得到大豆钙肽溶解度最终平均值为 98.59%。

2.3 大豆肽-钙分子量分布

图 13 所示为大豆肽-钙螯合物的分子量分布情况,试验结果得出:分子量大于 5 000 Da 的大豆肽-钙螯合物占总体的 1.76%;3 000 ~ 5 000 Da 的占总体的 2.79%;2 000 ~ 3 000 Da 的占总体的 3.51%;1 000 ~ 2 000 Da 的占总体的 11.70%;500 ~ 1 000 Da 的占总体的 25.87%;180 ~ 500 Da 的占总体的 47.91%;小于 180 Da 的占总体的 6.64%。由此可知分子量小于 5 000 Da 的占绝大多数,是总体的 98.24%,其中 180 ~ 500 Da 占比最大。优质大豆肽的分子量应小于 1 000 Da,本试验所得分子量小于 1 000 Da 的大豆肽-钙螯合物占总体的 80.24%。曾有研究发现,分子量大于 1 000 Da 的肽段与小于 1 000 Da 的肽段相比,更易参与大豆肽-钙螯合物的形成,这与本研究得到的结果有所不同,这可能是由于酶种类、效果及改性方式的差异所引起的<sup>[18]</sup>。此外,文献[25]采用超滤发现分子量低于1 000 Da 的虾蛋白肽具有较高的钙结合量,这说明金属离子与不同相对分子量肽的结合与肽的来源也密切相关。

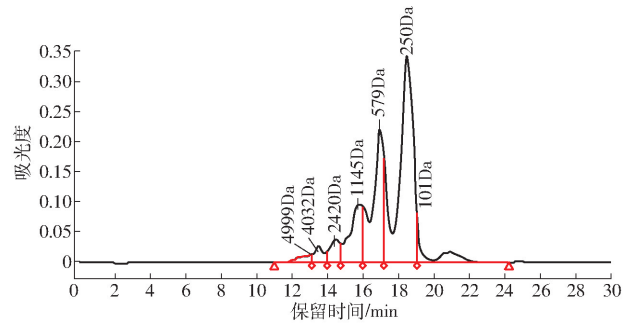


图 13 分子量分布图  
Fig.13 Molecular weight distribution map

3 结论

(1)通过试验确定了肽钙比、反应时间、反应温度和 pH 值对钙结合量的影响,通过单因素试验和响应面试验设计,确定最佳螯合工艺为:钙肽比 1.6,pH 值 6.6,反应温度 38℃,反应时间为 44 min,

通过此工艺制备所得大豆肽-钙螯合物中钙结合量为 78.73 mg/g。  
(2)大豆肽-钙螯合物的溶解度为 98.59%。大豆钙肽螯合物的分子量大于 5 000 Da 的占总体的 1.76%,小于 5 000 Da 的占 98.24%,小于 1 000 Da 的占 80.24%,其中分子量 180~500 Da 占比最大。

参 考 文 献

[1] RIZZO G, BARONI L. Soy foods and their role in vegetarian diets[J]. *Nutrients*, 2018, 10(1): 43.

[2] DING Y, LI X, KAN J. Isolation and identification of flavor peptides from douchi (traditional Chinese soybean food)[J]. *International Journal of Food Properties*, 2017, 20(Supp. 2):1982-1994.

[3] 丁俭, 齐宝坤, 姜楠, 等. 超声处理大豆分离蛋白-壳聚糖复合物结构性性质研究[J/OL]. *农业机械学报*, 2017, 48(9): 352-358.  
DING Jian, QI Baokun, JIANG Nan, et al. Structural properties of soybean protein isolate-chitosan complex treated by ultraasonic[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2017, 48(9): 352-358. [http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view\\_abstract.aspx?flag=1&file\\_no=20170945&journal\\_id=jcsam](http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20170945&journal_id=jcsam). DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2017.09.045. (in Chinese)

[4] 刘志胜, 李里特, 辰巳英三. 大豆蛋白营养品质和生理功能研究进展[J]. *大豆科学*, 2000, 19(3): 263-268.  
LIU Zhisheng, LI Lite, EIZO Tatsumi. Nutritional quality and physiological functions of soy protein, a review[J]. *Soybean Science*, 2000, 19(3): 263-268. (in Chinese)

[5] 杨杨, 郭庆启, 张娜, 等. 利用红外光谱与原子力显微技术揭示纳米级大豆肽结构及其与溶解性的关系[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(22): 7-11.  
YANG Yang, GUO Qingqi, ZHANG Na, et al. Relationship between the structure and solubility of nano-soybean peptides revealed by infrared spectroscopy and atomic force microscopy[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(22): 7-11. (in Chinese)

[6] XU J, JIANG L Z, LI Y, et al. Antioxidative capacity of peptides isolated from soybean meal[J]. *Advanced Materials Research*, 2012, 554-556:1381-1386.

[7] 刘静波, 刘畅, 赵颂宁, 等. 不同分子质量的大豆肽螯合钙工艺优化[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(6): 146-152.  
LIU Jingbo, LIU Chang, ZHAO Songning, et al. Process optimization of soybean peptide chelated calcium of different molecular weights[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(6): 146-152. (in Chinese)

[8] YIMIT D, HOXUR P, AMAT N, et al. Effects of soybean peptide on immune function, brain function, and neurochemistry in healthy volunteers[J]. *Nutrition*, 2012, 28(2): 154-159.

[9] RAYAPROLU S J, HETTIARACHCHY N S, HORAX R, et al. Soybean peptide fractions inhibit human blood, breast and prostate cancer cell proliferation[J]. *Journal of Food Science & Technology*, 2017, 54(1): 38-44.

[10] LIU H, LV Y, XU J, et al. Soybean peptide aggregates improved calcium binding capacity[J]. *LWT—Food Science and Technology*, 2016, 67: 174-180.

[11] LIU F R, WANG L, WANG R, et al. Calcium-binding capacity of wheat germ protein hydrolysate and characterization of peptide-calcium complex[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(31):7537-7544.

[12] 关爽,刘宇杭,孙博,等. 林蛙皮胶原多肽螯合钙的制备及表征[J]. *食品科技*, 2018, 43(11):132-138.  
GUAN Shuang, LIU Yuhang, SUN Bo, et al. Preparation and structure characterization of calcium chelate from collagen polypeptide[J]. *Food Science and Technology*, 2018, 43(11):132-138. (in Chinese)

[13] 刘凤茹. 麦胚蛋白聚集行为及其钙离子螯合肽的制备与评价[D]. 无锡: 江南大学, 2014.

[14] 牛秋娥, 崔腊凤. 氨基酸螯合钙在预防妊娠高血压病中的作用[J]. *临床和实验医学杂志*, 2007, 6(4): 103.

[15] WANG X, GAO A, CHEN Y, et al. Preparation of cucumber seed peptide-calcium chelate by liquid state fermentation and its characterization[J]. *Food Chemistry*, 2017, 229:487-494.

[16] LV Y, BAO X, LIU H, et al. Purification and characterization of calcium-binding soybean protein hydrolysates by Ca<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> immobilized metal affinity chromatography (IMAC)[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(3):1645-1650.

[17] 温雪琴, 刘岫, 黄弢, 等. 大豆粕碱性蛋白酶水解肽及 ACE 抑制活性的研究[J]. *食品研究与开发*, 2014, 35(9):9-12.  
WEN Xueqin, LIU Shen, HUANG Tao, et al. ACE inhibitory activity on hydrolytic peptides from soybean meal hydrolyzed by alkaline protease[J]. *Food Research and Development*, 2014, 35(9):9-12. (in Chinese)

[18] 崔宇, 王小林, 孔祥珍, 等. 大豆肽螯合钙能力影响因素的研究[J]. *中国油脂*, 2018, 43(2):70-77.  
CUI Yu, WANG Xiaolin, KONG Xiangzhen, et al. Effect factors of calcium-binding capacity of soybean peptides[J]. *China Oils and Fats*, 2018,43(2):70-77. (in Chinese)

2015. (in Chinese)
- [14] 何忠波, 柏果, 薛光明, 等. 磁致伸缩式振动能量回收技术研究进展 [J]. 机床与液压, 2019, 47(5): 144 – 150.  
HE Zhongbo, BAI Guo, XUE Guangming, et al. Research progress on magnetostrictive vibration energy harvesting technology [J]. Machine Tool & Hydraulic, 2019, 47(5): 144 – 150. (in Chinese)
- [15] 王博文, 曹淑瑛, 黄文美. 磁致伸缩材料与器件 [M]. 北京: 冶金工业出版社, 2008.
- [16] STACHOWIAK D. The influence of magnetic bias and prestress on magnetostriction characteristics of a giant magnetostrictive actuators [J]. Przegląd Elektrotechniczny, 2013, 89(4): 233 – 236.
- [17] BRAGHIN F, CINQUEMANI S, RESTA F. A low frequency magnetostrictive inertial actuator for vibration control [J]. Sensors and Actuators, 2012, 180(6): 67 – 74.
- [18] 王志华. 超磁致伸缩式与永磁式振动发电的理论及实验研究 [D]. 天津: 河北工业大学, 2010.  
WANG Zhihua. Theoretical and experimental studies of vibration-to-electrical power generation based on giant magnetostrictive and permanent magnetic materials [D]. Tianjin: Hebei University of Technology, 2010. (in Chinese)
- [19] 唐志峰, 吕福在, 项占琴. 影响超磁致伸缩执行器中逆效应性能的主要因素 [J]. 机械工程学报, 2007, 43(12): 133 – 143.  
TANG Zhifeng, LÜ Fuzai, XIANG Zhanqin. Main factors of converse effect performance in giant magne-tostrictive actuator [J]. Chinese Journal of Mechanical Engineering, 2007, 43(12): 133 – 143. (in Chinese)
- [20] 吴大正. 电路基础 [M]. 北京: 国防工业出版社, 1979.
- 

(上接第 385 页)

- [19] 张美玲, 赵新淮. 大豆蛋白水解物的酶法修饰及其亚铁和钙离子的螯合能力 [J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(12): 26 – 30.  
ZHANG Meiling, ZHAO Xinhuai. Enzymatic modification of soybean protein hydrolysates by plastein reaction and its influence on chelating activities for ferrous and calcium ions [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(12): 26 – 30. (in Chinese)
- [20] 王小林, 孔祥珍, 华欲飞, 等. 大豆分离蛋白肽钙螯合物的制备及表征 [J]. 中国油脂, 2017, 42(7): 50 – 54.  
WANG Xiaolin, KONG Xiangzhen, HUA Yufei, et al. Preparation and characterization of soybean protein isolate peptide-calcium chelate [J]. China Oils and Fats, 2017, 42(7): 50 – 54. (in Chinese)
- [21] JENS A N. Enzymatic hydrolysis of food protein [M]. London and New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 100 – 169.
- [22] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMMAM C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis [J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642 – 646.
- [23] 孙莉洁, 梁金钟. 响应面法优化大豆肽与钙离子螯合的研究 [J]. 中国粮油学报, 2010, 25(1): 22 – 27.  
SUN Lijie, LIANG Jinzhong. Optimization of chelation of soybean peptides with calcium using response surface method [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2010, 25(1): 22 – 27. (in Chinese)
- [24] 张玉, 王伟, 张一帆, 等. 响应面法优化蚕蛹蛋白源  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽酶解条件 [J]. 中国食品学报, 2016, 16(4): 137 – 144.  
ZHANG Yu, WANG Wei, ZHANG Yifan, et al. The enzymatic hydrolysis condition optimization of  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory peptides of silkworm Pupa protein by response surface methodology [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(4): 137 – 144. (in Chinese)
- [25] HUANG G, REN L, JIANG J. Purification of a histidine-containing peptide with calcium binding activity from shrimp processing byproducts hydrolysate [J]. European Food Research and Technology, 2011, 232(2): 281 – 287.