

复合蛋白酶水解高温变性豆粕的研究

王金玲¹,江连洲^{1,2,*},许晶³,李杨¹,杨柳¹

(1.东北农业大学食品学院,黑龙江哈尔滨 150030;
2.国家大豆工程技术研究中心,黑龙江哈尔滨 150030;
3.东北农业大学理学院,黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:以高温变性豆粕为原料,采用单因素和正交实验方法,对高温变性豆粕在复合蛋白酶作用下的水解特性进行深入研究。考查高温变性豆粕中蛋白质水解度随酶添加量、酶解温度、酶解时间、pH及底物浓度的变化规律,得到了水解高温变性豆粕的最佳水解条件。结果表明,复合蛋白酶水解高温变性豆粕的最佳条件为:酶添加量 18000U/g,温度 55℃,水解时间 4h,pH 为 7.0,底物浓度 9%。此条件下高温变性豆粕中蛋白质水解度可达到 36.8%。

关键词:高温变性豆粕,复合蛋白酶,水解度

Study on hydrolysis of the high-temperature soybean meal by protamex protease

WANG Jin-ling¹,JIANG Lian-zhou^{1,2,*},XU Jing³,LI Yang¹,YANG Liu¹

(1.College of Food,Northeast Agricultural University,Harbin 150030,China;
2.National Research Centre of Soybean Engineering and Technology,Harbin 150030,China;
3.College of Science,Northeast Agricultural University,Harbin 150030,China)

Abstract:The hydrolysis characteristics of the high-temperature soybean meal hydrolyzed with protamex protease was studied systematically, by using single factor experiment and orthogonal experiment method. Through the effects of enzyme quantity, temperature, time, pH and substract concentration during the hydrolysis were studied, the optimized conditions of hydrolysis were gotten. Results indicated that the optimum hydrolysis conditions of the high-temperature soybean meal by protamex protease are the following: enzyme quantity 18000U/g, temperature 55℃, time 4h, pH 7.0 and substract concentration 9%. In such a condition, the degree of hydrolysis of the high-temperature soybean could reach 36.8%.

Key words: high-temperature soybean meal; protamex protease; degree of hydrolysis

中图分类号: TS229

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2010)07-0298-04

在我国,榨油是大豆的一个传统且非常重要的用途。高温变性豆粕是由大豆浸油后,经高温脱溶而得的副产品,它含有大豆中全部蛋白质,具有很高的开发和利用价值^[1]。但由于高温变性豆粕中蛋白质几乎全部变性,用物理方法几乎无法分离出食用蛋白^[2],所以目前主要应用于饲料及酿造食品原料,未能充分发挥大豆蛋白资源的潜在作用,造成了一定的资源浪费。近年国内相继报道了利用大豆分离蛋白、低温豆粕为原料,制备大豆肽的研究^[3-6],但以高温变性豆粕为原料,酶法水解制备大豆肽的报道较少。利用生物酶技术可将高温变性豆粕中蛋白质降解成小分子肽或氨基酸,为生产大豆活性肽提供新的原料,最终实现充分利用高温变性豆粕来提取可食用大豆蛋白、缓解日益紧缺的蛋白资源的目的。

利用复合蛋白酶水解大豆蛋白,与其他多种内切蛋白酶相比,即使在低水解度的条件下也不会产生苦味的蛋白质水解物^[6]。为此,作者在大量实验的基础上,对高温变性豆粕中蛋白质在复合蛋白酶作用下的酶解特性进行了深入研究,以获得利用高温变性豆粕制备大豆肽的最佳工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

高温变性豆粕 黑龙江省九三油脂有限公司;复合蛋白酶 丹麦 novo 公司(经测定酶活为 100000U/g)。

酸度计(pHS-25型) 上海伟业仪器厂;电子分析天平(AE100) 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;离心机(LD4-2A) 北京医用离心机厂;可见分光光度计(722-P) 上海光谱科学仪器有限公司;消化仪(HYP) 上海纤检仪器有限公司;半自动定氮仪(KDN-0413) 上海新嘉电子有限公司。

1.2 实验方法

收稿日期:2009-08-18 * 通讯联系人

作者简介:王金玲(1984-),女,在读硕士研究生,研究方向:粮食油脂及植物蛋白。

1.2.1 测定方法 粗蛋白含量测定:GB/T 5009.5-2003;水分测定:GB/T 5009.3-2003;脂肪测定:GB/T 5009.6-2003;酶活力测定:福林-酚法^[7];水解度测定:pH-stat法^[8-10],通过pH-stat法计算蛋白质的水解度,公式如下:

$$\text{水解度(DH, \%)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}}}{(\alpha \times M_p \times H_{\text{tot}})} \times 100\%$$

式中: V_{NaOH} :消耗碱液的体积(mL); N_{NaOH} :消耗碱液的摩尔浓度(mol/L); α :氨基酸的解离数; M_p :参加水解的蛋白总量(g); H_{tot} :每克原料蛋白质中肽键的毫摩尔数(mmol/g)。

1.2.2 样品制备 将高温变性豆粕粉碎后过40目筛(预实验测得此条件下豆粕样品蛋白含量高并且水解效果相对较好),备用。

1.2.3 酶解工艺及操作要点

过40目筛样品 $\xrightarrow{\text{一定条件下酶解}}$ 酶解液 $\xrightarrow{\text{高温灭活,离心分离}}$ 水解产物备用

按照实验设计方案(参考复合蛋白酶水解大豆分离蛋白工艺条件)^[6,11-12],配制一定底物浓度的高温变性豆粕溶液,放置于反应装置中,在一定的温度、pH条件下,添加适量的蛋白酶进行酶解;酶解过程中不断进行搅拌,利用1N的NaOH溶液调节反应体系pH恒定不变,反应结束后记录消耗NaOH溶液的体积,利用pH-stat法计算高温变性豆粕的水解度。

2 结果与讨论

2.1 高温变性豆粕常规指标的测定

蛋白含量为46.60%,脂肪含量为1.02%,水分含量为11.10%,糖分含量为32.78%,灰分含量为4.03%。

2.2 复合蛋白酶最佳水解条件的确定^[13-14]

2.2.1 最佳酶添加量的确定 在温度55℃,pH7.0,底物浓度7%,酶添加量分别为6000、10000、14000、18000、22000U/g的条件下酶解3h,研究酶添加量对水解度的影响,实验结果见图1。

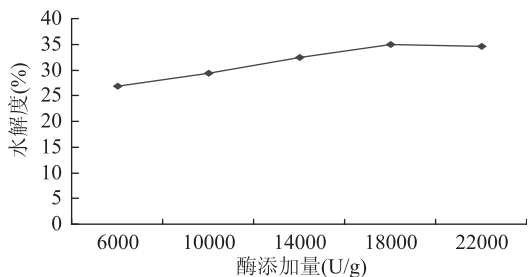


图1 酶添加量对水解度的影响

由图1可以看出,水解度随着蛋白酶添加量的增加逐渐升高。在酶添加量较低时,水解度增加幅度较大;当酶添加量达18000U/g时,水解度达到最大;当酶添加量大于18000U/g后,水解度变化缓慢。可能因为底物浓度一定时,酶添加量的增加使蛋白酶与蛋白质分子肽键的接触概率增加,则水解度也就相应增加;随着酶添加量的进一步增加,底物被饱和,过剩的酶分子没有底物可以作用。在实际生产中,要综合考虑水解度和生产成本,以达到低成本高

效率的要求,因此最佳酶添加量确定为18000U/g。

2.2.2 最佳酶解温度的确定 在pH7.0,酶添加量18000U/g,底物浓度7%,酶解温度分别为45、50、55、60、65℃的条件下酶解3h,研究酶解温度对水解度的影响,实验结果见图2。

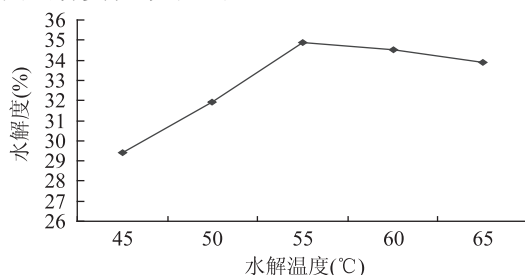


图2 酶解温度对水解度的影响

由图2可以看出,在45~55℃的范围内,随着温度的升高,水解度也随着升高;当温度达到55℃时,水解度达到最大值;之后随着温度的升高,水解度呈现明显的下降趋势。可能因为适当的加热可使酶活性达到最佳状态,同时也使蛋白质结构疏松,暴露出更多的酶作用位点;但当温度过高时,酶蛋白部分变性,反应速度下降^[15],因此最佳酶解温度确定为55℃。

2.2.3 最佳酶解时间的确定 在温度55℃,pH7.0,酶添加量18000U/g,底物浓度7%的条件下,分别酶解1、2、3、4、5h,研究酶解时间对水解度的影响,实验结果见图3。

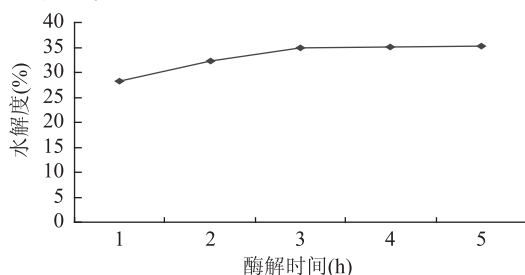


图3 酶解时间对水解度的影响

由图3可以看出,随着时间的延长,水解度随之升高;当时间达到3h时,水解度基本达到最大值;之后随时间的增加水解度的变化不明显。可能因为蛋白酶的专一性,蛋白酶可水解的肽键会随着时间的延长而逐渐减少,同时蛋白酶的活力以半衰期方式下降^[15]。因此,综合考虑成本问题,最佳酶解时间确定为3h。

2.2.4 最适pH的确定 在温度55℃,酶添加量18000U/g,底物浓度7%,pH分别为6.5、7.0、7.5、8.0、8.5的条件下酶解3h,研究pH对水解度的影响,实验结果见图4。

由图4可以看出,在pH为6.5~7.0时,随着pH增大,水解度呈现上升趋势;在pH为7.0时水解度达到最大值;随着pH的继续增大,水解度呈现下降趋势。可能因为溶液pH是决定酶催化活性的重要参数之一,一方面过酸过碱可改变酶的空间构象,使酶失活;另一方面,pH还可以改变反应底物的解离状态,影响其与酶的结合^[16]。因此,最适pH确定为7.0。

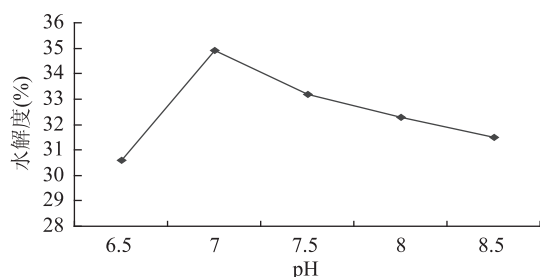


图4 pH对水解度的影响

2.2.5 最佳底物浓度的确定 在温度 55℃, pH7.0, 酶添加量 18000U/g, 底物浓度分别为 3%、5%、7%、9%、11%、13% 的条件下酶解 3h, 研究底物浓度对水解度的影响, 实验结果见图 5。

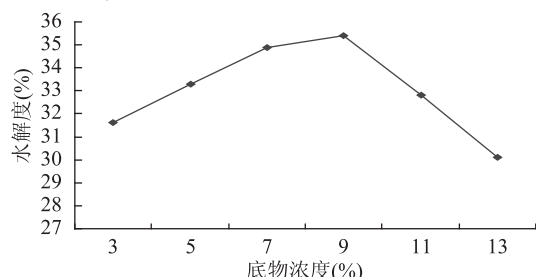


图5 底物浓度对水解度的影响

由图 5 可以看出, 底物浓度在 3%~9% 范围内, 水解度随着底物浓度的增加呈现上升趋势; 在底物浓度为 9% 时水解度达到最大值; 随着底物浓度的继续增加, 水解度呈现下降趋势。可能因为随着底物浓度的增加, 与蛋白酶作用的底物分子也增加, 酶解液中可溶性蛋白增多, 故水解度上升; 在底物浓度进一步增加时, 不断加热会使蛋白分子出现交联聚合现象, 溶解性差, 黏度增大, 从而降低了其与蛋白酶之间的接触几率, 故水解度有所下降^[12]。因此, 最佳底物浓度确定为 9%。

2.3 正交实验方案及结果分析^[17]

2.3.1 正交实验方案 根据单因素实验所得结果, 采用了 $L_{16}(4^5)$ 正交表(表 1)来考察五个因素对水解度的影响。

表1 正交实验方案表

水平	因素				
	A 底物浓度 (%)	B 酶添加量 (U/g 底物)	C pH	D 温度 (°C)	E 反应时间 (h)
1	5	10000	7.0	50	2
2	7	14000	7.5	55	3
3	9	18000	8.0	60	4
4	11	22000	8.5	65	5

2.3.2 正交实验结果分析 以水解度为指标, 正交实验结果见表 2。

由极差分析可知, 各因素对水解度的影响主次顺序为: 酶添加量 = 酶解温度 > pH > 底物浓度 > 酶解时间。复合蛋白酶酶解高温变性豆粕的最优条件组合为 $A_3B_3C_1D_2E_3$, 即底物浓度 9%, 酶添加量 18000U/g, 酶解温度 55℃、pH7.0, 酶解时间 4h。通过验证实验, 在此条件下水解度可达到 36.8%。

3 结论

3.1 复合蛋白酶水解高温变性豆粕的最佳工艺条件

表2 复合蛋白酶水解高温变性豆粕正交实验结果

实验号	A	B	C	D	E	水解度 (%)
1	1	1	1	1	1	21.4
2	1	2	2	2	2	30.0
3	1	3	3	3	3	30.1
4	1	4	4	4	4	27.8
5	2	1	2	3	4	26.9
6	2	2	1	4	3	34.1
7	2	3	4	1	2	27.5
8	2	4	3	2	1	30.6
9	3	1	3	4	2	28.1
10	3	2	4	3	1	27.3
11	3	3	1	2	4	36.8
12	3	4	2	1	3	27.8
13	4	1	4	2	3	27.7
14	4	2	3	1	4	28.2
15	4	3	2	4	1	29.9
16	4	4	1	3	2	32.2
K_1	109.3	104.1	124.5	104.9	109.2	
K_2	119.1	119.6	114.6	125.1	117.8	
K_3	120.0	124.3	117.0	116.5	119.7	
K_4	118.0	118.4	110.3	119.9	119.7	
k_1	27.325	26.025	31.125	26.225	27.300	
k_2	29.775	29.900	28.650	31.275	29.450	
k_3	30.000	31.075	29.250	29.125	29.925	
k_4	29.500	29.600	27.575	29.975	29.925	
R	2.675	5.050	3.550	5.050	2.625	
优水平				$A_3B_3C_1D_2E_3$		
影响				$B = D > C > A > E$		
次序						

为: pH7.0, 酶解温度 55℃, 底物浓度 9%, 酶用量 18000U/g, 酶解时间 4h。在最适的水解条件下, 复合蛋白酶水解高温变性豆粕水解度为 36.8%。

3.2 高温变性豆粕含有丰富的大豆蛋白, 本工艺将其酶解制得大豆肽产品, 大大降低了大豆肽的成本, 同时, 提高了高温变性豆粕的附加值。本研究为合理利用高温变性豆粕中的蛋白资源提供了理论基础, 可为今后的研究提供借鉴。

参考文献

- [1] 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, 32(11): 36-39.
- [2] 石彦国, 张朝, 毛伟杰. 胃蛋白酶水解高变性豆粕的蛋白质的研究[J]. 大豆通报, 1997(4): 20.
- [3] 夏宁, 高媛, 迟玉杰. 蛋白酶水解低温豆粕制备大豆寡肽的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 171-172.
- [4] 李玉珍, 肖怀秋, 兰立新, 等. 2709 碱性蛋白酶酶解大豆分离蛋白的研究[J]. 中国酿造, 2008, (5): 21-23.
- [5] 王文杰, 王璋, 许时婴. 两种蛋白酶水解大豆分离蛋白的特性研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(11): 117-120.
- [6] 周媛媛, 周瑞宝. Protamex 蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究[J]. 中国油脂, 2007, 32(7): 25-27.
- [7] 郑铁松. 粮食与食品生化实验指导[M]. 郑州: 河南医科大学出版社, 1996.
- [8] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 10-12.

富含浒苔多糖的可食性食品包装膜的研制

刘 畅¹, 高宏伟^{2,*}

(1. 青岛二中, 山东青岛 266061;

2. 山东出入境检验检疫局, 山东青岛 266002)

摘 要:以浒苔多糖浸液为基料,测定了浒苔多糖浸液中多糖和蛋白质的含量,并以正交实验和综合平衡法确定浒苔多糖浸液与辅料成膜的最佳添加量,并对成品膜的抗拉强度、断裂生长率和透水率进行了检测。结果表明,100g 浒苔粉使用 10g 的 NaHCO₃ 抽提多糖浸液,制成的多糖膜中含有浒苔多糖 1g,蛋白质 0.07g,磷脂 0.2g,变性淀粉 0.5g,CMC 1g,甘油 0.3g,明胶 2g,膜的透水率为 6.2%。

关键词:浒苔多糖,正交实验,可食性包装膜

Study on development of edible food packaging film with polysaccharides of *Enteromorpha*

LIU Chang¹, GAO Hong-wei^{2,*}

(1. Qingdao No.2 Middle School of Shandong Province, Qingdao 266061, China;

2. Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

Abstract:The extracted polysaccharide of *Enteromorpha* was used as main materials of edible food packing film. The contents of polysaccharide and proteins in *Enteromorpha* extract were determined. The orthogonal design and integrated balance method were used to determine the best formulation of the edible film. The tensile strength of finished film, fracture rate of growth rate and water were tested. The results showed that 10g of NaHCO₃ were added in 100g *Enteromorpha* powder when extract polysaccharide. The film made of 100g *Enteromorpha* contained polysaccharide 1g, protein 0.07g, lecithin 0.2g, modified starch 0.5g, CMC 1g, glycerol 0.3g, gelatin 2g. Permeability of the membrane was 6.2%.

Key words: *Enteromorpha* polysaccharide; orthogonal experiments; edible packaging film

中图分类号: TS206.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)07-0301-04

浒苔 (*Enteromorpha*) 为绿藻门 (*Chlorophyta*) 石莼目 (*Ulvales*) 石莼科 (*Ulvaceae*) 的藻类, 常见的有缘管浒苔 (*Enteromorpha linza*)、扁浒苔 (*Enteromorpha compressa*)、条浒苔 (*Enteromorpha clathrata*)、肠浒苔 (*Enteromorpha intestinalis*) 等^[1]。浒苔为近海滩涂中

的天然野生绿藻, 其自然繁殖能力特别强, 产量巨大。浙江沿海有人工培植浒苔的工厂, 生产的浒苔供做食品和饲料。我国医藉和民间经验认为, 浒苔不仅具有丰富的营养价值, 而且具有清热解毒、抗菌消炎、降胆固醇、增强机体免疫力、软坚散结、消肿利尿及化疾之功效^[2]。开发利用浒苔的新途径, 变废为宝, 已经成为一件利国利民的大事。可食性包装是随着现代食品工业的发展出现的, 通过不同分子间

收稿日期: 2009-07-07 * 通讯联系人

作者简介: 刘畅 (1992-), 男, 高中学生。

[9] ADLER-NISSEN J. Enzymatic hydrolysis of food protein [M]. London: Elsevier applied science publishers, 1986, 12-14.

[10] Margot A, Flaschel E, Ronken A. Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis correlation of base consumption with soluble nitrogen content [J]. Process Biochemistry, 1994, 29: 257-262.

[11] 江连洲. 利用酶修饰技术制取系列功能性大豆蛋白的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005.

[12] 黄开红, 李莹, 周剑忠, 等. 复合蛋白酶水解大豆制备大豆肽工艺的研究 [J]. 江苏农业科学, 2007(4): 184-186.

[13] 王银满. 酶法制备大豆活性肽的工艺研究 [J]. 粮食加工, 2007, 32(5): 70-72.

[14] 邹东恢, 郭宏文, 彭凯, 等. 大豆多肽复合酶解工艺条件优化的研究 [J]. 食品科技, 2008(2): 48-51.

[15] 郭勇, 郑穗平. 酶学 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000.

[16] 孙月梅. 大豆抗氧化肽酶法制备及其活性保护技术研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008.

[17] 潘丽军, 陈锦权. 实验设计与数据处理 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2008.