

大豆蛋白呈鲜组分的制备及其性质研究^{*}

宋 美 郭顺堂

(中国农业大学食品科学与营养工程学院蛋白质加工利用研究室, 北京 100083)

摘要 大豆经酶解后可产生呈现鲜味的物质。为了研究产品中鲜味的来源及产生鲜味组分的主要组成, 本研究以大豆分离蛋白为原料, 经风味蛋白酶改性, 感官分析后发现, 水解度达到 43% 时的酶解液呈鲜较强、苦味较弱; 该酶解产物过截留分子量为 10000 Da, 6000 Da, 3000 Da 的超滤膜分成四个组分, 发现是平均分子量小于 3000 Da 的肽组份, 而大于 3000 Da 和小于 500 Da 的组分只有微弱的鲜味, 苦味和涩味明显。研究结果同时发现该酶解产物与肌苷酸间有显著风味增强效果。

关键词 大豆分离蛋白; 酶解; 水解度; 鲜味; 感官分析

中图分类号 S565.1 Q517 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)04-0349-06

人类对食品的本质要求包括四个方面: 安全、营养、美味和保健, 其中食品的美味占有重要的地位。食品的基本滋味由原料自身以及加工过程中产生, 最后的美味还需要调味品的参与。谷氨酸钠是氨基酸类鲜味调味品, 在食品中应用广泛, 但鲜味成分和营养成分单一, 口感不够自然、可口。大豆发酵食品, 如豆酱、酱油等能产生比谷氨酸钠(MSG)更温和的鲜味(umami), 经研究证实来源于原料蛋白质经米曲霉分泌的蛋白酶、肽酶及谷氨酰胺酶的作用后生成的氨基酸和肽类, 并且研究发现这种鲜味醇厚、持久并且有提香的作用^[1]。

Seung Ho K.^[2]等从豆酱的水溶性提取物中发现, 鲜味组分主要来源于谷氨酸和天冬氨酸及呈鲜肽; 对酱油中的肽组分研究也发现了至少有 10 种多肽中含有大量的谷氨酸和天冬氨酸^[3]; Hanifah N.^[4]等报道在印度酱油的鲜味组分中还含有疏水性游离氨基酸, 如 L-苯丙氨酸和 L-赖氨酸。成坚等^[5]的研究进一步证明了水解蛋白中对风味有积极贡献的成分主要是呈鲜味的氨基酸(谷氨酸和天门冬氨酸)或肽, 并且发现呈甜味的氨基酸(如甘氨酸、丙氨酸等)或肽对风味的产生也有重要作用。以上研究都表明以大豆蛋白质为原料经过生物降解之后产生的产品具有醇厚的鲜味。

食物蛋白质的水解是产生肽和氨基酸的有效途

径, 与酸水解相比酶水解反应温和, 水解产物中不会产生一氯丙醇、二氯丙醇之类的致癌物, 应用前景广阔。但大豆蛋白酶解后产生强烈的苦味, 掩盖了本身含有的鲜味滋味。Kim 等^[6]报道大豆球蛋白的水解度在 1h 内急速上升; SDS PAGE 电泳显示 11S 球蛋白的酸性亚基大部分被水解, 苦味的产生大约在水解 1h 后, 即 DH=7%, 并呈逐渐增强趋势, 呈苦味的多肽分子量在 360~2100 Da 范围内。Arai 等^[7,8]从胃蛋白酶酶解的经类蛋白反应脱苦的大豆蛋白酶解液纯化的寡肽中发现了含谷氨酰胺残基的寡肽(Glu Asp, Glu Glu, Glu Ser, Glu Gly Ser)具有“brothy”的风味, 但这些小肽在蛋白亚基中的定位有待于进一步研究。本文优化酶解条件, 以风味蛋白酶酶解的大豆分离蛋白为原料, 制备了鲜味较强, 苦味较弱的酶解液原料, 并对此原料进行分离纯化及与鲜味相关的特性进行了研究, 为进一步定位呈鲜组分及为专用大豆的育种研究提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料及仪器

1.1.1 实验材料

* 收稿日期: 2006-04-18

作者简介: 宋美(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为蛋白质加工与利用。

通讯作者: 郭顺堂教授, 博士生导师。

大豆分离蛋白,哈高科大豆食品有限责任公司提供;碱性蛋白酶(Alcalase)活力2.5AU/g,风味蛋白酶(Flavourzyme)活力为500LAU/g,复合蛋白酶(Protamex)活力为1.5AU/g 诺维信公司提供;Protease M amino 活力≥5500u/g,日本天野酶制品株式会社提供。

其它试剂为分析纯。
1.1.2 主要实验仪器
SP 2100UV 紫外可见分光光度计;FD-1 冷冻

干燥机;TDL 40B 低速大容量离心机;SHJ A 电热恒温水浴锅;90-1 型恒温磁力搅拌器;BSZ-100 自动部分收集器

1.2 实验方法
1.2.1 大豆蛋白酶解液的制备
在诺维信及天野酶制品公司提供的酶中初步选定水解苦味较低的五种酶进行酶解,参照厂家提供的酶/底物(E/S)浓度及最适反应温度,酶解方法见表1。

表1 5种蛋白酶酶解大豆分离蛋白的酶解条件
Table 1 The condition of hydrolysis of SPI hydrolysates by five different enzyme

酶的种类	酶/底物	酶解温度(℃)	酶解时间(h)
The variety of enzymes	E : S	Temperature	Time
A 风味蛋白酶 Flavourzyme	6.6 : 100	50	10
B 复合蛋白酶 Protamex	10 : 100	50	10
C 蛋白酶 M Protease M	6 : 100	50	10
D 风味蛋白酶+蛋白酶 M Flavourzyme and Protease M	3.3 : 100+3 : 100	50	10
E 风味蛋白酶+碱性蛋白酶 Flavourzyme and Alcalase	3.3 : 100+4 : 100	50	10

1.2.1.1 水解度及游离氨基的测定
 $DH = h / h_{tot} \times 100\%^{[9]}$
h: 水解后每克蛋白被裂解的肽键,毫摩尔数 (mmol/g)
 h_{tot} : 每克原料蛋白质的肽键毫摩尔数 (mmol/g),即原料蛋白质中肽键被裂解的百分数表示蛋白质被酶催化水解的程度。由于每裂解一个肽键就同时新生成一个-NH₂基和-COOH基,所以只要定量的测出蛋白质水解后新生成的-NH₂基和-COOH基的量就可以求得h值。测定蛋白质的-NH₂基和-COOH基含量的方法主要有三硝基苯磺酸(TNBS)法、茚三酮法、甲醛法。本研究中水解液的水解度及游离氨基(-NH₂)的测定采用茚三酮显色法测定^[10]。

1.2.1.2 水解物平均肽链长度(APL)的估计
若一个蛋白质分子未被水解时肽链长度(即肽中的氨基酸的平均数目)为APL₀,则肽键总数目为APL₀-1,当被切开n-1个肽键而水解成n个肽时,由于大豆蛋白质的APL₀为200~300(相应于亚基的分子量为25000~40000),因此,水解物平均肽链长度可估计为^[9,11]:

$$APL = \frac{1 \times 100\%}{DH}$$

1.2.1.3 感官评定^[12~13]
选用苦丁茶、蔗糖、食盐、谷氨酸钠和酒石酸分别作为苦味、甜味、咸味、鲜味和酸味的标

准物质。五种基本呈味标准物质配制成不同的浓度,品尝鉴定。由经过培训的人员组成评审小组(经两点检验试验合格者,确定为鉴别员),选定5人采用评分法进行感官评定。检验前,首先应确定所使用的标度类型,使鉴别员对每一个评分点所代表的意义有共同的认识,样品的出示顺序可利用拉丁法随机排列。在室温条件进行评定,将每个样品配成1%的浓度,取20ml盛放在杯中,鉴别员将溶液全部浸入口中,并保持10秒左右的时间,然后吐出。评分标准:5-非常强,4-强,3-标准,2-弱,1-很弱,0-不可鉴别。

1.2.2 识别阈值的确定与水解物呈味性的评价
本研究采用递增必选法测阈值^[16],评价肽和肌苷酸(IMP)的鲜味协同作用。配成不同浓度的IMP溶液,由感官评定确定的鉴别员10人组成感官评定小组,评定IMP的识别阈值;然后加入识别阈值下的不同风味蛋白酶酶解时间获得的肽(感官评定结果:阈值0.005g/100mL),评定混合溶液中IMP的识别阈值。

为分析肽和IMP间的鲜味协同效果,配制四种不同的溶液:a.0.025gIMP的溶液;b.0.05g大豆分离蛋白水解产物的50mL溶液;c.0.025gIMP和0.05g大豆分离蛋白水解产物的混合溶液;d.0.025gIMP和0.1g大豆分离蛋白水解产物的50mL混合溶液。由10人组成的感官评定小组评定四种溶液的鲜味强度。

1.2.3 酶解产物中呈鲜组分的分离

将酶解产物分别用截留量为 10000Da、6000 Da、3000 Da 超滤膜超滤, (Amicon model 8200, Millipore Corporation) 共分离出 ≥ 10000 Da; 6000 ~10000 Da; 3000 ~6000 Da; ≤ 3000 Da 四种超滤液组分。冷冻干燥后进行感官评定。

1.2.4 数据处理

数据采用 方差分析, SAS 软件处理。(P<0.05)

2 结果与分析

2.1 大豆水解产物的感官分析

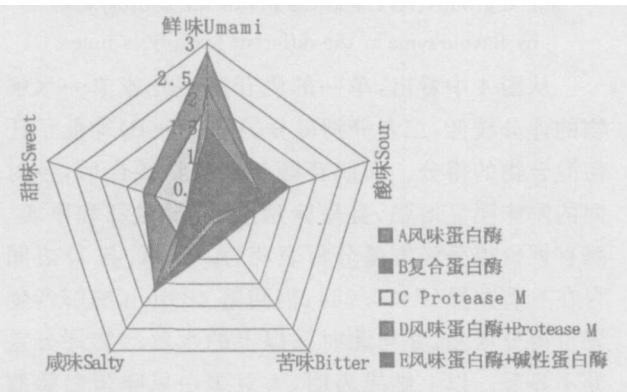


图 1 五种不同酶解产物感官评定后的风味剖面图

Fig. 1 The taste intensity of sensory analysis of SPI hydrolysates by five different enzymes

大豆蛋白经风味蛋白酶(A)、复合蛋白酶(B)、Protease M(C)以及风味蛋白酶+Protease M(D)和风味蛋白酶+碱性蛋白酶(E)酶解后, 五种酶解产物感官评定结果如图 1 所示, 风味蛋白酶酶解产物鲜味和甜味最强, 苦味较弱; 复合蛋白酶的苦味最强; 风味蛋白酶+碱性蛋白酶双酶酶解获得的产物鲜味不突出, 但苦味最小; 风味蛋白酶+Protease M 酶解产物与风味蛋白酶比鲜味稍弱, 甜味相差较大。对五种样品的鲜味感官评定结果进行两向分组单独观察值试验的方差分析结果表明, 各样品间的鲜味有显著差异(P<0.05), 而品评员间无显著差异, 说明样品间的差异来源于酶解产物之间。

对上述五种酶解产物的 pH 测定结果表明, 样品酶解前其 pH 为 7.1, 酶解后 pH 在 6.0~6.3(图 2a), 该 pH 对酶的活性保持非常有利, 同时在接近中性条件下有利于酶解产物的感官评定。对酶解物的水解度和游离氨基酸的含量分析表明, 酶解产物的水解度和游离氨基的含量呈正相关(图 2b), 相关系数为 0.9936(P<0.01); 由水解度和平均肽链长

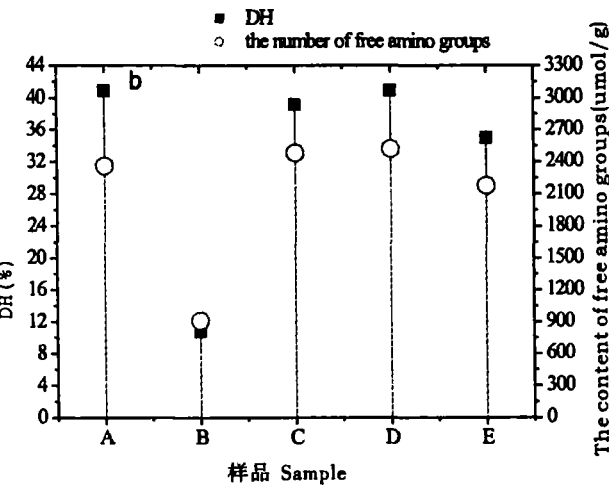
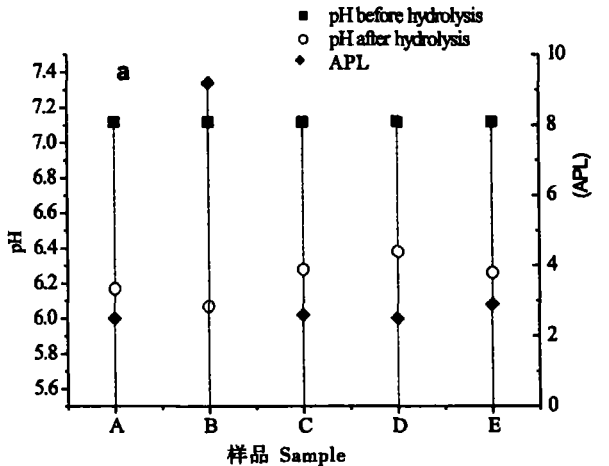


图 2 大豆分离蛋白 5 种酶解产物性质

Fig. 2 The property of SPI hydrolysates by five different enzymes

注: A: 风味蛋白酶; B: 复合蛋白酶; C: Protease M; D: 风味蛋白酶+Protease M; E: 风味蛋白酶+碱性蛋白酶
度知, 在此条件下, 复合蛋白酶水解速度较慢, 而风味蛋白酶水解速度较快。因此, 根据以上结果本研究选风味蛋白酶作为分析工具酶。

2.2 不同水解时间水解产物的群体识别阈值浓度与个体识别阈值浓度

根据 ASTM^[16] 的方法, 群体阈值为个体阈值的几何平均数, 不同水解时间水解产物的群体识别阈值浓度与个体识别阈值浓度结果见图 3。群体阈值普遍低于个体阈值; 两者都随着水解时间的延长逐渐降低; 群体评定酶解 300min 以后测定的阈值基本稳定, 个体评定酶解 840min 的阈值最低。但由于个体受多种因素的影响, 即使同一个样品, 在不同的品尝时间会出现不同的结果^[17]。本实验也证明采用群体阈值判断水解产物的呈味程度要比个体可靠。

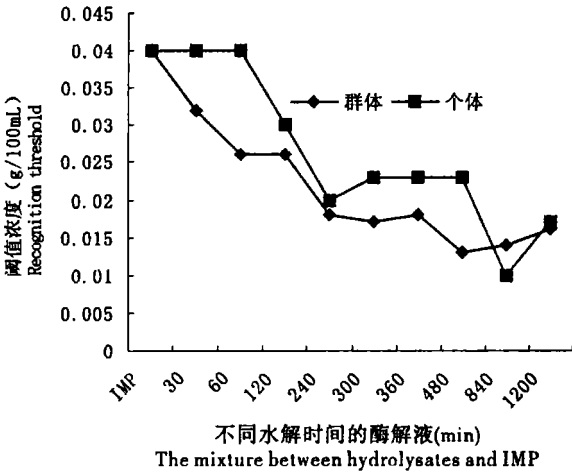


图3 各时间段水解产物的群体识别阈值浓度与个体识别阈值浓度及对比

Fig. 3 The changes of concentration recognition threshold of IMP by adding SPI hydrolysates

2.3 大豆分离蛋白酶解产物与IMP间的风味协同效果

以谷氨酸钠为标准鲜味物质,按表2配制了肌苷酸(IMP)与蛋白水解物的混合物,然后从本研究室选出经过培训的10人组成评审小组,采用评分法进行感官评定。评定结果如图4所示。

表2 风味蛋白酶酶解产物与肌苷酸混和物配制
Table 2 The preparation of solutions IMP with or without different enzymatic(flavourzyme time) hydrolysates

样品Sample	IMP(A)	Peptide(B)	IMP+ peptide (C)	IMP+ peptide (D)
浓度 g/50ml Concentration	0.0250	0.0500	0.0250+0.0500	0.0250+0.1000

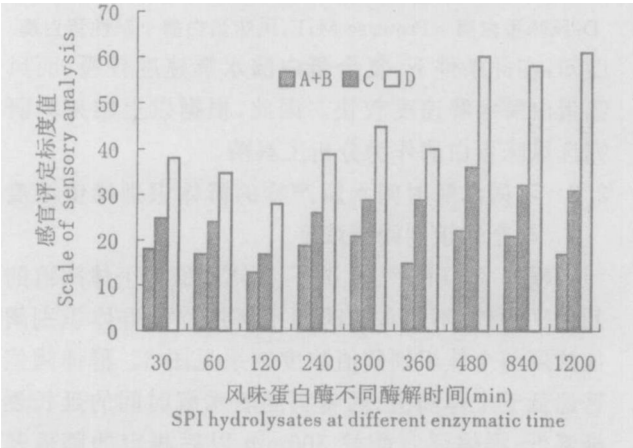


图4 大豆分离蛋白风味蛋白酶酶解产物与IMP间的风味协同作用

Fig. 4 The enhanced effect on umami taste of IMP by adding the different enzymatic(flavourzyme time) hydrolysates

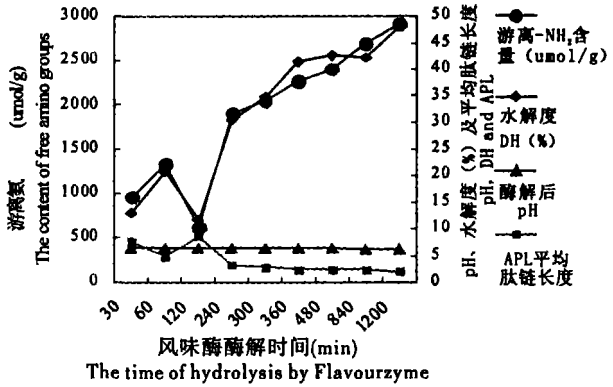


图5 大豆分离蛋白风味蛋白酶不同时间段酶解产物中游离-NH₂、水解度及酶解后pH变化
Fig. 5 The changes tendency of the number of free amino groups, APL and the pH of the hydrolysates by flavourzyme at the different hydrolysis time

从图4中看出,单一的肌苷酸评分或单一水解物的评分较低,二者分别得分的和(A+B)均低于任何混合物的得分。而肌苷酸与水解物混合后,各时间的鲜味明显增强,且呈味延续、更加温和和厚实。感官评价得分经方差分析表明,A+B、C与D之间存在显著差异($P<0.05$),但酶解480min酶解产物评价得分增强,并与此时间以上的水解产物评分差异不显著。以上结果表明,大豆蛋白风味蛋白酶酶解产物与肌苷酸类鲜味剂有很强的呈鲜协同作用,并且用风味酶酶解480min即可获得较好效果。

对不同时间段风味蛋白酶酶解产物性质进行了分析,结果表明(图5),除了120min的水解产物外,随着时间的延长,平均肽链长度在降低;游离氨基酸的含量和水解度增加,且两者呈正相关,相关系数为0.9868($P<0.01$)。然而120min时酶解物的水解度和游离氨基酸的含量明显低于30min和60min的酶解物,其原因不明确。

2.4 大豆蛋白酶解物中鲜味的分布

大豆分离蛋白经风味蛋白酶水解480min后,分别过截留分子量为10000 Da,6000 Da,3000 Da的超滤膜在0.25 Mpa下进行了超滤,将酶解物按分子量分成了四部分。样品经冷冻干燥后分别配成1%的浓度,并经10人组成的鉴评小组进行了感官评定,结果如表3。

从表3看出,分子量大于6000 Da的超滤组分无鲜味,而有较强的苦涩味;而截留分子量在3000~6000 Da的超滤物有非常弱的鲜味,但有涩味;分子量小于3000 Da的超滤物有很强的鲜味,且有很高的得率,说明大豆蛋白经酶解后其呈鲜味的成分

主要分布在 3000Da 以下酶解物中。

表 3 风味蛋白酶水解 480min 增味蛋白超滤组份感官品评结果
Table 3 Sensory analysis of the fractions of 480 min flavourzyme hydrolysates after ultra filtration

样品	分子量范围(Da)	配成溶液的 pH	冷冻干燥制品的颜色	品尝结果
Sample	The range of molecular weight	pH of solution	Colour of dried sample	Taste Description
A	≥10000	6.3	暗棕色	得率 18%，无鲜味，有苦涩味
B	6000~10000	6.7	棕色	得率 5%，无鲜味，有苦涩味
C	3000~6000	6.7	棕黄色	得率 5%，有非常弱的鲜味，有涩味
D	≤3000	6.3	鹅黄色	得率 72%，有很强的鲜味 稍有涩味

3 结论与讨论

前人对大豆蛋白酶解的研究主要集中在苦味肽上。Fuji-maki 等人^[18] 和 Kukman 等人^[19] 进行了从大豆球蛋白的水解产物中分离苦味肽的研究; Maehashi K. 等人^[20] 报道大豆蛋白、酪蛋白只有经过复合酶水解后才能分解成小肽, 并且只显示苦味风味; Kim, M. R 等人^[21] 从 11S 球蛋白的胰蛋白酶水解产物中分离出来 21 种苦味多肽, 经过检测, 其分子量都在 200~1400Da 之间。苦味的产生机理, 根据 Ney 的 Q-理论^[22], 在紧密的蛋白质分子中, 由于疏水键包裹在分子内部, 不能充分的与味觉接受部位接触, 随着水解的进行, 产生了不同长短的肽链, 同时疏水键逐渐暴露出来, 疏水性增强; 肽链的疏水值> 1.4 kcal/mol 时呈苦味; < 1.3 kcal/mol 时没有苦味。因此, 在酶解过程中选择合适的酶和控制水解度, 减少苦味的产生是非常重要的。Nakata T. 等人^[23] 从合成的 5 肽的感官分析中发现肽中的酸性组分和碱性组分对风味的形成和强度起了很重要的作用, 疏水性片断只是在酸性和碱性片断之间的隔板, 肽的风味形成只是酸性和碱性组分之间的相互作用。本研究选取风味蛋白酶水解大豆分离蛋白, 经感官分析后发现, 480min 风味蛋白酶酶解产物呈鲜较强、苦味较弱, 与肌苷酸有强烈的鲜味协同作用, 且呈味延续, 更加温和和厚实。经超滤后感官分析, 大豆蛋白酶解液呈鲜组分主要分布在 3000 Da 以下酶解物中。

参 考 文 献

1 Netto F. M., Galeazzi M. A. M. Production and Characterization of Enzymatic Hydrolysate from Soy Protein Isolate[J]. Lebens. Wiss. Techno, 1998, 31, 624- 631.

2 Seung Ho, K., Kyung Ae, L. Evaluation of taste compounds in water soluble extract of a doenjang (soybean paste)[J]. Food Chemistry, 2003, 83, 339- 342.

3 Yoshinori, O., Kazuo, S., Osamu T. et al. Mapping of peptides in soy sauce by an ion exchange[J]. Agric. Biol. Chem., 1972, 36(8): 1371 - 1380.

4 Hanifah, N. L., Anton, A., Kensaku T., et al. Low Molecular Weight Compounds Responsible for Savory Taste of Indonesian Soy Sauce[J]. Agric. Food Chem., 2004, 52, 5950- 5956.

5 成坚, 陈海光, 曾庆孝, 等. 影响水解蛋白风味的因素[J]. 中国调味品, 2003, 4, 20- 24.

6 Kim, M. R, Choi, S. Y., Lee, C. H.. Molecular characterization and bitter taste formation of tryptic hydrolysis of 11S glycinin[J]. J. Microbiol Biotechnol, 1999a, 9(4): 509- 513.

7 Arai, S., Yamashita, M., Fuji-maki M.. Glutamyl oligopeptides as factors responsible for tastes of a proteinase modified soybean protein[J]. Agric. Biol. Chem., 1972, 36, 1253 - 1256.

8 Arai, S., Yamashita, M., Noguchi, M. et al. Taste of L Glutamyl Oligopeptides in relation to their chromatographic properties[J]. Agric. Biol. Chem., 1973, 37(1): 151- 156.

9 J. Adler Nissen Enzymatic hydrolysis of food proteins[M]. Elsevier Appl. Sci. Pub. New York, 1986.

10 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994(11): 65 - 67.

11 窦君, 孙君社. 腐乳中水溶性蛋白质平均肽链长度及氨基酸组成的研究[J]. 食品工业科技(增刊). 2004.

12 杨荣华. 中国调味品. 食品的滋味研究[J]. 2003(6): 38- 41.

13 宋钢. 新编调味品生产与应用[M]. 北京: 中国轻工业出版社. 2003.

14 孙君社, 薛毅编. 食品感官鉴评[M]. 广州: 华南理工大学出版社. 1994.

15 曹雁平 编著. 食品调味技术[M]. 北京: 化学工业出版社. 2002.

16 ASTM. Standard practice for determination of odor and taste threshold by a forced choice method of limits[M]. 1991a Vol. 15(07): E- 679 - 79. In Annual Book of standards.

17 Brown, D. G. W., Clapperton, J. F., Meilgaard, M. C. et al. Flavor thresholds of added substances[J]. American society of Brewing Chemists Journal. 1978, 36, 73 - 80.

18 Fuji-maki, M., Yamashita, M., Okazawa, Y., et al. S. Diffusible bitter peptide in peptic hydrolysate of soybean protein[J]. Agric Biol Chem. 1968, 32(6): 794- 795.

19 Kukman IL, Zelenik M, Abram V. Isolation of low molecular mass hydrophobic bitter peptides in soybean protein hydrolysates

- by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. J Chromatography A. 1995, 704, 113 – 120.
- 20 Maehashi K., Matsuzaki M., Yamamoto, Y. et al. Isolation of peptides from an enzymatic hydrolyzate of food proteins and characterization of their taste properties[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63, 555 – 559.
- 21 Kim, M. R., Kawamura, Y., Lee, C. H. Isolation and identification of bitter peptides of tryptic hydrolysate of soybean 11S glycinin by reverse phase high performance liquid chromatography[J]. Journal of Food Science. 2003, 68(8): 2416 – 2422.
- 22 Ney, K. H. Voraussage der bitterkeit von peptiden aus derenaminosäuren zusammensetzung[J]. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1971, 147, 64 – 68.
- 23 Nakata T., Takahashi, M., Nakatani M., et al. Role of Basic and Acidic Fragments in Delicious Peptides (Lys Gly Asp Glu Glu Ser Leu Ala) and the Taste Behavior of Sodium and Potassium Salts in Acidic Oligopeptides. Biosci. Biotech. Biochem. 1995, 59(4): 689 – 693.

RESEARCH ON THE PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF HYDROLYSATE OF SPI WITH UMAMI TASTE

Song Mei Guo Shuntang

(College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract Umami taste is the major concern for foodstuff made with soybean. To elucidate the mechanism of the production of umami taste, it is crucial to analyze the composition of compounds forming the umami taste. In the present study, 43 % of soybean protein isolate (SPI) was hydrolyzed by flavourzyme, producing the most intense umami taste, which is composed of peptides with average molecular weight less than 3000 Da as characterized by ultrafiltration. In contrast, peptide fractions with molecular weight more than 3000 Da hardly produced the umami taste but forming significantly bitter and astringent tastes. Our results also showed that there was strong synergistic interaction between IMP and soybean hydrolysates on the case of umami taste.

Key words Soybean protein isolate; Enzymatic hydrolysis; The degree of hydrolysis; Umami; Sensory analysis

欢迎订阅 2007 年《大豆通报》

《大豆通报》杂志是由国家大豆工程技术研究中心、中国作物学会大豆专业委员会与中国食品科技学会大豆分会联合主办的国内外公开发行的综合性专业期刊。2006 年被“中国核心期刊(遴选)数据库”收录。主要刊登与大豆行业相关的政策、科研、开发、生产、市场、产品等方面的规划建议、研究成果、阶段性试验、农业生产与深加工技术、国内外科技动态、科技信息、知识资料、经贸市场信息、学术活动、科普宣传以及科研院所、大专院校、农场、企业简介等。

《大豆通报》为双月刊,大 16 开本,46 页码,每册定价为 5.00 元,全年为 30.00 元。国内统一刊号为 CN23-1337/S,国际刊号为 ISSN1009-2765,邮发代号为 14-228,国外代号为 BM4836,广告代许可证号:2301004060002。如错过订期,可直接与编辑部联系。

《大豆通报》地址:哈尔滨市道外区南通大街 23 号

邮政编码:150050 联系电话:0451-82553178

E-mail:soytb@163.com dadoutongbao@yahoo.com.cn

联系人:杨秋萍