

# 用蛋白酶组合对大豆分离蛋白改性的研究

黄浩<sup>1</sup>, 黄宏伟<sup>1</sup>, 赖勤<sup>2</sup>

(1. 宜春学院化学与生物工程学院, 宜春 336000; 2. 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081)

**摘要** 用蛋白酶组合对大豆分离蛋白进行有限水解, 所得水解液不苦, 具有良好的风味。改性后的大豆分离蛋白的氮溶指数由未水解的 82 提高到 95, 20 ℃ 时溶解度在 25% 以上。经正交试验得到的大豆分离蛋白水解的最佳工艺参数为: 加酶量, 0.55% (w/w); 固液比, 1: 8 (w/w); 酶解时间, 60 min。

**关键词** 大豆分离蛋白; 改性; 蛋白酶

**中图分类号** TS229 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0245-05

## STUDIES ON PROTEASE ASSEMBLY MODIFICATION IN SOYBEAN PROTEIN ISOLATES

HUANG Hao, HUANG Hong-wei, LAI Qing

(1. School of Chemistry and Bio-engineering, Yichun University, Yichun 336000; 2. Life science college of Hunan Normal University, Changsha 410081)

**Abstract** Soybean protein isolates (SPI) was modified by protease assembly, the NSI (Nitrogen solubility index) value of the modified SPI increased sharply (from 82 to 98). What is more, the liquid has no bittering basically. The optimum condition for enzymatic hydrolysis were E/S = 0.55% (w/w), substrate concentration = 1:8 (w/w), reaction time = 60 min.

**Key words** Soybean protein isolates; Modification; Protease

我国大豆年产量约 1640 万吨, 占世界总产量的 9% 左右, 居第四位。大豆分离蛋白 (SPI) 含有 90% 的蛋白质, 广泛应用于食品工业, 如乳制品和肉制品加工<sup>[1]</sup>, 且 SPI 具有一定的延缓衰老、延长寿命的作用<sup>[2]</sup>。由于 SPI 在酸性条件下溶解性差, 具有豆腥味, 对某些消费者产生过敏等缺陷限制了它的应用<sup>[3]</sup>, 需要对其改性, 达到除去异味和提高营养利用率的目的。改性的方法有物理改性、化学改性、酶改性和生物工程改性<sup>[4-6]</sup>。酶法改性是通过酶部分降解蛋白质, 改变蛋白质的功能性质<sup>[7]</sup>。酶法生产大豆多肽现已成为 SPI 深加工的一个重要方向, 同

时也为油脂工厂大豆粕的综合利用提供了一条有效途径。当 SPI 被酶解成肽后, 往往产生不同程度的苦味, 这对产品风味有很大影响。分子量在 500 ~ 1000Da 的大豆多肽苦味最强, 只有分子量大于 5000Da 的大豆多肽没有苦味<sup>[8]</sup>。由于微生物蛋白酶来源丰富, 产量较大且价格低廉, 已逐渐成为最重要的工业用蛋白酶品种, 也将成为今后酶改性研究的热点领域<sup>[9]</sup>。本研究首次采用微生物蛋白酶组合对 SPI 进行有限酶解, 既避免了酶法生产多肽的苦味问题, 又提高了产品的溶解性。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

大豆豆粕由黑龙江三江食品公司提供。碱性蛋白酶 2.4 L(液态,其余酶均为固态)、复合蛋白酶和风味酶均为 Novo Nordisk 公司产品。HAP 碱性蛋白酶(8 万 U/g)、中性蛋白酶(A. 1389)(4 万 U/g)和酸性蛋白酶(207)(5 万 U/g)均由无锡星达生物工程有限公司产品。

茆三酮显色液:2 g 茆三酮加入 100 mL 双蒸水,溶解,放棕色瓶中保存,应每次使用前配制。其它试剂均为分析纯。

1.2 水分的测定

按照 GB5009.3-85 测定。

1.3 粗蛋白含量的测定

参照 GB5009.5-85 测定。

1.4 SPI 水解度(DH)的测定

在文献[10]的基础上改进。

1.4.1 蛋白质完全水解液的制备 取 100 mg SPI,加 100 mL 6 mol/L 盐酸,放 130 ℃烘箱中水解 24 h,过滤,滤液真空浓缩至 0.5 mL 左右,加蒸馏水 90 mL,用 1 mol/L NaOH 中和至中性,定容至 100 mL。

1.4.2 工作曲线的绘制 取完全水解液 0.1 ~ 1.0 mL 于 25 mL 比色管中,蒸馏水稀释至 4 mL,加 pH8 缓冲溶液 1.0 mL,茆三酮溶液 1.0 mL,沸水浴加热 15 min,冷却,蒸馏水稀释至 25 mL。测 A<sub>570</sub>(水作参比)。另取 100 mg SPI,加水 100 mL,振荡均匀后过滤,取相应体积的滤液,按上述方法测 A<sub>570</sub>。以相同体积样品的光密度之差对蛋白质质量作工作曲线,取线性部分做标准曲线。

1.4.3 水解液水解度的测定 取 SPI 水解后灭酶的水解液 1mL,稀释至 100 mL,过滤,取滤液 1 ~ 4 mL(使测定值在工作曲线的线性部分),加水至 4 mL,加 pH8 缓冲溶液 1.0 mL,茆三酮溶液 1.0 mL,沸水浴加热 15 min,冷却,蒸馏水稀释至 25 mL,测 A<sub>570</sub>(水作参比)。另取相同浓度未水解 SPI 溶液 1 ~ 4 mL,按上述方法测 A<sub>570</sub>,以二者光密度之差从工作曲线上查蛋白质含量,按下式计算水解度:

$DH(\%) = A/(1000 \times W) \times V_1 \times 100/V_2 \times 100$   
式中:A 为按标准曲线查得蛋白质的 mg 数,W 为称样重(g),V<sub>1</sub>为水解液的总体积(mL),V<sub>2</sub>为显色时所用稀释液的体积(mL)。

1.5 水解液苦味强度测定

按文献[11]的方法进行。

1.6 SPI 的提取及酶解工艺流程

豆粕(加 10 倍水)→碱浸(45 ℃,20 min)→离心得上清液→酸沉→离心得凝乳→水洗 2 次得 pH6 的凝乳→调至 pH7→冷冻干燥得 SPI→调固液比、pH、恒温→加酶水解→灭酶活得水解液→测定水解度→冷冻干燥得酶改性的 SPI。

2 结果与分析

2.1 测定水解度的工作曲线

由表 1 数据作出工作曲线(图 1)并得出回归直线方程  $y = 2.365x - 0.329$ 。

表 1 蛋白质的质量与吸光度的对应关系

Table1 The parallelism relation between quality of SPI and the absorbency						
蛋白质质量(mg) Quality of protein	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
吸光度 ΔA <sub>570nm</sub> Absorbency	0.030	0.144	0.480	1.090	1.490	1.985

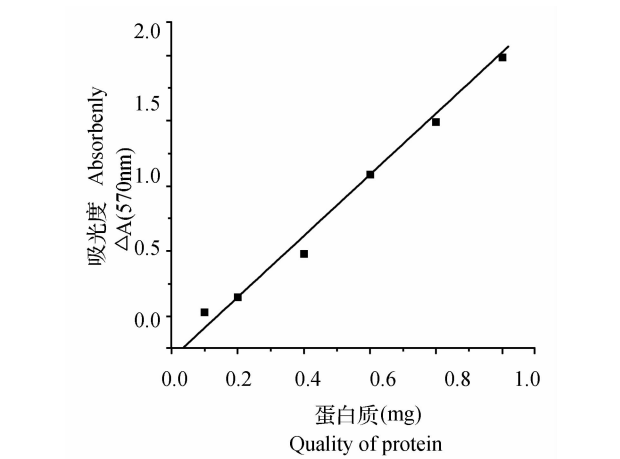


图 1 测定大豆分离蛋白水解度的工作曲线  
Fig.1 Mensuration of work curve of SPI hydrolysis degree

2.2 不同蛋白酶对 SPI 的水解作用的比较

从表 2 可知,进口碱性蛋白酶、复合蛋白酶、国产 HAP 碱性蛋白酶、中性蛋白酶(A. 1389)和酸性蛋白酶(207)酶解大豆分离蛋白所得水解液均有不同程度的苦味,只有进口风味酶和进口酶组合所得水解液无苦味。进口酶组合情况见表 3。各酶的作用条件见表 4。通常蛋白质的水解度(DH)越高,其

水解产物的氮溶指数 (NSI) 也越高,而从表 2 可看出,风味酶对 SPI 水解时,水解度虽然达到了 13,而其水解液的 NSI 值只有 64.2。原因在于风味酶是内切蛋白酶和外切肽酶的混合物,肽酶能将已溶解的蛋白质和肽水解为游离氨基酸,导致水解液中游离氨基酸和小肽的比例较高,水解度偏高。在选用的另外几种蛋白酶:碱性蛋白酶 2.4 L、HAP 碱性蛋白酶、酸性蛋白酶(207) 和 A. 1389 中性蛋白酶属于内切蛋白酶,可将蛋白质大分子水解成分子量较小的多肽,对蛋白质的溶解作用较强,因而尽管蛋白质的水解度较低,但所得水解液的 NSI 值较高。另外,风味酶酶水解产物有一种特殊的香味。因此,选用复合蛋白酶和碱性蛋白酶 2.4 L 以增加对蛋白质的溶解作用,选用风味酶以改善产品的风味,优选这三种酶组合进行正交试验。经预备试验,初步拟定各酶的加酶量之比(表 3)。各酶的作用条件见表 4。

表 2 不同蛋白酶对 SPI 的水解作用

蛋白酶种类 Kind of protease	NSI	DH	苦味强度 Bitterness of intensity
中性蛋白酶(A. 1389) Neutral protease	85.1	10	11
HAP 碱性蛋白酶 HAP alkaline protease	83.5	10	24
酸性蛋白酶(207) Acidic protease	86.4	9	3
复合蛋白酶 Mulriple protease	91.0	9	6
碱性蛋白酶 2.4L Alkaline protease	86.5	11	21
风味酶 Flavour enzyme	64.2	13	0
酶组合 Enzyme assembly	93.7	9	0

注:水解时间为 90 min,固液比为 1: 8 (w/w),E/S 为 2000 U/g 蛋白  
质;酶组合的加酶量为 0.55% (w/w)(每 kg 底物加 5.5 g 酶)  
Note:hydrolyze time is 90 min,substrate concentration is 1: 8(w/w),  
E/S is 2000 U/g protein; E/S of enzyme assembly is 0.55%  
(w/w) (5.5 g enzyme assembly/kg substrate)

表 3 酶组合的加酶量

蛋白酶种类 Kind of protease	加酶量 (%) E/S		
	0.40	0.55	0.70
碱性蛋白酶 2.4 L Alkaline protease	0.15	0.20	0.25
复合蛋白酶 Mulriple protease	0.10	0.15	0.20
风味酶 Flavour enzyme	0.15	0.20	0.25

表 4 酶的有关工艺参数  
Table 4 The parameters of the protease  
of the protease assembly

蛋白酶种类 Kind of protease	最适作用条件 The optimum condition	酶灭活条件(1 0min) Protease denaturation Condition
中性蛋白酶(A. 1389) Neutral protease	pH7.0,40 ℃	pH7,80 ℃
HAP 碱性蛋白酶 HAP alkaline protease	pH9.0,40 ℃	pH8,80 ℃
酸性蛋白酶(207) Acidic protease	pH3.0,40 ℃	pH7,80 ℃
碱性蛋白酶 2.4 L Alkaline protease	pH6.5 ~ 8.5, 55 ~ 70 ℃	pH8,80 ℃
复合蛋白酶 Mulriple protease	pH5.5 ~ 7.5, 35 ~ 60 ℃	pH8,80 ℃
风味酶 Flavour enzyme	pH5.0 ~ 7.0,50 ℃	pH7,75 ℃
酶组合 Enzyme assembly	pH6.5 ~ 7.0,50 ℃	pH7,80 ℃

2.3 酶组合最佳水解参数的选定

80 g 脱脂豆粕经一次碱抽提得约 20 g SPI(干基),根据 SPI 蛋白质含量(97.2%) 计算加酶量。表 4 确定了酶水解的最适条件,但影响其水解的因素还有酶的用量、底物溶度和水解时间。根据预备试验,确定上述各因素的水平范围,选用三因素三水平表(表 5)。以 NSI 值为考察指标,酶组合正交试验数据见表 6。

表 5 三因素三水平表 L9(3<sup>3</sup>)

Table 5 Three factors and Level 3 on L9(3 <sup>3</sup> )			
水平 Level	A(加酶量) A(E/S)	B(固液比) B(Substrate concentration)	C(水解时间,min) Cydrolyze time
1	0.40%	1: 5	45
2	0.55%	1: 8	60
3	0.70%	1: 10	90

因素主次关系 B>A>C 取 B<sub>2</sub>A<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,从各因素对 NSI 值影响的直观图(图 2)可以看出,当加酶量超过 0.55% (w/w)、固液比超过 1: 8 (w/w)、酶解时间超过 60 min,NSI 值均呈下降趋势,故最后选定最佳工艺参数为:加酶量,0.55% (w/w);固液比,1: 8 (w/w);酶解时 60 min。在此条件下水解 SPI,30 min 后,水解液粘度急剧下降,酶改性后的 SPI 产品具有良好的溶解性,其 NSI 值由原来的 82 提高到 95,酶解产物的溶解度在 25% 以上,流动性良好,且其溶解度和粘度随 pH 值的变化无明显改变,并保证良好的风味,极适合应用于溶解性较好的食品中。酶改性后 SPI 持水性和吸油性均有较大幅

度的降低。

表6 L9(3<sup>3</sup>)正交试验数据及分析表

Table 6 L9(3 <sup>3</sup> ) Orthogonal test data and analysis					
试验号 Test number	A	B	C	DH	NSI
1	0.40%	1: 5	45	9	85.4
2	0.40%	1: 8	60	9	92.8
3	0.40%	1:10	90	9	89.0
4	0.55%	1:5	60	8	90.0
5	0.55%	1:8	90	9	93.4
6	0.55%	1:10	45	9	94.0
7	0.70%	1:5	90	8	91.2
8	0.70%	1:8	45	8	94.0
9	0.70%	1:10	60	10	91.0
NSI	K1	267.2	266.6		273.4
	K2	277.4	280.23		273.8
	K3	276.2	274		273.6
NSI	R1	89.1	88.9		91.1
水平	R2	92.5	93.4		91.3
Level 均值	R3	92.1	91.3		91.2
Average value					
极差 Range	3.4	4.5		0.2	

注:A 为加酶量,B 为固液比,C 为水解时间( min )。  
Note:A is E/S ,B is substrate concentration ,C is hydrolyze time( min ) .

3 讨论

以酶改性 SPI 为基料添加部分全脂奶粉、蜂蜜和强化必需氨基酸,即蛋氨酸和半胱氨酸,强化 Fe、Ca、Zn 等无机盐并调入天然果汁(苹果汁、胡萝卜汁),研制出高蛋白、高果糖、低动物性脂肪、易消化的速溶性老年奶粉,可以降低血清胆固醇,对老年人作用特别大,是优质的营养保健食品;可用于生产适用于肥胖病患者的功能性保健食品及婴幼儿奶粉、咖啡伴侣、甜点心等食品;也可用于生产酸奶、干酪、醋、酱油和火腿等食品,使其风味更佳,成本降低。酶改性后的 SPI 产品中,小分子肽组分含量高,可用于某些目标功能肽的分离。

本文依据 Chen<sup>[10]</sup>的方法和现行的方法(茚三酮比色法)进行改进,介绍一种新的测定 SPI 水解度的方法,利用待水解原料的完全水解液作为标准,消除了由于不同氨基酸与茚三酮结合产物的呈色度不同对测定结果造成的误差,使测定结果更接近真实值,并得出了测定 SPI 水解度的回归直线方程,根据该方程可简单快捷确定 SPI 的水解度,极适用于工业生产对水解度的监测,以保证酶法改性 SPI 的品质。

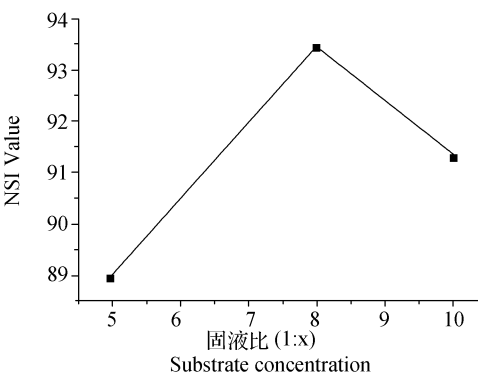
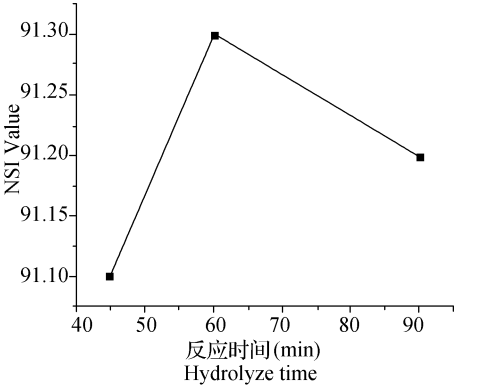
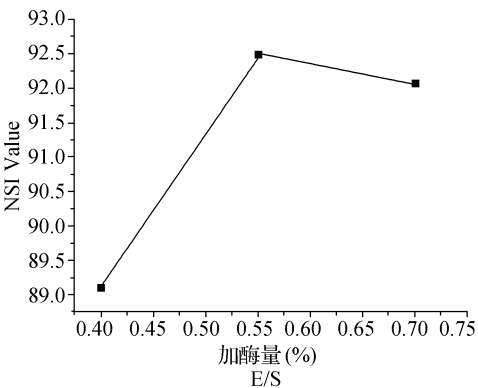


图2 各因素对 NSI 值影响的直观图

Fig.2 The influence of various factors on the visual map of the NSI value

参 考 文 献

[1] 黄友如,华欲飞. 大豆分离蛋白的改性及其对功能性质的影响[J]. 中国油脂,2003,28(4):35-38.  
[2] 韩加,付德润,徐臻荣. 大豆分离蛋白的抗衰老作用[J]. 卫生研究,2002,31:305-306.  
[3] 刘大川,钟方旭. 酶水解法制备大豆肽的研究[J]. 中国油脂,1997,22(6):14-24.  
[4] Gennadios, A. (Univ of Nebraska); Weller, C. L.; Testin, R. F. Property modification of edible wheat, gluten-based films [J]. Transactions of the ASAE,1993,36(2):465-470.  
[5] Kumar, Rakesh; Choudhary, Veena; Mishra, Saroj et al. Mattiason, Bo. Adhesives and plastics based on soy protein products[J].

Industrial Crops and Products,2002,16(3):155-172.

[6] Mo Xiaoqun, Hu Jie, Sun X, et al. Compression and tensile strength of low-density straw-protein particle board[J]. Industrial Crops and Products,2001,14(1):1-9.

[7] Achouri, Allaoua, Zhang, Wang. Effect of succinylation on the physicochemical properties of soy protein hydrolysate[J]. Food Rsearch International,2001,34(6):507-514.

[8] 邓勇,冯学武. 大豆多肽分子质量分布与苦味的确定[J]. 中国农业大学学报,2001,6(4):98-102.

[9] 孙鹏,大豆蛋白改性技术的研究[J]. 食品研究与开发,2005,26(5):115-117.

[10] Chen Qin-yun . Effect of Amide contents in wheat gluten hydrolysates on the thermal flavour generation, pH. [D]. Thesis, Rutgers University, U. S. A, 1995:54-56.

[11] 杨兰,刘通讯. 酶法水解鸡肉蛋白及其水解液脱苦方法的研究[J]. 食品工业科技,1999,20(2):4-6.

征 订 启 示

编辑部现存有少量过刊:2005 年 2~4 期,订价 21.00 元;2006 年 1~4 期,订价 40.00 元;2007 年 1 期,订价 10.00 元;还有 2006 年精装合订本,订价 60.00 元。以上订刊款均含邮资。如需要直接汇款至编辑部即可,款到即寄书。汇款请写明订阅刊期、数量,详细邮寄地址。

编辑部地址:哈尔滨市南岗区学府路 368 号

联系电话:0451-86668735

E-mail: ddkexue@126.com

《大豆科学》编辑部