

酶法提高大豆分离蛋白酸溶性的研究

黄橙子¹,王 静¹,高红亮¹,崔红亮²,常忠义¹

(1. 华东师范大学 生命科学院,上海 200241;2. 平顶山天晶植物蛋白有限责任公司,河南 平顶山 467000)

摘 要:通过单因素试验研究了植酸酶添加量、酶解时间、pH、温度和料液浓度对大豆蛋白酸溶度、透光率和料液粘度的影响,在单因素试验的基础上对pH、温度、料液浓度和时间进行四因素三水平的正交试验,结果表明,当植酸酶添加量为0.6%时,酶解的最佳条件组合为pH3.0,温度40℃,料液浓度10%,酶解时间45 min,此时大豆分离蛋白的酸溶度为45.79%,透光率为68.5%,与优化前相比,分别提高了30.65%和29.4%。

关键词:大豆分离蛋白;酸溶性;植酸酶

中图分类号:TS201.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2013)01-0111-04

Improvement on Acid-solubility of Soy Protein Isolate with Enzymatic Method

HUANG Cheng-zi¹,WANG Jing¹,GAO Hong-liang¹,CUI Hong-liang²,CHANG Zhong-yi¹

(1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200241;2. Pingdingshan Tianjing Plant Albumen Co. Ltd, Pingdingshan 467000, Henan, China)

Abstract: Soy protein isolate(SPI)has been used in the food industry for decades,but its application in acidic food products was limited because of its low solubility in the acidic condition. The objective of the experiments was to improve the solubility of SPI under acidic conditions by hydrolyzing the phytic acid with phytase and to find the optimum conditions for the enzymatic hydrolyzing process. During the experiments, acid-soluble properties, including acid-solubility, transmittance, and viscosity of the processed material have been observed. Single factor and orthogonal experiments revealed that when the solid content of the curd slurry was 10%, the best phytase adding amount was 0.6%, the ideal condition for the enzymatic reaction was pH3.0, 40℃,45 min. After the enzymatic treatment,acid-solubility and transmittance of SPI reached 45.79% and 68.5%,increased by 30.65% and 29.4%, respectively.

Key words: Soy protein isolate(SPI);Acid-soluble properties;Phytase

大豆分离蛋白营养价值高、功能性优越,在肉制品、乳制品和保健品等领域已经广泛应用^[1-2]。然而,传统的大豆分离蛋白在酸性环境中的溶解度极低^[3],使其在酸性饮料等酸性食品中的应用受到了限制^[4-5]。随着人们生活水平的提高,消费者对食品多元化的需求越来越高,如果能够把大豆蛋白添加到酸性食品中,将具有广泛的应用前景。利用植酸酶对大豆分离蛋白中的植酸盐进行水解,能够大幅降低料液中的植酸盐含量^[6],从而提高大豆分离蛋白在酸性条件下的溶解度^[7]。该文对植酸酶处理大豆分离蛋白的工艺条件进行了优化,旨在为酸性可溶性大豆蛋白的生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及设备

1.1.1 供试材料 大豆分离蛋白:平顶山天晶植物蛋白有限责任公司;磷酸、氢氧化钠:分析纯,洛阳市化学试剂厂;植酸酶:液体植酸酶(5 000 U·g⁻¹),北京挑战生物技术有限公司;Bradford 蛋白质测定试剂

盒:SK3031,生工生物工程(上海)有限公司。

1.1.2 仪器设备 料理机,电动搅拌机,恒温水浴锅,PHS-3C 精密酸度计,CP114 电子天平,NDJ-1 旋转粘度计,LD5-10 离心机,V-5000 可见分光光度计。

1.2 试验设计

首先将大豆分离蛋白加水溶解,调整其浓度,并用磷酸或氢氧化钠调pH。将料液加热后,加入植酸酶,放入水浴锅中保温并搅拌。在预试验的基础上,先后以加酶量、时间、pH、温度、料液浓度为因素,设置相应的水平进行单因素试验,得到优化的试验条件。在单因素试验的基础上,对pH、温度、料液浓度和时间四个因素进行三水平的正交试验,确定最优方案。

1.3 测定项目与方法

1.3.1 粘度 将料液的pH调为3.0,采用NDJ-1旋转粘度计测定其粘度,温度为25℃,单位mPa·s。使用3号转子,根据样品粘度选择不同的转速进行测定。

收稿日期:2012-09-24

基金项目:国家自然科学基金(81072422)。

第一作者简介:黄橙子(1988-),女,在读硕士,研究方向为食品生物化学。E-mail:orange0755@gmail.com。

通讯作者:常忠义(1968-),男,副教授,博士,从事微生物与食品生物化学研究。E-mail:zychang@bio.ecnu.edu.cn。

1.3.2 酸溶度 将料液稀释成固形物含量为 5% (w/v) 的溶液,调 pH3.0,取 100 mL,2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,测定上清液蛋白含量 M2(g·mL⁻¹) 和离心前溶液中的蛋白含量 M1(g·mL⁻¹)。

$$\text{酸溶度}(\%) = M2/M1 \times 100。$$

1.3.3 透光率 将料液稀释成蛋白含量为 0.1% (w/v) 的溶液,调 pH3.0,读取 600 nm 处的透光率 T (%)。

1.3.4 蛋白质含量 采用 Bradford 法测定^[8]。吸取样品稀释液 100 μ L,加入 1 mL Bradford 试剂,迅速混匀,室温下静置 5 min,期间颠倒混匀 1~2 次,在分光光度计上读出 595 nm 下的吸光值。根据样品稀释液 A₅₉₅ 的平均值,在标准曲线上确定出该样品稀释液的蛋白质浓度,并计算出样品溶液的蛋白含量。

1.4 数据分析

采用正交设计助手 II v3.1 进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 植酸酶添加量 固定酶解 pH3.0,酶解温度 40℃,底物浓度 10%,酶解时间 60 min,植酸酶添加量对大豆分离蛋白酸溶性的影响如图 1 所示。随着植酸酶的增多,蛋白的酸溶度和透光率都逐渐升高,当植酸酶的添加量达到 0.6% 以后,蛋白的酸溶度和透光率都不再增加,说明植酸酶的最适添加量为 0.6%。

在酸性条件下的溶解度越高说明蛋白的酸溶性越好;透光率越高代表蛋白溶液的透明度越高;在料液 pH 和浓度一定的情况下,料液的粘度与酸溶度呈正相关,但是粘度过高会引起管道堵塞以及杀菌和喷雾干燥等后续处理困难,通常情况下要求进入杀菌管道前的料液粘度不得超过 850 mPa·s。因此,本组试验中料液的粘度都符合要求,优选 0.6% 为植酸酶的最适添加量。

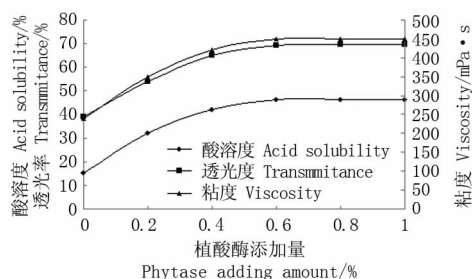


图 1 植酸酶添加量对大豆分离蛋白酸溶性的影响

Fig.1 Effect of phytase on the acid solubility of SPI

2.1.2 酶解时间 固定酶解 pH3.0,酶解温度

40℃,底物浓度 10%,加酶量 0.6%,植酸酶酶解时间对大豆分离蛋白酸溶性的影响如图 2 所示。随着酶解时间的延长,蛋白的酸溶度和透光率都逐渐升高,粘度也持续增大,前 15 min 内,粘度增加较快,随后粘度增速变慢。当酶解到 45 min 时,透光率不再升高,粘度略有增加,说明此时酶解已经基本结束。因此在后续试验中选择 45 min 作为酶解时间。

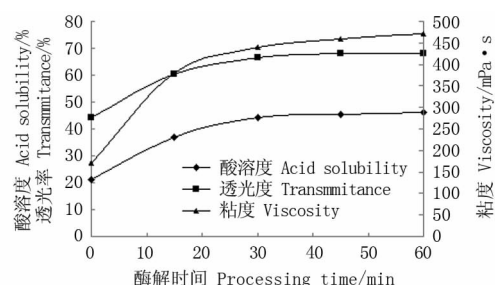


图 2 植酸酶酶解时间对大豆分离蛋白酸溶性的影响

Fig.2 Effect of the phytase processing time on the acid solubility of SPI

2.1.3 酶解 pH 固定酶解温度 40℃,底物浓度 10%,加酶量 0.6%,酶解时间 45 min,植酸酶酶解 pH 对大豆分离蛋白酸溶性的影响如图 3 所示。已知大豆分离蛋白的等电点为 4.4~4.6,在该 pH 范围附近进行酶解,得到的蛋白酸溶度很低;在偏离该等电点的 pH 下进行酶解,蛋白的酸溶度可以提高 40% 以上。但是在 pH 为 2.0 时蛋白料液的粘度过高,并且酸度过大会对设备造成严重腐蚀,不利于实际生产,而 pH 值为 3.0、7.0、8.0 时粘度分别为 450、270、3 120 mPa·s,所以选择 3.0、7.0、8.0 作为优选的酶解 pH。其中,最优的酶解 pH 为 3.0,其次为 8.0,再次为 7.0,因为在粘度允许的范围内,应当选取溶解度和透光率较高的酶解条件。在这 3 个优选的 pH 当中,pH3.0 时,蛋白的酸溶度和透光率最高,粘度较低;pH8.0 时,蛋白酸溶度和透光率较高,但粘度偏大;pH 7.0 时,虽然粘度很低,但是

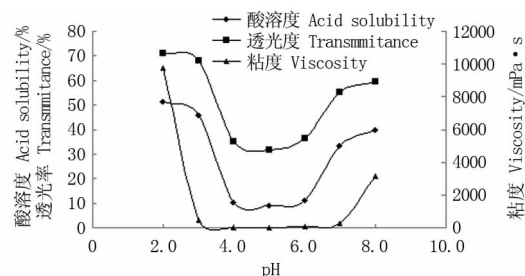


图 3 植酸酶酶解 pH 对大豆分离蛋白酸溶性的影响

Fig.3 Effect of the phytase processing pH on the acid solubility of SPI

溶解度和透光率相对最小。

2.1.4 酶解温度 固定酶解 pH3.0,底物浓度为 10%,加酶量 0.6%,酶解时间 45 min,植酸酶酶解温度对大豆分离蛋白酸溶性的影响如图 4 所示。随着温度的升高,酸溶度与透光率先升高后降低,在 40℃ 时酸溶度达到最大,透明度最高;而蛋白料液的粘度在 40℃ 以上迅速提高。因此,最优的酶解温度为 40℃。

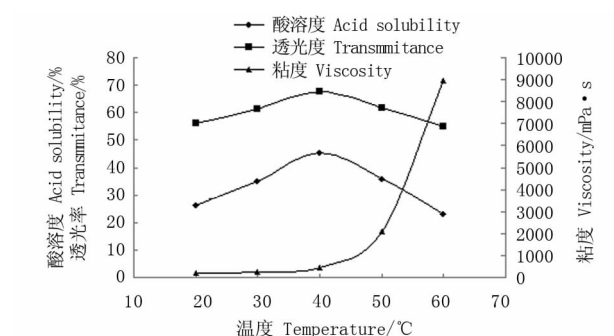


图 4 植酸酶酶解温度对大豆分离蛋白酸溶性的影响
Fig.4 Effect of the phytase processing temperature on the acid solubility of SPI

2.1.5 料液浓度 固定酶解 pH3.0,酶解温度 40℃,加酶量 0.6%,酶解时间 45 min,植酸酶酶解时的料液浓度对大豆分离蛋白酸溶性的影响如图 5 所示。随着料液浓度的提高,料液的粘度不断增大,而蛋白的酸溶度和透光率都缓慢下降。若料液浓度过低,设备利用率不高;若料液浓度过高,料液过于粘稠,后续工艺操作困难。因此,选择料液浓度在 8% ~ 12% 之间较为合适。综合试验结果,最佳料液浓度为 10%,此时料液的粘度在 450 mPa·s 附近,符合生产工艺的要求。

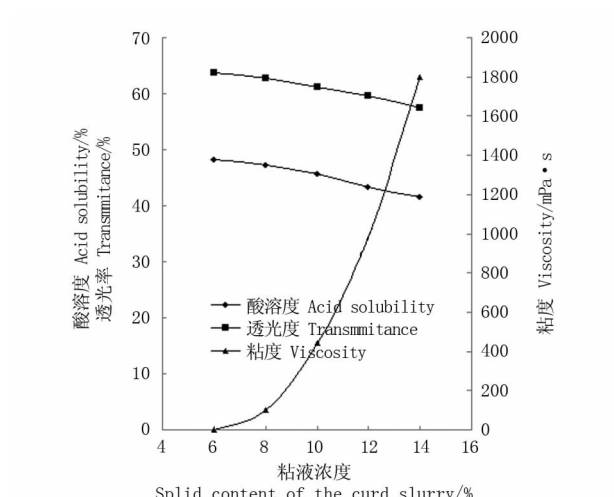


图 5 植酸酶酶解时的料液浓度对大豆分离蛋白酸溶性的影响
Fig.5 Effect of the solid content of the curd slurry on the acid solubility of SPI

2.2 正交试验

固定植酸酶的添加量为 0.6%,对 pH、温度、料液浓度和时间各因素按表 1 所示的因素和水平进行正交试验,结果见表 2。对正交试验结果的方差分析表明,4 个因素的重要性依次为温度 > pH > 料液浓度 > 酶解时间,其中温度和 pH 2 个因素具有显著性。最佳条件组合为 A₁B₂C₂D₂,即植酸酶酶解 pH3.0,酶解温度 40℃,蛋白料液浓度 10%,酶解时间 45 min;在该条件下得到的大豆蛋白的酸溶度为 45.79%,并测得其透光率为 68.5%,与单因素试验中相同条件下得到的酸溶度和透光率相符合。

表 1 植酸酶酶解条件的正交试验因素和水平

Table 1 Factors and levels in the orthogonal experiments of phytase treatment				
水平 Level	A pH	B 温度 Temperature/°C	C 料液浓度 Solid content of the curd slurry/%	D 时间 Time/min
1	3	30	8	30
2	7	40	10	45
3	8	50	12	60

表 2 植酸酶酶解条件的正交试验结果与分析

Table 2 Results and analyses of the orthogonal experiments of the phytase treatment					
试验号 Test No.	A	B	C	D	酸溶度 Acid solubility/%
1	1	1	1	1	38.36
2	1	2	2	2	45.79
3	1	3	3	3	33.19
4	2	1	2	3	21.24
5	2	2	3	1	34.66
6	2	3	1	2	23.75
7	3	1	3	2	27.42
8	3	2	1	3	42.87
9	3	3	2	1	30.91
偏差平方和 Sum of squared deviations	238.382	286.278	16.775	10.295	
自由度 Degrees of freedom	2	2	2	2	
F 比 F ratio	23.155	27.807	1.629	1.000	
F 临界值 F critical value	19.000	19.000	19.000	19.000	
显著性 Significance	*	*			

* 表示在 0.05 水平上具有显著差异。
* represent significantly different at 0.05 level.

3 结 论

植酸酶处理可以提高大豆分离蛋白在酸性条

件下的溶解度。单因素试验表明,植酸酶最适添加量 0.6%,最适酶解时间 45 min,最适酶解 pH3.0,最适酶解温度 40℃,最佳料液浓度 10%。正交试验分析表明,植酸酶酶解过程中影响大豆蛋白酸溶度的因素按重要性由高到低的顺序排列,依次为温度、pH、料液浓度和酶解时间,提高大豆蛋白酸溶度的最佳条件组合为温度 40℃,pH3.0,料液浓度 10%,酶解时间 45 min,此时大豆分离蛋白的酸溶度和透光率可以达到 45.79% 和 68.5%,与未经过植酸酶处理的对照相比,分别提高了 30.65% 和 29.4%。

参考文献

- [1] John E K. Functional properties of soy proteins[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1979, 56(3): 242-258.
- [2] Walter J W. Soybean proteins; their functional, chemical, and physical properties [J]. Agricultural Food Chemistry, 1970, 18(6): 969-976.
- [3] 周瑞宝. 植物蛋白功能原理与工艺[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007; 81-82. (Zhou R B. Plant protein function principle and process[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007; 81-82.)
- [4] Monica L, Richard S, Paul P, et al. Pectin stabilization of soy protein isolates at low pH[J]. Food Research International, 2007, 40: 101-110.
- [5] Roesch R, Juneja M, Monagle C, et al. Aggregation of soy/milk mixes during acidification [J]. Food Research International, 2004, 37: 209-215.
- [6] 张铁涛, 赵新淮. 外源性植酸酶在大豆乳中的应用[J]. 食品工业科技, 2006, 27(5): 106-108. (Zhang T T, Zhao X H. Study on the application of an external phytase in soybean milk[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(5): 106-108.)
- [7] Fadi A, Denis I, Francois L, et al. Characterization of low-phytate soy protein isolates produced by membrane technologies[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11: 162-168.
- [8] Marion M B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [9] 毛晓英, 华欲飞, 卢伟. 核桃蛋白质的研究进展[J]. 食品工业科技, 2009(9): 328-331. (Mao X Y, Hua Y F, Lu W. Research progress of walnut protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2009(9): 328-331.)
- [10] 骆倩, 郑力, 吴旭, 等. 核桃蛋白饮料工艺及其稳定性研究[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(12): 52-55. (Luo Q, Zheng L, Wu X, et al. Development of processing technology and stability of walnut protein beverage[J]. Dairy Industry, 2010, 38(12): 52-55.)
- [11] 黄翠姬, 刘昭明. 全脂核桃乳饮料生产关键工艺条件研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(4): 127-133. (Huang C J, Liu Z M. Study on the key technological conditions of whole fat walnut milky beverage production [J]. Food and Machinery, 2007, 23(4): 127-133.)
- [12] Deshpande R P, Chinnan M S, Mewatters K H. Nutritional, physical and sensory characteristics of various chocolate-flavored peanut-soy beverage formulations [J]. Journal of Sensory Studies, 2005, 20: 130-146.
- [13] 王中江, 江连洲, 李杨, 等. 大豆制品的营养成分及研究进展[J]. 中国食物与营养, 2010(4): 16-19. (Wang Z J, Jiang L Z, Li Y, et al. Progress of soybean products nutrients and research [J]. Food and Nutrition in China, 2010(4): 16-19.)
- [14] 陈鸽. 大豆蛋白对牛奶及乳饮料品质的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2009. (Chen G. Effect of soybean protein on the quality of milk and milk beverage[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009.)
- [15] 周玉宇, 吕兵. 核桃乳饮料的研制[J]. 食品科技, 2006, 31(2): 69-72. (Zhou Y Y, Lv B. Study on the walnut milk[J]. Food Science and Technology, 2006, 31(2): 69-72.)
- [16] 徐效圣. 核桃乳生产工艺研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2010. (Xu X S. Studies on the processing technology of the walnut milk[D]. Urumchi: Xinjiang Agricultural University, 2010.)
- [17] 刘晓红, 吴胜利, 万剑真, 等. 全果核桃蛋白饮料稳定性研究[J]. 食品工业, 2011(9): 52-54. (Liu X H, Wu S L, Wan J Z, et al. Study on stability of whole walnut milk beverage[J]. Food Industry, 2011(9): 52-54.)
- [18] A Report of the Panel on Macronutrients. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids (Macronutrients) [M]. National Academies Press (NAP), 2005: 589-590. [Internet Document] URL <http://www.nap.edu/books/0309085373/html>.
- [19] Deshpande R P, Chinnan M S, Phillips R D. Process development of a chocolate-flavoured peanut-soy beverage [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2008, 43: 886-894.

(上接第 110 页)