

低限度酶解制备低粘度弱苦味的大豆分离蛋白

葛文静, 华欲飞

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用几种常用酶制剂(木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、天野蛋白酶 PC10F 和 SDNY 10) 对大豆分离蛋白进行低限度酶解, 感官评价各种酶解蛋白的苦味值, 同时测定不同酶解大豆分离蛋白的粘度、凝胶性、悬浮稳定性等性质。结果表明: 天野蛋白酶 PC10F 酶解蛋白苦味最弱、粘度最小、悬浮稳定性最好, 但是几乎没有凝胶性。综合这几种性质, 木瓜蛋白酶酶解的大豆分离蛋白具有低粘度弱苦味弱凝胶性且悬浮稳定性较好等功能性质的改善。进一步用 70% 的乙醇将不同酶酶解的大豆分离蛋白中苦味肽提取出来, 感官评价各种酶产生的苦味肽的苦味值, 并运用 RP-HPLC 分析。由谱图发现随着苦味肽苦味值的增加, 疏水性肽段增多, 且 65 ~ 75 min 的肽段增加较明显, 可能此部分肽对苦味的贡献较大。

关键词: 大豆分离蛋白; 酶改性; 功能性质; 苦味肽

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2014)01-0114-05

Limited Enzymatic Hydrolysis of Soybean Protein Isolates to Obtain Hydrolysate with Lower Viscosity and Weaker Bitterness

GE Wen-jing, HUA Yu-fei

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The bitterness of soy protein isolate were evaluated after limited enzymatic hydrolysis by papain protease, alcalase, neutrase, amano protease, PC10F and SDNY 10, respectively, and determined the viscosity, suspension stability and gelling property of different enzymatic proteins. The result showed that amano protease PC10F could obtain protein with the lowest viscosity, weakest bitterness and best suspension stability, but it did not have gelling property. However, protein hydrolyzed by papain protease possess weak bitter and gelling property, low viscosity and good suspension stability. Furthermore, we extracted crude bitter peptides from hydrolysates by using 70% alcohol and determined the bitterness by sensory evaluation. Results showed the amount of hydrophobic peptides increased with the bitterness of bitter peptides by using RP-HPLC, especially from 65 to 75 min.

Key words: Soybean protein isolates; Enzyme hydrolysis; Functional properties; Bitter peptides

大豆分离蛋白是大豆制品中蛋白质含量最高、应用面最广的高附加值产品^[1]。这与其营养丰富且在食品加工、储藏和消费过程中体现出的良好功能性质有很大关系。蛋白质酶法水解条件温和, 能改善蛋白质功能特性(如溶解性、乳化性、起泡性、热稳定性等), 促使氨基酸组成趋于合理、风味更为突出, 降低蛋白质抗原性, 同时还能产生一系列具有生物活性的小肽^[2], 所以酶解蛋白常作为食品原料。天然蛋白质中疏水性氨基酸残基排列在分子内部, 不与味蕾接触, 故感觉不到苦味; 当蛋白质水解时, 随着肽链解离, 可呈现苦味的疏水性氨基酸残基或其形成小肽游离出来, 产生苦味^[3], 影响产品风味, 限制酶解产物的可接受性和应用范围。因此, 如何减弱或脱去这些苦味物质引起了人们的广泛关注^[4]。苦味的强弱与蛋白质来源、种类、酶的种类及水解度等因素有关^[5]。本试验选用常用的

几种商业酶制剂对大豆分离蛋白进行低限度水解, 同时测定其粘度、凝胶性等功能性质, 筛选出一种能使蛋白功能性质得到改善, 且苦味较小的酶制剂。并进一步用 70% 乙醇粗提各酶解蛋白中的苦味肽, 研究其 RP-HPLC 肽谱图规律。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

大豆分离蛋白(SPI 含氮量 94.43%), 哈尔滨高科技公司; 木瓜蛋白酶(papain), 上海生物工程公司; 菠萝蛋白酶(bromelin), 南宁庞博生物工程有限公司; 碱性蛋白酶(alcalase)、中性蛋白酶(neutrase), 诺维信(中国)生物技术有限公司; 天野蛋白酶 PC10F 和 SDNY10, 天野酶制剂公司; 奎宁(quinine), 上海蓝季公司; 三硝基苯磺酸(TNBS), Sigma 公司。

收稿日期: 2013-07-06

第一作者简介: 葛文静(1988-), 女, 在读硕士, 主要从事大豆蛋白研究。E-mail: gwjghj@163.com。

通讯作者: 华欲飞(1962-), 男, 博士, 教授, 主要从事植物蛋白相关研究。E-mail: yfhua@jiangnan.edu.cn。

TD25-WS 台式低速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;MCR301 旋转流变仪,Anton paar 公司;LGJ-18 冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;高效液相色谱仪,日本 Hitachi 公司;TCC-240A 紫外分光光度计,日本 Hitachi 公司;R-501 旋转蒸发器,上海申顺生物科技有限公司;SHB-III 循环水式多用真空泵,南京予凯仪器设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 氮含量的测定 半微量凯氏定氮法(GB 5009.5—1985)。

1.2.2 大豆蛋白的酶改性 将 10 g 大豆分离蛋白分散于 190 g 去离子水中,置于磁力搅拌器上搅拌 2 h,即得 1 份蛋白溶液样品。将蛋白溶液加热到所需温度后,调节相应酶适 pH,加入一定量酶液反应 30 min,待反应结束,将酶解液置于沸水浴中,常压加热 10 min 灭酶,冷却后,冷冻干燥。

1.2.3 水解度(DH)的测定 TNBS 法^[6]测定酶解蛋白的水解度。

1.2.4 粘度的测定 将得到的酶解大豆蛋白干粉溶于去离子水中,配置浓度为 16% 的溶液,于磁力搅拌器上搅拌 30 min 后测定粘度变化。测定参数:测试类型为稳态转动,夹具为 60 mm 2° 不锈钢锥板,样品间隙 1 mm,温度 25℃,剪切速率 0.1~250 s⁻¹。

1.2.5 凝胶性的测定 采用流变仪进行频率扫描:夹具 60 mm 2° 不锈钢锥板,样品间隙 1 mm,温度 25℃,固定形变 0.01,扫描频率 0.1~10 Hz^[7]。

1.2.6 悬浮稳定性的测定 采用离心沉淀率大小来评价悬浮稳定性。取一定量不同蛋白酶酶解的蛋白粉分散于去离子水中,配置 3% 的蛋白溶液,于 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min,称取离心管底部沉淀物的重量,每个样品进行 3 次重复,通过下式计算离心沉淀率^[8]。

$$\text{离心沉淀率}/\% = \frac{\text{沉淀重量}}{\text{离心样品总量}} \times 100$$

1.2.7 苦味肽的提取 取 3 g 酶解蛋白溶于 57 mL 去离子水中,置于磁力搅拌器上搅拌 1 h,加入无水乙醇,使乙醇浓度达到 70%,静置 10 min 后,4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min。取上清液旋转蒸发后冷冻干燥得苦味肽。将沉淀真空蒸掉酒精后加少量水冷冻干燥。

1.2.8 苦味的评定方法 将不同酶解蛋白溶于去离子水中,配置 3% 的待评定液 A。将提取的不同酶的苦味肽溶于去离子水中,配置 0.5% 的待评定液 B。

感官评定小组由 5 人组成,评定员用蒸馏水漱口之后,取待评定液 2~3 mL 置于口中,10 s 后吐出,漱口后取与之味道相近的标准液品尝,如确认两味道相近,即可将待评定液的苦味值定为该标准

液的苦味值,否则需取其他标准液再尝,直至确定苦味值。取 5 人评定的平均值以奎宁为基准物质。经评定当标准液浓度为 $c(3 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$ 时,刚好无苦味,定 c 值为下限,32 c 为上限。此时若再增加奎宁浓度,苦味基本上不再增加。在 $c \sim 32c$ 之间,奎宁浓度成倍增加,苦味值也相应增加。据此设定评分标准:奎宁浓度为 c 无苦味,苦味值为 0;2 c 微苦,苦味值为 1;4 c 中度苦,苦味值为 2;8 c 较苦,苦味值为 3;16 c 苦,苦味值为 4;32 c 很苦,苦味值为 5^[9]。

1.2.9 RP-HPLC 表征苦味肽 称取一定量冷冻干燥的苦味肽,溶于去离子水中浓度为 10 mg·mL⁻¹,通过孔径 0.45 μm 的醋酸纤维素膜,上清液以 A 乙腈(0.085% 三氟乙酸)和 B 水(0.1% 三氟乙酸)为流动相^[10],色谱柱 250 × 4.6 mm,5 μm YMC-Pack Pro C18 column(YMC Co., Ltd, Kyoto, Japan)梯度洗脱,柱温:30℃,检测波长为 214 nm。洗脱梯度为:0~10 min, A 95%, B 5%;10~70 min, A 95%~60%, B 5%~40%;70~85 min, A 60%~95%, B 40%~5%;85~95 min, A 95%, B 5%。

2 结果与讨论

2.1 TNBS 法测定酶解蛋白的水解度

随着水解度增大,酶解蛋白产生的苦味肽会增多,使苦味值变大。为确保不同酶酶解的大豆分离蛋白水解度相近,按照 Jens Adler-Nissen TNBS 法测定酶解蛋白的水解度。如图 1 所示,这 6 种酶解蛋白的水解度均在 3 左右。可以排除水解度差异对苦味的影响。

2.2 不同酶解蛋白的功能性质

2.2.1 粘度 低限度酶解可以一定程度地改善大豆分离蛋白的性质,酶作为一种具有生理活性的特殊蛋白质,活性中心不同,其相应的水解专一性亦不同,对同一种蛋白质选用不同的蛋白酶进行水解,得到酶解蛋白的性质亦有差异。图 2 为各酶对大豆分离蛋白酶解液在剪切速率 100 s⁻¹ 时的粘度的比较,可以看出,酶解后的粘度均比原蛋白降低,而天野蛋白酶 PC10F 酶解的蛋白粘度最低。

同时根据 OSAANA N. DONKOR 和 A. HENRIKSSON 的黏度模型 $\eta = \tau/\gamma = \kappa\gamma^{n-1}$ 推导计算出不同酶解蛋白的稠度系数,其中 η 为粘度(Pa·s), τ 为剪切应力(Pa), γ 为剪切速率(s⁻¹), κ 为稠度系数, n 是描述非牛顿流体物理性质的参数。稠度系数越小则表明体系粘度越低^[11]。如表 1 所示,天野蛋白酶 PC10F 的稠度系数最小即该酶酶解得到的大豆分离蛋白粘度最低,这与剪切速率 100 s⁻¹ 下的不同酶解蛋白粘度的比较结果一致。

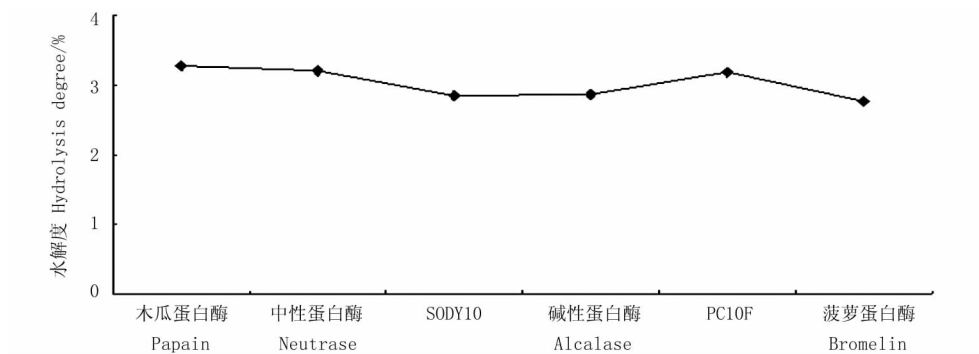


图1 不同酶酶解大豆分离蛋白的水解度

Fig.1 The hydrolysis degree of different hydrolysates

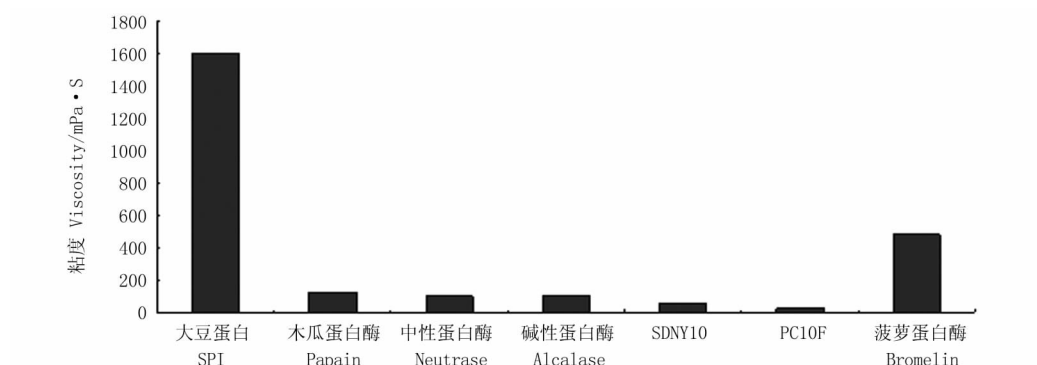


图2 不同酶解蛋白的粘度

Fig.2 The viscosity of different hydrolysates

表1 粘度模型计算的稠度系数

Table 1 Consistency index of different hydrolysates

	原大豆 蛋白 SPI	木瓜蛋白酶 Papain	中性蛋白酶 Neutrase	碱性蛋白酶 Alcalase	SDNY10	PC10F	菠萝蛋白酶 Bromelin
稠度系数 Consistency index	180.68	3.16	1.14×10^{-2}	1.32×10^{-2}	3.37×10^{-5}	2.7×10^{-16}	34.47

2.2.2 凝胶性 由于酶解后的蛋白形成的凝胶较弱,故采用流变仪进行频率扫描, G' 和 G'' 可作为评价粘弹性体粘性及弹性大小的指标。损耗角正切 $\tan\delta = G''/G'$,表征了体系的粘弹性特征,损耗角正切越大,则体系越表现为流体的特征;损耗角正切越小,则体系越表现为固体的特征^[7]。如图3所

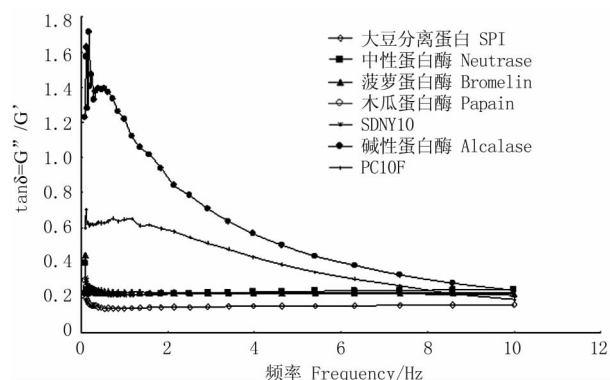


图3 不同酶解蛋白的凝胶性

Fig.3 The gelling property of different hydrolysates

示,经过蛋白酶酶解后的大豆分离蛋白,凝胶性较原蛋白减弱,其中中性蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶和天野酶 SDNY10 的酶解蛋白凝胶性相似,均为弱凝胶。而碱性蛋白酶和天野酶 PC10F 的酶解蛋白几乎不形成凝胶,流体特征较明显。

2.2.3 不同酶解蛋白的悬浮稳定性 由图4可以看出,酶解之后蛋白的离心沉淀率较原大豆分离蛋白明显降低,表明酶解后的大豆分离蛋白悬浮稳定性得到改善。其中天野蛋白酶 PC10F 酶解蛋白的悬浮稳定性最好,然后依次为碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和天野酶 SDNY10。

2.3 不同酶酶解蛋白及相应苦味肽的苦味值

由图5可知,苦味最强的是中性蛋白酶酶解的大豆分离蛋白,其次是碱性蛋白酶和天野酶 SDNY10,苦味最弱的是天野酶 PC10F。用70%乙醇可以将酶解蛋白中的苦味肽提取出来,所以苦味肽的苦味明显比酶解蛋白增强。

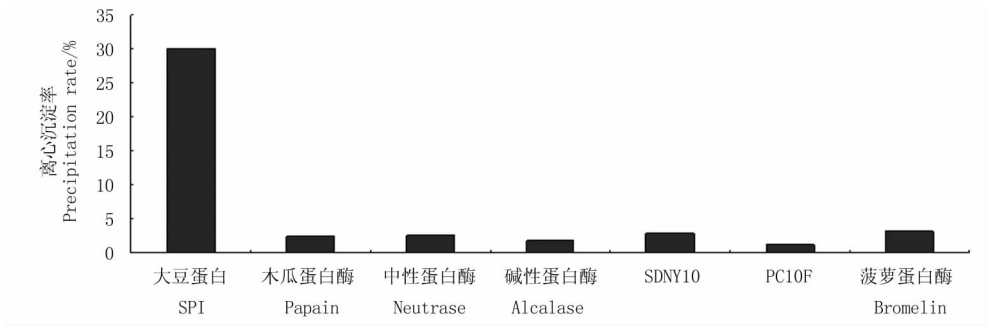


图 4 不同酶解蛋白溶液的离心沉淀率

Fig. 4 The centrifugation precipitating rate of different hydrolysates

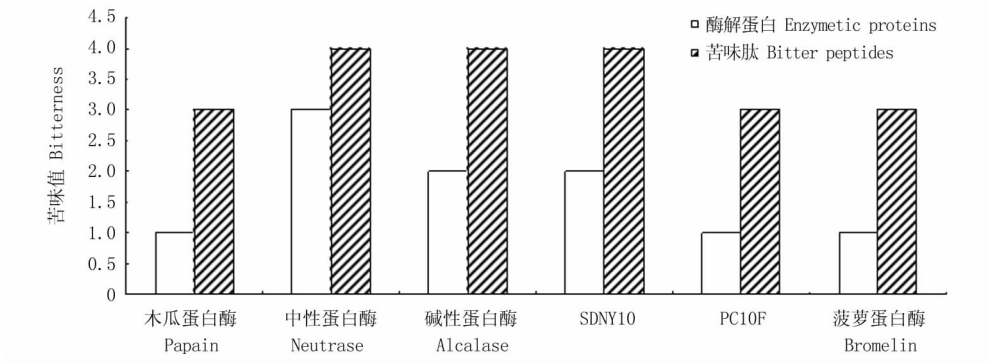


图 5 不同酶解蛋白及 70%乙醇提取肽的苦味值

Fig. 5 The bitterness of different hydrolysates and bitter peptides

2.4 不同酶提取的苦味肽的 RP-HPLC 谱图

从图 6 可以看出,苦味较强的中性蛋白酶、碱性蛋白酶和天野蛋白酶 SDNY10 的酶解蛋白提取肽中

疏水性肽段较多,尤其是 65 ~ 75 min 以后出现的疏水性肽段增多且峰面积较大,可能这部分肽段对苦味的贡献较大。

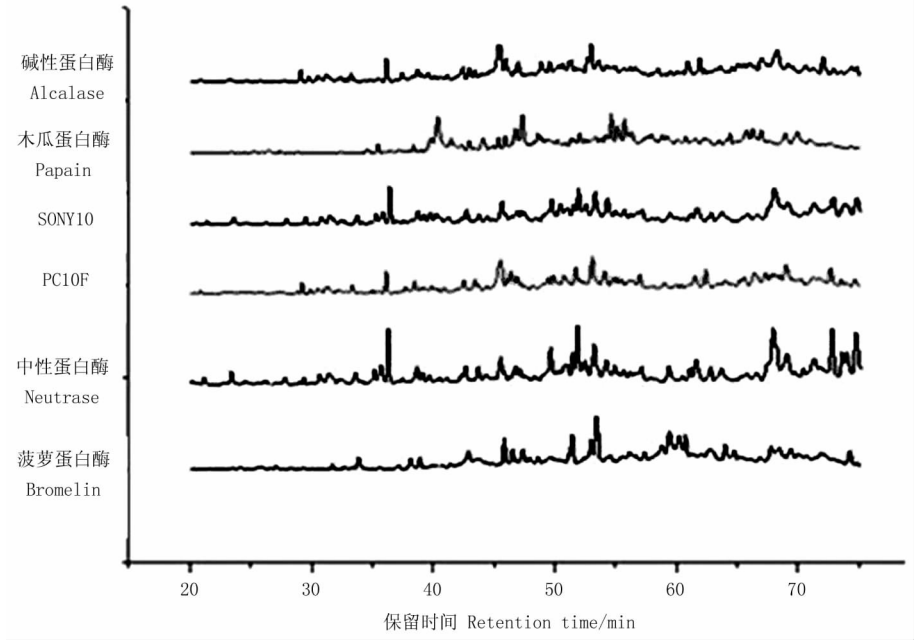


图 6 不同酶解蛋白 70%乙醇提取肽的 RP-HPLC 谱图

Fig. 6 The RP-HPLC graphs of different bitter peptides

3 结 论

木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、天野蛋白酶 PC10F 和 SDNY10 这 6 种酶制剂

对大豆分离蛋白进行低限度酶解后,天野蛋白酶 PC10F 的苦味最小,粘度最低,悬浮稳定性最好,但是几乎没有凝胶性。综合这几种性质,木瓜蛋白酶酶解的蛋白苦味较弱,粘度较低,悬浮稳定性也较

好,并能形成弱凝胶。进一步用 70% 的乙醇提取不同酶解的大豆分离蛋白中的苦味肽,通过 RP-HPLC 分析,发现随着苦味的增加,疏水性肽段增多,且不同酶解蛋白中提取的苦味肽在 65 ~ 75 min 之间的谱图差别较明显,苦味越大,肽峰越多、峰值越高、峰面积也越大,因此推断此部分肽段对苦味值的贡献较大。

参考文献

- [1] 赵国华,明建,陈宗道. 酶解大豆分离蛋白乳化特性的研究[J]. 中国粮油学报,2002,17(2):1-3. (Zhao G H, Ming J, Chen Z D. Study on the emulsifying property of enzyme hydrolysis soybean protein isolates[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2002, 17(2): 1-3.)
- [2] 逯昕,华欲飞. 酶改性制备低黏度弱凝胶型大豆分离蛋白[J]. 中国油脂,2008,33(2):18-21. (Lu X, Hua Y F. Enzymatic modification of soy protein isolate to obtain hydrolysate with lower viscosity and weaker gel strength[J]. China Oils and Fats, 2008, 33(2): 18-21.)
- [3] 周雪松. 蛋白质酶解物苦味形成机理及控制研究[J]. 粮食与油脂,2004(8):20-24. (Zhou X S. Study on forming mechanism and control methods of bitter taste from protein hydrolysates[J]. Journal of Cereals and Oils, 2004(8): 20-24.)
- [4] 邓靖,林亲录. 酶法脱除蛋白水解产物苦味的研究进展[J]. 中国食品添加剂,2004(3):67-72. (Deng J, Lin Q L. Research on methods through protease to debitter the protease hydrolysates[J]. China Food Additives, 2004(3): 62-72.)
- [5] 陶红,梁歧,赵谋明. 双酶法水解对大豆寡肽苦味的影响[J]. 华南理工大学学报,2006,4(8):121-124. (Tao H, Liang Q, Zhao M M. The effect on bitterness of soy oligo-peptides by doubled enzymes hydrolysis[J]. Journal of South China University of Technology, 2006, 4(8): 121-124.)
- [6] Jens A N. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1979, 27: 1256-1262.
- [7] 逯昕. 酶改性制备专用大豆分离蛋白的研究[D]. 无锡:江南大学,2008:24,30. (Lu X. Study on enzymatic modification of special soybean protein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008: 24, 30.)
- [8] 吴金鋈,刘通讯. 微细化处理对全豆蛋白饮料稳定性的影响[J]. 现代食品科技,2009,25(11):1246-1249. (Wu J L, Liu T X. Effects of micronized treatment on stability of whole-seed protein[J]. Modern Food Science & Technology, 2009, 25(11): 1246-1249.)
- [9] 冯学武. 大豆蛋白酶法水解物的苦味机理及脱苦方法的研究[D]. 北京:中国农业大学,2001:13. (Feng X W. Study on bitter mechanism of enzymatic hydrolysate of soybean isolate protein and debittering methods[D]. Beijing: China Agricultural University, 2001: 13.)
- [10] Bas J H K, Bakx E J, Harry G. Functional region identification in proteins by accumulative-quantitative peptide mapping using RP-HPLC-MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 9337-9344.
- [12] Osaana N D, Henriksson A, Vasiljevic T, et al. Rheological properties and sensory characteristics of set-type soy yogurt[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 9868-9876.

(上接第 109 页)

3 结 论

将 20% 豆粕溶液在 90℃ 下预热处理 10 min,在温度 37℃、pH1.8、酶添加量 $14\ 000\ \text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ 、水解 3 h 时的水解工艺条件下,水解度达 23.4%。此时大豆蛋白水解液中多肽混合物的分子量大都在 1 000 D 左右,疏水性基团也暴露得最多,适宜与其他化学药剂发生交联反应而制备大豆蛋白胶黏剂。

参考文献

- [1] 迟玉杰,朱秀清,李文滨,等. 大豆蛋白质加工新技术[M]. 北京:科学出版社,2008:294-301. (Chi Y J, Zhu X Q, Li W B, et al. The new technology of soybean protein processing[M]. Beijing: Science Press, 2008: 294-301.)
- [2] 张亚慧. 改性大豆蛋白胶黏剂的合成与应用技术研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2010:17-19. (Zhang Y H. The synthesis and application technology of modified soybean protein adhesive[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry Sciences, 2010: 17-19.)
- [3] 王东. 酶法生产大豆多肽及苦味肽的研究[D]. 西安:陕西科技大学,2005:27-34. (Wang D. Study on produce soybean peptides by using enzyme and research on bitterness peptides[D]. Xi'an: Shaanxi University of Science and Technology, 2005: 27-34.)
- [4] 冯学武. 大豆蛋白酶法水解物的苦味机理及脱苦方法的研究[D]. 北京:中国农业大学,2001:15-17. (Feng X W. Study on bitterness mechanism for enzymatic hydrolysate of soybean isolate protein and debittering methods[D]. Beijing: China Agricultural University, 2011: 15-17.)
- [5] 丁玉萍,韩诚武,陈会海,等. 一种复合蛋白酶水解大豆蛋白最适工艺条件的研究[J]. 食品工程,2011(2):132-134. (Ding Y P, Han C W, Chen H H, et al. A method of study on the optimal process conditions for enzymatic hydrolysis of soybean protein[J]. Food Engineering, 2011(2): 132-134.)
- [6] 郭勇,郑穗平. 酶学[M]. 广州:华南理工大学出版社,2000:142-145. (Guo Y, Zheng S P. Enzymology[M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2000: 142-145.)
- [7] 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,2008:35-36. (Sun Y M. The antioxidative soybean peptide produced by enzymic method and it's antioxidative active preserve technique[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008: 35-36.)
- [8] 陶红,梁歧,张鸣镝. 热处理对大豆蛋白水解度的影响[J]. 中国油脂,2003,28(9):61-63. (Tao H, Liang Q, Zhang M D. Effect of heat treatment on hydrolysis degree of soybean protein[J]. China Oils and Fats, 2003, 28(9): 61-63.)
- [9] 周志红,唐传核,杨晓泉. 大豆蛋白的模拟体外消化过程及热处理的影响[J]. 食品科学,2006,27(1):37-40. (Zhou Z H, Tang C H, Yang X Q. In vitro study on digestibility of soy protein isolates and effects of thermal treatments[J]. Food Science, 2006, 27(1): 37-40.)