

反胶束中蛋白酶对前萃取蛋白和油脂的影响^{*}

杨宏顺¹ 陈复生²

(1. 上海交通大学机械与动力工程学院, 上海 200030; 2. 郑州工程学院粮油食品学院, 郑州 450052)

摘要 在 AOT/ 异辛烷反胶束体系中加入蛋白酶, 研究蛋白酶对豆粉萃取分离大豆蛋白和油脂的影响。在 40—50℃, 对豆粉进行 80℃, 2min 水浴预处理可提高蛋白的萃取率。与不加酶相比, 在 35—40℃蛋白酶可以显著提高反胶束中大豆蛋白的萃取率, 在 40℃时, 以 0.2mol·L⁻¹ 的 pH 值为 8.0 的枯草杆菌中性蛋白酶 AS1.398 液作增溶液的的反胶束萃取, 蛋白前萃取率达到 65.5%, 不加酶时为 56.8%。萃取 120min 时, 添加中性蛋白酶 AS1.398 和碱性蛋白酶 2709 组的油脂的前萃取率比不加蛋白酶组低 1.75% 和 0.877%。萃取 60min 时反胶束的油脂的萃取率为正己烷萃取的 94.68%。表明蛋白酶对蛋白质进入水核过程或进入后可能起作用, 对萃取油脂作用不显著。

关键词 反胶束; 大豆蛋白; 油脂; 蛋白酶; 前萃

中图分类号 TS 201.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2003)04—0257—04

0 前言

表面活性剂溶于有机溶剂, 当浓度大于临界胶团浓度时, 在有机相中形成聚集体, 称为反胶束。如图 1 所示。反胶束中称为“水池”的亲水内核具有增溶蛋白质、酶的能力, 并且保持蛋白或酶的活性。

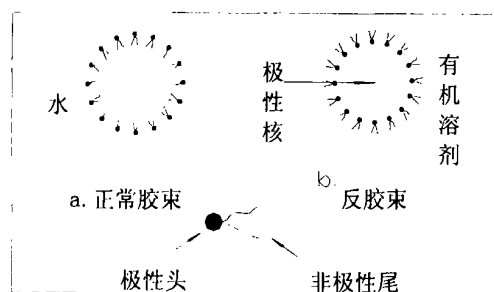


图 1 胶束与反胶束

Fig. 1 Micelles and reverse micelles

Leser 等^[1]首次提出用反胶束技术同时分离植物油脂与蛋白, 将向日葵和大豆粉溶于 AOT/ 异辛烷反胶束体系, 大豆蛋白增溶于反胶束极性“水池”内, 同时油脂萃取入异辛烷中, 即为前萃, 然后用水相, 通过调节离子强度等, 使蛋白转入水相, 离心

分离, 实现反萃。上层有机相降温或柱层析分离出 AOT, 然后蒸馏分离异辛烷和油脂。下层蛋白液经精制得液态或粉状产品^[1-4]。

作者研究了中性蛋白酶 AS1.398 和碱性蛋白酶 2709 的酶活力性质^[5,6], 反胶束体系能很好地保持这两种蛋白酶的活性, 设想在前萃取分离大豆蛋白和油脂时加入蛋白酶, 则可以同时得到酶解蛋白和油脂, 然后可用一高浓度盐溶液反萃出来。本文研究蛋白酶对前萃取中蛋白萃取率的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 全脂大豆粉 郑州油脂化学厂提供;

1.1.2 试剂 AOT(二-(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠), 异辛烷、氯化钾、无水甲醇、卡尔费休溶液, 硫酸钾、硒粉、层析用硅胶、Na₂HPO₄·12H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O、KH₂PO₄、枯草杆菌 AS1.398 中性蛋白酶, 碱性蛋白酶 2709, 无锡星达生物工程有限公司。

1.1.3 仪器

ZSD—I 型自动水分测定仪, THI—8L 型气浴恒

* 收稿日期: 2003—03—31

基金项目: 河南省科技攻关项目(971070103)

作者简介: 杨宏顺(1977—), 男, 博士生, 研究方向食品传热质工程。

温振荡器, IG 10—2.4 型离心机, 凯氏定氮仪, 分析天平, 恒温磁力搅拌器, 微量进样器, 真空薄膜旋转蒸发器, 柱层析装置。

1.2 实验方法

1.2.1 原料(大豆)中油脂、蛋白质和水分含量^[3]

1.2.2 缓冲液的配制^[3]

1.2.3 反胶束溶液的配制

称取一定量(如 1.6g)AOT, 放入 100mL 的锥形瓶中, 加入 20mL 的异辛烷, 待其完全溶解后, 向溶液中加入一定量的 KCl 液(0.1M, pH 7.0), 根据加入 KCl 液量可调节反胶束溶液的 W0 值。

1.2.4 用反胶束溶液萃取大豆中的蛋白质^[3]

将准确称量的 0.4g 左右(精确到 0.0001g)的大豆粉加入上述 1.3.2 所述反胶束溶液中。将锥形瓶置于振荡器中, 180 r/min, 振荡 2h。然后 3000r/min, 5min 离心分离, 取上清液凯氏定氮(以萃取前的反胶束溶液作为空白样)。

蛋白质前萃取率(S)= 反胶束中蛋白质量/加入蛋白质量×100%

1.2.5 蛋白酶作用研究

在 1.2.3 所示配置反胶束溶液时, 用蛋白酶的 KCl 溶液代替 KCl 水溶液, 其余不变。按 1.2.4 萃取后取样立刻消化, 同时酶反应终止。

1.2.5.1 原料预处理对蛋白萃取率的影响

待萃取豆粉分别用 0.1mol/L KCl, pH 7.5 和 0.2mol/L KCl, pH 9.2 的缓冲液溶解后, 80℃水浴加热 2 min, 分别添加 AS1.398 和碱性蛋白酶 2709 浓缩酶溶液, 然后按照反胶束的 W0 值补足水分, 以大豆粉量折算豆粉溶液按 1.2.4 进行前萃取操作。

1.2.5.2 蛋白酶溶液条件对萃取蛋白的影响

选择两种蛋白酶分别酶活性较高时的溶液 pH 值和盐浓度情况, 比较不同 pH 值和盐浓度条件下蛋白酶对蛋白前萃取率的影响^[5,9]。

1.2.6 油脂萃取率的计算

反胶束萃取的溶液用等体积的 1.0M KCl 溶液振荡分离反萃 1.5hr, 将前萃取的油脂充分反萃出来, 然后将上层溶液经离心机离心分离(3000r/min)后, 用柱层析的方法将溶剂相的表面活性剂分离(约 3—4hr), 得到的混合油在旋转薄膜蒸发器内真空蒸发除去溶剂(也可用 105℃恒重法)后称重得到。

油脂萃取率(O%)= 溶剂相中油的质量/萃取用豆粉的油的质量×100%

2 结果与讨论

2.1 试验所用豆粉主要成分分析

2.2 加入蛋白酶对蛋白萃取的影响

2.2.1 预处理对蛋白萃取的影响

图 2 表示预处理对酶法萃取的影响, 由图 2 可知, 在 30℃时, 蛋白酶的活性较低, 而且由于原料先用溶液调成糊状, 传质较颗粒状小, 结果萃取率小于未预处理组。中性蛋白酶与碱性蛋白酶作用的萃取率的不同部分来自于所用的 pH 值和盐浓度。^[3] 在 40—45℃之间, 经过预处理后蛋白萃取率明显增大, 此时蛋白酶的活性很高。说明蛋白酶解作用强烈, 同时由于蛋白酶对蛋白质的强的吸引定位作用, 蛋白质的萃取率增加^[7]。经过预处理后, 蛋白分子中紧密折叠在一起的多肽链复杂结构能够得到很好的破坏, 有利于酶的作用。而在 50℃时, 无论是否经过预处理, 蛋白萃取率均大大降低, 因为萃取所用的反胶束浓度很高, 高浓度的反胶束体系在温度较高时很不稳定, 不利于蛋白质的萃取。

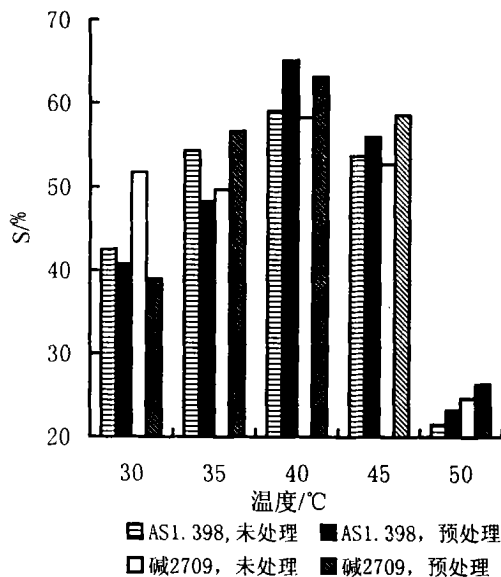


图 2 原料预处理对蛋白前萃取率的影响

Fig 2 The effect on pretreatment of the soybean powder to the protein extraction rate

2.2.2 不同蛋白酶对萃取蛋白的影响

图 3 表示加入不同酶对酶法萃取蛋白的蛋白萃取率的影响, 由图 3 可见, 30℃时, 碱性蛋白酶使蛋白萃取率有所增大, 而中性蛋白酶在此温度下蛋白萃取率没有增加, 反而因为它的加入使体系更为复杂^[8], 导致蛋白萃取率降低。在 35—40℃, 酶液均起到了催化作用, 特别是中性蛋白酶在 0.2mol/L—1, pH 8.0 时萃取蛋白效果最佳, 酶在此温度范围

内活性比较高,因而蛋白萃取率增加较快^[9]。而在40℃到50℃之间,蛋白萃取率降低,同样是由于

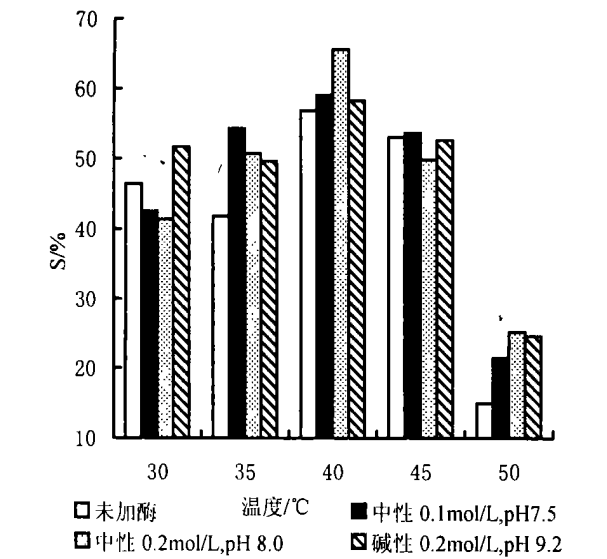


图3 酶的条件对蛋白萃取率的影响

Fig 3 The effect of enzyme condition on the protein extraction rate

温度较高时反胶束体系变得不稳定,反胶束体系发生了变化造成的。

比较不同温度下添加蛋白酶作用对蛋白萃取率的显著性影响,在35℃下酶的作用最为明显,三种条件下分别比没有添加蛋白酶的高约20%。

2.2.3 蛋白酶对萃取油脂的影响

不同工艺条件对油脂萃取率的影响见表1,前五组实验均为不同时间和加酶情况反胶束萃取油脂的萃取率,与正己烷萃取60min相比。由表1可知,反胶束萃取时,在60min前萃取率增加较快,60min后萃取率增加很少。与正己烷萃取相比,60min时反胶束萃取油脂的萃取率为正己烷的94.68%。因为反胶束中除极性“水核”外,大部分溶剂相是由异辛烷构成的。而异辛烷的性质与正己烷的性质很相似,而异辛烷非极性略小于正己烷,萃取油脂的能力也略低于正己烷。由萃取时间,在前60min,萃取油脂几乎达到平衡,说明反胶束萃取油脂是个快速的过程^[8]。加入中性蛋白酶AS1.398和碱性蛋白酶2709,萃取2hr后油脂的萃

表1 萃取工艺条件对油脂萃取率的影响

Table 1 The effect of extraction technology on the oil extraction rate

萃取条件/min	30	60	120	中酶, 120 Neutrase, 120	碱酶, 120 Alcalase, 120	正己烷, 60 Hexane, 60
O/ %	50.1	71.2	79.8	78.4	79.1	75.2

取率分别比不加酶的低1.75%和0.877%。

3 结论与展望

3.1 反胶束中加入蛋白酶可以应用于分离蛋白和油脂。

3.2 在40℃时,用0.2mol·L⁻¹的pH值8.0的枯草杆菌中性蛋白酶AS1.398液作增溶溶液,蛋白前萃取率达到65.5%,不加酶时为56.8%,表明蛋白酶可以提高蛋白的前萃取率。

3.3 反胶束中分别加入中性蛋白酶AS1.398和碱性蛋白酶2709,萃取2hr后油脂的萃取率分别比不加酶的低1.75%和0.877%;与正己烷相比,萃取60min时反胶束的油脂的萃取率为正己烷的94.68%。

3.4 蛋白酶对蛋白萃取量的变化,表明蛋白酶对蛋白起作用。

参 考 文 献

1 Leser M E, Kristina R Luide P. The use of reverse micelles for the simultaneous extraction of oil and protein from vegetable meal[J] . Biotechnol. Bioeng., 1989, 34(11): 1140—1146.

2 杨宏顺, 陈复生, 于志玲, 等. 反胶束萃取技术在食品科学中的研究进展[J] . 郑州工程学院学报, 2001, 22(4): 66—70.

3 杨宏顺, 陈复生, 赵俊廷. 反胶束溶液同时分离大豆蛋白和油脂的前萃研究[J] . 食品科技, 2002, 1: 16—18.

4 Chou S T, Chiang B H. Reversed Micellar Extraction of Hen Egg Lysozyme [J] . J Food Sci., 1998, 63(3): 399—402.

5 杨宏顺, 陈复生, 赵俊廷, 等. 反胶束中性蛋白酶AS1.398活力的研究[J] . 郑州工程学院学报, 2002, 23(2): 10—13.

6 杨宏顺, 陈复生, 李云飞, 等. 反胶束中碱性蛋白酶2709活力的研究[J] . 食品科学, 2002, 24(4): 1—4.

7 Marangoni A G. Effects of the interaction of porcine pancreatic lipase with AOT/isooctane reverse micelles on enzyme structure and function follow predictable patterns[J] . Enzyme Microb. Technol., 1993, 15: 944—949.

8 Dekker M, Riet K V, Bijsterbosch B H, et al. Mass Transfer Rate of Protein Extraction with Reversed Micelles[J] . Chem. Engi. Sci., 1990, 45(9): 2949—2957.

9 Kashyap M C, Agrawal Y C, Sarkar B C, et al. Response surface analysis of enzyme aided extraction of soybean[J] . J. Food Sci. Technol., 1997, 34(5): 386—389.

THE EFFECT OF PROTEASES IN REVERSE MICELLES ON THE FORWARD EXTRACTION OF SOYBEAN PROTEIN AND OIL

Yang Hongshun¹ Chen Fusheng²

(1. *School of Mechanical and Dynamic Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200030;*

2. *School of Grain & Oil Food, Zhengzhou Institute of Technology, Zhengzhou, 450052*)

Abstract The proteases were added into the AOT/iso—octane reverse micelles to study the effects of the proteases on the extractions of soybean protein and oil from soybean powder. Between 40 °C and 50 °C, pretreatment of the soybean powder with 80 °C, 2min water bath can increased the protein extraction rate. Contrast with no proteases added, proteases could increase the protein extraction rate at 35—40 °C. At 40 °C, the forward protein extraction rate was 65.5% when 0.2mol L⁻¹ pH8.0 neutrase AS1.398 solution dissolved; 56.8% with no proteases but only KCl solution in reverse micelles. At 120min, the oil extraction rate of reverse micelles with AS1.398 and Alkalase 2709 were 1.75% and 0.877% respectively lower than that with no proteases. At 60min, the oil extraction rate of reverse micelles was 94.68% of that with hexane extraction. It showed proteases have some actions on the protein before or after it dissolved into the water nucleus of reverse micelles, nowever, with no signinfluence on extraction.

Key words Reverse micelles; Soybean protein; Oil, protease; Forward extraction

欢迎订阅 2004 年《种子世界》

《种子世界》杂志是由黑龙江省种子协会、中国种子协会、中国种子贸易协会主办,我国种业界多家具具有强大实力的种子经营单位共同协办的种子综合指导类月刊。大 16 开本,内文 56 页,每月 15 日出版;每期定价 7.00 元,全年 84.00 元。

杂志社地址:哈尔滨市文昌街 99 号 邮编:150008

电话:0451—82624517 82631124(传真)

开户行:哈尔滨市农行南岗支行 户头:种子世界杂志社

帐号:046201040000242