

大豆中脲酶抗营养因子的钝化方法研究

安红波,秦学功,陈 向,于佩琳

(黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院,黑龙江 大庆 163319)

摘 要:采用正交试验设计对化学钝化法(亚硫酸钠法)和物理钝化法(微波法和超声波法)进行比较。结果表明:化学法钝化的最优钝化工艺条件为: Na_2SO_3 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,温度 75°C ,钝化时间 60 min;物理微波法钝化为:微波功率 230 W,时间 90 s,粉碎度为过 60 目筛;物理超声波钝化法为:加水量 20 mL,时间 30 min,粉碎度为过 60 目筛。3 种钝化方法处理后,脲酶活性均低于 0.3 U,符合优质饲料的要求。

关键词:大豆;脲酶;抗营养因子;钝化方法

中图分类号:S816.42

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)02-0294-04

Research on Deactivated Methods of Soybean Urease Anti-nutrition Factors

AN Hong-bo, QIN Xue-gong, CHEN Xiang, YU Pei-lin

(College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China)

Abstract: The present study compared the chemical and physical deactivation methods of urease anti-nutrition factors in soybean meal by orthogonal experimental design. The results showed that the optimized conditions were deactivated soybean meal with $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{SO}_3$ for 60 min at 75°C for chemical deactivation method; treated at 230 W for 90 s with the soybean particle size of 60 mesh sieve for microwave deactivation method; adding 20 mL H_2O reacted 30 min with the soybean particle size of 60 mesh sieve for physical ultrasonic method. The urease activities were lower than 0.3 U after these three deactivated processes and accorded with the standard of high quality feeds.

Key words: Soybean; Urease; Anti-nutritional factors; Deactivated methods

大豆因其蛋白质含量高和氨基酸平衡性好而成为畜禽优良的植物性蛋白质源。但大豆中存在着一些严重制约大豆丰富营养高效利用的生物活性复合物—大豆抗营养因子^[1],它们阻碍营养物质的消化吸收,降低大豆蛋白的利用效率,更危及动物的健康与生长繁殖,严重影响畜牧业生产与发展^[2]。消除大豆中抗营养因子的作用,主要通过减少抗营养因子含量和降低或钝化其活性来实现。国家颁布有关大豆制品中抗营养因子检测标准中均以脲酶活性作为大豆制品中“抗营养因子指标”^[3]。脲酶活性只要在 $0.03 \sim 0.40 \text{ U}$ 范围内,饲用效果均良好^[4]。

大豆抗营养因子的钝化通常有物理法和化学法。化学钝化一般都是在生大豆制品或结晶物中加入一定的化学物质,使抗营养因子失活或活性降低^[5]。该方法设备简单化学残留量很低。物理钝化是利用抗营养因子的热不稳定性,经适宜的加热处理,使大豆蛋白质的可溶性降低,抗营养因子失

活或变性,有效改善大豆中蛋白质等营养成分的消化率^[6]。该文采用正交试验法比较了化学钝化法(亚硫酸钠法)和物理钝化法(微波法和超声波法)以确定钝化大豆脲酶抗营养因子的最优工艺条件,为指导优良饲料生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料与试剂

大豆豆粕:黑龙江九三油脂有限责任公司;磷酸氢二钠:天津市大茂化学试剂厂;磷酸二氢钾:天津市大茂化学试剂厂;无水亚硫酸钠:天津市耀华化工厂;尿素:天津市河东区红岩试剂厂;NaOH:沈阳新兴试剂厂;盐酸:沈阳市华东试剂厂,试剂均为分析纯。试验用水均为蒸馏水。

1.2 试验仪器

DF-1 集热式加热搅拌器:金坛市虹盛仪器厂;EL20 实验室 pH 计:上海梅特勒-托利用仪器有限公司;标准分析筛:浙江上虞市华丰五金仪器有限公

收稿日期:2010-11-24

基金项目:黑龙江省农垦总局科技计划资助项目(HNKXIV-02-07a)。

第一作者简介:安红波(1977-),女,讲师,硕士,研究方向为生物分离工程。E-mail:annhb@126.com。

司;JA2003N 分析天平:上海精密科学仪器有限公司;HWS21 型电热恒温水浴锅:上海一恒科学仪器有限公司;SHB-3 循环水真空泵:上海生申科技有限公司;MK-2485M 型微波炉:青岛海尔微波制品有限公司;超声波清洗机:上海科导超声仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 亚硫酸钠法 采用三因素三水平正交试验设计(表 1)。具体过程:称取相同质量的豆粕 2 g 至试管中,共 9 组。分别加入指定浓度的亚硫酸钠溶液 5 mL,将溶液加热至指定温度,按不同的时间进行钝化。钝化后,对所得内容物进行抽滤,将抽滤所得的豆粕真空干燥,再经过研磨过 40 目标标准筛后以备检测。

表 1 Na₂SO₃ 法的正交试验因素和水平表

Table 1 Orthogonal experiment design of sodium sulfite method

水平 Level	因素 Factor		
	A 温度	B 时间	C 浓度
	Temperature/℃	Time/min	Concentration/mol · L ⁻¹
1	70	30	0.02
2	75	60	0.03
3	80	90	0.04

1.3.2 微波法 采用三因素三水平正交试验设计进行脲酶的微波法钝化处理(表 2)。具体步骤:称取不同粒度的豆粕 3 g,共 9 组。分别加水 20 mL,放入微波炉中,在一定功率和时间下进行钝化。样品处理后,对所得内容物进行抽滤,将抽滤得到的豆粕真空干燥,再经过研磨过 40 目标标准筛后以备检测用。

表 2 微波法的正交试验因素和水平表

Table 2 Orthogonal experiment design of microwave method

水平 Level	因素 Factor		
	A 功率	B 时间	C 粉碎度
	Power/W	Time/s	Smashing degrees/sieve
1	120	60	粗筛
2	230	90	10 目筛
3	380	120	60 目筛

1.3.3 超声法 超声法钝化脲酶同样采用正交试验设计(表 3)。具体操作:称取相同质量不同粒度的豆粕 3 g,共 9 组。分别加入 20~40 mL 的水,超声 20~40 min。样品处理后,对所得内容物进行抽滤,将抽滤所得的豆粕干燥,再经过研磨过 40 目标标准筛后以备检测。

表 3 超声波法的正交试验因素和水平表

Table 3 Orthogonal experiment design of ultrasonic method

水平 Level	因素 Factor		
	A 加水量	B 时间	C 粉碎度
	Water/mL	Time/min	Smashing degrees/sieve
1	20	20	粗粉
2	30	30	10 目筛
3	40	40	60 目筛

1.4 测定项目与方法

1.4.1 溶液的制备 (1) 尿素磷酸盐缓冲液 (pH7.0):分别称取 8.95 g 磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄) 和 3.40 g 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 溶于水中并定容至 1 000 mL。再称取 30 g 尿素溶于该磷酸盐缓冲液中,并调节 pH 值至 7.0。(2) 盐酸溶液 [c(HCl) = 0.1 mol · L⁻¹]:移取 8.3 mL 盐酸,用水稀释至 1 000 mL。(3) 氢氧化钠溶液 [c(NaOH) = 0.1 mol · L⁻¹]:称取 4 g 氢氧化钠溶于水并定容至 1 000 mL,按 GB/T601 规定的方法配制和标定。

1.4.2 豆粉的制备 将普通市售大豆豆粕通过研磨后,分别过不同目(10、40、60 目)的标准筛待用。

1.4.3 脲酶活性的检测 精确称取 0.20 g 的试样于玻璃试管中,加入 10 mL 尿素缓冲液,立即盖好试管盖剧烈振摇后,将试管马上置于 30℃ 恒温水浴中,计时保持 30 min。要求每个试样加入尿素缓冲液的时间间隔保持一致。停止反应时再以相同的时间间隔加入 10 mL 盐酸溶液,振摇后迅速冷却至 20℃。将试管内容物全部转入烧杯中,用 20 mL 水冲洗试管数次,以氢氧化钠标准溶液用酸度计滴定至 pH 4.7。

另取试管做空白试验。精确称取 0.20 g 的试样于玻璃试管中,加入 10 mL 盐酸溶液,振摇后再加入 10 mL 尿素缓冲液,立即盖好试管盖剧烈振摇后,将试管置于 30℃ 恒温水浴中,计时保持 30 min。停止反应时将试管迅速冷却至 20℃。将试管内容物全部转入烧杯中,用 20 mL 水冲洗试管数次,以氢氧化钠标准溶液用酸度计滴定至 pH 4.7。空白试验只是在盐酸的加入步骤上有所不同。

1.4.4 脲酶活性 大豆制品中脲酶活性 X,以脲酶活性单位每克 (U · g⁻¹) 表示,按下式计算。

$$X = 14 \times c(V_0 - V) / 30 \times m$$

式中:X—试样的脲酶活性 (U · g⁻¹);c—氢氧化钠标准滴定溶液浓度 (mol · L⁻¹);V₀—空白消耗氢氧化钠标准滴定溶液体积 (mL);V—试样消耗氢氧化钠标准滴定溶液体积 (mL);14—氮的摩尔质量, M(N₂) = 14 g · mol⁻¹;30—反应时间 (min);m—试样质量 (g)。

2 结果与分析

2.1 Na₂SO₃ 钝化

Na₂SO₃ 能钝化大豆中的脲酶,Na₂SO₃ 与氧气和豆粕中的水作用,生成亚硫酸根离子(-SO₃²⁻),它们又进一步相互作用,生成新的二硫复合物。此复合物以亚硫酸根离子作催化剂,使脲酶蛋白重组成不可塑性失活分子基团^[7]。Na₂SO₃ 钝化的脲酶活性检测结果见表 4,方差分析结果见表 5。

表 4 Na₂SO₃ 钝化法的 L₉(3⁴)

正交试验设计及结果

Table 4 L₉(3⁴) orthogonal experiment result of sodium sulfite method

序号 No.	A 温度 Temperature/℃	B 时间 Time/min	C 浓度 Concentration /mol · L ⁻¹	活性 Activity /U · g ⁻¹
1	1	1	1	0.38
2	1	2	2	0.33
3	1	3	3	0.11
4	2	1	2	0.34
5	2	2	3	0.32
6	2	3	1	0.18
7	3	1	3	0.11
8	3	2	1	0.22
9	3	3	2	0.12
K ₁	0.273	0.277	0.260	
K ₂	0.280	0.290	0.263	
K ₃	0.150	0.137	0.180	
R	0.130	0.153	0.083	

表 5 Na₂SO₃ 法的方差分析表

Table 5 Variance analysis of sodium sulfite method

因素 Factor	偏差平方和 Warp square sum	自由度 Free degree	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Notability
A	0.032	2	1.091	5.140	
B	0.043	2	1.466	5.140	*
C	0.013	2	0.443	5.140	
误差	0.090	6			

由表 5 可知,由于方差 B > A > C,所以时间对脲酶钝化效果有显著的影响,其次为温度,最后为浓度。从表 4 中可以看出,因 K_{A2} > K_{A1} > K_{A3},故因素 A 选择水平 2,即温度为 75℃;因 K_{B2} > K_{B1} > K_{B3},故因素 B 选择水平 2,即时间为 60 min;因 K_{C2} > K_{C1} > K_{C3},故因素 C 选择水平 2,即浓度为 0.03 mol · L⁻¹;即优选的脲酶钝化条件为 A₂B₂C₂,温度为 75℃,时间为 60 min,浓度为 0.03 mol · L⁻¹。

2.2 脲酶的微波辐射钝化处理

微波是一种频率很高(30~300 MHz)而波长却

很短(0.001~1 m)的电磁波。当电磁波在介质内部起作用时,蛋白质、脂肪、碳水化合物等极性分子受到交变电场的作用而剧烈震荡,引起强烈的磨擦而产生热,这种热效应使得蛋白质等分子结构发生改变,从而破坏大豆中的抗营养因子。相关研究表明,采用微波法可有效钝化 POD 酶活性^[8]。提高反应速度,节省反应时间^[9]。因此,试验采用微波法钝化脲酶,其活性检测结果见表 6。

表 6 微波辐射钝化法的 L₉(3⁴)

正交试验设计及结果

Table 6 L₉(3⁴) orthogonal experiment result of microwave method

序号 No.	A 功率 Power /W	B 时间 Time/s	C 粉碎度 Smashing degrees/sieve	NaOH Volume /mL	活性 Activity /U · g ⁻¹
1	1	1	1	5.50	0.116
2	1	2	2	5.38	0.093
3	1	3	3	5.90	0.014
4	2	1	2	5.68	0.023
5	2	2	3	5.31	0.143
6	2	3	1	5.88	0.030
7	3	1	3	5.00	0.214
8	3	2	1	5.39	0.149
9	3	3	2	5.36	0.096
K ₁	0.079	0.118	0.098		
K ₂	0.196	0.128	0.071		
K ₃	0.153	0.053	0.128		
R	0.117	0.075	0.057		

表 7 微波法的方差分析表

Table 7 Variance analysis of microwave method

因素 Factor	偏差平方和 Warp square sum	自由度 Free degree	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Significance
A	0.0210	2	35.2584	9.2766	*
B	0.0100	2	16.6946	9.2766	
C	0.0049	2	8.1846	9.2766	
误差	0.0060	2			

从表 7 的方差分析可以看出,由于方差 A > B > C,所以在这 3 个因素中微波功率对脲酶钝化效果有显著的影响,其次为时间,最后为粉碎度。从表 6 中可以看出,因 K_{A2} > K_{A3} > K_{A1},故因素 A 选择水平 2,即微波功率 230 W;因 K_{B2} > K_{B1} > K_{B3},故因素 B 选择水平 2,即时间为 90 s;因 K_{C3} > K_{C1} > K_{C2},故因素 C 选择水平 3,即粉碎度为过 60 目筛的样品;即最优的脲酶钝化条件为 A₂B₂C₃,微波功率 230 W,时间为 90 s,粉碎度为过 60 目筛。

2.3 脲酶的超声波钝化处理

超声波能显著地加强神经细胞膜中的胆碱脂酶的活性。结晶酶或纯态酶在超声波的作用下,通

常失去酶的活性,或降低酶的活性。由于超声波频率高,能量大,被介质吸收时能产生显著的热效应。杨汝德等^[10]提出超声波湿热处理可有效促进大豆抗营养因子的钝化。因此,试验采用湿法进行超声钝化,其脲酶活性检测结果见表 8。

表 8 超声波钝化法 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果

Table 8 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment result of ultrasonic method

序号 NO.	A 加水量 Water /mL	B 时间 Time /min	C 粉碎度 Smashing degrees/sieve	NaOH Volume /mL	活性 Activity /U · g ⁻¹
1	1	1	1	4.95	0.244
2	1	2	2	4.78	0.231
3	1	3	3	4.77	0.269
4	2	1	2	5.21	0.129
5	2	2	3	4.79	0.260
6	2	3	1	5.41	0.139
7	3	1	3	4.68	0.283
8	3	2	1	4.54	0.206
9	3	3	2	5.45	0.076
K_1	0.248	0.219	0.196		
K_2	0.176	0.232	0.145		
K_3	0.188	0.161	0.271		
R	0.072	0.071	0.126		

表 9 超声波法的方差分析表

Table 9 Variance analysis scheme in ultrasonic method

因素 Factor	偏差平方和 Warp square sum	自由度 Free degree	F 比 F ratio	F 临界值 F critical value	显著性 Notability
A	0.008928	2	15.8049	9.2766	
B	0.008574	2	15.1782	9.2766	
C	0.024102	2	42.6668	9.2766	*
误差 Error	0.000565	2			

从表 9 中可以看出,由于方差 $C > A > B$,所以在这 3 个因素中粉碎度对脲酶钝化效果有显著的影响,其次为加水量,最后为时间。从表 8 中可以看出,因 $K_{A_1} > K_{A_3} > K_{A_2}$,故因素 A 选择水平 1,即加水量 20 mL;因 $K_{B_2} > K_{B_1} > K_{B_3}$,故因素 B 选择水平 2,即时间为 30 min;因 $K_{C_3} > K_{C_1} > K_{C_2}$,故因素 C 选择水平 3,即粉碎度为过 60 目筛的样品;即最优的脲酶钝化条件为 $A_1B_2C_3$,加水量 20 mL,时间为 30 min,粉碎度为过 60 目筛。

3 结论

分别采用化学法和物理法(微波法及超声法)钝化大豆豆粕中的脲酶抗营养因子。采用 Na_2SO_3

钝化时,豆粕在 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} Na_2SO_3$ 、75℃ 条件下处理 60 min 的钝化下效果最好。采用微波法钝化的最佳条件为:微波功率 230 W,时间为 90 s,粉碎度为过 60 目筛。而用超声波钝化的最优条件是加水 20 mL,时间为 30 min,粉碎度为过 60 目筛。采用的 3 种钝化方法操作简单、耗时短,大豆的钝化效果理想,得到的产品符合优质饲料的要求。综合比较可知,微波法效率最高。

参考文献

[1] Liener I E. Implications of antinutritional components in soybean foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1994, 34(1):31-67.

[2] 王涛,秦贵信,赵元. 大豆主要抗营养因子对猪的影响[J]. 大豆科学,2008,27(2):326-330. (Wang T, Qin G X, Zhao Y. Effects of main soybean antinutritional factors on swine[J]. Soybean Science,2008,27(2):326-330.)

[3] 周明涵,丁玉萍,刘冬梅,等. 豆奶、豆粉生产中钝化尿酶活性最佳工艺参数研究[J]. 食品科技,2001,19(5):19-20. (Zhou M H, Ding Y P, Liu D M, et al. Study of optimum process parameter of passive activity of urease in soymilk and soybean production [J]. Food Science and Technology, 2001,19(5):19-20.)

[4] 张明峰. 全脂大豆中抗营养因子及其钝化研究[J]. 饲料工业,1998(4):18-19. (Zhang M F. Study of full-fat soybean antinutritional factors and their passivation[J]. Feed Industry, 1998 (4):18-19.)

[5] 何玉华,严昌国. 豆粕中抗营养因子及其钝化方法[J]. 吉林农业科技学院学报,2009,18(1):20-21. (He Y H, Yan C G. On the antinutritional factors in the soybean meal and their deactivation way[J]. Journal of Jilin Agricultural Science and Technology College,2009,18(1):20-21.)

[6] 张金彪,金征宇,田忠卫,等. 全脂大豆热处理工艺研究[J]. 粮食与饲料工业,2002(1):21-22. (Zhang J B, Jin Z Y, Tian Z W, et al. A study on the heat treatment process for full-fat soybean(FFS)[J]. Cereal and Feed Industry,2002(1):21-22.)

[7] Tarun E, Rubinov D, Metelitz D. Inhibition of soybean urease by triketone oximes[J]. Biochemistry, 2004, 69(12):1344-1352.

[8] 卓成龙,宋江峰,李大婧,等. 微波处理对毛豆仁 POD 酶活的影响[J]. 食品科学,2010,31(14):289-293. (Zhuo C L, Song J F, Li D J, et al. Effects of microwave treatment conditions on the POD activity of green soybean [J]. Food Science, 2010, 31 (14):289-293.)

[9] 曹晓菊. 微波和超声波在化学中的应用[J]. 实验教学与仪器,2003,20(12):42-44. (Cao X J. Applications of microwave and ultrasonic wave in chemistry[J]. Experiment Teaching and Apparatus,2003,20(12):42-44.)

[10] 杨汝德,梁汉华,郭乾初. 低频超声波对大豆胰蛋白酶抑制素的处理效果[J]. 华南理工大学学报(自然科学版),1998,26(6):98-102. (Yang R D, Liang H H, Guo Q C. Effect of low-frequency ultrasonic treatment on soybean trypsin inhibitor[J]. Journal of South China University of Technology (Natural science edition),1998,26(6):98-102.)