

植物蛋白水解复合酶的研究

(广西大学化学化工学院, 南宁 530004)

王孝英

(广西南宁市庞博生物工程有限公司, 南宁 530004)

徐瑞莲 湛永辉 陈宗霞 刘汉灵

摘要 在研究植物蛋白水解机理及前处理基础上, 通过正交实验筛选出植物蛋白水解专用复合酶配方与使用条件, 测定植物蛋白水解复合酶酶解产物结果。

关键词 植物蛋白质 酶解机理 复合酶

Abstract Based on the study of enzymatic vegetable protein hydrolysis mechanism and orthogonal experiment, an enzyme blend for vegetable protein hydrolysis was made up and the best hydrolysis conditions were suggested. The result of enzymatic hydrolysis was analyzed.

Key words vegetable protein; enzymatic hydrolysis mechanism; mixed enzyme

中图分类号: TS201.2'5 文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2002)06-0037-02

植物蛋白质占世界蛋白供应总量 70% 以上, 其营养价值与动物蛋白质接近, 且胆固醇含量低, 含有大量人体必需氨基酸, 是人类食用蛋白质重要来源^[1]。植物蛋白资源扩大应用的出路在于利用生物方法或酸碱化学方法对植物蛋白进行加工处理, 使其分子量降低, 同时去除抗营养因子及毒素, 改善营养价值与功能特性, 提高溶解性能, 使其生物效价接近动物蛋白质, 代替部分动物蛋白质, 达到充分利用植物蛋白资源的目的。

从现有的植物蛋白加工方法来看^[2], 传统发酵加工方法存在生产工序繁多, 生产时间长, 劳动强度大, 生产质量与卫生条件不易控制等问题; 酸碱化学加工方法因副反应多, 营养成分损失大, 产品质量不佳, 可能产生三氯丙醇等有毒成分而在食品实际使用中受到一定限制; 生物酶工程加工方法在温和反应条件下, 水解生成多肽及氨基酸等物质, 具有很高营养价值与功能特性, 易于人体吸收与消化, 反应可控、副反应少, 产品质量好和不破坏氨基酸等特点, 生物酶法将是植物蛋白资源开发利用最有效、最有前途的加工方法。我们在深入研究传统发酵工艺与现代生物酶水解机理基础上, 结合植物蛋白质结构特点, 对植物蛋白水解复合酶进行了研究。

1 材料与方 法

收稿日期: 2002-03-12

作者简介: 王孝英 (1964-), 男, 实验师, 研究方向: 生物酶分离及应用方面的研究。

1.1 材料与仪器

豆粕、黄豆及麦麸 外购; 生物前处理剂 南宁庞博生物有限公司; 木瓜蛋白酶等生物酶 南宁庞博生物有限公司; 化学试剂 南宁医药站。

pH 计 上海雷磁公司; 恒温水浴 上海医疗器械厂; 滴定管 北京; 磁力搅拌器 上海; 分析天平 上海; UV-1100 紫外分光光度计 北京; 氨基酸分析仪 日立。

1.2 方法

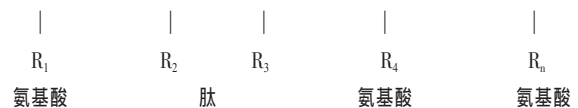
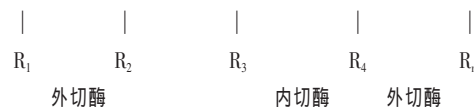
1.2.1 蛋白酶活力测定 紫外法。蛋白酶活力的定义为: 样品在测定条件下水解酪蛋白, 每分钟释放出 1 μg 酪氨酸所需的酶量即为一个酶活力单位, 以 u/ml 或 u/g 表示。测定条件为: 样品用量 100mg, 温度 37℃, 反应时间 10min, 测定波长 275nm。

1.2.2 氨基态氮 AN 测定 甲醛滴定法。

1.2.3 蛋白外切酶制备方法 大豆原料 → 米曲霉、黑曲霉 → 发酵 → 提取 → 分离 → 超滤 → 冻干 → 外切酶

1.2.4 风味酶制备方法 大豆原料 → 酵母菌、乳酸菌 → 发酵 → 提取 → 分离 → 超滤 → 冻干 → 风味酶

1.2.5 植物蛋白质酶解机理



1.2.6 植物蛋白水解复合酶酶解工艺路线 植物蛋白 → 高压蒸煮 → 生物前处理 → 酶解 → 风味化 → 植物蛋白水解液

2 结果与讨论

2.1 植物蛋白水解复合酶研制

2.1.1 前处理工艺 前处理目的就是通过高温高压、化学物质、生物酶等作用, 破坏起稳定作用的物理化学键, 打开植物蛋白复杂结构, 使蛋白分子结构变得松散, 非极性蛋白基团暴露出来, 有利于蛋白内切酶作用, 加快植物蛋白水解, 结果见表 1。

从表 1 可见, 前处理酶配合高温、高压蒸煮, 水解液氨基氮含量 AN 达到 0.58g/100ml。

表1 12%植物蛋白溶液前处理情况

	高温高压	高温高压+CaCl ₂ 及焦亚硫酸钠	高温高压+前处理生物酶
条件	0.2MPa 25min	0.2%	1% (水解40h)
AN (g/100ml)	0.41	0.50	0.58

2.1.2 蛋白内切酶筛选 从现有蛋白内切酶中筛选木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶、2709碱性蛋白酶、酸性蛋白酶等做酶解实验,在高温高压蒸煮、添加生物前处理剂下,测定12%植物蛋白溶液中加入3‰内切酶,55℃ pH 6.5条件下水解40h时的AN,结果见表2。

表2 蛋白内切酶水解情况

	木瓜蛋白酶	菠萝蛋白酶	1.398中性蛋白酶	2709碱性蛋白酶	酸性蛋白酶
AN (g/100ml)	0.68	0.59	0.62	0.69	0.63

从表2可见,以2709碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶水解效果为好。

2.1.3 蛋白外切酶筛选 如果植物蛋白水解只使用蛋白内切酶,则其氨基氮、风味均达不到实际应用要求,所以从米曲霉、枯草杆菌及黑曲霉中提取外切酶,添加3‰,于55℃ pH 6.5条件下水解72h,结果见表3。

表3 蛋白外切酶水解情况

	米曲霉外切酶	黑曲霉外切酶	米曲黑曲外切酶
AN(g/100ml)	1.15	0.87	1.05

从表3可见,添加米曲霉外切蛋白酶,植物蛋白水解液AN达到1.15g/100ml,接近天然发酵6个月的AN水平,为实际大生产应用提供可能。

2.1.4 风味酶的筛选 植物蛋白水解添加蛋白内、外切酶,AN虽已达到生产要求,但风味略逊,为此从酵母菌、乳酸菌、枯草杆菌中提取风味酶,添加3‰,于55℃ pH 6.5条件下水解72h,结果见表4。

表4 风味酶水解实验结果

	酵母风味酶	乳酸菌风味酶	枯草杆菌风味酶
AN(g/100ml)	1.21	1.11	1.18
风味	鲜、浓大豆香味	较鲜、大豆香味	较鲜、浓大豆香味

从表4可见,以添加酵母风味酶的植物蛋白水解液风味最好。

2.1.5 植物蛋白水解复合酶调制 根据水解度、氨基氮、功能特性与风味等指标,以木瓜内切酶A、米曲霉外切酶B及酵母风味酶C三因素作正交试验,研制出植物蛋白水解复合酶,结果见表5。

用极差分析可知,影响程度为米曲霉外切酶>木瓜内切酶>酵母风味酶,植物蛋白水解复合酶适宜组成为1000u/g木瓜内切酶、1000u/g米曲霉外切酶及100u/g酵母风味酶,水解液氨基氮含量1.28g/100ml,味鲜并有浓大豆香味。

2.2 植物蛋白水解复合酶水解工艺条件

植物蛋白酶解受到温度、pH、时间及酶量等影响,

表5 正交试验结果表

试验号	木瓜内切酶 (μ/g)	米曲霉外切酶 (μ/g)	酵母风味酶 (μ/g)	AN(g/100ml) (风味指数)
1	1 (500)	1 (500)	1 (100)	1.01(6)
2	1	2 (750)	2 (200)	1.15(7)
3	1	3 (1000)	3 (300)	1.18(8)
4	2 (1000)	1	2	1.11(7)
5	2	2	3	1.22(8)
6	2	3	1	1.28(9)
7	3 (1500)	1	3	1.09(9)
8	3	2	1	1.18(7)
9	3	3	2	1.23(8)
K ₁	3.34	3.21	3.47	
K ₂	3.61	3.55	3.49	
K ₃	3.50	3.69	3.49	
R	0.27	0.48	0.02	

选择温度、时间与酶量三因素,以AN与风味为指标,做植物蛋白复合酶酶解条件正交试验,结果见表6。

表6 正交试验结果表

试验号	温度 (℃)	时间 (h)	酶量 (%)	AN(g/100ml) (风味指数)
1	1 (50)	1 (60)	1 (1)	1.02(6)
2	1	2 (72)	2 (2)	1.16(8)
3	1	3 (84)	3 (3)	1.14(7)
4	2 (55)	1	2	1.22(8)
5	2	2	3	1.32(9)
6	2	3	1	1.20(8)
7	3 (60)	1	3	1.11(7)
8	3	2	1	1.08(6)
9	3	3	2	1.04(6)
K ₁	3.32	3.35	3.30	
K ₂	3.73	3.55	3.42	
K ₃	3.23	3.38	3.56	
R	0.50	0.20	0.24	

用极差分析可知,影响程度为温度>酶量>时间,植物蛋白水解复合酶酶解适宜条件为温度55℃、时间72h、酶量3‰,水解氨基氮含量为1.32g/100ml,风味好。

3 结论

3.1 结合高温高压蒸煮,开发生物酶法前处理植物蛋白工艺是相当有效的。

3.2 研制出含有1000u/g木瓜内切酶、1000u/g米曲霉外切酶及100u/g酵母风味酶的植物蛋白水解复合酶,适宜使用条件为温度55℃、pH6.5、时间72h、酶量3‰。

3.3 植物蛋白水解复合酶酶解产物氨基氮含量达到1.32g/100ml,游离氨基酸总量4.8g/100ml,味鲜并具有浓大豆香味。

参考文献

- 1 李新华,等.豆乳酶解效应分析.沈阳农业大学学报,1998,29(2)
- 2 朱史齐.试论当前我国酱油生产的技术状况.中国调味品,1999(11)