

脱脂豆粕的 AS1.398 中性蛋白酶水解

郭敏亮 姜涌明 孙晓燕 夏敬阳 江苏农学院基础部生化教研室 225007

摘要 高度变性豆粕的氮萃取率在 pH7~12 范围内均呈上升趋势。当用 AS1.398 中性蛋白酶进行水解处理时,低酶浓度,长时间水解的效果明显比高酶量,短时间的水解效果好,在酶浓度低时,随酶浓度的增加,氮萃取率、酸溶性肽得率、蛋白得率均呈上升趋势,延长水解时间效果更为明显,但以 3 h 为宜;酶浓度进一步增加时,3 者变化情况反而呈下降趋势。实验结果表明,AS1.398 中性蛋白酶对大豆蛋白的最大水解度为 34%,比 166 中性蛋白酶的最大水解度小,且水解速度也较缓慢。

关键词 脱脂豆粕水解 氮萃取率 酸溶性肽 AS1.398 中性蛋白酶 166 中性蛋白酶

Abstract Defatted Soya-bean Cake that was highly denaturated was incubated in different pH. Its nitrogen solubility index increased as pH increased from 7 to 12. Nitrogen solubility Index, recovery of protein and amount of acid-solubility peptide were determined by incubation under different As 1.398 subtilisin concentration for different time at pH 7.5, 40°C. It was found that low concentration of As 1.398 subtilisin and long incubating time were much more efficient on hydrolysis of defatted soya-bean cake. The optima of As 1.398 subtilisin concentration and incubating time were 250 U/ml, 3 hours respectively. Further experiments showed that hydrolysis degree of As 1.398 subtilisin to defatted soya-bean cake was lower than that of 166 subtilisin and the rate of hydrolysis of As 1.398 subtilisin was slower than that of 166 subtilisin.

Key words Defatted Soya-Bean Cake Hydrolysis Nitrogen Solubility Index Acid-Solubility Peptide
As 1.398 Subtilisin 166 Subtilisin.

关于脱脂豆粕和大豆蛋白酶法水解的研究,近几年时有报导^[1,2],大多采用胰酶水解,有关微生物蛋白酶水解的研究,日本的报导较多,且主要集中在大豆凝乳方面^[3],但国内几乎未见。随着近几年我国酶制剂行业的不断壮大,不断有新的微生物蛋白酶问世,其中有工业级的酶制剂,也有食品级的酶制剂。微生物酶的来源远比动植物酶丰富,成本较低。同时用不同的酶,由于其水解条件和专一性不一样,即使对同一种蛋白的水解情况也不一样,因此系统地开展这方面的研究,对我国蛋白营养食品的开发具有重要的指导意义。作者在前文^[4]已经对脱脂豆粕的 2709 碱性蛋白酶水解做了详细研究,本文将进一步研究脱脂豆粕的 AS1.398 中性蛋白酶水解情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 脱脂豆粕,由我院加工系提供(产于黑龙江),蛋白含量为 49.16%。

1.1.2 酶制剂,枯草杆菌 AS1.398 中性蛋白酶,食品级酶制剂(无锡酶制剂厂),最适反应温度为 40°C,最适 pH 为 7.5。放线菌 166 中性蛋白酶,工业级酶制剂(上海佳乐酶厂),最适反应条件同 AS1.398 蛋白酶。

1.1.3 酪蛋白为生化试剂,其它试剂均为分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质含量测定,凯氏定氮法(N×6.25)^[5]。

1.2.2 氮萃取率,酸溶性肽得率和蛋白得率的测定和计算同前文^[4],水解温度为 40°C, pH 为 7.5。酸溶性肽得率为等电点沉淀后滤液中的可溶性氮与被加入豆粕的总氮之比。

1.2.3 水解度的测定,根据 Spies J. R. &

Chambers D. C.^[6]的方法并略加改进, 1ml 待测样品液加 3 ml 磷酸铜悬浮液摇匀并置于沸水浴 5 min 使蛋白酶失活, 离心取上清液加入 1 ml 丙氨酸 (1mg/ml) 于 721 分光光度计上测定 OD_{620nm} , 与盐酸彻底水解液的 OD_{620nm} 之比则为水解度。计算公式为:

$$\text{水解度 (DH\%)} = \frac{\text{样品液的 } OD_{620nm}}{\text{HCl 彻底水解液的 } OD_{620nm}}$$

1. 2. 4 大豆蛋白的水解同前^[4], 水解 pH 为 7.5, 每隔一定时间取样测定 OD_{620nm} , 以计算水解度。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 值对豆粕氮萃取率的影响

不同的酶, 反应的最适 pH 值不同, 当用不同的蛋白酶处理豆粕时就必需选用合适的 pH 值, 同时不同变性程度的豆粕, 其氮萃取率随 pH 的变化趋势也不同, 因此测定不同变性程度的豆粕在不同 pH 值下的氮萃取率。对正确评价某一蛋白酶对豆粕的作用效果就显得非常重要。图 1 表明未变性的脱脂豆粉在 pH=7~8 时, 氮萃取率已达最大值, 这与文献^[7]报导一致, 而脱脂豆粕因蛋白严重变性, 氮萃取率在碱性范围内随 pH 值的上升不断增大, 这说明

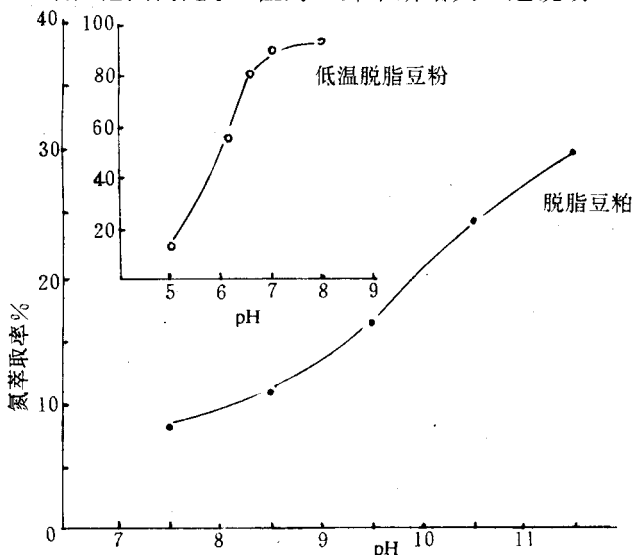


图 1 不同 pH 值对豆粕氮萃取率的影响 (40℃ 保温 6 h 豆粕: 水=1:10)

变性越严重的豆粕, 要使其中的蛋白溶出就越困难, 所需的碱量就越大, 然而考虑到碱性条

件下某些氨基酸易被破坏, 不宜用提高碱量的方法来增加豆粕的氮萃取率。从结果中还可以看出, 在 AS 1.398 中性蛋白酶作用的最适 pH 值 7.5 处, 氮萃取率只有 8.40%。

2.2 短时间不同酶量对豆粕水解效果的影响

为了选择合适的豆粕水解条件, 先选用 AS1.398 中性蛋白酶浓度在 0~2000 u/ml 范围内水解处理, 1 h 后测定其氮萃取率、酸溶性肽得率及蛋白得率, 结果见图 2。酶量在 0~500 u/ml 范围内随酶量的增大, 3 项指标均上升, 到 500 u/ml 时达最大值, 酶量继续增大时反而呈下降趋势。

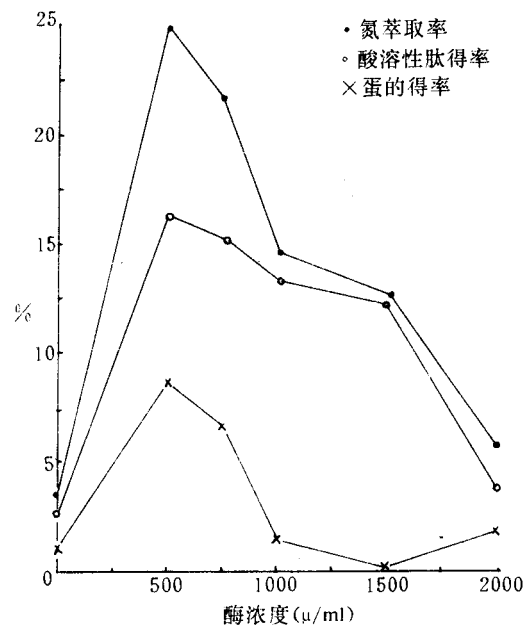


图 2 短时间内不同酶浓度对氮萃取率、酶溶性肽得率、蛋白得率的影响 (水解条件: 豆粕: 水=1:10, pH=7.5, 40℃ 保温 1 h)

这说明在 500 u/ml 酶浓度附近有一最适浓度。对这种下降趋势的解释, 我们认为主要原因是液-固非均相反应体系中, 随酶浓度的增加, 自身相互水解作用也加强, 因而阻碍了酶对豆粕中大豆蛋白的水解。酶浓度大于 1000 u/ml 时, 氮萃取率与酸溶性肽得率已比较接近, 说明在此酶浓度下, 被萃出的大豆蛋白已基本上全被酶水解成在酸性 (pH4.5) 条件下可溶的短肽。另外由图可, 知水解 1 h 的情况下, 氮萃取率最高只能达到 25.09%, 需进一步

提高氮萃取率。

2.3 长时间不同酶量对豆粕水解效果的影响

由于靠加大酶量的方法未能达到较理想的氮萃取率,因此只有靠延长时间来提高氮萃取率。

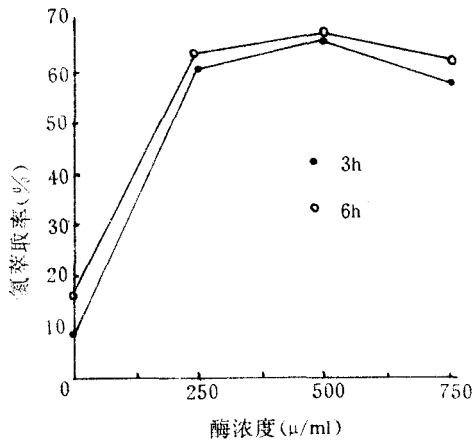


图3 不同酶量和时间对氮萃取率的影响(豆粕:水=1:10, 40°C pH7.5 分别水解3h和6h)

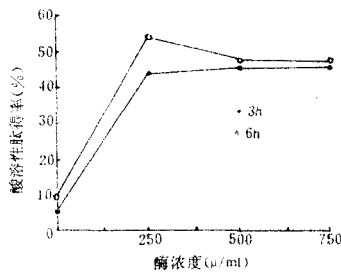


图4 不同酶量和时间对酸溶性蛋白得率的影响

2.3.1 不同酶量和时间对氮萃取率的影响

由图3可以看出,水解3h和6h的氮萃取率随酶浓度而变化的趋势是一致的,在酶量0~500 u/ml 范围内均呈上升趋势,到500 u/ml 时达最高值,两者数值接近均为67%。与水解1h(图2)相比,氮萃取率有显著增高。从图中还可看出,两条曲线十分靠近,在酶量为500 u/ml 处几乎重合,说明从氮萃取率这一指标考虑,水解时间只需延长到3h。

2.3.2 不同酶量和时间对酸溶性肽得率的影响

酸溶性肽得率的结果见图4,变化趋势与氮萃取率不同,适当降低酶浓度(250 u/ml),延

长水解时间可提高酸溶性肽得率。

2.3.3 不同酶量和时间对蛋白得率的影响:蛋白得率的结果(图5)说明,较低酶浓度下,延长水解时间,蛋白得率降低,高酶浓度下结果相反,但不管酶浓度多高,水解时间多长,蛋白得率都较低。这说明大豆蛋白被AS1.398中性蛋白酶水解所得的产物在酸性(pH=4.5)条件下溶解性良好。

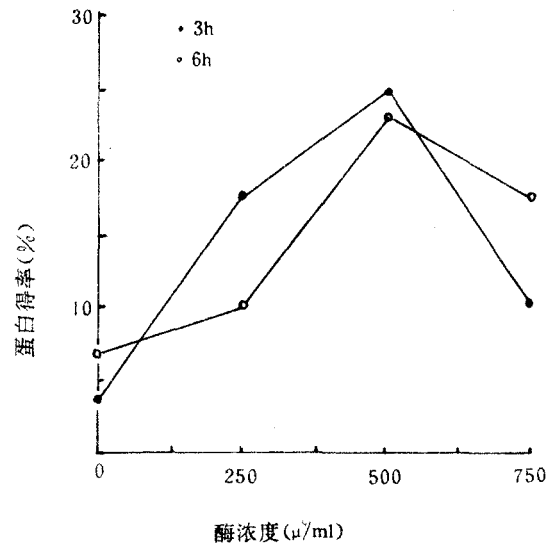


图5 不同酶量和时间对蛋白得率的影响

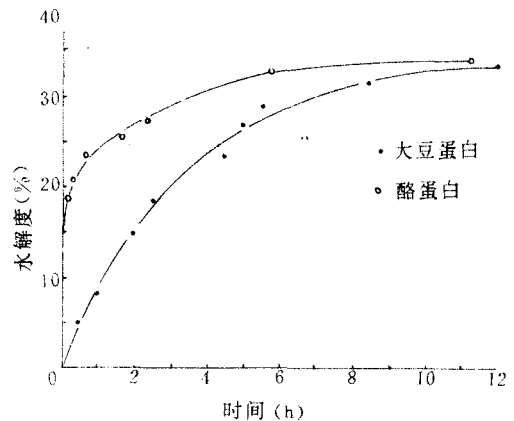


图6 AS1.398中性蛋白酶对大豆蛋白和酪蛋白水解度和水解进度的比较(40°C, pH7.5, 大豆蛋白的浓度5.44 mg/ml, 酪蛋白浓度5 mg/ml, 酶浓度800 u/ml)

2.4 AS3.198中性蛋白酶对大豆蛋白的水解进程

从上述不同酶量、不同水解时间的实验结

果显示, AS1. 398 中性蛋白酶对大豆蛋白的水解速度比较缓慢。我们进一步对其水解进度作了一些比较试验。

2. 4. 1 AS1. 398 中性蛋白酶对大豆蛋白及酪蛋白水解进度的比较 发酵工业上测定蛋白酶活力都以酪蛋白为底物, 且水解时间也较短^[8],

从图 6 可以看出, As1. 398 中性蛋白酶对酪蛋白的水解速度明显比大豆蛋白的水解速度快, 但最大水解度均接近 34%, 这进一步说明需要延长 AS1. 398 中性蛋白酶对大豆蛋白的水解时间, 才能达到较好的水解效果。

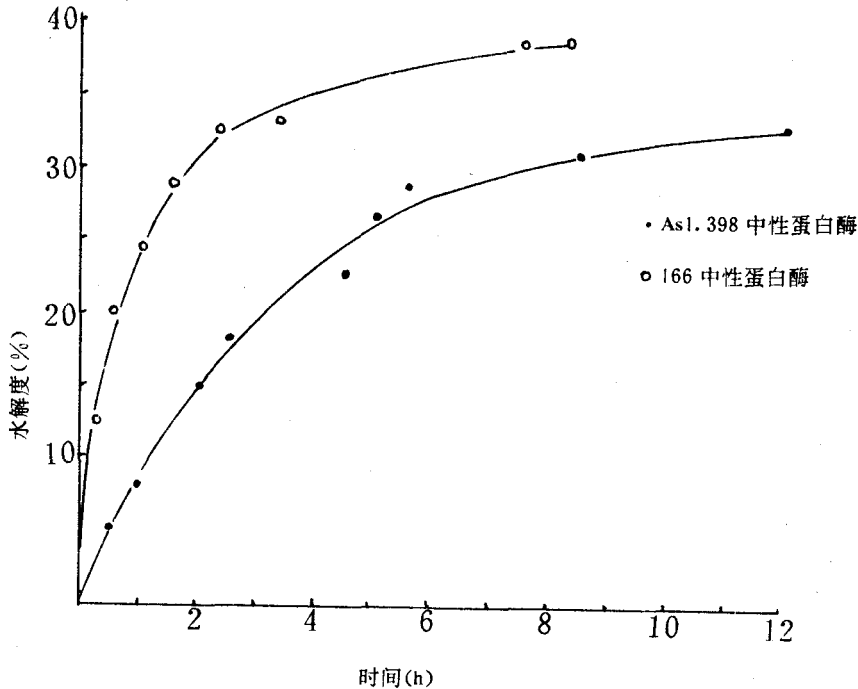


图 7 AS1. 398 中性蛋白酶和 166 中性蛋白酶对大豆蛋白水解度和水解进度的比较 (40°C, pH7.5, 大豆蛋白浓度为 5.44 mg/ml, 两种酶浓度均为 800 u/ml)

2. 4. 2 As1. 398 中性蛋白酶和 166 中性蛋白酶对大豆蛋白水解度和水解进度的比较: 为进一步了解 As1. 398 中性蛋白酶对大蛋白的水解情况, 与另一放线菌 166 中性蛋白酶进行比较, 用同样酶浓度 (800 u/ml) 的 As1. 398 中性蛋白酶和 166 中性蛋白酶水解大豆蛋白, 结果 (图 7) 表明, 166 中性蛋白酶水解大豆蛋白的速度比 As1. 398 中性蛋白酶快, 最终水解度 (39%) 也高, 这说明大豆蛋白中的肽键对 166 中性蛋白酶更敏感。

参考文献

- 1 张德桐, 邵坤范. 胰酶水解脱脂大豆粕制造, 氨基酸保健饮料. 粮油食品科技, 1991, (6), 32~33.
- 2 Kimball, M. E. et al. Chymotrypsin Hydrolysis of Soy-

- bean Protein. J. Agric. Food Chem., 1981, 29: 872~874.
- 3 村田克己等. 用商品化蛋白酶制剂发酵豆浆凝乳. 食品工业学会志(日), 1989, 36(5): 417~423.
- 4 郭敏亮等. 用豆粕生产大豆蛋白肽饮料的初探. 食品科学, 1992, (10): 1.
- 5 浙江农业大学. 农业化学实验. 上海科学技术出版社, 1980, 41~44.
- 6 Spies, JR and Chambers, DC. Spectrophotometric Analysis of Amino Acids and Peptides with Their Copper Salts. J. Biol. Chem., 1951, 91: 787~797.
- 7 凌关庭, 威尔敏译. 大豆蛋白质的利用和理化性质 [1]. 上海食品科技, 1980 (3): 42~46.
- 8 张树政. 酶制剂工业 (下册). 科学出版社, 1984, 446~449.