

文章编号:1673-1689(2010)01-0050-06

双酶分步水解制备菜籽蛋白肽

金晶^{1,2}, 徐志宏^{*1,2}, 魏振承¹, 谢笔钧², 刘军^{1,2}

(1. 广东省农业科学院 农业生物技术研究所以,广东省农产品加工公共实验室,广东 广州 510610;
2. 华中农业大学 食品科技学院,湖北 武汉 430070)

摘要: 实验选取 Alcalase 2.4 L 碱性蛋白酶和复合风味蛋白酶分步水解菜籽蛋白。结果表明双酶分步水解制备菜籽肽的最佳工艺为 Alcalase 碱性蛋白酶在 pH 值 9.5, 温度 55 °C, 底物质量分数 3%, 酶活性 5 500 u/g 条件下酶解 5.5 h, 水解度为 21.14%, 再用复合风味酶在 pH 值 6, 温度 50 °C, 酶活性 900 u/g 条件下继续酶解 3 h。单因素试验和正交实验研究粗肽液用活性炭脱色的优化条件为:在活性炭质量分数 1.5%, pH 值 4.5, 温度 55 °C 条件下脱色 50 min, 脱色率达 32.15%, 氨基酸损失率为 25.15%。

关键词: 菜籽蛋白; Alcalase 碱性蛋白酶; 复合风味蛋白酶; 水解

中图分类号: TQ 936.1

文献标识码: A

Preparation Rapeseed Protein by Double Enzymes

Jin Jing^{1,2}, XU Zhi-hong^{*1,2}, WEI Zhen-cheng¹,
XIE Bi-jun², LIU Jun^{1,2}

(1. Agricultural Biotechnology Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / Guangdong Open Access Laboratory of Farm Product Processing, Guangzhou 510610, China; 2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: In this manuscript, the determination of optimum conditions of the rapeseed protein hydrolyzation was performed and the results listed as follows: hydrolyzation time 5 hours with alcalase at pH 9.5, 55 °C, 3% substrate and enzyme concentration 5500 u/g, the hydrolysis rate could reach to 21.14%, then hydrolyzation with flavourzyme for 3 hours at pH 6, 50 °C and enzyme concentration 900 u/g, the bitter value of rapeseed protein hydrolysates was very low under such conditions. The results of decoloration experiment of rapeseed protein hydrolysates with active carbon showed that the optimum conditions were: active carbon dosage 1.5%, pH 4.5, temperature 55 °C, and reaction time 50 min, the decoloration rate could reach to 32.15%, and the amino acid loss rate was 25.15% under such conditions.

Key words: rapeseed protein, alcalase protease, flavourzyme, hydrolytic

收稿日期:2009-02-24

基金项目:国家农业科技成果转化基金项目(2006GBZE000219);广东省科技计划项目(2005B33701015)。

*通讯作者:徐志宏(1965-),男,湖北黄冈人,研究员,主要从事农产品加工研究。

Email:zhihongxup@yahoo.com.cn

菜籽蛋白是一种优质蛋白,生物效价和营养价值比大豆、花生、棉籽等其他植物蛋白高,水解后制备成具有生理活性的菜籽蛋白肽的生物效价和营养价值更高。碱性蛋白酶(Alcalase)是一种高效的细菌蛋白酶,主要用于水解各种蛋白质,该酶的主要有效成分枯草杆菌蛋白酶A是一种内切蛋白酶。而且Alcalase碱性蛋白酶具有高度的操作安全性^[1]。复合风味酶(Flavourzyme)是一种用于中性或微酸性条件下水解蛋白质的真菌蛋白酶/肽酶的复合体,该酶可用于脱除低水解度产物的苦味,同时也可用于水解蛋白质,增进和改善水解液的风味^[2]。由于不同的酶它们的最适pH值,最适温度不一样,为了使它们达到最佳的水解效果,一般采取分步酶水解的方法。本实验选用碱性蛋白酶和复合风味酶对菜籽蛋白进行分步酶水解,结果表明利用此两种酶进行酶解可有效提高水解度以及减少菜籽多肽的苦味。

菜籽蛋白经碱性蛋白酶解后其溶解性得到了改善,经风味复合酶酶解后其苦味值降低,但其色泽较深,气味较重,需要进行脱色脱异味处理。活性炭具有很大的比表面积,当被脱除的有色物质的分子直径小于或等于活性炭的入孔直径时可被活性炭吸附而起到脱色效果,同时,活性炭还兼具脱臭的效果^[3]。本实验采用粉末活性炭作为吸附剂对菜籽蛋白酶解液进行脱色实验。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菜籽蛋白:作者自制,蛋白质量分数83.67%;碱性蛋白酶Alcalase 2.4L(活力95 000 U/g):丹麦NOVO公司产品。Flavourzyme复合风味酶500MG(活力为7740 U/g):丹麦NOVO公司产品。其它所用化学试剂均为分析纯。

1.2 主要试验仪器

台式离心机:TDL-5型,上海安亭科学仪器厂生产;pH计:phs-3C型,上海理达仪器厂生产;分析天平:FA2004型,上海精科天平厂产品;分光光度计:UV-1700, Sigma公司产品,美国;冷冻干燥机:FD-1,北京博医康实验仪器公司生产;恒温水浴振荡器:SHA-C,金坛市精达仪器制造厂生产。

1.3 方法

1.3.1 蛋白酶活力测定 福林-酚法,见参考文献[4]。

1.3.2 蛋白质水解度(DH)测定 pH-stat法,见参考文献[5]。

1.3.3 氨基态氮测定 甲醛快速滴定法,见参考文献[6]。

1.3.4 苦味值的测定 感官评定法,见参考文献[7]。

1.3.5 酶解方法

配制一定浓度的菜籽蛋白溶液,水浴至实验设定的温度,用1 mol/L的NaOH调pH至实验设定值,加入适量的碱性蛋白酶并低速搅拌。在反应过程中以0.1 mol/L的NaOH维持pH值恒定(±0.1 pH值单位),水解至预定时间后,酶解液置沸水浴10 min钝化碱性蛋白酶,冷却到2次酶解所需的温度,调pH值,加入适量的复合风味酶,低速搅拌,水解至预定时间后至沸水浴中钝化复合风味酶,5 000 r/min的转速离心10 min,取上清液于烧杯中,冷冻干燥^[8-10]。

1.3.6 脱色研究方法 在菜籽蛋白肽液中加入一定量的活性炭吸附剂,用1 mol/L的NaOH调pH值,设定脱色温度,在水浴恒温振荡器中振荡一定的时间,过滤水解液,上清液在波长为400 nm处测定其吸光度,按下列公式计算脱色率^[3,11];同时上清液在波长为280 nm处测定其吸光度,按下列公式计算氨基酸损失率:

$$\text{脱色率}(\%) = \frac{A_{400\text{脱色前}} - A_{400\text{脱色后}}}{A_{400\text{脱色前}}} \times 100$$

$$\text{氨基酸损失率}(\%) = \frac{A_{280\text{脱色前}} - A_{280\text{脱色后}}}{A_{280\text{脱色前}}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 酶水解条件的试验研究

2.1.1 酶活力对酶解菜籽蛋白水解度的影响 在不同的酶浓度下,pH值为8,温度50℃,底物质量分数3%,酶解180 min,测定水解度,结果见图1。

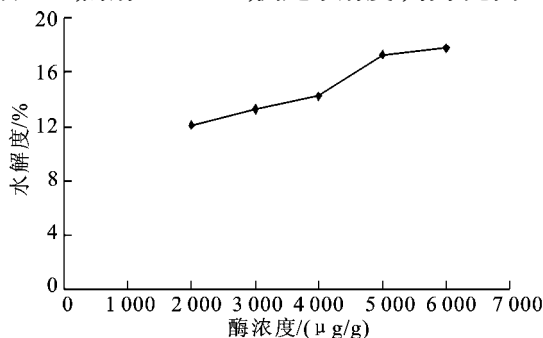


图1 酶浓度对水解度的影响

Fig.1 Effect of [E] on hydrolysis rate

随着酶活力的增加,水解度也随之增加,当酶活力达到5 000 u/g时,水解度达到最大,当酶浓度继续增加时,水解度变化不大,考虑到成本等经济

原因,故选择酶活力 5 000 u/ g。

2. 1. 2 pH 值对酶解菜籽蛋白水解度的影响 在不同的 pH 条件下,酶浓度 5 000 u/ g,温度 50 ℃,底物质量分数 3 %,酶解 180 min,测定水解度,结果见图 2。

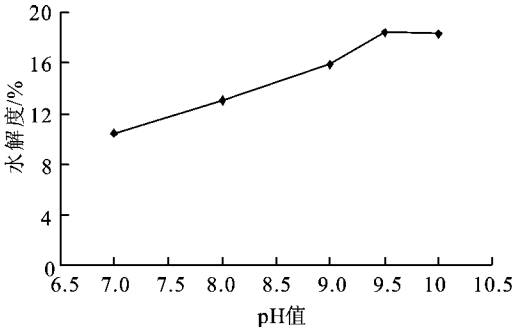


图 2 pH 对水解度的影响

Fig. 2 Effect of pH on hydrolysis rate

由图 2 可知,随着 pH 值的增大,水解度逐渐增大,到 pH 值 9. 5 时达到最大,继续增加 pH 值时,由于过高的 pH 值降低了酶的活性,水解度降低,且酶解液颜色显著加深,气味也显著加重,故选择 pH 值为 9. 5。

2. 1. 3 底物质量分数对酶解菜籽蛋白水解度的影响 在不同的底物浓度下,酶浓度 5 000 u/ g,pH 值 9. 5,温度 50 ℃,酶解 180 min,测定水解度,结果见图 3。

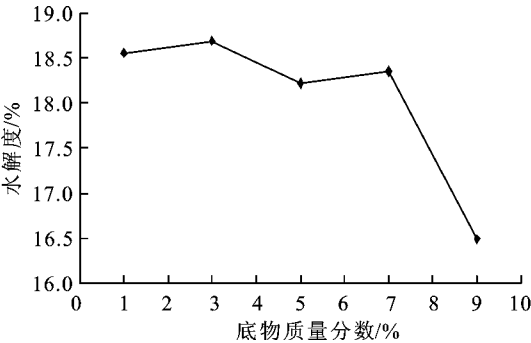


图 3 底物浓度对水解度的影响

Fig. 3 Effect of concentration of substrate on hydrolysis rate

由图 3 可知,当底物质量分数在 3 %时,水解度最大,故选择底物质量分数为 3 %。

2. 1. 4 温度对酶解菜籽蛋白水解度的影响 在不同的温度下,酶活力 5 000 u/ g,pH 9. 5,底物质量分数 3 %,酶解 180 min,测定水解度,结果见图 4。

由图 4 可知,随着温度的上升,水解度逐渐增大,当温度在 45 ℃~55 ℃时,水解度达到最大且相对稳定,继续升高温度,酶的活性受到了抑制,使水解度逐渐降低。综合考虑,选择酶解温度 50 ℃。

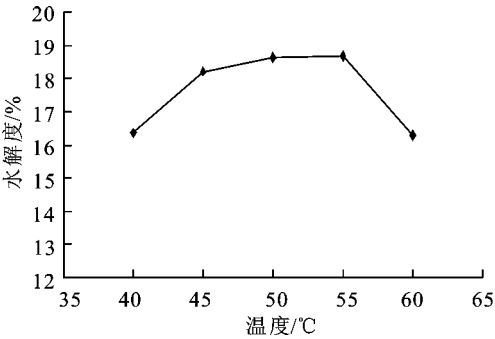


图 4 温度对水解度的影响

Fig. 4 Effect of temperature on hydrolysis rate

2. 1. 5 水解时间对酶解菜籽蛋白水解度的影响 酶浓度 5 000 u/ g,pH 值 9. 5,底物质量分数 3 %,温度 50 ℃,酶解不同的时间,测定水解度,结果见图 5。

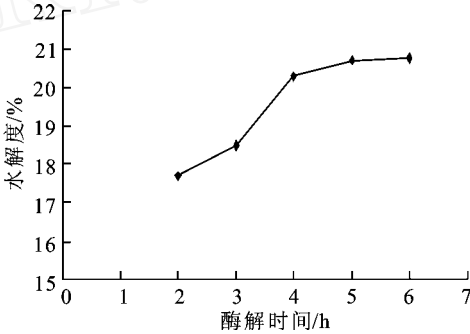


图 5 酶解时间对水解度的影响

Fig. 5 Effect of time on hydrolysis rate

由图 5 可知,随着水解时间的延长,水解度不断增加,在酶解 4 h 后水解度增加缓慢,水解 5 h,水解度达到最大,继续水解,水解度增加不明显,考虑到经济原因,故选取酶解时间为 5 h。

2. 1. 6 碱性蛋白酶酶解正交实验 在单因素的实验基础上,固定底物质量分数,以 pH 值、酶浓度、酶解时间和提取温度为因素,设计 L₉ (3⁴) 正交实验,实验方案和结果见表 1。

表 1 正交实验方案与结果分析

Tab. 1 The result of orthogonal experiment					
试验序号	酶解试验因素				DH/%
	A (酶浓度) / (u/ g)	B (pH)	C (温度) / ℃	D (时间) / h	
1	1(4 500)	1(9)	1(45)	1(4. 5)	18. 71
2	1	2(9. 5)	2(50)	2(5)	20. 57
3	1	3(10. 0)	3(55)	3(5. 5)	20. 78
4	2(5 000)	1	2	3	19. 23
5	2	2	3	1	20. 64
6	2	3	1	2	20. 50
7	3(5 500)	1	3	2	19. 45

续表 1

试验 序号	酶解试验因素				DH/ %
	A (酶浓度) (u/g)	B (pH)	C (温度) /℃	D (时间) /h	
8	3	2	1	3	20.93
9	3	3	2	1	20.58
K ₁	20.02	19.13	20.05	19.98	
K ₂	20.12	20.71	20.13	20.17	
K ₃	20.32	20.62	20.29	20.31	
R	0.30	1.58	0.24	0.33	

由表 1 可见,对水解度影响对大的是 pH 值,酶解时间和酶浓度次之,温度影响最小。最优组合是 A₃B₂C₃D₃,因为此组合不在正交表中,故需做一组最优组合的实验,即在酶解活力为 5 500 u/g,pH 值 9.5,酶解温度 55 ℃条件下酶解 5.5 h,测得的水解度为 21.14 %。

2.2 复合风味酶对菜籽蛋白的 Alcalase 碱性蛋白酶水解物的继续水解作用

2.2.1 复合风味酶酶活力对 2 次酶解的影响 在不同的复合风味酶酶浓度条件下,pH 值 6.0,温度 50 ℃,酶解 1 h,以每 mL 水解液中游离氨基酸含量和苦味值为指标,结果如图 6。

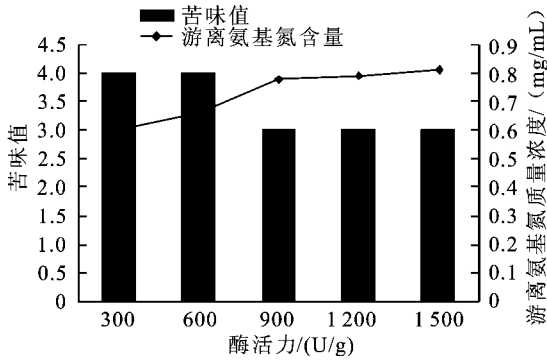


图 6 复合风味酶浓度对二次酶解的影响

Fig.6 Effect of Flavourzyme [E] on the second hydrolysis

由图 6 可知,随着复合风味酶浓度的增加,游离氨基酸的含量逐渐增加,苦味也在逐渐减轻,酶活力到 900 u/g 时,游离氨基酸含量达到最大,再增加酶浓度,游离氨基酸含量增加不显著,苦味减轻也不显著。故选择复合风味酶浓度为 900 u/g。

2.2.2 pH 值对 2 次酶解的影响 在不同的 pH 条件下,酶活力 900 u/g,温度 50 ℃,酶解 1 h,以每毫升水解液中游离氨基酸含量和苦味值为指标,结果如图 7。

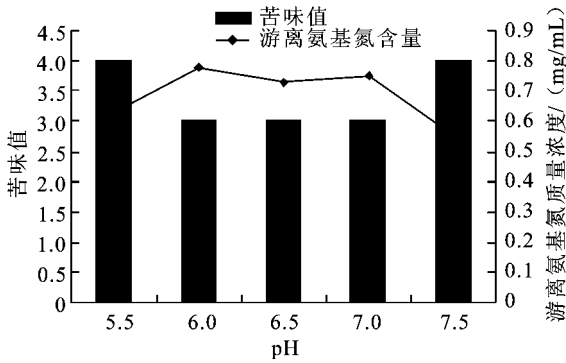


图 7 pH 对二次酶解的影响

Fig.7 Effect of pH on the second hydrolysis

由图 7 可知,pH 值在 6~7 的范围内,游离氨基酸的变化不显著,在 pH 值为 6 时,游离氨基酸含量最大,pH 过大或过小都不利于复合风味酶二次酶解菜籽蛋白。同时,pH 过高或过低都无法使酶解液的苦味减轻,故选取 2 次酶解的 pH 值为 6。

2.2.3 酶解温度对 2 次酶解的影响 在不同的酶解温度下,pH 值 6.0,酶浓度 900 u/g,酶解 1 h,以每 mL 水解液中游离氨基酸含量和苦味值为指标,结果如图 8。

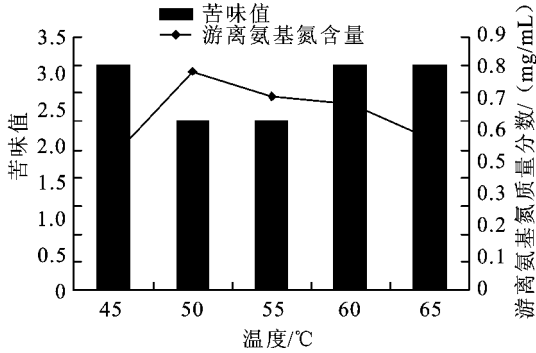


图 8 酶解温度对 2 次酶解的影响

Fig.8 Effect of temperature on the second hydrolysis

由图 8 可知,游离氨基酸含量先随着温度的增加而增加,当温度达到 50 ℃时,游离氨基酸含量达到最大,温度继续上升时,游离氨基酸含量慢慢减少,酶解液苦味恰好相反,过低或过高的温度都无法达到减轻酶解液苦味值的效果,故选取 50 ℃为 2 次酶解的温度。

2.2.4 酶解时间对二次酶解的影响 pH 值 6.0,酶解温度 50 ℃,酶活力 900 u/g,酶解不同的时间,以每毫升水解液中游离氨基酸含量和苦味值为指标,结果如图 9。

由图 9 可知,酶解前 3 h,游离氨基酸含量随着酶解时间的延长迅速增加,3 h 后,游离氨基酸含量增加缓慢,菜籽肽的苦味值在酶解 3 h 后达到最小,继续酶解,苦味值不发生明显的改变。综合考虑,故选择酶解时间为 3 h。

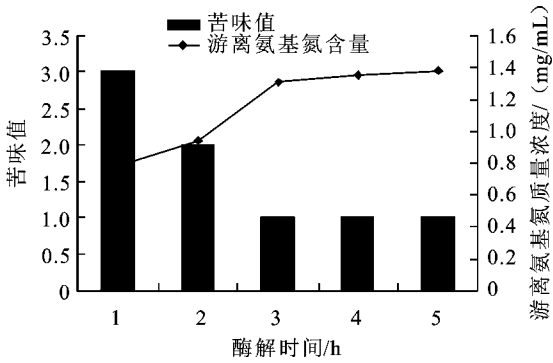


图 9 酶解时间对二次酶解的影响

Fig. 9 Effect of time on the second hydrolysis

综上所述,菜籽肽酶分步酶解工艺为先用 *Alcalase* 碱性蛋白酶在水解条件为:*Alcalase* 碱性蛋白酶浓度为 5 500 u/g,温度 55 ℃,pH 值为 9.5,菜籽蛋白质量分数 3 %酶解 5.5 h,然后用复合风味酶在 pH 值 6.0,酶解温度 50 ℃,酶活力 900 u/g 的条件下酶解 3 h,得到游离氨基酸含量较高,苦味值较低

表 3 正交实验方案与结果分析

Tab. 3 The result of orthogonal experiment

试验 序号	酶解试验因素				脱色 率/ %	氨基酸 损失率/ %	R
	活性炭 质量分数/ %	pH 值	温度/ ℃	时间/ h			
1	1	1	1	1	32.15	25.15	75.16
2	1	2	2	2	26.61	30.80	36.91
3	1	3	3	3	27.65	32.04	38.20
4	2	1	2	3	28.68	33.87	38.00
5	2	2	3	1	33.07	37.03	48.48
6	2	3	1	2	26.44	37.11	20.80
7	3	1	3	2	38.50	45.63	50.00
8	3	2	1	3	36.00	45.21	40.66
9	3	3	2	1	34.45	43.21	39.12
K ₁	50.09	54.39	45.54	54.25			
K ₂	35.76	42.02	38.01	35.90			
K ₃	43.26	32.71	45.56	38.95			
R	14.33	21.68	7.55	18.35			

由极差分析可知,对脱色实验效果的影响 pH 值 > 时间 > 活性炭用量 > 温度,由此可得出最优脱色工艺,即正交实验中的方案 1,活性炭用量为质量分数 1.5 %,pH 值 4.5,温度 55 ℃,时间 50 min,脱色率可达 32.15 %,氨基酸损失率 25.15 %。

4 结 语

1) 菜籽蛋白经 *Alcalase*2.4 L 碱性蛋白酶在酶

的菜籽肽酶解液。

3 菜籽肽的脱色实验

由于此时的菜籽肽酶解液颜色较深,且气味较重,故需要进行脱色实验,本实验采用粉末活性炭作为吸附剂对肽液进行脱色实验,根据单因素实验得到一系列的单因素实验结果,然后结合正交试验得出最佳工艺,实验设计方案和结果分析如表 2、表 3。

表 2 正交试验设计方案

Tab. 2 Design of orthogonal test

水平	活性炭 质量分数/ %	pH 值	温度/ ℃	时间/ min
1	1.50 %	4.5	55	50
2	2 %	5	60	60
3	2.50 %	5.5	65	70

浓度 5 500 u/g,pH 值 9.5,酶解温度 55 ℃的条件下酶解 5.5 h,可得到水解度为 21.14 %肽液。

2) 经碱性蛋白酶酶解的菜籽肽液经复合风味酶在 pH 值 6.0,酶解温度 50 ℃,酶浓度 900 u/g 的条件下酶解 3 h,可得到游离氨基酸含量较高,苦味较低的菜籽多肽。

3) 由于提取菜籽蛋白和酶解时所需的 pH 值较高,故酶解所得的菜籽肽颜色较深,且稍有难闻

的气味,故在活性炭用量为质量分数 1.5%,pH 值 4.5,温度 55℃条件下脱色 50 min,得到较清亮的菜籽肽,此方法脱色率可达 32.15%,氨基酸损失率 25.15%。

参考文献(References):

- [1] 汪建斌,邓勇. Alcalase 碱性蛋白酶对大豆分离蛋白水解作用的研究[J]. 食品工业科技,2002,23(1):61-63.
Wang Jian-bin, Deng Yong. Study on the enzymatic hydrolytic of soy protein with Alcalase[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2002,23(1):61-63. (in Chinese)
- [2] 郭兴凤,周瑞宝,谷文英,等. 菜籽蛋白的酶水解—复合风味蛋白酶水解条件的研究[J]. 粮油食品科技,2001,9(2):32-34.
Guo Xing-feng, Zhou Rui-bao, Gu Wen-ying, et al. The hydrolysis of rapeseed protein—The study on the hydrolysis conditions of flavorzyme[J]. **Science Technology of Cereal,Oils and Foods**, 2001,9(2):32-34. (in Chinese)
- [3] 刘大川,周俊梅. 富硒菜籽蛋白肽的精制研究[J]. 食品科学,2008,29(21):129-133.
Liu Da-chun, Zhou Jun-mei. Study on refining of selenium-enriched rapeseed protein peptide[J]. **Food Science**, 2008,29(21):129-133. (in Chinese)
- [4] 余冰宾. 生物化学实验指导[M]. 北京:清华大学出版社,2004,133-136.
- [5] Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. **J Agric Food Chem**, 1999,27:1256-1262.
- [6] 赵新淮,冯志彪. 大豆蛋白水解物水解度测定的研究[J]. 东北农业大学学报,1995,26(2):178-181.
Zhao Xin-huai, Fong Zhi-biao. A study on the determination of the degree of hydrolysis in soy protein hydrolysates[J]. **Journal of Northeast Agricultural University**, 1995,26(2):178-181. (in Chinese)
- [7] Minagawa E, Kaminogawa S, Tsukasaki F. Debittering mechanism in bitter peptides of enzymatic hydrolysates from milk casein by Aminopeptidase T[J]. **J Food Sci**,1989,54(5):1225-1229.
- [8] 薛照辉,吴谋成,尹经章. 复合酶水解菜籽清蛋白的研究[J]. 中国粮油学报,2004,19(3):57-61.
Xue Zhao-hui, Wu Mou-cheng, Yin Jing-zhang. Study on enzymatic hydrolysis of rapeseed albumin[J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**, 2004,19(3):57-61. (in Chinese)
- [9] Chabanon G, I Chevalot, X Framboisier, et al. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates[J]. **Process Biochemistry**,2007,10:1-10.
- [10] 张锐昌,徐志宏,刘邻渭. 酶解谷朊粉制备小麦肽的研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(6):4-6.
Zhang Rui-chang, Xu Zhi-hong, Liu Lin-wei. Study on preparation of wheat peptides from enzyme-hydrolyzed wheat protein[J]. **Food Research and Development**,2006,27(6):4-6. (in Chinese)
- [11] 王芙蓉,黄文,陈红秀,等. 谷氨酸菌体蛋白酸水解及脱色工艺研究[J]. 食品科学,2005,26(7):155-157.
Wang Fu-rong, Huang Wen, Chen Hong-xiu, et al. Study on the acid hydrolysis of Glu thalline protein and discolored technics[J]. **Food Science**, 2005,26(7):155-157. (in Chinese)

(责任编辑:杨萌)