

利用碱性蛋白酶改性麦芽蛋白功能特性的研究

肖连冬, 黄雪征, 韦 冬

(南阳理工学院生物与化学工程学院, 河南 南阳 473004)

摘 要: 利用碱性蛋白酶对麦芽蛋白进行酶法改性。通过对水解度(DH)的控制, 来改善麦芽蛋白的某些功能特性。系统考察了酶量、pH 值、酶解时间和酶解温度对功能特性的影响。通过单因素试验和正交试验, 确定了最佳工艺条件: pH10、酶解时间 15min、加酶量 4000U/g。改性后麦芽蛋白的起泡性、溶解性和乳化性均有大幅提高, 分别达到 167%、22.68% 和 13.8%, 比未改性前的麦芽蛋白分别提高了 7.35 倍、2.47 倍和 0.28 倍。

关键词: 麦芽蛋白; 碱性蛋白酶; 功能特性; 改性

Study on Modification of Functional Properties of Malt Protein with Alcalase

XIAO Lian-dong, HUANG Xue-zheng, WEI Dong

(College of Biochemical Engineering, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China)

Abstract: Through controlling the degree of hydrolysis, some functional properties of malt protein were improved by means of enzymatic modification with alcalase in this study. The effects of alcalase amount, pH, hydrolysis time and temperature on functional properties of malt protein were investigated in single-factor test, and then except temperature that was confirmed to be 45 °C in single-factor test, three other hydrolysis conditions were further optimized via orthogonal test, as follows: alcalase amount 4000 U/g, pH 10, and hydrolysis time 15 min. After enzymatic modification under the above conditions, the foamability, water solubility and emulsifying capacity of malt protein reach 167%, 22.68% and 13.8%, respectively, which are improved by 7.35 times, 2.47 times and 0.28 times than before, respectively.

Key words: malt protein; alcalase; functional property; modification

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)07-0190-04

麦糟也叫麦芽糟、啤酒糟, 是啤酒生产中的副产物, 主要由麦芽的皮壳、叶芽、不溶性蛋白质、半纤维素、脂肪、灰分及少量未分解的淀粉组成。麦芽蛋白是指从麦芽糟中通过碱法^[1]或醇碱法^[2]等提取得到的蛋白质产品, 也称麦糟蛋白, 其蛋白质含量在 70% 以上, 可作为食品工业添加剂。

食用蛋白质不仅营养丰富, 且在食品中也体现出不同的功能特性, 不仅影响食品的感官特性, 而且对食品在制造、加工或保藏中的物理化学性质起着重要的作用。麦芽蛋白中的蛋白质主要是醇溶蛋白和谷蛋白, 有很强的疏水性, 限制了麦芽蛋白在食品中的应用。在通常条件下, 蛋白质只有处于溶解状态时, 才能表现出良好的功能特性和更广泛的实用性。为满足现代食品加工的要求, 需要采取一定的方法来改善其功能特性, 特别是蛋白质的溶解性能。

蛋白质改性的方法有物理法、化学法和酶法。酶法改性技术就是利用蛋白酶将蛋白分子切割成较小分子, 使其功能特性有所改变。酶法改性程度取决于所用的酶、处理时间及人们所需要功能性质。相对于物理法和化学法而言, 酶法改性有更多的优点^[3-4]。酶法改性条件温和、副产物少; 最终产品功能性质可通过选择特定的酶和反应因素加以控制; 蛋白水解物可直接为消化不良者提供营养。酶改性后的蛋白产品具有良好的溶解性, 并保证良好的风味, 极适合应用于溶解性较好的食品中。本研究是用碱性蛋白酶对麦芽蛋白进行改性, 探讨获得最佳功能特性的酶水解条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

啤酒糟 南阳市天冠啤酒有限公司; 大豆分离蛋白

收稿日期: 2008-06-22

基金项目: 河南省科技发展重点攻关项目(082102340012)

作者简介: 肖连冬(1964-), 女, 副教授, 硕士, 主要从事生物技术和发酵工程研究。E-mail: xld515@sohu.com

湖北云梦公司;碱性蛋白酶(10万单位) 南宁市东恒华道生物科技有限公司;大豆色拉油 市售。

1.2 仪器与设备

台式离心机、PHS-3C精密pH计 上海安亭科学仪器厂;磁力搅拌器 上海雷磁仪器厂;721分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;电热恒温水浴锅 上海跃进医疗器械厂;电动搅拌机 杭州仪表电机厂;BS110S型电子天平 德国Sartorius公司;微量凯氏定氮仪 天津玻璃仪器厂;电热恒温鼓风干燥箱 上海精宏试验设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 麦芽蛋白的提取

啤酒糟经粉碎机粉碎,过100目筛,取筛下物,以95%乙醇:0.05mol/L氢氧化钠为2:1的醇碱比、固液比1:30、提取时间60min、提取温度为常温的条件对啤酒糟中的麦芽蛋白进行提取,并对提取出的麦芽蛋白进行沉淀和干燥^[2]。

1.3.2 麦芽蛋白酶改性的单因素试验

准确称取0.5g麦芽蛋白,加入10~20ml蒸馏水,置于磁力搅拌器中搅拌30min,使之成为悬浊液后,在调至所需温度的恒温水浴中保温5min。同时用0.1mol/L氢氧化钠溶液调节pH值至所需的数值,然后加入一定量的碱性蛋白酶进行水解反应,反应到预定时间后,用0.05mol/L氢氧化钠溶液将pH值调至反应前数值,记下加入的氢氧化钠溶液体积,将酶解液迅速在100℃水浴3min灭酶,待测定。根据加入的NaOH体积计算水解度。

以麦芽蛋白的功能特性为指标,考察酶量(1000、2000、3000、4000、5000U/g)、pH值(8、9、10、11、12)、酶解时间(5、10、15、20、25min)和酶解温度(35、40、45、50、55℃)四个因素对其功能特性的影响。

1.3.3 麦芽蛋白酶改性的正交试验

以单因素试验的结果为依据,选用L₉(3⁴)正交表进行正交试验,并用加权评分法来确定最佳的酶解条件组合,正交试验因素与水平见表1。

表1 正交试验因素与水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test for optimizing hydrolysis conditions of malt protein

水平	因素		
	A pH	B 时间(min)	C 酶量(U/g)
1	9	10	2000
2	10	15	3000
3	11	20	4000

1.3.4 成分测定

粗蛋白测定:微量凯氏定氮法;粗脂肪测定:索

氏提取法;灰分测定:550℃灼烧法;水分测定:105℃恒重法。

1.3.5 水解度(DH)测定^[5]

酶解反应开始前,调节反应体系的pH值至所需值,进行反应,反应结束后测定反应体系的pH值,用0.05mol/L的NaOH将pH值调回至反应前的pH值,记录下所用碱液的量,按下式即可计算出蛋白质的水解度:

$$\text{水解度}(\%) = B \times M_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

式中: B 为 NaOH 的体积(ml); M_b 为 NaOH 的浓度(mol/L); 1/α 为 2.26; M_p 为蛋白质的净质量; h_{tot} 为每克原料蛋白质的肽键毫摩尔数(mmol/g pro),取 8.2。

1.3.6 溶解度、起泡性、持水性、乳化性测定

参考文献[2]。

1.3.7 正交试验方差分析的加权评分法

参考文献[6]。

2 结果与分析

2.1 改性前麦芽蛋白成分组成及功能特性

由表2、3可见,从啤酒糟中提取得到的麦芽蛋白产品其蛋白质含量达75.49%,但其功能特性是比较差的,特别是其溶解性很低。在通常条件下,蛋白质只有处于溶解状态时,才能表现出良好的功能特性,才具有实用性,因此对麦芽蛋白改性,改善麦芽蛋白的功能特性是必要的。

表2 啤酒糟及麦芽蛋白的成分

Table 2 Components of brewer's spent grains and malt protein

指标	水分(%)	灰分(%)	粗蛋白(%)	粗脂肪(%)
啤酒糟	8.36	4.11	28.98	7.25
麦芽蛋白	5.29	7.32	75.49	8.54

表3 改性前麦芽蛋白功能特性

Table 3 Functional properties of malt protein before modification

指标	起泡性(%)	溶解性(%)	持水性(g/g)	吸油性(ml/g)	乳化性(%)
麦芽蛋白	20.0	6.54	4.44	2.0	10.80

2.2 麦芽蛋白酶改性的单因素试验

2.2.1 加酶量对麦芽蛋白功能特性的影响

控制pH10、酶解时间10min、反应温度45℃、酶量设置1000、2000、3000、4000、5000U/g五个水平,以考察其对麦芽蛋白功能特性的影响,其结果见表4。

表4 酶量对麦芽蛋白功能特性的影响

Table 4 Effects of alcalase amount on functional properties of malt protein

酶量 (U/g)	DH (%)	起泡性 (%)	溶解性 (%)	持水性 (g/g)	吸油性 (ml/g)	乳化性 (%)
1000	9.14	90	12.47	3.24	1.48	5.3
2000	12.81	100	14.43	3.97	1.67	7.1
3000	15.15	130	21.72	4.18	1.71	10.2
4000	15.11	76	20.04	4.09	1.92	10.0
5000	15.06	40	18.80	4.07	0.74	3.7

由表4可见,水解度随酶的添加量的增加而增大,但在3000U/g的添加量之后,水解度不再增加,或略有下降。这是由于酶加量少时,酶不足以结合所有的底物,随着酶量的增加,则酶解作用增强,但当所有底物与酶结合后,水解作用就不再增加,酶量过多会影响物质间的渗透反而对酶解不利。

对于功能特性的影响,除吸油性是在酶量为4000U/g时达到最大值之外,其他各项功能特性的变化与水解度的变化相似,都是在酶量为3000U/g时达到最大,且与水解度变化一致,随后降低。其中起泡性和溶解性相比于未酶解前的麦芽蛋白有很大提高,而持水性、吸油性及乳化性相比于未酶解前的麦芽蛋白略有下降。从麦芽蛋白整体功能性出发,选择加酶量为3000U/g。

2.2.2 酶解 pH 值对改性麦芽蛋白功能特性的影响

控制酶用量3000U/g、酶解时间10min、反应温度45℃,考察pH值分别为8、9、10、11、12时对麦芽蛋白功能特性的影响,结果见表5。

表5 pH值对麦芽蛋白功能特性的影响

Table 5 Effects of pH value on functional properties of malt protein

pH	DH(%)	起泡性(%)	溶解性(%)	持水性(g/g)	吸油性(ml/g)	乳化性(%)
8	5.78	72	7.48	3.19	1.25	6.2
9	14.27	88	15.69	3.63	1.54	7.8
10	14.76	150	19.87	4.21	1.82	8.4
11	13.14	116	19.47	4.05	1.43	10.4
12	12.82	80	11.66	3.89	1.38	8.1

由表5可见,各项功能特性在pH值为10时都较高,特别是起泡性和溶解性有很大提高;水解度也在pH10时达到最大,这说明碱性蛋白酶在pH10时活性最强,pH值过高、过低都会抑制碱性蛋白酶的酶活,使酶解速度减慢,从而使水解度较低。

功能特性的变化规律与水解度的变化规律相似,在pH10时对麦芽蛋白的酶解改性效果最佳,故酶解pH值选择10。

2.2.3 酶解时间对麦芽蛋白功能特性的影响

控制酶用量3000U/g、pH10,反应温度45℃,酶解时间设置5、10、15、20、25min五个水平,以考

察其对麦芽蛋白功能特性的影响,结果见表6。

表6 酶解时间对麦芽蛋白功能特性的影响

Table 6 Effects of enzymatic hydrolysis time on functional properties of malt protein

酶解时间 (min)	DH (%)	起泡 性(%)	溶解 性(%)	持水 性(g/g)	吸油性 (ml/g)	乳化 性(%)
5	6.06	80	8.87	3.84	1.30	3.8
10	13.14	104	13.45	4.26	1.95	7.5
15	16.33	124	19.12	4.31	1.87	10.9
20	16.37	117	18.97	4.37	1.05	11.3
25	16.48	120	17.49	3.82	0.87	11.0

由表6可知,水解度随酶解时间的增加而增大,在15~25min水解度的增加不明显。麦芽蛋白的起泡性、溶解性和吸油性这三项功能特性在15min时达到最大,其中起泡性和溶解性有很大提高;持水性和乳化性则在20min时达到最大,但相比于未酶解前的麦芽蛋白并没有提高,综合考虑,酶解时间确定为15min。

2.2.4 酶解温度对麦芽蛋白功能特性的影响

控制酶用量3000U/g, pH值10,酶解时间15min,酶解温度变化35、40、45、50、55℃,以考察其对麦芽蛋白功能特性的影响,结果见表7。

表7 酶解温度对麦芽蛋白功能特性的影响

Table 7 Effects of enzymatic hydrolysis temperature on functional properties of malt protein

酶解 温度(℃)	DH (%)	起泡性 (%)	溶解性 (%)	持水性 (g/g)	吸油性 (ml/g)	乳化性 (%)
35	15.38	115	18.05	3.76	1.56	8.9
40	15.95	117	19.64	3.82	1.64	9.6
45	16.27	121	20.06	3.79	1.66	10.4
50	16.77	113	19.72	3.68	1.58	11.7
55	15.92	110	17.88	3.01	1.48	10.2

由表7可知,在较低温度下,水解度随酶解温度的升高而增大,在45~50℃水解度变化不大,温度再上升酶活性降低,蛋白质水解度下降。各项功能特性中,除乳化性是在50℃时达到最大外,其他项功能特性均在45℃达到最大,所以45℃作为酶解反应温度。

2.3 麦芽蛋白酶解改性的正交试验

在单因素试验的基础上,采用正交试验对酶解改性条件组合进行优化。其结果及分析见表8。

由表8可知,各因素对麦芽蛋白功能特性的影响的主次顺序为A>C>B,最优组合为A₂B₂C₃,即当酶解温度45℃时,其最佳酶解pH10、酶解时间15min、加酶量4000U/g。在此条件下,麦芽蛋白的水解度为16.18%,其起泡性达到167%,溶解性达到22.68%,持水性3.98g/g,吸油性1.28ml/g,乳化性达到13.8%。其中起泡性和溶

解性相比未改性前的麦芽蛋白有很大提高, 分别提高了 7.35 倍和 2.47 倍; 乳化性也有一定提高, 提高了 27.8%; 而持水性和吸油性则略有下降。

表 8 正交试验结果及极差分析
Table 8 Results of orthogonal test and range analysis

试 验 号	因素			指标									
	A	B	C	误差 估计	起泡 性(%)	溶解 性(%)	持水 性(g/g)	吸油性 (ml/g)	乳化 性(%)	DH (%)	综合 评分		
1	1	1	1	1	81	9.28	3.03	1.02	9.3	8.13	58.50		
2	1	2	2	2	92	13.29	3.42	0.98	7.6	17.89	62.19		
3	1	3	3	3	84	12.31	3.14	1.05	10.7	19.21	64.45		
4	2	1	2	3	139	20.84	4.07	1.56	11.6	18.92	90.72		
5	2	2	3	1	167	22.68	3.98	1.28	13.8	16.18	94.88		
6	2	3	1	2	145	18.82	4.22	1.51	10.9	18.75	88.70		
7	3	1	3	2	121	16.09	4.31	1.06	10.2	16.80	77.05		
8	3	2	1	3	124	15.27	3.58	1.21	9.6	12.48	74.35		
9	3	3	2	1	130	17.02	3.26	1.15	10.4	15.59	75.52		
K ₁				61.71	75.42	73.85	76.30						
K ₂				91.43	77.14	76.14	75.98						
K ₃				75.64	76.22	78.79	76.51						
R				29.72	1.72	4.94	0.53						

2.4 麦芽蛋白功能特性和水解度关系的综合分析

Kuehler 等^[7]的研究表明, 通过对水解反应的控制可很大程度上提高蛋白质的功能特性, 蛋白质的水解度对其功能特性起着主要影响。对于起泡性来说, 适当的酶解可以改善起泡性能。蛋白质的有限酶解可以增加疏水基团的暴露, 增加多肽链的交联, 疏水性的增加可以增强起泡能力。对于溶解性, Bigelow 等^[8]认为溶解性受到疏水性和电荷频率两个参数的影响, 高的电荷频率和低的疏水性可有效提高溶解性。本实验的麦芽蛋白通过酶的水解, 可使蛋白质极性基团($-\text{NH}_3^+$ 、 $-\text{COO}^-$)的数量增加, 即电荷频率增加, 使其溶解性上升, 而尽管疏水性有一定的增加, 但总体来说电荷频率对麦芽蛋白溶解性的影响要远大于疏水性的影响, 所以其溶解性增大。对于持水性, 由于蛋白质含有很多极性基团, 所以具有持水性, 但本实验中麦芽蛋白的持水性比未酶

解改性前略降, 这可能是因为疏水性的增加对其产生了更大的影响从而使持水性降低。对于吸油性, 本实验中麦芽蛋白的吸油性比未酶解改性前下降, 这是因为麦芽蛋白酶解之后, 其相对分子质量减小, 难于形成凝胶质阻止脂肪的表面移动, 所以其吸油性产生了下降的现象。对于乳化性, 酶水解可导致蛋白质分子紧密构象的破坏, 使包埋于蛋白质内部的疏水性残基暴露, 使它们进入油水界面, 促使界面张力降低, 同时由于酶水解使蛋白质分子中所带的净电荷数量增加, 它们通过静电斥力阻止了油滴间的聚合, 提高了乳化能力^[4]。

3 结 论

3.1 利用碱性蛋白酶对麦芽蛋白进行酶法改性, 能显著的改善麦芽蛋白的水溶性、起泡性和乳化性。当酶解温度 45℃ 时, 其最佳酶解条件组合为: pH10、加酶量 4000U/g、酶解时间 15min, 此时水解度为 16.18%。
3.2 改性后的麦芽蛋白的起泡性和溶解性得到大幅提高, 分别提高了 7.35 倍和 2.47 倍; 乳化性也有一定提高, 提高了 27.8%; 而持水性和吸油性则略有下降。

参考文献:

- [1] 肖连冬, 姬鄂豫, 葛中巧. 麦芽蛋白的提取及其功能特性的研究[J]. 酿酒, 2005(1): 56-58.
- [2] 肖连冬, 于海彦, 薛艳. 麦芽蛋白的醇碱提取及其功能性评价[J]. 酿酒, 2003(11): 85-87.
- [3] 赵新准, 冯志标, 于国平, 等. 酶促水解大豆分离蛋白的研究[J]. 食品与发酵工业, 1994, 44(1): 7-10.
- [4] 刘大川, 杨国燕. 酶改性大豆分离蛋白的制备及产品功能性的研究[J]. 中国油脂, 2004(12): 56-61.
- [5] 袁斌, 吕桂善, 刘小玲. 蛋白质水解度的简易测定方法[J]. 广西农业生物科学, 2002(6): 113-115.
- [6] 刘晔玮, 宋海, 马振远, 等. 甘草多糖提取工艺的研究[J]. 中成药, 2006(5): 729-731.
- [7] KUEHLER C A, STINE C M. Effect of enzymatic hydrolysis on some functional properties of whey protein[J]. Food Sci, 1974, 39: 379-382.
- [8] BIGELOW C C. On the average hydrophobicity of proteins and the relation between it and protein structure[J]. J Theoret Biol, 1967, 16(2): 187-211.