

优化蛋清粉蛋白热变性条件的研究

于志鹏, 林松毅, 刘静波*, 郝 慧

(吉林大学军需科技学院营养与功能食品研究室, 吉林 长春 130062)

摘 要: 为了降低蛋清粉蛋白高F值寡肽的生产成本以实现工业化大规模生产, 本实验利用了对比分析和 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方法, 考察热变性时间、热变性温度和加酶量三个因素对蛋清粉蛋白水解度的影响, 优化出蛋清粉蛋白热变性条件的最佳参数为: 当底物浓度为5%, 热处理温度90℃, 热处理时间10min, 碱性蛋白酶加酶量5%, 酶解5h后蛋清粉蛋白水解度为26.68%。

关键词: 蛋清粉蛋白; 碱性蛋白酶2709; 热变性

Study on Controllable-hydrolysis of Egg-white Protein

YU Zhi-peng, LIN Song-yi, LIU Jing-bo*, HAO Hui

(Laboratory of Nutrition and Functional Food, College of Quartermaster Technology,
Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: The contrast analysis and $L_9(3^4)$ orthogonal test were used in this study to reduce the cost of producing egg white powder protein high F value peptide that would help to realize the industrialization of large scale production. Three factors of heat denaturation time, temperature and the enzyme dosage were investigated to measure the effect of egg white powder proteolysis, then, the optimal parameters were: the concentration of substrate 5%, heat denaturation temperature 90℃, heat denaturation time 10 minutes, the enzyme dosage 5%. After enzymolysis for 5 h, the proteolysis degree of egg white powder protein was 26.68%.

Key words egg white powder protein; alkali protease 2709; heat denaturation

中图分类号: TS253.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0229-04

天然蛋白质分子具有紧密的立体结构, 氢键、疏水键、二硫键等作用使肽链卷曲于蛋白分子内部, 很难被蛋白酶水解。要加快酶解速度、提高蛋清水解度必须考虑对原料进行前处理, 使蛋清粉蛋白高度压缩、紧密的结构松散开, 暴露出分子内部的酶作用位点, 以利于蛋白酶的结合。目前主要方法有酸处理、碱处理、超声处理和热处理。本实验主要研究热处理对蛋清粉酶解的影响。热处理破坏蛋白质的二、三级或四级结构, 打开氢键、二硫键及疏水键, 使之变成无秩序的肽链状态, 那些原来在分子内部包藏而易与酶发生作用的部位, 由于分子结构松散而暴露出来, 从而使蛋白水解酶的作用点大大增加, 提高了酶解速度, 但不能加热过度, 否则松散的多肽链又会由于S-S键和疏水键的再生而重新结合得更加紧密, 这样反而阻碍了酶对蛋白的水解作用^[1]。

杨万跟等^[2]从消除或者减轻蛋清对蛋白酶抑制作用的

角度研究了天然蛋清对胰蛋白酶与几种商业蛋白酶的抑制作用, 以及不同温度和pH条件下变性后对蛋白酶抑制作用的改变。蛋白质的热处理程度还取决于蛋白质的性质和环境因素(包括浓度、水分活度、pH、离子强度和离子的种类等)以及其他因素, 本研究在单因素基础上进行正交试验, 以水解度为指标主要考察热处理温度和时间对水解效果的影响, 优化出最适的热处理条件, 降低蛋清高F值寡肽的生产成本。

1 材料与方法

1.1 材料

蛋清粉 北京金健力公司; 碱性蛋白酶2709、风味酶 天津泛氟国际贸易有限公司。

1.2 仪器与设备

CS501型超级恒温水浴锅 上海锦屏仪器有限公司;
ZD-2型自动电位滴定仪 上海虹益仪器仪表有限公司;

收稿日期 2007-08-01

*通讯作者

基金项目: 吉林省科技厅农业重点研究项目(20050202-3); 吉林大学农学部大学生科技创新基金资助项目(2007051837)

作者简介: 于志鹏(1984-), 男, 本科, 研究方向为营养与功能食品。

MILLIPORE 牌超纯水机 美国生产; 752PC 型紫外可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司生产; METTLE TOLEDO AG204 型电子天平 瑞士。

1.3 方法

1.3.1 酶活力测定方法

采用 Folin-酚试剂法。

1.3.2 蛋白酶活力的标准曲线

为了确定酪氨酸与吸光度值的对应关系, 应以不同浓度的标准酪氨酸溶液(配制方法如表1所示)与福林试剂显色, 测定吸光度值绘制标准曲线(以不含酪氨酸的管为空白)。以吸光度 A 为纵坐标, 酪氨酸的浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

表1 标准曲线的测定数据
Table 1 Data for standard curve

管号	酪氨酸的浓度 (ml/mg)	100μg/ml L-酪氨酸标准溶液 (ml)	蒸馏水 (ml)
对照	0	0	10
1	10	1	9
2	20	2	8
3	30	3	7
4	40	4	6
5	50	5	5
6	60	6	4

1.3.3 水解度(DH)的测定方法

采用 pH-Stat 法。

在酶法水解蛋白的过程中可以通过水解度控制水解的程度。测定蛋白质水解度常用的有 pH-Stat 法、三氯乙酸沉淀法、三硝基苯磺酸法、茚三酮比色法、甲醛滴定法等, 本实验采用 pH-Stat 法测定水解度, 是利用蛋白质的肽键在水解后形成的自由氨基和自由羧基在不同的 pH 值下解离状态也不同, 当蛋白质酶解过程在 pH 值 6.5 以上时, 水解度按公式 1 进行计算。

$$DH = V_{NaOH} \times \frac{C_{NaOH}}{M_p} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \quad (1)$$

式中, V_{NaOH} 为水解过程中用去的 NaOH 的量(ml); M_p 为蛋白质的总量(g); C_{NaOH} 为 NaOH 的浓度(mol/L); h_{tot} 为每克蛋白质中肽键的克当量(取 8.38); α 为 α -氨基酸的解离度。按计算公式 2 进行计算。

$$\alpha = 10^{pH-pK} / (1 + 10^{pH-pK}) \quad (2)$$

式中, pH 为实验时采用的 pH 值; pK 为 α -氨基酸的解离度常数, 可取 7.0 进行计算。

1.3.4 碱性蛋白酶用量对蛋清粉蛋白水解度的影响

在底物浓度 5%, 反应温度 55℃, pH10.0 的条件下, 考察碱性蛋白酶加酶量依次为 4%、6%、8%、10%、12%、13% 的条件下对蛋清粉蛋白水解程度的影

响, 连续跟踪记录 5 h 内水解度随时间变化的情况。

1.3.5 热处理对蛋清粉蛋白水解度的影响

为实现较小的加酶量获得理想的水解效果, 考察了热处理对蛋清粉蛋白水解度的影响程度。当碱性蛋白酶加酶量 12%, 底物浓度为 5%, 反应温度 55℃, pH10.0 时, 对比分析了原料经过 60℃ 水浴热处理对蛋清粉蛋白水解度的影响程度。

1.3.6 蛋清粉蛋白可控酶解条件的优化方案

由于中试生产为连续操作, 即稀释、处理、水解在同一容器中进行, 因此处理过程是一个连续的升温过程, 当容器内蛋清温度达到 60℃ 时开始出现变性现象, 但水解度变化幅度较小, 故本实验重点考察热变性时间、热变性温度和加酶量三个因素对蛋清粉蛋白水解度的影响, 利用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计方案, 其因素水平如表 2 所示。

表2 正交试验因素水平表
Table 2 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	A 热变性时间(min)	B 热变性温度(℃)	C 加酶量(%)
1	10	70	3
2	20	80	4
3	30	90	5

2 结果与分析

2.1 蛋白酶活力的标准曲线

利用 Folin-酚试剂法绘制碱性蛋白酶活力标准曲线如图 1 所示, 此标准曲线的方程为: $A = 0.0098C + 0.0068$, 相关系数为 $R^2 = 0.9963$ 。根据作图或用回归方程, 计算出当吸光度为 1 时的酪氨酸的微克数, 即为吸光常数 K 值, 算得 $K = 100$ (通常 K 值在 95~100 范围比较准确)。

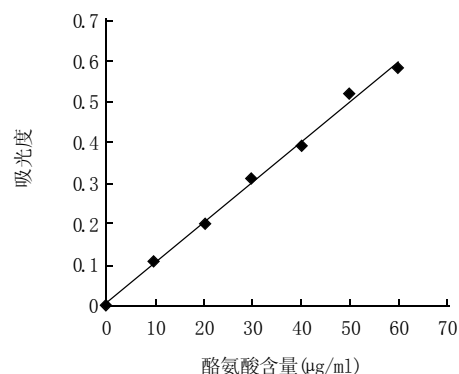


图1 酶活力测定标准曲线
Fig.1 Standard curve for enzyme activity

2.2 碱性蛋白酶用量对蛋清粉蛋白水解度的影响程度

在底物浓度 5%, 反应温度 55℃, pH10.0, 碱性

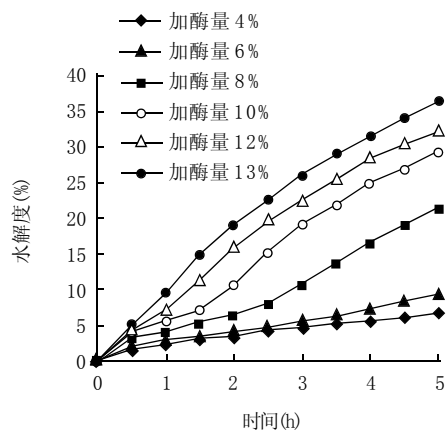


图2 碱性蛋白酶水解加酶量与水解度的单因素试验曲线
Fig.2 Single factor test of enzymatic quality

蛋白酶加酶量对蛋清粉蛋白水解程度影响情况如图2所示。从图2可以看出：随着酶解时间的延长和加酶量的增加，蛋清粉蛋白水解度变化的总趋势是逐渐增加的。当酶用量为4%时，5h水解度为6.53%，不能达到预期效果；加酶量为12%的最终水解度比较理想，但从经济因素考虑，酶用量较大。

2.3 热处理对蛋清粉蛋白水解度的影响程度

碱性蛋白酶加酶量12%，底物浓度为5%，反应温度55℃，pH10.0时，60℃水浴热处理对蛋清粉蛋白水解度的影响情况如图3所示。从图3可以看出热处理方式对水解度有影响，且当水解时间在0.5、1.0、1.5h内热处理对蛋清粉蛋白水解度增加幅度依次达到74.1%、84.9%、56.7%，而当水解时间在5.0h水解度增加幅度14.1%。

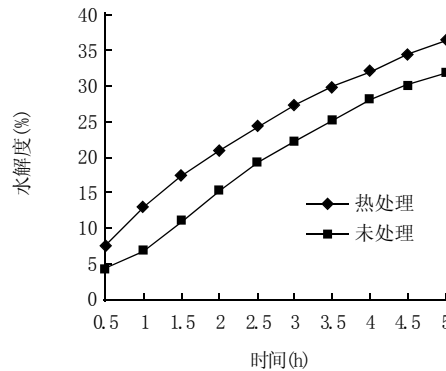


图3 不同处理方式的水解度的影响程度
Fig.3 Effects of different treatment on hydrolysis degree of protein

2.4 L₉(3⁴)正交试验结果分析

利用L₉(3⁴)正交试验研究热变性时间、热变性温度和加酶量三个因素对蛋清粉蛋白水解度的影响程度见表3。由表3的分析结果可知：当底物浓度为5%，影响蛋清粉蛋白水解度的主次顺序为：B > C > A，即：热

变性温度 > 加酶量 > 热变性时间。可控酶解条件的最优组合为A₃B₃C₃，即热变性时间30min，热变性温度为90℃，加酶量为5%。

表3 L₉(3⁴)正交试验结果及其极差分析
Table 3 Result of L₉(3⁴) orthogonal test and analyse

试验号	因素				y
	A 热变性时间(min)	B 热变性温度(℃)	C 加酶量(%)	D	
1	1	1	1	1	7.71%
2	1	2	2	2	9.80%
3	1	3	3	3	26.88%
4	2	1	2	3	10.45%
5	2	2	3	1	11.65%
6	2	3	1	2	20.21%
7	3	1	3	2	15.07%
8	3	2	1	3	7.86%
9	3	3	2	1	24.79%
K ₁	0.2939	0.1823	0.3771	0.2915	S=89.42%
K ₂	0.2731	0.1431	0.3004	0.3008	
K ₃	0.3272	0.5688	0.386	0.3019	
k ₁	0.097967	0.060767	0.1257	0.097167	
k ₂	0.091033	0.0477	0.100133	0.100267	
k ₃	0.109067	0.1896	0.128667	0.100633	
R	0.018033	0.1419	0.028533	0.003467	
优水平	A ₃	B ₃	C ₃		
主次因素		B > C > A			
最优组合		A ₃ B ₃ C ₃			

对L₉(3⁴)正交试验结果进行方差分析，结果见表4。由于处理时间所在列的偏差平方和很小，表明其对水解度的影响也很小，因而在分析时将该列平方和作为试验误差偏差平方和的一部分。温度和加酶量显著性水平均为0.01，本试验中温度和加酶量为显著因素。从经济效益考虑选择最优的工艺组合为A₁B₃C₃。即热变性时间10min，热变性温度为90℃，加酶量为5%。对应的水解效果为不经过处理样品的4倍左右。从而显著提高了酶的利用率，降低了生产成本，便于工业规模化生产。

表4 方差分析表
Table 4 Variance of orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	均方和	F比	显著性水平
B	SB=0.036904	2	0.018452	142.4207	0.01
C	Sc=0.038303	2	0.019152	147.8187	0.01
误差	Se=0.000518	4	0.00013	—	—
总和	S=0.075726	8		F _{0.01} (2, 4)=18.00 F _{0.05} (2, 4)=6.94	

3 结论

利用L₉(3⁴)正交试验设计方法优化出蛋清粉蛋白热变性条件的最佳参数为：当底物浓度为5%，热处理温度90℃，热处理时间10min，碱性蛋白酶加酶量5%，酶

葛根总黄酮的提取及抗氧化活性评价研究

刘晓宇, 张俊杰, 王蕊霞

(华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 以野葛根为原料, 以醇回流法提取总黄酮, 根据单因素及正交试验确定了最佳工艺条件, 并对提取的葛根黄酮采用邻苯三酚-碳酸盐缓冲溶液-鲁米诺和鲁米诺-H₂O₂两种化学发光体系进行抗氧化活性评价。研究表明: 最佳工艺条件为70% (V/V)的乙醇水溶液作为提取剂, 浸提时间为1h, 料液比为1:30 (m/V), 浸提温度为80℃。葛根黄酮清除O₂^{•-}的IC₅₀为28.94 μg/ml, 清除H₂O₂的IC₅₀为46.30 μg/ml。

关键词: 野葛; 黄酮; 提取工艺; 化学发光; 抗氧化活性

Study on Extracting Process of *Pueraria* Flavone and Evaluation of Anti-oxidant Activity

LIU Xiao-yu, ZHANG Jun-jie, WANG Rui-xia

(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The optimal process of extracting flavone from *Pueraria* by ethanol was studied and the optimal conditions were obtained by orthogonal matrix on the basis of single factor test in this paper. Meanwhile, the anti-oxidant activities of the extraction liquid were also studied by Pyrogallol-carbonate buffer-Luminol chemiluminescence system and Luminol-H₂O₂ chemiluminescence system. The results showed that the optimal conditions by orthogonal matrix were in the following: time 1 hour, the temperature 80 °C the volume of ethanol 70% and the ratio of material to solvent 1:30. It was also found that the CL intensity of the Luminol-H₂O₂ system and Pyrogallol-carbonate buffer-Luminol system could be inhibited in the presence of flavonoids of pueraria. It was demonstrated that the flavone of *Pueraria* had powerful ability to clear off superoxide radicals (IC₅₀=28.94 μg/ml) and hydrogen peroxide (IC₅₀=46.30 μg/ml).

Key words *Pueraria* flavone extracting process; chemiluminescence; anti-oxidant activity

中图分类号: Q503 TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0232-06

收稿日期: 2007-07-26

基金项目: 湖北省科技攻关项目(2007AA201C05)

作者简介: 刘晓宇(1969-), 女, 副教授, 研究方向为食品安全及农业资源综合利用。

解5h后蛋清粉蛋白水解度为26.68%。本方法是通过降低加酶量实现降低蛋清粉蛋白高F值寡肽的生产成本, 为后期实现工业化大规模生产奠定研究基础。

参考文献:

- [1] 刘珊, 刘晓艳. 热处理对蛋白质理化性质的影响[J]. 食品添加剂, 2006: 108-112.
- [2] 杨万根, 王璋, 许时婴. 蛋清酶解前的变性条件研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(2): 123-125.
- [3] 卢雁一, 李向荣. 蛋白质处理机理与处理时的热力学参数研究进展[J]. 化学进展, 2005, 17(5): 905-910.
- [4] 萨楚尔夫, 罗辽复. 蛋白质处理的渐变模型[J]. 内蒙古师范大学学报: 自然科学汉文版, 2002, 31(1): 26-30.
- [5] FREIRE E, MURPHY K N. Molecular basis of co-operativity in protein folding [J]. J Mol Biol, 1992, 222: 687-698.
- [6] NOJIMA H, IKAI A, OSRIMA T, et al. Reversible thermal unfolding of thermostable phosphoglycerate kinase[J]. J Mol Biol, 1977, 116: 429-442.
- [7] 陶慰孙, 李惟, 姜涌明. 蛋白质分子基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995: 321-326.
- [8] 迟玉杰, 田波. 蛋清寡肽制备技术的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(11): 177-179.
- [9] 萨楚尔夫, 罗辽复. 蛋白质热处理现象的研究[J]. 内蒙古师范大学学报自然科学版, 2002, 31(4): 337-342.