

限制性酶水解 - 超滤法生产改性大豆蛋白

杨国龙¹, 赵谋明², 杨晓泉², 徐 鑫², 彭志英²

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 河南 郑州 450052

2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘 要: 通过限制性酶解和超滤的方法制得富含 11S 亚基的改性大豆蛋白。脱脂豆粕经过碱提得到可溶性蛋白溶液, 粗蛋白液经过选择性水解、超滤, 截留液冷冻干燥得到改性大豆蛋白, 产物经 SDS-PAGE 分析, 表明其成分主要是 11S 亚基, 蛋白质含量大于 70%, 产率在 80% 以上。

关键词: 改性大豆蛋白; 限制性酶解; 超滤

Processing of Modified Soy Protein by Limited Enzymatic Hydrolysis-Ultrafiltration

YANG Guo-long¹, ZHAO Mou-ming², YANG Xiao-quan², XU Xin², PENG Zhi-ying²

(1. School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China

2. College of Food and Biological Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Modified soybean protein concentrates with high content of 11S subunits were produced by limited hydrolysis and ultrafiltration. Water extracts of defatted soy flour were selectively hydrolysed and ultrafiltered. Modified soy protein was obtained by freezing dry the retentates. It was proved by SDS-PAGE that the product mainly contains 11S subunits. The yield is better than 80%, and the protein content of the product is better than 70%.

Key words modified soy protein; limited enzymatic hydrolysis; ultrafiltration

中图分类号: Q814.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)05-0163-05

含有大量优质蛋白的大豆已被人们作为食用植物蛋白的来源, 尤其对东方人大豆是不可缺少的食物^[1]。大豆蛋白是由具有高级复杂结构的不同蛋白组成的, 根据超速离心时沉降系数的不同, 这些蛋白被分成 2S、7S、11S 和 15S, 大豆蛋白的主要组分是 7S 球蛋白 (7S globulin or conglycinin) 和 11S (11S globulin or glycinin), 它们都有独特的物理化学特性^[1]。由于组成和结构的不同, 大豆蛋白的主要组分 7S 和 11S 的稳定性不同, 7S 在碱性条件下对温度比较敏感, 11S 在酸性环境中则没有 7S 稳定; 碱性条件下, 7S 和 11S 对蛋白酶水解的敏感性也不同, 7S 较易被水解, 11S 则相对较难水解^{[2][6, 7]}。

大豆蛋白经过酶水解后某些功能性会得到改善^[3]。Mohri M. 和 Matsushita S. ^[5] 用菠萝蛋白酶对大豆蛋白进行改性, 和大豆蛋白相比改性蛋白的持水性得到提高。Were L.、Hettiarachchy N. S. 和 Kalapathy U. ^[11] 对大豆蛋白先进行碱 (pH10.0) 处理, 再用木瓜蛋白酶水

解。改性蛋白的起泡性、溶解性、持水性和表面疏水性都得到提高。大豆蛋白的选择性水解产物中有小分子肽、大分子肽和没有水解的蛋白。用膜分离的方法可以将其分成大分子的截留液和小分子多肽, 其性质与天然大豆蛋白有很大的差别。在本文通过蛋白酶选择性水解和膜分离的方法对大豆蛋白进行改性, 以提高大豆蛋白的某些功能性, 扩大大豆蛋白在食品中的应用范围。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

脱脂豆粕 山东万德福蛋白厂, 成分: 蛋白质 (N × 6.25) 52.6%; 水分 4.8%; 灰分 5.9%; 其他 36.7%。

蛋白酶 (Alcalase 2.4L) 诺维信酶制剂公司; 标准蛋白质 上海升正生物技术有限公司生产; 超滤膜块、Vivaflow 200 平板式超滤膜模块 Sartorius 集团 Vivascience

收稿日期: 2004-10-11

基金项目: 国家“十五”招标攻关项目 (2001BA501A02); 广东省“十五”攻关农产品加工重大资助项目 (A20301)

作者简介: 杨国龙 (1974-), 讲师, 博士, 主要从事油脂与植物蛋白的研究。

公司。

BT00-300M 型蠕动泵 保定兰格恒流泵有限公司;
PHS-3C 精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; 集热式磁力搅拌器 金坛市新一佳仪器厂; 压力控制系统 订做 Bio-radIII 微型电泳仪 英国。

1.2 方法

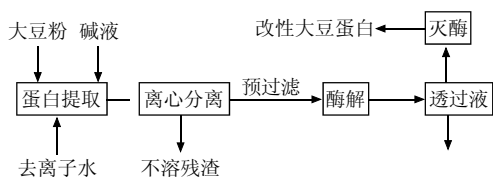
蛋白质含量的测定: 按照 GB/T14771-1993 标准;

水分的测定: 按照 GB/T10358-1989 标准;

残油的测定: 索氏抽提法(AOCS)。

整个实验操作过程如图所示。脱脂豆粕和去离子水按一定比例配制成悬浊液, 室温下搅拌 60min。在搅拌的过程中, 用稀 NaOH 溶液调节溶液的 pH 值在 8.0。悬浊液在室温, 8000r/min, 离心 20min, 弃去不溶物, 保留上清液。上清液经 300 目滤网过滤, 清液酶解后, 由恒流泵高速泵入超滤系统。超滤时调节溶液的 pH 值到设定值, 并调节超滤的操作压力达到预定值。

在整个超滤过程中, 压力降、膜面压力、温度、pH 值和流速保持不变。



膜性能的评价^[12~14] 对于间歇式操作而言, 任何组分的产率与浓缩系数和截留率有关。

$$\text{浓缩系数}(\Xi): \Xi = \frac{V_0}{V_r}$$

$$\text{截留系数}(R): R = (C_r - C_p) / C_r$$

$$\text{产率}(Y): Y = \frac{\text{浓缩液中的质量}}{\text{原料液中的质量}} = \frac{V_r C_r}{V_0 C_0}$$

$$\ln \frac{C_r}{C_0} = -R \ln X \quad (1)$$

如果以 $\ln X$ 为横坐标, $\ln(C_r/C_0)$ 为纵坐标作图, 则直线的斜率是 R 。

$$J = k \ln(C_m/C_b) \quad (2)$$

依照试验数据得出二者的线性关系, 外推至膜通量为 0 时, 就可得到形成凝胶层时的浓度 C_g 。其中, V_0 和 V_r 分别是原料液体积和浓缩液体积; C_0 、 C_r 和 C_p 分别是原料液、浓缩液和透过液中物质的浓度; J 为膜通量; k 为传质系数; C_m 为膜表面的溶质浓度, C_b 为物料主体的溶质浓度。

膜的清洗 实验结束后, 超滤膜用去离子水冲洗,

而后用稀 NaOH 溶液冲洗, 再用去离子水清洗至中性; 用 0.1% SDS 清洗, 用去离子水洗至中性; 再用稀 HNO_3 溶液冲洗 30min, 用去离子水洗至中性。注入 10% 乙醇溶液放入冰箱保存。以膜的纯水恢复通量(Water flux recovery, WFR)作为膜清洗效果的量化指标。

$$\text{水通量恢复率} = [(J_w - J_{fw}) / (J_{iw} - J_{fw})] \times 100\%$$

其中, J_{fw} 是膜的当前通量;

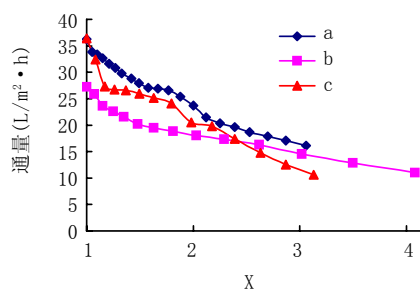
J_{iw} 是膜没有污染前的纯水通量;

J_{fw} 是膜被污染后的纯水通量。

SDS- 聚 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)参考 Molina Ortiz S.E. 等的方法^[6]。取适量的样品, 再加入 300μl 2 倍样品缓冲液和 15μl β-巯基乙醇, 沸水煮 5min。不连续 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 3% 浓缩胶, 12% 分离胶, 电压 220V 电泳, 考马斯亮兰 G250 溶液染色。

2 结果与讨论

2.1 通量的变化



操作条件:

a: 温度 50℃; $\Delta P=0.12\text{MPa}$; 1:15(豆粕/水, m/m) 蛋白提取液。

b: 温度 50℃; $\Delta P=0.12\text{MPa}$; 1:10(豆粕/水, m/m) 蛋白提取液。

c: 温度 55℃; $\Delta P=0.16\text{MPa}$; 1:10(豆粕/水, m/m) 蛋白提取液。

图1 超滤过程中通量的变化

Fig.1 Variations of flux with time during ultrafiltration

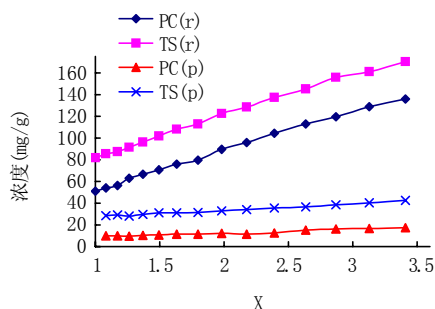
超滤时通量的变化如图 1 所示。随着超滤的进行, 由于膜污染和料液浓度不断增加, 通量不断减小(见 a、b、c)。膜污染使得传质阻力增大, 膜污染包括大分子在膜面的吸附、浓差极化形成的凝胶层和水解产生的小分子在膜孔内的吸附、堵塞。粘度影响扩散系数和料液的流动状态, 而扩散系数和流动状态又都影响传质系数, 粘度大传质系数就小, 通量也就小。料液初始浓度增大使初始通量有较大幅度的下降(见 a 与 b), 这是因为料液浓度高其粘度大, 通量就小。温度的升高可使通量增大(见 b 与 c), 这是由于扩散系数随温度的升高而增大, 粘度随温度的升高而减小。

跨膜压力对通量的影响是多方面的。根据边界层阻力模型^[13,14], $J = \Delta P / [\mu (R_m + R_c + R_f)]$ (ΔP , 跨膜压力; μ , 料液粘度; R_m , 膜的固有传质阻力; R_c , 浓差极化产

生的阻力; R_f , 膜污染产生的阻力), 膜通量取决于受压力影响下膜和边界层的性质, 在膜控制区或压力控制区, 通量于压力成正比; 在质量传递控制区或浓差极化区, 通量随压力的变化并不明显。随着压力的增大, 膜面的浓差极化也会更厉害, 凝胶层的厚度会增加, R_c 变大, 膜通量下降较快。当料液中有小分子物质时, 跨膜压力增大, 膜污染尤其是膜孔内的吸附和堵塞更严重, 增大传质阻力, 超滤初始阶段膜通量的下降更为明显(见图 1c)。根据渗透压模型^[13, 14], $J = (\Delta P - \Delta \pi) / (\mu R_m) (\Delta \pi \text{ 膜面的渗透压})$, 增加跨膜压力会提高膜通量, 但是溶质向膜表面的对流传递加快, 膜面处的溶质浓度增加, 导致 $\Delta \pi$ 的增加, 部分抵消了跨膜压力的增加。由于 $\pi = f(C)$, 所以有可能出现 C_m 的微小增加导致 $\Delta \pi$ 的极大增加, 部分甚至完全抵消高压的驱动力, 使膜通量减小(图 1 见 b 和 c, 浓缩系数大于 2.5 以后)。即使 c 中的温度高些, 也不能避免通量的降低。

2.2 超滤分离

截留液和透过液中固形物含量和蛋白质浓度如图 2 所示。



TS: 总固形物含量; PC: 蛋白质浓度; R: 截留液; p: 透过液

图 2 超滤过程中截留液和透过液中固形物含量和蛋白质浓度的变化
Fig.2 Variation of total solid content and protein concentration in retentate and permeate during ultrafiltration

截留液中的固形物含量和蛋白质浓度都有显著的增加, 而透过液中固形物含量和蛋白质浓度的增加比较缓慢。截留液中固形物含量和蛋白质浓度的变化是膜分离浓缩的结果, 而透过液中的变化则是酶水解使得料液中含有较多的小分子物质引起的。由图 3 可以看出, 开始阶段截留率稍有增大, 随后便趋于平稳。截留率基本没有发生变化说明仍然有小分子物质生成, 酶解仍在进行。当产物中的某一组分被分离后, 平衡会朝正反应方向移动, 这一现象也符合化学平衡的规律。而截留液中固形物含量和蛋白质浓度又都在增加, 这又说明水解的速度是很慢的。膜的选择性在此得到了体现, 水解产生的小分子物质不断的透过膜, 而大分子则被膜截留。

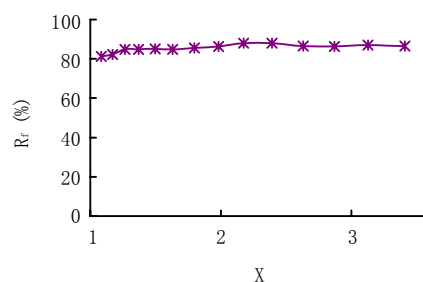


图 3 超滤过程中蛋白质截留率的变化
Fig.3 Variation of protein rejection during ultrafiltration

2.3 超滤膜的操作特性

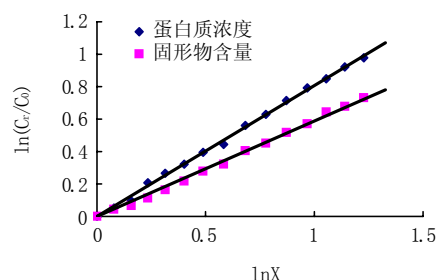


图 4 超滤浓缩过程中截留液中固形物含量和蛋白质浓度随浓缩系数的变化
Fig.4 Variations of total solid content and protein concentration in the retentate with concentration factor during ultrafiltration

根据公式(1)作图得图 4。对蛋白质而言有 $\ln(C_r/C_0) = 0.8071\ln X$, 平均截留率 80.7%; 对固形物来说有 $\ln(C_r/C_0) = 0.5891\ln X$, 平均截留率 58.9%。由于蛋白酶的水解作用产生了一些可以透过膜的小分子物质(如多肽), 这样透过液中有可溶性多糖、非蛋白氮和蛋白氮, 所以无论以蛋白质来衡量还是以固形物含量来衡量截留率都比较低。

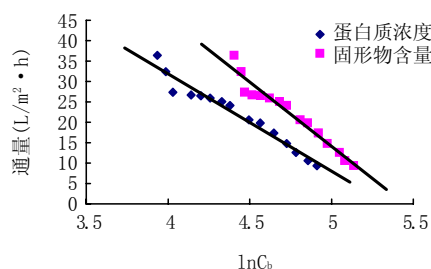
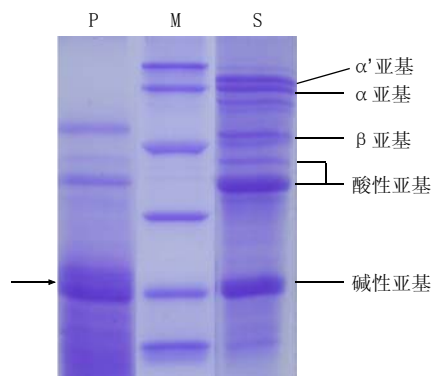


图 5 超滤过程中截留液中固形物含量和蛋白质浓度与通量的关系
Fig.5 Effect of total solid content and protein concentration in the flux retentate during ultrafiltration

根据公式(2)作图如图 5。对蛋白质来说有 $J = 23.9 \ln(207.5/C_b)$, 传质系数是 $23.9 \text{ (L/m}^2 \cdot \text{h)}$, 形成凝胶层时蛋白质的浓度是 20.8%; 对于固形物而言有 $J = 31.51 \ln(232.3/C_b)$, 传质系数是 $31.5 \text{ (L/m}^2 \cdot \text{h)}$, 形成凝胶层时的固形物含量是 23.2%。由于蛋白酶的水解作用, 使得

料液的粘度和总体平均分子量下降,粘度小、分子量小都有利于扩散,故有较大的扩散系数。

2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳



P : 产物; M : 标准蛋白质; S : 原料

图6 原料和产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
Fig.6 SDS-PAGE of material and product

原料和产物的 SDS-PAGE 如图 6 所示。标准蛋白质的分子量从上到下依次是 97400、66200、43000、31000、20100、14400。从电泳图谱中可以看出,原料蛋白中 7S 组分的 α' 亚基和 α 亚基被完全水解,7S 的 β 亚基和 11S 组分的碱性亚基绝大部分被水解。产物蛋白质中的主要组分是 11S 的酸性亚基,还有少量 11S 的碱性亚基、7S 的 β 亚基。产品的电泳图中还出现了新的亚基(如图中箭头所指)。

2.5 产率

表1 产物的蛋白质含量和产率
Table 1 Protein content and yield of products

	a	b	c
产率(%)	82.2	80.2	83.2
蛋白质含量(%)	73.4	76.5	78.9

注: a、b、c 见图 1 标注。

表 1 给出了生产富含 11S 亚基蛋白的产率和蛋白质含量。蛋白质含量都在 70% 以上,回收率大于 80%。比膜分离大豆蛋白提取液的产率低,产率较低的原因是蛋白酶的水解产生了可透过膜的小分子物质,蛋白质透过率提高,增加蛋白质损失。

2.6 膜的清洗

图 7 给出了不同清洗剂清洗超滤膜的效果。清洗效果比较好。由于超滤过程中,膜表面和膜孔内部均有污染,清洗时要考虑用合适的清洗剂和清洗方法来清洗。膜面的污染通过去离子水和碱液的冲洗基本可以除去;SDS 溶液冲洗可以除去膜孔内部的污染。实验证明通过去离子水、碱性溶液、SDS 溶液和酸性溶液冲洗能够使膜通量得到较好的恢复,恢复率可达 90% 以上。

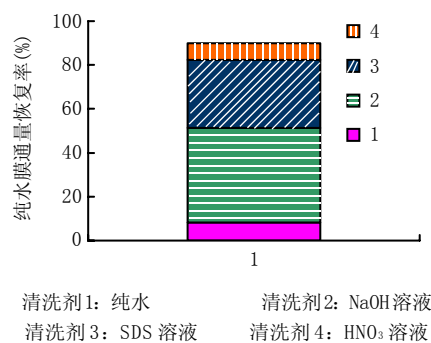


图7 清洗效果
Fig.7 Cleaning efficiency

3 结论

通过酶解改性和膜分离的方法得到主要组分为 glycinin 亚基的改性大豆蛋白。蛋白质含量在 70% 以上,产率在 80% 以上。

通过膜分离过程的动力学分析得出,在膜分离蛋白的酶解液时,虽然超滤的传质系数增加了,但是膜的传质阻力并没有因为粘度的下降而减小。可能是因为小分子物质在膜孔内的吸附和堵塞造成传质阻力增加造成的。

参考文献:

- [1] Damadarm S, Paraf A. Food protein and their applications[J]. Marcel Dekker Inc, New York, 1997.
- [2] Damodaran S. Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation[J]. J Agric Food Chem, 1988, 36(2): 262-269.
- [3] Dinakar P, Arun K. Enhancing the functional-ity of food proteins by enzymatic modification[J]. Trends Food Sci Technol, 1996, 7(4): 120-125.
- [4] Krishna Kumar N S, Yes M K, Cheryan M. Soy protein concentrates by ultrafiltration[J]. J Food Sci, 2003, 68(7): 2278-2283.
- [5] Mohri M, Matsushita S. Improvement of water absorption of soybean protein by treatment with bromelain[J]. J Agric Food Chem, 1984, 32: 486-490.
- [6] Molina Ortiz S E, Anón M C. Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates[J]. J Am Oil Chem Soc, 2002, 77(12): 1293-1301.
- [7] Puppo M C, Anón M C. Soybean protein dispersions at acid pH. thermal and rheological properties[J]. J Food Sci, 1999, 64(1): 50-56.
- [8] Tsumura K, Kugimiya W, Hoshino K, et al. Soybean protein hydrolysate, process for producing the same, and meat products and drinks using the same[P]. US Patent 6,126,973. 2002, 10.
- [9] Vioque J, Clemente A, Sánchez-Vioque R, et al. Effect of Alcalase™ on olive pomace protein extraction[J]. J Am Oil Chem Soc, 2000, 77(2): 181-185.
- [10] Were L, Hettiarachchy N S, Kalapathy U. Modified soy protein with improved foaming and water hydration properties[J]. J Food Sci, 1997, 62(4): 821-850.
- [11] 彭志英, 赵谋明, 刘通讯. 食品生物技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [12] 张玉忠, 郑领英, 高从塔. 液体分离膜技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [13] 王湛. 膜分离技术基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.