

抑制作用,其中鼠伤寒沙门氏菌对大蒜更为敏感,0.05%大蒜便能在发酵期内显著地延缓鼠伤寒沙门氏菌的增殖,0.1%大蒜能显著地延缓大肠杆菌O₁₅₇的增殖,而添加1%大蒜即可在发酵期内抑制两种肠道菌生长,甚至杀灭肠道菌。

植物乳杆菌6003对大蒜的敏感性却远低于两种肠道菌,即使1%大蒜浓度照样能够快速生长,同时由于大蒜中含有丰富的碳水化合物^[4],为植物乳杆菌6003生长提供了部分碳源,反而对植物乳杆菌6003的生长起了微弱的促进作用。

大蒜中的含硫化合物逐步氧化后,其抑菌效果开始下降,最终消失。由于大蒜提供了部分碳源,造成两种肠道菌菌数重新迅速上升,致使0.05%蒜和0.1%蒜组中大肠杆菌O₁₅₇和鼠伤寒沙门氏菌在48h均高于对照组。

大蒜中丰富的碳水化合物也是本实验各组中pH值出现差异的原因,由于前三组碳水化合物含量少或没有,使微生物分解蛋白质导致pH值上升。1%、0.5%蒜组中,由于分解蛋白质能力较强的肠道菌生长受到抑制,促进植物乳杆菌6003利用蒜中的碳水化合物产酸,导致发酵前期pH值下降,

而0.5%蒜组发酵后期,由于大蒜抑制作用逐步消失,两种肠道菌开始快速生长,导致pH值较快上升。

虽然大蒜中抑菌成分氧化后,肠道菌菌数开始快速上升,但在干发酵香肠发酵前期、pH值下降之前,大蒜抑菌的作用对控制肠道菌过度增殖能起到相当有效的作用。

参考文献:

- [1] Block E. The chemistry of garlic and onions[J]. Sci Am. 1985; 252: 114-119.
- [2] Turantas F and Adnan U. The effect of NITRITE, Garlic and starter culture on to survival of *Salmonella typhimurium* in Turkish soudjuk[J]. J Sci Food Agric. 1993; 61: 95-99.
- [3] Barone FE, Tansey MR. Isolation, purification, identification, synthesis and kinetics of activity of the anticandidal components of *Allium sativum* and a hypothesis for its mode of action[J]. Mycologia. 1977; 69: 793-825.
- [4] Kumar M, Berwal J S. Sensitivity of food pathogens to garlic (*Allium sativum*)[J]. J Appl Microbiol. 1998; 84: 213-215.

酶法提取变性脱脂豆粕中蛋白质的研究

刘芳, 王遂

(哈尔滨师范大学化学系, 黑龙江 哈尔滨 150080)

摘要: 变性豆粕是由大豆浸油后,经高温脱溶所得。本文以高温变性脱脂大豆粕为原料,用正交实验法对变性豆粕在蛋白酶作用下的水解特性进行了深入研究。选用国产胰蛋白酶为水解酶对变性豆粕进行水解,研究了变性豆粕中蛋白质溶出率随温度、pH值、时间、底物浓度及用酶量的变化规律,找到了水解变性豆粕的最佳实验条件,为生产实践提供了基础数据。该研究结果对其它蛋白质原料的水解特性研究也具有参考价值。研究结果表明:胰蛋白酶水解高温变性豆粕的最佳条件为:温度50℃,时间6h,底物浓度11%,用酶量1000U/g, pH值8.0,在此条件下,变性豆粕中蛋白质可有69.34%水解溶出。所得蛋白质其水解度DH为9.0%,溶解度(用氮溶解指数NSI表示)为57.0%。

关键词: 变性脱脂豆粕; 水解; 蛋白质

Study on Protein Obtained from Denatured Soybean Meal with Proteinase

LIU Fang, WANG Sui

(Department of Chemistry, Harbin Normal University, Harbin 150080, China)

Abstract: The denatured soybean meal was obtained from the high temperature desolventized bean. At the same time the denatured soybean meal hydrolyzed with proteinase was studied systematically by using orthogonal experiment method. For the denatured soybean meal hydrolyzed with basic proteinase, the effects of temperature, pH value, time, substrate concentration and enzyme/substrate during the hydrolysis were studied. The optimum conditions of the hydrolytic high temperature denatured soybean meal was obtained. The results provided the reference values for the study of hydrolysis of the other protein materials. Results indicated that the optimum extracting conditions of the denatured soybean meal by basic proteinase were as

followings: temperature: 50℃, time 6h, substrate concentration 11.0%, enzyme/substrate 10000U/g. In such conditions 69.34% protein in denatured soybean meal would be hydrolyzed and digested.

Key words: the denatured soybean meal; hydrolysis; protein

中图分类号: Q556.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630 (2004) 03-0089-04

变性脱脂大豆粕由大豆浸油后经高温脱溶所得。目前, 高温豆粕主要用作饲料, 在食品方面应用极少, 而且只限于酿造食品。豆粕中约含 45%~50% 的蛋白质, 10%~15% 的低聚糖、20%~25% 的多糖和纤维素, 有极高的开发和利用价值。

由于高变性豆粕中蛋白质几乎全部变性, 而且国内现有浸油厂的前处理设备投入非常少, 原料清杂差, 豆粕中含杂率高, 想用普通的物理方法从中分离出可食用的产品几乎是不可能的。因此, 我们拟采用生物工程技术—利用蛋白酶降解豆粕中的蛋白质, 使其转变为可溶性的多肽, 最终达到分离的目的。

酶是生物细胞产生的具有催化功能的生物催化剂, 其特点是催化效率高, 专一性强, 作用条件温和, 蛋白酶又称解脲酶, 能使蛋白质水解成肽和氨基酸, 能提高和改善蛋白质的溶解性、乳化性、起泡性、粘度等, 还能避免酸法水解或碱法水解或碱法水解对氨基酸的破坏作用和变旋作用, 以保证蛋白质质量。近年来国内相继报道了玉米蛋白及大豆分离蛋白的酶解特性的研究^[1~4], 但对变性豆粕中蛋白质的酶解特性的研究目前尚未见报导。为此, 作者在大量实验的基础上, 对变性豆粕中蛋白质在碱性蛋白酶中的水解特性进行了研究, 从而为变性豆粕的进一步开发和应用提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

变性豆粕 黑龙江省嫩江油脂厂提供 胰蛋白酶 无锡酶制剂厂提供, 经测定酶活力为 16 万 U/g。

1.2 主要仪器

微量凯氏定氮仪 上海玻璃仪器厂; HZS-H 水浴振荡器 哈尔滨东联电子技术开发有限公司; LXJ-61-01 型离心机 北京医疗仪器修理厂; TG328 型分析天平 湘仪天平仪器厂; HH8 型电热恒温水浴锅 江苏第二分析仪器厂; 721 型分光光度计 上海第二分析仪器厂。

1.3 主要试剂

酪蛋白 食用级, 上海长江生化制药厂; 钼酸钠 (Na_2MoO_4) 分析纯, 北京化学试剂公司; 钨酸钠 (Na_2WO_4) 分析纯, 沈阳试剂厂; 硫酸锂 (Li_2SO_4) 分析纯, 北京新华化学试剂厂; 甲醛 分析纯, 上海太平洋化工公司。

1.4 测定方法

粗蛋白含量测定 按照 GB5009.5-85 微量凯氏定氮法标准进行; 水分测定 按照 GB5009.3-85 常压烘干法标准进行;

酶活力测定 按照 QB/T 1803-93 福林—酚法标准进行; 脂肪测定 按照 GB5009.6-85 索氏提取法标准进行; 氨基酸态氮的测定 按照 GB/T 5009.39-96 甲醛法标准进行。

溶解采用氮溶解指数 (NSI) 表示:

$$\text{NSI} (\%) = \frac{\text{水溶解氮 (滤液中的含氮量)}}{\text{样品中总氮}} \times 100\%.$$

1.5 实验方法

1.5.1 样品及其制备

将变性豆粕磨碎过 20 目筛, 备用。

1.5.2 蛋白酶水解工艺流程

过 20 目筛样品 $\xrightarrow[\text{酶解 } T_{\min}]{\text{pH8.0, } t^\circ\text{C}}$ 酶解液 $\xrightarrow[\text{离心}]{\text{分离}}$ 酶解产物
残渣用 pH8 缓冲液冲洗 \rightarrow 洗液并入酶解产物 $\xrightarrow{\text{定容}}$ 测蛋白质含量

1.5.3 操作要点

称过 20 目筛样品 10g, 加 pH8.0 磷酸缓冲液配成一定物料浓度的溶液。

酶解 将蛋白酶按 4000U/g_{原料} 的量直接加入反应器中, 在 $t^\circ\text{C}$ 水解 T_{\min} 。

离心分离 将水解后样品离心, 再以一定 pH 值的缓冲液洗 2~3 次, 一并定容到一定体积, 得水解产物。

2 结果与讨论

2.1 变性豆粕成分的测定

经实验测得变性豆粕的主要成分为: 水分 14.60%, 粗脂肪 1.30%, 粗蛋白 49.82%, 氮溶解指数 (NSI 值) 为 19.76%。

2.2 最佳酶法水解蛋白工艺条件的确定

2.2.1 胰蛋白酶最适作用温度的确定

以 pH 值为 8.0 的磷酸缓冲溶液配制一系列 10% 物料溶液, 分别加入 4000U/g_{原料} 的蛋白酶, 在不同温度下保温 3h, 离心, 清洗分离, 测定不同酶解温度下所得产品中的蛋白质含量, 计

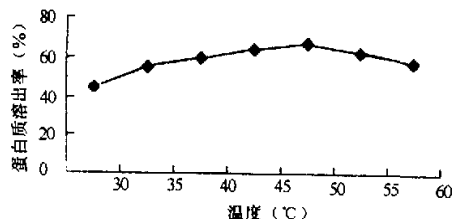


图 1 不同作用温度对蛋白质溶出率的影响

算蛋白质溶出率, 结果见图1。从图1可以看出, 在底物10%, pH8.0, 酶4000 U/g_{原料}, 酶解时间3h的条件下, 胰蛋白酶的_最作用温度为45~55℃, 此时蛋白质溶出效果最好。

2.2.2 胰蛋白酶最佳酶解时间的确定

调节一系列10%物料溶液, pH8.0, 分别加入4000U/g_{原料}蛋白酶, 在50℃下保温不同时间进行离心, 清洗, 分离, 测不同酶解时间下所得产物的蛋白质溶出率。结果见图2。

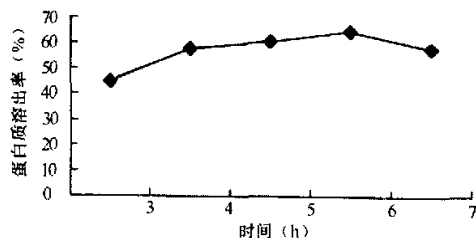


图2 不同作用时间对蛋白质溶出率的影响酶解

从图2可以看出, 在底物10%, pH8.0, 酶量4000U/g_{原料}, 温度50℃的条件下, 胰蛋白酶作用5~6h时蛋白质溶出率达到最大值69.34%, 故最佳作用时间为2~5h。

2.2.3 胰蛋白酶最适用量的确定

调节一系列10%物料溶液, pH8.0, 分别加入不同用量的蛋白酶, 50℃下保温3h, 然后离心清洗分离后测不同酶用量下所得产物的蛋白质溶出率, 结果见图3。

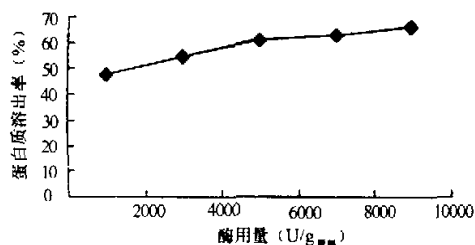


图3 不同酶用量对蛋白质溶出率的影响

由图3可看出, 在pH8.0, 底物10%, 温度50℃, 酶解时间为3h的条件下, 当酶用量达到10000U/g_{原料}时, 蛋白质溶出率不再增加, 故最佳酶用量为800~10000U/g_{原料}。

2.2.4 底物最适浓度的确定

配制一系列不同底物浓度的溶液, 在pH8.0, 加酶4000U/

g_{原料}, 50℃下反应3h, 离心, 清洗, 分离测产物蛋白质溶出率见图4。

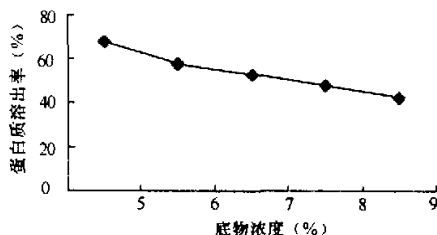


图4 不同底物浓度对蛋白质溶出率的影响

由图4可看出, 在pH8.0, 反应温度50℃, 酶用量4000U/g_{原料}, 酶解时间3h条件下, 随底物浓度增加, 产物蛋白质溶出率降低。

2.2.5 最适水解pH值的确定

配制一系列10%物料溶液, 用不同pH缓冲溶液配制, 分别加入4000U/g_{原料}蛋白酶, 50℃下保温水解3h, 然后离心分离, 清洗后测产物的蛋白质溶出率, 果见图5。

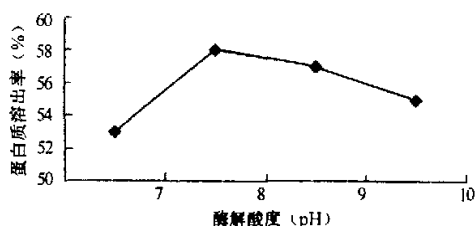


图5 不同酶解酸度对蛋白质溶出率的影响

由图5可看出: 在底物浓度10%, 酶用量4000U/g_{原料}, 酶解温度50℃, 酶解时间3h的条件下, 酶解的最佳酸度为pH8.0, 此时蛋白质溶出率高。

2.3 L₁₆(4³) 正交试验法确定(验证)最佳水解条件

我们采用了L₁₆(4³) 正交表, 拟出试验方案(表1)来考察五个因素对水解的影响, 并以蛋白质溶出率为指标作极差分析, 其数据结果见表2。

由极差分析可知, 影响酶解反应的最主要因素是底物浓度, 其次是水解时间, 再次为pH值, 影响最小的为酶解的温度。最佳酶解变性豆粕的条件是A₁B₄C₃D₃E₁, 即底物浓度为11%的溶液, 加胰蛋白酶10000U/g_{原料}在pH8.0的缓冲溶液中

表1 正交试验方案表

水平	因 素				
	A 底物浓度[S] (%)	B 加酶量 (U/g_底物)	C 酸度 (pH)	D 温度 (℃)	E 反应时间
1	5	4000	7.0	40	3
2	7	6000	7.5	45	4
3	9	8000	8.0	50	5
4	11	10000	8.5	55	6

表2 胰蛋白酶水解豆粕正交试验因素水平及结果数据表

试验号	因素					蛋白质溶出率(%)
	A (%)	B (U/g)	C (pH)	D (°C)	E (h)	
1	1 (5.0)	1 (4000)	1 (7.0)	1 (40)	1 (3)	49.47
2	1 (5.0)	2 (6000)	2 (7.5)	2 (45)	2 (4)	48.21
3	1 (5.0)	3 (8000)	3 (8.0)	3 (50)	3 (5)	49.73
4	1 (5.0)	4 (10000)	4 (8.5)	4 (55)	4 (6)	50.40
5	2 (7.0)	1 (4000)	2 (7.5)	3 (50)	4 (6)	56.60
6	2 (7.0)	2 (6000)	1 (7.0)	4 (55)	3 (5)	60.16
7	2 (7.0)	3 (8000)	4 (8.5)	1 (40)	2 (4)	61.49
8	2 (7.0)	4 (10000)	3 (8.0)	2 (45)	1 (3)	61.53
9	3 (9.0)	1 (4000)	3 (8.0)	4 (55)	2 (4)	66.62
10	3 (9.0)	2 (6000)	4 (8.5)	3 (50)	1 (3)	65.53
11	3 (9.0)	3 (8000)	1 (7.0)	2 (45)	4 (6)	66.33
12	3 (9.0)	4 (10000)	2 (7.5)	1 (40)	3 (5)	65.83
13	4 (11.0)	1 (4000)	4 (8.5)	2 (45)	3 (5)	67.83
14	4 (11.0)	2 (6000)	3 (8.0)	1 (40)	4 (6)	68.03
15	4 (11.0)	3 (8000)	2 (7.5)	4 (55)	1 (3)	66.82
16	4 (11.0)	4 (10000)	1 (7.0)	3 (50)	2 (4)	67.92
K ₁	197.81	240.33	243.88	244.82	243.35	
K ₂	239.78	241.93	237.46	243.90	267.40	
K ₃	246.31	244.37	249.91	239.78	243.55	
K ₄	270.60	245.68	245.25	244.00	241.36	
k ₁	39.56	48.07	48.78	48.96	48.67	
k ₂	47.96	48.39	47.49	48.78	48.85	
k ₃	52.86	48.87	49.18	49.96	48.67	
k ₄	54.12	49.14	49.05	48.80	48.82	
R	14.56	1.07	1.69	1.0	0.58	
优水平		A ₄ B ₄ C ₃ D ₃ E ₄				

在50℃水解4h, 所得产物蛋白质溶出率最高, 在此条件下做验证实验得蛋白质溶出率为69.34%。

值得注意的是, 以胰蛋白酶水解变性豆粕, 虽然底物浓度是五因素中影响最高的, 底物浓度低, 蛋白质溶出率增加很快, 但实验发现, 底物浓度太小, 产品的得率及生产效率不同, 故在工业化生产中, 可适当增加底物浓度来提高产品的得率。

2.4 经实验测得溶出蛋白质水解度DH为9.0%, 氮溶解指数(NSI)为57.0%。

3 结论

3.1 胰蛋白酶催化反应的最适pH值为8.0, 最适温度为50℃。

3.2 胰蛋白酶水解变性豆粕的最佳条件为: pH值8.0, 温度

50℃, 底物浓度(以蛋白质含量计)11%, 酶量10000U/g底物, 反应时间6h。

3.3 在最适宜的水解条件下, 经6h的水解时间, 胰蛋白酶可使变性豆粕中69.34%的蛋白质水解溶出。

参考文献:

- [1] 崔继科, 刘景顺. 大豆分离蛋白酶解的研究(一)[J]. 郑州粮食学院学报, 1998, (3): 12-20.
- [2] 翟瑞文, 李雁群, 陈子林, 等. 玉米渣中蛋白质的酶水解[J]. 食品工业科技, 1997 (5): 34-40.
- [3] 王梅, 谷文英. 酶解玉米黄粉蛋白制备可溶性肽[J]. 粮油食品科技, 1999 (1): 1-3.
- [4] 邓勇, 呈煜欢. 微生物蛋白酶对大豆分离蛋白水解作用的研究[J]. 食品科学, 1999 (6): 42-45.