

- 18 石黑幸雄等. 抗菌性物质存在下での高压处理がトマトジュース中の菌の挙動に与える影响について. 日本农芸化学会志, 1993, 67 (12): 1707~1711.
- 19 阮征. 微生物对高静压的耐性研究及其初步动力学表征. 华南理工大学硕士学位论文, 1997.
- 20 高桥观二郎. 低温域ごの高压杀菌. 食品と开发, 1990, 25 (12): 13~16.
- 21 高桥观二郎等. 低温域における高压杀菌技术与システムの研究开发. 食品と容器. 1994, 35 (12): 682~690.
- 22 Hayakawa, I. et al. Application of high pressure for spore inactivation and protein denaturation. J. of Food Sci., 1994, 59 (1): 159~163.
- 23 梶山昇等. 高压による大肠杆菌の杀菌. 日本食品工业学会志, 1993. 40 (6): 406~413.
- 24 吉岡薫等. 高粘物质への高压处理の应用(2). 食品と容器, 1994, 35 (11): 608~615.
- 25 Pandya, Y. et al. Concurrent effects of high hydrostatic pressure, acidity and heat on the destruction and injury of yeasts. J. of Food Protection. 1995, 58 (3): 301~304.
- 26 木村郁夫. 水产食品への高压处理と应用, 食品と容器, 1994, 35 (8): 428~435.
- 27 Heinz, V. et al. Inactivation of *Bacillus subtilis* endospores by ultra-high-pressure in combination with other treatments. IFT Annual Meeting, 1995, 268.
- 28 Hayakawa, I. et al. Oscillatory compared with continuous high pressure sterilization on *Bacillus stearothermophilus* spores. J. of Food Sci., 1994, 59 (1): 164~167.
- 29 西贤司等. *Bacillus* 属芽胞の压力による活性化と杀菌. 日本食品工业学会志, 1994, 41 (8): 542~549.
- 30 Maggi, A. et al. Use of high pressure for inactivation of butyric clostridia in tomato serum. *Industria conserva*, 1995, 70 (3): 289~293.
- 31 齐藤义行. 食品用フィルムの高压处理による影响と高压处理适性静菌剂の探索. 食品と容器. 1994, 35(7): 368~373.

菠萝汁对鲜豆浆酶解作用的研究

黄惠华 高孔荣 张少兰

华南理工大学食品科学与工程系 广州五山 510641

摘 要 利用菠萝汁对鲜豆浆进行酶解。测定和电泳分析结果表明, 在 pH8.0, 温度 60℃, 反应时间 60min 的条件下, 菠萝蛋白酶能使豆浆中大分子量 (M_r 1 096 478) 的蛋白组份降解成 5 种分子量为 7, 586, 83 176, 190, 546, 319, 890, 524, 807 的小分子蛋白质和多肽类分子, 其等电点也由 pH5.9、6.0 变为 pH5.3、5.5。酶解后的游离氨基酸在种类和数量上没有变化, 产物是多肽或小分子量的蛋白质。

利用菠萝蛋白酶进行蛋白质的酶法改性和水解, 最经济和最简便的方法就是将菠萝汁添加到富含蛋白质的食品如豆浆中, 通过控制适当的条件获得需要的酶解产物。本研究利用菠萝汁对大豆浆进行酶解, 通过分析大豆蛋白在酶解前后的变化, 探讨将菠萝汁应用于开发大

豆保健食品的可能性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 大豆及豆浆制备: 大豆购自农贸市场, 为当年收获的种子, 颗粒饱满、色泽黄亮。豆浆制备过程: 大豆预处理(烘干、除杂、清

洗)→浸豆(常温, 10h)→去豆皮→磨浆(pH9.0, 常温, 豆:水=1:5)→豆渣分离(8层纱布过滤)→胶体磨均质→鲜豆浆(4℃冷藏备用)。

1.1.2 菠萝及菠萝汁的制备:菠萝购自农贸市场, 以7~9成熟为标准。菠萝皮和果肉分别经打碎、榨汁、纱布粗滤后, 用4000 r/min离心, 上清液作为菠萝蛋白酶源, 冰箱中存放备用。

1.2 实验方法

1.2.1 菠萝蛋白酶活力的定义及测定方法:测定样品在水解酪蛋白底物时每分钟释放出1微克酪氨酸即为1个酶活力, 以u/ml表示。标准测定方法参考文献^[4], 采用F、I、P法, 样品与酪蛋白作用后, 产生在275nm波长处有吸收峰的酪氨酸, 用分光光度法测定释放出的酪氨酸含量, 即可计算其酶活力。测定条件:底物浓度0.43%, pH7.0, 温度36℃±1, 反应时间10min。

1.2.2 可溶性蛋白质含量的测定:采用Bradford法^[5], 根据样品用Bradford试剂显色后在595nm波长处的O.D值变化比较其蛋白质或多肽类含量的变化。

1.2.3 氨基酸含量的测定:采用茚三酮比色法^[6], 根据样品用茚三酮显色后在570nm波长处的O.D值变化比较其氨基酸含量的变化。

1.2.4 氨基酸纸上层析:展开剂:正丁醇:水:冰醋酸=4:1:1^[6]。

1.2.5 大豆蛋白及酶解产物的电泳分离及分子量的测定:采用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[6], 上层胶浓度3.0%, 下层胶浓度7.5%。标准蛋白为:烟草花叶病毒外壳蛋白(Mr:17000)、碳酸酐酶(Mr:30000)、肌动蛋白(Mr:43000)、磷酸化酶(Mr:94000)、牛血清白蛋白(Mr:67000)。

1.2.6 大豆蛋白及酶解产物的等电聚焦电泳:采用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法^[6], 凝胶浓度7.5%, 交联度2.5%, 电极溶液为磷酸—NaOH体系, 以细胞色素C作聚焦指示剂, 凝胶中加入PHARMALITE作为载体两性电解质, 通过凝胶的“pH—距离”曲线确定显色后

各谱带的等电点。

1.2.7 豆浆加入菠萝汁的处理:取7个三角瓶, 分别加100ml, 98ml, 96ml, 94ml, 92ml, 90ml, 88ml的豆浆, 预热至60℃后, 分别加入0ml, 2ml, 4ml, 6ml, 8ml, 10ml, 12ml的菠萝皮汁, 于60℃温浴反应60min后取出进行各项测定。

2 结果与讨论

2.1 菠萝原料中蛋白酶的活性差异及酶学特性

菠萝蛋白酶的活性, 因菠萝品种、菠萝组织、菠萝的成熟程度以及收获季节的不同而有较大差异。对于利用方面来说, 最有意义的是果皮和果肉之间酶活性的差异。表1的测定结果表明, 皮汁与果肉汁之间的酶活性差异是较大的, 果皮组织中酶活性远比果肉大, 同时果皮是罐头厂的下脚料, 因此其综合利用的价值和意义都较大。

表1 菠萝组织中的蛋白酶活性差异 (u/ml)

	批 次					
	1	2	3	4	5	6
果肉汁	657	498	489	680	700	621
皮 汁	986	814	1136	1050	1735	1711
茎叶汁	814	770	764	862	826	752

对酶在不同温度及不同pH值条件下测得的活性变化曲线见图1、图2。由图1和图2得知菠萝蛋白酶的最大反应温度是60℃, 最大反应的pH值是6.4~8.0。图3是菠萝蛋白酶在60℃下经过不同的温浴时间后的活性变化。图3表明菠萝蛋白酶在60℃温浴60min后, 活性下降到原来的一半左右, 因此菠萝蛋白酶在60℃时的半衰期为约60min左右。

由上述结果可以确定利用菠萝汁酶解豆浆时的反应参数, 即60℃的温度, pH8.0的酸碱度以及60min的反应时间。对于碱法提取的豆

浆来说, pH8.0 的反应酸碱度尤为合适, 因豆浆不需较大的调整而可以用菠萝汁直接处理。

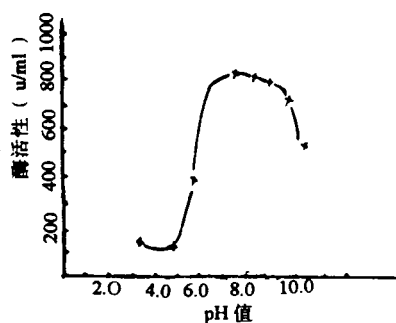


图1 pH 值对菠萝蛋白酶活性的影响

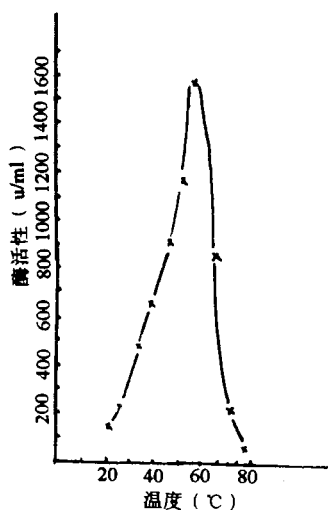


图2 温度对菠萝蛋白酶活性的影响

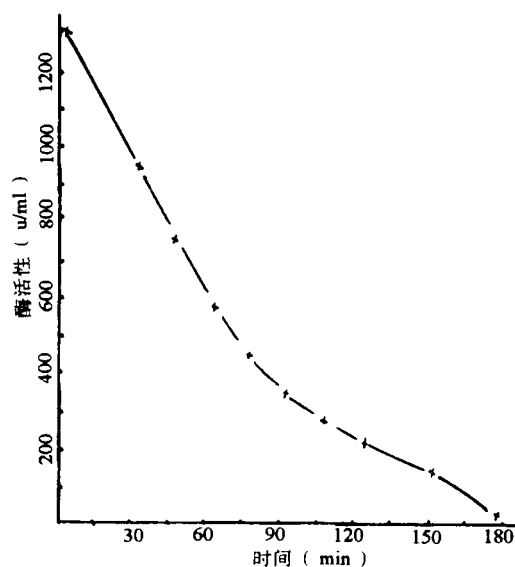


图3 60℃下菠萝蛋白酶的热失活曲线

2.2 豆浆酶解前后大豆蛋白及游离氨基酸的比色 O.D 值变化。

经菠萝汁处理后的豆浆, 取样品与 Bradford 试剂显色, 在 595nm 波长处测得其 O.D 值变化如表 2。由表 2 可知, 在所有经菠萝汁处理的豆浆中测得的 O.D₅₉₅ 值是增加的, 并且随菠萝汁的添加量增加而增加。O.D₅₉₅ 值增加的现象, 有两种可能分别是单位体积内 (即每毫升) 的可溶性蛋白质含量和单位体积内的多肽分子含量的增加。这是由于菠萝蛋白酶的作用, 使大豆蛋白水解成为多肽类或分子量更小的蛋白质, 这样使更多的基团暴露, 得以与 Bradford 试剂结合而显色, 因此表现为 O.D₅₉₅ 值增大。添加的酶量越多, 对大豆蛋白的水解作用也越大, O.D₅₉₅ 值也越大。

表 2 酶解前后豆浆的蛋白质和氨基酸显色变化

菠萝皮汁加入量 (ml)	2	4	6	8	10	12
酶解前 Bradford 试剂显色 O.D ₅₉₅ 值	0.160	0.148	0.161	0.152	0.154	0.153
酶解后 Bradford 试剂显色 O.D ₅₉₅ 值	0.183	0.184	0.186	0.191	0.198	0.197
酶解前茚三酮试剂显色 O.D ₅₇₀ 值	0.852	0.851	0.850	0.853	0.852	0.845
酶解后茚三酮试剂显色 O.D ₅₇₀ 值	0.852	0.853	0.850	0.853	0.853	0.847

将酶解前后的样品与茚三酮显色后测定其 O.D₅₇₀ 值变化以确定其游离氨基酸含量的变化, 表 1 结果表明, 豆浆酶解前后的 O.D₅₇₀ 值

基本上无变化, 说明其中的游离氨基酸含量无变化。另外, 纸层析结果表明, 图谱中的游离氨基酸种类亦无变化。

结果表明, 在本实验的条件下, 菠萝蛋白酶对大豆蛋白的水解作用, 不是彻底水解成氨基酸终产物, 而是水解成多肽类和小分子蛋白质等一些中间产物。

2.3 豆浆酶解前后蛋白质的电泳图谱及

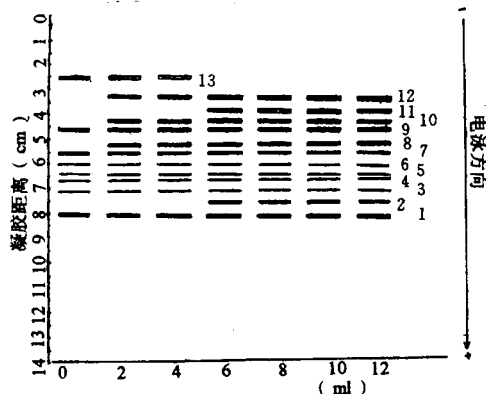


图3 豆浆加入不同量菠萝汁酶解前后的 SDS 电泳图谱

分子量和等电点的确定

图4是豆浆经菠萝汁酶解前后的聚丙烯酰胺凝胶 SDS 电泳图谱。菠萝汁处理后的豆浆, 其蛋白质组份中的 13 号带 (M_r 约 1096478) 的

显色逐渐减弱乃至完全消失, 而增加了 2、8、10、11、12 等五条谱带。这进一步证明菠萝蛋白酶是对大豆蛋白中分子量最大的组份降解, 使之成为分子量较小的蛋白质和多肽类分子。以标准蛋白一起电泳作出的标准曲线, 根据图谱中各组分的迁移率确出的分子量见表 3。

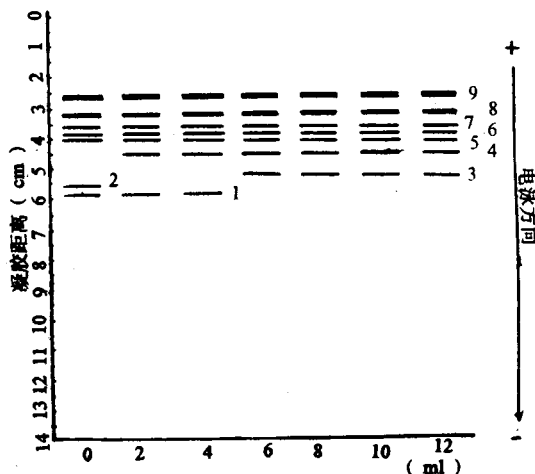


图4: 豆浆加入不同量菠萝汁酶解前后的等电聚焦电泳图谱

表3 豆浆中蛋白组成的电泳分子量及等电点

SDS 电泳带	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
分子量	4168	7586	10471	13804	19055	34674	60256	83176	151356	190546	319890	524807	1096478
等电聚焦带	1	2	3	4	5	6	7	8	9				
等电点 (pH)	6.0	5.9	5.5	5.3	5.2	5.1	4.9	4.8	4.3				

图5是豆浆酶解前后的大豆蛋白的等电聚焦电泳图谱。从等电聚焦的结果上分析, 酶解后被降解消失的蛋白组份, 其等电点是 pI5.9 和 pI6.0, 而增加的蛋白组份, 其等电点为 pI5.3 和 pI5.5。图谱中各组份的等电点, 可根据凝胶的“pH 值—距离曲线”^[7]以及各组份在凝胶上的电泳距离确定出来, 其值见表 3。

参考文献

- 1 Kamata, Y., Chiba K., et al. Selection of commercial enzymes for soymilk-curd production by limited proteolysis with immobilized enzyme reactor. Journal of Japanese Society of Food Science and Technology, 1992, 39 (1): 102~105.

- 2 郭敏亮等. 用豆粕生产大豆蛋白肽饮料. 食品科学, 1992, 10: 5~7.
- 3 郭学敏等. 脱脂豆粕的 AS_{1.398} 中性蛋白酶水解. 食品科学, 1993, 7: 10~14.
- 4 钱嘉渊译. 酶的测定方法. 北京: 轻工业出版社, 1992, 279~313.
- 5 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 1975, 248~254.
- 6 张志良等. 植物生物化学技术和方法. 北京: 农业出版社, 1986, 62~123.
- 7 黄惠华等. 茶多酚对菠萝蛋白酶的分离及特性的影响研究. 食品科学, 1996, 4: 6~11.