

酶解大豆分离蛋白及脱苦技术的研究

王绍英, 刘丰, 束克泉

(武汉食品工业加工区管委会, 湖北 武汉 430040)

摘要: 本试验对酶法水解大豆分离蛋白及其水解液苦味脱出进行了研究, 结果表明, ASI.398 中性蛋白酶水解度和水解液苦味值较好, 最佳水解条件为 pH 为 7.0, 温度 50℃, 底物浓度 5%, 酶浓度 8%, 水解时间 6h。大豆蛋白水解液采用 1%粉末状活性炭, 0.8% β-环状糊精和 0.08%柠檬酸, 三者联合脱苦风味较好。

关键词: 大豆分离蛋白; 酶水解; 脱苦

中图分类号: TS201.2; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)01-0054-04

Enzymatic Hydrolysis of Soybean Protein Isolates and the Debittering of Hydrolysate

WANG Shao-ying, LIU Feng, SHU Ke-qian

Abstract: Enzymatic hydrolysis of soybean protein isolates and debittering of hydrolysate were studied. Neutral protease ASI.398 was shown to be the best biocatalyst for the hydrolysis of soybean protein isolates and debittering of hydrolysate. For the hydrolysis reaction, the optimal pH value, temperature, substrate concentration, enzyme dosage and reaction time were 7.0, 50℃, 5%, 8%, and 6h, respectively. For the debittering reaction, the best activated carbon, β-cyclodextrin and citric acid were: 1%, 0.8% and 0.08%, respectively.

Key words: Soybean protein isolates; Enzymatic hydrolysis; Debitter

大豆中蛋白质含量丰富, 氨基酸分布合理, 是一种重要的植物蛋白质。但大豆蛋白的溶解性差, 在酸性环境中易沉淀, 高浓度状态下粘度大, 流动性差, 并且易受温度、酸碱度、辐射、挤压等影响而发生变性, 这些原因都限制了大豆蛋白在食品工业中的应用^[1]。为了促进大豆蛋白在食品工业中的应用, 将蛋白质进行水解, 水解方法有化学法和酶法, 由于酶法反应条件温和, 产品性质发生明显改变, 水解产物具有很好的生物活性^[2]。

采用酶水解蛋白, 水解后往往产生一种令人难以接受的苦味, 因而影响水解物在食品中的应用。许多研究者已确认数种带疏水基短肽是其产生苦味的重要原因^[3]。这些疏水基掩盖在天然蛋白质体中, 被隔绝与味蕾的接触, 而在酶水解过程中, 由于蛋白质被水解成小分子的肽类或游离氨基酸, 使疏水基团暴露出来, 产生苦味, 并随着水解程度的加深, 苦味不断加重。大豆多肽的苦味物质严重制约了其在食品工业中的应用和发展。目前, 国内外对大豆多肽的提取工艺进行了较多的研究^[4,5], 报道单酶水解的水解度较低, 多肽得率低, 混合酶水解则克服上述缺点。因此, 本为采用单酶和复合酶水解, 比较两者的水解效果, 并

收稿日期: 2006-09-27

对水解液的苦味脱除进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

ASI.398 中性蛋白酶、酸性蛋白酶: 无锡酶制剂厂产; 胰蛋白酶、胃蛋白酶: 丹麦 NOVO 公司产; 大豆分离蛋白: 湖北云梦植物蛋白厂提供。

1.2 酶解条件

在大豆分离蛋白液中分别加入不同的蛋白酶, 改变酶解条件, 酶解完毕后, 沸水浴 3min 灭酶, 立即冷却, 离心, 得水解液。

表 1 不同酶的最适水解条件

种类	最适 pH 值	最适温度/℃
ASI.398 中性蛋白酶	7.0	45
胰蛋白酶	7.0	50
胃蛋白酶	1.5	45
酸性蛋白酶	3.0	50

由表 1 可知, 中性蛋白酶和胰蛋白酶的水解条件相近, 将这两种酶 1:1 混和在一起, 水解条件确定为 pH=7.0, 温度 50℃。

1.3 水解度的测定^[6]

$$DH(\%) = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

根据 Adler-Nissen 方法, 水解度(Degree of Hydrolysis, DH)定义为:

式中 h : 水解后每克蛋白质被裂解的肽键毫摩尔数(mmol/g); h_{tot} : 每克原料蛋白质的肽键毫摩尔数(mmol/g); h_{tot} 对于某一特定的蛋白质来讲是一个常数, 大豆蛋白的 $h_{\text{tot}}=7.8$ mmol/g.

1.4 总氮量的测定: 采用微量凯式定氮法进行测定。

1.5 苦味评分标准

以 1g 苦丁茶溶于 1L 水中, 煮沸 1h, 过滤澄清后定容至 1000mL, 并将其分别稀释至 300mg/L, 275mg/L, 250mg/L, 225mg/L, 200mg/L, 175mg/L, 150mg/L, 125mg/L, 100mg/L, 75mg/L, 50mg/L, 其苦味值分别定义为 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0。

1.6 脱苦方法

每次均取 20mL 原水解液, 加入不同剂量的脱苦材料, 40℃ 恒温磁力缓慢搅拌 30min, 静置, 于 6000r/min 离心分离, 过滤后得澄清脱苦液。

2 结果与分析

2.1 水解条件对水解度的影响

2.1.1 水解酶的选择

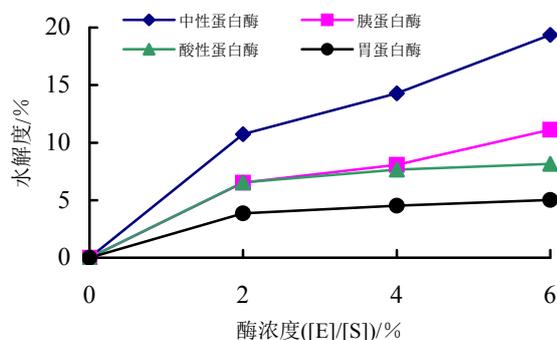


图 1 酶在最适 pH 和温度条件下的水解度 ([S]=3%, t=4h)

由图 1 可知, 在所选用的 4 种蛋白酶中, 在相同酶浓度下, ASI.398 中性蛋白酶对大豆蛋白的水解度最高, 胰蛋白酶的水解度次之, 而酸性蛋白酶和胃蛋白酶水解度较低。故本试验选取中性蛋白酶、胰蛋白酶和两种酶的混合酶作比较试验。

2.1.2 酶浓度对水解度的影响

由图 2 可知, 中性蛋白酶水解度略高于混合酶, 明显高于胰蛋白酶。随着蛋白酶用量增加, 蛋白质的水解度都逐渐提高, 在酶底比 8% 时趋于平缓, 因此最适酶底比为 8%。

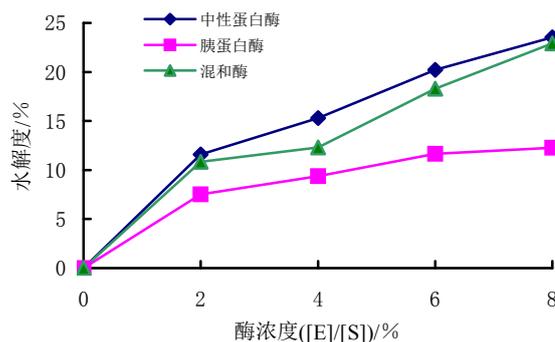


图 2 酶浓度对水解度的影响 (t=4h, [S]=3%)

2.1.3 酶水解时间对水解度的影响

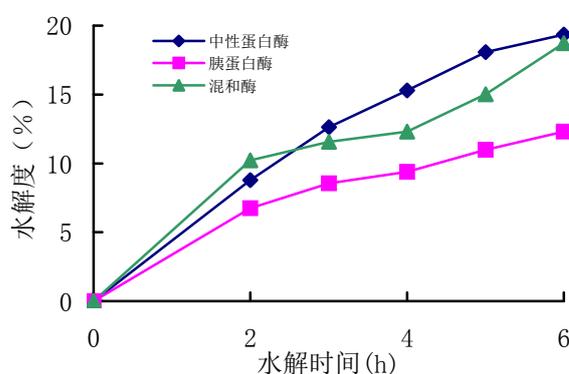


图 3 水解时间对水解度的影响 ([S]=3%, [E]/[S]=4%)

由图 3 可以看出, 中性蛋白酶水解度比胰蛋白酶明显较大, 与混合酶水解度比较接近, 蛋白质水解度随着水解时间的增加而提高, 酶解开始时, 酶解速度增加很快, 随着时间延长, 水解度增加渐缓, 在 6h 趋于平缓。因此水解时间选用 6h 比较合适。

2.1.4 底物浓度对水解度的影响

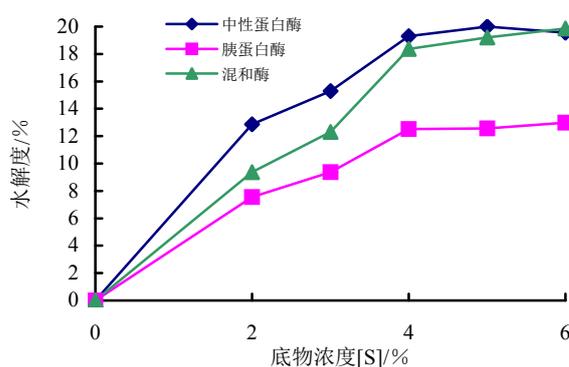


图 4 底物浓度对水解度的影响 (t=4h, [E]/[S]=4%)

由图 4 表明, 中性蛋白酶水解度比胰蛋白酶明显较大, 与混合酶水解度比较接近。在较低底物浓度时, 随着底物浓度的增加, 蛋白质水解度增加快, 底物浓度超过 4.0% 时, 水解度增加缓慢。底物浓度 6% 时, 水解度, 略有下降。因此最适底物浓度为 5%。

上述试验结果发现,采用 ASI 中性蛋白酶酶解大豆蛋白,水解度最好,水解条件是: pH 为 7.0, 温度 50℃, 底物浓度为 5%, 酶浓度 8%, 水解时间 6h。

2.2 苦味去除试验

2.2.1 活性炭去苦

在大豆蛋白最佳水解条件下,对水解液进行脱苦。

活性炭吸附法是食品脱苦常用的方法,此法用于蛋白酶水解液的脱苦研究也有报道,但用量的差异较大,有的高达 50%,蛋白质损失率也很高。本试验探讨低活性炭用量的脱苦方法,在达到脱苦目的的前提下尽降低生产成本,减小蛋白质损失率。由于颗粒状活性炭比表面积小,有效吸附面积小,吸附力弱,初步试验与大部分资料显示一致,几乎无效果,所以本试验主要采用粉末状活性炭,试验结果见表 2。

表 2 活性炭对脱苦效果的影响

活性炭用量(%W/V)	0.3	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
处理前苦味值	7	7	7	7	7	7
处理后苦味值	7	6	5	5	4	3

活性炭经过长期放置,可能吸附空气中灰尘和异味,直接实用会影响试验结果,同时可能给水解液带来异味,在实用活性炭之前要对其进行清洗,干燥,灭菌等预处理。经过处理的粉末状活性炭用量少,而且具有较好的脱苦效果。出于氮损失率、原料的利用率和生产成本等多方面的考虑,选用 1.0%粉末状活性炭的水平比较合理,虽然效果不太好,但还可以结合其它方法改善苦味值。

2.2.2 β -环状糊精包埋苦味的效果

大豆蛋白水解液苦味的产生主要因为裸露的疏水基团与味蕾接触所致,将疏水基团包埋于分子内部,隔绝其与味蕾的接触就可以降低其苦味值。 β -环状糊精(β -CD)具有疏水性空洞,能够包埋疏水性物质,因此被广泛地应用于包埋蛋白水解液的苦味。 β -环糊精的苦味掩盖作用是由其化学结构决定的。 β -环糊精是由 α -1,4 连接的 7 个葡萄糖单位组成寡糖,分子呈环状结构,其疏水基团集中在环的内部,形成一个能结合疏水基团的疏水中心,水解蛋白的小分子肽和氨基酸的疏水基团与疏水中心结合而被包到环内部。因此,有力的疏水性肽和氨基酸数量减少,水解蛋白的苦味因此降低。本试验在水解液中添加 β -CD, 结果见表 3。

表 3 β -CD 对脱苦效果的影响

β -CD 用量(% W/V)	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0
处理前苦味值	7	7	7	7	7
处理后苦味值	7	6	6	5	有结晶

由表 3 可知,单独使用 β -CD 来降低水解液的苦味,效果不理想,可能由于苦味肽分子相对于糊精的洞穴太大,而且苦味肽往往具有两个以上疏水基团,糊精无法包埋所造成的。

2.2.3 风味掩盖

根据 Shinoda 等提出的甜味及苦味接受模型,一些有机酸和酸性氨基酸可以掩盖苦味。有机酸虽然有掩盖苦味的效果,同时也带来酸味,而且有机酸作为食品添加剂,在食品中要限量使用,否则会给人带来副作用。本试验采用柠檬酸来试验,结果见表 4。

表 4 柠檬酸对脱苦效果的影响

柠檬酸用量(%W/V)	0.05	0.10	0.15	0.20
处理前苦味值	7	7	7	7
处理后苦味值	5	4	3	3
附加说明		微酸	较酸	浓酸

有机酸的苦味掩盖效果比较明显,但同时酸味也比较明显,所以有机酸的选择只能在 0.10%左右。

2.2.4 联合脱苦法

以上脱苦试验说明,用粉末状活性炭、 β -CD 和柠檬酸单独脱苦效果均不十分理想。为此,将三者联合去苦,以期达到去除苦味,减少损失的目的。试验发现,用 1.0%粉末状活性炭吸附后,加入 0.08%柠檬酸和 0.8% β -CD 可以达到良好的去苦效果,得到风味较好和营养损失少的大豆蛋白水解液。其结果见表 5。(处理前苦味值 7)。

表 5 活性炭、 β -CD 和柠檬酸联合脱苦的效果

活性炭/%	柠檬酸/%	β -CD/%	苦味值	其它
1.0	0.05	0.3	5	
1.0	0.05	0.5	5	
1.0	0.05	0.8	4	
1.0	0.05	1.0	3	
1.0	0.08	0.3	4	弱酸
1.0	0.08	0.5	3	弱酸
1.0	0.08	0.8	2	弱酸
1.0	0.10	0.3	3	酸
1.0	0.10	0.5	2	酸

从表 5 可知,水解液中活性炭添加量为 1.0%、柠檬酸 0.08%、 β -CD 0.8%时,此时苦味值最低,略带弱酸味。对脱苦的水解液进行测定,发现,脱苦过程中氮损失为 11.18%。

3 结论

3.1 以水解度为指标,确定选用中性蛋白酶作为水解 (下转第 59 页)