

酶解热榨花生粕制备花生多肽的研究

毛晓宇, 张春雨, 陈晓丹, 林思敏, 黄谢俊, 曾庆祝

(广州大学化学化工学院, 广东广州 510006)

摘要: 本文以热榨花生粕为原料, 水解度 (DH) 为指标, 用木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、Alcalase 蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶对花生粕进行酶解并筛选出最佳酶种, 通过实验确定最佳酶为 Alcalase 蛋白酶。正交试验得出 Alcalase 蛋白酶的最适工艺条件: 温度 55℃、pH 值 8.5、加酶量 8000 U/g、液固比 12:1、水解时间 3h。在此条件下, DH 高达 18.45%。

关键词: 花生多肽; 酶解; 水解度

文章编号: 1673-9078(2013)1-150-152

Study on the Preparation of Peanut Polypeptides from Hot Pressed Peanut Cake by Enzymatic Hydrolysis

MAO Xiao-yu, ZHANG Chun-yu, CHENG Xiao-dan, LIN Si-min, HUANG Xie-jun, ZENG Qing-zhu

(College of Chemical Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In the study hot pressed peanut cake was hydrolyzed with Alcalase. Alcalase were selected from the tested 5 enzymes (papain, trypsin, pepsin, Alcalase and subtilisin) when the degrees of hydrolysis were measured in peanut cake with those proteinases. The results showed that the optimal conditions were as follows: enzymolysis temperature 55 °C, pH 8.5, dosage of Alcalase 8000 U/g, liquid/solid 12:1, and enzymolysis time 3 h. Under the optimized conditions, the DH reached 18.45%.

Key words: peanut peptides; enzymatic hydrolysis; DH

花生是我国六大油料作物之一, 花生榨油后的花生粕中含有丰富的蛋白质, 含量高达 45%~55%, 此外还含有大量的维生素、矿物质等多种营养成分^[1]。花生蛋白主要由花生球蛋白和伴花生球蛋白组成, 其中花生球蛋白占 63%, 伴花生球蛋白占 33%, 是一种高营养的植物蛋白资源。我国的花生粕资源含量丰富且廉价, 而这类蛋白资源多用作饲料, 利用率很低。现研究发现: 蛋白质水解后致敏性降低; 得到的多肽, 营养功能比蛋白质更好, 吸收率比氨基酸高; 而且还有抗氧化、促进矿物质吸收、降血压、降血脂和降胆固醇和抗菌等潜在的生物活性, 具有显著的开发价值^[2-4]。目前, 我国多肽保健品和多肽食品的开发应用也日益广泛, 但由于技术、规模等因素的局限, 多肽的研究仍处于初步阶段, 有待进一步发展^[4-5]。本文通过木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、Alcalase 蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶对花生豆粕进行酶解, 选出最佳酶

种并通过正交确定了最佳工艺条件, 为花生粕的综合利用、附加值的提高提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

热榨花生粕; Alcalase 蛋白酶 (丹麦诺维信公司); 胰蛋白酶 (国药集团化学试剂有限公司); 胃蛋白酶 (北京奥博星生物技术有限公司); 木瓜蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶 (南宁庞博生物工程有限公司)。

1.2 主要设备

THZ-82 水浴恒温振荡器, 金坛市华欧实验仪器厂; PHS-25 数显 pH 计, 上海精密科学仪器有限公司; UV2300 紫外-可见分光光度计, 上海天美可仪器有限公司。

1.3 实验步骤

1.3.1 酶活的测定

酶活的测定用福林酚法^[6]。

酶活力的定义为: 在 40℃ 下每分钟水解干酪素产生 1 mg/L 酪氨酸定为一个酶活力单位。

1.3.2 水解度的测定

用甲醛滴定法^[7]。

1.3.3 工艺流程^[8]

收稿日期: 2012-09-13

基金项目: 广东省大学生创新实验项目 (1107812003); 第十三届全国挑战杯学生作品校级项目

作者简介: 毛晓宇 (1991-), 男, 本科生

通讯作者: 曾庆祝 (1965-), 男, 博士, 教授, 主要从事生物活性物质制备及功能性研究

蛋白酶水解法制备花生多肽工艺流程: 花生饼→50 ℃下烘干→粉碎过 60 目筛→花生粕预处理(沸水浴加热 10 min)→酶解→灭酶→4000r/min 离心 10 min→干燥→花生多肽

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 酶种类筛选

用胃蛋白酶、胰蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、Alcalase 碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶水解花生粕, 表2是通过文献^[9-10]查找确定这5类蛋白酶的初选条件。添加不同的加酶量, 使用表2的水解初选条件进行水解, 水解过程中维持反应溶液的pH值和温度恒定, 水解4 h, 灭酶后测水解度。

表1 各蛋白酶的最适条件

酶制剂	pH 值	温度/℃	液固比/(m/m)	酶解时间/h
Alcalase 蛋白酶	8.0	55	10	4
木瓜蛋白酶	7.0	55	10	4
胰蛋白酶	8.0	45	10	4
胃蛋白酶	3.5	37	10	4
枯草杆菌蛋白酶	7.0	55	10	4

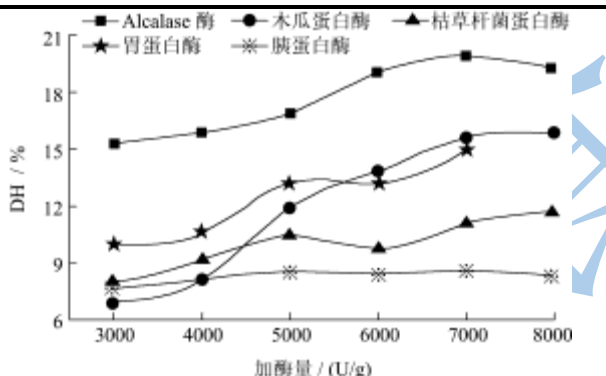


图1 酶的种类对水解度的影响

Fig.1 Effect of various enzymes on DH of peanut protein

由图1可知, 碱性蛋白酶的水解效果最好, 任一加酶量均比同一加酶量下的其它酶类的水解度大, 胰蛋白酶的水解效果最差。这是由于不同的蛋白酶具有不同的活性、纯度或底物专一性。所以, 选择Alcalase碱性蛋白酶作为制备花生多肽的实验用酶较为理想。

2.1.2 酶解温度对水解度的影响

选用 pH 值 8.0、加酶量为 2000 U/g 花生粕、液固比为 10:1, 分别在温度为 40 ℃、50 ℃、55 ℃、和 60 ℃下水解时间 4 h, 结果如图 2 所示。

从图2可以看出40~50 ℃花生的水解度变化比较大, 而50 ℃之后花生粕蛋白的水解度随温度的升高增加的幅度减少甚至还有略微的下降。这可能是因为温度升高, 酶的活性受到抑制, 甚至使得酶蛋白的结构

发生改变, 导致酶失活。考虑到节能环保, 故选取50 ℃为最佳酶解温度。

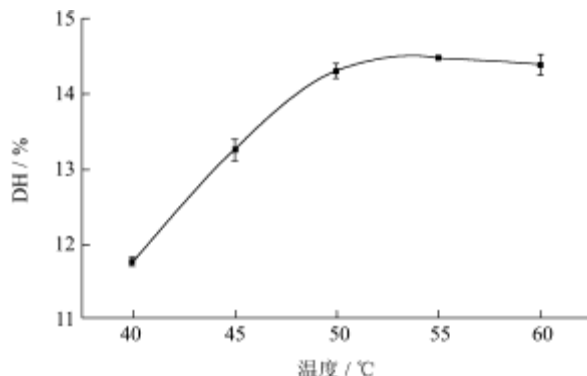


图2 酶解温度对水解度的影响

Fig.2 Effects of the hydrolysis temperature on DH

2.1.3 pH 值对水解度的影响

在温度 50 ℃、加酶量 2000 U/g 花生粕、液固比为 10:1 的条件下, 选用不同的 pH 值, 水解 4 h, 结果如图 3 所示。

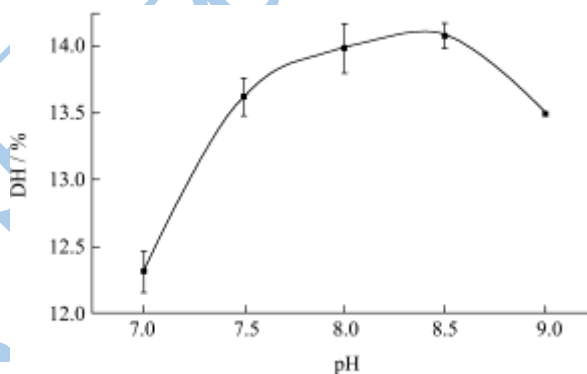


图3 pH 值对水解度的影响

Fig.3 Effects of pH value on DH

如图3所示: pH对水解度的影响较大, pH 7.0~8.0, 水解度增加幅度较大, pH>8.5时, 水解度快速下降, pH 8.0~8.5之间的酶解效果较好。这是因为体系的pH值影响酶分子结构的稳定性, 过酸过碱都能引起酶蛋白变性而使酶失活, pH还影响酶分子与底物分子的解离状态, 而酶只与某种解离状态的底物才形成复合物而起催化作用。故选取最佳pH为8.0。

2.1.4 加酶量对水解度的影响

选用温度为 50 ℃、pH 值 8.0、液固比为 10:1 的条件下, 分别加 5000 U/g、6000 U/g、7000 U/g、8000 U/g、9000 U/g 花生粕的酶, 水解 4 h, 结果如图 4 所示。

如图4所示, 当加酶量低于7000 U/g底物时, 水解度随加酶量的增加而增加。当加酶量高于7000 U/g底物时, 水解度增加趋于缓慢。因此, 酶的添加量定为 7000 U/g底物。

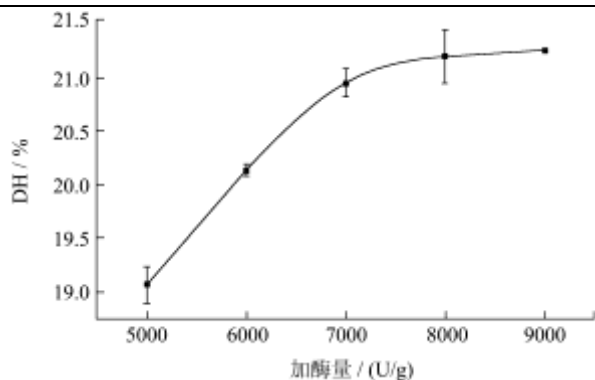


图4 加酶量对水解度的影响

Fig.4 Effects of Alcalase dose on DH

2.1.5 液固比对水解度的影响

在温度 50 °C、pH 8.0、加酶量 7000 U/g 花生粕的条件下, 选用不同的液固比, 水解 4 h, 结果如图 5 所示。

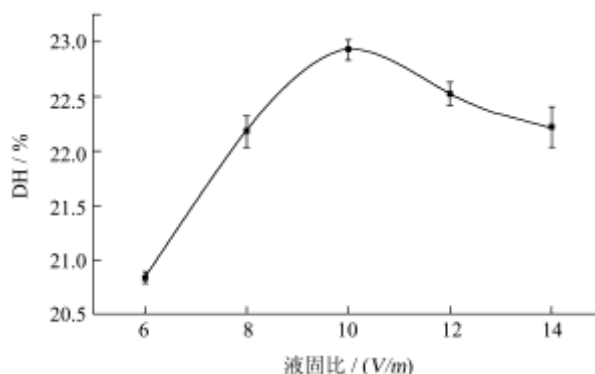


图5 液固比对水解度的影响

Fig.5 The effect of Liquid-to-solid ratio on DH

如图5所示, 当液固比小于10时, 水解度随液固比的增加而呈直线上升, 液固比大于10时, 水解度呈下降趋势。这是因为液固比较小时, 溶液黏度大且蛋白质不能充分浸润, 花生蛋白的溶出率较小, 影响酶对蛋白的作用, 并且底物浓度过高, 分散不均匀, 过多底物分子堆积于酶的活动中心, 从而会影响酶催化速度及产物分子的扩散, 故水解度较低; 液固比过大时, 底物的浓度较小, 酶的水解效率受底物浓度的限制。故取10:1为适宜的液固比。

2.1.6 水解时间对水解度的影响

在温度50 °C、pH 8.0、加酶量7000 U/g花生粕、液固比10:1的条件下, 选用不同的液固比, 分别水解1 h~5 h, 结果如图6所示。

由图6可见: 水解前3 h内, 酶活力高, 产物抑制小, 水解度变化很大。3 h后随着水解时间的延长, 酶的活力逐渐降低, 同时游离的氨基酸与肽增多, 产物的抑制作用增大, 水解率增加趋势渐缓。从节省能耗方面考虑, 选择水解时间为3 h比较合适。

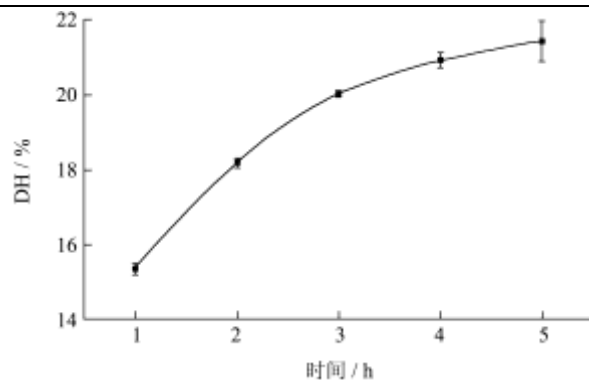


图6 酶解时间对水解率的影响

Fig.6 Effects of hydrolysis time on DH

2.2 正交试验结果

为了进一步的优化酶解条件, 在上述单因素基础上, 选取温度、pH 值、加酶量和液固比进行正交实验^[11], 因素水平表见表 2, 采用花生粕蛋白的水解度作为指标进行评价。结果见表3。

表2 因素水平表

Table 2 Coded factors and levels of the orthogonal design with 4 factors on enzymatic hydrolysis conditions of peanut protein

水平	A(温度 / °C)	B (pH)	C [加酶量(U/g)]	D[固液比 / (m/V)]
1	45	7.5	6000	1:8
2	50	8.0	7000	1:10
3	55	8.5	8000	1:12

表3 L₉(3⁴) 正交试验表

Table 3 Results of the rthogonal design with 4 factors

试验号	A	B	C	D	DH/%
1	1	1	1	1	13.61
2	1	2	2	2	16.23
3	1	3	3	3	18.13
4	2	1	2	3	16.92
5	2	2	3	1	18.74
6	2	3	1	2	17.72
7	3	1	3	2	18.18
8	3	2	1	3	18.21
9	3	3	2	1	18.10
K1	47.97	48.71	49.54	50.45	
K2	51.28	53.18	51.25	52.13	
K3	54.49	53.95	55.05	53.26	
极差 R	6.52	5.24	5.51	2.81	
因素主次	温度>加酶量>pH>液固比				
优方案	A ₃ B ₃ C ₃ D ₃				

由表3可以得出, 对花生粕蛋白质水解度影响最大的因素是温度, 其次是加酶量、pH 值、液固比, 通过极差分析得到最优组合为 A₃B₃C₃D₃, 即最佳工艺条件

为: 温度 55 °C, pH 值为 8.5, 加酶量为 8000 U/g 花生粕, 液固比为 12:1。为了验证结果的准确性, 根据极差分析所得的最佳工艺条件 $A_3B_3C_3D_3$ 与正交表中最好的第 5 号试验 $A_2B_2C_3D_1$ 进行验证试验, 得到结果为 $DH(A_3B_3C_3D_3)=18.45\%$, $DH(A_2B_2C_3D_1)=17.62\%$, 所以可以认为 $A_3B_3C_3D_3$ 是真正的最优方案。

3 结论

Alcalase 蛋白酶水解花生粕蛋白制备花生多肽的最佳工艺条件: 温度 55 °C, pH 值 8.5, 加酶量 8000 U/g 花生粕, 液固比 12:1、酶解时间 3 h。此方案所得花生蛋白最高水解度为 18.45%。

参考文献

- [1] 梅娜,周文明,胡晓玉.花生粕营养成分分析[J].西北农业学报,2007,3(16):96-99
- [2] 刘传富,张兆静.花生蛋白及其在食品中的应用[J].中国食

物与营养,2005,1:24-25

- [3] 陈杰,马美湖.风味蛋白酶水解蛋清工艺条件的研究[J].现代食品科技,2007,23(7):43-47
- [4] 孙显慧,蒋文强.大豆多肽功能特性及其开发利用[J].粮食与油脂,2004,5:7-10
- [5] 孔令明,李芳,陶永霞.多肽的功能活性与研究进展[J].中国食品添加剂,2009,3:71-73
- [6] SB/T10317-1999. 蛋白酶活力测定法[S]
- [7] 徐勤,葛向阳,刘建峰.甲醛法测大豆蛋白水解度的改进[J].饲料工业,2008,29(5):46-47
- [8] 饶珊,潘思轶.酶解大豆分离蛋白的抗坏血酸改性研究[J].现代食品科技,2005,21(1):21-24
- [9] 何国庆,丁立孝.食品酶学[M].北京:化学工业出版社,2006
- [10] (日)相察孝亮等著,黄文涛,胡学智译.酶应用手册[M].上海市:上海科学技术出版社,1989
- [11] 李云雁,胡传荣.实验设计与数据处理[M].北京:化学工业出版社,2008