

复合蛋白酶水解豆粕制备呈味基料的研究

姚玉静, 邱礼平, 陈琼

(广东化工制药职业技术学院, 广东 广州 510520)

摘要: 采用碱性蛋白酶和风味蛋白酶水解豆粕蛋白制备呈味基料, 并分析了豆粕酶解液的呈味成分。结果表明, 添加风味蛋白酶 1200 U/g 和碱性蛋白酶 1000 U/g (以豆粕蛋白计), 55 °C 水解 45 h 后酶解液中总氮和氨态氮分别达到 0.34 g/100 g 和 0.68 g/100 g, 游离氨基酸占总氮的 50%, 酶解液中大部分肽的分子量小于 1000 Da。

关键词: 豆粕; 酶解液; 呈味

中图分类号: TS201.2⁺5; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)06-0008-03

Hydrolysis of Defatted Soybean Flakes by Complex Proteases

YAO Yu-jin, QIU Li-pin, CHEN Qiong

(Guangdong Vocational and Technical College of Chemical Engineering Pharmaceutics, Guangzhou 510520, China)

Abstract: The taste components of the enzymic hydrolysate of defatted soybean flakes by Alcalase and Flavorzyme were studied. After hydrolyzed by 1200 U/g Alcalase and 1000 U/g Flavorzyme for 45 h at 55 °C, the amino nitrogen and total nitrogen contents in the hydrolysate reached 0.34 g/100 g and 0.68 g/100 g, respectively. Besides, the ratio of amino acids to total nitrogen was 50% and the molecular weights of most peptides in hydrolysate were less than 1000 Da.

Key words: defatted soybean flakes; hydrolysates; taste

我国是世界上重要的大豆生产和消费大国, 2005 年我国大豆消费量为 4339 万吨, 因我国大豆的消费利用以榨油为主 (占总消费量的 70%), 使我国豆粕的总量达到 2560 万吨^[1]。目前, 我国大部分豆粕主要用作养殖用饲料, 附加值低。豆粕蛋白质含量高, 是生产调味品的优质蛋白原料。随着生物技术, 特别是酶技术的崛起和广泛应用, 利用酶技术对低值蛋白资源进行回收利用已成为目前研究的重点和热点之一。采用复合蛋白酶对大宗豆粕进行酶解制备调味基料是豆粕高值化利用的有效途径之一, 鉴于此, 本文研究了内切蛋白酶结合外切蛋白酶对豆粕进行水解制备调味基料, 以提高豆粕的附加值。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

低温脱脂豆粕: 山东万德富植物蛋白厂; 蛋白酶: 风味蛋白酶 (FlavourzymeTM) 和碱性蛋白酶 (AcalaseTM) 购于诺维信中国公司; 氢氧化钠、酚酞、盐酸、甲醛、无水硫酸钾、硫酸铜、无水乙醇、乙醚、

收稿日期: 2007-04-11

基金项目: 广东化工制药职业技术学院院级资助项目 (2005009)

作者简介: 姚玉静 (1979-), 女, 硕士, 食品工程师, 研究方向为蛋白质化学与工程

蔗糖、味精、氯化钠、柠檬酸、单宁等化学试剂均为分析纯; 去离子水。

pHS-25 数显 pH 计: 上海精密科学仪器有限公司; CU600 型电热恒温水箱: 上海福玛实验有限公司; KND-2C 型定氮仪: 上海纤检仪器有限公司; LD4-2A 型离心机: 北京医用离心机厂; 高效液相色谱: 美国 Waters 公司。

1.2 分析方法

总蛋白质测定, 半微量凯氏定氮法 (GB5009.5-1994); 氨态氮, 甲醛滴定法; 挥发性盐基氮 (GB2733-94); 水分含量, 热失重法 (GB5009.3-94); 脂肪含量, 乙醚索氏抽提法 (GB5009.6-94); 总糖测定: 3,5-二硝基水杨酸法 (GB8210-87); 总酸测定: 氢氧化钠滴定法 (GB/T12456-90); 食盐含量测定: 硫氰酸钾滴定法^[2]。

氨基酸分析: 高效液相色谱, 分析柱: PICO.TAG 氨基酸分析柱, 温度 38 °C, 检测波长 254 nm, 流速 1 ml/min。分子量分布测定: 将酶解液 8000 r/min 离心后, 取上清液, 采用 Amersham 蛋白质纯化系统, Superdex_peptide_10/300_GL 预装柱: Vt=24.0, Vo=8.0, 最大压力=1.8 MPa, 默认流速=0.5 mL/min。分析条件如下: 洗脱液: 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液, 0.25 mol/L NaCl, pH 7.2; 流速: 0.5 mL/min, 室温;

检测波长: 0.5 AUFS, 214 nm。采用 Globin (Mr 16,949)、Globin I (Mr 8,519)、Globin II (Mr 6,214)、Globin III (Mr 2,512 Da)、GSSH (Mr 630) 进行分子量测定。

1.3 水解液制备

豆粕和水 (1:9, *m/v*) 室温下混合搅拌 1 h 后在 8000 r/min 离心 30 min, 除去不溶物, 得到大豆蛋白提取液后, 加热到 95 °C 保温 20 min, 再降到温, 调节 pH 至 7.0 后, 添加风味蛋白酶 1200 U/g 和碱性蛋白酶 1000 U/g (以豆粕蛋白计) 后, 55 °C 水解 45 h 后, 灭酶, 8000 r/min 离心 30 min, 过滤, 得豆粕酶解液。

2 结果与讨论

2.1 豆粕化学成分

豆粕中蛋白质含量为 52.6%, 水分含量为 4.8%, 灰分含量为 5.9%, 脂肪含量为 2.2%, 其他组分含量为 34.5%。对其蛋白进行氨基酸组成分析, 具体见表 1。

表 1 豆粕蛋白的氨基酸组成分析 单位: mg/100 g

氨基酸	含量	氨基酸	含量
天冬氨酸 Asp	6690.28	丙氨酸 Ala	2271.08
谷氨酸 Glu	9286.46	脯氨酸 Pro	2726.54
丝氨酸 Ser	2960.50	酪氨酸 Tyr	1725.43
甘氨酸 Gly	2068.92	缬氨酸 Val	1728.63
组氨酸 His	1909.67	蛋氨酸 Met	101.88
精氨酸 Arg	4182.93	半胱氨酸 Cys	116.88
苏氨酸 Thr	2032.22	异亮氨酸 Ile	1530.53
苯丙氨酸 Phe	2130.07	亮氨酸 Leu	3352.55
赖氨酸 Lys	2223.02	色氨酸 Trp	--
		总量	47037.60

表 1 的结果显示, 采用氨基酸分析法测定的蛋白质含量比凯氏定氮法所得到的蛋白质含量低。这是因为凯氏定氮法测定结果包含了非蛋白氮等含氮成分, 其测定结果应比实际含量偏高; 而氨基酸分析法在浓酸水解过程中色氨酸被破坏, 丝氨酸和苏氨酸被部分破坏^[3], 其测定结果应比实际含量偏低。

对豆粕蛋白的氨基酸组成进行分析可见, 豆粕中呈味氨基酸含量较为丰富, 如天冬氨酸占 14.22%, 谷氨酸占 19.74%, 甘氨酸占 4.39%, 丝氨酸占 6.29%, 丙氨酸占 4.8%, 共计 49.44%, 是一种优质的蛋白呈味原料。

2.2 豆粕蛋白水解液的氨基酸组成分析

由图 1 可知, 随着酶解时间的延长, 豆粕蛋白水解液的总氮和氨态氮含量均呈上升趋势, 其中酶解 9 h

前总氮含量和氨态氮含量增加较快, 分别达到 0.28 g/100 g 和 0.60 g/100 g。随后酶解速度变缓, 45 h 以后酶解液的总氮和氨态氮分别达到 0.34 g/100 g 和 0.68 g/100 g, 即游离氨基酸占总氮的 50%。酶解后期酶解速度下降主要是由于酶解产物对蛋白酶的抑制作用^[4]。

由于豆粕酶解液中的游离氨基酸对酶解液的呈味有较大影响^[3], 有必要对豆粕蛋白酶解液进行氨基酸分析, 见表 2。

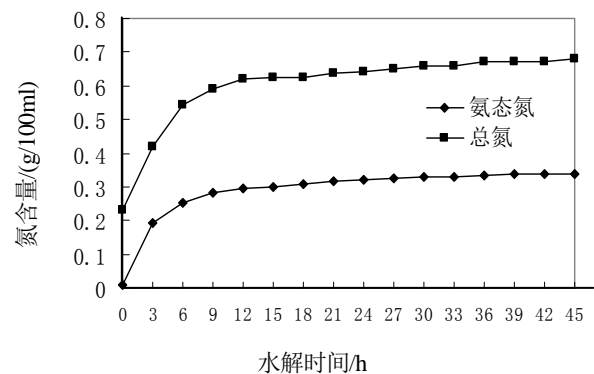


图 1 豆粕酶解过程中氨态氮和总氮的变化

表 2 豆粕酶解液的氨基酸组成分析 (mg/100 g)

氨基酸	游离氨基酸	肽*	总氨基酸	释放率
天冬氨酸	65.17	237.78	302.95	21.51
谷氨酸	123.48	322.78	446.26	27.67
天冬酰胺	135.24	--	--	--
谷氨酰胺	193.06	--	--	--
赖氨酸	144.55	205.50	350.05	41.29
精氨酸	186.2	181.35	367.55	50.66
组氨酸	68.11	57.41	125.52	54.26
脯氨酸	20.09	148.33	168.42	11.93
甘氨酸	30.38	104.47	134.85	22.53
丙氨酸	75.95	122.21	198.16	38.33
缬氨酸	127.89	121.72	249.62	51.23
丝氨酸	105.35	126.65	232.0	45.41
苏氨酸	98.98	91.91	190.89	51.85
异亮氨酸	119.07	114.08	233.15	51.07
亮氨酸	257.74	159.17	416.91	61.82
苯丙氨酸	166.11	122.71	288.82	57.51
色氨酸	62.23	--	--	--
酪氨酸	105.35	26.12	131.47	80.13
蛋氨酸	55.37	35.28	90.65	61.08
半胱氨酸	7.35	1.23	8.58	85.66
合计	2147.67	2157.48	4326.38	

注: 肽的氨基酸=总氨基酸-游离氨基酸; 释放率=游离氨基酸/总氨基酸。

由表 2 可知, 游离氨基酸组成中疏水性氨基酸含量较高, 如亮氨酸含量为 12%, 谷氨酰胺含量为

8.99%，天冬酰胺含量为 6.30%，苯丙氨酸含量为 7.73%，缬氨酸含量为 5.95%，异亮氨酸含量为 5.54%；与之相反，亲水性氨基酸含量偏低，如甘氨酸含量为 1.41%，天冬氨酸含量为 3.03%，丙氨酸含量为 3.54%。与游离氨基酸相反，寡肽和多肽中氨基酸则以亲水性氨基酸为主，如天冬氨酸含量为 11.02%，谷氨酸含量为 14.96%。从游离氨基酸的释放率来看，疏水性氨基酸和碱性氨基酸释放率较高，如亮氨酸释放率为 61.82%，缬氨酸释放率为 51.23%，异亮氨酸释放率为 51.07%，精氨酸释放率为 50.66%，赖氨酸释放率为 41.29%，与之相反，亲水性氨基酸的释放率偏低，天冬氨酸释放率为 21.51%，谷氨酸释放率为 27.67%，

脯氨酸释放率为 11.93%。游离氨基酸组成和肽的氨基酸组成与所用碱性蛋白酶的专一性有较大的关系。

需说明的是，豆粕酶解液的总氨基酸分析由于采用强酸水解，这导致天冬酰胺和谷氨酰胺被水解为天冬氨酸和谷氨酸，色氨酸被完全破坏，因此酶解液中天冬酰胺、谷氨酰胺和色氨酸无法检出。

无论是传统的调味品如酱油、酱类、黄酒、腐乳、肉汤还是现代调味品如蛋白质抽提物、酵母抽提物、骨素等都含有一定量的肽，这些肽对它们风味有着显著的影响。鉴于肽的分子量分布对呈味有较大的影响，采用凝胶过滤色谱对豆粕酶解液中肽的分子量分布进行分析，见图 2 和图 3。

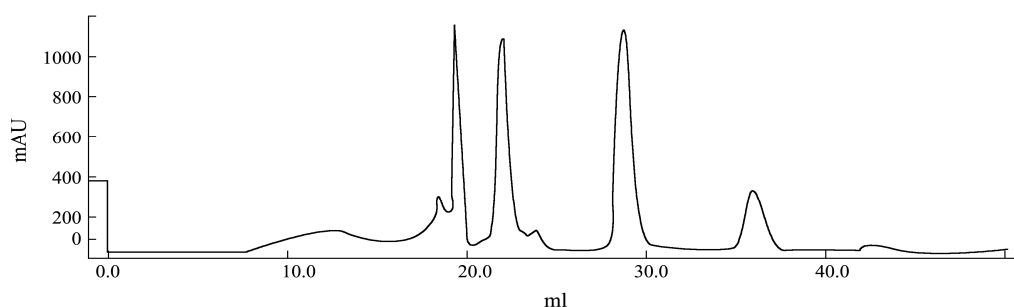


图 2 豆粕酶解液中肽分子量的分布 (280 nm)

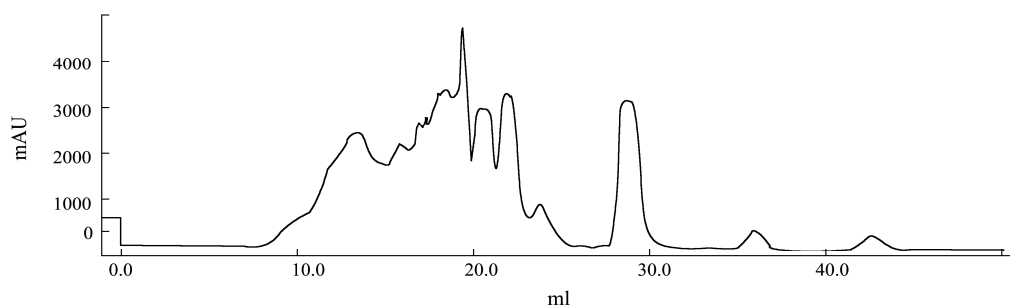


图 3 豆粕酶解液中肽分子量的分布 (214 nm)

从图 2、图 3 可知，两者谱图的出峰时间大致相同，峰形相似，但各峰所占比例和吸收值略有差异。214 nm 的谱图在吸收值上更为敏感，其吸收值为 280 nm 的 3.5 倍左右，且其高分子量（大于 1000 Da）组分略高于 280 nm 的谱图。豆粕酶解液在凝胶柱上的保留体积大部分均大于 14.47 mL（分子量为 1000 Da），这表明酶解液中肽类主要以小分子寡肽为主。

3 结论

添加风味蛋白酶 1200 U/g 和碱性蛋白酶 1000 U/g（以豆粕蛋白计），55 °C 水解 45 h 得豆粕蛋白酶解液。酶解液中总氮和氨态氮分别为 0.34 g/100 g 和 0.68 g/100 g，游离氨基酸占总氮的 50%，酶解液中大部分

寡肽的分子量小于 1000 Da。

参考文献

- [1] 李建雷,孙泰然. 2005 年国内豆粕市场回顾及 2006 年展望 [J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(2): 35-38
- [2] 杨惠芬,李明元,沈文. 食品卫生理化检验标准手册 [M]. 中国标准出版社, 1977
- [3] Aaslyng M D, Larsen L M, Nielsen P M. The influence of maturation on flavor and chemical composition of hydrolyzed soy protein produced by acidic and enzymatic hydrolysis [J]. Food research and technology, 1999, 208(5-6): 355-361