

酶种类对生物解离大豆蛋白酶解物功能性和苦味的影响

江连洲 佟晓红 刘宝华 王欢 张巧智 李杨

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 在生物解离提取大豆油脂过程中会伴随产生丰富的水解液, 水解液主要成分为大豆蛋白酶解物。以不同种类蛋白酶(碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶)对挤压膨化大豆粉进行酶解, 将得到的不同蛋白酶解物作为研究对象, 采用水解度、SDS-PAGE凝胶电泳、氨基酸组成分析、傅里叶红外光谱对大豆蛋白酶解物结构进行表征, 利用乳化活性和乳化稳定性、溶解性及感官评价等表征大豆蛋白酶解物功能性和苦味。结果显示: 采用碱性蛋白酶进行生物解离时, 提油率最高, 为91.23%; 碱性蛋白酶解物溶解性为91.12%, 但是酶解产物的苦味值大大增加, 乳化性也不理想。采用风味蛋白酶处理时, 尽管提油率不是最高, 为87.73%, 但是酶解产物苦味值为1.5, 溶解性为87.12%, 乳化活性和乳化稳定性效果最优。

关键词: 蛋白酶解物; 功能性; 苦味; 生物解离; 傅里叶红外光谱

中图分类号: TS214.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2018)08-0368-07

Effect of Enzymatic Species on Function and Bitterness of Enzyme-assisted Aqueous Extraction Soybean Protein Hydrolysates

JIANG Lianzhou TONG Xiaohong LIU Baohua WANG Huan ZHANG Qiaozhi LI Yang

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Enzyme-assisted aqueous extraction process is a green oil extraction technology, which has advanced in recent years, may be a effective alternative technology to separate oil and protein from soybeans. It will be accompanied by cream, skim and residual fraction in the enzyme-assisted aqueous extraction process. The main component in the skim is soy protein hydrolysates. Different types of proteases (Alcalase, Neutrase, Papain, Bromelain, Flavourzyme, Protamex and Trypsin) were used to hydrolyze the extruded soybean flour. Different kinds of protein hydrolysates were used as the research objects. The structure of soybean protein hydrolysates was characterized by degree of hydrolysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, amino acid composition analysis and Fourier transform infrared spectroscopy. Solubility, emulsion activity index and emulsion stability index characterized the functional of the soy protein hydrolysates. The bitterness value of the soy protein hydrolysates was obtained by sensory evaluation. The results indicated that when using Alcalase for enzyme-assisted aqueous extraction, the highest oil extraction rate was 91.23% and the solubility of soybean protein hydrolyzate was 91.12%. However, the bitterness value of the hydrolyzate was increased greatly which was 4, the emulsion activity index and emulsion stability index were not good. When using Flavourzyme for enzyme-assisted aqueous extraction treatment, the oil extraction was 87.73% and the solubility was 87.12%. However, the bitterness of the hydrolyzates was only 1.5, thus the sensory evaluation was the best. And the hydrolyzates had the best emulsion activity index and emulsion stability index.

Key words: protein hydrolysates; function; bitterness; enzyme-assisted aqueous extraction; Fourier transform infrared spectroscopy

收稿日期: 2018-02-06 修回日期: 2018-03-11

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0401402)和中国博士后科学基金特别项目(2017T100507)

作者简介: 江连洲(1960—),男,教授,博士生导师,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究, E-mail: jlname@163.com

通信作者: 李杨(1981—),男,教授,博士生导师,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究, E-mail: liyanghuangyu@163.com

0 引言

作为一种可以替代溶剂浸出法的绿色提油技术,生物解离是通过机械破碎联合酶解作用于油料,使油脂从油料固体中释放出来,所提取的油脂品质较高、色泽较好^[1]。生物解离得到的大豆蛋白及肽主要存在于离心得到的水解液中^[2]。大豆约 80% 的总蛋白质被存储在称为蛋白质体的细胞器中,它占据子叶细胞大部分体积,而且大豆油脂储存在油脂体中,油脂体的镶嵌蛋白与磷脂相互结合并协同作用,使其内部的油脂体不易分解,因此,通过蛋白酶酶解更有助于油脂释放^[3]。生物解离过程中酶水解会造成大豆蛋白质带电基团的增加,分子量变小,分子结构发生改变,因此其功能性质(如溶解性、起泡性、乳化性和凝胶特性等)会发生变化^[4]。蛋白酶解物中小肽通过小肠吸收的速度比同样氨基酸组成的游离氨基酸混合物更快、更均匀,并且具有更高的营养价值^[5]。但是,蛋白经过酶水解可导致苦味肽的形成,影响其在食品中的应用,特别是蛋白质水解物应用于饮料中会产生严重不良影响^[6]。因此,本文研究 7 种食品级商业蛋白酶制剂(碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶)对生物解离油脂提取率、得到的蛋白质水解物苦味和功能特性的影响。通过氨基酸分析、凝胶电泳、水解度及感官评价对苦味进行分析,同时,通过水解度和傅里叶红外光谱对样品功能性(溶解性和乳化性)进行分析,探讨不同酶种类对其功能性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

挤压膨化大豆(蛋白质量分数 40%,脂肪质量分数 17%,纤维质量分数 7%),山东省高唐蓝山集团总公司;碱性蛋白酶 Protex 6 L,杰能科(中国)生物工程有限公司;中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、彩虹光谱蛋白 Marker,北京索莱宝科技有限公司;复合蛋白酶,诺维信(中国)生物技术有限公司;奎宁,上海源叶生物科技有限公司;其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

磁力搅拌器,广州仪科实验仪器有限公司;PHSJ-4A 型实验室 pH 计,中国上海雷磁公司;HH-4 型数显恒温水浴锅,金坛市双捷实验仪器厂;GL-21M 型高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;3-18K 型高速冷冻离心机,Sigma

公司;FD5-3 型冷冻干燥机,美国 SIM 公司;UV-1600PC 型紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;Mini-PROTEAN Trtra 型垂直电泳槽,Bio-Rad 公司;L-8900 型全自动氨基酸分析仪,日本日立公司;MAGNA-IR560 型傅里叶红外光谱仪,美国尼高丽公司。

1.3 生物解离大豆蛋白酶解物的制备

参考 LI 等^[6]的方法制备生物解离大豆蛋白酶解物,主要流程如下:挤压膨化大豆→粉碎→过筛(60 目)→调节液固比为 6 mL/mg→调节温度、pH 值→酶解(3 h,酶添加量为 1 mL/(100 g)或 1 g/(100 g))→灭酶(100 ℃,10 min)→离心分离(8 000 g,20 min)→得到水解液→冷冻干燥→脱脂(正己烷)→得到大豆蛋白酶解物。

1.4 蛋白水解度的测定

依据 NIELSEN 等^[7]的方法,即邻苯二甲醛(Ortho-phthalaldehyde,OPA)法。将上述制得酶解物用 0.1 mol/L pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲溶液配制,样品溶液与 OPA 试剂充分混匀 5 s,准确静止 2 min,用可见光分光光度计在 340 nm 下测定其吸光度。试验重复 3 次取平均值,蛋白质水解度计算公式为

$$H = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中 h ——水解的肽键数

h_{tot} ——总肽键数(大豆取 7.8^[8])

1.5 SDS-PAGE 凝胶电泳

参考 LAEMMLI^[9]的方法略作修改:分离胶质量分数为 12% 和浓缩胶质量分数为 5%,样品质量浓度为 5 mg/mL,上样前于沸水浴中加热 5 min,上样量为 10 μL,电泳电压初始为 80 V,待样品进入分离胶时,提高电压至 120 V。电泳后用考马斯亮蓝 R250 溶液染色,而后用脱色液脱色 4~5 次,脱色完全后,采用 Gel Doc EZ imager 型凝胶成像系统分析电泳条带。

1.6 氨基酸组成分析

大豆蛋白酶解物的氨基酸组成利用氨基酸分析仪进行测定,样品用 6 mol/L 盐酸封管,在 110℃ 条件下水解 24 h,过滤后进行真空干燥,溶解后上机分析,进样量为 50 μL。所测结果用占蛋白质质量分数表示^[10-11]。游离氨基酸测定时,样品用 10% 三氯乙酸沉淀 2 h,然后在 11 000 g 下离心 15 min,调节 pH 值为 2.0,过滤后利用氨基酸分析仪进行测定。

1.7 傅里叶红外光谱测定

傅里叶红外光谱测定采用 KBr 压片法,准确称取蛋白酶解物样品 1 mg,加入 KBr 100 mg,充分研磨

约 15 min 后进行压片处理,在室温(20℃)条件下,扫描波数谱段设定为 400~4 000 cm⁻¹,设定分辨率为 4 cm⁻¹、波数精度为 0.01 cm⁻¹条件下扫描 64 次,重复 3 次。利用 Peakfit Version 软件处理谱图^[12]。

1.8 蛋白质功能特性测定

1.8.1 溶解性

参照 MORR 等^[13]的方法并稍作修改,准确称取 20 mg 样品溶于 10 mL 去离子水中,搅拌 1 h 后在 20 000 r/min 条件下离心 15 min。分别测定上清液蛋白质含量及样品总蛋白含量。溶解度表示为上清液中蛋白浓度与总蛋白质浓度的比值。

1.8.2 乳化活性和乳化稳定性

参照 DOMBROWSKI 等^[14]的方法测定蛋白酶解物样品的乳化活性指数(Emulsifying activity index,EAI)及乳化稳定性指数(Emulsifying stability index,ESI)并稍作修改:将样品溶液与大豆油按体积比 3:1 混合,用高速均质机在 20 000 r/min 下均质 1 min 使其混合均匀。立即准确吸取乳状液 50 μL 与 5 mL 0.1% 的 SDS 溶液混合均匀,记录此时及 30 min 后在 500 nm 处的吸光度,乳化活性指数和乳化稳定性指数计算公式为

$$E_{AI} = \frac{4.606A_0N}{1\,000C\phi} \tag{2}$$

$$E_{SI} = \frac{30A_0}{A_0 - A_{30}} \tag{3}$$

式中 E_{AI} ——乳化活性指数,m²/g
 E_{SI} ——乳化稳定性指数,min
 N ——稀释倍数
 C ——乳液在形成前蛋白质水溶液中蛋白质的质量浓度,g/mL
 ϕ ——乳状液中油相体积分数,%
 A_0 ——0 min 时的吸光度
 A_{30} ——30 min 时的吸光度

1.9 感官评价

将不同酶酶解产物用蒸馏水配制成质量浓度 0.01 g/mL 的样品溶液。不同浓度的奎宁溶液作为标准进行评分^[15]。标准溶液的质量浓度分别为 0、8×10⁻⁶、1.6×10⁻⁵、2.4×10⁻⁵、3.2×10⁻⁵、4×10⁻⁵ g/mL,对应的分值为 0、1、2、3、4、5 分,苦味越重,分值越高。将样品溶液与标准溶液在室温下进行对比,并按照标准进行评分,选择 10 名训练有素的感官评定小组成员(5 名男性和 5 名女性,年龄在 20~35 岁之间)来评估水解产物的苦味^[5]。

1.10 数据统计方法

所有试验均重复 3 次,利用 ANOVA 进行差异显著性分析,并用 Origin 8.0 和 Excel 等统计分析数

据并制图, $P<0.05$ 时为显著性差异。

2 结果与分析

2.1 生物解离提油率分析

表 1 为不同酶种类对大豆生物解离提油效果的影响,碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶及胰蛋白酶解离后提油率分别为 91.23%、86.19%、74.45%、75.68%、87.73%、89.44% 及 79.93%,碱性蛋白酶提油率最高,中性蛋白酶、风味蛋白酶及复合蛋白酶的提油率相似,并且与碱性蛋白酶提油率相近。木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶及胰蛋白酶的提油率不理想。

表 1 不同酶解条件对大豆提油率的影响
Tab.1 Effect of different enzyme hydrolysis conditions on soybean oil extraction rate

酶种类	酶解温度/℃	酶解 pH 值	提油率/%
碱性蛋白酶	55	9	91.23±0.32
中性蛋白酶	50	7	86.19±0.28
木瓜蛋白酶	55	7	74.45±0.17
菠萝蛋白酶	50	7	75.68±0.56
风味蛋白酶	50	7	87.73±0.10
复合蛋白酶	50	7	89.44±0.37
胰蛋白酶	50	7	79.93±0.33

2.2 水解度分析

经过计算可知,碱性蛋白酶处理得到的大豆蛋白酶解物水解度最大为 15.4%,其次是复合蛋白酶 12.8%,中性蛋白酶和风味蛋白酶水解度相近,分别是 10.6%、11.1%,两种植物来源的蛋白酶——木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶的水解度分别是 9.2%、7.6%,胰蛋白酶的水解度最低,为 3.3%,这可能归因于胰蛋白酶抑制剂的存在,抑制了胰蛋白酶的蛋白水解作用^[16]。

2.3 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

图 1 是大豆分离蛋白(SPI)和不同酶处理后大豆蛋白酶解物的 SDS-PAGE 图,大豆蛋白的主要组分是 β-伴大豆球蛋白和大豆球蛋白,β-伴大豆球蛋白主要含有 3 个亚基,分别是 α'(67~72 kDa)、α(63 kDa)和 β 亚基(47 kDa);大豆球蛋白由酸性亚基 A(29~33 kDa)和碱性亚基 B(22 kDa)两个亚基组成^[17]。如图 1 所示,相对于 SPI,所有大豆蛋白酶解物中均有许多低分子量的肽片段存在,其中在碱性蛋白酶的作用下,大豆蛋白的 α'、α、β 亚基和酸性亚基 A 都基本被水解,由于碱性基团位于大豆球蛋白复合体内部,因此不易水解,相反,位于复合体外部的酸性亚基几乎全部被蛋白酶降解为小分子肽^[4]。胰蛋白酶也同样作用于 β-伴大豆球蛋白和大豆球蛋白,但

仍有大部分未被水解,这可能由于胰蛋白酶的专一性较强。菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解物的酶解程度相似,这与它们的水解度相似存在关联。中性蛋白酶、风味蛋白酶和复合蛋白酶酶解产物的 β -伴大豆球蛋白组分几乎被破坏,生成小分子肽。

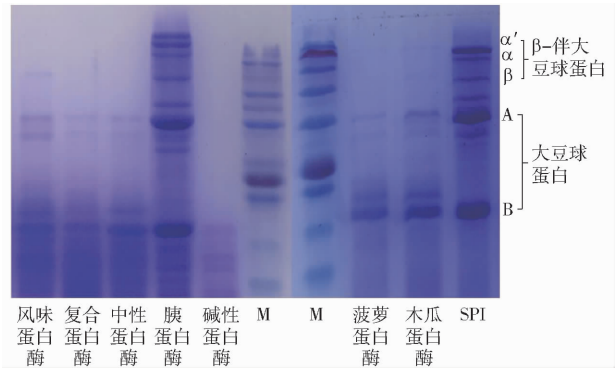


图 1 不同酶解条件下水解液蛋白的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE of proteins in skim under different enzymolysis conditions

2.4 氨基酸组成分析

疏水性氨基酸为侧链具有高疏水性氨基酸的总称,蛋白水解所释放出含有的疏水性氨基酸残基的短肽是产生苦味的主要原因,特别是含有长链的芳香族氨基酸残基。一般情况下,疏水性基团都埋藏在蛋白质内部,因此不会产生苦味。当蛋白质水解为小分子短肽时疏水性氨基酸的含量越高,接触味蕾产生的苦味越强,苦味氨基酸上有苦味产生的结合位点和刺激位点,当苦味氨基酸的比例较高时,其产生苦味可能性较大。但总疏水氨基酸和总苦味氨基酸所占比例对苦味的影响还需要进一步验证^[18]。由表 2 可知,从疏水性氨基酸和苦味氨基酸的比例来看,碱性蛋白酶和中性蛋白酶酶解物中所含比例较大,这与其在感官评定中苦味值结果相一致。风味蛋白酶和胰蛋白酶酶解物中所含比例较小,这与其在感官评定中苦味值结果相一致^[5]。

表 2 不同大豆蛋白酶解物中氨基酸质量分数

	Tab.2 Amino acid composition of different soybean protein hydrolysates							%
氨基酸	碱性蛋白酶	中性蛋白酶	木瓜蛋白酶	菠萝蛋白酶	风味蛋白酶	复合蛋白酶	胰蛋白酶	
天冬氨酸(Asp)	11.14	11.08	11.41	10.96	11.19	11.15	11.50	
苏氨酸(Thr)	3.38	3.58	3.62	3.58	3.55	3.57	3.46	
丝氨酸(Ser)	5.22	5.11	5.18	5.06	5.06	5.13	5.16	
谷氨酸(Glu)	17.73	18.14	19.58	18.68	19.76	18.88	19.32	
甘氨酸(Gly)	3.90	3.76	3.88	3.77	3.85	3.81	3.77	
丙氨酸(Ala)	4.13	3.99	3.94	3.92	3.93	3.98	3.74	
半胱氨酸(Cys)	2.10	2.06	2.08	2.25	2.18	2.16	2.10	
缬氨酸(Val)	4.65	4.45	4.49	4.45	4.41	4.56	4.31	
甲硫氨酸(Met)	1.22	1.19	1.12	1.13	1.19	1.22	1.02	
异亮氨酸(Ile)	3.98	3.75	3.62	3.62	3.59	3.62	3.77	
亮氨酸(Leu)	7.12	6.76	6.38	6.47	6.19	6.51	6.59	
酪氨酸(Tyr)	3.07	3.16	3.14	3.08	2.97	3.21	3.02	
苯丙氨酸(Phe)	4.68	4.47	4.24	4.21	3.87	4.39	4.39	
组氨酸(His)	3.98	3.35	3.34	3.33	3.33	3.37	3.30	
赖氨酸(Lys)	13.80	14.00	12.91	13.90	13.78	13.44	13.18	
精氨酸(Arg)	6.88	7.97	7.91	7.79	8.08	8.20	8.01	
脯氨酸(Pro)	3.02	3.18	3.16	3.80	3.07	2.79	3.36	
总疏水性氨基酸	31.87	30.95	30.09	30.68	29.22	30.28	30.20	
总苦味氨基酸	52.40	52.28	50.31	51.78	50.48	51.31	50.95	

2.5 傅里叶红外光谱分析

图 2 为不同酶种类条件下样品中大豆蛋白酶解物和大豆分离蛋白的 FT-IR 图。FT-IR 光谱可显示蛋白质酰胺 I 带、酰胺 II 带、酰胺 III 带信息以及蛋白质结构中的 C—C 伸缩振动和 C=O 等伸缩振动信息,红外光谱酰胺 I 带 1 600 ~ 1 700 cm^{-1} 范围是蛋白二级结构的主要谱带^[19],根据文献[20],蛋白质二级结构与各子峰间的对应关系为: α -螺旋结构对应波数 1 646 ~ 1 664 cm^{-1} ; β -折叠结构对应波数 1 615 ~ 1 637 cm^{-1} 和 1 682 ~ 1 700 cm^{-1} ; β -转角结

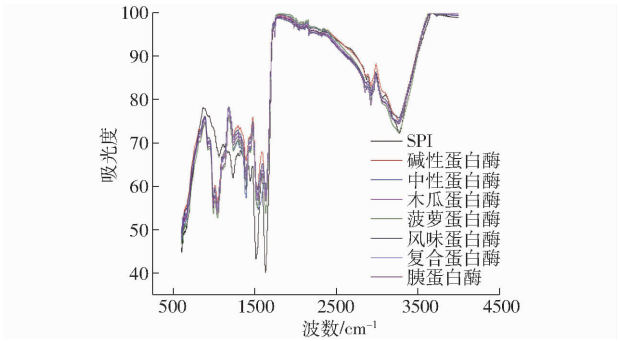


图 2 不同酶解蛋白的红外光谱分析

Fig.2 FT-IR spectra analysis of different enzymatic proteins

构对应波数 1 664 ~ 1 681 cm⁻¹;无规则卷曲结构对应波数 1 637 ~ 1 645 cm⁻¹。采用 peakfit 软件对酰胺 I 带进行去卷积和高斯曲线拟合,通过峰位归属确定二级结构种类和相对含量,计算结果见表 3。

大豆蛋白的二级结构以 β-折叠为主,相对含量为 51.03%,α-螺旋相对含量为 15.53%,β-转角相对含量为 22.68%,无规则卷曲相对含量为 10.76%。碱性蛋白酶酶解得到的大豆蛋白酶解物二级结构中无规则卷曲相对含量为 31.80%,相对于其他酶最高,风味蛋白酶、复合蛋白酶及中性蛋白酶条件下无规则卷曲相对含量相近,分别为

20.52%、20.42%及 20.40%,木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶及胰蛋白酶条件下无规则卷曲相对含量依次减小,为 18.59%、15.72%及 13.71%,蛋白酶解物的无规则卷曲相对含量都比大豆分离蛋白高。除了胰蛋白酶特殊外,随着无规则卷曲相对含量的增加,β-折叠变化规律相反。与上文水解度对比可以看出,总体趋势上无规则卷曲相对含量越大水解度越高^[21]。无规则卷曲主要是由 β-折叠及 β-转角转化而来,不同酶的酶解位点及水解度的不同是酶解后二级结构组成存在差异的主要原因,蛋白质的无规则卷曲结构为其良好表面性质及乳液稳定性等提供了柔性结构单元^[22]。

表 3 不同酶解蛋白的二级结构相对含量				
Tab.3 Relative content of the secondary structure of different enzymatic proteins				%
酶种类	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规则卷曲
SPI	(15.53 ± 0.12) ^g	(51.03 ± 0.01) ^a	(22.68 ± 0.21) ^a	(10.76 ± 0.04) ^h
碱性蛋白酶	(12.03 ± 0.27) ^h	(34.57 ± 0.08) ^g	(21.60 ± 0.15) ^b	(31.80 ± 0.12) ^a
中性蛋白酶	(30.70 ± 0.13) ^c	(36.15 ± 0.21) ^f	(12.75 ± 0.02) ^f	(20.40 ± 0.25) ^d
木瓜蛋白酶	(32.96 ± 0.09) ^a	(32.88 ± 0.25) ^h	(15.57 ± 0.05) ^d	(18.59 ± 0.02) ^e
菠萝蛋白酶	(18.90 ± 0.21) ^f	(49.37 ± 0.27) ^b	(16.01 ± 0.11) ^c	(15.72 ± 0.09) ^f
风味蛋白酶	(30.72 ± 0.05) ^b	(38.42 ± 0.16) ^e	(10.34 ± 0.01) ^h	(20.52 ± 0.14) ^b
复合蛋白酶	(30.52 ± 0.11) ^d	(38.46 ± 0.09) ^d	(10.60 ± 0.07) ^g	(20.42 ± 0.13) ^c
胰蛋白酶	(26.78 ± 0.20) ^e	(45.58 ± 0.16) ^c	(13.93 ± 0.03) ^e	(13.71 ± 0.02) ^g

2.6 溶解性分析

蛋白质溶解性是非常重要的功能特性,它对其其他功能特性,尤其是乳化性、凝胶化及起泡性有相当大的影响,与 SPI 相比,酶解可以提高蛋白质的溶解性,这是因为蛋白经过酶解后,蛋白质的空间结构被局部展开、改善了分子柔性,促进了蛋白质结构的舒张,溶解性因此得到提高^[23]。碱性蛋白酶酶解样品的溶解性最好,为 91.12%,中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶及复合蛋白酶酶解样品的溶解性分别为 84.09%、83.43%、79.2%、87.12%及 89.4%,所有酶解样品中,胰蛋白酶处理的溶解性(70.98%)最差,因为相同酶解时间下,碱性蛋白酶的水解度最高,蛋白质被酶解形成更小的多肽,分子量的降低及比表面积的增长使水合作用变强,因此溶解度最大。研究表明蛋白质二级结构的变化程度、小肽的释放以及可电离氨基和羧基的增加是增加样品与水分子相互作用、溶解度增加的原因^[24]。

2.7 乳化性分析

乳化活性指数表征机械搅拌作用后互不相溶的液体形成乳液的能力;乳化稳定性指数表征乳液中乳滴的稳定能力。乳化活性指数和乳化稳定性指数是大豆蛋白非常重要的表面性质之一,在食品加工

过程中起到了重要的作用。如图 3 所示,除了碱性蛋白酶和复合蛋白酶外,其他蛋白酶解物的乳化活性指数和乳化稳定性指数相对于 SPI 均增加,风味蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶的乳化活性指数为 185.06、173.12、158.23、143.05、121.8 m²/g。CALDERON 等^[25]证实大豆蛋白经蛋白酶水解后乳化活性增加。乳化特性的增加可能是由于大分子蛋白质的降解,疏水基团的暴露和蛋白质溶解度的提高,从而提高了蛋白质的表面活性,因此具有更好的乳化活性^[26]。蛋白质酶解后产生的无规则卷曲结构为其良好表面性质及乳液稳定性等提供了柔性结构单元^[27],由表 3 可知,酶解后无规则卷曲相对含量增多,原理上酶解产物的乳化性会得到提高。然而,与未水解的 SPI 相比,碱性蛋白酶和复合蛋白酶酶解产物的乳化活性指数和乳化稳定性指数均降低,其原因可能是由于蛋白质的过度水解,如水解度和 SDS - PAGE 结果表明,蛋白水解程度较大,亚基降解成大量小分子肽。据报道,水解物的乳化性与水解程度密切相关,低水解度乳化性增加和高水解度乳化性降低^[28]。但是也不是绝对的,尽管风味蛋白酶酶解物的水解度也较大,为 11.05%,但是乳化活性指数和乳化稳定性指数却最大,分别为 185.06 m²/g 和 78.9 min。

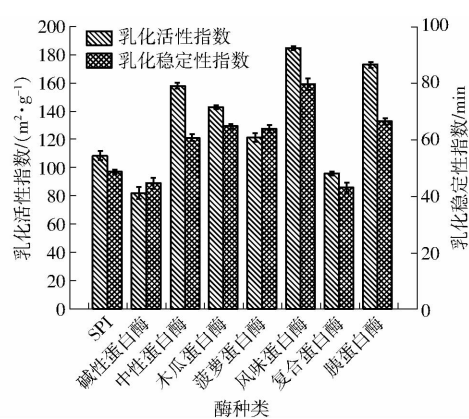


图 3 不同酶解条件下水解液蛋白的乳化性

Fig. 3 Emulsion activity index and stability index of proteins in skim under different enzymolysis conditions

2.8 感官评价分析

当蛋白酶酶解蛋白质时,大量生成由疏水性氨基酸残基形成的小肽,会产生强烈的苦味。根据之前研究得出,多肽自身的疏水性、氨基酸序列、分子量及空间结构可能影响水解物的苦味^[29]。经过碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶及胰蛋白酶酶解后,样品的苦味值分别为 4.0、3.5、2.0、2.0、1.5、2.5、1.5。酶种类水解大豆蛋白产生的苦味值存在明显差异,苦味最强的是碱性蛋白酶处理得到的酶解蛋白,其次是中性蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶及菠萝蛋白酶的酶解蛋白,苦味最弱的为风味蛋白酶和胰蛋白酶的酶解蛋白。由水解度和 SDS-PAGE 可知,碱性蛋白酶的水解程度最大,分子量小的肽较多,通过氨基酸组成分析可知,疏水性氨基酸和苦味氨基酸在蛋白酶解物样品中比例最高,这是因为疏水性氨基酸残基的羧基端肽键是碱性蛋白酶的主要识别酶切位点,多肽 C-末端大部分是疏水性氨基酸,因此碱性蛋白酶酶解产物的苦味最大^[30]。尽管风味蛋白酶

的水解度也很高,但是蛋白酶解物样品中疏水性氨基酸和苦味氨基酸的比例最低,因为风味蛋白酶是内切酶和外切酶的混合物,外切酶可有效地将大豆多肽端基的疏水性氨基酸切除,同时风味蛋白酶添加的风味物质也有掩盖苦味的作用^[31]。

3 结论

- (1)不同酶处理时,提油效果较好的是碱性蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶,提油率均在 90% 左右。
- (2)碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶及胰蛋白酶酶解样品的溶解性分别为 91.12%、84.09%、83.43%、79.2%、87.12%、89.4% 及 70.98%,所有酶解样品中碱性蛋白酶处理的溶解性最好,风味蛋白酶处理的溶解性与其相比差异较小。
- (3)经蛋白酶水解后,由于大豆蛋白大分子蛋白质的降解,疏水基团的暴露,蛋白质溶解度的提高和无规则卷曲结构的增多,提高了蛋白质的表面活性,因此具有更好的乳化活性。风味蛋白酶酶解的样品乳化性最好,乳化活性指数和乳化稳定性指数分别为 185.06 m²/g 和 78.9 min;碱性蛋白酶酶解物的乳化性最差。
- (4)通过感官评价、氨基酸组成分析、水解度和 SDS-PAGE 分析可知,风味蛋白酶酶解物苦味值最低,这是由于风味蛋白酶含有的外切酶可有效地将大豆多肽端基的疏水性氨基酸切除,达到降低苦味的目的,同时含有的风味物质也有掩盖苦味的功效。该结果为风味蛋白酶应用于生物解离,在获取较高提油率前提下,还能得到功能性良好、苦味值低的大豆蛋白酶解物提供了一定的理论依据。

参 考 文 献

- 1 江连洲,李杨,王妍,等. 水酶法提取大豆油的研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 346-350.
JIANG Lianzhou, LI Yang, WANG Yan, et al. Research advance in aqueous enzymatic extraction of soybean oil[J]. Food Science, 2013, 34(9): 346-350. (in Chinese)
- 2 江连洲,张巧智,李杨,等. 大豆水酶法水解液中蛋白质超滤回收及特性研究[J/OL]. 农业机械学报, 2017, 48(2): 327-334. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20170244&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2017.02.044.
JIANG Lianzhou, ZHANG Qiaozhi, LI Yang, et al. Ultrafiltration recovery of skim protein from enzyme-assisted aqueous extraction process of soybean and its functional properties[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(2): 327-334. (in Chinese)
- 3 CAMPBELL K A, GLATZ C E, JOHNSON L, et al. Advances in aqueousextraction processing of soybeans[J]. Journal of American Oil Chemist Society, 2011, 88: 449-465.
- 4 YIN S W, TANG C H, CAO J S, et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate[J]. Food Chemistry, 2008, 106(3): 1004-1013.
- 5 LIU B Y, ZHU K X, PENG W, et al. Effect of sequential hydrolysis with endo- and exo-peptidase on bitterness properties of wheat

- gluten hydrolysates[J]. RSC Advances, 2016, 6(33): 27659–27668.
- 6 LI L, YANG Z Y, YANG X Q, et al. Debittering effect of actinomucor elegans peptidases on soybean protein hydrolysates[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(1): 41–47.
- 7 NIELSEN P M, PETERSE D, DAMBMANN C, et al. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642–646.
- 8 ADLER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- 9 LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680–685.
- 10 BIDLINGMEYER B A, COHEN S A, TARVIN T L, et al. A new, rapid, highsensitivity analysis of amino acids in food type samples[J]. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1987, 70(2): 241–247.
- 11 YANG B, YANG H, LI J, et al. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees [J]. Food Chemistry, 2011, 124(2): 551–555.
- 12 SUREWICZ W K, MANTSCH H H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Protein Structure and Molecular Enzymology, 1988, 952: 115–130.
- 13 MORR C V, GERMANE B, KINSELLA J E, et al. A collaborative study to develop a standardized food proteinsolubility procedure[J]. Journal of Food Science, 2010, 50(6): 1715–1718.
- 14 DOMBROWSKI J, DECHAU J, KUŁOZIK U. Multiscale approach to characterize bulk, surface and foaming behavior of casein micelles as a function of alkalisation [J]. Food Hydrocolloids, 2016, 57: 92–102.
- 15 STEVENSON D E, OFMAN D J, MORGAN K R, et al. Protease-catalyzed condensation of peptides as a potential means to reduce the bitter taste of hydrophobic peptides found in protein hydrolysates [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22(2): 100–110.
- 16 MEINLSCHMIDT P, SUSSMANN D, SCHWEIGGERT-WEISZ U, et al. Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties[J]. Food Science & Nutrition, 2016, 4(1): 11–20.
- 17 PLAIMEIN A, ELVIRAGONZALEZ D M. Purification, characterisation, and quantification of the soy allergen profilin (Gly m 3) in soy products[J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1671–1680.
- 18 葛文静. 大豆蛋白的低限度酶解改性及其苦味物质分析鉴定[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
GE Wenjing. Limited proteolysis of soy proteins and analysis and identification of the bitterness substances[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014. (in Chinese)
- 19 BARTH A. Infrared spectroscopy of proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Bioenergetics, 2007, 1767(9): 1073–1101.
- 20 NGUYEN J, BALDWIN M A, COHEN F E, et al. Prion proteinpeptides induce alpha-helix to beta-sheet conformational transitions[J]. Biochemistry, 1995, 34(13): 4186–4192.
- 21 龙国徽. 大豆蛋白的结构特征与营养价值的关系[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
LONG Guohui. Structural properties of soy protein and its relationship to the nutritional value[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- 22 ZHAO X, CHEN F, XUE W, et al. FTIR spectra studies on the secondary structures of 7S and 11S globulins from soybean proteins using AOT reverse micellar extraction[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(4): 568–575.
- 23 [美]菲尼玛 OR. 食品化学[M]. 2版. 王璋, 钟芳, 徐良增, 等, 译. 北京: 中国轻工业出版社, 1991.
- 24 ORTIZ S E M, WAGNER J R. Hydrolysates of native and modifed soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties[J]. Food Research International, 2002, 35(6): 511–518.
- 25 CALDERON DE LA BARCA A M, RUIZ-SALAZAR R A, JARA-MARINI M E. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties[J]. Journal of Food Science, 2010, 65(2): 246–253.
- 26 WU W U, HETTIARACHCHY N S, QI M. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1998, 75(7): 845–850.
- 27 王喜波, 王健, 张泽宇, 等. 物理改性对大豆蛋白柔性与乳化性的影响及其相关性分析[J/OL]. 农业机械学报, 2017, 48(7): 339–344. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20170743&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2017.07.043
WANG Xibo, WANG Jian, ZHANG Zeyu, et al. Effect of physical modification on flexibility and emulsifying property of soy protein and its correlation analysis[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(7): 339–344. (in Chinese)
- 28 ACHOURI A, WANG Z, XU S Y. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolate and effect of succinylation on the functional properties of resulting protein hydrolysates[J]. Food Research International, 1998, 31(9): 617–623.
- 29 KIM M R, KAWAMURA Y, KIM K M, et al. Tastes and structures of bitter peptide, asparagline-alanine-leucine-proline-glutamate, and its synthetic analoguess[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(14): 5852–5858.
- 30 LIU B Y, ZHU K X, GUO X N, et al. Changes in the enzyme-induced release of bitter peptides from wheat gluten hydrolysates [J]. RSC Advances, 2016, 6(104): 102249–102257.
- 31 MEINLSCHMIDT P, SCHWEIGGERT-WEISZ U, BRODE V, et al. Enzyme assisted degradation of potential soy protein allergens with special emphasis on the technofunctionality and the avoidance of a bitter taste formation[J]. LWT—Food Science and Technology, 2016, 68: 707–716.