

文章编号 :1009-038X(2002)06-0559-05

大豆蛋白质的酶促速凝

钟芳, 王璋, 许时婴

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要:测定了 6 种商品蛋白酶胶凝大豆蛋白质过程中体系粘弹性质的变化曲线,定量比较结果表明,木瓜蛋白酶(papain)和微生物蛋白酶(alcalase)具有较强的使大豆蛋白质胶凝的能力。Papain 的热和 pH 稳定性均优于 alcalase,因而更适用于用作速凝凝固剂。当 papain 的添加量为 0.05~0.133 g/dL 时,速凝形成的大豆蛋白凝胶强度随添加量的增加而增大,进一步增大 papain 用量会对大豆蛋白质的胶凝产生不利的影响,至添加量为 0.2 g/dL,速凝 1 min 后出现储能模量(G')值的急剧下落,最终导致反应后期不能形成凝胶。

关键词:大豆蛋白;蛋白酶;凝固剂;胶凝

中图分类号:Q 51

文献标识码:A

Instant Coagulation of Soy Protein by Proteinases

ZHONG Fang, WANG Zhang, XU Shi-ying

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Coagulability of six commercial proteinases to soy protein was compared quantitatively by dynamic viscoelastic measurements. Among the six proteinases, papain and alcalase were the most effective as a soy protein coagulant. Papain had higher thermal and pH stability than alcalase, and it is more suitable to be an instant coagulant. Increase of papain usage at the range from 0.05%~0.133% would be beneficial to form firmer soy protein gel instantly, but further increasing papain concentration would affect the gel strength adversely. When 0.2% papain was used as coagulant, sharply drop of G' value occurred 1 min after reaction started, and no gel was formed at the end.

Key words: soy protein; proteinase; coagulant; gelation

随着大豆优异的营养价值、功能性质以及生理活性越来越多地被认可和发掘,近年来大豆及大豆食品在全球范围内受到了广泛的关注。1999 年,美国 FDA 宣布了关于确认源自东方的黄豆能减少冠心病风险的“健康声明”,引发了开发和生产新的大豆食品的热潮^[1]。随着人们生活节奏的加快,方便

食品正日益成为现代食品工业的主流。然而,目前市场上还没有真正意义上的方便豆制品出售^[2]。豆腐是最大宗的豆制品,高的水分含量限制了传统豆腐的保质期。因此,制备这样一种能在开水冲调后迅速溶解继而在几分钟内凝固的方便豆腐粉应该是具有吸引力和市场前景的。制备方便豆腐粉的一

收稿日期 2002-07-12; 修订日期 2002-09-13.

基金项目 国家自然科学基金项目(20206011)江苏省自然科学基金项目(BK200269)资助课题.

作者简介 钟芳(1972-),女,河南新乡人,工学博士,副教授.

个困难在于采用传统的豆腐凝固剂,例如 CaCl_2 或葡萄糖酸内酯(GDL),凝固豆浆时一般都需要超过 30 min 的时间.20 世纪 70 年代,日本学者 UTAKA 和 FUKAZAWA 在研究中发现无花果蛋白酶(ficin)有使大豆蛋白质胶凝的能力^[3].1980 年,日本学者 FUKA 和 MATSUOKA 也报道菠萝蛋白酶(bromelain)可促使大豆蛋白质凝固^[4,5].1987 年,KATSUMI 首次报道了某些商品微生物蛋白酶制剂具有使大豆蛋白质胶凝的功效^[6],并采用评价凝乳酶活力的方法比较了多种商品蛋白酶制剂胶凝大豆蛋白质的能力,但实验中大豆蛋白溶液是否胶凝是以肉眼观察为标准的,以定性为主^[6,7].根据酶催化反应的一般原理,通过改变加酶量可以对酶反应速度进行有效的调控.因此,若能筛选出具有较高的促进大豆蛋白质胶凝活力的蛋白酶并能确定加速胶凝的酶用量,就有可能将其作为大豆蛋白质的速凝凝固剂.为定量地比较蛋白酶使大豆蛋白质凝结作用的强弱,研究中通过比较几种酶制剂与大豆蛋白溶液共存静置反应过程中体系流变性质的变化,寻找出能使大豆蛋白质胶凝的商品酶制剂,进而通过比较酶的热及 pH 稳定性,确定用作速凝凝固剂的适合蛋白酶以及合适的酶添加量.

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

脱脂大豆粉:黑龙江三江食品公司提供;葡萄糖酸内酯(GDL):常州瀚兴化工有限公司提供;木瓜蛋白酶:商品酶制剂,碱性蛋白酶(Alcalase)、复合风味蛋白酶(Flavourzyme)、中性蛋白酶(Nutrase)、复合蛋白酶(Protamax)、菠萝蛋白酶(Brominase),均为 Novo 公司产品,其它试剂均为分析纯.

AR1000 Rheometer 型流变仪:英国 TA Instrument 制造.

1.2 实验方法

1.2.1 大豆分离蛋白质的制备及预处理 以脱脂大豆粉为原料,采用碱提、酸沉淀的方法制备大豆分离蛋白质(SPI).调节 SPI 溶液的蛋白质质量浓度至 8 g/dL (pH 7.0).将 8 g/dL 的 SPI 溶液置于夹套反应器中,于 90 °C 保温 30 min,停止加热后迅速将已经预处理的 SPI 溶液倒入烧杯,将烧杯置于冰浴冷却至 10 °C 左右,再置于冰箱冷藏待用.

1.2.2 蛋白酶活力的测定 以酪蛋白为底物,采用分光光度法测定蛋白酶活力^[8],以 1 min 水解产生 1 μg 酪氨酸为 1 个酶活单位(U).

1.2.3 不同种类的蛋白酶使大豆分离蛋白质胶凝

能力的比较 分别取 2 mL 已预处理的 SPI 溶液(8 g/dL, pH 7.0)与 1 mL 新鲜配制的蛋白酶溶液混合.混合液中蛋白酶的质量浓度及酶活见表 1.将形成的混合液迅速加入流变仪的样品台进行流变性质测定.设定的参数如下:夹具 40 mm 平行板(使用油封和溶剂盖);样品间隙 500 μm ;加样量 0.6 mL;恒温 40 °C;时间 40 min;振荡扫描参数:角频率 12.5 r/s;应力 1.0 Pa.

表 1 蛋白酶-SPI 混合体系的组成

Tab.1 Final composition of SPI-proteinase mixture

混合体系	蛋白酶		SPI 质量浓度/ g/dL
	质量浓度/ g/dL	酶活/ (U/mL)	
SPI-碱性蛋白酶	0.074	10.0	5.33
SPI-菠萝蛋白酶	0.163	10.1	5.33
SPI-复合风味蛋白酶	0.411	10.2	5.33
SPI-中性蛋白酶	0.245	10.2	5.33
SPI-木瓜蛋白酶	0.100	10.2	5.33
SPI-复合蛋白酶	0.080	10.1	5.33

1.2.4 酶反应过程中体系 pH 值的变化 分别取 10 mL 已预处理的 SPI 溶液(8 g/dL, pH 7.0)与 5 mL 新鲜配制的蛋白酶溶液混合.混合液中各蛋白酶的质量浓度与 1.2.3 相同,混合的同时开始计时.将混合液置于 40 °C 的水浴中进行酶反应.在反应体系中插入 pH 计,记录 pH 的变化.

1.2.5 酸凝固剂诱发 SPI 凝结过程中凝胶强度与 pH 值的关系 取 2 mL 已预处理的 SPI 溶液(8 g/dL, pH 7.0)与 1 mL 新鲜配制的 GDL 溶液(1.2 g/dL)混合.形成的混合液迅速加入流变仪的实验平台进行流变性质测定.测定时除温度设定为 50 °C 外,其它测定条件如 1.2.3.同时按 1.2.4 的方法测定在 50 °C 条件下,上述 SPI-GDL 体系 pH 随时间的变化.

1.2.6 papain 及 Alcalase 的热失活曲线 配制质量浓度 1 g/dL 的 papain(或 Alcalase)溶液.分别取该酶液 2 mL 于 4 组试管中,试管用薄膜封口.各取 1 组试管分别置于 60、70、80 和 90 °C 的水浴中热处理,反应分别至 1、2、4、6、8 和 10 min 时取出 1 支试管放入冰浴中冷却.按 1.2.2 的方法测定经上述热处理后所得酶液的残余活力.以未经热处理的酶液的酶活力为 100%.

1.2.7 pH 值对 papain 和 Alcalase 活力的影响 配置不同 pH 值的酪蛋白底物溶液(质量浓度为 0.6 g/dL).控制 pH 分别为 5.8、6.1、6.4、6.7、7.0(采用 0.2 mol/L 的磷酸缓冲液配制).按 1.2.2 的方法

测定不同 pH 条件下 papain 和 Alcalase 的活力。

1.2.8 papain 用量对 SPI 速凝性质的影响 分别取 2 mL 已预处理的 SPI 溶液 (8 g/dL, pH 7.0) 与 1 mL 新鲜配制的 papain 溶液混合。混合液中 papain 的质量浓度分别为 0.05 g/dL, 0.067 g/dL, 0.1 g/dL, 0.133 g/dL, 0.167 g/dL 和 0.2 g/dL。将形成的混合液迅速加入流变仪的样品平台进行流变性质测定。测定条件如下: 夹具 40 mm 平行板 (使用油封和溶剂盖); 样品间隙 1 000 μm ; 振荡扫描程序: 升温扫描, 40 ~ 85 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 降温扫描, 85 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$, 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$; 振荡扫描参数: 角频率为 12.5 r/s; 应力为 1.0 Pa。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶凝固大豆蛋白质能力的比较

为比较蛋白酶使大豆蛋白质凝结作用的强弱, 测定了在相同酶活及用量条件下, 酶与大豆蛋白质反应过程中体系流变性质的动态变化。6 种蛋白酶的添加量及酶活见表 1, 酶作用于预处理 SPI 时的流变曲线见图 1, 反应至 40 min 后 SPI 凝胶的流变学性质及 pH 见表 2。

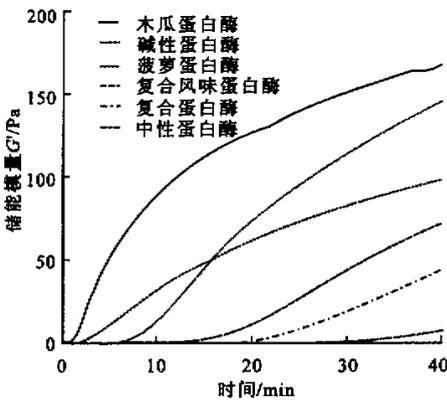


图 1 蛋白酶-SPI 体系流变性质 (G') 随时间的变化

Fig. 1 Dynamic viscoelastic profile of proteinase-SPI mixtures

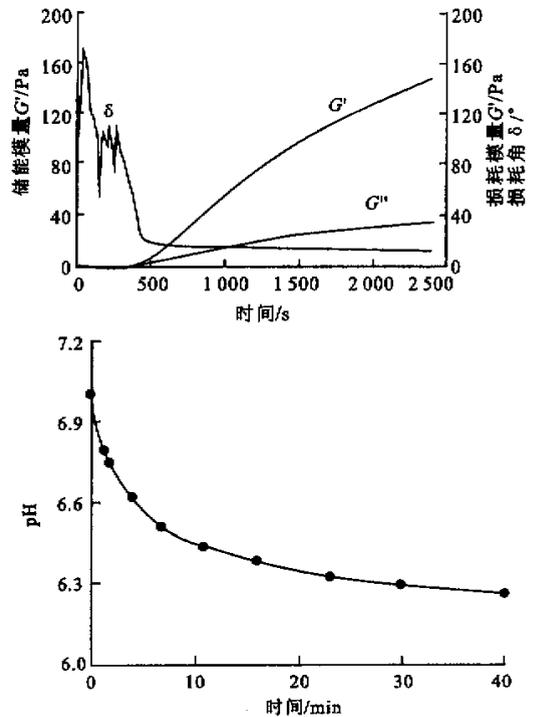
从表 2 的实验结果可以看出, 静置反应过程中 6 种蛋白酶的作用均可使体系损耗角下降, 反应后期体系的损耗角均小于 10° 。也就是说, 这 6 种蛋白酶都具有使大豆蛋白质发生胶凝的能力。比较图 1 中反应体系的 G' (储能模量) 数值可以发现, 在试用的 6 种蛋白酶当中, Alcalase 和 papain 促使大豆蛋白质形成的凝胶强度最高, 其次是 Brominase。因此, 商品酶制剂 Alcalase 和 papain 可以作为大豆蛋

白凝固剂。图 2 和图 3 所示是 Alcalase 和 papain 胶凝大豆蛋白质的动态流变曲线, 从中可以明显看出蛋白酶在几分钟的时间内使大豆蛋白质出现明显的胶凝, 图中同时示出了与胶凝过程对应体系的 pH 的变化。

表 2 蛋白酶作用 40 min 后 SPI 凝胶的性质

Tab.2 The SPI Gel Properties after 40 min, Following the Addition of Proteinase

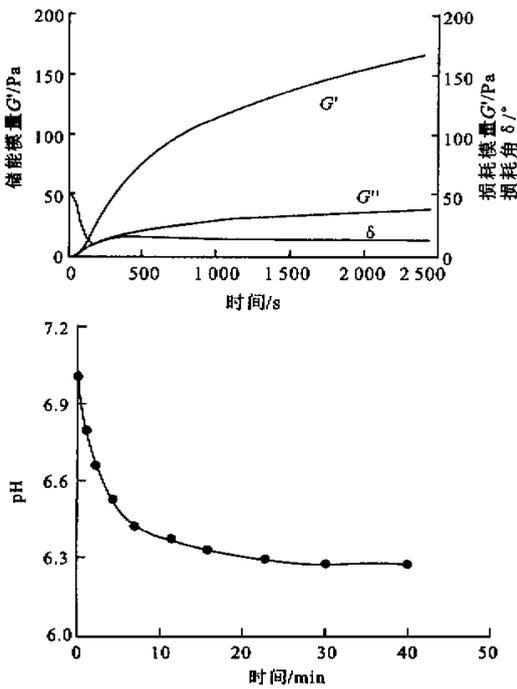
混合体系	储能模量 G'/Pa	损耗模量 G''/Pa	损耗角 $\delta/^{\circ}$	pH
SPI-碱性蛋白酶	148.0	33.8	12.9	6.27
SPI-菠萝蛋白酶	99.0	22.5	12.7	6.25
SPI-复合风味蛋白酶	75.0	15.7	11.9	6.25
SPI-中性蛋白酶	8.1	1.7	12.0	6.32
SPI-木瓜蛋白酶	171.0	39.6	13.0	6.32
SPI-复合蛋白酶	45.0	8.6	10.8	6.32



40 $^{\circ}\text{C}$, Alcalase 0.074 g/dL

图 2 Alcalase-SPI 体系流变性质随时间的变化

Fig.2 Dynamic viscoelastic profile and pH profile of Alcalase-SPI mixture



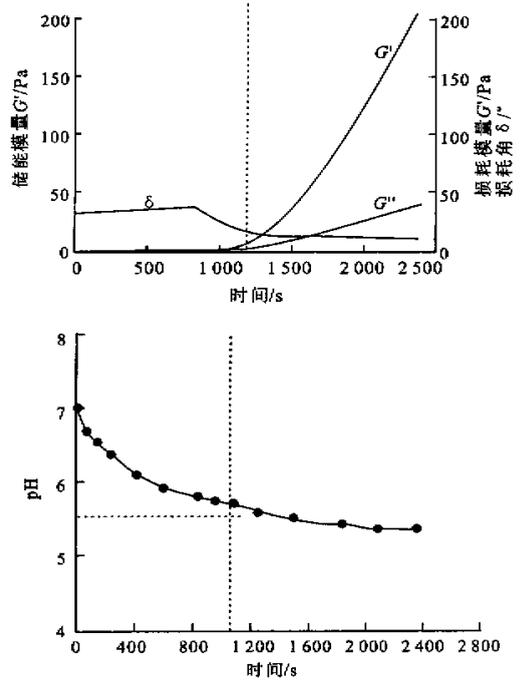
40 °C,木瓜蛋白酶的质量浓度为 0.1 g/dL

图 3 papain-SPI 体系流变性质随时间的变化

Fig.3 Dynamic viscoelastic profile and pH profile of Papain -SPI mixture

蛋白酶水解蛋白质的同时具有使体系 pH 下降的趋势, pH 值下降的程度一方面可以反映蛋白质的水解程度^[9],另一方面同使用酸凝固剂一样, pH 的下降本身就有促进大豆蛋白质胶凝的作用^[10]. 为考察 6 种蛋白酶促使大豆蛋白质胶凝能力的强弱是否是因为水解程度和体系 pH 下降程度的差异而造成的, 试验中同时检测了在相同条件下酶-SPI 体系 pH 的变化. 从表 2 可以看出, 体系 pH 变化幅度基本相同, 这说明在试验选定的酶反应条件下, 6 种蛋白酶水解大豆蛋白质的能力相当, 同时也说明在试验条件下, 体系 pH 的下降并非大豆蛋白质胶凝的主要原因. 为进一步考察体系 pH 下降对大豆蛋白质胶凝贡献的大小, 试验中测定了以酸凝固剂 (GDL) 为凝固剂时, 大豆蛋白质体系流变参数与 pH 的关系, 试验结果如图 4 所示. 可以看出, 对于单纯由酸引发的大豆蛋白质胶凝, 只有当体系的 pH 值降至 5.6 时才出现体系 G' 的显著上升, 即蛋白质的胶凝才刚刚开始. 而如图 2、图 3 所示, 在 papain 和 Alcalase 的作用下大豆蛋白质已经显著胶凝时, Alcalase-SPI 和 papain-SPI 体系的 pH 值分别下降到 6.5 和 6.74 左右, 这就更加确定了蛋白酶使大豆蛋白质胶凝的机理是不单纯依赖于水解过程

中体系 pH 值的下降, 但不排除 pH 下降对大豆蛋白质胶凝的辅助作用. 不同蛋白酶胶凝大豆蛋白质能力的强弱应来源于其底物特异性, papain 和 Alcalase 水解大豆蛋白质的模式可能更有利于肽链间形成交联网络结构.



50 °C,葡萄糖酸内酯质量浓度为 0.4 g/dL

图 4 GDL-SPI 体系流变性质随时间的变化

Fig.4 Dynamic viscoelastic profile and pH profile of GDL -SPI mixture

2.2 papain 和 Alcalase 的 pH 和热稳定性

蛋白酶具有促使大豆蛋白质胶凝并形成较高强度凝胶的能力, 是其作为大豆蛋白速凝固剂的必要前提. 此外, 鉴于速凝时开水冲调的高温条件, 作为速凝固剂还应具有高的热稳定性, 否则就需加大用量以保证热失活后残余的酶活仍能满足促使大豆蛋白质胶凝的需要. 但从经济的角度讲, 高的酶用量显然是不合适的. Alcalase 和 papain 的热失活曲线分别见图 5 和图 6. 从图中所示结果看, papain 的热稳定性远远优于 Alcalase, 90 °C 热处理 10 min 后仍保留有 49.1% 的残余活力, 而 Alcalase 在 80 °C 受热 2 min 后其活力仅残存 50.2%.

在速凝过程中蛋白酶-大豆蛋白体系的 pH 是下降的, 因此, 若使用的蛋白酶在广泛的 pH 范围内能保持较高的酶活力, 则速凝时可使用低的添加量而形成强度高的大豆蛋白凝胶. 在不同 pH 条件下, Alcalase 和 papain 的相对酶活力列于表 3. 从表中数

据来看,在酶促大豆蛋白质胶凝时的 pH 变化范围内,papain 的活力随 pH 下降基本呈现持续升高趋势,仅在 pH 5.8 时有小幅回落.而 Alcalase 的活力则随 pH 下降而逐渐下降,至 pH 5.8,其活力已下降至 pH 7.0 时的 51.7%.

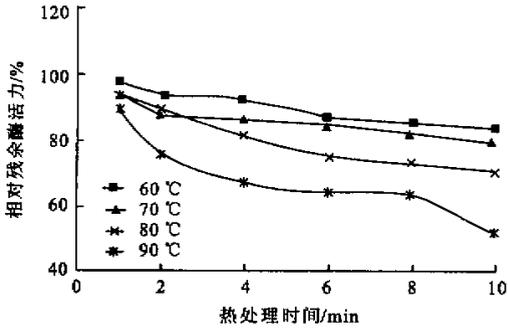


图 5 Papain 的热失活曲线

Fig.5 Residual activity profiles of papain

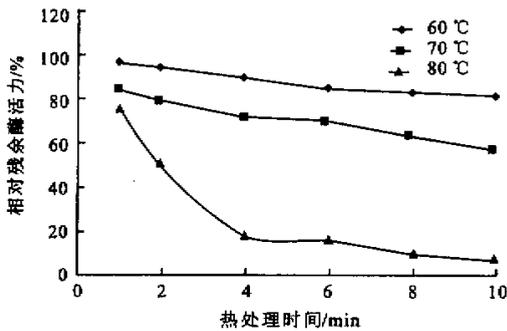


图 6 Alcalase 的热失活曲线

Fig.6 Residual activity profiles of Alcalase

表 3 不同 pH 下 papain 和 Alcalase 的相对活力(以 pH 7.0 时的活力记做 100%)

Tab.3 Relative activity of Papain and Alcalase at different pH

反应体系 pH 值	酶的相对活力/%	
	木瓜蛋白酶	碱性蛋白酶
7.0	100	100
6.7	109	92.7
6.4	114	78.1
6.1	119	64.8
5.8	110	51.7

综上所述,无论是就热稳定性还是 pH 稳定性而言,papain 都比 Alcalase 更适合于用作大豆蛋白质的速凝凝固剂.

2.3 papain 用量对大豆蛋白质速凝特性的影响
在模拟开水冲调后温度变化的条件下,试验中

测定了采用不同 papain 用量时大豆蛋白质的速凝特性曲线.从图 7 可以看出,当酶的质量浓度在 0.05~0.133 g/dL 的范围内时,papain-SPI 体系的 G' 值都随速凝时间的延长而上升,且随着 papain 加入量的增大,G' 增加的幅度也上升.当 papain 用量增大到质量浓度为 0.167 g/dL 时,速凝初期体系的 G' 值仍高于低 papain 用量时的数值,但反应后期其 G' 值低于 papain 用量为 0.133 g/dL 的情况.当 papain 用量进一步增大到质量浓度为 0.2 g/dL 时,体系的 G' 值呈现先上升后下降的变化趋势,反应 1 min 后就出现 G' 值的急剧下落,最终导致反应后期不能形成凝胶.高 papain 用量对大豆蛋白质胶凝的不利影响可能是高温高酶活条件下大豆蛋白质水解速度太快,使得大豆蛋白质及其水解产物在形成凝胶网络结构前已被过度水解,这对大豆蛋白质的胶凝显然是极为不利的.

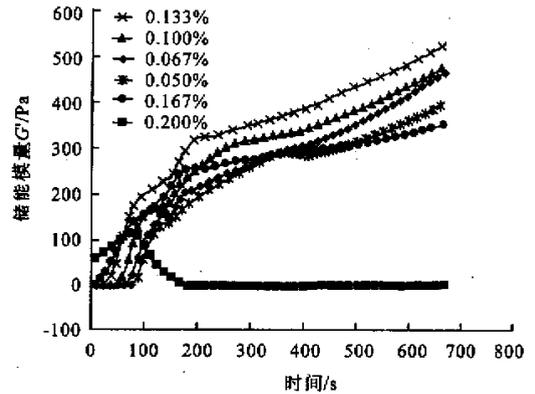


图 7 不同 papain 用量 SPI 的速凝特性曲线

Fig.7 Instant coagulation profiles of Papain-SPI mixture at different Papain usage levels

3 结 语

综上所述,实验中所试用的 6 种蛋白酶水解大豆蛋白质的能力相当,但其中 papain 和 Alcalase 具有较强的使大豆蛋白质胶凝的能力.从酶在静置反应过程中体系 pH 变化曲线与 GDL 凝固大豆蛋白质时的 pH 变化曲线的比较可以看出,酶促胶凝过程中单纯依靠体系 pH 的下降还不足以使大豆蛋白质胶凝.鉴于 papain 具有远优于 Alcalase 的 pH 和热稳定性,因而更适宜用作速凝凝固剂.高的 papain 用量有助于形成强的大豆蛋白速凝凝胶,但 papain 添加量过大反而会对凝胶强度产生不利影响.在适宜的 papain 用量下,大豆蛋白质可在 3 min 内形成具有一定强度的凝胶.

参考文献:

- [1] 丁一庆. 双歧杆菌活菌粉剂的研究[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1998.
- [2] 曹永梅. 微胶囊双歧杆菌的研究[D]. 无锡: 无锡轻工大学, 1998.
- [3] 姚卫蓉, 姚惠源. 多孔淀粉的研究之 I 酶和原料粒度对形成多孔淀粉的影响[J]. 中国粮油学报, 2001, 16(1): 36-38.
- [4] 张明, 苏丽明, 马天良等. 非厌氧下 HJ9211 冻干双歧杆菌的存活特性[J]. 华东理工大学学报, 1999, 25(1): 36-38.

(责任编辑 李春丽)

(上接第 563 页)

参考文献:

- [1] FUKUSHIMA D. Review: Recent progress in research and technology on soybeans[J]. **Food Sci Technol Res**, 2001, 7(1): 8-16.
- [2] PSZCZOLA D E. Soy: why it 's moving into the mainstream[J]. **Food Tech**, 2000, 54(9): 76-86.
- [3] UTAKA K, FUKAZAWA C. Gelation mechanism of soybean proteins treated by ficir[A]. Repot of the 39th Daizu Shokushi Kaihatus Kenkyukai, Toyko, 1976.
- [4] FUKU Y, MASAKATSU S, MSTSUOKA H. Coagulation of soy milk by proteolytic enzyme treatment[J]. **J Jap Soc Food Sci Technol**, 1980, 27: 275-279.
- [5] FUKU Y, SEKIGUCHI M, MSTSUOKA H. Nature of stem bromelain treatments on the aggregation and gelation of soybean protein[J]. **J Food Sci**, 1985, 50: 1283-1288.
- [6] MURATA K, KUSAKABE I, KOBAYASHI H. Studies on the coagulation of soymilk-protein by commercial proteinase[J]. **Agric Biol Chem**, 1987, 51: 385-388.
- [7] ARIMA K, IWASAKI S, TAMURA G. Milk clotting enzyme from microorganism[J]. **Agric Biol Chem**, 1967, 31: 540-545.
- [8] GODFEREY T, REICHEL T. Industrial Enzymology- the application of enzymes in industry[M]. New York: Macmillan Publishers Ltd, 1983. 553-554.
- [9] WHITKER J R. Principles of enzymology for the food science[M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1972, 511-541.
- [10] KOHYAMA K, SANO Y, DOI E. Rheological characteristics and gelation mechanism of Tofu (Soybean Curd)[J]. **J Agric Food Chem**, 1995, 43: 1808-1812.

(责任编辑 杨萌)