

文章编号:1673-1689(2005)03-0001-07

木瓜蛋白酶中主要组分凝固大豆蛋白的特性

杨欣, 钟芳, 麻建国

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214036)

摘要: 采用 SP-Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱分离木瓜蛋白酶得到木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶, 测定了两种酶在不同条件下凝固大豆蛋白质过程中体系粘弹性质的变化曲线和水解进程曲线。结果表明 20 ℃ 下体系形成的凝胶比 40 ℃ 下形成的稳定, 而且体系在低温下形成凝胶所用的酶活力比高温下所用的低; 木瓜凝乳酶-SPI 体系比木瓜蛋白酶-SPI 体系形成凝胶所需酶活力低, 且最终形成凝胶强度高, 说明木瓜凝乳酶促凝 SPI 效果比木瓜蛋白酶好。两种酶凝固大豆蛋白的机理和作用方式存在区别。

关键词: 大豆蛋白; 木瓜凝乳酶; 木瓜蛋白酶; 凝胶

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

Mechanism of Chymopapain and Papain Treatment on the Gelation of Soybean Protein Isolate

YANG Xin, ZHONG Fang, MA Jian-guo

(The Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Papaya proteinases was separated by Ion-exchange support: SP-Sepharose Fast Flow. The coagulability of chymopapain and papain to soy protein isolate was investigated by dynamic viscoelastic measurements and determination of hydrolyzing degree. The gel formed in lower temperature is better than that formed in higher temperature, and the enzyme usage level of the former is lower than that of the later. This facts may be due to the coordination between the rate of hydrolysis and the unfolding degree of protein molecular. Further analysis indicated the cogulability of chymopapain is better than that of papain, meaning the mechanism of the two proteinases are different.

Key words: soy protein; chymopapain; papain; gelation

蛋白酶促进大豆蛋白形成凝胶的现象很早就已经发现了。据文献报道, 一些蛋白酶具有使豆乳凝固的能力, 不同的蛋白酶可能存在不同程度的肽键选择特异性, 其作用结果也各不相同^[1]。木瓜蛋白酶便是一种可以促使大豆蛋白质凝固的蛋白酶。

由木瓜乳胶提取粗制酶, 除含有木瓜蛋白酶外, 还含有半胱氨酸蛋白酶、纤维素酶、溶菌酶、谷氨酰胺以及低相对分子质量的巯基化合物, 还有葡萄糖酶等^[2]。其中大部分都是巯基蛋白酶, 主要的两种组分是木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶。在乳胶酶

收稿日期: 2004-09-03; 修回日期: 2005-03-14。

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

作者简介: 杨欣(1981-), 女, 江西南昌人, 食品科学与工程硕士研究生。

万方数据

中,木瓜凝乳酶质量分数约为45%,等电点为8~9;木瓜蛋白酶质量分数约为10%左右,等电点在10以上;其他成分包括木瓜肽酶等。由于两种酶等电点的不同,在近中性条件下进行阳离子交换柱层析,可以将它们分开。

由于木瓜蛋白酶的组成比较复杂,各组分凝固大豆蛋白的机理不可一概而论。作者采用阳离子交换柱分离了商品木瓜蛋白酶(papaya enzymes),得到木瓜凝乳酶(chymopapain)和木瓜蛋白酶(papain)两种主要成分,分别测定了它们在不同浓度和不同温度下凝固大豆蛋白的流变曲线以及水解度,比较了两种酶促大豆蛋白形成凝乳过程的差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

脱脂豆粉:东北产;木瓜蛋白酶(papain):广州裕立宝酶制剂公司;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS):Sigma公司产品。

1.2 主要实验仪器

流变仪 AR1000 Rheometer:美国TA仪器公司产品;数控低温超级恒温水浴:上海天平仪器厂生产;冷冻离心机:上海安亭科学仪器厂产品;LGI-10冷冻干燥机:北京四环科学仪器厂生产。

1.3 实验方法

1.3.1 水解酶活的测定(采用福林酚法) 以酪蛋白为底物,采用分光光度法测定蛋白酶活力,以1 min水解产生1 μ g酪氨酸为1个酶活单位(U)^[4]。

1.3.2 凝乳酶活的测定(采用 Arima 方法) 取5 mL鲜乳,在40℃下保温5 min,加入0.5 mL 10 g/L酶液,迅速混合均匀,准确记录从加入酶液到乳凝固的时间(s)。把40℃凝固1 mL 100 g/L的鲜乳的酶量定义为一个索氏单位(Soxhlet unit)。1SU = $\frac{5(\text{mL}) \times 2400(\text{s})}{0.5(\text{mL}) \times t \times D}$, t 是凝乳时间, D 是稀释倍数^[5]。

1.3.3 流变曲线的动态测定 取2 mL已经热处理的样品(7%, pH 7.0)加入1 mL木瓜蛋白酶溶液,配制含4.67%大豆分离蛋白的溶液,搅拌均匀。将混合液迅速加入流变仪的样品台进行流变性质的测定。设定的参数如下:夹具为40 mm平行板(使用油封和溶剂盖),样品间隙为1 000 μ m,加样量为0.6 mL,恒温40℃(或指定温度),时间为60 min(可延长),振荡扫描参数为角频率12.5 r/s,应力1.0 Pa^[6]。

1.3.4 水解度的测定(TNBS法) 按一定浓度混合2 mL 10% SDS溶液和10 mL酶液,倒入用超级恒温

水浴控温的50 mL酶反应器中,静置反应。每隔一定时间后取出1 mL反应液加入3 mL SDS溶液(1%, 70℃)中振荡均匀,并在70℃下保温30 min,作为水解液。将水解液稀释至一定倍数后即为待测液。吸取0.1 mL待测液加入2 mL磷酸盐缓冲液(pH 8.2)中,在50℃下保温5 min后加入1 mL TNBS溶液(2%),混匀后避光反应1 h后加入4 mL盐酸溶液终止显色反应。静置半小时后,在340 nm下测定吸光度,对照标准曲线求得水解度(DH%)^[8]。

1.3.5 脱脂豆粉制备大豆分离蛋白(SPI) 方法同参考文献[7]。

1.3.6 大豆蛋白预处理 用去离子水配SPI得含大豆蛋白浓度为7 g/dL的大豆蛋白溶液(pH 7.0),用磁力搅拌器混合溶解后倒入酶反应器中,控温95℃,并不断用磁力搅拌器搅拌使其均匀受热,预处理30 min后迅速冷却,放入冰箱中待用。

1.3.7 木瓜蛋白酶和木瓜凝乳酶的提取分离

1) 冷冻离心 将25 g木瓜蛋白酶制剂溶于100 mL起始缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.5磷酸缓冲液)中,4℃条件下7 200 r/min进行冷冻离心,除去大分子杂质。

2) 超滤 将冷冻离心后的澄清酶液用截留相对分子质量3 000的超滤膜在4℃层析柜内通氮气超滤浓缩,除去小分子杂质。

3) SP Fast Flow 阳离子制备柱分离木瓜蛋白酶和木瓜凝乳酶 浓缩酶液经已用起始缓冲液平衡好的SP Fast Flow 阳离子制备柱(46 mm × 100 mm)分离,体积流量60 mL/h,用200 mL磷酸缓冲液(0.01 mol/L pH 8.0)洗柱后,再用1 000 mL 0~1.0 mol/L NaCl(0.01 mol/L pH 7.5磷酸缓冲液)梯度洗脱。紫外检测仪在280 nm处检测到蛋白峰的出现,检测洗脱液蛋白酶活。

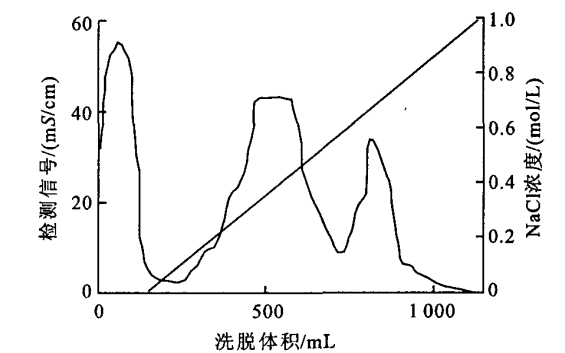
4) 超滤和冷冻干燥 收集有效部分,在4℃层析柜内进行超滤(超滤膜截留相对分子质量为3 000),超滤至一定体积后冷冻干燥制成粉剂,再分别测定水解酶活和凝乳酶活后待用。

2 结果与讨论

2.1 木瓜蛋白酶主要组分的分离

木瓜蛋白酶和木瓜凝乳酶的等电点不同,但都偏碱性,在近中性条件下进行阳离子交换柱层析可以把它分开。因本实验的目的是为了研究分离后的各组分的凝固大豆蛋白的性质,用量较大,故使用了处理量较大的SP Fast Flow制备柱^[3]。图1为

洗脱色谱图.



进样量:25 g;起始缓冲液:0.01 mol/L 磷酸缓冲液 pH 7.5;梯度洗脱液:0~0.8 mol/L NaCl 溶液(0.01 mol/L 磷酸缓冲液 pH 8.0);体积流量:60 mL/h;检测波长:280 nm

图 1 SP-Sepharose Fast Flow 分离木瓜蛋白酶洗脱色谱图

Fig.1 Ion-exchange chromatography of the papaya enzymes on SP-Sepharose Fast Flow

收集峰 1,测定其蛋白水解酶活极低,大部分为杂质.收集峰 2、峰 3,在 4 ℃ 层析柜内进行超滤(超滤膜分子截流量:3 000),超滤至一定体积后冷冻干燥得酶 1(峰 2)、酶 2(峰 3).分别测定酶 1、酶 2 的蛋白水解酶活和凝乳酶活,结果列于表 1.从表 1 中可以看出两种酶都有蛋白水解酶活.酶 1 具有较大凝乳酶活,而酶 2 几乎没有凝乳酶活.酶 1 可能大部分是木瓜凝乳酶,酶 2 则可能大部分为木瓜蛋白酶.

表 1 木瓜蛋白酶分离前后酶活数据
Tab.1 The enzyme activity of papaya proteinases

酶样品	水解酶活/ (U/g)	凝乳酶活/ (U/g)
进样木瓜蛋白酶	91 665	11 704
酶 1	73 019	19 221
酶 2	70 625	0

2.2 凝胶过程的动态流变物性研究

蛋白质凝胶的形成大致包括两个阶段,蛋白质分子首先发生构象改变或部分变性,接着单个变性的蛋白质分子逐渐联结,粘度以指数上升,开始呈现弹性固体性质^[9].可以通过测量体系流变学性质的变化来观察凝胶点^[10].

2.2.1 酶活力对凝胶速度和凝胶强度的影响 图 2、图 3 为 20 ℃ 下添加不同浓度的木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶时体系的动态流变曲线,形成凝胶的时间和 G 值分别如表 2、3 所示.图 4 和图 5 为 40 ℃ 下添加不同浓度的木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶时体系的动态流变曲线,形成凝胶的时间和 G 值分别如表 4 和表 5 所示.图中酶活力均用酶活力(U/mL)表示,万方数据

酶活力可通过相应温度下得酶活数据换算到酶质量浓度,20 ℃ 和 40 ℃ 下的酶活数据列于表 6 中.

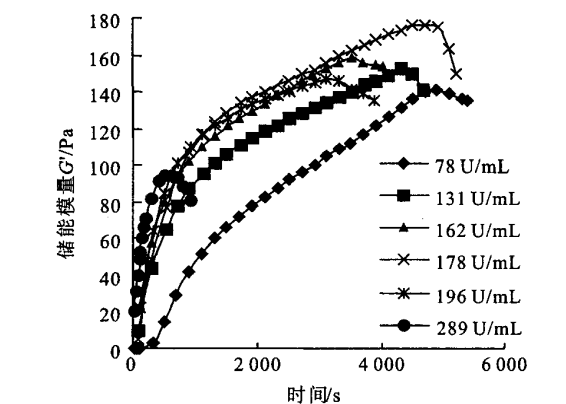


图 2 20 ℃ 时不同木瓜凝乳酶用量的 SPI 体系流变性质 G 随时间变化

Fig.2 Dynamic viscoelastic profile of chymopapain-SPI mixture at different chymopapain usage levels at 20 ℃

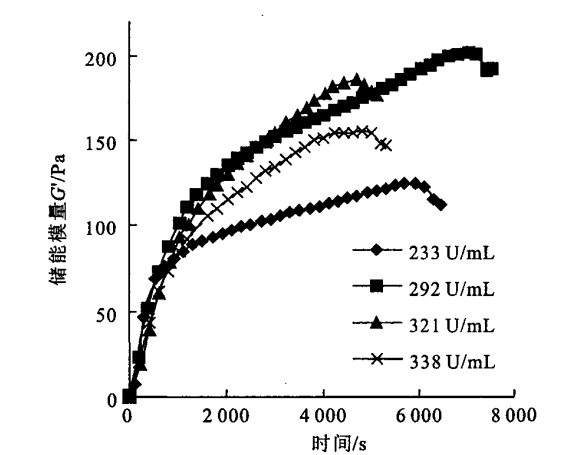


图 3 20 ℃ 时不同木瓜蛋白酶用量的 SPI 体系流变性质 G 随时间变化

Fig.3 Dynamic viscoelastic profile of papain-SPI mixture at different papain usage levels at 20 ℃

表 2 20 ℃ 不同木瓜凝乳酶用量的 SPI 体系形成凝胶时间和 G 最大值

Tab.2 The Gel Properties of chymopapain-SPI mixture at different chymopapain usage levels at 20 ℃

蛋白酶活力/ (U/mL)	时间/ s	G 最大值/ Pa
78	4 878	142.7
131	4 376	152.9
162	3 529	158.8
178	4 648	176.9
196	3 238	147.2
289	585	95.07

表 3 20 ℃ 不同木瓜蛋白酶用量的 SPI 体系形成凝胶时间和 G 最大值

Tab. 3 The Gel Properties of papain-SPI mixture at different papain usage levels at 20 ℃

蛋白酶活力/ (U/mL)	时间/ s	G 最大值/ Pa
233	5 891	125.5
292	7 046	202.1
321	4 691	185.7
338	4 677	155.9

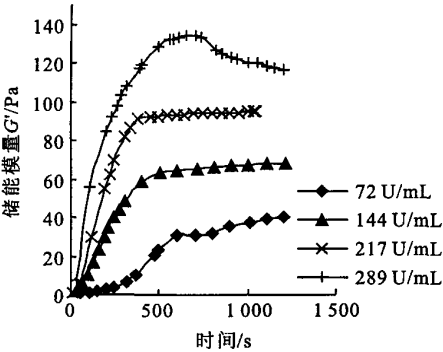


图 4 40 ℃ 时不同木瓜凝乳酶用量的 SPI 体系流变性质 G 随时间变化

Fig. 4 Dynamic viscoelastic profile of chymopapain-SPI mixture at different chymopapain usage levels at 40 ℃

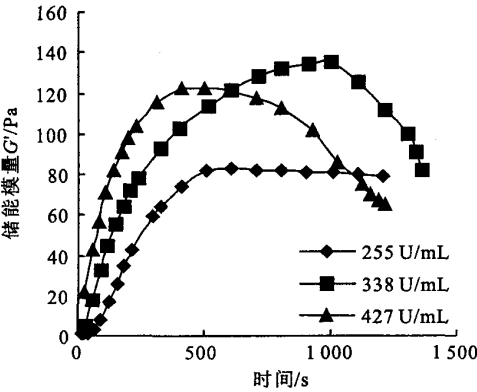


图 5 40 ℃ 时不同木瓜蛋白酶用量的 SPI 体系流变性质 G 随时间变化

Fig. 5 Dynamic viscoelastic profile of papain-SPI mixture at different papain usage levels at 40 ℃

在相同温度情况下，酶活力较低时体系形成凝胶的速度（以 G 上升速度和 G' 达到最大值的时间长短表示）较慢，形成的凝胶强度（以 G' 最大值表示）也较低；酶活力适中时，酶活力越大，G' 上升速度越

快，体系最终达到的 G' 最大值越高；但当酶活力达到很高，G' 迅速达到最大值就立刻下降，体系形成的凝胶强度不高或难以形成凝胶。所以，只有当酶活力适中时，形成的凝胶强度才能达到最大。其原因可能是因为当酶活力较小时，反应过慢，最终的水解程度太低，大豆蛋白还未达到形成凝胶的最佳展开程度，虽然能形成凝胶，但强度不够高；当酶活力过大时，则反应速度过快，展开的大豆蛋白还来不及形成凝胶就已经降解成短肽了，不能形成很好的凝胶；而在酶活力适中时，水解速度和大豆蛋白展开形成凝胶的速度相适应，形成凝胶比较好。

表 4 40 ℃ 时不同木瓜凝乳酶用量的 SPI 体系形成凝胶时间和 G 最大值

Tab. 4 The Gel Properties of chymopapain-SPI mixture at different chymopapain usage levels at 40 ℃

蛋白酶活力/ (U/mL)	时间/ s	G 最大值/ Pa
72	2 983	51.88
144	1 194	68.01
217	1 050	94.9
289	677	133.8

表 5 40 ℃ 不同木瓜蛋白酶用量的 SPI 体系形成凝胶时间和 G 最大值

Tab. 5 The Gel Properties of papain-SPI mixture at different papain usage levels at 40 ℃

蛋白酶活力/ (U/mL)	时间/ s	G 最大值/ Pa
255	570	83.37
338	442	122.9
427	966	135.6

对比不同温度下酶活力比较适中的体系的动态流变曲线可以看出，在 20 ℃ 时，不同酶活力的体系在反应初期 G' 上升的速度差别不大，而到了后期才出现差别，酶活力较低的体系上升速度变慢，较大的体系则反之；而在 40 ℃ 时，不同酶活力的体系从反应一开始就表现出形成凝胶速度的明显差异，活力越大，G' 上升越快。可见温度对凝胶形成速度影响比较大，一方面温度影响到酶活力，另一方面温度高可能有助于内部分子的快速展开，即使是酶活力相同（酶质量浓度不同，因为不同温度下酶活大小不同），在高温下形成凝胶的速度也会更快，这一点在后面会讨论。所以，在 20 ℃ 时，加大酶活力也很难提高凝胶的形成速度，而在 40 ℃ 时，酶活力稍

有加大,凝胶的形成速度就会明显提高.但在将各条曲线达到 G' 最大值的时间和 G' 最大值的数值对比后又发现,40 ℃ 时的体系 G' 达到最大值的时间虽然较短, G' 最大值却比较小,20 ℃ 时的体系则反之.这可能是因为 40 ℃ 时凝胶形成虽然快,但酶解速度也很快,并且体系中分子运动太快,形成凝胶不稳定,凝胶体系很快就解散了.而且很明显的是,20 ℃ 时体系的 G' 值上升时间比较长而且达到最大后还维持了比较长的时间才开始下降,而 40 ℃ 时体系的 G' 迅速达到最大值后很快就降下来了,可见温度低时形成的凝胶比温度高时形成的凝胶稳定.

对木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶促凝大豆蛋白过程的动态流变曲线的分析表明,虽然木瓜蛋白酶不具凝乳酶活性,但仍然可以促凝大豆蛋白,不过形成与木瓜凝乳酶促凝体系相应强度的凝胶所需的酶活力更高,加酶量更大.而且,对比 G' 上升的时间和达到最大值后稳定的时间可以看出,20 ℃ 下添加两种酶的体系形成凝胶稳定性差异还不是很大,而 40 ℃ 下添加木瓜蛋白酶的体系显然不如添加木瓜凝乳酶的体系形成的凝胶稳定.所以从形成凝胶所需酶活力大小以及凝胶的稳定性来看,木瓜凝乳酶确实比木瓜蛋白酶促进大豆蛋白形成凝胶的能力强.

2.2.2 温度对酶活的影响 温度不但影响体系中蛋白分子的展开等因素,主要还影响到酶活.为了讨论不同温度下体系形成凝胶情况的差异,首先保证各个温度下的体系中酶活力(U/mL)应该一致才能去除由于酶活力差别引起的凝胶速度等方面的差异.所以先测定了不同温度下木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶的酶活力,数据见表 6.不同温度下木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶的 SPI 体秒形成凝胶时间和 G' 最大值见表 7,8.

表 6 不同温度下木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶的酶活数据
Tab. 6 The enzyme activity of chymopapain and papain at different temperature

温度/ ℃	酶活力/(U/g)	
	木瓜凝乳酶	木瓜蛋白酶
20	19 650	18 316
30	34 751	37 253
40	73 019	70 625
45	95 157	102 425

表 7 木瓜凝乳酶-SPI 体系在不同温度时形成凝胶时间和 G' 最大值

Tab. 7 The Gel Properties of chymopapain-SPI mixture at different temperature

温度/ ℃	蛋白酶活力/ (U/mL)	酶质量浓度/ (mg/mL)	时间/ s	G' 最大值/ Pa
20	289	14.71	585	95.07
30	—	8.32	757	124.4
40	—	3.96	677	133.8
45	—	3.04	293	126.2

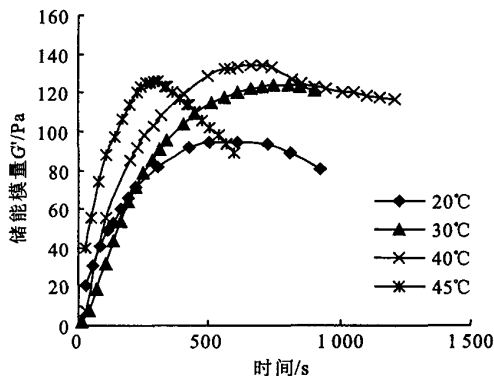
表 8 木瓜蛋白酶-SPI 体系在不同温度时形成凝胶时间和 G' 最大值

Tab. 8 The Gel Properties of papain-SPI mixture at different temperature

温度/ ℃	蛋白酶活力/ (U/mL)	酶质量浓度/ (mg/mL)	时间/ s	G' 最大值/ Pa
20	338	18.45	4777	155.9
30	—	9.07	3598	155.3
40	—	4.79	1000	135.6
45	—	3.30	517	126.4

从图 6 和图 7 可以看出,在酶活力相同情况下,温度越高, G' 值上升速度越快,达到最大值的时间越短,但 G' 最大值越小,而且下降的很快.其原因可能是温度高时,大豆蛋白分子展开较快,利于蛋白酶的水解作用,内部疏水键暴露也较快,可以迅速相互交联而形成凝胶.但又由于温度较高,分子运动速度加快,形成的凝胶不够稳定,所以 G' 最大值不及低温下形成的凝胶好.木瓜凝乳酶 20 ℃ 时的情况是一个例外,这可能是因为 289 U/mL 的酶活力对于 20 ℃ 下木瓜凝乳酶促凝大豆蛋白凝胶体系太高了,在图 2 中酶活较低的体系形成凝胶的 G' 最大值还是大于其他温度下形成的凝胶.由此也可以推断低温下形成凝胶体系所需的酶活力比高温下要低.其原因可能是形成凝胶过程中,酶水解大豆蛋白的速度和体系内蛋白分子展开交联的速度需匹配.在低温下,如果酶水解的速度和高温下相同(酶活力一样),但蛋白分子展开交联的速度不够快,可能很容易就在未展开的时候局部水解成多肽而不能形成很好的凝胶.如果在低温的条件下降低酶活力,则酶的水解作用放缓,蛋白分子可以慢慢展开,这样内部疏水键、巯基等基团可以在分子还未水解成多肽的情况下形成交联网状结构.而且整个作用过程速度比较慢,形成的凝胶也会比较稳定.

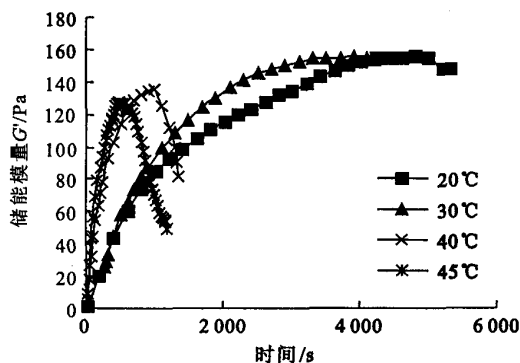
对比图6和图7可以看出,虽然添加木瓜凝乳酶体系的酶活力比添加木瓜蛋白酶体系的低,但前者形成凝胶的时间更短,可以说明木瓜凝乳酶的促凝作用比木瓜蛋白酶强。



(酶活力:289 U/mL,大豆蛋白质量分数:4.67%)

图6 不同温度下木瓜凝乳酶-SPI体系流变性质G随时间变化

Fig. 6 Dynamic viscoelastic profile of chymopapain-SPI mixture at different temperature



(酶活力:338 U/mL,大豆蛋白质量分数:4.67%)

图7 不同温度下木瓜蛋白酶-SPI体系流变性质G随时间变化

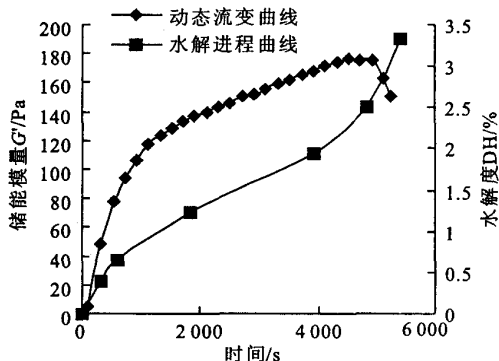
Fig. 7 Dynamic viscoelastic profile of papain-SPI mixture at different temperature

2.3 酶的水解物性的实验研究

参考相同温度下添加不同酶活力的木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶的体系的动态流变曲线,分别选取20℃和40℃下木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶形成凝胶的最佳添加酶活力体系,测定相同条件下相应的水解进程曲线.20℃下木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶促凝大豆蛋白的最佳酶活力分别为178 U/mL和292 U/mL,其动态流变曲线和水解进程曲线如图8,9所示;40℃下木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶促凝大豆蛋白的最佳酶活力分别为289 U/mL和338 U/mL,其动态流变曲线和水解进程曲线见图10和图11.

万方数据

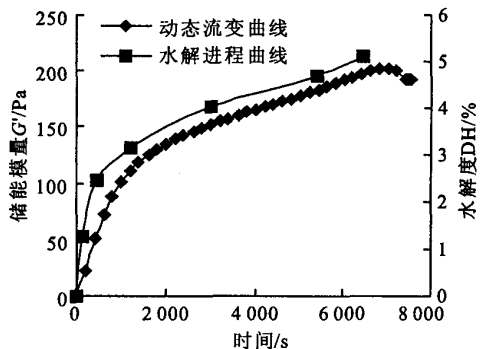
数据列于表9中。



(酶活力:178 U/mL,大豆蛋白质量分数:4.67%)

图8 20℃时木瓜凝乳酶-SPI体系动态流变曲线和水解进程曲线

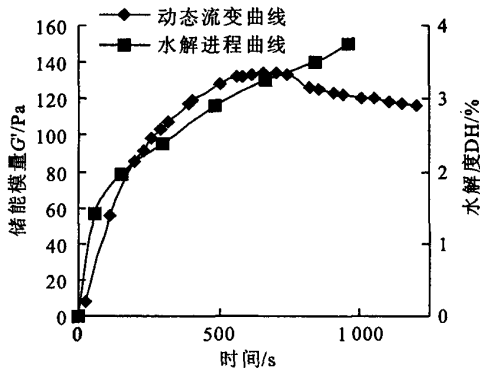
Fig. 8 Dynamic viscoelastic profile and Hydrolyzing curve of chymopapain-SPI mixture at 20℃



(酶活力:292 U/mL,大豆蛋白质量分数:4.67%)

图9 20℃时木瓜蛋白酶-SPI体系动态流变曲线和水解进程曲线

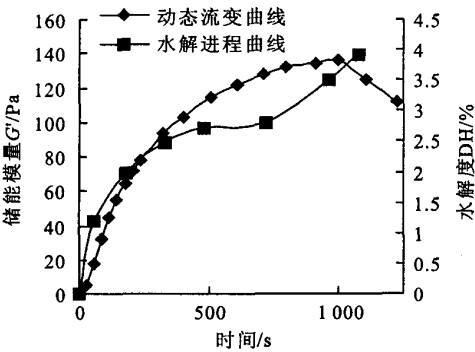
Fig. 9 Dynamic viscoelastic profile and Hydrolyzing curve of papain-SPI mixture at 20℃



(酶活力:289 U/mL,大豆蛋白质量分数:4.67%)

图10 40℃时木瓜凝乳酶-SPI体系动态流变曲线和水解进程曲线

Fig. 10 Dynamic viscoelastic profile and Hydrolyzing curve of chymopapain-SPI mixture at 40℃



(酶活力:338 U/mL,大豆蛋白质量分数:4.67%)
图 11 40 ℃时木瓜蛋白酶-SPI 体系动态流变曲线和
水解进程曲线

Fig. 11 Dynamic viscoelastic profile and Hydrolyzing
curve of papain-SPI mixture at 40 ℃

由上图可知,随着水解度的上升,G'值也在上升,凝胶逐渐形成;而当反应后期水解度达到比较大时,G值开始下降,凝胶结构解体.这可以从豆腐凝胶的形成过程来分析.在豆腐凝胶形成过程中,首先是大豆蛋白质适当展开,使原本处于蛋白质分子内部的疏水性氨基酸暴露,然后通过蛋白质分子间的相互作用使蛋白质聚集形成凝胶^[13].传统的豆腐制作工艺中是采用加热方法使大豆蛋白质展开.

而采用加酶的方法,则是通过蛋白酶水解作用后,适当的打断一些肽键,暴露一定量的疏水性氨基酸残基,这是大豆蛋白质形成凝胶所必需的^[14].但若水解过度,将蛋白质降解为短肽,则蛋白质凝胶也不能形成.所以只有水解度达到一个适中值时,体系才能形成比较好的凝胶.而且对比 20 ℃和 40 ℃的图可以看出,低温下水解度上升速度比高温下的要慢,这和添加的酶活力大小不同有关.从表 9 中在 G 达最大值的时间下测定的水解度值可以看出,添加木瓜凝乳酶体系的水解度偏小,为 3 左右,而添加木瓜蛋白酶体系的水解度略大,在 4 以上.这和木瓜凝乳酶体系中酶活力较木瓜蛋白酶体系中浓度低是一致的,而且木瓜凝乳酶体系 G 达最大值的时间比木瓜蛋白酶体系短,酶水解时间短,水解度也就比较低.但两个体系形成凝胶时 G 最大值大小却差不多.这说明,形成凝胶时木瓜凝乳酶水解体系中大豆蛋白的程度不及木瓜蛋白酶水解的程度高,但凝胶强度却差不多.这可能和两种蛋白酶促凝大豆蛋白的机理不同有关.如果要形成相应强度比较好的凝胶,木瓜凝乳酶体系的水解度应该低于木瓜蛋白酶体系,其内部机理可以通过测定内部疏水键以及内部结构等参数变化进行研究.

表 9 20 ℃和 40 ℃时蛋白酶-SPI 体系形成凝胶的各个参数
Tab. 9 The Gel Properties of proteinase-SPI mixture at 20 ℃ and 40 ℃

温度/ ℃	木瓜凝乳酶				木瓜蛋白酶			
	酶活力/ (U/mL)	时间/ s	G 最大值/ Pa	水解度 DH/ %	酶活力/ (U/mL)	时间/ s	G 最大值/ Pa	水解度 DH/ %
20	178	4 648	176.9	2.2	292	7 146	202.1	5.1
40	289	677	133.8	3.2	338	1 000	135.6	4.0

3 结 论

比较了木瓜凝乳酶和木瓜蛋白酶在促凝大豆分离蛋白溶液形成凝胶过程中体系 G 值和水解度的变化情况.结果表明在 20 ℃时体系形成的凝胶比 40 ℃下形成的稳定,而且体系在低温下形成凝

胶所用的酶活力比高温下所用的低,这可能和水解速度与蛋白分子展开速度相匹配有关.从凝胶所需的酶活力和形成凝胶的稳定性分析,木瓜凝乳酶的促凝作用优于木瓜蛋白酶.而且两种酶的凝乳机理存在区别,形成凝胶时大豆蛋白的水解程度不一样,其内部变化还有待于进一步研究.

参考文献:

[1] Katsumi Murata, Isao Kusakabe. Studies on the coagulation of soymilk-protein by commercial proteinases[J]. *Agric Biol Chem*, 1987, 51(2):385—389.
[2] 凌兴汉 吴显荣. 木瓜蛋白酶与番木瓜栽培[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
[3] Mohamed Azarkan. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of carica papaya[J]. *Journal of Chromatography B*, 2003,790:229—238.

(下转第 11 页)

参考文献:

- [1] Ikehata H, Wakaizumi M, Murata K. Antioxdant and antihemolytic activity of a new isoflavone, "Factor 2" isolated from tempeh[J]. *Agric Biol Chem*, 1968, 32(6):740-746.
- [2] 徐德平, 江汉湖, 庞自洁, 等. 丹贝异黄酮的提取分离与结构鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(3):1-4.
- [3] Matsuura M, Obata A, Fukushima D. Objectionable flavor of soymilk developed during the soaking of soybeans and its control[J]. *J Food Science*, 1989, 54(3):602-605.
- [4] Matsuura M, Akio Obata. β -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin[J]. *J Food Science*, 1993, 58(1):144-147.
- [5] WANG Huei-ju, Murphy A. Isoflavone content in commercial soybean food[J]. *J Agric Biol Chem*, 1994, 42:1666-1673.
- [6] 徐德平, 潘福生, 江汉湖等. 丹贝发酵过程中异黄酮组分和含量的变化[J]. 植物资源与环境学报, 2001, 3:63-65.

(责任编辑:朱明)

(上接第7页)

- [4] 江南大学食品科学教研组. 食品酶学实验讲义[Z]. 无锡:江南大学, 2002.
- [5] 张富新, 田程瑞. 木瓜蛋白酶凝乳特性的研究[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(2):102-105.
- [6] 钟芳. 大豆蛋白质的酶促速凝[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(6):559-563.
- [7] 钟芳. 大豆蛋白速凝特性研究 I—热处理条件对大豆蛋白速凝特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2001, 16(4):47-50.
- [8] Jens Adler-Nissen. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1979, 27(6):1256-1262.
- [9] 巫庆华. 木瓜蛋白酶凝固大豆蛋白质机理[J]. 乳业科学与技术, 2002, (98):6-9.
- [10] Kaoru Kohyama, Yoh Sano, Etsushiro Doi. Rheological characteristics and gelation mechanism of tofu(soybean curd) [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1995, 43(7):1808-1812.
- [11] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 武汉:武汉大学出版社, 1994.
- [12] 姜锡瑞. 酶制剂应用手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1999.
- [13] Lee Kah Hui, Azhar Mat Easa, Noryati Ismail. Effects of thermal treatments on texture of soy protein isolate tofu[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2000, 24:275-286.
- [14] Fuke Y, Masakatsu S, Matsuo H. Nature of stem bromelain treatments on the aggregation and gelation of soybean proteins[J]. *Journal of Food Science*, 1985, 50:1283-1288.

(责任编辑:杨萌)