

酶法豆乳工艺的研究

王璋 葛世军

(食品科学与工程系)

摘要 本文研究了蛋白酶和果胶酶在酶法豆乳工艺中的作用机制。采用这两种酶处理大豆不溶性残渣的结果表明,蛋白酶的作用主要是将不溶性的蛋白质转变成可溶性的组分,而果胶酶能部分地降解大豆组织的细胞壁,从而起到增溶大豆不溶性残渣的作用。蛋白酶和果胶酶具有协同作用的效果。酶法豆乳工艺包括了先用蛋白酶后用果胶酶处理的步骤,与传统工艺相比,新工艺显著地提高了原料的利用率和改进了豆乳粉的质量。

关键词 酶法豆乳工艺;蛋白酶;果胶酶

0 引言

传统的豆乳工艺包括浸泡、磨浆、热处理和过滤等步骤。虽然人们在改进传统工艺上也作了许多研究,见于专利报道的也不少,但是传统工艺仍存在着一些难以克服的困难,其中最主要的是原料利用率低,产品稳定性差以及制成固体产品后复溶性不佳等。酶法豆乳工艺由于在酶的作用下,大豆中的蛋白质和碳水化合物被部分地降解,这样就有可能提高原料的利用率,增加产品的稳定性和改进产品的营养价值,因此,酶法工艺一出现就引起人们的高度重视。Drachenberg和Allred^[1]提出了采用蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的豆乳工艺。在此工艺中蛋白酶和纤维素酶的作用比较明显,它们能减小豆乳的粒度,然而淀粉酶的作用不甚清楚。Hsieh等人^[2]提出了使用果胶酶和纤维素酶的豆乳工艺,此工艺提高了得率,所得产品的稳定性较高,据称在常温下放置8个月不出现分层,但是固体产品的复溶性并不理想,这主要是蛋白质在热处理及喷雾干燥过程中发生不可逆变性所致。Olsen等人^[3]提出一个酶法豆乳工艺,在此工艺中使用了蛋白酶、果胶酶和纤维素酶。据报道,当单独使用纤维素酶或果胶酶时,与不使用酶时相比仅稍微提高原料的利用率;当先使用蛋白酶接着使用果胶酶时,原料的利用率可达68%,蛋白质的萃取率可达76%。

Olsen等人指出,他们所提出的酶法豆乳工艺还处于实验室研究阶段,因此还不能看作是一个成熟的工艺。此外,他们对蛋白酶和果胶酶提高原料利用率的机制也没有作深入的研究。我们研究了蛋白酶和果胶酶对大豆中蛋白质和碳水化合物的增溶作用(solubilization)及其机制,在此基础上论证了在传统工艺中使用蛋白酶和果胶酶的实际意义。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 大豆不溶性残渣的制备 称取100g豆粉(经80目过筛),加900ml去离子水,搅拌30min,离心,弃去上清液,重复上述操作两次,将残渣真空干燥(温度不超过50℃),磨粉,过筛(80目)即得实验材料。

1.1.2 酶制剂 蛋白酶:米曲霉961酶制剂(无锡轻工业学院发酵厂生产),精制后酶活力为6.1万单位/g。果胶酶:黑曲霉果胶酶(烟台食品厂生产),精制后酶活力为133单位/g。

1.2 测定方法

1.2.1 蛋白质测定 Lowry法^[4]。

1.2.2 总糖测定 3,5-二硝基水杨酸法^[5]。

1.2.3 溶出产物的分离及分析 溶出产物经浓缩以后,用凝胶过滤法分离并分析其中蛋白质及碳水化合物的分子量大小分布,凝胶材料为Sephadex G-50和G-25(瑞典Pharmacia产品),洗脱液为0.01mol/l磷酸盐缓冲液(pH7.6,含0.05mol/l NaCl),用紫外吸收法(280nm)测定蛋白质,用硫酸酚法测定碳水化合物含量^[6]。

1.2.4 羟脯氨酸的测定 采用Grunbanm法^[7]测定层析组分中羟脯氨酸的含量,样品先经6mol盐酸在121℃下水解8h。

1.2.5 超微结构分析^[8] 对照样品的制备:称取大豆不溶性残渣(制备方法见实验材料的制备)10g,分散于100ml水中,搅拌30min,离心,将沉淀再分散于100ml水中,重复上述操作两次,将沉淀冰冻干燥,镀金即得测试所需对照样品。测试样品的制备:取反应混合物(即酶处理大豆不溶性残渣的反应体系)100ml离心,弃去上清液,沉淀按对照样品制备方法洗涤两次后经冷冻干燥和镀金即得测试样品。

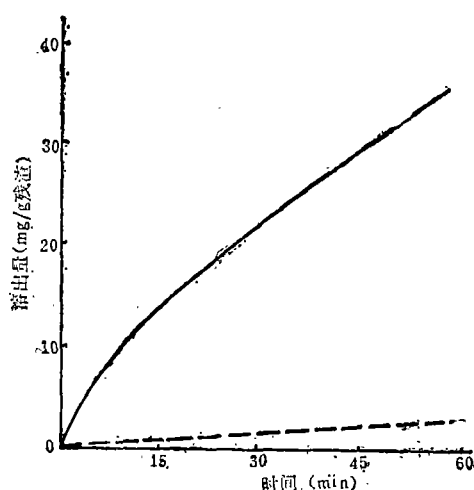
1.2.6 溶出物的氨基酸分析 对照样品的制备 称取10g脱脂(乙醚法,4℃)大豆粉溶于100ml水中,搅拌30min,离心,上清液经冰冻干燥后进行氨基酸分析。测试样品的制备:称取一定量大豆不溶性残渣,分散在水中,加入适量的酶制剂,经一定时间后离心,除去残渣,上清液经冰冻干燥后进行氨基酸分析。氨基酸的分析采用自动氨基酸分析仪(日立835型)。

1.2.7 酶动力学分析方法 称取一定量的底物,分散在一定量的水中,在一定温度和PH下加入一定量的酶,反应一定时间后,取样,使酶失活,过滤,测定上清液中蛋白质和碳水化合物的含量,连续测定若干点。对照样品的制备方法除不加酶外与上述方法一致。计算溶出物产量时,扣除本底(即不加酶时在相同条件下的溶出量)。

2 结果与讨论

2.1 蛋白质增溶作用

2.1.1 蛋白质及碳水化合物的溶出曲线 大豆不溶性残渣在961蛋白酶作用下蛋白质及碳水化合物溶出过程如图1所示。蛋白质作用于大豆不溶性残渣(残渣主要成分为不溶性蛋白质、

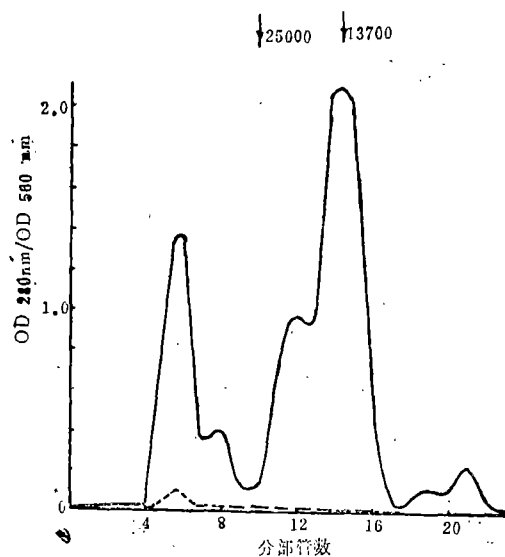


— 蛋白质 --- 碳水化合物(总糖)

图1 蛋白质及碳水化合物的溶出曲线

注: 蛋白酶浓度为0.4mg/ml, 50℃, pH7.0

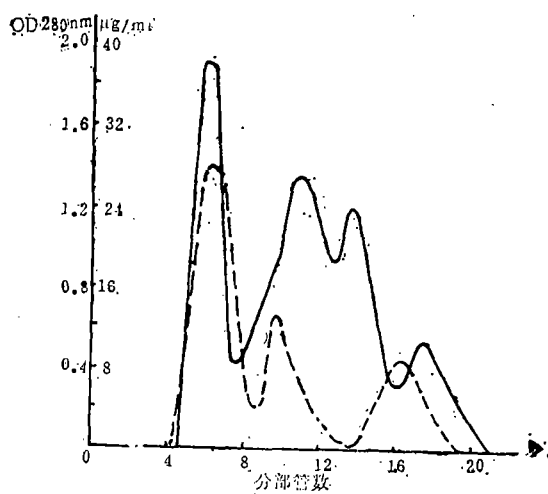
果胶物质、纤维素和半纤维素)是一个极其复杂的过程。随着水解作用的进行,可溶性蛋白质和碳水化合物的量不断地增加。可溶性蛋白质的增加与蛋白酶催化肽键的断裂有关,而可



— 蛋白质 ---- 碳水化合物,

图2 溶出产物的分子量分布

注: 凝胶材料: Sephadex-G-50; 柱尺寸: 76 × 1.1cm; 分部体积: 5ml; 洗脱液: 0.01mol 磷酸盐缓冲液 (pH7.0, 含0.05mol/l NaCl); 蛋白质测定: 紫外法(280nm); 碳水化合物测定: 硫酸酚法; 分子量标准: 核糖核酸酶A13700胰凝乳蛋白酶原A25000



— 蛋白质 ---- 羟脯氨酸(ug/ml)

图3 溶出产物中羟脯氨酸的分布

注: 凝胶材料: Sephadex-G-25; 羟脯氨酸测定: Grunbanm^[7]法其他操作条件和图2注中所指出的相同

溶性碳水化合物的增加显然是一个间接的效果。

2.1.2 溶出产物的分子量分布 大豆不溶性残渣在961蛋白酶作用下溶出产物分子量分布如图2所示,从图中可以看出,溶出产物中的蛋白质分为两大部分,一部分分子量大于25000,另一部分的分子量在10000左右,第一部分可能是存在于残渣中的大豆贮藏蛋白质和结合在细胞壁上的糖蛋白,第二部分则是水解产物。

2.1.3 溶出产物中羟脯氨酸的分布 大豆不溶性残渣在961蛋白酶作用下溶出产物中羟脯氨酸的分布如图3所示。植物细胞壁一般包括两类含羟脯氨酸的糖蛋白。这两类糖蛋白的主要差异在于羟脯氨酸的含量不同,一类羟脯氨酸的含量较高,称之为富含羟脯氨酸糖蛋白,分子量在17000左右,另一类羟脯氨酸含量较低,分子量在120000左右。这两类糖蛋白都不能被蛋白酶水解,因此,在溶出过程中基本上不发生变化。低羟脯氨酸糖蛋白一般是结合在细胞壁表面上,富含羟脯氨酸糖蛋白很可能是植物组织细胞壁的一个组成部分^[9]。从图3可以看出,溶出物中的糖蛋白分子量较高,主要是低羟脯氨酸糖蛋白,而分子量较低的富含羟脯氨酸糖蛋白的含量较少;这说明在961蛋白酶作用下,大豆不溶性残渣的细胞壁可能没有明显的分解。

2.1.4 超微结构分析 图4是大豆不溶性残渣经961蛋白酶处理前后的扫描电镜图片。从中

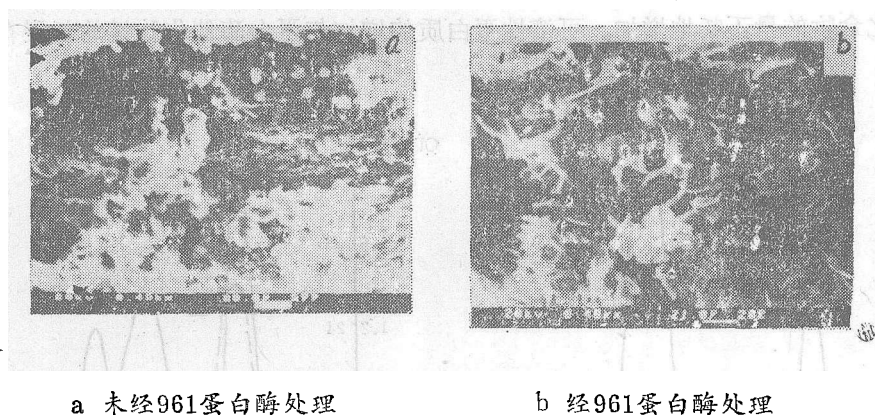


图4 大豆不溶性残渣超微结构的扫描电镜照片

可以看出,在未经酶处理之前,大豆不溶性残渣基本上是以粒状形式存在的,不溶性蛋白质与细胞壁结合在一起,很难分辨出细胞壁的具体位置;但经酶处理后,不溶性蛋白质被溶解转入溶液相中,细胞壁仍留在残渣中(图4b中的蜂窝状薄片)。比较图4a和图4b可以清楚地看出,蛋白酶只降解了大豆不溶性残渣中不溶性蛋白质和其他细胞器,而对细胞壁的作用是不明显的。

2.1.5 溶出产物的氨基酸组成 表1列出了961蛋白酶处理大豆不溶性残渣时溶出产物的氨基酸组成,其中对照品是指大豆中可溶性蛋白质提取物。从表1可以看出,对照品和溶出产物的氨基酸组成有着明显的差异,可见酶作用不仅仅是将不溶性的变性蛋白质(是指在加工过程中由可溶性蛋白质转化来的不溶性蛋白质)转变为可溶性蛋白质,而且还降解了组织中其他不溶性细胞器和质体以及增溶了结合在细胞壁上的糖蛋白。

表1 溶出产物的氨基酸组成(mg氨基酸/100mg蛋白质)

氨基酸名称	对 照 品	溶出产物	氨基酸名称	对 照 品	溶出产物
门冬氨酸	12.80	7.69	异亮氨酸	4.62	5.23
苏氨酸	3.67	4.71	亮氨酸	7.77	8.71
丝氨酸	4.85	5.36	酪氨酸	3.72	4.03
谷氨酸	20.27	20.03	苯丙氨酸	5.08	5.30
甘氨酸	4.21	5.01	赖氨酸	6.43	6.35
丙氨酸	4.32	5.39	组氨酸	2.31	2.83
缬氨酸	4.57	5.62	精氨酸	9.16	6.62
蛋氨酸	1.39	1.57	脯氨酸	4.81	5.47

2.2 果胶酶增溶作用

2.2.1 碳水化合物及蛋白质的溶出曲线 大豆不溶性残渣在果胶酶作用下碳水化合物及蛋

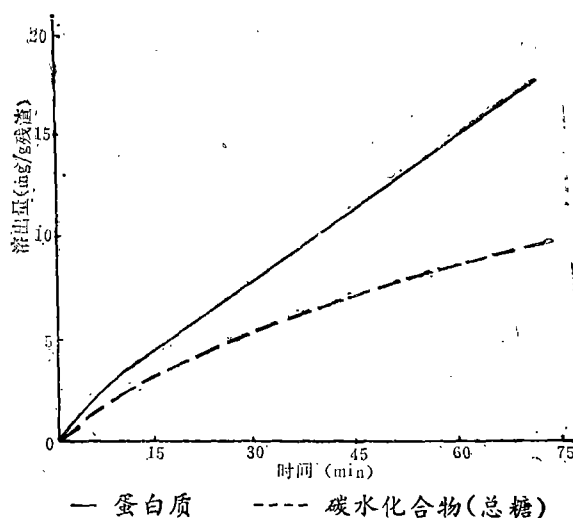


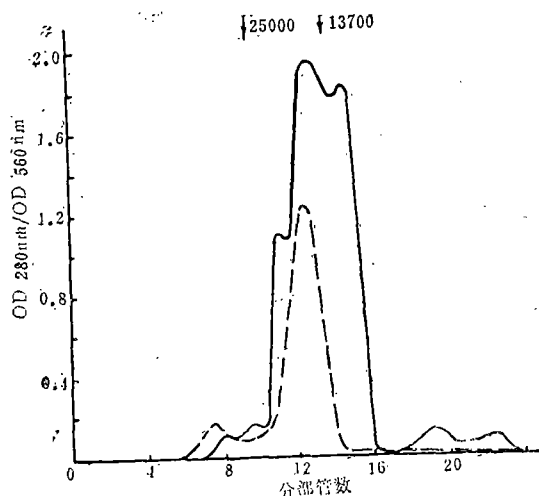
图5 碳水化合物及蛋白质的溶出曲线

注：果胶酶浓度为40mg/ml，45℃，pH4.2

白质的溶出过程见图5。比较图5和图1可以看出，在果胶酶作用下，碳水化合物溶出速度较在蛋白酶作用下来得高，而在蛋白酶作用下，蛋白质溶出速度比在果胶酶作用下来得高。这反映了两种酶对大豆不溶性残渣增溶作用的不同机制。

2.2.2 溶出产物的分子量分布 大豆不溶性残渣在果胶酶作用下溶出产物的分子量分布见图6。从图中可以看出，溶出产物主要是分子量在13700左右的蛋白质分子，而分子量较大的蛋白质所占比例很小或几乎没有。果胶酶作用的pH在4—5，在此pH范围大豆球蛋白溶解度较低，而果胶酶又不能水解蛋白质，这或许是上述实验结果的一种解释。

2.2.3 溶出产物中羟脯氨酸的分布 果胶酶作用于大豆不溶性残渣时溶出产物中羟脯氨酸的分布见图7。比较图7和图3可以发现，在果胶酶作用下，溶出产物中糖蛋白组分含有更

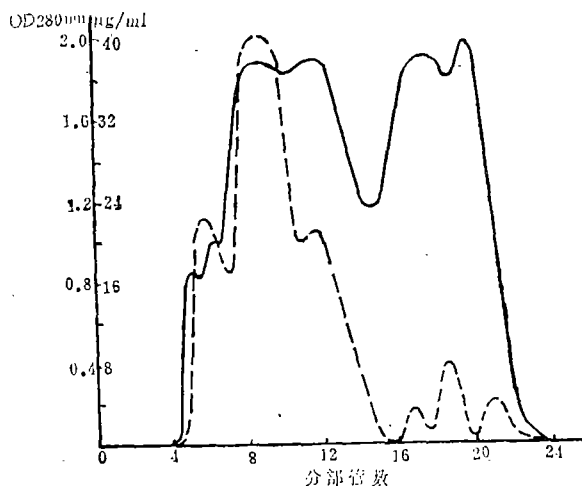


— 蛋白质 --- 碳水化合物,

图6 溶出产物的分子量分布曲线

注: 操作条件和图2注中所指出的相同

多的羟脯氨酸, 并且溶出的糖蛋白的主要部分分子量也较低。这些糖蛋白可能部分来源于细胞壁^[10], 这是细胞壁被果胶酶分解的一个证据。

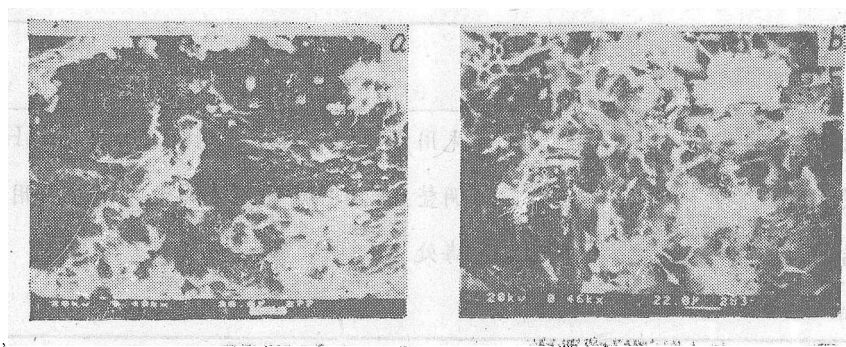


— 蛋白质 --- 羟脯氨酸(ug/ml)

图7 溶出产物中羟脯氨酸的分布

注: 凝胶材料: Sephadex-G-25; 羟脯氨酸测定: Grunbanm^[7]法 其他操作条件和图2注中所指出的相同。

2.2.4 超微结构分析 图8是大豆不溶性残渣经果胶酶处理前后的扫描电镜图片。从中可以看出, 经果胶酶处理后, 残渣中被细胞壁包埋的物质被释放出来, 同时细胞壁也发生降解。蛋白酶作用于大豆不溶性残渣时细胞壁并没有发生显著的变化, 这说明果胶酶有着不同的作用机制。



a 未经果胶酶处理

b 经果胶酶处理

图8 大豆不溶性残渣超微结构的扫描电镜照片

2.3 蛋白酶和果胶酶的协同作用

综上所述,在豆乳工艺中蛋白酶的作用是将不溶性蛋白质转变为可溶性蛋白质,并使可溶性蛋白质进一步降解从而改进它的功能性质。蛋白酶的作用对象可以是可溶性蛋白质、不溶性蛋白质以及蛋白质与其他物质所形成的复合物,也可以是结合在细胞壁上的蛋白质。果胶酶只同存在于大豆残渣中的果胶物质作用,并将它们转化为可溶性物质。由于果胶物质主要分布在细胞壁的中间层,因此,果胶物质在表面的暴露程度将影响到果胶酶的作用。鉴于果胶物质在细胞壁中分布的特征决定了一旦它被降解就必然导致细胞壁的解体,这样就促使一些原来与细胞壁相结合或构成细胞壁的成分释放出来。此外,细胞壁的解体也可以导致包埋在细胞壁中的其他物质转移到液相。

由于蛋白酶和果胶酶具有不同的作用机制,因此,在豆乳工艺中它们的协同作用应是值得研究的一个方面。表2和表3分别指出了蛋白酶对果胶酶的协同作用和果胶酶对蛋白酶的协同作用。

从表2可以看出,在果胶酶作用下经蛋白酶处理过的样品比未经蛋白酶处理过的样品,蛋白质的溶出速度较高,这表明蛋白酶的作用对果胶酶溶出蛋白质有某种协助效果。从表3可以看出,虽然果胶酶对蛋白酶也有协助效果,但是不明显。

表2 蛋白酶对果胶酶的协同作用

样 品 号	A	B
处理大豆不溶性残渣的方法	仅用果胶酶处理	先用蛋白酶处理一定时间,然后将pH从7.0调至4.2,此时蛋白酶被抑制,再用果胶酶处理
蛋白质溶出速度* (mg/min)	1.19	2.72

*测定果胶酶处理时的溶出速度

表3 蛋白酶对果胶酶的协同作用

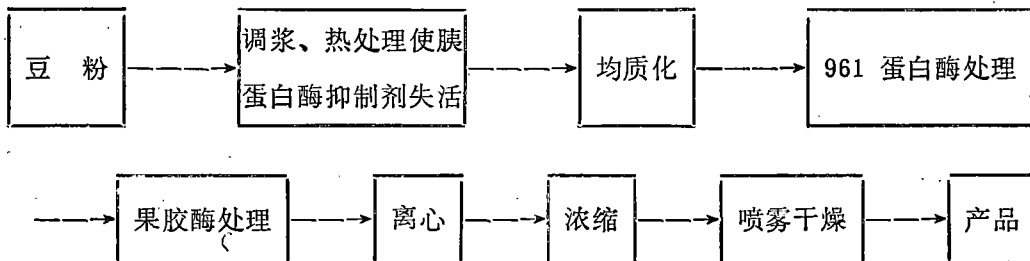
样 品 号	A	B
处理大豆不溶性残渣的方法	仅用蛋白酶处理	先用果胶酶处理一定时间, 然后将 pH 从 4.2 调整至 7.0, 此时果胶酶被抑制, 再用蛋白酶处理
碳水化合物溶出速度* (mg/min)	7.05	7.50

*测定蛋白酶处理时的溶出速度

在另一项试验中采取了 3 种方式处理大豆不溶性残渣: a 先蛋白酶后果胶酶; b 先果胶酶后蛋白酶; c 同时使用两种酶。测定结果表明, 按第一种方式处理, 蛋白质总提取率、碳水化合物总提取率和固形物总提取率均是最高。因此, 在双酶法豆乳工艺中选择了先使用蛋白酶后使用果胶酶的处理方式。

2.4 双酶法豆乳工艺

在研究了蛋白酶和果胶酶增溶大豆不溶性残渣的基础上, 提出了双酶法工艺:



蛋白酶作用条件: pH7.0, 温度50℃, 1h, 果胶酶作用条件: pH5.0, 温度50℃, 1h

按上述工艺, 蛋白质的萃取率达到82.4%, 大豆的总利用率达到68.9%; 若不经浓缩和喷雾干燥, 所得豆乳的固形物为7.8%, 蛋白质含量为3.8%。蛋白质经酶水解后平均分子量在18000左右, 产品复活性良好, 无特征性水解苦味。

3 结 论

a. 蛋白酶能降解大豆不溶性残渣中的不溶性蛋白质和一些细胞器, 而对大豆组织细胞壁没有显著的影响。

b. 果胶酶能分解大豆细胞壁, 同时释放出碳水化合物及细胞壁上的蛋白质。

c. 蛋白酶和果胶酶的协同作用能显著地提高豆乳工艺中的蛋白质总提取率和原料利用率。

d. 采用蛋白酶接果胶酶处理的双酶法工艺能显著地改进传统的豆乳工艺, 除了产量得到提高外, 豆乳粉的复溶性也得到改进。

参 考 文 献

- 1 Drachenberg F G, Allred P E. United states patent 3941890, 1976
- 2 Hsich S T, Bright RA, Rha C K. United states patent 4119733, 1979
- 3 Olsen H S. MIFT Symp. Kuala Lumpur, 1979; 12-13
- 4 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr AL. Biol chem, 1951; 193: 265-275
- 5 Miller G L. Analytic Chem, 1959; 31: 426-428
- 6 Doubois M, Gilles K A, Hamilton J K, Rebers P A, Smith F. Analytic Chem, 1956; 28: 350-356
- 7 Grunbanm B W, Glick D. Arch Biochim Biophys, 1956; 65: 260-267
- 8 Wolf WJ. J Am oil chem, 1970; 40: 107-108
- 9 Brown R G, Kimmins W S. Adv plant chem, 1982; 72: 115-134
- 10 Mudryett R E, Rufner R, Bajracharya P, Kim K, Rajayopalan K. J Food Biochem, 1978; 185-207

The Studies on Enzymatic Processing Technology of Soymilk

Wang Zhang Ge Shijun

(Dept. of Food Sci. and Eng.)

Abstract This paper studied the reaction mechanism of proteolytic and pectic enzymes in soymilk processing technology. The results of treating insoluble soybean residue with two enzymes show that the proteolytic and pectic enzymes can transfer the insoluble proteins into the soluble components and decompose the cell wall of the soybean tissue respectively, thus, solublize the insoluble soybean residue. The two enzymes have been shown as having a synergistic effect. The enzymatic processing technology of soymilk includes the consecutive treatments with the proteolytic and pectic enzymes. Comparing with the traditional processing technology, the new one can increase the utilization of the raw material and improve the quality of final product.

Keywords Enzymatic processing technology of soymilk; Proteolytic enzyme
Pectic enzyme