

# 大豆分离蛋白酶法有限水解 工艺过程及动力学分析

刘焱 浙江工业大学生物与环境工程学院 杭州 310014

**摘要** 采用 pH-stat 法在 pH8.0, T = 50℃ 条件下, 以 Alcalase 酶对大豆分离蛋白进行有限水解处理, 探讨了酶与底物摩尔浓度比 [E]/[S] 和反应时间 t 对产物水解度及溶解性的影响; 研究了相应的有限水解 ( $x < 6.0$ ) 过程的动力学特征。实验结果显示, 控制主要影响因素为 [E]/[S] < 0.4%, pH8.0 和 T = 50℃ 条件下, 在 25min 内可使产物的水解度 x 达到约 6.0%, 并且产物在酸性 pH 范围的溶解性明显改善。对实验结果的分析显示, 水解过程中底物与酶之间的相互作用引起酶的抑制和失活。在此基础上推导出底物存在临界浓度, 在实验条件下, 其值为 96.77mg/ml。

**关键词** 大豆分离蛋白(SPI) 酶 有限水解 工艺过程 动力学

**Abstract** The enzymatic limited hydrolysis ( $x < 6.0$ ) of soy protein isolate (SPI) was carried out with the pH-stat method under pH8.0, T = 50℃. The effects of the main parameters including [E]/[S] in mole ratio and reaction time t on the degree of hydrolysis (x) and the solubility were investigated. The results showed that x could be regulated to below 6.0% with the mentioned factors [E]/[S] = 0.4%, T = 50℃ and pH8.0 within about 25min. The solubility of the hydrolysate in acetic pH range got improved obviously. The experiment results showed that the enzyme-substrate intermediate induced the enzyme inhibition and inactivation. A critical [S] would correspond to a [E], which was 96.77mg/ml under the experiment condition.

**Key words** Soy protein isolate (SPI) Enzyme Limited hydrolysis Preparation Kinetics

蛋白质经酶水解有助于改善其营养价值和功能性, 从而拓宽其应用范围<sup>[1]</sup>。在低水解度的条件下, 水解产物性质的改善主要体现在功能性方面。因此, 有限水解作为改善含蛋白质食品质构特征的加工工艺技术有着特殊的应用范围和意义。

在蛋白质水解过程中, 产物质量控制对其应用性能的影响是至关重要的。与其它方法相比, 酶法工艺具有条件温和, 反应特异性强, 以及较少发生副反应的特点。从应用角度看, 大豆分离蛋白来源丰富, 较适合做蛋白质水解物制备的原料。

蛋白质经酶水解过程受酶的种类以及水解过程条件的影响。Alcalase 是一种非特异性蛋白质肽键内切酶, 主要作用于含有酪氨酸、苯丙氨酸及色氨酸的肽键。以往研究认为 Alcalase 是一种很适合于蛋白质, 如 SPI 进行水解处理的蛋白酶<sup>[2]</sup>。

有限水解产物由于其分子量分布介于蛋白质与低聚肽之间, 性能上表现出不同于两者的特征。对于有限水解过程, 从反应机理出发, 结合有限水解过程的特点, 推导出符合实验数据的实验模型, 对于加深对蛋白

质水解过程的理解是很有实际意义的。

本研究通过 pH-stat 法水解工艺, 研究主要工艺参数, 包括酶与底物摩尔浓度比 [E]/[S] 和反应时间 t 对产物水解度及溶解性两项性能的影响规律。在实验基础上通过理论分析, 提出了相应的水解过程反应动力学模型, 为制备有限水解产物提供了水解过程相应条件, 可作为工艺相关操作依据。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 实验材料

蛋白酶 Alcalase 0.6L, NOVO 公司产品, 使用前测定比活力<sup>[3]</sup>为 0.64AU/mg

大豆分离蛋白(SPI) 三江食品公司产品, 经测定, 蛋白质 92.21%, 水分 3.52%

紫外-可见分光光度计 UV-120-02 型, Shimadzu 公司

自动电位滴定仪 ZD-2 型, 上海雷磁分析仪器厂所用试剂均为分析纯

### 1.2 实验方法

1.2.1 水解过程 - pH - stat 法<sup>[4]</sup> 以蒸馏水配制底物溶液, 在 pH8.0 及 T = 50℃ 下预热 5min, 然后按比例加入酶液。反应过程维持 pH 和温度恒定。反应条件为 [S] = 80mg/ml, pH8.0 和 T = 50℃。

记录不同时刻 t 时, 为维持反应体系 pH 恒定而消耗的碱液的 ml 数。产物水解度 x, 定义为蛋白质中被水解的肽键的比例, 由下式计算:

$$x = \frac{E}{\alpha \cdot M_p \cdot ht} \times 100$$

式中, E 为所消耗的碱液的当量数; α 为 α - NH<sup>+</sup> 的平均解离度, 实验条件下为 0.89; M<sub>p</sub> 为蛋白质质量, g; ht 为单位质量蛋白质肽键当量数, SPI 取 7.75meq/g。

1.2.2 产物溶解性测定 - TCA 指数法<sup>[5]</sup>

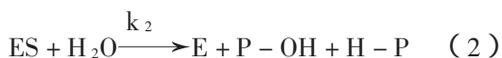
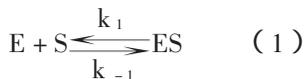
取水解液 1ml, 35℃ 下恒温 5min, 加入 4ml TCA 液, 以 0.1mol/L NaOH 或 HCl 调节 pH, 摇匀, 静置 10min。在 4000r/min 条件下离心 5min, 275nm 处测定上清液中吸光度, 从标准曲线计算 -NH<sub>2</sub> 含量。以对样品做空白。TCA 指数按下式计算:

$$TCA = 15 \times \frac{N_1 - N_2}{N_T} \times 100$$

式中, N<sub>1</sub> 上清液中 -NH<sub>2</sub> 含量; N<sub>2</sub> 对比样中 -NH<sub>2</sub> 含量; N<sub>T</sub> 样品中总 -NH<sub>2</sub> 含量的计算值。

## 2 理论分析

蛋白质酶法水解反应符合双底物顺序反应机理<sup>[6]</sup>, 由以下几步反应过程组成。在水溶液中, 第二步反应为限速步骤, 并且逆过程可忽略。



在有限水解条件下, 相应反应速度为

$$V = [S] \frac{dx}{dt} = k_2 [ES] \quad (4)$$

在稳态下, 有下列反应平衡式

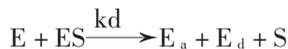
$$\frac{d[E]}{dt} = (k_{-1} + k_2) [ES] - k_1 [E][S] = 0$$

又有, [S] >> k<sub>-1</sub>/k<sub>1</sub> = K<sub>1</sub>, k<sub>-1</sub> >> k<sub>2</sub>。

因此, 具有催化活性酶浓度

$$[E_a] = [S] + [ES] = \left( \frac{k_{-1} + k_2}{k_1 [S]} + 1 \right) [ES] = [ES]$$

酶失活由游离酶与中间过度态结合而产生<sup>[7]</sup>, 即



其相应失活动力学方程为

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = k[E][ES] \quad (5)$$

又有, 在有限水解条件下, [S] 可近似为底物初浓度。

因此, 由式(4)和式(5)两端分别相比, 整理得

$$dx = \frac{-k_2 d[E_a]}{k_d K_1 [E_a]} \quad (6)$$

对式(6)积分, 得

$$[E_a] = [E] \exp\left(-\frac{k_2}{k_d K_1} x\right)$$

因此得

$$V = [S] \frac{dx}{dt} = k_2 [E] \exp\left(-\frac{k_2}{k_d K_1} x\right) = a[S] \exp(-bx)$$

$$\frac{dx}{dt} = a \exp(-bx) \quad (7)$$

实验目的是制备有限水解物, 因此, 实验条件的选择以在 25min 左右 x 值达到约 6.0%。在有限水解条件下, 底物浓度小于 96mg/ml 时, 产物水解度和酶与底物摩尔浓度比之间基本上呈线性增加。根据实验结果, 选择底物浓度在一合适的固定水平, [S] = 80mg/ml。

## 3 结果与讨论

### 3.1 工艺参数对产物水解度的影响

#### 3.1.1 底物浓度对水解度的影响

实验条件下 x 随 [E] 的变化如图 1。

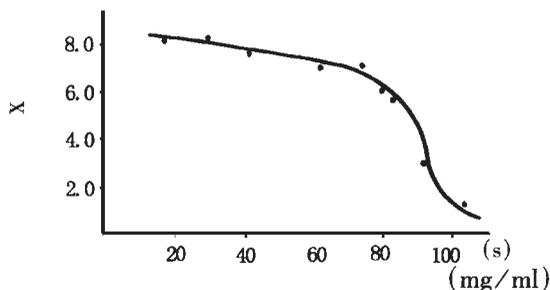


图 1 x ~ [S] 关系曲线

在 t = 25min 条件下的实验结果表明, 在实验范围

内,低[S]条件下,产物的 $x$ 值均达到较高水平。这一现象表明,此时酶对底物的作用程度还很低。因此, $x < 6.0\%$ 时为有限水解。当[S]增加到约96mg/ml左右时, $x \sim [S]$ 关系曲线出现转折。

这一现象表明底物同时存在着促进反应速度和对酶产生抑制的双重作用。在有限水解过程中,底物对酶产生抑制及失活而引起活力下降是反应速度降低的主要原因。

### 3.1.2 酶浓度对水解度的影响

在低[E]条件下,当反应时间为25min时,产物 $x$ 值随[E]的增加而明显升高。但过高[E]条件下 $x$ 值的变化程度趋于降低,图2。

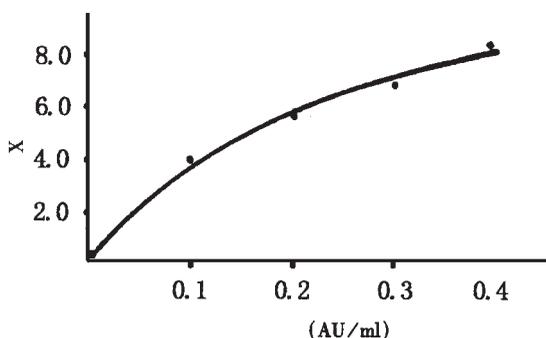


图2  $x \sim [E]$ 关系曲线

这一效应可能通过下列一种或几种途径形成:1、多个底物分别与酶活性中心不同部位作用,导致酶不能完成催化功能;2、产物中某些组分对酶产生抑制。这一作用随反应时间及酶浓度而增加;3、随产物浓度的增加,体系中有效底物与酶结合过程中阻碍作用增大。

采取较低酶浓度具有以下有利特点:可以减少酶用量,降低成本;在低酶浓度条件下,产物的水解度易于控制,有利于保证产品品质的均一性。

### 3.1.3 反应时间对水解度的影响

实验所得 $x$ 与 $t$ 的关系如图3所示。

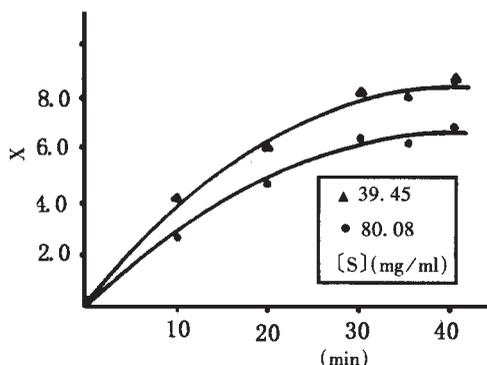


图3  $x \sim t$ 关系曲线

在不同的[S]条件下, $x$ 均随 $t$ 而增加,而水解速度则随之降低。反应时间较短时, $x$ 的增加较为明显。在实验范围内,当 $t$ 超过30min后,水解速度快速降低,即 $x$ 增加程度变得缓慢。

水解速度随反应时间而降低的可能原因有以下几个方面:(1)随水解作用进行,可被酶作用的肽键数量减少;(2)产物对酶的抑制效应随产物浓度而增大;(3)酶的变性失活随反应进行而加重。

在实验的[S]范围内,第一个因素不是主要的。当 $t$ 达到30min左右时,体系中可被作用的肽键远未全部水解。在反应时间较短时,反应速度较高。但随时间增加,反应速度逐渐降低。此时,酶受抑制作用及由底物或产物质子化所引起的pH变化都对反应产生影响,水解速度因而降低。

### 3.2 产物水解度与溶解度的关系

在pH6.0条件下产物 $x$ 值与TCA指数的关系如图4所示。

水解度对产物的溶解特性产生影响。未经水解作用的蛋白质的TCA指数为47.7%。实验结果显示,即使是有限水解作用也可以显著改善其溶解性。这一效应为产物在酸性食品中的应用提供了条件。

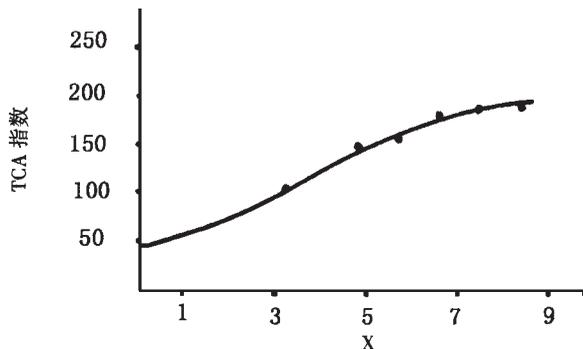


图4  $x \sim \text{TCA}$ 指数关系曲线(pH6.0)

这一效应主要是由于水解作用降低了分子的体积,增加了离子化基团的数量和分布。同时也破坏了分子中疏水区域的结构,分子间相互排斥作用增加,提高了其在酸性溶液中的分散稳定性<sup>[8]</sup>。

### 3.3 水解过程底物临界浓度求算

对式(7)积分,得

$$x = \frac{1}{b} \ln(1 + abt)$$

表1 a、b计算值表([E] = 0.21AU/ml)

[S] (mg/ml)	16.28	27.56	39.45	61.25	80.08
a	0.0331	0.0263	0.0205	0.014	0.0055
b	24.97	26.63	27.71	28.04	29.90

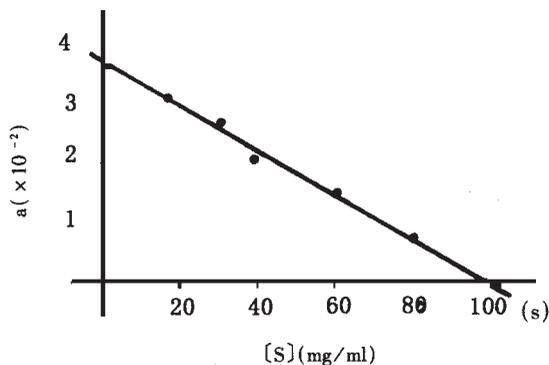


图5 a ~ [S]关系曲线

由不同[S]条件下的  $x_t$  值求出相应的  $a, b$  值, 列于表1。作  $a \sim [S]$  关系曲线, 图5。

可见在表中所列实验数据范围内, 两者间有较好的线性关系, 即符合

$$a = \alpha + \beta[S]$$

利用线性回归方法求出  $\alpha = 0.03774$ ,  $\beta = 0.00039$ , 得两者间关系式

$$a = 0.03774 - 0.00039[S]$$

相关系数  $\gamma = -0.9922$ 。

因此, 得到

$$\frac{dx}{dt} = (0.03774 - 0.00039[S]) \exp(-bx)$$

当  $[S] \geq 96.77 \text{ mg/ml}$  时, 上式  $\leq 0$ , 水解反应不能进行。因此, 此值为实验条件下的底物临界浓度。

#### 4 结论

通过控制主要工艺参数酶与底物浓度比  $[E]/[S]$  和反应时间  $t$ , 可以调节对大豆分离蛋白水解作用的程度, 使产物的  $x$  值在  $<6.0$  范围内, 即实现有限水解。

大豆分离蛋白经蛋白酶 Alcalase 0.6L 有限水解作用过程动力学符合关系式

$$V = a[S] \exp(-bx)$$

在水解过程中, 过高底物浓度会引起酶的抑制失活作用, 导致反应速率下降。因此, 反应过程存在相应底物临界浓度。实验条件下其值为  $96.77 \text{ mg/ml}$ 。

有限水解产物在低 pH 处的溶解性表现出明显改善, 为增强其功能性质, 扩大应用范围提供了条件。

#### 参考文献

1 Boonvisut, S, Effect of heat, amylase and disulfid bond cleavage on the in vitro digestibility of soybean, J. Agric. Food Chem, 1970, 24: 1130~1137.

2 Adler - Nissen, J. Enzymic hydrolysis of food proteins, Elsevier, London, 1986, 28 ~ 43.

3 NOVO Industri A/S, Modified Anson - hemoglobin method for the determination of proteolytic activity, AF4/5 NOVO Industri A/S, Bagsvaerd, Denmark, 1978.

4 NOVO Industries, Use of food grade Alcalase or Neutrase for controlled enzymatic hydrolysis of proteins, Information tecnica, NOVO Industries, 1989.

5 Margot, A, Flaschel, E, Renken, A, Continuous monitoring of enzymatic whey protein hydrolysis, Process Biochemistry, 1994, (29): 257 ~ 262.

6 Gonzalez - Tello, P, Camacho, F, Jurado, E, Enzymatic hydrolysis of whey proteins I: Kinetic models, Biotechnol. Bioeng, 1994, 44 (4): 523 ~ 528.

7 Marquez Moreno, M. C. Fernandez Cuadrado, V. Enzymic hydrolysis of vegetable proteins: Mechanism and Kinetics, Process Biochemistry, 1993, (28): 481 ~ 490.

8 Mahmoud, H. I. Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties, J. Food Sci, 1992, 57(5): 1223 ~ 1228.

广告编号 2001 - 04 - 46

## 《保健食品质量分析技术》

一书由江苏科学技术出版社出版

本书以保健食品概述和质量标准制订为起点, 比较系统的介绍了保健食品分析技术, 涉及功能性成分分析、卫生质量分析、剂型质量检验及原料的薄层层析检验, 并着重剖析了热点保健食品质量分析方法。

作者将国内外的先进分析技术与自己的实践经验融为一体, 在内容的写法上体现“求实”和“创新”, 对每类功能性成分分析, 既有各种方法的概述, 又有重点方法的介绍。该书具有一定的先进性、科学性和实用性, 可供高等院校、科研单位参考, 是保健食品开发、生产、管理、质量检验部门必备的分析工具书。

该书由宓晓黎、钮伟民等编著, 全书 223 千字。定价每册 13.5 元(另加邮费 1.5 元), 需书者可与作者联系

地址: 无锡市钱荣路 7 号, 江苏省微生物研究所

邮编: 214063 联系人: 袁建兴

电话: 0510 - 5500626