

大豆胨制备工艺条件研究

齐 奇¹, 刘河涛¹, 杨文君¹, 王 银¹, 余建强²

(1. 宁夏医科大学 基础医学院, 宁夏 银川 750004; 2. 宁夏医科大学 药学院, 宁夏 银川 750004)

摘 要:以脱脂豆粕为原料,通过“碱提酸沉”法制备大豆分离蛋白,经正交实验确定的最适条件是碱液萃取温度为 50 ℃、碱液萃取 pH 值为 8、酸沉淀 pH 值为 4.0。以所得的大豆分离蛋白为反应底物制备大豆胨并优化其制备工艺。结果表明,反应的最佳条件为:酶解温度为 55 ℃,酶解 pH 值为 7.5,底物浓度为 5%,E/S 为 16 g/kg。将按照此工艺条件制备出的大豆胨的各项理化指标与所购标准品相比,差异不大。氨基酸分析结果表明,大豆胨中必需氨基酸种类丰富齐全,可为微生物的生长提供丰富的营养。

关键词:大豆蛋白;大豆胨;木瓜蛋白酶;正交实验

中图分类号:TS 214.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2015)01-0074-05

Study on the preparation of soya peptone

QI Qi¹, LIU He-tao¹, YANG Wen-jun¹, WANG Yin¹, YU Jian-qiang²

(1. Basic Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan Ningxia 750004;

2. College of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan Ningxia 750004)

Abstract: Soybean protein isolate (SPI) was prepared from defatted soybean meal by alkali extraction and acid precipitation. The optimum condition was obtained by orthogonal experiment, and the alkali solution temperature was 50 ℃, alkali-soluble pH 8, acid precipitation pH 4.0. Soya peptone was prepared from SPI and the preparation techniques were optimized. The result showed that the optimal technical conditions were as follows: reaction temperature 55 ℃, pH value 7.5, substrate concentration 5% and E/S 16 g/kg. All physical and chemical indexes of the obtained soya peptone were similar to the purchased standards. The soya peptone was abundant in essential amino acids with complete varieties and was suitable for culture medium in the preparation of microorganism.

Key words: soybean protein; soya peptone; papain; orthogonal test

大豆原产于中国,是世界上产量最大的食用、饲用蛋白资源,大豆经高温提取豆油后所得的豆粕中含有丰富的蛋白质^[1],但其并没有得到充分的利用^[2-3]。大豆分离蛋白具有一定的乳化特性,在天然食品添加剂中应用广泛,提高其加工性能是研究的热点^[4-6]。大豆胨(Soya Peptone)是一种关键的培养基原材料,含有丰富的碳水化合物和维生素,维生素 B₁ 含量较高,它适用于包括真菌在内的极广泛的微生物的生长。在一般培养基上无法生长的链球菌、肺炎球菌、巴斯德菌等在含大豆胨的培养基上能有很好的生长效果,大豆胨制备工艺以及制备出的大豆胨质量直接影响微生物实验的结果^[7-8]。目前

国内对从大豆到大豆胨提取工艺的研究报道较少^[9],大部分的研究都直接采用市售的大豆分离蛋白进行研究,没有对脱脂豆粕中提取物的完整工艺流程的研究,不利于脱脂豆粕的大规模应用。本文采用当地所产的脱脂豆粕,经过“碱提酸沉”法制备出大豆分离蛋白^[10-13],将制备出的大豆分离蛋白作为底物,通过木瓜蛋白酶水解后得到大豆胨。木瓜蛋白酶酶解效率低于动物蛋白酶,但其原料丰富、生产简单、价格低廉,有利于大豆胨产品的大规模生产。分别研究 pH 值、底物浓度、水解温度、酶与底物的浓度比对木瓜蛋白酶水解效率的影响,通过 L₉(3⁴) 正交表排列优化提取工艺参数,提高大豆分离蛋白的利用率,获得成本低、水解度高、氨基酸及其他各项理化性质达标的大豆胨产品,为脱脂豆粕的进一步应用和大豆胨的工业化生产提供理论依据。

收稿日期:2014-08-12

基金项目:国家科技支撑计划(2009BAK61B04);宁夏医科大学校级项目(XM200917,XM200914)

作者简介:齐奇,1981年出生,女,安徽安庆人,讲师。

通讯作者:余建强,1965年出生,男,宁夏银川人,教授。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

低温脱脂豆粕:宁夏恒生源生物有限公司,饲料级黄大豆;木瓜蛋白酶:Solarbio 公司;大豆脲标准品:OXOID 公司;大豆蛋白标准品:上海丰寿实业有限公司。

1.2 仪器设备

TU1810 型紫外可见分光光度仪:北京普析通用仪器;L-8800 型氨基酸分析仪:日本 HITACHI 公司;PowerDry LL3000 冻干机:丹麦 Heto 公司;AnkeTDL-S-A 台式离心机:上海安亭科学仪器厂;DK-s24 恒温水浴箱:上海精密实验设备有限公司;Z-2000 原子吸收光谱仪:日本 HITACHI 公司;高效液相色谱仪:日本 HITACHI 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大豆分离蛋白的制备流程

大豆分离蛋白的制备采用“碱提酸沉”法,具体工艺流程为^[14]:豆粕粉碎(100 目过筛)→碱提→离心去杂→调节 pH 值→酸沉→静置分离→中和杀菌(pH 7.0)→干燥储存。

1.3.2 大豆蛋白制备工艺条件的优化

为确定大豆蛋白制备的最佳工艺条件,以制备出的大豆蛋白中蛋白质的含量(总氮)为考察指标,对碱液萃取温度、碱液萃取 pH 值和酸沉淀 pH 值进行三因素三水平正交实验,总氮含量为三次平行实验的平均值。实验因素和水平排列见表 1。

表 1 大豆分离蛋白制备因素水平表

水平	A 碱液萃取温度/℃	B 碱液萃取 pH 值	C 酸沉淀 pH 值
1	50	7.5	4
2	55	8	4.5
3	60	8.5	5

1.3.3 大豆脲的制备流程

大豆分离蛋白→配液→高温灭菌(90℃,10 min),自然冷却→酶解(4 h)→高温灭酶(90℃,5 min)→干燥储存。

1.3.4 大豆脲制备工艺条件的优化

1.3.4.1 酶解温度的选择 大豆分离蛋白溶液的质量分数 5%、pH 值为 7.5、酶/底物质量比(E/S)为 8 g/kg 时,分别在 50、55、60、65、70℃条件下水解 4 h,测定其水解度,找出最适酶解温度。

1.3.4.2 酶解 pH 值的选择 大豆分离蛋白溶液的质量分数 5%、酶解温度为 60℃、E/S 为 8 g/kg 时,在 pH 值分别为 6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5 的条件下水解 4 h,测定其水解度,找出酶解最适 pH 值。

1.3.4.3 底物浓度的选择 设定大豆分离蛋白溶液的质量分数分别为 2%、3%、4%、5%、6%、7%,

在 pH 值为 7.5、酶解温度为 60℃、E/S 为 8 g/kg 的条件下水解 4 h,测定其水解度,找出最适底物浓度。

1.3.4.4 酶浓度的选择 选择大豆分离蛋白溶液的质量分数为 5%、温度为 60℃、pH 值为 7.5,分别在 E/S 为 2、4、8、16、32 g/kg 的条件下水解 4 h,测定其水解度,找出最适 E/S。

1.3.4.5 酶解最优工艺条件的确定 以水解度为考察指标,对水解条件进行优化,确定酶解的最佳工艺。以底物浓度、E/S、水解温度和 pH 值为因素,进行四因素三水平正交实验。因素和水平排列如表 2 所示。

表 2 大豆脲制备因素水平表

水平	A 温度/℃	B pH 值	C 底物浓度/%	D E/S/(g/kg)
1	55	7.0	4	4
2	60	7.5	5	8
3	65	8.0	6	16

1.3.5 检测方法

为确定所制备的大豆脲是否符合市售大豆脲产品的理化指标要求,分别对各项理化性质进行检测^[15-16]。

1.3.5.1 水解度(DH)的测定 水解度测定采用 pH-STAT 法。

1.3.5.2 总脂、水分、灰分和总氮的测定 参照国家标准测定。总氮的测定:GB/T5009.5—2003;总脂的测定:GB/T5009.10—2003;水分的测定:GB/T5009.3—2003;灰分的测定:GB/T5009.4—2003。

1.3.5.3 氨基酸的测定 采用国家标准 GB/T18246—2000 进行测定。

2 结果与分析

2.1 脱脂豆粕制备大豆分离蛋白正交实验

以所制备的大豆分离蛋白中的总氮含量为指标进行正交实验,所得结果见表 3。

表 3 大豆分离蛋白制备正交实验结果

序号	A 碱液萃取温度	B 碱液萃取 pH 值	C 酸沉淀 pH 值	总氮含量/%
1	1	1	1	87.3
2	1	2	2	93.7
3	1	3	3	85.7
4	2	1	2	80.8
5	2	2	3	86.9
6	2	3	1	84.4
7	3	1	3	79.7
8	3	2	1	90.2
9	3	3	2	81.5
k ₁	88.9	82.6	87.3	
k ₂	84.033	90.267	85.333	
k ₃	83.8	83.867	84.1	
极差	5.1	7.667	3.2	

由表 3 可得出,以产物中的总氮含量为指标,根据极差分析得出利用“碱提酸沉”法制备大豆分离蛋白的最适条件是 $A_1B_2C_1$,各因素影响顺序为碱液萃取 pH 值 > 碱液萃取温度 > 酸沉淀 pH 值。对此最适工艺组合进行三次平行实验验证,三次实验制备出的产物总氮含量分别为 92.1%、93.8%、93.4%,优于大部分实验组,因此确立“碱提酸沉”法制备大豆分离蛋白的最适条件是碱液萃取温度为 50℃、碱液萃取 pH 值为 8、酸沉淀 pH 值为 4.0。

2.2 大豆蛋白理化性质分析

对制备出的大豆分离蛋白进行理化性质分析,并与标准品进行比较,结果见表 4。

表 4 大豆分离蛋白与标准品理化性质比较结果 %				
成分	水分	灰分	脂肪	蛋白质
大豆分离蛋白标准品	7	6	1	90
大豆分离蛋白成品	7.18	4.85	0.83	91.24

由表 4 可以得出,根据以上制备工艺制得的大豆分离蛋白与市场所售标准品各项理化性质差别不大,满足下一步实验需要。

2.3 大豆脲制备酶解温度的确定

在蛋白质酶解过程中,在一定范围内升高温度,酶解效率相应提高底物转变成产物的速度加快。温度过高,酶蛋白变性,酶的稳定性下降,酶解效率随之降低。分别在 50、55、60、65、70℃ 时测定木瓜蛋白酶水解大豆分离蛋白后的水解度,结果如图 1 所示。

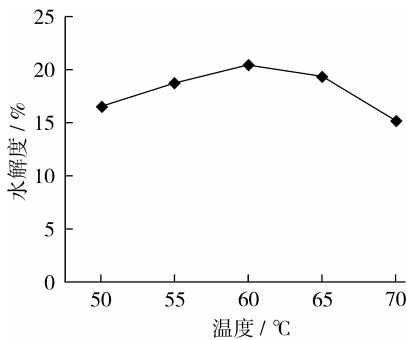


图 1 温度对水解性能的影响

由图 1 可以看出,水解度随着温度的增大先后升降,因此选择温度调控范围为 55~65℃。

2.4 大豆脲制备酶解 pH 值的确定

pH 值可以影响酶的稳定性以及酶催化底物转变成产物的效率。分别在 pH 值为 6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5 的条件下测定酶解液的水解度,结果如图 2 所示。

由图 2 可以看出,水解度随着 pH 值的增大先后升降,因此选择 pH 值调控范围为 7.0~8.0。

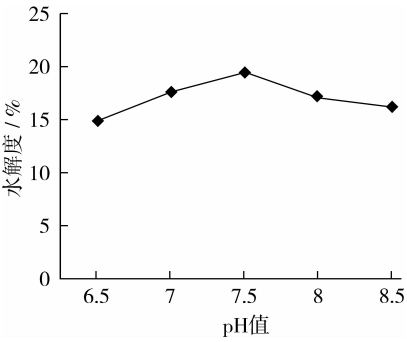


图 2 pH 值对水解性能的影响

2.5 大豆脲酶解底物浓度的确定

底物浓度可以影响酶解反应的速度。分别设置大豆分离蛋白溶液的质量分数为 2%、3%、4%、5%、6% 和 7%,水解结果见图 3。

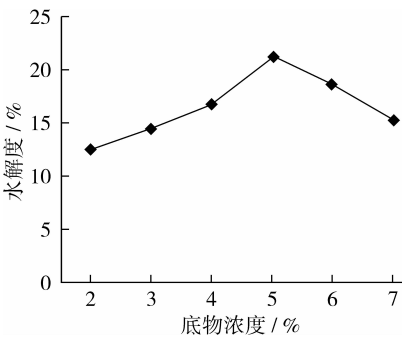


图 3 底物浓度对蛋白质水解的影响

由图 3 可以看出,随着底物浓度的增加,水解度先上升,当底物浓度到达 5% 后底物浓度再增加时水解度反而下降,所以选择底物浓度的调控范围为 4%~6%。

2.6 大豆脲制备酶解 E/S 的确定

酶浓度与底物溶液浓度 (E/S) 之比,比酶浓度本身能更好地反映酶解过程中的反应速度特征。当底物浓度一定、增加的酶量未使底物饱和时,E/S 越大,酶解反应速度越快,蛋白质的水解率也越高。但 E/S 过大有可能导致酶自身相互水解,使酶活力降低,同时也提高了生产成本。

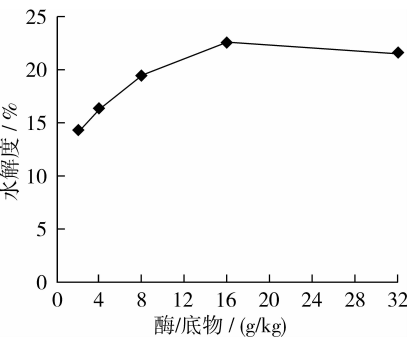


图 4 酶与底物比对水解性能的影响

由图 4 可以看出,随着酶与底物比的增加,水解度呈上升趋势,但是当 E/S 达到 16 g/kg 后,再增加酶与底物比,水解度的增加不明显,这可能是因为酶与底物比高于 16 g/kg 以后酶在底物表面的吸附作用已达到饱和,多出的酶不能在底物上起作用。考虑到成本问题,我们选择 E/S 的调控范围为 4~16 g/kg。

2.7 大豆分离蛋白水解条件正交实验结果

考虑到各因素的相互依赖和相互制约对酶解效果的影响^[17],进行正交实验以确定各参数的最佳组合,结果见表 5。

表 5 大豆脲制备正交实验结果

序号	A 温度	B pH 值	C 底物浓度	D E/S	水解度 /%
1	1	1	1	1	13.73
2	1	2	2	2	22.31
3	1	3	3	3	19.56
4	2	1	2	3	24.64
5	2	2	3	1	14.19
6	2	3	1	2	15.3
7	3	1	3	2	12.58
8	3	2	1	3	21.19
9	3	3	2	1	18.62
k ₁	18.533	16.983	16.74	15.513	
k ₂	18.043	19.23	21.857	16.73	
k ₃	17.463	17.827	15.443	21.797	
极差	1.07	2.247	6.414	6.284	

由表 5 可得出,以水解度为指标,根据极差分析得出木瓜蛋白酶酶解大豆分离蛋白制备大豆脲的最适条件是 A₁B₂C₂D₃,各因素影响顺序为底物浓度>E/S>pH 值>温度。对此工艺组合进行三次平行实验验证,三次实验的水解度分别为 24.67%、23.68%、24.6%,高于大部分实验组,因此确立最适条件是酶解温度为 55℃、酶解 pH 值为 7.5、底物浓度为 5%、E/S 为 16 g/kg。

2.8 大豆脲各项理化指标

对制备出的大豆脲进行理化分析,并与标准品比较,结果见表 6。

表 6 大豆脲与标准品理化指标比较结果 %

成分	水分	灰分	总脂	总氮	总磷
大豆脲标准品	5.8	13.5	1.12	9.1	0.7
大豆脲成品	4.2	6.7	0.95	9.7	0.68

经过以上工艺流程制备的大豆脲与所购标准品

进行比较,两者各项理化指标接近。所制大豆脲的总磷、总脂、灰分的测定结果都小于标准品,其中总脂小于标准品是因为对样品采用了脱脂的实验操作。

将用木瓜蛋白酶水解 1 h 后的大豆蛋白水解物进行 HPLC 分析,得出大豆蛋白水解物主要成分的分子量为 1 092 Da,能有效提供培养所需氮源。

2.9 氨基酸检测结果

氨基酸是蛋白脲中的主要成分之一,也是细胞生长过程中的重要营养成分^[18]。对所制备的大豆脲进行氨基酸分析,结果见表 7。表 7 显示,该大豆脲中的必需氨基酸种类齐全且含量高,因此自制大豆脲产品具有较高的营养价值。

表 7 氨基酸组分分析 mg/100 mg

氨基酸	大豆脲	大豆脲标准品
天冬氨酸	7.77	7.06
苏氨酸	1.85	1.68
丝氨酸	0.92	0.67
谷氨酸	16.24	14.71
甘氨酸	2.55	2.83
丙氨酸	2.69	2.57
异亮氨酸	2.97	2.51
亮氨酸	5.87	4.31
色氨酸	0.97	0.64
苯丙氨酸	0.62	0.38
赖氨酸	4.36	3.77
精氨酸	5.01	4.64
脯氨酸	3.22	3.40

3 结论

本研究以当地所产脱脂豆粕为原料,通过“碱提酸沉”法制备大豆分离蛋白。通过三因素三水平的正交实验得出大豆分离蛋白制备的最适条件是碱液萃取温度为 50℃,碱液萃取 pH 值为 8,酸沉淀 pH 值为 4.0。以制备出的大豆分离蛋白作为反应底物,再通过单因素和正交实验优化出制备大豆脲的最佳条件,即酶解温度为 55℃、酶解 pH 值为 7.5、底物浓度为 5%、E/S 为 16 g/kg,此时水解效率最高达到 24.67%。将制备出的大豆脲与市售的进口大豆脲标准品的理化性质进行比较,差异不大,满足大豆脲产品的规格要求,符合微生物实验所需。对所制得的大豆脲进行氨基酸分析,发现微生物生长所需的谷氨酸、赖氨酸等氨基酸质量分数较高,其他必需氨基酸种类齐全且丰富,可为微生物的生长

提供丰富的营养。

参考文献:

- [1] 张元元. 功能性大豆蛋白的制备及应用研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- [2] 郭睿. 功能性大豆蛋白的制备及应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
- [3] 穆利霞, 赵谋明, 颜小平, 等. 超声强化制备大豆蛋白-乳糖接枝物工艺条件的优化[J]. 现代食品科技, 2013, 29(1): 96-101.
- [4] Comas D I, Wagner J R, Tomás M C. Creaming stability of oil in water (O/W) emulsions: Influence of pH on soybean protein-lipid interaction [J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20(7): 990-996.
- [5] Molina E, Papadopoulou A, Ledward D A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins [J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15: 263-269.
- [6] Chun Liu, Xiansheng Wang, Hao Ma, et al. Functional properties of protein isolates from soybeans stored under various conditions [J]. Food Chemistry, 2008, 111(1): 29-37.
- [7] 吴建中. 大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2003.
- [8] 张焱. 大豆蛋白 ACE 抑制肽的酶法制备及分离纯化[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.

- [9] 班玉凤, 朱海峰, 孙明珠. Alcalase 水解大豆蛋白制备大豆蛋白寡肽的研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(11): 51-53.
- [10] 李杨, 江连洲, 隋晓楠, 等. 复合酶水酶法提取大豆蛋白的工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(14): 130-133.
- [11] 陈敏, 蔡会武, 邵纪生, 等. 双酶解法提取大豆蛋白的工艺研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(3): 537-539.
- [12] 潘妍, 王昌涛, 董银卯, 等. 微波-酶法耦合提取大豆蛋白的初步研究[J]. 食品科技, 2008(9): 10-13.
- [13] 陈敏. 双酶复合法提取大豆蛋白的工艺研究[D]. 西安: 西安科技大学, 2010.
- [14] 李淑芬, 胡敏. 碱溶酸沉法提取大豆蛋白条件的优化[J]. 大豆科学, 2014, 33(2): 274-277.
- [15] 陈创前, 蔡会武, 邵纪生, 等. 大豆蛋白复合酶解法研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(10): 6070-6074.
- [16] 钟瑜, 周欢, 陈礼刚. 大豆蛋白提取工艺初探[J]. 轻工科技, 2012(5): 4-7.
- [17] 任晓芬, 潘道东, 曾小群, 等. 嗜酸乳杆菌产胞壁蛋白酶的培养及发酵条件优化[J]. 中国食品学报, 2014, 14(2): 146-152.
- [18] Yufei Hua, Steve W, Qi Wang, et al. Heat induced gelling properties of soy protein isolates prepared from different defatted soybean flours[J]. Food Research International, 2005(38): 377-385. 完

(上接第37页)

0.05 显著统计水平,因此该建模能用于樟树籽油的超声波提取工艺优化。用回归方程对樟树籽油的超声波提取过程进行分析预测,软件分析得回归方程为: $Y = 37.68 + 1.64125X_1 + 0.77875X_2 + 0.7225X_3 - 2.23875X_1^2 + 0.1125X_1X_2 + 0.8X_1X_3 - 1.96375X_2^2 - 0.52X_2X_3 - 2.20625X_3^2$ 。拟合方程的一次项系数均为正,二次项系数均为负,表明这三个因素都对樟树籽油提取有正效应并且存在固定值使得转化率达到最大。SAS 程序预测最佳值: $X_1 = 0.409824$ 、 $X_2 = 0.181333$ 、 $X_3 = 0.216672$ 时,预测的提取率达到最大值,为38.165191%,且最大值处于稳定点(Stationary Point)。将X编码值分别回代到表1中求得对应参数,得超声波提取温度69.09824℃、超声波提取时间31.181333min、料液比1:21.08336g/mL,为了方便该模型的实际生产操作,分别选取超声波提取温度70℃、超声波提取时间32min、料液比1:21g/mL,在此条件下进行三次平行验证试验,得樟树籽油的平均提取率为38.12%,仅与预测值相差0.12%,说明此模型可信度高,可用于樟树籽油超声波提取工艺优化。

3 结论

超声波提取樟树籽油提取率高,提取时间短,作为植物油的新型提取技术值得推广。响应面优化超声波提取樟树籽油的提取工艺参数为:超声波提取温度70℃、超声波提取时间32min、料液比1:21g/mL,此条件下的樟树籽油提取率为38.12%,与模型预测结果相差甚小,模型可信度高。

参考文献:

- [1] 熊建华, 吴琴, 林丽萍, 等. 响应面分析法优化超声提取樟树籽油的工艺[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(3): 65-68.
- [2] 黄喜根, 任建敏, 刘晓庚, 等. 樟树籽核油的开发与利用研究[J]. 食品科学, 2002, 23(3): 19-20.
- [3] 李福星, 张彬, 周武, 等. 几种植物种子油脂的脂肪酸组成研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(10): 74-76.
- [4] 周武, 张彬, 邓丹雯. 樟树籽油提取的研究[J]. 中国油脂, 2004, 29(2): 30-31.
- [5] 赵晓霞, 董振浩, 刘光斌, 等. 香樟树籽油提取及其在化妆品中的应用[J]. 应用化工, 2013, 42(9): 1620-1623.
- [6] 史亚亚, 陶武辉, 曾哲灵. 樟树籽油酯交换法制备生物柴油的研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(1): 54-57.
- [7] 史亚亚. 樟树籽油制备轻质型生物柴油[D]. 南昌: 南昌大学, 2008. 完