

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2013.09.028

花生乳状液体系中蛋白质的酶解动力学研究*

章绍兵 刘向军 陆启玉

(河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要: 采用碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L 水解花生乳状液体系中蛋白质,研究了蛋白酶在乳状液体系中的水解特性。结果表明:蛋白质水解度随着初始酶浓度的增加而提高,在酶浓度一定的情况下水解度随着初始底物浓度的提高而降低。蛋白质水解度与乳状液的破乳率存在显著正相关($r=0.983$)。在花生乳状液体系中 Alcalase 2.4 L 的水解动力学参数 $K_m=0.0698 \text{ mol/L}$, $V_{\max}=3.71 \times 10^{-4} \text{ mol}/(\text{min}\cdot\text{L})$ 。由实验数据推导出蛋白质酶解初级阶段的动力学方程,确定蛋白质水解和乳状液破乳的临界初始底物质量浓度为 8.73 g/L (加酶量为 0.05%)。在酶和底物初始浓度以及反应时间确定的前提下,通过动力学方程可预测破乳过程中蛋白质的水解度及破乳率。

关键词: 花生乳状液 蛋白质 破乳 酶解 动力学

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2013)09-0157-05

Kinetics of Enzymatic Hydrolysis of Proteins in Peanut Emulsion

Zhang Shaobing Liu Xiangjun Lu Qiyu

(College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The kinetics of protein hydrolysis catalyzed by alkaline protease Alcalase 2.4 L was investigated in the peanut emulsion medium. The results showed that degree of protein hydrolysis was enhanced with the increase of initial enzyme concentration, but it was decreased with the increase of initial substrate concentration at fixed enzyme concentration. There was a good positive relationship between degree of protein hydrolysis and demulsification of emulsion ($r=0.983$). The apparent Michaelis constant K_m was 0.0698 mol/L and the maximum velocity V_{\max} was $3.71 \times 10^{-4} \text{ mol}/(\text{min}\cdot\text{L})$ in the peanut emulsion. The kinetic equation of peanut protein hydrolyzed by Alcalase 2.4 L at initial stage was obtained based on the experimental data. The critical substrate concentration was 8.73 g/L (initial enzyme concentration was 0.05%) for hydrolysis of protein and demulsification.

Key words: Peanut emulsion Protein Demulsification Enzymatic hydrolysis Kinetics

引言

水剂法同时制油和蛋白质从 20 世纪 50 年代就开始应用于花生加工,其工艺研究近年来得到了不断完善^[1~4]。与传统的提油工艺相比,水剂法制取的花生油质量高,后续精炼工艺少,得到的蛋白质变性程度低,有利于对油料蛋白的深度利用。但制油过程中由于形成大量稳定的乳状液,严重影响了游离油的分离。为提高水剂法制油工艺的油脂得率,

对乳状液必须进行破乳处理。通常采用的破乳方法有加热^[5]、冷冻解冻^[6]、转相法^[7]和高速离心^[8]等,这些物理方法虽可以有效破乳,但耗能高的缺点限制了其工业化应用。前期研究发现采用蛋白酶可以有效破坏花生乳状液的稳定性,花生油的提取率可以达到 90% 以上^[9]。蛋白酶破乳的本质应该是乳状液中蛋白质(包括界面蛋白质和非界面蛋白质)被水解后分子量变小,难以维持原有界面膜的强度所致。目前关于水相体系中蛋白质酶解动力学的研

收稿日期: 2013-01-16 修回日期: 2013-02-25

* 国家自然科学基金资助项目(31171652)

作者简介: 章绍兵,副教授,主要从事食品生物技术研究,E-mail: shaobingzhang@126.com

通讯作者: 陆启玉,教授,主要从事农产品加工技术研究,E-mail: qiyulu7120@vip.sina.com

究已有较多报道^[10-12],而对于乳状液体系中蛋白质酶解动力学的认识却非常有限。Alcalase 2.4 L 是一种来源于枯草杆菌的食品级碱性内切蛋白酶,由于其对底物作用范围广,水解蛋白质程度较为彻底,已被广泛应用于植物或动物蛋白的水解中。由于乳状液破乳与蛋白质酶解程度密切相关,为进一步掌握花生乳状液的破乳规律,本文采用 Alcalase 碱性蛋白酶水解花生乳状液体系中蛋白质,研究影响蛋白质水解度的重要因素,在此基础上确定乳状液体系蛋白质酶解反应的动力学参数,并探讨初级阶段反应的动力学方程。

1 材料与方 法

1.1 材 料

花生仁(未脱红衣):市售,粗脂肪质量分数为 46.06%、粗蛋白质量分数为 26.50%、含水率为 3.46%。

蛋白酶:Alcalase 2.4 L,酶活力 2.48×10^5 IU。

1.2 仪 器

A-88 型组织匀浆捣碎机,江苏金坛医疗器械厂;JMS-50DX 型胶体磨,廊坊市廊通机械有限公司;DT5-4B 型离心机,北京时代北利离心机有限公司;PHS-3C 型 pH 计,上海大浦仪器有限公司。

1.3 实 验 方 法

1.3.1 基本指标测定

含水率的测定:直接干燥法,参照 GB 5009.3—2010。花生仁粗蛋白质含量和乳状液中蛋白质含量的测定:凯氏定氮法,参照 GB 5009.5—2010。粗脂肪和乳状液中油脂含量测定:参照 GB/T 5009.6—2003;酶活力测定:参照 SB/T 10317—1999。

1.3.2 蛋白质水解度的测定方法(pH-stat 法)

pH-stat 法主要是基于蛋白质水解过程中,总伴随质子的释放或吸收,质子化的多少,依赖于溶液的 pH 值,通过用于维持体系 pH 值的碱或酸的消耗直接计算出水解度。计算公式^[13]为

$$x = \frac{BN_B M_p}{\alpha h_{tot}} \times 100\% \quad (1)$$

式中 x ——水解度, %

B ——碱液的体积, mL

N_B ——碱液 NaOH 的浓度,取 0.1 mol/L

α ——氨基的离解度

M_p ——底物中蛋白质总量, g

h_{tot} ——底物中蛋白质肽键摩尔质量浓度,取 7.5 mmol/g

1.3.3 乳状液的制取

花生仁和水按 1 g:10 mL 的比例置于烧杯中浸

泡 12 h。使用组织捣碎机对花生进行初步粉碎,再使用胶体磨对花生进一步粉碎,调节磨头间隙为 16 μm 。将适量花生浆转移烧杯中,用 10 mol/L 的 NaOH 调节体系 pH 值为 10.5,放入水浴锅中,40℃ 下搅拌 1.5 h。将物料转移至离心机中进行离心(2 800 g,15 min)。离心后用吸管吸出上层少量清油,再用小勺取出乳状层,放入烧杯中 4℃ 冷藏备用。

1.3.4 加酶量对蛋白质水解度及破乳率的影响

取 20 mL 乳状液(蛋白质质量浓度 0.92 g/mL)放入 50 mL 离心管中,加入 20 mL 蒸馏水混匀,此时蛋白质底物质量浓度为 4.60 g/L,调节混合浆液 pH 值到 8.5(Alcalase 在花生乳状液体系中水解蛋白质的最适 pH 值,由前期实验测定)。在 60℃(Alcalase 在花生乳状液体系中水解蛋白质的最适温度,由前期实验测定)恒温水浴条件下,分别在 5 个样品中加入 0.025%、0.050%、0.075%、0.100%、0.125% 的 Alcalase 酶进行水解反应,测定不同酶解时间下乳状液蛋白质的水解度。并将酶解 1 h 后的混合液在 2 800 g 条件下离心 20 min,取上层清油,称其质量 W_1 ,用罗兹-哥特里法测定乳状液中总油脂质量 W_0 ,破乳率计算公式为

$$P = \frac{W_1}{W_0} \times 100\% \quad (2)$$

1.3.5 底物质量浓度对蛋白质水解度的影响

分别取 5、10、15、20、25、30、35 mL 乳状液,添加蒸馏水至 40 mL 混匀,此时底物质量浓度分别为 1.15、2.30、3.45、4.60、5.75、6.90、8.05 g/L,调节混合浆液 pH 值到 8.5,在 60℃ 恒温水浴条件下,加入 0.05% 的 Alcalase 酶进行水解,测定不同酶解时间下乳状液蛋白质的水解度。用反应 30 min 时的水解度,按照 Lineweaver-Burk 作图法绘图,计算出前 30 min 酶解反应的动力学参数 K_m 和 V_{max} 值,其中底物质量浓度以底物中肽键物质的量浓度表示。

1.4 数 据 处 理

实验结果以 2 次以上实验的平均值 \pm 标准偏差表示,并使用 SPSS 13.0 for Windows 软件进行单因素方差分析, $p < 0.05$ 代表差异显著。

2 结 果 与 讨 论

2.1 加酶量对蛋白质水解度及破乳率的影响

由图 1 可以看出,在同一时间下,水解度随初始酶浓度的增加而增加。在同一初始酶浓度下,水解速率随着水解时间的延长而下降;在较低的初始酶浓度下,蛋白质水解度随着水解时间延长而显著增加,当加酶量(体积分数)达到 0.125% 时,水解度在

40 min 以后增加趋缓;当水解时间相同时,蛋白质的水解度随初始酶浓度的增加而提高。由图 2 可知,在加酶量为 0.050%、水解时间为 1 h 时,破乳率可达 90% 以上,随着加酶量的继续增加,破乳率没有显著变化。酶解乳状液的最终目的在于破乳,而不是获得蛋白质的最高水解度,所以本实验选择 0.050% 作为最佳加酶量。

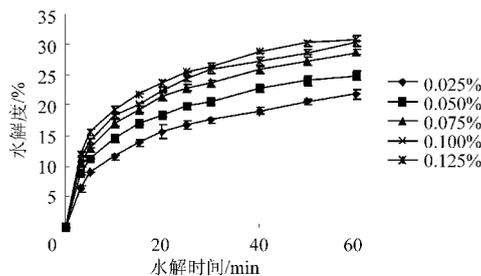


图 1 加酶量对花生乳状液体系蛋白质水解度的影响

Fig. 1 Effect of enzyme concentration on degree of hydrolysis of proteins in peanut emulsion

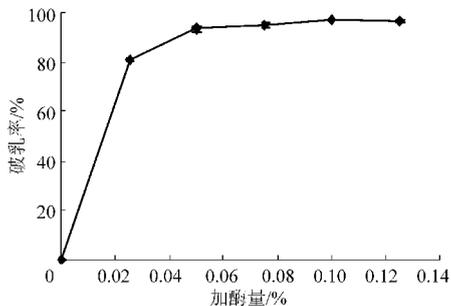


图 2 加酶量对酶法水解花生乳状液破乳率的影响

Fig. 2 Effect of enzyme concentration on demulsification of peanut emulsion

2.2 底物质量浓度对蛋白质水解度的影响

从图 3 可以看出,水解度随底物质量浓度的提高而下降,这一现象表明在反应体系中高质量浓度底物对酶促反应存在抑制作用,当底物质量浓度达到一定值时,抑制作用会大大加强。这与刘璘^[10]和黎金^[12]等研究水相体系中蛋白质酶解特性得到的结果一致。另一方面,在本研究的特定体系中,随着底物质量浓度的提高,乳状液的粘度势必增加,从而有可能限制了底物和酶分子的碰撞和结合,降低了蛋白质的水解度。

2.3 蛋白质水解度与乳状液破乳率的相关性研究

由图 4 可知,蛋白质水解度和乳状液的破乳率在水解前 30 min 内增加都很快,之后增加趋于平缓,通过线性拟合可知随着水解时间增加,两者存在显著正相关关系($r = 0.983$),即乳状液的破乳率随着蛋白质水解度的增加而提高。赵新淮等^[14]报道了大豆浓缩蛋白、分离蛋白的限制性酶解均可以提高产品的乳化活性。但在他们的研究中大豆蛋白的水解度均非常低,仅为 1% 和 2%。本实验结果表明

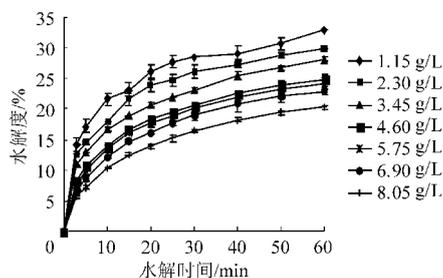


图 3 底物质量浓度对酶法水解花生乳状液体系蛋白质水解度的影响

Fig. 3 Effect of substrate concentration on degree of hydrolysis of proteins in peanut emulsion

随着花生乳状液蛋白质水解度增加,由于蛋白质分子量变小而容易从界面脱吸,使乳状液原本稳固的界面膜受到破坏,乳状液油滴易于相互聚并,最终导致破乳率增加。

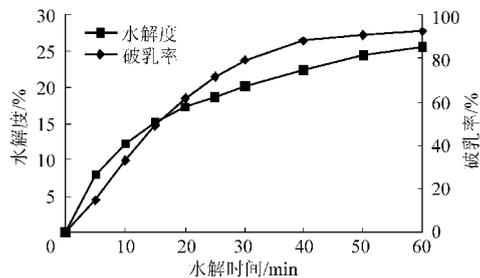


图 4 乳状液体系蛋白质水解度与破乳率的关系

Fig. 4 Relationship between degree of protein hydrolysis and demulsification of emulsion

2.4 酶法水解花生乳状液体系蛋白质的动力学

从图 1 可以看出,不管酶浓度的高低,Alcalase 酶水解花生乳状液蛋白过程中,前 30 min 蛋白质水解度随酶浓度的增加而显著升高,表明此时底物中可水解肽键数量仍很多,属于有限水解过程(反应初期阶段)。这一阶段也正是破乳率升高最快的阶段(图 4),因此,对其蛋白质水解动力学的研究具有重要意义。在反应初期阶段,产物与底物之间差异较小,有助于用较简单的水解过程模型来描述。在高底物质量浓度条件下,反应过程近似满足米氏方程^[13]。

2.4.1 水解动力学参数的确定

由图 5(图中 c_s 表示底物质量浓度,用肽键物质的量浓度表示; V 表示水解速率)得线性方程为 $y = 188.29x + 2697.5$, $R^2 = 0.9987$,相关性很好。由方程可得,Alcalase 催化水解花生乳状液蛋白反应前 30 min 的 $K_m = 0.0698 \text{ mol/L}$, $V_{\max} = 3.71 \times 10^{-4} \text{ mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$ 。与该酶在水相体系中催化水解米渣蛋白的动力学参数($K_m = 0.6598 \text{ mol/L}$, $V_{\max} = 3.51 \times 10^{-3} \text{ mol}/(\text{min} \cdot \text{L})$)^[15]相比,在乳状液体系中 Alcalase 的 K_m 更小,表明界面蛋白可能与该酶的

亲和力更强(不考虑2种底物的一级结构差异),而最大反应速度由于受到乳状液体系粘度大的影响明显变小。

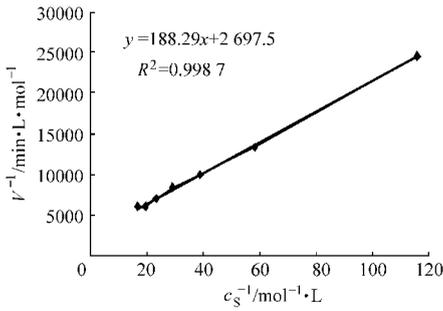


图5 Lineweaver - Burk 作图法求 K_m 和 V_{max}

Fig. 5 Determination of K_m and V_{max} by Lineweaver - Burk mapping method

2.4.2 水解动力学方程的确定

蛋白质的有限水解过程符合双底物顺序反应机理,在恒定 pH 值和温度的条件下,花生乳状液蛋白质的总水解速率可表示为^[16-17]

$$V = aS_0 \exp(-bx) \quad (3)$$

式中 S_0 ——初始底物质量浓度

a 、 b ——动力学参数

对式(3)进行积分可得水解速率随水解度变化关系,方程为

$$dx/dt = a \exp(-bx) \quad (4)$$

对式(4)进行积分,可得水解度与水解时间的关系方程

$$x = (1/b) \ln(1 + abt) \quad (5)$$

使用 DPS 软件对不同底物浓度条件下水解度和时间关系(图3)进行非线性回归运算,可得式(5)中动力学参数 a 和 b 的值(见表1, E_0 表示加酶量)。

表1 a 和 b 与 E_0/S_0 的关系

Tab. 1 Relationship between a , b and E_0/S_0

$S_0/g \cdot L^{-1}$	$E_0/\%$	E_0/S_0	a	b
1.15	0.050	0.043 5	16.684 9	0.152 973
2.30	0.050	0.021 7	11.416 2	0.153 556
3.45	0.050	0.014 5	10.257 5	0.174 621
4.60	0.050	0.010 9	6.048 4	0.168 516
5.75	0.050	0.008 7	4.698 9	0.156 306
6.90	0.050	0.007 2	3.679 5	0.152 946
8.05	0.050	0.006 2	3.000 0	0.173 187
4.60	0.025	0.005 4	4.015 8	0.175 510
4.60	0.075	0.016 3	8.836 0	0.158 575
4.60	0.100	0.021 7	9.417 4	0.148 323
4.60	0.125	0.027 2	11.742 3	0.151 393

从表1中可以看出,在加酶量 E_0 为 0.050%, pH 值 8.5, 温度 60℃, 不同底物浓度下水解 30 min 时, b 值总是接近一个常数, 其值在平均值 0.160 5

左右波动。并且在加酶量一定的情况下, a 值随着 S_0 的增加而减小。经线性拟合后, 加酶量都为 0.050% 的时候, a 与 S_0 存在如图6的关系。

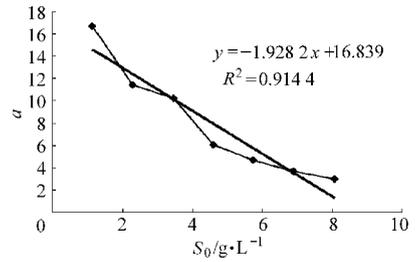


图6 a 与 S_0 的关系

Fig. 6 Relationship between a and S_0

由图6可知 a 与 S_0 的关系方程为

$$a = 16.839 - 1.928 2S_0 \quad (6)$$

因此, 将式(6)代入式(4)可得

$$dx/dt = (16.839 - 1.928 2S_0) \exp(-0.160 54x) \quad (7)$$

式(7)表明, 当 $16.839 - 1.928 2S_0 \geq 0$, 即 $S_0 \leq 8.73$ g/L 时, 反应才能进行, 否则, $dx/dt \leq 0$, 反应将无法进行。所以, 在加酶量为 0.05% 时, 临界底物质量浓度 S_0 为 8.73 g/L。研究破乳实验过程中也发现当乳状液不稀释时(此时初始底物质量浓度为 9.2 g/L), 破乳效果很差。

由表1同样可知, 在加酶量为 0.05%, pH 值为 8.5, 温度为 60℃ 时, 不同底物质量浓度条件下酶解 30 min, 将 a 与 E_0/S_0 的值进行拟合(图7)得到关系方程

$$a = 360.27E_0/S_0 + 2.169 \quad (8)$$

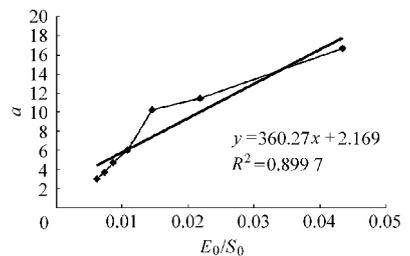


图7 a 与 E_0/S_0 的关系

Fig. 7 Relationship between a and E_0/S_0

将表1中参数 b 的平均值 0.160 5 与式(8)的 a 代入 $x = (1/b) \ln(1 + abt)$ 可得到描述 Alcalase 酶在 60℃、pH 值 8.5 条件下催化水解花生乳状液中蛋白质的动力学方程

$$x = 6.230 5 \ln(1 + 57.823(E_0/S_0 + 0.006)t) \quad (9)$$

式(9)表明, 在 Alcalase 蛋白酶催化水解花生乳状液蛋白的体系中, 水解度 x 与加酶量 E_0 、初始底物质量浓度 S_0 和时间 t 存在一定关系: 在 S_0 不变的情况下, 水解度随着加酶量 E_0 的提高而提高; 反之, 在 E_0 不变的情况下, 水解度随着初始底物质量浓度

S_0 提高而降低。随机抽取实验中 8 组数据与相应条件下该方程的预测值对比,发现实验值与预测值无显著差异。在实际生产中,当初始酶浓度和底物质量浓度已知时,可以通过此方程计算反应一定时间后蛋白质的水解度,进而预测乳状液的破乳率。

3 结论

(1) Alcalase 蛋白酶水解花生乳状液体系中蛋白质时,蛋白质水解度随着加酶量的增加而提高,在

加酶量一定的情况下水解度随着初始底物质量浓度的提高而降低。

(2) 蛋白质水解度与乳状液的破乳率存在显著正相关($r=0.983$)。

(3) 在花生乳状液体系中,Alcalase 蛋白酶的水解动力学参数 $K_m = 0.0698 \text{ mol/L}$, $V_{\max} = 3.71 \times 10^{-4} \text{ mol}/(\text{min}\cdot\text{L})$ 。水解初期(前 30 min)动力学方程为 $x = 6.2305 \ln(1 + 57.823(E_0/S_0 + 0.006)t)$ 。

参 考 文 献

- 1 Sugarman N. Process for simultaneously extracting oil and protein from oleaginous materials: US, 842356[P]. 1956-08-28.
- 2 Sharma A, Khare S K, Gupta M N. Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2002, 79(3):215~218.
- 3 Jiang Lihua, Hua Di, Wang Zhang, et al. Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates [J]. Food and Bioproducts Processing, 2010, 88(1):233~238.
- 4 Zhang Shaobing, Lu Qiyu, Yang Hongshun, et al. Aqueous enzymatic extraction of oil and protein hydrolysates from peanut seeds [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2011, 88(4):727~732.
- 5 李瑚传. 水剂法加工花生的工艺及设备的探讨[J]. 中国油脂,1984(9):506~511.
Li Huchuan. Investigation of the technology and equipments of aqueous extraction of peanut seeds[J]. China Oils and Fats, 1984(9):506~511. (in Chinese)
- 6 王瑛瑶,王璋,罗磊. 水酶法提花生油中乳状液性质及破乳方法[J]. 农业工程学报,2008,24(12):259~263.
Wang Yingyao, Wang Zhang, Luo Lei. Property of the emulsion formed in aqueous enzymatic extraction of oil from peanut and demulsification methods [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2008,24(12):259~263. (in Chinese)
- 7 Dominguez H, Nunez M J, Lema J M. Aqueous processing of sunflower kernels with enzymatic technology [J]. Food Chemistry, 1995, 53(4):427~434.
- 8 Shah S, Sharma A, Gupta M N. Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by combination of ultrasonication and aqueous enzymatic oil extraction[J]. Bioresource Technology,2005,96(1):121~123.
- 9 章绍兵,吕燕红,胡玥,等. 水剂法提取花生油中的破乳研究[J]. 河南工业大学学报:自然科学版,2010,31(5):1~4,61.
Zhang Shaobing, Lü Yanhong, Hu Yue, et al. Study on demulsification of emulsion formed during aqueous extraction of peanut oil [J]. Journal of Henan University of Technology: Natural Science Edition, 2010, 31(5):1~4, 61. (in Chinese)
- 10 刘璘,叶峰,段志敏. 蛋白质酶法有限水解过程反应机理和动力学特性[J]. 化工学报,2002,53(2):199~202.
Liu Lin, Ye Feng, Ou Zhimin. Mechanism and kinetic analysis of enzymatic limited hydrolysis of soy protein isolate[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering, 2002, 53(2):199~202. (in Chinese)
- 11 Chabanon G, Chevalot I, Framboisier X, et al. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates [J]. Process Biochemistry, 2007, 42(10):1419~1428.
- 12 黎金,张国权,罗勤贵. 荞麦蛋白的碱性蛋白酶酶解动力学研究[J]. 中国粮油学报,2009,24(6):41~46.
Li Jin, Zhang Guoquan, Luo Qingui. Kinetics in alkaline protease hydrolysis of buckwheat protein[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,2009,24(6):41~46. (in Chinese)
- 13 Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food proteins [M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- 14 赵新淮,侯瑶. 大豆蛋白限制性酶解对乳化性质和吸油性的影响[J]. 农业机械学报,2009,40(12):159~163.
Zhao Xinhuai, Hou Yao. Limited hydrolysis of soybean proteins and modifications in emulsifying property and oil absorption capacity[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery,2009,40(12):159~163. (in Chinese)
- 15 李积华,郑为完,苏冰霞,等. Alcalase 2.4L FG 酶解米渣蛋白动力学特性研究[J]. 食品科学,2007,28(5):190~194.
Li Jihua, Zheng Weiwan, Su Bingxia, et al. Study on hydrolysis kinetics rice dregs with Alcalase 2.4L FG [J]. Food Science, 2007,28(5):190~194. (in Chinese)
- 16 Marquez M C, Vazquez M A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 1999, 35(1~2):111~117.
- 17 Qu Wenjuan, Ma Haile, Jia Junqiang, et al. Enzymolysis kinetics and activities of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein prepared with SFP ultrasound-assisted processing [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2012, 19(5):1021~1026.