

乳清蛋白酶解条件优化

Optimization on conditions of protease hydrolysis for whey protein

孙 洋¹ 钱 方² 赵 磊² 刘晓慧² 牟光庆²

SUN Yang¹ QIAN Fang² ZHAO Lei² LIU Xiao-hui² MU Guang-qing²

(1. 大连工业大学信息科学与工程学院, 辽宁 大连 116034; 2. 大连工业大学食品学院, 辽宁 大连 116034)

(1. School of Information Science and Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China;

2. School of Food Science and Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

摘要:用二次回归正交旋转组合设计对乳清蛋白酶解条件进行优化,建立酶法水解乳清蛋白的水解度与水解温度、水解时间、加酶量等三因素的正交回归模型。结果表明:在反应温度 57 ℃、加酶量 8 214 U/g·蛋白条件下酶解 114 min,可获得中性蛋白酶水解乳清蛋白的最大水解度 11.72%,与模型值基本相符。

关键词:乳清蛋白;蛋白酶;酶法水解

Abstract: With quadratic regression orthogonal rotational combination design, the conditions of whey protein enzyme hydrolysis were optimized. Established the orthogonal regression model which is about the degree of hydrolysis to three factors of temperature, time, enzyme dosage. Experiments showed under the conditions of temperature of 57 ℃, enzyme dosage of 8 214 U/g protein and hydrolysis time of 114 minutes, the degree of hydrolysis was the maximum, of 11.72%, which basically consistent with the model value.

Keywords: whey protein; protease; hydrolysis of protease

近年来随着人们营养健康意识的增强,蛋白质和脂肪含量相当于原料乳 10 倍的干酪,成为世界上唯一保持连续上升的乳制品^[1]。按生产 1 t 干酪排放 9 t 乳清计,每年有上亿吨的乳清等待利用和处理^[2]。乳清不仅产量大,且营养丰富(含乳清蛋白、脂肪、乳糖、矿物质和水溶性维生素等),必需氨基酸组成完全符合或超出 FAO/WHO 要求^[3]。由于蛋白酶能部分降解乳清蛋白多肽骨架,增加特殊功能基团,具有改变乳清蛋白的乳化性、稳定性等功能特性^[4]。也是降低其

过敏反应的有效方法之一^[5]。本研究为便于乳清蛋白酶解后直接用于乳制品中,因此在自然 pH 下对乳清蛋白预处理及酶解条件进行优化,以提高乳清蛋白酶解产物的利用率和营养价值。

1 材料与方法

1.1 材料

乳清浓缩蛋白(WPC80):美国哥兰比亚乳业公司;

中性蛋白酶:酶活 14.6 万 U/g,广西南宁庞博生物工程有限公司;

木瓜蛋白酶:酶活 21.4 万 U/g,广西南宁庞博生物工程有限公司;

胰蛋白酶:酶活 10.0 万 U/g,北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅:DK-S22 型,上海精密实验设备有限公司;

光栅分光光度计:722 型,山东高密彩虹分析仪器有限公司;

精密 pH 计:pH S-3B 型,上海雷磁仪器厂;

多管架自动平衡离心机:TDZ5-WS 型,湘仪离心机仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 测定项目及方法

(1) 蛋白酶活力测定:福林—酚法^[6,7]。

(2) 蛋白含量测定:微量凯氏定氮法^[8]。

(3) 蛋白水解度(DH)测定:改进 pH-stat 法^[9,10]。

1.3.2 预处理方式对乳清蛋白酶解的影响 分别采用 63 ℃/30 min, 80 ℃/10 min, 95 ℃/5 min 的预处理方式对乳清蛋白 WPC80 进行处理,以未经预处理的作对照。水解条件:WPC80 8%,初始 pH 6.8,木瓜蛋白酶量 5 000 U/g·蛋白,

基金项目:国家十二五科技支撑(编号:2013BAD18B09, 2013BAD18B04);辽宁省高校重大科技平台(编号:辽教发[2011]191);辽宁省科学计划(编号:2013229027);辽宁省高校优秀人才项目(编号:LR2013024)

作者简介:孙洋(1955—),男,大连工业大学工程师。

E-mail: qf09@163.com

通讯作者:钱方

收稿日期:2014-11-26

温度 50 ℃, 时间 60 min。通过乳清蛋白水解程度来确定最佳的预处理方式。

1.3.3 不同蛋白酶水解乳清蛋白的效果比较 选用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶, 在加酶量 5 000 U/g·蛋白, 初始 pH 6.8, 50 ℃, 60 min 的条件下对终浓度 8% 的乳清蛋白(WPC80)进行酶解, 并经沸水 10 min, 冷至室温后, 通过比较水解程度来确定乳清蛋白酶解的最佳酶。

1.3.4 单因素试验

(1) 加酶量对酶解乳清蛋白的影响: 在初始 pH 6.8、水解温度 50 ℃、水解 60 min 条件下, 用最佳酶对终浓度 8% 的乳清蛋白进行酶解, 分别测定在 1 000, 3 000, 5 000, 7 000, 9 000 U/g·蛋白加酶量的水解度。

(2) 水解温度对酶解乳清蛋白的影响: 在初始 pH 6.8、加酶量 5 000 U/g·蛋白、水解 60 min 条件下, 用最佳酶对终浓度 8% 的乳清蛋白进行酶解, 分别测定在 40, 45, 50, 55, 60 ℃ 水解温度下的水解度。

(3) 水解时间对酶解乳清蛋白的影响: 在初始 pH 6.8、水解温度 50 ℃、加酶量 5 000 U/g·蛋白条件下, 用最佳酶对终浓度 8% 的乳清蛋白进行酶解, 分别测定 30, 60, 90, 120, 150 min 水解时间的水解度。

1.3.5 正交旋转回归试验设计 基于单因素试验结果, 以木瓜蛋白酶的水解温度、水解时间和加酶量 3 个因素为自变量, 以乳清蛋白水解度为响应值, 设计 20 个试验点的正交旋转回归试验, 保证试验点最小的前提下, 提高乳清蛋白酶解效率, 并用 Design Expert 8.0.6 统计软件对结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 预处理方式对酶解乳清蛋白的影响

由于乳清蛋白的热稳定性较差, 不同的预处理方式对其酶解效果影响较大。为了得到最佳水解效果, 按表 1 的预处理方式及水解条件酶解乳清蛋白 WPC, 并测其水解度。

由图 1 可知, 其中 80 ℃ 处理 10 min 的水解度最大, 达 9.21%。所以选用 80 ℃ 处理 10 min 对酶解前乳清蛋白进行预处理。

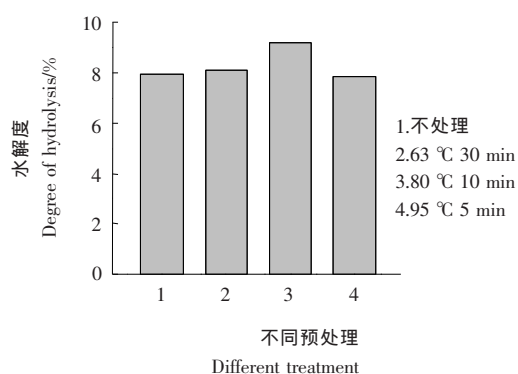


图 1 不同预处理方式水解乳清蛋白的比较

Figure 1 Comparison of different pretreatments of enzymolysis of whey protein

2.2 不同蛋白酶水解乳清蛋白的效果比较

考虑到酶解反应受温度、加酶量、底物浓度和水解时间等多种因素影响。为寻找水解乳清蛋白的适宜酶及其最佳酶解条件, 本研究分别用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶 3 种酶, 在相同酶解条件水解乳清蛋白, 比较其水解程度。由图 2 可知, 木瓜蛋白酶水解度最大, 达 8.96%。因此选用木瓜蛋白酶作为乳清蛋白水解最佳用酶。

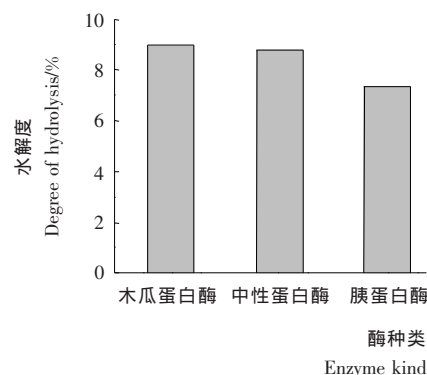


图 2 不同蛋白酶水解乳清蛋白的比较

Figure 2 Comparison of different proteases of enzymolysis of whey protein

2.3 单因素试验

2.3.1 加酶量对酶解乳清蛋白的影响 由图 3 可知, 在同一初始 pH、水解温度和时间下, 当木瓜蛋白酶量低于 5 000 U/g·蛋白时, 乳清蛋白水解度随酶量的增加而明显升高; 而加酶量高于 5 000 U/g·蛋白时, 由于底物浓度和酶逐渐达到饱和, 水解度升高幅度不明显。因此, 初步确定木瓜蛋白酶水解乳清蛋白适宜用酶量为 5 000 U/g·蛋白, 相应水解度 DH 为 9.65%。

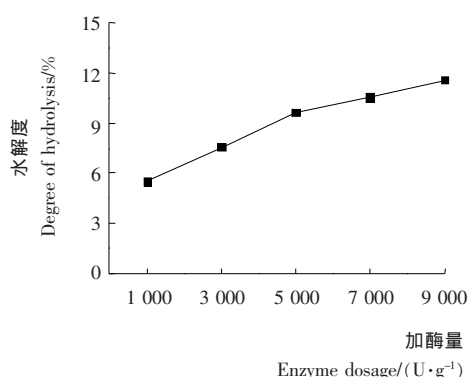


图 3 加酶量对蛋白酶水解乳清蛋白的影响

Figure 3 Effects of different enzyme dosage on whey protein enzymolysis

2.3.2 水解温度对酶解乳清蛋白的影响 由图 4 可知, 在同一初始 pH、水解时间和加酶量下, 酶解温度控制在 40~55 ℃ 时, 乳清蛋白水解度随温度上升而增大, 而高于 55 ℃

时,则随着温度升高,水解度降低,说明酶活力下降。木瓜蛋白酶水解乳清蛋白的适宜水解温度为 55 ℃,相应水解度 DH 为 9.96%。

2.3.3 水解时间对酶解乳清蛋白的影响 由图 5 可知,在同一水解温度、初始 pH 值和加酶量下,乳清蛋白水解度随水解时间的延长而升高。而水解 90 min 后,水解度趋势线变缓。因此,初步确定木瓜蛋白酶水解乳清蛋白适宜水解时间为 90 min,相应水解度 DH 为 9.87%。

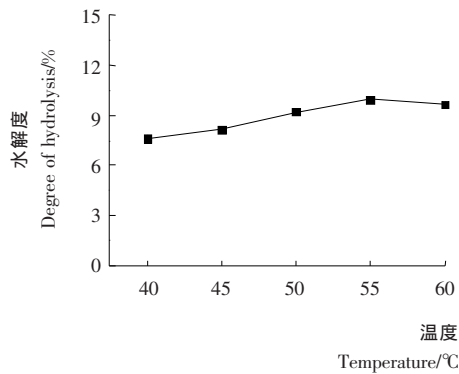


图 4 水解温度对酶解乳清蛋白的影响
Figure 4 Effects of different temperature on whey protein enzymolysis

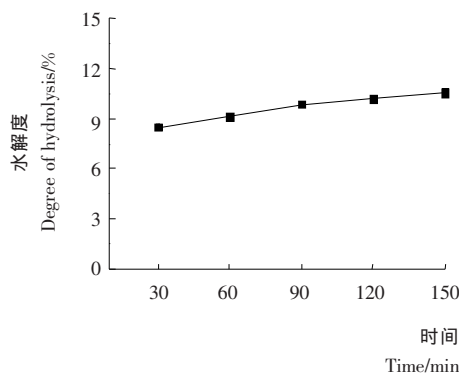


图 5 水解时间对酶解乳清蛋白的影响
Figure 5 Effects of different time on whey protein enzymolysis

2.4 正交旋转回归试验

2.4.1 正交旋转回归设计酶解乳清蛋白试验结果分析 根据单因素试验结果确定的回归正交旋转试验因素水平取值见表 1,木瓜蛋白酶解乳清蛋白回归正交旋转试验结果见表 2,方差分析见表 3、4。

用 Design-Expert 软件进行回归分析,对各因素回归拟合后得回归方程:

$$DH = 10.40 + 0.22X_1 + 0.30X_2 + 1.31X_3 + 0.019X_1X_2 + 0.011X_1X_3 - 0.039X_2X_3 - 0.39X_1^2 - 0.16X_2^2 - 0.40X_3^2 \quad (1)$$

表 1 正交旋转回归设计的因素水平编码表

Table 1 Factors level coding schedule of regression orthogonal rotary tests

编码	X ₁ 水解温度/℃	X ₂ 时间/min	X ₃ 加酶量/(U·g ⁻¹ 蛋白)
+1.682	63.41	140.45	8 363.59
+1	60	120	7 000
0	55	90	5 000
-1	50	60	3 000
-1.682	46.59	39.55	1 636.41

表 2 正交旋转回归设计酶解乳清蛋白试验与结果

Table 2 Design and results of orthogonal rotational regression of whey protein enzymolysis

序号	X ₁	X ₂	X ₃	DH 水解度/%
1	-1	-1	-1	7.44
2	+1	-1	-1	7.83
3	-1	+1	-1	7.94
4	+1	+1	-1	8.37
5	-1	-1	+1	10.40
6	+1	-1	+1	10.80
7	-1	+1	+1	10.71
8	+1	+1	+1	11.22
9	-1.682	0	0	9.07
10	+1.682	0	0	9.83
11	0	-1.682	0	9.41
12	0	+1.682	0	10.82
13	0	0	-1.682	7.56
14	0	0	+1.682	11.30
15	0	0	0	10.23
16	0	0	0	10.67
17	0	0	0	10.23
18	0	0	0	10.58
19	0	0	0	10.33
20	0	0	0	10.28

由表 3 可知,模型交互项 X₁X₂、X₁X₃、X₂X₃ 及二次项 X₂² 差异不显著,模型一次项 X₂、X₃ 及二次项 X₁²、X₃² 差异极显著,模型一次项 X₁ 差异显著,说明响应面分析所选的 3 个主效应显著。其中各种因素间的交互作用较小。同时由 F 值(各项均方/剩余误差均方)可看出,水解温度、水解时间、加酶量 3 个因素中加酶量对乳清蛋白水解度影响最大,其次为水解时间和温度。

表 3 正交试验结果方差分析表[†]
Table 3 Variance analysis table of the result of
orthogonal tests

变异来源	系数 估计值	平方和 SS	自由度	均方 MS	F 值	显著性
截距	10.40	—	—	—	—	
X ₁	0.22	0.66	1	0.66	7.10	*
X ₂	0.30	1.26	1	1.26	13.55	**
X ₃	1.31	23.30	1	23.30	250.54	**
X ₁ X ₂	0.02	0.00	1	0.00	0.03	
X ₁ X ₃	0.01	0.00	1	0.00	0.01	
X ₂ X ₃	-0.04	0.01	1	0.01	0.13	**
X ₁ ²	-0.39	2.20	1	2.20	23.66	
X ₂ ²	-0.16	0.35	1	0.35	3.76	**
X ₃ ²	-0.40	2.28	1	2.28	24.52	**
回归模型		29.42	9	3.27	35.16	
剩余误差		0.93	10	0.09		
纯误差		0.18	5	0.04		
失拟项		0.75	5	0.15	4.17	
总变异		30.35	19			

[†] * 为显著(P<0.05), ** 为高度显著(P<0.01); $F_{0.01(1,10)} = 10.04$, $F_{0.05(1,10)} = 4.96$; $F_{0.01(5,5)} = 11.0$, $F_{0.05(5,5)} = 5.05$; $F_{0.01(9,10)} = 4.95$, $F_{0.05(9,10)} = 3.02$ 。

表 4 乳清蛋白水解度模型的方差分析
Table 4 Variance analysis of the model of DH

模型统计	结果
均值	9.75
标准差	1.26
复相关系数的平方	96.94
复相关系数	98.46
变异系数	12.96

本试验模型不同处理间差异极显著,说明回归方程描述各因子与响应值之间的关系时,其应变量与全体自变量之间的线性关系是显著的。同时变异系数(CV=12.96%)也说明了这种试验方法是可靠的。复相关系数平方 $R^2 =$ 回归平方和/总平方和=96.94%,说明由这 3 个因素及二次项能解释 96.94%响应值的变化。由表 3 可知,回归方程的显著性检验 F 值=35.16 > $F_{0.01(9,10)} = 4.95$ 极显著,说明试验数据与采用的数学模型相符合;回归方程的失拟性检验 F 值=4.17 < $F_{0.05(5,5)} = 5.05$ 不显著,可认为所选用的二次模型是适当的^[11-15]。

2.4.2 响应面效应分析 用 Design Expert 软件进行分析,作出响应面和等高线,得到因素间的交互关系及对乳清蛋白

水解度的影响。由图 6 可知,水解体系加酶量一定时,乳清蛋白水解度随着反应时间增长而增大,当时间达到一定值后水解度的增大变缓;在水解体系加酶量一定时,乳清蛋白水解度随着温度增加而增加,当温度达到一定时水解度开始下降。在适当中间区域的反应时间和温度两种因素交互作用下,可获得水解度较高的酶解产物。

同样,由图 7 和 8 可看出,水解温度与加酶量、水解时间和加酶量等之间的关系均与图 6 水解温度和水解时间的分析结果类似。

2.5 酶解乳清蛋白最佳水解条件确定

为进一步确定乳清蛋白最佳酶解条件,对回归方程取一阶偏导数为零整理得:

$$\begin{cases} 0.22 + 0.019X_2 + 0.011X_3 - 0.78X_1 = 0 \\ 0.30 + 0.019X_1 - 0.039X_3 - 0.32X_2 = 0 \\ 1.31 + 0.011X_1 - 0.039X_2 - 0.80X_3 = 0 \end{cases} \quad (2)$$

联立上述 3 个方程求解,得到极值点 $X_1 = 0.324$ 、 $X_2 = 0.794$ 、 $X_3 = 1.607$ 。换算后得乳清蛋白最优酶解条件,即在反应温度 56.62℃、加酶量为 8 213.77 U/g·蛋白条件下,木瓜蛋白酶水解乳清蛋白 113.83 min 时能获得最大水解度,其最大水解度为 11.60%。考虑到实验可操作性,验证实验在反应温度 57℃、加酶量 8 214 U/g·蛋白、水解时间 114 min 条件下进行,所得到乳清蛋白水解度为 11.72%,与模型值(11.60%)相符。

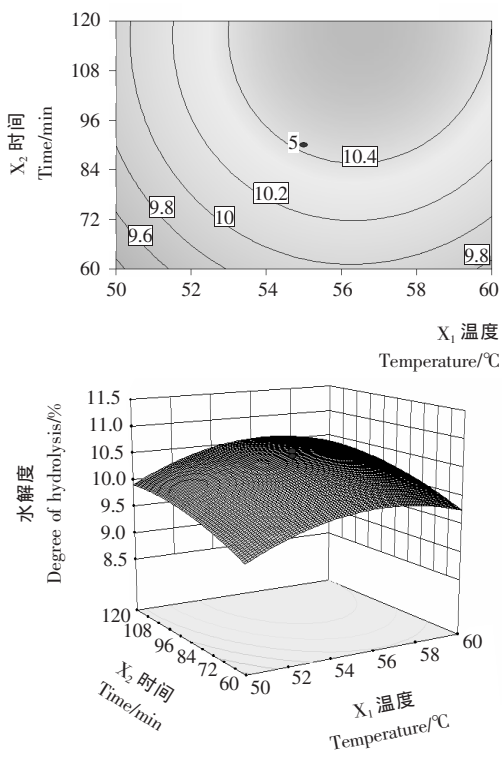


图 6 水解温度和水解时间对水解度的交互影响
Figure 6 Mutual influence of temperature and time on DH

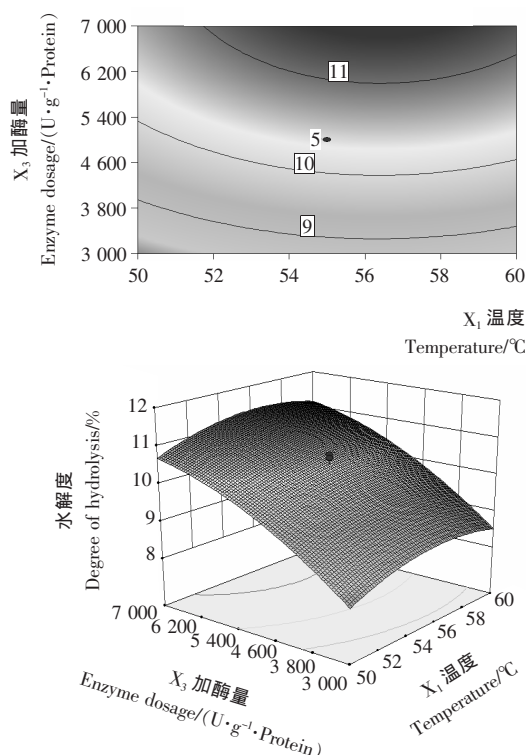


图 7 水解温度和加酶量对水解度的交互影响

Figure 7 Mutual influence of temperature and enzyme dosage on DH

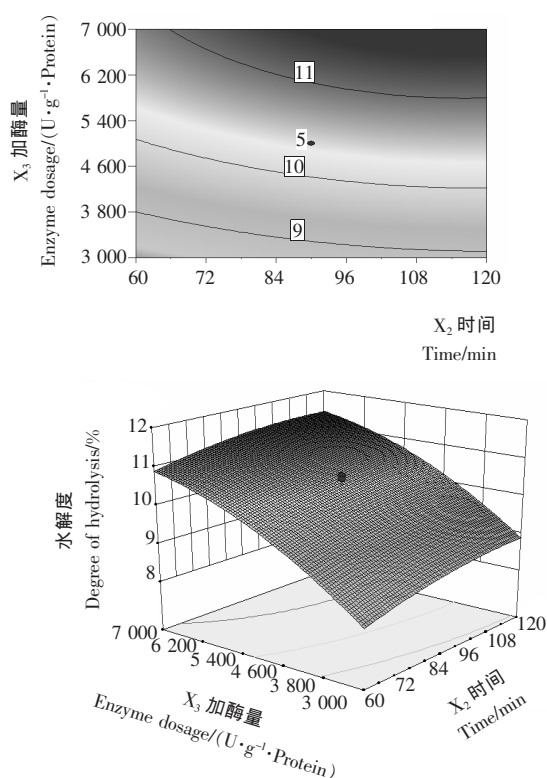


图 8 水解时间和加酶量对水解度的交互影响

Figure 8 Mutual influence of time and enzyme dosage on DH

3 结论

为更好地提高乳清蛋白酶解产物的利用率和营养价值,本研究比较了乳清蛋白在不同预处理方式下酶解程度,分析了酶切位点相异的蛋白酶自然 pH 下对乳清蛋白的酶解效果,并通过正交旋转回归设计优化了乳清蛋白的酶解条件。研究表明乳清蛋白水溶液经 80 °C 10 min 预处理后,加入 8 214 U/g·蛋白的木瓜蛋白酶,57 °C 水解 114 min 后能获得最大水解度。以往关于酶解乳清蛋白的研究,都是控制蛋白酶在其各自最适 pH 下且未考虑预处理对水解产物的影响,这势必会影响到乳清蛋白在食品中的应用。本研究不仅提高了乳清蛋白酶解效率,同时还可将其酶解产物—乳清蛋白肽直接地应用于液态乳制品等功能性食品中。

参考文献

- 1 杜琨,张亚宁.干酪的营养价值及研究动态[J].中国食物与营养,1995(10):45~46.
- 2 严宝兴.乳清资源的综合利用[J].草业与畜牧,2008(9):52~55.
- 3 郭本恒.乳品化学[M].北京:中国轻工业出版社,2001:246~247.
- 4 Scheme I, Muschiolik G. Effects of various whey protein hydrolysates on the emulsifying and surface properties of hydrolysed lecithin[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2001(21): 107~117.
- 5 Ena J M, Van Beresteijn E C H, Robben A J P M, et al. Whey protein antigenicity reduction by fungal proteinases and a pepsin/pancreatic combination[J]. Journal of Food Science, 1995, 60(1): 104~116.
- 6 Mamoru S, Masao I, Masanori S, et al. A new method for protease activity measurement[J]. Analytical Biochemistry, 1979, 97(1): 11~16.
- 7 周景祥,王桂芹.蛋白酶和淀粉酶活性检测方法探究[J].中国饲料,2011(11):78~86.
- 8 王镜岩.生物化学[M].第三版.北京:高等教育出版社,2002:196~199.
- 9 袁斌,吕桂善,刘小玲.蛋白质水解度的简易测定[J].广西农业生物科学,2002,21(2):113~115.
- 10 Jens Adler-Nissen. Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes[J]. Chem. Tech. Biotechnol., 1984(34B): 215~222.
- 11 官波,郑文诚.山药多糖提取工艺的优化[J].食品与机械,2010,26(1):98~101.
- 12 刘军海,黄宝旭,蒋德超,等.响应面分析法优化艾叶多糖提取工艺研究[J].食品科学,2009,30(2):114~118.
- 13 王曙光,贾士儒,乔长晟,等.响应面法优化鸡骨泥酶解条件的研究[J].中国酿造,2009(2):80~82.
- 14 林伟静,吴广枫,王强,等.燕麦全粉中β-葡聚糖提取工艺优化[J].食品与机械,2010,26(1):121~124.
- 15 吴波,陈运中.响应面分析法优化鱼鳞脱钙条件的研究[J].食品科学,2008(9):123~129.