

黑大豆与扁豆活性蛋白质提取工艺的研究

郝利平, 郝林

(山西农业大学)

摘要: 利用较先进的冷却粉碎、膜分离、真空冷冻干燥等技术对黑大豆与扁豆活性蛋白质的提取进行研究分析。试验证明冷却粉碎、低温离心分离、膜分离及真空冷冻干燥等工艺对胰蛋白酶抑制剂、糜蛋白酶抑制剂的活性无明显影响, 可以很好地保持黑大豆与扁豆功能性蛋白质的活性。

关键词: 活性蛋白质; 冷却粉碎; 膜分离; 真空冷冻干燥

中图分类号: S377

文献标识码: A

文章编号: 100226819(2002)0320117203

豆类含有丰富的蛋白质, 是人类重要的植物蛋白资源。不同豆类蛋白质含量、活性物质的含量、以及蛋白质的功能不同。目前有关豆类功能性活性蛋白的研究深受国内外研究者的重视^[1-3]。但是在豆类蛋白质提取过程中, 提取工艺、提取条件对蛋白质的生物活性的丢失与否, 提取效果有着重要的影响。因此, 本研究利用较先进的冷却粉碎、膜分离、真空冷冻干燥技术对黑大豆与扁豆活性蛋白质的提取进行了研究分析, 为豆类功能性活性蛋白质的进一步开发利用提供一定的参数。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

材料: 山西产扁豆(红皮)、黑大豆。

分离膜: Seam less Cellulose Tubing Small Size 18 Wake Chemicals U SA, Inc

主要试剂: Trypsin、Chymotrypsin、酪蛋白(Casein)、三氯乙酸、磷酸缓冲液、福林试剂(Folin)、 Na_2CO_3 等。

1.2 主要设备仪器

冷却式粉碎机: Analysenm uhce A 10 (德国 W 2 Germany 公司)。

冷却式离心分离机, 5800 型, 日本久保制作所。

真空冷冻干燥机, EYELA FD. 81 型, 日本东京理化器械株式会社。

U best230 分光光度计, 日本光学机械株式会社。

1.3 试验方法

1.3.1 工艺流程

原料清选 冷却粉碎 盐析提取 离心去杂

膜透析分离 冻结 真空冷冻干燥 活性蛋白质

1.3.2 蛋白质活性测定方法

豆类普遍存在的功能性活性蛋白—胰蛋白酶抑制剂、糜蛋白酶抑制剂 (Trypsin Inhibitors, Chymotrypsin Inhibitors) 对胰蛋白酶 (Trypsin)、糜蛋白酶 (Chymotrypsin) 有抑制作用^[3], 我们利用豆类功能性活性蛋白对胰蛋白酶、糜蛋白酶的抑制效果进行分析测定^[4], 来判断豆类功能性蛋白质的活性。

2 结果与分析

2.1 原料粉碎方式对蛋白质活性的影响

蛋白质在 40~ 50 以上大部分变得不稳定并开始变性^[5]。豆类所含有的活性蛋白质一般在温度低于 50 时不容易失活^[1]。本试验采用普通粉碎机和冷却式粉碎机对原料进行粉碎处理, 发现用普通粉碎机进行粉碎时, 原料往往会由于摩擦产生热, 温度可达到 55~ 60 以上; 而利用冷却式粉碎机对原料进行粉碎处理, 温度一般在 40 以下。我们通过对豆类普遍存在的功能性活性蛋白胰蛋白酶抑制剂、糜蛋白酶抑制剂对胰蛋白酶抑制剂、糜蛋白酶抑制剂抑制效果进行了测定, 其结果如表 1 所示。结果说明冷却式粉碎可以较好地保持胰蛋白酶抑制剂、糜蛋白酶抑制剂的活性, 可以明显地抑制胰蛋白酶、糜蛋白酶对酪蛋白的分解, 而非冷却式粉碎原料则使其丢失生物活性, 对胰蛋白酶、糜蛋白酶均无抑制作用。黑大豆活性蛋白对胰蛋白酶、糜蛋白酶均有很好的抑制作用, 而扁豆则对胰蛋白酶有很好的抑制作用, 对糜蛋白酶的抑制作用比黑大豆弱。

2.2 盐析提取液用量对蛋白质提取的影响

为了较好地分离提取豆类功能性活性蛋白, 本试验利用 10% 的食盐溶液对粉碎后的原料进行盐析处理, 在盐析时将盐溶液与原料的用量设置了 5 种不同的比例, 试验发现由于浸提液用量不同对蛋

收稿日期: 2002201209

基金项目: 山西省留学资助项目

作者简介: 郝利平, 教授, 山西太谷 山西农业大学食品科学与工程学院, 030801

白质的提取过程与提取效果有较大程度的影响, 其结果如表 2 所示。

表 1 不同粉碎方式对胰蛋白酶抑制剂、糜蛋白酶抑制剂活性的影响

Table 1 Influence of crushing styles on the activities of inhibitors of Trypsin and Chymotrypsin

主要反应物投放顺序及主要反应条件				不同蛋白酶 660 nm Abs		
				胰蛋白酶	糜蛋白酶	
黑大豆	空白	+	+	(37, 10 min 反应)	0.000	0.000
	对照	+		(37 10 min 反应后)+	0.133	0.243
	冷却式粉碎	+	+	(37 10 min 反应后)+	0.000	0.051
	非冷却式粉碎	+	+	(37 10 min 反应后)+	0.131	0.240
扁豆	冷却式粉碎	+	+	(37 10 min 反应后)+	0.003	0.151
	非冷却式粉碎	+	+	(37 10 min 反应后)+	0.128	0.245

注: 为酪蛋白酶; 胰蛋白酶或糜蛋白酶; 缓冲液浸提豆类蛋白; 反应终止剂(三氯乙酸)。

表 2 盐析溶液用量对蛋白质的提取效果的影响

Table 2 Effects of salting out solution dosage on extraction protein

盐溶液原料	浸提时间/h	膜透析时间/h	真空冷冻干燥时间/h	蛋白质提取率/%
4	1	24	44	75.4
6	1	32	56	81.3
8	1	40	68	94.6
10	1	48	76	95.2
12	1	56	94	95.8
14	1	64	120	96.1

由表 2 结果可见, 浸提液 原料的比值越大蛋白质的提取率越高, 但是其后处理时膜透析和真空冷冻干燥所需要的时间长, 膜用量及离心分离量也增大, 提取耗费大。以利用浸提液 原料的比值为 10 1 左右为好, 这样既能够取得较高的蛋白质的提取率, 又可以节约时间和干燥动力。

2.3 离心分离与膜分离

豆类组成成分中除了含有丰富的蛋白质外, 还含有丰富的淀粉和油脂, 如: 大豆含有 26% 的淀粉, 17.5% 的油脂, 扁豆含有 60% 的淀粉, 1.1% 的油脂, 其他豆类也基本如此。我们根据豆类蛋白质多为水溶性的特点, 并且淀粉、油脂、蛋白质的比重的不同, 选用离心分离法进行分离, 结果如表 3 所示。

经过离心分离去除分离液表面的油脂和底部沉淀的淀粉, 取其澄清溶液, 而所得澄清溶液中还含有盐分、水溶性糖类等小分子物质。为了脱除澄清液中的盐分、水溶性糖类等小分子物质本试验采用无缝管状醋酸纤维膜(0.015~ 0.02 Lm)对经过离心去杂的蛋白质溶液进行透析分离, 即将离心分离出的溶液装入无缝管状醋酸纤维膜中, 利用蒸馏水进行透析, 透析温度为 4 , 每隔 3~ 5 h 换一次水, 直至水中无 NaCl 检出为止。

表 3 不同离心速度与时间对黑大豆淀粉、油脂分离效果的影响

Table 3 Effects of rate and time of centrifuge on separating starch and oil from black soybeans

离心速度/r·min ⁻¹	离心时间/min	离心温度/°C	澄清效果	备注
1 000	10	10	+++	淀粉沉淀较好, 油脂无析出
1 000	50	10	++	淀粉沉淀良好, 油脂无析出
2 000	10	10	++	淀粉沉淀良好, 油脂无析出
2 000	50	10	+	淀粉沉淀良好, 油脂稍析出
3 000	10	10	-	淀粉沉淀良好, 油脂析出
3 000	50	10	--	淀粉沉淀良好, 油脂析出良好
3 500	10	10	--	淀粉沉淀良好, 油脂析出良好
5 000	10	10	--	淀粉沉淀良好, 油脂析出良好

注: 澄清效果表示: +++ 很混浊; ++ 混浊; + 较混浊; - 较澄清; -- 澄清。

2.4 真空冷冻干燥

将透析液盛放于广口塑料容器中, 首先利用 - 30 低温冻结, 然后用具有针孔的铝箔封口, 移入真空冷冻干燥室内进行冻结干燥。获得具有金属光泽的豆类蛋白质。其蛋白质的功能性活性经过测定(主要反应物投放顺序及主要反应条件同 2.1), 结果如表 4。

表 4 真空冷冻干燥对胰蛋白酶抑制剂、糜蛋白酶抑制剂活性的影响

Table 4 Influence of vacuum freeze drying on the activities of inhibitors of Trypsin and Chymotrypsin

种类	处理	不同蛋白酶活性 660 nm Abs	
		胰蛋白酶	糜蛋白酶
黑大豆	空白	0.000	0.000
	对照	0.133	0.243
	缓冲液浸提蛋白质	0.000	0.051
	真空冷冻干燥蛋白质	0.011	0.056
扁豆	缓冲液浸提蛋白质	0.003	0.151
	真空冷冻干燥蛋白质	0.012	0.146

结果说明真空冷冻干燥胰蛋白酶抑制剂、糜蛋白酶抑制剂的活性无明显影响, 可以很好地保持豆类功能性活性蛋白质。通过对黑大豆与扁豆真空冷冻干燥所得到的提取物蛋白质进行测定分析, 黑大豆提取物中蛋白质的含量为 99.3%, 扁豆提取物中蛋白质的含量为 98.1%。

3 结论与讨论

1) 在豆类活性蛋白质提取过程中, 利用低温粉碎、低温离心分离、膜分离及真空冷冻干燥可以很好地保持豆类功能性蛋白质——胰蛋白酶抑制剂、糜蛋白酶抑制剂的活性。

2) 黑大豆与扁豆的活性蛋白对胰蛋白酶、糜蛋白酶均有抑制作用, 黑大豆比扁豆对胰蛋白酶的抑制作用强。

3) 在豆类活性蛋白质提取时, 利用原料 10 倍左右的食盐提取液进行浸提分离效果较好。低温离心分离可以很好地除去蛋白质提取液中的脂肪和淀粉。

4) 利用本试验所采用的提取工艺可以得到具有生物活性的蛋白质, 提取物蛋白质含量可以达到 98.1% 以上。

目前, 对大豆功能蛋白质的生物活性及利用研究较多, 但是对其他豆类研究报道较少。而豆类蛋白质含量丰富, 蛋白质的功能有所不同, 因此对豆类活性蛋白质的提取分离将为其他豆类的开发和利用提供一定的参考。

[参 考 文 献]

- [1] 孙 明, 丁安林 大豆加工产品在食品工业中的角色[J] 食品工业科技, 1999 年(增刊). 158~ 159
- [2] 傅翠真, 胡谟彪 西部地区食用豆类营养特点及其利用[J] 西南农业学报, 1997, 10(2): 62~ 66
- [3] 吕耀昌 豆类胰蛋白酶抑制剂活度测定方法的研究[J] 作物品种资源, 1996, (1): 26~ 28
- [4] 李建武 生物化学实验原理和方法[M] 北京: 北京大学出版社, 1997. 168~ 171.
- [5] 沈 同, 王镜岩 生物化学[M] 北京: 高等教育出版社, 1990. 216~ 220

Extraction Technology of Active Protein From Black Soybeans and Lentils

Hao Liping, Hao Lin

(College of food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu Shanxi 030801, China)

Abstract: This paper reports a study on the technology for extracting active protein from black soybeans and lentils. The technology includes cooling crush, low temperature centrifuge, membrane separation and vacuum freeze drying. Results show that none of these processes have any obvious influence on the activities of inhibitors of Trypsin and Chymotrypsin, and that the activity of the functional protein in black soybean and lentils could be maintained.

Key words: active protein; cooling crush; membrane separation; vacuum freeze drying