

酶法有限水解含油菜籽蛋白的机理及动力学

刘志强¹, 曾云龙¹, 金宏²

(1. 湖南科技大学化工系, 湘潭 411201; 2. 湖南农业大学动物科技学院, 长沙 410128)

摘要: 为探索油菜籽水相酶解法萃取菜籽油的机理, 以A lcalase 蛋白酶在温度 50 ℃、pH8.0 条件下, 对以水剂法从菜籽中提取的含油菜籽蛋白进行酶解处理。试验研究表明: 含油菜籽蛋白乳液的固形物颗粒度对酶解反应速率有明显影响, 总的趋势是颗粒度越小, 酶促反应速率越大; 酶催化水解速率随水解进程呈指数下降, 在反应过程中过高的底物浓度会抑制酶的失活。在此基础上由试验数据推导出描述催化水解含油菜籽蛋白的动力学方程, 由此通过控制酶与底物浓度之比、反应时间, 可以控制水解作用的程度, 从而指导和优化菜籽水相酶解法提取菜籽油的工艺。

关键词: 菜籽蛋白; 水剂法; 水相酶解法; 动力学方程

中图分类号: TS224.4; TS225.14; TQ644.16

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2004)01-0203-04

0 引言

菜籽蛋白是一种优质蛋白, 营养价值优于其它植物蛋白^[1], 因此, 在菜籽制油过程中寻找一种制取菜籽油与获得无毒菜籽蛋白二者兼顾的新工艺至关重要。

研究表明: 对植物油料如大豆^[2]、可可^[3]、玉米胚芽等采用水相酶解法制油, 在提取植物油的同时可以得到优质低变性植物蛋白。在水相酶解法制油过程中, 采用蛋白酶处理能降解大分子蛋白质的肽键, 使包裹在蛋白质内部的油脂释出, 减少因脂蛋白膜形成乳化状态以及亲脂性固体吸附, 造成部分油脂难以取出现象^[4,5], 从而提高油脂及蛋白质的得率与质量。该技术应用于油菜籽, 在流程中结合萃取超滤技术, 有望在提高出油率及蛋白质得率的同时获得无毒食用菜籽蛋白。

在水相酶解菜籽制油过程中, 菜籽蛋白酶解程度的控制至关重要。常规方法是采用高度酶解, 如王璋等人^[6]用蛋白酶降解大豆蛋白至等电点可溶, 以水剂法提取大豆油, 水解蛋白和油的得率分别达到 74% 和 66%; Rosenthal^[7]、Guerard^[8]等也开展了类似的研究。这样做一方面酶的用量增加, 另一方面不利于产品的加工利用, 钱俊青^[9]、刘志强^[10]等分别在大豆、花生制油中采用蛋白质低度水解, 不仅能显著提高蛋白质和油脂的得率, 且所得蛋白质功能特性较好, 有利于加工利用。

为更好地拟合实际生产条件, 本项目在水剂法制油基础之上对菜籽进行水相酶解法制油, 采用A lcalase 蛋白酶, 在温度 50 ℃、pH8.0 条件下对水剂法制油所得含油菜籽蛋白低度水解, 研究酶解反应过程中处理参数的影响, 并从反应机理出发建立描述水解过程规律的动力学关系式, 为后续油菜籽水相酶解制油工艺的优化奠定基础。

1 材料和方法

收稿日期: 2003-05-08

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(02JJY5001)

作者简介: 刘志强(1964-), 男, 副教授, 主要从事生物化工教学与科研。湘潭市 湖南科技大学化工系, 411201

1.1 试验材料

油菜籽: 市售双低油菜籽, 清选、干燥, 脱皮后测得蛋白质含量 26.4%、脂肪含量 44.5%、水分含量 8%。

蛋白酶: A lcalase 蛋白酶: 丹麦Novo 公司, 经测定酶活力为 2.8×10^4 u/g。

1.2 检测方法

固体样本中油脂含量测定: 索氏抽提法(So xhlet method)^[11]

液体样本中油脂含量测定: Werner-Schmidt^[12]

蛋白质含量的测定: 凯氏定氮法, 参照 GB 5497-85

氨基氮的测定: 甲醛滴定法^[13]

水解度的测定^[14]

水解度(DH) = (水解后生成的-NH₂基的量/样品总含N量) × 100%

水解后生成的-NH₂基的量由甲醛滴定法测得, 样品总含氮量由凯氏定氮法测定。

蛋白酶活力测定: Folin 酚法, 参照 GB 547-80

水分测定: 常压烘干法, 参照 GB 5495-85

1.3 含油菜籽蛋白浆的制备及酶水解工艺流程

准确称取经清理、干燥、去皮后的油菜籽 500g, 粉碎过 80 目标准筛, 置于浸取器中沸水处理 5 min 使芥子酶失活, 调 pH4.5, 加水比 1:5 水浸取, 除去菜籽粉中的类酚物质, 过滤后调 pH 9.0, 温度 25 ℃、加水搅拌浸提 3h, 分离出上层乳油得含油菜籽蛋白浆。

将含油菜籽蛋白配制成不同的蛋白质浓度, 置于酶反应器中, 控制 pH8.0 温度 50 ℃, 按不同加酶量及不同时间进行水解, 测水解度。

2 结果与分析

2.1 底物固形物颗粒度对酶解反应的影响

取等量含油菜籽蛋白浆充分水磨, 分别过 100 目、120 目、140 目、160 目、180 目、200 目标准筛, 形成固形物含量一致(蛋白质含量 4.87 g/100 mL)而颗粒度不同的系列乳液, 各取样 200 mL, 在恒定温度 50 ℃、pH 8.0 条件下, 加入 0.6% 蛋白酶(g/100 mL), 在水浴磁力搅拌器上反应, 测定不同酶解时间下乳液蛋白质的水解

度。结果见图 1 所示。

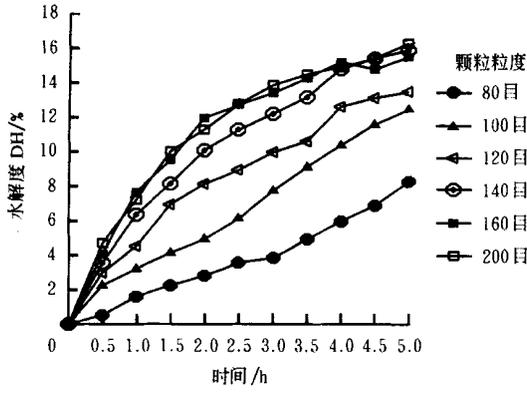


图 1 不同颗粒度乳液在不同时间下的水解度

Fig 1 Degrees of hydrolysis of different particle sizes of milk under different time of enzymatic hydrolysis

依米氏方程, 当反应体系酶用量与底物浓度一致时, 则在同一反应条件下反应速率应相同, 但图 1 结果表明, 不同固形物颗粒度的乳液在同一时间内酶促反应速率相差很大, 说明乳液体系中固形物颗粒度对酶反应速率有明显影响, 总的趋势是颗粒度越小, 酶促反应速率越大, 从 80 目至 140 目趋势十分明显, 140 目以上颗粒度的乳液水解度增加不明显。原因是固形物颗粒较大时, 底物与酶接触的比表面积较小, 必然影响反应速率, 颗粒度减小时反应速率明显增加。固形物颗粒在 120 目以下时, 反应的开始阶段速率较小, 以后由于酶解作用, 颗粒结构被破坏, 增加了反应接触面, 使速率有所加快。

工业上限于能耗及工艺因素, 固形物不可能磨得很细, 同时为避免因微生物繁殖而影响产品品质, 反应时间不宜太长, 因此了解适宜颗粒度(120 目)乳液酶促反应速率变化对实际生产有现实意义。

2.2 底物浓度对酶解反应的影响

取含油菜籽蛋白浆水磨, 过 120 目筛, 配制成不同浓度的乳液, 测蛋白质含量, 各取样 200 mL, 在恒定温度 50、pH8.0 条件下, 加入 0.4% 蛋白酶 (g/100 mL), 在水浴磁力搅拌器上反应, 测定不同酶解时间下乳液蛋白质的水解度, 结果见图 2、图 3。

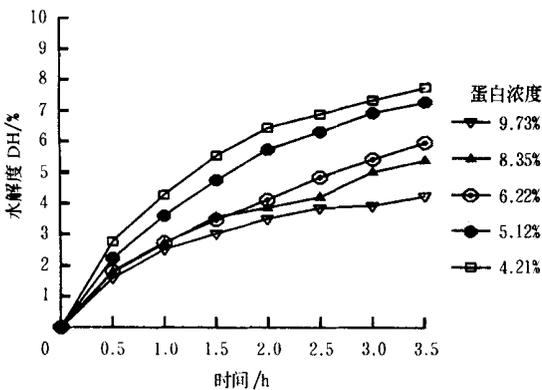


图 2 不同蛋白浓度乳液在不同酶解时间下的水解度

Fig 2 Degrees of hydrolysis of different concentrations of protein in milk under different time of enzymatic hydrolysis

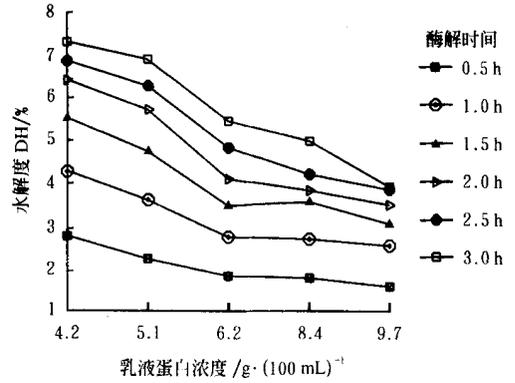


图 3 不同时间水解度-底物浓度曲线

Fig 3 Hydrolysis degree-substrate concentration curves under different time of enzymatic hydrolysis

从图 2、图 3 可以看到, 在试验范围内, 水解度随底物浓度(乳液蛋白浓度)的提高而下降, 这一现象表明在反应体系中底物对酶反应存在抑制作用, 当底物浓度达到一定值时, 这种抑制作用大大加强, 因此底物存在着促进反应速度和对酶产生抑制的双重作用。在有限水解的过程中, 底物对酶产生抑制及失活而引起活力下降是反应速度下降的主要原因。因此, 在实际生产中, 合理设置物料加水比尤其重要。

2.3 酶浓度对水解反应的影响

取含油菜籽蛋白浆水磨, 过 120 目筛, 配制成蛋白质含量 5.12 g/100 mL, 各取样 200 mL, 在恒定温度 50、pH8.0 条件下, 分别设定初始酶浓度 (g/100 mL) 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6% 加入蛋白酶, 在水浴磁力搅拌器上反应, 按不同的时间下取样测定水解度, 结果见图 4。

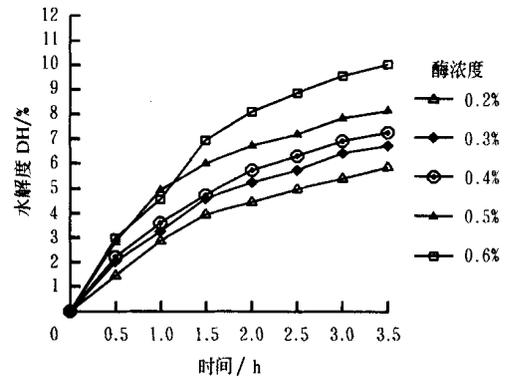


图 4 不同酶浓度水解度-时间曲线

Fig 4 Hydrolysis degree-time curves under different enzyme concentrations

从图 4 不同初始酶浓度的水解进程曲线可以看出: 水解速率随着水解时间的延长而下降, 同时水解度趋向于一个极限值, 不同的初始酶浓度, 水解度的极限值不同, 其值随初始酶浓度的提高而提高; 在同一处理时间下, 水解度随初始酶浓度的增加而增加。

在实际生产中宜采用较低酶浓度, 可以减少加酶量, 降低成本, 且在较低酶浓度条件下, 产物的水解度易于控制。

2.4 反应时间对水解反应的影响

结合图 1~4 的情况可知: 在不同的初始酶浓度, 初始底物浓度条件下, 水解度随处理时间的增加而增加, 但水解速率随时间的增加而减小, 在反应时间 60 min 内水解度增加较为明显, 以后水解速度随反应时间的增加而降低, 反应 3 h 后水解度趋于稳定的值, 水解速率随反应时间的增加而降低的原因有如下几个方面: 1) 经酶作用后, 底物中易被酶水解的肽键数目减少; 2) 产物对酶的抑制效应随产物浓度增大而增大; 3) 酶的变性失活随反应的进行而加重。

2.5 含油菜籽蛋白酶水解过程中酶活力的变化

在以上反应体系中, 定时取样测定酶活力的变化, 结果如表 1 所示。

表 1 含油菜籽蛋白酶水解过程中酶活力的变化

Table 1 Changes of enzyme activity during the process of enzymatic hydrolysis of rapeseed protein containing oil

水解时间 /min	0	30	60	90	120	150	180	210
存活率/%	100	71.5	62.3	48.4	39.2	32.5	29.4	27.2

由表 1 可见, 在含油菜籽蛋白酶水解体系中, 酶活力随水解时间的增加而逐渐下降, 酶解反应 30 min 时, 酶活力丧失 30%, 酶解反应达 120 min 时, 酶活力丧失 39% 左右, 造成酶活力的下降的原因主要有如下几个方面: 1) 底物对酶反应存在抑制作用, 这主要表现在反应初始阶段酶活力的损失, 也是引起活力下降的主要原因; 2) 水解产物含有对酶有抑制作用的成分, 且抑制效应随产物浓度的增大而增大; 3) 酶的变性失活随反应的进行而加重。前两点已从前面的试验得到了证实。

3 含油菜籽蛋白酶水解的动力学探讨

根据已掌握的水相酶解制油工艺资料^[2,9,10]及对目标产物的质量要求, 酶解反应的水解度不宜过大 ($x < 6$), 属低度水解过程, 水解过程符合双底物顺序反应机理^[15], 在恒定 pH 值和温度的条件下, 含油菜籽蛋白的总水解速率可用下述方程表示

$$V = a[S_0] \exp(-bx) \quad (1)$$

式中 V —— 总水解速率; S_0 —— 初始底物浓度; x —— 蛋白质水解度。

对方程(1)积分可得水解速度 dx/dt 随水解度呈指数递减关系, 关系方程如下

$$\frac{dx}{dt} = a \exp(-bx) \quad (2)$$

对(2)进行积分, 可得描述水解度与水解时间的关系方程如下

$$x = (1/b) \ln(1 + abt) \quad (3)$$

根据方程(3), 对试验中的 $x-t$ 关系数据进行非线性回归运算, 可得(3)中的动力学参数 a 和 b (见表 2)。

表 2 含油菜籽蛋白酶水解动力学参数值

Table 2 Values of kinetics of enzymatic hydrolysis of rapeseed protein of containing oil

S_0 /g · (100 mL) ⁻¹	E_0 /g · (100 mL) ⁻¹	E_0/S_0	a	b	a_m
9.73	0.4	0.041	1.34	0.432	1.4
6.22	0.4	0.064	2.78	0.428	2.98
5.12	0.4	0.078	3.97	0.512	3.56
4.21	0.4	0.095	4.94	0.509	4.72
5.12	0.2	0.039	1.39	0.477	1.50
5.12	0.3	0.059	2.46	0.482	2.29
5.12	0.5	0.098	5.87	0.496	5.03
5.12	0.6	0.117	6.13	0.452	5.61

表中 S_0 —— 初始底物浓度, E_0 —— 初始酶浓度, E_0/S_0 —— 初始酶浓度与初始底物浓度之比, a, b, a_m —— 回归方程系数。

从表 2 可看出, b 值总是接近于一个常数, 其值在平均值 0.4735 左右波动; 另外, a 值随着 E_0 的增加而增加, 随着 S_0 的增加而减小。取 b 值的平均值代入上述的拟合方程中, 重新计算 a 值, 得 a_m 值 (如表 2 所示)。当使用 a_m 值和 b 值时, 重复上述水解试验, 误差小于 $\pm 10\%$ 。

a_m 对 E_0/S_0 通过计算机处理得到一元线性方程,

$$a_m = 57.1 \frac{E_0}{S_0} - 0.84 \quad (4)$$

线性相关系数: $r = 0.976$

综合方程(2)、(3)和(4)可得总水解速率的方程如下

$$V = S_0 \frac{dx}{dt} = S_0 a \exp(-bx) = 57.1(E_0 - 0.84/S_0) \exp(-0.474x) \quad (5)$$

方程(5)表明:

$E_0 = \frac{0.84S_0}{57.1}$ 时, 此酶浓度为临界酶浓度, 低于或等于此浓度, 水解反应不会发生, 因为这时候总水解速率变为负数。这个结果一方面可能是由于方程(5)对于较低的 E_0/S_0 值不适用; 另一方面, 由于底物或底物水解过程产生的产物对酶反应存在不可逆抑制。

同理, $E_0 = \frac{57.1S_0}{0.84}$ 时, 此底物浓度为临界底物浓度, 高于或等于此浓度, 水解反应不会发生。

将表 2 所得动力学参数 $b = 0.4735$ 与方程(4)的 a_m 代入方程(3)可得描述 Alcalase 蛋白酶在 50 °C、pH 8.0 条件下催化水解含油菜籽蛋白的动力学方程如下:

$$X = 2.112 \ln[1 + 27.04(\frac{E_0}{S_0} - 0.3987)t] \quad (6)$$

方程(6)表明, 在 Alcalase 蛋白酶催化水解含油菜籽蛋白的体系中, 水解度 x 与初始酶浓度 E_0 、初始底物浓度 S_0 和时间 t 存在一定关系: 在 S_0 不变的情况下, 水解度随着初始酶浓度 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浓度 S_0 提高而降低; 这与上面讨论到的试验结果是一致的。

为检验所得方程与试验的符合情况,随机抽取试验中 20 组数据与方程预测值拟合对比,结果发现,酶促反应的水解度小于 6 时,试验值与预测值无显著差异。

4 结 论

1) 在水相酶解法制油菜过程中,固形物颗粒度对酶反应速率有明显影响,总的趋势是颗粒度越小,酶促反应速率越大,从 80 目至 140 目趋势十分明显,140 目以上颗粒度的乳液水解度增加不明显。

2) Alcalase 蛋白酶催化水解含油菜籽蛋白时水解产物及过高的底物浓度对酶反应起抑制作用。根据酶动力学的基本理论,由试验数据得到描述 Alcalase 蛋白酶在温度 50、pH8.0 的条件下催化水解含油菜籽蛋白的动力学方程,该方程可以用来指导和优化水相酶解法同时提取菜籽油与菜籽蛋白的酶解试验。

[参 考 文 献]

- [1] 余礼明,伍冬生,吴谋成,等. 开发油菜籽蛋白资源的关键技术及其意义[J]. 农业工程学报, 1997, 13(1): 117- 121.
- [2] Rosenthal A, Pyle D L, Niranjan K, et al. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28(6): 224 - 228.
- [3] Tano Debrah K, Ohta Y. Application of enzyme assisted aqueous fat extraction to cocoa fat [J]. J Am Oil Chem Soc, 1995, 72: 1409- 1411.
- [4] Che Man Y B, Suhardiyono A, Sbi A B, Azudin M N, et al. Aqueous enzymatic extraction of coconut oil [J]. J Am Oil Chem Soc, 1996, 73: 683- 686.
- [5] Fullbrook P D. The use of enzymes in the processing of oilseeds [J]. J Am Oil Chem Soc, 1983, 60(2): 428- 430.
- [6] 王 璋,许时婴,林 岚,等. 酶法从全酯大豆中同时制备大豆油和大豆水解蛋白工艺研究[J]. 无锡轻工业学院学报, 1994, 13(3): 180- 191.
- [7] Rosenthal A, Pyle D L, Niranjan K. Mechanisms in the simultaneous aqueous extraction of oil and protein from soybean [J]. Transactions of The Institute of Chemical Engineers Part C. Food and Bioproducts, 1998, 76: 224 - 230.
- [8] Guerard F, Dufosse L, De La Broise D, et al. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellow fin tuna wastes using Alcalase [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001, 11: 1051- 1059.
- [9] 钱俊青,何国庆. 水相酶解大豆蛋白的条件对其油脂分布的影响[J]. 浙江大学学报(工学版), 2001, 35(6): 684- 688.
- [10] 刘志强,易平贵,吴苏喜. 酶法有限水解花生蛋白条件对其含油率影响[J]. 中国粮油学报, 2003, 18(3): 36- 39.
- [11] Deng Y, Pyle D L, Niranjan K. Studies of aqueous enzymatic extraction of oil from rapeseed [A]. In: Agricultural Engineering and Rural Development I Conference Proceedings [C]. Beijing, China, 1992, 1, 190- 195.
- [12] Pearson D, Kirk R S, Egan H. Pearson's chemical analysis of food [M]. 8th ed. Churchill Livingstone Publishers, London and New York, 1981, 591.
- [13] Guerard F, Dufosse L, De La Broise D, et al. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellow fin tuna wastes using Alcalase [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001, 11: 1051- 1059.
- [14] 郝利平,郝 林. 黑大豆与扁豆活性蛋白提取工艺的研究 [J]. 农业工程学报, 2002, 18(3): 114- 117.
- [15] Volkert M A, Klein B P. Protein dispersibility and emulsion characteristics of flour soy products [J]. Food Science, 1979, 44: 93- 96.

Mechanism and kinetic analysis of enzymatic limited hydrolysis of rapeseed protein containing oil

Liu Zhiqiang¹, Zeng Yunlong¹, Jin Hong²

(1. Department of Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China;

2. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: To study the mechanism of aqueous enzymatic extraction of oil from rapeseed, the enzymatic hydrolysis of rapeseed protein containing oil by alcalase was carried out at pH8.0 and 50. The results indicated that the particle size of the solid in milk influenced reaction velocity obviously, and the velocity increased greatly with the size decreasing. The overall rate of hydrolysis diminished exponentially versus the degree of hydrolysis. Based on this approach and experimental data, a kinetic model equation simulating the enzymatic hydrolysis of rapeseed protein containing oil with Alcalase was obtained and it could be used to guide and optimize the technology of aqueous enzymatic extraction of oil from rapeseed.

Key words: rapeseed protein; aqueous extraction; aqueous enzymatic extraction; kinetic model equation