

文章编号 :1003-8701(2003)03-0046-04

Alcalase 酶水解玉米蛋白粉制备 可溶性肽最佳条件的研究

韩继福 ,任建波

(中国人民解放军军需大学 ,吉林 长春 130062)

摘 要 :对影响 Alcalase 酶水解玉米蛋白粉水解度的主要因素为底物浓度、酶浓度、温度和 pH 值进行了研究。通过对正交试验数据的分析 ,结果表明 ,对水解度影响最大的因素为酶浓度 ,其次是底物浓度和温度 ,pH 值影响最小。最佳水解条件为 :酶浓度 2.5%、底物浓度 5%、温度 50℃ 和 pH 值 8.5 ,在此条件下 ,水解 6 h ,水解度可达 28.53%。以后随着时间的延长 ,水解度基本上没有变化。

关键词 :玉米蛋白粉 (CGM) ;Alcalase 酶 ;水解度 (DH) ;可溶性肽

中图分类号 S513

文献标识码 :A

我国玉米年产量已达 1.1 亿 t 以上 ,约占世界总产量的 22% ,居世界第二位。玉米湿法淀粉生产厂达 300 多家 ,每年消费玉米约 400 万 t ,产生玉米蛋白粉 (俗称黄粉) 21 万 t^[1] ,这些玉米蛋白粉含有 40% ~ 60% 的蛋白质 ,主要为醇溶蛋白 (zein ,68%)、谷蛋白 (glutelin ,22%)、球蛋白 (globulins ,1.2%)和白蛋白 (albumin)^[2]。但由于玉米蛋白粉中的氨基酸不平衡 ,尤其是一些生物体所必需的氨基酸如赖氨酸、色氨酸等较缺乏 ,使其价值较低 ,限制了它的应用。长期以来 ,玉米蛋白粉只能作为饲料廉价出售或自然排放 ,我国每年随废液排走的玉米蛋白质高达 8 万 t^[3] ,不仅污染了环境 ,而且造成了蛋白资源的浪费。

由于玉米蛋白粉的水不溶性 ,使得它的食品功能特性极差 ,严重影响了其在食品工业中的应用。据日本文献称^[4,5] ,水解后的玉米蛋白肽有消除疲劳、改善酒醉的功能 ,可制成功能食品。所以 ,我们使用 Alcalase 酶对 CGM 进行酶法改性实验 ,探讨酶水解玉米蛋白粉的最佳作用条件 ,提高其溶解性 ,使其在食品工业中有良好的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

Alcalase 酶 :Novo Nordisk ,酶活力 2.4AU/g。

玉米蛋白粉 :长春大成玉米责任有限公司 ,预处理后粗蛋白含量 76.5%。

2D-2 型自动电位滴定仪 :上海精密科学仪器有限公司。

501 型超级恒温水浴锅 :上海浦东荣丰科学仪器有限公司。

收稿日期 :2003-04-21

基金项目 :本研究为吉林省科委重大课题“玉米高 F 值寡肽混合物的制备及其在功能性食品上的应用”的一部分内容

作者简介 :韩继福 (1963-) ,男 ,解放军军需大学副教授 ,博士。

JJ-1 型定时电动搅拌器 金坛市江南化仪器厂。

1.2 实验方法

按正交表安排(表 1、表 2),称取一定质量的玉米蛋白粉入反应瓶中,加入适量的蒸馏水,搅拌,在一定的温度下保温 10 min,达到酶解反应的温度后,用 2 mol/L 的 NaOH 调节溶液的 pH 值,然后,加入一定量的 Alcalase 酶进行酶解。在反应过程中不断搅拌,并滴加 2 mol/L 的 NaOH 维持溶液的 pH 值不变,反应 6 h 后停止加热搅拌,在 100℃水浴中加热 10 min 灭酶。

根据消耗的 NaOH 体积计算水解度。

水解度 (DH)的计算方法根据 pH-Stat^[6]法：

$$DH=\frac{\text{被水解的肽键数目}}{\text{总的肽键数目}}=V_{NaOH}\times\frac{1}{\alpha}\times\frac{C_{NaOH}}{M}\times\frac{1}{n_{tot}}\quad(\text{当蛋白质酶解过程在 pH}>6.5\text{ 以上时})$$

表 2 Alcalase 酶的正交试验及结果

试验因素						试验因素					
序号	A 底物浓度 (%)	B 酶浓度 (E/S)	C pH 值	D 温度 (℃)	DH%	序号	A 底物浓度 (%)	B 酶浓度 (E/S)	C pH 值	D 温度 (℃)	DH%
1	5	1.0	8.0	50	25.01	9	9	1.0	9.0	60	8.61
2	9	2.0	7.5	55	24.66	10	5	2.0	8.5	45	26.78
3	3	1.0	7.5	45	20.78	11	7	1.5	7.5	50	20.84
4	7	2.5	9.0	45	25.56	12	9	1.5	8.0	45	15.28
5	3	2.0	9.0	50	27.11	13	9	2.5	8.5	50	26.93
6	7	2.0	8.0	60	25.16	14	5	1.5	9.0	55	23.34
7	5	2.5	7.5	60	27.17	15	3	2.5	8.0	55	27.44
8	3	1.5	8.5	60	22.48	16	7	1.0	8.5	55	24.01

2 结果与分析

由表 3 和表 4 的分析结果可以看出,在影响水解度的 4 个因素中,B>A>D>C,最佳反应条件为 B₄A₂D₂C₃,即酶浓度为 2.5%、底物浓度为 5%、温度为 50℃和 pH 值为 8.5,其中酶浓度对水解度的影响最大,pH 的影响最小。在最佳条件下,水解度可达 28.53%。但由表 3 可以看出,当底物浓度为 7%时,玉米蛋白粉的水解度与底物浓度为 5%时水解度相差不到 2%,考虑到水解物的产量,实际中底物浓度也可以为 7%。

表 3 Alcalase 酶水解度极差顺序分析

因子	A	B	C	D
K				
K ₁	97.812	78.412	93.452	88.400
K ₂	102.300	81.940	92.892	99.892
K ₃	95.568	103.712	100.200	99.452
K ₄	75.480	107.100	84.620	83.420
k ₁	24.453	19.603	23.363	22.100
k ₂	25.575	20.485	23.223	24.973
k ₃	23.892	25.928	25.050	24.863
k ₄	18.870	26.775	21.155	20.855
R	6.705	7.172	3.895	4.118

表 4 Alcalase 酶水解度方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方和	F	P
总和	8 988.773	16			
底物浓度	105.751	3	35.250	3.534	0.164
酶浓度	162.132	3	54.044	5.419	0.099
温度	50.459	3	16.820	1.686	0.339
pH 值	30.526	3	10.175	1.020	0.494
误差	29.921	3	9.974		

2.1 pH 值对 Alcalase 酶水解度的影响

酶是一种特殊的蛋白质,具有一个或多个活性部位。酶的活性部位是由结合部位和催化部位所组成。活性部位中的基团在蛋白质的一级结构所处的位置通常相距较远,也许可能位于不同的肽链上。但它们在酶的空间结构中却必须按一定的相对位置靠近在一起,形成活化中心。因此,酶的活性部位只有在酶蛋白保持一定的空间构象时才能存在,并发挥其催化功能。结合部位和催化部位的基团对反应体系 pH 值的变化比较敏感,其解离状态随 pH 值的变化而变化。这些变化会影响酶分子的特殊构象。另外,作为底物的玉米蛋白也随着 pH 值的变化表现出不同的解离状态。因此,pH 直接影响了酶与底物的结合和催化。每个酶催化反应体系都有一个最适宜的 pH 值。在以 S=5% E/S=2.5% ,温度为 50℃时,选择不同的 pH 值按 pH-Stat 法反应 6 h ,计算不同 pH 下的水解度(见图 1)。由图 1 可见,Alcalase 酶的最佳 pH 值为 8.5。

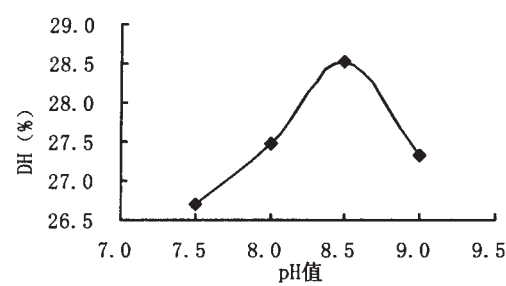


图 1 pH 与水解度的关系

反应条件:底物浓度=5% ,酶浓度=2.5% ,T=50℃ t=6 h

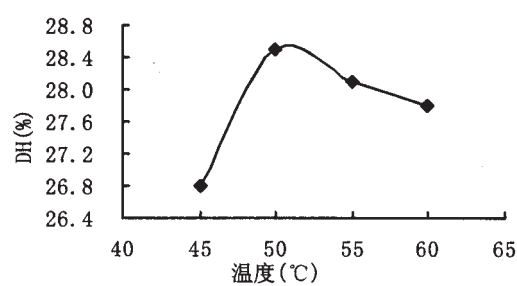


图 2 温度与水解度的关系

反应条件:pH=8.5 ,酶浓度=2.5% ,底物浓度=5% t=6 h

2.2 温度对 Alcalase 酶水解度的影响

各种酶催化的反应都有最适的温度。在酶的最适温度以下,单位时间内酶与底物分子间的有效接触次数最多,酶的催化效率最高。如果反应体系中温度超过酶的最适温度,酶分子吸收了过多的能量,引起维持酶分子结构的次级键解体,导致酶蛋白变性,因而使酶活性减弱甚至丧失催化能力。在 S=5%、E/S=2.5%、pH 8.5 时,玉米蛋白粉在不同的温度下水解 6 h ,计算各自的水解度。如图 2 所示,该酶的最适反应温度为 50℃ ,与正交试验的结果一致。

2.3 酶浓度对玉米黄粉水解度的影响

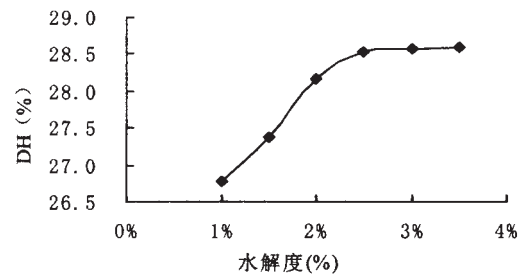


图 3 酶浓度与水解度的关系

反应条件:pH=8.5 ,T=50℃ ,底物浓度=5% t=6 h

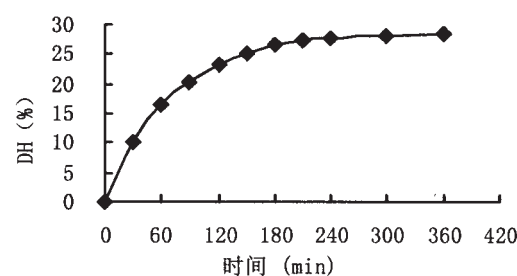


图 4 时间与水解度的关系

反应条件:底物浓度=5% ,酶浓度=2.5% pH 8.5 ,T=50℃

当底物浓度一定时(5%) ,底物的水解度取决于酶的浓度,理论上讲,酶分子愈多,水解度就会越来越大,但图 3 显示,反应呈现两个不同的部分,即酶依赖反应(酶浓度<5%)和酶不依赖反应(酶浓度>5%)。酶浓度较低时,水解度增长很快,酶浓度较高时,水解度变化很小,这是因为酶浓度较高时,蛋白质的相对浓度较低,酶分子已过饱和,有一部分酶分子将不能与蛋白质结合。

2.4 时间对玉米黄粉水解度的影响

由图 4 可以看出，在前 4 h，水解度随着时间的延长而显著增加，水解度从 0 增加到 27.86%，但在 2 h 以后，水解度随时间的延长几乎没有变化，水解度增加了不到 1 个百分点。因此，Alcalase 酶水解玉米蛋白的最佳时间为 4 h。

3 结 论

由正交表的极差、方差分析结果以及酶的单因素试验结果可以看出，Alcalase 酶水解玉米蛋白粉的最适作用条件为：底物浓度 5%、酶浓度 2.5%、温度 50℃、pH8.5 和时间 4 h，在此条件下，水解度可达到 27.86%，玉米蛋白的水溶性大大增加。

参考文献：

[1] 彭 军. 中国玉米加工业的现状和发展[J]. 食品开发, 2001, (6) 3-5.
[2] 翟瑞文, 等. 用玉米渣生产玉米蛋白肽饮料[J]. 食品科学, 1997, 18 (9) 31-33.
[3] 李志远, 等. 从玉米黄浆中回收食用蛋白质[J]. 粮食与饲料工业, 1992, (4) 28-30.
[4] 佐野良史. コノンペプチドの飲料への利用[J]. 食品と科学, 1993, (2) :102-106.
[5] 山口孙一. トウモロコシ由来ペプチドの開発と応用[J]. 食品と開発, 1992, 27 (12) 46-48.
[6] Jacobsen C F, et al. The pH-stat and its use in biochemistry. In: Gleek. Methods of Biochemistry Analysis, 1957,4: 171 .

Study on the Optimum Conditions of CGM Hydrolyzed with Alcalase Protease to Produce Soluble Peptide

HAN Ji-fu, REN Jian-bo

(Faculty of Quartermaster Engineer, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: This paper studied the main factors which affected the degree of hydrolysis of CGM hydrolyzed with Alcalase protease. The results showed that enzyme concentrate was the main factor, substrate concentrate and temperature in turn, pH was the last. The optimum conditions: E/S 2.5%, [S] 5%, temperature 50℃, pH 8.5. Under this condition, the CGM was hydrolyzed for six hours, DH was 28.53%. With prolong of time, the DH changed little.

Key words: CGM (corn gluten meal); Alcalase enzyme; Degree of hydrolysis; Soluble peptide

出售奶牛信息

我站有一批优质奶牛急待出售 ,质优价廉 ,望有意投资奶牛养殖业的单位及个人
前来考察选购。本站负责接送 ,免费提供食宿 ,代办运输及检疫。

联系人 :刘庆华 电话：0350-3672016 手机：(0)13096579635
地址 :山西省忻州市忻府区曹张乡 邮编：034016