

联合酶法提取豆渣蛋白肽和可溶性膳食纤维

王凌翌¹, 周利琴¹, 刘志国², 冯学珍¹, 孙丽霞¹, 孙建华¹, 廖丹葵¹

(1. 广西大学 化学化工学院, 南宁 530004; 2. 广西平南县万家香食品有限公司, 广西 贵港 537100)

摘要:豆渣是大豆加工的主要副产物之一,含有丰富的蛋白质和膳食纤维。为促进豆渣高值化利用,采用联合酶法从豆渣中提取蛋白肽和可溶性膳食纤维(SDF)。首先用碱性蛋白酶酶解豆渣蛋白,以蛋白肽得率为指标,通过单因素试验优化了提取豆渣蛋白肽的工艺条件,再将脱蛋白豆渣用纤维素酶酶解制备SDF,以SDF提取率为指标,通过单因素试验优化提取SDF的工艺条件。结果表明:碱性蛋白酶酶解提取蛋白肽最佳工艺条件为料液比1:35、酶与底物比2%、酶解时间5 h、酶解温度50℃、pH 9.5,在此条件下豆渣蛋白肽得率为66.81%;纤维素酶酶解提取SDF最佳工艺条件为料液比1:30、酶与底物比3%、酶解温度50℃、酶解时间2 h、pH 4.0,在此条件下SDF提取率为15.54%。利用碱性蛋白酶和纤维素酶依次酶解后,豆渣总利用率达到了89.81%,这为豆渣综合利用开发提供了一种新途径。

关键词:豆渣;膳食纤维;蛋白肽;酶解

中图分类号:TS252.5;TS251.9 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2021)06-0114-05

Extraction of protein peptides and soluble dietary fiber from soybean dregs by combined enzymatic method

WANG Lingyi¹, ZHOU Liqin¹, LIU Zhiguo², FENG Xuezheng¹,
SUN Lixia¹, SUN Jianhua¹, LIAO Dankui¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;
2. Guangxi Pingnan Wanjiexiang Food Co., Ltd., Guigang 537100, Guangxi, China)

Abstract: Soybean dregs are one of the main by-products of soybean processing, and are rich in protein and dietary fiber. The protein peptides and soluble dietary fiber (SDF) were separately extracted from soybean dregs by combined enzymatic method. First, the protein in the soybean dregs was hydrolyzed with alcalase, and the yield of protein peptides was used as an indicator, the conditions for extracting protein peptides from soybean dregs were optimized through single factor experiment, and then the deproteinized soybean dregs were hydrolyzed with cellulase to prepare SDF, and the yield of SDF was used as an indicator, the process conditions for extracting SDF were optimized through single factor experiment. The results showed that the optimal conditions for extracting protein peptides from soybean dregs were obtained as follows: material-liquid ratio 1:35, enzyme-substrate ratio (E/S) 2%, enzymolysis temperature 50℃, pH 9.5, and enzymolysis time 5 h. Under the optimal conditions, the yield of protein peptides was 66.81%. The optimal conditions for extracting SDF from deproteinized soybean dregs were obtained as follows: material-liquid ratio 1:30, E/S 3%, enzymolysis temperature

50℃, enzymolysis time 2 h, and pH 4.0. Under the optimal conditions, the yield of SDF was 15.54%. After enzymolysis with alcalase and cellulase sequentially, the total utilization rate of soybean dregs reached 89.81%, which provided a new way for the comprehensive development and utilization of soybean dregs.

收稿日期:2020-08-20;修回日期:2021-04-06

基金项目:贵港市科学研究与技术开发计划项目(贵科攻1829011)

作者简介:王凌翌(1995),女,硕士研究生,研究方向为天然产物活性组分提取(E-mail)714907064@qq.com。

通信作者:廖丹葵,教授,博士生导师(E-mail)liaodk@gxu.edu.cn。

Key words: soybean dregs; dietary fiber; protein peptide; enzymolysis

我国是大豆消费大国,每年因加工豆浆、豆腐、豆乳等豆制品产生大量豆渣^[1],由于豆渣含水量高不易保存,导致其未得到有效利用,大部分被作为家畜饲料或者废弃物处理,造成了资源浪费及环境污染。豆渣中含有丰富的蛋白质和纤维素^[2],可用于提取蛋白肽和膳食纤维^[3],其中:蛋白肽易被人体吸收且具有抗氧化性、免疫调节、降血压等特殊生理功能^[4-5];膳食纤维根据溶解性差异可分为不溶性膳食纤维(IDF)和可溶性膳食纤维(SDF),IDF主要作用于肠道起机械蠕动效果,SDF主要发挥其代谢功能,常食用添加SDF的食品可以预防糖尿病、心血管疾病、肥胖症等^[6-7],同时SDF也是制造低能量、低胆固醇、低钠健康食品的重要原料,被广泛用于功能食品研发领域。

近年来,关于豆渣的开发利用国内已有相关报道,但都局限于对豆渣单一组分即蛋白肽^[8]或膳食纤维^[9]的提取研究,以豆渣为原料依次提取蛋白肽和膳食纤维的报道相对较少。因此,如何充分利用资源,在制备膳食纤维的同时,又能利用豆渣中蛋白质的工艺值得深入探讨。为使豆渣中的蛋白肽和SDF均能被回收利用,本文通过联合酶法处理豆渣,即先用碱性蛋白酶酶解提取豆渣中的蛋白肽,再将脱蛋白豆渣用纤维素酶酶解得到SDF,并分别对两种酶的酶解工艺进行优化,为进一步实现豆渣高值化综合利用提供理论基础和数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

豆渣,广西大学食堂;纤维素酶(酶活力15万U/g),国药集团化学试剂有限公司;碱性蛋白酶(酶活力20万U/g),南宁庞博生物有限公司;硼酸、硫酸钾、硫酸铜,均为分析纯,广东光华科技股份有限公司;磷酸氢二钠、乙酸钠,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;磷酸二氢钠、氢氧化钠、盐酸、无水乙醇,均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

FW80高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司;101C-2电热鼓风干燥箱,上海实验仪器有限公司;UV-2501PC紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限公司;PHS-3C精密pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司;CT15RT高速

冷冻离心机,德国Eppendorf公司;RE-2000B旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 豆渣的预处理

将湿豆渣放入托盘中,在65~80℃下鼓风干燥7~10h,期间每隔1h翻一次面^[10],干燥至豆渣无豆腥味,呈乳白色,淡而微甜^[10]后,取出,研磨成粉末,过0.250mm(60目)筛,备用。

1.2.2 豆渣粉基本成分分析

蛋白质、膳食纤维、灰分和脂肪含量分别参照GB 5009.5—2016、GB 5009.88—2014、GB 5009.4—2016和GB 5009.6—2014进行测定。

1.2.3 豆渣蛋白肽的制备

参照汪志华等^[11]的方法略有改动。称取一定量豆渣粉于烧杯中,按一定比例加入去离子水混匀,煮沸10min,冷却至一定温度,加入0.1mol/L的氢氧化钠溶液调节pH至一定值后,加入碱性蛋白酶启动反应,在酶解过程中,每隔一段时间滴加0.1mol/L氢氧化钠以维持反应体系pH的稳定。反应一定时间后,将酶解液加热至100℃,保温10min钝化碱性蛋白酶,冷却至室温后,离心(3000r/min,20min),上清液为酶解产物,记录体积,下层沉淀干燥后为脱蛋白豆渣,待下一步酶解处理。参照文献^[12]采用双缩脲法测定酶解产物中蛋白肽的含量,按照下式计算蛋白肽得率(Y)。

$$Y = m_1/m \times 100\% = CV/m \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_1 为蛋白肽质量; m 为豆渣中蛋白质质量; C 为酶解产物中蛋白肽的含量; V 为酶解产物体积。

1.2.4 SDF的制备

参照文献^[13]的方法制备SDF。以脱蛋白豆渣为原料,按一定比例加入去离子水,混匀,加热,用0.1mol/L盐酸调节pH至一定值后,加入纤维素酶启动反应,待反应结束后,将酶解液置于100℃沸水浴10min灭酶。冷却至室温后,离心(3400r/min,20min),沉淀为IDF,上清液进行减压浓缩,浓缩液加入4倍体积的无水乙醇,在50℃下静置2h,过滤分离得到SDF。将SDF、IDF干燥后按下式分别计算SDF、IDF提取率以及豆渣的总利用率。

$$y_1 = m_2/m_4 \times 100\% \quad (2)$$

$$y_2 = m_3/m_4 \times 100\% \quad (3)$$

$$y = (m_1 + m_2 + m_3) / m_0 \times 100\% \quad (4)$$

式中: y_1 、 y_2 分别为 SDF 和 IDF 的提取率; y 为豆渣的总利用率; m_2 为 SDF 质量; m_3 为 IDF 质量; m_4 为脱蛋白豆渣质量; m_0 为豆渣质量。

2 结果与讨论

2.1 碱性蛋白酶酶解制备豆渣蛋白肽工艺优化

2.1.1 酶解时间对蛋白肽得率的影响

在料液比 1:35、酶与底物比 (E/S) 1.5%、酶解温度 50℃、pH 9.5 条件下,考察酶解时间对蛋白肽得率的影响,结果如图 1 所示。

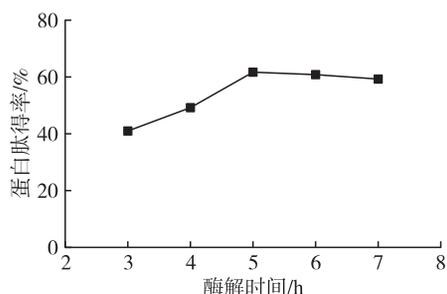


图 1 酶解时间对蛋白肽得率的影响

由图 1 可看出,随着酶解时间的延长,蛋白肽得率逐渐增加,当酶解时间为 5 h 时,蛋白肽得率达到最高,为 61.63%,继续延长酶解时间,蛋白肽得率略有下降,这是因为随着酶解进程的不断深入,豆渣中的部分可溶性蛋白肽水解过度,使其中包埋在分子内部的疏水性氨基酸暴露出来,使得疏水性增加,蛋白的溶解度下降。因此,选择 5 h 为最佳酶解时间。

2.1.2 酶解温度对蛋白肽得率的影响

在料液比 1:35、E/S 1.5%、pH 9.5、酶解时间 5 h 条件下,考察酶解温度对蛋白肽得率的影响,结果如图 2 所示。

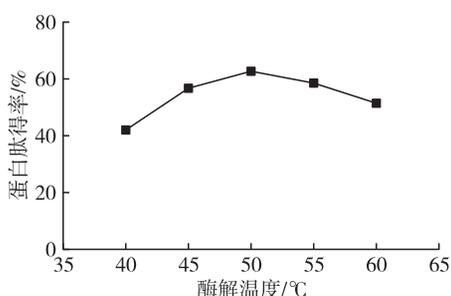


图 2 酶解温度对蛋白肽得率的影响

由图 2 可看出,随着酶解温度的升高,蛋白肽得率逐渐提高,当酶解温度为 50℃ 时,蛋白肽得率达到最高,为 62.76%,这是由于升高温度可以使豆渣中蛋白质分子逐渐被酶解成蛋白肽,从而使得蛋白肽得率增加。当酶解温度高于 50℃ 时,蛋白肽得率下降,这是因为继续升高温度,其超过酶的最适温度,抑制了酶活,降低了蛋白质的酶解率。因此,选

取 50℃ 为最佳酶解温度。

2.1.3 酶与底物比 (E/S) 对蛋白肽得率的影响

在料液比 1:35、酶解温度 50℃、pH 9.5、酶解时间 5 h 条件下,考察 E/S 对蛋白肽得率的影响,结果如图 3 所示。

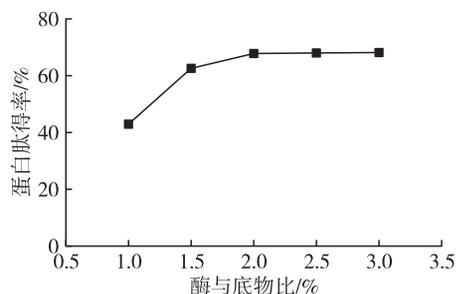


图 3 E/S 对蛋白肽得率的影响

由图 3 可看出,蛋白肽得率先随着 E/S 增加而增加,当 E/S 达到 2% 时,蛋白肽得率达到最大。这是因为在反应底物充足时,随着酶解反应的进行,豆渣中大分子蛋白质被酶解成小分子肽;但继续增加 E/S,由于可供酶解的底物不足,对豆渣蛋白肽得率没有提升效果。因此,选择 2% 为最佳 E/S。

2.1.4 pH 对蛋白肽得率的影响

在料液比 1:35、E/S 2%、酶解温度 50℃、酶解时间 5 h 条件下,考察 pH 对蛋白肽得率的影响,结果如图 4 所示。

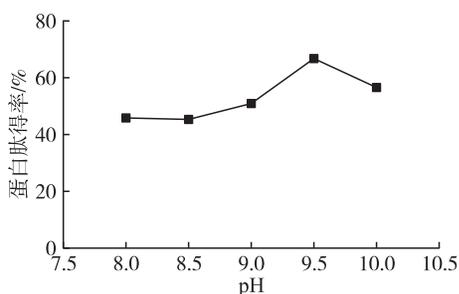


图 4 pH 对蛋白肽得率的影响

pH 对酶催化活性的影响较大,pH 过高或过低都不能使酶发挥其最大活性甚至还有可能导致酶失活。由图 4 可看出,随着 pH 的升高,蛋白肽得率先升高后降低,当 pH 为 9.5 时,蛋白肽得率达到最大,为 66.78%。因此,最佳 pH 为 9.5。

2.1.5 料液比对蛋白肽得率的影响

在酶解时间 5 h、酶解温度 50℃、pH 9.5、E/S 2% 条件下,考察料液比对蛋白肽得率的影响,结果如图 5 所示。

由图 5 可看出,随着料液比的增加,蛋白肽得率先升高后逐渐降低,当料液比为 1:35 时,蛋白肽得率达到最大值,为 66.81%。豆渣蛋白溶液过稀或过浓都不利于反应的进行,过浓则溶液黏性大,阻碍

了碱性蛋白酶与底物的传质,过稀则豆渣中的蛋白质与碱性蛋白酶不能充分反应,从而使得蛋白肽的得率有所下降。因此,选取 1:35 为最佳料液比。

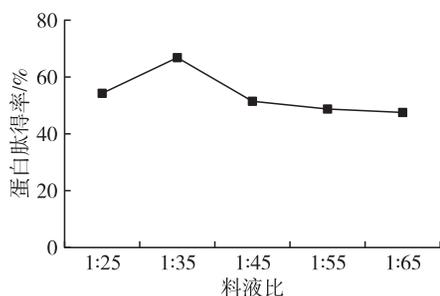


图5 料液比对蛋白肽得率的影响

基于上述结果,得到利用碱性蛋白酶酶解豆渣中蛋白质制备蛋白肽的最佳工艺条件为料液比 1:35、E/S 2%、酶解时间 5 h、酶解温度 50℃、pH 9.5,在最佳条件下蛋白肽得率为 66.81%。

2.2 纤维素酶酶解制备 SDF 工艺条件优化

2.2.1 酶解时间对 SDF 提取率的影响

在料液比 1:35、E/S 2%、酶解温度 50℃、pH 4.5 条件下,SDF 提取率随酶解时间的变化如图 6 所示。

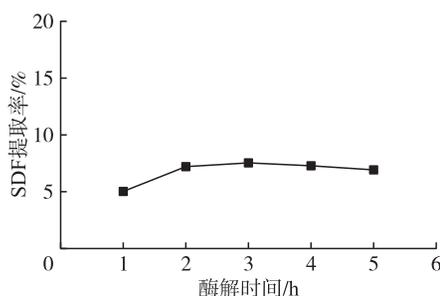


图6 酶解时间对 SDF 提取率的影响

由图 6 可看出,当酶解时间为 2 h 时,SDF 提取率达到最大值,为 7.52%,当酶解时间大于 2 h,SDF 提取率基本处于不变的状态,这说明在酶解时间达到 2 h 后,反应底物基本被酶解完全,再继续延长酶解时间对 SDF 提取率影响不大。综合考虑经济成本等问题,选择 2 h 为最佳酶解时间。

2.2.2 料液比对 SDF 提取率的影响

在 E/S 2%、酶解温度 50℃、pH 4.5、酶解时间 2 h 条件下,SDF 提取率随料液比的变化如图 7 所示。由图 7 可看出,当料液比为 1:30 时,SDF 提取率最高,为 8.60%,继续增加料液比,SDF 提取率有明显的下降趋势,这是因为随着料液比增加,纤维素酶和底物均被不同程度地稀释,使得脱蛋白豆渣不能够充分地纤维素酶接触。因此,选择 1:30 为最佳料液比。

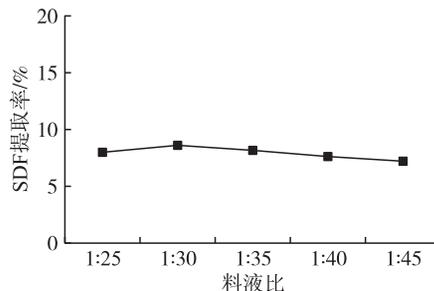


图7 料液比对 SDF 提取率的影响

2.2.3 pH 对 SDF 提取率的影响

在料液比 1:30、E/S 2%、酶解温度 50℃、酶解时间 2 h 条件下,SDF 提取率随 pH 的变化如图 8 所示。

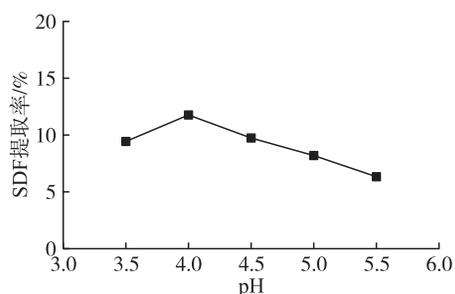


图8 pH 对 SDF 提取率的影响

由图 8 可看出,随着 pH 增加,SDF 提取率呈现先上升后下降的趋势,在 pH 4.0 时,SDF 提取率达到最高,为 11.76%。这是由于 pH 通过提高纤维素酶活性而影响 SDF 的提取,在最适 pH 条件下,纤维素酶具有最大的活性,高于或者低于其最适 pH,都会降低纤维素酶活性。因此,选择 4.0 作为最佳 pH。

2.2.4 酶与底物比(E/S)对 SDF 提取率的影响

在料液比 1:30、酶解温度 50℃、pH 4.0、酶解时间 2 h 条件下,SDF 提取率随 E/S 的变化如图 9 所示。

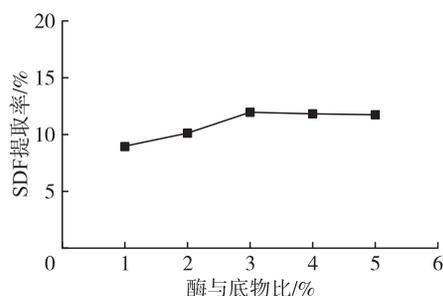


图9 E/S 对 SDF 提取率的影响

由图 9 可看出,随着 E/S 增加,SDF 提取率不断提高,这是因为纤维素酶将脱蛋白豆渣中的 IDF 降解,使其溶解度改变,其中一部分 IDF 变成 SDF^[14]。当 E/S 为 3% 时,SDF 提取率最大,为 11.95%,随着 E/S 继续增加,SDF 提取率基本不变。这是由于纤维素酶用量的增加提高了纤维素酶与底物的接触机会,使得 SDF 提取率增加,但反应底物的量是一定

的,继续增加纤维素酶用量对 SDF 提取无益,并且还会增加生产成本。因此,选择 3% 为最佳 E/S。

2.2.5 酶解温度对 SDF 提取率的影响

在料液比 1:30、E/S 3%、酶解时间 2 h、pH 4.0 条件下,SDF 提取率随酶解温度的变化如图 10 所示。

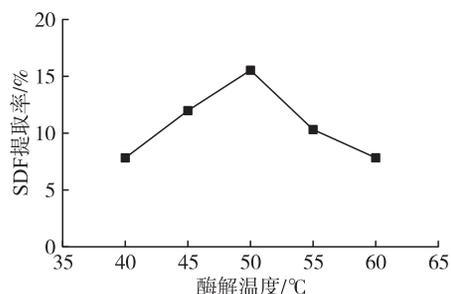


图 10 酶解温度对 SDF 提取率的影响

由图 10 可看出,随着酶解温度升高,SDF 提取率逐渐增加,当酶解温度为 50 °C 时,SDF 提取率达到最高,为 15.54%,当酶解温度继续升高,SDF 提取率反而下降,其原因是温度对传质速率和溶剂密度均有影响,适当的高温可以提高纤维素酶活性和分子运动,使得 SDF 提取率有所提高,但过高的酶解温度会降低酶的活性,从而使得 SDF 提取率降低。因此,选择 50 °C 作为最佳酶解温度。

基于上述试验,以最佳碱性蛋白酶酶解条件下得到的脱蛋白豆渣为原料,采用纤维素酶酶解制备 SDF 的最佳工艺条件为料液比 1:30、E/S 3%、酶解时间 2 h、酶解温度 50 °C、pH 4.0,在最佳工艺条件下 SDF 提取率为 15.54%,较刘昊飞等^[15]采用纤维素酶制备豆渣 SDF 的提取率(10.45%)和陈磊等^[16]以豆渣为原料采用酶法制备豆渣 SDF 的提取率(8.05%)高。另外,IDF 提取率为 79.92%,豆渣的总利用率达到 89.81%。

3 结论

通过单因素试验确定了联合酶法提取豆渣蛋白肽和可溶性膳食纤维的最佳工艺条件,先利用碱性蛋白酶酶解,在料液比 1:35、E/S 2%、酶解温度 50 °C、酶解时间 5 h、pH 9.5 的最佳酶解条件下,蛋白肽得率为 66.81%,再将干燥后的脱蛋白豆渣利用纤维素酶酶解,在料液比 1:30、E/S 3%、酶解温度 50 °C、酶解时间 2 h、pH 4.0 的最佳酶解条件下,SDF 提取率为 15.54%。经过酶法依次处理豆渣后,其总利用率达到了 89.81%,这为实现豆渣全利

用提供了一定的数据基础。

参考文献:

- [1] 沈祥坤,应恺. 利用豆渣生产优质大豆膳食纤维的研究[J]. 现代食品科技,2006,22(3):277-279.
- [2] 赵爽,庞沐嘉. 大豆豆渣再利用现状概述[J]. 食品安全导刊,2018(24):169-170.
- [3] ALBA K, MCNAUGHTON W, LAWS A P, et al. Fractionation and characterization of dietary fiber from blackcurrant pomace[J]. Food Hydrocolloid, 2018, 81: 398-408.
- [4] HONG H, FAN H B, MERAM C, et al. Preparation of low-molecular-weight, collagen hydrolysates (peptides): current progress, challenges, and future perspectives [J/OL]. Food Chem, 2019, 301: 125222 [2020-08-20]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125222>.
- [5] XIAO L, QI W, BAO D Z, et al. Hydration properties and binding capacities of dietary fibers from bamboo shoot shell and its hypolipidemic effects in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2017(109): 1003-1009.
- [6] 方冬冬,李长乐,师园园,等. 豆渣膳食纤维研究与综合利用[J]. 粮食加工,2018,43(2):62-64.
- [7] 付全意,刘冬,李坚斌,等. 膳食纤维提取方法的研究进展[J]. 食品科技,2008,33(2):225-228.
- [8] 高义霞,周向军,魏苇娟,等. 豆渣蛋白肽的酶解工艺、抗氧化作用及其特性研究[J]. 中国粮油学报,2014,29(4):46-52,67.
- [9] 景言,迟玉杰. 豆渣可溶性膳食纤维酶法制备工艺及其品质分析[J]. 食品与发酵工业,2012,38(8):68-72.
- [10] 王双燕,贺学林. 不同干燥方法对豆腐渣粉感官品质的影响[J]. 农业工程,2013,3(3):76-78.
- [11] 汪志华,王毅梅,蔡广霞,等. 大米肽含量的快速测定方法[J]. 食品科学,2011,32(12):169-173.
- [12] 肖莲荣,任国谱,张素文. 双缩脲比色法分析三氯乙酸沉淀乳蛋白效果探讨[J]. 食品工业科技,2011,32(5):415-417.
- [13] 任媛媛,陈学武,李丹丹. 豆渣中可溶性膳食纤维提取的研究[J]. 中国食品添加剂,2015(1):84-91.
- [14] 徐广超,姚惠源. 豆渣水溶性膳食纤维制备工艺的研究[J]. 河南工业大学学报,2005,26(1):54-57.
- [15] 刘昊飞,程建军,王蕾. 酶法制备豆渣水溶性膳食纤维[J]. 食品工业科技,2008(5):202-204,207.
- [16] 陈磊,刘辉,刘贵洲,等. 豆渣中可溶性膳食纤维酶法制备工艺优化[J]. 广东化工,2017,44(13):56-57,71.