

Alcalase 蛋白酶酶解大豆蛋白制备 啤酒糖浆复配液的研究

罗建勇¹, 吴晨宇², 黄隽光², 周泓江², 钱芳^{1,2}, 郭峰¹, 黄立新²

(1. 广州双桥股份有限公司, 广州 510280; 2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广州 510640)

摘要:采用 Alcalase 蛋白酶酶解大豆蛋白, 通过测定酶解产物的蛋白质回收率、水解度、隆丁(Lundin)区分以及 SDS-PAGE 电泳图谱分析, 确定在酶解条件为酶解温度 55℃、底物质量分数 5%、酶量 750 U/g、pH 8.0、反应时间 0.5~1.0 h 时所得的酶解液为浅棕色, 其 Lundin 分布较为接近麦汁 Lundin 区分分布的要求, 蛋白质回收率约 65%, 可与啤酒糖浆复配作为啤酒发酵的氮源。

关键词:啤酒糖浆; 大豆蛋白; Alcalase 蛋白酶; 酶解; 隆丁区分

中图分类号: TS262.5; TS210.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)08-0103-06

Preparation of beer syrup complex solution by Alcalase protease enzymatic hydrolysis of soybean protein

LUO Jianyong¹, WU Chenbei², HUANG Junguang², ZHOU Hongjiang²,
QIAN Fang^{1,2}, GUO Feng¹, HUANG Lixin²

(1. Guangzhou Shuangqiao Company Ltd., Guangzhou 510280, China; 2. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Alcalase protease was used for enzymatic hydrolysis of soybean protein, and the protein recovery rate, hydrolysis degree, Lundin fraction and SDS-PAGE electropherogram of the enzymolysis product were determined. The enzymatic hydrolysis conditions were obtained as follows: enzymolysis temperature 55℃, substrate mass concentration 5%, enzyme dosage 750 U/g, pH 8.0, reaction time 0.5-1.0 h. Under these conditions, the obtained enzymatic hydrolysate was light brown, and its Lundin fraction was closer to the requirement of the distribution of protein in wort. The protein recovery rate was about 65%, which could be combined with beer syrup as a nitrogen source suitable for beer fermentation.

Key words: beer syrup; soybean protein; Alcalase protease; enzymatic hydrolysis; Lundin fraction

啤酒是世界上产量最大、酒精含量低、营养价值丰富的酒种。2002年我国的啤酒产量为2386.83万t,开始超过美国成为世界第一^[1-2],之后我国的啤酒产量就一直稳居世界前列。2000年前,我国的

啤酒企业以大麦为主要原料、大米为辅料生产淡爽型等各式啤酒。随着啤酒行业的快速发展,产量逐年攀升,对大麦、大米的需求量日益增加,价格大幅上扬。2002年以来,进口大麦不但价格涨幅大,而且质量不稳定,给国内啤酒行业带来很大影响^[2]。许多厂家开始试验使用啤酒用糖浆作为啤酒的辅料,达到缩短酿造周期、提高原料利用率、降低生产成本、扩大产能等目的,为啤酒和淀粉糖行业带来了较好的经济效益。

由玉米淀粉或木薯淀粉经酶法制备的啤酒用糖浆,含有麦芽糖、单糖组分,适于啤酒酿造。然而,这类淀粉糖浆主要为碳源物质,添加过多造成体系氮

收稿日期:2019-11-06;修回日期:2020-04-24

基金项目:2017年绿色制造系统集成项目(工信部节函[2017]327号);2019年华南理工大学国家级大学生创新训练计划项目(201910561127);华南理工大学2019年学生研究计划项目(X201910561588)

作者简介:罗建勇(1979),男,高级工程师,主要从事淀粉糖工艺的研究工作(E-mail)34336683@163.com。

通信作者:黄立新,副教授(E-mail)lxhuang@scut.edu.cn。

源偏少,对啤酒酿造及其产品品质产生不利影响。对于啤酒麦汁的含氮物质,不仅有含量要求,而且对其分子大小有要求,由此 Lundin 提出了 A、B、C 区分法,又称为蛋白质的隆丁(Lundin)区分法^[3]。隆丁区分一般要求高分子含氮物质占 25%,中分子含氮物质占 15%,低分子含氮物质占 60%,在此条件下较有利于酵母发酵和形成啤酒良好的风味和泡沫^[3~5]。大豆蛋白含氮量高、产量大、来源广,为重要的食品原料,但其相对分子质量大,80%以上的蛋白质相对分子质量大于 10 万 Da,如果要将其添加到淀粉糖浆中用于啤酒发酵,需要进一步水解,达到啤酒对氮源物质 Lundin 区分的分布要求。

Alcalase 蛋白酶属于微生物蛋白酶,酶解蛋白质的效果好,是一种较为理想的酶制剂^[6~10]。在企业开发啤酒用糖浆的基础上,本文采用 Alcalase 蛋白酶在不同的酶解条件下酶解大豆蛋白,研究测定其大豆蛋白酶解液的蛋白质回收率、水解度、Lundin 区分的变化及其 SDS - PAGE 凝胶电泳特性,探讨酶解制备大豆蛋白酶解液的条件,以期与啤酒用糖浆复配使用更适于啤酒的发酵。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大豆蛋白,山东香驰豆业科技有限公司;Alcalase 碱性蛋白酶(酶活力 2.4 AU/g),诺维信公司。三氯乙酸、高岭土、浓硫酸、浓盐酸等为分析纯,无水碳酸钠、邻苯二甲酸氢钾为基准纯,L-酪氨酸、甘氨酸、干酪素为生化试剂,丙烯酰胺、N,N'-甲叉双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)、考马斯亮蓝 R-250、十二烷基硫酸钠和电泳标准蛋白样品均为电泳纯。

PHS-3C 型 pH 计,FA1004 电子分析天平,KHW-D-1 电热恒温水浴锅,79-3 型恒温磁力搅拌器,JJ-1 增力电动搅拌器,KDN-2C 型凯氏定氮仪,KDN 型消化炉,TDL-5-A 型低速台式离心机,DYCG-30 型电泳槽。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆蛋白酶解液制备

准确称取一定量的大豆蛋白,加入一定量蒸馏水,搅拌均匀,在(80±2)℃处理 15 min,冷却至预定温度后恒温水浴,调节 pH 至设定值。加入一定量的酶粉(液),配制成设定底物质量分数的反应液,缓慢搅拌,反应过程用 0.5 mol/L NaOH 溶液滴定维持体系在预定的 pH。反应到预定时间后,立即放入 85℃

或 100℃水浴中加热 15 min 钝化蛋白酶,冷却后在 4 800 r/min 下离心 20 min,取上清液,于冰箱冷藏。采用 pH - state 法测定大豆蛋白酶解过程的水解度^[11]。

1.2.2 干固体含量的测定

采用常压干燥法^[12]测定。

1.2.3 蛋白质含量的测定

参照 GB 5009.5—2016 的方法测定,换算系数为 5.71。

1.2.4 蛋白质回收率的计算

大豆蛋白酶解后,计量酶解离心后上清液的质量。准确称取约 1.000 g 的蛋白酶解液,用凯氏定氮法消化、定氮,测定上清液中蛋白质含量,按下式计算蛋白质回收率。

$$\text{蛋白质回收率} = \frac{\text{上清液中蛋白质含量}}{\text{底物蛋白质含量}} \times 100\%$$

1.2.5 隆丁区分^[13]

高分子含氮物质在酸性溶液中易被单宁所沉淀,磷钼酸可同时沉淀高、中分子含氮物质。低分子含氮物质则不为上述试剂所沉淀。因此,将样品用硫酸酸化后,加单宁使高分子含氮物质沉淀,测定滤液的含氮量,从总氮中减去此值即可得到高分子含氮物质的含氮量(A 区分)。另一份样品用磷钼酸沉淀,测定滤液中的含氮量,即为低分子含氮物质的含氮量(C 区分)。用单宁沉淀高分子含氮物质后的滤液含氮量减去低分子含氮物质的含氮量,即为中分子物质的含氮量(B 区分)。

1.2.6 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS - PAGE)分析^[14]

标准蛋白样品和分析样品在同一块凝胶上进行电泳,用标准蛋白的迁移率与相对分子质量的对数作图,可以获得一条标准曲线,根据未知蛋白的迁移率,可得到未知样品的相对分子质量。

2 结果与讨论

2.1 酶量对大豆蛋白酶解产物的影响

底物质量分数 5%,酶解温度 55℃,pH 8.0,分别在 500、750 U/g 和 1 000 U/g 的酶量下进行酶解,随着酶解的进行,体系 pH 逐渐下降,过程滴加 0.5 mol/L 的 NaOH 保持 pH 为 8.0。取不同时间段的酶解液测量其蛋白质回收率和水解度、酶解液 Lundin 分布以及电泳后的相对分子质量分布,结果见图 1~图 3。

由图 1 可见,随着酶量的增加,蛋白质回收率不断增大,大分子蛋白不断被酶解成相对分子质量较

小的蛋白质和多肽。反应 2 h 时,蛋白质回收率接近峰值;此后随着时间延长,蛋白质回收率有所减小。该酶解是一个较复杂的变化过程,在大分子蛋白被酶解成小分子蛋白和多肽的同时,这些小分子蛋白和多肽也能够经过相互作用,再次聚集成相对分子质量稍大的蛋白质,使得体系的蛋白质回收率

有所降低。随着酶量的增加和酶解时间的延长,大豆蛋白水解度呈现逐渐增加的趋势。在水解初期的 30~40 min 内,水解速率与酶量呈正相关,水解度上升很快;1 h 后水解度上升速度逐渐放缓,至 2 h 以后水解度趋于一个极限稳定值;不同的酶量,其极限值不同,与酶量呈正相关。

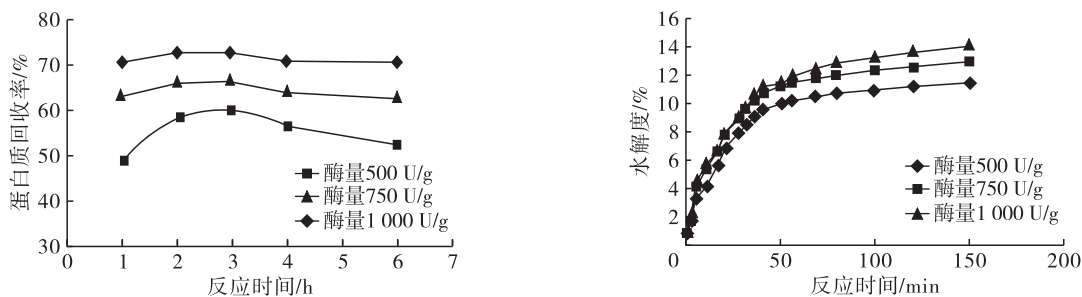


图1 酶量对蛋白质回收率和水解度的影响

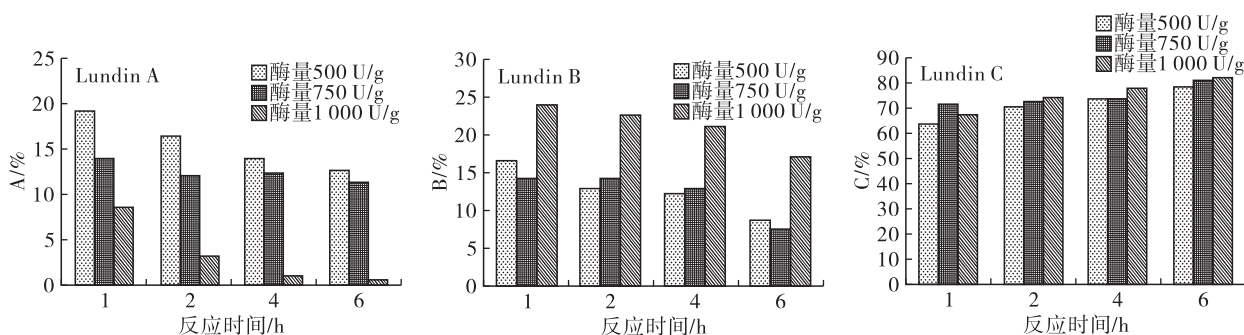
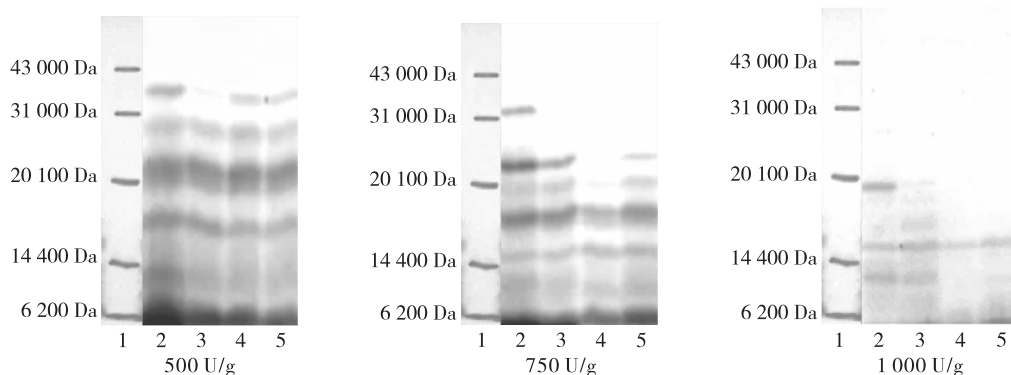


图2 酶量对 Lundin A、B 和 C 区分布的影响



注:1. 标准蛋白样品;2. 反应 0.5 h 样品;3. 反应 1 h 样品;4. 反应 1.5 h 样品;5. 反应 2 h 样品。下同。

图3 不同酶量条件下随反应时间变化所得酶解液的 SDS-PAGE 图谱

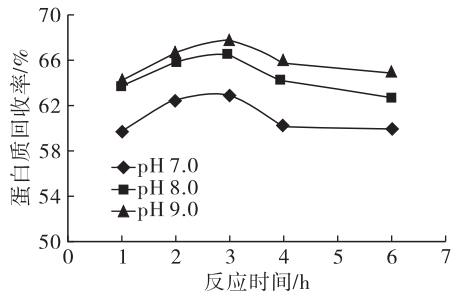
由图 2 可见:随着酶量增加和酶解时间的延长,C 区分的含量最大,占比超过 60%,且变化较小;A 区分的变化最为显著,含量在 20% 以下,显示大分子的蛋白质被酶解的最多。尤其在较高的酶量下,A 区分含量随酶解的进行,下降明显;B 区分的含量总体呈下降趋势,当酶量为 750 U/g 时,1 h 和 4 h 的 B 区分含量比较接近,在 2 h 时反而有所上升。可能在酶解过程中,Alcalase 碱性蛋白酶首先将大豆蛋白切断成为相对分子质量在 12 000~30 000 Da 的 B 区分的多肽,然后将 B 区分的多肽酶解成相对分子质量更小

的 C 区分的多肽、小肽,在单位时间段,前者酶解生成的 B 区分的数量以及 C 区分的多肽、小肽可能复合形成的 B 区分的数量之和,大于后者 B 区分酶解的数量,从而出现 B 区分反而有所增多的现象。

由图 3 可见:随着酶量增加与酶解时间的延长,大分子蛋白质不断减少;当酶量为 1 000 U/g 时,酶解 0.5 h 的酶解液样品,其相对分子质量基本在 25 000 Da 以下,相较于麦汁的一般 Lundin 分布来说,A 区分含量较少。因此,考虑啤酒的营养要求与酶解效果,选取酶量为 750 U/g。

2.2 pH 对大豆蛋白酶解产物的影响

Alcalase 碱性蛋白酶的最适 pH 为 8.0。本实验底物质量分数 5%，酶解温度 55℃，酶量 750 U/g，分别在 pH 为 7.0、8.0 和 9.0 下进行酶解，过程滴加



0.5 mol/L NaOH 保持 pH 不变。取不同时间段的酶解液测量其蛋白质回收率和水解度、酶解液 Lundin 分布以及电泳后的相对分子质量分布，结果见图 4 ~ 图 6。

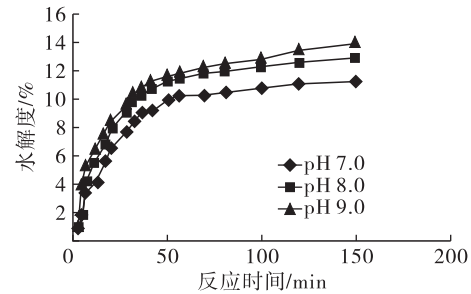


图 4 pH 对蛋白质回收率和水解度的影响

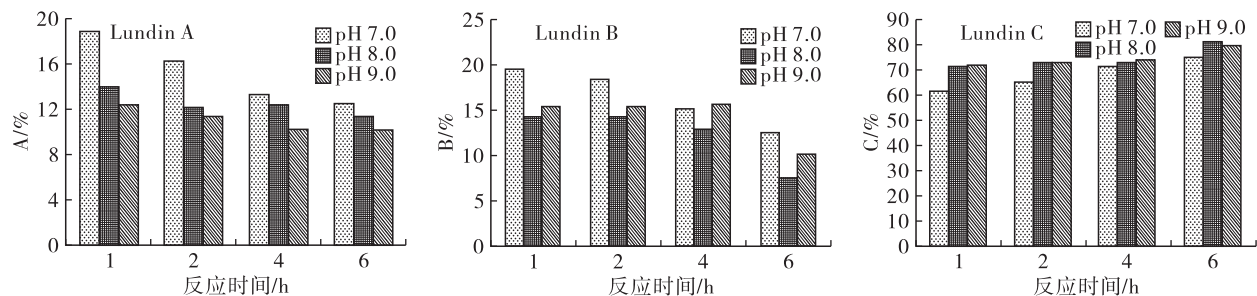


图 5 pH 对 Lundin A、B 和 C 区分分布的影响

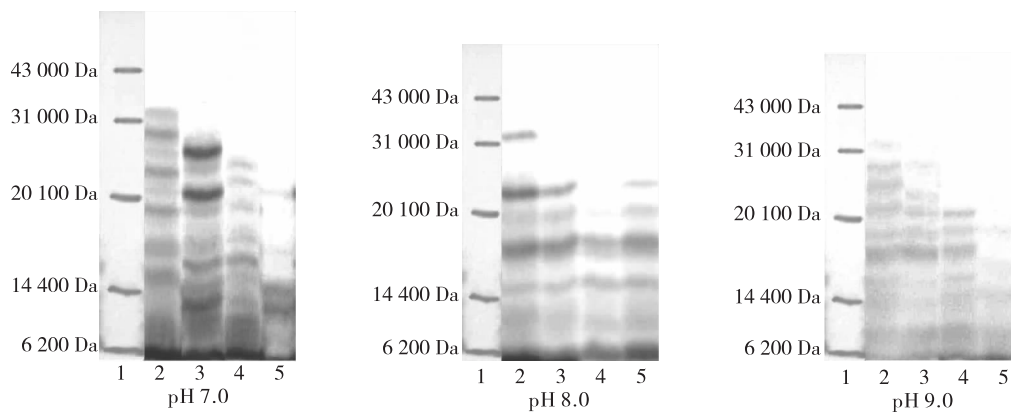


图 6 不同 pH 条件下随反应时间变化所得酶解液的 SDS-PAGE 图谱

由图 4 可见，随 pH 增加和反应时间的延长，蛋白质回收率先增大后趋于平稳。Alcalase 属于碱性蛋白酶，在碱性环境酶解效果较好，pH 为 8.0 和 9.0 时，蛋白质回收率相差不大。当 pH 增大，逐渐接近 Alcalase 的最适反应 pH 时，其水解度呈明显的上升趋势，但当 pH 超过 8.0 时，水解度的变化并不大。考虑到碱性较高会引起酶解液苦味加重，且可能产生不愉快的碱味，影响后续发酵液的感官品质，因此选择 pH 8.0 的酶解条件较为适宜。

由图 5 可见，在 pH 7.0~9.0 下，随着反应时间的延长，C 区分的含量都最大，占比超过 60%，且变化较小。另外，pH 对于 Lundin 分布的影响小于酶量的影响。Alcalase 属于碱性蛋白酶，在中性条件

下酶解效果较弱，pH 7.0 时高分子蛋白含量比较多，A 区分含量较高。

对于在 pH 9.0 下 1~4 h 阶段的酶解，B 区分分布相近；反应 4.0~6.0 h，此阶段大分子的蛋白质绝大多数已经不再被酶解了，继续生成 B 区分的数量有限，由此导致 B 区分的增加变小；而 B 区分还有相当数量又继续被酶解成 C 区分，由此导致 B 区分含量降低。可见，可以利用酶解 pH 的变化控制大豆酶解液中高分子蛋白的含量。

由图 6 可见，随着 pH 增大，反应所得酶解液的相对分子质量逐渐降低，但是降低的趋势较为缓慢。当 pH 增大到 9.0 时，反应 2 h 仍有少量 20 100 Da 左右的多肽存在，pH 对蛋白质回收率的影响小于酶量对蛋白质回收率的影响，考虑到水解度以及对后

续发酵液的影响,选取 pH 为 8.0。

2.3 酶解温度对大豆蛋白酶解产物的影响

底物质量分数 5%, pH 8.0, 酶量 750 U/g, 分别在 50、55、60、65 °C 下进行酶解, 过程滴加 0.5 mol/L

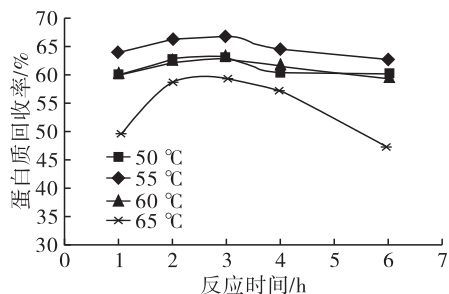


图7 酶解温度对蛋白质回收率和水解度的影响

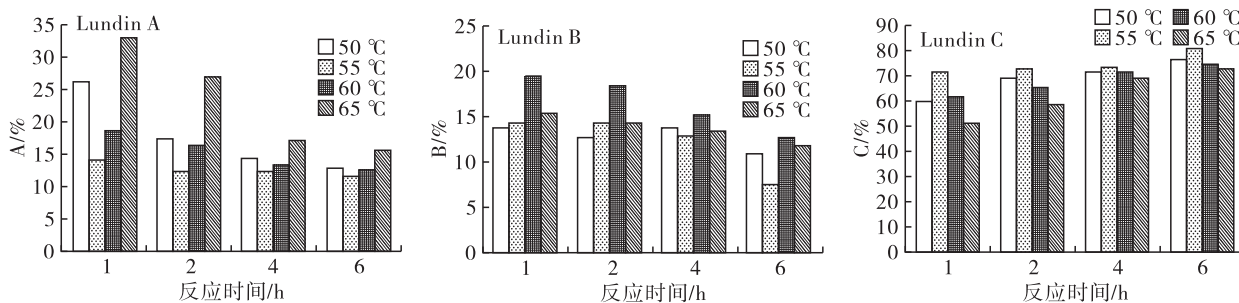
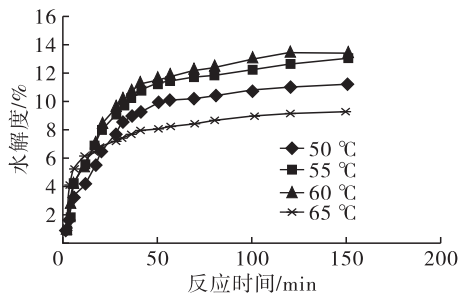


图8 酶解温度对酶解液 Lundin A、B 和 C 区分分布的影响

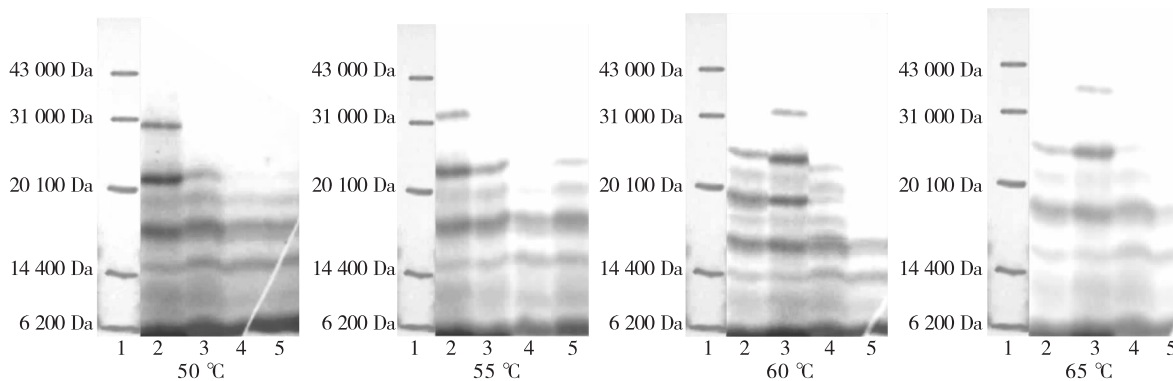


图9 不同酶解温度条件下随反应时间变化所得酶解液的 SDS-PAGE 图谱

由图 7 可见,在 50 ~ 65 °C 的酶解温度范围,蛋白质回收率先随温度上升而增大,55 °C 有较大或最大的蛋白质回收率,然后开始降低。可能高温加速了小分子肽的聚合作用,重新生成了相对分子质量较大的蛋白,使可溶性蛋白的含量降低。在 50 ~ 65 °C 的温度范围,蛋白质回收率随反应的进行而增大,3.0 h 时具有最大值,然后开始下降;65 °C 下蛋白质回收率的变化较大,反应 4.0 h 之后,蛋白质回收率降低幅度大。

从图 8 可见,酶解温度对 Lundin 分布的影响较为显著。当酶解温度高于 55 °C,使酶活力有所降低,导致 A、B 区分的含量产生明显变化。当酶解温度为 65 °C 时,A 区分含量相对较高,与图 7 65 °C 的变化曲线一致。

结合图 8、图 9 可见,在 60、65 °C 酶解 2 h 阶段,

的 NaOH 溶液保持 pH 8.0。取不同时间段的酶解液测定其蛋白质回收率和水解度、酶解液 Lundin 分布以及电泳后的相对分子质量分布,结果见图 7 ~ 图 9。

A、B 区分的含量较高,但 C 区分产生量不多,聚集作用可能又使之减少,65 °C 时总含量小于 60%,作为啤酒发酵液,将导致酵母细胞生长所需的 α -氨基氮的含量过低,酵母生长不良,影响酒液的品质。另外,在工厂条件下,一般温度控制在 45 ~ 55 °C 之间。综上所述,考虑到蛋白质回收率、水解度和 A、B 和 C 区分的相对分子质量分布关系,选择酶解温度为 55 °C。

2.4 底物质量分数对大豆蛋白酶解产物的影响

酶量 750 U/g, pH 8.0, 酶解温度 55 °C, 底物质量分数分别为 4%、5%、6% 和 7% 下进行酶解,滴加 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液保持 pH 在 8.0。取不同时间段的酶解液测定其蛋白质回收率、水解度(2.5 h)以及电泳后的相对分子质量分布,结果见图 10 和图 11。

高底物浓度具有较高的酶解效率,对提高生产

设备利用率有好处。但过高的底物浓度又造成酶解液黏度增大,影响蛋白酶的扩散,降低水分活度,对酶解反应有一定的抑制作用。由图 10 可见,从蛋白

质回收率来看,底物质量分数越高,蛋白质回收率越低。因此,考虑到生产实际情况及蛋白质回收率,选择适中的底物质量分数是必要的。

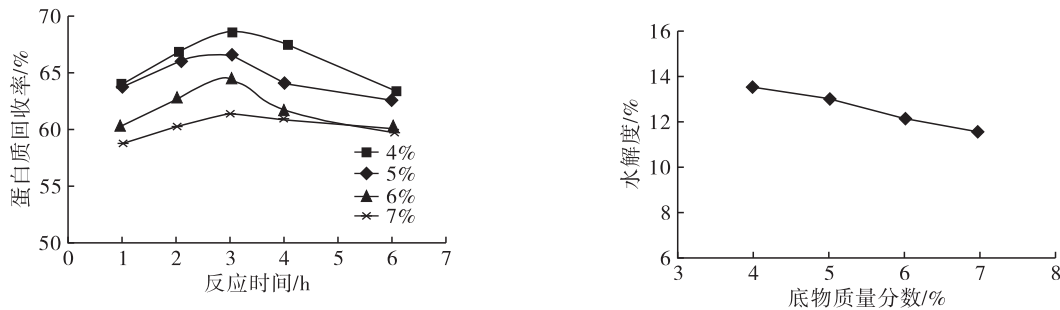


图 10 底物质量分数对蛋白质回收率和水解度的影响

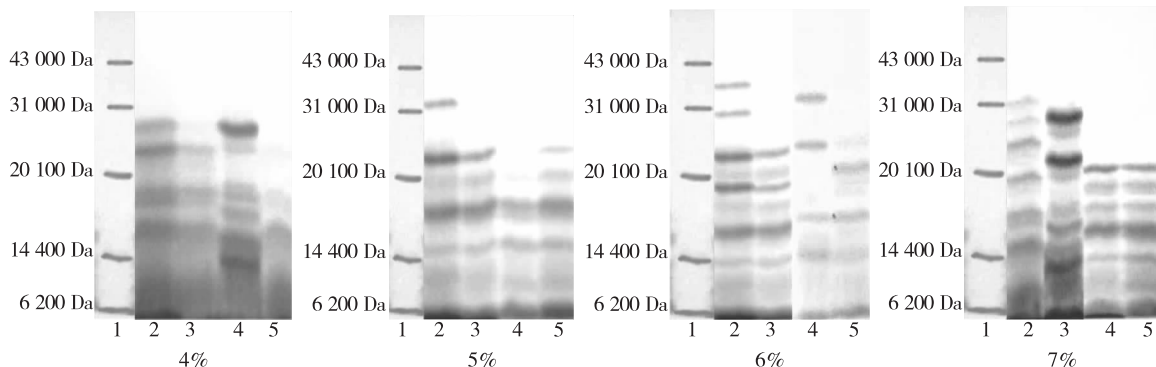


图 11 不同底物质量分数条件下随反应时间变化所得酶解液的 SDS-PAGE 图谱

由图 11 可见,低底物质量分数条件下反应在初始酶解阶段,所得的多肽分布情况大致相似,当底物质量分数提高以后,相对分子质量高的肽类增加较多,酶解物的溶解性会变差,使发酵所得的啤酒的生物稳定性降低。综上,选择酶解大豆蛋白的底物质量分数为 5%,反应时间为 0.5 ~ 1.0 h。此时大豆蛋白酶解液为浅棕色,苦味稍重。

3 结论

(1)通过单因素实验得知,Alcalase 蛋白酶对大豆蛋白有很好的酶解作用。Alcalase 蛋白酶酶解大豆蛋白制取复配酶解液的最佳条件为:酶解温度 55 ℃,底物质量分数 5%,酶量 750 U/g, pH 8.0,反应时间 0.5 ~ 1.0 h。在最佳条件下所得的酶解液为浅棕色,苦味稍重,蛋白质回收率约 65%,所得到的酶解液的 Lundin 分布比较接近麦汁 Lundin 区分分布的要求。采用 Alcalase 蛋白酶制取啤酒糖浆的含氮复配液是可行的。

(2)复配糖浆可提高啤酒用糖浆有机含氮营养元素含量,在啤酒酿造中将具有更好的效果,具有积极的现实意义。

参考文献:

[1] 程殿林. 啤酒生产技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2005.
[2] 中国酿酒工业协会啤酒分会. 2003 年上半年啤酒工业概况及对中小啤酒企业发展的建议[J]. 啤酒科技,

2003(9):1-4,7.
[3] 申文波,孟艳丽,刘传玲,等. 麦芽隆丁区分在生产过程中的变化与重要性[J]. 酿酒,2012,39(3):61-64.
[4] 郑敏. 啤酒发酵中蛋白质对泡沫质量的影响[J]. 合肥联合大学学报,2001,11(2):78-82.
[5] 王志坚. 改善啤酒泡沫的工艺途径[J]. 山东食品发酵,2004(3):21-24.
[6] 宋永康,黄薇,林虬,等. 不同酶解法水解豆粕蛋白的比较研究[J]. 农学学报,2012,2(9):51-55.
[7] 张静,李理. Alcalase 蛋白酶酶解高温豆粕制备水溶性大豆多肽[J]. 食品工业科技,2012,33(10):212-215.
[8] 孙显慧. 正交实验确定 Alcalase 水解大豆蛋白的最佳实验条件[J]. 潍坊学院学报,2015,15(6):21-23.
[9] DOS SANTOS AGUILAR J G, SATO H H. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates[J]. Food Res Int,2018(103):253-262.
[10] 赵莎. Alcalase 蛋白酶对草鱼鱼鳞胶原多肽提取的研究[J]. 生物化工,2019,5(1):103-105.
[11] 徐英操,刘春红. 蛋白质水解度测定方法综述[J]. 食品研究与开发,2007,28(7):173-176.
[12] 黄立新,徐正康. 味精生产中间物料干固体含量的简易测定方法[J]. 现代食品科技,2006,22(4):218-220,226.
[13] 蔡定域. 酿酒工业分析手册[M]. 北京:轻工业出版社,1988.
[14] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:北京科学出版社,2003.