

低胰蛋白酶抑制剂全豆豆浆的研制

霍建冶, 王建光, 吴超义, 钱和*, 成玉梁 (江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要 [目的] 研制低胰蛋白酶抑制剂全豆豆浆。[方法] 利用中性蛋白酶和复合超微粉碎技术制备低胰蛋白酶抑制剂全豆豆浆, 创新性地在打浆时加入中性蛋白酶, 并研究了打浆豆水比、打浆温度、蛋白酶添加量、酶解时间对豆浆水解度和胰蛋白酶抑制剂钝化率的影响, 并利用正交试验进行了工艺优化。[结果] 试验表明, 豆水比 1:7、水解温度 50 ℃、酶用量 16 μL/g、酶解时间 20 min 可钝化 90% 以上的胰蛋白酶抑制剂。添加豆浆质量 3% 的 β-环糊精可以掩蔽酶解后豆浆的苦味。[结论] 研究可为低胰蛋白酶抑制剂全豆豆浆的工业化生产提供参考。

关键词 全豆豆浆; 中性蛋白酶; 钝化; 胰蛋白酶抑制剂

中图分类号 S188+.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)14-251-03

Development of Whole Soybean Milk with Low Content of Trypsin Inhibitor

HUO Jian-ye, WANG Jian-guang, WU Chao-yi, QIAN He* et al (The School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122)

Abstract [Objective] To develop whole soybean milk with low content of trypsin inhibitor. [Method] A new way was developed to make whole soybean milk with low content of trypsin inhibitor. Ultrafine grinding technology and neutral protease were used in this method. Degree of hydrolysis and inactivation of trypsin inhibitor by neutral protease in different conditions (soybean/water ratio, grinding temperature, enzyme dosage, incubation time) were studied. The technique was optimized by orthogonal test. [Result] The optimum activation parameters were soybean: water = 1:7 (W/W), grinding temperature 50 ℃, enzyme dosage 16 μL/g protein, incubation time 20 min. 3% β-cyclodextrin was added to remove the bitterness of soybean milk. [Conclusion] The study can provide reference for industrial production of whole soybean milk with low content of trypsin inhibitor.

Key words Whole soybean milk; Neutral protease; Inactive; Trypsin inhibitor

不排豆渣的全豆豆浆是利用超微粉碎技术实现大豆营养全利用的豆浆, 口感细腻, 富含大豆蛋白、膳食纤维等营养物质。大豆蛋白是一种理想的植物蛋白, 氨基酸种类齐全, 其中人体所必需的 8 种氨基酸的含量基本上与联合国卫生组织所建议的相近^[1]。但是, 大豆蛋白中有抗营养因子胰蛋白酶抑制剂^[2]。胰蛋白酶抑制剂对人体的危害主要表现在抑制人体胰蛋白酶活性, 食用未完全除去胰蛋白酶抑制剂的豆制品时, 不仅会抑制人体对蛋白质的消化吸收, 还会引起胰腺肿大等中毒症状^[3]。研究表明, 当大豆中的胰蛋白酶抑制剂含量降低 90% 以上时才被认为可放心食用。主要的去除方法包括物理处理法、化学处理法和生物处理法等。其中物理法钝化是研究最广泛的, 而热失活是常用的钝化大豆胰蛋白酶抑制剂的方法。但过度加热将导致大豆中某些氨基酸, 尤其是赖氨酸、精氨酸和色氨酸等碱性氨基酸利用率下降^[4]。化学处理方法主要有尿素处理、乙醇处理等。操作方便, 但有化学物质残留, 应用较少。生物学方法主要有酶制剂处理法、微生物发酵法、发芽处理法等。大豆胰蛋白酶抑制剂可以被蛋白酶水解, 改变活性中心而失活^[5]。应用酶法消除大豆蛋白中的胰蛋白酶抑制剂具有效率高, 保护营养成分, 安全无残留等优点。笔者创新性地在打浆阶段加入中性蛋白酶, 研究其对胰蛋白酶抑制剂的钝化效果, 以期工业化生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂。东北大豆; 中性蛋白酶(活力大于 1 600

作者简介 霍建冶(1990-), 男, 河南桐柏人, 硕士研究生, 研究方向: 食品资源开发与利用。* 通讯作者, 教授, 从事食品安全与质量控制研究。

收稿日期 2015-03-27

AZO/g); 牛胰蛋白酶; 氢氧化钠; 甲醛溶液; 苯甲酰-DL-精氨酸-p-硝基酰替苯胺盐酸盐(BAPA); Tris; 氯化钙; 盐酸溶液; 冰醋酸; β-环糊精。

1.1.2 主要设备。打浆机, 胶体磨, 恒温磁力搅拌器, 高压均质机, 激光粒度分析仪, 分光光度计, 水浴锅。

1.2 试验方法

1.2.1 全豆豆浆制备方法。大豆除残、除杂、清洗后, 按 1:3 的豆水质量比于 4 ℃下浸泡 18 h。将浸泡完全的大豆沥干, 置于沸腾的 0.5% (W/V) 的 NaHCO₃ 溶液中进行热烫处理 6 min。

将热烫后的湿豆冲洗至中性后和一定温度去离子水按一定比例混合, 加入一定量的中性蛋白酶, 打浆机粗粉碎 2 min 后静置让蛋白酶充分反应。酶解片刻后迅速将豆浆加热至 80 ℃保温 10 min 灭酶。

灭酶后的豆浆使用胶体磨粉碎 1 min, 然后使用高压均质机进一步细化豆浆, 最终得到口感细腻的全豆豆浆。

1.2.2 胰蛋白酶抑制剂含量的测定。将样品稀释, 使其产生 40%~60% 的抑制百分率。分别加溶液于下面 4 个 10 ml 具塞玻璃离心管中: (a) 标准空白。5 ml BAPA 溶液, 3 ml 去离子水, 1 ml 5.3 mol/L 醋酸。(b) 标准溶液。5 ml BAPA 溶液, 3 ml 去离子水。(c) 样品空白。5 ml BAPA 溶液, 1 ml 样品稀释液, 2 ml 去离子水, 1 ml 5.3 mol/L 醋酸。(d) 样品溶液。5 ml BAPA 溶液, 1 ml 样品稀释液, 2 ml 去离子水。将各离心管充分混匀后置于 37 ℃恒温水浴锅中温育 10 min。然后各离心管均加入 1 ml 胰蛋白酶工作液, 混匀, 继续温育 10 min ± 5 s 后于 (b) 管和 (d) 管中分别加入 1 ml 5.3 mol/L 醋酸终止反应。充分混合上述溶液, 用分光光度计在 410 nm 用 10 mm 比色皿测定溶液吸光度(用标准空白调零)。该溶液能够保持稳定至少 2 h^[6]。

结果计算:

①胰蛋白酶抑制百分率。公式如下:

$$I(\%) = \frac{A_r - (A_s - A_{bs})}{A_r} \times 100\%$$

式中, I 为胰蛋白酶抑制百分率; A_r 为标准溶液的吸光度; A_s 为样品溶液的吸光度; A_{bs} 为样品空白吸光度。

②胰蛋白酶抑制剂活性。只有样品提取液胰蛋白酶抑制百分率在 40% ~ 60% 范围内时,样品溶液吸光度可用于胰蛋白酶抑制剂活性计算。计算胰蛋白酶抑制剂活性,用每克样品抑制的胰蛋白酶毫克数表示,结果精确至 0.1 mg/g。

$$TIA(\text{mg/g}) = \frac{A_i \times V \times D}{0.019 \times m \times 1\,000}$$

式中, TIA 为胰蛋白酶抑制剂活性(mg/g); $A_i = A_r - (A_s - A_{bs})$ 为吸光度变化值; V 是样品提取液体积(ml); m 是测试样品的质量(g);0.019 是 1 μg 纯牛胰蛋白酶在 410 nm 波长的吸光度; D 是样品的稀释倍数。

③胰蛋白酶抑制剂钝化率的计算。计算公式:

$$\text{钝化率}(\%) = \frac{TIA_0 - TIA_1}{TIA_0}$$

式中, TIA_0 为根据未处理大豆折算的豆浆中胰蛋白酶抑制剂活性, TIA_1 为酶解后豆浆中胰蛋白酶抑制剂。

1.2.3 豆浆水解度的测定。取水解灭酶后 5.0 ml 酶解液,置于 200 ml 烧杯中,加入 60 ml 无 CO_2 水,开动磁力搅拌器,加少量碱液调节 pH 为 8.20,再加入 10 ml 中性甲醛溶液,用 0.5 mol/L NaOH 标准溶液调节体系 pH 至 9.20,记录消耗 NaOH 标准溶液体积为 $V(\text{ml})$ 。同时取未酶解相同浓度蛋白质溶液 5.0 ml,按上述方法作空白试验,记录消耗 NaOH 标准溶液体积为 $V_0(\text{ml})$ 。

$$DH(\%) = C \times (V - V_0) \times \frac{0.014}{N} \times 100\%$$

式中, C 为 NaOH 标准溶液浓度(mol/L); V 为酶解液消耗 NaOH 标准溶液体积(ml); V_0 为空白液消耗 NaOH 标准溶液体积(ml);0.014 为氮毫克当量; N 为底物样品总氮含量(g)。

1.2.4 酶法钝化胰蛋白酶抑制剂的单因素试验。分别考察打浆豆水比:1:5 ~ 1:9、打浆温度:30 ~ 70 $^{\circ}\text{C}$ 、蛋白酶添加量:0 ~ 20 $\mu\text{L/g}$ 、酶解时间:0 ~ 30 min 对豆浆水解度和胰蛋白酶抑制剂钝化率的影响。

1.2.5 酶法钝化胰蛋白酶抑制剂条件的正交试验优化。采用正交试验对酶解条件进行优化,根据单因素试验结果,研究豆水比、打浆温度、加酶量和酶解时间 4 个因素对试验结果的影响。通过单因素试验确定 4 个因素的取值水平范围,以胰蛋白酶抑制剂钝化率为指标,以确定最佳水解条件组合。正交试验组合见表 1。

1.2.6 豆浆脱苦效果的感官评定。向酶解完成后的豆浆中加入不同质量的 β -环糊精,80 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 10 min,经过超微粉碎后由 10 名感官评定员进行评定。表 2 为感官评定标准。

2 结果与分级

2.1 打浆豆水比对豆浆水解度和胰蛋白酶抑制剂钝化率的影响 打浆时的豆水比影响着底物浓度,豆水比太低,底物

浓度低,酶与底物接触的几率小,水解度低。豆水比过高,底物浓度高,蛋白质分子会通过疏水作用和二硫键作用,形成网状聚合体,降低酶解效率^[7]。

表 1 正交试验因素水平设计

水平	因素			
	豆水比(A)	打浆温度(B) / $^{\circ}\text{C}$	加酶量(C) / $\mu\text{L/g}$	酶解时间(D) / min
-1	1:6	40	14	15
0	1:7	50	16	20
1	1:8	60	18	25

表 2 感官评分标准

编号	描述	得分
1	非常苦,难以接受	0 ~ 2
2	苦,可以接受	3 ~ 5
3	稍苦	6 ~ 8
4	不会感到苦味	9 ~ 10

豆水比分别为 1:5、1:6、1:7、1:8、1:9,加酶量为 6 $\mu\text{L/g}$ 蛋白,打浆温度 50 $^{\circ}\text{C}$,酶解 15 min,结果如图 1、图 2 所示,胰蛋白酶抑制剂(TI)的钝化率与水解度呈正相关趋势。当豆水比 1:7 时,豆浆水解度和 TI 钝化率最高。

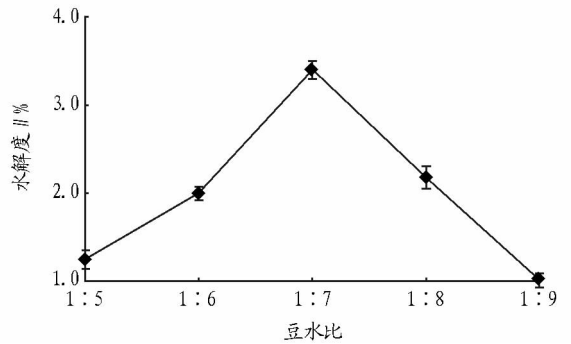


图 1 豆水比对豆浆水解度的影响

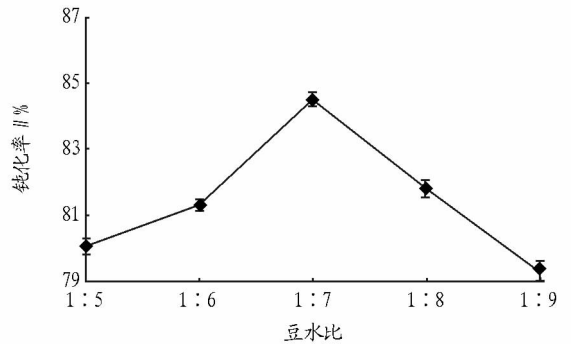


图 2 豆水比对胰蛋白酶抑制剂钝化率的影响

2.2 打浆温度对豆浆水解度和胰蛋白酶抑制剂钝化率的影响 保持豆水比 1:7,加酶量为 6 $\mu\text{L/g}$ 蛋白酶解时间 15 min 时,研究不同的打浆温度对水解度和 TI 钝化率的影响。如图 3、图 4 所示,打浆温度从 30 $^{\circ}\text{C}$ 提高到 50 $^{\circ}\text{C}$,酶解反应速度相应提高,但是打浆温度超过 50 $^{\circ}\text{C}$ 后,水解度和胰蛋白酶抑制剂钝化率降低。

打浆过程为升温过程,打浆结束后豆浆的终温会影响蛋

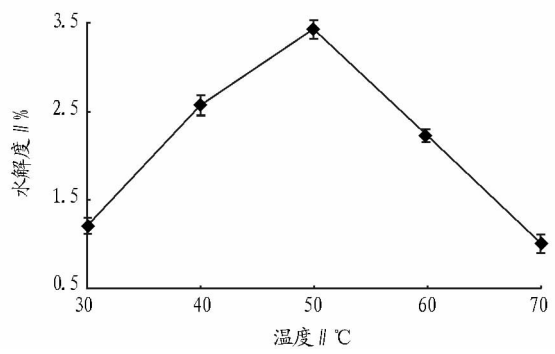


图3 打浆温度对豆浆水解度的影响

白酶分子稳定性,这是因为蛋白酶分子的肽键具有特定的空间结构,如果反应温度过高,会引起次级键解离,从而使蛋白酶丧失或部分丧失催化活性;但是若反应温度过低,则会大大降低体系内分子运动的激烈程度,从而降低蛋白酶与底物的碰撞机率^[8]。

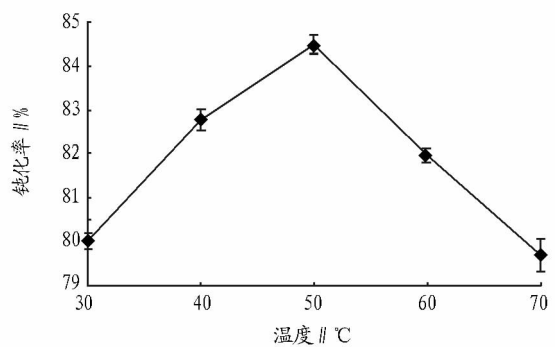


图4 打浆温度对胰蛋白酶抑制剂钝化率的影响

2.3 蛋白酶添加量对豆浆水解度和胰蛋白酶抑制剂钝化率的影响 保持豆水比 1:7,打浆温度 50 °C,蛋白酶解时间 15 min 时,考察中性蛋白酶添加量对水解度和胰蛋白酶抑制剂钝化率的影响,结果如图 5、图 6 所示。当添加量大于 14 μl/g 蛋白时,水解度和胰蛋白酶抑制剂钝化率变化平缓。

随着中性蛋白酶用量增加,酶的催化位点与蛋白分子相应位点接触几率增多,水解度升高。当这些位点快全部断裂时,即使继续加入蛋白酶,肽键都难以再断裂。

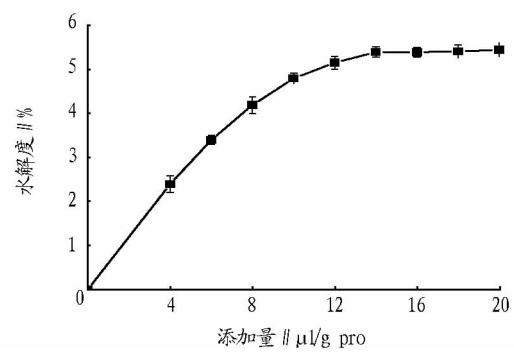


图5 中性蛋白酶添加量对豆浆水解度的影响

2.4 酶解时间对豆浆水解度和胰蛋白酶抑制剂钝化率的影响 保持豆水比 1:7,打浆温度 50 °C,添加 6 μl/g 蛋白的中性蛋白酶,考察水解时间对豆浆水解度和胰蛋白酶抑制剂钝化率变化的影响,结果如图 7、图 8 所示。15 min 内水解度和

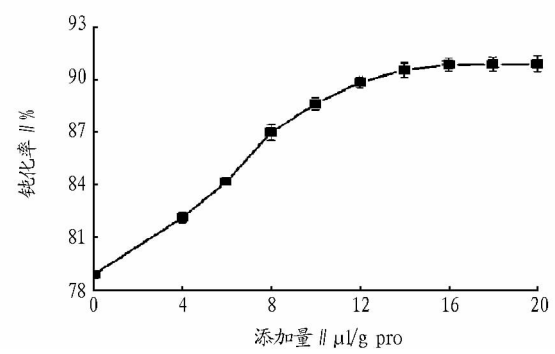


图6 中性蛋白酶添加量对胰蛋白酶抑制剂钝化率的影响

胰蛋白酶抑制剂迅速上升,20 min 后水解度和胰蛋白酶抑制剂钝化率的变化趋势平缓。

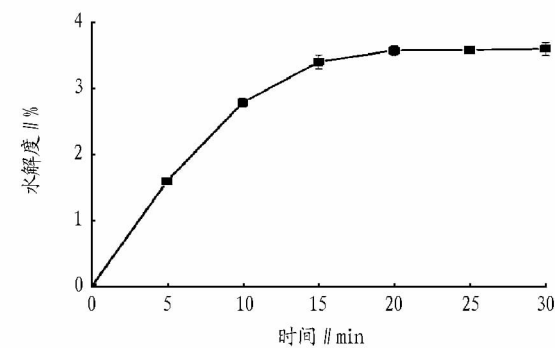


图7 酶解时间对豆浆水解度的影响

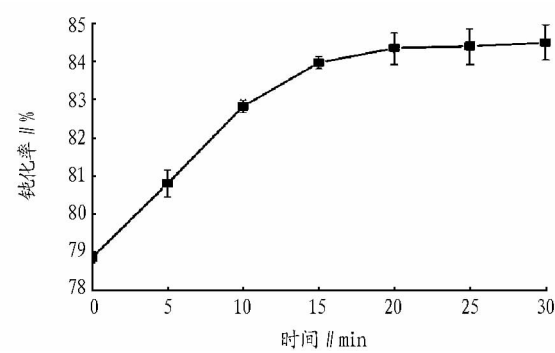


图8 酶解时间对胰蛋白酶抑制剂钝化率的影响

2.5 胰蛋白酶抑制剂钝化条件的优化 该试验采用 $L_9(3^4)$ 的正交表设计,正交试验结果和极差分析见表 2。用 SPSS 软件对结果进行分析处理,建立钝化率与因素的数学模型,以胰蛋白酶抑制剂钝化率为指标,通过对模型分析获得最佳工艺条件。由表 2 可知,影响钝化率的主次关系为:豆水比 > 水解温度 > 酶用量 > 酶解时间。最佳组合为豆水比 1:7、水解温度 50 °C、酶用量 16 μl/g、酶解时间 20 min,在此基础上进行验证试验,胰蛋白酶抑制剂钝化率为 90.5%,符合要求。

2.6 酶解后豆浆的脱苦 结果如表 3 所示,当添加 3.0% 的 β-环糊精时,感官评分最高。当蛋白质水解时,随着肽链解离,可呈现苦味的疏水性氨基酸残基或其形成小肽游离出来,产生苦味^[9]。β-环糊精是由 7 个葡萄糖分子连接成的环状结构化合物,主体构型像个中间有空洞,两端不封闭的筒^[10]。圆筒上部的广口排列着 12 个 C₂,C₃ 的羟基,底部狭

备),型号:WP841, $Q=2\text{ kg Cl}_2/\text{h}$ 。②氯瓶,2套,容量:100 kg。③漏氯吸收装置1套,能力:500 kg/h。④电动单梁悬挂起重机,1台, $T=1\text{ t}$, $L=7.5\text{ m}$,起吊高度:5.0 m。

2.8 污泥处理部分

2.8.1 构筑物。①污泥泵池,矩形污泥泵池。尺寸:2 m×2 m×4 m。②脱水机房。尺寸:12 m×6 m×5 m。

2.8.2 主要设备。①滤布式浓缩脱水一体机,1套。型号TB-2000,尺寸12 m×6 m×5 m,湿污泥处理量9~15 m³/h,滤布宽度2 000 mm,功率20 kW。②电动单梁悬挂起重机1台。 $T=1\text{ t}$,跨度7.5 m,起吊高度:5.0 m,功率2 kW。

2.9 过程控制系统 工程通过现场总线控制系统,对污水处理工艺(电气)运行过程进行分散控制、集中管理。现场总线控制系统由工控机和自治控制器以及智能现场设备组成。整个污水处理厂拟建中央控制室一间。

3 结语

随着社会进步与发展,环境治理工作越来越受到重视,建立合理新型,能够达到国家要求的污水处理厂势在必行。天津港保税区起步区雨污水泵站新型污水处理厂的建立,能够满足当地污水处理要求,废水水质达到标准。

(1)污水处理及回用工程采用CASS与MBR相结合的工艺,不需要大量的污泥回流和内回流,运行管理简单。采

用这种组合式工艺,结构紧凑,分期建设和扩建方便,同时也为国内类似污水处理工程的设计提供借鉴。

(2)由于季节原因,中水需用量变化较大。膜组件运行方式可降低能耗,根据回用水量的变化,可以对模块进行灵活调节,及时调整运行方案,使中水用量与处理量相匹配,既避免了设备及运转的浪费,又确保用水安全可靠。

(3)MBR处理出水含盐量等尚不明确,故中水脱盐处理需做场地预留与经济测算,待MBR实际运行后,对其出水进行相关监测来确定脱盐处理是否需要。

参考文献

[1] 颜斌.城市污水处理业市场取向改革研究[J].产业经济,2013,4(10):40-41.
[2] 李利蓉,李晔,桑稳姣.城镇污水处理厂提标改扩建工程设计[J].安全与环境工程,2013,20(2):72-76.
[3] 张辰,李春光.国外污水处理厂改造工程实例分析[J].给水排水,2009,35(2):14-18.
[4] 张智,陈杰云,李勇,等.处理低碳源污水的倒置A²/O工艺强化脱氮技术研究[J].中国给水排水,2009(7):7-9.
[5] 胡邦,蒋岚岚,张万里,等.MBR工艺在城市污水处理厂中的工程应用[J].给水排水,2009,35(11):22-24.
[6] 曾一鸣.膜生物反应器技术[M].北京:国防工业出版社,2007.
[7] 钱伯章.膜生物反应器处理污水高效环保[J].水处理技术,2011(8):126.
[8] 黄学政.膜生物反应器(MBR)处理高浓度有机废水的研究[D].西安:西安建筑科技大学,2006.

+++++

3 结论

该研究给出了一种利用湿法超微粉碎技术,并在打浆时添加中性蛋白酶来生产低胰蛋白酶抑制剂的全豆豆浆的方法,为其工业化大生产提供了参考。试验结果表明,豆浆的胰蛋白酶抑制剂钝化率和水解度呈正相关趋势,苦味也会随着水解度的提高而提高。豆水比1:7,打浆温度50℃,加入16 μl/g蛋白质的中性蛋白酶,酶解20 min后灭活,可钝化90%以上的胰蛋白酶抑制剂。添加3.0%的β-环糊精可以完全掩蔽酶解后豆浆的苦味。

参考文献

[1] 周春晖,黄惠华.大豆胰蛋白酶抑制失活诸方法研究探讨[J].武汉工业学院学报,2004(4):6-10.
[2] ANDERSON R L. Effect of steaming on soybean proteins and trypsin inhibitors[J]. Am Oil Chem Soc,1992,69:1170-1176.
[3] 王韧.超高压对大豆脂肪氧合酶、营养抑制因子和蛋白性质的影响[D].无锡:江南大学,2008.
[4] BAJPAI S,SHARMA A,GUPTA M N. Removal and recovery of antinutritional factors from soybean flour[J]. Food Chemistry,2005,89(4):497-501.
[5] 吴非,霍贵成.酶法钝化大豆胰蛋白酶抑制剂的研究[J].食品研究与开发,2002,23(6):26-28.
[6] 史艳宇,刘金华.豆制品中胰蛋白酶抑制剂含量的测定方法的改进[J].食品科学,2009,30(12):237-240.
[7] 刘静,张光华.蛋白酶联合水解大豆蛋白制备小分子肽的研究[J].食品工业,2010(4):26-30.
[8] 梁秋丽.大豆肽酶法生产工艺优化及抗氧化特性研究[D].泰安:山东农业大学,2012.
[9] 周雪松.蛋白酶解物苦味形成机理及控制研究[J].粮食与油脂,2004(8):20-24.
[10] 廖才智.β-环糊精的应用研究进展[J].化工科技,2010,18(5):69-72.
[11] 韩雅珊.食品化学[M].北京:北京农业大学出版社,1992.
[12] 冯学武.大豆蛋白酶法水解物的苦味机理及脱苦方法的研究[D].北京:中国农业大学,2001.

(上接第253页)

窄处有6个C₆羟基。因而从整体上看环糊精是亲水的,但是由于环的内侧被C-H所覆盖,与外侧相比有更强的疏水性。当溶液中同时存在亲水和疏水性物质时,疏水物质则被环内疏水基团吸附而形成包含化合物。对于疏水性多肽来说,该机理的实际效果则是对苦味起到“包埋”作用^[11]。另外,β-环状糊精本身也带有淡淡的甜味^[12]。

表2 正交结果分析

试验号	因素				钝化率 %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	80.10
2	1	2	2	2	86.20
3	1	3	3	3	80.50
4	2	1	2	3	86.50
5	2	2	3	1	90.89
6	2	3	1	2	85.50
7	3	1	3	2	82.30
8	3	2	1	3	84.10
9	3	3	2	1	81.20
K ₁	82.267	82.967	83.233	84.063	
K ₂	87.630	87.063	84.633	84.667	
K ₃	82.533	82.400	84.563	83.700	
R	5.363	4.663	1.400	0.967	

表3 β-环糊精用量对豆浆感官评定的影响

添加量//%	分数	添加量//%	分数
0	0.7	2.5	8.5
1.0	2.5	3.0	9.0
1.5	4.2	3.5	9.0
2.0	5.1		