

# 木瓜蛋白酶控制水解蚕豆水溶性蛋白及水解度对蚕豆蛋白质功能性质的影响

秦艳<sup>1</sup>, 刘建福<sup>1,\*</sup>, 谭斌<sup>2</sup>, 汪丽平<sup>2</sup>, 刘明<sup>2</sup>

(1.天津商业大学生物技术与食品科学学院, 天津 300134;

2.国家粮食局科学研究院, 北京 100037)

**摘要:**针对蚕豆蛋白在 pH 较低的体系中溶解性差、乳化能力低, 制约其在食品工业中应用等问题, 应用 808Titrand 瑞士万通全自动滴定仪控制木瓜蛋白酶水解蚕豆蛋白, 实现蚕豆蛋白的有限水解, 探讨水解度对蚕豆蛋白水解物的溶解性、乳化能力及持水性等功能性质的影响。通过木瓜蛋白酶的控制水解获得水解度为 2%~4% 的蚕豆蛋白水解物; 与蚕豆蛋白相比, 在 pH4.0~6.0 体系、水解度为 4% 的蚕豆蛋白水解物的溶解度提高 2~3 倍; pH6.0、水解度为 2% 的蚕豆蛋白水解物的乳化能力是蚕豆蛋白的 2.3 倍, 持水力是蚕豆蛋白的 1.6 倍。

**关键词:**蚕豆蛋白, 木瓜蛋白酶, 酶法控制水解, 功能性

## Effect of limited hydrolysis with papain on the functional properties of broad bean protein

QIN Yan<sup>1</sup>, LIU Jian-fu<sup>1,\*</sup>, TAN Bin<sup>2</sup>, WANG Li-ping<sup>2</sup>, LIU Ming<sup>2</sup>

(1.School of Biotechnology & Food Science, Tianjin University of Commerce, Tianjin 300134, China;

2.Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037, China)

**Abstract:** Broad bean seeds are a rich source of protein. The limited hydrolysis of broad bean proteins used Metrohm 808 automatic titrator aiming at the problems of low solubility of broad bean protein at low pH. Functional properties of native and modified (through limited enzymatic hydrolysis) broad bean had been investigated. Broad bean hydrolysates with 2.0% to 4.0% degree of hydrolysis (DH) were produced by papain. Compared with native broad bean protein, the protein solubility was improved 4.0~5.0 times in the range of pH4.0~6.0. The limited proteolysis isolate had better emulsifying and foaming properties than the native isolates, emulsifying capacity and the water-holding capacity of modified protein was increased 2.3 and 1.6 times at pH 6.0, respectively.

**Key words:** broad bean protein; papain; limited hydrolysis; functional properties

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)19-0162-04

蚕豆 (*Vicia faba* L.) 为重要的粮食和经济作物。目前中国是世界蚕豆第一生产大国, 据联合国粮农组织 (FAO) 2010 年统计, 全世界蚕豆种植面积 3839 万亩, 总产量 431 万 t。中国种植面积 1320 万亩, 总产量 170 万 t, 中国蚕豆的种植面积和总产量分别占世界的 34.4% 和 39% (2010, FAOSTAT)。蚕豆营养丰富, 富含大量的碳水化合物、蛋白质、纤维素, 以及维生素、矿物质等多种营养成分。蚕豆蛋白质含量高达 25%~30% (干基), 是豆类中仅次于大豆的高蛋白作物<sup>[1]</sup>。蚕豆蛋白质的氨基酸组成接近人体和动物所需要的理想比例, 其含有人体所需的 8 种必需氨基酸, 尤其赖氨酸含量丰富, 蚕豆种子中赖氨酸质量分数是谷类的 3 倍<sup>[2]</sup>, 因此, 蚕豆蛋白是一种重要的植物蛋白资源。目前蚕豆在我国的主要用途是

从原料豆中提取淀粉加工粉丝, 蚕豆淀粉生产的废水中含有大量的蚕豆蛋白。蛋白质的功能特性直接影响着食品的质构以及食品体系的稳定性等, 因而决定其能否在食品中应用<sup>[3]</sup>。蚕豆蛋白在 pH 较低的体系中溶解性较差, 较差的溶解性会导致其稳定性、乳化性、发泡性等性能不佳, 其不能在偏酸性食品体系中与其他物料形成均匀的体系, 影响其在偏酸性食品体系中的应用<sup>[4]</sup>。控制酶法水解蛋白质的水解度、实现蛋白质的有限水解是提高蛋白质溶解性等功能特性的有效手段, 酶法有限水解大麻蛋白质、葵花籽蛋白、花生蛋白等不同来源的蛋白质可以提高其溶解性等特性<sup>[5-7]</sup>, 但是酶法水解对蚕豆蛋白功能特性的影响尚未见研究报道。本研究适度水解蚕豆蛋白对蚕豆蛋白的功能特性的影响, 为开发具有良好功能特性的蚕豆蛋白或功能性蚕豆多肽等食品基料提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

收稿日期: 2012-03-20 \* 通讯联系人

作者简介: 秦艳 (1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 发酵工程。

基金项目: 十二五国家科技支撑计划 (2012BAD34B05)。

青海蚕豆 青海 11 号蚕豆,干燥的蚕豆种子;  
木瓜蛋白酶 广西南宁庞博生物工程有限公司提供  
(100 万 u/g);化学试剂均为分析纯。

Modul YOD-203 冷冻干燥机 Thermo Electron Corporation;808 Titrand 自动电位滴定仪 Metrohm 瑞士万通公司;高压液相色谱 美国 Cometro 公司; WND-100 型高速粉碎机 浙江省兰溪市伟能达电器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蚕豆蛋白质冷冻干粉的制备 青海蚕豆经粉碎(转速 10000r/min,间歇式粉碎 30min)后获得的蚕豆粉,过 200 目筛,收集筛下粉末用于提取蚕豆水溶性蛋白。称取 50.0g 蚕豆粉于烧杯中,加入 2.0L 的蒸馏水,磁力搅拌 30min,冷冻离心(4℃、6000r/min),弃沉淀,收集上清液,该上清液经过旋转蒸发、冷冻干燥获得蚕豆水溶性蛋白的冻干粉。

1.2.2 蚕豆蛋白的酶法水解 采用 pH-Stat 法水解蚕豆蛋白。去离子水将冷冻干燥的蚕豆蛋白粉配成浓度为 200mg/mL 的蚕豆蛋白溶液。向瑞士万通全自动电位滴定仪的恒温水解槽中加入 50mL 蚕豆蛋白溶液,然后加入浓度为 2mg/mL 的木瓜蛋白酶液 2mL。蚕豆蛋白水解过程中,通过 808Titrand 瑞士万通全自动电位滴定仪向反应体系滴加碱来维持蚕豆蛋白水解过程中反应体系的 pH 恒定在 7.0,酶反应温度 45℃。通过控制酶水解时间控制蚕豆蛋白的水解度,制备水解度为 2.0~6.0 的蚕豆蛋白水解物。蚕豆蛋白的水解物经过旋转蒸发、冷冻干燥获得干燥的蚕豆蛋白水解物。

1.2.3 蚕豆水溶性蛋白水解度的测定 蚕豆水溶性蛋白水解度的测定方法参照参考文献<sup>[8]</sup>。蛋白质的水解度 DH(Degree of hydroLysis)为蛋白质水解断裂的肽键数量与蛋白质中总的肽键之比。蚕豆蛋白的水解度通过下式计算:

$$DH(\%) = (B \times C_b) / (\alpha \times M_p \times h_{tot}) \times 100$$

式中:B-消耗碱液的体积,mL;C<sub>b</sub>-碱液的浓度,mol/L;α-氨基的离解度;M<sub>p</sub>-底物中蛋白质总含量,g;h<sub>tot</sub>-底物中蛋白质中肽键的总数,mmol/g (protein)。

1.2.4 蚕豆蛋白及其酶水解物的 HPLC 分析 冷冻干燥的蚕豆蛋白及其水解物配成 20mg/mL 的溶液,用 0.45μm 滤膜过滤,滤液上 HPLC 柱。分离蚕豆蛋白的 HPLC 条件为:色谱柱:TSK-GEL 凝胶色谱柱(日本 TOSOH 公司),紫外检测器的波长调节为 210nm,流动相为 0.1mol/L 的硫酸钠和 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲溶液 pH7.0,柱温 25℃,洗脱流速 1mL/min。

1.2.5 蚕豆蛋白及其水解物溶解性的测定 参照参考文献<sup>[7]</sup>,采用沉淀法测定蚕豆蛋白质在不同 pH 下的溶解度。将浓度为 200mg/mL、冷冻干燥的蚕豆蛋白或其酶水解物,用 0.5mol/L HCl 或 NaOH 调至不同 pH,静置 30min 后,冷冻离心(4℃,8000r/min,10min),采用 Bradford 法测定上清液中蛋白质的含量。

1.2.6 蚕豆蛋白质乳化性测定 取一定浓度的蚕豆蛋白质溶液 3mL 置于 10mL 试管中,边搅拌边缓缓加入葵花籽油 1mL,然后以组织分散机高速(8000r/min)分散 2min 制成乳状液,用微量取样器从底部取乳化液 100μL,立即与 50mL 0.1% SDS 溶液混合,以 0.1% 的 SDS 溶液为对照,在 722 型可见分光光度计上 500nm 处测定吸光值(A)。

1.2.7 蚕豆蛋白质持水性测定 称取一定质量的冷冻干燥蚕豆蛋白样品置于离心管,加蒸馏水 30mL,混合均匀,调节样液 pH 为 7.0。在恒温水浴中,加热 30min 后冷却 30min,3000r/min 离心 10min,倾去上清液,称重,并计算每克蛋白质样品的持水力(WHC)。

2 结果与讨论

2.1 蚕豆蛋白的酶法水解前后的分子量变化

图 1 与图 2 为蚕豆蛋白酶法水解前后的 HPLC 图谱。TSK-GEL 凝胶色谱柱的分离介质为凝胶,其按照被分离物质的分子量由大到小的顺序出峰。由图 1 可知,蚕豆蛋白有多个吸收峰,表明蚕豆蛋白是由分子量不同的多种蚕豆蛋白组成。比较图 1 与图 2 可知,蚕豆蛋白水解物在保留时间为 5.024min 和 5.796min 的色谱峰的峰面积明显小于蚕豆蛋白,表明保留时间为 5.024min 和 5.796min 的蚕豆蛋白组分发生了部分水解;蚕豆蛋白水解物中的多个色谱峰的保留时间与峰面积与蚕豆蛋白基本相同,表明这些蚕豆蛋白组分没有被水解。因此,可以推断:木瓜蛋白酶对蚕豆蛋白的部分组分进行了有限的水解。

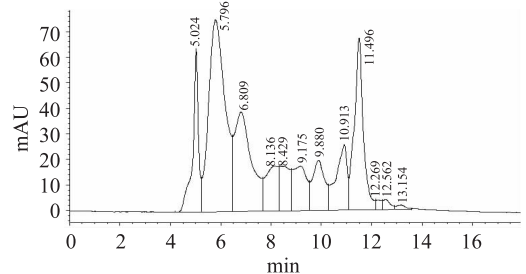


图 1 蚕豆蛋白酶的高压液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of soluble water protein of broad bean

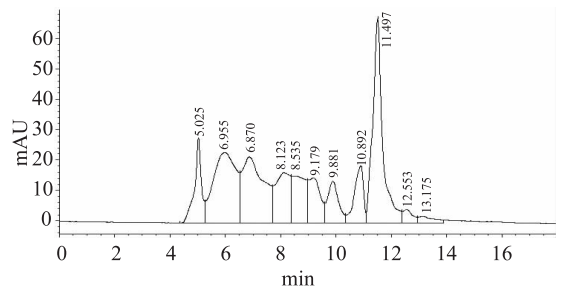


图 2 蚕豆蛋白酶水解物的高压液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of hydrolysates of soluble water broad bean protein after 1h of hydrolysis treated by papain

2.2 酶法改性对蚕豆蛋白的溶解性的影响

经过木瓜蛋白酶控制酶解的蚕豆蛋白在不同 pH 条件下的溶解性如图 3,蚕豆蛋白及其水解物在

pH4.0~6.0 的范围内蚕豆蛋白的溶解度低,这可能是由于蚕豆蛋白的等电点约为 5.0,在等电点附近时,蛋白质分子所带的静电荷少,此时蛋白质分子间的静电排斥作用力小,蛋白质容易发生聚集、沉淀。由图 3 还可知,同蚕豆蛋白相比,经过酶切控制改性的蚕豆蛋白在 pH4.0~6.0 的范围内溶解性均显著提高,水解度为 4% 蚕豆蛋白的溶解度比蚕豆蛋白提高 2~3 倍。蛋白的功能特性如乳化性、起泡性、增稠性和胶凝性通常受蚕豆蛋白溶解性的影响。在宽广的 pH 范围内,蛋白质具有良好的溶解性利于其在食品加工中应用。

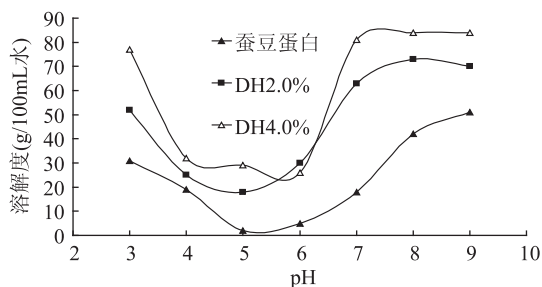


图3 蚕豆蛋白及酶法改性蚕豆蛋白水解物的溶解性  
Fig.3 Solubility of broad bean protein and its hydrolysates as a function of pH

### 2.3 酶法改性对蚕豆蛋白的乳化能力的影响

由图 4 可知,蚕豆蛋白经过控制水解可以提高蚕豆的乳化能力,蚕豆蛋白水解物的乳化能力受蚕豆蛋白水解度和 pH 的影响,pH7.0、水解度 2% 的条件下蚕豆蛋白水解物的乳化能力最大,是蚕豆蛋白的 2.3 倍。蛋白质表面含有亲水性和疏水性基团,因而其能降低水和油的表面张力,可作为表面活性剂、形成稳定的乳状液。蛋白质稳定乳状液的能力主要依赖于两个因素:通过吸附至表面而降低表面张力;通过静电、空间作用力等形成高粘弹性保护膜,阻止油滴相互聚集,稳定乳状液。因此,蛋白质的乳化性常受蛋白浓度、pH、离子强度等因素的影响<sup>[8]</sup>。较低分子量的蛋白质容易扩散、并在界面发生吸附,从而降低界面张力,这可能是控制酶切蚕豆蛋白的乳化能力提高的原因;在较高 pH 条件下,由于蛋白质所带负电荷使未能展开的蛋白质肽链相互排斥而在界面定向排列,从而有利于蛋白质肽链中亲水和疏水氨基酸残基的暴露,促进其在油/水界面的作用,降低表面张力;这可能是蚕豆在 pH7.0 比 pH4.0 时乳化能力高的原因。

### 2.4 酶法改性对蚕豆蛋白的持水力的影响

同蚕豆蛋白相比,酶法改性蚕豆蛋白的持水能力显著增加(图 5),水解度为 2% 的蚕豆蛋白水解物的持水力最大,是蚕豆蛋白的 1.6 倍。蛋白质的持水性是蛋白质的一种功能特性,干燥蛋白质能吸收液态水的最大量称为持水性。蛋白质的持水能力源于蛋白质分子表面的极性基团与极性水分子具有亲合性,蛋白质分子表面的极性基团越多,则吸水性越强。蚕豆蛋白水解物的持水能力增加可能是由于蚕豆蛋白部分酶切后蚕豆蛋白肽链中暴露的亲水氨基酸残基数量增加。

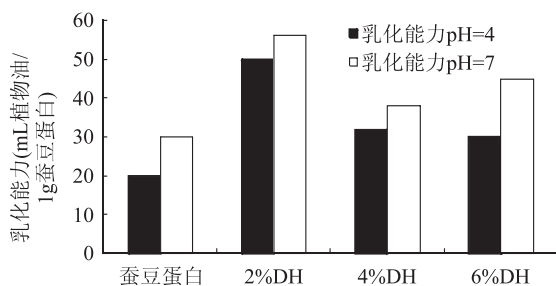


图4 酶法改性对蚕豆蛋白乳化活力的影响  
Fig.4 Emulsifying ability of water soluble protein of broad bean and its hydrolysates

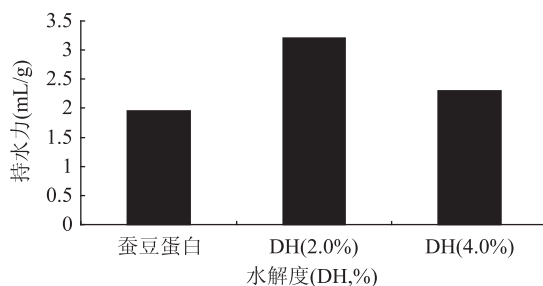


图5 蚕豆蛋白及酶法改性蚕豆蛋白水解物的持水力  
Fig.5 Water-retaining capacity of water soluble protein of broad bean and its hydrolysates

## 3 结论

采用 pH-stat 法通过控制木瓜蛋白酶水解蚕豆蛋白过程中酶水解时间可实现蚕豆蛋白的有限水解。同蚕豆蛋白相比,经过有限酶解的蚕豆蛋白水解物在 pH4.0~6.0 的范围内溶解性均显著提高,水解度为 4% 蚕豆蛋白水解物的溶解度比蚕豆蛋白提高 2~3 倍。蚕豆蛋白水解物的乳化能力受蚕豆蛋白的水解度和 pH 等因素的影响,pH7.0、水解度 2% 的条件下蚕豆蛋白水解物的乳化能力最大,是蚕豆蛋白的 2.3 倍。有限酶解的蚕豆蛋白水解物的持水能力显著增加,水解度为 2% 的蚕豆蛋白水解物的持水力最大,是蚕豆蛋白的 1.6 倍。

### 参考文献

- [1] G Duc. Faba bean (*Vicia faba L*) [J]. Field Crops Research, 1997, 53: 99-109.
- [2] M S Azaza, K Wassim, F Mensi, et al. Evaluation of faba beans (*Vicia faba L var minuta*) as a replacement for soybean meal in practical diets of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. Aquaculture, 2009, 287: 174-179.
- [3] A Tsoukala, E Papalamprou, E Makri, et al. Adsorption at the air-water interface and emulsification properties of grain legume protein derivatives from pea and broad bean [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2006, 53: 203-208.
- [4] 白正晨, 刘建福, 胡娟. 胰蛋白酶有限水解蚕豆盐溶蛋白的研究 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 263-265.
- [5] Shou-Wei Yin, Chuan-He Tang, Jin-Song Cao. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa L*) protein isolate [J]. Food

(下转第 172 页)



号花生产生的发根的培养条件进行了优化。研究表明,MS 为最适的基本培养基,蔗糖含量为 1.5%、氮源含量同标准 MS 培养基、磷酸盐为 3.75mmol/L、初始 pH 为 6.1 时可以促进发根的生长;添加 NAA、6-BA、IBA 等激素抑制发根的生长。100 $\mu$ mol/L SA 和 100mg/L 酵母提取物分别对发根胞内和胞外合成白藜芦醇有一定作用,其中 SA 可极大地增加培养液中白藜芦醇苷的合成量,但需要进一步研究其最适添加量。

### 参考文献

- [1] 史丽.白藜芦醇的生物活性研究进展[J].食品与药品,2006,8(11A):5-8.
- [2] 苗晓燕,于树宏,沈银柱,等.利用基因转化提高虎杖毛状根中活性成分的含量[J].药学学报,2007,42(9):995-999.
- [3] 闻玉莉,杨世海.罗勒毛状根的诱导及培养[J].安徽农业科学,2010,38(4):1727-1730.
- [4] Bensaddek L, Gillet F, Saucedo JE, et al. The effect of nitrate and ammonium concentrations on and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots [J]. *J Biotechnology*, 2001, 85 (1): 35-40.
- [5] 许铁峰,张汉明,丁如贤,等.粟米草毛状根的研究[J].第二军医大学学报,1999,20(10):764-766.
- [6] 万瑞晨,崔红.商陆发状根生长动力学研究[J].河南科学,2005,23(2):214-217.

- [7] 于荣敏,马娜,严春艳,等.外源激素对何首乌毛状根生长及蒽醌类成分生物合成的影响[J].生物工程学报,2006,22(4):620-623.
- [8] Medina B F, Jose Condori, Agnes M Rimando, et al. Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68:1992-2003.
- [9] Kim J S, Lee SY, Park SU. Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2008, 17:3785-3787.
- [10] 刘杰,任艳,张宗申,等.花生毛状根诱导及其体外培养[J].安徽农业科学,2012,40(6):3229-3233.
- [11] 蔡国琴,李国珍,叶和春,等. Ri 质粒转化的青蒿素发根培养及青蒿素的生物合成[J].生物工程学报,1995,11(4):315-320.
- [12] 李翠芳,王芳,麻浩,等.培养基及温度对新疆紫草毛状根生长的影响[J].新疆农业科学,2009,46(5):1117-1120.
- [13] 张兴,刘晓娟,吕巧玲,等.毛状根生产次生代谢产物的研究进展[J].化工进展,2007,26(9):1228-1232.
- [14] 许铁峰,张汉明,丁如贤,等.粟米草毛状根的研究[J].第二军医大学学报,1999,20(10):764-766.
- [15] 于树宏,刘传飞,李玲,等.野葛毛状根的离体培养与异黄酮生产[J].植物生理与分子生物学报,2002,28(4):281-286.

(上接第 164 页)

*Chemistry*, 2008, 106:1004-1013.

- [6] A Karayannidou, E Makri, E Papalamprou, et al. Limited proteolysis as a tool for the improvement of the functionality of sunflower (*Helianthus annuus* L) protein isolates produced by seeds or industrial by-products (solvent cake) [J]. *Food Chemistry*, 2007, 104:1728-1733.
- [7] Guanli Zhao, Yan Liu, Mouming Zhao, et al. *Enzymatic*

*hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate* [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127 (4):1438-1443.

- [8] D Spellman, E McEvoy, G O`Cuinn, et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis [J]. *International Dairy Journal*, 2003, 13(6):447-453.

(上接第 167 页)

究[J].粮食与食品工业,2009,16(5):43-49.

- [5] 姚惠源.稻米深加工[M].北京:化学工业出版社,2004:96.
- [6] 马力.食品化学与营养学[M].北京:中国轻工业出版社,2007:32.
- [7] G L Miller. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31 (3):426-428.
- [8] 廖周华,陈铭志,李彩娟,等.麦麸提取  $\gamma$ -氨基丁酸工艺的优选[J].亚热带农业研究,2010,6(4):267-270.
- [9] 张利.国际饮料分析方法[M].北京:中国轻工业出版社,

1992:109.

- [10] 姜照,杜金华,孙文涛,等.发酵温度对发酵玉米醪中总酸及主要微生物的影响[J].食品与发酵工业,2011,37(6):87-91.
- [11] 白鹏,刘红英,薛长湖,等.米曲霉发酵对鲍鱼中氨基酸态氮含量的影响[J].安徽农业科学,2011,39(26):16448-16449.
- [12] 夏明忠.蚕豆菜用栽培及加工利用[M].四川:四川科学技术出版社,2006:92.
- [13] 刘志强,肖翔,周立平.红曲霉与乳酸菌混合发酵产  $\gamma$ -氨基丁酸工艺研究[J].中国食品添加剂,2011(3):113.