

复合中性蛋白酶水解乳清蛋白中 β -乳球蛋白的工艺条件优化

韩仁娇^{1,2}, 王彩云^{1,2}, 罗述博^{1,2}, 程英^{1,2}, 云战友^{1,2}

(1. 内蒙古乳业技术研究院有限责任公司, 内蒙古呼和浩特 010110;

2. 内蒙古伊利实业集团股份有限公司, 内蒙古呼和浩特 010110)

摘要: 为优化双酶水解技术生产水解乳清蛋白工艺, 探寻适度水解条件下最优的 β -乳球蛋白水解工艺, 本研究以 Neutral protease F(以下简称 F 酶)添加量、Neutral protease G 酶(以下简称 G 酶)添加量、酶解温度为主要影响因素, 结合实际生产中的其他水解条件, 在单因素实验基础上, 运用 Box-Behnken 实验设计原理, 探讨 F 酶与 G 酶添加量、酶解温度的最佳组合。结果表明: F 酶与 G 酶同时添加, F 酶添加量 0.44% (相当于 2672.32 U/g)、G 酶添加量 0.08% (相当于 362.24 U/g)、酶解温度 55.2 °C 时生产乳清水解蛋白的 β -乳球蛋白水解率高达 58.99% \pm 0.02%, 与市售品牌水解乳清蛋白相比, 过敏原 β -乳球蛋白水解率最高, 分子量分布在 1000~180 u 之间的肽段占 51.76%, 游离氨基酸含量为 2.34%, 明显优于市售同类产品。

关键词: 乳清蛋白, 复合中性蛋白酶, β -乳球蛋白水解率, 分子量分布, 响应面法

Optimization of compound neutral enzymatic hydrolysis of β -lactoglobulin in whey protein

HAN Ren-jiao^{1,2}, WANG Cai-yun^{1,2}, LUO Shu-bo^{1,2}, CHENG Ying^{1,2}, YUN Zhan-you^{1,2}

(1. Inner Mongolia Research Center of Dairy Technology Co., Ltd., Hohhot 010110, China;

2. Inner Mongolia Yili Industrial Group Co., Ltd., Hohhot 010110, China)

Abstract: The purpose was to optimize the production of hydrolyzed whey protein by double enzyme hydrolysis technology and to explore the optimal process of β -lactoglobulin hydrolysis under moderate hydrolysis conditions. The enzymatic hydrolysis of whey protein with F-Neutral protease and G-Neutral protease was optimized using a Box-Behnken design with response surface methodology. The β -lactoglobulin hydrolysis rate of whey protein hydrolysate was 58.99% \pm 0.02% when the optimal hydrolysis conditions were established as follows: 0.44% (equivalent to 2672.32 U/g) F-protease, 0.08% (equivalent to 362.24 U/g) G-protease, and hydrolysis at 55.2 °C, which represented a maximum value over that reported for commercial whey protein hydrolysate. Mass fraction of molecular weight 1000~180 u was 51.76%, and the free amino acid was 2.34%, significantly lower than the market similar products.

Key words: whey protein; complex neutral protease; β -lactoglobulin hydrolysis rate; molecular weight distribution; response surface methodology

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)08-0203-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.08.031

乳清蛋白作为一种重要的乳源食品蛋白, 经过生物酶解可制备易于人体消化吸收的肽段^[1-2], 还能产生一些具有特殊生理功能的生物活性肽, 如具有降血压功能的降血压肽、具有促进钙铁吸收的酪蛋白磷酸肽, 具有抗菌功能的抑菌肽等^[3-5]。但是牛乳清蛋白中所含有的 β -乳球蛋白(β -Lg), 是导致婴幼儿过敏的主要过敏原, 人乳中并不含有这一蛋白组分, 但它在牛乳乳清蛋白中所占的比例高达 56%~60%^[6-8], 所以, 要生产母乳化、舒适或是低致敏性的婴幼儿配方奶粉, 降低或去除乳清蛋白中的 β -乳

球蛋白是十分必要的。

生物酶解法是一种降低 β -乳球蛋白含量的新手段, 该方法工艺简单、生产成本低, 在水解 β -乳球蛋白的同时可获得大量的生物活性肽, 提高乳清蛋白的生物效价, 拓宽乳清蛋白的应用领域。研究表明, 在相同浓度以及相同氨基酸组成的条件下, 人体对肽的吸收速度要比游离氨基酸快, 尤其是小肽(二肽、三肽)^[9-10]。但是, 在水解乳清蛋白的过程中势必会产生不同比例的游离氨基酸组分, 而游离氨基酸含量过高食用后会导导致婴儿体内渗透压的升高, 进

收稿日期: 2016-10-14

作者简介: 韩仁娇(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 乳品加工, E-mail: hanrenjiao@yili.com。

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

而产生不适感。因此,提高水解产物中小肽质量分数、降低或控制游离氨基酸比例,对制备优质的水解乳清蛋白是十分必要的。

本研究采用生物酶解技术,使用前期筛选后获得的两种中性蛋白酶(Neutral protease F, F酶和 Neutral protease G, G酶)复合酶解乳清蛋白,以 β -乳球蛋白水解率为主要考察指标,对两种蛋白酶的最适添加量和最适酶解温度进行了响应面优化实验分析,进而获得乳清蛋白达到适度水解(水解度在10%左右)状态下的最佳水解工艺,对水解产物的分子量分布和 β -乳球蛋白水解率进行了检测,同时与市售同类产品进行了 β -乳球蛋白水解率和分子量分布情况的对比。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

Neutral protease F 酶活 607345.5 U/g,市售商业蛋白酶; Neutral protease G 酶活 452800 U/g,市售商业蛋白酶; 浓缩乳清蛋白 WPC80 蛋白质含量 80.2%,新西兰恒天然公司; 水解乳清蛋白 1、2、3 为 3 种市售水解乳清蛋白粉; β -Lg(色谱纯)、低分子量标准蛋白(Marker)、Tris-Base、细胞色素 C (MW12384)、杆菌酶(MW1450)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(MW451)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(MW189)等均为分析纯, Sigma 公司。

T6 紫外-可见分光光度仪 北京普析通用仪器有限责任公司; ML1602 型电子天平 梅特勒公司; LSHZ-300 型冷冻水浴恒温振荡器 太仓培英; BUCHI B-370 型凯氏定氮仪 瑞士 BUCHI 公司; 1200 高效液相色谱仪 安捷伦; iMark 酶标仪、Mini-PROTEAN 垂直电泳仪 美国伯乐。

1.2 实验方法

1.2.1 乳清蛋白水解工艺 将 WPC80 与水按照 1:9 的比例配制成蛋白溶液,按比例加入蛋白酶,在搅拌转速为 450 r/min 的条件下进行水解,该过程保持温度恒定,水解 2 h 后加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 为 6.8~7.0,取出溶液置于 85 °C 水浴中保温 10 min,冷却至 50 °C 后进行喷雾干燥。

1.2.2 单因素实验设计方法

1.2.2.1 F 酶添加量对 β -乳球蛋白水解率及分子量分布的影响 将 WPC80 与水按照 1:9 的比例配制成蛋白溶液,在 G 酶添加量为底物蛋白添加量的 0.08% 的条件下,分别按 [E]/[S] 比例为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6% 加入蛋白酶 F,该过程始终保持温度为 55 °C,其他条件及操作按 1.2.1,考察不同 F 酶添加比例对 β -乳球蛋白水解率及分子量分布的影响,确定最佳的 F 酶添加量。

1.2.2.2 G 酶添加量对 β -乳球蛋白水解率及分子量分布的影响 将 WPC80 与水按照 1:9 的比例配制成蛋白溶液,在 F 酶添加量为底物蛋白添加量的 0.4% 的条件下,分别按 [E]/[S] 比例为 0.03%、0.05%、0.07%、0.09%、0.11% 加入蛋白酶 G,该过程始终保持温度为 55 °C,其他条件及操作按 1.2.1,考察不同 G 酶添加比例对 β -乳球蛋白水解率及分子

质量分布的影响,确定最佳的 G 酶添加量。

1.2.2.3 酶解温度对 β -乳球蛋白水解率及分子量分布的影响 将 WPC80 与水按照 1:9 的比例配制成蛋白溶液,按以上确定的最适 F 酶和 G 酶添加量分别为底物蛋白添加量的 0.4% 和 0.07% 的比例添加两种蛋白酶,在搅拌转速为 450 r/min、水解温度分别为 40、45、50、55、60 °C 的条件下进行水解,其他条件及操作按 1.2.1,考察不同酶解温度对 β -乳球蛋白水解率及分子量分布的影响,确定最佳的酶解温度。

1.2.3 F 酶单独酶解样品的制备 将 WPC80 与水按照 1:9 的比例配制成蛋白溶液,按 [E]/[S] 为 0.4% 的比例加入蛋白酶 F,在搅拌转速为 450 r/min 的条件下进行水解,该过程保持温度恒定 55 °C,水解 2 h 后加入 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 为 6.8~7.0,取出溶液置于 85 °C 水浴中保温 10 min,冷却至 50 °C 后进行喷雾干燥。

1.2.4 水解度测定 采用三硝基苯磺酸钠(TNBS)法^[11-12]。

1.2.5 β -乳球蛋白水解率的测定 采用 SDS-PAGE 法测定^[13] β -乳球蛋白水解率的计算公式如下:

$$\beta\text{-乳球蛋白水解率}(\%) = (\text{水解前}\beta\text{-乳球蛋白含量} - \text{水解后}\beta\text{-乳球蛋白含量}) / \text{水解前}\beta\text{-乳球蛋白含量} \times 100。$$

1.2.6 分子量分布测定 采用高效液相色谱法测定,具体检测条件如下。

色谱条件:色谱柱:TSKgel 2000 SWXL 300 mm × 7.8 mm,流动相:乙腈:水:三氟乙酸为 45:55:0.1 (V/V) 在 UV220 nm 下检测,流速为 0.5 mL/min,柱温为 30 °C。

样品制备:将样品配制成 1 mg/mL 的溶液,吸取 2 mL 于 10 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,用微孔过滤膜过滤后供进样。

相对分子量校正曲线:以相对分子质量的对数(lg Mr)对保留时间作图得到相对分子量校正曲线方程。

1.2.7 Box-Behnken 实验设计 根据单因素实验结果,采用响应面设计,运用 Box-Behnken 实验设计原理,以 β -乳球蛋白水解率为响应值,选定 F 酶添加量、G 酶添加量和酶解温度,设计三因素三水平响应面分析实验,其中蛋白酶添加量以占蛋白干基质量分数计,实验因素水平见表 1。

表 1 响应面实验因素和水平设计

Table 1 Coded values and corresponding real values of the optimization parameters tested in response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
A F 酶添加量(%)	0.3	0.4	0.5
B G 酶添加量(%)	0.04	0.07	0.10
C 酶解温度(°C)	50	55	60

1.3 数据处理

采用 Design-Expert7.0 软件(Static Made Easy, Minneapolis, MN, USA) 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 F 酶添加量对 β -乳球蛋白水解率及分子质量分布的影响 F 酶与 G 酶同时添加, 确定 G 酶添加量不变, 改变 F 酶的添加量, 考察其对 β -乳球蛋白水解率的影响, 实验结果见图 1。

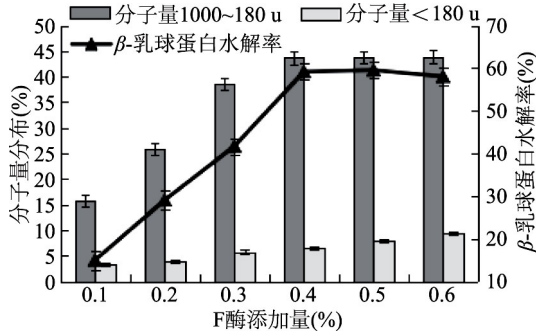


图1 F 酶添加量对 β -乳球蛋白水解率及分子质量分布的影响

Fig.1 Effect of F-protease concentration on β -Lg hydrolysis rate

由图 1 可知 β -乳球蛋白水解率随着 F 酶添加量的增加不断上升, 当添加量超过底物蛋白的 0.4% 时, β -乳球蛋白水解率上升趋缓; 另外, 当 F 酶添加量低于底物蛋白的 0.4% 时, 随着蛋白酶添加量的增加水解产物中分子量处于 1000~180 u 之间的肽段的质量分数明显增加; 当添加量超过底物蛋白的 0.4% 时, 水解产物游离氨基酸(分子量 < 180 u 的组分)含量明显增加; 考虑到添加过多的蛋白酶对 β -乳球蛋白水解率影响不大, 反而使水解产物中产生较多的游离氨基酸组分, 又增加生产成本, 破坏水解产物的风味, 所以选择 F 酶添加量为底物蛋白的 0.4% 左右较为合适。

2.1.2 G 酶添加量对 β -乳球蛋白水解率及分子质量分布的影响 F 酶与 G 酶同时添加, 确定 F 酶添加量不变, 考察在此基础上 G 酶添加量对 β -乳球蛋白水解率及分子质量分布的影响, 具体实验结果见图 2。

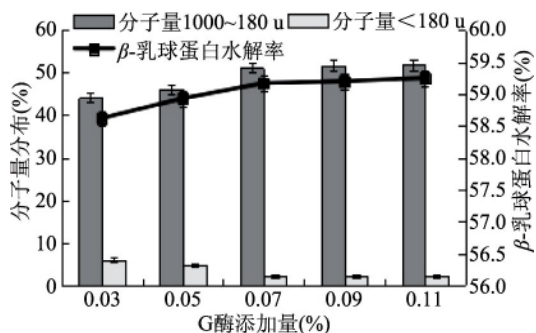


图2 G 酶添加量对 β -乳球蛋白水解率及分子质量分布的影响

Fig.2 Effect of G-protease concentration on β -Lg hydrolysis rate

由图 2 可知 β -乳球蛋白水解率随着 G 酶添加量的增加呈增加趋势, 但变化幅度不明显, 但分子质量分布受 G 酶添加量影响较明显。随着添加量的增加水解产物中处于 1000~180 u 之间的肽段比例逐渐

增加, 游离氨基酸组分逐渐减少, 当添加量超过 0.07% 时, 分子量变化趋势趋缓, 考虑到添加过多的 G 酶对 β -乳球蛋白水解率和分子量分布影响不大, 还会引起生产成本的提高, 所以选择 G 酶添加量为 0.07% 左右较为合适。

2.1.3 酶解温度对 β -乳球蛋白水解率及分子质量分布的影响 由图 3 可知, 在两种蛋白酶同时水解且添加量不变的情况下, β -乳球蛋白水解率随着酶解温度的升高先升高后降低, 当酶解温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 时, β -乳球蛋白水解率达到最高值, 当酶解温度达到 60 $^{\circ}\text{C}$ 时, 有部分蛋白酶已经失活, 所以其 β -乳球蛋白水解率明显下降, 综合考虑 β -乳球蛋白水解率和水解产物分子量分布, 选择酶解温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 左右较为合适。

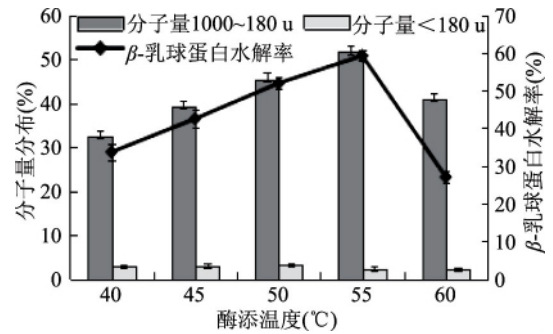


图3 酶解温度对 β -乳球蛋白水解率及分子质量分布的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis temperature on β -Lg hydrolysis rate

2.2 响应面法优化水解乳清蛋白生产工艺

2.2.1 模型建立及显著性分析 根据表 1 方案进行响应面实验, 在 17 个实验中, 1~12 是析因实验, 13~17 是中心实验, 用来估算实验误差。响应面分析实验结果见表 2, 方差分析见表 3。

经回归拟合后, 实验因素对响应值的影响可用回归方程表示。

$$Y = 58.75 + 1.39A + 0.17B + 0.33C + 0.12AB - 0.21AC + 0.07BC - 1.89A^2 - 0.04B^2 - 4.02C^2$$

由表 3 可见, 整体模型的显著水平 $p < 0.0001$, 表明实验所选的二次多项模型具有高度显著性, 能够很好的描述各因素与响应值之间的真实关系, 可以利用该回归方程确定水解 β -乳球蛋白的最佳酶解工艺参数。同时, 失拟项 $p = 0.7051 > 0.05$, 表明失拟不显著, 说明残差均由随机误差引起; 该模型 $R^2 = 99.51\%$, $R^2_{\text{Adj}} = 98.89\%$, 说明该模型与实验模拟性良好。

由表 3 可以看出, A 、 A^2 、 C^2 为极显著性影响因素, C 和 B^2 影响显著。在各影响因素中, F 酶添加量对 β -乳球蛋白水解率影响最大, 其次是酶解温度和 G 酶添加量。

2.2.2 响应面优化与分析 根据模型方程绘制 β -乳球蛋白水解率响应面图, 结果如图 4~图 6 所示。从图中可以直观地看出各因素对 β -乳球蛋白水解率的影响。

由图 4、图 5 可以看出, 当 G 酶添加量和酶解温度不变时 β -乳球蛋白水解率随 F 酶添加量的增加

表2 响应面分析实验设计及结果
Table 2 Box-Behnken experimental design
and results for response surface analysis

实验号	A	B	C	Y: β -乳球蛋白 水解率(%)
1	-1	-1	0	54.91
2	1	-1	0	57.41
3	-1	1	0	55.27
4	1	1	0	58.24
5	-1	0	-1	50.84
6	1	0	-1	54.08
7	-1	0	1	52.02
8	1	0	1	54.40
9	0	-1	-1	54.06
10	0	1	-1	54.02
11	0	-1	1	54.50
12	0	1	1	54.74
13	0	0	0	58.89
14	0	0	0	59.17
15	0	0	0	58.65
16	0	0	0	58.34
17	0	0	0	58.7

而升高,当达到一定值以后略有降低;当F酶添加量和酶解温度不变时, β -乳球蛋白含量随G酶添加量的增加变化趋势不大,说明G酶的加入对于 β -乳球蛋白的水解效果影响不大。F酶添加量对 β -乳球蛋白含量影响较G酶添加量显著,表现为曲线变化趋势较大。

由图5、图6可以看出,当F酶和G酶添加量不变时, β -乳球蛋白水解率随着温度的升高呈现先升高后降低的趋势,说明当酶解温度超过蛋白酶的最适温度以后,随着酶活力的逐渐降低其水解底物蛋

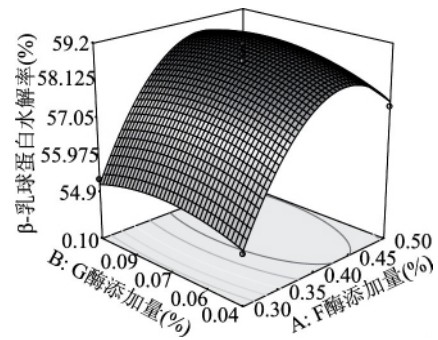


图4 F酶添加量和G酶添加量对 β -乳球蛋白水解率影响的响应面图

Fig.4 Response surface plot for the effect of cross-interaction between F-protease concentration and G-protease concentration on β -Lg hydrolysis rate

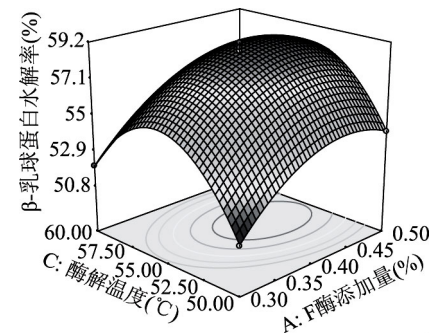


图5 F酶添加量和酶解温度对 β -乳球蛋白水解率影响的响应面图

Fig.5 Response surface plot for the effect of cross-interaction between F-protease concentration and hydrolysis temperature on β -Lg hydrolysis rate

白中 β -乳球蛋白的能力也逐渐下降。

通过对模型方程求导计算,得到 β -乳球蛋白水解率最高的酶解工艺参数为F酶添加量0.44%(相

表3 响应面实验方差分析

Table 3 Analysis of variance for the fitted regression model

来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
模型	105.80	9	11.76	159.36	<0.0001	**
A	15.37	1	15.37	208.40	<0.0001	**
B	0.24	1	0.24	3.27	0.1133	
C	0.88	1	0.88	11.99	0.0105	*
AB	0.055	1	0.055	0.75	0.4156	
AC	0.18	1	0.18	2.51	0.1574	
BC	0.020	1	0.020	0.27	0.6221	
A ²	15.10	1	15.10	204.70	<0.0001	**
B ²	0.67	1	0.67	9.08	0.0196	*
C ²	68.09	1	68.09	922.98	<0.0001	**
残差	0.52	7	0.074			
失拟	0.14	3	0.047	0.49	0.7051	
纯误差	0.38	4	0.094			
总和	106.32	16				
R ²	0.9951					
R ² _{Adj}	0.9889					

注:*表示差异显著($p < 0.05$);**表示差异极显著($p < 0.01$)。

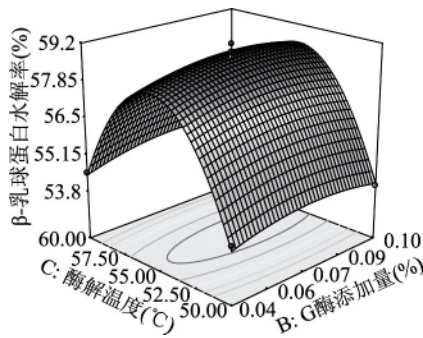


图6 G酶添加量和酶解温度对β-乳球蛋白水解率影响的响应面图

Fig.6 Response surface plot for the effect of cross-interaction between G-protease concentration and hydrolysis temperature on β-Ig hydrolysis rate

当于 2672.32 U/g)、G酶添加量 0.08% (相当于 362.24 U/g)、酶解温度 55.17 °C,由模型方程预测得到此时的β-乳球蛋白水解率是 59.04%。根据响应面优化结果,以 F酶添加量 0.44%、G酶添加量 0.08%、酶解温度 55.2 °C 酶解生产水解乳清蛋白,通过验证实验,所得水解乳清蛋白的β-乳球蛋白水解率为 58.99% ± 0.02%,与模型方程预测值基本一致。

2.3 酶解产物分子质量分布情况

采用高效液相色谱法对以上工艺制备的水解乳清蛋白的分子质量分布情况进行了检测,测定结果见图 7。

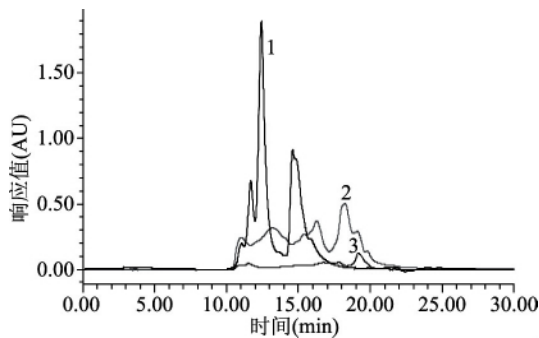


图7 酶解产物高效液相检测图谱

Fig.7 HPLC diagram of whey protein hydrolyzate

注: 1 为水解前样品的 HPLC 谱图, 2 为 F酶酶解产物 HPLC 谱图, 3 为 F酶与 G酶共同酶解后产物 HPLC 谱图。

表4 分子质量分布结果分析

Table 4 The analysis result of molecular weight distribution

分子量范围 (u)	水解前浓缩乳清蛋白 (WPC80, %)	F酶单独酶解后 (%)	F酶与 G酶共同酶解后 (%)
> 10000	55.19	28.88	19.61
10000~3000	8.99	7.61	5.98
3000~2000	19.09	5.52	6.40
2000~1000	10.33	12.62	13.91
1000~500	2.75	13.67	18.88
500~180	1.63	25.16	32.88
< 180	2.03	6.54	2.35

以相对分子质量的对数(lg Mr)对保留时间作图得到相对分子质量校正曲线方程: lg Mr = 6.62 - 0.259T,所以出峰时间在 14 min 之前的为分子量分布在 10000 u 以上的片段 β-乳球蛋白的分子量为 18.4 ku,主要分布在 10000 u 以上的组分中,通过图 7 与表 4 分子量分布检测结果可以看出,水解前浓缩乳清蛋白的 HPLC 谱图共有 7 个峰,但是由于个别峰出现叠加,导致直观很难辨别,通过谱图可以看出水解前浓缩乳清蛋白以分子量分布在 10000 u 以上的组分占主要比例,单独加入 F酶时,对 10000 u 以上的组分有明显的水解效果, > 10000 u 以上的组分比例由 55.19% 下降到 28.88%, F酶与 G酶共同作用时底物蛋白中 > 10000 u 的组分有更进一步的水解,这说明 F酶与 G酶都具备水解底物蛋白大分子的作用,但是 F酶的作用效果更加明显,即 F酶是导致 β-乳球蛋白水解的主要因素;单独加入 F酶以后分子量 < 1000 u 组分所占的比例较水解前增加了 38.96%,而加入 G酶后该比例仅在单独加入 F酶的基础上提高了不到 10%,这说明 F酶的加入是提高小肽比例的决定性因素;添加 G酶以后游离氨基酸组分(< 180 u)的比例明显降低,说明 G酶除了能使原本大分子量的肽段进一步水解成小肽以外,还能使部分游离氨基酸再度交联形成小肽,这对平衡乳清水解蛋白产品摄入人体以后的渗透压以及改善水解产物的风味起到一定作用。

分析以上分子量变化的原因可能是由于 F酶是内肽酶,主要作用于肽链内部,可以使大分子蛋白断裂成分子量相对较少的片断,加之其酶活力较 G酶更高一些,所以其对 β-乳球蛋白这样的大分子片段的水解效果更强;而 G酶虽然也有内肽酶的成分,但是其酶活力相对较低,所以对大分子肽片段的水解能力相对弱一些;至于 G酶能使部分游离氨基酸再度交联形成小肽的原因主要是受蛋白酶固有特性的影响,其深层次机理还需要进一步研究。

2.4 水解产物的凝胶电泳分析

采用上述复合中性蛋白酶对浓缩乳清蛋白进行水解,水解前后的 SDS-PAGE 电泳图如图 8 所示, WHP1、WHP2、WHP3 是采用相同方法三次实验制备的水解产物,其水解度分别为 9.75%、10.40%、9.53%。

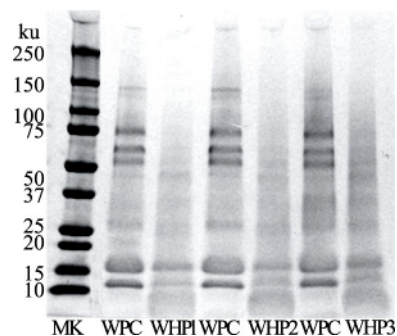


图8 浓缩乳清蛋白水解前后的电泳结果
Fig.8 Electrophoresis results of whey protein concentrate before and after hydrolysis

表5 不同品牌乳清水解蛋白关键指标比较

Table 5 Comparison of key indicators among different brands of whey protein hydrolyzate

名称	水解度(%)	β -乳球蛋白 水解率(%)	1000~180 u 质量分数(%)	<180 u 质量分数 (%)
自制水解乳清蛋白	10.02 ± 0.20	62 ± 0.23	51.76	2.34
水解乳清蛋白1	11.38 ± 0.15	53.53 ± 0.19	44.24	5.92
水解乳清蛋白2	12.64 ± 0.18	58.61 ± 0.31	48.96	14.22
水解乳清蛋白3	9.57 ± 0.11	45.32 ± 0.27	37.53	14.8

由图8可以看出,经过复合中性蛋白酶水解以后,10000 u 以上的组分含量明显降低,经计算WHP1、WHP2、WHP3三个样品的 β -乳球蛋白水解率分别为60%、73%、55%,平均水解率为62.6%,说明当水解产物的水解度控制在10%左右时,采用上述优化的复合中性蛋白酶酶解工艺对乳清蛋白中 β -乳球蛋白具有较好的水解效果。

2.5 与市售同类产品关键指标对比

按照上述确定的工艺制备乳清水解蛋白,并与三款市售同类竞品进行对比,主要对比指标为水解度、 β -乳球蛋白水解率、1000~180 u 肽段比例和游离氨基酸(<180 u)比例,测定结果如表5所示。

从表5可以看出,在水解度相近的情况下,本研究使用的复合中性蛋白酶酶解工艺生产的乳清水解蛋白的 β -乳球蛋白水解率最高,达到60%以上,与其他市售同类产品相比,酶解产物分子量分布在1000~180 u 之间的肽段比例最大,而游离氨基酸组分(分子量<180 u)所占的比例明显低于市售同类产品,这说明在适度水解条件下,由F酶和G酶组成的复合中性蛋白酶体系对底物乳清蛋白中 β -乳球蛋白有较好的水解效果,同时可以有效控制水解产物中游离氨基酸的形成,采用该复合中性蛋白酶酶解工艺生产的乳清水解蛋白在抗原水解率和消化吸收率上更有优势。

3 结论

利用Box-Behnken实验设计和响应面分析,探讨提高 β -乳球蛋白水解率的最佳酶解工艺参数,所建立的实验模型能够反映响应值的变化,对实验的拟合较好。优化结果显示,在F酶与G酶同时添加,F酶添加量0.44%、G酶添加量0.08%、酶解温度55.2℃条件下生产的水解乳清蛋白 β -乳球蛋白水解率为58.99% ± 0.02%。以此条件为基础生产的水解乳清蛋白与市售三款同类产品相比较抗原 β -乳球蛋白水解率最高,分子量处于1000~180 u 的肽段所占比例明显高于市售同类产品,且产品中游离氨基酸组分所占比例得到明显的控制。按照生产婴幼儿配方奶粉对乳清水解蛋白的要求,在该条件下制备的水解乳清蛋白更适合添加到婴幼儿配方奶粉中,同时,本研究中确定的复合中性蛋白酶酶解工艺及研究思路为后续提高婴幼儿配方粉母乳化和舒适化程度的研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Guo H, Kong BH. Health and Function Food [M]. Harbin: Heilongjiang science and technology press, 1996.
- [2] Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins [M]. London, UK: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- [3] Renate Jonker, Nicolaas EP, Deutz, et al. Hydrolyzed casein and whey protein meals comparably stimulate net whole-body protein synthesis in COPD patients with nutritional depletion without an additional effect of leucine co-ingestion [J]. Clinical Nutrition, 2014, 33(2): 211-220.
- [4] Argyri K, Theophanidi A, Kapna A, et al. Iron or zinc dialyzability obtained from a modified in vitro digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals [J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 716-721.
- [5] Caroline Mellinger-Silva, Luisa OL, Rosa, et al. Dual function peptides from pepsin hydrolysates of whey protein isolate [J]. International Dairy Journal, 2015, 48: 73-79.
- [6] Tavares, Tania, Contreras, et al. Novel whey-derived peptides with inhibitory effect against angiotensin-converting enzyme: In vitro effect and stability to gastrointestinal enzymes [J]. Peptides, 2011, 32: 1013-1019.
- [7] DERECK E W C, GEOFFREY S, PETER R, et al. Bioactivity of β -Lactoglobulin and α -lactalbumin - Technological Implications for Processing [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(11): 1229-1240.
- [8] Barros RM, Malcata FX. Molecular characterization of peptides released from β -lactoglobulin and α -lactalbumin via cardosins A and B [J]. Dairy Sci, 2006, 89(2): 483-494.
- [9] Lucia de la Hoz, Vera S, Nunes da Silva, et al. Small peptides from enzymatic whey hydrolysates increase dialyzable iron [J]. International Dairy Journal, 2014, 38(2): 145-147.
- [10] WEBB K E. The Developments in Gastrointestinal Absorption Tissue Utilization of Peptides [J]. Dairy Science, 1993, 76(1): 351-361.
- [11] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定 [J]. 食品科学, 1994, 15(11): 65-67.
- [12] 张俊英, 王彩云, 靳焯, 等. 酶水解乳清蛋白工艺条件的研究 [J]. 农产品加工, 2009(6): 35-37.
- [13] 杨章昀, 冯郑珂, 潘家荣. 脱盐牛乳乳清粉中 β -乳球蛋白的分离纯化 [J]. 中国乳品工业, 2015, 43(4): 10-12.