

# 真菌豆乳凝固酶的筛选及其凝固 豆乳的工艺条件研究

鲍松林 虞炳钧 吴琴芳

(浙江工业大学轻工系, 杭州 310014)

**摘要** 筛选获得 SCE2 豆乳凝固酶, 在固态发酵时的产酶量为 128u/g 干麸皮。采用正交试验法对 SCE2 凝固豆乳的工艺条件进行优化, 结果表明, 控制凝固温度 69℃、自然 pH(6.1)、加酶终浓度 3u/ml 豆乳时, 蛋白质凝固率和固形物收率分别高达 88.4% 和 81.0%。微生物酶凝固豆乳应用于传统豆腐乳制作使生产周期相对缩短了 20.4%。

**关键词** 豆乳凝固酶, 腐乳生产菌, 蛋白质凝固率, 豆乳, 凝固

采用凝乳酶(rennin)凝固牛乳酪蛋白在干酪制作中有着悠久的历史, 但以豆乳部分替代牛乳制作混合乳干酪时则发现凝乳酶并不能使大豆蛋白和牛乳酪蛋白很好地发生胶凝作用, 制得的混合乳干酪在微细结构上远不如纯牛乳干酪那样呈现出极有规则的网络结构; 这是由于皱胃酶并不能使结构上不同于酪蛋白的大豆蛋白发生胶凝作用所致。随着食品生物技术的发展, 人们认识到了以酶法替代传统盐、酸法凝固豆乳的必要性和重要性, 近年来日本一些学者已致力于筛选能使大豆乳凝固的酶类, 并将其试用于植物蛋白干酪的制作, 有的已着手开发与之相适应的固定化酶反应器<sup>[1~3]</sup>。本文报道真菌豆乳凝固酶的筛选及凝固豆乳的工艺条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 微生物酶来源

AS1.398 中性蛋白酶(食品级), 由无锡酶制剂厂提供。

豆乳凝固酶 SCE2 等, 分别由发酵大豆食品的生产菌毛霉科(Mucoraceae)菌种 M2、M5、M6、M7 及少孢根霉(*Rhizopus oligosporus*) AS3.4392(购于中科院微生物所)的麸皮培养物中提取得到(粗酶液)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 固形物含量测定:** 恒重法<sup>[4]</sup>。

**1.2.2 蛋白质含量测定:** 半微量凯氏定氮法<sup>[4]</sup>。

**1.2.3 蛋白酶活力单位的定义<sup>[4]</sup>:** 采用 Folin-酚法, 定义为: 每 min 水解酪蛋白产生 1μg 酪氨酸所需的酶量定义为 1 个蛋白酶活力单位。

**1.2.4 微生物酶凝固豆乳的操作方法:** 常规法处理豆乳, 待其冷却至 70℃ 时置于恒温水浴保温, 然后加酶作用 5~15min, 将形成的豆腐脑适度搅碎后以 2130×g 离心 10min, 倾去乳清后测定固形物收率及蛋白质凝固率。

**1.2.5 豆乳凝固酶活力单位的定义<sup>[1~3]</sup>:** 每 10min 能使 1ml 豆乳凝固所需的酶量定义为 1 个豆乳凝固酶活力单位。

## 2 结果与讨论

### 2.1 豆乳凝固酶的筛选

豆乳凝固酶是一种特定的蛋白质水解酶, 表 1 所示为各菌株在麸皮固态发酵时的蛋白酶和豆乳凝固酶产量。从质的角度考虑, 重要的是豆乳凝固酶与蛋白酶的比值。作为对照, 当

使用枯草杆菌 AS1.398 中性蛋白酶凝固豆乳时,其添加量按蛋白酶计需大于 8u/ml 豆乳才有一定胶凝作用,但所得豆腐凝胶有明显苦味,表明其凝固过程实际上是大豆球蛋白的水解,并已达到产生苦味肽的程度。测定其理化指标蛋白质凝固率也偏低,说明有部分水解产物的分子量已很小而随乳清流失。比较表 1 数据可以看出,来源于 M2 菌株的粗酶液不仅具有较高的豆乳凝固酶活力,而且其豆乳凝固酶占蛋白酶的比值也高达 17.5%,命名为 SCE2 并进行进一步的探讨。

表 1 各菌株在麸皮上的蛋白酶和豆乳凝固酶产量

酶来源	豆乳凝固酶		蛋白酶
	(u/g 干麸皮)	(u/g 干麸皮)	蛋白酶 豆乳凝固酶/ (%)
AS1.398	/	/	<5
M2	128	730	17.5
M5	34	420	8.1
M6	26	384	6.8
M7	30	394	7.6
AS3.4392	53	526	10.1

注: 100ml 豆乳含固形物 7.35g, 蛋白质 3.84g

表 2 正交试验的因素与水平设计

因素水平	温度(℃)	pH	加酶量(u/ml 豆乳)
1	55	5.8	2
2	62	6.1	3
3	69	6.4	4

2.2 SCE2 凝固豆乳的工艺条件

用同一种酶凝固豆乳,所形成的凝乳质量与凝固工艺条件有关,主要因素包括凝固温度、pH、加酶量、放置时间等。采用正交试验法(表 2)分别以蛋白质凝固率和固形物收率为指标对凝固温度、pH、加酶量三因素的影响特征进行考察,并由此得出了适宜于 SCE2 凝固豆乳的工艺条件。实验结果见表 3。

(1) 极差分析和方差分析(表 4、表 5)可知,各因素对蛋白质凝固率指标的影响程度为:凝固温度>pH>加酶量。其理论最佳工艺条

表 3 正交试验的实验结果

试验号	1	2	3	凝固时间	蛋白质凝固率	固形物收率
				(min)	(%)	(%)
1	1	1	1	2.0	76.5	71.30
2	1	2	2	2.5	73.6	71.67
3	1	3	3	11.0	65.4	76.36
4	2	1	2	2.5	78.5	74.35
5	2	2	3	1.5	75.4	78.75
6	2	3	1	15.0	77.6	74.44
7	3	1	3	1.3	81.4	81.48
8	3	2	1	1.9	85.6	71.76
9	3	3	2	8.8	74.6	77.09

表 4 以蛋白质凝固率为指标的极差分析结果

	温度	pH	加酶量
k1	71.83	78.80	79.90
k2	77.17	78.20	75.57
k3	80.53	72.53	74.07
极差	8.70	6.27	5.83

表 5 以蛋白质凝固率为指标的方差分析结果

来源	平方和	自由度	均方和	F 值	显著性
凝固温度	115.47	2	57.74	17.80	*
pH	71.74	2	35.87	11.05	*
加酶量	55.06	2	27.53	8.51	
Qe	6.47	2			
总和	248.74				

按 F 分布数值表  $F_{0.10}(2, 2) = 9$

件为:凝固温度 69℃、pH5.8、加酶量 2 u/ml 豆乳。在  $\alpha=0.1$ (即 90%置信区间)的水平下,凝固温度和 pH 是影响蛋白质凝固率的显著性因子,加酶量的影响则较小。

(2) 极差分析和方差分析(表 6、表 7)可知,各因素对固形物收率指标的影响程度为:加酶量>凝固温度>pH。其理论最佳工艺条件为:凝固温度 69℃、pH5.8、加酶量 4u/ml 豆乳。在  $\alpha=0.1$ (即 90%置信区间)的水平下,只有加酶量是影响固形物收率的显著性因子,而凝固温度和 pH 的影响则很小。

表 6 以固形物收率为指标的极差分析结果

	温度	pH	加酶量
k1	73.11	75.71	72.50
k2	75.85	74.86	74.37
k3	76.78	75.17	78.86
极差	3.67	1.91	6.36

表 7 以固形物收率为指标的方差分析结果

来 源	平方和	自由度	均方和	F 值	显著性
凝固温度	21.80	2	10.90	4.07	
pH	6.40	2	3.20	1.19	
加 酶 量	64.68	2	32.09	11.97	*
Qe	5.36	2			
总 和	97.75				

综合考虑三因素对蛋白质凝固率和固形物收率指标的影响特征,同时考虑豆乳的自然 pH 为 6.1;有意义的是 pH 为 5.8 和 6.1 对两指标的影响并不很显著,使用豆乳自然 pH 进

行凝固有利于简化工艺,因此确定 SCE2 凝固豆乳的工艺条件为:凝固温度 69℃、加酶量为 3u/ml 豆乳、pH6.1(自然 pH)。按此工艺条件进行重复验证实验,结果是蛋白质凝固率和固形物收率分别高达 88.4% 和 81.0%,达到了工艺条件优化的目的。

采用优化工艺将 SCE2 应用于传统豆腐乳制作,生产周期相对缩短 20.4%;将 SCE2 应用于植物蛋白干酪的研究尚在进行中。

### 参 考 文 献

- [1] Park Y W, Kusakabe I, Kobayashi H. *et al.* Agric Biol Chem, 1985, 49(11): 3215~3219.
- [2] Murata K, Kusakabe I, Kobayashi H. *et al.* Agric. Biol. Chem. 1987, 51(2): 385~395.
- [3] Kamata Y, Sanpei S, Yamauchi F. *et al.* 日本食品工业学会志, 1993, 40(4): 296~298.
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术, 北京: 高等教育出版社, 1987.

## SELECTION OF FUNGAL SOYMILK CLOTTING ENZYME AND ITS COAGULATION CONDITION

Bao Songlin Yu Bingjun Wu Qinfang

(Department of Light Industry, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

**Abstract** The yield of soymilk clotting enzyme SCE2 by sufu starter reached 128 U / g dry bran while on solid state fermentation (SSF). The optimum condition of coagulating soymilk by SCE2 was obtained from orthogonal test. While coagulating temperature was controlled at 69℃, pH natural, and final concentration of enzyme at 3 U / ml soymilk; The recovery of soy protein and soymilk solids reached 88.4% and 81.0% respectively. The application of soymilk clotting enzyme SCE2 on sufu process shortened the period of sufu fermentation by 20.4%.

**Key words** Soymilk clotting enzyme, Sufu starter, Soy protein recovery, Soymilk, Coagulation