

豆乳凝固酶的研究概况

蒋咏梅 章文贤

(福建师范大学生物工程学院 福州 350007)

摘要: 豆乳凝固酶是制备大豆蛋白食品的优质凝固剂。文中对豆乳凝固酶的来源、酶学特性、作用机制及其在大豆食品工业中的应用研究情况进行了综述。

关键词: 豆乳凝固酶, 研究现状, 应用前景

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0078-04

豆乳凝固酶, 顾名思义是能够凝固豆乳的酶。长期以来, 大豆作为一种质优价廉的蛋白质资源, 其营养及保健价值已为世人所熟知。随着人们生活水平日益提高, 传统的大豆食品已不能满足需要。因此, 国内外学者致力于新型大豆蛋白食品(如豆凝乳、大豆干酪)的研究。

传统制备豆凝乳的方法有: 加酸、加盐、加热、酒精凝固、添加凝固剂(如葡萄糖酸- δ -内酯)^[1]等。这些方法在应用上通常存在一些问题, 即形成的豆凝乳带有酸味、碱味或苦味, 大大破坏其口感。研究表明酶法凝固豆乳能够获得令人满意的凝块, 是制备新型大豆食品的优质凝固剂^[2]。但国内外对豆乳凝固酶的研究开展较晚, 尤其国内仅有极少的几篇报道, 有鉴于此, 本文对目前世界上豆乳凝固酶的研究现状和应用前景作一简要介绍。

1 豆乳凝固酶的来源

豆乳凝固酶广泛地存在于动植物组织及微生物中, 包括酸性、中性、碱性 3 种蛋白酶^[3]。动植物中能凝固豆乳的酶有胰蛋白酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶和木瓜蛋白酶等, 其中菠萝蛋白酶凝固效果最好^[4], 但植物蛋白酶只能作用于加热变性后的大豆蛋白, 生产工艺比较繁杂。而微生物产生的蛋白酶无论是在蛋白水解及豆乳凝固的效率方面, 还是在生产工艺的简化方面, 都优于动植物组织中的蛋白酶, 其中碱性及中性蛋白酶效果更佳, 更适合工业化生产豆凝乳^[5]。

尽管微生物豆乳凝固酶在应用上具有明显的优势, 且产酶菌株广泛分布于细菌、霉菌、酵母菌中, 国内外对其产生菌的筛选研究仍然很少, 且方法单一, 通常遵循一个模式, 即平板初筛, 豆浆管复筛, 最后摇瓶产酶^[6]。如 1985 年 Yang Wan 利用该方法首次从土壤中分离到一株豆乳凝固酶的产生菌 K-295G-7^[7], 国内也筛选到两株产豆乳凝固酶的芽孢杆菌 LY-3655 及 UV-10。从自然界中筛选到的产酶菌株酶活往往偏低, 通气量需求较大, 培养时间较长, 2~4 d 才能达到最高酶活。但芽孢杆菌 UV-10 的产酶温度较低, 培养 20 h 即可达最高酶活^[8]。

2 豆乳凝固酶的酶学特性

关于豆乳凝固酶酶学特性的研究报道较少。尤其国内只在发酵液和粗酶的酶学性质方面有所探讨。国外则侧重于商品蛋白酶制剂的研究^[5]。目前,只有短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)和青霉(*Penicillium* sp.)产生的豆乳凝固酶得到了纯化。短小芽孢杆菌(*B. pumilus*) TYO-67 产生的豆凝乳酶经 30 倍纯化后,对其均相制备的检测表明,该酶为一单体,分子量约 30kD,等电点 pH9.75,氨基酸组成分析结果表明,该酶富含丙氨酸,天冬氨酸,甘氨酸,丝氨酸,缬氨酸^[9]。而 Koo 采用硫酸铵沉淀、葡聚糖凝胶、G-25、G-100、CM-凝胶、phenyl-Toyopearl 等纯化手段,证实青霉产生的豆乳凝固酶是由两个极相似的部分组成,分子量分别为 24kD 和 40kD^[10]。

豆乳凝固酶活力受温度影响很大,随来源的不同其最适作用温度也有所不同。目前所知的豆乳凝固酶最适作用温度通常在 55℃~85℃之间。不同来源的酶虽在作用温度上有所差别,但都遵循同一规律:即在最适作用温度时,豆乳凝固酶表现出最大活力,随温度的进一步升高,酶活急剧下降。豆乳凝固酶的稳定温度相差不大,通常在 45℃~50℃之间,但其最适作用温度 55℃-85℃远远超过其变性温度,这似乎很矛盾。原因可能是酶的变性不仅与温度的高低,还与时间的长短有关^[11]。豆乳凝固酶在其变性温度短时间表现较高的凝乳活力,长时间则变性失活,这一特点对其应用十分有利。因为在较高温度下制备豆凝乳时,酶在凝固豆乳后迅速失活,能够避免凝块过度水解。

表 1 豆乳凝固酶的酶学性质

产酶菌株	最适作用条件		酶的稳定性	
	温度(℃)	pH	温度(℃)	pH
芽孢杆菌 LY-3655	70	5.8	45	5.8~8.0
芽孢杆菌 JJ-3	65~75	5.8	50	6~7
青霉 SPL-151	60	5.8	50	3~5
K-295G-7	75	5.8	50	5~7
UV-10	70	5.8	50	6~7

pH 是影响豆乳凝固酶活力的重要因素。酶活随 pH 降低而增加,由于豆浆在 pH5.8 以下发生酸凝固,因此豆乳凝固酶通常具有相同的最适作用 pH 值即 pH5.8。其稳定 pH 范围偏窄,中性条件较为稳定。现将国内外研究

的一些微生物来源的豆乳凝固酶的酶学特性列于表 1。

3 豆乳凝固酶的作用机制

有关豆乳凝固酶的作用机制报道不多,仅有的几篇都集中在菠萝蛋白酶对豆乳的凝固上^[4]。但对不同商品酶凝固豆乳的研究表明,豆乳的凝固是由不同的酶通过相同的机制发生的^[2]。下面就以菠萝蛋白酶为代表对其作用机制作一简要介绍。

菠萝蛋白酶是通过水解大豆蛋白完成其凝固的。用菠萝蛋白酶凝固豆乳首先需经热处理,使所有的蛋白(包括 2S、7S 和 11S 蛋白)都变成可溶的聚集物。其中 2S 蛋白很快被降解,7S 蛋白(由甘露糖和 N-乙酰葡萄糖胺组成的糖蛋白)释放到上层也被酶水解。余下的 11S 球蛋白是形成凝乳的主要部分。若无该加热过程,豆乳无法凝固,只会产生沉淀。可能是 7S 蛋白对凝乳的形成有抑制作用。

11S 球蛋白的凝固过程可归纳如下:

- (1) 酸性亚单位将碱性亚单位包于 11S 球蛋白内部;
- (2) 11S 球蛋白分子经热处理伸展;

(3) 这些球状体结合形成分子量为 8000000 的聚集体;

(4) 聚集体的蛋白质链被菠萝蛋白酶切割和降解后重新结合, 导致其结构和性质发生改变;

(5) 发生变化的碎片链通过二硫键与疏水作用形成网状结构。这种网状结构与热诱导产生的凝胶结构不同, 网状结构形成的凝固体不具自持性, 摇动时就象酸乳一样易于移动。

4 豆乳凝固酶的应用研究

豆乳凝固酶通常用于食品的制造, 国内外对其凝固豆乳的应用研究较多, 大部分集中于商品蛋白酶。

日本的 Katsumi MUATA^[2] 采用一系列商品蛋白酶凝固豆乳, 结果发现由不同蛋白酶得到的豆凝乳含水量基本相同, 回收率也差别不大。由液解化淀粉杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*), 多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*) 产生的酶制得的豆凝乳质地光滑, 无苦味, 有很高的应用价值。此外, 他们还用不同的蛋白酶分别凝固用各种豆制得的豆乳, 发现蛋白回收率随蛋白酶和豆种类的改变而变化, 而含水量与酶的种类无关, 只随豆种类的不同而改变^[5]。

同种酶凝固豆乳形成的凝乳质量与工艺条件有关, 鲍松林^[13] 采用正交试验法分别以蛋白质凝固率和固形物收率为指标进行考察, 得出了适于 SCE2 (一种真菌豆乳凝固酶) 凝固豆乳的工艺条件: 凝固温度 69℃, 加酶量为 3μ/mL 豆乳, pH6.1 (自然 pH)。采用优化工艺, 蛋白质的凝固率和固形物收率分别高达 88.4% 和 81.0%, 将该工艺应用于传统豆腐乳制作, 生产周期相对缩短 20.4%。

酶作用温度对所形成豆凝乳的质量影响很大。据报道^[12], 利用蛋白酶在高于最适作用温度的情况下凝固豆乳可减少豆凝乳的涩味、苦味和怪味, 得到口感与质地更佳的凝乳。

除商品蛋白酶以外, 用微生物直接凝固豆乳生产食品的方法也屡见报道^[14], 如 Hashimoto 曾用一种酿酒酵母在 30℃ 下制备无豆腥味的凝乳。日本的山中茂^[15] 用曲霉、红曲霉、青霉、根霉、脉孢菌、毛霉等微生物凝固各种蛋白质溶液, 作为培养基和作用底物的蛋白可以是: 各种大豆蛋白 (分离蛋白、浓缩蛋白、抽提的蛋白、脱脂蛋白、7S 蛋白、11S 球蛋白), 玉米蛋白, 小麦蛋白, 大米蛋白等植物性蛋白及酪蛋白, 骨胶原, 各种鱼、鸡、鸭、猪的动物性蛋白。基质浓度通常为 0.2% ~ 6.0%, 凝固温度为 28℃ ~ 35℃, 时间 60 ~ 75h。

固定化酶一个重要的优点在于酶可以反复利用。因此在豆乳凝固酶严重短缺的情况下, 采用固定化技术十分有效。日本已进行了固定化酶反应器的研制工作, 并取得初步成效。

5 豆凝乳酶的前景展望

到目前为止, 豆乳凝固酶十几年来来的研究工作已取得很大进展, 但仍远远落后于凝乳酶。由这种差距即可看出豆乳凝固酶的研究方向和发展前景主要体现在以下几方面:

无论工业化生产豆乳凝固酶, 还是直接利用微生物凝固豆乳生产食品, 都需要高

酶活菌株。而自然界筛选到的产酶菌株活力偏低。因此,对高产菌株的筛选,尤其采用育种的方法提高酶活是行之有效的手段。

利用豆乳和牛乳制作混合乳食品是今后乳制品发展的一个趋势,能够同时凝固豆乳和牛乳的凝乳酶将有十分广阔的应用前景,但这方面的研究尚未见报道。

对豆乳凝固酶的结构组成尚不甚明了,为进一步加强对该酶的了解及更好的利用,酶的纯化工作亟待进行。

固定化酶具有许多优点:①酶可以反复利用;②易于自动控制和连续化生产;③对酶要求不甚严格,多种蛋白酶都有潜在的应用可能;④不会把蛋白酶留在乳清和干酪中。而豆乳凝固酶的固定化只有日本进行了初步探索,离工业化生产尚有很长的距离。

利用重组 DNA 技术生产优质的豆乳凝固酶是今后的必由之路。美、英、日等国多个实验室已对凝乳酶开展了这方面的研究工作。他们采用该技术生产小牛凝乳酶,虽未进入市场,但已获得重大进展。而豆乳凝固酶这方面的工作尚未见报道。

豆乳凝固酶与凝乳酶在研究进展上的差距主要体现在以上几方面。而我国的科研工作者对此尚不够重视,远远落后于国外,尤其是日本。迄今为止,国内仅有 3 篇有关豆乳凝固酶的报道,且研究得不够深入,对凝乳酶的研究却颇多。但在我国这样一个乳品资源严重缺乏而大豆产量很高的国家,利用豆乳部分或全部替代牛乳生产食品已成为必然趋势。因此,豆乳凝固酶的研究工作在我国将有广阔的前景。

参考文献

- [1] 杨 梅,张其昌.食品科学,1997,18(2):72~74
- [2] Katsumi M, Isao K. Agric Biol Chem, 1987, 51(2): 385~389.
- [3] Rodriguez T, Came J. J Alimentaria (Madrid), 1996, 237, 65~67 (Span.)
- [4] Yoko F. Journal of Food Science, 1985, 50: 1283~1286.
- [5] Katsumi M, Isao K. Agric Biol Chem, 1988, 51(5): 1317~1318.
- [6] 刘 勇,姜成林.微生物学通报,1991,18(3):141~144.
- [7] Yangwon P, Isao K. Biol chem, 1985, 49(11): 3215~3219.
- [8] 蒋咏梅,章文贤.福建师范大学学报,2000,16(1):89~93.
- [9] Yasuda M, Aoyama M. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(4): 474~479.
- [10] sungkeum K, Lee Sang ok. J Microbiol Biotechnol, 1992, 2(1): 14~20.
- [11] 宋 云,孙莉婷.中国乳品工业,1995,23(3):124~128.
- [12] Hirorshi K. US PATENT, 1989, 4, 877, 622.
- [13] 鲍松林,虞炳钧.微生物学通报,1997,18(3):141~144.
- [14] 小野荣治,山中茂.公开特许公报,特开平 5~23113.
- [15] 上野隆生.特公昭,53~37424.

· 论文写作要点 ·

前 言

简明介绍论文背景,相关领域研究历史与现状,同时与自己的研究工作进行比较,突出自己著文的意图与分析依据,包括:论文追求目标和创新性,研究范围和理论,技术方案选取与确定,研究结论等。

前言应言简意赅,切勿相同于摘要,切勿评述同行熟知或教科书中已陈述的基本理论和实验方法。