

大豆分离蛋白的复合改性 及其对某些功能性的影响

曲 玲, 张春红*, 刘长江
(沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110161)

摘 要: 利用中性蛋白酶和微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)对大豆分离蛋白进行复合改性, 通过单因素实验和正交实验研究, 获得改性 SPI 最佳凝胶性的反应条件为: 添加中性蛋白酶 0.003%, 水解 20min; 添加 MTG 0.5% 作用 2.0h。获得最佳溶解性的反应条件为: 添加中性蛋白酶 0.005%, 水解 30min; 添加 MTG 0.3% 作用 1.0h。正交实验结果表明, 双酶复合改性的最佳处理组合为添加中性蛋白酶 0.005%, 水解 30min; 添加 MTG 0.5%, 作用 1.0h, 得到产品凝胶性为 4226cp, 比对照提高了 36.3%, 溶解性为 70.1% 比对照降低了 5.8%。

关键词: 大豆分离蛋白, 中性蛋白酶, 微生物谷氨酰胺转氨酶, 功能性

Abstract: Using neutral proteinase and transglutaminase on SPI, through the single factor experiment and orthogonal experiment, the optimized conditions of gelation were determined: the time of neutral proteinase hydrolyzing was 20minutes, addition was 0.003%, addition of MTG was 0.5%, reaction time was 2 hours. The optimized conditions of solubility: hydrolyzing time was 30minutes, addition of neutral proteinase was 0.005%, addition of MTG was 0.3%, reaction time was 1.0 hour. The result of orthogonal experiment: the optimized conditions was that addition of proteinase was 0.005%, the time of hydrolyzing was 30minute; the addition of MTG was 0.5%, reaction time was 1.0hour; the gelation of products was 4226cp, increased 36.3% with control; Solubility was 70.4%, decreased 5.8% with control.

Key words: soybean protein isolate; neutral proteinase; transglutaminase; functional properties

中图分类号: TS201.2*1 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2007)02-0071-03

大豆分离蛋白(SPI)不仅具有很高的营养价值, 还具有凝胶性、溶解性、吸水性、吸油性、起泡性、乳化等功能性, 广泛应用于食品加工体系。然而, 天然大豆分离蛋白功能性尚不能满足生产加工中的需要, 因此需要进行改性处理。传统的改性方法往往在

改善一种或几种功能性的同时, 使其他的功能性显著下降。如何获得兼具几种功能平衡点的产品是改善大豆蛋白功能性目前研究的关键问题。近年来, 酶法改性有了很大的发展, 它是利用酶制剂使大豆蛋白的氨基酸残基和多肽链发生某种变化, 引起蛋白质大分子空间结构和理化性质改变, 从而获得较好的功能特性和营养性。酶的作用方式主要有水解作用、交联作用。本实验采用先用蛋白酶水解, 然后用微生物谷氨酰胺转氨酶(MTG)进行交联, 研究复合改性对 SPI 凝胶性和溶解性的影响, 目的是扩大 SPI 的应用范围。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白(蛋白质含量 90%) 山东禹王实业有限公司; 中性蛋白酶(酶活 20 万 u/g) 广西南宁庞博生物工程有限公司; 谷氨酰胺转氨酶(酶活 100u/g) 江苏一鸣精细化工有限公司; 牛血清蛋白 为生化试剂; 硫酸铜、酒石酸钾钠、氢氧化钠 均为分析纯。

RVA-3D 型快速粘度分析仪 澳大利亚 Newport 公司; PHS-3C 精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; UNICO7200 可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司; HH-6 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; FA1004 万分之一天平 上海精密科学仪器有限公司; TDL-5-A 离心机 上海安亭仪器有限公司。

1.2 分析方法

蛋白质凝胶性的测定: 采用快速粘度分析仪; 蛋白质含量的测定: 采用 GB 5009.5-85; 中性蛋白酶酶活测定: 采用紫外分光光度法; 蛋白质溶解性的测定: 采用双缩脲比色法。

1.3 实验设计

1.3.1 中性蛋白酶水解时间对 SPI 溶解性和凝胶性的影响 配制浓度为 13.8% 的 SPI 溶液, 调节 pH 为

收稿日期: 2006-06-06 * 通讯联系人

作者简介: 曲玲(1981-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物蛋白质、酶工程方面的研究。

基金项目: 辽宁省科技厅科技攻关项目(2004205001)。

7.0, 中性蛋白酶添加量为 0.005%, 在 50 °C 下分别反应 10、20、30、40、50min。灭酶后, 加入 MTG 的量为 0.4%, 50 °C 时反应 1.5h。

1.3.2 中性蛋白酶添加量对 SPI 溶解性和凝胶性的影响 调节底物浓度 13.8%, pH 为 7, 中性蛋白酶添加量分别为 0.003%、0.005%、0.007%、0.009%、0.011%, 50 °C 下水解 30min, 灭酶, 加入 MTG 的量为 0.4%, 保持温度 50 °C 作用 1.5h。

1.3.3 MTG 添加量对 SPI 溶解性和凝胶性的影响 调节底物浓度 13.8%, pH 为 7, 中性蛋白酶添加量为 0.005%, 50 °C 下反应 30min, 灭酶后, 分别加入 0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%MTG, 50 °C 反应 1.5h。

1.3.4 MTG 作用时间对凝胶性和溶解性的影响 调节底物浓度为 13.8%, pH 为 7.0, 中性蛋白酶添加量为 0.005%, 50 °C 下水解 30min, 灭酶后, 加 MTG 0.4%, 分别作用 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5h。

1.3.5 双酶改性大豆分离蛋白的正交实验 见表 1。

表 1 双酶改性大豆分离蛋白的正交实验表 $L_9(3^4)$

| 水平 | 因素 | | | |
|----|--------------|-----------|------------|-------------|
| | 蛋白酶水解时间(min) | 蛋白酶添加量(%) | MTG 添加量(%) | MTG 反应时间(h) |
| 1 | 20 | 0.003 | 0.3 | 1.0 |
| 2 | 30 | 0.005 | 0.4 | 1.5 |
| 3 | 40 | 0.007 | 0.5 | 2.0 |

2 结果与讨论

2.1 单因素分析

2.1.1 中性蛋白酶水解时间对 SPI 溶解性和凝胶性的影响 见图 1。

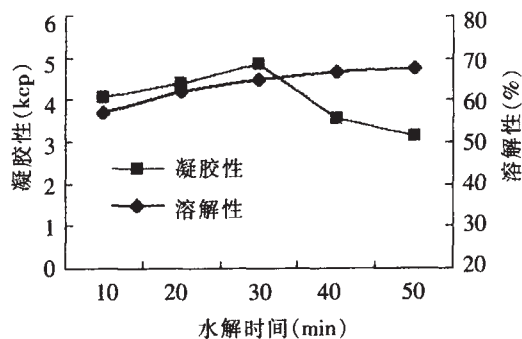


图 1 水解时间对凝胶性和溶解性的影响

由图 1 可以看出, 当水解时间小于 30min 时, 凝胶性随水解时间延长而增加, 水解时间大于 30min 后, 继续水解凝胶性显著下降。溶解性随水解时间变化从 56.8% 提高到 67.3%。分析原因中性蛋白酶能使蛋白质中的一些肽键断裂, 使部分疏水性氨基酸残基暴露出来。水解 30min 时, SPI 被降解后恰好是 MTG 催化交联最适作用的位点, 凝胶性较高。随着水解时间的延长, 水解起主导作用时, 不利于 MTG 催化形成凝胶。综合考虑选择水解时间为 30min。

2.1.2 中性蛋白酶添加量对 SPI 溶解性和凝胶性的影响 见图 2。

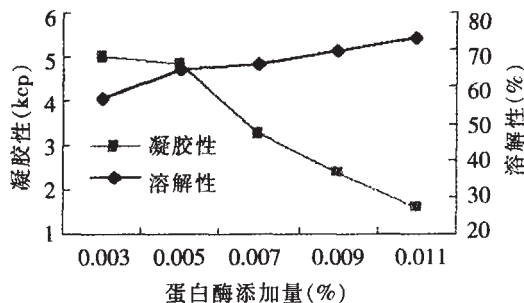


图 2 蛋白酶添加量对凝胶性和溶解性的影响

由图 2 可以看出, 蛋白酶添加量从 0.003% 到 0.005% 之间凝胶性略有下降, 添加量 0.005% ~ 0.011% 之间时凝胶性显著下降。整个过程溶解性增加。原因是中性蛋白酶添加量小, 反应速度慢, 适合 MTG 催化的展开结构。当酶量加大后, 过度水解形成短肽, 即使再 MTG 作用凝胶性仍然呈下降趋势, 故选择中性蛋白酶添加量 0.005%。

2.1.3 MTG 添加量对 SPI 溶解性和凝胶性的影响 见图 3。

由图 3 可知, MTG 添加量增加, 凝胶性随之增大, 当酶用量大于 0.4% 后, 凝胶性变化不大, 可能是由于有限的底物浓度及适当的水解程度决定了有限的酰基和氨基反应。而溶解性呈下降趋势。综合考虑 MTG 的适宜添加量为 0.4%。

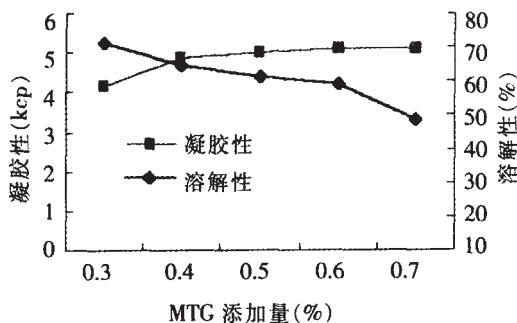


图 3 MTG 添加量对凝胶性和溶解性的影响

2.1.4 MTG 作用时间对凝胶性和溶解性的影响 见图 4。

从图 4 中可看出, 随反应时间的延长, SPI 凝胶性逐渐增加, 反应达 2.5h 时凝胶性达到 5109cp, 而此时的溶解性却下降到 46%。根据本实验对大豆分离蛋白功能性的要求, 适宜的 MTG 作用时间为 1.5h。

2.2 双酶改性大豆分离蛋白的正交实验

由表 2 中 R 值得出对影响凝胶性的主次关系为: 中性蛋白酶添加量>MTG 添加量>MTG 作用时间>水解时间; 影响溶解性的主次关系为: 中性蛋白酶添加量>MTG 作用时间>MTG 添加量>水解时间。通过以上分析获得凝胶性最高的最佳组合是 $A_1B_1C_3D_3$ 。

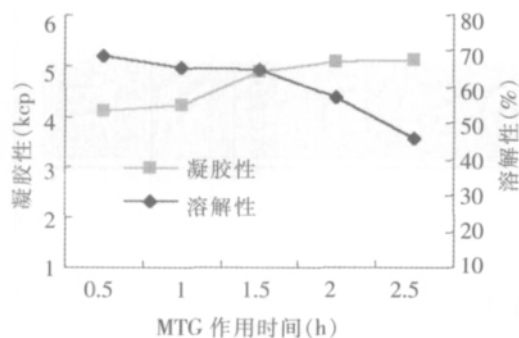


图4 MTG作用时间对凝胶性和溶解性的影响

表2 双酶改性 SPI 正交实验表极差分析结果

| 实验号 | 因素 | | | | 凝胶性 (cp) | 溶解性 (%) |
|-----|----------------|------|------|------|----------|---------|
| | A | B | C | D | | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 4622 | 62.5 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 4365 | 68.5 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3 | 4518 | 43.5 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 3 | 5261 | 51.0 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 4226 | 70.1 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 2818 | 65.7 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 2 | 5668 | 48.8 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 3581 | 67.3 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 2549 | 69.8 |
| 凝胶性 | k ₁ | 4502 | 5184 | 3674 | 3799 | |
| | k ₂ | 4102 | 4057 | 4058 | 4284 | |
| | k ₃ | 3933 | 3295 | 4804 | 4453 | |
| | R | 569 | 1889 | 1130 | 654 | |
| 溶解性 | k ₁ | 58.2 | 54.1 | 65.2 | 67.5 | |
| | k ₂ | 62.3 | 68.6 | 63.1 | 61.0 | |
| | k ₃ | 62.0 | 59.7 | 54.1 | 53.9 | |
| | R | 4.1 | 14.5 | 11.1 | 13.6 | |

获得较好溶解性的最佳组合是 A₂B₂C₁D₁。MTG 添加量越大和作用时间越长, 会使凝胶性增加, 与此同时溶解性下降。由于本实验考虑到将此种复合改性后产品在生产中应用的需要, 具有一定凝胶性的同时, 还要具有良好的溶解性, 故选择 5 号处理。

在此基础上, 对正交实验中 5 号处理所得功能性与对照、单酶改性、复合改性对比, 见表 3。

表3 改性 SPI 的功能性与对照比较

| 处理 | 凝胶性 (cp) | 溶解性 (%) |
|--------|----------|---------|
| 对照 | 3100 | 74.4 |
| 单酶改性 | 2454 | 84.7 |
| MTG 改性 | 5687 | 34.3 |
| 复合改性 | 4226 | 70.1 |

注: 单酶改性条件为: SPI 浓度为 13.8%, 50, pH 为 7, 中性蛋白酶添加量 0.005%, 水解 30min; MTG 改性条件为: SPI 浓度为 13.8%, 50, pH 为 7, MTG 添加量 0.4%, 作用 1.5h; 复合改性条件为: 正交实验中 5 号, 中性蛋白酶添加量为 0.005%, 水解 30min, 添加 MTG 0.5%, 作用 1.0h。

由表 3 看出, 虽然经 MTG 单独改性后 SPI 的凝胶性最高, 但溶解性却显著下降, 使其应用受到限制。经复合改性处理得到的样品凝胶性为 4226cp, 比

对照提高 36.3%, 溶解性比对照降低了 5.8%。本实验经复合改性后得到的产品在凝胶性提高的同时, 溶解性并没有显著下降, 使其在盐水注射型肉制品中应用值得进一步研究。

3 讨论

中性蛋白酶是一种内切蛋白酶, 能够使蛋白质的大分子水解, 使分子量变小, 这对于蛋白质分子量密切相关的一些性质(如凝胶性)得不到改善作用。谷氨酰胺转氨酶可以催化蛋白质发生交联, 导致蛋白质改性, 它的作用与蛋白水解酶类完全不同, 它使得蛋白质的分子量变大。

4 结论

4.1 本实验先利用中性蛋白酶适度水解, 再添加 MTG 进行复合改性处理, 获得凝胶性的最佳条件是: 中性蛋白酶水解 20min, 添加量为 0.003%, MTG 添加量为 0.5%, 作用时间为 2h。

4.2 利用中性蛋白酶和 MTG 复合改性处理, 获得溶解性的最佳条件是: 中性蛋白酶水解 30min, 添加量为 0.005%, MTG 添加量为 0.3%, 作用时间为 1.0h。

4.3 正交实验 5 号条件为添加中性蛋白酶 0.005%, 水解 30min, 添加 MTG 0.5%, 作用 1.0h, 处理得到产品凝胶性 4226cp, 比对照高 36.3%; 溶解性为 70.1%, 比对照低 5.8%。

参考文献:

- [1] 李荣和.大豆新加工技术原理与应用[M].北京:科学技术文献出版社,1998.
- [2] 刘大川,杨国燕.大豆分离蛋白的制备及产品功能性的研究[J].中国油脂,2004,29(12):56-61.
- [3] 刘志同,裴静.酶改性技术在大豆分离蛋白生产中的应用[J].粮油食品科技,2003,11(3):11-12.
- [4] 田少君,梁华民.转谷氨酰胺酶对大豆分离蛋白的改性研究[J].粮油加工与食品机械,2005(6):54-56.
- [5] 朱秀清,许慧,等.酶法大豆蛋白水解程度控制研究[J].粮油食品科技,2005(1):32-34.
- [6] 唐传核,杨晓泉.MMTase 聚合大豆蛋白及其改性机理[J].中国粮油学报,2004(1):43-47.
- [7] 黄友如,华欲飞,等.醇洗豆粕对大豆分离蛋白功能性的影响(一)凝胶性能[J].中国油脂,2003(10):54-57.
- [8] Babiker E E. Improvement in the functional properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by microbial transglutaminase treatment [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1996,44:3746-3750.
- [9] D J Walsh, D Cleary. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross-linking [J]. Food Research International, 2003,36:677-683.