

胰蛋白酶水解对荞麦蛋白功能特性的影响

龚倩, 唐传核, 杨晓泉*

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 研究胰蛋白酶水解及热处理对荞麦蛋白功能特性的影响。结果表明: 随水解度的增大, 蛋白质溶解性增大, 表面疏水度降低, 乳化性及乳化稳定性升高, 起泡能力及泡沫稳定性下降。热处理使荞麦蛋白溶解性上升, 表面疏水度增大, 乳化性及乳化稳定性下降, 起泡能力上升, 并且加热处理可抑制由于水解度下降导致的泡沫稳定性降低的趋势。

关键词: 荞麦蛋白; 胰蛋白酶; 热处理; 功能特性

Effect of Trypsin Hydrolysis on Functional Properties of Buckwheat Protein Isolate

GONG Qian, TANG Chuan-he, YANG Xiao-quan*

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this study, the effects of limited trypsin hydrolysis and heating treatment on physicochemical and functional properties of buckwheat protein isolate (BPI) were investigated. Results indicated that higher hydrolysis degree could result in the improvement of protein solubility and emulsification stability, and the reduction of surface hydrophobicity, emulsifying ability and stability, and foaming ability and foam stability. However, heating treatment could lead to the increase of protein solubility, surface hydrophobicity and foaming ability, and the decrease of emulsifying activity and emulsifying stability. Moreover, heating treatment could inhibit the reduction trend of foam stability due to decreasing hydrolysis degree.

Key words: buckwheat protein; trypsin; heating treatment; functional property

中图分类号: TQ936.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)05-0244-04

荞麦是具有较高营养价值和药用价值的作物, 在每克荞麦种子中含有 100~125mg 蛋白质, 650~750mg 碳水化合物, 20~25mg 脂肪以及 20~25mg 无机盐^[1]。此外荞麦中还含有铁、钙、磷、铜、锌、硼、碘、铂、钴等多种微量元素以及许多对某些慢性病具有医疗作用的稀有成分如黄酮、类黄酮、植物甾醇、荞麦碱及硫氨酸结合蛋白等。荞麦蛋白的组分同小麦粉差异较大, 水溶性清蛋白的含量较高(31.8%~42.3%), 谷蛋白含量次之(25.4%~26.1%), 醇溶蛋白含量最低(1.7%~2.3%)。荞麦虽然被认为是假禾谷类作物, 但高含量的清蛋白、球蛋白, 低含量的醇溶蛋白、谷蛋白表明荞麦蛋白质与其他豆类植物蛋白更相似^[2]。

目前国内对荞麦资源的利用仍处于起步阶段, 市场上常见的荞麦制品为荞麦面、荞麦粥等粗加工而成的传统荞麦食品。这种传统的粗放型的加工方式不利于充分利用荞麦中的营养成分。为此, 在传统加工技术的基础上, 利用新的技术来改善传统荞麦食品品质是未来荞

麦制品发展的趋势。本实验考察胰蛋白酶水解及热处理对荞麦蛋白功能特性的影响, 以期对荞麦深加工提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

荞麦种子(甜荞麦) 市购; 胰蛋白酶粉末(从猪胰脏中提取, 酶比活力 $2 \times 10^7 \sim 1 \times 10^6 \text{U/mg}$) 诺维信公司。

高效液相色谱仪 美国 Waters 公司; 凯氏定氮仪 上海洪纪仪器设备有限公司; 冷冻干燥机 德国 Christ 公司; 冷冻离心机 日本 Hitachi 公司; F93A 荧光分光光度计 上海思龙科学仪器有限公司; SP-721 可见分光光度计 上海安锐自动化仪表有限公司; RW20 digital 均质机 德国 IKA 公司; 数显 pH 计、分析天平 德国 Mettler Toledo 公司; 电动强力搅拌机 上海标本模型厂; 电热恒温水浴锅 江苏金坛市宏华仪器有限公司; JB-1 电磁搅拌机 上海雷磁新泾仪器有限公司; WH-1 微型旋涡混合仪 上海沪西分析仪器有限公司。

收稿日期: 2009-06-14

作者简介: 龚倩(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物蛋白工程。E-mail: fegongqian@163.com

* 通信作者: 杨晓泉(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物蛋白工程。E-mail: fexqyang@scut.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 实验流程

荞麦种子 → 粉碎 → 碱法提取蛋白质 → 荞麦分离蛋白
 ↓
 添加胰蛋白酶 → ↓
 蛋白质水解产物 ← 冻干 ← 蛋白质水解液

1.2.1.1 荞麦分离蛋白的提取

料液质量比 1:10, pH8.0, 恒温 40℃ 搅拌提取 1h, 6000r/min 离心分离 20min, 1mol/L HCl 调节上清液 pH 值至荞麦蛋白等电点 4.5, 沉淀水洗, 1mol/L NaOH 调 pH 值至中性, 冻干备用。

1.2.1.2 蛋白水解物制备

调节 2mg/100mL 荞麦分离蛋白溶液 pH 值为 8.0, 37℃ 水浴中保温 10min 后添加胰蛋白酶。制备水解度为 0、4.5、8.3、12.8 的蛋白质水解样品, 进行灭酶处理 (95℃ 水浴 10min), 冻干备用。

1.2.2 功能特性指标测定方法

1.2.2.1 水解度(DH)

水解度的测定用 pH-stat 法^[3]。

1.2.2.2 溶解性(PS)^[4]

将 1mg/100mL 的荞麦分离蛋白溶解于 pH 值为 7.0 的 10mmol/L 磷酸缓冲液中, 搅拌 30min, 采用 Lowry 法^[5-6]测定上清液中蛋白质含量。蛋白质溶解性用 100g 总蛋白质中能溶解的蛋白质的克数表示。

1.2.2.3 表面疏水度

表面疏水度测定用 ANS 荧光探针法^[7]。

1.2.2.4 乳化特性^[7]

把荞麦分离蛋白按 0.2mg/100mL 的质量浓度溶解于 pH 值为 7.0 的 10mmol/L 磷酸缓冲液中, 取 9.0mL 0.2mg/100mL 蛋白质溶液与 3.0mL 玉米油在均质机上混合 1min 以形成乳状液。立即在底部取 50 μL 的乳化液, 用 0.1% SDS 稀释 100 倍至 5mL, 在漩涡混合器上混合 5s 左右后, 用分光光度计测 500nm 波长处的吸光度。10min 后在底部取 50 μL 的乳化液, 重复操作。

$$\text{乳化性}/(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times n}{c \times \phi \times (1 - \theta) \times 10000}$$

$$\text{乳化稳定性}/\text{min} = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times 10$$

式中: c 为蛋白质初始质量浓度/(g/mL); ϕ 为光程, 0.01m; n 为稀释倍数; θ 为油的体积分数/%; A_0 、 A_{10} 分别为稀释液在 0、10min 时的吸光度。

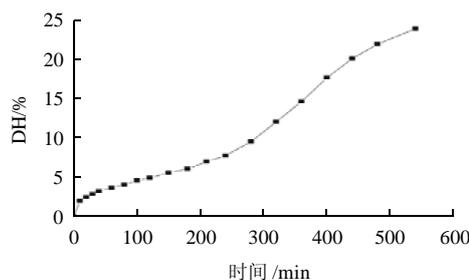
1.2.2.5 起泡特性^[7]

把荞麦分离蛋白按 1mg/100mL 的质量浓度溶解于 pH

值为 7.0 的 10mmol/L 磷酸缓冲液中, 取 10.0mL 置于 25mL 量筒中, 以 10000r/min 的速度均质 2min。起泡能力指混合后蛋白质溶液总体积的增加, 起泡稳定性是指 30min 后留存的泡沫的体积百分比。

2 结果与分析

2.1 胰蛋白酶对荞麦蛋白的水解作用



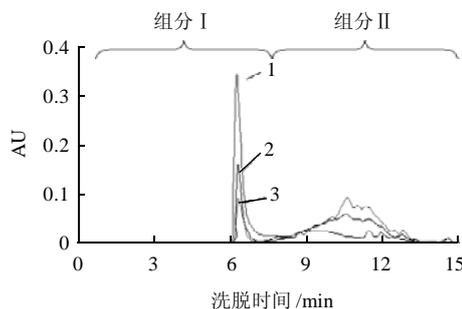
荞麦分离蛋白质量浓度 2mg/100mL, pH8.0, 酶与蛋白底物的比为 1:200(m/m)。

图1 胰蛋白酶酶解荞麦蛋白水解度-时间关系曲线

Fig.1 Time course of hydrolysis degree of BPI hydrolyzed with trypsin

如图 1 所示, 向反应体系中添加胰蛋白酶后, 由于底物浓度相对较高, 体系的瞬间反应速率很大, 继续反应后, 溶液中的底物数量持续减少, 水解的速度逐渐减慢。当水解反应进行到 240min 后, 水解使蛋白质的絮凝物解体并形成可溶性蛋白质分子, 使得溶液中的蛋白质浓度升高而更利于酶解反应的发生。400min 之后, 水解速度又再次减缓。在本实验中, 最长反应时间 540min 时, 水解度达到 24.0%。

2.2 水解物的体积排阻色谱分析



凝胶柱: Sepharose CL-6B column (2.5 μm × 90cm); 洗脱条件: 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.6), 含 0.2mmol/L NaCl。峰 1.水解度 0; 峰 2.水解度 4.5%; 峰 3.水解度 8.3%。

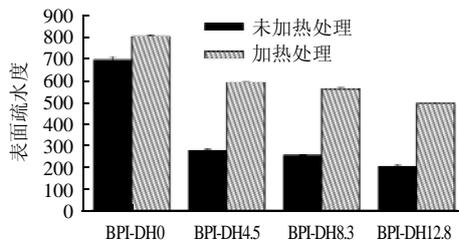
图2 荞麦分离蛋白及其水解物体积排阻色谱图

Fig.2 Size exclusion chromatographic profile of BPI and its hydrolysates

由图 2 可见, 荞麦分离蛋白的主要成分为组分 I (0~8min 出峰物质), 其分子量最大, 未被水解或水解

程度低。而组分 II (8min 后出峰的物质) 为水解后产生的分子量较小的蛋白质以及肽链。随着水解进行, 蛋白质样品中组分 I 的比例逐渐减小, 这是由于水解导致荞麦分离蛋白的分子变小, 生成分子量较小的蛋白质甚至是更小的分子肽链, 在洗脱曲线上则表现为组分 II 的增多。

2.3 表面疏水度



BPI-DH0、BPI-DH4.5、BPI-DH8.3、BPI-DH12.8 分别为水解度 0、4.5%、8.3%、12.8% 的荞麦分离蛋白。下同。

图3 荞麦分离蛋白及其水解物的表面疏水度

Fig.3 Effect of heating treatment on surface hydrophobicity of BPI and its hydrolysates with different hydrolysis degrees

由图 3 可知, 随着水解的进行, 荞麦分离蛋白水解物表面疏水度显著下降。这是由于水解作用导致肽键断裂, 增加溶液中氨基以及羧基等亲水性基团的数目, 同时蛋白质分子中一些极性基团随着水解度的增大而逐步暴露, 故导致蛋白表面疏水度的减小。同时, 热处理能显著增加蛋白表面疏水度。这是由于加热作用使部分蛋白质发生热聚集, 在聚集过程中, 部分亲水基团相互作用而被包埋在新生成的致密结构内, 使蛋白质表面疏水度升高。

2.4 溶解性

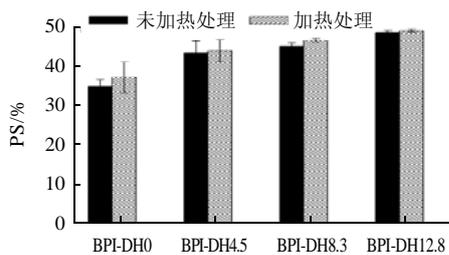


图4 pH 值中性条件下荞麦分离蛋白及其水解物溶解性

Fig.4 Effect of heating treatment on protein solubility of BPI and its hydrolysates with different hydrolysis degrees at pH 7

如图 4 所示, 随着水解进行, 荞麦分离蛋白水解物溶解性得到显著改善。在 DH12.8% 时, 荞麦分离蛋白水解物的溶解性比对照样增加 34.6%。在水解的过程中, 蛋白质部分肽键断裂, 原先的紧密结构受到破坏, 释放出一些易于水化的较小的多肽单位以及新暴露的氨基、羧基等亲水基团。这一结论与凝胶色谱洗脱曲线结论一致。表面疏水度结果显示水解物疏水度下降, 再

次验证了溶解性的变化趋势。此外, 如图 4 可见热处理对荞麦分离蛋白水解物的溶解性存在很小影响。

2.5 乳化性

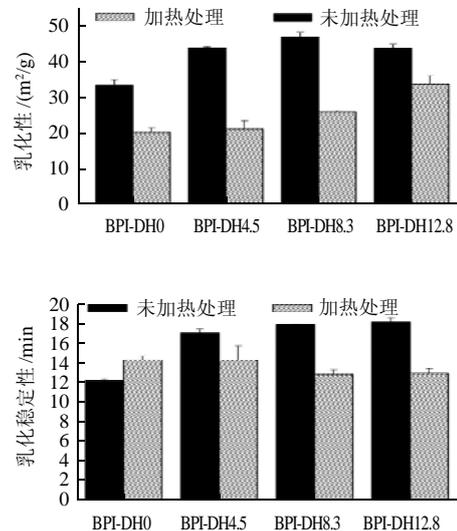


图5 pH 中性条件下荞麦分离蛋白及其水解物的乳化性及乳化稳定性

Fig.5 Effect of heating treatment on emulsifying activity index (EAI) and emulsifying stability index (ESI) of BPI and its hydrolysates with hydrolysis degrees at pH 7

如图 5 所示, 随着水解度的增大, 蛋白质水解物的乳化性显著增加, 但水解度为 12.8 样品的乳化性低于水解度为 8.3 样品的乳化性。这与 Kong 等^[8]对胰蛋白酶对小麦谷蛋白改性研究的结果一致。在水解度较低的时候, 胰蛋白酶对蛋白质分子的降解增加小分子蛋白质及多肽单元的数目, 使多肽单元在油-水界面上的有效性增大, 并具有更大的界面面积, 因此使蛋白质溶液具有更好的乳化性。当荞麦蛋白质进一步水解时, 蛋白质被降解为更小的分子, 过度的水解反而不利于界面的形成, 导致乳化性的降低。热处理能显著影响乳化性指标的大小。热处理后, 荞麦蛋白质水解物的乳化性在数量上有明显的降幅。这是由于加热使蛋白质分子及多肽单元生成絮凝物, 这部分物质由于溶解性不佳而对乳化液的形成贡献较小, 故乳化性降低。

乳化稳定性通常与时间和乳化液微粒直径有关, 粒径越小稳定性越好^[9]。随着水解的进行, 蛋白质的二级结构遭到破坏而生成较小分子量的蛋白质分子以及多肽链, 这使得分子的乳化液颗粒减小, 从而导致蛋白质乳化稳定性增大。而热处理对乳化稳定性则产生负面影响, 这是由于热处理使得水解产生的小分子肽链及蛋白水解物重新发生絮凝, 生成较大颗粒, 故导致乳化稳定性的降低。且在水解度为 12.8% 时, 由于水解程度最大, 故加热对其影响最显著。

2.6 起泡性

中性条件下荞麦分离蛋白及水解物的起泡能力、泡沫稳定性如表 1 所示。

表 1 中性条件下荞麦分离蛋白及水解物的起泡特性
Table 1 Foaming ability and foam stability of BPI and its hydrolysates with different hydrolysis degrees at pH 7

样品	未经过加热处理		经过加热处理	
	起泡能力 /%	泡沫稳定性 /%	起泡能力 /%	泡沫稳定性 /%
BPI-DH0	77.5 ± 0.4	86.9 ± 2.2	117.7 ± 2.0	46.0 ± 0.0
BPI-DH4.5	53.9 ± 1.6	76.2 ± 4.6	89.1 ± 2.2	58.3 ± 0.6
BPI-DH8.3	49.4 ± 1.7	56.3 ± 3.3	55.1 ± 3.2	66.9 ± 2.8
BPI-DH12.8	33.5 ± 2.3	60.7 ± 3.4	35.8 ± 1.5	85.4 ± 1.2

一般认为较大的蛋白质分子拥有较高的起泡性^[7]。泡沫产生之后,为了稳定泡沫,必须在每一个起泡周围形成厚的、黏着的、弹性的、连续的和空气不能渗透的蛋白质膜^[9]。本实验中,经胰蛋白酶水解后,荞麦蛋白分子的肽链长度变短,起泡能力降低,稳定性也呈下降的趋势。这是由于随着水解度的增大,蛋白质分子结构变得松散不连续,所形成的泡沫蛋白质膜稳定性随之变差。

对荞麦蛋白水解物进行热处理后,蛋白质的起泡能力显著增强,且低水解度时增幅较大。但热处理后其稳定性的变化较为复杂。水解度为 0、4.5% 样品经加热过程后稳定性下降,而水解度为 8.3%、12.8% 样品经过加热过程后稳定性上升。这是由于,一方面加热产生的絮凝物体积过大而在稳定泡沫中起着不利的作用,另一方面蛋白质分子变松散后受热生成小絮凝物利于形成厚的蛋白质膜而能稳定泡沫。

3 结 论

3.1 水解过程对荞麦分离蛋白的性质影响较大。随水

解度的增大,蛋白质溶解性增大,表面疏水度降低,乳化性及乳化稳定性升高,起泡能力及泡沫稳定性下降。

3.2 热处理对荞麦分离蛋白性质有较大影响。加热处理使荞麦分离蛋白溶解性上升,表面疏水度增大,乳化性及乳化稳定性下降,起泡能力提高,并且加热扭转了由于水解度下降导致的泡沫稳定性降低的趋势。

3.3 本实验研究胰蛋白酶处理对荞麦分离蛋白功能特性的影响,并研究工业生产中常用的热处理灭酶方式对其影响,发现经由以上处理方式,荞麦分离蛋白的溶解性、乳化性、起泡性等特性均有一定程度的改善,这对食品工业中对荞麦资源的深加工利用有一定借鉴意义。

参 考 文 献:

- [1] LI S Q, ZHANG Q H. Advances in the development of functional foods from buckwheat[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2001, 41(6): 451-464.
- [2] 杜双奎,李志西,于修焯. 荞麦蛋白研究进展[J]. *食品科学*, 2004, 25(10): 409-414.
- [3] NISSEN A. *Enzymatic hydrolysis of food proteins*[M]. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 12-14.
- [4] TANG C H. Functional properties and *in vitro* digestibility of buckwheat protein products: influence of processing[J]. *Journal of Food Engineering*, 2007, 82(4): 568-576.
- [5] 高茜娣. Lowry 法测定蛋白质含量的统计分析[J]. *应用数学*, 2001, 14(4): 121-123.
- [6] 李红兵,李宗让,王志玲,等. 微量法测定蛋白质含量[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1993, 20(5): 402-403.
- [7] YIN S W, TANG C H, CAO J S, et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate[J]. *Food Chemistry*, 2008, 106(3): 1004-1013.
- [8] KONG X Z, ZHOU H M, QIAN H F. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2006, 101(2): 615-620.
- [9] 莫重文,马宇翔,杨国龙. *蛋白质化学与工艺学*[M]. 北京:化学工业出版社, 2007: 90-91.