

碱性蛋白酶限制性水解对高温菜籽粕蛋白功能性质的影响

王素雅, 刘 胜, 鞠兴荣, 严梅荣, 袁 建
(南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏 南京 210003)

摘 要: 为改善高温菜籽粕蛋白质的功能性质, 用碱性蛋白酶对其进行限制性水解, 并研究不同水解度(DH)高温菜籽粕蛋白功能性质及相对分子质量分布。结果表明: 碱性蛋白酶限制性水解高温菜籽粕蛋白的溶解度、乳化性和吸油性均有所改善, 其中溶解度随水解度增加而增加, pH7.0时 DH 为 10% 的高温菜籽粕蛋白的溶解度达 63.82%, 是原蛋白溶解度的 2.1 倍; DH 为 2.0% 的水解蛋白乳化性最好, pH6.0 和 pH8.0 时乳化指数分别为 0.43 和 0.49, 比原蛋白乳化指数分别高 0.13 和 0.11; DH 为 8% 的水解蛋白吸油性最好, 为 4.39g/g。水解后高温菜籽粕蛋白的某些功能性质与其相对分子质量分布有一定的关系, 需控制高温菜籽粕蛋白水解度以获得某种良好的功能性质。

关键词: 菜籽粕蛋白; 碱性蛋白酶; 水解度; 功能性质

Effect of Limited Alkaline Protease Hydrolysis on Functional Properties of Rapeseed Thermoresistant Protein

WANG Su-ya, LIU Sheng, JU Xing-rong, YAN Mei-rong, YUAN Jian
(School of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210003, China)

Abstract : To improve functional properties, the thermoresistant protein extracted from rapeseed meal was limitedly hydrolyzed by alkaline protease hydrolysis. Also, the relationships between protein functions and degree of hydrolysis (DH) were investigated. The solubility, emulsifying capacity and oil absorption capacity of rapeseed thermoresistant protein all increased after alkaline protease hydrolysis. Its solubility increased with increasing DH, and the solubility of rapeseed thermoresistant protein with 10% DH was as high as 63.82% at pH 7, 2.1 times higher than before hydrolysis. The emulsifying capacity of the hydrolysate obtained at 2.0% DH was the best and the emulsifying index was 0.43 and 0.49 at pH 6.0 and pH 8.0, 0.13 and 0.11 higher than unhydrolyzed rapeseed thermoresistant protein, respectively. The hydrolysate obtained at 8% DH presented the highest oil absorption capacity, 4.39 g/g. Rapeseed thermoresistant protein was decomposed into peptides with a smaller molecular weight after the hydrolysis, so changes in some of its functional properties took place.

Key words: rapeseed thermoresistant protein; alkaline protease; degree of hydrolysis; functional properties

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)13-0044-04

植物蛋白质改性的方法有酶法、化学法、物理法及生物转基因法等, 其中酶法与化学法最常用。与化学法改性相比, 酶法改性具有许多优点, 如条件温和、效率高, 不破坏氨基酸结构, 产生有害物质的可能性小, 安全性高等^[1]。蛋白质限制性水解改性是指利用蛋白酶水解, 使蛋白质分子的空间结构和理化性质发生改变^[2], 从而提高蛋白质营养价值、改善各种功能特性并扩大蛋白质应用领域。然而, 过度酶解会造成某些功能特性减弱甚至完全丧失^[3]。已有的研究表明, 蛋

白质的分子质量大小(即肽链长短)与功能特性改善有密切关系^[4-5]。因此限制性水解是获得良好性能蛋白质的重要基础。

工业榨油后, 菜籽粕中的蛋白质由于高温、有机溶剂等作用而功能性质劣化, 因此, 采取适宜方法对高温菜籽粕蛋白改性, 是提高菜籽粕蛋白利用率的关键。目前, 国内外有关酶法改善高温菜籽粕蛋白功能性质的研究较少, 因此, 本实验用碱性蛋白酶限制性水解高温菜籽粕蛋白, 探讨不同水解度高温菜籽粕蛋白

收稿日期: 2009-10-20

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z331)

作者简介: 王素雅(1969—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wsy_wangsy@sina.com

的功能性质及相对分子质量变化, 以期为高温菜籽粕蛋白的进一步利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高温菜籽粕蛋白 自制; 高温菜籽粕 南京隆盛油脂有限公司; 金龙鱼菜籽色拉油(精炼一级) 益江(张家港)粮油工业有限公司。

碱性蛋白酶(20000U/g) 北京奥博星生物技术有限公司; 酒石酸钾钠、硼酸、硫酸钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硫酸、盐酸、邻苯二甲酸氢钾、氢氧化钠、十二烷基硫酸钠均为分析纯。

1.2 仪器与设备

PHS-25 型 pH 计、722N 可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; 台式离心机 TDL-5-A 上海安亭科学仪器厂; RE-52AA 旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; 501 型超级恒温器 上海试验仪器厂有限公司; FJ200-S 数显高速分散均质机 上海标本模型厂; AIPHA1-4LD PLUO 真空冷冻干燥机 德国 Christ 公司; JJ-1 精密定时电动搅拌器 江苏省金坛市荣华制造有限公司; AKTA purifier 全自动蛋白质分析纯化仪 美国 GE Healthcare 集团。

1.3 方法

1.3.1 高温菜籽粕蛋白的提取

以高温菜籽粕为原料, 采用淀粉酶与碱(稀 NaOH 溶液)提取相结合的方法提取蛋白。淀粉酶作用条件为加酶量 2.5%, 料液比 1:20(g/mL), pH7.0, 50℃ 反应 3h; 之后用碱提取, 其作用条件为料液比 1:12(g/mL), pH10.0, 55℃ 提取 2h。4000r/min 离心 20min, 上清液用稀酸调至 pH4.0 使蛋白质等电点沉淀, 然后 70% 乙醇溶液脱色处理后冻干。提取的菜籽粕蛋白中蛋白质含量为 78.44%, 硫代葡萄糖苷含量为 0.17mg/g。

1.3.2 碱性蛋白酶限制性水解高温菜籽粕蛋白

将一定量的高温菜籽粕蛋白配制成相应质量浓度的溶液, 用 1mol/L 的 NaOH 溶液调节至相应 pH 值与温度, 用碱性蛋白酶进行水解, 其间不断滴加 0.5mol/L NaOH 溶液保持反应体系 pH 值稳定。当达到预期水解度时, 将反应液置于 90℃ 保温灭酶。冷冻干燥后即得不同水解度的改性高温菜籽粕蛋白。

1.3.3 高温菜籽粕蛋白水解度的测定

采用 pH-stat 法测水解度(DH)^[6]。DH 定义为蛋白质中被水解的肽键的比例, 水解度计算如式(1)。

$$DH/\% = \frac{V \times c}{\alpha \times m_p \times h_{\text{tot}}} \quad (1)$$

式中: V 为消耗碱的体积 /mL; c 为标准 NaOH 的浓度 /mol/L; m_p 为蛋白质的质量 /g; h_{tot} 为每克蛋白质底物具有的肽键毫摩尔数(取 7.8mmol/g); α 为样品分离蛋白氨基平均解离度。

1.3.4 限制性水解前后高温菜籽粕蛋白溶解度的测定

采用双缩脲法^[7]。准确称取 0.20g 样品溶于 20mL 水中, 分别调节 pH 值至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 室温搅拌 30min, 然后 4000r/min 离心 20min。采用双缩脲法测定上清液蛋白质含量, 并计算高温菜籽粕蛋白的溶解度。

1.3.5 限制性水解前后高温菜籽粕蛋白乳化性及乳化稳定性的测定

采用浊度法^[8]。称取一定量样品溶解于不同 pH 值缓冲液中配成质量分数 1.0% 的蛋白溶液, 室温磁力搅拌 30min 后, 加入 5.0mL 大豆油, 以 10000r/min 均质 60s, 立即从底部吸取 100μL 乳浊液与 10.0mL 0.1% SDS 溶液混匀, 于波长 500nm 处测定吸光度 A_0 , 此值记为乳化活性(EA)。10min 后重新从静置的乳浊液底部取样测定吸光度 A_t 。按式(2)计算乳化稳定性(ES)。

$$ES = \frac{A_0 \times \Delta t}{A_0 - A_t} \quad (2)$$

式中: Δt 为两次测定乳化活性的时间间隔 /min; 本实验中该值为 10min。

1.3.6 限制性水解前后高温菜籽粕蛋白吸油性的测定^[9]

取 0.50g 蛋白样品置于 10mL 离心管中, 加入 5.0mL 大豆油, 搅匀后置于 40℃ 水浴中保温 30min, 然后 4000r/min 离心 30min, 倾去上层未吸附的大豆油, 称蛋白质量, 计算每克蛋白质样品的吸油性。

$$\text{吸油性} = \frac{m - m_0}{m_0} \quad (3)$$

式中: m_0 为蛋白质样品质量 /g; m 为蛋白质吸油后质量 /g。

1.3.7 限制性水解前后高温菜籽粕蛋白的相对分子质量分布

采用凝胶排阻层析色谱法^[10]。AKTA purifier 全自动层析系统, 分离柱为 Superose12 10/300 GL(10mm × 300mm)预装柱, 进样体积为 500μL, 洗脱液为 0.15mol/L NaCl, 50mmol/L pH7.0 磷酸盐缓冲液, 洗脱流速 0.5mL/min, 检测波长为 215nm。相对分子质量标准品为牛血清白蛋白(M_r 67000)、细胞色素 (M_r 12700)、钴胺酰胺(VB₁₂, M_r 1355)、Gly-Gly-Tyr-Arg(M_r 451.48)。

2 结果与分析

2.1 限制性水解对高温菜籽粕蛋白溶解性的影响

溶解性是蛋白质功能性质的基础, 具有良好溶解性的蛋白质才可能拥有优良的乳化性、起泡性和凝胶性, 适于食品工业加工利用。高温菜籽粕蛋白质溶解性差, 直接影响到高温菜籽粕蛋白的应用, 而限制性水解可有效提高高温菜籽粕蛋白的溶解性。

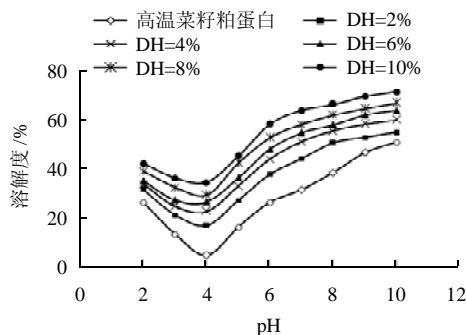


图1 不同水解度高温菜籽粕蛋白的溶解度

Fig.1 pH dependence of solubility of rapeseed thermoresistant protein with different DHs

由图1可知, 高温菜籽粕蛋白及其限制性水解物的等电点均在pH4.0附近, 其中高温菜籽粕蛋白溶解性差, pH4.0时溶解度仅为4.77%。而经碱性蛋白酶水解后其溶解度不断提高, 当DH为10%时, 水解高温菜籽粕蛋白溶解度达34.44%, 比原蛋白提高了6倍。在pH7.0时, DH为10%的水解高温菜籽粕蛋白的溶解度达63.82%, 是原高温菜籽粕蛋白的2.1倍。水解高温菜籽粕蛋白溶解度提高可能是由于多肽链断裂并暴露出离子化的氨基和羧基, 使分子极性增强, 亲水性增加^[11-12]; 同时, 水解破坏了分子中疏水区域的结构, 增加分子间相互排斥作用, 提高了水解物在溶液中的分散稳定性, 进而提高了蛋白质的溶解性^[13]。

2.2 限制性水解对高温菜籽粕蛋白乳化性及乳化稳定性的影响

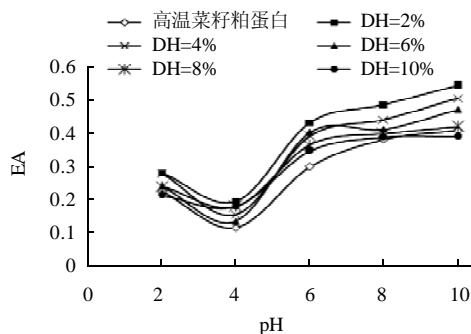


图2 不同水解度高温菜籽粕蛋白的乳化性

Fig.2 pH dependence of emulsifying capacity of rapeseed thermoresistant protein with DHs

由图2可知, 限制性水解前后高温菜籽粕蛋白的乳化性均受pH值影响, 在等电点附近乳化活性最低, 偏离等电点则乳化活性提高, 该结果与赵国华等^[13]和Yin等^[14]报道一致。不同水解度高温菜籽粕蛋白乳化活性不同, 其中DH为2%的水解高温菜籽粕蛋白乳化活性最好, pH6.0、8.0时乳化活性分别为0.43、0.49, 比原蛋白分别高0.13、0.11。分析认为: 制油过程使菜籽蛋白严重变性, 溶解性降低, 不能够迅速扩散到油/水界面^[15]。而限制水解后高温菜籽粕蛋白溶解性增大, 分子柔顺性增加, 利于蛋白质迅速扩散而降低油/水界面的自由能。同时多肽链电荷增加, 静电作用阻止了油滴聚集^[16], 因此, 限制性水解高温菜籽粕蛋白乳化性得到一定程度改善。但随着水解度不断提高, 多肽链中更多的极性基团外露, 其降低界面自由能的能力下降, 因此乳化活性降低。

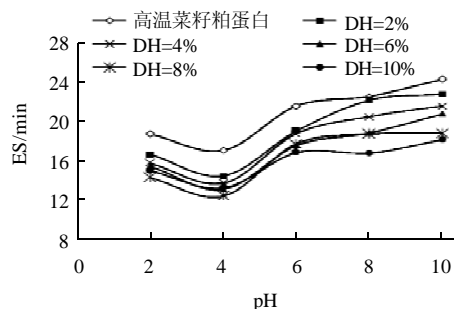


图3 不同水解度高温菜籽粕蛋白的乳化稳定性

Fig.3 pH dependence of emulsion stability of rapeseed thermoresistant protein with DHs

本实验中限制性水解不能改善高温菜籽粕蛋白的乳化稳定性, 由图3可知, 高温菜籽粕蛋白乳化稳定性最高, 水解蛋白的乳化稳定性随DH增大而降低。这可能是由于缩短的多肽链在油/水界面上的相互作用能力减弱, 在界面上形成的黏弹性膜不能维持界面平衡, 乳化球易于破裂。

2.3 限制性水解对高温菜籽粕蛋白吸油性的影响

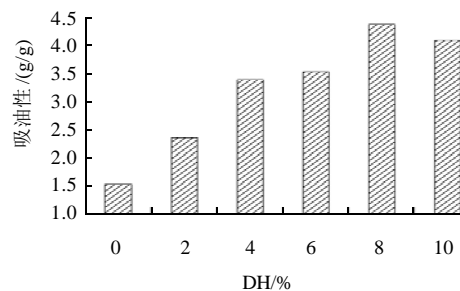


图4 不同水解度高温菜籽粕蛋白的吸油性

Fig.4 Relationship between oil absorption capacity and DHs of rapeseed thermoresistant protein

本实验限制性水解可有效改善高温菜籽粕蛋白的吸

油性, 由图 4 可知, DH 为 8% 的高温菜籽粕蛋白吸油性最佳, 为 4.39g/g, 比原蛋白的 1.53g/g 提高约 2.9 倍。这可能是由于水解使蛋白分子内部的疏水基团暴露, 吸油性显著提高。但当水解度进一步增大时, 多肽链极性增强, 蛋白质吸附油滴的能力降低, 吸油性又呈下降趋势。

2.4 不同水解度高温菜籽粕蛋白的相对分子质量分布

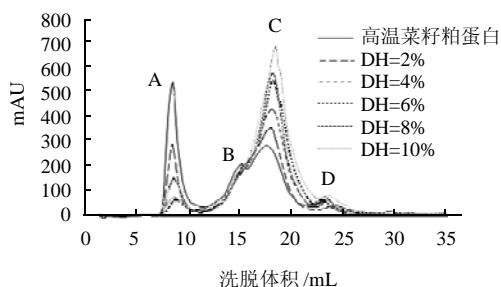


图 5 酶解改性高温菜籽粕蛋白的相对分子质量分布曲线

Fig.5 Molecular weight distribution curves of rapeseed thermoresistant protein with DHs

表 1 不同水解度高温菜籽粕蛋白的相对分子质量分布

Table 1 Molecular weight distribution of rapeseed thermoresistant protein with DHs

高温菜籽粕 蛋白水解度	相对分子质量				相对分子质量分布范围百分比/%		
	A	B	C	D	> 5000	1500~5000	< 1500
DH=0%	279000	12600	4200	275	56.72	41.63	1.83
DH=2%	272000	—	3600	270	16.72	78.73	4.55
DH=4%	272000	—	3300	290	13.19	83.45	3.36
DH=6%	262000	—	3200	340	8.55	88.03	3.42
DH=8%	251000	—	3300	285	4.12	89.94	5.94
DH=10%	279000	—	3200	280	4.61	91.11	4.28

注: —, 无峰出现。

由图 5 与表 1 可知, 原蛋白质在凝胶层析色谱中出现 4 个峰, 其中 A 峰占总峰面积的 38.96%, B 峰占 17.76%, 相对分子质量大于 5000 的大分子蛋白共占 56.72%, 说明原蛋白质以大分子为主。随水解度的增加, 碱性蛋白酶水解蛋白在凝胶层析中 A 峰面积减小, B 峰消失, C 峰面积增加, 表明高相对分子质量蛋白逐渐减少, 低相对分子质量蛋白逐渐增多。DH 为 2% 的限制性水解高温菜籽粕蛋白的 C 峰面积比例大幅增加, 达到 78.73%, A 峰面积则下降至 16.72%, 说明小分子质量的寡肽比例相应增加。当 DH 为 10% 时, 限制性水解高温菜籽粕蛋白的相对分子质量则以 1500~5000 的多肽为主, 占峰面积的 90% 以上, 此时水解高温菜籽粕蛋白相对分子质量较小, 肽链较短。高温菜籽粕蛋白的相对分子质量分布情况主要取决于水解度的高低, 随水解度提高, 低相对分子质量小肽类物质逐渐增多, 网状结构遭到破坏, 膨胀性降低, 蛋白多聚体解聚, 使得蛋白质的有序性增加, 蛋白质的表观体积减小, 溶解性增加; 另外, 蛋白的降解使得肽类分子的离子基团增加, 相互排斥性增强, 这也使得蛋白的溶解性增加。

而当 DH 为 2% 时, 水解高温菜籽粕蛋白可能处在一种适度松散的状态, 有利于分散到油/水界面上形成具有高度黏弹性的网络膜, 阻止油滴间的聚集, 进而表现出较高的蛋白质乳化性; 当高温菜籽粕蛋白被进一步深度水解时, 蛋白相对分子质量变小, 多肽链过短, 不能像高相对分子质量蛋白那样伸展以形成具有高黏弹性的保护膜及降低油水界面的界面张力, 从而导致乳化性能下降。所以有必要对蛋白质的水解度进行控制, 保证其相对分子质量处于合理状态, 以取得较理想的功能性质。

3 结 论

3.1 采用碱性蛋白酶对高温菜籽粕蛋白进行限制性水解改性后, 水解高温菜籽粕蛋白的溶解度随水解度增加而增大, pH4.0 时 DH 为 10% 水解蛋白溶解度比原蛋白提高了 6 倍, pH7.0 时 DH 为 10% 水解蛋白的溶解度达 63.82%; 水解蛋白的乳化性和吸油性也都有所提高, DH 为 2% 的水解蛋白乳化性最好, 在 pH6.0 与 pH8.0 时乳化活性分别为 0.43 与 0.49; DH 为 8% 的水解蛋白吸油性最好, 为 4.39g/g, 比原蛋白提高了近 2.9 倍, 但所有改性蛋白的乳化稳定性并无改善。

3.2 采用凝胶排阻层析分析了限制性水解高温菜籽粕蛋白的相对分子质量分布, 表明蛋白的某些功能性质与相对分子质量分布有一定的关系。因此, 需控制高温菜籽粕蛋白水解度以获得某种良好的功能性质。

参考文献:

- [1] 沈辉, 王梅. 食品酶的应用[J]. 食品科学, 1996, 17(2): 3-7.
- [2] LEE K A, KIM S H. SSGE and DEE, new peptides isolated from a soy protein hydrolysate that inhibit platelet aggregation[J]. Food Chem, 2005, 90(3): 389-393.
- [3] KUEHLER C A, STINE C M. Effect of enzymatic hydrolysis on some functional properties of whey protein[J]. Food Sci, 1974, 39: 379-82.
- [4] DEESLIE W D, CHERYAN M. Fractionation of soy protein hydrolysates using ultrafiltration membranes[J]. Food Sci, 1991, 57: 411-413.
- [5] 孙群, 阚健全, 赵国华, 等. 大豆肽特性及其在食品工业中应用[J]. 粮食与油脂, 2003(12): 11-13.
- [6] ADLER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 116-124.
- [7] 陈钧辉, 李俊, 张太平, 等. 生物化学实验[M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2008: 63-64.
- [8] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique[J]. J Agri Food Chem, 1978, 26 (3): 716-723.
- [9] SINHA R, RADHA C. Whey protein hydrolysate: Functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation[J]. Food Chem, 2007, 101: 1484-1491.
- [10] 鞠兴荣, 何荣, 袁建, 等. 固态发酵生产菜籽肽菌种的筛选[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 494-497.
- [11] PUSKI G. Modification of functional properties of soy protein by proteolytic enzyme treatment[J]. Cereal Chem, 1975, 52(5): 655-664.
- [12] MAHMOUD H I. Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties[J]. Food Sci, 1992, 57(5): 1223-1228.
- [13] 赵国华, 陈宗道, 王光慈, 等. 改性对玉米蛋白质功能性质和结构的影响[J]. 中国粮油学报, 2000, 15(2): 28-31.
- [14] YIN Shouwei, TANG Chuanhe, CAO Jinsong, et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate[J]. Food Chem, 2008, 106(3): 1004-1013.
- [15] 王文高, 陈正行, 姚惠源. 大米蛋白及其水解物功能性质与疏水性关系的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2002(7): 49-50.
- [16] 刘巍. 酶法有限水解对大豆分离蛋白乳化性能的影响[J]. 中国粮油学报, 2000, 15(1): 26-29.