

酶法交联对花生分离蛋白理化 与功能特性的影响

胡晓,任娇艳,赵谋明*,崔春,赵强忠
(华南理工大学轻工与食品学院,广东广州 510640)

摘要:采用转谷氨酰胺酶(TGase)对花生分离蛋白(PPI)进行交联改性,比较了TGase在37℃下催化不同时间(0~240min)对PPI理化与功能特性的影响。结果表明,TGase可促使PPI亚基发生改变并形成高分子聚合物,同时使PPI的游离巯基含量降低,表面疏水性增加。随着交联程度的上升,PPI在pH3.0~10.0的溶解性逐渐降低,其制备的乳状液表面积平均粒径(d_{32})趋于增大,但适度交联(37℃下交联90min)可明显改善蛋白乳状液的稳定性。

关键词:转谷氨酰胺酶,花生分离蛋白,交联

Effect of enzymatic cross-linking on physicochemical and functional properties of peanut protein isolate

HU Xiao, REN Jiao-yan, ZHAO Mou-ming*, CUI Chun, ZHAO Qiang-zhong

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

Abstract: Peanut protein isolate (PPI) was cross-linked by Transglutaminase (TGase), and the effects of TGase-catalyzed reactions (37°C, 0~240min) on physicochemical and functional properties of PPI were studied. The results showed that TGase cross-linking induced the changes in PPI subunits and the formation of the high molecular weight polymers. The free sulfhydryl content was decreased and the surface hydrophobicity was increased after TGase cross-linked PPI. The decrease in solubility of PPI at pH3.0~10.0 and increase in surface area mean diameter (d_{32}) of emulsions made with the PPI products were both observed when the extent of TGase cross-linking was increased. However, limited cross-linking (37°C, 90min) could obviously improve the emulsion stability of PPI.

Key words: transglutaminase; peanut protein isolate; cross-linking

中图分类号: TS201.2⁺5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)06-0228-04

我国是花生生产大国,其年产量位居世界首位,花生资源十分丰富。花生在我国主要作为油料作物用于榨油,经压榨处理后的花生粕大多作为饲料使用,高值化应用程度低,造成蛋白资源的大量浪费。为此,利用改性手段提高花生粕蛋白的功能特性是充分利用该蛋白资源的重要途径。转谷氨酰胺酶(TGase, EC 2.3.2.13)是一种可催化酰基转移反应的酶,可促使蛋白分子内或分子间、蛋白质与多肽、氨基酸以及多肽间形成 ϵ -(γ -谷氨酰基)-赖氨酸异肽共价键,从而使其发生交联聚合^[1]。蛋白分子交联后由于聚合物的生成和支链结构的引入,其空间构型与分子柔性发生改变,改性后的蛋白功能特性也随之发生变化。目前,TGase交联已成为蛋白改性的重要手段,应用于改善多种植物或动物蛋白功能特性

的领域中,但国内外关于TGase改性花生蛋白的研究较少,且尚缺乏深入的研究。本文拟从花生粕中提取分离蛋白,探讨TGase交联程度对花生蛋白理化与功能特性的影响,以期拓宽花生粕蛋白资源的应用范围,为提高其附加值提供方法和理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

低温脱脂花生粕 山东天申生物蛋白有限公司;转谷氨酰胺酶 江苏一鸣生物制品有限公司;其它试剂 均为分析纯。

CR22G 高速冷冻离心机、F-7000 荧光分光光度计 日本日立公司;320-S 数显 pH 计 瑞士梅特勒-托利多公司;Alpha1-4 LD plus 冷冻干燥机 德国 Marin Christ 公司;电泳槽 北京六一仪器厂;APV-1000 高压均质机 丹麦 APV 公司;Mastersizer2000 粒度分布仪 英国 Malvern Instruments Ltd。

1.2 实验方法

1.2.1 花生分离蛋白的制备 取一定量的花生粕将其与水按 1:10(w/w)混合,用 1mol/LNaOH 调节 pH

收稿日期:2011-03-28 * 通讯联系人

作者简介:胡晓(1981-),男,博士研究生,研究方向:食品生物技术。

基金项目:国家自然科学基金(20806030);国家 863 计划项目(2006AA10326)。

至 8.0, 常温搅拌提取 1h, 离心 30min(8000 × g), 取上清液, 用 1mol/L HCl 调节 pH 至 4.5, 离心 10min(8000 × g), 取离心沉淀物, 加水, 用 1mol/L NaOH 调节 pH 至 7.0 使其充分溶解, 用去离子水透析 24h, 冷冻干燥制备得花生分离蛋白(PPI)。

1.2.2 TGase 交联反应 将 PPI 配成蛋白浓度为 2% 的溶液, 调节溶液 pH 至 7.0, 添加 TGase, 加酶量为 0.5g/100g 蛋白, 在 37℃ 分别反应 30、60、90、120、240min, 反应后冷冻干燥制备得 PPI 交联样品。

1.2.3 乳状液的制备 用去离子水将蛋白样品配成蛋白浓度为 2% 的溶液, 调节 pH 为 7.0, 将溶液与玉米油按质量比 4:1 混合, 采用 APV 均质机在 30MPa 下均质制成乳状液。

1.2.4 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 参考 Laemmli 方法^[2]。分离胶浓度为 12%, 浓缩胶浓度为 5%, 电泳进样前, 将已和样品缓冲液混合的样品煮沸 5min, 并离心 5min, 上样量为 10μL, 凝胶电泳于恒流下进行, 在浓缩胶中电流为 40mA, 进入分离胶后增至 80mA, 然后取胶用考马斯亮蓝 R250 染色, 甲醇和醋酸混合液脱色。

1.2.5 游离巯基含量的测定 参照 Beveridge 等人^[3]的 Ellman 试剂分析方法。加 4mg DTNB 试剂于 1mL 的 Tris-甘氨酸缓冲液(0.086mol/L Tris, 0.09mol/L 甘氨酸, 4mmol/L EDTA, pH8.0) 中, 配成 Ellman 试剂。分别称取 15mg 样品溶于 5mL 的 Tris-甘氨酸-8mol/L 尿素缓冲液中, 漩涡震荡, 加入 50μL Ellman 试剂, 将悬浮液置于室温下保温 1h, 以未加蛋白混合液为空白, 测定 412nm 处吸光值(A₄₁₂), 游离巯基含量(μmol/g) = 73.53 × A₄₁₂/C, 式中: 73.53 = 106/(1.36 × 10⁴), 1.36 × 10⁴ 为摩尔消光系数, C 为样品的蛋白质浓度, mg/mL。

1.2.6 表面疏水性的测定 采用 ANS(1-苯胺基-8-萘磺酸) 荧光探针法^[4], 用 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH7.0) 配制不同浓度的样品蛋白溶液(0.005%~0.2%) 和 8mmol/L 的 ANS 溶液。取 20μL ANS 溶液加到 4mL 蛋白溶液中, 混合均匀, 迅速测定混合液的荧光强度, 激发波长和发射波长分别为 390nm 和 470nm, 以荧光强度对蛋白质浓度作图, 直线斜率即为蛋白质样品的表面疏水性(H₀)。

1.2.7 溶解性的测定 将 1% (w/w) 的蛋白质溶液调节到 pH3.0~10.0, 然后离心 20min(8000 × g), 上清液中的蛋白质采用 Lowry 法^[5]测定, 利用牛血清蛋白(BSA) 做标准曲线, 测定 500nm 处的吸光值。根据样品中蛋白质含量和溶液中蛋白质含量来计算溶解度。

1.2.8 粒度分布的测定 乳状液样品按质量比 1:1000 用去离子水稀释, 采用粒度分布仪测定乳状液中粒子大小及其分布, 根据相关参考文献设置操作参数^[6-7], 表面积平均粒径 d₃₂ 的计算公式为: d₃₂ = Σn_id_i³ / Σn_id_i², 式中: n_i 是直径为 d_i 的脂肪球的数量。

1.2.9 乳析率测定 向制备好的乳状液中添加 2% (w/v) 的叠氮钠溶液, 使叠氮钠在乳状液中最终浓度达 0.02% (w/v), 以抑制乳状液中的微生物生长, 然后准确吸取 10mL 置于具塞刻度试管中, 常温加盖密

封静置, 第 20d 记录乳析层的高度。乳析率即为乳析层的高度与乳状液高度的比值。

2 结果与讨论

2.1 SDS-PAGE 分析

花生分离蛋白(PPI) 经 TGase 交联不同时间后, 其 SDS-PAGE 如图 1 所示。从图 1 中可以看出, 与原始 PPI 样品(参见泳道 1) 相比, 随着交联时间的增加, PPI 原有亚基条带逐渐消退, 而分子量大于 66.2kDa 的新亚基条带逐渐生成, 当 TGase 催化时间高于 90min 时, 由于部分生成的聚合物分子量较大, 已经难以进入浓缩胶, 从而在其顶部形成颜色较深的条带。由此现象可知, 在 240min 内的催化时间里, PPI 的亚基在 TGase 催化作用下较易发生分子间的交联而形成高分子量的聚合物, 其交联程度随着催化时间的延长而上升, 同时也表明 PPI 是 TGase 较为良好的作用底物。

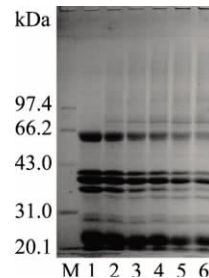


图 1 PPI 交联产物的 SDS-PAGE 图谱

注: M 为蛋白质分子质量标记物, 泳道 1、2、3、4、5、6 分别为 PPI 经 TGase 催化 0、30、60、90、120、240min。

2.2 游离巯基含量与表面疏水性的变化

PPI 经 TGase 交联后其游离巯基含量的变化见图 2。从图 2 中可以看出, 游离巯基含量随催化时间的增加而减少, 当 PPI 交联 240min 后, 其游离巯基含量已由原始样中的 4.12μmol/g 蛋白降至 3.19μmol/g 蛋白。游离巯基含量的下降可归结为巯基经氧化作用后生成二硫键所致, 这可能是由于 PPI 经 TGase 催化交联后其蛋白结构被展开, 原先包裹于分子内部的巯基被暴露出来, 从而易于氧化并生成二硫键, 导致其含量下降。

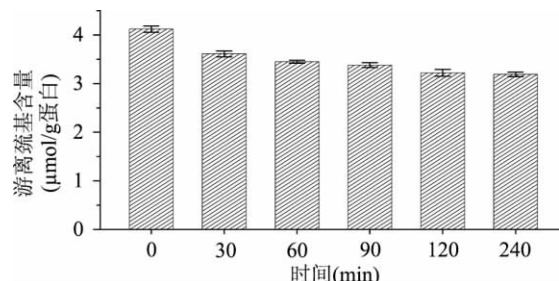


图 2 TGase 交联对 PPI 游离巯基含量的影响

从图 3 表面疏水性的变化来看, PPI 经过 TGase 不同时间的交联改性后, 其表面疏水性均比未改性样品高, 表明 TGase 催化交联后, PPI 暴露出更多的疏水性基团, 而这些基团原本是包埋于分子内部的, 从而进一步佐证了 TGase 可促使 PPI 结构的展开。从表面疏水性随催化时间延长的变化趋势来看, 在

催化前期其表面疏水性增加较快,90min 时其表面疏水性达到最高,随后呈下降趋势,这可能是由于随着 PPI 交联程度的增加,其蛋白结构不断被展开,当过多的疏水性基团被暴露时会导致重聚集现象的发生,从而使表面疏水性有所降低。

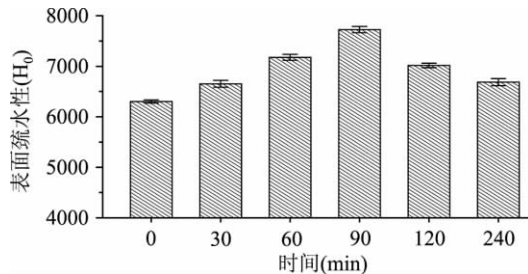


图3 TGase 交联对 PPI 表面疏水性的影响

2.3 溶解性的变化

蛋白质的溶解性是蛋白质水化作用的重要体现。PPI 经过 TGase 交联处理后其溶解性变化见图 4。由图 4 可知,PPI 及其交联样品在 pH4.0~6.0 范围内其溶解性最低,高于或低于此范围溶解性均有不同程度的增加。与 PPI 原始样相比,交联后的样品随着交联程度的上升其在 pH3.0~10.0 的溶解性逐渐降低,高分子不溶聚合物的生成以及蛋白结构的变化可能是导致溶解性下降的主要原因。除花生蛋白外,TGase 交联处理同样会导致燕麦、芸豆等植物蛋白溶解性的下降^[8-9],而 Babiker 等研究发现交联后的大豆蛋白在 pH2.0 和 pH8.0~12.0 范围内其溶解性会有所增加^[10]。这种结果上的差异可能是由于不同底物蛋白在其组成与结构上有所不同而导致的。

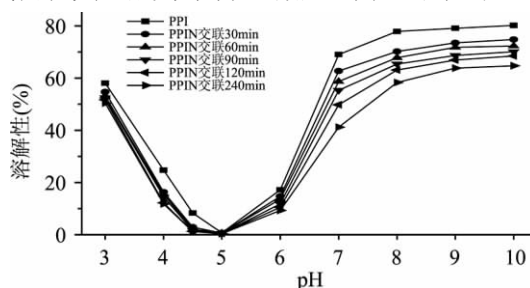


图4 TGase 交联对 PPI 溶解性的影响

2.4 乳状液粒度分布、粒径及乳析率的变化

蛋白质的乳化特性可以从其制备的乳状液的粒度分布、表面积平均粒径、乳析率来进行综合评价。PPI 交联前后其乳状液粒度分布的变化见图 5。从图 5 中可以看出,交联时间在 90min 以内,乳液粒度分布均呈单峰分布,虽然交联时间的增加会导致其峰形向大粒径方向偏移,但其绝大部分乳液颗粒直径均小于 10 μ m,但当交联时间增加到 120min 和 240min 后,乳液粒度分布呈双峰分布,且大粒径乳液颗粒(大于 10 μ m)所占体积分别约增大 14% 和 32%。从图 6 所示的表面积平均粒径的数据来看,也很好反映了这一变化趋势。表面积平均粒径(d_{32})的大小可表征样品的乳化活性,一般 d_{32} 较小,其乳化活性较好^[11-12]。从图 6 中可知,随着样品交联时间的延长, d_{32} 呈现逐步增大的趋势,这可能是由于交联后的蛋白的溶解性的下降导致其在制备乳液的

均质过程中无法迅速迁移到油水界面,而高的界面蛋白浓度对形成小粒径颗粒至关重要^[13],从而导致乳液颗粒增大,乳化活性降低。

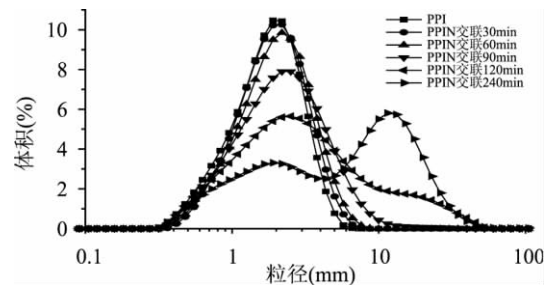


图5 TGase 交联对 PPI 乳状液粒度分布的影响

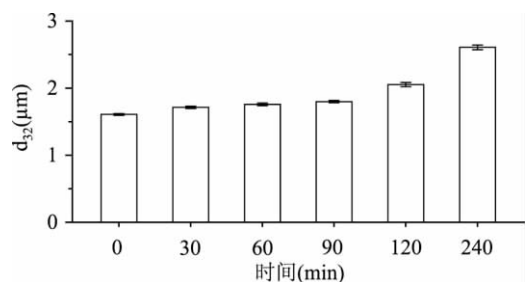


图6 TGase 交联对 PPI 乳状液表面积平均粒径(d_{32})的影响

样品交联前后乳析率的变化见图 7。乳析率是反映乳状液稳定性的重要指标,从图 7 中可知,当 PPI 交联时间从 0min 增至 90min 时,样品的乳析率逐渐降低,从而表明其乳状液的稳定性在逐步提高,这可能是由于交联后的蛋白其结构得到展开,暴露出更多的疏水性基团,有利于蛋白吸附在油脂颗粒表面形成蛋白膜;另外,蛋白分子交联后产生了支链结构,分子量增加,吸附后可增加界面膜的厚度及抗形变能力,使其覆盖后的油滴颗粒不易相互碰撞而聚结^[14-15]。当 PPI 交联时间增至 120min 以上时,其乳状液的乳析率反而升高,这可能是由于随着交联程度的进一步增加,蛋白的溶解性和表面疏水性急剧下降从而导致乳化稳定性的降低。由此可知,适度交联有利于 PPI 乳化稳定性的提高。

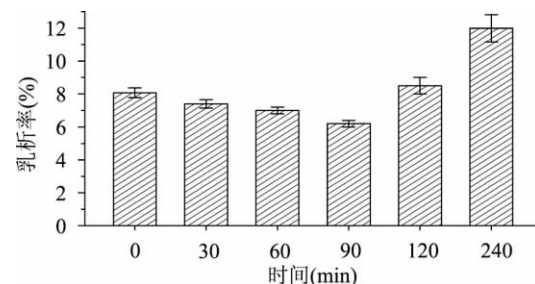


图7 TGase 交联对 PPI 乳状液乳析率的影响

3 结论

通过研究发现,TGase 可促使 PPI 亚基发生分子间交联而生成高分子量聚合物,交联后 PPI 的游离巯基含量降低,内部疏水基团暴露,表面疏水性增加,其蛋白结构在 TGase 作用下被展开。功能特性方面,随着交联时间的递增(0~240min),PPI 在 pH3.0~10.0 的溶解性逐渐降低,其制备的乳状液表面积平均粒径(d_{32})趋于增大,从而表明其乳化活性在 TGase 作用后减小,但限制性交联(37 $^{\circ}$ C 下交联

90min) 可明显提高 PPI 乳状液的稳定性, 过度交联反而会导致乳化稳定性的下降。

参考文献

[1] Zhu Y, Rinzema A, Tramper J, et al. Microbial transglutaminase—a review of its production and application in food processing [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995, 44(3-4): 277-282.

[2] Laemmle U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685.

[3] Beveridge T, Toma S J, Nakai S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent [J]. Journal of Food Science, 1974, 39: 49-51.

[4] Voutsinas L P, Cheung E, Nakai S. Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins [J]. Food Science, 1983, 48: 26-32.

[5] Lowry O H, Rosebroug H J, Lewis A, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 19: 265-275.

[6] Chen J S, Dickinson E. Protein/surfactant interfacial interactions Part1. Flocculation of emulsions containing mixed protein surfactant [J]. Colloids and Surfaces A, 1995, 100: 255-265.

[7] Schokker E P, Dalgeish D G. The shear-induced destabilization of oil-in-water emulsions using caseinate as emulsifier [J]. Colloids and Surfaces A, 1998, 145: 51-69.

[8] Siu N C, Ma C Y, Mock W Y, et al. Functional properties of

oat globulin modified by a calcium-independent microbial transglutaminase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 2666-2672.

[9] Tang C H, Sun X, Yin S W, et al. Transglutaminase-induced cross-linking of vicilin-rich kidney protein isolate: Influence on the functional properties and in vitro digestibility [J]. Food Research International, 2008, 41: 941-947.

[10] Babiker E E. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin-digested soy proteins [J]. Food Chemistry, 2000, 70: 139-145.

[11] Krause J P, Dude S, Schwenke K D. Changes in interfacial behaviour, emulsifying and foaming properties of faba bean leguminous after modification with dimethylsuberimidate [J]. Nahrung, 2000, 44: 403-406.

[12] Poon S, Clarke A E, Schultz C J. Effect of denaturants on the emulsifying activity of proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 281-286.

[13] Tomas A, Paquet D, Courthaudon J L. Effect of fat and protein contents on droplet size and surface protein coverage in dairy emulsions [J]. Journal of Dairy Science, 1994, 77(2): 413-417.

[14] Aluko R E, Yada R Y. Effect of a microbial calcium-independent transglutaminase on functional properties of a partially purified cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79: 286-290.

[15] Nonaka M, Toiguchi S, Sakamoto H, et al. Changes caused by microbial transglutaminase on physical properties of thermally induced soy protein gels [J]. Food Hydrocolloids, 1994(8): 1-8.

(上接第 227 页)

对正交实验结果进行方差分析(表 5)可知, 因素 A(装液量)对真姬菇菌丝体富锌的影响具有显著性。

表 5 正交实验结果方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	11.822	2	3.512	3.110	*
B	1.512	2	0.449	3.110	
C	0.022	2	0.007	3.110	
D	0.107	2	0.032	3.110	
误差	13.46	8			

3 结论

通过液体发酵技术对真姬菇菌丝体进行富锌, 结果表明: 真姬菇菌丝体具有较强的耐锌能力和富锌能力, 在 300~700mg/L 的锌浓度范围内都可以生长。菌丝体对锌的最适富集浓度为 400mg/L, 并且对富集的锌有机化程度较高, 最大富锌率可达 7.98%, 该组的有机锌的富集率为 4.90%。

本文采用 ZnSO₄ 作为真姬菇富锌的锌源, 不同的锌源对食用菌菌丝体富锌会产生不同的影响。根据黄仁术等人的研究结果液体培养金针菇富锌 Zn(CH₃COO)₂ 作为锌源要比 ZnSO₄、ZnCl₂ 利用率高。因为 Zn(CH₃COO)₂ 是弱酸弱碱盐, 它可以使菌丝与锌在适宜的、稳定的环境中络合和生长^[10]。培养基中的无机锌是通过与菌丝体中的蛋白质、多糖等大

分子结合而形成有机锌的。

参考文献

[1] 张俊刚. 真姬菇功能食品抗疲劳研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(19): 8141-8142.

[2] 李娟, 王臻, 姚良同, 等. 真姬菇多糖研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2005, 25(4): 89-91.

[3] 邓超, 邬敏辰. 食用菌深层发酵及其多糖活性研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(15): 4622-4625.

[4] 秦义. 富锌灵芝液体种子培养条件的优化 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(1): 153-156.

[5] 张红兵. 富锌灵芝枇杷保健冰激凌的研制 [J]. 冷饮与速冻食品工业, 2006, 12(2): 13-18.

[6] 刘坤, 沈卫, 章克昌. 姬松茸深层发酵富集锌的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(4): 84-86.

[7] 邓百万, 陈文强. 猪苓菌丝液体培养及富锌研究 [J]. 中国食用菌, 2002(22): 33-34.

[8] 张琪林, 王红. 大球盖菇液体培养富锌特性研究 [J]. 农业与技术, 2007, 27(5): 58-59.

[9] 无锡轻工业大学, 天津轻工业学院. 食品分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 313-318.

[10] 黄仁术. 液体培养富锌金针菇锌源与锌添加量的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(12): 48-51.