

油料蛋白

响应面法优化大豆分离蛋白复合酶法糖基化交联改性工艺研究

余留印^{1,2}, 乔明武^{1,2}, 李向力³, 赵秋艳^{1,2}, 黄现青^{1,2}, 宋莲军^{1,2}

(1. 河南农业大学 食品科学技术学院, 郑州 450002; 2. 郑州市大豆深加工重点实验室, 郑州 450002;

3. 河南省商业科学研究所有限责任公司, 郑州 450002)

摘要:大豆分离蛋白(SPI)用木瓜蛋白酶适度水解再与氨基葡萄糖在转谷氨酰胺酶的作用下进行糖基化交联改性,制备高乳化性能 SPI。在单因素实验基础上以氨基葡萄糖与 SPI 质量比、SPI 水解度和交联反应时间为自变量,以乳化活性为响应值,利用响应面法对 SPI 糖基化改性条件进行优化。结果表明:最佳反应条件为氨基葡萄糖与 SPI 质量比 0.96:1、SPI 水解度 0.64%、交联反应时间 3.29 h。在最佳反应条件下,改性 SPI 乳化活性为 16.97 m²/g,是未改性 SPI 乳化活性的 3.25 倍,乳化稳定性提高了 35 个百分点,达到 96%。

关键词:大豆分离蛋白;氨基葡萄糖;改性;乳化性

中图分类号:TS201.2;TQ936.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)04-0028-05

Optimization of compound enzymatic glycosylation of soybean protein isolate by response surface methodology

YU Liuyin^{1,2}, QIAO Mingwu^{1,2}, LI Xiangli³, ZHAO Qiuyan^{1,2}, HUANG Xianqing^{1,2}, SONG Lianjun^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Zhengzhou City Key Laboratory for Soybean Refined Processing, Zhengzhou 450002, China;

3. Institute of Commercial Sciences Co., Ltd. of Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Soybean protein isolate (SPI) was hydrolyzed partially by papain, then it was glycosylated with glucosamine by transglutaminase to prepare high emulsifying ability SPI. With mass ratio of glucosamine to SPI, SPI hydrolysis degree and reaction time as independent variables, and emulsifying activity (EAI) as response value, the glycosylation conditions were optimized by response surface methodology based on single factor experiment. The results showed that the optimal glycosylation conditions were obtained as follows: mass ratio of glucosamine to SPI 0.96:1, SPI hydrolysis degree 0.64% and reaction time 3.29 h. Under the optimal conditions, EAI of the glycosylated SPI was 16.97 m²/g, which was 3.25 times higher than that of SPI before glycosylation, and the emulsion stability was up to 96%, increasing by 35 percentage points.

Key words: soybean protein isolate; glucosamine; modification; emulsibility

大豆分离蛋白因其价格低廉、营养价值高,被广

泛应用于食品加工行业^[1]。但大豆分离蛋白功能特性相对较差,对加工条件(高温、pH等)敏感,很大程度限制了其在诸多食品体系的应用,因此需要对大豆分离蛋白进行改性^[1-2]。目前改性的方法有物理改性、化学改性以及酶法改性,其中酶法改性具有催化反应条件温和而且专一、无副产物等优点,已成为大豆分离蛋白改性的主要研究方向,是具有广

收稿日期:2017-08-07

基金项目:河南省产学研合作计划项目(172107000024)

作者简介:余留印(1994),男,硕士研究生,研究方向为食品科学与工程(E-mail)15093557265@163.com。

通信作者:宋莲军,教授,硕士生导师(E-mail)slj69@126.com。

泛前景的大豆蛋白改性方法^[3]。

大豆蛋白的酶法糖基化修饰主要是通过转谷氨酰胺酶(TG)途径,通过TG酶将具有伯胺性质的糖连接到大豆分离蛋白,能够有效地提高其溶解性、乳化性、凝胶性、热稳定性、流变性等功能特性^[4-6]。大豆蛋白在天然状态下呈现出紧密的球状结构,反应基团深埋在蛋白分子内部,不利于糖基化交联的进行。故先使用蛋白酶处理能够有效改善大豆蛋白的结构状态,从而达到改善蛋白质功能特性的目的^[7-9]。Babiker等^[10-11]研究发现,大豆蛋白酶解物经TG交联后,不仅增加了蛋白质的溶解性,还显著提高了其乳化性和起泡性。Walsh等^[12]利用碱性蛋白酶对大豆蛋白进行限制性水解,再经TG交联,产物溶解度显著提高。Zhang等^[13-16]在大豆蛋白酶解-糖基化接枝复合物制备的研究中发现,水解度为2.24%时,糖基化产物具有良好的乳化性、乳化稳定性和抗脂质氧化性,并将其应用于鱼油微胶囊的制备。

本实验使用木瓜蛋白酶对大豆分离蛋白进行适度水解,将其与具有伯胺性质的氨基葡萄糖在TG酶的作用下进行糖基化交联修饰。研究氨基葡萄糖与大豆分离蛋白质量比、SPI的水解度、交联反应时间对大豆分离蛋白乳化活性和乳化稳定性的影响,并采用响应面优化法确定最佳工艺参数,为SPI进一步的研究应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

大豆分离蛋白(蛋白质含量92.92%),华丰试剂公司;福临门一级大豆油;氨基葡萄糖(≥99%),阿拉丁试剂;木瓜蛋白酶(≥200 000 U/g),博美生物科技有限责任公司;转谷氨酰胺酶(≥1 500 U/g),博美生物科技有限责任公司;透析袋,索莱宝科技有限公司;氢氧化钠、浓盐酸、十二烷基硫酸钠(SDS)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

UV-2000紫外可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司;JB-1A磁力搅拌器;FA2104A分析天平;PHS-3C pH测定仪,上海理达仪器厂;仪表恒温水浴锅;THZ-C台式恒温振荡器;LCJ-10D冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂有限公司;T18型高速分散器,德国IKA公司;涡旋振荡器,江苏金仪仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆分离蛋白酶解物制备

参考徐莹等^[17]的实验方法,有所改动。将大豆分离蛋白(SPI)溶于蒸馏水中搅拌充分溶解,制备50 g/L的SPI溶液,在45℃下预热30 min,调节pH为7.0。加入适量木瓜蛋白酶,通过加入0.1 mol/L的NaOH溶液稳定酶解过程pH为7.0,记录NaOH溶液的消耗量。酶解结束90℃水浴加热10 min灭酶,冷却至室温备用。采用pH-Stat法计算产物水解度(DH)。

$$DH = \frac{CV}{\alpha M_p h_{tot}} \times 100\%$$

式中:C为NaOH溶液浓度,mol/L;V为水解过程中消耗NaOH溶液的体积,mL; α 为氨基解离度; M_p 为底物蛋白质质量,g; h_{tot} 为蛋白质中总的可被水解的肽键数。

1.2.2 SPI酶解物糖基化产物的制备

在SPI酶解物溶液中加入适量的氨基葡萄糖,在37℃、TG酶添加量15 U/g、pH 7.5的条件下振荡反应,反应结束后85℃水浴加热灭酶5 min^[4]。冷却至室温后,将上述溶液装入透析袋,在4℃条件下透析过夜,除去未反应的氨基葡萄糖,冷冻干燥备用。

1.2.3 SPI酶解糖基化产物的乳化性能测定

参照Pearce等^[18]的方法进行改进。取15 mL 0.1%的糖基化产物溶液(待测产物溶于0.2 mol/L pH 7.0的磷酸缓冲液中)于离心管中,加入5 mL大豆油,在10 000 r/min下高速均质1 min,立即从离心管底部取乳化液50 μ L,加入到5 mL 0.1%的SDS溶液,涡旋混匀后于500 nm处测定吸光值 A_0 ,以SDS溶液作为空白。放置10 min后再次取样测定吸光值 A_{10} 。乳化活性(EAI)及乳化稳定性(ESI)分别按下式计算:

$$EAI = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{\alpha LC \times 10^4}$$

$$ESI = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100\%$$

式中: α 为乳化液中油相的比例;L为比色杯光径;C为蛋白质的初始质量浓度;N为稀释倍数。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 氨基葡萄糖与SPI质量比对糖基化产物乳化性能的影响

在100 mL、50 g/L、水解度0.5%的SPI酶解物溶液中加入与SPI质量比分别为0.5:1、0.75:1、1.0:1、1.25:1的氨基葡萄糖,在37℃、TG酶添加量15 U/g、pH 7.5的条件下振荡反应3 h,制备糖基化产

物,测定其 *EAI* 和 *ESI*。考察氨基葡萄糖与 SPI 质量比对糖基化产物乳化性能的影响,结果见图 1。

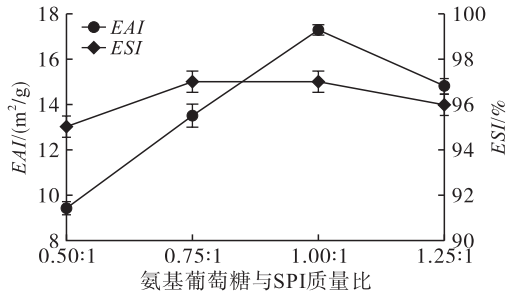


图1 氨基葡萄糖与SPI质量比对 *EAI* 和 *ESI* 的影响

由图1可以看出,随着氨基葡萄糖与SPI质量比不断加大,SPI的乳化活性先增加后减少。这是因为随着糖基导入量的增加,使SPI的溶解度增加同时暴露更多的疏水性基团,从而使乳化活性提高;但过量的糖分子基团会影响SPI在油水界面的吸收及内部的展开复位,降低乳化活性^[19];随着糖基的引入和蛋白质结构的改善,SPI的乳化稳定性得到提高,且数据之间变化不显著。

2.1.2 SPI水解度对糖基化产物乳化性能的影响

在100 mL、50 g/L、水解度分别为0、0.5%、1.0%、1.5%的SPI酶解物溶液中加入与SPI质量相同的氨基葡萄糖,在37℃、TG酶添加量15 U/g、pH 7.5的条件下振荡反应3 h,制备糖基化产物,测定其 *EAI* 和 *ESI*。考察SPI水解度对糖基化产物乳化性能的影响,结果见图2。

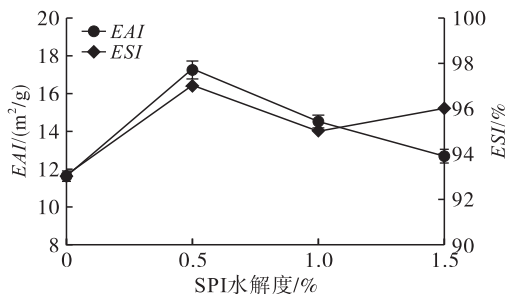


图2 SPI水解度对 *EAI* 和 *ESI* 的影响

由图2可以看出,随着SPI水解度的增加,SPI的乳化活性先增加后减小。这是因为适当的酶解打开了SPI的球状结构,暴露出疏水性基团和糖基化位点,从而使乳化活性提高。但过度的水解会使糖基化产物的极性电荷数量和亲水性增加,吸附油滴能力下降,降低了乳化能力;随着SPI水解度的增加,SPI的乳化稳定性得到提高,且数据之间变化不显著。

2.1.3 交联反应时间对糖基化产物乳化性能的影响

在100 mL、50 g/L、水解度0.5%的SPI酶解物溶液中加入与SPI质量相同的氨基葡萄糖,在

37℃、TG酶添加量15 U/g、pH 7.5的条件下振荡反应1、2、3、4 h,制备糖基化产物,测定其 *EAI* 和 *ESI*。考察交联反应时间对糖基化产物乳化性能的影响,结果见图3。

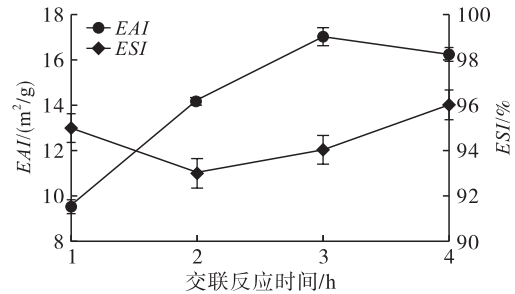


图3 交联反应时间对 *EAI* 和 *ESI* 的影响

由图3可以看出,随着交联反应时间的延长,SPI的乳化活性先增加后减小。这是因为交联反应时间越长,导入的糖基数量就越多同时暴露更多的疏水性基团,从而使乳化活性提高。但交联反应时间过长会使过量的糖分子基团影响SPI在油水界面的吸收及内部的展开复位,同时过度交联会聚合生成大分子基团,从而影响乳化能力;随着反应时间的延长,乳化稳定性先减小后增大,数据之间变化不大。

2.2 响应面优化实验

由单因素实验结果可以看出,单因素因素水平变化对乳化活性影响显著,对乳化稳定性影响不大,故确定氨基葡萄糖与SPI质量比(*A*)、SPI水解度(*B*)、交联反应时间(*C*)为考察因素,以乳化活性(*EAI*)为响应值,依照Box-Behnken中心组合实验设计原理^[20-21],采用三因素三水平响应面进行实验。每组实验重复3次,取平均值为实验结果。响应面实验因素水平见表1,响应面实验方案设计及结果见表2,回归模型方差分析见表3。

表1 响应面实验因素水平

| 水平 | <i>A</i> | <i>B</i> /% | <i>C</i> /h |
|----|----------|-------------|-------------|
| -1 | 0.75:1 | 0 | 2 |
| 0 | 1.00:1 | 0.5 | 3 |
| 1 | 1.25:1 | 1.0 | 4 |

表2 响应面实验方案设计及结果

| 实验号 | <i>A</i> | <i>B</i> | <i>C</i> | <i>EAI</i> /(m ² /g) |
|-----|----------|----------|----------|---------------------------------|
| 1 | -1 | 0 | -1 | 11.67 |
| 2 | 0 | -1 | 1 | 5.97 |
| 3 | 1 | 0 | -1 | 11.24 |
| 4 | 1 | -1 | 0 | 7.42 |
| 5 | -1 | 1 | 0 | 13.10 |
| 6 | -1 | 0 | 1 | 14.25 |
| 7 | -1 | -1 | 0 | 8.01 |

续表 2

| 实验号 | A | B | C | EAI/(m ² /g) |
|-----|---|----|----|-------------------------|
| 8 | 0 | 0 | 0 | 16.50 |
| 9 | 0 | 1 | 1 | 13.51 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 16.45 |
| 11 | 1 | 1 | 0 | 12.47 |
| 12 | 0 | 1 | -1 | 8.11 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 16.53 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 16.50 |
| 15 | 1 | 0 | 1 | 13.47 |
| 16 | 0 | -1 | -1 | 6.29 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 16.52 |

表 3 回归模型方差分析

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F | P |
|----------------|--------|-----|--------|----------|-----------|
| 模型 | 232.84 | 7 | 33.26 | 2 843.50 | <0.001 ** |
| A | 0.68 | 1 | 0.68 | 58.01 | <0.001 ** |
| B | 47.14 | 1 | 47.14 | 4 030.00 | <0.001 ** |
| C | 12.23 | 1 | 12.23 | 1 045.20 | <0.001 ** |
| A ² | 4.60 | 1 | 4.60 | 392.88 | <0.001 ** |
| B ² | 115.27 | 1 | 115.27 | 9 853.94 | <0.001 ** |
| C ² | 33.00 | 1 | 33.00 | 2 821.44 | <0.001 ** |
| BC | 8.18 | 1 | 8.18 | 699.24 | <0.001 ** |
| 残差 | 0.11 | 9 | 0.01 | | |
| 失拟项 | 0.10 | 5 | 0.02 | 1.42 | 0.452 |
| 误差 | 0.003 | 4 | 0.001 | | |
| 总残差 | 232.94 | 16 | | | |

注: ** 为极显著, $P < 0.01$; * 为显著, $P < 0.05$ 。

以回归系数建立乳化活性(EAI)与氨基葡萄糖与SPI质量比(A)、SPI水解度(B)、交联反应时间(C)的响应面回归方程为: $EAI = -31.325 + 32.267A + 17.204B + 16.605C - 16.716A^2 - 20.929B^2 - 2.800C^2 + 2.860BC$ 。

由表3可知,回归模型极显著($P < 0.01$),同时模型失拟项不显著($P > 0.05$),无失拟因素存在。相关系数 $R^2 = 0.995$, $R^2_{Adj} = 0.992$,说明该模型拟合程度较好,模型预测值与实际值吻合。在实验水平范围内,氨基葡萄糖与SPI质量比、SPI水解度、交联反应时间均是影响极显著的因素,影响大小顺序依次为 $B > C > A$,即SPI水解度 > 交联反应时间 > 氨基葡萄糖与SPI质量比。

根据所建立的数学模型得最优工艺条件为氨基葡萄糖与SPI质量比0.96:1、SPI水解度0.64%、交联反应时间3.29 h,在此条件下EAI的预测值为17.03 m²/g,实际得到的EAI为16.97 m²/g。预测值与实验值拟合良好。

对改性前后SPI的EAI和ESI进行比较,结果见表4。

表 4 改性前后SPI的EAI和ESI比较

| 样品 | EAI/(m ² /g) | ESI/% |
|--------|-------------------------|-----------|
| 未改性SPI | 5.22 ± 0.21 | 61 ± 1.51 |
| 改性SPI | 16.97 ± 0.33 | 96 ± 2.43 |

由表4可以看出,未改性SPI的EAI为5.22 m²/g,通过复合酶法糖基化得到的改性SPI的EAI为16.97 m²/g,是未改性SPI的3.25倍,同时ESI提高了35个百分点,达到96%,EAI和ESI显著提高。

3 结论

利用复合酶法糖基化对SPI进行改性,以乳化活性(EAI)为响应值,通过响应面法优化所得的最佳工艺条件为氨基葡萄糖与SPI质量比0.96:1、SPI水解度0.64%、反应时间3.29 h,在此条件下EAI为16.97 m²/g。未改性的SPI的EAI为5.22 m²/g,乳化稳定性(ESI)为61%,改性后其EAI是改性前的3.25倍,ESI提高了35个百分点,达到96%,EAI和ESI得到显著提高。

参考文献:

- [1] 穆利霞. 大豆蛋白-糖接枝改性及其结构与功能特性研究[D]. 广州:华南理工大学,2010.
- [2] 张亚婷,张晓明. 复合改性改善大豆分离蛋白功能性质的研究[J]. 食品与生物技术学报,2015,33(10):1031-1037.
- [3] 关天琪,刘颖,窦博鑫. 响应面优化转谷氨酰胺酶改善大豆分离蛋白酶解液乳化稳定性的研究[J]. 食品工业科技,2015,36(10):192-197.
- [4] JIANG S J, ZHAO X H. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation in soybean protein isolates and its impacts on some functional properties of the products[J]. Eur Food Res Technol, 2010, 231(5): 679-689.
- [5] JIANG S J, ZHAO X H. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation of casein and some functional properties of the modified product[J]. Int Dairy J, 2011,21(4):198-205.
- [6] JIANG S J, ZHAO X H. Cross-linking and glucosamine conjugation of casein by transglutaminase and the emulsifying property and digestibility in vitro of the modified product[J]. Int J Food Prop, 2012,15(6):1286-1299.
- [7] KURISHI C, YAMAZAKI K, SUSU Y, et al. Transglutaminase: its utilization in the protein food industry[J]. Food Rev Int, 2001,17(2):221-246.
- [8] LORENZEN P C, SCHLIMME E. Properties and potential fields of application of TG preparations in dairying[J]. Bul-

- letin IDF, 1998, 332:47 - 53.
- [9] SHARMA R, LORENZEN P C, QVIST K B. Influence of transglutaminase treatment of skim milk on the formation of epsilon - (*gamma* - glutamyl) lysine and the susceptibility of individual proteins towards cross linking [J]. *Int Dairy J*, 2001, 10(11):785 - 793.
- [10] BABIKER E E. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrypsin - digested soy protein [J]. *Food Chem*, 2000, 70 (2): 139 - 145.
- [11] BABIKER E E, FUJISAWA N, MATSUDOMI N, et al. Improvement in the functional properties of gluten by protease digestion or acid hydrolysis followed by microbial transglutaminase treatment[J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 12(44):3746 - 3750.
- [12] WALSH D J, CLEARY D, MCCARTHY E, et al. Modification of the nitrogen solubility properties of soy protein isolate following proteolysis and transglutaminase cross - linking[J]. *Food Res Int*, 2003, 36(7):677 - 683.
- [13] ZHANG Y T, TAN C, ZHANG X M, et al. Effects of maltodextrin glycosylation following limited enzymatic hydrolysis on the functional and conformational properties of soybean protein isolate [J]. *Eur Food Res Technol*, 2014, 238(6): 957 - 968.
- [14] ZHANG Y T, TAN C, KARANGWA E, et al. Combined modified SPI improves the emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules[J]. *Food Hydrocoll*, 2015, 51:108 - 117.
- [15] ZHANG Y T, TAN C, KARANGWA E, et al. Effect of limited enzymatic hydrolysis on physico - chemical properties of soybean protein isolate - maltodextrin conjugates [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2015, 50(1): 226 - 232.
- [16] ZHANG Y T, TAN C, SHABBAR A, et al. The effect of soy protein structural modification on emulsion properties and oxidative stability of fish oil microcapsules [J]. *Colloid Surf B: Biointerf*, 2014, 120: 63 - 70.
- [17] 徐莹, 陈海英, 周星, 等. 转谷氨酰胺酶交联木瓜蛋白酶水解产物改善大豆分离蛋白乳化特性的研究[J]. *食品工业科技*, 2013, 34(6):113 - 117.
- [18] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of protein: evaluation of a turbidimetric technique [J]. *J Agric Food Chem*, 1978, 26(3):716 - 723.
- [19] 夏秀芳, 洪岩, 郑环宇, 等. 湿法糖基化改性对大豆分离蛋白溶解性和乳化能力的影响[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(1):167 - 172.
- [20] 王淑霞, 李爱梅, 张俊杰. 响应面分析法优化龙眼核中多酚物质提取工艺[J]. *食品科学*, 2011(10): 35 - 39.
- [21] SATOH S, APINES M J, TSUKIOKA T, et al. Bioavailability of amino acid - chelate and glass - embedded manganese to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), fingerlings [J]. *Aquac Res*, 2001, 32 (1): 18 - 25.

(上接第 27 页)

通过对添加 TG 酶工艺进行优化, 得到最佳添加量为 0.22%, 萃取提取率降低 1.2%, 酸沉损失率降低 13%, 大豆分离蛋白的回收率由 70.2% 提高到 75.3%, 大豆分离蛋白粗蛋白含量可达到 91.3%, 在生产过程中中和黏度增加, 对设备要求有所提高。凝胶硬度提高 25.1%, 弹性提高 12.3%, 咀嚼性提高 41.1%。在大豆分离蛋白生产时使用 TG 酶可以提高大豆的蛋白质利用率。在此过程中回收的大豆分离蛋白的凝胶特性优势明显, 提高了产品品质, 扩大了蛋白质的利用领域, 对节约能源, 提高经济效益有重要意义。

参考文献:

- [1] 时玉强, 鲁绪强, 马军, 等. 湿法粉碎豆粕对大豆分离蛋白生产的影响[J]. *中国油脂*, 2017, 42(5):45 - 47.
- [2] 刘香海, 刘磷. TG 酶性质及在肉类重组产品中的应用 [J]. *中国食品添加剂*, 2012(2):15 - 17.
- [3] 江波, 周红霞. 谷氨酰胺转氨酶对火腿肠凝胶性质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2000(8):1 - 6.
- [4] ZHU Y. Microorganism transglutaminase: a review of its production and application in food processing[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1995, 44(7):277 - 282.
- [5] 郭永, 王雪平, 张春红. 不同改性大豆分离蛋白乳化性比较研究[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(7):26 - 28.
- [6] 郭永, 申森. 谷氨酰转氨酶改性大豆分离蛋白在肉制品加工中的应用研究[J]. *粮油加工*, 2009(3):131 - 133.
- [7] 李萍萍, 刘振. TG 酶对大豆分离蛋白的作用及在肉制品中的应用[J]. *大豆科技*, 2012(5):36 - 38.
- [8] 时玉强, 鲁绪强, 马军, 等. 大豆蛋白在传统豆制品中的应用[J]. *中国油脂*, 2017, 42(3):155 - 157.