

低值鱼蛋白酰化改性与其酶解特性关系的研究

刘通讯, 李媛

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东 广州 510640)

摘要: 本文选用低值鱼蛋白进行酰化改性, 研究其改性程度与酶解特性(酶解物氨态氮得率, TCA 可溶性肽得率及肽分子量分布)间的关系。结果表明: 酰化鱼蛋白导致氨态氮得率下降, 但有利于 TCA 可溶性氮得率的提高。最终得到 60 °C/30 min 热处理后 0.3 g SA/g Pro 改性的鱼蛋白酶解 10 h, TCA 可溶性肽得率最高达 38%。

关键词: 低值鱼; 酰化; 酶解

中图分类号: TS201.2; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0635-03

Acylation of Low-cost Fish Protein and Enzymatic Hydrolysis of its Acylate

LIU Tong-xun, LI Yuan

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

Abstract: Low-cost fish protein was acylated, and then the effect of the acylation degree on the enzymatic hydrolysis of the acylated fish protein, including yield of amino acids and TCA-soluble peptide, and molecular weight distribution of peptide, was studied in this paper. Results showed that acylation significantly reduced the yield of amino acids, but improved the TCA-soluble peptides in the hydrolysates of the fish protein. For the acylation of fish protein, the best pre-incubation temperature and time and the dosage of the acylating reagent SA were 60 °C, 30 min, and 0.3 g/g Pro, respectively, under which the highest yield of TCA soluble peptide reached 38% after hydrolyzing the fish protein for 10 h.

Key words: low-cost fish; acylation; hydrolysis

水溶性、乳化性和乳化稳定性等是食品蛋白质最重要的功能性质, 提高食物蛋白质的功能性质对食品工业有重大意义。改性是人们常用的有效途径, 其中化学改性是目前食品蛋白质化学改性研究的热点。对食品蛋白进行化学改性以及改性对这些蛋白功能性质和结构的影响已有广泛研究。

酰化反应使原蛋白质分子带正电氨基被带负电酸根所取代, 静负电荷增加, 蛋白质等电点向低值移动。同时使蛋白质分子内和分子间原氨基与羧基的引力变为斥力, 导致螺旋结构多肽链趋于伸展状态并使蛋白质分子间作用减弱, 蛋白质一水之间作用力增强, 从而增加蛋白质溶解性、持水性、持油性、乳化性和发泡性等。改性后蛋白质的营养价值也倍受人们关注。有研究表明, 蛋白质琥珀酰化程度提高, 干扰蛋白质利用的生物作用, 不利于动物消化吸收^[1]。Due 等^[2]对油菜蛋白粉进行酰化, 结果发现随着酰化试剂浓度的提高, 其抗营养成分显著下降。Thompson 和 Reyes

^[3]在对热凝固乳清蛋白进行琥珀酰化改性研究中也指出酰化后乳清蛋白的生物学效价略有减低, 且改性后蛋白的安全性问题仍是隐患。

酰化改性引起的蛋白质结构变化及其生物学效价是否改变报导较少且意见不一, 本文对低值鱼蛋白乙酰化、琥珀酸化改性后进行体外酶解, 得出改性程度对酶解特性的影响程度。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 低值鱼

由南海渔民提供, 清洗后冻藏备用, 蛋白质含量 18.04%。

1.1.2 酶制剂

由 NovoNordisk 提供, Alcalase (2.4 AU/g)。

1.2 主要设备

HHS4 型电热恒温水浴锅: 上海浦东跃欣科学仪器厂; 722 可见分光光度计: 上海精密科学仪器有限公司; FA/JA 电子天平: 上海精密科学仪器有限公司; PHS-2C 型酸度计: 上海虹益仪器仪表有限公司;

收稿日期: 2008-03-13

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (031348); 广东省农业重大攻关项目 (A20302); 广东省科技计划项目 (2004A20302003)

KDN-2C 定氮仪：上海纤检仪器有限公司；TDL-5-A 离心机：上海安亭科学仪器产。

1.3 实验方法

1.3.1 低值鱼酶法水解工艺流程

备用鱼→解冻绞碎→添加→倍水进行改性（酰化或磷酸化）→反应完毕将加水量补充至 1.5 倍并调 PH 至 7.0 左右→加内切酶水解（0.012 AU/g protein, 50 °C 水解 10 h）→灭酶→过滤→水解液

1.3.2. 鱼蛋白测定：微量凯氏定氮法^[4]。

1.3.3 游离氨基酸：甲醛滴定法^[4]。

1.3.4 TCA 可溶性氮（TCA-N）^[5]：5 mL 水解液与 5 mL 10% TCA 混合后静置 30 min, 4800 r/min 离心 15 min 得上清液，凯氏定氮法测定上清液中氮含量。

TCA 可溶性肽得率/% = TCA 可溶性氮得率/% - 游离氨基酸得率/%

1.3.5 低值鱼蛋白酰化方法及改性程度测定

(1) 酰化方法：配置一定浓度的鱼蛋白溶液，以 4 mol/L NaOH 调节 pH 使其稳定在 8.0~8.5 之间，室温下加入酰化试剂（琥珀酸酐或己酸酐）进行反应，反应 1 h 后将 pH 调至 7.0 左右并加水至鱼重的 1.5 倍，进行酶解。

(2) 酰化程度测定^[6]：低值鱼蛋白溶液经酰化反应后，于 3000 r/min 离心 15 min, 取上清液 2.0 mL 稀释至 25 mL, 再取 2~2.5 mL 鱼蛋白溶液于 25 mL 比色管，补加蒸馏水至 4 mL, 另加 pH 8.04 的磷酸缓冲液及茚三铜溶液各 1 mL, 混合均匀后水浴加热 15 min, 处理后迅速冷却至室温并加水定容至 25 mL, 静置 15 min 后，以蒸馏水为空白，测定其在 570 nm 处的吸光度。吸光度表示游离氨基酸与茚三铜试剂的反应程度，吸光度越大表示鱼蛋白的酰化程度越低。酰化程度的公式为：

$$\text{酰化程度}(\%) = \frac{\text{鱼蛋白的吸光度} - \text{酰化鱼蛋白的吸光度}}{\text{鱼蛋白的吸光度}} \times 100$$

1.3.6 肽分子量分析

高效凝胶过滤色谱法，分子量标准品：GlobinIII, MW2512; Globin II, MW6214; Globin I, MW8159; Globin I +III, MW10700; Globin I + II, MW14404; Globin, MW16949。

2 实验结果与分析

2.1 低值鱼蛋白酰化改性

低值鱼蛋白含有丰富的 Lys, 还有较多的 His 和 Tyr, 极易与酰化试剂发生反应。由图 1 可知，随着酰化试剂用量的增大，酰化程度不断提高，但酰化程度

并不与酰化试剂用量呈正比，酰化反应总的趋势是先快后慢。同样条件下，鱼蛋白的乙酰化程度高于琥珀酰化，这是因为乙酸酐分子相对于环状琥珀酸酐分子对蛋白质的空间可反应性高，位阻较小。在酰化试剂用量为 0.3 g 酸酐/g 蛋白质时乙酰化和琥珀酰化程度相差最大，分别达到 82.8%和 53.1%。

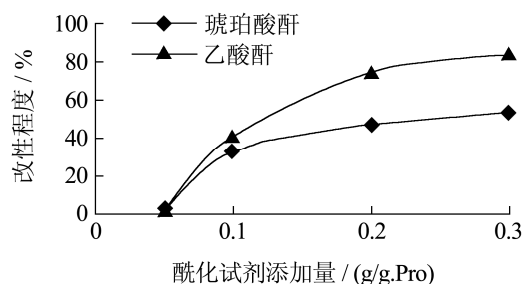


图 1 琥珀酸酐和乙酸酐添加量与鱼蛋白改性程度关系

Fig.1 Effect of the dosages of SA and AA on the acylation of fish protein

2.2 酰化对低值鱼蛋白酶解物氨态氮和 TCA 可溶性氮得率的影响

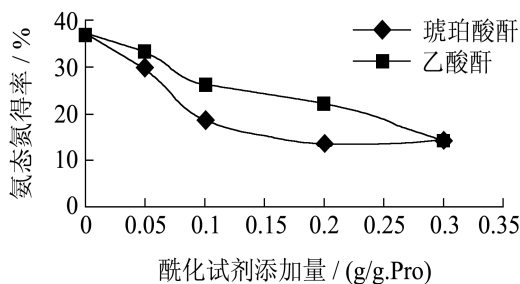


图 2 改性后样品氨态氮得率

Fig.2 Effect of SA dosage on yield of amino acids in the hydrolyzate of the acylated fish protein

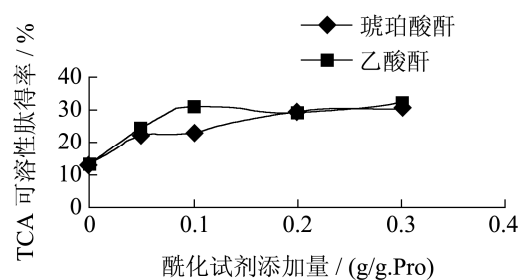


图 3 酰化改性对 TCA 可溶性肽得率的影响

Fig.3 Effect of SA dosage on yield of TCA soluble peptide in the hydrolyzate of the acylated fish protein

由图 2 可知两种改性后鱼蛋白水解 10 h 后，游离氨基酸得率都呈下降趋势。随着两种酰化试剂添加量增加，氨基酸得率逐步降低。当酰化试剂用量为 0.05 g/g Pro 时，酰化蛋白氨基酸得率与对照样相差不大，当用量增加到 0.1 g/g Pro 或以上时，氨基酸得率显著下降。图中显示在相同的试剂用量下，乙酰化鱼蛋白

的氨基酸得率明显低于琥珀酰化鱼蛋白。这是因为乙酸酐位阻较小,更易与蛋白发生反应,酰化程度提高,酶解位阻增大,降低了鱼蛋白的水解程度。此外,酰化过程为保持一定 pH 添加了不同量的 NaOH 溶液,从而增加了鱼蛋白中盐含量,抑制了酶的活性,也降低了水解程度。PK.J.P.D. Wanasundara 等人用胃蛋白酶-胰蛋白酶或胃蛋白酶-胰酶对亚麻蛋白产品进行试管内消化,结果乙酰化和琥珀酰化蛋白的消化率与亚麻蛋白相比分别从 90% 减低至 80% 和 78%^[7]。也有研究表明热凝乳清蛋白浓缩物琥珀酰化改性后水解物中,除赖氨酸略有降低外其它氨基酸组成都未改变,凝胶过滤表明酰化使大量蛋白分子展开^[3]。

图 3 为酰化鱼蛋白水解 10 h 后 TCA 可溶性肽得率。由图可知添加 0.05 g SA (或 AA) /g Pro 时, TCA 可溶性肽得率明显提高,分别比对照样高出 10.68% 和 8.43%,随着添加量增大,两种酰化鱼蛋白水解物 TCA 可溶性肽得率都有上升趋势,且增幅相近。添加 0.3 g 酰化剂/g 蛋白质时,琥珀酰化和乙酰化蛋白 TCA 可溶性肽得率高达 32.13% 和 30.31%。这说明酰化后鱼蛋白酶解位点被掩盖,结构发生变化,氨态氮生成率较少,而 TCA 可溶性肽得率升高,可见酰化蛋白大部分水解成 TCA 可溶性肽。此外酰化过程中为中和碱带来了不同量的盐浓度,这也是酰化蛋白 TCA 可溶性肽得率提高的原因之一。

在前一阶段研究基础上^[8],选用了有利于酶解的热处理温度 60 °C,对鱼蛋白进行改性前的适度变性,研究变性蛋白侧链基团的反应活性。由试验可知 0.3 g SA/g Pro 改性后的鱼蛋白虽然氨基酸得率较低,但小肽含量较多,故进行了热处理后改性的处理,以进一步提高短肽得率。经测定热处理后琥珀酰化程度达 68.9% (没有热处理时为 53.1%)。热处理后鱼蛋白内部基团暴露,参与反应的基团增多,改性程度增大,酶解位阻也随之增加。水解结果显示,与对照样相比,热处理后改性的鱼蛋白氨基酸得率都下降,但 TCA-肽得率有较大幅度提高,达到了 38%。

2.3 酶解物肽分子量分析

对 60 °C, 30 min 变性后, 0.3 g SA/g Pro 改性的鱼蛋白水解物及对照样进行凝胶色谱分析 (见图 4)。与对照样曲线相比,酰化改性样品的出峰时间较早,且在短出峰时间对应的峰面积更大,20 min 后对照样曲线峰形明显高于酰化样品 2,说明改性后样品水解物中肽含量在高分子区域比对照样高,而短肽含量较

少。由表 1 可知 2000~8000 Da 部分由原样的 87.66% 升至 93.97%, 5000~2000 Da 部分由原来的 43.77% 上升到 55.04%, 2000 Da 以下的肽降低了一倍。可见虽然热处理后酰化样品的 TCA 可溶性肽得率升高,但热处理暴露了更多可酰化基团,增加酶解位阻,肽链长度增大。

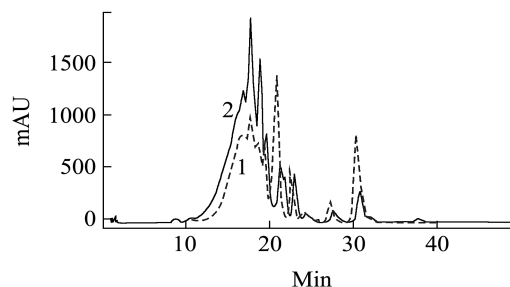


图 4. 酶解物凝胶过滤色谱图

Fig.4 GPC chromatogram of the enzymatic hydrolyte of fish protein

表 1 不同分子量范围肽的百分含量/%

Table 1 MW distribution of the hydrolyte of the fish protein

分子量范围 (单位 Da)	8000 以上	8000~5 000	5000~ 2000	2000~ 1000	1000 以下
1	0.15	38.93	55.04	0.81	4.51
2	0	43.77	43.89	1.9	9.91

3 结论

酰化改性增加了酶水解鱼蛋白的空间位阻,降低了游离氨基酸的得率,但小肽得率增加,其中以琥珀酰化的效果最为显著。60 °C、30 min 热处理后 0.3 g SA/g Pro 改性的鱼蛋白水解物 TCA 可溶性肽得率最高,达 38%。凝胶过滤色谱分析得出水解物分子量大部分集中在 2000~8000 Da。

参考文献

- [1] 孔祥珍,周惠明.食品蛋白质改性技术.粮食与油脂,2004,(2): 22-24
- [2] Dua S et al. Improvement of Functional Properties of Rapeseed (Brassica Campestris Var. Toria) Preparations by Chemical Modification[J]. J. Agric Food Chem. 1996,44:706-710
- [3] L.U.THOMPSON, E.S.REYES. modification of Coagulated Whey Protein Concentrates by Succinylation[J]. J Dairy Sci. 1980,63:715-721

(下转第 736 页)