

微生物转谷氨酰胺酶对大豆分离蛋白乳液 凝胶性能的影响

杨淼, 唐传核

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 研究了不同油相比例($\phi=0.2\sim 0.6$)的微生物 ϕ 转谷氨酰胺酶(MTGase)诱导的大豆分离蛋白(SPI)乳液凝胶性能及微观结构,发现提高乳液中的油相比例,凝胶的弹性模量 G' 及凝胶持水性均有显著提高并存在一定相关性,乳液凝胶形成的凝胶网络机械强度更大,油滴在酶促乳液凝胶中充当了良好的“活性填充剂”。

关键词: 大豆分离蛋白; MTGase; 乳液凝胶; 微观结构

文章篇号: 1673-9078(2012)1-5-8

Study of properties of Soy Protein-Stabilized Emulsion Gels Induced by Microbial Transglutaminase

YANG Miao, TANG Chuan-he

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

Abstract: The properties and microstructures of MTGase induced SPI emulsion gels with different oil volume fractions ($\phi=0.2\sim 0.6$) were studied. It was found that the water-holding capacity and G' progressively increased with oil fractions increasing. Confocal laser scanning microscope analyses indicated that the network microstructure of the formed emulsion gels varied with oil volume fractions. The networks became much stronger with oil volume increasing. Protein-coated oil droplets can act as “active fillers” in the emulsion gel formation.

Key words: soy protein isolate (SPI); microbial transglutaminase (MTGase); emulsion gels; microstructures

微生物转谷氨酰胺酶(MTGase)能够催化不同蛋白质的赖氨酸上残基和谷氨酸残基之间发生转酰胺反应形成 ϵ -(γ -谷氨酰基)赖氨酸键,从而导致蛋白之间发生聚合或凝胶化^[1,2],能够显著提高蛋白凝胶性能和水化能力,同时具有钙非依赖性,被广泛用于蛋白质的改性^[3]。酶反应过程比较温和,形成凝胶不需要通过加热、改变pH值和离子强度,可以避免乳液的显著失稳^[4],与其他化学改性相比,酶诱导乳液凝胶可以避免副反应和有毒物质的生成,同时,酶促乳液凝胶在食品加工中可以防止产生异味和营养被破坏^[5]。大豆分离蛋白(SPI)的主要成分为7S和11S球蛋白,被报道可以形成动态稳定的乳液,其凝胶性能受pH值、离子强度、油相比比例和增稠剂等因素的影响^[6]。

一般来说,酶促蛋白乳液凝胶中,油滴镶嵌于凝胶基质,蛋白质既是乳化剂又是酶作用的良好底物。吸附蛋白内部和之间都会形成共价交联,这些共价交

联影响乳液的稳定性和流变性,为了形成稳定的乳液凝胶,蛋白质需要充分展开并迅速吸附到油滴表面,并对MTGase具有良好的敏感性从而形成强而稳定的网络结构^[7-9]。油相比比例在乳液性能中起到非常重要的作用,凝胶体系中的油滴根据其周围凝胶基质的相互作用,可分为活性填充物和非活性填充物^[10]。

本文通过研究不同油相比比例($\phi=0.2\sim 0.6$)乳液凝胶的性能及微观结构,探索油滴在酶促乳液凝胶中的作用,进一步揭示酶促乳液凝胶的形成机理,为脂类活性物质的包埋与控释载体的制备奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆,河南鹤壁;商用MTGase,江苏一鸣生物制品有限公司;N α -CBZ-GLN-GLY,购于Sigma公司;福临门大豆油,广州好又多超市;罗丹明B,北京鼎国生物技术有限公司;尼罗兰,上海宝奥生物技术有限公司,其他化学试剂均为分析纯。

冷冻离心机,日本Hitachi公司;M-110EH高压微射流纳米均质机,美国Microfluidics公司;FJ-200

收稿日期: 2011-08-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972049)

作者简介: 杨淼(1986-),女,硕士研究生

通讯作者: 唐传核,副教授,博导

高速分散均质机, 上海垒固仪器有限公司; HAKKE 流变仪, 德国 HAKKE 公司; 激光共聚焦扫描显微镜 (CLSM), 德国 LEICA 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SPI 的制备

100 g 脱脂大豆粉按 1:15 溶于去离子水中, 用 2 M NaOH 调节 pH 至 8.0, 室温下搅拌 2 h, 离心 (8000 g, 30 min, 10 °C) 并除去沉淀。恢复室温后用 2 M HCl 调节上清液的 pH 为 4.5, 室温搅拌 1 h。经离心 (5000 g, 20 min, 10 °C), 收集沉淀, 将沉淀重新分散于蒸馏水中, 再用 2 M NaOH 调节 pH 至 7.5。在 4 °C 下用去离子水透析 24 h, 中间换水 3 次, 然后将溶液冻干即得到 SPI。所提取的 SPI 用杜马斯定氮法测得蛋白含量为 92.87%。

1.2.2 MTGase 的纯化与其活性的测定

商用 MTGase 的纯化过程根据唐传核^[11]等提供的方法。酶粉 (100 U/g) 用 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲溶液完全溶解后, 将其放置在 4 °C 下 4 h, 然后在 10000 g、4 °C 下离心 15 min。上清液在 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲溶液下透析后, 置于 4 °C 下备用。此法制得的上清液的酶活性约为 25.0 U/mL, 总蛋白含量少于 0.05 g/mL (凯氏定氮法测定, N×6.25)。酶活性用比色法进行测定, 以 N_α-CBZ-GLN-GLY 作为底物。

1.2.3 SPI 乳液的制备

自制大豆分离蛋白 SPI 溶于含有 0.04% 叠氮钠的蒸馏水中, 配制浓度为 6% (m/V) 的 SPI 蛋白溶液, 调节 pH 至 7.0, 水化过夜后加入一定比例的大豆油 ($\phi=0.2$ 、0.3、0.4、0.5、0.6), 用均质机预均质 (2 min, 10000 r/min), 室温下于 40 MPa 下微射流处理 3 次, 分别制得 $\phi=0.2\sim 0.6$ 的纳米乳液样品。

1.2.4 乳液凝胶的制备

分别取 $\phi=0.2\sim 0.6$ 的乳液样品各 5 mL 于 25×25 mm 的小称量皿中, 加入浓度为 20 U/g 蛋白的 MTGase 酶, 室温下搅拌 2~3 min, 待酶与乳液混匀后, 置于 37 °C 的水浴锅中加热 6 h 后取出, 冷却至室温后进行凝胶持水性测定。

1.2.5 凝胶的流变性

乳液及凝胶的性能通过哈克流变仪 (HaakeCo., Germany) 进行流变测量。蛋白乳液与 MTGase (20 U/g 蛋白) 的混合样品置于两平行板之间, 将两平行板之间的间隙调至 1.0 mm。除去多余蛋白乳液, 并在样品自由边加一薄层矿物油以防止水分损失, 于 37 °C 下记录储存模量 (G') 和损耗模量 (G'') 为时间 t (0~360 min) 的函数。初次压力幅度扫描在 0.1% 应变, 1 Hz

振动剪切下进行。随后, 25 °C 下记录 0.01~10 Hz 频率范围内凝胶样品的储存模量 (G') 和损耗模量 (G'')。

1.2.6 持水性测定

乳液凝胶样品经机械性能分析后, 采用 Wu^[12] 等人报道的方法进行持水性测定。5 g 乳液凝胶样品 ($\phi=0.2\sim 0.6$) 分别于离心管中离心 (8000 g, 30 min, 4 °C), 用滤纸小心吸除离心出来的水分。10 min 后再次称重。

(失水重量 W_F = 离心管重 + 5 g 样品重 - 离心排水后管和样品重)

$$WHC = (W_T - W_F) / W_T \times 100\%$$

其中, W_T - 凝胶样品中的总水分含量; W_F - 离心后凝胶失去的水分的重量。实验三次取平均值。

1.2.7 激光共聚焦扫描 (CLSM)

不同油相比例的乳液凝胶的内部结构通过激光共聚焦扫描显微镜进行观察, 蛋白和油滴分别采用罗丹明 B (0.2%) 和尼罗兰 (1%) 进行染色, 激发波长为 488 和 633 nm。取 5 mL 不同油含量的乳液于 25×25 mm 称量皿中, 加入 0.05% 的染液, 制片后观察。

2 结果与讨论

2.1 凝胶过程的动态模量分析

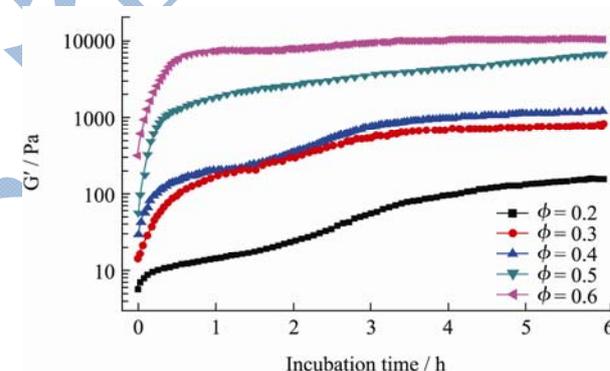


图1 MTGase 处理 SPI 乳液 (37 °C, $\phi=0.2\sim 0.6$) 不同时间时 G' 的变化

Fig.1 Storage modulus (G') changes of SPI-stabilized emulsions incubated with MTGase at 37 °C, at various oil fractions ($\phi=0.2\sim 0.6$), as a function of incubation time

图 1 显示了 MTGase 处理的不同油相 SPI 乳液 (37 °C, 6 h) 形成乳液凝胶的动态过程。从图 1 可以看出, 不同油含量的乳液凝胶 G' 值均随着反应时间逐渐增大, 在反应 15 min 内, G' 值的增加幅度最高。随着 ϕ 值增加, G' 值依次升高, $\phi=0.5$ 、0.6 时, G' 值升高幅度增加, 达到 7000~8000 Pa。相似的结果也在大豆分离蛋白及豆乳凝胶过程中被报道, 与 Chen^[13] 等指出的活性填充物的增加能使凝胶弹性模量提高, 非活性填充物的增加则使之降低^[14,15] 的结论相符, SPI 乳液凝胶的存储模量和机械强度的增加可归因于蛋白分子

间的共价交联。

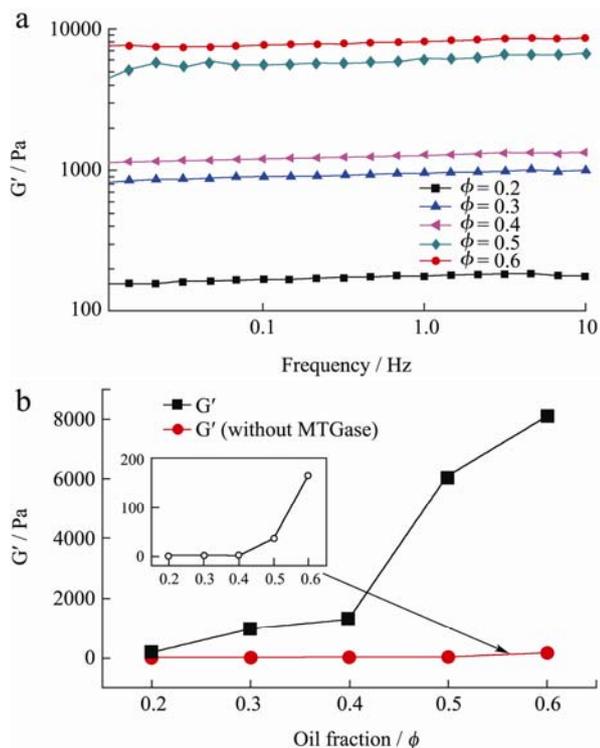


图2 酶促 SPI 乳液凝胶不同频率下 G' 的变化 (a) 和频率 1.0 Hz 时 phi 与 G' 的关系 (b)

Fig.2 Frequency dependence of G' of SPI-stabilized emulsion gels (a) and the relationship between the G' (at a frequency of 1.0 Hz) (b), formed at various oil fractions ($\phi=0.2\sim0.6$) after incubation with MTGase at 37 °C for 6 h

频率扫描进一步反应了酶促 SPI 乳液凝胶中油相比比例对凝胶机械强度的影响, 图 2a 显示在 0.01~10 Hz 频率范围内, 乳液凝胶样品 G' 值均无明显频率依变性。Dickinson^[16]等人发现, 酶促 β -乳球蛋白乳液凝胶比热致乳液凝胶具有更强的非频率依赖性, 这是由于酶诱导的乳液凝胶形成了永久的共价交联, 其凝胶强度远远高于物理作用。

图 2b 对比了不同油相的初始乳液及乳液凝胶在 1.0 Hz 下的 G' 值, 乳液凝胶中 G' 值随油相比比例的变化明显, 这说明被蛋白包裹的油滴充当了“活性填充物”并加强了凝胶网络结构, 高油相时更多分散的油滴被包埋或整合进凝胶网络, 使凝胶强度更高, “活性填充物”的作用更加明显^[17]。phi=0.4~0.6 时, G' 值对油相比比例的依赖性高于 phi=0.2~0.4, 这可能由于在高浓度乳液中, 酶诱导的共价交联作用易于作用在油滴表面吸附蛋白上, 从而形成更硬的凝胶网络。

2.2 凝胶持水性分析

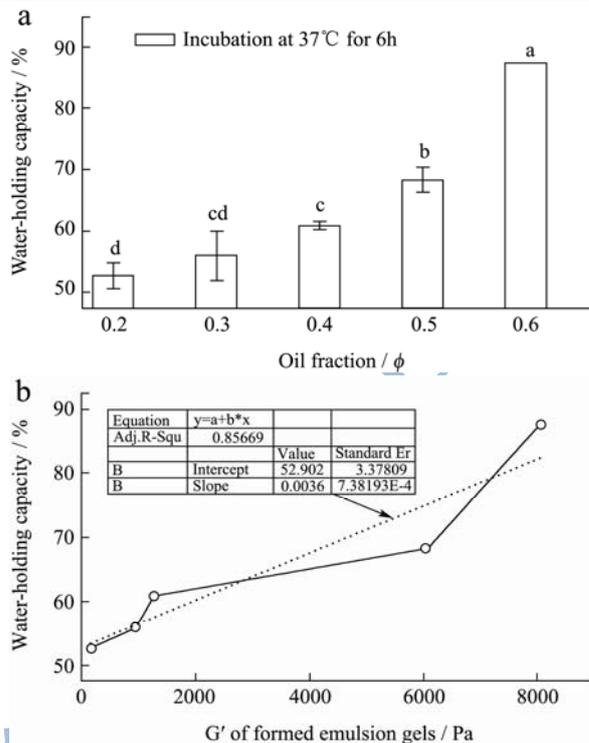


图3 不同油相比比例 SPI 乳液凝胶的持水性 (a) 和持水性与 G' 的关系 (b)

Fig.3 WHC (a) and plot of WHC against the storage modulus (G') of SPI emulsion gels (b) formed at various oil fractions ($\phi=0.2\sim0.6$), after an incubation period of 6 h

图 3a 为经过 MTGase 酶作用 6 h 时不同油相比比例的乳液凝胶的持水性。随着油相比比例的升高, 凝胶的持水性逐渐增大, 从 53% 升高至 88%, 这与凝胶网络紧密的微观结构及凝胶强度密不可分。图 3b 进一步说明了凝胶持水性与 6 h 形成酶促凝胶后的 G' 值之间具有良好的线性关系 ($R^2=0.86$), 这证明了高强度乳液凝胶持水性更好, Sok Line^[18]等人在研究钙离子诱导的 β -乳球蛋白凝胶时也得到相似结论, 提高油相比比例使 G' 值增大, 使乳液凝胶具有抵抗离心过程中机械力的作用。

2.3 乳液凝胶的微观结构

采用 CLSM 分析 SPI 乳液凝胶的微观结构, 图 4 分别为不同油相比比例 (phi=0.2、0.4、0.6) 经 MTGase 诱导乳液凝胶在作用 6 h 的内部网络结构。图 4a、4b、4c 显示出不同油相的乳液凝胶网络结构差别较大。phi=0.2 时, 凝胶网络由细小的线形成均匀的纤维状, 油滴包埋于其中并构成了凝胶网络的主体, phi=0.4 时, 凝胶网络结构逐渐转变为油滴聚集形成的簇, 网络形态为颗粒状, 且油滴不断的合并, phi=0.6 时, 油滴的

粒度几乎达到 $4\ \mu\text{m}$, 网络结构变得粗糙。这说明, 油相越高, 所形成的凝胶网络强度越大。高油相中, 油滴作为“活性填充物”起到的作用更强。

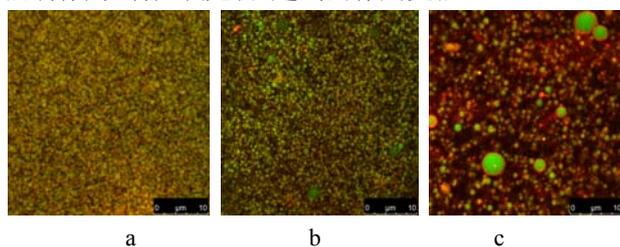


图4 不同油相 SPI 乳液凝胶的微观结构

Fig.4 CLSM images of MTGase-induced emulsion gels, formed after an incubation period of 6 h at different oil fractions

注: a: $\phi=0.2$; b: $\phi=0.4$; c: $\phi=0.6$ 。

3 结论

随着油相比例的升高 ($\phi=0.2\sim 0.6$), MTGase 酶促乳液凝胶的存储模量 G' 值及凝胶强度依次增大, 酶的作用使油滴表面的蛋白分子间发生共价交联, 油滴作为“活性填充物”增大了凝胶网络强度。乳液凝胶的持水性也随着油相比例的提高依次从 53% 升高至 88%, 且与形成凝胶后 G' 值呈良好的线性关系 ($R^2 = 0.86$)。乳液凝胶的微观结构随油相比例变化, 高油相乳液凝胶网络结构更粗糙且强度更大。油相比例越高, 油滴作为“活性填充物”的作用越强。

参考文献

- [1] 刘付, 王昌盛, 唐传核. 采用激光光散射技术研究转谷氨酰胺酶催化的 β -乳球蛋白交联反应[J]. 现代食品科技, 2010, 26: 14-18
- [2] 韩春然, 李可, 王强, 等. 利用微生物转谷氨酰胺酶回收大豆乳清废水[J]. 现代食品科技, 2011, 27(10): 1210-1213
- [3] 王君立, 唐传核, 周志红, 等. 微生物转谷氨酰胺酶促豆腐质构性质研究[J]. 粮食加工, 2006, 3: 77-80
- [4] Yasuki Matsumura, Hiroko Sakamoto et al. Filler effects of oil droplets on the viscoelastic properties of emulsion gels [J]. Food Hydrocolloids, 1993, 7: 227-240
- [5] Dickinson E. Enzymic crosslinking as a tool for food colloid rheology control and interfacial stabilization [J]. Trends in Food Science & Technology, 1997, 8: 334-339
- [6] Martin A H, Bos M A, van Vliet T. Interfacial rheological properties and conformational aspects of soy glycinin at the air/water interface [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16: 63-71
- [7] Nio N, Motoki M, Takinami K. Gelation of protein emulsion by transglutaminase [J]. Agricultural Biology and Chemistry, 1986, 50: 1409-12
- [8] Lee H A, Choi S J, Moon T W. Characteristics of sodium caseinate and soy protein isolate-stabilized emulsion-gels formed by microbial transglutaminase [J]. Journal of Food Science, 2006, 71: C352-C357
- [9] Faergemand M, Murray B S, Dickinson E. Cross-linking of milk-proteins with transglutaminase at the oil-water interface [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 2514-2519
- [10] Van Vliet T. Rheological properties of filled gels. Influence of filler matrix interaction [J]. Colloid and Polymer Science, 1988, 266: 518-524.
- [11] Tang C H. Effect of thermal pretreatment of raw soymilk on the gel strength and microstructure of tofu induced by microbial transglutaminase [J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40: 1403-1409
- [12] Wu M, Xiong Y, Chen J, et al. Rheological and microstructural properties of porcine myofibrillar protein lipid emulsion composite gels [J]. Journal of Food Science, 2009, 74: E207-E217
- [13] Chen J, Dickinson E. Effect of surface character of filler particles on rheology of heat-set whey protein emulsion gels [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1999, 12: 373-381
- [14] Dickinson E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2001, 20: 197-210
- [15] Reiffers-Magnani C K, Cuq J L, Watzke H J. Composite structure formation in whey protein stabilized O/W emulsions. I. Influence of the dispersed phase on viscoelastic properties [J]. Food Hydrocolloids, 1999, 13: 303-316
- [16] Dickinson E, Yamamoto Y. Rheology of milk protein gels and protein-stabilized emulsion gels cross-linked with transglutaminase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44: 1371-1377
- [17] Dickinson E, Chen J. Heat-set whey protein emulsion gels: role of active and inactive filler particles [J]. Journal of Dispersion Science and Technology, 1999, 20: 197-213
- [18] Sok Line V L, Remondetto G E, Subirade M. Cold gelation of β -lactoglobulin oil-in-water emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19: 269-278