

酶法复合改性对小麦面筋蛋白性质和结构的影响

王凯强, 黎敏, 罗水忠, 姜绍通, 郑志

(合肥工业大学生物与食品工程学院安徽省农产品精深加工重点实验室, 安徽合肥 230009)

摘要: 本文研究了小麦面筋蛋白(WG)经胰蛋白酶限制性酶解和谷氨酰胺转氨酶(TG酶)交联后其流变特性和热特性的变化,并且对小麦面筋蛋白的结构进行了表征。结果表明,适当的胰蛋白酶限制性酶解有利于TG酶对小麦面筋蛋白的交联作用,使用80U/g的胰蛋白酶限制性酶解和TG酶交联复合改性效果最为显著,其弹性模量 G' 和热变性温度 T_g 分别由2.26 kPa和55.59℃提高为6.46 kPa和59.17℃。通过对小麦面筋蛋白的结构分析表明,适当的胰蛋白酶限制性酶解能够使小麦面筋蛋白分子间二硫键断裂,表面疏水性增大,从而使紧密地小麦面筋蛋白结构变得较为松散,暴露出更多谷氨酰胺残基供TG酶交联,导致水化小麦面筋蛋白形成更为多孔且致密的小麦面筋蛋白网络结构。但是过度的酶解将不利于TG酶的交联反应。

关键词: 小麦面筋蛋白; 复合改性; 性质; 结构

文章编号: 1673-9078(2016)3-177-182

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.029

Effects of Enzymatic Modification on the Characteristics and Structure of Wheat Gluten

WANG Kai-qiang, LI Min, LUO Shui-zhong, JIANG Shao-tong, ZHENG Zhi

(Key Laboratory for Agriculture Products Processing of Anhui Province, School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Changes in the rheological behavior and thermal properties of wheat gluten after trypsin-based enzymatic hydrolysis and the subsequent transglutaminase (TGase) catalyzed cross-linking reactions were investigated and the structure of wheat gluten was characterized. The results indicate that an appropriate degree of trypsin-based partial enzymatic hydrolysis favored TGase cross-linking. The most significant composite modification effect was observed when 80 U/g trypsin-based partial hydrolysis was combined with TGase cross-linking, where the wheat gluten storage modulus (G') and thermal denaturation temperature (T_g) increased from 2.26 kPa and 55.59℃ to 6.46 kPa and 59.17℃, respectively. Structural analysis indicated that an appropriate degree of trypsin-based enzymatic hydrolysis could result in breakage of intermolecular disulfide bonds and an increase in surface hydrophobicity. Consequently, the compact wheat gluten structure became loose and more glutamine residues were exposed to allow TGase cross-linking. This resulted in the formation of a more compact and porous wheat gluten network structure from the hydrated wheat gluten. However, excessive enzymatic hydrolysis was unsuitable for TGase cross-linking.

Key words: wheat gluten; composite modification; characteristics; structure

小麦面筋蛋白是小麦淀粉生产的副产物,其蛋白质含量丰富,氨基酸组成齐全,含有人体所必须的15种氨基酸,是一种物美廉价的植物蛋白^[1]。然而,天然的小麦面筋蛋白其流变性和热稳定性相对较差,主要用作为动物饲料,其应用范围得到了限制。因而,对小麦面筋蛋白进行适当的改性,开发其新的应用价值迫在眉睫。

收稿日期: 2015-05-20

基金项目: 国家 863 计划(2013AA102201); 安徽省科技攻关重大项目(1301031031)

作者简介: 王凯强(1991-),男,在读硕士,研究方向:食品化学

通讯作者: 郑志(1971-),男,博士,教授,研究方向:农产品加工及贮藏工程研究

谷氨酰胺转氨酶(TG酶)是一种能够催化蛋白质肽链上谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基(酰基供体)和一系列酰基受体发生酰基转移的蛋白酶,它可以催化小麦面筋蛋白侧链中的赖氨酸和谷氨酰胺通过形成 ϵ -(γ -谷氨酰胺)赖氨酸异肽键而发生交联反应,形成高分子量的聚合物^[2],从而达到改善面筋蛋白网络结构,提高其粘弹性的目的。目前,TG酶已经被用于改善鱼糜、大豆蛋白和花生蛋白等食品蛋白质的功能特性^[3]。然而,天然的小麦面筋蛋白是一种致密的球蛋白,分子内疏水区域较多,含有大量的谷氨酰胺和脯氨酸,而离子化的侧链却很少,导致其在水中易结块而不易分散^[4],TG酶的作用位点大多被埋藏在小麦面筋蛋白分子内部,不利于其发生交联反应。对蛋白

质进行适当的预处理可以使蛋白质结构变得松散,活性位点暴露,从而有利于 TG 酶的交联反应。

蛋白质的预处理方法有很多,主要可以归纳为物理方法、化学方法和酶法,物理方法虽然无毒副作用,但是作用效果不是很明显,化学方法可能会危害食品安全,蛋白酶限制性酶解技术作为一种安全可靠的方法,成为当前研究的热点。研究表明,限制性酶解能够改善蛋白质的溶解性和其他多种功能性质。Ghribi 等^[5]研究了碱性蛋白酶限制性酶解鹰嘴豆蛋白,发现其溶解性和乳化性得到了改善。Zhang 等^[6]研究表明中性蛋白酶限制性酶解改变了大豆分离蛋白的结构,促进了麦芽糊精对大豆蛋白的糖基化反应。Martind 等^[7]研究表明碱性蛋白酶限制性酶解改善了向日葵蛋白的表面性质,提高了其起泡性。赵新淮等^[8]使用中性蛋白酶和胰蛋白酶对大豆蛋白进行限制性酶解,发现产品的溶解性得到改善,并在一定程度上改善了其保水性。

而目前使用蛋白酶限制性酶解和 TG 酶复合改性蛋白质的功能特性的研究较少,本文采用胰蛋白酶限制性酶解限制性酶解小麦面筋蛋白,再通过 TG 酶对其进行交联反应,目的是为了改善小麦面筋蛋白的流变性和热稳定性,提高小麦面筋蛋白的应用范围,为植物蛋白的改性提供一个新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

主要实验材料:小麦面筋蛋白来自安徽瑞福祥食品有限公司;胰蛋白酶(20万 U/g)购自南宁庞博生物科技有限公司;TG 酶(1000U/g)购自山东一鸣生物科技有限公司;低分子量蛋白质标品购自生工生物工程有限公司;DNTB 和 ANS 购自北京索莱宝生物科技有限公司;其他化学试剂纯度为化学分析纯。其中小麦面筋蛋白的组成如表 1 所示:

表 1 小麦面筋蛋白的基本组成

Table 1 Essential composition of wheat gluten

指标	蛋白质	淀粉	脂肪	水分	灰分	其他
含量/%	76.25	4.16	0.88	9.65	0.59	8.47

主要仪器: DHR-3 型旋转流变仪,美国 TA 公司; Q200 型差示扫描量热仪, Mini-PROTEIN Tetra Cell 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司; 722 可见光分光光度计,上海光谱仪器有限公司; Thermo Fisher FC 型酶标仪,美国热电公司; Nicolet 67 傅里叶红外光谱仪,美国热电公司; JSM-6490LV 扫描电子显微镜,日本电子公

司。

1.2 试验方法

1.2.1 限制性酶解小麦面筋蛋白样品 (HWG) 的制备

配置 5% (m/V) 的小麦面筋蛋白悬液,用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.5。然后向小麦面筋蛋白悬液中添加胰蛋白酶,其添加量分别为 40 U/g、80 U/g、120 U/g、160 U/g 和 200 U/g,在 55 °C 的水浴中酶解 10 min,100 °C 加热 15 min 抑制酶活,然后进行冷冻干燥、备用。酶解产物分别记为 HWG-40、HWG-80、HWG-120、HWG-160 和 HWG-200,未添加胰蛋白酶的小麦面筋蛋白标记为 HWG-0。

1.2.2 复合改性小麦面筋蛋白样品 (CHWG) 的制备

取上述小麦面筋蛋白酶解产物,配置 15% (m/V) 的小麦面筋蛋白悬液,用 1 mol/L 的 NaOH 或 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 7.0, TG 酶添加量为 20 U/g,在 45 °C 水浴中反应 1.5 h,反应完毕后迅速转移至冰水浴中进行冷却,然后冷冻干燥、备用。复合改性小麦面筋蛋白样品分别记为 CHWG-0、CHWG-40、CHWG-80、CHWG-120、CHWG-160 和 CHWG-200,以原小麦面筋蛋白为对照组。

1.2.3 流变特性的测定

取 1.0 g 冻干小麦面筋蛋白分散于 10 mL 的蒸馏水中,8000 r/min 离心 5 min。平衡水分后,将小麦面筋蛋白做成直径约 25 mm 的圆球,放在流变仪的直径为 40 mm 的两个平行板之间进行流变性测定,测定温度为 25 °C,两个平行板之间的间隙为 1 mm,轻轻刮掉挤压出来的多余样品,用矿物油封住两板周围,以防水分干燥。测量之前,使样品在两板之间平衡 10 min。然后分别进行应力扫描和频率扫描。

1.2.4 热特性的测定

小麦面筋蛋白的热特性通过差示扫描量热法测定,采用 TA-Q200-DSC 进行分析。准确称取 8-10 mg 冻干的小麦面筋蛋白样品于铝盘中,压盘,以空盘为对照组。热扫描以 10 °C/min 的升温速率从 20 °C 升至 100 °C,氮气流速 80 mL/min。变性温度 T_g 和变性焓 ΔH 由 DSC 自带软件测量。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳根据 Song 等^[9]的方法进行了一些修饰,使用 12% (pH 8.8) 的分离胶和 5% 的浓缩胶 (pH 6.8)。将小麦面筋蛋白样品溶于 pH 6.8 的 Tris-HCl 缓冲液 (0.0625 mol/L, 含 2.3% SDS、5% β -巯基乙醇、10% 甘油和 0.1% 溴酚蓝) 中。然后在沸水浴中煮沸 10

min, 8000 r/min 离心 10 min, 取 10 μ L 上样。电泳结束后, 将凝胶置于 0.1% 的考马斯亮蓝 R-250 溶液 (含甲醇:冰醋酸:水=5:1:4) 中染色 40 min, 然后至于脱色液 (甲醇:冰醋酸:水=1:1:8) 中脱色过夜。

1.2.6 游离巯基的测定

取 100 mg 小麦面筋蛋白溶于 10 mL pH 8.0 的磷酸缓冲液 (含 1 mmol/L EDTA 和 1% SDS) 中, 8000 r/min 离心 10 min。取 3 mL 上清液加入 3 mL 上述磷酸缓冲液, 再加入 0.1 mL 4 mg/mL 的 DNTB 溶液, 剧烈震荡后于 25 $^{\circ}$ C 的水浴中保温 1 h, 然后在 10000 r/min 条件下离心 30 min。以磷酸缓冲液为对照组, 取上清液于 412 nm 波长下测定吸光度, 巯基含量计算如下:

$$SH (\mu\text{mol/g}) = 73.53 \times A_{412} \times D / C$$

其中 $73.53 = 10^6 / (1.36 \times 10^4)$, 1.36×10^4 为 DNTB 试剂的摩尔消光系数, A_{412} 为 412 nm 处的吸光度, D 为稀释倍数, C 为样品的最终浓度。

1.2.7 表面疏水性的测定

表面疏水性根据 Mu 等^[10]的方法进行了一些修饰。取 100 mg 冻干小麦面筋蛋白分散于 15 mL pH 7.0 的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液中, 于 7000 r/min 离心 10 min, 上清液蛋白浓度由考马斯亮蓝法测得, ANS 试剂 (8.0 mmol/L) 由上述的磷酸缓冲液配制。将上清液稀释到几个不同的浓度梯度 (分别稀释 1、0.75、0.50、0.25 和 0.125 倍), 再取 40 μ L ANS 试剂加到 4 mL 的蛋白质溶液中, 选择激发波长 365 nm, 发射波长 484 nm, 测定不同浓度蛋白样品的荧光强度, 以荧光强度对蛋白质浓度做曲线, 将曲线的最开始的斜率定义为被检测样品的表面疏水度 H_0 。

1.2.8 微观形貌观察

将小麦湿面筋蛋白样品 HWG-0、HWG-80、HWG-200、CHWG-0、CHWG-80 和 CHWG-200 进行冷冻干燥, 然后切片, 喷金。将样品转移到 JSM-6490LV 扫描电子显微镜上, 在 25 kV 的加速电压下观察小麦面筋蛋白网络结构的形貌并拍照。

1.2.9 数据处理

所有的实验进行三次重复, 数据以平均值 \pm 标准差的形式表示。数据的显著性 ($p < 0.05$) 通过 SPSS 软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 水化小麦面筋蛋白流变性分析

蛋白质的流变特性 (储能模量 G' 和损耗角 $\text{Tan}\delta$) 与其机械加工性能、加工条件及最终的产品质量密切

相关, 图 1 反应了限制性酶解和复合改性对小麦面筋蛋白流变性的影响。储能模量 G' , 又称弹性模量, 能反应小麦面筋蛋白弹性的变化。由图 1 可知, 未改性的小麦面筋蛋白 G' 为 2.26 kPa, 经过限制性酶解后, G' 随胰蛋白酶添加量的增加而降低, 说明小麦面筋蛋白的网络结构发生了破坏。限制性酶解小麦面筋蛋白经 TG 酶交联后, 其 G' 较未交联之前有所增加, 在胰蛋白酶添加量 80 U/g 时达到最大, 说明适当的限制性酶解有利于 TG 酶的交联反应。从图中还可以看出, 胰蛋白酶浓度继续增大时导致 TG 酶的交联作用减弱, 这可能是由于过度的酶解使得小麦面筋蛋白生成了大量的小分子量的多肽, 从而不利于 TG 酶的交联。 $\text{Tan}\delta$ 是储能模量 G' 和耗能模量 G'' 的比值, 能反应小麦面筋蛋白的质量好坏^[11]。图 1 表明 $\text{Tan}\delta$ 随着酶解程度的增大而增大, 说明小麦面筋蛋白的网络结构被破坏, 其更趋向于一种液体状态。TG 酶处理后, $\text{Tan}\delta$ 较未处理之前降低, 可能是由于 TG 酶催化小麦面筋蛋白肽链间形成了大分子量的多聚体, 从而改善了小麦面筋蛋白的网络结构。

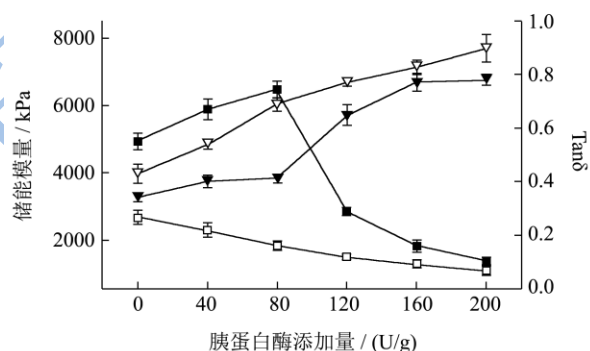


图 1 限制性酶解和复合改性对小麦面筋蛋白流变性的影响

Fig.1 Effect of partial enzymatic hydrolysis and composite modification on the rheological behavior of wheat gluten

注: \square : 限制性酶解小麦面筋蛋白储能模量; \blacksquare : 复合改性小麦面筋蛋白储能模量; ∇ : 限制性酶解小麦面筋蛋白 $\text{Tan}\delta$; \blacktriangledown : 复合改性小麦面筋蛋白 $\text{Tan}\delta$ 。

2.2 小麦面筋蛋白热性质的变化

蛋白质的热特性与其在食品中的加工应用密切相关。图 2 为小麦面筋蛋白的 DSC 图谱, 表 2 则反映了小麦面筋蛋白经限制性酶解和复合改性后热特性的变化。其中热变性温度 T_g 与蛋白质的稳定性有关。研究发现, 一定程度的限制性酶解使得小麦面筋蛋白的 T_g 有所升高, 而过度的酶解又会使得 T_g 降低。Myers 等^[12]研究表明, 疏水性氨基酸越多, T_g 越大。所以本研究中, T_g 的增大可能是由于轻度的酶解会使得蛋白质结构展开、疏水性氨基酸暴露所致, 而过度的酶解会

使得暴露的氨基酸被水解为离子化基团,故而 T_g 降低。80 U/g 的胰蛋白酶限制性酶解处理和 TG 酶交联复合改性显著的 ($p < 0.05$) 提高了小麦面筋蛋白的 T_g , 达到了 59.17°C , 说明 TG 酶交联稳定了小麦面筋蛋白的结构。 ΔH 能反应蛋白质的聚集程度,样品 HWG-80 的 ΔH 最低,可能是由于该条件下生成了较为松散的结构,而 HWG-200 的 ΔH 显著高于 HWG-4,可能是由于暴露的疏水性氨基酸导致蛋白质侧链间通过疏水相互作用或氢键形成了聚集体。TG 酶的添加使得 ΔH 显著增加,这可能与 TG 酶诱导小麦面筋蛋白分子形成大分子量的聚集体有关。

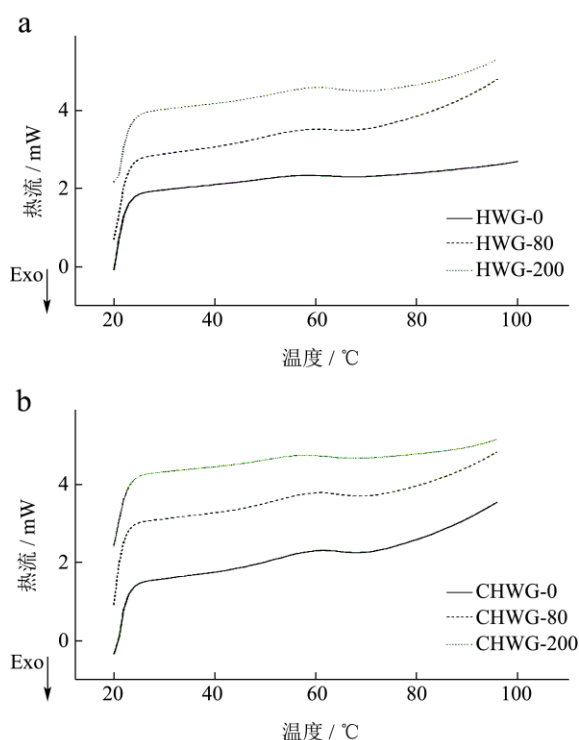


图2 限制性酶解和复合改性小麦面筋蛋白的 DSC 图谱

Fig.2 DSC profiles of partially hydrolyzed and composite modified wheat gluten samples

表2 改性小麦面筋蛋白的热特性参数

Table 2 Thermal characteristic parameters of wheat gluten samples

小麦面筋蛋白样品	热变性温度 $T_g/^\circ\text{C}$	焓变 $\Delta H/(\text{J/g})$
HWG-0	55.59 ± 0.51 ^{cd}	1.291 ± 0.052 ^d
HWG-80	56.47 ± 0.41 ^{bc}	1.142 ± 0.054 ^e
HWG-200	55.32 ± 0.82 ^d	1.300 ± 0.020 ^d
CHWG-0	57.34 ± 0.30 ^b	1.515 ± 0.045 ^b
CHWG-80	59.17 ± 0.12 ^a	1.697 ± 0.038 ^a
CHWG-200	56.11 ± 0.68 ^{cd}	1.421 ± 0.019 ^{bc}

注:同一列中不同小写字母代表数据间具有显著性差异($p < 0.05$)。

2.3 小麦面筋蛋白 SDS-PAGE 电泳

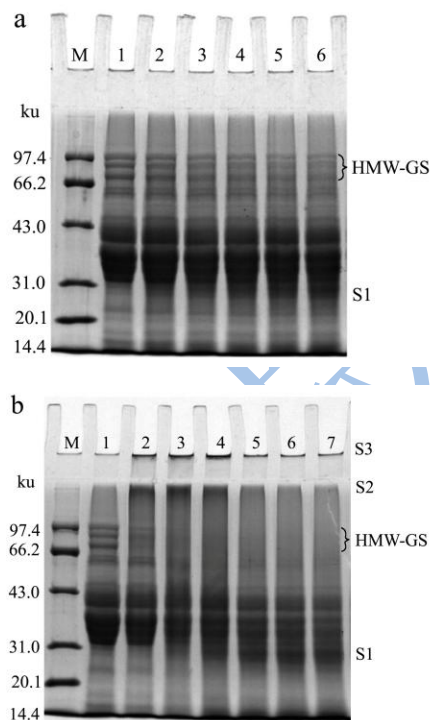


图3 小麦面筋蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.3 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis patterns of wheat gluten samples

注: (a) 限制性酶解小麦面筋蛋白, M: 蛋白质标品, 1: HWG-0, 2: HWG-2, 3: HWG-4, 4: HWG-6, 5: HWG-8, 6: HWG-10; (b) 复合改性小麦面筋蛋白, M: 蛋白质标品, 1: HWG-0, 2: CHWG-0, 3: CHWG-2, 4: CHWG-4, 5: CHWG-6, 6: CHWG-8, 7: CHWG-10。

图3中的还原性 SDS-PAGE 电泳反映了不同处理条件下的小麦面筋蛋白各亚基条带的变化。图3(a)表明高分子量麦谷蛋白亚基(HMW-GS)的光密度随着胰蛋白酶浓度的增大逐渐减弱,而 S1 处光密度逐渐增强,表明胰蛋白酶主要酶解 HMW-GS,经酶解后的高分子量麦谷蛋白亚基生成了分子量低于 31.0 ku 的多肽。从图3(b)中可以发现,小麦面筋蛋白复合改性后其亚基条带发生了显著地变化,主要表现为在 S2 和 S3 处新增了两个条带,产生这种现象的原因为 TG 酶会引起蛋白质侧链中的谷氨酰胺和赖氨酸的 γ -氨基发生交联反应而形成 γ -谷氨酰胺赖氨酸异肽键,通过交联后的小麦面筋蛋白形成了分子量更大的条带,而这些条带间的 γ -谷氨酰胺赖氨酸异肽键不会因为还原性 SDS-PAGE 电泳中的还原剂 β 巯基乙醇而断裂。因此,在电泳时这些大分子量的蛋白质聚集体由于不能通过浓缩胶和分离胶而积累在 S2

和 S3 处。通过泳道 1 和泳道 2 对比可以发现, TG 酶也是主要作用于 HMW-GS, 泳道 3 的 S2 处光密度最大, 说明 CHWG-80 中生成的高分子量多聚体最多。胰蛋白酶添加量超过 80 U/g 时会导致小麦面筋蛋白的高分子量麦谷蛋白亚基被过度的水解, 这将不利于随后 TG 酶的交联反应。以上结果也验证了流变性的分析结果。

2.4 小麦面筋蛋白游离巯基变化

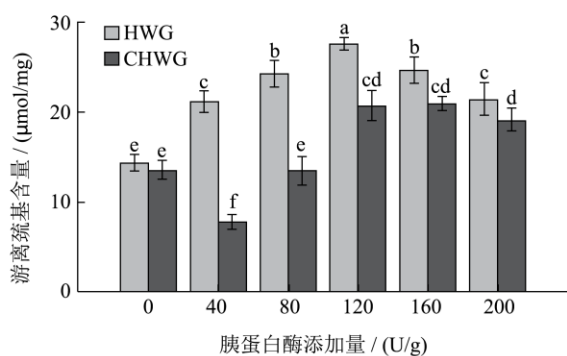


图 4 限制性酶解和复合改性对小麦面筋蛋白游离 SH 含量的影响

Fig.4 Effect of partial hydrolysis and composite modification on the free SH content of wheat gluten

注: 图中的不同小写字母代表数据间具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

小麦面筋蛋白的网络结构与其所含的巯基/二硫键的比例密切相关, 分子间二硫键的断裂将会引起蛋白质的解聚, 从而引起游离巯基 (SH) 含量的增加。从图 4 中可以发现, 对照组小麦面筋蛋白游离 SH 含量约 14.4 $\mu\text{mol/g}$, 当小麦面筋蛋白经胰蛋白酶限制性酶解后, 在一定范围内小麦面筋蛋白的游离巯基含量随着酶解程度的增大而增大, 在酶添加量达 120 U/g 时, 小麦面筋蛋白的游离巯基含量达到最大, 约为 27.66 $\mu\text{mol/g}$, 较对照组小麦面筋蛋白得到显著提高 ($p < 0.05$), 说明限制性酶解使得小麦面筋蛋白结构发生了变化, 蛋白质分子内和分子间 S-S 键发生了断裂, 转化为了游离 SH, 小麦面筋蛋白由致密的结构变得松散。然而, 当水解程度继续加大时, 小麦面筋蛋白的游离 SH 含量开始降低, 这可能是因为过度的酶解使小麦面筋蛋白内部疏水性基团暴露, 过多的疏水性残基将会引起蛋白质分子间发生聚集反应, 游离 SH 之间又重新转化为了 S-S 键。通过图 4 我们还可以发现 TG 酶交联会引起小麦面筋蛋白游离 SH 含量降低, 其中添加 80 U/g 胰蛋白酶限制性酶解的小麦面筋蛋白再经 TG 酶交联后, 游离 SH 含量由下降为 13.61 $\mu\text{mol/g}$ 。结果表明, TG 酶交联使小麦面筋蛋白形成多

聚体以后, 小麦面筋蛋白的游离 SH 之间又转化为了 S-S 键。

2.5 小麦面筋蛋白疏水性变化

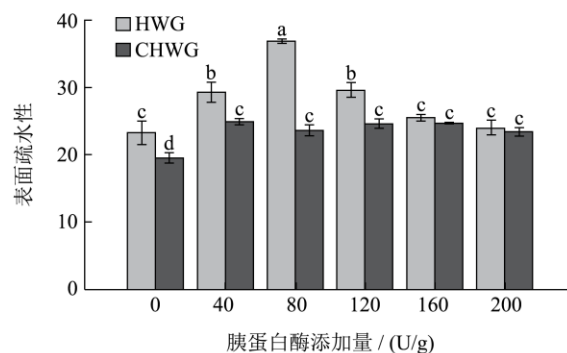


图 5 限制性酶解和复合改性对小麦面筋蛋白表面疏水性的影响

Fig.5 Effect of partial hydrolysis and composite modification on the surface hydrophobicity of wheat gluten

注: 图中的不同小写字母代表数据间具有显著性差异 ($p < 0.05$)。

表面疏水性是评价蛋白质构象改变的一个指标, 能够表明在极性环境中蛋白质表面疏水残基的数量。图 5 表明未经处理的小麦面筋蛋白的表面疏水性为 23.34, 经限制性酶解后的小麦面筋蛋白表面疏水性得到显著改善, 当胰蛋白酶添加量为 80 U/g 时, 表面疏水性达到最大。有研究表明, 酶水解能够使蛋白质结构变得松散, 使埋藏在小麦面筋球蛋白内部的疏水性氨基酸残基暴露, 因而表面疏水性提高。酶水解对蛋白质表面疏水性的改变依赖于酶解条件、酶解程度和酶的特性, 本实验中当胰蛋白酶添加量超过 80 U/g 时, 表面疏水性开始下降, 导致这种现象的原因可能有两种: 1) 过度的酶水解降解了位于蛋白质表面的疏水性基团, 生成了可溶的离子化基团^[13]; 2) 疏水性相互作用导致蛋白质间发生了聚集, 重新聚集的蛋白质能够改变蛋白质侧链与溶剂间的相互作用, 降低了暴露在表面的疏水性基团, 从而降低了表面疏水性^[14]。经 TG 酶处理后, 小麦面筋蛋白的表面疏水性降低, 可能是由于 TG 酶共价交联后一些疏水性基团被交联在了分子内部, 同时, TG 酶引起的脱酰胺也会引起表面疏水性的降低。

2.6 水化小麦面筋蛋白微观结构

图 6 反应了水化小麦面筋蛋白的微观形貌。未经改性的小麦面筋蛋白呈现出大孔的海绵状结构。经胰蛋白酶限制性酶解的小麦面筋蛋白海绵状结构消失, 尤其是对于 HWG-200。TG 酶改性会改善小麦面筋蛋

白的网络结构,图6(e)表明经80 U/g胰蛋白酶限制性酶解和TG酶复合改性的小麦面筋蛋白形成了更为多孔且致密的网络结构,这可能是由于该条件处理的小麦面筋蛋白形成了分子内或分子间二硫键,且生成了分子量更大的多聚体,导致形成更为致密的网络结构,这与SDS-PAGE电泳结果和游离SH测定结果一致。如果胰蛋白酶添加量太大时,将会导致支持小麦面筋蛋白网络结构的大分子量麦谷蛋白被水解成小分子量的多肽,以至于不能形成网络结构(图6c、f)。

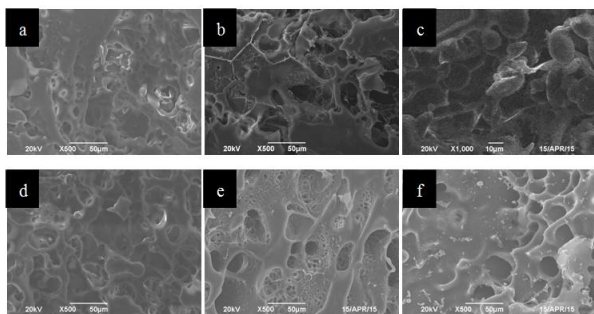


图6 水化小麦面筋蛋白的微观结构

Fig.6 Microstructure of hydrated wheat gluten

注:(a): HWG-0; (b): HWG-80; (c): HWG-200;
(d): CHWG-0; (e): CHWG-80; (f): CHWG-200。

3 结论

本实验研究了胰蛋白酶限制性酶解和TG交联复合改性对小麦面筋蛋白流变性、热特性及其结构的影响。结果表明:(1)适当的限制性酶解和TG酶交联能够提高小麦面筋蛋白的G'和T_g,其中80 U/g的胰蛋白酶限制性酶解后再经TG酶交联,使小麦面筋蛋白的G'和T_g分别由2.26 kPa和55.59 °C提高为6.46 kPa和59.17 °C,和单纯的用TG酶交联改性相比提高显著,而过度的酶解不利于TG酶交联;(2)SDS-PAGE电泳表明80 U/g的胰蛋白酶酶解和TG酶复合改性后,生成了分子量更大的多聚体,而过度的水解使得大分子量麦谷蛋白亚基生成了分子量低于31.0 kDa的多肽;(3)游离巯基和表面疏水性测定表明,适当的胰蛋白酶酶解能够使小麦面筋蛋白结构变松散,暴露出更多TG酶作用位点,从而促进TG酶的共价交联;(4)扫描电镜结果表明适当的限制性酶解有利于TG酶催化小麦面筋蛋白生成结构致密的小麦面筋网络结构,而过度水解将会使小麦面筋蛋白三维网状结构消失。本研究提高了小麦面筋蛋白的应用范围,提供了一种高效并且安全可靠的双酶复合改性植物蛋白的方法。

参考文献

- [1] Wieser H. Chemistry of gluten proteins [J]. Food Microbiology, 2007, 24: 115-119
- [2] Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing [J]. Trends in Food Science & Technology, 1998, 9(5): 204-210
- [3] 董建云,钟昔阳,罗水忠,等.谷氨酰胺转氨酶对小麦蛋白凝胶性的影响研究[J].中国粮油学报,2014,29(12):5-11
DONG Jian-yun, ZHONG Xi-yang, LUO Shui-zhong, et al. Gelling characteristics of wheat protein modified by transglutaminase [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(12): 5-11
- [4] 张涛,沐万孟,江波,等.谷氨酰胺转氨酶对豆腐凝胶强度的影响[J].现代食品科技,2007,23(10):18-21
ZHANG Tao, MU Wan-meng, JIANG Bo, et al. Effects of Transglutaminase on the Gel Strength of Tofu [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(10): 18-21
- [5] Ghribi A M, Gafsi I M, Sila A, et al. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate [J]. Food Chemistry, 2015, 187: 322-330
- [6] Zhang Y, Tan C, Zhang X, et al. Effects of maltodextrin glycosylation following limited enzymatic hydrolysis on the functional and conformational properties of soybean protein isolate [J]. European Food Research and Technology, 2014, 238(6): 957-968
- [7] Martinez K D, Baeza R I, Millan F, et al. Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams [J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(3), 361-369
- [8] 刘宏芳,侯瑶,赵新淮.大豆蛋白限制性酶解修饰与产品的溶解性和保水性变化[J].东北农业大学学报, 2009, 40(1): 97-103
LIU Hong-fang, HOU Yao, ZHAO Xin-huai. Limited hydrolysis of soybean proteins and modifications in solubility and water retention capacity of final products [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2009, 40(1): 97-103
- [9] Song C L, Zhao X H. Structure and property modification of an oligochitosan-glycosylated and crosslinked soybean protein generated by microbial transglutaminase [J]. Food Chemistry, 2014, 163: 114-119
- [10] Mu L, Zhao M, Yang B, et al. Effect of ultrasonic treatment on the graft reaction between soy protein isolate and gum acacia and on the physicochemical properties of conjugates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(7): 4494-4499

- [11] Song Y, Zheng Q. Dynamic rheological properties of wheat flour dough and proteins [J]. Trends in Food Science & Technology, 2007, 18(3): 132-138
- [12] Myers J K, Nick Pace C, Martin Scholtz J. Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding [J]. Protein Science, 1995, 4(10): 2138-2148
- [13] Celus I, Brijs K, Delcour J A. Enzymatic hydrolysis of brewers' spent grain proteins and technofunctional properties of the resulting hydrolysates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(21): 8703-8710
- [14] Zhang H H, Li Q, Claver I P, et al. Effect of cysteine on structural, rheological properties and solubility of wheat gluten by enzymatic hydrolysis [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(10): 2155-2161

现代食品科技