

类蛋白反应法改性水解明胶的条件

安广杰 王 璋

(江南大学食品学院,无锡,214036)

摘 要 研究了在木瓜蛋白酶作用下蛋氨酸酯与水解明胶进行类蛋白反应的条件,利用单因素实验并通过主成分分析法对几个评价指标进行综合评定,得出最佳反应条件为:氨基酸酯采用蛋氨酸月桂醇酯、底物浓度为40%,反应时间为6 h,加酶量为0.1%水解明胶,加酯量为0.025 mol/100 g水解明胶,反应温度为55℃,pH为6.0。

关键词 类蛋白反应,水解明胶,蛋氨酸酯

类蛋白反应是利用浓缩的蛋白水解物在合适的条件下(底物浓度、pH、底物类型等)经蛋白酶的作用合成类蛋白产品。类蛋白反应最早是由日本人发现,由于它可以较好地解决水解蛋白的苦味去除而引起人们的重视。Yamashita等利用合成类蛋白反应在木瓜蛋白酶存在下,将蛋氨酸乙酯导入大豆蛋白和酪蛋白中,这种反应改变了蛋白的氨基酸组成,同时也提高了其生物效价^[3]。张雅丽等报道了以大豆蛋白和芝麻蛋白的胰蛋白酶水解物为原料,以胃蛋白酶为催化剂合成类蛋白物并对其进行了营养评价,结果表明,利用该反应可以进行优质蛋白质资源的开发^[1,2]。Watanabe等以明胶做亲水性原料,亮氨酸酯做亲油性材料,在木瓜蛋白酶作用下进行酶反应,得到蛋白质型表面活性剂^[4]。众所周知,水解明胶以其优良的水溶性、营养丰富以及生物活性等特性为人们所喜爱。但由于某些氨基酸的缺乏,降低了它的应用范围,同时如果采用单纯直接地加入氨基酸的方法不利于其吸收利用。另外由于水解明胶的相对分子质量相对于明胶低,且亲水性氨基酸含量相对较高,亲油性较弱,所以要使水解明胶成为营养丰富而且功能性质较好的理想食品,做一定的改性是非常必要的。

本试验的目的在于利用水解明胶和蛋氨酸酯,通过类蛋白反应接上氨基酸月桂酯,一方面提高了其营养价值,另一方面也较其他方法导入氨基酸的改性蛋白的乳化性、稳定性得到提高,克服了水解明胶由于分子质量较小而导致的理化功能急剧降低的缺点,该产品可应用于化妆品生产、食品添加剂等领域。另外通过对类蛋白反应条件的研究,也为研究其反应机理提供了理论依据。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料与设备

1.1.1 试剂与材料

DL-蛋氨酸:生物试剂;乙醇、月桂醇、丙酮、十二烷基硫酸钠(SDS)等:均为分析纯;水解明胶、DL-蛋氨酸乙酯、DL-蛋氨酸月桂醇酯:均为实验室自制;木瓜蛋白酶:购于NOVO公司;氨基酸自动分析仪(美国安捷伦1100);722型光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂);超级恒温水浴锅:超级恒温浴(上海市实验仪器厂);高速分散器:JANKE & KUNKEL IKA^R-Labortechnik ULTRA-TURRAX T25;LG-3型多用冰冻干燥机(宁波市生化仪器厂);90-2型定时恒温磁力搅拌器(上海沪西分析仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 表面活性剂合成

参考Yamashita等的一步法进行。称取一定量的水解明胶加入至一定pH的缓冲溶液中,充分溶解,然后加入蛋氨酸酯,再加入木瓜蛋白酶和适量的L-半胱氨酸进行反应。蛋氨酸月桂醇酯改性时须加入20%丙酮碳酸盐缓冲溶液,其他条件同上。测定不同时间对反应进程的影响时,分别在0、0.5、2、6、12、24 h取样,用最终体积分数为80%的乙醇沉淀样品并洗涤,沉淀产物经干燥获得干品。

1.2.2 氨基酸组成与含量的测定

采用自动氨基酸分析仪测定。

1.2.3 乳化性测定

采用浊度法^[6]。精确称取0.5 g样品于250 mL烧杯中,加入50 mL去离子水,加热溶解(40℃)一定时间,然后在磁力搅拌下缓慢加入5 mL大豆色拉油,并用高速分散机以20 500 r/min的转速搅打1

第一作者:博士研究生。

收稿时间:2004-09-01,改回时间:2004-10-29

min。搅打后立即取 1 mL 乳化液于 100 mL 容量瓶中,加入 0.1% 的 SDS 溶液定容至刻度并摇匀,然后测定样品在 500 nm 处的吸光度。此外,搅打后立即取 25 mL 样品于具塞试管中并置于 30℃ 恒温水浴静置 1 h,1 h 后将试管取出并轻轻摇动试管使其中的样品混匀,随后取 1 mL 样品按上述方法再稀释,并测定稀释样品在 500 nm 处的吸光度。样品浊度的定义为 T , $T = 2.303A_{500}/I$,其中 I 为光路长度,此处为 1 cm。由于采用的稀释倍数相同,乳化剂的乳化能力 (EC) 可直接用搅打结束后测定的样品浊度 (T_1) 表示。乳化稳定性 (ES) 则用 1 h 后的浊度 (T_2) 变化程度表示, $ES = T_2/T_1$ 。

2 结果与讨论

2.1 蛋氨酸酯的醇种类的选择

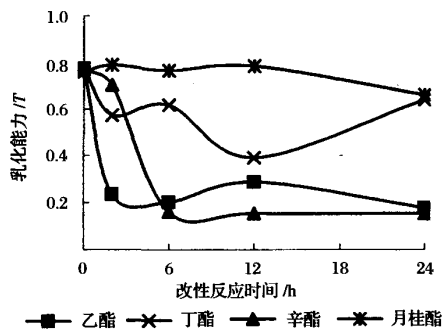


图1 不同蛋氨酸酯改性水解明胶后的乳化能力随时间的变化

注:反应条件:底物浓度 40%、温度 57℃、pH 6.0、加酶量 0.1% 水解明胶、加酯量 0.025 mol/100 g 水解明胶。

由图 1 可知,经过 4 种蛋氨酸酯改性的水解明胶的乳化能力随酯中烃链长度的不同而有所差别。由长链醇所形成的酯改性后的水解明胶的乳化能力较短链的强,这是因为长的烃链具有较强的疏水性,与亲水性的水解明胶反应能形成较好的两亲性产物,使其乳化能力加强。对于每种改性剂来说,在开始反应的 6 h 内,蛋氨酸的丁酯和乙酯改性的水解明胶的乳化能力下降较快,这是因为在这段反应时间,水解作用占主导地位,所以水解明胶被进一步水解,相对分子质量变小,从而导致乳化能力下降。但随着反应的进一步的进行,水解作用减弱,合成同时进行,所以乳化能力不再有明显变化。而对于辛酯改性的水解明胶,不同改性时间所得产品的乳化能力变化比较复杂。在前 2 h 的改性反应时间内,产品的乳化能力下降较

快,而后逐渐上升,说明合成作用大于水解作用,随后乳化能力的下降是由于相对分子质量的变小所致,当水解作用不再进行时,乳化能力又有所上升。月桂酯改性水解明胶,在不同改性时间产品的乳化能力变化不明显,但随着反应时间的延长,乳化性有所下降。说明经过蛋氨酸月桂酯改性的水解明胶具有较好的乳化性能,考虑到改性后水解明胶应有较好的功能性质,因此以下实验选用蛋氨酸月桂酯作为改性剂。

另外由图 1 可知,比较 4 种改性剂对水解明胶的改性效果来看,在改性过程中,产品的乳化性均有一个升高的过程,但对不同改性剂所需的改性时间不同,并且酯中烃链越短所需改性时间就越长,由此也说明烃链越长越容易进行改性反应。

2.2 影响类蛋白反应的条件

本实验综合得率、乳化性、乳化稳定性、蛋氨酸含量 4 个指标作为评价的依据,考察了底物浓度、时间、加酶量、加酯量、温度、pH 6 个因素对水解明胶改性的影响,实验结果见表 1。利用 sas 软件对单因素数据结果进行主成分分析,可得 4 个主成分,处理结果如下:

协差阵的特征值

	特征值	差异	贡献率	累计贡献率
1	117.277209	29.341239	0.5698	0.5698
2	87.935969	87.330485	0.4272	0.9970
3	0.605485	0.602916	0.0029	1.0000
4	0.002569		0.0000	1.0000

特征向量

	主成分 1	主成分 2	主成分 3	主成分 4
x_1	0.820456	- .571044	-.027539	0.001378
x_2	-.000039	0.001257	0.022791	0.999739
x_3	0.571254	0.820773	-.000347	-.001002
x_4	0.022808	-.015479	0.999361	-.022762

由于前 2 个主成分累计贡献率达到 99%,根据累计贡献率超过 85% 的原则,选择前 2 个主成分即可反映 5 个指标的变化。另外,在第 2 主成分中,乳化稳定性的系数为 0.820 773,而其他指标的系数均较小,说明第 2 主成分只是主要反映了乳化稳定性的变化,而在本实验中,乳化稳定性并非主要指标,因此在综合评定时只选用第 1 主成分,即 $y = 0.820456x_1 - 0.000039x_2 + 0.571254x_3 + 0.022808x_4$ 。

评定结果见表 1。根据评定结果,酶合成的反应条件为:底物浓度为 40%,反应时间为 6 h,加酶量为水解明胶的 0.1%,加酯量为 0.025 mol/100 g (水解明胶),反应温度为 55℃,pH 为 6.0。

表 1 水解明胶改性反应的影响因素

因 素	水 平	指 标				综合指标
		X ₁ 得率/%	X ₂ 乳化能力 (T)	X ₃ 乳化稳定性/%	X ₄ 蛋氨酸含量 (蛋白质)/%	
底物浓度/%	20	43.27	0.698	68.65	2.60	76.94087
	30	49.68	0.624	73.80	2.61	85.1605
	40	63.50	0.553	75.83	2.63	97.15552
	50	62.88	0.553	58.33	2.67	85.63119
时间/h	0	37.45	0.659	86.01	2.30	83.37748
	0.5	39.23	0.498	88.43	1.26	86.25647
	2	49.79	0.525	83.77	2.34	91.5308
	6	63.50	0.553	75.83	2.63	97.15552
	12	55.87	0.580	69.84	2.63	87.46025
	24	52.51	0.553	88.75	1.93	96.7713
加酯量 /mol·kg ⁻¹ (水解明胶)	0	74.58	0.580	94.44	0.80	117.4406
	0.25	75.16	0.649	98.59	2.61	120.5584
	0.50	63.50	0.553	75.83	2.63	97.1552
温度/℃	35	63.50	0.553	75.83	2.63	97.15552
	45	63.31	0.624	90.78	4.40	106.4916
	55	66.53	0.656	99.75	4.75	114.6585
pH	4	68.74	0.622	71.11	3.60	98.26494
	6	72.02	0.544	82.20	3.66	107.8084
	8	68.99	0.622	75.93	4.02	101.75122
	9	63.50	0.553	75.83	2.63	97.15552
	10	61.11	0.645	92.14	3.13	105.6101
加酶量/%	0.1	74.13	0.484	81.91	3.45	109.2554
	0.5	68.61	0.516	81.25	3.27	104.5549
	1.0	63.50	0.553	75.83	2.63	97.15552
	2.0	63.14	0.576	82.40	2.81	101.0279

2.2.1 底物浓度的影响

底物浓度的大小是类蛋白反应的一个重要影响因素。一般情况下合成类蛋白所需底物浓度为 20%~40%。而更低的底物浓度对水解反应的进行是有利的。因此本实验选取 20%、30%、40% 和 50% 这 4 个水平研究底物浓度对反应的影响。由表 1 可知,在 20%~40% 范围内,随着底物浓度的提高,得率逐渐增加,乳化性逐渐下降,乳化稳定性逐渐升高,当底物浓度达到 50% 时,得率略有下降,乳化性保持不变,而乳化稳定性下降。在整个浓度范围内,蛋氨酸含量均随底物浓度的升高而升高,但总体变化并不大。这是因为在底物浓度为 20%~40% 的范围,随着底物浓度的提高,得率的提高有 2 方面的原因,一是高的底物浓度不利于水解反应的进行,从而使分子质量下降较小。另外高的底物浓度促进了类蛋白反应速度的提高,使得 80% 乙醇不溶物增加,即得率提高。蛋氨酸含量的变化在一定程度上也反应了氨基酸酯的导入和水解明胶被进一步水解的情况。该指标的增减也反映了上面所述的类蛋白反应随底物浓度变化的规律。乳化能力随着底物浓度的提高而有所下降,可能是底物浓度不同所形成的产物结构不同所致,目

前尚无法解释清楚,有待于做进一步的类蛋白反应机理详细探讨。综合以上指标可知,最佳反应的底物浓度为 40%。

2.2.2 反应时间的影响

有关类蛋白反应所需时间在文献报道中说法不一,反应时间在 15 min~36 h 不等。实验中分别选取 0、0.5、2、6、12、24 h。由表 1 可知,在开始的 0.5 h 内,蛋氨酸含量下降,而得率仅略有上升,乳化能力下降,说明在这段反应时间水解作用占优势,蛋氨酸被水解下来,也导致分子质量降低,引起乳化性下降。从 0.5~6 h 这段时间内,得率及蛋氨酸含量均呈上升的趋势,而从 6 h~24 h 则略有下降的趋势。说明在反应 0.5 h 以后,类蛋白反应进行较快,而在 6 h 以后,2 种反应基本维持平衡状态。其乳化能力变化的规律可见 2.1 节中月桂酯改性过程对乳化能力的影响。

2.2.3 加酯量的影响

选择 4 个加酯量水平,即 0、0.025、0.05 mol/100g(水解明胶)进行类蛋白反应。由表 1 可知,当不加酯时,其得率较加酯量为 0.5、1.0 mol/kg(水解明胶)高,其原因为当加酯量较高时,反应体系变得粘

稠,流动性差,不利于酶的作用。同时类蛋白反应也可以在水解明胶分子之间进行,所以不加酯时的得率要比不进行类蛋白反应(即反应时间为0)的高。另外随着加酯量的增加,蛋氨酸含量明显上升,说明蛋氨酸月桂酯与水解明胶之间的反应明显竞争了水解明胶之间的反应。综合几个评价指标的结果表明,加酯量为0.25 mol/kg(水解明胶)时最佳。

2.2.4 温度对反应的影响

因为在较低的温度下蛋氨酸月桂酯难于溶解,在较高温度下又容易导致酶的失活,所以实验中选择了35℃、45℃和55℃来考察反应温度对反应的影响。由表1可知,随着反应温度的提高,各个指标都随着增加,说明高的反应温度有利于反应的进行,所以选择55℃作为反应的温度。

2.3 pH值对反应的影响

类蛋白反应中pH的选择是很重要的,因为类蛋白反应与水解反应的最佳pH范围往往是不同的,但也和别的反应条件有关。实验中选择在pH4~10的范围内研究pH对类蛋白反应的影响。由表1可知,pH为6时其综合评价指标最高,因此选择pH6作为类蛋白反应的pH条件。这也与Fujimaki等的报道一致^[5]。

2.4 加酶量的影响

固定其他反应条件,选择加酶量分别为0.1%、0.5%、1.0%、2.0%水解明胶来研究加酶量对类蛋白反应进行的影响。由表1可知,随着加酶量的增加,得率的总体变化趋势是下降的,乳化能力逐渐上升,乳化稳定性的变化趋势与蛋氨酸含量的变化趋势相同,均是当加酶量低于1%时,随着加酶量增加而降低,当加酶量大于1%时,随着加酶量增加而略有升高。根据综合指标的比较,选择酶添加量为0.1%水解明胶较为合适。

3 结 语

(1)通过比较蛋氨酸乙酯、丁酯、辛酯和月桂酯分别改性水解明胶的结果可知,蛋氨酸月桂酯反应所得类蛋白产物具有较好的乳化能力,而且反应进行较快。

(2)通过单因素实验和主成分分析法对几个评价指标进行综合评定,得出最佳反应条件为:氨基酸酯采用蛋氨酸月桂醇酯,底物浓度为40%,反应时间为6h,加酶量为0.1%水解明胶,加酯量为0.25 mol/kg(水解明胶),反应温度为55℃,pH为6.0。

参 考 文 献

- 1 张雅丽,王凤翼,宋世廉等.蛋白质酶法修饰的初步探讨—大豆蛋白和芝麻蛋白的合成类蛋白研究[J].食品与发酵工业,1994(2):8~13
- 2 张雅丽,王凤翼,宋世廉等.蛋白质酶法修饰的初步探讨—大豆蛋白和芝麻蛋白的合成类蛋白研究[J].食品与发酵工业,1994(5):67~68
- 3 Michiko Yamashita, Soichi arai, Yoshimasa Amano et al. A novel one-step process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins: application to soy protein and flour for enhancing their methionine levels[J]. Agric Biol Chem, 1979, 43 (5), 1 065~1 068
- 4 Michiko Watanabe, Atsuko Shimada, Etsuko Yazawa. Proteinaceous surfactants produced from gelatin by enzymatic modification: application to preparation of food items[J]. Journal of Food Science, 1981, 46, 1 738~1 981
- 5 Fujimaki M, Arai S, Yamashita M. Enzymic protein degradation and resynthesis for protein improvement. In R.E. Feeney, Whitaker J R ed. Food proteins: improvement through chemical and enzymatic modification[M]. Washington, DC: American Chemical Society, 1977. 156~187
- 6 Kevia N Pearce, John E Kinsella. Emulsifying properties of proteins: evaluation of turbidimetric Technique[J]. J Agric Food Chem, 1978, 26(3): 716~722

Modification of Hydrolyzed Gelatin Through Plastein Synthesis

An Guangjie Wang Zhang

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze university, Wuxi, 214036, China)

ABSTRACT In this study, we optimize the plastein synthetic conditions from methionine esters and hydrolyzed gelatin under the catalyzation of papain. Statistics methods of single factor and princomp analysis were used in this paper. The optimal reaction conditions using methionin dodecanol ester as substrate were: substrate concentration 40%, enzyme to substrate ratio 0.1%, reaction temperature 55℃, pH6.0 and the reaction time 6 h.

Key words plastein reaction, hydrolyzed gelatin, methionine esters