

食品蛋白质的酶法改性

王 璋

(食品科学与工程系)

0 前言

在开发蛋白质资源以满足人们日益增长的需求时, 食品科学家逐渐认识到蛋白质功能性质(functionality)的重要性。一些重要的蛋白质资源, 例如豆类(大豆和蚕豆)蛋白质和油料种子(花生和棉子)蛋白质只要补充个别氨基酸就能使其氨基酸组成接近或达到FAO推荐的模式。然而, 这些蛋白质被应用于食品时所表现出来的功能性质却不能充分满足食品加工的要求, 因此对食品蛋白质的改性已成为开发和利用蛋白质资源的重要研究课题。

1 食品体系中蛋白质的功能性质

“功能性质”这个术语应用于食品成分时, 是指除营养性质外能影响该食品成分使用价值的任何性质。大多数功能性质影响着食品的感官性质(特别是食品的质构性质), 然而, 它们在决定食品或食品成分在加工和贮藏中的物理性质上也起着重要的作用^[1]。蛋白质的功能性质是指能使蛋白质对食品的优良特性作出贡献的那些性质。

在任何一种食品中的蛋白质, 通常都能呈现几种显著的功能性质(表1)。可以将蛋白质的功能性质分为三类: (1)水合性质, 它取决于蛋白质-水相互作用; (2)与蛋白质-蛋白质相互作用有关的性质; (3)表面性质。第一类性质涉及到吸收水(保留水)、润湿、溶胀、粘合、分散性、可溶性和粘度。第二类性质在沉淀作用、凝胶作用和形成其他各种结构(例如面团和蛋白质纤维)的过程中才表现出来。第三类性质主要关系到蛋白质的表面张力、乳化作用和起泡特性。显然这三类性质不是完全独立的。例如凝胶作用不仅包括蛋白质-蛋白质相互作用, 而且还包括蛋白质-水相互作用; 而粘度和可溶性都取决于蛋白质-水和蛋白质-蛋白质相互作用。由于根据蛋白质的结构特征预测它的功能性质往往是不成功的, 因此, 有必要通过实验方法评价蛋白质的功能性质。评价试验包括准确测定能严格定义的物理化学性质(粘度、表面张力和溶解度)到简单的终点(应用)试验, 例如, 测定面包烘烤后体积的减小或汉堡包在烧煮后水分的损失。由于应用试验代价很大而且耗费时间, 因此, 最近将较多的注意力放在模型体系的简单试验上。例如, 测定一个简单的油-水-蛋白质体系的乳化能力和(或)稳定性, 或在有控制的条件下测定一个蛋白质粉末的吸收水的作用

表1 各种食品所需要的蛋白质功能物质^[2]

食 品	功 能 性 质
饮料	可溶性(在不同pH下)、热稳定性、粘度
汤和调味汁	粘度、乳化作用、保留水
面团的形成及焙烤产品 (面包和蛋糕)	形成具有粘弹性的组织和薄膜、粘合性、热变性、凝胶作用、吸收水、乳化作用、起泡、褐变
乳品	乳化作用、保留脂肪、粘度、起泡、凝胶作用、凝结
鸡蛋代用品	起泡、凝胶作用
肉制品(香肠和火腿)	乳化作用、凝胶作用、粘合性、吸收(保留)水和脂肪
肉的代用品(组织化蛋白质)	吸收(保留水)水和脂肪、不溶性、粘度、咀嚼性、粘合性、热变性
食品涂层	粘合性、粘附性
甜食(牛乳巧克力)	分散性、乳化作用

2 食品蛋白质的酶法改性

前面已提到一些重要的植物蛋白质在功能性质上不能充分满足食品加工的需要,而这些植物蛋白质在缓解全球范围的蛋白质紧缺上又是举足轻重的,因此,采用适当的方法将这些蛋白质改性,使它们能适合于更广泛的应用,已成为近年来在开发和利用食品蛋白质新资源方面普遍受关注的研究课题。

蛋白质改性的方法主要有化学方法和酶法。蛋白质在酸或碱催化下水解是最简单的化学改性方法。除此以外,采用某些化学试剂,例如亲核试剂、氧化剂、还原剂和芳香族环取代剂,使它们同蛋白质侧链上各种敏感的基团发生反应,也可以使蛋白质改性。然而,化学方法改性在产生预期的效果的同时,也有可能营养和毒理方面造成有害的效应。例如,蛋白质在酸或碱处理下会造成某些氨基酸的损失;又如,采用各种化学试剂处理蛋白质时所产生的蛋白质衍生物所包含的非天然结构或许不能被人体代谢,甚至也有可能产生抑制作用或毒性^[3]。因此,蛋白质的化学方法改性在食品加工中的应用受到了很大的限制。然而,蛋白质的酶法改性一般不会导致营养方面的损失,也不会产生毒理上的问题。此外,蛋白质的酶法改性还具有下列优点:(1)酶作用具有特异性;(2)在低酶浓度下也能产生很显著的效果;(3)酶法改性可以在温和的条件下进行,能耗很低^[4]。因此,蛋白质的酶法改性受到食品科学家的普遍重视,并且已在食品加工中得到广泛的应用。本文将集中讨论食品蛋白质酶法改性的原理、方法及其应用。

根据酶催化反应的性质可将食品蛋白质酶法改性分为两类:非水解改性和水解改性。食品科学家曾经完成了三种非水解改性:磷酸化、脂肪氧合酶催化形成交联和酪氨酸羟基化^[5]。然而,蛋白质的水解改性具有更为重要的实用价值,因此,目前有关蛋白质酶法改性的研究

也大多集中在水解改性。在蛋白质水解改性中采用了蛋白酶。在蛋白酶的作用下,蛋白质分子中的肽键被裂开,这可能存在两种情况,即蛋白质分子中有相当数量的肽键被裂开,或有限的甚至个别的肽键被裂开。我们将集中讨论蛋白质在酶催化下有控制的水解。

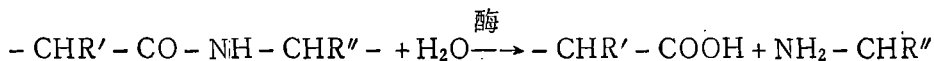
2.1 蛋白质在酶催化下有控制水解的原理

许多研究证明,蛋白质在酶催化下有控制的水解能改进蛋白质的某些功能性质。1976年 Adler—Nissen^[6]首先提出了水解度(DH)的概念:

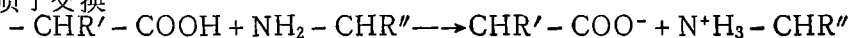
$$DH = \frac{h(\text{被裂开的肽键数})}{h_{\text{总}}(\text{蛋白质的总肽键数})} \quad (1)$$

1977年 Adler—Nissen^[1]又采用了这个参数描述了控制蛋白质酶催化水解的原理和方法。蛋白质在酶催化下被水解,随着被裂开的肽键数不断地增加,反应体系的pH不断地下降,如果在反应过程中连续地加入碱液就有可能保持反应体系的pH值不变。整个过程可参见下列反应式:

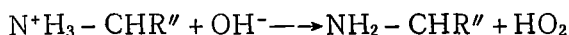
(1) 肽键的裂开



(2) 质子交换



(3) 氨基的滴定



根据下式可以计算反应中蛋白质的水解度(DH)

$$DH = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{h_{\text{总}}} \times 100\%$$

式中各项的意义如下: B ——滴定时碱液消耗的量(ml); N_b ——碱液的浓度(mol); α —— α - NH_2 的平均离解度; M_p ——反应体系中蛋白质的量,即 $N \times f_N$, f_N 为 Kieldahl 转换因子,对于大豆蛋白,它等于6.25; h ——单位重量蛋白质底物中肽键的总量(meq/g)。 α - NH_2 的平均离解度可按下列式计算:

$$\alpha = \frac{10^{\text{pH}-\text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}}} \quad (3)$$

式中pH代表反应体系的pH值,而pk代表在蛋白质水解过程中被释放出的 α - NH_2 的平均pk值,它随温度而变,可以用实验方法测定。

根据方程式(2),可以从碱液的消耗量计算蛋白质的水解度。当蛋白质的水解度达到预期的数值时,设法使反应体系中的蛋白酶失活,这样就能有效地控制蛋白质在酶催化下水解的程度。有关式(2)和式(3)中各参数的具体测定或详细计算的方法可参见参考文献[8]中的第五和第六两章。Adler-Nissen描述的控制蛋白质酶催化水解的原理和方法被称为pH-Stat技术,它已成为蛋白质酶法改性中一项基本的技术。

2.2 酶法改性对蛋白质功能性质的影响

蛋白质在酶催化下随着肽键不断地被裂开,肽链的长度逐渐变短,它的一些重要的功能性质发生了显著的变化,以大豆蛋白质为例来解释这一现象。

溶解度 从图1可以看出大豆蛋白质在微生物蛋白酶作用下，溶解度随着水解度的提高而增加，而且当水解度较高时，大豆水解蛋白质的溶解度在相当宽广的pH范围内实际上不再受pH的影响。

乳化能力 如图2所示，大豆蛋白质经酶法改性后提高了乳化能力，然而过高的水解度却导致乳化能力下降。蛋白质的乳化作用涉及到同一分子中的亲水和疏水基团，因此，蛋白质分子不能太小。此外，在油-水界面上形成薄膜和表面变形对乳化作用是重要的，这也意味着蛋白质分子不能太小。从提高改性蛋白质的乳化能力来看，控制酶水解的程度是重要的。

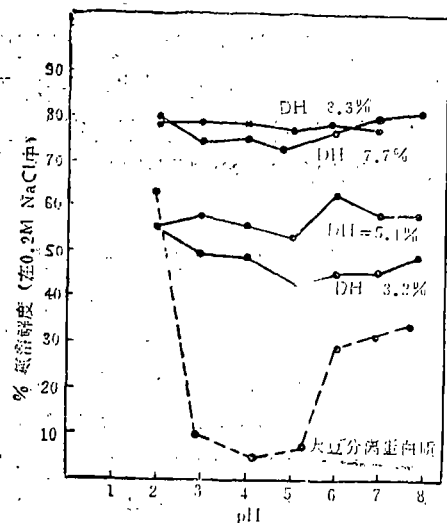


图1 在不同水解度(DH)下大豆蛋白质的溶解度和pH的关系。在pH8酶解大豆分离蛋白质，在预定DH加酸使酶失活

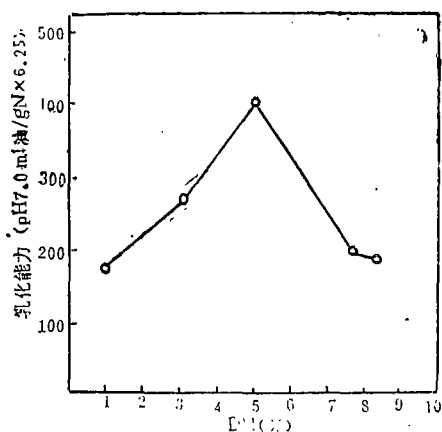


图2 大豆水解蛋白质的乳化能力和DH的关系。酶催化蛋白质水解的条件同图1注中所指出的^[9]。

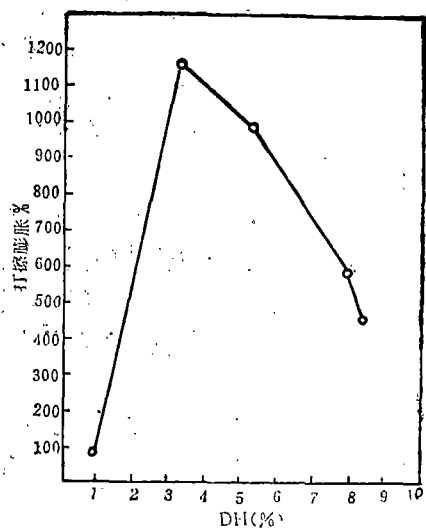


图3 大豆水解蛋白质的起泡能力和DH的关系，酶催化蛋白质水解的条件同图1注中指出的^[9]。

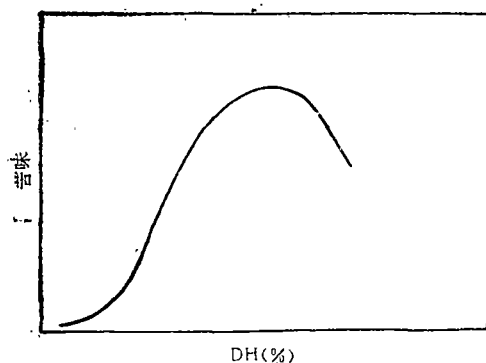


图4 蛋白质苦味和DH之间的关系(示意图) 酶催化蛋白质水解的条件同图1注中指出的^[9]。

起泡能力 类似于乳化能力,大豆蛋白质经酶水解后起泡能力也显著地提高,过高的水解度也导致起泡能力下降(参见图3)。考虑到蛋白质乳化作用的机制和起泡作用的机制多少有点相似,这就不足为奇的了。

蛋白质酶法改性在改进一些重要功能性质的同时也产生了一些有害的效应,其中最受食品科学家关注的是水解蛋白质的苦味问题。水解蛋白质的苦味随水解度增加而增加,然而也有实验结果表明,当水解度超过一定数值时,苦味又减小,参见图4。

Belitz等⁽¹⁰⁾认为产生苦味的化合物含有一个疏水区和一个亲水区,而这两个区域必须相隔0.3nm,产生苦味的天然L-氨基酸和肽也都具有这样的构型。在一个完整的球状蛋白质分子中,疏水的侧链定向在分子的内部,因而它们不能同味蕾相作用⁽¹¹⁾。因此,像大豆蛋白和酪蛋白这样的蛋白质本身并没有苦味,然而,当它们被水解时,因疏水区域逐渐暴露出来而产生了苦味。当蛋白质完全水解成游离氨基酸时,苦味又减轻,这是因为疏水性的肽比相应的混合氨基酸要苦一些。

在pH-Stat技术中,当蛋白质在酶催化下达到一定水解度时一般采用加热或调节反应体系pH至酸性的方法使酶失活。采用这样的步骤使酶失活显然会导致酶法改性蛋白质某些功能性质的丧失。此外,根据pH-Stat技术的原理,蛋白质的水解度也仅仅是一个平均水解度。凝胶过滤色谱的结果也表明,酶法改性蛋白质中含有高分子量和低分子量的肽,而中间分子量肽所占的比例却较少⁽⁹⁾。对此实验结果可作如下的解释:在蛋白酶催化下,反应体系中并非所有的蛋白质按相同的方式和同时发生降解,更可能的情况是,蛋白质分子一个接着一个地被降解,因此,在任何反应时刻反应体系中总含有较小的肽和未发生降解的蛋白质分子。

为了进一步改进蛋白质酶法改性的技术,Sejr-Olsen和Adler-Nissen⁽¹²⁾在前人工作的基础上提出了在一个膜反应器中完成连续水解反应的设想,并在实验室规模上进行了试验。他们所提出的新工艺实际上是将pH-Stat技术和超滤技术结合起来。如果选择分子量截留值(Molecular Weight Cut off)一定的超滤膜,反应器中的蛋白质降解到一定程度时即通过超滤膜,从而同酶分开,而分子量较大的蛋白质底物在酶的催化下继续水解,这样就可以得到分子量较一致的酶法改性蛋白质。当然将这个工艺推广到生产实际还需要做大量的工作。

Adu-Amankwa⁽¹³⁾等报道将霉菌蛋白酶固定在复制的胶原上,用这种固定化酶水解大豆蛋白质能得到具有理想的起泡和涂抹性质的酶法改性蛋白质。

本文一开始就提到,从蛋白质的结构预测它的功能性质是很困难的。采用pH-Stat技术得到的酶法改性蛋白质实际上是一个复杂的混合物,它的成分除了取决于被改性的蛋白质的种类和水解度外,还取决于所采用的蛋白酶的性质。在实际工作中最经常采用的是微生物蛋白酶。微生物蛋白酶一般都具有较低的特异性,这也增加了研究酶法改性蛋白质的结构和功能性质关系的困难。

目前,在食品蛋白质酶法改性的过程中有效地控制它们的结构还存在很大的困难。尽管如此,蛋白质酶法改性的一般原理和方法仍然被广泛地应用于食品加工和保藏,并出现不断扩大的趋势。

3 食品蛋白质酶法改性的应用

下面将通过一些实例来说明食品蛋白质酶法改性在食品工业中的应用。

1 等电点可溶大豆水解蛋白(ISSPH)的制备

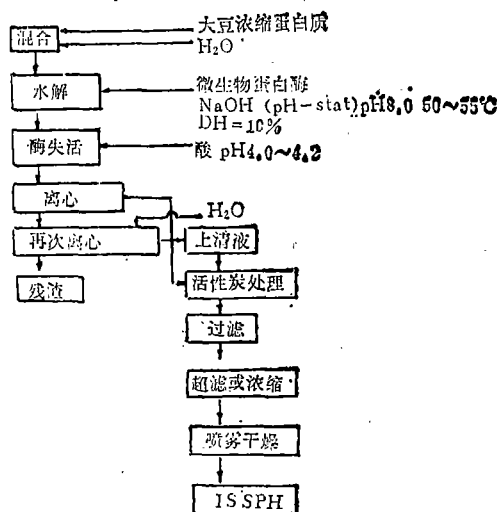


图5 等电点可溶大豆水解蛋白(ISSPH)的制备

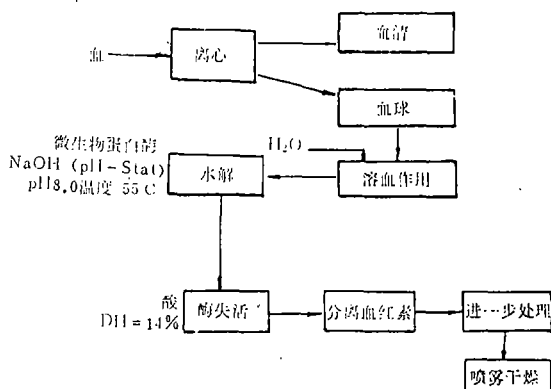


图6 血的酶法脱色

以低温脱脂大豆为原料，经过四步酸洗，可将寡糖和豆腥味成分除去并得到蛋白质含量达到70%的大豆浓缩蛋白，然后按照图5所示的工艺流程生产ISSPH⁽¹⁴⁾。ISSPH在广宽的pH范围，特别是在大豆蛋白的等电点附近是溶解的，因此，它可应用于某些食品，例如软饮料。

3.2 血红蛋白的脱色

血是肉类加工工业的重要副产品，然而，由于血中含有血红蛋白，使得在食品工业中大量地利用血遇到困难。按照图6所示的工艺流程可以除去血红蛋白中的血色素，从而为食品工业提供了新的蛋白质原料⁽¹⁵⁾。在图6所示的工艺流程中，采用pH-Stat技术将血红蛋白进行有控制的酶催化水解。血红蛋白在改性的同时血色素部分同蛋白质部分脱离，为后继的分离工作提供了可能性。

3.3 大豆水解蛋白用作肉的代用品

将含有大豆蛋白的盐水注射进肉以提高西式火腿的产量和质量已成为西式火腿加工工艺中的一个重要步骤。最近正在研究，将大豆分离蛋白进行有控制的酶催化水解以提高它的功能性质，例如溶解性和乳化能力，然后再注射到肉中去。采用这项技术有可能生产低成本的腌制肉类产品⁽¹⁶⁾。

3.4 酶法豆乳工艺

在传统豆乳工艺的基础上应用大豆蛋白质酶法改性的原理，有可能提高豆乳的得率和质量。图7描述了酶法豆乳工艺的流程。在酶反应这一步骤中，如果在蛋白酶处理后接着使用果胶酶，那么豆乳中蛋白质和总固形物的提取率都能显著地提高⁽¹⁷⁾，并且豆乳粉的复水性也得到了改进。

3.5 用酶处理的方法从全脂大豆粉提取油脂和制备大豆水解蛋白

1978年Sejr-Olsen⁽¹⁸⁾研究了从全脂大豆粉提取油脂和制备大豆水解蛋白的新工艺。此

工艺的关键是采用微生物蛋白酶对全脂大豆粉中的蛋白质进行有控制的水解。当水解度增加到一定的数值时,再增加就会导致大豆蛋白质的乳化能力下降,于是油脂被逐渐分离出来,同时获得溶解度很高的大豆水解蛋白质。虽然Sejr-Olsen新工艺还需要作进一步的改进才能使油脂的回收率达到可以被工业界接受的水平,但是此工艺的基本原理给我们指出了一条不采用有机溶剂处理而直接从全脂大豆粉提取油脂和制备大豆水解蛋白的新道路。

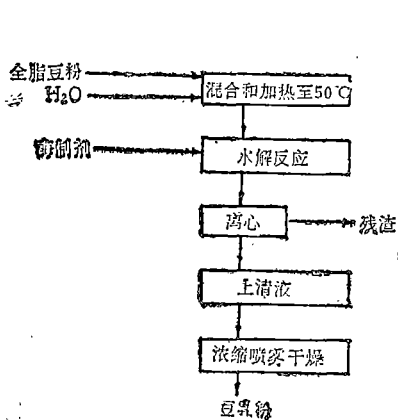
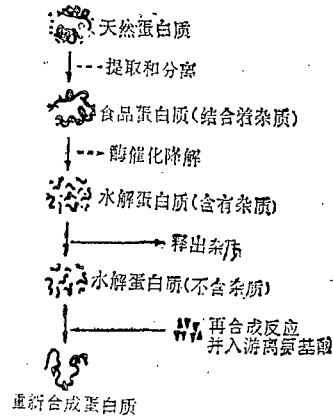


图7 酶法豆乳工艺流程

图8 蛋白质的酶催化降解和再合成反应过程^[3]

3.6 蛋白质的酶催化降解和再合成反应相结合以生产新的蛋白质

蛋白质降解后再合成已受到相当的关注,特别是在日本⁽¹⁹⁾,利用这个机制有可能显著地改变高蛋白质体系的性质。在这类反应中,首先在中性pH下用蛋白酶处理一种蛋白质,例如大豆蛋白质,使蛋白质水解成10000~20000道尔顿的蛋白质碎片。当蛋白质达到预期的水解度时即将反应体系浓缩至蛋白质浓度约35%(或加入限制性必需氨基酸),适当调整pH,利用反应体系中原有的蛋白酶或加入另一种蛋白酶催化再合成或重排少量的肽键。图8描述了整个反应的过程。

蛋白质降解后再合成的优点在于:提高了蛋白质的溶解度;改进蛋白质功能性质;减少苦味;通过共价结合并入限制性的必需氨基酸。虽然蛋白质的再合成有着上述的优越性,但是食品工业界在广泛地采用这个方法制备改性蛋白质时还必须考虑成本问题。

食品蛋白质酶法改性的原理在食品加工和保藏中还有许多其他的应用。例如,采用固定化蛋白酶处理啤酒,能控制啤酒中蛋白质的水解程度⁽²¹⁾,于是一方面提高了啤酒的稳定性,防止它在保藏中出现混浊,另一方面又避免了因蛋白质过分水解而导致的泡沫稳定性的丧失。又如,在以动物皮骨为原料的生产明胶的工艺中,采用碱性蛋白酶处理代替碱处理能缩短生产周期和提高产品质量⁽²¹⁾。又如采用蛋白酶对经过热处理的棉子粉进行有控制的水解,可以提高棉子蛋白质的提取率和改进它的功能性质^[22]。

食品蛋白质酶法改性在食品工业中已得到了广泛的应用。然而,由于酶法改性蛋白质的结构与功能性质的关系还没有被深入地研究,事实上评价食品蛋白质功能性质的方法还没有达到标准化的水平。因此,在这个领域中还有许多问题有待于解决。可以深信,随着上述这些问题的解决,再加上固定化酶和微胶囊酶等新技术的应用,食品蛋白质酶法改性的原理在食品工业中应用的潜力会更充分地发挥出来。

参 考 文 献

- 1 Kinsella J. E. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1976; 7: 219-280
- 2 Fennema O. R. Food Chemistry. 2nd ed, New York: Marcel Dekker Inc, 1985; 282-283
- 3 Feeney R. E. Whitaker J. R. In: Altschut A. M. Wilcke H. L. New protein Foods Vol 5 New York Academic Press, 1987; 181~219
- 4 Lee J. W. CRC Crit Rev Food Sci Nutr, 1985; 21: 289-322
- 5 Whitaker J. R. Puigserver A. J. Adv Chem Ser, 1982; 198: 57~87
- 6 Adler-Nissen J. J. Agric. Food Chem. 1976; 24: 1090~1093
- 7 Adler-Nissen J. J. Process Biochemistry, 1977; 12: 18~23
- 8 Adler-Nissen J. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins, London and New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986; 110~169
- 9 Adler-Nissen J. Olsen H. S. In Pour-EL A. Functionality and Protein Structure, Washington, D. C. Am Chem Soc 1979; 125~146
- 10 Belitz H. D. Chen W. Jugel H. Treleano R. Wieser H. Gasteiger J. Marsili M. Am Chem Soc Symp Ser 1979; 115: 93
- 11 Matoda T. Hata T. Agric Biol Chem, 1972; 36: 1422; 36: 1423~1431
- 12 Olsen H. S. Adler-Nissen J. Am Chem Soc Symp Ser, 1981; 154: 133
- 13 Adu-Amankwa B. Constantinides A. Vieth W. R. Biotechnol Bioeng, 1981; 23: 2609
- 14 Petersen B. R. In: Birch G. G. Blakbrough N. Parker K. J. Enzymes and Food Processing, London: Applied Science Publishers LTD, 1981; 149-175
- 15 Adler-Nissen J. Ann Nutr Alim, 1978; 32: 205~216
- 16 Olsen H. S. Adler-Nissen J. Process Biochemistry. 1979; 14: 6~11
- 17 Olsen H. S. MIFT Symposium Kuala Lumpur, 1979; July: 12~13
- 18 Olsen H. S. UK Patent, 1979; 2053228A
- 19 Fujimaki M. Arai S. Yamashita M. Adv Chem Ser, 1977; 160: 153~184
- 20 Godfrey T. Reichelt J. Industrial Enzymology, England: Macmillan Publishers LTD, 1983; 259
- 21 Petersen B. Yates J. R. UK Patent, 1979; 1557005
- 22 Childs E. A. J Food Sci, 1975; 40: 78-80