文章编号:1009-038X(2004)05-0069-05

脱脂小麦胚芽的蛋白酶法水解及其蛋白水解物的功能性质

克拉维, 周惠明, 孔祥珍
(江南大学 食品学院,江苏 无锡 214036)

摘 要:研究了不同蛋白酶对脱脂小麦胚芽的水解特性. 实验发现,碱性蛋白酶和复合风味酶可溶出脱脂小麦胚芽中蛋白质的 80%,而木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和复合蛋白酶则相对较低. 对采用碱性蛋白酶得到的脱脂小麦胚芽蛋白水解物(DWGP)的功能性质进行了研究,pH 值为 6.0 时氮溶指数约为 70%,中性条件下乳化活性、乳化稳定性及乳化能力分别为 64%,57% 及 62%. 在 pH 值为 7 和 70 ℃,持水性为 232%. DWGP 可作为一种潜在的功能性蛋白资源应用于食品中.

关键词:脱脂小麦胚芽;蛋白;酶;水解;功能性质
中图分类号:Q 51 **文献标识码**:A

Optimization of Wheat Germ Proteins Solubilisation by Enzymatic Hydrolysis and Functional Properties of Hydrolysates

Irakoze Pierre Claver, ZHOU Hui-ming, KONG Xiang-zhen
(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Enzyme preparations were used to increase the yield of soluble protein. Alcalase and Flavourzyme solubilized 80% of protein while Papain solubilized 70%. Neutrase and Protamex solubilized 60%. Functional properties of resulting protein hydrolysates using Alcalase were observed. Nitrogen solubility was 74%, emulsifying activity, stability and capacity were 64%, 57% and 62%, respectively. Water retention, at pH 7 and temperature 70 ℃, was 232%. DWGP is a potential source of functional protein for possible food applications.

Key words: defatted wheat germ; protein; enzyme; hydrolysis; functional properties

小麦胚芽营养丰富,大约含有质量分数 36% 蛋白质(清蛋白、球蛋白、麦醇溶蛋白和麦谷蛋白),质量分数 10% 的脂肪,质量分数 5% 粗纤维及质量分数 4% 灰分,其中清蛋白、球蛋白被认为是可溶性蛋白的主要组成成分[1]. 近年来,可溶性蛋白受到人们的关注,因为研究发现可溶性蛋白在面团形成中发挥着重要的作用[2~4].

采用适当的蛋白酶对蛋白质进行水解,反应条件温和,几乎没有副反应发生. 这已成为研究功能性蛋白质和多肽的主要处理手段. 作者就酶法处理小麦胚芽蛋白及其制品功能性质的影响进行了研究. 对可溶性麦胚蛋白的产量及其功能性质

收稿日期:2003-11-05; 修回日期:2004-04-07.
作者简介:克拉维(1970-),男,非洲布隆迪人,粮食、油脂与植物蛋白工程硕士研究生.
万方数据

的影响,也进行了研究.

1 材料与方法

1.1 原料

小麦胚芽来自上海福新面粉厂,经清理、筛选及内源酶的钝化处理(即在烘箱中于 105 ℃下加热钝化 15 min). 然后采用超临界 CO_2 萃取脱脂,粉碎后于 4 ℃下保存备用.

1.2 蛋白酶

碱性蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶均购自诺维信酶制剂公司;木瓜蛋白酶购自广州酶制剂厂(使用时以 16 mg/mL 分散于 pH 8.3 0.05 mol/L 硼酸钠缓冲液中,于 4 ℃,10 000 r/min 离心 10 min,上清液备用).

1.3 脱脂小麦胚芽的酶法水解

采用 5 种不同的蛋白酶对脱脂小麦胚芽进行水解,具体条件见表 1. 100 g 脱脂小麦胚芽分散于 700 mL 蒸馏水中,按适当的酶质量分数将酶加入其中,维持相应的温度、pH 值,反应 8 h. 反应期间(从开始计时) 60,120,180,240,300,360,420,480,540,600 min 分别从反应液中取出 75 mL,而后于4 ℃,10 000 r/min 分别离心 10 min,收集各自的上清液,立即于沸水浴中钝化蛋白酶. 这里在离心后才对蛋白酶进行钝化是为了防止淀粉加热糊化[5]. 然后喷雾干燥即得产品.

表 1 各种蛋白酶水解最适条件

Tab. 1 Hydrolysis conditions

酶名称	pH	T/℃	(E/S)/%
风味蛋白酶 500MG	7	50	1
木瓜蛋白酶	8	55	2
中性蛋白酶 0.8L	7	55	1
复合蛋白酶 1.5MG	7	40	1
碱性蛋白酶 2.4L	8	50	0.6

注 E/S:酶与底物质量比(m: m)

1.4 水解度(DH)的测定

采用 pH - Stat 法[6] 测定. 对碱性蛋白酶的水解度.

在 50 ℃下,30 g 脱脂麦胚粉分散于 400 mL 水中,调节 pH 值为 8.0,然后加入碱性蛋白酶,磁力搅拌反应一段时间. 采用下面的公式计算 DH.

$$DH = \frac{V_B \times c_b}{\alpha \times m_P \times h_{tot}} \times 100\%$$

其中,V_B 为碱的消耗体积数(mL),c_b 为碱的浓度(mol/L),α 为平均离解度(在 50 ℃,pH 8.0 下为 0.885),m_P 为蛋白质量;h_{tot} 为每千克麦胚蛋白中的总肽键数,蛋白质中的肽键数(在此为 7.8 eqv/kg).

1.5 蛋白质质量的测定

采用凯氏定氮法[7].

1.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

蛋白标准物购自 Sigma 公司(相对分子质量 14 000 ~ 97 400). 样品分散于样品缓冲液中,其中包括 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),1 mmol/L EDTA,1 g/dL SDS,5 g/dL 巯基乙醇,15 g/dL 甘油及溴酚蓝. 根据亚基在凝胶上的相对迁移率来估算其相对分子质量[6].

1.7 游离氨基质量浓度的测定

采用甲醛滴定法[6].

1.8 DWGP 的氮溶指数的测定

1 g/dL DWGP 分散于去离子水中,且控制不同 pH 值(分别为 2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,12.0),磁力搅拌 30 min,而后于 4 ℃,10 000 r/min 离心 10 min,所得上清液进行氮溶指数(NSI)的测定[8].

1.9 持水性的测定

分别在不同 pH 值(4.0,6.0,7.0,8.0)和不同温度(5,15,30,70 ℃)下进行测定. 2.5 g DWGP 分散于 47.5 mL 去离子水中,磁力搅拌调节到上述 pH 值,在上述温度下静置保持 30 min,于 4 ℃,10 000 r/min 离心 10 min,而后对沉淀物称重. 每克样品水合前后的质量差即为持水性的衡量指标[9].

DWGP 起泡性质的测定和 DWGP 乳化性质测定参见文献[10]和文献[11].

2 结果与讨论

2.1 酶法水解

如图 1 所示,用碱性蛋白酶处理脱脂小麦胚芽在水解期间,其蛋白质含量增加最快,到 210 min 时达到最高(质量分数 81%). 用风味蛋白酶水解 540 min 时,可溶出大约质量分数 80% 的蛋白质. 用中性蛋白酶在 390 min 时溶出蛋白最多(质量分数为 66%),而木瓜蛋白酶则在 300 min 时达到最大,质量分数为 73%,复合蛋白酶在 150 min 时溶出蛋白质最多质量分数为 61%. 之后水解期间,蛋白质溶出率有所下降,这是由于随加热时间的延长蛋白质发生变性的缘故. 据实验结果可知,碱性蛋白酶和风味蛋白酶较为有效.

万方数据

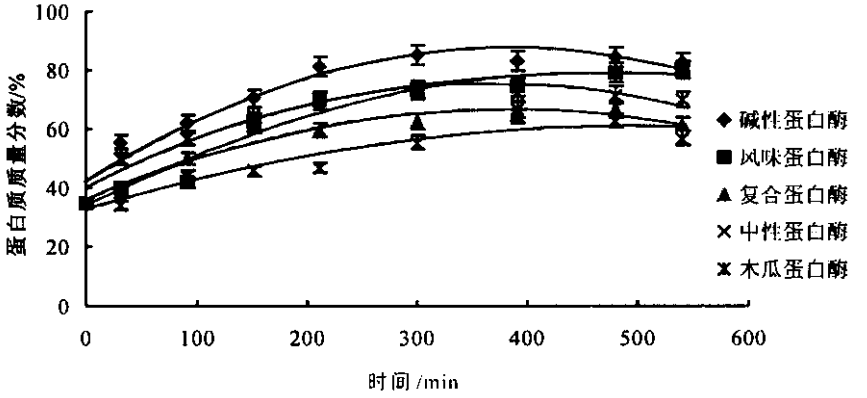

图 1　采用不同蛋白酶不同水解时间对蛋白质溶出率的影响

Fig. 1　Amount of protein released during enzymatic hydrolysis of DWGP

2.2　脱脂小麦胚芽蛋白相对分子质量的测定

采用 SDS-PAGE 对蛋白相对分子质量进行了测定. 对 DWGP 的等电点及游离氨基质量浓度测定结果分别为 pI4.0 和 0.02 26 g/dL. 据报道显示,碱提所得的 DWGP 其相对分子质量分布范围在13 200 ~ 91 300 之间[8]. 由于 DWGP 的制备采用了蛋白酶,会对蛋白质的肽键有一定的水解降解,从而使得 DWGP 的相对分子质量有一定程度的减小(见图 2). 当使用内肽酶如碱性蛋白酶来进行水解(DH < 20%),游离氨基和二肽的相对含量较低. 这也就是说,当采用内肽酶时可以忽略水解度对 α-NH_2 的变化影响[11].

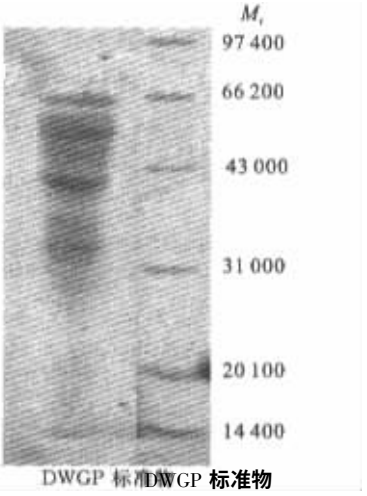

图 2　DWGP 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2　SDS-PAGE pattern of DWGP

2.3　功能性质

2.3.1　溶解性　如图 3 所示,在 pH 值为 1.0 ~ 4.0 的范围内,DWGP 蛋白溶解度 NSI 由 33% 降至 5%,而在 pH 值为 4.0 ~ 6.0 的范围内,NSI 随 pH 值的增大而增大,并且在 pH 值为 6.0 时达到最佳值 74%. NSI 在 pH 值为 4.0 时最小值质量分数为 5%,这是由于 DWGP 的等电点约为 4.0. 水解程度的变化可归因于羧基和氨基的离子化作用引起的自由能变化. 当离子化作用减弱时,肽键的合成加强,从而降低了溶解度[12,13]. DWGP 在中性条件下有良好的溶解性.

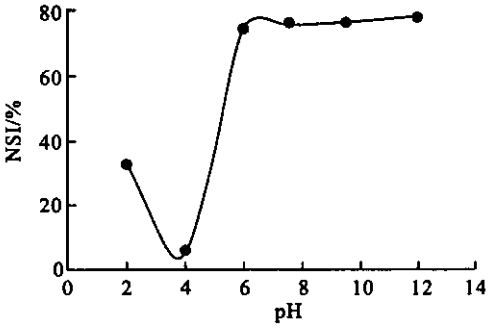

图 3　不同 pH 对 DWGP 溶解性的影响

Fig. 3　Nitrogen solubility of DWGP

2.3.2　起泡性　DWGP 由于其较大的紧密结构,使其起泡性较差. DWGP 和蛋清蛋白的起泡性见图 4. 起初时 DWGP 的泡沫能力为 259 mL,与蛋清蛋白的 264 mL 相似[14]. 然而经过 20 min 的静置,DWGP 的体积下降为 150 mL,而蛋清蛋白起泡稳定性较好为 216 mL. 酶的处理可以增加泡沫体积,但泡沫稳定性明显下降. 可能是因为水解使相对分子质量大的蛋白组分减少所致.

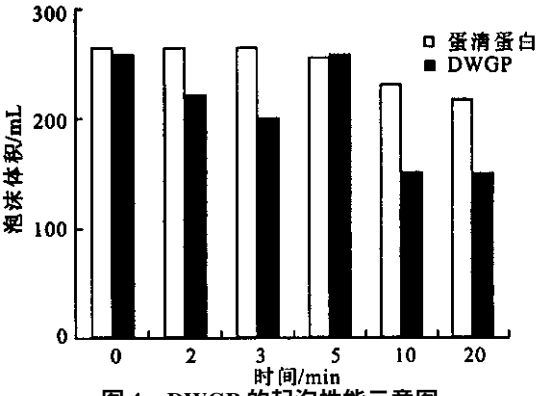

图 4　DWGP 的起泡性能示意图

Fig. 4　Foaming properties of DWGP

万方数据

2.3.3 乳化性 图5所示为DWGP、牛酪蛋白(CAS)与牛血清蛋白(BSA)的乳化性质比较. 三者的乳化能力(EA)、乳化稳定性(ES)及乳化容量(EC)相应分别为64%,57%,62%;49%,47%,45%及68%,66.5%,67.5%. 由结果可知,DWGP的乳化特性与BSA的相似,优于酪蛋白. 影响乳化特性的因素有吸附动力学、表面负荷、界面张力、界面膜的流变性及表面疏水性[15]. 油水界面上蛋白质的展开对乳状液的形成及其稳定非常重要. 45 ℃加热处理30 min,其乳化能力(EA)没有观察到显著下降.

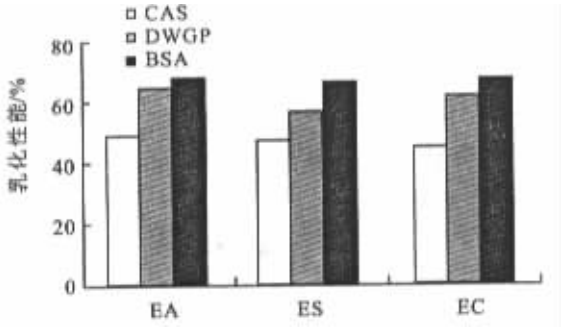

图5 DWGP的乳化性能图示

Fig. 5 Emulsifying properties of DWGP

2.3.4 持水性(WR) 由表2可知,在pH值为7.0,70 ℃时,持水性最大为231.9%,而在pH值为4.0,5 ℃时,持水性最小为70.6%. 蛋白质的持水性受pH值和温度的影响,随着温度的升高,DWGP的持水性有所增大. pH值为4.0时持水性差可能是由于pH值影响了蛋白质的静电荷分布,该条件下羧基转化为非离子化的形式,因此降低了其持水能力. 蛋白质能结合大量水的特性主要是由于在水分子和多肽的极性基团之间形成氢键所致[16].

表2 pH值和温度对DWGP的持水性的影响

Tab. 2 Effect of pH and Temperature on WR of DWGP

pH	T/℃	持水性/%
4	5	70.6
5	15	149
6	30	149
7	70	231.9

3 结 论

采用酶法处理可以使蛋白质溶出率显著提高. 碱性蛋白酶和风味蛋白酶对蛋白的溶出率分别为89%和82%.

小麦胚芽作为小麦磨粉工业的副产品,营养丰富,蛋白含量高. 用它为原料采用碱性蛋白酶制得脱脂小麦胚芽蛋白DWGP有良好的功能特性,包括溶解性、起泡性、乳化性和持水性,在食品工业中有良好的应用前景.

参考文献:

[1] Osborne T B. The proteins of the wheat flour[J]. **Ind Eng Chem**,1974, 6:211-214.

[2] Finney K F. Fractionating and reconstituting techniques as tools in wheat flour research[J]. **Cereal Chem**, 1943,20:381-396.

[3] Pence J W, Nimmo C C. Proteins in hlynya I wheat chemistry and technology[J]. **AACC St Paul Minnesota**,1951,5 227-258.

[4] Pence, J W, Weinstein. The albumin and globulin contents of wheat flour and their relationship to protein quality[J]. **Cereal Chem**,1954,31:303-311.

[5] Nkonge C, Ballance G M. Enzymic solubilization of cereal proteins by commercial proteases[J]. **J Cerial Chem**,1984,61(4):316-320.

[6] Adler-Nissen. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins[M]. New York:Elsevier,1986. 110-132.

[7] AOAC. Official methods of analysis of the american association of analytical chemists[J]. The Association 14ed:Washington, DC,1984.

[8] Yiqiang G, Aidong S, Yuanying N, *et al*. Some nutritional and functional properties of defatted wheat germ protein[J]. **J Agric Food Chem**,2000, 48(12):6215-6218.

[9] Horiuchi T, Fukushima D, Sugimoto H, *et al*. Studies on enzyme-modified proteins as foaming agents:Effect of structure on foam stability[J]. **Food Chem**,1978,(3) 35-42.

[10] Swift C E, Lockett C, Fryar. Commited meat emulsions and the capacity of meats for emulsifying fat[J]. **Food Technol**, 1961,15 468-473.

万方数据

[11] Richards F M. Titration of amino groups released during the digestion of ribonuclease by subtilisin[J]. **C R Trav Lab Carlsberg ser Chim**,1956, 29:322 – 328.
[12] Fruton J S. Proteinase-catalyzed synthesis of peptide bonds[J]. **Adv Enzymol**,1982, 53:239 – 306.
[13] You-shang Z. Enzymatic synthesis of proteins and peptides[J]. **Trends Biochem Sci**, 1983,(1):16 – 17.
[14] Townsend A A, Nakai S. Relationship between hydrophobicity and foaming characteristics of food proteins[J]. **J Food Sci**, 1983, 48 (2):588 – 594.
[15] Das K P, Kinsella J E. Stability of food emulsions:Physicochemical role of protein and nonprotein emulsifiers[J]. **Advances in Food and Nutrition Res**, 1990, 1 34.
[16] Jones L J, Tung M A. Functional properties of modified oilseed protein concentrates and isolates[J]. **Can Inst Food Sci Technol J**, 1983, 16 (1) 57 – 62.

(责任编辑 杨 萌)

(上接第 68 页)

金属离子的作用,Fe^{2+}**,**Mg^{2+}**对该酶的产生具有一定的激活作用;**K^{+}**,**Ca^{2+}**作用不显著;**Cu^{2+}**,**Zn^{2+}**,**Mn^{2+}**具有一定的抑制作用.**

参考文献:

[1] Yamami J, Tanigawa M, Ishiguro M. Chitin, chitosan and enxymes[J]. **Biosci Biochem**,1998,6(4) 825 – 828.
[2] Muraki E, Yaku F, Kojirna H. Preparation and crystallization of D-glucosamine oligosaccharides with dp 5-8[J]. **Carbohydr Res**,1993,(239) 226 – 230.
[3] **王扬,娄永江,杨文鸽. 酶法制备几丁寡糖和壳聚糖研究现状与进展[J]. 东海海洋**,2001,19(4) 40 – 44.
[4] Charnley A K, St. Leger R J. The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals[M]. New York:Plenum, 1991. 267 – 286.
[5] **夏文水. 酶法改性壳聚糖的研究进展[J]. 无锡轻工大学学报**,2001,20(5) 550 – 554.
[6] Yol Jin-Jeon,Shanidi F, Kim Se-Kwon. Preparation of chitin and chitosan chitooligosacchrides and their applications in physiological functional foods[J]. **Food Reviews International**,2000,16(2) 159 – 176.
[7] Zhang H. Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme[J]. **Carbohydr Res**, 1999,320(3 ~ 4): 257 – 260.
[8] Omumasaba CA, Yoshida N, Sekiguchi Y. Purification and some properties of a novel chitosanase from *Bacillus* subtilis KH1 [J]. **Journal-of-General-and-Applied-Microbiology**, 2000,46 (1) 19 – 27.
[9] Yamashita. Effect of chitosan-deacetylation degree on the production of chitooligosaccharides by *Bacillus* sp. Chitosanase[J]. **Kichin Kitosan Kenkyu**,1999,5(2) 148 – 189.
[10] Saito-J, Kita-A, Higuchi-Y. Crystal structure of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1 at 1.6-angstrom resolution and its substrate recognition mechanism[J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1999, (43):30818 – 30825.
[11] Hutadilok N , Mochimasu T. The effect of N-substitution on the hydrolysis of chitonsan by an endo-chitosanase[J]. **Carbohydr Res**, 1995,(6) 128 – 143.

(责任编辑 杨 萌)

万方数据