

网络出版时间:2017-11-29 09:24

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2018.01.012

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20171129.0924.024.html

转谷氨酰胺酶对大豆蛋白凝胶特性及结构的影响

臧学丽^{1,2}, 陈 光¹

(1 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 2 长春医学高等专科学校, 吉林 长春 130031)

【摘要】【目的】研究大豆种类、凝固酶种类及反应条件对大豆蛋白凝胶特性的影响。【方法】选择 6 种优质大豆品种吉农 34、吉农 28、吉农 18、吉农 17、吉农芽豆及北豆 28, 对其大豆蛋白质含量及凝胶强度进行分析; 然后以未添加酶组为空白对照, 分析加入转谷氨酰胺酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶对大豆蛋白凝胶强度的影响; 并通过响应面优化试验与 Design-Expert8.0 数据处理软件, 对高强度大豆蛋白凝胶的制作工艺进行优化; 通过扫描电镜和圆二光谱, 对转谷氨酰胺酶作用前后大豆蛋白的凝胶构象进行表征。【结果】6 种大豆中, 吉农芽豆的蛋白质含量最高, 凝胶特性最强。4 种蛋白酶中, 以转谷氨酰胺酶对大豆分离蛋白凝胶强度的提升效果最为明显。对高强度大豆蛋白凝胶制作工艺的优化结果表明, 在转谷氨酰胺酶添加量为 34.67 U/g、反应时间 2.21 h、反应温度 60 ℃、pH 为 7.22 的条件下, 大豆蛋白的凝胶强度达到最大, 为 181.779 g·mm。通过扫描电子显微镜观察、CD 图谱分析及 Reed 拟合计算可知, 转谷氨酰胺酶作用前后大豆蛋白的表观结构、二级结构及三级结构均发生了明显变化。【结论】转谷氨酰胺酶对大豆蛋白形成凝胶具有促进作用, 其通过使大豆蛋白结构发生变化来实现。

【关键词】 大豆蛋白; 凝胶特性; 转谷氨酰胺酶; 响应面优化; CD 图谱; Reed 拟合

【中图分类号】 TS201.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2018)01-0086-09

Influence of transglutaminase on soybean protein gel preparation and structure

ZANG Xueli^{1,2}, CHEN Guang¹

(1 School of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2 Changchun Medical College, Changchun, Jilin 130031, China)

Abstract: 【Objective】The effects of soybean varieties, enzyme types and reaction conditions on properties of soy protein gels were studied in this paper. 【Method】Six high-quality soybean varieties including Jinong 34, Jinong 28, Jinong 18, Jinong 17, Jinong sprouted broad bean and Beidou 28 were selected, and protein content and gel strength of soybean were analyzed. The effects of adding transglutaminase, alkaline protease, neutral protease and papain on the gel strength of soybean protein were analyzed and the control group added no enzyme. The preparation of high-strength soybean protein gel was also optimized by response surface optimization and Design-Expert8.0 data processing software, and the conformation of soybean protein gel was analyzed by scanning electron microscopy and circular dichroism before and after transglutaminase treatment. 【Result】The contents of protein of Jinong sprouted broad bean were the highest with the strongest gel characteristics among the six soybeans. Among the four proteases, transglutaminase was the most effective to enhance the gel strength of soybean protein isolate. The optimum conditions

【收稿日期】 2016-11-18

【基金项目】 吉林省高等学校秸秆综合利用高端科技创新平台项目(吉高平合字[2014]C-1); 吉林省教育厅科研项目(吉教科合字[2014]第 609, 吉教科合字[2014]第 546)

【作者简介】 臧学丽(1980—), 女, 吉林长春人, 副教授, 博士, 主要从事功能性食品、发酵工程研究。

E-mail: m13944890551@163.com

【通信作者】 陈 光(1961—), 女, 吉林长春人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事生物技术研究。E-mail: chg61@163.com

for preparation of high strength soy protein gel were enzyme concentration of transglutaminase 34.67 U/g, reaction time 2.21 h, reaction temperature 60 °C and pH value 7.22. The obtained highest gel strength was 181.779 g · mm. The apparent structure, secondary structure and tertiary structure of soybean protein changed significantly after transglutaminase treatment through scanning electron microscope, CD map analysis and Reed fitting calculation. 【Conclusion】 Transglutaminase could promote the formation of soybean protein gel by changing the structure of soybean.

Key words: soybean protein; gel preparation; transglutaminase; response surface optimization; CD map; Reed fitting

大豆是我国传统的植物蛋白源食物^[1],具有使用范围广、制品种类多等特点^[2]。大豆中蛋白质含量较高^[3],且必需氨基酸含量丰富^[4]。大豆蛋白具有溶解性、凝胶性、乳化性等功能特性,添加到食品中可以提高食品的营养价值,改善食品的感官,具有降血脂、保护心血管及美容等功效^[5]。但天然的大豆蛋白功能特性不突出,如形成凝胶的强度差等,难以满足食品体系对大豆蛋白的需求,需要用一定的方法改善大豆蛋白的功能特性。目前,大豆蛋白改性的方法有物理法、酶法、化学法等。其中酶法改性大豆蛋白不但可以提高大豆蛋白的功能特性,还能提高其营养价值,被认为是一种理想的改性方法,成为人们研究的热点。但目前酶法改性大豆分离蛋白的改性结果仍然不能满足工业生产需要,如曲玲等^[6]对大豆分离蛋白进行复合改性,改性后的大豆分离蛋白的凝胶性能虽然得到了提高,但提高效果并不显著。酶法改性大豆蛋白过程极其复杂,大豆品质^[7]及大豆蛋白凝固酶的种类^[8]、作用时间^[9]、作用温度、添加量和 pH 等,均为影响大豆制品口感^[10]、品质及外观的重要因素^[11],改性过程中氨基酸的组成、比例、蛋白的空间结构均会发生很大变化,如何控制酶凝固过程,使改性后大豆蛋白的功能特性满足人们的需求,是酶改性大豆蛋白的关键,但目前对该问题的研究尚显薄弱。本研究从大豆蛋白和酶两个方面进行分析,包括优质大豆的选择^[12]及大豆蛋白凝固酶种类的选择^[13]等,利用响应面法优化转谷氨酰胺酶凝固大豆蛋白的最佳作用时间^[14]、温度、pH 和酶添加量,旨在提高大豆蛋白的凝胶性,并对转谷氨酰胺酶聚合大豆蛋白结构^[15]的变化进行分析,以期大豆蛋白的分离和大豆制品的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试大豆品种

大豆品种吉农 34、吉农 28、吉农 18、吉农 17、吉

农芽豆及北豆 28,由吉林农业大学生命科学学院提供。

1.2 试验用酶

碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶及转谷氨酰胺酶,均购于 Sigama。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆分离蛋白的制备 以 6 种大豆粉碎的大豆粉为原料,经石油醚脱脂制得脱脂大豆粉,然后采用碱提酸沉法^[16]制备大豆分离蛋白。

1.3.2 6 种大豆的蛋白质含量及凝胶强度分析 精选 6 种不同大豆,利用近红外谷物分析仪对大豆蛋白质、脂肪及水分含量进行分析,并用上述 4 种凝固酶对 6 种大豆分离蛋白进行凝固反应,利用 SMSTA.XTPlus 质构仪测定大豆蛋白的凝胶强度,分析大豆蛋白质含量对大豆分离蛋白凝胶的影响。凝胶强度为破断力与凹陷距离的乘积:凝胶强度(g · mm)=破断力×凹陷距离。

1.3.3 4 种酶对大豆分离蛋白凝固能力的比较 准确称取 7 g 大豆分离蛋白,放入烧杯中,加入 50 mL 蒸馏水,充分搅拌均匀,使大豆分离蛋白达到均匀、稳定状态,在 0.1 MPa、121 °C 高温下蒸煮 20 min,置室温条件下冷却。将冷却后的大豆分离蛋白在 40 °C 水浴 1 h,然后分别加入转谷氨酰胺酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶,酶加入后迅速搅拌,使酶与大豆分离蛋白迅速混合,1 h 后取出,放入冰水混合物中冷却 1 h,置于 4 °C 冰箱保存,即得大豆蛋白凝胶,测定大豆蛋白的凝胶强度。同时以未添加酶的处理为空白对照。每组 3 个平行。

1.4 大豆分离蛋白凝胶强度的影响因素

1.4.1 反应时间 控制反应条件为反应温度 50 °C,酶添加量 36 U/g, pH 7.0,测定反应时间为 1, 2, 3, 4 和 5 h 时大豆蛋白的凝胶强度。

1.4.2 反应温度 控制反应条件为酶添加量 36 U/g, pH 7.0,分别在 30, 40, 50, 60 和 70 °C 的温度条件下反应 2 h,测定大豆蛋白的凝胶强度。

1.4.3 酶添加量 控制反应条件为反应温度 50 ℃,pH 7.0,在转谷氨酰胺酶添加量分别为 24,30,36,42 和 48 U/g 的条件下反应 2 h,测定大豆蛋白的凝胶强度。

1.4.4 pH 控制反应条件为反应温度 50 ℃,酶添加量 36 U/g,在 pH 分别为 5.0,6.0,7.0,8.0 和 9.0 的条件下反应 2 h,测定大豆蛋白的凝胶强度。

表 1 高强度大豆分离蛋白凝胶制作工艺响应面优化试验的因素及水平

水平 Level	因素 Factor			
	酶添加量/(U·g ⁻¹) Enzyme count	反应时间/h Reaction time	反应温度/℃ Reaction temperature	pH
—1	30	1	40	6.0
0	36	2	50	7.0
1	42	3	60	8.0

1.6 加入转谷氨酰胺酶前后大豆分离蛋白凝胶的扫描电镜分析

取加入转谷氨酰胺酶后制得的大豆蛋白及未加转谷氨酰胺酶的大豆蛋白样品各适量,5 000 r/min 离心 10 min,保留沉淀并均匀分散于体积分数 4% 的戊二醛中,4 ℃ 冰箱中过夜固定。取固定的沉淀用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液冲洗 3 次,用体积分数 30%,50%,70%,85%,95% 的乙醇溶液逐级脱水,再用体积分数 100% 的乙醇脱水 2 次,每次脱水 15 min。脱水后的样品 5 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,于真空冷冻干燥机中冷冻干燥,最后电镜检测。

1.7 大豆分离蛋白结构的圆二光谱分析

1.7.1 Near-UV CD 光谱检测 主要用于大豆分离蛋白的三级结构分析。称取 5 mg 大豆分离蛋白样品,溶于 5 mL pH 7.2 的 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液中,室温条件下搅拌 25 min,8 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,稀释至 1 mg/mL 进行 CD 光谱检测。圆二光谱的检测波长为 250~320 nm。

表 2 6 种供试大豆主要成分的含量

Table 2 Main components of six selected soybeans				g/kg			
大豆品种 Soybean varieties	脂肪 Fat	水分 Water content	蛋白 Protein	大豆品种 Soybean varieties	脂肪 Fat	水分 Water content	蛋白 Protein
吉农 34 Jinong 34	216.0	108.0	329.2	吉农 17 Jinong 17	209.9	115.3	343.1
吉农 28 Jinong 28	200.8	106.0	341.1	吉农芽豆 Jinong sprouted broad bean	182.1	108.9	383.9
吉农 18 Jinong 18	224.1	109.4	324.6	北豆 28 Beidou 28	203.3	111.4	353.0

2.2 4 种蛋白酶对大豆分离蛋白凝固能力的影响

试验观察发现,未添加蛋白酶的对照组未形成大豆蛋白凝胶。由图 2 可以看出,相较于对照,蛋白酶的加入使得大豆蛋白的凝胶强度得到了明显提

1.5 高强度大豆分离蛋白凝胶制作工艺的响应面法优化

在单因素试验的基础上,选取酶添加量(X_1)、反应时间(X_2)、反应温度(X_3)和 pH(X_4)作为自变量,以大豆分离蛋白的凝胶强度为因变量(Y)进行响应面(表 1)分析,对大豆蛋白凝胶的最佳制作工艺条件^[17]进行优化。

1.7.2 Fear-UV CD 光谱检测 主要用于大豆分离蛋白的二级结构分析。称取 5 mg 大豆分离蛋白样品,溶于 5 mL pH 7.2 的 5 mmol/L 磷酸盐缓冲液中,室温条件下搅拌 25 min,8 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,稀释至 0.1 mg/mL 进行 CD 光谱检测。圆二光谱的检测波长为 190~250 nm。

2 结果与分析

2.1 6 种大豆的蛋白质含量及凝胶强度

大豆分离蛋白的凝胶强度与大豆中所含的蛋白质含量密切相关。由表 2 可知,6 种大豆的蛋白质含量均较高,其中吉农芽豆中的蛋白质含量最高,达到了 383.9 g/kg。对图 1 和表 2 进行对照分析得知,大豆蛋白含量与所形成凝胶的强度呈正相关性,蛋白质含量越高,凝胶强度值越大,吉农芽豆所形成的大豆蛋白凝胶强度最强,与理论上高蛋白有利于提高大豆分离蛋白的凝胶强度相一致^[18]。所以在后续试验中选择吉农芽豆作为原材料。

高,但每种蛋白酶对大豆分离蛋白的凝固能力也不尽相同,其中以转谷氨酰胺酶对大豆分离蛋白凝固的影响作用最强,所以选择转谷氨酰胺酶进行后续试验。

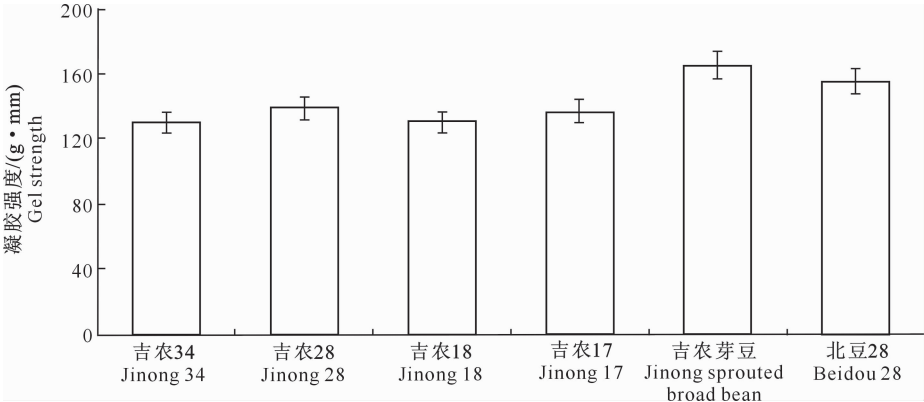


图 1 6 种大豆分离蛋白凝胶强度的比较

Fig. 1 Comparison of six soy protein isolate gel strengths

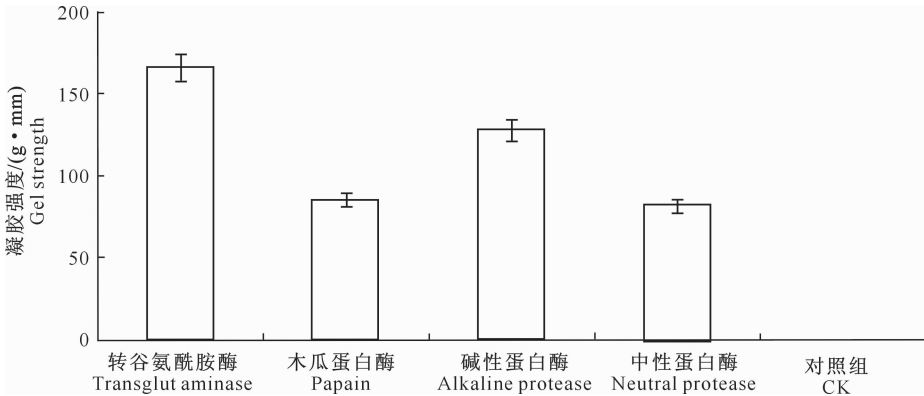


图 2 不同蛋白酶对大豆分离蛋白凝胶强度的影响

Fig. 2 Effect of different proteases on strength of soy protein isolate gel

2.3 大豆分离蛋白凝胶强度的影响因素

2.3.1 反应时间 由图 3 可知,在反应时间小于 2 h 时,大豆蛋白的凝胶强度随着反应时间的增加不断增大,反应超过 2 h 后大豆蛋白的凝胶强度逐渐降低。因此确定大豆蛋白与转谷氨酰胺酶的最佳反应时间为 2 h。

2.3.2 反应温度 由图 4 可知,在反应温度为 50

℃时,大豆蛋白的凝胶强度达到最高值。主要原因可能是在温度较低的条件下降谷氨酰胺酶的活性较低,因此大豆蛋白的凝聚程度较低;而温度过高时,大豆蛋白的催化活性有所降低^[19]。所以在其他反应条件确定时,大豆蛋白与转谷氨酰胺酶的最佳反应温度为 50 ℃。

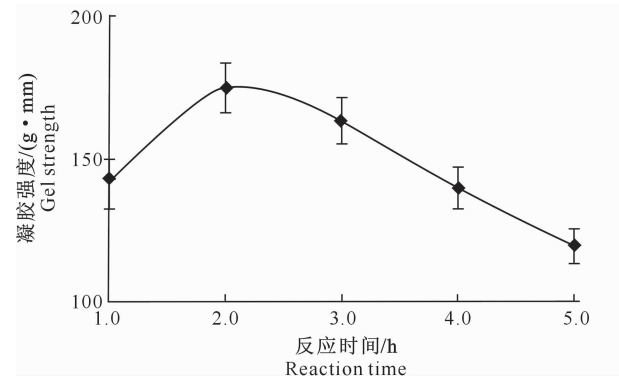


图 3 反应时间对大豆分离蛋白凝胶强度的影响

Fig. 3 Effect of reaction time on strength of soy protein isolate gel

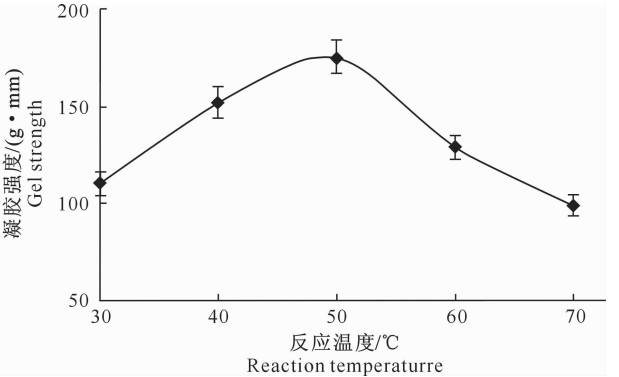


图 4 反应温度对大豆分离蛋白凝胶强度的影响

Fig. 4 Effect of reaction temperature on strength of soy protein isolate gel

2.3.3 酶添加量 由图 5 可以看出,在酶添加量为 36 U/g 时,大豆蛋白的凝胶强度达到最佳值。所以在其他反应条件确定时,大豆蛋白与转谷氨酰胺酶反应时酶的最佳添加量为 36 U/g。

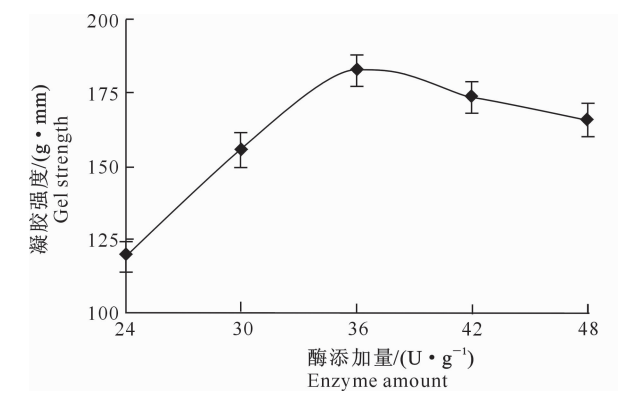


图 5 酶添加量对大豆分离蛋白凝胶强度的影响

Fig. 5 Effect of enzyme concentration on strength of soy protein isolate gel

2.4 高强度大豆分离蛋白凝胶制作工艺的优化

2.4.1 大豆分离蛋白凝胶制作工艺的响应面优化 酶添加量(X_1)、反应时间(X_2)、反应温度(X_3)和

2.3.4 pH 由图 6 可以看出,在反应 pH 为 7.0 时,大豆蛋白的凝胶强度达到最大。原因可能是转谷氨酰胺酶的最佳催化 pH 为 7.0,pH 过高或过低都会抑制转谷氨酰胺酶的酶活^[20]。

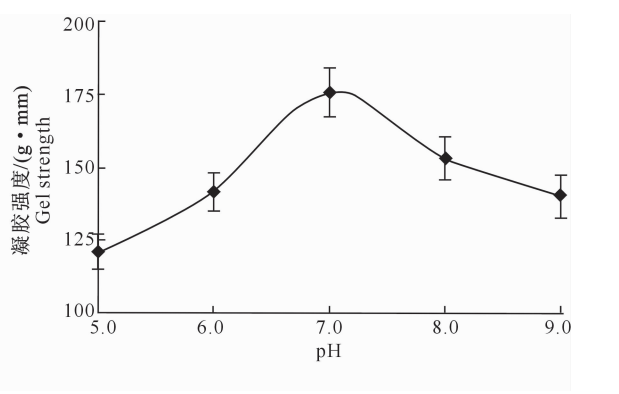


图 6 pH 对大豆分离蛋白凝胶强度的影响

Fig. 6 Effect of pH value on strength of soy protein isolate gel

pH(X_4)对大豆分离蛋白凝胶强度(Y)影响的响应面试验结果见表 3。

表 3 大豆分离蛋白凝胶制作工艺响应面试验结果

Table 3 Result of response surface on preparation of soy protein isolate gel

试验号 Experimental number	$X_1/(U \cdot g^{-1})$	X_2/h	$X_3/^{\circ}C$	X_4	$Y/(g \cdot mm)$	试验号 Experimental number	$X_1/(U \cdot g^{-1})$	X_2/h	$X_3/^{\circ}C$	X_4	$Y/(g \cdot mm)$
1	36	3	50	8	170	16	36	3	40	7	173
2	42	2	60	7	158	17	30	2	50	8	160
3	36	2	60	8	178	18	36	3	60	7	172
4	42	2	40	7	167	19	36	3	50	6	166
5	36	2	50	7	180	20	36	2	50	7	182
6	30	1	50	7	145	21	36	1	60	7	164
7	36	2	50	7	181	22	36	1	40	7	164
8	36	2	40	8	174	23	42	1	50	7	152
9	36	1	50	6	160	24	36	2	60	6	174
10	42	3	50	7	145	25	36	2	50	7	180
11	30	2	60	7	170	26	42	2	50	6	158
12	36	2	40	6	172	27	36	2	50	7	180
13	30	2	40	7	160	28	42	2	50	8	160
14	36	1	50	8	162	29	30	3	50	7	164
15	30	2	50	6	156						

注: X_1 . 酶添加量; X_2 . 反应时间; X_3 . 反应温度; X_4 . pH; Y . 凝胶强度。表 4 同。

Note: X_1 . Enzyme amount; X_2 . Reaction time; X_3 . Reaction temperature; X_4 . pH; Y . Gel strength. Table 4 is same.

根据表 3 试验数据,对自变量 X_1 (酶添加量)、 X_2 (反应时间)、 X_3 (反应温度)和 X_4 (pH)进行回归分析,由 Design-Expert 8.0.5.0 拟合出二次多项回归方程为:

$$Y=180.6-1.25 X_1+3.583\ 333X_2+0.5X_3+1.5X_4-6.5X_1X_2-4.75X_1X_3-0.5X_1X_4-0.25X_2X_3+0.5X_2X_4+0.5X_3X_4-16.925X_1^2-11.675X_2^2-0.55X_3^2-5.05X_4^2。$$

二次响应面回归模型的显著性检验及方差分析结果见表 4。由表 4 可以看出,回归方程中因素 X_2 、 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 及 X_4^2 对大豆蛋白凝胶强度影响极显著($P<0.01$);因素 X_1 对大豆蛋白凝胶强度影响显著($P<0.05$);因素 X_3 、 X_4 、 X_1X_4 、 X_2X_3 、 X_2X_4 、 X_3X_4 及 X_3^2 对大豆蛋白凝胶强度的影响不显著($P>0.05$)。

表 4 二次多项回归模型的 ANOVA 分析

Table 4 ANOVA analysis of quadratic multinomial regression model

方差来源 Source of variance	平方和 Quadratic sum	自由度 DOF	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	2 924.56	14	208.89	68.62	< 0.000 1	* * *
X ₁	18.75	1	18.75	6.16	0.026 4	* *
X ₂	154.08	1	154.08	50.62	< 0.000 1	* * *
X ₃	3	1	3	0.99	0.337 7	*
X ₄	27	1	27	8.87	0.337 7	*
X ₁ X ₂	169	1	169	55.52	< 0.000 1	* * *
X ₁ X ₃	90.25	1	90.25	29.65	< 0.000 1	* * *
X ₁ X ₄	1	1	1	0.33	0.575 6	*
X ₂ X ₃	0.25	1	0.25	0.08	0.778 6	*
X ₂ X ₄	1	1	1	0.33	0.575 6	*
X ₃ X ₄	1	1	1	0.33	0.575 6	*
X ₁ ²	1 858.09	1	1 858.09	610.40	< 0.000 1	* * *
X ₂ ²	884.14	1	884.14	290.45	< 0.000 1	* * *
X ₃ ²	1.96	1	1.96	0.64	0.435 5	*
X ₄ ²	165.42	1	165.42	54.34	< 0.000 1	* * *
残差 Residual	42.62	14	3.04			
失拟项 Loss of fitting	39.42	10	3.94	4.9	0.069 0	*
纯误差 Pure error	3.2	4	0.8			
总和 Sum	2 967.17	28				

注: * 表示无显著影响, $P>0.05$; * * 表示影响显著, $P<0.05$; * * * 表示影响极显著, $P<0.01$ 。

Note: * Means insignificant, $P>0.05$; * * Means significant, $P<0.05$; * * * Means extremely significant, $P<0.01$ 。

根据 ANOVA 分析可以看出,反应时间对大豆蛋白凝胶强度的影响最为显著。由表 4 可知,失拟项的 P 值 >0.05 ,差异不显著,模型的 F 检验值为 68.62, P 检验值 $<0.000 1$,差异性极显著,说明该模型与实际试验结果拟合较好,可用于对大豆蛋白凝胶强度的理论预测。

通过响应面法优化可知,在酶添加量为 34.67 U/g、反应时间为 2.21 h、反应温度为 60℃及 pH 为 7.22 时,大豆蛋白的凝胶强度达到最大,为 181.779 g·mm。

2.4.4.2 影响因素交互作用分析 1)转谷氨酰胺酶

添加量与反应时间的交互作用。由图 7 可知,当转谷氨酰胺酶的添加量和反应时间增大或减小时,大豆蛋白凝胶的凝胶强度随之增大或减小,而当转谷氨酰胺酶的酶添加量达到 36 U/g 左右,反应时间约为 2 h 时,大豆蛋白凝胶强度达到最高。超过此范围,凝胶强度则下降。说明转谷氨酰胺酶的添加量过高或反应时间过长都不适合大豆蛋白凝胶强度的增大^[21],故本试验中转谷氨酰胺酶添加量与反应时间的交互作用对大豆蛋白凝胶强度有极显著的影响。

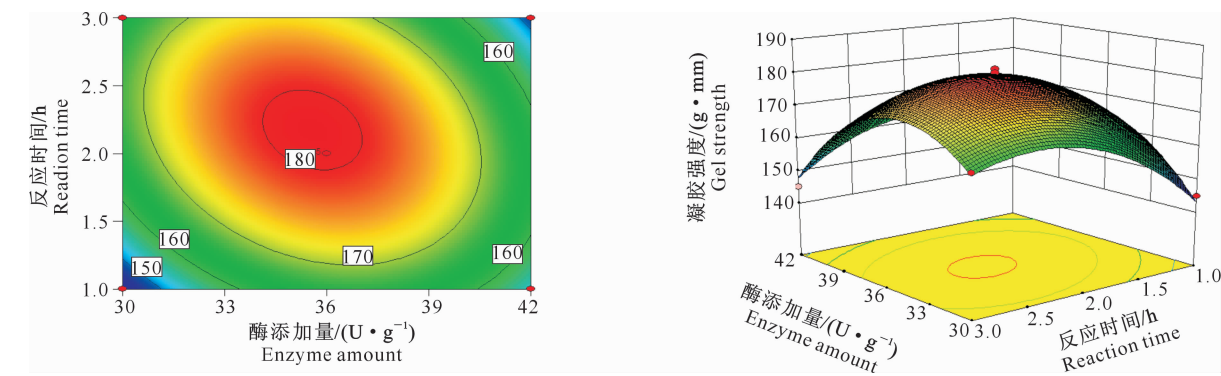


图 7 转谷氨酰胺酶添加量与反应时间的交互作用对大豆蛋白凝胶强度影响的等高线图及响应面图

Fig.7 Contour map and response surface map of soybean protein gel strength under the interaction between transglutaminase concentration and reaction time

2)转谷氨酰胺酶添加量与反应温度的交互作用。由图 8 可知,在反应温度一定的条件下,大豆蛋

白的凝胶强度随酶添加量增加先增大后减小,在酶添加量为 36 U/g 时达到最高值。而在酶添加量一定的条件下,大豆蛋白凝胶的凝胶强度随反应温度

的变化略有不同。本试验中转谷氨酰胺酶的添加量与反应温度的交互作用对大豆蛋白凝胶强度有极显著影响。

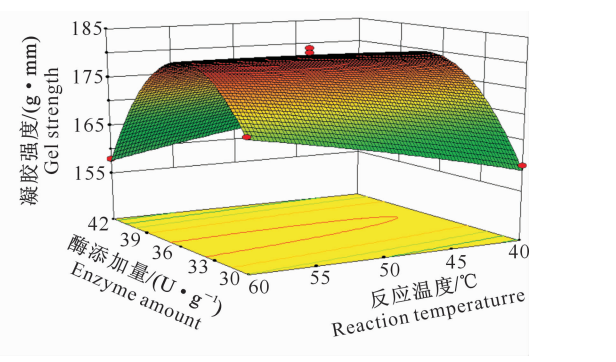
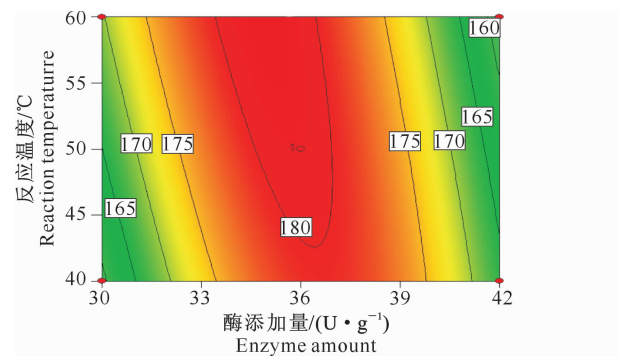


图 8 转谷氨酰胺酶添加量与反应温度的交互作用对大豆蛋白凝胶强度影响的等高线图及响应面图
Fig. 8 Contour map and response surface map of soybean protein gel strength under the interaction between transglutaminase concentration and reaction temperature

2.5 转谷氨酰胺酶对大豆蛋白凝胶结构的影响

由图 9 和 10 可知,未添加转谷氨酰胺酶的大豆蛋白凝胶内部结构非常松散(图 9),而添加转谷氨

酰胺酶的大豆蛋白凝胶内部结构致密(图 10),说明转谷氨酰胺酶对大豆蛋白凝胶的内部结构或集团之间的相互作用有非常重要的调节作用^[22]。

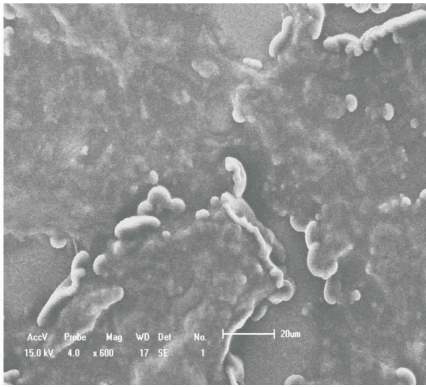
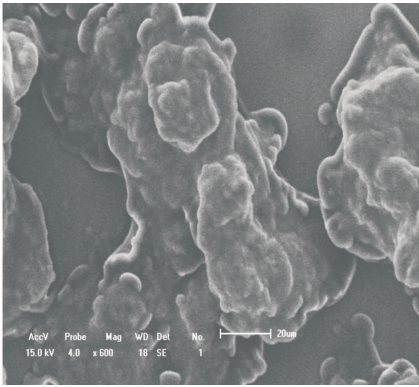


图 9 未加入转谷氨酰胺酶的大豆蛋白凝胶的电镜观察
Fig. 9 Electron microscope observation of soybean protein without addition of transglutaminase

图 10 加入转谷氨酰胺酶的大豆蛋白凝胶的电镜观察
Fig. 10 Electron microscope observation of soybean protein with addition of transglutaminase

2.6 大豆分离蛋白的圆二光谱

2.6.1 Near-UV CD 分析 大豆分离蛋白经过转谷氨酰胺酶处理前后的近紫外 CD 分析结果见图 11,近紫外 CD 图谱可明确显示出大豆分离蛋白酶处理前后三级结构的变化。由图 11 可以看出,大豆分离蛋白在 265 nm 处有紫外吸收峰。不同种类氨基酸的吸收峰值不同,Trp、Tyr 及 Phe 3 种芳香族氨基酸的吸收峰值均在 250~290 nm^[23],故本研究证实近紫外光谱的主要来源为芳香族氨基酸,经过转谷氨酰胺酶的处理,芳香族氨基酸所对应区域的光谱图形状椭圆率大幅降低。由此说明经过转谷氨酰胺酶处理后,芳香族氨基酸残基更多地暴露出来,

这与 Lagrain 等^[24]的研究结果一致。
2.6.2 Far-UV CD 分析 转谷氨酰胺酶处理前后大豆蛋白二级结构的远紫外 CD 分析结果见图 12。从图 12 可以看出,大豆蛋白和转谷氨酰胺酶处理大豆蛋白 2 种样品的远紫外 CD 图在 195 及 215 nm 附近分别有 1 个正峰和 1 个负峰,这是高度有序的 β 类型结构的一种特征。

通过 Reed 拟合计算,得到 2 种样品的二级结构组成,见表 5。从表 5 可以看出,转谷氨酰胺酶处理前后大豆蛋白的二级结构存在一定的差别,与未经过酶处理的大豆蛋白相比,转谷氨酰胺酶处理后的大豆蛋白有序度更高,无规则卷曲结构含量相对较

低,而 β 折叠含量相对增加。可能原因是经过转谷氨酰胺酶处理的大豆蛋白疏水基团重新排列^[25],大豆蛋白聚集体结构发生了变化,形成了稳定的 β -折叠构造,从而使产品的凝胶强度得到了明显改善。

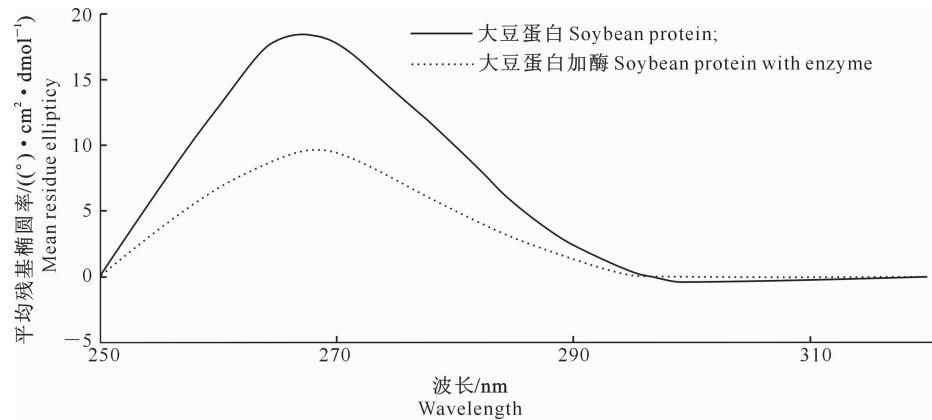


图 11 转谷氨酰胺酶处理前后大豆蛋白三级结构的近紫外光谱分析

Fig. 11 Near-ultraviolet spectrum of soybean protein/soybean protein with enzyme

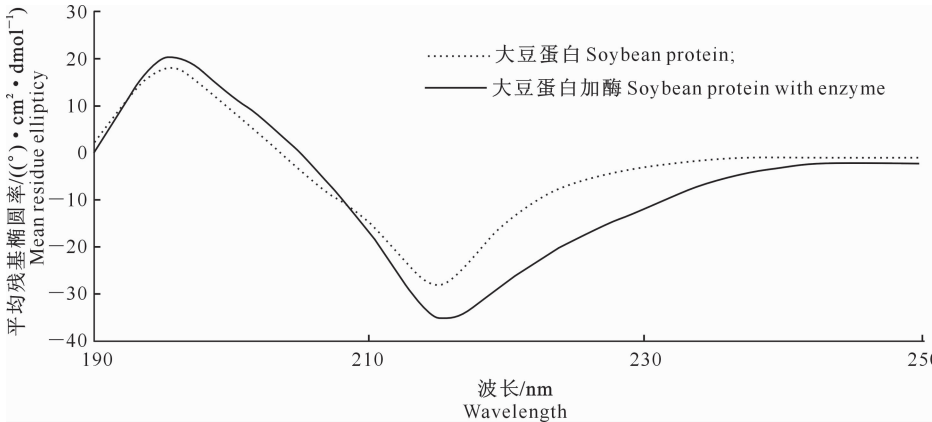


图 12 转谷氨酰胺酶处理前后大豆蛋白二级结构的远紫外光谱分析

Fig. 12 Far-ultraviolet spectrum of soybean protein/soybean protein with enzyme

表 5 转谷氨酰胺酶处理前后大豆蛋白二级结构的变化

Table 5 Change of secondary structure of soybean protein/soybean protein with enzyme

大豆蛋白 Soybean protein	α -螺旋/% α -helix	β -折叠/% β -sheet	β -转角/% β -turns	无规则卷曲/% Random coil
加酶 With enzyme	18.31	37.64	25.10	18.95
未加酶 Without enzyme	17.50	28.35	20.02	34.13

3 结 论

1)确定了大豆品种吉农芽豆高蛋白更有利于提高大豆分离蛋白的凝胶强度,转谷氨酰胺酶为最佳的大豆蛋白凝固酶。

2)响应面法优化结果表明,在酶添加量为 34.67 U/g、反应时间为 2.21 h、反应温度为 60 ℃ 及 pH 为 7.22 时,大豆蛋白的凝胶强度达到最大值 181.779 g · mm。

3)通过电子显微镜扫描发现,转谷氨酰胺酶对大豆蛋白凝胶的内部结构或集团之间的相互作用有非常重要的调节作用。

4)CD 图谱分析表明,经过转谷氨酰胺酶作用,大豆蛋白聚基体结构发生了变化,形成了稳定的 β -折叠构造,从而使产品的凝胶强度得到明显改善。

[参考文献]

[1] Visentin A N,Drago S R,Osella C A. Effect of the addition of soy flour and whey protein concentrate on bread quality and mineral dialyzability [J]. Archivos Latinoamericanos de Nutricion,2009,59(3):325-331.

[2] 金郁葱.大豆蛋白凝胶结构和质构的控制研究 [D]. 广州:华南理工大学,2013.

Jin Y C. Control study of soy protein gel texture and structure [D]. Guangzhou:South China University of Technology,2013.

- [3] Gekko K, Li X, Makino S. Competing effect of polyols on the thermal stability and gelation of soy protein [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1999, 63(12): 617-622.
- [4] 李冬莹. 转谷氨酰胺酶对大豆蛋白凝胶特性影响的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
Li D Y. Study on the gel properties of the coagulation by transglutaminase producing soy peptone [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2014.
- [5] 龙国徽. 大豆蛋白的结构特征与营养价值的关系 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
Long G H. Structural properties of soy protein and its relationship to the nutritional value [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2015.
- [6] 曲 玲, 张春红, 刘长江. 大豆分离蛋白的复合改性及其对某些功能性的影响 [J]. *食品工业科技*, 2007, 14(2): 71-73.
Qu L, Zhang C H, Liu C J. Comprehensive modifications of soybean protein isolate and their effects on its functional properties [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2007, 14(2): 71-73.
- [7] 石小琼, 饶华明. 天然食品保鲜防腐剂 Nisin 在豆腐保鲜上的应用研究 [J]. *食品工业科技*, 2004, 38(11): 130-131.
Shi X Q, Rao H M. Study on the application of natural food preservative nisin in preservation of tofu [J]. *The Food Industry Science and Technology*, 2004, 38(11): 130-131.
- [8] Dias K, Myers D J. Functional properties of the acidic and basic subunits of the glycinin (11S) soy protein fraction [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2003, 80(6): 551-555.
- [9] 袁德保. 大豆蛋白热聚集行为及其机理研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
Yuan D B. Heat-induced aggregation of soy proteins and its mechanism [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.
- [10] Lakemond C, Grupen H, Hessing M. Heat denaturation of soy glycinin: influence of pH and ionic strength on molecular structure [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(6): 1991-1995.
- [11] Yuan D B, Min W, Yang X Q. An improved isolation method of soy β -conglycinin subunits and their characterization [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2010, 87(9): 997-1004.
- [12] 安 静, 于国萍, 初云斌. 转谷氨酰胺酶催化对不同大豆蛋白凝胶性的影响 [J]. *食品科学*, 2011, 32(6): 32-37.
An J, Yu G P, Chu Y B. Effect of transglutaminase on characteristics of soybean protein gels [J]. *Food Science*, 2011, 32(6): 32-37.
- [13] 吴 伟. 蛋白质氧化对大豆蛋白结构和凝胶性质的影响 [D]. 江苏无锡: 江南大学, 2010.
Wu W. Effects of protein oxidation on structure and gel properties of soy protein [D]. Wuxi, Jiangsu: Jiangnan University, 2010.
- [14] 王金梅. 大豆蛋白热聚集行为及界面、乳化性质研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
Wang J M. Thermally aggregation behaviors, interfacial and emulsifying properties of soy protein [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [15] 田 琨. 大豆蛋白的结构表征及应用研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2010.
Tian K. Structure characterization and application of soy protein [D]. Shanghai: Fudan University, 2010.
- [16] 汪建斌, 邓 勇. Alcalase 碱性蛋白酶对大豆分离蛋白水解作用的研究 [J]. *食品工业科技*, 2002, 23(1): 35-37.
Wang J B, Deng Y. Studies on the isolated soy proteins hydrolytic action by alkaline proteinase-Alcalase [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2002, 23(1): 35-37.
- [17] Kang H J, Wang Z, Zhang W. Physico-chemical properties improvement of soy protein isolate films through caffeic acid incorporation and tri-functional aziridine hybridization [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61: 923-932.
- [18] Gao X Q, Hao X Z, Xiong G Y. Interaction between carrageenan/soy protein isolates and salt-soluble meat protein [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2016, 100: 47-53.
- [19] Boatright W L, Crum A D. Nonpolar-volatile lipids from soy protein isolates and hexane-defatted flakes [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1997, 74(4): 461-467.
- [20] Puppo M C, Sorgentini D A, Anón M C. Rheological properties of emulsions containing modified soy protein isolates [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2003, 80(6): 605-611.
- [21] 张晋博. 多糖对大豆蛋白的修饰及其界面、乳化和凝胶性质的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2013.
Zhang J B. Interfacial emulsifying and gelation properties of soy protein modified by polysaccharide [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013.
- [22] Deak N A, Murphy P A, Johnson L A. Characterization of fractionated soy proteins produced by a new simplified procedure [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2007, 84(2): 137-149.
- [23] Wang C, Pagadala S, Sherrard M S. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, 75(3): 337-341.
- [24] Lagrain B, Thewissen B G, Brijs K. Mechanism of gliadin-glutenin cross-linking during hydrothermal treatment [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(2): 753-760.
- [25] Li C, Wang C L, Sun Y. Microencapsulation of lactobacillus rhamnosus GG by transglutaminase cross-linked soy protein isolate to improve survival in simulated gastrointestinal conditions and yoghurt [J]. *Journal of Food Science*, 2016, 81(7): 1726-1734.