

应用二次回归正交旋转组合设计优化 转谷氨酰胺酶作用下的乳清蛋白交联条件

胡慧玲¹, 唐善虎^{1,2,*}, 杨蓉生², 袁伟²

(1. 成都理工大学材料与化学化工学院, 四川成都 610059)

(2. 西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041)

摘要: 考察了 pH 催化时间、催化温度及加酶量对转谷氨酰胺酶作用 WPI 形成交联产物的粘度影响, 并对影响因素进行优化, 找出最佳组合。该研究共分两个实验进行, 实验 1 考察 pH 时间、温度及加酶量单个因素对转谷氨酰胺酶交联作用的影响; 实验 2 是基于单因素实验结果, 采用四因素 (pH 催化时间、催化温度、加酶量) 五水平回归正交旋转设计, 对 WPI 经转谷氨酰胺酶交联后产生最大粘度的最佳条件进行优化, 以便确定实验多元回归方程和获得较大 WPI 粘度的最佳条件。实验结果表明: 交联时间 4 h 交联温度 50℃、pH 8.0 和加酶量 20 U/g 时, 具有最佳粘度值, 转谷氨酰胺酶作用效果最佳。

关键词: 转谷氨酰胺酶, 乳清分离蛋白 (WPI), 粘度, 二次回归正交旋转组合设计

Optimization of whey protein cross-linking via transglutaminase using quadratic regression rotational combination design

HU Hui-ling, TANG Shan-hu^{1,2,*}, YANG Rong-sheng, YUAN Wei

(1. College of Material and Chemistry & Chemical Engineering Chengdu University of Technology Chengdu 610059, China)

(2. College of Life Science & Technology Southwest University for Nationalities Chengdu 610041, China)

Abstract: The objectives of this study was to investigate the influence of pH, catalytic time, catalytic temperature and amount of transglutaminase on WPI cross-linking and the changes of viscosity of the product and to optimize the factorial combinations. Two experiments were conducted. In experiment 1, effects of pH, time, temperature or enzyme amount of individual factor on cross-linking were investigated. In experiment 2, four factors (pH, catalytic time, catalytic temperature, enzyme amount) with five levels were arranged with orthogonal rotational design based on the single factor test results. Viscosities were measured and data were analyzed with multiple regression. The experimental results showed that at pH 8.0, 50℃, addition of 20 U/g of transglutaminase and cross-linking for 4 h had the optimal viscosity.

Keywords: transglutaminase, whey protein isolate, viscosity, quadratic regression rotational design

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)05-0188-04

乳清蛋白是从乳清中回收获得的, 是营养最全面的一种天然蛋白质。多数乳清蛋白产品的蛋白质效价 (PER 值) 约 3.1, 高于酪蛋白的 PER 值 (2.5), 仅次于鸡蛋清的 PER 值 (3.9)^[1]。然而, 乳清蛋白除持水性较好外, 热稳定性、起泡性和流变学等特性在食品工业应用中存在很大的局限性^[2-3]。通过改性, 可以显著改善乳清蛋白的功能特性, 如热稳定性、热凝胶特性、乳化特性等^[4]。Sullivan 等人 2004 年的研究表明, 乳清浓缩蛋白经变性、均质、乳化、酸化、发酵

后通过核磁共振 (NMR) 检测与分析, 可以提高乳清浓缩蛋白的持水能力^[5]。2008 年 Zhen 等人通过响应面设计优化用碱性蛋白酶水解乳清浓缩蛋白条件的研究, 通过对 pH、温度、酶/底物浓度三个因素的控制, 碱性蛋白酶水解乳清蛋白能够明显降低 α -lactalbumin (α -La) 和 β -lactoglobulin (β -Lg) 的抗原性^[6]。乳清蛋白的改性方法有化学改性、物理改性和酶改性, 酶改性主要包括水解和交联^[7]。转谷氨酰胺酶 (Transglutaminase, EC 2.3.2.13) 能催化酰基转移反应, 从而在蛋白质、多肽以及伯胺之间导入共价键。如果蛋白质中赖氨酸残基的 ϵ -氨基作为酰基受体, 可在分子间以及分子内形成 ϵ -(γ -Glu)-Lys 键^[8]。乳中蛋白质经转谷氨酰胺酶改性后, 可以提高其乳化性、热稳定性; 改善其粘度、凝胶强度等流变

收稿日期: 2009-08-10 * 通讯联系人

作者简介: 胡慧玲 (1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术及其应用。

基金项目: 四川省科技支撑计划 (07NG11-002)。

学特性,提高其在可食性膜制备等方面的应用^[9]。乳清蛋白的粘度、热凝胶性等流变学特性在食品工业应用中存在很大局限性,也是食品工作者急需解决的难题,目前对酶改性后的乳清蛋白形成交联产物的粘度变化尚未见报道。本研究旨在考察 pH 催化时间、催化温度及加酶量对转谷氨酰胺酶作用 WPI 形成交联产物的粘度影响,同时应用二次回归正交旋转组合设计对影响因素进行优化,找出最佳因素组合,为工业生产及科学研究等操作提供参考^[10]。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

转谷氨酰胺酶 (TG-H) 江苏一鸣精细化工提供;乳清分离蛋白粉 美国哥伦比亚公司,蛋白含量大于 90%;DTT(二硫苏糖醇) 购于 Merck公司;其它试剂 均为分析纯。

Centrifuge5804R冷冻离心机 德国 eppendorf 公司;流变仪 美国 Brookfield公司;DELTA320 pH 计 瑞士 METTLER TOLEDO公司;HH数显恒温水浴锅 金坛市金城国盛实验仪器厂;电子天平。

1.2 实验设计

1.2.1 单因素实验设计 分别考察交联时间 X_1 (1, 2, 4, 8, 16 h)、催化温度 X_2 (35, 40, 45, 50, 55, 60℃)、反应 pH X_3 (6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0)和加酶量 X_4 (20, 30, 40, 50, 60 u/g)对转谷氨酰胺酶 (TG-H)交联乳清分离蛋白 (WPI)溶液的粘度影响。

1.2.2 四因素二次回归正交旋转组合设计 根据单因素实验结果,固定 WPI浓度为 6%,选择交联时间、pH 交联温度和加酶量四个因素作为研究对象,取实验中效果较好的水平作为各因素的零水平,确定各因素的间距,因素水平编码表见表 1。

表 1 响应面分析的因素和水平

水平	因素			
	X_1 时间 (h)	X_2 温度 (℃)	X_3 pH	X_4 加酶量 (u/g)
-2	1	35	6	10
-1	2	45	7	15
0	4	50	8	20
1	8	55	9	25
2	16	60	10	30

1.3 实验方法

1.3.1 TG-H催化聚合乳清分离蛋白 准确称取乳清分离蛋白 6 ± 0.01 g充分溶解于 100mL去离子水中,在 8000 r/min 4℃下冷冻离心 10 min 除去其中的杂质(包括矿物质、不溶性蛋白以及一些乳糖)。设定基础参数为温度 50℃,交联时间 4 h pH 为 8.0 TG-H为 20 u/g根据考察的单因素改变相应的实验参数。

1.3.2 交联后 WPI粘度的测定 使用 Brookfield流变仪测试经 TG-H交联后的 WPI的粘度,选用圆柱型零号转子,在 25 ± 0.1 ℃室温下,测定转度为 20 r/min 剪切率为 $24.6 s^{-1}$ 下测定,每个样品重复测定三次^[11]。粘度公式为:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \frac{\tau}{\omega R} \cos \alpha$$

其中: η 表示在流体中取两面积各为 $1 m^2$,相距 $1 m$ 相对移动速度为 $1 m/s$ 时所产生的阻力,单位泊 (Poise)或者厘泊 (cP)^[11], $1 cP = 1 \times 10^{-3} Pa \cdot s = 1 mPa \cdot s$

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果

2.1.1 交联时间对 WPI粘度的影响 TG-H可催化不同来源的蛋白,相对而言,乳清蛋白不是 TG-H的很好底物。为了达到实验目的,需要对乳清蛋白进行处理^[8]。本实验对乳清分离蛋白进行预热处理 (80℃, 15 min) 之后加入一定量还原剂 DTT (20 mmol/L)。在不同时间条件下 TG-H交联 WPI 所得粘度结果见图 1。随着 TG-H催化交联时间的延长, WPI粘度开始时增大,在交联 4 h时粘度达到最大,交联 4 h后,随着交联时间的延长, WPI粘度反而减小。这是因为交联 4 h后,随着时间的延长,合成的生物聚合物分子量会进一步增大,形成超大聚合物而沉淀下来,从而降低 WPI溶液粘度值^[11]。

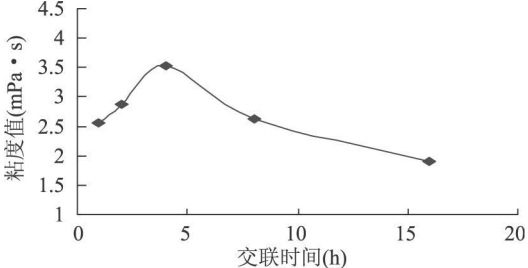


图 1 交联时间对 WPI粘度的影响

2.1.2 pH对 WPI粘度的影响 由图 2可知, pH在 5~7时 TG-H催化 WPI的粘度变化不是很明显,当 pH在 7~9时,粘度变化值明显,当 pH超过 8时, TG-H催化后的 WPI粘度开始下降,这是因为酶的活力受 pH的影响极为显著,不同酶具有不同的最适 pH。在最适 pH下,酶的活性最高,催化交联效果最好。由图 2所示, TG-H催化 WPI存在一个最佳 pH范围,约在 8左右,这与赵金和张睿^[12]研究认为转谷氨酰胺酶的最适 pH范围为 7.0~9.0是相符合的。

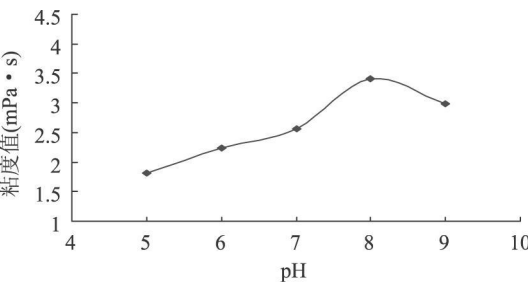


图 2 pH对 WPI粘度的影响

2.1.3 温度对 WPI粘度的影响 由图 3可知,在 35~50℃之间,粘度随催化温度升高而增大,当温度超过 50℃时, TG-H催化交联 WPI的粘度开始下降,这是因为 TG-H催化 WPI聚合有一个最适温度范围。王金水等人^[13]报道转谷氨酰胺酶最适作用温度为 50~55℃。该实验结果表明, TG-H催化 WPI粘度达到最大时的温度为 50℃左右,这与王金水等人报道的结果相符合。

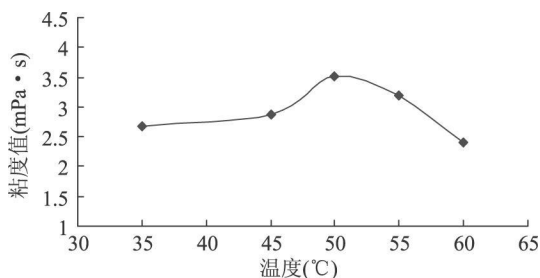


图 3 温度对 TG-H 交联 WPI 粘度的影响

2.1.4 加酶量对 WP 粘度的影响 一般来说,酶底物值越大,越有利于酶完全地催化底物。当底物浓度一定时,加酶量会存在一个临界值^[13]。由图 4 可知,当加酶量在 20~30 u/g 粘度值随加酶量增加而升高;当加酶量在 30~40 u/g 时,粘度值随加酶量增加而降低,可见在该实验条件下 30 u/g 加酶量是酶催化聚合的临界加酶量。酶对底物的催化量与催化效率是相互矛盾的,有关这一点可以明显地从图中看出,底物浓度固定,加酶量越多,催化效率越低。对于一个催化反应,需要综合考虑此二者的关系,在保证达到最大粘度值的条件下,尽可能地提高催化效率,本实验最佳加酶量可选 20~30 u/g

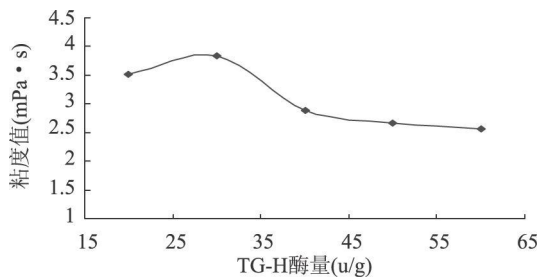


图 4 加酶量对 TG-H 交联 WP 粘度的影响

2.2 四因素二次回归正交旋转组合设计实验结果

2.2.1 实验设计表和实验结果 根据回归计划 R436R0(C^[10]),编制实验设计表,并将实验结果列入表 2。各种组合处理的 WPI 溶液的粘度在 1.61~4.05 mPa·s

2.2.2 回归方程的建立与检验 对实验结果进行统计分析,得到影响乳清分离蛋白粘度(η)的回归方程:

$$\eta = 3.6083 - 0.2688 X_1 + 0.1004 X_2 - 0.1704 X_3 + 0.0113 X_4 + 0.1306 X_1 X_2 + 0.2294 X_1 X_3 - 0.0294 X_1 X_4 + 0.0369 X_2 X_3 - 0.373 X_2 X_4 - 0.160 X_3 X_4 - 0.3568 X_1^2 - 0.0893 X_2^2 - 0.1843 X_3^2 - 0.1843 X_4^2$$

其模型与单因素实验效果相同,为进一步确定各因素对交联后乳清分离蛋白粘度的影响程度,对所得的数学模型进行方差分析,其结果见表 3。

粘度值大于 3.07 mPa·s 的 105 个方案中的各个因素分布见表 4。对回归方程进行显著性检验: $F_{\text{回归}}/MS_{\text{剩余}} = 6.47 > F_{0.05}(14, 21)$,说明得到的回归方程显著,实验数据与采用的数学模型相符合,不需要改变数学模型。进行失拟均方与误差的 F 值检验: $F_2 = MS_{\text{失拟}}/MS_{\text{误差}} = 2.81 < F_{0.05}(10, 11)$,失拟不显著,说明回归方程与实际情况拟合的较好。粘度最高值为 3.74 mPa·s 的各个因素组合为:时间 2 h 温度 50°C、pH 7.0 加酶量为 20 u/g

表 2 响应面分析设计及结果

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	粘度 (mPa·s)
1	-1	-1	-1	-1	2.56
2	-1	-1	-1	1	2.88
3	-1	-1	1	-1	2.56
4	-1	-1	1	1	2.77
5	-1	1	-1	-1	2.24
6	-1	1	-1	1	2.56
7	-1	1	1	-1	2.56
8	-1	1	1	1	2.24
9	1	-1	-1	-1	2.56
10	1	-1	-1	1	2.56
11	1	-1	1	-1	3.35
12	1	-1	1	1	3.84
13	1	1	-1	-1	2.67
14	1	1	-1	1	3.2
15	1	1	1	-1	3.63
16	1	1	1	1	3.73
17	-2	0	0	0	2.35
18	2	0	0	0	1.71
19	0	-2	0	0	2.56
20	0	2	0	0	3.64
21	0	0	-2	0	2.88
22	0	0	2	0	2.56
23	0	0	0	-2	2.24
24	0	0	0	2	3.2
25	0	0	0	0	3.52
26	0	0	0	0	3.84
27	0	0	0	0	3.52
28	0	0	0	0	3.48
29	0	0	0	0	3.54
30	0	0	0	0	3.88
31	0	0	0	0	4.05
32	0	0	0	0	3.58
33	0	0	0	0	3.2
34	0	0	0	0	3.34
35	0	0	0	0	3.86
36	0	0	0	0	3.49

表 3 回归旋转组合设计实验方差分析表

来源	DF	SS	MS	F 值	F _{0.05}
回归	14	10.3664	0.7405	6.47	2.53
剩余	21	2.4035	0.1145		
失拟	10	1.7273	0.1727	2.81	3.53
误差	11	0.6762	0.0615		

表 4 大于 3.07 mPa·s 的 105 个方案中的各个因素频率分布

	加权均数	标准误差	95% 的分布区间
X ₁	-0.619	0.064	-0.744~0.494
X ₂	0	0.138	-0.271~0.271
X ₃	0.667	0.097	-0.856~-0.477
X ₄	0	0.074	-0.145~0.145

3 结论

3.1 由单因素实验得到转谷氨酰胺酶交联 6% 乳清分离蛋白(WPI)溶液的最佳粘度条件为:交联时间为 4 h 交联温度为 50°C、pH 为 8.0 酶的添加量最佳范围为 20~30 u/g 考虑到酶的来源及经济因素,选择添加量为 20 u/g

(下转第 194 页)

3.3 关于培养基的问题

由于本实验主要检测的是好氧或兼性厌氧的污染菌,所以采取了常规的增菌分离方式,未完全采用GB/4789.26-2003分离菌的方法。

本实验采用了多种培养基,除了包括了国标中酸性和低酸性罐头商业无菌检验的诸多培养基,还有实验室常用的培养基,如察式培养基等,其目的是试图筛选出一种适合山楂罐头微生物分离的培养基体系。本实验中增菌液效果最好的是酸性肉汤,次之为麦芽浸膏和溴甲酚紫葡萄糖肉汤;分离培养基效果最好的是溴甲酚紫葡萄糖琼脂培养基和马铃薯葡萄糖培养基,次之为酸性肉汤琼脂培养基。

4 结论

本实验通过对罐头腐败微生物的分离、纯培养,并结合污染菌的菌落特征、染色观察以及部分生理生化指标的鉴定,参考细菌鉴定相关手册得出鉴定结果:1号菌株为乳杆菌属,2号菌株为葡萄球菌属,3号菌株为魏斯氏菌属^[17]。此外,初步摸索出较适合分离山楂罐头污染微生物的培养基路线:增菌液(酸性肉汤)→分离培养基(溴甲酚紫葡萄糖琼脂培养基或马铃薯葡萄糖培养基)。本研究为罐头制品污染微生物的检测及生物学特性的分析检验提供一定参考,同时为软罐头制品的防腐保鲜提供理论依据。

参考文献

[1] M L斯佩克.食品微生物学检验方法提要[M].何晓青,等译.人民卫生出版社,1982:382-390.

[2] 赵晋府.食品技术原理[M].中国轻工业,2007.

[3] 傅力,刘彤.番茄酱中几种微生物指标检测方法的探讨[J].新疆农业大学学报,2002,25(4):51-53.

[4] GB/T4789.26-2003食品 卫生微生物学检验 罐头食品商业无菌的检验[S].

[5] 唐丽杰.微生物学实验[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2005:252-264.

[6] GB/4789-2003食品 卫生检验方法 微生物学部分[S].

[7] 马长利,张志新.热解糖梭菌致蘑菇罐头膨胀变质的实验分析[J].中国食品卫生杂志,2005,17(5):433-435.

[8] 李仲兴,郑家齐,李家宏.临床细菌学[M].北京:人民卫生出版社,1986:452-459.

[9] R E布坎南, N E吉本斯.伯杰细菌鉴定手册(第8版)[M].北京:科学出版社,1984.

[10] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.

[11] 杜红利,刘畅.罐头制品中微生物检测方法[J].肉类工业,2008,331(11):40-43.

[12] 黄忠梅,黄玲.番茄酱中厌氧菌检测方法的研究[J].新疆农业科学,2007,44(1):80-86.

[13] 刘艳莉,张春艺.山楂炮制前后 pH变化的研究[J].湖北中医杂志,2008,30(1):86-90.

[14] 张刚.乳酸细菌(第8版)[M].化学工业出版社,2007.

[15] 华玉苍,王彩红.厌氧菌的检测方法[J].酿酒科技,2001(2):69-70.

[16] 李中华,段雄波,李金钟,等.魏斯氏菌属细菌的分类与鉴定新进展[J].国际检验医学杂志,2006,27(8):721-723.

(上接第190页)

3.2 采用二次回归正交旋转组合设计对转谷氨酰胺酶交联乳清分离蛋白(WPI)的工艺条件进行研究,在交联时间、温度、pH、加酶量之间建立的二次回归数学模型为:

$$\eta = 3.6083 - 0.2688x_1 + 0.1004x_2 - 0.1704x_3 + 0.0113x_4 + 0.1306x_1x_2 + 0.2294x_1x_3 - 0.0294x_2x_3 + 0.0369x_1x_4 - 0.373x_2x_4 - 0.160x_3x_4 - 0.3568x_1^2 - 0.0893x_2^2 - 0.1843x_3^2 - 0.1843x_4^2$$

由该模型模拟所得的粘度值与单因素实验效果是基本一致的。

3.3 本研究实现了乳清分离蛋白在经转谷氨酰胺酶交联后的粘度值的较大提高,在未经改性前6%WPI的粘度值为1.61mPa·s,改性后的6%WP粘度值可高达4.05mPa·s,在食品材料研究和开发中具有一定的应用潜力。

参考文献

[1] 赵晶,张睿.微生物谷氨酰胺转氨酶对乳清蛋白的改性[J].中国乳品工业,2004,32(2):36-40.

[2] 韩雪,孙兵.乳清蛋白的功能特性及应用[J].中国乳品工业,2003,31(3):28-30.

[3] 赵国华,王雅茜,陈宗道.乳清蛋白改性综述[J].中国乳品工业,1998,26(4):29-32.

[4] 刘晶,韩清波.乳清蛋白的特性及应用[J].食品科学,2007,28(7):535-537.

[5] Meng G T, Ma C Y. Fourier-transform infrared spectroscopic study of globulin from Phaseolus angularis (red bean) [J]. Int J Biol Macromolecules, 2001, 29: 287-294.

[6] Zheng H, Shen XQ, Bu GH, et al. Effects of pH, temperature and enzyme-to-substrate ratio on the antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by Alkalase [J]. International Dairy Journal, 2008, 18: 1028-1033.

[7] Allen E, Jack P, Davis Mathew K, et al. Advances in modifying and understanding whey protein functionality [J]. Trends in Food Science and Technology, 2002, 13: 151-159.

[8] 唐传核,杨晓泉,彭志英,等.微生物转谷氨酰胺酶催化乳清蛋白聚合研究[J].中国乳品工业,2002,30(6):11-15.

[9] 黄志良,宁正祥.转谷氨酰胺酶对乳蛋白质的改性作用[J].食品工业科技,2002,23(3):77-79.

[10] 杨德.实验设计与分析[M].北京:中国农业出版社,2002:239-241.

[11] Cony G, Joana T, C Paulo J, et al. Cross-linking of milk whey proteins by transglutaminase [J]. Process Biochemistry, 2008, 43: 788-794.

[12] 赵晶,张睿.微生物谷氨酰胺转氨酶对乳清蛋白的改性[J].中国乳品工业,2004,32(2):36-40.

[13] 王金水,赵淑明.转谷氨酰胺酶的性质、制备及在食品加工中的应用[J].中国调味品,2005,319(9):9-13.

[14] 阚建全.食品化学[M].北京:中国农业大学出版社,2002:240-243.