

蛋白质凝胶机理的研究进展

胡 坤, 方少瑛, 王秀霞, 梁 洁

(广东药学院公共卫生学院, 广东广州 510224)

摘 要:凝胶特性是食品蛋白质的重要功能特性,蛋白质的凝胶行为及其流变性质是形成某些食品独特的质构、感官和风味的决定性因素。长期以来,人们对蛋白质的凝胶行为进行了广泛深入的研究,但对蛋白质凝胶的机理和凝胶动力学还没有完全了解。本文对当前有关蛋白质凝胶的类型、凝胶过程中蛋白质分子构象的变化、形成蛋白质凝胶的主要作用力和凝胶动力学过程的研究进展作了综述。随着现代分析研究技术的进步,对蛋白质凝胶行为的认识也逐渐深入。

关键词:蛋白质,凝胶机理

Abstract: Gelation properties are the major functional properties of food proteins; its gelation behavior and rheological properties are key factors for texture, sensory properties and flavor of some food. For a long time, protein gelation phenomena have been widely studied, but gelation mechanism and dynamics are still unknown. The article reviews the recent research developments in gelation types, molecule conformation changes during gelation, gelation forces, and gelation dynamics of food proteins. With the advances in modern analysis technology and research, knowledge in protein gelation behaviors is being accumulated.

Key words: protein; gelation mechanism

中图分类号: TS201.2¹ 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2006)06-0202-04

凝胶特性是食品蛋白质最重要的功能特性之一,人类在很久以前就利用蛋白质的凝胶特性来制作凝胶类食品,其中最典型的就中国的豆腐和西方的奶酪。但是,蛋白质的凝胶机理及其过程动力学还没有被完全了解。随着现代研究分析技术与方法的发展,有关蛋白质凝胶的机理与过程的研究已经取得大量的成果,下面将有关蛋白质凝胶机理的研

收稿日期: 2005-09-20

作者简介: 胡坤,博士,副教授,研究方向:食品添加剂的研究与开发,食品蛋白质功能特性研究。

基金项目:广东省自然科学基金博士启动基金(04300625)。

究进展作一综述。

1 蛋白质凝胶的定义、类型及其凝胶过程中分子构象的变化

蛋白质凝胶的形成可以定义为蛋白质分子的聚集现象,在这种聚集过程中,吸引力和排斥力处于平衡,以至于形成能保持大量水分的高度有序的三维网络结构或基体(matrix)。如果吸引力占主导,则形成凝结核,水分从凝胶基体排除出来。如果排斥力占主导,便难以形成网络结构^[1]。

蛋白质凝胶的类型主要决定于蛋白质分子的形状。由于凝胶过程是一个动态过程,也受外界环境的pH、离子强度及加热的温度和时间的影响。纤维状蛋白质分子,如明胶和肌浆球蛋白凝胶的网络结构由随机的或螺旋结构的多肽链组成。Ledward报道^[2],明胶的凝胶网络为线性分子通过形成连接区而形成凝胶网络。Hermanssan和langton观测到^[3]肌浆球蛋白凝胶是由线性分子间形成连接点而构建成三维网络。

球蛋白的热凝胶是由仍保持球形结构的蛋白质分子首尾聚集而形成的。Tombs认为^[4]球蛋白形成两种类型的凝胶:高度定向有序的“念珠串状(stream beads)”网络结构和随机聚集的网络结构。“念珠串状”凝胶外观透明或半透明,Nakamura等^[5]报道了大豆glycinin蛋白具有这种凝胶的网络结构。这种凝胶是在低离子强度和远离蛋白质等电点pI的条件下形成的。当环境的离子强度较高及pH接近等电点pI时,则形成随机聚集的凝胶。然而大多数球蛋白凝胶都具有这两种类型的凝胶网络,这决定于蛋白质的浓度、环境的pH与离子强度及加热的温度和时间。

蛋白质分子构象的变化是蛋白质分子聚集的先决条件,球蛋白更是如此。在串状网络结构中发现蛋白质分子仍保持球形构象。经典的球形蛋白质分子

展开的“两种状态”理论认为仅存在两种状态的蛋白质:未变性的蛋白质和高度变性的无序蛋白质。现在已经证明^[6],在从无序状态向未变性状态展开的路径中明显存在一动态的中间体。已经发现相似的中间体状态存在于低 pH(或高 pH)的平衡条件下、适当浓度变性剂的条件下和高温度的条件下。这种中间体状态被称为“熔融球蛋白状态(molten globulin)”,它被定义为含有与未变性状态相似的二级结构而三级结构展开的紧凑的球形分子。从受热时的未变性状态到熔融球蛋白的转变及这种部分变性的形式主要与热凝胶的形成有关。Clark 和 Lee-Tuffnell 报道^[7]加热时牛血清蛋白 α -螺旋下降,而 β -折叠结构增加到接近纤维蛋白中观测到的含量,这表明热凝胶的二级结构发生显著的改变,这与熔融球蛋白中间体的概念相矛盾。 β -折叠含量的增加似乎是由于变性分子间的连接而形成的,也就是说 β -折叠的形成与球蛋白的变性步骤没有直接的关系。

通过 CD、IR 和 NMR 也观测到 α -螺旋结构减少而 β -折叠结构增加的现象^[8,9]。Bouraoui 等^[10]最先用拉曼光谱分析鱼肌肉蛋白结构的变化,提出蛋白质凝胶时 α -螺旋减少而 β -折叠增加。如果二级结构完全破坏,蛋白质表现为随机卷曲的行为,并且形成凝胶的能力也丧失。因此,分子间 β -折叠的形成似乎与蛋白质聚集体的形成有关^[11]。

Clark 等^[12]对热处理时球蛋白聚集体内部结构的远红外光谱、拉曼光谱和圆二色性研究发现,在大多数情况下,变性前蛋白质二级结构的基本残基成分仍然存在。然而,在红外的酰胺 I 吸收带的肩峰表明,反平行的 β -折叠有增加的趋势。这种向 β -折叠的转变对于含有很少的原始折叠结构的蛋白质(如血清球蛋白)来说最明显,但在其他一些含有更高 β -折叠的蛋白质(如植物球蛋白和乳的 β -乳球蛋白)中也能观测到^[13]。由于折叠的含量和类型的变化也伴随着热处理,这又表明这种结构在蛋白质聚集体形成过程中的作用。实际上 β -折叠的形成现在已经变成“纤维/细纤维”形成过程的公认“信号”。

但是,试图将二级结构的变化与长距离结构和流变性联系起来的努力并没有获得成功。复杂性的原因是由于其他一些因素和预凝胶中间体间的精确平衡相矛盾^[14]。

2 形成蛋白质热凝胶的作用力

蛋白质凝胶是变性的蛋白质分子间排斥和吸引相互作用力相平衡的结果。一般认为,形成和维持蛋白质凝胶的作用力主要是疏水相互作用、氢键、静电相互作用等物理作用力,但含有巯基的蛋白质分子间 SH-SS 交换反应也可能对蛋白质的凝胶作用有贡献。

2.1 疏水相互作用

蛋白质受热时包埋的非极性多肽暴露出来,从

而增强了临近多肽非极性片段的疏水相互作用。因而,平均疏水性(例如蛋白质中疏水氨基酸的比率)应该影响凝胶的形成过程^[15]。Shimada 和 Matsushita 等^[16]报道,含有高于 31.5%克分子百分数的非极性氨基酸残基的蛋白质形成凝结型凝胶,而那些含有低于 31.5%克分子百分数的非极性氨基酸残基的蛋白质则形成半透明型凝胶。这种分类方法清楚地表明疏水相互作用对凝胶形成的重要性和从蛋白质的氨基酸组成预测凝胶特性的可能性。但是 Maria Babajimopoulos 等^[17]认为疏水相互作用和静电相互作用对于大豆分离蛋白凝胶的形成是可以忽略的。

2.2 氢键

有关氢键对蛋白质凝胶形成的作用,不同的研究者得到的结论相似。Catsimpoolas 和 Meyer 报道^[18],用 6mol/L 的尿素处理预凝胶,抑制了大豆分离蛋白冷却时形成凝胶,因此认为氢键和疏水相互作用是形成凝胶的主要作用力。但是高浓度的尿素可能导致蛋白质严重变性,破坏了蛋白质的二级结构,而二级结构对于球蛋白形成凝胶来说是必需的,因为氢键是形成与凝胶有关的 β -折叠结构的主要作用力。Maria Babajimopoulos 等^[17]认为与大豆分离蛋白凝胶过程有关的主要作用力是氢键和范德华力,而疏水相互作用和静电相互作用可以忽略。Shigeru Utsumi 等^[19]也报道氢键是大豆 11S 球蛋白、7S 球蛋白和大豆分离蛋白凝胶的形成及维持凝胶网络结构的最重要的物理作用力。

2.3 静电相互作用

静电相互作用通常在蛋白质聚集过程中表现为相互排斥力,特别是在体系仅含有一种蛋白质或含有相似等电点的不同种蛋白质的情况下。 pI 时蛋白质的净电荷为零,当环境的 pH 接近 pI 时,蛋白质分子快速随机的聚集,因而很容易形成凝结块。在 pH 条件远离 pI 时,由于存在较高的净负电荷,静电排斥力占主导,蛋白质分子的聚集不会发生。当体系的 pH 处于 pI 和极端 pH 的中间区域时,静电排斥力和相互吸引作用力(主要是疏水相互作用)很好地平衡,从而形成凝胶网络^[1]。凝胶中静电排斥力的重要性已被在介质中添加盐类所证实,即在 pH 远离 pI 的条件下,加入盐类屏蔽了蛋白质分子表面过剩的电荷,并使蛋白质间连接形成纤细的“念珠串”状网络结构。然而,在介于 pI 和极端 pH 中间的 pH 条件下,加入盐类打破了吸引力和排斥力间的平衡,导致形成聚集体或凝结块。

2.4 二硫键

Koseki 等^[20]证实,即使一些蛋白质的 SH-SS 间的交换反应被抑制,凝胶的形成也是可能的,因此他们认为分子间的共价二硫键(S-S)不充当起始的凝胶网络的骨架。Shigeru Utsumi 等^[19]也认为 SH-SS 间

的交换反应对于大豆 11S 凝胶的形成是不必要的,但对于形成强的弹性凝胶很重要。由凝胶的溶解性试验表明,通过形成分子间的二硫键可以获得凝胶网络的物理完整性。二硫键是否在凝胶网络的连接区形成或它们仅仅有助于增加多肽的有效链长目前还不清楚。但在后一种情况下,长的多肽链很容易缠绕在一起,因而在凝胶网络内加强了非共价键的形成^[21]。

3 热致球蛋白凝胶的动力学

蛋白质的凝胶过程是一个多步骤的机制,其中,原始未变性蛋白质的受热展开是起始步骤(如果存在多亚基蛋白质时,分子展开过程可能是在一定程度的解聚过程之后)。受热过程中,具有固定二级和三级结构的紧凑分子结构被破坏,在热处理中变得对周围的蛋白质分子更为活跃。分子展开程度依赖于受热的时间和温度,并且可能是多步骤的。但其结果通常是一个仍能与另外相似展开程度的蛋白质分子物理地或化学地连接的球形颗粒。随着展开的进行,展开分子间的连接对“溶胶-凝胶”的转变是必需的。但通常情况下这一过程也是复杂的,包含多种步骤。在展开分子高度带电荷,并且这种电荷没有被有效屏蔽(pH 远离 pI 且离子强度很低)的情况下,起始的连接过程是有限的,并且以线性连接为主^[21]。

Clark^[12]根据前人的研究将均一的热致球蛋白凝胶过程概括为三个主要步骤:蛋白质分子的展开、线性纤维的聚集和纤维聚集体的随机连接。当然,每一步都可能是相当复杂的,伴随着蛋白质分子的变性展开和可能包括亚基解聚或后来有限聚集的主要过程。纤丝(fibrils)的形成可能通过成核现象及其生长而发生,并且纤丝的连接是一个产生许多外形的多聚凝结的过程。另外,由于凝胶结构可能是由动力学确定的,起始的均匀网络结构(特别是在纤丝净电荷较低或较高屏蔽效应的情况下)可能经历一个长期的熟化过程,如向更不均匀的(相分离)形态缓慢移动。这是球蛋白凝胶形成的第四个动力学步骤(分层过程)。实际上,不均匀球蛋白凝胶的形成一定包括这第四步。

4 展望

虽然对球蛋白凝胶的微观结构、凝胶作用力、凝胶过程中蛋白质分子高级结构和构象的变化、蛋白质分子的聚集及凝胶动力学已经进行了广泛和深入的研究,但对蛋白质凝胶这一复杂物理化学现象的理解还仅是冰山一角。新的研究手段与观测技术,如小角中子散射(SANS)、动态光散射(DLS)和静态光散射(SLS)已被用于描述相分离机制和过程的动力学,但在描述凝胶状态相图的介质中大分子的定位却很难做到^[22]。利用更合适的技术,如傅立叶转换红外显微镜(FTIRM)、激光共聚焦显微镜(CLSM)、拉曼

共聚焦显微镜(confocal Raman microscopy)以及原子力显微镜(AFM)在这方面及蛋白质分子的聚集过程和空间网络结构的动态形成过程的观测方面更具应用潜力^[23,24]。

参考文献:

- [1] Hermassan A-M. Aggregation and denaturation involved in gel formation. In: Functionality and protein structure[M]. A Poulr Edited. Washington DC: American Chemical Society, 1979. 82~103.
- [2] J R Mitchell, D A Leward. Functional Properties of Food Macromolecules [M]. London:Elsevier Applied Science, 1986.171~201.
- [3] Hermanssan A-M, Langton M. Filamentous structures of bovine myosin in diluted suspension and gels [J]. Journal of Science of Food and Agriculture,1988, 42: 335~369.
- [4] Tombs M P. Gelation of globular proteins[J]. Faraday Discuss Chemistry Society ,1974, 57: 158~164.
- [5] Nakamura T, Utsumi S, Mori T. Network structure formation in thermally induced gelation of soybean glycinin[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry ,1984, 32: 349~352.
- [6] T E Creighton. Protein Folding [M]. New York :W H Freeman and Company, 1992.243~300.
- [7] Clark A H, Lee -Tuffnell D D. Gelation of globular proteins. In: Functional Properties of Food Macromolecules[M]. Edited by J R Mitchell, D A Leward. London:Elsevier Applied Science, 1986.203~272.
- [8] Belloque J, Smith GM. Thermal denaturation of β -lactoglobulin. A ¹H NMR study[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry,1998, 46:1805~1813.
- [9] Qi XL, Holt C, McNulty D, et al. Effect of temperature on the secondary structure of β -lactoglobulin at pH6.7, as determined by CD and IR spectroscopy: a test of the molten globule hypothesis[J]. Biochemistry Journal,1997, 324: 341~346.
- [10] Bouraoui M, Nakai S, Li-Chan E. In situ investigation of protein structure in Pacific whiting surimi and gels using Raman spectroscopy[J]. Food Research International,1997, 30: 65~72.
- [11] K Nishinari, H Zhang, S Ikede. Hydrocolloid gels of polysaccharides and proteins [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science,2000(5): 195~201.
- [12] A H Clark, G M kavanagh, S B Ross-Murphy. Globular protein gelation--theory and experiments [J]. Food Hydrocolloids,2001,15: 383~400.
- [13] Allain A-F, Paquin P, Subirade M. Relationships between conformation of β -lactoglobulin in solution and gel

states as revealed by attenuated reflection Fourier transform infrared spectroscopy [J]. International Biological Macromolecules, 1999, 26: 337~344.

[14] Walraj S Gosal, Simon B Ross-Murphy. Globular protein gelation [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2000(5): 188~194.

[15] Relkin P. Reversibility of heat-induced conformational changes and surface exposed hydrophobic clusters of β -lactoglobulin: their role in heat-induced sol-gel state transition [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1998, 22: 59~66.

[16] Shimada K, Matsushita S. Relationship between thermo-coagulation of protein amino acid compositions [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1980, 28: 413~417.

[17] Maria Babajimopoulos, Srinivasan Damodaran, Syed S H Rizvi, et al. Effect of various anions on the rheological and gelling behavior of soy proteins: thermodynamic observations [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1983, 31: 1270~1275.

[18] Catsimopoulos N, Meyer E W. Gelation phenomena of soybean globulins. I Protein-protein interactions [J]. Cereal Chemistry, 1970, 47: 559~570.

[19] Shigeru Utsumi, John E Kinsella. Forces involved in

soy protein gelation: Effects of various reagents on the formation, hardness and solubility of heat-induced gels made from 7S, 11S, and soy isolate [J]. Journal of Food Science, 1985, 50: 1278~1282.

[20] Koseki T, Kitabatake N, Doi E. Irreversible thermal denaturation and formation of linear aggregates of ovalbumin [J]. Food Hydrocolloids, 1989(3): 123~134.

[21] Hermansson A-M. Structure of soya glycinin and conglycinin gels [J]. Journal of Science of Food and Agriculture, 1985, 36: 822~832.

[22] I Capron, T Nicolai, C Smih. Effect of addition of κ -carrageenan on the mechanical and structural properties of β -lactoglobulin gels [J]. Carbohydrate polymers, 1999, 40: 233~238.

[23] Sylvie L Turgeon, Martin Beaulieu. Improvement and modification of whey protein gel texture using polysaccharides [J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15: 583~591.

[24] Natalia M Ptitchkina, Nadezhda I Panina, Elena V Karmanva, et al. Gel formation in the gelatin-NaCMC-water system [M]. In: G O Philips, D J Wedlock, P A Williams Edited. IPL press, Oxford. Gums and Stabilisers for the Food Industry, Vol8. 1996. 207~215.

(上接第 86 页)

表 9 木耳粉面包正交实验结果

实验号	A 木耳粉添加量(%)	B 香精添加量(%)	C 发酵时间(h)	D 误差	弹性
1	1	1	1	1	0.850
2	1	2	2	2	0.876
3	1	3	3	3	0.804
4	2	1	2	3	0.736
5	2	2	3	1	0.833
6	2	3	1	2	0.881
7	3	1	3	2	0.839
8	3	2	1	3	0.890
9	3	3	2	1	0.902
K ₁	0.843	0.808	0.874	0.862	
K ₂	0.817	0.866	0.838	0.865	
K ₃	0.877	0.862	0.825	0.810	
R	0.060	0.058	0.049	0.055	R _A >R _B >R _C

木耳粉添加量的混合粉的粉质特性进行了测定, 测试结果: 纯小麦粉吸水率 61.8%(校正至 500FU) 面团形成时间 5.2min、稳定性 4.0min、弱化度(ICC 标准) 151FU、粉质评价价值 69.2% 木耳粉含量的混合粉吸水率 69.6%(校正至 500FU) 面团形成时间 5.0min、稳定性 3.3min、弱化度(ICC 标准) 149FU、粉质评价价值 66。

利用物性仪对面包的硬度、弹性、回复性进行测定, 以弹性作为主要考察指标, 硬度和回复性作为次要考察指标, 通过正交实验最终得出面包最佳工艺配方: 木耳粉添加量为 3%, 香精添加量 0.6%, 发酵

时间 3h。

参考文献:

- [1] 李红卫. 木耳研究[J]. 中国果菜, 2004(2): 46~47.
- [2] 李小东. 木耳的药理作用[J]. 中国中医科技, 2001(5): 21~30.
- [3] 张守文. 面包科学与加工工艺[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996. 78~84.
- [4] 李里特, 江正强, 卢山. 烘焙食品工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 123~167.
- [5] A H 罗斯. 发酵食品[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1982. 98~99.