

食品蛋白磷酸化改性的研究进展

马庆保^{1,2}, 汪一红¹, 刘志东^{1*}, 黄洪亮¹, 曲映红², 刘健¹, 戚亭^{1,3}, 燕梦雅^{1,3}, 王帅² (1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090; 2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 3. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

摘要 食品蛋白的磷酸化改性是食品蛋白质改性的有效方式, 能够改善食品蛋白质的功能特性, 扩大食品蛋白质应用领域。综述了食品蛋白磷酸化改性的研究现状、存在的问题、改性产物的安全性, 并对今后该领域的研究前景进行了展望。

关键词 食品蛋白; 磷酸化改性; 功能特性; 进展

中图分类号 TS201.2⁺¹ **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)01-0099-03

Advances in Phosphorylation Modification of Food Proteins

MA Qing-bao^{1,2}, WANG Yi-hong¹, LIU Zhi-dong^{1*} et al (1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090; 2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract Phosphorylation modification is an effective way to modify food protein, which can improve the functional properties of food protein, expand the field of food protein applications. The research status of food protein phosphorylation modification, existing problems, safety of modified products were reviewed, the prospect of this field was forecasted.

Key words Food protein; Phosphorylation modification; Functional properties; Advance

蛋白质是食品重要的组分之一, 能够对食品品质、品质和消费者的接受度产生较大的影响。由于应用领域的不同, 对于食品蛋白的功能特性要求差异也较大。研究人员为了获得特定用途的食品蛋白, 探索了食品蛋白功能特性的改善研究方法。蛋白质改性的目的是改善食品蛋白的功能特性(持水性、持油性、溶解性、乳化性、乳化稳定性等), 减少或消除食品本身含有的抗营养因子等, 拓展其应用领域^[1-3]。

目前, 食品蛋白功能特性改善方法主要有物理法、化学法和生物法等。化学法改性主要包括: 磷酸化、酰化、去酰胺、羰基化、糖基化及氧化等方法。蛋白质的磷酸化改性是通过将磷酸基团引入蛋白质基团, 改变或影响食品蛋白的结构, 从而改变食品蛋白的功能特性。近年来, 研究人员以大豆蛋白、乳蛋白、鸡蛋清蛋白、酪蛋白等为原料开展了食品蛋白的磷酸化改性研究并取得了积极进展^[4-7]。然而, 食品蛋白的磷酸化改性仍然存在改性产物的结构不明确, 产物安全性较差等问题。

笔者综述了食品蛋白磷酸化改性的基本原理、主要方法、影响因素等, 以期推动食品蛋白的磷酸化改性研究进展, 扩大其应用领域。

1 食品蛋白质磷酸化改性的方法

1.1 化学法磷酸化改性

化学法磷酸化改性是指采用磷酸基化学物质, 如三氯氧磷、五氧化磷等用于食品蛋白的化学改性, 获得磷酸化蛋白产物。研究发现, 磷酸化乳蛋白的乳化性质得到显著改善, 酪蛋白和 β 乳球蛋白与钙结合的能力增强。Nayak等^[8]采用三氯氧磷对水牛乳蛋白(酪蛋白、沉

淀物和乳清蛋白)进行磷酸化处理, 结果表明, 乳清蛋白在水溶液、钠盐溶液和钙盐溶液中的溶解性均明显提高。化学磷酸化改性具有成本低、操作简单、应用广的优势, 但也存在反应条件剧烈, 产物中存在化学试剂残留, 反应过程存在安全隐患, 产物的相关毒理学信息较少等不足。

1.2 酶解法磷酸化改性

食品蛋白的酶解法磷酸化改性反应条件较为温和, 反应产物安全性较高。Ross等^[9]以大豆分离蛋白为原料, 采用蛋白激酶磷酸化改性, 改性后的产物起泡性和乳化特性得到明显改善。金华丽等^[10]研究发现, 采用三聚磷酸钠磷酸化改性后的花生蛋白的水解度和蛋白提取率都有所提高。金丽丽等^[11]采用多聚磷酸钠对大豆分离蛋白酶解液进行修饰, 发现经木瓜蛋白酶水解及磷酸化修饰, 大豆分离蛋白在pH 4.5条件下的氮溶解指数由2.98%提高到64.14%。但是酶的专一性强、价格高等因素限制了其在食品蛋白质磷酸化改性方面的应用。

1.3 物理法磷酸化改性

1.3.1 美拉德反应磷酸化改性

美拉德反应磷酸化的原理是蛋白质与G6P反应生成蛋白质-G6P结合物。Kato等^[12]以卵清蛋白为原料进行磷酸化改性, 结果表明, 采用G6P磷酸化改性, 卵清蛋白的溶解性、热稳定性、乳化性等的功能特性均有显著改善。该法的不足是反应产物会因发生褐变反应而影响食品的感官特性, 且6-磷酸葡萄糖较高的价格也影响了其规模化应用。

1.3.2 加热干燥法磷酸化改性

加热干燥法磷酸化指食品蛋白在磷酸盐存在条件下加热, 促使含有羟基的糖、氨基酸、蛋白及糖蛋白能够发生磷酸化反应。Li等^[13]将乳清大豆蛋白与焦磷酸盐进行磷酸化反应, 发现乳清大豆蛋白具有较强的热稳定性、乳化性、起泡性、吸水性和吸油性等。蛋清蛋白经过加热磷酸化法改性后, 磷酸化程度提高了1.05%, 电泳强度、表面疏水性、起泡性、热稳定性和消化性明显提高。同时, 其凝胶强度增强, 持水能力显著增加, 表明加热干燥法磷酸化能够改善食品蛋白的功能特性^[14-15]。

基金项目 上海市科技兴农项目(沪农科政字[2015]第5-5号); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2016HY-ZD0903, 2016HY-ZD1003); 国家“863”计划项目(2012AA092304)。

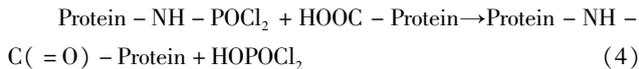
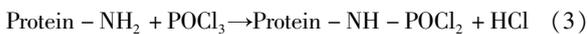
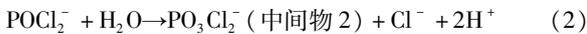
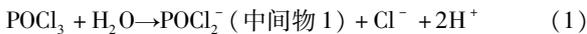
作者简介 马庆保(1991—), 男, 山东泰安人, 硕士, 从事食品生物技术研究。*通讯作者, 副研究员, 博士, 从事海洋生物资源利用研究。

收稿日期 2016-11-09

2 食品蛋白磷酸化改性的原理

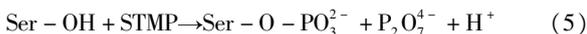
食品蛋白磷酸化改性的基本原理是通过磷酸基团与蛋白质基团特定氧原子(Ser、Thr、Tyr的-OH)或氮原子(Lys的氨基、His咪唑环1,3位的N、Arg的肌基末端的N)的结合形成-C-O-Pi或-C-N-Pi的酯化反应。前者在食品的pH(3~7)范围内是稳定的,所以,蛋白的磷酸化改性理论上适用于食品蛋白的改性^[16];后者对酸不稳定,在pH<7的环境下发生水解。传统的磷酸化改性多采用化学磷酸化法,其基本机理是磷酸化试剂提供的无机磷与蛋白质中的特定氨基酸分子的羟基氧原子或者氮原子发生反应,但是不同的化学磷酸化试剂与蛋白质反应的部位、反应途径、反应产物等均不同。下面列举化学磷酸化某些常用的试剂简要说明相关反应机理。

2.1 三氯氧磷 三氯氧磷与水接触通常发生放热反应,通过这种放热反应容易导致食品蛋白变性。三氯氧磷通常先溶于四氯化碳或者己烷,再对食品蛋白进行改性,改性时采用氢氧化钠或者盐酸保持pH为5和9,反应所需温度较低,通过冰浴进行控制。因为氯离子是活性游离基团,三氯氧磷和2个中间产物[(1)和(2)]活性都很强,磷酸化可以改善蛋白的功能特性,反应原理如(3)和(4)^[17]所示。



申世强^[18]研究发现,采用三氯氧磷改性的大豆分离蛋白结构趋于稳定,变性温度和变性焓均高于未改性的大豆分离蛋白,表明改性后的大豆分离蛋白结构发生了改变。Hirofumi等^[19]对β乳球蛋白进行加热干燥磷酸化研究,也发现蛋白质的热稳定性增强。Huang等^[20]采用三氯氧磷对酵母蛋白进行磷酸化改性,发现磷酸化后蛋白质的乳化稳定性很高,泡沫稳定性增强,且胃蛋白酶和胰液素对磷酸化以后的酵母蛋白抑制作用明显降低,易被消化吸收。田少君等^[21]采用三氯氧磷对大豆分离蛋白进行磷酸化改性,发现改性后大豆分离蛋白的溶解性、凝胶性得到较大的提高。当等电点为pI 3.0左右时,磷酸化分离蛋白溶液的黏度较之前提高。大豆分离蛋白用三聚磷酸钠改性,乳化性显著提高。

2.2 环状磷酸三钠 环状磷酸三钠(STMP)是食品药品监督管理局(FDA)许可的食品添加剂,被视为磷酸化改性的安全试剂,主要是羟氨磷酸酯化和赖氨酸氨基磷酸化,具体反应机理^[22]见式(5)和(6)。



2.3 三聚磷酸钠 三聚磷酸钠(STP)已作为食品添加剂应用于食品工业(水分保持剂、品质改良剂、pH调节剂、金属螯合剂),能够有效改善食品功能和营养特性且不影响食品蛋白的消化率。毒理学试验已经证实,改性产物是安全的。STP与食品蛋白的反应受pH影响较大,酸性条件下,羟基活

性较弱;碱性条件下,STP主要与食品蛋白胺基反应。研究表明,磷酸根主要连接在氮原子上,实质是赖氨酸残基的氨基磷酸酯化反应^[23]。Kim等^[24]采用三聚磷酸钠对大豆蛋白进行磷酸化改性研究,发现改性后的大豆蛋白溶解性、起泡性和持水性都显著提高,pH为8时蛋白质的溶解度却降低,可能是磷酸化改性蛋白的等电点转变到酸性区域,结构改变发生聚合,溶解度降低。

3 食品蛋白磷酸化的影响因素

3.1 蛋白质原料 目前,用于磷酸化改性的食品蛋白主要有大豆蛋白、鸡蛋清蛋白、乳蛋白、酪蛋白等。申世强^[18]对大豆分离蛋白进行磷酸化改性时,发现磷酸化程度随底物大豆分离蛋白浓度的增加而增加。Xiong等^[25]研究了卵清蛋白的磷酸化,发现食品蛋白引入的磷酸基团增加了分子间的排斥作用,使粒子半径减小,提高了卵清蛋白的乳化性能。李珊珊等^[26]研究得出,乳蛋白的磷酸化修饰对酪蛋白胶束与磷酸钙的结合至关重要,与牛奶的稳定性有关。康鹏^[27]将酪蛋白通过磷酸化改性修饰引入磷酸根基团改变酪蛋白分子的电负性,使其更易分散。不同种类的食品蛋白原料经磷酸化改性时,功能特性改变不同,可以选择性利用蛋白质原料的特定功能进行磷酸化改性。

3.2 磷酸化基团 食品蛋白磷酸化也同样受到磷酸化基团的影响,不同的磷酸化基团对蛋白质的作用位点不同,从而影响蛋白的功能特性。核磁共振谱表明,三氯氧磷蛋白磷酸化反应的实质主要是赖氨酸及精氨酸残基进行氨基磷酸酯化反应。潘秋琴等^[28]采用红外光谱研究发现,赖氨酸、苏氨酸和丝氨酸残基是发生食品蛋白磷酸化的主要位置。Yamada等^[29]采用STMP作为磷酸化试剂对大豆分离蛋白和大豆组织蛋白进行磷酸化改性。研究发现,STMP只在碱性环境中起作用,对蛋白质的亲和能力强。Sung等^[30]采用环状磷酸三钠磷酸化大豆蛋白,在pH 11.5、35℃、1%环状磷酸三钠条件下,大豆蛋白中30%的丝氨酸残基被磷酸化,其水溶性、持水能力、乳化能力和发泡能力等功能性质改善且生物效应不降低。李阳阳^[31]采用多聚磷酸钠对大豆分离蛋白进行磷酸化改性,发现在pH 2.0~5.5范围内磷酸化大豆分离蛋白的溶解性提高;磷酸化蛋白的乳化活性明显增加,但乳状液的稳定性降低;磷酸化大豆分离蛋白的起泡率和泡沫稳定性均增大;大豆分离蛋白溶液的黏度随蛋白浓度的增加呈近似指数增大,磷酸化大豆分离蛋白溶液的黏度降低。吴磊燕^[32]研究发现,玉米醇溶蛋白引入磷酸根基团,提高了玉米醇溶蛋白的界面活性,且磷酸化程度越高,界面蛋白膜的延伸率也显著提高,膜柔韧性效果越好,磷酸化改性有效改善膜的柔韧性,适合工业化应用。不同磷酸化试剂对改性蛋白功能特性影响差距较大,可能与其各自的化学结构及磷酸化的氨基酸种类不同有关。

3.3 盐离子 Arfat等^[33]研究了不同浓度硫酸锌溶液对鲐鱼鱼糜(0.25%和0.50%的STPP磷酸化)凝胶特性的影响,发现磷酸化后的鱼糜更容易与锌离子结合,且可增加鱼糜或蛋白质的凝胶色度和强度。申世强^[18]研究氯化钠浓度对磷

酸化改性蛋白溶解度的影响,结果表明,磷酸化蛋白的溶解度降低,磷酸化使蛋白分子上的电荷分布发生了变化,阳离子中和蛋白表面的负电荷,破坏蛋白分子的水合膜,从而使蛋白质溶解度降低。研究发现,体系添加阳离子中和磷酸化后引入的磷酸根阴离子,产生电荷屏蔽效应,影响物质的功能特性。

3.4 体系的 pH 蛋白质基团所带的电荷通过相吸或相斥影响了食品蛋白的功能特性,蛋白基团所带电荷的种类和多少又受体系 pH 的影响。Miedzianka 等^[34]研究体系 pH 对马铃薯分离蛋白磷酸化的影响,发现在体系 pH 5.2 时,改性马铃薯分离蛋白氨基酸含量很高,碱性条件下却降低;体系 pH 8.0 时,磷酸化马铃薯分离蛋白具有较高的吸油性、乳化性和起泡性;然而,其在 pH 10.5 时才具有较高的吸水性。Sang 等^[35]采用三聚磷酸钠磷酸化小麦淀粉,发现碱性条件下小麦淀粉中单磷酸盐和二磷酸盐减少,磷酸化二淀粉磷酸酯却显著增加。食品蛋白磷酸化改性残留的化学物质和反应产生的毒害物质,对机体存在潜在的威胁^[36]。因此,改性蛋白若需要作为食品添加剂或食物辅料,需要进行相关的毒理学试验。

4 结论

食品蛋白的磷酸化改性改善了蛋白的功能特性,扩大了蛋白在食品工业领域的应用。目前,食品蛋白的磷酸化改性研究仅局限于大豆蛋白、花生蛋白等,应进一步扩展到其他蛋白。在食品蛋白磷酸化改性机理和方法方面还有待进行深入的研究,磷酸化改性蛋白的营养特性、毒理学研究也是未来研究的重点。

参考文献

[1] 于莉萍. 改性对大豆分离蛋白组分凝胶稳定性影响的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2012.

[2] 姚玉静,杨晓泉,张新会. 大豆分离蛋白的磷酸化改性研究[J]. 食品与发酵工业,2010,27(10):5-8.

[3] 熊柳,孙高飞,王建华,等. 花生分离蛋白磷酸化改性研究[J]. 食品科学,2010,31(10):35-41.

[4] 李阳阳,张坤生,任云霞. 磷酸化大豆分离蛋白质功能特性的研究[J]. 食品研究与开发,2005,26(4):3-5.

[5] BRAND J, SILBERBAUER A, KULOZIK U. Comparison of different mechanical methods for the modification of the egg white protein ovomucin, part A: Physical effects[J]. Food and bioprocess technology, 2016, 9(3): 501-510.

[6] 郑优,贾亮,段蓉,等. 响应面法优化可食性鸡蛋清蛋白膜的酶法改性工艺[J]. 食品工业科技,2016,37(6):242-249.

[7] 刘雨莉,向敏,康怀彬,等. 鸡蛋清蛋白磷酸化改性及功能性质的研究[J]. 食品工业科技,2013,34(6):154-158.

[8] NAYAK S K, ARORA S, SINDHU J S, et al. Effect of chemical phosphorylation on solubility of buffalo milk proteins[J]. International dairy journal, 2006, 16(3): 268-273.

[9] ROSS L F, BHATNAGAR D. Enzymatic phosphorylation of soybean proteins[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1989, 37(4): 841-844.

[10] 金华丽,郑静静. 磷酸化预处理对花生蛋白酶解特性的影响[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2015, 36(1): 8-11.

[11] 金丽丽,朱秀清,赵兴明,等. 磷酸化修饰对大豆分离蛋白酶溶液溶解性的影响[J]. 食品工业,2014,35(8):98-103.

[12] KATO Y, AOKI T, KATO N, et al. Modification of ovalbumin with glucose 6-phosphate by Amino-carbonyl reaction. Improvement of protein heat sta-

bility and emulsifying activity[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 1995, 43(2):301-305.

[13] LI C P, CHEN D Y, PENG J L, et al. Improvement of functional properties of whey soy protein phosphorylated by dry-heating in the presence of pyrophosphate[J]. LWT-food science and technology, 2010, 43(6):919-925.

[14] LI C P, IBRAHIM H R, SUGIMOTO Y, et al. Improvement of functional properties of egg white protein through phosphorylation by dry-heating in the presence of pyrophosphate[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2004, 52(18):5752-5758.

[15] 赵卉双,陈丽娇,梁鹏,等. 不同改性方法对蛋白质功能性质的影响研究[J]. 食品工业,2015,36(12):223-225.

[16] 李林. 蛋白质磷酸化作用的结构基础[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(4):290-295.

[17] MATHEIS G. Phosphorylation of food proteins with phosphorus oxychloride-improvement of functional and nutritional properties: A review[J]. Food chemistry, 1991, 39(1):13-26.

[18] 申世强. 磷酸化和琥珀酰化大豆分离蛋白的制备与功能性质研究[D]. 广州:暨南大学,2010.

[19] ENOMOTO H, LI C P, MORIZANE K, et al. Glycation and phosphorylation of beta-lactoglobulin by dry-heating: Effect on protein structure and some properties[J]. Journal of agriculture and food chemistry, 2007, 55(6):2392-2398.

[20] HUANG Y T, KINSELLA J E. Effects of phosphorylation on emulsifying and foaming properties and digestibility of yeast protein[J]. Journal of food science, 1987, 52(6):1684-1688.

[21] 田少君,李小阳,曾艳菊,等. 大豆分离蛋白的磷酸化改性[J]. 中国粮油学报,2003,18(2):46-49.

[22] WANG Y C, WANG S S, WANG J F, et al. Preparation and anti-osteoporotic activities in vivo of phosphorylated peptides from Antarctic krill (*Euphausia superba*) [J]. Peptides, 2015, 68:239-245.

[23] 蔺丹华. 磷酸化处理对酪蛋白酶解特性的影响[D]. 郑州:河南工业大学,2014:10-22.

[24] KIM N S, KWON D Y, NAM Y J. Effects of phosphorylation and acetylation on functional properties and structure of soy protein[J]. Journal of food science and technology, 1988, 20(5):625-630.

[25] XIONG Z Y, ZHANG M J, MA M H. Emulsifying properties of ovalbumin: Improvement and mechanism by phosphorylation in the presence of sodium tripolyphosphate[J]. Food hydrocolloids, 2016, 60:29-37.

[26] 李珊珊,王加启,魏宏阳,等. 乳蛋白磷酸化分析方法研究进展[J]. 东北农业大学学报,2010,41(1):149-152.

[27] 康鹏. 酪蛋白的磷酸化及功能性质研究[D]. 天津:天津商业大学,2008:5-48.

[28] 潘秋琴,沈莜英,程霜. 花生蛋白质的磷酸化改性[J]. 中国油脂,1997, 22(1):25-27.

[29] YAMADA E A, SGARBIERI V C. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) protein concentrate: Preparation, chemical composition and nutritional, and functional properties[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2005, 53(10):3931-3936.

[30] SUNG H Y, CHEN H J, LIU T Y, et al. Improvement of the functionalities of soy protein isolate through chemical phosphorylation[J]. Journal of food science, 2006, 48(3):716-721.

[31] 李阳阳. 大豆分离蛋白磷酸化及功能性质研究[D]. 天津:天津商学院,2006:3-47.

[32] 吴磊燕. 玉米醇溶蛋白改性、界面特性及成膜性研究[D]. 上海:华东理工大学,2010:29-125.

[33] ARFAT Y A, BENJAKUL S. Effect of zinc sulphate on gelling properties of phosphorylated protein isolate from yellow stripe trevally[J]. Food chemistry, 2013, 141(3):2848-2857.

[34] MIEDZIANKA J, P E KSA A. Effect of pH on phosphorylation of potato protein isolate[J]. Food chemistry, 2013, 138(4):2321-2326.

[35] SANG Y J, PAULA S, ALVAROL H, et al. Effects of alkaline treatment on the structure of phosphorylated wheat starch and its digestibility[J]. Food chemistry, 2010, 118(2):323-327.

[36] 胡磊. 大豆浓缩蛋白的改性及其在肉制品的应用研究[D]. 上海:华南理工大学,2013:45-65.