

复合酶水解卵白蛋白及其特性与结构分析

Complex enzyme hydrolysis of ovalbumin and its characteristics and structure analysis

刘丽莉 陈珂 李玉 代晓凝 孟圆圆

LIU Li-li CHEN Ke LI Yu DAI Xiao-ning MENG Yuan-yuan

(河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471003)

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China)

摘要:为提高鸡蛋清蛋白的功能特性,以鸡蛋卵白蛋白(Ovalbumin, OVA)为研究对象,采用复合酶(木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶)对其进行酶解改性处理,并分析卵白蛋白功能特性和结构的变化。以水解度为指标,确定了木瓜蛋白酶:中性蛋白酶:风味蛋白酶的最佳质量比为 1:1:2。在单因素试验的基础上,通过响应面优化试验确定了复合酶的最佳酶解工艺条件:pH 7.5、酶解时间 7 h、OVA 浓度 5%、加酶量 7 500 U/g、温度 56 °C,该条件下水解度为(31.03±0.14)%。针对复合酶水解 OVA 功能性质的分析表明,其持水性提高了 1.65 g/g,持油性降低了 1.05 g/g,表面疏水性降低了 4.05%,浊度显著性下降。通过化学作用力、荧光光谱和扫描电镜(SEM)分析酶解对 OVA 结构的影响。结果表明,酶解导致蛋白质的一级结构发生了显著的变化,同时三级结构也发生了改变;此外,微观结构由球状变成片状。

关键词:鸡蛋卵白蛋白;酶解物;功能特性;结构表征;复合酶

Abstract: In order to improve the functional characteristics of egg albumin, taking the egg Ovalbumin (OVA) as the research object, the complex enzymes (papain, neutral protease and flavor protease) were used to modify OVA, and its functional and structural properties were analyzed. Taking the degree of hydrolysis (DH) as index, the optimum mass ratio of the complex enzyme (Papain: neutral protease: flavor protease) was determined to be 1:1:2. Based on the single factor, the enzymolysis conditions were determined by response surface methodology (RSM) and the optimum conditions were pH of 7.5, enzyme hydrolysis time of 7 h, OVA con-

centration of 5%, enzyme amount of 7 500 U/g, temperature of 56 °C. Under these conditions, the degree of hydrolysis was (31.03±0.14)%. The effects of complex enzymolysis on the functional properties of OVA were analyzed. The results showed that its water holding capacity was increased by 1.65 g/g, the oil retention was reduced by 1.05 g/g, the surface hydrophobicity was reduced by 4.05%, and the turbidity was decreased significantly. The effects of enzymatic hydrolysis on the structural changes of OVA were analyzed by chemical reaction, fluorescence spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). The results showed that the primary structure of OVA was changed significantly, and its tertiary structure was also changed. In addition, the microstructure was transformed from spherical to lamellar structure.

Keywords: egg ovalbumin; hydrolysate; functional properties; structure characterization; complex enzymes

中国是世界上第一鸡蛋生产大国,蛋品深加工比例却不到 1%^[1],这种现状严重限制了中国蛋品行业的发展。鸡蛋清粉是蛋品深加工中产量最大的制品之一,但它的功能特性及局限性影响了其在食品加工中的应用。卵白蛋白又称卵清蛋白(Ovalbumin, OVA),是鸡蛋清中的主要成分,其分子量为 44.5 kDa^[2]。等电点为 4.5,由 4 个自由巯基和 1 个包埋在 OVA 中心的二硫键组成^[3]。OVA 中疏水氨基酸含量为 50%^[4]。OVA 作为模式蛋白能较好地体现鸡蛋清的功能特性。

目前,提高蛋白质的功能特性主要是通过通过对蛋白质改性实现的^[5]。国内外关于鸡蛋清蛋白改性的报道有很多,如许美玉等^[6]通过碱性蛋白酶酶解改善 OVA 的乳化性,并优化了酶解工艺条件,使其酶解 OVA 的乳化活性较未改性 OVA 提高了 89.61%。Lechevalier 等^[7]研究了干热处理对蛋清粉功能、营养和过敏性的影响。Xiong 等^[8]研究了高强度超声波(HIUS)对 OVA 结构和性质的影响。本课题组^[9]前期利用碱性蛋白酶对 OVA 进行酶解处理,发现酶解后 OVA 溶

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:U1704114,31401622);河南省重大专项(编号:161100110900,161100110600-2,161100110700-2,161100110800-06);公益性行业(农业)科研专项(编号:201303084)

作者简介:刘丽莉(1974—),女,河南科技大学教授,博士。

E-mail: yangliuyilang@126.com

收稿日期:2018-04-06

解度和乳化性明显提高。酶法改性可以将大分子的蛋白质降解成小分子肽甚至更小的氨基酸,同时产生具有生物活性的物质,从而提高了人体对其的消化吸收^[10]。

市场上的鸡蛋清粉由于溶解度差、腥味重等缺点限制了其在食品加工中的应用,所以需要应用适当的方法对蛋清粉进行改性以开发出功能特性较好的蛋清粉。而针对OVA改性的探讨对提高整体蛋清粉的功能特性起到关键作用。生物酶解改性方法是当前蛋白质较为理想的改性方法,它具有安全、高效、作用条件温和的优点。但目前针对酶解OVA改性的相关文献研究^[6,9]多集中在单一酶源的筛选和应用,OVA的水解度偏低,而且缺乏针对酶解改性后OVA特性与结构的深入分析。本试验拟在前期单一酶酶解OVA试验^[9]基础上,采用复合酶对OVA进行酶解改性,以提高OVA的功能特性从而开发出高附加值的功能性蛋清粉,为鸡蛋深加工制品提供一种新途径。

1 材料与设备

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

木瓜蛋白酶(1.0×10^4 U/g)、中性蛋白酶(5.0×10^4 U/g)和风味蛋白酶(1.6×10^4 U/g):上海蓝季生物有限公司;

酒石酸钾钠:分析纯,济南金日和化学试剂有限公司;

溴酚蓝、溴化钾:分析纯,上海一研生物有限公司;

尿素、三羟甲基氨基甲烷:分析纯,上海山浦化工有限公司。

1.1.2 仪器与设备

高速分散均质机:HD-1604型,北京杰瑞恒达科技有限公司;

磁力加热搅拌器:78-1型,深圳美达仪器有限公司;

高速分散均质机:HD-1604型,北京杰瑞恒达科技有限公司;

超速冷冻离心机:H1650型,北京兴达恒信科技有限公司;

全自动凯氏定氮仪:K9860型,济南海能仪器股份有限公司;

磁力加热搅拌器:78-1型,深圳美达仪器有限公司;

荧光分光光度计:Cary eclipse型,美国Agilent公司;

扫描电镜:EM-30Plus型,韩国COXEM公司。

1.2 方法

1.2.1 OVA的酶解工艺 称取一定质量的OVA粉溶解于蒸馏水中,配制成OVA溶液,调节温度和pH,加入一定量的复合酶,再滴加NaOH来维持pH值恒定,反应一段时间后,置于90℃水浴中灭酶10 min,冷却后于10 000 r/min离心10 min,取上清液测水解度,将上清液冷冻干燥,即得OVA肽。

1.2.2 复合酶配比选择 配制3%蛋白浓度的OVA溶液,pH为8,总酶量5 000 U/g(木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶的质量比分别为2:1:1,1:1:2,1:2:1),在50℃的水浴锅中加热4 h,测定其水解度。并以3种单一酶

作为对照。

1.2.3 OVA酶解工艺优化

(1) pH的选择:固定酶解时间6 h,底物OVA浓度5%,加酶量8 000 U/g,温度60℃,分别考察不同pH(5,6,7,8,9)对酶解反应水解度的影响。

(2) 酶解时间的选择:固定pH 7,底物OVA浓度5%,加酶量8 000 U/g,温度60℃,分别考察不同酶解时间(2,4,6,8,10 h)对酶解反应水解度的影响。

(3) 底物OVA浓度的选择:固定pH 7,酶解时间6 h,加酶量8 000 U/g,温度60℃,分别考察不同底物OVA浓度(2%,3%,4%,5%,6%,7%)对酶解反应水解度的影响。

(4) 加酶量的选择:固定pH 7,酶解时间6 h,底物OVA浓度5%,温度60℃,分别考察不同加酶量(4 000,5 000,6 000,7 000,8 000,9 000 U/g)对酶解反应水解度的影响。

(5) 温度的选择:固定pH 7,酶解时间6 h,底物OVA浓度5%,加酶量8 000 U/g,分别考察不同温度(40,45,50,55,60,65℃)对酶解反应水解度的影响。

1.2.4 OVA酶解的响应面优化试验 在单因素试验基础上,利用Design-Expert 8.0.5软件,以水解度为响应值,设计五元二次通用旋转组合试验。

1.2.5 水解度测定 采用甲醛滴定法测定氨基态氮含量,凯氏定氮法测定总氮含量^[11]。水解度(DH)按式(1)计算:

$$DH = \frac{N_1}{N_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

DH——水解度,%;

N_1 ——上清液中氨基态氮含量,mol/L;

N_0 ——样品中总氮含量,mol/L。

1.2.6 OVA功能特性的测定

(1) 持水性和持油性的测定:称取0.1 g待测样品于离心管中称量总重,加入3 mL水(或大豆油),静置30 min后,于10 000 r/min离心10 min,称量沉淀与离心管总重^[12]。按式(2)计算蛋白质持水性和持油性。

$$WAC(OAC) = \frac{W_2 - W_1}{W_0}, \quad (2)$$

式中:

WAC——蛋白质持水性,g/g;

OAC——蛋白质持油性,g/g;

W_0 ——待测样品的重量,g;

W_1 ——待测样品和离心管的总重量,g;

W_2 ——沉淀与离心管总重量,g。

(2) 表面疏水性的测定:参照Chelh等^[13]的方法,将OVA、OVA肽分别溶于pH 7.4 Tris-HCl缓冲液中,加入1 mg/mL溴酚蓝溶液200 μ L,于10 000 r/min离心10 min,取上清液稀释10倍后在595 nm处测定吸光值,以Tris-HCl缓冲液为空白,以1 mL pH 7.4的Tris-HCl缓冲液加1 mg/mL溴酚蓝为对照。蛋白质表面疏水性按式(3)计算:

$$SH = \frac{200 \times (A_0 - A_1)}{A_0}, \quad (3)$$

式中:

SH ——蛋白质表面疏水性, %;

A_0 ——1 mL pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液加 1 mg/mL 溴酚蓝为对照的吸光值;

A_1 ——上清液稀释 10 倍后在 595 nm 处测定吸光值。

(3) 浊度的测定:取一定量的 OVA、OVA 肽分别加入 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液,配制成 2.5 mg/mL 溶液,于 6 000 r/min 均质 1 min,使其充分溶解,以不加样品的 Tris-HCl 缓冲液作为空白组,在 340 nm 处测定样品吸光度值 ($A_{340\text{ nm}}$),吸光值表示其浊度^[14]。

1.2.7 OVA 结构表征

(1) 化学作用力的测定:根据文献[15]的方法,修改如下,准确称取 1 g OVA 和 OVA 肽,分别加入 10 mL 的 0.05 mol/L NaCl(SA)、0.6 mol/L NaCl(SB)、0.6 mol/L NaCl+1.5 mol/L 尿素(SC)、0.6 mol/L NaCl+8.0 mol/L 尿素(SD)、0.6 mol/L NaCl+8.0 mol/L 尿素+1.5 mol/L β -巯基乙醇(SE),于 10 000 r/min 均质 1 min 后,4 °C 静置 2 h,然后于 10 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液。采用标准曲线法计算上清液中不同蛋白质含量。分别按式(4)~(7)计算离子量含量、氢键含量、疏水相互作用含量和二硫键含量。

$$IC = C_2 - C_1, \quad (4)$$

$$HB = C_3 - C_2, \quad (5)$$

$$HI = C_4 - C_3, \quad (6)$$

$$DB = C_5 - C_4, \quad (7)$$

式中:

IC ——离子量含量, %;

HB ——氢键含量, %;

HI ——疏水相互作用含量, %;

DB ——二硫键含量, %;

C_1 ——溶解于 SA 的蛋白质含量, %;

C_2 ——溶解于 SB 的蛋白质含量, %;

C_3 ——溶解于 SC 的蛋白质含量, %;

C_4 ——溶解于 SD 的蛋白质含量, %;

C_5 ——溶解于 SE 的蛋白质含量, %。

(2) 荧光光谱分析:将待测样品溶于 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液中,配制成浓度为 1 mg/mL 的蛋白溶液,激发和发射单色器的带宽均为 5 nm,在激发波长为 295 nm,扫描范围 300~450 nm 的条件下,测定待测样品的荧光发射光谱。

(3) 扫描电镜(SEM)分析:分别将 OVA、OVA 肽进行喷金处理,再将样品置于扫描电子显微镜下观察样品的微观结构。

1.2.8 数据分析 每个样品重复 3 次试验,采用 Design-Expert 8.0.5 软件进行响应面试验设计及方差分析,Origin 8.5 软件作图。

2 结果与分析

2.1 复合酶配比的筛选

复合酶比对 OVA 水解度的影响见图 1。

由图 1 可知,采用复合酶酶解 OVA 的水解度显著优于

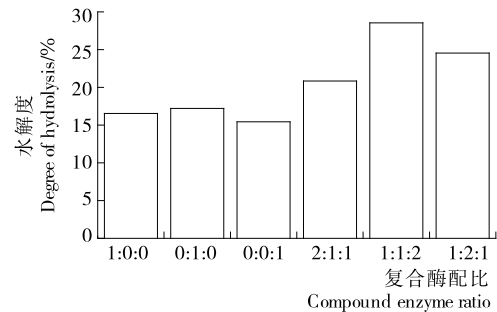


图 1 复合酶比对 OVA 水解度的影响

Figure 1 Effect of enzyme ratio on degree of hydrolysis and of OVA

单一酶($P < 0.05$);而且不同配比的复合酶酶解 OVA 水解度的顺序为 1:1:2 > 1:2:1 > 2:1:1,当 3 种酶的质量比为 1:1:2 时,水解度达到最大值,为 26.54%,故 3 种酶复合的比例选用 1:1:2。

2.2 单因素试验

不同酶解条件对水解度的影响见图 2。

由图 2(a)可知,当 $pH < 7$ 时,水解度随着 pH 升高而升高;当 $pH > 7$ 时,水解度随着 pH 的升高而下降;当 pH 为 7 时,水解度达到最大值。可能是 3 种酶的最适 pH 均在 7 左右^[16],当 $pH > 7$ 时,酶的活性受到影响,水解度降低,因此 OVA 的酶解 pH 为 7 时较为适宜。

由图 2(b)可知,水解度随着 OVA 酶解时间的延长,呈先升高后下降的趋势;当酶解时间为 6 h 时,水解度出现最大值。可能是在一定酶解时间内,随着酶解时间的延长,酶作用在 OVA 上,使其断裂成大小不一的多肽分子,OVA 中可被酶解的肽键逐渐增多,水解度变大;而后随着酶解时间的延长,酶的活性下降,进而造成水解度逐步下降^[17]。因此酶解时间选择 6 h。

由图 2(c)可知,当 OVA 浓度 $< 5\%$ 时,水解度逐渐增加;当 OVA 浓度 $> 5\%$ 时,水解度呈逐渐下降趋势。这可能是当 OVA 浓度逐渐增大时,复合酶和 OVA 结合的几率增大,OVA 酶解较彻底,水解度逐渐增大;而当 OVA 浓度继续增大时,导致酶与蛋白之间接触减小,酶解液黏度变大,溶解性降低,OVA 酶解进行较慢,从而导致水解度降低^[18]。因此,OVA 浓度选定为 5%。

由图 2(d)可知,水解度随着加酶量的增加,呈先增加后减少的趋势。原因是随着加酶量的增加,酶与 OVA 结合的几率增大,反应速率升高,水解度相应增大;但随着加酶量的增多,底物 OVA 相对不足,导致反应进程减弱,水解度逐渐减小。因此,加酶量选定为 8 000 U/g。

由图 2(e)可知,随着温度的升高,水解度先上升后下降;在 60 °C 时,水解度达到最大值。可能是温度过高导致蛋白酶变性,从而使酶解反应速率降低^[19]。所以,温度选定为 60 °C。

2.3 二次回归正交旋转试验

通过五因素三水平通用旋转试验对复合酶酶解制备 OVA 肽的工艺进行响应面优化,其试验设计方案及结果见表 1、2。

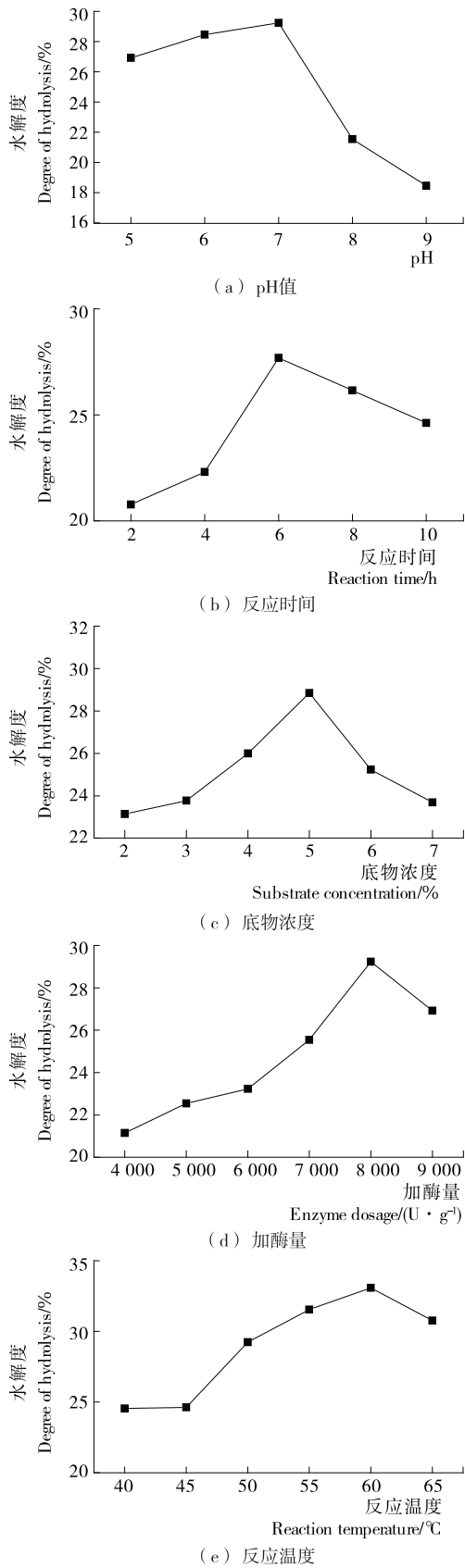


图2 酶解条件对水解度的影响

Figure 2 Influence of different enzymatic conditions on degree of hydrolysis

表1 五元二次通用旋转组合设计试验因素与水平

Table 1 Factors and levels used in second-order rotation combination experimental design

水平	X ₁ pH	X ₂ 酶解时间/h	X ₃ 底物 OVA 浓度/%	X ₄ 加酶量/(U·g ⁻¹)	X ₅ 温度/°C
-2	6.0	6.0	3.0	7 000	50.0
-1	6.5	6.5	4.0	7 500	52.5
0	7.0	7.0	5.0	8 000	55.0
1	7.5	7.5	6.0	8 500	57.5
2	8.0	8.0	7.0	9 000	60.0

表2 五元二次通用旋转组合试验设计方案及结果

Table 2 Quadratic orthogonal rotary composite experimental design in terms of coded values of five variables and corresponding experimental results

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	水解度/%
1	1	1	1	1	1	27.13
2	1	1	1	-1	-1	29.68
3	1	1	-1	1	-1	27.68
4	1	1	-1	-1	1	29.49
5	1	-1	1	1	-1	26.62
6	1	-1	1	-1	1	30.99
7	1	-1	-1	1	1	30.46
8	1	-1	-1	-1	-1	26.06
9	-1	1	1	1	-1	27.41
10	-1	1	1	-1	1	30.96
11	-1	1	-1	1	1	27.58
12	-1	1	-1	-1	-1	26.45
13	-1	-1	1	1	1	27.63
14	-1	-1	1	-1	-1	26.64
15	-1	-1	-1	1	-1	25.81
16	-1	-1	-1	-1	1	25.09
17	-2	0	0	0	0	26.55
18	2	0	0	0	0	28.37
19	0	-2	0	0	0	27.82
20	0	2	0	0	0	28.79
21	0	0	-2	0	0	25.59
22	0	0	2	0	0	27.12
23	0	0	0	-2	0	29.23
24	0	0	0	2	0	26.79
25	0	0	0	0	-2	28.12
26	0	0	0	0	2	30.59
27	0	0	0	0	0	30.28
28	0	0	0	0	0	30.59
29	0	0	0	0	0	30.29
30	0	0	0	0	0	31.08
31	0	0	0	0	0	30.12
32	0	0	0	0	0	31.14

对表 2 中水解度的试验数据进行多元回归拟合,得到水解度的回归方程为:

$$Y_1 = 30.47 + 0.59X_1 + 0.38X_2 + 0.48X_3 - 0.41X_4 + 0.75X_5 - 0.45X_1X_2 - 0.44X_1X_3 - 0.23X_1X_4 + 0.19X_1X_5 - 0.030X_2X_3 - 0.53X_2X_4 - 0.32X_2X_5 - 0.87X_3X_4 - 0.016X_3X_5 - 0.15X_4X_5 - 0.67X_1^2 - 0.46X_2^2 - 0.94X_3^2 - 0.53X_4^2 - 0.19X_5^2 \quad (8)$$

该水解度模型在 $\alpha=0.05$ 水平下剔除不显著项后的回归方程为:

$$Y_1 = 30.47 + 0.59X_1 + 0.38X_2 + 0.48X_3 - 0.41X_4 + 0.75X_5 - 0.45X_1X_2 - 0.44X_1X_3 - 0.53X_2X_4 - 0.87X_3X_4 - 0.67X_1^2 - 0.46X_2^2 - 0.94X_3^2 - 0.53X_4^2 \quad (9)$$

2.3.1 方差分析和显著性检验 由表 3 可知, Y_1 回归模型的 $R^2=96.43$, $P<0.0001$, 差异极显著, 失拟项 $P=0.1586>0.05$, 差异不显著, 说明 Y_1 模型的拟合度较高。因此该回归模型可以较好地反映自变量与响应值之间的变化关系。

2.3.2 双因素交互效应分析 由图 3 可知, 响应面呈抛物线形, 等高线呈椭圆形, 说明底物 OVA 浓度与加酶量的交互作用对水解度影响极显著, 这与表 3 中显著性分析结果一致。由等高线的变化趋势可看出, 当底物 OVA 浓度低于 5.0%~5.5% 中某固定值、加酶量低于 7 750~8 000 U/g 中某固定值时, 随着底物 OVA 浓度与加酶量增加, 水解度增加; 当底物 OVA 浓度高于 5.0%~5.5% 中某固定值、加酶量高于 7 750~8 000 U/g 中某固定值时, 随着底物 OVA 浓度与加酶量的增加, 水解度减小; 当底物 OVA 浓度为 5%、加酶量为 8 000 U/g 时, 水解度为 30.28%。

由图 4 可知, 酶解时间与加酶量的响应面呈抛物线形且

表 3 水解度的方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
X_1	8.38	1	8.38	23.69	0.000 5
X_2	3.39	1	3.39	9.59	0.010 2
X_3	5.51	1	5.51	15.58	0.002 3
X_4	4.10	1	4.10	11.59	0.005 9
X_5	13.38	1	13.38	37.83	<0.000 1
X_1X_2	3.40	1	3.40	9.63	0.010 1
X_1X_3	3.05	1	3.05	8.61	0.013 6
X_1X_4	0.82	1	0.82	2.32	0.156 3
X_1X_5	0.59	1	0.59	1.68	0.221 9
X_2X_3	0.014	1	0.014	0.041	0.843 8
X_2X_4	4.54	1	4.54	12.83	0.004 3
X_2X_5	1.63	1	1.63	4.60	0.055 2
X_3X_4	12.11	1	12.11	34.24	0.000 1
X_3X_5	0.004	1	0.004	0.012	0.914 9
X_4X_5	0.37	1	0.37	1.03	0.330 8
X_1^2	13.03	1	13.03	36.83	<0.000 1
X_2^2	6.08	1	6.08	17.18	0.001 6
X_3^2	26.06	1	26.06	73.70	<0.000 1
X_4^2	8.20	1	8.20	23.20	0.000 5
X_5^2	1.09	1	1.09	3.08	0.107 2
回归	105.17	20	5.26	14.87	<0.000 1
剩余	3.89	11	0.35		
失拟	2.94	6	0.49	2.58	0.158 6
误差	0.95	5	0.19		
总和	109.06	31			

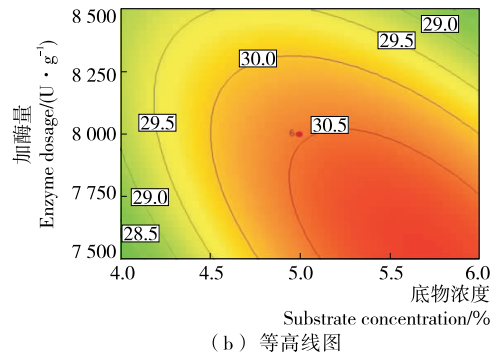
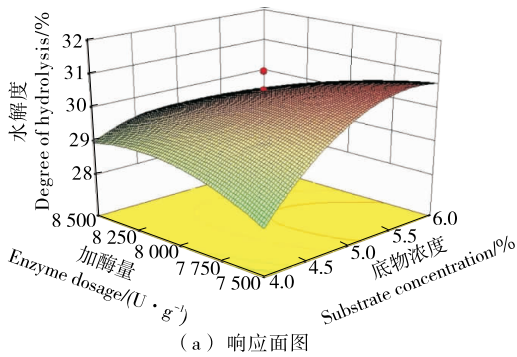


图 3 OVA 浓度与加酶量交互作用对水解度的影响

Figure 3 Response surface and corresponding contour plots showing the effect of interaction of OVA concentration and enzyme dosage on degree of hydrolysis

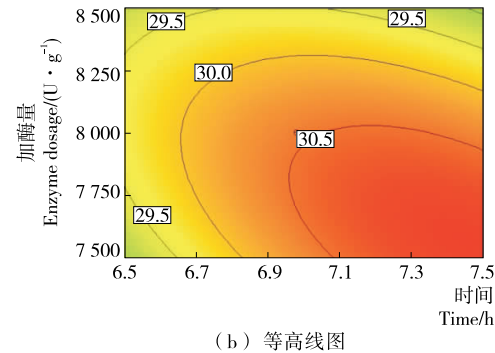
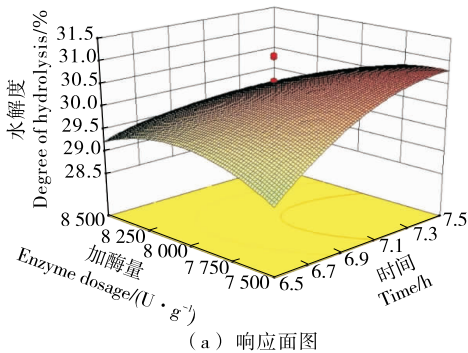


图 4 酶解时间与加酶量交互作用对水解度的影响

Figure 4 Response surface and corresponding contour plots showing the effect of interaction of hydrolysis time and enzyme dosage on degree of hydrolysis

比较陡峭,等高线呈明显的椭圆形,说明酶解时间与加酶量对水解度影响有极显著的交互作用。由等高线的变化趋势可看出,当酶解时间低于7.0~7.3 h中某固定值、加酶量低于7 750~8 000 U/g中某固定值时,随着底物 OVA 浓度与加酶量增加,水解度增加;当底物 OVA 浓度高于7.0~7.3 h中某固定值、加酶量高于7 750~7 938 U/g中某固定值时,随着底物 OVA 浓度与加酶量的增加,水解度减小。

2.4 利用回归方程确定最佳作用参数和模型验证

经五元二次正交旋转试验及响应面优化法,采用 Design Expert 8.0 软件和回归方程分析得到复合酶酶解 OVA 的最佳工艺为:pH 7.5、酶解时间 7.29 h、底物 OVA 浓度 5.28%、加酶量 7 529.72 U/g、温度 56.42 °C,此时水解度为 31.22%。为了提高复合酶酶解制备 OVA 肽试验的操作性和验证模型的准确性,将预测的最优工艺条件修改为:pH 7.5、酶解时间 7 h、底物 OVA 浓度 5%、加酶量 7 500 U/g、温度 56 °C。在此条件下做 3 次重复验证实验,实际测得水解度为(31.03±0.14)%。水解度的实际值与预测值相差 0.61%,说明水解度的模型方程与实际结果拟合度良好,证明响应面优化复合酶酶解 OVA 的工艺条件是可行的。

2.5 复合酶酶解对 OVA 功能特性的影响

由表 4 可知,OVA 肽的持水性较 OVA 提高了1.65 g/g。可能是酶解使蛋白分子断裂,形成小分子肽链,从而使其结合水的能力增强,持水性增强^[20]。与持水性相反,OVA 肽的持

油性较 OVA 降低了 1.05 g/g,主要是蛋白的持油性与表面疏水性有关,表面疏水基团减少,与油结合机会减少造成的。OVA 肽较 OVA 的表面疏水性大小明显减小了4.05%(P<0.05),造成的主要原因是复合酶酶解得到的 OVA 肽的溶解度升高,表面疏水性相应降低^[21]。OVA 肽的浊度大小呈下降趋势且差异显著^[22](P<0.05),这是因为 OVA 肽是由 OVA 经酶解得到了分子量较小的多肽或者氨基酸,OVA 肽能与水形成氢键,使其溶解度较 OVA 升高浊度下降^[23]。

2.6 复合酶水解 OVA 结构表征

2.6.1 化学作用力分析 酶解改性对 OVA 化学作用力即离子键、氢键、疏水相互作用、二硫键的影响见表 5。相对于 OVA,OVA 肽的离子键含量明显减少(P<0.05),这是因为酶解改性使得离子键发生了断裂,导致 OVA 肽的离子键含量较 OVA 分别下降 6.63%。氢键的稳定性弱于离子键,经酶解处理后的 OVA 即 OVA 肽的氢键发生断裂使其含量较 OVA 明显减少 17.29%(P<0.05)。OVA 肽的疏水相互作用含量较 OVA 分别减少 4.35%,可能是酶解使蛋白质分子量变小,亲水基团增多,溶解性升高,疏水相互作用减弱;另外,OVA 肽的羧基缩合破坏了蛋白质分子的疏水性相互作用,最终导致 OVA 肽的疏水相互作用含量较 OVA 明显减少(P<0.05)。相对于 OVA,酶解制备的 OVA 肽的二硫键含量均明显减少(P<0.05),可能是酶解改性破坏了半胱氨酸残基,使二硫键的形成受阻^[24]。

表 4 酶解改性对 OVA 功能性质的影响[†]

Table 4 Effect of the enzymatic modification on functional properties of OVA

样品	持水性/(g·g ⁻¹)	持油性/(g·g ⁻¹)	表面疏水性/%	浊度
OVA	2.29±0.02 ^a	3.23±0.03 ^c	79.88±0.42 ^c	0.43±0.01 ^c
OVA 肽	3.94±0.03 ^b	2.18±0.02 ^b	75.83±0.47 ^b	0.27±0.01 ^b

† 不同字母表示差异显著(P<0.05)。

表 5 酶解改性对 OVA 化学作用力的影响[†]

Table 5 Effect of the enzymatic modification on chemical reaction of OVA %

样品	离子键含量	氢键含量	疏水相互作用含量	二硫键含量
OVA	21.56±1.47 ^c	36.07±2.34 ^c	22.18±1.43 ^c	16.53±0.86 ^c
OVA 肽	14.93±0.85 ^b	18.78±1.35 ^a	17.83±1.17 ^b	10.18±0.52 ^b

† 不同字母表示差异显著(P<0.05)。

2.6.2 荧光光谱分析 对 OVA 和复合酶酶解制备的 OVA 肽进行荧光光谱分析,结果见图 5。

从图 5 可以看出,相对于 OVA,OVA 肽的荧光强度均有所降低;最大吸收峰位置也发生了改变,OVA 的最大吸收峰在 340 nm 处,OVA 肽的最大吸收峰红移至 345 nm 处。可能是荧光强度与表面疏水性呈正相关,酶解改变了 OVA 的空间构象,使其氢键更加稳定,表面疏水性降低,OVA 肽荧光强度减弱。

2.6.3 扫描电镜(SEM)分析 对 OVA 和复合酶酶解制备的 OVA 肽进行 SEM 测定分析,结果见图 6。

由图 6 中可知,OVA 为典型的球蛋白,表面光滑,成颗粒状。酶解之后,表面不规则的凹陷消失,颗粒变小。说明

酶解改性使其微观结构发生明显变化。

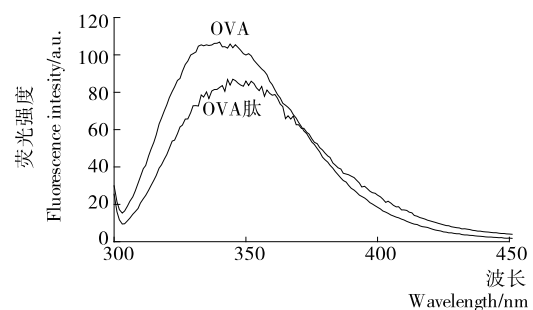


图 5 荧光光谱分析

Figure 5 Analysis of fluorescence spectroscopy

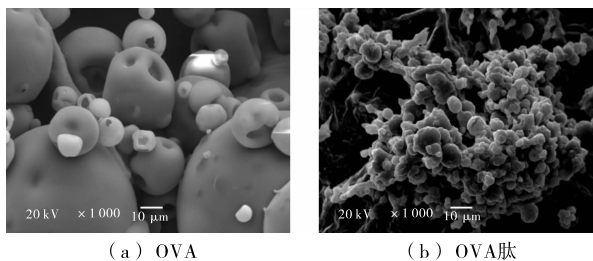


图 6 改性前后 OVA 的 SEM 图

Figure 6 Scanning electron micrographs of OVA before and after modification

3 结论

本试验研究了木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶复合酶水解 OVA 及其特性与结构,确定了 3 种酶的最佳质量比和最适酶解工艺条件。结果表明,与单一酶相比,复合酶显著性提高了 OVA 的水解度。通过对改性后的 OVA 特性分析表明,酶解作用显著提高了 OVA 的功能特性,如持水性提高、表面疏水性和浊度降低等。为了更加深入地了解 OVA 相关功能性质变化的机理,通过测定化学作用力分析经酶解改性后 OVA 的离子键、氢键、疏水相互作用、二硫键的变化;采用荧光光谱和扫描电镜观察改性后 OVA 结构的变化。结果表明蛋白质的三股螺旋结构发生了明显的变化,同时,OVA 的微观结构由球状完全变成片状,表明酶解改性对 OVA 结构产生显著性的影响。但针对改性后的 OVA 结构与功能特性之间的构效机制还有待进一步的深入探讨。

参考文献

- [1] 时永利. 我国蛋品加工业的现状[J]. 农业知识: 科学养殖, 2017 (10): 21-22.
- [2] HASSAN N, MESSINA P V, DODERO V I, et al. Rheological properties of ovalbumin hydrogels as affected by surfactants addition[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(3): 495-500.
- [3] SAVADKOOHI S, BANNIKOVA A, MANTRI N, et al. Structural properties of condensed ovalbumin systems following application of high pressure[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 53: 115-124.
- [4] LI Can-peng, HE Zhi-kun, WANG Xiao-yan, et al. Selenization of ovalbumin by dry-heating in the presence of selenite: effect on protein structure and antioxidant activity[J]. Food Chemistry, 2014, 148(3): 209-217.
- [5] SUN-WATERHOUSE Dong-xiao, ZHAO Mou-ming, WATERHOUSE G I N. Protein modification during ingredient preparation and food processing: approaches to improve food processability and nutrition[J]. Food & Bioprocess Technology, 2014, 7(7): 1 853-1 893.
- [6] 许美玉, 王希希, 黄群, 等. 酶法改善卵白蛋白乳白化性研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 150-155.
- [7] LECHEVALIER V, GUÉRIN-DUBIARD C, ANTON M, et al. Effect of dry heat treatment of egg white powder on its functional, nutritional and allergenic properties[J]. Journal of Food Engineering, 2017, 195: 40-51.
- [8] XIONG Wen-fei, WANG Yun-tao, ZHANG Chun-lan, et al. High intensity ultrasound modified ovalbumin: Structure, interface and gelation properties [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 31: 302-309.
- [9] 刘丽莉, 王焕, 李丹, 等. 鸡蛋清卵白蛋白酶解工艺优化及其结构性质[J]. 食品科学, 2016, 37(10): 54-61.
- [10] 于文影, 郜玉钢, 郝建勋, 等. 鹿角盘蛋白酶解工艺优化及其水解物抗氧化活性研究[J]. 时珍国医国药, 2011(11): 2 699-2 700.
- [11] 杨文博, 张英华. 蛋白质水解度的测定方法研究[J]. 中国调味品, 2014(3): 88-90.
- [12] WANG Tao, SUN Xiao-hua, RADDATZ J, et al. Effects of microfluidization on microstructure and physicochemical properties of corn bran[J]. Journal of Cereal Science, 2013, 58(2): 355-361.
- [13] CHELH I, GATELLIER P, SANTELHOUTELLIER V. Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination[J]. Meat Science, 2006, 74(4): 681-683.
- [14] ZHANG Xi, QI Jun-ru, LI Kang-kang, et al. Characterization of soy β -conglycinin-dextran conjugate prepared by Maillard reaction in crowded liquid system [J]. Food Research International, 2012, 49(2): 648-654.
- [15] 林伟静. 糖基化改性对花生蛋白膜性能的影响及其作用机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015: 31-32.
- [16] 刘海梅, 陈静, 安孝宇, 等. 牡蛎酶解工艺参数优化及其产物分析与评价[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 240-244.
- [17] 刘嘉坤, 焦艳, 于永军. 响应面法优化沧州小枣协同酶解多肽的研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(6): 86-90.
- [18] 于慧, 李明艳, 张典, 等. 响应面法优化裙带菜蛋白酶解工艺及酶解液抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 96-103.
- [19] 丛艳君, 于晓凤, 陈澍. 响应面法优化草鱼内脏蛋白酶解工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(10): 43-48.
- [20] NIU Li-ya, JIANG Shao-tong, PAN Li-jun, et al. Characteristics and functional properties of wheat germ protein glycosylated with saccharides through Maillard reaction[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2011, 46(10): 2 197-2 203.
- [21] ZHANG Hai-hua, LI Qin, CLAVER I P, et al. Effect of cysteine on structural, rheological properties and solubility of wheat gluten by enzymatic hydrolysis [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(10): 2 155-2 161.
- [22] ZHANG Xi, QI Jun-ru, LI Kang-kang, et al. Characterization of soy β -conglycinin-dextran conjugate prepared by Maillard reaction in crowded liquid system [J]. Food Research International, 2012, 49(2): 648-654.
- [23] ZHU Dan, DAMODARAN S, LUCEY J A. Physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates produced in aqueous solution[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(5): 2 988-2 994.
- [24] ALRIKSSON B, CAVKA A, JÖNSSON L J. Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1 254-1 263.