

热杀菌期间胰蛋白酶改性对蛋清液耐热性和结构特性的影响

祁腾达¹, 马艳秋¹, 迟玉杰^{1,*}, 迟媛^{2,*}

(1.东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2.东北农业大学工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:为提高蛋清液的巴氏杀菌温度, 开发具有较高耐热性的蛋清液, 探究胰蛋白酶改性对蛋清液耐热性和结构特性的影响。本研究设置未改性组和酶改性组, 以25 °C蛋清液为对照, 4种不同热杀菌温度为实验组(56、62、68 °C和72 °C处理3 min), 采用浊度和上清液蛋白含量2个指标衡量蛋清液耐热性的变化, 利用表观黏度、粒径、表面疏水性、傅里叶变换红外光谱、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)等对蛋清蛋白结构进行表征。胰蛋白酶改性能显著降低蛋清液浊度, 提高上清液的蛋白含量($P < 0.05$)。随着热杀菌温度提高, 蛋清液的浊度逐渐增加, 上清液蛋白含量逐渐减少, 粒子大小也逐渐增大。在相同热杀菌温度时, 与未改性蛋清液相比, 酶改性蛋清液的浊度和表观黏度显著降低, 同时表面疏水性显著升高($P < 0.05$), 粒径分布接近正态分布。酶改性可抑制蛋白热聚集, 改善耐热性。SEM结果显示酶改性使蛋清蛋白表面孔隙增多, 颗粒更加分散, 在同一热杀菌温度时, 表面保留的颗粒数量明显多于未改性蛋清。SDS-PAGE分析显示酶改性后蛋清中大分子蛋白发生降解。傅里叶变换红外光谱显示, 在低于68 °C条件时, 酶改性蛋清液 α -螺旋结构的相对含量显著高于未改性蛋清液($P < 0.05$), 无规卷曲结构相对含量明显低于未改性蛋清液。综合分析, 胰蛋白酶可有效改善热杀菌过程中蛋清蛋白热聚集, 提高蛋清液的耐热性, 对扩大其销售半径有重要意义。

关键词: 蛋清液; 酶改性; 耐热性; 热处理

Effect of Trypsin Modification on Heat Resistance and Structural Properties of Liquid Egg White during Heat Sterilization

QI Tengda¹, MA Yanqiu¹, CHI Yujie^{1,*}, CHI Yuan^{2,*}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Engineering, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to increase the pasteurization temperature and heat resistance of liquid egg white, the effect of trypsin modification on the heat resistance and structural properties of liquid egg white was investigated in this study. The sample in this study consisted of two groups: unmodified and enzyme-modified. Each group was kept at 25 °C (control) or sterilized at 56, 62, 68 or 72 °C for 3 min. The changes of heat resistance were measured by turbidity and supernatant protein content, and the structure of egg white protein was characterized by apparent viscosity, particle size, surface hydrophobicity, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and scanning electron microscopy (SEM). Trypsin modification significantly reduced egg white turbidity and increased the protein content of the supernatant ($P < 0.05$). As the sterilization temperature increased, the turbidity and particle size of egg white gradually increased, while the protein content of the supernatant gradually decreased. At the same sterilization temperature, the turbidity and apparent viscosity of the modified egg white were significantly lower, while the surface hydrophobicity was significantly higher ($P < 0.05$) and the particle size distribution was closer to the normal distribution compared with that of the unmodified egg white. Enzymatic modification could inhibit protein thermal aggregation and

收稿日期: 2023-03-21

基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项(2022YFD2101005); 国家蛋鸡产业技术体系项目(CARS-40-K25)

第一作者简介: 祁腾达(1997—)(ORCID: 0000-0002-5242-8581), 男, 硕士研究生, 研究方向为蛋产品深加工。

E-mail: tengdaq@126.com

*通信作者简介: 迟玉杰(1963—)(ORCID: 0000-0002-9669-7601), 女, 教授, 博士, 研究方向为蛋产品深加工。

E-mail: yjchi323@126.com

迟媛(1974—)(ORCID: 0000-0002-9600-4457), 女, 教授, 博士, 研究方向为机械工程。E-mail: cy207@126.com

improve heat resistance. SEM results showed that enzymatic modification increased the surface porosity of egg white protein and the dispersity of the particles; at the same sterilization temperature the number of particles retained on the surface was higher in modified than in unmodified egg white. SDS-PAGE analysis showed that enzymatic modification promoted the degradation of large molecular mass proteins in egg white. Fourier transform infrared spectroscopy showed that at temperatures below 68 °C, the relative content of α -helix of the modified egg white was significantly higher than that of the unmodified egg white ($P < 0.05$), while the relative content of random coil was significantly lower than that of the unmodified egg white. In conclusion, trypsin can effectively improve the thermal aggregation of egg white proteins during heat sterilization and improve the heat resistance of liquid egg white, which is important for expanding its sales radius.

Keywords: liquid egg white; enzymatic modification; heat resistance; heat treatment

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230321-209

中图分类号: TS253.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)24-0026-08

引文格式:

祁腾达, 马艳秋, 迟玉杰, 等. 热杀菌期间胰蛋白酶改性对蛋清液耐热性和结构特性的影响[J]. 食品科学, 2023, 44(24): 26-33. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230321-209. <http://www.spkx.net.cn>

QI Tengda, MA Yanqiu, CHI Yujie, et al. Effect of trypsin modification on heat resistance and structural properties of liquid egg white during heat sterilization[J]. Food Science, 2023, 44(24): 26-33. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230321-209. <http://www.spkx.net.cn>

除水分外, 蛋清液主要是由蛋白质、少量脂质、维生素及矿物质等组成的胶状物质^[1], 因其丰富的营养价值和优良的功能特性而广泛应用于焙烤食品^[2]。为了确保微生物安全性, 一般使用的巴氏杀菌条件为55~57 °C加热3~4 min^[3], 但是蛋清液易受到高温的影响而变性聚集^[4]。因此, 改善蛋清液的耐热性是扩大其在食品行业中应用的关键。为研究一种高耐热性蛋清液, 将其应用于在实际生产中, 本研究通过胰蛋白酶改性的手段提升蛋清的耐热性, 并研究耐热性与结构特性之间的关系。

胰蛋白酶是由胰腺分泌的消化酶之一, 通常是从牛、猪、羊的胰脏中提取纯化获得的结晶, 然后再制成冻干制剂^[5]。胰蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶家族, 主要作用是在小肠内将蛋白质和多肽分解为大小不等的肽段, 对蛋白质的水解起着重要作用^[6]。蛋白酶改性是利用蛋白酶在温和条件下水解蛋白质, 改变蛋白质结构, 从而使蛋白质获得更好的热稳定性和功能性。迟玉杰等^[7]利用中性蛋白酶水解蛋清粉, 发现可以提高蛋清的起泡性和泡沫稳定性。刘剑秋等^[8]通过使用复合风味蛋白酶水解浓度3%的全蛋液, 可使其热凝固温度提高至75 °C。涂勇刚等^[9]对木瓜蛋白酶改善蛋清蛋白的起泡性工艺进行优化, 起泡性提高140%。Tian Shuangqi等^[10]利用木瓜蛋白酶水解小麦胚芽白蛋白, 可有效改善起泡性。

近年来, 利用酶改性液态蛋的功能性质研究有很多, 但对于热杀菌期间胰蛋白酶改性对蛋清液耐热性和结构特性影响的分析相对较少。因此本研究采用胰蛋白酶对蛋清液进行酶改性, 通过浊度和上清液蛋白含量两个指标衡量蛋清液的耐热性, 探究在不同热杀菌温度(56、62、68 °C和72 °C, 3 min)条件下, 酶改性对蛋清

液耐热性和结构性质的影响, 旨在为酶改性技术在蛋清液中的高效应用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

新鲜鸡蛋 哈尔滨香坊区好又多超市。

胰蛋白酶(酶活力 8.9×10^4 U/g) 上海源叶生物科技有限公司; 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、8-苯胺-1-萘磺酸(8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid, ANS) 美国Sigma公司。所有试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

HH-4数显恒温水浴锅 常州国华电器有限公司; pH计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; JJ-1精密增力电动搅拌机 上海浦东物理化学仪器厂; TU-1810紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; F-7100荧光分光光度计、SU801场发射扫描电子显微镜 日本日立公司; Nicolet is50傅里叶变换红外光谱仪、HAAKE MARS60旋转流变仪 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; SYNC激光粒度仪 美国麦奇克有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品制备

取新鲜鸡蛋, 洗净干燥后打蛋分离蛋清, 用纱布过滤得到新鲜蛋清液, 匀速搅拌15 min。添加胰蛋白酶, 酶改性条件: 酶添加量0.15%、水解时间60 min、反应温度42 °C。以酶改性(25 °C)和未改性(25 °C)蛋清液为对照, 蛋清液常用的巴氏杀菌条件为56 °C加热3 min, 因

此本实验选用不同的热杀菌温度（56、62、68、72℃）加热蛋清液3 min，其中一部分样品经冻干后用于后续研究。

1.3.2 浊度的测定

参照杜清普等^[11]的方法并稍作修改。将制备好的蛋清液样品用去离子水稀释20倍，采用紫外-可见分光光度计测定溶液在540 nm波长处的吸光度，以此表示蛋清液样品的浊度。

1.3.3 上清液蛋白含量的测定

参照何大博等^[12]的方法。将制备好的蛋清液样品，8 000 r/min离心30 min，离心后取上清液。使用BCA法总蛋白定量测定试剂盒测定上清液蛋白含量。将56.3 g/L的BCA蛋白质标准品用去离子水稀释至不同质量浓度梯度（1、0.1、0.2、0.4、0.5 mg/mL），使用酶标仪在562 nm波长处测定吸光度，以蛋白含量为横坐标，吸光度为纵坐标制作标准曲线。比照标准曲线计算蛋清液样品的上清液蛋白含量。

1.3.4 表观黏度的测定

参照Liu Xin等^[13]方法并略有修改。测试前样品在25℃放置1 h。样品置于流变仪感应板上，使用C60平板进行测定，设定剪切速率范围为0.01~100 s⁻¹，板间距为1 000 nm。以剪切速率为横坐标，表观黏度为纵坐标，绘制剪切速率与表观黏度的关系图。运用Ostwald-de Waele幂次定律模型对关系图进行回归拟合，公式如下：

$$\eta / (\text{Pa} \cdot \text{s}) = K\lambda^{n-1}$$

式中： λ 为剪切速率/s⁻¹； η 为表观黏度； K 为黏稠系数； n 为流体指数。

1.3.5 粒径分布的测定

参照马艳秋等^[14]的方法并稍作修改，制备蛋白质量浓度为1~2 mg/mL的蛋清液样品，使用激光粒度仪测定蛋清液样品的粒径分布，测定温度25℃，参数设置：分散剂为水，分散剂折射率为1.33。以粒径为横坐标，体积分数为纵坐标绘制粒径分布图。

1.3.6 表面疏水性的测定

参照Li Xin等^[15]的方法略有修改。预制蛋白质量浓度为1 mg/mL的蛋清液样品，用磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline, PBS）（0.01 mol/L, pH 7.0）将蛋清液稀释为5个质量浓度梯度（蛋白质质量浓度0.1~0.5 mg/mL）。然后将20 μL ANS（8 mol/L）与4 mL样品溶液混合，并在黑暗中放置15 min。使用荧光分光光度计测定荧光强度，激发波长390 nm；发射波长470 nm；狭缝宽度5 nm。曲线的斜率为测定蛋清液样品的表面疏水性。

1.3.7 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）分析

参照Huang Qun等^[16]的方法并稍加修改。用PBS（0.01 mol/L, pH 7.0）稀释蛋清液蛋白质量浓度为1 mg/mL。采用质量分数5%浓缩胶、质量分数12%分离

胶进行SDS-PAGE，在80 V电压下持续30 min后，调整电压至120 V，染料距底部胶1 cm时停止电泳。凝胶用固定液固定30 min、染色液染色30 min、脱色液脱色过夜至条带清晰后，使用凝胶成像仪对凝胶照相。

1.3.8 扫描电子显微镜（scanning electron microscope, SEM）观察

参照Li Peishan等^[17]的方法并稍加修改。取少许冻干的蛋清样品固定在导电胶上，喷金处理200 s。将放大倍数至500倍，观察不同蛋清的表现形貌，并且拍摄照片记录所观察到的特征。

1.3.9 傅里叶变换红外光谱（Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR）分析

参照Han Ke等^[18]的方法并稍加修改。将冻干蛋清样品分别与干燥的KBr研磨混合后压片，使用FTIR进行测定，扫描范围为4 000~500 cm⁻¹。使用OMNIC软件对基线进行校正并分析蛋清液样品蛋白二级结构的相对含量。

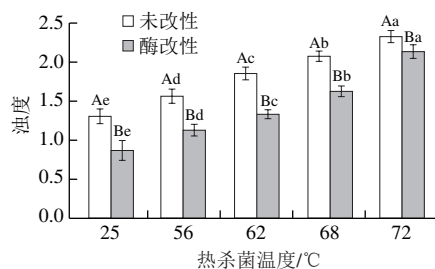
1.4 统计分析

所有实验重复3次，结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用SPSS 26.0软件和单因素方差分析进行数据处理和显著性分析（ $P < 0.05$ ，差异显著），使用Origin 2018软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 热杀菌期间酶改性对蛋清液浊度的影响

浊度能够反映出蛋清液中的粒子大小和数量，可以描述蛋白质的聚集程度，从侧面说明蛋清液耐热性的变化情况^[19]。热杀菌温度对酶改性和未改性蛋清液浊度的影响如图1所示。在同一杀菌温度下，酶改性蛋清液的浊度显著低于未改性蛋清液（ $P < 0.05$ ）。随着热杀菌温度的升高，改性前后蛋清液的浊度都逐渐升高。结果表明，经酶改性后的蛋清液可以有效抑制蛋清蛋白质的热聚集。可能是由于酶改性蛋清液的蛋白质水解为小分子蛋白，粒子变小导致浊度有所下降^[20]，之后热杀菌温度升高，小分子蛋白重新聚合，导致浊度逐渐上升，这与畅鹏等^[21]研究结果一致。



不同大写字母表示未改性组与酶改性组之间差异显著，不同小写字母表示不同杀菌温度样品之间差异显著（ $P < 0.05$ ）。图2、5和表2同。

图1 热杀菌期间酶改性对蛋清液浊度的影响
Fig. 1 Effect of enzymatic modification on the turbidity of liquid egg white during heat sterilization

2.2 热杀菌期间酶改性蛋清上清液蛋白含量的变化

如图2所示,与25℃未改性蛋清液相比,经酶改性蛋清液的上清液中蛋白含量越多,表明酶改性对蛋清液中蛋白热聚集的抑制效果越好,说明蛋白酶改性处理可以改善蛋清液的耐热性^[22]。总体上看,随着热杀菌温度的升高,上清液蛋白含量呈下降趋势。25℃酶改性蛋清液与未改性蛋清液的上清液蛋白含量无显著差异($P>0.05$)。在同一热杀菌温度下,酶改性蛋清液的上清液蛋白含量显著高于未改性($P<0.05$)。主要原因可能是加热引起蛋白通过疏水相互作用聚集,导致上清液蛋白含量降低。而酶改性使蛋清蛋白水解为小分子,导致蛋清液里存在的上清液蛋白含量增多,带电氨基酸暴露出来,增强了蛋白间的静电斥力^[23],从而抑制了蛋白的热聚集,改善了蛋清液的耐热性。

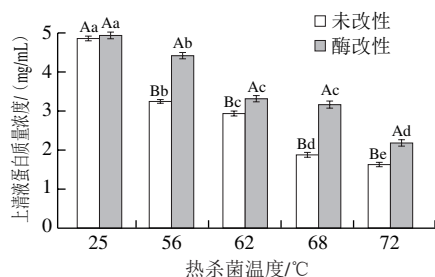
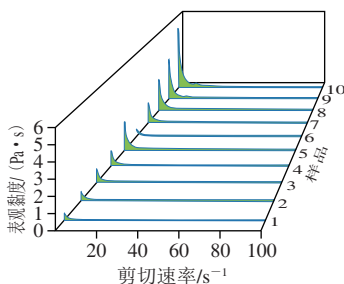


图2 热杀菌期间酶改性蛋清上清液蛋白含量的变化

Fig. 2 Changes in protein content of enzyme-modified egg white supernatants during heat sterilization

2.3 热杀菌期间酶改性对蛋清液表观黏度的影响

在不同热杀菌温度下,通过测定酶改性对蛋清液体系的静态流变学性质,得到黏度的变化。采用Ostwald-de Waele幂次定律模型进行拟合,判断热杀菌期间经过酶改性后体系的流体特性是否发生变化。



1~5分别代表酶改性25℃和热杀菌温度56、62、68、72℃的蛋清液;6~10分别代表未改性25℃和热杀菌温度56、62、68、72℃的蛋清液。

图3 热杀菌期间酶改性对蛋清液表观黏度的影响

Fig. 3 Effect of enzymatic modification on the apparent viscosity of liquid egg white during heat sterilization

如图3所示,表观黏度随着剪切速率的增加而降低,呈现剪切稀化的现象,说明酶改性和未改性的蛋清液均

为非牛顿流体^[24]。随着热杀菌温度的升高,蛋清液的黏度呈现逐渐升高的趋势。在同一热杀菌温度下,酶改性蛋清液的黏度均显著低于未改性蛋清液($P<0.05$)。蛋清液的黏度增加可能是由于热杀菌温度的升高,蛋白质分子发生交联,分子间的相互作用力增强。酶改性使得蛋清液结构间的相互作用力和共价交联减少而降低黏度^[25]。Li Xin等^[26]研究发现,随着热杀菌温度的升高,蛋白质扩展,然后通过疏水相互作用和二硫键重新聚集形成聚合体,具有更高的表观黏度。

由表1可知, $R^2>0.98$,表示图3能较好地反映表观黏度和剪切应力的变化关系。对图3中的曲线进行拟合Ostwald-de Waele幂次定律模型分析,其中K值越大表示蛋清液 η 越大^[27]。从表1可以看出,酶改性蛋清液黏度降低,随着热杀菌温度的升高,蛋清液黏度呈逐渐上升趋势,K值增大。由于酶水解蛋清蛋白使蛋清液的体系分散,降低蛋白质分子间的凝集,热杀菌温度升高,其K值越大,说明蛋白分子交联,重新聚合成较大的不溶性集合体。 n 变化不规律,这可能是由于蛋清液中包含多种蛋白质,其蛋白质在不同热杀菌温度下变化有所不同,对 n 的变化产生影响。

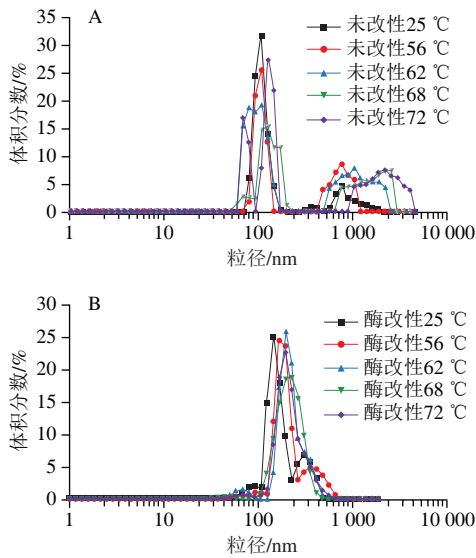
表1 不同热杀菌温度的蛋清液表观黏度拟合参数

Table 1 Fitting parameters of apparent viscosity of liquid egg white at sterilization temperatures

样品	K	n	R ²
未改性25℃	0.120	0.243	0.983
酶改性25℃	0.096	0.315	0.985
未改性56℃	0.362	0.512	0.985
酶改性56℃	0.233	0.295	0.982
未改性62℃	0.591	0.397	0.991
酶改性62℃	0.246	0.431	0.983
未改性68℃	0.780	0.756	0.980
酶改性68℃	0.371	0.336	0.986
未改性72℃	1.23	0.639	0.985
酶改性72℃	0.503	0.495	0.982

2.4 热杀菌期间蛋白酶改性对蛋清液粒径分布的影响

如图4所示,不同热处理下未改性和酶改性蛋清液的粒径分布呈现出明显差异。随着热杀菌温度不断升高,蛋清液的粒径峰正向移动,平均粒径逐渐增大。酶改性蛋清液的粒径分布更加接近正态分布,表现出单一的峰。根据Wang Baoli等^[28]的研究发现,样品较小的粒径可以降低颗粒在热应力下的聚集程度,从而提高蛋清蛋白颗粒的热稳定性。相比之下,未改性蛋清液的粒径分布更加分散,呈现双峰,且大粒径颗粒所占比例更大。而随着热杀菌温度的升高,粒径大小逐渐增大,这可能是由于加热导致蛋白质的热聚集,所以粒径有所增加^[29]。



A. 未改性蛋清液组; B. 酶改性蛋清液组。图7、8同。

图4 不同热杀菌温度下蛋清液的粒径分布

Fig. 4 Particle size distribution of egg white liquid under different heat sterilization temperatures

2.5 热杀菌期间酶改性对蛋清液表面疏水性的影响

如图5所示, 蛋清液的表面疏水性随着温度的升高, 呈现先升高后降低的趋势, 当蛋白质内部的疏水基团暴露时, 蛋清液的疏水性提高。在同一热杀菌温度条件下, 酶改性蛋清液表面疏水性显著高于未改性蛋清液 ($P < 0.05$)。在25 °C时, 酶改性蛋清液表面疏水性显著高于未改性蛋清液 ($P < 0.05$), 原因可能是酶改性促进了蛋白质的色氨酸残基、酪氨酸残基等疏水性基团的暴露, 提高其表面疏水性。从蛋清液粒径分布可以看出酶改性改变蛋白质分子的聚集和分散, 影响疏水基团的暴露情况, 从而改变蛋清液的疏水性。与未改性蛋清液相比, 酶改性使蛋清液蛋白的表面疏水性显著降低 ($P < 0.05$)。热杀菌温度达到68 °C时, 未改性蛋清液和酶改性蛋清液表面疏水性均达到最大值, 分别为 600.68 ± 6.22 和 809.90 ± 4.01 。根据王晨等^[30]研究, 蛋白酶处理可能会使蛋清蛋白内部的疏水基团暴露, 从而导致蛋白表面疏水性的增加。而过高的热杀菌温度使蛋白分子重新聚合, 疏水基团被掩埋, 表面疏水性降低^[31]。

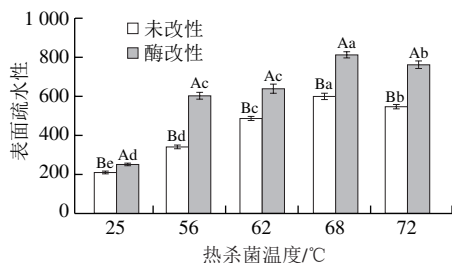
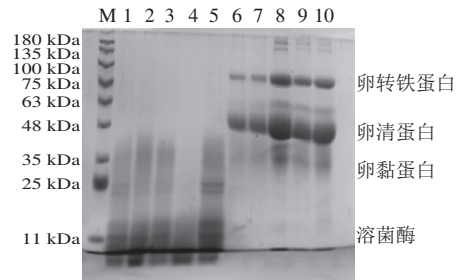


图5 热杀菌期间酶改性对蛋清液表面疏水性的影响

Fig. 5 Effect of enzymatic modification on the surface hydrophobicity of liquid egg white during heat sterilization

2.6 SDS-PAGE分析

蛋清蛋白主要成分为卵黏蛋白 (28 kDa)、卵清蛋白 (45 kDa)、卵转铁蛋白 (78 kDa) 和溶菌酶 (14.3 kDa)^[32]。以未改性25 °C (泳道6) 为对照, 结果如图6所示, 未改性蛋清液的条带颜色因为热杀菌温度升高而变化最大, 酶改性蛋清液的蛋白大部分为小分子蛋白, 酶改性72 °C的蛋清液 (泳道5) 在卵黏蛋白处的条带变深, 而未改性62 °C的蛋清液 (泳道8) 在卵转铁蛋白和卵清蛋白处的条带变深, 开始出现蛋白聚集物, 且随着热杀菌温度的升高, 蛋白聚集物越多。这说明酶改性使蛋清中高分子质量的蛋白水解, 且热杀菌处理后, 酶改性蛋清液的高分子质量条带颜色依然较浅, 说明热处理酶改性蛋清液形成的大分子颗粒较少, 抑制了蛋清液蛋白的热聚集, 从而改善了蛋清液的耐热性。更小的粒径大小与分布很好地佐证了这一结果。当泳道颜色变浅时, 表明蛋白质聚集物已被 β -巯基乙醇和SDS分解, 酶改性促进了疏水相互作用和巯基二硫键交换的反应, 从而增强了疏水相互作用并断裂二硫键。当蛋清蛋白质被蛋白酶水解后, 蛋白质中的自由氨基和巯基减少, 与考马斯亮蓝发生显色反应的基团减少, 从而使条带变浅或不显色。



M. Marker; 1~5分别为25 °C和热杀菌温度56、62、68、72 °C的酶改性蛋清液; 6~10分别为25 °C和热杀菌温度56、62、68、72 °C的未改性蛋清液。

图6 不同热杀菌温度下酶改性与未改性蛋清液SDS-PAGE图像

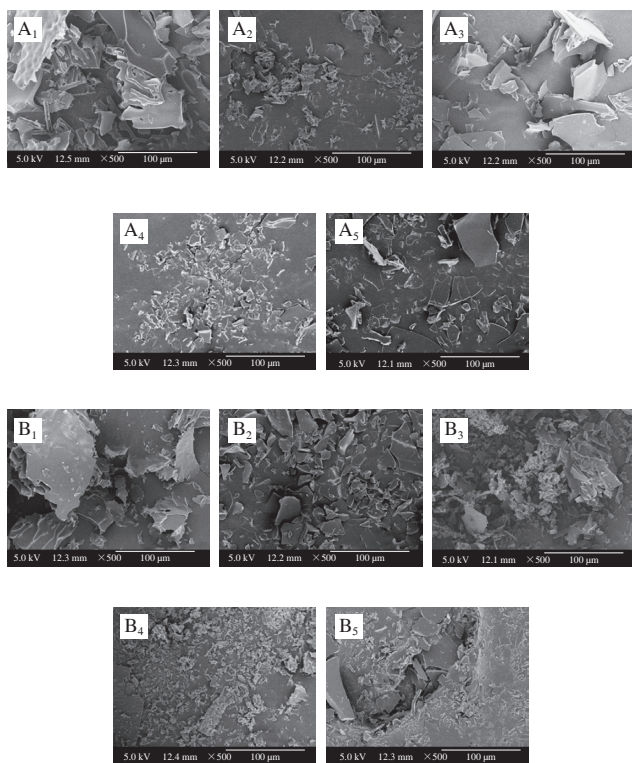
Fig. 6 SDS-PAGE images of enzyme-modified and unmodified liquid egg white at different sterilization temperatures

2.7 热杀菌期间酶改性对蛋清结构的影响

如图7所示, 未改性25 °C的蛋清样品颗粒尺寸较大, 这些颗粒之间有些黏连在一起, 导致总体呈现不规则且不均匀的分布。随着热杀菌温度的升高, 未改性蛋清蛋白颗粒数量明显减少, 且分布更加松散。酶改性25 °C的蛋清样品微观颗粒的表面孔洞和缝隙增多, 经过热杀菌处理后, 颗粒表面出现黏连, 其颗粒数量减少。与未改性蛋清样品的SEM图像进行对比, 在同一热杀菌温度下, 酶改性蛋清蛋白的颗粒数量多于未改性蛋清蛋白。

SEM图像表明酶改性处理可以改善蛋清蛋白的热聚集, 酶改性后蛋清粉的颗粒结构被破坏并分裂成大量碎片, 产生不规则的孔状结构, 出现一定程度的片状凸

起, 颗粒大小也变得更小。由于热杀菌处理使蛋清蛋白发生热聚集, 经过离心后冻干的不同蛋清样品SEM图像也不同, 其结果与上述蛋清上清液蛋白含量的结果一致。酶改性处理可使结构紧密的蛋白质分子展开, 并暴露活性残基, 经过热杀菌处理仍保留较多的蛋清蛋白, 表明酶改性处理改善了蛋清的耐热性。



下标1~5. 25 °C和热杀菌温度56、62、68、72 °C。

图7 热杀菌期间酶改性对蛋清结构的影响

Fig. 7 Effect of enzymatic modification during heat sterilization on the microstructure of liquid egg white

2.8 FTIR分析

2.8.1 图谱分析

红外光谱学可以通过多肽链的主干吸收红外辐射, 从而激发其组成酰胺键的振动模式^[33]。其中, 酰胺I带是在1 700~1 600 cm^{-1} 范围内出现的振动带^[34], 它的振动主要是由羰基(C=O)双键导致, 是分析蛋白质二级结构的重要带位。如图8所示, 处理前后的蛋清液蛋白红外图谱并无明显变化, 但在酰胺I带处, 未改性蛋清组中峰值由1 652.63 cm^{-1} 处偏移到1 622.37 cm^{-1} 处, 酶改性蛋清组的峰值位于1 657.41 cm^{-1} 处, 酶改性使得蛋白质的酰胺I带向高波数偏移, 热杀菌处理使蛋白质的酰胺I带向低波数偏移, 偏移到1 636.85 cm^{-1} 处。通过氢键的断裂, 可以提高化学键的力常数, 从而吸收频率移向高波数方向。因此, 蛋白酶改性处理可能会导致蛋白质分子结构展开, 并改变官能团。

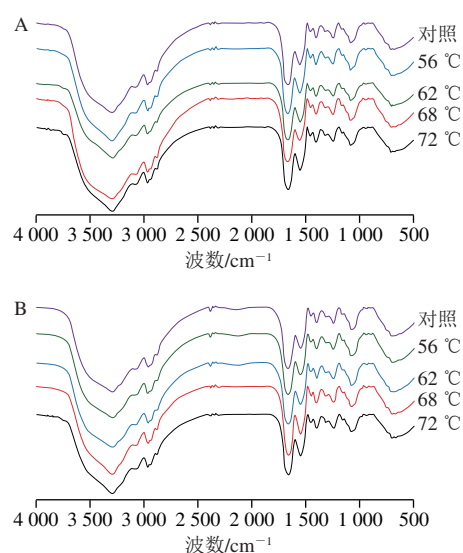


图8 热杀菌期间酶改性对蛋清蛋白红外光谱的影响

Fig. 8 Effect of enzymatic modification on the infrared spectrum of egg white proteins during heat sterilization

2.8.2 酰胺I带的反卷积和曲线拟合

为进一步了解酶改性对蛋清蛋白质的影响, 对不同处理的蛋清蛋白的二级结构进行测定。结果表明, 蛋白质改性后, C=O数量以及C=O和N-H之间的氢键都发生了变化。

表2 热杀菌期间酶改性对蛋清蛋白质二级结构相对含量的影响

Table 2 Effect of enzymatic modification on the relative contents of secondary structures of egg white protein during heat sterilization

样品	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
未改性25 °C	35.74±0.18 ^{Bd}	28.45±0.15 ^{Bb}	25.71±0.02 ^{Ad}	10.10±0.02 ^{Ad}
酶改性25 °C	43.54±0.09 ^{Abc}	33.31±0.10 ^{Ac}	11.19±0.13 ^{Bd}	9.75±0.01 ^{Bd}
未改性56 °C	39.19±0.03 ^{Bb}	15.87±0.01 ^{Bd}	35.82±0.04 ^{Aa}	10.32±0.04 ^{Ac}
酶改性56 °C	43.75±0.16 ^{Ab}	33.22±0.03 ^{Ac}	12.16±0.08 ^{Bc}	9.95±0.13 ^{Bc}
未改性62 °C	32.25±0.17 ^{Bc}	23.75±0.19 ^{Bc}	29.94±0.06 ^{Ab}	11.74±0.07 ^{Ac}
酶改性62 °C	35.51±0.04 ^{Ad}	30.62±0.15 ^{Ab}	22.25±0.11 ^{Ba}	11.06±0.06 ^{Bb}
未改性68 °C	27.13±0.02 ^{Bc}	38.05±0.21 ^{Aa}	20.85±0.06 ^{Ac}	12.36±0.13 ^{Ab}
酶改性68 °C	45.23±0.10 ^{Aa}	27.91±0.11 ^{Bd}	16.23±0.17 ^{Bb}	9.12±0.04 ^{Bc}
未改性72 °C	42.83±0.26 ^{Aa}	16.04±0.22 ^{Bd}	25.85±0.02 ^{Ac}	13.28±0.02 ^{Ba}
酶改性72 °C	28.62±0.04 ^{Bc}	34.92±0.18 ^{Aa}	22.32±0.15 ^{Ba}	14.04±0.05 ^{Aa}

蛋清蛋白质二级结构含量变化情况如表2所示, 蛋清蛋白二级结构组成为 α -螺旋35.74%、 β -折叠28.45%、 β -转角25.71%、无规卷曲10.10%。这与康鹏等^[35]的研究结果基本一致。热处理使未改性和酶改性蛋清液中蛋白质二级结构发生变化。未改性蛋清蛋白二级结构中 β -折叠、 β -转角结构的相对含量变化不规律, 无规卷曲结构的相对含量随温度的升高不断增大, 在72 °C时无规卷曲结构相对含量达到13.28%, 而 α -螺旋相对含量先增大后减小, 超过68 °C后 α -螺旋相对含量显著升高($P<0.05$)。酶改性后蛋清液 α -螺旋和 β -折叠结构在

68 ℃条件下相对含量分别为最高和最低,使得蛋白同时具有稳定性和灵活性,在此时酶改性蛋清液 α -螺旋结构相对含量显著高于未改性蛋清液($P<0.05$),无规卷曲结构相对含量明显低于未改性蛋清液,且酶改性后蛋清液二级结构相对含量的变化幅度明显小于未改性蛋清液,这说明酶改性改变了蛋清液蛋白质内的氢键,适当热处理对蛋白质的有序性有促进作用。

3 结论

本研究通过胰蛋白酶对蛋清液进行改性,探究热杀菌期间胰蛋白酶对蛋清液耐热性和结构特性的影响。结果显示,蛋白酶改性处理使蛋清液浊度显著降低($P<0.05$),与未改性蛋清液相比,改性后的上清液蛋白含量无显著差异($P>0.05$)。在热杀菌过程中,酶改性蛋清液浊度显著低于未改性蛋清液,其上清液蛋白含量显著高于未改性蛋清液($P<0.05$),证明蛋白酶改性是一种改善蛋清液耐热性的有效方法。通过分析表观黏度、表面疏水性发现,酶改性蛋清液在热杀菌过程中蛋白质表观黏度逐渐升高,表面疏水性呈现先上升后下降的趋势。在同一热杀菌温度下,酶改性蛋清液的表现黏度显著低于未改性蛋清液,表面疏水性显著高于未改性蛋清液($P<0.05$)。FTIR结果显示,酶改性处理可以使蛋白酰胺I带向高波数偏移,蛋白质二级结构的结果显示热杀菌温度低于68 ℃时,酶改性蛋清液蛋白质的 α -螺旋相对含量显著高于未改性蛋清液,无规卷曲结构相对含量显著低于未改性蛋清液($P<0.05$)。酶改性蛋清液的粒径分布趋于正态分布,在同一热杀菌温度下,其粒径显著小于未改性蛋清液($P<0.05$)。SDS-PAGE结果表明蛋白酶改性能抑制蛋白热聚集。酶改性25 ℃的蛋清液颗粒的表面孔洞和缝隙增多,经过热杀菌处理后,其颗粒数量减少。在同一热杀菌温度下,酶改性蛋清蛋白的颗粒数量多于未改性蛋清蛋白。因此,在热杀菌过程中,胰蛋白酶对蛋清液有积极作用,可有效改善蛋清蛋白的热聚集,提高蛋清液的耐热性,对扩大其销售半径有重要意义。

参考文献:

- [1] 李弓中,赵英,王俊彤,等. 超声处理对蛋清蛋白结构性及蛋清液起泡性的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(9): 68-75. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20180419-248.
- [2] 迟玉杰,赵英,毋引子. 鸡蛋蛋清液起泡性的研究[J]. 中国家禽, 2017, 39(3): 1-5. DOI:10.16372/j.issn.1004-6364.2017.03.001.
- [3] HO H Y, CIOU J Y, QIU Y T, et al. Improvement of foaming characteristics and stability of sterilized liquid egg with egg white hydrolysate (EWH)[J]. Foods, 2021, 10(6): 1326. DOI:10.3390/foods10061326.

- [4] JOERES E, SCHOLZEL H, DRUSCH S, et al. Ohmic vs. conventional heating: influence of moderate electric fields on properties of egg white protein gels[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 127: 107519. DOI:10.1016/j.foodhyd.2022.107519.
- [5] TUSAR L, USENIK A, TURK B, et al. Mechanisms applied by protein inhibitors to inhibit cysteine proteases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(3): 997. DOI:10.3390/ijms22030997.
- [6] KAUR J, SINGH P K. Trypsin detection strategies: a review[J]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2022, 52(5): 949-967. DOI:10.1080/10408347.2020.1846490.
- [7] 迟玉杰,胥伟,李鸿健. 酶法提高蛋清粉起泡功能及其机理的研究[J]. 中国家禽, 2011, 33(24): 16-19. DOI:10.16372/j.issn.1004-6364.2011.24.002.
- [8] 刘剑秋,迟玉杰. 通过酶改性技术提高鸡蛋的热凝固温度[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(10): 99-101. DOI:10.3321/j.issn.0253-990X.2003.10.025.
- [9] 涂勇刚,聂旭亮,徐明生,等. 响应曲面法优化木瓜蛋白酶改善蛋清蛋白起泡性能工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(20): 84-88. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201120018.
- [10] TIAN S Q, DU K, YAN F, et al. Microwave-assisted enzymatic hydrolysis of wheat germ albumin to prepare polypeptides and influence on physical and chemical properties[J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131707. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131707.
- [11] 杜清普,赵英,王瑞红,等. 不同解冻方法对冰蛋黄功能特性、理化特性及蛋白质结构的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 8-16. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20200612-172.
- [12] 何大博,全其根. 利用酪蛋白酸钠的分子伴侣特性抑制蛋清蛋白的热聚集研究[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(5): 69-77. DOI:10.3969/j.issn.2095-6002.2020.02.009.
- [13] LIU X, MA L L, ZHONG M Z, et al. Formation mechanism of high-viscosity gelatinous egg white among "Fenghuang Egg": phenomenon, structure, and substance composition[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 217: 803-813. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.07.089.
- [14] 马艳秋,迟媛,宋冰洁,等. 蛋清源肠内营养粉的冲调特性及品质稳定性评价[J]. 食品科学, 2020, 41(13): 38-45. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190624-292.
- [15] LI X, LI J H, CHANG C H, et al. Foaming characterization of fresh egg white proteins as a function of different proportions of egg yolk fractions[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90: 118-125. DOI:10.1016/j.foodhyd.2018.12.014.
- [16] HUANG Q, LIU L, WU Y Y, et al. Mechanism of differences in characteristics of thick/thin egg whites during storage: physicochemical, functional and molecular structure characteristics analysis[J]. Food Chemistry, 2022, 369: 130828. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.130828.
- [17] LI P S, JIN Y G, SHENG L. Impact of microwave assisted phosphorylation on the physicochemistry and rehydration behaviour of egg white powder[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105380. DOI:10.1016/j.foodhyd.2019.105380.
- [18] HAN K, LIU Y F, LIU Y Y, et al. Characterization and film-forming mechanism of egg white/pullulan blend film[J]. Food Chemistry, 2020, 315: 126201. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126201.
- [19] LIU J B, JIANG H Y, ZHANG M, et al. Ions-regulated aggregation kinetics for egg white protein: a promising formulation with controlled gelation and rheological properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 200: 263-272. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2021.12.185.
- [20] 钟敏,常方圆,赵谋明,等. 碱性蛋白酶控制酶解诱导大豆分离蛋白纳米颗粒的形成机制[J]. 食品科学, 2022, 43(14): 93-101. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210628-319.

- [21] 畅鹏, 谢艳英, 王浩, 等. 热处理温度及时间对镜鲤鱼肌原纤维蛋白热聚集行为的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(1): 101-107. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20191213-152.
- [22] GROSSMANN L, HINRICHS J, WEISS J. Solubility and aggregation behavior of protein fractions from the heterotrophically cultivated microalga *Chlorella protothecoides*[J]. Food Research International, 2019, 116: 283-290. DOI:10.1016/j.foodres.2018.08.037.
- [23] AI M M, TANG T, ZHOU L D, et al. Effects of different proteases on the emulsifying capacity, rheological and structure characteristics of preserved egg white hydrolysates[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 933-942. DOI:10.1016/j.foodhyd.2018.09.023.
- [24] TANG T T, WU S F, TANG S S, et al. Effect of modified egg white powder on the properties of angel cakes[J]. Journal of Food Engineering, 2022, 326: 111012. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2022.111012.
- [25] ZHOU Y J, MEI Y Q, LUO T, et al. Study on the relationship between emulsion properties and interfacial rheology of sugar beet pectin modified by different rhyzemes[J]. Molecules, 2021, 26(9): 2829. DOI:10.3390/molecules26092829.
- [26] LI X, WANG Y M, LÜ J H, et al. Investigations of foaming, interfacial and structural properties of dispersions, batters and cakes formed by industrial yolk-contaminated egg white protein[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154: 112776. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112776.
- [27] KUMBAR V, ONDRUSIKOVA S, TROST D, et al. Rheological and flow behaviour of yolk, albumen and liquid whole egg from eggs of six different poultry species[J]. Foods, 2021, 10(12): 3130. DOI:10.3390/foods10123130.
- [28] WANG B L, WANG P, XU X L, et al. Structural transformation of egg white protein particles modified by preheating combined with pH-shifting: mechanism of enhancing heat stability[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 170: 114114. DOI:10.1016/j.lwt.2022.114114.
- [29] XUE H, ZHANG G W, HAN T F, et al. Improvement of gel properties and digestibility of the water-soluble polymer of tea polyphenol-egg white under thermal treatment[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131319. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131319.
- [30] 王晨, 马艳秋, 张梓湘, 等. 不同处理方法对蛋清蛋白免疫原性及结构的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(15): 93-100. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20210623-267.
- [31] LUO X, WANG Q, WU Y Y, et al. Mechanism of effect of heating temperature on functional characteristics of thick egg white[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 154: 112807. DOI:10.1016/j.lwt.2021.112807.
- [32] WANG C Y, LI J H, LI X, et al. Emulsifying properties of glycation or glycation-heat modified egg white protein[J]. Food Research International, 2019, 119: 227-235. DOI:10.1016/j.foodres.2019.01.047.
- [33] BOOTH S G, FELISILDA B M B, DE EULATE E A, et al. Secondary structural changes in proteins as a result of electroadsorption at aqueous-organogel interfaces[J]. Langmuir, 2019, 35(17): 5821-5829. DOI:10.1021/acs.langmuir.8b04227.
- [34] 石彦国, 郭庆启, 杨晓婉, 等. 大豆蛋白-酪蛋白复合物结构的红外光谱分析[J]. 中国食品学报, 2018, 18(11): 225-231. DOI:10.16429/j.1009-7848.2018.11.029.
- [35] 康鹏, 雷晓民, 葛武鹏, 等. 不同巴氏杀菌处理对绵羊乳总蛋白及乳清蛋白二级结构的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(23): 9219-9225. DOI:10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.2021.23.032.