

糟蛋减压加工过程中蛋黄蛋白质二级结构的变化研究

王红妮, 刘会平, 刘平伟, 袁伟

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 本研究通过减压抽真空技术加工糟蛋, 采用 FTIR 研究糟蛋加工过程中不同时期的蛋黄中蛋白质二级结构含量变化。结果显示: 在糟蛋腌制过程中, α 螺旋和无规则卷曲含量变化不明显; 而 β 折叠和 β 转角在腌制过程中互相转化, 在腌制 30 d 时变化最为明显: β 折叠含量明显上升至 37.70%, β 转角明显下降至 16.32%。研究结果表明糟蛋在腌制初期, 蛋黄蛋白质在酸性条件、钙离子以及钠离子的影响下, 蛋白质天然结构展开, 蛋白质分子间的次级键断裂, 蛋白质肽链结构打开, 二级结构含量发生变化; 而在腌制后期, pH 值保持恒定, 蛋白质二级结构恢复, 与生蛋含量基本一致。

关键词: 减压技术; 蛋黄; 傅里叶红外变换光谱; 二级结构

文章编号: 1673-9078(2013)6-1262-1265

Changes in Yolk Protein Secondary Structure of the Preserved Egg in Wine during Low Pressure-vacuum Processing

WANG Hong-ni, LIU Hui-ping, LIU Ping-wei, YUAN Wei

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The research examined the secondary structure of yolk proteins of the egg preserved in wine and treated by low pressure vacuum for 0-45 days, using Fourier transformed infrared spectrum (FTIR). Noticeable changes in β -sheet (up to 37.70%) and β -turns (reduce to 16.32%) were found when the egg pickled for 30 days. The structures of β -sheet and β -turns were transformational with each other during pickling. On the other hand, the content of α -helix and random coils had little changes. The results indicated the secondary bonds of yolk proteins of egg preserved in wine were broken effected by ionic strength (Ca^{2+} and Na^+) under acid conditions. The results also showed the degeneration of yolk proteins were accelerated by low pH and ionic strength.

Key words: low pressure technology; yolk; FTIR; secondary structure

糟蛋有“中华饮食一绝”之美称^[1], 为中国传统腌制食品, 是鸭蛋在糯米酒糟中腌制而成。糟蛋中含有全面的、高质量的蛋白质, 含有所有人体必需氨基酸, 提供了丰富的维生素和矿物质元素, 符合人体营养需求^[2]。

糟蛋的传统生产周期为 5~12 个月不等, 传统方法一般在常温常压下进行。本研究首次采用减压抽真空技术进行糟蛋腌制, 可使原料蛋内部的气体溢出, 形成压力差, 借助压力差的作用, 加速料液中物料的渗透, 提高料液渗透均匀性, 成功使糟蛋的化清、凝固、成熟阶段缩短, 整个糟蛋生产周期缩短至 2.5 个月。鲜鸭蛋在含有有机酸的料液的渗透下, 蛋清蛋黄在酸性条件下逐渐凝固成糊状或者胶冻状。在加工过程, 由于有机酸的渗入, 蛋处于一个酸性环境中, 酸

收稿日期: 2012-12-18

通讯作者: 刘会平

性环境会导致蛋黄中的蛋白质部分降解^[3], 蛋白质高级结构和低级结构都会发生改变。为了更加深入的了解糟蛋蛋黄在加工过程中的变化, 有必要对糟蛋蛋黄中蛋白质的二级结构进行研究。目前, 关于糟蛋的研究限于加工方式的研究, 而对于糟蛋加工过程中的蛋白质二级结构的研究尚未见报道。

蛋白质二级结构的研究方法主要有 X-射线衍射、核磁共振 (NMR)、拉曼光谱 (Raman)、荧光和紫外光谱、以及红外光谱 (IR) 和圆二色光谱 (Circular Dichroism, CD) 等^[4]。本实验采用傅里叶变换光谱法对糟蛋在腌制过程中的蛋白质二级结构含量变化进行研究, 进而探讨糟蛋腌制过程中影响蛋白质凝固变性的因素。

1 材料与方法

1.1 原料

根据专利《减压快速糟制糟蛋》的配方进行料液配置,专利号为 ZL201010586953.2^[5]。将原料蛋在温度 25 ℃、真空度为 0.08 MPa、每天维持真空度 24 h 的条件下进行腌制。在糟蛋腌制过程中,定期随机取样 10 枚,小心将蛋清蛋黄分离,将蛋黄打碎备用。

1.2 主要仪器设备

真空泵(型号: TW-2A),温岭市挺威真空设备有限公司;真空腌制设备,天津科技大学自制;傅里叶变换红外光谱仪,型号: HTAR 型,德国布鲁克仪器公司;ATR Zese 晶片;组织捣碎机;蛋清蛋黄分离器。

1.3 谱图收集

分别取生鸭蛋、腌制 10 d、20 d、30 d、45 d 以及成品糟蛋蛋黄,将样品搅拌均匀,将样品溶液均匀地铺满 ATR 的 ZeSe 晶片,在 4 cm⁻¹ 分辨率下,扫描 512 次。在与样品测定完全相同的条件下,将在 4 cm⁻¹ 分辨率及扫描 2048 次收集的水蒸汽的谱图作为水汽校正的参考光谱。

1.4 谱图处理

采用 OMNIC 数据处理软件处理上述谱图,对蛋白质在酰胺 I 带(1600~1700 cm⁻¹)波段的图谱进行分析。用 Peakfit 4.12 软件对谱图酰胺 I 带进行傅立叶变换去卷积、二阶导数峰拟合^[6],子峰数目在 8~9 之间,其残差(r²)大于 0.98,确认峰位归属,计算各子峰面积的相对质量分数。各子峰与二级结构对应关系的指认为:1618~1640 cm⁻¹和 1670~1690 cm⁻¹为 β 折叠;1650~1660 cm⁻¹为 α 螺旋;1640~1650 cm⁻¹为无规则卷曲;1660~1700 cm⁻¹为 β 转角^[7]。

2 结果与讨论

2.1 红外光谱谱图拟合结果

采用 1.4 中所述谱图处理方法,对红外原谱图进行傅立叶变换去卷积、二阶导数峰拟合,二阶导数拟合结果如图 1 所示。

2.2 对红外谱图拟合结果中二级结构峰的确证

糟蛋不同时期的蛋黄中蛋白质的二阶导数拟合峰面积进行统计,进行峰位确定,结果如表 1 所示。

将表 1 所得的不同类型的蛋白质二级结构进行整理总结,得出蛋白质二级结构含量,如表 2 所示。

如表 1 和表 2 可知,通过傅里叶红外变换光谱对糟蛋加工过程中蛋黄中蛋白质酰胺 I 带进行傅立叶变换去卷积、二阶导数峰拟合,得到子峰数目在 8~9 之间。其中鲜鸭蛋蛋黄中蛋白质红外光谱图二阶拟合峰位 8 个:α 螺旋的峰位为 1659、1651,峰面积与总面积之比为 26.98%;β 折叠对应的峰位为:1633、1624,峰

面积与总面积之比为 29.20%;β 转角的峰位为 1684、1675、1667,峰面积与总面积之比 19.29%;无规则卷曲对应的峰位为 1642,峰面积与总面积之比为 15.46%。

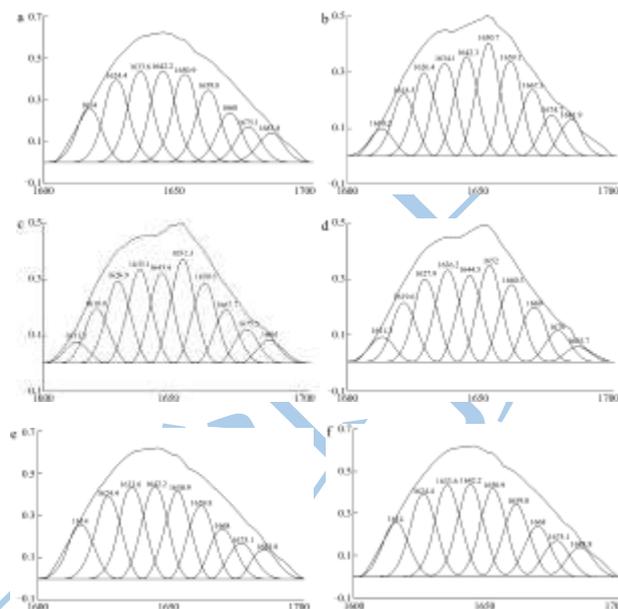


图 1 糟蛋腌制不同时期蛋黄中蛋白质的二级结构红外拟合图

Fig.1 Amide I spectra of yolk proteins of the egg pickled for different days

注: a: 鲜蛋黄, b: 腌制第 10 d 蛋黄, c: 腌制第 20 d 蛋黄, d: 腌制第 30 d 蛋黄, e: 腌制第 45 d 蛋黄, f: 糟蛋成品蛋黄。

腌制 10 d 时,二阶拟合峰位 9 个,α 螺旋的峰位为 1659、1651,峰面积与总面积之比为 29.01%;β 折叠对应的峰位为:1634、1626、1619,峰面积与总面积之比为 33.18%;β 转角的峰位为 1682、1675、1667,峰面积与总面积之比为 20.02%;无规则卷曲对应的峰位为 1642,峰面积与总面积之比为 13.95%。腌制 20 天时,二阶拟合峰位 9 个,α 螺旋的峰位为 1659、1651,峰面积与总面积之比为 28.90%;β 折叠对应的峰位为:1635、1627、1619,峰面积与总面积之比为 36.12%;β 转角的峰位为 1684、1675、1667,峰面积与总面积之比为 17.48%;无规则卷曲对应的峰位为 1643,峰面积与总面积之比为 14.06%。腌制 30 d 时,二阶拟合峰位 9 个,α 螺旋的峰位为 1659、1652,峰面积与总面积之比为 27.99%;β 折叠对应的峰位为:1636、1628、1620,峰面积与总面积之比为 37.70%;β 转角的峰位为 1686、1678、1669,峰面积与总面积之比为 16.32%;无规则卷曲对应的峰位为 1644,峰面积与总面积之比为 13.97%。腌制 45 d 时,二阶拟合峰位 8 个,α 螺旋的峰位为 1659、1651,峰面积与总面积之

比为 26.98%； β 折叠对应的峰位为：1634、1624，峰面积与总面积之比为 29.20%， β 转角的峰位为 1684、1675、1668，峰面积与总面积之比为 19.29%；无规则卷曲对应的峰位为 1642，峰面积与总面积之比为

15.46%，不同二级结构含量与生鸭蛋几乎一致。成品蛋黄中蛋白质二阶拟合峰位 8 个，峰位与腌制 45 d 时一致，含量一致，蛋白质二级结构含量不再发生变化。

表 1 糟蛋不同腌制时期的蛋黄中蛋白质二级结构峰位认定

Table 1 Gaussian curve-fitting (GCF) of amide I spectra of yolk proteins pickled for different days

样品	峰位 /cm ⁻¹	峰面积/百分比%	峰归属	样品	峰位 /cm ⁻¹	峰面积 /百分比%	峰归属	样品	峰位 /cm ⁻¹	峰面积 /百分比%	峰归属
鲜蛋黄	1684	4.91	β -转角	第 10 d	1682	5.13	β -转角	第 20 d	1684	3.72	β -转角
	1675	5.96	β -转角		1675	5.70	β -转角		1675	5.30	β -转角
	1667	8.43	β -转角		1667	9.19	β -转角		1667	8.46	β -转角
	1659	12.18	α -螺旋		1659	13.26	α -螺旋		1659	12.61	α -螺旋
	1651	14.80	α -螺旋		1651	15.74	α -螺旋		1651	16.28	α -螺旋
	1642	15.46	无规则卷曲		1642	13.95	无规则卷曲		1643	14.06	无规则卷曲
	1633	15.32	β -折叠		1634	12.99	β -折叠		1635	14.67	β -折叠
	1624	13.87	β -折叠		1626	11.56	β -折叠		1627	12.86	β -折叠
第 30 d	1686	1686	β -转角	第 45 d	1684	1.75	β -转角	成品	1684	1.00	β -转角
	1678	1678	β -转角		1675	2.94	β -转角		1675	3.55	β -转角
	1669	1669	β -转角		1668	5.57	β -转角		1668	6.13	β -转角
	1659	1660	α -螺旋		1659	6.70	α -螺旋		1659	7.01	α -螺旋
	1652	1652	α -螺旋		1651	8.82	α -螺旋		1651	9.16	α -螺旋
	1644	1644	无规则卷曲		1642	10.79	无规则卷曲		1642	11.31	无规则卷曲
	1636	1636	β -折叠		1634	11.55	β -折叠		1634	12.81	β -折叠
	1628	1628	β -折叠		1624	11.04	β -折叠		1624	12.95	β -折叠
	1620	1620	β -折叠								

表 2 糟蛋不同腌制时期的蛋黄中蛋白质二级结构含量变化

Table 2 Changes of protein secondary structure in yolk proteins pickled for different days

结构分类	0 d	10 d	20 d	30 d	45 d	成品
α 螺旋/%	26.98	29.01	28.90	27.99	26.98	27.00
β 折叠/%	29.20	33.18	36.12	37.70	29.20	29.20
β 转角/%	19.29	20.02	17.48	16.32	19.29	19.26
无规则卷曲/%	15.46	13.95	14.06	13.97	15.46	15.46

可以看出，糟蛋腌制过程中蛋黄中蛋白质二级结构含量变化如下，在腌制时间为 30 d 时， β -折叠有明显的上升趋势，生鸭蛋的蛋黄中 β -折叠含量为 29.20%，而腌制 30 d 时上升至 37.70%；而在 45 d 时 β 折叠含量又下降至 29.20%，与生鸭蛋中蛋黄蛋白质含量一样，成品蛋中蛋黄蛋白质的 β -折叠含量与生鸭蛋中的 β -折叠含量一致。在腌制的时间为 30 d 时， β -转角明显下降，生鸭蛋中蛋黄蛋白质的 β -转角含量为 19.29%，而在腌制 30 d 时下降至 16.32%；而在 45 d 和成品蛋中的蛋黄蛋白质的 β -转角含量均与生鸭蛋中一致。 β -折叠与 β -转角在糟蛋腌制过程中含量的变化，推测可能在腌制过程中， β -折叠与 β -转角相互转换； α -螺旋和无规则卷曲在腌制过程中变化不明显。当蛋在

受到热、盐、酸、碱及机械作用时会发生凝固^[8-10]。糟蛋在腌制前期，蛋黄 pH 值急速下降，受酸的影响，蛋白质天然结构的短暂打开，蛋白质分子天然结构中的次级键（如氢键、二硫键、盐键等）被破坏， β 结构之间互相转换。而随着腌制时间的延长，pH 值为 5.2，达到平衡，虽然仍然成酸性，但是离等电点 pH=4.5 仍有一定的距离，蛋白质的天然结构有所恢复，检测得出成品中的二级结构与生蛋中的二级结构含量基本一致。

蛋黄中的蛋白质含量约为 14.22%，脂蛋白占大部分^[11]，主要是低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、卵黄高磷蛋白和卵黄球蛋白。凝固性或成凝胶化是蛋白质的重要特性之一。蛋白质凝固是由于蛋白质天然分子结构发生变化，该变化使蛋黄由半流动的黏稠状变成固体或半固体（凝胶）状态。蛋白质的凝固分为两个阶段：变性和结块。变性就是在外界因素的作用下，例如当蛋在受到热、酸、碱、盐、及机械作用的干预时会发生变性凝固。蛋白质分子的自然结构遭到破坏，蛋白质分子天然结构中的次级键（如氢键、二硫键、盐键等）被破坏，使蛋白质有规则的肽链结构（二级、三级、四级结构）打开呈松散型不规则结构，分子的

刚性降低, 柔性、不对称性增加, 疏水基团暴露, 形成中间体。当外界作用时间短或者作用时间不长时, 蛋白质发生可逆变性, 中间体恢复到原来状态, 蛋白质仍然具有原来的特性; 当外界作用较强或者长时间作用时, 发生不可逆变性, 中间体中被释放出来的极性基团, 重新聚合形成新的空间结构, 改变了蛋白质原来的性质。不可逆变性的蛋白质分子的肽链之间又借助次级键相互结合形成较大的聚合物成为凝胶状块, 失去流动性和可溶性^[2]。

蛋液的凝固变性, 主要是由于蛋白质受物理化学等因素的影响所致, 而蛋白质的凝固变性又与等电点有密切的关系。在等电点时, 蛋白加热最易凝固变性, 反之, 蛋液蛋白质的pH距离它的等电点越远时, 加热时较不易凝固变性。蛋中的大多数蛋白质的等电点接近pH=4.5, 在等电点时, 蛋白质的溶解度、黏度、渗透压、膨胀性及导电能力最小。糟蛋料液腌制之后, 蛋黄pH值为5.20, pH呈酸性, 蛋黄中蛋白质中的氢键、二硫键、盐键等在酸性条件下断裂, 导致蛋白质的高级结构被破坏, 进而导致有规则的二级结构(肽链结构)展开, 二级结构含量发生改变, 说明酸性条件可促进蛋白质变性, 促进蛋白质凝胶化。

钙和食盐对蛋白质的凝固也有促进作用^[3], 这是由于钠离子和钙离子能降低蛋白质分子间的排斥力, 其中钙的凝固力是钠离子的1000倍。糟蛋在加工过程中, 料液中含有乙酸, 乙酸和蛋壳中的碳酸钙反应, 使蛋壳中的钙游离, 并随着料液的渗透进入蛋清继而进入蛋黄中; 另外, 料液中存在大量的乙醇, 乙醇在腌制过程中, 随着时间的延长部分转化为乙酸, 促进了钙的游离^[3]。除此之外, 料液中的食盐也会随着料液的渗透而进入蛋黄中。由于钙和食盐对蛋白质的凝固也有促进作用, 因此渗入蛋黄中的钙离子和食盐辅助了酸性条件下蛋白质的凝固变性。

3 结论

通过对糟蛋加工过程中蛋黄中蛋白质二级结构含量变化的检测, 得出蛋黄中蛋白质的二级结构在腌制前期, 即腌制前30d有明显变化。蛋黄蛋白质在酸性条件、钙离子以及钠离子的影响下, 蛋黄中蛋白质发生凝固变性, 天然结构展开, 蛋白质分子间的次级键断裂, 高级结构被破坏, 进而导致蛋白质肽链结构打

开, 二级结构含量发生变化, 其中 α 螺旋和无规则卷曲含量无明显变化, 而 β 折叠和 β 转角可互相转换。而随着腌制时间的延长pH值保持恒定, 蛋白质天然结构有所恢复, 二级结构含量与最初生蛋二级结构含量基本一致。

参考文献

- [1] 汪建国, 尤明泰. 糟蛋加工技艺和特征[J]. 中国酿造, 2010, 9:138-141
- [2] 汪建国. 浙江名特产-平湖糟蛋[J]. 江苏调味副食品, 2001, 1: 31-32
- [3] 孟成杰, 徐侃, 陈杰. 平湖糟蛋的理化特性及微生物安全性初探[J]. 中国家禽, 2010, 32(8):36-39
- [4] 季玲, 刘会平, 曹春玲, 等. 皮蛋风味物质的检测[J]. 现代食品科技, 2012, 28(12):233-237
- [5] 刘会平, 刘平伟, 张新源, 等. 减压快速糟制糟蛋. 中国发明专利. ZL201010586953.2, 2010.12.14
- [6] Wang F, Liu A P, Ren F Z, et al. FTIR analysis of protein secondary structure in cheddar cheese during ripening [J]. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi. 2011, 31(7): 1786-1789
- [7] Brckley C A, Auty M A E, Piraino P, et al. Journal of Food Science [M]. 1966
- [8] Croguennec T, Nau F, Brule G. Influence of pH and salts on egg white gelation [J]. Journal of food science, 2002, 67(2): 608-614
- [9] HANDE AT K K N. Heat-induced egg white gels as affected pH [J]. J Food Sci, 1998, 63(3):403-407
- [10] KITABATAKE N S A D E. Preparation of heat-induced transparent gels from egg white by the control of pH and ionic strength of the medium [J]. J Food Sci, 1988, 53(4): 1091-1095
- [11] Ternes W. Egg protein. In: Chemical and functional properties of food proteins (edited by Sikorski, Z. S.). Pp. 2001, 335-343. Boca Raton, US: CRC Press
- [12] 李晓东, 张兰威. 蛋品加工技术[M]. 化学工业出版社, 2005
- [13] Sun Y, Hayakawa S. Thermally induced aggregation in mixtures of α -lactalbumin with ovobumins from different avian species [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001, 49(5): 2511-2517