

基于胃液动态消化模型下 SPI 乳液酶解产物特性的研究

付笑飞, 管军军

(河南工业大学生物工程学院, 河南郑州 450001)

摘要: 本研究利用胃液动态消化模型, 探讨了大豆分离蛋白 (SPI) 乳液 (O/W 型和 W/O 型) 在胃液酶解消化过程中酶解产物的特性。显微镜检和粒径测定发现, 经酶解消化后, 乳液液滴逐渐发生分离、絮凝和结合现象, O/W 型液滴趋于逐渐变大, 而 W/O 型液滴趋于逐渐变小。乳液经胃液酶解消化后, 电位值均由胃液酶解前的负值变成正值, 且 O/W 型电位值逐渐降低, W/O 型电位值逐渐升高。说明强酸环境使乳液界面蛋白带电电荷残基发生变化, 导致了乳液表面电荷的稳定失衡。两者的游离氨基酸含量都呈先升高后降低的趋势, 小肽含量则是 O/W 型乳液先降低后升高, 而 W/O 型乳液始终呈升高趋势, 可推断, O/W 型乳液在酶解消化过程中存在二次乳化现象, W/O 型乳液没有。聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和双向电泳分析乳液蛋白组分变化均表明, 在胃液的酶解消化过程中, 11S 蛋白比 7S 蛋白更易酶解, 且其在 W/O 型乳液中比 O/W 型乳液中酶解更快, β 亚基不易酶解。双向电泳还表明, 7S 蛋白中偏碱性的亚基易酶解, 11S 蛋白中偏酸性的亚基易酶解。

关键词: 大豆分离蛋白; 乳液; 胃液动态消化模型; 胃蛋白酶; SDS-PAGE; 双向电泳

文章编号: 1673-9078(2017)7-56-62

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.7.009

Characteristics of the Enzymatic Hydrolyzates of Soybean Protein Isolate (SPI) Emulsion in the Dynamic Gastric Model

FU Xiao-fei, GUAN Jun-jun

(College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The characteristics of the enzymatic hydrolyzate of soybean protein isolate (SPI) emulsion (oil-in-water (O/W) and water-in-oil (W/O) type) in the process of gastric digestion were discussed by using the dynamic gastric model in this study. Microscopic examination and particle size determination showed that the uniformly distributed droplets were separated, flocculated, and combined gradually after being digested by the enzyme, and the liquid droplet size of O/W emulsion became larger, whereas that of the W/O emulsion became smaller. After the emulsion was digested by gastric juice, the potential values of emulsions changed from negative to positive; in addition, with the increase in the enzymatic hydrolysis time, the potential values of O/W emulsion and W/O emulsion gradually decreased and increased, respectively. This finding indicated that the strong acidic environment changed the charged protein residues at the emulsion interface, leading to an imbalance of the electric charges on the surface. The free amino acid contents of both emulsions and the content of small peptides of the O/W emulsion increased first and subsequently decreased, while the content of small peptides of W/O emulsion constantly increased. Therefore, it could be inferred that secondary emulsification occurred in the O/W emulsion but not in the W/O emulsion. Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and two-dimensional electrophoresis were used to analyze the changes in the protein composition of the emulsions. The results showed that 11S protein was more easily hydrolyzed by pepsin than 7S protein during the enzymatic hydrolysis and was hydrolyzed faster in W/O emulsion than in O/W emulsion, while β subunit was not easily hydrolyzed. Furthermore, two-dimensional gel electrophoresis showed that the partial basic and the partial acidic subunits of 7S and 11S protein, respectively, were easily hydrolyzed by pepsin.

Key words: soybean protein isolate; emulsion; dynamic gastric model; pepsin; sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE); two dimensional gel electrophoresis

收稿日期: 2016-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31371782); 河南省教育厅科学技术研究重点项目基础研究计划 (14A550007); 河南工业大学校基金基础研究重点培育计划 (2013JCYJ04)

作者简介: 付笑飞 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质化学

通讯作者: 管军军 (1975-), 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 蛋白质化学及蛋白资源的开发与利用

大豆分离蛋白(SPI)是多种蛋白质的混合物,根据溶液离心时的沉降系数不同可分为四种蛋白组分,分别为2S、7S、11S和15S组分。其中7S组分(β -伴大豆球蛋白)和11S组分(大豆球蛋白)的含量超过了80%^[1]。7S蛋白是包含 α' 、 α 和 β 三种亚基的晶体结构,而11S蛋白是一种包含酸性亚基A和碱性亚基B的六聚体。

大豆分离蛋白的组成、结构、变性情况及其主要成分7S和11S的聚集程度反应了它的功能性质。大豆分离蛋白有良好的溶解性、乳化性、凝胶性和发泡性。其中,它的溶解性与等电点有密切关系,7S蛋白的等电点^[2,3]为pH=4.8,11S蛋白的等电点为pH=6.4。另外,由于11S蛋白是由二硫键连接的稳定结构,7S蛋白缺乏二硫键,所以11S蛋白的乳化性和起泡性都远低于7S蛋白。大豆蛋白作为植物蛋白中最经典的蛋白质,在食品营养中的应用越来越广泛^[4],且近年来人们越来越注重营养油脂的健康,使得食品中脂肪含量降低又不失营养均衡变得极其重要。因此,对大豆蛋白在胃肠道消化中的研究也变得势在必行。

由于人体实验成本高,且有伦理争议,使得体外消化模型被越来越广泛地应用在食品和营养科学等领域,如用于研究食品成分在模拟胃肠道环境中的结构变化、消化率和释放率等等。国外已有研究者开发出多种关于食品应用的体外消化模型^[5],例如Hur S J和Lee S J等^[6]建立胃肠道体外模拟模型,研究了乳化液对方便面中脂质消化的影响;Capriotti Anna Laura和Caruso Giuseppe等^[7]研究了大豆种子和大豆乳蛋白在体外模拟消化道消化过程中产生的潜在生物活性肽的鉴定。然而,体外模拟的结果往往与体内模拟的结果不同,原因是想要准确模拟人和动物消化道内的理化性质和生理活动是非常困难的。因此,为了使体外模拟结果尽量精准,就要求体外模型与体内条件高度接近。

人体进食后,胃液分泌机制^[11]相当复杂,是一个动态过程,最重要的一个特点就是胃液分泌量与分泌速度受多种因素影响,并且随着消化时间的增加会改变。一般来说,可将胃液分泌的过程(约4 h内)大致分为三个阶段:头期、胃期和肠期。头期时,食物经过口腔进入食管后,随即从食管的切口流出体外,食物并未进入胃内,但却能引起胃液分泌。头期的胃液分泌特点是,量和酸度都较高,而胃蛋白酶的含量尤其高。胃期阶段中,胃液分泌速度快且量大。肠期指当胃中的食物随着消化时间的增加,部分进入小肠中后,胃部仍能分泌一定的胃液,但量少速度慢。近年来已知的消化模型大部分为静态模型,不能较好的

模拟胃液的动态分泌,少量的一些动态模型也不能很好的反映出胃液的分泌特点。而本研究则遵循人体胃部消化的生理特点,基于准确的人体胃部电解质浓度数据^[8],设计了一种体外胃液动态消化模型,来探讨大豆分离蛋白乳液(O/W型和W/O型)在胃液酶解消化过程中酶解产物的消化特性。

1 材料与方法

1.1 材料及设备

1.1.1 材料与试剂

黄豆,郑州市丹尼斯超市购;金龙鱼调和油,益海嘉里食品营销有限公司;胃蛋白酶,活性1000 NFU/mg,生工生物工程(上海)股份有限公司;2,4-二硝基氟苯(色谱纯),中国医药上海化学试剂公司;所用其它试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

FA 25 高剪切分散乳化机,德国FLUKO公司;E2695 高效液相色谱仪,美国沃特世;Thermo Heraeus Multifuge X1R 台式高速冷冻离心机,赛默飞世尔科技-实验室产品;FD-1 冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;ZS 90 纳米粒度及Zeta 电位分析仪,英国马尔文仪器有限公司;L-8900 日立全自动氨基酸分析仪,日立高新技术公司;JY600C 电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司;JY5000C 电泳仪,北京君意东方电泳设备有限公司,SHA-C 数显水浴恒温振荡器,金坛华峰仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 SPI 制备

依照文献^[9]方法:精选黄豆粉碎后过80目筛,用石油醚脱脂,所得脱脂豆粉加10倍蒸馏水置于磁力搅拌器上搅拌1 h,搅拌时用2 mol/L NaOH调节pH至8.0加速溶解,然后50℃水浴加热1 h,离心(9000 r/min)30 min。离心所得上清液用2 mol/L HCl调节pH至4.8后4℃过夜,次日再次离心(9000 r/min)30 min,取沉淀冷冻干燥即得SPI。

1.2.2 SPI 乳液的制备

依照文献^[10]方法适当改动制备SPI乳液:称取一定质量SPI分散于蒸馏水中后置于磁力搅拌器上搅拌2 h制得2 wt% SPI溶液,搅拌时用2 mol/L NaOH调节溶液pH至8.0加速溶解。将大豆油与SPI溶液混合(O/W型按1:4,W/O型按4:1),用高剪切分散乳化机乳化150 s,即得SPI乳液,此时乳液的SPI含量为2 wt%,O/W型乳液含油量为20 wt%,W/O型乳液含

油量为 80 wt%。

1.2.3 模拟胃液(Simulated Gastric Fluid, SGF) 的制备

SGF 由电解质溶液、胃蛋白酶、氯化钙和水组成, 其成分配制如表 1。SGF 母液电解质的量是模拟胃液 500 mL 所含的量, 这些电解质母液为 1.25 倍浓缩液, -20 °C 储存。加入胃蛋白酶、Ca²⁺ 和水导致最终消化液中正确的电解质浓度。配制时先按照表 1 中母液浓度配制 50 mL 母液电解质溶液, 按照母液体积添加于烧杯中, 添加蒸馏水至 400 mL, 用 4 mol/L HCl 调节溶液 pH 至 2.0, 最后定容至 500 mL。胃蛋白酶先不加, 建好胃液动态消化模型后取样前加入。

表 1 模拟胃液的配制

Table 1 Preparation of SGF

成分	母液浓度 /(g/L)	母液体积 /mL	SGF 中的浓度 /(mmol/L)
KCl	37.3	6.9	6.9
KH ₂ PO ₄	68	0.9	0.9
NaHCO ₃	84	12.5	25
NaCl	117	11.8	47.2
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30.5	0.4	0.1
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.5	0.5
HCl ^a		1.3	15.6
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	44.1	1.5(0.75 ^b)	0.15(0.075)

注: a, HCl 用来将溶液 pH 值调到 2.0; b, CaCl₂(H₂O)₂ 不加入到模拟胃液中, 括号内指 Ca²⁺ 在最终乳液与胃液混合液中的浓度。

1.2.4 胃液动态消化模型的建立

本模型依照人体胃部消化时胃液分泌特点, 大致将食物消化过程分成了三个阶段, 通过调节输液器滴速, 来模拟控制胃液分泌的速度和量。具体操作为: 取 SPI 乳液和模拟胃液各 100 mL, 胃蛋白酶 0.3 g, 先将 30 mL 胃液与全部乳液混合于 250 mL 锥形瓶并加入 0.1 g 胃蛋白酶, 同时将剩下的 70 mL 胃液与 0.2 g 胃蛋白酶混合于 100 mL 输液瓶中, 调节输液器滴速 (前 1.5 h 内滴速约 0.5 mL/min, 后 2.5 h 内滴速约 0.166 mL/min), 滴入锥形瓶, 定时取样。此过程中锥形瓶始终置于数显水浴恒温振荡器上, 并保持温度 37 °C、95 r/min^[12] 的转速持续摇动。取样后应立即进行相关指标测定。

1.2.5 乳液游离氨基酸和小肽的测定

游离氨基酸和小肽的测定按 GB/T 22492-2008 标准执行。样品先进行预处理 (4000 r/min, 离心 10 min 后去掉脂肪层), 然后调节 pH 至中性, 用 DNFB(2,4-二硝基氟苯) 衍生试剂, 形成稳定的黄色衍生物, 经

DNFB-AA 分析柱分离, 用氨基酸自动分析仪以外标法测定样品的游离氨基酸含量。而样品经三氯乙酸酸化后, 滤液中的酸溶蛋白质的含量减去游离氨基酸的含量即为小肽含量。

1.2.6 显微镜观察

取样完成后立即吸取 10 μL 样品均匀涂于载玻片上, 在 16×40 倍镜下观察乳液结构变化。

1.2.7 粒径分布及 Zeta 电位的测定

每个样品取好后, 立即将乳液稀释 100 倍 (0.1 mL 乳液+9.9 mL 蒸馏水), 取 1 mL 放入样品槽, 温度设定 25 °C。先测乳液粒径, 液滴的吸光度值为 0.001, 乳液的相对折射率为 1.095, 即大豆油 (1.456) 与水相 (1.33) 的折射率之比。再测乳液 Zeta 电位。整个测量过程中, 样品槽的温度保持不变。

1.2.8 SDS-PAGE 电泳分析

依照文献^[13,14] 进行电泳: 配制 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 上样 20 μL, 然后按电压 200 V, 功率 100 W, 电流浓缩胶 10 mA, 分离胶 30 mA 进行电泳, 电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250 染色液染色 5 h, 脱色用 10% 乙酸与 5% 乙醇混合液直至脱色完全。

1.2.9 基于 ISO-DALT (isoelectric focus-dalton weight) 系统的双向电泳分析

首先进行第一向等电聚焦电泳^[15], 利用等电点不同将 SPI 乳液中的蛋白组分分开。配制 5 mL 等电聚焦电泳凝胶 (2.75 g 尿素, 0.985 mL 蒸馏水, 1 mL、10% 的 TritonX-100, 0.665 mL 丙烯酰胺储液, pH 3~10 和 pH 5~7 的两性电解质各 84 μL, 10 μL、10% 的过硫酸铵, 3 μL TEMED), 灌胶后静置 1~2 h, 待胶凝固后添加电泳缓冲液 (上槽加 0.02 M NaOH 溶液, 下槽加 0.01 M H₃PO₄ 溶液), 按以下参数进行预电泳: 200 V 15min、300 V 15 min、400 V 30 min, 预电泳结束后上样, 样品需经裂解液 (9.5 M 尿素, 2% TritonX-100, 2% 两性电解质, 5% β-巯基乙醇) 处理, 上样完成后再覆盖 10 μL 覆盖液 (9 M 尿素和 1% 两性电解质), 然后依次按 400 V 3 h、800 V 13 h 和 1500 V 2 h 进行电泳。

等电聚焦电泳结束后, 取出胶条, 放入平衡液 (0.05 M 的 pH 6.8 Tris-HCl 缓冲液, 6 M 尿素, 20% SDS, 20% 甘油, 1% β-巯基乙醇) 中平衡 1~2 h, 后立即进行第二向 SDS-PAGE 电泳, 按电压 1500 V, 功率 100 W, 浓缩胶电流 40 mA, 分离胶 70 mA 进行。电泳结束后银染^[16]。

1.3 数据分析

各项测定指标测定次数应不少于 5 次, 取平均值

后用 SAS 统计学软件数据分析, $p \leq 0.05$ 时差异显著。

2 结果与讨论

2.1 乳液显微结构和粒径分布

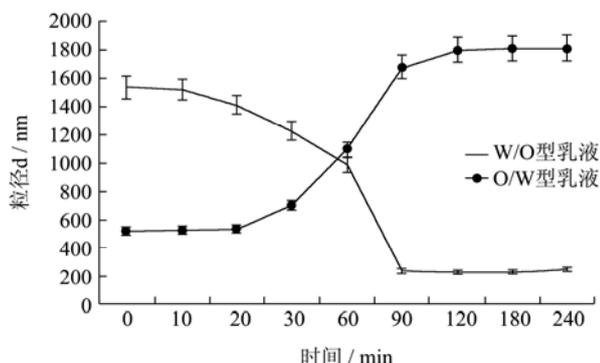


图 1 SPI 不同酶解时间乳液的粒径变化

Fig.1 Changes in the particle size of SPI emulsions with different enzymatic hydrolysis times

注: 误差线表示标准偏差。

图 2a1 为 O/W 型 SPI 乳液酶解前的显微结构图, 可以看出, 乳液液滴分布较均匀, 有将近 94%液滴粒径都在 104.90 ± 0.70 nm 之间, 但经胃液酶解后液滴粒径发生了显著变化: 整体平均粒径在消化 120 min 内呈近似线性增长 ($p < 0.05$), 在 120 min 至 240 min 趋于平缓 (图 1)。其中, 酶解 90 min 时, 乳液在胃液作用下不断破乳、水解, 乳液稳定性变差, 原样中的小液滴开始出现絮凝、结合, 平均粒径整体增大。酶解 120 min 时乳液继续破乳、水解, 更多的小液滴不断絮凝、结合, 液滴平均粒径继续增加, 达到了 380.3 ± 0.3 nm。而到 240 min 时, 有少量粒径大于 $5 \mu\text{m}$ 的液滴出现。

W/O 型乳液中, 乳液液滴粒径在 90 min 内逐渐减小, 90 min 到 240 min 内趋于平缓 (图 1)。图 2b1 显示, W/O 型 SPI 乳液液滴平均粒径偏大, 达到 307.1 ± 0.3 nm, 是 O/W 型乳液的近两倍。酶解 90 min 时, 液滴粒径就减小到 47.28 ± 0.3 nm, 说明 W/O 型 SPI 乳液在胃液作用 90 min 内, 乳液稳定性变差, 急速破乳、水解, 液滴发生大范围分离。酶解 120 min 时, 乳液平均粒径继续减小, 但有少量粒径大于 $10 \mu\text{m}$ 的液滴出现。图 2b4 是 W/O 型 SPI 乳液经胃液酶解消化 240 min 时, 可以看出与酶解 120 min 时变化不大, 说明乳液破乳、水解的速度并没有加快。

O/W 型乳液和 W/O 型乳液, 两者均在胃液的酶解消化过程中出现液滴分离、絮凝和结合现象, 且 O/W 型乳液酶解过程中液滴的絮凝和结合现象远远大于分离现象, W/O 型乳液酶解过程则是分离现象占

主导地位。因此, O/W 型乳液更倾向于液滴逐渐变大的过程, 而 W/O 型乳液则是液滴逐渐变小的过程。

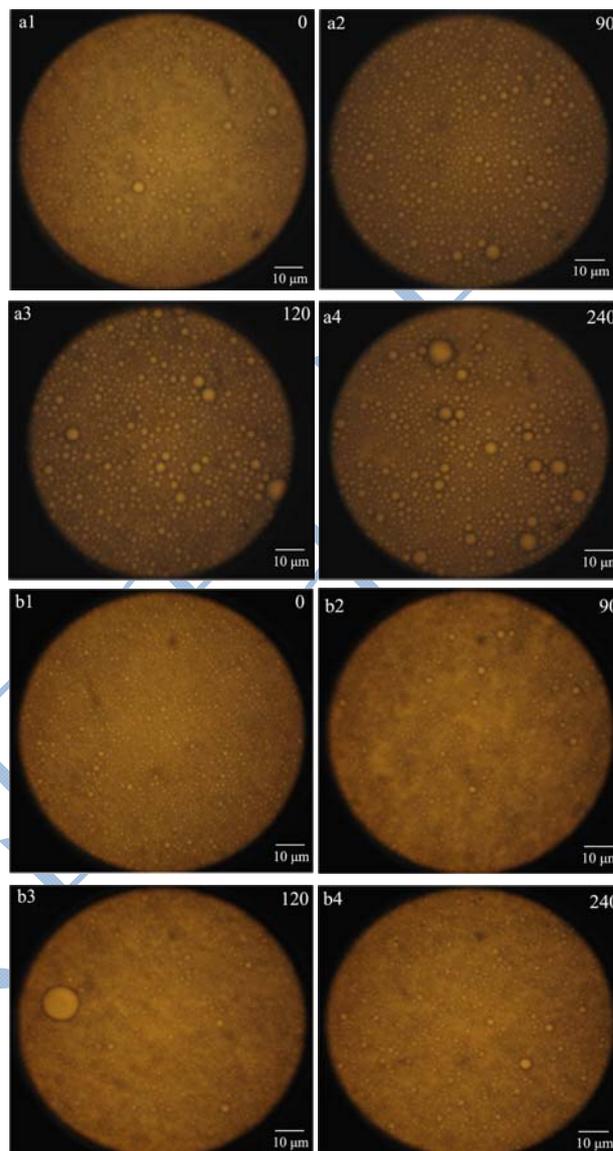


图 2 SPI 不同酶解时间乳液的显微结构

Fig.2 Changes in the microstructure of SPI emulsions with different enzymatic hydrolysis times

注: a 表示 O/W; b 表示 W/O; 0、90、120 和 240 表示酶解时间, min。

2.2 乳液的 Zeta 电位

图 3 显示, 乳液经胃蛋白酶消化前即 pH 为 7.0 时, O/W 型乳液的 Zeta 电位为 -44.7 mV, W/O 型乳液的 Zeta 电位为 -45.5 mV。经胃蛋白酶酶解后, 乳液的 Zeta 电位值变为正值, 酶解 10 min 后, O/W 型乳液的 Zeta 电位达到了 43.6 mV, W/O 型乳液的 Zeta 电位为 44.2 mV。酶解 240 min 的过程中 O/W 型乳液的电位值逐渐降低, W/O 型乳液的电位值逐渐升高。乳液经胃蛋白酶酶解后, 强酸环境显著影响了

乳液稳定性($p < 0.05$),胃蛋白酶作用于乳液界面蛋白,使界面蛋白一些带电电荷残基发生损失,从而导致了乳液表面电荷稳定失衡,带电荷量改变,稳定性变差。界面蛋白水解产生的小肽会降低界面粘度,减弱蛋白对乳液的稳定作用,导致乳液液滴发生分离、絮凝和结合,进而导致乳液表面电荷的稳定失衡。粒径测定表明,经酶解后,O/W型乳液液滴粒径逐渐变大,W/O型乳液液滴粒径逐渐变小,这说明O/W型乳液中带电液滴之间排斥力小于相互吸引的范德华力,使得液滴逐渐絮凝、结合,而排斥力越小,带电荷越少,从而导致O/W型乳液Zeta电位也逐渐降低。相反,W/O型乳液液滴逐渐变小,说明其带电液滴间的排斥力大于吸引力,使液滴带电荷越来越多,乳液Zeta电位也逐渐升高。

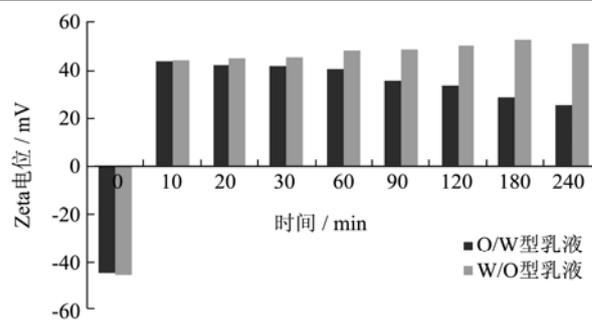


图3 SPI不同酶解时间乳液的Zeta电位

Fig.3 Zeta potential values of SPI emulsions with different enzymatic hydrolysis times

注:误差线表示标准偏差。

表2 SPI不同酶解时间乳液的游离氨基酸及小肽含量

Table 2 Amounts of free amino acids and small peptides in SPI emulsions with the different enzymatic hydrolysis times

		0 min	90 min	240 min
O/W	游离氨基酸总量/($\times 10^{-2}$ mg/g)	127.85 \pm 0.16	144.88 \pm 0.25	113.72 \pm 0.17
	肽/%	1.01 \pm 0.23	0.59 \pm 0.19	0.82 \pm 0.30
W/O	游离氨基酸总量/($\times 10^{-2}$ mg/g)	186.07 \pm 0.20	313.34 \pm 0.33	264.14 \pm 0.28
	肽/%	0.02 \pm 0.15	0.65 \pm 0.24	0.82 \pm 0.26

2.3 乳液蛋白成分变化

2.3.1 游离氨基酸及小肽含量

O/W型乳液和W/O型乳液两者经胃液酶解消化后,乳液不断破乳,肽键断裂,蛋白被逐渐水解为小分子游离氨基酸和小肽。两者游离氨基酸的含量在90 min内均不断升高,但在240 min时降低。这是由于测游离氨基酸和小肽含量前,需要先对样品进行预处理即离心,离心导致乳液破乳,酶解生成的小肽分子量比游离氨基酸大且有一定粘度,更易附着于蛋白膜上,使得生成的部分游离氨基酸游离不出来,导致游离氨基酸含量240 min时降低。小肽含量则是O/W型乳液先降低后升高,而W/O型乳液始终呈升高趋势。由于SPI特殊结构,O/W型乳液较W/O型乳液相对稳定,随着乳液不断的破乳水解,O/W型乳液中,已水解的部分蛋白可能会重新与油滴乳化,形成蛋白膜,降低破乳速度,导致其小肽含量在90 min时降低。因此,O/W型乳液在酶解过程中可能出现二次乳化现象,而W/O型乳液中没有。

2.3.2 SDS-PAGE电泳

SPI乳液(O/W型和W/O型)在胃液酶解消化过程中不同蛋白组分发生了不同变化(图4)。从图中可以看出,两者7S(α' 亚基)蛋白和11S蛋白谱带颜色逐渐变浅、消失,说明乳液在胃液酶解作用下,蛋

白被逐渐水解,肽键断裂,形成小分子肽,直到水解完全。其中,O/W型乳液的11S蛋白在90 min时几乎被酶解完全,而W/O型乳液的11S蛋白在第10 min时谱带就基本已经消失,被酶解成小分子组分。7S蛋白的 β 亚基谱带240 min时依然存在,不易酶解。由于7S蛋白分子量小,且其表面疏水性强于11S蛋白^[17],当在W/O型乳液中时,7S蛋白表面迅速聚集大量油滴,11S蛋白表面油滴较少,导致胃蛋白酶剪切11S蛋白时的阻力比7S蛋白小很多,使得11S蛋白更易被酶解;测定经酶解后两种乳液的粒径和Zeta电位发现,O/W型乳液在酶解消化过程中液滴粒径逐渐变大,Zeta电位值降低,W/O型乳液液滴粒径变小,Zeta电位值升高,这一变化使得O/W型乳液整体表面积减小,W/O型乳液整体表面积增大,W/O型乳液与胃蛋白酶活性位点结合逐渐增多,也导致W/O型乳液酶解更快;另外,田琨^[18]等人曾研究发现,7S球蛋白中精氨酸、赖氨酸和组氨酸的总含量比11S球蛋白中的多,而11S球蛋白中亮氨酸与苯丙氨酸的总含量则远远高于7S球蛋白。胃蛋白酶由于其特殊结构使其在对蛋白质或多肽进行剪切时,具有一定的氨基酸序列特异性,即它更倾向于剪切氨基端或羧基端为芳香族氨基酸(如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)或亮氨酸的肽键,而如果某一肽键氨基端为碱性氨基酸(如赖氨酸和组氨酸)或精氨酸时,则不能有效剪切,这种剪切特异

性尤其在强酸性环境下表现更为明显,这一特点也导致 11S 蛋白更易被剪切。因此,乳液在胃液的酶解消化过程中,11S 蛋白比 7S 蛋白更易酶解,且其在 W/O 型乳液中比 O/W 型乳液中酶解更快。

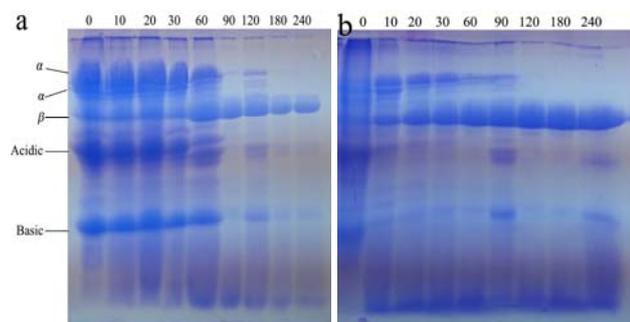


图4 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE electrophoresis patterns

注: a 表示 O/W 型; b 表示 W/O 型; 0、10、20、30、60、90、120、180 和 240 表示乳液酶解时间, min。

2.3.3 双向电泳

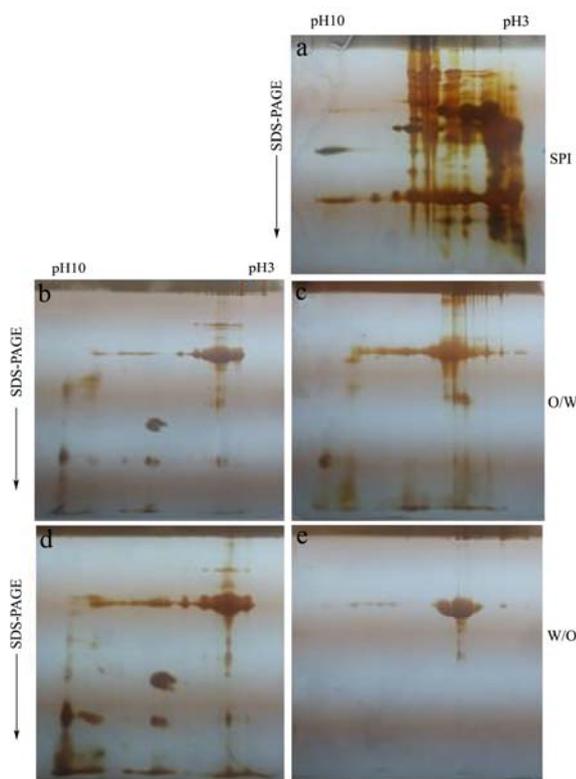


图5 SPI 不同酶解时间乳液的双向电泳图

Fig.5 Two dimensional gel electrophoresis pattern of SPI emulsions with different enzymatic hydrolysis times

注: a 表示 SPI; b 和 d 表示 90 min; c 和 e 表示 240 min; b 和 c 表示 O/W; d 和 e 表示 W/O。

图 5a 为 SPI 电泳图。随着酶解时间的增加,蛋白点逐渐减少。整体来看,7S 蛋白点较 11S 蛋白点减少的慢,酶解 240 min 时,O/W 型(图 5c)乳液中,7S 蛋白只剩下 β 亚基,11S 蛋白还有少量碱性亚基,W/O

型(图 5e)乳液中,除了 β 亚基,其余全被酶解。表明 11S 蛋白比 7S 蛋白易酶解,且其在 W/O 型乳液比 O/W 型乳液中酶解更快。另外,整体来看,随着酶解时间的增加,乳液中偏酸性的亚基(pH 3 附近)斑点减少的快,偏碱性的(pH 10 附近)亚基斑点减少缓慢,表明乳液中偏酸性的亚基较偏碱性的亚基易酶解。其中,两者乳液 7S 蛋白中偏碱性的亚基斑点酶解 90 min(图 5b 和 5d)时,几乎就完全消失,表明其易酶解。而 11S 蛋白中则是偏酸性的亚基斑点减少快,偏碱性的亚基斑点减少缓慢,11S 蛋白中的酸性亚基较碱性亚基易酶解。

3 结论

3.1 SPI 乳液液滴分布均匀,在胃液(37 °C, pH 2.0)酶解消化作用下,液滴发生分离、絮凝和结合现象,O/W 型液滴趋于逐渐变大,而 W/O 型液滴趋于逐渐变小。

3.2 胃液的强酸环境使乳液的表面电荷稳定失衡,Zeta 电位由负值变为正值,且 O/W 型乳液电位值逐渐降低,W/O 型乳液电位值逐渐升高。

3.3 O/W 型乳液,在胃液的酶解消化过程中可能存在二次乳化现象,W/O 型乳液不存在。

3.4 胃蛋白酶的酶解作用使乳液界面蛋白成分发生改变,乳液游离氨基酸和小肽含量均发生改变,11S 蛋白比 7S 蛋白更易酶解,且其在 W/O 型乳液比 O/W 型乳液中酶解更快, β 亚基不易酶解;7S 蛋白中偏碱性的亚基易酶解,11S 蛋白中偏酸性的亚基易酶解。

参考文献

- [1] Nishinari K, Fang Y, Guo S, et al. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 301-318
- [2] Maruyama N, Sato R, Wada Y, et al. Structure-physicochemical function relationships of soybean beta-conglycinin constituent subunits [J]. Agric. Food Chem., 1999, 47(12): 5278-5284
- [3] Iwabuchi S, Yamauchi F. Knockdown of the 7S globulin subunits shifts distribution of nitrogen sources to the residual protein fraction in transgenic soybean seeds [J]. Agric. Food Chem., 1987, 35: 205-209
- [4] 李昂,张华江.大豆分离蛋白在食品中的应用与前景[J].食品研究与开发,2016,37(1):202-204
- LI Ang, ZHANG Hua-jiang. Application and prospect of soybean protein isolate in food [J]. Food Research and Development, 2016, 37(1): 202-204

- [5] Hur Sun Jin, Lim Beong Ou, Decker Eric A, et al. *In vitro* human digestion models for food applications [J]. Food Chemistry, 2011, 12(5):1-12
- [6] Hur S J, Lee S J, Lee S Y, et al. Effect of emulsifiers on microstructural changes and digestion of lipids in instant noodle during *in vitro* human digestion [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 60: 630-636
- [7] Capriotti Anna Laura, Caruso Giuseppe, Cavaliere Chiara, et al. Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2015, 44: 205-213
- [8] Minekus M, Alving M, Alvito P, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food an international consensus [J]. Food Function, 2014, 5(6): 1113-1124
- [9] QI M, Hettiarachchy N S. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin [J]. J. Food Sci., 1997, 62(6): 1110-1115
- [10] 李欣荣,唐传核.大豆分离蛋白包埋特性的研究[J].现代食品科技,2012,28(6):617-621
LI Xin-rong, TANG Chuan-he. Research of encapsulation properties of soy protein isolate [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(6): 617-621
- [11] Saladin Kenneth S. Anatomy & physiology the unity of form and function [M]. Dubuque: IA: McGraw-Hill, 2007
- [12] Beysseriat M, Decker E A, McClements D J. Preliminary study of the influence of dietary fiber on the properties of oil-in-water emulsions passing through an *in vitro* human digestion model [J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20(6): 800-809
- [13] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999
GUO Yao-jun. Protein electrophoresis technology [M]. Beijing: Science Press, 1999
- [14] Brush M. Dye hard: protein gelstaining products [J]. Science, 1998, 12: 16-22
- [15] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(10): 4007-4021
- [16] Switzer R C III, Merrill C R, Shifrin S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels [J]. Anal. Biochem., 1979, 98: 231-237
- [17] 陈海敏,华欲飞.大豆蛋白组成与功能关系研究[J].西部粮油科技,2001,26(3):36-38
CHEN Hai-min, HUA Yu-fei. Structure-function relationships of soybean protein [J]. Western Grain and Oil Science and Technology, 2001, 26(3): 36-38
- [18] 田琨,管娟.大豆分离蛋白结构与性能[J].化学进展,2008, 20(4):565-573
TIAN Kun, GUAN Juan. Structural and functional study of soybean protein isolation [J]. Progress in Chemistry, 2008, 20(4): 565-573