

超声波-酶法联合改性提高酸性条件下大豆分离蛋白的乳化性能

李婷婷¹, 赵彩红¹, 王嘉熙², 郝建敏¹, 于冬蕾¹, 房媛媛¹, 朱秀清^{1,3}

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030) (2. 中国矿业大学信电学院, 江苏徐州 221116)

(3. 东北农业大学, 国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 为了研究超声波联合酶技术提高大豆分离蛋白(Soybean Protein Isolated, SPI)在酸性条件下(pH 4)乳化性能的效果, 本文以大豆分离蛋白为原料, 以乳化性能和乳状液粒径为衡量指标, 确定超声波联合植酸酶-酸性蛋白酶(Ultrasonication combined with phytase-acidic protease, Uphy-aci)改性方法的最适宜条件。研究发现, 当SPI浓度6%, 植酸酶添加量4 U/g, 酸性蛋白酶添加量1500 U/g, 植酸酶与酸性蛋白酶的酶解时间分别为50 min和30 min时, 改性后的SPI(pH 4)乳化性能明显增加, 乳状液粒度减小; 通过表面疏水性(H_0)和扫描电镜(SEM)分析了超声波-酶复合改性处理的SPI, 发现在酸性条件下, SPI表面疏水性含量为487.78, 比未改性提高了71.2%, 并呈现破碎均一、多孔的微观结构。因此, 超声波与植酸酶-酸性蛋白酶联合改性提高酸性条件下SPI的乳化特性等功能性质, 并且拓宽了大豆分离蛋白的应用领域。

关键词: 大豆分离蛋白; 超声波; 酶解; 乳化性能

文章编号: 1673-9078(2016)10-190-197

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.029

Enhancing the Emulsifying Properties of Soybean Protein in Acidic Conditions by Ultrasound-enzymatic Modification

LI Ting-ting¹, ZHAO Cai-hong¹, WANG Jia-xi², HAO Jian-min¹, YU Dong-lei¹, FANG Yuan-yuan¹, ZHU Xiu-qing^{1,3}

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

(2. School of Information and Electrical Engineering, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221116, China)

(3. The National Research Center of Soybean Engineering and Technology, Harbin 150030, China)

Abstract: In order to study the effect of ultrasound-enzymatic modification on the emulsifying properties of soybean protein isolate (SPI) under acidic conditions (pH 4), SPI was used as the raw material in this study. The emulsifying properties and particle sizes were used as evaluating indices to determine the optimum conditions for the modification method using ultrasound combined with phytase-acidic protease (Uphy-aci). The results showed that, when the SPI concentration was 6%, the amount of phytase was 4 U/g, that of the acid protease was 1500 U/g, and the durations of enzymatic hydrolyses using phytase and acidic protease were 50 min and 30 min, respectively. The emulsion performance was significantly increased and the size of the emulsion particles decreased. The surface hydrophobicity, H_0 , and the scanning electron microscope (SEM) were used to analyze the structure of SPI under the optimal Uphy-aci conditions. The surface hydrophobicity of SPI was 487.78 under acidic conditions and was enhanced by 71.2% compared to that of the unmodified sample. Moreover, SPI presented a homogeneous and porous microstructure. Therefore, the ultrasound-enzymatic modification method can effectively improve the emulsifying properties and functional properties of SPI in acidic conditions, and expand the applications of SPI.

Key words: soybean protein isolate; emulsifying properties; ultrasound; enzymolysis

收稿日期: 2016-01-04

基金项目: 国家科技支撑项目(大豆产业链共性关键技术创新与示范)
(2014BAD22B01)

作者简介: 李婷婷(1990-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白工程

通讯作者: 朱秀清(1968-), 女, 研究员, 研究方向: 大豆精深加工

SPI是一种重要的植物蛋白质产品, 其蛋白质含量达到90%以上, 同时还具有多种良好的功能特性, 如: 溶解性、乳化性、发泡性、凝胶性、吸水性等^[1,2]。乳化性是SPI运用于食品工业的一种重要功能性质, 将其应用于肉制品、乳制品、饮料制品及面制品中, 可以达到改善产品的品质和理化性能的目的^[3]。但是,

天然的 SPI 的乳化性不能很好的满足生产加工的需求,特别是在酸性环境下,蛋白溶液易形成不溶性蛋白聚集体,导致在油水界面吸附能力减弱,油包水平衡状态被打破,致使乳化能力降低,从而影响食品品质,限制大豆分离蛋白在某些产品(如酸性饮料、色拉酱等)中的应用。因此,常常对 SPI 进行改性处理以提高和强化其乳化特性。

酶法改性由于反应条件温和、安全无毒副作用,在改善蛋白功能性质上的应用屡见不鲜。但是大豆蛋白分子高度压缩,结构紧密,对蛋白酶的酶解作用具有很强的抵抗力^[4,5]。因此要加速酶解速度,提高大豆蛋白水解,就必须对大豆蛋白进行预处理,使其高度紧密的结构松散开,暴露分子内部的酶作用位点。近几年,超声波前处理被证实可以有效的促进酶解反应。Jia 等^[6]发现经过超声预处理后小麦胚芽蛋白能在相同的酶与底物比例和酶解时间下,达到更高的水解度,而且联合改性产物的 ACE 抑制活性比单纯酶解改性产物的好。超声波作用使蛋白分子发生了机械性振荡,破坏了蛋白分子的空间结构^[7],使蛋白分子部分展开,更多的酶结合位点被暴露出来,利于与酶的结合。

本研究选用超声波联合酶法复合改性技术提高 SPI 在酸性条件下(pH 4)的乳化性能,首先利用超声处理产生的空化效应破坏蛋白空间结构^[8],暴露出更多的酶结合位点,再通过酶的限制性水解技术^[9],催化水解 SPI,改善了酸性条件下 SPI 乳化性能,缩短酶解时间。进一步通过对改性后的 SPI 进行疏水性和扫描电镜验证,分析了在酸性条件下不同改性方法对 SPI 结构的影响。

1 材料与方法

1.1 原料

大豆分离蛋白,黑龙江哈高科大豆食品有限责任公司;大豆色拉油,九三集团哈尔滨惠康食品有限公司;胰蛋白酶,北京 Solarbio 科技有限公司;木瓜蛋白酶,北京奥博星生物技术有限责任公司;菠萝蛋白酶、酸性蛋白酶,上海金穗生物科技有限公司;植酸酶 9001-89-2,上海田源生物技术有限公司。

1.2 主要仪器设备

JY92-11N 超声细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;荧光分光光度计, F-4500 日立 Hitachi 公司; TU-1901 双光束紫外分光光度计,北京普希通用仪器有限责任公司; FEI QUNATA 200 环境扫描电镜,美国 FEI 公司; SCD 005 高真空离子溅射镀膜机,

芬兰 BAL-TEC 公司; Mastersizer 2000 激光粒度分析仪,英国 Malvern Instrument 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酶制剂的选择

配制一定浓度的 SPI 溶液,进行超声处理,经过预实验,确定最佳超声功率 350 W,超声时间 30 min。经过超声处理的 SPI 溶液分别加入五种酶,分别为:植酸酶(phy)、酸性蛋白酶(aci)、菠萝蛋白酶(bro)、木瓜蛋白酶(pap)、胰蛋白酶(try);在其最适温度、最适 pH(如表 1)及相同的酶活添加量、酶解时间条件下(预实验最佳的酶活和酶解时间),测定 SPI 在 pH 4 时的乳化能力和乳状液粒径。

表 1 不同酶的最适 pH 和最适温度

Table 1 Optimum pH and temperature of different enzymes

	植酸酶	酸性蛋白酶	菠萝蛋白酶	木瓜蛋白酶	胰蛋白酶
最适 pH	5	3	7	7	8
最适温度/℃	50	40	55	50	40

超声波联合植酸酶-酸性蛋白酶(Uphy-aci)复合改性方法的具体步骤:将超声波处理的 SPI 溶液调至 pH 5,加入一定量的植酸酶,50℃震荡水浴锅中反应一定时间,在沸水浴中灭酶,冷水冷却;再将调至 pH 3,加入一定量的酸性蛋白酶,40℃震荡水浴锅中反应一定时间,沸水浴中灭酶,冰水浴迅速冷却至室温,进行乳化性能和乳状液粒径的测定(预实验最佳的复合酶)。

1.3.2 超声波联合植酸酶-酸性蛋白酶复合改性研究

1.3.2.1 SPI 浓度对改性后 SPI 乳化性能和乳状液粒径的影响

SPI 浓度分别为 2%、4%、6%、8%、10%、12% 时,考察 SPI 浓度对改性后 SPI 的乳化活性(emulsifying activity index, EAI)、乳化稳定性(emulsifying stability index, ESI)和乳状液粒径的影响。

1.3.2.2 植酸酶添加量对改性后 SPI 乳化性能和乳状液粒径的影响

植酸酶添加量分别为 1 U/g、2 U/g、3 U/g、4 U/g、5 U/g,考察植酸酶添加量对改性后 SPI 的 EAI、ESI 和乳状液粒径的影响。

1.3.2.3 酸性蛋白酶添加量对改性后 SPI 乳化性能和乳状液粒径的影响

酸性蛋白酶添加量分别为 0 U/g、600 U/g、900 U/g、1200 U/g、1500 U/g、1800 U/g,考察酸性蛋白酶添加量对改性后 SPI 的 EAI、ESI 和乳状液粒径的

影响。

1.3.2.4 植酸酶的酶解时间对改性后 SPI 乳化性能和乳状液粒径的影响

植酸酶的酶解时间分别为 10 min、30 min、50 min、70 min、90 min，考察植酸酶酶解时间对改性后 SPI 的 EAI、ESI 和乳状液粒径的影响。

1.3.2.5 酸性蛋白酶的酶解时间对改性后 SPI 乳化性能和乳状液粒径的影响

酸性蛋白酶的酶解时间分别为 10 min、30 min、50 min、70 min、90 min，考察酸性蛋白酶的酶解时间对改性后 SPI 的 EAI、ESI 和乳状液粒径的影响。

1.3.3 乳化能力的测定

EAI 和 ESI 的测定按 Pearce^[10]的方法测定，取一定体积浓度为 0.5% 的蛋白溶液用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 调整 pH 值至 4，并与大豆色拉油以 3:1 比例混合，以 10000 r/min 均质 1 min，分别在 0 min、10 min 从溶液底部取样，所得的乳状液以 0.1% SDS 稀释 100 倍，以 SDS 溶液为空白，测定 500 nm 处的吸光度值，以 0 min 的吸光度值(A_0)表示 EAI，ESI 计算公式为：

$$ESI = \frac{A_0 \times \Delta T}{\Delta A}$$

注： A_0 ，0 时刻的吸光值； ΔT ，时间差 (min)； ΔA ， ΔT 内的吸光值差。

1.3.4 乳状液粒度测定

(1) 乳状液的制备：将不同改性处理的蛋白溶液的体积浓度调为 0.5%，与大豆色拉油，以 3:1 比例混合，用高速均质机均质 1 min，立即从溶液底部取样，即为乳状液。

(2) 乳液粒度的测定：乳状液样品的粒度分布采用 Malvern 激光粒度分析仪测定。体积平均粒径(d_{43})常用于检测乳状液的粒径变化。

1.3.5 扫描电镜 (SEM) 分析

参考 Jourdain^[11]方法。对蛋白溶液进行冷冻干燥，粉碎。用 Sputter Coating SCD005 高真空离子溅射镀膜机在样品表面镀上一层金属膜。将处理好的样品放入样品盒中，采用 FEI QUNATA 200 环境扫描电镜对样品的微观结构分析。

1.3.6 表面疏水性 (H_0) 测定

参考 Kato^[12]方法。采用 ANS 荧光探针法测定。设置荧光光度仪的参数：激发波长 λ_{ex} 设为 370 nm，发射波长 λ_{em} 设为 470 nm，夹缝设为 5 nm。以所测的荧光值为纵坐标，蛋白质浓度为横坐标作图，初始段斜率即为表面疏水性指数。

1.3.7 数据统计分析

应用 SPSS 17.5、Origin 8.0 和 SPSS Statistics 17.0

对实验数据进行统计分析和作图，数据用平均值±标准偏差表示，样品平均值之间的差异显著性 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 超声-酶制剂的选择

2.1.1 不同酶制剂对 SPI 乳化性能的影响

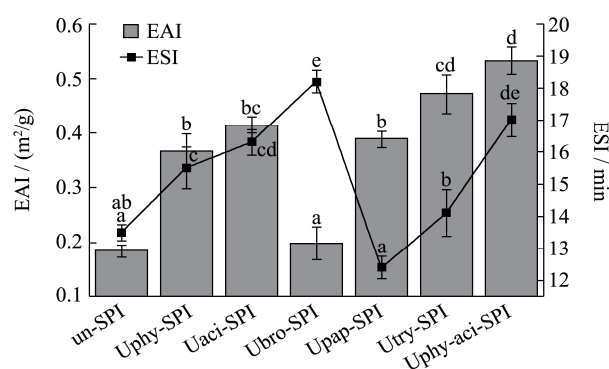


图1 超声与不同酶制剂对 SPI 的 EAI 和 ESI 的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic treatment coupled with different enzymes on the emulsifying activity index(EAI) and emulsifying stability index (ESI) of SPI

如图 1 所示，在超声波联合酶法复合改性研究中，Uphy-aci-SPI 的 EAI (0.53 m²/g) 最佳，Uphy-aci-SPI 比未改性 SPI 的 EAI (0.18 m²/g) 提高了 194%。乳化稳定性方面分析表明，Ubro-SPI 改性后的 ESI (18.2 min) 最高，比未改性 SPI (13.5 min) 提高 34.8%；Uphy-aci-SPI 的 ESI (17 min) 比未改性的提高 25.9%，但 Uphy-aci-SPI 与 Ubro-SPI 改性后的 EAI 差异不显著 ($p > 0.05$)。超声波前处理使蛋白分子的空化效应、机械剪切等作用提高，致使蛋白结构舒展，暴露出更多酶结合位点，有利于蛋白与酶的结合，改善乳化性能。郭睿等^[13]测定了不同酶处理条件下蛋白的水解度，先用植酸酶处理再用酸性蛋白酶处理后蛋白的水解度增大，认为可能是由于植酸酶的处理使蛋白的酶切位点部分暴露，增强了蛋白酶的酶解作用，并且植酸酶可以降解蛋白中的植酸，使更多的蛋白质释放出来^[14]，扩大了可溶性蛋白在油水界面的吸附作用，从而使乳化性能得以提高。综合考虑，Uphy-aci-SPI 乳化效果最好，选择 Uphy-aci 改性方法进一步研究。

2.1.2 不同酶制剂对 SPI 粒度的影响

图 2 为超声与不同酶制剂的 SPI 乳状液的粒径变化。未改性 SPI 的乳状液最高峰值为 178.25 μm，且分布范围广，即从 0.40 μm 起到 502.38 μm 终止，可见酸性条件下乳状液粒度较大，容易聚沉，不利于乳状液的稳定，这与 Teng^[15]的研究报道一致。超声波联合酶改性中，Ubro-SPI 改性后粒径的峰值 (251.79 μm)

较大,其他改性处理 SPI 的粒度都较小,可能是由于大豆蛋白高度结构化,形成紧密的结构,含有的不规则结构占一半以上,这种紧密的构造使得木瓜蛋白酶水解困难。Uphy-aci-SPI 粒径的峰值为 44.77 μm ,乳状液粒度最小,油与蛋白溶液能够较好的交融,由此验证了 Uphy-aci-SPI 乳化性能效果好的原因。

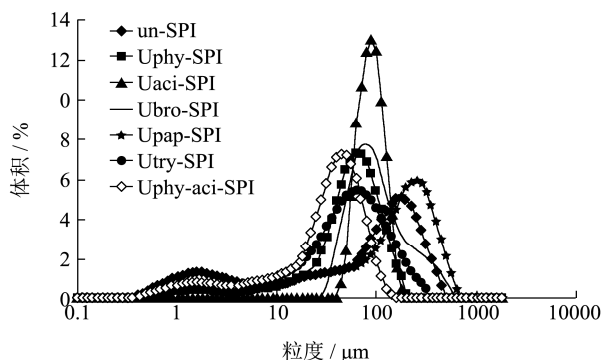


图2 超声与不同酶制剂改性对 SPI 粒度的影响

Fig.2 Effect of ultrasonic treatment coupled with different enzymes on the particle size of SPI

2.2 超声波联合植酸酶-酸性蛋白酶复合改性研究

2.2.1 SPI 浓度对改性 SPI 乳化性能和乳状液粒度的影响

由图 3 可知,随着 SPI 浓度的增加,SPI 溶液的 EAI 和 ESI 呈先上升后逐渐降低的趋势。SPI 浓度为 6%时 EAI 为 0.58 m^2/g ,比未改性 SPI 的 EAI 提高 222%。当 SPI 浓度过低(2%~4%)时,酶与蛋白接触机会少,反应速度慢,乳化性改善不明显,适度增加底物浓度(6%~8%)有利于反应的进行,提升乳化性能。乳化稳定性方面,SPI 浓度为 10%时 ESI (16.7 min)最高,比未改性 SPI 的 ESI 增加 23.7%。当 SPI 浓度为 12%时,ESI 和 EAI 都下降,可能由于 SPI 浓度较大时,蛋白质间易交联聚合,减少了酶与蛋白的碰撞机会,导致乳化性能降低。

粒度分布图4所示,SPI浓度为2%、4%、6%、8%,对应的粒度分别为126.19 μm 、44.77 μm 、39.91 μm 、50.24 μm ,说明在低蛋白浓度条件下,不溶性蛋白聚集体可以被破碎完全,使溶液中蛋白颗粒粒径减小,有利于在分散液中均匀分布,增大与水溶液的接触面积,使水合作用增强^[6]。SPI浓度的过度增加,如10%对应的粒度为70.96 μm 、12%的粒度为178.25 μm ,粒度则会变大,可能由于随着蛋白分子的增加,多余的部分不能被酶分解成小分子,总体表现为粒度变大的趋势。蛋白浓度为6%时,EAI提高了222%,ESI不是

最高值,但与未改性SPI的ESI具有显著性差异($p < 0.05$),粒度为39.91 μm ,综合考虑,在后续的研究中,SPI浓度为6%。

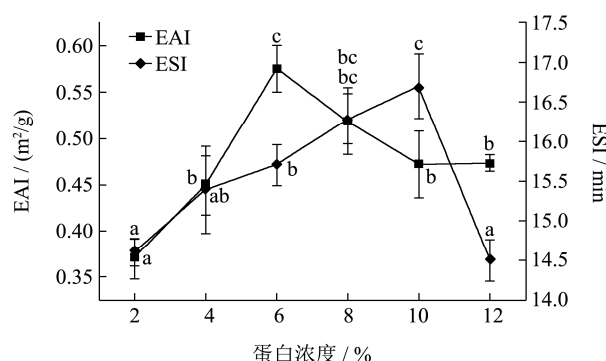


图3 SPI 浓度对改性 SPI 的 EAI 和 ESI 的影响

Fig.3 Effect of SPI concentration on the emulsifying activity index (EAI) and emulsifying stability index (ESI) of modified SPI

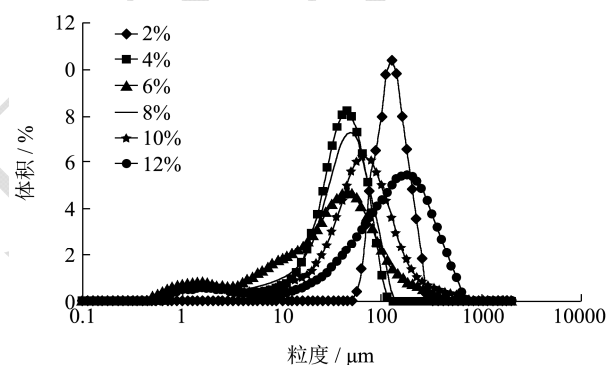


图4 蛋白浓度对改性 SPI 粒度的影响

Fig.4 Effect of SPI concentration on the particle size of modified SPI

2.2.2 植酸酶添加量对改性 SPI 乳化性能和乳状液粒度的影响

图 5 所示,添加植酸酶进行水解反应后改性 SPI 的 EAI 和 ESI 值显著提升,植酸酶添加量为 4 U/g 时,改性 SPI 的 EAI 值最高(0.54 m^2/g),比未改性 SPI 提高 200%;植酸酶添加量为 3 U/g 时,改性 SPI 的 ESI 效果最好(16.9 min),比未改性 SPI 提高 25.2%。SPI 经植酸酶分解后,断裂成多肽和小分子短链物质,一些包埋于蛋白质内部的疏水性残基暴露出来,有利于其向油-水界面扩散,降低界面张力,乳化功能得到改善。当植酸酶添加量增大到一定程度,由于低分子肽片段过多、过小,蛋白的乳化性能降低。

粒度分布图6所示,添加植酸酶为2 U/g (63.25 μm)、3U/g (47.75 μm)与4 U/g (44.77 μm)的粒度明显降低。可见,在酸性条件下SPI的乳化能力得到改善,且改性后SPI溶液较小粒径的峰所占比例增大,说明植酸酶改性导致蛋白的解离,疏水基团显露在外面。

植酸酶添加量为5 U/g时, 乳状液的粒度有变大趋势, 可能由于分子间的相互作用如疏水相互作用、氢键和静电作用等重新组合, 从而形成较大的聚集体, 降低了乳状液的稳定性。植酸酶添加量为4 U/g时EAI值最高, ESI与3 U/g时的ESI差异不显著 ($p>0.05$), 粒度为44.77 μm , 综合考虑, 在后续的研究中, 植酸酶添加量为4 U/g。

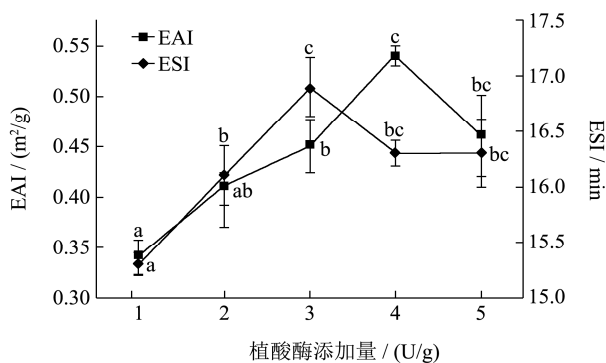


图5 植酸酶添加量对改性SPI的EAI和ESI的影响

Fig.5 Effect of the amounts of phytase on the emulsifying activity index (EAI) and emulsifying stability index (ESI) of modified SPI

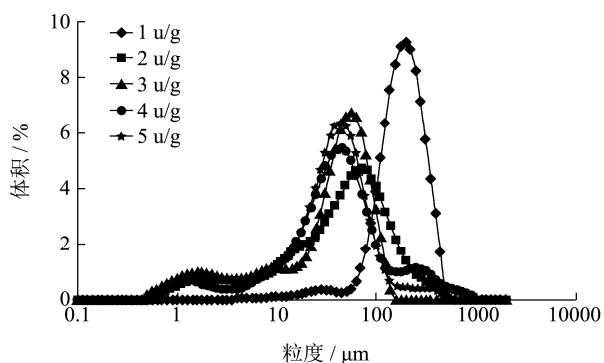


图6 植酸酶添加量对改性SPI粒度的影响

Fig.6 Effect of the amounts of phytase on the particle size of modified SPI

2.2.3 酸性蛋白酶添加量对改性SPI乳化性能和乳状液粒度的影响

图7所示, 超声波-植酸酶改性后的SPI经酸性蛋白酶的进一步水解, 显著增加了乳化活性和稳定性, 且随着酸性蛋白酶添加量的增加, 改性SPI的EAI和ESI的走势相似。酸性蛋白酶添加量为600~1500 U/g时, 改性SPI的EAI与ESI呈上升趋势, 添加量超过1500 U/g时, EAI与ESI开始下降。当酸性蛋白酶添加量为1500 U/g时, 改性SPI的乳化活性和乳化稳定性最好, EAI与ESI分别为0.56 m^2/g 和17 min, 比未改性SPI提高211%和26%。然而酸性蛋白酶添加量为500~1200 U/g的SPI的ESI值比未添加酸性蛋白酶的, 可能是由于经酸性蛋白酶酶解后, 蛋白分子量

变小, 油水界面上蛋白质浓度相对变低, 界面张力增大, 导致乳状液稳定性降低。

粒度分布图8所示, 酸性蛋白酶的添加对乳液粒度影响很大, 不添加酸性蛋白酶时, 粒径分布非常广, 吸收峰在0.1~1000 μm 之间, 可能由于植酸酶在灭酶时, 酶失活变性, 使乳状液形成絮凝体。随着酸性蛋白酶添加量的增加, 粒径吸收峰向左大幅度迁移。添加量为900~1500 U/g时, 粒径最高峰主要分布在40~63 μm 之间。添加量为1800 U/g时, 粒径最大吸收峰向右迁移, 粒径高于100 μm 。综合考虑, 在后续的研究中, 酸性蛋白酶添加量为1500 U/g。

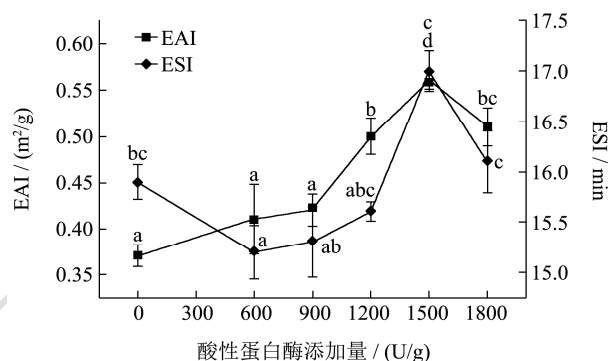


图7 酸性蛋白酶添加量对改性SPI的EAI和ESI的影响

Fig.7 Effect of the amount of added acidic protease on the emulsifying activity index (EAI) and emulsifying stability index (ESI) of modified SPI

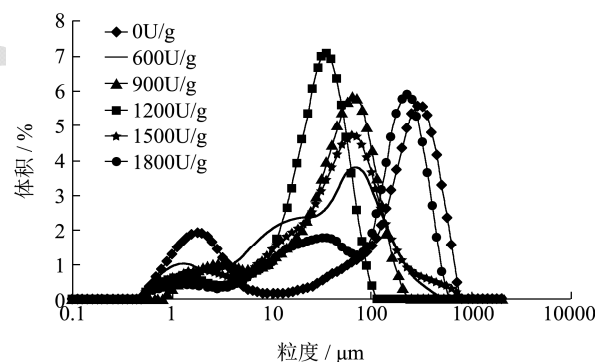


图8 酸性蛋白酶添加量对改性SPI粒度的影响

Fig.8 Effect of the amount of added acidic protease on the particle size of modified SPI

2.2.4 植酸酶酶解时间对改性SPI乳化性能和乳状液粒度的影响

图9所示, 不同的植酸酶酶解时间对改性SPI的影响不同, 当酶解50 min时, EAI值最高(0.53 m^2/g), 比未改性SPI提高194%, 酶解70 min时的ESI(16.9 min)最高, 比未改性SPI提高25.19%。酶解时间超过70 min, 改性SPI的EAI和ESI值逐渐降低。

粒度分布图10所示, 植酸酶酶解时间在30~70 min范围内, 随着水解时间升高, 乳状液的粒度减小。酶

解90 min时,吸收峰为70.963 μm ,说明水解时间过长,有向粒度变大的趋势发展,这与Bael^[17]等人,酶解时间太长导致酶活性降低,使蛋白逐渐聚沉,研究结果一致。植酸酶酶解时间50 min的EAI (0.53 m^2/g) 值最高,70 min时的ESI值最高,但植酸酶酶解时间在50 min的EAI值与70 min的EAI (0.47 m^2/g) 具有显著差异 ($p < 0.05$),综合考虑成本和实验操作方面,在后续的研究中,植酸酶酶解时间为50 min。

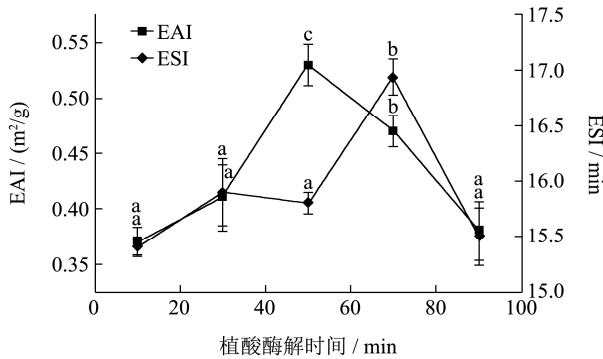


图9 植酸酶酶解时间对改性 SPI 的 EAI 和 ESI 的影响

Fig.9 Effect of enzymatic hydrolysis time of phytase on EAI and

ESI of modified SPI

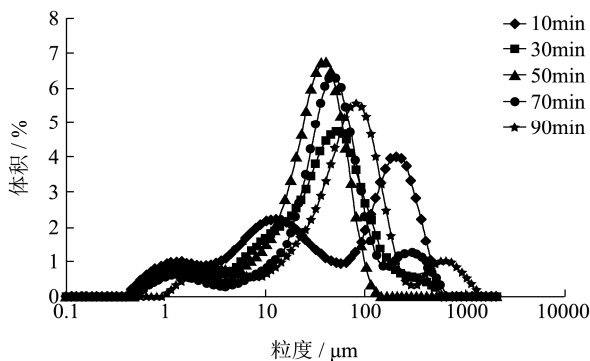


图10 植酸酶酶解时间对改性 SPI 粒度的影响

Fig.10 Effect of enzymatic hydrolysis time of phytase on

particle size of modified SPI

2.2.5 酸性蛋白酶酶解时间对改性 SPI 乳化性能和乳状液粒度的影响

图11所示,酸性蛋白酶酶解时间在10~50 min范围内,改性SPI的EAI随酶解时间的延长而增加,酸性蛋白酶酶解50 min时EAI (0.52 m^2/g) 最高,比未改性SPI提高了189%,酸性蛋白酶酶解30 min时,EAI为0.51 m^2/g ,比未改性SPI提高了183%,二者之间无显著差异 ($p > 0.05$);乳化稳定性方面,酸性蛋白酶酶解30 min时ESI (16 min)最高,比未改性SPI提高了18.5%,并且随着酶解时间的延长,ESI下降,可能由于两种酶的酶解反应时间过长,导致酶变性失活,酶降解蛋白的能力降低。

粒度分布图12所示,酸性蛋白酶酶解时间由10

min到30 min,粒度由56.37 μm 缩小到35.57 μm ,而30 min和50 min的粒度大小相似,且粒度都较小,可见在此范围内的酶解效果最佳。酸性蛋白酶酶解时间70 min时,粒径开始增大至100.24 μm ,酶解90 min时,出现了两个大的吸收峰,峰值分别为44.77 μm 和399 μm ,说明此时酶解时间过长,使蛋白酶变性,有些可能聚集在一起形成大的颗粒,导致粒度变大。酸性蛋白酶酶解50 min和30 min的EAI无显著差异 ($p > 0.05$),但是,酶解30 min时ESI最高,粒度为35.57 μm ,综合考虑,酸性蛋白酶的酶解时间为30 min。

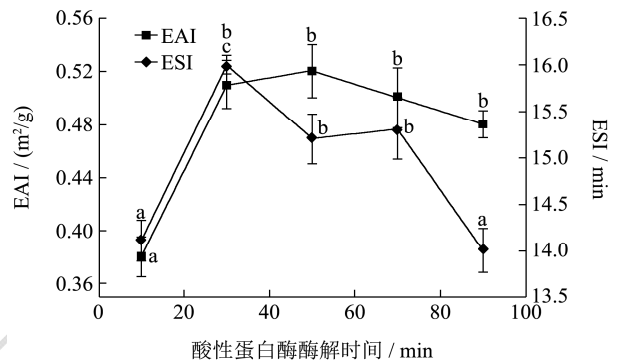


图11 酸性蛋白酶酶解时间对改性 SPI 的 EAI 和 ESI 的影响

Fig.11 Effect of enzymatic hydrolysis time of acidic protease on

EAI and ESI of modified SPI

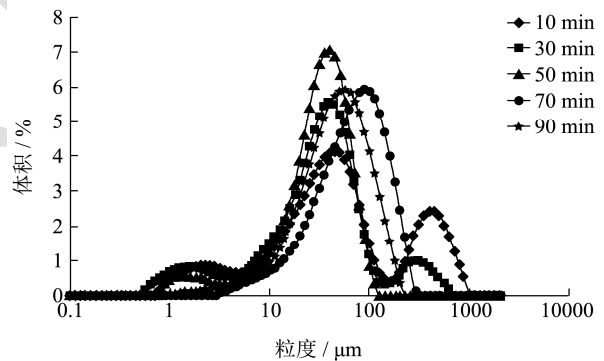


图12 酸性蛋白酶酶解时间对改性 SPI 粒度的影响

Fig.12 Effect of enzymatic hydrolysis time of acidic protease on

particle size of modified SPI

2.2.6 验证实验

当蛋白浓度6%,植酸酶添加量4 U/g,酸性蛋白酶添加量1500 U/g,植酸酶与酸性蛋白酶的酶解时间分别为50 min和30 min时,酸性条件下,改性后SPI的EAI为0.63 m^2/g ,比普通SPI(0.18 m^2/g)提高250%,ESI为16.8 min,比普通SPI(13.5 min)提高24.4%,乳状液粒度39.91 μm ,粒径比普通SPI明显减小。

2.3 超声波联合植酸酶-酸性蛋白酶复合改性

SPI 的结构分析

2.3.1 表面疏水性的分析

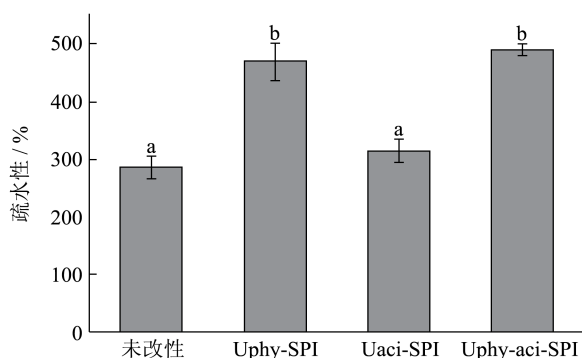


图 13 SPI 及改性 SPI 的表面疏水性的分析

Fig.13 Analysis of surface hydrophobicity of native and modified SPIs

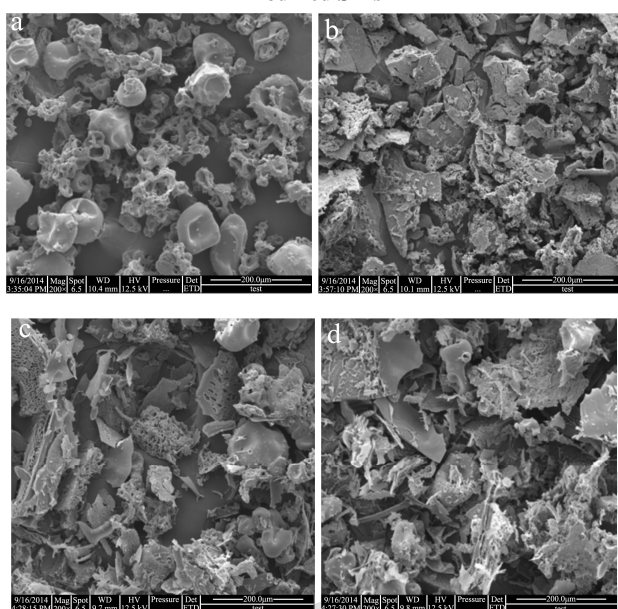


图 14 SPI 及改性 SPI 的扫描电镜观察 (×200)

Fig.14 SEM images of native and modified SPIs (×200)

注: a, 未改性; b, Uphy-SPI; c, Uaci-SPI; d, Uphy-aci-SPI.

由图 13 分析, Uphy-SPI 表面疏水性为 468.8, 比未改性 SPI (284.95) 提高了 64.5%, 超声波处理诱导蛋白质分子一定程度的解折叠, 引起疏水基团的增加^[18], 且植酸酶可以降解蛋白中的植酸, 使蛋白质释放出来, 可使蛋白的空间结构发生变化, 蛋白分子内部疏水相互作用被破坏, 暴露了更多的疏水性区域, 致使 SPI 的表面疏水性增加。Uaci-SPI 其表面疏水性指数 313.47, 与未改性差异不显著 ($p>0.05$), 可能由于酸性蛋白酶水解小分子物质形成大分子物质, 使疏水基团被掩盖。Uphy-aci-SPI 暴露疏水性基团最多, 表面疏水性含量最高为 487.78, 比未改性提高了 71.2%, 由于植酸酶与酸性蛋白酶在酸性条件下均具有最大酶活性, 并且植酸酶水解后的蛋白酶切位点暴露, 使酸性蛋白酶更容易作用到蛋白上, 说明联合改性对蛋白

质进行有限的水解, 使蛋白质部分变性, 促进蛋白质分子中疏水键的伸展, 使一些埋藏的疏水肽段暴露于蛋白表面, 有利于改变蛋白的表面性质, 引起疏水性的改善, 使疏水性与亲水性保持在一个最佳的动态平衡^[19]。

2.3.2 扫描电镜分析

如图 14 所示, 在 200 倍的放大倍数下的电子扫描显微结构图片。未改性 SPI 表面光滑, 颗粒大而圆滑, 立体感好, 颗粒分布不均匀, 部分含有细小的絮状结构。Uphy-SPI 表面粗糙, 破坏程度明显, 结构更加粉碎, 同时可以观察到有许多不规则聚集体出现。Uaci-SPI 破碎程度不完全, 且表面呈现细小孔洞, 由于蛋白酶酶解处理的所致^[20]。Uphy-aci-SPI 球状结构被分解的很充分, 表面光滑, 结构松散, 粒径也相对减小, 呈多孔状。超声处理后使蛋白结构破碎, 引起蛋白一些基团暴露或某些次级键受到影响, 如二硫键被破坏, 游离巯基增加, 表面疏水性增加, 再经植酸酶水解, 暴露更多的蛋白酶切位点, 使酸性蛋白酶更容易作用于其一级结构, 加速蛋白的分解^[19,20]。

3 结论

3.1 本研究以大豆分离蛋白为原料, 选用超声波预处理与植酸酶-酸性蛋白酶相结合, 提高在酸性条件下 SPI 的乳化性能, 结果表明: 超声波联合植酸酶-酸性蛋白酶改性方法的最适宜条件: 蛋白浓度 6%, 植酸酶添加量 4 U/g, 酸性蛋白酶添加量 1500 U/g, 植酸酶与酸性蛋白酶的酶解时间分别为 50 min 和 30 min, 在酸性条件下, 改性后 SPI 的 EAI 为 0.63 m²/g, 比普通 SPI 提高 250%, ESI 为 16.8 min, 比普通 SPI 提高 24.4%, 乳状液粒度 39.91 μm。

3.2 超声波联合植酸酶-酸性蛋白酶改性的 SPI, 暴露疏水性基团增多, 表面疏水性含量为 487.78, 比未改性提高了 71.2%。超声波-酶法改性使原来紧密的扁球状微观结构变成破碎均一、多孔的微观结构。

参考文献

- [1] Nagano T, Fukuda Y, Akasaka T. Dynamic viscoelastic study on the gelation properties of β -conglycinin-rich and glycinin-rich soybean protein isolates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44(11): 3484-3488
- [2] Kinsella J E. Functional properties of soy proteins [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1979, 56(3): 242 -258
- [3] Fields C, Mallee P, Muzard J, et al. Isolation of Bowman-Birk-inhibitor from soybean extracts using novel peptide probes and high gradient magnetic separation [J].

- Food Chemistry, 2012, 134, 1831-1838
- [4] Tsumura K, Saito T, Kugimiya W, et al. Selective proteolysis of the glycinin and B-conglycinin fractions in a soy protein isolate by pepsin and papain with controlled pH and temperature [J]. Journal of Food Science, 2004, 69(5): 363-367
- [5] Marsman G J P, Gruppen H, Mul A J, et al. *In vitro* accessibility of untreated, toasted and extruded soybean meals for proteases and carbohydrates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 4088-4095
- [6] Jia J Q, Ma H L, Zhao W R, et al. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein [J]. Food Chemistry, 2010, 119: 336-342
- [7] Arzeni C, Martinez K, Zema P, et al. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality [J]. Journal of Food Engineering, 2012, 108(3): 463-472
- [8] Soria A, C Villamiel M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2010, 21(7): 323-331
- [9] Surowk A K, Zmudzinsk I D, Surowk A J. Enzymatic modification of extruded soy protein concentrate as a method of obtaining new function a food components [J]. Trends in Food Science and Technology, 2004, 15: 153-160
- [10] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1978, 26(3):716-723
- [11] Jourdain L, Leser M E, Schmitt C, et al. Stability of emulsions containing sodium caseinate and dextran sulfate: relationship to complexation in solution [J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22: 647-659
- [12] Kato A, Nakai S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1980, 624(1): 13-20
- [13] 郭睿.功能性大豆蛋白的制备及应用[D].广州:华南理工大学,2011
- GUO Rui. The preparation and application of functional soy protein [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011
- [14] An Z C, Zhou H M, Zhu K X. Pretreatment methods on functional properties of wheat gluten and hydrolysis efficiency [J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35:25-30
- [15] Teng Z, Wan Z L, Yin S W, et al. Formation and dynamic interfacial adsorption of glycininchitosan soluble complex at acidic pH relationship to mixed emulsion stability [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 31(1): 85-93
- [16] Liang Y C, Gillies G, Patel H, et al. Physical stability, microstructure and rheology of sodium-caseinate-stabilized emulsions as influenced by protein concentration and non-adsorbing polysaccharides [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 36: 245-255
- [17] Bae I Y, Kim J H, Lee H G. Combined effect of protease and phytase on the solubility of modified soy protein [J]. Journal of Food Biochemistry, 2013, 37(5): 511-519
- [18] Jiang L Z, Wang J, Li Y, et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates [J]. Food Research International, 2014, 62:595-601
- [19] Xiang B Y. Effects of pulsed electric fields on structural modification and rheological properties for selected food proteins [D]. Macdonald: McGill University, 2008
- [20] Luo D H, Zhao Q Z, Zhao M M, et al. Effects of limited proteolysis and high-pressure homogenisation on structural and functional characteristics of glycinin [J]. Food Chemistry, 2010, 122(1): 25-30