

谷氨酰胺内肽酶限制性水解对大豆伴球蛋白 乳化性的影响

侯俊杰, 严江殷, 杨晓泉

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 天然的 7S 球蛋白于 pH=7.5 通过谷氨酰胺内肽酶(E.C. 3.4.21.19)的特异性酶切, 结合超滤的方法(截留分子量为 10 kDa), 制得 7S-核心区(7S-core)。该方法能去除 7S 球蛋白的 α 、 α' 亚基延展区, 且不影响 α 、 α' 亚基的核心区及 β 亚基。本研究采用 β -伴大豆球蛋白(7S)、7S 酶解产物(7S-GE)及 7S-核心区(7S-core)作为乳化剂, 制备了三种乳液。研究了这三种乳液在改变 pH、离子强度和储藏对乳液稳定性的影响, 表征了乳液的 zeta-电位, 平均粒径和乳析指数, 采用光学显微镜观察了乳液的微观结构。实验结果表明, 7S 经酶切后, 形成的乳液的表面电位的绝对值减小。7S-core 乳液的电位的绝对值明显小于 7S 及 7S-GE 乳液; 同时, 粒度及界面蛋白量显著增加。且失去延展区的 7S 制备的乳液在不同的 pH、离子强度条件下聚集程度增加, 放置后乳液的乳析指数增大, 且显微结果表明乳液液滴发生聚合, 乳化稳定性明显下降。本研究表明, 延展区对于天然 7S 球蛋白的乳化能力和乳化稳定性具有重要的意义。

关键词: 7S 球蛋白; 延展区; 乳液; 谷氨酰胺内肽酶; 水解

文章编号: 1673-9078(2015)4-51-57

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.009

Effect of Glutamyl Endoproteinase Modification on Emulsifying Properties of β -conglycinin

HOU Jun-jie, YAN Jiang-yin, YANG Xiao-quan

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A soy β -conglycinin (7S) hydrolysate (7S-GE), obtained by the hydrolysis by the glutamyl endoproteinase (E.C. 3.4.21.19) at pH 7.5. The core region of 7S (7S-core) was prepared by filtered the 7S-GE through the micro-filter member with 10 kDa molecule cut-off. The emulsifying ability of 7S, 7S-GE and 7S-core were investigated using zeta-potential, droplet size and saturation surface load. The results showed that the emulsion formed by 7S-core had lower zeta-potential and significant higher droplet size and saturation surface load compared with the emulsion which formed by 7S and 7S-GE. The influence of pH, iron strength on the stability of the emulsions formed by 7S, 7S-GE and 7S-core were investigated. The results showed that the stability of the emulsion formed by 7S-core was decreased remarkably against the pH, iron strength. Higher creaming index and coalescence of oil droplet through the microscope were observed. This study demonstrated emulsifying ability and stability of 7S remarkably depended on the extension regions.

Key words: β -conglycinin; extension; emulsion; glutamyl endoproteinase; hydrolysis

大豆蛋白是一种在食品工业中被广泛应用的食品乳化剂^[1]。乳化性包括乳化能力和乳化稳定性两方面^[2]。大豆伴球蛋白(7S 球蛋白)是大豆蛋白主要的贮藏蛋白之一。7S 球蛋白由 α 、 α' 和 β 三个亚基组成, 其表面疏水性大小依次为 $\alpha' > \alpha > \beta$ ^[3]。其中 α 和 α' 亚基可分为核心区 and 延展区两个不同的结构域, β 亚基只具有

收稿日期: 2014-10-31

基金项目: 国家高新技术研究发展计划(863 计划)项目(2013AA102208-3); 公益性行业(农业)科研专项经费资助(201303071)

作者简介: 侯俊杰(1985-), 男, 博士研究生, 研究方向: 蛋白质化学工程

通讯作者: 杨晓泉(1965-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 蛋白质化学工程

核心区^[3]。Maruyama et al 通过大肠杆菌分别的表达了 7S 的各个亚基, 并表达了缺失延展区的 α 、 α' 亚基突变体。通过研究表明, 缺失延展区的 α 、 α' 亚基突变体的乳化性明显下降^[4,5], 延展区是 7S 蛋白高乳化性的结构基础^[6]。Prak et al 通过基因重组表达的方法, 将 α' 的延展区接到大豆球蛋白(11S)的 C 末端以提高 11S 的乳化性。研究发现, 重组的 11S 的乳化稳定性有所提高, 且依赖于链接在 C 末端的 α' 的延展区的长度和片段的性质^[7]。基因工程及蛋白质工程是研究蛋白质结构与功能的有效手段, 天然的 7S 是一个糖蛋白, 而通过大肠杆菌表达系统表达的重组蛋白没有糖基化^[3-4, 6]。虽然

重组 α 、 α' 亚基的二级结构与天然的 α 、 α' 亚基具有一定的结构相似性^[3,5-6], 同时 7S 是一个三聚体蛋白, 通过大肠杆菌表达系统分别表达得到的 α 、 α' 及 β 亚基组装得到的 7S 与天然的 7S 在高级构象上依然存在差异。

已经有许多研究表明, 通过酶的水解可以改善大豆蛋白的功能性质, 如溶解性、乳化性等^[7,8]。但是, 通过酶解修饰大豆蛋白的某一特定结构, 及其对功能性质的影响还未见报道。谷氨酰胺内肽酶 (glutamyl endoproteinase, EC 3.4.21.19) 是一种专一性水解蛋白质多肽链 C-末端的谷氨酸和 (或) 天冬氨酸残基 α 羧基形成的肽键的内切蛋白酶^[9], 在酶切位点处暴露出更多的疏水性氨基酸。对于 7S 球蛋白来说, 谷氨酰胺内肽酶的酶切位点主要在 α 和 α' 亚基的延展区上, 谷氨酰胺内肽酶的酶切可将延展区水解而 α 和 α' 的核心区和 β 亚基则不受影响^[10]。通过特异性酶切的方法, 获得缺失延展区的 7S 球蛋白, 研究延展区对天然 7S 蛋白的乳化性的影响。

本研究以天然大豆 7S 球蛋白为研究对象, 利用谷氨酰胺内肽酶的酶切位点专一性, 通过水解结合超滤技术分离获得 7S 球蛋白的核心区, 系统研究天然 7S 球蛋白、水解产物 (7S-GE) 和 7S 核心区 (7S-core) 乳化性的差异, 进一步探明延展区对 7S 球蛋白乳化性的作用。

1 材料与设备

1.1 实验材料

低温脱脂豆粕, 山东禹王有限公司。谷氨酰胺内肽酶 (EC.243.2.12), 丹麦 Novozyme(中国)公司, 酶活通过 David 的方法测定^[11], 为 15.2 U/ μ L 酶液, 即每微升酶液, 每分钟水解 acetyl-Glu. pNA (Bubendorf, Switzerland), 释放出 15 nmol pNA。食品级玉米油, 市售。所有化学试剂均为分析纯。

Malven Zetasizer Nano ZS 纳米粒度仪, 英国马尔文公司; Malven Mastersizer 2000, 英国马尔文公司; CR22G II 高速冷冻离心机, 日本 HITACHI 公司; ECP3000 SDS-PAGE 三恒电泳仪, 北京市六一仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆 7S 球蛋白的制备

本文采用 Nagano 的方法^[12]从低温脱脂豆粕中提取 7S 球蛋白。杜马斯定氮测得 7S 样品的蛋白含量在 90.1% (m/m) 以上。

1.2.2 大豆 7S 球蛋白的酶解及超滤分离

配制 1% (m/V) 7S 球蛋白溶液, 室温搅拌 2 小时

后置 4 °C 冰箱水化过夜。待水解蛋白溶液于 40 °C 预热 10 min, 调节初始 pH 值 7.5, 使用谷氨酰胺内肽酶液 (15.2 U/50 mg 蛋白质), 在 pH 为 7.5, 温度为 40 °C 条件下对 7S 球蛋白进行水解, 水解时间为 30 min。

水解后的蛋白溶液, 参考 Kusters 等^[13]的方法制备 7S 球蛋白核心区。将水解后的蛋白溶液的 pH 值调至 2.0。用截留分子量为 10 kDa 的超滤膜对蛋白水解液进行超滤。当截留液体积下降为原体积一半时, 加入 ddH₂O (pH=2.0) 至原体积, 继续超滤。重复 5 次, 尽量去除水解产生的小分子肽。截留液回收, 调 pH 至 7.0。样品用截留分子量为 14 kDa 的透析膜进行透析脱盐后冻干备用。冻干样品即为 7S 核心区。

1.2.3 SDS-PAGE 分析

按照 Laemmli 的方法^[14]在不连续的缓冲体系中进行, 分别于垂直电泳槽中配置浓度为 12% 分离胶和 4% 的浓缩胶, 样品溶于还原性的样品缓冲液 (10% SDS, 2.5% β -巯基乙醇), 样品浓度为 2 mg/mL, 上样量为 5 μ L。电泳过程恒流, 浓缩胶和分离胶电流分别为 20 mA 和 40 mA。电泳结束后, 分别采用考马斯亮蓝 R250 染色, 用 0.5 mol/L NaCl 溶液进行脱色。

1.2.4 溶解曲线

7S、7S-GE 和 7S-core 用 5 mM 的磷酸缓冲液配成 0.56% (m/V) 的蛋白溶液, 搅拌充分溶解后, 用 2 mol/L 的 NaOH 和 HCl 溶液分别调节 pH 至 3.0、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。取 1 mL 置于小离心管中, 以 10000 r/min, 25 °C 离心 20 min 后, 取 100 μ L 上清液加入 4.9 mL 蒸馏水定容稀释至 5.0 mL。然后采用 Lorry 法^[15]测定上清液中的蛋白质含量, 计算各样品上清液蛋白浓度与总蛋白浓度的比值 (氮溶指数)。每个样品测定三次取平均值, 以 pH 值为横坐标、各样品的氮溶指数为纵坐标, 将各点连成折线, 即为溶解度曲线^[16]。

1.2.5 乳液的制备

分别配制 7S、水解 7S 球蛋白 (7S-GE) 和 7S 球蛋白核心区 (7S-core) 的溶液, 调节 pH=7.0, 加入相同量的玉米油, 使溶液中蛋白终浓度为 0.5% (m/V)、含油量为 10% (m/V)。溶液充分搅拌后, 用均质机 (IKA T25, Germany) 于 10000 r/min 均质 2 min, 然后冰浴超声处理 3 min, 超声功率为 80 W。即得实验用乳液。研究不同 pH 值对乳液的影响, 按照上述方法制备乳液后, 用 2 mol/L 的 HCl 调节乳液 pH 值为 3.0 和 5.0, 研究 pH=3.0、5.0 和 7.0 时乳液的相关性质。研究不同离子强度对乳液的影响, 按照上述方法制备乳液后, 加入 NaCl 得到不同离子强度的乳液。离子强度 (I) 分别为 0、0.05、0.10、0.15、0.20 mol/L。

1.2.6 乳液 zeta 电位

取新鲜制备的乳液 50 μL, 稀释 100 倍进行 zeta 电位的测定。测定温度为 25 °C, 平衡时间为 2 min。每个样品平行测定三次。

1.2.7 乳液粒度

用 Mastersizer 2000 测定乳液的粒度。泵的转速为 2200 r/min, 分散剂折射率为 1.330, 颗粒折射率为 1.520。得到乳液的 d_{43} (Volume weighted mean)、 d_{32} (Surface weighted mean) 和比表面积。每个样品平行测定三次。

1.2.8 乳液的形貌观察

吸取乳液一滴于载玻片上, 盖上盖玻片后于光学显微镜下, 用 10×目镜、100×物镜进行乳液液滴的形貌观察。

1.2.9 乳液界面蛋白含量

参考 McClements^[17]的方法测定乳液界面蛋白含量。新鲜制备的 7S、7S-GE 和 7S-core 乳液在 25 °C、20000 r/min 离心 40 min 后, 用 1 mL 一次性注射器转移下层水相, 采用 Lowry 法测定水相中的蛋白含量。通过公式 (2) 计算乳液界面蛋白含量:

$$\Gamma = 1000 \times (C_{total} - C_{serum}) / A \quad (1)$$

注: 其中 Γ 为界面蛋白吸附量 (mg/m²); C_{total} 为乳液中总蛋白浓度 (g/g); C_{serum} 为水相的蛋白浓度 (g/g); A 为液滴的比表面积 (m²/g)。

1.2.10 乳析率

将 5 mL 新鲜乳液移至高为 75 mm, 直径为 9 mm 的平地试管中, 加入 0.02% (m/V) 的 NaN₃ 防止微生物的生长, 试管口包上两层保鲜膜以防止乳液中的水分挥发。置于室温, 定期测量乳液分层的样品底部清液层的高度 (HS), 根据公式 (3) 计算乳液的乳析指数 (Creaming index, CI), HT 为乳液总高度。每个样品平行测定两次。

$$CI(\%) = \frac{H_s}{H_T} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.11 统计分析

所有数据除特殊说明外, 均为平行测定三次的平均值, 通过 SPSS 软件一维方差分析的 Duncan 方法比较样品平均值之间的显著差异。

2 结果与讨论

2.1 酶切产物的分析

图 1 为 7S 蛋白及经过谷氨酰胺内肽酶酶切得到的电泳条带, 泳道 1 为 7S, 7S 蛋白三个亚基均被较明显的分离出来, 且受 11S 碱性亚基和酸性亚基的污染非

常小。泳道 2 为经过谷氨酰胺内肽酶酶切的 7S (7S-GE) 的电泳条带图, 图中 7S 的 α 和 α' 亚基的延展区被水解, 并生成了一条 47 kDa 的条带, 而核心区 (47 kDa) 及 β 亚基则不受影响, 与文献报道相似^[10]。泳道 3 为经过超滤处理去除小分子肽后的酶解样品 (7S-core), 电泳条带和 7S-GE 相似, 核心区 (core) 和 β 亚基没有受到超滤处理的影响。

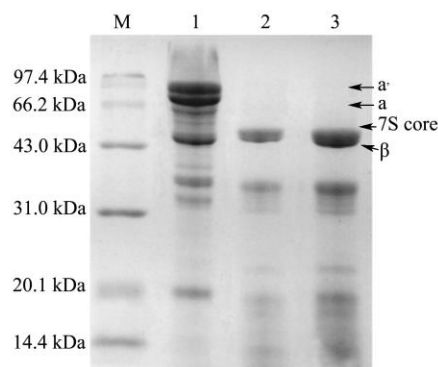


图 1 7S, 7S-GE 和 7S-core 的 SDS-PAGE 电泳
Fig.1 SDS-PAGE of 7S, 7S-GE and 7S-core

2.2 不同蛋白质样品的溶解度曲线

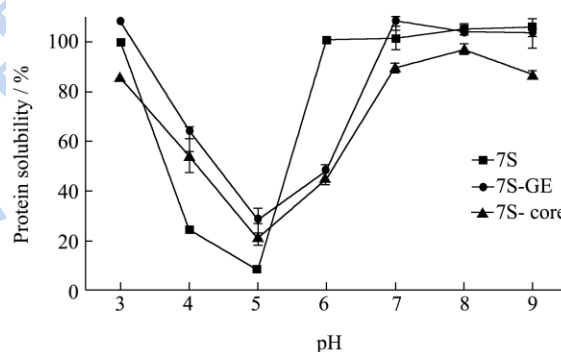


图 2 7S 球蛋白、7S-GE 和 7S-core 的溶解度曲线
Fig.2 Solubility curves of 7S, 7S-GE and 7S-core

7S、7S-GE 和 7S-core 的溶解度曲线如图 2 所示, 三者的溶解度都在 pH=5.0 时达到最低, 曲线呈倒 U 型, 表明这三个样品的等电点均在 pH=5.0 左右; 在 pH=3.0 和 pH=7.0 时溶解性良好。在 pH 4.0 时, 7S-GE 和 7S-core 的溶解性高于天然 7S 球蛋白; 在 pH=6.0 时则相反。且在中性及碱性条件下具有良好的溶解性。与通过重组表达获得的缺失延展区的 α 、 α' 及表达的 β 亚基的溶解度曲线相比^[5], 表达获得的缺失延展区的 α 、 α' 及表达的 β 亚基在 pH 高于 5.0 后, 基本不溶于水。而酶解后的 7S 的溶解度曲线和天然的 7S 相似。N 末端糖基化片段在 7S 中对溶解性和乳化性均有重要影响。该结果表明, 虽然重组表达的亚基具有与天然 7S 亚基相似的二级结构^[6]。但是同时缺失 N 末端糖基化片段和延展区片段, 所以溶解性均较差, 而较低的溶解性对蛋

白的乳化性能具有较大的影响。而通过酶切得到的 7S 核心区只缺失了延展区, 溶解度较好, 可更好的研究 7S 延展区对其乳化性的影响。

2.3 不同蛋白质样品乳液的基本性质

表 1 显示了采用天然 7S 球蛋白、7S-GE 和 7S-core 在中性条件下制备的乳液的粒径、电位和界面蛋白含量。从表面积平均粒度 (d_{32}) 和体积平均粒度 (d_{43}) 来看, 7S 乳液和 7S-GE 乳液的粒径无明显差异。与这两者相比, 7S-core 所形成的乳液的 d_{32} 变大了一倍, d_{43} 变大了接近四倍, 达到 $1.81 \pm 0.04 \mu\text{m}$ 和 $9.82 \pm 0.44 \mu\text{m}$ 。7S-core 乳液的界面蛋白含量是 7S 和 7S-GE 的十倍, 这是由于 7S-core 乳液的比表面积 ($3.31 \pm 0.35 \text{ m}^2/\text{g}$) 比

7S ($7.87 \pm 0.14 \text{ m}^2/\text{g}$) 和 7S-GE ($9.65 \pm 0.21 \text{ m}^2/\text{g}$) 的要小很多。三种乳液的表面电荷从小到大依次为 7S-core、7S-GE、7S。

在 7S 的 α 和 α' 亚基的延展区中富含带负电荷的氨基酸残基, 7S 球蛋白经谷氨酰胺内肽酶酶切后, 一方面使乳液的表面带电量降低, 液滴间的静电斥力减少; 另一方面延展区被水解, 7S-GE 制备的乳液的粒度增加。进一步通过超滤去除酶切产生的水解产物后, 7S-core 制备的乳液的表面电荷进一步下降, 粒度也更大。该结果表明, 延展区对 7S 的乳化性具有重要的作用, 同时可提高蛋白及液滴的表面带电量, 增加静电斥力, 保持乳液稳定。

表 1 蛋白乳液粒径、电位和界面蛋白含量

Table 1 mean droplet size, Zeta potential and surface protein coverage of protein-stabilized emulsions

样品名称	$d_{32}/\mu\text{m}$	$d_{43}/\mu\text{m}$	电位/mV	界面蛋白含量/(mg/m ²)	比表面积/(m ² /g)
7S	0.76 ± 0.005^b	2.87 ± 0.01^b	-38.60 ± 1.56^c	0.08 ± 0.05^b	7.87 ± 0.14^b
7S-GE	0.62 ± 0.001^b	3.43 ± 0.01^b	-30.25 ± 1.48^b	0.08 ± 0.018^b	9.65 ± 0.21^a
7S-core	1.81 ± 0.04^a	9.82 ± 0.44^a	-25.65 ± 0.92^a	0.74 ± 0.14^a	3.31 ± 0.35^c

注: 不同的字母表明每列数值的显著性差异($p < 0.05$)。

2.4 不同条件对蛋白乳化性质的影响研究

2.4.1 pH 值

7S、7S-GE 和 7S-core 乳液在不同 pH 值下的电位、粒度如图 3A、3B 所示。从图 3A 中可以看出, 当乳液的 pH 为 5 和 7 时, 乳液带有负电荷的 zeta 电位; 当乳液的 pH 为 3 时, 表现出带有正电荷的 zeta 电位。7S 稳定的乳液的 zeta 电位由 pH 为 3.0 的 $30.65 \pm 1.2 \text{ mV}$ 变为 pH 为 7 的 $-38.6 \pm 1.56 \text{ mV}$ 。7S-GE 和 7S-core 稳定的乳液 zeta 电位的绝对值在实验考察的 pH 范围内均小于 7S 稳定的乳液。这可能是由于 7S 的延展区上有较多的荷电氨基酸, 水解后 7S 因为失去延展区, 从而导致乳液液滴的 zeta 电位的绝对值减小。各乳液的 d_{43} 的变化趋势相似, 且均在 pH=5.0 时达到最大值。这种由 pH 引起的乳液粒径的变化, 是因为当 pH=5.0 时, 乳液的 zeta 电位最小, 导致乳液液滴聚集使乳液的平均粒径变大。总体上看, 7S-core 乳液粒径最大 (pH=3: $10.12 \pm 0.01 \mu\text{m}$; pH=5: $14.18 \pm 0.19 \mu\text{m}$; pH=7: $9.82 \pm 0.44 \mu\text{m}$), 其次是 7S-GE 乳液 (pH=3: $5.09 \pm 0.63 \mu\text{m}$; pH=5: $6.83 \pm 0.18 \mu\text{m}$; pH=7: $3.43 \pm 0.01 \mu\text{m}$), 最小的是天然 7S 球蛋白乳液 (pH=3: $4.22 \pm 0.11 \mu\text{m}$; pH=5: $5.94 \pm 0.03 \mu\text{m}$; pH=7: $2.88 \pm 0.013 \mu\text{m}$)。

在不同 pH 值条件下, 乳液在放置后呈现出不同的稳定性。乳液的乳析率和乳液液滴聚集程度、乳液液滴平均粒径成正相关^[18]。乳液静置 14d 后, 乳析指数

如图 3C 所示, 7S 和 7S-GE 乳液在 pH=5.0 时乳液的乳析指数高于 pH=3.0 和 pH=7.0 处, 乳液在 pH=7.0 时乳析指数最小, 这是因为乳液的 zeta 电位在 pH=7.0 是最大, 所以乳液相对稳定。7S-core 乳液放置后出现明显的乳析, 乳液乳析指数均大于相同 pH 值时的 7S 和 7S-GE 乳液, 稳定性最差。

7S 和 7S-GE 乳液的粒径 (d_{43}) 在各 pH 值下放置 14d 后变化不大, 但放置后 7S-core 乳液的粒径则明显高于新鲜制备乳液的粒径。乳液微结构结果反映了乳液放置前后状态的变化 (图 4A, B)。当乳液在 pH 为 3.0 和 7.0 时, 乳液液滴呈单滴分散, 在 pH=5.0 时均出现了明显的聚集, 因为 pH=5.0 乳液的 zeta 电位绝对值较低而发生聚集。放置 14d 后 (图 4B), 7S-core 的乳液液滴合并, 乳液粒度增加。且在各 pH 下, 7S-core 的乳液聚集程度均高于 7S 和 7S-GE 乳液。相关研究表明, 在天然 7S 球蛋白中, 色氨酸只存在于 α (Trp63) 和 α' (Trp63, Trp100) 亚基 N-末端的延展区内。当 7S 稳定乳液时, 色氨酸从蛋白质内部转移到蛋白质表面更亲水的区域, 说明在乳液界面, 7S 核心区与油相相互作用, 延展区则伸展到水相中去^[19]。酶解后的 7S 失去了亲水的延展区, 同时延展区含有较多的荷电氨基酸, 稳定的乳液的表面也失去了由延展区形成的亲水层, 且乳液液滴间的静电斥力减少, 乳液液滴之间的相互作用增加, 因此 7S-core 形成的乳液的粒度和乳析现象在放置后均明显增加, 表明延展区对乳液的稳

定性具有重要的作用。

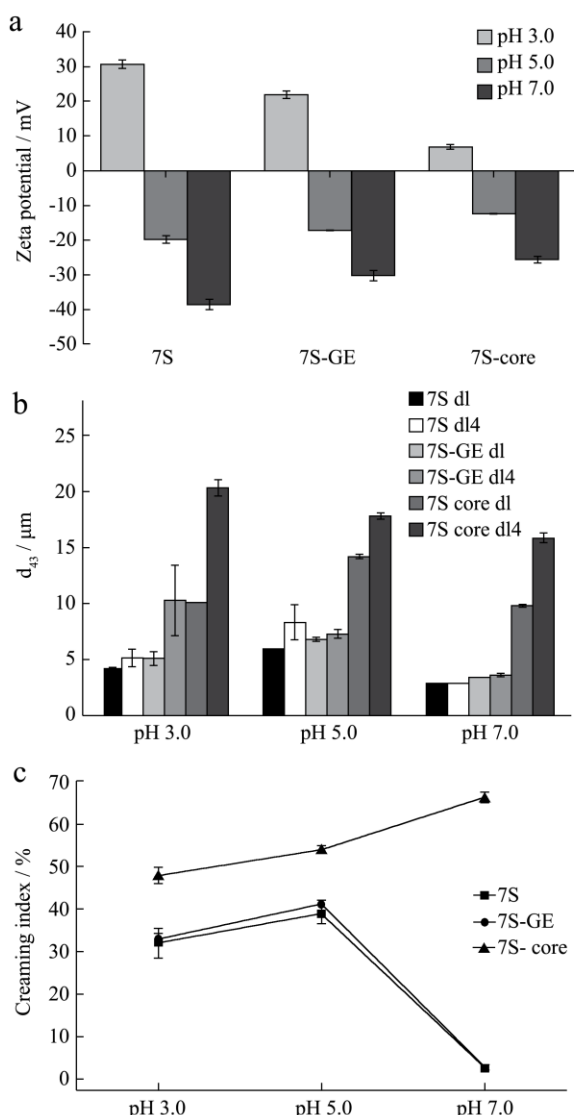


图3 不同 pH 值对 7S、7S-GE 和 7S-core 乳液稳定性的影响。

Fig.3 Influence of pH on the stability of the emulsions formed by 7S, 7S-GE and 7S-core

注: a: 电位; b: 乳液粒度 (d_{43}); c: 放置 14 d 后乳液的乳析指数。

2.4.2 离子强度

不同离子强度下蛋白乳液的电位、粒径见图 5a、5b。乳液的粒径随离子强度的增加而增大。7S-core 乳液粒径的变化程度最大, 从 $9.82 \pm 0.44 \mu\text{m}$ 增加至 $14.33 \pm 0.28 \mu\text{m}$ 。7S 乳液的粒径则从 $2.88 \pm 0.01 \mu\text{m}$ 到 $4.99 \pm 0.02 \mu\text{m}$, 7S-GE 乳液的粒度从 $3.43 \pm 0.01 \mu\text{m}$ 到 $3.99 \pm 0.01 \mu\text{m}$ 。

乳液粒度的变化与乳液液滴表面所带的电荷有关。结合图 5a, 当离子强度增大时, 各乳液的 zeta-电位的绝对值由于盐离子的屏蔽而逐渐减少。7S-core 稳定的乳液随着 NaCl 浓度的增加, 乳液 zeta-电位绝对值减小的最少, 乳液液滴聚集情况更严重, 乳液粒度显

著变大。7S 和 7S-GE 由于延展区及延展区水解生成的多肽的存在, 并在乳化过程中吸附到了乳液液滴表面, 使得液滴的 zeta-电位的绝对值较高, 抑制蛋白分子和液滴间的聚集, 防止了粒度的增大。

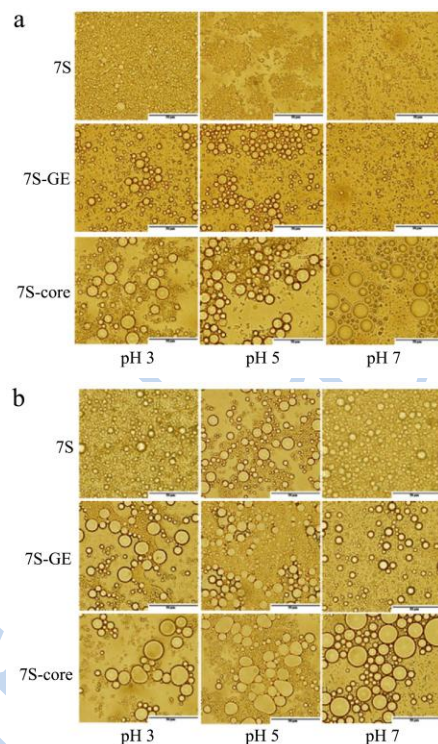


图4 不同 pH 对 7S 球蛋白、7S-GE 和 7S 核心区乳液液滴形貌的影响

Fig.4 Microstructure of emulsions formed by 7S, 7S-GE and 7S-core at different pHs

注: a: 新鲜制备得到乳液的形貌; b: 放置 14 d 后乳液的形貌。

因为盐离子的静电屏蔽作用, 液滴 zeta 电位的绝对值和静电斥力下降, 乳液变得不稳定。在放置 14 d 后, 乳析指数如图 5c 所示, 7S 乳液在低离子强度 ($I=0.05$) 时, 能保持良好的稳定性; 当离子强度继续增大, 乳析指数上升 ($CI > 60\%$)。经谷氨酰胺内肽酶水解后, 7S-GE 的 zeta-电位绝对值下降。在低离子强度 ($I=0.05$) 时, 乳液就产生了严重的乳析现象, 乳析指数达到了 50%。而 7S-core 形成的乳液乳析现象更厉害, 乳析现象在放置 5 h 后就开始出现 (结果未在本文中列出)。

从乳液液滴形貌上看 (图 6a), 随着离子强度的增大, 乳液中的液滴聚集情况加剧, 且乳液液滴的粒径也随着离子强度的增加而变大。7S 经谷氨酰胺内肽酶水解后, 7S-GE 制备的乳液随离子强度的增加而进一步聚集, 同时乳液粒径变大。7S-core 制备的乳液不仅粒度大, 而且聚集得更厉害, 同时乳液液滴之间发生聚合。7S、7S-GE 和 7s-core 乳液在室温下放置 14 d 后

(图 6b), 随着离子强度的增加, 7S 乳液的粒度及形貌前后变化不大。7S-GE 和 7S-core 乳液的粒度随着离子强度和时间的增加而增加。7S-core 形成的乳液在离子强度增大的时, 乳液液滴合并并且呈现不均匀且不规则的形状。

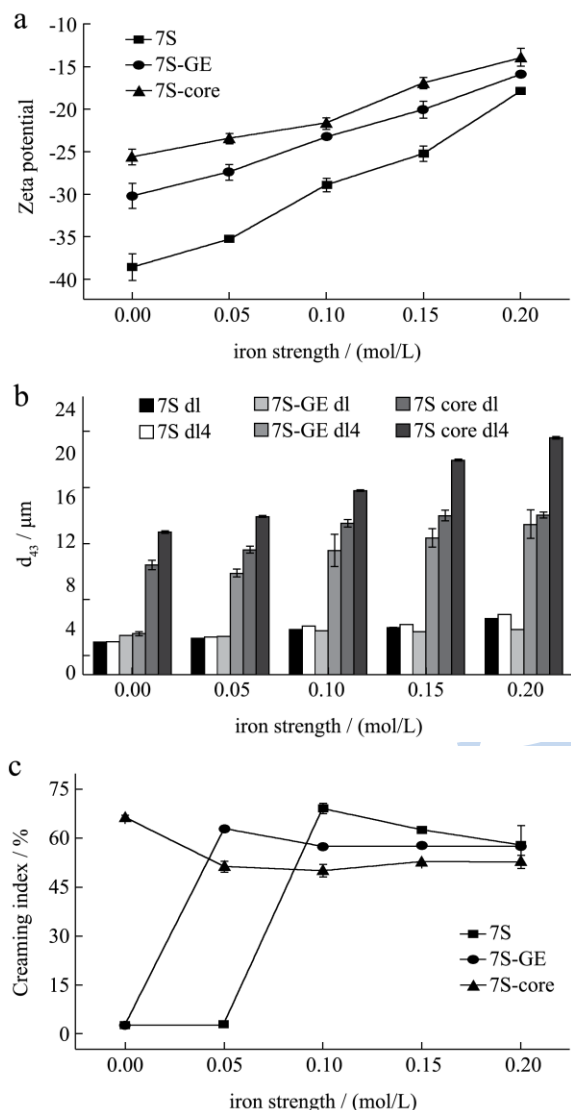


图 5 不同离子强度对 7S、7S-GE 和 7S-core 乳液稳定性的影响

Fig.5 Influence of ionic strength on the stability of the emulsions formed by 7S, 7S-GE and 7S-core

注: a: 电位; b: 乳液粒度 (d_{43}); c: 放置 14 d 后乳液的乳析指数。

3 结论

本研究通过谷氨酰胺内肽酶的酶切特性, 特异性酶解了 7S 的延展区, 并对天然 7S 球蛋白、7S-GE 和 7S-core 制备的乳液在不同 pH 值和离子强度下的乳化性和乳化稳定性进行了研究, 通过特异性酶解的方法, 研究了天然蛋白质特定区域带其功能特性的影响。实验结果表明, 7S-core 由于失去了延展区, 制备的乳液

的 zeta-电位的绝对值在不同 pH 和离子强度下均较小。同时, 7S-core 制备的乳液由于液滴表面失去了由延展区形成的亲水层, 乳液液滴间的静电斥力较弱, 相互作用增加, 液滴间容易发生聚集和合并, 乳液的稳定性下降。该结果表明, 高荷电及亲水的延展区对 7S 球蛋白的乳化特性具有重要的作用。

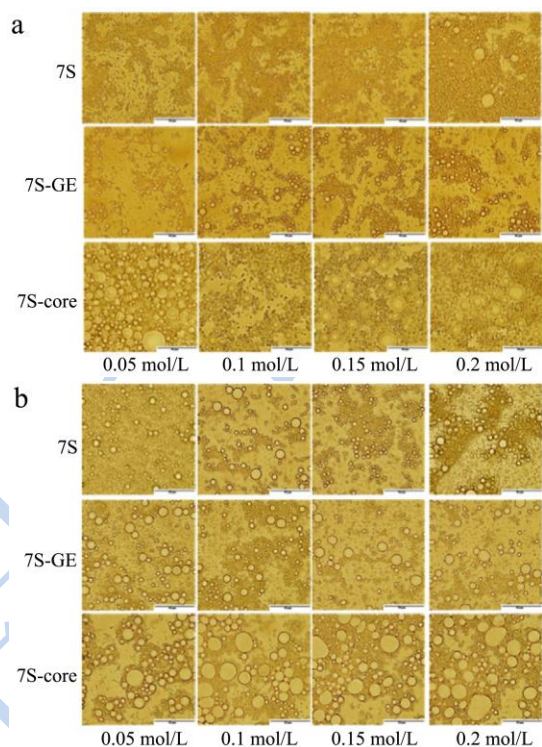


图 6 不同离子强度下 7S、7S-GE 和 7S-core 乳液液滴形貌的变化

Fig.6 Microstructure of emulsions formed by 7S, 7S-GE and 7S-core at different iron strengths

注: a: 新鲜制备得到乳液的形貌; b: 放置 14 d 后乳液的形貌。

参考文献

- [1] Wan Z L, Wang L Y, Wang J M, et al. Synergistic interfacial properties of soy protein-stevioside mixtures: Relationship to emulsion stability [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 127-135
- [2] Dickinson E. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(6): 1473-1482
- [3] Utsumi S, Maruyama N, Satoh R, et al. Structure-function relationships of soybean proteins revealed by using recombinant systems [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(3): 284-288
- [4] Maruyama N, Salleh M R M, Takahashi K, et al. The effect of the N-linked glycans on structural features and physicochemical functions of soybean β -conglycinin homotrimers [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2002, 79(2): 139-144

- [5] Maruyama N, Sato R, Wada Y, et al. Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycinin constituent subunits [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1999, 47(12): 5278-5284
- [6] Maruyama N, Salleh M R M, Takahashi K, et al. Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycinin heterotrimers [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, 50(15): 4323-4326
- [7] Suppavorasatit I, De Mejia E G, Cadwallader K R. Optimization of the enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase and its effect on the functional properties of the protein [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2011, 59(21): 11621-11628
- [8] Zhang Y, Tan C, Zhang X, et al. Effects of maltodextrin glycosylation following limited enzymatic hydrolysis on the functional and conformational properties of soybean protein isolate [J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 238(6): 957-968
- [9] Breddam K, Meldal M. Substrate preferences of glutamic acid specific endopeptidases assessed by synthetic peptide substrates based on intramolecular fluorescence quenching [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1992, 206(1): 103-107
- [10] Hwang D, Shah N K, Kerr P S, et al. Protein hydrolysate compositions [P]. US, 20110250313A1, 2011-10-13
- [11] Spellman D, Kenny P, O'Cuinn G, et al. Aggregation properties of whey protein hydrolysates generated with *Bacillus licheniformis* proteinase activities [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(4): 1258-1265
- [12] Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1992, 40(6): 941-944
- [13] Kosters H A, Wierenga P A, de Vries R, et al. Protein-peptide interaction: Study of heat-induced aggregation and gelation of β -Lactoglobulin in the presence of two peptides from its own hydrolysate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(18): 4218-4225
- [14] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685
- [15] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 265-275
- [16] Petrucci S, Anon M C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 1. Structural and hydration properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(10), 2161-2169
- [17] McClements D J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2007, 47(7): 611-649
- [18] Surh J, Ward L S, McClements D J. Ability of conventional and nutritionally-modified whey protein concentrates to stabilize oil-in-water emulsions [J]. *Food Research International*, 2006, 39(7): 761-771
- [19] Miriani M, Keerati-u-rai M, Corredig M, et al. Denaturation of soy proteins in solution and at the oil-water interface: A fluorescence study [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(4): 620-626