

真空减压加速皮蛋蛋清凝胶形成的机理

张晓维, 刘旭辉, 高洁, 刘会平, 徐向昕, 田文坛

(食品营养与安全国家重点实验室, 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘要: 真空减压法可显著缩短皮蛋加工周期, 但此技术下皮蛋蛋清凝胶形成的机理还未知。因此, 本文研究真空减压法下腌制皮蛋蛋清形成凝胶过程中, 蛋清水分迁移、蛋白质构象变化、微观结构及分子间作用力变化等, 以探究其凝胶形成机理。结果表明: 在皮蛋腌制过程中, 蛋清蛋白的疏水性先增加后降低, 适宜的疏水相互作用有利于维持蛋白质凝胶结构的稳定; 蛋清蛋白的浊度显著增大而溶解性显著降低, Zeta 电位增大了 1.13 倍, 静电斥力的增强有利于有序线性蛋白质聚集体的形成, 形成了透明的凝胶; α -螺旋结构的相对含量减少至 13.00%, 而 β -折叠和 β -转角分别增加至 54.00% 和 20.40%, 蛋白质的 α -螺旋结构转化为 β -结构来参与蛋白质分子之间的聚集; 维持蛋白质凝胶的分子间作用力从强到弱依次是离子键、二硫键、疏水相互作用和相对较少的氢键; 通过以上的相互作用, 皮蛋蛋清最终形成了规则的包埋着大量结合水的三维纤维网络凝胶结构。

关键词: 皮蛋; 真空减压; 蛋清; 凝胶; 腌制

文章编号: 1673-9078(2020)06-172-180

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1151

Mechanism of Accelerating the Formation of Preserved Egg White Gel by Vacuum Decompression

ZHANG Xiao-wei, LIU Xu-hui, GAO Jie, LIU Hui-ping, XU Xiang-xin, TIAN Wen-tan

(State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457)

Abstract: The vacuum decompression method can significantly shorten the processing period of preserved eggs, but the mechanism of gelatin formation of egg white gel under this technology is unknown. Thus, in this paper, to explore the gel formation mechanism, water migration in egg white, protein conformational change, microstructure and intermolecular force changes were investigated, during the gelatinization process of egg white of preserved egg using the vacuum decompression method. Results showed that, during the pickling process of preserved egg, the hydrophobicity of egg white protein first increased and then decreased, the proper hydrophobic interaction was helpful to maintain the stability of the protein gel structure. The turbidity of egg white protein was significantly increased while the solubility was significantly reduced, the Zeta potential was increased by 1.13 times, the increase in electrostatic repulsion was beneficial to the formation of ordered linear protein aggregates, forming a transparent gel; the relative content of α -helical was reduced to 13.00%, while the β -sheet and β -turn structure were increased to 54.00% and 20.40%, respectively, the α -helix structure is transformed into β -structures to participate in the aggregation between protein molecules; the intermolecular forces that maintain protein gels in order from strong to weak were ionic bonds, disulfide bonds, hydrophobic interactions, and relatively few hydrogen bonding; through the above interactions, preserved egg whites finally formed a regular three-dimensional fiber network gel structure embedded with a large amount of bound water.

引文格式:

张晓维, 刘旭辉, 高洁, 等. 真空减压加速皮蛋蛋清凝胶形成的机理[J]. 现代食品科技, 2020, 36(6): 172-180

ZHANG Xiao-wei, LIU Xu-hui, GAO Jie, et al. Mechanism of accelerating the formation of preserved egg white gel by vacuum decompression [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 172-180

收稿日期: 2019-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31801568); 天津市科技重大专项与工程项目 (17ZXYENC00010); 天津市自然科学基金青年基金项目 (18JQNJC79300); 江苏省高邮市科技项目资助 (GY201812)

作者简介: 张晓维(1985-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 蛋制品加工及新技术; 共同第一作者: 刘旭辉(1993-), 男, 硕士, 研究方向: 蛋制品加工及新技术

通讯作者: 刘会平(1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 蛋制品加工及新技术

Key words: preserved egg; vacuum decompression; egg white; gel; pickling

皮蛋是一种深受消费者喜爱的传统风味蛋制品,富含营养,风味独特,诱人的色泽,且具有抗炎活性、治疗内热及腹泻的功能作用^[1-3]。皮蛋传统加工方法已有 500 多年历史,主要利用碱和盐腌制而成,具有很长的货架期。皮蛋研究主要集中于加工技术和品质影响因素上,如无铅皮蛋和质量控制^[4,5]。目前,食品工业中皮蛋多采用作坊式加工,通常要求先腌制 20~25 d 再后熟 15~20 d^[6],加工周期长品质控制主要依赖于生产经验,同时还存在着生产效率低,产品品质不均一的缺陷,制约着现代化皮蛋加工业的发展。

为解决上述这些问题,需寻找合适的新技术方法来缩短皮蛋生产周期,加速生产品质良好的皮蛋产品,突破皮蛋加工技术的瓶颈。前期工作研究已证实真空减压技术可应用于皮蛋的加工,季玲^[7]优化了真空减压法腌制皮蛋的工艺条件,与传统腌制相比,腌制时间缩短了 74%,且品质优良,出缸合格率高;邹乾^[8]研究了减压法腌制过程中皮蛋风味和色泽的变化,这为真空减压法在皮蛋加工行业的应用奠定了基础。但是真空减压法下皮蛋蛋清凝胶形成的机制还未知,为了真空减压技术更好的应用于生产健康品质优良的皮蛋,有必要进行凝胶形成机理研究。

皮蛋蛋清是由碱诱导形成的凝胶,蛋白质在碱的作用下分解并形成了皮蛋蛋清特有的凝胶体系,推测其凝胶机制为变性蛋清蛋白质聚集的过程^[9],蛋白质的凝胶过程一般认为是适度变性的蛋白质分子发生聚集的过程,当蛋白质聚集体间的吸引力和排斥力达到动态平衡时,便形成包裹着大量水分的三维网格结构。皮蛋生产加工过程中蛋白质凝胶的调控因素主要包括碱、金属离子和腌制温度,主要是控制碱的渗透速率和渗透量对蛋清凝胶的影响,皮蛋凝胶质构的特殊性是由于蛋白质在碱作用下发生一系列的变化引起的,因此,皮蛋蛋清蛋白质结构是其凝胶性质的基础^[10],蛋清蛋白质在腌制过程中形成凝胶特性的好坏决定着皮蛋产品的感官品质。但是蛋白质结构复杂,蛋白质间存在哪些分子作用力而相互聚集在一起,这些研究还很薄弱。因此,要明确皮蛋凝胶体系的具体形成机理仍需深入研究。本研究以减压技术下腌制的皮蛋为原料,从蛋清蛋白质物化性质,蛋白质变性及聚集特性等方面研究皮蛋腌制过程中蛋清凝胶形成的机制,为皮蛋加工、凝胶机理研究提供一定的理论基础。

1 材料与方

1.1 材料与试剂

新鲜鸭蛋(65~75 g):从天津市滨海新区当地市场购买,洗净晾干备用。

氯化钠:食品级,中盐天津市长芦盐业有限公司;氢氧化钠:食品级,滨化集团股份有限公司;硫酸铜:食品级,广州硕维食品添加剂有限公司;尿素,上海源叶生物科技有限公司; β -巯基乙醇,西安天茂化工有限公司;8-苯胺-1-萘磺酸(ANS)、双缩脲试剂盒,北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

真空减压腌制设备:实验室自研;低场脉冲核磁共振仪:NMI20-060H-I,苏州纽迈分析仪器股份有限公司;Zeta 电位仪:Zetasizer NanoZS,英国马尔文仪器有限公司;扫描电子显微镜:SU1510,日立高新技术公司;紫外分光光度计:UV-2550PC,日本岛津仪器有限公司;真空冷冻干燥剂: BK-FD105,博科仪器有限公司;均质机:T25,德国 IKA 公司;离心机:H1650R,湘仪离心机仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 皮蛋制备

皮蛋制备参照季玲^[7]的方法并进行了部分改动。皮蛋腌制料液为 5.80% (m/m) 氢氧化钠、4.00% (m/m) 氯化钠和 0.40% (m/m) 硫酸铜,将其充分溶解混匀备用。将鸭蛋整齐地堆放在腌制桶中,倒入腌制料液直至没过所有鸭蛋。将腌制桶放入真空腌制设备中,合盖拧紧,保证腌制罐的气密性良好。腌制条件:温度 23 °C、真空度-0.08 MPa、真空保持 8 h 和常压保持 2 h 进行循环腌制 4 d。腌制 4 d 后,鸭蛋表面涂上草木灰和腌制液的混合涂料,进行后熟,后熟三周。

1.3.2 水分分布的测定

水分在皮蛋蛋清凝胶过程中的分布情况通过低场核磁(LF-NMR)进行检测。根据 Li 等人^[11]的方法进行适量的修改,在低场脉冲核磁共振仪上进行自旋-自旋弛豫时间(T_2)的测量。将皮蛋蛋清凝胶样品放入玻璃管中,置于 NMR 探头里面。采用 Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) 序列测定 T_2 ,测量条件如下: T=32 °C, SW=100 kHz, TW=4500 ms, NS=4, NECH=6000。通过 10 次重复扫描,获得 30 个回波数据。

1.3.3 游离巯基 (SH) 和总巯基含量测定

根据 Beveridge 和 Arntfield 的方法^[12], 采用 Ellman 试剂测定皮蛋蛋清凝胶中巯基的含量。取 3 g 切碎的皮蛋凝胶样品与 27 mL 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 混合置于 50 mL 离心管中, 3000 r/min 均质 2 min, 然后 8000 r/min 离心 20 min。取上清液待用, 使用双缩脲法测定上清液的蛋白浓度。

测定游离巯基 (SH) 含量, 取 0.20 mL 上清液加入 2.80 mL 缓冲液 1 (0.10 mol/L Tris, 0.10 mol/L 甘氨酸, 4.00 mmol/L EDTA, pH 8) 和 0.02 mL 的 Ellman 试剂 (4 mg/mL DTNB 溶解于 Tris-甘氨酸缓冲液中)。混合物在 40 °C 保温 15 min。随后, 上清液的吸光度用紫外分光光度计在 412 nm 测定。SH 含量使用 1.36×10^4 mol/(L·cm) 的摩尔消光系数计算, 使用磷酸缓冲液作空白。

总巯基含量的测定, 取 0.20 mL 上清液加入 2.8 mL 的缓冲液 2 (0.10 mol/L Tris, 0.10 mol/L 甘氨酸, 4 mmol/L EDTA, 0.50% SDS (W/V), 8.00 mol/L 尿素, pH 8) 和 0.02 mL Ellman 试剂。然后根据与测量游离巯基含量相同的方法对所得混合物进行分光光度分析。SH 含量计算如下:

$$\text{SH} / (\mu\text{mol} / \text{g}) = \frac{73.35 \times A_{412} \times D}{C}$$

式中: A_{412} : 样品在 412 nm 处的吸光度值; C: 样品浓度 (mg/mL); D: 稀释倍数, 15.01。

1.3.4 蛋白质表面疏水性的测定

采用 Chen 等人^[13]描述的方法来测定皮蛋腌制过程中蛋清的表面疏水性。在腌制的不同时间点取样, 取 1 g 样品加入 50 mL 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 7.4), 在 1200 r/min 均质 2 min, 随后 2000 r/min 离心 15 min, 得到上清液。上层清液中的蛋白质浓度采用双缩脲方法进行测定。用磷酸缓冲液将蛋清蛋白上清液稀释至蛋白浓度 0.05~2.50 mg/mL 之间 (5 个样)。

疏水性的测定: 取不同浓度样品的溶液 4 mL, 分别加入 20 μ L 8 mmol/L 的 ANS 甲醇溶液 (0.01 mol/L, pH 7.4 的磷酸缓冲液配制), 振荡后暗室静置 15 min, 然后用荧光分光光度计测定样品的相对荧光强度 (FI)。荧光强度 (FI) 测定: 本实验中, 激发波长和发射波长分别设定为 374 nm 和 485 nm, 狭缝宽度为 5 nm。取荧光强度测定的平均值对蛋白质浓度作曲线, 计算曲线的斜率值作为样品的表面疏水性指数 (S_0)。

1.3.5 皮蛋蛋清凝胶的内源荧光光谱的变化

采集不同腌制时间段的皮蛋蛋清样品, 加入 $10 \times$ 磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH 8.0), 1200 r/min 均

质 2 min, 随后 2000 r/min 离心 15 min。上清液通过 0.45 μ m 过滤器过滤。使用双缩脲检验测定蛋白质的浓度, 用相同的磷酸盐缓冲液将样品浓度调节到 0.01 mg/mL。用荧光分光光度计测定色氨酸的荧光发射光谱。测定内源荧光光谱的条件: 激发波长 295 nm, 扫描范围 300~450 nm, 激发和发射狭缝宽度均为 5 nm。

1.3.6 溶解度、浊度和 Zeta 电位的测定

准确称取 2 g 皮蛋蛋清样品, 置于 50 mL 离心管中, 加入 30 mL 磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L KCl, 0.01 mol/L NaH_2PO_4 , 0.03 mol/L Na_2HPO_4), 2000 r/min 均质 2 min 得到均一的均质液。

随后均质液 4000 r/min 离心 10 min, 用双缩脲法测定上清液蛋白质含量。蛋清蛋白的溶解度根据离心所得上清液蛋白含量占初始蛋清上清液蛋白含量的百分比来计算。

均质液用磷酸缓冲液稀释为 0.12% 蛋白含量的样液, 用于测定浊度和 Zeta 电位。浊度的测定: 取适量样液在常温下静置 15 min, 使用紫外分光光度计测定 600 nm 下的吸光度值。Zeta 电位测定采用电位仪直接测定。每个样品测定 3 次。

1.3.7 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 分析

取鲜鸭蛋以及腌制第 1~4 d 的皮蛋, 去壳后小心地将蛋黄和蛋清分开, 将蛋清冻干后进行粉碎备用。取样品 1 mg, 加入 150 mg 溴化钾研磨压片, 进行红外光谱扫描, 每个样品扫描前均进行 KBr 背景扣除。收集波数范围为 $4000 \sim 400$ cm^{-1} 、扫描次数为 16 次、分辨率为 4 cm^{-1} 。收集每个样品的光谱, 重复测定三次。测定完成的图谱基线校正后进行傅里叶去卷积, 使用高斯函数对谱图进行多次拟合。最后根据各子峰与不同二级结构的对应关系, 按其积分面积占比得到不同二级结构的百分比。

1.3.8 分子间相互作用力的测定

根据 Zhao 等^[14]人的方法进行适当修改, 分析维持皮蛋蛋清凝胶结构的分子作用力。皮蛋蛋清凝胶先后在四种溶剂中的溶解: 0.60 mol/L 氯化钠 (A); 0.60 mol/L 氯化钠+1.50 mol/L 尿素 (B); 0.60 mol/L 氯化钠+8.00 mol/L 尿素 (C); 0.60 mol/L 氯化钠+8.00 mol/L 尿素+0.50 mol/L β -巯基乙醇 (D)。取约 3 g 凝胶切碎后与 27 mL 的 A 溶剂混合, 10000 r/min 乳化均质 1 min, 匀浆在 23000 r/min 下离心 20 min。从 A 中得到的沉淀与 27 mL 的 B 溶剂混合, 进行如上条件的均质离心。然后用 C、D 溶剂依次进行同样的操作。根据双缩脲法测定上清液中的蛋白浓度。每个 D 组分在 A 溶剂中室温下透析 24 h, 以防止 β -巯基乙醇的干扰。每组平行 3 次, 并表示成相对于总蛋白的溶解百分比。

1.3.9 扫描电子显微镜 (SEM) 微观观察

将凝胶样品切成细长条, 用 3.50% 戊二醛固定液浸泡 24 h, 再用 0.10 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 浸泡清洗 15 min, 重复 3 次。然后依次用 50%、70%、80%、90%、100% 乙醇脱水各 10 min。梯度脱水后进行冷冻干燥, 样品冻干后在液氮里面进行萃断, 之后采用离子溅射方法喷金, 喷金时间为 5 min, 然后置于扫描电镜下观察。

1.3.10 数据处理

每个样品平行实验 3 次, 采用 Origin 8.0 进行数据处理分析。测定结果以平均值±标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 皮蛋蛋清凝胶中水分的分布

用 LF-NMR 技术可以测定凝胶样品中的水分状态, 水分子根据它们的分子流动性或它们与凝胶内大分子的结合程度, 将它们分为几个组分^[15]: 如自由水, 单层和多层束缚水。水和蛋白质分子之间的相互作用在蛋白质—水系统中起着重要的作用。因此, 通过测定水分子的自由度或流动性来探究水分子和蛋白质分子的结合。自旋弛豫时间 T_2 代表皮蛋凝胶中的总质子密度, 当 T_2 大于 100 ms 表示高自由度的自由水, 当 T_2 在 10~100 ms 之间时表明为具有较低流动性的多层结合水。

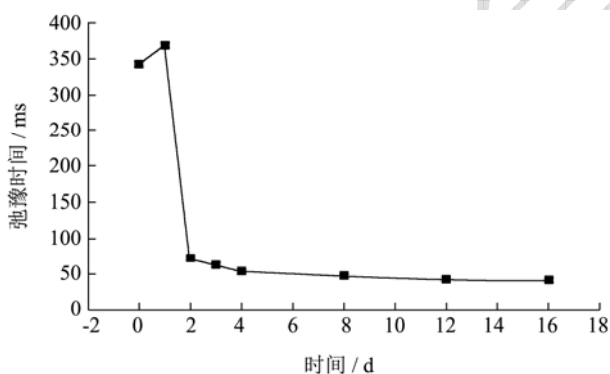


图 1 皮蛋蛋清凝胶在腌制过程中 T_2 的变化

Fig.1 Changes in T_2 of egg white gel of preserved egg during the pickling progress

图 1 结果显示, 腌制第 1 d 蛋清凝胶的 T_2 明显大于新鲜蛋清的 T_2 , 说明化清期水分子变得更易移动, 所以此时蛋清成水样, 具有很高的流动性, 由原来的溶胶状态变成溶液状态。随后在腌制的第 2 d T_2 突然下降, 这是由于蛋白质基质的结构发生变化, 水被包裹在一个由蛋清蛋白伸展和交织形成三维网状结构里面。此时在蛋清中发现部分完整的胶体, 表明凝胶已经开始形成; T_2 的下降表明, 皮蛋蛋白中所含的水分

子结合的程度更加牢固, 水的流动性减弱或自由水的数量减少。这一现象可以归因于两个因素。首先, 由于碱性溶液形成的渗透压力梯度, 导致皮蛋中少量的水通过蛋壳膜向外移动^[16]。第二, 形成的凝胶可能固定了水分子, 离子和多肽链末端的电解质可能与水分子形成了水—离子键, 从而减弱了水分子的移动性^[17]。凝胶完全形成后, 皮蛋进入后熟阶段, 由于蛋白质凝胶的稳定性, T_2 基本保持不变, 但由于水分的流失, 导致 T_2 会出现缓慢的降低的现象, 最终 T_2 约为 40 ms, 表明此时皮蛋凝胶的水分子状态表现为低流动性的多层结合水, 具有良好的持水能力。

2.2 腌制过程中皮蛋凝胶的游离巯基和总巯基含量变化

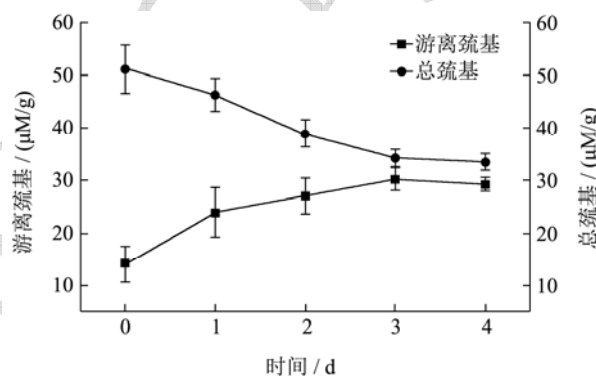


图 2 腌制过程中皮蛋蛋清凝胶中巯基含量的变化

Fig.2 Changes in sulfhydryl group content of egg white gel of preserved egg during the pickling progress

蛋清中蛋白质的巯基和二硫键存在众多, 在卵清蛋白中存在着 4 个游离巯基, 这些巯基大都被埋藏在蛋白质的疏水核心部分, 卵转铁蛋白中就有 15 个二硫键存在, 这些基团与蛋白质的聚集行为息息相关。在皮蛋凝胶腌制过程巯基和总巯基含量的变化如图 2 所示。与新鲜鸭蛋蛋清相比, 用强碱性溶液腌制后, 皮蛋蛋清的游离巯基含量显著增加, 而总巯基含量显著减少。腌制初期由于碱液快速进入, 蛋清在强碱的作用下发生变性, 相互缠绕折叠的二级结构打开, 包埋在蛋白质内部疏水区域内的活性基团暴露, 使游离巯基的含量显著增加。然而, 随着凝胶结构的形成, 游离巯基含量稳定在一定水平, 这是由于巯基的氧化和巯基-二硫键 (SH-SS) 交换反应在极端碱性环境下快速完成^[18]。有研究显示, 半胱氨酸含量在皮蛋腌制过程中大量减少, 这是由于两个半胱氨酸残基的巯基通过与分子氧的氧化反应形成二硫键^[19], 总巯基含量最初显著下降。蛋白质中的二硫键是分子内和分子间共价交联的主要方式, 随着巯基氧化和 SH-SS 交换反

应的反应速率减慢，凝胶化后总巯基含量维持在一定水平。

2.3 腌制过程中皮蛋蛋清蛋白表面疏水性的变化

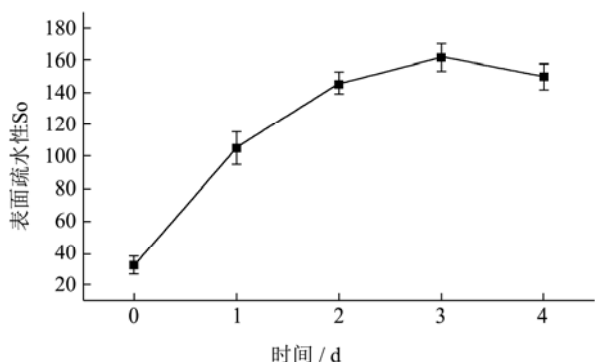


图3 腌制过程中皮蛋蛋清蛋白表面疏水性的变化

Fig.3 Changes of surface hydrophobicity of egg white protein of preserved egg during the pickling progress

巯基是否暴露在分子表面以及巯基的反应活性，还有蛋白质分子的表面疏水性对蛋清蛋白质的凝胶性能会产生一定的影响。ANS 荧光探针用于确定蛋白质的表面疏水性。由图 3 可知，在 0~3 d，随着在料液中浸泡时间的延长，蛋清蛋白表面疏水性指数逐渐增加，表明蛋清蛋白质疏水性逐渐增加。卵清蛋白由 385 个氨基酸残基组成，其中 50%或更多是疏水性氨基酸。在强碱作用下，蛋清蛋白迅速发生变性，空间结构发生变化，蛋白质分子发生去折叠，一些原来埋藏在分子内部的疏水基团，更多的被暴露出来，使蛋白质分子的疏水基团增多，故疏水性增加。疏水相互作用力是维持蛋白质三级结构的一种重要作用力^[20]，蛋白质结构的稳定在很大程度上都要依赖于分子内的疏水作用，因此它对蛋清凝胶结构的稳定性和功能性质具有重要的意义。

然而，在凝胶化过程中，表面疏水性随时间呈缓慢下降趋势。这可能是因为强碱的持续作用下，破坏了蛋清凝胶的分子结构，也必然覆盖了暴露的疏水区域。因此，游离的碱液 (OH⁻) 可能导致变性的蛋白质分子的疏水区逐渐极化，导致疏水性降低。有研究显示，适宜的疏水相互作用有利于蛋白质凝胶网络结构的形成，而疏水相互作用过大则会导致蛋白质分子聚集形成聚集体，造成混浊度升高，凝胶脱水收缩，进而降低所形成的凝胶强度^[21]。这就可能导致在强碱下蛋清形成透明高含水量的凝胶过程中，蛋白质分子之间的疏水相互作用非常弱。

2.4 皮蛋蛋清凝胶的内源荧光光谱的变化

天然卵清蛋白在 290 nm 激发时的荧光发射峰最大值 (λ_{max}) 为 338 nm。表 1 结果显示，腌制过程中的皮蛋蛋清凝胶的 λ_{max} 从 338 nm 逐渐增加到 350 nm，发生红移。蛋白质荧光发射峰的 λ_{max} 逐渐增大，表明腌制过程中，蛋白质变性，芳香族氨基酸分子的侧链基团逐渐暴露于水溶液中，其所处的环境极性逐渐增加。由于色氨酸的芳香性，色氨酸常常被完全或部分地埋藏在蛋白质内部疏水核心区，两个蛋白质结构域或亚结构域的交界处，或者在寡聚蛋白质系统中的亚单位界面。也即，疏水基团的暴露对色氨酸基态和激发态的态能级产生了影响，导致激发态能量的降低，从而引起发射光谱的红移 (λ_{max} 增加)^[22]。因此 λ_{max} 红移可以用来反映蛋白质构象的变化，红移程度越大则说明在变性过程中，蛋白质构象的变化程度越大。在本研究中，皮蛋蛋清的最大发射波长的红移表明了蛋白质结构发生显著的变化，内部疏水基团的暴露。此发现与腌制过程中蛋白质表面疏水性的变化相似。

表 1 腌制过程中皮蛋蛋清蛋白质荧光发射峰 (λ_{max}) 的变化

Table 1 Changes of fluorescence emission peak (λ_{max}) of egg white protein of preserved egg during the pickling process

腌制时间/d	0	1	2	3	4
λ_{max}/nm	338	342	345	350	350

2.5 腌制过程中皮蛋蛋清溶解性和浊度的变化

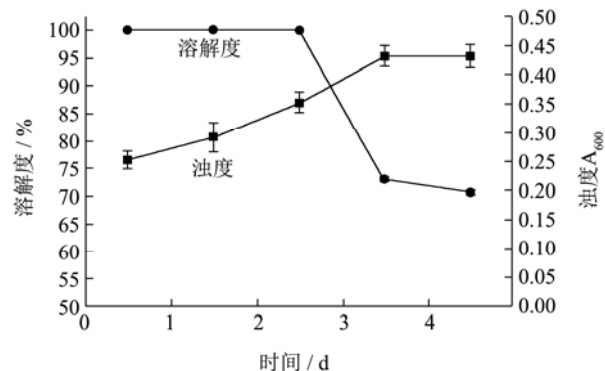


图4 腌制过程中皮蛋蛋清溶解性和浊度的变化

Fig.4 Changes in solubility and turbidity of egg white of preserved egg during the pickling progress

聚集体的性质决定了所得到的宏观凝胶的物理性质，如形成凝胶为透明和弹性或者是混浊和脆性。浊度可以被用来估算蛋白质受环境条件如 pH 或高子强度影响的聚集程度^[23]。如图 4 所示，随着腌制时间的增加，浊度持续增加。说明蛋清在碱的作用下开始变

性,蛋白质展开,蛋白质分子间开始发生聚合作用形成聚集体,随着腌制时间的增加,蛋白质分子间的聚集作用越明显。在腌制的0~2 d内,蛋清的溶解度没有发生显著性的变化,说明碱液(OH⁻)主要作用于蛋白分子的非共价键,影响了蛋清蛋白的分子构象,而展开的蛋白质分子间发生聚合作用,致使蛋清蛋白质溶液浊度增加,但形成的聚集体是可溶性聚集,而非不可溶沉淀,因而体系的溶解度下降不明显。在腌制的3~4 d,在强碱持续作用下,蛋清的浊度显著增大,溶解性显著降低,导致了在这阶段开始形成了致密和连续的蛋清凝胶。

2.6 腌制过程中皮蛋蛋清 Zeta 电位的变化

蛋白质凝胶聚集体的表面电荷对溶剂条件有很高的依赖性,是反映凝胶性质的一个重要参数。通过测定 Zeta 电位来表征蛋白质聚集体之间相互排斥或吸引力的相对大小。

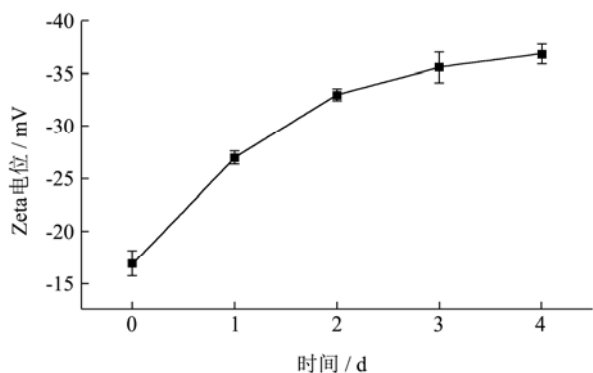


图5 腌制过程中皮蛋蛋清 Zeta 电位的变化

Fig.5 Changes in Zeta value of egg white of preserved egg during the pickling progress

如图5所示,随着腌制时间的延长,蛋清凝胶颗粒的负电荷从第1 d的-16.67 mV增加第4 d时的-35.57 mV,增加了1.13倍。这些蛋白质的负电荷是由于蛋清蛋白中的酸性氨基酸在很高的碱性pH值下产生的。

表2 腌制过程中皮蛋蛋清蛋白质二级结构的变化

腌制时间/d	0	1	2	3	4
α -螺旋/%	40.50±0.12	32.90±0.09	27.70±0.12	12.60±0.07	13.00±0.11
β -折叠/%	35.10±0.09	38.70±0.14	42.40±0.06	54.30±0.09	54.00±0.10
无规卷曲/%	12.90±0.13	11.60±0.11	12.30±0.12	13.20±0.14	12.60±0.07
β -转角/%	13.50±0.09	16.80±0.07	17.60±0.11	19.90±0.09	20.40±0.08

2.8 皮蛋蛋清凝胶中的分子间作用力

为了测量保持蛋白质凝胶结构的分子间作用力以及确定蛋白质凝胶的形成机制,用变性剂处理皮蛋蛋清凝胶以破坏分子间作用力。这些变性剂包括: A 试

在远离等电点的 pH 值下,羧基带负电荷,净负电荷增加。随着腌制时间的延长,蛋白质结构更多地展开,暴露出许多带电荷的氨基酸。在皮蛋的腌制过程中,碱性条件会导致蛋清蛋白肽键的缓慢水解,从而导致肽和氨基酸的形成^[24]。这更有可能是导致多肽负电荷数量增加的原因。有研究显示,皮蛋蛋清聚合物是凝胶粒子主要通过静电斥力而聚集形成的^[9]。随着蛋白质分子的电负性逐渐增加,蛋白质分子间静电斥力的增大,从而导致蛋白质不会过度聚集,阻碍随机聚集体的产生,这都有利于有序线性蛋白质聚集体的形成,从而有利于皮蛋蛋白质形成透明的凝胶。

2.7 皮蛋蛋清凝胶过程中蛋白质二级结构的变化

采用 FTIR 测定腌制过程中的皮蛋蛋清凝胶过程中蛋白质的二级结构变化,酰胺 I 吸收带的红外峰归属分类如下: 1662~1645 cm⁻¹ 为 α -螺旋; 1638~1615 cm⁻¹ 为 β -折叠; 1695~1662 cm⁻¹ 为 β -转角; 1645~1638 cm⁻¹ 为无规卷曲结构^[25]。结果见表2,新鲜蛋清蛋白质二级结构以 α -螺旋和 β -折叠为主,其比例分别占到了40.50%和35.10%。腌制过程中,随着蛋白质变性发生了去折叠和聚集形成更加有序的结构导致 α -螺旋相对含量减少至13.00%, β -折叠增加到54.00%, β -转角由最开始的13.50%增加到20.40%。因此,在碱性环境和凝胶体系中,变性蛋白质结构为较多的 β -折叠和 β -转角,较少的 α -螺旋和无规卷曲,蛋清蛋白可以在上述环境中维持有序结构,其中大多数处于相对稳定的结构状态。在蛋白质凝胶形成期间,蛋白质的二级结构发生了很大变化,这种变化可能是由于二级结构之间的相互转换, β -结构有助于参与蛋白质分子之间的聚集^[26]。

剂, 0.60 mol/L 氯化钠(离子键); B 试剂, 1.50 mol/L 脲(氢键); C 试剂, 8.00 mol/L 脲(氢键和疏水相互作用); D 试剂, 0.50 mol/L β 巯基乙醇(二硫键)。不同的变性剂以各种组合使用来测量蛋白质的溶解度,以确定蛋白质凝胶形成中每种类型的力(即离子

键, 氢键, 疏水相互作用, 二硫键和非二硫键共价键) 的作用。

凝胶形成后体系中存在各种力的动态平衡变化, 也就是吸引力和排斥力不断变化。如图 6 所示, 各种溶剂中的蛋白质溶解度分布显著不同, 在 A、B、C 和 D 溶剂中的蛋白质溶解度分别约为 $39.12\% \pm 4.50\%$ 、 $8.95\% \pm 3.10\%$ 、 $16.92\% \pm 4.20\%$ 和 $35.01\% \pm 3.80\%$ 。该结果表明, 维持蛋白质凝胶的分子间作用力从强到弱依次是离子键、二硫键、疏水相互作用和相对较少的氢键。此外, 没有观察到不溶性现象, 表明没有其他形式的共价键存在。

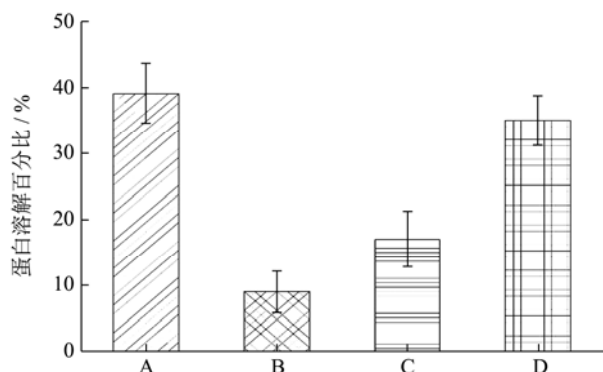


图 6 使用不同溶剂溶解的皮蛋蛋清凝胶的蛋白质溶解度

Fig.6 Protein solubility of egg white gel of preserved egg by dissolved in different solutions

注: 0.60 mol/L 氯化钠 (A); 0.60 mol/L 氯化钠+1.50 mol/L 尿素 (B); 0.60 mol/L 氯化钠+8.00 mol/L 尿素 (C); 和 0.60 mol/L 氯化钠+8.00 mol/L 尿素+0.50 mol/L β -巯基乙醇 (D)。

皮蛋凝胶有大量的离子键和一定数量的二硫键可能是由于在强碱性溶液中建立的亲水环境而形成的。离子键的类型可能包括静电吸引力, 既“盐桥”, “水-离子键”。高 pH 下蛋白质分子表面会产生净负电荷, 从而导致蛋白质聚集体间产生静电斥力, 静电排斥力可以防止蛋白质分子间过度聚集, 这对得到均匀的凝胶网络是非常重要的。“盐桥”和离子键可能促进凝胶结构的稳定性和稳定凝胶体系。皮蛋蛋白在 B 和 C 的高浓度尿素溶液中的溶解度值较低。氢键和疏水作用力也存在于凝胶体系中, 但它们在含有高含水量的凝胶体系中可能不起很大作用。因此氢键和疏水相互作用并不是稳定皮蛋凝胶的主导力量。

在 D 溶剂中溶解的可溶部分表示皮蛋凝胶中二硫键的比例。丰富的游离巯基组和蛋白的蛋白质中的二硫键以及强碱性环境, 给含巯基的氧化反应和 SH-SS 交换反应提供了良好的条件^[27]。由于二硫键相当于增加了肽链的长度, 使分子间的相互缠绕机会增大, 蛋白质和多肽链之间发生交联增加凝胶体系的平均分子量, 有助于凝胶。当凝胶趋于稳定时, 凝胶体系中的

分子相互作用达到一定的平衡。例如, 疏水性内部基团的暴露可以增强疏水性的作用, 并通过二硫键相互作用驱动蛋白质分子的聚集。长的多肽链也倾向于相互缠绕, 因为二硫键有利于增加多肽的有效长度, 从而促进共价键的形成^[28]。

2.9 腌制过程中皮蛋蛋清微观结构的变化

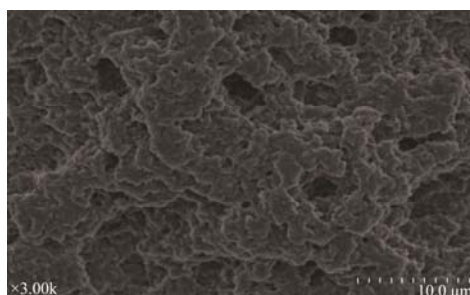


图 7 热诱导蛋清凝胶微观结构

Fig.7 Microstructure of egg white gel induced by heat ($\times 3000$)

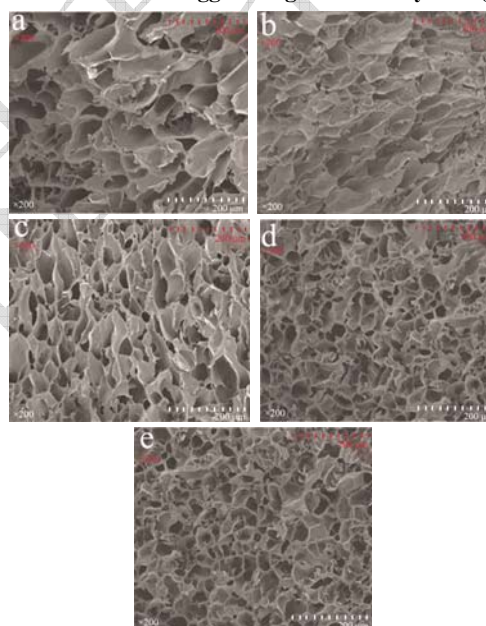


图 8 腌制过程中皮蛋蛋清凝胶的微观结构变化

Fig.8 Changes in the microstructure of egg white gel of preserved egg during the pickling progress ($\times 200$)

注: a: 第 3 d; b: 第 4 d; c: 第 8 d; d: 第 12 d; e: 第 16 d。

不同腌制时间点的皮蛋凝胶采用 SEM 观察其凝胶的微观结构。图 7 为热诱导蛋清凝胶微观结构, 可看出蛋清蛋白质聚集形成了具有颗粒链的网络结构。图 8 为皮蛋蛋清凝胶微观结构, 与热诱导形成的颗粒链网络结构不同, 减压法下腌制的皮蛋蛋清凝胶微观结构呈现出均匀、精细和规则的三维网络结构, 该结构现象与前人研究结果一致^[29,30]。图 8 显示, 随着腌制时间的延长, 蛋白质凝胶网状结构更加规整、细小、致密。在样品真空冷冻干燥过程中, 蛋白质凝胶网格

结构的形成很可能是由于凝胶内部包裹的水分子气化后而留下的。因此,凝胶结构可能随着含水量的变化而变化,随着腌制过程中自由水的减少,网络结构越来越细小、致密。本研究中的蛋清凝胶呈现出良好的丝状网络,这种结构可能是由蛋白质分子的聚集和延伸引起的,变性的蛋白质分子通过疏水相互作用聚集,相互排列,形成一个线性聚合物^[31]。由于碱液 pH 值下,净负电荷引起的分子内的强静电排斥力导致了分子间的聚集被削弱,阻碍了线性聚合物的过度聚集。二硫键对于皮蛋凝胶来说是必不可少的^[7],线性聚合物可以通过二硫键相互连接,于是形成类似于本研究中所观察到的纤维网络结构。

3 结论

皮蛋蛋清凝胶体系中存在低流动性的多层结合水,具有良好的持水能力;蛋清蛋白的游离巯基先显著增加后维持稳定,总巯基含量先显著下降后维持在一定水平,疏水性先增加后降低,适宜的疏水相互作用有利于蛋白质凝胶网络结构的形成;蛋清蛋白的浊度显著增大而溶解性显著降低,形成了致密和连续的蛋清凝胶;蛋白质分子间静电斥力增加了 1.13 倍,有利于有序线性蛋白质聚集体的形成,形成透明的凝胶; α -螺旋相对含量减少至 13.00%, β -折叠增加到 54.00%, β -转角增加到 20.40%,表明 β -结构有助于参与蛋白质分子之间的聚集;维持蛋白质凝胶的分子间作用力从强到弱依次是离子键、二硫键、疏水相互作用和相对较少的氢键;通过以上的相互作用,皮蛋蛋清最终形成了均匀、精细和规则的三维纤维网络结构。本研究阐明了减压技术腌制皮蛋蛋清凝胶形成的机理,为现代化加工皮蛋提供了理论基础。

参考文献

- [1] Mao C Y, Yu Z H, Li C L, et al. The functional properties of preserved eggs: from anti-cancer and anti-inflammatory aspects [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2018, 38(3): 615-628
- [2] Zhang M Y, Zhao Y, Wu N, et al. The anti-inflammatory activity of peptides from simulated gastrointestinal digestion of preserved egg white in DSS-induced mouse colitis [J]. Food & Function, 2018, 9(12): 6445-6455
- [3] Ding N, Mao C, Cai Z, et al. Anti-inflammatory effect of preserved egg with simulated gastrointestinal digestion on LPS-stimulated RAW264.7 cells [J]. Poultry Science, 2019, 98: 4401-4407
- [4] Chen Z Y, Li J K, Tu Y G, et al. Changes in gel characteristics

- of egg white under strong alkali treatment [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 45(3): 1-8
- [5] Ganesan P, Benjakul S. Effect of glucose treatment on texture and color of pidan white during storage [J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2014, 51(4): 729-735
- [6] Zhang X W, Jiang A M, Chen M T, et al. Effect of different alkali treatments on the chemical composition, physical properties, and microstructure of pidan white [J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2015, 52(4): 2264-2271
- [7] 季玲,刘会平,杨晓兴,等.减压技术快速腌制松花蛋工艺条件的优化[J].现代食品科技,2013,29(5):1029-1035
JI Ling, LIU Hui-ping, YANG Xiao-xing, et al., Fast preparation of preserved eggs by low-pressure technology [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 1029-1035
- [8] 邹乾.减压法腌制皮蛋及其后熟过程中品质变化研究[D].天津:天津科技大学,2018:18-25
ZOU Qian, Study on the quality change of pickled preserved eggs and their post-cooking process under reduced pressure [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2018: 18-25
- [9] 赵燕,徐明生,涂勇刚.皮蛋加工相关机理研究进展[J].食品科学,2010,31(17):472-475
ZHAO Yan, XU Ming-sheng, TU Yong-gang. Research progress in mechanisms of preserved egg processing [J]. Food Science, 2010, 31(17): 472-475
- [10] Zhao W, Yang R J, Tang Y L, et al., Investigation of the protein-protein aggregation of egg white proteins under pulsed electric fields [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(9): 3571-3577
- [11] Li J H, Zhang M Q, Chang C H, et al. Molecular forces and gelling properties of heat-set whole chicken egg protein gel as affected by NaCl or pH [J]. Food Chemistry, 2018, 261: 36-41
- [12] Beveridge T, Arntfield S. Heat induced changes in sulphhydryl levels in egg white [J]. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 1979, 12(4): 173-176
- [13] Chen Y X, Sheng L, Gouda M, et al. Studies on foaming and physicochemical properties of egg white during cold storage [J]. LWT - Food Science and Technology, 2019, 113: 108303
- [14] Zhao Y, Chen Z Y, Li J K, et al. Changes of microstructure characteristics and intermolecular interactions of preserved egg white gel during pickling [J]. Food Chemistry, 2016, 203: 323-330

- [15] Kuo M I, Gunasekaran S, Johnson M, et al. Nuclear magnetic resonance study of water mobility in pasta filata and non-pasta filata mozzarella [J]. *Journal of Dairy Science*, 2001, 84(9): 1950-1958
- [16] Zhao Y, Tu Y, Xu M, et al. Physicochemical and nutritional characteristics of preserved duck egg white [J]. *Poultry Science*, 2014, 93(12): 3130-3137
- [17] Totosaus A, Montejano J G, Salazar J A, et al. A review of physical and chemical protein-gel induction [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 37(6): 589-601
- [18] Van Der Plancken I, Van Loey A, Hendrickx M E G. Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(14): 5726-5733
- [19] Hwang J S, Lai K M, Hsu K C. Changes in textural and rheological properties of gels from tilapia muscle proteins induced by high pressure and setting [J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(2): 746-753
- [20] Ai M M, Zhou Q, Guo S G, et al. Effects of tea polyphenol and Ca(OH)₂ on the intermolecular forces and mechanical, rheological, and microstructural characteristics of duck egg white gel [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 94: 11-19
- [21] Wu L, Zhao W, Yang R J, et al. Aggregation of egg white proteins with pulsed electric fields and thermal processes [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(10): 3334-3341
- [22] Pinotsi D, Grisanti L, Mahou P, et al. Proton transfer and structure-specific fluorescence in hydrogen bond-rich protein structures [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(9): 3046-3057
- [23] Ganasen P, Benjakul S. Effect of three cations on the stability and microstructure of protein aggregate from duck egg white under alkaline condition [J]. *Food Science and Technology International*, 2011, 17(4): 343-349
- [24] Ganesan P, Benjakul S. Influence of different cations on chemical composition and microstructure of pidan white and yolk during pickling and aging [J]. *International Journal of Food Properties*, 2010, 13(5): 1150-1160
- [25] Zhou X X, Chen T, Lin H H, et al. Physicochemical properties and microstructure of surimi treated with egg white modified by tea polyphenols [J]. 2019, 90: 82-89
- [26] Pezennec S, Gauthier F, Alonso C, et al. The protein net electric charge determines the surface rheological properties of ovalbumin adsorbed at the air-water interface [J]. *Food Hydrocolloids*, 2000, 14(5): 463-472
- [27] Mine Y. Recent advances in egg protein functionality in the food system [J]. *World's Poultry Science Journal*, 2002, 58: 31-39
- [28] Yang Y, Zhao Y, Xu M S, et al., Changes in physico-chemical properties, microstructure and intermolecular force of preserved egg yolk gels during pickling [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 89: 131-142
- [29] Handa A, Takahashi K, Kuroda N, et al. Heat-induced egg white gels as affected by pH [J]. *Journal of Food Science*, 2008, 63(3): 403-407
- [30] Guo W B, Zhao Y, Yao Y, et al., Relationship between protein structure changes and *in vitro* digestion of preserved egg white during pickling [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 138: 116-124
- [31] Tani F, Murata M, Higasa T, et al. Heat-induced transparent gel from hen egg lysozyme by a two-step heating method [J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1993, 57(2): 209-214

(上接第 203 页)

- [10] 徐丽青.岩藻黄素纳米乳液的制备、性质及体外释放研究 [D].南昌:南昌大学,2015
XU Li-qing. Preparation, characterization and *in vitro* digestion of fucoxanthin emulsion [D]. Nanchang: Nanchang University, 2015
- [11] Ridgley D M, Ebanks K C, Barone J R. Peptide mixtures can self-assemble into large amyloid fibers of varying size and morphology [J]. *Biomacromolecules*, 2011, 12(10): 3770-3779
- [12] Liu X, Guo J, Wan Z L, et al. Wheat gluten-stabilized high internal phase emulsions as mayonnaise replacers [J]. *Food hydrocolloids*, 2018, 77: 168-175
- [13] Wu N N, Huang X, Yang X Q, et al. *In vitro* assessment of the bioaccessibility of fatty acids and tocopherol from soybean oil body emulsions stabilized with ι-carrageenan [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(6): 1567-1575
- [14] Bellesi F A, Martinez M J, Ruiz-Henestrosa V M P, et al. Comparative behavior of protein or polysaccharide stabilized emulsion under *in vitro* gastrointestinal conditions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 52: 47-56