

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2024.05.041

不同酶解条件下大豆分离蛋白结构特性及起泡性研究

齐宝坤 王英 李子玉 张小影 王帅

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 以大豆分离蛋白(SPI)为原料,采用碱性蛋白酶(Alcalase)进行酶解(0~180 min),通过凝胶电泳、傅里叶红外光谱(FT-IR)和内源荧光光谱等方法探究酶解产物的结构变化;通过表面张力、界面蛋白吸附量等指标说明酶解产物的界面行为,并分析结构变化和界面行为对泡沫性质的影响。经酶解后,蛋白中7S和11S典型条带消失并有新条带产生(约24 ku);与SPI相比,水解物中 α -螺旋含量减少, β -转角和无规则卷曲含量增加;荧光波长发生红移。以上结果说明蛋白结构展开,进而促进蛋白功能性的改变。结果发现,酶解90 min时样品起泡性最好(起泡性指数143.20%),可能由于此时水解物平均粒径最低(208.10 nm),溶解度较高(90.44%),表面张力最低,有利于提升水解物在空气-水界面的吸附速率,但由于酶解作用产生较小的肽段失去了蛋白质网络结构的能力,因而对泡沫稳定性有负面的影响。此外,酶解作用大大提高了蛋白抗氧化性。通过酶解可以有效地改善SPI的起泡性,拓宽了酶解后的SPI作为一种有效的起泡剂在食品中的应用范围。

关键词: 大豆分离蛋白;碱性蛋白酶;界面行为;起泡性;抗氧化

中图分类号: TS214.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2024)05-0431-09

OSID:



Effect of Enzymatic Hydrolysis on Structure and Foamability of Soybean Protein Isolate

QI Baokun WANG Ying LI Ziyu ZHANG Xiaoying WANG Shuai

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

Abstract: Soybean protein isolate (SPI) was used as raw material for hydrolysis with Alcalase (0~180 min). The structural changes of enzymatic hydrolysis products were investigated by gel electrophoresis, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and intrinsic fluorescence spectra. The interfacial behavior of enzymatic hydrolysis products was described by surface tension and adsorption of interfacial protein, and the influence of structural changes and interfacial behavior on the foam properties was analyzed. After enzymatic hydrolysis, the typical 7S and 11S bands disappeared and new bands were produced (about 24 ku). Compared with SPI, the content of α -helix was decreased, the content of β -turn and random coil was increased in hydrolysate, and the fluorescence wavelength was red shifted. These results indicated that the protein structure was unfolded, which in turn promoted the change of protein function. The results showed that the foamability of the sample was the best (143.20%) at 90 min, which may be due to the lowest average particle size (208.10 nm), high solubility (90.44%) and lowest surface tension of the hydrolysate at this time, which was conducive to improving the adsorption rate of the hydrolysate at the air-water interface. However, due to the small peptides produced by enzymolysis, the ability of protein network structure was lost, which had a negative impact on foam stability. In addition, the antioxidant activity of the protein was greatly improved by enzymatic hydrolysis. The foamability of SPI can be effectively improved through enzymatic hydrolysis, and the application range of SPI as an effective foaming agent in food was expanded.

Key words: soybean protein isolate; alcalase; interfacial behavior; foamability; antioxidant

收稿日期: 2023-09-05 修回日期: 2023-10-10

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD2100301)

作者简介: 齐宝坤(1986—),男,副教授,博士,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: qibaokun22@163.com

0 引言

泡沫是一种重要的胶体分散体系,普遍存在于食品中,如蛋糕、面包、冰淇淋、鲜奶油、啤酒、咖啡泡沫等。这些产品的结构取决于泡沫的形成和稳定性,并且泡沫的形成有助于产品感官质量的提升。但是这些泡沫分散体在热力学上是不稳定的,其相对稳定性取决于体系中表面活性组分的性质^[1]。天然蛋白本身具有的表面活性可以使其在气-水界面进行吸附,导致表面张力的降低,从而具有良好的起泡性,因此在食品工业中被广泛用作发泡剂^[2]。

大豆分离蛋白(Soybean protein isolate, SPI)因其高营养价值、低成本和良好的功能特性被广泛应用在食品工业。然而,与动物源蛋白(如蛋清或奶制品)相比,大豆蛋白的起泡性较低,这往往与其紧凑的三级结构和较差的溶解性有关^[3]。对大豆蛋白进行结构修饰以提高其构象灵活性是提高起泡能力的一种可行途径。各种改性方法,包括物理、化学或酶法修饰,已被用于提高蛋白质的营养价值或功能特性^[4]。与其他方法相比,酶解具有反应期间条件(pH值、温度)温和、安全性高、设备要求低^[5]等优势。有研究表明,酶法改性可以提高蛋白的起泡性及生物活性。文献[6]利用木瓜蛋白酶和胃蛋白酶水解 β -伴大豆球蛋白改善了其起泡性,发现酶解产生的多肽对界面和泡沫稳定性有积极的影响,并具有促进健康的作用。文献[7]在用碱性蛋白酶(Alcalase)水解向日葵蛋白时,发现较低的水解度(1.50%)可以促进泡沫的产生,但是水解度增加到9.80%并没有进一步改善起泡性,并且泡沫稳定性远低于天然向日葵蛋白。同时,文献[8]提到,Alcalase修饰后的鹰嘴豆蛋白具有更高的抗氧化活性。然而,目前研究表明酶解会影响蛋白起泡性和稳定性,但水解后SPI的结构变化与起泡性之间的关系没有进行更全面的阐述。

因此,本文使用Alcalase酶解SPI,得到不同水解时间的水解物,并对其结构和泡沫性质进行评价。通过FT-IR(傅里叶红外光谱)、内源荧光光谱和表面疏水性指数 H_0 等测试手段表征大豆分离蛋白水解产物(Soybean protein isolate hydrolysate, SPIH)的结构特征,同时测定水解物起泡性和抗氧化性等性质,并从微观和界面角度分析结构变化对蛋白起泡性的影响,建立SPI构象改变与泡沫特性之间的关系,以期拓宽SPI在泡沫产品中的应用范围。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白(Soybean protein isolate, SPI;蛋白质量分数90%以上),上海源叶有限公司;碱性蛋白酶(5.00×10^4 U/g, EC3),丹麦诺维信公司;邻苯二甲醛(o-Phthalaldehyde, OPA)、8-苯胺-1-萘磺酸(8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid, ANS),阿拉丁生物试剂有限公司;2,2-连氮双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2-zaino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS),美国Sigma-Aldrich公司;二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT),索莱宝生物试剂有限公司;其他化学试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

PHS-3C型pH计,上海仪电科仪仪器系统有限公司;UV-240IPC型紫外-可见分光光度计,日本岛津仪器公司;F-4500型荧光分光光度计,日立高新技术公司;pilot10-15EP型真空冷冻干燥机,北京博医康仪器有限公司;FTIR-8400S型傅里叶红外光谱仪,日本日立公司;Zeta Sizer Nano ZS90型粒度及电位分析仪,英国马尔文仪器有限公司;Gel Doc EZ型凝胶成像仪,美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 大豆分离蛋白水解产物制备

准确称量一定的SPI溶于去离子水中,配置成底物质量浓度为0.05 g/mL的分散液,室温(20℃)搅拌2 h,确保蛋白完全溶解。随后加入Alcalase(55℃, pH值9)进行酶解,加酶量为底物质量的0.5%。分别在不同时间15、30、60、90、120、180 min进行取样,0 min为未水解的SPI。完成后立即在沸水浴中灭酶10 min,待水解液冷却至室温后离心(8 000 r/min, 4℃)15 min,收集上清液并冷冻干燥处理,保存在干燥皿中备用。

1.3.2 水解度(DH)测定

根据文献[9]的方法,稍作修改。配制2 mg/mL的蛋白水解液,吸取400 μ L样品溶液和3 mL OPA溶液在棕色试管中充分混合,室温避光反应2 min后,立即读取340 nm处的吸光度,记为 A_{sample} ,标准和空白分别用丝氨酸和去离子水代替样品与OPA混合,读数记为 A_{standard} 和 A_{blank} ,丝氨酸标准溶液OD值(吸光度)为0.80左右,每个样品重复3次。水解度(DH)计算公式为

$$D_H = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{其中} \quad h = \frac{S_{\text{erine-NH}_2} - \beta}{\alpha} \quad (2)$$

$$S_{erine-NH_2} = \frac{0.9516(A_{sample} - A_{blank})}{(A_{standard} - A_{blank})C} \quad (3)$$

式中 h ——被水解的肽键数

D_H ——水解度, %

h_{tot} ——蛋白中含有的总肽键数, 取 $7.80^{[10]}$

C ——样品质量浓度, mg/mL

对于大豆蛋白来说, 系数 $\beta = 0.34$, $\alpha = 0.97$ 。

1.3.3 溶解度测定

用双缩脲法测定样品的溶解度。首先配制牛血清白蛋白标准溶液, 做出标准曲线, 然后制备质量浓度为 2.50 mg/mL 的样品溶液 (pH 值 7), 在 $10\,000g$ 、 4°C 下离心 15 min , 取 1 mL 上清液和 4 mL 双缩脲试剂混匀, 室温避光反应 30 min , 在 540 nm 处测定吸光度, 根据标准曲线计算出可溶性蛋白质质量浓度, 溶解度 $S_{olubility}$ 计算公式为

$$S_{olubility} = \frac{C}{C_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中 C_0 ——总蛋白质质量浓度

1.3.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳测定

SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳) 采用文献 [11] 的方法, 稍作修改。配制 2 mg/mL 的样品, 将样品 ($10 \mu\text{L}$) 与 $4 \times$ 上样缓冲液 ($30 \mu\text{L}$) 进行混合, 随后沸水浴 10 min , 上样 $10 \mu\text{L}$ 。使用 12% 分离凝胶和 5% 浓缩凝胶进行电泳, 80 V 运行 30 min , 120 V 运行至结束, 结束后凝胶用考马斯蓝 R-250 染色, 然后甲醇-冰醋酸进行脱色至条带清晰, 最后用凝胶成像仪进行拍照分析。

1.3.5 平均粒径和 Zeta 电位测定

配制 1 mg/mL 的样品分散液, 采用 Zeta Sizer Nano ZS90 型粒度分析仪测量样品的粒度分布和表面电荷^[12], 分散相和连续相的折射率分别为 1.46 和 1.33 , 将样品稳定在 25°C 下 120 s , 重复 3 次。

1.3.6 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 分析

将冻干样品与溴化钾按 $1:100$ 混合 (样品与溴化钾质量之比) 制备片剂, 然后使用 FT-IR 扫描。自动信号记录在 $400 \sim 4\,000 \text{ cm}^{-1}$ 范围内, 以分辨率 4 cm^{-1} 扫描 32 次。采用 OMNIC 6.0 数据采集软件和 Peak Fit V4.12 峰处理软件程序对光谱数据进行分析。

1.3.7 表面张力测定

配制 10 mg/mL 样品溶液, 然后加入微型进样针管中, 使用视频光学角监测所有样品在 $5 \mu\text{L}$ 恒定滴落体积下持续 500 s 的动态表面张力。

1.3.8 表面疏水性指数 H_0 测定

根据文献 [13] 的方法, 稍作修改。将 ANS 分散于磷酸盐缓冲溶液 (PBS, 10 mmol/L , pH 值 7) 中, 室

温下充分搅拌, 再用 PBS 稀释样品 ($0.01 \sim 1.00 \text{ mg/mL}$)。在 4 mL 的样品中, 加入 $20 \mu\text{L}$ ANS 溶液 (8 mmol/L , pH 值 7), 避光反应 5 min , 在 370 nm (激发) 和 465 nm (发射) 下测量 ANS 的荧光强度, 并以两者差值为纵坐标, 蛋白质质量浓度 (mg/mL) 为横坐标, 激发和发射的狭缝均设置为 5 nm 。通过线性回归分析计算初始斜率, 即为表面疏水性指数 H_0 。

1.3.9 内源荧光光谱测定

参考文献 [14] 的方法测定蛋白的内源荧光光谱。配制 1 mg/mL 的样品溶液, 使用 F-7100 型荧光分光光度计, 以 $1\,200 \text{ nm/min}$ 的扫描速率记录 $300 \sim 500 \text{ nm}$ 之间的发射光谱, 狭缝宽度设定为 2.5 nm 。

1.3.10 界面蛋白吸附量

根据文献 [14] 的方法, 稍作修改, 测定泡沫中蛋白质的质量浓度。不同酶解时间的蛋白溶液 (10 mg/mL) 用高速剪切机在 $10\,000 \text{ r/min}$ 下剪切 2 min 。放置 30 min 后, 用双缩脲法测定剪切前溶液的蛋白质质量浓度和放置 30 min 后析出下层液体中的蛋白质质量浓度。界面蛋白吸附量定义为泡沫蛋白质质量浓度占初始蛋白质质量浓度的百分比。

1.3.11 DPPH 自由基清除活性测定

在 96 孔板上滴加 $100 \mu\text{L}$ 用 95% 乙醇制备的 DPPH 溶液 (0.2 mmol/L), 与 $100 \mu\text{L}$ 样品溶液 ($0.01 \sim 10.00 \text{ mg/mL}$) 混合, 以 95% 乙醇代替样品作为对照, 室温避光孵育 30 min , 测定其 517 nm 处的吸光度。DPPH 自由基清除率 D_p 计算公式为

$$D_p = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \quad (5)$$

式中 A_1 ——对照组吸光度

A_2 ——实验组吸光度

1.3.12 ABTS⁺ 自由基清除活性测定

将 ABTS 试剂 (7 mmol/L) 与等体积的过硫酸钾溶液 (2.45 mmol/L) 混合制备成 ABTS⁺ 储备液 (使用前室温孵育 $12 \sim 16 \text{ h}$), 用 10 mmol/L PBS 稀释 ABTS⁺ 储备液, 使其在 734 nm 处吸光度为 0.70 ± 0.02 。在 96 孔板上滴加稀释后的 ABTS⁺ 储备液 ($150 \mu\text{L}$) 和样品 ($0.01 \sim 1.00 \text{ mg/mL}$) $50 \mu\text{L}$, 混合均匀后, 室温避光反应 10 min , 测定 734 nm 处的吸光度, PBS 代替样品作为对照^[15]。ABTS⁺ 自由基清除率计算方法同 DPPH 自由基清除率。

1.3.13 起泡性及泡沫稳定性测定

根据文献 [16] 的方法, 稍作修改, 测定样品的起泡性和泡沫稳定性。将样品溶液 (10 mg/mL) 置

于平底离心管中,记录下样品高度 H_1 ,用高速剪切机在 10 000 r/min 下剪切 2 min,记录下此时样品高度 H_2 ,静置 30 min 后,记录下此时样品高度 H_3 ,起泡性(FC)指数和泡沫稳定性(FS)指数计算公式为

$$F_c = \frac{H_1 - H_2}{H_1} \times 100\% \quad (6)$$

$$F_s = \frac{H_3 - H_1}{H_2 - H_1} \times 100\% \quad (7)$$

1.3.14 泡沫显微图像

按照 1.3.13 节的方式制备新鲜泡沫,吸取 70 μL 泡沫样品放在凹面载玻片上,在显微镜上分别用 4 \times 目镜和 10 \times 物镜观察 2 min 和 30 min 泡沫的微观结构。

1.4 数据统计

所有实验均为 3 次重复,数据以平均值 \pm 标准差表示。采用 SPSS 25.0 统计分析软件对样品的结果进行 ANOVA 显著性差异分析($P < 0.05$)。采用 Origin 2019 软件制图。

2 结果与分析

2.1 水解度和溶解度

由图 1 可知,DH 随着水解时间的延长呈现逐渐上升的趋势,其增长速率在 90 min 后较为缓慢,酶解 180 min 时样品的 DH 为 $(10.27 \pm 0.23)\%$ 。在酶解前期,由于蛋白酶水解的底物比较充足,酶切位点较多,所以酶解速率增加较快。但随着水解时间的延长,SPI 逐渐被分解为多肽,酶切位点减少,酶解速率增加缓慢^[17];同时,过多的 SPIH 积累也可能对蛋白酶产生竞争性抑制,这也会导致酶解曲线出现上述变化。

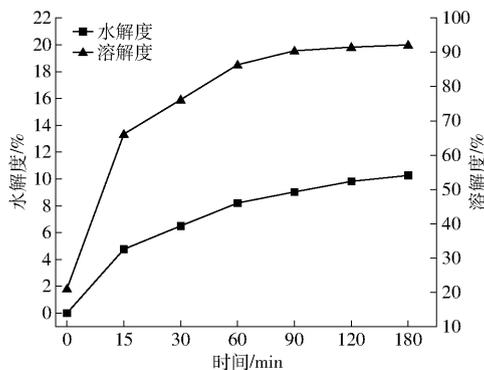


图 1 不同酶解时间下样品的水解度和溶解度

Fig. 1 Hydrolysis degree and solubility of samples at different enzymatic hydrolysis times

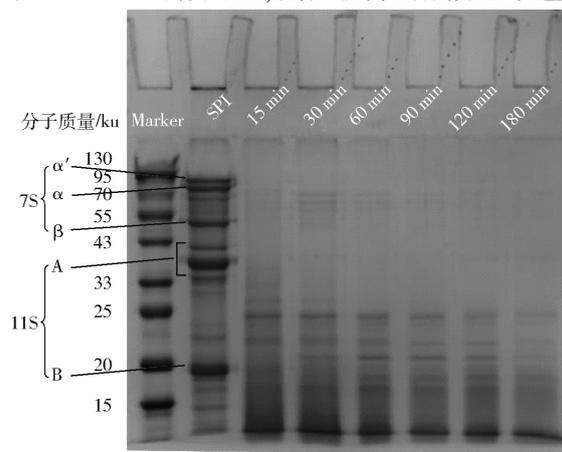
溶解度是蛋白质的一项重要功能特性,在很大程度上影响蛋白质的其他功能特性^[18](如起泡性、凝胶性等)。由图 1 可知,SPI 溶解度仅为 $(21.04 \pm 0.39)\%$,在 Alcalase 作用下,SPI 溶解度显著($P <$

0.05)增加,这是由于 SPI 经酶解作用后肽键断裂,形成小分子肽,同时氨基和羧基数目增多,极性和亲水性增大,溶解度增强^[19]。

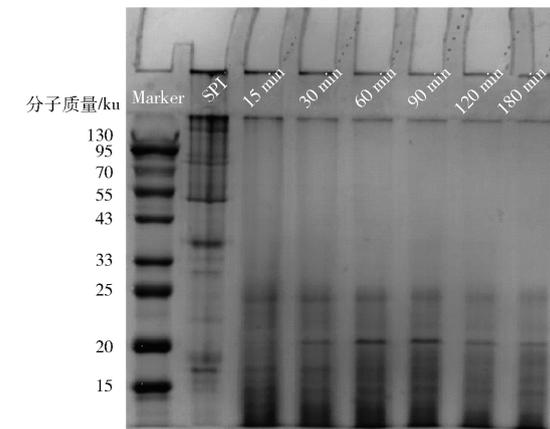
2.2 酶解对 SPI 结构特性的影响

2.2.1 SDS-PAGE

为了进一步研究水解时间对 SPI 的结构影响程度,在还原和非还原条件下测定酶解前后的 SDS-PAGE。文献[20]指出 SPI 的主要组成部分是 7S 和 11S,组成亚基包括 7S 的 α 、 α' 和 β ,11S 的酸性亚基 A 和碱性亚基 B。在图 2a 中天然 SPI 显示出含有 7S 和 11S 的典型条带。在非还原条件下(图 2b),通过二硫桥连接的酸性和碱性亚基(A、B)条带在酶解样品中被发现比 SPI 减弱,同时有部分阴影堆积在浓缩胶顶部,这意味着部分聚集。而在还原条件下(图 2a),失去的条带大部分恢复,说明聚集体的形成主要是通过二硫键作用^[21]。由图 2a 可知,在 Alcalase 作用下 SPI 的电泳图谱发生了明显变化,酶解初期,7S 的典型条带几乎消失,同时出现了 1 条约为 24 ku 的条带。随着酶解时间的延长,蛋白条带逐渐模糊,大量小于 15 ku 的多肽被释放。这说明在 Alcalase 的作用下,蛋白被降解成分子质量较



(a) 还原条件



(b) 非还原条件

图 2 不同酶解时间下样品的 SDS-PAGE

Fig. 2 SDS-PAGE of samples at different enzymolysis times

小的肽段,肽段间的作用力(二硫键和疏水相互作用)都被破坏。

2.2.2 平均粒径和 Zeta 电位

如表 1 所示,随着酶解时间的延长,样品平均粒径先减小后增大,90 min 样品粒径最小(208.10 nm)。有研究证明,Alcalase 作用 SPI 后,由于肽键断裂,蛋白形成小分子多肽导致样品的粒径减小^[22]。继续酶解产生大量的小分子物质可能通过疏水相互作用又发生聚集,SPIH 的平均粒径又逐渐增大。Zeta 电位是评价蛋白颗粒稳定性的一个重要特征。酶解前后蛋白 Zeta 电位均表现出负值(表 1),表明蛋白表面具有较多的负电荷和较强的静电斥力。随着酶解时间的延长,蛋白表面所带净电荷数量逐渐下降,这与文献^[23]的研究结果相似,可能是酶解产生了较多的亲水性多肽,其一般所带电荷较分散且数量较少。

表 1 酶解产物的平均粒径和 Zeta 电位

Tab. 1 Average particle size and Zeta potential of enzymolysis products

酶解时间/min	平均粒径/nm	Zeta 电位/mV
0	(827.00 ± 2.97) ^a	(-35.30 ± 1.13) ^e
15	(284.93 ± 2.17) ^b	(-25.63 ± 1.06) ^d
30	(274.76 ± 1.37) ^b	(-21.96 ± 0.45) ^c
60	(246.80 ± 3.10) ^c	(-19.16 ± 0.15) ^b
90	(208.10 ± 0.45) ^e	(-18.50 ± 0.36) ^b
120	(227.90 ± 6.95) ^d	(-18.46 ± 1.26) ^b
180	(271.10 ± 3.34) ^b	(-10.66 ± 0.76) ^a

注:同列数据不同字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2.3 傅里叶红外光谱

如图 3 所示,在酰胺 A 区(3 000 ~ 3 500 cm^{-1})的特征吸收峰被认为是 N—H 键和 O—H 键的伸缩振动,这主要与多肽主链的氢键有关。与 SPI 相比,由于酶解导致氢键数量的减少,SPIH 的波长发生蓝移^[24]。此外,酰胺 I 带(1 600 ~ 1 700 cm^{-1})和酰胺 II 带(1 500 ~ 1 600 cm^{-1})是表征蛋白质结构的代表性光谱区域^[21],酰胺 I 带主要是蛋白质主链的 C—O 键拉伸,酰胺 II 带是 N—H 弯曲和 C—N 拉伸。经 Alcalase 作用后,SPI 的二级结构发生改变,导致 SPIH 特征吸收峰从 1 630.50 cm^{-1} (对照)移动到 1 640.50 cm^{-1} (红移)。酰胺 I 带包括 α -螺旋(1 650 ~ 1 660 cm^{-1})、 β -转角(1 660 ~ 1 700 cm^{-1})、 β -折叠(1 600 ~ 1 640 cm^{-1})和无规则卷曲(1 640 ~ 1 650 cm^{-1})。如图 4(图中不同字母表示差异性显著,下同)所示,SPI 主要由 α -螺旋和 β -折叠组成,酶解前期 SPIH 的 α -螺旋含量降低, β -转角和无规则卷曲含量增加,这些结构变化是蛋白质展开的典型特征,酶解会破坏蛋白质侧链的氢键,使蛋白质侧

链的疏水基团残基暴露,导致二级结构含量的变化^[25]。当继续酶解到 120 min 时, α -螺旋含量再次增加,无规则卷曲含量降低,这是由于酶解后期较强的疏水相互作用,疏水残基发生聚集,促进了蛋白质折叠结构再次恢复^[5]。

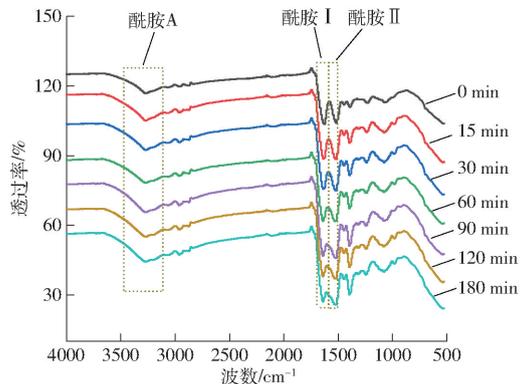


图 3 不同酶解时间下样品的 FT-IR

Fig. 3 FT-IR of samples at different enzymolysis times

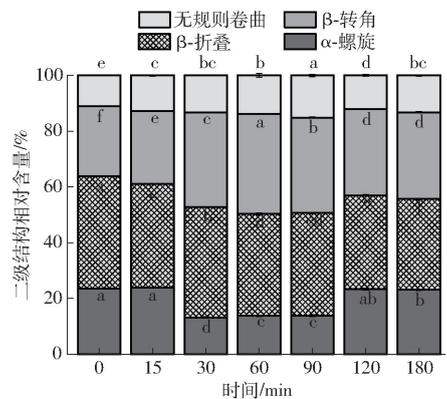


图 4 不同酶解时间下样品的二级结构相对含量

Fig. 4 Secondary structure contents of samples at different enzymolysis times

2.2.4 表面张力

蛋白质降低空气-水表面张力的能力与蛋白质的空气-水界面活性密切相关,它反映了蛋白质在空气-水界面的吸附和膨胀速度。通常蛋白质降低气-水表面张力的程度越大,越容易在气-水界面被吸附、拉伸和重排,从而具有更高的起泡能力^[26]。图 5 显示了不同酶解时间下样品气-水表面张力随时间的变化。与对照组相比,Alcalase 作用后 SPI 表面张力都有所降低。在各组中,表面张力均随时间的增加而减小,并在前 200 s 内迅速下降,这有利于蛋白在气-水界面的吸附、拉伸和重排^[14]。随着酶解时间的延长,表面张力呈现先减小后增大的趋势,酶解 90 min 时表面张力达到最低,表明气-水界面之间的界面活性最高,这与起泡性的趋势一致。过度的水解会导致分子肽段过小而降低分子柔韧性,在气-水界面吸附速率减小,从而导致表面张力上升。

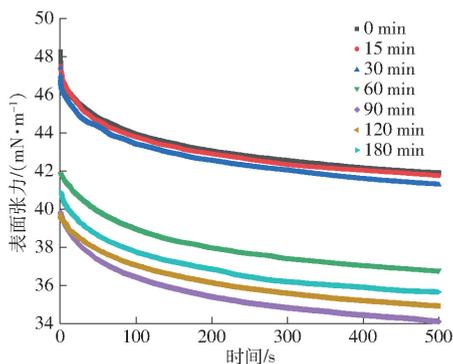


图5 不同酶解时间下样品的表面张力变化

Fig. 5 Changes of surface tension of samples at different enzymolysis times

2.2.5 表面疏水性

如图6所示, SPIH的 H_0 随着水解时间的延长先增加后降低,在Alcalase作用下, SPI中的表面结构松散的多肽链被水解,隐藏在蛋白内部的疏水基团残基暴露出来;结合电泳图分析(图2), α 和 α' 亚基的水解也会造成蛋白疏水区域的暴露,所以酶解15~90 min水解物的 H_0 较SPI均有所提升。然而,随着水解进一步进行,此时大量的疏水基团通过疏水相互作用暴露、聚集、交联,将其重新埋在更大的聚集体结构中,导致 H_0 降低^[5]。类似地,文献[21]研究发现,在Alcalase作用下,蛋白的 H_0 随DH增加而急剧下降,这表明过多暴露的疏水性基团相互作用增强,在上清液中留下亲水性较高的组分,导致 H_0 降低。

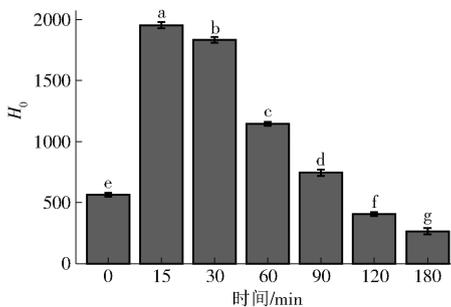


图6 不同酶解时间下样品的表面疏水性指数

Fig. 6 Surface hydrophobicity of samples at different enzymolysis times

2.2.6 内源荧光光谱

内源荧光光谱可以进一步揭示蛋白质三级结构的变化,在蛋白质中,酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸残基,尤其是色氨酸残基对溶剂极其敏感^[27]。如图7所示,酶解后样品的荧光强度与SPI相比都有所增强,这是由于酶解处理破坏了SPI的内部疏水区域,暴露了更多的芳香族氨基酸,导致荧光强度的增加。同时SPIH的荧光波长发生红移,这可能是由蛋白质构象改变和色氨酸残基暴露于极性微环境所

致^[28]。随着酶解时间的延长,荧光强度逐渐降低,这与之前描述的表面疏水性(图6)结果一致。类似的研究发现,胰蛋白酶水解产物荧光强度随着水解程度的增加而下降^[29]。

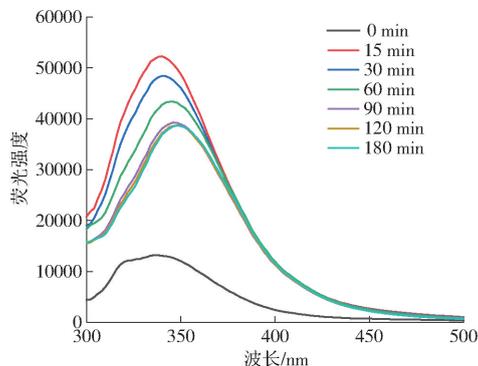


图7 不同酶解时间下样品内源荧光光谱

Fig. 7 Intrinsic fluorescence spectra of samples at different enzymolysis times

2.3 界面蛋白吸附量

如图8所示,随着水解时间的延长,与SPI相比, SPIH的吸附量由23.59%减小到7.56%。之前的研究认为,分子结构的展开使蛋白质变得灵活和松散,因此更多的蛋白质分子在空气-水界面吸附和重排,从而FS和FC增加^[14]。这与本实验的研究结果相反,原因可能是酶解作用虽然改善了蛋白的FS,但是FC却显著下降($P < 0.05$),从而样品放置30 min后大部分蛋白析出在下层液体中,导致界面蛋白吸附量逐渐下降。

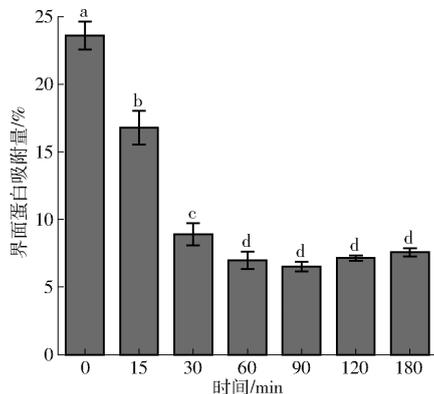


图8 不同酶解时间下样品的界面蛋白吸附量

Fig. 8 Adsorption capacity of interfacial protein in samples at different enzymolysis times

2.4 酶解对SPI功能特性的影响

2.4.1 抗氧化性

图9显示了酶解时间对样品DPPH和ABTS⁺自由基清除率的影响。如图9a所示, SPIH的DPPH自由基清除率均显著高于SPI($P < 0.05$),并且不同时间SPIH的DPPH自由基清除率各有差异。在蛋白质量浓度为10 mg/mL时,120 min样品的DPPH自由基清除率(32.35%)相对于SPI(15.04%)提升

115.09%,这是由于较高的DH会降低肽的分子量,产生含有生物活性(如抗氧化剂)的小肽部分,导致DPPH自由基清除活性增加^[8]。文献[25]在研究酶解对大米蛋白抗氧化性的影响时发现,DPPH自由基清除率随着水解程度的增加而增加,这与本实验研究结果一致。另外,Alcalase水解同时也提高了SPIH的ABTS⁺自由基的清除能力(图9b),120 min样品的ABTS⁺自由基清除率达到90.71%。由图9可以观察到,酶解120 min时样品抗氧化活性最高,这是由于水解过程中蛋白质结构的展开可以暴露原始蛋白质中隐藏的氨基酸,从而使蛋白抗氧化活性增加^[30]。以上结果表明,酶解可以有效改善蛋白抗氧化性。

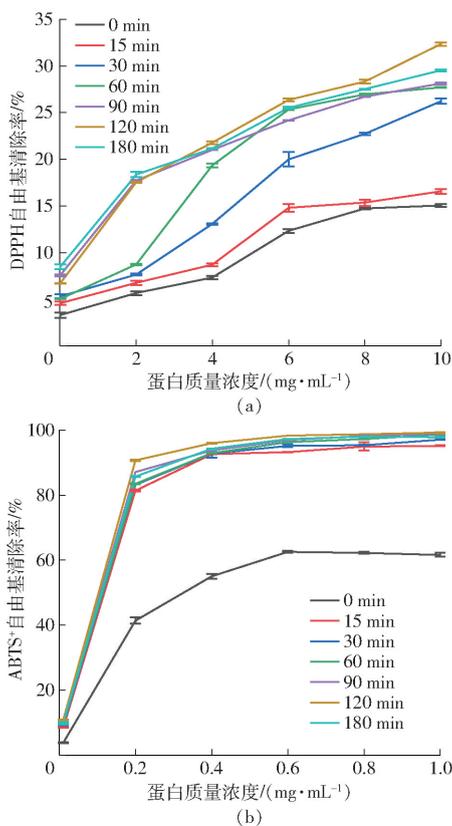


图9 不同酶解时间下样品的抗氧化性

Fig.9 Antioxidant activity of samples at different enzymolysis times

2.4.2 起泡性及泡沫稳定性

图10显示了酶解时间对SPI起泡性和泡沫稳定性的影响。可以观察到,SPIH的起泡性随着酶解时间的延长先增加后减小,在酶解90 min时起泡性指数达到最大值(143.20%),此时在液体表面形成了具有一定韧性的液膜。随着水解程度的增大,肽链被分解得越来越短,此时在液体表面形成的液膜越来越弱,导致起泡能力的下降^[22]。结合以上结构变化分析,SPI经Alcalase作用后发生降解(图2),肽键断裂,此时形成的小分子肽提升了蛋白的溶解

度(图1),同时酶解90 min时SPIH的平均粒径(表1)达到最小(208.10 nm),表面张力降低的程度最大(图5),这提高了分子迁移到空气-水界面的吸附速率并且发生重排,改善了蛋白的起泡性^[5]。此外,具有柔性结构的蛋白质具有更好的起泡性^[31]。FT-IR分析结果印证了这一点(图4),SPIH分子具有更强的柔韧性和无序性。荧光结果显示(图7),SPIH的芳香族氨基酸所处的极性环境增强,蛋白结构展开,同时SPIH的 H_0 有所上升(图6),其起泡性随之增大,这是由于疏水基团的暴露,促进了蛋白质分子与空气的相互作用^[32]。综上所述,蛋白起泡性的改变是多种因素相互作用的结果,需要综合考虑其他因素的影响。

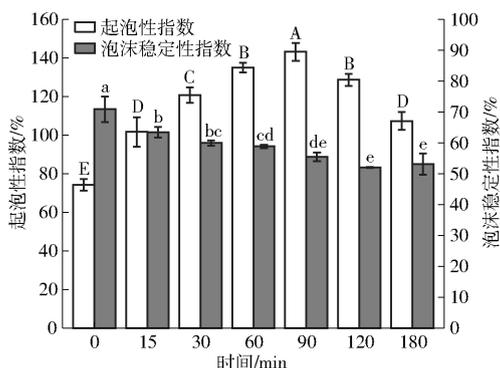


图10 不同酶解时间下样品的起泡性和泡沫稳定性

Fig.10 Foamability and foam stability of samples at different enzymolysis times

FS取决于界面上蛋白质之间形成的内聚网络的能力^[33]。在Alcalase作用下,蛋白被酶解成小分子肽段,不足以在气-水界面上稳定的支撑,此时形成的液膜对泡沫的包裹作用减弱,导致FS逐渐下降,这与界面蛋白吸附量随着酶解时间的延长而逐渐降低的结果一致(图8)。据报道,Zeta电位绝对值的增加会增强蛋白分子形成的电负性界面层的致密性,从而可以抑制气泡的聚集^[31],酶解后蛋白FS的降低可能与其所带表面电荷减少相关。

2.5 泡沫微观图像

显微镜观察到的气泡形态变化可以从微观上反映不同水解时间下SPIH的气泡特征。总体而言,与SPI相比,SPIH产生的泡沫在前2 min内气泡尺寸更小,分布更均匀,酶解15 min和180 min样品的粒径较大导致其泡沫尺寸较大。从图11中可以观察到,酶解90 min样品的泡沫致密性最大,这与起泡性的结果一致(图10)。随着时间的推移,所有样品的气泡尺寸逐渐增大,很大程度上是因为水相泡沫体系不平衡,导致了重力排水、粗化和泡沫破裂,最终增大了平均气泡尺寸^[34]。除了SPI的气泡基本保持球形外,SPIH的泡沫图像

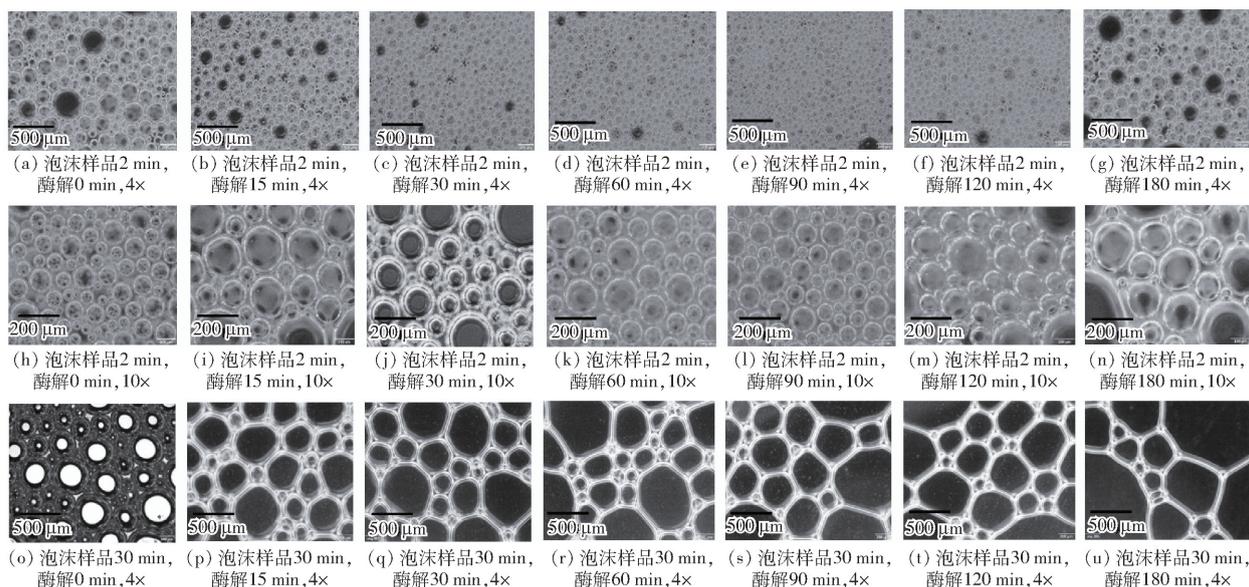


图 11 不同酶解时间下样品的泡沫微观图像

Fig. 11 Foam microscopic images of samples at different enzymolysis times

基本变成网格状,进一步印证了酶解后泡沫稳定性下降的结果。

3 结束语

采用 Alcalase 对 SPI 进行酶解,研究水解程度对 SPI 结构和功能性质的影响。酶解后,SPIH 的分子质量主要集中在 25 ku 以下,SPIH 分子尺寸降低,溶解度显著提升($P < 0.05$)。SPIH 中 α -螺旋含量降低, β -转角和无规则卷曲含量增加;表面张力降低,荧光波长随着酶解时间的延长发生红移,表明

SPI 经酶解作用后蛋白结构展开,暴露了疏水性和芳香族氨基酸残基,增强了分子柔韧性,这有利于改善蛋白起泡性和抗氧化性。研究发现,酶解 120 min 时样品具有最高的 DPPH 和 ABTS⁺ 自由基清除能力;同时酶解 90 min 时样品起泡性最好,但由于酶解后蛋白表面所带电荷量的减少以及较小分子量多肽的增加不足以在气-水界面进行稳定的支撑,导致酶解对泡沫稳定性有负面的影响。这些发现为 SPIH 的起泡行为提供了有用的见解,并为扩展其在加工食品中的应用提供了理论参考。

参 考 文 献

- [1] RODRÍGUEZ P J M, CARRERA S C, RODRÍGUEZ N M R. Implications of interfacial characteristics of food foaming agents in foam formulations[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2008, 140(2): 95 - 113.
- [2] ZHAN F, YOUSSEF M, SHAH B R, et al. Overview of foam system: natural material-based foam, stabilization, characterization, and applications[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 125: 107435.
- [3] DAY L. Proteins from land plants-potential resources for human nutrition and food security[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 32(1): 25 - 42.
- [4] JIN F, WANG Y, TANG H, et al. Limited hydrolysis of dehulled walnut (*Juglans regia* L.) proteins using trypsin: functional properties and structural characteristics[J]. *LWT*, 2020, 133: 110035.
- [5] LYU S, CHEN M, WANG Y, et al. Foaming properties of egg white proteins improved by enzymatic hydrolysis: the changes in structure and physicochemical properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 141: 108681.
- [6] XIA Y, BAMDAD F, GÄNZLE M, et al. Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134(3): 1509 - 1518.
- [7] MARTINEZ K, BAEZA R, MILLAN F, et al. Effect of limited hydrolysis of sunflower protein on the interactions with polysaccharides in foams[J]. *Food Hydrocolloids*, 2005, 19(3): 361 - 369.
- [8] AHMAD NADZRI F N, TAWALBEH D, SARBON N M. Physicochemical properties and antioxidant activity of enzymatic hydrolysed chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein as influence by alcalase and papain enzyme[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021, 36: 102131.
- [9] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(5): 642 - 646.
- [10] HERNÁNDEZ M J M, CAMAÑAS R M V, CUENCA E M, et al. Determination of the protein and free amino acid content in a sample using o-phthalaldehyde and N-acetyl-L-cysteine[J]. *The Analyst*, 1990, 115(8): 1125 - 1128.
- [11] ZHANG X, HUANG Y, MA R, et al. Structural properties and antioxidant activities of soybean protein hydrolysates produced

- by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cell envelope proteinase[J]. Food Chemistry, 2023, 410: 135392.
- [12] LIU X, LIU J, ZHANG W, et al. Effect of the degree of glycation on the stability and aggregation of bovine serum albumin [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105892.
- [13] HE W, TIAN L, FANG F, et al. Limited hydrolysis and conjugation of zein with chitosan oligosaccharide by enzymatic reaction to improve functional properties[J]. Food Chemistry, 2021, 348: 129035.
- [14] ZHANG T, ZHANG M, GONG P, et al. Ions-induced ovalbumin foaming properties enhancement: structural, rheological, and molecular aggregation mechanism[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107221.
- [15] SILVEIRA C M, DE ARAUJO A S, MACHADO L J, et al. In vitro and in vivo antioxidant capacity of chia protein hydrolysates and peptides[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 91: 19–25.
- [16] HUANG H, YI J, FAN Y. Influence of peroxy radical-induced oxidation on structural characteristics, emulsifying, and foaming properties of α -lactalbumin[J]. LWT, 2022, 163: 113590.
- [17] BAO Z, ZHAO Y, WANG X, et al. Effects of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties of egg yolk hydrolysate with alcalase[J]. Journal of Food Science and Technology, 2017, 54(3): 669–678.
- [18] LIU N, LIN P, ZHANG K, et al. Combined effects of limited enzymatic hydrolysis and high hydrostatic pressure on the structural and emulsifying properties of rice proteins [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2022, 77: 102975.
- [19] 金丽丽. 木瓜蛋白酶水解和磷酸化修饰对大豆分离蛋白溶解性的影响[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2014.
JIN Lili. Effect of hydrolysis and phosphorylation of papain on solubility of soybean protein isolate[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [20] NISHINARI K, FANG Y, GUO S, et al. Soy proteins: a review on composition, aggregation and emulsification[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 301–318.
- [21] SHEN P, ZHOU F, ZHANG Y, et al. Formation and characterization of soy protein nanoparticles by controlled partial enzymatic hydrolysis[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 105: 105844.
- [22] 郭荣佳. 酶解对大豆蛋白结构功能性影响及高乳化起泡性蛋白制备[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2014.
GUO Rongjia. Effect of enzymatic hydrolysis on structure and function of soybean protein and preparation of high emulsification foamable protein[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [23] 钟敏, 常方圆, 赵谋明, 等. 碱性蛋白酶控制酶解诱导大豆分离蛋白纳米颗粒的形成机制[J]. 食品科学, 2022, 43(14): 93–101.
ZHONG Min, CHANG Fangyuan, ZHAO Mouming, et al. Formation and underlying mechanism of soy protein nanoparticles via controlled alcalase hydrolysis[J]. Food Science, 2022, 43(14): 93–101. (in Chinese)
- [24] JIN B, ZHOU X, ZHENG Z, et al. Investigating on the interaction behavior of soy protein hydrolysates/ β -glucan/ferulic acid ternary complexes under high-technology in the food processing: high pressure homogenization versus microwave treatment[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 823–830.
- [25] XIE H, ZHANG L, CHEN Q, et al. Combined effects of drying methods and limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and antioxidant properties of rice protein hydrolysates[J]. Food Bioscience, 2023, 52: 102427.
- [26] WANG Y, WANG S, LI R, et al. Effects of combined treatment with ultrasound and pH shifting on foaming properties of chickpea protein isolate[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107351.
- [27] YU M, ZENG M, QIN F, et al. Physicochemical and functional properties of protein extracts from *Torreya grandis* seeds[J]. Food Chemistry, 2017, 227: 453–460.
- [28] NIU F, ZHANG Q, YU J, et al. Interfacial adsorption behavior of ovalbumin/sodium carboxymethyl cellulose colloidal particles: the effects of preparation methods[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 120: 106969.
- [29] XU X, LIU W, LIU C, et al. Effect of limited enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of rice glutelin[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 61: 251–260.
- [30] ABBASI S, MOSLEHSHAD M, SALAMI M. Antioxidant and alpha-glucosidase enzyme inhibitory properties of hydrolyzed protein and bioactive peptides of quinoa[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 213: 602–609.
- [31] SHENG L, YE S, HAN K, et al. Consequences of phosphorylation on the structural and foaming properties of ovalbumin under wet-heating conditions[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 91: 166–173.
- [32] DUAN X, LI M, SHAO J, et al. Effect of oxidative modification on structural and foaming properties of egg white protein[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 75: 223–228.
- [33] LIU G, TU Z, YANG W, et al. Investigation into allergenicity reduction and glycation sites of glycated β -lactoglobulin with ultrasound pretreatment by high-resolution mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2018, 252: 99–107.
- [34] DU H, ZHANG J, WANG S, et al. Effect of high-intensity ultrasonic treatment on the physicochemical, structural, rheological, behavioral, and foaming properties of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.)-seed protein isolates [J]. LWT, 2022, 155: 112952.