

蛋黄中免疫球蛋白提取副产物的综合利用研究

高净乐^{1,2,3}, 顾璐萍^{1,2,3}, 常翠华^{1,2,3}, 李俊华^{1,2,3}, 杨严俊^{1,2,3}, 苏宇杰^{*1,2,3}

(1. 江南大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 国家功能食品工程技术研究中心, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 以蛋黄免疫球蛋白提取后的副产物—冻融蛋黄颗粒(FYP)为原料,经酶解和亚临界萃取后制备具有良好功能特性与品质的低脂蛋黄粉和蛋黄油,以期实现蛋黄资源的综合利用。首先采用蛋白酶对已发生变性的FYP进行酶解,研究酶解对其功能性质的改善效果,进而采用亚临界萃取低脂蛋黄粉和副产物蛋黄油,以低脂蛋黄粉的残油率为主要指标对萃取工艺进行优化,最终选择丙烷为萃取溶剂,萃取温度35℃,压力1.5 MPa,时间120 min,料液质量体积比1 g:7 mL。进一步对低脂蛋黄粉的溶解性和乳化性等特性进行分析。结果表明,随着加酶量的增加,低脂蛋黄粉的溶解度上升,乳化性能提高,残油率明显下降。当加酶量为1 000 U/g时,低脂蛋黄粉的残油率为15.50%。而进一步增加酶添加量,反而会降低油脂萃取效率。因此,酶的最适添加量为1 000 U/g,此条件下制得的低脂蛋黄粉含脂量低且具有较好的溶解性和乳化性。

关键词: 冻融蛋黄颗粒;酶解;亚临界萃取;低脂蛋黄粉;功能性质

中图分类号:TS 201.1

文章编号:1673-1689(2023)10-0073-10

DOI:10.12441/spyswjs.20220317001

Comprehensive Utilization of by Products from Immunoglobulin Extraction in Egg Yolk

GAO Jing^{1,2,3}, GU Luping^{1,2,3}, CHANG Cuihua^{1,2,3}, LI Junhua^{1,2,3}, YANG Yanjun^{1,2,3}, SU Yujie^{*1,2,3}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Functional Food Engineering Technology Research Center, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The byproduct of yolk immunoglobulin, freeze-thaw egg yolk pellet (FYP), was used as raw material to prepare low-fat egg yolk powder and egg yolk oil with desirable functional properties and quality through enzymatic hydrolysis and subcritical extraction, aiming to realize the comprehensive utilization of egg yolk resources. Initially, denatured FYP was subjected to enzymatic hydrolysis with alcalase, and the improvement of functional properties were investigated. Subsequently, subcritical extraction was employed to obtain low-fat egg yolk powder and the byproduct (egg yolk oil). The extraction process was optimized primarily based on the residual oil rate of low-fat egg yolk powder. Propane was selected as the extraction solvent, and the optimal extraction conditions were determined to be at extraction temperature of 35 °C, pressure of 1.5 MPa, extraction time of 120 minutes, and solid-to-liquid ratio of 1 g:7 mL. Furthermore, the solubility and

收稿日期: 2022-03-17 修回日期: 2022-05-06

* 通信作者: 苏宇杰(1982—),男,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事食品营养与功能食品研究。E-mail:suyujie@jiangnan.edu.cn

emulsification of low-fat egg yolk powder were analyzed. The results demonstrated that the solubility and emulsifying capacity of low-fat egg yolk powder increased with an increase in enzyme dosage, while the residual oil rate decreased significantly. At the enzyme dosage of 1 000 U/g, the residual oil rate of the low-fat egg yolk powder reached 15.50%. However, further increasing the enzyme dosage led to a decrease in oil extraction efficiency. Therefore, the optimal enzyme dosage was determined to be 1 000 U/g, where the low-fat egg yolk powder has reduced fat content and desirable solubility and emulsifying properties.

Keywords: freeze-thaw egg yolk pellet, enzymatic hydrolysis, subcritical extraction, low-fat egg yolk powder, functional properties

蛋黄中含有多种优质蛋白质,氨基酸配比均衡,消化率高达98%,生物学价值高达96,远远高于其他动植物性食物蛋白质的消化率和生物学价值^[1]。此外,蛋黄中还含有免疫球蛋白(immunoglobulin of egg yolk, IgY)、卵磷脂、卵黄高磷蛋白等活性成分,具有极高的营养价值。其中,IgY因具有良好抑菌活性以及廉价易得、不产生耐药性等优点,有望部分代替抗生素用于细菌感染性疾病的治疗及提高免疫力^[2]。与传统IgY提取方法相比,冻融-水稀释法^[3]能有效简化提取流程、提高产品纯度,因而成为一种极具应用前景的IgY提取新方法。然而,在冻融-水稀释法提取IgY过程中将会产生大量的副产物—冻融蛋黄颗粒(freeze-thaw egg yolk pellet, FYP)。FYP因经过冻融和高速剪切处理而发生严重变性,几乎丧失其原有的溶解性、乳化性功能特性,无法直接用于食品加工,大大降低了蛋品的附加值。此外FYP中还含有丰富的蛋白质与脂质,具有极高的营养价值,若不加以利用而直接丢弃,势必造成蛋黄资源的严重浪费。因此,如何充分利用FYP成为IgY提取与蛋黄资源综合利用中一个亟待解决的课题。

近年来,限制性酶解技术因能显著改善蛋白质功能性质而被广泛应用于各种蛋白质原料,如大豆蛋白^[4]、乳清蛋白^[5]、蛋黄粉^[6]等。Gu等发现限制性酶解可使大分子蛋白质分解为小分子的肽或氨基酸,从而提高蛋白质的溶解性^[7];Bao等认为溶解性与蛋白质的其他功能性质密切相关,如乳化性等,并对碱性、中性及风味蛋白酶的水解效果进行了比较,结果表明碱性蛋白酶能更显著提高蛋白质的功能性质^[8]。因而采用限制性酶解将有望改善FYP的溶解性及其他功能特性,拓宽其应用领域。

此外,针对FYP不易保存的问题,可将经酶解

后的FYP进行喷雾干燥处理,得到酶解蛋黄颗粒干粉(hydrolyzed egg yolk pellet powder, HYP)。HYP水分含量低,在运输与保质期方面有显著优势。然而,其脂肪质量分数为50%~60%,胆固醇质量分数为20 mg/g,这显然与目前大众追求的健康低脂消费观相违背。因此,选择合适的方法对HYP中的油脂进行分离,一方面可降低蛋黄颗粒中的脂质及胆固醇含量,有利于提高酶解蛋黄颗粒的消费者接受度、拓宽其应用范围,与此同时又可以制得副产品蛋黄油,进一步提高蛋黄综合利用率。目前,蛋黄粉中蛋黄油分离的方法主要包括有机溶剂法、酶法^[9]、超临界萃取法、亚临界萃取法等。其中,超临界和亚临界萃取技术是2种新型绿色油脂萃取技术,具有无溶剂残留,提取率高,保护有益成分等优点^[10-11]。且与超临界萃取技术相比,亚临界萃取成本更低,常温萃取、低温脱溶,易实现大规模工业化应用^[12]。目前国内外对于采用亚临界萃取技术提取蛋黄粉中脂质的研究较少。

作者以冻融-水稀释法提取蛋黄免疫球蛋白之后变性严重的冻融蛋黄颗粒副产物为原料,采用限制性酶解结合亚临界萃取技术,制得低脂蛋黄粉与副产物蛋黄油,对亚临界萃取工艺进行优化,并对产品性质进行研究,以期拓宽冻融蛋黄颗粒副产物的应用范围,进而为蛋黄资源的综合利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜鸡蛋和葵花籽油:购自江苏无锡超市;碱性蛋白酶:购自南宁庞博生物工程有限公司;邻苯二甲醛(OPA)、1-4-二硫苏糖醇(DTT):购自Sigma公司;其余化学试剂:均为分析纯,购于国药化学试

剂有限公司。

1.2 仪器与设备

分析天平(AB204-N):梅特勒-托利多仪器公司产品;pH计:梅特勒-托利多仪器公司产品;喷雾干燥机(MOBILE MINOR):基伊埃工程技术(中国)有限公司;冷冻离心机(5430R):德国 Eppendorf 公司产品;电热恒温鼓风干燥器(DGG-9240A):上海森信实验仪器有限公司产品;凯氏定氮仪(K9840):济南海能仪器股份有限公司产品;紫外分光光度计(UH5300):日本日立公司产品;高速剪切器(T25 basic):德国 IKA 公司产品;激光粒度分析仪(S3500):美国 Microtrac 公司产品;冷场发射扫描电子显微镜(SU8100):日本株式会社日立高新技术公司产品;CBE-5L 亚临界流体萃取实验成套设备:河南省亚临界萃取设备工程技术研究中心产品。

1.3 实验方法

1.3.1 冻融蛋黄颗粒(FYP)的制备 参考王旭婷等^[3]人提取 IgY 的方法并作适当修改,人工分离蛋黄和蛋清,并将蛋黄在吸水纸上小心滚动以去除表面残留蛋清。用镊子刺破蛋黄膜,收集蛋黄液,将其放置在 (-18 ± 2) °C 的温度下冷冻 8 h,之后在 4 °C 的温度下解冻,得到蛋黄凝胶。将蛋黄凝胶与去离子水以质量比 1:5 混合,然后用高速剪切机以 11 000 r/min 剪切 15 s,再将混合液以 8 000 r/min 的转速离心 20 min,得到上清液为 IgY 粗提液,沉淀即为 FYP。

1.3.2 酶解蛋黄颗粒干粉(HYP)的制备及成分分析 将 FYP 与去离子水以质量比 1:2 混合,25 °C 搅拌 30 min,使其混合均匀。预热至 50 °C,并用 1 mol/L 的 NaOH 调节体系 pH 至 8.0。加酶量分别为 250、500、1 000、2 000 U/g,反应 4 h,酶解过程中用 1 mol/L 的 NaOH 维持体系 pH 值恒定,用磁力搅拌器搅拌使 FYP 始终保持分散均匀。酶解过程中每隔 0.5 h 取 0.4 mL 的水解液,迅速用冰水浴冷却至室温,测定水解度(DH)。同样条件处理的未加酶组为对照组。反应结束后,迅速将水解液用冰水浴冷却至室温,经喷雾干燥得到酶解蛋黄粉(HYP),喷雾干燥入口温度 175~185 °C,出口温度 80~90 °C,适当调整不同水解度水解液的干燥时的进出口温度,确保所得干燥产品的流动性基本接近,HYP 在 4 °C 下贮存。对制得的 HYP 成分进行测定,水分质量分数按照 GB/T 5009.3—2016 中的第一法直接干燥法

测定;蛋白质含量参照 GB 5009.5—2016 中的凯氏定氮法进行测定;脂肪含量采用氯仿-甲醇改良法^[13]测定;磷脂含量参照 GB/T 5537—2008 中的钼蓝比色法进行测定,并做适当修改:为排除其他含磷物质的干扰,先提取总脂质,再测定磷脂含量;胆固醇含量按照 Sun 等^[14]人的方法进行测定。

1.3.3 水解度(DH)的测定 参照文献[15]的方法对酶解过程中蛋白质的水解度(DH)进行测定。首先配置邻苯二甲醛(OPA)试剂,然后选用 L-丝氨酸与 OPA 试剂反应制作标准曲线。将酶解物用去离子水稀释至 4 mg/mL,将 400 μ L 稀释液与 3 mL OPA 试剂混合,反应 2 min 后用紫外分光光度计测定 340 nm 处的吸光度。根据标准曲线和公式(1)计算蛋白质水解度 DH:

$$DH=h/h_{\text{tot}}\times 100=\frac{W_{\text{NH}_2}-\beta}{\alpha h_{\text{tot}}} \quad (1)$$

式中: h 为每单位质量断裂的肽键质量摩尔浓度,mmol/g; h_{tot} 为每单位质量的肽键质量摩尔浓度,mmol/g; W_{NH_2} 为 NH_2 质量摩尔浓度,mmol/g; $\alpha=1.0$; $\beta=0.4$ ^[17]。

1.3.4 酶解蛋黄颗粒干粉(HYP)激光共聚焦分析 参照 Xu 的方法^[18]用激光共聚焦显微镜观察 HYP 的微观结构,并做适当修改。将对照组(未酶解)与 HYP 样品溶解在去离子水中(质量比 1:20),室温下混匀 5 min。分别将尼罗红和尼罗蓝溶于质量分数 0.1%丙酮中。脂肪用尼罗红染色,蛋白质用尼罗蓝染色。取 10 μ L 尼罗红和尼罗蓝溶液加入 1 mL 样品溶液中,染色 20 min,取 20 μ L 样品涂布于显微镜载玻片上。蛋白质的分析模式:绿色荧光通道发射波长为 488 nm,激发波长为 500~595 nm。油脂的分析模式:红色荧光通道发射波长为 633 nm,激发波长为 649~780 nm。对焦后扫描并保存图像。

1.3.5 酶解蛋黄颗粒干粉(HYP)溶解度分析 溶解度的测定根据 Tang 等^[19]的方法并做适当修改,将 1 g 样品和 30 mL 去离子水转移至 50 mL 离心管中,振荡 5 min,然后于 8 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀物,再加入 30 mL 去离子水,同样条件再次离心。最后将所有收集到的沉淀物于鼓风干燥箱中在 105 °C 的温度下干燥 8 h。以公式(2)计算蛋黄粉溶解度 S 。

$$S=100-\frac{(m_1-m_2)\times 100}{m} \quad (2)$$

式中: S 为溶解度,%; m 为样品质量,g; m_1 为沉淀及培养皿总质量,g; m_2 为培养皿质量,g。

1.3.6 酶解蛋黄颗粒干粉(HYP)乳化性分析 采用比浊法测定样品的乳化活性指数(EAI)和乳化稳定性指数(ESI)^[20]。将 HYP 样品分散在去离子水中(2 g/dL),室温下磁力搅拌 1 h。取 30 mL 样品溶液,加入 10 mL 葵花籽油,使用高速乳化器以 11 000 r/min 乳化 1 min。乳化后于 0 min 和 10 min 时分别从管底吸取 100 μ L 乳液移至 10 mL 的 0.1 g/dL 十二烷基硫酸钠(SDS)溶液中,然后在 500 nm 下测定稀释溶液的浊度。ESI 值通过下式计算:

$$ESI = \frac{A_0 - 10}{A_0 - A_{10}} \quad (3)$$

式中:ESI 为乳化后立即测定的吸光度; A_0 和 A_{10} 分别为乳液在 0、10 min 时的吸光度。

1.3.7 低脂蛋黄粉制备工艺优化

1) 亚临界萃取溶剂选择 分别选择丙烷或丁烷作为亚临界萃取溶剂,制备蛋黄油与低脂酶解蛋黄粉,以萃取后低脂酶解蛋黄粉中残油率为指标,选择最佳萃取溶剂。具体制备工艺如下:

亚临界丙烷萃取:称取适量 HYP 样品,用 150 目尼龙纱布袋分装,置于萃取罐,通过设备流量阀送入一定体积丙烷,萃取压力 1.1 MPa,萃取温度 35 $^{\circ}$ C,每次萃取 40 min,重复萃取 3 次。然后减压脱溶,从分离罐底部收集萃取得到的蛋黄油,离心后取上清液置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱待分析。从萃取罐内收集剩余低脂酶解蛋黄粉用于进一步分析。

亚临界丁烷萃取:称取适量 HYP 样品,用 150 目尼龙纱布袋分装,置于萃取罐(与丙烷相同),通过设备流量阀送入一定体积丁烷,萃取压力 0.46 MPa,萃取温度 45 $^{\circ}$ C,每次萃取 40 min,重复萃取 3 次。后续操作与上述丙烷相同。

2) 亚临界萃取工艺优化 最终选用丙烷作为萃取溶剂,以萃取后低脂酶解蛋黄粉中残油率为指标,对萃取温度、萃取压力、萃取时间、料液质量体积比等可调工艺参数进行优化。

萃取温度:分别将萃取温度设定为 25、30、35、40、45 $^{\circ}$ C,萃取压力 1.5 MPa,萃取时间 120 min,按照料液质量体积比 1 g:9 mL 加入亚临界丙烷溶剂进行萃取。

萃取压力:分别将萃取压力设定为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 MPa,萃取温度 35 $^{\circ}$ C,萃取时间 120 min,按

照料液质量体积比 1 g:9 mL 加入亚临界丙烷溶剂进行萃取。

萃取时间:分别将萃取时间设定为 30、60、90、120、150 min,萃取温度 35 $^{\circ}$ C,萃取压力 1.5 MPa,按照料液质量体积比 1 g:9 mL 加入亚临界丙烷溶剂进行萃取。

料液质量体积比:分别将料液质量体积比设定为 1 g:3 mL、1 g:5 mL、1 g:7 mL、1 g:9 mL、1 g:11 mL,萃取温度 35 $^{\circ}$ C,萃取压力 1.5 MPa,萃取时间 120 min,加入亚临界丙烷溶剂进行萃取。

1.3.8 低脂蛋黄粉理化与功能性质分析

1) 残油率测定 参照氯仿-甲醇改良法^[13]并做适当修改。称取 1 g 左右的待测蛋黄粉,加入 1.2 mL 去离子水、5 mL 甲醇、2.5 mL 氯仿,旋涡振荡 2 min,再加入 2.5 mL 去离子水和 2.5 mL 氯仿,振荡 3 min,使溶液从一相系统转变成二相系统。离心分离出氯仿层,用氮气吹去氯仿,称质量。

2) 粒度分析 将 0.1 g 待测蛋黄粉溶于 10 mL 去离子水,旋涡振荡 5 min,保证蛋黄粉溶液混合均匀^[7]。采用激光粒度分析仪测量不同水解度样品的粒径分布。

3) 微观结构分析 用扫描电子显微镜(SEM)观察蛋黄粉的微观结构^[21]。取少量样品用双面胶固定,镀金并进行观察。每个样品选取放大倍数 1 000 和 2 000 观察并拍摄。

4) 溶解度分析 方法同 1.3.5。

5) 乳化性分析 方法同 1.3.6。

1.4 数据统计分析

所有实验均重复 3 次,实验结果表示为平均值 \pm 标准偏差。采用 SPSS 22.0 统计软件的 Duncan 法检验进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。实验数据采用 OriginPro 2018C 绘图。

2 结果与分析

2.1 酶解蛋黄颗粒干粉(HYP)成分分析

对 HYP 进行成分分析,结果如表 1 所示。与对照组(未酶解)相比,酶解处理步骤并未显著改变蛋黄粉主要营养物质的含量。经过提取 IgY 后剩余的 HYP 仍然具有较高的营养价值,需要对其进行合理处理以实现蛋黄资源的充分开发利用。

2.2 加酶量对酶解液水解度的影响

如图 1 可知,不同酶添加量的条件下,蛋黄颗

表 1 HYP 成分分析

Table 1 Composition analysis of HYP

样品	质量分数				胆固醇/(mg/g)
	水分/%	蛋白质/%	总脂质/%	磷脂/%	
对照	3.12±0.06 ^b	28.21±0.45 ^a	59.36±0.78 ^a	16.34±0.46 ^a	14.36±0.46 ^a
250 U/g	3.68±0.15 ^b	28.79±0.56 ^a	59.35±0.64 ^a	16.48±0.49 ^a	14.21±0.39 ^a
500 U/g	4.25±0.09 ^a	28.63±0.68 ^a	58.34±0.58 ^a	15.79±0.38 ^a	13.34±0.34 ^a
1 000 U/g	4.38±0.10 ^a	28.64±0.55 ^a	59.29±0.79 ^a	15.65±0.56 ^a	13.22±0.38 ^a
2 000 U/g	4.46±0.13 ^a	28.58±0.45 ^a	58.67±0.69 ^a	15.63±0.42 ^a	13.16±0.41 ^a

注:同一列数据中的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

粒水解度呈现相同的变化趋势,蛋黄颗粒的快速酶解发生在反应最初的 0.5 h 左右,之后水解度上升趋势明显减缓,经 4 h 左右,酶解反应基本达到平衡状态,该变化趋势与 Gu 等^[7]人的研究结果一致。此外,当加酶量分别为 250、500、1 000 和 2 000 U/g 时,随着加酶量的增加,最终的 DH 值逐渐升高,最终 DH 分别为 8.0%、11.22%、13.85% 和 13.99%。这是由于体系中酶分子越多,与底物分子的接触概率越大,蛋白质被酶解产生氨基酸和小肽的量增加从而导致水解度提高。当加酶量超过 1 000 U/g 时,体系的最终水解度值基本无差异,这可能是由于在此加酶量条件下,酶对底物的作用位点已趋于饱和,进一步增大加酶量对水解度的提高作用有限。为了区分各组样品,后续以加酶量来表示不同样品。

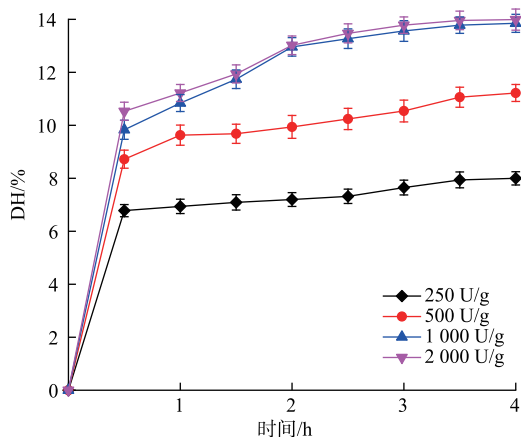


图 1 不同加酶量下的酶解液水解度变化

Fig. 1 Degree of hydrolysis of enzymatic hydrolysate under different enzyme dosages

值得注意的是,与未经冻融处理的新鲜蛋黄的酶解研究结果相比,本研究在相同的加酶量和反应时间下可以获得相对较高的 DH^[7]。这可能是由于 IgY 提取过程中的冻融及剪切操作,导致蛋黄脂蛋

白结构被破坏,从而使碱性蛋白酶可以更好地与底物接触,促进酶水解。

2.3 酶解蛋黄颗粒干粉(HYP)微观结构分析

为了获得样品的微观结构信息,采用激光共聚焦显微镜(CLSM)观察蛋白质和脂质在 HYP 中的分布情况。如图 2 所示,能够从对照组样品清楚地观察到 HYP 是由内部的油滴和外部的蛋白质共同构成的颗粒组成的,对照组样品与原蛋黄粉相比具有更小的粒径^[7],颗粒表面可以清晰观察到许多孔洞,这可能与之前的冻融和剪切处理有关。经酶解处理后,颗粒尺寸变得更小、更为均一,这些结构上的变化可能导致随着水解度的增加,样品的溶解度逐渐增加。值得注意的是,当水解程度较低时,没有出现游离的脂肪滴,然而,当加酶量达到 500~1 000 U/g 时,可以观察到许多游离的红色脂肪滴,这可能是由于当处于较低的水解度时,颗粒的结构尚未被破坏,仍然保持其包裹脂质分子的结构,随着加酶量的增加,蛋黄颗粒表面的蛋白质被水解,从而导致内部脂质的释放^[7]。当加酶量达到 1 000 U/g 时,出现相对较大的游离脂肪滴,这可能是由于此时蛋黄颗粒结构被严重破坏,更多的脂质被释放并聚集从而形成了较大的脂肪滴。但当加酶量进一步增加到 2 000 U/g 时,游离的脂肪滴反而减少,同时出现一些尺寸较大的颗粒,可能是因为随着水解度提高 HYP 的乳化性逐渐提高,游离的脂肪滴被重新乳化,蛋黄颗粒非极性表面之间发生疏水相互作用而聚集在一起^[19]。

2.4 酶解蛋黄颗粒干粉(HYP)溶解度分析

蛋白质的溶解性与其他功能性质如乳化性、发泡性等密切相关,因此被认为是其最基本的理化性质。如图 3 所示,HYP 的溶解度与对照组相比显著提高。此外,在相对较低的加酶量条件下,样品的溶

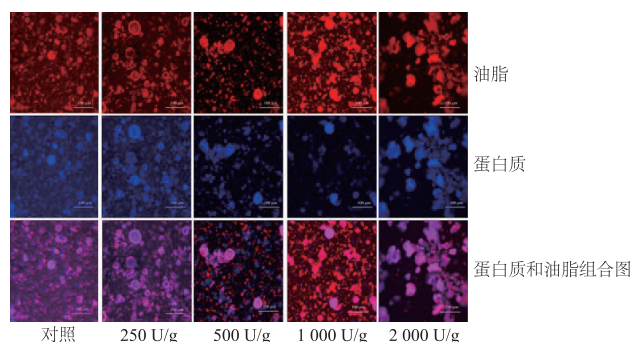


图2 HYP及对照组的激光共聚焦图

Fig. 2 CLSM micrographs of HYP and the control group

解度提高趋势明显,而随着加酶量的进一步增大,溶解度上升速度趋缓,直到达到一个相对恒定值,这与 Gao 等电泳观察到的结果一致^[22]。水解程度对蛋白质的溶解性具有积极的作用,当水解程度较高时,形成的多肽相对分子质量较小,溶解性更佳,这主要归因于小分子多肽表面具有较多的极性氨基酸残基,易与周围溶剂环境的水分子形成更多的氢键^[23]。此外,有报道称卵黄高磷蛋白质和 HDL 在自然条件下通过钙磷桥形成的不溶性复合物在水解过程中被破坏也会促使蛋白质溶解度提高^[24]。

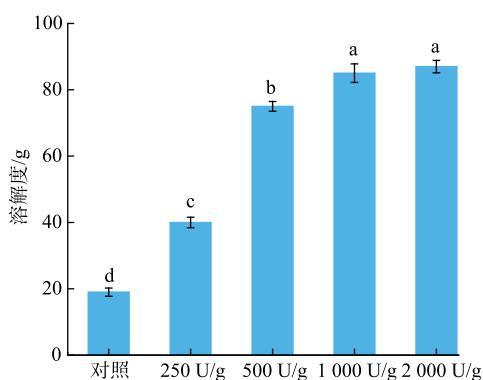


图3 HYP及对照组的溶解度

Fig. 3 Powder solubility of HYP and the control group

2.5 酶解蛋黄颗粒干粉(HYP)乳化性分析

乳化性是蛋黄的一项重要功能特性,可赋予产品所需要的口感和质感。通过测定 ESI 和 EAI 来观察酶解处理对样品乳化性的影响。如图 4 所示,样品的 EAI 没有显著差异($P < 0.05$),而乳化液的稳定性随着加酶量的增加而显著提高,这可能与 HYP 粒径的减小和溶解度的增加密切相关。据报道粒径越小,越有利于形成更均匀、更稳定的乳状液^[25]。此外,较高的表面疏水性也有助于提高乳化性能,

这可能由于酶解产生的多肽可通过与油滴相互作用从而形成更强的界面膜^[26]。还有研究认为,酶解产生的同时具有亲水和疏水基团的小肽段转移到油水界面上,也可能通过降低界面张力而起到稳定乳液的作用^[24]。

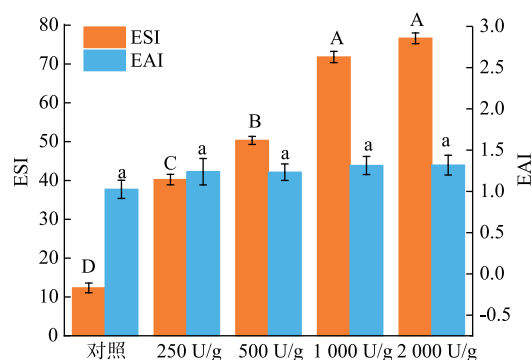


图4 HYP及对照组的乳化性质

Fig. 4 Emulsifying properties of HYP and the control group

2.6 蛋黄粉残油率对比分析

如图 5 所示,原蛋黄粉(OEYP)、亚临界丙烷萃取后的蛋黄粉(EYP-P)及亚临界丁烷萃取后蛋黄粉(EYP-B)的脂肪质量分数分别为 58.75%、37.00%、45.25%。由此可见,与丁烷相比,亚临界丙烷显示出了对蛋黄粉中油脂更强的提取能力。

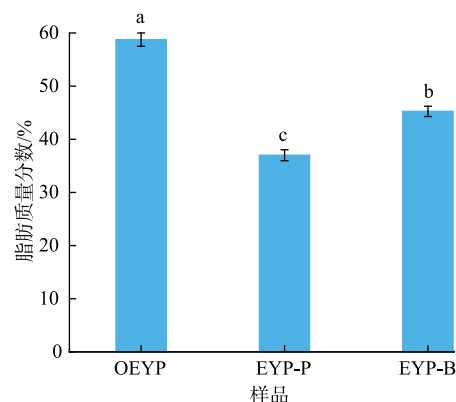


图5 亚临界丙烷和丁烷萃取后蛋黄粉脂肪质量分数分析

Fig. 5 Analysis of the fat content of egg yolk powder after subcritical propane and butane extraction

2.7 亚临界萃取工艺优化

由亚临界丙烷和丁烷萃取对低脂蛋黄粉残油率指标的分析可知,亚临界丙烷对蛋黄油的萃取效果优于丁烷。此外,前期的研究结果显示,与亚临界丙烷相比,采用亚临界丁烷萃取时低脂蛋黄粉中磷

脂的保留率更低,降低了产物低脂蛋黄粉的营养价值。因而作者最终选择亚临界丙烷作为萃取溶剂,并进一步对亚临界丙烷萃取技术的工艺参数包括萃取温度、萃取压力、萃取时间、料液比等进行优化。

2.7.1 萃取温度 由图 6(a)可知,当萃取温度从25℃升高到35℃时,萃取后蛋黄粉残油率呈明显下降的趋势,在35℃时残油率达到最低值,若继续提高萃取温度,蛋黄粉残油率反而呈上升趋势。这可能是由于温度适当升高可有效增大丙烷溶剂的挥发性和扩散系数,从而更好溶解蛋黄脂质,使得蛋黄油提取率提高;然而当温度过高时,萃取溶剂在萃取釜中易气化,萃取过程中传质推动力减小,油脂提取率反而降低^[27]。另外,萃取温度过高会增加能耗,并会导致脂质中磷脂等活性物质的变性与降解,故萃取温度宜选择35℃。

2.7.2 萃取压力 由图 6(b)可知,当萃取压力从0.5 MPa 升高到1.5 MPa 时,萃取后蛋黄粉残油率呈明显下降的趋势,继续增大萃取压力,残油率未发生显著改变。原因可能是由于在温度不变的条件下,当萃取压力达到一定值时,丙烷对甘油三酯和

胆固醇的溶解趋于饱和,而进一步提高萃取压力反而使丙烷的传质效率降低,萃取效率随之降低。故萃取压力宜选择1.5 MPa。

2.7.3 萃取时间 由图 6(c)可知,当萃取时间从30 min 增加到120 min 时,萃取后蛋黄粉残油率呈明显下降的趋势,继续延长萃取时间,残油率下降不显著。且随着萃取时间的延长,能量消耗增大,萃取成本提高。因此,考虑实际需求,萃取时间为120 min 最适宜。

2.7.4 料液质量体积比 由图 6(d)可知,随着液化丙烷体积的增加,萃取后蛋黄粉残油率显著下降,但是当料液质量体积比超过1 g:7 mL 时,残油率下降不显著,且丙烷溶剂的消耗增加也会提高萃取成本。因此,综合考虑残油率与成本需求,选择1 g:7 mL 作为最合适的料液质量体积比。

综上,亚临界丙烷萃取脱除 HYP 中脂质的最佳条件为:温度35℃,压力1.5 MPa,时间120 min,料液质量体积比为1 g:7 mL。此条件下,不同加酶量的 HYP 经过亚临界丙烷萃取后,所得低脂酶解蛋黄粉的残油率分别为26.00%、23.25%、19.25%、15.50%、20.23%。

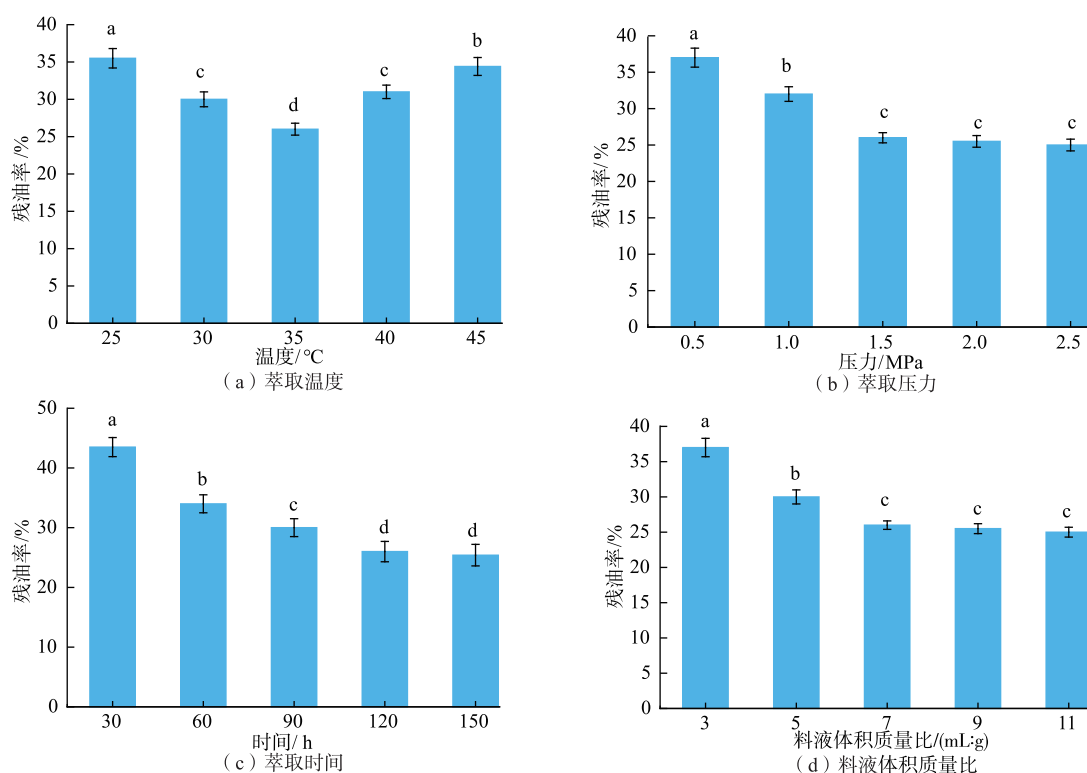


图 6 萃取温度、萃取压力、萃取时间、料液体积质量比对蛋黄粉残油率的影响

Fig. 6 Effect of temperature, pressure, time and solid-liquid ratio on the residual oil rate of egg yolk powder

2.8 低脂蛋黄粉理化与功能特性分析

2.8.1 粒度分析 如图 7 所示,与对照组相比,酶解后的蛋黄颗粒样品整体呈现出更小的粒径。随着加酶量的增加,样品的粒径逐渐变小。表明随着加酶量的增加,蛋黄脂蛋白的结构被破坏愈发严重,更有助于脂质溶出。这也在一定程度上能够解释亚临界萃取后蛋黄粉中残油率会随加酶量的增加而下降的现象。

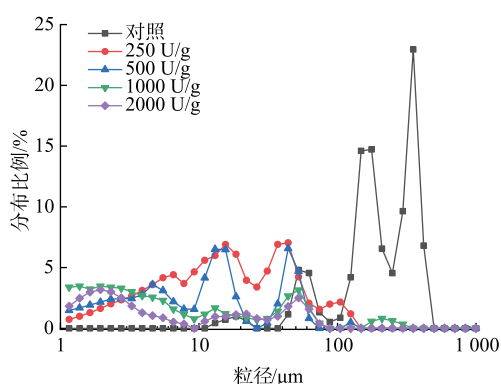


图 7 蛋黄粉的粒径分布

Fig. 7 Particle size distribution of egg yolk powder

2.8.2 微观结构分析 扫描电镜(SEM)结果表明经过亚临界萃取处理后蛋黄粉的微观结构会发生显著变化,如图 8 所示。与对照组(只剪切,未酶解)相比,HYP 经亚临界丙烷萃取后结构被破坏愈发严重,这更有助于蛋黄油的提取。随着酶解程度的增大,HYP 的平均尺寸明显减小,聚集减少。但当加酶量为 2 000 U/g 时,蛋黄颗粒干粉出现聚集结块现象。这可能是由于碱性蛋白酶的酶解产生了大量的小分子,而水解暴露的疏水基团与脂蛋白结合,导致微小颗粒的大量聚集结块^[28]。此外当加酶量较高时样品粒度过细,样品在萃取罐中更易受萃取压力挤压而结块,在一定程度上阻碍了亚临界溶剂对样品的渗透和油脂的提取,从而使得萃取后蛋黄粉的残油率较高。这一结果与低脂蛋黄粉残油率测定结果一致。

2.8.3 溶解特性分析 如图 9 所示,由 HYP 提油制得的低脂蛋黄粉的溶解度均显著高于未酶解组。与脱脂前 HYP 的溶解度相比较,经亚临界萃取后低脂蛋黄粉的溶解度大多会进一步提高,但当加酶量达到 2 000 U/g 时,HYP 经亚临界丙烷萃取后所得低脂蛋黄粉的溶解度反而下降。这可能是由于水解度较高时产生蛋黄颗粒较小,在亚临界萃取过程中颗

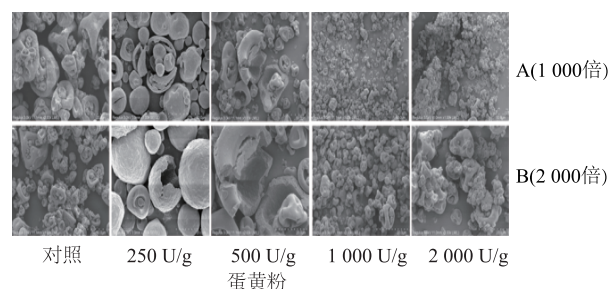


图 8 蛋黄粉的扫描电镜图

Fig. 8 SEM images of egg yolk powder

粒易产生颗粒聚集结块现象,从而导致蛋黄粉的溶解度变差。由此可见,经酶解和亚临界萃取步骤得到的低脂蛋黄粉具备良好的溶解性能。

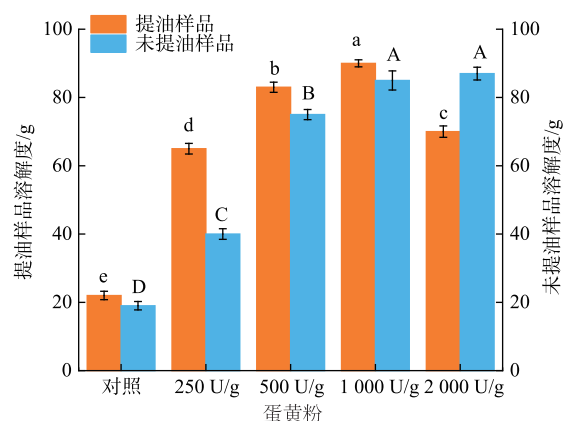


图 9 蛋黄粉的溶解性

Fig. 9 Solubility of egg yolk powder

2.8.4 乳化特性分析 如图 10(a)所示,与对照组(未酶解)相比,低脂蛋黄粉的乳化活性无显著性差异,而乳化稳定性随着加酶量的增加显著提高,当加酶量达到 1 000 U/g 时,乳化稳定性达到最大值,这与 HYP 的乳化稳定性变化趋势基本一致。蛋黄粉的乳液宏观结果(20 min 内)如图 10(b)所示,低脂蛋黄粉的乳化性能明显优于对照组。由此可见,经酶解和亚临界萃取步骤得到的低脂蛋黄粉具备良好的乳化性能。

3 结 语

以冻融-水稀释法提取蛋黄免疫球蛋白后剩余变性严重的冻融蛋黄颗粒为原料,采用限制性酶解制备酶解蛋黄颗粒干粉(HYP),并进一步结合亚临界萃取工艺制备低脂蛋黄粉产品。结果显示,酶解处理可以显著影响 HYP 的结构和功能性质,破坏脂蛋白结构,有助于提高亚临界萃取脱脂效率。当酶

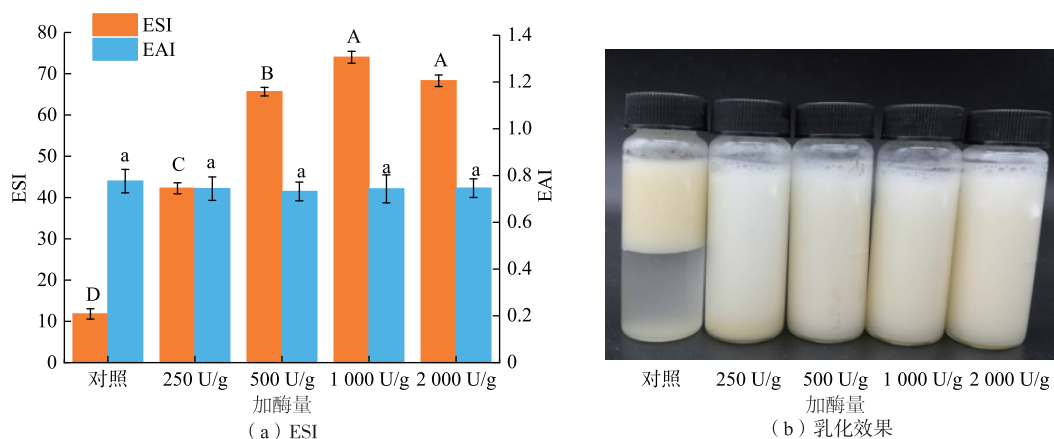


图 10 蛋黄粉的乳化性质

Fig. 10 Emulsion properties of egg yolk powder

添加量为 1 000 U/g 时,在萃取温度 35 ℃,压力 1.5 MPa,时间 120 min,料液质量体积比为 1 g:7 mL 的最优萃取条件下进行亚临界丙烷萃取,得到低脂蛋黄粉的残油率仅为 15.50%。作者制备的 HYP 和低脂蛋黄粉均呈现良好的溶解和乳化性能,可根据不同应用场合作为食品加工原料加以利用,有效提高蛋黄资源的综合利用效率。同时采用亚临界萃取技

术还可制得副产物蛋黄油,具备进一步开展深入研制新产品的潜力。因而本研究方法可有效解决冻融-水稀释法提取免疫球蛋白后剩余蛋黄颗粒功能性差、利用率低的问题,提高蛋黄产品附加值,有望拓宽蛋制品深加工的产业链,推动蛋黄资源的综合利用。

参考文献:

- [1] 邱宁,马美湖. 鸡蛋蛋白质组学研究现状与展望[J]. 中国家禽, 2011, 33(2):4-10.
QIU N, MA M H. Present situation and prospect of egg protein omics research[J]. *China Poultry*, 2011, 33(2):4-10. (in Chinese)
- [2] 甄宇红,郭洁,金礼吉,等. 抗金黄色葡萄球菌 IgY 的酶解稳定性及活性研究[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(10):1510-1512, 1523.
ZHEN Y H, GUO J, JIN L J, et al. Digesting stability and activities of IgY against *Staphylococcus aureus* [J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2007, 7(10):1510-1512, 1523. (in Chinese)
- [3] WANG X T, LI J H, SU Y J, et al. Freeze-thaw treatment assists isolation of IgY from chicken egg yolk[J]. *Food Chemistry*, 2021, 364:130225.
- [4] YUAN D, ZHOU F B, SHEN P H, et al. Self-assembled soy protein nanoparticles by partial enzymatic hydrolysis for pH-driven encapsulation and delivery of hydrophobic cargo curcumin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 120:106759.
- [5] DUAN C C, YANG L J, LI A L, et al. Effects of enzymatic hydrolysis on the allergenicity of whey protein concentrates[J]. *Iranian Journal of Allergy, Asthma, and Immunology*, 2014, 13(4):231-239.
- [6] 李建颖,赵彦巧,吴子健,等. 脱脂蛋黄蛋白粉酶水解实验研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(12):153-156.
LI J Y, ZHAO Y Q, WU Z J, et al. Study on enzymic hydrolysis of skim egg yolk protein powder[J]. *Food Research and Development*, 2012, 33(12):153-156. (in Chinese)
- [7] GU L P, JIAO H, MCCLEMENTS D J, et al. Improvement of egg yolk powder properties through enzymatic hydrolysis and subcritical fluid extraction[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 150:112075.
- [8] BAO Z J, ZHAO Y, WANG X Y, 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.
- [9] 王辉,许学勤,陈洁. 酶法提取蛋黄油的工艺[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 22(1):102-104.
WANG H, XU X Q, CHEN J. Enzymatic extraction of egg yolk oil[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2003, 22

- (1):102-104. (in Chinese)
- [10] 杨志空,韩伟. 亚临界萃取技术在天然产物提取中的应用[J]. 机电信息,2018(8):42-46.
YANG Z K,HAN W. Application of subcritical technology in natural product extraction[J]. **Mechanical and Electrical Information**,2018(8):42-46. (in Chinese)
- [11] 张庆富,杨文芳. 超临界 CO₂ 的应用技术及发展现状[J]. 毛纺科技,2011,39(8):48-54.
ZHANG Q F,YANG W F. Development and application of supercritical CO₂[J]. **Wool Textile Journal**,2011,39(8):48-54. (in Chinese)
- [12] GNAYFEED M H,DAOOD H G,ILLÉS V,et al. Supercritical CO₂ and subcritical propane extraction of pungent paprika and quantification of carotenoids,tocopherols,and capsaicinoids[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2001,49(6):2761-2766.
- [13] FOLCH J,LEES M,SLOANE STANLEY G H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. **Journal of Biological Chemistry**,1957,226(1):497-509.
- [14] SUN R,SIVIK B,LARSSON K. The fractional extraction of lipids and cholesterol from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide[J]. **Lipid / Fett**,1995,97(6):214-219.
- [15] CHURCH F C,SWAISGOOD H E,PORTER D H,et al. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins[J]. **Journal of Dairy Science**,1983,66(6):1219-1227.
- [16] WANG Y Y,WANG Z,CHENG S W,et al. Aqueous enzymatic extraction of oil and protein hydrolysates from peanut[J]. **Food Science and Technology Research**,2008,14(6):533-540.
- [17] 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.
- [18] XU L L,ZHAO Y,XU M S,et al. Changes in aggregation behavior of raw and cooked salted egg yolks during pickling[J]. **Food Hydrocolloids**,2018,80:68-77.
- [19] TANG S T,ZHOU X,GOUDA M,et al. Effect of enzymatic hydrolysis on the solubility of egg yolk powder from the changes in structure and functional properties[J]. **LWT-Food Science and Technology**,2019,110:214-222.
- [20] SU Y J,JI M Y,LI J H,et al. Subcritical fluid extraction treatment on egg yolk:product characterization[J]. **Journal of Food Engineering**,2020,274:109805.
- [21] CHEN Y,ZHANG B C,SUN Y H,et al. Physicochemical properties and adsorption of cholesterol by okra (*Abelmoschus esculentus*) powder[J]. **Food & Function**,2015,6(12):3728-3736.
- [22] GAO Y,LI J H,CHANG C H,et al. Effect of enzymatic hydrolysis on heat stability and emulsifying properties of egg yolk[J]. **Food Hydrocolloids**,2019,97:105224.
- [23] LIU Q,KONG B H,XIONG Y L,et al. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis[J]. **Food Chemistry**,2010,118(2):403-410.
- [24] FU X,HUANG X,JIN Y G,et al. Characterization of enzymatically modified liquid egg yolk:structural,interfacial and emulsifying properties[J]. **Food Hydrocolloids**,2020,105:105763.
- [25] 高扬. 酶解蛋黄乳化性质及壳聚糖对其稳定性的影响[D]. 无锡:江南大学,2019.
- [26] DAMODARAN S. Protein stabilization of emulsions and foams[J]. **Journal of Food Science**,2005,70(3):R54-R66.
- [27] KANG S W,RAHMAN M S,KIM A N,et al. Yield and physicochemical properties of low fat tofu prepared using supercritical carbon dioxide treated soy flours with different fat levels[J]. **Journal of Food Science and Technology**,2018,55(7):2712-2720.
- [28] 唐世涛. 超声联合蛋白酶酶解对蛋黄粉溶解性及乳化稳定性的影响[D]. 武汉:华中农业大学,2019.