

空化射流条件下酶法制油豆渣蛋白结构与理化特性研究

李 杨^{1,2} 和铭钰¹ 吴长玲¹ 王中江¹ 滕 飞¹

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 哈尔滨市食品产业研究院, 哈尔滨 150028)

摘要: 为运用空化射流处理技术有效提高酶法制油豆渣中可溶性蛋白含量、改善其理化特性, 采用二维和三维荧光、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳及扫描电镜解析了不同空化射流处理时间(0、5、10、15 min)对豆渣蛋白结构的影响及形态变化, 并采用溶解性、乳化性、氨基酸分析、粒度分布及 ζ -电位对其理化及功能特性进行表征, 最终明确了空化射流处理对酶法制油豆渣蛋白结构及理化特性的影响规律。结果表明: 空化射流可促进豆渣蛋白结构解折叠, 使分子间相互作用增强, 其亚基结构由高分子量向低分子量转化; 当空化射流处理 10 min 时, 豆渣蛋白粒度分布稳定, 且体积平均粒径 $D_{[4,3]}$ 达到最低值(470.10 ± 8.70) nm, ζ -电位绝对值达到最大(27.4 ± 0.83) mV, 溶解特性及界面性质最佳; 经氨基酸分析发现, 酶法制油豆渣蛋白和大豆分离蛋白(SPI)的氨基酸组成相似, 其疏水性氨基酸质量分数达 33.03%。

关键词: 酶法制油豆渣; 空化射流; 豆渣蛋白; 荧光光谱

中图分类号: TS214.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)12-0332-09

OSID:



Effect of Cavitation Jet on Structure and Physicochemical Properties of Soybean Residue Protein Produced by Enzymatic Oil Production

LI Yang^{1,2} HE Mingyu¹ WU Changling¹ WANG Zhongjiang¹ TENG Fei¹

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

2. Harbin Food Industry Research Institute, Harbin 150028, China)

Abstract: Aiming to use the cavitation jet treatment technology to effectively increase the soluble protein content and improve the physicochemical properties of the soybean residue produced by enzymatic oil production, two-dimensional, three-dimensional fluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE), and scanning electron microscopy were used to analyze the effects of different cavitation jet treatment times (0 min, 5 min, 10 min and 15 min) on the structure and morphological changes of soybean residue protein, and its solubility, emulsification, amino acid analysis, particle size distribution and ζ -potential were used to characterize its physicochemical and functional characteristics, and finally the cavitation jet effect on the structure and physicochemical properties of protein from soybean residue produced by enzymatic method was clarified. The results showed that the cavitation jet can promote the unfolding of the soybean residue protein structure and the intermolecular interaction was enhanced, and its subunit structure was transformed from high molecular weight to low molecular weight. When the cavitation jet was treated for 10 min, the particle size distribution of the soybean residue protein was stable and the volume average particle diameter $D_{[4,3]}$ reached the lowest value (470.10 ± 8.70) nm, the absolute value of ζ -potential reached the maximum value (27.4 ± 0.83) mV, and the dissolution characteristics and interfacial properties were the best; in particular, amino acid analysis revealed that the amino acid composition of the enzyme-made oil soybean residue protein and soy protein isolate (SPI) was similar, with hydrophobic amino acids reached 33.03%.

Key words: enzymatically produced oil soybean residue; cavitation jet; soybean residue protein; fluorescence spectroscopy

收稿日期: 2020-03-10 修回日期: 2020-04-17

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0400402)和第一批“大禹英才”(创新B类)项目

作者简介: 李杨(1981—),男,教授,博士,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究, E-mail: liyanghuangyu@163.com

通信作者: 滕飞(1986—),女,讲师,主要从事生命科学研究, E-mail: tengfei@neau.edu.cn

0 引言

酶法制油是一种新型环保提油技术,可以从大豆中同步提取植物油及蛋白质。与传统提油技术相比,酶法制油具有处理条件温和、产品品质高、操作安全、环境污染小、无溶剂残留等优点^[1-3]。随着酶法制油技术进入产业化阶段,其产生的大量加工副产物并未得到充分利用,造成严重的环境污染,极大地影响了酶法制油技术的经济可行性^[4-6]。目前,对豆渣的研究主要集中在多糖、膳食纤维、大豆异黄酮等方面,对豆渣蛋白的研究较少^[7-9]。研究表明,与很多植物蛋白相类似,豆渣蛋白中含人体所需的氨基酸,具有较低过敏性和较高的蛋白效价比。因此,酶法制油豆渣蛋白具有很大的发展潜力^[10-11]。

空化射流技术是一种新型物理改性技术,该技术集高速冲击、高频振动、高速剪切、超微粉碎、瞬时压降等多种处理技术于一体,从而改变生物大分子物质的物理、化学及结构特性,并提高物质功能活性。近几年,有研究指出,空化射流处理对于改善蛋白结构具有显著功效^[12-13]。文献[14]研究了空化射流调节豌豆球蛋白可溶性聚集体的乳化性质,发现微射流加工过程的空穴效应导致球蛋白聚集体内的结构重排,从而提高了蛋白聚集体的乳液稳定性。文献[15]研究表明,大豆分离蛋白(SPI)在空化射流高剪切处理下,导致大的不溶性聚集体破碎,并形成新的亚基间二硫键,从而大大提高了SPI的溶解度和表面疏水性。空化射流技术对植物蛋白质的结构和功能性质产生显著影响,与其他处理技术相比具有操作简单、处理时间短、温度低和效果独特的优点。目前,采用空化射流对SPI或其他豆类分离蛋白改性的研究已经很广泛,但对豆渣蛋白的影响研究尚未见报道。

本文运用空化射流技术处理酶法制油豆渣,采用二维及三维荧光光谱法、电泳及扫描电镜分析不同时间空化射流处理下豆渣蛋白的构象及表面形态变化,通过豆渣蛋白界面性质、溶解性、氨基酸水合能力、粒度分析及 ζ -电位对其功能特性进行表征,以明确空化射流对酶法制油豆渣蛋白的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

大豆(蛋白质质量分数94%),市售;碱性蛋白酶,酶活10 000 U/g以上,广州柏棠贸易有限公司;Lowry法测溶解度试剂盒,上海荔达生物科技有限公司;大豆分离蛋白(纯度90.21%以上,灰分质量

分数5.7%,脂肪质量分数0.95%,粗纤维质量分数0.87%),山东禹王实业(集团)有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

S22-2型恒温磁力搅拌器,上海司乐仪器有限公司;AL204型分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;PL303型电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;DC-500A型高速多功能粉碎机,浙江武义鼎藏日用金属制品厂;HH-4型数显恒温水浴锅,常州丹瑞实验仪器设备有限公司;JJ-1型精密增力电动搅拌器,常州丹瑞实验仪器设备有限公司;PHS-3C型雷磁pH计,上海精科仪器有限公司;TDL-408型台式离心机,上海安亭科学仪器厂;DHG-9146型鼓风干燥箱,上海一恒科学仪器有限公司;空化射流均质机,北京中森汇嘉科技发展有限公司;L-8800型氨基酸分析仪,日本HITACHI公司;Mastersizer 2000型激光粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;F-4500型荧光分光光度计,日本HITACHI公司。

1.3 方 法

1.3.1 酶法制油豆渣的制备

根据文献[16]的方法进行适当修改,将市售大豆经粉碎机粉碎过60目筛,取200g过筛后的豆粉,按液料比6 mL/g加入蒸馏水,搅拌均匀后放入55℃水浴锅内按照酶法制油进行酶解,酶解条件为:酶解温度55℃,酶解时间2 h,pH值维持在9.0,碱性蛋白酶Protex6L(8 900 U/mL)添加量为0.5%,用搅拌器边搅拌边酶解,酶解结束后,取出并用1 mol/L HCl溶液调节溶液pH值至7.0,之后在100℃沸水中灭酶5 min,灭酶后冷却至室温(20℃),在4 500 r/min、4℃条件下离心20 min,离心后去除上层液体,仅保留下层豆渣,并在相同离心条件下按液料比3 mL/g用去离子水将豆渣水洗3遍,之后将豆渣在平板上铺平后置入55℃鼓风干燥箱待质量恒定后取出研磨,即得所需酶法制油豆渣。

1.3.2 空化射流技术处理

称取一定量研磨后的豆渣,按液料比8 mL/g溶于去离子水中,采用空化射流均质机,对其进行均质处理,处理时间分别为5、10、15 min,同时以未经过高压微射流处理(0 min)的样品作为对照,温度25℃,压力0.1 MPa,在4 500 r/min、4℃条件下离心20 min,之后沉淀干燥即可。

1.3.3 基本成分测定

粗蛋白含量检测参照标准GB 5009.5—2016,利用凯氏定氮法;可溶性蛋白含量测定参照标准NY/T 1250—2006;膳食纤维含量检测参照标准

GB 5009.88—2014,利用重量法;脂肪含量检测参照 GB 5009.6—2016,利用索氏抽提法;含水率检测参照 GB 5009.3—2016,利用 105℃ 恒重法;灰分含量检测参照 GB 5009.4—2016,利用灼烧恒重法。

1.3.4 酶法制油豆渣蛋白等电点确定

根据文献[17]的方法采用沉淀质量法进行测定。取过 100 目筛的豆渣粉 50 g,按液料比 22 mL/g 加入蒸馏水,45℃ 下用 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 9.5,水浴锅搅拌提取 1 h, pH 值维持 9.5。在 8 000 r/min、10 min、4℃ 条件下离心,去上清液平均分为 10 份,用 1 mol/L HCl 溶液分别调 pH 值至 4.2、4.4、4.6、4.8、5.0、5.2、5.4、5.6、5.8、6.0,静置 2 h 后在 4℃ 条件下 8 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液后称质量,重复一次,绘制沉淀量与 pH 值的关系曲线图,沉淀量最大时的 pH 值为豆渣等电点,故等电点为 4.6。

1.3.5 豆渣蛋白的提取工艺

根据文献[18]的方法进行适当修改,取 100 g 豆渣粉用正己烷以液料比 6 mL/g 混合搅拌 1 h,离心(4 500 r/min、20 min、4℃)脱脂,得到脱脂豆粕^[19],将脱脂豆粕按 1:20 的质量比与水混合,用 2 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 9.0,常温搅拌 2 h 后,将其悬浮液在 4℃ 条件下 9 000 r/min 离心 30 min,取上清液。再用 2 mol/L HCl 溶液调节 pH 值至豆渣等电点 4.6。静置 2 h 后在 4℃ 条件下 7 000 r/min 离心 30 min,得蛋白沉淀,用去离子水洗 3 次,最后取沉淀溶解于水中并用 2 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0。再在 4℃ 条件下 9 000 r/min 离心 30 min,取上清液,将此蛋白溶液冷冻干燥后研磨即得粉末状豆渣蛋白。

1.3.6 乳化活性和乳化稳定性测定

乳化性能的测定根据文献[20]的方法进行适当修改,取一定体积质量浓度为 0.005 g/mL 的蛋白质溶液,加入同体积的葵花籽油,用高速分散器以 10 000 r/min 的速度高速搅拌 1 min,之后分别在 0 min 和 10 min 从容器底部移取等分试样的乳液(50 μL),以质量浓度为 0.001 g/mL 的 SDS(十二烷基硫酸钠, pH 值 7.0)稀释 100 倍,以 SDS 溶液为空白,在 500 nm 下测量稀释溶液的吸光度,乳化活性指数(EAI)和乳化稳定性指数(ESI)计算公式为

$$E_{AI} = 2 \times 2.303 \frac{A_0 N}{1\,000 CV} \quad (1)$$

$$E_{SI} = \frac{A_0 \Delta T}{\Delta A - A_{10}} = \frac{\Delta T}{A_{10} - A_0} \quad (2)$$

式中 A_0 ——初始时刻的吸光度

N ——稀释倍数,取 100

C ——豆渣蛋白质量浓度, g/mL

V ——乳化液中油相体积分数, %

ΔT ——时间差, min

ΔA —— ΔT 内的吸光度差

A_{10} ——10 min 时吸光度

1.3.7 起泡性和泡沫稳定性测定

根据文献[21]的发泡性能测定方法,取 50 mL 质量浓度 0.03 g/mL 豆渣蛋白溶液用高速分散器以 10 000 r/min 的速度搅打 1 min,用 10 mL 蒸馏水清洗刀具,洗液小心并入起泡液中,记录搅打前后的体积。起泡能力用体积增加的百分比表示。随后,将搅打起泡的样品静置 10、20、30 min,记录不同时间段的泡沫体积,其中所有实验平均测量 3 次。起泡性指数(FC)和泡沫稳定性指数(FS)计算公式为

$$F_C = \frac{V_2 - V_1}{V_1} \times 100\% \quad (3)$$

$$F_S = \frac{V_3}{V_1} \times 100\% \quad (4)$$

式中 V_1 ——搅打前体积, mL

V_2 ——搅打后体积, mL

V_3 ——放置一段时间后泡沫体积, mL

1.3.8 溶解性测定

参照文献[22]的方法并加以改进。将豆渣蛋白溶于去离子水中,分别配成质量浓度为 0.01、0.02、0.03、0.04 g/mL 的豆渣蛋白溶液。精确称取 10 mL 豆渣蛋白溶液,在 4 500 g 条件下离心 15 min。上清液经适当稀释后,应用 Lowry 法测定上清液蛋白含量,以牛血清白蛋白为标准物绘制标准曲线,用凯氏定氮法测定样品总蛋白含量。溶解度 S 计算公式为

$$S = \frac{T_1}{T_2} \times 100\%$$

式中 T_1 ——上清液豆渣蛋白质量浓度, g/mL

T_2 ——总豆渣蛋白质量浓度, g/mL

1.3.9 氨基酸分析

根据文献[23-24]的测定方法,利用 L-8800 型氨基酸分析仪进行氨基酸分析。

1.3.10 粒径分布及 ζ -电位测定

根据文献[25]的测定方法,利用 Mastersizer 2000 型激光粒度仪进行粒径分布及 ζ -电位测定。

1.3.11 荧光光谱分析

根据文献[26-27]的测定方法,使用 F-4500 型荧光光谱仪测定样品的荧光光谱。配置 50 mL 质量浓度 10 mg/mL 的豆渣蛋白溶液,用磷酸盐缓冲液稀释 100 倍后取适量稀释样品置于石英比色皿中

测定。二维荧光测定参数为:扫描发射波长为 300~500 nm,激发波长为 280 nm,激发和发射狭缝均为 5 nm;三维荧光光谱的连续扫描记录发射波长为 200~500 nm,起始激发波长为 200 nm,增长间隔为 10 nm,扫描 16 条曲线。

1.3.12 扫描电子显微镜观察

参照文献[28]的方法并略作修改。称取 0.1 g 样品,将其固定在碳带和铝短柱上并在真空下涂覆铂-铅(Pt-Pb),于 3 kV 下观察豆渣蛋白微观结构图像。

1.3.13 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

参照文献[29]的方法,并稍作修改。将 SPI 溶液以质量浓度 1.5 mg/mL 悬浮在磷酸盐缓冲液(0.02 mmol/L,pH 值 6.0)中。将 SPI 溶液(1 mL)加入 4 mL 样品缓冲液中,煮 5 min。将 Bio-Rad MiniProtein 3 系统用作不连续的缓冲液系统,在 5% 堆积凝胶和 12% 分离凝胶上,恒定电流设置为 25 mA,持续约 1.5 h。蛋白带用考马斯亮蓝 G-250 染色,然后用 7% 的乙酸(甲醇、乙酸、水体积比 227:

37:236)脱色。将预先染色的蛋白质分子质量标记(10~170 ku)在同一凝胶上电泳,以鉴定染色的凝胶中蛋白质条带的分子质量。

1.4 数据统计及分析

在本研究中,所有收集的数据均为 3 次测定的平均值及 3 次重复试验,结果表示为平均值 \pm 标准差(SD),利用 SPSS Statistics 22 软件,采用方差分析对数据进行差异显著性比较, $p < 0.05$ 为显著性差异。采用 Origin 9.5 软件进行数据分析、图表处理及图谱分析处理。

2 结果与分析

2.1 豆渣基本成分分析

由表 1 可知,豆渣中主要成分是膳食纤维,其次就是蛋白质。未处理及空化射流处理(5、10、15 min)的豆渣蛋白水溶性蛋白质量占粗蛋白百分比分别为 71.63%、73.21%、74.59% 及 74%。与未处理豆渣蛋白相比,水溶性蛋白含量显著提高,表明空化射流处理可以使豆渣蛋白中的不溶性成分转为可溶。

表 1 豆渣基本成分含量

Tab. 1 Composition of soybean residue protein

处理时间/ min	粗蛋白 质量分数	水溶性蛋白 质量分数	膳食纤维 质量分数	脂肪 质量分数	含水率	灰分 质量分数
0	(24.50 \pm 0.15) ^b	(17.55 \pm 0.10) ^b	(58.35 \pm 1.55) ^a	(4.01 \pm 0.05) ^b	(8.05 \pm 0.08) ^b	(3.17 \pm 0.02) ^d
5	(25.27 \pm 0.16) ^a	(18.45 \pm 0.13) ^a	(58.41 \pm 1.30) ^a	(4.12 \pm 0.06) ^a	(7.75 \pm 0.07) ^c	(4.17 \pm 0.01) ^a
10	(24.83 \pm 0.22) ^a	(18.52 \pm 0.11) ^a	(58.22 \pm 1.61) ^a	(3.34 \pm 0.03) ^c	(8.15 \pm 0.09) ^a	(4.07 \pm 0.03) ^b
15	(25.01 \pm 0.18) ^a	(18.48 \pm 0.09) ^a	(57.45 \pm 1.52) ^a	(4.24 \pm 0.05) ^a	(8.26 \pm 0.07) ^a	(3.57 \pm 0.02) ^c

注:所有样品均测定 3 次取平均值,同一列数据后不同字母代表样品间差异显著($p < 0.05$)。

2.2 豆渣蛋白粒径及 ζ -电位分析

图 1(图中相同图例不同字母表示处理间差异显著,下同)为不同空化射流处理时间对豆渣蛋白粒径分布、体积平均粒径 $D_{[4,3]}$ 及 ζ -电位的影响。与未处理豆渣蛋白相比,经空化射流处理的豆渣蛋白溶液显示出更宽的颗粒分布,体积平均粒径 $D_{[4,3]}$ 较低, ζ -电位绝对值升高,表明空化射流处理使豆渣蛋白溶液体系更加稳定。当空化微射流处理 10 min 后, $D_{[4,3]}$ 最低,为(470.10 \pm 8.70) nm, ζ -电位绝对值最高,为(27.4 \pm 0.83) mV。另外,随着处理时间的延长,豆渣蛋白粒径先降低后升高, ζ -电位绝对值先增加后降低。原因是空化射流处理过程中的强力剪切、高速冲击及高频振动等作用能有效减小豆渣蛋白的粒径,增加蛋白质上的负表面电荷,增强颗粒间静电排斥,破坏现有蛋白质聚集体,并抑制进一步聚集,粒子间的相互排斥力增大,体系稳定性增强。随着处理时间的延长,过度的处理在一定程度上促使

蛋白分子间发生聚集,蛋白质变性,高频的聚集现象和极高的能量密度使豆渣蛋白产生了过处理现象,使豆渣蛋白发生热聚集,故粒径变大, ζ -电位绝对值降低,体系稳定性下降^[30]。

2.3 豆渣蛋白微观结构分析

通过扫描电子显微镜可以更好地观察豆渣蛋白表观结构的显著变化。由图 2a、2c 可以看出,未处理的豆渣蛋白呈聚集状态,且形状不规则,大小不均一。当经过 10 min 的空化射流处理后发现,豆渣蛋白的尺寸变小,质地也更松散,表明空化射流处理使豆渣蛋白部分展开,使聚集状态的豆渣蛋白分散。

2.4 豆渣蛋白溶解性分析

由于溶解度是蛋白质变性和聚集最实用的衡量指标,因此它是蛋白质功能的良好指标,溶解度的改变可以改善豆渣蛋白的功能特性^[31]。不同空化射流处理时间下豆渣蛋白的溶解度变化如图 3 所示,对比发现在同一蛋白质量浓度下空化射流

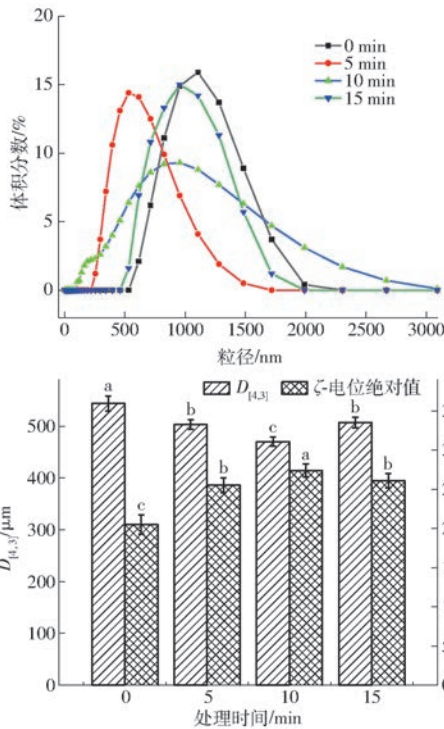


图1 不同空化射流处理时间对豆渣蛋白粒径分布、体积平均粒径 $D_{4,3}$ 及 ζ -电位的影响

Fig. 1 Effects of different cavitation jet treatment times on particle size distribution and volume mean diameter $D_{4,3}$ and ζ -potential of soybean residue protein

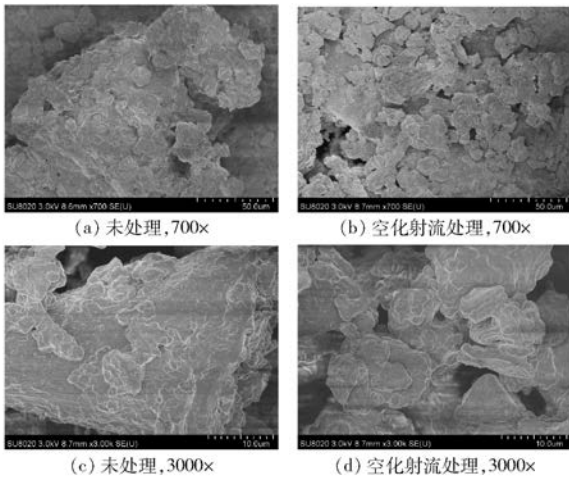


图2 豆渣蛋白扫描电子显微镜图

Fig. 2 Scanning electron microscopy of soybean residue protein

处理后豆渣蛋白溶解度均有所提升,并随着处理时间的延长,溶解度呈现先增加后降低的变化趋势。这主要是因为,空化射流处理产生的空穴效应使蛋白质分子发生解折叠,结构展开,亲水性提高,疏水基团暴露;另一方面,空化射流的剪切作用使豆渣蛋白粒径减小,蛋白比表面积增加,增加了蛋白质和水分子之间的相互作用,豆渣蛋白溶解性得到改善^[32-33]。但随着处理的继续进行,分子碰撞作用不再增加,蛋白质部分变性,可溶性聚

集体变为不溶性沉淀,导致豆渣蛋白溶解度降低。文献[34]研究发现,在较短的处理时间内,旋转空化作用导致蛋白质的解折叠和构象变化,最初不溶的沉淀物形成可溶性聚集体,提高了商业 SPI 的溶解度,从而验证了本研究的结果。

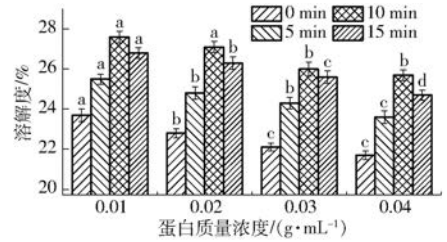


图3 不同空化射流处理时间对豆渣蛋白溶液溶解度的影响

Fig. 3 Effect of different cavitation jet treatment times on solubility of soybean residue protein solution

2.5 豆渣蛋白界面性质分析

图4为不同空化射流处理时间下豆渣蛋白的界面性质。结果表明,空化射流可以显著改善豆渣蛋白的起泡性和乳化性($p < 0.05$)。随着空化射流时间的延长,豆渣蛋白的起泡性和乳化性均表现为先升高后降低的趋势,处理时间10 min最佳。

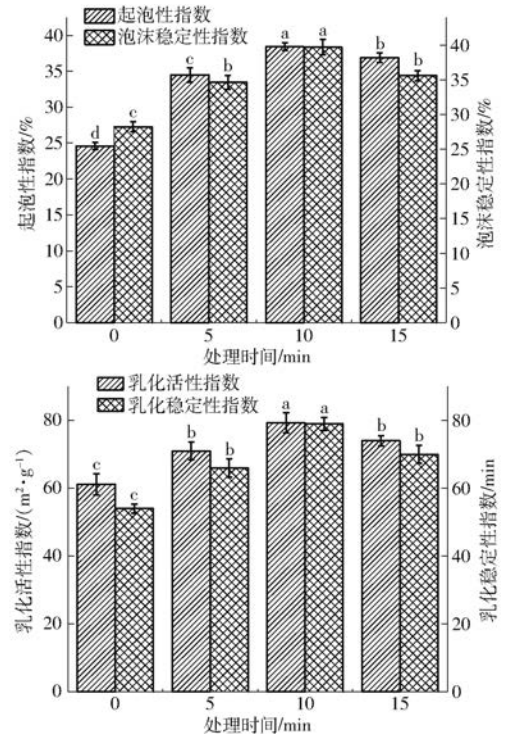


图4 不同空化射流处理时间对豆渣蛋白界面性质的影响

Fig. 4 Effect of different cavitation jet treatment times on interfacial properties of soybean residue protein

泡沫形成受3个因素影响,分子在空气-水界面的转运、渗透和重组。因此,要表现出良好的发泡性,蛋白质必须能够在空气-水界面迁移,在界面处展开和重新排列^[33]。文献[35]研究表明,更大的溶解度有利于在界面处形成多层粘性蛋白膜,以提高

泡沫的容量和稳定性。空化射流作用使蛋白质展开,迁移至空气-水界面的蛋白分子数量增多,溶解性增强,分子交联程度增加,蛋白质分子变得更加柔软,促进了泡沫的形成,从而增加了豆渣蛋白的发泡能力和发泡稳定性。

乳化性的增加是因为豆渣蛋白在空化射流空化和剪切作用下,蛋白质结构受到破坏从而使肽链得到进一步伸展,疏水基团朝向油相形成液膜来固定油滴,导致蛋白质分子在水-油界面上的更有效吸收。但是随着处理时间的延长,蛋白分子间重新形成难溶性分子聚集体,分子间碰撞停止,无法达到良好的亲水-疏水平衡,导致起泡性和乳化性降低^[36-38]。FC、FS、EAI 及 ESI 随空化射流时间的变化与溶解度的变化一致,这证实溶解度的增加有助于乳化能力和起泡性的提高。

2.6 豆渣蛋白氨基酸分析

表 2 为 SPI、未处理及经空化射流处理的豆渣蛋白氨基酸组成分析。结果表明豆渣蛋白与 SPI 的氨基酸组成相似,其主要组成均为谷氨酸。豆渣蛋白中人体必需氨基酸含量高于 SPI,且经空化射流处理后含量增加(SPI、未处理及空化射流处理下豆渣蛋白的必需氨基酸含量分别为 20.88%、21.64% 及 25%),故豆渣蛋白具有较高的营养价值。水合能力 α (g/g)的计算公式为

$$\alpha = f_C + 0.4f_F + 0.2f_N \quad (5)$$

式中 f_C f_F f_N ——蛋白质分子中带电、极性和非极性残基所占质量分数

表 2 氨基酸分析

Tab.2 Amino acid (AA) analysis %

氨基酸	单一氨基酸占总氨基酸质量分数		
	SPI	未处理豆渣蛋白	空化射流豆渣蛋白
Asp	14.41	12.19	13.16
Thr	3.86	3.36	3.57
Ser	6.23	5.76	5.87
Glu	18.99	21.97	21.91
Gly	4.27	4.11	4.11
Ala*	4.37	5.20	4.08
Cys	1.21	1.78	0.70
Val*	4.29	3.80	4.50
Met	0.02	0.02	0.98
Ile*	4.49	3.97	4.63
Leu*	7.13	9.12	9.54
Tyr*	3.51	3.00	4.00
Phe*	5.38	5.17	6.28
His	4.86	3.27	2.79
Lys	7.23	4.19	5.84
Arg	7.93	6.27	8.06

注: * 为疏水性氨基酸。

如表 2 所示, SPI、未处理及空化射流处理下豆渣蛋白的疏水性氨基酸质量分数分别为 29.17%、30.26% 及 33.03%, 豆渣蛋白所含疏水性氨基酸含量高于 SPI。经计算, SPI 的 α 为 0.82 g/g, 而未处理及经空化射流处理的豆渣蛋白 α 分别为 0.75、0.77 g/g。可以得出豆渣蛋白结合水能力低于 SPI, 且空化射流处理的豆渣蛋白水合能力比未处理的高, 与上述豆渣蛋白溶解度变化趋势一致。

2.7 豆渣蛋白 SDS-PAGE 分析

样品的 SDS-PAGE 谱图如图 5 所示, 其中 A、B、C 分别表示未处理豆渣蛋白、空化射流处理 10 min 的豆渣蛋白和 SPI, M 表示蛋白质 marker。豆渣蛋白与 SPI 的组成类似, 主要由大豆球蛋白(11S)和 β -伴大豆球蛋白(7S)组成。7S 是 3 种亚基通过非共价键的结合, 即 α' 、 α 和 β , 而 11S 是由 6 个亚基组成, 酸性(A)和碱性(B)亚基经过一个二硫键连接为 AB 亚基。与未处理的豆渣蛋白(图 5 中 A)相比, 空化射流处理 10 min 后, α' 、 α 强度降低, 分子质量由高向低转移。这表明空化射流处理破坏了氢键和疏水键, 导致分子质量改变和降低, 进而增加蛋白质与水分子之间的相互作用, 氨基酸内部亲水基团暴露于水中, 进而豆渣蛋白的溶解度提高^[39]。

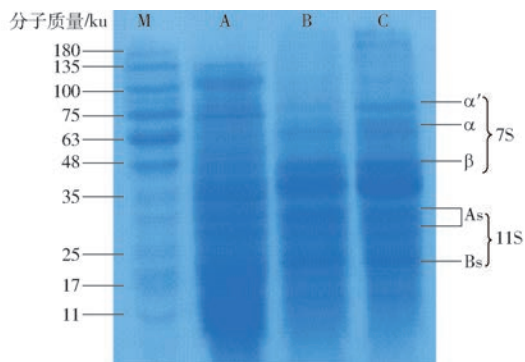


图 5 豆渣蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig. 5 SDS-PAGE image of soybean residue protein

2.8 豆渣蛋白二维荧光光谱分析

大豆蛋白的荧光主要来自于 Trp 残基, 且其荧光变化值可直接反映大豆蛋白中 Trp 残基本身及其周围环境变化, 因此可以从荧光的波动确定蛋白质的三级结构变化。研究表明最大荧光发射波长 λ_{\max} 与 Trp 残基所处的微环境有关, λ_{\max} 小于 330 nm 表示 Trp 残基位于蛋白质分子内部的非极性环境中, 当 λ_{\max} 大于 330 nm 时表明 Trp 残基位于蛋白质分子外部的极性环境中^[27,40]。如图 6 所示, 空化射流处理 0~15 min 的豆渣蛋白 λ_{\max} 分别为 342.6、344、350.8、346.6 nm, 由此可知本研究所测试豆渣蛋白 Trp 残基分布趋向于蛋白分子外部环境。与未处理

豆渣蛋白相比,空化射流处理的豆渣蛋白发生了红移,随着处理时间的延长,红移迁移量先增加后降低。并且当处理时间为 10 min 时,荧光强度达到最大。这种结果主要归因于空化射流使豆渣蛋白的空间构象改变,结构展开,最初掩埋在分子内部疏水环境的 Trp 残基逐渐暴露在外部亲水环境中,肽链结构舒展^[41-42],导致荧光强度改变和位移。但随着处理时间延长,大豆蛋白的空间结构进一步展开,蛋白分子间的次级键和疏水作用等使蛋白发生聚集,生色基团转移到疏水环境中,使荧光强度下降, λ_{\max} 蓝移。

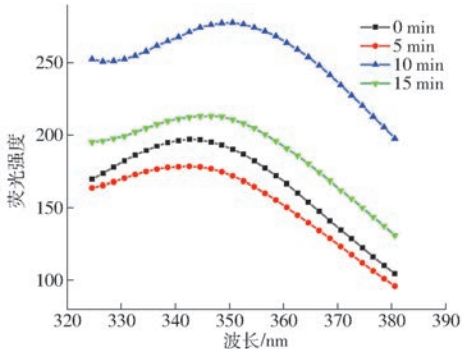


图6 不同空化射流处理时间豆渣蛋白的荧光光谱
Fig.6 Fluorescence spectra of soybean residue protein at different cavitation jet treatment times

2.9 豆渣蛋白三维荧光光谱分析

三维荧光光谱法是一种用于提供蛋白质构象和结构信息的有力方法。图7为不同空化射流处理时间下豆渣蛋白的三维荧光光谱图,并绘出相应的强

度等高线图。其中两个形如山脊的小峰为瑞利一级散射峰 Peak a ($\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}, \lambda_{\text{ex}}$ 表示激发波长, λ_{em} 表示发射波长)及二级散射峰 Peak b ($2\lambda_{\text{ex}} = \lambda_{\text{em}}$); Peak 1 为蛋白质 Trp 和 Tyr 残基的特征峰 ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$); Peak 2 主要代表多肽链骨架结构的特征峰 ($\lambda_{\text{ex}} = 230 \text{ nm}, \lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$),这些都是荧光峰的典型特征峰^[43]。

通过对比可知,经空化射流处理的豆渣蛋白瑞利一级散射峰 Peak a 荧光强度显著高于未处理豆渣蛋白 ($p < 0.05$),并且随着处理时间的延长,豆渣蛋白的荧光强度呈现先升高后降低的趋势。产生这种结果的原因是空化射流作用带来的分子碰撞使豆渣蛋白形成部分大粒径的可溶性聚集体,光散射作用增强,表现出更强的瑞利衍射峰。当作用时间超过 10 min 后,这种分子碰撞停止,故荧光强度反而下降^[44]。

荧光特征峰 Peak 1 及 Peak 2 主要显示了 Trp 残基和 Tyr 残基的光谱特性。未处理及不同空化射流处理时间(5、10、15 min)的豆渣蛋白的荧光特征峰 Peak 1 强度分别为 189.6、225、278.8 及 218.3。显然,经过空化射流处理后荧光特征峰 Peak 1 强度高于未处理,这主要是由于空化射流处理使蛋白质分子伸展,粒径减小导致其疏水结合及离子结合被切断,非极性基团暴露,Trp 和 Tyr 趋向暴露态,氢键作用逐渐减小,故荧光强度呈上升趋势变化;而当

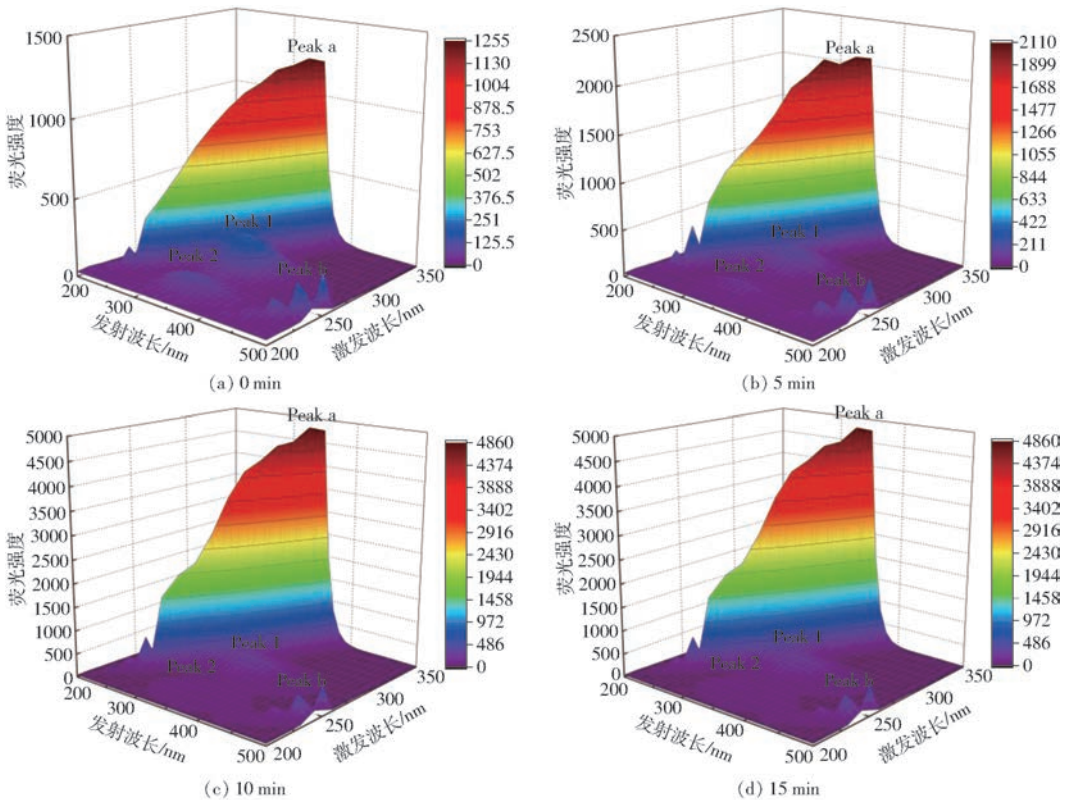


图7 豆渣蛋白体系三维荧光强度等高线图

Fig.7 3D-contour line figures of soybean residue protein

处理时间达到 10 min 后,豆渣蛋白分子间碰撞作用停止,氢键作用反而增大,豆渣蛋白部分变性,蛋白发生聚集,形成不溶性聚集体,使荧光强度下降。

另外对比荧光特征峰 Peak 2,未处理及不同空化射流空化射流处理时间(5、10、15 min)的豆渣蛋白的荧光特征峰 Peak 2 强度分别为 99.53、118.9、107.3 及 106.2。表明空化射流作用使荧光特征峰 Peak 2 的区域面积发生变化,豆渣蛋白多肽链的骨架伸展,蛋白的结构发生改变,疏水基团逐渐暴露。但随着时间的延长,荧光特征峰 Peak 2 强度有所降低,表明豆渣蛋白分子间作用降低,促使暴露态疏水性氨基酸重新包埋在分子内部^[45-46]。但空化射流作用并未显著改变豆渣蛋白的酪氨酸特征峰荧光强度。

3 结束语

通过对比不同空化射流处理时间下酶法制油

豆渣蛋白的氨基酸组成、粒径、 ζ -电位、溶解性、界面性质及二维和三维荧光光谱,发现空化射流作用时间为 10 min 时,效果较好。随着空化射流处理时间的延长,豆渣蛋白的粒径分布、体积平均粒径 $D_{[4,3]}$ 先降低后升高、 ζ -电位绝对值先升高后降低,空化射流处理后,豆渣蛋白溶解性、起泡性及乳化性均有所改善。经氨基酸分析发现,酶法制油豆渣蛋白和 SPI 的氨基酸组成相似,具有较高的营养价值,且豆渣蛋白所含人体必需氨基酸及疏水性氨基酸含量均高于 SPI。荧光光谱的变化表明,空化射流导致豆渣蛋白构象改变,色氨酸和酪氨酸残基的微环境发生了变化,最初掩埋在分子内部的疏水基团逐渐暴露。因此,空化射流技术可以有效改善酶法制油豆渣蛋白的理化性质及结构特性,本研究可为空化射流技术广泛应用于食品加工领域提供理论指导。

参 考 文 献

- [1] NADAR S S, RAO P, RATHOD V K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: a review[J]. Food Research International, 2018,108(5):309-330.
- [2] LIU Junjun, GASMALLA M A, LI Pengfei, et al. Enzyme-assisted extraction processing from oilseeds: principle, processing and application[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 35:184-193.
- [3] JIANG Lihuang, HUA Di, WANG Zhang, et al. Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates[J]. Food and Bioproducts Processing, 2010, 88(2):233-238.
- [4] CHENG M H, SEKHON J J, ROSENTRATER K A, et al. Environmental impact assessment of soybean oil production: extruding-expelling process, hexane extraction and aqueous extraction[J]. Food & Bioproducts Processing, 2018, 108(2):58-68.
- [5] JASREEN K S, KURT A R, STEPHANIE J, et al. Effect of co-products of enzyme-assisted aqueous extraction of soybeans, enzymes, and surfactant on oil recovery from integrated corn-soy fermentation[J]. Industrial Crops and Products, 2018, 121(2):441-451.
- [6] YUSOFF M M, GORDON M H, NIRANJAN K. Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion demulsifying methods: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 41(1):60-82.
- [7] MOURA J M L N D, MAURER D, JUNG S, et al. Pilot-plant proof-of-concept for integrated, countercurrent, two-stage, enzyme-assisted aqueous extraction of soybeans[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2011, 88(10):1649-1658.
- [8] ULLAH I, YIN T, XIONG S, et al. Structural characteristics and physicochemical properties of okara (soybean residue) insoluble dietary fiber modified by high-energy wet media milling[J]. LWT—Food Science and Technology, 2017, 82:15-22.
- [9] SUÁREZ M V, LUISA P C, REDONDO C A. Sequential extraction of polysaccharides from enzymatically hydrolyzed okara byproduct: physicochemical properties and in vitro fermentability[J]. Food Chemistry, 2013, 141(2):1114-1119.
- [10] JANKOWIAK L, TRIFUNOVIC O, BOOM R M, et al. The potential of crude okara for isoflavone production[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 124:166-172.
- [11] VONG W C, LIU Shaoquan. Biovalorisation of okara (soybean residue) for food and nutrition[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 52(5):139-147.
- [12] SUN Cuixia, DAI Lei, LIU Fuguo, et al. Dynamic high pressure microfluidization treatment of zein in aqueous ethanol solution [J]. Food Chemistry, 2016, 210:388-395.
- [13] LIU Wei, ZHANG Zhaohui, LIU Chengmei, et al. The effect of dynamic high-pressure microfluidization on the activity, stability and conformation of trypsin[J]. Food Chemistry, 2010, 123(3):616-621.
- [14] OLIVIERO B, POTIN F, CASES E, et al. Modulation of the emulsifying properties of pea globulin soluble aggregates by dynamic high-pressure fluidization[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 47(2):292-300.
- [15] SHEN Lan, TANG Cuanhe. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate[J]. Food Research International, 2012, 48(1):108-118.
- [16] LI Yang, SUI Xiaonan, QI Baokun, et al. Optimization of ethanol-ultrasound-assisted destabilization of a cream recovered from enzymatic extraction of soybean oil[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2014, 91(1):159-168.
- [17] 马秀婷. 豆渣蛋白提取、结构及性质研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2013.
- [17] MA Xiuting. The research of soybean dregs protein extraction, structure and properties[D]. Harbin: Northeast Agricultural University,2013. (in Chinese)
- [18] HOUDE M, KHODAEI N, BENKERROUM N, et al. Barley protein concentrates: extraction, structural and functional properties[J]. Food Chemistry, 2018, 254(7):367-376.
- [19] 杨梦曦,朱叶,邓雪盈,等. 复合酶法提取豆渣膳食纤维的研究[J]. 食品与机械, 2014,30(4):186-189.
- [19] YANG Mengxi, ZHU Ye, DENG Xueying, et al. Research on extraction of dietary fiber from soybean dregs by complex enzyme [J]. Food and Machinery, 2014,30(4):186-189. (in Chinese)

- [20] MA Mengting, REN Yanjing, XIE Wei, et al. Physicochemical and functional properties of protein isolate obtained from cottonseed meal[J]. Food Chemistry, 2018, 240:856–862.
- [21] PROSEKOV A, BABICH O, KRIGER O, et al. Functional properties of the enzyme-modified protein from oat bran[J]. Food Bioscience, 2018, 24(3):46–49.
- [22] WU Haiwei, WANG Qiang, MA Tiezheng, et al. Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein[J]. Food Research International, 2009, 42(3):343–348.
- [23] JANG J, BJORCK L, FONDEN R. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter culture[J]. Journal of Applied Microbiology, 1999, 85(1):95–102.
- [24] NICOLosi R J, ROGERS E J, KRITCHEVSKY D, et al. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hasters[J]. Artery, 1997, 22(1):266–277.
- [25] TANG Chuanhe, CHOI S M, MA C. Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2007, 40(2):96–104.
- [26] ZHANG Yezhong, ZHOU Bo, ZHANG Xiaoping, et al. Interaction of malachite green with bovine serum albumin: determination of the binding mechanism and binding site by spectroscopic methods[J]. Journal of Hazardous Materials, 2009, 163(2–3):1345–1352.
- [27] ZHANG Qiuting, TU Zongcai, XIAO Hui, et al. Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate[J]. Food and Bioproducts Processing, 2014, 92(1):30–37.
- [28] MUTTAKIN S, KIM M S, LEE D U. Tailoring physicochemical and sensorial properties of defatted soybean flour using jet-milling technology[J]. Food Chemistry, 2015, 187:106–111.
- [29] LAEMMLI B U K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4[J]. Nature, 1970, 227(5259):680–685.
- [30] 沙小梅, 肖万榕, 叶云花, 等. 动态高压微射流技术超微细化鲢鱼鱼骨[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12):174–179.
SHA Xiaomei, XIAO Wanrong, YE Yunhua, et al. Ultramicro-pulverization of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) bone by dynamic high pressure microfluidization technology[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(12):174–179. (in Chinese)
- [31] ARZENI C, MARTÍNEZ 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.
- [32] JIANG Lianzhou, WANG Jing, LI Yang, et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates[J]. Food Research International, 2014, 62:595–601.
- [33] LIU Chengmei, ZHONG Junzhen, LIU Wei, et al. Relationship between functional properties and aggregation changes of whey protein induced by high pressure microfluidization[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(4):E341–E347.
- [34] YANG Feng, LIU Xue, REN X, et al. Swirling cavitation improves the emulsifying properties of commercial soy protein isolate[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2018, 42:471–481.
- [35] DAMODARAN S, PARAF A. Food proteins and their applications[M]//Food proteins and their applications. Marcel Dekker, 1997.
- [36] AMIRI A, SHARIFIAN P, SOLTANIZADEH N. Application of ultrasound treatment for improving the physicochemical, functional and rheological properties of myofibrillar proteins[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111(1):139–147.
- [37] HU Hao, WU Jiahui, LI-CHAN E, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2):647–655.
- [38] 马楠. 三种不同处理工艺对米糠蛋白功能特性的影响研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2018.
MA Nan. Effect of three different treatment processes on functional properties of rice bran protein[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Land Reclamation University, 2018. (in Chinese)
- [39] NAZARI B, MOHAMMADIFAR M A, SHOJAEI-ALIABADI S, et al. Effect of ultrasound treatments on functional properties and structure of millet protein concentrate[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 41:382–388.
- [40] VIVIAN J, CALLIS P R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins[J]. Biophysical Journal, 2001, 80(5):2093–2109.
- [41] 李杨, 王迪琼, 齐宝坤, 等. 超声处理对大豆亲脂蛋白结构及溶解性的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2020, 51(2):357–362, 373.
LI Yang, WANG Diqiong, QI Baokun, et al. Effect of ultrasonic treatment on structure and solubility of soybean lipophilic protein[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(2):357–362, 373. http://www.jcsam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=2002039&flag=1. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2020.02.039. (in Chinese)
- [42] WANG Y Q, ZHANG H M, ZHANG G C, et al. Interaction of the flavonoid hesperidin with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study[J]. Journal of Luminescence, 2007, 126(1):211–218.
- [43] DING Fei, LIU Wei, LI Nan, et al. Complex of nicosulfuron with human serum albumin: a biophysical study[J]. Journal of Molecular Structure, 2010, 975(1):256–264.
- [44] 李杨, 刘宝华, 樊金源, 等. 超声及高压均质处理对大豆蛋白-磷脂酰胆碱相互作用的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(8):162–171.
LI Yang, LI Baohua, FAN Jinyuan, et al. Effects of ultrasound and high pressure homogenization treatment on the interaction of soybean protein-phosphatidylcholine[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(8):162–171. (in Chinese)
- [45] 吴长玲, 田甜, 王冬梅, 等. 低温超微粉碎对豆渣蛋白结构及功能性质的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23):50–55.
WU Changling, TIAN Tian, WANG Dongmei, et al. Effect of superfine comminution of low temperature on the structure and functional properties of soys drges protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(23):50–55. (in Chinese)
- [46] MANNA A, CHAKRAVORTI S. Role of block copolymer-micelle nanocomposites in dye-bovine serum albumin binding: a combined experimental and molecular docking study[J]. Molecular Biosystems, 2013, 9(2):246–257.