

# 乳液中柔性界面蛋白构效关系研究

朱颖<sup>1</sup> 赵思明<sup>2</sup> 王冬梅<sup>3</sup> 江连洲<sup>2</sup> 王中江<sup>2</sup> 范志军<sup>3</sup>

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 哈尔滨 150028; 2. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030;

3. 黑龙江省北大荒绿色健康食品有限责任公司, 佳木斯 154000)

**摘要:** 乳液的稳定性取决于形成的水油界面处蛋白膜的稳定性, 研究界面蛋白的构效关系对蛋白工业化生产十分重要。提取了不同品种大豆蛋白乳液的界面蛋白, 分析了界面蛋白的结构特征, 并通过对界面蛋白溶解性和乳化性质的分析, 解析蛋白质柔性结构对功能性质的影响机制。结果表明, 柔性较高的蛋白可以更快吸附到油滴表面, 结构更易伸展; 柔性较高的界面蛋白中疏水性氨基酸含量较高, 表面疏水性增加, 其二级结构中  $\alpha$ -螺旋结构含量较低, 无规则卷曲结构含量较高; 紫外光谱和荧光光谱分析表明, 界面蛋白质分子在解折叠后暴露出更多的疏水性基团, 其溶解性降低, 在水油界面处易形成稳定的蛋白膜, 从而增加乳液的稳定性。

**关键词:** 大豆蛋白乳液; 柔性; 界面蛋白; 结构特征

中图分类号: TS214.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2021)03-0341-09

OSID: 

## Structure and Flexibility Analysis of Interface Protein in Protein Emulsion

ZHU Ying<sup>1</sup> ZHAO Siming<sup>2</sup> WANG Dongmei<sup>3</sup> JIANG Lianzhou<sup>2</sup> WANG Zhongjiang<sup>2</sup> FAN Zhijun<sup>3</sup>

(1. College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China

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

3. Heilongjiang Province Beidahuang Green Health Food Co., Ltd., Jiamusi 154000, China)

**Abstract:** The stability of soybean protein emulsion depends on the stability of protein membrane at oil-water interface. It is important to study the structure and functional property of interface protein of different protein emulsions. Totally 12 varieties of different interface protein were extracted. The interface flexible protein had higher content of hydrophobic amino acids, and the molecular weight of the protein contained mainly more than 100 ku. The globulin subunits of 7S and 11S protein were analyzed by FTIR. The content of  $\alpha$ -helix was lower and the content of random coil was higher, which was consistent with the above results of different flexible SPIs. From the composition of SDS-PAGE subunits, it could be seen that the proportion of 7S in the flexible protein was increased, which further proved that 7S protein had higher flexibility. The flexibility of the interface protein was higher. The result of surface hydrophobicity of interface protein was the same as that of SPI, and the interface protein had more hydrophobic residues to be stable at the water-oil interface. From the analysis of the tertiary structure of the interface protein by UV and fluorescence spectrum, it could be seen that the amino acid residues of the interface flexible protein were more exposed and the structure was more flexible, which was conducive to the molecular rearrangement at the interface. The functional properties were also changed, the solubility was decreased and the emulsification was increased, which was related to the structure features of the interface proteins.

**Key words:** soybean protein emulsion; flexibility; interface protein; structure feature

收稿日期: 2020-05-24 修回日期: 2020-07-01

**基金项目:** 国家自然科学基金重点项目(3143000560)、国家自然科学基金项目(31671807)、黑龙江省应用技术与开发重大项目(GA17B002)、山东省泰山产业领军人才工程高效生态农业创新类项目(LJNY201607)和哈尔滨商业大学“青年创新人才”项目(2020CX40)

**作者简介:** 朱颖(1992—), 女, 讲师, 主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究, E-mail: 13258512068@163.com

**通信作者:** 范志军(1987—), 男, 研究员级高级工程师, 主要从事食品加工与安全研究, E-mail: 15845177666@139.com

## 0 引言

目前,水包油型乳液被广泛应用于化妆品、护肤品、制药和食品工业中。乳液是一种不稳定的液体,乳滴易发生絮凝和聚集甚至沉降等现象<sup>[1]</sup>。因此,一些表面活性剂被应用于降低界面张力并形成粘弹性保护层,从而抑制油滴的聚集<sup>[2]</sup>。蛋白质作为一种高效的食品乳化剂,具有亲水亲油性。蛋白质的关键功能特性是通过吸附至油、水两相之间的界面处形成并稳定乳液,从而降低界面张力、增强界面膜的稳定性<sup>[3]</sup>。已有研究证明了油水界面吸收的乳蛋白层在稳定乳液中的作用<sup>[4-5]</sup>。鹰嘴豆蛋白是具有最高弹性模量的乳化剂,可以形成较小尺寸液滴,同时提高乳液的抗氧化性<sup>[6]</sup>。蛋白质在溶解过程中发生结构的解折叠,蛋白质构象的改变使疏水性残基暴露,从而改善了乳化性能<sup>[7-8]</sup>。文献<sup>[9]</sup>研究了蛋白质浓度对蛋白质乳液性质的影响,结果表明,乳液的流变行为取决于蛋白质的种类和浓度。蛋白质分子的柔性差异取决于不同程度的结构变化<sup>[10]</sup>。文献<sup>[11]</sup>从蛋白质的不同结构角度研究分子柔性与乳化性的关系。由于蛋白质对外界环境因素具有敏感性,故会因蛋白质结构的稳定性差异而影响蛋白质乳液的稳定性<sup>[12]</sup>。因此,对蛋白乳液稳定机理进行深入探究有利于拓宽其在工业生产中的应用范围。

界面蛋白的吸附是一个动态过程,蛋白分子吸附到油滴表面,形成不均一的蛋白膜。因此,界面蛋白可以在乳液中同时与油相和水相结合,包裹油滴,防止液滴聚沉,从而起到稳定乳液的作用。研究表明,乳液中界面蛋白的含量越高,越有利于降低油水界面张力,乳液稳定性越强<sup>[13-14]</sup>。界面蛋白的结构性质是影响乳液稳定性的重要因素,一些学者对此进行了相关研究<sup>[15-21]</sup>。蛋白质的界面功能性表达历经分子吸附、结构重排、界面扩张等复杂过程,从蛋白质的天然稳态结构难以分析界面功能性表达的构效关系,通过柔性结构分析、确定功能单位或结构域可为深入解析大豆蛋白界面功能性提供可靠依据。

关于乳状液稳定性和蛋白质表面活性的研究较少,迄今为止,尚未见关于乳状液中界面蛋白柔性的相关报道。本文采用红外光谱、紫外光谱、荧光光谱分析不同品种大豆蛋白乳液中界面蛋白的结构特征,探究界面蛋白的柔性结构,通过分析不同品种界面蛋白的表面疏水性、二硫键含量、溶解性和乳化性等,对比界面蛋白的功能性,以期解析界面蛋白的柔性结构对功能性质的影响机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白,实验室自提;葵花籽油,市售;盐酸、氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠,北京新光化工试剂厂;正己烷、乙醇、甲醇,天津北科化学品有限责任公司;其他化学试剂均为分析纯试剂。

### 1.2 仪器与设备

GL-20G-II型高速冷冻离心机,上海卢湘仪离心机仪器公司;FD5-3型冷冻干燥机,美国SIM公司;PHSJ-4A型实验室pH计,上海雷磁公司;电子分析天平(0.0001g),北京赛多利斯仪器系统有限公司;ULTRA-TURRAX UTL2000型乳化机,德国IKA仪器设备公司;F-4500型荧光分光光度计,日本HITACHI公司。

### 1.3 界面蛋白提取

将大豆分离蛋白溶解在0.05 mol/L、pH值7.5±0.1的磷酸盐缓冲溶液中配置成1%的蛋白溶液,室温(20℃)下搅拌2h,然后4℃静置充分后水和12h。加入0.02%的叠氮化钠,防止微生物生长。按照葵花籽油与蛋白质质量比1~1.5加入葵花籽油,然后用FJ-200型高速均质器在20000g下进行5min均匀化,然后立即在50MPa的压力下进行高压均匀化。制得的乳液用于以下研究。

界面蛋白的提取参照文献<sup>[22]</sup>的方法并进行了修改,将上述不同品种大豆蛋白乳液首先进行10000g离心10min,去上层乳液层添加4倍体积去离子水进行水洗30min,然后20000g高速离心20min,取下层溶液进行酸沉(pH值4.5)得到蛋白沉淀,然后将沉淀后的蛋白碱溶(pH值8.0),冻干得到界面蛋白。

### 1.4 指标测定

#### 1.4.1 界面蛋白含量测定

参照文献<sup>[23]</sup>的方法测定不同品种大豆蛋白乳液界面蛋白含量。将乳液样品在室温15000g的条件下离心40min,使样品乳液分层。顶部是乳液油层,底部是蛋白水相。使用牛血清蛋白作为标准物,通过文献<sup>[24]</sup>方法测定底部溶液和初始蛋白溶液的蛋白浓度,界面蛋白质量分数计算式为

$$P = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100\% \quad (1)$$

式中  $C_t$ ——最初乳液中总的蛋白质量比,g/g

$C_s$ ——上清液中的蛋白质量比,g/g

#### 1.4.2 界面蛋白氨基酸组成测定

氨基酸组成测定参照文献<sup>[25]</sup>的方法。使用Hitachi L-8800型自动氨基酸分析仪(德国曼默博

尔公司)测定氨基酸组成。在 110℃ 下将蛋白质样品在密封管中用 6 mol/L HCl 水解 24 h。水解后将溶液进行冻干处理,复溶过滤待用。在 38℃ 下进行测定,检测波长为 254 nm,流速为 1.0 mL/min。样品氨基酸组成用氨基酸占蛋白质质量分数来表征。

#### 1.4.3 红外光谱分析(FTIR)

界面蛋白的红外光谱测定参照文献[26]的方法。FTIR 光谱在波长 4 000 ~ 400  $\text{cm}^{-1}$  范围内进行扫描,界面蛋白研磨成粉末,并在室温下利用 KBr 进行压片(每 1 mg 蛋白使用 100 mg KBr)。每个光谱平均扫描 60 次,分辨率为 2  $\text{cm}^{-1}$ 。酰胺 I 带的分析在 1 700 ~ 1 600  $\text{cm}^{-1}$  的区域内进行。蛋白的二级结构由“peak fitting”软件进行拟合获得。

#### 1.4.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

SDS-PAGE 根据文献[27]方法进行实验,配制 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶。将溶解好的大豆分离蛋白(6 mg/mL)与上样缓冲液混合后沸水浴 5 min,3 000 g 离心 5 min 后上样到凝胶中。浓缩胶先以 80 mV 进行跑胶,然后在分离胶中以 120 mV 进行电泳,直到到达凝胶底部为止。电泳完成后,将凝胶用 0.05% 考马斯亮蓝(R-250)染色,染色时间为 30 min,最后用脱色液(甲醇、冰乙酸、水,体积比 1:1:8)洗脱至条带清晰。使用 Molecular Imager Gel Doc(美国加利福尼亚州 Bio-Rad 实验室)分析凝胶条带并进行拍摄。

#### 1.4.5 荧光光谱分析

采用 F-4500 型荧光分光光度计(日本 HITACHI 公司)对样品进行荧光光谱测定。将不同品种的 SPI(大豆分离蛋白)溶液稀释,使其质量浓度达到 0.2 mg/mL。光谱测定条件设置为:激发波长(Ex)280 nm,扫描波长(Em)为 300 ~ 500 nm,激发狭缝宽度(Ex Slit)为 5 nm,同样发射狭缝宽度(Em Slit)也为 5 nm。重复扫描 3 次。

#### 1.4.6 紫外扫描

将界面蛋白溶液稀释到 0.1 ~ 0.2 mg/mL 进行紫外光谱扫描,波长范围 250 ~ 350 nm,扫描速率 100 nm/min,分辨率为 0.2 nm,重复扫描 3 次记录平均值。

#### 1.4.7 表面疏水性分析

参照文献[28]的方法,使用疏水性荧光探针 8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)测定表面疏水性。在 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲盐水(pH 值 7.0)中制备  $8 \times 10^{-3}$  mol/L ANS 溶液和 0.01 g/mL 蛋白质溶液。取 5 mL 蛋白溶液加入 50  $\mu\text{L}$  10 mmol/L 的 ANS 溶液。将混合物涡旋振荡约 5 s。在  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$  条件

下,使用 Tecan M200 PRO(美国普洛麦格公司)设置激发波长(Ex)为 390 nm,扫描波长(Em)为 468 nm,激发和发射狭缝宽度(Ex Slit 和 Em Slit)为 5 nm,扫描速率(Scan spe)为 10 nm/s。以荧光值为因变量,SPI 质量浓度为自变量作图,得到的一次函数拟合线的初始斜率为表面疏水性指数。

#### 1.4.8 二硫键含量测定

SPI 中-SH 和-SS 含量参照文献[29]的方法测定。在 0.5 mL 的样品溶液中加入 2.5 mL 含有 8 mol/L Urea(尿素)的 Tris-甘氨酸缓冲液和 0.02 mL 含有 1% DNTB(5,5'-二硫双-2-硝基苯甲酸)的 Tris-甘氨酸缓冲液,将其置于 40℃ 水浴中保温 25 min。利用双光束分光光度计(日本 HITACHI 公司)在 412 nm 处测量其吸光度。Tris-甘氨酸缓冲液作为空白对照。-SH 和-SS 质量摩尔浓度计算公式为

$$S_{SH} = \frac{73.53A_{412}D}{C} \quad (2)$$

式中  $A_{412}$ ——412 nm 处的吸光度

$C$ ——样品质量浓度,mg/mL

$D$ ——稀释因子,-SH 取 5.02,-SS 取 10

#### 1.4.9 界面蛋白溶解性测定

应用 BCA 测定法测定蛋白质浓度。将含有  $\text{Cu}^{2+}$  和 BCA 试剂的工作液添加到梯度标准溶液(每 1 mL PBS 缓冲溶液中有 5 mg 牛血清白蛋白)及 200  $\mu\text{L}$  蛋白样品的 96 孔板中,并于 37℃ 保温 30 min。采用 Tecan M200 PRO 型酶标仪记录在 562 nm 处的吸光度,溶解度计算公式为

$$S = \frac{C_u}{C_t} \times 100\% \quad (3)$$

式中  $C_u$ ——上清液蛋白质量浓度

$C_t$ ——总蛋白质量浓度

#### 1.4.10 界面蛋白乳化性质测定

根据文献[30]的方法,测定乳化性指数(EAI)和乳化稳定性指数(ESI)。将葵花籽油和蛋白质溶液(0.2 mg/mL)以 1:3 的体积比放入烧杯中,然后使用 Ultra-Turrax T18 型均质器将其均质化 3 min。然后立即用 0.1% SDS 将 50  $\mu\text{L}$  乳液稀释 100 倍。使用分光光度计(上海 SHJH 有限公司)记录 500 nm 处和 10 min 后的吸光度。EAI 和 ESI 计算公式为

$$E_{AI} = \frac{2 \times 2.303 \times 100A_0}{10000\theta LC} \quad (4)$$

$$E_{SI} = \frac{10A_0}{A_0 - A_{10}} \quad (5)$$

式中  $E_{AI}$ ——乳化性指数, $\text{m}^2/\text{g}$

$E_{st}$ ——乳化稳定性指数, min

$L$ ——比色皿的光路长度, 取 1 cm

$\theta$ ——乳液的油相分数, 取 25%

$A_0$ 、 $A_{10}$ ——乳液在 0、10 min 的吸光度

1.5 数据统计及分析

所有的实验至少进行 3 次, 利用 SPSS Statistics 软件对数据进行 ANOVA 差异显著性分析。采用 Origin 9.1 软件、PeakFit 4.12 分析软件对数据进行处理。

2 结果与讨论

2.1 界面蛋白含量

前期研究<sup>[31]</sup>确定 12 种蛋白的柔性从大到小依次为 HH-53、HN-87、HN-48、HN-44、HN-61、HN-52、HH-49、JY-55、HN-85、HN-66、HN-69、HH-51 (HH 代表黑河品种大豆, HN 代表黑农品种大豆, JY 代表金源品种大豆)。柔性较高的蛋白以较快的吸附速率吸附到水油界面处, 增加乳液中界面柔性蛋白的含量。图 1 (图中不同字母表示差异显著, 下同) 显示了不同品种蛋白乳液的界面柔性蛋白质量分数, HH-53、HN-87、HN-48 和 HH-44 蛋白制备的乳液含有超过 50% 的界面柔性蛋白, 而 HN-66、JY-55、HN-85 和 HN-61 蛋白

乳液含有 40% ~ 50% 的界面蛋白, HN-52、HH-49 和 HH-51 蛋白乳液中界面蛋白质量分数在 40% 左右。这说明仍有很多未吸附的蛋白分子存在于水溶液中。柔性蛋白会增加油滴表面的吸附蛋白含量, 有利于界面分子间的相互作用, 从而提高乳液的稳定性。文献[32]研究表明, 界面蛋白含量越高, 乳液越稳定。

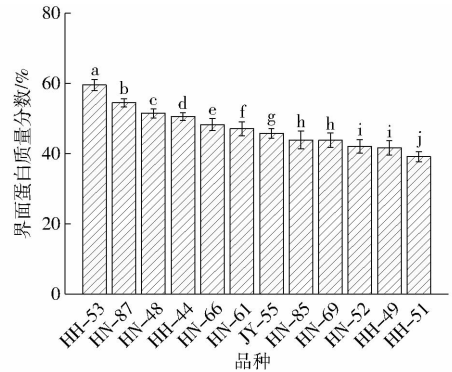


图 1 不同品种大豆蛋白乳液的界面蛋白含量  
Fig. 1 Interface protein percentage of different soybean protein emulsions

2.2 界面蛋白氨基酸组成

已知大豆蛋白包含人体所需的 8 种必需氨基酸, 界面蛋白和大豆分离蛋白的氨基酸组成差异不大。通过表 1 比较可知, HN-48 和 HN-87 界面蛋

表 1 不同品种界面蛋白的氨基酸质量分数

Tab. 1 Content of different amino acids in different interface proteins

品种	Asp	Glu	His	Lys	Arg	Thr	Ser	Gly	Cys	Tyr	Ala	Val	Met	Ile	Leu	Phe	Pro
HN-48	(11.32 ± 0.1) <sup>d</sup>	(19.02 ± 0.1) <sup>b</sup>	(2.38 ± 0.1) <sup>b</sup>	(17.87 ± 0.1) <sup>c</sup>	(6.39 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.49 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.50 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.99 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.37 ± 0.1) <sup>b</sup>	(2.76 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.88 ± 0.1) <sup>c</sup>	(4.13 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.22 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.41 ± 0.1) <sup>a</sup>	(7.78 ± 0.1) <sup>b</sup>	(4.82 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.66 ± 0.1) <sup>a</sup>
HN-52	(10.58 ± 0.1) <sup>e</sup>	(19.66 ± 0.1) <sup>b</sup>	(2.45 ± 0.1) <sup>b</sup>	(17.07 ± 0.1) <sup>c</sup>	(6.87 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.40 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.65 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.67 ± 0.1) <sup>b</sup>	(1.03 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.33 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.78 ± 0.1) <sup>c</sup>	(4.05 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.12 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.02 ± 0.1) <sup>a</sup>	(7.00 ± 0.1) <sup>c</sup>	(4.60 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.71 ± 0.1) <sup>a</sup>
HN-61	(11.88 ± 0.1) <sup>b</sup>	(20.96 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.24 ± 0.1) <sup>a</sup>	(11.21 ± 0.1) <sup>d</sup>	(6.97 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.66 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.71 ± 0.1) <sup>b</sup>	(4.21 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.67 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.30 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.13 ± 0.1) <sup>ab</sup>	(4.59 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.39 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.47 ± 0.1) <sup>a</sup>	(8.06 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.78 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.77 ± 0.1) <sup>a</sup>
HN-66	(11.63 ± 0.1) <sup>c</sup>	(18.99 ± 0.1) <sup>c</sup>	(3.16 ± 0.1) <sup>a</sup>	(12.82 ± 0.1) <sup>d</sup>	(7.94 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.61 ± 0.1) <sup>a</sup>	(5.30 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.77 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.69 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.61 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.94 ± 0.1) <sup>c</sup>	(4.45 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.27 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.40 ± 0.1) <sup>a</sup>	(7.72 ± 0.1) <sup>b</sup>	(4.98 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.73 ± 0.1) <sup>a</sup>
HN-69	(10.66 ± 0.1) <sup>c</sup>	(19.28 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.27 ± 0.1) <sup>a</sup>	(11.46 ± 0.1) <sup>d</sup>	(7.82 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.84 ± 0.1) <sup>a</sup>	(5.54 ± 0.1) <sup>b</sup>	(4.13 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.75 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.77 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.33 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.58 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.36 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.36 ± 0.1) <sup>a</sup>	(7.99 ± 0.1) <sup>a</sup>	(5.11 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.76 ± 0.1) <sup>a</sup>
HN-85	(12.22 ± 0.1) <sup>a</sup>	(19.63 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.24 ± 0.1) <sup>a</sup>	(11.41 ± 0.1) <sup>d</sup>	(7.93 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.60 ± 0.1) <sup>a</sup>	(5.39 ± 0.1) <sup>b</sup>	(4.05 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.65 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.53 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.07 ± 0.1) <sup>b</sup>	(4.42 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.19 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.32 ± 0.1) <sup>a</sup>	(7.80 ± 0.1) <sup>ab</sup>	(4.82 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.72 ± 0.1) <sup>a</sup>
HN-87	(10.65 ± 0.1) <sup>e</sup>	(17.92 ± 0.1) <sup>d</sup>	(2.40 ± 0.1) <sup>b</sup>	(20.67 ± 0.1) <sup>b</sup>	(6.82 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.35 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.66 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.73 ± 0.1) <sup>b</sup>	(1.00 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.34 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.78 ± 0.1) <sup>c</sup>	(4.06 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.10 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.09 ± 0.1) <sup>a</sup>	(7.04 ± 0.1) <sup>c</sup>	(4.63 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.75 ± 0.1) <sup>a</sup>
HH-44	(10.90 ± 0.1) <sup>e</sup>	(17.89 ± 0.1) <sup>d</sup>	(2.45 ± 0.1) <sup>b</sup>	(20.99 ± 0.1) <sup>b</sup>	(6.86 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.32 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.65 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.64 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.94 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.27 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.72 ± 0.1) <sup>c</sup>	(3.96 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.06 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.98 ± 0.1) <sup>a</sup>	(7.03 ± 0.1) <sup>c</sup>	(4.66 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.67 ± 0.1) <sup>a</sup>
HH-49	(10.56 ± 0.1) <sup>e</sup>	(17.68 ± 0.1) <sup>d</sup>	(2.48 ± 0.1) <sup>b</sup>	(20.74 ± 0.1) <sup>b</sup>	(6.98 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.37 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.73 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.69 ± 0.1) <sup>b</sup>	(1.20 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.36 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.79 ± 0.1) <sup>c</sup>	(3.97 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.12 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.94 ± 0.1) <sup>a</sup>	(7.08 ± 0.1) <sup>c</sup>	(4.68 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.63 ± 0.1) <sup>a</sup>
HH-51	(10.76 ± 0.1) <sup>e</sup>	(18.59 ± 0.1) <sup>c</sup>	(2.38 ± 0.1) <sup>b</sup>	(21.05 ± 0.1) <sup>b</sup>	(6.96 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.15 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.64 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.61 ± 0.1) <sup>b</sup>	(1.00 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.26 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.53 ± 0.1) <sup>d</sup>	(3.81 ± 0.1) <sup>b</sup>	(1.07 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.90 ± 0.1) <sup>a</sup>	(6.91 ± 0.1) <sup>c</sup>	(4.65 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.74 ± 0.1) <sup>a</sup>
HH-53	(10.50 ± 0.1) <sup>e</sup>	(19.10 ± 0.1) <sup>c</sup>	(2.35 ± 0.1) <sup>b</sup>	(21.28 ± 0.1) <sup>b</sup>	(7.09 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.04 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.66 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.54 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.99 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.17 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.42 ± 0.1) <sup>d</sup>	(3.73 ± 0.1) <sup>b</sup>	(1.02 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.82 ± 0.1) <sup>a</sup>	(6.84 ± 0.1) <sup>cd</sup>	(4.69 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.77 ± 0.1) <sup>a</sup>
JY-55	(10.39 ± 0.1) <sup>e</sup>	(18.34 ± 0.1) <sup>c</sup>	(2.39 ± 0.1) <sup>b</sup>	(21.06 ± 0.1) <sup>b</sup>	(7.02 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.22 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.62 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.60 ± 0.1) <sup>b</sup>	(1.05 ± 0.1) <sup>b</sup>	(3.24 ± 0.1) <sup>a</sup>	(3.63 ± 0.1) <sup>cd</sup>	(4.00 ± 0.1) <sup>a</sup>	(1.07 ± 0.1) <sup>a</sup>	(4.02 ± 0.1) <sup>a</sup>	(6.96 ± 0.1) <sup>c</sup>	(4.65 ± 0.1) <sup>b</sup>	(0.73 ± 0.1) <sup>a</sup>

注:同一列中带有不同上角标的数据有显著性差异( $P < 0.05$ ),下同。

白含有较多的疏水性 Leu 和 Phe,这可能与 HN-48 和 HN-87 蛋白构成的乳液的稳定性有相关性。蛋白柔性较高,会导致含更多疏水性氨基酸的蛋白吸附在水油界面,形成稳定的界面膜。而 HN-69、HN-52 和 HN-61 含有更多的酸性氨基酸 Glu 和 Asp,导致分子间斥力增加,这可能是导致其界面蛋白柔性较低的原因。HN-61、HN-66、HN-69 和 HN-85 界面蛋白的碱性氨基酸 Lys 显著低于其他品种界面蛋白,这与本团队之前研究<sup>[31]</sup>的氨基酸分离组成对柔性蛋白的影响保持一致。柔性蛋白具有的氨基酸组成特点决定了柔性蛋白质的结构<sup>[33]</sup>。文献[34]研究证实疏水性和带电性氨基酸的分布将影响蛋白质分子的柔性,进而影响蛋白质的功能性质。文献[35]的实验结论进一步证明了课题组的实验结果,在相邻多肽链分布的疏水性和带电荷氨基酸残基趋向于重排并暴露在蛋白质分子的表面。

### 2.3 界面蛋白二级结构

傅里叶红外光谱 (FTIR) 是一种用来分析蛋白质结构特征的光谱方法<sup>[36]</sup>。不同品种界面蛋白的红外光谱图见图 2,采用 Gauss 面积法拟合对界面蛋

白的酰胺 I 带(1 700 ~ 1 600  $\text{cm}^{-1}$ )红外谱图进行二阶求导,可计算得出界面蛋白的二级结构相对含量,如表 2 所示。不同品种的界面蛋白均以  $\beta$ -折叠结构为主,其中柔性较高的 HN-87、HN-48、HH-44 和 HH-53 界面蛋白含有较多的无规则卷曲结构和较低含量的  $\alpha$ -螺旋结构。这 4 种界面蛋白所含有的柔性结构较多,更有利于在界面处展开,稳定乳液。文献[37]研究证明, $\alpha$ -螺旋位于多肽链骨架的内部,与蛋白质的稳定性相关,而无规则卷曲结构更多地与蛋白质的柔性相关。因此,界面蛋白内部骨架稳定性降低,其柔性结构增加,更有利于吸附到水油界面处。

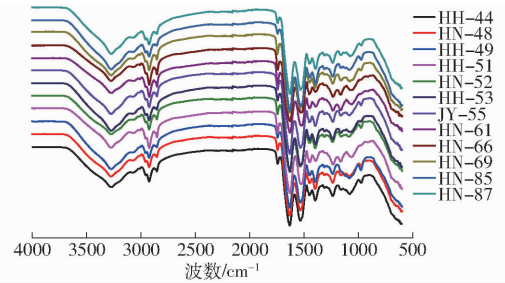


图 2 不同品种界面蛋白 FTIR 谱图

Fig. 2 FTIR spectrogram of different interface proteins

表 2 不同品种界面蛋白的二级结构相对含量

Tab. 2 Secondary structure content of different interface proteins by FTIR

%

品种	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规则卷曲
HN-48	(14.73 ± 0.23) <sup>d</sup>	(48.34 ± 0.23) <sup>b</sup>	(14.11 ± 0.23) <sup>c</sup>	(22.82 ± 0.23) <sup>a</sup>
HN-52	(17.33 ± 0.23) <sup>a</sup>	(46.61 ± 0.23) <sup>d</sup>	(15.87 ± 0.23) <sup>b</sup>	(20.19 ± 0.23) <sup>b</sup>
HN-61	(17.88 ± 0.23) <sup>a</sup>	(46.35 ± 0.23) <sup>d</sup>	(15.22 ± 0.23) <sup>b</sup>	(20.56 ± 0.23) <sup>b</sup>
HN-66	(17.43 ± 0.23) <sup>a</sup>	(48.98 ± 0.23) <sup>b</sup>	(15.50 ± 0.23) <sup>b</sup>	(18.10 ± 0.23) <sup>d</sup>
HN-69	(16.70 ± 0.23) <sup>b</sup>	(51.56 ± 0.23) <sup>a</sup>	(13.83 ± 0.23) <sup>d</sup>	(17.92 ± 0.23) <sup>d</sup>
HN-85	(17.65 ± 0.23) <sup>a</sup>	(47.07 ± 0.23) <sup>c</sup>	(15.86 ± 0.23) <sup>b</sup>	(19.42 ± 0.23) <sup>c</sup>
HN-87	(15.03 ± 0.23) <sup>c</sup>	(46.86 ± 0.23) <sup>d</sup>	(15.39 ± 0.23) <sup>b</sup>	(22.72 ± 0.23) <sup>a</sup>
HH-44	(15.27 ± 0.23) <sup>c</sup>	(47.14 ± 0.23) <sup>c</sup>	(13.88 ± 0.23) <sup>d</sup>	(21.70 ± 0.23) <sup>ab</sup>
HH-49	(17.61 ± 0.23) <sup>a</sup>	(51.05 ± 0.23) <sup>a</sup>	(13.47 ± 0.23) <sup>d</sup>	(17.87 ± 0.23) <sup>d</sup>
HH-51	(16.19 ± 0.23) <sup>b</sup>	(45.39 ± 0.23) <sup>c</sup>	(17.46 ± 0.23) <sup>a</sup>	(20.99 ± 0.23) <sup>b</sup>
HH-53	(14.85 ± 0.23) <sup>d</sup>	(48.01 ± 0.23) <sup>b</sup>	(14.88 ± 0.23) <sup>c</sup>	(22.25 ± 0.23) <sup>a</sup>
JY-55	(17.66 ± 0.23) <sup>a</sup>	(46.76 ± 0.23) <sup>d</sup>	(15.29 ± 0.23) <sup>b</sup>	(20.30 ± 0.23) <sup>b</sup>

### 2.4 界面蛋白亚基组成

不同品种界面蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析见图 3(图中 M 表示标准品 Marker)。大豆分离蛋白由 7S 和 11S 蛋白组成,共多个不同分子质量的亚基。而界面蛋白的结构组成中差异较大,部分条带颜色深且宽,部分条带较浅,这是由于在稳定乳液后的蛋白中部分蛋白无法进入电泳槽。其中 HN-69、HH-49 和 HN-52 界面蛋白条带颜色最浅,这 3 种蛋白的柔性较差,因此吸附在界面处的含量较少导致在提取过程中含量低。也有可能是因为界面蛋白在提取过程中存在少许的交叉污染<sup>[38]</sup>。经离

心后的 JY-55、HH-51、HN-66、HN-85、HN-61 界面蛋白组成中 11S 蛋白含量较高,而 HH-53、HN-48、HH-44、HN-87 界面蛋白中 7S 蛋白比重增加。7S 蛋白的结构柔性高于 11S 蛋白,二者的比重将影响界面蛋白的结构组成,进而影响其功能性质表达。

### 2.5 界面蛋白表面疏水性

目前研究学者认为,蛋白质吸附于水油界面后,蛋白质界面层的流变性质主要来自于疏水相互作用和二硫键的贡献<sup>[39]</sup>。不同品种界面蛋白的表面疏水性如图 4 所示,反映了界面蛋白的结构和表面活

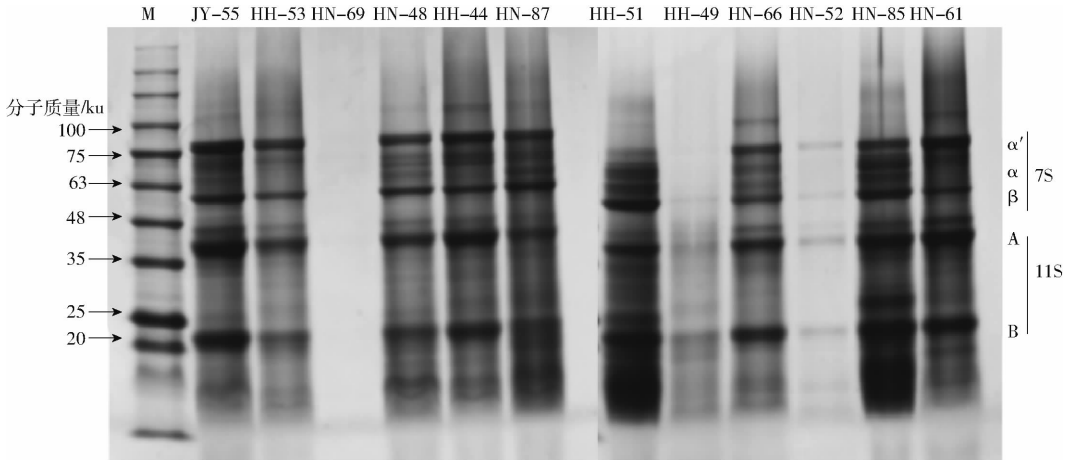


图3 不同品种界面蛋白的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE profiles of different interface proteins

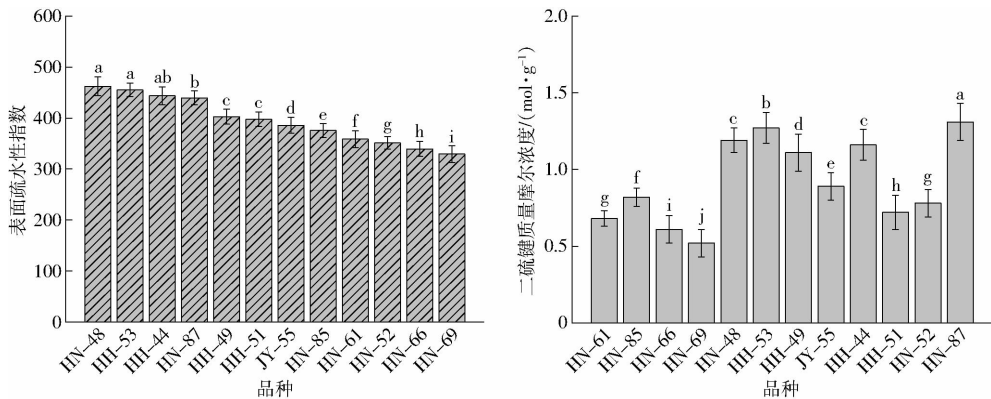


图4 不同品种界面蛋白的表面疏水性和二硫键含量

Fig.4 Surface hydrophobicity and sulfhydryl contents of different interface proteins

性。HN-87、HH-53、HN-48 和 HH-44 界面蛋白含有较高的表面疏水性基团,而 HN-69、HN-66、HN-52 和 HN-61 界面蛋白的表面疏水性较低,这与蛋白在水油界面的稳定性相关。界面蛋白的折叠结构减少,使埋藏在分子内部的疏水性位点暴露出来,吸附在水油界面深入到油相内部,形成比较牢固的蛋白膜来稳定乳液,提高蛋白质的乳化性能。文献[40]的研究结果同样表明,当蛋白分子更易舒展,柔性较高时,其疏水性相对较高,一定程度上维持乳液的稳定。

## 2.6 二硫键含量分析

不同品种界面蛋白的二硫键含量如图4所示。二硫键对于稳定蛋白质起重要作用,一般二硫键数目越多,蛋白结构的稳定性越强,柔性较差<sup>[41]</sup>。HN-87、HH-53、HN-48 和 HH-44 界面蛋白二硫键含量较高,其他品种的界面蛋白也存在较大差异( $P>0.05$ )。这是由于二硫键存在于蛋白质分子内和分子间。在界面蛋白吸附到油滴表面形成蛋白膜,这些蛋白质分子间就通过二硫键结合,才能形成稳定的蛋白质,增强膜的强度。与此同时,蛋白质中的疏水残基多数围绕蛋白质中的二硫键形成疏水区

域<sup>[42]</sup>,这也导致界面蛋白形成稳定的乳液。

## 2.7 界面蛋白荧光光谱分析

由于蛋白分子中的酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸残基能够吸收发射荧光,而色氨酸残基的变化程度及其微环境情况反映了蛋白质的结构变化。由图5可以看出,不同品种大豆界面蛋白的最大吸收峰均大于330 nm,说明所有界面蛋白的色氨酸残基均分布在蛋白质分子外部极性环境中。HH-51、HN-61、HN-66 和 HN-69 界面蛋白的最大吸收峰小于330 nm,说明这4种界面蛋白的更多色氨酸残基位于蛋白质分子内部,结构柔性较低,不易打开暴露。HH-53、HN-52 和 HH-49 界面蛋白的最大吸收峰位于330 nm,而 HN-87、HN-85、HN-48、JY-55 和 HH-44 界面蛋白吸收峰大于330 nm,均出现了红移现象,说明这些界面蛋白的结构柔性较高,更易伸展暴露,使更多的色氨酸残基暴露在蛋白质分子的外部,形成疏水残基,使得界面蛋白柔性更高,更易吸附在水-油界面,防止油滴聚集,从而稳定乳液。由于红移的程度反映蛋白质构象的差异程度,红移程度越大,说明蛋白质色氨酸极性越强,导致蛋白质表面疏水性越大<sup>[43]</sup>。所以 HN-48、HH-



44 和 JY-55 界面蛋白的红移幅度更大,说明蛋白质分子结构更加松散,结构柔性更强,更易暴露内部的氨基酸残基。这与界面蛋白表面疏水性的结果一致。

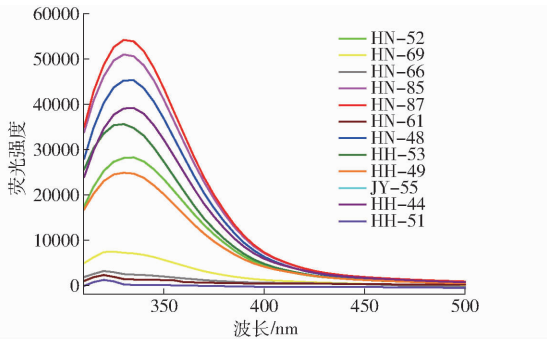


图5 不同品种界面蛋白的荧光光谱图

Fig.5 Fluorescence emission spectra of different interface proteins

## 2.8 界面蛋白紫外-可见吸收光谱

紫外-可见吸收光谱是一种非常简单、实用的,用于探究蛋白质结构的方法。由于蛋白质侧链含有的色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基等芳香族氨基酸,会产生不同的紫外吸收峰,从而反映蛋白质的三级构象的变化<sup>[44]</sup>。由图6可知,界面蛋白在290 nm左右处出现了峰值。HN-69、HN-61、HH-51和HH-44界面蛋白的峰值低于其他品种的界面蛋白,界面蛋白发生了红移,说明蛋白质中的酪氨酸更多地暴露于极性环境中,而色氨酸更多地趋向于埋藏在蛋白质分子内部。

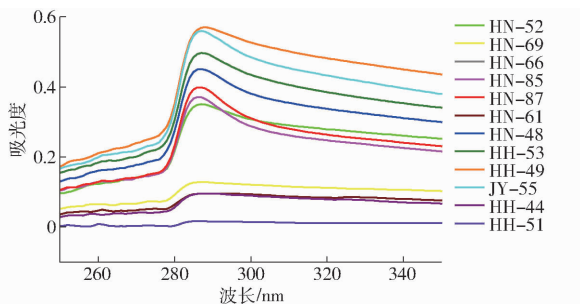


图6 不同品种界面蛋白的紫外光谱谱图

Fig.6 UV spectroscopy of different interface proteins

## 2.9 界面蛋白溶解性

蛋白质的溶解性与乳化性质有着密切关系,不同品种界面蛋白的溶解性如图7所示。12种界面蛋白的溶解性较差,且具有显著性差异( $P < 0.05$ )。由于界面的提取是从蛋白质乳液中分离得到的,含有少部分的油脂残存。另外,界面蛋白的结构特征表明,界面蛋白结构稳定,且含有较多的疏水性氨基酸,使得溶解性降低。这与上述对界面蛋白的表面疏水性的分析结果相同。

## 2.10 界面蛋白乳化性质

柔性较高的HN-87、HH-44、HH-53和HN-

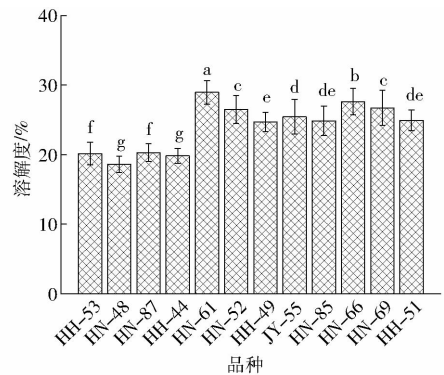


图7 不同品种界面蛋白的溶解性

Fig.7 Solubility of different interface protein

48界面蛋白表现出更好的界面性质(图8)。不同品种界面蛋白的乳化稳定性差异不大,较分离蛋白相比有所降低。这可能是由于界面提取后蛋白质的结构发生了变化,在稳定蛋白膜上失去了原本稳定的结构,导致乳化稳定性降低。对比前期对大豆分离蛋白的乳化性质的测定<sup>[31]</sup>,进一步确定界面蛋白是柔性最高的柔性蛋白,表面拥有较高的疏水性基团,有利于吸附在水油界面,增加蛋白质分子间的相互作用。文献[45]的研究结果表明,表面疏水性是影响分析蛋白质乳化性质的主要参数,本文研究结果与其相吻合。结合上述界面蛋白结构特征的分析,可以确定蛋白质结构的改变会极大影响界面学性质。

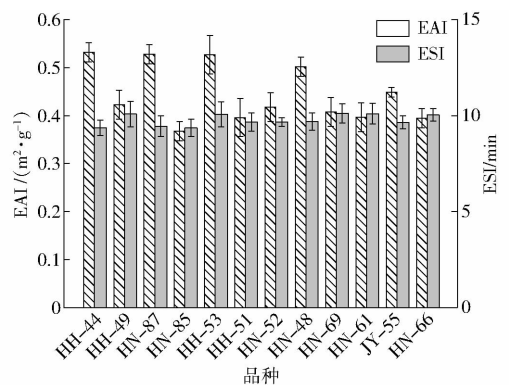


图8 不同品种界面蛋白的乳化性质

Fig.8 EAI and ESI of different interface protein

## 3 结束语

探究了不同品种大豆界面蛋白的结构特征和界面学性质。结果表明:柔性蛋白更易吸附到水油界面,且增加界面蛋白的吸附量,形成的乳液稳定性增加。这与其氨基酸组成存在相关性,疏水性氨基酸含量决定了柔性界面蛋白与水分子的相互作用,与表面疏水性呈现相同趋势。界面蛋白的 $\alpha$ -螺旋结构含量较低,无规则卷曲结构含量增加。界面蛋白中7S亚基的柔性较高。紫外光谱和荧光光谱分析

表明,柔性界面蛋白分子的结构易伸展,使内部的疏水性基团暴露出来,且界面蛋白分子的二硫键多在疏水基团附近形成,从而降低了界面蛋白的溶解性,增加其界面学性质。

## 参 考 文 献

- [1] LIU H, LI Y, DIAO X, et al. Effect of porcine bone protein hydrolysates on the emulsifying and oxidative stability of oil-in-water emulsions[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2018, 538: 757 – 764.
- [2] CHEN W, LIANG G, LI X, et al. Impact of soy proteins, hydrolysates and monoglycerides at the oil/water interface in emulsions on interfacial properties and emulsion stability[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2019, 177(6): 550 – 558.
- [3] WIERENGA P A, GRUPPEN H. New views on foams from protein solutions[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010, 15(5): 365 – 373.
- [4] SU J, FLANAGAN J, HEMAR Y, et al. Synergistic effects of polyglycerol ester of polyricinoleic acid and sodium caseinate on the stabilisation of water-oil-water emulsions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(2 – 3): 261 – 268.
- [5] DJORDJEVIC D, CERCACI L, ALAMED J, et al. Chemical and physical stability of protein and gum arabic-stabilized oil-in-water emulsions containing limonene[J]. *Journal of Food Science*, 2008, 73(3): 167 – 172.
- [6] FELIX M, CERME O M, ROMERO A, et al. Characterisation of the bioactive properties and microstructure of chickpea protein-based oil in water emulsions[J]. *Food Research International*, 2019, 121: 577 – 585.
- [7] CORT S-RUIZ J A, PACHECO-AGUILAR R, RAMIREZ-SUAREZ J C, et al. Conformational changes in proteins recovered from jumbo squid (*Dosidicus gigas*) muscle through pH shift washing treatments[J]. *Food Chemistry*, 2015, 196: 769 – 775.
- [8] KRISTINSSON H G, HULTIN H O. Effect of low and high pH treatment on the functional properties of cod muscle proteins[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2003, 51(17): 5103 – 5110.
- [9] ZHAO X, WU T, XING T, et al. Rheological and physical properties of O/W protein emulsions stabilized by isoelectric solubilization/precipitation isolated protein: the underlying effects of varying protein concentrations[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 95: 580 – 589.
- [10] LI R, WANG X, LIU J, et al. Relationship between molecular flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate-glucose conjugates[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(14): 4089 – 4097.
- [11] TANG C-H, SUN X, FOEGEDING E A. Modulation of physicochemical and conformational properties of kidney bean vicilin (phaseolin) by glycation with glucose: implications for structure-function relationships of legume vicilins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(18): 10114 – 10123.
- [12] 酃金龙, 赵文婷, 苏春元, 等. 乳化界面上蛋白-多糖相互作用的研究进展[J]. *中国食物与营养*, 2010(12): 31 – 34.  
LI Jinlong, ZHAO Wenting, SU Chunyuan, et al. Research advancement of interaction between protein and polysaccharide on emulsion interface[J]. *Food and Nutrition in China*, 2010(12): 31 – 34. (in Chinese)
- [13] CASTELLANI O, BELHOMME C, DAVID-BRIAND E, et al. Oil-in-water emulsion properties and interfacial characteristics of hen egg yolk phospholipid[J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(1): 35 – 43.
- [14] DAMODARAN S. Protein stabilization of emulsions and foams[J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(3): 54 – 66.
- [15] 王瑛瑶, 王璋. 水酶法提油中乳状液的特性研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(1): 112 – 115.  
WANG Yingyao, WANG Zhang. Study on properties on emulsion forming in aqueous-enzymatic extraction of peanut oil[J]. *Food Science*, 2009, 30(1): 112 – 115. (in Chinese)
- [16] CHEN W, LIANG G, LI X, et al. Impact of soy proteins, hydrolysates and monoglycerides at the oil/water interface in emulsions on interfacial properties and emulsion stability[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, 177(6): 550 – 558.
- [17] HUANG L, DING X, LI Y, et al. The aggregation, structures and emulsifying properties of soybean protein isolate induced by ultrasound and acid[J]. *Food Chemistry*, 2019, 279(12): 114 – 119.
- [18] POON S, CLARKE A E, SCHULTZ C J. Effect of denaturants on the emulsifying activity of proteins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(1): 281 – 286.
- [19] KATO A, KOMATSU K, FUJIMOTO K, et al. Relationship between surface functional properties and flexibility of proteins detected by the protease susceptibility[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1985, 33(5): 931 – 934.
- [20] MARUYAMA N, SALLEH M R M, TAKAHASHI K, et al. Structure-physicochemical function relationships of soybean  $\beta$ -conglycinin heterotrimers[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(15): 4323 – 4326.
- [21] TANG C H, SHEN L. Role of conformational flexibility in the emulsifying properties of bovine serum albumin[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(12): 3097 – 3110.
- [22] ZHANG S B, LU Q Y. Characterizing the structural and surface properties of proteins isolated before and after enzymatic demulsification of the aqueous extract emulsion of peanut seeds[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 47(3): 51 – 60.
- [23] PUPPO M, BEAUMAL V, SPERONI F, et al.  $\beta$ -conglycinin and glycinin soybean protein emulsions treated by combined temperature-high-pressure treatment[J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(3): 389 – 397.



- [24] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [25] ZHENG L, ZHAO Y, XIAO C, et al. Mechanism of the discrepancy in the enzymatic hydrolysis efficiency between defatted peanut flour and peanut protein isolate by flavorzyme[J]. *Food Chemistry*, 2015, 168:100-106.
- [26] FU K, GRIEBENOW K, HSIEH L, et al. FTIR characterization of the secondary structure of proteins encapsulated within PLGA microspheres[J]. *Journal of Controlled Release*, 1999, 58(3): 357-366.
- [27] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [28] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Protein Structure*, 1980, 624(1): 13-20.
- [29] BEVERIDGE T, TOMA S, NAKAI S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent[J]. *Journal of Food Science*, 1974, 39(1): 49-51.
- [30] CAMERON D R, WEBER M E, IDZIAK E S, et al. Determination of interfacial areas in emulsions using turbidimetric and droplet size data: correction of the formula for emulsifying activity index[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, 39(4): 655-659.
- [31] ZHU Y, FU S, WU C, et al. The investigation of protein flexibility of various soybean cultivars in relation to physicochemical and conformational properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 103:105709.
- [32] HILMI Y, ABUSHAMA M F, ABDALGADIR H, et al. A study of antioxidant activity, enzymatic inhibition and in vitro toxicity of selected traditional sudanese plants with anti-diabetic potential[J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 14(1): 149.
- [33] 黄永棋, 刘志荣. 天然无序蛋白质: 序列-结构-功能的新关系[J]. *物理化学学报*, 2010, 26(8): 2061-2072.  
HUANG Yongqi, LIU Zhirong. Intrinsically disordered proteins: the new sequence-structure-function relations[J]. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 2010, 26(8): 2061-2072. (in Chinese)
- [34] VALERIO M, COLOSIMO A, CONTI F, et al. Early events in protein aggregation: molecular flexibility and hydrophobicity/charge interaction in amyloid peptides as studied by molecular dynamics simulations[J]. *Proteins Structure Function and Bioinformatics*, 2005, 58(1): 110-118.
- [35] 常翠华. 蛋清蛋白界面吸附, 聚集行为及应用特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018.  
CHANG Cuihua. The interface adsorption, aggregation and application properties of egg white protein[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2018. (in Chinese)
- [36] JACKSON M, MANTSCH H H. The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 30(2): 95-120.
- [37] NEUCERE N J, JACKS T J, SUMRELL G. Interactions of globular protein with simple polyphenols[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1978, 26(1): 214-216.
- [38] 陈硕, 唐传核. 不同比例球蛋白组成对大豆蛋白溶液乳化性与界面特性的影响[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(9): 62-68.  
CHEN Shuo, TANG Chuanhe. Effect of varying  $\beta$ -conglycinin/glycinin ratios on the emulsifying and interfacial properties of soybean proteins[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2016, 32(9): 62-68. (in Chinese)
- [39] BOS M A, VAN VLIET T. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2001, 91(3): 437-471.
- [40] 胡存书. 花生乳状液界面吸附蛋白的提取及其特性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2015.  
HU Cunshu. The studies on extraction and properties of interfacial proteins from peanut emulsion[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2015. (in Chinese)
- [41] 陶慰孙, 李惟, 姜涌明. 蛋白质分子基础[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1995.
- [42] 徐国恒. 二硫键与蛋白质的结构[J]. *生物学通报*, 2010, 45(5): 5-7.  
XU Guoheng. The structure of disulfide bond and protein[J]. *Bulletion of Biology*, 2010, 45(5): 5-7. (in Chinese)
- [43] 尹燕霞, 向本琼, 佟丽. 荧光光谱法在蛋白质研究中的应用[J]. *实验技术与管理*, 2010, 27(2): 33-36, 40.  
YIN Yanxia, XIANG Benqiong, TONG Li. The application of studying fluorescence spectroscopy on protein[J]. *Experimental Technology and Management*, 2010, 27(2): 33-36, 40. (in Chinese)
- [44] DING F, LIU W, LI N, et al. Complex of nicosulfuron with human serum albumin: a biophysical study[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2010, 975(1-3): 256-264.
- [45] KIM D A, CORNEC M, NARSIMHAN G. Effect of thermal treatment on interfacial properties of  $\beta$ -lactoglobulin[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 285(1): 100-109.