

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2021.02.034

大豆亲脂蛋白热诱导解离缔合及自组装纳米颗粒表征

孙冰玉 刘琳琳 石彦国 朱秀清 张娜 曾剑华

(哈尔滨商业大学食品工程学院, 哈尔滨 150076)

摘要: 大豆亲脂蛋白(SLP)是解决大豆分离蛋白水合特性和界面特性等功能特性问题的关键。采用多光谱、热分析和凝胶电泳等技术研究了大豆亲脂蛋白热诱导解离缔合行为,并对其自组装纳米颗粒进行表征。结果显示,80~90℃是SLP热处理过渡带,在热处理温度低于80℃时,SLP能基本保持天然构象而无显著性变化,在热处理温度高于90℃时,SLP二级构象发生显著性改变。在90℃处理20 min时,SLP蛋白分子结构解聚,且伸展至最大程度,表面疏水性增加,随后自组装形成粒径约为110 nm的稳定单分布纳米颗粒体系。电泳分析结果显示,解离的亚基通过二硫键和疏水相互作用重新聚集成中间聚集体,导致分子间聚集程度增大、构象稳定性增强。本研究可为SLP专用大豆蛋白粉及其在食品领域的开发应用提供理论支撑。

关键词: 大豆亲脂蛋白; 解离缔合行为; 自组装纳米颗粒; 热诱导

中图分类号: TS214 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2021)02-0346-09

OSID:



Characterization of Dissociation-association Behavior and Self-assembly Nanoparticles of Soybean Lipophilic Protein by Heating Induction

SUN Bingyu LIU Linlin SHI Yanguo ZHU Xiuqing ZHANG Na ZENG Jianhua
(College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Soybean lipophilic protein (SLP) is a highly hydrophobic protein rich in phospholipids, which is the key to solve the functional defects of soybean protein isolates, such as hydration properties and interfaces properties, etc. The dissociation-association behavior and self-assembly nanoparticles of SLP induced by heating were characterized by some modern technology means, which were the ultraviolet spectrum, fluorescence spectrum, circular dichroism spectrum, Fourier transform infrared, thermal analysis and gel electrophoresis techniques. The results showed that the heating treatment transition zone of SLP was 80~90℃, where the SLP can basically maintain a natural structure without significant changes when the heating treatment temperature was below 80℃. While the secondary conformation of SLP was changed significantly when the heating treatment temperature was above 90℃. The molecular structure of the SLP was dissolved and extended to maximum extent, with increased surface hydrophobicity at 90℃ for 20 min. Subsequently, the SLP self-assembled to form a stable single-distributed nanoparticle system with a particle size of about 110 nm. The dissociate subunits were reassembled into intermediate aggregates by interaction of disulfides and hydrophobic interaction, resulting in an increase of the degree of intermolecular aggregation and structural stability. The research result would provide theoretical support for the development of SLP-specific powder and its application in the food field.

Key words: soybean lipophilic protein; dissociation-association behavior; self-assembly nanoparticles; heating induction

0 引言

热处理是大豆食品加工过程中必不可少的操作

单元,通过杀菌、钝化抗营养因子等作用而获得理想功能品质的产品^[1-2]。热处理使蛋白逐渐变性,蛋白分子历经结构展开、解聚和再聚集等过程;形成的

收稿日期:2020-04-08 修回日期:2020-06-08

基金项目: 黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2020C060)、黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2019ZX08B01-04)和黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(UNPYSCT-2020217)

作者简介: 孙冰玉(1978—),女,副教授,博士,主要从事蛋白质化学与大豆加工技术研究,E-mail: sby0451@163.com

通信作者: 刘琳琳(1986—),女,工程师,博士,主要从事蛋白质化学与大豆加工技术研究,E-mail: linlinliu0309@163.com

蛋白聚集状态主要有无定性聚集和纤维化聚集两种形式,其中无定性聚集是工业化热处理过程中蛋白的主要聚集状态;通常认为蛋白热聚集过程中主要作用力为疏水相互作用、静电引力、氢键和二硫键^[3-5]。通过调控热处理过程中蛋白亚基的解离缔合反应、控制形成聚集体的状态可以获得具有优良功能性质的聚集体。文献[6]研究显示,在120℃条件下能诱导大豆分离蛋白形成可溶性无定型聚集体,其乳液具有优良的冻融稳定性^[6]。

大豆亲脂蛋白(Soybean lipophilic protein, SLP)是一种有别于大豆球蛋白和伴大豆球蛋白的富含磷脂高疏水性的大豆蛋白组分^[7],具有良好的物理和生物功能特性^[8-10]。如 SLP 可通过物理作用而非生理调控降低血液胆固醇和三酰基甘油;SLP 纳米乳液可作为共轭亚油酸的输送载体;SLP 能显著降低界面张力,并呈现出耐盐耐热性;添加 0.1% 的羟丙基甲基纤维素能提高 SLP 的乳化功能。文献[11]研究发现,SLP 与大豆蛋白的溶解行为具有相关性,从而推测 SLP 有可能是提高大豆分离蛋白溶解性和改善界面特性等功能的关键因素。近年来,自组装纳米颗粒引起了物理、化工和医药等领域学者的广泛关注,即通过在纳米尺度上调控粒子间的相互作用来控制粒子在整个组装体上的分布,并着重于构建有序和复杂的结构。自组装颗粒超级结构因具有不同于或优于基础粒子结构的特性和功能,而被广泛应用于药物传递、催化、医学诊断和传感器等领域^[12]。植物球蛋白(如大豆蛋白、玉米醇溶蛋白)因其具有良好的生物相容性、可持续性和环境友好性而被广大学者作为基础材料用于蛋白纳米颗粒自组装研究^[13]中。SLP 具有明显的亲水、疏水核心,且具有较高的疏水性,强的疏水作用可以驱动 SLP 分子自组装^[14]。然而,目前关于热处理过程中 SLP 的构象变化和纳米颗粒自组装行为的研究鲜有报道。

本文以 SLP 为研究对象,采用多光谱、热分析技术、化学分析法和微观成像技术表征热诱导对 SLP 结构和纳米颗粒自组装的影响,以期对 SLP 专用大豆蛋白粉和 SLP 在食品领域的开发应用提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冷榨大豆粕,黑龙江鹤旭食品有限公司;一级大豆色拉油,九三粮油工业集团有限公司。

三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、四甲基乙二胺、过硫酸铵、考马斯亮蓝 R250,分析纯,上海索莱宝生物

科技有限公司;正己烷、氯仿、甲醇、 β -巯基乙醇、甲醇、冰醋酸、甘氨酸(Gly)、尿素、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(TDNB)、三氯乙酸(TCA)、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、溴化钾、溴酚蓝,均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

PHS-3C 型 pH 计,上海雷磁有限公司;79-1 型磁力搅拌器,江苏国华仪器厂;HH-4 型恒温水浴锅,江苏金坛宏华仪器厂;DYY-6D 型电泳仪,北京六一电泳仪仪器厂;ALPHA 1-2 LD plus 型冷冻干燥机,德国 Christ 公司;ALPHA 1650 型紫外可见分光光度计,上海谱元仪器有限公司;Lambda365 型紫外光谱仪、Spectrum Two 型红外光谱仪和 DSC-4000 型差示量热扫描仪,美国珀金埃尔默股份有限公司;F-7000 型荧光光谱仪,日本日立仪器(上海)有限公司;Chirascan CD 型圆二色谱仪,英国应用光物理公司;Nano-ZS-90 型马尔文激光粒度仪,英国马尔文仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 SLP 制备

SLP 的制备参照文献[15],具体方法如下:冷榨豆粕在浓度为 0.5 mol/L、pH 值 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液,55℃ 条件下水浴提取 60 min,经 4 000 r/min 离心 20 min,取上清液,将上清液 pH 值调至 6.4 静置 30 min,在 4 000 r/min 离心 20 min;上清液 pH 值调至 5.2 静置 30 min 后,将 pH 值调回至 5.5,在 4 000 r/min 离心 20 min 分离出沉淀即为 SLP;沉淀用适量去离子水溶解并将 pH 值调至 7,透析 48 h,冷冻干燥。

1.3.2 热诱导处理

将 SLP 粉末用 10 mmol/L pH 值 7.2 的 PBS 配制成蛋白质浓度为 10 mg/mL 的溶液,在不同温度条件(25~95℃)下分别诱导 5、10、15、20、30 min;诱导结束后迅速冰水浴冷却至室温(20℃)并储藏于 4℃ 或冷冻干燥备用。

1.3.3 巯基、二硫键含量测定

蛋白质巯基、二硫键含量参考 Ellman 试剂法^[16]测定。

1.3.4 粒径和电位测定

取 10 mg/mL 的 SLP 上清液 1 mL 于 PCS8501 型石英测试池中,利用马尔文激光粒度仪 Trend 程序升温 and 程序降温功能对 SLP 在热诱导过程中粒径和电位的变化进行实时监测,具体参数设置如下:温度 25~90℃、测试间隔为 5℃、每个测试点平衡 120 s、平行测量 3 次。

1.3.5 紫外光谱

将样品稀释成质量浓度为 0.1 mg/mL 的溶液,

10 000 r/min 离心 1 min, 取上清液用于紫外光谱分析。波长为 190 ~ 800 nm, 分辨率为 0.2 nm, 扫描速率为 600 nm/min。所得的一阶紫外光谱通过 Origin 2017 软件微分得到二级衍生紫外光谱。

1.3.6 内源荧光光谱测定

将样品液用 pH 值 7.2 的 PBS 稀释为质量浓度 0.1 mg/mL, 在激发和发射狭缝均为 5 nm、电压为 500 V 条件下, 以激发波长 295 nm, 从波长 300 ~ 400 nm 扫描得到荧光光谱, 扫描 3 次取平均值最后得到内源荧光光谱图。

1.3.7 外源荧光光谱测定

取 4 mL 浓度为 0.1 mol/L 的蛋白样品溶液, 加入 20 μ L 浓度为 8 mmol/L 的 1-苯胺基-8-萘磺酸荧光探针, 摇匀, 静置 3 min; 测试条件为: 狭缝为 5 nm、激发波长 390 nm、扫描 400 ~ 600 nm 内荧光发射光谱。

1.3.8 傅里叶红外光谱

将冻干的 SLP 样品置于干燥器内, 充分干燥, 精确称取 2 mg 干燥的样品, 加入 200 mg 的 KBr, 进行研磨混合均匀, 然后进行压片, 红外光谱扫描, 扫描波段 4 000 ~ 400 cm^{-1} , 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描次数 32。采集的红外图谱进行基线校正和平滑处理后, 使用 Peakfit 4.0.2 结合 Origin 2017 对蛋白酰胺 I 带 (1 700 ~ 1 600 cm^{-1}) 做二阶导数、去卷积和高斯曲线拟合, 根据峰面积计算各种二级结构的相对含量。

1.3.9 圆二色谱

将样品用磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.2, 浓度 0.01 mol/L) 稀释成质量浓度 0.2 mg/mL, 采用 Chirascan CD 圆二色谱在波长范围为 190 ~ 260 nm 内扫描 3 次取平均值, 光径 10 mm, 扫描频率为 90 nm/min, 间隔时间 0.25 s, 以相应磷酸盐缓冲液为溶剂空白。

1.3.10 聚丙烯酰胺凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 分析参照文献 [17] 的方法, 将 2.0 mg/mL 样品与含有 SDS 和 β -巯基乙醇的上样缓冲液以体积比 1:1 混合, 沸水浴蒸煮 10 min。上样量均为 20 μ L, 浓缩胶和分离胶质量分数分别为 5% 和 12%, 凝胶板厚度为 15 mm, 电泳缓冲溶液采用 Tris - 甘氨酸 - SDS 缓冲体系。Native - PAGE 电泳分析与 SDS - PAGE 电泳分析类似, 不同的是样品缓冲溶液及电泳缓冲溶液中无 SDS 和 β -巯基乙醇, 电泳缓冲溶液中无 SDS, 且上样前也不经过加热处理。

1.3.11 扫描电镜

取适量冻干后的样品均匀粘在扫描电镜观察台上, 用 Q150T ES 型粒子溅射镀膜仪给样品镀金, 厚

度约为 15 nm, 采用 Hitachi S3400 型扫描电镜观测, 仪器观测参数: 加速电压 5 kV、放大倍数 500 倍。

1.4 数据处理

采用 Excel 2013 和 SPSS 22.0 对数据进行处理和显著性分析, 通过 Origin 2017 绘图, 实验结果除有特殊说明外, 均为 3 次平均值 \pm 标准偏差。

2 结果与分析

2.1 热诱导对 SLP 结构影响分析

2.1.1 热诱导对 SLP 三级构象的影响

在 280 nm 附近的紫外吸收峰为蛋白芳香族氨基酸残基特征吸收峰, 因色氨酸紫外吸收峰较宽而基本掩盖了酪氨酸的吸收峰, 但蛋白酪氨酸和色氨酸残基对苯丙氨酸氨基在 250 ~ 270 nm 处的吸收峰基本没有影响, 因而常规紫外光谱难以区分蛋白构象变化过程中酪氨酸和色氨酸的行为。紫外二阶导数光谱在解析温度、pH 值和化学因子等引起蛋白精细结构变化中芳香族氨基酸贡献具有重要作用, 研究表明蛋白紫外二阶导数光谱中酪氨酸和色氨酸残基吸收峰的波峰和波谷的距离 a (284 ~ 288 nm) 和 b (291 ~ 296 nm) 的比值 $r(a/b)$ 能表征蛋白构象变化构成中酪氨酸暴露程度 [18-19]。

热诱导对 SLP 紫外二阶导数光谱的影响如图 1 所示, 当温度高于 90 $^{\circ}\text{C}$ 时, 紫外二阶导数光谱显示 SLP 紫外二阶导数吸收光谱发生 1 ~ 2 nm 蓝移, 但 296 nm 处未发生变化 (数据未给出); 表明热处理使得 SLP 埋藏于内部的酪氨酸残基暴露于亲水环境中。总体上, 随着温度的升高, r 呈先增大后降低的趋势 (图 1), 在 90 $^{\circ}\text{C}$ 具有最大值, 在该条件下 SLP 构象伸展至最大程度, 即此时 SLP 微环境变得更加亲水, 酪氨酸暴露程度更高。

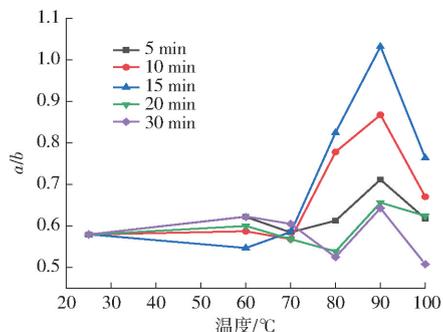


图 1 热诱导对 SLP 二阶导数紫外光谱的影响

Fig. 1 Effects of heating induction on second-derivative UV spectra of SLP

进一步采用内源荧光光谱分析热诱导过程中由色氨酸和酪氨酸残基微环境极性变化引起 SLP 三级构象的变化, 热诱导对 SLP 内源荧光光谱的影响如图 2 所示, 对外源荧光光谱的影响如图 3 所示。

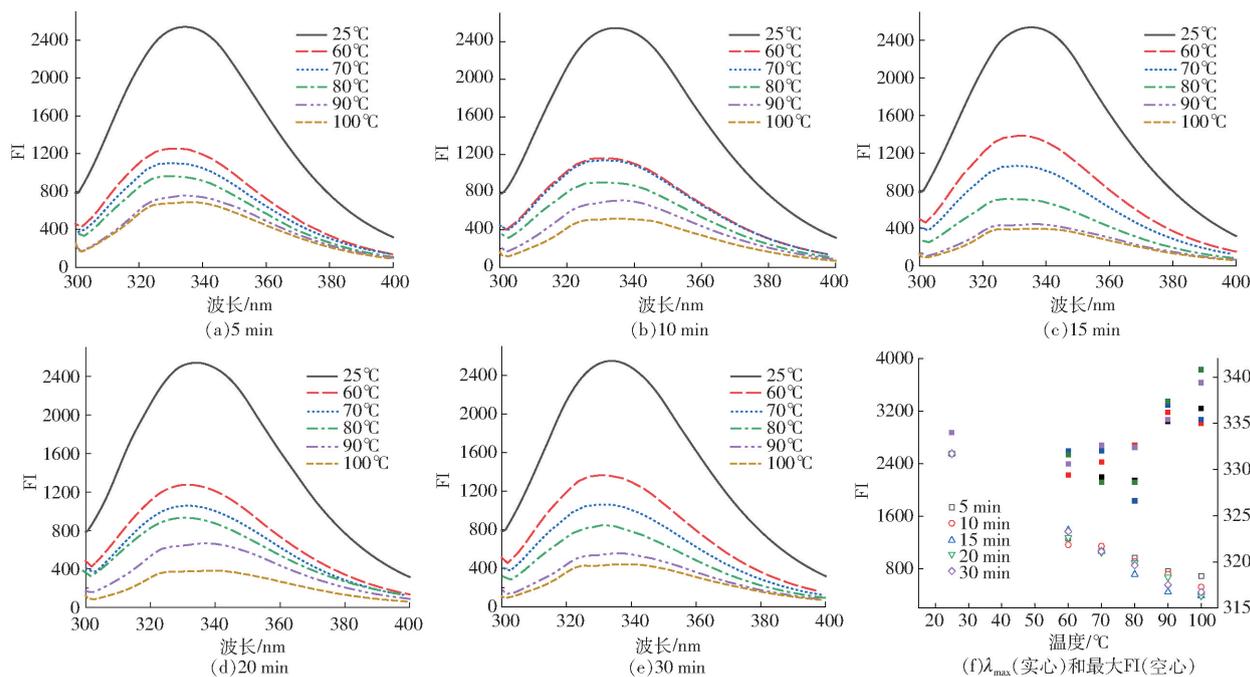


图2 热诱导对SLP内源荧光光谱的影响

Fig. 2 Effects of heating induction on intrinsic fluorescence spectra of SLP

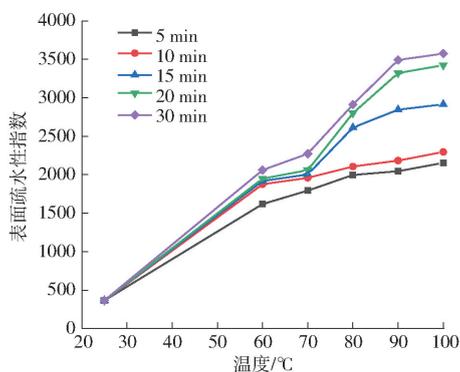


图3 热诱导对SLP外源荧光光谱的影响

Fig. 3 Effects of heating induction on extrinsic fluorescence spectra of SLP

与对照组(25℃)相比,基本上随着热诱导温度和时间的增加,SLP的最大荧光强度(Fluorescence intensity, FI)逐渐下降(图2f);当温度低于90℃时,热诱导SLP最大吸收波长(λ_{\max})发生明显的蓝移现象,表明SLP三维构象发生改变并且色氨酸和酪氨酸等发色基团微环境变得更疏水,原先暴露于表面的色氨酸等基团重新埋藏于SLP内部;当温度高于90℃时,SLP的 λ_{\max} 显著地向大波长方向移动;表明该条件下热诱导SLP能逐步暴露出埋藏于SLP内部疏水环境的发色基团。文献[20]研究也发现热处理能使SPI的 λ_{\max} 发生红移。

由图3可知,SLP的表面疏水性指数随着热处理温度和时间的增加而逐渐增大,表明热处理过程中SLP分子逐渐暴露出埋藏于分子内部的非极性侧链,这与内源荧光和紫外二阶导数分析结果相一致;此外,文献[21]研究也发现能量调控过程中能

使SPI表面疏水性急剧增加。

2.1.2 热诱导对SLP二级构象的影响

研究显示蛋白在热诱导过程中会发生化学键的断裂,如维持蛋白高级结构的氢键、范德华力等次级键以及维系亚型结构的二硫键断裂使得蛋白聚集,从而使蛋白结构发生变化。热诱导对SLP圆二色谱的影响如图4a~4e(图中CD值是指椭圆率)所示,短时间热处理(5 min)后,SLP圆二色谱的谱型基本保持不变,表明SLP具有一定耐热性,这与SLP中11S具有较高的热稳定性有关;随着热诱导时间的增加,当温度小于80℃时,SLP谱型基本类似;而当温度大于80℃时,SLP的CD谱型发生显著性改变,表明高温处理能显著改变SLP二级结构。文献[22]研究显示桑葚凝集素在低于80℃处理时,其CD谱型基本保持不变。随着能量输入,SLP的CD图谱(图4f)中218 nm处 β -折叠峰型逐渐凸显,表明热诱导使得SLP的 β -折叠结构含量增加。文献[23]研究显示热诱导后 α -突触蛋白的 β -折叠结构含量增加,且伴随着表面疏水性增强,从而有助于蛋白自组装行为的发生;因此, β -折叠结构含量增加可能与SLP解离缔合行为密切相关。

2.1.3 热诱导对SLP构象稳定性的影响

天然SLP(25℃)的变性峰为74.63℃和92.88℃,对应焓值为0.99 J/g和3.44 J/g,如图5(图中 ΔT 表示温度变化量, ΔH 表示焓值变化量)所示,当热处理温度小于等于80℃时,SLP基本保持大部分天然蛋白构象,而100℃处理时,SLP基本变

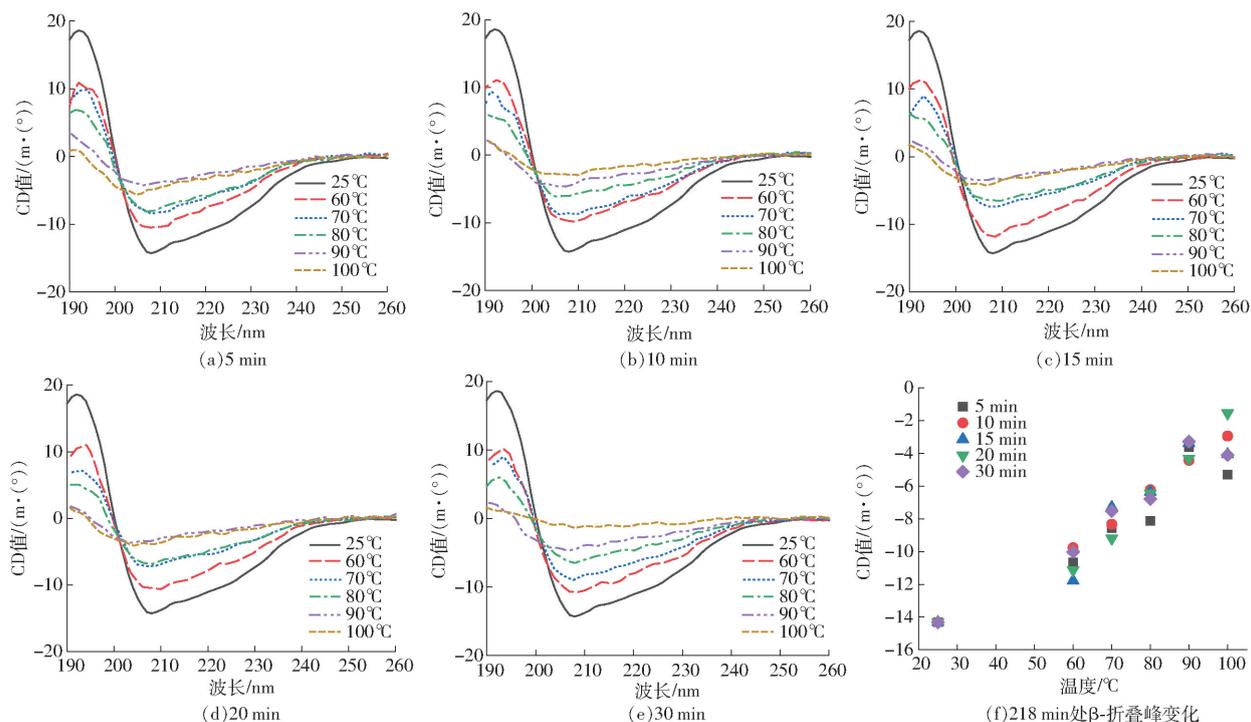


图4 热诱导对 SLP 圆二色谱的影响

Fig. 4 Effects of heating induction on CD spectra of SLP

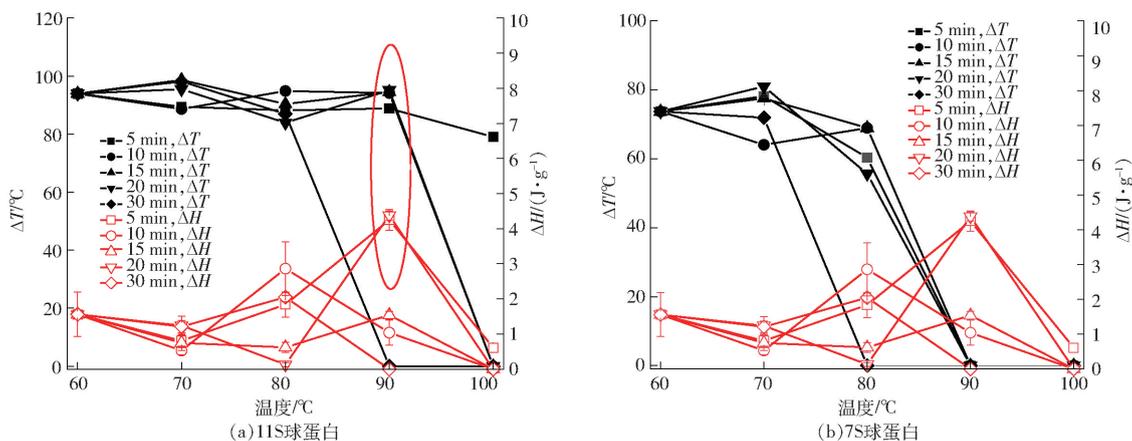


图5 热诱导对 SLP 热稳定性的影响

Fig. 5 Effects of heating induction on thermal stability of SLP

性。而当处理温度为 90℃ 时, DSC (差示扫描量热分析) 未检测到 7S 变性峰, 表明 7S 球蛋白基本都发生变性; 而 11S 变性峰则逐渐增强, 在热处理 20 min 时变性温度最大为 95.14℃, 同时也具有相对较高的焓值, 为 4.38 J/g, 表明在 90℃ 处理 20 min 冷冻干燥后保持一定的天然构象并且热稳定性增加, 持续的能量调控使蛋白解离, 当能量调控结束后蛋白亚基重新缔合或排列成结构热稳定性更高的可溶性蛋白聚集体, 这与 FTIR 结果分析一致。

综上所述, 由热诱导对 SLP 构象影响可知, 80~90℃ 范围是 SLP 热处理分界线, 在热处理温度低于 80℃ 时, 在本次实验数据范围内, SLP 能基本保持天然构象不发生显著性变化, 而在热处理温度高于 90℃ 时, SLP 蛋白二级构象发生显著性改变,

在 90℃ 处理 20 min 时, SLP 蛋白结构解聚伸展至最大程度, 表面疏水性增加, 分子间聚集程度增大, 同时热稳定性增强。

2.2 热诱导 SLP 聚集形成分析

蛋白质经热诱导后维持蛋白高级结构的氢键、范德力等次级键以及维系亚型结构的二硫键断裂使蛋白分子解离成亚基单位, 从而引起蛋白高级结构发生变化; 而当能量调控结束后, 解离的亚基会重新聚集形成可溶性聚合物和难溶性聚合物, 在 90℃ 处理不同时间 SLP 的 Native-PAGE 和 SDS-PAGE 如图 6 所示。

Native-PAGE 显示在 90℃ 诱导 SLP 主要形成 3 个中间组分, 分别为难溶性组分 M1 和高分子聚合物 M2 (180 ku 以上) 以及大分子聚合物 M3

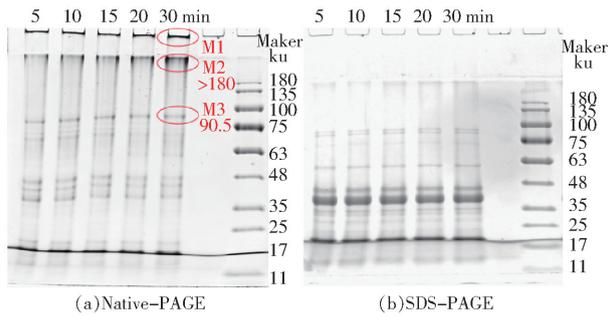


图 6 在 90°C 处理不同时间 SLP 的 Native - PAGE 和 SDS - PAGE 谱图

Fig. 6 Native - PAGE and SDS - PAGE patter of SLP at 90°C with different time

(90.5 ku); 而 SDS - PAGE 显示在原来形成的中间产物 (M1 ~ M3) 位置完全消失, 取而代之的是 7S 和 11S 的 α 、 α' 和 β 以及 A3、A 和 B 亚基, 且主要为胱氨酸和半胱氨酸含量高的 11S 球蛋白亚基。这表明热处理过程中 SLP 亚基经历蛋白结构伸展、亚基解离并暴露出疏水性基团, 而后 SLP 的亚基单位通过疏水相互作用和二硫键缔合重新聚集形成中间产物。

通过测定在 90°C 加热不同时间 SLP 的巯基和二硫键的变化可以进一步判定二硫键在热处理过程中 SLP 亚基重新聚集的重要性程度。如图 7 所示, 短时间的能量调控 (0 ~ 5 min) 时二硫键和游离巯基含量无明显变化, 即表明此时 SLP 构象并未发生显著性改变, 这与本研究构象结构分析一致。当热处理时间增加, 可以发现游离巯基含量逐渐下降、而二硫键含量逐渐增加; 这与图 6 中 M1 ~ M3 中间产物灰度随着热处理时间的延长而增加的现象相吻合; 文献[24] 研究结果显示苦杏仁蛋白在热处理过程中亚基重新排列并通过二硫键形成分子质量在 70 ~ 88 ku 的中间产物。

2.3 热诱导对 SLP 自组装纳米颗粒尺寸的影响

热诱导形成 SLP 自组装纳米颗粒调控温度的选择受 SLP 变性温度的影响。SLP 有两个变性温度, 分别为 74.63°C 和 92.88°C, 因 SLP 中 11S 球蛋

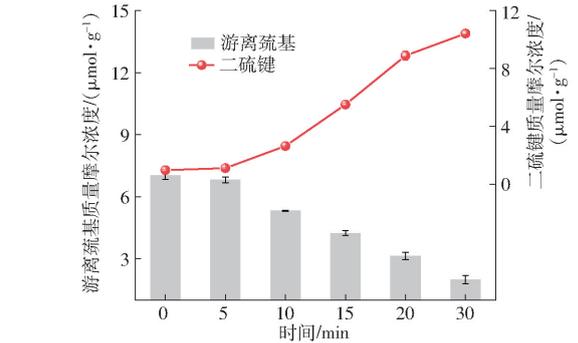
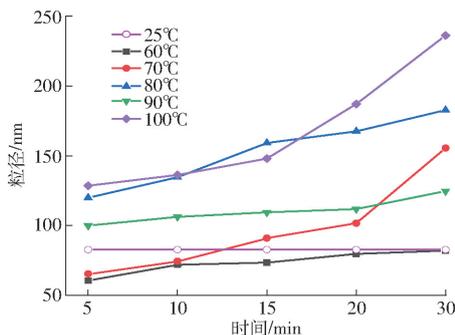


图 7 在 90°C 处理不同时间对 SLP 游离巯基和二硫键含量的影响

Fig. 7 Effect of treatment at 90°C with different time on free -SH and S-S contents of SLP

白含量最多 (质量分数约 40%), 因此 SLP 具有相对较高的热稳定性, 如果想利用热诱导形成 SLP 自组装纳米颗粒, 就要选择相对较高的调控温度。由图 8 (图中浊度以 600 nm 处 OD 值表示) 和表 1 可知, 在 60、70、100°C 诱导处理 SLP 的 PdI (多分散系数) 大于 0.2; 而在 80°C 和 90°C 处理时 SLP 的多分散系数接近 0.2 并趋于单分布; 相比 80°C, 在 90°C 处理时形成的 SLP 纳米颗粒自组装平均粒径和表面电荷相对稳定, 平均粒径在 100 ~ 110 nm、表面电荷在 -23 ~ -20 mV。随着热诱导时间的延长, SLP 平均粒径逐渐增大、Zeta 电位绝对值逐渐减小并伴随着浊度的升高, 表明热诱导 SLP 自组装形成大量纳米胶体颗粒。在 90°C 处理 20 min 时 SLP 能形成相对稳定的单分散纳米颗粒。

在热诱导过程中, SLP 的 Zeta 电位呈下降趋势, 即 SLP 表面带电量减少, 从而引起蛋白分子之间静电斥力减弱; 但 Zeta 电位仍维持相对较大的数值 (绝对值大于 15 mV), 因而分子间静电引力较弱, 从而推测热诱导引起 SLP 分子间聚集的主要作用力不是静电引力。

SLP 的程序升温和程序降温显示 SLP 纳米颗粒自组装具有调控规律, 如图 9 所示, 在温度上升过程中, 在 55°C 前粒径基本保持不变, 当温度上升到 60 ~ 90°C 时, 粒径增大, 这可能是蛋白受热后结

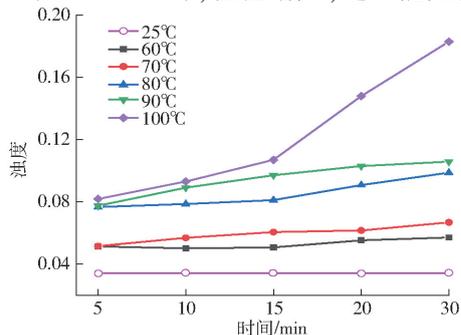


图 8 热诱导对 SLP 纳米颗粒自组装的平均粒径和浊度的影响

Fig. 8 Effect of heating induction on average size and turbidity

表1 热诱导对 SLP 纳米颗粒自组装的多分散系数和电位的影响

Tab.1 Effect of heating induction on PDI and Zeta potential

| 指标 | 温度/ ℃ | 热诱导时间/min | | | | |
|---------|----------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| | | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 |
| PDI | 25 | (0.32 ± 0.03) ^b | (0.32 ± 0.03) ^c | (0.32 ± 0.03) ^b | (0.32 ± 0.03) ^c | (0.32 ± 0.03) ^{cd} |
| | 60 | (0.65 ± 0.05) ^a | (0.57 ± 0.02) ^a | (0.53 ± 0.03) ^a | (0.47 ± 0.05) ^a | (0.46 ± 0.03) ^a |
| | 70 | (0.51 ± 0.22) ^e | (0.55 ± 0.01) ^b | (0.54 ± 0.02) ^a | (0.45 ± 0.03) ^{ab} | (0.42 ± 0.01) ^b |
| | 80 | (0.22 ± 0.01) ^d | (0.21 ± 0.01) ^e | (0.18 ± 0.07) ^{ede} | (0.28 ± 0.09) ^{cd} | (0.26 ± 0.03) ^d |
| | 90 | (0.26 ± 0.01) ^e | (0.22 ± 0.01) ^{de} | (0.23 ± 0.02) ^{ed} | (0.20 ± 0.02) ^d | (0.25 ± 0.01) ^{de} |
| | 100 | (0.22 ± 0.04) ^d | (0.24 ± 0.03) ^d | (0.24 ± 0.04) ^{ed} | (0.49 ± 0.04) ^a | (0.36 ± 0.04) ^c |
| 表面电位/mV | 25 | (-7.16 ± 0.65) ^d | (-7.16 ± 0.65) ^e | (-7.16 ± 0.65) ^e | (-7.16 ± 0.65) ^e | (-7.16 ± 0.65) ^d |
| | 60 | (-27.23 ± 1.08) ^a | (-28.07 ± 1.07) ^a | (-26.93 ± 0.42) ^a | (-26.84 ± 0.85) ^a | (-25.10 ± 1.93) ^a |
| | 70 | (-24.61 ± 1.44) ^b | (-25.22 ± 0.89) ^b | (-23.70 ± 0.82) ^{bc} | (-19.77 ± 1.00) ^{bcd} | (-18.77 ± 3.23) ^{bc} |
| | 80 | (-20.47 ± 0.59) ^c | (-20.57 ± 0.76) ^{cd} | (-19.46 ± 0.91) ^d | (-20.98 ± 3.40) ^{bc} | (-15.36 ± 0.49) ^c |
| | 90 | (-20.37 ± 0.85) ^c | (-22.13 ± 1.12) ^c | (-21.43 ± 2.21) ^{cd} | (-19.37 ± 1.29) ^{bcd} | (-19.20 ± 2.17) ^b |
| | 100 | (-24.37 ± 1.62) ^b | (-25.67 ± 0.64) ^b | (-25.64 ± 0.99) ^{ab} | (-21.50 ± 2.04) ^b | (-19.93 ± 2.82) ^b |

注:同列数据不同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

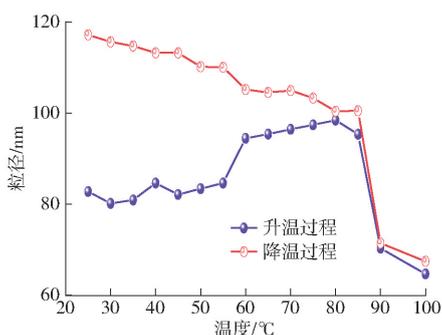


图9 程序升温/降温过程 SLP 平均粒径响应曲线

Fig.9 Response curves of average size of SLP during heating and cooling process

构得到适当伸展,导致粒径增大;在90℃时粒径急剧下降,这可能是维持蛋白亚型结构的次级键如氢键、范德华力以及二硫键断裂导致 SLP 分子解聚形成亚基,从而导致 SLP 粒径减小。在降温过程中的初始阶段(90~100℃),可能是体系中仍维持有较

高的能量,SLP 粒径变化较小,当温度进一步下降时,在80℃时 SLP 粒径急剧增大,这可能是当能量撤去后,氢键和范德华力以及二硫键的形成速率大于分解速率,SLP 游离亚基逐渐聚集,且聚集程度随着温度降低而逐渐增大,从而表现出 SLP 粒径增大;这与上文热诱导对 SLP 构象影响分析结果相一致。

2.4 显微成像分析

由图10可知,天然 SLP 呈大小不一、棱角分明和质地相对密实的片状;当 SLP 进行热处理后(60~90℃),如图10b~10e所示,SLP 结构变得相对疏松、棱角逐渐消失,颗粒细小化并呈均匀分布,这可能是热诱导引起维持 SLP 高级结构作用力如氢键、二硫键断裂,促使 SLP 分子亚基解聚形成分子量相对较小的颗粒。当热处理温度过高时(90℃以上),SLP 通过强烈的疏水相互作用聚集成更大的

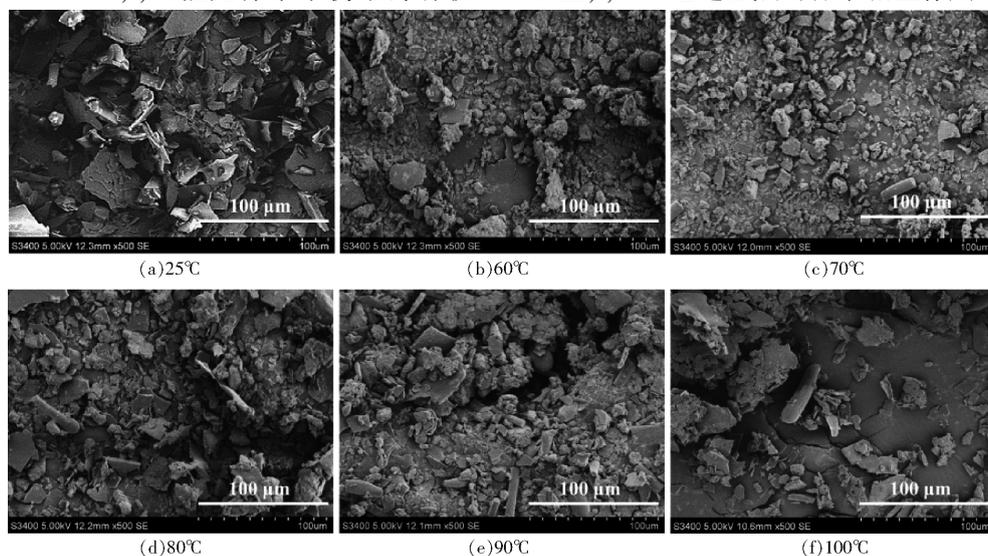


图10 不同热诱导条件下 SLP 的扫描电镜图

Fig.10 Scanning electron microscopy images of SLP under different heating induction conditions

颗粒(图 10f)。此外热处理后溶液中的 SLP 分子结构展开并暴露出更多的游离巯基和疏水性基团于分子表面,但在后续冷冻干燥过程中 SLP 的游离亚基通过游离巯基和疏水相互作用重新聚集形成较大的聚集体^[25]。

综上,综合 SLP 在热诱导过程结构变化规律、亚基解离缔合行为以及粒径的变化趋势和微观形貌结果,可推测 90℃ 是 SLP 蛋白分子温度的调控关键点。在热处理过程中,SLP 中维持分子结构稳定的氢键、范德华力等次级键和二硫键发生断裂,蛋白结构伸展、解离,含有胱氨酸和半胱氨酸的侧链暴露,表面疏水性增加,三级构象伸展程度最大,且二级构象显著改变,并伴随着 β -折叠含量增加和 α -螺旋含量下降,分子间聚集程度增大,同时热稳定性增强。暴露出的胱氨酸和半胱氨酸的巯基(—SH)在热处理过程中氧化形成极不稳定的中间硫化物,并在冷却过程中两个相邻的不稳定中间硫化物极易形成二硫键,从而生成了以二硫键和疏水相互作用为主要作用力的热诱导中间产物(M1 ~ M3)。在热诱导 20 min 时,SLP 可自组装形成相对稳定的单分布纳米颗粒体系,如图 11 所示。

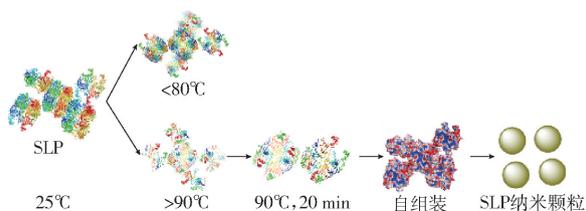


图 11 热诱导 SLP 自组装纳米颗粒行为示意图

Fig. 11 Idealized schematic self-assembly of SLP by heating induction shifted treatment

3 结束语

采用多光谱技术、热分析技术以及凝胶电泳和动态光散射研究了热诱导过程中 SLP 纳米颗粒自组装。结果显示,80 ~ 90℃ 是 SLP 热处理分界线,在热处理温度低于 80℃ 时,SLP 能基本保持天然构象,不发生显著性变化,而在热处理温度高于 90℃ 时,SLP 蛋白二级构象发生显著性改变。在 90℃ 处理 20 min 时,SLP 蛋白结构解聚、伸展至最大程度,表面疏水性增加。解离后的亚基通过二硫键和疏水相互作用重新聚集成中间聚集体,导致分子间聚集程度增大、构象稳定性增强。SLP 自组装形成粒径约为 110 nm 的稳定单分布纳米颗粒体系。

参 考 文 献

- [1] TANG C H. Emulsifying properties of soy proteins: a critical review with emphasis on the role of conformational flexibility [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2017, 57(12): 2636–2679.
- [2] RIZZO G, BARONI L. Soy, soy foods and their role in vegetarian diets [J]. *Nutrients*, 2018, 10(1): 43.
- [3] 李杨,陈凡凡,王中江,等. 超声预处理对大豆蛋白聚集体结构和乳化特性的影响[J/OL]. *农业机械学报*, 2020, 51(6): 366–374.
LI Yang, CHEN Fanfan, WANG Zhongjiang, et al. Effect of ultrasonic pretreatment on structure and functional properties of soy protein aggregates [J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2020, 51(6): 366–374. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20200640. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.06.040. (in Chinese)
- [4] SUN H, LUO Q, HOU C, et al. Nanostructures based on protein self-assembly: from hierarchical construction to bioinspired materials [J]. *Nano Today*, 2017, 14:16–41.
- [5] WEI G, SU Z, REYNOLDS N P, et al. Self-assembling peptide and protein amyloids: from structure to tailored function in nanotechnology [J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(15): 4661–4708.
- [6] WANG J M, XIA N, YANG X Q, et al. Adsorption and dilatational rheology of heat-treated soy protein at the oil-water interface: relationship to structural properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(12): 3302–3310.
- [7] SAMOTO M, MAEBUCHI M, MIYAZAKI C, et al. Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate [J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(1): 317–322.
- [8] URADE R, KOHNO M. Physiological function of highly purified soy proteins [J]. *Soy Protein Research, Japan*, 2011, 14:7–11.
- [9] GAO Z M, WANG J M, WU N N, et al. Formation of complex interface and stability of oil-in-water (O/W) emulsion prepared by soy lipophilic protein nanoparticles [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(32): 7838–7847.
- [10] MATSUMURA Y, SIRISON J, ISHI T, et al. Soybean lipophilic proteins — origin and functional properties as affected by interaction with storage proteins [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2017, 28:120–128.
- [11] SIRISON J, MATSUMIYA K, SAMOTO M, et al. Solubility of soy lipophilic proteins: comparison with other soy protein fractions [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017, 81(4): 790–802.
- [12] ZHANG K, JIANG M, CHEN D. Self-assembly of particles—the regulatory role of particle flexibility [J]. *Progress in Polymer Science*, 2012, 37(3): 445–486.
- [13] MEISL G, MICHAELS T C, AROSIO P, et al. Dynamics and control of peptide self-assembly and aggregation [M] // KNECHT M R, WALSH T S. *Biological and bio-inspired nanomaterials*. Singapore: Springer, 2019: 1–33.
- [14] LI Y, ZHONG M, XIE F, et al. The effect of pH on the stabilization and digestive characteristics of soybean lipophilic protein oil-in-water emulsions with hypromellose [J]. *Food Chemistry*, 2020, 309(2): 125579.

- [15] 曾剑华, 刘琳琳, 杨杨, 等. 大豆脂蛋白组分分析及体外抗氧化特性 [J]. 食品科学, 2020, 41(14): 58–65.
ZENG Jianhua, LIU Linlin, YANG Yang, et al. Composition and in vitro antioxidant properties of soy lipophilic protein [J]. Food Science, 2020, 41(14): 58–65. (in Chinese)
- [16] BEVERIDGE T, TOMA S, NAKAI S. Determination of —SH and S—S groups in some food proteins using ellman's reagent [J]. Journal of Food Science, 1974, 39(1): 49–51.
- [17] ZHAO J, HE S, TANG M, et al. Low-pH induced structural changes, allergenicity and in vitro digestibility of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Food Chemistry, 2019, 283: 183–190.
- [18] KUELTZO L A, ERSOY B, RALSTON J P, et al. Derivative absorbance spectroscopy and protein phase diagrams as tools for comprehensive protein characterization: a bGCSF case study [J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003, 92(9): 1805–1820.
- [19] YAMAGISHI T, EBINA F, YAMAUCHI F. Analysis of the state of aromatic amino acid residues in heated soybean 7S globulin by absorption derivative spectrophotometry and spectrofluorimetry [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 2014, 46(10): 2441–2448.
- [20] ZHANG Y, CHEN S, QI B, et al. Complexation of thermally-denatured soybean protein isolate with anthocyanins and its effect on the protein structure and in vitro digestibility [J]. Food Research International, 2018, 106(4): 619–625.
- [21] GUO F, XIONG Y L, QIN F, et al. Surface properties of heat-induced soluble soy protein aggregates of different molecular masses [J]. Journal of Food Science, 2015, 80(2): C279–C287.
- [22] DATTA D, M J S. Fluorescence and circular dichroism studies on the accessibility of tryptophan residues and unfolding of a jacalin-related alpha- δ -galactose-specific lectin from mulberry (*Morus indica*) [J]. J. Photochem. Photobiol. B, 2017, 170: 108–117.
- [23] MORRIS A M, WATZKY M A, FINKE R G. Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Proteins and Proteomics, 2009, 1794(3): 375–397.
- [24] 林岱. 苦杏仁 11S 球蛋白自组装现象及其应用研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2018.
LIN Dai. Study on self-assembly property and application of 11S globulin from Chinese apricot kernel [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2018. (in Chinese)
- [25] HU H, WU J, LI-CHAN E C Y, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2): 647–655.

(上接第 177 页)

- [22] 姜广辉, 张瑞娟, 张翠玉, 等. 基于空间集聚格局和边界修正的基本农田保护区划定方法 [J]. 农业工程学报, 2015, 31(23): 222–229.
JIANG Guanghui, ZHANG Ruijuan, ZHANG Cuiyu, et al. Approach of land use zone for capital farmland protection based on spatial agglomeration pattern and boundaries modification [J]. Transactions of the CSAE, 2015, 31(23): 222–229. (in Chinese)
- [23] 熊昌盛, 谭荣, 岳文泽. 基于局部空间自相关的高标准基本农田建设分区 [J]. 农业工程学报, 2015, 31(22): 276–284.
XIONG Changsheng, TAN Rong, YUE Wenzhe. Zoning of high standard farmland construction based on local indicators of spatial association [J]. Transactions of the CSAE, 2015, 31(22): 276–284. (in Chinese)
- [24] 倪九派, 李萍, 魏朝富, 等. 基于 AHP 和熵权法赋权的区域土地开发整理潜力评价 [J]. 农业工程学报, 2009, 25(5): 202–209.
NI Jiupai, LI Ping, WEI Chaofu, et al. Potentialities evaluation of regional land consolidation based on AHP and entropy weight method [J]. Transactions of the CSAE, 2009, 25(5): 202–209. (in Chinese)
- [25] 鞠洪润, 左丽君, 张增祥, 等. 中国土地利用空间格局刻画方法研究 [J]. 地理学报, 2020, 75(1): 143–159.
JU Hongrun, ZUO Lijun, ZHANG Zengxiang, et al. Methods research on describing the spatial pattern of land use types in China [J]. Acta Geographica Sinica, 2020, 75(1): 143–159. (in Chinese)
- [26] 胡长慧. 国土空间集聚的格局及演变过程研究: 以宁波市为例 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
HU Changhui. Study on the pattern and evolution process of territorial spatial agglomeration: a case study of Ningbo [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019. (in Chinese)
- [27] 曲衍波, 魏淑文, 刘敏, 等. 农村居民点多维形态空间格局与耦合类型 [J]. 自然资源学报, 2019, 34(12): 2673–2686.
QU Yanbo, WEI Shuwen, LIU Min, et al. Spatial pattern and coupling types of multidimensional morphology of rural residential land [J]. Journal of Natural Resources, 2019, 34(12): 2673–2686. (in Chinese)
- [28] 刘倩, 张超, 马立军, 等. 基于模糊评价-三维魔方的村级生态旅游区划研究 [J]. 中国农机化学报, 2019, 40(8): 221–228.
LIU Qian, ZHANG Chao, MA Lijun, et al. Study on rural eco-tourism regionalization – three dimensional magic cube [J]. Journal of Chinese Agricultural Mechanization, 2019, 40(8): 221–228. (in Chinese)