

超声预处理对大豆蛋白聚集体结构和乳化特性的影响

李 杨 陈凡凡 王中江 滕 飞

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 以大豆分离蛋白为原料,采用超声对蛋白进行预处理,经加热(100℃、20 min)和离心得到可溶性热聚集体(STSPI),以可溶性大豆分离蛋白(SSPI)(原大豆分离蛋白溶于磷酸盐缓冲液后离心制备)作为对照,探究热诱导对超声预处理蛋白的结构特性(微观结构、粒径分布、官能团、二三级结构、电位、疏水性)和乳化特性(乳化性和乳化稳定性)的影响。结果表明:与 STSPI 相比,超声预处理再经加热、离心后得到的可溶性蛋白(USTSPI)在超声时间和超声功率为 6 min、600 W 时,其平均粒径、电位绝对值、蛋白质分散度指数(PDI)和浊度分别下降了 273.50 nm、6 mV、0.33 和 288.2;官能团中羰基和二硫键质量摩尔浓度分别降低了 0.26 nmol/mg 和 0.38 μmol/g,游离氨基和游离巯基质量摩尔浓度提高了 0.16 μmol/mg 和 0.59 μmol/g;α-螺旋和 β-转角结构增多,β1 结构相对含量降低了 11.97 个百分点;表面疏水性指数提高了 364.78,乳化性指数和乳化稳定性指数提高了 123.56 m²/g 和 360.95 min。这说明对蛋白进行超声预处理后能在一定程度上阻碍因热效应导致的蛋白乳化活性降低,可为解决因加热引起蛋白乳化特性降低问题提供参考。

关键词: 大豆蛋白;可溶性热聚集体;结构;乳化特性;超声处理

中图分类号: TS201.2⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2020)06-0366-09

OSID:



Effect of Ultrasonic Pretreatment on Structure and Functional Properties of Soy Protein Aggregates

LI Yang CHEN Fanfan WANG Zhongjiang TENG Fei

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

Abstract: The protein was pretreated with soy protein isolate (0, 6 min 200 W, 6 min 400 W, 6 min 600 W, 12 min 600 W and 24 min 600 W), then heated (100℃, 20 min), centrifuged and dried to prepare soluble thermal aggregate. Aggregates, using ultrasound-free pretreatment of soluble soy protein isolate (original soy protein isolate was dissolved in phosphate buffer and prepared by centrifugation) as a control, to investigate the structural characteristics (spatial structure, particle size distribution, functional group, potential, hydrophobicity) and emulsifying properties (emulsification and effect of emulsion stability). The results showed that compared with SSPI, USTSPI reached the maximum in the ultrasonic time and ultrasonic power of 6 min, 600 W, and the average particle size, absolute value of potential, protein dispersity index (PDI) and turbidity were decreased by 273.50 nm, 6 mV, 0.33 and 288.2, respectively. The carbonyl and disulfide bonds in the functional group were reduced by 0.26 nmol/mg and 0.38 μmol/g, respectively, and the free amino and free sulfhydryl groups were increased by 0.16 μmol/mg and 0.59 μmol/g. The β-turn structure was increased, the β1 folded structure content was decreased by 11.97 percentage points; the surface hydrophobicity was increased by 364.78, and the emulsification and emulsion stability were increased by 123.56 m²/g and 360.95 min, respectively. The above results indicated that the thermal aggregates can change the protein structure to reduce the emulsification properties of the protein, while the ultrasonic pretreatment can resist the degradation of protein emulsification activity caused by thermal effects to some extent, which provided a method for solving the problem of protein emulsification degradation caused by heating.

Key words: soy protein; heat accumulation; structure; emulsification; sonication

收稿日期: 2019-07-07 修回日期: 2019-08-11

基金项目: 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(NYPYSCT-2018163)和国家重点研发计划项目(2016YFD0400702)

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@hotmail.com

通信作者: 滕飞(1986—),女,讲师,博士,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: tengfei-5730@sina.com

0 引言

大豆分离蛋白(Soy protein isolate, SPI)是一种全价蛋白^[1],常作为乳化剂应用于乳制品、肉制品和面制品中,通过降低水和油的表面张力、水和空气的表面张力,达到改善食品风味、颜色、质地和储存稳定性以及提高产品质量的目的^[2-3]。在加热、杀菌、干燥等加工过程中,蛋白质极易受到温度的影响,进而发生构象改变,造成蛋白功能活性的衰减,而热聚集体的形成是导致蛋白丧失某些生物和功能特性(如蛋白的溶解性、乳化活性和乳化稳定性)的重要原因^[4-6]。热聚集体的形成主要包括两个阶段:分子解聚成亚基形式,随后亚基逐渐去折叠,此时分子内部疏水残基逐渐暴露,表面疏基含量增高;当这些分子累积的能力足够彼此接近以实现聚合物形成时,去折叠的亚基通过疏水相互作用迅速聚集成聚集体^[7]。近年来,国内外学者对热诱导聚集领域进行了大量的研究,考察了热诱导聚集对蛋白结构和功能性质的影响^[8],并尝试通过各种物理方法来解聚热聚集体,以达到提高蛋白质功能特性的目的^[9],但对于调控热诱导可溶性聚集体形成的研究较少。

超声作为一种非热物理加工技术,能产生局部的空化效应,改变分子间氢键、范德华力、疏水性等维持蛋白质结构的作用力,促进蛋白构象改变,进而引起蛋白乳化特性的改变,因此引起广泛关注。超声技术应用范围较广^[10],蛋白经过超声处理后,其溶解度发生变化^[11],且超声对蛋白的作用分为两种:一种是蛋白结构预修饰,以增强功能性,然后应用于生产;另一种是将超声直接作用于生产体系,增强蛋白与其他物质结合的稳定性。目前,关于超声改性提高蛋白特性的研究较多,研究发现,超声处理可提高米糠蛋白溶解性和乳化性^[12]、破坏黑豆蛋白分子的内部疏水作用、解聚和重组黑豆蛋白结构^[13],而适当的超声功率和超声时间会使黑豆蛋白的粒径最小化、电位绝对值最大化、蛋白表面疏水性提高^[14]。研究表明超声可用于改性蛋白增加蛋白功能特性和结构稳定性,但经超声处理的蛋白进行热处理后,其结构和功能特性变化的相关研究却未见报道。蛋白自身特性可直接影响加工生产中的构象改变和功能特性发挥,本文将超声技术作用于大豆蛋白,然后将处理后的蛋白进行常规加工的热诱导处理,利用超声稳定蛋白结构的特性,抑制蛋白因过热处理而发生的聚集,进而提高蛋白的功能特性,以解决热诱导引起蛋白功能衰减的难题。

本文以超声处理为预处理技术,并对超声后的蛋白进行热诱导,探究超声处理对蛋白结构特性(微观结构、粒径分布、官能团、二三级结构、电位、疏水性)和乳化特性(乳化性和乳化稳定性)的影响,分析蛋白结构的改变与蛋白乳化特性的关系。研究超声功率和超声时间对蛋白热聚集的抑制效果,并探究其原因,为解决热效应造成蛋白热聚集而使蛋白功能衰退的难题提供方法和理论。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白(纯度91.12%),山东禹王集团;2,4-二硝基苯肼,天津博迪化工股份有限公司;三氯乙酸,天津市致远化学试剂有限公司;叠氮化钠,山东浩中化工有限公司;乙酸乙酯,天津市光复精细化工研究所; β -巯基乙醇、过硫酸铵,Geniview公司;2-硝基苯甲酸(DTNB)、乙二胺四乙酸(EDTA),天津市博迪化工有限公司;邻苯二甲醛(OPA),广州奈姆塔贸易有限公司;8-苯胺萘磺-1-酸盐(ANS),上海将来实业股份有限公司;尿素(Urea)试剂,武汉博士康生物工程有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS),索莱宝生物科技有限公司。其他试剂均为分析纯等级。

1.2 仪器与设备

Biosafe 650-92型超声波细胞破碎仪,江苏赛飞信息技术有限公司;HH-6型数显水浴锅,山东爱博科技贸易有限公司;LW-1600FC型紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;Zetasizer Nano ZSP型马尔文纳米粒度电位仪,马尔文仪器公司;F-4500型荧光分光光度计,日本HITACHI公司;MAGNA-IR560型傅里叶变换红外光谱,美国尼高力公司;Ultra-Turrax T25型高速分散器,德国IKA公司;ALPHA 1-4 LSC型冷冻干燥机,德国Christ公司;PHSJ-4A型实验室pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司;DK-98-1型电热恒温水浴锅,天津市泰斯特仪器有限公司;XW-80A型旋涡混合器,上海青浦沪西仪器厂;GL10M型立式高速冷冻离心机主机,北京新诺立华仪器有限公司;FJ200-S型数显高速均质机,邢台浩诚科技开发有限公司。

1.3 蛋白超声预处理和加热诱导处理

利用0.01 mol/L、pH值7.4的磷酸盐缓冲溶液将大豆分离蛋白(SPI)溶液(含0.5 mg/mL NaN_3)质量浓度调配为10 mg/mL,超声(对照;6 min, 200 W; 6 min, 400 W; 6 min, 600 W; 12 min, 600 W; 24 min, 600 W)处理之后转移至100℃恒温箱中20 min,诱

导大豆蛋白发生热聚集。将热聚集液体于低温离心机中 9 000 r/min 离心 20 min,弃去沉淀物后留存上清液经过 24 h 冷冻干燥后即可得到 6 种可溶性蛋白样品,再加上可溶性大豆分离蛋白(SSPI)(蛋白溶液经离心冻干所制),即 7 个样品,分别记为 SSPI、STSPI、6 min 200 W-STSPI、6 min 400 W-STSPI、6 min 600 W-STSPI、12 min 600 W-STSPI 和 24 min 600 W-STSPI。

1.4 蛋白的微观结构

通过扫描电镜对样品的表面形貌进行观察。将样品均匀平摊在贴有导电胶的样品台上,喷金处理,观察成像时加速电压为 20 kV,观测倍数为 10 000。

1.5 粒径分布测定

将可溶性蛋白溶于水中配成质量浓度为 0.05 g/mL 的溶液,搅拌均匀后,缓慢加入测量池中,用仪器测量其粒径电位和蛋白质分散度指数(PDI)。

1.6 浊度的测定

参考文献[15]的方法,并稍作修改。将样品溶于去离子水中配制成所需的浓度,在室温(20℃)下磁力搅拌 60 min。分光光度计在 600 nm 下测定其吸光度。以去离子水作空白,测定其吸光度 A ,浊度计算公式为

$$T=1.302\frac{AV}{I}\tag{1}$$

式中 V ——稀释倍数

I ——光程距离,取 0.01 m

1.7 游离氨基含量的测定

参考文献[16]的方法,并稍作修改。400 mg OPA 试剂充分溶解于 1 mL 甲醇溶液中,而后依次向溶液中加入预先配置的质量浓度为 200 g/L 的 SDS 溶液 2.5 mL 及质量浓度为 0.1 mol/L 的硼酸溶液 25 mL,继而转移至通风橱内加入 100 μ L 的 β -巯基乙醇,最后将溶液用蒸馏水定容至 50 mL,制备成 OPA 溶液用于后续检测分析,量取 OPA 试剂 4 mL 与 200 μ L 蛋白样品充分混匀后进行 35℃ 水浴处理 2 min,以蒸馏水空白组为对照在 340 nm 处测定吸光度。

1.8 游离巯基和二硫键含量的测定

参考文献[17]的方法,并稍作修改。称取 400 mg 的 DTNB,加入 Tris-Gly(氨丁三醇-甘氨酸)缓冲液定容至 100 mL,配成 Ellman 试剂。分别称取 2 mg 样品溶解于 2 mL 的 Tris-Gly 缓冲液(pH 值 8.0)和 0.02 mL 的 Ellman 试剂。测定时溶液振荡快速混合后在 25℃ 下保温反应 15 min,用分光光度计测定其在 412 nm 处的吸光度,以不加 Ellman 试剂为

空白。将样品用磷酸盐缓冲液配制成 0.5 mL 质量浓度为 5 mg/mL 的蛋白质溶液,置于 10 mL 塑料离心管中,加入 2.5 mL 含 8 mol/L 尿素的 Tris-Gly(10.4 g Tris,6.9 g Gly,每 1 L 加 1.2 g EDTA,pH 值 8.0),每隔 1.5 min 加入 20 μ L DTNB(0.004 g DTNB 用 Tris-Gly 溶解定容至 1 mL,避光),反应 25 min,立即在 412 nm 处测吸光度。对照组不加蛋白质溶液,其他处理方法相同。根据标准曲线($y=0.0502x-0.0009,R^2=0.9994$)计算出蛋白质质量浓度 ρ 。摩尔消光系数取 13 600 L/(mol·cm),巯基质量摩尔浓度计算公式为

$$S=\frac{73.53DA_{412}}{C}\tag{2}$$

式中 S ——巯基质量摩尔浓度, μ mol/g

A_{412} ——加 Ellman 试剂时 412 nm 处样品的吸光度

D ——稀释系数

C ——样品蛋白最终质量浓度,mg/mL

1.9 羰基含量的测定

参考文献[18]的方法,并稍作修改。将蛋白用去离子水配制为 5 mg/mL 的蛋白溶液,以双缩脲指示剂法测定蛋白质溶液的质量浓度($y=0.2412x+0.0135,R^2=0.997$)。在 367 nm 处用 2,4-二硝基苯肼比色法进行比色,每毫克蛋白质羰基衍生物的摩尔数通过摩尔消光系数 22 000 L/(mol·cm) 进行计算,公式为

$$G=\frac{45.45nA_{367}}{E}\tag{3}$$

式中 G ——蛋白羰基质量摩尔浓度,nmol/mg

n ——稀释因子

A_{367} ——367 nm 处吸光度

E ——蛋白质溶液的质量浓度,mg/mL

1.10 红外光谱分析

参考文献[19]的方法,并稍作修改。将冻干样品置于干燥器内充分干燥,称取 1 mg 样品于 100 mg 溴化钾中混匀,在玛瑙研钵中研磨并用压片器压片,于红外光谱仪中测定吸收光谱。测量条件:波数范围为 4 000 ~ 400 cm^{-1} ,分辨率 4 cm^{-1} ,波数精度 0.01 cm^{-1} ,扫描次数 64 次,环境温度 25℃。

1.11 内源性光谱分析

参考文献[20]的方法,并稍作修改。称取一定量样品于 5 mmol 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)配成质量浓度为 0.001 g/mL 的溶液,取适量样品置于荧光分光光度计中测量。测量条件:激发波长 290 nm,发射波长 300 ~ 400 nm,狭缝宽均为 5 nm,电压为 700 mV。

1.12 Zeta 电位的测定

参照文献[21]的测定方法,并稍作修改。采用 Zetasizer Nano ZSP 型马尔文纳米粒度电位仪对蛋白溶液的 Zeta 电位进行测定。将蛋白样品分散到 50 mmol/L、pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲液中,配成质量分数为 0.2% 的蛋白溶液,取样量为 3 mL,测定温度为 25℃。

1.13 表面疏水性指数 H_0 测定

参照文献[22]的 ANS 荧光探针法测定样品表面疏水性的方法,并稍作修改。用 0.1 mol/L 的中性磷酸盐缓冲溶液稀释,10 000 r/min 高速离心处理 0.5 h 除去沉淀物,以 Lowery 法分析测试上清液中蛋白浓度,通过磷酸盐缓冲液的逐步稀释,调控蛋白溶液质量浓度至 0.05 ~ 0.4 mg/mL,取 40 μ L 浓度为 8 mmol/L 的 ANS 溶液滴加至不同浓度的蛋白溶液 4 mL,经振荡混匀后静置 3 min,在荧光分光光度计下进行荧光强度测试,测试条件为:激发波长 λ_{ex} = 390 nm,发射波长 λ_{em} = 468 nm,扫描夹缝宽度设置为 5 nm,扫描速度设置为 10 nm/s。将荧光强度与蛋白质量浓度作线性图,初始段的斜率计为样品的表面疏水性指数。

1.14 乳化性和乳化稳定性的测定

参照文献[23]的方法,并稍作修改。在测试管中分别加入 15 mL 质量浓度 0.001 g/mL 蛋白质溶液和 5 mL 玉米油,乳液经高速均质机(24 000 r/min)处理 1 min 后,从测试管底部取出 50 μ L 乳液,用 0.001 g/mL 的 SDS 溶液稀释 100 倍后,于 500 nm 比色。乳化性指数 E_{AI} 和乳化稳定性指数 E_{SI} 的计算公式为

$$E_{AI} = \frac{2 \times 2.303FA_0}{10\,000H\varphi(1-\theta)}$$

(4)

$$E_{SI} = \frac{100A_0}{A_0 - A_{30}}$$

(5)

式中 E_{AI} ——乳化性指数, m^2/g
 E_{SI} ——乳化稳定性指数, min
 F ——稀释因子,取 100
 A_0 ——0 min 时的吸光度
 A_{30} ——30 min 时的吸光度
 H ——蛋白质质量浓度, g/mL
 φ ——光程,取 0.01 m
 θ ——油相质量分数,取 25%

1.15 数据处理和分析

每个实验均进行 3 次重复平行实验,利用 SPSS Statistics 22 软件对数据进行 ANOVA 差异显著性分析,以 $P < 0.05$ 为显著性差异。采用 Origin 9.1 软件、Peak Fit 4.12 软件等进行数据分析、图表处理及图谱分析处理。

2 结果与分析

2.1 可溶性蛋白的微观结构变化

由图 1 箭头指出的孔洞结构可知, SPI 在经过热处理后由片状结构聚集成网状结构;随着超声功率的增大,USTSPI 微观图中箭头所指的网状结构由松散杂乱逐渐变得致密且孔洞均匀;但当超声功率不变,随着超声时间的增大,超声后热可溶性蛋白的结构逐渐由致密均匀逐渐变得松散。这表明超声处理可以影响蛋白的聚集效果,进而影响蛋白的微观结构^[24]。

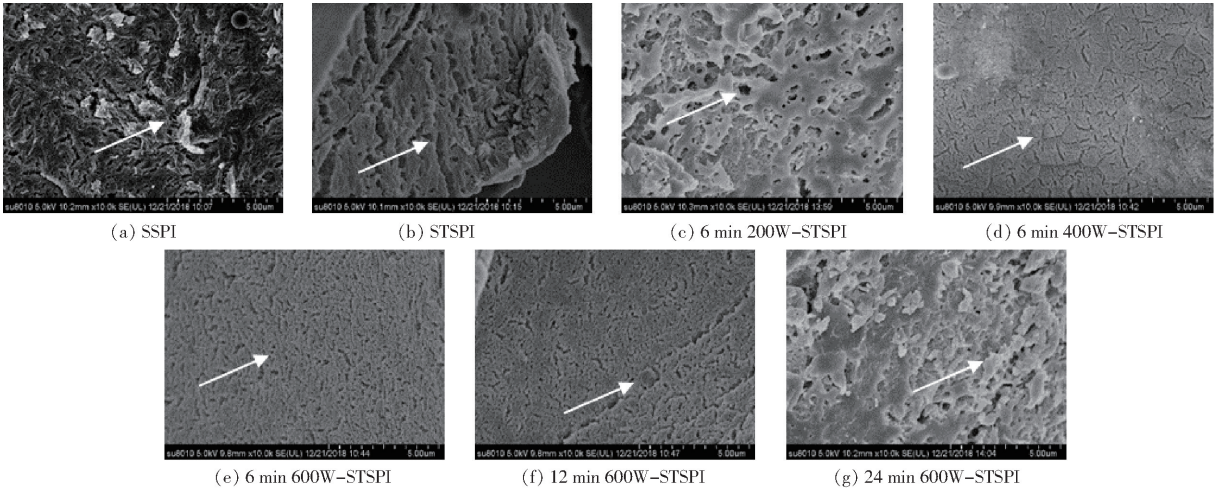


图 1 超声预处理对蛋白微观结构的影响

Fig. 1 Effects of ultrasonic pretreatment on microstructure of protein

2.2 热处理对预处理蛋白粒径的影响

由图 2 和表 1 可知,与 SSPI 相比,STSPI 的平均粒径、PDI 和浊度均显著增大,且粒径分布图由原来的单峰变成了三峰;与 STSPI 相比,经过超声预处理

的蛋白在热诱导时粒径、PDI 和浊度显著降低,随着超声功率的增大,其粒径分布图逐渐左移,且 STSPI 最右侧峰消失,表中平均粒径、浊度和 PDI 逐渐减小;与 6 min 600 W - STSPI 相比,随着超声时间的增

大,粒径分布图逐渐右移,平均粒径、PDI 和浊度呈现增大的趋势。

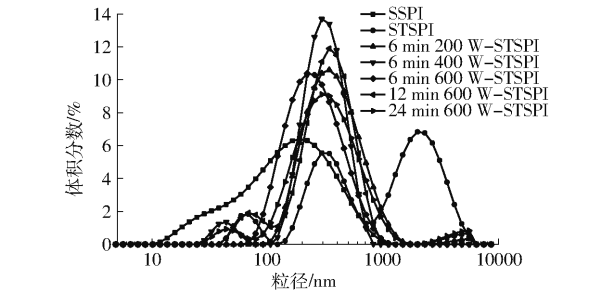


图 2 超声预处理对蛋白粒径分布的影响
Fig. 2 Effect of ultrasonic pretreatment on protein particle size distribution

加热处理可使蛋白先解聚后聚集,导致粒径、PDI 和浊度增大。而超声预处理使蛋白发生一定程度的疏水性基团暴露,增强颗粒间的静电排斥力,从而提高蛋白质分散体系的稳定性^[14]。超声功率越大,蛋白疏水性基团暴露得越明显,分子间斥力越大,抑制热聚集体形成的效果越明显^[25]。而超声时间过长会导致蛋白分子在疏水作用力的情况下发生聚合,溶液稳定性变差,从而降低了抑制热聚集体形成的效果,并促进小分子聚集体向中等大小聚集体转变。粒径分布图可在一定程度上反映蛋白粒度的分布状况,而 PDI 则反映粒径分布范围,而溶液浊度可以反映蛋白质的聚集程度,可从侧面衡量蛋白

表 1 超声预处理对蛋白结构的影响

Tab. 1 Effect of ultrasonic pretreatment on protein structure			
样品	粒径/nm	PDI	浊度
SSPI	(104. 80 ± 2. 33) ^f	(0. 52 ± 0. 03) ^a	(214. 70 ± 0. 06) ^g
STSPI	(478. 27 ± 8. 66) ^a	(0. 58 ± 0. 04) ^a	(518. 39 ± 0. 06) ^a
6 min 200 W - STSPI	(287. 70 ± 9. 20) ^b	(0. 35 ± 0. 06) ^b	(387. 35 ± 0. 05) ^b
6 min 400 W - STSPI	(243. 27 ± 3. 74) ^d	(0. 27 ± 0. 03) ^c	(292. 17 ± 0. 05) ^e
6 min 600 W - STSPI	(204. 77 ± 4. 27) ^e	(0. 25 ± 0. 02) ^c	(230. 19 ± 0. 06) ^f
12 min 600 W - STSPI	(246. 43 ± 1. 45) ^{cd}	(0. 33 ± 0. 07) ^{bc}	(323. 16 ± 0. 05) ^d
24 min 600 W - STSPI	(260. 57 ± 7. 95) ^c	(0. 35 ± 0. 05) ^b	(340. 86 ± 0. 05) ^e

注:同列中相同字母表示数据差异不显著($P>0.05$),不同则表示差异显著($P<0.05$),下同。

质相互作用大小及聚集体的相对尺寸。图 2 中超声预处理后峰图较 STSPI 左移,且大颗粒峰图消失,颗粒分布较为集中。从表 1 可知,经过超声预处理的蛋白 PDI 处于 0.25~0.35 之间,较 SSPI 的 0.52 和 STSPI 的 0.58 小,经过超声预处理的蛋白浊度也显著降低。粒径、PDI 和浊度的变化趋势说明超声预处理在一定程度上抑制了蛋白热聚集,且超声功率和时间的不同对热诱导聚集抑制程度不同。

2.3 可溶性蛋白游离氨基和羰基含量的测定

蛋白结构在受热展开的过程中,埋藏在分子内部的氨基侧链暴露并很快被氧化生成羰基结构,氨基含

量和羰基含量在一定程度上可用来表征蛋白结构的展开程度和氧化程度^[26]。巯基基团(—SH)是蛋白中重要的功能基团,其含量变化可反映蛋白质的变性程度,对其功能性质的发挥具有很重要的作用^[27]。如表 2 所示,与可溶性 SPI 相比,可溶性 TSPI 的游离氨基、游离巯基和总巯基含量减少,而羰基和二硫键含量增多;与 STSPI 相比,随着超声功率的增大,其游离氨基和巯基呈现升高趋势,而羰基含量和二硫键含量呈现减小趋势;与 6 min 600 W - STSPI 相比,随着超声时间的增大,游离氨基和巯基含量呈现降低趋势,而羰基含量先增大后减小,二硫键含量呈现升高趋势。

表 2 游离氨基、巯基、二硫键和羰基含量

Tab. 2 Free amino, sulfhydryl, disulfide and carbonyl contents					
样品	游离巯基质量摩尔	总巯基质量摩尔	二硫键质量摩尔	游离氨基质量摩尔	羰基质量摩尔
	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	浓度/($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)
SSPI	(5. 13 ± 0. 34) ^{bc}	(8. 94 ± 0. 12) ^a	(1. 91 ± 0. 22) ^{ab}	(0. 32 ± 0. 02) ^c	(5. 67 ± 0. 03) ^f
STSPI	(4. 79 ± 0. 33) ^{cd}	(8. 93 ± 0. 22) ^a	(2. 07 ± 0. 28) ^a	(0. 24 ± 0. 01) ^d	(6. 01 ± 0. 02) ^a
6 min 200 W - STSPI	(4. 97 ± 0. 22) ^{bc}	(8. 50 ± 0. 18) ^b	(1. 76 ± 0. 27) ^{bc}	(0. 38 ± 0. 01) ^{ab}	(5. 87 ± 0. 03) ^c
6 min 400 W - STSPI	(5. 20 ± 0. 26) ^{ab}	(8. 73 ± 0. 25) ^{ab}	(1. 76 ± 0. 16) ^{bc}	(0. 38 ± 0. 01) ^{ab}	(5. 78 ± 0. 02) ^{de}
6 min 600 W - STSPI	(5. 38 ± 0. 23) ^{ab}	(8. 78 ± 0. 29) ^{ab}	(1. 70 ± 0. 26) ^c	(0. 40 ± 0. 02) ^a	(5. 75 ± 0. 01) ^e
12 min 600 W - STSPI	(4. 99 ± 0. 17) ^{bc}	(8. 86 ± 0. 27) ^{ab}	(1. 94 ± 0. 21) ^{ab}	(0. 36 ± 0. 03) ^b	(5. 94 ± 0. 03) ^b
24 min 600 W - STSPI	(4. 50 ± 0. 21) ^d	(8. 63 ± 0. 16) ^{ab}	(2. 06 ± 0. 19) ^a	(0. 37 ± 0. 02) ^{ab}	(5. 82 ± 0. 02) ^d

蛋白溶液在进行热处理时,当蛋白聚集程度高于解聚时,巯基基团部分转换为二硫键,部分被重新

掩藏,导致巯基含量降低,二硫键含量增加。蛋白结构在展开过程中产生的部分氨基因氧化生成新的羰

基基因^[26,28], 羰基含量增多。已有研究证实, 超声波的空化效应和剪切力可将大聚集体解聚转化为小聚集体, 提高蛋白表面疏水性, 增大巯基的暴露量, 破坏分子间二硫键形成游离巯基^[25], 增加蛋白质表面负电荷, 增强颗粒间静电排斥, 并提高蛋白质分散体的稳定性^[14], 抑制蛋白聚集, 进而减少羰基量。当超声功率为 600 W 和超声时间为 6 min 时疏水性基团的暴露量达到最大值, 超声功率和时间持续增大, 存在过量的自由基, 促进羰基的形成^[29]。蛋白之间非共价相互作用推动蛋白颗粒聚集, 游离巯基和游离氨基减少, 二硫键含量增多。

2.4 可溶性蛋白二级结构组分含量测定

傅里叶变换红外光谱是表征蛋白质二级结构的主要技术方法之一。热处理可断开蛋白 α-螺旋结构中的氢键, 使 α-螺旋结构减少^[30], β-转角结构和 β-折叠结构 (β1 + β2) 含量增多。而反向平行的折叠结构 (β1) 通常在聚集的蛋白质分子间形成^[31],

在一定程度上可表征蛋白的聚集程度。如图 3 和表 3 所示, 与 SSPI 相比, STSPI 的 β1 结构增多, α-螺旋和 γ-无规则卷曲结构均减少; 随着超声功率的增大, β1 呈现减小趋势, α-螺旋和 γ-无规则卷曲结构增多; 与 6 min 600 W - STSPI 相比, 随着超声时间的增大, β1 增多, α-螺旋、β-转角和 γ-无规则卷曲结构均减少。

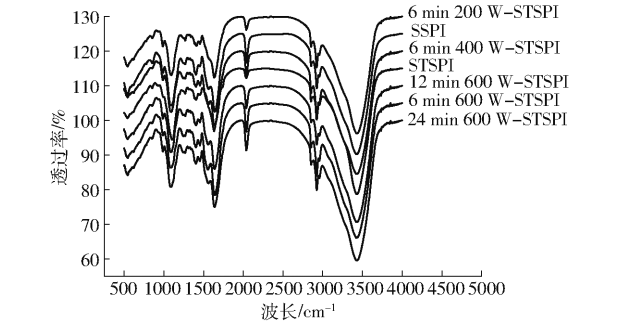


图3 蛋白的红外光谱图
Fig.3 Infrared spectrum of protein

表3 超声预处理对蛋白二级结构的影响

Tab.3 Effect of ultrasonic pretreatment on secondary structure of protein

样品	二级结构各构象相对含量/%					
	β1 (反对称)	β2 (对称)	α-螺旋	β-转角	γ-无规则卷曲	β1 + β2
SSPI	(41.30 ± 0.53) ^b	(5.96 ± 1.43) ^{ab}	(17.28 ± 0.91) ^b	(22.99 ± 1.03) ^c	(12.47 ± 0.98) ^c	(47.25 ± 0.27) ^d
STSPI	(44.67 ± 0.48) ^a	(6.35 ± 2.61) ^a	(13.78 ± 0.94) ^{cd}	(31.62 ± 0.50) ^a	(3.58 ± 0.81) ^d	(51.01 ± 1.74) ^b
6 min 200 W - STSPI	(41.68 ± 1.57) ^b	(8.89 ± 2.88) ^a	(13.87 ± 1.25) ^c	(32.42 ± 0.81) ^{ab}	(3.14 ± 2.97) ^c	(50.57 ± 0.86) ^c
6 min 400 W - STSPI	(35.92 ± 1.87) ^d	(5.90 ± 1.48) ^{ab}	(15.07 ± 1.40) ^b	(33.72 ± 2.09) ^b	(9.38 ± 1.75) ^d	(41.82 ± 1.75) ^e
6 min 600 W - STSPI	(32.70 ± 1.03) ^e	(6.19 ± 1.07) ^{ab}	(15.23 ± 1.73) ^a	(34.89 ± 1.73) ^a	(10.99 ± 0.62) ^c	(38.89 ± 1.74) ^f
12 min 600 W - STSPI	(36.48 ± 1.28) ^d	(2.84 ± 1.44) ^{bc}	(14.44 ± 1.87) ^b	(32.57 ± 1.81) ^c	(9.67 ± 0.99) ^b	(39.32 ± 1.43) ^e
24 min 600 W - STSPI	(38.97 ± 1.31) ^c	(5.77 ± 2.54) ^a	(13.05 ± 2.27) ^d	(31.78 ± 0.95) ^b	(5.42 ± 0.54) ^c	(46.74 ± 1.56) ^b
波长/cm ⁻¹	1 615 ~ 1 637	1 682 ~ 1 700	1 646 ~ 1 664	1 664 ~ 1 681	1 637 ~ 1 645	

研究表明, 超声功率和超声时间的增大可能增加了蛋白质上的负表面电荷, 而颗粒的有效表面电荷主要决定了它们的分散和聚集^[32], 增强颗粒间静电排斥, 并提高蛋白质的稳定性^[14]。与 STSPI 相比, 超声后再经热诱导的可溶性蛋白 β-折叠 (尤其是 β1) 结构减少, α-螺旋、β-转角结构增多, 可能与超声使蛋白表面电荷增多抑制蛋白受热聚集有关^[25]。当超声条件为 600 W、6 min 时抑制蛋白聚集的能力达到最大, β1 蛋白结构达到最小值。当超声时间进一步增大时, β-折叠结构增加^[14], 同时伴随着聚集体中 α-螺旋结构减少, 抑制聚集的能力减弱, 这可能是局部氨基酸序列之间和部分分子之间相互作用被破坏所致^[33]。这表明适当的超声预处理可在一定程度上抑制蛋白发生热聚集, 这与之前的研究结果一致。

2.5 蛋白三级结构测定

蛋白质三级结构的变化可以通过内源性荧光的

最大吸收波长的变化来确定^[34]。由图 4 可知, 与 SSPI 相比, STSPI 的最大吸收波长出现蓝移现象; 超声预处理后再经过热处理得到的可溶性蛋白, 与 STSPI 相比, 随着超声功率的增大, 蛋白最大吸收波长出现不同程度红移; 与 6 min 600 W - STSPI 相比, 随着超声时间的增大, 蛋白最大吸收波长出现蓝移。加热诱导蛋白聚集时, 随着温度的增大, 蛋白结构发生聚集, 发色基团被掩藏, 最大吸收波长发生蓝移^[18]。随着超声功率增大, 蛋白发生的红移现象可能与超声使蛋白结构柔性打开和伸展, 暴露出疏水性基团和带电粒子, 稳定的蛋白结构抑制蛋白进一步发生聚集有关, 使蛋白暴露的发色基团较 STSPI 多, 进而发生红移^[35]。当超声功率和超声时间为 600 W 和 6 min 时, 疏水性基团达到稳定值, 蛋白溶液状态达到一个稳定态临界值。但随着超声时间的进一步增加, 较高的疏水相互作用促使蛋白聚集, 最大吸收波长较 6 min 600 W - STSPI 出现蓝移。

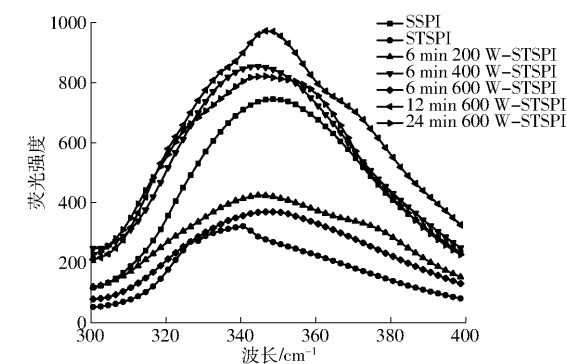


图4 超声预处理对蛋白三级结构的影响

Fig. 4 Effect of ultrasonic pretreatment on tertiary structure of protein

2.6 蛋白表面疏水性的测定

Zeta 电位通常被用来表征溶液体系的稳定性,绝对值越大溶液越稳定,而表面疏水性变化侧面反映了大豆蛋白的结构变化^[8],且对蛋白质的稳定性、构象和功能至关重要。由表 4 可知,与 SSPI 相比,STSPI 的表面疏水性指数和电位绝对值增大;与 STSPI 相比,超声预处理蛋白电位绝对值整体减小,且随着超声功率的增大,蛋白的表面疏水性指数和电位绝对值呈现增大趋势;与 6 min 600 W - STSPI 相比,随着超声时间的增大,蛋白的电位绝对值呈现减小趋势,表面疏水性指数先增大后减小,且在 6 min 600 W - STSPI 电位绝对值达到最大值,在 12 min 600 W - STSPI 表面疏水性指数达到最大值。

表 4 超声预处理对蛋白电位和表面疏水性的影响

Tab.4 Effect of ultrasonic pretreatment on protein potential values and surface hydrophobicity

样品	电位/mV	H_0
SSPI	(-22.53 ±0.81) ^b	(745.32 ±45.48) ^f
STSPI	(-29.13 ±0.93) ^a	(858.53 ±22.58) ^e
6 min 200 W - STSPI	(-21.80 ±0.40) ^b	(916.65 ±11.30) ^{cd}
6 min 400 W - STSPI	(-22.20 ±0.53) ^b	(1 179.80 ±13.12) ^b
6 min 600 W - STSPI	(-23.13 ±0.74) ^b	(1 223.31 ±33.16) ^a
12 min 600 W - STSPI	(-23.07 ±0.65) ^b	(1 275.90 ±28.32) ^a
24 min 600 W - STSPI	(-22.00 ±1.01) ^b	(951.40 ±36.45) ^c

热处理可以打开蛋白结构,诱导蛋白质分子内部疏水残基和带电基团暴露,电位绝对值增大,而蛋白疏水相互作用的增大可促进蛋白发生聚集,导致蛋白表面疏水性降低^[36],表中 STSPI 的表面疏水性高于 SSPI 可能与蛋白聚集方式发生变化导致部分疏水性基团仍处于暴露态有关。超声预处理导致电位绝对值整体减小,侧面反映了超声抑制聚集的作用。随着超声功率增大,诱导蛋白质去折叠,从而导致最初在分子内部的疏水基团数量增加并暴露于极性周围环境^[14],增大空气和水的界面面积,干扰

分子间氢键和疏水相互作用^[24],同时游离官能团和带电粒子数量的增多,增大了溶液中的静电作用力,进而增加溶液稳态,抑制了蛋白热诱导聚集现象,导致表面疏水性和电位绝对值增大^[14]。且当处理功率和时间达到 600 W、6 min 时抑制能力达到最大,蛋白溶液状态达到一个稳态临界值。随着超声时间的进一步增加,蛋白的抑制能力减弱,高功率超声波处理可能会增加蛋白结合程度,进而降低蛋白分散体稳定性,导致电位绝对值和表面疏水性减小^[37]。

2.7 蛋白乳化性的测定

蛋白质分子因具有疏水和亲水的基团,从而能够分别作用于油相和水相,起到乳化剂的作用。蛋白质的热聚集会影响蛋白质分子的结构,进而影响蛋白质的乳化性。如图 5(图中同一参数不同字母表示差异显著)所示,与 SSPI 相比,STSPI 的乳化性指数和乳化稳定性指数降低;超声预处理后再经过热处理得到的可溶性蛋白,与 STSPI 相比,随着超声功率的增大,蛋白的乳化性和乳化稳定性呈现增大趋势;与 6 min 600 W - STSPI 相比,随着超声时间的增大,蛋白的乳化性和乳化稳定性呈现减小趋势,且在 6 min、600 W 时乳化性和乳化稳定性达到最大值。

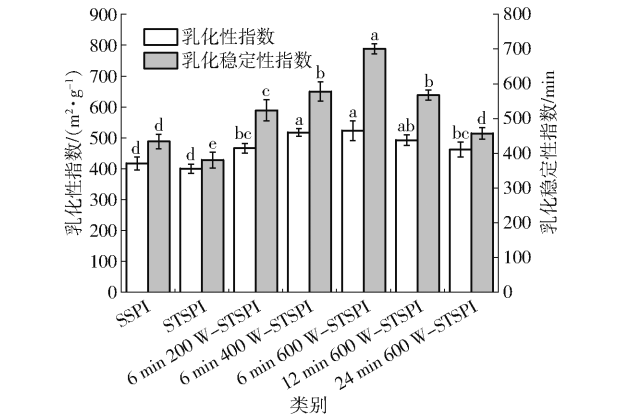


图5 超声预处理对蛋白乳化特性的影响

Fig. 5 Effect of ultrasonic pretreatment on protein emulsifying properties

热诱导降低了蛋白质分子疏水性指数/亲水性指数比值,蛋白质分子柔韧性降低,在油水界面不能迅速展开,进而降低了大豆蛋白的乳化性。超声功率和超声时间的增大可减小蛋白的粒径和增大蛋白的比表面积,增加分子间静电斥力和疏水相互作用,提高蛋白溶液稳定性,抑制蛋白聚集,提高乳液界面吸附蛋白能力,进而增强乳化性和乳化稳定性^[38-39]。当超声时间和功率增大到 6 min、600 W 时,蛋白的疏水性基团的暴露量达到临界值。随着超声时间的增大,蛋白质分子内部疏水相互作用的

破坏增加和蛋白质分子运动的加速使蛋白逐渐发生聚集,乳液界面上大分子颗粒蛋白极易被小分子蛋白置换,乳液界面张力增大,乳液发生絮凝,造成乳化性和乳液稳定性下降。

3 结论

(1)与 SSPI 相比,STSPI 的平均粒径、PDI 和浊度分别升高了 373.47 nm、0.06 和 303.69;官能团中二硫键和羰基质量摩尔浓度分别升高了 0.16 μmol/g 和 0.34 nmol/mg,游离巯基和氨基质量摩尔浓度分别降低 0.34 μmol/mg 和 0.08 μmol/g;二级结构中 α-螺旋结构减少,β-转角结构增加,β1 结构相对含

量提高了 3.37 个百分点;乳化性和乳化稳定性指数分别降低了 16.77 m²/g 和 60.03 min,表面疏水性指数提高了 113.21。这表明热聚集体可改变蛋白结构,并降低蛋白的乳化特性。

(2)与 STSPI 相比,经过超声预处理(6 min、600 W)的蛋白在进行热处理后,其平均粒径、PDI、电位绝对值和浊度显著降低,而 α-螺旋、β-转角结构、表面疏水性、乳化性和乳化稳定性提高,微观结构变得均匀致密。这表明适当的超声预处理可抑制因蛋白聚集而导致蛋白构象发生改变,进而防止蛋白因热聚集导致蛋白乳化特性的降低,这为解决因加热引起蛋白乳化特性衰减问题提供了方法和理论。

参 考 文 献

[1] 施蒙. 酶解和热诱导修饰大豆分离蛋白的性质及其应用的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2018.
SHI Meng. The properties of enzymatic hydrolysis combined with heating modified soy protein isolate and its application in meat products[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2018. (in Chinese)

[2] 冯建岭, 彭云婷, 李迎秋. 大豆分离蛋白的功能特性及应用[J]. 粮食与食品工业, 2017(6):37-40.
FENG Jianling, PENG Yunting, LI Yingqiu. Functional properties and applications of soy protein isolate [J]. Cereal and Food Industry, 2017(6): 37-40. (in Chinese)

[3] LI R, HETTIARACHCHY N, RAYAPROLU S, et al. Improved functional properties of glycosylated soy protein isolate using D-glucose and xanthan gum[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(9):6067-6072.

[4] 畅鹏, 杜鑫, 杨东晴, 等. 蛋白质热聚集行为机理及其对蛋白质功能特性影响的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(24):318-325.
CHANG Peng, DU Xin, YANG Dongqing, et al. Research progress on the mechanism of protein thermal aggregation behavior and its influence on functional properties of protein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(24): 318-325. (in Chinese)

[5] ALTING A C, WEIJERS M, DE HOOG E H A, et al. Acid-induced cold gelation of globular proteins: effects of protein aggregate characteristics and disulfide bonding on rheological properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(3):623-631.

[6] PATRO S P T. Simulations of kinetically irreversible protein aggregate structure[J]. Biophysical Journal, 1994, 66(5):1274-1289.

[7] CHI E Y, KRISHNAN S, RANDOLPH T W, et al. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation[J]. Pharmaceutical Research, 2003, 20(9):1325-1336.

[8] 武肖. 热诱导聚集对大豆蛋白凝胶流变特性及稳定性影响[D]. 杭州:浙江工商大学, 2013.
WU Xiao. The influence of heat-induced aggregation on gel rheological properties and stability in soybean protein solutions [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2013. (in Chinese)

[9] LELIA M, SAEDEDEH S A, SYEYED M H. Recent approaches in physical modification of protein functionality[J]. Food Chemistry, 2016, 199(67):619-627.

[10] ZOU Y, WANG L, LI P, et al. Effects of ultrasound assisted extraction on the physiochemical, structural and functional characteristics of duck liver protein isolate[J]. Process Biochemistry, 2017, 52(27):174-182.

[11] 胡昊. 利用高场强超声波增强大豆蛋白凝胶性及凝胶缓释效果[D]. 武汉:华中农业大学, 2014.
HU Hao. Using high intensity ultrasound to improve gelatin protein of the drug control release of soy protein hydrogel [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014. (in Chinese)

[12] 马楠, 王霞, 鹿保鑫, 等. 超声处理提高米糠蛋白溶解性与乳化性工艺研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2018, 30(6):41-50.
MA Nan, WANG Xia, LU Baoxin, et al. Study on ultrasonic treatment to improve the solubility and emulsification of rice bran protein [J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2018, 30(6): 41-50. (in Chinese)

[13] 杨勇, 王中江, 毕爽, 等. 超声处理黑豆蛋白结构变化的拉曼光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2016, 36(7):2318-2324.
YANG Yong, WANG Zhongjiang, BI Shuang, et al. Raman spectroscopy study structural changes in black bean protein isolate upon ultrasonic-treatment[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2016, 36(7): 2318-2324. (in Chinese)

[14] JIANG L, WANG J, LI Y, et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates [J]. Food Research International, 2014, 62:595-601.

[15] 李云. 大豆蛋白聚集及共混凝胶性质研究[D]. 无锡:江南大学,2007.

- LI Yun. The study on aggregated soybean protein and mixed gelation soybean proptein [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007. (in Chinese)
- [16] 周麟依, 孙玉凤, 吴非, 等. 丙二醛氧化对米糠蛋白结构及功能性质的影响[J]. 食品科学, 2018, 40(12): 98–107.
ZHOU Linyi, SUN Yufeng, WU Fei, et al. Effects of oxidation by malondialdehyde on the structure and function of rice bran protein [J]. Food Science, 2018, 40(12): 98–107. (in Chinese)
- [17] ELLMAN G L. Tissue sullhydrl groups[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82(1): 70–79.
- [18] HUANG Y, HUA Y, QIU A. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation[J]. Food Research International, 2006, 39(2): 240–249.
- [19] 袁德保. 大豆蛋白热聚集行为及其机理研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
YUAN Debao. Heat-induced aggregation of soy proteins and its mechanism [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010. (in Chinese)
- [20] KABIRULLAH M, WILLIS R B. Characterization of sunflower protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1983, 31(5): 953–956.
- [21] CRUDDEN A, AFOUFA-BASTIEN D, FOX P F, et al. Effect of hydrolysis of casein by plasmin on the heat stability of milk [J]. International Dairy Journal, 2005, 15(10): 1017–1025.
- [22] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. Biophysica Acta (BBA)—Protein Structure, 1980, 624(1): 13–20.
- [23] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(3): 716–723.
- [24] 汪长青, 李兴江, 穆冬冬, 等. 预处理对大豆分离蛋白结构及凝胶性质的影响[J]. 中国粮油学报, 2018, 33(10): 48–54.
WANG Changqing, LI Xingjiang, MU Dongdong, et al. Effect on structure and gel properties of soybean protein isolate under pretreatments [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2018, 33(10): 48–54. (in Chinese)
- [25] HU Hao, WU Jiahui, 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.
- [26] SANTE-LHOUTELLIER V, AUBRY L, GATELLIER P. Effect of oxidation on in vitro digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(13): 5343–5348.
- [27] 毕爽, 齐宝坤, 隋晓楠, 等. 超声处理对黑豆蛋白结构和功能性质的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(6): 153–160.
BI Shuang, QI Baokun, SUI Xiaonan, et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black soybean protein isolate [J]. Chinese Journal of Food Science, 2016, 16(6): 153–160. (in Chinese)
- [28] STADTMAN E. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions [J]. Annual Review of Biochemistry, 1993, 62(1): 797–821.
- [29] KANG D C, ZOU Y H, CHENG Y P, et al. Effects of power ultrasound on oxidation and structure of beef proteins during curing processing[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 33: 47–53.
- [30] 孙佳悦, 钱方, 牟光庆. 基于红外光谱分析热处理对牛乳蛋白质二级结构变化研究[J]. 食品科学, 2017, 38(23): 82–86.
SUN Jiayue, QIAN Fang, MOU Guangqing. Study on secondary structure changes of milk protein based on infrared spectroscopy heat treatment[J]. Food Science, 2017, 38(23): 82–86. (in Chinese)
- [31] ELLEPOLA S W, CHOI S M, MA C Y. Conformational study of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds by Fourier-transform infrared spectroscopy[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 37(1–2): 12–20.
- [32] SONG X, ZHOU C, FU F, et al. Effect of high-pressure homogenization on particle size and film properties of soy protein isolate[J]. Industrial Crops and Products, 2013, 43: 538–544.
- [33] STATHOPOULOS P B, SCHOLZ G A, HWANG Y M, et al. Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid[J]. Protein Science, 2010, 13(11): 3017–3027.
- [34] SHEN L, TANG C H. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate[J]. Food Research International, 2012, 48(1): 108–118.
- [35] PALLARÈS I, VENDRELL J, AVILÉS F X, et al. Amyloid fibril formation by a partially structured intermediate state of alpha-chymotrypsin[J]. Journal of Molecular Biology, 2004, 342(1): 321–331.
- [36] WANG Zhongjiang, LI Yang, JIANG Lianzhou, et al. Relationship between secondary structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolate subjected to heat treatment[J]. Journal of Chemistry, 2014, 25: 1–10.
- [37] SUN Yanjun, CHEN Jianhang, ZHANG Shuwen, et al. Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 124: 11–18.
- [38] ZHANG L, JIN Y, XIE Y, et al. Releasing polysaccharide and protein from yeast cells by ultrasound: selectivity and effects of processing parameters[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2014, 21(2): 576–581.
- [39] HIGUERA-BARRAZA O A, DEL TORO-SANCHEZ C L, RUIZ-CRUZ S, et al. Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 23(31): 558–562.