

不同来源豆类亲脂蛋白提取与理化性质研究

李 杨 方 琳 齐宝坤 谢凤英 钟明明 许顺楠
(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 阐述了从不同来源豆类的分离蛋白中提取亲脂蛋白的方法,并对这些不同来源的亲脂蛋白进行了结构验证与性质对比。通过电泳、溶解度、表面疏水性、热效应和二级结构相对含量等指标分别从结构和理化性质两方面分析提取出的蛋白是否为亲脂蛋白及这些蛋白的相似性和差异性。组分分析结果表明,4种提取物(大豆亲脂蛋白、黑豆亲脂蛋白、绿豆亲脂蛋白、豌豆亲脂蛋白)中蛋白质量分数在84%~86%之间、脂质质量分数在13%~13.5%之间。电泳、拉曼光谱及红外光谱的测定结果表明,4种蛋白组分中大豆亲脂蛋白、黑豆亲脂蛋白和绿豆亲脂蛋白结构相似,而豌豆亲脂蛋白略有不同,主要与二级结构稳定性的差异有关。差示扫描量热结果表明,4种蛋白组分仍然是混合物,变性温度范围为60~74℃,而从宏观角度测定的蛋白表面性能也证明了提取出来的4种蛋白均为亲脂蛋白组分。

关键词: 大豆;黑豆;绿豆;豌豆;亲脂蛋白;理化性质

中图分类号: TS210.4; TS202.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2022)06-0388-08 **OSID:** 

Extraction and Analysis of Physicochemical Properties of Lipophilic Protein from Different Sources

LI Yang FANG Lin QI Baokun XIE Fengying ZHONG Mingming XU Shunnan
(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The methods of extracting lipophilic proteins from different sources were introduced, and the structures and properties of these lipophilic proteins were compared. By means of SDS-PAGE, solubility, surface hydrophobicity, thermogravimetric analysis, and determination of protein secondary and tertiary structures, the composition of the extracted protein was analyzed from structural characteristics and physicochemical properties to determine whether it was lipophilic proteins, and the similarities and differences between these proteins. The contents of protein and lipid in the four extracts were 84%~86% and 13%~13.5%, respectively. The results of SDS-PAGE, Tunku Abdul Rahman spectra and infrared spectra showed that the structure of soybean lipophilic proteins, black bean lipophilic proteins and mung bean lipophilic proteins were similar, but pea lipophilic proteins were slightly different, the main difference was that the secondary structure of pea protein was less stable than that of other lipophilic proteins. The results of differential scanning calorimetry (DSC) showed that the four protein extracts were still mixture, and the denaturation temperature was ranged from 60℃ to 74℃, the results also proved that all the four proteins were lipotropic components. The extraction of these protein components not only broadened the source of lipophilic protein, but also provided a theoretical basis for the analysis and modification of protein components of four legumes, and it can provide a way for the processing and application of four legumes.

Key words: soybean; black bean; mung bean; pea; lipophilic protein; physicochemical properties

0 引言

近年来,随着健康饮食等观念逐渐受到重

视^[1],采用植物蛋白代替动物蛋白也逐渐成为研究的热点内容^[2]。迄今为止,食品科学中关于复杂系统配方的研究大多关注少数被广泛使用的蛋白质来

源,如大豆等的研究。因此拓宽蛋白来源,形成多元化局面,成为当今蛋白应用和发展过程中亟待解决的问题之一^[3]。

在加工大豆蛋白的过程中主要提取的组分是大豆分离蛋白(Soybean protein isolate, SPI),长期以来,研究者们普遍认为 SPI 主要由大豆球蛋白(11S)和 β -伴大豆球蛋白(7S)两种组分构成^[4]。然而近几年,通过精细化加工调节脱脂豆粕水溶液的 pH 值,逐步分离出 3 个组分:11S 蛋白、大豆亲脂蛋白(Soybean lipophilic protein, SLP)和 7S 蛋白。因此, SPI 的功能特性也应该基于这 3 种蛋白质组分的性质来重新考虑。

黑豆是大豆中的一个分支,在成分组成、性质和结构功能等方面都与大豆相类似^[5]。尤其在脂肪和蛋白质含量及比例上较为相似。亲脂蛋白在豆类中的存在多与脂类相关,所以适当的脂类含量有利于亲脂蛋白组分的存在,因而将黑豆作为制备黑豆亲脂蛋白(Black bean lipophilic protein, BLP)的新来源,相比于其他豆类在提取工艺和应用等方面更具有优势^[6-7]。绿豆中蛋白质含量高于小麦、玉米、水稻等常见的粮食作物^[8-9]。另外,其氨基酸种类相对齐全,不同种类氨基酸的含量比例也更适于人体吸收和利用。但是目前对于绿豆的研究,主要集中在对淀粉的研究上,对于其中的蛋白组分并没有重视^[10-11],类比于大豆、黑豆亲脂蛋白的提取,绿豆亲脂蛋白(Mung bean lipophilic protein, MLP)的提取增加了亲脂蛋白的来源,也为绿豆蛋白的工业加工提供了新的思路。豌豆在豆类生产总量中的占比最大,为 36%。但是由于豌豆蛋白的性质相对较差,疏水性、溶解度、乳化性等性质方面的不利因素导致了豌豆蛋白在实际应用过程中受到了阻碍^[12]。针对以上问题,豌豆亲脂蛋白(Pea lipophilic protein, PLP)组分的含量与蛋白质的亚基结合方式、疏水性基团的含量和分布等关系有待被进一步研究。

亲脂蛋白作为分离蛋白中的贮藏蛋白之一,其功能性质在分离蛋白功能性质表现上起到了一定作用,如作为表面活性剂,亲脂蛋白中的磷脂成分使蛋白与脂类物质相互结合变得更加容易,提高油水界面张力,起到稳定界面的能力,促进乳状液的形成和稳定。目前有关亲脂蛋白的相关研究仅停留在大豆亲脂蛋白的提取和应用,而在黑豆、绿豆和豌豆中的亲脂蛋白尚未有相关研究,多数研究仅包含 3 种豆类中的分离蛋白相关理化性质和改性处理对蛋白的影响,因此本文分别从大豆、黑豆、绿豆、豌豆 4 种豆类中提取亲脂蛋白,并利用电泳、热性质、表面性能

和二级结构等对提取出来的不同来源的亲脂蛋白进行表征,从而拓宽亲脂蛋白来源,进一步分析蛋白组分,使每一组分得到充分利用,也为黑豆、绿豆和豌豆在蛋白领域的加工和利用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆,东农 42 号,市售;黑豆,齐黑 1 号,市售;绿豆,绿丰 5 号,市售;豌豆,中豌 2 号,市售;正己烷,分析纯,500 mL,天津市富宇精细化工有限公司;亚硫酸钠,分析纯,淄博永业精细化工股份有限公司;氯化钠,分析纯,500 g,天津市科密欧化学试剂有限公司;氢氧化钠,分析纯,500 g,天津市科密欧化学试剂有限公司;硫酸,98%,山东东佳集团股份有限公司;氯仿,分析纯,500 mL,广东予能实验室设备科技有限公司;甲醇,分析纯,500 mL,天津市科密欧化学试剂有限公司;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠,分析纯,天津市东丽区天大化学试剂厂;聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂盒,GB/T 23528,河南兴鼎化工产品有限公司。

1.2 仪器与设备

HH8 型恒温水浴锅,常州市凯航仪器有限公司;制备型冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;离心管,济南来宝医疗器械有限公司;傅里叶变换红外光谱仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;rapid MAX N exceed 型杜马斯定氮仪,关河仪器设备(上海)有限公司;电泳仪,美国伯乐公司;F98 型荧光分光光度计,上海棱光技术有限公司;JC-1086A 型多功能酶标分析仪,浙江聚创智能科技有限公司;DTA 型热重热差分析仪,北京赛思蒙仪器有限公司;湘仪式离心机,湘仪离心机仪器有限公司;SL200L 型视频光学接触角测量仪,美国科诺工业有限公司;UV-5100 型高性能紫外-可见分光光度计,上海奥析科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 大豆亲脂蛋白提取

参考文献[13]的方法并进行改进,提取大豆亲脂蛋白。大豆磨粉,过 120 目筛,向过筛后的大豆粉以液料比 4 mL/g 加入正己烷,螺旋桨搅拌 1 h 后静置,待大豆粉完全沉降,进行固液分离并干燥,沉淀组分即为脱脂大豆粉。将脱脂大豆粉与水以液料比 8 mL/g 混合,调节 pH 值至 8,用螺旋搅拌桨搅拌 1 h,以 4 000 r/min 的转速离心 15 min,取上清液加入 10 mmol/L 的亚硫酸钠,并调节 pH 值至 5.8,同等条件下离心 15 min,取清液调节 pH 值至 5.0,加入 50 mmol 氯化钠,在 55℃ 下保温 15 min,取出保温

后的溶液调节 pH 值至 5.5,再离心 15 min,取沉淀组分进行冻干,即得到大豆亲脂蛋白。

1.3.2 黑豆亲脂蛋白提取

参考文献[14]的方法并进行改进,提取出黑豆分离蛋白,并进一步处理得到黑豆亲脂蛋白,具体操作如下:黑豆磨粉过 120 目筛,粉碎后的黑豆以液料比 6 mL/g 加入正己烷,磁力搅拌 1.5 h 后静置,待黑豆粉完全沉降,沉淀组分加热干燥后即可得到脱脂黑豆粉。将脱脂黑豆粉与水以液料比 11.93 mL/g 混合,调节 pH 值至 8.5,搅拌 1 h 混合均匀,以 7 500 r/min 的转速离心 20 min,取上清液调节 pH 值至 5.8,同等条件离心 20 min 取上清液调节 pH 值至 4.9,在 55℃ 下保温 20 min 后调节 pH 值至 5.6,离心 20 min,取沉淀物进行冻干,得到黑豆亲脂蛋白。

1.3.3 绿豆亲脂蛋白提取

参考文献[15]的方法并进行改进,提取出绿豆分离蛋白,并进一步处理得到绿豆亲脂蛋白,具体操作如下:将绿豆磨粉,过 120 目筛,按照液料比 5 mL/g 加入正己烷,搅拌均匀并静置,进行脱脂,得到脱脂绿豆粉后干燥。将脱脂绿豆粉与水以料液比 15 mL/g 加入,调节 pH 值至 10.0,搅拌均匀在 40℃ 下恒温水浴 30 min,后在 7 500 r/min 条件下离心 20 min,保留上清液并调节 pH 值至 5.8,离心取上清液调节 pH 值至 5.0,在 60℃ 下保温 20 min,取出后调节 pH 值为 5.5,离心 15 min,得沉淀组分进行冻干,即得到绿豆亲脂蛋白组分。

1.3.4 豌豆亲脂蛋白提取

参考文献[16]的方法并进行改进,提取出豌豆分离蛋白,并进一步处理得到豌豆亲脂蛋白,具体操作如下:将豌豆置于磨粉机中粉碎,过 120 目筛,按照液料比 4 mL/g 加入正己烷,用磁力搅拌器搅拌均匀,静置 1 h,取沉淀脱脂豌豆粉干燥 2 h。将豌豆粉溶于 25 倍的水中,用氢氧化钠调节 pH 值至 9.0,在 50℃ 下恒温水浴 1 h,在 4 000 r/min 下离心 30 min,取上清液调节 pH 值至 5.8,离心取上清液在 50℃ 下保温 30 min,调节 pH 值至 5.0,离心 20 min,取沉淀组分进行冻干,得到豌豆亲脂蛋白组分。

1.3.5 不同来源亲脂蛋白中组分测定

杜马斯定氮:实验参照 NY/T 2007—2011《谷类、豆类粗蛋白质含量的测定杜马斯燃烧法》方法,使用杜马斯分析仪定量测定提取物中蛋白质含量。称取 30~50 mg 试样置于专用锡箔中,压紧成饼状并置于自动落样盘上。样品在氮气和氧气的条件下于左炉 950℃ 中充分燃烧,然后进入右炉 840℃,氧化还原管中自动净化,设置柱温 50℃,载气 300 mL/min,分析时间 10 min,进样延迟时间 12 s,净化后的产物进入

热岛池,测定结果于 FLASH 4000 系统软件中自动计算并打印结果。

脂质含量的测定:根据文献[13]的方法测定 SLP、BLP、MLP 和 PLP 粉末的脂质含量。将粉末加入 10 倍质量的氯仿-甲醇(体积比 2:1)溶剂中,并在 50℃ 下搅拌 2 h。将提取的溶液转移到离心管中,在 1 470 g 下离心 30 min。离心后,回收上层,剩余固体用氯仿-甲醇溶剂洗涤。所有提取的溶液被汇集、蒸发,并用氮气固化,然后测量质量。脂质含量以质量分数表示。

1.3.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

参考文献[17]的方法并进行改进。分析前将 SLP、BLP、MLP 和 PLP 沉淀冻干。将样品与含有 0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液、2% 十二烷基硫酸钠、20% 甘油和 0.001% 溴酚蓝(BPB)的电泳样品缓冲液混合,pH 值为 6.8。向样品缓冲液中添加 5% 的 2-巯基乙醇(2-ME)。将样品和缓冲液的混合物在沸水中加热 5 min,并在 9 000 g、4℃ 条件下离心 5 min。将等分试样装入 15% 的凝胶梳孔中。电泳缓冲液配比为 0.025 mol/L Tris HCl、0.192 mol 甘氨酸和 0.001 g/mL 的 SDS(十二烷基磺酸钠)。电泳后得到的凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min,脱色液脱色洗涤,静置 12 h。

1.3.7 差示扫描量热法

采用文献[18]的方法并改进,测定 4 种蛋白的热变性温度。称取 5~8 mg 的 SLP、BLP、MLP 和 PLP 粉末。使用 DSC-60 型差示扫描量热仪,以 1℃/min 的扫描速率在 20~120℃ 的范围内进行差示扫描量热(DSC)测量。水用作参考。使用 TA-60WS 型热分析系统软件测定变性峰温度。

1.3.8 傅里叶变换红外光谱

参考文献[17]的方法并进行改进。将 SLP、BLP、MLP 和 PLP 置于含 P₂O₅ 的干燥器中保存 14 d 以上去除水分。将无水分分离物放在 ATR 晶体上并向下压以确保良好的接触。用干燥空气连续吹扫光谱仪。记录在波段 600~4 000 cm⁻¹ 范围内的光谱(分辨率 4 cm⁻¹ 下的平均值),并以空池为参照。使用 peakfit 软件对光谱进行傅里叶自解卷积(FSD)、二阶导数(SD)分析和曲线拟合程序,以定位酰胺 I (1 600~1 700 cm⁻¹) 区域中的重叠峰。以蛋白不同二级结构的相对含量为依据,通过计算给予酰胺 I 区特定亚结构的光谱成分(高斯峰)的面积确定。

1.3.9 拉曼光谱

参考文献[19]的测定方法并进行改进,进一步验证二级结构的相似性。将 SLP、BLP、MLP 和 PLP

粉末分别放置在显微镜下,对准焦距后,采集样品的拉曼光谱。拉曼光谱仪参数为曝光时间 10 s;激光功率 35 mW;采集光谱范围 200 ~ 1 800 cm⁻¹。利用商业化的高斯(Gaussian)程序包和 ADF 程序包,计算 4 种蛋白的拉曼光谱。计算方法主要用密度泛函理论(Density functional theory, DFT)。

1.3.10 表面性能测定

参考文献[20]的测定方法,对 4 种蛋白与水相关的表面学性能进行测定。

溶解度:将 4 种蛋白分散在水中,形成质量分数 2% 的溶液,搅拌 1 h,9 000 r/min 离心 15 min,采用 BCA 法测定蛋白含量。

表面疏水性:取上述离心后的上清液,用 PBS 稀释至质量浓度为 0.005、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL,将所得梯度溶液与 8 mmol/L ANS (以体积比 100:1)混合,静置 3 min 后测定荧光强度,激发光波长 390 nm,发射光波长 497 nm,狭缝 5 nm,以荧光强度对蛋白质量浓度作图,初始斜率为蛋白分子的表面疏水性指数。

表面张力:将上述蛋白溶于水,以 500 r/min 的转速磁力搅拌得到 4 种蛋白质量分数为 1% 的溶液,在视频光学角仪器下测定表面张力。

乳化性:参考文献[21]的方法,取 15 mL 0.01 g/mL 待测蛋白溶液(样品蛋白溶于 pH 值为 7.0 的 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲溶液中),加入金龙鱼大豆油 5 mL,在室温(20℃)下,用均质机以 10 000 r/min 的速度搅拌 1 min,迅速从底部取样,用 0.001 g/mL 的十二烷基磺酸钠(SDS)溶液将其稀释 100 倍,然后在波长 550 nm 处测定其吸光度 A₅₅₀,记为 A₀。搅拌 30 min 后取样用 SDS 稀释,重复上述操作,测定 30 min 时的吸光度 A₃₀,同时采用 SDS 溶液作为空白对照。

乳化活性指数(EAI)计算公式为

$$E_{AI} = \frac{2 \times 2.303 A_{550} N \times 10^{-4}}{\theta LC} \tag{1}$$

式中 E_{AI}——乳化活性指数,m²/g
N——稀释倍数
θ——油相体积分数
C——蛋白质质量浓度,g/mL
L——比色皿中光路长度,取 1 cm

乳化稳定性指数(ESI)计算公式为

$$E_{SI} = \frac{A_0 t}{A_0 - A_t} \tag{2}$$

式中 E_{SI}——乳化稳定性指数,min
A_t——时间 t 时的吸光度
t——时间,取 30 min

1.3.11 数据处理与分析

实验数据采用 SPSS 22.0 分析软件和 Origin 8.0 软件进行处理,采用方差与邓肯分析对数据进行差异显著性分析(P<0.05)。所有实验均重复 3 次,结果取平均值或平均值±标准差。

2 结果

2.1 组分测定

对 4 种来源亲脂蛋白组分含量进行测定,结果如表 1 所示。从测定结果来看,提取出来的亲脂蛋白中脂类含量与原料中的脂类含量无关,按照 1.3.1 ~ 1.3.4 节中的方法进行提取后,每种亲脂蛋白中残留的脂类质量分数保持在 13% ~ 14% 之间,且由品种带来的差距较小。一般情况下,为除去豆类中的脂类多采用正己烷进行处理,但是正己烷只能除去其中大部分的极性脂,而对于某些中性脂却无法脱除,导致蛋白产品纯度较低,且这部分残留脂类也会对亲脂蛋白的性质产生影响,如溶解性降低、疏水性升高等。因此,为提高亲脂蛋白中蛋白组分的含量,本文进一步采用氯仿-甲醇溶剂对亲脂蛋白组分进行脱脂处理,然后再进行冻干操作以期提高产物中蛋白质组分的含量。

表 1 不同来源亲脂蛋白组分中各组分质量分数

Tab.1 Determination of contents of lipophilic proteins from different sources				%
来源	蛋白	脂类	杂质	
大豆	(84.851 ± 0.017) ^b	(13.147 ± 0.006) ^c	(1.999 ± 0.001) ^c	
黑豆	(84.038 ± 0.019) ^c	(13.367 ± 0.006) ^a	(2.593 ± 0.001) ^b	
绿豆	(85.391 ± 0.006) ^a	(13.160 ± 0.010) ^c	(1.455 ± 0.001) ^d	
豌豆	(84.031 ± 0.006) ^c	(13.353 ± 0.006) ^b	(2.616 ± 0.001) ^a	

注:同列数字后不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05),下同。

2.2 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

根据文献[13]的实验结果可知亲脂蛋白组分的相对分子质量主要分布在 75 ~ 100 kDa 之间,图 1 中从左到右分别为按照上述方法提取出来的 SLP、BLP、MLP 和 PLP。从图 1 中可以看出,SLP 组分中主要成分分布在 75 ~ 100 kDa 附近,与文献[10]实验结果的描述保持一致。从图 1 中可见,BLP 在 75 ~ 100 kDa 之间有一明显条带,与亲脂蛋白中主要组分保持一致。与 SLP 的电泳条带相比,BLP 的电泳条带在 63 kDa 附近的一条较大豆更为明显,说明在黑豆中这一分子量的蛋白含量比大豆中高。在 MLP 的电泳条带中,75 ~ 100 kDa 之间有一条条带,但分子量略大于常见亲脂蛋白组分,可能是由于 MLP 在亚基结构中亲水性基团含量相对较高,使得

整体蛋白组分子分子量偏高,这与疏水性的结果保持一致。PLP 的电泳条带在典型亲脂蛋白 75 ~ 100 kDa 之间有两条条带,造成这一结果可能的原因是组成亲脂蛋白的亚基在提取出来后,进行凝胶电泳的过程中,两个亚基的分离不平衡,本应是两个分子量相近的亚基由于其中某些基团连接得相对紧密,无法通过电泳实验的操作进行完全分离。因此,本应平均分为两个相同分子量的蛋白组分被分成了两个处于 75 ~ 100 kDa 之间的蛋白条带。此外,由于亲脂蛋白中磷脂的存在导致在染色过程中其对考马斯亮蓝不敏感,因此凝胶电泳图当中条带颜色的深浅与蛋白中磷脂含量的多少存在一定关联。从图 1 中可看出,大豆和绿豆亲脂蛋白条带显色程度相近,而黑豆和豌豆的条带颜色深浅接近,这与蛋白组分测定中脂类含量测定的结果相一致,磷脂含量越高,被脱除后,蛋白所占比例越高,电泳条带越明显。

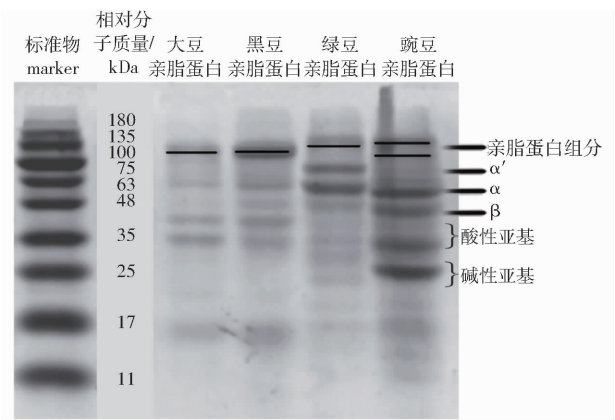


图 1 不同来源亲脂蛋白 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of lipophilic proteins from different sources

2.3 差示扫描量热

根据差示扫描量热图可知,样品温度从 20℃ 到 120℃ 变化的过程中 SLP 与 MLP 的质量分数变化规律相似,这一结果与两种亲脂蛋白疏水性相似的结果保持一致,证明 SLP 与 MLP 的疏水性基团在含量和暴露程度上基本保持一致^[22]。BLP 在同等温度变化条件下质量分数变化率较小,主要原因可能是黑豆中 β-折叠含量较高,功能性基团暴露程度低,所以随温度提高的质量分数变化较小。而 PLP 的测定结果与 BLP 恰恰相反。根据图 2 可知,4 种亲脂蛋白的热流量吸收峰值对应的温度为变性温度,因此 4 种蛋白的变性温度分别为 60.23、61.21、65.00、73.86℃。从变性温度来看,SLP 和 BLP 相似性最高,其原因在于黑豆从生物学角度分析与大豆最为相近,因此,在进行亲脂蛋白提取时得到的产物从多数性质和功能上看应最为相似,但仍然存在差异^[23]。MLP 和 PLP 的变性温度略高于 SLP 和 BLP,

主要与蛋白结构中 β-转角含量有关。β-转角含量越高,蛋白的变性温度越高,且 β-转角含量的微小变化也会引起变性温度的极大改变^[24]。

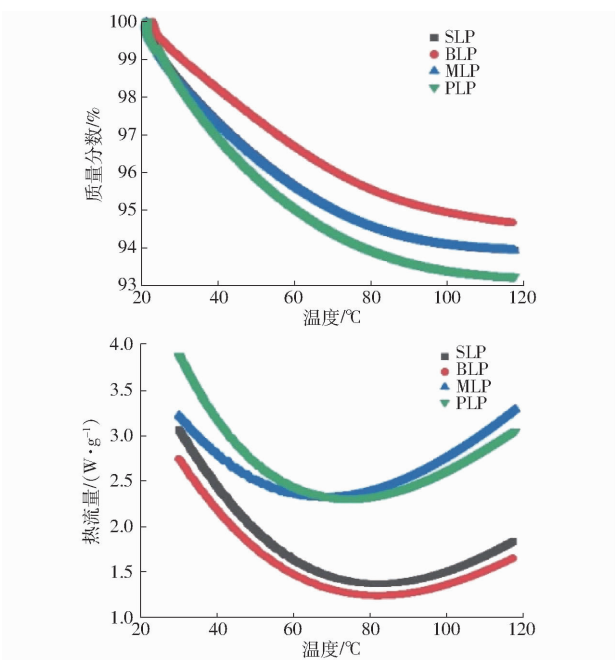


图 2 不同来源亲脂蛋白热重热差分析图

Fig. 2 TDA of lipophilic proteins from different sources

2.4 傅里叶变换红外光谱

亲脂蛋白中二级结构主要包括 α-螺旋、β-折叠和 β-转角 3 种,这 3 种结构主要通过碳链骨架上的羰基和酰胺基团之间形成的氢键维持,因此可通过这 3 种结构的含量了解蛋白质中氢键作用力和维持蛋白质结构稳定性的能力^[25]。蛋白质在形成立体结构时,肽链首先形成 α-螺旋和 β 型结构,而后随着蛋白质在修饰过程中受到的外界作用逐渐转变为 4 种主要二级结构构象,即 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规则卷曲^[26]。从图 3 和表 2 来看,SLP 和 BLP 中无规则卷曲含量相对较少,而 β-折叠含量较高,证明 SLP 和 BLP 中氢键含量较高,因此在稳定性上优于 MLP 和 PLP。根据表 2 也可认为在蛋白质修饰加工过程中,MLP 和 PLP 中部分 β-折叠结构转变

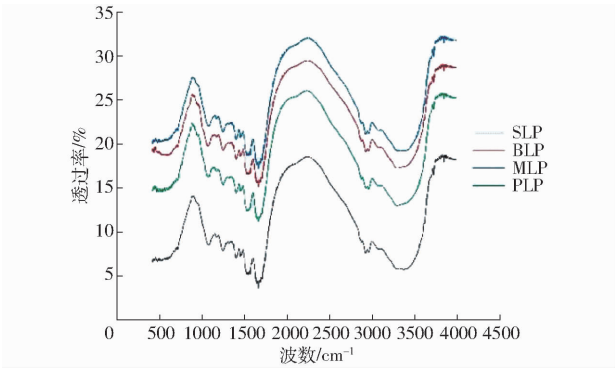


图 3 不同来源亲脂蛋白红外光谱图

Fig. 3 Infrared spectrogram of lipophilic proteins from different sources

成为无规则卷曲,因而在含量上有所降低,稳定性也存在差异^[27]。SLP、BLP 与 MLP、PLP 相比 α -螺旋含量高而 β -转角含量低,但两种结构之间保持总量的稳定,而存在个体差异。

表 2 不同来源亲脂蛋白中各二级结构相对含量

Tab.2 Content of secondary structure in lipophilic proteins from different sources

来源	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
大豆	(29.26 $\pm$ 0.04) ^a	(41.22 $\pm$ 0.73) ^b	(19.71 $\pm$ 0.33) ^b	(9.58 $\pm$ 0.42) ^b
黑豆	(27.53 $\pm$ 0.05) ^b	(43.64 $\pm$ 0.40) ^a	(18.64 $\pm$ 0.36) ^c	(10.25 $\pm$ 0.36) ^b
绿豆	(23.11 $\pm$ 0.05) ^c	(13.91 $\pm$ 0.27) ^c	(26.12 $\pm$ 0.50) ^a	(37.02 $\pm$ 0.14) ^a
豌豆	(23.18 $\pm$ 0.04) ^c	(13.17 $\pm$ 0.17) ^d	(26.67 $\pm$ 0.21) ^a	(37.00 $\pm$ 0.08) ^a

2.5 拉曼光谱

由拉曼光谱结果可知,从整体上看 SLP 和 MLP 在三级结构组成上相似,BLP 和 PLP 的三级结构含量相似,而 4 种亲脂蛋白所含有的基团在种类上保持一致,而在含量上存在差异。图 4 中位移750 ~ 1 000 cm^{-1} 处出现第 1 个峰,在此范围内主要代表 C—S 键,证明在 4 种蛋白中均存在一定量的二硫键,且在 BLP 和 PLP 中二硫键的含量高于 SLP 和 MLP。位移 1 250 ~ 1 500 cm^{-1} 处出现第 2 和第 3 个较为明显的峰,主要体现蛋白中存在的 R 基、甲基和含氮基团,与 BLP 和 PLP 相比,SLP 和 MLP 中第 3 个峰值较小,证明在 SLP 和 MLP 中含氮基团含量较少,与电泳中条带的分离、蛋白展现出更多氮端结构等结果保持一致^[28]。位移 1 600 cm^{-1} 处存在第 4 个较为明显的峰,此为 N—N 双键的峰值范围。从图中可知 BLP 中 N—N 双键的峰面积大于 SLP、MLP 和 PLP,证明在 BLP 中含氮基团含量高于其他 3 种亲脂蛋白,且 N—N 双键键能较高,因此黑豆亲脂蛋白在结构稳定性上优于其他 3 种蛋白。位移 2 000 ~ 2 250 cm^{-1} 和位移 2 500 ~ 2 600 cm^{-1} 区域主要表示 C—N 三键和巯基。在这部分区域中 BLP 和 PLP 的峰面积明显大于 SLP 和 MLP,因此 BLP 和 PLP 的稳定性较另外两种亲脂蛋白高^[29]。从巯基对应的拉曼区域峰面积来看,MLP 和 PLP 的巯基含量较高,因此部分结构以游离巯基形式存在,而未形成二硫键,与电泳测定中蛋白组分条带发生分离的结果保持一致。

2.6 表面性能测定

2.6.1 溶解度

通过测定 4 种豆类来源的亲脂蛋白吸光度,并

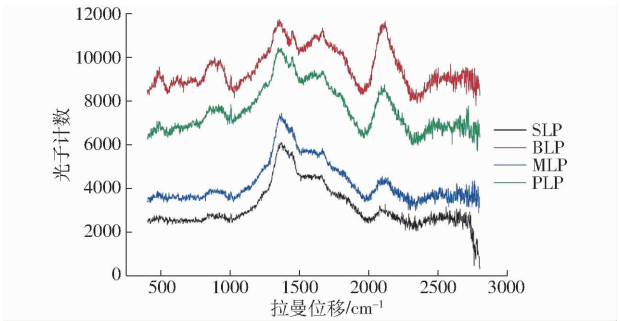


图 4 不同来源亲脂蛋白拉曼光谱
Fig.4 Raman spectra lipophilic proteins from different sources

在同一浓度条件下进行比较发现,不同来源亲脂蛋白吸光度相似。根据计算得到 SLP、BLP、MLP 和 PLP 的溶解度分别为 2.313、2.092、1.492、1.545 mg/mL ,由此可知 SLP 和 BLP 结果相近,而 MLP 和 PLP 在同一浓度条件下结果也相似^[30]。因此可以说明 BLP 和 SLP 在基团组成及结构分布上存在相似性,而 MLP 和 PLP 在这两方面上也相似,这与红外光谱测定的结果保持一致。

2.6.2 表面疏水性

以每种豆类在不同浓度条件下测定的荧光强度为纵坐标,以质量浓度为横坐标作图,得到曲线的初始斜率为相应亲脂蛋白分子的表面疏水性指数。其中 BLP 和 MLP 疏水性相似,SLP 疏水性最小,PLP 疏水性最大。计算得到 SLP、BLP、MLP 和 PLP 的 R^2 分别为 0.999 2、0.997 4、0.999 3 和 0.992 4,证明每种蛋白组内数据测定结果可靠。稀释中水合作用对蛋白溶解度影响较小。而同一浓度、不同来源亲脂蛋白在表面疏水性这一性质上却存在显著性差异,这与不同来源豆类中含硫氨基酸以及疏水性结构的暴露程度之间存在关系^[31-32]。由表 3 可知,BLP 和 MLP 疏水性相似,虽然与 SLP 疏水性存在一定差异,但是总体上差异不显著。PLP 疏水性指数最大,原因在于豌豆中疏水性基团暴露相对明显,亲脂蛋白由两个部分分子量有差异的疏水性亚基组成,使得豌豆亲脂蛋白的疏水基团暴露得更加充分,与电泳中两条条带的分离结果一致。

2.6.3 表面张力与乳化性

通过测定质量分数为 1% 的 4 种蛋白的表面张力和乳化性,发现大豆和黑豆中的亲脂蛋白组分表面张力无显著差异,而绿豆和豌豆蛋白溶液的表面张力与其他两种豆类之间存在显著差异,这一结果与 4 种蛋白表面疏水性的测定结果保持一致,因此通过表面学性能测定的结果可以证明,亲脂蛋白组分在低浓度条件下即存在较强的界面稳定性^[32],可以作为一种优良的食品级乳化剂应用。

表 3 不同来源亲脂蛋白表面学性能测定结果

Tab.3 Determination of surface properties of lipophilic proteins from different sources

种类	溶解度/(mg·mL ⁻¹)	表面疏水性指数	表面张力/(mN·m ⁻¹)	EAI/(m ² ·g ⁻¹)	ESI/min
SLP	(2.313±0.100) ^a	(27 114.667±2 252.04) ^b	(227.892 2±4.058 2) ^{ab}	(125.377±2.585) ^b	(88.3±2.7) ^b
BLP	(2.092±0.130) ^a	(23 148.333±2 115.97) ^b	(232.359 3±4.916 2) ^{ab}	(120.250±2.776) ^{ab}	(92.5±2.3) ^{bc}
MLP	(1.492±0.065) ^b	(36 016.667±3 090.57) ^a	(237.717 3±4.546 4) ^b	(135.148±3.559) ^c	(98.4±1.8) ^d
PLP	(1.545±0.067) ^b	(8 578.833±1 047.66) ^c	(221.558 4±10.647 4) ^a	(116.353±4.989) ^a	(81.3±3.3) ^a

3 结束语

依据 4 种来源豆类,首先分离相应豆类的分离蛋白,再从相应的分离蛋白中提取该种豆类的亲脂蛋白组分。从实验结果来看,SLP 与 BLP 在多数指标中性质都保持相近,而 MLP 和 PLP 的性质相似。但这两组之间存在较为显著的差异。

提取出的 SLP、BLP、MLP 和 PLP 中的蛋白质量分数均在 80% 以上,同时与大豆亲脂蛋白中最为相似的是 BLP、MLP 和 PLP 也同样存在 13% 左右的脂类。4 种蛋白组分在表面学性能、组分含量、二级结构等方面性质相似但含量不同。所提取的 4 种亲脂蛋白组分,为 4 种豆类的深加工提供了新的方向和思路。

参 考 文 献

[1] 王瑞元. 创新抢占大豆蛋白开发利用的至高点[J]. 中国油脂,2021,46(3):1-2.
WANG Ruiyuan. Innovation to seize the high poing of development and utilization of soybean protein[J]. China Oils and Fats, 2021,46(3):1-2. (in Chinese)

[2] JIMENEZ-MUNOZ L M, TAVARES G M, CORREDIG M. Design future foods using plant protein blends for best nutritional and technological functionality[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 113: 139-150.

[3] VAN M K, ROHMER S, GERDESSEN J C. A model for composing meat replacers; reducing the environmental impact of our food consumption pattern while retaining its nutritional value[J]. Journal of Cleaner Production, 2017,165: 930-950.

[4] YASUKI M, JIRAPORN S, TOYA I, et al. Soybean lipophilic proteins—origin and functional properties as affected by interaction with storage proteins[J]. Current Opinon in Colloid & Interface Science,2017, 28(2):120-128.

[5] 孙元宾. 黑大豆油制取及其理化特性的研究[J]. 农业科技,2008,28(1):33-35.
SUN Yuanbin. Extraction of black soybean oil and it's physical and chemical characteristics[J]. Agricultural Science and Technology,2008,28(1):33-35. (in Chinese)

[6] 张英蕾,姚鑫淼,卢淑雯,等. 碱溶酸沉法提取黑豆蛋白工艺优化[J]. 中国食品添加剂,2019,30(1):60-68.
ZHANG Yinglei, YAO Xinmiao, LU Shuwen, et al. Optimization of black soybean protein extraction process by alkali and acid precipitation[J]. China Food Additives,2019,30(1):60-68. (in Chinese)

[7] ZHANG Y L, YIN Y Y, LU S W, et al. Effects of modified processing methods on structural changes of black soybean protein isolate[J]. Molecules,2018, 23(9):2127-2141.

[8] CHANDRASIRI S D, LIYANAGE R, VIDANARACHCHI J K, et al. Does processing have a considerable effect on the nutritional and functional properties of mung bean (*Vigna radiata*) [J]. Procedia Food Science,2016,6:352-355.

[9] BRISHTI F H, CHAY S Y, MUHAMMAD K, et al. Effects of drying techniques on the physicochemical, functional, thermal, structural and rheological properties of mung bean (*Vigna radiata*) protein isolate powder[J]. Food Research International, 2020, 138:109783.

[10] 黄梦迪,吴会琴,王娜,等. 不同品种绿豆理化特性和抗氧化性研究[J]. 食品研究与开发,2020,41(6):32-37.
HUANG Mengdi, WU Huiqin, WANG Na, et al. Study on physicochemical properties and antioxidant actity of different varieties of mung bean[J]. Food Research and Development,2020,41(6):32-37. (in Chinese)

[11] ZHANG Q, JEGANATHAN B, DONG H, et al. Effect of sodium chloride on the thermodynamic, rheological, and microstructural properties of field pea protein isolate/chitosan complex coacervates[J]. Food Chemistry,2021,344: 128569.

[12] LAN Y, CHEN B, RAO J. Pea protein isolate—high methoxyl pectin soluble complexes for improving pea protein functionality: effect of pH, biopolymer ratio and concentrations[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 80(2): 245-253.

[13] 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.

[14] EVANGELHO J A D, VANIER N L, PINTO V Z, et al. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: physicochemical and functional properties[J]. Food Chemistry,2016, 214:460-467.

[15] ZHONG Z, XIONG Y L. Thermosonication-induced structural changes and solution properties of mung bean protein[J]. Ultrasonics Sonochemistry,2020,62:104908.

[16] TAMNAK S, MIRHOSSEINI H, TAN C P, et al. Physicochemical properties, rheological behavior and morphology of pectin-pea protein isolate mixtures and conjugates in aqueous system and oil in water emulsion[J]. Food Hydrocolloids,2016,56(2):

- 405 – 416.
- [17] JIRAPORN S, KENTARO M, MASAHICO S, et al. Solubility of soy lipophilic proteins: comparison with other soy protein fractions[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2017, 81(4): 790 – 802.
- [18] REINA K, SHO H, MAYUKA T, et al. Preparation of liquid crystal nanocapsules by polymerization of oil-in-water emulsion monomer droplets[J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2020, 563: 122 – 130.
- [19] 张涛, 李战海, 李炎, 等. 非法食品添加剂乌洛托品的拉曼光谱及 DFT 分析方法[J]. *检验检疫学刊*, 2013(2): 36 – 37. ZHANG Tao, LI Zhanhai, LI Yan, et al. A combined Raman and DFT study of illegal food additives methenamine[J]. *Quality Safety Inspection and Testing*, 2013(2): 36 – 37. (in Chinese)
- [20] BONASTRE O, SALIM A Y, ELIANE C, et al. Drying method determines the structure and the solubility of microfluidized pea globulin aggregates[J]. *Food Research International*, 2019, 119: 444 – 454.
- [21] LI C, HUANG X J, PENG Q, et al. Physicochemical properties of peanut protein isolate-glucomannan conjugates prepared by ultrasonic treatment[J]. *Ultrasonics-Sonochemistry*, 2014, 21(5): 1722 – 1727.
- [22] 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(2): 120 – 128.
- [23] WANG Z, LIANG J, JIANG L, et al. Effect of the interaction between myofibrillar protein and heat-induced soy protein isolates on gel properties[J]. *Cy TA-Journal of Food*, 2015, 13(4): 527 – 534.
- [24] CHOI Y S, KIM H W, HWANG K E, et al. Effects of gamma irradiation on physicochemical properties of heat-induced gel prepared with chicken salt-soluble proteins[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2015, 106(1): 16 – 20.
- [25] BARTH A. Infrared spectroscopy of proteins[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1767(9): 1073 – 1101.
- [26] 冯芳, 刘文豪, 陈志刚. 大豆 7S、11S 蛋白的结构与热致凝胶特性的分析[J]. *食品科学*, 2020, 41(2): 58 – 64. FENG Fang, LIU Wenhao, CHEN Zhigang. Structure and heat-induced gelation properties of soybean 7S and 11S proteins [J]. *Food Science*, 2020, 41(2): 58 – 64. (in Chinese)
- [27] 齐宝坤, 赵城彬, 江连洲, 等. 大豆分离蛋白组成及二级结构对表面疏水性的影响[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(5): 288 – 293. QI Baokun, ZHAO Chengbin, JIANG Lianzhou, et al. Effect of composition and secondary structure of soybean protein isolate on surface hydrophobicity[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(5): 288 – 293. (in Chinese)
- [28] TOMEZYNSKA-MLEKO M, KAMYSZ E, SIKORSKA E, et al. Study on changes of secondary structure and surface tension of whey protein isolate dispersions upon pH and temperature[J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2014, 32(1): 82 – 89.
- [29] CHOI S M, MA C Y. Conformational study of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2005, 53(20): 8046 – 8053.
- [30] AMIRI A, MOUSAKHANI-GANJEH A, SHAFIEKHANI S, et al. Effect of high voltage electrostatic field thawing on the functional and physicochemical properties of myofibrillar protein[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2019, 56: 102191.
- [31] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determination by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. *Biophysica Acta*, 1980, 624(1): 13 – 20.
- [32] 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]. *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]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2020, 51(2): 357 – 362, 373. (in Chinese)