

物理改性对大豆蛋白柔性与乳化性的影响及其相关性分析

王喜波 王健 张泽宇 陈爽 高婷婷 江连洲

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 通过不同物理改性方法(热处理、超声处理、高压均质处理、微波处理)分别得到不同柔性的大豆分离蛋白(SPI),并利用SPI对胰蛋白酶的敏感性表征柔性,研究物理改性对SPI柔性与乳化性的影响并分析两者之间的相关性。结果表明,各改性方式对SPI柔性和乳化性产生不同的影响且乳化性随柔性的上升而上升。与其他处理条件相比,121℃热处理10 min得到最高的柔性和乳化活性,高压均质处理对SPI柔性影响小但对乳化活性影响大。相关性分析结果表明:热处理、超声处理条件下SPI柔性与乳化活性、乳化稳定性呈极显著正相关,相关系数分别为0.969、0.950和0.942、0.954。超高压均质处理条件下SPI柔性与乳化活性、乳化稳定性呈正相关,相关系数分别为0.771、0.720。微波处理条件下SPI柔性与乳化活性呈极显著正相关,与乳化稳定性呈显著正相关,相关系数分别为0.976、0.862。

关键词: 大豆分离蛋白; 柔性; 乳化性; 物理改性; 相关性分析

中图分类号: TS201.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2017)07-0339-06

Effect of Physical Modification on Flexibility and Emulsifying Property of Soy Protein and Its Correlation Analysis

WANG Xibo WANG Jian ZHANG Zeyu CHEN Shuang GAO Tingting JIANG Lianzhou

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

Abstract: Effect of different physical modification conditions (heating treatment, ultrasound treatment, high-pressure treatment, homogenization treatment and microwave treatment) on emulsifying properties and flexibility characterized by sensitivity to trypsin of soy protein isolate was investigated. The correlation analysis between flexibility and emulsifying properties (emulsifying activity and emulsion stability) was also investigated. The results suggested that different physical modification methods had different effects on flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate, and emulsifying activity and emulsion stability were increased with the increase of flexibility. The best flexibility and emulsifying activity were got at 121℃ with 10 min heating treatment, comparing with other physical modification conditions. High-pressure homogenization treatment had little impact on flexibility but it had great impact on emulsifying activity. Correlation analysis suggested that soy protein isolate flexibility was very significantly and positively correlated with emulsifying activity and emulsion stability under heating and ultrasound treatment conditions, correlation coefficients were 0.969, 0.950 and 0.942, 0.954, respectively. Flexibility of soy protein isolate was positively correlated with emulsifying activity and emulsion stability under high-pressure treatment conditions, correlation coefficients were 0.771 and 0.720, respectively. Flexibility of soy protein isolate was very significantly and positively correlated with emulsifying activity and emulsion stability under microwave treatment conditions, correlation coefficients were 0.976 and 0.862, respectively.

Key words: soy protein isolate; flexibility; emulsifying properties; physical modification; correlation analysis

收稿日期: 2016-11-12 修回日期: 2016-12-17

基金项目: 国家大豆产业技术体系项目(CARS-04-PS25)

作者简介: 王喜波(1975—),男,副教授,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究, E-mail: wangxibo@neau.edu.cn

通信作者: 江连洲(1960—),男,教授,博士生导师,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究, E-mail: jlzname@163.com

引言

大豆分离蛋白(SPI)由于其良好的功能性质和营养价值而一直成为国内外的研究热点并被广泛应用于食品的多个领域^[1-3]。大豆分离蛋白的功能性质包括起泡性、乳化性、溶解性、凝胶性等,普遍认为与蛋白的浓度、溶解度^[4]、表面疏水性^[5]、分子量^[6]等相关。蛋白柔性定义为蛋白中各个结构域的相对运动或者其多肽链中氨基酸残基的重新取向松弛率^[7]。因其在决定蛋白功能性质尤其是界面功能性质中的关键作用而受到越来越多学者的关注。

TANG等^[8]研究牛血清蛋白结构与功能性质关系时发现,柔性越高的蛋白越易在界面形成更好的粘弹性蛋白膜,从而表现出更好的乳化性质。KATO等^[9]利用不同蛋白对胰蛋白的敏感性来表征柔性,结果发现起泡性、乳化性与蛋白柔性具有较好的相关性,因此认为蛋白柔性是影响乳化性和起泡性的重要因素。POON等^[10]通过破坏S-S和非共价键得到不同柔性的蛋白,探究蛋白柔性与其乳化能力的关系,并发现蛋白柔性的增加提高了蛋白乳化能力。这些研究主要从化学改性的角度研究蛋白柔性与其功能性质的关系,而柔性与其功能性质在物理改性条件下的关系尚未见报道研究。

本文采用加热、超声、高压均质、微波等不同方式处理SPI,研究不同处理方式对SPI柔性的影响,并分析和建立SPI柔性与其乳化性相关性关系,为进一步研究SPI结构与功能性质的关系提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

大豆由东北农业大学大豆研究所提供;大豆油(九三集团哈尔滨惠康食品有限公司);三氯乙酸(永华精细化学品有限公司);SDS、Tris、胰蛋白酶(Sigma公司);其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

T18 Basic型高速分散机/匀浆机(德国IKA公司);LD4-2A型低速离心机(北京医用离心机厂);TU-1800型紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);ALPHA 1-4 LSC型冷冻干燥机(德国Christ公司);ALC-310.3型分析天平(德国艾科勒ACCULAB公司);恒温数显水浴锅(赛普实验仪器厂);实验型高压均质机(英国Stansted Fluid Power公司);超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);KD238-DA型微波炉(广东美的微波炉制造有限公司)。

1.3 方 法

1.3.1 SPI制备

参照SORGENTINI等^[11]方法并略作改动。大豆去皮、粉碎后过60目筛,乙醚脱脂,脱脂后豆粕与蒸馏水以0.1 g/mL的料液比混合,调pH值至8.5,室温(25℃)低速搅拌2 h溶解。离心(4 000 g)20 min,取上清液,用2 mol/L HCl调pH值至4.5,4℃静置12 h,去上清液,离心(4 000 g)5 min,水洗沉淀,离心2次,沉淀复溶调其pH值至7.0后冷冻干燥。

1.3.2 SPI组分测定

蛋白含量测定参照GB 5009.5—2010;含水率测定参照GB 5009.3—2010;灰分含量的测定参照GB 5009.4—2010;粗脂肪含量的测定参照GB/T 14772—2008。

1.3.3 样品制备

将SPI溶于缓冲液(0.2 mol/L、pH值7.0磷酸盐缓冲液),质量浓度为20 mg/mL,室温搅拌2 h,再用分散机(10 000 r/min)处理1 min,静置12 h。

1.3.4 热处理

将制备好的样品在不同温度60、70、80、90、100℃(水浴)及121℃(灭菌锅)处理10 min,迅速冰水冷却5 min备用。

1.3.5 超声处理

选择超声功率100~800 W、处理时间10 min,将超声仪探头浸入样品液面约2 cm进行超声处理,并将样品置于冰水浴中。

1.3.6 高压均质处理

选择均质压力为100~450 MPa,对样品进行高压均质处理,均质次数为1次。

1.3.7 微波处理

选择微波处理功率为800 W,处理时间为20~60 s,单次处理量为100 mL。

1.3.8 柔性测定

参照KATO等^[12]的方法略作改动。利用SPI对胰蛋白酶的敏感性来表征柔性。取250 μL质量浓度1 mg/mL的胰蛋白酶溶液(0.05 mol/L、pH值8.0的Tris-HCl缓冲液)加入到4 mL 1 mg/mL处理后蛋白溶液中(蛋白溶液与胰蛋白酶溶液体积比16:1),38℃保温酶解5 min,酶解反应结束后,加4 mL 5% TCA终止酶解反应,离心,取上清液在280 nm测定其吸光度。用吸光度A表示柔性。

1.3.9 乳化性测定

参照TANG等^[13]的方法,将改性后的蛋白样品稀释到2 mg/mL,处理后蛋白样品与大豆油以体积比3:1的比例混合,分散机(10 000 r/min)处理

1 min, 迅速吸取底部乳液 50 μL 加入到 5 mL 0.1% SDS 溶液中, 混合均匀。分别测定 0 min 和 10 min 吸光度, 乳化活性(EAI)用吸光度 A 表示, 乳化稳定性计算公式为

$$W = \frac{10A}{A_0 - A_{10}}$$

式中 W ——乳化稳定性, min

A_0 ——0 min 时测得的吸光度

A_{10} ——10 min 时测得的吸光度

1.3.10 数据统计分析

每次试验做 3 次平行, 结果用平均值 \pm 标准差表示, 组间差异显著性采用 t 检验分析 ($p < 0.05$)。数据统计分析采用 SPSS 17.0 软件, 试验数据用 Origin 9.0 软件绘制趋势曲线图。

2 结果与分析

2.1 大豆分离蛋白的组成

试验所制得的 SPI 蛋白质、水分、灰分和粗脂肪质量分数分别为 $(87.22 \pm 0.44)\%$ 、 $(3.24 \pm 0.67)\%$ 、 $(3.39 \pm 0.53)\%$ 和 $(0.47 \pm 0.06)\%$, 符合试验要求。

2.2 不同物理改性对大豆分离蛋白柔性和乳化性的影响

由图 1(图中不同小写字母表示柔性差异显著, 下同)和图 2(图中不同小写字母表示乳化活性差异显著, 不同大写字母表示乳化稳定性差异显著, 下同)可以看出, 当处理温度低于 80°C 时, 热处理对 SPI 柔性的影响不大, 当热处理温度大于 80°C 时, 随着热处理温度的提高, SPI 的柔性不断上升, 并在 121°C 时柔性达到最高。伴随着柔性上升, SPI 乳化活性和乳化稳定性也不断上升, 这与 PALAZOLO 等^[14]的结果相似, 该研究也认为适当的热处理可以有效地提高大豆蛋白的乳化性质。而 KATO 等^[15]研究热处理对大豆伴球蛋白功能性质影响发现, 乳化性(乳化活性和乳化稳定性)与表面疏水性指数呈线性相关。

蛋白的柔性受氢键、范德华力、静电引力和疏水相互作用等非共价键影响, 高于 80°C 的热处理可以破坏这些键从而使 SPI 紧密的结构伸展开^[16], 柔性增大。而处理温度为 121°C 时, 蛋白柔性显著增大, 可能是由于高温处理使蛋白分子内二硫键断裂^[17], 造成柔性增加。柔性蛋白能快速吸附到界面, 使 SPI 更容易形成界面膜, 从而改善大豆分离蛋白的乳化性能^[8, 18-19]。

从图 3、4 可以看出, 当处理功率小于 300 W 时, 随着功率的增加, SPI 乳化活性和乳化稳定性都随

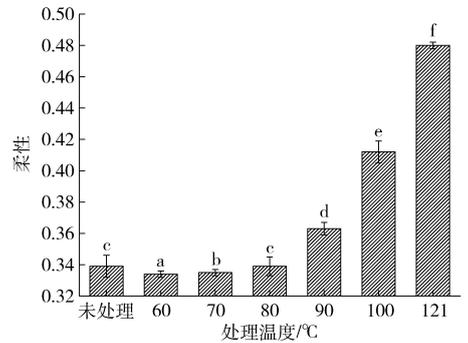


图 1 不同热处理条件对 SPI 柔性的影响

Fig. 1 Effect of different heat treatment conditions on flexibility of soy protein isolate

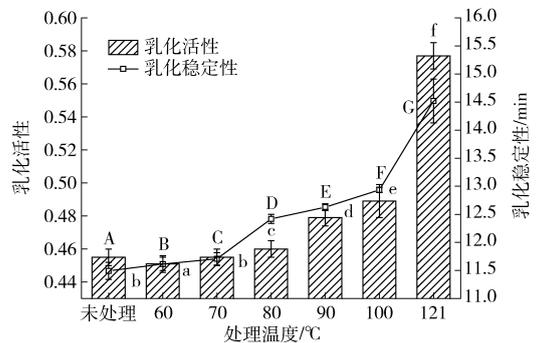


图 2 不同热处理条件对 SPI 乳化性的影响

Fig. 2 Effect of different heat treatment conditions on emulsion property of soy protein isolate

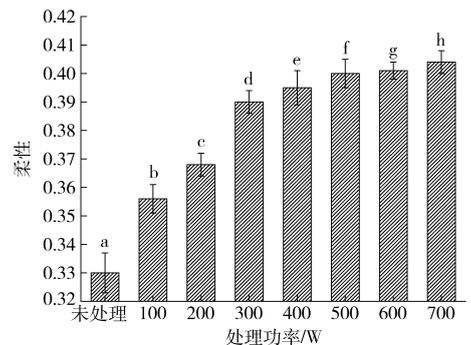


图 3 不同超声处理条件对 SPI 柔性的影响

Fig. 3 Effect of different ultrasonic treatment conditions on flexibility of soy protein isolate

柔性增加而增加, 当处理功率大于 300 W 时, 三者变化都不大。有研究表明, 超声产生的空化效应和机械效应会破坏蛋白质的四级结构, 同时释放出小分子的亚基和肽^[20], 使蛋白柔性增加而导致乳化性的上升。JAMBRACK 等^[21]研究表明, 超声处理可降低蛋白粒径, 使蛋白质分子质量显著降低, 还可改变蛋白中柔性区域与刚性区域的组成, 从而降低了蛋白柔性。

由图 5、6 可以看出, 随着均质压力的升高, SPI 柔性升高, 在均质处理压力为 350 MPa 时达到最高, 随后下降。而 SPI 乳化活性在 300 MPa 时达到最高, 乳化稳定性则在不断地上升。这归因于高压均

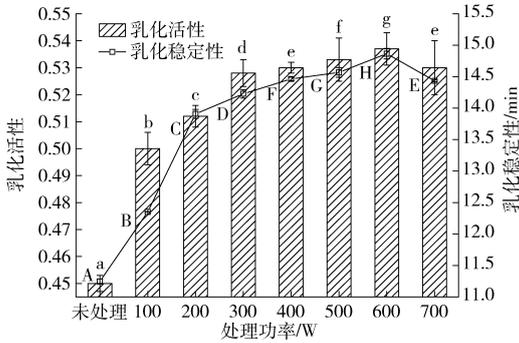


图4 不同超声处理条件对SPI乳化性的影响

Fig.4 Effect of different ultrasonic treatment conditions on emulsion property of soy protein isolate

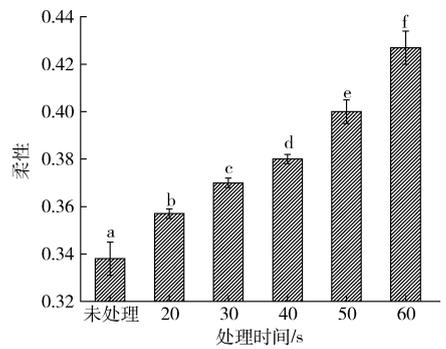


图7 不同微波处理条件对SPI柔性的影响

Fig.7 Effect of different microwave treatment conditions on flexibility and emulsion stability of soy protein isolate

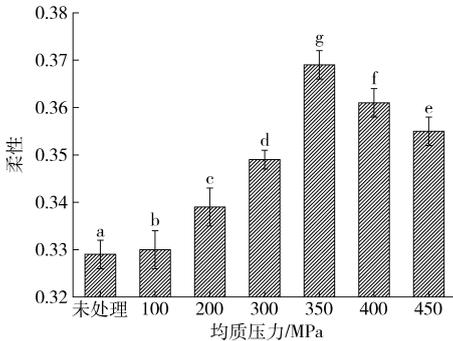


图5 不同高压均质处理条件对SPI柔性的影响

Fig.5 Effect of different high pressure homogenization conditions on flexibility of soy protein isolate

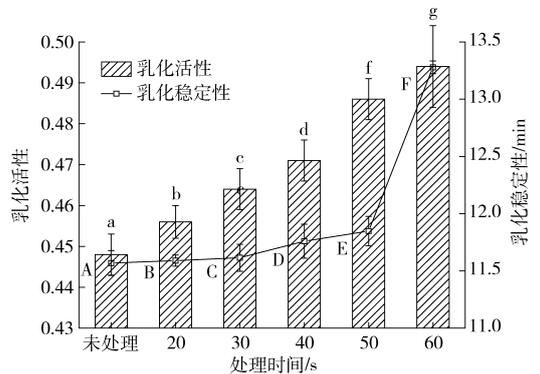


图8 不同微波处理条件对SPI乳化性的影响

Fig.8 Effect of different microwave treatment conditions on emulsion property of soy protein isolate

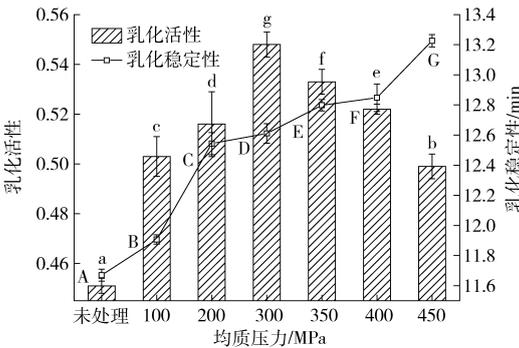


图6 不同高压均质处理条件对SPI乳化性的影响

Fig.6 Effect of different high pressure homogenization conditions on emulsion property of soy protein isolate

质产生的压力作用、高频振荡和对流撞击等机械力使SPI结构发生改变,增加了柔性,从而造成乳化性的提升^[22-23]。

由图7、8可以看出,随着微波处理时间的延长,SPI乳化活性和乳化稳定性随柔性上升都呈上升趋势,可能是由于微波场诱导SPI分子体系产生极化现象破坏了SPI的刚性结构,使柔性增加,内部的疏水残基暴露在蛋白表面,更容易在界面上展开和重排,促进水-油界面的形成^[18-19],使大豆分离蛋白乳化性质提高。BOHR等^[24]研究微波处理对球状蛋白构象的影响,发现微波处理可促进蛋白质结构的柔性展开,使蛋白质柔性增加,进而改善蛋白质的功

能特性。

2.3 SPI 柔性 与 乳化性 相关性 分析

为了进一步分析柔性 与 乳化活性 及 乳化稳定性 之间的关系,利用 Origin 7.5 对其关系进行函数拟合,结果见图9、10。

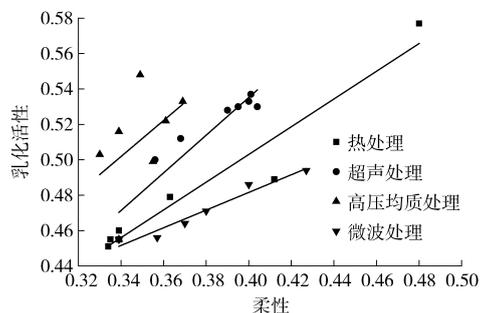


图9 4种改性条件下SPI柔性 与 乳化活性的关系

Fig.9 Relationships of emulsifying activity with flexibility of soy protein isolate combined with four modification conditions

由图9、10可知,经过热处理、超声处理、高压均质处理和微波处理以后,随着柔性的增加,乳化性和乳化稳定性呈现递增趋势,具有良好的线性相关关系,相关系数如表1所示。相对于其他处理条件,121℃热处理10min能得到最高的柔性和乳化活性,高压均质处理对SPI柔性影响小但对乳化活性

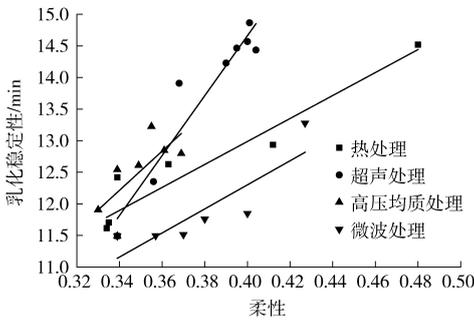


图 10 4 种改性条件下 SPI 柔性与其乳化稳定性的关系

Fig. 10 Relationships of emulsion stability with flexibility of soy protein isolate combined with four modification conditions

表 1 4 种改性条件下乳化活性、乳化稳定性与柔性相关性系数

Table 1 Correlation coefficients of emulsifying activity and emulsion stability with flexibility of soy protein combined with four modification conditions

参数	相关性系数			
	热处理	超声处理	高压均质处理	微波处理
乳化活性	0.969 **	0.942 **	0.771	0.976 **
乳化稳定性	0.950 **	0.954 **	0.720	0.862 *

注: ** 表示极显著 ($P < 0.01$); * 表示显著 ($P < 0.05$)。

影响大。

由表 1 可知,热处理、超声处理条件下 SPI 柔性与其乳化活性、乳化稳定性呈极显著正相关,相关性系数分别为 0.969、0.950 和 0.942、0.954。超高压均质处理条件下 SPI 柔性与其乳化活性、乳化稳定性呈正相关,相关性系数分别为 0.771、0.720。微波处理条件下 SPI 柔性与其乳化活性呈极显著正相关,与乳化稳定性呈显著正相关,相关性系数分别为 0.976、0.862。

TORNBERG^[25] 认为在形成乳液的过程中蛋白质分子首先通过扩散和/或对流作用从体相溶液扩散到界面附近,并形成界面层,此过程受蛋白浓度、蛋白粒度、表面疏水性等因素的影响;其次,大部

分蛋白质分子在界面发生结构展开;最后,吸附的蛋白质分子以更加紧凑的结构在界面上重排。不同的物理改性方法以不同的方式破坏了 SPI 的刚性结构,造成柔性的上升,使 SPI 更容易在界面展开并快速吸附,从而提高了 SPI 的乳化性(乳化活性、乳化稳定性)。这与 KITTIPHATTANABAWON^[26] 的观点一致。KREBS 等^[27] 探究了蛋白质分子结构特性与界面蛋白构象变化的关系,证实了柔性蛋白比球蛋白更易在界面上展开和重排。MIN 等^[28] 采用尿素和二巯基苏糖醇(DTT)分别破坏蛋白质分子刚性结构的非共价和二硫键,得到更加柔性的蛋白,从而加速了蛋白质分子在界面上的展开和重排。

也有理论认为,由于能垒的存在,当蛋白质分子到达界面后,不能立刻发生吸附,需要克服能垒后才能发生真实的吸附,能垒的大小与蛋白质分子表面和界面间相互作用的情况相关^[29]。通过外加处理改变 SPI 柔性也许可以降低吸附过程的能垒,从而提高 SPI 的乳化性质^[30]。

3 结论

(1) 各个改性方式对 SPI 柔性和乳化性产生不同的影响且乳化性随柔性的上升而上升。与其他处理条件相比,121℃ 热处理 10 min 得到最高的柔性和乳化活性,高压均质处理对 SPI 柔性影响小但对乳化活性影响大。

(2) 热处理、超声处理条件下 SPI 柔性与其乳化活性、乳化稳定性呈极显著正相关,相关性系数分别为 0.969、0.950 和 0.942、0.954。超高压均质处理条件下 SPI 柔性与其乳化活性、乳化稳定性呈正相关,相关性系数分别为 0.771、0.720。微波处理条件下 SPI 柔性与其乳化活性呈极显著正相关,与乳化稳定性呈显著正相关,相关性系数分别为 0.976、0.862。

参 考 文 献

- 1 NISHINARI K, FANG Y, GUO S, et al. Soy proteins: a review on composition, aggregation and emulsification[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39(2):301-318.
- 2 FRIEDMAN M, BRANDON D L. Nutritional and health benefits of soy proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(3):1069-1086.
- 3 LEI M, LI B, HAN F, et al. Evaluation of the chemical quality traits of soybean seeds, as related to sensory attributes of soymilk[J]. Food Chemistry, 2015, 173(15):694-704.
- 4 NAKAI S, MODLER H W. Food proteins: properties and characterization[J]. Food Proteins Properties and Characterization, 1997, 75(3):199-200.
- 5 KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1980, 624(1):13-20.
- 6 NIR I, FELDMAN Y, ASERIN A, et al. Surface properties and emulsification behavior of denatured soy proteins[J]. Journal of Food Science, 1994, 59(3):606-610.

- 7 DAMODARAN S, PARAF A. Food proteins and their applications[J]. Food Science and Technology, 1997, 142(12):1992.
- 8 TANG C H, SHEN L. Role of conformational flexibility in the emulsifying properties of bovine serum albumin[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(12):3097-3110.
- 9 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.
- 10 POON S, AND A E C, SCHULTZ C J. Effect of denaturation on the emulsifying activity of proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(1):281-286.
- 11 SORAGENTINI D A, WAGNER J R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins[J]. Food Chemistry, 1999, 23(5):489-507.
- 12 KATO A, IBRAHIM H R, WATANABE H, et al. Structural and gelling properties of dry-heating egg white proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38(1):32-37.
- 13 TANG S, HETTIARACHCHY N S, HORAX R, et al. Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes[J]. Journal of Food Science, 2006, 68(1):152-157.
- 14 PALAZOLO G G, MITIDIERI F E, WAGNER J R. Relationship between interfacial behaviour of native and denatured soybean isolates and microstructure and coalescence of oil in water emulsions—effect of salt and protein concentration[J]. Food Science & Technology International, 2003, 9(6):409-419.
- 15 KATO A, OSAKO Y, MATSUDOMI N, et al. Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1983, 47(1):33-37.
- 16 ERIK M F, KANG S Y, GERALD G F, et al. Interfacial rheology of globular and flexible proteins at the hexadecane/water interface: comparison of shear and dilatation deformation[J]. Journal of Physical Chemistry B, 2004, 108(12):3835-3844.
- 17 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 & Food Chemistry, 2012, 60(12):3302-3310.
- 18 BASZKIN A, NORDE W. Physical chemistry of biological interfaces[M]. Wageningen, UR:2000.
- 19 MOLINA E, PAPADOPOULOU A, LEDWARD D A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins [J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15(3):263-269.
- 20 JING L, CAI Y, WEI W U, et al. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates [J]. Food Research International, 2014, 62(6):595-601.
- 21 JAMBRAK A R, MASON T J, LELAS V, et al. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 121(1):15-23.
- 22 TANG C H, WANG X S, YANG X Q. Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa*, L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2009, 114(4):1484-1490.
- 23 KEERATI-U-RAI M, CORREDIG M. Effect of dynamic high pressure homogenization on the aggregation state of soy protein[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(9):3556-3562.
- 24 BOHR H, BOHR J. Microwave-enhanced folding and denaturation of globular proteins[J]. Physical Review E Statistical Physics Plasmas Fluids and Related Interdisciplinary Topics, 2000, 61(4):4310-4314.
- 25 TORNBERG E. The application of the drop volume technique to measurements of the adsorption of proteins at interfaces[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1978, 64(3):391-402.
- 26 KITTIPHATTANABAWON P, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Characterization of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chemistry, 2005, 89(3):363-372.
- 27 KREBS K E, PHILLIPS M C. The contribution of α -helices to the surface activities of proteins [J]. FEBS Letters, 1984, 175(2):263-266.
- 28 MIN D J, WINTERTON L, ANDRADE J D. Behavior of model proteins, pretreated in urea and/or dithiothreitol, at air/solution interfaces[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 1998, 197(1):43-47.
- 29 SENGUPTA T, LEV RAZUMOVSKY A, DAMODARAN S. Energetics of protein-interface interactions and its effect on protein adsorption[J]. Langmuir, 1999, 15(20):6991-7001.
- 30 NAKAI S, LI-CHAN E. Hydrophobic interactions in food systems[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., 1988.