

高压均质对大豆蛋白柔性和乳化性的影响及相关性分析

王喜波 徐晔晔 于洁 王健 王小丹 江连洲

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 以大豆分离蛋白(Soy protein isolate, SPI)对胰蛋酶的敏感性表征其柔性,研究不同均质压力(0~200 MPa)对SPI柔性和乳化性的影响,并探索SPI结构变化及其柔性与乳化性之间的相关性。结果表明,当均质压力为0~160 MPa时, SPI柔性随着均质压力的增加而增加,160~180 MPa时柔性变化不明显,当均质压力为180~200 MPa时, SPI柔性又呈现下降的趋势。表面疏水性随着均质压力的增大而增大,而浊度则随之减小,柔性随均质压力的变化趋势与乳化性随均质压力的变化趋势一致。相关性分析结果表明:SPI柔性 与乳化活性和乳化稳定性呈线性正相关关系,相关系数分别为0.893和0.938。紫外扫描、内源性色氨酸荧光光谱研究发现,随着SPI柔性的增加,其结构变得更加舒展。

关键词: 大豆分离蛋白; 高压均质处理; 柔性; 乳化特性; 相关性分析

中图分类号: TS201.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2018)06-0362-06

Effect of High Pressure Homogenization on Flexibility and Emulsifying Properties of Soy Protein Isolate and Correlation Analysis

WANG Xibo XU Yeye YU Jie WANG Jian WANG Xiaodan JIANG Lianzhou

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

Abstract: The sensitivity of soy protein isolate to trypsin was characterized by its flexibility. The effects of different homogenization pressures (0~200 MPa) on soy protein isolate flexibility and emulsifying properties were investigated. The changes of soy protein isolate structure and the correlation analysis between flexibility and emulsifying properties (emulsifying activity and emulsion stability) were also investigated. The results showed that when the homogenization pressure was 0~160 MPa, the soy protein isolate flexibility was increased with the increase of the homogenization pressure, while the flexibility did not change obviously at 160~180 MPa. When the homogenization pressure was 180~200 MPa, the soy protein isolate flexibility was declined. The surface hydrophobicity was increased with the increase of homogeneous pressure, while the turbidity was decreased. The changing tendency and flexibility of the emulsification property with homogeneous pressure were consistent with the homogeneous pressure. Correlation analysis suggested that the soy protein isolate flexibility had a linear positive correlation with the emulsifying activity and the emulsifying stability, and the correlation coefficients were 0.893 and 0.938, respectively. Through ultraviolet spectral scanning analysis of soy protein isolate and endogenous tryptophan fluorescence spectroscopy analysis, it was found that as the conformational flexibility of soy protein isolate was increased, the structure became more stretch.

Key words: soy protein isolate (SPI); high pressure homogenization; flexibility; emulsifying properties; correlation analysis

0 引言

大豆分离蛋白(SPI)由于其高度的营养和功

能特性而被广泛应用于许多基于蛋白质的食品配方中^[1]。其中SPI柔性指的是当蛋白质所处周围环境变化时,其结构能够发生改变的能力^[2],通过

收稿日期: 2017-12-20 修回日期: 2018-01-22

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,博士,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

蛋白酶消化检测的蛋白质结构柔性可能是控制乳化的重要结构因素^[3]。TANG 等^[4]通过 S-S 裂解研究了牛血清白蛋白的构象柔性和乳化性质,发现蛋白质(在溶液中)的构象柔性在其乳化特性的不同方面起着至关重要的作用。高压均质是在制药、食品和化妆品领域研究中被广泛应用的一种非热技术,需要高能量输入来制备液滴尺寸在亚微米范围内的乳液,一般通过高剪切搅拌、高压均质机或超声波引发器获得^[5]。在均质化过程中,流体受到空穴爆炸力、湍流、剪切、摩擦、热、压缩、加速、快速压降和碰撞等各种力的同时作用而形成一种精细的、均匀的乳液^[6]。近年来对于高压均质对蛋白结构和功能性质之间构效关系的研究已经获得了广泛的关注,然而,关于高压均质对 SPI 柔性的影响及柔性与乳化特性相关性关系分析还鲜有报道。

本文将柔性的概念引入高压均质改性中,研究均质压力对 SPI 柔性、乳化特性以及其他结构特性的影响,并分析 SPI 柔性、乳化特性之间的关系,以期在实际生产提供理论支持。

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(十二烷基硫酸钠)、Tris(三羟甲基氨基甲烷)、胰蛋白酶、ANS 荧光探针, 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;实验型高压均质机,英国 Stansted Fluid Power 公司;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;紫外分光光度计,美国布鲁克海文仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 SPI 制备

根据 SORAGENTINI 等^[7]的方法略作修改,大豆经粉碎机粉碎并过 60 目筛,再经索氏提取器用乙醚提取后获得脱脂豆粕。将脱脂豆粕与蒸馏水以料液比 10 mg/L 的比例混合。用 2 mol/L NaOH 调体系 pH 值为 8.5,室温(20℃)低速搅拌 2 h。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,取沉淀进行离心(4 000 g,5 min),沉

淀水洗两次,复溶后调 pH 值至 7.0,冷冻后进行冷冻干燥。

1.3.2 SPI 成分测定

蛋白含量测定采用凯氏定氮法(GB 5009.5—2010);含水率测定采用直接干燥法(GB 5009.3—2010);灰分含量测定参照 GB 5009.4—2010;粗脂肪测定参照 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 5 mg/mL,室温搅拌 2 h,再使用 T18 Basic 型高速分散机处理 1 min,转速为 10 800 r/min,然后在 4℃静置水化 12 h。

1.3.4 高压均质处理

将制备好的样品取出搅拌均匀至室温,用高压均质机处理,设定均匀压力分别为 0、40、60、80、100、120、140、160、180、200 MPa。

1.3.5 柔性测定

参照 KATO 等^[8]的方法略作修改。利用 SPI 对胰蛋白酶的敏感性来表征柔性。取 250 μL 1 mg/mL 酶液(0.05 mol/L、pH 值 8.0 Tris-HCl 缓冲液)加入到 4 mL 1 mg/mL 处理后 SPI 蛋白溶液中(蛋白与酶质量比为 16:1),38℃保温酶解 5 min,酶解反应结束后,加 4 mL 5% TCA(三氯乙酸)终止反应,离心后取上清液测定其在 280 nm 吸光度,用吸光度 A 表征量化柔性。

1.3.6 表面疏水性测定

参照 SCHMAL 等^[9]方法并略作改动。用浓度 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 值 7.0)将 SPI 样品溶液稀释到 2 mg/mL,再稀释为样品质量浓度分别为 0.1、0.05、0.002 5、0.001 25 mg/mL,加入 20 μL 的ANS(8 mmol/L ANS,溶于 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液,pH 值 7.0)荧光探针,混匀后在室温下避光 15 min 后测定 SPI 样品的荧光强度,同时设定激发波长为 390 nm,发射波长为 470 nm,狭缝宽度 5 nm,测得的荧光强度对蛋白溶液质量浓度作图,选择线性关系良好的回归线斜率作为蛋白质表面疏水性指数。

1.3.7 浊度测定

参照 KURGANOV^[10]的方法并略作改动。将处理后的 SPI 样品溶液稀释至 3 mg/mL,混合均匀后在波长 400 nm 测定其吸光度,用所得光密度(OD 值)表示浊度,所有测定结果重复 3 次。

1.3.8 粒径测定

将处理过的 SPI 样品用去离子水稀释到 1 mg/mL,在粒度测定仪上进行粒度的测定,每个蛋白样品检测 3 次。

1.3.9 内源性色氨酸荧光光谱测定

参照 LIU 等^[11]的方法并略作改动。处理后的 SPI 样品稀释到 0.2 mg/mL 进行测定,同时设定激发波长为 290 nm,发射波长范围为 300 ~ 460 nm,狭缝宽度均为 2.5 nm,电压为 700 mV 进行荧光光谱扫描,所有测定结果重复 3 次。

1.3.10 紫外扫描

参照 LIANG 等^[12]的方法并略作改动。处理后的 SPI 样品稀释至 0.2 mg/mL 后进行紫外扫描,扫描波长范围 150 ~ 500 nm,扫描速率 100 nm/min,分辨率为 0.2 nm,所有测定结果重复 3 次。

1.3.11 乳化性测定

参照 TANG 等^[13]的方法。将处理后的 SPI 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 混合,分散机 10 000 r/min 处理 1 min,迅速吸取底部乳液 50 μ L 加入到 5 mL 0.1% SDS 溶液中,在漩涡混合器上混合均匀。分别测定 0 min 和 10 min 时吸光度,乳化活性用吸光度 A 表示,乳化稳定性的计算公式为

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

式中 E ——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

1.3.12 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,数据间差异显著性采用 SPSS 17.0 进行数据统计分析,试验数据用 Origin 9.0 绘制。

2 结果与分析

2.1 大豆分离蛋白的组成

试验制得的 SPI 蛋白质量分数、含水率、灰分质量分数和粗脂肪质量分数分别为 (90.22 $\pm$ 0.44)%、(3.24 $\pm$ 0.67)%、(3.39 $\pm$ 0.53)% 和 (0.47 $\pm$ 0.56)%,符合试验要求^[14]。

2.2 均质压力对 SPI 柔性的影响

在不同均质压力处理条件下,SPI 柔性随着均质压力的增大而呈现增大的趋势,在均质压力范围为 0 ~ 160 MPa 时,SPI 柔性随着均质压力的增大而增大,180 MPa 时,柔性变化趋势不明显,这是因为高压均质产生了强大剪切力、撞击力及空穴爆炸力,均质压力处理对 SPI 的三级和四级结构有显著的影响,并通过非共价键的切割破坏了 SPI 蛋白内部的刚性结构^[15-16],导致柔性的上升,且随着均质压力的上升,破坏强度增大。当均质压力为 200 MPa 时,SPI 柔性表现出下降的趋势,这可能是由于通过

SH/S-S 交换连接形成分子间二硫键,压力过大而引起了蛋白亚基的聚集^[17-18]。

2.3 均质压力对 SPI 表面疏水性指数的影响

TEDFORD 等^[15]指出均质压力使弱氢键和分子间作用力之间裂解从而导致蛋白质分子结构的变化。SPI 表面疏水性指数随着均质压力的增加而上升,表明高压均质的作用会使 SPI 蛋白质分子进一步伸展,原来隐藏在 SPI 内部的疏水基团随着均质压力的增加而逐渐暴露于外部,使得 SPI 结构变得更加伸展。当均质压力为 200 MPa 时,SPI 表面疏水性指数大幅增加,这可能是因为高压处理 SPI 时强剪切力对 SPI 内部隐藏的疏水性基团进行切割,更多的疏水性基团暴露,SPI 表面疏水性指数大幅增加,柔性随均质压力变化趋势与表面疏水性指数随均质压力变化的趋势相近。SPI 表面疏水性指数的增加可以增强 SPI 的乳化活性,这是因为高压均质处理改善了大豆蛋白质,特别是 β -伴大豆球蛋白的 β -亚基和大豆球蛋白的酸性亚基吸附在油-水乳液的油/水界面处的能力^[19],因此,SPI 表面疏水性指数的增加意味着乳化活性也随之增强。

2.4 均质压力对 SPI 浊度的影响

随着均质压力的增加,SPI 浊度逐渐降低,这是因为未高压均质处理的蛋白质在底部沉积有大量高分子聚合物,蛋白质溶液不均匀,故 SPI 浊度较大。CROMWELL 等^[20]认为浊度与溶液中聚集体大小和数量有关,当较大的 SPI 颗粒在高压均质条件下处理后可以加工成稳定的乳液或悬浮液细颗粒,导致溶液浊度的降低,并且均质压力越大,浊度越低,这可能是由于高压均质处理产生了更加灵活和低分子量的聚集体,这些聚集体迅速移动到气-液界面并展开,导致表面张力的有效降低^[21]。IBANOĞLU 等^[22]在乳清蛋白分离物中也发现了类似结果,推测蛋白质分子变得更小,更易于在高压下以更快的速度在界面吸附,形成均匀稳定的乳液,即浊度降低。

2.5 均质压力对 SPI 粒径的影响

FERNÁNDEZÁVILA 等^[23]研究发现,超高压 (100 MPa 和 200 MPa) 乳液表现出低粒度和多分散性,而 HEBISHY 等^[24]研究发现,均质压力的增加能够产生更多的微小液滴。理论上,粒度的分布可以全面反映样品溶液中颗粒的大小和均匀性。如图 1 所示,未进行均质处理的 SPI 粒径在 948.5 nm 左右分布,高压均质处理会导致 SPI 粒径的降低,在一定均质压力条件下,随着均质压力的增加而效果变好,表明 SPI 蛋白分子被解离成更小的分子,这可能是造成柔性上升的原因之一,这与体系浊度的测定结果相似,当均质压力大于 160 MPa 时,粒径又呈现增

大的趋势且增加不明显,这可能是因为被解离的 SPI 分子部分重新聚集,聚集可能是由于高压引起蛋白质解折叠和/或聚集,这些处理通过形成新的二硫键而形成复杂的聚集体^[25],造成蛋白亚基的聚集,这与柔性的变化趋势一致。

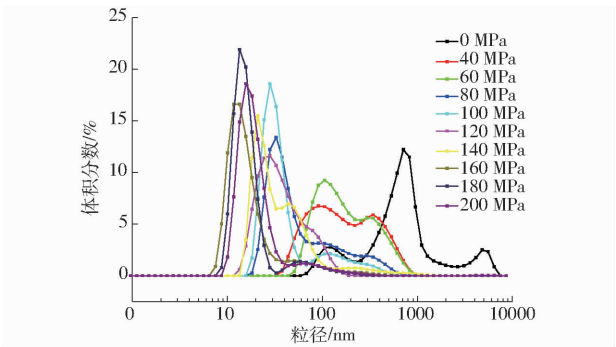


图 1 均质压力对 SPI 粒径的影响

Fig. 1 Effect of homogeneous pressure treatment on particle size of SPI

2.6 SPI 内源性色氨酸荧光光谱分析

荧光光谱法是一种非常成熟的技术,用于观察蛋白质构象变化,以及研究蛋白质基质在加工或储存过程中的变化,在蛋白质中,主要的荧光基团是色氨酸的吲哚基团,其发射对溶剂极性非常敏感^[26-28]。因此,蛋白质的荧光光谱由荧光氨基酸的化学环境决定,色氨酸(Trp)光谱的变化可以用于鉴定蛋白质的构象变化^[29]。如图 2 所示,内源性荧光强度随着均质压力的增加而增加,这与浊度变化趋势一致,表明随着柔性的增加,SPI 空间结构发生变化,色氨酸残基暴露于蛋白质分子表面,蛋白质的疏水区域局部改变,发色基团如色氨酸残基所处环境由非极性向极性转化,这可能是由高压均质处理导致 SPI 蛋白分子部分解折叠造成的,即随着柔性的增加,SPI 三级结构变得更加舒展。

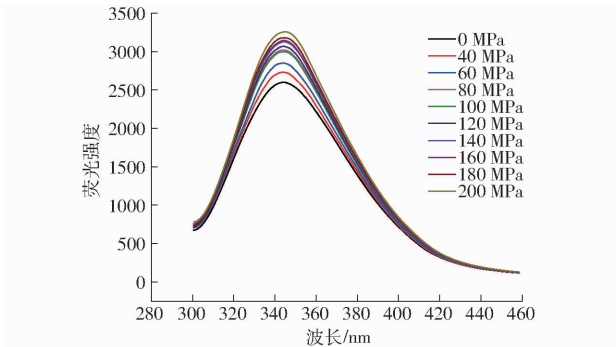


图 2 SPI 内源性色氨酸荧光光谱分析

Fig. 2 Analysis of endogenous tryptophan fluorescence of SPI

2.7 SPI 紫外扫描光谱分析

蛋白质产生紫外吸收主要是由于蛋白中的发色基团对紫外光的吸收作用,发色基团包括色氨酸和酪氨酸残基侧链基团,根据对紫外光谱吸收的不同,可

以推断蛋白质分子构象的变化^[30],如图 3 所示,随着均质压力的增加,紫外吸收下降,说明 SPI 分子中具有紫外吸收的氨基酸残基(如酪氨酸残基等)因均质处理而暴露在蛋白分子的表面,发色基团所处的环境由非极性向极性变化,均质处理促使蛋白多肽链局部展开,蛋白分子柔性增大。这与浊度变化趋势一致。这更加印证了内源性色氨酸荧光光谱的结果,随着蛋白柔性的增加,SPI 结构变得更加的舒展。

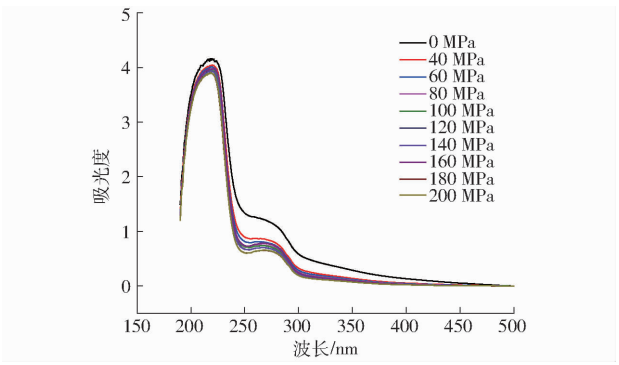


图 3 SPI 紫外图谱分析

Fig. 3 Analysis of SPI by ultraviolet scanning spectrometry

2.8 均质压力对 SPI 乳化活性和乳化稳定性的影响

如图 4 所示,当均质压力不大于 160 MPa 时,乳化活性随着均质压力的增加而增加,这与杨盛楠等^[31]的结果一致,即在一定均质压力范围内,随着均质压力的增大,SPI 乳化活性增加,当压力为 160 MPa 时乳化活性最大,随后乳化活性又呈现下降的趋势,而乳化稳定性随着均质压力的变化趋势与乳化活性随均质压力的变化趋势相似,当压力为 180 MPa 时乳化稳定性最大,这与柔性变化趋势较相近。SPI 柔性增强,原先包含在分子内部的疏水性基团暴露出来,增强了蛋白的亲油性,宏观表现为蛋白乳化能力的提高。

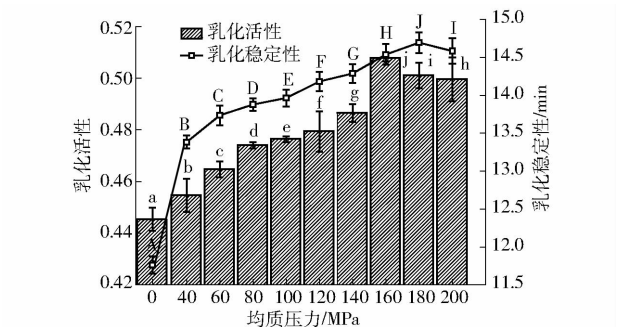


图 4 均质压力对 SPI 乳化特性的影响

Fig. 4 Effect of homogeneous pressure treatment on emulsification properties of SPI

注:不同大写字母表示乳化稳定性差异显著($P < 0.05$),不同小写字母表示乳化活性差异显著($P < 0.05$)。

2.9 SPI 柔性与乳化性的关系

由图 5、6 可知,在各高压均质压力条件下,随着

柔性的增加,乳化活性和乳化稳定性均呈现递增趋势,具有良好的线性相关关系,其中,SPI 柔性、乳化活性、乳化稳定性的线性拟合模型函数分别为 $y = 1.4858x + 0.0169$ 、 $y = 34.062x + 3.5206$, 相关系数分别为0.893、0.938,当均质压力为180 MPa

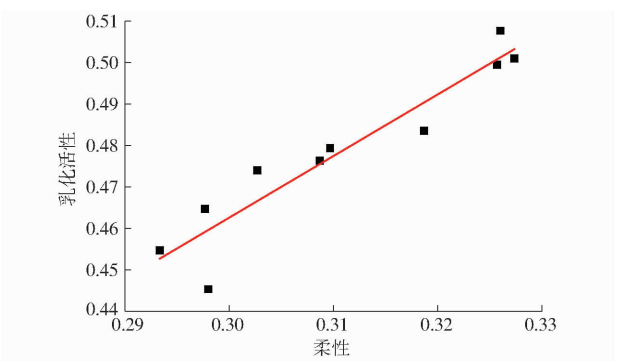


图5 柔性与乳化活性的关系

Fig.5 Relationship between flexibility and emulsifying activity of SPI

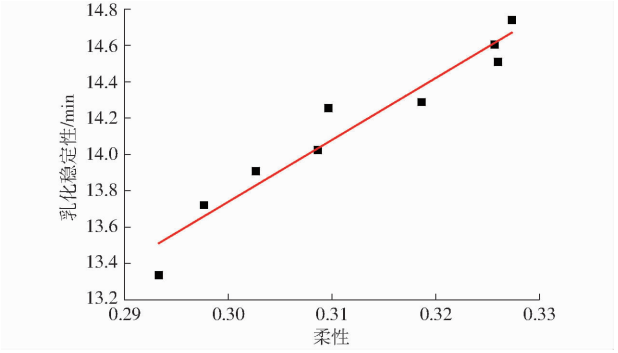


图6 柔性与乳化稳定性的关系

Fig.6 Relationship between flexibility and emulsification stability of SPI

时,SPI 柔性、乳化活性、乳化稳定性可以达到最大,且高压均质处理对乳化活性和乳化稳定性的影响略大于柔性。

中性大豆蛋白经过高压均质处理可以提高这些蛋白的乳化活性^[32],形成具有抗絮凝现象和高界面蛋白浓度的油滴乳液^[15],YU 等^[33]发现高压均质处理可以改善贻贝分离蛋白的乳化活性和乳化稳定性。关于柔性和乳化性的关系研究,其中KITTI PHATTANABAWON 等^[34]认为,蛋白质的乳化性与分子的柔性有关,柔性的增加可以促进蛋白质分子向界面移动,并有助于蛋白分子在界面上发生重排,王喜波等^[35]的研究结果表明,超高压(100 ~ 450 MPa)均质处理条件下,SPI 柔性、乳化活性、乳化稳定性呈正相关关系。

3 结论

(1)当均质压力为 0 ~ 160 MPa 时,SPI 柔性随着均质压力的增加而增加,160 ~ 180 MPa 时柔性变化不明显,当均质压力为 180 ~ 200 MPa 时,SPI 柔性又呈现下降的趋势。

(2)表面疏水性随着均质压力的增大而增大,而浊度则随之减小。乳化特性随均质压力的变化趋势与柔性随均质压力的变化趋势相似,紫外扫描、内源性色氨酸荧光光谱研究发现,随着 SPI 柔性的增加,其结构变得更加舒展。

(3)在不同均质压力处理条件下,SPI 柔性、乳化活性、乳化稳定性呈显著性正相关关系,相关系数分别为 0.893 和 0.938。

参 考 文 献

1 KINSELLA J E. Functional properties of soy proteins[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1979, 56(3):242-258.

2 TANG C H. Emulsifying properties of soy proteins: a critical review with emphasis on the role of conformational flexibility[J]. Critical Review in Food Science and Nutrition, 2017, 57(12):2636-2679.

3 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(33):931-934.

4 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.

5 WEISS J, TAKHISTOV P, MCCLEMENTS J. Functional materials in food nanotechnology[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(9):R107-R116.

6 FLOURY J, DESRUMAUX A, LARDIÈRES J. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of model oil-in-water emulsions[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2000, 1(2):127-134.

7 SORAGENTINI D A, WAGNER J R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins[J]. Journal of Food Biochemistry, 2010, 23(5):489-507.

8 KATO A, IBRAHIM H R, WATANABE H, et al. Structural and gelling properties of dry-heated egg white proteins[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2002, 38(1):32-37.

9 SCHMAL H, NIEMEYER P, ZWINGMANN J, et al. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins[J]. Journal of Food Science, 1985, 50(2):486-491.

10 KURGANOV B I. Kinetics of protein aggregation. Quantitative estimation of the chaperone-like activity in test-systems based on suppression of protein aggregation[J]. Biochemistry, 2002, 67(4):409-422.

11 LIU Y, ZHAO G, ZHAO M, et al. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran

- through Maillard reaction[J]. Food Chemistry, 2012, 131(3): 901–906.
- 12 LIANG H N, TANG C H. Emulsifying and interfacial properties of vicilins: role of conformational flexibility at quaternary and/or tertiary levels[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(46): 11140–11150.
- 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 FERNÁNDEZ-ÁVILA C, TRUJILLO A J. Ultra-high pressure homogenization improves oxidative stability and interfacial properties of soy protein isolate-stabilized emulsions[J]. Food Chemistry, 2016, 209:104–113.
- 15 TEDFORD L A, SMITH D, SCHASCHKE C J. High-pressure processing effects on the molecular structure of ovalbumin, lysozyme, and beta-lactoglobulin[J]. Food Research International, 1999, 32, 101–106.
- 16 HAYAKAWA I, LINKO Y-Y, LINKO P. Mechanism of highpressure denaturation of proteins[J]. LWT—Food Science and Technology, 1996, 29(8): 756–762.
- 17 GALAZKA V B, DICKINSON E, LEDWARD D A. Emulsifying behavior of 11S globulin *Vicia faba* in mixtures with sulphated polysaccharides: comparison of thermal and high-pressure treatments[J]. Food Hydrocolloids, 1999, 13(5): 425–435.
- 18 GALAZKA V B, SMITH D, LEDWARD D A, et al. Interactions of ovalbumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength, heat and high-pressure treatment[J]. Food Hydrocolloids, 1999, 13(2): 81–88.
- 19 PUPPO M C, SPERONI F, CHAPLEAU N, et al. Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins [J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(2):289–296.
- 20 CROMWELL M E M, HILARIO E, JACOBSON F. Protein aggregation and bioprocessing [J]. The Journal of American Association of Pharmaceutical Scientists, 2006, 8(3):E572–E579.
- 21 YUAN B, REN J Y, ZHAO M M, et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with pepsin and high-pressure homogenization on the functional properties of soybean protein isolate[J]. LWT—Food Science and Technology, 2012, 46(2):453–459.
- 22 IBANOĞLU E, ŞÜKRÜ KARATAŞ, IBANOĞLU E, et al. High pressure effect on foaming behaviour of whey protein isolate[J]. Journal of Food Engineering, 2001, 47(1):31–36.
- 23 FERNÁNDEZ-ÁVILA C, ESCRIU R, TRUJILLO A J. Ultra-high pressure homogenization enhances physicochemical properties of soy protein isolate-stabilized emulsions[J]. Food Research International, 2015, 75:357–366.
- 24 HEBISHY E, BUFFA M, JUAN B, et al. Ultra high-pressure homogenized emulsions stabilized by sodium caseinate: effects of protein concentration and pressure on emulsions structure and stability[J]. LWT—Food Science and Technology, 2017, 76:57–66.
- 25 WANG W, ZHU Y, CHEN T, et al. Kinetic and thermodynamic analysis of ultra-high pressure and heat-induced denaturation of bovine serum albumin by surface plasmon resonance[J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2017, 16(8):1965.
- 26 CASTELAIN C, GENOT C. Conformational changes of bovine serum albumin upon its adsorption in dodecane-in-water emulsions as revealed by front-face steady-state fluorescence[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1994, 1199(1):59–64.
- 27 GRANGER C, COSTA J P D, TOUTAIN J, et al. Mapping of ice cream formulation using front-face fluorescence spectroscopy [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(5):489–496.
- 28 TAY S L, KASAPIS S, PERERA C O, et al. Functional and structural properties of 2S soy protein in relation to other molecular protein fractions. [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(16):6046.
- 29 LAKOWICZ J R. Principles of fluorescence spectroscopy[J]. Naturwissenschaften, 1991, 78(10):456–457.
- 30 RUSSO J M, GONZÁLEZ-PÉREZ A, PRIETO G, et al. Study of the interactions between lysozyme and a fully-fluorinated surfactant in aqueous solution at different surfactant-protein ratios[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2003, 33(1):67–73.
- 31 杨盛楠, 翟爱华. 高压均质对大豆分离蛋白功能性质的影响[J]. 中国酿造, 2014, 33(12):89–93.
YANG Shengnan, ZHAI Aihua. Effect of high pressure homogenization on the functional properties of soy protein isolate [J]. Chinese Brewing, 2014,33(12):89–93. (in Chinese)
- 32 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.
- 33 YU C, CHA Y, WU F, et al. Effects of high-pressure homogenisation on structural and functional properties of mussel (*Mytilus edulis*) protein isolate[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2018,53(5):1157–1165.
- 34 KITTIPIHATTANABAWON P, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) [J]. Food Chemistry, 2005, 89(3):363–372.
- 35 王喜波, 王健, 张泽宇,等. 物理改性对大豆蛋白柔性及乳化性的影响及其相关性分析[J/OL]. 农业机械学报, 2017, 48(7):339–344. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20170743&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2017.07.043.
WANG Xibo, WANG Jian, ZHANG Zeyu, et al. Effect of physical modification on the flexibility and emulsification of soybean protein and its correlation analysis[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(7):339–344. (in Chinese)