doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.03.039

# 空化微射流对米糠蛋白热聚集体结构及特性的影响

周麟 $ilde{x}^{1,2}$  干  $ilde{k}^1$  干中 $ilde{x}^2$  刘  $ilde{x}^3$  李汝 $ilde{h}^1$ (1. 大理大学工程学院, 大理 671000; 2. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 3. 临邑禹王植物蛋白有限公司, 临邑 251500)

摘要: 以米糠蛋白为研究对象,采用加热处理(pH值7.2、100℃、20min)制备热可溶性聚集体,分别对热聚集体进 行空化微射流(0、30、60、90、120 MPa)处理,以未经处理的可溶性米糠蛋白作为对照,探究空化微射流处理对可溶 性米糠蛋白聚集体结构特性(3D 微观结构、粒径分布、电位、表面疏水性、官能团、二三级结构)和乳化特性(乳化性 和乳化稳定性)的影响。结果表明:与热可溶性聚集体相比,经过空化微射流处理(90 MPa)后,3D 微观结构高度和 颗粒大小、总游离巯基含量、平均粒径和β-折叠含量降到最低,结构变得疏松;表面疏水性、乳化性指数及乳化稳定 性指数提高了 798.05、90.32 m<sup>2</sup>/g 和 281.68 min。低压(30~90 MPa)处理减小了热可溶性聚集体颗粒粒径,将不 溶性聚集体转化为可溶性聚集体,使其乳化特性增大;而高压(120 MPa)处理则会使蛋白发生聚集,乳化特性降低。 关键词:米糠蛋白;热聚集;空化微射流;结构性质;乳化特性 OSID:

文章编号: 1000-1298(2020)03-0341-09 中图分类号: TS210.4 文献标识码:A

# Effect of Cavitation Microjet on Structure and Properties of **Rice Bran Protein Thermal Aggregates**

ZHOU Linyi<sup>1,2</sup> WANG Chen<sup>1</sup> WANG Zhongjiang<sup>2</sup> LIU Jun<sup>3</sup> LI Ruheng<sup>1</sup>

2. College of Food, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

3. Linyi Yuwang Plant Protein Industry Co., Ltd., Linyi 251500, China)

Abstract: The heat-soluble aggregates were prepared by heat treatment (pH value 7.2,  $100^{\circ}$ , 20 min), and the cavitation microjet of different pressures (0, 30 MPa, 60 MPa, 90 MPa, 120 MPa) were respectively applied to the thermal aggregates. Impacts of cavitation microjet treatment on structural characteristics (3D microstructure, molecular weight distribution, functional group, particle size, potential and hydrophobicity) and emulsifying properties (emulsification and emulsion stability) of soluble rice bran protein aggregate were investigated by using soluble rice bran protein as a control. The results showed that compared with the heat-soluble aggregates, 3D microstructure height and particle size, total free sulfhydryl content, the average particle size and  $\beta$ -sheet content were reduced to the lowest point after cavitation microjet treatment (90 MPa), and the structure became loose; the surface hydrophobicity, emulsifying property and emulsion stability reached the maximum value, which was increased by 798.05, 90.32 m<sup>2</sup>/g and 281.68 min, respectively, compared with the heat-soluble aggregate. Low-pressure (30 ~ 90 MPa) micro-jet treatment would reduce the hot-soluble aggregate particles, convert the insoluble aggregate into soluble aggregates, and increase the emulsifying properties, while high pressure (120 MPa) would cause the protein to aggregate and the emulsifying properties would be slightly reduced.

Key words: rice bran protein; heat accumulation; cavitation microjet; structural properties; emulsification

<sup>(1.</sup> College of Engineering, Dali University, Dali 671000, China

收稿日期: 2019-09-09 修回日期: 2019-10-03

基金项目:山东省重点研发计划项目(2018YYSP026)

作者简介:周麟依(1987—),女,讲师,东北农业大学博士后,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究, E-mail: dorisneau@126.com 通信作者: 李汝恒(1962—), 男, 教授, 博士, 主要从事食品工程研究, E-mail: 47787114@ qq. com

# 0 引言

蛋白质的功能性是指蛋白质在食品体系中表现 出的物理化学性质的总称<sup>[1]</sup>,主要分为4类:水化性 质、界面性质、结构性质及感官性质。米糠蛋白 (RBP)的主要功能性质为结构性质和界面性质。界 面特性是蛋白质疏水性基团及亲水性基团的作用结 果,如乳化、起泡、成膜等。热处理是蛋白制品加工 中不可避免的操作单元,如热杀菌、喷雾干燥等。蛋 白质在热杀菌、喷雾干燥等加工过程中,极易受到温 度的影响而发生构象改变(即高级结构发生去折 叠),分子内部疏水残基逐渐暴露并且表面巯基含 量增高,高离子强度下形成疏水键的氨基酸残基在 加热作用下从蛋白分子内部转移到分子表面,这些 促使蛋白质通过化学作用力相互连接而逐渐聚集, 组分的聚集程度决定了蛋白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等[2-5]。 文献[6]研究发现, RBP 乳化性受其表面的静电作 用及 RBP 疏水基团的暴露情况的影响;文献[7]发 现 RBP 的溶解性与吸附脂质的能力成正比,会直接 影响油-水界面的形成,最终对 RBP 的乳化性质造 成影响。近年来,国内外学者对蛋白热诱导聚集领 域进行了大量的研究,研究热诱导聚集对蛋白功能 性质的影响,进而探寻因热聚集而引起功能衰减的 解决方法<sup>[8]</sup>。

现有研究表明,空化微射流具有强烈剪切力、高 速撞击力、高压瞬时释放和空穴效应等,在很大程度 上能改变蛋白的结构和性质,可以有效破坏分子间 的疏水以及静电相互作用,改变蛋白分子的三、四级 结构,减小粒径尺寸,提高蛋白聚集体的界面吸附稳 定性及疏水作用,进而提高蛋白的乳化特性。目前, 关于各种蛋白结构和功能特性的研究较多,文献[9] 探究了大米谷蛋白热聚集行为对其结构和功能特 性的影响,文献[10]研究了棉籽球蛋白在热处理 下的聚集行为、聚集体结构及其对凝胶特性的影 响,文献[11-12]发现微射流处理可提高米谷蛋 白和豌豆蛋白热聚集体结构和功能特性,但并未 见空化微射流处理对 RBP 热聚集体结构和特性的 影响研究。

本文采用加热方法诱导 RBP 形成聚集体,利用 空化微射流技术处理蛋白热聚集体,探究空化微射 流处理对聚集体结构特性(分子量分布、官能团、空 间结构、粒径、电位、疏水性)和乳化特性(乳化性和 乳化稳定性)的影响。分析空化微射流处理压强对 RBP 热聚集体乳化特性的影响,研究空化微射流调 控蛋白乳化特性的影响机制,为解决 RBP 在加工过 程中因热聚集造成的蛋白功能特性下降的难题提供 方法和理论基础。

# 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

RBP(纯度 90%),西安博联特化工有限公司; 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,北京鼎国昌盛生物技术有限责 任公司;过硫酸铵,北京鼎国昌盛生物技术有限责任 公司;2-硝基苯甲酸(DTNB),天津博迪化工有限公 司;乙二胺四乙酸(EDTA),天津博迪化工有限公 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

M-110EH 型空化微射流均质机,美国 MFIC 公 司;Asylum Research Cypher 型原子力显微镜,牛津 仪器科技(上海)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仪, 美国尼高力公司;Ultra-TurraxT25 型高速分散器, 德国 IKA 公司;ALPHA1-4LSC 型冷冻干燥机,德 国 Christ 公司;PHSJ-4A 型实验室 pH 计,上海雷磁 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;HH-6 型数显水浴锅,山东爱博科技 贸易有限公司。

#### 1.3 RBP 热聚集体的制备

将米糠蛋白溶于 0.01 mol/L pH 值 7.4 (含 NaN<sub>3</sub>质量浓度 0.5 mg/mL)的磷酸盐缓冲溶液配 成 10 mg/mL 的 RBP 溶液,将 RBP 溶液中置于 100℃恒温箱中20 min,诱导 RBP 发生热聚集,迅 速冰浴,冷却备用。将热聚集液体(TRBP)于空化 微射流中在 0、30、60、90、120 MPa 压力下处理 5 min,之后转移至低温离心机中 9 000 r/min 离心 20 min,留存上清液经过24 h 冷冻干燥后,加上可 溶性 RBP 即可得到 6 种蛋白样品,记为 SRBP、 STRBP、STRBP – 30MPa、STRBP – 60MPa、STRBP – 90MPa 和 STRBP – 120MPa。

#### 1.4 原子力显微镜(AFM)成像

参照文献 [13] 的方法,并稍作修改。取 2 μL 样品溶液(10 μg/mL)置于刚剥离的云母片上,室温 (20℃)干燥处理 10 min 后使用 Asylum Research Cypher 型原子力显微镜进行观察。操作条件:频率 为 320 kHz;扫描速度 1.0 Hz;硅尖的长度为 125 μm,力常数为42 N/m,针尖顶端曲率半径8 nm, 共振频率为 290 kHz,测试采用轻敲模式。以去离子 水样品作为空白样品进行观察,排除可能的底片 污染。

#### 1.5 指标测定

(1) 粒径分布

将样品配成 0.05 g/mL 的溶液,搅拌均匀后,缓 慢加入测量池中,当遮光度达到 8% 左右时停止加 样,用仪器测量其粒径和电位。

(2) 浊度

参照文献[14]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

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

式中 A——稀释乳液在 600 nm 处的吸光度

V----稀释倍数

*I*——光程差,取0.01 m

(3)电位

采用 Zetasizer Nano ZSP 型粒度仪测定蛋白溶 液的 ζ-电位。测定条件如下:比色池的长度为 1 cm,间距为 0.4 cm。测定温度 25℃,温度平衡时 间 2 min。

(4) 表面疏水性

参照文献[15]中 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 溶液质量浓度为 0.05 ~ 0.4 mg/mL,取 40  $\mu$ 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 $\lambda_{ex}$  = 390 nm,发射波长 $\lambda_{em}$  = 468 nm,扫描夹缝设置为 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,以初始段的斜率表征样品的表 面疏水性。

(5)游离氨基含量

参照文献[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 μL 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 μL 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。

(6)蛋白羰基含量

参照文献[17]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( $y = 0.241 2x + 0.0135, R^2 = 0.997$ )。在 367 nm 处用 2,4-二硝基 苯肼比色法测吸光度  $A_{367}$ ,每毫克蛋白质羰基衍生 物的摩尔数通过消光系数 22 000 L/(mol·cm)进行 计算,羰基含量计算公式为

$$E = \frac{45.\ 45\ nA_{367}}{C} \tag{2}$$

式中 E----蛋白羰基质量摩尔浓度, nmol/mg

n----稀释因子

C——蛋白质溶液质量浓度,mg/mL

(7)蛋白游离巯基和二硫键含量

参照文献「18]的方法,并稍作修改。称取 400 mg 的 DTNB, 加入 Tris - Gly 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, 测量游离巯基含量。将样品用磷酸盐缓冲液配置成 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, 每升加 1.2 g EDTA, pH 值 8.0), 每隔 1.5 min 加入 20 µL DTNB (0.004 g DTNB 用 Tris - Gly 溶解定容 1 mL,避光), 反应 25 min, 立即在 412 nm 处测得吸光度 A412, 测出 总巯基含量。二硫键含量为总巯基含量和游离巯基 含量差的1/2。对照组不加蛋白质溶液,其他处理 方法相同。根据标准曲线( $\gamma = 0.050 \ 2x - 0.000 \ 9$ ,  $R^{2} = 0.9994$ ) 计算出蛋白质质量浓度  $\rho$ 。使用摩尔 消光系数 13 600 L/(mol·cm), 巯基含量计算公式为

$$F = \frac{73.\ 53DA_{412}}{C} \tag{3}$$

$$L = \frac{C_1 - C_2}{2}$$
(4)

- 式中 F——巯基质量摩尔浓度,μmol/g L——二硫键质量摩尔浓度,μmol/g
  - D----稀释系数
  - *C*<sub>1</sub> 样品蛋白总巯基质量摩尔浓度, μmol/g
  - $C_2$ —样品蛋白游离巯基质量摩尔浓度,

µmol∕g

(8)红外光谱分析

参照文献[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,在玛瑙研埚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<sup>-1</sup>,分辨率 4 cm<sup>-1</sup>,波数精度 0.01 cm<sup>-1</sup>,扫描次数 64 次,环境温度 25℃。

(9)内源性光谱分析

参照文献[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 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:激发波长为 290 nm,发 射波长范围为 300~400 nm,狭缝宽均为 5 nm,电压 为 700 mV。

(10)乳化性和乳化稳定性

参照文献[21]的方法,并稍作修改,采用比浊 法测定乳化特性。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 葵花籽油,乳 液经高速均质机(24 000 r/min)处理 2 min 后,从测 试管底部取出 50 μL 乳液,用质量浓度 0.001 g/mL 的 SDS 溶液稀释 100 倍后,于 500 nm 比色。乳化性 指数和乳化稳定性指数的计算公式为

$$H = \frac{2 \times 2.303 DA_0}{10\ 000 C\varphi(1-\theta)}$$
(5)

$$G = \frac{100A_0}{4} \tag{6}$$

式中 *H*——乳化性指数,m<sup>2</sup>/g *G*——乳化稳定性指数,min *A*<sub>0</sub>——0 min 时的吸光度

*A*<sub>30</sub>——30 min 时的吸光度

- *φ*——光程,取0.01 m
- θ----油相质量分数,取25%

#### 1.6 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, P < 0.05 为显著性差异。采用 Origin 9.1 软件、 PeakFit 4.12 软件进行数据分析、图表处理及图谱分析处理。

# 2 结果与分析

# 2.1 空化微射流对 RBP 热聚集体表面结构的影响

原子力显微镜通过检测待测样品表面和一个微 型力敏感元件之间的极微弱原子间相互作用力来研 究物质的表面结构及性质。从深色到浅色的色泽渐 变过程即为蛋白从下到上的高度状态过程,深色表 征蛋白颗粒高度较低,浅色表明颗粒高度较高。由 图 1 可知, RBP 呈分散状态, 颗粒大小差异较大, 表 面凸起平缓, 直径多在 20~40 nm 之间, 最高高度为 44.5 nm,经过热诱导聚集后直径多在 20~150 nm, 颗粒状态相互连接,浅色颗粒较多,最高高度为 158 nm。热聚集体经过空化微射流处理后,蛋白颗粒 粒径随着压力的增大而呈现先减小后增大趋势,当压 力为90 MPa 时颗粒最小,最高高度为56.2 nm,颗粒 状态整体一致且呈现分散态。结果表明,热诱导聚 集不仅增大了蛋白粒径,还使蛋白从分散态成为交 联态,且热聚集体在经过低压处理后(<90 MPa), 观察到 SRBP 的颗粒高度从 158 nm 降到 56.2 nm。 在处理压力范围为 90~120 MPa 时,观察到颗粒高



图1 原子力显微镜图



度为 56.2~90.7 nm。该研究结果直观反映了压力 对热聚集体高度和整体表面结构的影响,表征了蛋 白的 3D 结构变化,为蛋白分析提供了宏观影像。

# 2.2 空化微射流对 RBP 热聚集体粒径的影响

由图 2 粒径分布和表 1 中平均粒径可知,与 SRBP 相比,热聚集体平均粒径、PDI(蛋白质分散指 数)和浊度分别升高了 373.47 nm、0.06 和 347.11。 STRBP 的粒径分布图出现 3 个峰,颗粒大小明显增 大且分布极不均匀,PDI、电位绝对值和浊度增大; 而随着处理压力的增大,粒径分布峰图微微左移,且 蛋白分子分布集中,平均粒径、PDI、电位绝对值和 浊度减小,当处理压力超过 90 MPa 时,粒径分布图 右移,蛋白平均粒径、PDI 和浊度增大。受热后蛋白 质构象去折叠,分子内部疏水残基和带电粒子暴露, 蛋白质分子通过非共价相互作用发生聚集,导致颗 粒的粒径、浊度和 PDI 也随之增大<sup>[2-3]</sup>。空化微射 流处理产生的强剪切力可改变蛋白分子的三、四级 结构,暴露分子间疏水性基团,增大蛋白间疏水相互 作用,且压力越大其作用效果越明显<sup>[22-24]</sup>,增加蛋 白质表面的负电荷数量,增强颗粒间的静电排斥 力<sup>[25]</sup>,最终提高蛋白质分散体系的稳定性。但当处 理压力为90 MPa 时,疏水性基团的暴露量趋于临界 值,当处理压力持续增大,疏水性基团含量进一步增 大,在更多的疏水性基团发生暴露时,蛋白质表面 的极性氨基酸尤其是带电氨基酸相对减少<sup>[25]</sup>,而 疏水相互作用的增大,促进了聚集体再次聚集,进 而促使蛋白颗粒发生聚集,消耗溶液中的负电荷, 从而使得ζ-电位下降<sup>[26]</sup>,并促进平均粒径、浊度和 PDI 增大。



Fig. 2 Protein aggregate size distribution diagram

表 1 不同处理方式下蛋白颗粒的特性 Tab. 1 Characteristics of protein particles under different treatments

| 样品                                | 平均粒径/nm                          | PDI                       | 电位/mV                       | 浊度                               |
|-----------------------------------|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| SRBP                              | $(104.\ 80\ \pm 2.\ 33)^{\rm d}$ | $(0.52 \pm 0.03)^{b}$     | $(-22.53 \pm 0.80)^{\circ}$ | $(214.\ 70\ \pm 2.\ 43)^{\rm f}$ |
| STRBP                             | $(478.27 \pm 8.66)^{a}$          | $(0.58 \pm 0.04)^{a}$     | $(-26.13 \pm 0.93)^{a}$     | $(561.81 \pm 5.36)^{a}$          |
| $\mathrm{STRBP} - 30\mathrm{MPa}$ | $(236.53 \pm 5.44)^{\rm b}$      | $(0.32 \pm 0.02)^{\circ}$ | $(-21.00 \pm 1.11)^{\circ}$ | $(542.28 \pm 3.76)^{\rm b}$      |
| STRBP - 60 MPa                    | $(223.63 \pm 3.32)^{\rm b}$      | $(0.27 \pm 0.01)^{d}$     | $(-22.53 \pm 0.21)^{\circ}$ | $(518.39 \pm 3.21)^{\rm bc}$     |
| STRBP – 90MPa                     | $(203.93 \pm 2.84)^{d}$          | $(0.26 \pm 0.01)^{d}$     | $(-24.83 \pm 0.81)^{b}$     | $(405.05 \pm 3.42)^{e}$          |
| STRBP – 120MPa                    | $(214.23 \pm 1.86)^{\circ}$      | $(0.28 \pm 0.01)^{d}$     | $(-22.03 \pm 1.05)^{\circ}$ | $(427.27 \pm 4.12)^{d}$          |

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

#### 2.3 空化微射流对 RBP 热聚集体表面疏水性的影响

表面疏水性不仅反映了 RBP 的结构变化<sup>[27]</sup>, 也对稳定蛋白质结构、提高蛋白质功能有重要作 用<sup>[28]</sup>。如图3(图中不同字母表示差异显著)所示, 与 SRBP 相比, 热聚集体表面疏水性指数提高了 245.1。随着处理压力的增大,蛋白质表面疏水性呈 现先增大后减小的趋势,且在处理压力为90 MPa 时 达到最大。热处理暴露了被掩蔽在蛋白质天然结构 内的疏水结构域,增大蛋白质的表面疏水性,降低了 颗粒间静电斥力<sup>[29]</sup>,蛋白质发生聚集时结合位点的 改变导致部分疏水性基团暴露,表面疏水性增大。 而空化微射流处理可以改变蛋白质的构象,低压打 开蛋白质聚集结构,增加蛋白质表面的负电荷数量, 增强颗粒间的静电排斥力,提高蛋白质的稳定 性<sup>[30]</sup>。当处理压力为90 MPa,表面疏水性和溶液稳 态达到临界值,表面疏水性指数提高了798.05,随 着处理压力的进一步增大,微射流破坏蛋白质分子 中的疏水结构域<sup>[12]</sup>,打破静电斥力与疏水相互作用 间的平衡,蛋白质分子之间重排,进而诱导新蛋白质 聚集体的形成,表面疏水性减小。



图 3 蛋白质热聚集体表面疏水性指数



#### 2.4 游离氨基和羰基测定

游离氨基和羰基的含量变化在一定程度上可 反映出蛋白质的氧化聚集程度。与 SRBP 相比, STRBP 的 游 离 氨 基 质 量 摩 尔 浓 度 降 低 了

%

0.08 μmol/mg, 而 羰 基 质 量 摩 尔 浓 度 增 加 0.21 nmol/mg, 如表 2 所示。随着处理压力的增大, 与 STRBP 相比, 蛋白游离氨基含量呈现先增大后减 小趋势, 而羰基含量则呈现先减小后增大趋势, 且在 90 MPa 时氨基质量摩尔浓度提高了 0.17 μmol/mg, 羰基质量摩尔浓度降低了 0.17 nmol/mg。研究表 明,随着温度的升高, 包含在分子内部的氨基酸侧链 暴露并被氧化生成羰基。而本实验中氨基含量的增 多和羰基含量的减少可能与空化微射流处理产生的 强烈剪切力、高速撞击力和高压瞬时释放导致蛋白 结构打开和羰基键被破坏有关, 这与文献[31]一 致。随着处理压力的进一步增大, 高压力差促使蛋 白产生自由基促进羰基的形成, 羰基含量逐渐增 多<sup>[32]</sup>。

表 2 氨基和羰基含量 Tab. 2 Amino and carbonyl contents

| D 44           | 游离氨基质量摩尔浓                        | 羰基质量摩尔浓度/                 |  |
|----------------|----------------------------------|---------------------------|--|
| 作自由            | 度/( $\mu$ mol·mg <sup>-1</sup> ) | $( nmol \cdot mg^{-1} )$  |  |
| SRBP           | $(0.32 \pm 0.01)^{\rm bc}$       | $(5.67 \pm 0.02)^{d}$     |  |
| STRBP          | $(0.24 \pm 0.02)^{d}$            | $(5.88 \pm 0.03)^{a}$     |  |
| STRBP – 30MPa  | $(0.28 \pm 0.02)^{\circ}$        | $(5.86 \pm 0.01)^{a}$     |  |
| STRBP – 60MPa  | $(0.34 \pm 0.02)^{b}$            | $(5.77 \pm 0.02)^{\circ}$ |  |
| STRBP – 90MPa  | $(0.41 \pm 0.01)^{a}$            | $(5.71 \pm 0.02)^{\circ}$ |  |
| STRBP – 120MPa | $(0.40 \pm 0.01)^{a}$            | $(5.72 \pm 0.01)^{\circ}$ |  |

# 2.5 空化微射流对 RBP 热聚集巯基和二硫键的影响

巯基和二硫键是稳定蛋白质分子构象的重要化 学键。如图 4(图中同种图例不同字母表示差异显 著,下同)所示,与 SRBP 相比,STRBP 的总巯基和二 硫键含量升高,而游离巯基含量减少。随着处理压 强的增大,蛋白二硫键含量呈现先减小后稍增大的 趋势,而游离巯基则呈现先增大后减小的趋势,且在 60 MPa 时游离巯基含量出现最大值,二硫键含量出 现最小值。研究表明,在热处理期间发生热诱导的 蛋白质去折叠将暴露最初埋在蛋白质内的 SH 基 团,并将在蛋白质分子内引起 SH/SS 交换,导致二 硫键含量增加,游离巯基含量减少<sup>[12]</sup>。而空化微射 流处理打破蛋白质热聚集状态,破坏蛋白质的三、四 级结构,将 SS 转化为 SH,SS 含量减小,巯基含量增 多。但当处理的压力超过 90 MPa 时,蛋白进一步解 折叠,隐藏的巯基暴露并被重新氧化形成二硫 键<sup>[11]</sup>,在蛋白簇内部建立新的稳定结构,这与之前 的研究结果一致。



#### 2.6 RBP 热聚集体二级结构的测定

通过对红外光谱图进行拟合得到蛋白二级结构 组成如表 3 所示,与 SRBP 相比, STRBP 的 β1 结构 相对含量提高了 3.37 个百分点,反平行 β-折叠结 构( $\beta$ 1 +  $\beta$ 2)相对含量提高了 3.76 个百分点,  $\alpha$ -螺 旋结构和 β-转角结构减少;经过空化微射流处理 后,STRBP的β-折叠结构进一步转化为β-转角和  $\alpha$ -螺旋结构,  $\beta$ -折叠结构含量减少,  $\beta$ -转角、 $\alpha$ -螺旋 和无规卷曲结构含量增加,且在 90 MPa β1 折叠结 构达到最小值。随着处理压力增大,β-折叠结构增 多,α-螺旋、β-转角和 γ-无规则卷曲结构减少。热 诱导作用可使蛋白 α-螺旋展开<sup>[30]</sup>,诱导 α-螺旋结 构减少,增大溶液表面疏水性,进而促进蛋白聚集, 而 β1-折叠结构在聚集分子中形成<sup>[33]</sup>,因此 STRBP 的 $\alpha$ -螺旋结构减少,  $\beta$ 1-折叠结构增多。空化微射 流的高剪切力将不溶性聚集体转化成可溶性聚集 体<sup>[34]</sup>,当处理压力增大,β-折叠结构主要转化为 β-转角和非天然  $\alpha$ -螺旋结构<sup>[11]</sup>, β-折叠结构减少, β-转角和 α-螺旋结构增多。β-转角结构是蛋白质

表 3 二级结构各组分相对含量

| Tab. 3 | Content | of | each | component | of | the | secondary | structure |  |
|--------|---------|----|------|-----------|----|-----|-----------|-----------|--|
|--------|---------|----|------|-----------|----|-----|-----------|-----------|--|

| 样品             | β1                         | β2                         | α-螺旋                        | β-转角                       | γ-无规则卷曲                    | $\beta 1 + \beta 2$        |
|----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| SRBP           | $(41.30 \pm 0.53)^{b}$     | $(5.96 \pm 0.54)^{a}$      | $(17.28 \pm 0.92)^{\circ}$  | $(22.99 \pm 0.53)^{a}$     | $(12.47 \pm 0.59)^{d}$     | $(47.25 \pm 1.75)^{b}$     |
| STRBP          | $(44.67 \pm 0.48)^{a}$     | $(6.35 \pm 0.61)^{a}$      | $(13.78 \pm 0.94)^{d}$      | $(21.62 \pm 0.50)^{b}$     | $(13.58 \pm 0.81)^{\circ}$ | $(51.01 \pm 1.74)^{a}$     |
| STRBP – 30MPa  | $(44.74 \pm 1.43)^{a}$     | $(3.22 \pm 0.536)^{\circ}$ | $(19.70 \pm 1.08)^{a}$      | $(15.67 \pm 1.01)^{\rm f}$ | $(16.67 \pm 0.31)^{\rm b}$ | $(47.95 \pm 0.68)^{b}$     |
| STRBP – 60MPa  | $(44.39 \pm 0.74)^{a}$     | $(4.77 \pm 0.25)^{b}$      | $(19.22 \pm 0.93)^{ab}$     | $(16.81 \pm 0.83)^{e}$     | $(16.79 \pm 0.31)^{b}$     | $(47.17 \pm 0.97)^{b}$     |
| STRBP – 90MPa  | $(37.71 \pm 1.25)^{\circ}$ | $(4.64 \pm 0.27)^{b}$      | $(19.63 \pm 0.65)^{a}$      | $(20.12 \pm 0.24)^{\circ}$ | $(17.90 \pm 0.58)^{a}$     | $(42.35 \pm 0.52)^{\circ}$ |
| STRBP – 120MPa | $(41.03 \pm 0.43)^{b}$     | $(5.63 \pm 0.91)^{ab}$     | $(18.14 \pm 0.17)^{\rm bc}$ | $(19.15 \pm 0.12)^{d}$     | $(16.06 \pm 0.82)^{d}$     | $(48.66 \pm 1.34)^{b}$     |

高度有序结构的产物<sup>[35]</sup>,伴有更强的分子内部氢 键,β-转角结构的增多可改善蛋白的功能性质。随 着处理压强的进一步增大(超过 90 MPa),破坏了蛋 白分子中的疏水结构域<sup>[12]</sup>,打破静电斥力与疏水相 互作用之间的平衡,蛋白分子重排和新聚集体的形 成导致 β1-折叠结构增多,α-螺旋、β-转角和 γ-无规 则卷曲结构减少。

# 2.7 蛋白热聚集体三级结构的测定

蛋白荧光光谱主要反映的是色氨酸微环境极性 的变化,可表征蛋白结构的三级结构构象变化。由 图 5 可知,与 SRBP 相比, STRBP 的处理压力从 0 MPa 至120 MPa 的最大吸收波长  $\lambda_{mx}$ 均发生了不 同程度的蓝移;与 STRBP 相比, STRBP - 30MPa 和 STRBP-60MPa 的 λ<sub>max</sub>发生了红移, STRBP-90MPa 和 STRBP-120MPa 的 $\lambda_{max}$ 无变化。研究表明,经热处 理后的蛋白在共价键或非共价键相互作用下发生聚 集,色氨酸和酪氨酸发色基团被重新掩埋,形成具有 更高分子量的募聚体或多聚体,λ<sub>max</sub>发生蓝移。经 过空化微射流处理后,随着处理压力的增大,蛋白发 生解折叠作用使 RBP 可溶性蛋白热聚集体打开,促 使发色基团暴露, $\lambda_{max}$ 发生红移。当处理压力进一 步增大(超过90 MPa),增大了蛋白颗粒发生相互碰 撞的几率,改变了蛋白分子的三、四级结构,有效破 坏分子间的疏水以及静电相互作用,诱发蛋白颗粒 发生聚集, $\lambda_{max}$  蓝移<sup>[22-24]</sup>。





# 2.8 空化微射流对 RBP 热聚集体乳化性的影响

蛋白质的乳化特性可通过乳化性和乳化稳定 性来表征<sup>[29]</sup>。如图 6 所示,与 SRBP 相比,STRBP 的乳化性指数和乳化稳定性指数分别降低了 77.61 m<sup>2</sup>/g和157.64 min。与 STRBP 相比,热聚集 体随着处理压力的增大,其乳化性和乳化稳定性呈 先增大后减小的趋势,且在处理压力为 60 MPa 时乳 化性达到最大,处理压力为 90 MPa 时乳化稳定性最 大。热诱导下,疏水基团的暴露促使蛋白质分子相 互靠近并形成分子量较大的蛋白进而降低蛋白的乳 化特性<sup>[36]</sup>。而空化微射流处理(30~90 MPa)可使 蛋白热聚集体解聚为更小的颗粒<sup>[37]</sup>,维持蛋白空间 结构的非共价键作用力被破坏,蛋白质内部的疏水 基团暴露,蛋白质能更快地吸附在油-水界面上,降 低乳液的界面张力,进而提高蛋白的乳化性和乳化 稳定性<sup>[38]</sup>。当处理压力为 90 MPa,乳化性指数和乳 化稳定性指数提高了 90.32 m<sup>2</sup>/g 和 281.68 min。而 随着处理压力(120 MPa)的进一步增大,强大的剪 切力使过度展开的蛋白质分子通过疏水相互作用形 成聚集体,进而使蛋白粒径增大,从而导致蛋白乳化 性和乳化稳定性下降。



# 3 结束语

热聚集体可改变 RBP 结构,将整体结构由分散 态变成交联态。与原蛋白相比,热聚集体蛋白平均 粒径、PDI 和浊度分别升高了 373.47 nm、0.06 和 347.11,官能团如游离氨基质量摩尔浓度降低了 0.08 μmol/mg,羰基质量摩尔浓度增加 0.21 nmol/mg,二 级结构中 β1 结构相对含量提高了 3.37 个百分点, β-折叠结构提高了 3.76 个百分点。α-螺旋结构、 β-转角结构和 γ-无规则卷曲结构减少,表面疏水性 指数提高了245.1,乳化性指数和乳化稳定性指数 分别降低了 77.61 m<sup>2</sup>/g 和 157.64 min。热聚集体经 过空化微射流处理后,其乳化特性明显改善,平均粒 径、PDI和浊度明显提高,90 MPa时氨基质量摩尔浓 度提高0.081 µmol/mg, 羰基质量摩尔浓度降低了 0.17 nmol/mg, β1 结构、α-螺旋结构与 γ-无规则卷 曲结构减少,表面疏水性、乳化性和乳化稳定性也显 著提高。

参考文献

[J]. Journal of Cereal Science, 2009, 50(2): 184-189.

[2] 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):324-331.

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):324-331. (in Chinese)

- [3] 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.
- [4] PATRO S P. Simulations of kinetically irreversible protein aggregate structure [J]. Biophysical Journal, 1994, 66(5):1274 1289.
- [5] 王长远,郝天舒,张敏. 干热处理对米糠蛋白结构与功能特性的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(7):13-18.
  WANG Changyuan, HAO Tianshu, ZHANG Min. Effect of dry heat treatment on structural and functional properties of rice bran protein[J]. Food Science, 2015, 36(7): 13-18. (in Chinese)
- [6] KHAN S H, BUTT M S, SHARIF M K, et al. Functional properties of protein isolates extracted from stabilized rice bran by microwave, dry heat, and parboiling[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(6): 2416-2420.
- [7] ZHANG H J, ZHANG H, WANG L, et al. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran [J]. Food Research International, 2012, 47(2): 359 - 363.
- [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. Effect of heat-induced aggregation on rheological properties and stability of soybean protein gel[D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2013. (in Chinese)
- [9] 李传雯.大米谷蛋白热聚集行为和机理研究[D].武汉:湖北工业大学,2016.
  LI Chuanwen. Study on the thermal aggregation behavior and mechanism of rice gluten [D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2016. (in Chinese)
- [10] 周建中.棉籽球蛋白热聚集行为及其凝胶特性研究[D].无锡:江南大学,2016.
  ZHOU Jianzhong. Thermally aggregation behavior and gelation properties of cottonseed globulin [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016. (in Chinese)
- [11] 邢贝贝,张亭亭,赵强,等. 高压微射流处理对米谷蛋白热聚集体性质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(3):118-124.
  XING Beibei, ZHANG Tingting, ZHAO Qiang, et al. Effect of high pressure microfluidization treatment on the properties of thermal glutelin aggregates[J]. Food Science, 2019, 40(3): 118-124. (in Chinese)
- [12] OLIETE B, FRANÇOIS P, CASES E, et al. Modulation of the emulsifying properties of pea globulin soluble aggregates by dynamic high-pressure fluidization[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 47:292 - 300.
- [13] 王金梅.大豆蛋白热聚集行为及界面、乳化性质研究[D].广州:华南理工大学,2012.
  WANG Jinmei. Thermally aggregation behavior, interfacial and emulsifying properties of soy protein[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012. (in Chinese)
- [14] 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 properties of aggregated soy protein and blending gel [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007. (in Chinese)
- [15] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Protein Structure, 1980,624(1):13-20.
- [16] 周麟依,孙玉凤,吴非.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,2019,40(12):98-107.
  ZHOU Linyi, SUN Yufeng, WU Fei. Effects of oxidation by malondialdehyde on the structure and function of rice bran protein
  [J]. Food Science, 2019, 40(12): 98-107. (in Chinese)
- [17] HUANG Y R, HUA Y F, QIU A Y. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation [J].
  Food Research International, 2006, 39(2): 240 249.
- [18] ELLMAN C L. Tissue sullhydryl groups [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1959, 82(1):70-79.
- [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 protein and its mechanism [D]. Guangzhou: South China University of Technology,2010. (in Chinese)
- [20] KABIRULLAH M, WILLS R B. Characterization of sunflower protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1983, 31(5):953-956.
- [21] 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.
- [22] IORDACHE M, JELEN P. High pressure microfluidization treatment of heat denatured whey proteins for improved functionality
  [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2003,4(4): 367 376.
- [23] GRACIA J A. Effect of dynamic high pressure on whey protein aggregation: a comparison with the effect of continuous short-

time thermal treatments [J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(6):1014-1032.

[24] 涂宗财,张雪春,刘成梅,等.动态超高压均质对花生蛋白溶解性和乳化性的影响[J].食品工业科技,2007,28(6): 88-89.

TU Zongcai, ZHANG Xuechun, LIU Chengmei, et al. The effect of microfluidization on solubility and emulsibility of peanut proteins solution[J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(6): 88 - 89. (in Chinese)

- [25] HUANG L, DING X, LI Y, et al. The aggregation, structures and emulsifying properties of soybean protein isolate induced by ultrasound and acid[J]. Food Chemistry, 2019, 279:114 - 119.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] LALIGANT A, DUMAY E, CASAS V C, et al. Surface hydrophobicity and aggregation of beta-lactoglobulin heated near neutral pH[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(12):2147-2155.
- [29] ERSOY B, EVCIN A, UYGUNOGLU T, et al. Zeta potential-viscosity relationship in kaolinite slurry in the presence of dispersants[J]. Arabian Journal for Science and Engineering, 2014, 39(7):5451-5457.
- [30] 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.
- [31] JUNG S, NAM K C, AHN D U, et al. Effect of phosvitin on lipid and protein oxidation in ground beef treated with high hydrostatic pressure[J]. Meat Science, 2013, 95(1):8-13.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [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] 雷莉,赵强,范婷,等.高压微射流处理对白木通籽分离蛋白结构及流变性质的影响[J].现代食品科技,2015,31(2) :145-150.

LEI Li, ZHAO Qiang, FAN Ting, et al. Effects of high pressure microfluidization on the structure and rheological properties of *Akebia trifoliata* var. australis seed protein isolate [J]. Modern Food Science & Technology, 2015, 31(2):145 - 150. (in Chinese)

- [36] 郭健. 大豆蛋白热聚集行为控制及其结构表征的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2012.
  GUO Jian. Control of soy protein thermal aggregation behavior and structural characterization of soy protein aggregates [D].
  Guangzhou: South China University of Technology, 2012. (in Chinese)
- [37] 涂宗财, 王辉, 刘成梅,等. 动态超高压均质对蛋清蛋白溶液的粒度和流变性影响[J]. 食品科学, 2007, 28(6):27-28.
  TU Zongcai, WANG Hui, LIU Chengmei, et al. Effects of microfluidization on particle size and rheological properties of egg white proteins solution[J]. Food Science, 2007, 28(6):27-28. (in Chinese)
- [38] 许艳华,赵光远,敬思群,等. 高压微射流对大豆分离蛋白化学性质及结构的影响[J]. 食品工业, 2018,39(3):44-48.
  XU Yanhua, ZHAO Guangyuan, JING Siqun, et al. Effect of high pressure microfluidization on chemical properties and structure of soybean protein isolate[J]. Food Industry, 2018,39(3):44-48. (in Chinese)