

高压均质条件下大豆蛋白热聚集体结构和乳化特性研究

郭增旺<sup>1</sup> 郭亚男<sup>1</sup> 李柏良<sup>1</sup> 江连洲<sup>1</sup> 王中江<sup>1</sup> 刘 军<sup>2,3</sup>

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 临邑禹王植物蛋白有限公司, 德州 253000;  
3. 克东禹王大豆蛋白食品有限公司, 齐齐哈尔 161000)

**摘要:** 以大豆蛋白为原料,采用加热处理(100℃、20 min)制备可溶性热聚集体,分别对其进行高压均质(0、30、60、90、120 MPa)处理,探究高压均质技术(HPH)对大豆蛋白热聚集体结构特性(粒径分布、浊度、骨架结构、二三级结构、疏水性、电位、巯基)、流变学表征和乳化特性(乳化活性和乳化稳定性)的影响。结果表明:低压力的高压均质处理可以促进热聚体发生再聚集,使粒径和浊度逐渐增大、骨架结构变密、无序结构增多,并且发生再聚集,其疏水性降低,ζ-电位绝对值和二硫键含量升高,进而导致乳化活性提高;而高压力的均质处理会导致热聚集体的二硫键和骨架结构发生大量断裂,分子结构展开,疏水性位点大量暴露,导致疏水性增强、蛋白分子链变短、粒径和ζ-电位绝对值降低,进而导致乳化活性降低。本研究可为大豆蛋白功能性质的改性及高压均质在热聚集体行为调控方面的应用提供参考。

**关键词:** 大豆蛋白; 热聚集体; 高压均质; 结构特性; 乳化特性

中图分类号: TS201.1      文献标识码: A      文章编号: 1000-1298(2021)04-0351-08      OSID: 

Effects of High-pressure Homogenization on Structural and Emulsifying Properties of Soybean Protein Thermal Aggregates

GUO Zengwang<sup>1</sup> GUO Ya'nan<sup>1</sup> LI Bailiang<sup>1</sup> JIANG Lianzhou<sup>1</sup> WANG Zhongjiang<sup>1</sup> LIU Jun<sup>2,3</sup>

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China  
2. Linyi Yuwang Plant Protein Co., Ltd., Dezhou 253000, China  
3. Kedong Yuwang Soybean Protein Food Co., Ltd., Qiqihar 161000, China)

**Abstract:** To investigate the effect of high-pressure homogenization on the structure and emulsification of soybean protein, high-pressure homogenization (HPH) treatment at 20 min and 100℃ were applied to the soybean protein thermal aggregates (HSPIs). The changes of HSPIs structure characteristics (particle size distribution, turbidity, skeleton structure, secondary and tertiary structure, hydrophobicity, potential, sulfhydryl) and emulsification characteristics (rheological characterization, emulsification and emulsification temperature) were assayed. The results showed that compared with the heat soluble aggregates degree, the lower pressure of HPH can promote the re-aggregation of the thermal induced HSPIs, which resulted in the increase of particle size and turbidity, the densification of HSPIs skeleton structure. Along with the re-aggregation, the HSPIs disordered structure, particle ζ-potential and protein peptide chains disulfide bond content were increased, and resulted in the increase of emulsifying activity and decrease of hydrophobicity. While on HPH, strong strength homogenization can lead the disulfide bond and skeleton structure of HSPIs broken, the protein spatial structure was opened, and the hydrophobic sites were exposed, which resulted in enhancement of hydrophobicity, shortening of protein peptide chain, decrease of particle size and the increase of ζ-potential, and then the decrease of emulsifying activity of HSPIs. The results for the modification of soybean protein functional properties and the application by high-pressure homogenization changed HSPIs.

**Key words:** soybean protein; thermal aggregates; high-pressure homogenization; structural properties; emulsifying properties

收稿日期: 2020-05-24    修回日期: 2020-06-24

**基金项目:** 山东省重点研发计划项目(2018YYSP026)、中国科协第五届(2019—2021 年度)青年人才托举工程项目(2019QNRC001)、哈尔滨市雏鹰计划项目(CY2019JH020004)、黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(UNPYSC-T-2018163)、黑龙江省博士后科研启动资金项目(LBH-Q2008)和山东省德州市大禹英才项目

**作者简介:** 郭增旺(1992—),男,博士生,主要从事粮食、油脂及植物蛋白研究,E-mail: gzwname@163.com

**通信作者:** 刘军(1959—),男,高级工程师,主要从事大豆精深加工研究,E-mail: liujun@yuwangcn.com

## 0 引言

大豆是我国主要农作物之一。大豆富含蛋白质和人体必需的氨基酸,其蛋白质含量几乎是肉、蛋、鱼的2倍,是小麦、大米等谷类作物的2倍以上,质量分数通常为40%~50%<sup>[1]</sup>。但大豆蛋白中含有脲酶和胰蛋白酶抑制剂等,为提高大豆产品的消化性,常采用特殊手段对其进行失活处理。热处理技术可通过灭活蛋白酶抑制剂和促使蛋白质变性来增强大豆蛋白的营养价值和功能活性<sup>[2]</sup>。在热杀菌、喷雾干燥等加工过程中,蛋白质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和表面巯基含量增高,在加热作用和高离子强度下形成疏水键的氨基酸残基从蛋白分子内部转移到了分子表面,促使蛋白质通过化学作用力相互连接而逐渐聚集。蛋白组分的聚集程度决定了蛋白的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<sup>[3]</sup>。研究表明,热处理对大豆蛋白营养和功能活性的影响程度受蛋白质聚集程度和聚集形态的影响<sup>[4]</sup>。为此,国内外学者在蛋白热诱导聚集领域进行了大量的研究<sup>[5-8]</sup>,探究热诱导聚集对蛋白功能性质的影响,并通过一定的手段改变热处理后的蛋白质变性和聚集程度,进而实现物理场对热聚集体的改性作用机理。

高压均质(High-pressure homogenization, HPH)加工处理具有高压力和高剪切应力、高速湍流、空化效应等作用,通过该处理影响和改变蛋白间的相互作用力,打破分子间化学键,改变蛋白的空间构象,进而实现对蛋白的结构和功能特性的改性处理<sup>[9]</sup>。文献[10]研究表明,高压均质可以通过改变蛋白聚集体的形态改善乳清蛋白的起泡特性。文献[11]研究了不同压强下高压均质对乳清蛋白乳化特性的影响,发现160 MPa的高压均质处理能降低乳清蛋白的乳化活性。这些研究均表明,高压均质处理工艺能通过改变蛋白的聚集结构和分子构象来改变其功能特性。但是,目前关于高压均质与热聚集体的结构和功能活性之间的关系,尤其是HPH对大豆蛋白热聚集体(HSPIs)的影响却鲜有报道。

为了探讨高压均质处理对大豆蛋白热聚集体结构和功能特性的影响,本文采用加热方法诱导生成大豆蛋白可溶性热聚集体,采用高压均质技术作用于蛋白聚集体,进而探讨高压均质(30、60、90、120 MPa)处理对大豆蛋白热聚集体结构和功能特性的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白(SPIs,纯度94.2%),山东禹王生态食业有限公司;8-苯胺萘磺-1-酸盐(ANS),上海将来实业股份有限公司;磷酸盐缓冲溶液、十二烷基硫酸钠(SDS),索莱宝生物科技有限公司;一级大豆油,九三粮油工业集团有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

AVP-2000型高压均质仪,英国 Stansted Fluid Power 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;Bohlin Gemini 2型旋转流变仪,英国 Malvern 公司;ALPHA1-4LSC型冷冻干燥机,德国 Christ 公司。

### 1.3 样品制备

将SPIs溶于0.01 mol/L的磷酸盐缓冲溶液中(pH值7.2、含Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>质量浓度0.5 mg/mL),配成10 mg/mL的SPIs溶液后,置于100℃恒温水浴锅中20 min,诱导生成大豆蛋白热聚集体(HSPIs),迅速冰浴,冷却备用。分别采用压力为0、30、60、90、120 MPa的高压均质处理大豆蛋白热聚集体1个循环后,9 000 r/min低温离心20 min,取上清液冻干,制得实验样品,其与未经高压均质处理的SPIs分别记为SPIs、HSPIs、HSPIs-30、HSPIs-60、HSPIs-90、HSPIs-120。

### 1.4 指标测定

#### 1.4.1 粒径分布测定

将样品配制成0.05 g/mL的溶液,磁力搅拌10 min后加入测量池中,参数设定为:颗粒折射率1.460、分散剂折射率1.330,采用纳米粒径电位仪测定其粒径分布特征和蛋白质分散指数。

#### 1.4.2 浊度测定

参照文献[12]的方法,并略加改动。将各组样品采用磷酸盐缓冲溶液配制成为所需的蛋白浓度后,磁力搅拌60 min,采用荧光光度计测定600 nm波长下的吸光度A,浊度计算公式为

$$T = 1.302 \frac{AV}{l} \times 100\% \quad (1)$$

式中 V——稀释倍数

l——光程,取0.001 m

#### 1.4.3 蛋白骨架结构成像

参照文献[11]的方法,并略加改动。取一滴样品滴于铜网格上固定,待吸附后反复冲洗并取

0.5% ~ 1.0% 的醋酸双氧铀染色,待干燥后即可用透射电镜(TEM)观察样品。

1.4.4 二级结构含量测定

参考文献[13]的方法,并稍加修改。取1 mg 充分干燥后的样品和100 mg KBr 进行混合后压片,在波长范围为4 000 ~ 400 cm<sup>-1</sup>、分辨率为4 cm<sup>-1</sup>、扫描次数为64 次的条件下进行吸收光谱测定。

1.4.5 荧光光谱测定

参考文献[12]的方法,并略有改动。采用5 mmol/L、pH 值7.2 的磷酸盐缓冲溶液将样品配制为0.1 mol/L 的蛋白溶液,在激发波长290 nm、发射波长300 ~ 400 nm、夹缝宽度5 nm 的条件下测定样品的内源性荧光光谱。

1.4.6 表面疏水性测定

参考文献[11]的方法,并略有改动。采用ANS 荧光探针法进行测定,分别将样品采用0.01 mol/L pH 值7.2 的磷酸盐缓冲溶液配制成0.05 ~ 0.4 mg/mL 的蛋白溶液,然后取4 mL 后加入40 μL 的8 mmol/L ANS 溶液(0.01 mol/L pH 值7.2 磷酸盐缓冲溶液配制后,超声处理3 min 制得),混匀后静止3 min,在激发波长390 nm、发射波长490 nm、夹缝宽度5 nm 的条件下测定其荧光强度。将各质量浓度下的荧光强度与蛋白质质量浓度作标准曲线,其斜率即为样品的表面疏水性指数。

1.4.7 ζ-电位测定

参考文献[11]的方法,并略有改动。分别将样品采用50 mmol/L、pH 值7.0 的磷酸盐缓冲液配制成质量分数0.2% 的蛋白溶液,采用Zetasizer Nano ZSP 型粒度仪在比色皿长度为1 cm、间距为0.4 cm 的条件下测定各样品的ζ-电位。

1.4.8 巯基含量测定

参考文献[13]的方法,并略有改动。准确称取2 mg 的样品溶于2 mL pH 值8.0 的Tris - Gly 缓冲液和0.02 mL Ellman 溶液,快速混合后25℃ 静止15 min,采用分光光度计在412 nm 处测定其吸光度A<sub>412</sub>,并以未加 Ellman 溶液作为空白,表征游离巯基含量。将样品采用50 mmol/L、pH 值7.0 的磷酸盐缓冲液配制成0.5 mL 5 mg/mL 的溶液,取10 mL 后加入2.5 mL 含有8 moL/L 尿素的Tris - Gly 溶液,混匀后静止反应25 min,采用分光光度计在412 nm 处测定其吸光度A<sub>412</sub>,测出总巯基含量。二硫键含量的计算方法为总巯基含量与游离巯基含量之差的1/2。摩尔消光系数取13 600 L/(mol·cm),计算巯基含量。巯基和二硫键质量摩尔浓度计算公式分别为

$$F = \frac{73.53DA_{412}}{c} \tag{2}$$

$$L = \frac{F_1 - F_2}{2} \tag{3}$$

式中 F——巯基质量摩尔浓度,mmol/g  
L——二硫键质量摩尔浓度,mmol/g  
D——稀释系数  
c——蛋白质量浓度,g/mL  
F<sub>1</sub>——总巯基质量摩尔浓度,mmol/g  
F<sub>2</sub>——游离巯基质量摩尔浓度,mmol/g

1.4.9 流变特性测定

参考文献[14]的方法,并略有改动。将15 mL 0.1% 样品溶液和5 mL 大豆油混合后,24 000 r/min 高速均质处理1 min 制备乳液,取适量体积的乳液加入到旋转流变仪感应板上,在平板直径40 mm、角度1°、剪切速率0 ~ 100 s<sup>-1</sup>、取点数100 的条件下,采用旋转流变仪测定其流变学曲线,并利用 Sisko 模型拟合其流变学曲线,即

$$\eta = \eta_0 + K\gamma^{n-1} \tag{4}$$

式中 η——表观黏度,Pa·s  
η<sub>0</sub>——初始表观黏度,Pa·s  
γ——剪切速率,s<sup>-1</sup>  
K——稠度系数  
n——流性指数

1.4.10 乳化活性测定

参考文献[13]的方法,并略有改动。采用比浊法表征样品乳化特性。将15 mL 0.001 g/mL 样品溶液和5 mL 大豆油混合后,24 000 r/min 高速均质处理1 min 制备乳液,从底部取出50 μL 乳液,加入5 mL 0.001 g/mL 的SDS 溶液,采用分光光度计在500 nm 处测定其吸光度,乳化活性指数(EAI)和乳化稳定性指数(ESI)计算公式分别为

$$E = \frac{2 \times 2.303 \times 100A_0}{10\,000c\varphi(1 - \theta)} \tag{5}$$

$$S = \frac{100A_0}{A_0 - A_{30}} \tag{6}$$

式中 E——乳化活性指数,m<sup>2</sup>/g  
S——乳化稳定性指数,min  
A<sub>0</sub>、A<sub>30</sub>——0、30 min 时的吸光度  
φ——光程,取0.01 m  
θ——油相所占体积分数,取25%

1.5 数据处理与分析

所有实验重复3 次,结果用平均值 ± 标准差表示,采用SPSS 19.0 软件对实验数据进行ANOVA 显著性分析,P<0.05 为显著性差异,采用 Origin 9 软件作图,采用 PeakFit 4.12 进行红外图谱分析。

2 结果与分析

2.1 高压均质对大豆蛋白热聚集体粒径分布的影响

由图 1 和图 2(图中不同字母表示差异显著,下同)可知,大豆蛋白经过热处理后,粒径分布发生了明显改变,粒径峰均向右移动,且大分子粒径的峰面积含量显著增多,并且 PDI(分散指数)显著升高。这表明当大豆蛋白受到热处理后蛋白间发生相互聚集形成大分子粒径的可溶性热聚集体<sup>[3]</sup>,导致粒径分布图中第 1 个粒径峰右移和 PDI 显著升高。当高压均质压力由 30 MPa 升高到 60 MPa 时,大豆蛋白可溶性热聚集体的粒径分布图中第 1 个峰逐渐向右移动且 PDI 逐渐降低。当高压均质压力由 90 MPa 升高到 120 MPa 时,大豆蛋白可溶性热聚集体的粒径分布图逐渐向左移动且 PDI 逐渐升高。这表明低压条件下的高压均质处理能显著促进大豆蛋白热聚集体的聚集,而高压条件下的高压均质处理能促使大豆蛋白热聚集体有解聚作用。

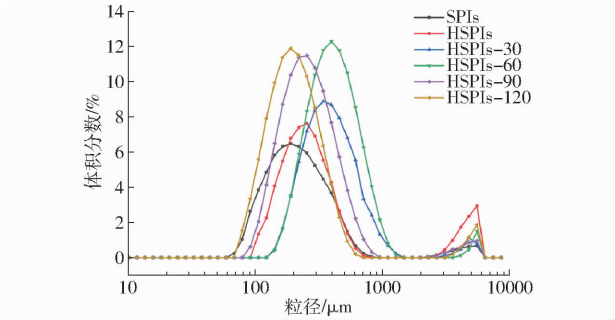


图 1 高压均质对大豆蛋白热聚集体粒径分布的影响  
Fig.1 Effect of HPH on particle size distribution of soybean protein thermal aggregates

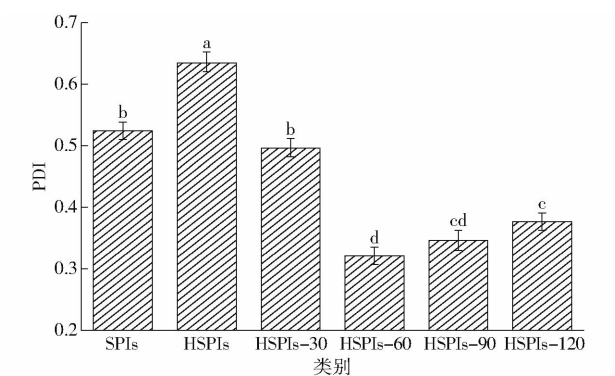


图 2 高压均质对大豆蛋白热聚集体蛋白分散指数的影响  
Fig.2 Effect of HPH on protein dispersion index of soybean protein thermal aggregates

2.2 高压均质对大豆蛋白热聚集体浊度的影响

浊度能直观地反映蛋白颗粒在溶液中的分散状态,一定程度上反映了蛋白的聚集状态。由图 3 可知,HSPIs 的浊度显著高于 SPIs。这表明热处理会引起蛋白质发生聚集,导致蛋白溶液中的大分子可

溶性聚集体含量升高和粒径增大,增大光线在溶液中的漫反射程度,进而导致浊度升高。随着高压均质处理压力的增大,蛋白溶液的浊度呈现先升高后下降的趋势,且在处理压力为 60 MPa 时浊度达到最大。这表明低压条件下的高压均质处理能通过促进蛋白间的巯基和二硫键的转变而形成大分子可溶性聚集体的结构,导致浊度增加;而高压条件下的高压均质处理能通过强剪切应力和空化效应导致蛋白聚集体的结构发生破坏,打破蛋白聚集体,降低粒径,导致浊度降低<sup>[13]</sup>。

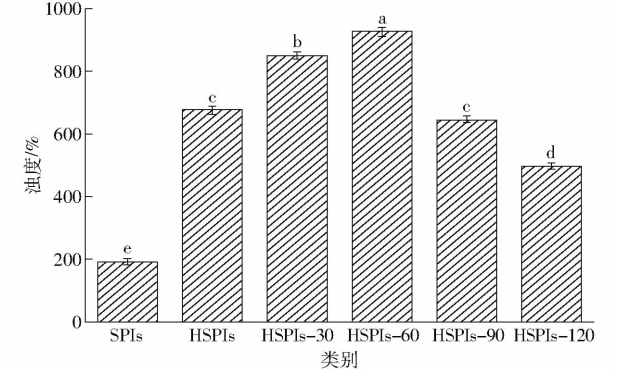


图 3 高压均质对大豆蛋白热聚集体浊度的影响  
Fig.3 Effect of HPH on turbidity of soybean protein thermal aggregates

2.3 高压均质对大豆蛋白热聚集体骨架结构的影响

TEM 能通过蛋白质骨架结构成像对聚集结构进行表征。由图 4 可知,SPIs 的 TEM 图无明显聚集区域和串状形态,HSPIs 出现树枝状和葡萄串状聚集形态。这表明热处理通过改变分子间的相互作用力,引起大豆蛋白分子间发生聚集,形成热聚集体<sup>[14]</sup>。当高压均质处理压力由 30 MPa 升高至 60 MPa 时,聚集形态逐渐呈现更多的分支和更为密集的中心,且聚集的面积明显增大;但当处理压力超过 60 MPa 时,逐渐转变为更松散、更小和更多分支的聚集形态。研究表明,蛋白质聚集过程为蛋白结构展开暴露活性巯基和疏水区域,活性巯基通过共价和非共价相互作用(如疏水相互作用、静电引力作用等)形成二硫键,进而团聚形成大分子蛋白聚集体<sup>[15]</sup>。因此,低压条件下的高压均质处理可能促进了蛋白质间的活性巯基和二硫键的转换形成大分子可溶性聚集体;而高压条件下的高压均质处理所产生的高压湍流效应、高速剪切效应及空化效应能够破坏蛋白质间的相互作用,打破二硫键,破坏蛋白聚集体,减小蛋白粒径,导致聚集体逐渐转变为更松散、更小和更多分支的形态。

2.4 高压均质对大豆蛋白热聚集体二级结构的影响

由图 5 和表 1 可知,热处理显著降低了 SPI 的

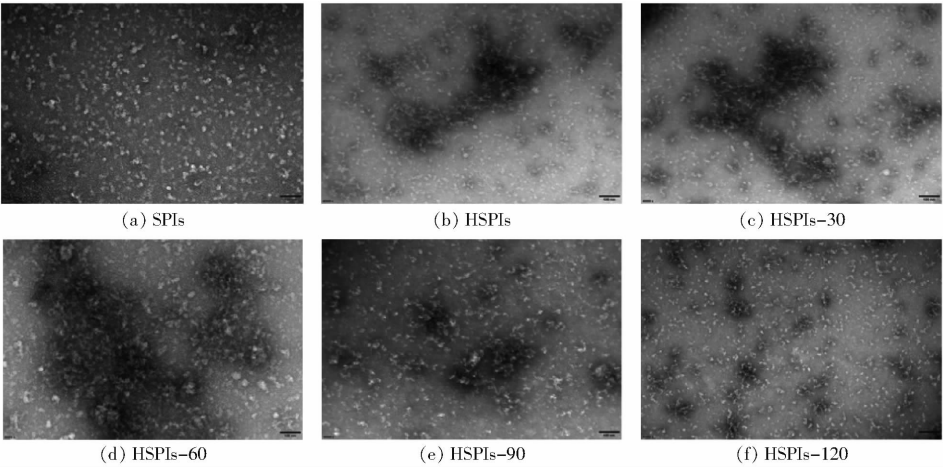


图 4 高压均质对大豆蛋白热聚集体骨架结构的影响

Fig. 4 Effect of HPH on skeleton structure of soybean protein thermal aggregates

$\beta$ -转角和 $\alpha$ -螺旋含量,但显著增加了 $\beta_1$ -折叠、 $\beta_2$ -折叠和无规则卷曲的含量。 $\beta$ -转角和 $\alpha$ -螺旋代表蛋白质的有序结构,而 $\beta$ -折叠和无规则卷曲代表蛋白质的无序结构。这表明热处理能打开蛋白结构,暴露疏水性基团,增强蛋白质间的相互作用,进而通过分子间 $\beta_1$ -折叠形成蛋白聚集体<sup>[16-17]</sup>。随着处理压力由 30 MPa 升高到 120 MPa,分子内 $\beta$ -折叠含量呈现先减小后增大趋势,而 $\beta_1$ -折叠、 $\beta_2$ -折叠和无规则卷曲含量呈现先增大后减小趋势, $\alpha$ -螺旋和 $\beta$ -转角含量逐渐增加。FTIR 光谱显示,高压均质处理对热聚集体氢键有显著影响,会导致蛋白热聚集体发生部分变性和二级结构改变。这表明低压条件下的高压均质处理促进热聚集体的有序结构向无序结构转变,并通过 $\beta$ -折叠形成更大的聚集体。研究表明,蛋白质疏水基团暴露和无序结构的增多能诱导蛋白在油水界面更好的吸附<sup>[18]</sup>。因此,低压条件下的高压均质可能通过导致大豆蛋白热聚集体的无序

结构增多和构象重排,提高其乳液的稳定性。而高压条件下的高压均质处理会破坏蛋白分子间的疏水性结构区域,打破分子间的作用力平衡,导致蛋白热聚集体内的 $\beta$ -折叠结构断裂,由大分子的热聚集体转化为小分子的热聚集体。这与 TEM 的结果相一致。

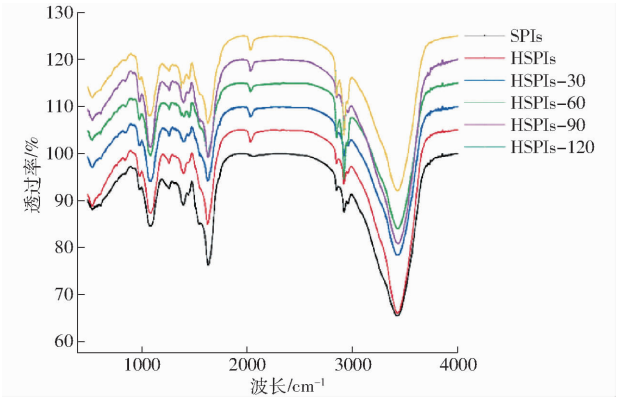


图 5 蛋白的红外光谱图

Fig. 5 Infrared spectrum diagram of protein

表 1 不同高压均质条件下大豆蛋白热聚集体二级结构的相对含量

| Tab. 1 Effect of HPH on the secondary structure of soybean protein thermal aggregate |                                 |                                 |                                 |                                 |                                  |                                 | % |
|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---|
| 二级结构类别                                                                               | SPIs                            | HSPIs                           | HSPIs-30                        | HSPIs-60                        | HSPIs-90                         | HSPIs-120                       |   |
| $\beta_1$ -折叠(分子间反平行 $\beta$ -折叠)                                                    | (6.96 $\pm$ 0.28) <sup>d</sup>  | (10.14 $\pm$ 0.18) <sup>a</sup> | (9.12 $\pm$ 0.12) <sup>c</sup>  | (9.42 $\pm$ 0.18) <sup>b</sup>  | (9.24 $\pm$ 0.14) <sup>bc</sup>  | (9.17 $\pm$ 0.15) <sup>c</sup>  |   |
| $\beta_2$ -折叠(分子间平行 $\beta$ -折叠)                                                     | (5.43 $\pm$ 0.21) <sup>e</sup>  | (6.43 $\pm$ 0.22) <sup>d</sup>  | (7.76 $\pm$ 0.14) <sup>c</sup>  | (8.88 $\pm$ 0.19) <sup>a</sup>  | (8.15 $\pm$ 0.19) <sup>b</sup>   | (7.79 $\pm$ 0.19) <sup>c</sup>  |   |
| 分子内 $\beta$ -折叠                                                                      | (24.53 $\pm$ 0.19) <sup>a</sup> | (24.00 $\pm$ 0.23) <sup>b</sup> | (23.25 $\pm$ 0.18) <sup>c</sup> | (20.81 $\pm$ 0.11) <sup>f</sup> | (21.92 $\pm$ 0.17) <sup>e</sup>  | (22.40 $\pm$ 0.21) <sup>d</sup> |   |
| $\alpha$ -螺旋                                                                         | (23.25 $\pm$ 0.17) <sup>a</sup> | (21.37 $\pm$ 0.21) <sup>c</sup> | (20.78 $\pm$ 0.15) <sup>d</sup> | (20.88 $\pm$ 0.14) <sup>d</sup> | (22.07 $\pm$ 0.15) <sup>b</sup>  | (22.24 $\pm$ 0.18) <sup>b</sup> |   |
| $\beta$ -转角                                                                          | (14.20 $\pm$ 0.21) <sup>a</sup> | (11.22 $\pm$ 0.18) <sup>d</sup> | (11.43 $\pm$ 0.16) <sup>d</sup> | (11.78 $\pm$ 0.16) <sup>c</sup> | (12.27 $\pm$ 0.18) <sup>bc</sup> | (12.72 $\pm$ 0.15) <sup>b</sup> |   |
| 无规则卷曲                                                                                | (25.63 $\pm$ 0.18) <sup>e</sup> | (26.84 $\pm$ 0.24) <sup>c</sup> | (27.66 $\pm$ 0.21) <sup>b</sup> | (28.23 $\pm$ 0.13) <sup>a</sup> | (26.35 $\pm$ 0.21) <sup>d</sup>  | (25.68 $\pm$ 0.12) <sup>e</sup> |   |

注:同行数据不同字母表示差异显著。

2.5 高压均质对大豆蛋白热聚集体荧光光谱的影响

荧光光谱主要反映芳香族氨基酸的微环境极性变化,能直接表征蛋白结构的三级结构构象变化。蛋白质最大吸收波长 $\lambda_{\max}$ 红移表明荧光发色基团暴露,蛋白结构展开,蓝移表明蛋白或者亚基发生了聚集等变化<sup>[19]</sup>。由图 6 可知,未经处理的大豆蛋白最

大吸收波长 $\lambda_{\max}$ 为 327 nm,而热处理导致 $\lambda_{\max}$ 发生红移至 330 nm,且荧光强度增强。这表明热处理通过破坏大豆蛋白分子间的相互作用,促进了大豆蛋白结构的展开和构象重组发生聚集,增加了蛋白中芳香族氨基酸所处环境的极性,从而增强了荧光发色基团与水分子的接触,导致发生红移和荧光强度

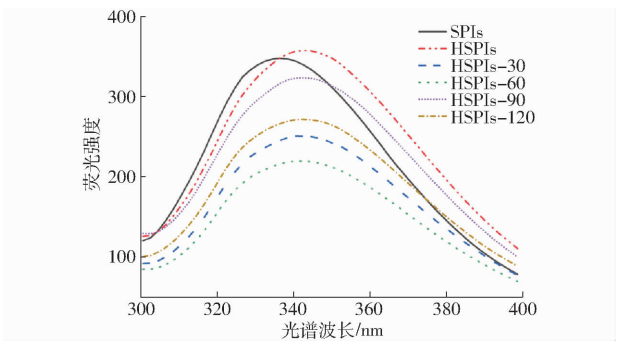


图 6 高压均质对大豆蛋白热聚集体荧光光谱的影响  
Fig.6 Effect of HPH on fluorescence spectrum of soybean protein thermal aggregates

升高<sup>[20-21]</sup>。随着高压均质处理压力的增大,大豆蛋白可溶性热聚集体的荧光强度出现下降现象,且 $\lambda_{\max}$ 先蓝移后红移。低压处理条件下所发生的蓝移和荧光强度下降表明大豆蛋白热聚集体的芳香族氨基酸从亲水性环境转移至更疏水的环境,反映出蛋白聚集体更趋向于再聚集的结构。而高压处理条件下所发生的蓝移和荧光强度降低表明大豆蛋白热聚集体发生解折叠,增强了芳香族氨基酸的水合作用并转移至亲水环境,并发生了荧光猝灭现象。文献[22]的研究表明高压均质所产生的高压、高剪切力和空化作用能通过影响氢键和疏水相互作用来调节蛋白质的三级结构。

2.6 高压均质对大豆蛋白热聚集体表面疏水性的影响

蛋白表面疏水性反映蛋白表面疏水性基团的相对含量,对分子间相互作用能力有决定性影响,是衡量蛋白质变性程度的重要指标之一。由图 7 可知,与 SPIs 相比,HSPIs 的表面疏水性显著增强;随着高压均质处理压力的增强,表面疏水性指数呈现先降低后升高的趋势,且在 60 MPa 的条件下达到最低,但也显著高于 SPIs。这是因为当蛋白受到外界加热条件的影响时,蛋白质单体发生可逆的构象变化,其高级结构被打开,内源性荧光光谱的 $\lambda_{\max}$ 发生红移现象,分子内部疏水性的芳香族和脂肪族氨基酸侧链基团暴露,导致 HSPIs 的表面疏水性显著增强。经过热处理得到的 HSPIs 结构展开,暴露出来的疏水性基团增多,而低压力的高压均质处理增加了蛋白颗粒的碰撞聚集,从而通过共价交联和疏水相互作用进一步发生聚集反应<sup>[18]</sup>。这与内源性荧光光谱的结果相一致。高压处理 HSPIs 时,强剪切力对其内部隐藏的疏水性基团发生剪切效应,使更多的疏水性基团发生暴露并且削弱了蛋白聚集反应,导致表面疏水性随之增强。

2.7 高压均质对大豆蛋白热聚集体  $\zeta$ -电位的影响  
蛋白质聚集是蛋白质分子间的静电和疏水作用

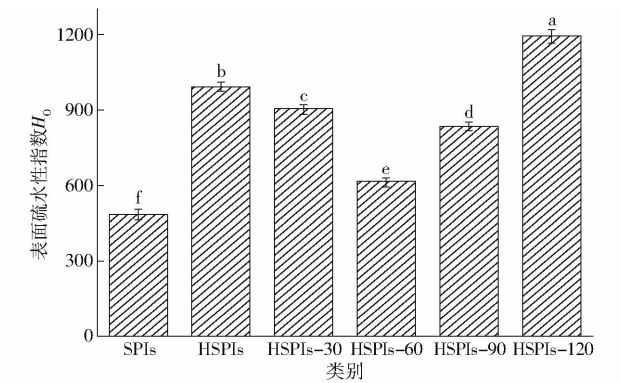


图 7 高压均质对大豆蛋白热聚集体表面疏水性的影响  
Fig.7 Effect of HPH on hydrophobicity of soybean protein aggregates thermal aggregates

间的竞争现象。在维持蛋白溶液体系的稳定性和形成不同类型的聚集体中, $\zeta$ -电位和表面疏水性指数的平衡发挥着重要的作用。当蛋白溶液中的亲水基团能够提供足够的斥力时,蛋白的聚集便不再进行。而当疏水性基团的作用较高时,便给蛋白质聚集提供动力。研究表明,蛋白质分子间的作用力除了与自身性质有关外,也取决于外界的加工改性条件<sup>[22]</sup>。由图 8 可知,与 SPIs 相比,HSPIs 的 $\zeta$ -电位绝对值显著上升;与 HSPIs 相比,随着高压均质处理压力的升高, $\zeta$ -电位绝对值呈现先升高后下降的趋势。热处理可以促进可溶性蛋白聚集体结构的打开,诱导了疏水性基团的暴露进而造成 $\zeta$ -电位绝对值的升高。热处理后再进行高压均质处理的过程中,蛋白结构进一步展开,且在 30、60 MPa 高压均质处理后的 $\zeta$ -电位绝对值均高于 SPIs 和 HSPIs。热处理能促进可溶性聚集体二级结构和三级结构的改变,从而使更多的带电氨基酸暴露在分子表面<sup>[23]</sup>。高压处理后 HSPIs 的 $\zeta$ -电位也会发生变化,是由于高压处理会影响蛋白质二级结构和疏水能力,并且会诱发蛋白颗粒发生聚集和分解,进而导致溶液凝胶体系结构的重组以及溶液电位的改变<sup>[24]</sup>。热处理和高压均质处理均会引起蛋白结构发生变化,引

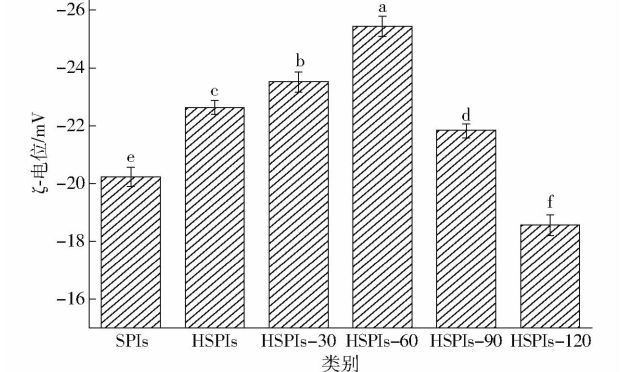


图 8 高压均质对大豆蛋白热聚集体  $\zeta$ -电位的影响  
Fig.8 Effect of HPH on  $\zeta$ -potential of soybean protein thermal aggregate

发疏水基团的暴露和电位的改变,进而影响可溶性聚集体分子的表面性质。结合表面疏水性和粒径分布结果可以推断,低压力的高压均质处理可以促进聚集体进行再次聚集,进而减少疏水性基团的暴露,提高各分子之间的斥力,增大溶液聚集体的粒径,而高压力的均质处理会诱导蛋白结构展开得更加完全且蛋白分子被解离成更小的分子,使更多的疏水性基团发生暴露,导致蛋白质表面的极性氨基酸以及表面电荷量减少,从而使得 $\zeta$ -电位绝对值下降。

2.8 高压均质对大豆蛋白热聚集体巯基含量的影响

由图 9 可知,与 SPIs 相比,HSPIs 的二硫键含量显著上升,游离巯基含量显著下降,总巯基含量无显著性差异;与 HSPIs 相比,随着高压均质处理压力的升高,二硫键含量呈现先升高后降低的趋势,游离巯基呈现先下降后上升的趋势,总巯基含量呈现先上升后下降的趋势。游离巯基含量可以反映外界处理条件对蛋白共价相互作用的影响。热处理可以促进游离巯基氧化成二硫键和发生-SH-SS 互换反应,从而发生游离巯基减少和二硫键增多的现象<sup>[13]</sup>;随着高压均质处理压强的增大,游离巯基含量整体呈现升高的趋势,这是因为在压力处理过程中蛋白质分子发生了部分去折叠或者离子化程度有所增强,游离巯基变得更加活泼且会随着场强和处理时间的增加而增强,但在压力为 60 MPa 时游离巯基含量略有下降,其原因可能为在此压力处理下聚集体形成二硫键的程度大于游离巯基的生成和表达<sup>[10]</sup>。二硫键对稳定蛋白质构象和聚集起着重要作用,可以使蛋白质分子相互作用形成更加紧密的结构。结果表明二硫键的含量随着压力增大呈现先升高后降低的趋势,其原因可能为低压力处理可以促进蛋白分子间和分子内的二硫键形成,促进交联反应和聚集体的形成,而高压处理下的强剪切作用会使聚集体自身的二硫键发生断裂,导致蛋白粒径减小,结构展开,疏水性增强。

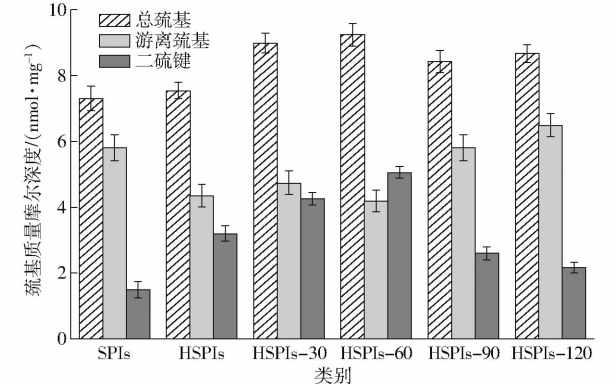


图 9 高压均质对大豆蛋白热聚集体巯基含量的影响  
Fig. 9 Effect of HPH on content of sulfhydryl group in soybean protein thermal aggregate

2.9 高压均质对大豆蛋白热聚集体流变特性的影响

由图 10 和表 2 可知, Sisko 模型可以拟合所有的乳液流变学曲线, 决定系数均为 0.99, 且均呈现非牛顿流体的剪切稀化现象, 流性指数  $n$  在 0.78 ~ 0.88 之间。对于稳定的乳液, 剪切变稀行为可能是由乳液中蛋白分子间的相互作用引起的分子间吸引作用及形成的网状结构所造成的<sup>[25]</sup>。与 SPIs 乳液相比, HSPIs 乳液的表观黏度和稠度系数显著升高; 在 30 ~ 120 MPa 时, 随着高压均质处理压力的升高, 乳液的表观黏度呈现逐渐降低趋势, 稠度系数呈现先增大后减小的趋势。但当乳液体系在受到初始外界剪切应力时, 表观黏度呈现先升高后下降的趋势。这表明热处理增加了乳液的表观黏度和稠度指数, 而高压均质处理对乳液流变学性质的影响取决于处理压力, 其变化趋势与聚集体粒径的变化趋势相一致。研究表明, 乳液的流变性主要取决于表面活性剂及分散相的体积分数及其粒径分布, 假设乳液内部蛋白分子所形成的网状结构具有相似的刚性, 那么较大分子粒径的蛋白聚集体就需要更大的外界剪切应力才能发生流变行为<sup>[14]</sup>。因此, 当外界剪切应力刚作用于乳液时, 大豆蛋白热聚集体表现出更大的流动阻力和表观黏度。而相关研究表明, 蛋白聚合程度的提高和体积分数的增大可以显著增加乳液体系中蛋白分子间基团的相互作用, 形成更多更稳定的网状结构以便提

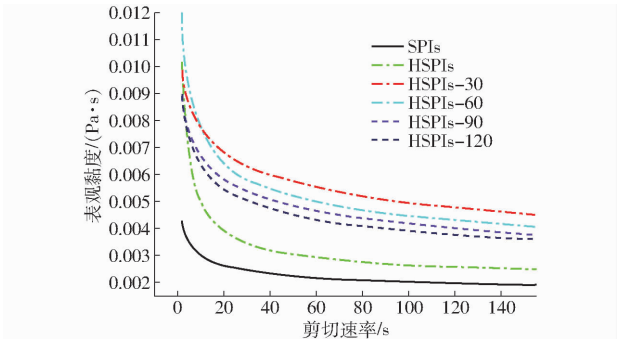


图 10 高压均质对大豆蛋白热聚集体流变学曲线的影响  
Fig. 10 Effect of HPH on rheological curve of soybean protein thermal aggregate

表 2 高压均质对大豆蛋白热聚集体流变学特性的影响  
Tab. 2 Effect of HPH on rheological properties of soybean protein thermal aggregates

| 类别        | 稠度系数 $K/(\text{Pa} \cdot \text{s}^n)$ | 流性指数 $n$ | 决定系数 $R^2$ |
|-----------|---------------------------------------|----------|------------|
| SPIs      | 0.007 3                               | 0.87     | 0.99       |
| HSPIs     | 0.012 2                               | 0.78     | 0.99       |
| HSPIs-30  | 0.013 2                               | 0.88     | 0.99       |
| HSPIs-60  | 0.015 8                               | 0.85     | 0.99       |
| HSPIs-90  | 0.014 5                               | 0.83     | 0.99       |
| HSPIs-120 | 0.011 7                               | 0.84     | 0.99       |

高束缚溶剂分子的能力,进而增强其稠度系数和表观黏度<sup>[26]</sup>。这可能也是高压均质处理调节大豆蛋白热聚集体流变性质的原因之一。

2.10 高压均质对大豆蛋白热聚集体乳化活性的影响

由表3可知,热处理显著提高了SPIs的EAI和ESI。这是因为热处理使大豆球蛋白的三级结构打开,暴露出疏水性基团,改变了蛋白分子表面的亲水/亲油性,降低油水界面的界面张力和促进乳液中的油滴形成凝胶网状结构,增强其在油/水界面上的吸附能力和乳液的黏度,导致其乳化活性和乳化稳定性的增强<sup>[7]</sup>。随着高压均质处理压力的升高,EAI和ESI呈现先升高后降低的趋势,且在高压均质压力为60 MPa时达到最大。研究表明,高压均质所产生的高压、湍流、剪切和空化效应可以通过影响蛋白游离巯基和疏水性基团的暴露,导致其EAI和ESI发生显著改变<sup>[27]</sup>。结合上文实验结果发现,低压条件下的高压均质处理可以促进游离巯基和二硫键发生互换反应和 $\zeta$ -电位绝对值升高,导致表面疏水性下降,从而诱导大粒径的可溶性聚集体形成。而大分子可溶性聚集体的形成可以显著增加油/水界面上吸附蛋白质的含量,增强界面活性,降低油水界面张力,进而提高蛋白质的乳化能力和乳化稳定性<sup>[28]</sup>。文献[11]的研究结果也表明适当压力的高压均质处理可以显著降低液滴间的界面张力和增强静电斥力,防止液滴破碎,进而增强乳液稳定性。而当高压均质压力过高时,可溶性聚集体发生进一步的破碎重组,形成粒径较小的蛋白体,可能会造成界面膜的稳定性下降和增强絮凝效应,进而导致乳

活性和乳液稳定性的降低。

表3 高压均质对大豆蛋白热聚集体乳化活性的影响  
Tab.3 Effect of HPH on emulsification activity of soybean protein thermal aggregates

| 类别        | 乳化活性指数/( $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ ) | 乳化稳定性指数/min                  |
|-----------|---------------------------------------------|------------------------------|
| SPIs      | (93.65 ± 4.44) <sup>e</sup>                 | (198.86 ± 5.34) <sup>e</sup> |
| HSPIs     | (122.28 ± 5.32) <sup>d</sup>                | (268.34 ± 6.87) <sup>e</sup> |
| HSPIs-30  | (152.14 ± 4.98) <sup>c</sup>                | (299.94 ± 5.51) <sup>b</sup> |
| HSPIs-60  | (221.90 ± 4.32) <sup>a</sup>                | (333.66 ± 4.84) <sup>a</sup> |
| HSPIs-90  | (199.42 ± 5.35) <sup>b</sup>                | (225.49 ± 5.61) <sup>d</sup> |
| HSPIs-120 | (158.45 ± 4.84) <sup>cd</sup>               | (193.22 ± 6.27) <sup>e</sup> |

注:同列数据不同字母表示差异显著。

3 结束语

以大豆蛋白为原料,采用热处理制备大豆蛋白热聚集体,探讨不同压力下高压均质技术对其结构和乳化活性的影响。结果表明:热处理会引起大豆蛋白结构展开、疏水性基团暴露,通过疏水相互作用形成二硫键,蛋白骨架结构变大,使粒径和浊度增大,形成可溶性热聚集体,进而导致乳化活性提高。与可溶性热聚集体相比,低压力的高压均质处理可以促进热聚体发生再聚集,使粒径和浊度逐渐增大、骨架结构变密、无序结构增多,疏水性降低, $\zeta$ -电位绝对值和二硫键含量升高,进而导致乳化活性的提高;而高压力的均质处理会导致热聚集体的二硫键和骨架结构发生大量断裂,分子结构展开,疏水性位点大量暴露,导致疏水性增强、蛋白分子链变短、粒径和 $\zeta$ -电位绝对值降低,进而导致乳化活性的降低。

参 考 文 献

[1] 朱颖,王中江,李杨,等.花青素对大豆蛋白质二级结构影响的多重光谱分析[J/OL].农业机械学报,2018,49(6):368-374,426.  
ZHU Ying, WANG Zhongjiang, LI Yang, et al. Effects of anthocyanins on the secondary structure of soybean protein isolate by multiplex spectroscopy[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2018, 49(6): 368-374, 426. [http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view\\_abstract.aspx?file\\_no=20180644&flag=1](http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20180644&flag=1). DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.06.044. (in Chinese)

[2] 李娜.干热预处理制备酶解全豆浆及其稳定性研究[D].天津:天津科技大学,2018.

[3] TANG C H, MA C Y. Effect of high-pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate[J]. LWT—Food Science & Technology, 2009, 42(2):600-611.

[4] 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.

[5] 何秀婷.大豆7S蛋白热聚集体的形成及其性质研究[D].广州:华南理工大学,2015.

[6] WAN Y, LIU J, GUO S. Effects of succinylation on the structure and thermal aggregation of soy protein isolate[J]. Food Chemistry, 2018, 245(15):542-550.

[7] KEERATI-U-RAI M, CORREDIG M. Heat-induced changes in oil-in-water emulsions stabilized with soy protein isolate[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(8):2141-2148.

[8] TANG C H, WANG X Y, YANG X Q, et al. Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties[J]. Journal of Food Engineering, 2009, 92(4):432-437.

[9] YANG J, LIU G, ZENG H, et al. Effects of high-pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 83(29):275-286.

[10] BOUAOUINA H, DESRUMAUX A, LOISEL C, et al. Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(4):270-284.

[11] LIU C M, ZHONG J Z, LIU W, et al. Relationship between functional properties and aggregation changes of whey protein induced by high pressure microfluidization[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(4):341-347.

- [J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2019, 50(5): 187 – 195. [http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view\\_abstract.aspx?file\\_no=20190522&flag=1&journal\\_id=jcsam](http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20190522&flag=1&journal_id=jcsam). DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298. 2019.05.022. (in Chinese)
- [20] DENAVIT J. A kinematic notation for lower-pair mechanism based on matrices[J]. Journal of Applied Mechanics, 1955, 22: 215 – 221.
- [21] QIAO Y J, TANG Y C, LI J S. Improved Harris sub-pixel corner detection algorithm for chessboard image[C]// Proceedings of the 2013 2nd International Conference on Measurement, Information and Control, 2013: 1408 – 1411.
- [22] 蔡自兴. 机器人学[M]. 2版. 北京: 清华大学出版社, 2009.
- [23] RASTEGAR J, DERAVID P. Methods to determine workspace, its subspaces with different numbers of configurations and all the possible configurations of a manipulator[J]. Mechanism and Machine Theory, 1987, 22(4): 343 – 350.
- [24] 李光, 肖帆, 杨加超, 等. 基于唯一域方法的机器人逆向运动学求解[J/OL]. 农业机械学报, 2019, 50(10): 386 – 394. LI Guang, XIAO Fan, YANG Jiachao, et al. Solution of inverse kinematics of robots based on unique domain method[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2019, 50(10): 386 – 394. [http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view\\_abstract.aspx?flag=1&file\\_no=20191045&journal\\_id=jcsam](http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20191045&journal_id=jcsam). DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298. 2019. 10. 045. (in Chinese)
- [25] 陈为, 李泽辰, 张婧, 等. 基于 HALCON 的工业机器人视觉系统标定方法研究[J]. 电子测量技术, 2020, 43(21): 137 – 141. CHEN Wei, LI Zechen, ZHANG Jing, et al. Research on HALCON-based robot vision calibration and application[J]. Modern Electronics Technique, 2020, 43(21): 137 – 141. (in Chinese)

(上接第 358 页)

- [12] 李杨, 陈凡凡, 王中江, 等. 超声预处理对大豆蛋白聚集体结构和乳化特性的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2020, 51(6): 366 – 374. LI Yang, CHEN Fanfan, WANG Zhongjiang, et al. Effect of ultrasonic pretreatment on structure and functional properties of soy protein aggregates[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(6): 366 – 374. [http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view\\_abstract.aspx?file\\_no=20200640&flag=1](http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20200640&flag=1). DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298. 2020.06.040. (in Chinese)
- [13] PENG W, KONG X, CHEN Y, et al. Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 52(2): 301 – 310.
- [14] RYAN K N, VARDHANABHUTI B, JARAMILLO D P, et al. Stability and mechanism of whey protein soluble aggregates thermally treated with salts[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 27(2): 411 – 420.
- [15] SHEN L, TANG G H. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate[J]. Food Research International, 2012, 48(1): 108 – 118.
- [16] CHEN L, ETTELAIE R, AKHTAR M. Improved enzymatic accessibility of peanut protein isolate pre-treated using thermosonication[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 93(15): 308 – 316.
- [17] GUO Z W, TENG F, HUANG Z X, et al. Effects of material characteristics on the structural characteristics and flavor substances retention of meat analogs[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 105: 105752.
- [18] HE X T, YUAN D B, WANG J M, et al. Thermal aggregation behaviour of soy protein: characteristics of different polypeptides and sub-units[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2016, 96(4): 1121 – 1131.
- [19] ZHANG Y, YANG R, ZHANG W, et al. Structural characterization and physicochemical properties of protein extracted from soybean meal assisted by steam flash-explosion with dilute acid soaking[J]. Food Chemistry, 2017, 219(1): 48 – 53.
- [20] MUDASIR A M, SAINI C S, et al. Heat treatment of sunflower protein isolates near isoelectric point: effect on rheological and structural properties[J]. Food Chemistry, 2019, 276(41): 554 – 561.
- [21] TAO X, CAI Y, LIU T, et al. Effects of pretreatments on the structure and functional properties of okara protein[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 90(7): 394 – 402.
- [22] GONG K, CHEN L, XIA H, et al. Driving forces of disaggregation and reaggregation of peanut protein isolates in aqueous dispersion induced by high-pressure microfluidization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 7643 – 7654.
- [23] OLIVIERO B, POTIN F, 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(2): 292 – 300.
- [24] LI K, ZHONG Q. Aggregation and gelation properties of preheated whey protein and pectin mixtures at pH 1.0 – 4.0[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 60(2): 11 – 20.
- [25] DAPUETO N, TRONCOSO E, MELLA C, et al. The effect of denaturation degree of protein on the microstructure, rheology, and physical stability of oil-in-water (O/W) emulsions stabilized by whey protein isolate[J]. Journal of Food Engineering, 2019, 263(33): 253 – 261.
- [26] DICKINSON E. Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and foams[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 68(2): 219 – 231.
- [27] KEERATI-U-RAI M, CORREDIG M. Effect of dynamic high-pressure homogenization on the aggregation state of soy protein[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(9): 3556 – 3562.
- [28] WU D, WU C, WANG Z, et al. Effects of high pressure homogenize treatment on the physicochemical and emulsifying properties of proteins from scallop (*Chlamys farreri*) [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94(5): 537 – 545.