

L-精氨酸/L-赖氨酸改性大豆分离蛋白乳化性

马天怡¹, 郭凤仙², 何振东¹, 黄梅桂¹, 王耀松^{1*}

(1. 南京林业大学 轻工与食品学院, 江苏 南京 210037; 2. 泉州师范学院 海洋与食品学院, 福建 泉州 362000)

摘要: 在质量浓度为 20 g/L 大豆分离蛋白(SPI)中分别加入终质量浓度分别为 1、3 g/L 的 L-精氨酸(L-Arg)和 L-赖氨酸(L-Lys), 以不加氨基酸、仅调节与上述溶液对应相同 pH 的样品为处理对照, 制备水包油型(O/W)乳状液。通过物化手段及光谱技术表征 SPI 结构、溶液的物化性质和乳化性能以及乳状液的微观结构。结果表明, L-Arg、L-Lys 可提升 SPI 溶液的 pH, 显著提高蛋白溶解度(从 77.1%到最大 91.3%)、降低浊度, 促进蛋白分子疏水性基团折叠而降低蛋白疏水性, 有效降低 SPI 在溶液中的粒径大小并提高蛋白带电量, 降低蛋白所成乳状液的乳滴大小且提高其均匀性; 改性后的 SPI 比对照组的乳化活性和乳化稳定性分别提高了 31.4%和 78.9%; 相比之下, L-Arg 比 L-Lys 更能有效地改性 SPI 结构而获得更高的乳化活性, 且乳化活性随着两种氨基酸浓度的增加而增强。

关键词: 大豆分离蛋白; L-精氨酸/L-赖氨酸; 溶解性; 乳化性; 食品化学品

中图分类号: TS201.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214(2022)01-0150-08

L-Arginine/L-lysine ameliorating the emulsifying properties of soy protein isolate

MA Tianyi¹, GUO Fengxian², HE Zhendong¹, HUANG Meigui¹, WANG Yaosong^{1*}

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, Fujian, China)

Abstract: L-Arginine (L-Arg) and L-lysine (L-Lys) with final mass concentrations of 1 g/L and 3 g/L were added to mass concentration of 20 g/L soy protein isolate (SPI) solution, respectively. The samples without adding L-Arg or L-Lys and the same pH corresponding to the added L-Arg or L-Lys were served as the control. These samples were then subjected to prepare oil-in-water (O/W) emulsions. The physical and chemical measurements and spectroscopic techniques were used to characterized the structure, physicochemical properties and emulsifying properties of SPI. Subsequently, the microstructure of the resulting emulsions was accordingly characterized. The results showed that the addition of L-Arg and L-Lys could increase the pH of SPI solution, significantly improve the solubility (from 77.1% to max 91.3%), decrease the turbidity, promote the hydrophobic group of protein molecular folding and reduce protein hydrophobicity. L-Arg/L-Lys also effectively reduced the SPI particle size in the solution and enhanced the charge, significantly reduced the size of emulsion droplets and promoted their uniformity. Consequently, compared with those of control group, the emulsification and emulsification stability of SPI after modification increased by 31.4% and 78.9%, respectively. L-Arg was capable of modifying SPI structure more effective than L-Lys to obtain higher emulsifying properties, and the emulsification increased with the increase of the concentration of these two amino acids.

Key words: soybean protein isolate; L-arginine/L-lysine; solubility; emulsifying properties; food chemicals

碱性氨基酸(BAA)是一类等电点 >7.0 的氨基酸,包括精氨酸(Arg)、赖氨酸(Lys)和组氨酸(His),其作为新型添加剂已用于食品中^[1]。研究发现,Arg能显著抑制蛋白质聚集,并能与多肽链上的特定氨基酸发生相互作用,达到提高蛋白质溶解度并稳定蛋白胶体的目的^[2]。His分子侧链上的咪唑基是增加肌球蛋白溶解度的关键基团,主要机理是咪唑基以其较强的亲核性破坏蛋白质二级结构中 α -螺旋中的氢键结构,打断肌球蛋白细丝的装配过程,进而降低蛋白质微粒的平均粒径^[3]。GUO等^[4]发现,Lys能减少猪肉肌球蛋白的 α -螺旋数量,增加 β -折叠、 β -转角和无规卷曲结构的数量,提高了蛋白质的溶解度。

BAA能通过提高肌球蛋白在油-水界面的吸附能力来提升肌球蛋白乳化活性和稳定性。不同BAA具有不同的改性机制,其中Arg能增加油-水界面压力和蛋白质在油滴表面的定位速率,但降低了蛋白质在油滴表面的扩散速率,而Lys则能提升蛋白质在油滴表面的定位速率,但降低了油-水界面压力和蛋白质在油滴表面的扩散速率^[5]。ZHU等^[6]通过研究Arg、Lys改性后的肌原纤维蛋白-大豆油O/W型乳状液,发现Arg、Lys的引入显著降低乳滴的粒径尺寸和表观黏度,提高粒子的 ζ -电位绝对值,加上Arg、Lys的两亲性,直接参与油滴的界面吸附,有效提高蛋白质O/W型乳状液的稳定性。

目前,关于BAA处理肉类蛋白的报道较多,并发现Arg/Lys具有更好的改进效果,而与之相关的改进机制也研究得较为透彻,但是鲜有利用BAA提高植物源蛋白(如大豆蛋白)的报道。因为大豆蛋白营养价值和产量较大,在食品工业生产中其被广泛应用在多种食品体系中^[7]。天然大豆蛋白存在加工缺陷,如溶解度不高、乳化性能差、稳定性低等,又由于动物源和植物源蛋白质结构的显著差异(肌肉蛋白通常呈纤维状^[8],植物蛋白通常呈球状^[9]),因此,本研究将BAA中的Arg、Lys引入大豆蛋白乳化体系中,探讨其对大豆分离蛋白结构的影响进而改进其乳化性能,以期植物蛋白功能性提升提供一种技术策略和理论基础。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

大豆购于锁金村农贸市场,保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱;新鲜大豆油购于当地超市。

L-精氨酸(L-Arg)、L-赖氨酸(L-Lys),上海源叶生物科技有限公司;尼罗红、耐尔蓝A,上海麦克林生化科技有限公司;5,5'-二硫代二硝基苯甲酸(DTNB),上海生工生物工程股份有限公司;8-

苯胺基-1-萘磺酸镁(ANS-Mg),东京化成工业株式会社;十二烷基硫酸钠(SDS),国药集团化学试剂有限公司,以上试剂均为分析纯,实验用水为自制去离子水。

FE28 pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;SCIENTZ-18N冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;UVmini-1240紫外-可见分光光度计,岛津企业管理(中国)有限公司;LSM710共聚焦激光显微镜(CLSM),蔡司光学仪器(上海)国际贸易有限公司;FA25高剪切分散乳化机,上海弗鲁克流体机械制造;NanoDrop 2000C超微量分光光度计,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;SpectraMax i3x多功能酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;Zetasizer Nano ZSP纳米粒度电位仪,英国Malvern公司。

1.2 方法

1.2.1 大豆分离蛋白的制备

参考JIANG等^[10]方法制备大豆分离蛋白(SPI)。

1.2.2 碱性氨基酸处理SPI溶液及样品设置

取一定量冻干后的SPI粉末溶于去离子水,室温下磁力搅拌至蛋白质全部溶解,制成质量浓度为 20 g/L 的蛋白溶液,测定其pH为 6.92 ,作为空白对照,记为图中“对照”。分别在蛋白溶液中加入L-Arg或L-Lys使其最终质量浓度均为 $1、3\text{ g/L}$,加入L-Arg后溶液对应的pH分别为 8.84 和 9.55 ,分别记为图中“+1”、“+3”Arg(g/L),而加入L-Lys后溶液对应的pH分别为 8.95 和 9.16 ,分别记为图中“+1”、“+3”Lys(g/L)。将不加L-Arg和L-Lys,但将SPI溶液的pH分别调节至与加入SPI质量浓度为 $1、3\text{ g/L}$ 的L-Arg、L-Lys后对应等同pH的样品,分别记为图中“-1”、“-3”Arg(g/L)和“-1”、“-3”Lys(g/L)。

1.2.3 溶解度测定

参考WANG等^[11]方法作适当修改测定蛋白溶解度。将初始蛋白溶液使用与制备样品溶液pH相同的蒸馏水(经质量浓度 80 g/L NaOH调节)稀释到质量浓度 5 g/L ,在室温下离心(5000 g) 15 min 。蛋白质量浓度采用双缩脲法^[12]测定,测得离心前后蛋白质的质量浓度。蛋白质溶解度(%)计算公式如式(1)所示:

$$\text{溶解度}/\% = \rho_s / \rho_d \times 100 \quad (1)$$

式中: ρ_s 为离心后上清液中蛋白质量浓度, g/L; ρ_d 为离心前溶液中蛋白质质量浓度, g/L。

1.2.4 浊度测定

碱性氨基酸改性后的蛋白溶液浊度采用文献[13]方法进行测定。采用pH 7.0 、 50 mmol/L 磷酸缓冲液将 20 g/L 蛋白溶液稀释至 10 g/L ,在 600 nm 下

测定样品溶液的吸光度。

1.2.5 表面巯基含量测定

参考 WANG 等^[14]方法略作修改。将 20 g/L 蛋白溶液离心后取上清液, 用 pH 7.0、50 mmol/L 磷酸缓冲液稀释至 2 g/L; 取 2 mL 稀释液加入新鲜制备的 50 μ L 浓度为 10 mmol/L DTNB, 避光反应 15 min 后测定在 412 nm 波长下溶液的吸光度, 根据公式 (2) 计算 SH 含量 (μ mol/g)。

$$\text{SH}(\mu\text{mol/g}) = A_{412} \times 10^6 / (\rho \times \varepsilon) \quad (2)$$

式中: A_{412} 为 412 nm 下溶液的吸光度, cm^{-1} ; ρ 为蛋白质量浓度, 为 2 g/L; ε 为消光系数, 为 13600 L/(mol·cm)。

1.2.6 紫外全波长扫描

采用 pH 7.0、50 mmol/L 磷酸缓冲液将配制的初始蛋白溶液稀释至 1 g/L, 取样 2 μ L 在微量分光光度计上进行全波长扫描。设置波长范围为 220~400 nm。

1.2.7 内源荧光扫描

参考文献[15]方法并适当修改。在酶标仪上记录样品的色氨酸 (Trp) 荧光光谱曲线。取 1.2.6 节中 1 g/L 的稀释液于 96 孔板, 采用荧光光谱检测模式, 设置激发波长(λ_{ex})为 295 nm, 发射波长(λ_{em})为 320~400 nm, 扫描速率为 1 nm/s。

1.2.8 表面疏水性测定

蛋白质表面疏水性的测定根据参考文献[16]方法作适当修改。根据预实验结果, 将 1.2.6 节中 1 g/L 的蛋白溶液进一步稀释至 0.1~0.5 g/L 梯度, 然后每个样品的梯度稀释液各取 2 mL, 分别加入 20 μ L 10 mmol/L 疏水荧光探针 ANS-Mg, 室温下避光反应 15 min 后, 在酶标仪上测定其荧光强度; 设置 $\lambda_{\text{ex}}=365$ nm, $\lambda_{\text{em}}=484$ nm。以蛋白质量浓度 (g/L) 为横坐标, 荧光强度为纵坐标, 拟合一条回归直线, 其斜率即为样品的表面疏水性。

1.2.9 SPI 溶液的 ζ -电位与平均粒径测定

参考文献[17]方法, 采用纳米粒度电位仪测定蛋白粒径大小和 ζ -电位。测定粒径时采用光径为 1 cm 的粒径专用池, 上样量为 1 mL, 参数设置: 测定温度为 25 $^{\circ}$ C, 分散剂为水, 折光率为 1.330, 平衡时间 120 s; 测定电位时采用可抛弃折叠毛细管样品池, 样品溶液蛋白质量浓度为 0.2 g/L。

1.2.10 大豆蛋白乳状液的制备

每组样品各取 80 mL 质量浓度为 20 g/L 蛋白溶液, 分别与 20 mL 大豆油混合。利用高剪切分散乳化机在转速 13000 r/min 下间歇处理 2 min (分 3 次, 间隔 5 s, 每次 40 s); 在整个剪切过程中样品始终处于冰水浴中。

1.2.11 乳状液的乳化活性与乳化稳定性测定

乳化活性指数 (EAI) 和乳化稳定性指数 (ESI)

根据文献[11]方法作适当修改。乳状液制备结束后静置 1 min, 从烧杯底部取 50 μ L 乳液加到 5 mL 1.0 g/L SDS 中, 混匀后在 500 nm 下测定溶液吸光度, 记为 A_1 ; 60 min 后再从烧杯底部取 50 μ L 乳液同上操作, 吸光度记为 A_{60} 。根据公式 (3)、(4) 计算 EAI (m^2/g) 和 ESI (%)。

$$\text{EAI}(\text{m}^2/\text{g}) = 2T \times A_1 \times N / [10^4 \times (1 - \varphi) \times \rho] \quad (3)$$

$$\text{ESI}/\% = A_{60} / A_1 \times 100 \quad (4)$$

式中: T 为转化系数, 为 2.303; N 为稀释倍数, 201; φ 为分散相的体积分数, 为 0.25; ρ 为乳化前蛋白质量浓度, 为 20 g/L。

1.2.12 乳状液的微观结构

选取空白对照组 (即无氨基酸加入且无 pH 调节)、3 g/L L-Arg、3 g/L L-Lys 处理组和相应 pH 对照组的乳状液进行微观结构观察。参考 LI 等^[5]的方法, 采用激光共聚焦显微镜观察乳状液微观结构。取 1 mL 新鲜制备的乳液与 40 μ L 复合染料 (1.0 g/L 尼罗红和 1.0 g/L 耐尔蓝 A 等体积混匀, 二者溶剂均为丙酮) 充分混合, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光存放 30 min, 然后取少量染色后的样品于载玻片中央, 盖盖玻片时避免产生起泡。 $\lambda_{\text{ex}}=488$ nm, $\lambda_{\text{em}}=633$ nm。采用 $\times 10$ 目镜, $\times 40$ 物镜, 选择典型形貌区观察并拍照, 其中脂肪球被染为红色, 蛋白质被染为绿色。

1.3 数据处理

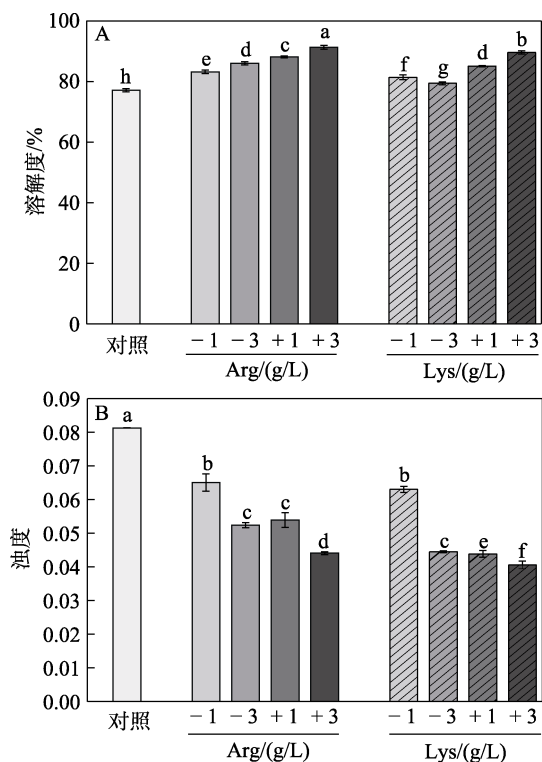
所有数据重复测定 3 次, 以“平均值 \pm 标准偏差”表示。使用 Statistix 9 软件 (美国佛罗里达州塔拉哈西分析软件公司) 进行统计分析。显著性水平设为 $\alpha=0.05$; 用最小显著性差异法检验数据间的差异显著性, 用 $p<0.05$ 表示。

2 结果与讨论

2.1 Arg/Lys 对 SPI 溶解性及浊度的影响

溶解度是衡量蛋白质水化能力的重要指标之一, 而溶解度的高低可能影响到蛋白质重要功能性之一的乳化性^[18]。不同处理方式下的 SPI 溶解度如图 1A 所示, 1、3 g/L 的 L-Arg、L-Lys 添加量均显著提升蛋白质溶解度, 且溶解度随碱性氨基酸添加量的增加而增加, 反映出添加剂分子与蛋白质之间存在着弱相互作用^[2,19]。文献显示^[1], L-Arg、L-Lys 的等电点 (pI) 分别为 10.76 和 9.74, 明显大于 SPI (pI \approx 4.5), 故 BAA 的引入会引起体系 pH 的显著提升, 而 pH 的升高使 SPI 更加偏离其等电点, 蛋白质微粒表面电荷增加导致的分子间静电斥力加强, 最终提高了蛋白质的溶解度。为此, 本文特设置了 pH 对照组, 即在不添加 L-Arg、L-Lys 条件下, 调节 SPI 溶液的 pH 与各 BAA 处理组相同。从图 1A

可以看出, pH 对照组的溶解度 (79.4%~86.0%) 显著高于空白对照组 (77.1%), 这与 LI 等^[20-21]研究结果类似。对比样品 L-Arg、L-Lys 处理组与 L-Arg、L-Lys 对照组的结果, 可见 BAA 还可在 pH 的基础上进一步改善蛋白质溶解度, 最大达到 91.3%。



注: 不同统计字母表示差异显著, $p < 0.05$, 下同

图 1 L-Arg/L-Lys 对大豆分离蛋白溶解性(A)和浊度(B)的影响

Fig. 1 Effects of L-Arg/L-Lys on solubility (A) and turbidity (B) of soybean protein isolate

浊度可以粗略反映 SPI 的聚集情况。一般地, 蛋白质溶液的浊度与溶解度呈负相关性, 如空白对照组的溶解度最小, 而其浊度最大。不同处理方式下的 SPI 溶液浊度如图 1B 所示, 3 g/L L-Arg、L-Lys 处理过的蛋白溶液浊度显著小于其他对照样品, 表明较高浓度的 BAA 添加到体系中, 能够明显降低蛋白质分子的聚集浑浊程度, 这种作用有利于 SPI 溶解度的提升。许多研究者发现, L-Arg 虽然是一种能使水的表面张力增大的盐, 但能够显著抑制蛋白质发生重聚集并增强蛋白质在体系中的稳定性, 进而提升蛋白质的溶解度^[2,22-26]; 而 Lys 主要通过静电排斥作用及增加蛋白的水合位点进而提高蛋白溶解性, 降低浊度^[1,27]。

2.2 L-Arg/L-Lys 对 SPI 表面疏水性及表面巯基含量的影响

表面疏水性可以反映蛋白质分子表面疏水基团的分布情况, 由于 ANS-Mg 荧光探针与疏水性基团

会发生特异性结合, 故可以根据 SPI 的表面疏水性推测蛋白质在结构上的变化。文献表明, 大豆蛋白是典型的球状蛋白^[9], 天然的 SPI 主要由亲水外壳和疏水内核构成, 通常具有一定的溶解性。当体系中引入其他小分子, 尤其是 BAA 等带电性的微粒, 极有可能因为体系 pH 变化、水的表面张力变化以及与蛋白分子相互作用而改变蛋白结构。

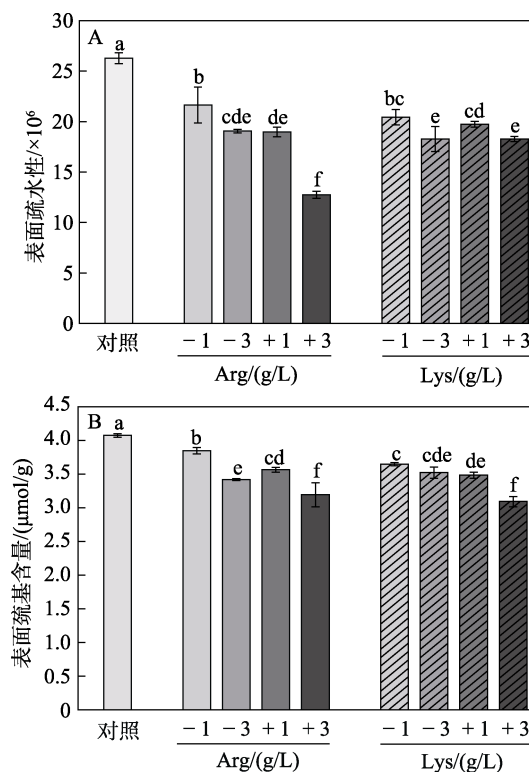


图 2 L-Arg/L-Lys 对大豆分离蛋白表面疏水性(A)和表面巯基(B)的影响

Fig. 2 Effects of L-Arg/L-Lys on surface hydrophobicity (A) and surface free sulfhydryl (B) of soybean protein isolate

图 2A 显示, L-Arg、L-Lys 的添加能显著 ($p < 0.05$) 降低 SPI 的表面疏水性, 并且 pH 的增加也会降低蛋白质表面疏水性。GAO 等^[28]发现, 随 Arg 浓度的增加, 肌球蛋白的表面疏水性有下降趋势, 这与本文结果一致。本研究还发现, L-Arg 处理组相对于 pH 调节组的表面疏水性下降更明显 ($p < 0.05$), 而 L-Lys 降低的效果不明显, 说明 L-Lys 对 SPI 表面疏水性的降低可能源自对 SPI 所处环境 pH 的提高, 而 L-Arg 在降低 SPI 表面疏水性方面还有增加水合位点作用。一般认为, 表面疏水性的变化是蛋白质分子结构部分展开、亲/疏水残基暴露、部分分子间聚集等原因共同作用的结果。本实验中, BAA 引入蛋白溶液, 体系 pH 升高, SPI 球蛋白分子发生部分展开, 暴露大量内部的疏水性残基, 为适应新环境分子内的疏水基团随即发生新的疏水相

互作用，引起蛋白质表面疏水性的降低，而分子间由于较强的静电斥力无法靠近，因而，SPI 保持了较高的溶解度和较低的浊度。

另外，L-Arg、L-Lys 添加到蛋白溶液后，这两种氨基酸带正电荷。一方面，带正电的氨基酸会与蛋白质表面带负电荷的残基（主要是酸性氨基酸侧链残基，如谷氨酸和天冬氨酸）发生静电结合^[20]；另一方面，L-Arg、L-Lys 也可能与芳香族氨基酸残基酪氨酸（Tyr）、苯丙氨酸（Phe）、色氨酸（Trp）发生特异性结合，主要是 L-Arg 的胍基和 L-Lys 的 ϵ -NH₂ 与芳香族氨基酸残基发生阳离子- π 相互作用^[29-30]。这两方面均能促进形成蛋白质-BAA 复合物，提高蛋白分子靠近、进一步聚集的能垒，故能稳定单个蛋白质分子。

图 2B 表明，L-Arg、L-Lys 的添加能显著 ($p < 0.05$) 降低 SPI 的巯基数量，并且质量浓度均为 3 g/L 的 L-Arg、L-Lys 在降低巯基数量方面效果相近。同表面疏水性的变化类似，对比空白对照组和 pH 对照组，可以发现巯基数量也随 pH 的上升而降低；对比 L-Arg、L-Lys 处理组和对应的 pH 对照组，可以看出这两种氨基酸在降低表面巯基含量方面的作用更加显著，这可能使表面巯基与加入的 L-Arg、L-Lys 发生潜在的酯化反应^[31]。

2.3 L-Arg/L-Lys 处理对 SPI 粒径、 ζ -电位的影响

为了探究 L-Arg、L-Lys 与 SPI 大分子之间的静电相互作用和 SPI 分子间的聚集情况，本研究也测定了蛋白质微粒大小（图 3A）及其表面的 ζ -电位（图 3B）。图 3A 表明，对照样品平均粒径为 128.3 nm，而 L-Arg、L-Lys 所有处理组平均粒径中的最大值为 107.7 nm，而未加 L-Arg、L-Lys（但 pH 调节）所有处理组平均粒径则为 46.2 nm，即添加 L-Arg、L-Lys 及 pH 处理能够显著降低 SPI 粒径大小 ($p < 0.05$)。其中，3 g/L Arg、Lys 处理效果最为明显。值得注意的是，1 g/L Arg 处理组的平均粒径分别大于各自对照组，而图 1A 显示它们的溶解度更大，由此说明，1 g/L L-Arg 可能诱导 SPI 组分内部发生解离和再聚集，形成了分子粒径较大的可溶性聚集体。

如图 3B 所示，所有溶液的 ζ -电位都是负值，原因是所有样品的 pH 均大于 SPI 的等电点。粒子表面电荷是决定其分散和聚集的重要指标之一^[32-33]。总体来看，所有样品的 ζ -电位绝对值分别与对应样品的溶解度呈正相关性，L-Arg、L-Lys 处理组和 pH 对照组的 ζ -电位绝对值显著 ($p < 0.05$) 高于空白对照组。表面净电荷越多，说明蛋白质微粒间的静电斥力越强，粒子不易靠近，则蛋白质之间发生聚集的可能性降低，整个体系趋于稳定^[33-34]，这与处理

后的 SPI 溶解度提高、浊度降低（图 1）的结果基本一致。

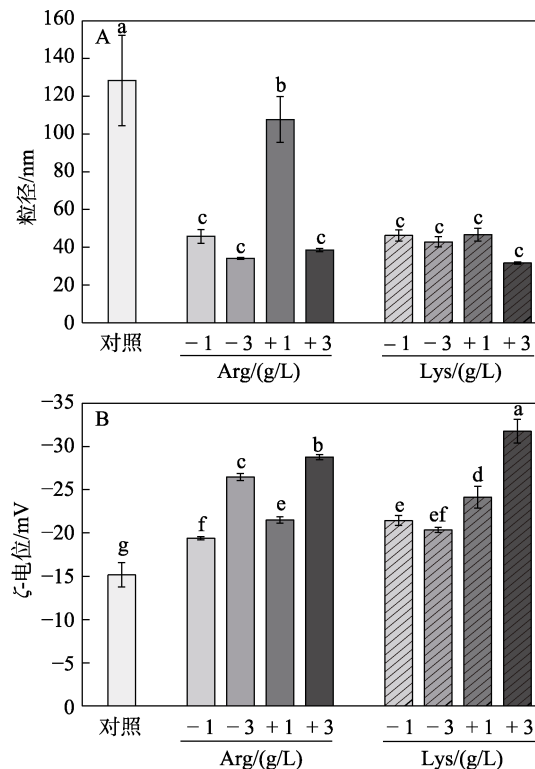


图 3 L-Arg/L-Lys 对大豆分离蛋白平均粒径 (A) 和 ζ -电位 (B) 的影响

Fig. 3 Effects of L-Arg/L-Lys on average particle size (A) and ζ -potential (B) of soybean protein isolate

2.4 L-Arg/L-Lys 处理对 SPI 结构的影响

表面疏水性的变化结果反映出 BAA 处理后的蛋白质发生了结构上的变化，而荧光、紫外光谱扫描能够进一步显示蛋白质在三级结构上的变化。L-Arg、L-Lys 处理过的 SPI 样品的内源荧光光谱图、紫外光谱图分别如图 4 和图 5 所示。荧光光谱实验采取 295 nm 的激发波长，针对特定的 Trp 残基^[35]，可以发现，经不同质量浓度的 L-Arg、L-Lys 处理后，SPI 的最大荧光强度均显著上升。另外，pH 对照组的数据显示，pH 的提高也能增加 SPI 的荧光强度。具体的，1 g/L L-Arg 处理 SPI 后，使得溶液的荧光强度提高显著，表明此浓度下的 L-Arg 处理隐藏了更多蛋白质内部的疏水性 Trp 残基；而对比 3 g/L L-Arg 处理组与相应的 pH 对照处理组，发现 3 g/L L-Arg 处理组在提高内源荧光强度方面作用不显著。1 g/L 和 3 g/L L-Lys 处理后，SPI 的荧光强度提升显著，且 3 g/L L-Lys 处理相比于 pH 对照组隐藏 Trp 残基的效果更加明显，而 1 g/L L-Lys 处理对荧光强度的改善则可能归因于 L-Lys 的添加对蛋白质溶液 pH 的增加。此外，从图 4 中发现，pH 调节及 L-Arg、L-Lys 加入均能引起荧光光谱最大吸收峰红移 1~3 nm，其中 L-Lys 造成的红移更为显著，这暗示着 SPI

亲水性的提高^[36]。这与疏水性(图 2A)变化趋势基本一致。

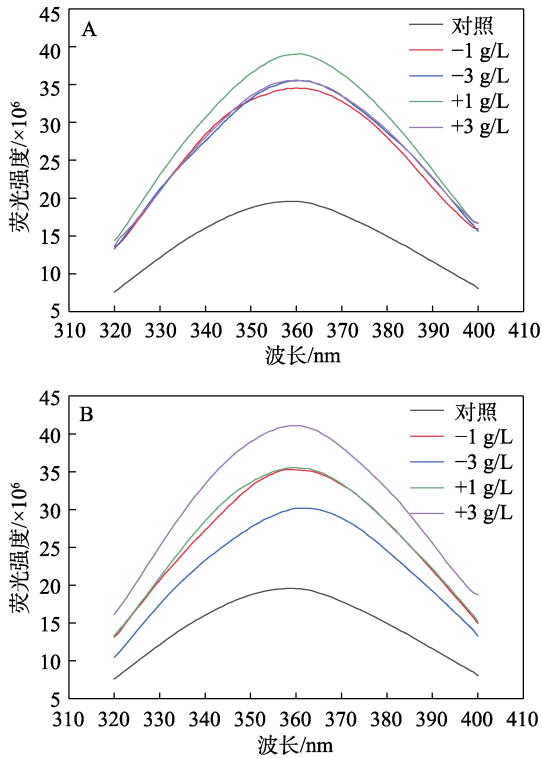


图 4 L-Arg (A) /L-Lys (B) 处理后的大豆分离蛋白荧光光谱图

Fig. 4 Fluorescence spectra of soybean isolate protein treated with L-Arg (A)/L-Lys (B)

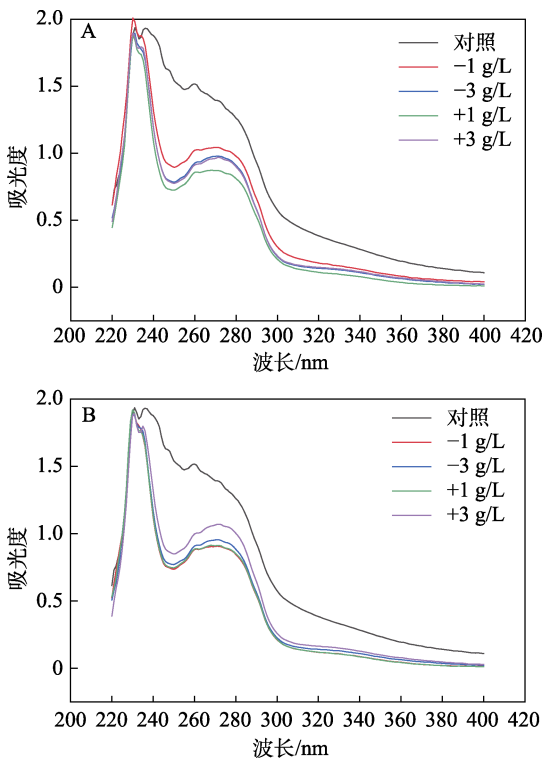


图 5 L-Arg (A) /L-Lys (B) 处理后的大豆分离蛋白紫外光谱图

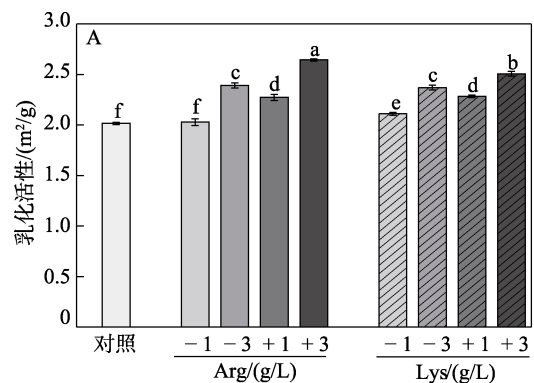
Fig. 5 Ultraviolet spectra of soybean isolate protein treated with L-Arg (A)/L-Lys (B)

具有苯环结构的氨基酸(即 Phe、Trp 和 Tyr)在 260~280 nm 下有特征吸收峰,图 5 表明, L-Arg、L-Lys 的引入均能显著降低大豆蛋白在 260~280 nm 内的吸光度。不同浓度的 L-Arg 也能降低 260~280 nm 内的吸光度,而对比 3 g/L L-Arg 处理组和相应 pH 对照组,降低作用差异不大。Lys 处理对 SPI 紫外光吸收度的改变作用不同于 L-Arg, 3 g/L L-Lys 处理使 SPI 在 260~280 nm 内的吸光度下降程度最小,说明 L-Lys 能够削弱因 pH 升高导致的蛋白质表面芳香族氨基酸残基的屏蔽效应。

通过两种光谱的比较分析,发现 3 g/L L-Arg 处理组与对应 pH 对照组具有几乎重合的荧光光谱和紫外光谱图,说明 3 g/L L-Arg 增加 SPI 的溶解度不是通过影响蛋白质表面 Trp 排布产生作用的,换言之,3 g/L L-Arg 与蛋白质表面 Trp 残基之间不存在潜在的相互作用。而对比 L-Lys 处理组与对应 pH 对照组,可以发现 L-Lys 可能与 SPI 相互作用。L-Arg、L-Lys 对 SPI 紫外光谱的变化与荧光光谱的变化基本一致,即它们与 SPI 相互作用促进蛋白分子疏水性折叠。

2.5 L-Arg/L-Lys 处理对 SPI 乳化性能的影响

EAI 和 ESI 可以衡量乳状液的物理稳定性,EAI 代表单位质量(g)蛋白质所能稳定的油-水界面大小(m^2),反映乳化剂的乳化能力^[37];而 ESI 则反映乳状液应对外界环境变化并维持体系不发生相分离的能力^[38]。如图 6 所示, L-Arg、L-Lys 的添加显著提高了大豆分离蛋白的乳化活性和稳定性;相比空白对照组,乳化活性和稳定性分别最大提高了 31.4%和 78.9%。表明经过它们改进修饰后的 SPI 更容易在油滴表面形成界面膜,进而促进油滴的分散,并稳定乳液油滴。较高浓度的 L-Arg、L-Lys 处理更能提高 SPI 的乳化活性。这可能是较高浓度的 BAA 能有效提高 SPI 溶解度及 SPI-BAA 复合物充当乳化剂所造成的。结合粒径变化规律(图 3B),发现蛋白质溶液的粒径越小,制备的乳状液乳化活性越高,说明较小的粒径有利于提升蛋白质的界面吸附性, MORALES 等^[39]也发现了类似规律。此外,图 6A 还表明,环境的 pH 越偏离蛋白质等电点,蛋白质的乳化活性越大。



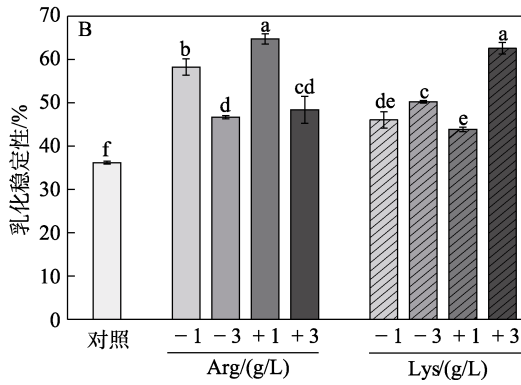


图 6 L-Arg/L-Lys 对大豆分离蛋白乳化活性 (A) 和乳化稳定性 (B) 的影响

Fig. 6 Effects of L-Arg/L-Lys on emulsifying activity (A) and emulsifying stability (B)

L-Arg、L-Lys 加入同样也能改善 SPI 的乳化稳定性, 且总体上浓度越大, 乳状液的稳定性越好。L-Arg 的乳化稳定性的规律不同于 L-Lys, 尽管 3 g/L L-Arg 在提升乳化活性方面效果显著, 但是其乳化稳定性不如 1 g/L L-Arg。可能原因是高浓度的 L-Arg 导致界面膜脱水, 还可能与其侧链结构 (即平面化的胍基) 有关。有报道显示, 一定浓度的 L-Arg 会发生分子间的自缔合, 使 L-Arg 的柔性降低, 不利于 SPI-Arg 复合物在油滴表面的铺展^[6,30]。SHI 等^[40]在研究中也指出, Arg 的引入能显著提高鱼肉肌球

蛋白乳状液的物理稳定性。L-Arg、L-Lys 能提高乳状液稳定性的原因可能是, 它们的添加提高了体系 pH, 增加了 SPI 带电荷量, 乳液微粒间静电斥力增强, 形成的 SPI-BAA 复合物附着于油滴表面, 形成空间位阻效应, 阻碍乳液分子相互靠近。此外, SPI 分子、油滴颗粒以及 SPI-BAA 复合物等共同形成网络凝胶结构, 稳定乳化体系。

2.6 L-Arg/L-Lys 处理 SPI 后所成乳状液的微观结构

通过 CLSM 可以显示乳状液的微观结构, 结果如图 7 所示。从图 7 可以观察到, 乳状液体系由大小不等的油滴 (图中红色部分) 和连续相蛋白 (图中绿色部分) 组成, 蛋白质分散在油滴周围。空白对照组中, 可以很明显观察到较大直径的油滴 (直径超过 50 μm), 且油滴大小差异明显, 说明油滴可能发生了聚集。而在 3 g/L L-Arg 处理组和 pH 对照组中发现大颗粒油滴消失, 视野中出现的油滴最大直径也不超过 30 μm, 对比两组实验组, 发现添加 3 g/L L-Arg 的样品小尺寸油滴数量更多, 但 pH 对照组的油滴分布更加均匀。观察 3 g/L L-Lys 处理组和 pH 处理对照组, 可以明显看出 L-Lys 添加可以明显降低乳液中油滴尺寸, 且油滴分布均匀、相互远离, 说明蛋白质间存在较强的静电斥力, 又加上 SPI-Lys 复合物以及 SPI-SPI 缔合物填充于油滴之间, 进一步阻碍了油滴聚集, 维持了乳液的稳定。

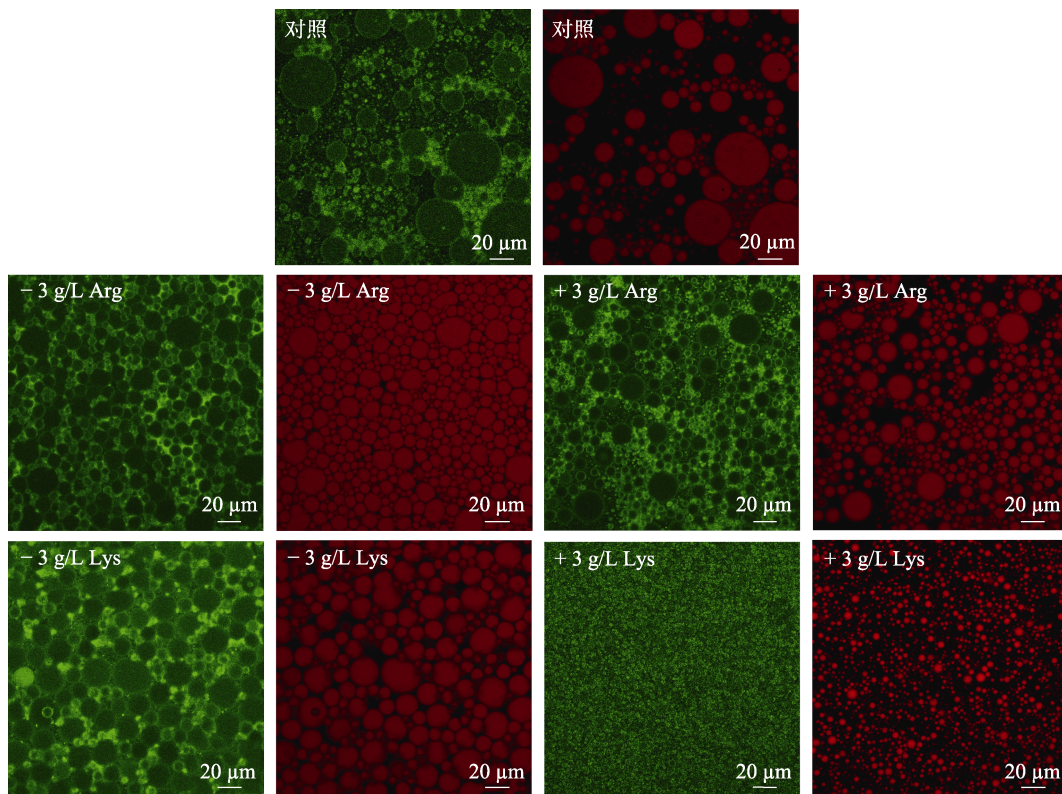


图 7 L-Arg/L-Lys 对大豆分离蛋白所成乳状液微观结构的影响

Fig. 7 Effects of L-Arg/L-Lys on microstructure of emulsions prepared with soybean protein isolate

而 pH 对照组中油滴分布不均匀, 且排列紧密, 有可能发生了油滴聚集现象。CLSM 的结果与图 6B 中稳定性结果一致。

3 结论

采用两种质量浓度均为 1.3 g/L 的 L-Arg、L-Lys 分别改性 SPI, 系统研究了这两种氨基酸对 SPI 结构、物理化学性质及溶解性、乳化性的影响。主要结论如下:

(1) L-Arg、L-Lys 均能有效地提高 SPI 的溶解性, 这为 SPI 基于溶解度的功能性提升提供了基础。

(2) L-Arg、L-Lys 加入 SPI 溶液中, 通过改变溶液 pH 及与蛋白之间非共价相互作用, 进而促进 SPI 疏水性基团(比如: Trp 残基)折叠; 显著降低 SPI 在溶液中的粒径大小, 并促进蛋白带电量。

(3) L-Arg、L-Lys 能够显著提高 SPI 乳化活性和乳化稳定性。

(4) L-Arg、L-Lys 对 SPI 结构及功能性的影响随着浓度增加而增强。总体上来看, L-Arg 比 L-Lys 更有效地提高 SPI 溶解性和乳化活性。

总之, 天然碱性氨基酸能够有效提升植物蛋白的乳化性。以上研究一方面挖掘了碱性氨基酸的功能性并扩大了它们在食品体系中的应用范围, 另一方面为蛋白功能改进提供了一种方法和理论基础。

参考文献:

- [1] MA T Y (马天怡), ZHANG W W (张唯唯), HE Z D (何振东), *et al.* Recent advances on basic amino acids modifying functionalities of food proteins[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(2): 294-305.
- [2] ARAKAWA T, EJIMA D, TSUMOTO K, *et al.* Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects[J]. *Biophysical Chemistry*, 2007, 127(1/2): 1-8.
- [3] CHEN X, ZOU Y F, HAN M Y, *et al.* Solubilisation of myosin in a solution of low ionic strength L-histidine: Significance of the imidazole ring[J]. *Food Chemistry*, 2016, 196: 42-49.
- [4] GUO X Y, PENG Z Q, ZHANG Y W, *et al.* The solubility and conformational characteristics of porcine myosin as affected by the presence of L-lysine and L-histidine[J]. *Food Chemistry*, 2015, 170: 212-217.
- [5] LI L X, CHEN L, NING C, *et al.* L-Arginine and L-lysine improve the physical stability of soybean oil-myosin emulsions by changing penetration and unfolding behaviors of interfacial myosin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 98: 105265.
- [6] ZHU X C, LI L X, LI S Y, *et al.* L-Arginine/L-lysine improves emulsion stability of chicken sausage by increasing electrostatic repulsion of emulsion droplet and decreasing the interfacial tension of soybean oil-water[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 89: 492-502.
- [7] SINGH P, KUMAR R, SABAPATHY S N, *et al.* Functional and edible uses of soy protein products[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2008, 7(1): 14-28.
- [8] CRAIG R, WOODHEAD J L. Structure and function of myosin filaments[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2006, 16(2): 204-212.
- [9] MU B N, XU H L, LI W, *et al.* Spinnability and rheological properties of globular soy protein solution[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 90: 443-451.

- [10] JIANG J, CHEN J, XIONG Y L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(16): 7576-7583.
- [11] WANG Y S, LIU C Q, MA T Y, *et al.* Physicochemical and functional properties of γ -aminobutyric acid-treated soy proteins[J]. *Food Chemistry*, 2019, 295: 267-273.
- [12] GORNALL A G, BARDAWILL C J, DAVID M M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1949, 177(2): 751-766.
- [13] JIANG J, XIONG Y L, CHEN J. pH Shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(13): 8035-8042.
- [14] WANG Y S, XIONG Y L, RENTFROW G K, *et al.* Oxidation promotes cross-linking but impairs film-forming properties of whey proteins[J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 115(1): 11-19.
- [15] ZHANG W W, LIU C Q, ZHAO J, *et al.* Modification of structure and functionalities of ginkgo seed proteins by pH-shifting treatment[J]. *Food Chemistry*, 2021, 358: 129862.
- [16] WANG Y S (王耀松), ZHANG W W (张唯唯), MA T Y (马天怡), *et al.* Influence of oxidative modification by malondialdehyde on structure and emulsifying properties of walnut protein[J]. *Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学)*, 2020, 53(16): 3372-3384.
- [17] WANG Y S, ZHAO J, ZHANG W W, *et al.* Modification of heat-induced whey protein gels by basic amino acids[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100: 105397.
- [18] LAM R S H, NICKERSON M T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(2): 975-984.
- [19] WU G L, WANG S J, TIAN Z, *et al.* Elucidating the weak protein-protein interaction mechanisms behind the liquid-liquid phase separation of a mAb solution by different types of additives[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017, 120: 1-8.
- [20] LI S Y, ZHENG Y D, XU P, *et al.* L-Lysine and L-arginine inhibit myosin aggregation and interact with acidic amino acid residues of myosin: The role in increasing myosin solubility[J]. *Food Chemistry*, 2018, 242: 22-28.
- [21] LI S Y, LI L X, ZHU X X, *et al.* Conformational and charge changes induced by L-arginine and L-lysine increase the solubility of chicken myosin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 89: 330-336.
- [22] STÄRTZEL P. Arginine as an excipient for protein freeze-drying: A mini review[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 107(4): 960-967.
- [23] HAYES D G, SOLAIMAN D K Y, ASHBY R D. Biobased surfactants: Synthesis, properties, and applications[M]. Cambridge: Academic Press and AOCS Press, 2019: 413-445.
- [24] ARAKAWA T, TSUMOTO K. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: Not facilitate refolding, but suppress aggregation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 304(1): 148-152.
- [25] BAYNES B M, WANG D I C, TROUT B L. Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(12): 4919-4925.
- [26] LANGE C, RUDOLPH R. Suppression of protein aggregation by L-arginine[J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2009, 10(4): 1-7.
- [27] HU Y, ARORA J, JOSHI S B, *et al.* Characterization of excipient effects on reversible self-association, backbone flexibility, and solution properties of an IgG1 monoclonal antibody at high concentrations: Part 1[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 109: 340-352.
- [28] GAO R C, SHI T, SUN Q C, *et al.* Effects of L-arginine and L-histidine on heat-induced aggregation of fish myosin: Bighead carp (*Aristichthys nobilis*) [J]. *Food Chemistry*, 2019, 295: 320-326.
- [29] SHUKLA D, TROUT B L. Interaction of arginine with proteins and the mechanism by which it inhibits aggregation[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114(42): 13426-13438.