

超声与碱性氨基酸联合改善大豆分离蛋白功能

李静^{1,2}, 罗灿^{1,2}, 李长春^{1,2}, 郑操^{1,2}

(1. 特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室, 湖北 孝感 432000; 2. 湖北工程学院 生命科学技术学院, 湖北 孝感 432000)

摘要: 为考察超声和碱性氨基酸 (BAA) 联合处理 (简称联合处理) 对大豆分离蛋白 (SPI) 结构和功能性质的影响, 对比了超声或 BAA 单独处理对 SPI 表面疏水性和荧光光谱、Zeta 电位、平均粒径、游离巯基、总巯基、相对溶解度、二级结构、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、乳化性、乳化稳定性进行了测试, 并对其中部分测定结果进行了相关性分析。结果表明, 联合处理后 SPI 的乳化性和相对溶解度均比 BAA 单独处理显著提高 (差异显著性 $P < 0.05$); 联合处理提升了 SPI 表面电荷量, 增强了粒子之间的静电斥力; 使更多的疏水基团暴露在极性环境中, 改善了 SPI 的亲水/疏水基团比例, 有利于提升 SPI 乳化能力; 使游离巯基暴露量增加, 总巯基含量下降; 有利于 SPI 向有序分子结构转变。超声或 BAA 单独处理和联合处理均不会引起 SPI 亚基结构的改变。表面疏水性与相对溶解度和乳化性的相关度分别为 0.960 和 0.861, 呈极显著正相关性, Zeta 电位与相对溶解度的相关度为 -0.974, 呈极显著负相关性。

关键词: 超声; 碱性氨基酸; 大豆分离蛋白; 乳化性质; 相关性; 食品用化学品

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2024) 07-1599-07

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Improvement on soy protein isolate function via combined treatment of ultrasound and basic amino acids

LI Jing^{1,2}, LUO Can^{1,2}, LI Changchun^{1,2}, ZHENG Cao^{1,2}

(1. Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables, Xiaogan 432000, Hubei, China; 2. College of Life Science and Technology, Hubei Engineering University, Xiaogan 432000, Hubei, China)

Abstract: In order to investigate the influence of ultrasound and basic amino acid (BAA) combined treatment (hereafter called combined treatment) on the structural and functional properties of soy protein isolate (SPI), the surface hydrophobicity, fluorescence spectra, Zeta potential, average particle size, free sulfhydryl group, total sulfhydryl group, relative solubility, secondary structure, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, emulsification and emulsification stability of SPI treated with ultrasound, BAA or both were compared, and the correlation analysis based on some results was performed. The results showed that, compared to BAA treatment alone, the combined treatment enhanced the emulsification and relative solubility of SPI, and improved surface charges and electrostatic repulsion between the protein particles. And more hydrophobic groups were exposed to the polar environment, promoting the ratio of hydrophilic/hydrophobic groups of SPI, which was conducive to the SPI emulsification ability. The free sulfhydryl group exposure was increased, with the total sulfhydryl group content decreased, which was beneficial for SPI transformation into ordered molecular structure. The structure of SPI subunit was not changed by ultrasound or BAA alone or combined treatment. The correlation between surface hydrophobicity and relative solubility as well as emulsification was 0.960 and 0.861, respectively, showing a very significant positive correlation. The correlation between Zeta potential and relative solubility was -0.974, demonstrating a very significant negative correlation.

收稿日期: 2023-06-01; **定用日期:** 2023-09-02; **DOI:** 10.13550/j.jxhg.20230440

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划指导性项目 (B2022178); 孝感市自然科学计划立项项目 (XGKJ2022010111)

作者简介: 李静 (1990—), 女, 讲师, E-mail: ljljini@163.com.

Key words: ultrasound; basic amino acids; soy isolate protein; emulsifying properties; correlation; food chemicals

大豆分离蛋白(SPI)作为大豆主要的工业化产品,是一种环境友好型天然材料,具有易获取、蛋白质质量分数高($\geq 90\%$)且氨基酸组成合理的优势,在植物蛋白消费中占比很大^[1-2],在食品、医药、化妆品等众多领域中发挥着重要作用。SPI营养价值高,但通过常规工业方法(碱提酸沉后喷雾干燥)生产的商业SPI溶解度较低、乳化性较差,限制了其在食品工业中的进一步应用^[3]。因此,探究绿色、清洁、高效的改善SPI功能的方法,是扩展其在食品工业应用范围的关键。

碱性氨基酸(BAA,如精氨酸、赖氨酸、组氨酸等)具有价格低、接受度高及良好的生物相容性等优点,已广泛应用在动物蛋白功能改性中^[4-6]。SHI等^[7]指出,L-精氨酸通过改变鱼肌球蛋白的构象有效提升了蛋白的乳化性质。SHUKLA等^[8]研究表明,L-精氨酸和L-赖氨酸可以通过阳离子- π 结合的方式与蛋白质侧链相互作用,有效提升了蛋白质的Zeta电位和表面疏水性。王耀松等^[9]认为,L-精氨酸和L-赖氨酸在不同pH下均能通过改变乳清蛋白分子间作用显著提升凝乳的质构特性和持水性。然而,将BAA应用在植物蛋白质改性中的研究较少。

超声作为一种绿色、清洁的物理处理方式,已广泛应用在蛋白质的改性中^[10]。HUANG等^[11]指出,高强度超声产生的空化效应和机械效应能改变SPI的结构,有效提升SPI的溶解度。李杨等^[12]研究发现,超声主要通过影响大豆蛋白三级结构的方式来改善大豆蛋白的乳化性。然而,关于BAA和超声联合作用对SPI的改性研究还鲜有报道。探究对比BAA单独处理、超声与BAA联合处理能否协同调控达到进一步提升SPI乳化能力是本研究关注的重点。

本研究拟以SPI为原料,研究BAA单独处理以及BAA和超声联合处理(简称联合处理,下同)对SPI理化性质和功能性质的影响,并对后两者的相关性进行分析,以期对SPI的开发应用提供数据支持。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

SPI(蛋白质质量分数 $\geq 90\%$),上海善优生物科技有限公司;5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、乙二胺四乙酸(EDTA)、甘氨酸,上海源叶生物科技有限公司;L-精氨酸、L-组氨酸、L-赖氨酸,质量分数均为98%,上海易恩化学技术有限公司;8-苯胺萘磺-1-酸盐(ANS),默克Sigma公司;

SDS-PAGE凝胶配制试剂盒,碧云天生物技术公司。其他试剂均为分析纯。

Nano-ZS90型纳米粒度及Zeta电位分析仪,英国马尔文仪器有限公司;Sorvall RC5B高速离心机、FB705超声细胞破碎仪,美国Thermo Fisher Scientific公司;IKA25高速剪切均质机,德国IKA公司;F-6000荧光分光光度计,日本Hitachi公司;UV-1800紫外-可见分光光度计,北京瑞利分析仪器;Universal Hood凝胶成像分析系统,美国Bio-Rad公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SPI的处理

将SPI溶解在0.01 mol/L磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH=7.00)中,配制质量浓度为10 g/L的SPI溶液。

BAA处理组:将SPI溶液分别加入含量(以SPI溶液为基准,下同)为0.3%的BAA(L-精氨酸、L-组氨酸、L-赖氨酸,下同)中,在室温下磁力搅拌1 h,然后用0.1 mol/L盐酸将溶液pH回调至7.00 \pm 0.05,将3种样品分别标记为A、H、L。

超声和BAA联合处理组:将SPI溶液分别加入含量为0.3% BAA后,在室温下磁力搅拌1 h,然后在20 kHz、振幅80%的超声细胞破碎仪中处理5 min,最终用0.1 mol/L盐酸将溶液pH调至7.00 \pm 0.05,将3种样品分别标记为AU、HU和LU。

原始SPI标记为Control,经过与超声和BAA联合处理组相同条件处理,只是不加入BAA,得到的SPI记为Control-U。

1.2.2 Zeta电位和粒径的测定

用0.01 mol/L的PBS(pH=7.00)将样品稀释至质量浓度为1.0 g/L后用0.45 μ m滤膜过滤。室温下用纳米粒度及Zeta电位分析仪测定样品的Zeta电位和粒径。

1.2.3 表面疏水性测定

参照文献[13]方法,采用ANS作为荧光探针检测SPI的表面疏水性。

用0.01 mol/L的PBS(pH=7.00)将样品稀释至质量浓度为1.0 g/L,同时将ANS稀释至2.4 mmol/L。在5 mL稀释后的SPI溶液中加入50 μ L ANS溶液。采用荧光分光光度计在激发波长为390 nm检测其在400~600 nm范围内荧光光谱。表面疏水性表示为样品的峰面积,空白荧光光谱面积用PBS进行校正。

1.2.4 内源荧光光谱测定

参照文献[13]方法,用0.01 mol/L的PBS(pH=

7.00) 将样品稀释至质量浓度为 1.0 g/L。在 300~450 nm 范围内测荧光光谱, 激发波长 290 nm, 狭缝宽度 5 nm。

1.2.5 游离巯基与总巯基含量测定

用含有 86 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、90 mmol/L 甘氨酸、4 mmol/L 的 EDTA 和 8 mol/L 尿素的 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH=8.0) 将样品溶液稀释至质量浓度为 3.0 g/L, 用于总巯基测定; 用不含尿素的 Tris-甘氨酸缓冲液将样品分别稀释至相同质量浓度, 用于游离巯基测定。然后在 5 mL 稀释后的 SPI 中加入 50 μ L Ellman 试剂 (质量浓度为 4.0 g/L 的 DTNB), 暗室中孵育 1 h, 不添加 DTNB 的样品溶液作为空白。反应结束后, 采用紫外-可见分光光度计测定混合溶液在 412 nm 处的吸光度。SPI 的巯基含量按照式 (1) 进行计算:

$$H=73.53 \times A_{412} \times D / \rho \quad (1)$$

式中: H 为 SPI 的巯基含量, μ mol/g; A_{412} 为样品在 412 nm 处吸光度; D 为样品稀释倍数; ρ 为样品质量浓度, g/mL。

1.2.6 FTIR 测定

采用 FTIR 表征 SPI 处理前后二级结构的变化^[14]。将样品经真空冷冻干燥后与烘干的 KBr 以质量比 1:100 进行混合研磨压片。扫描条件设置如下: 光谱范围 4000~500 cm^{-1} , 扫描次数 32 次。用 PeakFit Version 4.12 软件对酰胺 I 带 (1600~1700 cm^{-1}) 的数据分析, 并计算样品二级结构各组分的占比。

1.2.7 凝胶电泳测定

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 参照文献[14]的研究方法略有修改。采用 SDS 上样缓冲液 (150 mmol/L Tris-HCl、体积分数 20% 甘油、体积分数 1% SDS、8 mol/L 尿素、体积分数 2% β -巯基乙醇, pH 6.8)。将样品稀释至质量浓度为 1.0 g/L 后与 SDS 上样缓冲液以体积比 1:1 混合。然后煮沸 5 min, 以 10000 \times g 离心 5 min, 将 10 μ L 上清液上样至凝胶。采用质量分数 5% 的浓缩胶和质量分数 12% 的分离胶进行电泳测试, 室温下 80 V 运行直至条带从浓缩胶迁移至分离胶中, 后于 120 V 运行 1 h。使用考马斯亮蓝染液 R-250 染色 2 h, 脱色液 [V (乙酸): V (甲醇): V (超纯水)=1:3:6] 脱色 12 h。脱色后通过凝胶成像系统进行显影。

1.2.8 相对溶解度测定

根据文献[15]的方法进行测定并稍作修改。将样品用 0.01 mol/L 的 PBS (pH=7.00) 稀释至质量浓度为 1.0 g/L 后, 10000 \times g 下离心 20 min。以牛血清白蛋白为标准品, 用二喹啉甲酸 (BCA) 法测定上清液的蛋白质量浓度。蛋白相对溶解度按照式 (2) 进行计算:

$$RS/\% = \rho_2 / \rho_1 \times 100 \quad (2)$$

式中: RS 为相对溶解度, %; ρ_1 、 ρ_2 分别为离心前、后 SPI 溶液的蛋白质量浓度, g/L。

1.2.9 乳化能力测定

SPI 的乳化能力根据文献[16]测定并稍加修改。将 15 mL 质量分数为 0.2% 的样品溶液与 5 mL 中链脂肪酸甘油三酯 (MCT) 混合, 用均质机在 10000 r/min 下均质 1 min 得到乳液, 用质量分数 0.1% 的 SDS 溶液立即将 50 μ L 乳液稀释至 5 mL [稀释倍数 (N) = 100]。采用紫外-可见分光光度计测定稀释后乳液在 500 nm 处的吸光度 (A_0), 30 min 后同样条件再次测定其吸光度 (A_{30})。SPI 的乳化性 (EAI) 和乳化稳定性按照式 (3) 和 (4) 进行计算:

$$EAI = (2 \times T \times A_0 \times N) / (\rho \times L \times \varphi \times 10^4) \quad (3)$$

$$ESI/\% = A_{30} / A_0 \times 100 \quad (4)$$

式中: EAI 为乳化性, m^2/g ; ESI 为乳化稳定性, %; T 为常数, 2.303; A_0 和 A_{30} 分别表示 0 和 30 min 时的吸光度; N 为稀释倍数, 100; φ 为油相 MCT 的体积分数, 25%; L 为光程长度, 1 cm; ρ 为蛋白质量浓度, g/mL。

1.2.10 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 SPSS22.0 软件进行统计分析。以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 Zeta 电位和平均粒径分析

图 1 为是经不同方法处理后 SPI 样品的 Zeta 电位。蛋白质的表面电荷是判断其颗粒在溶液中分散和团聚程度的重要指标之一。由图 1 可以看出, 所有样品的 Zeta 电位都呈负值。

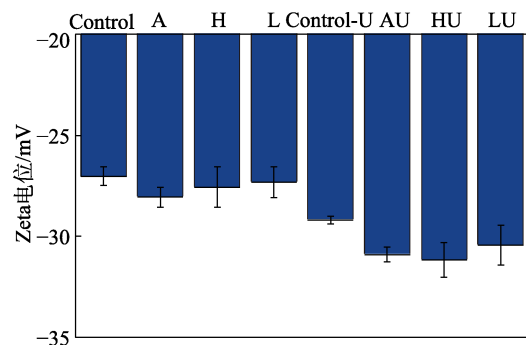


图 1 不同处理方法对 SPI Zeta 电位的影响

Fig. 1 Effect of different treatment methods on Zeta-potential of SPI

A、H、L 的 Zeta 电位绝对值显著高于 Control ($P < 0.05$), 这与文献[17]报道的结果一致。这可能

是由于 BAA 中的代表基团（如胍基、 ϵ -氨基）能从蛋白质的酸性残基中捕获质子^[18]，使带负电荷的离子基团增加。Control-U 的 Zeta 电位绝对值显著高于 Control ($P < 0.05$)，这可能是由于超声的空穴效应能使蛋白暴露更多的负电荷离子基团^[19-20]。与 A、H、L 相比较，AU、HU、LU 的 Zeta 电位绝对值显著性增加 ($P < 0.05$)，说明超声与 BAA 协同作用能够进一步提升 SPI 表面负电荷量。

不同处理方法对 SPI 平均粒径的影响见图 2。

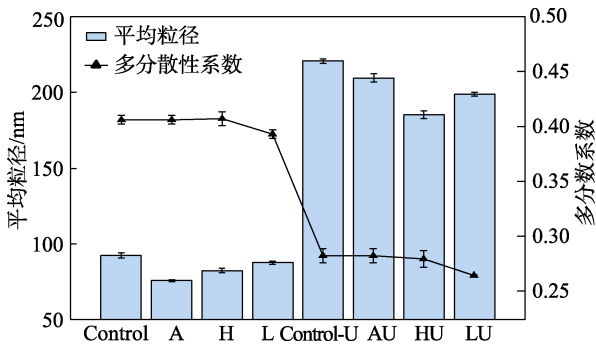


图 2 不同处理方法对 SPI 平均粒径的影响

Fig. 2 Effect of different treatment methods on mean particle size of SPI

由图 2 可以发现，A、H、L 平均粒径显著性低于 Control ($P < 0.05$)，马天怡等^[17]和 CAO 等^[21]也报道了相似的结果，这可能是由于 BAA 与蛋白质分子的芳香族残基相互作用提升了蛋白质聚集的活化能，减少了蛋白质颗粒之间的聚集^[22]。Control-U 的平均粒径显著大于 Control ($P < 0.05$)，之前的研究也报道了类似的结果^[12,23]，说明短时高强度的超声处理促进了蛋白质颗粒的聚集。AU、HU、LU 的平均粒径显著低于 Control-U ($P < 0.05$)，但高于 A、H、L ($P < 0.05$)，说明 BAA 处理只能在一定程度上降低由超声引起的蛋白质颗粒聚集作用。AU、HU、LU 和 Control-U 的多分散性系数 (PDI) 显著低于 Control 和 A、H、L ($P < 0.05$)，说明超声处理后样品粒径更加均一。

2.2 表面疏水性及荧光光谱分析

图 3 为经不同方法处理后 SPI 样品的表面疏水性。表面疏水性可以直观反映蛋白质表面疏水基团的多少，而疏水基团和亲水基团的组成比例决定了蛋白质在油水界面的吸附能力以及在水溶液中的聚集和分散程度。

如图 3 所示，A、H、L 的表面疏水性显著高于 Control ($P < 0.05$)，说明 BAA 让更多的疏水性基团暴露。这可能与 BAA 能够促进蛋白质分子展开，并阻止蛋白质分子聚集有关^[18,24]。Control-U 的表面疏水性显著性高于 Control ($P < 0.05$)，说明超声也能

诱导疏水性基团的暴露，文献^[10,23]也报道了相似的结果。这是由于超声处理能够引起蛋白质去折叠，使原本在蛋白内部的疏水基团更多地暴露在极性环境中^[20]。AU、HU、LU 的表面疏水性较 Control、A、H 和 L 显著提高 ($P < 0.05$)，说明联合处理在增强 SPI 表面疏水性方面比 BAA 单独处理更有效。这可能是由于超声和 BAA 共同促进了 SPI 的展开，使更多的疏水性基团暴露在极性环境中。

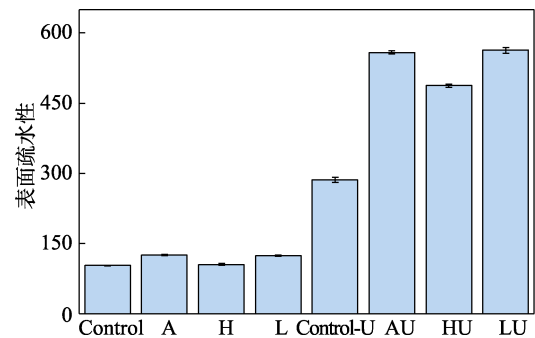


图 3 不同处理方法对 SPI 表面疏水性的影响

Fig. 3 Effect of different treatment methods on surface hydrophobicity of SPI

图 4 为不同方法处理后 SPI 样品的荧光光谱。蛋白质内部的芳香族氨基酸可以作为鉴定蛋白质三级结构的指标，常利用内源荧光光谱对特定的色氨酸和酪氨酸进行测定，通过荧光光谱强度及波峰的差异来判断蛋白结构的变化。

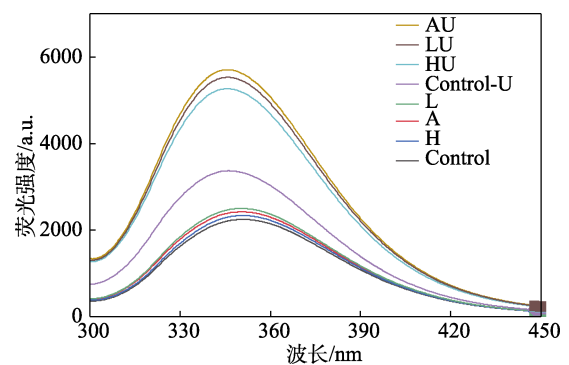


图 4 不同处理方法对 SPI 荧光光谱的影响

Fig. 4 Effect of different treatment methods on fluorescence spectrum of SPI

由图 4 可以看出，A、H、L 的荧光强度大于 Control，说明经过 BAA 处理 SPI 后使更多的色氨酸暴露在极性环境中。Control-U 的荧光强度大于 Control，说明超声也能使更多的芳香族残基暴露在极性环境中，这可能是由于超声产生的机械效应使蛋白质分子展开^[25]。而 AU、HU、LU 的荧光强度大于 A、H、L 和 Control，说明超声和 BAA 对 SPI 的展开存在协同作用，使更多的芳香族基团暴露在极性

环境中, 这与表面疏水性的结果一致。与 Control 相比较, A、H、L 的最大峰波长没有明显变化, 而 Control-U 发生蓝移。AU、HU、LU 与 A、H、L 相比较也发生不同程度的蓝移。这与李杨等^[26]的发现相似, 热诱导可以使 SPI 的最大峰波长发生蓝移。

2.3 游离巯基和总巯基含量分析

图 5 为不同方法处理后 SPI 样品的游离巯基和总巯基含量。蛋白质的巯基分为表面巯基和包埋在内部的巯基, 总巯基含量和游离巯基的改变可反映蛋白质结构的变化, 对判断其功能性质具有重要作用。

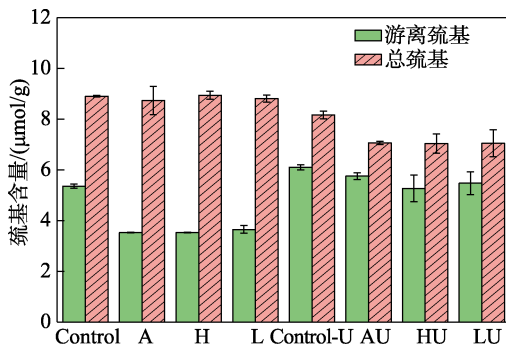


图 5 不同处理方法对 SPI 游离巯基和总巯基含量的影响
Fig. 5 Effect of different treatment methods on free sulfhydryl/total sulfhydryl groups of SPI

由图 5 可知, 与 Control 相比, A、H、L 的游离巯基含量显著下降 ($P < 0.05$), 总巯基含量没有显著性变化 ($P > 0.05$)。与 Control 相比较, Control-U 的游离巯基含量显著上升 ($P < 0.05$), 而总巯基含量显著性降低 ($P < 0.05$)。这可能是由于超声作用的剪切力和空化效应可将较大的蛋白质聚集体分散, 增大了巯基的暴露量, 同时破坏了分子间的二硫键形成了更多的游离巯基^[10]。与 A、H、L 相比较, AU、HU、LU 的游离巯基含量显著性上升 ($P < 0.05$), 总巯基含量显著性下降 ($P < 0.05$)。这可能是由于超声过程中水分子分解产生瞬时自由基 ($\cdot\text{OH}$ 和 $\cdot\text{H}$), 氧化了暴露的部分巯基, 降低了总巯基的含量, 因此, 联合处理的 SPI 总巯基含量显著性降低。

2.4 SPI 二级结构分析

图 6 为不同方法处理后 SPI 样品的二级结构占比。

从图 6 可见, 与 Control 相比, A、H、L 的 α -螺旋和 β -转角占比明显上升, β -折叠和无规卷曲占比明显下降, 说明在 BAA 处理下, SPI 从无序的无规卷曲结构转变为更为有序分子结构 (α -螺旋和 β -转角), CAO 等^[21]和 LI 等^[16]也报道了相似的研究结果。与 Control 相比, Control-U 的 α -螺旋、 β -转角和 β -折叠占比上升, 无规卷曲占比明显下降, 说

明超声的剪切作用和空化效应可以改变 SPI 的二级结构^[10,23]。与 A、H、L 相比较, AU、HU、LU 的 α -螺旋、 β -转角和 β -折叠占比增加, 无规卷曲占比下降。说明超声和 BAA 协同作用更有利于 SPI 由无序分子结构向有序分子结构的转变。

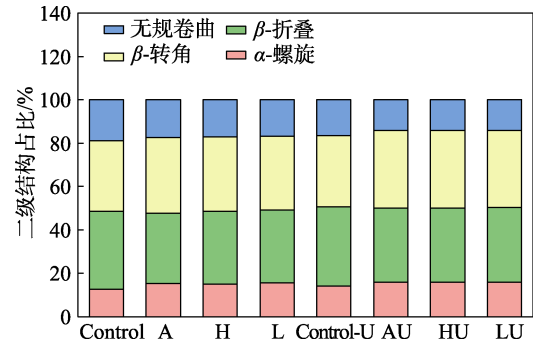


图 6 不同处理方法对 SPI 二级结构占比的影响
Fig. 6 Effect of different treatment methods on the secondary structural content of SPI

2.5 凝胶电泳分析

图 7 为不同方法处理后 SPI 样品的 SDS-PAGE 图像。SPI 主要由大豆球蛋白 (11S) 和 β -伴大豆球蛋白 (7S) 组成。

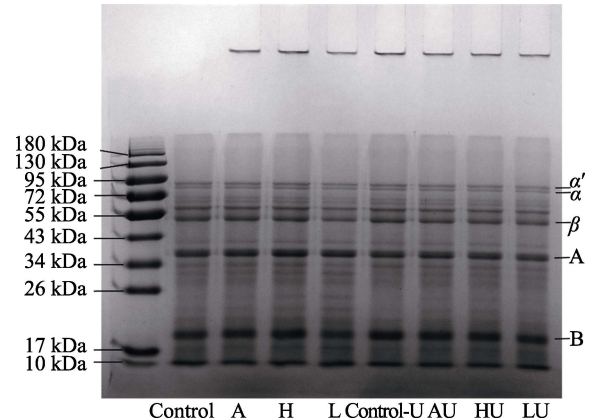


图 7 不同方法处理后 SPI 的 SDS-PAGE 图像
Fig. 7 SDS-PAGE images of SPI after different treatment methods

如图 7 所示, 7S 中 75 kDa 左右对应的条带分别是 α' 亚基和 α 亚基, 50 kDa 左右对应 β 亚基; 11S 中 36 kDa 与 22 kDa 左右分别对应 A 亚基和 B 亚基。与 Control 相比, A、H、L 和 AU、HU、LU 的 SDS-PAGE 图像没有明显变化, 说明 BAA 和超声处理均不会对 SPI 的亚基结构产生影响。HU 等^[10]和田然等^[14]利用超声对 SPI 以及大豆 7S 和 11S 进行处理也得到相似的结论。王耀松等^[9]研究也发现, 乳清蛋白经过 BAA 处理后的亚基条带没有产生明显变化。

2.6 相对溶解度分析

图 8 为不同方法处理后 SPI 样品的相对溶解度。溶解性是蛋白质在食品工业中应用的重要功能特性，较低的相对溶解度不仅限制了 SPI 应用领域，也影响与其密切相关的其他功能性质（如乳化性、起泡性、凝胶性等）。

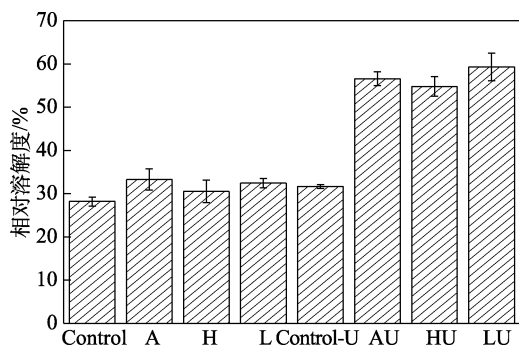


图 8 不同方法处理对 SPI 相对溶解度的影响

Fig. 8 Effect of different treatment methods on relative solubility of SPI

由图 8 可以发现，与 Control 相比，A、H、L 的相对溶解度显著提升 ($P < 0.05$)，CAO 等^[21]和 WANG 等^[5]也报道了相似的研究结果，这可能是由于 BAA 能够提高 SPI 的表面电荷量并降低 SPI 的粒径，从而增强蛋白质间静电斥力，减少蛋白粒子间的聚集^[17]，平均粒径和 Zeta 电位的结果也支持这一点。Control-U 的相对溶解度显著性高于 Control ($P < 0.05$)，这可能是由于超声能破坏蛋白分子的氢键和疏水相互作用，从而将不溶性聚集体转化为可溶且均一的单体^[27]。还可能是超声处理提高了蛋白质表面电荷量，增强了蛋白质间静电斥力。AU、HU、LU 的相对溶解度较 A、H、L 和 Control 显著提高 ($P < 0.05$)。因此，超声和 BAA 协同作用能进一步提升 SPI 的相对溶解度。

2.7 乳化能力分析

图 9 为不同方法处理后 SPI 样品的乳化性和乳化稳定性。

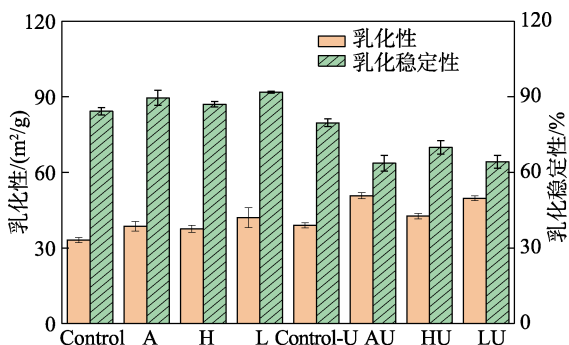


图 9 不同方法处理对 SPI 乳化能力的影响

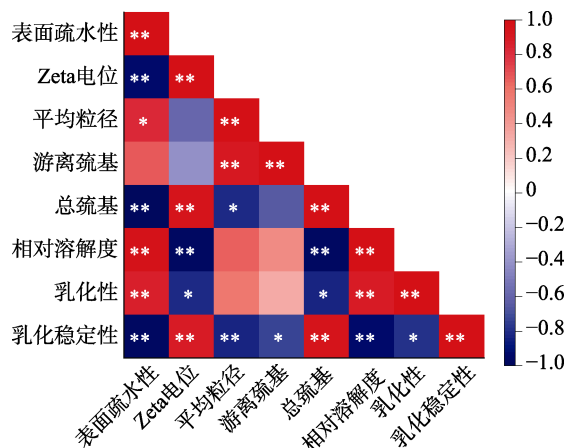
Fig. 9 Effect of different treatment methods on EAI/ESI of SPI

乳化能力作为蛋白质重要的功能性质，与植物蛋白乳制品的应用密切相关。蛋白质的乳化能力常用乳化性 (EAI) 和乳化稳定性 (ESI) 作为评价指标。

如图 9 所示，A、H、L 的 EAI 显著增加 ($P < 0.05$)。这可能是由于 BAA 可以促进蛋白质的展开，并降低蛋白质的颗粒尺寸，增强蛋白质颗粒在油水界面的吸附能力^[18,24]，平均粒径结果也支持了这一点。Control-U 的 EAI 也显著性高于 Control ($P < 0.05$)。AU、HU、LU 的 EAI 较 A、H、L 和 Control 显著提升 ($P < 0.05$)，说明超声和 BAA 协同作用能够进一步提升 SPI 的乳化能力，这可能与两者能够共同促进 SPI 的展开以及改善 SPI 亲水/疏水基团比例有关。另外，与 Control 相比，SPI 经赖氨酸处理后 (L) ESI 显著增加 ($P < 0.05$)，而经过精氨酸和组氨酸处理后 (A、H) 略微提升 ($P > 0.05$)。这是由于经过 BAA 处理后 SPI 带电荷量增加，乳液液滴之间的静电斥力增强，从而有效抑制了液滴间的聚集和絮凝^[17]。而不同 BAA 上的代表基团 (精氨酸的胍基、组氨酸咪唑基、赖氨酸 ϵ -氨基)^[28]影响了其与 SPI 的相互作用程度，最终表现为 ESI 的差异。Control-U 的 ESI 显著性低于 Control ($P < 0.05$)。与 Control 和 A、H、L 相比较，AU、HU、LU 的 ESI 显著下降 ($P < 0.05$)，这也可能与高强度超声引起的 SPI 粒径增加有关，乳液液滴之间更容易产生聚集和絮凝。

2.8 SPI 相关性分析

图 10 为蛋白质结构与功能特性的相关性分析。



“**”表示相关性极显著 ($P < 0.01$)；“*”表示相关性显著 ($P < 0.05$)

图 10 SPI 功能特性和结构之间的相关性分析

Fig. 10 Correlation analysis between functional properties and structure of SPI

从图 10 可见，其中表面疏水性与相对溶解度 (相关度 0.960) 和乳化性 (相关度 0.861) 呈极显著正相关，说明提高蛋白的表面疏水性可以改善蛋白质疏水基团和亲水基团的比例，从而有效提高蛋白的相对溶解度和乳化性。Zeta 电位与相对溶解度

呈极显著负相关(相关度-0.974),说明提高蛋白表面带电荷量可以增大蛋白质之间的静电斥力,减少粒子团聚,从而提高蛋白质相对溶解度。

3 结论

通过对单独处理(超声或BAA)和联合处理(超声和BAA)影响SPI功能的考察,得到结论如下:

(1) 超声和BAA联合处理在提升SPI的相对溶解度和乳化能力方面更显著;BAA单独处理在提升SPI乳化稳定性方面更有效。

(2) 与单独处理相比,联合处理显著提高了SPI的平均粒径,且粒径更为均一。

(3) 与BAA单独处理相比较,超声与BAA的协同作用下显著提升了SPI表面带电量,有效提升了粒子间静电斥力;使更多的疏水性基团暴露在极性环境中,改善了SPI的亲水/疏水基团比例,更有利于提升SPI的乳化能力;使SPI活性巯基含量显著提高,总巯基含量显著下降;更有利于SPI向有序分子结构转变。超声和BAA处理均不会引起SPI亚基结构的改变。

(4) 相关性分析表明,表面疏水性与相对溶解度(相关度0.960)和乳化能力(相关度0.861)呈极显著正相关性,Zeta电位与相对溶解度(相关度-0.974)呈极显著负相关性。

参考文献:

- JIMENEZ-MUNOZ L M, TAVARES G M, CORREDIG M. Design future foods using plant protein blends for best nutritional and technological functionality[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 113: 139-150.
- WANG Y, TUCCILLO F, LAMPI A M, *et al.* Flavor challenges in extruded plant-based meat alternatives: A review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2022, 21(3): 2898-2929.
- ZHA F C, RAO J J, CHEN B C. Modification of pulse proteins for improved functionality and flavor profile: A comprehensive review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(3): 3036-3060.
- ZHANG D J, ZHANG Y Y, HUANG Y J, *et al.* L-Arginine and L-lysine alleviate myosin from oxidation: Their role in maintaining myosin's emulsifying properties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(10): 3189-3198.
- WANG Y S, MA T Y, LIU C Q, *et al.* L-Histidine improves solubility and emulsifying properties of soy proteins under various ionic strengths[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2021, 152: 112382.
- ZHANG Y W, GUO X Y, PENG Z Q, *et al.* A review of recent progress in reducing NaCl content in meat and fish products using basic amino acids[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2022, 119: 215-226.
- SHI T, LIU H, SONG T, *et al.* Use of L-arginine-assisted ultrasonic treatment to change the molecular and interfacial characteristics of fish myosin and enhance the physical stability of the emulsion[J]. *Food Chemistry*, 2021, 342: 128314.
- 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.
- WANG Y S (王耀松), MA T Y (马天怡), ZHANG W W (张唯唯), *et al.* L-Arginine/L-lysine improved textural properties and water holding capacity of whey protein gels formed at various pH values[J]. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, 2020, 46(17): 46-53.
- HU H, WU J H, LI-CHAN E C Y, *et al.* Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30(2): 647-655.
- HUANG L R, DING X N, LI Y L, *et al.* The aggregation, structures and emulsifying properties of soybean protein isolate induced by ultrasound and acid[J]. *Food Chemistry*, 2019, 279: 114-119.
- LI Y (李杨), TIAN T (田甜), LIU J (刘军), *et al.* Effect of ultrasound on structure and emulsification of soy protein isolate SPI[J]. *The Food Industry (食品工业)*, 2019, 40(1): 184-188.
- XIONG W F, WANG Y T, ZHANG C L, *et al.* High intensity ultrasound modified ovalbumin: Structure, interface and gelation properties[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016, 31: 302-309.
- TIAN R (田然), FENG J R (冯俊然), SUI X N (隋晓楠), *et al.* Effect of high intensity ultrasound on the conformational and physicochemical properties of soy 7S and 11S globulin[J]. *Science and Technology of Food Industry (食品工业科技)*, 2022, 43(5): 87-97.
- ZHAO X H, TANG C H. Spray-drying microencapsulation of CoQ(10) in olive oil for enhanced water dispersion, stability and bioaccessibility: Influence of type of emulsifiers and/or wall materials[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 61: 20-30.
- 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.
- MA T Y (马天怡), GUO F X (郭凤仙), HE Z D (何振东), *et al.* L-Arginine/L-lysine ameliorating the emulsifying properties of soy protein isolate[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(1): 150-157, 163.
- 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.
- AGI A, JUNIN R, GBADAMOSI A, *et al.* Influence of nanoprecipitation on crystalline starch nanoparticle formed by ultrasonic assisted weak-acid hydrolysis of cassava starch and the rheology of their solutions[J]. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 2019, 142: 107556.
- JIANG L Z, 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.
- CAO Y G, LI Z R, FAN X, *et al.* Multifaceted functionality of L-arginine in modulating the emulsifying properties of pea protein isolate and the oxidation stability of its emulsions[J]. *Food & Function*, 2022, 13(3): 1336-1347.
- SCHNEIDER C P, TROUT B L. Investigation of cosolute-protein preferential interaction coefficients: New insight into the mechanism by which arginine inhibits aggregation[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2009, 113(7): 2050-2058.
- ZHENG T, LI X H, TAHA A, *et al.* Effect of high intensity ultrasound on the structure and physicochemical properties of soy protein isolates produced by different denaturation methods[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 97: 105216.
- 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.
- LI C, HUANG X J, PENG Q, *et al.* Physicochemical properties of peanut protein isolate-glucomannan conjugates prepared by ultrasonic treatment[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, 21(5): 1722-1727.
- LI Y (李杨), CHEN F F (陈凡凡), WANG Z J (王中江), *et al.* Effect of ultrasonic pretreatment on structure and functional properties of soy protein aggregates[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery (农业机械学报)*, 2020, 51(6): 366-374.
- LIU R, LIU Q, XIONG S, *et al.* Effects of high intensity ultrasound on structural and physicochemical properties of myosin from silver carp [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 37: 150-157.
- BELITZ H D, GROSCH W, SCHIEBERLE P. *Food Chemistry*[M]. Springer, 2004.