

不同离子对核桃蛋白结构及功能特性的影响

任祥瑞¹, 赵晓燕¹, 刘红开¹, 张晓伟¹, 王萌¹, 虎海防²

(1. 济南大学 食品科学与营养系, 济南 250022; 2. 新疆林业科学院, 乌鲁木齐 830063)

摘要: 为了提高核桃蛋白的利用率, 拓展核桃蛋白在食品领域的应用范围, 采用阴离子 (Cl^- 、 PO_4^{3-} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 HCO_3^-) 和阳离子 (Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+}) 对核桃蛋白进行改性, 并对改性后核桃蛋白的结构与功能特性进行研究。结果显示: 阴离子 PO_4^{3-} 、 HCO_3^- 和阳离子 Na^+ 、 Mg^{2+} 增加了核桃蛋白的巯基含量; 除了 Cl^- 和 K^+ , 其他 6 种离子改性核桃蛋白的二硫键含量均下降, 其中 HCO_3^- 改性核桃蛋白下降最多; 8 种离子对核桃蛋白的亚基组成无影响; Cl^- 、 PO_4^{3-} 、 Na^+ 和 Ca^{2+} 使核桃蛋白构象稳定性提高, 而 HCO_3^- 会使核桃蛋白紧密程度变差; 不同离子对核桃蛋白溶解度的影响存在差异; 不同离子改性均提高了核桃蛋白的乳化性和乳化稳定性, 其中阴离子 PO_4^{3-} 改性核桃蛋白的乳化性提高了 2.52 倍, 而阳离子 Na^+ 改性核桃蛋白的乳化稳定性提高了 46.22 个百分点; 阴离子 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 与阳离子 Mg^{2+} 对核桃蛋白的起泡性影响最大, 而 Na^+ 改性核桃蛋白的起泡稳定性最好; PO_4^{3-} 改性核桃蛋白的持水性和吸油性均最高。综合来讲, Na^+ 和 Mg^{2+} 改性核桃蛋白的乳化性、乳化稳定性、起泡性和起泡稳定性相对更好。

关键词: 核桃蛋白; 阴离子; 阳离子; 结构; 功能特性

中图分类号: TS229; TQ936.2

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2024)12-0020-07

Effects of different ions on the structure and functionality of walnut protein

REN Xiangrui¹, ZHAO Xiaoyan¹, LIU Hongkai¹, ZHANG Xiaowei¹,
WANG Meng¹, HU Haifang²

(1. Department of Food Science and Nutrition, University of Jinan, Jinan 250022, China;

2. Xinjiang Academy of Forestry Sciences, Urumqi 830063, China)

Abstract: In order to effectively improve the utilization rate of walnut protein and expand its application range in the field of food, walnut protein was modified by anions (Cl^- , PO_4^{3-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, HCO_3^-) and cations (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), and the structure and functionality of the modified walnut protein were studied. The results showed that the anions PO_4^{3-} , HCO_3^- and cations Na^+ , Mg^{2+} could increase the sulfhydryl content of walnut protein. Except Cl^- and K^+ , the content of disulfide bonds in walnut protein treated with other six ions decreased, among which HCO_3^- treated samples decreased the most. Eight ions had no effect on the subunit composition of walnut protein. The Cl^- , PO_4^{3-} , Na^+ and Ca^{2+} improved the stability of walnut protein conformation, while HCO_3^- made the tightness of walnut protein worse. The effects of different ions on the solubility of walnut protein were different. The ions improved the emulsifying property and emulsion stability of walnut protein. The emulsifying property of walnut

protein treated with anion PO_4^{3-} increased 2.52 fold, while the emulsion stability of walnut protein treated with cation Na^+ increased by 46.22 percentage points. The anion $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ and cation Mg^{2+} had the greatest effect on the foaming property of walnut protein, while the foam stability of walnut protein treated with Na^+ was the best. The walnut protein treated with PO_4^{3-}

收稿日期: 2023-04-26; 修回日期: 2024-06-25

基金项目: 山东省重点研发计划(2019QYTPY058); 国家自然科学基金(21406133); 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研项目(KY2020030)

作者简介: 任祥瑞(1999), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物与功能食品开发(E-mail)1240488170@qq.com。

通信作者: 赵晓燕, 教授, 硕士生导师(E-mail)zhaoyx_2201@163.com; 虎海防, 研究员(E-mail)43784936@qq.com。

had the highest water holding capacity and oil absorption capacity. In general, the emulsifying property, emulsion stability, foaming property and foam stability of walnut protein treated with Na^+ and Mg^{2+} are relatively better.

Key words: walnut protein; anion; cation; structure; functionality

核桃是胡桃科胡桃属植物,其与扁桃、腰果、榛子并称为世界“四大干果”^[1]。我国是世界核桃起源中心之一和世界核桃生产第一大国,拥有最大的核桃种植面积和产量。核桃富含脂肪、蛋白质及多种矿物质元素和维生素,营养丰富,有“万寿子”“长寿果”等美誉^[2]。核桃蛋白能增强脑功能,经常吃核桃有健脑益智的作用^[3]。门德盈等^[4]报道,核桃蛋白酶解后制备的核桃肽具有抗癌作用;Carrillo等^[5]认为核桃蛋白具有抗癌细胞增殖活性,对癌细胞扩散有抑制作用。此外,核桃蛋白还有抗氧化、降血压、提高记忆力和抗疲劳等功效^[6-8]。

近年来,国内外学者发现不同离子对核桃蛋白的结构与功能特性的影响存在差异,如某些阴离子可使核桃蛋白的乳化稳定性提高,某些阳离子可使核桃蛋白的泡沫稳定性提高,某些离子可增强核桃蛋白的凝胶性,提高核桃蛋白在黏附方面的应用^[9-10]。但目前对于离子是否改变核桃蛋白的其他物理性质,如溶解性、持水性等研究较少。另外,目前有关核桃蛋白的研究主要集中在蛋白提取分离方面,对于改性的相关研究较少。蛋白质的结构与其功能特性密切相关^[11],通过改性可促使蛋白质结构发生变化,提高其功能特性。

因此,本文利用不同离子对核桃蛋白进行改性,研究改性核桃蛋白的结构及功能特性变化,以期为深入研究核桃蛋白和核桃产品加工提供参考,以拓展核桃蛋白的应用范围。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新新2号核桃粕[150 μm (100目)],新疆林业科学院提供。BCA试剂盒,美国Pierce公司;其他试剂均为分析纯。

LXJ-IIB 低速大容量多管离心机;医用离心机;UV756 扫描型紫外可见分光光度计;HH-4 数显恒温水浴锅;FD-1A-50 真空冷冻干燥机;KQ3200DB 型数控超声波清洗器;FSH-2 型可调高速匀浆机;AE-6450 电泳仪,日本 ATTO 株式会社;Nicolet is50 傅里叶变换红外光谱(FT-IR)分析仪,赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 核桃蛋白的制备

采用碱溶酸沉法^[12]制备核桃蛋白。将核桃粕与去离子水以料液比1:20混合,调节混合液pH为9.0,50℃下水浴振荡提取90 min,于10 878 $\times g$ 、4℃下离心15 min,取上清液,调节pH至4.5,室温下磁力搅拌1 h,于10 878 $\times g$ 、4℃下离心15 min,弃上清,将沉淀分散于去离子水中,磁力搅拌1 h,调pH为8.0,于4℃下在7 000 Da透析袋中透析48 h,冷冻干燥,得到核桃蛋白。

1.2.2 核桃粕和核桃蛋白基本成分的测定

蛋白质含量测定参考GB 5009.5—2016;水分含量测定参考GB 5009.3—2016;灰分含量测定参考GB 5009.4—2016;脂肪含量测定参考GB 5009.6—2016。

1.2.3 离子改性核桃蛋白的制备

参考文献[13]和[14],并稍作修改。配制0.1 mol/L的NaCl、 Na_3PO_4 、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 、 NaHCO_3 溶液,以及用pH 7.1、0.05 mol/L的Tris-HCl缓冲液配制0.6 mol/L的NaCl、KCl、 MgCl_2 、 CaCl_2 溶液,分别以料液比1:10将以上8种离子溶液添加到核桃蛋白中,调节混合溶液pH为8.8,于45℃下搅拌2 h,再于4℃下在7 000 Da透析袋中透析48 h,冷冻干燥,得到阴、阳离子改性核桃蛋白。将未经离子处理的核桃蛋白设置为对照组。

1.2.4 核桃蛋白结构表征

1.2.4.1 巯基和二硫键含量的测定

巯基(游离巯基)含量的测定^[15]:取0.5 mL 10 mg/mL的核桃蛋白溶液,加入2.5 mL含8 mol/L尿素的Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.0)和0.02 mL Ellman's试剂,于25℃下保温15 min后,用分光光度计测定其在412 nm处的吸光度,实验进行3次平行,采用公式(1)计算巯基含量。

$$M_{\text{SH}} = \frac{73.53 \times A \times D}{C} \quad (1)$$

式中: M_{SH} 为巯基含量, $\mu\text{mol/g}$;A为412 nm处的吸光度;D为稀释倍数;C为样品质量浓度,mg/mL。

二硫键含量的测定:总巯基含量的测定参考宋娜等^[16]的方法,并稍作修改。取0.5 mL 10 mg/mL的核桃蛋白溶液,加入1 mL 10 mol/L的尿素溶液

和 0.02 mL β -巯基乙醇,混匀,室温下振荡 0.5 h,加入 6 mL 12% 的三氯乙酸溶液反应 1 h,4 496 \times g 下离心 15 min,去上清,用 12% 三氯乙酸溶液洗涤沉淀 2 次。用 3.0 mL 含 8 mol/L 尿素的 Tris-甘氨酸缓冲液 (pH 8.0) 溶解沉淀,取 1.5 mL 并加入 0.05 mL Ellman's 试剂反应 10 min,在 412 nm 处测定吸光度,并做空白对照实验。采用公式(1)计算总巯基含量,二硫键含量为总巯基含量与游离巯基含量差值的二分之一。

1.2.4.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析

参考申慧珊^[15]的方法,并稍作修改。分别配制 A 液(30% 丙烯酰胺溶液)、B 液(15 mol/L Tris 缓冲液)、C 液(0.5 mol/L Tris 缓冲液)、D 液(10% 过硫酸铵溶液),制备 12.5% 的分离胶和 4.5% 的浓缩胶,并插入梳子待凝固。称取适量核桃蛋白于 0.05 mol/L 的磷酸缓冲液中,按照体积比 1:1 加入上样缓冲液,煮沸 5 min,冷却后,加样于凝固的梳子孔中,设定电压为 140 V,电流为 40 mA 电泳,待样品跑出浓缩胶后调整电压为 180 V。电泳结束后,取出凝胶,将其放入染色液中染色 1 h,之后采用冰醋酸脱色,直至凝胶的条带位置清晰可见,拍照记录。

1.2.4.3 二级结构测定

采用固态法即溴化钾压片法对样品进行 FT-IR 分析^[17]并计算蛋白质二级结构的含量。分析条件:分辨率 4 cm^{-1} ,扫描次数 64 次,扫描范围 400 ~ 4 000 cm^{-1} 。

1.2.5 核桃蛋白功能特性的测定

1.2.5.1 溶解性

参考齐宝坤等^[18]的方法,并稍作修改。将 0.05 g 核桃蛋白溶解于 5 mL 去离子水中,调节溶液 pH 分别为 2、4、6、8、10 和 12,或调节溶液中 NaCl 浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L,搅拌 0.5 h,然后于 7 468 \times g 下离心 20 min。收集上清液,采用 BCA 试剂盒测定上清液中的蛋白质含量,实验重复 3 次。采用公式(2)计算核桃蛋白在不同 pH 和 NaCl 浓度下的溶解度(S)。

$$S = C_1/C_2 \times 100\% \quad (2)$$

式中: C_1 为上清液中蛋白质的含量,g/mL; C_2 为样品中蛋白质的含量,g/mL。

1.2.5.2 乳化性及乳化稳定性

参考杨威等^[19]的方法,并稍作修改。取 0.05 g 核桃蛋白于 10 mL 的离心管中,加入 2.0 mL 去离子水,用匀浆机于 10 000 r/min 的转速下搅打 2 min,用 1 mol/L HCl 溶液或 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH

分别为 2、4、6、8、10、12。加入 2.0 mL 大豆油,10 000 r/min 下均质 1 min,随后于 375 \times g 下离心 5 min,观察并计算试管中样品溶液高度(H_2)和乳化层高度(H_1),上述样品于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中处理 30 min,取出后于 375 \times g 下离心 5 min,观察并计算再次离心后试管中的乳化层高度(H_3),实验重复 3 次。采用公式(3)计算乳化性(E_A),采用公式(4)计算乳化稳定性(E_S)。

$$E_A = H_1/H_2 \times 100\% \quad (3)$$

$$E_S = H_3/H_1 \times 100\% \quad (4)$$

1.2.5.3 起泡性及起泡稳定性

参照 GB/T 7462—1994,并稍作修改。分别取 0.05 g 核桃蛋白于 10 mL 的离心管中,加入 5 mL 去离子水混匀,记录混合液体积(V_1)。用匀浆机于 10 000 r/min 下搅打 2 min,迅速转移至量筒,记录溶液和泡沫总体积(V_2)。将上述搅打后的溶液分别静置 20、30、40、60、120 min,记录其体积(V_i),实验重复 3 次。采用公式(5)计算起泡性(F_C),采用公式(6)计算起泡稳定性(F_S)。

$$F_C = (V_2 - V_1)/V_1 \times 100\% \quad (5)$$

$$F_S = (V_i - V_1)/V_1 \times 100\% \quad (6)$$

1.2.5.4 持水性与吸油性的测定

参考 Boye 等^[20]的方法,并稍作修改。取 0.5 g 核桃蛋白于 10 mL 的离心管中,称其质量(m_1),向离心管中加入 5 mL 去离子水或大豆油,用摇床在 220 r/min 下混匀 30 min。取出后用超速离心机以 22 200 \times g 离心 25 min,弃上清,随后于 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘烤 25 min 后称其质量(m_2),实验重复 3 次。采用公式(7)计算持水性(W_H)或吸油性(W_O)。

$$W_H(W_O) = (m_2 - m_1)/0.5 \quad (7)$$

2 结果与讨论

2.1 核桃蛋白的基本成分

核桃粕和核桃蛋白的基本成分见表 1。

表 1 核桃粕和核桃蛋白的基本成分

Table 1 Basic components of walnut meal and walnut protein %

样品	蛋白质	水分	灰分	脂肪
核桃粕	38.91 \pm 0.07 ^a	5.71 \pm 0.05 ^b	4.85 \pm 0.38 ^a	2.72 \pm 0.08 ^b
核桃蛋白	64.75 \pm 0.16 ^b	2.33 \pm 0.03 ^a	4.05 \pm 0.24 ^a	1.80 \pm 0.12 ^a

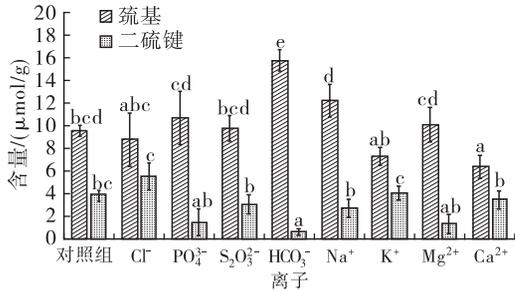
注:同列不同字母表示具有显著差异($p < 0.05$)。下同
Note: Different letters in the same column indicate significant differences ($p < 0.05$). The same below

由表 1 可知,与核桃粕相比,核桃蛋白的蛋白质含量增加至 64.75%,水分含量减少至 2.33%,灰分含量降至 4.05%,脂肪含量降至 1.80%。

2.2 核桃蛋白的结构表征

2.2.1 巯基和二硫键含量

不同离子改性核桃蛋白的巯基和二硫键含量如图1所示。



注:不同字母表示组间具有显著差异($p < 0.05$)。下同

Note: Different letters indicate significant differences between groups ($p < 0.05$). The same below

图1 不同离子改性核桃蛋白的巯基和二硫键含量

Fig. 1 Sulphydryl and disulfide bond contents of different ions modified walnut protein

由图1可知:与对照组相比,在阴离子改性核桃蛋白中,HCO₃⁻改性核桃蛋白的巯基含量显著增加($p < 0.05$),增加了6.24 μmol/g;在阳离子改性核桃蛋白中,Na⁺和Mg²⁺改性核桃蛋白的巯基含量分别增加了2.69、0.55 μmol/g,但增加不显著($p > 0.05$),Ca²⁺改性核桃蛋白的巯基含量显著下降($p < 0.05$),降至6.38 μmol/g。

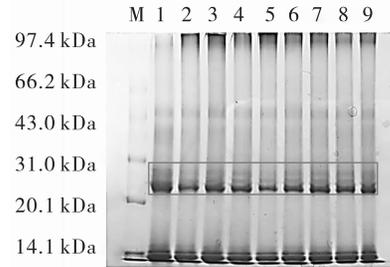
由图1还可知,与对照组相比,Cl⁻和K⁺改性核桃蛋白的二硫键含量增加(不显著, $p > 0.05$),分别增加了1.63、0.18 μmol/g,其他6种离子改性核桃蛋白的二硫键含量均下降,下降最多的是HCO₃⁻改性核桃蛋白($p < 0.05$),二硫键含量减少了3.25 μmol/g。因此,HCO₃⁻改性核桃蛋白中巯基含量增加最多,二硫键含量减少最多,推测原因是加入HCO₃⁻,静电屏蔽效应导致核桃蛋白聚集,影响了蛋白质分子的立体结构,从而使二硫键含量下降,这与冯潇等^[21]的研究结论一致。此外,离子改性破坏了蛋白质的结构,影响了二硫键的交联。

2.2.2 SDS-PAGE 分析

不同离子改性核桃蛋白的SDS-PAGE图谱如图2所示。

由图2可知,对照组中共有5个亚基带,分子量分别为95.0~97.4、43.0~66.2、31.0~43.0、20.1~31.0 kDa和14.1~16.0 kDa,不同离子改性核桃蛋白的亚基组成与对照组差距不大,条带数量没有发生变化,说明离子改性后核桃蛋白中没有发生肽键的断裂,对核桃蛋白进行不同离子改性并不会使其亚基种类发生改变。然而,与对照组相比,阴

离子Cl⁻、PO₄³⁻、S₂O₃²⁻和HCO₃⁻改性后的核桃蛋白在20.1~31.0 kDa处的条带位置发生了细微的变化,有上移的趋势,这说明阴离子改性后核桃蛋白亚基的分子量发生了变化,而阳离子改性核桃蛋白的变化则不明显。综上,离子改性没有改变核桃蛋白的亚基组成。



注: M. Marker; 1. 对照组; 2. Cl⁻; 3. PO₄³⁻; 4. S₂O₃²⁻; 5. HCO₃⁻; 6. Na⁺; 7. K⁺; 8. Mg²⁺; 9. Ca²⁺

Note: M. Marker; 1. Control group; 2. Cl⁻; 3. PO₄³⁻; 4. S₂O₃²⁻; 5. HCO₃⁻; 6. Na⁺; 7. K⁺; 8. Mg²⁺; 9. Ca²⁺

图2 不同离子改性核桃蛋白的SDS-PAGE图谱

Fig. 2 SDS-PAGE patterns of different ions modified walnut protein

2.2.3 二级结构含量

不同离子改性核桃蛋白的二级结构含量见表2。

表2 不同离子改性核桃蛋白的二级结构含量

Table 2 Secondary structure content of different ions modified walnut protein

离子	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规卷曲
对照组	15.23 ± 0.30 ^d	25.14 ± 1.88 ^d	34.44 ± 2.33 ^c	25.19 ± 0.22 ^e
Cl ⁻	18.38 ± 0.46 ^e	42.16 ± 1.36 ^f	27.28 ± 2.17 ^c	12.18 ± 0.13 ^b
PO ₄ ³⁻	37.06 ± 0.77 ^b	18.85 ± 1.41 ^e	23.47 ± 1.03 ^b	20.62 ± 0.14 ^e
S ₂ O ₃ ²⁻	1.35 ± 0.05 ^a	37.83 ± 1.15 ^e	29.01 ± 1.51 ^{cd}	31.81 ± 0.16 ^b
HCO ₃ ⁻	19.22 ± 0.80 ^f	12.23 ± 1.16 ^a	50.27 ± 2.05 ^f	18.28 ± 0.18 ^d
Na ⁺	17.50 ± 0.63 ^e	43.14 ± 1.08 ^e	14.29 ± 1.60 ^a	25.07 ± 0.25 ^e
K ⁺	25.27 ± 0.64 ^e	14.38 ± 0.43 ^b	58.28 ± 2.79 ^e	2.07 ± 0.08 ^a
Mg ²⁺	13.31 ± 0.68 ^e	26.88 ± 1.21 ^d	35.64 ± 2.47 ^e	24.17 ± 0.13 ^f
Ca ²⁺	8.46 ± 0.40 ^b	39.78 ± 1.00 ^e	33.94 ± 1.39 ^{de}	17.82 ± 0.17 ^c

由表2可知,相较于对照组,不同离子改性核桃蛋白的二级结构发生了不同程度的变化。对照组核桃蛋白的二级结构中β-转角含量最高,其次为无规卷曲,β-折叠,α-螺旋含量最低。Cl⁻、HCO₃⁻、PO₄³⁻、K⁺、Na⁺改性后,核桃蛋白的α-螺旋含量上升,其中PO₄³⁻改性后α-螺旋含量增加最多($p < 0.05$),增加了143.33%,说明该离子能够提高蛋白质的结构稳定性^[22],而S₂O₃²⁻改性后α-螺旋含量下降最显著($p < 0.05$)。与对照组相比,PO₄³⁻、Mg²⁺

改性核桃蛋白的 β -折叠与 β -转角含量的变化趋势相同,且与 α -螺旋含量的变化基本相反; Cl^- 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 HCO_3^- 、 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 改性后,核桃蛋白的 β -折叠与 β -转角的变化趋势相反,最明显的为 Na^+ ,表现为 β -折叠增加71.60%,而 β -转角减少58.51%。核桃蛋白的无规卷曲含量在 K^+ 改性后降至最低值2.07%, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 改性后升至最大值31.81% ($p < 0.05$)。蛋白质分子中 α -螺旋和 β -折叠能形成紧密的非空腔结构,与二者相比, β -转角和无规卷曲的构象稳定性和紧密程度则相对较差^[22]。因此,与对照组相比, Cl^- 、 PO_4^{3-} 、 Na^+ 和 Ca^{2+} 改性使核桃蛋白构象稳定性提高,而 HCO_3^- 改性会使核桃蛋白紧密程度变差, K^+ 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 和 Mg^{2+} 改性基本不改变核桃蛋白稳定性。

2.3 核桃蛋白的功能特性

2.3.1 溶解性

NaCl 浓度对不同离子改性核桃蛋白溶解度的影响如图3所示。

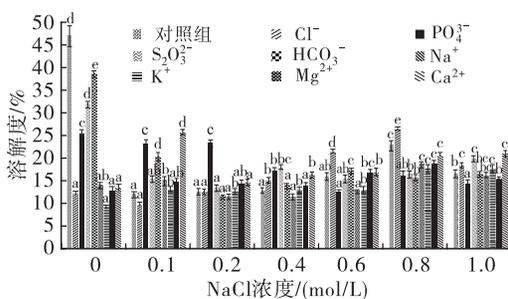


图3 NaCl浓度对不同离子改性核桃蛋白溶解度的影响
Fig.3 Effect of NaCl concentration on solubility of different ions modified walnut protein

由图3可知,随着 NaCl 浓度的增加,有一半离子改性核桃蛋白的溶解度呈现先降后升再降的趋势。当 NaCl 浓度为0时,对照组的溶解度最高,达到46.91%,离子改性核桃蛋白的溶解度均有所降低,其中 K^+ 改性核桃蛋白的溶解度最小,为9.17%。当 NaCl 浓度为0.1 mol/L时, Ca^{2+} 改性核桃蛋白的溶解度最大,但仅为25%左右;当 NaCl 浓度为0.2 mol/L时, PO_4^{3-} 改性核桃蛋白的溶解度最大(23.17%), Na^+ 改性核桃蛋白的溶解度最小(11.38%);当 NaCl 浓度为0.8 mol/L时,阴离子中 Cl^- 改性核桃蛋白的溶解度最大, HCO_3^- 改性核桃蛋白的最小;而当 NaCl 浓度为0.4 mol/L和1.0 mol/L时,各组核桃蛋白的溶解度差距不大。综上, NaCl 与不同离子改性共同作用使得核桃蛋白的溶解度降低,表现为“盐析”效应,或盐离子与水分子相互作用,导致核桃蛋白与水分子间相互作用相对减少,蛋白质分子

间碰撞概率增加,促使蛋白质分子间发生聚集^[23],这与Bilgi等^[24]的研究结果相似。

pH对不同离子改性核桃蛋白溶解度的影响如图4所示。

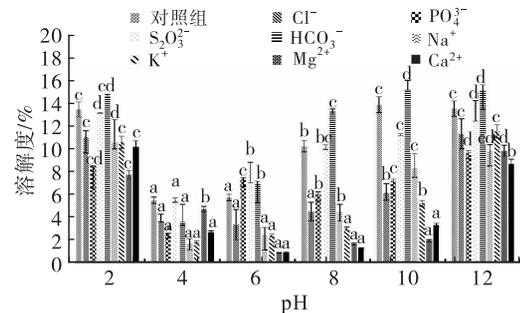


图4 pH对不同离子改性核桃蛋白溶解度的影响
Fig.4 Effect of pH on solubility of different ions modified walnut protein

由图4可知,各组核桃蛋白的溶解度随着pH的增加总体呈现先降后升的趋势。在pH为4时,对照组以及 PO_4^{3-} 、 HCO_3^- 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 K^+ 、 Na^+ 改性核桃蛋白的溶解度最低,其中又以 Na^+ 改性核桃蛋白的最低,为1.68%;而 Cl^- 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 改性核桃蛋白的溶解度在pH为6时最低,其中又以 Mg^{2+} 改性核桃蛋白的最低,为0.81%。除了 Cl^- 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 外,其他离子改性核桃蛋白的等电点基本不变。可能是因为 Cl^- 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 改变了蛋白质的静电荷数,使其等电点改变^[25]。综上,不同离子对核桃蛋白溶解度的影响存在差异。

2.3.2 乳化性及乳化稳定性

不同离子改性核桃蛋白的乳化性及乳化稳定性如图5所示。

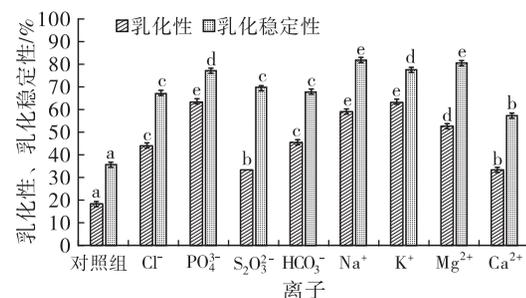


图5 不同离子改性核桃蛋白的乳化性及乳化稳定性
Fig.5 Emulsification and emulsion stability of different ions modified walnut protein

由图5可知,不同离子改性均使核桃蛋白的乳化性显著提高($p < 0.05$)。与对照组相比,阴离子中 PO_4^{3-} 改性核桃蛋白的乳化性提高程度最大,为对照组的3.52倍,而 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 改性核桃蛋白的乳化性提高程度最小,提高了15.10个百分点;阳离子中 K^+ 改性核桃蛋白的乳化性提高程度最大,提高了

45.22 百分点,而 Ca^{2+} 改性核桃蛋白的乳化性提高程度最小,仅提高了 14.96 百分点。在对核桃蛋白乳化性提高程度较大的 3 种离子中,其影响的强弱顺序为 $\text{PO}_4^{3-} > \text{K}^+ > \text{Na}^+$, PO_4^{3-} 改性核桃蛋白的乳化性最好,原因可能是 PO_4^{3-} 作用时蛋白质非共价键相互作用最大,从而提高了其乳化性^[25]。

由图 5 还可知,不同离子改性均使核桃蛋白的乳化稳定性显著提高($p < 0.05$)。与对照组相比,阴离子中 PO_4^{3-} 改性对核桃蛋白的乳化稳定性影响最大,使其提高了 41.38 百分点;而阳离子中 Na^+ 改

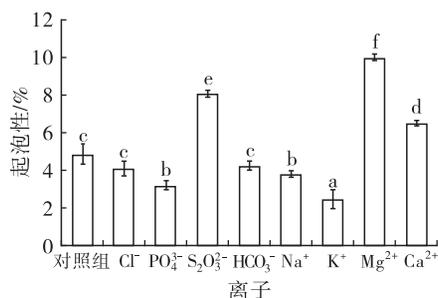


图 6 不同离子改性核桃蛋白的起泡性及起泡稳定性

Fig. 6 Foaming and foam stability of different ions modified walnut protein

由图 6 可知,阴离子中,除 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 改性核桃蛋白的起泡性提高(约 3.2 百分点)外,其他阴离子改性核桃蛋白的起泡性均有所降低,最低的为 PO_4^{3-} 改性核桃蛋白的,其起泡性为 3.20%。阳离子中, Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 改性核桃蛋白的起泡性显著提高($p < 0.05$),而其他阳离子改性核桃蛋白的起泡性均有所降低,其中 Mg^{2+} 改性核桃蛋白的起泡性最高,为 9.99%, K^+ 改性核桃蛋白的起泡性最低,为 2.47%。综上,阳离子 Mg^{2+} 和阴离子 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 对增强核桃蛋白起泡性有很大作用,原因可能是 Mg^{2+} 和 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 会改变蛋白质的疏水性,使蛋白质分子中的静电荷数增加,进而加快了蛋白质在空气-水界面间的展开,有利于泡沫的形成^[25]。

由图 6 还可知,各组样品的起泡稳定性均在 120 min 时降为 0,与对照组相比,不同离子改性核桃蛋白的起泡稳定性均有不同程度的下降。其中, K^+ 改性核桃蛋白的起泡稳定性最差, PO_4^{3-} 改性核桃蛋白的起泡稳定性在 30 ~ 40 min 时快速下降, Na^+ 改性核桃蛋白的起泡稳定性在 20 min 时与对照组的相同,均为 91.80%,整体来说, Na^+ 改性核桃蛋白的起泡稳定性最好。

2.3.4 持水性与吸油性

不同离子改性核桃蛋白的持水性与吸油性如图 7 所示。

性对核桃蛋白的乳化稳定性影响最大,使其提高了 46.22 百分点。在核桃蛋白乳化稳定性提高程度较大的 3 种离子中,其影响的强弱顺序为 $\text{Na}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{PO}_4^{3-}$ 。阳离子对核桃蛋白乳化稳定性的提升较大,可能是因为核桃蛋白溶液在加入阳离子后,静电斥力和疏水相互作用力更加平衡,有利于在油水界面形成高黏弹性的膜^[26],从而增大了乳化稳定性。

2.3.3 起泡性及起泡稳定性

不同离子改性核桃蛋白的起泡性及起泡稳定性如图 6 所示。

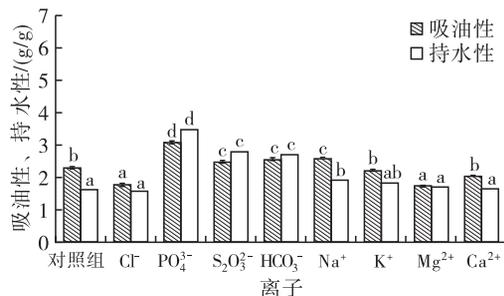
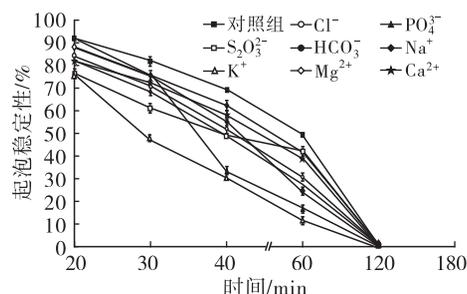


图 7 不同离子改性核桃蛋白的持水性与吸油性

Fig. 7 Water holding capacity and oil absorption capacity of different ions modified walnut protein

由图 7 可知,总体来看,阴离子改性核桃蛋白的持水性均有提升,其中 PO_4^{3-} 改性核桃蛋白的持水性最大,为 3.47 g/g,原因可能是 PO_4^{3-} 改变了核桃蛋白结合水的能力,使核桃蛋白的构象发生改变,破坏了氢键等其他次级键,使原本质地紧密、排列有序的蛋白质肽链变得松散且不规则,使得吸水性上升^[27];而阳离子对核桃蛋白的持水性影响不大。

由图 7 还可知:与对照组相比, PO_4^{3-} 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 、 HCO_3^- 、 Na^+ 改性核桃蛋白的吸油性明显提高,分别提高了 0.78、0.16、0.26、0.28 g/g;而 Cl^- 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 改性核桃蛋白的吸油性均有所降低,分别降低了 0.54、0.08、0.56、0.26 g/g。由此可知, PO_4^{3-} 对核桃蛋白的吸油性影响最大,使其明显增加,原因可能是 PO_4^{3-} 使核桃蛋白的结构发生改变,

更多的非极性基团暴露出来,可以束缚更多的脂肪烃链,从而提高了蛋白质的吸油性^[25]。

3 结 论

PO_4^{3-} 、 HCO_3^- 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 增加了核桃蛋白的巯基含量;除了 Cl^- 和 K^+ 外,其他6种离子改性核桃蛋白的二硫键含量均下降,其中 HCO_3^- 改性核桃蛋白下降最多;8种离子对核桃蛋白的亚基组成无影响;与对照组相比, Cl^- 、 PO_4^{3-} 、 Na^+ 和 Ca^{2+} 使得核桃蛋白构象稳定性提高,而 HCO_3^- 会使核桃蛋白紧密程度变差, K^+ 、 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 和 Mg^{2+} 基本不改变核桃蛋白构象稳定性。随着 NaCl 浓度和 pH 的升高,各离子改性核桃蛋白的溶解度均有所波动,不同离子对核桃蛋白溶解度的影响存在差异;不同离子改性提高了核桃蛋白的乳化性和乳化稳定性,其中阴离子 PO_4^{3-} 改性核桃蛋白的乳化性提高了2.52倍,而阳离子 Na^+ 改性核桃蛋白的乳化稳定性提高了46.22个百分点;阴离子 $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 与阳离子 Mg^{2+} 对核桃蛋白的起泡性影响最大,而 Na^+ 改性核桃蛋白的起泡稳定性最好(不同离子改性核桃蛋白的起泡稳定性均有不同程度下降); PO_4^{3-} 改性核桃蛋白的持水性和吸油性均最高。综合来讲, Na^+ 和 Mg^{2+} 改性核桃蛋白的乳化性、乳化稳定性、起泡性和起泡稳定性相对更好。

参考文献:

[1] 沈敏江,刘红芝,刘丽,等.核桃蛋白质的组成、制备及功能特性研究进展[J].中国粮油学报,2014,29(1):123-128.

[2] 田荣欢,刘迪秋,陈朝银,等.核桃分子生物学研究进展[J].生物技术通报,2010(11):19-24.

[3] 高蕾蕾,李迎秋.植物蛋白的研究进展[J].江苏调味副食品,2018,35(4):6-10,16.

[4] 门德盈,代佳和,汤木果,等.核桃肽制备及生物活性的研究进展[J].食品科学,2022,43(23):367-376.

[5] CARRILLO W, GÓMEZ-RUIZ J A, RUIZ A L, et al. Antiproliferative activity of walnut (*Juglans regia* L.) proteins and walnut protein hydrolysates[J]. J Med Food, 2017, 20(11):1063-1067.

[6] 刘丹丹.核桃蛋白的抗氧化与降血压活性评价及酶解必要性研究[D].江苏镇江:江苏大学,2020.

[7] 陈卉平.核桃粕蛋白抗氧化肽的分离纯化、结构鉴定及其改善记忆的研究[D].广州:华南理工大学,2015.

[8] 段心妍.核桃肽对雄性大鼠抗疲劳作用的研究[D].太原:太原理工大学,2014.

[9] 李秋杰.不同离子对大豆蛋白结构及表面活性的影响[D].广西柳州:广西科技大学,2015.

[10] 豁银强,刘传菊,聂荣祖,等.核桃蛋白的组成、制备及特性研究进展[J].中国粮油学报,2020,35(12):

191-197.

[11] 沈敏江.核桃蛋白粉的制备及其溶解性研究[D].北京:中国农业科学院,2014.

[12] ZHANG H Y, SHAO S, HAN R X, et al. Structural, physicochemical and functional properties of *Semen Ziziphi Spinosa* protein[J]. RSC Adv, 2020, 10(49):29555-29566.

[13] 王威娜,熊健,叶君.阴离子对SPI膜性能的影响[J].现代食品科技,2008,24(11):1093-1095.

[14] 杨鹏程.钠、钾、钙、镁离子对面条品质的影响研究[D].郑州:河南工业大学,2020.

[15] 申慧珊.面团加工过程中小麦A、B淀粉影响面筋蛋白结构转变的机制研究[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2024.

[16] 宋娜,李竹生,丁志理.蒸制过程中馒头坯蛋白质变化特性研究[J].粮食与油脂,2021,34(7):14-18.

[17] 焦斐,杨倩,杨超,等.陇藜1号藜麦清蛋白体外消化产物抗氧化活性及结构特征分析[J].食品科学技术学报,2023,41(3):116-126.

[18] 齐宝坤,江连洲,王欢,等.离子强度对大豆11S球蛋白表面疏水性及结构的影响[J].食品科学,2018,39(8):39-44.

[19] 杨威,董志文,何东平,等.铁核桃蛋白和多肽功能特性的研究[J].粮食与油脂,2018,31(5):86-91.

[20] BOYE J I, AKSAY S, ROUFIK S, et al. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques[J]. Food Res Int, 2010, 43(2):537-546.

[21] 冯潇,武朝升,杨玉玲,等.不同盐离子对藜麦蛋白凝胶特性及分子间作用力的影响[J].中国农业科学,2023,56(21):4318-4329.

[22] 刘丽莉,于影,苏克楠,等.植物多酚-牛血清白蛋白相互作用及对蛋白质结构的影响[J].农业工程学报,2023,39(13):290-298.

[23] 王美玉,王愈,陈振家,等.pH及离子强度对燕麦分离蛋白功能特性及亚基特性的影响[J].食品与机械,2019,35(10):1-5.

[24] BILGI B, ÇELİK S. Solubility and emulsifying properties of barley protein concentrate[J]. Eur Food Res Technol, 2004, 218(5):437-441.

[25] 毛晓英.核桃蛋白质的结构表征及其制品的改性研究[D].江苏无锡:江南大学,2012.

[26] 宋玉洁.盐离子对大米蛋白纤维化聚集行为及功能特性的影响[D].江苏无锡:江南大学,2024.

[27] ERTUGRUL U, NAMLI S, TAS O, et al. Pea protein properties are altered following glycation by microwave heating[J/OL]. LWT - Food Sci Technol, 2021, 150:111939[2024-04-26]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111939>.