

加工条件对醇法大豆浓缩蛋白溶解性及结构的影响

赵方园¹, 郭兴凤¹, 赵树超², 张明³, 杨迎¹

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001; 2. 山东凯斯达机械制造有限公司, 山东 济宁 272000; 3. 济宁市机械设计研究院, 山东 济宁 272000)

摘要:为探究工业化生产的醇法大豆浓缩蛋白溶解性较差的原因,研究了醇法加工条件(乙醇体积分数、浸提温度、干燥温度)对大豆浓缩蛋白溶解性及结构的影响。结果表明:大豆浓缩蛋白的溶解度随着乙醇体积分数的增大呈现先降低后升高的趋势,乙醇体积分数为65%时溶解度最低;浸提温度和干燥温度的升高会导致溶解度大幅降低;随着浸提液中乙醇体积分数的增大,大豆浓缩蛋白表面疏水性、分子间的疏水相互作用、二硫键含量及粒径均呈现先增加后降低的趋势,在乙醇体积分数为65%时最大,而 α -螺旋含量增加, β -折叠含量整体先增加后降低,无规卷曲含量降低;随着浸提温度和干燥温度的升高,大豆浓缩蛋白分子间氢键作用力降低,而表面疏水性、分子间疏水相互作用、二硫键含量和粒径增大, α -螺旋向 β -折叠及无规卷曲转变,蛋白质结构趋于无序。综上,工业化醇法加工工艺(60%~70%乙醇体积分数、50~60℃浸提温度、60~70℃干燥温度)所引发的大豆浓缩蛋白表面疏水性的增大、分子间聚集程度的增加等导致了其溶解度的降低,不利于后期应用。

关键词:醇法大豆浓缩蛋白;溶解度;蛋白质结构

中图分类号:TS214.2;TS210.9 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)10-0057-08

Effects of processing conditions on the solubility and structure of alcohol leached soybean protein concentrate

ZHAO Fangyuan¹, GUO Xingfeng¹, ZHAO Shuchao²,
ZHANG Ming³, YANG Ying¹

(1. School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;
2. Shandong Chemsta Machinery Manufacturing Co., Ltd., Jining 272000, Shandong, China;
3. Jining Machinery Design and Research Institute, Jining 272000, Shandong, China)

Abstract: To explore the reasons for the low solubility of alcohol leached soybean protein concentrate in industrial production, the effects of processing conditions (ethanol volume fraction, leaching temperature and drying temperature) on the solubility and structure of soybean protein concentrate were studied. The results showed that the solubility of soybean protein concentrate showed a trend of decreasing and then increasing with the increase of ethanol volume fraction, with the lowest solubility at an ethanol volume fraction of 65%. The solubility decreased significantly with the increase of extraction temperature and drying temperature. The surface hydrophobicity, the hydrophobic interaction between molecules, the content of disulfide bond and the particle size of soybean protein concentrate increased first and then

decreased, and the maximum value was when the ethanol volume fraction was 65%; the α -helix content increased, β -sheet content first increased and then decreased, the random coil content decreased. With the increase of leaching temperature and drying temperature, the hydrogen bond interaction between molecules decreased,

收稿日期:2022-03-16;修回日期:2023-06-15

基金项目:国家自然科学基金项目(U21A20270);国家重点研发计划项目(2017YFD0400200)

作者简介:赵方园(1999),女,硕士研究生,研究方向为植物蛋白质化学与利用(E-mail)zfy998812@163.com。

通信作者:郭兴凤,教授,硕士(E-mail)guoxingfeng@haut.edu.cn。

the surface hydrophobicity, the hydrophobic interaction between molecules, the content of disulfide bond and the particle size of soybean protein concentrate increased, the α -helix changed to β -sheet and random coil which indicated that the protein structure tended to disorder. In summary, the increase of protein surface hydrophobicity, the increase of intermolecular aggregation degree and other protein structure changes caused by the industrial alcohol processing process (60% - 70% ethanol volume fraction, 50 - 60 °C leaching temperature, 60 - 70 °C drying temperature) lead to the decrease of protein solubility, which is not conducive to later application.

Key words: alcohol leached soybean protein concentrate; solubility; protein structure

大豆浓缩蛋白(SPC)是以脱脂豆粕为原料,用乙醇和(或)水除去糖类等可溶性成分并干燥得到的物质,其主要成分为蛋白质、纤维素及半纤维素,其中蛋白质含量不低于65%^[1]。目前工业生产大豆浓缩蛋白的方法主要有醇法、酸法及湿热变性法,其中醇法制备大豆浓缩蛋白无污水排放、成本低,是工业化生产大豆浓缩蛋白较常用的方法。但在醇法加工过程中,乙醇溶液及较高的温度引起的蛋白质变性会使所得产品的溶解性较差,限制了其应用^[2]。研究表明^[3-6],乙醇溶液对蛋白质的变性作用主要是通过其较低的介电常数来影响蛋白质分子内静电作用力,导致肽链展开,促进蛋白质分子间发生聚集,从而影响其功能特性。而温度引起的蛋白质热变性则是通过破坏维持蛋白质构象的氢键等作用力,使蛋白质结构展开^[7],从而影响其功能特性。目前对于醇法生产大豆浓缩蛋白过程中加工条件所引起的蛋白质结构的变化,以及对其功能特性的影响机制研究较少。因此,本文基于乙醇体积分数、浸提温度及干燥温度这3个关键因素,研究了醇法加工过程中加工条件对蛋白质结构及性质的影响,探究目前工业化生产醇法大豆浓缩蛋白导致蛋白质溶解性较差的原因,以期工业化生产功能特性较好的醇法大豆浓缩蛋白提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

低温脱脂豆粕(蛋白质含量为55.03%,N×6.25,湿基),山东万得福有限公司;无水乙醇、硫酸铜、酒石酸钾钠、尿素、溴化钾、溴酚蓝、甘氨酸、三氯乙酸、二硝基苯甲酸(DTNB)、十二烷基硫酸钠(SDS)等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

PHS-2F pH计,上海精密科学仪器有限公司;BeNano 90 Zeta 纳米粒度分析仪,丹东百特仪器有限公司;VERTEX70 傅里叶变换红外光谱仪,德国

Bruker公司;722s可见分光光度仪,上海精密科学仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 醇法大豆浓缩蛋白的制备

将低温脱脂豆粕按料液比1:7与一定体积分数乙醇溶液混合,在一定水浴温度下以400 r/min的转速进行搅拌浸提1 h,抽滤后再按料液比1:5与体积分数为95%的乙醇溶液混合浸提30 min,将抽滤所得滤饼在一定温度下真空烘干,所得样品即为大豆浓缩蛋白,粉碎,待测。

1.2.2 溶解度的测定

参考汤虎等^[8]的方法采用双缩脲试剂法测定大豆浓缩蛋白的溶解度,并略有改动。将1.0 g大豆浓缩蛋白溶于50 mL去离子水中,在4 000 r/min下离心15 min后,取1 mL上清液与4 mL双缩脲试剂涡旋混合均匀,静置30 min后在540 nm波长处测定吸光值。溶解度用氮溶解指数(NSI)表示,按照公式(1)计算。

$$I = m_1 / m_2 \times 100\% \quad (1)$$

式中: I 为氮溶解指数; m_1 为上清液蛋白质含量,mg; m_2 为样品总蛋白质含量,mg。

1.2.3 表面疏水性的测定

参考Shen等^[9]的方法测定大豆浓缩蛋白的表面疏水性,并略有改动。将0.05 g大豆浓缩蛋白与10 mL pH为7.0的0.1 mol/L的磷酸盐缓冲溶液混合,配制成5 mg/mL的大豆浓缩蛋白溶液。取1 mL大豆浓缩蛋白溶液与200 μ L 1 mg/mL的溴酚蓝溶液涡旋混合均匀,室温下静置10 min后在10 000 r/min下离心15 min,同时用1 mL磷酸盐缓冲溶液与200 μ L溴酚蓝混合作为空白,在595 nm波长处测定吸光值。表面疏水性(B)用蛋白质与溴酚蓝结合量表示,按照公式(2)计算。

$$B = 200 \times \frac{A_0 - A_1}{A_0} \quad (2)$$

式中: A_0 , A_1 分别为空白及样品的吸光值。

1.2.4 分子间作用力的测定

参考张莹莹等^[10]的方法测定分子间作用力,并略有改动。通过大豆浓缩蛋白在不同溶液中溶解度的不同评价其分子间作用力。溶液体系分别为10 mL 0.1 mol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液(对照组)、含1% SDS的10 mL 0.1 mol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液(氢键作用力)、含6 mol/L 脲的10 mL 0.1 mol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液(疏水相互作用)、含2% β -巯基乙醇的10 mL 0.1 mol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液(二硫键作用力)。氢键作用力、疏水相互作用和二硫键作用力以溶解于各溶液中的蛋白质含量占总蛋白质含量的比例表示。

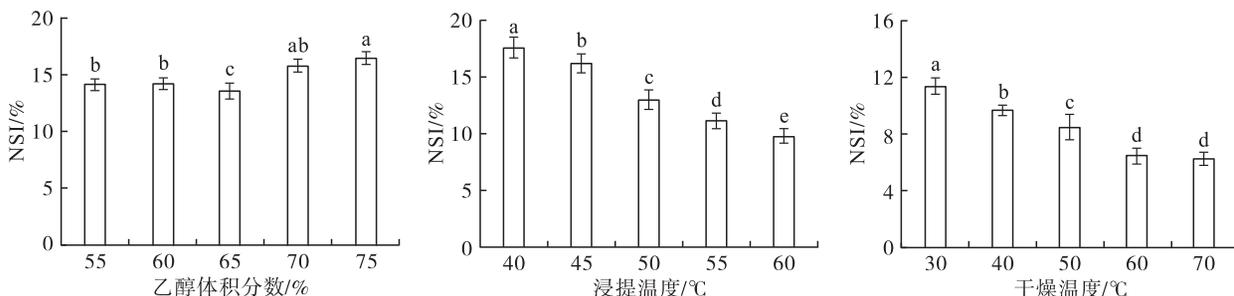
1.2.5 游离巯基和二硫键含量的测定

参考张莹莹等^[11]的方法测定游离巯基和二硫键含量,并略作改动。将0.1 g大豆浓缩蛋白与10 mL 0.1 mol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液混合,磁力搅拌1 h,在5 000 r/min条件下离心15 min后收集上清液。取4 mL上清液与0.1 mL 10 mmol/L的DTNB溶液涡旋混合均匀,在室温下显色20 min后,于412 nm波长处测定吸光值。样品中游离巯基含量(w_1)按照公式(3)计算。

$$w_1 = n/c \quad (3)$$

式中: n 为通过L-半胱氨酸标准曲线计算得到的游离巯基含量, $\mu\text{mol/mL}$; c 为样品溶液质量浓度, g/mL 。

另取1 mL上述离心后所得上清液,加入4 mL 0.1 mol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液及0.1 mL的 β -巯基乙醇溶液混匀,在25℃保温1 h,保温结束后加入10 mL 12%的三氯乙酸溶液,混合均匀后于25℃再次保温1 h。所得混合溶液在4 500 r/min条件下离心15 min,弃去上清液,将沉淀用10 mL 12%的三氯乙酸溶液洗涤,共洗4次,最后在所得沉淀中加入10 mL 0.1 mol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液,充分溶解后加入0.1 mL DTNB,混匀,放置20 min,



注:经前期的预试验,根据大豆浓缩蛋白得率及蛋白质含量确定固定条件浸提温度50℃、干燥温度30℃、乙醇体积分数65%,试验时只考察变量的变化;不同字母表示具有显著性差异($p < 0.05$)。下同

图1 加工条件对大豆浓缩蛋白溶解性的影响

由图1可知,大豆浓缩蛋白的溶解度随着浸提液中乙醇体积分数的增加呈现先减小后增加的趋势,在

于412 nm波长处测定其吸光值,通过公式(4)计算样品中总巯基含量(w_2)。

$$w_2 = nV_2/(cV_1) \quad (4)$$

式中: n 为通过L-半胱氨酸标准曲线计算所得的巯基含量, $\mu\text{mol/mL}$; c 为样品溶液质量浓度, g/mL ; V_1 为上清液体积, mL ; V_2 为沉淀复溶后体积, mL 。

二硫键含量(w_3)根据公式(5)计算。

$$w_3 = \frac{w_2 - w_1}{2} \quad (5)$$

1.2.6 蛋白质二级结构的测定

参考齐宝坤等^[12]的方法测定蛋白质的二级结构。将1 mg充分干燥的样品与100 mg溴化钾研磨混匀压片后,用傅里叶变换红外光谱仪在400 ~ 4 000 cm^{-1} 波数范围内进行全波长扫描,分辨率设置为4 cm^{-1} ,波数精度设置为0.01 cm^{-1} ,扫描次数为64。采用Peakfit软件对酰胺I带的吸收峰进行二阶导数拟合,计算出对应区间范围内蛋白质中各二级结构的相对含量。

1.2.7 粒径的测定

将样品用0.1 mol/L pH 7.0的磷酸盐缓冲溶液配制成0.1 mg/mL的溶液,用Zeta纳米粒度分析仪测定粒径,每个样品测定3次。

1.2.8 数据处理

采用SPSS 22.0软件对试验数据进行统计分析,采用Duncan法进行单因素方差分析,差异显著水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 加工条件对大豆浓缩蛋白溶解性的影响

溶解性是蛋白质的基本功能特性之一,蛋白质的起泡性、凝胶性、乳化等功能特性在食品中的应用都需建立于其具有良好的溶解性,因此蛋白质的溶解性对于其工业应用具有重要意义。加工条件对大豆浓缩蛋白溶解性的影响如图1所示。

乙醇体积分数 65% 时最低,溶解性最差。这主要是由于乙醇分子会影响溶液的介电常数,使蛋白质分子内的静电斥力增加,肽链展开,暴露出蛋白分子内的巯基、疏水基等活性基团^[3],促使蛋白质分子间通过疏水相互作用、二硫键、氢键等作用力发生聚集,溶解度降低^[4]。而乙醇体积分数高于 65% 时则会削弱蛋白质分子间疏水相互作用及维持聚集体结构的各作用力,使聚集体部分解离^[13],导致溶解度增加。

由图 1 可知,随着浸提温度和干燥温度的升高,大豆浓缩蛋白溶解度降低。在较高的浸提温度下蛋白质发生热变性会使其结构展开,暴露出分子内部的疏水基团,表面疏水性增大,导致溶解度降低。而伸展的蛋白质分子在各种作用力的共同影响下发生聚集,形成不溶性聚集体,使溶解度降低^[14]。干燥温度的升高会使蛋白质分子内结构去折叠程度增

大,导致疏水性基团暴露于分子表面,不利于蛋白质的溶解,并且较高的干燥温度下,干燥时间缩短,大豆浓缩蛋白表面容易发生硬化^[15],也会导致溶解度呈现降低的趋势。

目前工业化生产醇法大豆浓缩蛋白是采用 60% ~ 70% 的乙醇溶液在 50 ~ 60 °C 下浸提,干燥温度为 60 ~ 70 °C^[16]。由图 1 可知,乙醇体积分数为 65% 时,溶解度最低,浸提温度 50 ~ 60 °C 及干燥温度 60 ~ 70 °C 也会导致溶解度大幅度降低。为了解醇法加工条件对大豆浓缩蛋白溶解度的影响机制,对其表面疏水性、分子内及分子间作用力等指标进行分析。

2.2 加工条件对大豆浓缩蛋白表面疏水性的影响

表面疏水性作为蛋白质的结构特性,对其功能特性具有重要影响。加工条件对大豆浓缩蛋白表面疏水性的影响如图 2 所示。

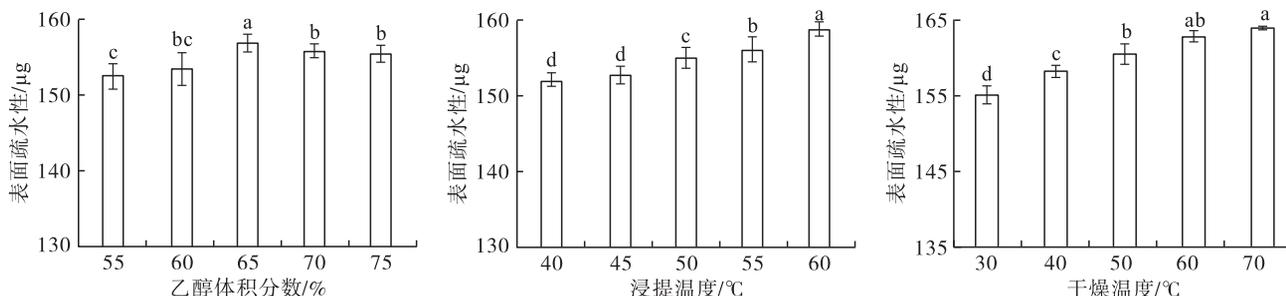


图 2 加工条件对大豆浓缩蛋白表面疏水性的影响

由图 2 可知,随着浸提液中乙醇体积分数的增加,大豆浓缩蛋白的表面疏水性呈现先增大后减小的趋势,在乙醇体积分数为 65% 时最大。表面疏水性主要取决于蛋白质的去折叠程度及疏水基团的暴露程度^[17],该变化趋势表明乙醇体积分数从 55% 增大到 65% 时蛋白质分子内疏水基团的暴露程度增大。相关性分析表明,表面疏水性与溶解度的相关性系数(r)为 -0.887 , $|r|$ 大于 $r_{0.01}$,表明溶解性与表面疏水性呈负相关关系,表面疏水性的增加不利于蛋白质的溶解,因此乙醇体积分数为 65% 时,溶解度最低。而在乙醇体积分数高于 65% 时,由于蛋白质分子间疏水相互作用增强导致蛋白质分子表面疏水基团暴露数量减少^[18],进而导致表面疏水性的降低。

由图 2 可知,随着浸提温度和干燥温度的升高,大豆浓缩蛋白表面疏水性增大。蛋白质表面疏水性的增加导致溶解度呈现持续降低的趋势^[19]。

醇法加工工艺所导致的蛋白质表面疏水性的增大是工业化所生产的醇法大豆浓缩蛋白溶解度较低的原因之一。乙醇体积分数 60% ~ 70%、浸提温度 50 ~ 60 °C 及干燥温度 60 ~ 70 °C 的条件均会使蛋白

质表面疏水性增大,从而导致溶解度降低,分子表面疏水基团的暴露所促进的分子聚集,也是导致蛋白质溶解度降低的主要原因。

2.3 加工条件对大豆浓缩蛋白分子间作用力的影响

氢键、二硫键等作用力是蛋白质维持结构且发生聚集的主要作用力^[20]。加工条件对大豆浓缩蛋白分子间作用力的影响如图 3 所示。

由图 3 可知,随着浸提液中乙醇体积分数的增加,氢键作用力增加,这主要是由于乙醇溶液较低的介电常数有利于蛋白质分子间氢键的形成^[4],疏水相互作用及二硫键作用力均呈现先增大后降低的趋势,疏水相互作用在乙醇体积分数为 65% 时最大,二硫键作用力在乙醇体积分数为 70% 时最大。较强的疏水相互作用会使蛋白质分子间发生疏水性聚集,促进聚集体的形成。二硫键作用力的增大则维持了聚集体构象的稳定^[21],聚集体的存在导致了蛋白质溶解度的降低。当乙醇体积分数大于 65% 时,蛋白质分子间疏水相互作用被削弱,当乙醇体积分数大于 70% 时,二硫键作用力降低,此时分子间形成的聚集体发生解离,蛋白质溶解度增加^[4]。

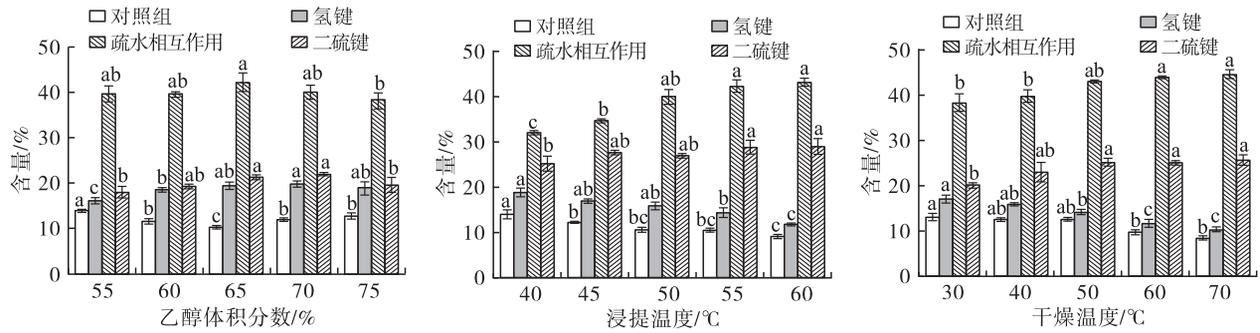


图3 加工条件对大豆浓缩蛋白分子间作用力的影响

温度的升高也会导致蛋白质结构展开,暴露出埋藏在分子内部的活性基团,促使蛋白质分子之间通过疏水相互作用、氢键和二硫键等作用力发生聚集等现象^[22]。由图3可知,随着浸提温度和干燥温度的升高,氢键作用力降低。氢键是维持蛋白质构象稳定的主要作用力,氢键作用力的降低表明温度的升高使蛋白质构象被破坏,分子内结构展开^[23]。随着浸提温度和干燥温度的升高,疏水相互作用及二硫键作用力则逐渐增大,促进了蛋白质分子间的交联。研究表明^[24],在干燥过程中蛋白质分子间会形成由次级键相联的聚集体。因此,随着温度的升高,疏水相互作用及二硫键等作用力的增强促进了聚集体的形成,导致了蛋白质溶解度的降低。

2.4 加工条件对大豆浓缩蛋白中游离巯基和二硫键含量的影响

游离巯基是位于蛋白质分子表面较活跃的基团,二硫键则是蛋白结构中较稳定的共价键,在维持蛋白质结构稳定性方面起着重要作用^[25]。二硫键及游离巯基含量的变化可以表示加工过程中蛋白质的变性程度以及稳定性的变化^[26]。加工条件对大豆浓缩蛋白中游离巯基和二硫键含量(以蛋白质质量计)的影响如表1所示。

由表1可知:不同加工条件下,总巯基含量无显著性差异,而随着浸提液中乙醇体积分数的增加,游离巯基含量先减小后增大,二硫键含量先增加后减小;随着浸提温度和干燥温度的升高,游离巯基含量减小,二硫键含量先增加后减小。游离巯基及二硫键含量变化是由于醇提过程中蛋白质结构的展开促进了分子中游离巯基相互交联形成了二硫键^[27]。二硫键含量的增多有利于维持聚集体结构稳定,从而导致蛋白质溶解度的降低^[28]。随着温度的升高,游离巯基同样通过交联/氧化转化为二硫键,因此游离巯基含量随着浸提温度和干燥温度的升高而降低,二硫键含量则随之增多。但当干燥温度高于60℃及浸提温度高于55℃时,由于游离巯基大量暴

露的同时也会被蛋白质分子间形成的聚集体所掩埋^[29],影响巯基氧化及SH—SS交换反应形成二硫键,因此游离巯基及二硫键含量变化均不再显著。

表1 加工条件对大豆浓缩蛋白中游离巯基和二硫键含量的影响

加工条件	含量/($\mu\text{mol/g}$)		
	游离巯基	总巯基	二硫键
乙醇体积分数/%			
55	9.43 ± 0.23 ^a	31.54 ± 0.15 ^a	11.05 ± 0.19 ^c
60	8.79 ± 0.05 ^b	31.80 ± 0.26 ^a	11.50 ± 0.15 ^{ab}
65	7.94 ± 0.16 ^c	31.34 ± 0.84 ^a	11.69 ± 0.34 ^a
70	8.63 ± 0.08 ^b	31.85 ± 0.50 ^a	11.61 ± 0.29 ^a
75	8.65 ± 0.10 ^b	31.30 ± 0.90 ^a	11.32 ± 0.04 ^b
浸提温度/℃			
40	9.37 ± 0.14 ^a	30.99 ± 0.17 ^a	10.80 ± 0.01 ^c
45	8.87 ± 0.01 ^b	31.42 ± 0.20 ^a	11.27 ± 0.09 ^b
50	8.07 ± 0.18 ^c	31.13 ± 0.61 ^a	11.52 ± 0.21 ^a
55	7.81 ± 0.17 ^d	30.62 ± 0.46 ^a	11.40 ± 0.14 ^{ab}
60	7.81 ± 0.09 ^d	30.52 ± 0.51 ^a	11.35 ± 0.30 ^{ab}
干燥温度/℃			
30	9.22 ± 0.34 ^a	31.17 ± 0.86 ^a	10.97 ± 0.26 ^b
40	8.79 ± 0.01 ^b	31.62 ± 1.28 ^a	11.41 ± 0.65 ^{ab}
50	8.41 ± 0.14 ^c	31.97 ± 0.68 ^a	11.78 ± 0.27 ^a
60	8.10 ± 0.01 ^d	31.69 ± 0.58 ^a	11.79 ± 0.28 ^a
70	7.97 ± 0.18 ^d	30.85 ± 1.13 ^a	11.43 ± 0.17 ^{ab}

注:表中每一列不同字母表示具有显著性差异($p < 0.05$)。下同

2.5 加工条件对大豆浓缩蛋白二级结构的影响

为进一步明确大豆浓缩蛋白的结构变化,对其二级结构进行了定量分析,结果如表2所示。

由表2可知,随着浸提液中乙醇体积分数的增加, α -螺旋含量增加, β -折叠含量整体呈先增加后减小的趋势。 α -螺旋含量的增加主要是由于随着乙醇体积分数的增加,氢键含量增多,因此由氢键维持稳定结构的 α -螺旋含量随之增加^[12]。而 β -折叠含量则代表了蛋白质分子间的聚集程度^[30], β -折叠含量的变化表明随着浸提液中乙醇体积分数的增加,蛋白质分子聚集程度先增加后减少。而随着浸提温度的升高, α -螺旋含量减小, β -折叠

含量则增大,这表明较高的温度下蛋白质分子内发生了解螺旋,结构展开并且分子间发生了聚集。以上结果进一步证明了在浸提过程中,蛋白质发生的热变性和醇变性使分子内结构展开,分子间发生聚集,导致了蛋白质溶解度的降低。随着干燥温度从

30℃升高到70℃, α -螺旋含量降低了8.10%, β -折叠及无规卷曲含量分别增加了6.03%、4.59%,这也表明在干燥过程中, α -螺旋向 β -折叠及无规卷曲转变,蛋白质结构趋于无序,且分子间的聚集程度增大,导致了蛋白质溶解度的降低^[31]。

表2 加工条件对大豆浓缩蛋白二级结构含量的影响

加工条件	含量/%			
	β -折叠	β -转角	α -螺旋	无规卷曲
乙醇体积分数/%				
55	37.81 ± 2.37 ^b	24.13 ± 1.90 ^{bc}	11.70 ± 0.53 ^b	15.90 ± 0.20 ^a
60	36.95 ± 0.07 ^c	25.91 ± 1.56 ^b	11.91 ± 0.88 ^{ab}	15.43 ± 0.48 ^{ab}
65	41.65 ± 1.87 ^a	22.91 ± 0.32 ^c	11.82 ± 1.23 ^{ab}	14.86 ± 0.73 ^b
70	39.32 ± 1.21 ^{ab}	27.70 ± 0.35 ^a	12.33 ± 0.18 ^a	14.79 ± 0.30 ^b
75	38.32 ± 1.52 ^b	26.78 ± 1.26 ^{ab}	12.51 ± 1.02 ^a	14.30 ± 1.44 ^c
浸提温度/℃				
40	33.66 ± 0.30 ^c	27.38 ± 0.67 ^a	12.56 ± 1.94 ^a	14.42 ± 0.39 ^c
45	35.11 ± 0.71 ^b	25.79 ± 0.44 ^b	12.42 ± 0.71 ^a	15.43 ± 0.56 ^b
50	36.18 ± 2.69 ^a	25.44 ± 0.78 ^b	12.23 ± 1.39 ^{ab}	15.69 ± 1.69 ^b
55	36.60 ± 1.24 ^a	24.52 ± 1.09 ^c	11.98 ± 1.26 ^b	16.42 ± 0.54 ^a
60	35.84 ± 1.46 ^{ab}	24.65 ± 0.62 ^c	12.20 ± 0.03 ^{ab}	16.22 ± 0.63 ^a
干燥温度/℃				
30	34.83 ± 0.28 ^c	32.52 ± 2.67 ^a	12.72 ± 1.26 ^a	14.59 ± 0.59 ^b
40	33.71 ± 0.06 ^d	30.88 ± 1.77 ^b	12.37 ± 0.14 ^{ab}	14.40 ± 0.77 ^b
50	35.65 ± 0.43 ^b	25.40 ± 1.05 ^{cd}	11.87 ± 0.19 ^b	14.80 ± 0.37 ^{ab}
60	35.00 ± 0.77 ^{bc}	26.43 ± 2.45 ^c	11.52 ± 0.83 ^c	14.94 ± 0.42 ^{ab}
70	36.93 ± 0.98 ^a	24.44 ± 1.17 ^d	11.69 ± 1.59 ^b	15.26 ± 0.88 ^a

2.6 加工条件对大豆浓缩蛋白粒径的影响

蛋白质颗粒的大小及聚集程度会影响其功能特性,粒径是反映蛋白质聚集程度的关键指标。为进

一步了解大豆浓缩蛋白分子间的聚集程度,对不同加工条件下的大豆浓缩蛋白进行了粒径分析,结果如图4所示。

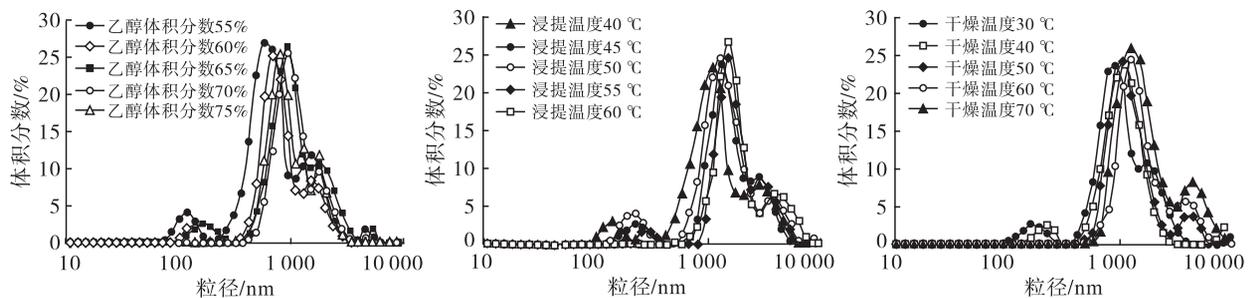


图4 加工条件对大豆浓缩蛋白粒径的影响

由图4可知,乙醇体积分数从55%增加到65%,粒径的体积分布峰逐渐向大粒径方向移动,且峰值增大,表明蛋白质分子间的聚集程度增大,形成了较多的大粒径聚集体。而在乙醇体积分数高于65%时,蛋白质粒径略有减小,这表明较高乙醇体积分数下聚集体发生了部分解离,这也与蛋白质分子间作用力的测定结果一致。而随着浸提温度和干燥温度的升高,蛋白质粒径的体积分布峰持续右移,峰值也逐渐增大,这表明温度的升高同样促进了蛋白

质分子间聚集程度的增大。在干燥温度高于40℃时,小粒径体积分布峰消失,表明在干燥过程中,随着干燥温度的升高,蛋白质分子间发生了进一步聚集,形成了大粒径聚集体。粒径越大,蛋白质溶解度越低,因此推测在浸提与干燥过程中发生的醇、热变性,使蛋白质分子间发生聚集形成了不溶性聚集体,聚集体的形成与解离影响了蛋白质的溶解度^[32]。

结合蛋白质分子间各作用力的研究结果来看,工业化生产醇法大豆浓缩蛋白时,浸提液中乙醇体

积分数60%~70%、浸提温度50~60℃及干燥温度60~70℃会使蛋白质分子间作用力增强,蛋白质分子发生聚集形成大粒径聚集体,这也是导致产品溶解度较低的原因。

3 结论

大豆浓缩蛋白生产过程浸提液中乙醇体积分数为65%时,蛋白质的溶解度最低,而随着浸提温度及干燥温度的升高,蛋白质溶解度呈现持续降低的趋势。对大豆浓缩蛋白结构的研究表明,随着乙醇体积分数的增加,表面疏水性、分子间的疏水相互作用、分子中的二硫键含量及粒径均呈现先增加后降低的趋势,在乙醇体积分数为65%时最大。而随着浸提温度和干燥温度的升高,大豆浓缩蛋白分子间氢键作用力降低,表面疏水性、分子间的疏水相互作用及粒径均增大, α -螺旋向 β -折叠及无规卷曲转变,蛋白质结构展开并趋于无序。

综上,在目前工业化生产醇法大豆浓缩蛋白为保证得率及蛋白质含量而采用的乙醇体积分数60%~70%、浸提温度50~60℃及干燥温度60~70℃的加工条件下,蛋白质结构变化所导致的蛋白表面疏水性的增大、分子间聚集程度的增加均会导致溶解度的降低,不利于应用。后续将继续探究在保证得率及蛋白质含量的前提下能够改善醇法大豆浓缩蛋白溶解度的工艺。

参考文献:

- [1] 李林桂,肖伟伟,葛梦兰.大豆浓缩蛋白的生产工艺、营养组成及在动物日粮中的应用[J].饲料工业,2015,36(S1):29-32.
- [2] 黄友如,华欲飞,裘爱泳.醇法大豆浓缩蛋白制取工艺的探讨[J].中国油脂,2002,27(3):50-52.
- [3] YOSHIZAWA S, ARAKAWA T, SHIRAKI K. Dependence of ethanol effects on protein charges [J]. Int J Biol Macromol, 2014, 68:169-172.
- [4] 牛新培,魏安池,郑华丽,等.醇变性大豆7S球蛋白结构特征研究[J].粮食与油脂,2012,25(12):1-4.
- [5] PENG L P, XU Y T, LI X T, et al. Improving the emulsification of soy β -conglycinin by alcohol-induced aggregation[J/OL]. Food Hydrocolloid, 2020, 98: 105307 [2022-03-16]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105307>.
- [6] 冯扬扬,王浩,于栋,等.乙醇诱导改性对乳清分离蛋白结构及乳化特性的影响[J].食品工业科技,2020,41(23):1-7.
- [7] HU X Z, CHENG Y Q, FAN J F, et al. Effects of drying method on physicochemical and functional properties of soy protein isolates[J]. J Food Process Pres, 2009, 34(3): 520-540.
- [8] 汤虎,孙智达,徐志宏,等.超声波改性对小麦面筋蛋白溶解度影响的研究[J].食品科学,2008,29(12):368-372.
- [9] SHEN H, ZHAO M M, SUN W Z. Effect of pH on the interaction of porcine myofibrillar proteins with pyrazine compounds[J]. Food Chem, 2019, 287:93-99.
- [10] 张莹莹,石长硕,王瑞红,等.大豆蛋白复配对面团特性及面条品质的影响[J].粮食与饲料工业,2019(8):32-36,42.
- [11] 张莹莹,王瑞红,石长硕,等.质构化大豆蛋白与大豆水解蛋白复配对面团特性及面条品质的影响[J].河南工业大学学报(自然科学版),2019,40(5):25-31.
- [12] 齐宝坤,赵城彬,李杨,等.热处理对大豆11S球蛋白溶解性和二级结构的影响[J].食品科学,2018,39(22):39-44.
- [13] 牛新培.醇法大豆浓缩蛋白变性机理及改性研究[D].郑州:河南工业大学,2013.
- [14] RAHMATI N, KOOCHEKI A, VARIDI M, et al. Introducing speckled sugar bean (*Phaseolus vulgaris*) protein isolates as a new source of emulsifying agent[J]. Food Hydrocolloid, 2018, 79:498-508.
- [15] 刘亚男.怀山药全粉的制备及其性质研究[D].河南洛阳:河南科技大学,2017.
- [16] 石珊珊.醇法大豆浓缩蛋白制取、改性及生产实践[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2009.
- [17] 陈震东,陈嘉琦,王金梅,等.热诱导大豆蛋白纤维聚集体的分离及性质研究[J].现代食品科技,2015,31(6):172-177.
- [18] 李丹,魏冬旭,贾焯,等.大豆11S球蛋白热力学特性和溶液性质与表面疏水性关系研究[J].食品工业科技,2018,39(10):46-50,57.
- [19] 李祥鹏.热处理诱导大豆11S蛋白熔球态结构及其功能性质的研究[D].哈尔滨:哈尔滨商业大学,2021.
- [20] 李杨,王中江,王瑞,等.不同热处理条件下大豆分离蛋白的红外光谱分析[J].食品工业科技,2016,37(8):104-109.
- [21] SHEN L, TANG G H. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate[J]. Food Res Int, 2012, 48(1):108-118.
- [22] 唐婷婷,杨玲玲,蒋艳,等.卵白蛋白和大豆分离蛋白相互作用对凝胶结构及性质的影响[J].食品与生物技术学报,2022,41(4):31-37.
- [23] 贺云.豆腐酸浆中乳酸菌的分离鉴定及其在酸浆豆腐中的应用[D].江苏无锡:江南大学,2018.
- [24] 毕万里,华欲飞.不同干燥方式对大豆浓缩蛋白溶解度和结构影响[J].粮食与油脂,2008,21(1):24-26.

- [11] LIU G, LI W R, QIN X G, et al. Pickering emulsions stabilized by amphiphilic anisotropic nanofibrils of glycosylated whey proteins [J/OL]. *Food Hydrocolloid*, 2020, 101: 105503 [2022-04-12]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105503>.
- [12] JIA Z B, ZHENG M, TAO F, et al. Effect of covalent modification by (-)-epigallocatechin-3-gallate on physicochemical and functional properties of whey protein isolate [J]. *LWT - Food Sci Technol*, 2016, 66: 305-310.
- [13] ASHAOLU T J, ZHAO G H. Fabricating a Pickering stabilizer from okara dietary fibre particulates by conjugating with soy protein isolate via Maillard reaction [J]. *Foods*, 2020, 9(2): 143-160.
- [14] 陈艾霖, 洪鹏志, 宋春勇, 等. 热处理对负载叶黄素的罗非鱼分离蛋白乳液稳定性和体外消化的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(16): 173-180.
- [15] 陈悦, 陈季旺, 周琦, 等. 壳聚糖-乳清分离蛋白复合膜的制备、形态结构及理化性质 [J]. *食品科学*, 2014, 35(9): 106-111.
- [16] 李宛蓉, 刘佩, 余静怡, 等. 乳清分离蛋白与单宁酸相互作用提高稻米油 Pickering 乳液的稳定性 [J]. *食品科学*, 2020, 41(18): 1-7.
- [17] ZHU D, DAMODARAN S, LUCEY J A. Formation of whey protein isolate (WPI) - dextran conjugates in aqueous solutions [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 7113-7118.
- [18] TURAN D, GIBIS M, GUNES G, et al. The impact of the molecular weight of dextran on formation of whey protein isolate (WPI) - dextran conjugates in fibers produced by needleless electrospinning after annealing [J]. *Food Funct*, 2018, 9: 2193-2200.
- [19] HONG Z, XIAO N, LI L, et al. Glycation of whey protein isolate and emulsions prepared by conjugates [J/OL]. *J Food Eng*, 2022, 316: 110852 [2022-04-12]. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110852>.
- [20] CHEN W J, MA X B, WANG W J, et al. Preparation of modified whey protein isolate with gum acacia by ultrasound Maillard reaction [J]. *Food Hydrocolloid*, 2019, 95: 298-307.
- [21] 李松南. 淀粉基 Pickering 乳液稳定机理及在叶黄素递送中的应用研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2020.
- [22] LILLARD J S, CLARE D A, DAUBERT C R. Glycosylation and expanded utility of a modified whey protein ingredient via carbohydrate conjugation at low pH [J]. *J Dairy Sci*, 2009, 92: 35-48.
- [23] QIN X G, YU J Y, WANG Q, et al. Preparation of camellia oil pickering emulsion stabilized by glycosylated whey protein isolate and chitoooligosaccharide: effect on interfacial behavior and emulsion stability [J/OL]. *LWT - Food Sci Technol*, 2022, 153: 112515 [2022-04-12]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112515>.
- [24] YI P, WU Z Z, XIE Q T, et al. Insight into the stabilization mechanism of emulsions stabilized by Maillard conjugates: protein hydrolysates - dextrin with different degree of polymerization [J/OL]. *Food Hydrocolloid*, 2020, 99: 105347 [2022-04-12]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105347>.
- [25] DOOST A S, NASRABADI M N, GOLI S A H, et al. Maillard conjugation of whey protein isolate with water-soluble fraction of almond gum or flaxseed mucilage by dry heat treatment [J/OL]. *Food Res Int*, 2020, 128: 108779 [2022-04-12]. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108779>.
- [26] CHEN C, SHI K, QIN X, et al. Effect of interactions between glycosylated protein and tannic acid on the physicochemical stability of Pickering emulsions [J/OL]. *LWT - Food Sci Technol*, 2021, 152: 112383 [2022-04-12]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112383>.
- [27] ZHANG B, LEI M, HUANG W J, et al. Improved storage properties and cellular uptake of casticin-loaded nanoemulsions stabilized by whey protein-lactose conjugate [J/OL]. *Foods*, 2021, 10(7): 1640 [2022-04-12]. <https://doi.org/10.3390/foods10071640>.
- (上接第 63 页)
- [25] RAZI SM, MOTAMEDZADEGAN A, SHAHIDI A, et al. The effect of basil seed gum (BSG) on the rheological and physicochemical properties of heat-induced egg albumin gels [J]. *Food Hydrocolloid*, 2018, 82: 268-277.
- [26] GONG K J, SHI A M, LIU H Z, et al. Emulsifying properties and structure changes of spray and freeze-dried peanut protein isolate [J]. *J Food Eng*, 2016, 170: 33-40.
- [27] 阮奇珺. 大豆蛋白热诱导二硫键连接物的形成及巯基变化亚基水平研究 [D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2015.
- [28] 汪长青, 李兴江, 穆冬冬, 等. 预处理对大豆分离蛋白结构及凝胶性质的影响 [J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(10): 40-46, 52.
- [29] 陈振家, 王晓闻, 荆旭, 等. 不同温度处理对红芸豆蛋白热稳定性及结构的影响 [J]. *农业工程学报*, 2020, 36(19): 306-312.
- [30] MALIK M A, SANINI C S. Heat treatment of sunflower protein isolates near isoelectric point: effect on rheological and structural properties [J]. *Food Chem*, 2019, 276: 554-561.
- [31] 王晓琳, 朱力杰, 陈妍婕, 等. 不同干热处理对花生蛋白二级结构及乳化性的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(5): 86-90.
- [32] 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): 318-325.