

不同比例球蛋白组成对大豆蛋白溶液乳化性与界面特性的影响

陈硕, 唐传核

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文研究大豆蛋白组成(不同配比 7S 和 11S 蛋白)对水包油型乳液乳化和界面吸附特性的作用规律。结果表明: 自提 7S 和 11S 球蛋白基本处于天然未变性状态; 随着大豆蛋白中 11S 含量的增加, 乳液整体粒径分布增大, 乳液乳化活性指数、 ζ 电位绝对值、油水界面蛋白浓度及含量均逐渐减少, 乳滴絮凝和合并指数显著上升, 乳液整体乳化活性及稳定性也随之降低; 由乳化特性数据可知 7S 球蛋白对大豆蛋白整体乳化性能贡献大于 11S; 界面蛋白电泳结果表明所有亚基均可吸附至界面, 且吸附的两类蛋白各亚基含量变化与各样品蛋白所占比重基本一致; 乳液微结构随着 11S 球蛋白含量提升由清晰球状转变为无规则絮凝聚集态; 整体上本实验所提大豆 11S 球蛋白在油水界面扩散、展开和重排速率高于 7S 球蛋白, 不同 11S 含量的大豆蛋白界面重排速率均高于吸附展开速率, 通过调整大豆蛋白组成可一定程度上调控蛋白在乳液界面吸附行为。

关键词: 蛋白组成; 乳化特性; 界面特性; 7S 球蛋白; 11S 球蛋白

文章编号: 1673-9078(2016)9-62-68

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.010

Effect of Varying β -Conglycinin/Glycinin Ratios on the Emulsifying and Interfacial Properties of Soybean Proteins

CHEN Shuo, TANG Chuan-he

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effect of soybean protein composition (different ratios of 7S globulin (β -conglycinin) and 11S globulin (glycinin)) on the emulsifying and interfacial properties of oil-in-water (O/W) emulsions was evaluated. The results indicated that manually extracted 7S and 11S globulins were in their native state. With increasing 11S content, the emulsifying activity index, absolute value of ζ -potential, protein concentration, content at the O/W interface, emulsifying activity, and stability were reduced, and the overall particle size distribution, droplet flocculation index, and droplet coalescence index of the emulsion were increased. According to the results of emulsifying properties, 7S globulin contributed more towards the overall emulsification ability of soybean proteins than the 11S globulin did. Electrophoresis images of interfacial proteins indicated that all subunits of the two globulins could be adsorbed at the O/W interface, and changes in the contents of all subunits were in accordance with the proportion of proteins in the sample. With increasing 11S content, the emulsion microstructure changed from a clear spherical shape into irregularly flocculated aggregates. In general, diffusion, adsorption, and rearrangement rates of the 11S globulin at O/W interface were higher than that of 7S globulin, and the rearrangement rates of all protein samples with different 11S contents at O/W interface were higher than the adsorption rates. These results suggest that emulsifying and interfacial adsorption properties of soybean globulins can be regulated to some extent by altering the protein composition.

Key words: protein composition; emulsifying properties; interfacial properties; 7S globulin; 11S globulin

大豆蛋白是一类优良食品蛋白资源, 其主要由 7S (β -伴大豆球蛋白) 和 11S (大豆球蛋白) 两大类球

收稿日期: 2015-07-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31471695, 31171632)

作者简介: 陈硕 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质资源开发与综合利用

通讯作者: 唐传核 (1973-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 蛋白质资源开发与综合利用研究

蛋白构成, 占大豆贮藏蛋白总含量约 70%, 因而大豆暴露出来, 而分布于外部亲水性氨基酸通过形成空间蛋白很多功能特性, 如凝胶性、起泡性、乳化性和流变性等, 主要由这两类蛋白决定^[1~2]。另一方面, 由于各自特定结构和氨基酸组成差异, 两类球蛋白相对含量会对大豆蛋白整体功能特性产生不同影响。乳液是常见的一类食品胶体分散体系, 为降低表面张力以使乳滴稳定, 均需通过相关均质手段将油滴粒径减小,

把不相溶油相和水相转变为均一乳液,同时添加适量乳化剂稳定油滴表面^[3]。球蛋白作为乳化剂主要用来制备水包油型乳液,埋藏于球蛋白内部的疏水氨基酸位阻阻止合并和絮凝行为发生^[4]。国内外对大豆蛋白及其组分稳定乳液研究已有很多文献报道,其中蛋白组成对乳液性能影响研究也有相关报道。Miriani 等^[5]通过荧光光谱技术比较了大豆 7S 和 11S 球蛋白在水溶液和乳液油水界面中的结构变化行为,测得两类蛋白包含色氨酸伸展区均更倾向暴露于水连续相而不是乳滴内部。胡超等^[6]探讨了 11S/7S 球蛋白比值对大豆蛋白功能性的影响,得出乳化性、凝胶透明性和起泡性均随 11S/7S 比值增加而降低。Luo 等^[7-8]研究了 11S 蛋白含量在不同比例 7S/11S 大豆蛋白凝胶样乳液形成中的作用,得出当 11S 蛋白含量大于 65%时,85 °C 加热后的混合总蛋白可制备得到凝胶样乳液;在相同加热温度下,大豆 11S 球蛋白形成的凝胶样乳液凝胶强度大于 7S。程翠林等^[9]探究了不同大豆品种因大豆蛋白 7S/11S 比例不同对所制备乳液性能影响,结果表明品种差异造成大豆蛋白中两类球蛋白比例不同,进而影响其功能性。

本文则制备在低蛋白浓度下不同 11S 球蛋白含量的大豆蛋白乳液,从不同角度深入探究不同 11S 含量的大豆蛋白乳化性能和界面吸附行为变化规律,以期通过调控大豆蛋白组成来改变乳液特性,为深入开发和高效合理利用大豆蛋白资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

大豆油:食品级,市售;脱脂豆粕:山东禹王公司;NaN₃、丙烯酰胺:分析纯,北京鼎国生物技术公司;十二烷基磺酸钠(SDS):化学纯,上海伯奥生物技术公司;尼罗红、尼罗蓝:纯度 95%,美国 Sigma 公司;其它化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

ALPHA1-4/2-4 真空冷冻干燥机,德国 Christ 公司;KDN-102C 型凯氏定氮仪,上海新嘉公司;TA Q100 差示扫描量热仪,美国 TA 仪器公司;IKA T25 高速分散机,德国 IKA 公司;M110-EH 型微射流纳米均质机,美国 MFIC 公司;Mastersizer 3000 粒度分布仪和 Nano-ZS 纳米粒度电位仪,英国 Malvern 公司;UV-VS 2501PC 紫外可见分光光度计,日本 Shimadzu 公司;Bio-Rad 电泳仪和 Gel Doc XR 凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;TCS SP5 型激光共聚焦扫描显微

镜,德国 Leica 仪器公司;OCA20 视频光学接触角测量仪,德国 Data Physics 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆 7S 和 11S 球蛋白提取

大豆 7S 和 11S 蛋白提取参考 Nagano^[10]的方法并略有改动。将脱脂豆粕溶于蒸馏水(1:15, *m/V*),调节 pH 至 7.5 后用均质机搅拌 2 h。于 9000 r/min 离心 30 min (25 °C)。向离心后上清添加 NaHSO₃ 至终浓度为 1.04 g/L,调 pH 至 6.4,置于 4 °C 冰箱过夜后 6500 r/min 离心 20 min (4 °C),将沉淀复溶于蒸馏水,用去离子水透析 48 h。透析后蛋白液冷冻干燥即得 11S 球蛋白。

向上一步离心得到上清液中加入固体 NaCl 至浓度为 0.2 mol/L,调 pH 至 5.0,9000 r/min 离心 30 min,弃除沉淀,向上清液加入两倍体积蒸馏水,调 pH 至 4.8,置于 4 °C 静置 30 min,6500 r/min 离心 20 min (4 °C),将沉淀复溶于蒸馏水,加入去离子水稀释后透析 48 h,冷冻干燥,即得 7S 球蛋白。两蛋白样品经 KDN-102C 型凯氏定氮仪测定得到大豆 7S 和 11S 蛋白含量分别约为 82.4%和 93.7%。

1.3.2 蛋白热学特性分析

自提蛋白热学特性指标通过差示扫描量热技术(Differential Scanning Calorimetry, DSC)进行测量。准确称取 2 mg 样品置于已备好铝盒中,用微型注射器加 10 μL 去离子水后加盖压盘,过夜充分水化。相关参数设置为:温度扫描范围:40~105 °C,稳定时升温速率:6 °C/min, N₂ 流速:50 mL/min。以空盘为对照进行测量并用 Universal Analyzer 2000 软件计算处理样品变性温度 T_d 、半峰宽 $\Delta T_{1/2}$ 和变性焓 ΔH 。

1.3.3 乳液制备

配制含有不同比例 11S/7S (即 11S 含量分别为 0%、25%、50%、75%、90%和 100%)的 0.5% (*m/V*) 混合蛋白溶液,添加 0.02% NaN₃ 抑制微生物生长,磁力搅拌 2 h 后调 pH 至 7.0,4 °C 过夜水化。次日取 40 mL 蛋白液与 10 mL 大豆油混合,磁力预搅拌 30 min,先用 IKA T25 高速均质机 10000 r/min 预均质 2 min,再经微射流于 40 MPa 处理 1 循环。

1.3.4 乳液粒度分布、絮凝指数和凝结指数测定

乳液的粒度分布用 Mastersizer 3000 粒度仪测定,并分别以去离子水和 1% SDS 为分散剂。体积平均粒径 $d_{4,3} = \sum n_i d_i^4 / \sum n_i d_i^3$, 表面积平均粒径 $d_{3,2} = \sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$, 其中 n_i 和 d_i 分别为液滴数及液滴直径^[11]。

$$\text{凝结指数 } CI (\text{Coalescence Index, \%}) = (d_{4,3(24\text{h})} / d_{4,3(0\text{h})}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{絮凝指数 } FI (\text{Flocculation Index, \%}) = [(d_{4,3\text{-水}} / (d_{4,3\text{-SDS}}) - 1.0) \times 100 \quad (2)$$

其中, $d_{4,3\text{-水}}$ 和 $d_{4,3\text{-SDS}}$ 分别为乳液在水和 1% SDS 介质的体积平均粒径, 而 $d_{4,3(0\text{h})}$ 和 $d_{4,3(24\text{h})}$ 分别为乳液静置 0 h 和 24 h 以 1% SDS 为介质的体积平均粒径, ϕ 为油相 0.2 (V/V)。

1.3.5 乳液 ζ 电位和乳化活性指数测定

乳状液液滴的电位大小采用 Nano ZS 电位测定仪测定。测试前先将待处理样品稀释成浓度为 0.1% (m/V)。

乳化活性指数 (Emulsifying ability index, EAI) 测量采用 Pearce 的经典浊度法^[12]。于 0 h 和 24 h 处从乳液底部取 5 μL 稀释到 5 mL 0.1% SDS 中, 经涡流搅拌机振荡后, 于 500 nm 下测稀释液吸光度值。乳液的浊度 (T) 用下式计算:

$$T = (2.303 \times A) / l$$

其中, A 为 500 nm 下吸光度值, l 为光程长 (1 cm)。

进而乳化活性指数:

$$EAI (\text{m}^2/\text{g}) = (2 \times T \times D) / (\phi \times C \times 10^4) \quad (3)$$

其中 A_t 和 A_0 分别代表储藏 t 和 0 时刻的乳液 500 nm 下吸光度值, T 为浊度, D 为稀释倍数 1000, ϕ 为油相比比例 0.2 (V/V), C 为连续相蛋白溶液浓度 0.5% (m/V), 10^4 为换算系数。

1.3.6 界面蛋白含量和浓度测定^[13]

取 1 mL 乳液置于离心管中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下 11270 r/min 离心 30 min 后得到脂肪层和清液。用注射器将底部清液取出, 用 Folin-Phenol 试剂盒测定下清液蛋白含量 C_f 。将原蛋白液同样在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下 11270 r/min 离心 30 min, 测定上清液蛋白含量 C_i 。吸附至界面蛋白含量 $AP\%$ 是 C_i 与 C_f 的差。

$$\text{界面表面积 } S_v (\text{m}^2/\text{mL emulsion}) = 6\phi / d_{3,2} \quad (4)$$

$$\text{吸附蛋白含量 } AP\% (\text{mg/mL emulsion}) = C_i - C_f \quad (5)$$

$$\text{界面蛋白浓度 } \Gamma (\text{mg/m}^2) = AP\% / S_v \quad (6)$$

1.3.7 乳液界面蛋白组成分析

采用还原型十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析离心后下清液和乳析层界面蛋白组分。凝胶染色与脱色后, 置于凝胶成像系统进行成像处理。

1.3.8 乳液微结构观察

通过微射流均质方式制备乳液则是通过 CLSM 进行观察。乳液样品用 1% 尼罗蓝和 0.1% 尼罗红混合液进行染色。将载有样品玻片倒置于载物台上, 用 Argon 和 He/Ne 激光器为激发光源, 于 514 nm 和 633 nm 波长同时激发, 40 倍物镜进行观察。

1.3.9 乳液界面张力测定

采用动态滴形分析法来检测不同蛋白组成大豆

蛋白分子吸附在油-水界面上的表面张力 (π) 随吸附时间 (t) 的变化^[11]。实验时, 将玻璃槽盛装约 3/4 体积的纯玉米油, 微量注射器中注入蛋白溶液后与自动控制注射单元相连, 连接在毛细管上的不锈钢针插入油中, 形成封闭系统, 静置 10 min 后注入 20 μL 液滴, CCD 视频摄像系统立即检测表面张力随蛋白吸附时间的变化。界面张力计算采用 Young-Laplace 方程, 其中 $\pi = \sigma_0 - \sigma$, σ 和 σ_0 是加入与未加入蛋白时缓冲溶液对油相的表面张力。本实验于 20 $^{\circ}\text{C}$ 下进行, 每次检测总时长为 3 h。

1.3.10 数据统计分析

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行单因素方差分析和显著性差异分析, 数据以均值 \pm 标准差表示。

2 结果与讨论

2.1 大豆 7S 和 11S 球蛋白热学特性

表 1 7S 和 11S 球蛋白热学特征参数

Table 1 Thermal characteristics of 7S globulin and 11S globulin

样品	$T_d/^{\circ}\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$	$\Delta T_{1/2}/^{\circ}\text{C}$
11S	89.51 \pm 0.35	21.09 \pm 0.12	9.11 \pm 0.64
7S	74.18 \pm 0.44	7.204 \pm 0.20	8.44 \pm 0.38

采用差示扫描量热 (DSC) 方法研究所提球蛋白的热学特性, 变性温度 T_d 体现变性焓变, ΔH 反映蛋白吸热变性程度。大豆 7S 和 11S 球蛋白具有两显著的热跃迁峰, 变性范围: 7S: 68~75 $^{\circ}\text{C}$, 11S: 85~93 $^{\circ}\text{C}$ ^[14-15]。本实验两类蛋白详细的热学参数见表 1, 可以看到, 11S 变性温度 T_d 中值约为 89.51 $^{\circ}\text{C}$, 7S 为 74.18 $^{\circ}\text{C}$, 11S 和 7S 变性焓 ΔH 达到 21.09 J/g 和 7.204 J/g, 且 $\Delta T_{1/2}$ 数值较大说明两蛋白有较宽变性域, 综合可知自提球蛋白变性程度较小, 蛋白基本处于 native 状态。

2.2 乳液粒度分布

观察图 1a, 可知不同比例各乳液均呈现双峰形态, 表明都存在不同程度的絮凝行为。同时, 随着 11S 比例的增加, 各乳液粒径均有所右移, 且当大于 50% 时, 粒度在 50 μm 和 0.8 μm 左右均有分布, 从而表明 7S 球蛋白乳化活性优于 11S。与 a 图相比, 在小于 75% 时, b 图 (1% SDS 为分散剂) 呈现出较好的单峰状态

且粒径均集中于 1 μm 左右, 相应各乳液粒径均有所回收以及相应体积分数的增大, 进一步说明絮凝程度较大。而在大于 75%时, 仍然存在双峰现象, 但各相应峰值所在粒径有大幅度降低, 说明在此含量范围内, 可能出现乳滴聚结或者本身形成的是较大粒径乳液, 表明 0.5%蛋白浓度与 20% (V/V) 油相这一体系对乳液稳定作用不是非常显著。

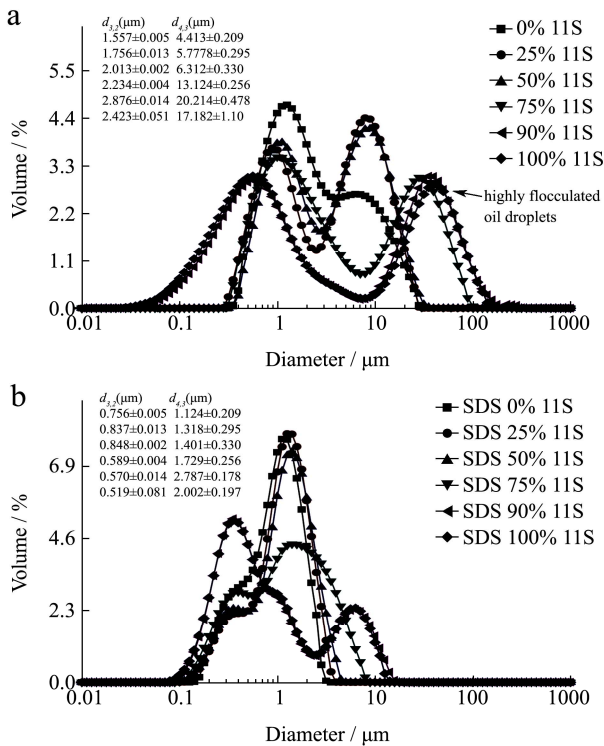


图 1 不同含量 11S 的大豆蛋白乳液粒度分布

Fig.1 Oil droplet size distribution of soy globulin-stabilized emulsions with varying content of 11S globulin (0~100%)

注: 分散剂 a, 去离子水; 分散剂 b, 1% SDS。

2.3 乳液乳化性能表征

乳化活性指数 *EAI* 和乳化稳定性指标 (絮凝指数 *FI* 和凝结指数 *CI*) 等可用来表征蛋白乳化性能。如表 2 所示, 对于经微射流均质纯 7S 乳液, 与 100% 含量 11S 乳液相比, 刚制备以及 24 h 后其 *EAI* 均明显优于后者, 再次表明 7S 比 11S 具有更优乳化活性, 与 Puppò^[16]和 Chove^[17]的报道一致。此外, 由于乳液乳化体系的失稳现象出现, 如乳滴间絮凝或凝结等, 致使 24 h 后实际测得的各项 *EAI* 值发生不同程度下降, 且随 11S 含量增加, 乳液乳化活性降低越迅速, 各样品间均有显著性差异 ($p < 0.05$)。刚制备各乳液 *EAI* 值随着 11S 比例增大整体呈下降趋势, 且 11S 比例超过 50%时, 下降幅度也随之变大, 这和 ζ 电位趋势一致 (表 2)。

通过比较絮凝指数 *FI* 和凝结指数 *CI* 大小可知, 随着 11S 含量增加, 絮凝和凝结程度整体呈上升趋势, 在只有 7S 与 11S 时 *FI* 分别达到 3.93%和 8.58%, 这与 *EAI* 数据相吻合, 当 11S 含量在 50%以下时, *FI* 则均集中于 4.0%左右, 而大于 50%时絮凝程度大幅增加。界面吸附蛋白浓度 Γ 与界面蛋白含量 *AP* 同样用来间接表征蛋白乳化性能大小, 两者数值越大, 吸附至油水界面能力越强。由表 2 可以看到, 随着 11S 含量提升, 界面蛋白浓度 Γ 整体呈显著减少趋势, 吸附蛋白含量 *AP* 同样是显著降低, 最高吸附比例为纯 7S 时的 17.84%, 表明所有乳液样品吸附蛋白比例相对较小, 大部分未吸附蛋白主要存在于水连续相中。对于本实验中自提的两类蛋白, 在以微射流均质为乳化手段时, 0.5%总浓度的不同 11S 含量大豆蛋白样品均足以覆盖乳滴表面。

表 2 不同 11S 含量大豆蛋白稳定乳液乳化活性指数 (*EAI*)、 ζ 电位 (ζ -potential)、絮凝指数 (*FI*)、凝结指数 (*CI*)、界面蛋白含量 (*AP*) 和浓度 (Γ)

Table 2 Emulsifying activity index (*EAI*), flocculation index (*FI*), coalescence index (*CI*), ζ -potential, interfacial protein percentage (*AP*), and concentration (Γ) of emulsions with varying content of 11S globulin (0~100%)

11S 含量/%	<i>EAI</i> /(m ² /g)		<i>CI</i> /%	ζ -电位/mV	<i>FI</i> /%	界面蛋白	
	0 h	24 h	3 weeks			Γ /(mg/m ²)	<i>AP</i> /%
0	336.24±12.38 ^a	329.33±3.91 ^a	6.14	(-38.47)±2.25 ^d	3.93±0.46 ^d	0.89±0.011 ^a	17.84±0.030 ^a
25	330.02±0.33 ^a	291.10±18.56 ^b	6.58	(-37.38)±1.31 ^d	4.38±0.27 ^c	0.73±0.01 ^b	14.50±0.016 ^b
50	273.59±18.24 ^b	197.59±16.61 ^c	7.03	(-36.25)±0.78 ^c	4.51±0.40 ^c	0.60±0.04 ^c	11.94±0.027 ^c
75	189.99±8.14 ^c	126.20±0.65 ^d	7.59	(-34.40)±3.96 ^{bc}	7.59±1.01 ^b	0.50±0.01 ^d	10.06±0.020 ^d
90	91.66±0.65 ^d	47.44±0.65 ^e	8.26	(-31.70)±0.42 ^b	7.25±0.19 ^b	0.41±0.011 ^e	8.16±0.022 ^e
100	73.69±5.19 ^e	41.91±9.12 ^e	8.47	(-28.50)±0.57 ^a	8.58±1.10 ^a	0.39±0.011 ^f	6.79±0.018 ^f

注: 相同列中标有不同小写字母数值间的差异显著 ($p < 0.05$, $n = 3$)。

2.4 界面蛋白组成分析

观察图 2-I 可知,大豆 7S 球蛋白有三个特征亚基,对应分子量分别为 80 ku (α 亚基)、75 ku (α' 亚基)和 50 ku (β 亚基),11S 球蛋白则分为酸性多肽 A (约 35 ku)和碱性多肽 B (约 20 ku),大豆蛋白所有亚基均参与乳化过程中,油滴上蛋白和下清层中蛋白组成无明显差异。由 0%和 100%处条带可知两蛋白样品在提取过程中存在少许交叉污染现象。在经离心后的下清液中(图 2-II),随着总蛋白中 11S 比例增加,7S 三个主要亚基条带逐渐变暗,即含量降低,与之相对应的是 11S 球蛋白含量逐步增加,由之前界面蛋白比例数据(见表 2)可知,下清液中蛋白含量明显高于界面蛋白,故其不同比例混合乳液间条带难以看出显著变化。又由图 2-I,随着 7S 比例的降低与 11S 含量增加,整体上油水界面层蛋白各自电泳条带相应亚基也大致呈现此消彼长规律。Keerati-u-rai 等^[18]于 75 °C 和 95 °C 在乳化前后分别对两类蛋白进行热处理进而改变界面亚基组成,所有乳液样品均形成 30~40 nm 厚界面膜。本实验样品并未经过高温等强理化操作处理,因而主要从蛋白组成的含量变化角度进行比较。

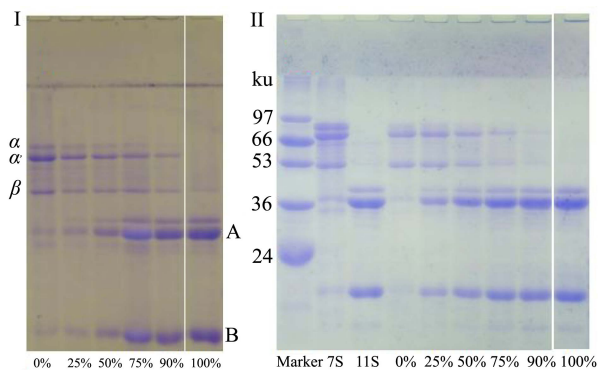


图 2 乳液油水界面层 (I) 与下清层 (II) 中大豆蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.2 SDS-PAGE images of soy globulins present (I) at the oil/water interface and (II) in the subnatant layer of emulsions

2.5 乳液微结构

图 3 为放置 24 h 后,不同比例混合乳液微结构的 CLSM 观察。对于 11S 含量为 0%、25%及 50%乳液,可明显看出三者油滴分布较为均匀、轮廓清晰且粒径较小,同时絮凝等不稳定现象不明显,而增大至 75%时,有絮凝现象出现且油滴轮廓已较难辨识出,大于 90%时,可清楚看到有较大范围的凝结乳滴存在,同时絮凝程度进一步加深,这些观察结果与表 2 中测得乳化性能数据有较好一致性。

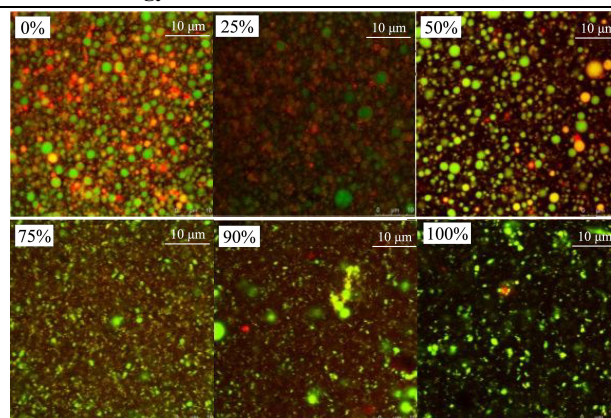


图 3 不同 11S 含量大豆蛋白乳液微结构的 CLSM 观察图

Fig.3 Typical CLSM micrographs of emulsion microstructure at various 11S contents

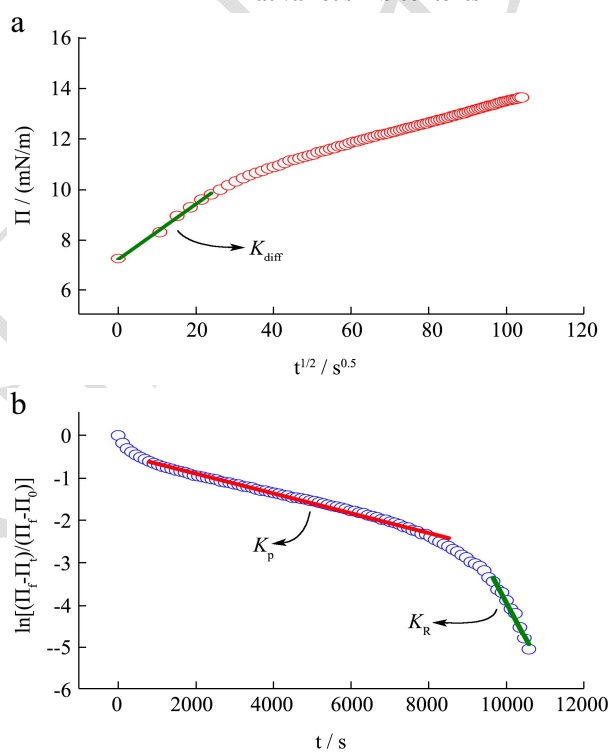


图 4 a: 大豆蛋白在 O/W 界面上扩散动力学特征曲线图; b: 大豆蛋白在 O/W 界面上的展开和重排动力学特征曲线图。

Fig.4 a: Characteristic curve of kinetics for soy globulins diffusion at oil-water interface; b: A typical profile of molecular penetration and configurational rearrangement step at the interface for soy globulins

注: K_{diff} 、 K_p 和 K_R 分别代表蛋白扩散、展开和重排速率常数。

2.6 界面吸附动力学特性

大豆蛋白吸附过程中特定时间界面压力用 Ward 和 Todai 方程 (7) 进行计算,稍作调整^[13,19]。 $\pi=2C_0KT(Dt/3.14)^{1/2}$ (7), 其中 C_0 为总蛋白浓度, D 是扩散系数, T 是绝对温度, t 为时间, K 为波尔兹曼常数。当

扩散过程控制吸附动力学时, 方程曲线呈线性, 线性部分斜率即为扩散率 K_{diff} (图 4a)。为进一步检测界面蛋白在油水界面展开和重排过程, 应用第一速率方程来计算吸附过程中的展开和重排速率:

$$\ln[(\pi_{11800}-\pi_t)/(\pi_{11800}-\pi_0)] = -k_1 t \quad (8)$$

式中 π_{11800} 、 π_0 和 π_t 分别为蛋白吸附最后、起始及任一时间 t 时界面压力, k_1 为第一速率常数^[11]。

运用该方程所获得曲线可显示出两线性区域 (图 4b), 两线性区域斜率先后分别代表大豆蛋白在油水界面展开速率 K_p 和重排速率 K_R 。

表 3 不同 11S 含量大豆蛋白在油水界面扩散 (K_{diff})、展开 (K_p) 和重排速率 (K_R) 参数

Table 3 K_{diff} , K_p , and K_R of soy globulins with varying content of 11S globulins (0~100%) at the oil-water interface

11S 含量/%	$K_{diff} \times 10^{-2} / [mN/(m \cdot s^{1/2})]$ (LR)*	$K_p \times 10^2 / s^{-1}$ (LR)*	$K_R \times 10^5 / s^{-1}$ (LR)*
0	8.21(0.9934)	215.26(0.9986)	3.23(0.9658)
25	9.47(0.9804)	211.57(0.9939)	1.71(0.9892)
50	11.67(0.9916)	699.72(0.9953)	3.64(0.9787)
75	9.92(0.9901)	228.19(0.9828)	3.82(0.9880)
90	8.24(0.9746)	237.61(0.9989)	1.33(0.9875)
100	10.11(0.9952)	389.31(0.9893)	3.67(0.9802)

观察图 4a 可以看到, 在 $t^{1/2}$ 小于 $30 s^{0.5}$ 范围内, π 与 $t^{1/2}$ 的关系图是呈线性增加至 $10 mN/m$ 左右, 表明界面吸附程度的增强, 在此阶段不同组成大豆蛋白均由扩散过程所控制。由与之相对应的扩散速率常数 K_{diff} 大小 (表 3) 可以看出, 只有 11S 时 K_{diff} 要高于 7S, 可能是由于本实验提取 11S 蛋白样品相对较高的表面疏水性, 致使其扩散至油水界面速率大于 7S。与 K_{diff} 规律大体相一致地是展开速率 K_p 和重排速率 K_R , 其中, 在 50% 处 K_p 和 K_R 要明显高于其它比例, 可能是由于两蛋白在乳滴界面存在竞争性吸附行为, 在两蛋白含量相同时, 界面集聚至一定浓度后竞争性吸附效应也达到最大, 致使蛋白整体展开和重排速率的提升。综合比较 K_p 和 K_R 大小可以看到, 在同一蛋白组成下, 重排速率常数 K_R 要明显高于展开速率常数 K_p , 说明在大豆蛋白扩散至油水界面后, 界面蛋白重排过程对界面吸附行为的作用效果比展开过程更为显著, Liang^[11]等在测定不同浓度尿素对芸豆 vicilin 蛋白的乳液油水界面吸附特性影响时也发现同样现象。

另一方面, 由于蛋白吸附至界面形成一类似于凝胶的具有粘弹性紧密界面膜^[20], 因而在乳滴界面压缩或膨胀时也会表现出扩张流变特性。Wang 等^[21]测定了热处理大豆蛋白界面扩张流变特性, 得出大豆蛋白在油水界面的粘弹膜以弹性为主, 蛋白热致聚集程度的增大降低界面粘弹模量, 并利于形成多层界面结构, 进而增强乳液脂肪上浮稳定性和酸盐耐受性。Bos 等^[22]指出油水蛋白界面膜流变特性主要源于疏水作用力和一些二硫键的形成, 界面吸附动力学参数与界面流变特性参数均伴随蛋白分子在界面上吸附、扩散及重排过程而呈现相似演变规律。

3 结论

3.1 在油相 ϕ 为 0.2 (V/V), 蛋白总浓度为 0.5% (m/V) 制备条件下, 7S 球蛋白比 11S 具有更优乳化能力, 即对大豆蛋白整体乳化活性贡献更大。

3.2 大豆蛋白乳液粒径随着 11S 比重提升而在大粒径范围分布增加, 乳化活性降低的同时乳液絮凝及聚结行为加剧, 乳化稳定性减弱。

3.3 增加大豆蛋白中 11S 含量致使所制备乳液界面蛋白浓度和比例减少, 界面吸附蛋白各亚基含量变化趋势与大豆蛋白中两组分浓度大小相一致, 乳液微结构由较为清楚球形轮廓转变成不规则絮凝聚集体。

3.4 蛋白界面吸附动力学数据表明, 界面张力随着吸附时间递增而增大且速率趋缓, 整体上本实验提取大豆 11S 球蛋白扩散、展开和重排速率均高于 7S, 任一蛋白组成下吸附蛋白结构重排过程比展开过程影响程度更大, 通过调整大豆蛋白中两类主要组分比例可以调整所稳定乳液的乳化和界面特性。

参考文献

- [1] Iwabuchi S, Watanabe H, Yamauchi F. Thermal denaturation of β -conglycinin. Kinetic resolution of reaction mechanism [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(1): 27-33
- [2] Nielsen N C. The structure and complexity of the 11S polypeptides in soybeans [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1985, 62(12): 1680-1686
- [3] McClements D J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2007, 47(7):

- 611-649
- [4] Nishinari K, Fang Y, Guo S, et al. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 39(2): 301-318
- [5] Miriani M, Keerati-u-rai M, Corredig M, et al. Denaturation of soy proteins in solution and at the oil-water interface: A fluorescence study [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(4): 620-626
- [6] 胡超,黄丽华,李文哲.大豆球蛋白11S/7S比值对大豆蛋白功能性的影响[J].*中国粮油学报*,2004,19(1):40-42
HU Chao, HUANG Li-hua, LI Wen-zhe. Effects of 11S/7S ratios of soybean globulin protein on functionalities of soybean protein [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2004, 19(1): 40-42
- [7] Luo L J, Liu F, Tang C H. The role of glycinin in the formation of gel-like soy protein-stabilized emulsions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 32(1): 97-105
- [8] 罗立君,唐传核.大豆7S和11S凝胶样乳液流变特性及微观结构的研究[J].*现代食品科技*,2013,29(2):242-246
LUO Li-jun, TANG Chuan-he. Rheological properties and microstructure of cold, gel-like emulsions prepared with β -conglycinin and glycinin soy proteins [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(2): 242-246
- [9] 程翠林,石彦国,朱秀清,等.品种差异对大豆蛋白乳化性的影响[J].*粮油食品科技*,2006,14(1):25-27
CHENG Cui-lin, SHI Yan-guo, ZHU Xiu-qing, et al. The effect of soybean variety on emulsifying function of soybean protein [J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2006, 14(1): 25-27
- [10] Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40(6): 941-944
- [11] Liang H N, Tang C H. Emulsifying and interfacial properties of vicilins: Role of conformational flexibility at quaternary and/or tertiary levels [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(46): 11140-11150
- [12] Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1978, 26(3): 716-723
- [13] Tang C H, Shen L. Role of conformational flexibility in the emulsifying properties of bovine serum albumin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(12): 3097-3110
- [14] Lakemond C M, Jongh H, Hessing M, et al. Heat denaturation of soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on molecular structure [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(6): 1991-1995
- [15] Renkema J M, Lakemond C M, Gruppen H, et al. The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins [J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, 79(3): 223-230
- [16] Puppo M C, Beaumont V, Speroni F, et al. β -Conglycinin and glycinin soybean protein emulsions treated by combined temperature-high-pressure treatment [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(3): 389-397
- [17] Chove B E, Grandison A S, Lewis M J. Emulsifying properties of soy protein isolate fractions obtained by isoelectric precipitation [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2001, 81(8): 759-763
- [18] Keerati-u-rai M, Corredig M. Heat-induced changes occurring in oil/water emulsions stabilized by soy glycinin and β -conglycinin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(16): 9171-9180
- [19] Ortiz S E M, Sánchez C C, Ma R R N, et al. Structural characterization and surface activity of spread and adsorbed soy globulin films at equilibrium [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, 32(1): 57-67
- [20] Patino J M R, Ortiz S E M, Sánchez C C, et al. Dynamic properties of soy globulin adsorbed films at the air-water interface [J]. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, 268(1): 50-57
- [21] Wang J M, Xia N, Yang X Q, et al. Adsorption and dilatational rheology of heat-treated soy protein at the oil-water interface: Relationship to structural properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(12): 3302-3310
- [22] Bos M A, Vilet T V. Interfacial rheological properties of adsorbed protein layers and surfactants: a review [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2001, 91(3): 437-471