

用拉曼光谱分析低压均质处理对大豆分离蛋白结构的影响

吕博¹, 李明达¹, 张毅方¹, 牛祥臣², 王中江¹, 江连洲¹, 刘军²

(1. 东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030) (2. 山东禹王生态食业有限公司, 山东禹城 251200)

摘要: 本文测定了不同均质处理条件下大豆分离蛋白溶液的拉曼光谱和圆二色谱, 以此来研究低压均质对大豆分离蛋白结构的影响。研究表明: 均质压力较低(0~8 MPa)时, 大豆分离蛋白的二级结构基本保持不变; 当均质压力为 10~30 MPa 时, α -螺旋和无规则卷曲结构明显增加, β 折叠显著降低, 色氨酸残基和酪氨酸残基由“埋藏态”逐渐转变为“暴露态”, 蛋白质分子表现出解聚的行为; 均质压力继续增大到 40 MPa 过程中, 酪氨酸费米共振线 I_{850}/I_{830} 比值略有下降, 酪氨酸残基由“暴露态”向“埋藏态”转变, 表明产生了蛋白聚集体, 并且低压均质处理未显著改变二硫键的构型。综上所述, 拉曼光谱通过对蛋白分子的二级结构和三级结构进行表征, 揭露了低压均质处理使得大豆分离蛋白表现出先解聚后聚合的性质, 并且圆二色谱的结果验证了上述结论。

关键词: 拉曼光谱; 圆二色谱; 大豆分离蛋白; 低压均质

文章编号: 1673-9078(2018)10-58-63

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.10.009

Raman Spectroscopic Characterization of the Structural Changes in Soybean Protein Isolate Induced by Low Pressure Homogenization

LYU Bo¹, LI Ming-da¹, ZHANG Yi-fang¹, NIU Xiang-chen², WANG Zhong-jiang¹, JIANG Lian-zhou¹, LIU Jun²

(1.College of Food, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

(2.Shandong Yu Wang Ecological Food Co., Ltd., Yucheng 251200, China)

Abstract: In this study, Raman spectroscopy and circular dichroism spectra of soy protein isolate solutions subjected to different homogenization conditions were acquired for investigations on the effects of low pressure homogenization on the structure of soy protein isolate. The results showed that the secondary structure of soybean protein isolate basically remained unchanged when the homogenization pressure was low (0~8 MPa). When the homogeneous pressure was 10~30 MPa, the α -helical and random coil structures increased significantly, β -sheet decreased significantly. Thryptophan and tyrosine residues gradually changed from “buried state” to “exposed state”, and the protein molecule exhibited depolymerization behavior; Over the course of the increase of homogenization pressure to 40 MPa, the ratio of tyrosine - Fermi resonance line I_{850}/I_{830} decreased slightly, and the tyrosine residue changed from “exposed state” to “buried state”, indicating that protein aggregates were produced, and low pressure homogenization did not significantly alter the configuration of disulfide bonds. In summary, the secondary structure and tertiary structure of protein molecules can be characterized by Raman spectroscopy, and obtained results revealed that low-pressure homogenization induced depolymerization and then polymerization of soy protein isolate. These results were confirmed by circular dichroism.

Key words: raman spectroscopy; circular dichroism; soybean protein isolate; low pressure homogenization

拉曼光谱技术是一门基于拉曼散射效应而发展起来的光谱分析技术, 体现的是分子的振动或转动信息。拉曼光谱技术与常规化学分析技术相比, 具有无损、快速、环保、无需制备试样、无需消耗化学试剂和所需样品量少等特点, 并且激光光源的出现使得拉

收稿日期: 2018-05-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31671807)

作者简介: 吕博(1994-), 硕士, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白工程

通讯作者: 刘军(1982-), 男, 工程师, 研究方向: 食品科学与工程

曼光谱已广泛应用于石油化工、生物医学、地质考古、刑事司法和宝石鉴定等领域。目前研究蛋白构象的方法较多, 但是红外光谱和拉曼光谱可以说是最常用的方法。众所周知红外光谱由于简单实用, 是最早也是应用最普遍的研究蛋白构象的方法; 而拉曼光谱作为对红外光谱的一个补充, 由于其在样品量稀少(如单丝)和有水干扰(如溶液或溶胶状态)等情况下具有红外光谱无法比拟的优势, 因此它也是一个非常有用的研究蛋白构象的方法。与其他光谱仪器技术相比,

拉曼光谱是一种既能提供蛋白质二级和三级结构信息^[1-3]又具有非破坏性的直接分析技术^[4]。从蛋白质的拉曼光谱可以得到有关它的芳香族组成氨基酸的信息,还能进一步得到二级结构的信息。有关利用拉曼光谱分析多肽及蛋白质构型的研究国内外均有报道^[5-7]。大豆分离蛋白由于其丰富的营养价值,在食品加工中应用广泛。目前对蛋白质改性的方法主要有物理改性、化学改性和酶法改性。高压均质是最常用、也是最被广为接受的改性手段。原理是通过利用高压均质产生的强大剪切力、冲击力、撞击力,改变蛋白质固有的结构,改变其功能特性,以提高蛋白质的应用价值^[8]。但是大部分学者研究的压力范围都是在40 MPa以上。Puppo等^[9]研究了超过100 MPa高压均质对大豆蛋白质的影响,已经证明高压均质对大多数球蛋白的三级和四级结构有破坏性影响,而对二级结构几乎没有影响。沈兰^[10]等研究发现0~160 MPa高压微射流处理可以使蛋白分子展开,使蛋白发生部分变性,但是对于蛋白二级、三级结构没有明显影响。张媛^[11]研究发现60~120 MPa的高压均质对大豆蛋白的二级结构产生了显著影响, α -螺旋、 β -转角含量增多, β -折叠含量减少,无规则卷曲含量亦发生变化。

在实际生产中,由于设备的限制,高压均质的压力一般不超过40 MPa,本文对经40 MPa以下均质压力处理后的大豆分离蛋白进行了拉曼光谱分析,并对其主要的碳链与侧链构象进行研究,从蛋白质的结构特征的变化探讨其机理,希望能够为大豆分离蛋白的实际生产提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 原料

低温豆粕,山东禹王生态食业有限公司;氢氧化钠、盐酸等为国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器设备

FD-1C 冷冻干燥机,北京德天佑科技发展有限公司;高速分散均质机(FJ-200),上海标本模型厂;低速自动平衡离心机DT5-2,北京时代北利离心机公司;DFS-Dairy-001均质机,帝斯曼公司;LGR20-W台式高速冷冻离心机,北京京立离心机公司;PE Raman Station 400 激光显微拉曼光谱仪,美国PE公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆分离蛋白的制备

称取1600 g低温脱脂豆粕,分散在12 L去离子

水中,用2 mol/L的NaOH调pH值至7.5,在55℃下搅拌1 h,离心(4500 r/min, 20 min)取上清液;在沉淀中加入9.6 L去离子水搅拌并重复上述离心操作,取上清液^[12]。将两次上清液合并,在水浴50℃下,调pH值至4.5,离心(3000 r/min, 10 min)取沉淀,即为蛋白凝乳,加少量水洗涤3次后调pH值至7.0,配成11%的大豆分离蛋白溶液,分为9份,分别在压力1、2、5、8、10、15、20、30、40 MPa下均质改性,与对照样品一起冷冻干燥,贮存。

1.3.2 拉曼光谱的测定及分析

拉曼光谱测定参照江连洲等^[13]的方法,进行一定的修改,相关参数设定:发射功率80 mW,测量拉曼谱范围为400~1800 cm^{-1} ,激发光波长785 nm,曝光时间60 s,每个样品都重复扫描3次以上,由计算机做信号累加平均并绘图输出,峰位误差控制在3 cm^{-1} 内。扫描后各样品的拉曼数据利用Origin 8.5软件进行平滑处理,先进行基线校正,然后以苯丙氨酸(1003 \pm 1) cm^{-1} 作为归一化因子^[14]。采用Peakfit Version 软件进行拟合分析各蛋白样品二级结构组分含量。图表制作采用Origin 8.5软件,归一化处理苯丙氨酸1004 cm^{-1} 为内标,使用SPSS 19.0进行ANOVA差异显著性和方差分析($p < 0.05$ 为显著性差异)。

1.3.3 圆二色谱分析

圆二色谱的测定参照毕爽等^[15]的方法,取样品在20℃条件下10000 r/min离心后稀释至蛋白质质量浓度为0.1 mg/mL。测定条件:扫描速率为100 nm/min,扫描波长范围为250~200 nm,样品池光程为0.1 nm,灵敏度为100 mdeg/cm,每个样品重复3次测定。数据通过CDPro软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 拉曼光谱分析

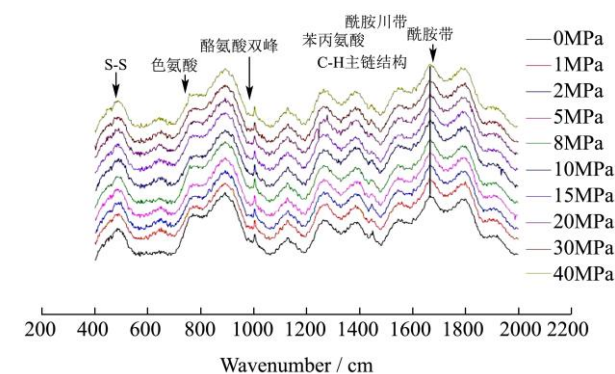


图1 不同均质条件下大豆分离蛋白拉曼光谱图

Fig.1 Raman spectra of soy protein isolate under different homogenization conditions

低压均质处理对大豆蛋白在波长为 400~1800 cm^{-1} 的拉曼光谱如图 1 所示, 相关特征峰根据已有研究^[16], 指认如表 1 所示。根据表中振动来源与波数的对应关系可在图 1 中标注出不同低压均质处理条件下大豆分离蛋白的拉曼谱带。

表 1 不同均质条件下大豆分离蛋白的拉曼特征峰位及峰位归属

Table 1 Characteristic Raman frequencies and tentative assignments of structures in SPI at different treatment

波数/ cm^{-1}	峰位指认
508	二硫键振动 ggg 振动模式
520	二硫键振动 ggt 振动模式
544	二硫键振动 tgt 振动模式
760	色氨酸
850/830	酪氨酸残基
1003	苯丙氨酸残基
1450~1465	微环境极性
1230~1248	酰胺III带反平行折叠
1242~1250	酰胺III带无规则结构
1264~1310	酰胺III带螺旋 α -螺旋
1630~1700	酰胺 I 带

2.1.1 不同压力对主链结构的影响

大豆分离蛋白的构象主要由酰胺 I 带和酰胺III带的拉曼特征峰确定, 酰胺 I 带是 C=O 与 C-N 键的伸张, 而酰胺III带是 C-N 键的伸张和 N-H 在平面上的转折。大豆分离蛋白酰胺 I 带和酰胺III带的二级结构拉曼光谱频率及归属如表 2 所示。

蛋白质的酰胺 I 带及酰胺III带常用于表征蛋白质的主链结构。拉曼谱图中 1665~1675 cm^{-1} 处谱带强度大, 表明大豆分离蛋白酰胺 I 带中主要存在 β -折叠结

构及无规卷曲结构。蛋白质的酰胺 I 带用于研究蛋白质二级结构相对含量的定量分析^[17], 结果如表 3 所示。本实验中大豆分离蛋白的拉曼图谱二级结构的定量计算使用 Peakfit 4.12 软件完成。由于大豆分离蛋白酰胺 III 带的振动光谱产生频带在其范围内 (位于 1230~1310 cm^{-1}) 的图形较复杂, 故未进行定量分析。

表 2 大豆分离蛋白的二级结构拉曼光谱频率及归属

Table 2 Raman Spectra Frequency and ownership of Secondary structure of Soybean protein isolate

二级结构	酰胺 I 带 (1630~1700 cm^{-1})	酰胺III带 (1230~1310 cm^{-1})
α -螺旋	1645~1660	1265~1300
β -折叠	1665~1680	1230~1240
β -转角	1680~1690	1305
无规则卷曲	1660~1670	1240~1260

将大豆分离蛋白的酰胺 I 带用于研究低压均质后蛋白二级结构变化情况的分析, 实验结果如表 3 所示。对比不同压力下与未处理大豆分离蛋白的二级结构组成可知, 未处理的大豆分离蛋白二级结构组成为: 24.46% α -螺旋、31.31% β -折叠、20.13% β -转角及 24.10% 无规卷曲。与未处理条件相比, 经低压均质处理后大豆分离蛋白中各结构组分含量呈现规律性变化趋势。当均质压力较低 (1~8 MPa) 时, 各结构组分的含量变化不明显, 说明较低压力下, 蛋白结构并未发生明显变化; 随着均质处理程度的增强, 大豆分离蛋白中 β 折叠结构的含量显著降低, α 螺旋和无规则卷曲结构明显增多, 可能是由于均质处理下蛋白分子刚性结构减弱, 柔性结构增加, 分子由有序变得无序, 这与郭丽等^[18]人在 20 MPa 和 30 MPa 下观察到蛋白的二级结构发生变化的结果相似。

表 3 拉曼光谱测定不同均质处理大豆蛋白二级结构的含量

Table 3 Determination of Secondary structure of Soybean protein with different homogenization by Raman Spectroscopy

样品名	二级结构组成			
	α 螺旋	β 折叠	β 转角	无规卷曲
0 MPa	24.46±0.30 ^d	31.31±0.10 ^a	20.13±0.07 ^e	24.10±0.12 ^e
1 MPa	24.40±0.20 ^e	31.03±0.30 ^d	20.23±0.15 ^e	24.33±0.14 ^a
2 MPa	24.50±0.00 ^e	31.30±0.14 ^c	20.00±0.18 ^g	24.30±0.16 ^a
5 MPa	24.49±0.01 ^c	30.74±0.13 ^b	20.74±0.04 ^g	24.77±0.23 ^b
8 MPa	24.55±0.01 ^c	30.33±0.02 ^{cd}	20.41±0.11 ^g	24.70±0.30 ^{bc}
10 MPa	25.05±0.08 ^c	28.03±0.13 ^e	20.73±0.00 ^d	26.19±0.22 ^{cd}
15 MPa	25.30±0.12 ^c	26.90±0.08 ^f	21.01±0.30 ^c	26.69±0.19 ^{cd}
20 MPa	26.75±0.09 ^b	25.40±0.16 ^g	21.10±0.20 ^a	26.72±0.13 ^d
30 MPa	27.06±0.04 ^a	25.13±0.11 ^g	21.09±0.11 ^b	26.72±0.08 ^d
40 MPa	27.10±0.04 ^c	26.06±0.07 ^e	20.82±0.12 ^f	26.02±0.19 ^a

注: 同一列数据后不同字母代表差异显著 ($p < 0.05$), 下同。

蛋白质二级结构随蛋白质聚合程度而变化, 较高程度的蛋白质聚合与稳定的二级结构的积聚高度相关, α -螺旋和 β -折叠构象比例越高, 表明低压均质处理大豆分离蛋白的有序结构越多, 蛋白质聚合越强, 而低压均质作用过程中蛋白粒径减小, 比表面积大幅增加, 蛋白聚合程度增强, 从而导致蛋白这种结构单元变化的发生, 与 Xiong^[19]、和 Hou^[20]的研究结果一致。同时, Lee 等^[21]人研究表明, 蛋白质二级结构中 β -折叠构象的增加和 β -转角结构的减少, 表明形成了更多的聚合和稳定的蛋白网络, 证明低压均质能够使大豆分离蛋白趋向于有序的二级结构, 验证了本研究中 α -螺旋结构含量的增加, β -转角及无规卷曲结构下降的趋势。

2.1.2 不同压力对侧链结构的影响

2.1.2.1 色氨酸残基的变化

760 cm^{-1} 附近的拉曼谱带归属为色氨酸侧链, 对于观察蛋白质微环境的极性及氢键变化规律有着重要作用。Ferrer 等人^[22]研究表明热变性破坏了蛋白质的结构, 进而引起色氨酸残基的暴露, 在拉曼谱图中表

现为谱带强度的降低。在本研究中, 经过 10~30 MPa 均质处理的大豆分离蛋白拉曼光谱峰强度在 760 cm^{-1} 附近区域显著降低 ($p < 0.05$), 表明色氨酸残基由“埋藏态”转为“暴露态”, 而均质压力为 40 MPa 时, 色氨酸残基则趋向“埋藏态”。

2.1.2.2 酪氨酸残基的变化

酪氨酸的环吸收振动和面弯曲振动产生的特征振动频率在 830 cm^{-1} 、850 cm^{-1} 附近^[23]。二者的相对强度 (I_{850}/I_{830}) 常用来鉴定酪氨酸组分埋藏和暴露的程度^[24]。当 I_{850}/I_{830} 比值为 1.25~1.40 时, 酪氨酸残基趋向于“暴露”态; 当 I_{850}/I_{830} 比值为 0.3~0.5 时, 酪氨酸残基趋向于“包埋”态; 当 I_{850}/I_{830} 比值为 0.7 时, 酪氨酸残基呈电离态。通过研究这两条谱线的强度比, 还可知酪氨酸是作为氢键的供体还是受体^[25]。当 I_{850}/I_{830} 为 0.3 时, 表明酪氨酸的苯环上的羟基氧原子是强氢键的供体。当 I_{850}/I_{830} 为 1.25, 环上羟基氧原子同时作为中等强度氢键供体和受体。当 I_{850}/I_{830} 为 2.5 时, 酪氨酸的苯环上羟基氧原子就成为一个强氢键受体^[26]。

表 4 不同处理条件下大豆分离蛋白侧链基团谱带强度

Table 4 Band strength of side chain groups of soybean protein isolate under different treatment conditions

样品名	色氨酸谱带强度	酪氨酸费米共振线 I_{850}/I_{830}	C-H 谱带强度
0 MPa	0.924 \pm 0.01 ^g	0.962 \pm 0.01 ^g	0.992 \pm 0.01 ^e
1 MPa	0.922 \pm 0.00 ^{fg}	0.968 \pm 0.03 ^f	0.990 \pm 0.00 ^e
2 MPa	0.923 \pm 0.00 ^{ef}	0.969 \pm 0.01 ^{ef}	0.993 \pm 0.01 ^e
5 MPa	0.922 \pm 0.03 ^{fg}	0.971 \pm 0.03 ^{ef}	0.994 \pm 0.01 ^e
8 MPa	0.920 \pm 0.01 ^e	0.972 \pm 0.01 ^e	0.996 \pm 0.01 ^e
10 MPa	0.915 \pm 0.02 ^d	0.978 \pm 0.01 ^d	0.998 \pm 0.01 ^e
15 MPa	0.909 \pm 0.01 ^c	0.984 \pm 0.02 ^c	1.040 \pm 0.00 ^d
20 MPa	0.904 \pm 0.02 ^b	0.992 \pm 0.00 ^b	1.090 \pm 0.01 ^b
30 MPa	0.900 \pm 0.01 ^a	1.014 \pm 0.01 ^a	1.130 \pm 0.01 ^a
40 MPa	0.903 \pm 0.01 ^d	0.982 \pm 0.02 ^c	1.07 \pm 0.02 ^c

注: 同一列数据后不同字母代表差异显著 ($p < 0.05$), 下同。

由表 4 可知, 本研究中 I_{850}/I_{830} 比值均在 0.902~1.130 范围内, 当均质压力超过 10 MPa 时, 色谱峰强度明显升高, 大豆分离蛋白的酪氨酸残基趋向于“暴露态”, 说明经过均质处理后, 大豆分离蛋白分子中的酪氨酸部分暴露在极性微环境中, 并且作为中等强度氢键供体和受体; 当均质压力增大到 40 MPa 时, 酪氨酸费米共振线 I_{850}/I_{830} 的比值显著降低, 即酪氨酸由原本的“暴露态”向“包埋态”转变。综合分析, 经过低压均质处理后, 酪氨酸的苯环上的羟基氧原子由强氢键的供体向受体转变。

2.1.2.3 脂肪族 C-H 键弯曲振动模式变化

由表 4 可知, CH_2 和 CH_3 的弯曲振动在 1450 cm^{-1}

波数附近可以观察到, 均质压力在 0~40 MPa 范围内, 拉曼光谱中 1450 cm^{-1} 的谱带强度随着均质压力的增大呈先增加后下降的趋势; 均质压力为 30 MPa 时, 样品的谱带强度达到最大值, 但随着均质压力的进一步增大, 谱带强度反而下降。在 1450 cm^{-1} 处 C-H 键强度的增加说明蛋白质分子展开, 样品中的疏水基团暴露到极性环境中^[27]。

当均质压力进一步增加时, 蛋白分子间由于相互作用形成聚集导致疏水基团包埋并向微极性环境转变, 谱带强度降低。

2.1.2.4 二硫键构型分析

二硫键是蛋白质三级结构的重要维持力, 在不同

振动模式下所反应出来的拉曼位移有所不同, 500~510 cm^{-1} 处 gauche-gauche-gauche (g-g-g) 模式, 515~525 cm^{-1} 为 gauche-gauche-trans (g-g-t) 模式, 535~545 cm^{-1} 为 trans-gauche-trans (t-g-t) 模式^[28]。

由图 1 可知, 当均质压力较低 (0~40 MPa) 时, 大豆蛋白二硫键拉曼归属峰位于 508 cm^{-1} 处, 表明大

豆分离蛋白中二硫键应归属于 g-g-g 振动模式, 可以判断, 均质处理并未显著改变蛋白质的二硫键构型, 大豆蛋白二硫键保持了分子内构型特征, 这与江连洲^[13]的研究结果一致。

2.2 圆二色谱分析

表 5 低压均质处理对蛋白质二级结构的影响

Table 5 Low pressure homogenization treatment of protein secondary structure

样品	α -螺旋/%	β -折叠/%	β -转角/%	无规则卷曲/%
0 MPa	13.60±0.02 ^f	42.50±0.07 ^a	19.53±0.09 ^{ef}	24.37±0.03 ^h
1 MPa	14.34±0.07 ^e	41.40±0.08 ^b	19.46±0.07 ^{ef}	24.80±0.03 ^g
2 MPa	14.62±0.11 ^d	41.23±0.17 ^b	19.58±0.07 ^d	24.47±0.04 ^h
5 MPa	15.11±0.07 ^c	40.47±0.09 ^c	19.43±0.03 ^{ef}	24.99±0.15 ^f
8 MPa	15.90±0.03 ^a	40.26±0.11 ^c	19.10±0.09 ^g	24.74±0.09 ^g
10 MPa	15.21±0.03 ^{bc}	37.52±0.16 ^d	19.59±0.11 ^d	27.68±0.0 ^e
15 MPa	15.81±0.09 ^a	35.30±0.12 ^e	20.00±0.08 ^e	28.89±0.02 ^d
20 MPa	15.80±0.11 ^a	33.23±0.12 ^f	20.90±0.08 ^b	30.07±0.02 ^b
30 MPa	16.25±0.08 ^b	31.91±0.04 ^g	21.45±0.06 ^a	30.49±0.05 ^a
40 MPa	15.81±0.02 ^{bc}	33.22±0.03 ^f	21.29±0.12 ^a	29.78±0.05 ^c

注: 同一列中右上角标相同者无显著性差异, 不同者有显著性差异 ($p < 0.05$)。

由表 5 可知, 低压均质处理对大豆分离蛋白的结构变化显著 ($p < 0.05$), 大豆分离蛋白的二级结构组成中以 β -折叠构象为主。当均质压力在 1~8 MPa 时, 大豆分离蛋白基本保持原有二级结构特征, 仅 β -折叠构象含量发生了部分降低及无规则卷曲结构含量的增加, 由此可以证明大豆分离蛋白在低压均质作用下保持了原有分子结构, 无规则卷曲结构含量的增加可能与蛋白质分子结构的局部解折叠有关, β -折叠构象含量的降低与蛋白聚集体解聚行为有关^[29]。

当均质压力在 10~30 MPa 时, β -折叠和无规则卷曲结构变化显著, β -折叠构象含量迅速降低, 而无规则卷曲结构含量明显增加, 同时伴随着 α -螺旋, β -转角的含量有所上升。Stathopoulos 等^[30]研究表明, β -折叠结构含量的降低与疏水基团暴露有关, β -折叠结构含量降低常伴随着蛋白表面疏水性的增加。可推测: 当均质压力在 10~30 MPa 时, 大豆分离蛋白分子结构展开程度增大, 疏水基团发生更大的暴露。当均质压力在 30~40 MPa 时, 大豆分离蛋白结构中 β -折叠构象含量显著增大, 并伴随着其他三种构象含量的减少, 由此表明在此压力范围内, α -螺旋、 β -转角、无规则卷曲构象转化为 β -折叠构象, 说明这可能与此状态下大豆蛋白亚基聚集行为有关, 进一步表明大豆分离蛋白形成了可溶性聚集。综合拉曼分析结果可知, 大豆分离蛋白在低压均质作用下既发生蛋白结构的解折叠又伴随着聚集体的生成。

3 结论

依据酰胺 I 带对大豆分离蛋白二级结构进行定量, 可以发现 10~30 MPa 低压均质处理对二级结构的影响显著, 即随着均质压力的增大, α -螺旋结构含量增加, β -折叠结构含量降低, 大豆分离蛋白的色氨酸残基和酪氨酸残基趋向于“暴露态”, 蛋白分子表现出一种解聚的行为; 而均质压力继续增大到 40 MPa 过程中, 酪氨酸费米共振线 I_{850}/I_{830} 比值略有下降, 酪氨酸残基由“暴露态”向“埋藏态”转变, 表明有聚集体的产生, 并且圆二色谱的分析验证了拉曼分析的结果, 但低压均质处理并未显著改变蛋白质的二硫键构型, 上述结论为低压均质处理在食品加工过程中的应用提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Jin J, Ma H, Wang K, et al. Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis and structural characteristics of corn gluten meal [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 24: 55-64
- [2] Yanjun S, Jianhang C, Shuwen Z, et al. Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate [J]. Journal of Food Engineering, 2014, 124(4): 11-18
- [3] Molina E, Ledward D A. Effects of combined high-pressure

- and heat treatment on the textural properties of soya gels [J]. Food Chemistry, 2003, 80(3): 367-370
- [4] Guo S, Bocklitz T, Popp J. Optimization of Raman-spectrum baseline correction in biological application [J]. Analyst, 2016, 141(8): 2396
- [5] Miersch J, Tschimedbalshir M, Bärlocher F, et al. Heavy metals and thiol compounds in *Mucor racemosus* and *Articulospora tetracladia* [J]. Mycological Research, 2001, 105(7): 883-889
- [6] Staaf M, Yang Zhennai, Huttunen E, et al. Structural elucidation of the viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* Lb161 [J]. Carbohydrate Research, 2000, 326: 113-191
- [7] Zhang M, Cai H, Science S O. Raman spectrum analysis of oseltamivir phosphate [J]. Journal of Changchun University of Science & Technology, 2016
- [8] 江连洲.食用蛋白质柔性化加工技术概述[J].中国食品学报,2015,15(8):1-9
JIANG Lian-zhou. An introduction of the flexible processing technology of edible protein [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2015, 15(8): 1-9
- [9] Puppo M C, Speroni F, Chapeau N, et al. Effect of high-pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins [J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(2): 289-296
- [10] 沈兰,王昌盛,唐传核.高压微射流处理对大豆分离蛋白构象及功能特性的影响[J].食品科学,2012,33(3):72-76
SHEN Lan, WANG Chang-sheng, TANG Chuan-he. Effect of high pressure microfluidization on functional and conformational properties of SPI [J]. Food Science, 2012, 33(3): 72-76
- [11] 张媛.超高压均质对大豆分离蛋白影响及制备复合蛋白膜研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2016
ZHANG Yuan. Effect of ultra-high pressure homogenization on soybean protein isolate and study on preparation of composite protein films [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2016
- [12] 唐晓婷,孔保华,刘寿,等.高压均质处理淀粉及大豆分离蛋白凝胶性质研究[J].中国食品学报,2016,16(9):68-76
TANG Xiao-ting, KONG Bao-hua, LIU Qian, et al. Studies on properties of soybean protein isolate mixed gelation with starches by high-pressure homogenization [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(9): 68-76
- [13] 江连洲,张潇元,朱一方,等.物理处理对大豆蛋白-磷脂酰胆碱结构影响的拉曼分析[J].农业机械学报,2018,49(2): 345-350
JIANG Lian-zhou, ZHANG Xiao-yuan, ZHU Yi-fang, et al. Raman analysis of influence of physical treatment on structure and interaction of soybean protein-phosphatidylcholine [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2018, 49(2): 345-350
- [14] Herrero A M, Jiménezcolmenero F, Carmona P. Elucidation of structural changes in soy protein isolate upon heating by Raman spectroscopy [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 44(4): 711-717
- [15] 毕爽,李杨,隋晓楠,等.高压均质对大豆蛋白-磷脂复合体系结构及理化/功能性质的影响[J].食品科学,2017,38(5): 148-153
BI Shuang, LI Yang, SUI Xiao-nan, et al. Effect of High Pressure Homogenization on Structural, Physicochemical and Functional Properties of Soybean Protein-Lecithin Composite System [J]. Food Science, 2017, 38(5): 148-153
- [16] Bryant R N, Pasteris J D, Fike D A. EXPRESS: Variability in the Raman spectrum of unpolished growth and fracture surfaces of pyrite due to laser heating and crystal orientation [J]. Applied Spectroscopy, 2018, 72(1): 37
- [17] Reppert M, Tokmakoff A. Computational amide I 2D IR spectroscopy as a probe of protein structure and dynamics [J]. Annual Review of Physical Chemistry, 2016, 67(1)
- [18] 郭丽,王鹏,赵东江,等.高压均质对大豆 β -伴球蛋白结构及功能特性的影响[J].食品科学,2011,32(19):83-87
GUO Li, WANG Peng, ZHAO Dong-jiang, et al. Effect of high-pressure homogenization on structure and functional properties of soybean β -conglycinin [J]. Food Science, 2011, 32(19): 83-87
- [19] Xiong L, Zhang B, Niu M, et al. Protein polymerization and water mobility in whole-wheat dough influenced by bran particle size distribution [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 82
- [20] Hou D H, Chang S K. Structural characteristics of purified glycinin from soybeans stored under various conditions [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2004, 52(12): 3792
- [21] Mauerer A, Lee G. Changes in the amide I FT-IR bands of poly-L-lysine on spray-drying from α -helix, β -sheet or random coil conformations [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2006, 62(2): 131-142
- [22] Ferrer E G, Gómez A V, Añón M C, et al. Structural changes in gluten protein structure after addition of emulsifier. A Raman spectroscopy study [J]. Spectrochimica Acta Part A

- Molecular & Biomolecular Spectroscopy, 2011, 79(1): 278-281
- [23] Hernández B, Coñ Y, Pflüger F, et al. All characteristic Raman markers of tyrosine and tyrosinate originate from phenol ring fundamental vibrations [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2016, 47(2): 210-220
- [24] 李丹,魏冬旭,贾焯,等.大豆 7S 球蛋白结构特性与表面疏水性相关性研究[J].中国油脂,2017,42(4):93-98
LI Dan, WEI Dong-xu, JIA Ye, et al. Correlation between structure characteristics and surface hydrophobicity of β -conglycinin (7S) [J]. Chinese Oil, 2017, 42(4): 93-98
- [25] Van d V E, Mensch C, Johannessen C. Direct measurements of the crowding effect in proteins by means of raman optical activity [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2016, 120(5): 886
- [26] Lykina A A, Artemyev D N, Bratchenko I A, et al. Raman spectra analysis of human blood protein fractions using the projection on latent structures method [C] // Information Technology and Nanotechnology. 2017:64-68
- [27] 王中江,张潇元,隋晓楠,等.热处理大豆蛋白体外消化产物结构特征分析[J].食品科学,2017,38(1):20-26
WANG Zhong-jiang, ZHANG Xiao-yuan, SUI Xiao-nan, et al. Structural characteristics of *in vitro* digestion products of heat-treated soybean protein [J]. Food Science, 2017, 38(1): 20-26
- [28] 毕爽,隋晓楠,韩天翔,等.超声波作用于大豆分离蛋白-磷脂复合体系的流变性和拉曼光谱变化[J].食品科学,2016,37(21):61-66
BI Shuang, SUI Xiao-nan, HAN Tian-xiang, et al. Effect of ultrasound on rheological and raman spectroscopy properties of soybean protein isolate-phospholipid composite system [J]. Food Science, 2016, 37(21): 61-66
- [29] Cando D, Herranz B, Borderías A J, et al. Effect of high pressure on reduced sodium chloride surimi gels [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 51: 176-187
- [30] Stathopoulos P B, Scholz G A, Hwang Y M, et al. Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid [J]. Protein Science, 2004, 13(11): 3017-3027