

热处理温度和离子强度对汉麻蛋白热聚集行为的影响

王 冰, 杨 杨, 范洪臣, 李婷婷, 张 娜, 石彦国*, 朱秀清*

(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江省普通高等学校食品科学与工程重点实验室, 黑龙江省谷物食品与资源综合加工重点实验室, 哈尔滨 150028)

摘 要: **目的** 研究热处理和不同离子强度条件下汉麻蛋白的热聚集行为。**方法** 以汉麻籽为原料, 考察在 80、90、100°C 热处理下, 以及不同离子强度(0、0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L NaCl 溶液)下汉麻蛋白的 ζ -电位、粒径、浊度、二级结构、凝胶电泳、巯基及二硫键等指标。**结果** 汉麻蛋白随着热处理温度的升高和离子强度的增大, ζ -电位绝对值降低、粒径增大、浊度增加; 电泳图中在 70 kDa 处有聚集条带显示; 傅里叶变换红外光谱显示随着热处理温度升高, α -螺旋结构显著降低, β -折叠和无规则卷曲结构显著增大; 随着离子强度增大, α -螺旋和 β -转角结构显著降低, β -折叠结构增加, 无规则卷曲结构先增大后减小; 90°C 热处理时游离巯基含量低于 80°C 和 100°C, 二硫键含量在 80°C 处理下最少; 离子强度对汉麻蛋白总巯基影响不显著。**结论** 热处理温度的升高及离子强度增大对汉麻蛋白聚集行为具有促进作用, 为汉麻蛋白热加工工艺优化和品质调控提供了理论基础。

关键词: 汉麻蛋白; 聚集体; 离子强度; 热处理

Effects of heat treatment temperature and ionic strength on thermal aggregation behavior of hemp protein

WANG Bing, YANG Yang, FAN Hong-Chen, LI Ting-Ting, ZHANG Na,
SHI Yan-Guo*, ZHU Xiu-Qing*

(College of Food Engineering, Key Laboratory of Food Science and Engineering of Heilongjiang Ordinary Higher Colleges, Key Laboratory of Grain Food and Comprehensive Processing of Heilongjiang Province, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China)

ABSTRACT: Objective To study the thermal aggregation behavior of hemp protein under heat treatment and different ionic strength. **Methods** Hemp seeds were used as materials, the ζ -potential, particle size, turbidity,

基金项目: 哈尔滨商业大学青年创新人才支持计划项目(2019CX34)、黑龙江省普通高等学校青年创新人才培养计划项目(UNPYSCT-2020218)、哈尔滨商业大学研究生创新科研基金项目(YJSCX2020-635HSD)

Fund: Supported by the “Young Innovative Talents” Support Program of Harbin University of Commerce (2019CX34), the Training Plan of Young Innovative Talents in Universities of Heilongjiang (UNPYSCT-2020218), and the Innovation Scientific Research Fund for Graduate Students of Harbin University of Commerce (YJSCX2020-635HSD)

*通信作者: 石彦国, 教授, 主要研究方向为蛋白质化学与大豆加工技术。E-mail: yanguosh@163.com

朱秀清, 教授, 主要研究方向为蛋白质化学与大豆加工技术。E-mail: xqzhuwang@163.com

*Corresponding author: SHI Yan-Guo, Professor, Harbin University of Commerce, No.1, Xuehai Street, Songbei District, Harbin 150028, China. E-mail: yanguosh@163.com

ZHU Xiu-Qing, Professor, Harbin University of Commerce, No.1, Xuehai Street, Songbei District, Harbin 150028, China. E-mail: xqzhuwang@163.com

secondary structure, gel electrophoresis, sulfhydryl and disulfide bond of hemp protein were investigated under heat treatment at 80, 90 and 100 °C and different ionic strength (0, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 mol/L NaCl solution). **Results** The ζ -potential absolute value decreased, the particle size and the turbidity increased with the increase of heat treatment temperature and ionic strength of hemp protein. There were aggregation bands at 70 kDa in the electropherogram. FTIR showed that the α -helix structure decreased significantly, the β -sheet and random coil structure increased significantly with the increase of temperature. And the α -helix and β -turn structure decreased significantly, the β -sheet structure and the random coil increased first and then decreased with the increase of ionic strength. The content of free sulfhydryl group in 90°C heat treatment was lower than 80°C and 100°C. The disulfide bond content was the lowest at 80°C heat treatment. The change of ionic strength had no significant effect on the sulfhydryl group of hemp protein. **Conclusion** The thermal aggregation behavior of hemp protein is promoted with the increase of heat treatment temperature and ionic strength, which provides a theoretical basis for the optimization of hot processing technology and quality control of hemp protein.

KEY WORDS: hemp protein; aggregation; ionic strength; heat treatment

0 引言

汉麻又称大麻、火麻,被广泛应用在医药领域,其籽仁可食用。汉麻籽含有丰富的营养成分,其中蛋白质含量占 20%~25%^[1-2]。汉麻蛋白是一种优质蛋白质,富含多种必需氨基酸,具有极高的营养价值、低致敏性和易消化的特性,越来越多的应用在食品领域^[3-4]。在现代食品加工过程中,热处理是食品加工的基本方法^[5]。热处理时食物中的蛋白质在化学力的作用下形成聚集体^[6],这种聚集行为可引起蛋白质性质和功能发生变化,如溶解性降低^[7]、沉淀析出、功能性改变^[8]等。蛋白聚集行为受到溶液的加热温度^[9]、离子强度^[10]、pH^[11]等因素影响,加热温度具有影响蛋白分子去折叠状态的效果^[12],离子强度可以发挥屏蔽静电作用,影响蛋白分子与溶剂的水合反应^[13]。AMAGLIANI 等^[14]认为蛋白浓度、温度、pH 和离子强度对蛋白质无定形聚集体的影响较大。目前,对于汉麻蛋白的研究多围绕提取方法及功能特性,对热聚集行为机制及调控方式的研究较少。汉麻蛋白热聚集行为的探究可以为调控产品加工工艺参数、提高产品品质、促进产品开发应用奠定基础。

本研究以汉麻籽为原料,探究汉麻蛋白热聚集行为以及离子强度对汉麻蛋白热聚集行为的影响,为汉麻蛋白食品热加工工艺优化和质量控制提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

汉麻籽(广西巴马县)。

甘氨酸(glycine, Gly)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、Ellman 试剂、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺、过硫酸铵、二硫苏糖醇、碘乙酰胺、 β -巯基乙醇(分析纯,美

国 Sigma 公司);十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、尿素、考马斯亮蓝 R250(分析纯,北京博奥拓达科技有限公司);氯化钠、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、正己烷、盐酸(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司)。

1.2 仪器与设备

PHS-3C 型 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司);HH-S4 型恒温水浴锅(巩义市予华仪器有限责任公司);FA224 电子天平(精度 0.0001 g,上海舜宇恒平科学仪器有限公司);524G 数显恒温磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司);FD-1A-50 真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司);GL-21M 冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);TDL-5-A 离心机(上海安亭科学仪器厂);HAD-HZS-H 恒温振荡器(北京恒奥德科技有限公司);Zetasizer Nano ZS 纳米粒度分布仪(英国 Malvern 仪器有限公司);DYY-6D 电泳仪(北京六一生物科技有限公司);L160000A FTIR 傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR)(珀金埃尔默仪器有限公司);Alpha-1506 紫外可见光分光光度计(上海谱元仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 汉麻蛋白的提取

汉麻籽浸于正己烷中振荡 2 h,抽滤,重复上述操作进行脱脂 3 次,粉碎,过筛,得 60 目脱脂汉麻粉。将原料与蒸馏水按照料液比 1:20 (*m*:*V*)混合后,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 到 10.0,在室温条件下磁力搅拌 1 h,再以 5000 r/min 转速离心 30 min,取上清液。用 1 mol/L HCl 将上清液的 pH 调到 4.5,静置 30 min,5000 r/min 离心 30 min,收集沉淀,并将沉淀用蒸馏水洗 3 次去除其中的盐分,调 pH 至 7.0,冷冻干燥,备用^[15]。采用凯氏定氮法测定干粉样品中蛋白质的含量为 93.46%。

1.3.2 不同温度汉麻蛋白热聚集体的制备

将汉麻蛋白粉溶于 pH 为 7.0、10 mmol/L 的磷酸缓冲液(标准缓冲液)中, 配制为 5% (*m*:*V*)的蛋白质溶液, 在 25°C 下磁力搅拌 2 h 使其充分溶解。5000 r/min 的转速离心 30 min, 取上清液过 0.45 μm 纤维素膜, 滤液倒入带塞三角瓶中。将样品分别置于 80、90、100°C 水浴锅中处理 30 min, 迅速冷却以终止聚集体的形成。样品经 5000 r/min 离心 30 min, 取上清液过 0.45 μm 纤维素膜除去不溶性物质, 得到不同温度汉麻蛋白热聚集体^[16]。

1.3.3 不同离子强度汉麻蛋白热聚集体的制备

将汉麻蛋白粉以 1:15 (*m*:*V*)溶于去离子水中, 在 25°C 下磁力搅拌 2 h 使其充分溶解。5000 r/min 的转速离心 30 min, 取上清液过 0.45 μm 纤维素膜, 滤液倒入带塞三角瓶中, 向样品中分别加入 NaCl 溶液, 制备成 NaCl 浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 mol/L 的汉麻蛋白溶液, 摇晃均匀, 将样品放入 90°C 水浴锅中加热 30 min, 迅速冷却以终止聚集体的形成。样品经 5000 r/min 离心 30 min, 取上清液过 0.45 μm 纤维素膜除去不溶性物质, 得到不同离子强度处理的汉麻蛋白热聚集体。

1.3.4 粒径分布

将经过不同条件处理后的汉麻蛋白热聚集体配制成 10 mg/mL 溶液, 稀释后经过 0.45 μm 滤膜, 进行样品测定。采用 Malvern 纳米粒度分布仪测定其粒径分布特征和多分散指数(polydispersity index, PDI), 平行 3 次, 取其平均值作为测定值。

1.3.5 ζ-电位

将经过不同条件处理后的汉麻蛋白热聚集体样品用 pH 7.0、10 mmol/L 磷酸缓冲液配制成 10 mg/mL 的蛋白质溶液, 稀释后缓慢加入马尔文电位样品池。采用 Malvern 纳米粒度分布仪测定电位值, 重复测量 3 次, 取其平均值作为测定值。

1.3.6 二级结构

将经过不同条件处理后的汉麻蛋白热聚集体样品, 冻干成粉末。利用 FTIR 测定, 扫描范围 4000~400 cm⁻¹, 分辨率 4 cm⁻¹, 利用 PeakFit v4.12 软件对红外光谱数据进行拟合分析。

1.3.7 巯基和二硫键含量测定

蛋白质样品巯基(包括游离巯基和总巯基)含量的测定采用 Ellman 法^[17]并稍做修改。

游离巯基: 取 0.0100 g 样品加入 10 mL Tris-Gly (pH 8.0) 缓冲液, 4500 r/min 离心 10 min, 取上清液加入 100 μL Ellman 试剂, 20°C 避光保温 1 h, 在 412 nm 处测吸光度(以缓冲液代替样品为空白), 通过公式(1)计算出游离巯基含量。

总巯基: 取 0.0050 g 样品加入 10 mL 0.2 mol/L Tris-HCl (10 mmol/L EDTA、2% SDS、8 mol/L 尿素、pH 6.8) 缓冲液中, 加入 100 μL Ellman 试剂, 20°C 避光反应 1 h, 在 412 nm 处测定吸光度值, 通过公式(1)计算出总巯基含量。

$$\text{巯基含量}/(\mu\text{mol/g}) = \frac{73.53 \times A_{412} \times D}{C} \quad (1)$$

式中, A_{412} 表示 412 nm 波长处的吸光度; C 表示汉麻蛋白溶液质量浓度, mg/mL; D 表示稀释因子。

二硫键: 总巯基与游离巯基之差的 1/2, 通过公式(2)计算出二硫键含量:

$$\text{二硫键}/(\mu\text{mol/g}) = \frac{F_{\text{总}} - F_{\text{游}}}{2} \quad (2)$$

式中, $F_{\text{总}}$ 表示总巯基含量, μmol/g; $F_{\text{游}}$ 表示游离巯基含量, μmol/g。

1.3.8 浊度

将不同条件下处理后的汉麻蛋白热聚集样品, 用 pH 7.0、10 mmol/L 的磷酸缓冲液稀释蛋白质质量浓度至 8 mg/mL, 溶解 2 h, 用分光光度计在 600 nm 处测定吸光度计算浊度 T ^[18]。每个样品测定 3 次, 最终结果取其平均值(以蒸馏水为空白):

$$T/\% = 1.302 \frac{A \times V}{I} \times 100\%$$

式中, A 表示 600 nm 波长处的吸光度; V 表示稀释倍数; I 表示光程, 取 0.001 m。

1.3.9 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

将蛋白样品稀释为 80 mg/mL, 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液 0.5 mL 加入 250 μL 蒸馏水及缓冲液(0.2 mL 10% SDS 和 50 μL 0.01 mol/L 巯基乙醇)混合均匀, 煮沸 5 min, 冷却后的蛋白溶液 8000 r/min 离心 5 min, 上样量为 20 μL。采用 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 电压恒定为 120 V。取出凝胶放入考马斯亮蓝染液(R250)中染色 30 min, 再用脱色液脱色至背景清晰, 利用凝胶成像系统分析电泳条带^[19]。

1.4 数据处理

采用 Excel 2013 和 SPSS 22.0 对数据进行处理, 通过 Origin 2019 绘图, 实验结果以 3 次平均值±标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 粒径分布

加热温度对汉麻蛋白聚集体粒径分布有较大影响。由图 1 显示, 随加热温度的升高平均粒径增大, 90°C 下平均粒径高于 80°C, 达到 175.8 nm, PDI 下降。当热处理温度达到 100°C 时, 平均粒径可增至 400.1 nm, 随着热处理温度的升高, 蛋白分子表面电荷数量减小, 斥力减弱, 分子聚集更容易, 使汉麻蛋白热聚集体平均粒径增大。王冬梅等^[20]研究大豆蛋白热处理的行为表征结果与本结论一致, 随着热处理温度的升高, 大豆蛋白形成了可溶性聚集体, 聚集体粒径和分子量逐渐增大。

汉麻蛋白在不同离子强度作用下, 粒径分布发生了明显改变。如图 2 所示, 经 NaCl 处理后的汉麻蛋白聚集

体粒径峰向右偏移, 粒径增大, 平均粒径由 175.8 nm 增至 271.2 nm, PDI 升高。随着离子强度增大, 汉麻蛋白热聚集体粒径逐渐增大, 当 NaCl 浓度从 0.2 mol/L 增加至 0.8 mol/L 时, 平均粒径由 193.9 nm 增至 271.2 nm, PDI 略有降低, 这表明离子强度增加能促进汉麻蛋白的聚集。在盐离子作用下, 蛋白微环境中的电荷产生屏蔽作用^[21], 水化层被破坏, 影响蛋白质表面疏水作用, 分子间斥力减小, 更易发生聚集。同时, 离子强度的增加相当于减少蛋白质的净电荷密度, 随着 NaCl 浓度增大, 分子表面电荷数减少, 热力学稳定性下降, 蛋白质分子发生聚集, 汉麻蛋白热聚集体平均粒径增大。李向红等^[22]通过对不同离子强度大豆分离蛋白热聚集体的研究表明, 随着离子强度的增大, 大豆分离蛋白热聚集体的粒径随之增大, 与本研究结论一致。

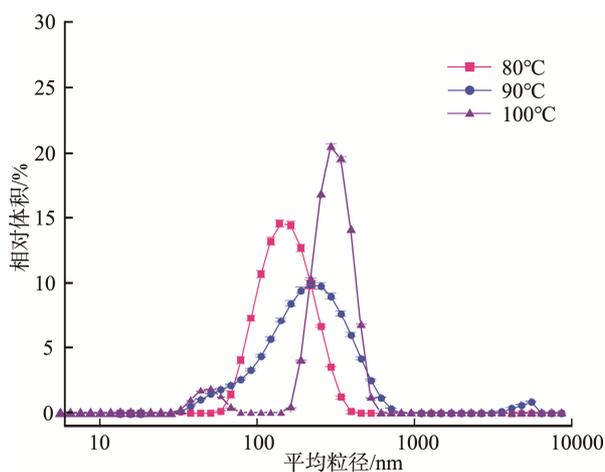


图 1 不同温度处理的汉麻蛋白热聚集体粒径分布变化($n=3$)

Fig.1 Changes of particle size distribution of hemp protein thermal aggregates treated at different temperatures ($n=3$)

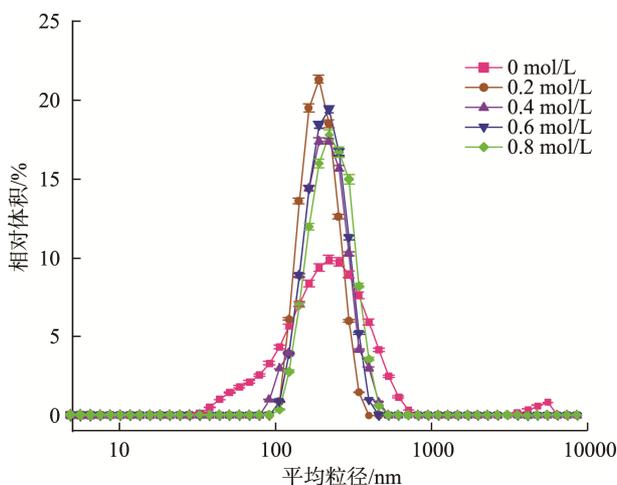


图 2 不同离子强度处理的汉麻蛋白热聚集体粒径分布变化($n=3$)

Fig.2 Changes of particle size distribution of hemp protein thermal aggregates treated at different ionic strength ($n=3$)

2.2 ζ -电位

ζ -电位是溶液中带电粒子的电层中剪切面的电位, 通常用来评价胶体的稳定性。蛋白质溶液是一种典型的胶态分散体系, ζ -电位的绝对值越大, 表明蛋白质分子表面的负载量就越大, 并有较大的静电斥力维持系统处于相对稳定的状态; 相反, 当 ζ -电位绝对值较低时, 体系状态不稳定, 蛋白质分子容易聚集。

随着热处理温度升高, ζ -电位绝对值逐渐减小。100°C 热处理汉麻蛋白 ζ -电位的绝对值小于 80°C 时, 表明在 100°C 下分子表面电荷总数发生减少, 蛋白质分子间的斥力减弱, 静电作用力增强, 汉麻蛋白分子及热聚集体分子被静电吸引形成了新的更大的聚集体分子。随着热处理温度升高, ζ -电位的绝对值降低, 可能是由于汉麻蛋白表面带负电残基随着高温处理逐渐掩埋, 静电排斥减少, 溶液稳定性降低, 这将有利于体系中蛋白分子形成聚集体。

离子强度对汉麻蛋白热聚集体 ζ -电位有较大影响, NaCl 处理后的汉麻蛋白热聚集体的 ζ -电位绝对值明显低于未经 NaCl 处理的汉麻蛋白热聚集体。随着 NaCl 浓度的增大, 汉麻蛋白热聚集体的 ζ -电位绝对值逐渐减小, 从 18.3 mV 降至 8.05 mV。处于特定离子强度的环境下汉麻蛋白分子由于静电相互作用产生了屏蔽效应, 静电相互作用引起的排斥弱化, 使整个溶液体系中吸引力大于排斥力, 以及体系中由于竞争水合加剧了分子间的碰撞, 产生疏水性聚集, 分散体系的平衡被完全破坏, 溶液稳定性降低, 从而导致了汉麻蛋白聚集现象的发生。袁江兰等^[23]通过实验发现随着 NaCl 浓度增加, 大米谷蛋白热聚集体 ζ -电位绝对值减少, 与上述结论相符。

2.3 二级结构

利用 FTIR 对汉麻蛋白聚集体进行扫描, 结果如图 3、4 所示。在酰胺 I 带(1700~1600 cm^{-1}), 汉麻蛋白热聚集体具有较强的吸收峰, 酰胺 I 带谱峰与蛋白质二级结构之间有相对应的关系, 可以通过对峰面积的研究进一步对蛋白质二级结构进行分析, 结果如表 1、2 所示。

经过不同温度处理的汉麻蛋白热聚集体在酰胺 I 带的特征吸收峰有显著差异($P<0.05$)。由图 3 和表 1 可知, 随着热处理温度的升高, 汉麻蛋白聚集体 α -螺旋结构显著减少($P<0.05$), 在 100°C 时最低; 而 β -折叠和无规则卷曲结构显著增多($P<0.05$)。此结果与热处理红芸豆蛋白的二级结构相似, 红芸豆蛋白随温度升高, α -螺旋结构占比呈下降趋势, 而不规则结构占比呈上升趋势^[24]。蛋白质二级结构主要由 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲组成, β -转角和 α -螺旋代表蛋白质的有序结构, 而 β -折叠和无规则卷曲代表蛋白质的无序结构^[25], 氢键是稳定二级结构的主要作用力。FTIR 结果显示, 热处理对汉麻蛋白聚集体氢键有显著影响, 使维持 α -螺旋的氢键断裂, α -螺旋结构打开,

疏水性基团暴露, 打破分子间作用力平衡, 分子间的相互作用增强, 进而通过 β -折叠形成蛋白聚集体^[26]。

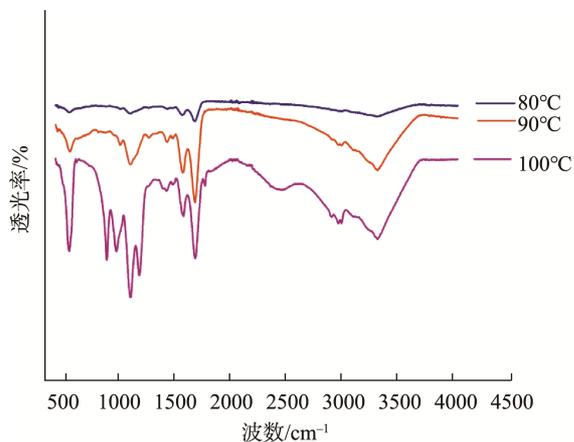


图 3 不同温度处理的汉麻蛋白热聚集体的红外光谱图
Fig.3 Infrared spectrogram of hemp protein thermal aggregates treated at different temperatures

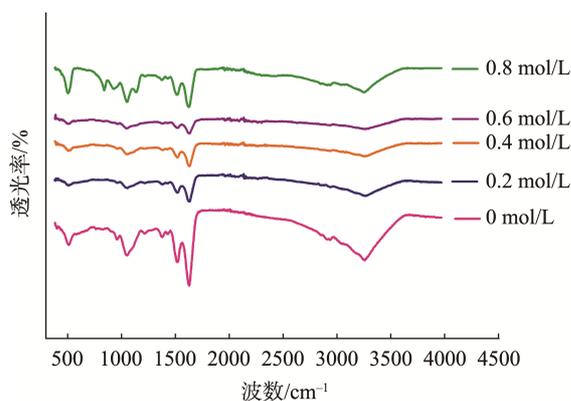


图 4 不同离子强度处理的汉麻蛋白热聚集体的红外光谱图
Fig.4 Infrared spectrogram of hemp protein thermal aggregates treated at different ionic strength

表 1 不同温度处理对汉麻蛋白热聚集体二级结构的影响
Table 1 Effects of different temperature treatments on the secondary structures of hemp protein thermal aggregates

| 温度/°C | α -螺旋/% | β -折叠/% | β -转角/% | 无规则卷曲/% |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 80 | 30.48±0.92 ^c | 25.52±0.64 ^a | 27.64±0.72 ^b | 16.36±0.58 ^a |
| 90 | 17.59±0.43 ^b | 33.85±0.57 ^b | 28.96±0.94 ^c | 19.60±0.32 ^c |
| 100 | 17.02±0.89 ^a | 39.09±1.42 ^c | 26.78±1.08 ^a | 17.11±0.97 ^b |

注: 同列不同字母表示差异显著($P < 0.05$), 下同。

离子强度对汉麻蛋白热聚集体二级结构影响如图 4 和表 2 所示。随着 NaCl 浓度的增加, 汉麻蛋白热聚集体 α -螺旋和 β -转角结构显著减少($P < 0.05$); β -折叠结构增多,

在 0.8 mol/L 时最高; 无规则卷曲结构先增大后减小, 在 0.6 mol/L 时最高。FTIR 结果表明, 离子强度的增加可以促进汉麻蛋白聚集体从有序结构向无序结构转变, β -折叠结构含量反映了蛋白疏水位点的暴露程度, 随着 NaCl 浓度的增加, 蛋白聚集体发生部分变性且二级结构改变, β -折叠结构含量增大, 疏水位点暴露, 同时 ζ -电位绝对值减小, 分子间斥力减小, 分子聚集形成更大的聚集体。

表 2 不同离子强度处理对汉麻蛋白热聚集体二级结构的影响
Table 2 Effects of different ionic strength treatments on the secondary structures of hemp protein thermal aggregates

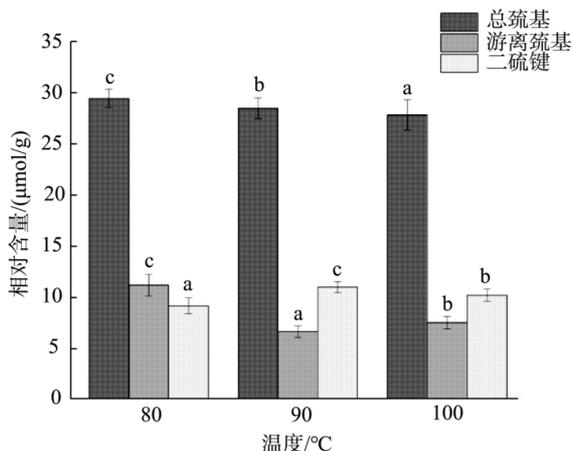
| NaCl 浓度/(mol/L) | α -螺旋/% | β -折叠/% | β -转角/% | 无规则卷曲/% |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 17.59±0.92 ^c | 33.85±0.83 ^a | 34.96±0.79 ^c | 13.60±0.97 ^a |
| 0.2 | 16.10±0.57 ^d | 33.71±0.64 ^a | 34.70±0.82 ^d | 15.49±0.61 ^c |
| 0.4 | 15.68±1.02 ^c | 34.93±1.38 ^b | 33.79±1.20 ^c | 15.60±1.18 ^c |
| 0.6 | 15.26±0.83 ^b | 34.99±0.99 ^b | 33.21±0.94 ^b | 16.54±0.97 ^d |
| 0.8 | 12.88±1.42 ^a | 39.95±1.54 ^c | 32.88±1.37 ^a | 14.29±1.38 ^b |

2.4 巯基及二硫键

游离巯基是蛋白质中最活跃的基团。它位于蛋白质分子表面, 氧化后形成一个新的二硫键, 对维持复合蛋白质的结构稳定性起着重要作用。用含量表征了汉麻热聚集体中蛋白质氧化程度的变化, 不同样品的游离巯基含量可以反映不同处理方式对蛋白质共价作用的影响。

由图 5 可知, 经过热处理后汉麻蛋白热聚集体的总巯基含量有显著变化($P < 0.05$), 由 29.49 $\mu\text{mol/g}$ 降至 27.87 $\mu\text{mol/g}$, 游离巯基含量先减小后增大, 二硫键先增大后减小。当 90°C 热处理时汉麻蛋白热聚集体溶液中的游离巯基含量最低为 6.62 $\mu\text{mol/g}$, 这是由于随着热处理温度的升高, 游离巯基氧化成二硫键和发生 -SH-SS 互换反应^[27], 从而发生游离巯基减少和二硫键增多的现象; 然而, 当热处理温度增加到 100°C 时, 游离巯基含量反而提升至 7.5 $\mu\text{mol/g}$, 可能是由于在 100°C 的热处理时, 蛋白质发生疏水性聚集, 使得暴露的游离巯基被部分包裹在聚集体内部, 不再发生 -SH-SS 互换和二硫键转换^[28]。

不同浓度 NaCl 处理对汉麻蛋白巯基和二硫键的影响如图 6 所示。随着离子强度增大, 游离巯基含量变化显著($P < 0.05$), 总巯基含量无显著变化($P > 0.05$)。可知离子强度对汉麻蛋白游离巯基的二硫键转换和 -SH-SS 互换影响不大。在不同离子强度的作用下, 汉麻蛋白聚集现象的差异可能是由于疏水性基团暴露增加, 蛋白质表面疏水性增加, 从而发生疏水性聚集。



注: 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 下图 6、7、8 同。

图 5 不同温度处理的汉麻蛋白热聚集体的巯基和二硫键含量($n=3$)

Fig.5 Content of sulphhydryl and disulfide bonds in hemp protein thermal aggregates treated at different temperatures ($n=3$)

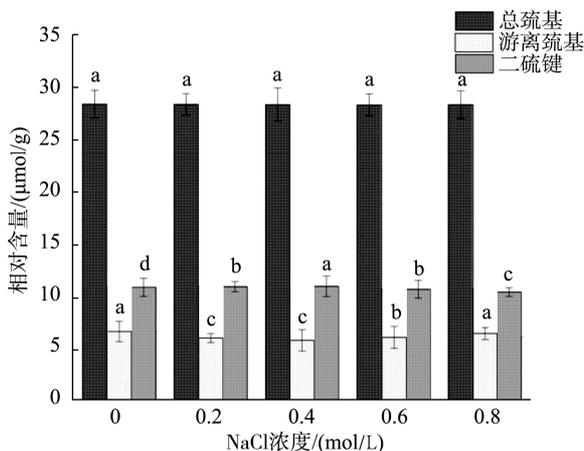


图 6 不同离子强度处理的汉麻蛋白热聚集体的巯基和二硫键含量($n=3$)

Fig.6 Content of sulphhydryl and disulfide bonds in hemp protein thermal aggregates treated at different ionic strength ($n=3$)

2.5 浊度

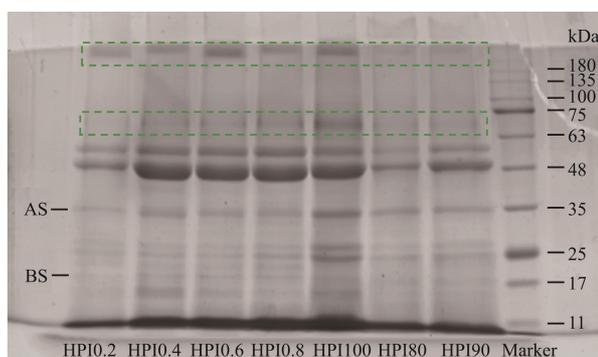
浊度法是监测蛋白质聚集最直观最简便的方法。热处理温度对汉麻蛋白热聚集体浊度具有一定影响。随着热处理温度的升高, 浊度显著增大($P < 0.05$), 80°C时汉麻蛋白浊度为 900.55%, 100°C时上升到 1297.66%, 浑浊程度肉眼可见。这是由于温度促进汉麻蛋白热聚集行为的发生, 随着温度升高, 大分子可溶性聚集体增多, 溶液浊度增大, 汉麻蛋白浊度的增加与其平均粒径增大的结果相互验证。陈振家等^[24]研究红芸豆蛋白在 70~95°C热处理时稳定性的结果与本研究结论一致, 随着热处理温度升高, 红芸豆蛋白内部疏水结构的暴露, 溶解度逐渐降低, 浊度升高, 高温促进蛋白聚集现象发生。JIANG 等^[29]的研究结果表明随着 NaCl 浓度的增加, 大豆蛋白更容易发生热聚集, 当蛋白在

0.6 mol/L NaCl 溶液中加热到 80~97°C时, SPI 浊度呈指数性增加, 蛋白质发生严重聚集。但 90°C与 100°C处理下汉麻蛋白浊度变化不大, 这是由于在 100°C下, 聚集现象加剧, 生成大分子不溶性聚集体并以沉淀的形式析出, 可溶性聚集体浊度相差不大。

离子强度对汉麻蛋白浊度也具有一定影响。随着 NaCl 浓度的增大, 汉麻蛋白浊度逐渐增大, 从 1267.2%增加到 1341.06%, 由此可知离子强度可促进汉麻蛋白聚集。随着离子强度增大, 汉麻蛋白分子粒径增大, 溶液体系更稳定。袁江兰等^[23]用 0.30 mol/L NaCl 处理大米谷蛋白时, 溶液浊度显著增加, 并且出现了肉眼可见的浑浊。JIANG 等^[29]研究结果显示, 大豆分离蛋白浊度随着盐离子强度的增加而增加。

2.6 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

汉麻蛋白主要由麻仁球蛋白(edestin)和白蛋白(albumin)组成。麻仁球蛋白占总蛋白质含量的 60%~80%, 它由 6 个相同的亚基组成, 每个亚基由一个酸性亚基(acidic subunits, AS)和一个碱性亚基(basic subunits, BS)通过一个二硫键连接而成^[30]。麻仁球蛋白的分子量大约为 300 kDa, 其中 AS 分子量约为 34 kDa, 组成相对均一; 而 BS 主要由两个亚基组成, 分子量分别为 20 和 18 kDa^[31]。由图 7 可见, 汉麻蛋白热聚集体在浓缩胶与分离胶顶部出现明显条带, 并随着温度的升高和离子强度的增大, 条带更明显。这可能是由于随温度升高和离子强度增大, 汉麻蛋白发生聚集并形成大分子可溶性聚集体, 这也是引起粒径增大及浊度上升的原因。此结果与蒋将^[32]的电泳结果一致, 大豆蛋白聚集体在浓缩胶顶部出现聚集条带。王庆玲^[33]在研究 pH 偏移及热处理对汉麻蛋白结构的影响过程中也得到相同结论。而随着热处理温度和离子强度的变化, 汉麻蛋白分布在 70 kDa 处的条带具有明显



注: HPI0.2: 0.2 mol/L NaCl 处理; HPI0.4: 0.4 mol/L NaCl 处理; HPI0.6: 0.6 mol/L NaCl 处理; HPI0.8: 0.8 mol/L NaCl 处理; HPI80: 80°C热处理; HPI90: 90°C热处理; HPI100: 100°C热处理; Marker: 标准品。

图 7 不同条件处理后汉麻蛋白热聚集体的电泳图

Fig.7 Electropherogram of hemp protein thermal aggregates treated under different conditions

变化, 随着热处理温度增加和离子强度增大, 70 kDa 处的条带逐渐加深, 在 100°C 和 0.8 mol/L NaCl 处理条件下出现明显的条带。这说明热处理温度和离子强度会促使蛋白亚基的聚集, 70 kDa 附近的亚基条带在加热过程中最易发生聚集, 且随着离子强度的增大聚集能力增大。温度升高也会促使红芸豆蛋白亚基的聚集, 90 kDa 附近的红芸豆蛋白亚基条带在加热过程中最易发生聚集, 与本研究所得结果相似^[24]。

3 结 论

食品加工过程中加热是常见的处理方式, 食盐是必不可少的调味品, 然而热处理和离子强度对食品加工及食品品质具有影响。热处理可以促进汉麻蛋白聚集行为的发生, 并随着热处理温度的升高, 聚集现象更显著。汉麻蛋白表面带负电残基随着高温处理逐渐掩埋, ζ -电位的绝对值降低, 静电排斥减少, 分子间作用力平衡破坏; α -螺旋结构打开, 形成 β -折叠和无规则卷曲构象, 游离巯基氧化生成二硫键, 分子聚集粒径增大, 浊度上升, 形成蛋白聚集体, 体系稳定性增强。随着离子强度的升高, 蛋白质表面净电荷密度减少, ζ -电位绝对值降低, 蛋白微环境中的电荷产生屏蔽作用, 分子间斥力减小, 蛋白分子粒径增大, 更易发生聚集; α -螺旋结构含量减少, β -折叠结构含量增大, 蛋白结构由有序性向无序性变化, 浊度增大, 形成大分子可溶性聚集体。离子强度对汉麻蛋白聚集行为具有一定的调控作用。本研究对热处理及离子强度对汉麻蛋白聚集行为的影响进行了探讨, 为汉麻蛋白的加工及应用提供了理论依据。

参考文献

- [1] 孟妍, 曾剑华, 王尚杰, 等. 汉麻籽蛋白研究进展[J]. 食品工业, 2020, 41(1): 268–273.
MENG Y, ZENG JH, WANG SJ, *et al.* Research progress on hemp seed protein [J]. Food Ind, 2020, 41(1): 268–273.
- [2] 刘雪强, 刘阳, 粟建光, 等. 中国汉麻综合利用技术与产业化进展[J]. 中国麻业科学, 2019, 41(6): 283–288.
LIU XQ, LIU Y, SU JG, *et al.* Progress in comprehensive utilization technology and industrialization of hemp in China [J]. Plant Fiber Sci China, 2019, 41(6): 283–288.
- [3] MIROSLAV H, TAMARA DH, ATHINA L, *et al.* Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. physicochemical properties [J]. Food Hydrocolloid, 2018, 79: 526–533.
- [4] 何锦风, 陈天鹏, 卢蓉蓉, 等. 汉麻籽的综合利用及产业化研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(3): 98–112.
HE JF, CHEN TP, LU RR, *et al.* Study on the comprehensive utilization and industrialization of hempseed (*Fructus cannabis*) [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2010, 10(3): 98–112.
- [5] 连文琦. 新型热和非热食品加工技术的研究进展及影响其工业应用的因素[J]. 食品工业科技, 2019, 40(9): 363–368.
LIAN WQ. Research progress of emerging thermal and non-thermal food processing technologies and factors impacting its industrial application [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, 40(9): 363–368.
- [6] WANG XF, HE ZY, ZENG MM, *et al.* Effects of the size and content of protein aggregates on the rheological and structural properties of soy protein isolate emulsion gels induced by CaSO₄ [J]. Food Chem, 2017, 22: 130–138.
- [7] 简华君, 张海瑞, 黄小林, 等. 碱溶热处理对大豆分离蛋白溶解度、热聚集和流变性质的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(16): 101–104.
JIAN HJ, ZHANG HR, HUANG XL, *et al.* Effects of alkaline-heating treatment on the solubility, thermal aggregation and rheological property of soybean protein isolate [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(16): 101–104.
- [8] 刘紫薇, 朱明明, 王凤新, 等. 高温湿热处理对大豆分离蛋白的结构及其功能特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(15): 157–164.
LIU ZW, ZHU MM, WANG FX, *et al.* Effect of high temperature hydrothermal treatment on structure and functional properties of soybean protein isolate [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(15): 157–164.
- [9] 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.
CHANG P, DU X, YANG DQ, *et al.* Research progress on the mechanism of protein thermal aggregation behavior and its influence on functional properties of protein [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(24): 318–325.
- [10] HUSSAIN R, GAIANI C, JEANDEL C, *et al.* Combined effect of heat treatment and ionic strength on the functionality of whey proteins [J]. J Dairy Sci, 2012, 95(11): 6260–6273.
- [11] 娄爱华, 潘腾, 陈星, 等. pH 值对纯化猪肉肌球蛋白热聚集体的影响[J]. 中国食品学报, 2021, 21(6): 46–53.
LOU AIH, PAN T, CHEN X, *et al.* Effects of pH values on the heat-induced aggregation of pork myosin [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2021, 21(6): 46–53.
- [12] HE XT, YANG XQ, ZHANG JB. Effects of pepsin hydrolysis on the soy β -conglycinin aggregates formed by heat treatment at different pH [J]. Int J Food Sci Technol, 2014, 49(7): 1729–1735.
- [13] SCHMITT C, MOITZI C, BOVAY C, *et al.* Interfacial structure and colloidal behaviour of covalent whey protein microgels obtained by heat treatment [J]. Soft Matter, 2010, 6(19): 4876–4884.
- [14] AMAGLIANI L, SCHMITT C. Globular plant protein aggregates for stabilization of food foams and emulsions [J]. Trends Food Sci Technol, 2017, 67: 248–259.
- [15] 宋淑敏, 魏连会, 石杰, 等. 汉麻籽蛋白提取制备工艺[J]. 食品工业, 2019, 40(10): 63–65.
SONG SM, WEI LH, SHI J, *et al.* Extraction and preparation of hemp seed protein [J]. Food Ind, 2019, 40(10): 63–65.
- [16] 安然. 大豆分离蛋白可溶性热聚集行为及其超声调控研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019.
AN R. Study on soluble thermal aggregates of soybean protein isolate and its ultrasonic regulation [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.
- [17] ELLMAN GD. Tissue sulfhydryl groups [J]. Arch Biochem Biophys, 1959, 82: 70–72.
- [18] 李云. 大豆蛋白聚集及共混凝胶性质研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
LI Y. The study on aggregated soybean protein and mixed gelation soybean proptein [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2007.
- [19] HE S, SHI J, WALID E, *et al.* Extraction and purification of a lectin from small black kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) using a reversed micellar system [J]. Proc Biol, 2013, 48(4): 746–752.
- [20] 王冬梅, 范志军, 安然, 等. 大豆蛋白热聚集体的溶液行为表征[J]. 现代食品, 2020, (7): 182–184.
WANG DM, FAN ZJ, AN R, *et al.* Characterization of solution behavior of soybean protein thermal aggregates [J]. Mod Food, 2020, (7): 182–184.
- [21] SCHOKKER EP, SINGH H, PINDER DN, *et al.* Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin AB at pH 2.5 as influenced by ionic strength and protein concentration [J]. Int Dairy J, 2000, 10: 233–240.

- [22] 李向红, 华欲飞, 刘展, 等. 不同离子强度大豆分离蛋白热诱导聚集体的研究[J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 104-109.
LI XH, HUA YF, LIU Z, *et al.* Study on the heat-induced aggregates of soy protein isolate formed at different ionic strengths [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2010, 10(2): 104-109.
- [23] 袁江兰, 黄亚明, 李传雯, 等. 大米谷蛋白热聚集的盐效应及机制[J]. 食品工业科技, 2017, 38(18): 69-73.
YUAN JL, HUANG YM, LI CW, *et al.* Salt effect and mechanisms of thermal aggregation of rice glutelin [J]. Sci Technol Food Ind, 2017, 38(18): 69-73.
- [24] 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.
CHEN ZJ, WANG XW, JING X, *et al.* Effects of different temperature treatments on thermal stability and structure of red kidney bean protein [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2020, 36(19): 306-312.
- [25] 王喜波, 曹佳, 杨赛, 等. 大豆乳清蛋白与硫酸葡聚糖相互作用及乳化特性研究[J]. 农业机械学报, 2021, 52(10): 409-416.
WANG XB, CAO J, YANG S, *et al.* Interaction and emulsification properties of soybean whey protein and dextran sulfate [J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 2021, 52(10): 409-416.
- [26] 吕彤, 林俊杰, 周昌瑜, 等. 热处理强度对猪肉肌球蛋白结构及风味成分吸附特性的影响[J]. 农业工程学报, 2016, 32(8): 285-291.
LV T, LIN JJ, ZHOU CY, *et al.* Effect of heat treatment intensity on structure and binding capacity of volatile compounds of myosin [J]. Trans Chin Soc Agric Eng, 2016, 32(8): 285-291.
- [27] PENG W, KONG X, CHEN Y, *et al.* Effects of heat treatment on the emulsifying properties of pea proteins [J]. Food Hydrocolloid, 2016, 52(2): 301-310.
- [28] 周建中. 棉籽球蛋白热聚集行为及其凝胶特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2016.
ZHOU JZ. Thermally aggregation behaviors and gelation properties of cottonseed globulin [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2016.
- [29] JIANG J, XIONG YL, CHEN J. pH Shifting alters solubility characteristics and thermal stability of soy protein isolate and its globulin fractions in different pH, salt concentration, and temperature conditions [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(13): 8035-8042.
- [30] 徐鹏伟. 火麻仁蛋白制备、性能表征及超声改性研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2020.
XU PW. Preparation, characterization and ultrasonic modification of hemp seed protein [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2020.
- [31] WANG XS, TANG CH, YANG XQ, *et al.* Characterization, amino acid composition and *in vitro* digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins [J]. Food Chem, 2008, 107(1): 11-18.
- [32] 蒋将. pH 偏移处理诱导熔球态大豆蛋白的结构变化及功能性质的改善[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
JIANG J. pH-shifting induced structural changes and functionality enhancements of soy proteins in molten globule state [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011.
- [33] 王庆玲. 汉麻蛋白改性对蛋白功能性质及营养价值的影响研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
WANG QL. Effects of protein modification on the functionality and nutritional value of hempseed protein [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



王 冰, 工程师, 主要研究方向为谷物发酵、谷物化学与加工技术。

E-mail: iceking85@163.com



石彦国, 教授, 主要研究方向为蛋白质化学与大豆加工技术。

E-mail: yanguosh@163.com



朱秀清, 教授, 主要研究方向为蛋白质化学与大豆加工技术。

E-mail: xqzhuwang@163.com