

干热处理和 pH 偏移对汉麻分离蛋白/ 卡拉胶接枝物凝胶性质的影响

吕铭守, 王子涵, 刘琳琳, 孙冰玉, 朱 颖, 黄雨洋, 曲 敏, 朱秀清*

(哈尔滨商业大学食品工程学院黑龙江省谷物食品与谷物资源综合加工重点实验室, 哈尔滨 150028)

摘 要: **目的** 研究不同 pH 偏移和干热处理时间对汉麻分离蛋白/卡拉胶接枝物凝胶性质的影响。**方法** 以未经 pH 偏移及干热处理组分为空白对照, 研究了不同干热处理时间(0、24、48、72 h)和 pH 偏移(2、12)条件对汉麻分离蛋白/卡拉胶接枝物凝胶硬度、流变特性、水分分布和微观结构的影响。**结果** 与对照组相比, 经干热处理和 pH 偏移处理的蛋白凝胶硬度、持水性和储能模量(G')整体上有提高, 其中干热处理 48 h 和 pH 2 偏移处理组是对照组的 1.38、1.10 和 19.45 倍。干热处理和 pH 偏移增加了凝胶中不可流动水的含量(92.88%)且电镜结果显示凝胶的微观结构逐渐致密, pH 2 偏移和干热处理 48 h 更加致密均匀, 复合凝胶中蛋白的 α -螺旋的含量减少, β -折叠含量增加, 这表明蛋白分子内部的有序结构增加。**结论** 在 pH 2 偏移干热处理 48 h 条件下, 汉麻分离蛋白凝胶性质最佳, 这为汉麻分离蛋白在食品工业中的应用提供了新的理论依据。

关键词: 汉麻分离蛋白; 卡拉胶; 干热处理; pH 偏移; 凝胶性质

Effects of dry heating treatment and pH shifting on gel properties of hemp protein isolate/carrageenan grafted hydrogel

LV Ming-Shou, WANG Zi-Han, LIU Lin-Lin, SUN Bing-Yu, ZHU Ying,
HUANG Yu-Yang, QU Min, ZHU Xiu-Qing*

(Heilongjiang Key Laboratory of Grain Resources Comprehensive Processing, School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of different pH shifts and dry heating treatment times on the gel properties of hemp protein isolate/carrageenan grafted hydrogel. **Methods** The effects of different dry heating treatment times (0, 24, 48, 72 h) and pH shifts (2, 12) on the gel hardness, rheological properties, water distribution, and microstructure of hemp isolate protein/carrageenan grafts were investigated using the un-pH-shifted and dry heat-treated fractions as a blank control. **Results** The hardness, water-holding capacity, and energy storage modulus (G') of the protein gels treated with dry heat treatment and pH shift increased overall compared with those of the control group, with the fractions treated with dry heat treatment for 48 h and pH 2 shift being 1.38, 1.10 and

基金项目: 黑龙江省“百千万”工程科技重大专项(2021ZX12B04)、黑龙江省“双一流”学科协同创新成果建设项目(LJGXCG2022-084)、黑龙江省自然科学基金项目(LH2023C064)、黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划项目(UNPYSCT-2020217)

Fund: Supported by the Heilongjiang Province “Hundred Million” Project Science and Technology Major Project (2021ZX12B04), the Heilongjiang Province “Double First-class” Discipline Collaborative Innovation Achievement Construction Project (LJGXCG2022-084), the Heilongjiang Natural Science Foundation (LH2023C064), and the Heilongjiang Provincial College Youth Innovative Talent Training Program (UNPYSCT-2020217)

*通信作者: 朱秀清, 教授, 主要研究方向为蛋白质分子化学及大豆深加工。E-mail: xqzhuwang@163.com

*Corresponding author: ZHU Xiu-Qing, Professor, Heilongjiang Key Laboratory of Grain Resources Comprehensive Processing, No.1, Xuehai Road, Songbei District, Harbin 150028, China. E-mail: xqzhuwang@163.com

19.45 times higher than those of the control group. Dry heat treatment and pH shift increased the content of immobile water in the gels (92.88%) and the electron microscopy results showed that the microstructure of the gels was gradually denser, with pH 2 shift and dry heat treatment for 48 h became more dense and uniform. The content of α -helix of the protein in the composite gels decreased, and the content of β -sheet increased, which indicated that the internal ordering of the protein molecules increased. **Conclusion** Under the condition of pH 2 shifts dry heat treatment for 48 h, the gel properties of hemp protein isolate are the best, which provides a new theoretical basis for the application of hemp protein isolate in the food industry.

KEY WORDS: hemp protein isolate; carrageenan; dry heating treatment; pH shift; gel property

0 引言

近年来,随着消费者健康意识的提高和植物蛋白的可持续发展及经济适用性优势的显现,植物蛋白市场占比逐年攀升^[1]。汉麻分离蛋白(hemp protein isolate, HPI)提取自汉麻籽粕,主要由球蛋白和白蛋白组成,具有凝胶性、低致敏性、高必需氨基酸含量等特点,其营养价值可与优质蛋白相媲美^[2-3]。尽管 HPI 营养价值丰富,常用作婴幼儿辅食,在香港等地区有汉麻乳、汉麻啤酒等产品,但由于溶解能力和凝胶性较差、易沉淀等特点在我国内陆地区未大规模生产,限制了其在食品工业中的应用^[4]。目前,已有研究表明,通过热处理^[5]、酶处理^[6]及乙酰化^[7]等方法对 HPI 的结构进行修饰,可达到提高其功能性质的目的。然而大多数化学修饰法易生成潜在的有害化合物,影响蛋白质消化而不适用于食品行业^[8]。因此,需要一种健康及易于被消费者接受的方法对 HPI 蛋白进行改性,以提高凝胶性质,拓宽其在食品产业的应用。

美拉德反应是一种经济、有效的改善蛋白质功能性质的方法^[9]。在反应过程中,亲水多糖分子的羰基和蛋白分子的氨基形成共价键,增加了蛋白质的亲水基团数量和接枝物与氢键结合能力,从而表现出更好的溶解性、乳化性、热稳定性、凝胶性等^[10]。但反应时间对凝胶性质的影响至关重要,过度美拉德反应生成的产物会降低蛋白分子间交联从而影响凝胶性质^[9]。卡拉胶(carrageenan, CA)是一种线性硫酸化多糖,具有乳化、增稠等功能特性,因此被广泛应用于食品行业^[11]。CA 形成的双螺旋连接区可以促进分子间相互作用,改善植物蛋白的凝胶化^[12]。已有研究表明大豆分离蛋白与 CA 发生美拉德反应可显著提升其乳化性能和 β -折叠含量^[13]。但 CA 与 HPI 接枝对蛋白凝胶性质的影响却很少被研究。pH 偏移也是一种有效改变蛋白结构的方法,已被广泛地用于改善植物蛋白的凝胶和乳化性质。蛋白肽链在极端酸碱条件下因静电作用展开,中性条件时重新折叠,产生熔融状态下的柔性结构,这种展开和折叠的过程显著影响蛋白的功能性质^[14-15]。目前已有研究表明适度的 pH 偏移处理可显著改变蛋白功能性质,而过度处理会影响蛋白分子的聚集进而影响凝胶的形成^[16-18]。近年

来对 HPI 的改性方法主要为在物理法处理或酶交联的单一方法^[5-7]。目前研究人员更倾向于研究单一方法改性对 HPI 凝胶的影响,对于糖基化反应和 pH 偏移的联合处理对 HPI 的凝胶性质研究还处于空白阶段,但近年来基于糖基化反应的蛋白质-多糖复合物在食品领域受到了广泛的关注, pH 条件影响复合物中多糖的静电排斥及蛋白的聚集和沉淀,具有一定的研究价值。

鉴于此,本研究为进一步探究处理时间和 pH 偏移对 HPI/CA 凝胶性质的影响,通过对比不同糖基化处理时间结合 pH 偏移制备 HPI-CA 凝胶,对其凝胶特性进行研究,旨在从结构的变化揭示其相关机制,为 HPI-CA 凝胶的制备和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

CA 购自上海卡拉丁有限公司;脱脂汉麻籽粕购自锦州俏牌生物科技有限公司(蛋白质干基含量: 70.20%; 脂肪干基含量: 2.90%; 水分含量: 9.80%; 灰分含量: 11.30%)。

磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.2, phosphate buffer solution, PBS)、十二烷基硫酸钠(分析纯)(北京索莱宝科技有限公司);无水乙醇、95%乙醇、邻苯二甲醛、 β -巯基乙醇(分析纯,天津天力试剂有限公司);戊二醛(分析纯,上海迈瑞尔生化科技有限公司);叔丁醇(分析纯,上海迈瑞尔生化科技有限公司);四硼酸钠、NaOH、浓 HCl(分析纯,天津光复科技发展有限公司)。

1.2 仪器与设备

DHP-9012 电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); Spectrum Two 红外光谱仪(美国铂金埃尔默股份有限公司); TG16-WS 高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司); AlpHa-1560 紫外分光光度计(上海谱元仪器有限公司); TA. new plus 质构仪(上海瑞粉智能科技有限公司); MCR 102 高级旋转流变仪[安东帕(上海)商贸有限公司]; NMI20 核磁共振成像分析仪(纽迈电子科技有限公司); Alpha 1-2 LDplus 冷冻干燥机(德国 Martin Christ 集团); Zeiss supra55 扫描式电子显微镜(卡尔蔡司光学有限公司); Spectramax M2

多功能酶标仪(美国美谷分子仪器有限公司); PR124ZH 型分析天平(感量 0.0001 g, 上海佑科仪器仪表有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 HPI 的制备

HPI 的提取参照 HADNADEV 等^[19]的方法并稍作修改。脱脂汉麻粕粉碎后过 80 目筛备用。过筛后的脱脂汉麻粉与去离子水混合搅拌($m:V=1:20$), 使用 2.0 mol/L NaOH 将混合溶液 pH 调至 9.0, 45°C 水浴 2 h 后 4000 r/min 离心 20 min, 收集上清液备用。使用 2.0 mol/L HCl 将备用的上清液 pH 调至 5.0, 4°C 条件下静置 12 h。弃去上清液, 4000 r/min 离心 15 min 收集沉淀, 用去离子水反复冲洗 3 次, 并调整 pH 为 7.0。对所获样品进行冷冻干燥处理, 得 HPI 冻干粉, 备用(凯氏定氮法测得蛋白含量为 89%)。

1.3.2 糖基化法制备 CHPI

参照 MA 等^[20]的方法制备 HPI-CA 接枝物(CHPI)。将 0.8 g CA 和 10 g HPI 冻干粉充分溶解于 100 mL 蒸馏水中, 调节 pH 至 7.0 (1 mol/L HCl), 冷冻干燥得到 HPI-CA 混合物冻干样品。将 HPI-CA 混合物置于相对湿度 74.71%±0.37% 的恒温培养箱中, 65°C 条件下恒温培养 0、24、48、72 h, 分别得到 CHPI-0、CHPI-24、CHPI-48、CHPI-72 接枝物。

1.3.3 CHPI 的 pH 偏移处理

经不同干热时间处理的 CHPI 样品溶于去离子水中搅拌 1 h (400 r/min), 制得 CHPI 分散液(10%, $m:V$), 然后分别用 2 mol/L 的 HCl 或 2 mol/L 的 NaOH 调节溶液至 pH 2、12。1 h 后将溶液 pH 分别调至 7.0。将所制备的分散液透析于 4°C 条件下储存 48 h 后冷冻干燥, 对照组做相同处理。分别标记为 CHPI2、CHPI7 和 CHPI12。所有冻干样品储存在 -18°C 下备用。

1.3.4 CHPI 凝胶的制备

将经不同干热处理时间及 pH 偏移的 CHPI 样品溶于去离子水中(10%, $m:V$), 25°C 400 r/min 搅拌 1 h, 4°C 下储存 2 h 使其更好的水化。95°C 水浴加热 30 min 后立即转移至冰水浴中冷却 20 min, 4°C 储存备用。

1.3.5 接枝度的测定

接枝度(grafting degree, GD)的测定参照 ZHAO 等^[21]的方法并稍做修改。邻苯二甲醛溶液配制如下: 80 mg 邻苯二甲醛试剂溶于 2 mL 的 95%乙醇中, 加入 0.01 mol/L 四硼酸钠缓冲液 50 mL (pH 9.7), 20%十二烷基硫酸钠 5 mL, β -巯基乙醇 200 μ L, 加入蒸馏水定容至 100 mL。凝胶冻干样品分散液(200 μ L, 2 mg/mL)与 4 mL 的 OPA 试剂在 35°C 下反应 5 min。通过紫外-可见分光光度计在 340 nm 处测定吸光度。CHPI-0 组样本为 100%游离氨基(free amino group, FAG)作为参考。GD 的计算如公式(1)下:

$$GD\% = \frac{A_r - A_s}{A_r} \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_r 为参考样品的吸光度(CHPI-0); A_s 为样品的吸光度。

1.3.6 持水能力

持水性(water holding capability, WHC)测定参照 MA 等^[22]方法并稍作改动。凝胶样品在 5000 r/min 离心 15 min, 离心后吸去多余水分, 计算持水性如公式(2):

$$WHC\% = \frac{m - (m_1 - m_2)}{m} \times 100\% \quad (2)$$

式中: m 为离心前凝胶的总质量(g); m_1 为离心前离心管和凝胶的总质量(g); m_2 为离心后离心管和凝胶的总质量(g)。

1.3.7 质构分析

使用质构仪参照 CUI 等^[23]描述的方法测定凝胶的硬度。预测试速度和测试速度分别为 1 mm/s 和 5 mm/s; 触发力 5.0 g。根据 TPA 曲线计算硬度。

1.3.8 流变特性分析

使用流变仪(PP50 平板探头)进行动态温度扫描。温度扫描条件: 直径 40 mm 的不锈钢平行板之间的间隙为 1 mm, 样品在 25°C 条件下平衡 10 min 后, 以 5.83°C/min 的速率从 25°C 上升至 95°C, 在 95°C 维持 10 min, 以相同速率从 95°C 降至 25°C, 记录动态扫描期间凝胶的弹性模量(G')的变化。

1.3.9 低场脉冲核磁共振自旋弛豫时间测量

使用低场核磁共振成像分析仪进行弛豫时间(T_2)的测量。用直径 10 mm 的打孔器轻取高 10 mm 的圆柱形样品放入直径 15 mm 的核磁玻璃管内, 将玻璃管插入核磁探头采样。采用 CPMG 序列, 单次采样参数: 主频率 18 MHz; 90° 脉宽 14; 采样点数 1020; 重复采样等待时间 1500 nms; 频谱宽度 100 kHz; 偏移频率 430360.89; 模拟增益 20。

1.3.10 扫描电子显微镜

使用 Zeiss supra55 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)对 pH 偏移及干热处理后的凝胶冻干样品的微观结构进行观察。将 CHPI 凝胶样品(高约 3 mm, 直径 7 mm)浸泡于 2.5%戊二醛(V/V , pH 6.8)中 4°C 储存 4 h 固定。然后用 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2)洗涤 3 次(每次 10 min), 洗涤后的凝胶分别在不同浓度的乙醇溶液(50%、70%、90%、100%)中脱水处理, 各浓度浸泡 3 次, 每次 10 min。将脱水处理的样品用无水乙醇和叔丁醇(100%)混合物清洗, 最后用纯叔丁醇清洗并作冷冻干燥处理。冻干样品以 10 kV 加速电压, 5000 倍倍率观察测试样品的表现形貌。

1.3.11 傅里叶变换红外光谱测量

使用 Spectrum Two 红外光谱仪在 500~4000 cm^{-1} 的波数范围内进行扫描, 获得红外光谱后利用 Peakfit 4.12 软件对蛋白质二级结构的变化进行反卷积分析, 计算蛋白质二级结构(α -螺旋、 β -折叠、 β -转角及无规卷曲)的相对百分含量。

1.3.12 荧光光谱测定

使用 Spectramax M2 多功能酶标仪测定了样品的内源荧光光谱^[24]。将 5 mg 经 pH 偏移及干热处理的 CHPI 样品溶于 10 mL PBS (0.01 mg/mL, pH 7.0), 涡旋振动 30 s。取

200 μL 样品置于 96 孔酶标版中测定荧光强度。操作参数如下: 激发波长 290 nm; 发射波长 300~400 nm。

1.4 数据统计分析

所有实验均在同一实验条件下重复 3 次, 并计算其平均值 $\pm$ 标准偏差。使用 SPSS 20.0 对数据进行统计分析, 采用单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)检验 ($P<0.05$)。使用 Origin 2021pro 软件绘制图。

2 结果与分析

2.1 GD、WHC 与凝胶强度

蛋白凝胶的糖基化程度常通过测量 GD 的含量确定, 糖基化程度与 GD 值呈正相关。由表 1 可知, 与对照组相比较, 糖基化程度随干热处理时间的增加逐渐增强($P<0.05$)。表明 HPI 和 CA 成功发生了接枝反应。在干热条件下(控制一定的温度和湿度), GD 值与干热处理时间呈正相关, GD 的增加同时表明了体系中游离氨基含量的减少。pH 偏移处理使蛋白 GD 增加, 可能是因为蛋白质结构的改变使内部暴露基团相互连接, 游离氨基含量减少, GD 增加^[25]。

凝胶硬度和 WHC 是反映蛋白凝胶性质变化的有效指标。不同组分的凝胶硬度和 WHC 变化如表 1 所示。在相同 pH 偏移处理条件下, 与对照组相比较, 处理时间小于 48 h 的 CHPI 凝胶的硬度及 WHC 随着增加干热处理时间的增加而显著增加($P<0.05$), pH 2 偏移处理 48 h 时凝胶硬度和 WHC 达到最大值, 分别为对照组的 1.38 和 1.10 倍(479.27 g 和 95.91%)。干燥加热展开蛋白肽链, 促进侧链氨基与 CA 共价结合, 这一变化减少了体系中游离氨基和氢键数量, 增加了疏水相互作用, 促进更加致密凝胶网络的形成, 从而提高凝胶硬度及 WHC^[26]。当干热处理时间大于 48 h 时,

表 1 经不同 pH 偏移及干热处理时间的 GD、WHC 和硬度变化
Table 1 GD, WHC and hardness changes after different pH shifts and dry heat treatment times

pH 偏移	干热处理时间/h	GD/%	WHC/%	硬度/g
pH 7	0	0	87.32 $\pm$ 0.40 ^{ef}	346.46 $\pm$ 14.51 ^d
	24	6.54 $\pm$ 2.72 ⁱ	88.79 $\pm$ 0.70 ^{cd}	358.36 $\pm$ 5.13 ^d
	48	12.31 $\pm$ 1.09 ^f	92.93 $\pm$ 1.17 ^b	388.62 $\pm$ 6.37 ^c
	72	19.23 $\pm$ 1.09 ^d	87.40 $\pm$ 0.73 ^{de}	290.36 $\pm$ 12.30 ^f
pH 2	0	0	89.14 $\pm$ 0.31 ^c	389.98 $\pm$ 11.46 ^c
	24	9.87 $\pm$ 2.43 ^h	91.57 $\pm$ 0.14 ^b	459.68 $\pm$ 8.79 ^b
	48	17.60 $\pm$ 3.64 ^e	95.91 $\pm$ 0.73 ^a	479.27 $\pm$ 7.91 ^a
	72	27.47 $\pm$ 3.03 ^b	88.67 $\pm$ 0.61 ^{cde}	327.08 $\pm$ 4.60 ^e
pH 12	0	0	85.90 $\pm$ 0.27 ^f	383.52 $\pm$ 7.07 ^c
	24	11.88 $\pm$ 2.17 ^g	88.85 $\pm$ 0.73 ^d	449.48 $\pm$ 4.82 ^b
	48	24.90 $\pm$ 1.08 ^c	94.03 $\pm$ 0.39 ^{bc}	460.70 $\pm$ 8.24 ^b
	72	34.10 $\pm$ 1.08 ^a	83.30 $\pm$ 0.04 ^e	304.64 $\pm$ 4.60 ^f

注: 同组数据以不同小写字母表示样品间差异($P<0.05$)。

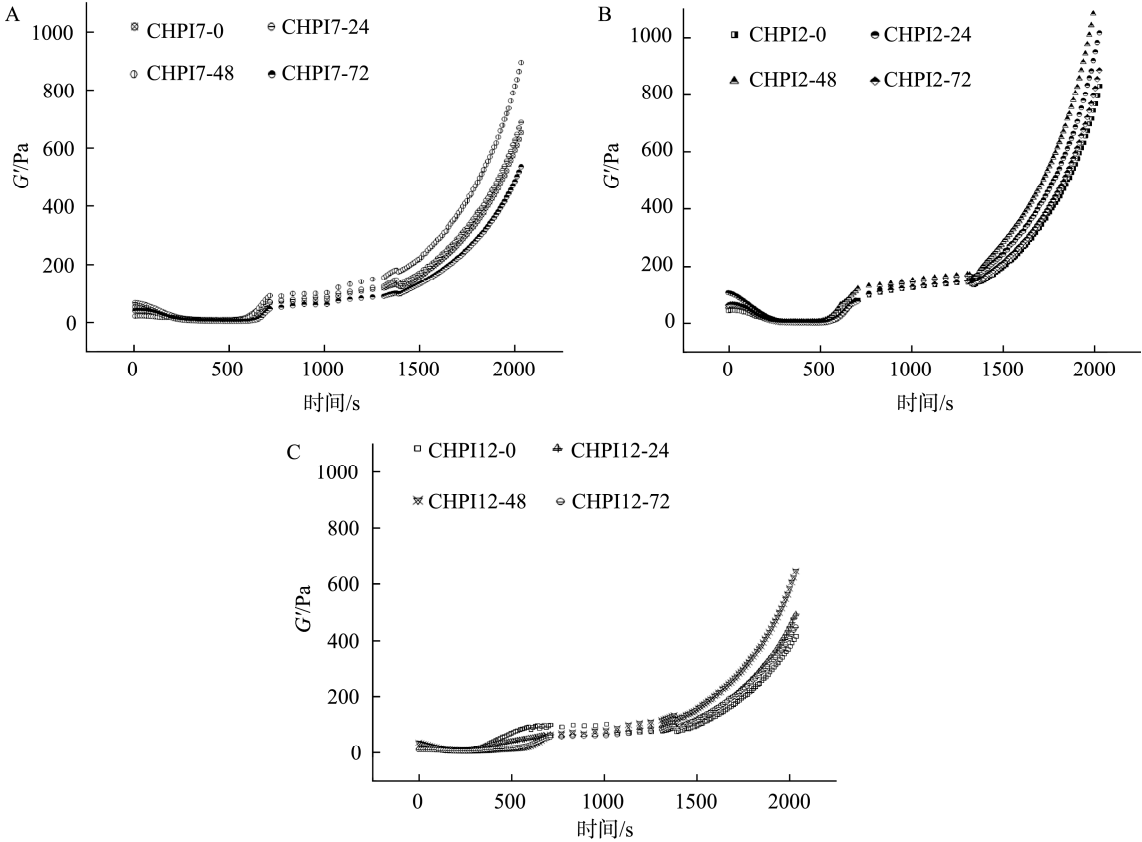
凝胶强度和 WHC 逐渐降低(处理 48 h 时硬度和 WHC 降至 327.08 g 和 88.67%)。长时间的美拉德反应需消耗蛋白的游离氨基, 这迫使因蛋白结构变化而暴露的疏水氨基参与到美拉德反应, 削弱凝胶蛋白分子间交联能力^[20]。极端 pH 环境使蛋白肽链展开, 促进了蛋白间疏水相互作用和二硫键的形成, 从而提高凝胶强度和持水性^[17]。目前普遍认为, 蛋白和多糖复合物聚集体的形成是熵驱动的, 外部因素对大分子生物的聚合有着较大的影响^[27]。因此, 当 pH 2 处理时, 蛋白质分子与多糖分子携带相反电荷导致 HPI 与 CA 间通过静电相互作用形成小聚集体填充在凝胶网络中, 增加凝胶强度。

2.2 流变

利用温度扫描曲线进一步分析 pH 偏移及干热处理时间对 HPI-CA 凝胶在加热和冷却过程中的弹性变化。如图 1 所示, 所有样品均表现出典型的熔胶-凝胶曲线, 且表现出较高的 G' 值。 G' 表示每次剪切形变循环后的可再生能量, 与凝胶的弹性有关^[25]。在初始加热阶段, 随着加热温度的缓慢增加, 初始阶段由赖氨酸交联形成的凝胶网络被逐渐升高的温度破坏, 导致 G' 略有下降^[28]。随着温度的升高, G' 快速上升, 这表明蛋白溶液由熔胶向凝胶转变, 逐渐形成致密凝胶网络。SHENG 等^[29]把这种变化归结于蛋白质分子间的相互作用逐渐增强。进入冷却阶段, G' 快速上升, 说明蛋白之间形成了有利于低温阶段存在的非共价相互作用。在相同 pH 条件下, 与对照组相比较, 凝胶 G' 随着干热处理时间的增加而增加, 在 pH 2 处理 48 h 时 G' 达到最大值, 为空白对照组的 19.45 倍(1075.4 Pa)。可以推测, 短时间的干热处理促进了蛋白质-蛋白质分子、蛋白质-多糖键的相互作用, 使暴露的官能团更好的参与凝胶的形成, 形成了更加牢固的凝胶网络^[30]。但长时间的干热反应对凝胶形成是不利的, 可能是长时间干热反应产生的美拉德产物阻碍蛋白疏水基团的暴露进而影响分子间交联。相同干热处理时间下, 经 pH 偏移处理的凝胶的 G' 值高于对照组, 其中 pH 2 偏移处理组分 G' 值最高。蛋白分子受极端 pH 条件影响, 肽链展开暴露内部基团, 增加分子间交联, 同时干热反应形成的聚集体在凝胶网络中起填充作用, 所以 G' 值增加并在 pH 2 处理组分达到最大值^[17]。蛋白质作为一种两性大分子物质, 当 pH 为 2 时携带大量正电荷, 当与携带负电荷的 CA 处于同一体系中时, 蛋白质多糖的分子间交联增加, G' 进一步增强。

2.3 干热处理时间及 pH 偏移对凝胶水分分布的影响

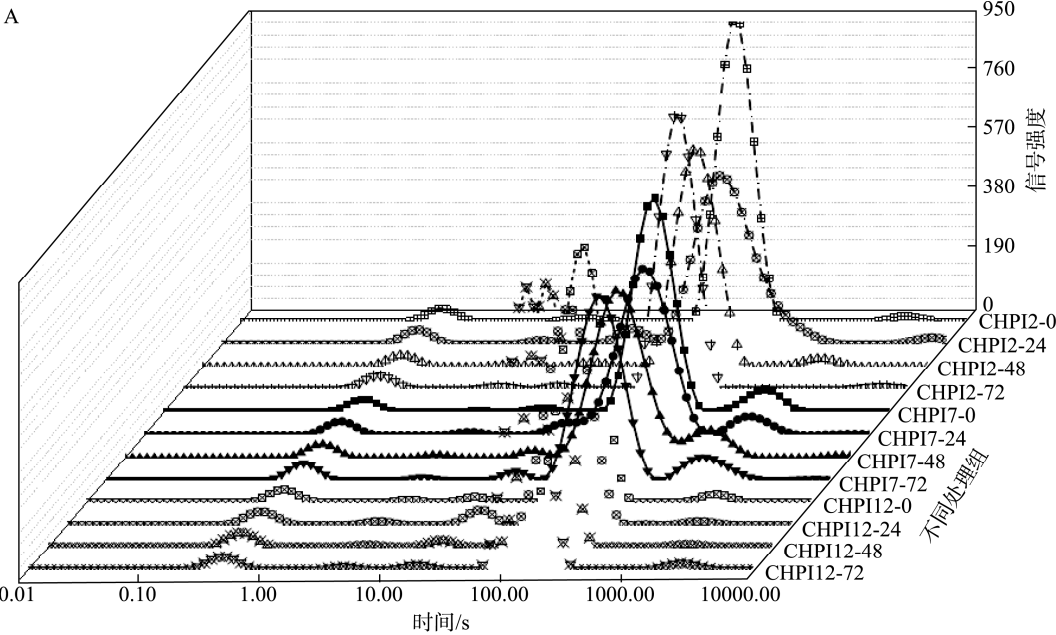
图 2A 显示了 CHPI 凝胶 T_2 弛豫时间的 3 个主要峰值, 即 T_{21} (0.01~10.00 ms)、 T_{22} (10.00~600.00 ms)、 T_{23} (>600.00 ms)^[29]。 T_{21} 表示与蛋白分子紧密结合的水分子; T_{22} 代表被困在凝胶中的水, 这部分水与凝胶性质有关; T_{23} 则表明凝胶中的自由水, 具有较高的流动性。如图 2B 所示, 所有组分均显示较高的 T_{22} 及较低的 T_{23} , 说明凝胶中含有较高的结合水



注: A~C 分别为 pH 7、pH 2、pH 12 偏移处理的 CHPI 的 G' 图像。

图 1 经不同干热处理时间和 pH 偏移处理的 CHPI 的温度扫描曲线

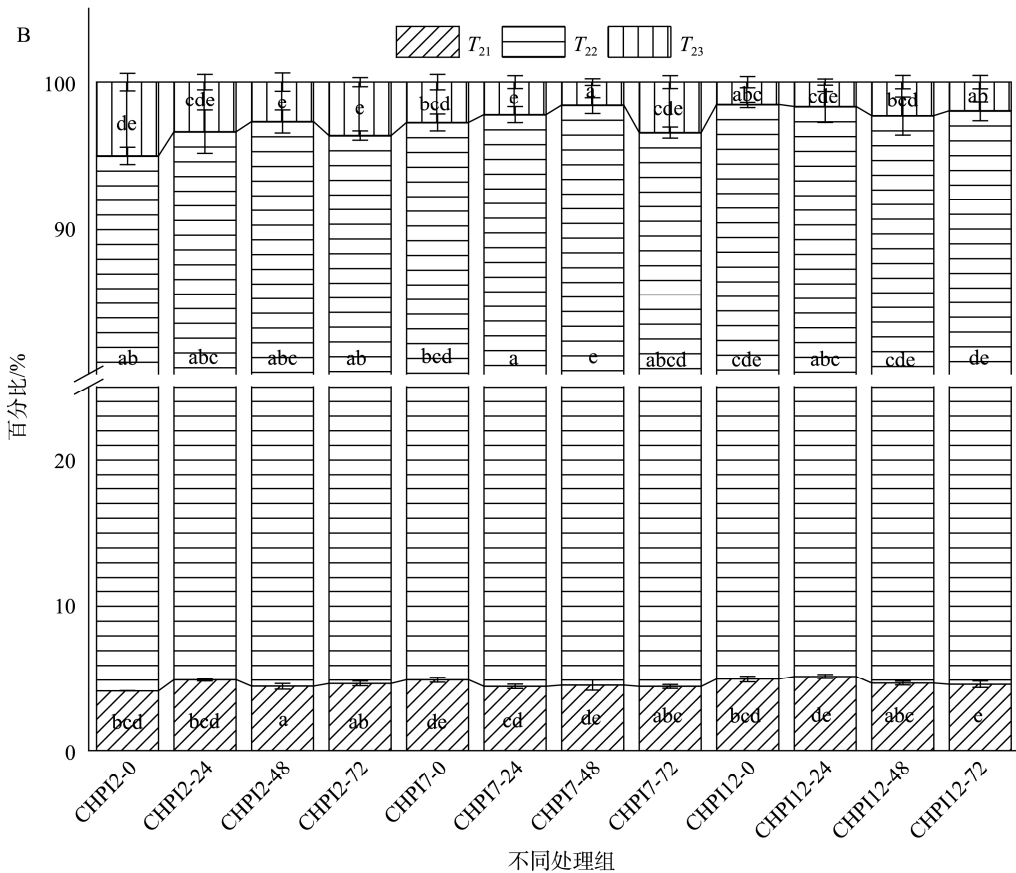
Fig.1 Temperature scan curves of CHPI treated with different dry heat treatment times and pH shifts



注: 不同小写字母表示样品间具有显著差异($P<0.05$), 图 4 同。

图 2 经不同干热处理时间和 pH 偏移处理的 CHPI 的 T_2 图像(A)与 T_2 弛豫时间内 T_{21} 、 T_{22} 、 T_{23} 面积(B)

Fig.2 T_2 images of CHPI treated with different dry heat treatment times and pH shifts (A) and T_{21} , T_{22} , T_{23} area with T_2 relaxation time (B)



注: 不同小写字母表示样品间具有显著差异($P<0.05$), 图 4 同。

图 2(续) 经不同干热处理时间和 pH 偏移处理的 CHPI 的 T_2 图像(A)与 T_2 弛豫时间内 T_{21} 、 T_{22} 、 T_{23} 面积(B)
Fig.2 T_2 images of CHPI treated with different dry heat treatment times and pH shifts (A) and T_{21} , T_{22} , T_{23} area with T_2 relaxation time (B)

和较少的自由水。相同 pH 偏移处理条件下, 随着干热处理时间的增加 CHPI 凝胶中的 T_{22} 弛豫峰面积显著增加, T_{23} 弛豫峰面积降低, 这些结果表明干热处理提高凝胶保留水分子的能力, 促使高流动性组分向低流动性组分转变^[26]。PT₂₁、PT₂₂、PT₂₃ 分别代表弛豫时间对应的峰面积。在相同 pH 偏移条件下, PT₂₂ 随着干热时间的增加而增加, 在 48 h 时达到最大值(92.88%)。这证实了 CHPI 凝胶中蛋白质和水的相互作用增强, 更加致密的凝胶网络可以捕获更多的水。此外, 分子间的氢键增强也是 PT₂₂ 面积增加的原因^[31]。水分分布变化与 WHC 变化结果相同, 但 WHC 在离心力的作用下排出了更多的水, 这表明外力作用下凝胶网络产生的形变影响蛋白与水分子的结合。

2.4 凝胶微观结构分析

凝胶的三维网络结构决定其功能性质^[32], 通过 SEM 对 CHPI 凝胶三维网络进行观察, 如图 3 所示。相同 pH 偏移条件下, 对照组凝胶结构较松散, 干热处理使凝胶结构由松散结构向致密转变(<48 h), 当处理时间为 48 h 时, 凝胶空腔减小, 结构更加紧密规则, 这是蛋白分子之间交联紧密的表现^[33]。处理时间增加至 72 h 时, 凝胶表面粗糙不

均匀并出现较大的孔隙。这与过度的美拉德反应有关, 蛋白的空间位阻效应影响蛋白分子间交联, 对蛋白凝胶化产生负面影响^[34]。

相同干热处理时间下, CHPI-0 凝胶网络由粗凝胶颗粒堆积而成, 凝胶表面不平整, 网络结构粗糙、不均匀, 经 pH 12 偏移的凝胶相较于酸性处理及对照组相比具有更大的孔洞结构以及更不平整的凝胶表面。可能是碱性 pH 偏移处理条件下蛋白快速聚集形成不规则聚集体影响凝胶微观结构。干热处理组分与对照组相比较, pH 偏移处理使凝胶结构更加紧密。通常情况, 当蛋白质直接暴露在极性 pH 条件时, 肽链会过度展开形成大分子的聚集体, 但经干热处理后, 蛋白质多糖形成了接枝物, 这阻碍了大分子聚集体的形成, 使凝胶更加致密^[24]。结果表明, 干热处理 48 h 协同 pH 2 偏移处理的凝胶微观结构最为致密均匀。

2.5 红外光谱和蛋白质二级结构变化

通常采用傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR)观察蛋白的官能团和二级结构的变化, 对酰胺 I 带(1600~1700 cm^{-1})的特征峰进行拟合分

析,如图 4 所示。与对照组相比较,干热处理时间增加及 pH 偏移显著改变了蛋白的二级结构($P<0.05$)。随着处理时间的增加,CHPI 的 β -折叠含量先升高后降低,其中 CHPI2-48 组分拥有最高的 β -折叠含量(40.35%)。相同的 pH 偏移条件下,干热处理时间小于 48 h 时,CHPI2-48 二级结构中的 α -螺旋含量随着干热处理时间的增加逐渐减。糖基化反应过程中 α -螺旋区域内羰基和氨基的缩合形成的氢键可能是 α -螺旋含量降低的原因^[34-35]。由此推断 α -螺旋含量与蛋白和 CA 的接枝程度有关,当接枝度较低时,氢键的形成消耗二级结构中的 α -螺旋;接枝度较高时,反应进入高级阶段,氢键含量下降, α -螺旋含量增加,这与红外光谱中-OH 拉伸变化趋势一致。 β -折叠含量的增加表明干热预处理提高了 CHPI 凝胶的有序结构比例,凝胶硬度的增加可能与这种无序结构向有序结构的转变有关^[13]。

2.6 蛋白三级结构的变化

经 pH 偏移处理和干热预处理的 CHPI 的荧光光谱如

图 5 所示。相同 pH 偏移处理条件下,随着干热处理时间的增加,荧光强度呈依赖性猝灭,这表明芳香族氨基酸所处极性环境逐渐增强^[36]。未经干热预处理(CHPI-0)的荧光强度最高,随着干热预处理时间的增加,CHPI 的荧光强度逐渐降低。这可能是 HPI 与 CA 的共价和非共价相互连接使色氨酸基团被包埋于分子内部,降低荧光强度^[33]。干热处理 48 h 的最大荧光波长(λ_{max})发生红移,表明干热处理时间的增加使蛋白质三级结构展开,色氨酸基团暴露^[37]。干热处理时间高于 48 h 时,最大荧光波长发生轻微蓝移,可能是长时间干热处理使蛋白质结构过度展开,蛋白分子间聚集形成不溶性聚集体或是美拉德产物包裹蛋白使处于极性条件下的色氨酸残基^[35]。在干热处理时间相同时,与对照组相比,经 pH 偏移处理的 CHPI 的最大发射波长红移, pH 偏移时蛋白质三级结构发生了改变,内部发色基团暴露在极性环境中。WANG 等^[16]研究加热和 pH 偏移对汉麻蛋白结构影响时发现, pH 偏移处理减小了蛋白荧光猝灭程度,蛋白致密结构展开,更多发色基团暴露在溶剂中。因此, pH 偏移和干热处理时间对蛋白质的三级结构产生了影响。

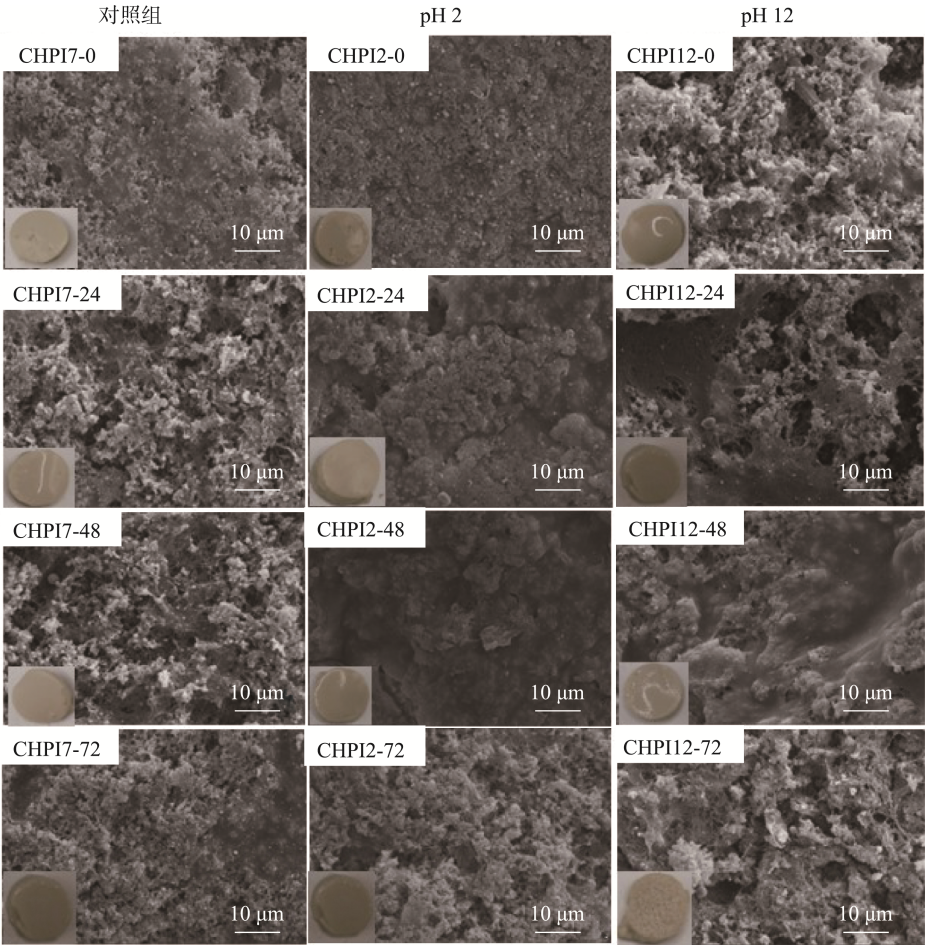


图 3 经不同干热处理时间和 pH 偏移处理的 CHPI 的 SEM 图像(5000×)

Fig.3 SEM images of CHPI treated with different dry heat treatment times and pH shifts (5000×)

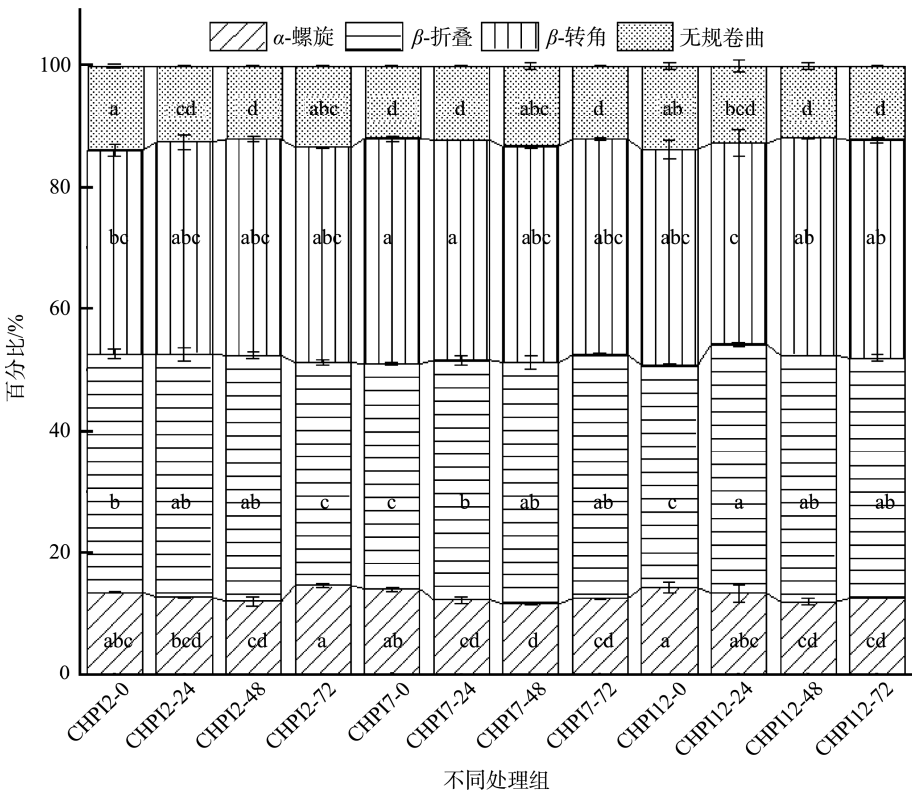


图 4 经不同干热处理时间和 pH 偏移处理的 CHPI 的二级结构变化

Fig.4 Secondary structure changes in CHPI treated with different dry heat treatment times and pH shifts

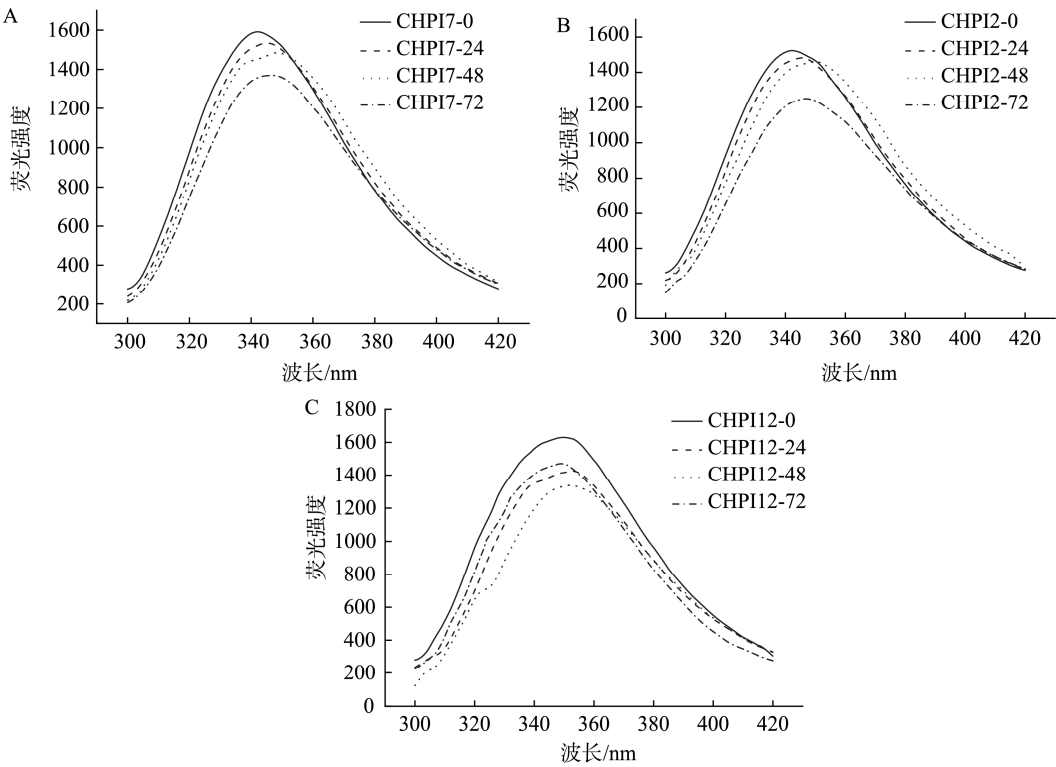


图 5 经不同干热处理时间和 pH 偏移处理的 CHPI 的荧光图谱

Fig.5 Fluorescence spectra of CHPI treated with different dry heat treatment times and pH shifts

3 结 论

本研究结果表明干热处理结合 pH 偏移对 CHPI 复合凝胶性质有着显著的影响($P<0.05$), 在 pH 2 偏移处理时间 48 h 凝胶性质最佳。与对照组相比较, 短时间(处理时间低于 48 h)的干热处理促进凝胶强度并提高凝胶的保水性; 通过对 FTIR 和荧光光谱的结果分析发现, HPI 经干热处理和 pH 偏移后蛋白结构发生改变, 无序蛋白结构向有序结构转变(β -折叠含量增加), 荧光强度降低, 这些变化能够有效防止蛋白分子的过度聚集, 更加利于蛋白的凝胶化, 提高储能模量。干热处理时间超过 48 h 时, 长时间反应生成的美拉德产物包裹在蛋白分子表面影响蛋白间聚集, 一定程度上阻碍疏水基团之间的相互作用, 凝胶性质减弱。此外, SEM 图片显示, 48 h 处理时间内凝胶形成的网络结构及孔隙分布更加均匀致密。以上结果表明, 干热处理和 pH 偏移可有效调控 HPI/CA 接枝物的凝胶特性, 为其在食品工业中的应用提供了理论基础。

参考文献

- KAHRAMAN O, PETERSEN GE, FIELDS C. Physicochemical and functional modifications of hemp protein concentrate by the application of ultrasonication and pH shifting treatments [J]. *Foods*, 2022, 11(4): 587.
- WANG Q, XIONG YL. Processing, nutrition, and functionality of hempseed protein: A review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2019, 18(4): 936–952.
- 毕崇慧, 马雨心, 王莉, 等. 挤压温度对火麻蛋白理化、加工功能特性的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(19): 280–287.
- BI CH, MA XY, WANG L, *et al.* Effect of extrusion temperature on physicochemical and functional properties of hemp protein [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(19): 280–287.
- WANG Q, JIANG J, XIONG YL. High pressure homogenization combined with pH shift treatment: A process to produce physically and oxidatively stable hemp milk [J]. *Food Res Int*, 2018, 106: 487–494.
- YIN S, TANG C, CAO J, *et al.* Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate [J]. *Food Chem*, 2008, 106(3): 1004–1013.
- WANG X, TANG C, CHEN L, *et al.* Characterization and antioxidant properties of hemp protein hydrolysates obtained with Neutrase® [J]. *Food Technol Biotechnol*, 2009, 47(4): 428–434.
- TEH S, BEKHIT A, CARNE A, *et al.* Antioxidant and ACE-inhibitory activities of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein hydrolysates produced by the proteases AFP, HT, Pro-G, actinidin and zingibain [J]. *Food Chem*, 2016, 203: 199–206.
- XU Y, ZHAO Y, WEI Z, *et al.* Modification of myofibrillar protein via glycation: Physicochemical characterization, rheological behavior and solubility property [J]. *Food Hydrocolloid*, 2020, 105: 105852.
- PENG Z, ZHANG Y, WANG H, *et al.* Effects of arginine-glucose Maillard reaction products on the physicochemical and gel properties of chicken myofibrillar protein [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2021, 152: 112244.
- LIU F, MA C, GAO Y, *et al.* Food-grade covalent complexes and their application as nutraceutical delivery systems: A review [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2017, 16(1): 76–95.
- CAO C, FENG Y, KONG B, *et al.* Textural and gel properties of frankfurters as influenced by various κ -carrageenan incorporation methods [J]. *Meat Sci*, 2021, 176: 108483.
- LU Z, LEE P-R, YANG H. Kappa-carrageenan improves the gelation and structures of soy protein isolate through the formation of hydrogen bonding and electrostatic interactions [J]. *Food Hydrocolloid*, 2023, 140: 108585.
- ZHANG Q, WU D, LUO W, *et al.* Molecular structure and functional properties of glycinin conjugated to kappa-carrageenan and guar gum: A comparative study [J]. *Food Chem*, 2022, 386: 132810.
- FIGUEROA-GONZÁLEZ JJ, LOBATO-CALLEROS C, VERNON-CARTER EJ, *et al.* Modifying the structure, physicochemical properties, and foaming ability of amaranth protein by dual pH-shifting and ultrasound treatments [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2022, 153: 112561.
- WANG Y, WANG S, LI R, *et al.* Effects of combined treatment with ultrasound and pH shifting on foaming properties of chickpea protein isolate [J]. *Food Hydrocolloid*, 2022, 124: 107351.
- WANG Q, JIN Y, XIONG YL. Heating-aided pH shifting modifies hemp seed protein structure, cross-linking, and emulsifying properties [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(41): 10827–10834.
- LI J, WU M, WANG Y, *et al.* Effect of pH-shifting treatment on structural and heat induced gel properties of peanut protein isolate [J]. *Food Chem*, 2020, 325: 126921.
- SUN L, LIN Y, LIU W, *et al.* Effect of pH shifting on conformation and gelation properties of myosin from skeletal muscle of blue round scads (*Decapterus maruadsi*) [J]. *Food Hydrocolloid*, 2019, 93: 137–145.
- HADNADEV M, DAPČEVIĆ-HADNADEV T, LAZARIDOU A, *et al.* Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques. Part I. physicochemical properties [J]. *Food Hydrocolloid*, 2018, 79: 526–533.
- MA Y, ZANG J, QING M, *et al.* Glycosylation of egg white protein with maltodextrin in the dry state: Changes in structural and gel properties [J]. *Food Chem*, 2022, 401: 134113.
- ZHAO C, YIN H, YAN J, *et al.* Structure and acid-induced gelation properties of soy protein isolate–maltodextrin glycation conjugates with ultrasonic pretreatment [J]. *Food Hydrocolloid*, 2021, 112: 106278.
- MA Z, LI L, WU C, *et al.* Effects of combined enzymatic and ultrasonic treatments on the structure and gel properties of soybean protein isolate [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2022, 158: 113123.
- CUI Q, LIU J, WANG G, *et al.* Effect of freeze-thaw treatment on the structure and texture of soy protein-dextran conjugate gels crosslinked by transglutaminase [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2022, 153: 112443.
- WU Y, ZHANG Y, DUAN W, *et al.* Ball-milling is an effective pretreatment of glycosylation modified the foaming and gel properties of egg white protein [J]. *J Food Eng*, 2022, 319: 110908.

- [25] LIU H, ZHU X, JIANG Y, *et al.* Physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate (WPI)-polydextrose conjugates prepared via Maillard reaction [J]. *Int J Food Sci Technol*, 2021, 56(8): 3784–3794.
- [26] MA Y, SHAN A, WANG R, *et al.* Characterization of egg white powder gel structure and its relationship with gel properties influenced by pretreatment with dry heat [J]. *Food Hydrocolloid*, 2021, 110: 106149.
- [27] YANG X, LI A, LI D, *et al.* Applications of mixed polysaccharide-protein systems in fabricating multi-structures of binary food gels—A review [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2021, 109: 197–210.
- [28] LEI YC, ZHAO X, LI D, *et al.* Effects of kappa-carrageenan and guar gum on the rheological properties and microstructure of phycocyanin gel [J]. *Foods*, 2022, 11(5): 734.
- [29] SHENG L, LIU Q, DONG W, *et al.* Effect of high intensity ultrasound assisted glycosylation on the gel properties of ovalbumin: Texture, rheology, water state and microstructure [J]. *Food Chem*, 2022, 372: 131215.
- [30] YANG Q, WANG YR, LI-SHA YJ, *et al.* Physicochemical, structural and gelation properties of arachin-basil seed gum composite gels: Effects of salt types and concentrations [J]. *Food Hydrocolloid*, 2021, 113: 106545.
- [31] CHENG Y, WANG J, CHI Y, *et al.* Effect of dry heating on egg white powder influencing water mobility and intermolecular interactions of its gels [J]. *J Sci Food Agric*, 2021, 101(2): 433–440.
- [32] CHEN X, CHEN CG, ZHOU YZ, *et al.* Effects of high pressure processing on the thermal gelling properties of chicken breast myosin containing κ -carrageenan [J]. *Food Hydrocolloid*, 2014, 40: 262–272.
- [33] WOODWARD SA, COTTERILL OJ. Texture and microstructure of heat-formed egg white gels [J]. *J Food Sci*, 1986, 51(2): 333–339.
- [34] MENG Y, ZHAO X, JIANG Y, *et al.* Effect of Maillard reaction conditions on the gelation and thermal stability of whey protein isolate/D-tagatose conjugates [J]. *Food Chem*, 2023, 405: 134928.
- [35] MA Z, CHI Y, ZHANG H, *et al.* Inhibiting effect of dry heat on the heat-induced aggregation of egg white protein [J]. *Food Chem*, 2022, 387: 132850.
- [36] WANG Y, WANG S, LI R, *et al.* Effects of combined treatment with ultrasound and pH shifting on foaming properties of chickpea protein isolate [J]. *Food Hydrocolloid*, 2022, 124: 107351.
- [37] 朱秀清, 邓筱琪, 李良, 等. 热诱导-自组装大豆蛋白凝胶结构与功能特性构效关系研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(12): 283–292.
- ZHU XQ, DENG XQ, LI L, *et al.* Structure-activity relationship between structure and functional properties of heat-induced self-assembled soybean protein gels [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(12): 283–292.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

作者简介



吕铭守, 博士, 讲师, 主要研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。

E-mail: lumingshou@hrbcu.edu.cn



朱秀清, 教授, 主要研究方向为蛋白质分子化学及大豆深加工。

E-mail: xqzhuwang@163.com