

# 鹰嘴豆分离蛋白的乳化性及结构关系

张 涛 江 波 王 璋

(江南大学食品科学与安全教育部重点实验室, 无锡 214036)

**摘 要** 研究了蛋白质浓度、加油量、pH 及离子强度对鹰嘴豆分离蛋白的乳化活力及乳化稳定性的影响。在蛋白质的等电点 pH 5.0 时, 乳化活力最小, 乳化稳定性最高, 离子强度增加, 乳化活力呈现先降后升, 而乳化稳定性表现为先升后降的趋势, 当离子强度为 0.2 时, 乳化活力最低而乳化稳定性最高。为了解释这一现象, 研究了 pH 及离子强度对蛋白质的二级结构及表面疏水性的影响。结果表明, 蛋白质的二级结构及表面疏水性随溶液的 pH 及离子强度的变化而变化, 在蛋白质的等电点或离子强度较低(如 0.1)时, 蛋白质的二级结构主要以  $\alpha$ -螺旋形式存在, 且当离子强度为 0.1 时, 蛋白质的表面疏水性最低。

**关键词** 鹰嘴豆, 分离蛋白, 乳化, 表面疏水性, 离子强度, 二级结构

蛋白质由于它们的表面特性而成为食品乳状液中的一种重要组分, 蛋白质形成及稳定乳状液的能力主要依赖于 2 个因素 (1) 通过吸附至表面而降低表面张力 (2) 通过静电、空间作用力等形成高粘弹性保护膜, 阻止油滴相互聚集, 稳定乳状液<sup>[1]</sup>。Lucassen-Reynders 认为: 蛋白质作为乳化剂的重要功能性不在于其平衡表面张力的能力, 而是由于它们的表面动态流变学特性, 增加了表面的抗缠结能力<sup>[2]</sup>。而事实上蛋白质呈现这些性质是蛋白质分子大小、带电情况、表面疏水性及分子柔性间的一个平衡<sup>[3]</sup>。

鹰嘴豆是世界第二大消费豆类, 产量居世界豆类第三<sup>[4-8]</sup>, 它作为植物蛋白质的重要来源, 在分离蛋白质的制备、营养价值、功能性质及分离纯化方面有部分报道<sup>[9-11]</sup>, 但各种因素如蛋白质浓度、pH、离子强度等对蛋白质的乳化性及其结构的影响研究尚未见报道。为此作者较为系统地研究了各种条件对鹰嘴豆分离蛋白质的乳化性及其结构的影响, 为鹰嘴豆分离蛋白质的应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

鹰嘴豆(新疆市场购买), 金龙鱼大豆色拉油, 其他所用化学试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器和设备

ULTYA-RURRAX T25 高速分散器(德国 FANKE&KUKEL 公司制), Hitachi 650-60 荧光分光光度计(日本, Hitachi 公司), JASCO J-715 圆二色谱仪(日本, Spectroscopic 公司), GL-20B 型冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂), 800 型台式离心机(上海手术器械厂), 722 分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 鹰嘴豆分离蛋白的制备

鹰嘴豆浸泡过夜, 手工脱皮, 60℃干燥后粉碎成鹰嘴豆粉。鹰嘴豆粉过 80 目筛, 正己烷脱脂, 豆粉: 正己烷为 1 g: 10 mL, 室温连续搅拌 60 min, 豆粉自然沉降与上层正己烷分离, 倾出正己烷进行回收, 豆粉再重复上述操作 2 次。最后鹰嘴豆粉置通风橱中室温干燥 12 h, 将处理好的脱脂豆粉装袋置 4℃冰箱中保存。

脱脂鹰嘴豆粉与水 1:10(g:mL)混合, 0.5 mol/L NaOH 调 pH 8.3 搅拌提取 1 h, 3 000 r/min 离心 20 min, 沉淀再按固液比为 1:5(g:mL)提取 2 次, 将 3 次上清液混合, 上清液用 0.5 mol/L HCl 调 pH 至等电点 pH 5.0 沉淀蛋

第一作者: 博士研究生(江波教授为通讯作者)。

收稿时间 2004-09-10, 改回时间 2004-10-18

白,去离子水洗涤沉淀3次,0.5 mol/L NaOH调pH至7.0,搅拌使沉淀复溶后,10 MPa均质并喷雾干燥即为鹰嘴豆分离蛋白。

1.3.2 鹰嘴豆分离蛋白的成分检测

水分测定:GB 5497—1985,105℃恒重法;灰分测定:GB 5505—1985,550℃灼烧法;蛋白质含量测定:GB 5511—1985,微量凯氏定氮法。

1.3.3 乳化活力及乳化稳定性的测定

浊度法<sup>[12,13]</sup>。

乳化活力:取一定量分离蛋白溶于250 mL水或一定离子强度的NaCl(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L)溶液中,调至所需pH值,量取一定体积大豆色拉油于蛋白质溶液中,高速分散器13 500 r/min分散1 min后,立即取250 μL乳状液用质量分数0.1% SDS稀释至25 mL后,用分光光度计在500 nm检测其吸光度A,其浊度为 $T_1$ 。浊度 $T=2.303 A/L$ ,L为光路长度。

乳化稳定性:乳化后的乳状液同时取10 mL于具塞试管中,于25℃放置1 h后再次检测浊度 $T_2$ 。乳化稳定性= $T_2/T_1$ 。

1.3.4 二级结构<sup>[16]</sup>

蛋白质样品溶于0.01 mol/L不同pH(pH 7.0 磷酸盐缓冲液,pH 3.0、5.0 柠檬酸-柠檬酸盐缓冲液,pH 9.0 硼酸-硼酸盐缓冲液)或不同离子强度(用NaCl调节,NaCl浓度0.1、0.3、0.6、1.0 mol/L)的缓液中,10 000×g离心15 min,并用相同pH及离子强度的缓冲液稀释至400 μg/mL。圆二色谱扫描波长范围:190~250 nm,扫描速率:100 nm/min,光程:1 mm,灵敏度:20 mdeg,扫描平行次数:3次。

1.3.5 表面疏水性

参考文献<sup>[15]</sup>并略有修改。蛋白质样品溶于0.01 mol/L不同pH(pH 7.0 磷酸盐缓冲液,pH 3.0、5.0 柠檬酸-柠檬酸盐缓冲液,pH 9.0 硼酸-硼酸盐缓冲液)或不同离子强度(用NaCl调节,NaCl浓度0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mol/L)的缓液中,10 000×g离心15 min,并用相同pH及离子强度的缓冲液稀释,使样

品浓度在0.15~0.60 mg/mL之间。激发波长为390 nm,发射波长470 nm。取不同浓度的样品2 mL,分别测定样品的荧光强度( $F_{10}$ )和样品加入10 μL的ANS溶液(8 mmol/L,pH 7.0、0.01 mol/L磷酸盐缓冲液配制)后的荧光强度( $F_1'$ )。 $F_1'$ 与 $F_{10}$ 的差值记为 $F_1$ ,以蛋白质浓度为横坐标, $F_1$ 为纵坐标作图,曲线初始段的斜率即为蛋白质分子的表面疏水性指数 $S_0$ 。

2 结果与讨论

2.1 鹰嘴豆分离蛋白化学成分测定

检测了鹰嘴豆分离蛋白各组分的含量,结果见表1所示。该分离蛋白中蛋白质含量为91.53%,脂肪及灰份的含量分别为0.87%和1.5%。

表1 鹰嘴豆分离蛋白的化学成分 %

水分	蛋白质	脂肪	灰分	其他
4.01	91.53	0.87	1.5	2.09

2.2 鹰嘴豆分离蛋白的乳化活力及乳化稳定性

2.2.1 蛋白质浓度及加油量对乳化活力及乳化稳定性的影响

分别取0.5、1、2、3 g分离蛋白溶于250 mL水中,调pH至7.0,分别加入大豆色拉油10、20、30 mL,按1.3.4的方法测定分离蛋白浓度及加油量对乳化活力及乳化稳定性,结果见图1所示。

由图1(a)可以看出,当加油量为10 mL时,随蛋白质添加量的增加,乳化活力基本不变;当加油量增加到20、30 mL时,随蛋白质添加量的增加,乳化活力增大;同一蛋白浓度,随加油量增加,乳化活力增大。蛋白质是两亲物质,可自发地迁移至油-水界面,降低表面张力,形成稳定的乳状液。乳化活力是指单位质量的蛋白质所产生的界面面积,因而当蛋白质足以吸附至油-水界面时,随着加油量的增加所形成的界面面积增大,因而乳化活力增大;当油含量相同时,随蛋白质含量的增加,蛋白质吸附至界

面的推动力增大,所形成的乳状液油滴粒径减小,界面面积增大,就有更多的蛋白质吸附在油-水界面,因而乳化活力增大,但当油含量较低、蛋白质过量时,此时再继续增加蛋白质乳化活力基本不变。

由图 1(b)可以看出,在同一蛋白质含量,随加油量的增加乳化稳定性降低;当加油量为

10、20 mL,随蛋白质含量增加乳化稳定性基本不变;当加油量为 30 mL 时,随蛋白质含量增加乳化稳定性升高。这主要是由于当油含量高而蛋白质含量较低时,形成的保护膜较薄,保护膜易于去稳定,导致油滴相互聚集、上浮,从而乳状液失去稳定性。

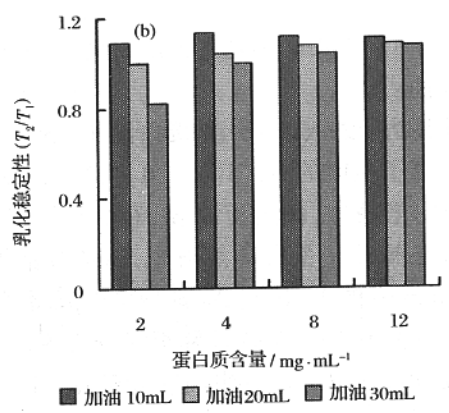
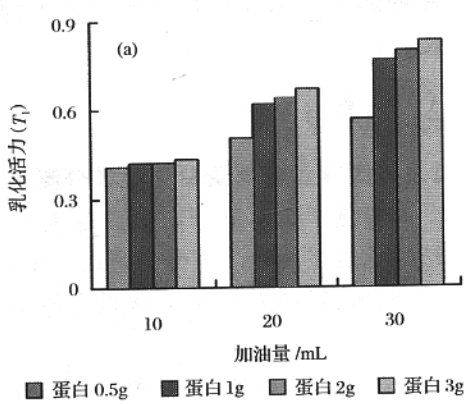


图 1 蛋白质含量、加油量对鹰嘴豆分离蛋白乳化活力及乳化稳定性的影响

2.2.2 pH 对乳化活力及乳化稳定性的影响

分别取 0.5 g 鹰嘴豆分离蛋白,测定了不同 pH 值时的乳化活力及乳化稳定性。鹰嘴豆分离蛋白的乳化活力及乳化稳定性与 pH 的关系见图 2 所示。在 pH 5.0 即该蛋白质的等电点时,乳化活力最小而乳化稳定性最高。这是因为在蛋白质的等电点,表面静电电荷为零,蛋白质的溶解性最差,吸附在油-水界面的蛋白质最少,形成的乳状液界面面积最小,因而乳化活力在该点时最低,而在静置的过程中,由于不存在静电排斥作用,蛋白质进一步在油-水界面重排乳

化,同时在油-水界面堆积促进了高弹性膜的形成,阻止油滴聚集上浮从而提高了乳状液的稳定性,故 1 h 后测得的浊度大大超过刚刚乳化后的浊度。

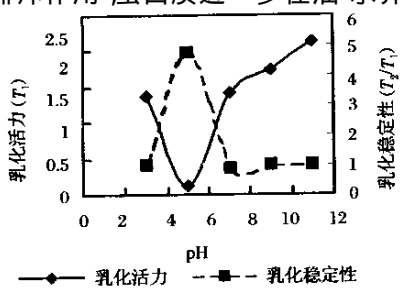


图 2 pH 对鹰嘴豆蛋白乳化活力及乳化稳定性的影响

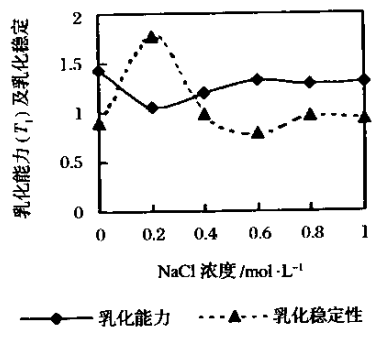


图 3 离子强度对乳化活力及乳化稳定性的影响

2.2.3 离子强度对乳化活力及乳化稳定性的影响

以不同浓度的 NaCl 溶液测定了 0.5 g 蛋白质在 pH 7.0 时,离子强度对鹰嘴豆分离蛋白乳化活力及乳化稳定性的影响。由图 3 可知,随离子强度增加,乳化活力呈先下降后升高的趋势,而乳化稳定性则相反,先升高后降低,但

总的来说乳化稳定性较好,放置前后的浊度基本不变;当离子强度在 0.2 时,乳化活力最低而乳化稳定性最高。这一现象可由盐浓度对蛋白质表面疏水性及结构的影响加以解释,如表 3 及图 4 所示。

2.3 鹰嘴豆分离蛋白的结构特征

2.3.1 pH 对二级结构的影响

由表 2 可知,蛋白质的二级结构随 pH 的变化而变化。蛋白质等电点时,在消耗  $\beta$ -折叠、转角及无规卷曲的基础上形成高含量的  $\alpha$ -螺旋结构,而在等电点的两侧无规卷曲含量增加,蛋白质分子柔性增大,因而乳化活力较高,而在等电点时的乳化活力最低。但当蛋白质处于等电点时,由于在油-水界面形成刚性的保护膜,因而乳化稳定性较高。

表 2 pH 对鹰嘴豆分离蛋白二级结构的影响

pH	3	5	7	9
$\alpha$ -螺旋/%	16.4	80.3	36.2	42.2
$\beta$ -折叠/%	44.4	0	28.4	21.1
转角/%	12.7	0	10.3	0
无规卷曲/%	26.5	19.7	25.2	36.8

2.3.2 离子强度对二级结构的影响

由表 3 可知,离子强度对鹰嘴豆分离蛋白质的结构影响较大。离子强度在 0.1 时, $\alpha$ -螺旋含量较高达 75.1%,其他构象含量大大降低。这可能是在低盐浓度时,一方面是溶液中的  $\text{Na}^+$  通过离子键吸附在蛋白质表面,中和蛋白质表面的负电荷,使蛋白质的亲水性降低疏水性增强,造成蛋白质构象发生变化,与蛋白质处于等电点时的二级结构相似,其有序结构  $\alpha$ -螺旋含量大幅度增加而无序结构含量降低,形成更加刚性的结构,因而蛋白质的溶解性降低,造成乳化活力降低。而当离子强度在 0.1 两侧时,更多的  $\text{Na}^+$  吸附至蛋白质表面,蛋白质的亲水性增加,蛋白质分子溶剂化、展开,至使  $\alpha$ -

表 3 离子强度对鹰嘴豆分离蛋白二级结构的影响

$\text{NaCl}/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0	0.1	0.3	0.6	1.0
$\alpha$ -螺旋/%	36.2	75.1	28	29.4	36.4
$\beta$ -折叠/%	28.4	0	44.4	19.4	0
转角/%	10.3	0	15.7	26.1	34.3
无规卷曲/%	25.2	24.9	11.9	25	29.3

螺旋含量降低而  $\beta$ -折叠、转角及无规卷曲含量,分子柔性增大,因而乳化活力增加。

2.3.3 离子强度对表面疏水性的影响

离子强度对鹰嘴豆分离蛋白质的表面疏水性的影响(见图 4)进一步说明,当该蛋白质处于较低离子强度时, $\text{Na}^+$  对蛋白质表面电荷的屏蔽作用致使蛋白质的结构发生变化。由图 4 可以看出,表面疏水性在离子强度 0.1 两侧,表面疏水性增大,而在 0.1 时最低。这主要是由于静电相互作用降低而疏水相互作用占据优势地位,使得疏水集团进一步包埋在分子内部,从而形成更加有序的蛋白结构。所以当蛋白质处于较低离子强度 0.1、0.2 时,乳化活力较低而乳化稳定性较高。

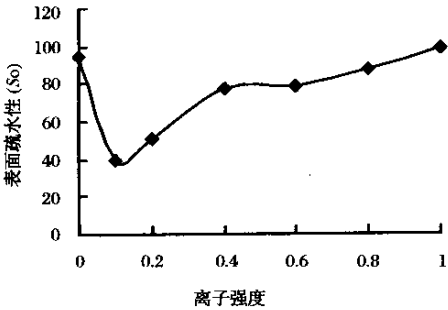


图 4 离子强度对表面疏水性的影响

3 结 论

pH 及离子强度对蛋白质的二级结构及表面疏水性的影响研究表明,由于 pH 及离子强度的不同造成蛋白质表面带电情况及相互作用力发生变化,使得蛋白质在等电点及离子强度较低时呈现较高含量的  $\alpha$ -螺旋结构,蛋白质的表面疏水性在离子强度为 0.1 时最低,因而蛋白质在等电点及溶液离子强度较低时,乳化活力较低而乳化稳定较高。

参 考 文 献

1 Mitidieri F E, Wagner F R. Coalescence of O/W emulsions Stabilized by whey and isolate soybean proteins : influence of thermal denaturation , salt addition and competitive interfacial adsorption [ J ]. Food Res

- inter. 2002, 35 : 547~557
- 2 Lucassen-Reynders E H. Interfacial viscoelasticity in emulsions and foams[ J ]. Food Struc , 1993 , 12 : 1~12
  - 3 Turgeon S L , Gauthier S F , Mollé D et al. Interfacial properties of tryptic peptides of  $\beta$ -lactoglobulin [ J ]. J of Agric and Food Chem , 1992 , 40 : 669~675
  - 4 Poltronieri F , Aréas J A G , Colli C. Extrusion and iron bioavailability in chickpea( *Cicer arietinum* L. ) [ J ]. Food Chem , 2000 , 70 : 175~178
  - 5 Clemente A , Vioque J , Sánchez-Vioque R. Effect of processing on water adsorption and softening kinetics in chickpea( *Cicer arietinum* L. ) seeds [ J ]. J of the Sci of Food and Agric , 1998 , 78 : 169~174
  - 6 Gil J , Nadal S. Variability of some physico-chemical characters in desi and kabuli chickpea types [ J ]. J of the Sci of Food and Agric , 1996 , 71 : 179~184
  - 7 Singh U , Subrahmanyam N. Cooking quality and nutritional attributes of some newly developed cultivars of chickpea( *cicer arietinum* L. ) [ J ]. J of the Sci of Food and Agric , 1991 , 55 : 37~46
  - 8 张涛江波,王璋.鹰嘴豆营养价值及其应用[ J ].粮食与油脂, 2004, 7 : 18~20
  - 9 Paredes-López O , Ordórica-Falomir C. Chickpea protein isolates : physicochemical , functional and nutritional characterization [ J ]. J of Food Sci , 1991 , 56 ( 3 ) : 726~729
  - 10 Sánchez-Vioque R , Clement A , Vioque J et al. Protein isolates from chickpea ( *Cicer arietinum* L. ) : chemical composition , functional properties and protein characterization [ J ]. Food Chem , 1999 , 64 : 237~243
  - 11 Ganesh K K , Venkataraman L V. Chickpea seed proteins : isolation and characterization of 10.3S protein [ J ]. J of Agric and Food Chem , 1980 , 28 : 524~529
  - 12 Kevin N P , Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins : evaluation of a turbidimetric technique [ J ]. Journal of Agric and Food Chem , 1978 , 26 ( 3 ) : 716~723
  - 13 钟芳.方便(即冲即凝)豆腐花的制备及大豆蛋白速凝机理研究[ D ].江南大学博士学位论文, 2001
  - 14 Greenfield N J. Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data [ J ]. Anal Biochem , 1996 , 235 : 1~10
  - 15 Kato A , Nakai S. Hydrophobicity Determined by Fluorescence Probe Methods and Its Correlation with Properties of Proteins [ J ]. Biochim Biophys Acta , 1980 , 642 : 13~20

## Relationship between Structure and Emulsifying Properties of Chickpea Protein Isolates

Zhang Tao   Jiang Bo   Wang Zhang

( The Key Lab of Food Science and Safety , Ministry of Education , Southern Yangtze University , Wuxi , 214036 )

**ABSTRACT** The effects of protein 's concentration , oil volume , pH and ionic strengths on emulsifying activity ( EA ) and emulsion stability ( ES ) of the Chickpea protein isolates were studied. At the protein 's isoelectric point ( pI 5.0 ) , the EA was the lowest while the ES was at the highest level. Under different ionic strengths , the change of the EA showed a pattern of decreasing first and then followed by increasing , while that of the ES was opposite. At the ionic strength 0.2 , the EA was the lowest , but the ES was the highest. In order to elucidate it , the effects of pH and ionic strengths on the protein 's secondary structure and the surface hydrophobicity were investigated. The results showed that they were changing with the pH and ionic strengths. At the protein 's pI or the lower ionic strength ( such as 0.1 ) ,  $\alpha$ -helix was the major configuration. The surface hydrophobicity was the lowest at the ionic strength 0.1.

**Key words** chickpea , protein isolates , emulsifying , surface hydrophobicity , ionic strength , secondary structure