

基于运动食品的蛋白-磷脂聚集体及其乳液的液滴特性

周洋¹, 管军军^{2*}, 路新开², 冀旭阳²

(¹河南工业大学体育学院 郑州 450001

²河南工业大学生物工程学院 郑州 450001

摘要 以酶解大豆蛋白与磷脂为主要材料,构建运动营养食品体系。通过电导、电位、粒径、SDS-PAGE 电泳、ISO-DALT 双向电泳及显微观察,对其形成聚集体及其复合乳液液滴特性与蛋白亚基的变化进行研究。结果表明:胃蛋白酶对大豆蛋白只能有限降解,酶解 30 min 后蛋白亚基变化不显著;当酶解大豆蛋白(酶解 30 min)与磷脂的质量比为 5:1 时,其聚集体具有较好的液滴特性($P<0.05$)。以该比例制备聚集体作为壁材,当油相和水相的比例为 1:3 时,可形成较为理想的水包油型乳化体系($P<0.05$)。对比酶解蛋白乳液,复合乳液液滴有较高的平均粒径及电位($P<0.05$)。在体外胃消化过程中,复合乳液的液滴特性(电导率、电位及平均粒径)明显高于酶解蛋白乳液($P<0.05$),其蛋白降解速度要大于酶解蛋白乳液,且除 β 亚基外其余亚基均能被降解。由此,推导复合乳液在体外胃消化中存在液滴"自组装"过程,这为大豆蛋白类食品乳化体系在运动营养食品中的应用以及阐明其消化吸收机理提供参考。

关键词 酶解大豆蛋白;磷脂;聚集体;复合乳液;液滴

文章编号 1009-7848(2022)09-0103-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.09.011

大豆蛋白与磷脂是大豆制油后的主要副产品^[1]。大豆蛋白按其蛋白含量主要分为大豆分离蛋白(SPI,蛋白>90%干基)与大豆浓缩蛋白(SPC,蛋白>70%干基)^[2]。SPI 蛋白含量高且基本接近纯蛋白,可作为研究大豆蛋白功能特性的主要原料;SPI 由 2S、7S、11S 和 15S 蛋白组成,其中 7S(β -伴球蛋白)和 11S(大豆球蛋白)为主要成分,占总蛋白的 80%左右^[3]。7S 蛋白由 α 亚基、 α' 亚基和 β 亚基通过疏水键形成三聚体,11S 则由酸性亚基 A 和碱性亚基 B 组成,通过双硫键和疏水作用形成六聚体结构的球蛋白^[4-5]。大豆中磷脂含量高,总磷脂中主要磷脂组分为磷脂酰胆碱(卵磷脂 PC)、磷脂酰乙醇胺(脑磷脂 PE)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酸(PA)、磷脂酰甘油(PG)等^[6]。磷脂是大脑和神经系统所必需成分,也是脂蛋白的主要成分,在脂类的转运中起重要作用。

大豆蛋白是重要的植物蛋白,具有良好的水中分散性与两亲性(亲水/亲油),广泛用于食品加工中^[7]。大豆蛋白包含人体全部必需氨基酸,可满足人体对蛋白质的需求,具有保健作用^[8]。其酶解

产品/大豆肽是一种较好的运动营养食品^[9-10],为体育运者快速提供营养补充。磷脂是细胞膜的基本成分,有很高的营养与医学价值,可改善运动性疲劳,稳定紧张情绪^[11-12]。磷脂也是两性物质,可作为天然的表面活性剂,形成乳液,然而,其乳化稳定性不如蛋白。研究发现磷脂与大豆蛋白形成复合乳液,可改善蛋白的乳化活性,同时增加磷脂的乳化稳定性^[13],且磷脂的结合对改善大豆蛋白功能性有重要作用^[14-15]。

关于磷脂与大豆蛋白形成的复合乳液中蛋白-磷脂聚集体及其复合乳液的液滴特性鲜有报道。本研究以酶解大豆蛋白与磷脂为主要原料,构建运动营养食品体系,研究其形成聚集体及其复合乳液,以及静态消化模型中复合乳液液滴特性与蛋白亚基的变化,为扩大这种复合乳液在运动营养食品中的应用,分析其消化机理奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

黄豆,郑州丹尼斯超市;大豆油,益海嘉里食品营销有限公司;粉末磷脂,丙酮不溶物含量 $\geq 98\%$,郑州四维科技有限公司;胃蛋白酶,10 000 NFU/mg,生工生物工程(上海)股份有限公司;化学试剂均为分析纯,天津市科密欧化学试剂有限

收稿日期:2021-09-07

基金项目:国家自然科学基金项目(31371782)

作者简介:周洋(1979—),男,硕士,讲师

通信作者:管军军 E-mail: junjunguan@163.com

公司等。

1.2 主要仪器

FA25 高剪切分散乳化机,德国 FLUKO 公司;SHA-C 数显水浴恒温振荡器,金坛华峰仪器有限公司;722N 可见分光光度计,上海精科实业有限公司;ZS90 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪,英国马尔文仪器有限公司;FD-1 型冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;85-2 型恒温磁力搅拌器,河南智城科技发展有限公司;JP-100A-2 高速多功能粉碎机,永康市久品工贸有限公司;DDS-11D 雷磁电导率仪,上海净信实业发展有限公司;BH200 生物显微镜,舜宇光学科技集团有限公司。

1.3 酶解大豆蛋白(ESP)制备

大豆分离蛋白(SPI)的制备:根据参考文献[16-17]所述方法,黄豆除杂粉碎过 60 目筛后石油醚脱脂,加 10 倍蒸馏水,搅拌 1 h,2 mol/L NaOH 调 pH 值至 8.0,50 °C 水浴搅拌 1 h,5 000 r/min 离心 35 min,取上清液,2 mol/L HCl 调 pH 值至 4.8,冰箱 4 °C 冷藏 8 h,5 000 r/min 离心 30 min,取沉淀冷冻干燥后即得到大豆分离蛋白。

ESP 制备:根据参考文献[18]适当改进,将 SPI 与蒸馏水按质量比 1:50 于锥形瓶中搅拌溶解,2 mol/L HCl 调 pH 值至 2,37 °C 水浴 30 min,加入胃蛋白酶(酶:SPI=1:1 000,质量比),进行酶解反应,茚三酮比色法(570 nm)监测反应进度。60 °C 水浴 30 min 结束酶解反应,冷冻干燥后即得到 ESP 样品。

1.4 酶解大豆蛋白-磷脂聚集体的制备

根据文献 [19-20] 方法加以改进,ESP:蒸馏水=1:50 (质量比)于烧杯中溶解,2 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0,一定质量比加入磷脂,高剪切分散乳化机(20 000 r/min)均质 3 min,形成 ESP-磷脂聚集体。

1.5 ESP-磷脂复合乳液及 ESP 乳液的制备

ESP-磷脂复合乳液:取一定量的 ESP 溶于蒸馏水中,2 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0,磷脂加热溶解于大豆油中,然后将三者混合,高剪切分散乳化机(20 000 r/min)均质 3 min。

ESP 乳液:取一定量的 ESP 溶于蒸馏水中,2 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0,加入大豆油,高剪切分散乳化机(20 000 r/min)均质 3 min。

1.6 胃消化模型的建立

参考文献[21-22]建立胃消化模型,取 200 mL 乳液、0.16 g 胃蛋白酶及 400 mL 胃液母液(组成:9.2 mL KCl 89.6 g/L,6.5 mL 质量分数 37%的 HCl,3.0 mL NaH₂PO₄ 88.8 g/L,10 mL NH₄Cl 30.6 g/L,15.7 mL NaCl 175.3 g/L,18 mL CaCl₂ 22.7 g/L,10 mL 葡萄糖 65 g/L,pH 1.3±0.2)于锥形瓶中混匀,水浴(37 °C)振荡(60 r/min)模拟胃运动 4 h。不同的消化时间点取样,一部分直接进行相关测定,一部分冷冻干燥制成干粉备用,试验重复 3 次。

1.7 电导率的测定

用电导仪对样品进行电导率的测定,温度设定为 25 °C。

1.8 粒径与 Zeta 电位的测定

参考 Chanamai 等^[23]的方法,稍有改动。用蒸馏水稀释样品至 500 倍,取适量稀释液于样品槽中,温度 25 °C,相对折射率设置为 1.095(大豆油 1.456 与水相 1.33 的折射率之比),取 3 次测量结果的平均值。

1.9 显微观察

吸取 20 μL 样品均匀涂于载玻片上,16×40 倍光学显微镜观察并拍照。

1.10 SDS-PAGE 单向电泳(1-DE)

称取一定量的样品溶于 200 μL 蒸馏水中,加入样品缓冲溶液(0.25 mol/L Tris-HCl,pH=6.8、10% SDS、50% 甘油、0.5% BPB、5% β-巯基乙醇)200 μL。配制 12%分离胶(pH=6.8,Tris-HCl 溶液,30%丙烯酰胺、10%SDS、10%AP)和 5%浓缩胶(pH=8.8,Tris-HCl 溶液、30%丙烯酰胺、10%SDS、10%AP),待胶凝固后,15 μL 样品液上样。电压 300 V,浓缩胶电流 10 mA,分离胶电流 30 mA。电泳结束后考马斯亮蓝 G250 染色。

1.11 ISO-DALT 双向电泳(2-DE)

参考文献[24],[25],第 1 步等电聚焦在凝胶管(120 mm×1.5 mm)中进行。凝胶液(尿素、10% TritonX-100、28.38%丙烯酰胺溶液、2%两性电解质(pH=3~10)、10%AP、双蒸水、10%TEMED)灌入凝胶管中,覆盖液 A(8 mol/L 尿素溶液)静置 1~2 h 后去除,加入 20 μL 裂解液(5% β-巯基乙醇、20%曲拉通、9.5 mol/L 尿素、2%两性电解质)和少

量双蒸水静置 1~2 h 后去除, 再加入 20 μL 裂解液和 NaOH 溶液。将凝胶管放在上槽为 NaOH 溶液、下槽为 H_3PO_4 缓冲溶液的电泳槽中, 200 V, 30 min; 300 V, 30 min; 400 V, 60 min。取出凝胶管并去除裂解液和 NaOH 溶液, 20 μL 样品液(同 SDS-PAGE 电泳制样) 上样并加覆盖液 B (9 mol/L 尿素, 2% 两性电解液) 10 μL 及 NaOH 溶液; 400 V, 3 h; 800 V, 13 h; 1 500 V, 2 h。结束后取出胶条于平衡液中平衡 2 h。

第 2 步 SDS-PAGE 电泳步骤同上述 1.10 节。不同的是将平衡好的胶条平放在浓缩胶上, 琼脂糖凝胶固定, 1 500 V, 浓缩胶时电流 40 mA, 分离胶时电流 70 mA。结束后硝酸银法染色^[26]。

1.12 数据分析

每组试验重复 3 次, 用 SAS9.2 软件进行单因素和多因素方差分析, $P < 0.05$ 时差异显著。

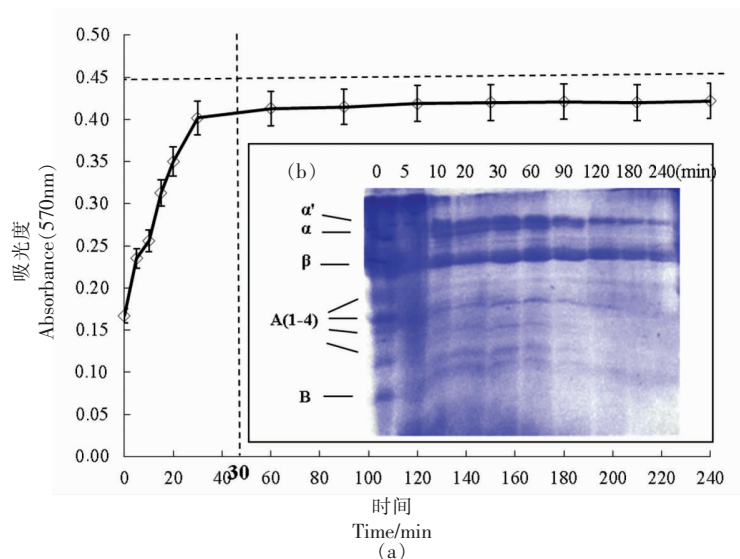
2 结果与讨论

2.1 酶解大豆蛋白的选择及其蛋白亚基分析

大豆蛋白经胃蛋白酶水解后, 其自由氨基将增加, 利用氨基与茚三酮显色反应可监测酶解反应的进度, 进而反映蛋白的酶解程度。图 1a 为 SPI 酶解反应过程中茚三酮比色法吸光度的变化。图中显示酶解 30 min 前蛋白水溶液的吸光度逐渐增加, 30 min 之后趋于平稳, 蛋白水溶液吸光度的变化反映了溶液中自由氨基含量, 说明胃蛋白酶在 30 min 前对蛋白作用明显, 使其酶解产生的氨基酸逐渐增多, 30 min 后蛋白酶作用减弱, 变化不明显。

对不同酶解时间的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳显示(图 1b), 随着酶解时间的延长, 蛋白中 7S 和 11S 蛋白亚基条带逐渐变浅, 尤其在 30 min 前变化最明显, 与酶解 0 min 的相比, 30 min 之后的酸性和碱性亚基明显减少。图 1b 显示酶解 4 h 之后, 蛋白依然不能完全降解, 可能是仅在酸性环境中, 蛋白的酶切位点不能完全暴露。进一步对酶解 30 min 的蛋白和 SPI 单双向电泳对比分析, 如图 1c 显示, 单向电泳图谱中酸性亚基的条带减少, 其余亚基条带变浅, 双向电泳图谱也显示 11S 亚基部位的蛋白点消失得较多, 尤其是 B 亚基。而 7S 的亚基中 $\text{pI}=4$ 左右的蛋白点增多^[27]。因此, 本研究中大豆蛋白酶解时间控制在 30 min, 从而制取酶解蛋白样品。

一般来说, 胃蛋白酶的活性位点芳香族氨基酸或酸性氨基酸形成的肽键。大豆蛋白含有人体全部必需氨基酸, 其肽键中有适合胃酶降解的位点, 但是本研究发现随着酶解反应的进行, 亚基并没有完全降解, 尤其是 7S 蛋白, 根据酶解反应空间位阻机理, 这与蛋白活性位点在溶液中的暴露程度有关。胃酶最适反应 pH 2 左右, 有研究表明, 极端 pH 值处理可诱导 SPI 与 11S 亚基部分解离, 而对 7S 亚基影响较小。在酸性环境中, 大豆蛋白中 11S 六聚体会解离成三聚体或单个亚基, 多以 7S 和 3S 亚基存在^[28], 因此胃蛋白酶反应条件下, 可促使大豆 11S 蛋白解聚成 7S 亚基或降解成更小的肽片断、氨基酸等, 而对于 7S 蛋白的降解则影响有限。



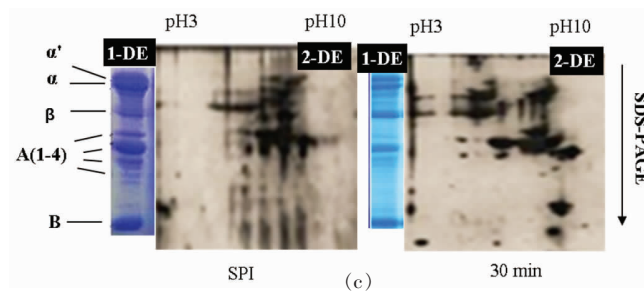


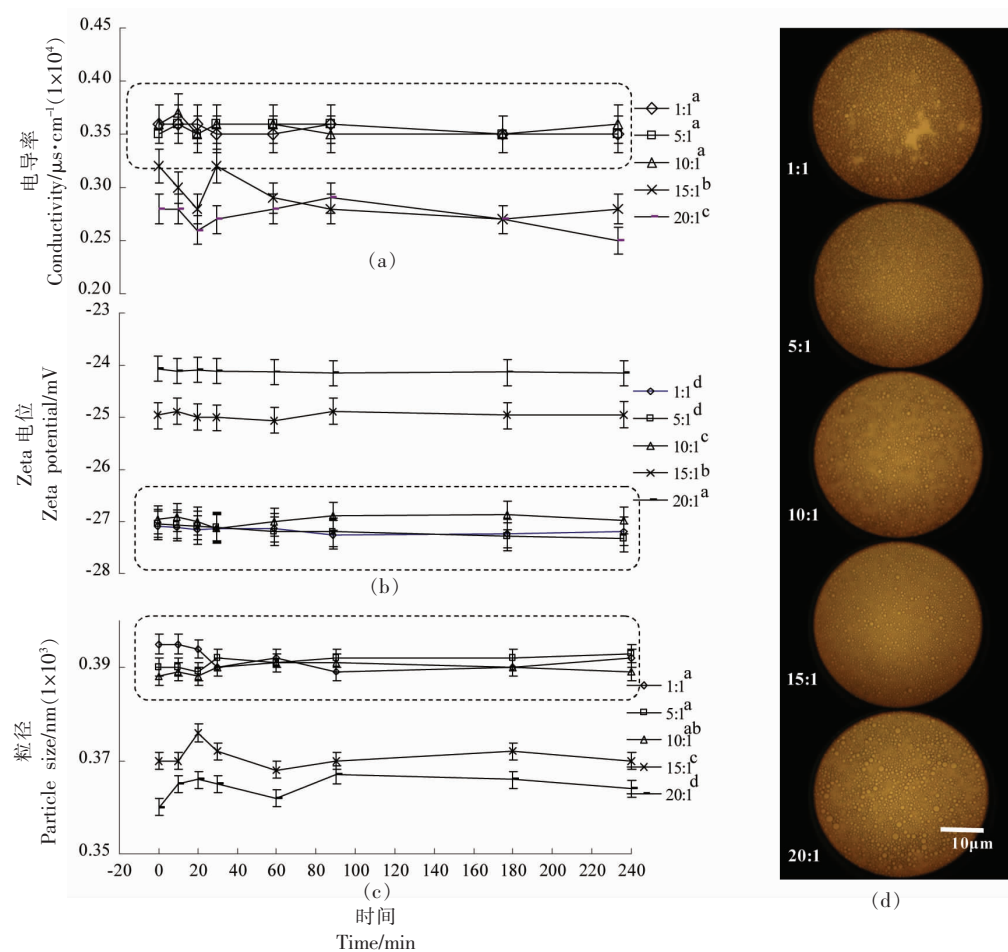
图1 大豆蛋白酶解过程中茚三酮显色反应(a)、SDS-PAGE电泳(b)及ISO-DALT双向电泳(c)图谱

Fig.1 Ninhydrin color reaction (a), SDS-PAGE electrophoresis (b) and ISO-DALT two-dimensional electrophoresis (c) during soybean proteolysis

2.2 酶解大豆蛋白-磷脂聚集体的液滴特性

图2显示的是不同比例的酶解蛋白与磷脂形成的聚集体放置不同时间的液滴变化。图2a表示的液滴电导率,即电荷流动难易程度。酶解蛋白与

磷脂的比例在10:1以内时电导率明显较高 ($P < 0.05$),且放置4 h后没有明显变化,而比例在10:1以上的聚集体溶液的电导率较低,放置4 h后电导率更低。结果说明高浓度的蛋白会增加溶液的



注:不同小写字母之间表示 $P < 0.05$ 水平的差异显著。

图2 ESP-磷脂聚集体的电导率(a)、Zeta电位(b)、粒径(c)及显微观察(d)分析

Fig.2 Analysis of conductivity (a), Zeta potential (b), particle size (c) and microscopic observation (d) of ESP-phospholipid aggregates particles

导电阻力。磷脂与蛋白通过疏水作用相结合^[29],酶解蛋白亲水端暴露在表面,随着蛋白量增加,理应导电性越好,但当酶解蛋白磷脂作用饱和后,其含量还持续增加,疏水基团也会增多,反而会增加导电阻力。

图2b显示酶解蛋白与磷脂比例在5:1内的溶液电位绝对值更大,与其它比例差异显著($P < 0.05$),放置时间对溶液电位值无明显作用。电位绝对值越大说明溶液越稳定^[30]。对不同比例的酶解蛋白磷脂聚集体溶液进行粒径测定(图2c)发现酶解蛋白与磷脂形成的聚集体的平均粒径基本在410 nm以内,比例在10:1以内的平均粒径明显要大一些(400 nm左右, $P < 0.05$),而且随放置时间的变化波动不大。再增加酶解蛋白与磷脂比例,测得聚集体的平均粒径反而偏小(<390 nm)。

结合图2a、2b、2c发现,聚集体溶液的电导率、电位及粒径基本表现一致,且随着放置时间延长并没有表现出较大的波动性,如图中虚线框内(10:1以内)。不过,5:1以内有更高的电位值(绝对值)。考虑到酶解大豆蛋白亲水性较强,磷脂更

偏向亲油性,且后续的工作要探讨其作为壁材形成的O/W型复合乳液,因此选用5:1酶解大豆蛋白-磷脂聚集体制备复合乳液。

另外,通过显微观察(图2d)可以看出蛋白与磷脂的比例为5:1形成的液滴大小均一,排列较为致密。综上结果说明酶解蛋白与磷脂的添加量为5:1时形成的聚集体溶液较稳定。

2.3 酶解大豆蛋白-磷脂复合乳液的液滴特性

通常,油脂在乳液中暴露的越多,电导率越小。乳液中水相的添加量大于油相时,易形成O/W体系,当油相被包埋的越多,体系电导率越大。以ESP-磷脂聚集体为壁材(添加量为5:1),与大豆油形成复合乳液,研究油/水比例对于复合乳液液滴的影响。由图3a可知,油/水比例为1:1时,乳液电导率最大($P < 0.05$),但此体系容易反相变为W/O型,油/水比例为1:2和1:3的乳液电导率相差并不显著,并结合O/W体系稳定性,本研究选择油/水比例为1:3的乳液体系较佳。

图3b、3c、3d显示的是以油/水比例1:3形成的酶解蛋白(ESP)-磷脂复合乳液和ESP乳液的

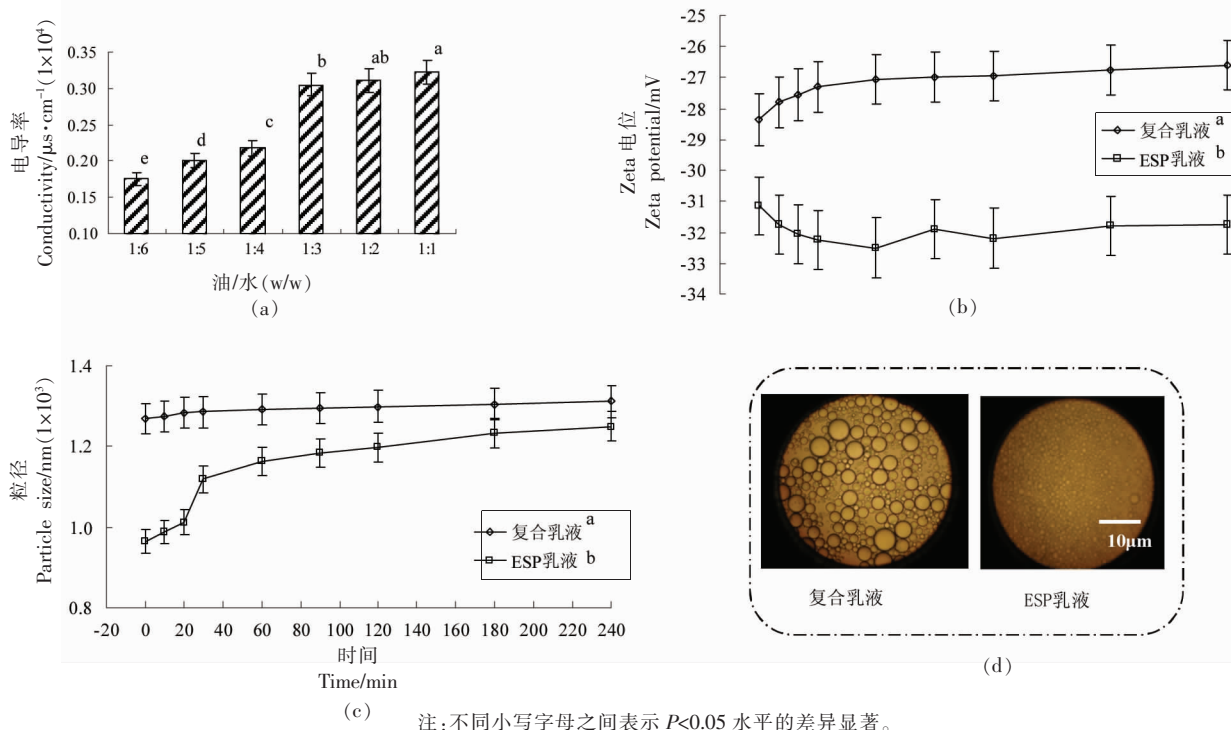


图3 ESP-磷脂复合乳液电导率(a)、复合乳液与ESP乳液Zeta电位(b)、粒径(c)及显微观察(d)分析

Fig.3 ESP-phospholipid composite emulsion conductivity (a), composite emulsion and ESP emulsion Zeta potential (b), particle size (c) and microscopic observation (d) analysis

液滴特性。由图 3b 可知复合乳液的电位绝对值整体偏小 ($P < 0.05$), 说明形成的液滴带电荷量不如 ESP 乳液, 其静电排斥作用较弱; 由于磷脂与 ESP 作用形成聚集体, 很多带电基团参与聚集体静电力的形成, 减少了液滴表面的负电荷。

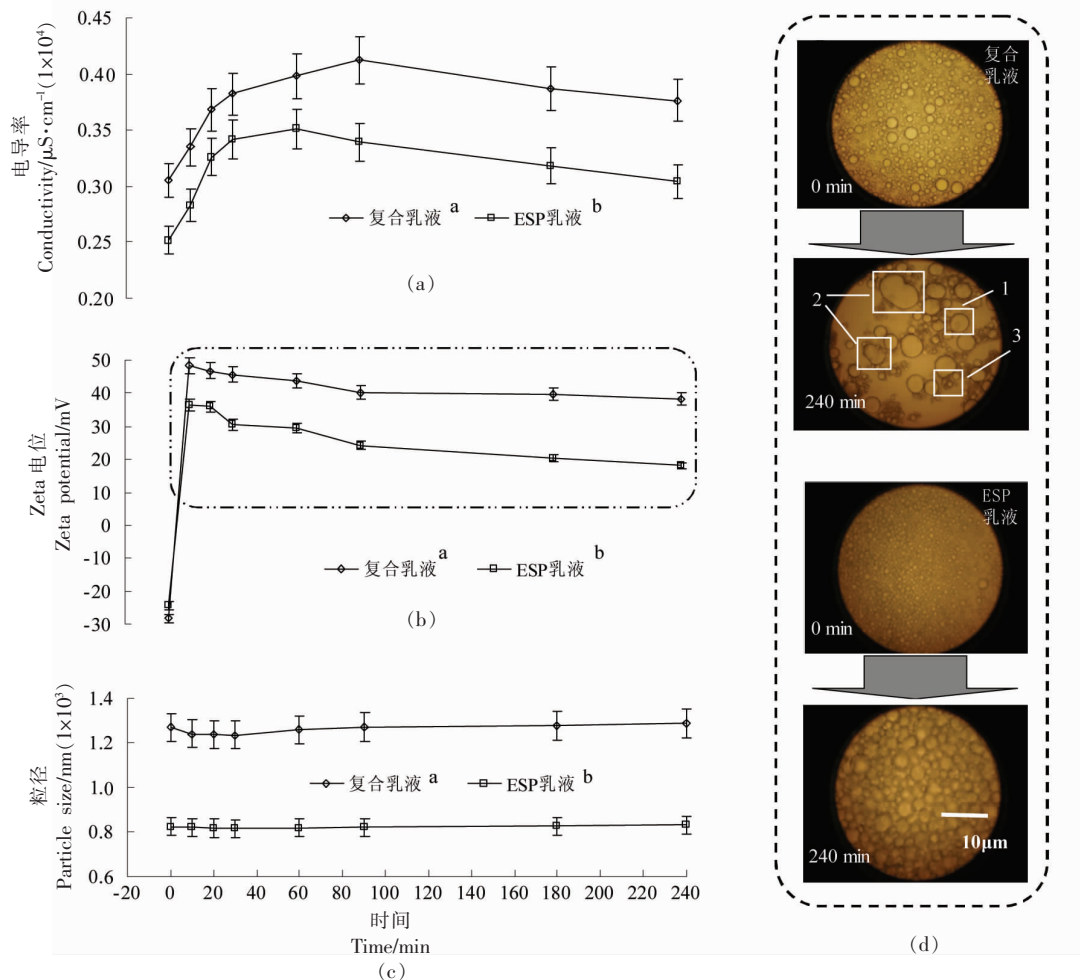
图 3c 可以看出复合乳液液滴平均粒径偏大 (1 300 nm 左右, $P < 0.05$), 且放置一定时间内, 没有发生明显变化。而 ESP 乳液液滴平均粒径偏小 (950 nm 左右), 静置 1 h 后粒径则迅速变大 (接近 1 200 nm)。结合乳液形成时的显微图 (图 d) 可知, 复合乳液液滴偏大, 且大小不均一, ESP 乳液偏小, 且排列紧密。

大豆蛋白为球蛋白有一定的刚性, 所以 ESP 为限制性水解大豆蛋白也具有一定的刚性, ESP

与磷脂形成聚集体后仍然存在刚性, 从而聚集体与油脂形成复合乳液时二者之间的位阻 (即空间效应) 较 ESP 与油脂间的位阻大, 这也决定了 ESP-磷脂复合乳液的液滴粒径较大。另一方面, 由于 ESP-磷脂复合乳液液滴表面电荷相对 ESP 乳液较少, 液滴之间的静电斥力也相对较小, 形成复合乳液后的液滴则较 ESP 乳液更易于聚集形成较大的液滴 (图 3d), 因此, 复合乳液形成后液滴可快速聚集 (< 10 min, 图 3c) 形成较稳定的乳液体系。

2.4 基于胃消化模型的 ESP-磷脂复合乳液的液滴特性

体外胃消化模型是研究食品在人体消化过程中组分变化及其体系稳定性的便捷方法。由图 4a



注:不同小写字母之间表示 $P < 0.05$ 水平的差异显著。

图 4 体外胃消化中乳液的电导率 (a)、Zeta 电位 (b)、粒径 (c) 及显微观察 (d) 分析

Fig.4 Analysis of conductivity (a), Zeta potential (b), particle size (c) and microscopic observation (d) of emulsion *in vitro* gastric digestion

可知,复合乳液在胃消化过程中的电导率整体要高于 ESP 乳液 ($P < 0.05$),说明复合乳液中水相对油相的包裹性更好。随着消化时间越长,乳液电导率均呈先增加后减小的趋势,30 min 前,暴露的油滴与蛋白结合不紧密,受蛋白酶进一步酶解作用,部分油滴聚集上浮,使乳液中的油相减少,电导率增加。消化后期使油滴暴露的速度大于其聚集上浮的速度,则电导率略降低。

图 4b 显示了乳液消化 4 h 内的电位变化,可知乳液电位受胃液影响严重,胃液的添加使乳液的电位从负值短时间内迅速变为正值,胃液中含有大量的 H^+ ,中和了蛋白的负电荷,前期试验表明复合乳液携带负电荷较 ESP 乳液少,中和胃液中 H^+ 的量较少,导致复合乳液在消化中的电位绝对值要高于 ESP 乳液 ($P < 0.05$,图中虚线框内数据)。但乳液进一步消化后,其电位值均有降低,说明胃蛋白酶对乳液中的酶解蛋白仍有一定作用。

图 4c 显示乳液消化中的平均粒径变化,可知无论复合乳液还是 ESP 乳液,胃消化过程对其粒径影响不大,但是复合乳液的平均粒径明显高于 ESP 乳液 ($P < 0.05$)。但结合图 4d 的乳液消化过程的显微观察,与 ESP 乳液相比,复合乳液液滴的变化主要体现在液滴大小不均一、排列稀疏。说明胃液消化过程加速了复合乳液液滴的变化,使其聚集形成较大的液滴(如图 4d、方框 1、2),或者形成粒径较小的液滴(如图 4d、方框 3)。而对于 ESP 乳液,也发现类似情况。不过,两种乳液显微观察与平均粒径的数据有不一致的情况(图 4c、4d),这是由于粒径数据表现的是乳液液滴整体的状况,是平均水平,显微观察则表现的是局部细节,从而出现乳液平均粒径在体外消化过程中变化不大,而在显微观察中有变化的情况。不过,二者(粒径与显微)结合起来则能较好地不同层面反映乳液液滴的真实状况。

2.5 酶解大豆蛋白-磷脂复合乳液体外胃消化中蛋白亚基变化

对复合乳液和 ESP 乳液在胃消化过程中蛋白质的变化进一步分析,通过 SDS-PAGE 单向电泳(图 5)可知乳液中的酶解蛋白在胃消化中进一步得到降解。与图 1b 显示的结果对比可知单独的蛋白被胃蛋白酶作用后不能完全被降解,但形成乳

液后,蛋白的部分亚基能被完全降解。说明大豆蛋白乳化后更易被蛋白酶作用,乳化能促进大豆蛋白被胃酶降解。大豆蛋白发挥其乳化性能后,改变了其空间结构,使蛋白的酶切位点暴露的更多。单向电泳显示复合乳液在胃消化 30 min 时,各亚基条带明显变浅,而 ESP 乳液在消化 30 min 时蛋白条带变化并不明显。单向电泳图谱还可以看出,乳液消化前期蛋白的 β 亚基没有降解,反而略有增加,可能是 11S 亚基受胃液环境影响部分降解为 7S,而 β 亚基不易被蛋白酶作用,故其不降反增。从图中可知碱性亚基在胃消化过程也不能降解完全。

双向电泳图谱(图 6)可知,复合乳液在消化 30 min 后,能检测到的蛋白点明显减少,其中碱性亚基 B 基本检测不到,而 ESP 乳液虽然在消化 30 min 后仍然能检测到较复合乳液较多的蛋白组分,但是也基本检测不到碱性亚基 B 组分;而到 240 min 后,两种乳液基本只能检测到 β 亚基。

由单向电泳可知,胃消化过程中复合乳液中蛋白酶解主要发生在 30 min 前,蛋白酶最先降解

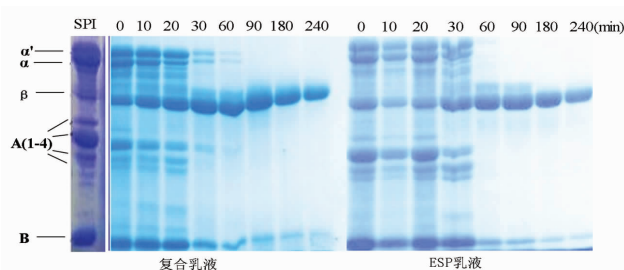


图 5 乳液 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.5 SDS-PAGE electrophoresis pattern of emulsion

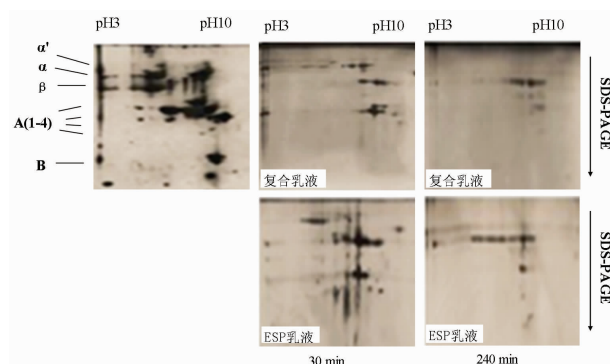


图 6 乳液 ISO-DALT 双向电泳图谱

Fig.6 ISO-DALT two-dimensional electrophoresis pattern of emulsion

的是 α 、 α' 和酸性亚基A,然后是碱性亚基B, β 亚基基本不能降解;复合乳液中由于采用ESP-磷脂聚集体,前面的结果表明复合乳液中空间效应较ESP乳液明显,因此复合乳液在胃消化过程中蛋白更易于暴露活性位点,从而增加聚集体中蛋白的降解速度。值得注意的是,碱性亚基B消化30 min后在单向电泳图谱中能检测到,但在双向电泳中未能检测到,这说明碱性亚基B某些组分已降解,其它组分由于含量少,在双向电泳中不能被检测到。

2.6 体外胃消化中复合乳液液滴“自组装”机理探讨

大豆蛋白与磷脂,二者因具有亲水/亲油性常作为天然表面活性剂而用于食品体系中,由于其营养功能,也常用于运动营养食品中。大豆蛋白由于具有一定的刚性,且分子质量较大,常以聚集态存在于溶液中,作为表面活性剂不利于快速移动至界面处,因此乳化活性较弱,但具有较好的乳化稳定性;磷脂刚好与之相反,由于其分子质量较小,便于快速移动至界面,具有较好乳化活性^[31];而且大豆蛋白两亲性中亲水性较强,磷脂则亲水性较弱;因此,大豆蛋白与磷脂作为壁材能较好的优势互补,形成较为稳定的大豆蛋白-磷脂聚集体系。

为了降低大豆蛋白的刚性,本研究中采用酶解的方法加以前处理以增加蛋白分子的柔性。之所以采用胃蛋白酶,是因为可减少乳液中大豆蛋白在胃消化中受到胃蛋白酶的作用有可能影响乳液的稳定性。而试验的结果却发现,胃蛋白酶对于大豆蛋白的前处理不能完全把蛋白中活性位点降解。不论是复合乳液还是酶解蛋白乳液,在体外胃消化中除 β 亚基外,其它亚基基本被降解。但从液滴特性来看,由于复合乳液中引入了磷脂,其平均粒径较酶解蛋白乳液(未加磷脂)大,但从粒径变化分析,复合乳液的平均粒径变化较小,因此乳液在重力场中有较好的稳定性。

由于分析方法对液滴特性表现侧重点不同,体外胃消化试验中,受到胃蛋白酶降解的乳液蛋白液滴发生了一些变化,虽然在数值上平均粒径波动不大,但是显微观察发现液滴受到不同程度的影响,尤其对于复合乳液更为明显。综合电导、

电位及粒径随放置时间或体外胃消化时间的变化,整体来说,体外胃消化中复合乳液液滴的稳定性要高于ESP乳液。

对于大豆蛋白,胃蛋白酶处理大豆蛋白只能限制性降解蛋白,但酶解蛋白能与磷脂形成较为稳定的聚集体,进而形成复合乳液后有较好的稳定性。虽然蛋白在体外胃消化过程中受到了降解,但复合乳液整体稳定性有所提升(电导率增加)。由此,可以推导复合乳液在体外胃消化中存在一个液滴“自组装”过程。具体来说:复合乳液进入胃液后,由于pH值突然降低,以至于其液滴表面电荷“由负变正”,且带有更多的正电荷(图4b),增加了液滴之间的静电斥力,减少液滴之间的聚集,从而使复合乳液的稳定性提高(图4a);随着消化的进行,液滴壁材(ESP-磷脂聚集体)中蛋白被降解,表面电荷有所减少,静电斥力相应降低,加上胃消化中对乳液一定程度的“蠕动”(本研究中以振荡代替),液滴“相互靠近”的可能性加大,当液滴之间的距离降到一定程度后,由于蛋白的降解导致壁材一定程度的破坏,液滴中油脂会“暴露”出来,根据“同性相吸”原理,液滴由于“暴露”的油脂而“吸引”在一起,其结果是壁材“自组装”形成新的聚集体将油脂重新包埋起来形成一个更大的液滴(如图4d、方框1、2),或者将液滴“一分为二”形成较小的液滴(如图4d、方框3)。在体外胃消化的后期,由于蛋白降解程度的提高,壁材的“强度”受到一定程度的影响,导致“包埋能力”下降,会有一部分油脂析出,最直接的表现就是电导率有所降低(图4a)。当然,以上只是根据试验的结果进行的推理,具体情况还需要通过相关试验加以验证。

另一方面,试验结果也表明,由于磷脂的加入,也加速了大豆蛋白类食品乳液于胃中蛋白的降解,进而有利于小肠中对于蛋白类营养物质的消化吸收。这为扩大大豆蛋白类食品乳化体系在运动营养食品中的应用并阐明消化吸收机理提供一定的理论支撑。

3 结论

本研究以酶解大豆蛋白、磷脂为主要原料,对其聚集体及其复合乳液的液滴进行系统探讨,结

果如下:

1) 胃蛋白酶对大豆蛋白只能有限降解,在酶解 30 min 后蛋白亚基变化不显著,酶解 4 h 后蛋白各亚基仍不能被完全降解。

2) 酶解蛋白与磷脂的质量比为 5:1 时其聚集体具有较好的液滴特性($P<0.05$);以该比例制备聚集体作为壁材,发现油相和水相的比例为 1:3 时可形成较为理想的水包油型乳化体系($P<0.05$)。

3) 复合乳液液滴平均粒径及电位均高于酶解蛋白乳液($P<0.05$),但是在消化过程中液滴特性变化程度相较于酶解蛋白乳液要小。

4) 体外胃消化过程中,复合乳液的液滴特性(电导率、电位及平均粒径)明显高于酶解蛋白乳液($P<0.05$),但二者变化趋势基本相同。

5) 体外胃消化过程中,复合乳液中的蛋白降解速度要大于酶解乳液,且除 β 亚基外其余亚基均能被降解。

综上所述,酶解蛋白-磷脂聚集体作为壁材形成复合乳液表现出较好的稳定性,但在体外胃消化过程中蛋白被降解,推导其在体外胃消化中存在液滴“自组装”过程,这为扩大大豆蛋白类食品乳化体系在运动营养食品中的应用如缓解运动性疲劳等,并阐明其消化吸收机理提供一定的理论支撑。

参 考 文 献

- [1] 林晨,文艳霞.大豆油脚提取磷脂及卵磷脂的工艺研究[J].广州化工,2019,47(7):96-98.
LIN C, WEN Y X. Study on Extraction of phospholipid and lecithin from soybean oil sediment[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2019, 47(7): 96-98.
- [2] 李慧娜,田少君,章绍兵.大豆分离蛋白和浓缩蛋白乳液体系稳定性的比较[J].河南工业大学学报(自然科学版),2017,38(4):6-13.
LI H N, TIAN S J, ZHANG S B. Comparative study of stability of soybean protein isolate and soybean protein concentrate emulsion systems[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2017, 38(4): 6-13.
- [3] NISHINARI K, FANG Y, GUO S, et al. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 301-318.
- [4] UTSUMI S, DAMODARAN S, KINSELLA J E. Heat-induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and beta subunits of 7S[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1984, 32(6): 1406-1412.
- [5] STASWICK P E, HERMODSON M A, NIELSEN N C. Identification of the acidic and basic subunit complexes of glycinin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1981, 256(16): 8752.
- [6] SZUHAJ B F, NIEUWENHUYZEN W V. Nutrition and bio-chemistry of phospholipids[M]. Champaign, IL: AOCS PRESS, 2003: 61-69.
- [7] 郝雅男,姚恒喆,周斌,等.大豆蛋白在素食食品中的应用研究现状[J].肉类工业,2020(8):32-36.
HAO Y N, YAO H Z, ZHOU B, et al. Application and research status of soybean protein in vegetarian food[J]. Meat Industry, 2020(8): 32-36.
- [8] 李默馨,王玉,李振岚,等.我国大豆蛋白在食品加工中的应用及展望[J].粮食加工,2010,35(1):83-86.
LI M X, WANG Y, LI Z L, et al. Application and prospects of soybean protein in Chinese food processing[J]. Food Processing, 2010, 35(1): 83-86.
- [9] 王佳蓉,丁阳月,姜云庆,等.酶法修饰对大豆分离蛋白凝胶性质影响研究进展[J].食品科学,2021,42(15):329-336.
WANG J R, DING Y Y, JIANG Y Q, et al. Research progress on the effect of enzymatic modification on gel properties of soy protein isolate[J]. Food Science, 2021, 42(15): 329-336.
- [10] 王露露,史茜茜,王雨桐,等.大豆肽的功能活性及其在食品加工中的应用[J].农产品加工,2021(2):59-63.
WANG L L, SHI X X, WANG Y T, et al. Function of soybean bioactive peptides and its application in food processing [J]. Processing of Agricultural Products, 2021(2): 59-63.
- [11] 殷涌光,陈玉江,刘瑜,等.磷脂功能性质及其生产应用的研究进展[J].食品与机械,2009,25(3):120-124.
YIN Y G, CHEN Y J, LIU Y, et al. The function and character of lecithin and the research process of its production and application[J]. Food and Machinery, 2009, 25(3): 120-124.

- [12] 李招群, 欧阳晓露, 万屏南. 大豆磷脂的研究进展[J]. 江西化工, 2009(1): 14-16.
LI Z Q, OUYANG X L, WAN P N, et al. Research progress of soybean phospholipids[J]. Jiangxi Chemical Industry, 2009(1): 14-16.
- [13] LI C, HUANG X J, PENG Q, et al. Physicochemical properties of peanut protein isolate-glucomannan conjugates prepared by ultrasonic treatment[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2014, 21(5): 1722-1727.
- [14] 王中江, 常宗明, 张翠, 等. 超声波及高压均质制备大豆蛋白-磷脂酰胆碱纳米乳液的特性比较[J]. 中国食品学报, 2019, 19(8): 157-165.
WANG Z J, CHANG Z M, ZHANG C, et al. Comparison of the characteristic of soybean protein-phosphatidylcholine nanoemulsion by ultrasound and high pressure homogenization[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(8): 157-165.
- [15] MOTTOLA M, VICO R V, VILLANUEVA M E, et al. Alkyl esters of L-ascorbic acid: stability, surface behavior and interaction with phospholipid monolayers[J]. Journal of Colloid & Interface Science, 2015, 457(1): 232-242.
- [16] QI M, HETTIARACHCH N S. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin[J]. Journal of Food Science, 1997, 62(6): 1110-1115.
- [17] MEINLSCHMIDT P, SCHWEIGGERT -WEISZ U, BRODE V, et al. Enzyme assisted degradation of potential soy protein allergens with special emphasis on the technofunctionality and the avoidance of a bitter taste formation[J]. LWT - Food Science and Technology, 2016, 68: 707-716.
- [18] 计晓曼, 马传国, 王化林. 酶改性大豆分离蛋白起泡性能的研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 164-167.
JI X M, MA C G, WANG H L. Study on foaming property of enzyme modified soy protein isolated[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(22): 164-167.
- [19] 罗建勇, 史一白, 刘泽瑾, 等. 木瓜蛋白酶水解大豆蛋白制备啤酒糖浆复配液的研究[J]. 农产品加工, 2020(11): 1-12.
LUO J Y, SHI Y B, LIU Z J, et al. Study on enzymatic hydrolysis of soy protein by papain to prepare beer syrup compound solution[J]. Processing of Agricultural Products, 2020(11): 1-12.
- [20] 郑建樟, 管军军, 路新开, 等. 酶解大豆分离蛋白-磷脂复合乳液的制备及稳定性分析[J]. 食品科学, 2020, 41(16): 244-251.
ZHENG J Z, GUAN J J, LU X K, et al. Stability of enzymatic hydrolysate of soy protein isolate-phospholipid composite emulsion[J]. Food Science, 2020, 41(16): 244-251.
- [21] 朱浩, 管军军, 刘雪, 等. 基于胃消化动态模型乳酸菌对大豆蛋白-磷脂复合乳液的影响[J]. 食品科技, 2019, 44(12): 6-11.
ZHU H, GUAN J J, LIU X, et al. Effect of lactic acid bacteria on soybean protein-phospholipid composite emulsion based on dynamic model of stomach digestion[J]. Food Science and Technology, 2019, 44(12): 6-11.
- [22] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus[J]. Food & Function, 2014, 5(6): 1113-1124.
- [23] CHANAMAI R, MCCLEMENTS D J. Prediction of emulsion color from droplet characteristics: dilute monodisperse oil-in-water emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15(1): 83-91.
- [24] 付笑飞, 管军军. 基于胃液动态消化模型下SPI乳液酶解产物特性的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 56-62.
FU X F, GUAN J J. Characteristics of the enzymatic hydrolyzates of soybean protein isolate (SPI) emulsion in the dynamic gastric model[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(7): 56-62.
- [25] ZHAN X Q, YANG H Y, PENG F, et al. How many proteins can be identified in a 2DE gel spot within an analysis of a complex human cancer tissue proteome[J]. Electrophoresis, 2018, 39(7): 965-980.
- [26] SWITZER R C, MERRIL C R, SHIFRIN S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels[J]. Analytical Biochemistry, 1979, 98(1): 231-237.
- [27] LU X K, CUI Y M, GUAN J J, et al. Establishment of two-dimensional gel electrophoresis for soybean protein isolate and its application[J]. Grain & Oil Science and Technology, 2020, 3(3): 100-109.
- [28] WOLF W J, RACKIS J J, SMITH A K, et al. Behavior of the11S protein of soybeans in acid solu-

- tions I. Effects of pH, ionic strength and time on ultracentrifugal and optical rotatory properties [J]. *Journal of the American Chemistry Society*, 1958, 80 (21): 5730-5735.
- [29] OHTSURU M, KITO M, TAKEUCHI Y, et al. Association of phosphatidylcholine with soybean protein [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1976, 40 (11): 2261-2266.
- [30] ANDJELKA B, RAINER H, SNEZANA D S, et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2014, 444(1): 15-25.
- [31] 吴长玲, 和铭钰, 韩瑞, 等. 大豆蛋白-磷脂酰胆碱纳米乳液的显微观测及界面结构分析[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(8): 240-247.
- WU C L, HE M Y, HAN R, et al. Microscopic observation and interface structure analysis of soy protein-phosphatidylcholine nanoemulsions [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(8): 240-247.

Droplet Characteristics of Protein-Phospholipid Aggregates and Their Emulsion Based on Sports Food

Zhou Yang¹, Guan Junjun^{2*}, Lu Xinkai², Ji Xuyang²

¹*Sports Institute, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001*

²*College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001*

Abstract Enzymatic soybean protein and phospholipids as the main materials, building a sports nutrition food system, through conductance, potential, particle size, SDS-PAGE electrophoresis, ISO-DALT two-dimensional electrophoresis and microscopic observation, the droplet characteristics of aggregates and their composite emulsions and protein subunit changes were systematically studied. The results showed that pepsin could only degrade soybean protein to a limited extent, and the protein subunits were not changed significantly after enzymatic hydrolysis for 30 minutes; when enzymatic hydrolysis of soybean protein (enzymatic hydrolysis for 30 minutes) and phospholipid with the mass ratio of 5:1, their aggregates had better droplet characteristics ($P<0.05$); when the aggregates were prepared with this ratio as the wall material, it was found that the oil phase and water phase ratio of 1:3 can be formed the more ideal oil-in-water emulsification system ($P<0.05$); Compared with the enzymatic soybean protein emulsion, the composite emulsion droplets had a higher average particle size and potential ($P<0.05$). In the process of *in vitro* gastric digestion, the droplet characteristics (conductivity, potential and average particle size) of the composite emulsion were significantly higher than that of the enzymatic protein emulsion ($P<0.05$), and the protein degradation rate was greater than that of the enzymatic protein emulsion, and all subunits except β subunit could be degraded. Therefore, it was deduced that there was a droplet "self-assembly" process in the *in vitro* gastric digestion of the composite emulsion, which will help the expansion of application in sports nutrition food for the soybean protein-food-emulsification system, and provide certain theoretical support for clarifying the mechanism of its digestion and absorption.

Keywords enzymatic soy protein; phospholipids; aggregates; composite emulsion; droplet