

超声对豌豆蛋白-高酯果胶复合颗粒理化和结构特性的影响

马开元¹, 孙晓洋², 陈复生¹, 张丽芬^{1*}

(¹河南工业大学粮油食品学院 郑州 450001

²河南牧业经济学院 食品与生物工程学院 郑州 450046)

摘要 采用超声制备豌豆蛋白-高酯果胶(PP-HMP)复合颗粒,研究超声作用下 PP-HMP 复合颗粒理化特性的变化规律,同时采用傅里叶红外光谱(FTIR)、内源荧光光谱和透射电子显微镜(TEM)对复合颗粒结构进行表征。结果表明,超声条件为 10 min、5.43 W/cm³、15 °C 时,超声制备豌豆蛋白-高酯果胶(PP-HMP-US)复合颗粒的乳化活性和稳定性较高;与 PP-HMP 相比,PP-HMP-US 浊度显著降低($P<0.05$),粒径以及多分散性指数(PDI)分别从 1 453.26 nm 和 0.34 降低到 541.44 nm 和 0.27。FTIR 和内源荧光光谱分析结果显示,加入 HMP 后,PP-HMP 复合颗粒的 β -转角和 α -螺旋相对含量从 13.67% 和 19.89% 分别增加至 33.85% 和 26.61%,HMP 的添加可抑制 PP 的聚集,使其形成更紧密的三级构象;适当的超声处理可使 PP 的 β -折叠展开形成 α -螺旋,促进其与 HMP 分子的结合,降低色氨酸残基的暴露程度。TEM 结果表明,超声可使 HMP 嵌入 PP 球状结构中,获得形态更加规则有序的 PP-HMP-US 复合颗粒。研究结果为豌豆蛋白在食品加工中的应用提供理论参考。

关键词 豌豆蛋白; 高酯果胶; 超声; 理化特性; 结构特性

文章编号 1009-7848(2024)02-0130-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.02.012

豌豆蛋白(Pea protein, PP)作为重要的植物蛋白来源之一,因易获得,营养价值高和低致敏性而被广泛接受。然而,豌豆蛋白的电荷量较低且表面疏水性较强,降低了其溶解性和乳化性,尤其在豌豆蛋白等电点附近蛋白质容易发生聚集,阻碍了其在食品领域中的应用^[1]。例如,豌豆蛋白在植物蛋白饮料中应用时乳化稳定性不佳,体系通常出现失稳现象^[2]。研究表明,多糖可以诱导自身与蛋白分子间的相互作用,对加工食品的结构和稳定性中起增稠、稳定、胶凝和乳化的作用^[3]。蛋白和多糖复合颗粒具有较好的生物可降解性和兼容性,在提高生物活性成分稳定性和利用度方面发挥着重要作用,是生物活性物质良好的输送载体^[4]。蛋白-多糖复合颗粒基乳液的稳定性较好,在食品乳液体系中具有广泛的应用前景^[5]。高甲氧基果胶(High methoxyl pectin, HMP)是从苹果中提取的一种天然阴离子多糖,是食品体系中最常用

的多糖稳定剂之一,HMP 可与蛋白质发生相互作用,增强蛋白的空间结构并减少其絮凝和沉淀^[6]。Tian 等^[7]研究发现 β -伴大豆球蛋白与果胶通过静电作用形成的可溶性复合物的粒径较小,Zeta-电位绝对值较高,使得该复合物具有更高的吸附动力学,可显著提高蛋白的乳化稳定性。Albano 等^[8]研究发现,大豆分离蛋白和果胶起乳化剂和稳定剂的作用,果胶的加入不但可提高液滴表面电荷,而且增加了液滴间的静电排斥和空间位阻效应,有效防止液滴絮凝和部分聚集,使蛋白乳液稳定性显著改善。

超声波因具有快速、有效的改性效果且不损失营养物质以及无毒、无害等优点,受到越来越多科研工作者的青睐^[9-10]。研究表明,利用超声制备蛋白-多糖复合颗粒,可改善复合物的功能性质,超声波的空化效应可减小复合颗粒的尺寸,使粒径分布更加均一,使粒子形态更规则^[11-12]。本研究以 PP 和 HMP 分别作为蛋白、多糖基质,利用超声制备复合颗粒,通过对 PP-HMP 复合颗粒乳化特性、浊度、粒径、多分散性指数(Polydispersity index, PDI)以及结构特征进行分析,揭示超声作用下复合颗粒理化和结构特性的变化规律,为扩大豌豆蛋白在食品加工中的应用提供理论基础。

收稿日期: 2023-02-06

基金项目: 河南省自然科学基金项目(222300420424);国家自然科学基金区域联合基金项目(U21A20270);河南省青年骨干教师培养计划项目(2020GGJS083)

第一作者: 马开元,女,硕士生

通信作者: 张丽芬 E-mail: zhanglifan2013@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

市售豌豆蛋白(蛋白含量为 81.2%),双塔食品贸易有限公司;高酯果胶(酯化度 55%~65%),上海Macklin 公司;金龙鱼大豆油,益海(周口)粮油工业有限公司;无水乙醇、光谱纯级溴化钾(KBr)、氢氧化钠(NaOH),天津市科密欧化学试剂有限公司;盐酸(HCl),洛阳昊华化学试剂有限公司;除标注外,试验所用试剂均为分析纯级。

1.2 仪器与设备

SCIENITZ-IIID 型超声波破碎仪、DC-2030 低温恒温槽,宁波新芝生物科技股份有限公司;BT-纳米粒度仪(Zeta 电位分析仪),丹东百特仪器有限公司;722S 可见分光光度计,上海仪电公司;FM200 高速剪切分散乳化机,上海弗鲁克科技发展有限公司;IRAffinity-1S 傅里叶变换红外光谱仪,日本岛津株式会社;Cary Eclipse 荧光光谱仪,安捷伦科技(中国)有限公司;HT7700 透射电子显微镜,日立(中国)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 PP-HMP 复合体系的制备 称取适量的 PP 和 HMP,分别使用蒸馏水配置成质量浓度为 8 mg/mL 的蛋白和果胶溶液,室温下置于磁力搅拌器匀速搅拌过夜,使颗粒充分溶胀。

将所制备的 PP 和 HMP 溶液以体积比 1:1 进行混合,搅拌均匀后用 0.1 mol/L HCl 和 NaOH 溶液调节溶液的 pH 值为 6.0,然后置于磁力搅拌器上搅拌 4 h。

1.3.2 超声制备 PP-US、PP-HMP-US 复合颗粒 将 PP-US、PP-HMP 混合溶液倒入超声杯中水浴,超声探头浸入液面以下 1.5 cm 处,工作时间 2 s,间隔时间 2 s,使用不同超声时间、功率密度和温度处理,超声后的 PP、PP-HMP 表示为 PP-US、PP-HMP-US。

1.3.3 理化特性分析

1.3.3.1 乳化活性和乳化稳定性 将 5 mL 大豆油和 10 mL 样品溶液在室温下用高速剪切机以 13 000 r/min 的转速剪切 2 min。快速在底部吸取 50 μ L 样品,用质量浓度为 0.1 g/100 mL 的十二烷基硫酸钠(SDS)溶液稀释 200 倍,混匀后立即测定波长 500 nm 处的吸光值(A_0)。静置 40 min(t)后从

底部同一部位吸取样品,用同样的方法测定吸光值(A_{40})^[13]。乳化活性(EAI)和乳化稳定性(ESI)分别按式(1)和(2)计算。

$$EAI(m^2/g)=2T \times \frac{A_0 \times \text{稀释倍数}}{c \times \varphi \times 10000} \quad (1)$$

$$ESI(\text{min})=\frac{A_0}{A_0-A_{40}} \times t \quad (2)$$

式中,EAI——乳化活性指数, m^2/g ;ESI——乳化稳定性,min; A_0 ——乳液放置 0 min 的吸光度; A_{40} ——乳液放置 40 min 后的吸光度;t——间隔时间,40 min;c——复合颗粒质量浓度,g/mL; φ ——油相体积分数,%;T=2.303。

1.3.3.2 浊度的测定 参考 Yi 等^[14]的方法,采用分光光度法进行样品的浊度测定。在常温下用分光光度计于波长 600 nm 处测定样品的吸光度值,每个样品重复测定 3 次。

1.3.3.3 粒径、PDI 以及 Zeta 电位的测定 复合颗粒的粒径及其分布、PDI 和 Zeta 电位使用纳米粒度仪进行测定。颗粒分散液用蒸馏水稀释到适当的浓度后,取适量样液进行测定。所有测定均在 25 $^{\circ}$ C 下进行,平衡 120 s,每个样品重复测定 3 次。

1.3.4 结构特性研究

1.3.4.1 二级结构 参考 Feng 等^[15]的方法,将 PP、PP-US、PP-HMP、PP-HMP-US 溶液进行冷冻干燥,取冻干后的样品 2 mg 左右,与 100 mg 烘干后的溴化钾研磨混匀,然后使用压片机压制成薄片,再用傅里叶红外光谱仪扫描分析,测定时波数范围为 4 000~400 cm^{-1} ,扫描次数为 32 次,分辨率 4 cm^{-1} ,得到的红外吸收曲线采用 Peakfit 软件和 Gaussian 拟合,分析蛋白二级结构含量的变化。

1.3.4.2 三级结构 将复合溶液稀释至合适浓度,使用荧光分光光度计进行测定,固定激发波长 λ_{ex} 为 280 nm,激发和发射狭缝宽度都为 5 nm,扫描范围为 300~500 nm。

1.3.4.3 微观形态 采用透射电子显微镜(TEM)对新鲜制备复合颗粒的表面形貌进行测定。对复合颗粒进行适当稀释,取一滴样液加到覆有聚乙烯醇缩甲醛脂膜的铜网上,水平放置 2~3 min,用滤纸吸去表面多余溶液,再滴加一滴 2%磷钨酸溶液对颗粒进行负染 2 min,然后将铜网在滤纸上放置 2 min 使充分染色并吸取多余的染液,置于红

外灯下干燥后用透射电子显微镜观察并拍照。

1.3.5 数据统计分析 每个试验重复3次,试验结果以3个测量值的平均值 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS Statistics 26.0 软件 Duncan 检验法对数值进行差异显著性分析 ($P < 0.05$),采用 Origin 8.0 软件作图。

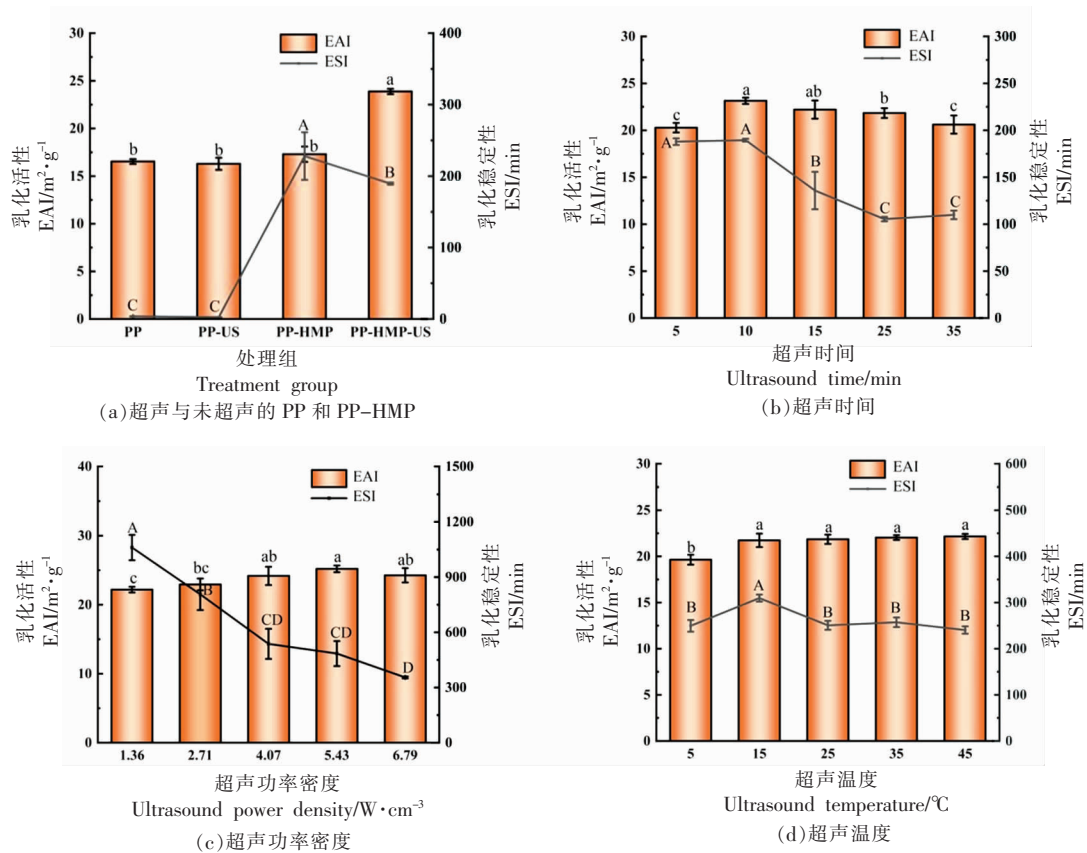
2 结果与分析

2.1 超声对 PP-HMP-US 复合颗粒乳化性的影响

超声对 PP-HMP-US 复合颗粒乳化性的影响如图 1 所示。PP 和超声豌豆蛋白(PP-US)的乳化稳定性较差。当 HMP 溶液加入 PP 后,PP 与 HMP 结合形成可溶性复合物。HMP 的静电斥力和空间位阻抑制蛋白的聚集,减少絮凝的产生并提高乳化稳定性^[18]。与 PP-HMP 相比,超声作用于 PP-

HMP 复合颗粒时,产生的空化效应和微射流使分子结构发生改变,促使吸附在油水界面的蛋白分子增多,并且增强了界面膜的刚性,提高 PP-HMP-US 的乳化活性^[19]。

随着超声时间的延长,PP-HMP-US 复合颗粒的乳化活性先增大后减小,在 10 min 时达到最大;随着超声温度和功率密度的增强,PP-HMP-US 复合颗粒的乳化活性在 15 °C 和 5.43 W/cm³ 时达到最大后趋于平稳。复合颗粒的乳化稳定性随着超声时间、功率密度与温度的增加出现降低的趋势。随着超声作用的增强 HMP 逐渐被降解,产生的静电斥力和空间位阻效应减弱,影响颗粒运动速度和疏水基团的暴露,导致乳液稳定性降低^[16]。



注:不同小写字母表示乳化活性的差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示乳化稳定性的差异显著($P < 0.05$)。

图 1 超声对 PP-HMP-US 乳化活性和稳定性的影响

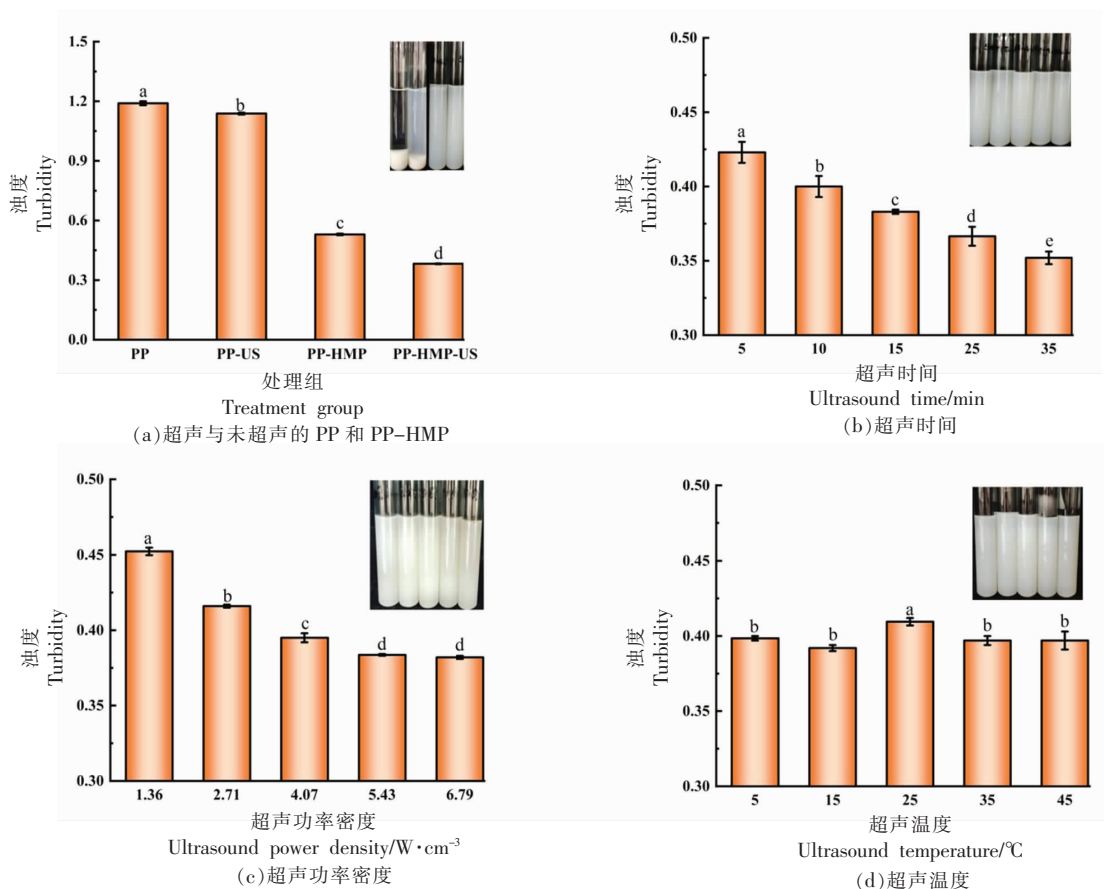
Fig.1 Effects of ultrasound on emulsifying activity and stability of PP-HMP-US

2.2 超声对 PP-HMP-US 复合颗粒理化特性的影响

2.2.1 浊度 图 2 表示超声对 PP-HMP-US 复合颗粒浊度的影响。图 2a 中, PP 和 PP-US 均有明显的相分离现象, 浊度较高, 放置一段时间后出现沉淀。当 HMP 加入后, 由于 PP 和 HMP 之间通过相互作用发生络合, 形成的 PP-HMP 复合颗粒表现出较高的稳定性, 浊度显著降低, 并且没有出现相分离现象。超声作用于 PP-HMP 复合颗粒, 显著降低了复合颗粒的浊度。由于超声处理后非聚集蛋

白质的结构改变, 获得了较小复合物颗粒尺寸, 有助于增加可用于光散射的表面积, 从而降低浊度^[20]。

如图 2b 和 2c 所示, 随着超声时间从 5 min 延长至 35 min, PP-HMP-US 复合颗粒的浊度从 0.423 降至 0.343, 随着超声功率密度增大至 5.43 W/cm³, 复合颗粒的浊度逐渐降低达到最小值后趋于平稳。从图 2d 可知, 与其它温度相比, 超声温度 25 °C 时, 复合颗粒浊度较高。



注: 不同小写字母表示同一超声因素不同组差异显著 ($P < 0.05$)。

图 2 超声对 PP-HMP-US 浊度的影响

Fig.2 Effects of ultrasound on turbidity of PP-HMP-US

2.2.2 粒径和 PDI 表 1 表示了超声处理对 PP 和 PP-HMP 复合颗粒的粒径和 PDI 的影响, PP 的平均粒径为 $(15\ 702.12 \pm 1\ 465.45)$ nm, PP 经超声后的粒径显著减小至 $(4\ 395.81 \pm 214.17)$ nm, 超声处理对 PP 的 PDI 无显著影响。与 PP 相比, PP-HMP 复合颗粒具有较小的粒径和较窄的分布, 表明 HMP 的加入抑制蛋白聚集, 并与 PP 颗粒形成可

溶复合物^[15]。超声处理后, PP-HMP-US 复合颗粒粒径和 PDI 均降低。超声的空化效应产生的湍流和剪切力破坏颗粒分子间的非共价键, 打开了水溶液中颗粒内部紧密堆积的结构, 导致蛋白质聚集体解离, 复合物的粒径显著减小^[21]。

随着超声时间的延长, PP-HMP-US 复合颗粒的粒径和 PDI 逐渐减小; 在超声温度为 5~45 °C 范

围内,复合颗粒的粒径及 PDI 没有显著变化;超声功率密度从 1.36 W/cm^3 增加至 5.43 W/cm^3 时,复合颗粒的粒径显著减小,分布更加均匀,超声功率进一步增大,复合颗粒的粒径和 PDI 均增大,说明

过高的功率会导致小颗粒聚集,增加复合颗粒在分散体系中的粒径。因此,超声作用可以使复合颗粒获得较小粒径,且粒径分布更集中,在水相体系中具有较高稳定性。

表 1 超声对 PP-HMP-US 粒径、PDI、Zeta 电位的影响

Table 1 Effects of ultrasound on particle size, PDI and Zeta potential of PP-HMP-US

超声条件	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
PP	$15\ 702.12 \pm 1\ 465.45^a$	0.47 ± 0.01^a	-16.10 ± 0.20^a
PP-US	$4\ 395.81 \pm 214.17^b$	0.43 ± 0.13^a	-15.65 ± 0.44^a
PP-HMP	$1\ 453.26 \pm 65.19^c$	0.34 ± 0.04^b	-31.94 ± 2.45^b
PP-HMP-US	541.44 ± 16.67^c	0.27 ± 0.01^c	-37.88 ± 1.22^c
超声时间/min	5	707.01 ± 17.82^a	-28.42 ± 1.76^b
	10	593.40 ± 23.32^b	-39.54 ± 2.02^d
	15	541.44 ± 16.67^c	0.27 ± 0.01^{ab}
	25	513.31 ± 11.53^c	0.23 ± 0.01^b
	35	471.20 ± 1.98^d	0.22 ± 0.04^b
超声功率密度/ $\text{W} \cdot \text{cm}^{-3}$	1.36	857.00 ± 15.10^a	-33.8 ± 0.26^{ab}
	2.71	687.73 ± 14.97^b	-29.64 ± 2.48^a
	4.07	618.04 ± 23.30^c	0.27 ± 0.01^c
	5.43	555.06 ± 4.68^d	0.26 ± 0.02^{bc}
	6.79	573.85 ± 7.55^d	0.28 ± 0.02^a
超声温度/ $^{\circ}\text{C}$	5	591.07 ± 11.09^a	-32.54 ± 0.37^{bc}
	15	574.49 ± 14.54^{ab}	0.26 ± 0.04^a
	25	570.11 ± 16.26^{ab}	0.28 ± 0.02^a
	35	555.06 ± 15.07^b	0.25 ± 0.02^a
	45	566.89 ± 15.34^{ab}	0.25 ± 0.03^a

注:不同小写字母表示不同组差异显著($P < 0.05$)。

2.2.3 Zeta 电位 Zeta 电位的大小表明胶体系统中相邻粒子之间的静电吸引或排斥程度,是分散体稳定性的关键指标。表 1 显示了超声对 PP-HMP-US 复合颗粒 Zeta 电位的影响。PP 在超声处理前、后的 Zeta 电位没有显著差异;当 HMP 加入后,带负电的 HMP 与 PP 发生结合形成的静电复合物带有更多负电荷,从而使 PP-HMP 复合颗粒的电位绝对值增大。PP 与 HMP 之间的相互作用提高了分散体的稳定性,改善复合颗粒乳化性能^[16]。PP-HMP 复合颗粒经超声后电位绝对值升高。超声影响 HMP 表面电荷的数量和分布,同时超声的空化效应可以使 PP 分子展开并破坏蛋白质聚集体,从而改变 PP 表面的净电荷^[22],影响 PP-HMP-US 的电位绝对值。

超声处理 10 min 时 PP-HMP-US 复合颗粒电

位绝对值较大为 $(39.54 \pm 2.02) \text{ mV}$,表明短时间超声可获得更稳定的分散体系。然而,随着超声时间的继续延长,复合颗粒电位的绝对值逐渐降低。超声温度和功率密度分别为 $15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 4.07 W/cm^3 时,PP-HMP 电位绝对值较大分别为 $(33.13 \pm 2.37) \text{ mV}$ 和 $(35.32 \pm 1.10) \text{ mV}$ 。

2.3 超声对 PP-HMP-US 复合颗粒结构特性的影响

2.3.1 二级结构 图 3 为 PP-HMP-US 的 FTIR 图谱。与 PP 相比,PP-HMP 复合颗粒的光谱中酰胺 II 带吸收峰出现红移,并在 $1\ 020 \sim 1\ 103 \text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 745 \text{ cm}^{-1}$ 处出现新的吸收峰,这两处新的吸收峰是由半乳糖醛酸(GalA)羧基形成的酯键($-\text{COOR}$)在此波段的特异吸收^[23], $1\ 020 \sim 1\ 103 \text{ cm}^{-1}$ 处吸收峰是由羧基形成的 $-\text{COOR}(\text{C}-\text{O})$ 和 $-\text{COO}-$ 伸缩

振动引起,是 HMP 中的 GalA 在指纹区($1\ 473\sim 1\ 000\ \text{cm}^{-1}$)的特征吸收峰^[24],与单独 PP 相比,PP-HMP 复合颗粒在-OH 伸缩振动区($3\ 200\sim 3\ 420\ \text{cm}^{-1}$)的吸收带蓝移($3\ 294\ \text{cm}^{-1}$ 到 $3\ 279\ \text{cm}^{-1}$),在 C-H 伸缩振动区($2\ 700\sim 3\ 000\ \text{cm}^{-1}$)的吸收带出现红移($2\ 928\ \text{cm}^{-1}$ 到 $2\ 930\ \text{cm}^{-1}$),表明复合颗粒中 PP 和 HMP 之间的相互作用可能与氢键的形成和 C-H 的拉伸有关。从图谱可以看出,超声后 PP-HMP-US 复合颗粒的红外光谱强度减弱,酰胺 II 带、酰胺 III 带吸收峰以及-OH 伸缩振动区域发生轻微红移,说明氨基酸环境向更加亲水的环境转移^[25]。

通过对酰胺 I 带进行傅里叶去卷积结合 Gaussian 拟合,得到蛋白质二级结构的定量信息(如表 2 所示)。与 PP 相比,PP-HMP 复合颗粒的 β -转角和 α -螺旋相对含量增大, β -折叠和无规卷曲相对含量减少,表明 HMP 能够抑制 PP 的聚集,使 PP 的有序结构增加^[26]。从表中可以看出,超声处理使 PP-HMP-US 复合颗粒中的 β -折叠展开形成 α -螺旋,说明超声的空化作用会导致二级结构相对含量发生变化,而蛋白质的二级结构折叠形成线状或螺旋螺旋会影响蛋白质的空间构象^[27]。超声时间对复合颗粒的 α -螺旋和无规卷曲含量影响不显著,随着超声时间的延长,PP-HMP-US 复合颗粒的 β -折叠含量减小, β -转角含量增大,说明长时间的超声处理会破坏 β -折叠片中的氢

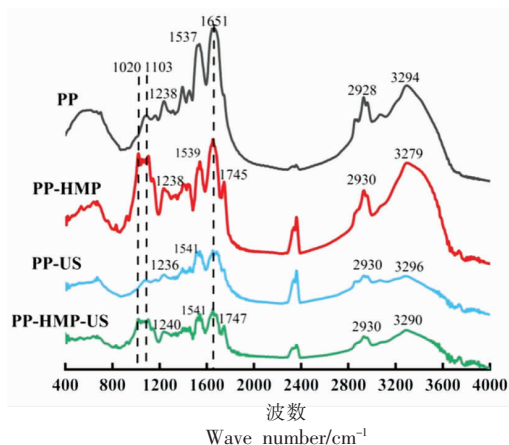


图 3 超声前、后 PP 和 PP-HMP 复合颗粒的傅里叶红外光谱图

Fig.3 FTIR spectra of PP and PP-HMP composite particles before and after ultrasound

键,使多肽链反转形成 β -转角,进而导致复合颗粒的结构松散,乳化活性和稳定性降低。当超声功率密度增大至 $5.43\ \text{W}/\text{cm}^3$ 时,PP-HMP-US 复合颗粒 β -转角逐渐向 α -螺旋和 β -折叠转变,表明适当的超声功率密度可促进 PP 和 HMP 分子间的分子间相互作用,进而增强蛋白质的柔性结构,更易于形成界面吸附,提高复合颗粒的乳化活性。随着超声温度的增大,复合颗粒无规则卷曲的相对含量增多,过高的超声温度使复合颗粒形成更多无序的分子结构。

表 2 超声对 PP-HMP-US 二级结构相对含量的影响

Table 2 Effects of ultrasound on the relative content of secondary structure of PP-HMP-US

样品	β -折叠/%	无规则卷曲/%	α -螺旋/%	β -转角/%
PP	40.41 ± 0.23^a	26.03 ± 0.16^a	19.89 ± 0.13^c	13.67 ± 0.07^b
PP-US	22.19 ± 1.33^b	21.55 ± 0.81^b	28.51 ± 1.53^{ab}	27.76 ± 3.68^a
PP-HMP	19.29 ± 1.02^{bc}	20.27 ± 0.57^b	26.61 ± 1.00^b	33.85 ± 0.53^a
PP-HMP-US	17.39 ± 0.4^c	21.38 ± 0.83^b	29.91 ± 0.04^a	32.04 ± 0.13^a
超声时间/min				
5	18.45 ± 0.43^a	21.47 ± 0.62^a	28.84 ± 0.16^a	31.24 ± 0.35^b
10	17.39 ± 0.42^{ab}	21.38 ± 0.83^a	29.91 ± 0.04^a	32.04 ± 0.13^b
45	16.83 ± 0.18^b	21.22 ± 0.47^a	28.51 ± 0.37^a	33.46 ± 0.28^a
超声功率密度/ $\text{W} \cdot \text{cm}^{-3}$				
1.36	15.93 ± 0.65^b	21.27 ± 0.01^a	28.07 ± 0.64^{ab}	34.74 ± 0.01^a
2.71	17.64 ± 0.06^a	20.29 ± 0.04^b	27.87 ± 0.10^b	34.19 ± 0.03^b
5.43	17.39 ± 0.42^a	21.38 ± 0.83^a	29.91 ± 0.04^a	32.04 ± 0.13^c
超声温度/ $^{\circ}\text{C}$				
5	16.65 ± 0.37^a	20.01 ± 0.37^b	28.13 ± 0.23^b	35.23 ± 0.52^a
15	17.39 ± 0.42^a	21.38 ± 0.42^a	29.91 ± 0.04^a	32.04 ± 0.13^b
45	17.17 ± 0.05^a	22.24 ± 0.16^a	27.66 ± 0.27^b	32.94 ± 0.37^b

注:不同小写字母表示不同组差异显著($P < 0.05$)。

2.3.2 三级结构 蛋白质的内源性荧光主要由色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)残基提供,是蛋白质三级结构变化的重要指标。图4显示了超声对PP及PP-HMP复合颗粒内源荧光光谱的影响。与PP的内源荧光最大发射波长 λ_{\max} (335 nm)相比,PP-US的 λ_{\max} (333 nm)发生蓝移,而且荧光强度显著降低,这可能是由于超声产生的空化效应导致蛋白质分子暴露的Trp等发色团被猝灭^[28]。添加HMP后,PP-HMP复合颗粒的荧光强度降低且 λ_{\max} (333 nm)发生蓝移,复合物的形成改变了Trp残基的微环境,表明PP和HMP之间的疏水相互作用参与了复合物的形成,降低了蛋白分子中Trp残基的暴露程度,使其形成了更紧密的三级构象^[29]。超声处理后,PP-HMP-US复合颗粒的荧光强度进一步降低, λ_{\max} 发生红移,表明超声影响Trp等发色团的极性微环境,超声处理时空化泡的瞬间坍塌会造成局部升温 and 空化作用,促进PP和HMP分子的结合,进一步降低Trp发色基团的暴露程度,导致蛋白的三级结构发生变化^[30]。

2.3.3 微观结构 利用TEM观察复合颗粒时,PP显色较深,而亲水性多糖HMP会显色较浅。从图5a和5b可知,单独PP(黑色部分)呈现出球状结构。PP-HMP复合颗粒如图5c所示,黑色部分为PP内核,浅灰色部分为HMP外层,而两者之间交联的灰色部分可能是由于糖链段因其较柔软和灵活在样品制备时发生脱水聚集作用^[31]。将PP-HMP复合颗粒进一步超声(图5d),超声的空化作用产生了巨大的剪切力和压强,使得粒子间发生猛烈地撞击,不断地撞击使原先伸展在粒子表面的不规则的蛋白结构发生断裂^[32],促进HMP和PP的结合,HMP嵌入PP的球状结构中,形成了规则有序类似毛线团的结构。

3 结论

本文以豌豆蛋白和高酯果胶作为蛋白和多糖基质,研究超声对PP-HMP-US复合颗粒理化和结构特性的影响。结果表明:PP颗粒不稳定,HMP可以抑制蛋白聚集,降低PP的浊度、粒径和PDI,增大其Zeta-电位绝对值,使PP-HMP复合颗粒的乳化活性和稳定性显著增强;超声作用于复合颗粒,可以增强分子之间的相互作用,使PP-HMP-

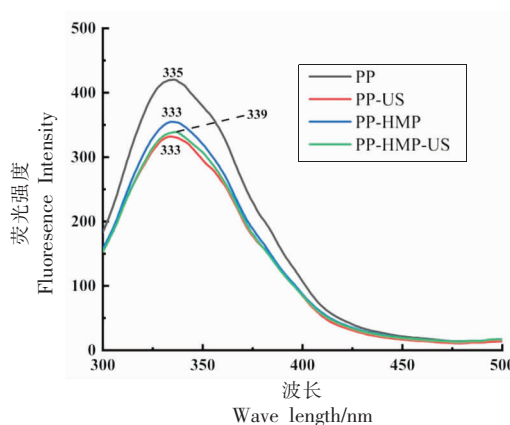


图4 超声前、后PP与PP-HMP的荧光光谱
Fig.4 Fluorescence spectra of PP and PP-HMP before and after ultrasound

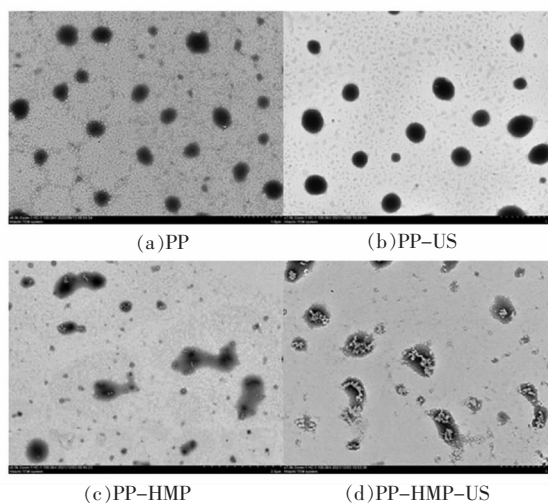


图5 PP、P-US、PP-HMP、PP-HMP-US的透射电镜图

Fig.5 Transmission electron micrographs of PP, PP-US, PP-HMP, PP-HMP-US

US复合颗粒的浊度、粒径和PDI显著降低,Zeta-电位绝对值增大,并在超声10 min、5.43 W/cm³、15℃时得到较高乳化活性和稳定性。通过对PP-HMP复合颗粒的结构分析,结果发现HMP的添加使PP的有序结构增加,超声使PP-HMP-US复合颗粒的 β -折叠展开形成 α -螺旋,同时促进PP和HMP的结合,使Trp基团的暴露程度降低;而超声时间过长或温度过高均会使分子结构变得松散无序,导致复合颗粒乳化活性和稳定性下降。TEM结果表明,超声促使HMP嵌入PP球状结构中,形成更加规则有序的结构,研究结果为豌豆蛋

白在食品加工中的应用提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] 夏轩泽, 李言, 钱海峰, 等. 豌豆蛋白乳化性及其改善研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(2): 279-284.
XIA X Z, LI Y, QIAN H F, et al. Research progress on improvement the emulsification property of pea protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(2): 279-284.
- [2] LAN Y, OHM J B, CHEN B C, et al. Phase behavior and complex coacervation of concentrated pea protein isolate-beet pectin solution[J]. Food Chemistry, 2019, 307(1): 125536.
- [3] SCHMITT C, SANCHEZ C, DESOBRY-BANON S, et al. Structure and technofunctional properties of protein-poly-saccharide complexes: A review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1998, 38(8): 689-753.
- [4] HUANG Q, YU H, RU Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(1): 50-57.
- [5] DE FOLTER J, VAN RUIJVEN M, VELIKOV K. Oil-in-water Pickering emulsions stabilized by colloidal particles from the water-insoluble protein zein [J]. Soft Matter, 2012, 8(25): 6807-6815.
- [6] ALBANO K M, NICOLETTI V R. Ultrasound impact on whey protein concentrate-pectin complexes and in the O/W emulsions with low oil soybean content stabilization [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2018, 41: 562-571.
- [7] TIAN Y, ZHANG Z, TAHA A, et al. Interfacial and emulsifying properties of β -conglycinin/pectin mixtures at the oil/water interface: Effect of pH[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 109: 106145.
- [8] ALBANO K M, CAVALIERI N, NICOLETTI V R. Electrostatic interaction between soy proteins and pectin in O/W emulsions stabilization by ultrasound application[J]. Food Biophysics, 2020, 15(3): 297-312.
- [9] CHEMAT F, ZILL-E-HUMA, KHAN M K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2010, 18(4): 813-835.
- [10] MIRMOGHHTADAIE L, ALIABADI S S, HOSSEINI S M. Recent approaches in physical modification of protein functionality[J]. Food Chemistry, 2016, 199(15): 619-627.
- [11] 包亚妮, 袁芳. 不同方法在蛋白-多糖复合反应中的应用现状[J]. 食品工业科技, 2012, 33(11): 383-387.
BAO Y N, YUAN F. Research status of applications of different methods in protein-polysaccharide interactions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(11): 383-387.
- [12] ZHANG Q T, TU Z C, XIAO H, et al. Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate[J]. Food & Bioproducts Processing, 2014, 92(1): 30-37.
- [13] GUO Q, MU T H. Emulsifying properties of sweet potato protein: Effect of protein concentration and oil volume fraction[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(1): 98-106.
- [14] YI J, GAN C, WEN Z, et al. Development of pea protein and high methoxyl pectin colloidal particles stabilized high internal phase pickering emulsions for β -carotene protection and delivery[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 113: 106497.
- [15] FENG T T, WANG X J, WANG X W, et al. High Internal phase Pickering emulsions stabilized by pea protein isolate-high methoxyl pectin-EGCG complex: Interfacial properties and microstructure [J]. Food Chemistry, 2021, 350(12): 129251.
- [16] MA X B, YAN T Y, HOU F R, et al. Formation of soy protein isolate(SPI)-citrus pectin(CP) electrostatic complexes under a high-intensity ultrasonic field: Linking the enhanced emulsifying properties to physicochemical and structural properties [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 59: 104748.
- [17] ZHANG Y H, ZHAO M M, NING Z X, et al. Development of sono-assembled, bifunctional soy peptide nanoparticle for cellular delivery of hydrophobic active cargos [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(16): 4208-4218.
- [18] GHARSALLAOUI A, YAMAUCHI K, CHAMBIN O, et al. Effect of high methoxyl pectin on pea protein in aqueous solution and at oil/water interface [J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 80(3): 817-827.
- [19] 杨会丽, 马海乐. 超声波对大豆分离蛋白物理改性

- 的研究[J]. 中国酿造, 2009(5): 24-27.
- YANG H L, MA H L. Physical modification of soy protein isolate by ultrasound [J]. China Brewing, 2009(5): 24-27.
- [20] HUANG L R, DING X N, LI Y L, et al. The aggregation, structures and emulsifying properties of soybean protein isolate induced by ultrasound and acid[J]. Food Chemistry, 2019, 279: 114-119.
- [21] ZHANG Z Y, REGENSTEIN J M, ZHOU P, et al. Effects of high intensity ultrasound modification on physicochemical property and water in myofibrillar protein gel[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 34: 960-967.
- [22] WANG T, WANG N, LI N, et al. Effect of high-intensity ultrasound on the physicochemical properties, microstructure, and stability of soy protein isolate-pectin emulsion [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 82: 105871.
- [23] 梁婉玲. 高酯果胶的结构及功能特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2021.
- LIANG W L. Study on structure and functional properties of high methoxyl pectin[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [24] 孙元琳, 崔武卫, 顾小红, 等. 傅里叶变换红外光谱法测定当归果胶多糖的酯化度[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(3): 682-685.
- SUN Y L, CUI W W, GU X H, et al. Determination of degree of esterification in pectic polysaccharides from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels by fourier transform infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2009, 29(3): 682-685.
- [25] 石彦国, 郭庆启, 杨晓婉, 等. 大豆蛋白-酪蛋白复合物结构的红外光谱分析[J]. 中国食品学报, 2018, 18(11): 225-232.
- SHA Y G, GUO Q Q, YANG X W, et al. FTIR analysis on the structure of soybean-casein protein complex[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(11): 225-232.
- [26] 龙慧, 李祎, 朱叶力, 等. 银耳多糖与大豆分离蛋白的相互作用及流变性能[J]. 2021, 43(16): 160-168.
- LONG H, LI Y, ZHU Y L, et al. The interaction and rheological properties of *Tremella fuciformis* polysaccharide and soybean protein isolate[J]. 2021, 43(16): 160-168.
- [27] RUAN J S, CHEN K, TUSZYNSKI J A, et al. Quantitative analysis of the conservation of the tertiary structure of protein segments[J]. Protein Journal, 2006, 25(5): 301-315.
- [28] 张淑艳, 章绍兵, 陈林, 等. 花生蛋白的浓度对其超声改性效果的影响[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2022, 43(3): 58-64.
- ZHANG S Y, ZHANG S B, CHEN L, et al. Effect of peanut protein concentration on its ultrasonic modification[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2022, 43(3): 58-64.
- [29] XUE F, LI C, ZHU X W, et al. Comparative studies on the physicochemical properties of soy protein isolate-maltodextrin and soyprotein isolate-gum acacia conjugate prepared through maillard reaction [J]. Food Research International, 2013, 51(2): 490-495.
- [30] WEN Q H, TU Z C, ZHANG L, et al. Effect of high-intensity ultrasound on the gel and structural properties of ctenopharyngodon idellus myofibrillar protein[J]. Journal of Food Biochemistry, 2017, 41(1): 12288.
- [31] WU N N, ZHANG J B, TAN B, et al. Characterization and interfacial behavior of nanoparticles prepared from amphiphilic hydrolysates of β -conglycinin-dextran conjugates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(52): 12678-12685.
- [32] 于钰. 酪蛋白自组装纳米粒的超声制备及其应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- YU Y. Preparation and application of self-assembled nanoparticles based on casein using ultrasonic method [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.

Effects of Ultrasound on the Physicochemical and Structural Properties of Pea Protein-high Methoxyl Pectin Composite Particles

Ma Kaiyuan¹, Sun Xiaoyang², Chen Fusheng¹, Zhang Lifen^{1*}

(¹School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001

²School of Food and Bioengineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046)

Abstract In this study, pea protein-high methoxyl pectin (PP-HMP) composite particles was prepared by ultrasound, and investigated the effect of ultrasound on the physico-chemical properties of PP-HMP composite particles. Meanwhile, the structure properties of PP-HMP-US were characterized by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), fluorescence spectroscopy, and transmission electron microscopy (TEM). The results showed that higher emulsifying activity and stability of pea protein-high methoxyl pectin by ultrasound (PP-HMP-US) were observed at 10 min, 5.43 W/cm³ and 15 °C. Compared with PP-HMP, the turbidity of PP-HMP-US was decreased. Particle size, and PDI of PP-HMP-US was reduced from 1 453.26 nm and 0.34 to 541.44 nm and 0.27, respectively. According to FTIR and fluorescence spectroscopy results, HMP could significantly increased the relative content of β -turn and α -helix from 13.67% and 19.89% to 33.85% and 26.61%, respectively. The addition of HMP inhibited the aggregation of PP, and formed a tighter tertiary conformation. Proper ultrasound treatment of PP could make its β -sheet unfold to form α -helix, and enhance the interaction of PP and HMP. Meanwhile, the exposure of tryptophan residues of PP decreased after ultrasound treatment. In addition, TEM results showed that ultrasound enhanced HMP embedded in PP spherical structure to obtain PP-HMP-US composite particles with more regular and ordered structure. The results provided a theoretical basis for the utilization of pea protein in food processing.

Keywords pea protein; high methoxyl pectin; ultrasound; physicochemical propertie; structure properties