

热-机械处理大豆分离蛋白的 FT-IR 光谱特性

赵学伟¹, 贾涛², 张雪林¹, 王章存¹, 章银良¹, 姜春鹏¹

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 郑州市质量技术监督检验测试中心, 河南 郑州 450006)

摘要:采用转矩流变仪在 30 ℃ 和 90 ℃ 对含水 60% 的大豆分离蛋白分别处理 2 min, 15 min, 30 min, 考察其 FT-IR 光谱特性的变化. 实验结果表明, 热-机械处理导致大豆分离蛋白分子的—CH₂ 中的 C—H 对称及非对称伸缩减弱甚至消失, C—H 伸缩振动和非对称伸缩向高位漂移, 蛋白二级结构中 α -螺旋和 β -转角含量降低, 同时伴有 β -折叠和无规则卷曲含量升高. 对于低水分大豆分离蛋白体系, 热-机械处理中的机械效应可能是导致其蛋白二级结构变化的主要因素.

关键词:大豆分离蛋白; 热-机械处理; FT-IR 光谱; 蛋白二级结构

中图分类号:TS201.2⁺1 **文献标志码:**A **DOI:**10.3969/j.issn.2095-476X.2014.03.003

FT-IR spectroscopic characterization of soybean protein isolates after thermo-mechanical treatments

ZHAO Xue-wei¹, JIA Tao², ZHANG Xue-lin¹, WANG Zhang-cun¹,
ZHANG Yin-liang¹, JIANG Chun-peng¹

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;

2. Zhengzhou Quality Technology Supervision Inspection and Testing Center, Zhengzhou 450006, China)

Abstract: Soybean protein isolate (SPI) with a moisture content of 60% was thermo-mechanically treated torque rheometer at 30 ℃ and 90 ℃ for 2 min, 15 min and 30 min respectively, and characterized by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. The results showed that after thermo-mechanical treatments, the symmetrical and asymmetrical stretching of C—H bonds in —CH₂ residues became weak and even disappeared the stretching vibration and asymmetrical stretching of C—H bonds drifted to higher position. The α -helix and β -turn decreased accompanying with β -sheet and random coil increased. For that lower moisture content SPI system, the mechanical effect during thermo-mechanical processing may be the major contributor to the transformation of secondary protein structure.

Key words: soybean protein isolate (SPI); thermo-mechanical treatment; FT-IR spectroscopy; secondary protein structure

0 引言

大豆分离蛋白(SPI)是较为常见的植物蛋白,

广泛用于食品及生物可降解材料的生产,加工可导致其发生分子水平上的变化,从而影响其营养价值和功能特性. 傅里叶转换红外光谱(FT-IR)是探测

蛋白分子水平变化的有效手段,具有样品用量较少、几乎不受蛋白质分子大小影响、没有光散射和荧光的影响及使动力学研究成为可能等优点.但蛋白体系中广泛存在的水在 $1\ 640\ \text{cm}^{-1}$ 附近的吸收对其准确定量造成很大影响,可以采用吹扫、差减及氘代等方法加以消除^[1].

前人研究了高压脉冲电场及热处理^[2]、高压^[3]、成膜过程^[4]、反向胶束提取^[5]、化学交联^[6]、水分含量变化($<30\%$)^[7]对 SPI 分子结构的影响.有些加工过程(如挤压组织化)中,物料在受热的同时,还受到较为明显的机械作用(包括剪切、拉伸等).关于热处理对 SPI 影响的研究较多,而对机械处理导致的 SPI 结构变化较少关注.张彩猛等^[8]研究了大豆蛋白溶液经受剪切处理后溶解性的变化.对于低水分(挤压组织化生产中,物料水分一般为 $30\% \sim 60\%$)大豆蛋白体系,其所经受的热-机械处理与 SPI 分子结构变化之间的关系尚不明确.

本文拟对含水量 60% 的 SPI 在 2 个设定温度下机械处理不同时间,通过 FT-IR 光谱分析,揭示热-机械处理对 SPI 分子结构的影响.

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

材料:SPI,郑州同创益生食品有限公司提供,调至含水量 60% .

设备:RM-400B 型 HAPRO 转矩流变仪,哈尔滨哈普电气技术有限公司产;NICOLET 5700 傅里叶红外光谱仪,美国 Nicolet 公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 热-剪切处理 分别设定转矩流变仪的一区、二区、三区温度皆为 $30\ ^\circ\text{C}$ 与 $90\ ^\circ\text{C}$,转速 $80\ \text{r}/\text{min}$;加样量 $62.50\ \text{g}$;剪切时间 $2\ \text{min}$, $15\ \text{min}$, $30\ \text{min}$.处理结束取出后迅速将样品搓碎,装入密封袋内, $-20\ ^\circ\text{C}$ 密封保存待测.

1.2.2 FT-IR 测定 波长扫描范围为 $4\ 000 \sim 550\ \text{cm}^{-1}$,扫描次数 32,分辨率 $2\ \text{cm}^{-1}$,环境温度 $25\ ^\circ\text{C}$.在与样品测定完全相同的条件下于室温敞开状态收集空气背景.在相同条件下测定水的红外光谱以作差减.

1.2.3 图谱处理 采用 OMNIC 6.0 数据处理软件处理原谱,将水的吸收从样品光谱中减去.用 Peakfit 4.12 软件,在 $1\ 700 \sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ (酰胺 I 带)范围内进行 2 点基线校正,做二阶导数谱并同时采

用 Gauss 峰形进行拟合,估算出子峰的个数和位置^[9],手动调整各子峰的峰高和半峰宽,多次拟合使残差最小($r^2 \geq 0.999$).对 SPI 酰胺 I 带进行谱带指认,根据各峰的面积,计算出 SPI 各二级结构的相对百分含量.

2 结果与分析

2.1 热-剪切处理中 SPI 体系的温度及扭矩变化

设定温度分别为 $30\ ^\circ\text{C}$ 和 $90\ ^\circ\text{C}$ 下剪切 $30\ \text{min}$ 过程中 SPI 体系的温度与扭矩的变化如图 1 所示.设定温度为 $30\ ^\circ\text{C}$ 时,机械处理过程中物料温度在达到设定值后仍然缓慢升高,最后达到 $56.2\ ^\circ\text{C}$,这是机械处理中的摩擦生热所致.设定温度为 $90\ ^\circ\text{C}$ 时,温度快速达到设定值后基本维持恒定在 $95.7\ ^\circ\text{C}$.关于扭矩的变化,图 1 中的第 1 个峰是加料时压紧物料所致.扭矩随后缓慢降低,高、低温处理时最后扭矩分别为 $4.1\ \text{N}\cdot\text{m}$ 和 $9.4\ \text{N}\cdot\text{m}$.高温处理过程中的扭矩较低,这是由于较高温度时物料的黏度较低,相同转速下扭矩也就较低.这一点也体现在输入的机械能上,高温处理 $2\ \text{min}$, $15\ \text{min}$, $30\ \text{min}$ 时输入的机械能分别为 $11.9\ \text{kJ}$, $40.1\ \text{kJ}$, $76.6\ \text{kJ}$,而低温时分别为 $17.6\ \text{kJ}$, $80.8\ \text{kJ}$, $160.7\ \text{kJ}$.

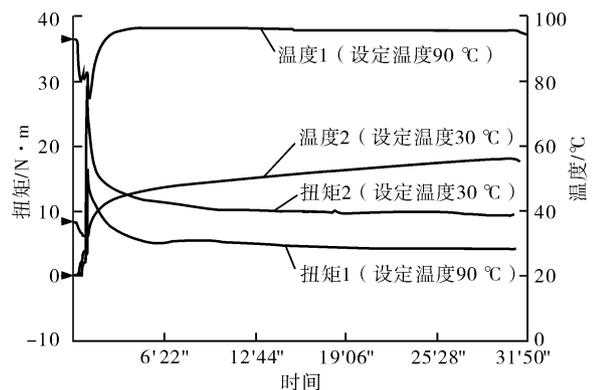


图 1 SPI 体系热-剪切处理中温度和扭矩的变化

仔细观察发现,对于高温处理,扭矩经历初始阶段的快速降低后有一个略为升高的过程.对于合成高分子材料,在高温处理一段时间后会发较大幅度的扭矩增大或减小现象,一般认为是高分子发生交联或降解所致.对于蛋白质这样的生物大分子,存在发生交联的可能,但高温下蛋白分子水化导致体积膨胀^[10]可能是主要因素.

2.2 热-机械处理 SPI 的红外光谱

图 2 给出了 SPI 原样及经过 $15\ \text{min}$ 处理的样品

的红外吸收光谱,各峰值对应的振动形式见表1.由图2可见,样品在酰胺I带($1\ 700\sim 1\ 600\text{ cm}^{-1}$)、酰胺II带($1\ 600\sim 1\ 500\text{ cm}^{-1}$)有较强吸收,后者的吸收稍弱; $3\ 000\sim 3\ 600\text{ cm}^{-1}$ 的较宽范围内出现A-OH吸收带.处理前后多数吸收峰的强度无明显变化.例外的是, $2\ 917.5\text{ cm}^{-1}$ (—CH₂中C—H的对称伸缩)及 $2\ 848.3\text{ cm}^{-1}$ (非对称伸缩)处的吸收峰在处理 after 明显减弱,且高温处理产生的影响更大.低温机械处理2 min, $2\ 848.3\text{ cm}^{-1}$ 峰肉眼可辨;对其余处理,该峰皆消失.同时考虑到低温机械处理时对物料输入的机械能较少,则可推断热效应是影响—CH₂中C—H伸缩振动的主要因素.

$3\ 275.1\text{ cm}^{-1}$ (氢键)吸收峰在处理 after 略向低位漂移. $2\ 954.1\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰向高位漂移 $4\sim 17\text{ cm}^{-1}$,且低温处理的漂移更多一些; $2\ 917.5\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰向高位漂移 $2\sim 15\text{ cm}^{-1}$. $1\ 631.6\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 542.7\text{ cm}^{-1}$ 的峰位波数略有减小或基本不变. $1\ 457.8\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 081.3\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰分别向低位漂移 $4\sim 5\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\sim 3\text{ cm}^{-1}$; $1\ 400.2\text{ cm}^{-1}$, $1\ 313.0\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 242.4\text{ cm}^{-1}$ 的峰位基本不变.

2.3 热-剪切处理对SPI分子二级结构的影响

对酰胺I带进行分峰,根据各子峰与二级结构对应关系^[15],对本研究中SPI酰胺I带各子峰进行指认,结果为: $(1\ 618\pm 1.0)\text{ cm}^{-1}$ 为 β -折叠; $(1\ 631\pm$

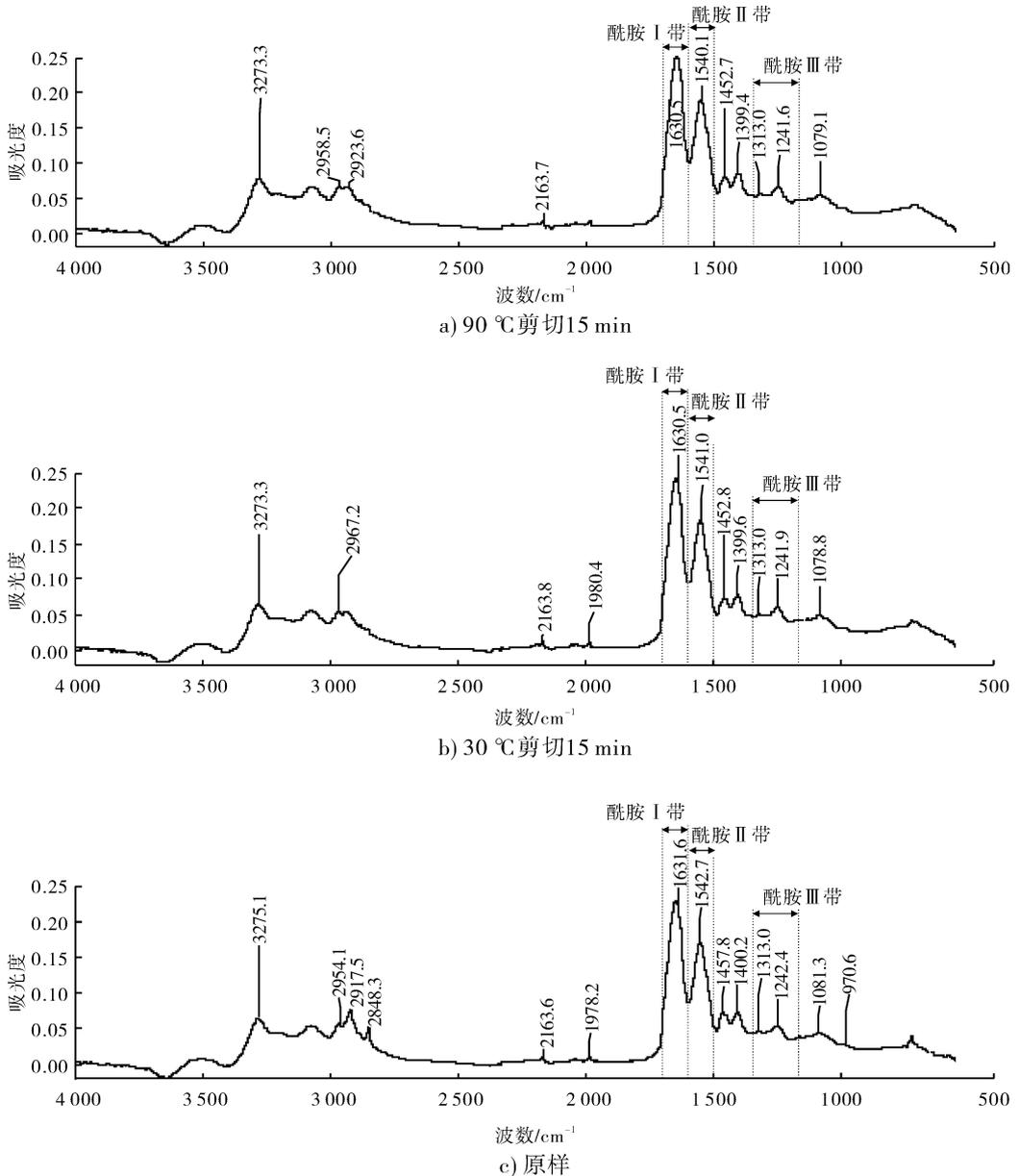


图2 SPI及其处理样品扣除水吸收后的红外光谱

表1 SPI原样的吸收峰及其对应的化学结构

吸收峰/ cm^{-1}	对应的化学结构
3 275.1	蛋白中 O—H、N—H 以及结合水中 O—H 基团与氨基酸中的 C=O 所形成的分子内和分子间氢键 ^[11]
2 954.1	饱和结构中 CH_3 和 CH_2 基团的 C—H 伸缩振动 ^[1]
2 917.5	CH_2 中 C—H 的非对称伸缩 ^[12]
2 848.3	CH_2 中 C—H 的对称伸缩 ^[12]
1 631.6	C=O 伸缩振动 ^[13]
1 542.7	N—H 弯曲 ^[1]
1 457.8	C(O)—NH 或 C(O)—NH ₂ 中 C—H 变角振动 ^[1,14]
1 400.2	C—OH 振动 ^[1]
1 313.0	C—O、C—O—C 振动 ^[14]
1 242.4	C—N 伸缩 ^[5]
1 081.3	来自不同基团,如芳香环的平面外 C—H 弯曲、磷脂中 PO_2 或 P—OH 的伸缩 ^[12]

2.0) cm^{-1} 为 β -折叠; (1 643 \pm 2.0) cm^{-1} 为无规则卷曲; (1 655 \pm 3.0) cm^{-1} 为 α -螺旋; (1 669 \pm 2.0) cm^{-1} 为 β -转角; (1 683 \pm 1.0) cm^{-1} 为 β -转角。

热-机械处理导致 1 655.9 cm^{-1} 处的 α -螺旋峰向高波段迁移 0.6 ~ 1 cm^{-1} , 无规则卷曲吸收峰的波数略有增大, 其余的基本不变。

不同热-机械处理 SPI 分子各二级结构的含量百分比见表 2。由表 2 可见, 总体来说, 与原样相比, 热-机械处理引起 β -折叠和无规则卷曲结构含量升高, 同时伴有 α -螺旋和 β -转角的含量降低。其中 β -折叠和 β -转角的变化幅度较大, 说明热-机械处理导致 SPI 分子无规则结构增多, 不同类型的规则结构之间发生转换。有研究表明, 挤压处理导致 SPI 无规则卷曲增多、 α -螺旋减少, 某些挤压条件下 β -折叠增多, 但是 β -转角含量增大^[16], 这与本研究的结果基本一致。刘燕燕等^[2] 研究表明, SPI 蛋白溶液 90 $^{\circ}\text{C}$ 加热 30 min 时, α -螺旋、 β -折叠含量

表2 不同热-机械处理 SPI 各二级结构含量 %

不同处理	β -折叠	无规则卷曲	α -螺旋	β -转角
原样	30.61	21.91	21.18	26.31
30 $^{\circ}\text{C}$ /2 min	32.26	22.80	20.32	24.61
30 $^{\circ}\text{C}$ /15 min	32.42	22.28	20.48	24.81
30 $^{\circ}\text{C}$ /30 min	32.84	22.30	20.24	24.62
90 $^{\circ}\text{C}$ /2 min	31.71	22.28	20.78	25.23
90 $^{\circ}\text{C}$ /15 min	32.55	22.05	20.32	25.07
90 $^{\circ}\text{C}$ /30 min	32.19	22.13	20.64	25.03

减少, 而 β -转角含量增加, 这与本研究的结果相反。本研究的对象为低水分体系, 且在加热的同时进行机械处理, 这些可能是造成结果差异的主要原因。这种差异也可能说明机械效应和热效应在对 SPI 二级结构的影响上表现出不同的趋势。

相同温度不同处理时间之间, 二级结构的含量变化不大。高温处理导致 β -折叠升高、 β -转角降低的幅度比低温处理的略小。高温处理时热效应更为显著, 但此时物料的黏度低(参见图 1), 使得输入的机械能减少, 相应机械效应引起的二级结构变化减弱。为此, 考察了单位机械能耗(SME)与 SPI 二级结构变化之间的关系, 结果见图 3。由图 3 可见, 不同温度处理的样品, 其二级结构含量基本各自在一条趋势线上, 说明对于低水分 SPI 体系, 在进行热-机械处理时, SME 是影响其二级结构变化的主要原因。SME > 400 kJ/kg 时, 二级结构不再发生变化, 说明机械作用对 SPI 二级结构的影响也有一定的限度。

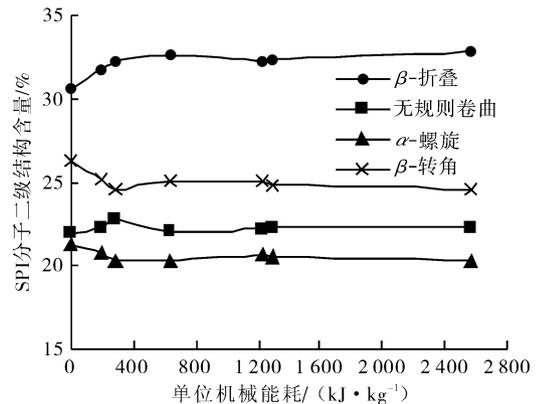


图3 SPI分子二级结构含量与单位机械能耗的关系

3 结论

本文采用转矩流仪研究了不同温度、时间下对含水 60% 的 SPI 红外光谱特性的变化, 结果表明: 2 917.5 cm^{-1} 和 2 848.3 cm^{-1} 吸收峰对热-机械作用最敏感, 经处理后明显减弱或消失。热-机械处理导致 SPI 中 2 954.1 cm^{-1} 和 2 917.5 cm^{-1} 吸收峰向高位漂移。

热-机械处理导致 SPI 分子无规则结构增多, 不同类型的规则结构之间发生转换, 表现为 α -螺旋和 β -转角含量降低、 β -折叠含量增多。对于低水分 SPI 体系, 热-剪切处理中的机械作用可能是引起蛋白质二级结构变化的主要原因。

参考文献:

- [1] Wellner N, Belton P S, Tatham A S. Fourier transform IR spectroscopic study of hydration-induced structure changes in the solid state of α -gliadins [J]. *Biochem J*, 1996, 319:741.
- [2] 刘燕燕, 曾新安, 陈晓东. FTIR 分析脉冲电场和热处理后的大豆分离蛋白结构变化[J]. *光谱学与光谱分析*, 2010, 30(9):2340.
- [3] Tang C H, Ma C Y. Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2009, 42:606.
- [4] Muriel S, Isabelle K, Jacques C. Molecular basis of film formation from a soybean protein: comparison between the conformation of glycinin in aqueous solution and in films [J]. *Int J Biol Macromol*, 1998, 23:241.
- [5] Chen X, Ru Y, Chen F, et al. FTIR spectroscopic characterization of soy proteins obtained through AOT reverse micelles [J]. *Food Hydrocol*, 2013, 31:435.
- [6] Gonzalez A, Strumia M C, Igarzabal C I A. Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: synthesis, characterization and biodegradation [J]. *J Food Eng*, 2011, 106:331.
- [7] Kealley C S, Rout M K, Dezfouli M R. Structure and molecular mobility of soy glycinin in the solid state [J]. *Bio-macromol*, 2008, 9(10):2937.
- [8] 张彩猛, 华欲飞, 孔祥珍. 高速剪切对醇法大豆浓缩蛋白溶解特征的影响 [J]. *大豆科学*, 2010, 29:853.
- [9] Surewicz W K, Mantsch H H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1988, 952(2):115.
- [10] Steinbach P J, Brooks B R. Protein hydration elucidated by molecular dynamics simulation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90:9135.
- [11] Schmidt V, Giacomelli C, Soldi V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate sodium dodecyl sulfate [J]. *Polym Degrad Stab*, 2005, 87:25.
- [12] Li C E, Chalmers J M, Griffiths P R. Applications of Vibrational Spectroscopy in Food [M]. New Jersey: Wiley, 2010.
- [13] Guerrero P, de la Caba K. Thermal and mechanical properties of soy protein films processed at different pH by compression [J]. *J Food Eng*, 2010, 100:261.
- [14] Liu Y Y, Zeng X A, Deng Z, et al. Effect of pulsed electric field on the secondary structure and thermal properties of soy protein isolate [J]. *Eur Food Res Technol*, 2011, 233:841.
- [15] Pelton J T and McLean L R. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure [J]. *Analytical Biochem*, 2000, 277:167.
- [16] 康立宁. 大豆蛋白高水分挤压组织化技术和机理研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.