

微波对大豆蛋白氧化聚集体结构及功能特性的影响

江连洲¹, 王一畅¹, 马依彤¹, 刘军^{2,3}, 杨宗瑞¹, 郭增旺^{1*}

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 山东禹王生态食业有限公司, 德州 253000;
3. 克东禹王大豆蛋白食品有限公司, 齐齐哈尔 161000)

摘要: 为了探究不同时间微波处理对大豆蛋白氧化聚集体的结构和功能性质的影响, 由偶氮二异丁脒盐酸盐 (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH) 诱导构建大豆蛋白氧化反应体系, 采用功率为 350 W 的微波对其照射不同时间 (0、10、20、30、40、50、60、70 s), 探究微波处理对氧化聚集大豆蛋白的结构特性和加工特性的影响。结果表明, 氧化可诱导形成粒径、分子量更大, 结构更致密的蛋白质聚集体, 同时对加工特性造成损害。适当时间 (<30 s) 的微波处理会导致氧化聚集体的分子结构打开、粒径降低和浊度降低, 无序结构减少, 进而改善了起泡性、乳化性和持水、持油性。长处理时间 (>30 s) 的微波处理导致已解聚的大豆蛋白分子重新形成更大的分子聚集体, 降低功能性质。这表明微波物理场可以通过改变大豆蛋白氧化聚集体的结构和聚集行为调节其功能性质, 为大豆蛋白功能性质的改善及微波在大豆蛋白氧化聚集体行为调控的应用方面提供参考。

关键词: 微波; 结构; 大豆蛋白; 氧化聚集体; 功能特性

doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202302061

中图分类号: S126

文献标志码: A

文章编号: 1002-6819(2023)09-0261-09

江连洲, 王一畅, 马依彤, 等. 微波对大豆蛋白氧化聚集体结构及功能特性的影响[J]. 农业工程学报, 2023, 39(9): 261-269. doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202302061 <http://www.tcsae.org>

JIANG Lianzhou, WANG Yichang, MA Yitong, et al. Effects of microwave treatment on the structural and functional properties of oxidized aggregated soybean proteins[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2023, 39(9): 261-269. (in Chinese with English abstract) doi: 10.11975/j.issn.1002-6819.202302061 <http://www.tcsae.org>

0 引言

大豆分离蛋白 (soy protein isolate, SPI) 是一种由脱脂豆粕为原料生产的蛋白质质量分数达 90% 以上的食品原料^[1], 因其具有优良的功能性质和生理活性等特点而被广泛应用于食品工业中^[2]。目前, 中国大豆分离蛋白年生产能力已达 70 万 t, 总产值突破百亿, 居世界第一。当储存和运输时间过长时, 大豆分离蛋白的氧化改变了理化性质, 导致其加工特性劣变, 并最终影响其在食品加工品质中的应用^[3]。脂质过氧化会产生各种活性氧成分物质 (reactive oxygen species, ROS), 它们已被证实是导致蛋白质氧化的重要因素^[4]。一些研究表明, 氧化修饰可引起蛋白质多肽骨架和氨基酸残基侧链的一系列变化, 促进二硫键的形成并加强蛋白质的聚集, 暴露后分子内的基团重组形成低聚物, 在疏水性和静电吸引作用下进一步形成大分子聚集体, 导致其溶解性和结

构柔性降低, 进而使功能性质劣化^[5]。且氧化程度越高, 蛋白质变性越剧烈, 其功能特性的变化越明显。因此, 调控蛋白质分子的聚集程度是改善蛋白质氧化聚集体功能活性下降的重要解决方式。

目前, 许多研究工作都集中在使用物理方法通过加热、机械作用等改变蛋白质的结构和聚集程度, 实现对蛋白质聚集体的调控。文献 [6] 表明, 高压均质使蛋白质解聚从而提高了蚕豆蛋白质的溶解度。文献 [7] 表明, 超声处理通过调控蛋白质聚集度的不同导致其不同的理化和功能特性。但是, 由于其巨大功率消耗和较低的生产能力, 高压均质化和超声波工艺很难在食品工业中广泛使用^[8]。微波作为一种物理加工技术, 由于其绿色、高效、简单的操作方式, 更适合在食品工业中应用^[9]。微波改性的机制主要是因为偶极和离子振动生热, 食品物料的带电性和极性基团在微波场下的响应不同, 会产生振动, 旋转, 最终表现为微波的靶向加热, 进而改变物料的理化和功能性质。现有研究表明微波处理能提高蛋白的乳化性、起泡性和交联特性等功能特性, 同时微波加热的特殊效应还能够改变蛋白的构象。一方面是因为微波交变电场下蛋白质氨基酸残基上的带电基团发生波动, 导致蛋白质分子间的电场和静电相互作用重新分布^[9]。另一方面蛋白质带电基团在微波场下的特殊响应也会对蛋白质的功能特性产生影响。文献 [10] 发现微波处理有助于形成紧凑的网络结构, 蛋白质结构刚性和柔性区域的位置被改变。文献 [11] 表明微波诱导了蛋白质极化和非极性基团的暴露, 蛋白质柔性区域增加, 从而使起泡

收稿日期: 2023-02-12 修订日期: 2023-04-26

基金项目: 山东省重点与研发计划项目 (2022CXGC010603); 黑龙江省优秀青年科学基金项目 (YQ2022C021); 黑龙江省百千万工程项目 (2021ZX12B02); 黑龙江省重点研发计划项目 (GA21B001); 国家重点研发计划项目 (2022YFF1100603); 黑龙江省支持重大科技成果转化项目 (CG19A002); 中国博士后面上项目 (2022M721995)

作者简介: 江连洲, 教授, 博士生导师, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。Email: jlzname@163.com。

※通信作者: 郭增旺, 副教授, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。Email: gzwname@163.com。

性得到改善。文献[12]研究表明大米蛋白受到微波处理后其内部的游离巯基减少, 生成了新的二硫键, 增强了蛋白质凝胶网络的强度, 进而改变大米的加工特性。这些研究均表明微波处理工艺能通过改变蛋白的聚集结构和分子构象来改变其功能特性。但是目前, 关于微波对氧化聚集体的结构和功能活性作用间的关系, 尤其是微波对大豆蛋白氧化聚集体的影响鲜有报道。

偶氮二异丁脒盐酸盐 (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH) 是一种具有良好可控性、稳定性、重复性和适用性的自由基引发剂, 因其不含脞基, 分解产物无毒, 同时比其他引发剂分解平稳, 安全性高。改变 AAPH 的浓度可以调节导致蛋白质氧化的过氧自由基的生成, 以模拟蛋白质在长期储存和运输过程中的环境, 并获得类似于实际储存和运输的氧化蛋白质模型。因此, 本研究以大豆蛋白为研究对象, 采用 AAPH 构建过氧自由基—大豆蛋白氧化体系, 模拟工厂储藏过程中实际产生的蛋白氧化聚集体, 将蛋白氧化聚集体分别进行不同时间的微波改性处理, 探究微波处理对蛋白结构特性和功能特性的影响, 进而研究微波对大豆蛋白氧化聚集体结构的改变与功能特性变化的关系, 以期从分子水平解析微波调控大豆蛋白氧化聚集体解聚作用机理, 从而为提升大豆蛋白氧化聚集体的功能性质以及大豆蛋白产品的开发和储藏提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白 (SPIs 纯度 94.2%), 山东禹王生态食业有限公司; 偶氮二异丁脒盐酸盐 (AAPH) 美国 Sigma 公司; 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 非转基因一级大豆油, 长春市辽都粮油有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

M1-L213B 型微波炉, 美的集团有限公司; pilot10-15EP 型真空干燥机, 博医康公司; Zetasizer Nano ZSP 型纳米粒度电位仪, 马尔文帕纳科技有限公司; Nicolet is50 型傅里叶变换红外光谱仪, 赛默飞世尔科技有限公司; F-4 500 型荧光分光光度计, 日本 HITACHI 公司。

1.3 样品制备

参考 CHENG 等[13]的方法, 以 10 mg/mL 的质量浓度把大豆分离蛋白溶解于磷酸盐缓冲溶液 (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 中。避光条件下加入 0.5 mmol/L 的 AAPH 后恒温 37 °C 水浴处理 6 h, 然后使用 14000 kDa 透析袋 4 °C 透析处理 72 h, 期间每隔 4 h 更换一次去离子水, 得到氧化大豆蛋白溶液, 经过冷冻干燥后制得大豆蛋白氧化聚集体样品, 命名为 OSPI。将制得的大豆蛋白氧化聚集体分别在功率为 350 W 的条件下进行微波处理 0、10、20、30、40、50、60、70 s 微波处理后制得 7 种不同的微波处理大豆蛋白氧化聚集体样品, 按照微波处理时间的不同分别命名为 WOSPI-10、WOSPI-20、WOSPI-30、WOSPI-40、WOSPI-50、WOSPI-60、WOSPI-70。

1.4 粒径分布测定

将样品用去离子水稀释为质量浓度 0.05 g/mL 的蛋白溶液, 加入测量池中, 采用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 设定参数为: 蛋白质折射率等于 1.460、分散剂折射率等于 1.330, 在 (25±2) °C 下测定其粒径分布特征和蛋白质分散指数。

1.5 浊度测定

参考文献[14]的方法, 并略加改动。将各组样品采用磷酸盐缓冲溶液配制所需蛋白浓度后, 磁力搅拌 60 min, 采用荧光光度计测定 600 nm 波长下的吸光度值 A , 浊度 T 由式 $T = 1.032 \times \frac{AV}{I}$ 计算获得, 式中 T 为浊度, A 为吸光度值, V 为稀释倍数, I 为光程 (0.001 m)。

1.6 硫磺素 T (Th T) 荧光检验分析

将样品用去离子水配制为 10 mg/mL 质量浓度样品溶液。将 4 mg 的 Th T 溶于 250 mL 的 pH 值 7.2, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (含 3 mmol/L 的 NaCl), 充分溶解后过 0.22 μm 滤膜除去不溶物质, 制得 Th T 溶液。将 50 μL 的样品溶液和 5 mL 的 Th T 溶液充分混匀后以 Th T 溶液为对照, 于 440 nm 激发波长, 482 nm 发射波长测定其荧光强度, 狭缝宽度均为 5 nm[15-16]。

1.7 傅里叶红外扫描光谱分析

称取 2 mg 样品与 200 mg 溴化钾研磨混匀压片测定傅里叶红外扫描光谱, 测定温度为 25 °C, 设定参数如下: 扫描波数为 4 000~400 cm⁻¹, 波数精度为 0.5 cm⁻¹, 分辨率为 4 cm⁻¹, 扫描 32 次。所得数据经 Peak Fit 软件对酰胺 I 带 1 750~1 550 cm⁻¹ 波段进行分析[17]。

1.8 内源性荧光光谱分析

使用 RF-7 000 PC 荧光分光光度计测定样品的荧光光谱, 将样品以 1 mg/mL 的浓度溶于去离子水中得到样品溶液, 在激发波长 290 nm、发射波长在 300~400 nm、夹缝宽均为 5.0 nm 的条件下测定样品的内源性荧光光谱[18]。

1.9 溶解度测定

将样品以 1 mg/mL 的浓度溶于去离子水中, 再于 4 °C 下 2 000 r/min 离心 15 min 取上清液。以 BSA 为标准蛋白, 使用 Lowry 法测定上清液中蛋白质的含量[19]。溶解度的计算公式为:

$$P_s = \frac{C_{\text{上}}}{C} \times 100\% \quad (1)$$

式中 P_s 为样品蛋白质的溶解度, %; $C_{\text{上}}$ 为上清液中的蛋白质含量, mg/mL; C 为样品中的蛋白质含量, 取 1 mg/mL。

1.10 持水性测定

参考 MCCONNELL 等[20]的方法并略作修改。取 300 mg 样品溶于 30 mL 去离子水中。再于 4 °C 下 1 500 r/min 离心 15 min 取沉淀, 测量其质量。持水性的计算公式为:

$$W_{\text{HC}} = \frac{W_{\text{沉淀}} - W}{W} \times 100\% \quad (2)$$

式中 W_{HC} 为样品的持水性, %; $W_{\text{沉淀}}$ 为沉淀的质量; W 为样品的质量, 取 300 mg。

1.11 持油性测定

参考 LIN 等^[21]的方法并略作修改。取 100 mg 样品溶于 20 mL 大豆油中,于 25 ℃ 漩涡振荡 15 min 使其充分混匀,再于 4 ℃ 下 1 500 r/min 离心 15 min 取沉淀,测量其质量。持油性的计算公式为:

$$O_{HC} = \frac{W_{沉淀} - W}{W} \times 100\% \quad (3)$$

式中 O_{HC} 为样品的持油性,%; $W_{沉淀}$ 为沉淀的质量; W 为样品的质量,取 100 mg。

1.12 起泡性及泡沫稳定性

参考 ZHANG 等^[22]的方法并略作修改。将样品以 1 mg/mL 的浓度溶于去离子水中,置于 4 ℃ 冰箱中水化 12 h 得到样品溶液。取 20 mL 样品溶液置于 100 mL 量筒内,使用 IKA T18 ULTRA-TURRAX 型高速均质机以 12 000 r/min 的速度在室温下均质 2 min,记录均质结束后 0 min 及 10 min 时的泡沫高度(以量筒刻度为准)。起泡性及泡沫稳定性的计算公式为:

$$F_C = \frac{V_0 - V}{V} \times 100\% \quad (4)$$

$$F_S = \frac{V_{30} - V_0}{V_0} \times 100\% \quad (5)$$

式中 F_C 为样品的起泡性,%; V_0 为样品溶液均质结束后 0 min 时的泡沫高度, mL; V 为样品溶液的体积, mL; F_S 为样品的泡沫稳定性,%; V_{30} 为样品溶液均质结束后 30 min 时的泡沫高度, mL。

1.13 乳化活性和乳化稳定性测定

参考 KINSELLA 等^[23]的方法并略作修改。将样品以 1 mg/mL 的浓度溶于去离子水中,置于 4 ℃ 冰箱中水化 12 h 得到样品溶液。取 21 mL 的蛋白溶液与 7 mL 的大豆油混合,使用 IKA T18 ULTRA-TURRAX 型高速均质机以 12 000 r/min 的速度在室温下均质 2 min 制得乳液。在乳液制备完成后的 0 min 和 10 min 时分别测定其吸光值。乳化活性和乳化稳定性的计算公式为:

$$E_{AI} = \frac{2 \times 2.303 A_0}{25 C_{蛋白}} \quad (6)$$

$$E_{SI} = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \Delta T \quad (7)$$

式中 E_{AI} 为样品的乳化活性, m^2/g ; A_0 为乳液在 0 min 时的吸光度; $C_{蛋白}$ 为样品溶液中的蛋白质含量,取 0.001 g/mL; E_{SI} 为样品的乳化稳定性, min; A_{10} 为乳液在 10 min 时的吸光度; ΔT 为两次取样的时间间隔,取 10 min。

1.14 激光共聚焦显微镜分析

参考殷静霖等^[24]的方法并略作修改。先用异丙醇为溶剂制备 1 mg/mL 的耐尔红染料以及 10 mg/mL 的耐尔蓝染料,分别过 0.22 μm 滤膜以去除不溶性物质。再取 1.13 中制得的乳液 100 μL 与 700 μL 的去离子水混匀后,加入 35 μL 的耐尔红染料、40 μL 的耐尔蓝染料。混匀后于避光环境静置 30 min 使其充分染色。使用染色的乳液制备激光共聚焦显微镜样片,在 550 nm 下激发耐尔红,490 nm 下激发耐尔蓝,于 20 \times 的物镜观察并拍摄。

1.15 数据处理与分析

所有的试验重复 3 次,结果用平均值 \pm 标准差表示,采用 SPSS 19.0 软件对试验数据进行 ANOVA 显著性分析, $P < 0.05$ 为显著性差异,采用 Origin 9 软件作图。

2 结果与分析

2.1 微波对大豆蛋白氧化聚集体粒径分布的影响

由蛋白质的粒径分布能直观地从宏观角度反映物理场作用下蛋白质分子中发生的聚集与解聚现象^[25]。微波处理对氧化大豆分离蛋白平均粒径的影响见图 1。由图 1 可知,与 SPI 的粒径分布相比,经过 AAPH 氧化处理后的 OSPI 粒径分布变为三峰分布,原有粒径峰均右移并在更大粒径处形成一个新的峰。这是因为大豆分离蛋白的蛋白质骨架及侧链基团受自由基攻击而附加上侧链基团,导致蛋白质发生了交联聚集^[26]。在微波处理后, WOSPI-10 的粒径分布变为双峰分布,当微波处理时间达到 40 s 后 WOSPI-40、WOSPI-50、WOSPI-60 的粒径分布呈现出小粒径峰降低,大粒径峰右移的趋势,在微波处理时间达到 70 s 时, WOSPI-70 的双峰均出现右移。这是因为短时间的微波处理能通过电场等非热效应促进大豆分离蛋白分子运动,增加了分子间碰撞发生概率,使得大豆分离蛋白分子间的非共价键断裂,原有的大粒径的氧化聚集体分子解聚为小粒径的氧化聚集体。而随着微波处理时间的逐渐增加,大豆分离蛋白氧化聚集体碰撞加剧,系统内热效应增强,诱导已经解聚的氧化聚集体分子出现变性,形成了新的化学键,增强了分子间相互作用力,继而导致聚集体的出现, WOSPI 粒径增加^[27]。

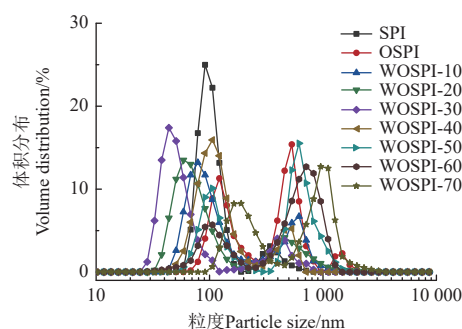
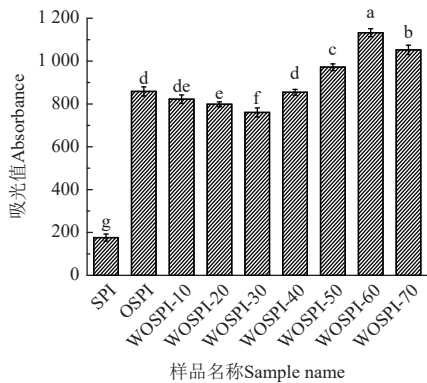


图 1 微波处理时间对大豆蛋白氧化聚集体粒径分布的影响
Fig.1 Effects of microwave treatment time on particle size distribution of OSPI (oxidized soybean protein aggregates)

2.2 微波对大豆蛋白氧化聚集体浊度的影响

蛋白质溶液的浊度取决于溶质即蛋白质自身的粒径大小,两者呈正相关,因此常用浊度来表征蛋白质的聚集和解离程度^[28]。由图 2 可知,与 SPI 的浊度相比,经过 AAPH 氧化处理后的 OSPI 的浊度显著增加 ($P < 0.05$)。这表明氧化处理可能引起蛋白溶液中的大分子氧化聚集体含量升高和粒径增加。随着微波处理时间的增加, WOSPI 的浊度整体上先降低后增加,并在微波处理 30 s 时达到极小值。这是因为在短时的微波处理中, OSPI 主要受电磁场等非热效应的影响,破坏了维持蛋白空间结构的非共价键,大豆分离蛋白分子间的聚合作用被削弱,导致 WOSPI 的浊度在前期呈下降趋势^[29]。然而长时间的微波处理下,已经解离出来的小分子氧化聚集体与原有的大分子氧化聚集体的结构被热效应破坏^[30],暴露了蛋白质内部基团,增加了蛋白质分子间的聚合机会,形成了大粒径的大豆蛋白聚集体,最终造成 WOSPI 的浊度上升。



注：小写字母 a、b、c... 为不同微波处理下浊度显著性分析结果（下同）（ $P<0.05$ ）。
Note: Lowercase letters a, b, c... are the significance analysis results of turbidity under different microwave treatments (the same below) ($P<0.05$).

图 2 微波处理时间对大豆蛋白氧化聚集体浊度的影响
Fig.2 Effects of microwave treatment time on turbidity of OSPI

2.3 微波对大豆蛋白氧化聚集体硫黄素 T 荧光强度的影响

硫黄素 T(Thioflavin T, Th T) 能特异性地平行插入纤维状蛋白聚集体内部的分子间反平行 β -折叠并与其结合，其荧光强度可以用来表征蛋白质聚集程度的变化。由图 3 可知，与 SPI 相比，OSPI 的 Th T 荧光强度显著升高，说明氧化处理显著增加了大豆分离蛋白中分子间反平行 β -折叠结构的含量。这可能是因为氧化处理会使得蛋白质分子通过二硫键等共价键的形成，诱导共价交联，继而通过分子间反平行 β -折叠结构形成大分子的氧化聚集体。而经过微波处理后，WOSPI 的 Th T 荧光强度随微波处理的时间整体呈现先下降后增加的趋势。这是因为微波处理引发的电场作用等非热效应对大豆分离蛋白氧化聚集体内部的氢键产生了作用，部分氢键断开，进而使得分子间反平行 β -折叠结构含量减少^[31]。当微波时间超过 20 s 以后，大豆分离蛋白氧化聚集体发生变性，蛋白表面的疏水性基团等被修饰，在分子间形成了二硫键、疏水键等，诱导小分子聚集体交联缔合形成大分子的热聚集体。而当微波处理时间达到 70 s 时，Th T 荧光强度的下降可能是因为纤维状聚集体的形成已经进入稳定期，生成速度减缓^[32]；同时热效应过强，诱导进一步聚集团聚，包

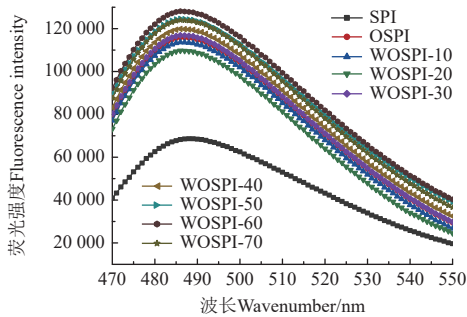


图 3 微波处理时间对氧化大豆分离蛋白硫黄素 T 荧光强度的影响
Fig.3 Effects of microwave treatment time on fluorescence intensity of Th T of OSPI

埋了部分分子间反平行 β -折叠结构，使得 Th T 无法与其结合，两者共同导致了荧光强度的下降。

2.4 微波对大豆蛋白氧化聚集体二级结构的影响

由表 1 可知，与 SPI 相比，OSPI 的二级结构出现显著变化（ $P<0.05$ ），蛋白质有序结构的减少和无序结构的增加表明氧化处理能破坏蛋白原有结构，通过分子间反平行 β -折叠形成氧化聚集体^[33]。随着微波处理时间的增加，WOSPI 的 α -螺旋、 β -转角和 β -折叠含量均呈现先增加后减少的趋势，而无规则卷曲和分子间反平行 β -折叠结构含量则相反。这是因为短时微波处理导致了大豆分离蛋白分子内部的偶极分子与极性侧链间发生高频振荡，诱导部分氢键断裂，增强了大豆分离蛋白的柔性，诱导了聚集体大分子的破碎。之后处理时间增加，存在的电场等非热效应的存在使得分子间碰撞机率大，更容易发生相互作用连接在一起，加速了自组装的过程，因而 OSPI 内的无序结构再次增多。AKKERMANS 等^[34]研究也表明，分子间的碰撞几率增加会显著促进蛋白聚集体的自组装。但是当微波处理时间达到 70 s 时，WOSPI-70 的分子间反平行 β -折叠结构开始下降。这可能是因为分子间反平行 β -折叠结构主要存在于聚集体核心中，而在微波处理带来的热效应作用下，聚集体形成进入稳定期，不再产生新的聚集体核心，反而转为聚集体之间的进一步聚集^[35]。

表 1 微波处理时间对大豆蛋白氧化聚集体二级结构的影响

Table 1 Effects of microwave treatment time on secondary structure of OSPI

样品名称 Sample name	无规则卷曲 Random coil/%	α -螺旋 α -helix/%	β -转角 β -turn/%	总 β -折叠 Total β -sheet/%	β_1 结构 (分子间反平行 β -折叠) Structure- β_1 (Intermolecular antiparallel β -sheet)/%
SPI	19.89±0.66 g	18.30±0.37 a	27.95±0.06 a	33.86±0.05 a	9.78±0.19 f
OSPI	33.13±0.31 c	13.60±0.06 e	23.98±0.20 d	29.29±0.49 d	15.68±0.40 c
WOSPI-10	30.56±0.40 d	14.24±0.30 d	24.76±0.05 c	30.44±0.37 c	14.24±0.15 d
WOSPI-20	28.47±0.17 e	14.77±0.18 c	25.62±0.26 b	31.14±0.04 b	13.58±0.35 e
WOSPI-30	28.16±0.12 f	15.40±0.33 b	25.81±0.39 b	30.63±0.25 c	14.29±0.29 d
WOSPI-40	29.27±0.18 d	14.78±0.20 c	24.87±0.31 c	31.08±0.36 b	15.62±0.09 c
WOSPI-50	32.45±0.67 c	13.90±0.31 e	23.53±0.16 e	30.12±0.11 c	16.24±0.15 b
WOSPI-60	34.83±0.08 b	12.81±0.06 f	22.18±0.05 f	30.18±0.25 c	16.91±0.21 a
WOSPI-70	35.64±0.44 a	12.08±0.23 g	21.69±0.22 g	30.59±0.22 c	16.40±0.07 b

2.5 微波对大豆蛋白氧化聚集体内源荧光强度的影响

由图 4 可知，与 SPI 相比，OSPI 内源荧光强度显著降低，这说明 OSPI 中出现氧化聚集现象^[36]。经过微波处理后，WOSPI 的内源荧光强度逐渐降低，最大吸收波

长 (λ_{max}) 先增加后减少，并在 30 s 时达到极大值。这表明色氨酸残基发生了荧光猝灭反应，且附近的微环境极性先增加后降低。这可能是因为微波处理导致的电场效应使得大豆分离蛋白分子间布朗运动加强，分子间碰撞

增加,继而处于激发态的大豆分离蛋白氧化聚集体分子间发生动态的荧光猝灭效应,导致荧光分子出现光度下降的现象;同时还会断开大豆分离蛋白氧化聚集体内部的疏水键等非共价键,使得内部的色氨酸残基暴露在极性环境中,进而导致 λ_{\max} 出现增加。处理时间过长时,大豆分离蛋白氧化聚集体重新交联形成大分子的热聚集体,色氨酸残基被埋入热聚集体的内部,继而导致 λ_{\max} 降低。

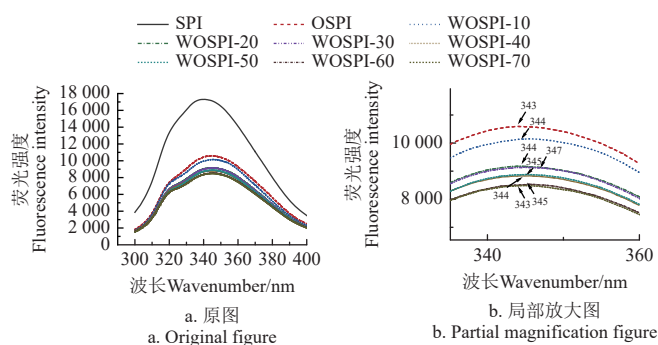


图4 微波处理时间对大豆蛋白氧化聚集体内源荧光强度的影响

Fig.4 Effects of microwave treatment time on endogenous fluorescence intensity of OSPI

2.6 微波对大豆蛋白氧化聚集体溶解度的影响

溶解度由蛋白质表面的疏水基团和亲水基团的性质决定,与其起泡性、乳化性等功能性质密切相关^[37]。由图5可知,与SPI相比,OSPI溶解度显著降低($P<0.05$)。这是因为在自由基在氧化过程中攻击了大豆分离蛋白的主链和侧链基团,形成了不溶性的氧化聚集体。随着微波处理时间的增加,WOSPI的溶解度呈现先增加后减少的趋势。这是由于适当的微波处理可以通过其非热效应使得蛋白分子极化,在水中高频振荡,非共价作用等被削弱导致结构更松散,从而使水分子容易进入蛋白内部与其发生水合,继而导致溶解度增加。而微波处理时间进一步延长导致热效应逐渐增强,大量暴露在大豆分离蛋白表面的疏水基团相互作用引发蛋白质发生缔合,导致溶解度下降^[38]。WANG等^[39]研究也表明,微波处理可以通过电场作用有效提升蛋白质的溶解度,但热效应增强则会导致蛋白质聚集形成不溶性组分,进而导致溶解度下降。

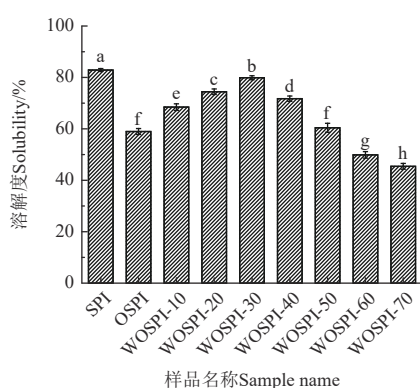


图5 微波处理时间对大豆蛋白氧化聚集体溶解度的影响

Fig.5 Effects of microwave treatment time on solubility of OSPI

2.7 微波对大豆蛋白氧化聚集体持水性的影响

持水性主要受蛋白质的构象等物理结构变化的影响^[40]。由图6a可知,与SPI相比,经AAPH氧化处理后的OSPI持水性显著下降($P<0.05$)。这是因为氧化会导致蛋白质聚集,形成不溶性的氧化聚集体,使得大豆分离蛋白分子刚性增强,结构稳定性下降,导致持水性下降。微波处理导致的振荡效应使得大豆分离蛋白分子内氢键、疏水键等非共价键断裂,打开了团聚的聚集体结构,使得分子舒展,柔性结构舒张,可以有效地吸附水分子。同时大豆分离蛋白中的 β -折叠结构有所增加,水分子更容易嵌入蛋白质空隙中,增强了大豆分离蛋白的持水性。之后微波处理时间延长,热效应诱导小分子聚集产生热聚集,继而形成大分子的不溶性热聚集体,阻碍了与水分子的接触,导致了持水性出现下降。邓芝申等^[41]研究表明,微波处理产生的热效应逐渐增加,大豆蛋白随之出现先展开后聚集的构象变化,持水性也出现了类似变化。

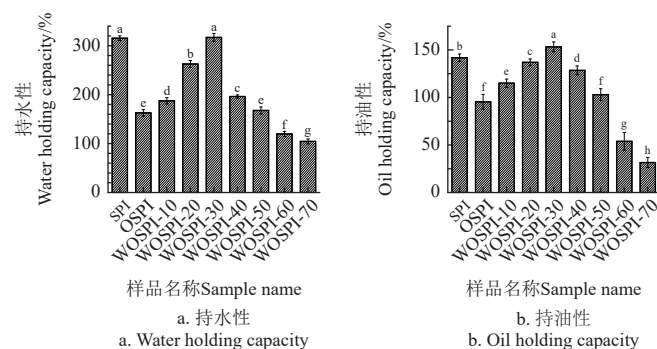


图6 微波处理时间对大豆蛋白氧化聚集体持水性及持油性的影响

Fig.6 Effects of microwave treatment time on water and oil holding capacity of OSPI

2.8 微波对大豆蛋白氧化聚集体持油性的影响

持油性是指一定重量的干基蛋白样品对油脂的保持能力,其作用基础来自蛋白质自身的疏水基团^[42]。由图6b可知,与SPI相比,经过AAPH氧化处理后的OSPI的持油性显著下降($P<0.05$)。这是因为大豆分离蛋白被氧化形成了氧化聚集体,疏水亲油性基团被包埋,阻碍OSPI与油脂分子结合。LI等^[43]研究也表明氧化会导致蛋白质表面疏水性的降低而降低持油性。随着微波处理时间的增加,WOSPI的持油性呈现出先增加后减少的趋势,并在30 s处达到极大值。这是因为短时微波处理中占据主导地位是非热效应,促进大豆分离蛋白氧化聚集体碰撞导致部分解聚,分子内氢键、疏水键等非共价键断裂,蛋白结构舒张,使得原本包埋在内部的疏水亲油性基团暴露到蛋白表面,进而与更多的油脂吸附结合。但是随着微波处理时间的进一步增加,表面的疏水性基团通过疏水相互作用发生交联,同时游离巯基也互相结合形成了二硫键,进而形成了大分子的聚集体,疏水基团重新包埋分子内部,导致不能与油脂充分结合,降低持油性。

2.9 微波对大豆蛋白氧化聚集体起泡性及泡沫稳定性的影响

由表2可知,与SPI相比,OSPI起泡性显著下降,稳定性显著增加($P<0.05$)。这是因为氧化过程中的自由基攻击大豆分离蛋白分子,导致蛋白变性,降低了蛋

白柔性,形成了大分子蛋白氧化聚集体,不易在气-水界面展开导致 OSPI 起泡性降低^[44-45]。经过微波处理后,OSPI 的起泡性随着微波处理时间的增加呈现出先增加后减少的趋势,泡沫稳定性整体来看也有相同趋势,两者分别于微波处理 30 s 和 20 s 处达到极大值。这是因为在微波的作用下,大豆分离蛋白出现极化现象,内部的非共价键被破坏,导致蛋白舒张展开柔性增强,促进了气-水界面的形成;舒张后的蛋白质在界面膜上形成的网状结构也更加稳定,所以增强了蛋白质的起泡性和泡沫稳定性。当处理时间过长时,热聚集体的形成导致气-水界面膜难以形成并维持,进而导致蛋白质的起泡性和泡沫稳定性出现下降。杨文敏等^[46]研究表明,在适当微波处理巴旦木蛋白后,蛋白结构伸展,更容易和水分子结合,提高了蛋白的溶解度,促进了蛋白向气-水界面扩散,继而增强了蛋白的起泡性,这与溶解度的变化相一致。

表 2 微波处理时间对大豆蛋白氧化聚集体起泡性及泡沫稳定性的影响

Table 2 Effects of microwave treatment time on foaming capacity and foaming stability of OSPI

样品名称 Sample name	起泡性 Foaming ability/%	泡沫稳定性 Foaming stability/%
SPI	94.37±6.56 a	56.13±1.68 d
OSPI	49.68±1.14 e	66.27±6.09 bc
WOSPI-10	57.35±5.63 d	72.79±3.20 b
WOSPI-20	68.59±4.75 c	79.33±0.43 a
WOSPI-30	81.97±4.55 b	71.12±4.37 b
WOSPI-40	64.01±9.82 cd	74.24±5.74 ab
WOSPI-50	42.66±3.00 f	67.79±3.06 bc
WOSPI-60	33.84±2.60 g	64.57±3.85 c
WOSPI-70	25.74±4.04 h	64.38±4.88 c

2.10 微波对大豆蛋白氧化聚集体乳化活性和乳化稳定性的影响

由表 3 可知, OSPI 的乳化活性和乳化稳定性比 SPI 显著降低 ($P<0.05$)。这可能是因为蛋白质氧化后降低了分子柔性,使得蛋白质与油-水界面难以结合,无法形成稳定的界面膜。随着微波处理时间的增加, WOSPI 的乳化活性及稳定性均呈现先增加后降低的趋势,分别在微波处理 30、20 s 处达到极大值。研究表明,微波所产生剪切力和振荡效应等导致氧化大豆蛋白聚集体的解聚和去折叠,蛋白质结构逐渐由有序变为无序,分子柔性增强,蛋白质的两亲性提高。因此,水-油界面的表面张力降低,从而增强了蛋白质的乳化特性。结合前面结果发现,较短时间内微波处理的非热效应使得大豆分离蛋白出现极化现象,破坏了蛋白内部的非共价键,一些不稳定的氧化结构被打开,使得蛋白的刚性减弱,柔性增强;同时非共价键断裂还导致了疏水性增高,促进油-水界面的形成,并诱导大豆分离蛋白更容易结合到油-水界面处吸附油脂并形成膜结构,提升其乳化能力。当微波处理时间继续延长,微波处理产生的热效应逐渐增强,暴露到蛋白质表面非极性基团增加,在非热效应促进的分子碰撞中互相以疏水作用结合形成了更加致密的不溶性热聚集体,阻碍了油-水界面的形成,降低了大豆分离蛋白在界面处的展开能力,进而导致乳化能力下降。

2.11 微波对大豆蛋白氧化聚集体乳液微观形态的影响

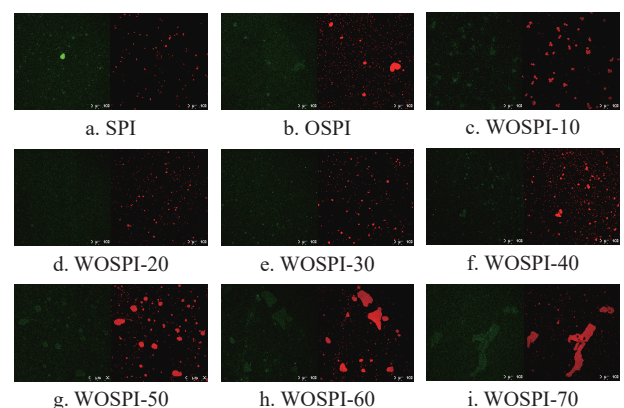
使用尼罗蓝和尼罗红作为荧光染料分布对乳液中的蛋白质和油脂进行染色。由图 7 可知,未经微波处理的 SPI

制成的乳液液滴呈球形,整体分布较为均匀,而 OSPI 制备的乳液粒径显著增加,出现了聚集现象。这是因为氧化导致大豆分离蛋白出现了聚集现象并形成了一定量的不溶性聚集体,影响了界面膜的形成和稳定性,降低了 OSPI 的乳化能力和乳液均一性。随处理时间增加, WOSPI 制备的乳液液滴更小更均一,与粒径结果相一致;当微波处理时间超过 30 s 后,乳液液滴出现了粒径增大的絮凝现象,乳液液滴逐渐失去圆形形态,变为不规则的大颗粒。这说明适当的微波处理可以通过振荡等作用使得大分子的氧化聚集体破碎解聚成小分子聚集体,提升其乳化能力,帮助小分子蛋白聚集体吸附到油-水界面上并形成相对稳定的界面膜,进而提升了乳液的均一性。但是当微波处理时间超过 30 s 后, WOSPI 乳液出现粒径增大且逐渐聚集的趋势。这说明乳化性正在降低,不能覆盖原有的油-水界面,可能因为长时间微波处理带来的热效应导致了大豆分离蛋白间以二硫键、疏水键等形成聚集,继而消耗并包埋了疏水基团,导致乳化能力降低,影响乳液稳定性和形成不规则的大分子乳液液滴。TENG 等^[47]的研究表明,长时间微波处理带来的强热效应使得大豆蛋白形成了大分子聚集体,进而导致制备的乳液间也发生了一定的絮凝,形成了大小不一的乳液液滴。

表 3 微波处理时间对大豆蛋白氧化聚集体乳化活性及乳化稳定性的影响

Table 3 Effects of microwave treatment on emulsifying activity and emulsion stability of OSPI

样品名称 Sample name	乳化活性 Emulsifying activity/(m ² ·g ⁻¹)	乳化稳定性 Emulsion stability/min
SPI	47.19±1.06 c	49.36±2.45 d
OSPI	35.10±1.09 f	41.97±1.79 e
WOSPI-10	39.91±2.03 e	54.28±0.85 c
WOSPI-20	44.83±1.06 d	69.07±2.27 a
WOSPI-30	54.10±1.59 a	68.27±1.69 a
WOSPI-40	50.55±2.03 b	58.44±1.56 b
WOSPI-50	32.37±1.12 g	35.96±2.54 f
WOSPI-60	27.15±0.44 h	33.83±2.59 f
WOSPI-70	12.64±1.29 i	41.19±1.30 e



注:图中使用尼罗蓝(Nile blue)和尼罗红(Nile red)作为荧光染料分别对乳液中的蛋白质和油脂进行染色,经 490 nm 和 550 nm 激发后分别发射绿色荧光(左边)和红色荧光(右边),绿色为蛋白质,红色为油脂。
Note: In the figure, Nile blue and Nile red were used as fluorescent dyes to dye protein and oil in lotion respectively. After being excited at 490 nm and 550 nm, they emitted green fluorescence (left) and red fluorescence (right) respectively. Green is protein and red is oil.

图 7 微波处理对大豆蛋白氧化聚集体乳液激光共聚焦显微镜图的影响

Fig.7 Effects of microwave treatment on the picture of OSPI emulsion by CLSM

3 结 论

本研究以大豆蛋白为原料,采用偶氮二异丁脒盐酸盐(2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride, AAPH)制备大豆蛋白氧化聚集体,然后探讨不同时间的微波处理技术对其结构和功能特性的影响。结果表明:氧化处理破坏大豆蛋白的结构,暴露其疏水性基团,并通过疏水相互作用形成二硫键,引起粒径和浊度增大,形成大分子氧化聚集体,进而导致功能活性下降;短时间(<30 s)的微波处理可以促进大豆蛋白氧化聚集体发生解聚,引起粒径和浊度减小,增强了分子柔性,无序结构减少,同时诱导蛋白结构舒张展开,包埋在蛋白内部的疏水基团和带电基团暴露,结合位点增多,进而导致持水性、持油性提高,增强了蛋白的界面性质,导致起泡性和乳化活性的提高;而长时间(>30 s)的微波处理带来的热效应增加,会导致解聚的氧化聚集体通过共价和非共价相互作用形成二硫键,包埋了表面的疏水性基团和带电基团并形成了致密的大分子热聚集体,阻碍了水分子和油脂分子与大豆蛋白氧化聚集体的结合,导致其持水性、持油性下降,这也对大豆蛋白氧化聚集体的乳化性质、泡沫性质产生了一定的负面影响,可为今后的研究中继续探讨微波作用中热效应和非热效应分别对于大豆蛋白的影响提供一定的理论基础。本研究结果阐明了不同微波处理时间对大豆蛋白氧化聚集体功能性质及结构的影响,为大豆蛋白氧化聚集体功能性质的改善及微波在氧化聚集体行为调控的应用方面提供参考。

【参 考 文 献】

- [1] 李晓惠,任仙娥,杨锋,等.水力空化对大豆分离蛋白钙致凝胶行为的影响[J]. *中国调味品*, 2022, 47(8): 1-5.
LI Xiaohui, REN Xian'e, YANG Feng, et al. Effect of hydrodynamic cavitation on calcium induced gel behavior of soy protein isolate[J]. *China Condiment*, 2022, 47(8): 1-5. (in Chinese with English abstract)
- [2] 江连洲,冉安琪,贾子璇,等.不同贮藏期大豆蛋白对千页豆腐品质的影响[J]. *农业工程学报*, 2019, 35(20): 311-318.
JIANG Lianzhou, RAN Anqi, JIA Zixuan, et al. The effect of soybean protein in different storage periods on the quality of thousand page tofu[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2019, 35(20): 311-318. (in Chinese with English abstract)
- [3] KUMARI S, GUPTA O P, MISHRA C, et al. Gamma irradiation, an effective strategy to control the oxidative damage of soy proteins during storage and processing[J]. *Radiation Physics and Chemistry*, 2020, 177: 109134.
- [4] GUO Y N, WANG Z C, HU Z D, et al. The temporal evolution mechanism of structure and function of oxidized soy protein aggregates[J]. *Food Chemistry*, 2022, 15: 100382.
- [5] GUO F X, LIN L, HE Z Y, et al. Storage stability of soy protein isolate powders containing soluble protein aggregates formed at varying pH[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(10): 5275-5283.
- [6] YANG J, LIU G, ZENG H, et al. Effects of high pressure homogenization on faba bean protein aggregation in relation to solubility and interfacial properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 83(5): 275-286.
- [7] CAO H W, SUN R L, SHI J R, et al. Effect of ultrasonic on the structure and quality characteristics of quinoa protein oxidation aggregates[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2021, 77: 105685.
- [8] HAN T, WANG M, WANG Y, et al. Effects of high-pressure homogenization and ultrasonic treatment on the structure and characteristics of casein[J]. *LWT*, 2020, 130(1): 109560.
- [9] CAO H W, FAN D M, JIAO X D, et al. Intervention of transglutaminase in surimi gel under microwave irradiation[J]. *Food Chemistry*, 2018, 268: 378-385.
- [10] LI Z Y, SUN Q, ZHENG Y M, et al. Effect of two-step microwave heating on the gelation properties of golden threadfin bream (*Nemipterus virgatus*) myosin[J]. *Food Chemistry*, 2020, 328: 127104.
- [11] WANG X, GU L P, SU Y J, et al. Microwave technology as a new strategy to induce structural transition and foaming properties improvement of egg white powder[J]. *Food hydrocolloids*, 2019, 101: 105530.
- [12] ZHONG Y, XIANG X, CHEN T, et al. Accelerated aging of rice by controlled microwave treatment[J]. *Food Chemistry*, 2020, 323: 126853.
- [13] CHENG Y, CHI Y, GENG X H, et al. Effect of 2, 2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) induced oxidation on the physicochemical properties, *in vitro* digestibility, and nutritional value of egg white protein[J]. *LWT*, 2021, 143: 111103.
- [14] ZHOU Y Y, YUE W T, LUO Q, et al. Preparation and stability characterization of soybean protein isolate/sodium alginate complexes-based nanoemulsions using high-pressure homogenization[J]. *LWT*, 2022, 154: 112607.
- [15] TONG X H, CAO J, TIAN T, et al. Changes in structure, rheological property and antioxidant activity of soy protein isolate fibrils by ultrasound pretreatment and EGCG[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 122: 107084.
- [16] LI X Y, LIU G Y, ZENG Q Z, et al. The formation of soy protein fibrils-chitin nanowhisker complex coacervates: Relationship to mixed foam stability[J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2022, 652: 129783.
- [17] 孟凡迪, 白银, 王中江, 等. 空化射流促糖基化对大豆蛋白结构与功能性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(15): 171-176.
MENG Fandi, BAI Yin, WANG Zhongjiang, et al. The effect of cavitation jet promoting glycosylation on the structure and functionality of soybean protein[J]. *Food Science*, 2020, 41(15): 171-176. (in Chinese with English abstract)
- [18] 王喜波, 张泽宇, 葛洪如, 等. 超声辅助制备抗冻融大豆分离蛋白工艺优化[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(14): 272-278.
WANG Xibo, ZHANG Zeyu, GE Hongru, et al. Optimization of ultrasonic assisted preparation of anti freezing and thawing soybean protein isolate[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2016, 32(14): 272-278. (in Chinese with English abstract)
- [19] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193(1): 256-275.
- [20] MCCONNELL A A, EASTWOOD M A, MITCHELL W D, et al. Physical characteristics of vegetable foodstuffs that could

- influence bowel function[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 25(12): 1457-1464.
- [21] LIN M J Y, HUMBERT E S, SOSULSKI F W, et al. Certain functional properties of sunflower meal products[J]. *Journal of Food Science*, 1974, 39(2): 368-370.
- [22] ZHANG H J, ZHANG H, WANG L, et al. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted rice bran[J]. *Food Research International*, 2012, 47(2): 359-363.
- [23] KINSELLA J E, DAMODARARAN S, GERMAN B. Physicochemical and functional properties of oilseed proteins with emphasis on soy proteins[J]. *New Protein Foods Seed Storage Proteins*, 1985, 79(5): 107-179.
- [24] 殷静霖, 熊舟翼, 熊汉国. 热聚合卵白蛋白自组装纤维及其稳定乳液的研究[J]. *中国调味品*, 2021, 46(10): 1-7.
YIN Jinglin, XIONG Zhouyi, XIONG Hanguo. State study on thermal polymerized ovalbumin self-assembled fiber and its stabilized lotion[J]. *China Condiment*, 2021, 46(10): 1-7. (in Chinese with English abstract)
- [25] AFKHAMI R, VARIDI M J, VARIDI M, et al. Improvement of heat-induced nanofibrils formation of soy protein isolate through NaCl and microwave[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 139: 108443.
- [26] WANG Y C, Li B L, GUO Y N, et al. Effects of ultrasound on the structural and emulsifying properties and interfacial properties of oxidized soybean protein aggregates[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 87: 106046.
- [27] 孙贺, 于寒松, 范宏亮, 等. α 和 α' 亚基缺失对大豆分离蛋白乳化特性的影响[J]. *农业工程学报*, 2020, 36(10): 261-268.
SUN He, YU Hansong, FAN Hongliang, et al. α and α' Effect of subunit deletion on emulsifying properties of soybean protein isolate[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2020, 36(10): 261-268. (in Chinese with English abstract)
- [28] ARCHUT A, KLOST M, DRUSCH S, et al. Complex coacervation of pea protein and pectin: Contribution of different protein fractions to turbidity[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 134: 108032.
- [29] JIANG S, ZHANG M, LIU H, et al. Ultrasound treatment can increase digestibility of myofibrillar protein of pork with modified atmosphere packaging[J]. *Food Chemistry*, 2022, 377: 131811.
- [30] ZHANG C, SU Y, GU L, et al. Microwave induced glycosylation of egg white protein: Study on physicochemical properties and baking performance[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 118: 106569.
- [31] S. LAM R S, NICKERSON M T. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(2): 975-984.
- [32] ZHANG Y G, ZHANG S Y, ZOU Y, et al. Self-assembling soy protein fibril aggregates: Characterization and impact on in vitro digestibility of potato starch[J]. *LWT*, 2023, 174: 114403.
- [33] 何秀婷. 大豆 7S 蛋白热聚集体的形成及其性质研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2015: 13-18.
HE Xiuting. Study on the Formation and Properties of Soybean 7S Protein Thermal Aggregates[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015: 13-18. (in Chinese with English abstract)
- [34] AKKERMANS C, VENEMA P, GRUPPEN H, et al. Micrometer-sized fibrillar protein aggregates from soy glycinin and soy protein isolate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(24): 9877-9882.
- [35] 郭健. 大豆蛋白热聚集行为控制及其结构表征的研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012: 15-18.
GUO Jian. Study on the Control of Thermal Aggregation Behavior and Structural Characterization of Soybean Protein[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012: 15-18. (in Chinese with English abstract)
- [36] FU J Y, REN Y J, JIANG F, et al. Effects of pulsed ultrasonic treatment on the structural and functional properties of cottonseed protein isolate[J]. *LWT*, 2022, 172: 114143.
- [37] 肖志刚, 王依凡, 王可心, 等. 高压均质-冷冻干燥技术制备大豆分离蛋白微粒及其功能特性[J]. *农业工程学报*, 2021, 37(13): 306-313.
XIAO Zhigang, WANG Yifan, WANG Kexin, et al. Preparation of soybean protein isolate particles by high-pressure homogenization freeze drying technology and its functional characteristics[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2021, 37(13): 306-313. (in Chinese with English abstract)
- [38] 曹洪伟. 微波对鱼糜加工过程中肌球蛋白和关键酶结构的影响 [D]. 无锡: 江南大学, 2019: 15-19.
CAO Hongwei. The Effect of Microwave on the Structure of Myosin and Key Enzymes in the Processing of Fish Mince[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019: 15-19. (in Chinese with English abstract)
- [39] WANG Z, SUN X X, LIAN Z X, et al. The effects of ultrasonic/microwave assisted treatment on the properties of soy protein isolate/microcrystalline wheat-bran cellulose film[J]. *Journal of Food Engineering*, 2013, 114(2): 183-191.
- [40] 沈晓梅, 冉根, 陈家凤, 等. 豆皮果胶类多糖的提取及其在大豆蛋白凝胶类食品的应用[J]. *农业工程学报*, 2022, 38(19): 295-302.
SHEN Xiaomei, RAN Gen, CHEN Jiafeng, et al. Extraction of pectin polysaccharide from soybean skin and its application in soy protein gel food[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE)*, 2022, 38(19): 295-302. (in Chinese with English abstract)
- [41] 邓芝串, 张晖, 张超, 等. 籽瓜种子蛋白质的持水及持油性研究[J]. *中国粮油学报*, 2015, 30(9): 49-54.
DENG Zhichuan, ZHANG Hui, ZHANG Chao, et al. Study on the water and oil holding properties of seed proteins in seed melon[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2015, 30(9): 49-54. (in Chinese with English abstract)
- [42] SHEN Y T, DU Z J, WU X R, et al. Modulating molecular interactions in pea protein to improve its functional properties[J]. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2022, 8: 100313.
- [43] LI F, WU X J, WU W. Effects of protein oxidation induced by rice bran rancidity on the structure and functionality of rice bran glutelin[J]. *LWT*, 2021, 149: 111874.
- [44] WU X J, LI F, WU W. Effects of oxidative modification by 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid on the structure and functional properties of rice protein[J]. *Food Research International*, 2020, 132: 109096.
- [45] 孙领鸽, 毛晓英, 吴庆智, 等. 蛋白质氧化对核桃蛋白界

- 面性质的影响[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 59-66.
- SUN Lingge, MAO Xiaoying, WU Qingzhi, et al. The effect of protein oxidation on the interfacial properties of walnut protein[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(9): 59-66. (in Chinese with English abstract)
- [46] 杨文敏, 杨冬, 任昊天. 微波辅助提取巴旦木蛋白工艺优化及其功能性质研究[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(10): 183-188.
- YANG Wenmin, YANG Dong, REN Haotian. Optimization of microwave assisted extraction process and study on functional properties of Padan wood protein[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(10): 183-188. (in Chinese with English abstract)
- [47] TENG X, ZHANG M, LIU K, et al. Garlic essential oil emulsions stabilized by microwave dry-heating induced protein-pectin conjugates and their application in controlling nitrite content in prepared vegetable dishes[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 136: 108277.

Effects of microwave treatment on the structural and functional properties of oxidized aggregated soybean proteins

JIANG Lianzhou¹, WANG Yichang¹, MA Yitong¹, LIU Jun^{2,3}, YANG Zongrui¹, GUO Zengwang^{1*}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Shandong Yuwang Ecological Food Industry Co., Ltd., Dezhou 253000, China; 3. Kedong Yuwang Soybean Protein Food Co., Ltd., Qiqihar 161000, China)

Abstract: Soybean protein is widely used as a high-quality plant protein in the food industry, due to its multiple functional properties. However, the high-activity lipoxygenase is easy to catalyze the lipid peroxidation of polyunsaturated fatty acids during the processing of soybean products. A large number of reactive oxygen species and secondary oxidation products can also be produced to further induce protein oxidation. The structure and function of proteins are closely related to the oxidation that is accompanied by the changes in protein solubility, water retention, gel, and emulsification functional properties, thus leading to the processing properties of proteins. Fortunately, microwave processing can be expected to alter the spatial structure of proteins and intermolecular forces. The reaction groups can be exposed to be originally embedded in the protein molecules, resulting in changes in their structure and functional characteristics. Taking the soybean protein oxidized aggregates as the raw materials, this work aims to clarify the effect of microwave treatment time on the functional characteristics and structure, such as solubility, emulsification, and foaming. The protein functional properties were then improved without the use of biochemical reagents, high-pressure, or radiation treatment, thereby expanding the protein applications without the wastes of food resources. An oxidation reaction was constructed with the soy protein and AAPH (2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride). Different irradiation durations (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, and 70 s) of the microwave with a power of 350 W were used to investigate the effect of microwave treatment on the structural characteristics (particle size distribution, turbidity, secondary structure, and microstructure) and processing properties (solubility, water-holding capacity, oil-holding capacity, foaming and foam stability, emulsification and emulsion stability) of oxidized aggregated soy protein. The results showed that the oxidation induced the formation of larger particle size, higher molecular weight, and more compact protein aggregates, which simultaneously damaged the processing properties. Microwave treatment for an appropriate time (<30 s) induced the polarization of protein isolate molecule. There was damage to the non-covalent bond that maintained the protein spatial structure. The protein isolate molecules were partially unfolded to expose the internal hydrophobic residues on the protein surface, thus promoting the formation of the water-air interface. At the same time, the interaction between that extensin molecules formed a more stable interfacial facial mask, thereby improving the foaming, emulsifying, water, and oil-holding properties. Microwave treatment for a long time (>30 s) promoted the further expansion of soy protein isolate molecules, and further exposure inside the hydrophobic and sulfhydryl groups. As such, the larger molecular aggregates were formed between depolymerized protein molecules through noncovalent bonds. There was an increase in the particle size, turbidity, and disordered structure, whereas, a decline in the stability of the interfacial facial mask, thus leading to the decline of functional properties. Consequently, the physical field of microwaves can be expected to modulate the functional properties of soy protein. Specifically, the structural and aggregation behavior can be altered to improve the functional properties of soy protein for the better behavior of soy protein oxidation aggregates using microwaves. The finding can also provide a strong reference for microwave processing in the field of food production.

Keywords: microwave; structure; soybean protein; oxidized aggregates; functional properties