



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115484831 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 16

(21) 申请号 202180033312.0

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

(22) 申请日 2021.05.04

专利代理师 黄明光

(30) 优先权数据

(51) Int.Cl.

2020901406 2020.05.04 AU

A23J 3/14 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.11.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2021/050409 2021.05.04

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/222976 EN 2021.11.11

(71) 申请人 科廷科技大学

地址 澳大利亚西澳大利亚州

(72) 发明人 斯图亚特·约翰逊

海德·阿卜杜勒扎赫拉·阿卜杜勒

马赫迪·阿勒阿里

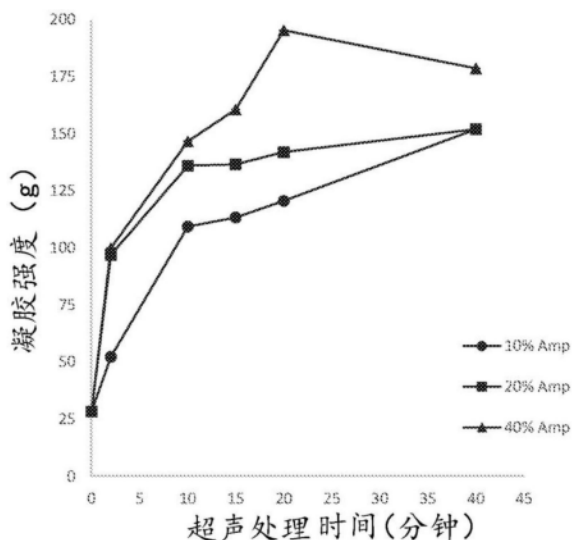
权利要求书2页 说明书17页 附图5页

(54) 发明名称

改性羽扇豆蛋白

(57) 摘要

本申请总体上涉及羽扇豆蛋白,更具体地涉及将羽扇豆蛋白改性以提高其作为蛋白质原料(例如在食品加工中)的用途。本发明提供了一种形成蛋白质原料的方法,该蛋白质原料包括与未改性羽扇豆蛋白相比具体降低的热稳定性改性羽扇豆蛋白,该方法包括提供羽扇豆蛋白溶液;以形成改性羽扇豆蛋白的方式使超声波穿过羽扇豆蛋白溶液;以及收集改性羽扇豆蛋白。还提供了一种由改性羽扇豆蛋白组成的蛋白质原料,与未改性的羽扇豆蛋白相比,改性的羽扇豆蛋白具有降低的热稳定性,其中改性羽扇豆蛋白是由未改性羽扇豆蛋白经超声波处理形成的;以及组成该蛋白质原料的组合物和食品。



1. 一种形成蛋白原料的方法,所述蛋白原料包含改性羽扇豆蛋白,所述改性羽扇豆蛋白与未改性羽扇豆蛋白相比具有降低的热稳定性,该方法包括:

提供羽扇豆蛋白溶液;

使超声波穿过羽扇豆蛋白溶液,形成改性羽扇豆蛋白;

收集改性羽扇豆蛋白。

2. 如权利要求1所述的方法,其中,所述改性羽扇豆蛋白与未改性羽扇豆蛋白相比具有增加的 β -折叠比例。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述超声波为高强度超声波。

4. 如权利要求1或3所述的方法,其中,所述超声波的频率为20kHz,功率范围为约5W/cm²至约50W/cm²。

5. 如权利要求1至4任一项所述的方法,其中,当经受超声波时,将羽扇豆蛋白溶液的温度保持在约35℃以下。

6. 如权利要求1至5任一项所述的方法,其中,所述羽扇豆蛋白溶液经受超声波60分钟或更短时间。

7. 如权利要求1至6任一项所述的方法,其中,羽扇豆蛋白溶液具有约10% (w/w)的蛋白质浓度。

8. 如权利要求1至7任一项所述的方法,其中,用于形成羽扇豆蛋白溶液的固体具有>35%,如>60%的羽扇豆蛋白含量。

9. 如权利要求1至8任一项所述的方法,其中,羽扇豆蛋白溶液在经受超声波时具有约7.0的pH值。

10. 如权利要求1至9任一项所述的方法,还包括将羽扇豆蛋白溶液纯化和/或将所述改性羽扇豆蛋白纯化的纯化步骤。

11. 如权利要求1至10任一项所述的方法,其中,在形成所述改性羽扇豆蛋白后,所述方法还包括:

将包含改性羽扇豆蛋白溶液的pH调节至改性羽扇豆蛋白的等电点;以及

将包含改性羽扇豆蛋白溶液加热到诱导改性羽扇豆蛋白聚集的温度,然后将包含改性羽扇豆蛋白溶液冷却以形成凝胶。

12. 如权利要求10所述的方法,其中,所述等电点为约的pH 4.5。

13. 如权利要求11或12所述的方法,其中,所述包含改性羽扇豆蛋白的溶液被加热到70℃以上。

14. 如权利要求11至13任一项所述的方法,其中,所述包含改性羽扇豆蛋白的溶液在诱导改性羽扇豆聚集的温度下保持60分钟或更短。

15. 如权利要求11至14中任一项所述的方法,其中,在将包含改性羽扇豆的溶液加热到诱导聚集的温度后,将包含改性羽扇豆蛋白的溶液冷却至室温以形成凝胶。

16. 如权利要求11至15任一项所述的方法,还包括在将包含改性羽扇豆蛋白溶液的pH调节至所述改性羽扇豆蛋白的等电点之前,形成改性羽扇豆蛋白溶液。

17. 如权利要求1至10或权利要求16中任一项所述的方法,其中,所述改性羽扇豆蛋白被收集为粉末。

18. 如权利要求1至17中任一项所述的方法,其中,所述改性羽扇豆蛋白被收集为改性

羽扇豆蛋白浓缩物或分离物。

19. 一种蛋白原料, 包含使用权利要求1至18中任一项所述的方法制备的改性羽扇豆蛋白。

20. 一种包含改性羽扇豆蛋白的蛋白原料, 所述改性羽扇豆蛋白与未改性羽扇豆蛋白相比具有降低的热稳定性, 其中改性羽扇豆蛋白是通过使未改性羽扇豆蛋白经受超声波而形成的。

21. 如权利要求20所述的蛋白质原料, 其中, 所述改性羽扇豆蛋白与未改性羽扇豆蛋白相比具有增加的 β -折叠的比例。

22. 如权利要求20或21所述的蛋白质原料, 具有改性羽扇豆蛋白 $>65\%$ 的纯度。

23. 如权利要求22所述的蛋白质原料, 其中, 所述纯度为 $>70\%$ 。

24. 如权利要求22或23所述的蛋白原料, 其中, 所述改性羽扇豆蛋白为浓缩物或分离物。

25. 如权利要求20至24中任一项所述的蛋白质原料, 其中, 所述蛋白原料为粉末形式。

26. 如权利要求11至24中任一项所述的蛋白质原料, 其中, 所述蛋白原料为凝胶形式。

27. 如权利要求26所述的蛋白质原料, 其中, 所述凝胶具有约20至约220的Bloom值。

28. 如权利要求26或27所述的蛋白质原料, 其中, 所述凝胶具有约20%至约75%的持水能力。

29. 如权利要求26至28任一项所述的蛋白质原料, 其中, 所述凝胶为冷成型凝胶。

30. 一种组合物, 包含权利要求19至29中任一项所述的蛋白原料。

31. 一种食品, 包含权利要求19至29中任一项所述的蛋白原料。

改性羽扇豆蛋白

技术领域

[0001] 本申请总体上涉及羽扇豆蛋白,更具体地涉及将羽扇豆蛋白改性以提高其例如在食品加工中用作蛋白原料的加工性能。

背景技术

[0002] 人们对植物豆类蛋白用作食品配料的兴趣越来越浓厚。营养价值和技术功能性质通常是任何用作食品配料的植物蛋白来源的最重要的性质。羽扇豆蛋白由于营养价值高、抗营养因子含量低,在主流食品工业中具有巨大的替代动物蛋白的潜力。羽扇豆仁的蛋白质重量约为40%,蛋白中诸如硫氨基酸等必需氨基酸是合理平衡的。

[0003] 尽管羽扇豆蛋白有前景,但由于一些加工上的困难,其作为食品配料的应用仍然不足。例如,它缺乏凝胶化性质,使其无法在某些食品应用中使用。蛋白质凝胶可以通过加热、聚集和凝胶化形成。这三个步骤同时发生在热成型凝胶上,而凝胶化步骤可以通过控制凝胶条件(例如蛋白质浓度和pH值)与冷凝胶系统中的前两个步骤分开。凝胶化步骤的分离,在这种情况下,凝胶在较低(冷却)温度下而不是在高温下形成。冷成型凝胶可用于广泛的应用,例如用在含有热敏性生物活性成分的食品的加工中。蛋白质凝胶是一种交联的聚合物网络,由未折叠和聚集的蛋白质链形成。由于该过程的控制因素(例如蛋白质类型、蛋白质浓度、pH、离子强度和热处理温度/时间)范围广泛,蛋白质凝胶化被认为是复杂的。

[0004] 羽扇豆蛋白与动物和豆类蛋白(如大豆和豌豆蛋白)相比具有非常弱的凝胶化性质。据报道,由于存在较大数量的二硫化物基团,羽扇豆蛋白比来自于大豆的蛋白具有更高的热稳定性。羽扇豆蛋白的热稳定性可以防止其变性和聚集,这是形成热成型凝胶或冷成型凝胶的决定性的凝胶化步骤。当需要凝胶样性质时,羽扇豆蛋白的这些性质使其不适合在食品加工工业中使用。

[0005] 由于缺乏理想的凝胶形成性质,人们对羽扇豆类蛋白质的使用和羽扇豆类凝胶的形成几乎没有关注。相反,人们将注意力集中在蛋白原料和衍生自大豆的蛋白质上。大豆蛋白被充分了解,现在占蔬菜类蛋白的很大一部分市场。另一方面,当前有个机会可以更好地了解如何更好的利用羽扇豆蛋白。

[0006] 蔬菜类蛋白来源的一个问题是,植物所需的生长条件意味着它们不能在所有地理位置生长,这可能会给蔬菜类蛋白净进口国带来粮食安全问题。例如,诸如大豆的植物类蛋白来源需要较高的水量。另一方面,羽扇豆需要更少的水,更适合在地中海气候下生产。

[0007] 应当理解,如果在此引用任何现有技术出版物,则这种引用并不构成对该出版物形成澳大利亚或任何其他国家本领域常识的一部分的承认。

发明内容

[0008] 本申请的一个方案提供一种形成蛋白原料的方法,所述蛋白原料包括改性羽扇豆蛋白,所述改性羽扇豆蛋白与未改性羽扇豆蛋白相比具有降低的热稳定性;该方法包括:提供羽扇豆蛋白溶液,使超声波穿过所述羽扇豆蛋白溶液,形成改性羽扇豆蛋白,使得改性羽

扇豆蛋白的热稳定性与未改性羽扇豆蛋白相比降低;以及收集所述改性羽扇豆蛋白。

[0009] 在一个实施方案中,公开了一种形成包含改性羽扇豆蛋白的蛋白原料的方法,所述改性羽扇豆蛋白与未改性羽扇豆蛋白相比具有降低的热稳定性;该方法包括:提供羽扇豆蛋白溶液,使超声波穿过所述羽扇豆蛋白溶液,以形成改性羽扇豆蛋白;以及收集改性羽扇豆蛋白。

[0010] 术语“蛋白原料”应理解为表示在一个或多个进一步的工艺中用于形成其他产品(例如在食品工业中)的蛋白质来源。术语“蛋白来源”可用“食用原料”互换。例如,该方法可用于提供改性羽扇豆蛋白来源,该来源用于形成蛋白质凝胶,蛋白质凝胶用在例如肉类替代产品制造或食品增稠(texturizing)应用中。

[0011] 一个实施方案中的改性羽扇豆蛋白可以具有与未改性羽扇豆蛋白相比升高的 β 折叠比例。

[0012] 超声波可以由超声仪产生。在一些实施方案中,超声波可以是适当高强度的超声波。超声频率的范围可以是约20kHz至约100kHz。优选的实施方案中,所述频率是约20kHz(即20kHz \pm 5kHz、或 \pm 2kHz、或 \pm 1kHz)。在一些实施方案中,高强度超声波功率范围为约5W/cm²到约50W/cm²。羽扇豆溶液的温度在经受超声波时可保持在约35°C以下。应当理解,尽管原浆(bulk)中的溶液可保持在约35°C以下,但在空化区(cavitation zone),温度可能明显高于35°C。

[0013] 羽扇豆蛋白溶液可经受超声波60分钟或更短的时间。羽扇豆蛋白溶液可具有约0.1% (w/w) 至约40% (w/w) 的蛋白质浓度,如约5% (w/w) 至约20% (w/w) 的蛋白质浓度,包括例如约10% (w/w) 的浓度。用于形成羽扇豆蛋白溶液的固体,例如粗天然分离蛋白,可以是羽扇豆蛋白浓缩物,即具有>35%的羽扇豆蛋白含量。在一些实施方案中,用于形成羽扇豆蛋白溶液的羽扇豆蛋白可具有>70%的纯度。在一些实施方案中,羽扇豆蛋白浓缩物可以是纯度>90%的羽扇豆蛋白分离物。羽扇豆蛋白溶液在经受超声波时可具有约7.0的pH值,例如7.0 \pm 0.5或7.0 \pm 0.1。在一个实施方案中,该方法还可以包括将羽扇豆蛋白溶液和/或改性羽扇豆蛋白进行纯化的纯化步骤。

[0014] 在一个实施方案中,在形成改性羽扇豆蛋白之后,该方法还可以包括:将包含改性羽扇豆蛋白溶液的pH调节到改性羽扇豆蛋白的等电点;以及将包含改性羽扇豆蛋白溶液加热到诱导改性羽扇豆蛋白的聚集的温度,然后将所述改性羽扇豆蛋白溶液冷却,以形成凝胶。

[0015] 改性羽扇豆蛋白可以作为凝胶进行收集。等电点可以大约为pH 4.5(即 \pm 0.5,优选 \pm 0.1)。包含改性羽扇豆蛋白溶液可以加热到70°C以上。包含改性羽扇豆蛋白溶液可以在引起改性羽扇豆的聚集的温度下维持少于60分钟。在一个实施方案中,包含改性羽扇豆蛋白溶液可以在引起改性羽扇豆的聚集的温度下维持约20分钟。将包含改性羽扇豆蛋白溶液加热到引起改性羽扇豆蛋白聚集的温度后,所述包含改性羽扇豆蛋白溶液可以冷却到约70°C以下,例如冷却至室温,以形成凝胶。加热期间达到的最高温度可为约95°C。该方法还可以包括对凝胶进行脱水。一个实施方案还可以包括在将包含改性羽扇豆蛋白溶液的pH值调节到改性羽扇豆蛋白的等电点之前,形成改性羽扇豆蛋白溶液。

[0016] 改性羽扇豆蛋白可以作为粉末进行收集。改性羽扇豆蛋白可以作为改性羽扇豆蛋白浓缩物或分离物进行收集。

[0017] 本申请还提供一种包含改性羽扇豆蛋白的蛋白原料,所述改性羽扇豆蛋白使用如上所述的方法制备。

[0018] 本申请还提供了一种包含改性羽扇豆蛋白的蛋白原料,所述改性羽扇豆蛋白相对于未改性羽扇豆蛋白具有降低的热稳定性。所述改性羽扇豆蛋白通过未改性羽扇豆蛋白经受超声波来形成。

[0019] 改性羽扇豆蛋白与未改性羽扇豆蛋白相比,可具有增加的 β 折叠的比例。蛋白原料可以具有 $>35\%$ (例如约 $>70\%$)的改性羽扇豆蛋白纯度(即基于改性羽扇豆蛋白的蛋白含量)。在本文的描述中,含蛋白 $>35\%$ 的组合物通常被称为“浓缩物”,含蛋白含量 $>90\%$ 或更高的组合物被称为“分离物”。一些高浓度蛋白的浓缩物的蛋白含量至少为 70% (约 $>70\%$)。分离物被视为“浓缩物”分类的子集,具有非常高的浓度。在一些实施方案中,包含改性羽扇豆蛋白的蛋白原料纯度可为 $>90\%$,并可被描述为改性羽扇豆蛋白分离物。在一些实施方案中,改性羽扇豆蛋白以浓缩物或分离物提供。蛋白原料可以是粉末的形式。

[0020] 在一个实施方案中,蛋白原料为凝胶形式。凝胶的Bloom值(Bloom number)可以为约20到约220不等。凝胶可以具有约 20% 至约 75% 的持水能力。凝胶可以是冷成型凝胶。

[0021] 还公开了包含如上所述的蛋白原料的组合物。

[0022] 还公开了包含上述蛋白原料的食品。该食品可以用于人类或动物,包括水产养殖动物。

附图说明

[0023] 现通过实施例对本申请的实施方案进行说明,仅参考以下非限制性附图。

[0024] 图1示出了 10% (w/w)羽扇豆蛋白溶液的酸化与各种葡萄糖酸- δ -内酯(GDL)百分比浓度(w/v)的关系。

[0025] 图2示出了超声处理时间和超声功率对羽扇豆凝胶强度的影响。

[0026] 图3示出了超声处理时间和超声功率对羽扇豆凝胶持水能力的影响。

[0027] 图4示出了在 $38\text{W}/\text{cm}^2$ 的功率下的超声处理时间(0-40分钟)对羽扇豆蛋白浓缩物溶解度的影响。柱中字母不同的a、b、c、d和e值具有显著不同($p \leq 0.05$)。

[0028] 图5示出了改性和未改性羽扇豆蛋白的从(a) $1600-1660\text{cm}^{-1}$ 和(b) $1200-1400\text{cm}^{-1}$ 的的红外光谱。

[0029] 图6示出了在以 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率从 25°C 加热到 95°C (线性线显示的温度变化)期间,超声处理对葡萄糖酸- δ -内酯(GDL)诱导的羽扇豆蛋白浓缩物的凝胶化性质的影响。圆圈是对照样品(非超声处理),方块表示在 $38\text{W}/\text{cm}^2$ 下超声处理40min。

[0030] 图7示出了在以 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率(线性线所示的恒温保存) 95°C 下的热保存步骤中,超声处理对GDL诱导的羽扇豆蛋白浓缩物凝胶化性质的影响。圆圈是对照样品(非超声处理),方块表示在 $38\text{W}/\text{cm}^2$ 下超声处理40min。

[0031] 图8示出了在以 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率从 95°C 冷却至 25°C (线性线所示的温度变化)期间,超声处理对GDL诱导的羽扇豆蛋白浓缩物凝胶化性质的的影响。圆圈是对照样品(非超声处理),方块表示在 $38\text{W}/\text{cm}^2$ 下超声处理40min。

具体实施方式

[0032] 第一实施方案提供了一种形成包含改性羽扇豆蛋白的蛋白原料的方法。该方法包括提供羽扇豆蛋白溶液并使超声波穿过羽扇豆蛋白溶液以形成改性羽扇豆蛋白的步骤。改性羽扇豆蛋白与未改性羽扇豆蛋白相比具有降低的热稳定性。该方法还包括收集改性羽扇豆蛋白。

[0033] 超声处理(即,超声波处理)需要使用高于人类听觉阈值(>16kHz)的声波,并通过在溶液中持续形成蒸汽腔和气泡,利用空化现象改变分子,例如食品配料结构。蒸汽腔和气泡在几个循环后破裂,释放出空化区的极端温度和压力。此外,超声处理会导致水裂分,产生活性自由基和 H^+ 和 OH^- 离子,这可能有助于构成蛋白质的氨基酸上的功能性R基团。活性自由基和 H^+ 和 OH^- 离子的形成也可能有助于形成新的交联,例如在蛋白质内部或相邻蛋白质之间。

[0034] 当溶解在溶液中的蛋白质受到超声波时,所产生的空化区的极端能量以及由此产生的反应性自由基可能促进蛋白质结构的强烈变化,从而可以改变蛋白质结构,进而改变功能性。基于被处理的蛋白溶液类型,适当使用高强度超声处理。高强度超声通常指低频(20-100kHz)和高声强度(10-200W/cm²)的声波。在一个实施方案中,使用的高强度超声波的频率为约20kHz。在一个实施方案中,使用的高强度超声波的功率从5-50W/cm²不等。超声(超声波)处理可促进蛋白质展开以及活性疏水性蛋白质基团(例如氨基酸R基团)的暴露,以形成改性羽扇豆蛋白。将疏水性蛋白质基团暴露可能有助于降低改性羽扇豆蛋白表面的总电荷密度,从而可能有助于降低溶液中相邻蛋白质之间的排斥力。排斥力的降低可能有助于促进聚集体的形成,并可能允许相邻蛋白质之间更好的分子间交联。相邻蛋白质之间排斥力的降低通常伴随着蛋白质热稳定性的降低。超声处理可能导致蛋白质二级结构的变化。在一个实施方案中,超声处理引起从 α 螺旋结构到 β -折叠结构的变化。这意味着,与未改性羽扇豆蛋白相比,改性羽扇豆蛋白可能具有增加的 β -折叠的比例。

[0035] 羽扇豆蛋白溶液可能具有不允许羽扇豆蛋白在超声处理过程中形成聚集体的pH值。在一个实施方案中,羽扇豆蛋白溶液的pH值在超声处理期间约为 7.0 ± 0.1 。羽扇豆蛋白溶液的pH值可以正好在超声处理前进行调节。羽扇豆蛋白溶液的pH值可以在羽扇豆蛋白溶液形成过程中调节。羽扇豆蛋白溶液可以在超声处理前立即冷冻储存和解冻。羽扇豆蛋白溶液可以通过重构干燥的羽扇豆蛋白而形成。

[0036] 羽扇豆蛋白溶液可以具有约5% (w/w) 至20% (w/w) 的羽扇豆蛋白浓度。在一个实施方案中,羽扇豆蛋白溶液可以具有约10% (w/w) 的浓度。在实践中,用于形成羽扇豆蛋白溶液的羽扇豆蛋白可以具有任何纯度。在一个实施方案中,羽扇豆蛋白是羽扇豆蛋白浓缩物,即纯度>35% (羽扇豆蛋白含量,w/w) 的羽扇豆蛋白。在一个实施方案中,羽扇豆蛋白浓缩物的纯度为>70%。在一个实施方案中,羽扇豆蛋白浓缩物可以是纯度>90%的羽扇豆蛋白分离物。

[0037] 所述羽扇豆蛋白可以在超声处理前的纯化步骤中进行纯化。例如,可以形成羽扇豆蛋白的粗溶液,然后在超声处理之前立即进行纯化。然而,在一些实施方案中,在形成羽扇豆蛋白溶液之前将羽扇豆蛋白纯化。改性羽扇豆蛋白可以在超声处理后的纯化步骤中予以纯化。例如,粗羽扇豆蛋白可用于形成羽扇豆蛋白溶液,然后在超声处理后除去杂质。在一些实施方案中,在超声处理前后执行羽扇豆蛋白纯化步骤。纯化可包括使用差分增溶和

沉淀、离心和超速离心、超滤、尺寸排阻色谱、离子交换色谱、HPLC和/或亲和色谱。纯化后，羽扇豆蛋白可以冻干。

[0038] 收集改性羽扇豆蛋白可以包括沉淀和/或冻干。在一些实施方案中，收集改性羽扇豆蛋白包括改性羽扇豆蛋白的纯化。在一些实施例中，改性羽扇豆蛋白的收集包括冷冻干燥和/或喷雾干燥。改性羽扇豆蛋白可以作为粉末提供。在一些实施例中，改性羽扇豆蛋白具有根据表1所述的性质。

[0039] 表1. 改性羽扇豆蛋白的性质

项目	性质
特性	淡黄色粉末
气味	中性至坚果味
味道	味道好至坚果味
能量	356 kcal/100g
水分	最高 5.0%
粗蛋白 (干基 N*5.5)	最低 68.0%
[0040] 脂肪 (干基)	最高 11.0%
膳食纤维 (干基)	最高 12.0%
灰分 (干基)	最高 3.5%
蛋白质消化率	98%
蛋白质消化率校正氨基评分	0.53
pH	7.0±0.5
麸质	未检出
植物雌激素	未检出

[0041] 使用的超声波频率大于16kHz。在一个实施方案中，超声波的频率为20kHz。超声波所需的功率可取决于超声波的频率和/或超声处理持续时间。超声波的功率可以小于约50M/cm²。在一个实施方案中，高强度超声波的功率范围为约5W/cm²至约50W/cm²。在一个实施方案中，高强度超声波的功率范围为约10W/cm²至约40W/cm²，如11W/cm²至38W/cm²。超声处理的持续时间取决于超声波的强度。当高强度超声波的功率范围为约5W/cm²至约50W/cm²时，羽扇豆蛋白溶液可以经受高强度超声波60分钟或更短的时间。例如，超声处理的持续时间可以小于约40分钟。在一些实施方案中，超声处理的持续时间范围为约20分钟至约40分钟。在一些实施方案中，超声处理的持续时间为约20分钟或更短，例如在约2至约20分钟之间。

[0042] 在超声处理过程中，羽扇豆蛋白溶液的温度可以保持在上阈值温度以下。上温度阈值可以是改性羽扇豆蛋白形成聚集体所需的温度。上温度阈值可以为约60℃。在一些实施方案中，在超声处理期间将羽扇豆蛋白溶液的温度保持在远低于上温度阈值的水平可能

是有益的。例如,羽扇豆蛋白溶液在超声处理期间可保持在约35℃以下。保持羽扇豆蛋白溶液的温度尽可能低可能有助于改善超声处理。在一些实施方案中,羽扇豆蛋白溶液可以在超声处理期间保持冷冻温度以上。应当理解,羽扇豆蛋白溶液的温度参考溶液的整体温度,并且气蚀等的影响可能导致羽扇豆蛋白溶液的区域在微尺度或纳尺度上具有高于上温度阈值的温度。通常,但并非总是如此,超声处理会导致溶液的温度升高。温度的升高取决于超声波的功率和处理的持续时间。羽扇豆蛋白溶液的温度可以用温度控制系统来控制。温度控制系统可以包括制冷剂和/或冰。

[0043] 改性羽扇豆蛋白形成后,可以再转化为凝胶。形成凝胶可以包括将包含改性羽扇豆蛋白溶液的pH值调节至改性羽扇豆蛋白的等电点。凝胶的形成可以包括加入一种或多种盐来调节改性羽扇豆蛋白溶液的离子强度。凝胶的形成还可以包括将包含改性羽扇豆蛋白的溶液加热到诱导改性羽扇豆蛋白的聚集的温度,然后包含改性羽扇豆蛋白溶液冷却以形成凝胶。通常,在加热之前调节包含羽扇豆蛋白的pH值。然而,在一些实施方案中,在加热期间或之后调节pH值。pH值可以调节到改性羽扇豆蛋白的等电点附近。等电点pH值可约为4.5。在一个实施方案中,调节pH值为约4.0至约5.5。等电点pH值可以通过加入酸来达到。所述酸可以是葡萄糖酸- δ -内酯(GDL)的水解产物。所述酸可以是葡萄糖酸。在加入酸之后,可以将羽扇豆蛋白溶液混合,例如通过涡旋混合。所得凝胶的强度可能会随着pH值远离等电点而降低。

[0044] 改性羽扇豆蛋白的溶液可以加热到或高于下温度阈值。下温度阈值可以是改性羽扇豆蛋白开始聚集所需的温度。聚集的开始可能伴随着包含改性羽扇豆蛋白的溶液的弹性模量的增加。下温度阈值可以为约60℃。在一个实施方案中,改性羽扇豆蛋白溶液可以加热到约75℃或更高,例如95℃。在一些实施方案中,改性羽扇豆蛋白溶液可以加热到约70℃以上。改性羽扇豆蛋白溶液可以在两个或多个加热步骤中加热,例如在第一步中以第一加热速率加热,然后在第二步中以第二加热速率加热。改性羽扇豆蛋白溶液可以在下温度阈值以上保持一段所需的时间。在实施方案中,在约75℃至约95℃的温度范围内将改性羽扇豆蛋白溶液处理约20分钟至约60分钟的时间。改性羽扇豆蛋白聚集所需的时间取决于改性羽扇豆蛋白溶液被加热达到的温度。一般来说,温度越低处理时间越长,温度越高处理时间越短。在一些实施方案中,将改性羽扇豆蛋白溶液加热到高于下温度阈值的所需温度,然后在所需温度下保持一段时间。改性羽扇豆蛋白溶液在被加热到或高于下温度阈值以形成凝胶后,可以冷却到下温度阈值以下。在一个实施方案中,所述凝胶是冷成型凝胶。溶液可以冷却到大约室温,例如<30℃。溶液可在<30℃保持60分钟以上以使凝胶凝固。

[0045] 凝胶的强度可取决于用于形成凝胶的条件。与不利于促进凝胶聚集的条件相比,有利于蛋白质聚集的条件往往会形成具有更高强度的凝胶。例如,将改性羽扇豆蛋白溶液加热到95℃而不是75℃,在同一时间段内往往会增加所得凝胶的强度。但是,这种关系并不适用于所有的情况。在一些实施方案中,调整超声条件可能会影响所得的凝胶性质。同样,将改性羽扇豆蛋白溶液的pH值调节至接近蛋白质的等电点可能有助于增加蛋白质聚集。增加超声处理时间也可能有助于增加 β -折叠相对于 α 螺旋结构的比例,这可能有助于提高改性蛋白形成聚集体的能力。聚集促进相邻蛋白质之间的分子间交联。交联可以包括共价键合和非共价键合。凝胶的强度可以具有约20至约220的Bloom值。

[0046] 当形成凝胶时,改性羽扇豆蛋白溶液的浓度范围为约5% (w/w) 至约30% (w/w)。达

到改性羽扇豆蛋白的等电点所需的酸量将根据改性羽扇豆蛋白的浓度而变化。通常,浓度的增加会导致所得凝胶强度的增加。凝胶形成后,可以允许其在水性溶液中进一步平衡。凝胶形成后可以洗涤,以去除凝胶网络中的任何污染物和/或任何未结合的蛋白质。

[0047] 凝胶的持水能力取决于凝胶强度。持水能力(也称为含水量或平衡含水量)是形成凝胶的网络可以吸附多少水的量度。与强度较低的等效凝胶相比,强度较高的凝胶通常具有较高的持水能力。由改性羽扇豆蛋白形成的凝胶的持水能力范围可以为约20%到约75%。改性羽扇豆蛋白浓度的增加可能会增加持水能力。

[0048] 重要的是,需要注意,如果没有超声处理,由于羽扇豆蛋白的热稳定性,不可能从具有当前申请中描述的性质的天然羽扇豆蛋白形成凝胶。

[0049] 凝胶所需的性能可以通过凝胶的使用来确定。例如,用于稠化食品的凝胶可能需要与用于凝固食品的凝胶不同的性质。因此,可以调整用于控制凝胶性质的参数(例如改性羽扇豆蛋白浓度、超声处理时间和凝胶形成过程中的加热温度),以提供具有所需强度和持水能力的凝胶。

[0050] 凝胶在形成后可以保持其水合形式。例如,凝胶可以储存在较低的温度下,以尽量减少改性羽扇豆蛋白的降解,例如通过水解。在一个实施方案中,水合凝胶保持在约4°C下备用。在一些实施方案中,凝胶是脱水的。脱水凝胶可以在使用前进行复水。

[0051] 收集的改性羽扇豆蛋白和/或由改性羽扇豆蛋白形成的凝胶可用于形成食品。例如,凝胶可用于形成肉类或乳制品类似物和无麸质产品。改性羽扇豆蛋白可以提供具有理想质地和适口性的植物性蛋白质。改性羽扇豆蛋白可用作蛋白原料。在一个实施方案中,组合物包含改性羽扇豆蛋白(例如蛋白原料)。在一个实施方案中,食品包含改性羽扇豆蛋白。改性羽扇豆蛋白可用于制备植物类产品,例如无麸质产品、素食和纯素食产品。在一个实施方案中,改性羽扇豆蛋白可具有提供稳定的三维网络的能力,通过粘度增强和凝胶化能力在目标食品系统中提供所需的质地。

[0052] 实施例

[0053] 现在将参照非限制性实施例对实施方案进行描述。

[0054] 实施例1

[0055] 1.1材料

[0056] 羽扇豆(*Lupinus angustifolius*)种子。Coromup品种由西澳大利亚州初级产业和区域发展部(DPIRD)提供。使用种子脱壳机(AMAR,印度)去除种皮,然后通过真空分离器将羽扇豆仁与外壳剥离(KIMSEED,澳大利亚)。然后将羽扇豆仁真空包装并保持在4°C备用。

[0057] 1.2方法

[0058] 1.2.1制备羽扇豆蛋白浓缩物

[0059] 在室温下将羽扇豆仁以1:3(w/v)的比例在蒸馏水中浸泡3h。浸泡后,将仁:水的比例调整为1:10(w/v),然后使用Waring搅拌机(型号32BL80,美国)高速混合1分钟。然后用1M NaOH将羽扇豆仁浆的pH值调节至9。使用型号为R50D的Ingenieurburo CAT均质机(德国汉堡),以最大速度均质30分钟。使用Eppendorf离心机(型号5810R,汉堡,德国)在4°C下以2060g离心30分钟分离样品。通过倾析从纤维颗粒中除去所得的上清蛋白提取物。将羽扇豆仁浸泡并使用蒸馏水1:5(w/v)再次提取。然后,合并来自两次提取的上清液。使用1M HCl诱导等电蛋白沉淀,将上清液pH调节至4.5。接着,将样品在4°C下以2060g离心30分钟,以将蛋

白质沉淀物与上清液分离。使用1M NaOH将沉淀物的pH值调节至 7 ± 0.1 。这种羽扇豆蛋白浓缩物的中和沉淀物使用型号ALPHA 1-2L0 (Christ, Osterode am Harz, 德国) 冷冻干燥机进行冷冻干燥, 然后真空包装并储存在 4°C 下备用。

[0060] 1.2.2用于凝胶研究的羽扇豆蛋白浓缩物的制备

[0061] 使用去离子水制备10% (w/w) 冻干羽扇豆蛋白浓缩物, 并在室温下使用MR Hei-Standard搅拌器 (Schwabach, 德国) 在750rpm下搅拌2h。将所得蛋白质悬浮液保持在 4°C 过夜以完成蛋白质的水合作用, 然后在超声处理前使用0.1M NaOH/HCl将pH值重新调节至 7 ± 0.1 。

[0062] 1.2.3高强度超声 (HIU) 处理

[0063] 高强度超声 (HIU) 处理是使用型号VCX 600 (Sonics&Materials Inc, Danbury, USA) 的超声处理器和型号为CV26和13mm钛探头的转换器进行的。使用10%、20%和40%的不同超声振幅处理20mL羽扇豆蛋白浓缩物的溶液的样品 (见第1.2.2节) 0、2、10、15、20和40分钟。HIU处理在双壁玻璃烧杯中进行, 该烧杯配有冷却器, 以在超声处理期间将样品温度保持在 35°C 以下。

[0064] 1.2.3.1. 高强度超声功率的测定

[0065] 根据量热技术计算施加的超声功率。超声功率 (P) 的计算公式如下: $P = MC_p (dT/dt)$

[0066] 其中, P (W) 是超声功率, M是样品质量 (g), C_p 是介质的比热 (kJ/gK), dT/dt 是温度随时间变化的速率 (t)。超声强度 (W/cm^2) 是发射表面的超声功率 (P) / 单位面积 (cm^2)。

[0067] 所计算的功率强度为 11W/cm^2 、 17W/cm^2 和 38W/cm^2 在10%, 振幅分别为20%和40%。

[0068] 1.2.4. 测定葡萄糖酸- δ -内酯水平以达到目标pH

[0069] 冷成型凝胶化需要4.5左右的pH值才能形成稳定的凝胶, 因为该pH值降低了蛋白质分子之间的排斥力, 并促进了分子间交联以形成凝胶网络。食品添加剂 (酸化剂) 葡萄糖酸- δ -内酯 (GDL) 会慢慢地水解成葡萄糖酸并降低pH值。为了在凝胶化过程中达到所需的最终4.5的pH值, 首先需要确定所需的GDL量, 因为其酸化水平取决于蛋白质类型和浓度。将不同量 (0.20%、0.22%、0.25%、0.27%、0.30%、0.40%、0.50%、0.60%、0.70%、0.75%、0.80%、0.90%、1.0%、1.1%、1.2%、1.5%、1.7%、1.8%和1.9% (w/v) 的GDL加入到20g等分试样的羽扇豆蛋白浓缩物的悬浮液中 (第1.2.2节), 然后在室温下涡旋30秒, 在 4°C 下储存24h。然后在室温下测量pH值。所有测量进行三个重复。图1显示了10% (w/w) 羽扇豆蛋白溶液的pH值与GDL添加量。

[0070] 1.2.5. 改性羽扇豆蛋白浓缩物的凝胶化

[0071] 1.2.5.1. 酸化

[0072] 将达到pH 4.5所需的GDL粉末加入到经过各种超声时间和功率处理 (第1.2.3节) 的20g的10% (w/w) 改性羽扇豆蛋白浓缩物溶液中。在热处理之前, 所有样品使用涡旋混合器混合20秒。

[0073] 1.2.5.2. 热处理和凝胶形成

[0074] 将酸化超声处理的羽扇豆蛋白浓缩物溶液在 95°C 下处理60min, 以诱导羽扇豆蛋白聚集体作为预凝胶化步骤。热处理后, 将溶液冷却至室温, 放入 (a) 宽40mm宽, 52mm高的50ml玻璃容器中, 用于凝胶强度测定; 或 (b) 50ml离心管, 用于持水能力测量。将样品在 4°C

下保持24小时,以使凝胶在凝胶质量分析前固化。

[0075] 1.2.6凝胶强度的测定

[0076] 根据已公开的方法测量凝胶强度 (Food Hydrocolloids, 32 (2), 303-311; Ultrasonics Sonochemistry, 17 (6), 1075-1081)。使用装有5kg称重传感器 (load cell) 和 P/0.5 (直径12.7mm) 圆柱形探头附件的TVT质构分析仪 (型号6700, Perten Instrument, 澳大利亚) 在5℃下进行凝胶强度分析。凝胶压缩以0.5mm/s的速度进行, 触发力为5g。凝胶强度以g表示, 所有测试进行三个重复。

[0077] 1.2.7持水能力的测定 (WHC)

[0078] 凝胶形成后, 通过倒置含有凝胶的试管来除去未结合的水。滤纸用于去除管壁上残留的任何自由水。羽扇豆凝胶样品在室温下使用Eppendorf离心机型号5810R (德国汉堡) 在室温下以1811g离心20分钟。离心后, 通过倒置试管以排出被释放的水来除去任何被释放的水。用滤纸去除试管壁上残留的水。WHC% (持水能力百分比) 计算为离心样品与原始凝胶样品之间的含水量差异。

[0079] 1.2.8蛋白质溶解度

[0080] 将2mg/mL羽扇豆蛋白浓缩物 (第1.2.2节) 溶于硫酸盐缓冲液pH 7中。将这些羽扇豆蛋白悬浮液搅拌2h, 然后在4℃下保持过夜以完全水合。蛋白质浓度使用二辛可宁酸蛋白质测定试剂盒 (Sigma-Aldrich公司, 澳大利亚) 进行。羽扇豆蛋白悬浮液使用Heraeus离心机 (型号Pico17, 德国) 在室温下以20000g离心15分钟。蛋白质溶解度 (%) 计算为 (离心后的上清液蛋白质浓度/离心前的总蛋白质浓度) * 100。

[0081] 1.2.9Zeta电位

[0082] 将来自天然 (未处理) 和超声处理样品的冻干羽扇豆蛋白浓缩物2mg/mL在室温下溶解在milli-Q水中。分析前, 将羽扇豆蛋白分散体混合并保持2h。使用Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument有限公司, 英国伍斯特郡马尔文) 分析Zeta电位。

[0083] 1.2.10粒径分布

[0084] 将羽扇豆蛋白浓缩物以2mg/mL浓度分散在Milli-Q水中2h后立即测定粒径。使用Mastersizer激光散射分析仪 (Mastersizer 2000, 英国Malvern Instruments有限公司) 在连续三次读数期间监测颗粒分布。粒径表示为表面加权平均值 (D3, 2) 和体积加权平均值 (D4, 3)。

[0085] 1.2.11小变形下的羽扇豆凝胶流变测量

[0086] 高强度超声处理的羽扇豆蛋白和未处理的羽扇豆蛋白分散体采用如第1.2.2-1.2.5节所述的方法进行制备。为了达到所需的pH值, 在测试前2分钟将1%的GDL与样品混合。存储模块 (G') 使用装有平行板 (直径40mm和1mm间隙) 的受控应力流变仪TA仪器AR-G2 (TA Instrument, 英国莱瑟黑德) 进行测量。测量是在0.05%的恒定应变下进行的, 该应变在线性区域内, 频率为1Hz。将样品从25℃加热至95℃, 升温速率为2℃/min, 在95℃下保持加热20min, 并以2℃/min的冷却速率冷却至25℃所有测量进行三个重复。

[0087] 1.2.12羽扇豆蛋白结构特征

[0088] 羽扇豆蛋白谱使用SDS-PAGE进行研究, 使用还原和非还原电泳, 如 (Villarino, Jayasena, Coorey, Chakrabarti-Bell, Foley, Fanning&Johnson, 2015; doi:10.1016/j.foodres.2014.11.046) 所述。用还原和非还原SDS-PAGE研究超声处理对羽扇豆蛋白浓缩

物的影响。将10 μ g羽扇豆分离蛋白溶解在10 μ L NuPAGE样品缓冲液(Invitrogen)中。将样品注入NuPAGE Novex 4-12%Bis-Tris凝胶(Invitrogen, Sigma Aldrich, 澳大利亚)。加入MES SDS电泳缓冲液(Invitrogen),然后在200V下进行电泳1h。当样品条带距离凝胶底部1cm时停止电泳。50ml生物安全考马斯G-250染色剂(Bio-Rad实验室, 美国)用于蛋白质染色。通过将凝胶浸泡在去离子水中五次来进行凝胶染色。分子量标记物(未染色的Mark 12蛋白质标准品, Invitrogen, Sigma Aldrich, 澳大利亚)作为参考,通过将每个级分的行进距离与分子量标记带的等效距离进行比较来确定羽扇豆蛋白级分分子量。

[0089] 1.2.13差示扫描量热法

[0090] 差示扫描量热法(DSC)测量使用TA Instruments DSC 2910(美国纽卡斯尔)进行。称取约5mg样品到密封的铝锅中。在氮气气氛下,在25 $^{\circ}$ C至160 $^{\circ}$ C的5 $^{\circ}$ C/min加热速率下记录羽扇豆蛋白浓缩物的温度图。DSC分析仪用钢校准。将空锅用作参考。使用Universal Analysis 2000软件4.5A版(TA仪器)分析测量值以确定起始温度(T_{onset})、峰值温度(T_{peak})和变性焓(ΔH)。

[0091] 1.2.14傅里叶变换红外光谱(FTIR)

[0092] 采用FTIR研究了在11W/cm²、17W/cm²和38W/cm²超声处理功率下处理0、2、10、15、20和40min产生的羽扇豆蛋白结构变化。冻干羽扇豆蛋白浓缩物通过Thermo Scientific Nicolet iS50FTIR光谱仪与智能的Smart iTR衰减全反射(ATR)采样附件(美国威斯康星州麦迪逊市Thermo Scientific)耦合进行分析。FTIR光谱记录在4000-400cm⁻¹范围内,光谱分辨率以4cm⁻¹,共增(co-addition)为64次扫描。在每个样品之前,从干净的钻石ATR晶体记录背景光谱,共增(co-addition)为64次扫描。使用OPUS v7.0(V7.0, Bruker, 埃特林根, 德国)进行后处理,并在覆盖酰胺I、酰胺II和酰胺III光谱区域的波长上校正FTIR光谱背景和矢量归一化。

[0093] 1.3统计分析

[0094] 除非另有说明,否则分析进行三个重复。使用SPSS vs.21版本软件对数据进行统计分析。使用具有95%置信区间的双因素方差分析(ANOVA)来评估所获得结果的显著性。 $P < 0.5$ 的ANOVA数据被认为统计学上是显著的。

[0095] 1.4结果和讨论

[0096] 1.4.1羽扇豆凝胶强度

[0097] 凝胶强度是最重要的凝胶质量属性之一。超声处理时间和超声功率对羽扇豆凝胶强度的影响如图2所示。超声处理时间、超声功率及其相互作用对羽扇豆蛋白凝胶强度具有显著影响($p \leq 0.05$)。已经发现,根据超声处理条件,羽扇豆凝胶强度从28.33g到195.33g不等。在所有时间的处理中,与11W/cm²(20% Amp)和17W/cm²(10% Amp)相比,未经超声处理的天然羽扇豆蛋白凝胶的凝胶强度显著最低($p \leq 0.05$),而38W/cm²(40% Amp)处理的凝胶强度具有显著最高($p \leq 0.05$)的羽扇豆蛋白凝胶强度。另一方面,在所有超声功率下,20分钟的处理时间与所有处理时间相比,赋予的凝胶强度显著最高。因此,在38W/cm²下20min的处理时间是所记录的最高凝胶强度。既往研究表明,适度的超声处理时间可以通过促进蛋白质展开和暴露活性疏水蛋白基团来提高凝胶强度,从而在大豆和乳清蛋白凝胶中提供更好的分子间交联能力,虽然尚无关于羽扇豆蛋白的研究报道(Hu, Cheung, Pan, & Li-Chan, 2015; Shen, Fang, Gao, & Guo, 2017; Shen, Zhao, Guo, Zhao, & Guo, 2017)。此外,据报道,与在

107W/cm²下轻度处理20分钟相比,超声处理时间增加到40分钟并没有显著改善乳清蛋白凝胶。然而,在本研究中,羽扇豆蛋白凝胶比文献(Hu, Li-Chan, Wan, Tian, & Pan, 2013)中报道的超声处理的大豆分离蛋白凝胶具有更高的凝胶强度。需要注意的重要事项是,尽管由改性羽扇豆蛋白形成的凝胶已与大豆蛋白凝胶进行比较,但羽扇豆与例如大豆蛋白之间的蛋白质结构差异意味着用于形成大豆蛋白凝胶的方法不能总是用于形成修饰的羽扇豆蛋白凝胶。例如,由大豆蛋白形成的稳定凝胶无需超声处理即可形成,而由羽扇豆蛋白凝胶形成的稳定凝胶则不能。

[0098] 1.4.2羽扇豆凝胶持水能力

[0099] 羽扇豆蛋白凝胶的持水能力(WHC)在天然和超声处理的羽扇豆蛋白凝胶之间约为29%-79%(图3)。超声处理时间和功率具有显著($p \leq 0.05$)的影响。本研究中记录的显著最低($p \leq 0.05$)的WHC是针对未经处理的羽扇豆蛋白凝胶的。本研究中,应用最高的超声处理时间和功率值(38W/cm²/20min)得到最高(79%)的羽扇豆蛋白凝胶WHC。与本研究使用的其他两种功率(11W/cm²和17W/cm²)相比,超声功率38W/cm²对羽扇豆蛋白凝胶WHC具有最显著的积极影响。另一方面,增加超声处理时间对羽扇豆蛋白凝胶WHC也有积极显著影响($p \leq 0.05$)。可以看出,由于超声处理,羽扇豆凝胶的WHC显著提高($p \leq 0.05$)。这可能是由于超声处理改变了蛋白质粒径和交联能力。这种交联可以产生更均一和致密的凝胶结构,可以在凝胶基质中的蛋白质分子之间保留更多的水分(Hu等人,2013;Morales, Martínez, Pizones Ruiz-Henestrosa, & Pilosof, 2015; Nazari, Mohammadifar, Shojaee-Aliabadi, Feizollahi, & Mirmoghtadaie, 2018; Shen, Fang等人, 2017)。然而,羽扇豆蛋白凝胶的WHC低于大豆和乳清蛋白的WHC,这可能是由于与当前样品相比的它们的样品纯度(就%w/w而言),或由于本研究使用的约为4.5的pH值。此外,乳液凝胶系统可能需要适度的WHC,这在一些需要油结合能力的食品基质中是必不可少的。超声处理的羽扇豆蛋白浓缩物和分离物可能具有在这些类型的产品中用作成功的动物蛋白替代品的潜力。

[0100] 1.4.3蛋白质溶解度

[0101] 蛋白质溶解度测定为在20000g离心后上清液中的蛋白质含量。超声处理在38W/cm²下进行0、2、10、15、20和40min的效果如图4所示。与天然(未处理)羽扇豆蛋白相比,超声处理2min和10min后的羽扇豆蛋白溶解度无显著差异($p \leq 0.05$)。增加超声处理暴露时间导致($p \leq 0.05$)羽扇豆蛋白溶解度降低,特别是对于40min的处理。这些结果已经得到粒径分析的证实,结果表明,超声处理在40min后显著增加($p \leq 0.05$)羽扇豆蛋白D₄₃(表2)。研究表明,由于不溶性蛋白质聚集体的配方,增加超声处理时间能够降低大豆和谷子蛋白的蛋白质溶解度,其中小蛋白质聚集体的配方会增加蛋白质粒径,导致蛋白质更容易沉淀并降低蛋白质溶解度。

[0102] 1.4.4羽扇豆蛋白粒径

[0103] 表2示出了天然羽扇豆和在20℃下进行超声处理((38W/cm²))的羽扇豆蛋白浓缩物的粒径(μm)分布。超声处理导致粒径显著增加($p \leq 0.05$) (体积平均直径(D₄₃))。与天然羽扇豆蛋白浓缩物中的28.24μm相比,在38W/cm²超声处理40分钟的羽扇豆蛋白浓缩物使羽扇豆蛋白粒径D₄₃增加至69.21μm。超声处理诱导的空化现象对蛋白质展开后疏水聚集具有重大影响,产生相对较大的团聚蛋白质颗粒(Arzeni等人,2012;Hu等人,2013;Jambrak, Lelas, Mason, Krešić & Badanjak, 2009)。另一方面,超声处理2分钟使体积平均直径D₄₃显著

降低 ($p \leq 0.05$)。天然羽扇豆蛋白的粒径比天然大豆蛋白小 (Berghout, Boom, & van der Goot, 2015; Morales 等人, 2015)。尽管超声处理 40min 后羽扇豆蛋白粒径明显增大 ($p \leq 0.05$), 但仍比大豆蛋白的粒径小。

[0104] 表2. 粒径和超声处理的羽扇豆蛋白分散体。

	超声处理时间 (分钟)	d(0.1) μm	d(0.5) μm	d(0.9) μm	D (3,2) (μm)	D (4,3) (μm)
	0	4.81 \pm 0.81a	16.12 \pm 0.13a	78.43 \pm 34.5 3a	10.0 \pm 2.58a	28.24 \pm 0.63a
[0105]	2	1.52 \pm 0.66ab	13.78 \pm 1.7a	44.68 \pm 0.55a	4.85 \pm 0.58a	20.44 \pm 1.9a
	10	10.57 \pm 1.71 bc	25.74 \pm 4.94a b	62.39 \pm 15.6 6a	33.82 \pm 7.77a b	19.94 \pm 3.61ab
	15	14.87 \pm 3.75c	43.34 \pm 13.2 4bc	119.56 \pm 37. 77b	30.63 \pm 8.36 bc	57.42 \pm 17.54b c
	20	13.69 \pm 3.44c	34.42 \pm 10.3a b	79.72 \pm 29.3 2a	26.06 \pm 7.21 bc	41.73 \pm 14.04a bc
[0106]	40	17.94 \pm 4.32c	59.35 \pm 12.8c	134.3 \pm 31.3 4b	38.03 \pm 9.08 bc	69.21 \pm 15.8c

[0107] a、b、c、d、e: 同一列中具有不同字母的值显著不同 ($p \leq 0.05$)。

[0108] 1.4.5 Zeta 电位

[0109] 蛋白质分子表面存在更多的负氨基酸会导致蛋白质的负 Z 电位, 反之亦然。结果 (表3) 表明, 在 $38\text{W}/\text{cm}^2$ 下进行 40 分钟超声处理后, 天然羽扇豆蛋白浓缩物的 Z 电位从 -26.85 降低到 -15.48mV 。羽扇豆蛋白颗粒负电荷的减少导致蛋白质颗粒之间的排斥力降低, 从而促进聚集。这种现象是由超声处理时的结构变化引起的, 粒径结果 (表2) 和 FTIR 光谱结果证实了这一点。

[0110] 表3. 天然的和在 $38\text{W}/\text{cm}^2$ 下超声处理 40min 的羽扇豆蛋白浓缩物的热性质和 zeta 电位。

样品	T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$)	T_{peak} ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (j/g)	zeta (mV)
天然的	70.40 \pm 0.24a	104.99 \pm 0.04a	288.28 \pm 0.88a	-
[0111]				26.85 \pm 0.07a
经处理的	65.46 \pm 0.31b	102.97 \pm 0.86a	260.70 \pm 0.71b	-
				15.48 \pm 0.25b

[0112] a、b、c、d、e: 同一列中具有不同字母的值显著不同 ($p \leq 0.05$)。

[0113] 1.4.6 差示扫描量热法

[0114] 对于天然 (未处理的羽扇豆蛋白) 和超声处理的羽扇豆蛋白的羽扇豆蛋白浓缩物的热性质包括起始温度 (T_{onset})、峰值温度 (T_{peak}) 和变性焓 (ΔH) 如表3所示。天然羽扇豆蛋白和超声处理的浓缩物均分别在 104.99°C 和 102.97°C 处显示出一个宽的吸热变性峰 (T_{peak})。与未处理的样品相比, 超声处理 ($38\text{W}/\text{cm}^2$ 持续 40 分钟) 的样品的 T_{onset} 和 ΔH 显著降低 ($p \leq 0.05$)。蛋白质热稳定性与二级和三级结构的蛋白质结构复杂性有关, 蛋白质热性质的任何改变都可能是由于蛋白质构象结构的变化, 该变化有利于变性。这一结果可能突出了超声处理会由于某些蛋白质结构变化 (例如增加 β 折叠的比例) 而降低羽扇豆蛋白的热稳

定性。超声处理对羽扇豆蛋白结构的这种改变通过粒径、zeta和FTIR得到证实。

[0115] 1.4.7傅里叶变换红外光谱 (FTIR)

[0116] 为了研究超声处理时间和功率对羽扇豆蛋白结构的影响,通过监测峰位置的变化来分析酰胺带I、II和III(见图5)。酰胺I光谱上的吸收(图5a)与羽扇豆蛋白二级结构的FTIR光谱之间的 $1600-1700\text{cm}^{-1}$ 波数范围内的 $\text{C}=\text{O}$ 拉伸振动有关。酰胺I光谱上的 α 螺旋和 β -折叠结构分别存在于波数 $1662-1655\text{cm}^{-1}$ 和 $1272-1264\text{cm}^{-1}$ 处。酰胺II和III吸收信号分别归属于蛋白质肽侧链的 $\text{C}-\text{N}$ 和 $\text{N}-\text{H}$ 在 $1480-1575\text{cm}^{-1}$ 和 1200 至 1400 范围内的拉伸振动。将天然羽扇豆蛋白的FTIR光谱与 $38\text{W}/\text{cm}^2/40\text{min}$ 的超声处理样品的酰胺I带进行比较,显示波数 1661 至 1665cm^{-1} 的峰略有偏移。这可能与蛋白质变性和聚集引起的 α -螺旋到 β -折叠结构的改变有关,这证实了粒径和zeta电位的发现。此外,在酰胺I区,超声处理的羽扇豆蛋白显示 1618cm^{-1} 处的信号吸光度增加(图5a),这进一步证明了形成蛋白质聚集的 β -折叠结构。图5a为超声处理的羽扇豆蛋白浓缩物在 1635cm^{-1} 处具有更大的酰胺I峰,与未处理的羽扇豆蛋白浓缩物相比,其被归因于形成反平行 β -折叠。这可能证实超声处理促进蛋白质展开并干扰羽扇豆蛋白的构象。在 1530 、 1538 、 1555 和 1570cm^{-1} 处酰胺II区域的FTIR光谱显示超声处理后的峰缺失。另一方面,羽扇豆蛋白FTIR光谱在 $1250-1230\text{cm}^{-1}$ 的酰胺III区域(图5b)显示超声处理后新峰的形成,这可能被归因于新聚集体的形成,产生更大的颗粒。

[0117] 1.4.8十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

[0118] 羽扇豆蛋白的SDS-PAGE显示了主要羽扇豆蛋白亚基的典型特征 α 凝集素(11S球蛋白)和 β 凝集素(7S球蛋白)。将天然羽扇豆蛋白与超声处理的羽扇豆蛋白的电泳图谱进行比较,显示羽扇豆蛋白SDS-PAGE图谱没有发生重大变化,这表明超声没有改变羽扇豆蛋白的一级结构或分子间二硫化物交联,并表明诸如静电和疏水相互作用等非共价键主导了新形成的羽扇豆蛋白聚集体。

[0119] 1.4.9流变性质

[0120] 采用受控应力流变仪监测羽扇豆蛋白浓缩物凝胶形成过程中羽扇豆蛋白的结构形成。从图6可以看出,超声处理的样品比未处理的羽扇豆样品具有更高的弹性模量(G'),这表明羽扇豆蛋白在超声处理后形成凝胶网络的能力。超声样品在 500 秒(40°C)后开始形成纹理,而未经处理的样品在 1750 秒(70°C)后开始形成纹理。这可以通过增加因蛋白质聚集体形成而导致的 G' 值而观察到,确认超声处理通过展开一些多肽来改变蛋白质结构,这促进了分子间相互作用,因为GDL水解导致pH降低,从而减少羽扇豆蛋白浓缩物中相邻蛋白质之间的排斥静电力。将羽扇豆蛋白分散体在 95°C 下保持 20 分钟(图7)会导致未经处理的样品的 G' 略微但稳定地增加。另一方面,超声样品在 1000 秒后显示 G' 从 800Pa 降低到 700Pa ,这是由于氢键干扰和疏水相互作用的形成。然而,与未经处理的样品相比,超声处理的样品在相同的加热量下具有更高的 G' 。这证实了超声处理会降低羽扇豆蛋白的热稳定性。冷却后(图8),超声处理的样品显示出比未处理的样品更高的 G' 值。超声处理的样品在 25°C 时达到最大值 4200Pa ,而未经处理的样品在 25°C 时达到最大值 1600Pa 。由超声处理的羽扇豆蛋白浓缩物形成的凝胶的性质表现出更强的凝胶网络,可能是由于羽扇豆蛋白的热稳定性降低(例如 β -折叠比例增加)而通过多肽侧链上新暴露的活性基团形成的。可以注意到,超声处理后羽扇豆蛋白粒径、zeta电位和DSC的变化对其粘弹性具有显著影响。采用低排斥力增加粒径导致羽扇豆蛋白可以比未经处理的羽扇豆样品更快地形成凝胶网络。此外,降低的

羽扇豆蛋白热稳定性促进蛋白质的展开和聚集过程比天然羽扇豆蛋白更快。

[0121] 1.5结论

[0122] 超声处理显著改变了羽扇豆蛋白的凝胶强度、WHC、粘弹性凝胶性质(G')、蛋白质溶解度、粒径和zeta电位。超声对羽扇豆蛋白的二级结构产生轻微的改变,FTIR光谱证实了这一点。此外,超声处理会降低羽扇豆蛋白的热性质。SDS-PAGE电泳结果显示主要的羽扇豆蛋白亚基分子量没有变化。对于羽扇豆来说,高强度超声处理首次显示出改善羽扇豆蛋白凝胶质量属性(凝胶强度、WHC、溶解度和粘弹性(弹性模块G'))的巨大潜力。改善澳大利亚甜羽扇豆的技术功能性质可能允许将羽扇豆蛋白用作食品工业中植物蛋白来源,用作为食品配料,这可能满足消费者对更健康食品替代品和食品加工要求的需求。

[0123] 实施例2

[0124] 2.1材料

[0125] 羽扇豆种子根据在实施例1中的第1.1节制备。

[0126] 2.2方法

[0127] 2.2.1羽扇豆蛋白浓缩物的制备

[0128] 羽扇豆蛋白浓缩物按照实施例1中的1.2.1节制备。

[0129] 2.2.2冷成型凝胶条件下进行超声处理以确定羽扇豆蛋白凝胶能力的控制因素

[0130] 使用Design Expert软件版本11,选择五独立因子两水平的部分因子(fractional factororial)实验设计 2^{5-1} 来确定它们对凝胶质量的影响,以确定自变量的影响:超声处理时间(US_t) (分钟)、超声处理强度(USI) (W/cm²)、热处理温度(TT) (°C)、热处理时间(Tt) (分钟)和pH值对羽扇豆蛋白浓缩物凝胶强度(g)、持水能力%和凝胶收率(%)。Design Expert软件用于使用自变量的最小值和最大值来生成实验运行(表4)。

[0131] 表4具有实际值和编码值的阶乘自变量

因素	自变量	单位	实际值		编码值	
			最小值	最大值	最小值	最大值
[0132] A	超声处理时间 (US _t)	分钟	2	20	-1	+1
B	超声处理功率 (US _p)	W/cm ²	11	38	-1	+1
C	热处理温度 (TT)	°C	75	95	-1	+1
D	热处理时间 (Tt)	分钟	20	60	-1	+1
[0133] E	pH	pH	4.5	5.5	-1	+1

[0134] 2.2.3羽扇豆蛋白凝胶的制备

[0135] 按实施例1中第1.2.2节制备10% (w/w) 羽扇豆蛋白溶液。用去离子水制备10% (w/w) 羽扇豆蛋白浓缩物分散体,室温搅拌1h。然后,蛋白质溶液在4°C下保持过夜以完成蛋白质水合作用。在高强度超声处理前,使用0.1M NaOH或HCl将pH调节至7+/-0.1。

[0136] 2.2.4高强度超声处理

[0137] 使用带有CV26型转换器和13mm钛探头的VCX 600型超声处理器(Sonics & Materials Inc, USA)进行高强度超声处理,以超声处理20ml 10% (w/w) 羽扇豆蛋白物的溶

液2分钟或20分钟,具体取决于运行限值。羽扇豆蛋白浓缩物溶液在配备冷却器的双壁玻璃烧杯中进行超声处理,以在超声处理过程中将样品温度保持在35℃以下。超声处理后,将样品转移到直径为40mm的60ml玻璃容器中。超声处理的功率和强度分别为11W/cm²、17W/cm²和38W/cm²,振幅分别为10%、20%和40%,如实施例1中的第1.2.3.1节所述。

[0138] 2.2.5研究添加葡萄糖酸-δ-内酯(GDL)

[0139] 将0.5%或1%(w/v)的GDL添加到羽扇豆蛋白浓缩分散体中,最终pH值分别约为5.5和4.5。

[0140] 2.2.6酸诱导的凝胶化

[0141] 在热处理前2分钟加入所需量的GDL粉末(第2.2.7节)。GDL将缓慢水解为葡萄糖酸,并根据运行限值将pH值降低到所需点。所有样品在热处理前使用涡旋混合器混合。

[0142] 2.2.7热处理

[0143] 经超声处理的(改性的)羽扇豆蛋白浓缩物溶液在75℃或95℃下处理20分钟或60分钟(表4)。加热后,将改性羽扇豆蛋白浓缩物溶液冷却至室温以形成凝胶,然后在4℃下保持24小时,以使凝胶在分析前平衡。

[0144] 2.2.8羽扇豆凝胶强度的测定

[0145] 凝胶强度按实施例1中的第1.2.6节测定。

[0146] 2.2.9持水能力的测定(WHC)

[0147] WHC试验按照实施例1中的第1.2.7节进行。

[0148] 2.2.10凝胶收率的测定

[0149] 羽扇豆凝胶形成后,通过将滤纸小心地接触未结合的自由水而除去未结合的自由水,小心不要从凝胶中去除水。凝胶产量是新鲜凝胶样品(去除自由水后)与原始样品重量之间的差值。除去自由水后,准确称量凝胶样品。凝胶收率按照以下公式计算:

[0150] 凝胶收率 = (Wg/Wt) * 100

[0151] 其中,Wg是去除未结合水后的凝胶样品的重量(克),Wt是原始改性羽扇豆蛋白溶液(包括添加的GDL)的重量。

[0152] 2.3统计分析

[0153] 所有结果均表示为平均值±标准偏差。Design expert软件(V11)(美国明尼阿波利斯市)用于创建模型并分析结果(Montgomery,2017)。采用单因素方差分析检验和Tukey检验比较每个因变量结果的结果。使用SPSS统计量(V23,SPSS Inc,美国伊利诺伊州芝加哥市)分析了因变量之间的Pearson相关性。

[0154] 2.4结果和讨论

[0155] 2.4.1自变量对羽扇豆蛋白凝胶强度的影响

[0156] 凝胶强度是用作食用原料的最重要的凝胶性质之一。羽扇豆蛋白浓缩物的凝胶强度范围为11g-215g(表5),这取决于用于形成凝胶的条件。该模型显示,凝胶强度受到TT、USt和USp的显著(p≤0.05)影响(表3)。此外,Tt对羽扇豆凝胶强度有积极影响,但无显著影响(p≤0.05)。据报道,≤20min USt可以提高凝胶强度,因为蛋白质变性和活性蛋白质基团的暴露提高了大豆和乳清蛋白凝胶中形成分子间交联的能力,这与目前的结果一致。相反,延长USt≥(40min)对大豆蛋白凝胶强度有负面影响。然而,羽扇豆蛋白凝胶比超声处理后由大豆分离蛋白形成的凝胶具有更高的凝胶强度(~50.9g)。析因分析表明,pH值对羽扇豆

凝胶强度有负面影响。据报道,由于排斥力的降低和蛋白质聚集的增加,将pH值降低到等电点附近将增加凝胶强度。然而,对于当前的实施例,pH值的影响并不显著($p \leq 0.05$)。目前尚无研究关注羽扇豆在冷成型凝胶和/或超声处理下的凝胶化性质,以便大豆蛋白和乳清蛋白用作比较参考。

[0157] 2.5自变量对羽扇豆蛋白凝胶持水能力(WHC)和凝胶收率的影响

[0158] 超声处理显著改善羽扇豆凝胶WHC($p \leq 0.05$),见表5。方差析因分析表明,羽扇豆凝胶的WHC受USt、USp和TT的影响(表5)。这些结果与超声处理后大豆、豌豆和乳清蛋白的结果一致。据报道,超声处理20分钟显著改善了羽扇豆蛋白的WHC,但将超声处理增加到40分钟并没有改善乳清蛋白的WHC。相反,增加USt超过20分钟会降低羽扇豆蛋白凝胶WHC。改变蛋白质结构、蛋白质部分尺寸、促进蛋白质展开和疏水基团暴露,可以构建高度交联的凝胶网络,从而改善WHC。此外,通过降低pH值来降低排斥力有助于通过形成疏水相互作用来产生致密的蛋白质网络,从而捕获水(Kohyama, Sano, & Doi, 1995; Puppo, Lupano, & Añón, 1995)。Pearson相关性表明凝胶强度与持水能力之间存在显著的正相关($R=0.799^{**}$, $P=0.01$)。与弱凝胶网络相比,由于更加稳定的结构,牢固而强力的凝胶网络也可以捕获更多的水,即使在剧烈离心期间也是如此。

[0159] 表5因子实验设计中的独立因子和依存因子及其实际值。

运行	变量的实际值					响应因子		
	A	B	C	D	E	凝胶强度	WHC	凝胶收率
	分钟	W/cm ²	°C	时间	pH	g	%	%
1	20	38	95	20	4.5	215.00±5.66k	71.71±0.12j	97.29±0.12b
2	20	38	95	60	5.5	210.67±4.24k	61.63±0.69i	96.96±0.06b
3	2	11	95	20	4.5	29.00±1.41bc	50.93±0.18efg	96.66±0.18b
4	2	11	95	60	5.5	50.33±4.24e	50.35±0.77efg	96.08±0.69b
5	20	10	75	20	4.5	39.67±2.83d	43.69±0.14cde	95.66±0.33b
[0160] 6	20	38	75	20	5.5	37.33±2.12cd	43.7±0.8cde	96.79±0.54b
7	2	38	75	60	5.5	25.67±1.41b	42.39±1.13cd	93.34±0.7b
8	2	38	95	20	5.5	82.67±2.12h	52.65±1.14fgh	97.45±0.5b
9	20	11	95	20	5.5	170.67±0.71j	58.39±1.52hi	97.16±0.8b
10	20	11	95	60	4.5	119.67±2.12i	50.08±1.04efg	94.17±0.96b
11	2	11	75	60	4.5	24.00±0.71b	37.24±0.86bc	96.91±0.86b
12	2	38	95	60	4.5	66.00±1.41g	55.72±0.97ghi	85.21±0.41a
13	2	11	75	20	5.5	11.00±1.41a	22.21±0.38a	84.04±0.32a
14	20	38	75	60	4.5	60.67±1.41fg	53.44±1.1fgh	97.36±0.47b
15	2	38	75	20	4.5	24.00±1.41b	30.04±1.12b	97.69±0.25b
16	20	11	75	60	5.5	56.00±2.12ef	47.48±1.34def	97.33±0.7b

[0161] 同一列中具有不同字母的平均值表示显著差异($P < 0.05$)。

[0162] 超声处理后,改性羽扇豆蛋白浓缩物的凝胶收率显著提高($p \leq 0.05$)。最大凝胶收率属于运行1(表5),为97.17%,明显高于运行13的84.6%(表5)。析因分析表明,USt是影响羽扇豆蛋白浓缩凝胶合成的最显著因素(表5)。这一结果可能是由于蛋白质粒径和蛋白质构象结构的变化(Arzeni等人,2012;Hu等,2015;Jambrak等人,2009)。此外,析因分析模型

表明,pH值的增加会对凝胶收率产生负面影响,因为当pH值远离等电点时,高排斥力会导致凝胶网络损失并最终失去水分。然而,方差分析表明,pH值对当前实施例的影响并不显著。Pearson相关分析显示,[凝胶收率]:[凝胶强度]与[凝胶产量]:[WHC]之间分别存在正向但不显著的相互作用($R=0.264$ 、 $P=0.05$)和($R=0.341$ 、 $P=0.05$)。来自羽扇豆凝胶蛋白网络的水协同作用主要取决于蛋白质通过亲水相互作用(如氢键)结合水分子的能力。然而,羽扇豆蛋白凝胶网络的凝胶收率与大豆和乳清蛋白的凝胶收率相当。

[0163] 表5针对每个响应的增量变化的部分因子模型的方差分析。空白条目表示不显著的结果。

响应	模型	USt	USp	TT	Tt	pH
凝胶强度	F	46.32	80.97	10.70	100.76	
	P	<0.0001	<0.0001	0.0084	<0.0001	
WHC	F	16.21	13.79	4.56	30.27	
	P	0.0002	0.0030	0.0541	0.0001	
凝胶收率	F	24.53	26.85			
	P	<0.0001	0.0008			

[0165] 2.3结论

[0166] 采用析因分析法探讨超声处理时间(USt)(分钟)、超声处理功率(USp)(W/cm^2)、热处理温度(TT)($^{\circ}C$)、热处理时间(Tt)(分钟)和pH值对羽扇豆蛋白凝胶强度、持水能力和凝胶得率的影响。该模型表明,羽扇豆蛋白凝胶性质受自变量USt、USp和TT效应的显著影响。

[0167] 在随后的权利要求书和前面的描述中,除非上下文因明示语言或必要的暗示而另有要求,否则“包含(comprise)”一词或变形如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”用于包容性意义,即明确所述特征的存在,但不排除在各种实施方案中存在或添加进一步特征。

[0168] 本发明领域的技术人员可以理解,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下进行许多修改。

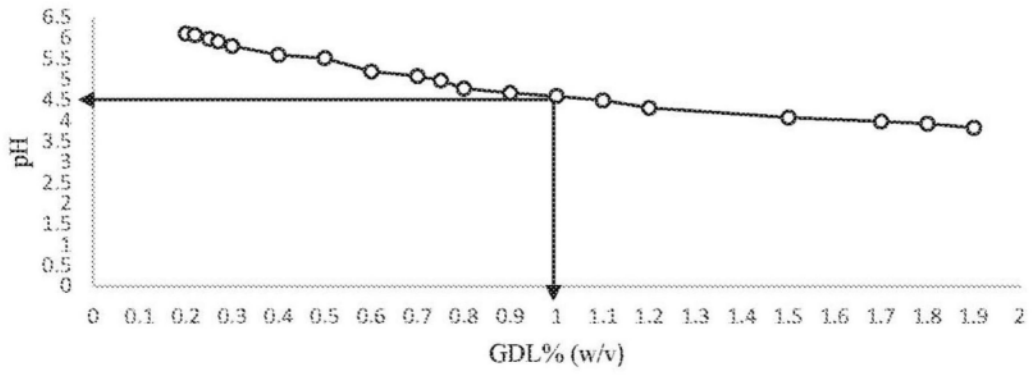


图1

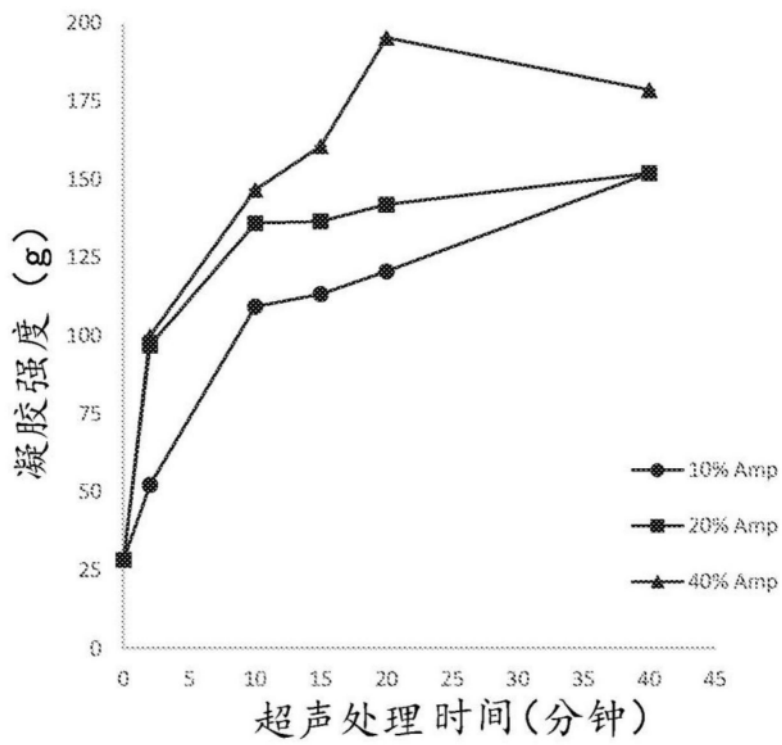


图2

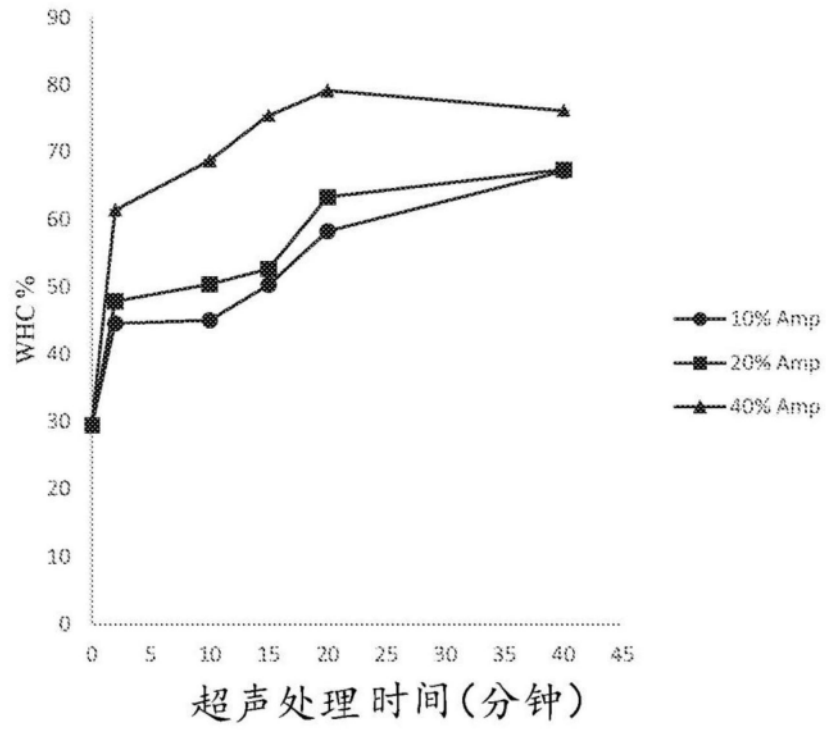


图3

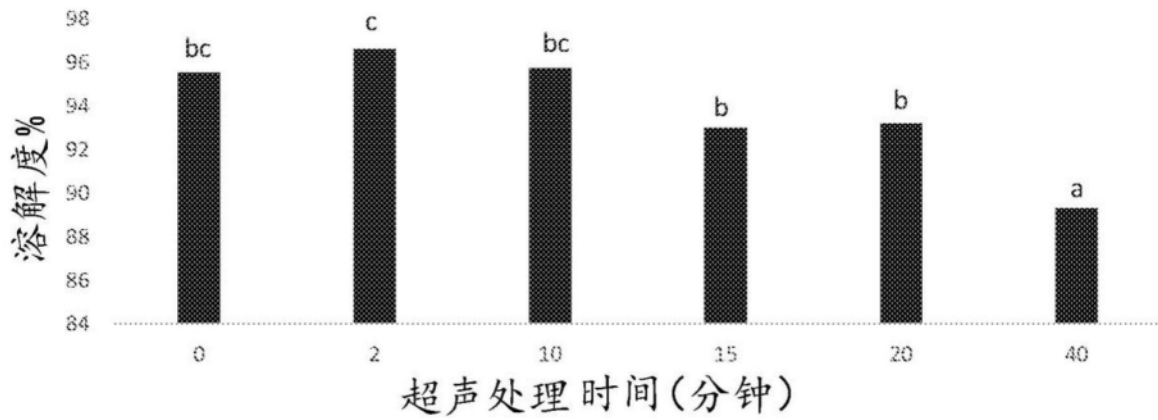


图4

酰胺 I

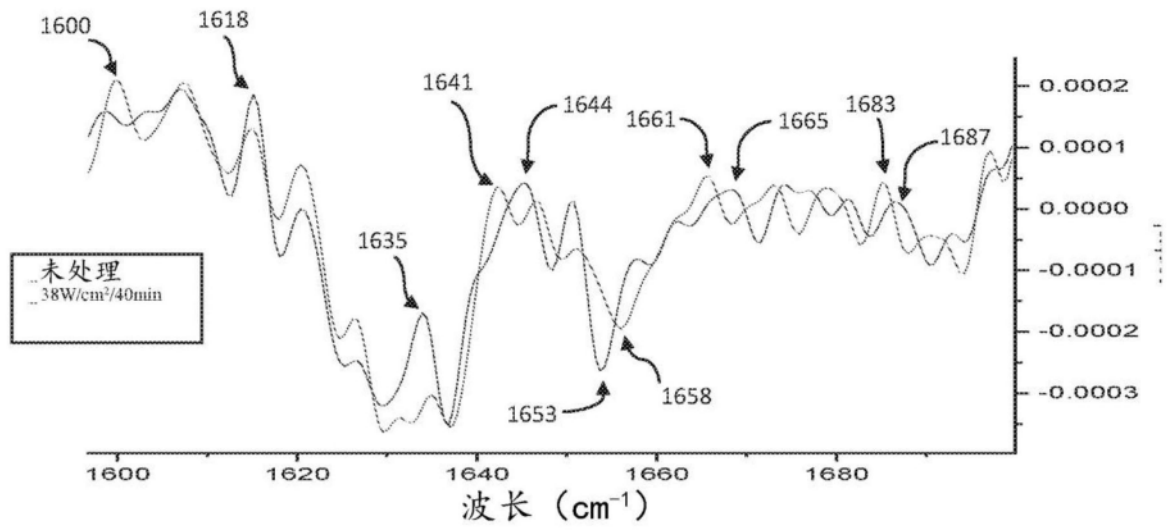


图5a

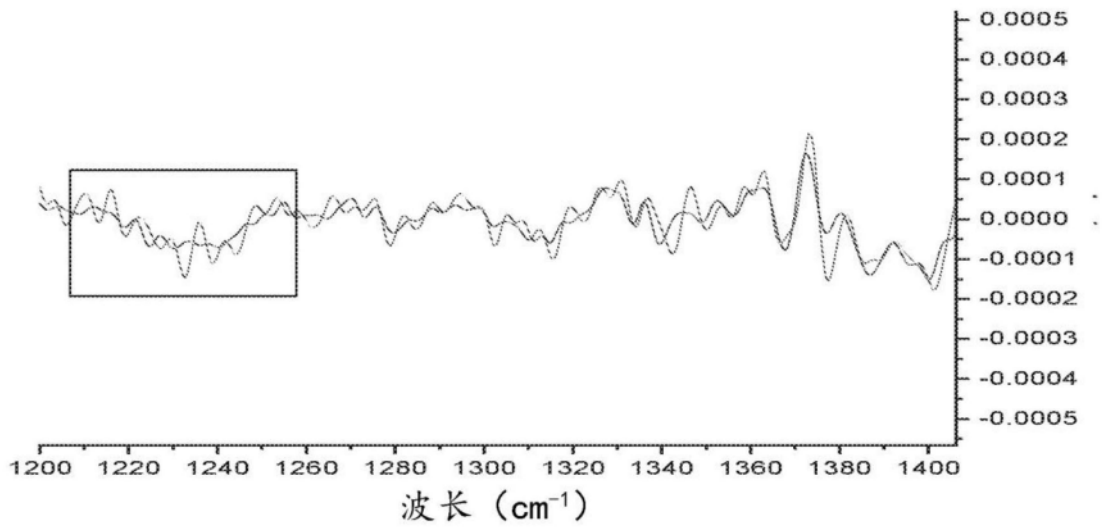


图5b

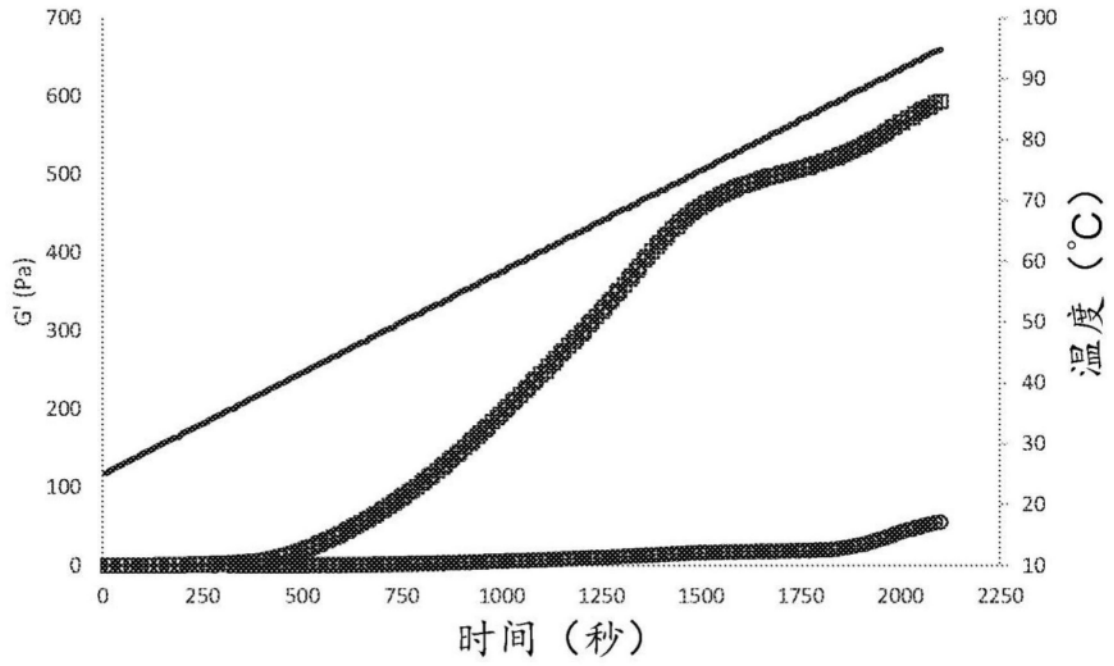


图6

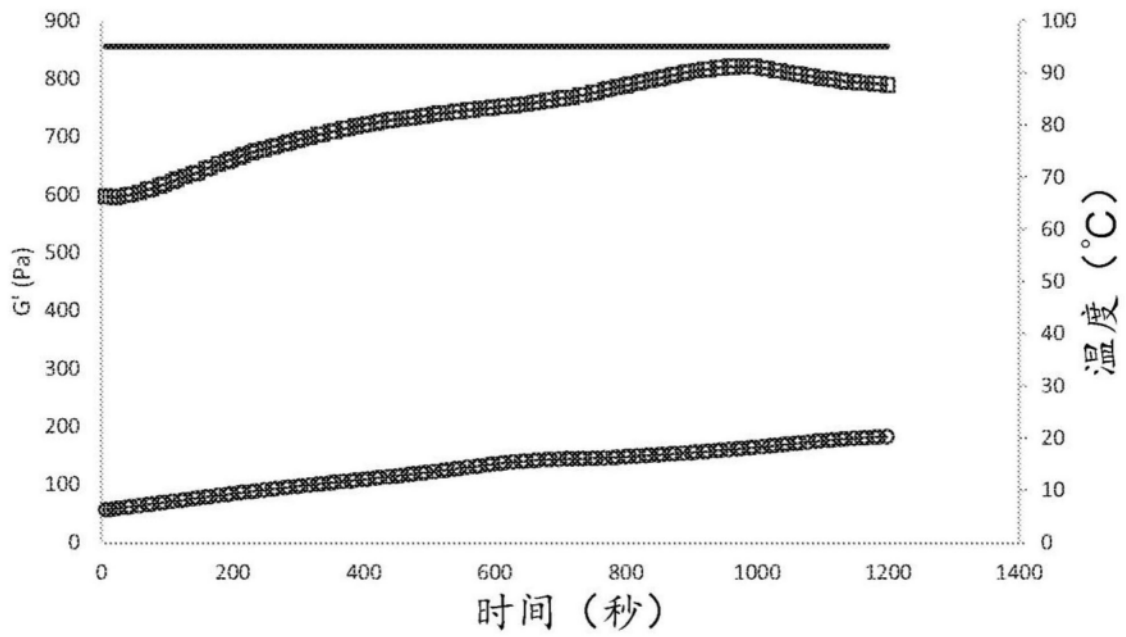


图7

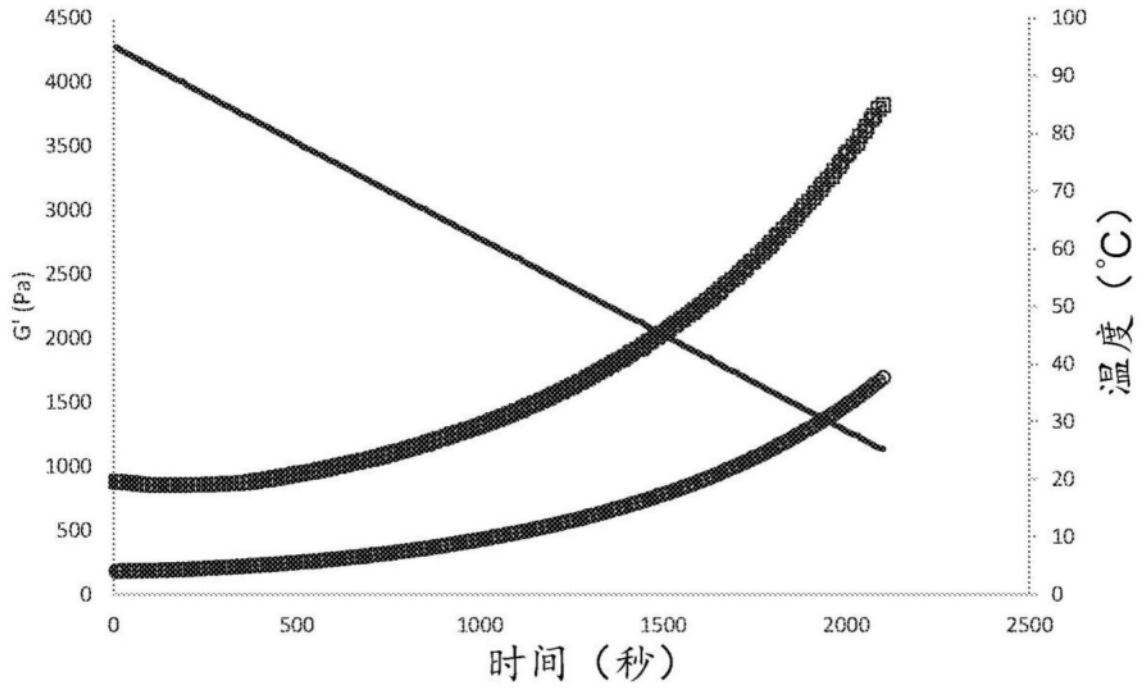


图8