

第五章 氨基酸，肽和蛋白质

第一节 概述

蛋白质是生物体的重要组成部分，在生物体系中起着核心作用，占活细胞干重的 50%左右。虽然有关细胞的进化和生物组织信息存在于 DNA 中，但是，维持细胞和生物体生命的化学和生物化学过程全部是由酶来完成。众所周知，每一种酶在细胞中是高度专一的催化一种生物化学反应，酶是具有催化功能的蛋白质。此外，有的蛋白质，例如胶原蛋白、角蛋白和弹性蛋白等，在细胞和复杂的生物体中作为结构单元，对于细胞的结构和功能起着重要作用。蛋白质之所以具有多种功能，这是与蛋白质的化学组成和结构有关。许多种蛋白质已经从生物材料中分离提纯，其相对分子质量大约在 5000 到几百万之间。蛋白质由 50%~55% C、6%~7% H、20%~23% O、12%~19% N 和 0.2%~3% S 等元素构成，有些蛋白质分子还含有铁、碘、磷或锌。蛋白质完全水解的产物是 α -氨基酸，它们的侧链结构和性质各不相同，大多数蛋白质是由 20 种不同氨基酸组成的生物大分子。蛋白质分子中的氨基酸残基靠酰胺键连接，形成含多达几百个氨基酸残基的多肽链。酰胺键的 C-N 键具有部分双键性质，不同于多糖和核酸中的醚键与磷酸二酯键，因此蛋白质的结构非常复杂，这些特定的空间构象赋予蛋白质特殊的生物功能和特性。

根据蛋白质的分子组成，蛋白质可以分为两类，一类是分子中仅含有氨基酸（即细胞中未被酶修饰的蛋白质）的简单蛋白（Homoproteins），另一类是由氨基酸和其他非蛋白质化合物组成（即经酶修饰的蛋白质）的结合蛋白（Conjugated proteins），又称杂蛋白（Heteroproteins）。结合蛋白中的非蛋白质组分统称为辅基（Prosthetic groups）。根据辅基的化学性质不同，可以分为核蛋白（核糖体和病毒）、脂蛋白（蛋黄蛋白、一些血浆蛋白）、糖蛋白（卵清蛋白、 κ -酪蛋白）、磷蛋白（ α -和 β -酪蛋白、激酶、磷酸化酶）和金属蛋白（血红蛋白、肌红蛋白和几种酶）。其中糖蛋白和磷蛋白是蛋白质以共价键分别与碳水化合物和磷酸基团连接，而其他的蛋白质则是蛋白质通过非共价键与核酸、脂类和金属离子形成复合物。

每一种蛋白质都有其特定的三维结构。因此也可按照蛋白质的结构分为纤维蛋白和球蛋白。纤维蛋白是由线形多肽链组成，构成生物组织的纤维部分，如胶原蛋白、角蛋白、弹性蛋白和原肌球蛋白都属于这类蛋白质。球蛋白是一条或几条多肽链靠自身折叠而形成球形或椭圆结构。此外，肌动蛋白和血纤维蛋白等纤维蛋白分子是为 α -球蛋白的线性聚集结构。大多数酶都属于球蛋白，纤维蛋白总是起着结构蛋白的作用。

蛋白质的一级结构是指蛋白质分子中氨基酸的排列顺序，而二级结构和三级结构则与多肽链的三维结构有关，四级结构表示多肽链的几何排列，这些肽链间大多是通过非共价键连接在一起。

蛋白质具有多种功能，根据功能不同可分为三大类：结构蛋白质，有生物活性的蛋白质和食品蛋白质。

肌肉、骨骼、皮肤等动物组织中含有结构蛋白质（角蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白等），它们的功能大多与其纤维结构有关。

具有生物活性的蛋白质是生物体的重要组成部分，它与生命活动有着十分密切的关系，生命现象和生理活动往往是通过蛋白质的功能来实现的。酶是活性蛋白中最重要的一类，已鉴定出的酶有 2000 种以上，它们都是高度专一性的催化剂。其他生物活性蛋白质包括结构蛋白、调节代谢反应的激素蛋白质（胰岛素、生长激素）、收缩蛋白质（肌球蛋白、肌动蛋白和微管蛋白）、转移蛋白质（血红蛋白、肌红蛋白、铁传递蛋白）、抗体蛋白（免疫球蛋白）、贮存蛋白质（卵清蛋白、种子蛋白）和保护蛋白（毒素和过敏原）以及一些蛋白类的抗生素。有些蛋白质还具有抗营养性质（例如胰蛋白酶抑制剂）。食品中存在的蛋白质抗原，可导致抗体的合成，使人体内防御机制改变并出现许多种变态反应。贮存蛋白质主要存在于蛋类和植物种子中，主要为种子和胚芽的萌发和生长提供氮源与氨基酸。保护蛋白则是某些微生物和动物为了生存所建立的一部分防御机制。毒蛋白存在于一些毒素和微生物中，如肉毒素、金黄色葡萄球菌毒素、毒蛇毒液和蓖麻蛋白等。

从细菌到人类，所有物种其蛋白质本质上都由 20 种基本氨基酸构成，但有的蛋白质可能不含有其中的一种或几种。这 20 种氨基酸其结构、大小、形状、电荷、形成氢键的能力和化学活性方面都存在差异。蛋白质实现的功能范围所以如此之广，就是由于 20 种氨基酸的差异，以及它们的各种组合的变化的结果。通过改变氨基酸的顺序、种类和比例，以及多肽链的链长，将可合成许多具有各种独特性质的蛋白质。

食品蛋白质包括可供人类食用、易消化、安全无毒、富有营养、具有功能特性的蛋白质。乳、肉（包括鱼和家禽）、蛋、谷物、豆类和油料种子是食品蛋白质的主要来源。随着世界人口的增长，为了满足人们对蛋白质逐渐增长的需求，不仅要寻求新的蛋白质资源和开发蛋白质利用的新技术，而且还应更充分地利用现有的蛋白质资源和考虑成本。因此，必须了解和掌握食品蛋白质的物理、化学和生物学性质，以及加工处理对这些蛋白质的影响，从而进一步改进蛋白质的性质，特别是营养品质和功能特性。

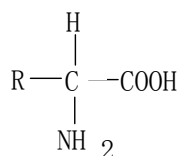
第二节 氨基酸和蛋白质的物理化学性质

一、 氨基酸的一般性质

1. 结构和分类

氨基酸是组成蛋白质分子的基本单位，有 20 种氨基酸通常存在于蛋白质水解物中，其他种氨基酸也存在于自然界，并具有生物功能。为了了解蛋白质的性质，必须首先了解氨基酸的结构性质。

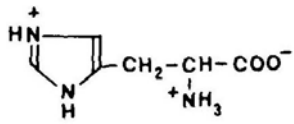
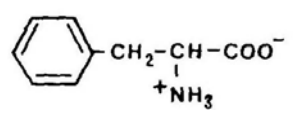
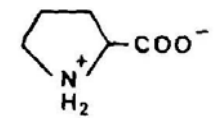
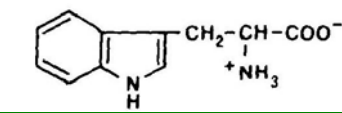
氨基酸是带有氨基的有机酸，分子结构中至少含有一个伯氨基和一个羧基， α -氨基酸含有一个 α -碳原子、一个羧基、一个氢原子和一个侧链 R 基团。天然 α -氨基酸具有以下结构：

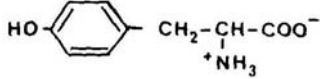
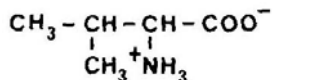


R 是侧链基团，脯氨酸和羟基脯氨酸的 R 基团来自吡咯烷，它们并不符合一般结构，蛋白质中常见的 α -氨基酸见表 5-1。

表 5-1 蛋白质中常见的 α -氨基酸

名 称	简 写 符 号		相对分 子质量	化学名称	结构式 (中性 pH)
	3 个字母	1 个字母			
丙氨酸 Alanine	Ala	A	89.1	α -氨基丙酸	$\text{CH}_3-\underset{\text{+NH}_3}{\text{CH}}-\text{COO}^-$
精氨酸 Arginine	Arg	R	174.2	α -氨基- σ -胍基戊酸	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{+NH}_2}{\text{C}}(\text{H})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\underset{\text{+NH}_3}{\text{CH}}-\text{COO}^-$
天冬酰胺 Asparagine	Asn	N	132.1	天冬酸酰胺	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\text{C}}(\text{H})-\text{CH}_2-\underset{\text{+NH}_3}{\text{CH}}-\text{COO}^-$
天冬氨酸 Aspartic acid	Asp	D	133.1	α -氨基琥珀酸	$\text{O} \quad \quad \quad \text{+NH}_3^+$ $ \quad \quad \quad $ $\text{O}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COO}^-$
半胱氨酸 Cysteine	Cys	C	121.1	α -氨基- β -巯基丙酸	$\text{HS}-\text{CH}_2-\underset{\text{+NH}_3}{\text{CH}}-\text{COO}^-$
谷氨酰胺 Glutamine	Gln	Q	146.1	谷氨酸酰胺	$\text{H}_2\text{N}-\underset{\text{O}}{\text{C}}(\text{H})-(\text{CH}_2)_2-\underset{\text{+NH}_3}{\text{CH}}-\text{COO}^-$

谷氨酸 Glutamic acid	Glu	E	147.1	α -氨基戊二酸	$\text{O}^- - \text{C}(=\text{O}) - (\text{CH}_2)_2 - \underset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}} - \text{COO}^-$
甘氨酸 Glycine	Gly	G	75.1	α -氨基乙酸	$\text{H} - \underset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}} - \text{COO}^-$
组氨酸 Histidine	His	H	155.2	α -氨基- β -咪唑基丙酸	
异亮氨酸 Isoleucine	Ile	I	131.2	α -氨基- β -甲基戊酸	$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \underset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}} - \text{COO}^-$
亮氨酸 Leucine	Leu	L	131.1	α -氨基异己酸	$\text{CH}_3 - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}} - \text{COO}^-$
赖氨酸 Lysine	Lys	K	146.2	α - ϵ -二氨基己酸	$\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_4 - \underset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}} - \text{COO}^-$
蛋氨酸 Methionine	Met	M	149.2	α -氨基- γ -甲硫醇基正丁酸	$\text{CH}_3 - \text{S} - (\text{CH}_2)_2 - \underset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}} - \text{COO}^-$
苯丙氨酸 Phenylalanine	Phe	F	165.2	α -氨基- β -苯基丙酸	
脯氨酸 Proline	Pro	P	115.1	吡咯烷-2-羧酸	
丝氨酸 Serine	Ser	S	105.1	α -氨基- β -羟基丙酸	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}} - \text{COO}^-$
苏氨酸 Threonine	Thr	T	119.1	α -氨基- β -羟基正丁酸	$\text{CH}_3 - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \underset{\text{NH}_3^+}{\text{CH}} - \text{COO}^-$
色氨酸 Tryptophan	Trp	W	204.2	α -氨基- β -3-吲哚基丙酸	

酪氨酸 Tyrosine	Tyr	Y	181.2	α -氨基- β -对羟基苯基 丙酸	
缬氨酸 Valine	Val	V	117.1	α -氨基异戊酸	

每种氨基酸具有特定的 R 侧链，它决定着氨基酸的物理化学性质。根据侧链的极性不同可将氨基酸分成四类：

- (1) 具有非极性或疏水性侧链的氨基酸（丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸），在水中的溶解度较极性氨基酸小（表 5-2），其疏水程度随着脂肪族侧链的长度增加而增大。
- (2) 带有极性、无电荷（亲水的）侧链的氨基酸含有中性、极性基团（极性基团处在疏水氨基酸和带电荷的氨基酸之间）能够与适合的分子例如水形成氢键。丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的极性与它们所含的羟基有关，天冬酰胺、谷氨酰胺的极性同其酰胺基有关。而半胱氨酸则因含有巯基，所以属于极性氨基酸，甘氨酸有时也属于此类氨基酸。其中半胱氨酸和酪氨酸是这一类中具有最大极性基团的氨基酸，因为在 pH 值接近中性时，巯基和酚基可以产生部分电离。在蛋白质中，半胱氨酸通常以氧化态的形式存在，即胱氨酸。当两个半胱氨酸分子的巯基氧化时便形成一个二硫交联键，生成胱氨酸。天冬酰胺和谷氨酰胺在有酸或碱存在下容易水解并生成天冬氨酸和谷氨酸。
- (3) 带正电荷侧链（在 pH 接近中性时）的氨基酸包括赖氨酸、精氨酸和组氨酸，它们分别具有 ϵ -NH₂、胍基和咪唑基（碱性）。这些基团的存在是使它们带有电荷的原因，组氨酸的咪唑基在 pH7 时，有 10% 被质子化，而 pH6 时 50% 质子化。
- (4) 带有负电荷侧链的氨基酸（pH 接近中性时）包括天冬氨酸和谷氨酸。由于侧链为羧基（酸性），在中性 pH 条件下带一个净负电荷。

除了 20 种常见的氨基酸外，从蛋白质水解物中还离析出另外的氨基酸，例如胶原蛋白中含有羟基脯氨酸和 5-羟基赖氨酸，弹性蛋白中含锁链素（desmosine）和异锁链素（isodesmosine），肌肉蛋白中存在甲基组氨酸， ϵ -N 甲基赖氨酸和 ϵ -N 三甲基赖氨酸。表 5-2 氨基酸在水中的溶解度（25℃）。

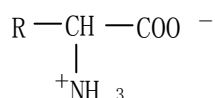
表 5-2 氨基酸在水中的溶解度

氨基酸	溶解度(g/L)	氨基酸	溶解度 (g/L)
丙氨酸	167.2	亮氨酸	21.7
精氨酸	855.6	赖氨酸	739.0
天冬酰胺	28.5	蛋氨酸	56.2
天冬氨酸	5.0	苯丙氨酸	27.6
半胱氨酸	--	脯氨酸	1620.0
谷胺酰胺	7.2 (37°C)	丝氨酸	422.0
谷氨酸	8.5	苏氨酸	13.2
甘氨酸	249.9	色氨酸	13.6
组氨酸	--	酪氨酸	0.4
异亮氨酸	34.5	缬氨酸	58.1

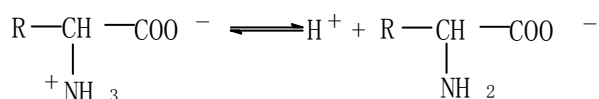
除上述 20 种氨基酸外，在动物、植物或微生物的细胞中还可能存在 150 种以上游离或结合的氨基酸，其中多数是重要的代谢中间产物（或前体），或者是参与传递神经冲动的化学介体。在某些抗生素中还可能存在 D 构型氨基酸。

2. 氨基酸的酸碱性质

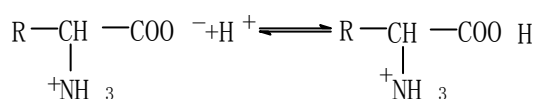
氨基酸的离子化能力在生物学上是非常重要的，这种性质可用来进行定量分析。另外，氨基酸的一些性质（熔点、溶解度、偶极矩和在水溶液中的介电常数）都是由于在水溶液中的电荷分布不均匀而产生的。因而，所有氨基酸在接近中性 pH 的水溶液中主要以两性离子（zwitterion），亦称偶极离子（dipolarion）的形式存在。



由于，氨基酸同时含有羧基（酸性）和氨基（碱性），因此，当氨基酸溶解于水时，可表现为酸的行为：

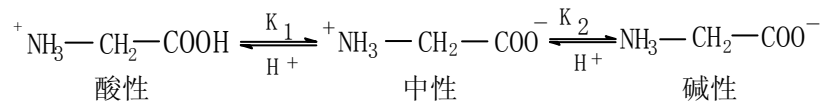


又可表现出碱的性质：



因此，是一类两性电解质。以最简单的甘氨酸（Gly）为例，在溶液中由于受 pH

的影响可能有 3 种不同的离解状态。



氨基酸的这种性质决定于介质的 pH 值，即氨基酸分子是两性的。当以完全质子化的形式存在时， α -氨基酸（-氨基、-羧基）用碱滴定可以释放出两个质子。氨基酸的等电点 pI 是指在溶液中净电荷为零时的 pH 值。pKa 值是上述两个反应的离解常数的负对数，即

$$pK_{a1} = -\log \frac{[H^+][R_0]}{[R^+]} \quad (5-1)$$

$$pK_{a2} = -\log \frac{[H^+][R^-]}{[R_0]} \quad (5-2)$$

在上列公式中， K_{a1} 和 K_{a2} 分别代表 α 碳原子上的 $-\text{COOH}$ 和 N^+H_3 的表观离解常数，R如果侧链基上有离解基团，其表观电离常数用 K_{a3} 表示。在中性pH范围， α -氨基和 α -羧基都处在离子化状态，因而当用酸滴定时， $-\text{COO}^-$ 被质子化($-\text{COOH}$)；碱滴定时， $-\text{NH}_3^+$ 发生去质子化。图 5-1 是典型氨基酸两性离子电化学滴定曲线。仅含 α -氨基和 α -羧基的氨基酸(侧链是不可离解的)的 pK_{a1} 的范围为 2.0~3.0, pK_{a2} 为 9.0~10.0 (见表 5-3)。带有可离解R基侧链的氨基酸，例如 Lys, Arg, Asp, Glu, Cys和Tyr, 相当于三元酸，有 3 个pKa值，因此滴定曲线比较复杂。绝大多数主要氨基酸的pKa和pI值见表 5-3，氨基酸的羧基 pK_{a1} 值比脂肪族羧酸低(醋酸的pKa为 4.74)，因为氨基酸的带正电荷的氨基连接在邻近羧基的 α 碳原子上。

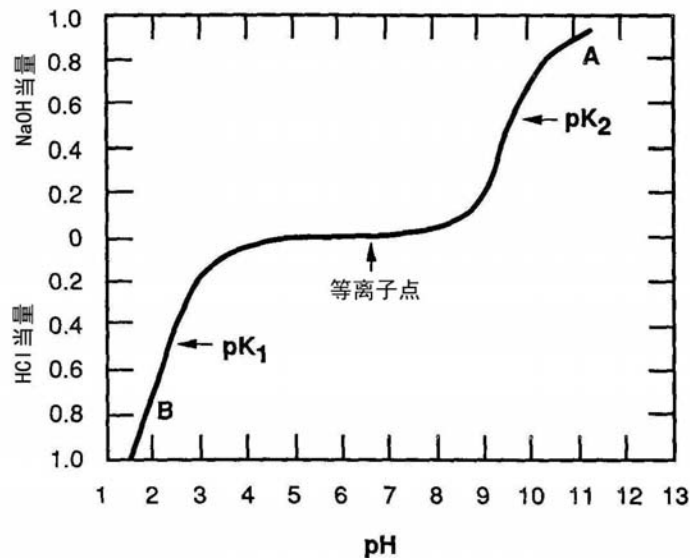


图 5-1 一种典型氨基酸滴定曲线

pKa是表观离解平衡常数的负对数，pI（等电点）是电中性状态（净电荷为零）时的pH值。根据下列等式，利用氨基酸的pKa₁、pKa₂和pKa₃值可估算等电点值：

$$\text{不带电荷侧链的氨基酸} \quad pI = (pKa_1 + pKa_2) / 2$$

$$\text{酸性氨基酸} \quad pI = (pKa_1 + pKa_3) / 2$$

$$\text{碱性氨基酸} \quad pI = (pKa_2 + pKa_3) / 2$$

在等电点以上的任何 pH 值，氨基酸带净负电荷，并因此在电场中将向正极移动。在低于等电点的任一 pH 值，氨基酸带有净正电荷，在电场中将向负极移动。在一定 pH 范围内，氨基酸溶液的 pH 离等电点愈远，氨基酸携带的净电荷愈多。

在蛋白质分子中，氨基酸的 α -COOH 是通过酰胺键与邻近氨基酸的 α -NH₂ 相结合，可以离解的基团只能是 N-端氨基酸残基的氨基，C-端氨基酸残基的羧基和侧链上的可离解基团。因此，蛋白质中这些可离解基团的 pKa 值不同于相应的游离氨基酸。蛋白质中的谷氨酸和天冬氨酸的酸性侧链基团的 pKa₃ 值大于相应的游离氨基酸的 pKa₃ 值，而碱性侧链的 pKa₃ 值则小于相应游离氨基酸的 pKa₃ 值。

根据 Henderson-Hasselbach 公式

$$pH = pKa + \log \frac{[\text{共轭碱}]}{[\text{共轭酸}]} \quad (5-3)$$

可以计算出任一 pH 条件下一种氨基酸的各种离子的离子化程度，并求出总的负电荷和正电荷之和，从而可计算出某一蛋白质在此 pH 时的净电荷。

3. 氨基酸的疏水性

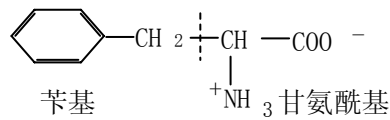
蛋白质在水中的溶解度同氨基酸侧链的极性基团（带电荷或不带电荷）和非极性（疏水）基团的分布状态有关，而且蛋白质和肽的结构、溶解性和结合脂肪的能力等许多物理化学性质，都受到组成氨基酸疏水性的影响。氨基酸以及肽和蛋白质的疏水程度可以根据氨基酸在水和弱极性溶剂例如乙醇中的相对溶解度来确定，将 1mol 氨基酸从水溶液中转移到乙醇溶液中，自由能的变化（即转移自由能）可从下式计算（忽略活度系数）：

$$\Delta \Delta G_t^0 = -RT \ln S_{\text{乙醇}} / S_{\text{水}} \quad (5-4)$$

式中，S_{乙醇}和S_水分别表示氨基酸在乙醇和水中的溶解度（mol/L）。假若氨基酸有多个基团，则 $\Delta \Delta G_t^0$ 是氨基酸中各个基团的加合函数。

$$\Delta \Delta G_t^0 = \sum \Delta G_t^{0'} \quad (5-5)$$

例如苯丙氨酸，从水向乙醇中转移的自由能可以分为两个部分，一部分是苯基，另一部分是氨基和羧基。



第二部分与给定甘氨酸的转移自由能相似，因而从该氨基酸和甘氨酸的转移自由能之差，可以表示出侧链的疏水性。

$$\Delta\Delta G_t^0(\text{侧链}) = \Delta G_t^0(\text{氨基酸}) - \Delta G_t^0(\text{甘氨酸})$$

表 5-4 给出了某些氨基酸侧链的疏水性数值。用这些数据可以预测氨基酸在疏水性载体上的吸附行为（它可作为疏水性的一个函数），像聚苯乙烯或连接脂肪族C₈或C₁₈链的二氧化硅，吸附系数与疏水程度成正比。具有较大的正 ΔG_t^0 的氨基酸侧链是疏水性的，因此易溶于有机相而不是水相。蛋白质分子中的疏水氨基酸残基倾向于处在蛋白质分子内部，氨基酸侧链的 ΔG_t^0 为负值时则是亲水的，这些氨基酸残基趋向于蛋白质分子表面。这里必须提出，赖氨酸尽管被认为是一种亲水性氨基酸，但 ΔG_t^0 为正值（这是由于它有 4 个易溶于有机相的-CH₂-基）。事实上，蛋白质分子中的赖氨酸侧链被埋藏的同时，它的 ϵ -氨基则突出在蛋白质分子的表面。

表 5-3 氨基酸的 pKa 和 pI (25°C)

名称	pKa ₁ (α -COO ⁻)	pKa ₂ (α -NH ₃ ⁺)	pKa _R (R=侧链)		pI
			AA	侧链*	
丙氨酸	2.34	9.69	—		6.00
精氨酸	2.17	9.04	12.48	>12.00	10.76
天冬酰胺	2.02	8.80	—		5.41
天冬氨酸	1.88	9.60	3.65	4.60	2.77
半胱氨酸	1.96	10.28	8.18	8.80	5.07
谷氨酰胺	2.17	9.13	—		5.65
谷氨酸	2.19	9.67	4.25	4.60	3.22
甘氨酸	2.34	9.60			5.98
组氨酸	1.82	9.17	6.00	7.00	7.59
异亮氨酸	2.36	9.68	—		6.02
亮氨酸	2.30	9.60	—		5.98
蛋氨酸	2.28	9.21	—		5.74
赖氨酸	2.18	8.95	10.53	10.20	9.74
苯丙氨酸	1.83	9.13	—		5.48
脯氨酸	1.94	10.60	—		6.30

丝氨酸	2.20	9.15	—	5.68
苏氨酸	2.21	9.15	—	5.68
色氨酸	2.38	9.39	—	5.89
酪氨酸	2.20	9.11	10.07	9.60
缬氨酸	2.32	9.62	—	5.96

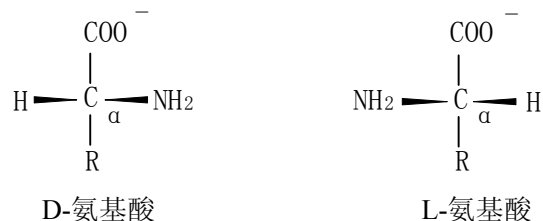
*蛋白质分子中可离子化基团的 pKa 值

表 5-4 氨基酸侧链的疏水性 (乙醇→水)

氨基酸	$\Delta\Delta G_r^0$ 侧链 (kJ/mol)	氨基酸	$\Delta\Delta G_r^0$ 侧链 (kJ/mol)
丙氨酸	2.09	亮氨酸	9.61
精氨酸	—	赖氨酸	—
天冬酰胺	0	蛋氨酸	5.43
天冬氨酸	2.09	苯丙氨酸	10.45
半胱氨酸	4.18	脯氨酸	10.87
谷氨酰胺	-0.42	丝氨酸	-1.25
谷氨酸	2.09	苏氨酸	1.67
甘氨酸	0	色氨酸	14.21
组氨酸	2.09	酪氨酸	9.61
异亮氨酸	12.54	缬氨酸	6.27

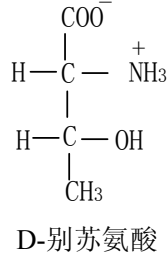
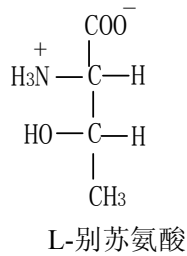
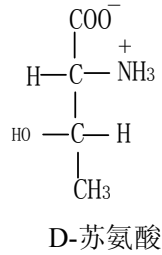
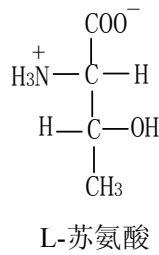
4. 氨基酸的立体化学

蛋白质温和水解 (酸或酶法) 产生的所有氨基酸除甘氨酸外, 都具有旋光性, 这种性质 (手性) 是因为有不对称 α -碳原子存在, 不对称碳原子轨道为 sp^3 杂化。根据碳原子上四种不同取代基的正四面体位置, 可以得到两种立体异构体 (或对映体)。因此, 用费歇尔法表示, 按 D-和 L-甘油醛类推, 而不是按对线性偏振光的旋转方向确定。L-和 D-氨基酸的两种立体异构体可用下式表示:



天然存在的蛋白质中, 只存在 L 型异构体。氨基酸的这种结构一致性是决定蛋白质结构的一个主要因素。异亮氨酸、苏氨酸、羟基赖氨酸和羟基脯氨酸等 4 种氨基酸各有第二个不对称中心 (即 β -碳原子), 所以它们各有四种立体异构

体。



某些氨基酸的 D 型异构体存在于一些微生物的细胞壁和具有抗菌作用的多肽内。例如放线菌素 D、短杆菌肽和短杆菌酪肽。

5. 氨基酸的光谱

蛋白质分子中只有色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等芳香族氨基酸是能够吸收紫外光的氨基酸，分别在波长 278、275 和 260nm 处出现最大吸收（表 5-5）。胱氨酸在 230nm 处有微弱吸收。所有参与蛋白质组成的氨基酸在接近 210nm 波长处都产生吸收，但是它们在可见光区域均没有吸收。

氨基酸仅色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸能产生荧光（表 5-5），甚至蛋白质分子中的色氨酸也仍然会产生荧光（激发波长 280nm，在 348nm 波长处荧光最强）。这些氨基酸所处的环境极性对它们的紫外吸收和荧光性质有影响，因此常通过这些氨基酸的环境变化，对生色基团产生的微扰作用所引起的光谱变化来考察蛋白质构象的变化。

表 5-5 芳香族氨基酸的紫外吸收和荧光

氨基酸	最大吸收波长 (λ_{max} , nm)	摩尔消光系数 ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)	荧光最大发射波长 (λ_{max} , nm)
苯丙氨酸	260	190	282 ^a
色氨酸	278	5500	348 ^b
酪氨酸	275	1340	304 ^b

a: 激发波长 260nm

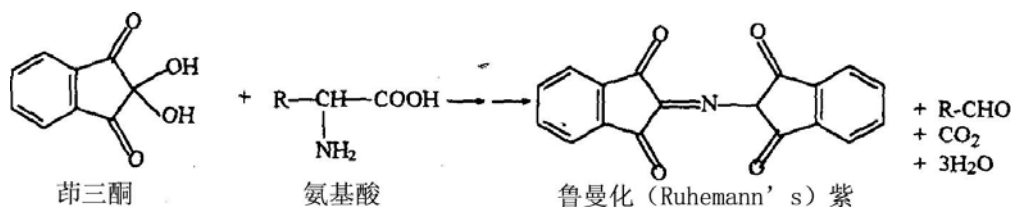
b: 激发波长 280nm

二、氨基酸的化学反应

氨基酸和蛋白质分子中的反应基团主要是指它们的氨基、羧基和侧链的反应基团即巯基、酚羟基、羟基、硫醚基 (Met)、咪唑基和胍基, 主要反应见表 5-6。其中有的反应可用来对蛋白质和肽进行化学修饰, 改善它们的亲水性和疏水性或功能特性。还有一些反应被用作蛋白质和氨基酸的定量分析, 例如氨基酸与茚三酮、邻苯二甲醛或荧光胺反应是氨基酸定量分析中常用的反应。

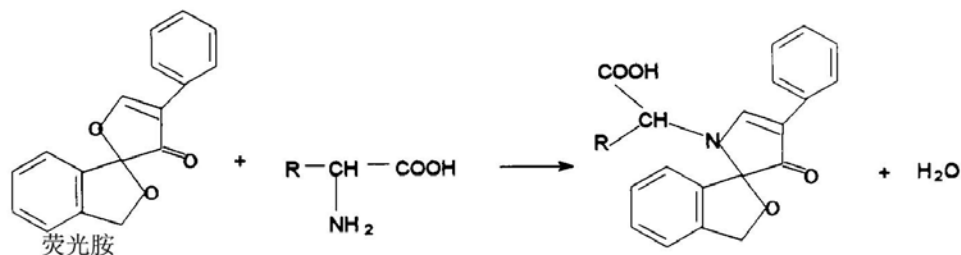
1. 与茚三酮反应

在氨基酸的分析化学中, 具有特殊意义的是氨基酸与茚三酮 (Ninhydrin) 的反应。茚三酮在弱酸性溶液中与氨基酸共热, 生成复合物, 大多数是蓝色或紫色, 在 570nm 波长处有最大吸收值。仅脯氨酸和羟基脯氨酸生成黄色产物, λ_{\max} 为 440nm, 上述反应常用于氨基酸的比色 (包括荧光法) 测定。其反应原理是:



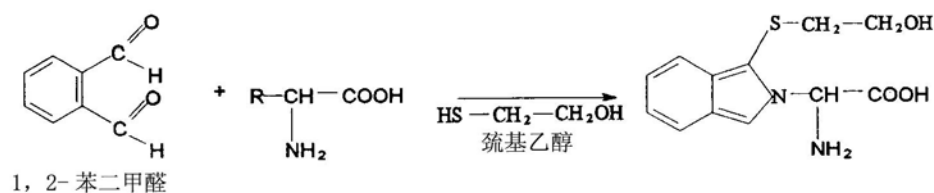
2. 与荧光胺 (fluorescamine) 反应

此化合物和一级胺反应生成强荧光衍生物, 因而, 可用来快速定量测定氨基酸、肽和蛋白质。此法灵敏度高, 激发波长 390nm, 发射波长 475nm。



3. 与 1, 2-苯二甲醛反应

当有巯基乙醇存在时, 1, 2-苯二甲醛与氨基酸反应能生成强荧光异吲哚衍生物 (激发波长 380nm, 发射波长 450nm)。



4. 与异硫氰酸苯酯反应

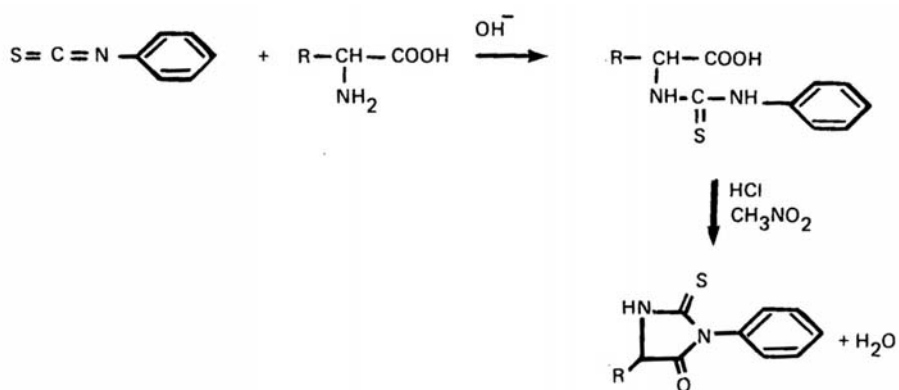
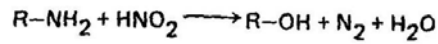


表 5-6 氨基酸及蛋白质官能团的化学反应

反应类型	说明	注释
氨基酸的一般反应		
次氯酸钠氧化	$ \text{R}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} + \text{NaOCl} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\text{CHO} + \text{NH}_3 + \text{NaCl} + \text{CO}_2 $	
与碳酰氯反应	$ \text{R}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} + \text{Cl}-\text{C}(=\text{O}) \longrightarrow \text{R}-\underset{\text{HN}}{\text{CH}}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O} $	生成的N-羧酐能与赖氨酸残基的ε-NH ₂ 起反应
α-COOH 的反应		
酯化	$ \text{R}-\text{COOH} + \text{R}'\text{OH} \xrightarrow[\text{沸腾}]{\text{HCl}} \text{R}-\text{COOR}' + \text{H}_2\text{O} $	在肽的合成时保护羧基
还原	$ \text{R}-\text{COOH} \xrightarrow{\text{NaBH}_4} \text{R}-\text{CH}_2\text{OH} $	蛋白质C末端氨基酸的鉴定
脱羧	$ \text{R}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH} \longrightarrow \text{R}-\text{CH}_2-\text{NH}_2 + \text{CO}_2 $	酶，热，酸或碱处理
酰胺化	$ \text{R}-\text{COOH} \xrightarrow{\text{NH}_3} \text{R}-\text{CO}-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} $	
α-氨基的反应		
酰化	$ \text{R}-\text{NH}_2 + \text{R}'-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{Cl} \longrightarrow \text{R}-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{R}' + \text{HCl} $	在肽合成时保护氨基
与醛反应	$ \text{R}-\text{NH}_2 + \text{R}'-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{H} \longrightarrow \text{R}-\text{N}=\text{CH}-\text{R}' + \text{H}_2\text{O} $	生成的希夫氏碱不稳定，相当于麦拉德反应的第一阶段

脱氨基反应



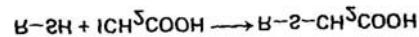
由释放的N₂可测定氨基酸

与茚三酮、荧光胺、1,2-苯二甲醛、异硫氰酸苯酯、丹磺酰氯反应

这些反应用于氨基酸的分离(如HPLC)和测定

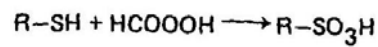
侧链上的反应

巯基与碘乙酸的反应



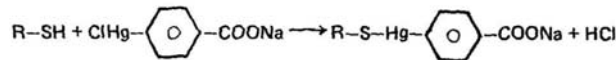
按 S-羧甲基衍生物的形式测定半胱氨酸时防止氧化

与过甲酸



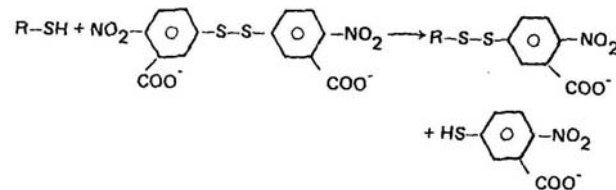
以磺基丙氨酸的形式测定半胱氨酸

与对氯汞苯甲酸



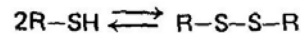
测定半胱氨酸

5,5'-二硫代-双(硝基苯甲酸)(Ellman 试剂)



测定半胱氨酸

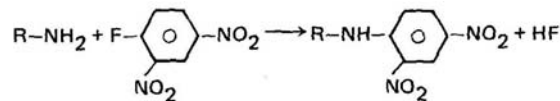
氧化



半胱氨酸氧化生成胱氨酸(二硫交联键),用β-巯基乙醇或二硫代苏糖醇还原时,反应是可逆的

赖氨酸氨基的反应

与 1-氟-2,4-二硝基苯反应



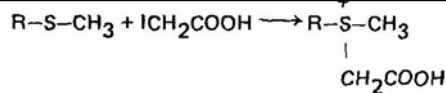
赖氨酸的ε-二硝基苯衍生物测定可能与这种氨基酸的生物有效性相关

与橙 G,2,4,6-三硝基苯磺酸或 O-甲基异脲反应

ε-NH₂的测定(与生物的有效性相关)

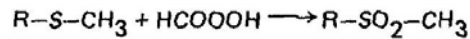
与硫醚基的反应

与碘乙酸反应



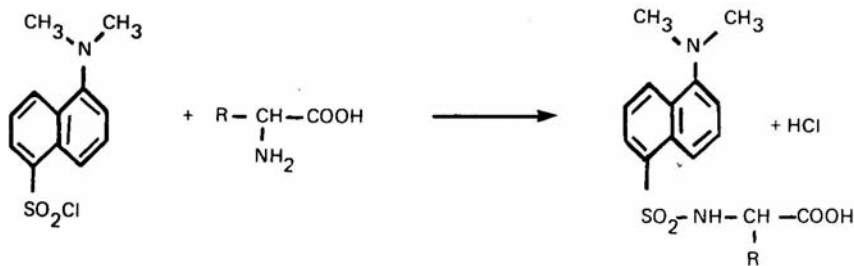
生成硫的衍生物可阻止硫
原子氧化

与过甲酸反应



以蛋氨酸砜的形式测定蛋
氨酸

5. 与丹磺酰氯(1-二甲氨基萘-5-磺酰氯)反应



上述的氨基反应可用来确定肽或蛋白质的 N 末端氨基酸,氨基酸丹磺酰衍生物可用非极性液相色谱柱进行分离。

第三节 蛋白质的结构

一、蛋白质的结构层次

蛋白质与核酸、糖类一样,都属于生物大分子,它们和一般的合成大分子的最大差别可以归结为两点:特定结构和时空特性。本章只介绍蛋白质的结构层次。蛋白质的时空特性超出了本书的范围,这里不予阐述。蛋白质的层次结构,与另外三类生物分子核酸、糖类和脂类相比,了解最为清楚。

前面已经提到蛋白质的肽链是由 20 种氨基酸单体随机组成的,因此蛋白质肽链结构的复杂程度就可想而知。另外,蛋白质的肽链如同其他合成高分子一样,分子链都很长。任何一种长链分子在伸展状态时,基本上都是处于较高的能态,只有使分子的内能降低,分子才能成为更稳定的状态。因而蛋白质的肽链就会自发地通过许多和 α-碳原子或肽平面键间的单键旋转,同时伴随着分子内大量的原子和基团间的相互作用,降低内能,折叠成为一些空间内较为稳定的立体结构。所以,蛋白质的结构并不只是描述蛋白质肽链中氨基酸的线性排列顺序。

蛋白质的立体结构是分阶段形成的,在现已查明的蛋白质立体结构中存在不同类型规则的有序结构。在此基础上,提出了蛋白质的多层次立体结构学说。

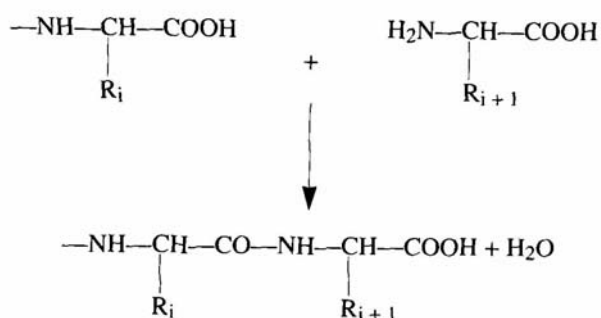
蛋白质的结构层次可分为一、二、三和四级结构。蛋白质的二、三、四级结

构一般又统称为蛋白质的高级结构。关于蛋白质三维结构的研究，目前已经有 9000 多种蛋白质的资料，蛋白质四级结构水平的概念已经不能满足科学发展的需要。因此，蛋白质化学家又在四级结构水平的基础上增加了两种新的结构层次，即超二级结构 (Supersecondary Structure) 和结构域 (Structure domain)。超二级结构是指几种二级结构的组合物存在于各种结构中。结构域的概念是指蛋白质分子中那些明显分开的球状部分。对于这两种新结构层次在本书中不作阐述。

1. 一级结构

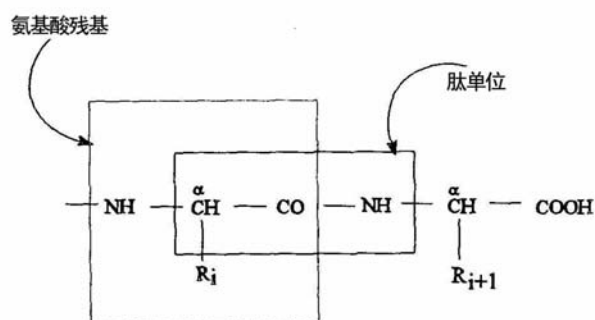
蛋白质的一级结构有时也称蛋白质的共价结构，一般而言，蛋白质的一级结构是指构成蛋白质肽链的氨基酸残基的线性排列顺序，有时也称为残基的序列。这一定义对只含氨基酸的简单蛋白质适用。但是在生物体内还有很多复合蛋白，它们除包含氨基酸外，还有其他的组成。对复合蛋白，完整的一级结构概念应该包括肽链以外的其他成分 (例如糖蛋白上的糖链，脂蛋白中的脂质部分等) 以及这些非肽链部分的连接方式和位点。蛋白质的一级结构是一个无空间概念的一维结构。

目前生物世界的蛋白质只有 L 型 α -氨基酸才能构成，氨基酸残基之间通过肽键连结 (即一个氨基酸的 α -氨基与另一个氨基酸的 α -羧基结合失去一分子水，形成肽键)，由 n 个氨基酸构成的蛋白质含有 $(n-1)$ 个肽键。蛋白质的末端氨基酸与在肽链中的氨基酸不同，以游离的 α -氨基酸存在的一端，称之为蛋白质的 N-端，习惯上列在左侧；另一端是以游离的 α -羧基存在，则称为 C-端，习惯上在右侧。



蛋白质的链长 n (这里 n 是指蛋白质序列中的残基数) 和序列，以及肽键的顺反异构，它们决定蛋白质的物理化学性质、结构、生物活性与功能。氨基酸的序列的作用如同形成二级和三级结构的密码 (code)，最终决定蛋白质的生物功能。许多蛋白质的一级结构业已确定，已知的最短蛋白质链肠促胰链肽 (secretin) 和胰高血糖素 (glucagon) 含 20~100 个氨基酸残基，大多数蛋白质都含有 100~500 个，某些不常见的蛋白质链多达几千个氨基酸残基。蛋白质的分子质量范围从几千到 1 百万以上，例如存在肌肉中的肌联蛋白 (Titin) 的

分子质量超过 100 万，而肠促胰链肽的分子质量仅约为 2300。大多数蛋白质的分子质量在 20000~100000 之间。



在讨论蛋白质的一级结构时，多肽链的主链可用-N-C-C-或-C-C-N-重复单元描述，这里-NH-CHR-CO-（-N-C-C-）相对于一个氨基酸残基，而-CHR-CO-NH-（-C-C-N-）是表示一个肽单位。两个氨基酸连接在一起的肽键是酰胺键（图 5-2），



虽然是将它作为一个共价键来描述，但实际上肽键的 C-N 键具有 40% 的双键特性，而 C=O 键有 40% 左右的单键性质，这是由于电子的非定域作用结果导致产生的共振稳定结构，使之肽键的 C-N 键具有部分双键性质。

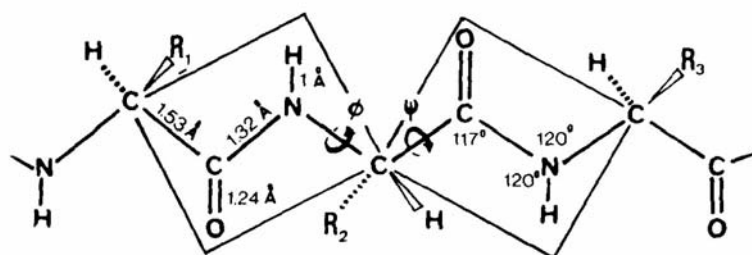
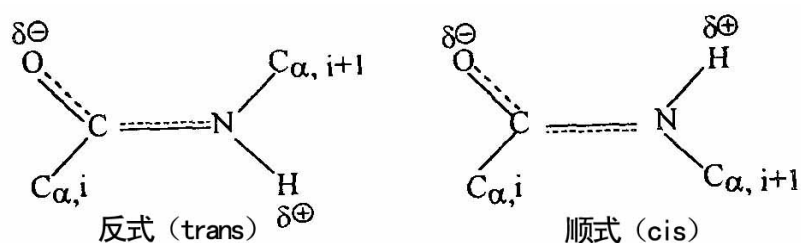


图 5-2 α -L-多肽链碎片的结构（反式构型）。原子间距离（ \AA ）和键角度（ $^\circ$ ），矩形中的 6 个原子在同一平面上， ϕ 和 ψ 表示围绕一个 α 碳原子的可能扭转角，两个邻近 α 碳原子的肽键各位于一个平面上， R_1 、 R_2 和 R_3 处于反式位置（ $\phi = \psi = 180^\circ$ ）

肽键的这个特性对蛋白质的结构具有重要的影响：其一，共振结构使-NH在 pH 0~14 之间不能被质子化；其二，肽键由于部分双键性质，-C-N键不能够像普通的C-N单键那样可以自由旋转，CO-NH键的旋转角（即 ω 角）最大为 6° 。由于这种限制的结果，肽键的每一个-C $_{\alpha}$ -CO-NH-C $_{\alpha}$ -片段（包含 6 个原子）处在同

一个平面上，称之为肽平面，于是，多肽主链可描述为通过 C_{α} 原子连接的一系列 $-C_{\alpha}-CO-NH-C_{\alpha}-$ 平面（图 5-2）。多肽主链的 $C=O$ 和 $N-H$ 基之间在适宜的条件下是可以形成氢键的。因为肽键在多肽主链中约占共价键总数的 $1/3$ ，它们限制了多肽主链的转动自由度，从而显著减少了主链的柔顺性。从已知结构的蛋白质分析表明，尽管多数肽平面是不可扭曲的平面，但也有一些肽平面是可扭曲的。也就是说，肽链的 $C-N$ 键虽然带有双键的性质，不易旋转，但也不是绝对刚性的，可在一定范围内旋转， $N-C_{\alpha}$ 和 $C_{\alpha}-C$ 键具有旋转自由度，它们的两面角分别为 ϕ 和 ψ ；其三，电子的非定域作用使羰基的氧原子带有部分负电荷， $N-H$ 基的氢原子带有部分的正电荷。由于上述原因，因此，多肽主链上的 $C=O$ 和 $N-H$ 基之间可以在主链内或主链与主链之间形成氢键。

既然肽键具有部分双键特征，因此肽键上的取代基也就可能出现类似于烯烃那样的顺反异构体。



然而，蛋白质中的肽键和多数顺反异构体一样，顺式因大基团间的相互作用，而处于高能态，是不稳定的；反式则因处于较低能态，在热力学上是较稳定的。因此，蛋白质中几乎所有的肽键都是以反式构型存在，顺式和反式的比例为 $1:1000$ ，反式向顺式转变时肽键的自由能增加 34.8kJ/mol ，实际上在蛋白质中肽键的异构化作用是不存在的。但是在含有脯氨酸残基的肽键是例外，存在顺式构型。因为脯氨酸残基参与的肽键，反式向顺式转变的自由能仅约为 7.8kJ/mol ，在高温下这些键有时能发生反式向顺式转变的异构化作用，顺式和反式出现的几率之比为 $2:8$ 。虽然 $N-C_{\alpha}$ 和 $C_{\alpha}-C$ 键确实是单键，理论上 ϕ 和 ψ 应具有 360° 转动自由度，实际上它们的转动自由度由于 C_{α} 上侧链原子的空间位阻效应而受到限制，这些限制使多肽链的柔顺性进一步降低。

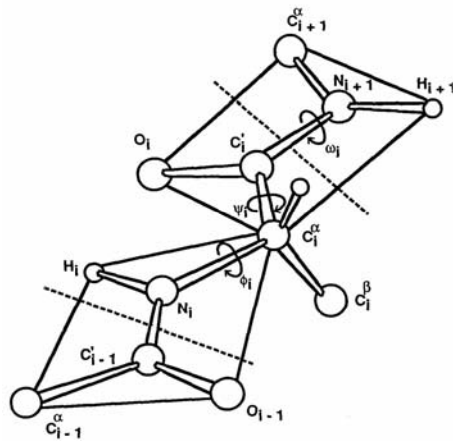


图 5-3 多肽主链的肽单位中原子的平面构型

ϕ 和 ψ 是 $C_{\alpha}-N$ 和 $C_{\alpha}-C$ 键的双面(扭转)角, 侧链位于平面上方或下方

2. 二级结构

蛋白质的二级结构是指多肽链骨架部分氨基酸残基有规则的周期性空间排列, 即肽链中局部肽段骨架形成的构象。它们是完整肽链构象(三级结构)的结构单元, 是蛋白质复杂的空间构象的基础, 故它们也可称为构象单元。它不包括侧链的构象和整个肽链的空间排列。在多肽链某一片段中, 当依次相继的氨基酸残基具有相同的 ϕ 和 ψ 转扭角时, 就会出现周期性结构。氨基酸残基之间近邻或短程的非共价相互作用, 将决定两面角 ϕ 和 ψ 的扭转, 同时导致局部自由能的降低。在多肽链的某些片段区域, 当依次连接的氨基酸残基的成对 ϕ 和 ψ 二面角取不同值时, 这些区域则为非周期或无规结构。

一般说来, 在蛋白质分子中主要存在两种周期性(有规则)的二级结构, 它们是螺旋结构和伸展的折叠结构。

各类二级结构的形成几乎全是由于肽链骨架中的羰基上的氧原子和亚胺基上的氢原子之间的氢键所维系。其他的作用力, 例如范德华力等, 也有一定的贡献。某一肽段, 或某些肽段间的氢键越多, 它(们)形成的二级结构就越稳定, 即二级结构的形成是一种协同的趋势。

(1) 螺旋结构

在蛋白质二级结构中通常将螺旋看成是蛋白质复杂构象的基础, 蛋白质的螺旋结构是由于依次相继的氨基酸残基的成对二面角 ϕ 和 ψ 角, 分别按同一组值扭转而形成的周期性规则构象。理论上 ϕ 和 ψ 角可以选择不同的组合值, 那么, 蛋白质就可能产生几种不同几何形状的螺旋结构。然而, 蛋白质实际上仅有 α -螺旋, 3_{10} -螺旋和 π -螺旋三种形式的螺旋结构(图 5-4), 其中 α -螺旋(α -helix)是蛋白质中最常见的规则二级结构, 也是最稳定的构象。

α -螺旋每圈螺旋包含 3.6 个氨基酸残基, 螺距(每圈所占的轴长)为

0.54nm，每一个氨基酸残基的垂直距离，即每圈螺旋沿螺旋轴上升 0.15nm。每个残基绕轴旋转 100° （即 $360^\circ / 3.6$ ），螺旋中氨基酸侧链在垂直于螺旋轴的方向取向（图 5-4）。在 α -螺旋中，所有的肽单位都是刚性平面结构，其构象符合立体化学的稳定原则，氢键使 α -螺旋稳定，N-H 基的氢和位于螺旋下一圈的肽键的氧（即前面第四个残基的 C=O）之间形成许多氢键。由于氢键的形成和所形成的电偶极指向相同的方向，所以螺旋结构有很高的稳定性。在 α -螺旋的氢键封闭环内即每对氢键包含 13 个主链原子，因此， α -螺旋有时又称 3.6_{13} 螺旋。氢键的方向与轴平行，从而 N、H 和 O 几乎都在一条直线上，氢键的长度，即 N-H...O 的距离约为 0.29nm，键的强度约为 18.8kJ/mol。 α -螺旋能以右手和左手螺旋两种形式存在，然而右手螺旋更稳定，对于 L-氨基酸构成的左手螺旋，由于侧链和肽链骨架过于靠近，其能量较高，构象不稳定，故而很罕见。天然蛋白质中的 α -螺旋几乎都是右手 α -螺旋。

3_{10} 螺旋是一种二级结构，为非典型的 α -螺旋构象，形成氢键的 N、H、O 三原子不在一直线上，有时存在于球蛋白的某些部位，它是每圈包含三个氨基酸残基的 α -螺旋，每对氢键包含 10 个原子。最近的研究结果认为， 3_{10} 螺旋可能是一种热力学的中间产物，比典型的 α -螺旋更紧密。此外还有某些不常见的螺旋，像 π 和 γ 螺旋每圈分别有 4.4 和 5.2 个氨基酸残基，它们不如 α -螺旋稳定， π -螺旋则更松散，这些螺旋仅存在于包含少数氨基酸的短片段中，而且它们对大多数蛋白质的结构不重要。脯氨酸是亚氨基酸，在肽链中其残基的丙基侧链与氨基通过共价键可形成的吡咯环结构，N-C α 键不能旋转，因此， ϕ 角具有一个固定体值 70° 。此外，氮原子上不存在氢，也不可能形成氢键。由于上述两个原因，含有脯氨酸残基的片段部分不可能形成 α -螺旋。事实上，脯氨酸可以看作是 α -螺旋的中断剂。含有高水平脯氨酸残基的蛋白质趋向于无规或非周期结构。例如 β -酪蛋白和 α_{s1} -酪蛋白中的脯氨酸残基分别占总氨基酸残基的 17% 和 8.5%，而且它们均匀地分布在整个蛋白质的一级结构中。因此，这两种蛋白质不存在 α -螺旋结构，而是呈无规卷曲结构。然而，聚脯氨酸能够形成两种螺旋结构，命名为聚脯氨酸 I (PP I) 和聚脯氨酸 II (PP II)。聚脯氨酸 I 为左手螺旋，每圈螺旋沿螺旋轴上升 0.19nm，每圈螺旋仅含 3.3 个氨基酸残基，顺式肽键构型；聚脯氨酸 II 也是左手螺旋，肽键呈反式构型，两个残基之间的距离在轴上投影为 0.31nm，每圈螺旋仅含 3 个残基。这两种结构能够相互转变，在水溶液介质中聚脯氨酸 II 更稳定，存在于胶原蛋白中。一条多肽链能否形成 α -螺旋，以及形成的螺旋是否稳定，与它的氨基酸组成和排列顺序有极大的关系，某些氨基酸侧链的同种电荷静电排斥效应或立体位阻使得多肽链不能建立 α -螺旋结构。

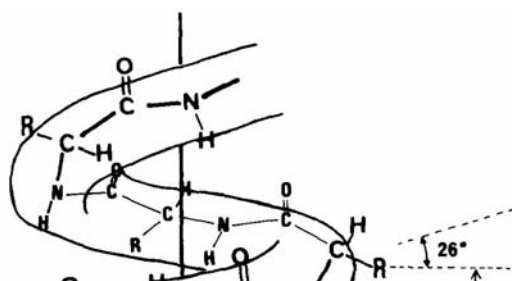


图 5-4 α 螺旋三维结构

(2) β -折叠 (β -sheet) 结构

β -折叠或 β 折叠片 (β -pleated sheet) 也称 β -结构或 β -构象, 是蛋白质中又一种普遍存在的规则构象单元, 它是一种具有特殊几何形状(锯齿型)的伸展结构(图 5-5), 在这一伸展结构中, C=O 和 N-H 基是在链垂直的方向取向。因此, 氢键只能通过较远距离的两个片段之间形成, 而同一肽段的邻近肽键间很难或不能形成氢键, 因此单股 β -折叠是不稳定的, 比 α -螺旋更加伸展。 β -链通常是 5~15 个氨基酸长, 分子中各股 β -折叠之间通过氢键相互作用, 组合成一组 β -折叠, 形成片层结构, 一般称为 β -折叠片。在片层结构中残基侧链垂直于片状结构平面, 位于折叠平面的上方或下方。按多肽主链中 N \rightarrow C 的指向, β -折叠片存在两种类型结构, 即平行 β -折叠和反平行 β -折叠。所谓平行式(Parallel)是所有肽链的 N 末端均在同一侧, 即肽链的排列极性(N \rightarrow C)是一顺的, 例如 β -角蛋白, 在平行式的 β -折叠片结构中链的取向影响氢键的几何构型。而反平行式(Anti-Parallel)肽链的 N 末端为一顺一反地排列, 呈间隔同向, 肽链的极性一顺一倒。N-H $\cdots\cdots$ O 三个原子在同一条直线上(氢键角为 0°), 从而增加了氢键的稳定性。而在平行式 β -折叠片结构中, 这些原子不在一条直线上, 而是形成一定的角度, 使氢键稳定性降低。因此, 反平行式的 β -折叠片比平行式的更为稳定。二者的结构示意图见图 5-5。电荷和位阻通常对 β -折叠片结构的存

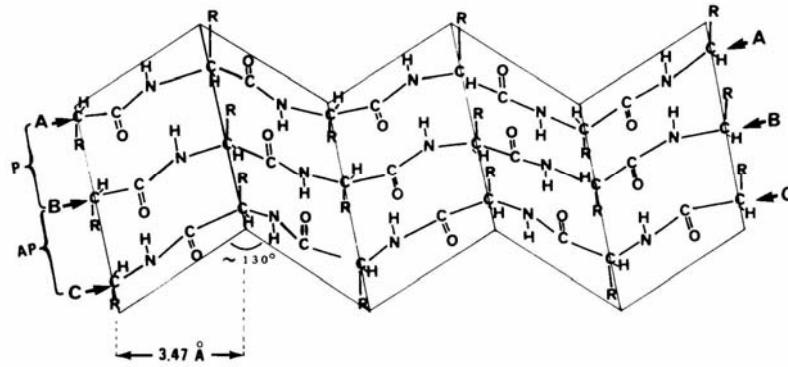


图 5-5 β 折叠片结构

β -折叠结构一般比 α -螺旋稳定。蛋白质中如若含有较高比例的 β -折叠结构，往往需要高的温度才能使蛋白质变性。例如 β -乳球蛋白（51% β -折叠）和大豆 11S 球蛋白（64% β -折叠）的热变性温度分别为 75.6° 和 84.5° 。然而，牛血清清蛋白中含有大约 64% α -螺旋结构，变性温度仅为 64°C 。加热和冷却蛋白质溶液，通常可以使 α -螺旋转变为 β -折叠结构。但是， β -折叠向 α -螺旋转变的现象迄今在蛋白质中尚未发现。 β -转角（ β -turn）也称回折或 β -弯曲（ β -bend）是蛋白质中常见的又一种二级结构（图 5-6，5-7），它是形成 β -折叠时多肽链反转 180° 的结果。发夹弯曲结构是反平行 β -折叠形成的，交叉弯曲则是由平行 β -折叠形成的结构。 β -转角由 4 个氨基酸残基构成，通过氢键稳定。在 β -转角中常见的氨基酸有天冬氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、脯氨酸和酪氨酸。

一些与食品相关的蛋白质的二级结构组成见表 5-7。

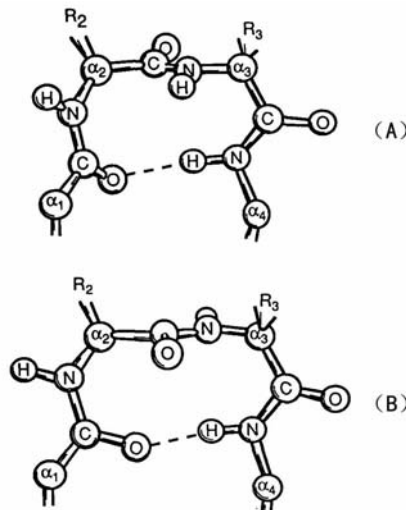


图 5-6 β -转角的 I 型 (A) 和 II 型 (B) 构象

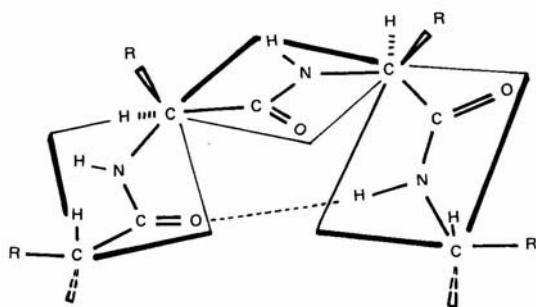


图 5-7 β 弯曲结构

表 5-7 一些与食品相关的蛋白质的二级结构组成

蛋白质	α —螺旋 (%)	β -折叠 (%)	β -转角 (%)	非周期结构 (%)
脱氧血红蛋白	85.7	0	8.8	5.5
牛血清清蛋白	67.0	0	0	33.0
胰凝乳蛋白酶系	11.0	49.4	21.2	18.4
免疫球蛋白 G	2.5	67.2	17.8	12.5
胰岛素 C	60.8	14.7	10.8	15.7
牛胰蛋白酶抑制剂	25.9	44.8	8.8	20.5
核糖核酸酶 A	22.6	46.0	18.5	12.9
溶菌酶	45.7	19.4	22.5	12.4
木瓜蛋白酶	27.8	29.2	24.5	18.5
α -乳清蛋白	26.0	14.0	-	60.0
β -乳球蛋白	6.8	51.2	10.5	31.5
大豆 11S	8.5	64.5	0	27.0
大豆 7S	6.0	62.5	2.0	29.5
云扁豆蛋白	10.5	50.5	11.5	27.5

注：数值代表总的氨基酸残基的百分数

3. 超二级结构 (Super-Secondary Structure)

蛋白质结构分析已经证明，在蛋白质结构中，常常发现两个或几个二级结构单元被连接多肽连接起来，进一步组合成有特殊的几何排列的局域空间结构，这些局域空间结构称为超二级结构或简称 Motif。图 5-8 所表示的是由两个 α 螺旋与连接多肽组成的最简单的具备特殊功能的超二级结构。

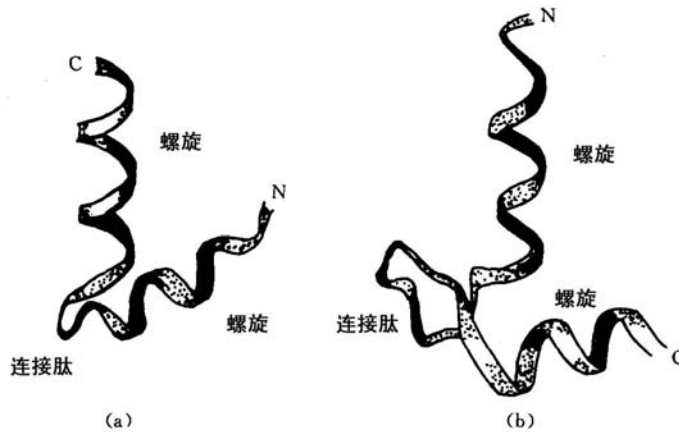


图 5-8 由两个 α 螺旋与连接多肽组成的最简单的具备特殊功能的超二级结构示意图

(a) DNA 结合 Motif (b) 钙原子结合 Motif

4. 三级结构 (Tertiary Structure)

蛋白质的三级结构是指含 α 螺旋、 β 弯曲和 β 折叠或无规卷曲等二级结构的蛋白质，其线性多肽链进一步折叠成为紧密结构时的三维空间排列。尽管许多蛋白质的三级结构已经充分了解，但很难用简单的方式来表示这种结构。大多数蛋白质含有 100 个以上的氨基酸残基，虽然在平面上表示的三维空间结构可以给人以深刻的印象，但这些描述仅仅是示意图 (图 5-9)。

蛋白质从线性构型转变成折叠的三级结构是一个复杂的过程。当蛋白质肽链局部的肽段形成二级结构以及它们之间进一步相互作用成为超二级结构后，仍有一些肽段中的单键在不断的运动旋转，肽链中的各个部分，包括已知相对稳定的超二级结构以及还未键合的部分，继续相互作用，使整个肽链的内能进一步降低，分子变得更为稳定。因此，在分子水平上，蛋白质结构形成的细节存在于氨基酸序列中。也就是说，三维构象是多肽链的各个单键的旋转自由度受到各种限制的结果。从能量观点上看，三级结构的形成包括：蛋白质中不同基团之间的各种相互作用（疏水，静电和范德华力的相互作用）的优化；最佳状态氢键的形成，使蛋白质分子的自由能尽可能的降低到最低值。

在已知三级结构的水溶性蛋白质中，发现在三级结构形成的过程中，大多数疏水性氨基酸残基重新取向后定位在蛋白质结构的内部，而大多数亲水性氨基酸残基，特别是带电荷的氨基酸则较均匀的分布在蛋白质-水界面，同时伴随着自由能的降低。但也发现一些例外，例如，电荷的各向异性分布可能出现，使得蛋白质有确定的生物功能（如蛋白酶）。就某些蛋白质而言，不溶于水而溶于有机溶剂（例如作为脂类载体的脂蛋白），其分子表面分布较多的疏水性氨基酸残基。

从上述氨基酸残基在蛋白质中的分布，不难进一步推测一些富含疏水氨基酸残基的肽段多数是处于球状蛋白质的内部，富含亲水残基的肽段应该更多的出现

在球状蛋白质的表面。然而这只是简单的推测，事实上，并非完全如此。在大多数球状蛋白质中，水可达到的界面有 40%—50% 被非极性基团占据，同时部分极性基团不可避免的埋藏在蛋白质的内部，而且总是能与其他极性基团发生氢键键合，以至于使蛋白质内部非极性环境中的自由能降低到最小。另外，球状蛋白质的三级结构的特征离不开各种不同类型的二级结构在蛋白质中的分布。原则上，一些相对规则的 α 螺旋和 β 折叠分布在球状蛋白质的内部，而且压积得很紧密，致使球状蛋白成为致密的结构；那些连接 α 螺旋和 β 折叠的规则性相对差一些的二级结构，转角和环状以及特定的“无规”卷曲，则更多的分布在球状蛋白质的外围。

蛋白质一级结构中亲水性和疏水性氨基酸残基的比例和分布，影响蛋白质的某些物理化学性质。例如，蛋白质分子的形状可通过氨基酸的序列预测，如果一个蛋白质分子含有大量的亲水性氨基酸残基，并且均匀的分布在多肽链中，那么蛋白质分子将为伸长或呈棒状形。这是因为在相对分子质量一定时，相对于体积而言，棒状形具有较大的表面积，于是更多的疏水性氨基酸残基分布在表面。反之，当蛋白质含有大量的疏水性氨基酸残基，蛋白质则为球形，它的表面积和体积之比最小，使更多的疏水性基团埋藏在蛋白质内部。

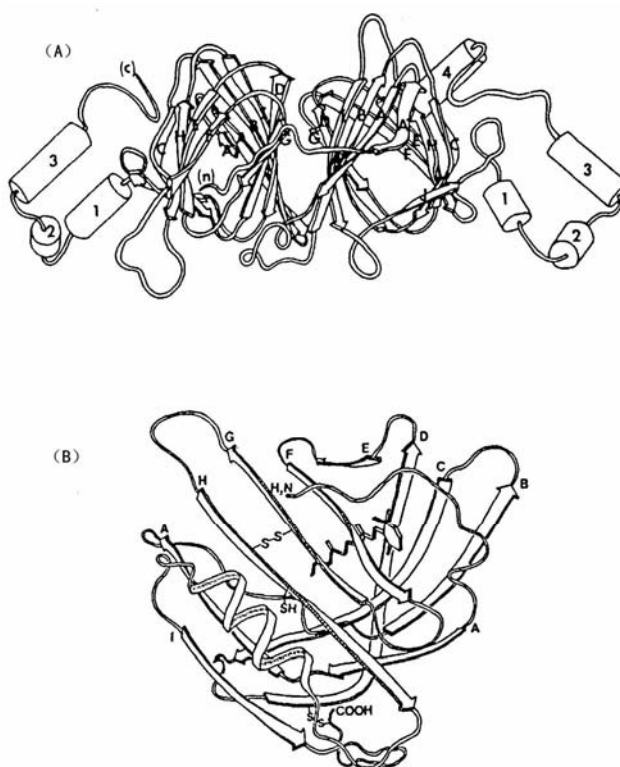


图 5—9 云扁豆蛋白 (A) 和 β —乳球蛋白 (B) 的三级结构

图中箭头表示 β 折叠结构，圆柱体表示 α 螺旋

5. 四级结构 (Quaternary Structure)

蛋白质的四级结构可定义为一些特定三级结构的肽链通过非共价键形成大分子体系时的组合方式，是指含有多于一条多肽链的蛋白质的空间排列。它是蛋白质三级结构的亚单位通过非共价键缔合的结果，这些亚单位可能是相同的或不同的，它们的排列方式可以是对称的，也可以是不对称的。稳定四级结构的力或键（除二硫交联键外）与稳定三级结构的那些键相同。

某些生理上重要的蛋白质是以二聚体、三聚体、四聚体等多聚体形式存在。任何四级结构的蛋白质（又称四级复合物，或寡聚体）都是由蛋白质亚基（或称亚单位）即单体构成。根据亚基的组成可分为由相同亚基和不同亚基构成的两大类。在各个体系中亚基的数目或不同亚基的比例可能有很大的差别。相同亚基构成的多聚体称为同源（homogeneous）多聚体，例如胰岛素通常是同源二聚体（homo-dimer）；由不同亚基形成的多聚体则成为异源（heterogeneous）多聚体，一些糖蛋白激素（如绒毛膜促性腺激素、促甲状腺素）是异源二聚体，含有 α 和 β 亚基各一个。血红蛋白是异源四聚体，含有 α 和 β 亚基各两个。有些蛋白质的亚基类型可在3种或3种以上。有的蛋白质在不同pH介质中可形成不同聚合度的蛋白质，如乳清中的 β -乳球蛋白亚基是相同的，在pH5~8是以二聚体存在，pH3~5呈现八聚体形式，当pH \geq 8时则以单体形式存在。

蛋白质寡聚体结构的形成是由于多肽链-多肽链之间特定相互作用的结果。在亚基间不存在共价键，亚基间的相互作用都是非共价键。例如氢键、疏水相互作用和静电相互作用。疏水氨基酸残基所占的比例较显著地影响寡聚蛋白形成的倾向。蛋白质中的疏水氨基酸残基含量超过30%时，比疏水氨基酸含量较低的蛋白质更容易形成寡聚体。

从热力学观点看，使亚基中暴露的疏水表面埋藏，是蛋白质四级结构形成的首要驱动力。当蛋白质中疏水氨基酸残基含量高于30%时，在物理的角度上，已不可能形成将所有非极性基团埋藏的结构。通常只是有可能使疏水小区存在，这些毗连单体间小区的相互作用将导致二聚体、三聚体等的形成（图5-10）。从动力学看，一般的寡聚体的装配过程是几个亚基随机地碰撞，因此装配过程是一个二级反应，速率和装配程度均是亚基浓度的函数。

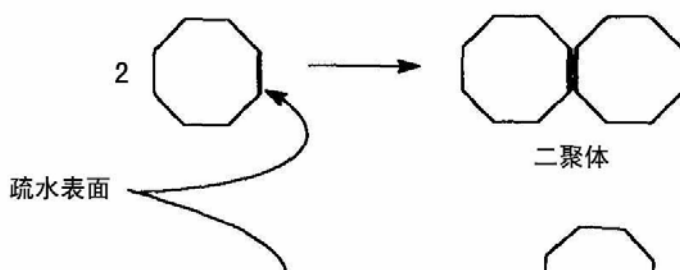


图 5-10 蛋白质中二聚体和寡聚体的形成示意图

许多食品蛋白质，尤其是谷蛋白，是由不同多肽构成的寡聚体。可以预见，这些蛋白质中疏水氨基酸残基（Ile、Leu、Trp、Tyr、Val、Phe 和 Pro）含量应高于 35%，此外，它们还含有 6%~12%的脯氨酸。由此可见，谷物蛋白以复杂的寡聚体结构存在。大豆中主要的储存蛋白是 β -大豆伴球蛋白和大豆球蛋白，它们分别含有大约 41%和 39%的疏水氨基酸残基。 β -大豆伴球蛋白是由 3 种不同的亚基组成的三聚蛋白，离子强度和 pH 的变化使它呈现复杂的缔合-解离现象。大豆球蛋白是由 12 种亚基构成，其中 6 种亚基是酸性的，另外 6 种亚基是碱性的，每一个碱性亚基通过二硫键与一个酸性亚基交联。6 对酸性-碱性亚基通过非共价键相互作用压缩在一起成为寡聚状态。大豆球蛋白随离子强度的变化同样也会产生复杂的缔合-解离现象。表 5-8 列出了某些食品蛋白质的结构特征。

表 5-8 某些主要食品蛋白质的结构特征

蛋白质	分子量	类型: 球状 (G) 纤维状 (F) 无规卷 曲 (RC)	二级结构		残基数	二硫 键数	硫 基 数	pI	亚单 位数	已知 (K) 和未知 (U) 顺序	辅基 (%W / w)	平均疏水 性 (kJ/mol)
			α 螺旋 (%)	β 折叠 (%)								
肌球蛋白 ^b	475000	F	高		4500	0	40	4~5	6	部分已知	磷	4.25 (T 兔)
肌动蛋白 ^b	42000	G→F				0	5~6	4~5	1-300			4.4 (兔)
胶原蛋白 (原胶原蛋白) ^b	300000	F	胶原蛋 白螺旋					~9	3	部分已知		4.5 (鸡)
α s-酪蛋白 B ^b	23500	RC			199	0	0	5.1	1	已知	磷 1.1	5.0
β -酪蛋白 A ^b	24000	RC			209	0	0	5.3	1	已知	磷 0.56	
K-酪蛋白 B ^b	19000	RC			169	0	2	4.1~ 4.5	1	已知	碳水化合物 5 磷 0.22	
β -乳球蛋白 A ^b	18400	G	10	30	162	2	1	5.2		已知		5.15
α -乳球蛋白 B ^b	14200	G	26	14	123	4	0	5.1		已知		4.8
卵清蛋白 ^c	45000	G				1 或 2	4	4.6			碳水化合物 3.3 磷	4.65
血清蛋白 ^b	69000	G				17	1	4.8	1	已知		4.7
麦醇溶蛋白 ^d (α , β , γ)	30000	G→F	30			2~4			1	部分已知		4.5
麦谷蛋白 ^d	45000 ≥1000000	F	15			50			15			
大豆球蛋白 ^e	350000	G	5	35		23	2	4.6	12	未知		
伴大豆球蛋白 ^e	200000	G	5	35		2		4.6	9	未知	碳水化合物 4	

b. 牛; c. 鸡蛋; d. 小麦; e. 大豆

6. 维持和稳定蛋白质结构的作用力

蛋白质是一大类具有特定结构的生物大分子, 它同任何分子一样, 只有在分子内存在着某些特定的相互作用时, 分子中一些原子或基团间的相对位置才能得到固定, 呈现某种稳定的立体结构。另外, 从热力学观点看, 任何一种伸展的长链分子基本上都是处于不稳定的高能态。为了使蛋白质处于热力学稳定的天然构象, 必须是使适合于该构象的各种相互作用达到最大, 而其他不适宜的相互作用减低至最小, 这样蛋白质的整个自由能将是一个最低值。

蛋白质形成二级、三级和四级结构, 并使之保持稳定的相互作用力包括两类:

① 蛋白质分子内固有的作用力，所产生的分子内相互作用(即范德华相互作用和空间相互作用)；② 周围溶剂影响所产生的分子内相互作用(包括氢键、静电和疏水相互作用)。

(1) 空间张力

从理论上说，在没有空间位阻的情况下， ϕ 和 ψ 可在 360° 内自由旋转。但氨基酸残基具有大小不同的侧链，由于侧链的空间位阻使 ϕ 和 ψ 的转动受到很大限制，它们只能取一定的旋转自由度。正因为如此，多肽链的序列仅能有几个有限的构象。肽单位平面几何形状的变形或键的伸长与弯曲改变，都会引起分子自由能的增加。因此，多肽链的折叠必须避免键长和键角的畸变。

(2) 范德华力

蛋白质中所有原子都在不断的运动，原子中的电子也在绕着原子核不停地运动。因此，一些原子的正负电荷在某一瞬间也可能有相对的偏移，形成瞬间偶极。这些诱导的瞬间偶极之间可能发生吸引和排斥相互作用，这种作用被称为色散力，作用力的大小与原子间的距离(r)有关，吸引力与 r^6 成反比，而相互间的排斥力与 r^{12} 成反比。尽管这种色散力很弱(一般在 $-0.17 \sim -0.8 \text{KJ/mol}$ 范围)，只在很短的距离内有作用，但是由于蛋白质分子内的原子数目是大量的，这种色散力也不容忽视(见表5-9)。就蛋白质而论，这种相互作用力同样与 α 碳原子周围扭转角(ϕ 和 ψ)有关(图5-2)。距离大时不存在相互作用力，当距离小时可产生吸引力，距离更小时则产生排斥力。

原子间存在的范德华吸引力包括偶极-偶极作用力(例如，肽键和丝氨酸是偶极相互作用力)、偶极-诱导偶极相互作用力和色散力，后者是最重要的一种力。

5-9 蛋白质-蛋白质键合和相互作用

类型	能量 (kJ/mol)	相互作用距离 (Å)	功能团	破坏溶剂	增强条件
共价键合	330~380	1~2	胱氨酸二硫键	还原剂	
				巯基	
				半胱氨酸	
				二硫代苏糖醇	
氢键键合	8~40	2~3	亚酰胺	脲素溶液	
			$-\text{NH} \cdots \text{O}=\text{C}$	盐酸胍	冷却
			羟基，酚，	去污剂	
			$-\text{OH} \cdots \text{O}=\text{C}$	加热	

疏水相互作用	4~12	3~5	长链脂肪酸族或芳香 族侧链 氨基酸残基	去污剂 有机溶剂	加热
静电相互作用	42~48	2~3	羧基 (COO ⁻) 氨基 (NH ₃ ⁺)	盐溶液 高或低 pH	
范德华力	1~9		永久偶极 诱导和瞬时偶极		

(3) 静电相互作用

蛋白质可看成是多聚电解质，因为氨基酸的侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸、酪氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、半胱氨酸）以及碳和氮末端氨基酸的可解离基团均参与酸碱平衡，肽键中的 α 氨基和 α 羧基在蛋白质的离子性中只占很小的一部分。

由于蛋白质氨基酸中可解离侧链基团很多（占残基总数的 30%~50%）。在中性 pH，天冬氨酸和甘氨酸残基带负电荷，而赖氨酸、精氨酸和组氨酸带正电荷；在碱性 pH，半胱氨酸和酪氨酸残基带负电荷。在中性 pH，蛋白质带净负电荷或净正电荷，取决于蛋白质分子中所带负电荷和正电荷残基的相对数目。蛋白质分子净电荷为零时的 pH 值定义为蛋白质的等电点 pI。等电点 pH 不同于等离子点 (isoelectric point)，等离子点是指不存在电解质时蛋白质溶液的 pH 值。

蛋白质分子中大部分可解离基团，也就是说，除少数例外，几乎所有带电荷的基团都是位于蛋白质分子表面。在中性 pH，蛋白质分子带有净正电荷或净负电荷，因此可以预料，蛋白质分子中带有同种电荷的基团，会因静电排斥作用而导致蛋白质结构的不稳定性。同样也有理由认为，蛋白质分子中在某一特定关键部位上，带异种电荷的基团之间，由于相互的静电吸引作用，将对蛋白质结构的稳定性有着重要的贡献。事实上，在水溶液中，由于水有很高的介电常数，蛋白质的排斥力和吸引力强度已降低到了最小值，其静电相互作用能仅为 $\pm 5.8 \sim \pm 3.5 \text{ kJ/mol}$ 。因此，处在蛋白质分子表面的带电基团对蛋白质结构的稳定性没有显著的影响。

蛋白质的可解离基团的电离情况和局部环境的 pH 值有很大的关系，也和局部环境的介电性质有关。部分埋藏在蛋白质内部的带电荷基团，由于处在比水的介电常数低的环境中，通常能形成具有强相互作用能的盐桥。一般蛋白质的静电

相互作用能在 $\pm 3.5 \sim \pm 460 \text{KJ/mol}$ 范围。

尽管静电相互作用不能作为蛋白质折叠的主要作用力，然而在水溶液介质中，带电荷基团仍然是暴露在蛋白质的表面，因此它们也确实影响蛋白质的折叠模式。

(4) 氢键相互作用

氢键键合：氢键键合是指具有孤电子对的电负性原子（如 N、O 和 S）与一个氢原子的结合，氢原子本身同时又与另一个电负性原子共价结合。在蛋白质中，一个肽键的羰基和另一个肽键的 N-H 的氢形成氢键。氢键距离 $\text{O} \cdots \text{H}$ 约 1.75\AA ，键能约为 $8 \sim 40 \text{KJ/mol}$ ，其大小取决于参与氢键的电负性原子的性质和键角。

在蛋白质肽链骨架中存在着大量的羰基和亚胺基团，氨基酸残基的侧链中又有许多带有极性的基团，这些基团中某些可以作为氢原子的供体，另一些则作为氢原子的受体，彼此相互作用形成氢键（图 5-11）。在具有 α -螺旋和 β -折叠结构的肽键中，其 N-H 和羰基 C=O 之间形成氢键的数量最多。

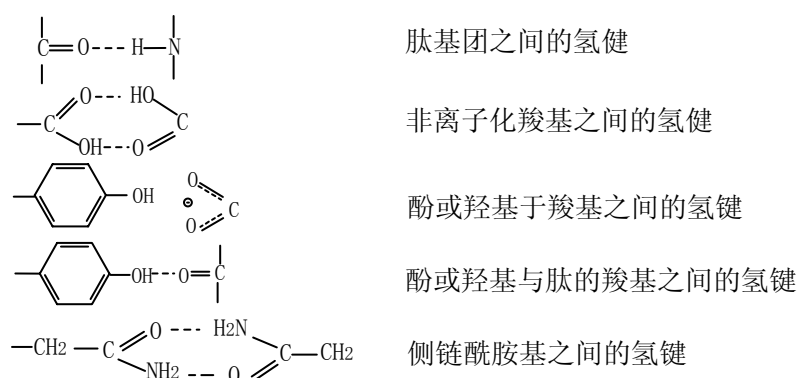


图 5-11 蛋白质形成氢键的基团

业已证明，蛋白质分子中存在大量氢键，由于每一氢键均能降低蛋白质的自由能（约 -18.8KJ/mol ），因此通常可以这样假定，氢键的作用不仅是作为蛋白质形成折叠结构的驱动力，而且同时又对稳定蛋白质的天然结构起重要影响。但是研究证实，这并非一个可靠的观点，因为生物体内存在着大量的水，而水分子可以与蛋白质分子中的 N-H 和羰基 C=O 竞争发生氢键键合。因此，这些基团之间不能自发地形成氢键，而且 N-H 和羰基 C=O 之间形成的氢键也不可能作为蛋白质形成 α -螺旋和 β -折叠的驱动力。事实上 α -螺旋和 β -折叠结构中氢键的相互作用，是另外一些有益的相互作用驱动这些次级氢键结构形成的结果。

氢键的稳定与环境的介电常数有关。蛋白质分子中氨基酸残基的庞大侧链可阻止水与 N-H 和羰基 C=O 接近形成氢键，致使非极性残基相互作用产生了有限

的低介电常数环境，从而使蛋白质二级结构的氢键得以稳定。

(5) 疏水相互作用

从上面的论述可以清楚地了解到，在水溶液中多肽链上的各种极性基团之间的静电相互作用和形成氢键，是不具有足够的能量驱动蛋白质折叠。蛋白质分子中的这些极性基团的相互作用是非常不稳定的，它们很容易和水作用，或是形成氢键，或是融合于水环境中。欲使其稳定就必须维持一个非极性环境。因此，在非极性基团间的这种疏水相互作用才是导致蛋白质折叠的主要驱动力。

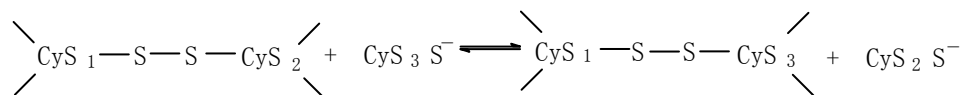
在水溶液中，具有非极性侧链的氨基酸残基，不表现出和水或其他极性基团相互作用的能力和倾向。它们在水溶液中，与在非极性环境中相比，在热力学上显然是不利的。因为当非极性基团溶于水，自由能的变化(ΔG)是正值，体积变化(ΔV)和焓(ΔH)为负值。尽管 ΔH 是负的，根据 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ，则 ΔS 应是一个大的负值才能使 ΔG 为正值。可见一个非极性基团溶于水，熵减小(ΔS 为负值)，这是一个热力学上不利的过程。由于熵减小引起了水在非极性基团周围形成笼形结构。 ΔG 为正值极大的限制了水同非极性基团间的相互作用，因此，非极性基团在水溶液中倾向于聚集，使它们直接与水的接触面积降到最小(参见第二章)，同时，将非极性侧链周围多少有些规则的水分子变成可自由运动的游离的水分子，这样一个过程的自由能改变使 $\Delta G < 0$ 。在水溶液中，这种由于水的结构引起的非极性基团相互作用称之为疏水相互作用。

非极性基团的疏水相互作用，实际上是非极性基团溶于水的逆过程， $\Delta G < 0$ ，而 ΔH 和 ΔS 为正值。因此，疏水相互作用的本质是一种熵驱动的自发过程。与其他共价键相互作用不同，疏水相互作用是一个吸热过程，在高温下作用很强，低温下较弱。而且非极性残基侧链的聚集所产生的能量变化，比上述几种分子间的相互作用大得多。为此，疏水相互作用对于稳定蛋白质主体结构是非常重要的。在蛋白质二级结构的形成中，疏水相互作用不是至关重要的，但是在蛋白质三级结构的形成和稳定中，疏水作用是位于诸多因素的首位。

(6) 二硫键

半胱氨酸残基侧链之间的共价交联可形成二硫键，它不但限制可能呈现的蛋白质结构数目，维持蛋白质结构的完整性，而且还有利于所形成的结构保持稳定。因此，对于大多数蛋白质，特别是在引起不可逆变性的条件下(极端 pH 或高温)，凡每 100 个氨基酸中具有 5~7 个二硫交联键组成的蛋白质分子特别稳定。

某些蛋白质含有半胱氨酸和胱氨酸残基，能够发生硫醇—二硫化物交换反应，这些反应可以在分子内或分子间发生。



二硫键也有不同的构型，因此形成二硫键的两个半胱氨酸残基所在的肽段的相对构象，也可因二硫键的构型不同而改变。这从另一个方面突出了二硫键在蛋白质结构中的重要性。

有利于稳定多肽链的二级结构和三级结构的各种相互作用在图 5-12 中说明。

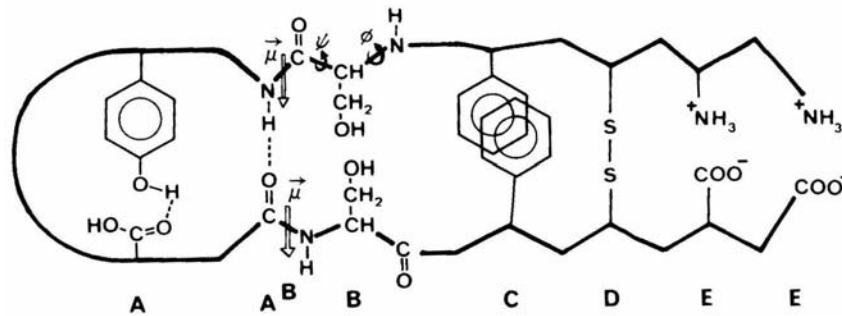


图 5—12 决定蛋白质二级、三级结构的键和相互作用

A 氢键；B 偶极相互作用；C 疏水相互作用；

D 二硫键；E 离子相互作用

(7) 配位键

一些蛋白质中除了肽链以外还含有一些金属，在分类上可称为金属蛋白。在蛋白质中已发现的金属有Fe、Ca、Zn、Cu、Mn、Mo等等。这是因为组成蛋白质的氨基酸中，可参与氢键的很多基团都能和一些金属形成配位键，例如色氨酸，丝氨酸以及一些酸性氨基酸残基的侧链。已知这些金属离子-蛋白质的相互作用有利于蛋白质四级结构的稳定。蛋白质⁻-Ca²⁺-蛋白质⁻型的静电相互作用对维持酪蛋白胶束的稳定性起着重要作用。在某些情况下，金属-蛋白质复合物还可能产生生物活性，使它们具有一定的功能，像铁的运载或酶活性。通常，金属离子在蛋白质分子一定的位点上结合，过渡金属离子（Cr、Mn、Fe、Cu、Zn、Hg等）可同时通过部分离子键与几种氨基酸的咪唑基和巯基结合。

(8) 蛋白质构象的稳定性和适应性

蛋白质分子中的天然状态和变性状态（或者是非折叠的）两者之间的自由能之差（ ΔG_0 ）可以用于判断天然蛋白质分子的稳定性。前面论述的非共价键相互作用，除静电排斥作用外，都起着稳定天然蛋白质结构的作用。这些相互作用引起的总自由能变化达到几百KJ/mol，然而，大多数蛋白质的 ΔG_0 在20~85KJ/mol范围。多肽链的构象熵（conformational entropy）主要作用是使蛋白质的天然结构失去稳定性。当一个无规状态的多肽链折叠成为紧密的状态时，蛋白质各个基团的平动、转动和振动将受到极大的限制，结果降低了构象熵，使总的净自由

能减少。蛋白质分子天然和变性状态间的自由能之差可用下面公式表示：

$$\Delta G_{D \rightarrow N} = \Delta G_{H-bond} + \Delta G_{ele} + \Delta G_{H\phi} + \Delta G_{vdw} - T\Delta S_{conf} \quad (5-6)$$

式中 ΔG_{H-bond} ， ΔG_{ele} ， $\Delta G_{H\phi}$ ， ΔG_{vdw} 分别表示氢键、静电、疏水和范德华相互作用的自由能变化。

ΔS_{conf} — 蛋白质多肽链构象熵的变化。

在非折叠状态，蛋白质每个残基的构象熵在 $8 \sim 42 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 范围，其平均值为 $21.7 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 。一个具有 100 个残基的蛋白质在 310 K 时的构象熵约为 672.7 KJ/mol。可见，这个不稳定的构象熵，将降低蛋白质天然结构的稳定性。

ΔG_0 是蛋白质解折叠时所需要的能量，某些蛋白质的 ΔG_0 见表 5-10。从这些数值可以清楚地看到，尽管蛋白质分子内有许多相互作用，但是蛋白质仍然只是刚好处于稳定状态。例如，大多数蛋白质的 ΔG_0 只相当于 1~3 个氢键或大约 2~5 个疏水相互作用的能量，因此可以认为打断几个非共价键相互作用将使许多蛋白质的天然结构不稳定。

表 5-10 某些蛋白质的 ΔG_0

蛋白质	pH	T(°C)	ΔG_0 (KJ/mol)
α -乳清蛋白	7	25	18.0
牛 β -乳球蛋白 A	3.15	25	42.2
牛 β -乳球蛋白 B	3.15	25	48.9
牛 β -乳球蛋白 A+B	7.2	25	31.3
T ₄ 溶菌酶	3.0	37	19.2
鸡蛋清溶菌酶	7.0	37	50.2
脂酶（来自曲霉）	7.0	—	46.0
肌钙蛋白	7.0	37	19.6
卵清蛋白	7.0	25	24.6
细胞色素 C	5.0	37	32.6
核糖核酸酶	7.0	37	33.4
α -胰凝乳蛋白酶	4.0	37	33.4
胰蛋白酶	—	37	54.3
胃蛋白酶	6.5	25	45.1
胰岛素	3.0	20	26.7
碱性磷酸酶	7.5	30	83.6

注： $\Delta G_0 = G_u - G_N$ 。式中， G_u 和 G_N 分别表示蛋白质分子变性和天然状态的自由能

蛋白质分子并非刚性分子，相反，它们是高度柔顺性分子。如前文所述，蛋白质分子的天然状态属于介稳定状态。蛋白质结构对于介质环境的适应性是十分必要的，因为这有利于蛋白质执行某些关键的功能。例如，酶与底物或辅助配体的有效结合，涉及到多肽链序列键合部位的重排。对于只有催化功能的蛋白质，通过二硫键使蛋白质的结构保持高度的稳定性，分子内的这些二硫键能够有效降低构象熵，减少多肽链伸长的倾向。

第三节 蛋白质分子的变性

蛋白质的天然结构是各种吸引和排斥相互作用的净结果，由于生物大分子含有大量的水，因此这些作用力包括分子内的相互作用和蛋白质分子与周围水分子的相互作用。然而，蛋白质的天然结构主要取决于蛋白质所处的环境。蛋白质的天然状态在生理条件下是热力学最稳定的状态，其自由能最低。蛋白质环境，例如 pH，离子强度、温度、溶剂组成等的任何变化，都会使蛋白质分子产生一个新的平衡结构，其构象会发生不同程度的变化。当这种变化仅是结构上的细微变化，而未能致使蛋白质分子结构发生剧烈改变，通常称为构象的适应性。蛋白质变性实际上是指蛋白质构象的改变（即二级、三级或四级结构的较大变化），但并不伴随一级结构中的肽键断裂。变性是一个复杂的现象，在此过程中还可出现新的构象，这些构象通常是中间状态且短暂存在的，蛋白质变性最终成为完全伸展的多肽结构（无规卷曲）。有时天然蛋白质的构象即使只有一个次级键改变，或一个侧链基团的取向不同，也会引起变性。对于那些天然状态为伸展结构的蛋白质（如酪蛋白单体），则不易发生变性。从结构观点来看，蛋白质分子的变性状态是很难定义的一个状态。结构上的较大变化意味着 α -螺旋和 β -折叠结构的增加，以及随机结构的减少。然而在多数情况下，变性涉及到有序结构的丧失。蛋白质的变性程度与变性条件有关，各种变性状态之间的自由能差别很小（图 5-13）。球蛋白完全变性时，成为无规卷曲的结构。

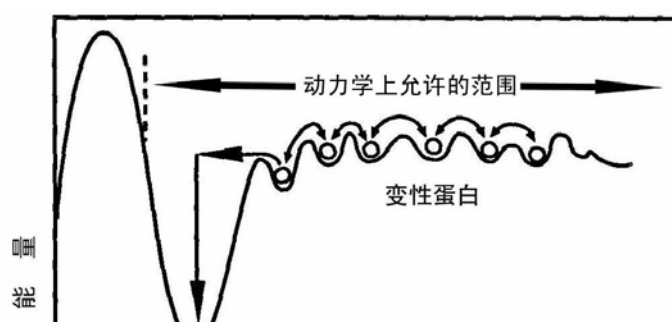


图 5-13 蛋白质分子构象变化与能量关系的示意图

蛋白质变性可引起结构、功能和某些性质发生变化。许多具有生物活性的蛋白质在变性后会使其丧失或降低活性，但有时候，蛋白质适度变性后仍然可以保持甚至提高原有活性，这是由于变性后某些活性基团暴露所致。食品蛋白质变性后通常引起溶解度降低或失去溶解性，从而影响蛋白质的功能特性或加工特性。在某种情况下，变性又是适宜的。例如，豆类中胰蛋白酶抑制剂的热变性，可能显著提高动物食用豆类时的消化率和生物有效性。部分变性蛋白质则比天然状态更易消化，或具有更好的乳化性、起泡性和胶凝性。

蛋白质变性对其结构和功能的影响有如下几个方面：

- (1) 由于疏水基团暴露在分子表面，引起溶解度降低。
- (2) 改变对水结合的能力。
- (3) 失去生物活性（例如酶或免疫活性）。
- (4) 由于肽键的暴露，容易受到蛋白酶的攻击，使之增加了蛋白质对酶水解的敏感性。
- (5) 特征粘度增大。
- (6) 不能结晶。

蛋白质变性的鉴定方法很多，通常是采用测定蛋白质的超离心沉降特征、粘度、电场中的迁移（电泳）、旋光性、圆二色性（CD）、X射线衍射、紫外差示光谱和红外光谱分析、热力学性质、生物或免疫性质、酶活力及某些功能基团的反应特性等检查蛋白质变性。近期研究表明，核磁共振波谱分析（¹H谱）和激光扫描共聚焦显微技术，能够清楚观察到蛋白质变性时的结构和三维立体形貌变化。

一、变性的热力学

蛋白质变性是生理条件下形成的折叠结构转变成为非生理条件下的伸展结

构的现象，可以通过上面介绍的方法测定蛋白质的变性。图 5—14 显示了典型的蛋白质变性曲线，以物理或化学性质变化为纵坐标（Y 轴），变性条件如变性剂浓度、温度或 pH 为横坐标（X 轴）作图。得到蛋白质变性程度与环境变化的相互关系。

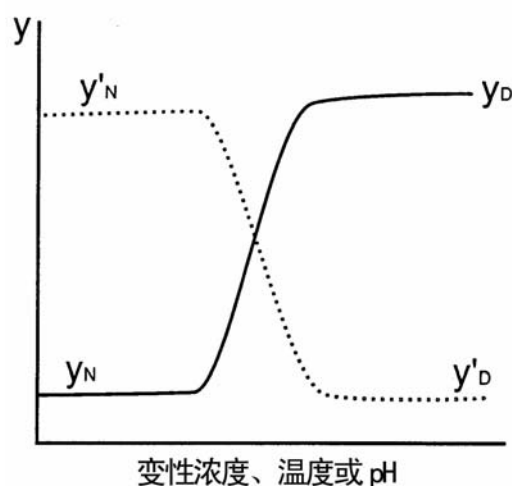


图 5—14 典型的蛋白质变性曲线

y 是与蛋白质变性有关的蛋白质分子的任何物理化学性质；
 y_N 和 y_D 是天然和变性蛋白质的 y 值

大多数蛋白质在变性时， Y 在起始的某一阶段不随变性剂浓度（或温度）的升高而变化，保持一个稳定值；当超过临界点后，随着变性条件的变化， Y_N 将在一个较窄的变性浓度（或温度）范围内，急剧的转变为 Y_D 。对于大多数单体球状蛋白质，曲线的转变是陡峭的，这表明蛋白质变性是一个协同过程。蛋白质分子一旦开始伸展或者是分子内的少数相互作用破裂，只要略微增加变性剂的浓度或提高温度，整个蛋白质就会完全伸展。因此，可以认为球状蛋白质变性不能存在中间状态，只可能以天然状态或变性状态存在。即所谓的“两种状态转变”模型。

当蛋白质受到强变性剂处理或蛋白质的摩尔质量很大时，蛋白质的变性是不可逆的。但在某些情况下，变性蛋白质也可以不同程度地“复原”。

虽然蛋白质变性的热力学过程很复杂，但仍然可以用简化的公式来讨论。



平衡常数 (K_D) 可以写成：

$$k_D = \frac{[P_D]}{[P_N]} \quad (5-7)$$

从以下的普通方程可得到热力学参数 ΔG^0 、 ΔH_D 、 ΔS_D 和 ΔC_D^0 ：

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K_D \quad (5-8)$$

同样，根据范特霍夫 (van' t Hoff) 方程，可以计算出变性热焓 ΔH_D 。

$$\frac{\delta(\ln k_D)}{\delta(T)} = \frac{\Delta H_D}{RT^2} \quad (5-9)$$

$$\Delta H_D = -R \frac{\delta \ln k_D}{\delta(1/T)} \quad (5-10)$$

式中 ΔG° 是标准自由能变化 (即等摩尔反应物中天然蛋白质体系的自由能与变化后平衡时，同一体系的自由能之差)，R 表示气体常数，T 表示绝对温度， ΔH 是恒压下焓的变化， ΔS_D 是熵变， ΔC_D° 表示恒压下热容的变化。 ΔC_D° 值大，表明 ΔH_D 和 ΔS_D 主要取决于温度，几种蛋白质的这些参数值见表 5-11，核糖核酸酶、胰凝乳蛋白酶原和肌红蛋白的 ΔH_D 和 ΔS_D 是正值， ΔG° 值相对较小。核糖核酸酶因伸展而焓增大，表明天然状态比变性状态的自由能低，熵增大相当于伴随伸展的无序状态。在变性时， ΔC_D° 增大与脂肪族、芳香族非极性基团向水溶液中转移以及缔合水的结构被破坏有关。

有的单体蛋白分子中含有两个或更多不同稳定性的结构域，在变性过程中通常是多步转变。因此更确切地说变性是一个逐步变化的过程，由于蛋白质的天然状态和完全变性状态之间有许多不同程度未伸展的中间状态存在，这些中间态结构相当于在各个不同阶段蛋白质构象的改变和水分子在蛋白质中的各种分布状态。如果各步转变能彼此分开，那么可以从两种状态模型的转变图，得到各个结构域的稳定性。寡聚蛋白的变性，首先是亚基的解离，随后才是亚基的变性。

与其他化学反应的活化能 E_a 相比，蛋白质变性的 E_a 值大，例如，胰蛋白酶、卵清蛋白和过氧化物酶的热变性活化能分别为 167、552、773KJ/mol，虽然蛋白质变性时共价键 (除二硫键) 不断裂，但很多低能非共价键相互作用和键均遭到破坏，由于变性涉及的键能小，而且相差不大，只要在小的温度范围或变性剂浓度变化不大的情况下就可以发生变性。蛋白质从天然状态向变性状态转变看起来似乎是一个简单反应，实际上是一个非常复杂的协同过程。

蛋白质变性，一般认为是可逆的。当变性因素除去后，变性蛋白质又可重新回到天然构象，这一现象称为蛋白质的复性 (renaturation)。是否所有的蛋白质变性都是可逆的，这一问题至今仍有疑问，至少实践中未能使所有的蛋白质在变性后都重新恢复活力。然而多数人都接受变性是可逆的概念，认为天然构象是处于能量最低的状态，大多数单体蛋白 (不存在聚集) 在适宜的溶液条件下，例如 pH、离子强度、氧化还原电位和蛋白质浓度等，它们可以重新折叠为原天然构象。许多蛋白质，当浓度低于 $1 \mu \text{mol/L}$ 时，可以重新折叠；浓度超过 $1 \mu \text{mol/L}$

时，由于分子间产生了大量的相互作用而减少了分子内的相互作用，从而使重新折叠受到抑制。一些通过二硫键结合的蛋白质，当体系的氧化还原电位与生理液体接近时，有助于重新折叠过程中二硫键的正确配对。有些蛋白质在极端条件，如在 90~100℃ 较长时间加热，变性后之所以不能逆转，主要是所需条件复杂，不易满足的缘故，有的甚至产生了化学变化，例如天冬酰胺的脱酰胺作用，天冬氨酸的肽键断裂，半胱氨酸和胱氨酸残基的破坏及聚集等。

表 5-11 蛋白质变性的热力学参数

蛋白质和变性条件	最大稳定性 温度 (°C)	ΔG^0 (kJ/mol)	ΔH^0 (KJ/mol)	ΔS^0 (J/ °C · mol)	ΔC_p^0 (KJ/°C · mol)
核糖核酸酶伸展 (30°C)					
pH1.13		-4.6	251	836	8.7
pH2.5	-9	3.8	238	773	8.3
pH3.15		12.9	222	690	3
胰凝乳蛋白质酶原 (25°C)					
pH3	10	30.5	163	439	10.9
肌红蛋白 (25°C)					
pH9	<0	56.8	176	397	5.9
β 乳球蛋白 (25°C)					
PH3.5mol/ml 尿酸	35	2.5	-88	-301	9

二、变性因素

(一) 物理因素

1. 热

热是蛋白质变性最普通的物理因素，伴随热变性，蛋白质的伸展程度相当大。例如，天然血清清蛋白分子是椭圆形的，长、宽比为 3.1，经过热变性后变为 5.5。

变性速率取决于温度。对许多反应来说，温度每升高 10℃，反应速率约增加 2 倍。可是，对于蛋白质变性反应，当温度上升 10℃，速率可增加 600 倍左右，因为维持二级、三级和四级结构稳定性的各种相互作用的能量都很低。

蛋白质对热变性的敏感性取决于多种因素，例如蛋白质的性质、蛋白质浓度、水活性、pH、离子强度和离子种类等。变性作用使疏水基因暴露和已伸展的蛋白质分子发生聚集，通常伴随出现蛋白质溶解度降低和吸水能力增强。许多蛋白质，无论是天然的或变性的，均倾向于向界面迁移，并且亲水基保留在水相中，疏水

基在非极性水相内（图 5-10）。因为天然蛋白质在此过程发生变性，若要保持其天然构象，应避免产生界面结构，例如泡沫或乳浊液中存在的界面结构。

即使是蛋白质用温和方法脱水例如冷冻干燥法仍然可引起某些蛋白质变性。蛋白质（或酶）在干燥条件下比含水分时热变性的耐受能力更大，说明蛋白质在有水存在时易变性。

热变性也会产生的其他影响，例如二硫键的断裂有时会释放出硫化氢，另外，热还可以改变氨基酸残基的化学性质（丝氨酸脱水，或谷氨酰胺和天冬酰胺的脱氨反应）、在分子内或分子间形成新的共价交联键（例如， γ -谷氨酰基- ϵ -N-赖氨酸）。这些变化均可改变蛋白质的营养价值和功能性。

蛋白质溶液在逐渐加热到临界温度以上时，蛋白质的构象从天然状态到变性状态有一个显著地转变，这个转变的中点温度称为熔化温度 T_m 或变性温度 T_d ，此时天然状态与变性状态浓度比为 1。关于温度引起蛋白质变性的机制相当复杂，主要涉及到非共价键相互作用的去稳作用。在天然状态下，蛋白质中的氢键、静电和范德华相互作用是放热反应（焓驱动），因此，这些作用力随着温度的升高而减弱，在高温下是去稳定作用的，而在低温下起到稳定作用。已知，在蛋白质分子中的大量肽氢键几乎都是埋藏在分子内部，因此，它们能在一个较宽的温度范围保持稳定。另一方面，疏水相互作用是吸热反应（熵驱动），随温度升高疏水作用增强，这也是在稳定蛋白质结构的所有作用力中，唯一与温度在某一范围内呈正相关的作用力。疏水相互作用一般在 $60\sim 70^\circ\text{C}$ 时达到最高值（与疏水侧链的结构有关），但温度超过一定值（ $>70^\circ\text{C}$ ，因侧链而异）后，又会减弱。因为超过一定温度，水的有序结构逐渐破坏，随之焓的变化有利于疏水基团进入水中，最终导致疏水相互作用去稳定。蛋白质溶液加热时，上述两种对立的作用均存在，当温度升高到一定值时，由于疏水相互作用不再增加，甚至还会减弱，最终导致蛋白质热变性。

在讨论蛋白质构象的稳定性时，已经知道多肽链的构象熵（ $-T\Delta S_{\text{conf}}$ ）是驱动蛋白质构象稳定的又一个主要的影响因素。随着温度的升高，多肽链的热动能增加，从而大大地促进了多肽链的伸展。图 5-15 显示了影响蛋白质分子稳定性的主要作用因素。总自由能为零（即 $K_b=1$ ）时的温度称为蛋白质的变性温度 T_d 。表 5-12 列出了某些蛋白质的变性温度和疏水值。

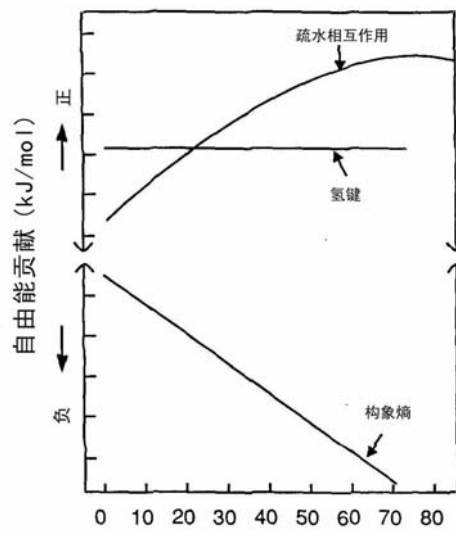


图 5-15 氢键、疏水相互作用和构象熵对稳定蛋白质的自由能所作贡献的相对变化与温度的函数关系

通常认为，温度越低，蛋白质越稳定。然而实际并非总是如此。对于那些主要以疏水相互作用稳定的蛋白质，在室温下比冻结温度时更稳定。因此，蛋白质的最适稳定温度，是使蛋白质具有最低自由能，这与蛋白质分子中极性和非极性相互作用对稳定的相对贡献之比有关。在蛋白质分子中极性相互作用超过非极性相互作用时，则蛋白质在冻结温度或低于冻结温度比在较高温度时稳定。图 5-16 是一些实际例子，肌红蛋白和 T₄ 噬菌体突变株溶菌酶最稳定的温度，分别为 30 °C 和 12.5 °C，低于或高于此温度二者的稳定性均下降。当在 0 °C 以下保藏，它们均会产生低温诱导变性。而核糖核酸酶的稳定性则随温度降低而增加。

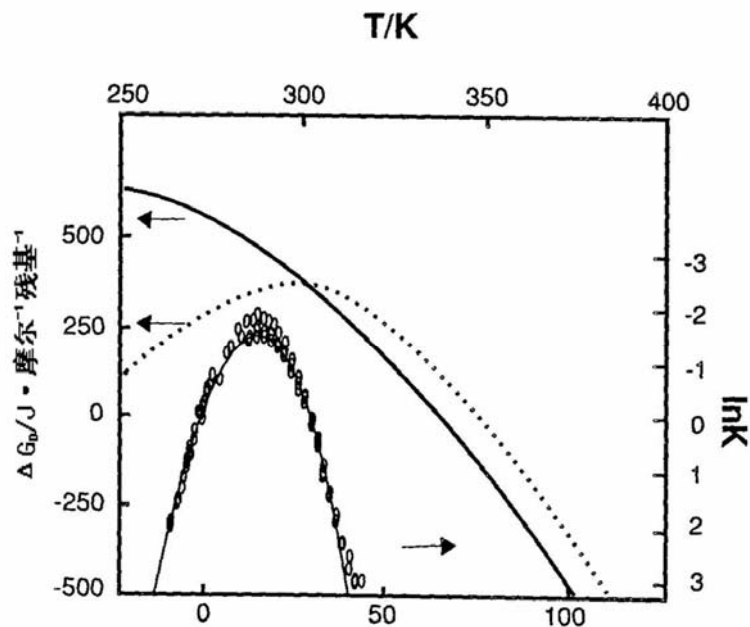


图 5-16 蛋白质稳定性 (ΔG°) 与温度的关系
 肌红蛋白 (···) 核糖核酸酶 (—)
 T₄ 噬菌体突变株溶菌酶 (○)

表 5-12 某些蛋白质的热变性温度 (Td) 和平均疏水性

蛋白质	Td	平均疏水性 (KJmol ⁻¹ 残基 ⁻¹)	蛋白质	Td	平均疏水性 (KJmol ⁻¹ 残基 ⁻¹)
胰蛋白酶原	55	3.68	卵清蛋白	76	4.01
胰凝乳蛋白酶原	57	3.78	胰蛋白酶抑制剂	77	
弹性蛋白酶	57		肌红蛋白	79	4.33
胃蛋白酶原	60	4.02	α-乳清蛋白	83	4.26
核糖核酸酶	62	3.24	细胞色素 C	83	4.37
羧肽酶	63		β-乳球蛋白	83	4.50
乙醇脱氢酶	64		抗生物素蛋白	85	3.81
牛血清清蛋白	65	4.22	大豆球蛋白	92	
血红蛋白	67	3.98	蚕豆萎蔫 11S 蛋白	94	
溶菌酶	72	3.72	向日葵 11S 蛋白	95	
胰岛素	76	4.16	燕麦球蛋白	108	

食品在加工和贮藏过程中, 热处理和冷藏是最常用的加工和保藏方法。因此必须注意在热加工过程中产生的不同程度变性, 以及温度效应与每种蛋白变性的关系, 一旦变性就会对蛋白质在食品中的功能特性和生物活性带来影响, 有的是需宜的, 有的则是不需宜的。

氨基酸的组成影响蛋白质的热稳定性, 含有较多疏水氨基酸残基(尤其是缬氨酸, 异亮氨酸、亮氨酸和苯丙氨酸)的蛋白质, 对热的稳定性高于亲水性较强的蛋白质。自然界中耐热生物体的蛋白质, 一般含有大量的疏水氨基酸。但是, 从表 5-12 可以看出, 平均疏水性与热变性温度之间的正相关, 只是一个近似值, 有的并非如此。可能是受其他因素影响的结果, 如蛋白质分子中存在的二硫键, 或者是蛋白质中的盐桥埋藏在疏水裂缝中。15 种不同蛋白质的统计分析表明, 蛋白质中天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、色氨酸和酪氨酸的残基百分数与热变性温度呈正相关 ($r=0.98$); 另外的同一组蛋白热变性温度与丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、缬氨酸等氨基酸的残基百分数则是呈负相关 ($r=-0.975$)。而其他氨基酸对蛋白质的 Td 影响甚少。对于这些关系的成因尚不清楚。蛋白质的热稳定性不仅决定于分子中氨基酸的组成, 极性与非极性氨基酸的比例, 而且还依赖于这两类氨基酸在肽链中的分布, 一旦这种分布达到最佳状态, 此时分子内的相互作用达到最大值, 自由能降低至最小, 多肽链的柔顺性也随之减小, 蛋白质则处于热稳定状态。可见, 蛋白质的热稳定性与分子的柔顺性呈负相关。

蛋白质的立体结构同样影响其热稳定性。单体球状蛋白在大多数情况下热变性是可逆的，许多单体酶加热到变性温度以上，甚至在 100℃ 短时间保留，然后立即冷却至室温，它们也能完全恢复原有活性。而有的蛋白质在 90~100℃ 加热较长时间，则发生不可逆变性。

水是极性很强的物质，对蛋白质的氢键相互作用有很大影响，因此水能促进蛋白质的热变性。干蛋白粉似乎是很稳定的。蛋白质水分含量从 0 增加至 0.35g 水/g 蛋白质时， T_d 急剧下降（图 5-17），当水分含量从 0.35 增加至 0.75g 水/g 蛋白质时， T_d 仅略有下降。水分含量大于 0.75g 水/g 蛋白质时，蛋白质的 T_d 与稀溶液状态下相同。蛋白质水合作用对于热稳定性的影响，主要与蛋白质的动力学相关。在干燥状态，蛋白质具有一个静止的结构，多肽链序列的运动受到了限制。当向干燥蛋白质中添加水时，水渗透到蛋白质表面的不规则空隙或进入蛋白质的小毛细管，并发生水合作用，引起蛋白质溶胀。在室温下大概当每克蛋白质的水分含量达到 0.3~0.4g 时，蛋白质吸水即达到饱和。水的加入，增加了多肽链的淌度和分子的柔顺性，这时蛋白质分子处于动力学上更有利的熔融结构。当加热时，蛋白质的这种动力学柔顺性结构，相对于干燥状态，则可提供给水更多的几率接近盐桥和肽链的氢键，结果 T_d 降低。

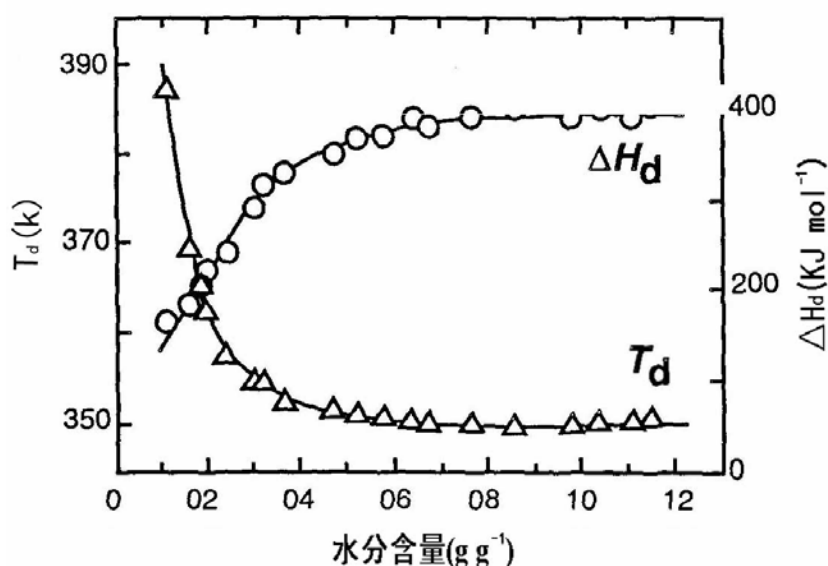


图 5-17 水分含量对卵清蛋白的变性温度下 T_d 和变性热焓 ΔH_d 的影响

在蛋白质水溶液中添加盐和糖可提高其热稳定性。例如蔗糖、乳糖、葡萄糖

和甘油能稳定蛋白质，对抗热变性。当 β -乳球蛋白、大豆蛋白、血清白蛋白和燕麦球蛋白中含有 0.5mol/L NaCl 时，能显著提高它们的变性温度 T_d 。

2. 低温

某些蛋白质经过低温处理后发生可逆变性，例如有些酶（L-苏氨酸脱氨酶）在室温下比较稳定，而在 0°C 时不稳定。某些蛋白质（11S大豆蛋白、麦醇溶蛋白、卵蛋白和乳蛋白）在低温或冷冻时发生聚集和沉淀。例如大豆球蛋白在 2°C 保藏，会产生聚集和沉淀，当温度回升至室温，可再次溶解。相反，低温能引起某些低聚物解离和亚单位重排，例如脱脂牛乳在 4°C 保藏， β -酪蛋白会从酪蛋白胶束中解离出来，从而改变了胶束的物理化学性质和凝乳性质。一些寡聚体酶例如乳酸脱氢酶和甘油醛磷酸脱氢酶，在 4°C 时由于亚基解离，会失去大部分活性，将其在室温下保温数小时，亚基又重新缔合为原来的天然结构，并恢复其原有活性。有些脂酶和氧化酶不仅能耐受低温冷冻，而且可保持活性。就细胞体系而言，某些氧化酶由于冷冻可以从细胞膜结构中释放出来而被激活。某些植物和海水动物能耐受低温，而有的蛋白质分子由于具有较大的疏水-极性氨基酸比因而在低温下易发生变性。

3. 机械处理

机械处理，例如揉捏、振动或搅打等高速机械剪切，都能引起蛋白质变性。在加工面包或其他食品的面团时，产生的剪切力使蛋白质变性，主要是因为 α -螺旋的破坏导致了蛋白质的网络结构的改变。

食品在经高压、剪切和高温处理的加工过程（例如挤压，高速搅拌和均质等）中，蛋白质都可能变性。剪切速率愈高，蛋白质变性程度则愈大。同时受到高温和高剪切力处理的蛋白质，则发生不可逆变性。 $10\%\sim 20\%$ 乳清蛋白溶液，在 $\text{pH}3.4\sim 3.5$ ，温度 $80\sim 120^\circ\text{C}$ 条件下，经 $7,500\sim 10,000\text{S}^{-1}$ 的剪切速率处理后，则变成直径为 $1\mu\text{m}$ ，不溶于水的球状大胶体颗粒。

4. 静液压

静液压能使蛋白质变性，是热力学原因造成的蛋白质构象改变。它的变性温度不同于热变性，当压力很高时，一般在 25°C 即能发生变性；而热变性需要在 0.1MPa 压力下，温度为 $40\sim 80^\circ\text{C}$ 范围才能发生变性。光学性质表明大多数蛋白质在 $100\sim 1200\text{MPa}$ 压力范围作用下才会产生变性。

蛋白质的柔顺性和可压缩性是压力诱导蛋白质变性的主要原因。尽管氨基酸残基是被紧密地包裹在球状蛋白质分子的内部，但是仍然存在一些恒定的空隙空间，这就使蛋白质具有可压缩性。球状蛋白平均有效体积， V^0 约为 0.74ml/g ， V^0 由三个部分组成：

$$V^0 = V_c + V_{\text{cav}} + \Delta V_{\text{sol}} \quad (5-11)$$

式中 V_c —原子体积的总和； V_{cal} —蛋白质内部空隙空间的体积总和； V_{sol} —水合作用时体积的变化。

V^0 值愈大，表示空隙空间对部分有效体积的贡献就愈大，说明蛋白质在压力的作用下愈不稳定。然而纤维状蛋白质大多数不存在空隙空间，因此它们对静液压作用的稳定性高于球状蛋白，也就是说静液压不易引起纤维状结构的蛋白质变性。

球状蛋白质因压力作用产生变性，此时由于蛋白质伸展而使空隙不复存在；另外非极性氨基酸残基因蛋白质的伸展而暴露，并产生水合作用。这两种作用的结果使得球状蛋白质变性过程会伴随体积减小 30~100mL/mol 左右。体积变化与自由能变化的关系可用下式表达

$$\Delta V = d(\Delta G) / dp \quad (5-12)$$

式中 P 代表静液压。

如果球状蛋白质在压力作用下完全伸展，体积变化减小的理论值应该是 2%，然而根据实验测得的体积减小值为 30~100mL/mol，相对体积减小百分数仅约为 0.5%，由此说明，蛋白质在高达 1000MPa 静液压作用下，仅能部分伸展。

压力引起的蛋白质变性是高度可逆的。大多数酶的稀溶液由于压力作用而酶活降低，一旦压力降低到常压，则又可使酶恢复到原有的活性，这个复活过程一般需要几个小时。对于寡聚蛋白和酶而言，变性首先是亚基在 0.1~200MPa 压力作用下解离，然后亚基在更高的压力下变性，当解除压力后，亚基又重新缔合，几小时后酶活几乎完全恢复。

高静压在食品加工过程中作为一种工具已经引起食品科学家的广泛关注，例如灭菌和胶凝化。在 200~1000MPa 高压下灭菌，使细胞膜遭到不可逆破坏，同时引起微生物中细胞器的解离，从而达到灭菌的目的。关于压力胶凝化作用已有不少报道和应用，如将蛋清、16%大豆球蛋白或 3%肌动球蛋白在 100~700MPa 静液压下，于 25℃加压 30min，则可形成凝胶，其质地比热凝胶柔软。静液压也常用于牛肉的嫩化加工，一般处理压力为 100~300MPa。压力加工，目前是一种较热加工理想的方法，加工过程中不仅必需氨基酸、天然色泽和风味不会损失，特别是一些热敏感的营养或功能成分能得到较好的保持，而且也不会产生有害和有毒化合物。但是因为成本关系，尚未得到广泛应用。

5. 辐射

电磁辐射对蛋白质的影响因波长和能量大小而异，紫外辐射可被芳香族氨基酸残基(色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸)所吸收，导致蛋白质构象的改变，如果能量水平很高，还可使二硫交联键断裂。 γ 辐射和其他电离辐射能改变蛋白质的构象，同时还会氧化氨基酸残基、使共价键断裂、离子化、形成蛋白质自由基、重组、

聚合，这些反应大多通过水的辐解作用传递。

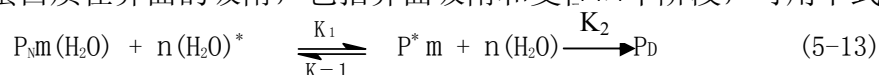
6. 界面

在水和空气，水和非水溶液或固相等界面吸附的蛋白质分子，一般发生不可逆变性。蛋白质吸附速率与其向界面扩散的速率有关，当界面被变性蛋白质饱和（约 $2\text{mg} / \text{m}^2$ ）即停止吸附。图 5-18 表示在水溶液中球形蛋白质从天然状态（图 5-18A）转变成吸附在水和非水相界面时的变性状态（图 5-18C）。

远离界面的那部分水分子处于低能态，它们不仅与另外一些水分子，而且还与蛋白质的离子和极性位点相互作用，靠近界面的水分子处于高能态，可与另外一些水分子相互作用。

蛋白质大分子向界面扩散并开始变性，在这一过程中，蛋白质可能与界面高能水分子相互作用，许多蛋白质-蛋白质之间的氢键将同时遭到破坏，使结构发生“微伸展”（图 5-18B）。由于许多疏水基团和水相接触，使部分伸展的蛋白质被水化和活化（ P^* ），处于不稳定状态。蛋白质在界面进一步伸展和扩展，亲水和疏水残基力图分别在水相和非水相中取向，因此界面吸附引起蛋白质变性。某些主要靠二硫交联键稳定其结构的蛋白质不易被界面吸附。

蛋白质在界面的吸附，包括界面吸附和变性两个阶段，可用下式表示



式中， P_N 表示天然蛋白质， P^* 表示水合的活化蛋白质， P_D 为变性蛋白质， (H_2O) 表示普通水， $(\text{H}_2\text{O})^*$ 表示高能水。

蛋白质的界面性质对各种食品体系都是很重要的，例如蛋白质在界面上吸附，有利于乳浊液和泡沫的形成和稳定（见第四节）。



图 5-18 界面内蛋白质构象

A 球形天然蛋白质浸在水溶液中

B 靠近界面的球形蛋白质

C 吸附、伸展和水合的蛋白质

(二) 化学因素

1. pH

蛋白质所处介质的 pH 对变性过程有很大的影响，蛋白质在等电点时最稳定，表 5-13 为几种蛋白质的等电点，在中性 pH 环境中，除少数几个蛋白质带有正电荷外，大多数蛋白质都带有负电荷。

表 5-13 几种蛋白质的等电点 (pI)

蛋白质	等电点	蛋白质	等电点
胃蛋白酶	1.0	血红蛋白	6.7
κ -酪蛋白 B	4.1-4.5	α -糜蛋白酶	8.3
卵清蛋白	4.6	α -糜蛋白酶原	9.1
大豆球蛋白	4.6	核糖核酸酶	9.5
血清蛋白	4.7	细胞色素 C	10.7
β -乳球蛋白	5.2	溶菌酶	11.0
β -酪蛋白 A	5.3		

因为在中性 pH 附近，静电排斥的净能量小于其他相互作用，大多数蛋白质是稳定的，然而在超出 pH4~10 范围就会发生变性。在极端 pH 时，蛋白质分子内的离子基团产生强静电排斥，这就促使蛋白质分子伸展和溶胀。蛋白质分子在极端碱性 pH 环境下，比在极端酸性 pH 时更易伸长，因为碱性条件有利于部分埋藏在蛋白质分子内的羧基，酚羟基，巯基离子化，结果使多肽链拆开，离子化基团自身暴露在水环境中。pH 引起的变性大多数是可逆的，然而，在某些情况下，部分肽键水解，天冬酰胺、谷氨酰胺脱酰胺，碱性条件下二硫键的破坏，或者聚集等都将引起蛋白质不可逆变性。

2. 金属

碱金属(例如 Na^+ 和 K^+)只能有限度地与蛋白质起作用，而 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 略微活泼些。过渡金属例如Cu、Fe、Hg和Ag等离子很容易与蛋白质发生作用，其中许多能与巯基形成稳定的复合物。 Ca^{2+} (还有 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Mg^{2+})可成为某些蛋白质分子或分子缔合物的组成部分。一般用透析法或螯合剂可从蛋白质分子中除去金属离子，但这将明显降低这类蛋白质对热和蛋白酶的稳定性。

3. 有机溶剂

大多数有机溶剂属于蛋白质变性剂，因为它们能改变介质的介电常数，从而使保持蛋白质稳定的静电作用力发生变化。非极性有机溶剂渗入疏水区，可破坏疏水相互作用，促使蛋白质变性，这类溶剂的变性行为也可能是因为它们和水产生相互作用引起的。

某些溶剂例如 2-氯乙醇，能增加 α -螺旋构象的数量，这种作用也可看成是一种变性方式(二级，三级和四级结构改变)，例如卵清蛋白在水溶液介质中有 31%的 α -螺旋，而在 2-氯乙醇中达到 85%。

4. 有机化合物水溶液

某些有机化合物例如尿素和盐酸胍的高浓度(4~8mol/L)水溶液能断裂氢键，从而使蛋白质发生不同程度的变性。同时，还可通过增大疏水氨基酸残基在水相中的溶解度，降低疏水相互作用。

在室温下 4~6mol/L 尿素和 3~4mol/L 盐酸胍，可使球状蛋白质从天然状态转变至变性状态的中点，通常增加变性剂浓度可提高变性程度，通常 8mol/L 尿素和约 6mol/L 盐酸胍可以使蛋白质完全转变为变性状态。盐酸胍由于具有离子特性，因而比尿素的变性能力强。一些球状蛋白质，甚至在 8mol/L 尿素溶液中也不能完全变性，然而在 8mol/L 盐酸胍溶液中，它们一般以无规卷曲(完全变性)构象状态存在。

尿素和盐酸胍引起的变性包括两种机制：第一种机制是变性蛋白质能与尿素和盐酸胍优先结合，形成变性蛋白质-变性剂复合物，当复合物被除去，从而引

起 N→D 反应平衡向右移动。随着变性剂浓度的增加，天然状态的蛋白质不断转变为复合物，最终导致蛋白质完全变性。然而，由于变性剂与变性蛋白的结合是非常弱的。因此，只有高浓度的变性剂才能引起蛋白质完全变性；第二种机制是尿素与盐酸胍对疏水氨基酸残基的增溶作用。因为尿素和盐酸胍具有形成氢键的能力，当它们在高浓度时，可以破坏水的氢键结构，结果尿素和盐酸胍就成为非极性残基的较好溶剂，使之蛋白质分子内部的疏水残基伸展和溶解性增加。

尿素和盐酸胍引起的变性通常是可逆的，但是，在某些情况下，由于一部分尿素可以转变为氰酸盐和氨，而蛋白质的氨基能够与氰酸盐反应改变了蛋白质的电荷分布。因此，尿素引起的蛋白质变性有时很难完全复性。

还原剂（半胱氨酸、抗坏血酸、 β -巯基乙醇、二硫苏糖醇）可以还原二硫交联键，因而能改变蛋白质的构象。

5. 表面活性剂

表面活性剂例如十二烷基磺酸钠（sodium dodecyl sulfate, SDS）是一种很强的变性剂。SDS 浓度在 3~8 mol/L 范围可引起大多数球状蛋白质变性。由于 SDS 可以在蛋白质的疏水和亲水环境之间起着乳化介质的介作用，且能优先与变性蛋白质强烈地结合，因此，破坏了蛋白质的疏水相互作用，促使天然蛋白质伸展，非极性基团暴露于水介质中，导致了天然与变性蛋白质之间的平衡移动。引起蛋白质不可逆变性，这与尿素和盐酸胍引起的变性不一样。球状蛋白质经 SDS 变性后，呈现 α -螺旋棒状结构，而不是以无规卷曲状态存在。

6. 离液盐 (chaotropic salts)

盐，这里指的是离液盐即易溶盐 (lyotropic salts) 对蛋白质稳定性的影响包括两种不同的方式，这与盐同蛋白质的相互作用有关。在低盐浓度时，离子与蛋白质之间为非特异性静电相互作用。当盐的异种电荷离子中和了蛋白质的电荷时，有利于蛋白质的结构稳定，这种作用与盐的性质无关，只依赖于离子强度。一般离子强度 ≤ 0.2 时即可完全中和蛋白质的电荷。然而在较高浓度 ($> 1\text{mol/L}$)，盐具有特殊离子效应，影响蛋白质结构的稳定性。阴离子的作用大于阳离子，图 5-19 表示了各种钠盐对 β -乳球蛋白热变性温度的影响，在离子强度相同时， Na_2SO_4 和 NaCl 能提高 T_d ，相反， NaSCN 和 NaClO_4 使 T_d 降低。无论大分子（包括 DNA）的结构和构象差别多大，高浓度的盐对它们的结构稳定性均产生不利影响。其中 NaSCN 和 NaClO_4 是强变性剂。根据感胶离子序，各种阴离子在离子强度相同时，对蛋白质（包括 DNA）结构稳定性的影响顺序如下： $\text{F}^- < \text{SO}_4^{2-} < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^- < \text{ClO}_4^- < \text{SCN}^- < \text{Cl}_3\text{CCOO}^-$ ，这个顺序称为 Hofmeister 序列（感胶离子序）或离液序列（chaotropic series）。顺序中左侧的离子能稳定蛋白质的天然构象；而右侧的离子则使蛋白质分子伸展、解离，为去稳定剂。

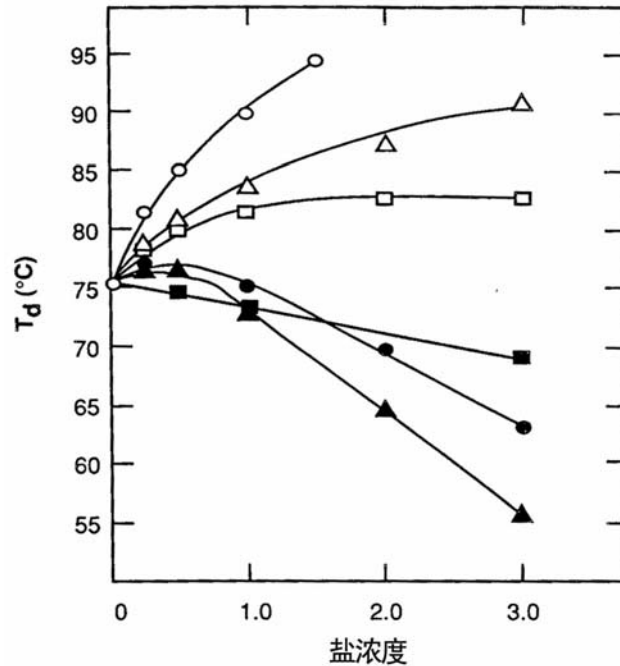


图 5-19 pH 7 时各种钠盐对 β -乳球蛋白变性温度的影响

○ Na₂SO₄ 、 △ NaCl 、 □ NaBr 、
● NaClO₄ 、 ▲ NaSCN 、 ■ 尿素

盐对蛋白质稳定性的影响机制还不十分清楚，可能与盐同蛋白质的结合能力，以及对蛋白质的水合作用影响有关。凡是能促进蛋白质水合作用的盐均能提高蛋白质结构的稳定性；反之，与蛋白质发生强烈相互作用，降低蛋白质水合作用的盐，则使蛋白质结构去稳定。进一步从水的结构作用讨论，盐对蛋白质的稳定和去稳定作用，涉及到盐对体相水有序结构的影响，稳定蛋白质的盐提高了水的氢键结构，而使蛋白质失稳的盐则破坏了体相水的有序结构，因而有利于蛋白质伸展，导致蛋白质变性。换言之，离液盐的变性作用可能与蛋白质中的疏水相互作用有关。

第四节 蛋白质的功能性质

食品的感官品质诸如质地、风味、色泽和外观等，是人们摄取食物时的主要依据，也是评价食品质量的重要组成部分之一。食品中各种次要和主要成分之间相互作用的净结果则产生了食品的感官品质，在这些诸多成分中蛋白质的作用显得尤为重要。例如焙烤食品的质地和外观与小麦面筋蛋白质的粘弹性和面团形成特性相关；乳制品的质地和凝乳形成性质取决于酪蛋白胶束独特的胶体性质；蛋糕的结构和一些甜食的搅打起泡性与蛋清蛋白的性质关系密切；肉制品的质地与多汁性则主要依赖于肌肉蛋白质（肌动蛋白、肌球蛋白、肌动球蛋白和某些水溶性肉类蛋白质）。表 5-14 列出了各种食品蛋白质在不同食品中的功能作用。

蛋白质的功能性质（Functional Properties）是指食品体系在加工、贮藏、制备和消费过程中蛋白质对食品产生需要特征的那些物理、化学性质。各种食品对蛋白质功能特性的要求是不一样的（表 5-15）。

表 5-14 食品体系中蛋白的功能作用

功能	作用机制	食品	蛋白质类型
溶解性	亲水性	饮料	乳清蛋白
粘度	持水性，流体动力学的大小和形状	汤、调味汁、色拉调味汁、甜食	明胶
持水性	氢键、离子水合	香肠、蛋糕、面包	肌肉蛋白，鸡蛋蛋白
胶凝作用	水的截留和不流动性，网络的形成	肉、凝胶、蛋糕焙烤食品和奶酪	肌肉蛋白，鸡蛋蛋白和牛奶蛋白
粘结-粘合	疏水作用，离子键和氢键	肉、香肠、面条、焙烤食品	肌肉蛋白，鸡蛋蛋白的乳清蛋白
弹性	疏水键，二硫交联键	肉和面包	肌肉蛋白，谷物蛋白
乳化	界面吸附和膜的形成	香肠、大红肠、汤、蛋糕、甜食	肌肉蛋白，鸡蛋蛋白，乳清蛋白
泡沫	界面吸附和膜的形成	搅打顶端配料，冰淇淋、蛋糕、甜食	鸡蛋蛋白，乳清蛋白
脂肪和风味的结合	疏水键，截面	低脂肪焙烤食品，油炸面圈	牛奶蛋白，鸡蛋蛋白，谷物蛋白

表 5-15 各种食品对蛋白质功能特性的要求

食 品	功 能 性
饮料、汤、沙司	不同 pH 时的溶解性、热稳定性、粘度、乳化作用、持水性
形成的面团焙烤产品（面包、蛋糕等）	成型和形成粘弹性膜，内聚力，热性变和胶凝作用，吸水作用，乳化作用，起泡，褐变
乳制品（精制干酪、冰淇淋、甜点心等）	乳化作用，对脂肪的保留、粘度、起泡、胶凝作用、凝结作用
鸡蛋代用品	起泡、胶凝作用
肉制品（香肠等）	乳化作用、胶凝作用、内聚力、对水和脂肪的吸收与保持
肉制品增量剂（植物组织蛋白）	对水和脂肪的吸收与保持、不溶性、硬度、咀嚼性、内聚力、热变性

食品的感官品质是由各种食品原料复杂的相互作用产生的。例如蛋糕的风味、质地、颜色和形态等性质，是由原料的热胶凝性，起泡、吸水作用、乳化作用、粘弹性和褐变等多种功能性组合的结果。因此，一种蛋白质作为蛋糕或其他类似产品的配料使用时，必须具有多种功能特性。动物蛋白，例如乳（酪蛋白）、蛋和肉蛋白等，是几种蛋白质的混合物，它们有着较宽范围的物理和化学性质，及多种功能特性，例如蛋清具有持水性、胶凝性、粘合性、乳化性、起泡性和热凝结等作用，现已广泛地用作许多食品的配料，蛋清的这些功能来自复杂的蛋白质组成及它们之间的相互作用，这些蛋白质成分包括卵清蛋白、伴清蛋白、卵粘蛋白、溶菌酶和其他清蛋白。然而植物蛋白（例如大豆和其他豆类及油料种子蛋白等）；和乳清蛋白等其他蛋白质，虽然它们也是由多种类型的蛋白质组成，但是它们的功能特性不如动物蛋白，目前只是在有限量的普通食品中使用。对于这类蛋白质的功能以及它们的分子结构，特别是立体构象对其功能的影响，还不甚了解。

蛋白质的大小、形状、氨基酸的组成和序列、净电荷及其分布、亲水性和疏水性之比，二级、三级和四级结构、分子的柔顺性或刚性，以及分子内和分子之间同其他组分作用的能力等诸多因素，均影响与蛋白质功能有关的许多物理和化学性质，而且每种功能性又是诸多因素共同作用的结果，这样就很难论述清楚何种性质与某种特定功能作用之间的相关性。

从经验上看食品蛋白质的功能性质分为两大类：①流体动力学性质；②表面性质。第一类包括水吸收和保持、溶胀性、粘附性、粘度、沉淀、胶凝和形成其他各种结构时起作用的那些性质（例如蛋白质面团和纤维），它们通常与蛋白质的大小、形状和柔顺性有关；第二类主要是与蛋白质的湿润性、分散性、溶解度、表面张力、乳化作用、蛋白质的起泡特性，以及脂肪和风味的结合等有关的性质，这些性质之间并不是完全孤立和彼此无关的。例如，胶凝作用不仅包括蛋白质-蛋白质相互作用，而且还有蛋白质-水相互作用；粘度和溶解度取决于蛋白质-水和蛋白质-蛋白质的相互作用。

从根据蛋白质的结构特征和分子的性质通常不一定能预测其功能性质，因此，必须通过实验来判断，包括物理、化学性质（粘度、表面张力和溶解度）的测定和实际应用实验。例如，面包烘烤后，体积的测定或油炸食品水分损失的测定，在实验的模拟体系中当蛋白质组分是一种已知天然结构的纯蛋白质时，其功

能性可得到最好的了解。然而，工业中使用的大多数蛋白质是一种混合物，含有相当多的糖类化合物、脂类、矿物盐和多酚类物质等，尽管蛋白质的离析物比大多数其他蛋白质含有较少的非蛋白质成分，但由于受到各种加工处理，这样就影响它们原来的结构和功能性。

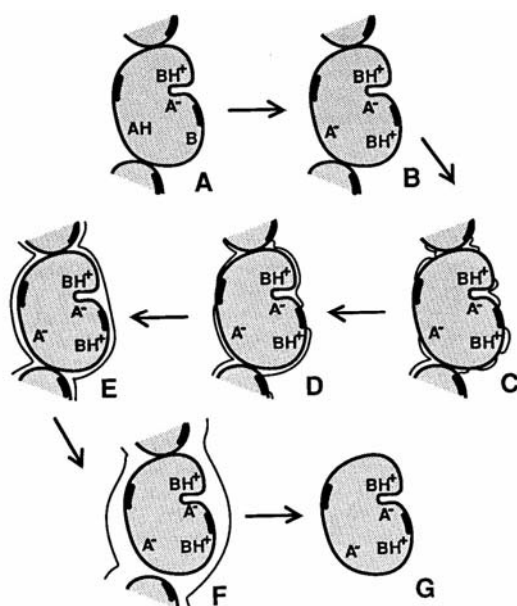
应用实验所需要的成本高，时间长，近来更多地是采用简单的模拟体系进行实验。但采用这种方法涉及到两个问题：这些实验目前还缺乏标准化；模拟体系实验得到的结果与真实体系（应用实验）相比常常相关性不好。因此，尽快建立一套标准可靠的方法是非常必要的。

以下讨论食品蛋白质的主要功能性质及蛋白质在加工或化学修饰时功能性质的变化。

一、水合性质

1.概述

蛋白质在溶液中的构象主要取决于它和水之间的相互作用,大多数食品是水合（hydration）固态体系。食品中的蛋白质、多糖和其他成分的物理化学及流变学性质,不仅受到体系中水的强烈影响，而且还受到水活性的影响。水能改变蛋白质的物理、化学性质，例如具有无定形和半结晶的食品蛋白质，由于水的增塑作用可以改变它们的玻璃化转变温度 T_g 和变性温度 T_D 。玻璃化温度是指从脆的无弹性的玻璃态（无定形固体）转变为柔软有弹性的橡胶态（高弹态）的转变温度。而溶化温度是结晶态转变为无规状态的温度。另外，干蛋白质浓缩物或离析物在使用时必须使之水合，因此，食品蛋白质的水合和复水性质具有重要的实际意义。蛋白质从干燥状态开始逐渐水合，可用图 5-20 列出的顺序表示。



A.未水合蛋白; B.带电基团的初始水合; C.在接近极性和带电部位形成水簇; D.在极性表面完成水合作用; E.非极性小区的水合形成单分子层覆盖; F.蛋白质-缔合水与体相水桥; G.完成流体动力学作用

图 5-20 干蛋白质的蛋白质-水相互作用顺序

蛋白质制品的许多功能性与水合作用有关,例如水吸收作用(也叫做水摄取、亲合性或结合性)、溶胀、湿润性、持水容量(或水保留作用),以及粘附和内聚力都与水合作用的前 5 个步骤有关。分散性和粘度(或增稠力)涉及 F 和 G 两个步骤。蛋白质的最终状态,可溶性或不溶性(部分或全部)也与功能性质相关,例如溶解性或速溶性。胶凝作用是指充分水合的不溶性块状物的形成,而且要求产生特殊的蛋白质-蛋白质相互作用。与表面性质有关的功能性,例如乳化作用和起泡性,蛋白质也必须是高度水合和分散的。

2. 蛋白质-水相互作用

蛋白质的水合作用是通过蛋白质的肽键(偶极-偶极或氢键),或氨基酸侧链(离子的极性甚至非极性基团)同水分子之间的相互作用来实现的。这些相互作用的方式表示在图 5-21 中,并在第二章详细讨论过。

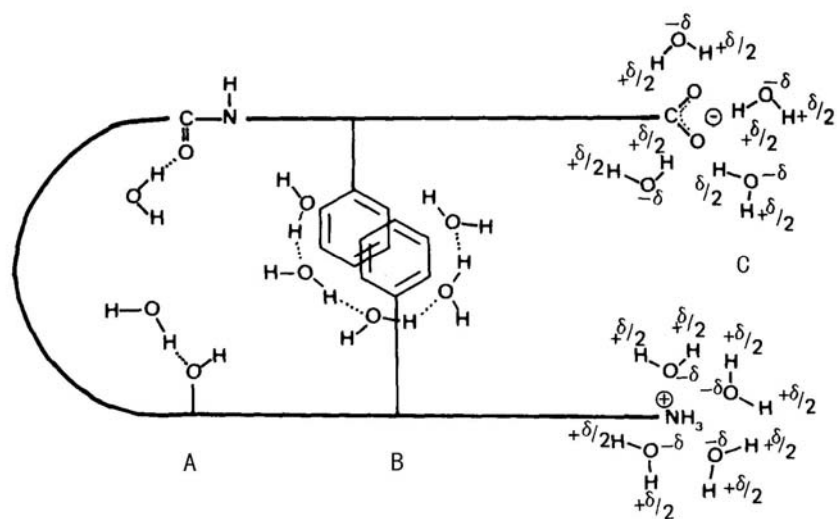


图 5-21 水同蛋白质相互作用的示意图

(A) 氢键; (B) 疏水相互作用; (C) 离子或极性基团相互作用

在宏观水平上,蛋白质与水的结合是一个逐步的过程,而且与水分活度密切相关。在低水分活度(a_w 为 0.05~0.3)时,离子基团因其高亲和性而首先溶剂化,随后是极性和非极性基团与水结合,最终在蛋白质表面形成单分子水层(或“结合水”),这部分水在流动上是受阻的,即不能冻结,也不能作为溶剂参与化学反应。但是,从能量观点看,在蛋白质表面结合的单分子水层(0.07~0.27gH₂O/g蛋白质)中的水解吸时(即从蛋白质表面转变为体相水),在 25℃时所需的解吸自由能为 0.75kJ/mol。可是水在 25℃时的热动能约为 2.5kJ/mol,远大于解吸自由能。因此有理由认为蛋白质单分子层中的水分子是可以流动的。在中等水分活度(0.3~0.7)范围,蛋白质结合水后,除形成单分子水层外,还可以形成多分子水层。例如在溶菌酶表面(6000Å²)大约覆盖了 300 个水分子,平均每 20Å²表面上有一个水分子。在水活性为 0.9 时,蛋白质结合的水量约为 0.3~0.5gH₂O/g蛋白质(表 5-16,这部分水中的大多数在 0℃是不能冻结的。当 $a_w > 0.9$ 时,大量的液态水(体相水)是凝聚在蛋白质分子的裂隙中,或者截留在不溶性蛋白质(例如肌纤维)体系的毛细管中,这部分水的性质类似于体相水,被称为流体动力学水,它们与蛋白质分子一起运动。

表 5-16 各种蛋白质的水合能力

蛋白质	水合能力 (gH ₂ O/g蛋白质)	蛋白质	水合能力 (gH ₂ O/g蛋白质)
纯蛋白质 ^a		商业蛋白质商品 ^b	
核糖核酸酶	0.53	乳清浓缩蛋白	0.45-0.52
溶菌酶	0.34	酪蛋白酸钠	0.39-0.92
肌红蛋白	0.44	大豆蛋白	0.33
β-乳球蛋白	0.54		
胰凝乳蛋白酶原	0.23		
血清白蛋白	0.33		
血红蛋白	0.62		
胶原蛋白	0.45		
酪蛋白	0.40		
卵清蛋白	0.30		

* a. 90%相对湿度的值

b. 95%相对湿度的值

3. 水合性质的测定方法

蛋白质成分的吸水性和持水容量的测定通常有以下四种方法。

(1) 相对湿度法（或平衡水分含量法）：

测定一定水活性 a_w 时所吸收的水量，这种方法用于评价蛋白粉的吸湿性和结块现象。

(2) 溶胀法：

将蛋白质粉末置于下端连有刻度的毛细管的烧结玻璃过滤器上，让其自发地吸收过滤器下面毛细管中的水，即可测定水合作用的速率和程度（图 5-22）。

(3) 过量水法：

是使蛋白质试样同超过蛋白质所能结合的过量水接触，随后通过过滤或低速离心或挤压，使过剩水同蛋白质保持的水分离。这种方法只适用于溶解度低的蛋白质。对于可溶性蛋白质必须进行校正。

(4) 水饱和法：

测定蛋白质饱和溶液所需要得的水量（用离心法测定对水的最大保留性）。

方法（2）、（3）和（4）可用来测定结合水，不可冻结的水以及蛋白质分子间借助于物理作用保持的毛细管水。

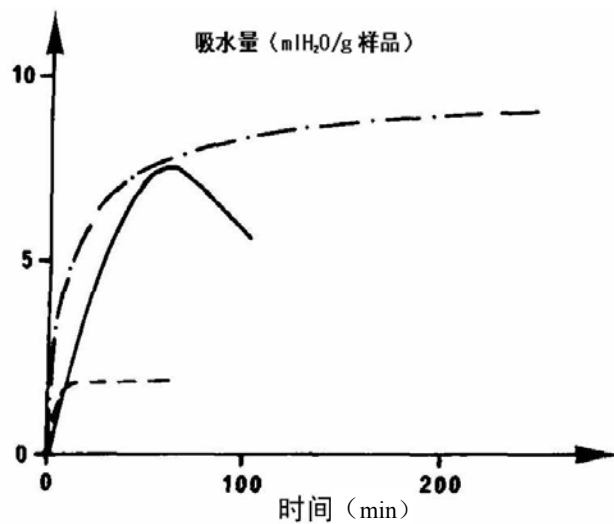


图 5-22 某些蛋白质的水吸收作用与时间的函数关系

- 酪氨酸钠
- · · · · 大豆蛋白质离析物
- 乳清蛋白质浓缩物

此外，还可以根据经验公式计算蛋白质的水合能力（是指在相对湿度为90%~95%的环境中，干燥蛋白质粉与水蒸气达到平衡时，每g蛋白质所结合水的g数）。表 5-17 指出了蛋白质分子中各种氨基酸的水合能力，带电基团的氨基酸残

基约为 6molH₂O/mol残基，不带电荷的的极性残基大约是 2molH₂O/mol残基，非极性残基结合水的能力最低约为 1molH₂O/mol残基。可见，蛋白质的水合能力与其氨基酸组成有一定的相关性。具体经验公式（没有考虑毛细管作用和物理截留）如下：

$$a=f_c+0.4f_p+0.2f_N \quad (5-14)$$

式中： a-水合能力（gH₂O/g蛋白质）

f_c、f_p和f_N分别表示蛋白质分子中带电、极性和非极性残基所占的分数。

表 5-17 氨基酸残基的水合能力^a

氨基酸残基	水合能力/（molH ₂ O/mol残基）
极性	
Asn	2
Gln	2
Pro	3
Ser, The	2
Trp	2
Asp（非离子化）	2
Glu（非离子化）	2
Tyr	3
Arg（非离子化）	3
Lys（非离子化）	4
离子化	
Asp ⁻	6
Glu ⁻	7
Tyr ⁻	7
Arg ⁺	3
His ⁺	4
Lys ⁺	4
非极性	
Ala	1
Gly	1
Phe	0
Val、Ile、Leu、Met	1

a: 根据核磁共振测定的氨基酸残基结合的非冻结水。

实验测得的单体球蛋白的水合能力与按上述经验公式得到的计算值十分相符，然而对于寡聚蛋白计算值一般高于实验值，这是因为在寡聚蛋白质结构中亚单体-亚单体之间的界面上有部分蛋白质表面被埋藏。而酪蛋白胶束相反，由于它的结构中存在大量的空隙，可以通过毛细管作用和物理截留结合水，因此，实验测得的结合水远大于计算值。

4. 影响水合性质的环境因素

蛋白质浓度、pH、温度、时间、离子强度、盐的种类和体系中的其他成分等因素都影响蛋白质的构象，影响蛋白质-蛋白质和蛋白质-水之间的相互作用，这些相互关系决定着蛋白质的大多数功能性质。

蛋白质的总吸水率随蛋白质浓度的增加而增加。

pH 值的变化影响蛋白质分子的解离和净电荷量，因而可改变蛋白质分子间的相互吸引力和排斥力，及其与水缔合的能力。在等电点 pH 时，蛋白质-蛋白质相互作用最强，蛋白质的水合作用的溶胀最小。例如，宰后僵直前的生牛肉（或牛肉匀浆）pH 从 6.5 下降至接近 5.0（等电点），其持水容量显著减少（图 5-23），并导致肉的汁液减少和嫩度降低。低于或高于蛋白质的等电点 pH 时，由于净电荷和排斥力的增加导致蛋白质溶胀并结合更多的水。在 pH9~10 时，许多蛋白质结合的水量均大于其他任何 pH 值的情况，这是由于疏水基和酪氨酸残基离子化的结果，当 pH>10 时赖氨酸残基的 ϵ -氨基上的正电荷丢失，从而使蛋白质结合水的能力下降。

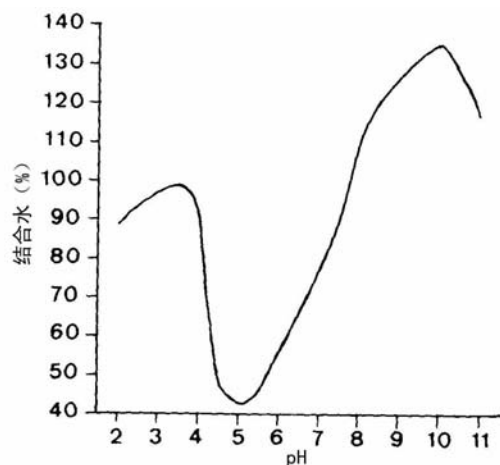


图 5-23 pH 对牛肌肉持水容量的影响

蛋白质结合水的能力一般随温度升高而降低，这是因为降低了氢键作用和离子基团结合水的能力，使蛋白质结合水的能力下降。蛋白质加热时发生变性和聚集，后者可以减少蛋白质的表面面积和极性氨基酸对水结合的有效性，因此，凡是变性后聚集的蛋白质结合水的能力因蛋白质之间相互作用而下降。另一方面，结合很紧密的蛋白质在加热时，发生解离和伸展，原来被遮掩的肽键和极性侧链暴露在表面，从而提高了极性侧链结合水的能力，一般变性蛋白质结合水的能力比天然蛋白质高约 1/10。例如乳清蛋白加热时可产生不可逆胶凝，如果将凝胶干燥，可增加不溶性蛋白质网络内的毛细管作用，因而使蛋白质的吸水能力显著增强。此外，干蛋白颗粒的大小、表面空隙和内空隙也同样影响吸水速率和吸水

程度。必须指出，大多数蛋白质变性后在水中的溶解度降低。

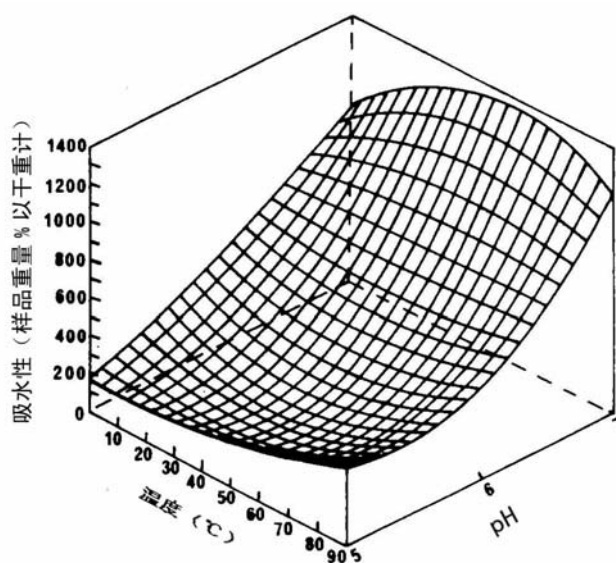


图 5-24 醇溶谷蛋白 D-大豆离析物表面吸水量与温度和 pH 变化的关系

图 5-24 表示 pH、温度同时对大豆蛋白质离析物的吸水量的影响。

离子的种类和浓度对蛋白质的吸水性、溶胀和溶解度也有很大影响。盐类和氨基酸侧链基团通常同水发生竞争性结合。在低盐浓度 ($<0.2\text{mol/L}$) 时，蛋白质的水合作用增强，这是由于盐离子与蛋白质分子的带电基团发生微弱结合的原因，但是这样低的浓度不会对蛋白质带电基团的水合壳层带来影响。实质上增加的结合水量是来自与蛋白质结合离子的缔合水。高盐浓度时，水和盐之间的相互作用超过水和蛋白质之间的相互作用，因而可引起蛋白质“脱水。”

5. 水合作用和其他功能性之间的关系

吸水性和粘度之间往往是关联的，但并不总是正相关，因为蛋白质的溶解度和吸水性之间的关系并不总是一致的，同时，pH 和温度的变化对于蛋白质的吸水性和蛋白质溶液的粘度的影响，随蛋白质种类不同而有所不同。

蛋白质成分吸收和保持水的能力在各种食品的质地性能中起着主要的作用，特别是碎肉和焙烤过的面团，不溶解的蛋白质吸水可导致溶胀和产生体积、粘度和粘合等特性。蛋白质的其他功能性（例如乳化作用或胶凝作用），也可使食品具有所需要的性质。蛋白质的持水能力在食品加工和保藏过程中比水合能力更为重要，所保留的水包括结合水、流体动力学水和物理截留水。其中物理截留水对持水能力的贡献大于结合水与流体动力学水。研究表明，蛋白质的持水能力是与水合能力呈正相关。

6. 溶胀

不溶性蛋白质的溶胀 (Swelling) 相当于可溶性蛋白质的水合作用，也就是

水嵌入在肽链残基之间，增加了蛋白质的体积，同时，使蛋白质相关的物理性质发生变化。例如，肌原纤维的二聚体浸泡在 1.0mol/L 的 NaCl 溶液中，体积比原有状态增加 2.5 倍，体积的增加值相当于 6 个折叠所占有的体积。蛋白质溶胀时所需要的水量通常是干重蛋白质的数倍。

二、溶解性

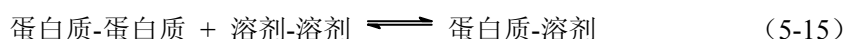
1. 概述

蛋白质的许多功能特性都与蛋白质的溶解度有关，特别是增稠、起泡、乳化和胶凝作用。目前不溶性蛋白质在食品中的应用非常有限。

溶解度特性数据不但对于确定天然资源中蛋白质分离提纯的最适条件很有用，而且也为蛋白质的应用可能性提供了一项重要指标。因为不溶性程度，是评价蛋白质变性和聚集作用最实用的标准，蛋白质在处于最初变性和部分聚集状态时，常常会损害胶凝和乳化作用及形成泡沫的能力。此外，溶解度也是评价蛋白质饮料的一个主要特性。

蛋白质在中性或等电点 pH 值时的溶解性通常是在制备和加工一种蛋白质过程中必须首先测定的功能性质。这类试验的目的是测定氮溶解指数（NSI）和找出溶解度同 pH、离子强度或热处理的关系。

蛋白质的溶解度是许多参数的函数。从热力学上讲，蛋白质溶解是一个较慢的过程，可以用蛋白质-蛋白质和蛋白质-溶剂相互作用的热力学平衡方程式表示。



2. 影响蛋白质溶解性的因素

蛋白质的溶解度除与蛋白质的氨基酸组成和蛋白质的结构有关外，溶解度大小随 pH、离子强度、温度和蛋白质浓度不同而改变。下面分别讨论影响蛋白质溶解度的各种因素。

(1) 氨基酸组成与疏水性

蛋白质中氨基酸的疏水性和离子性是影响蛋白质溶解性的主要因素。疏水相互作用增强了蛋白质与蛋白质的相互作用，使蛋白质在水中的溶解度降低。离子相互作用则有利于蛋白质-水相互作用，可使蛋白质分散在水中，从而增加了蛋白质在水中的溶解度。离子化残基使溶液中的蛋白质分子间产生两种排斥力，一种是当溶液的 pH 值高于或低于等电点时，由于蛋白质带有净正电荷或净负电荷而在蛋白质分子间产生静电排斥力；另一种是离子基团周围的水合壳层之间的排斥力。

Bigelow认为，蛋白质的溶解度与氨基酸残基的平均疏水性（ $\Delta G_0 = \sum \Delta G_0'$

\bar{n}) 和电荷频率 $[\sigma = (n^+ + n^-)/n]$ 有关, 平均疏水性愈小和电荷频率愈大, 蛋白质的溶解度愈大。尽管这个经验关系对于大多数蛋白质是正确的, 然而并非是绝对的。因为Bigelow没有考虑到蛋白质表面的亲水性和疏水性与其周围的相关性, 实际上表面的亲水性和疏水性比平均疏水性和电荷频率对蛋白质溶解度的影响更大。更确切地说, 蛋白质表面的疏水小区域的数目愈小, 蛋白质的溶解度愈大。在等电点时, 如果一种蛋白质的疏水基团因充分暴露, 它将通过疏水相互作用降低静电排斥力, 导致产生沉淀。相反, 当疏水相互作用很弱时, 由于水合作用和空间排斥作用使蛋白质仍然保持溶解状态。

(2) pH 的影响

蛋白质所带电荷的种类和大小与溶液的 pH 值密切相关, 当溶液的 pH 值高于等电点时, 蛋白质带负电荷, 低于等电点则带正电荷。带电荷的蛋白质分子比不带电荷的分子溶解度大, 因为水分子与电荷产生相互作用引起增溶效果, 另外, 带同种电荷的蛋白质链易于互相排斥、解离或展开。以蛋白质溶解度对 pH 作图, 得到如图 5-25 所示的 V 形或 U 形曲线。从图中可以看出, 溶解度最小的 pH 值与 pI 值完全一致, 这种特性可用于许多蛋白质的溶解, 特别是种籽蛋白(大豆, 向日葵等等)。在碱性 pH 介质中, 蛋白质的提取率和溶解度比在酸性 pH 介质中大; 当 $pH > pI$ 时, 带负电荷的残基数(天冬氨酸和谷氨酸)比 $pH < pI$ 时带正电荷的残基数多(例如赖氨酸)。增加蛋白质的净电荷可提高蛋白质的溶解度和提取率, 例如, 赖氨酸残基琥珀酰化或马来酰化以后, 变成可解离羧基的载体, 或者使蛋白质与具有疏水和可解离区的双极性分子(十二烷基硫酸钠)发生反应, 氨基酸的疏水残基通过这些化合物可变成负电荷的载体。

pH 值与 pI 值相差不大时, 蛋白质分子与水分子之间的相互作用最少, 所带净电荷也非常小, 以致多肽链相互靠近, 甚至形成聚集体, 引起蛋白质沉淀, 当聚集体的堆积密度(bulk density)与溶剂密度相差很大, 以及聚集体的直径很大时, 则沉淀速率加快。

大多数蛋白质是酸性蛋白, 因为天冬氨酸和谷氨酸残基的总和大于赖氨酸、精氨酸和组氨酸残基的总和。因此, 它们在 pH4~5(等电点)时的溶解度最低, 而在碱性 pH(一般 pH 8~9)时的溶解度最大。然而, 另外一些食品蛋白, 如像 β -乳球蛋白(pI5.2)和牛血清清蛋白(pI5.3)在它们的等电点 pH 时具有高的溶解度。因为在这些蛋白质表面, 亲水氨基酸残基的数量远高于非极性残基, 即使在等电点(电中性)时它们也仍然带有电荷, 只不过分子表面的净电荷为零。如果这些带电残基产生的亲水性水合作用的排斥力, 大于蛋白质-蛋白质疏水相互作用, 那么蛋白质在 pI 仍然是可溶的。

利用大多数蛋白质在 pH8~9 的高溶解性, 提取植物蛋白。例如将大豆粉置

于 pH8~9 的碱性水溶液中浸提，然后利用等电点沉淀法将 pH 调至 4.5~4.8，再从提取液中回收大豆蛋白。

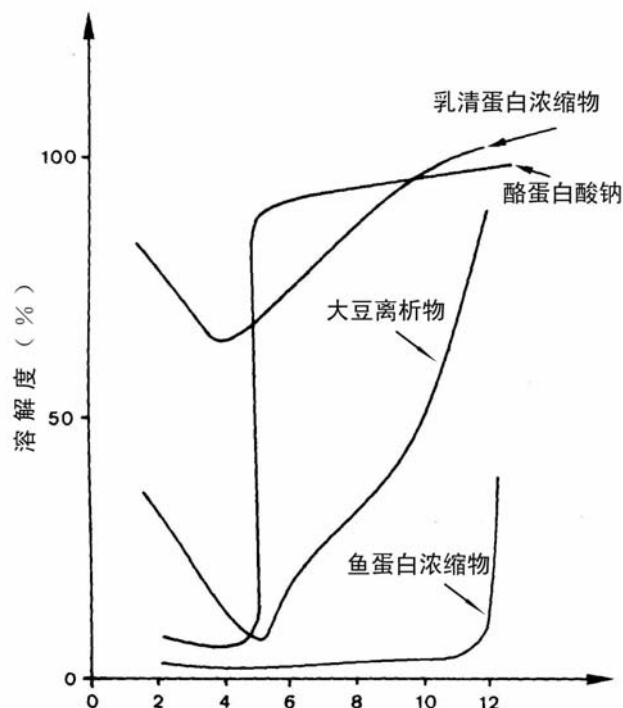


图 5-25 蛋白质溶解度与 pH (0.2mol/LNaCl 溶液) 的函数关系

(3) 离子强度 μ 的影响

$$\mu = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2 \quad (5-16)$$

式中 C_i 表示离子浓度， Z 表示离子价数。当中性盐的离子强度较低 (<0.5) 时，可增加蛋白质的溶解度 (图 5-26)，这种效应称为盐溶效应 (Salting in effect)。离子与蛋白质表面的电荷作用，产生了电荷屏蔽效应，并从两方面影响蛋白质的溶解度，这与蛋白质的表面特性有关。如果蛋白质含有高比例的非极性区域，那么电荷屏蔽效应将会降低蛋白质的溶解度，反之，溶解度则提高。在上述摩尔浓度范围内，蛋白质溶解度的对数是 $\sqrt{\mu}$ 的函数，各种离子的盐溶能力是不相同的。

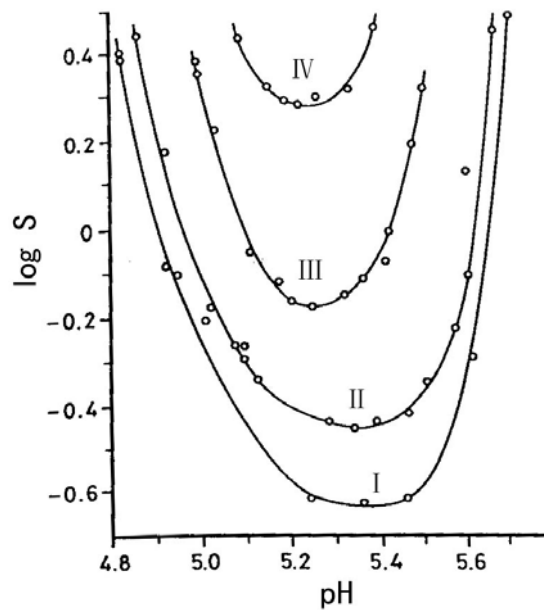


图 5-26 pH 和离子强度对 β -乳球蛋白溶解度的影响
离子强度 I 0.001, II 0.005, III 0.01

若中性盐的离子强度大于 1.0 时, 盐对蛋白质溶解度的影响具有特异的离子效应, 硫酸盐和氟化物将降低蛋白质的溶解度, 并产生沉淀 (盐析), 这种盐析效应 (Salting out effect) 是由于蛋白质和盐离子之间为各自溶剂化争夺水分子的结果。在高盐浓度时, 由于大部分水分子与盐牢固的结合, 使之不能满足蛋白质溶剂化所需水分子的要求, 因此, 蛋白质-蛋白质的相互作用比蛋白质-水的相互作用更强, 这样便导致蛋白质分子聚集, 继而产生沉淀。而硫氰酸盐和过氯酸盐则提高蛋白质的溶解度 (盐溶)。离子强度对蛋白质溶解度的影响可表示为:

$$\text{在低盐浓度时: } \log S = K_s \cdot \mu \quad (5-17)$$

$$\text{在高盐浓度时: } \log S = -K_s \mu + \log S_0 \quad (5-18)$$

$$\text{或 } \log(S/S_0) = \beta - K C_s$$

式中 S_0 是离子强度为零时的溶解度, μ 为离子强度, C_s 为盐的摩尔浓度, β 为常数, K_s 为盐析常数, 此常数不仅取决于蛋白质种类, 而且更依赖于盐的性质和浓度, 不同种类的盐产生的盐析作用随其水合能和空间位阻增大而增加。对盐析类盐 K 是正值, 而对盐溶类盐 K 是负值。

在相同 μ 值时, 各种离子对蛋白质溶解度的影响遵从感胶离子序 (Hofmeister 系列), 阴离子提高蛋白质的溶解度的排列顺序如下: $\text{SO}_4^{2-} < \text{F}^- < \text{CH}_3\text{COO}^- < \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^- < \text{ClO}_4^- < \text{SCN}^-$, 阳离子降低蛋白质溶解度的顺序: $\text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$ 。离子的性能类似于盐对蛋白质热变性时温度的影响, 多价阴离子对蛋白质溶解度的影响比一价阴离子更显著, 而二价阳离子比一价阳离子

的影响较小。

(3) 温度的影响

温度的影响(在恒定 pH 和离子强度时)通常是蛋白质的溶解度在 0℃ 到 40~50℃ 之间随温度上升而增加。然而对高疏水性蛋白质, 例如 β -酪蛋白和某些谷蛋白, 它们的溶解度则与温度呈负相关, 超过 40~50℃ 时, 分子运动足以使稳定的二级和三级结构的键断裂, 这种变性往往伴随发生聚集(见第三节), 在此情况下, 变性蛋白质比天然蛋白质的溶解度小, 可是, 已聚集的蛋白质对水的结合能力不会有大的改变, 在时甚至还增大(主要由于生成的凝块或凝胶的毛细管对水的吸收作用)。

大多数蛋白质在加热时, 溶解度明显地不可逆降低。有时为了使微生物钝化, 去除异味、水分和其他成分, 加热处理又是不可缺少的。因此, 即使是较温和的加工过程, 例如, 抽提和纯化蛋白质也会产生一定程度的变性, 市售大豆粉, 浓缩物和离析物的 NSI 值范围从 10~90%。

(4) 有机溶剂的影响

某些有机溶剂, 如乙醇或丙酮, 使水的介电常数降低, 因此, 提高了蛋白质分子内和分子间的静电作用力(排斥和吸引力)。分子内的静电排斥作用使蛋白质分子伸长, 有利于肽链基团的暴露和在分子之间形成氢键, 并使分子之间的异种电荷产生静电吸引。这些分子间的极性相互作用, 促使了蛋白质在有机溶剂中聚集沉淀或在水介质中溶解度降低。同时由于这些溶剂争夺水分子, 更进一步降低了蛋白质的溶解度。甚至在低浓度有机溶剂的水介质中, 暴露残基间的疏水相互作用对于降低蛋白质溶解度也是有贡献的。

前面已经提到, 蛋白质的结构状态与其溶解度之间关系密切, 因此, 在蛋白质(或酶)的提取、分离与纯化过程中常用溶解度作为衡量蛋白质(或酶)变性程度的指标。当然, 差示量热扫描(DSC)法是目前研究蛋白质变性过程中热力学函数变化的最有效方法。

3. 蛋白质的起始溶解度

一般认为蛋白质具有大的起始溶解度是产生其他功能性的先决条件。但这种假设不一定总是正确的, 已经发现蛋白质配料的预先变性和不溶解性, 有时反而可以提高蛋白质对水的吸收。另外, 蛋白质变性和部分不溶, 有时还可保持胶凝能力, 这与乳状液、泡沫和凝胶形成过程中蛋白质出现的不同程度伸展、聚集和不溶解等现象是一致的。

另一方面, 要使乳清蛋白和某些其他蛋白质在浮浊液、泡沫和凝胶形成中充分发挥作用, 则必须具有适度大的起始溶解度。另外, 可溶性酪蛋白酸盐比等电点时的酪蛋白(不易溶解的)具有更好的增稠性和乳化性。起始溶解度大的主要

优点是能使蛋白质分子或颗粒迅速分散，这样就可以得到具有均匀宏观结构和高度分散的体系。起始溶解度大，还有利于蛋白质向空气-水和油-水界面扩散，从而提高表面活性。

4. 按蛋白质的溶解度分类

Osborne 根据蛋白质的溶解度，将蛋白质分为四类：清蛋白（例如血清清蛋白、卵清蛋白和 α -乳清蛋白）可溶于 pH6.6 的水中；球蛋白（例如 β -乳球蛋白、谷蛋白）能溶解于 pH7 的稀盐溶液；醇溶谷蛋白（玉米醇溶蛋白和麦醇溶蛋白）可溶解于 70%乙醇中。谷蛋白（例如小麦麦谷蛋白）在上述溶剂中均不溶解，但可溶于酸（pH2）或碱（pH12）溶液。其中醇溶蛋白和谷蛋白为高疏水性蛋白。

三、蛋白质的界面性质

许多天然的和加工的食品都是泡沫或乳化体系的产品，它们都需要利用到蛋白质的起泡性、泡沫稳定性和乳化性等功能，例如焙烤食品、甜点心、啤酒、牛奶、冰淇淋、黄油和肉馅等，这些分散体系，除非有两亲物质存在，否则是不稳定的。蛋白质是两亲分子，它能自发地迁移到空气-水界面或油-水界面。研究证明，蛋白质在界面上的自由能，相对于在体相水中是较低的，因此，体相水中的蛋白质能自发地向界面迁移，当达到平衡后，蛋白质在界面上的浓度总是高于体相水。然而蛋白质作为一类天然大分子化合物，不同于低分子量的表面活性剂，能够在界面上形成高粘弹性薄膜，并产生物理垒以抵抗外界机械作用的冲击，其界面体系比由低分子质量的表面活性剂形成的界面更稳定。正因为如此，蛋白质的这种优良特性在食品加工中被广泛得到应用。

蛋白质的表面活性不仅与蛋白质中氨基酸的组成、结构、立体构象、分子中极性和非极性残基的分布与比例，二硫键的数目与交联，以及分子的大小、形状和柔顺性等内在因素有关，而且与外界因素，甚至加工操作有关。凡是能影响蛋白质构象和亲水性与疏水性的环境因素，诸如 pH、温度、离子强度和盐的种类、界面的组成、蛋白质浓度、糖类和低分子量表面活性剂，能量的输入，甚至形成界面加工的容器和操作顺序等，都将影响蛋白质的表面活性。尽管所有的蛋白质都具有两亲性，但是它们的表面活性有很大差别。如果仅仅是以蛋白质疏水残基与亲水残基数之比，解释上述现象是非常不科学的，而且有许多与实际相反。例如，许多植物蛋白（如大豆蛋白）的疏水性氨基酸残基含量超过 40%，但是它们的表面活性却比疏水残基数少（30%）的清蛋白（卵清蛋白和牛血清清蛋白）差。实际上卵清蛋白和血清蛋白是一种较好的起泡剂和乳化剂。再者，大多数蛋白质的平均疏水性是在一个较窄的范围，为此，不可能造成各种蛋白质表面活性的显著差别。因此，在讨论蛋白质的表面活性时，必须根据上述影响因素综合考虑。

蛋白质作为理想的表面活性剂必须具有 3 个属性：①快速吸附到界面的能

力；②在达到界面后迅速伸展和取向；③一旦达到界面，即与邻近分子相互作用形成具有强内聚力和粘弹性的膜，能耐受热和机械的作用。

蛋白质在搅打和均质时形成泡沫和乳状液的关键在于蛋白质必须自发和快速的吸附在新形成的界面（空气-水或油-水）上。这种能力取决于界面上疏水和亲水小区的分布模式，以及蛋白质的吸附自由能。如果蛋白质表面是非常亲水的，而且又不存在可辩别的疏水小区，那么，蛋白质的吸附自由能为正，也就是说蛋白质在水相中的自由能低于界面或非极性相，吸附则不能发生。随着蛋白质表面疏水小区的增多，蛋白质自发吸附到界面的可能性增加（图 5-27）。只有当蛋白质表面的疏水小区数目达到足以提供疏水-界面相互作用需要的能量，才能使蛋白质在界面牢固地吸附，并形成隔离的疏水小区。只有这样方可促进蛋白质吸附，并形成稳定的泡沫或乳状液。

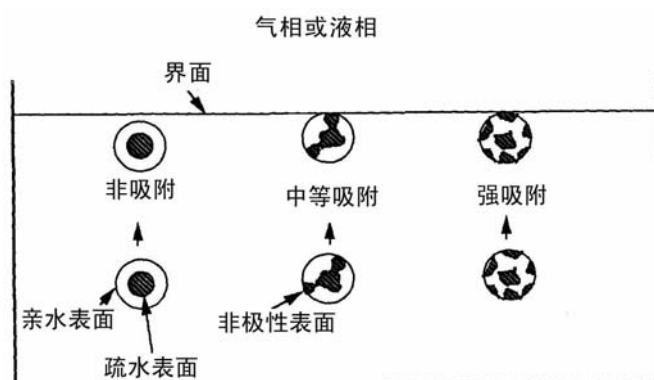


图 5-27 表面疏水小区对蛋白质在空气-水界面吸附几率的影响示意图

蛋白质因为具有庞大的体积和折叠性，分子是僵硬的，在界面上吸附时，疏水残基和亲水残基具有固定的分布模式，因而蛋白质在界面吸附必须取向，以利于泡沫和乳状液的形成和稳定。通常蛋白质分子的大部分仍然保留在体相中，仅有一小部分固定在界面，然而低分子质量的表面活性剂，例如卵磷脂和单酰甘油酯，由于它们的亲水和疏水部分在末端，且各占一半，这样的构象就迫使它们在界面吸附，而不存在取向。蛋白质束缚在界面上的那小部分的牢固程度，依赖于固定在界面上肽段的数目和这些肽段与界面的能量。只有肽段之间和肽段与界面的相互作用的自由能变化的总和为负值，而且其绝对值远大于蛋白质分子热运动的动能时，蛋白质才能保留在界面上。蛋白质在界面的吸附和取向与蛋白质分子构象的柔顺性有关，如像酪蛋白这样高度柔顺性分子，一旦在界面吸附时，可迅速发生构象转变，以适合界面性质的需要，因此，有较多的肽段结合到界面。相反，刚性球状蛋白质（如溶菌酶和大豆蛋白）在界面上不能广泛的发生构象转变。

在界面上柔顺性多肽链具有三种典型的构型（图 5-28）：列车型、环型和尾

型。它们可能以 1 种或多种构型同时在界面上存在。这与多肽链段的溶液行为和蛋白质的构象有关，一般列车型是多肽链段直接与界面接触形成的；多肽链段悬浮在水相时呈环形；肽链的 N-端和 C-端位于水相时呈为尾型。其中列车型在界面上出现的几率较多，且与界面强烈结合，并呈现出较低的表面张力。

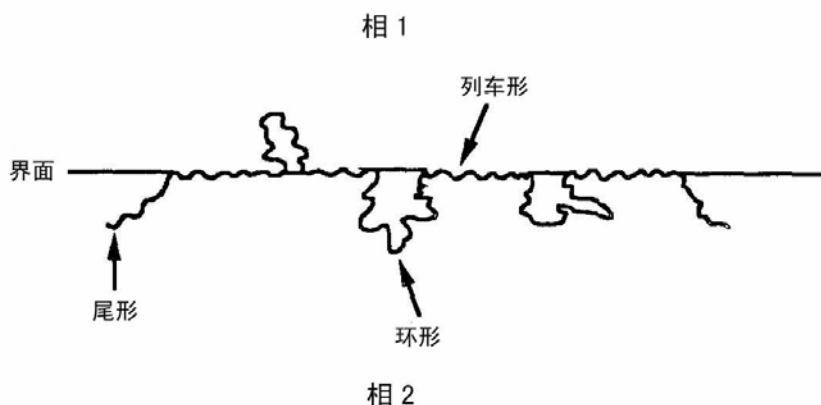


图 5—28 界面上柔顺性多肽链的各种构型

蛋白质在界面的稳定作用决定于它在界面形成膜的机械强度，而膜的强度又与分子间的相互作用、静电吸引、氢键和疏水相互作用有关。二硫键的形成可以增加蛋白质膜的粘弹性。当界面膜中蛋白质的浓度达到约 20%~25% (W/V) 时，蛋白质则以凝胶状态存在。各种非共价键相互作用达到所需平衡时，才能使凝胶状膜稳定和具粘弹性。倘若疏水相互作用太强，则蛋白质会在表面絮凝、聚结甚至沉淀。当静电排斥力大大超过吸引力时，不易形成厚的内聚膜。

蛋白质形成泡沫和乳状液的机制十分类似，但从能量观点考虑，这些界面相互作用是有差别的，而且它们对蛋白质结构的要求不一样。换言之，一种好的蛋白质乳化剂，但不一定是一种好的起泡剂。

蛋白质的界面形成非常复杂，影响因素较多，但由于对蛋白质的界面性质已经有了较清楚地了解，因此，下面分别定性讨论食品蛋白质的乳化性和起泡性。

1. 乳化性质

1) 蛋白质在食品乳胶体中的稳定作用

许多食品属于乳胶体（牛奶、乳脂、冰淇淋、豆奶、黄油、干酪、蛋黄酱和肉馅），蛋白质成分在稳定这些胶态体系中通常起着重要的作用。天然乳胶体靠脂肪球“这种“膜”由三酰甘油、磷脂、不溶性脂蛋白和可溶性蛋白的连续吸附层所构成，鲜乳中可溶性蛋白还包括免疫球蛋白。牛乳均质可以提高乳胶体的稳定性，因为均质能够使脂肪球变小以及新生成的酪蛋白亚胶束取代免疫球蛋白，并在脂肪球上吸附。

乳胶体的形成原理、破坏历程（分层、絮凝、聚结）以及稳定性因素在第四

章中已经论述。蛋白质吸附在油滴和连续水相的界面，并具有能阻止油滴聚结的物理和流变学性质（稠度、粘度、柔顺性和刚性）。氨基酸侧链也能发生解离，解离度与 pH 值有关，解离可产生有利于乳胶体稳定性的静电排斥力。

蛋白质一般对水/油（W/O）型乳胶液的稳定性较差。这可能是因为大多数蛋白质的强亲水性使大量被吸附的蛋白质分子位于界面的水相一侧。

2). 蛋白质乳化性质的测定方法

评价乳化特性的方法有油滴大小和分布、乳化活力、乳化能力和乳化稳定性。

鉴别食品乳胶体的性质必须测定液滴的大小和分布（总界面面积），可以运用显微镜、光散射、激光扫描共聚焦、离心沉降或考尔计数器（Coulter counter）装置（液滴通过已知大小的小孔）测定。

测量界面吸附的蛋白质数量（表面浓度）需预先分离油滴（O/W 乳状液），例如反复离心和洗涤，使松散结合的蛋白质除去。每毫升含几毫克蛋白质的乳状液相当于能使每平方米界面面积吸附几毫克蛋白质。当分散相体积分数 ϕ 大和液滴很小时，需要更多的蛋白质才能形成具有稳定剂作用的吸附蛋白质膜。

下面介绍广泛用于比较蛋白质乳化性质的四种试验方法。

(1) 乳化活力指标 (EAI)

首先采用光学显微镜，电子显微镜、光散射法或 Coulter 计数器，测定乳状液的平均液滴大小，并按下式计算总界面面积 A。

$$A = \frac{3\phi}{R} \quad (5-19)$$

式中 ϕ 是分散相（油）的体积分数，R 为乳状液粒子的平均半径。

然后根据蛋白质的质量（m）和界面总面积 A 可计算出乳化活力指标（Emulsifying Activity Index, EAI），即单位质量蛋白质所产生的界面面积

$$EAI = \frac{3\phi}{Rm} \quad (5-20)$$

浊度法也是一种测定 EAI 的简便、实用的方法，根据乳状液的浊度（透光率 T）与界面面积的关系，在测得透光率（浊度）后，再计算出 EAI。

$$T = \frac{2.303A}{L} \quad (5-21)$$

式中 A，吸光度；L，光程

根据 Mie 的光散射理论可知，乳状液的界面面积为浊度的 2 倍。假设 ϕ 是油的体积分数，C 是每个单位水相体积中蛋白质的量，则可根据下式计算 EAI

$$EAI = \frac{2T}{(1-\phi)C} \quad (5-22)$$

式中 $(1-\phi)C$ 代表单位体积乳状液中蛋白质的总量。

(2) 蛋白质负载

蛋白质负载是指一定温度下每平方米界面面积所吸附的蛋白质质量 (mg)。以蛋白质稳定的乳状液, 其稳定性与乳状液油-水界面吸附的蛋白质质量有关。为了测定吸附的蛋白质质量, 在一定温度下将乳状液离心之后, 分离除去液相乳化层, 然后用水反复洗涤和离心, 洗去疏松的吸附蛋白, 被吸附到乳化粒子上的量等于最初乳状液中的总蛋白质量与乳化层中吸附蛋白质量之差。如果已知乳化粒子的总界面面积, 即可计算出每平方米界面面积吸附的蛋白质量 (蛋白质负载)。大多数蛋白质的负载一般在 $1\sim 3\text{mg}/\text{m}^2$ 。当蛋白质的质量一定时, 增加油相体积会降低蛋白质的总量, 对于高脂肪含量的乳状液和小油滴, 则需要更多蛋白质适当覆盖在界面上, 才能使乳状液稳定。

(3) 乳化容量 (emulsion capacity, EC)

乳化容量是指乳状液发生相转变之前, 每克蛋白质能够乳化油的体积 (mL)。在一定温度下, 蛋白质水溶液 (或盐溶液) 或分散液在搅拌下以恒定速率不断地加入油或熔化脂肪, 当粘度陡然降低或颜色变化 (特别是含油溶性染料) 或者电阻增大时, 即可察觉出相转变, 特别是当 ϕ 超过 0.74 时相转变推动力增大, 在没有蛋白质存在时相转变 ϕ (ϕ_i) 值接近 0.5, 有蛋白质存在时相转变 ϕ 值一般在 0.65~0.85 之间。在相转变时不可能立即形成连续的油相, 而首先是形成 W/O/W 双乳状液。乳化容量用每克蛋白质表示, EC 值将随着蛋白质浓度增大而降低, 而 ϕ_i 值开始急剧上升, 然后下降达到平稳。

(4) 乳状液稳定性 (emulsion stability, ES) 通常表示为:

$$ES = \frac{\text{最终乳浊液体积} \times 100}{\text{最初乳浊液体积}} \quad (5-23)$$

预先加热 (或不加热) 的乳状液, 经低速离心 (或放置) 几小时后, 乳状液破坏出现水和油层分离现象。当油滴向上移动形成密集的填充层时, 乳状液常常出现分层 (不聚结), 同时水相向下移动在底部形成水层, 用这个实验可以测定泄水速率, 但与被实验蛋白质的乳化性质无关。许多食品乳状液因为分层而失去稳定性。发现 O/W 型乳状液的 ϕ 值在 0.77 和 0.88 之间稳定性最好, ϕ 值较低发生泄水, 而 ϕ 值较大则易发生油层聚结和分离。

关于评价蛋白质的乳化性质, 目前尚无标准的统一方法, 只能是相对比较。

3) 影响乳化作用的因素

许多因素影响乳状液的特性和乳化结果, 例如仪器设备的类型、输入能量的强度、加油速率、油相体积、温度、pH、离子强度、糖类和低分子量表面活性剂与氧接触、油的种类 (熔点)、可溶性蛋白质浓度和蛋白质的乳化性质等。

蛋白质溶解度在 25%~80% 范围和乳化容量或乳状液稳定性之间通常存在

正相关。不溶性蛋白质对乳化作用的贡献很小，然而也不需要能完全溶解的蛋白质，因此蛋白质在出现表面性质之前必须溶解，并向界面扩散。在肉馅胶体中（pH4~8）有氯化钠（0.5~1mol/L）存在可提高蛋白质的乳化容量，很可能是因为肌原纤维蛋白质发生盐溶，所以溶解度和伸展性两者都增大。热聚集形成的不溶性大豆蛋白质比可溶性的乳化效率低，但不溶性蛋白质颗粒常常能够在已经形成的乳状液中起到稳定作用。

pH 影响蛋白质的乳化性质。某些蛋白质在等电点 pH 值时能微溶，因而降低乳化能力，不能稳定油滴的表面电荷（排斥）。另一方面，在等电点或一定的离子强度时，由于蛋白质以高粘弹性紧密结构形式存在，可防止蛋白质伸展或在界面吸附（不利于乳状液的形成），但是可以稳定已吸附的蛋白质膜，阻止表面形变或解吸，后者有利于乳状液维持稳定。因为界面蛋白质膜的形变或解吸均发生在乳状液失去稳定作用之前，同时在蛋白质等电点时脂类和蛋白质的疏水相互作用加强。有些蛋白质在等电点时具有最令人满意的乳化性质（明胶、血清蛋白和卵清蛋白），而有一些蛋白质则相反，在非等电点 pH 值时乳化作用更好（大豆蛋白、花生蛋白、酪蛋白、乳清蛋白、牛血清蛋白和肌原蛋白）。此外，蛋白质的表观特性在某种程度上还决定于实验条件。

花生蛋白的乳化容量与 pH 和氯化钠浓度的关系见图 5-29 在这种情况下，表观乳化容量和蛋白质溶解度之间存在着良好的正相关。

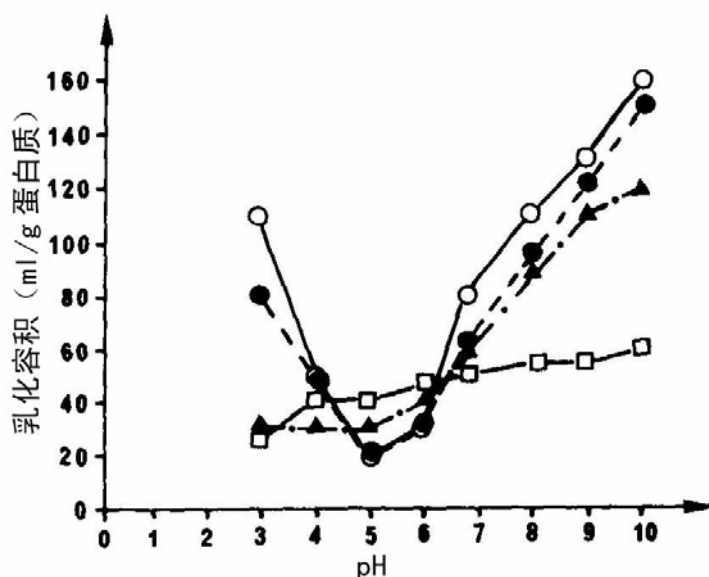


图 5-29 pH 和氯化钠浓度对花生蛋白离析物乳化容量的影响

- 0.1mol/L NaCl;
- 0.2mol/L NaCl;
- ▲——0.5mol/L NaCl;
- ——1.0mol /L NaCl

加热通常可降低被界面吸附的蛋白质膜的粘度和刚性，结果使乳状液稳定性降低。 β -乳球蛋白热处理时，可使蛋白质分子内的巯基(-SH)暴露，并与相邻分子间-SH形成二硫交联键，在界面上发生有限聚集。可是高度水合的界面蛋白质膜的胶凝作用可提高表面的粘度和刚性，从而使乳状液保持稳定。因此，肌原纤维蛋白的胶凝作用有助于肉类胶体例如香肠的热稳定性，其结果是提高这类食品对水和脂肪的保护力和粘结性。

添加小分子表面活性剂，一般对依靠蛋白质稳定的乳状液的稳定性不利，因为它们会降低蛋白质膜的硬性，使蛋白质保留在界面的能力减弱。

由于某些蛋白质从水相向界面缓慢扩散和被油滴吸附，使水相中蛋白质的浓度降低，因此蛋白质起始的浓度必须较高才能形成具有适宜厚度和流变学性质的蛋白质膜。实际上，如果用 0.5%~5%蛋白质浓度 (W/W, 乳状液)，界面蛋白质浓度可达 0.5~20mg/m²。

4) 蛋白质乳状液的表面特性

可溶性蛋白质乳化作用最重要的特性是其向油/水界面扩散和在界面吸附的能力。一般认为蛋白质的一部分一旦与界面接触，非极性氨基酸残基则朝着非水相，于是体系的自由能降低，蛋白质的其余部分自动在界面上吸附。大多数蛋白质在吸附时广泛伸展，如果吸附面积增大，可以扩展成单分子层 (约 1mg/m²,

10~20^Å厚)。有研究者认为，蛋白质的疏水性愈大，界面的蛋白质浓度也愈大，使界面张力变小，乳状液更稳定。但是，蛋白质的总疏水性（按亲水和疏水氨基酸残基的体积比 P 或平均疏水性 \bar{G}^0 确定）和乳化性质不十分相关。根据疏水亲和色谱、疏水分配或用疏水性试剂测定的结果，增加蛋白质的表面疏水性与降低界面张力和增大乳化作用指数均存在明显的相关性（图 5-30）。然而，研究乳清蛋白质浓缩物对乳状液稳定作用时发现，在碱性pH时 β -乳球蛋白是在油界面上吸附的主要蛋白质，而在酸性pH时，被吸附的是 α -乳清蛋白，在产生吸附作用的pH条件下，这两种蛋白质都不显示表面疏水性和吸附作用之间有相关性。这可能是当韧性蛋白质在与脂类表面接触时能够伸展和扩展，并容易和脂类液滴产生疏水相互作用，因此，形成粘弹性适宜的吸附膜，使乳状液有良好的稳定性（无论是它们具有大的 \bar{G}^0 值还是大的表面疏水性起始值）。

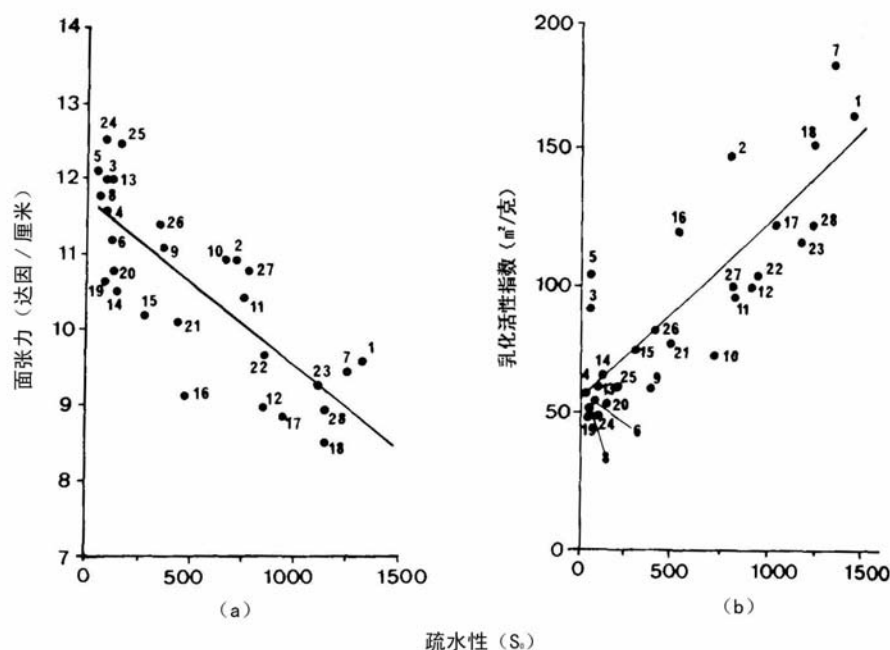


图 5-30 各种蛋白质的表面疏水性与 (a) 油/水界面张力和 (b) 乳化作用指数相互关系，表面疏水性是按单位质量蛋白质结合的疏水荧光探针测定，乳化作用指数是每 g 蛋白质形成的界面表面积。1.牛血清清蛋白；2. β -乳球蛋白；3.胰蛋白质；4.卵清蛋白；5.伴清蛋白；6.溶菌酶；7. κ -酪蛋白；8-12.卵清蛋白于 85^{°C}分别加热 1、2、3、4 或 5min；19-23.每 mol 卵清蛋白分别结合 0.2、0.3、1.7、5.7、或 7.9mol 十二烷基硫酸盐；24-28.为分别结合 0.3、0.9、3.01、4.8 或 8.2mol 亚油酸酯的卵清蛋白（每 mol 蛋白质）

结构稳定和表面疏水性大的球蛋白（例如乳清蛋白、溶菌酶和卵清蛋白）不

是好的乳化剂，除非它们经过不丧失溶解性的预处理后仍然能够伸展，适度热处理似乎能够起到这样的作用。与上面提到的蛋白质相比，酪蛋白酸盐是一种较好的乳化剂，因为它们除了溶解度高外，还具有解离的和伸展的结构（无规卷曲），总疏水性也较大，而且多肽链的高度疏水和高度亲水区隔开。酪蛋白（微胶束）和脱脂奶粉、肌动球蛋白（肉和鱼肉蛋白）、大豆蛋白（特别是大豆离析物）以及血液的血浆和珠蛋白都具有很好的乳化性质（表 5-18）。

表 5-18 各种蛋白质的乳化作用指数值^a

蛋白质	乳化作用指数 (每克供试蛋白质的界面 (m ²) 的稳定性)		蛋白质	乳化作用指数 (每克供试蛋白质的界面 (m ²) 稳定性)	
	pH6.5	pH8.0		pH6.5	pH8.0
	合成 (88%) 酵母蛋白	322		341	大豆蛋白离析物
牛血清清蛋白		197	血红蛋白		75
酪蛋白酸钠	149	166	酵母蛋白	8	59
β -乳球蛋白		153	溶菌酶		50
乳清蛋白粉末	119	142	卵清蛋白		49

a. 蛋白质分散在 0.5% 的磷酸盐缓冲液中，pH6.5，离子强度 0.1，琥珀酰化 (%) 表示酵母蛋白中琥珀酰化的赖氨酸基数

对水-油或水-空气界面吸附的蛋白质的行为已进行过很多研究，但关于不同蛋白质在这些界面的构象以及最初构象和在界面上的构象之间的关系同乳化或起泡性的关系仍不完全了解，产生厚和高度水化且带电荷的吸附蛋白质膜可能对稳定乳状液或泡沫最重要。

5) 蛋白质-脂类相互作用

蛋白质-脂类的相互作用对蛋白质的提取产生不利的影响，特别是从富含脂类的物质（像油料种子或鱼类）中提纯蛋白质，例如油料种子用水或碱性水溶液不可能直接提取蛋白质，因为形成了稳定的蛋白质乳状液而阻碍离心。中性三酰甘油酯通过疏水相互作用与蛋白质结合，所以只能用非极性溶液例如己烷使之除去。可是，磷脂与蛋白质是以极性键更紧密地结合在一起，又需要极性溶剂例如乙醇或丙醇等才能分离。

有时干燥的蛋白质物料吸附一定量的油脂是需宜的，每克大豆浓缩物和离析物分别可结合 70ml 和 170ml 油脂，向日葵蛋白离析物每克结合油脂可达到

400ml, 织构菜籽蛋白每克能结合 150ml 油脂。从而可以看出, 不溶性和疏水性较大的蛋白质结合油脂量最大, 小颗粒低密度蛋白粉比密度大的蛋白粉结合油脂量更多。油脂结合量随着温度上升而减少, 因为这时油脂粘度降低。植物蛋白粉及其浓缩物中的糖类组分对油脂结合无明显影响, 蛋白质对油脂和非极性挥发性化合物的结合存在某些相似性。

氧化的脂类不仅与食品蛋白质相互作用, 而且损害蛋白质的营养价值。

2. 起泡性

1) 食品泡沫的形成和破坏

食品泡沫通常是气泡在连续的液相或含可溶性表面活性剂的半固相中形成的分散体系。种类繁多的泡沫其质地大小不同, 例如蛋白质酥皮、蛋糕、棉花糖和某些其他糖果产品、点心顶端配料、冰淇淋、蛋奶酥、啤酒泡沫、奶油冻和面包等。大多数情况下, 气体是空气或 CO_2 , 连续相是含蛋白质的水溶液或悬浊液。某些食品泡沫是很复杂的胶态体系, 例如冰淇淋中存在分散的和群集的脂肪球(多数是固体)、乳胶体(或悬浊液)、分散的冰晶悬浮体, 多糖凝胶、糖和蛋白质的浓缩溶液以及空气气泡。泡沫中, 薄液层连续相(薄片)使气泡分散, 气-液界面可调节至 $1\text{m}^2/\text{mL}$ 液体, 如乳状液一样, 产生界面同样需要做功。通常用表面活性剂以保持界面, 使之防止气泡聚集, 因为表面活性剂能够降低界面张力, 并且在气泡之间形成有弹性的保护层, 某些蛋白质可通过在气-液界面吸附形成保护膜, 这种情况下, 两个邻近的气泡之间的薄片由被液层隔开的 2 个吸附蛋白质膜所组成。各种泡沫的气泡大小很不相同, 直径从 1 微米到几cm不等, 气泡的大小取决于多种因素, 例如, 液相的表面张力和粘度、输入的能量, 分布均匀的细微气泡可以使食品产生稠性、细腻和松软性, 提高分散性和风味感。

产生泡沫有三种方法: 最简单的一种方法是让鼓泡的气体通过多孔分配器(例如烧结玻璃), 然后通入低浓度(0.01%~2.0%, W/V)蛋白质水溶液中, 最初的气体乳胶体因气泡上升和排出而被破坏, 由于气泡被压缩成多面体而发生畸变, 使泡沫产生一个大的分散相体积(ϕ)(图 5-31)。如果通入大量气体, 液体可完全转变成泡沫, 甚至用稀蛋白质溶液同样也能得到非常大的泡沫体积。一般可膨胀 10 倍(膨胀率为 1000%), 在某些情况下可能达到 100 倍, 对应的 ϕ 值分别为 0.9 和 0.99(假定全部液体都转变成泡沫), 泡沫密度也相应地改变。

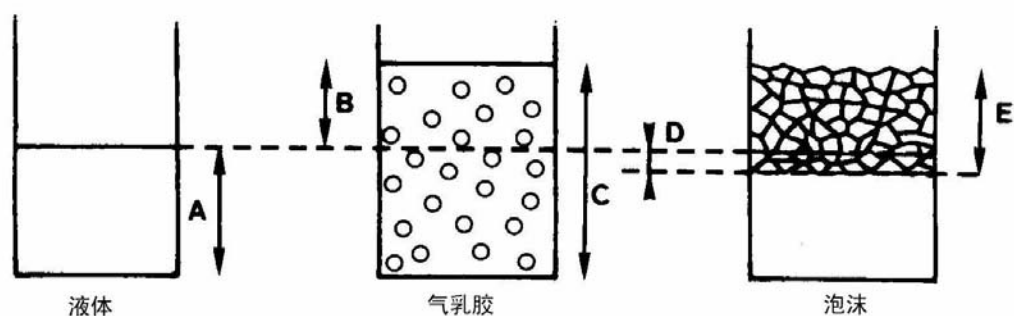


图 5-31 形成泡沫图解。A.液体体积；B.掺入的气体体积；C.分散体的总体积；D.泡沫中的液体体积 (=E-B)；E.泡沫体积。泡沫体积定义为 $100 \times E/A$ ；膨胀量为 $100 \times B/A = 100 \times (C-A) / A$ ，起泡能力为 $100 \times B/D$ ，泡沫相体积为 $100 \times B/E$ 。

第二种起泡方法是在有大量气相存在时搅打（或搅拌）或振摇蛋白质水溶液产生泡沫，搅打是大多数食品充气最常用一种方法，与鼓泡法相比，搅打产生更强的机械应力和剪切作用，使气体分散更均匀。更剧烈的机械应力会影响气泡的聚集和形成，特别是阻碍蛋白质在界面的吸附，导致对蛋白质的需要量增加（1%~40%，W/V）。在搅打时，掺合的空气体积通常出现一最大值（动力学平衡），试样体积通常增加 300%~2000%不等。

第三种产生泡沫的方法是突然解除预先加压溶液的压力，例如在分装气溶胶容器中加工成的搅奶油（搅打奶油）。

乳状液和泡沫之间的主要差别是泡沫中分散相（气体）的体积分散比乳状液中的变化范围更大。因为许多种泡沫都有很大的界面面积，所以它们通常是不稳定的。三种主要失稳（泡沫破坏）历程如下：

（1）薄片液体因重力、压力差和蒸发等原因而出现泄水（或泄漏），气泡的内压力 P 用拉普拉斯（Laplace's）毛细管压力方程表示：

$$P = P_{atm} + \frac{2r}{R} \quad (5-24)$$

式中 P_{atm} 表示大气压力（Pa·S）， r 表示界面张力（N/m）， R 是气泡的曲率半径（m）。

泄漏是在泡沫形成时发生的现象，低密度泡沫中由于气泡倾向于紧密压在一起，从而促使薄片泄漏，界面张力小和直径大的气泡可降低内部压力和泄漏。高度膨胀（ ϕ 值大）有利于泄漏的持续进行。当泡沫形成后泄漏会进一步使 ϕ 值增大和液体薄片的厚度和强度降低。当主体液相粘稠（如加糖时）和吸附的蛋白质膜的表面粘度很大时，泄漏将会减少。相反，蛋糕和面包类的泡沫食品，是在泡沫形成后加热，因而此时会因空气膨胀和粘度下降导致气泡破裂和解体。

(2)气体从小气泡扩散到大气泡的这种歧化作用，是因为气体溶解在水相中所引起的重新分配。

(3)隔离气泡的液体薄片破裂，可导致气泡通过聚集而变大，最终使泡沫崩溃。液体薄片的泄漏和破裂两者相互依存，因为液体薄片破裂可以增加泄漏，而泄漏会使薄片的厚度和强度变小。如果薄片的两层吸附蛋白质膜彼此接近至50~150Å，由于泄漏或碰撞使膜的应力减弱，以致发生破裂。在这样的距离范围内，两个被吸附蛋白质膜之间的相互作用力究竟是静电排斥力还是分子引力起主要作用，至今还不清楚，但厚而富有弹性的吸附蛋白质膜能够阻止膜破裂。

对泡沫稳定性有利的三个重要因素是：界面张力小，主体液相粘度大，以及吸附蛋白质膜牢固并有弹性。

2) 起泡性质的评价

评价蛋白质起泡性质可采用不同的方法。方法的选择取决于产生泡沫的方法是鼓泡、搅打或振摇。

气泡的平均大小是可以测定的，从而能粗略估计界面的面积。

起泡率有不同的表示方法：1)“稳态”泡沫体积(100×泡沫体积/液相最初体积)；2)膨胀率[100×(分散体总体积-流体最初体积)/流体最初体积]%；3)起泡能力(100×泡沫中气体的体积/泡沫中液体的体积)%；4)泡沫中气体与鼓泡气体的体积比(鼓泡法)；5)泡沫密度(图 5-31)。此外，达到一定泡沫体积所需的时间或膨胀量也是重要的。

起泡能力(Fp)一般随液相中蛋白质浓度(Pc)的增加而增大，直到某一最大值。各种蛋白质起泡能力的大小可以通过测定Fp最大值的一半(Pc值)进行比较(表 5-19)，这些数字说明在低浓度的蛋白质中明胶的起泡能力最大，但不能从一种较高浓度蛋白质(例如 1%，W/V)的起泡能力的测定值推出表中的这些数值。

泡沫稳定性可按下述测定结果进行评价：1)一定时间后，液体泄漏或泡沫崩溃(体积减少)的程度；2)全部或一半泄漏(体积减少一半)的时间；3)泄漏开始前的时间。

表 5-19 蛋白质起泡能力

蛋白质	起泡能力 ^a (%) (0.5%蛋白质溶液， W/V)	蛋白质	起泡能力 ^a (%) (0.5%蛋白质溶液， W/V)
牛血清清蛋白	280	β-乳球蛋白	480
乳清分离蛋白	600	血纤维素原蛋白	360
卵清蛋白	40	大豆蛋白(酶水解)	500

蛋清	240	明胶(酸法加工猪皮)	760
牛血浆	260		

a 根据上述公式的计算值

泡沫强度或刚性可根据泡沫柱承受重量的能力或泡沫的粘度进行评价。

某些情况下，泡沫加热时的特性也是很重要的。例如蛋白酥皮或蛋糕，应该在起泡前或起泡时将蔗糖加至蛋白质溶液中，随后加热泡沫。

在这些不同的实验中，蛋白质物料性能完全依赖于所用的设备和实验条件。为了比较蛋白质的起泡能力，应采用标准操作方法和一种标准蛋白质，卵清蛋白是最常用的标准，因为它具有较好的起泡性质。多数情况下，需用廉价的蛋白质物料与卵清蛋白的起泡性质进行比较。

3). 影响泡沫形成和稳定性的环境因素

蛋白质溶液的 pH、盐类、糖、脂类和蛋白质浓度等因素，都影响泡沫的形成和稳定性。下面对这些因素分别进行讨论。

(1) pH

蛋白质溶解度大虽然是起泡能力大和泡沫稳定性高的必要条件，但不溶性蛋白质微粒(在等电点时的肌原纤维蛋白、胶束和其他蛋白质)对稳定泡沫也能起到有利的作用，很可能是由于增大了表面粘度。虽然泡沫膨胀量一般在蛋白质的等电点 pH 时不大，但泡沫的稳定性常常是相当好的，如球蛋白(pH5~6)、谷蛋白(pH6.5~7.5)和乳清蛋白(pH4~5)都具有这种特性。这种现象表明在等电点时，分子间的静电吸引作用使被吸附在空气-水界面的蛋白质膜的厚度和刚性增大。但也发现蛋白质在极限 pH 值时泡沫的稳定性增大，可能是由于粘度增加的原因。卵清蛋白在天然泡沫的 pH 值(8~9)和接近等电点 pI(4~5)时都显示最大的起泡性能，大多数食品泡沫都是在与它们的蛋白质成分等电点不同的 pH 条件下制成的。

(2) 盐类

盐类不仅影响蛋白质的溶解度、粘度、伸展和聚集，而且还改变起泡性质。因此，盐的种类和蛋白质在盐溶液中的溶解特性，影响蛋白质的起泡性。大多数球状蛋白质例如牛血清清蛋白，卵清蛋白、谷蛋白和大豆蛋白等的起泡性和泡沫稳定性，随着 NaCl 浓度的增加而增加，这主要是由于盐对蛋白质电荷的中和作用。相反，另外一些蛋白(如乳清蛋白，特别是 β -乳球蛋白)，由于盐溶效应，其起泡性和泡沫稳定性，则随着盐浓度的增加而降低。在特定盐溶液中，蛋白质的盐析作用通常可以改善起泡性。反之，盐溶使蛋白质显示较差的起泡性。NaCl 通常能增大膨胀量和降低泡沫稳定性(表 5-20)，可能是由于降低蛋白质溶液的粘度

的结果。二价阳离子例如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 在 0.02~0.04mol/L范围，能与蛋白质的羧基生成桥键，使之生成粘弹性较好的蛋白质膜，从而提高泡沫的稳定性。

表 5-20 NaCl 对乳清分离蛋白起泡性和稳定性的影响

NaCl 浓度 (mol/L)	总界面面积 (cm^2/mL 泡沫)	泡沫面积破裂 50%的时间 (Sec)
0.00	333	510
0.02	317	324
0.04	308	288
0.06	307	180
0.08	305	165
0.10	287	120
0.15	281	120

(3) 糖类

蔗糖、乳糖和其他糖类通常能够抑制泡沫膨胀，但也可提高泡沫的稳定性。后者是因为糖类物质能增大体相粘度，降低了薄片流体的脱水速率。相反，在糖溶液中由于提高了蛋白质结构的稳定性，于是蛋白质不能够在界面吸附和伸长，因此，在搅打时蛋白质就很难产生大的界面面积和大的泡沫体积。所以制作蛋白酥皮和其他含糖泡沫甜食，最好在泡沫膨胀后再加入糖。卵清蛋白和糖蛋白（卵类粘蛋白，卵清蛋白）有助于泡沫的稳定，因为这类蛋白质能在薄层中吸附和保持水分。

(4) 脂类

当蛋白质被低浓度（直到 0.1%）脂类污染时，脂类物质将会严重损害起泡性能，因此，无磷脂的大豆蛋白质制品、不含蛋黄的蛋白质、“澄清的”乳清蛋白或低脂乳清蛋白析物与它们的含脂（脂质污染）对应物相比，其起泡性能更好。可能是由于具有表面活性的极性脂类化合物占据了空气-水界面，对吸附蛋白质膜的最适宜构象产生干扰，从而抑制了蛋白质在界面的吸附，使泡沫的内聚力和粘弹性降低，最终造成搅打过程中泡沫破裂。即使低浓度脂（0.1%）也会阻止蛋白质的泡沫形成。

(5) 蛋白质浓度

蛋白质浓度影响泡沫的某些特性。蛋白质浓度愈高，泡沫愈牢固。蛋白质浓度增加至 10%时，泡沫稳定性的增加超过泡沫体积的增大。初始液相中的蛋白质浓度在 2%~8% (W/V)（搅打法），一般可达到最大膨胀量，并产生适宜的液相粘度和吸附膜厚度。对于一个气泡直径为 150 μm 和 $\phi=0.95$ 的典型泡沫。起泡前液

相中蛋白质浓度为 0.1%，如果全部被吸附，则可产生 $1\text{mg}/\text{m}^2$ 的界面蛋白质浓度，形成的表面刚性能使泡沫保持稳定。增加蛋白质浓度将会产生更小的气泡和更稳定的泡沫。起泡前使蛋白质溶液陈化，有利于泡沫的稳定性，可能是由于促进蛋白质-蛋白质的相互作用能形成更厚的吸附膜。

(6) 温度

蛋白质加热部分变性，可以改善泡沫的起泡性。因此在产生泡沫前，适当加热处理可提高大豆蛋白（ $70\sim 80^\circ\text{C}$ ）、乳清蛋白（ $40\sim 60^\circ\text{C}$ ）、卵清蛋白（卵清蛋白和溶菌酶）等蛋白质的起泡性能，热处理虽然能增加膨胀量，但会使泡沫稳定性降低。若用比上述更剧烈的条件热处理则会损害起泡能力（图 5-32）。除非蛋白质的胶凝作用能使稳定泡沫的吸附膜产生足够的刚性，否则加热泡沫将会使空气膨胀、粘性降低、气泡破裂和泡沫崩溃。卵清蛋白的泡沫在加热时仍保持其结构，而乳清蛋白的泡沫是不耐热的，在 70°C 加热 1min，可以改善起泡性，但是在 90°C 加热 5min，则降低起泡性，尽管此时蛋白质仍然保持溶解，但是蛋白质分子的-SH 之间会形成二硫交联键，分子间发生聚合，增加了蛋白质的分子质量，使之不宜在空气-水界面吸附。

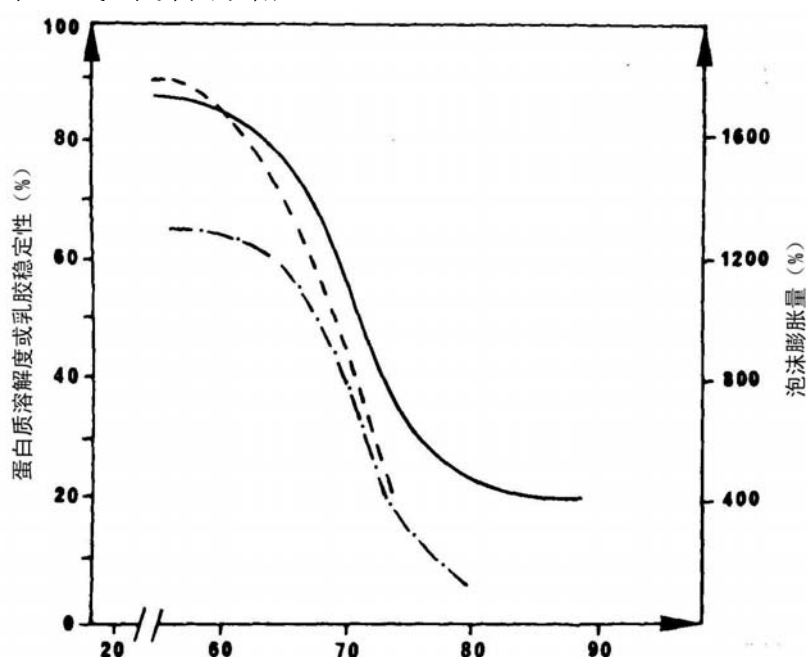


图 5-32 干燥-复水的乳清蛋白受热处理影响溶解度、乳胶稳定性和泡沫膨胀量。

乳清蛋白经超滤、浓缩在各种温度下（横坐标）下加热 30min，干燥，然后复水。

- 加热的乳清蛋白在 pH4.6 的蛋白质的溶解度 (%)；
- · - 加热的乳清蛋白浓缩物在 pH6.6 制成的乳胶体；
- - - 在 pH6.6 用加热提取的乳清蛋白浓缩物制成的泡沫的膨胀量

要想形成足够量的泡沫，必须使搅动的持续时间和强度适合于蛋白质的充分

伸展和吸附。但过度强烈搅拌会降低膨胀量和泡沫的稳定性，卵清对过度搅拌特别敏感，搅打卵清或清蛋白超过 6~8min 可引起蛋白质在空气-水界面发生聚集-絮凝。这些不溶解的蛋白质在界面不能被完全吸附，使液体薄片的粘性不能满足泡沫高度稳定性的要求。

4). 影响泡沫形成和稳定性的分子特性

蛋白质作为一类有效的起泡剂或乳化剂，同样应满足前面提到的三点要求。实验结果表明，泡沫的形成和稳定性对蛋白质性质的要求略有不同，泡沫的形成包括可溶性蛋白质向空气-水界面扩散、伸展、浓集和快速扩展，结果降低界面张力。影响泡沫特性的分子性质是：蛋白质分子的柔顺性，电荷密度和分布，以及疏水性。

空气-水界面的自由能显著地高于油-水界面的自由能。因此，要保持空气-水界面的稳定性，蛋白质就必须具有快速吸附的能力和形成新的界面，同时使界面张力降低到最低水平。自由能的降低与分子在界面上的迅速伸展、重排和疏水残基在界面的暴露有关。

几乎不具有二级和三级结构的柔顺性蛋白质分子，例如 β -酪蛋白是有效的表面活性剂。球蛋白伸展前经过温和加温、变性剂（例如二硫化物还原剂）处理或蛋白质部分水解（若伸展不伴随聚集和溶解度降低），则有利于蛋白质在界面更好地取向和起泡能力提高。另一方面，溶菌酶由于分子内的 4 个二硫键，使之具有紧密折叠的结构，在界面吸附非常缓慢，仅能部分伸展，界面自由能降低很小。因此，溶菌酶不是一种好的起泡剂。可以认为，一种优良的起泡剂在界面必须是柔顺性的。如前所述，蛋白质的表面疏水性与降低表面和界面张力的能力之间存在着直接的相关性（图 33，表 5-21），酪蛋白和其他蛋白质的疏水衍生物能在空气-水界面更好地取向和扩散，具有较大的起泡能力。

泡沫稳定性与气泡周围蛋白质膜的特性有关，要使泡沫的稳定性高，每个气泡必须有一层粘结、富有弹性而不透气的蛋白质厚膜。相对分子质量高的球蛋白因能部分阻止表面伸展，所以适合气泡外面蛋白质膜特性的要求，它能形成具有良好表面流变学性质的吸附膜和稳定性高的泡沫，这很可能是部分伸展的几层球蛋白通过疏水、氢键、静电相互作用，首先在界面缔和形成稳定的膜。显然，在使蛋白质膜稳定的蛋白质分子间的内聚相互作用和能引起蛋白质聚集或破裂的蛋白质自缔合之间存在着临界平衡。另一方面，蛋白质必须靠疏水相互作用在界面牢固吸附，这对于防止蛋白质解吸和随后发生液体泄漏损失是非常重要的。同时还要求蛋白质分子有足够的韧性和流动性，以阻止应力形变、界面扩大和薄片的厚度变薄。一个同时具有良好起泡能力和泡沫稳定性的蛋白质，其柔顺和刚性必须保持适当平衡。界面扩大可导致界面的吸附蛋白质分子浓度降低和张力增

大。蛋白质必须拖带位于下面的水分子一起从低界面张力区向高界面张力区移动，只有这样才能形成非常稳定的泡沫，使薄片能恢复最初厚度和蛋白质膜的极性侧链（或多肽环）与薄片内的水相互作用，以减少液体泄漏。此外，蛋白质的电荷密度与泡沫稳定性之间通常是负相关。

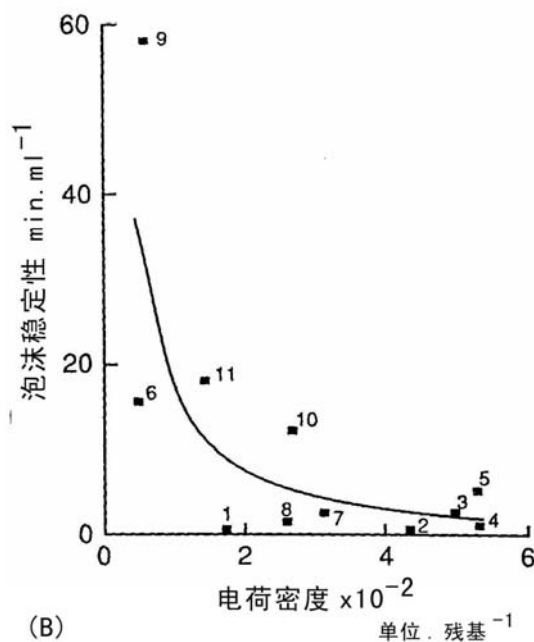
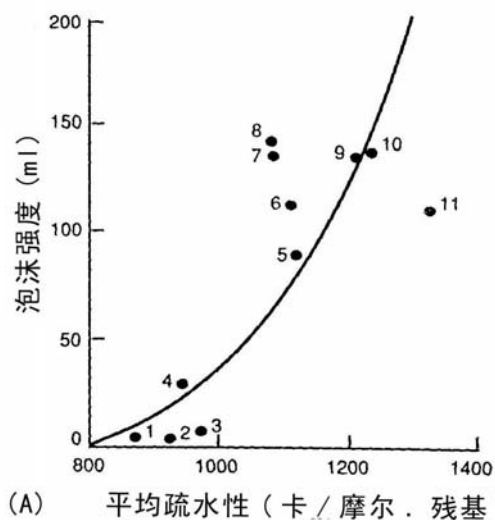


图 5-33 起泡能力和平均疏水性的相关性 (A);
泡沫稳定性与蛋白质的电荷密度之间的关系 (B);

表 5-21 各种蛋白质的表面活性和疏水性

蛋白质种类	水/空气	水/油	相对表面疏水性
	界面张力 (N/m)	界面张力 (N/m)	
牛血清清蛋白	58×10^{-3}	10.3×10^{-3}	1400
κ -酪蛋白	54×10^{-3}	9.5×10^{-3}	1300
β -乳球蛋白	60×10^{-3}	11.0×10^{-3}	750
溶菌酶	64×10^{-3}	11.2×10^{-3}	100
胰蛋白酶	64×10^{-3}	12.0×10^{-3}	90
伴清蛋白	64×10^{-3}	12.1×10^{-3}	70
卵清蛋白	61×10^{-3}	11.6×10^{-3}	60

具有良好起泡性质的蛋白质有卵清蛋白、血红蛋白的珠蛋白部分、牛血清蛋白、明胶、乳清蛋白、酪蛋白胶束、 β -酪蛋白、小麦蛋白（特别是麦谷蛋白）、大豆蛋白和某些蛋白质的低度水解产物。结构无序的 β 酪蛋白（韧性无规卷曲）能迅速降低表面和界面张力，并促使泡沫的形成，可是被吸附蛋白质的膜薄使泡沫稳定性差。 κ 酪蛋白形成泡沫时伸展缓慢，也许它是靠分子内的二硫键维持稳定，在界面的扩展不如 β 酪蛋白，因此，不能迅速形成泡沫，但生成的蛋白质膜既厚又牢固，使泡沫具有良好的稳定性。血清蛋白是高度有序的球形韧性结构，足以在泡沫界面部分地伸展和吸附，并使被吸附分子的残余结构能产生良好的泡沫稳定性。就卵清蛋白而言，由于各种蛋白质成分不相同，物理化学性质可能互相补充，结果可迅速形成低密度、稳定、耐热的泡沫。大多数蛋白质是一种复合蛋白，因此，它们的起泡性质受吸附在界面上的蛋白质组分之间的相互作用影响。例如，蛋清之所以具有优良的起泡性能，是与它的蛋白质组成有关。酸性蛋白质如果适当与碱性蛋白结合，则可提高起泡性。乳胶体和泡沫的形成有许多相似之处，但蛋白质的乳化能力和起泡能力之间不存在紧密的相关性，可能是因为泡沫稳定性比乳胶体稳定性对残余蛋白质结构有更多的要求。

四、粘度

一些流体和半固体类食品（例如调味汁、汤和饮料等）的可接受性与产品的粘度或稠度密切相关。流体的粘度反映它对流动的阻力，用粘度系数 η 表示。对于理想溶液 η 为剪切应力（即单位面积上的作用力， F/A ）对剪切速率（两液层之间的速率梯度， dv/dr ）的比，即

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dr} \quad (5-25)$$

牛顿流体服从上述关系式，具有粘度系数不随剪切力或剪切速率变化的特性。但是包括蛋白质在内的大多数亲水性大分子的溶液分散体（匀浆或悬浮体）、乳状液、糊状物或凝胶都不符合牛顿流体的特性，其粘度系数随剪切速率的增加而降低，这种特性叫做假塑性或切变稀释。表示为

$$\frac{F}{A} = m \left(\frac{dv}{dr} \right)^n \quad (5-26)$$

式中 m 表示稠度系数， n 表示流动特性指数。

蛋白质切变稀释的原因可以解释为：1) 蛋白质分子的主轴朝着流动方向逐渐取向，使摩擦阻力减小；2) 蛋白质的水合范围沿着流动方向形变（如果蛋白质是高度水合和分散的）；3) 氢键和其他弱键的断裂可导致蛋白质聚集体或网络结构的解离。在上述情况下，朝着流动方向的分子或颗粒的表观直径变小。

弱键的断裂是缓慢发生的，以致有时蛋白质流体在达到平衡之前，剪切应力和表观粘度（剪切速率和温度不变）随着时间而降低，当停止剪切处理时，可能（或者不能）重新形成原来的聚集体或网络结构的解离。如果恢复到原来的状态，粘度系数的降低是可逆的，这种体系是触变的（thixotropic）。例如，大豆蛋白离析物和乳清蛋白浓缩物的分散体是触变的。

由于蛋白质-蛋白质的相互作用，大多数蛋白质流体的粘度系数随蛋白质浓度的增加呈指数增大，（图 5-34），这种相互作用还可以解释为什么蛋白质在高浓度时，剪切稀释效应更明显。只有当蛋白质-蛋白质的相互作用很大时（象蛋白质糊或凝胶中），才显示出可塑性粘弹性能，所以，流体只有在受到超过某些相互作用力（屈服应力）时才开始流动。

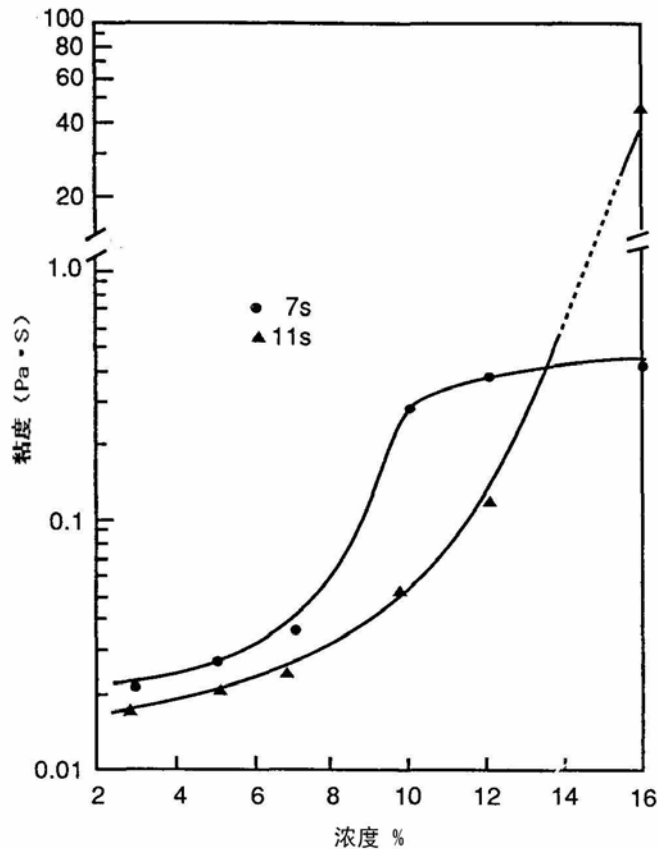


图 5—34 7S 和 11S 大豆蛋白溶液在 20°C 时浓度对粘度（或稠度指数）的影响

影响蛋白质流体粘度特性的一个主要因素是被分散的分子或颗粒的表观直径，而表观直径取决于下述参数：蛋白质分子固有的特性，例如相对分子质量、大小、体积、结构和对称性、电荷和易变形程度（环境因素，例如 pH、离子强度和温度等）；蛋白质-溶剂的相互作用，这种作用影响溶胀，溶解度和分子周围的流体动力学水合作用范围；蛋白质-蛋白质相互作用，决定聚集体的大小，对于高浓度蛋白质，蛋白质-蛋白质相互作用是主要因素。

蛋白质分子的形状和大小与溶液粘度的关系，以增比粘度 η_{sp} (Specific Viscosity) 表示

$$\eta_{sp} = \beta C (v_2 + \delta_1 v_1) \quad (5-27)$$

式中 η_{sp} —增比粘度（溶液粘度比溶剂粘度增加的百分数，代表溶质对粘度的贡献。）

β —形状因子

C—浓度

v_2 、 v_1 —分别代表未水合蛋白质和溶剂的比体积

δ_1 —每g蛋白质结合水的质量 (g)

这里 v_2 是与分子的柔顺性有关，蛋白质的比体积愈大，则柔顺性愈大。

对于稀蛋白质溶液的粘度，可以分别用相对粘度 η_{rel} ，比浓粘度 η_{sp}/C 和特性粘度 $[\eta]$ 表示。

采用Ostwald—Fenske毛细管粘度计测定时， η_{rel} (Relative Viscosity) 表示为

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{\rho t}{\rho_0 t_0} \quad (5-28)$$

式中 ρ 、 ρ_0 —分别表示蛋白质溶液和溶剂的密度

t 、 t_0 —分别表示指定体积的蛋白质溶液和溶剂流经毛细管的时间

其他几种粘度的表示，可以通过相对粘度得到

$$\text{增比粘度: } \eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (5-29)$$

比浓粘度: η_{red} (reduced viscosity)

$$\eta_{red} = \frac{\mu_{sp}}{C} \quad (5-30)$$

式中 C —蛋白质浓度

特性粘度 $[\eta]$ (intrinsic viscosity)

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_{sp} / C) \quad (5-31)$$

将比浓粘度 (η_{sp}/C) 对蛋白质浓度 (C) 作图，然后外推到蛋白质浓度为零 (极限)，即得到特性粘度 $[\eta]$ 。特性粘度 $[\eta]$ 是描述单个粒子对粘度的贡献，与粒子大小有关。 $[\eta]$ 与分子尺寸的关系符合Flory粘度公式

$$[\eta] = \phi' \frac{\langle R^2 \rangle^{3/2}}{M} \quad (5-32)$$

$$\text{或} [\eta] = \phi' \frac{\langle h^2 \rangle^{3/2}}{M} \quad (5-33)$$

式中， ϕ' 和 ϕ 均为常数， ϕ 值约为 2.1×10^{21} 。

$\langle h^2 \rangle^{1/2}$ —均方根末端距

$\langle R^2 \rangle^{1/2}$ —均方根回转半径

上式很清楚地表示了蛋白质分子形状和大小与粘度的关系。通常利用特性粘度研究蛋白质变性前、后分子的尺寸和分子质量，以及流体动力学行为与分子形变的关系。

蛋白质体系的粘度和稠度是流体食品的主要功能性质，例如饮料、肉汤、汤汁、沙司和稀奶油。了解蛋白质分散体的流体性质，对于确定加工的最佳操作过

程同样具有实际意义。例如，泵传送、混合、加热、冷却和喷雾干燥，都包括质和热的传递。

粘度和溶解度之间具有相关性，将不溶的热变性蛋白粉置于水溶液介质中并不显示高的粘度。吸水性差和溶胀度小的易溶蛋白粉（乳清蛋白），在中性或等电点 pH 值时粘度也低。而起始吸水性大的可溶蛋白粉（酪蛋白酸钠和某些大豆蛋白制品）则具有高粘度。可见对许多蛋白质来说，吸水性和粘度之间是正相关的。

五、胶凝作用

1. 概述

首先必须把胶凝作用同蛋白质溶液分散程度的降低，即缔合、聚集、聚合、沉淀、絮凝和凝结等区别开来。蛋白质的缔合一般是指亚单位或分子水平发生的变化；聚合或聚集反应一般包括大的复合物的形成；沉淀作用是指由于溶解性完全或部分失去而引起的聚集反应；絮凝是指不发生变性的无规聚集反应，这常常是因为链间的静电排斥受到抑制而发生的一种现象；将发生变性的无规聚集反应和蛋白质-蛋白质的相互作用大于蛋白质-溶剂的相互作用引起的聚集反应，定义为凝结作用，凝结反应可形成粗糙的凝块。变性的蛋白质分子聚集并形成有序的蛋白质网络结构过程称为胶凝作用。通过扫描电镜观察，可看出蛋白质的聚集体和网络的大小、形状、排列以及孔隙大小。

胶凝是某些蛋白质的一种很重要的功能性质，在许多食品的制备中起着主要作用，包括各种乳品、果冻、凝结蛋白、明胶凝胶、各种加热的碎肉或鱼制品、大豆蛋白质凝胶、膨化或喷丝的组织化植物蛋白和面包面团的制作等。蛋白质胶凝作用不仅可用来形成固态粘弹性凝胶，而且还能增稠，提高吸水性和颗粒粘结、乳状液或泡沫的稳定性。

各种蛋白质胶凝的条件虽然能够确定，但是蛋白质预处理和蛋白质混合物需要的环境因素还不易达到最佳程度。

大多数情况下，热处理是蛋白质胶凝必不可少的，但随后需要冷却，略微酸化有助于凝胶的形成。添加盐类，特别是钙离子可以提高胶凝速率和凝胶的强度（大豆蛋白、乳清蛋白和血清清蛋白）。可是有的蛋白质不经过加热也可以发生胶凝，仅需适度酶水解（酪蛋白胶束、卵白和血纤维蛋白）即可，或者添加钙离子（酪蛋白胶束），也可以先碱化，然后恢复到中性或等电点 pH（大豆蛋白）使蛋白质发生胶凝作用。虽然许多凝胶是由蛋白质溶液形成的（鸡卵清蛋白和其他卵清蛋白、 β -乳球蛋白和其他乳清蛋白、酪蛋白胶束、血清清蛋白和大豆蛋白），但是某些不溶或微溶的蛋白质的水溶液或盐水的分散体也可以形成凝胶（胶原蛋白、肌原纤维蛋白、部分或完全变性的大豆蛋白离析物和其他蛋白），因此，蛋

白质的溶解性不一定总是胶凝作用所必需的条件。

2. 凝胶形成的特性和凝胶结构

迄今为止，对蛋白质胶凝的立体网络特性形成机制和相互作用还不十分清楚，但有许多研究表明，在有序的蛋白质-蛋白质相互作用导致聚集之前，蛋白质必然发生变性和伸展，这就可以解释为什么大豆蛋白质离析物预先加热或者用溶剂（或碱）处理发生变性后，即使不加热也能胶凝。

热凝结胶凝作用，通过下面两个步骤，然后形成网络结构。当从蛋白质的水溶液开始时，第一步通常用式（5-34）表示。

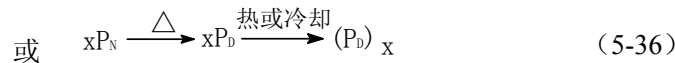
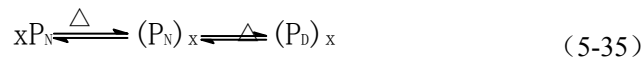
（1）四级结构可逆地解离成亚单位或单体（天然聚合物），也可以象变性作用第一步那样发生不可逆解离。



式中， P_N 表示天然蛋白质， P_D 是变性蛋白质， n 为已知的亚单位数。

（2）二级结构和三级结构的不可逆变性（一般保持部分伸展）。

形成的凝胶相当于部分变性蛋白质 $(P_D)_x$ 的聚集体，但这种变化属于以下哪一种途径尚不了解。



通常认为（5-35）的第一部分可以表示絮凝反应，第二部分表示粗凝聚。在有利于聚集反应的变性条件下（低或高 pH 值，蛋白质的高静电荷，离子强度很低，某种盐类或断裂键的试剂存在，例如脲素、胍、去污剂，加热时发生如式（5-36）所示的反应。

与变性相比，聚集作用更缓慢，在聚集前，部分伸展的多肽可以更好地取向，这同样有利于生成有序、均匀、光滑、稠性、高度膨胀、富弹性、透明和抗脱水收缩、渗出的稳定凝胶。由粗粒聚集的蛋白质颗粒形成的凝胶不透明，缺乏弹性，对脱水收缩和漏液特别敏感，属于不稳定的凝胶。

蛋白质因其结构和形成凝胶的条件，可以生成可逆或不可逆凝胶。通常靠非共价键相互作用形成的凝胶结构是可逆的，如明胶的网络结构是靠氢键保持稳定，在加热（约 30℃）时熔融，并且这种凝结-熔融可反复多次。靠疏水相互作用形成的凝胶网络结构是不可逆的。因为疏水相互作用是随温度升高而增加，如蛋清凝胶。含半胱氨酸和胱氨酸的蛋白质在加热时形成二硫键，这种通过共价相互作用生成的凝胶是不可逆的，卵清蛋白和β-乳球蛋白的凝胶通常就是这样。

一般认为，蛋白质网络的形成是蛋白质-蛋白质-溶剂（水）之间的氢键、疏

水和静电相互作用，以及邻近的肽链之间的吸引力和排斥力建立平衡的结果。因此，蛋白质分子的结构和性质，影响凝胶的形成。已知疏水相互作用（高温时增强）、静电相互作用（例如Ca²⁺或其他二价离子桥接）、氢键键合（因冷却而增强）和二硫键等的相对贡献是随蛋白质的性质、环境条件和胶凝过程中步骤的不同而异。静电排斥和蛋白质-水相互作用有利于使肽链分开。蛋白质浓度升高时，因为分子间接触的几率增大，更容易产生蛋白质分子间的吸引力和胶凝作用。例如高浓度蛋白质溶液，甚至在对聚集作用并不十分有利的环境条件下（不加热、pH值与等电点pH值相差很大等），仍然可以发生胶凝。

蛋白质分子的解离和伸展，一般使反应基团更易暴露，特别是球蛋白的疏水基团，因此有利于蛋白质-蛋白质的疏水相互作用，它通常是蛋白质发生聚集的主要原因。所以，分子量大的疏水氨基酸含量高的蛋白质容易形成稳固的网络。高温下可增强疏水相互作用，而冷却有利于氢键的形成，加热还可使内部的巯基暴露，促使二硫键的形成或交换。大量的巯基和二硫键存在，可使分子间的网络得到加强，有利于形成热不可逆的凝胶。此外，钙离子形成的桥键能提高许多凝胶的硬度和稳定性。

在 pH 值超出凝胶稳定范围时，胶凝作用一般随蛋白质浓度的增大而增强，这表明当 pH 值与蛋白质等电点相差非常大时，高浓度蛋白质中的许多疏水键和二硫键能够补偿由于大量净电荷产生的静电排斥力。在等电点 pH 值时，因为不存在排斥力，所以凝胶的膨胀、水合作用和硬度都较小。疏水氨基酸摩尔百分含量大（>31.5%）的蛋白质（血红蛋白、过氧化氢酶、卵清蛋白和脲酶），其胶凝 pH 范围一般决定于蛋白质的浓度，而疏水氨基酸摩尔百分含量小（22~31.5%）的那些蛋白质（如 r-球蛋白、胰凝乳蛋白酶、凝血酶原、血清清蛋白、伴清蛋白、卵清蛋白、明胶和大豆蛋白），胶凝 pH 值范围不因蛋白质浓度的改变而变化。这种特性的差别可作为热凝凝胶的分类标准：1) 象卵清蛋白这类蛋白质在低浓度时加热可产生沉淀；而高浓度时形成不透明的凝胶；2) 明胶类蛋白质低浓度时加热仍保持可溶解状态，高浓度时则生成透明的热可逆凝胶，象酪蛋白、β-乳球蛋白和胃蛋白酶属于这类蛋白质，虽然它们的疏水氨基酸摩尔百分数分别为 38、34.6 和 34%，但特性与 2) 类中的蛋白质相似，这种特性也许是由于它们分子量小的缘故。纯卵清蛋白的特性象酪蛋白，但当这种蛋白质与伴清蛋白混合时，由于蛋白质-蛋白质键的形成和表观相对分子质量增大，所以它们的特性与 1) 类蛋白质相似。

对某些不同种类的蛋白质放在一起加热可产生共胶凝作用，此外，蛋白质还能通过和多糖胶凝剂相互作用形成凝胶，带正电荷的明胶和带负电荷的褐藻酸盐或果胶酸盐之间通过非特异离子相互作用可形成高熔点（80℃）凝胶。同样，在

牛乳 pH 时， κ -酪蛋白带正电荷的部位和多硫酸酯化 κ -鹿角藻胶之间能发生特异的离子相互作用，因此酪蛋白胶束被包藏在鹿角藻胶凝胶中。

许多凝胶以高度膨胀（稀疏）和水合结构的形式存在，通常每克蛋白质能保持 10g 以上的水，而且其他食品成分可被蛋白质的网络所截留。有些蛋白质凝胶含水量甚至高达 98%，虽然这种水大部分和稀盐溶液中水的性质相似，但这些水是以物理的方式被截留，因而不易挤出。曾有许多关于凝胶具有很大持水容量的假说，认为可能是因为二级结构热变性后肽键暴露的 CO 和 NH 沿着肽键分别成为负的和正的极化中心，这样就可以建立一个广泛的多层水体系，冷却时，这种蛋白质分子可通过重新形成的氢键相互作用，提供固定自由水所必需的结构；也可能是蛋白质网络的微孔通过毛细管作用来保持水分。

六、面团的形成

小麦蛋白是众多食品蛋白质中唯一具有形成粘弹性面团特性的蛋白质。当小麦面粉与水（约 3:1）于室温下混合、揉搓，形成强内聚性和粘弹性的面团，再通过发酵、烘烤便制成面包，但黑麦和大麦的这种性质较差。

小麦面粉中含有可溶性和不溶性两类蛋白，可溶性蛋白大约占总蛋白的 20%，主要为清蛋白（溶于水）和球蛋白（溶于 10%NaCl），以及少量的糖蛋白。他们对于小麦粉的面团形成特性没有贡献。面筋蛋白（即小麦中的水不溶性蛋白是一类杂蛋白混合物）约占小麦总蛋白的 80%，主要包含麦醇溶蛋白（溶于 70%~90%乙醇）和麦谷蛋白（不溶于水和乙醇，而溶于酸或碱）。小麦面粉发酵时面筋蛋白能够捕捉气体形成粘弹性面团。此外，面筋蛋白中，还含有淀粉粒、戊聚糖、极性和非极性脂类及可溶性蛋白质，所有这些成分都有助于面团网络和（或者）面包质地形成。麦醇溶蛋白和麦谷蛋白的组成及大分子体积使面筋富有很多特性。由于它们的可离解氨基酸含量低，使面筋蛋白质不溶于中性水溶液。面筋富含谷氨酰胺（33%以上）和含羟基的氨基酸，因而易形成氢键，可用来解释面筋的吸水能力和内聚-粘合性。面筋中所含的许多非极性氨基酸（约 30%），有利于蛋白质分子和脂类的疏水相互作用，使之产生聚集。另外，半胱氨酸和胱氨酸约占面筋总量的 2%-3%，可形成许多二硫交联键，这也有利于蛋白质分子之间在面团中的紧密连接。

某些小麦品种的面筋蛋白质特别适合制作面包。而大多数谷物和植物蛋白质却不适宜制作面包，因此添加它们到小麦粉中常常是有害的，尽管其原因还不完全清楚，但可以解释小麦面筋蛋白质对面团的形成和在面包制作中所起的作用。

水合的面包面粉在混合和揉搓时，面筋蛋白质开始取向，排列成行和部分伸展，这样将增强疏水相互作用并通过二硫交换反应形成二硫键。由于最初的面筋颗粒转变成薄膜，形成三维空间的粘弹性蛋白质网络，于是便起到截留淀粉粒和

其他面粉成分的作用。然而还原剂（例如半胱氨酸）或巯基封闭剂（如 N-乙基马来酰亚胺）能极大的降低面团粘度，所以具有破坏水合面筋和面包面团的内聚结构的作用。添加氧化剂例如溴酸盐可增加面团的韧性和弹性。含高强度面筋的面粉需要长时间混合，才能产生粘合的面团。而面筋含量低的面粉用水混合时，若用力或持续时间超过一定的限度，可使面筋网络破坏，这很可能是由于二硫键断裂（特别是没有空气存在时）的缘故。

面团强度与麦谷蛋白以及完全不溶解的“残余蛋白质”的含量有关。用不同比例麦醇溶蛋白-麦谷蛋白的均质小麦面粉进行试验，表明麦谷蛋白决定面团的弹性、粘结性和混合耐受性、麦醇溶蛋白的易流动性以及面团的延伸度和膨胀等特性，因此有利于产生大的面包松容积。两种蛋白质适当的比例对于面包制作是很重要的，面团过度粘结（麦谷蛋白）会抑制发酵过程中截留的CO₂气泡膨胀、面团鼓起和焙烤后面团屑中网眼状空气腔泡的存在。过大的伸长度（麦醇溶蛋白）则形成易破的和可渗透的面筋薄膜，这样不仅保留CO₂的能力差，而且面包会瘪塌。

麦谷蛋白和麦醇溶蛋白对面团强度、粘弹性和膨胀性产生不同的影响，是与他们各自的结构特性有关。麦谷蛋白是相对分子质量从 12 000 到 130 000 的异种多肽组成的蛋白质，按相对分子质量又可分为高相对分子质量（M_w>90 000）和低相对分子质量（M_w<90 000=麦谷蛋白。在面筋中麦谷蛋白的巯基通过分子之间的相互作用，形成分子间的二硫交联键，生成相对分子质量甚至高达几百万的多聚体。分子间的这些二硫键是面团具有大的弹性的原因。

麦醇溶蛋白是以一条单链存在，相对分子质量从 30000~80000，包括 α、β、γ 和 ω 四种麦醇溶蛋白。分子中虽然含有 2%~3%的半胱氨酸残基，但是不能够在分子之间发生巯基-二硫键交换反应形成多聚体。在面团中二硫键仍然保持在分子内。一旦麦醇溶蛋白和淀粉被分离，面团就仅显示粘性，而不具有粘弹性。因此，麦谷蛋白和麦醇溶蛋白的适当比例，对于形成粘弹性面团结构是非常必要的。

面粉或添加在面团中的中性与极性脂类，它们与麦醇溶蛋白和麦谷蛋白相互作用，能削弱或增加面筋的网络结构。

焙烤不会引起面筋蛋白质大的再变性，因为麦醇溶蛋白和麦谷蛋白在面粉中已经部分伸展，在捏柔面团时使之变得更加伸展，而在正常温度下焙烤面包时将阻止其进一步伸展。温度高于 70~80℃，面筋蛋白质释放出的一些水分被部分糊化的淀粉粒所吸收，因此，即使在焙烤时，面筋蛋白质也仍然能使面包（含 40%~50%水）柔软和保持水分。

可溶性小麦蛋白质（清蛋白和球蛋白）在焙烤时发生变性和聚集，这种部分

胶凝作用有利于面包屑的凝结。因此，在向焙烤食品中添加外来的蛋白质往往是适宜的，例如营养强化。但不是所有外源蛋白质都适合于形成面筋网络。水溶性球蛋白对面包的松软体积非常不利，而热变性的大豆、乳清或乳蛋白可避免这种不良影响。添加极性脂类、小麦面粉糖脂（单和二半乳糖二酸甘油酯）或合成表面活性剂（非离子型蔗糖酯或离子型硬酯酰乳酸钠），也可以掺合更多不致于使面包结构变坏的外源蛋白质。这表明糖脂对面团网络中的疏水键形成起着重要作用，也可以在小麦面粉中添加面筋增强面团的网络。由于面筋具有粘性，还可用作各种肉制品的粘结剂。

七、风味结合

蛋白质本身是没有气味的，然而他们可以结合风味化合物，因此影响食品的感官特性。某些蛋白质食品（例如油料种子蛋白和乳清浓缩蛋白），虽然在功能和营养上可以为人们所接受，但由于一些产生异味（豆腥味、**哈**味、苦味和涩味）的化合物，例如醛、酮、醇、酚和氧化脂肪酸，能够与蛋白质结合，使之在烹煮或咀嚼时能感觉到这些物质的释放。然而某些物质与蛋白质结合非常牢固，甚至蒸汽或溶剂提取也不能去除。

与消除异味完全不同的是用蛋白质作为风味载体，例如结构化植物蛋白可产生肉的风味，要使所有挥发性风味成分在贮藏和加工中能始终保持不变，并在口腔内迅速全部不失真地释放，这只有通过挥发性化合物与蛋白质结合的机理研究才能得到解决。

1. 挥发性物质和蛋白质之间的相互作用

食品的香味是由接近食品表面的低浓度挥发物产生的，挥发物浓度取决于食品和其表层空隙（headspace）之间的分配平衡。在水-风味模拟体系中添加蛋白质，可降低表层空隙挥发性化合物的浓度。

风味结合包括食品的表面吸附或经扩散向食品内部渗透，且与蛋白质样品的水分含量和蛋白质与风味物质的相互作用有关。固体食品的吸附分为两种类型：1) 范德华力或氢键相互作用，以及蛋白质粉的空隙和毛细管中的物理截留引起的可逆物理吸附；2) 共价键或静电力的化学吸附。前一种反应释放的热能低于20KJ/mol，第二种至少为40KJ/mol。吸附性风味结合除涉及上述机理外，还有疏水相互作用。极性分子如醇是通过氢键结合，而非极性氨基酸残基靠疏水相互作用优先结合低分子量挥发性化合物。对于液态或高水分含量食品，风味物质与蛋白质结合的机理主要是风味物质的非极性部分与蛋白质表面的疏水性区或空隙的相互作用，以及风味化合物与蛋白质极性基团，例如羟基和羧基，通过氢键和静电相互作用。而醛和酮在表面疏水区被吸附后，还可以进一步扩散至蛋白质分子的疏水区内部。

风味物质与蛋白质的相互作用通常是完全可逆的。然而在某些情况下，挥发性物质以共价键与蛋白质结合。然而这种结合通常是不可逆的，例如，醛或酮与氨基的结合、胺类与羧基的结合都是不可逆的结合。然而虽然羰基类挥发性化合物同蛋白质和氨基酸的 ϵ -或 α -氨基之间能形成可逆的希夫氏碱，但分子量较大的挥发性物质可能发生不可逆固定（在同浓度下，2-十二醛同大豆蛋白不可逆结合是 50%，而辛醛为 10%）。这种性质可以用来消除食品中原有挥发性化合物的气味。

挥发性物质与蛋白质的结合，只能发生在那些未参与蛋白质-蛋白质或其他相互作用的位点上，挥发性化合物同蛋白质的可逆的非共价键结合遵循卡特卡尔（Scatchard）方程，平衡时

$$\frac{V_{\text{结合}}}{[L]} = nk - V_{\text{结合}}k \quad (5-37)$$

式中 $V_{\text{结合}}$ 表示每 mol 蛋白质结合挥发性化合物的 mol 数， $[L]$ 表示平衡时游离挥发性化合物的 mol/L 浓度， K 为平衡结合常数 (mol/L)， n 为每 mol 蛋白质可用于结合挥发性化合物的总位点数。

根据平衡时的不同 $[L]$ 值，用 Scatchard 方程，从实验测定的 $V_{\text{结合}}$ 值即可计算出 k 和 n ，或者以 $V_{\text{结合}}/[L]$ 对 $V_{\text{结合}}$ 作图，得到一条直线， k 为直线的斜率， nk 为截距。 $V_{\text{结合}}$ 随着游离挥发物浓度 $[L]$ 的增加而增大。Scatchard 方程表明 $V_{\text{结合}}$ 和蛋白质浓度之间不存在依赖关系，这对于有一条多肽链的蛋白质是正确的，例如牛血清蛋白；但对低聚蛋白质并不如此，例如大豆球蛋白，每 mol 蛋白质结合的挥发化合物分子数随着蛋白质浓度的增加而减少（挥发性化合物浓度恒定时），因为蛋白质-蛋白质的相互作用随着蛋白质浓度的增加而增大。吸着作用测定（表层空隙气体分析和透析平衡）结果表明，结合的位点数目随着挥发性化合物的结合而增多，斯卡特卡尔图的曲线可说明。曲线斜率随 $V_{\text{结合}}$ 增加而降低。在结合时蛋白质发生伸展（用差示分光光度法可观察到），于是有更多的疏水氨基酸残基能用于结合挥发性化合物。

根据报道，非极性挥发性化合物能渗入蛋白质的疏水性中心，并产生相互作用，这样就取代了分子内或分子间的蛋白质-蛋白质相互作用，同时又破坏了蛋白质内部的疏水相互作用，从而引起蛋白质构象的变化，使蛋白质去稳定和改变蛋白质的溶解度。由于上述原因，Scatchard 关系式在蛋白质应用中呈曲线。

风味化合物与蛋白质结合的自由能变化，可以根据 $\Delta G = -RT \ln K$ 方程得到。式中 R 是气体常数， T 为绝对温度。各种羰基化合物与蛋白质结合的热力学常数见表 5—22

表 5—22 羰基化合物与蛋白质结合的热力学常数

蛋白质	羰基化合物	n (mol/mol)	K (mol/L) ⁻¹	△G (KJ/mol)
血清清蛋白	2-壬酮	6	1800	-18.4
	2-庚酮	6	270	-13.8
β-乳球蛋白	2-庚酮	2	150	-12.4
	2-辛酮	2	480	-15.3
	2-壬酮	2	2440	-19.3
大豆蛋白(天然)	2-庚酮	4	110	-11.6
	2-辛酮	4	310	-14.2
	2-壬酮	4	930	-16.9
	5-壬酮	4	541	-15.5
大豆蛋白(部分变性)	壬酮	4	1094	-17.3
大豆蛋白(琥珀酰化)	2-壬酮	4	1240	-17.6
	2-壬酮	2	850	-16.7

从表 5—22 可看出, 风味物质结合自由能的变化为 -2.3KJ/mol ($-\text{CH}_2-$)。结合平衡常数也随($-\text{CH}_2-$)基团的增加而增大。由此说明在天然状态下, 蛋白质与风味物质是通过疏水相互作用结合。

2. 影响风味结合的环境因素:

挥发性的风味物质与水合蛋白之间是通过疏水相互作用结合, 因此, 任何影响蛋白质疏水相互作用或表面疏水作用的因素, 在改变蛋白质构象的同时, 都会影响风味的结合。例如水活性、pH、盐、化学试剂、水解酶、变性及温度等。

水可以提高蛋白质对极性挥发物的结合, 但对非极性化合物的结合几乎没有影响。在干燥的蛋白质成分中, 挥发性化合物的扩散是有限度的, 稍微提高水的活性就能增加极性挥发物的迁移和提高它获得结合位点的能力。在水合作用较强的介质(或溶液)中, 极性或非极性挥发物的残基结合挥发物的有效性受到许多因素的影响。酪蛋白在中性或碱性 pH 值时比在酸性 pH 溶液中结合的羧基、醇或脂类挥发性的物质更多, 这是与 pH 引起的蛋白质构象变化有关。盐溶类盐由于使疏水相互作用去稳定, 降低风味结合, 而盐析类盐提高风味结合。凡能使蛋白

质解离或二硫键裂开的试剂，均能提高对挥发物的结合。然而低聚物解离成为亚单位可降低非极性挥发物的结合，因为原来分子间的疏水区随着单体构象的改变易变成被埋藏的结构，关于蛋白质浓度的影响已经叙述过。

蛋白质经酶彻底水解将会降低它对挥发性物质的结合，例如每 kg 大豆蛋白能结合 6.7mg 正己醛，可是用一种酸性细菌蛋白酶水解后只结合 1mg。因此，蛋白质水解可减轻大豆蛋白的豆腥味，此外，用醛脱氢酶使被结合的正己醛转变成己酸也能减少异味。

相反，蛋白质热变性一般导致对挥发性物质的结合增强，例如，10%的大豆蛋白析物水溶液在有正己醛存在时于 90℃加热 1h 或 24h，然后冷冻干燥，发现其对己醛的结合量比未加热的对照组分别大 3 倍和 6 倍。

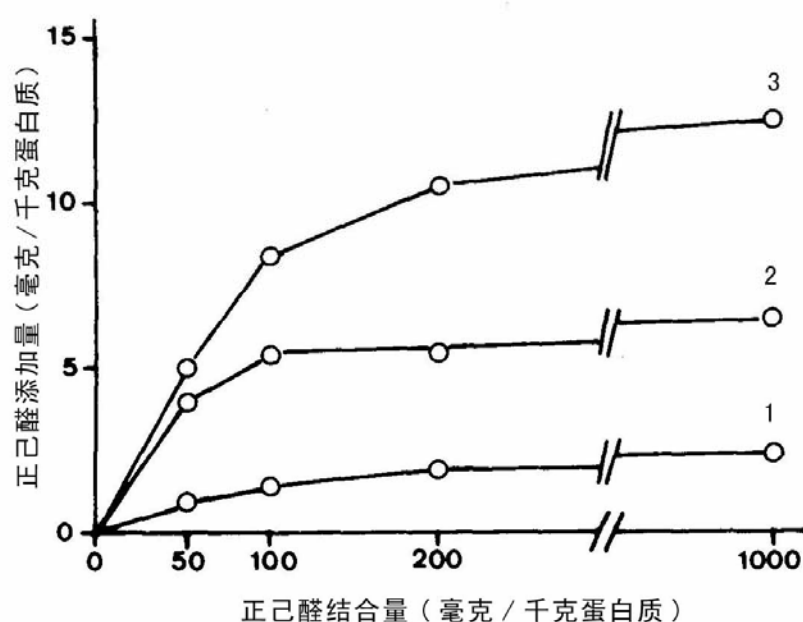


图 5-35 温度对大豆蛋白质的正己醛结合

将用酸沉淀的 10g 天然大豆蛋白溶解在 100ml 水中，添加不同量的正己醛。
1) 样品在氮气条件下于 20℃搅拌 5h；2) 样品在 90℃回流搅拌 1h；3) 样品在 90℃下回流 24h，然后使所有样品冷冻干燥，再将蛋白质溶解在 pH13 的 NaOH 溶液中，使蛋白质结合的正己醛释放出，并测定其含量。

脱水处理，例如冷冻干燥通常使最初被蛋白质结合的挥发物质降低 50%以上，例如酪蛋白，对蒸汽压低的低浓度挥发性物质具有较好的保留作用。脂类的存在能促进各种羰基挥发性物质的结合和保留，包括那些脂类氧化形成的挥发性物质。

温度对风味物质的结合影响非常小，这是因为结合过程是熵驱动，而不是焓驱动。

八、对其他化合物的结合

食品蛋白质除了与水、离子、金属、脂类和挥发性风味物质结合以外，还能通过弱相互作用或共价键结合很多其他物质，这将取决于他们的化学结构。例如色素、合成染料（可用来分析测定蛋白质）和致突、致敏等其他生物活性物质，这些物质的结合可导致毒性增强或解毒。在某些情况下蛋白质的营养价值也同时受到有害的影响。

第五节 非普通蛋白质的来源

一、植物蛋白的分离和提纯

油料种籽磨碎后，用溶剂浸提萃取油脂，得到的植物蛋白并未发生变性，仍具有功能性，例如黄豆粉蛋白质含量约为 45%，用以下方法进一步处理，可得到蛋白质含量更高的产品。

(1) 酸性水溶液处理：用酸性溶液、水-乙醇混合溶液或热水处理，可除去可溶性糖类（低聚糖）和矿物质，大多数蛋白质在上述条件下保持适宜的不溶解状态。用蛋白质等电点 pH 的酸性水溶液处理，蛋白质的伸展、聚集和功能性丧失最小，形成的蛋白质浓缩物经干燥后含大约 65%~75%的蛋白质、15%~25%的不溶解多糖、4%~6%的矿物质和 0.3%~1.2%的脂类。

(2) 另一种方法是使脱脂大豆粉在碱性水溶液中增溶，然后过滤或离心沉淀，除去不溶性多糖，在等电点（pH4.5）溶液中再沉淀，随后离心，洗涤蛋白质凝乳，除去可溶性糖类化合物和盐类。干燥（通常是喷雾干燥）后得到含蛋白质 90%以上的分离蛋白。因为过多的加工过程和化学处理以及原粉中蛋白质的回收率很少超过 75%，所以即使按蛋白质含量计算，蛋白质析析物的价格比蛋白质浓缩物贵得多。类似的湿法提取和提纯蛋白质成分的方法，可用于花生、棉籽、向日葵和菜籽等脱脂蛋白粉，以及其他低油脂种籽例如刀豆、豌豆、鹰咀豆等豆科植物种籽。而空气分级法（干法），适用于低油脂种籽磨粉，可以利用富含蛋白质的浓缩物与大的淀粉颗粒之间在大小和比重上的差异进行分离。

采用湿法回收和提纯植物蛋白，应着重考虑蛋白质的溶解度曲线和非适宜的低分子量组分如何除去（图 5-25）。因此，制备向日葵的蛋白质浓缩物，应防止多酚类物质氧化形成的色素与蛋白质发生共价结合。一般在温和条件下除去富含多酚类化合物的种籽外壳，然后从种仁中提取油脂，并用 50%的乙醇水溶液（v/v）可有效地除去油脂中残余的多酚类物质。

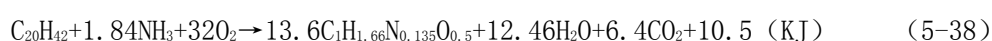
对大多数种籽粗粉或磨粉，用湿法浓缩能除去大部分低相对分子质量有毒物

质或抗营养因子（棉酚、 α -半乳糖苷、黄曲霉毒素和其他成分），但是在提取的蛋白质中某些抗营养因子仍然被浓缩（胰蛋白酶抑制剂和凝集素），因此，必须在高的水活性条件下加热才能使这些化合物失活。由于这种处理方法对蛋白质功能性有不良影响，所以一般是在蛋白质浓缩物掺合到食品中以后再进行处理（即焙烤、蒸煮或加工）。虽然以上的种籽都可以制成蛋白粉，浓缩物和离析物。但从经济效益上考虑，黄豆仍然是上述蛋白质制品的主要原料来源。植物蛋白制品用于各种食品作为蛋白质强化和肉制品的掺合物，不仅价格便宜，而且掺合大豆蛋白质可以使食品产生功能特性。

具有光合作用并合成的植物叶片是取之不尽的植物蛋白质来源，许多禾本科植物（谷物、甘蔗、大豆和苜蓿）的绿色部分含有 80%的水分和 2%~4%的蛋白质。新鲜的叶片和茎秆经过切细、磨细和压榨得到的绿色汁液中，含 10%的干物质和 40%~60%的粗蛋白质，几乎不含纤维素，经压榨部分脱水的纤维状残渣是饲养反刍动物极好的饲料。汁液含有与叶绿体和可溶性蛋白质结合的不溶性蛋白质，加热至 90℃形成蛋白质凝结核，同时可以除去抑制生长的低相对分子质量物质，经洗涤的干燥凝结核含大约 60%蛋白质、10%的脂类、10%的矿物质和各种色素（叶绿素、叶黄素和胡萝卜素）。商业上将其用于家禽的饲料，能使动物的皮、肉和蛋黄带黄色。

二、 单细胞蛋白质

利用微生物进行蛋白质工业化生产，淀粉、制糖工业的糖蜜或乳清的乳糖均可用作发酵底物，假丝酵母属（*Genus candida*）的某些酵母菌种能在纯石蜡甚至粗汽油等类烃物上生长，据报道，已建立的连续发酵罐，酵母生物量每年大约 100 000T，生产能力每小时每升发酵罐工作体积 2g 干酵母，发酵过程中，链烷首先被氧化成对应的脂肪酸，然后经 β 氧化降解。总反应方程为：



式中 $C_1H_{1.66}N_{0.135}O_{0.5}$ 表示平均细胞组成。

离心分离回收酵母细胞，经几种溶剂洗涤后，干燥，每 1t 链烷和 0.11t 氨气可得到大约 1.2t 干酵母（含 63%蛋白质）。

已发现在 5%的甲醇溶液中繁殖假单胞菌属细菌（*Pseudomonas bacteria*）比繁殖酵母菌更经济，每吨甲醇可产生 0.4t 含 80%蛋白质的干菌体，连续培养每升发酵罐每小时工作体积可生产 3.5g 干菌体。

酵母和细菌在过量氮（例如 NH_3 ）存在下，以中等生长速率连续发酵可得到最适宜的细胞组成，即高含量蛋白质和赖氨酸及低含量的核酸，但含硫氨基酸略微缺乏。用热或碱处理细胞，有利于提高蛋白质的消化率、氨基酸有效性和除去核酸。经过这种处理的酵母和细菌，进行动物饲养试验检验其营养价值，即使长

期试验也未发现毒性。对微生物源离析和提纯蛋白质的大量研究,旨在生产适合于人类食用的蛋白质食物。

某些霉菌以纤维素为底物(农业或其他副产物)进行生长繁殖,但对丝状霉菌例如曲霉、根霉和镰孢霉属等分解淀粉的菌株最好的底物是湿法磨碎的谷物或糊化淀粉团(木薯、马铃薯),在30℃培育几天后,表面菌丝体中有大量的蛋白质存在。此外,具有光合作用能力的单细胞藻类也可作为人类蛋白质食物的来源。

第六节 食品蛋白质在加工和贮藏中的变化

食品加工通常涉及到加热、冷却、干燥、化学处理、发酵、辐照或其他各种处理。加热是最常用的方法,它可以使微生物和内源酶失活,达到消毒灭菌、防止食品在贮藏中氧化和水解,同时获得安全性高和感官上需宜的加工产品。此外,通过加热还能使某些蛋白质中的有害物质或非需宜成分除去,例如牛的 β -乳球蛋白、 α -乳清蛋白和大豆蛋白中存在的某些过敏因子和抗营养因子,以及蛋白质结合的不良风味物质。虽然加热能对食品产生有益影响,但同样也会对食品的营养价值和功能特性造成损害,下面将分别进行讨论。

一、 营养价值的变化和毒性

人们对食品蛋白质在烹调和加工过程中的影响已经进行了广泛深入的研究。大多数情况下,食品在加工过程中蛋白质的营养价值不至于受到不利的影响,甚至在某些情况下还可以得到改善。某些损害营养价值的反应通常是由于蛋白质的一级结构发生改变,从而造成必需氨基酸含量的降低或抗营养和有毒的衍生物的生成。

1. 适度热处理引起的蛋白质变性

多数食品蛋白质只能在窄狭的温度范围内(60-90℃, 1h 或更短时间)才具有生物活性或功能性。但是适度加热仍然可引起蛋白质结构的改变和变性,球蛋白水溶液在加热时溶解度降低,同时影响与溶解度相关的某些功能特性。如果始终保持适度热处理,既不会破坏共价键也不至于形成新的共价键,说明一级结构未受到有害的影响。从营养学的观点讲,蛋白质对温和热处理所产生的变化一般是有利的。

热烫或蒸煮能使酶失活,例如脂酶、脂肪氧合酶、蛋白酶、多酚氧化酶和其他氧化酶及酵解酶类,酶失活能防止食品产生不应有的颜色,也可防止风味质地变化和维生素的损失。菜籽经过热处理可使黑芥子硫苷酸酶(myrosinase)失活,因而阻止内源硫葡萄糖苷形成致甲状腺肿大的化合物,即5-乙炔基-2 硫^噻唑烷酮。

食品中天然存在的大多数蛋白质毒素或抗营养因子均可通过加热使之变性

和钝化，例如微生物污染所产生的大多数蛋白质毒素（肉毒杆菌毒素在 100℃钝化，而金黄色葡萄球菌内毒素仍不失活）；豆科植物种籽或叶（例如大豆、花生、菜豆、蚕豆、豌豆和苜蓿等）中所含的抑制或结合人体蛋白质水解酶的蛋白质，这些蛋白质能降低膳食蛋白质的消化力和营养价值（例如大豆种籽中存在的胰蛋白酶抑制剂和胰凝乳蛋白酶抑制剂，能使几种动物的胰脏过度分泌和增生，并伴随出现生长缓慢见表 5-23）。

表 5-23 生大豆粉对几种动物的生理效应

种类	生长抑制剂	胰脏	
		大小	酶分泌
鼠 ^a	有	增大	增加
小鸡 ^a	有	增大	增加
猪 ^a	有	无变化	减少
小牛	有	无变化	减少
狗	无	无变化	暂时增加

a. 成年动物可保持原来体重不减轻，但对胰脏仍有影响。

豆科植物中的植物血球凝集素（或外源凝集素）是一种能和多糖苷结合的热不稳定性蛋白质，在膳食中能降低天然植物蛋白的营养价值。可能是由于凝集素与肠道刷状缘细胞膜多糖苷形成复合物，使氨基酸的转移和消化能力减弱，并对人和动物产生毒性。因此，也可以通过加热处理的方法消除它们的不良影响。鸡蛋蛋白中的蛋白酶抑制剂如胰蛋白酶抑制剂和卵类粘蛋白抑制剂、牛乳中的蛋白酶抑制剂、血纤维蛋白溶酶抑制剂，当有水存在时经适度热处理，都可使这些抑制剂失活。

种籽、磨粉或蛋白质浓缩物在高温条件下，如高压灭菌、膨化、消毒、蒸煮、焙烤等，所有抗营养因子都会变性失活（图 5-36），由于适当热处理可明显提高植物蛋白的营养价值，因此某些植物蛋白质饲料通常需经过热处理。

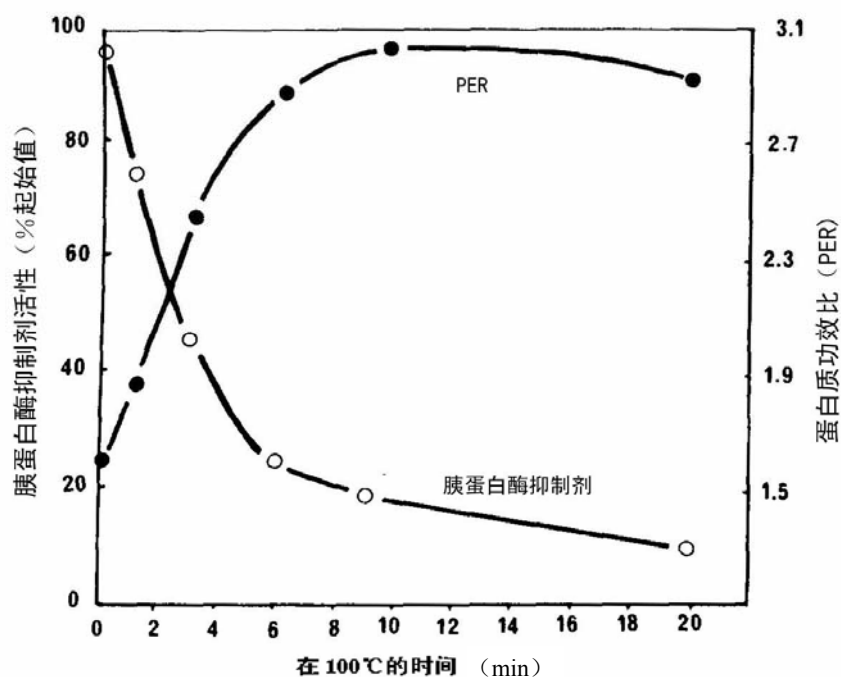


图 5-36 蒸汽对胰蛋白酶抑制活性和饲料大豆粉蛋白质功效比的影响

许多蛋白质例如大豆球蛋白、胶原蛋白和卵清蛋白经适度热处理后更易消化，其原因是蛋白质伸展，被掩蔽的氨基酸残基暴露，因而使专一性蛋白酶能更迅速地与蛋白质底物发生作用。此外，大豆蛋白经热处理还可除去蛋白质结合的不良风味物质，以及因脂肪氧合酶作用产生的异味。

2. 蛋白质分离引起的氨基酸损失

蛋白质在提纯、浓缩或分离过程中可引起蛋白质成分和总氨基酸含量的改变。例如用大豆和其他植物制备的蛋白质离析物，在等电点沉淀可溶性蛋白质组分时，含硫氨基酸的蛋白质损失大于其他蛋白质部分，因而从等电点沉淀得到的分离蛋白与粗蛋白相比，蛋白质组成和营养价值均发生不同程度的变化。例如蛋氨酸和色氨酸在粗椰子粉中的评分分别为 100 和 89，而在等电点沉淀的椰子分离蛋白中化学评分仅为零。同样，采用超滤和离子交换法制备的乳清浓缩蛋白（WPC）中胱和脲的含量发生了显著的变化，结果影响其起泡性。同时也应注意，在某些情况下蛋白质抑制剂和有毒因子，可能被浓集在提纯的蛋白质制剂中。

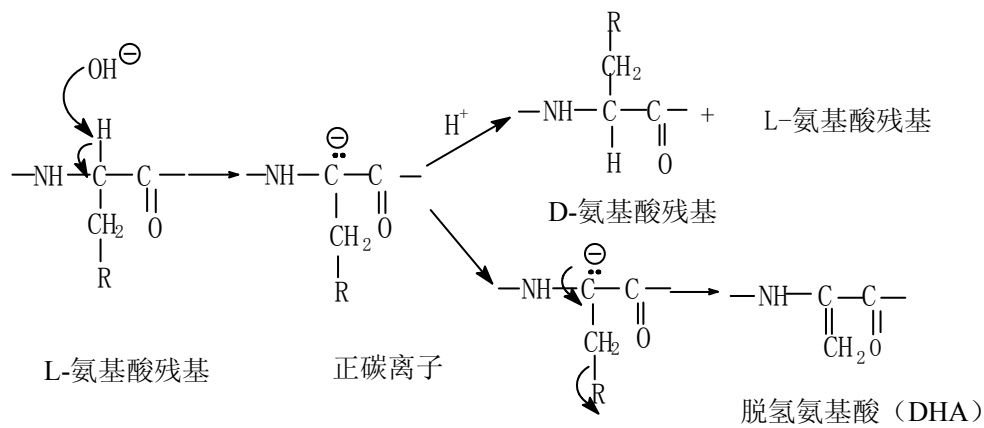
3. 氨基酸的化学变化

蛋白质或蛋白质食品在不添加其他物质的情况下进行热处理，可引起氨基酸脱硫、脱酰胺、异构化、水解等化学变化，有时甚至伴随有毒物质的产生，这主要取决于热处理的条件。在 115°C 灭菌，会使半胱氨酸和胱氨酸部分破坏（不可

逆变性), 生成硫化氢、二甲基硫化物和磺基丙氨酸。从鱼、肉的肌肉、牛乳及很多蛋白质的模拟体系中已测定出这些反应的生成物, 所产生的硫化氢和其他挥发性化合物能使加热食品产生风味。

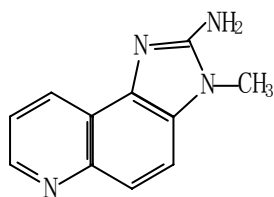
蛋白质在超过 100°C 时加热, 会发生脱酰胺反应, 释放出的氨主要来自谷酰胺和天冬酰胺的酰胺基。这些反应并不损害蛋白质的营养价值。

蛋白质在有氧存在下进行热处理, 色氨酸被部分破坏。温度超过 200°C 的剧烈处理和碱性 pH 环境中热处理都会导致 L-氨基酸残基异构化, 它包括 β-消去反应和形成负碳离子的过程, 负碳离子经质子化可随机形成 L 或 D 型氨基酸的外消旋混合物。

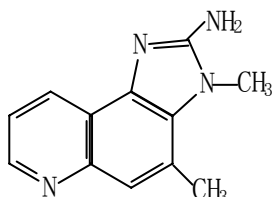


由于大多数 D-氨基酸不具有营养价值, 因此, 必需氨基酸残基发生外消旋反应, 使营养价值降低约 50%。此外 D 型异构体的存在可降低蛋白质消化率, 因为 D 残基肽键在体内比 L 残基肽键难以被胃和胰蛋白酶水解, 不易通过小肠吸收, 即使被吸收, 也不能在体内合成蛋白质。另外, 某些 D 型氨基酸 (如 D-脯氨酸) 还具有神经毒性, 毒性的大小与肠壁吸收的 D 氨基酸量成正比。

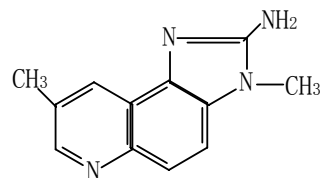
经剧烈热处理 (例如煎炸和烧烤) 的蛋白质可生成环状衍生物, 其中有些具有强致突变作用。肉在 200°C 以上加热环化生成氨基咪唑基氮杂环 (AIAS) 类致突变化合物。其中一类是由肌酸酐、糖和某些氨基酸 (例如甘氨酸、苏氨酸、丙氨酸和赖氨酸) 的浓缩产品在剧烈加热时生成的咪唑喹啉 (IQ) 类化合物。下面 3 种是在烧烤中发现的最强的致突变剂。



2-氨基-3-甲基咪唑-
(4, 5-f) 喹啉
(IQ)



2-氨基-3, 4-二甲基咪唑-
(4, 5-f) 喹啉
(MeIQ)



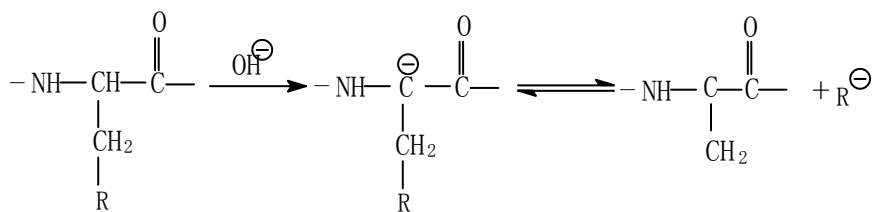
2-氨基-3, 8-二甲基咪唑-
(4, 5-f) 喹啉
(MeIQx)

在碱性 pH 条件下热处理时，精氨酸转变成鸟氨酸、尿素、瓜氨酸和氨，半胱氨酸转变成脱氢丙氨酸，从而引起氨基酸损失。在酸性 pH 加热时，丝氨酸、苏氨酸和赖氨酸的含量也会降低。

4. 蛋白质交联

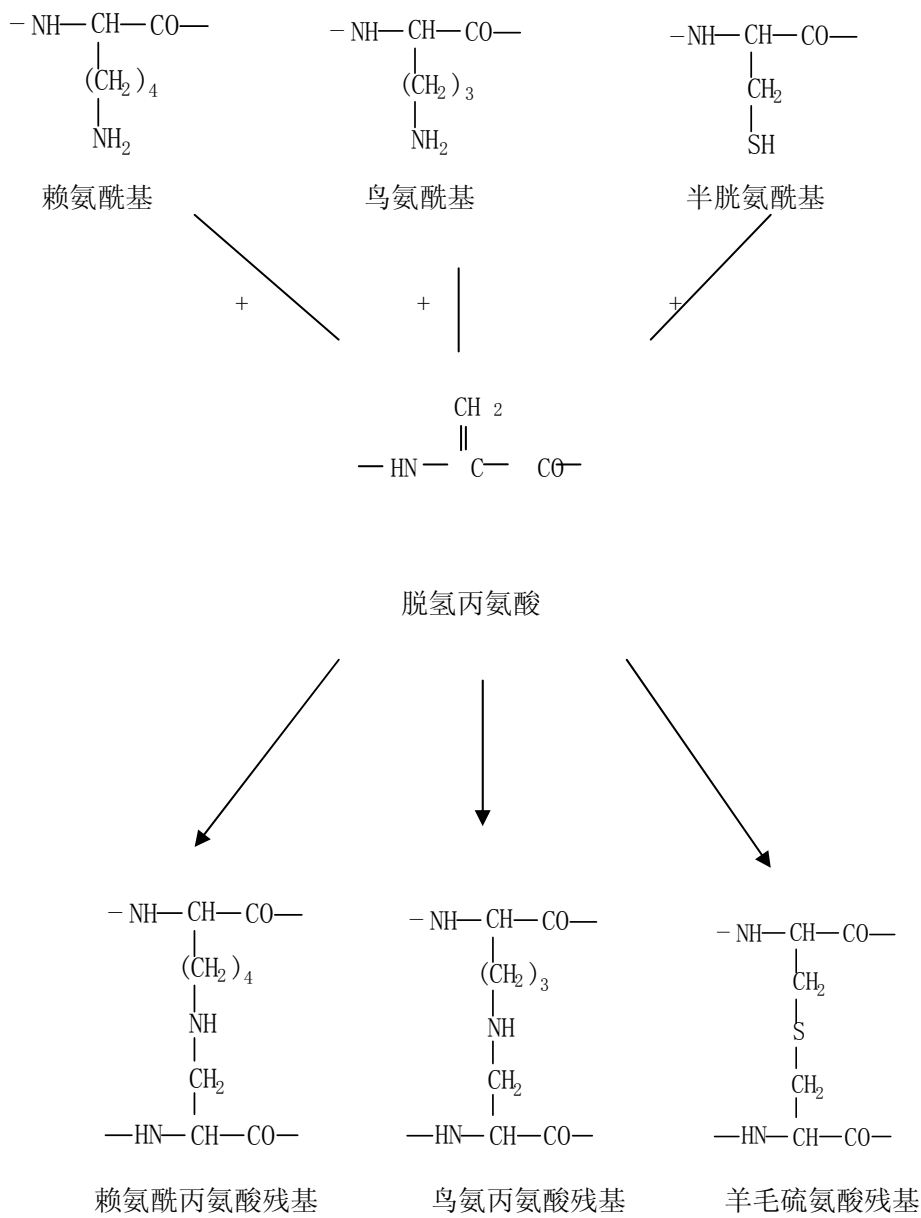
某些天然状态的蛋白质只部分被人体消化，因为多肽链存在着共价键交联连接，胶原蛋白、弹性蛋白和角蛋白就属于这一类。这类蛋白质的共价键有锁链（赖氨酸素）（desmosine）连接，它由四个赖氨酸分子缩合而成，例如锁链素和异锁链素。ε-N-（γ-谷氨酰）赖氨酰基或 ε-N-（γ-天冬氨酰基）赖氨酰基型的共价异肽键以及二硫键或脂键（胶原蛋白）。

在碱性 pH（或者接近中性）条件下进行热处理可导致赖氨丙氨酸，羊毛硫氨酸、鸟氨丙氨酸的生成，以及分子间或分子内形成共价交联键，这些交联键是由赖氨酸、半胱氨酸或鸟氨酸等残基与脱氢丙氨酸（DHA）残基发生缩合反应生成的。半胱氨酸或磷酸丝氨酸残基经 β-消去反应形成脱氢丙氨酸。



R=SH或OPO₃H₂。

DHA 残基的反应活性很强，与赖氨酸残基的 ε-氨基、鸟氨酸残基的 δ-氨基和半胱氨酸残基的巯基容易结合，分别形成含交联键的赖氨丙氨酸、鸟氨丙氨酸和羊毛硫氨酸。



在蛋白质中由于存在许多可反应的赖氨酰基残基，因此在经碱处理的蛋白质中，赖氨酰丙氨酸残基是主要的交联形式。

DHA 与精氨酸、组氨酸、苏氨酸、丝氨酸、酪氨酸和色氨酸等残基通过缩合反应也可以形成不常见的衍生物。

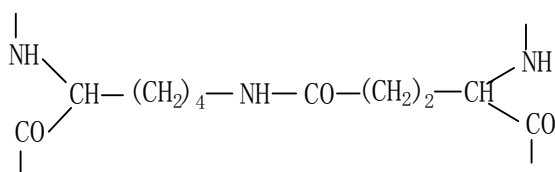
氨可以阻止以上这些交联化合物的形成，因为 DHA 与氨反应可生成 β-氨基丙氨酸。在碱性条件下，半胱氨酸、葡萄糖、亚硫酸氢钠或连二亚硫酸钠以及预先乙酰化的赖氨酸残基也能使蛋白质中赖氨酰丙氨酸的生成量减少。氨基酸的含量和蛋白质的三维结构同样影响赖氨酰丙氨酸的生成量。当蛋白质形成这种共价键时，其营养价值往往低于天然蛋白质。研究表明，蛋白质的功效比、净蛋白质利用率和蛋白质的生理价值都将随着处理时剧烈程度的增加（碱度、温度和

时间)成比例的降低。

鼠摄入含赖氨酰丙氨酸的蛋白质,通常伴随发生腹泻、胰腺肿大和脱毛。必需氨基酸残基形成共价键、异构化和生成有毒物质是鼠出现这些症状的原因。鼠摄入游离的(100ppm)或蛋白质(3000ppm)结合的赖氨酰丙氨酸可诱发肾原细胞异常增大、肾原细胞核异常增大和肾钙质沉着等疾病。经粪便排泄的蛋白质,结合型赖氨酰丙氨酸约占50%,而被吸收的赖氨酰丙氨酸大部分经尿排出。同位素示踪法证明,用 ^{14}C 标记的赖氨酰丙氨酸,在鼠肾中部分分解,而且还发现鼠尿中含有多种分解产物,其中有些与其他动物体内已鉴定的分解产物不同。由此可见,赖氨酰丙氨酸在鼠体内的毒性作用与这些异常衍生物有关。试验表明,赖氨酰丙氨酸的形成只对鼠是重要的,而鹌鹑、仓鼠和猴在摄取赖氨酰丙氨酸后,肾脏并未造成任何损伤。

食品中在加工中用碱或较温和的热处理(植物蛋白增溶、油料种籽中黄曲霉毒素脱毒、酪蛋白酸盐的制备和玉米加石灰烹煮),仅生成少量的赖氨酰丙氨酸及其相应产物。

食品灭菌时过度热处理可产生不良影响,采用蛋白质和只含少量糖类的蛋白质食品(肉、鱼)的模拟体系,在剧烈热处理条件下进行试验,结果发现赖氨酸和谷氨酰胺或赖氨酸残基与天冬氨酸残基之间分别形成 ϵ -N-(γ -谷氨酰)赖氨酰基或 ϵ -N-(β -天冬氨酰)赖氨酰基型共价交联键异肽。参与这种反应的赖氨酸残基可达15%。从营养学观点来看,蛋白质发生这种反应不但降低氮消化率和蛋白质的功效比,同时还影响蛋白质的生物价。另外,不只是赖氨酸,许多其他氨基酸的营养有效性也明显降低。由于谷氨酰基-赖氨酰基或天冬氨酰基-赖氨酰基交联键产生立体位阻,阻碍蛋白酶到达水解作用的位点,因而蛋白质在体内消化变得缓慢。游离的 ϵ -N-(γ -谷氨酰基)L-赖氨酸可作为鼠或鸡的赖氨酸来源,而 ϵ -N-(β -天冬氨酰基)L-赖氨酸则不能用来代替。



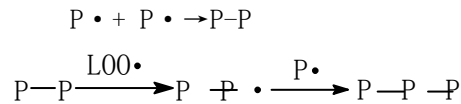
ϵ -N(γ -谷氨酰基)-L-赖氨酰基

蛋白质受到 γ 辐射,或者在氧化脂类存在下储存,可发生-SH和-S-S-的交换反应和形成分子间或分子内的共价交联键,主要是从氨基酸残基 α -碳生成的游离基开始发生聚合。



天然蛋白质 脂类自由基 脂类过氧化物

形成的蛋白质自由基 $P\cdot$ ，随后发生多肽链聚合等



此外， γ 辐射还可以引起低水分食品中的多肽链断裂。

在 H_2O_2 和过氧化氢酶存在时，酪氨酸残基发生氧化性交联，生成二酪氨酸残基。

5. 氧化剂的影响

氧化剂在食品在加工过程中使用相当广泛。例如过氧化氢是常用的杀菌剂和漂白剂，例如在乳品工业中用作干酪加工的牛乳冷灭菌或改善鱼蛋白质浓缩物和谷物面粉、麦片、油料种籽蛋白质析物等产品的色泽。此外，还用于含黄曲霉毒素的面粉、豆类和麦片的脱毒以及种籽去皮。其他过氧化物，例如过氧化苯甲酰是面粉和乳清粉常用的漂白剂。次氯酸钠具有杀菌作用所以应用也非常广泛，例如肉品的喷雾法杀菌，黄曲霉毒素污染的花生粉脱毒，其主要原理是根据这种毒素的内脂环在碱性介质中开环后很容易被次氯酸所氧化，生成的衍生物是无毒的，从而达到脱毒的目的。然而上述氧化剂往往会引起蛋白质中氨基酸残基的变化。因此，使用时必须注意。

脂类氧化产生的过氧化物及其降解产物存在于很多食品体系中，它们通常是引起蛋白质成分发生降解的原因。氨基酸残基由于光氧化反应、辐射、亚硫酸盐-微量金属-氧体系的作用、热空气干燥和发酵过程中充气等原因，也可以发生氧化。

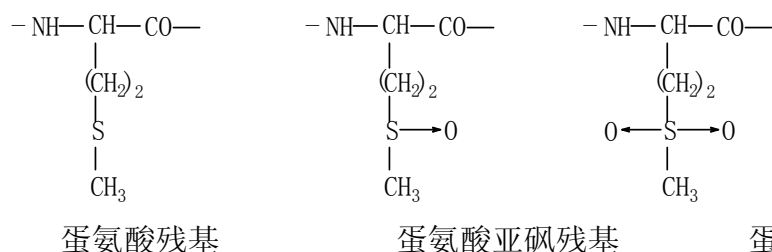
很多植物中存在多酚类物质，当这些化合物在中性或碱性 pH 条件下容易被氧化生成醌类化合物或聚合物。这种反应产生的过氧化物属于强氧化剂，因而容易引起蛋白质中氨基酸的损失。另外一些色素通过光敏氧化或碱加工处理产生的自由基等，也对蛋白质的营养性和功能性造成影响。

对氧化反应最敏感的氨基酸是含硫氨基酸和色氨酸，其次是酪氨酸和组氨酸。以下分别讨论这几种氨基酸的氧化反应。

(1) 蛋氨酸的氧化

强氧化剂如过甲酸能使蛋氨酸残基氧化成蛋氨酸砒，过氧化氢将游离的或结合的蛋氨酸氧化成蛋氨酸亚砒，有时也被氧化成蛋氨酸砒。例如，将 pH5-8 的 10mmol/L-蛋氨酸溶液或 pH7 的 5%酪蛋白溶液与 0.1mol/L 过氧化氢，于温度 50℃

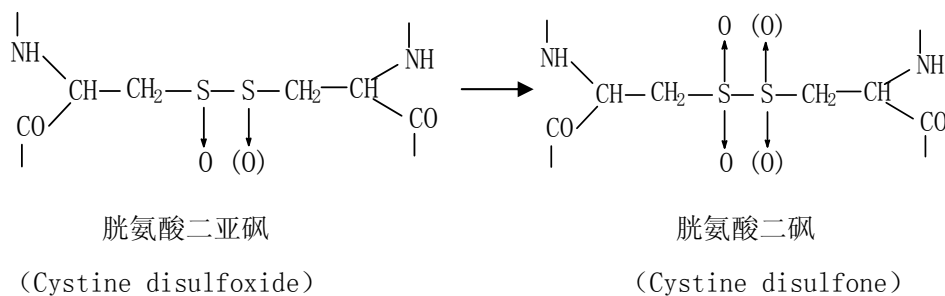
加热 30min，蛋氨酸将全部转变成蛋氨酸亚砷。此外，蛋白质与次氯酸钠、亚硫酸盐-锰-氧体系、氧化的脂类或多酚类化合物共存时，也可以形成这种氧化产物。在有光、氧和敏化剂（例如核黄素和次甲基蓝）存在时，蛋氨酸残基由于光氧化作用可生成蛋氨酸亚砷。

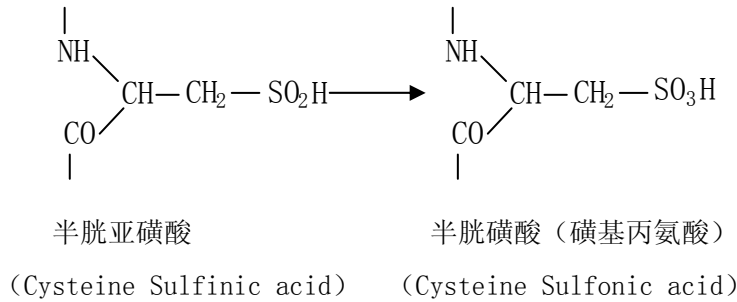
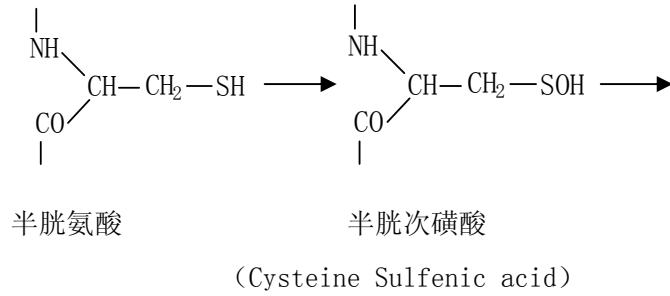


对氧化结合型蛋氨酸的营养效果的研究表明，蛋氨酸砷对鼠是生理上不可利用的物质，甚至还表现出某种程度的毒性。然而，游离的或蛋白质结合的蛋氨酸亚砷可代替鼠或鸡饲料中蛋氨酸，所产生的效率依蛋氨酸构型（L-或 D-型）而异。将蛋氨酸全部氧化成亚砷的酪蛋白进行鼠喂饲试验，结果表明蛋白质功效比或蛋白质净利用率比对照的未氧化酪蛋白大约低 10%。这可能是因为在蛋白质消化时释放出蛋氨酸亚砷，后在合成蛋白质之前，蛋氨酸亚砷被吸收并还原成蛋氨酸。如果用经消化的酪蛋白喂饲鼠，鼠的血液和肌肉中蛋氨酸亚砷的水平增高，这说明蛋氨酸亚砷在体内的还原过程是缓慢的。

(2) 半胱氨酸和胱氨酸的氧化

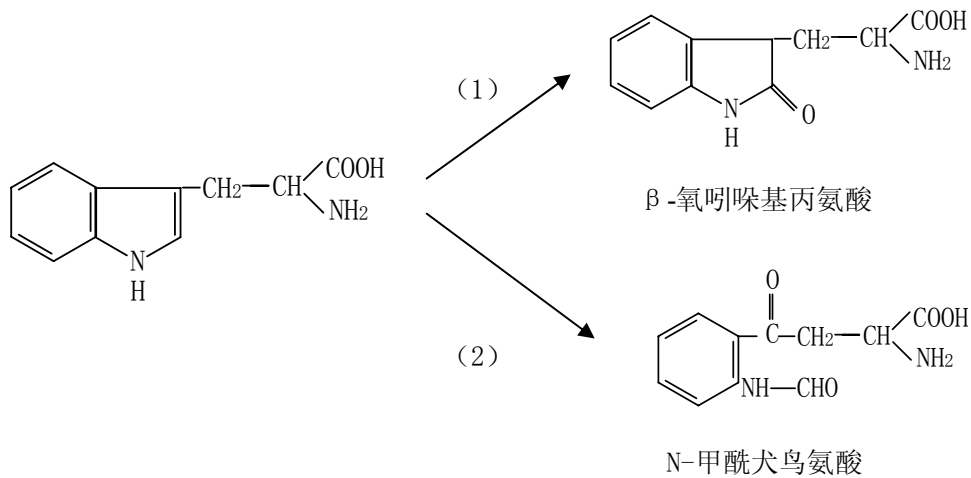
半胱氨酸和胱氨酸有多种氧化衍生物，由于它们不稳定，所以难以对每一种产物进行鉴定，但是其中一些已经用核磁共振法鉴定。从营养学的观点来看，L-胱氨酸的一、二亚砷衍生物和半胱次磺酸能部分代替 L-半胱氨酸，而磺基丙氨酸和半胱亚磺酸则不能代替 L-半胱氨酸。





(3) 色氨酸的氧化

色氨酸是人体必需氨基酸，有着重要的生理作用，因此在食品加工中必须着重考虑。在强氧化剂存在时，游离色氨酸氧化成β-氧吲哚丙氨酸和N-甲酰犬尿氨酸。



以上反应中，(1)是在有过甲酸 (RCOOOH)、二甲基亚砷 (CH₃SOCH₃) 和N溴 (或氯琥珀酰亚胺 [(CH₂CO)₂Br]) 存在下形成的产物，(2)是在有过甲酸、碘酸钠 (NaIO₄)、臭氧 (O₃) 和O₂+hν 的情况下生成的产物。

色氨酸与二甲基亚砷或N-溴琥珀酰亚胺反应，生成如反应(1)所示的β-氧吲哚基丙氨酸。用N-溴琥珀酰亚胺或N-氯琥珀酰亚胺处理蛋白质将首先引起色氨酸吲哚基端的肽键水解，然后色氨酸部分发生光氧化作用，生成N-甲酰基犬尿氨酸 (见上述反应(2))，在后一种情况下，还可以形成β-咔啉，六氢吡咯并吲哚和喹啉等衍生物。此外，色氨酸也能被过氧化氢氧化，采用高效液相

色谱法已检测出在 278nm 波长处有吸收的三、四种衍生物，其中一种相当于犬尿氨酸，它们的极性均大于色氨酸。此外，利用离子交换色谱柱，可分离得到许多种能与茚三酮反应的化合物，说明过氧化氢氧化色氨酸，并不是一个简单的化学反应。

从营养学观点来看，犬尿氨酸无论是甲酰化或非甲酰化，至少对鼠来说它们都不能代替色氨酸的作用。更值得注意的是。犬尿氨酸注射至动物膀胱内会产生致癌作用，色氨酸的这类降解产物对培养的鼠胚胎成纤维细胞的生长有抑制作用，并且表现出致突变性。

游离色氨酸和蛋氨酸用过氧化氢氧化，两者的反应速率大不相同，在接近中性 pH 和温度 50℃ 时，用浓度为 0.01~1mol/L 的过氧化氢溶液分别氧化这两种氨基酸，结果发现，蛋氨酸 (10mmol/L) 比色氨酸 (10mmol/L) 的氧化速率快几千倍，很可能是因为过氧化物和蛋白质的接触首先引起蛋氨酸或半胱氨酸残基发生氧化，然后才能氧化色氨酸。

6. 蛋白质与糖类化合物或醛类的相互作用

含有还原性糖或羰基化合物（例如脂类氧化产生的醛和酮）的蛋白质食品，在加工和贮藏过程中可能发生非酶褐变（麦拉德反应）。因为非酶褐变中的许多反应具有高活化能，所以在蒸煮、热处理、蒸发和干燥时这些反应明显地增强。中等含水量的食品，其褐变反应速率最大，例如焙烤食品、炒花生、焙烤早餐谷物和用滚筒干燥的奶粉发生褐变反应。

麦拉德反应对营养的影响至今仍然是研究的课题。赖氨酸的损失可以用体内试验或快速化学方法检测。通常采用的方法是测定活性赖氨酸残基，例如，用 1-氟-2, 4-二硝基苯 (FDNB) 试剂测定活性赖氨酸残基（蛋白质结合的未取代 ϵ -氨基赖氨酸）。赖氨酸残基与 FDNB 反应以后，接着用酸水解蛋白质，经过萃取即可测定所释放出的 ϵ -N-二硝基苯基赖氨酸 (ϵ -DNP 赖氨酸) (图 5-37)。假若用浓盐酸水解未与 FDNB 反应的蛋白质，结果赖氨酸的阿马道莱产物 (ϵ -N-脱氧果糖赖氨酸酰基化合物) 所释放出的游离赖氨酸约为最初取代赖氨酸的 50%，剩余部分是一些新的衍生物，这些衍生物可以用离子交换色谱法进行测定，用来作为衡量取代赖氨酸残基和蛋白质损失的一项指标。

按希夫氏碱反应的赖氨酸（麦拉德反应初期）仍然是生理上的有效化合物，因为在胃内的酸性条件下它可以被释放出来。而阿马道莱或汉斯产物中的赖氨酸则不能为鼠所利用，但这种产物用强酸处理后，约有 50% 获得再生，说明赖氨酸以这种形式结合可导致其营养价值的大量损失，表 5-24 表明各种加工方法对牛乳中赖氨酸的影响。

此外，阿马道莱产物对营养的影响还不完全了解，有人认为这类产物可能抑

制某些必需氨基酸在肠道内的吸收。

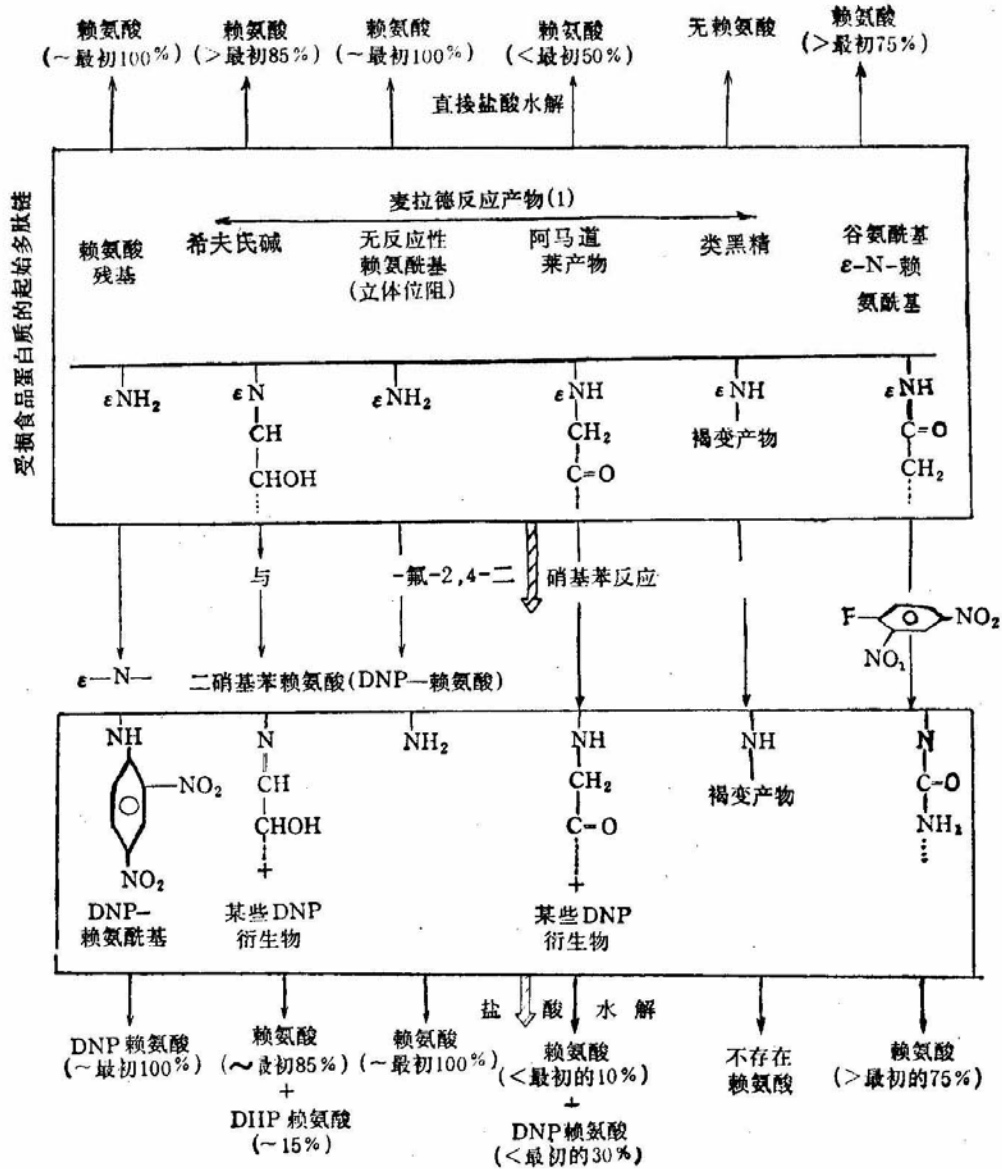


图 5-37 不同程度麦拉德反应的赖氨酸残基与 FDNB 反应和未反应的残基经酸水解后赖氨酸的回收率

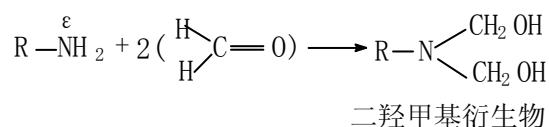
表 5-24 炼乳和奶粉中的赖氨酸含量和有效性

制备方法	总赖氨酸	FDNB 反应 (g/16gN)	有效赖氨酸	有效赖氨酸
	(g/16gN)		(试管中蛋白质水解) (g/16gN)	(鼠生长分析) (g/16gN)
冷冻干燥	8.3	8.4	8.3	8.4
喷雾干燥	8.0	8.2	8.3	8.1

蒸发	7.6	6.4	6.2	6.1
滚筒干燥（温和加热）	7.1	4.6	5.4	5.9
滚筒干燥（高温）	6.1	1.9	2.3	2.0

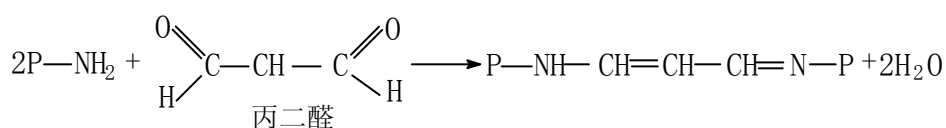
麦拉德反应后期，类黑精分子间或分子内形成共价键，能明显地损害其蛋白质部分的可消化性，加热某些蛋白质-糖类化合物模拟体系所产生的类黑精还有致突变作用，它的效力决定于麦拉德反应程度。类黑精是不溶于水的物质，肠壁仅能微弱地吸收，因此生理效应危险性减小，但是低分子量类黑精前体较容易吸收，它对动物产生的作用仍在研究之中。

各种醛例如棉酚、戊二醛均可用来防止蛋白质饲料在反刍动物胃中发生的脱氨反应，由脂类氧化形成的丙二醛和木屑熏烟产生的醛类，通过形成共价键与蛋白质发生反应，已成为鞣革或固相酶载体的研究对象，至今尚未完全阐明其复杂的反应机理。蛋白质结合的赖氨酸 ϵ -氨基能与甲醛发生缩合反应，生成二羟甲基衍生物。



鱼体表面的细菌繁殖可产生甲醛，甲醛和蛋白质反应被认为是鱼肌肉在冷藏中变硬的原因。

丙二醛可以与各种肽链的游离氨基反应，生成 1-氨基 3-亚氨基丙烯共价键，从而改变蛋白质的某些功能性质，例如溶解度或持水量。经丙二醛变性的酪蛋白不易被蛋白酶水解。



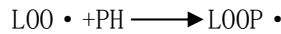
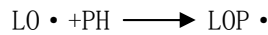
7. 食品中蛋白质的其他反应

(1) 与脂类的反应：

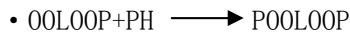
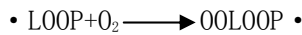
脂蛋白是由蛋白质和脂类组成的非共价复合物，广泛存在于活体组织中。它影响食物的物理和功能性质。在多数情况下，脂类成分经溶剂萃取分离，不致影响蛋白质成分的营养价值。脂类氧化产物与蛋白质之间可产成共价键结合，某些食物和饲料的脂类在氧化后，发生蛋白质-脂类的共价相互作用，例如冷冻或干制鱼、鱼粉和油料种籽。脂类的过氧化与蛋白质的共价结合和脂类诱导的蛋白质聚合反应包括以下两种机理。

1) 自由基反应:

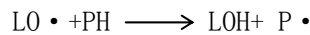
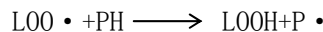
脂类氧化生成的自由基 $LO\cdot$ 、 $LOO\cdot$ 和蛋白质分子发生反应, 形成脂类-蛋白质自由基。



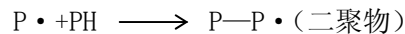
此反应系多种脂类自由基引起的包含蛋白质链交联的聚合反应。



脂类自由基与蛋白质反应, 同样可生成蛋白质自由基。



在半胱氨酸残基的 α -碳原子和硫原子上可形成蛋白质自由基, 蛋白质链同自由基发生直接聚合反应, 即



2) 羰氨反应:

不饱和脂肪酸氧化生成醛衍生物, 经希夫氏碱反应与蛋白质的氨基酸结合, 例如丙二醛与蛋白质反应形成共价交联键。

脂类-蛋白质作用是有害的反应, 酪蛋白与氧化亚油酸乙酯反应, 不仅使几种氨基酸的有效性降低, 而且降低其消化率、蛋白质功效比和生理价值。

蛋白质食品中的脂类氧化在其营养价值大量破坏以前, 在感官上就已不能被接受。而动物饲料例如鱼粉并非如此。

(2) 与多酚类化合物反应:

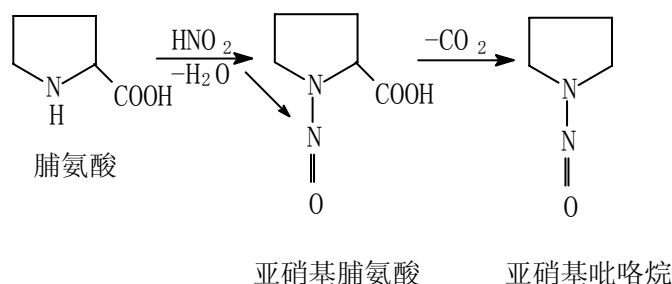
许多植物中的天然多酚类化合物, 例如儿茶酚、咖啡酸、棉酚、单宁、原花色素和黄酮类化合物等, 在有氧存在的碱性或接近中性 pH 介质环境中, 由于多酚氧化酶的作用被氧化成对应的醌。生成的醌类化合物可以聚合成巨大的褐色色素分子, 或者与某些氨基酸残基反应, 例如醌类化合物与赖氨酸或半胱氨酸残基发生的缩合反应, 或与蛋氨酸、半胱氨酸及色氨酸残基发生的氧化反应, 结果引起氨基酸的损失。

在以富含多酚的植物原料例如苜蓿叶或向日葵种籽制备蛋白质离析物时, 多酚的氧化物和蛋白质相互作用可以使有效赖氨酸含量降低。

(3) 与亚硝酸盐反应:

亚硝酸盐与二级和三级胺的反应, 生成 N-亚硝胺, 某些氨基酸例如脯氨酸、色氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、精氨酸或组氨酸 (游离的或蛋白质结合的) 构成反

应底物。蛋白质食品在烹调或胃酸 pH 条件下，通常容易发生这种反应，已知这类反应所生成的亚硝胺或亚硝酰胺是强致癌物。



肉类食品中通常存在的极低浓度的亚硝酸盐，不致引起赖氨酸、色氨酸和半胱氨酸的含量或有效性明显降低。

(4) 与卤化溶剂反应：

三氯乙烯能与蛋白质巯基结合，生成的 S-二氯乙烯-L-半胱氨酸可能是用三氯乙烯溶剂提取大豆粉时产生的有毒因子，可引起牛仔再生障碍性贫血。

脂溶性溶剂例如二氯甲烷、四氯乙烷和氟碳化合物可能都不与蛋白质起反应。

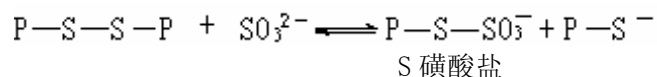
在弱碱条件下，1, 2-二氯乙烷能与鱼蛋白反应，使胱氨酸、组氨酸和蛋氨酸的可利用性降低。蛋白质巯基可被烷基化，在某些情况下是通过能抗蛋白酶的硫醚键与蛋白质链发生交联。

三氯化氮曾用作面粉的成熟剂，但这种化合物与小麦蛋白质的蛋氨酸残基反应，则生成有毒物质甲硫氨酸磺基亚氨 (methionine sulfoximine)。

甲基溴又名溴甲烷是谷物熏蒸剂，与谷物蛋白质的赖氨酸残基反应可生成 N-ε-甲基化衍生物，可能会降低蛋白质消化率。此外，组氨酸和硫氨酸残基也能够发生甲基化反应。

(5) 与亚硫酸盐反应：

亚硫酸盐离子与二硫化物反应，生成 S 磺酸盐和硫醇，在 pH7 时反应加快。



蛋白质中很多胱氨酸残基不容易受到亚硫酸盐的作用，说明这种氨基酸残基是比较稳定的。S-磺酸盐无论是在强酸或强碱溶液中都不稳定，一般被分解成二硫化物。从而可以推断亚硫酸盐对蛋白质的营养价值并无有害的影响，亚硫酸盐因为能与羰基化合物反应，因此可防止蛋白质发生不利于营养价值的麦拉德反应。

二、蛋白质功能性质的变化

蛋白质作为食品配料，在配制或应用时通常要进行物理或化学处理，这些处

理会影响蛋白质的功能性。例如在提取和纯化时，应尽可能减少蛋白质结构和功能性质的损害。另一方面，对蛋白质有目的的化学修饰，改进蛋白质原有的性质，或使之产生一些新的性质。食品在加工过程中，应该考虑蛋白质作为掺和配料加工成食品以后所产生的功能性变化。

事实上温和的物理或化学处理方法通常只改变蛋白质构象，而剧烈热处理或使用高活性化学物质不仅改变蛋白质的构象，而且使其一级结构改变。

1. 蛋白质二级、三级结构改变所引起的功能性变化

(1) 化学处理的影响

1) 调节蛋白质溶液至等电点pH或用盐析法使蛋白质沉淀，是简单而有效的分离、提纯蛋白质的方法。这些方法可以使蛋白质可逆聚集，一般不致于发生完全或不可逆伸展，特别是在低温下进行处理（酪蛋白除外），等电点集聚和沉淀均可导致其四级胶束结构破坏，因为羧基被质子化使得羧基- Ca^{2+} -羧基键变弱或者断裂，释放出磷酸钙并增加酪蛋白分子间的静电吸引力。等电酪蛋白具有抗凝乳酶水解的作用，如同天然胶束酪蛋白可以不受钙离子的影响一样。

2) 从蛋白质溶液中去除部分水，会使所有非水组分的浓度增大，结果增强了蛋白质-蛋白质、蛋白质-糖类化合物和蛋白质-盐类的相互作用。这类相互作用能明显改变蛋白质的功能性质，特别是在较高温度下除去水分时效果更为明显。用超滤去除牛乳中水分可以得到极易溶解的蛋白质浓缩物。乳清蛋白质浓缩物的超滤程度（或二次过滤，即超滤时向滞留物中添加水）决定于乳糖-蛋白质和盐类-蛋白质的比例。这些同样是影响乳清蛋白质热胶凝性质的因素。

3) 乳清用阳离子交换树脂处理时，蛋白质的 Ca^{2+} 、 K^+ 和 Na^+ 等阳离子被除去，生成低盐乳清，用低盐乳清制成的蛋白质浓缩物具有非常好的胶凝作用和起泡性，采用电渗析和浓缩法也可得到同样良好胶凝性和起泡性的产品

4) 酸性或碱性pH能促使阴离子或阳离子与蛋白质结合，并影响蛋白质的功能性质，特别是溶解度。在中性和碱性pH时， Ca^{2+} 的存在使许多蛋白质的溶解度降低（图 5-38）在等电点pH时， NaCl 增加了蛋白质的溶解度，但在碱性pH时溶解度降低。因此，用电渗析、离子交换、反渗透或超滤等方法预先除去阳离子，有利于植物蛋白或酪蛋白的碱性增溶。

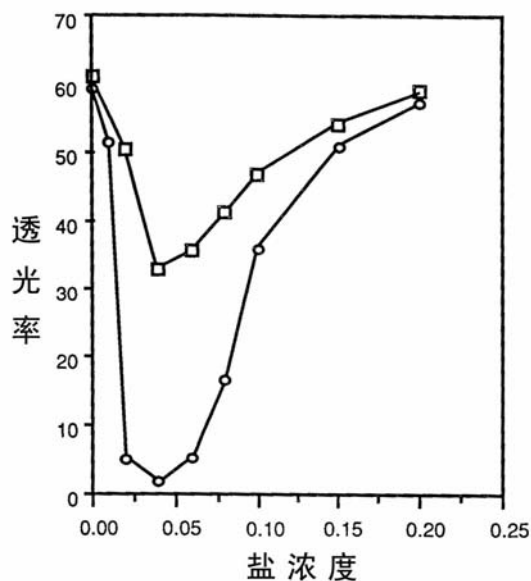


图 5-38 蛋白质功能性-溶解度

乳清蛋白离析物（5%）在CaCl₂和MgCl₂溶液中于室温温育 24h后的浊度与盐浓度的关系。

5) 制备蛋白质盐时采用适度的碱性 pH, 可使离解的羧基之间产生静电排斥, 以促进低聚蛋白质解离, 因此, 经喷雾干燥的酪蛋白酸钠 (或钾) 盐或大豆蛋白盐, 其溶解度大, 并具有良好的吸水性和表面性质。

大豆蛋白质在 pH 10~12 碱化, 接着用酸中和使蛋白质分子之间完全伸展, 再经喷雾干燥后于室温下复水, 即可发生胶凝, 这种处理看来能明显提高 7s 和 11s 两种大豆球蛋白的乳化容量和对 Ca²⁺ 的沉淀能力。

在适宜 pH 时, 多价离子 (或聚电解质) 可以促使蛋白质分子间形成离子键, 在中性或碱性 pH 时, 钙离子与蛋白质离解的羧基和磷酸丝氨酰基结合, 从而使蛋白质发生交联, 蛋白质钙盐加热时, 一般难溶解, 但可以形成凝胶。而天然酪蛋白酸钙胶束易在水中溶解而且稳定, 但经凝乳酶的作用后变成不易溶和不稳定的蛋白质。如果不溶性蛋白质钙盐中添加钙离子配位剂, 例如柠檬酸盐或聚磷酸盐加碱碱化均能使之增溶, 蛋白质发生解离和伸展通常能提高吸水、溶胀和表面性质。加工干酪时, 添加 3% 聚磷酸盐, 由于增强亚胶束与脂类成分间的疏水相互作用, 使酪蛋白胶束的体积变小, 以保持脂肪乳状液稳定。

咸肉中添加聚磷酸盐可提高持水能力, 可能是因为钙离子被配位和蛋白质发生解离, 氯化钠通过对肌原纤维蛋白的部分增溶可以提高蛋白质的持水能力, 同样也增加了聚磷酸盐的效果。

各种电解质还可用来使多肽链交联和沉淀, 因此, 在微酸性 pH 时, 带负电荷的羧甲基纤维素、海藻酸盐、聚丙烯酸或聚磷酸盐都能和带正电荷的蛋白质结合, 用这种方法可以从乳清和血浆中沉淀和回收蛋白质。虽然这些聚电解质大部

分在后续工序中可以与蛋白质分离，但仍有相当多的一部分聚电解质与蛋白质结合，因此，在这种情况下，聚电解质将使蛋白质的溶解度和功能性质发生改变。

一般用极性大小不同的溶剂可提取（或除去）蛋白质组分中的下述物质：脂类（己烷）；叶绿素和血红素色素（丙酮）；磷脂、水、矿物质和可溶性糖类化合物（乙醇和异丙醇）。溶剂提取前蛋白质试样需进行干燥，为降低溶剂的残留水平需用蒸汽加热处理。这些提取的处理方法使蛋白质中原来埋藏的疏水区暴露，往往会造成蛋白质不可逆聚集和不溶解（中性或等电点 pH），同时还降低蛋白质的吸水能力。用水和极性溶剂提取时，例如乙醇或异丙醇混合物，对蛋白质的损害最小，当溶剂除去后，通常能够恢复蛋白质的溶解性。

溶剂沉淀法可使蛋白质形成凝胶，向 8% 的大豆蛋白质溶液中添加乙醇，当乙醇浓度达到 20% 即形成胶凝，但超过 40% 后，由于蛋白质-蛋白质相互作用比蛋白质-水的相互作用更强，所以使蛋白质产生沉淀。

（2）脱水作用

当蛋白质溶液中的水分近乎全部除去时，由于（蛋白质-蛋白质的相互作用），引起蛋白质大量聚集，特别是在高温下除去水分，可导致蛋白质溶解度和表面活性急剧降低。干燥通常是制备蛋白质配料的最后一道工序，所以应该注意干燥处理对蛋白质功能性质的影响。

干燥条件对粉末颗粒的大小以及内部和表面孔率的影响，将会改变蛋白质的可湿润性、吸水性、分散性和溶解度。当水以蒸汽的形式迅速从体系中除去时，通常可得到高孔率度，同时使颗粒的收缩及盐类和糖类化合物向干燥表面的迁移减少到最低程度，在冷冻干燥和喷雾干燥时均会发生这种现象。蛋白质溶液在干燥前所含的气泡和控制干燥蛋白质颗粒的吸附能力都可以用来增大颗粒的孔率。

（3）机械处理：

充分干燥的蛋白质粉或浓缩物可形成小的颗粒和大的表面积，与未磨细的对应物相比，它提高了吸水性、蛋白质溶解度、脂肪的吸收和起泡性。充分磨细的蛋白质粉末用风力分级法可制备蛋白质含量高的部分，根据比重不同使富含蛋白质和淀粉的颗粒分离。

蛋白质悬浊液或溶液体系在强剪切力的作用下（例如牛乳均质）可使蛋白质聚集体（胶束）碎裂成亚单位，这种处理一般可提高蛋白质的乳化能力。向空气-水界面施加剪切力，通常会引起蛋白质变性和聚集，而部分蛋白质变性可以使泡沫变得更稳定。某些蛋白质，例如过度搅打鸡卵蛋白时会发生蛋白质聚集，使形成泡沫的能力和泡沫稳定性降低。

机械力同样对蛋白质的结构化过程起着重要作用，例如面团受挤压加工时，剪切力能促使蛋白质改变分子的定向排列，二硫键交换和蛋白质网络的形成（见

第四、五和六节)。

(4) 加热处理

加热处理时, 蛋白质的结构发生变化 (见第三节), 肽键水解、氨基酸侧链改变和其他分子缩合。这些变化受热处理强度和持续时间、水活性、pH、盐含量、其他活性分子种类和浓度等因素影响。侧链的改变和缩合反应对营养价值不利, 因此轻度热处理所引起的结构变化和肽键有限水解, 不致影响蛋白质的营养价值, 但明显地改变蛋白质的功能性质。

蛋白质的热变性程度 (构象改变和聚集, 见第三节和第四节第四部分) 主要取决于蛋白质本身的性质和环境条件。哺乳动物胶原蛋白在有大量水存在时, 加热温度超过 65°C 即发生伸展、解离和溶解。经过处理的肌原纤维蛋白同样也发生收缩、聚集和保水能力降低 (见图 5—39)。然而, 对无规则卷曲蛋白质如单体酪蛋白酸盐, 即使经过较高温度剧烈加热也几乎没有影响。

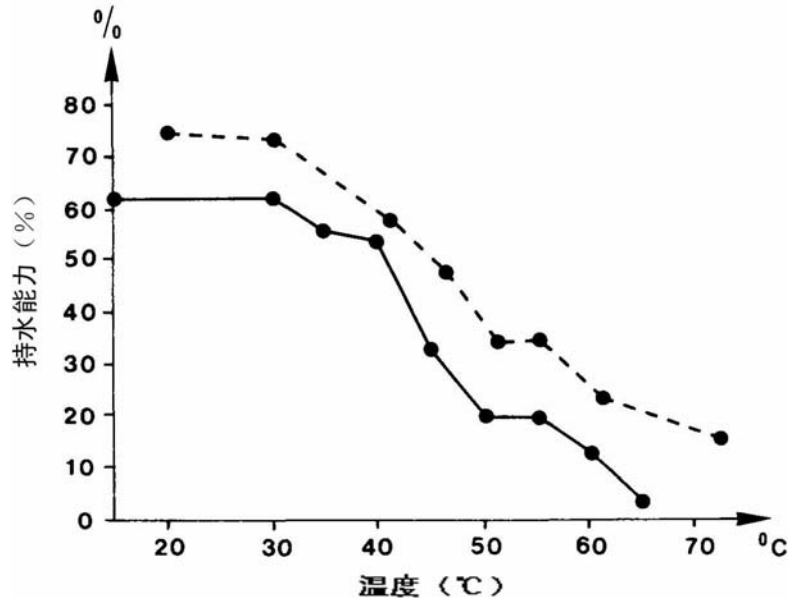


图 5-39 加热对牛肌肉持水容量的影响

可溶性球蛋白的热变性一般导致溶解度降低, 但变性温度和程度受多种因素影响, 从差示扫描量热法测定结果可以看出, 以 7s 和 11s 大豆蛋白的变性对 pH 的函数作图, 发现当 pH 偏离等电点 pH 时 (图 5—40), 蛋白质的变性转变温度 (出现伸展时的温度) 和变性焓 (变性时吸收的热量, 表示强吸热伸展程度) 两者都降低。在上述 pH 范围, 球蛋白以部分伸展状态存在, 加热还可引起更进一步伸展。在非等电点 PH 条件下, 由于蛋白质间静电排斥力, 可以阻止或减少因加热而出现的聚集、不溶解性和胶凝等作用。

在酸性 (pH2-4) 或微碱性 (pH7-8.5) pH 范围内, β -乳球蛋白和乳清蛋白

受热伸展（50-80℃，10-15min）可以提高功能性质，即使 pH 恢复至 6 时，与对应的天然蛋白质相比，这些蛋白质仍能大部分溶解，而且增稠、胶凝、起泡和乳化等性质也得到提高。说明发生非聚集的伸展能使最初高度亲水的蛋白质的双级性增强。

相反，蛋白质在等电点 pH 下热处理，将会引起大量蛋白质聚集。因此，这种方法可用于从乳清、血或血浆中定量沉淀、分离和提纯蛋白质，所得到的不溶性蛋白质析物除具有强吸水性外，几乎不具有其他功能性质。

正如前面已经叙述的（第四节），浓缩的蛋白质溶液在略微偏离等电点 pH 时加热，可发生胶凝，延长加热时间某些蛋白质凝胶仍可保持稳定状态，而其他蛋白质则发生变质。

有阳离子特别是Ca²⁺存在时，聚集作用超过伸展作用。絮凝或胶凝温度降低。高于等电点pH时，因羧基解离，从而增强了上述这些作用。已知钙离子能使热凝固凝胶的质地变硬，例如大豆蛋白凝胶。

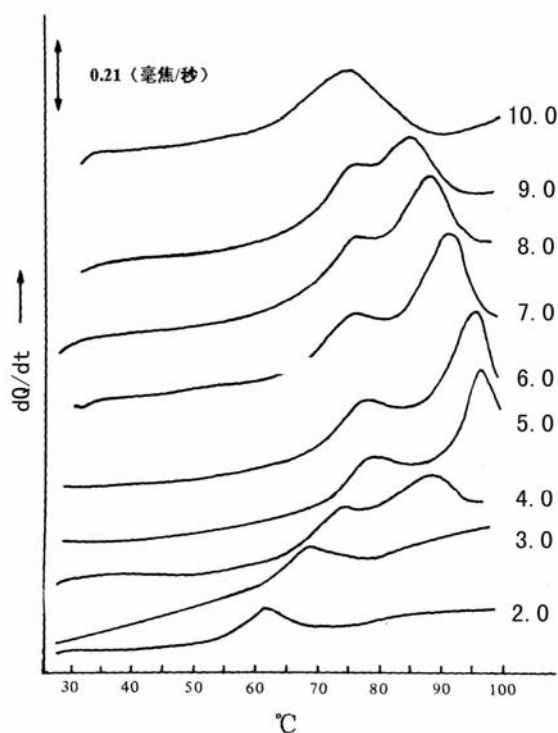


图 5-40 10%大豆蛋白分散在 pH2-10 的蒸馏水中的扫描差示热分析图

灵敏度：2.1mJ/sec，加热速率：10℃/min

蛋白质溶液的含水量明显影响变性温度焓（见第三节），图 5-41 显示抹香鲸肌红蛋白质的含水量与焓的关系，当含水量为 30%~50%时，变性最低温度为 74℃；在干燥状态下则急剧上升（122℃，含水量 3%）。当含水量低于 30%时，变性

焓 (ΔH_{apo}) 显著地降低。这些数据可用来控制蛋白质的功能性质。

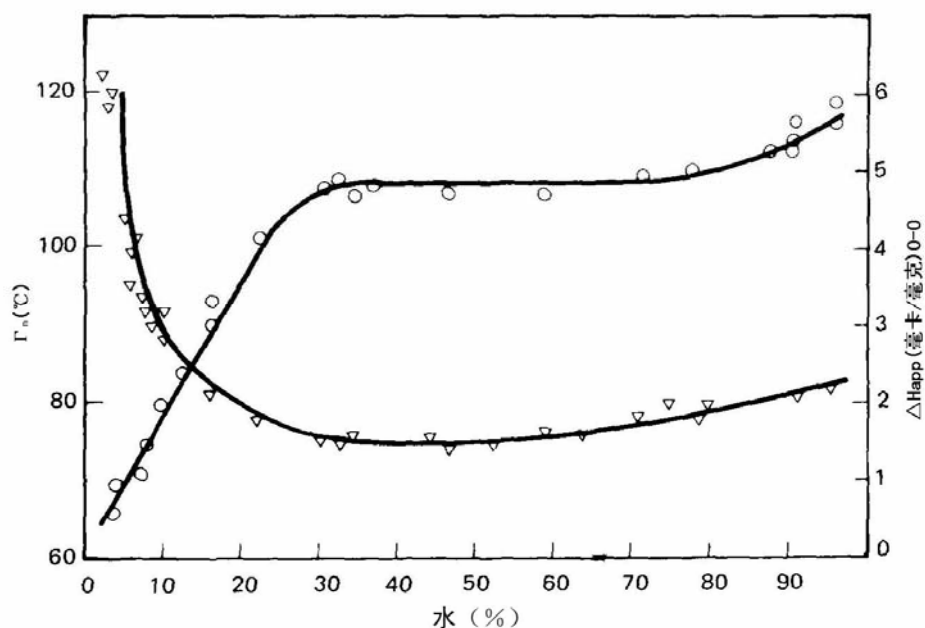


图 5-41 抹香鲸肌红蛋白含水量对变性温度 (T_m) 和变性焓 (ΔH_{apo}) 的影响。

构象变化用示差扫描量热法测定

高含水量蛋白质溶液采用真空浓缩或喷雾干燥,产物在较低温度下脱水,比板式或滚筒干燥法效果更好,产品复水后用差示扫描量热法测定,通常可观察到干燥蛋白质组分的溶解度和变性焓之间呈正相关。

低于冰点温度也会导致蛋白质变性和功能性损伤,例如鱼肌动球蛋白变硬和持水能力变小,牛乳酪蛋白胶束发生沉淀,蛋黄的脂蛋白变粘稠和发生胶凝,有些胶凝能延长冷冻保藏期并产生脱水浓缩,冷冻后进行解冻使蛋白质-水氢键合减少和蛋白质-蛋白质的相互作用增大。

植物蛋白在 $1\sim 3\text{mol/L}$ 的盐溶液中,于 100°C 条件下加热 $10\sim 15\text{h}$,可使肽键有限水解,非蛋白氮含量增加 3 倍,溶解度显著提高,从而使蛋白质配料的表面性质(如面筋蛋白)得到改善,酸水解一般会引起蛋白质侧链的改变,例如天冬酰胺和谷氨酰胺残基的脱酰胺反应和磷酸丝氨酸脱磷酸基以及色氨酸残基遭到破坏等。酸水解的更为复杂的反应是导致色素和肉风味物衍生物的形成,有些植物蛋白水解物,用碱中和或过滤后可用作增香剂。

蛋白质在碱性介质中加热也可以使肽键有限水解,例如在 $\text{pH}11\sim 12.5\text{NaOH}$ 溶液中,于 $70\sim 95^\circ\text{C}$ 加热 20min 至几小时,这种聚集方法可用于增溶和提取不易溶解的植物蛋白、微生物蛋白或鱼蛋白。牛乳蛋白用碱部分水解能明显提高起泡性,这种方法可用来制备起泡剂。因为它们是具有疏水侧链和极性羧酸钠末端

基团的双极性肽。

在碱性介质中强热处理蛋白质，半胱氨酸或胱氨酸发生脱硫，形成营养上不可以利用的赖氨酸基丙氨酸、羊毛硫氨酸和 D-氨基酸残基。

2. 蛋白质的化学和酶法修饰

蛋白质结构中含有可以反应的侧链，可以通过化学或酶修饰，改变其结构，使之达到需要的营养性或功能性。

(1) 化学修饰

蛋白质在酸性或碱性 pH 条件下加热都可引起氨基酸残基侧链的改变，例如麦谷蛋白在酸性条件下加热，使 30% 的天冬酰胺和谷氨酰胺残基脱氨。这种方法能提高蛋白质的溶解度和表面性质，特别是乳化性质。产生这样效果的原因是由于氢键键合减少和静电排斥力增大，从而引起蛋白质构象发生变化。碱处理可以使某些半胱氨酸残基（或磷酸丝氨酸）转变成脱氢丙氨酸，若蛋白质结合的脱氢丙氨酸被还原成丙氨酸，则蛋白质的疏水性增强。

蛋白质侧链的化学修饰，主要通过酰基化、烷基化、氧化还原、酯化和醚化等反应。一定的侧链可以与几种不同的试剂反应，而一定的试剂又能与不同种类侧链发生反应，结果可以在蛋白质分子中引入相同的侧链基。实际上，一种侧链很少有专一性试剂，除非反应条件特定。如烷基化试剂碘乙酰胺在 pH4 以下能和蛋氨酸硫醚基反应，而硫醇、氨基和咪唑基在上述 pH 范围并不发生反应，因为它们已被质子化。在 -10℃ 低温下，过甲酸对硫醚和硫醇基的氧化是专一性的。

对蛋白质进行化学修饰时，某些试剂在加入蛋白质的水溶液之前，最好先用少量有机溶剂溶解，同时，必须选用温和的试剂和反应条件，以保证蛋白质构象和功能性质的变化能够达到预期的要求。此外，一定种类的蛋白质侧链，不一定对一种试剂表现相同的反应性，因为反应性与蛋白质中的邻近氨基酸种类和蛋白质构象有关。有些蛋白质侧链埋藏在蛋白质分子内部，要使这些侧链参与化学反应必须首先设法让多肽链发生伸展。

蛋白质侧链基团的改变，一般导致极性的变化，有时甚至静电荷也发生变化，当这些变化达到一定程度时，蛋白质分子可出现折叠、伸展或与另外的蛋白质分子聚集，而且还能改变蛋白质对水和其他食品成分例如脂类的作用。

利用碘乙酸烷基化（硫醇和其他基团的羧甲基化）、二羧酸内酐酰化（ ϵ -氨基的琥珀酰化、马来酰化和柠康酰化）或丝氨酸残基磷酸化（用 POCl_3 ）等反应，可以向蛋白质分子中引入可离解羧基（图 5-43）。由于这些附加负电荷的存在，导致蛋白质产生静电排斥、伸展和解离，所以即使在等电点 pH，溶解度和分散性也仍然增大。这种修饰有利于植物或微生物蛋白的提取和与核酸或其他成分的分选，同时还可提高蛋白质对水的吸收能力与热稳定性，增强对钙离子沉淀的

敏感性。象鱼蛋白、大豆蛋白、谷蛋白等，通过化学修饰可产生上述效果。鱼蛋白的浓缩物经过琥珀酰化后其胶凝性质得到显著改善，乳化和起泡性变得更好，这主要由于蛋白质的溶解度增加，以及双极性构象增加引起的伸展和吸附蛋白质膜之间的静电排斥等原因所致。但经琥珀酰化或羧甲基化的蛋白质的性质变化主要取决于介质的pH值（图 5-42），在酸性pH几乎不发生解离。

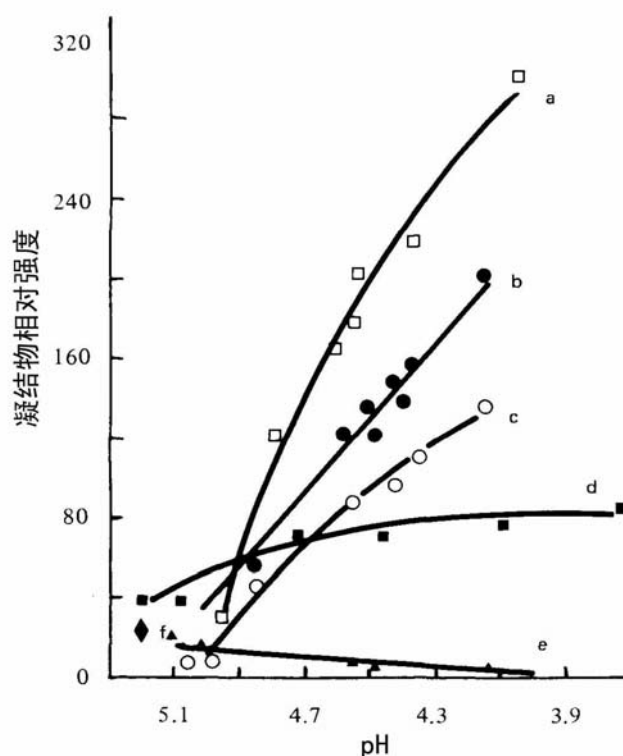
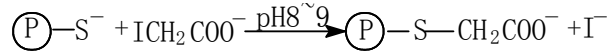


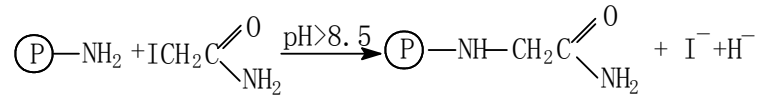
图 5-42 不同pH的琥珀酰化对鱼蛋白浓缩物（FPC）凝结强度的影响。琥珀酰化FPC（b）+玉米油（d）+Ca²⁺，FPC（高pH提取）（e）+玉米油（d），由凝乳酶制备的脱脂凝乳结构（f），3%蛋白质溶液制备的凝胶乳强度（Brookfeild凝度计测定）

经过化学修饰后，蛋白质的功能性质受其化学衍生程度的影响。例如，酪蛋白中ε-氨基的琥珀酰化低于40%时，虽然吸水性提高，但乳化能力降低，只有提高琥珀酰化程度才能提高乳化能力。谷蛋白分子引入磷酸或硫酸基后，其吸水性、胶凝作用和成膜能力均明显提高。图 5-44 表示了清蛋白磺化前后的溶解能力的变化。

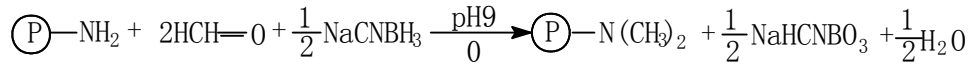
高度琥珀酰化将会降低赖氨酸残基的生理有效性。马来酰化和柠檬酰化在pH2 时是可逆的（例如在胃酸中），因此这两种酰化修饰对蛋白质生物利用率的损害比琥珀酰化修饰小。酰化：酰化试剂与α-或ε-氨基、羟基、酚基、咪唑基和巯基反应。



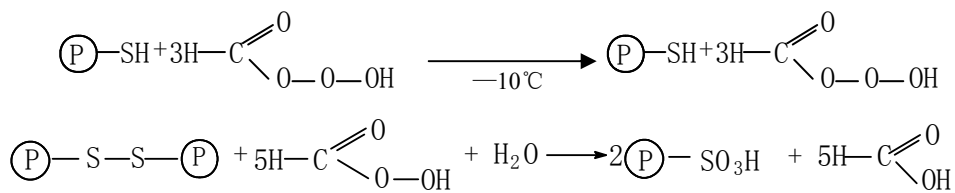
用碘乙酸或代乙酰胺的羧甲基化:



有氢化物给还原剂存在时, 氨基、咪唑基、硫存基和硫醚基用醛或酮的还原性烷基化:



氧化: 硫醇基、二硫化物、硫醚和咪唑基用过甲酸氧化



还原: 2-巯基乙醇、二巯苏糖醇、巯基乙酸还原性裂解

磷酸化: 三氯化磷是常用的磷酸化试剂。

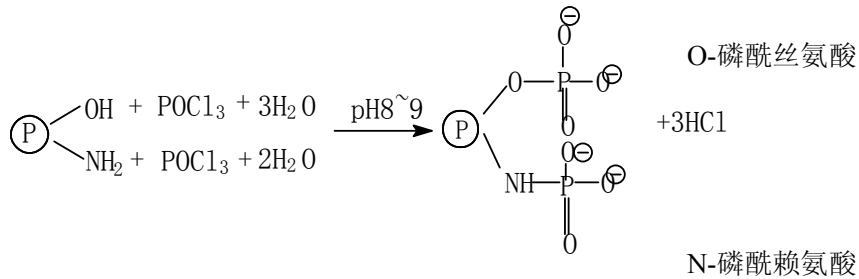


图 5-43 食品蛋白质的几种化学修饰方法

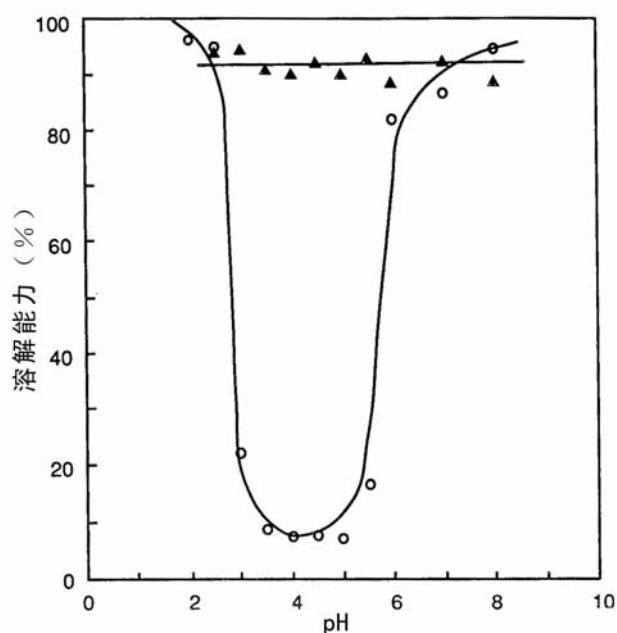


图 5-44 粗乳清蛋白 (○) 和磷酸化乳清蛋白 (△) 的溶解能力与 pH 的关系。

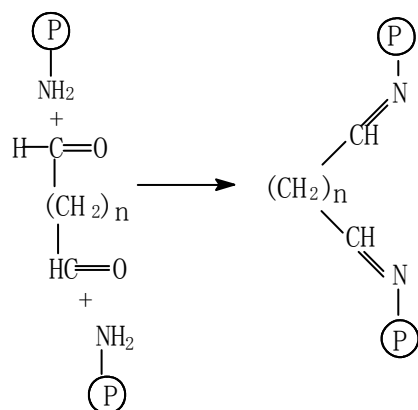
蛋白质与多羧基化合物共价结合可以增加蛋白质的极性，溶解度和抗热沉淀能力（阻止或减弱热诱导伸展引起的疏水聚集）。在希夫氏碱还原的条件下，羰基衍生物（例如单糖或低聚糖）与 ϵ -氨基之间的缩合可与多元醇结合。酰化试剂可以是由一种单羧酸分子间脱水形成的酐。经修饰的蛋白质，其疏水程度决定于所用氨基酸或脂肪酸的种类（长或短链烃，预聚合或非预先聚合）和衍生程度。例如，利用酰化反应可以提高牛乳蛋白质的乳化性质，但对大豆蛋白质反而会降低其吸水性。高度疏水性能可以增强分子内和分子间的疏水相互作用，并促使蛋白质分子折叠、聚集。酰化反应可改善蛋白质的乳化性质，可能是因为蛋白质分子变成了高度双亲性的分子。酪蛋白在醛或酮存在下进行还原性烷基化，每个分子中可引入 16 个甲基、异丙基、环己基或苄基，因而乳化性质得到提高。大豆球蛋白用棕榈酸的 N-羧基琥珀酰亚胺酯化，在每个分子中引入 5~11 个棕榈酸分子可以提高乳化性和起泡性。

ϵ -氨基发生衍生反应后使蛋白质的营养价值遭到损害，首先是蛋白质的消化速率和程度通常会降低。因为蛋白酶（例如赖氨酸键的专-酶胰蛋白酶）部分受到抑制；另一方面，取代的赖氨酸衍生物，不论是从多肽中释放出来或已被人体吸收，通常都是生理上不可利用的，其利用程度取决于各种动物的肾脏或其他组织是否存在高活性酰基转移酶，因此，乙酰 ϵ -N-赖氨酸和乙酰 ϵ -N-赖氨酸可部分地用作鼠的赖氨酸来源，倘若赖氨酸残基甲基化低于 50%，在鼠中甲基酪蛋白地蛋白质功效比仍然很高。

蛋氨酸或聚蛋氨酸与蛋白质共价联接，所形成的异肽链可被肠道氨肽酶水解，因此，这种结合可用于使蛋白质的氨基酸富集和防止 ϵ -氨基发生麦拉德反应。

共价交联键的形成方式是蛋白质的侧链首先转变成反应性很强的基团，后者可迅速参与反应，形成分子内或分子间交联键。因此，蛋白质用碱处理时，通过形成脱氢丙氨酸活性残基，在赖氨酰丙氨酸和羊毛硫氨酸之间形成稳定交联键。

双功能试剂，例如戊二醛、丙二醛或聚甲醛，均可用于使赖氨酸残基的 ϵ -氨基发生交联，这种反应通常会使得蛋白质的溶解度和可消化性降低。



n=1: 丙二醛; n=3: 戊二醛

蛋白质交联在其他方面的应用，例如制革、疫苗减毒，以及饲料蛋白质交联后减少蛋白质在反刍动物胃中变性等。

硫醇基在有空气或有氧化剂（例如溴酸盐、氧化酶）存在下温和氧化，可促使二硫键形成。这种反应通常用于焙烤工业中提高面筋蛋白质的粘弹性（二硫交换比二硫化化合物的形成更占优势）。添加还原剂（例如半胱氨酸）或在强碱条件下，也可使二硫键断裂，这种还原的蛋白质更易溶解，因此，通常更容易提纯，对进一步的化学修饰也更敏感，然而，蛋白质的还原将会导致某些功能（例如胶凝）的损伤。

显然，蛋白质的化学修饰是提高其功能性的有发展前途的方法，但化学修饰可能会引起营养降低和安全性等问题，因此有待进一步广泛深入的研究。

2. 酶法修饰

在生物体中存在一系列酶和蛋白质，许多酶对蛋白质的修饰已经了解。在体外可以通过酶的作用改善食品蛋白质的功能性，尽管在这些蛋白质中存在许多可被酶修饰的基因和反应，但是真正用于食品的还是很有限。

(1) 酶催化水解

食品中常用的水解蛋白酶有胃蛋白酶、胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、木瓜蛋白酶和嗜热菌蛋白酶。如果采用非专一性酶，例如木瓜蛋白酶完全水解，可能使原来溶解度低的蛋白质增溶，得到的水解物一般是含有 2-4 个氨基酸残基的小

肽。完全水解的结果会导致蛋白质的胶凝性，起泡性和乳化性等功能性性质受到损害。酶水解通常用于对溶解度要求高的液态食品（如汤、酱油等）。有时也用于不易消化的人群。一些专一性水解酶，（例如胰蛋白酶或胰凝乳蛋白酶）常用于控制部分水解，以改善蛋白质的泡沫和乳化性质，对于某些蛋白质则会引起溶解度瞬时下降，主要由于埋藏的疏水区暴露的结果。

蛋白质水解时释放的一些寡肽已证明具有重要的生理活性，如像鸦片样（Opioid）活性、免疫刺激活性和抑制血管紧张肽转化酶的活性。表 5-25 列出了来自人和牛酪蛋白的胃蛋白酶消化物中的生物活性肽的氨基酸序列。然而这些肽在原来的蛋白质中不具有活性，一旦释放出来才显示其特有的生物活性。这些肽的生理作用包括镇痛、强直性昏厥、镇静、呼吸抑制、降低血压、调节体温和食物摄入、抑制胃液分泌及性行为改善。

表 5-25 来自酪蛋白的类鸦片肽

肽序列	名称	来源和在氨基酸序列中的位置
Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ite	β -Casornorphin7	牛 β -酪蛋白（60-66）
Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly	β -Casornorphin5	牛 β -酪蛋白（60-64）
Arg-Tyr-Leu-Gly-Tyr-Leu-Glu	α -Casein exorphin	牛 α_{s1} -酪蛋白（90-96）
Tyr-Pro-PHe-Val-Glu-Pro-Ite-Pro		人 β -酪蛋白（51-58）
Tyr-Pro-PHe-Val-Glu-Pro		人 β -酪蛋白（51-56）
Tyr-Pro-PHe-Val-Glu		人 β -酪蛋白（51-55）
Tyr-Pro-PHe-Val		人 β -酪蛋白（51-54）
Tyr-Pro-PHe-Leu-Pro		人 β -酪蛋白（59-63）

大多数蛋白质在水解时释放出苦味肽，因此影响可食性。肽的苦味与其平均疏水性有关，通常根据肽的氨基酸组成计算平均疏水性，用以预测蛋白质水解物产生的苦味，若平均疏水性大于 5.85KJ/mol，则水解物具有苦味，小于 5.43KJ/mol，则水解物没有苦味。苦味的强度与氨基酸组成、排列顺序，以及水解时所使用的酶有关。亲水性蛋白质（例如明胶）的水解物产生较小的或不产生苦味，而疏水性蛋白质（例如酪蛋白和大豆蛋白）的水解物具有较强的苦味。嗜热菌蛋白酶水解蛋白质比胰蛋白酶、胃蛋白酶和胰凝乳蛋白酶的水解物具有较少苦味。

（2）改制蛋白反应

改制蛋白反应是指蛋白质经酶部分水解后，再用蛋白酶（通常是木瓜蛋白酶或胰凝乳蛋白酶）使肽键再合成为一种新的多聚肽。改制蛋白反应涉及到以下步

骤，首先用木瓜蛋白酶使低浓度的蛋白质底物部分水解，然后浓缩至水解物的浓度达到 30%~35%固含量并保温，此时酶使肽随机再结合成为一种新的多肽。改制蛋白反应也可以采用一步完成，即将 30%~35%的蛋白质溶液（或糊）在 L-半胱氨酸存在下与木瓜蛋白酶一起保温。改制蛋白反应得到的产物是一种结构和氨基酸序列不同于初始蛋白质的一种新多肽，于是它们的功能性也发生了改变。如果在反应混合物体系中加入 L-蛋氨酸，能够以共价结合的方式掺入至新形成的多肽中。因此，可以利用改制蛋白反应改善蛋氨酸或赖氨酸缺乏的食品。

(3) 蛋白质交联反应

转谷氨酰胺酶催化酰基转移，导致共价交联反应。赖氨酰胺残基（酰基接受体）与谷氨酰胺残基（酰基给予体）通过异肽键，在转谷氨酰胺酶的作用下，催化酰基转移并发生共价交联。在食品加工中利用此反应生成新形式的食品蛋白，以改善初始蛋白质的功能性质。在高浓度蛋白质的情况下，转移谷氨酰胺酶催化交联反应，使之室温下形成蛋白质凝胶和蛋白质膜。同时也利用赖氨酸或蛋氨酸与谷氨酰胺残基发生共价交联反应，提高蛋白质的营养质量。

