杨杨, 张璨, 马春敏, 等. 大分子拥挤剂对熔球态大豆 11S 球蛋白热稳定性的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(7): 53−60. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010076

YANG Yang, ZHANG Can, MA Chunmin, et al. Effect of Macromolecular Crowding Agents on the Thermal Stability of Molten Globule-state Soybean 11S Globulin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(7): 53−60. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010076

· 研究与探讨 ·

大分子拥挤剂对熔球态大豆 11S 球蛋白热稳定性的影响

杨　杨, 张　璨, 马春敏, 王　冰, 边　鑫, 张　光, 刘晓飞, 邹　灵, 张　娜*

（哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150028）

摘　要: 本研究旨在探讨不同浓度大分子拥挤剂聚蔗糖 70（Ficoll 70）对熔球态大豆 11S 球蛋白在 100 ℃ 水浴中加热 20 min 高温处理下的热稳定性及功能特性的影响。结果表明：与未加入 Ficoll 70 处理的熔球态 11S 球蛋白相比，低浓度 Ficoll 70（2~40 mg/mL）维持熔球态二级结构，内源荧光强度和表面疏水性降低，且在 40 mg/mL Ficoll 70 时热处理后熔球态蛋白的结构与未处理熔球态 11S 球蛋白最相似。同时 Ficoll 70 的加入减少分子聚集，增强分子柔性，并显著提高其乳化性和起泡性。当 Ficoll 70 浓度为 40 mg/mL 时，热处理后熔球态 11S 球蛋白平均粒径减小，EAI 和 ESI 提高至 12.35±0.01 m^2/g 和 199.95%±0.29%，FC 和 FS 分别从 54.29%±0.58% 增加至 63.71%±1.89%，57.81%±0.51% 增加至 86.53%±0.46%。然而当 Ficoll 70 浓度达到 50 mg/mL 时，其对蛋白质的稳定性和功能特性产生负面影响，导致分子聚集和功能特性下降。以上结果表明，添加适量浓度的 Ficoll 70 可以通过排除体积效应调节熔球态大豆 11S 球蛋白的结构，从而影响熔球态大豆 11S 球蛋白的功能特性。研究为利用大分子拥挤剂改善熔球态大豆 11S 球蛋白的热稳定性和功能特性提供了理论依据。

关键词: 大分子拥挤剂, 熔球态, 大豆 11S 球蛋白, 结构, 功能特性, 热稳定性

中图分类号: TS210.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)07−0053−08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010076

本文网刊:

Effect of Macromolecular Crowding Agents on the Thermal Stability of Molten Globule-state Soybean 11S Globulin

YANG Yang, ZHANG Can, MA Chunmin, WANG Bing, BIAN Xin, ZHANG Guang, LIU Xiaofei, ZOU Ling, ZHANG Na*

(College of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150028, China)

Abstract: This study aimed to investigate the effects of different concentrations of macromolecular crowding agent Ficoll 70 on the thermal stability and functional properties of fused globular soybean 11S globulin in a 100 ℃ water bath heated for 20 min. The results showed that low concentrations of Ficoll 70 (2~40 mg/mL) maintained the secondary structure of fused globular 11S globulin, and the intrinsic fluorescence intensity and surface hydrophobicity were reduced, compared with those without Ficoll 70 treatment. The structure of fused globulin after heat treatment was the most similar to that of untreated fused globular 11S globulin at 40 mg/mL Ficoll 70. Meanwhile, the addition of Ficoll 70 reduced molecular aggregation, enhanced molecular flexibility, and significantly improved its emulsifying and foaming properties. When the concentration of Ficoll 70 was 40 mg/mL, the average particle size of fused globular 11S globulin decreased, EAI and ESI increased to 12.35±0.01 m^2/g and 199.95%±0.29%, FC and FS increased from 54.29%±0.58% to 63.71%±1.89%, 57.81%±0.51% to 86.53%±0.46%, respectively. However, when the concentration of Ficoll 70 reached 50 mg/mL, it had a

收稿日期: 2025−01−09

基金项目: 国家自然科学基金（32372387, 32402015）; 黑龙江省自然科学基金（PL2024C011）; 黑龙江省青年科技人才托举工程项目（2025QNTJ026）; 黑龙江省“双一流”学科协同创新成果项目（LJGXCG2025-P32）; 黑龙江省重点研发计划揭榜挂帅项目（2023ZXJ08B03）。

作者简介: 杨杨（1991−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 大豆、谷物化学及加工机理研究, E-mail: foodyangyang@163.com。

*** 通信作者:** 张娜（1979−）, 女, 博士, 教授, 研究方向: 谷物化学与粮食高值化利用, E-mail: foodzhangna@163.com。

negative impact on the stability and functional properties of the protein, resulting in molecular aggregation and a decline in functional properties. The above results showed that the addition of an appropriate concentration of Ficoll 70 could adjust the structure of fused globular soybean 11S globulin by eliminating the volume effect, thus affecting the functional properties of fused globular soybean 11S globulin. This study provides a theoretical basis for improving the thermal stability and functional properties of fused globular soybean 11S globulin by using a macromolecular crowding agent.

Key words: macromolecular crowding; molten globule; soybean 11S globulin; structure; functional properties; thermal stability

大豆蛋白是一种具有高营养价值和良好功能特性的优质植物蛋白，且价格低廉，其在食品等领域已得到广泛的应用。大豆蛋白根据沉降系数一般可以分为 2S、7S、11S 和 15S，其中，大豆 11S 球蛋白约占大豆蛋白的 50%，并独立构成大豆 11S 组分，对大豆蛋白的功能性质有重要的影响[1]。由于大豆 11S 球蛋白中硫醇和二硫键的存在，且不同加工条件易使蛋白质结构被破坏，导致其疏水作用增加，往往形成聚集体降低其功能特性，限制其在食品加工中的应用[2]。蛋白质是由肽链连接折叠而成的具有特定二级和三级结构的氨基酸聚合物，其折叠和展开的过程能够影响其功能特性[3]。研究发现在球蛋白折叠过程中的天然状态和变性状态之间存在一种中间状态—熔球态（MG），部分折叠的熔球态蛋白是一种紧凑构象，其二级结构和黏度特性与天然蛋白相似，由肽侧链决定的三级结构松散[4]。由于其特定的结构，与未变性态和完全变性态的蛋白相比，它具有良好的功能特性，如乳化性、起泡性、凝胶性等[5]。但熔球态作为中间状态，吉布斯自由能较高，导致 MG 分子易发生聚集，降低了其稳定性[2]。因此，维持 MG 球蛋白的稳定性对提高大豆 11S 球蛋白商用价值具有重要意义。

蛋白质稳定性受蛋白质自身结构和外界条件（环境因素、溶液因素和工艺因素）的影响[6]。MG 态是具有不同无序范围的构象环境，具有瞬态寿命，在中性 pH 下的正常折叠条件下研究比较困难[7]。已有研究表明，在极端 pH 条件下，盐溶液中的阳离子和阴离子会与蛋白质发生键合作用，从而稳定 MG 状态[8−9]。添加大分子拥挤剂也是稳定蛋白质构象的重要手段。大分子拥挤剂是指在高浓度下通过占据溶液体积，改变其他大分子行为的物质[10]。研究表明适量浓度的大分子拥挤剂增强了折叠和部分折叠蛋白质的稳定性和结构含量[11−13]，一般机制是通过硬核排斥和化学相互作用共同作用。在硬核斥力下，大分子拥挤剂减少可用空间并诱导蛋白质的致密性。硬核排斥只考虑分子的排列，它还通过降低蛋白质解折叠的熵提高蛋白质的稳定性[14]。化学相互作用中在吸引相互作用的情况下，溶质与蛋白质骨架非特异性结合导致渗透物被排除在蛋白质表面，导致蛋白质水合，由于蛋白质未折叠状态的溶剂可及表面积的增加，使折叠平衡向天然状态转移[15−16]。Mcphie 等[17]发现加入大分子拥挤试剂能够使去折叠态脱辅基肌红蛋白向熔球态转变，并且这种现象与温度无关。Kumari 等[18]研究表明大分子拥挤效应能够促使酸变性铁细胞色素 C 稳定并重折叠为 MG 状态，且不同浓度的大分子拥挤剂影响蛋白质的热力学稳定性。目前研究使用的大分子拥挤剂包括聚乙二醇、葡聚糖 70（Dextran70）、聚蔗糖 70（Ficoll 70）、血红蛋白等。其中，Ficoll 70 因其化学惰性最为常用。Ficoll 70 是一种高度交联的蔗糖或环氧氯丙烷共聚物，表现为理想的中性半刚性球体[19−20]。有研究表明 Ficoll 70 与肌红蛋白的血红素部分结合，化学相互作用在排除体积效应中占主导地位，从而促进其熔球态的形成[21]。然而，大分子拥挤剂对蛋白质的稳定性影响较为复杂，它会随蛋白质的种类、形状和拥挤剂种类等因素发生变化。同时，大多数关于 MG 状态的研究都集中在相对低分子量的蛋白质上，针对大分子蛋白如大豆蛋白的研究较少，且关于大分子拥挤现象对熔球态蛋白质结构稳定性的研究较少，结果也不一致。因此，大分子拥挤现象对蛋白质结构的影响规律还需进一步探索。蛋白质稳定性的研究对于揭示蛋白质结构与功能之间的密切关系具有重要意义。目前高温酶催化、高温杀菌（100 ℃ 加热 20 min）等实际应用中的蛋白稳定性问题有待研究[22]，例如熔球态大豆 11S 球蛋白的热稳定性的研究。

因此，本研究以 Ficoll 70 作为大分子拥挤剂，通过远紫外圆二色谱、内源荧光光谱，以及乳化特性和起泡特性等指标探究在食品加工中常规的高温灭菌（100 ℃ 加热 20 min）下大分子拥挤处理对熔球态大豆 11S 球蛋白的热稳定性及功能特性的影响。本文为通过添加大分子拥挤剂的手段稳定熔球态蛋白方面的研究提供一定理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆（黑农 48） 黑龙江省农业科学院大豆研究所；九三非转基因一级大豆油（食品级） 九三粮油集团有限公司；聚蔗糖 70（Ficoll70） 生工生物工程（上海）股份有限公司；5,5'-二硫双-2-硝基苯甲酸（DTNB） 北京博润莱特科技有限公司；8-苯胺-1-萘磺酸（ANS） 上海阿拉丁生化科技股份有限公司；胰凝乳蛋白酶（800 U/mg） 国药集团化学试剂有限公司；95% 乙醇、正己烷（分析纯） 天津市富宇精细化工有限公司；所有指标测定的试剂均为分析纯。

SCIENTZ-12N 冷冻干燥机 宁波新芝生物科

技股份有限公司；TD5A 台式离心机　盐城市凯特仪器有限公司；Chirascan 圆二色谱仪　英国应用光物理公司；722 分光光度计　上海光谱仪器有限公司；F-7000 荧光分光光度计　日本 Hitachi 公司；Zetasizer Nano S90 激光粒度仪　马尔文仪器公司；HH-4 数显恒温水浴锅　上海力辰邦西仪器科技有限公司；UV-2600 岛津紫外可见分光光度计　岛津企业管理（中国）有限公司；Ultra-Turrax T25 高速分散器　德国 IKA 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　大豆 11S 球蛋白的制备　参考解长远等[23] 的方法稍作修改。将大豆脱皮粉碎后过 80 目筛，将大豆粉、95% 乙醇、正己烷按照比例为 1∶1∶3（w∶v∶v）混合，置于 25 ℃ 水浴振荡器中振荡脱脂（190 r/min），每 2 h 抽滤一次，直至锥形瓶中脱脂液呈无色透明状，干燥得到脱脂大豆粉。

将脱脂大豆粉与去离子水按照料液比 1∶15（m∶v）混合，用 2 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 7.5，磁力搅拌 2 h，在 4 ℃ 下，4000 r/min 离心 30 min，取上清液，添加亚硫酸钠粉末保持其浓度为 0.98 g/L，搅拌提取 1 h 后用 2 mol/L 的 HCl 将溶液的 pH 调至 6.4，于 4 ℃ 冰箱中静置 12 h。然后经过 4000 r/min 离心 20 min 保留沉淀，用去离子水水洗 2~3 次后溶解于去离子水中，用 2 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 7.0，混合均匀后冷冻干燥，即可得到大豆 11S 球蛋白冻干粉（纯度 92.01%）。

1.2.2　样品的制备　根据李翔鹏[24] 的方法稍作修改，将用 pH7.0 的磷酸盐缓冲溶液配制一定浓度的大豆 11S 蛋白溶液在 100 ℃ 水浴中加热 3 min，形成 MG 态的大豆 11S 球蛋白溶液。添加不同浓度（0、2、4、6、8、10、20、30、40、50 mg/mL）的 Ficoll 70 配制成 Ficoll 70-熔球态 11S 球蛋白溶液后，在 100 ℃ 水浴中加热 20 min，再 5000 r/min 离心 5 min，得上清液为实验样品（以下简称：Ficoll 70-熔球态蛋白溶液）。

1.2.3　紫外圆二色谱测定　参照 Yang 等[25] 的方法稍作修改。在波长范围为 200~250 nm，光程为 0.2 cm 的条件下，进一步测定二级结构变化。各 Ficoll 70-熔球态蛋白溶液中，熔球态大豆 11S 球蛋白的浓度均为 0.1 mg/mL，扫描三次。

1.2.4　内源荧光光谱测定　根据 Wang 等[26] 的方法稍作修改。各 Ficoll 70-熔球态蛋白溶液中，熔球态大豆 11S 球蛋白的浓度均为 1.0 mg/mL。设定狭缝宽度为 5 nm，激发波长为 290 nm，激发起始波长为 300 nm，发射结束波长为 400 nm，1 cm 石英比色皿样品池，扫描 3 次，得到各样品 300~400 nm 的荧光强度。

1.2.5　表面疏水性测定　用 8-苯胺基萘-1-磺酸铵盐（ANS）染料作为荧光探针，通过荧光光谱法检测发光强度进行表征。将 3.0 mL 的 Ficoll 70-熔球态蛋白溶液（熔球态大豆 11S 球蛋白的浓度为 0.5 mg/mL）与 50 μL 的 ANS 溶液（8.0 mmol/L）混合均匀，测定样品荧光强度。狭缝宽度设为 5 nm，激发波长为 390 nm，记录波长为 400~600 nm 下光谱变化，扫描三次[27]。

1.2.6　平均粒径测定　参照赵飞[28] 的实验方法，各 Ficoll 70-熔球态蛋白溶液中，熔球态大豆 11S 球蛋白浓度均为 0.1 mg/mL，以 4000 r/min 的转速离心 15 min，以孔径为 0.45 μm 水系醋酸纤维素滤膜过滤后通过马尔文激光粒度仪进行粒径的测定。具体测定参数：样品折射率为 1.145，分散相折射率为 1.33，在室温下平衡时间 2 min。

1.2.7　柔性测定　将 250 μL 1 mg/L 的胰凝乳蛋白酶溶液（0.05 mol/L，pH8.0 Tris-HCl 缓冲液溶解）加入 4 mL Ficoll 70-熔球态大豆 11S 球蛋白溶液（熔球态大豆 11S 球蛋白的浓度为 1.0 mg/mL）中混合均匀，立即在 38 ℃ 水浴中反应 5 min，然后用 4 mL 5% TCA（三氯乙酸）停止酶反应。在 4000 r/min 下离心 30 min，用分光光度计在 280 nm 处测定上清液的吸光度。

1.2.8　乳化性及乳化稳定性测定　参考 Zhou 等[29] 的实验方法并稍作修改。配制 Ficoll 70-熔球态大豆 11S 球蛋白溶液（熔球态大豆 11S 球蛋白浓度为 1.0 mg/mL），取其 15 mL 与 5 mL 大豆油混合，以 12000 r/min 均质 2 min 后，立即在容器底部取 100 μL 匀浆，与 5 mL 0.1% 十二烷基硫酸钠（SDS）溶液均匀混合。以 0.1% SDS 溶液为空白，在 500 nm 处分别测定其 0 min 和 30 min 时吸光度 A_0 和 A_{30}，表征其乳化性和乳化稳定性。乳化性（EAI）和乳化稳定性（ESI）分别由公式（1）和公式（2）计算：

$$EAI(m^2/g) = \frac{2\times 2.303\times A_0\times n}{c\times(1-\varphi)\times 10000} \qquad 式（1）$$

$$ESI(\%) = \frac{A_{30}}{A_0}\times 100 \qquad 式（2）$$

式中：EAI 为乳化活性，m^2/g；ESI 为乳化稳定性，%；A_0 为 0 min 的吸光度值；n 为稀释倍数；c 为形成乳状液之前的蛋白溶液的浓度，g/mL；φ 为乳状液中油相体积分数；A_{30} 为静置 30 min 后的吸光度值。

1.2.9　起泡性及起泡稳定性测定　参考何兴芬[30] 的实验方法稍作修改。将 15 mL 1.0 mg/mL Ficoll 70-熔球态大豆 11S 球蛋白溶液以 12000 r/min 均质 1 min 产生泡沫，均质后立即记录泡沫体积 V_1，静置 30 min 后再次记录泡沫体积 V_2。起泡性（FC）与起泡稳定性（FS）分别由公式（3）和公式（4）计算：

$$FC(\%) = \frac{V_1}{V_0}\times 100 \qquad 式（3）$$

$$FS(\%) = \frac{V_2}{V_1}\times 100 \qquad 式（4）$$

式中：FC 为起泡性，%；FS 为起泡稳定性，%；V_0 为初始溶液体积，mL；V_1 为均质 1 min 后泡沫体积，mL；V_2 为静置 30 min 后泡沫体积，mL。

1.3 数据处理

所有实验每次进行至少三次平行实验，结果以平均值±标准差表示，采用 SPSS 19.0 软件进行方差分析，$P<0.05$ 表示差异显著，采用 Origin Pro 2019b 软件作图。

2 结果与分析

2.1 Ficoll 70-熔球态 11S 球蛋白远紫外圆二色谱分析

通过远紫外圆二色谱可以反映不同处理条件下的熔球态大豆 11S 球蛋白二级结构含量的变化。如图 1 所示，不同处理条件下的熔球态大豆 11S 球蛋白的远紫外圆二色谱曲线在 212 nm 附近呈负峰，这表明熔球态蛋白的二级结构与天然态蛋白相似，有部分 α-螺旋构象存在[24]。图 1 表明在 100 ℃ 水浴中加热 20 min 时与熔球态大豆 11S 球蛋白的圆二色谱曲线相比，未添加 Ficoll 70 的熔球态大豆 11S 球蛋白经加热后的圆二色谱曲线的负峰位置发生轻微蓝移，但整体曲线向下移动，这表明高温处理会导致熔球态大豆 11S 球蛋白的二级结构重排，促使 α-螺旋解折叠并转化为 β-折叠。这是由于高温加热诱导熔球态大豆 11S 球蛋白的分子间疏水相互作用增强，形成富含 β-折叠的熔球态蛋白分子聚集体，使有序二级结构丢失[31]。相较于未添加 Ficoll 70 的熔球态大豆 11S 球蛋白，在加入 2~40 mg/mL 的 Ficoll 70 加热后，随着加入的 Ficoll 70 浓度的增加，其圆二色谱曲线的负峰位置发生红移，且曲线的振幅逐渐减弱，与熔球态大豆 11S 球蛋白的圆二色谱曲线相似，这表明 Ficoll 70 的加入使熔球态蛋白分子的 α-螺旋构象含量增加，更好地维持熔球态。因为 Ficoll 70 作为一种大分子拥挤剂，其高浓度通过占据溶液中的有效体积，通过空间限制作用，阻碍蛋白质在加热时完全解折叠，维持其熔球态的二级结构特征，同时通过空间位阻效应抑制分子间接触，阻止聚集体的形成[12]。而加入 50 mg/mL Ficoll 70 后，其圆二色谱曲线负峰位置发生蓝移，且振幅增强，说明此时熔球态大豆 11S 球蛋白的 α-螺旋含量减少，这是因为过高浓度的大分子拥挤剂的机械相互作用导致熔球态大豆 11S 球蛋白折叠状态改变，抑制了熔球态 11S 球蛋白的移动，迫使蛋白质间紧密靠近，形成聚集体，损害拥挤剂对蛋白质稳定性的有利影响[32]。

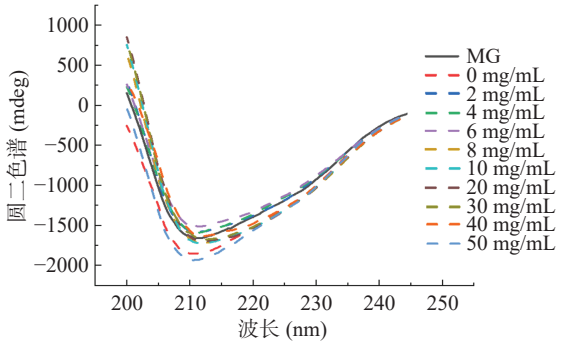


图 1 在 100 ℃ 水浴中加热 20 min 下不同浓度 Ficoll 70 对熔球态大豆 11S 球蛋白二级结构的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of Ficoll 70 on the secondary structure of molten globular soybean 11S globulin under heating in water bath at 100 ℃ for 20 min

2.2 Ficoll 70-熔球态 11S 球蛋白内源荧光光谱分析

如图 2 所示，在加热处理后未加入 Ficoll 70 的熔球态大豆 11S 球蛋白与熔球态大豆 11S 球蛋白相比，荧光强度显著增强，这表明加热处理后的熔球态大豆 11S 球蛋白结构被破坏，包埋在分子内部的色氨酸基团进一步暴露。当 Ficoll 70 浓度增加至 10 mg/mL 后，加热处理后熔球态大豆 11S 球蛋白的内源荧光强度呈减弱趋势，这是因为 Ficoll 70 将熔球态蛋白分子包裹在内，使得蛋白分子的色氨酸基团被掩埋，且随着 Ficoll 70 浓度的增加，包裹得越紧密，使得蛋白分子发生了一定的重折叠。此外，Ficoll 70 的排阻体积效应增强，使色氨酸和邻近氨基酸残基之间形成基态络合物，从而通过静态机制发生荧光猝灭[33]。然而，当 Ficoll 70 浓度增加至 50 mg/mL 时，加热处理后熔球态大豆 11S 球蛋白的内源荧光强度甚至低于熔球态大豆 11S 球蛋白，这表明过高的 Ficoll 70 浓度导致蛋白质-拥挤剂相互作用开始产生负面影响[32]。上述结果表明一定浓度的 Ficoll 70 有效地抑制高温变性，且具有浓度依赖性，这与 Kumar 等[7] 研究发现反应介质中存在拥挤剂是碱基变性蛋白质热稳定性增加的原因的结论相似。

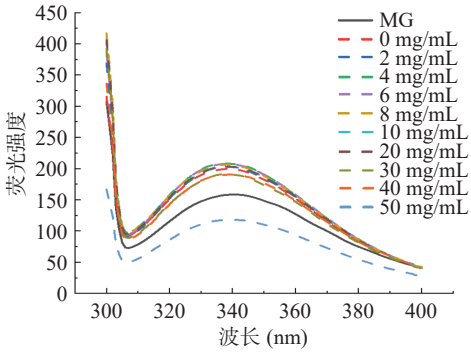


图 2 在 100 ℃ 水浴中加热 20 min 下不同浓度 Ficoll 70 对熔球态大豆 11S 球蛋白三级结构的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of Ficoll 70 on the tertiary structure of molten globular soybean 11S globulin under heating in water bath at 100 ℃ for 20 min

2.3 Ficoll 70-熔球态 11S 球蛋白表面疏水性分析

ANS 作为一种疏水探针，在与蛋白质表面的疏水区域结合时会改变荧光特性[34]，故通过 ANS 荧光光谱探究体系中的疏水性变化，如图 3 所示。与熔球态大豆 11S 球蛋白相比，100 ℃ 加热处理后未加入 Ficoll 70 的熔球态大豆 11S 球蛋白荧光强度发生大幅度增强，这说明高温环境使熔球态大豆 11S 球蛋白结构伸展，进一步暴露内部疏水基团，促进与 ANS 荧光探针结合[23]。与仅热处理的熔球态大豆 11S 球蛋白相比，随 Ficoll 70 浓度的增加，热处理的

熔球态大豆 11S 球蛋白的外源荧光强度逐渐减小，且当 Ficoll 70 浓度达到 50 mg/mL 时其荧光强度甚至低于未加热处理的熔球态大豆 11S 球蛋白。这是由于在 2~40 mg/mL 范围内，Ficoll 70 通过空间位阻抑制分子间接触，其物理约束作用阻碍熔球态大豆 11S 球蛋白疏水区域完全暴露，进而维持熔球态大豆 11S 球蛋白的结构稳定[35]。然而，当 Ficoll 70 浓度达到 50 mg/mL 时，过度拥挤打破平衡形成致密聚集体，进一步掩埋疏水区域[32]。

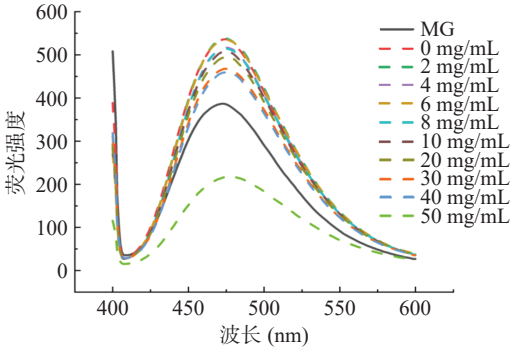


图 3　在 100 ℃ 水浴中加热 20 min 下不同浓度 Ficoll 70 对熔球态大豆 11S 球蛋白表面疏水性的影响

Fig.3　Effect of different concentrations of Ficoll 70 on the surface hydrophobicity of molten globular soybean 11S globulin under heating in water bath at 100 ℃ for 20 min

2.4　Ficoll 70-熔球态 11S 球蛋白平均粒径结果分析

粒度测定是表征蛋白质大小的一种非常有效敏感的技术[36]。图 4 所示为 100 ℃ 热处理 20 min 后添加不同浓度的 Ficoll 70 的熔球态大豆 11S 球蛋白平均粒径的变化。与未处理的熔球态大豆 11S 球蛋白的粒径（11.11±0.20 nm）相比，100 ℃ 加热 20 min 后的熔球态大豆 11S 球蛋白分子的平均粒径增加至 253.23±3.82 nm。这是由于加热导致熔球态蛋白结构伸展，增加其表面疏水性，使蛋白间疏水作用增强，促使蛋白间发生聚集，从而增大熔球态大豆 11S 球蛋白的平均粒径[37]。与未加 Ficoll 70 热处理后的熔球态 11S 球蛋白相比，在加入 2~40 mg/mL Ficoll 70 热处理后的熔球态 11S 球蛋白的平均粒径显著减小（P<0.05），且 Ficoll 70 浓度为 40 mg/mL 时平均粒径由 253.97±3.82 nm 降至 74.65±0.24 nm，这表明此时熔球态 11S 球蛋白仍具有 MG 状态下的相对致密的结构，没有完全延伸，这是由于 Ficoll 70 将熔球态大豆 11S 球蛋白包裹，使熔球态大豆 11S 球蛋白结构稳定，且减少蛋白分子间疏水相互作用，阻碍聚集体的形成[3]。而 Ficoll 70 浓度达到 50 mg/mL 后，热处理后的熔球态 11S 球蛋白分子的平均粒径显著增大（P<0.05），这说明当 Ficoll 70 浓度超过某一临界值，其占据的溶剂体积过大，导致蛋白质分子被强制压缩并紧密靠近，反而形成粒径较大的聚集体[32]。

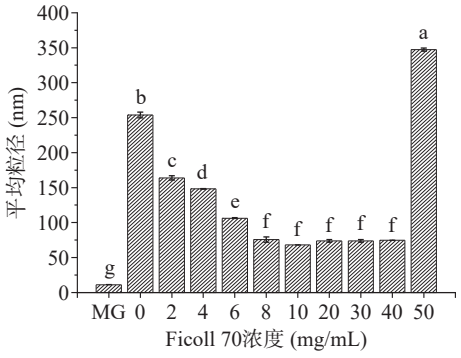


图 4　在 100 ℃ 水浴中加热 20 min 下不同浓度 Ficoll 70 对熔球态大豆 11S 球蛋白的平均粒径的影响

Fig.4　Effect of different concentrations of Ficoll 70 on the mean particle size of molten globular soybean 11S globulin under heating in water bath at 100 ℃ for 20 min

注：不同小写字母表示各组间有显著性差异（P<0.05），图 5~图 7 同。

2.5　Ficoll 70-熔球态 11S 球蛋白分子柔性的分析

添加不同浓度的 Ficoll 70 的熔球态 11S 球蛋白分子的柔性变化如图 5 所示。图 5 显示加热处理后未添加 Ficoll 70 的熔球态 11S 球蛋白柔性降低，这是由于温度的升高使熔球态大豆 11S 球蛋白结构改变，β-折叠结构含量增加，发生疏水性聚集，进而限制了其灵活性[38]，这一结果与 2.3 相一致。在添加浓度 2~40 mg/mL 下，随着 Ficoll 70 浓度的增大，熔球态大豆 11S 球蛋白分子柔性逐渐增大，这种现象产生的原因是 Ficoll 70 的添加导致蛋白质的疏水收缩，抑制了蛋白的聚集，使其分子柔性增大[6]。而加入 50 mg/mL Ficoll 70 后，熔球态蛋白分子柔性减小，这是因为此时 Ficoll 70 的空间排除体积效应增强，这可能会损害拥挤剂对蛋白质稳定性的有利影响。

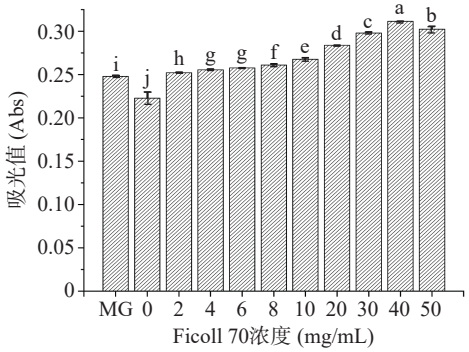


图 5　在 100 ℃ 水浴中加热 20 min 下不同浓度 Ficoll 70 对熔球态大豆 11S 球蛋白分子柔性的影响

Fig.5　Effect of different concentrations of Ficoll 70 on the molecular flexibility of molten globular soybean 11S globulin under heating in water bath at 100 ℃ for 20 min

2.6　Ficoll 70-熔球态 11S 球蛋白乳化性（EAI）及乳化稳定性（ESI）分析

不同浓度 Ficoll 70 对乳化性及乳化稳定性的影响如图 6 所示。未加入 Ficoll 70 的熔球态蛋白经热处理后，与熔球态大豆 11S 球蛋白（乳化性为 13.85 m^2/g，乳化稳定性为 224.06%）相比，乳化性降低 29.03%，乳化稳定性降低 166.84%，这是由于经热

处理的熔球态蛋白的分子柔性降低，表面疏水性增加，使熔球态蛋白在油水界面吸附能力降低，且聚集导致的较大粒径，使其分子扩散速率降低[39]，从而降低熔球态 11S 球蛋白 EAI 和 ESI。然而，随着加入 Ficoll 70 的浓度的增加，熔球态蛋白的 EAI 和 ESI 也增加，当 Ficoll 70 浓度为 40 mg/mL 时有最大 EAI 和 ESI，分别为 12.35±0.01 m^2/g 和 199.95%±0.29%。这说明 Ficoll 70 的加入有利于提高熔球态 11S 球蛋白的 EAI 和 ESI，一方面是因为 Ficoll 70 包裹熔球态 11S 球蛋白，在排阻体积效应下促使熔球态蛋白分子结构再折叠，减小表面疏水性，且 Ficoll 70 浓度的增加增大溶液黏度，有效防止絮凝，与 Lee 等[40] 结论相似；另一方面是因为 Ficoll 70 与熔球态蛋白分子发生化学相互作用[41]，生成的复合物既有蛋白质的表面活性又有 Ficoll 70 的亲水性，具有良好的乳化活性。然而，当加入的 Ficoll 70 浓度达到 50 mg/mL 时，EAI 和 ESI 开始下降，这是由于蛋白体系过度拥挤，拥挤剂的机械相互作用导致折叠状态的局部变形，产生更紧凑结构的蛋白聚集体，进而影响其功能特性[32]。

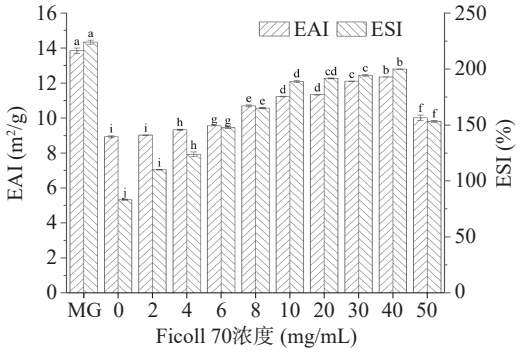


图 6 在 100 ℃ 水浴中加热 20 min 下不同浓度 Ficoll 70 对熔球态大豆 11S 球蛋白分子乳化性及乳化稳定性的影响

Fig.6 Effect of different concentrations of Ficoll 70 on the emulsifiability and emulsion stability of molten globular soybean 11S globulin molecules under heating in water bath at 100 ℃ for 20 min

2.7 Ficoll 70-熔球态 11S 球蛋白起泡性（FC）及起泡稳定性（FS）分析

如图 7 所示，未加入 Ficoll 70 的熔球态蛋白经热处理后的 FC 和 FS 与未经热处理的熔球态大豆 11S 球蛋白相比，分别减小了 28.94% 和 65.16%。这是因为加热使熔球态 11S 球蛋白结构被破坏，降低其溶解性，且减小蛋白柔性，从而降低泡沫形成能力。图 7 显示随 Ficoll 70 浓度的增加，熔球态 11S 球蛋白的 FC 和 FS 呈现先升高后下降的趋势，当 Ficoll 70 浓度为 40 mg/mL 时有最大 FC 和 FS，分别从 54.29%±0.58% 增加至 63.71%±1.89%，57.81%±0.51% 增加至 86.53%±0.46%，这表明 Ficoll 70 与熔球态 11S 球蛋白发生化学相互作用形成的复合物具有两亲性，增加蛋白的溶解性，从而利于泡沫形成。此外，Ficoll 70 通过排除体积效应维持熔球态 11S 球蛋白的部分展开状态，这既保留其一定柔性又避免完全聚集，促进熔球态 11S 球蛋白形成更致密的气-液界面层，减缓泡沫厚度变薄的速度，从而提高其 FS[3,27]。然而当 Ficoll 70 浓度超过 40 mg/mL 时，热处理的熔球态 11S 球蛋白的 FC 和 FS 开始下降，此时蛋白体系过度拥挤，Ficoll 70 的空间阻碍作用增强，使蛋白结构进一步再折叠形成致密结构[18]，阻碍蛋白分子迁移到气-液界面，且形成的界面膜结构缺乏弹性，导致 FC 和 FS 下降。

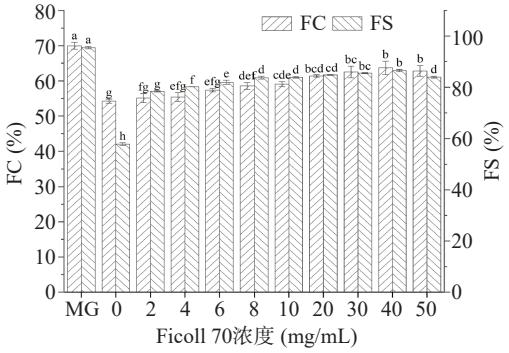


图 7 在 100 ℃ 水浴中加热 20 min 下不同浓度 Ficoll 70 对熔球态大豆 11S 球蛋白分子起泡性及泡沫稳定性的影响

Fig.7 Effect of different concentrations of Ficoll 70 on the foaming properties and foam stability of molten globular soybean 11S globulin molecules under heating in water bath at 100 ℃ for 20 min

3 结论

本研究揭示了大分子拥挤剂 Ficoll 70 对熔球态大豆 11S 球蛋白在高温处理下的热稳定性、其结构的变化及功能特性的影响。远紫外圆二色谱、荧光光谱以及表面疏水性和平均粒径结果分析表明适量 Ficoll 70（2~40 mg/mL）通过分子拥挤效应抑制熔球态大豆 11S 球蛋白的高温解折叠，二级结构 α-螺旋构象增加，维持其二级结构，三级结构折叠，减少疏水区域暴露，并有效抑制聚集（Ficoll 70 浓度为 40 mg/mL 时平均粒径由 253.97±3.82 nm 降至 74.65±0.24 nm），使得蛋白分子的柔韧性增加。其中 Ficoll 70 为 40 mg/mL 浓度适宜，低浓度 Ficoll 70 显著提升乳化性与起泡性，归因于其对蛋白质结构的稳定作用以及对表面疏水性的调节，增强蛋白界面吸附能力及液膜机械强度；而高浓度（50 mg/mL）因致密聚集导致功能劣化。因此，拥挤剂 Ficoll 70 对高温处理下熔球态大豆 11S 球蛋白的热稳定性和功能特性影响有一定的浓度依赖性。本研究发现通过调控分子拥挤剂浓度可实现熔球态蛋白热稳定性与功能特性的协同优化。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 孙冰玉，郭汝杞，刘琳琳，等. 高压均质对大豆蛋白乳液性质

影响的研究进展[J]. 食品工业科技，2023, 44(1): 465−474. [SUN Bingyu, GUO Ruqi, LIU Linlin, et al. Research progress on the effects of high pressure homogenization on the properties of soybean protein emulsions[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(1): 465−474.]

[2] ZHU Pengyu, YANG Yang, ZOU Ling, et al. The effect of trehalose on the thermodynamic stability and emulsification of soybean 11S globulin in the molten globule state[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118: 106811.

[3] GAO Jian, LI Xiaomei, CHEN Fenglian, et al. The effect of extreme acid-induced soybean glycinin molten globules state on foaming ability[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 105: 105819.

[4] RAMIREZ-SUAREZ J C, XIONG Y L. Transglutaminase cross-linking of whey/myofibrillar proteins and the effect on protein gelation[J]. Journal of Food Science, 2002, 67(8): 2885−2891.

[5] SALAMI M, YOUSEFI R, EHSANI M R, et al. Enzymatic digestion and antioxidant activity of the native and molten globule states of camel *α*-lactalbumin: Possible significance for use in infant formula[J]. International Dairy Journal, 2009, 19(9): 518−523.

[6] 张娜. 海藻糖抑制蛋白质脲和酸变性的研究[D]. 天津：天津大学, 2013. [ZHANG Na. Inhibition of urea-and acid-induced protein denaturations by trehalose[D]. Tianjin: Tianjin University, 2013.]

[7] KUMAR R, KUMAR R, SHARMA D, et al. Macromolecular crowding-induced molten globule states of the alkali pH-denatured proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2018, 1866(11): 1102−1114.

[8] NAKAMURA S, BABA T, KIDOKORO S I. A molten globule-like intermediate state detected in the thermal transition of cytochrome c under low salt concentration[J]. Biophysical Chemistry, 2007, 127(1−2): 103−112.

[9] DONG A C, LAM T. Equilibrium titrations of acid-induced unfolding-refolding and salt-induced molten globule of cytochrome c by FT-IR spectroscopy[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2005, 436(1): 154−160.

[10] MINTON A P, WILF J. Effect of macromolecular crowding upon the structure and function of an enzyme: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase[J]. Biochemistry, 1981, 20(17): 4821−4826.

[11] ERLKAMP M, GROBELNY S, WINTER R. Crowding effects on the temperature and pressure dependent structure, stability and folding kinetics of Staphylococcal Nuclease[J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2014, 16(13): 5965−5976.

[12] COZZOLINO S, GRAZIANO G. The magnitude of macromolecular crowding caused by Dextran and Ficoll for the conformational stability of globular proteins[J]. Journal of Molecular Liquids, 2021, 322: 114969.

[13] GHOSH S, SHAHID S, RAINA N, et al. Molecular and macromolecular crowding-induced stabilization of proteins: Effect of dextran and its building block alone and their mixtures on stability and structure of lysozyme[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 150: 1238−1248.

[14] ELLIS R J. Macromolecular crowding: Obvious but underappreciated[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2001, 26(10): 597−604.

[15] TIMASHEFF S N. The control of protein stability and association by weak interactions with water: How do solvents affect these processes?[J]. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1993, 22: 67−97.

[16] KUMAR R, SHARMA D, KUMAR V, et al. Factors defining the effects of macromolecular crowding on dynamics and thermodynamic stability of heme proteins *in vitro*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2018, 654: 146−162.

[17] MCPHIE P, NI Y S, MINTON A P. Macromolecular crowding stabilizes the molten globule form of apomyoglobin with respect to both cold and heat unfolding[J]. Journal of Molecular Biology, 2006, 361(1): 7−10.

[18] KUMARI B, SHABNAM, YADAV M, et al. Determinants for macromolecular crowding-induced thermodynamic stabilization of acid-denatured cytochrome c to molten globules[J]. Journal of Molecular Liquids, 2023, 387: 122608.

[19] STAGG L, CHRISTIANSEN A, WITTUNG-STAFSHEDE P. Macromolecular crowding tunes folding landscape of parallel *α*/*β* protein, apoflavodoxin[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(4): 646−648.

[20] GUPTA M N, UVERSKY V N. Chapter 13-Macromolecular crowding: How it affects protein structure, disorder, and catalysis, in structure and intrinsic disorder in enzymology[M]. M N GUPTA, V N UVERSKY, Editors. Academic Press, 2023, 353-376.

[21] NASREEN K, AHAMAD S, AHMAD F, et al. Macromolecular crowding induces molten globule state in the native myoglobin at physiological pH[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 106: 130−139.

[22] 王潇栋, 孔阳芷, 张艳玲, 等. 杀菌技术的作用机制及在食品领域中的应用[J]. 中国酿造, 2022, 41(2): 1−8. [WANG Xiaodong, KONG Yangzhi, ZHANG Yanling, et al. Mechanism of sterilization technology and its application in food field[J]. China Brewing, 2022, 41(2): 1−8.]

[23] 解长远, 王中江, 郭增旺, 等. 射流空化对大豆 11S 球蛋白结构和功能特性的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 57−65. [XIE Changyuan, WANG Zhongjiang, GUO Zengwang, et al. Effect of jet cavitation on the structure and functional properties of soybean 11S globulin[J]. Food Science, 2020, 41(9): 57−65.]

[24] 李祥鹏. 热处理诱导大豆 11S 蛋白熔球态结构及其功能性质的研究[D]. 哈尔滨：哈尔滨商业大学, 2021. [LI Xiangpeng. Study on the structure and functional properties of molten globule soybean 11S protein induced by heat treatment[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2021.]

[25] YANG Jing, DUAN Yuqing, GENG Fang, et al. Ultrasonic-assisted pH shift-induced interfacial remodeling for enhancing the emulsifying and foaming properties of *Perilla protein* isolate[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 89: 106108.

[26] WANG Jianming, LIU Ziyun, ZHENG Kaiwen, et al. Effect of pH on the formation mechanisms, emulsifying properties and curcumin encapsulation of oat protein isolate-high methoxy pectin complexes[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 149: 109454.

[27] 田然, 冯俊然, 隋晓楠, 等. 高强度超声处理对大豆 7S 和 11S 球蛋白结构和理化性质的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 87−97. [TIAN Ran, FENG Junran, SUI Xiaonan, et al. Effect of high intensity ultrasound on the conformational and physicochemical properties of soy 7S and 11S globulin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(5): 87−97.]

[28] 赵飞. 物理预处理对大豆分离蛋白结构和理化性质的影响机制[D]. 泰安：山东农业大学, 2019. [ZHAO Fei. Effects of physical pretreatment on structure and physicochemical properties of soybean protein isolate[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2019.]

[29] ZHOU Shijiao, HAN Lu, LU Keyang, et al. Whey protein

isolate–phytosterols nanoparticles: Preparation, characterization, and stabilized food-grade Pickering emulsions[J]. Food Chemistry, 2022, 384: 132486.

[30] 何兴芬. 热处理对藜麦蛋白质功能特性、结构及体外消化的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2020. [HE Xingfen. Effects of heat treatment on functional characteristics, structure and *in vitro* digestion of quinoa protein[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2020.]

[31] JAMAL G A, JAHANGIRIAN E, HAMBLIN M R, et al. A structural and biochemical approach to effect of temperature and pH on the molten globule phenomenon in a thermophilic protease: Molecular dynamics simulation, fluorescence spectroscopy and circular dichroism[J]. Journal of Molecular Structure, 2024, 1318: 139204.

[32] HOMOUZ D, STAGG L, WITTUNG-STAFSHEDE P, et al. Macromolecular crowding modulates folding mechanism of alpha/beta protein apoflavodoxin[J]. Biophysical Journal, 2009, 96(2): 671−680.

[33] SHAHID S, HASSAN M I, ISLAM A, et al. Size-dependent studies of macromolecular crowding on the thermodynamic stability, structure and functional activity of proteins: *In vitro* and *in silico* approaches[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2017, 1861(2): 178−197.

[34] ABDUR R M, LEE J E, PARK H H, et al. Exploring binding mechanisms between curcumin and silkworm 30Kc19 protein using spectroscopic analyses and computational simulations[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2018, 23(5): 605−616.

[35] SASAHARA K, MCPHIE P, MINTON A P. Effect of dextran on protein stability and conformation attributed to macromolecular crowding[J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 326(4): 1227−1237.

[36] PRASANTHAN P, KISHORE N. Alkali induced unique partially folded state of bovine serum albumin: Qualitative and quantitative insights[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 252−261.

[37] SINGH K, SHANDILYA M, KUNDU S, et al. Heat, acid and chemically induced unfolding pathways, conformational stability and structure-function relationship in wheat α-amylase[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0129203.

[38] 潘成磊, 丁景, 董唯, 等. 热处理温度对猪肝水溶性蛋白乳化性质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(16): 82−89. [PAN Chenglei, DING Jing, DONG Wei, et al. Effects of heat treatment temperature on emulsifying properties of water-soluble proteins in pig liver[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(16): 82−89.]

[39] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1980, 624(1): 13−20.

[40] LEE C F, BIRD S, SHAW M, et al. Combined effects of agitation, macromolecular crowding, and interfaces on amyloidogenesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(45): 38006−38019.

[41] 贾佳佳. 拥挤环境对碱性磷酸酶去折叠过程以及二肽组装机制的影响[D]. 天津: 天津大学, 2017. [JIA Jiajia. Effects of macromolecular crowding environment on alkaline phosphatase unfolding process and dipeptide assembly[D]. Tianjin: Tianjin University, 2017.]