

大豆分离蛋白与卵磷脂间相互作用对O/W型乳状液稳定性的影响

毕爽, 朱颖, 齐宝坤, 王中江, 邹晓霜, 李杨, 江连洲, 隋晓楠*
(东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 研究大豆分离蛋白与卵磷脂的复合比例及相互作用对乳化体系稳定性及功能性质的影响。结果显示: 乳状液的乳化活性和粒径分布等性质受大豆分离蛋白与卵磷脂比例分配的影响较大。当大豆分离蛋白与卵磷脂间的质量比为10:1时, 复合体系的乳化活性较高 ($98.1 \text{ m}^2/\text{g}$), 同时乳液的体积平均直径 $D_{4,3}$ 最小 ($13.34 \mu\text{m}$), 乳液双峰分布程度较低。乳化稳定性和 ζ -电位测试结果显示, 复合体系中大豆分离蛋白与卵磷脂比例为1:1或100:1都不利于体系稳定, 此时激光共聚焦显微镜观测乳液出现相分离和不规则非球形液滴。这说明大豆分离蛋白与卵磷脂作为复合乳化剂具有最适配比, 在该比例下大豆分离蛋白与卵磷脂间的相互作用对食品级水包油 (oil-in-water, O/W) 乳状液的稳定性是有利的。

关键词: 大豆分离蛋白; 卵磷脂; 蛋白质-卵磷脂相互作用; 乳状液稳定性

Effect of Interaction between Soybean Protein Isolate and Lecithin on Stability of Oil-in-Water Emulsion

BI Shuang, ZHU Ying, QI Baokun, WANG Zhongjiang, ZOU Xiaoshuang, LI Yang, JIANG Lianzhou, SUI Xiaonan*
(College of Food Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The purpose of this study was to explore the effect of the ratio and interaction between soybean protein isolate and lecithin on the stability and functional properties of emulsion systems containing them. The results showed that emulsion activity index and droplet size distribution were affected by the ratio between soybean protein isolate and lecithin. When the ratio was 10:1, a higher emulsion activity index ($98.1 \text{ m}^2/\text{g}$) and the smallest $D_{4,3}$ (volume average diameter, $13.34 \mu\text{m}$) as well as a lower level of bimodal distribution were observed. A soybean protein isolate-to-lecithin ratio of 1:1 or 100:1 was not suitable due to poor emulsion stability, as demonstrated by the measurement of ζ -potential. Phase separation and large irregular non-spherical droplets were evident under confocal laser scanning microscopy. Therefore, there was an optimal soybean protein isolate-to-lecithin ratio that provided good stability of food-grade O/W emulsion.

Key words: soybean protein isolate; lecithin; protein-lecithin interaction; emulsion stability

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201709013

中图分类号: TS214.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 09-0079-06

引文格式:

毕爽, 朱颖, 齐宝坤, 等. 大豆分离蛋白与卵磷脂间相互作用对O/W型乳状液稳定性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(9): 79-84. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201709013. <http://www.spkx.net.cn>

BI Shuang, ZHU Ying, QI Baokun, et al. Effect of interaction between soybean protein isolate and lecithin on stability of oil-in-water emulsion[J]. Food Science, 2017, 38(9): 79-84. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201709013. <http://www.spkx.net.cn>

大豆蛋白是大豆食品中重要的营养成分, 可为食品提供风味和质感^[1-2]。但天然大豆蛋白的功能性质在加工中会受到一定程度的破坏, 尤其是当溶液的pH值接近蛋白质的等电点时, 蛋白质的各种性质大幅度下降, 不能

满足生产和加工的需要^[3-4]。大豆卵磷脂 (lecithin, Lec) 是一种两性离子表面活性剂, 具有特殊的表面活性, 可以保证食品级乳状液的稳定性。作为一种生物小分子, 它可与蛋白质发生相互作用^[5-6]。

收稿日期: 2016-03-17

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目 (2014BAD22B01-02); 国家自然科学基金重点项目 (31430067);

黑龙江省人力资源和社会保障厅项目 (ZD201302); 东北农业大学“青年才俊”项目

作者简介: 毕爽 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: 13163436989@163.com

*通信作者: 隋晓楠 (1987—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: xiaonan.sui@neau.edu.cn

蛋白质和磷脂之间的相互作用会改变复合体系的表面活性及蛋白质结构。已有研究证明蛋白质-磷脂复合体系的形成：在中性条件下，大豆分离蛋白（soybean protein isolate, SPI）和Lec可通过静电相互作用和疏水相互作用自发组成复合体系^[7]。Ohtsuru等^[8]研究发现大豆蛋白与Lec之间存在交互作用，Lec在水溶液中形成囊泡或胶束，将蛋白质包裹其中。也有研究表明环境因素可以改变蛋白质与磷脂间的交互作用，影响复合体系的功能性质。Sunder^[9]和McClements^[10]等研究发现NaCl浓度的增加会导致乳清蛋白-磷脂乳液粒径增大，易造成油滴聚集，降低乳液稳定性。Ma Lei等^[11]研究指出pH值可以修改蛋白质和磷脂复合物的表面活性，同时改变液滴之间的流体动力学作用。但现今研究未能清楚地揭示蛋白质与磷脂间的相互作用对复合体系功能性质的影响，且大豆蛋白与磷脂间的比例对复合体系稳定性的影响研究也鲜有报道。

因此，本研究为揭示SPI和Lec的比例及相互作用对复合乳化体系功能性质和稳定性的影响，采用不同质量比的SPI与Lec（1:1、5:1、10:1、25:1、50:1、100:1）在高压均质处理（60 MPa）条件下形成乳状液，并对复合乳化体系的乳化活性、乳化稳定性、粒径分布、 ζ -电位及乳液微观形态进行分析和表征，明确乳化界面上SPI与Lec的交互作用及乳化剂比例对复合体系性质及乳液形貌的影响。以期高乳化活性SPI-Lec复合体系食品加工过程提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SPI 东北农业大学食品学院粮油加工实验室自制；葵花籽油 九三粮油工业集团有限公司；十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate, SDS）、盐酸、氢氧化钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠 北京新光化工试剂厂；Lec、尼罗红、尼罗蓝 美国Sigma公司；其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

ULTRA-TURRAX UTL2000乳化机 德国IKA仪器设备公司；超高压均质机FB-110T 上海励途机械设备有限公司；722型可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司；Mastersizer 2000 激光粒度仪 英国马尔文仪器有限公司；ZetaPALS-Zeta电位仪 美国布鲁克海文仪器公司；TCS SP2激光共聚焦显微镜（confocal laser scanning microscope, CLSM） 德国Leica公司。

1.3 方法

1.3.1 SPI的制备

脱脂豆粉与水混合后，用2 mol/L的NaOH调节溶液的pH值至8.5，50 ℃条件下搅拌1.5 h后，将其悬浮液在

4 ℃、10 000×g条件下离心20 min，取上清液再用2 mol/L HCl调节pH值至4.5。静置后在4 ℃、6 000×g条件下离心20 min，取蛋白沉淀水洗2次，最后将沉淀分散于水中并用2 mol/L NaOH调节pH值至7.0。将此蛋白溶液冷冻干燥后粉碎即得粉末状SPI^[12]，蛋白质含量的测定：依据GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》，最终测得蛋白质含量为（90.11±0.40）%。

1.3.2 高压均质制备SPI与Lec比例不同的乳状液

将SPI与Lec分别按1:1、5:1、10:1、25:1、50:1、100:1的质量比置于烧杯中（蛋白质质量浓度为10 mg/mL），搅拌1 h使SPI和Lec充分溶解并产生交互作用。向最终溶液中添加葵花籽油，油相体积分数为25%。采用乳化机20 000 r/min预乳化2 min制备初级乳液，二次乳化采用高压均质机，均质压力为60 MPa。

1.3.3 乳化活性及乳化稳定性的测定

高压均质0 min和10 min的乳液样品底部各取50 μ L，再用0.1 g/100 mL SDS稀释200倍，漩涡振荡混匀后用分光光度计在500 nm波长处测其吸光度 A ，以SDS作空白对照^[13]。乳化活性（emulsifying activity index, EAI）和乳化稳定性（emulsion stability index, ESI）分别如式（1）、（2）所示。

$$\text{EAI}/(\text{m}^2/\text{g}) = 2 \times 2.303 \times \frac{A_0 \times N}{\rho \times \theta \times L \times 10\,000} \quad (1)$$

$$\text{EAI}/\text{min} = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times (T_{10} - T_0) \quad (2)$$

式（1）、（2）中： N 为稀释倍数（200）； θ 为油相体积分数（1/4）； L 为比色杯厚度（1 cm）； ρ 为乳液形成前蛋白质水溶液中蛋白质质量浓度（10 g/mL）； A_0 、 A_{10} 为乳状液在0、10 min的吸光度； $T_{10} - T_0 = 10$ min。

1.3.4 乳层析指数的测定

将制备好的乳液分别置于20 mL的具塞比色管中于25 ℃静置7 d，每天观察SPI-Lec乳液的相分离现象并记录。底部清液层高度 H_c 和乳液总高度 H_t 的比值代表乳液的乳层析指数。按公式（3）计算^[14]。

$$\text{乳层析指数}/\% = \frac{H_c}{H_t} \times 100 \quad (3)$$

1.3.5 粒径分布的测定

利用Mastersizer 2000激光粒度仪进行粒径分布测定。对不同比例的SPI-Lec乳状液样品进行测定。参数设置：分散剂折射率1.33，颗粒折射率1.46，吸收参数0.001^[15]。

1.3.6 ζ -电位的测定

采用电位仪测定样品的 ζ -电位，SPI-Lec乳液适度稀释，上样体积为1 mL，测定温度为25 ℃，平衡2 min^[16]。计算3次重复得到的平均值为测定值。

1.3.7 CLSM观测

蛋白质经尼罗蓝染色后呈现绿色荧光, 葵花籽油经脂溶性荧光探针尼罗红染色后呈现红色荧光。分别将适量尼罗红和尼罗蓝溶解在丙醇中, 漩涡混合30 s后对SPI-Lec乳液染色30 min。染色结束后取10 μ L乳液于载玻片上, 采用CLSM观测SPI-Lec乳液的显微结构^[17]。

2 结果与分析

2.1 乳化活性及乳化稳定性分析

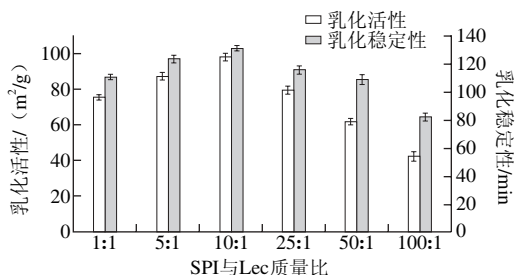


图1 SPI与Lec的比例对SPI-Lec乳液乳化活性及乳化稳定性的影响

Fig. 1 Effect of SPI/lecithin ratio on emulsion activity index and stability index of SPI-lecithin emulsion

大豆蛋白和大豆Lec是天然的表面活性剂, 在食品乳状液加工中常用作乳化剂, 维持水包油型液滴的稳定。图1为不同比例的Lec含量对SPI乳化活性以及乳化稳定性的影响。当SPI与Lec比例为1:1时, 乳化活性为75.4 m^2/g , 复合体系中蛋白比例的增加可以提高乳化活性和乳化稳定性。当SPI与Lec比例达到10:1时, 蛋白质的乳化活性为98.1 m^2/g , 较1:1时提高30.11%, 蛋白质的乳化稳定性较1:1时提高18.60%。已有研究显示, 蛋白质的溶解度和表面疏水性对乳化活性的改变有显著影响^[18]。Sunder等^[9]研究显示, 乳清蛋白-Lec乳液中蛋白质的乳化活性在一定范围内随着乳清蛋白浓度的增加而上升, 同时界面的表面张力降低。随着可溶性蛋白质含量增加, 其在油-水界面上分散均匀, 疏水基团与充分溶解后的Lec发生疏水相互作用。Lec诱导SPI的疏水基团暴露从而增加了乳化活性, 一部分Lec占据在蛋白质未占据的油-水界面上, 也起到乳化的作用。然而, 当蛋白质比例继续增加, 乳化活性和乳化稳定性又有所下降。Torrezan等^[19]曾研究指出在弱酸性或接近中性pH值条件下, 蛋白质浓度过高会导致乳化活性的降低。这与本实验结果相似。有研究指出大豆蛋白在油-水界面可形成30~40 nm的吸附层, 吸附层的厚度说明大豆蛋白在界面上是以聚集体的形式吸附的, 大豆蛋白浓度增加的同时界面上蛋白质聚集体的数量也随之增加, 但是蛋白质聚集体柔性程度较低, 在油-水表面上并不利于与Lec发生交互作用, 并且聚集的蛋白质构象稳定性更强, 不易解折叠及快速在油-水界面上稳定, 因此导致乳化活性的降低。SPI-Lec复合体系的乳

化稳定性变化趋势与乳化活性相似。总体上看, 复合体系中蛋白质的乳化活性和乳化稳定性随着SPI比例含量的增加呈现先升高后下降的趋势。乳液的粒径也是影响乳液稳定性的一个重要因素, 相比于小液滴来说, 大液滴更不利于稳定^[20]。因此, 粒径大小与乳化稳定性之间的相关性值得探讨。

2.2 乳层析指数分析

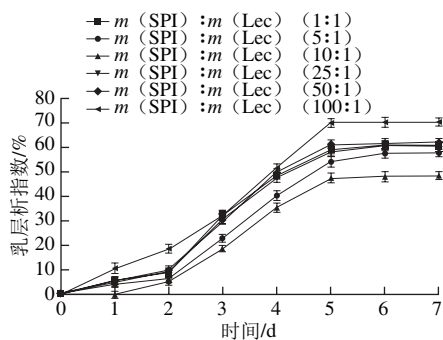


图2 SPI与Lec的比例对SPI-Lec乳液乳层析指数的影响

Fig. 2 Effect of SPI/lecithin ratio on creaming index of SPI-lecithin emulsion

SPI与大豆Lec在不同比例下形成的乳状液乳层析指数如图2所示。乳层析指数表征的是乳液抵抗重力分层的能力, 当SPI的添加量为Lec添加量的10倍时, 样品乳液的乳层析指数最低, 说明乳液的稳定性最好。大部分样品在室温条件下放置24 h内即出现相分离现象 (SPI与Lec质量比为10:1除外), 可能是由于乳液表面的组成物电荷含量较低的缘故, 未能通过为液滴间提供足够的排斥力阻止乳层析的发生^[21]。乳层析现象与粒径分布情况具有很大相关性。乳层析指数越高的样品, 粒径双峰分布程度越大。除此之外, 乳化剂的组成也是影响乳层析指数的重要因素^[16]。乳液主要是由大豆蛋白、大豆Lec和脂肪组成, 其中大豆蛋白在油-水界面上作为主要成分阻止乳液重力分层, 也可与Lec发生疏水相互作用或静电相互作用形成更为致密的乳化层, 使乳液在几天之内保持相对稳定。因此, SPI-Lec乳液 (SPI与Lec质量为10:1) 显示连续稳定的原因可能是乳化剂的组成成分中, 蛋白柔性结构舒张与Lec对接后复合体系的构象发生改变而提高两者之间的相互作用。蛋白质含量过少, 乳化效果较差; 蛋白质含量若过高, 则高浓度的聚集体阻止蛋白质与Lec相互作用的发生, 乳液的稳定性由此受到影响。

2.3 乳液粒径分析

SPI和Lec不同比例下复合乳化体系的体积平均直径 $D_{4,3}$ 可衡量乳液液滴的平均大小。高压均质处理使液滴的破碎与重聚同时发生, 但粒径 $D_{4,3}$ 的测量可迅速捕捉液滴平均粒径的变化。SPI-Lec乳液的体积平均径和粒径分布变化如图3所示。当SPI与Lec的比例为1:1时, 形成的乳液体积平均径为27.14 μm , 随着Lec含量的增加, 乳液的体积平均径逐渐降低, SPI与Lec的比例为10:1时

$D_{4,3}$ 最小, 为13.34 μm 。Chen等^[22]研究发现磷脂的添加对乳状液的乳析动力学和粒子密度产生影响, 粒径减小与界面层电荷增加有关, 阻止乳液发生絮凝和聚沉。然而, 当SPI与Lec的比例达到25:1以后, 乳液的体积平均粒径逐渐增加, 当比例达到100:1时, $D_{4,3}$ 达到36.25 μm 。Scuriatti等^[23]指出随着蛋白含量的添加, 天然蛋白-磷脂乳液的粒径增加, 高含量蛋白给乳液带来一定程度的聚沉。可能是过量的蛋白导致油-水界面上的磷脂分子被替换, 蛋白质与磷脂间的相互作用减弱, 不能维持油以小液滴存在, 所以体系的粒径较小^[24]。复合乳化体系液滴粒径呈双峰分布, 且主要分布在1~100 μm 之间。SPI与Lec以1:1比例复合后, 1 μm 左右的峰值相对体积较低, 10~100 μm 处的峰值较高。随蛋白质比例增加, 粒径分布曲线明显向小粒径方向移动。当SPI与Lec比例增加到10:1时, 体系中部分小粒径粒子存在, 大粒径粒子分布峰较窄, 且分布在3~30 μm 之间。随着SPI含量进一步增加, 10~100 μm 处的峰分布较宽, 说明体系呈现大粒子化。

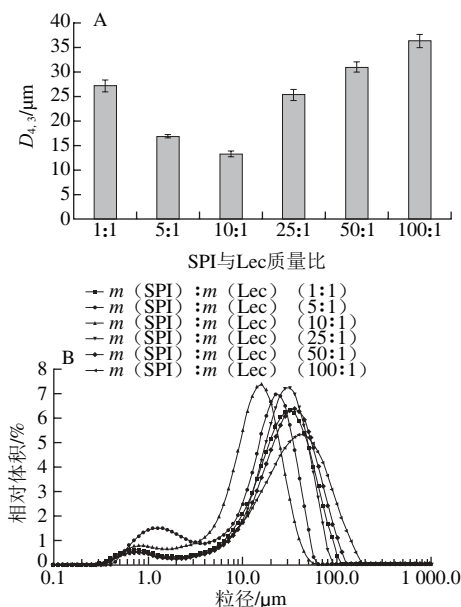


图3 SPI与Lec的比例对SPI-Lec乳液体积平均粒径 $D_{4,3}$ 和粒径分布的影响
Fig. 3 Effect of SPI/lecithin ratio on $D_{4,3}$ and droplet size distribution of SPI-lecithin emulsion

2.4 ζ -电位分析

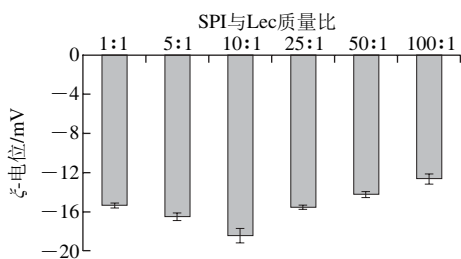
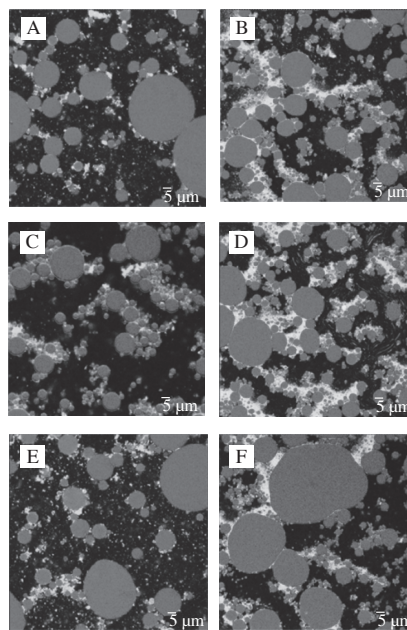


图4 SPI与Lec的比例对SPI-Lec乳液 ζ -电位的影响
Fig. 4 Effect of SPI/lecithin ratio on ζ -potential of SPI-lecithin emulsion

不同样品的 ζ -电位实验结果如图4所示。在中性条件下, SPI-Lec乳液均具有负电性, 当SPI与Lec的比例为1:1时, 复合乳化体系液滴表面的电位为-15 mV左右, 随着SPI复合比例的增加, 液滴 ζ -电位绝对值增加缓慢, 10:1时到达拐点, ζ -电位值达到-19 mV左右。随着Lec比例的进一步减小, ζ -电位绝对值呈现急剧下降的趋势, 当SPI与Lec比例达到100:1时, 液滴的电位值为-12 mV左右。 ζ -电位的绝对值较高, 说明乳液液滴表面的同种电荷含量较高, 彼此间的静电斥力保证乳液在储存期间发生液滴扰动, 因此稳定性较强^[25]。实验结果说明Lec的复合比例可改变复合乳化体系的表面电位。SPI与Lec的比例为10:1时可以提高复合乳化体系 ζ -电位的绝对值, 由于静电排斥而维持了乳液的稳定性, 抑制乳液在储存期间液滴的扰动。该结果可支持2.1节中样品乳化稳定性较好的结果。

2.5 CLSM乳液显微结构



A~F. SPI与Lec质量比分别为1:1、5:1、10:1、25:1、50:1、100:1。

图5 不同SPI与Lec比例下乳液CLSM图

Fig. 5 Confocal laser scanning microscopic pictures of SPI-lecithin emulsions with different SPI/lecithin ratios

CLSM图(图5)中呈红色荧光的核心是乳状液的油相-葵花籽油, 呈现绿色荧光的外围边界是SPI(图中未能显示), 其中Lec也分布于蛋白质周围或与蛋白质通过疏水相互作用形成复合体系存在^[26-27]。当SPI与Lec的比例为1:1时, 形成的乳液液滴较大, 具有一定的结构性。可见少部分蛋白质分散在油-水界面上, 液滴直径差异性较大。随着体系中蛋白质含量的增加, 乳液结构性得到加强, 形成了凝胶状的结构。两亲性的Lec分子可以和蛋白质同时占据在油-水界面层上, 或者是Lec与蛋白质通过

疏水相互作用结合到一起形成第二层乳化层。因此,乳滴稳定存在且球形状态更加规则。然而,蛋白质浓度较高时乳液产生微小的相分离,同时部分液滴呈现出不规则的非球状^[28]。Thivilliers等^[29]研究指出乳滴形态的改变说明表面活性剂的状态变化。在本实验中,可能与该条件下蛋白质在水相溶液中不溶性聚集体产生有关^[30]。复合乳化体系微观结构的改变,与粒径分布及乳液稳定性分析结果一致。

本研究采用功能表达与结构变化同步分析、宏/微观的讨论模式,探究了SPI与Lec比例及相互作用对复合乳化体系功能性质和乳液微观结构的影响。乳化活性与粒径关系密切,乳液的稳定性可通过乳化稳定性和 ζ -电位共同表征。CLSM可同时衡量乳液的粒滴分布和稳定情况。因此,分析手段有利于探究大豆蛋白与磷脂的交互程度对复合乳化体系功能性质的影响。

3 结 论

本研究制备了不同比例下SPI与Lec(1:1、5:1、10:1、25:1、50:1、100:1)的复合乳化体系,以探究SPI和Lec的比例及相互作用程度对复合乳化体系功能性质的影响,主要结论如下:

SPI-Lec复合乳化体系的乳化活性、乳化稳定性等功能性质因SPI与Lec比例的不同而具有差异性,且当SPI与Lec的比例为10:1时,复合体系的乳化活性和乳化稳定性最高。乳液粒径减小、分散均匀、外观均一,表明SPI与Lec的适宜配比易于两者交互作用产生,提高复合体系的乳化活性。

样品乳层析指数和 ζ -电位绝对值分析表明,当SPI与Lec添加量的比值过高或过低都不能使SPI-Lec复合乳化体系形成稳定乳液。体系通过增加颗粒表面的净电荷含量提高O/W型乳状液的稳定性,说明样品中Lec的复合对蛋白质乳液的稳定性产生很大影响。适宜含量的SPI与Lec在电中性条件下可发生疏水相互作用而保持乳化层致密且完整。

CLSM图表明当SPI与Lec比例为10:1时形成的乳液分散更均匀,表面蛋白吸附量较高,液滴直径减小。而当SPI所占比例较小时液滴直径大小差异大、双峰分布较为明显;当SPI所占比例过大时,乳液产生不规则的非球状,对乳液的微观结构破坏较大,不利于乳液均一。

参考文献:

- [1] 周志红,唐传核,杨晓泉.大豆蛋白的体外模拟消化过程及热处理的影响[J].食品科学,2006,27(1):37-40.
- [2] 江连洲,赵谋明,陈复生,等.大豆精深加工关键技术创新与应用[J].中国食品学报,2012,12(6):1-8.

- [3] KATO A, OSAKA Y, MATSUDOMI N, et al. Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1983, 47(1): 33-37.
- [4] WANG X S, TANG C H, LI B S, et al. Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22(4): 560-567. DOI:10.1016/j.foodhyd.2007.01.027.
- [5] 吴伟,李维林,喻子牛,等.大豆卵磷脂的酶法改性研究[J].中国粮油学报,2005,20(6):71-75.
- [6] 付茂辉,赵青山.大豆卵磷脂的研究概况[J].山西食品工业,2005(4):24-28.
- [7] van NIEUWENHUYZEN W, SZUHAJ B F. Effects of lecithins and proteins on the stability of emulsions[J]. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 1998, 100(7): 282-291.
- [8] OHTSURU M, KITO M. Association of phosphatidylcholine with soybean 11S globulin[J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1983, 47: 1907-1908.
- [9] SUNDER A, SCHERZE I, MUSCHLIOLIK G. Physico-chemical characteristics of oil-in-water emulsions based on whey protein-phospholipid mixtures[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2001, 21(1): 75-85. DOI:10.1016/S0927-7765(01)00186-2.
- [10] McCLEMENTS D J. Food emulsions: principles, practices, and techniques[M]. Boca Raton: CRC Press Inc., 2005: 22-25.
- [11] MA Lei, LI Bin, HAN Fenxia, et al. Evaluation of the chemical quality traits of soybean seeds, as related to sensory attributes of soymilk[J]. *Food Chemistry*, 2015, 173(5): 694-701. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.10.096.
- [12] WOLF W J. Soybean proteins. their functional, chemical, and physical properties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1970, 18(6): 969-976. DOI:10.1021/jf60172a025.
- [13] LI C, HUANG X J, PENG Q, et al. Physicochemical properties of peanut protein isolate-glucomannan conjugates prepared by ultrasonic treatment[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2014, 21(5): 1722-1727. DOI:10.1016/j.ultsonch.2014.03.018.
- [14] ZISU B, SCHLEYER M, CHANDRAPALA J. Application of ultrasound to reduce viscosity and control the rate of age thickening of concentrated skim milk[J]. *International Dairy Journal*, 2013, 31(1): 41-53.
- [15] TANG C H, CHOI S M, MA C Y. Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, 40(2): 96-104. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2006.06.013.
- [16] MANTOVANI R A, CAVALLIERI A L F, NETTO F M, et al. Stability and *in vitro* digestibility of emulsions containing lecithin and whey proteins[J]. *Food & Function*, 2013, 4(9): 1322-1331. DOI:10.1039/C3FO60156K.
- [17] PUPPO M C, BEAUMAL V, CHAPLEAU N, et al. Physicochemical and rheological properties of soybean protein emulsions processed with a combined temperature/high-pressure treatment[J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22: 1079-1089. DOI:10.1016/j.foodhyd.2007.05.018.
- [18] LEE S, LEE S, SONG K B, et al. Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of porcine and bovine blood plasma proteins[J]. *Food Chemistry*, 2003, 82(4): 521-526. DOI:10.1016/S0308-8146(02)00592-7.
- [19] TORREZAN R, THAM W P, BELL A E, et al. Effects of high pressure on functional properties of soy protein[J]. *Food Chemistry*, 2007, 104(1): 140-147. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.11.013.

- [20] LI Y Q, CHEN Z X, MO H Z, et al. Effects of pulsed electric fields on physicochemical properties of soybean protein isolates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2007, 40(7): 1167-1175. DOI:10.1016/j.lwt.2006.08.015.
- [21] ERIC K S, VIVIANE M A, ROSIANE L C, et al. Ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil: whey protein isolate *versus* modified starch[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 56: 71-83. DOI:10.1016/j.foodhyd.2015.12.006.
- [22] CHEN W S, SOUCIE W G. Modification of surface charges of soy protein by phospholipids[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1985, 62: 1686-1689.
- [23] SCURIATTI M, TOMAS M, WANGNER J. Influence of soybean protein isolates-phosphatidylcholine interaction on the stability on oil-in-water emulsions[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2003, 80(11): 1093-1100. DOI:10.1007/s11746-003-0825-7.
- [24] YUAN B E, REN J Y, ZHAO M M, et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with pepsin and high-pressure homogenization on the functional properties of soybean protein isolate[J]. LWT-Food Science and Technology, 2012, 46(2): 453-459. DOI:10.1016/j.lwt.2011.12.001.
- [25] SORENSEN A M, BARON C P, LET M B, et al. Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: oxidation linked to changes in protein composition at the oil-water interface[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(5): 1781-1789. DOI:10.1021/jf0623900.
- [26] PUPPO M C, CHAPLEAU N, SPERONI F, et al. Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 1564-1571. DOI:10.1021/jf034813t.
- [27] PUPPO M C, SPERONI F, CHAPLEAU N, et al. Effect of high pressure treatment on emulsifying properties of soybean proteins[J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(2): 289-296. DOI:10.1016/j.foodhyd.2004.07.001.
- [28] HERBERT S, BOUCHET B, RIAUBLANC A, et al. Multiple fluorescence labelling of proteins, lipids and whey in dairy products using confocal microscopy[J]. Dairy Science & Technology, 1999, 79(6): 567-575. DOI:10.1051/lait:1999646.
- [29] THIVILLIERS F, LAURICHESSES E, SAADAOU H, et al. Thermally induced gelling of oil-in water emulsions comprising partially crystallized droplets: the impact of interfacial crystals[J]. Langmuir, 2008, 24(23): 13364-13375. DOI:10.1021/la802521f.
- [30] 毕爽, 齐宝坤, 隋晓楠, 等. 超声处理对黑豆蛋白结构和功能性质的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(6): 153-160. DOI:10.16429/j.1009-7848.2016.06.021.