

冻融处理对大豆分离蛋白及其糖基化产物 凝胶理化性质的影响

罗裕旻¹, 马 钱¹, 徐子力¹, 王 薇¹, 张 清^{1,2}

(1. 四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 食品加工与安全研究所, 四川 雅安 625014)

摘要:为探究大豆分离蛋白(SPI)及其糖基化产物凝胶在不同温度冻融过程中的变化情况,采用SPI和SPI-葡聚糖(分子质量分别为10、40、70 kDa)衍合物制备凝胶,对其进行-18、-80℃冻融处理,测定冻融处理前后凝胶的表面疏水性、总游离巯基含量、凝胶网络结构、凝胶强度和持水力,研究冻融条件对SPI及其糖基化衍合物凝胶理化性质的影响。结果表明:与冻融前比较,-18、-80℃冻融处理后SPI凝胶表面疏水性显著增加,总游离巯基含量降低,凝胶网络结构被破坏,凝胶强度总体降低,持水力升高。与冻融前比较,SPI-葡聚糖衍合物凝胶在-18℃冻融处理后表面疏水性显著增加,最高增加了23.29%(SPI-40 kDa 葡聚糖衍合物),而-80℃冻融处理后无显著变化;-18℃冻融处理后总游离巯基含量下降,-80℃冻融处理后总游离巯基含量升高;冻融处理后凝胶结构未发生明显变化,而凝胶强度均降低;持水力在-18℃冻融处理后总体变化不大,-80℃冻融处理后升高。综上,-18℃冻融处理对SPI凝胶及SPI-葡聚糖衍合物凝胶的总游离巯基含量、凝胶强度的影响总体小于-80℃冻融处理,且3种分子质量的葡聚糖改性的SPI-葡聚糖衍合物凝胶的理化性质总体差异不大。

关键词:大豆分离蛋白;糖基化;凝胶;冻融处理

中图分类号:TS201.7;TS214.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)04-0039-07

Effect of freeze - thawing treatment on the physicochemical properties of gels of soybean isolated protein and its glycosylated products

LUO Yumin¹, MA Qian¹, XU Zili¹, WANG Wei¹, ZHANG Qing^{1,2}

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China;

2. Institute of Food Processing and Safety, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China)

Abstract: To investigate the changes of soybean isolate protein (SPI) and its glycosylated product gels during freeze - thawing treatment at different temperatures, gels were prepared using SPI and SPI - dextran (molecular masses of 10, 40 kDa and 70 kDa, respectively) conjugates, and were subjected to freeze - thawing treatment at -18℃ and -80℃. The surface hydrophobicity, total free sulfhydryl content, gel network structure, gel strength and water holding capacity of the gels were measured before and after freeze - thawing treatment to investigate the effects of freeze - thawing conditions on the physicochemical properties of the gels of SPI and its glycosylated conjugates. The results showed that the surface hydrophobicity of SPI gels increased significantly, the total free sulfhydryl content decreased, the gel network structure was destroyed, the gel strength overall decreased and the water holding capacity increased after freeze - thawing treatment at -18℃ and -80℃ compared with that before freeze -

thawing treatment. The surface hydrophobicity of SPI - dextran conjugate gel increased significantly after freeze - thawing treatment at -18℃, with the highest increasing rate of 23.29% (SPI - 40 kDa

收稿日期:2021-08-05;修回日期:2022-12-18

作者简介:罗裕旻(1999),男,在读本科,专业为食品科学与工程(E-mail)yumin.luo@outlook.com。

通信作者:张 清,教授(E-mail)zhangqing@sicau.edu.cn。

dextran conjugate), and there was no significant difference after freeze - thawing treatment at -80°C compared with that before freeze - thawing. The total free sulfhydryl content decreased after freeze - thawing treatment at -18°C , while it increased after treatment at -80°C . The gel structure did not change significantly after freeze - thawing treatment, but the gel strength decreased. The water holding capacity did not change much after freeze - thawing treatment at -18°C and increased after treatment at -80°C . In conclusion, the effects of freeze - thawing treatment at -18°C on the total free sulfhydryl content and gel strength of SPI gels and SPI - dextran conjugate gels are generally smaller than those of freeze - thawing treatment at -80°C , and the physicochemical properties of SPI - dextran conjugate gels modified with three molecular masses of dextran are generally not significantly different.

Key words: soybean protein isolate; glycosylation; gels; freeze - thawing treatment

大豆分离蛋白(SPI)是目前食品工业使用最为广泛的植物蛋白,其作为食品原辅料被广泛用于肉制品、鱼糜制品和凝胶类豆腐制品。SPI凝胶是由SPI加热后结构展开并相互连接成网络结构而形成的,SPI凝胶制品如豆腐、豆干、腐竹、腐乳等占据了大豆产业的相当比例,亦是深受人们喜爱的传统食品。

冻融过程是SPI凝胶制品在生产、运输、储存过程中面临的一个挑战,经冻融处理后蛋白凝胶的功能性质及微观结构会发生较显著的变化^[1]。例如:郭顺堂^[2]发现冻融处理后凝胶微观结构中出现较大孔隙,孔隙表面结构更均一致密,同时二硫键产生导致可溶性蛋白含量降低;Li等^[3]发现凝胶持水力、凝胶强度在冻融后显著降低;陈振家等^[1]发现冻结后凝胶持水性和弹性均呈下降趋势,而凝胶硬度呈增大趋势,表明凝胶品质劣变。

糖基化是蛋白质分子中 α -或 ε -氨基与糖类中还原性末端的羰基结合形成糖基化蛋白的反应^[4],这一改性方法具有过程温和、无有毒有害试剂添加等优势^[5]。糖基化改性蛋白制成的蛋白质凝胶微观结构和持水力等功能性质都有一定程度的改善^[6-7]。杜昱蒙等^[8]采用葡萄糖对SPI进行糖基化改性,发现接入葡萄糖使SPI不易脱水变性,凝胶抗冻性提高。因此,糖基化可以作为改善SPI凝胶在冻融过程中变化情况的一种良好改性方式。

目前,国内外现有研究对不同条件下冻融处理的SPI及糖基化改性SPI凝胶变化的研究报道较少。本研究采用不同分子质量葡聚糖糖基化改性SPI,制备SPI-葡聚糖衍合物,并制备SPI和SPI-葡聚糖衍合物凝胶,经过两种不同条件的冻融处理(-18°C -室温和 -80°C -室温)后,探究其微观结构和理化性质的变化,以期对糖基化SPI作为食品原料的应用及探究其凝胶合适的储存条件、变化规

律等提供思路和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

SPI(纯度 $\geq 85\%$)、葡聚糖(分子质量10、40 kDa和70 kDa)、Lowry蛋白浓度测定试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒,武汉博士德生物工程有限公司;1 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)、甲醇、四硼酸钠、SDS、 β -巯基乙醇、L-赖氨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘油、溴酚蓝、甘氨酸、葡萄糖酸- δ -内酯(GDL,食品级)、戊二醛、叔丁醇、乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)、甘氨酸、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)和8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS),均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

JY10002型电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;MYP11-2型数显恒温磁力搅拌器,上海沪粤明科学仪器有限公司;VORTEX 3型旋涡振荡仪,上海达姆实业有限公司;DHG-2200B型电热恒温干燥箱,郑州生元仪器有限公司;Thermo Scientific Sorvall型高速冷冻离心机、Varioskan LUX型荧光酶标仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;YTLG-10B型真空冷冻干燥机,上海叶拓科技有限公司;DYY-6D型电泳仪,北京六一仪器厂;L9双光束紫外可见分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;ST-Z16型质构仪,山东盛泰仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 SPI-葡聚糖衍合物的制备

SPI-葡聚糖衍合物的制备采用湿法糖基化法^[9]。先将SPI溶于双蒸水获得质量浓度为50 mg/mL的SPI溶液;再按SPI与葡聚糖质量比1:2

分别加入分子质量为10、40、70 kDa的葡聚糖于SPI溶液中,室温下磁力搅拌2 h,在4℃下静置过夜,放置于70℃水浴中加热4 h后取出,迅速放置于冰浴中以终止糖基化反应,得SPI-葡聚糖轭合物样品溶液,同时以未添加葡聚糖的SPI溶液和未添加葡聚糖热处理的SPI溶液作为对照。

1.2.2 凝胶的制备

凝胶的制备参照Cai等^[10]的方法并作适当修改。将样品溶液在95℃条件下水浴加热15 min,放置冷却,加入GDL使其质量浓度为5 mg/mL,磁力搅拌15 min后移入25 mm×30 mm称量皿中,放入85℃水浴锅中保温1 h,即形成凝胶。将凝胶放在4℃冰箱中,过夜备测。

1.2.3 凝胶的冻融处理

冻融处理参考马燕^[11]的方法。将所制备的相同尺寸的凝胶分别置于-18℃冰柜和-80℃超低温冰箱中,自凝胶进入冷冻环境中开始计时,48 h后将冻结凝胶样品置于周围无热源的室温[(25±1)℃]环境下自然解冻6 h后,待测。

1.2.4 SPI-葡聚糖轭合物的鉴定

1.2.4.1 接枝度的测定

将样品溶液冷冻干燥成粉末,称取6 mg粉末样品溶于2 mL 1 mol/L PBS中,旋涡振荡后离心取上清液,用Lowry蛋白浓度测定试剂盒测定其蛋白质浓度,计算样品溶解度,调整溶液蛋白质质量浓度至2 mg/mL。

采用邻苯二甲醛(OPA)法测定游离氨基并计算接枝度^[12]。称取400 mg OPA溶解于10 mL甲醇和30 mL去离子水中,为A液;将25 mL 100 mmol/L四硼酸钠溶液、2.5 mL 20% SDS溶液和100 μL β-巯基乙醇混合,用去离子水稀释至50 mL,为B液。将200 μL上述样品溶液与0.3 mL A液和3.7 mL B液混合后,室温下反应2 min,用紫外可见分光光度计在340 nm波长处测定吸光值(A_1),以SDS溶液代替样品溶液作为空白用于校零。以未经处理的SPI测得的吸光值为 A_0 。接枝度(x)按式(1)进行计算。

$$x = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

1.2.4.2 SDS-PAGE分析

SDS-PAGE分析参照Zhang等^[13]的方法并作适当修改。将样品溶液冷冻干燥,取一定量冻干样品溶于1 mL上样缓冲液使蛋白质质量浓度为2 mg/mL,沸水浴加热3 min,冷却后在8 000 r/min、4℃条件下离心10 min,取上清液10 μL加入泳道内。在电压120 V、10%分离胶和浓缩胶条件下电

泳,待蓝色横条纹迁移至胶底部时停止电泳。在培养皿中用染色液染色50 min,然后用脱色液脱色3次,每次20 min。最后放在凝胶成像仪上成像分析。

1.2.5 凝胶理化性质的测定

1.2.5.1 表面疏水性的测定

表面疏水性测定参考Kato等^[14]的方法并作适当修改。以ANS作为荧光探针,将ANS溶于PBS中,使其浓度为8 mmol/L。将冻融前后的凝胶分散在10 mmol/L PBS中,旋涡振荡1 min配制成样品溶液,置于4℃冰箱过夜,取出后在10 000 r/min下离心10 min,取上清液并调整蛋白质质量浓度为2 mg/mL,取3 mL加入60 μL ANS的PBS,混匀后在激发波长365 nm、发射波长400~600 nm、扫描间隔2 nm条件下,通过酶标仪测定样品的荧光光谱,以最大的荧光强度代表凝胶的表面疏水性。

1.2.5.2 总游离巯基含量的测定

总游离巯基含量测定参考Shimada等^[15]的方法并作适当修改。将冻干的凝胶样品溶解于pH 8.0的缓冲液(由4 mmol/L Na₂EDTA、0.09 mol/L甘氨酸和0.086 mol/L Tris组成)中,旋涡振荡1 min后置于4℃冰箱过夜,取出后在10 000 r/min下离心10 min,取上清液并调整蛋白质质量浓度为2 mg/mL,取3 mL加入0.03 mL Ellman's试剂后迅速摇匀,室温下避光反应15 min后,在412 nm处测定吸光值。以缓冲液作为试剂空白。总游离巯基含量(x)按式(2)进行计算。

$$x = (A_{412} \times 73.53) / C \quad (2)$$

式中: A_{412} 为412 nm处的吸光值; C 为溶液蛋白质质量浓度。

1.2.5.3 微观结构分析

凝胶的微观结构采用扫描电镜(SEM)进行观察分析,参照Li等^[16]的方法并作适当修改。样品前处理:将凝胶切成约2 mm×2 mm×5 mm的方块,置于体积分数为2.5%的戊二醛溶液(pH 7.2)中,4℃条件下浸泡2 h进行固定,再用0.1 mol/L、pH 7.2的PBS洗涤3次,每次10 min。然后用体积分数分别为50%、70%、80%和90%的乙醇进行脱水,每次10 min;再用无水乙醇脱水3次,每次10 min。之后用无水乙醇-叔丁醇(体积比1:1)、叔丁醇各进行1次置换,每次15 min。之后对样品进行冷冻干燥,将干燥后的样品用导电胶固定在样品台上,通过离子溅射在样品上喷金后,将样品转移到SEM台面上,在加速电压10 kV的条件下观察凝胶的形态结构并拍照。

1.2.5.4 凝胶强度的测定

采用质构仪进行凝胶强度测定^[17]。将盛放在称量皿中的凝胶样品在 25℃ 下水浴 1 h 后开始测定。凝胶强度的测定选用 return to start 模式,测试探头选用 p/0.5,测前、测中和测后速度分别设置为 5、1 mm/s 和 5 mm/s,压缩应变为 30.0%,触发力 5 g。

1.2.5.5 凝胶持水力(WHC)测试

凝胶 WHC 测定参考 Zhang 等^[17]的方法。称取约 1 g 凝胶样品(质量计为 W_1),将其放入底部塞有脱脂棉的离心管中,在 7 500 r/min 和 20℃ 的条件下离心 10 min,取出凝胶测其质量(W_2)。再将凝胶在 105℃ 下烘干 6 h 后,测其质量(W_3)。持水力(x)按式(3)进行计算。

$$x = (W_2 - W_3) / (W_1 - W_3) \times 100\% \quad (3)$$

1.2.6 数据处理

所有试验处理均进行 3 次重复。所有数据采用 Excel 进行处理;采用 SPSS 软件进行差异性分析(Duncan 检验)($p < 0.05$);采用 Origin 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 糖基化产物的鉴定

2.1.1 接枝度的变化

表 1 为 SPI 与 3 种不同分子质量葡聚糖糖基化产物的接枝度。由表 1 可看出,随着葡聚糖分子质量增大,接枝度逐渐降低($p < 0.05$)。SPI 与葡聚糖之间发生糖基化主要是 SPI 中的 ϵ -氨基与葡聚糖上的还原羰基端发生共价交联反应,葡聚糖分子质量增大,分子间空间位阻增强,羰基与氨基碰撞的概率降低,糖基化反应减少从而使接枝度降低^[17]。

表 1 不同分子质量葡聚糖糖基化产物的接枝度

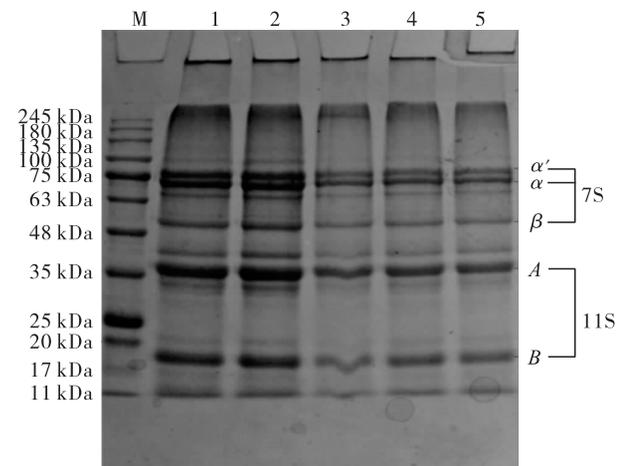
| 样品 | 接枝度/% |
|-----------------------|---------------------------|
| SPI - 10 kDa 葡聚糖糖基化产物 | 10.93 ± 1.02 ^a |
| SPI - 40 kDa 葡聚糖糖基化产物 | 8.74 ± 0.23 ^b |
| SPI - 70 kDa 葡聚糖糖基化产物 | 7.92 ± 0.26 ^c |

注:不同字母表示差异显著($p < 0.05$)

2.1.2 蛋白质组成分析

图 1 为糖基化前后 SPI 的 SDS-PAGE 图。由图 1 可看出,泳道 3~5 中的大豆 11S 蛋白和大豆 7S 蛋白特征条带较泳道 1、2 中的位置稍许偏上,这是由于糖基化反应的发生,形成 SPI-葡聚糖糖基化产物,分子质量增大,施加电压时在凝胶内的运动速率减小,呈现滞后现象。泳道 3~5 的条带颜色明显比泳道 1、2 的条带颜色浅。这是由于考马斯亮蓝在酸性条件下与蛋白质中的游离氨基结合呈现蓝色^[18],糖基化反应过程中葡聚糖与 SPI 中部分赖氨酸中的

自由氨基之间发生了共价连接,导致蛋白质中可以与考马斯亮蓝结合的游离氨基数量减少,从而使条带颜色变浅。

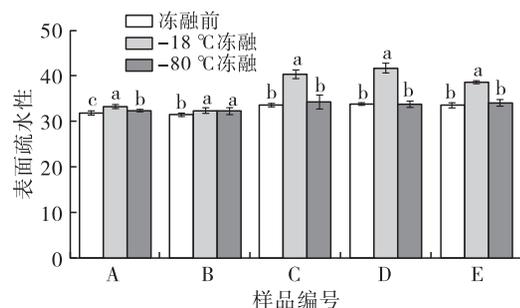


注:M. 标准分子质量蛋白;泳道 1. SPI;泳道 2. 热处理 SPI;泳道 3~5 分别为 SPI-10 kDa 葡聚糖糖基化产物、SPI-40 kDa 葡聚糖糖基化产物和 SPI-70 kDa 葡聚糖糖基化产物

图 1 糖基化前后 SPI 的 SDS-PAGE 图

2.2 凝胶表面疏水性

图 2 为各组凝胶冻融前后的表面疏水性。



注:A. SPI 凝胶;B. 热处理 SPI 凝胶;C. SPI-10 kDa 葡聚糖糖基化产物凝胶;D. SPI-40 kDa 葡聚糖糖基化产物凝胶;E. SPI-70 kDa 葡聚糖糖基化产物凝胶。不同小写字母表示组内差异显著($p < 0.05$)。下同

图 2 SPI 及其糖基化产物凝胶冻融前后的表面疏水性

由图 2 可看出,冻融前后 3 组糖基化产物凝胶表面疏水性均高于 SPI 凝胶和热处理 SPI 凝胶。与冻融前相比,-18℃冻融后,SPI 凝胶和热处理 SPI 凝胶表面疏水性分别增加 4.38%、2.80%,SPI-10 kDa、SPI-40 kDa、SPI-70 kDa 葡聚糖糖基化产物凝胶表面疏水性分别增加了 20.23%、23.29%、15.01%;-80℃冻融后,SPI 凝胶和热处理 SPI 凝胶表面疏水性分别增加 1.60%、2.38%,3 组糖基化产物凝胶表面疏水性与冻融前相比均无显著性差异($p > 0.05$)。

SPI 主要由球蛋白组成,球蛋白表面分布较多亲水基团,部分疏水基团包裹于分子内部^[19]。接入葡聚糖链引入的基团与其他组分相互作用,使

得球蛋白结构变得松散,将原本包埋在蛋白质内部的疏水基团暴露出来,表面疏水性增加。同时冻结过程中形成的冰晶大小和浓缩程度可能破坏蛋白质结构,使内部疏水基团暴露从而增加表面疏水性。

2.3 凝胶总游离巯基含量

图3为各组凝胶冻融前后的总游离巯基含量。

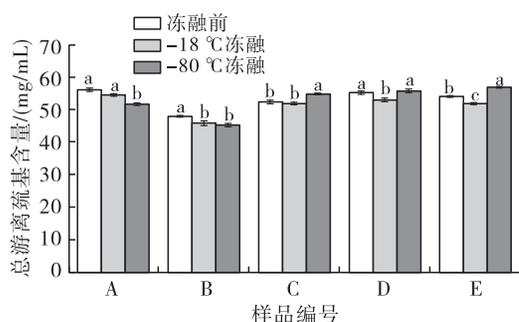


图3 SPI及其轭合物凝胶冻融前后的总游离巯基含量

由图3可看出,冻融前,热处理SPI凝胶的总游离巯基含量低于其他各组的。与冻融前相比,经过-18 °C冻融后,SPI凝胶和热处理SPI凝胶总游离巯基含量分别降低了2.85%、4.32%,SPI-10 kDa、SPI-40 kDa、SPI-70 kDa葡聚糖轭合物凝胶总游离巯基含量分别降低了0.95%、4.08%、4.01%;-80 °C冻融后,SPI凝胶和热处理SPI凝胶总游离巯基含量

分别降低了7.82%、5.53%,SPI-10 kDa、SPI-40 kDa、SPI-70 kDa葡聚糖轭合物凝胶总游离巯基含量分别升高了4.51%、0.92%、5.31%。冻融前后,3组轭合物凝胶的总游离巯基含量相差不大。

总游离巯基的含量变化可以反映蛋白质内和蛋白质间二硫键的变化情况,总游离巯基含量降低即二硫键含量增加^[20]。热处理使蛋白质聚集交联,此过程中蛋白质内部的巯基暴露,二硫键的形成交换作用加强,总游离巯基含量下降。加入葡聚糖后在加热条件下进行糖基化反应使得游离巯基含量显著升高,推测是因为葡聚糖与SPI接枝后,较长的糖链使得蛋白质间难以相互碰撞形成二硫键,或者体系中未反应的葡聚糖产生阻碍作用,使二硫键更难形成,使得总游离巯基含量升高。冻结过程中,SPI-葡聚糖轭合物中糖链的亲水基团与凝胶中的水分结合,减少参与形成冰晶的水,减小冰晶,从而降低对蛋白质挤压造成的二硫键形成,改善蛋白质脱水导致浓度升高而聚集产生二硫键的情况^[21]。二硫键的存在可以使蛋白质的折叠增加,更多包埋在内部的基团暴露,从而使表面疏水性增加^[22],这与表面疏水性的结果基本一致。

2.4 凝胶微观结构

各组凝胶冻融前后的微观结构如图4所示。

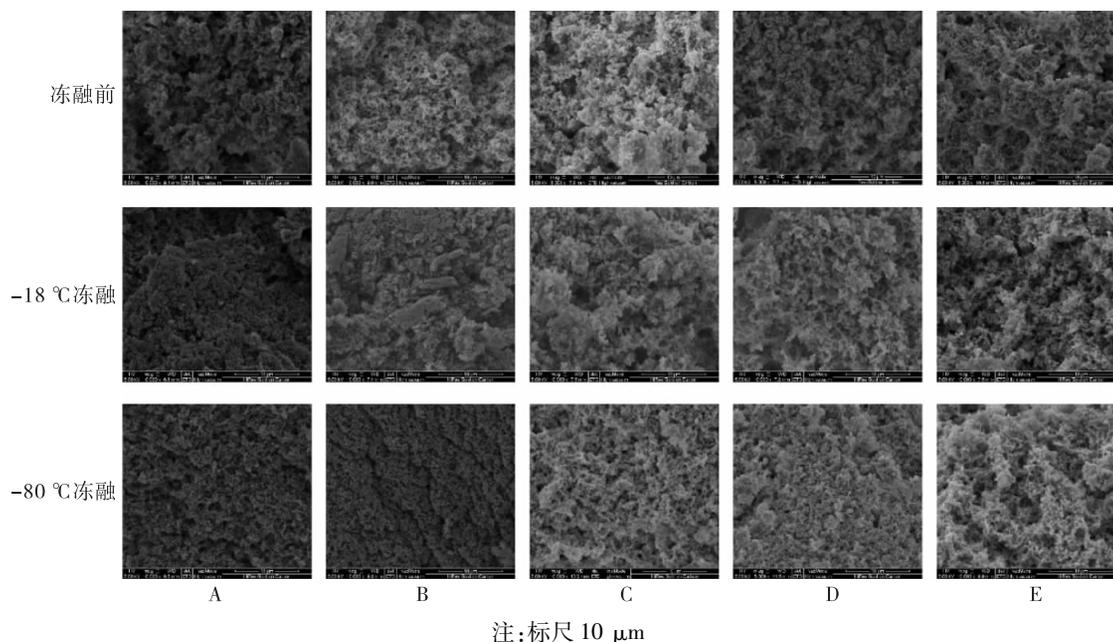


图4 SPI及其轭合物凝胶冻融前后的微观结构

根据凝胶的微观结构形态可将凝胶微观结构分为较细腻的线状凝胶和较粗糙的聚集体凝胶两类^[23]。由图4可看出,各组凝胶均为聚集体凝胶。冻融前各组凝胶均形成了网络结构,其中SPI凝胶和热处理SPI凝胶结构单元间交联程度最高,网络

结构的连续性和有序性最好,3组轭合物凝胶结构单元间孔隙有所增加,连续性下降。经过-18 °C冻融后,SPI凝胶和热处理SPI凝胶网络结构受到了比较严重的破坏,网络结构的单元间堆叠在一起,而3组轭合物凝胶仍具有良好的网络结构,较冻融前变

化不显著。在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融条件下, SPI 凝胶和热处理 SPI 凝胶结构单元间孔隙缩小, 形成了更致密、平滑的网络结构, 3 组韧带物凝胶结构较冻融前并未发生明显的变化。

在凝胶形成的过程中, 糖基化引入的糖链造成空间位阻效应以及体系中存在未反应的游离葡聚糖导致凝胶网络结构的单元间聚集被阻碍, 二硫键等含量下降, 从而具有更大的孔隙^[24]。在冻结过程中, 凝胶结构中的水形成冰晶, 导致蛋白质间的凝集从而破坏凝胶网络结构, 糖链的引入通过位阻, 防止蛋白质基团间的结合^[25], 防止网络结构在失水后过度收缩和聚集体过度聚集导致的凝胶网络结构破坏^[8], 从而维持微观结构的相对稳定。

2.5 凝胶强度

图 5 为 SPI 及其韧带物凝胶冻融前后的凝胶强度。

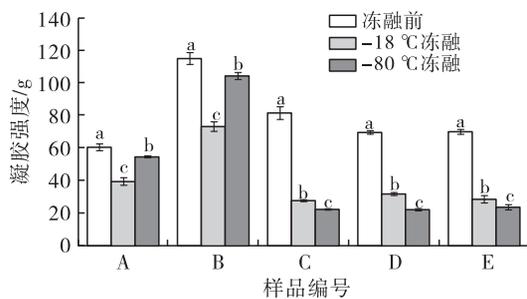


图 5 SPI 及其韧带物凝胶冻融前后的凝胶强度

由图 5 可知, 冻融前, 热处理 SPI 凝胶具有最大的凝胶强度, 比 SPI 凝胶高 90.41%, 而 3 组韧带物凝胶与热处理 SPI 凝胶相比, 凝胶强度分别降低了 29.14%、39.46%、35.14%。与冻融前相比, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融后, SPI 凝胶和热处理 SPI 凝胶的凝胶强度分别降低了 34.57%、36.34%, 3 组韧带物凝胶的凝胶强度分别降低了 61.71%、54.33%、59.16%; $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融后, SPI 凝胶和热处理 SPI 凝胶的凝胶强度分别降低了 9.59%、9.35%, 3 组韧带物凝胶的凝胶强度分别降低了 72.68%、68.21%、66.23%。SPI 凝胶和热处理 SPI 凝胶 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融后其凝胶强度低于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融的 ($p < 0.05$), 3 组韧带物凝胶则相反。

热处理 SPI 凝胶具有最大的凝胶强度, 这与其最低的总游离巯基含量即最大的二硫键含量和具有连续、有序的微观结构的结果是一致的。由于较长糖链间的空间位阻效应以及体系中存在未反应的游离葡聚糖阻碍, 凝胶形成时蛋白质更不易于聚集和交联, 形成的网络结构更疏松, 从而导致韧带物凝胶具有较低的凝胶强度, 且原本更疏松的结构也更容易在冻结过程中被破坏, 凝胶强度降低程度更大。

2.6 WHC

图 6 为各组凝胶冻融前后的 WHC。

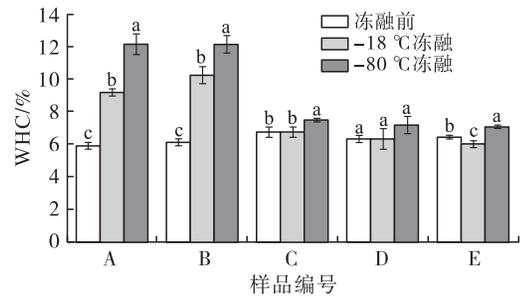


图 6 SPI 及其韧带物凝胶冻融前后的 WHC

由图 6 可看出, 与冻融前相比, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融后 SPI 凝胶和热处理 SPI 凝胶 WHC 分别提高了 55.35%、67.24%, SPI-10 kDa、SPI-40 kDa 葡聚糖韧带物凝胶 WHC 无显著变化 ($p > 0.05$), 而 SPI-70 kDa 葡聚糖韧带物凝胶 WHC 显著降低 ($p < 0.05$), $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融后 SPI 凝胶和热处理 SPI 凝胶 WHC 分别增加了 105.35%、96.56%, SPI-10 kDa、SPI-40 kDa、SPI-70 kDa 葡聚糖韧带物凝胶 WHC 分别增加了 10.93%、13.33%、9.84%, 均较 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融后的 WHC 高。冻融前 3 组韧带物凝胶的 WHC 较热处理 SPI 凝胶高, 而冻融后 3 组韧带物凝胶的 WHC 均低于热处理 SPI 凝胶的。SPI-10 kDa 葡聚糖韧带物凝胶的 WHC 在 3 种条件下均略高于 SPI-40 kDa、SPI-70 kDa 葡聚糖韧带物凝胶的。

冻融前, 糖基化使较多羟基随葡聚糖进入体系, 对水的结合能力大大提高, 从而持水力增加^[9]。冻融后未糖基化凝胶持水力升高程度大于韧带物凝胶, 可能是由于未糖基化凝胶在冻融过程中丢失更多游离水, 在冻结后结合水占比升高, 而韧带物凝胶在冻融过程中对游离水的相互作用更强, 游离水丢失更少, 使结合水的占比升高程度较小。另外, 3 组韧带物凝胶 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融后的 WHC 较 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融后的 WHC 低, 这可能与 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻结更缓慢, 分离出水形成冰晶时间更长, 更多水参与冰晶形成有关。

3 结论

采用 3 种分子质量葡聚糖糖基化改性 SPI, 制备 SPI-葡聚糖韧带物, 以其和未糖基化 SPI (SPI 和热处理 SPI) 为原料制备凝胶, 并在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分别进行冻结、室温解冻处理, 对韧带物进行鉴定并研究各组凝胶冻融前后理化性质的变化。与冻融前相比, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融处理后韧带物凝胶表面疏水性显著增加, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融处理后韧带物凝胶表面疏水性无显著变化, 但均较未糖基化 SPI 凝胶的高; $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻融处理后未糖基化凝胶和韧带物凝胶总游离巯基含量

均下降, -80℃冻融处理后未糖基化凝胶总游离巯基含量下降而羧合物凝胶总游离巯基含量升高;冻融处理后各组凝胶的凝胶强度均下降,且-18℃冻融处理后羧合物凝胶的凝胶强度高于-80℃冻融处理,未糖基化凝胶的凝胶强度高于羧合物凝胶的;未糖基化凝胶经冻融处理后持水力均大幅增加,羧合物凝胶冻融处理后持水力变化较小,但未糖基化凝胶和羧合物凝胶-80℃冻融处理下的持水力均大于-18℃冻融处理的。另外,3种分子量葡聚糖改性的SPI羧合物凝胶在相同条件下的理化性质总体差异不大。

参考文献:

- [1] 陈振家, 施小迪, 杜昱蒙, 等. 不同热处理大豆分离蛋白凝胶冻藏特性[J]. 农业工程学报, 2016, 32(11): 283-289.
- [2] 郭顺堂. 冷冻大豆分离蛋白凝胶的功能性分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(18): 99-102.
- [3] LI F F, WANG B, KONG B H, et al. Decreased gelling properties of protein in mirror carp (*Cyprinus carpio*) are due to protein aggregation and structure deterioration when subjected to freeze-thaw cycles [J/OL]. Food Hydrocolloid, 2019, 97: 105223 [2021-08-01]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105223>.
- [4] 兰秋雨, 张清, 刘琳, 等. 蛋白质糖基化改性方法和产物验证方法研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(2): 196-201.
- [5] 葛侠. 大豆分离蛋白的糖基化改性及其凝胶性质的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2019.
- [6] SPOTTI M J, PERDUCA M J, PIAGENTINI A, et al. Gel mechanical properties of milk whey protein-dextran conjugates obtained by Maillard reaction [J]. Food Hydrocolloid, 2013, 31(1): 26-32.
- [7] 王松, 夏秀芳, 黄莉, 等. 湿法糖基化改性对大豆分离蛋白功能性质的影响[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 38-42.
- [8] 杜昱蒙, 陈振家, 施小迪, 等. 葡萄糖糖基化大豆分离蛋白的凝胶抗冻性研究[J]. 中国粮油学报, 2016, 31(10): 45-49, 55.
- [9] 杜沁岭, 周思懿, 吴岱泽, 等. 湿法糖基化处理大豆11S蛋白后的表面活性变化[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(1): 80-88.
- [10] CAI T D, CHANG K C. Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality [J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(2): 720-727.
- [11] 马燕. 冻融工艺对豆腐品质的影响研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2015.
- [12] XUE F, LI C, ZHU X W, et al. Comparative studies on the physicochemical properties of soy protein isolate-maltodextrin and soy protein isolate-gum acacia conjugate prepared through Maillard reaction [J]. Food Res Int, 2013, 51(2): 490-495.
- [13] ZHANG Y T, TAN C, ZHANG X M, et al. Effects of maltodextrin glycosylation following limited enzymatic hydrolysis on the functional and conformational properties of soybean protein isolate [J]. Eur Food Res Technol, 2014, 238: 957-968.
- [14] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins [J]. Biochim Biophys Acta, 1980, 624(1): 13-20.
- [15] SHIMADA K, CHEFTEL J C. Determination of sulfhydryl groups and disulfide bonds in heat-induced gels of soy protein isolate [J]. J Agric Food Chem, 1988, 36: 147-153.
- [16] LI L, HE H, WU D Z, et al. Rheological and textural properties of acid-induced soybean protein isolate gel in the presence of soybean protein isolate hydrolysates or their glycosylated products [J/OL]. Food Chem, 2021, 360: 129991 [2021-08-01]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129991>.
- [17] ZHANG H J, CHI Y J. Modified soy protein isolate with improved gelling stability by glycosylation under the conditions of ocean shipping [J]. Int J Food Sci Technol, 2011, 46(1): 14-22.
- [18] 夏秀芳, 李芳菲, 潘男, 等. 大豆糖蛋白的抗氧化特性及其机理[J]. 中国食品学报, 2019, 19(2): 47-54.
- [19] NISHINARI K, FANG Y, GUO S T. Soy proteins: a review on composition, aggregation and emulsification [J]. Food Hydrocolloid, 2014, 39: 301-318.
- [20] 迟玉杰, 胥伟, 洪煜森. 糖基化处理对蛋清粉凝胶性与物化特性的影响[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 82-85.
- [21] 张文叶. 冷冻方便食品加工技术及检验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 181.
- [22] 冯芳, 刘文豪, 陈志刚. 大豆7S、11S蛋白的结构与热致凝胶特性的分析[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 58-64.
- [23] 李云. 大豆蛋白聚集及共混凝胶性质研究[D]. 江苏无锡: 江南大学, 2007.
- [24] 闵维. 大豆蛋白/多糖复合凝胶流变学及微结构研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- [25] JOSEPH C G, MATTHEW P D, SARAH K B, et al. Extraction and characterisation of lipids from Antarctic krill (*Euphausia superba*) [J]. Food Chem, 2011, 125(3): 1028-1036.