

超声预处理对大豆分离蛋白糖基化复合物酸诱导凝胶性质的影响

赵城彬¹, 许秀颖¹, 刘景圣¹, 张浩¹, 吴玉柱¹, 曹勇¹, 吴非^{2,*}

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 小麦和玉米深加工国家工程实验室, 吉林 长春 130118;

2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 对溶液体系中大豆分离蛋白 (soybean protein isolate, SPI) 与葡萄糖和麦芽糖之间的糖基化反应进行超声预处理, 探讨超声预处理对SPI/糖复合物酸诱导凝胶性质的影响。傅里叶变换红外光谱分析表明糖分子与SPI形成了共价复合物。超声预处理20 min时, SPI/糖复合物的接枝度最大。葡萄糖和麦芽糖与SPI的糖基化作用会降低蛋白质的表面疏水性 (H_0) 和平均粒径 (D_{43}), 而超声预处理能够使SPI/糖复合物具有更高的 H_0 和更低的 D_{43} 。由于疏水相互作用的减小, 糖基化反应会削弱SPI酸诱导凝胶网络, 导致凝胶强度和凝胶持水性降低。然而, 超声预处理能够降低或消除糖基化反应对SPI酸诱导凝胶的弱化作用, 甚至能够改善蛋白质的凝胶性。

关键词: 超声预处理; 大豆分离蛋白; 糖基化; 凝胶性质

Effect of Ultrasonic Pretreatment on Acid-Induced Gel Properties of Soybean Protein Isolate Glycoconjugates

ZHAO Chengbin¹, XU Xiuying¹, LIU Jingsheng¹, ZHANG Hao¹, WU Yuzhu¹, CAO Yong¹, WU Fei^{2,*}

(1. College of Food Science and Engineering, National Engineering Laboratory for Wheat and Corn Deep Processing, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The glycosylation reaction of soybean protein isolate (SPI) with glucose and maltose in a phosphate buffered saline was allowed to take place after ultrasonic pretreatment. The aim was to investigate the effect of ultrasonic pretreatment on acid-induced gel properties of SPI/sugar conjugates. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis indicated the formation of covalent conjugates between sugars and SPI. The largest degree of grafting for SPI/sugar conjugates was found upon ultrasonic pretreatment of the reaction system for 20 min. The surface hydrophobicity (H_0) and average particle size (D_{43}) of SPI were reduced by glycosylation with glucose and maltose. SPI/sugar conjugates with ultrasonic pretreatment had higher H_0 and lower D_{43} . The glycosylation reaction could weaken the network structure of acid-induced SPI gel due to the reduction of hydrophobic interaction, leading to a decrease of gel strength and water-holding capacity. However, ultrasonic pretreatment could reduce or abrogate the weakening effect of glycation on acid-induced SPI gel, and even improve gel properties.

Keywords: ultrasonic pretreatment; soybean protein isolate; glycosylation; gel properties

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171210-119

中图分类号: TS201.7

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2019) 01-0123-07

引文格式:

赵城彬, 许秀颖, 刘景圣, 等. 超声预处理对大豆分离蛋白糖基化复合物酸诱导凝胶性质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 123-129. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171210-119. <http://www.spkx.net.cn>

ZHAO Chengbin, XU Xiuying, LIU Jingsheng, et al. Effect of ultrasonic pretreatment on acid-induced gel properties of soybean protein isolate glycoconjugates[J]. Food Science, 2019, 40(1): 123-129. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20171210-119. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2017-12-10

基金项目: 吉林省教育厅科学研究项目 (JJKH20180654KJ); 吉林农业大学科研启动基金资助项目 (201715)

第一作者简介: 赵城彬 (1987—) (ORCID: 0000-0001-6748-4247), 男, 讲师, 博士, 研究方向为粮食油脂及植物蛋白工程。

E-mail: zhaochengbin1987@163.com

*通信作者简介: 吴非 (1968—) (ORCID: 0000-0002-9186-1505), 女, 教授, 博士, 研究方向为农产品精深加工。

E-mail: wufeiname@163.com

凝胶性作为使蛋白质形成三维空间网状结构的性质,可将水、风味物质及脂质等成分包裹在凝胶网络中,利用该性质能够有效改善食品的感官及质构^[1]。近年来,蛋白质糖基化改性受到国内外学者的广泛关注,由于该反应不需要催化剂,并能在可控的条件下获得所需的反应产物,可以作为新功能性材料应用于食品工业、生物材料及医药科学等领域^[2]。很多研究报道了食品体系中蛋白质与多糖通过糖基化反应进行共价结合,使蛋白质的溶解性、乳化性、凝胶性等功能性性质得到改善^[3]。然而,采用传统加热发生的糖基化反应效率低、反应时间长,且副产物多、能耗高,不能广泛应用于工业生产。目前,超声技术作为一种绿色、环保、无毒害的处理手段被广泛应用于食品加工中。超声波对蛋白质的影响主要包括两类:一类是将超声波直接作用于蛋白分子,通过对蛋白分子结构的修饰改善蛋白质的功能特性;另一类是在蛋白质发生化学反应之前或者整个过程中进行超声处理,以提高化学反应速率或改善对蛋白质的修饰作用^[4]。Zisu等^[5]采用20 kHz、4 000 W超声处理,能够降低乳清蛋白和酪蛋白的黏性,增加其凝胶性,同时改善其热结合能力及热稳定性。Stanic-Vucinic等^[6]利用强度为135 W/cm²、频率为20 kHz的超声波在10~15 °C的低温和中性pH值下处理 β -乳球蛋白和糖的混合溶液60 min,发现 β -乳球蛋白能与多种糖类发生糖基化反应,其中核糖的糖基化程度最高。然而,关于超声预处理下大豆分离蛋白(soybean protein isolate, SPI)糖基化复合物凝胶性质的研究鲜有报道。本研究对湿热法制备的SPI/糖复合物进行超声预处理,对其表面疏水性、粒径、凝胶流变性、凝胶强度、持水性进行分析,探讨超声预处理对SPI/糖复合物酸诱导凝胶性质的影响,为进一步了解超声作用下SPI/糖复合物的凝胶机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

SPI经凯氏定氮法测定蛋白质纯度为91.8%,由哈高科食品有限责任公司提供。

葡萄糖(glucose, G)、麦芽糖(maltose, M)、邻苯二甲醛(*o*-phthalaldehyde, OPA)、 β -巯基乙醇、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、8-苯胺基-1-萘磺酸(8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid, ANS) 美国Sigma公司;葡萄糖酸内酯(glucono- δ -lactone, GDL) 北京沃海环球科技有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

JY92-2D超声探头发生器 宁波Scientz生物科技股份有限公司; LGJ-1冷冻干燥机 上海医用离心机厂; DU800型紫外-可见分光光度计 美国贝克曼库

尔特有限公司; TNZ1-5700傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) 仪 美国Thermo Fisher公司; PE Pyris 6差示扫描量热仪 美国TA仪器公司; F2000荧光光谱仪 日本日立公司; Mastersizer 2000激光粒度仪、Bohlin旋转流变仪 英国马尔文仪器有限公司; TA-XT2质构仪 英国Stable Micro Systems公司。

1.3 方法

1.3.1 SPI/糖复合物的制备

将SPI分散到磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L、pH 7.0)中,配制质量分数为8%的SPI溶液。以蛋白、糖质量比为1:1分别向SPI溶液中添加葡萄糖和麦芽糖并混合均匀,配制SPI/糖混合液。将混合液在室温下磁力搅拌2 h,然后4 °C贮藏过夜以确保SPI完全溶解并充分与糖混匀。控制超声功率为200 W,室温下分别对混合液进行5、10、20、30 min超声预处理。超声处理模式为开启3 s、关闭1 s。超声预处理后将混合液置于95 °C水浴中热处理15 min,迅速冷却至室温得到超声SPI/糖复合物溶液,然后冷冻干燥即得超声SPI/G复合物和超声SPI/M复合物,分别记作U-SPI/G和U-SPI/M。相同的混合液未经超声预处理直接进行95 °C水浴热处理,随后与超声SPI/糖复合物的处理方式相同,得到非超声SPI/G复合物和非超声SPI/M复合物,分别记作NU-SPI/G和NU-SPI/M。

以不添加糖的SPI样品为对照组;将SPI在相同的条件下经超声预处理后,95 °C水浴加热15 min,所得样品为超声SPI,记作U-SPI;SPI在相同的条件下,未经超声预处理直接进行95 °C水浴加热15 min的样品为非超声SPI,记作NU-SPI;未经任何处理的SPI为天然SPI。

1.3.2 接枝度测定

采用OPA试剂法测定接枝度。将80 mg OPA溶解在2 mL体积分数95%乙醇溶液中,并与50 mL 10 mmol/L四硼酸钠缓冲液(pH 9.7)、5 mL质量分数20% SDS溶液以及200 μ L β -巯基乙醇混合,充分混匀后用蒸馏水稀释至100 mL配成OPA试剂。将200 μ L复合体系样品溶液(2 mg/mL)与4 mL OPA试剂在室温下反应5 min,然后采用紫外-可见分光光度计测定340 nm波长处的吸光度,以天然SPI作为对照样,接枝度(degree of grafting, DG)的计算公式如式(1)所示。

$$DG/\% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_c 为对照样的吸光度; A_s 为样品的吸光度。

1.3.3 FTIR测定

参照Zhao Chengbin等^[7]的方法测定FTIR光谱,将蛋白样品与溴化钾研磨成均匀粉末,压片后置于FTIR仪中进行测定。测定温度为25 °C,波数扫描范围为

4 000~500 cm^{-1} , 分辨率为4 cm^{-1} , 波数精度为0.01 cm^{-1} , 扫描次数为64次。

1.3.4 热性质测定

采用PE Pyris 6差示扫描量热仪对样品的热性质进行分析。取10 μL 样品溶液放入铝盒中密封, 以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的升温速率由20 $^{\circ}\text{C}$ 加热到120 $^{\circ}\text{C}$, 采用空铝盒作为对照。记录此过程的吸热峰温度(T_p)和热焓值(ΔH)。

1.3.5 表面疏水性测定

蛋白质表面疏水性采用ANS作为疏水荧光探针进行测定。将蛋白样品溶于pH 7.0、0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液中, 配成质量浓度为0.05~1.00 mg/mL的蛋白溶液, 采用相同的缓冲液配制8 mmol/L ANS溶液。将20 μL ANS溶液添加到2 mL蛋白溶液中, 充分振荡混匀。在390 nm激发波长和470 nm发射波长处, 采用荧光光谱仪测定荧光强度。表面疏水性以荧光强度相对于蛋白质量浓度的初始斜率(H_0)表征。

1.3.6 粒径测定

参考齐宝坤等^[8]的测定方法, 采用Mastersizer 2000激光粒度仪测定粒径分布。将质量分数8%样品溶液于室温下磁力搅拌2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 贮藏过夜以确保样品完全溶解。测定转速为1 900 r/min, 折射指数和吸收参数分别为1.46和0.1。平均粒径采用体积-平均直径(D_{43})表示。

1.3.7 酸诱导凝乳的制备

向得到的SPI/糖复合物溶液中加入质量分数0.8% GDL, 保证蛋白质与GDL的质量比为10:1。充分混匀后于25 $^{\circ}\text{C}$ 下酸化5 h, 酸化结束后4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏过夜, 即得酸诱导凝乳。对照组为不添加糖的SPI凝乳。

1.3.8 凝胶流变性测定

根据Zhao Chengbin等^[9]的方法测定凝胶样品的流变性。将样品溶液加入GDL后置于流变仪平板之间, 平板距离1 mm, 平板间充满溶液后擦去多余的溶液, 滴2~3滴植物油于溶液裸露部位以防止水分蒸发, 然后加上保温套准备测定。设定应变为0.5%, 频率为1 Hz, 25 $^{\circ}\text{C}$ 下酸化5 h, 进行时间扫描, 记录整个酸化过程中样品的储能模量(G')随时间的变化。初始应变扫描实验显示流变性在线性黏弹区域内。

1.3.9 凝胶强度测定

采用TA-XT2质构仪对凝胶强度进行测定。将凝胶样品放于测量台上, 采用P/0.5探头进行测定, 选择TPA模式, 设置压缩前、压缩中、压缩后的速率分别为3.0、2.0、3.0 mm/s, 凝胶压缩比例为35%, 两次下压间隔5 s, 触发力为5 g。测定后得质构参数, 凝胶强度以最大破裂力(g)表示。

1.3.10 凝胶持水性测定

应用离心法测定凝胶持水性, 具体步骤参照Choi等^[10]的方法。将空离心管称质量后放入适当质量的凝胶样

品, 设置离心机转速为4 500 r/min, 离心时间为15 min, 离心结束后将离心管取出, 室温下静置10 min, 将上清液吸出后称质量, 凝胶持水性计算公式如式(2)所示。

$$\text{持水性}/\% = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: m_0 为空离心管的质量/g; m_1 为离心前装有凝乳的离心管质量/g; m_2 为吸出水分后离心管质量/g。

1.4 数据统计分析

每组实验重复3次, 采用SPSS V17.0软件进行ANOVA差异显著性分析, $P < 0.05$ 为差异显著, 采用Origin 8.5软件作图。

2 结果与分析

2.1 超声时间对SPI/糖复合物接枝度的影响

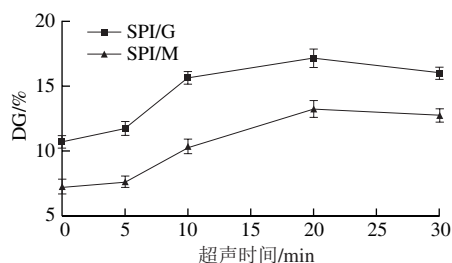


图1 SPI与葡萄糖和麦芽糖糖基化复合物DG随超声时间的变化
Fig. 1 Effect of ultrasonication time on degree of grafting for glycoconjugates of SPI with glucose and maltose

由图1可以看出, SPI/G复合物的DG比SPI/M复合物高, 这表明SPI与葡萄糖的反应活性比麦芽糖强。未经超声预处理的SPI/G复合物和SPI/M复合物的DG较低, 而超声预处理能够使复合物的DG增加。超声预处理20 min时DG达到最大, 而超过20 min后DG稍有降低。适当的超声作用会改变蛋白的空间构象及结构, 使蛋白分子展开, 埋藏在蛋白分子内部的氨基暴露出来^[11], 促进其与糖的碰撞, 利于糖基化反应的进行, 导致DG增加; 而过长的超声时间会使蛋白质展开的肽链重新聚集, 使游离氨基又被重新包埋在蛋白分子内部, 不利于糖基化反应的进行, 导致DG稍微降低。因此, 选择超声时间为20 min进行后续实验。

2.2 SPI/糖复合物FTIR结果分析

FTIR对于蛋白质-碳水化合物体系的研究是一种非常有效的技术, 该技术通过分子内原子间的振动产生辐射吸收, 从而提供化合物的化学组成和构象结构信息等^[12]。图2为非超声和超声预处理下SPI/糖复合物的FTIR图谱, 与天然SPI相比, 无论是否进行超声预处理, SPI/糖复合物均在3 200~3 700 cm^{-1} 波数范围内出现一个宽峰, 在1 000~1 260 cm^{-1} 波数范围内出现明显

吸收峰,这是糖分子以共价键与蛋白质形成复合物的典型特征^[13]。前者是由糖分子和水分子中的羟基发生伸缩振动引起的,后者是由糖分子中碳氧键的伸缩振动产生的^[14],这表明糖分子与SPI发生了糖基化反应,使糖基化共价复合物中羟基和碳氧键数量增加,导致相应的吸收峰增强。SPI/M复合物在 $3\ 200\sim 3\ 700\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 000\sim 1\ 260\text{ cm}^{-1}$ 波数范围的吸收峰比SPI/G复合物更宽、更强,这是由于麦芽糖比葡萄糖具有更多能够在此处产生吸收峰的基团。此外,SPI/糖复合物在 $1\ 658$ (酰胺I带)、 $1\ 542$ (酰胺II带)和 $1\ 405\text{ cm}^{-1}$ (酰胺III带)处的吸收峰均发生不同程度的变化,这也表明蛋白质结构发生改变,从侧面说明了糖基化反应的发生。

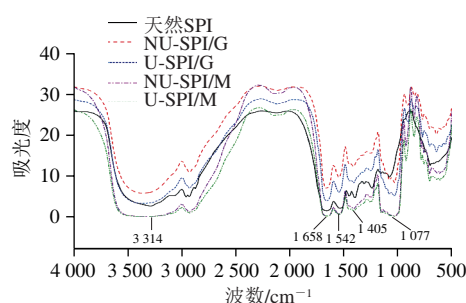


图2 非超声和超声预处理下SPI/糖复合物的FTIR图谱

Fig. 2 FTIR spectra of SPI/sugar conjugates with and without ultrasonic pretreatment

2.3 SPI/糖复合物热性质分析

表1 非超声和超声预处理下SPI和SPI/糖复合物的热力学参数
Table 1 Thermodynamic parameters of SPI and SPI/sugar conjugates with and without ultrasonic pretreatment

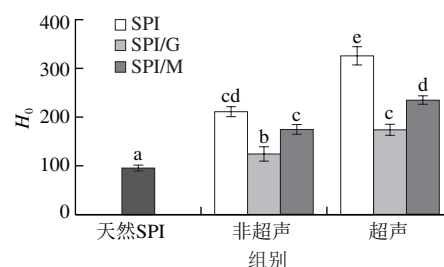
样品	7S球蛋白		11S球蛋白	
	$T_p/^\circ\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$	$T_p/^\circ\text{C}$	$\Delta H/(\text{J/g})$
天然SPI	73.36 ± 0.67	2.54 ± 0.18	91.58 ± 1.86^a	5.64 ± 0.12^c
NU-SPI	—	—	—	—
NU-SPI/G	—	—	94.78 ± 0.95^b	3.14 ± 0.35^b
NU-SPI/M	—	—	95.22 ± 1.50^{bc}	2.89 ± 0.08^{ab}
U-SPI	—	—	—	—
U-SPI/G	—	—	94.89 ± 0.46^{bc}	2.64 ± 0.11^a
U-SPI/M	—	—	95.43 ± 0.57^c	2.38 ± 0.04^a

注:—,蛋白质已变性,吸热峰消失, T_p 与 ΔH 无法读出;同列肩标小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

在一定升温 and 降温的过程中,蛋白质的热量变化可以通过差示扫描量热法进行测定,测定指标包括 T_p 和 ΔH 。如表1所示,天然SPI中7S球蛋白和11S球蛋白的 T_p 分别为 $73.36\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $91.58\text{ }^\circ\text{C}$ 。无论是否进行超声预处理,在 $95\text{ }^\circ\text{C}$ 下对SPI进行热处理15 min,7S球蛋白和11S球蛋白的吸热峰均消失,表明在此条件下7S球蛋白和11S球蛋白均发生完全变性。然而,SPI/糖复合物的7S球蛋白组分发生完全变性,而11S球蛋白组分只发生了部分

变性,形成了具有更高 T_p 的热聚集体。这说明葡萄糖和麦芽糖与SPI发生糖基化作用能够抑制蛋白质热变性,并形成具有更高热稳定性的聚集体。Medrano等^[15]在对 β -乳球蛋白与葡萄糖或乳糖糖基化复合物的研究中也得到了相似的结果。此外,SPI/G复合物与SPI/M复合物的11S球蛋白组分 T_p 和 ΔH 值没有显著差异($P>0.05$),且超声预处理对复合物11S球蛋白组分的热力学参数影响也不显著($P>0.05$)。

2.4 SPI/糖复合物表面疏水性分析



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

图3 非超声和超声预处理下SPI和SPI/糖复合物的表面疏水性(H_0)

Fig. 3 Surface hydrophobicity (H_0) of SPI and SPI/sugar conjugates with and without ultrasonic pretreatment

表面疏水性是反映极性水环境中蛋白质分子表面疏水基团数目的指标,也是影响蛋白质功能性的一个重要因素^[16]。如图3所示,与天然SPI相比,未经超声处理直接对SPI加热会使 H_0 显著增加($P<0.05$),这是由于加热能够引起蛋白质发生热变性,使疏水残基暴露于蛋白质分子表面^[17]。与热处理SPI相比,SPI/糖复合物的 H_0 均降低,这表明糖基化会阻碍热处理过程中蛋白质的变性,从而减少疏水残基的暴露,这与Kaye等^[18]的研究结果一致。SPI/G复合物的 H_0 比SPI/M复合物显著降低($P<0.05$),同时SPI/G复合物的DG比SPI/M复合物高(图1),这表明较高的DG会导致疏水性的降低。Achouri等^[19]的研究发现11S大豆球蛋白疏水性的降低与葡萄糖DG的增加有关。此外还有研究显示,随着更多的多糖与蛋白质接枝,蛋白质分子表面疏水环境减弱得更快^[20]。

超声体系的 H_0 比非超声体系显著增加($P<0.05$),这表明超声预处理能够明显增加热处理SPI和SPI/糖复合物的 H_0 ,这与Chen Lin等^[21]的研究结果相似,他认为超声处理能够导致SPI表面疏水性的增加。超声使 H_0 增加的原因可能是其引起的空化作用和微流束作用导致原本埋藏在蛋白质分子内部的疏水区域暴露在分子表面^[22]。此外,非超声SPI/M复合物的 H_0 与超声SPI/G复合物之间差异不显著($P>0.05$)。对于热处理SPI,糖基化能够通过阻碍SPI的热变性来减少疏水残基暴露,而糖基化前的超声处理能够弱化这种阻碍作用(如具有较高DG

的SPI/G复合物)或使更多的疏水基团暴露到SPI分子表面(如具有较低DG的SPI/M复合物)。这一发现表明,超声预处理能够降低糖基化对热处理SPI分子展开的抑制作用。

2.5 SPI/糖复合物粒径分析

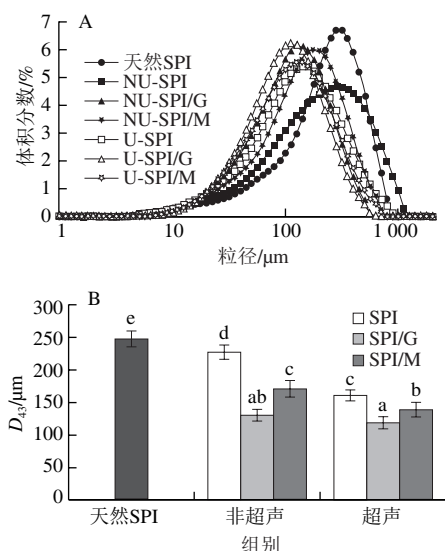


图4 非超声和超声预处理下SPI和SPI/糖复合物的粒径分布(A)和平均粒径(B)

Fig. 4 Particle size distribution (A) and average particle size (B) of SPI and SPI/sugar conjugates with and without ultrasonic pretreatment

由图4A可以看出, SPI/糖复合物与天然SPI一样呈单峰粒径分布,但是会出现更多较小的粒径。超声预处理使SPI粒径由较宽的分布变为较窄的分布,但不能使SPI/糖复合物的粒径分布发生明显改变,这与Arzeni等^[23]的研究结果一致。由图4B可以看出,热处理能够使SPI的 D_{43} 显著降低($P<0.05$),这可能是热处理使较大的蛋白质聚合物溶解导致的^[24]。无论在非超声还是超声预处理条件下, SPI/糖复合物的 D_{43} 都显著低于热处理SPI($P<0.05$)。根据Gu Xin等^[25]的研究结果,这可能是由于糖基化阻碍了热处理过程中蛋白质的变性,从而减少了蛋白质分子的聚集,导致SPI粒径减小。此外, SPI/M复合物比SPI/G复合物具有更大的 D_{43} ,这表明糖分子大小会影响SPI/糖复合物的粒径。超声处理导致所有体系 D_{43} 更明显降低,超声处理后粒径的减小可能是由超声引起的空化作用和微流束作用破坏了SPI分子之间的非共价键造成的^[26]。这与Jambrak等^[27]报道的超声处理能够改变蛋白质粒径大小的研究结果类似。

2.6 SPI/糖复合物凝胶流变性分析

如图5所示, 无论是否采用超声处理, SPI/糖复合物在酸化过程中 G' 的增长趋势与热处理SPI相似, 这与Kontogiorgos等^[28]的研究结果相同。所有体系的 G' 随着酸化时间的延长而逐渐增加, 最终达到一个平衡值, 这

与酸化过程中pH值下降到SPI等电点附近引起蛋白质聚集形成酸凝胶有关^[29]。此外, 超声预处理不会使SPI的 G' 增长速率发生改变, 但会显著提高SPI/糖复合物 G' 的增长速率。

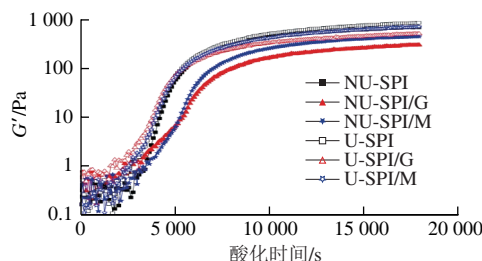


图5 非超声和超声预处理下SPI和SPI/糖复合物酸化过程中 G' 的变化

Fig. 5 Changes in G' of SPI and SPI/sugar conjugates with and without ultrasonic pretreatment during acidification

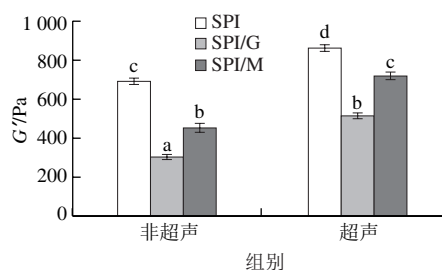


图6 非超声和超声预处理下酸化5 h后SPI和SPI/糖复合物酸化后的 G'

Fig. 6 G' of SPI and SPI/sugar conjugates with and without ultrasonic pretreatment after five hours acidification

由图6可知, 无论是否采用超声预处理, 酸化5 h后SPI/糖复合物的 G' 都显著低于SPI($P<0.05$), 这表明糖基化作用会弱化凝胶结构。在糖基化过程中, 糖通过提高蛋白质热变性温度而阻碍了蛋白质的变性, 这会减少GDL酸化过程中蛋白质的聚集, 影响化学键的形成, 导致凝胶的弱化^[25]。此外, SPI/G复合物的 G' 显著低于SPI/M复合物($P<0.05$), 这可能与DG有关(图1)。具有高DG的葡萄糖对蛋白质变性的阻碍作用比麦芽糖更显著, 从而导致其形成更弱的凝胶网络结构, 这也与本研究表面疏水性的分析结果一致(图3), 葡萄糖具有比麦芽糖更显著的阻碍蛋白质变性的作用。

然而, 与未经超声预处理的SPI和SPI/糖复合物相比, 超声预处理能够使 G' 显著增加($P<0.05$), 这表明超声处理能够强化凝胶网络结构。尽管糖基化作用会阻碍蛋白质变性, 但是超声处理还是会埋藏在SPI分子内部的疏水区域暴露(图3), 这对疏水相互作用形成凝胶非常有利。Zhao Chengbin等^[30]的研究也得到了相似的结果。此外, 超声处理减小了SPI和SPI/糖复合物的粒径(图4), 有利于SPI酸诱导凝胶的形成。这与Hu Hao等^[31]的研究结果一致, 他指出由超声引起SPI粒径的减小会强化凝胶结构。此外, 与SPI凝胶相比, 尽管糖基化作用弱

化了凝胶网络,但是超声处理会降低(如超声SPI/G复合物)或消除(如超声SPI/M复合物)这种对凝胶的弱化作用,甚至会改善凝胶性质。

2.7 SPI/糖复合物凝胶强度分析

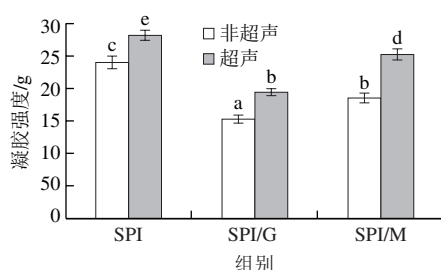


图7 非超声和超声预处理下SPI和SPI/糖复合物的凝胶强度

Fig. 7 Gel strength of SPI and SPI/sugar conjugates with and without ultrasonic pretreatment

如图7所示, 无论是否进行超声预处理, SPI/糖复合物的凝胶强度都显著低于SPI凝胶 ($P < 0.05$), 这表明糖基化作用会降低SPI的凝胶强度。这可能是由于糖基化作用抑制了蛋白质的热变性, 使埋藏在蛋白分子内部的活性基团不能够充分地暴露, 从而影响酸化过程中蛋白分子的聚集与交联^[32]。与SPI/M复合物相比, SPI/G复合物具有更低的凝胶强度, 这可能是SPI/G复合物具有更高的DG造成的(图1)。具有高DG的SPI/G复合物表面疏水性更低(图3), 这不利于蛋白质通过疏水相互作用形成更牢固的凝胶网络。

无论是SPI还是SPI/糖复合物, 超声预处理均能够使其凝胶强度显著提高 ($P < 0.05$)。超声作用会促使蛋白质分子内部的疏水区域暴露, 蛋白质通过疏水相互作用形成凝胶网络可能是凝胶强度增加的重要原因。Sun Yanjun等^[33]对复原乳浓缩蛋白凝胶性质的研究发现, 超声作用会显著增强乳蛋白的凝胶强度, 这与本研究结果一致。此外, SPI与麦芽糖发生糖基化反应虽然会降低蛋白质的凝胶强度(如非超声SPI/M复合物凝胶强度低于SPI凝胶), 但是超声作用会使SPI/M复合物的凝胶强度再次高于SPI凝胶, 从而起到了改善SPI凝胶性质的作用。

2.8 SPI/糖复合物凝胶持水性分析

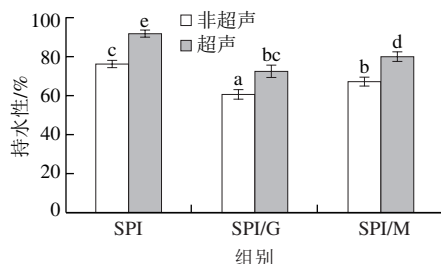


图8 非超声和超声预处理下SPI和SPI/糖复合物凝胶的持水性

Fig. 8 Water-holding capacity of SPI and SPI/sugar conjugate gels with and without ultrasonic pretreatment

凝胶在受到外力的作用下对水的保留能力为凝胶的持水性, 它反映了凝胶在破裂过程中水分的释放特性, 凝胶的持水性与其微观结构和质构有关^[28]。由图8可以看出, 无论是否进行超声预处理, SPI/糖复合物凝胶的持水性都显著低于SPI凝胶 ($P < 0.05$), 这可能是由于糖基化作用使凝胶网络结构更加松散, 空间结构空隙增大, 不利于水分的保持。SPI/M复合物凝胶的持水性比SPI/G复合物凝胶更高, 这可能与SPI/M复合物较低的DG有关(图1)。此外, 麦芽糖比葡萄糖具有更多的羟基, 使SPI/M复合物具有更高的亲水性, 这也可能有利于糖基化蛋白与水分子的相互作用, 从而改善凝胶持水性。

无论是SPI还是SPI/糖复合物, 超声预处理均能够显著提高凝胶的持水性 ($P < 0.05$)。超声作用会促进蛋白质网络的强化, 形成均一、结构紧密的凝胶, 这有利于凝胶网络对水的包裹, 导致持水性的增加。Zhao等^[34]证实了超声处理对凝胶网络的强化和加固作用是导致凝胶持水性增加的原因。Riener等^[35]对传统热处理酸奶和超声热处理酸奶品质进行比较, 发现超声热处理酸奶品质较好, 超声处理能够使酸奶凝胶的网络结构增强, 提高酸奶的持水性, 这与本研究结果相似。持水性作为蛋白质凝胶的一种重要性质, 在超声作用下能够得到显著提高 ($P < 0.05$), 这再次证明适当的超声处理能够改善蛋白质的凝胶性质。

3 结论

将SPI与葡萄糖和麦芽糖发生糖基化反应, SPI与葡萄糖的反应活性比麦芽糖强, 超声预处理20 min时, SPI/糖复合物的DG最大。FTIR分析表明, 无论是否进行超声预处理, 葡萄糖和麦芽糖均能与SPI形成共价复合物。糖基化作用会降低SPI的 H_0 和 D_{43} , 这是糖基化阻碍了热处理过程中蛋白质的变性导致的。然而, 超声产生的空化作用和微流束作用能够使SPI/糖复合物具有更高的 H_0 和更低的 D_{43} 。凝胶性质分析表明, 糖基化作用通过抑制SPI的热变性, 从而减小酸化过程中蛋白分子间的疏水相互作用, 不利于SPI聚集与交联, 导致SPI酸诱导凝胶网络结构弱化, 宏观上表现为凝胶强度的减弱和凝胶持水性的降低。然而, 超声预处理能够降低或消除糖基化反应对SPI酸诱导凝胶的弱化作用, 甚至能够改善蛋白质凝胶强度和持水性。

参考文献:

- [1] LAKEMON C M M, JONGH H H J D, PAQUES M, et al. Gelation of soy glycinin; influence of pH and ionic strength on network structure in relation to protein conformation[J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17(3): 365-377. DOI:10.1016/S0268-005X(02)00100-5.

- [2] 布冠好, 张楠, 陈复生. 大豆蛋白-木糖复合物的抗原性、致敏性及结构特性研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(11): 33-38; 91. DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.006.
- [3] DIFTIS N, KIOSSEOGLOU V. Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugation with carboxymethyl cellulose[J]. Food Chemistry, 2003, 81(1): 1-6. DOI:10.1016/S0308-8146(02)00236-4.
- [4] 胡昊, 胡坦, 许琦, 等. 高场强超声波技术在食品蛋白质加工中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(15): 260-265. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201515048.
- [5] ZISU B, BHASKARACHARYA R, KENTISH S, et al. Ultrasonic processing of dairy systems in large scale reactors[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, 17(6): 1075-1081. DOI:10.1016/j.ulsonch.2009.10.014.
- [6] STANIC-VUCINIC D, PRODIC I, APOSTOLOVIC D, et al. Structure and antioxidant activity of β -lactoglobulin-glycoconjugates obtained by high-intensity-ultrasound-induced Maillard reaction in aqueous model systems under neutral conditions[J]. Food Chemistry, 2012, 138(1): 590-599. DOI:10.1016/j.foodchem.2012.10.087.
- [7] ZHAO Chengbin, ZHANG Hao, XU Xiuying, et al. Effect of acetylation and succinylation on physicochemical properties and structural characteristics of oat protein isolate[J]. Process Biochemistry, 2017, 57: 117-123. DOI:10.1016/j.procbio.2017.03.022.
- [8] 齐宝坤, 李杨, 王中江, 等. 不同品种大豆分离蛋白Zeta电位和粒径分布与表面疏水性的关系[J]. 食品科学, 2017, 38(3): 114-118. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201703019.
- [9] ZHAO Chengbin, WU Fei, LI Yongping, et al. Effects of β -glucans on properties of soya bean protein isolate thermal gels[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2015, 50(2): 347-355. DOI:10.1111/ijfs.12635.
- [10] CHOI Y J, CHO M S, PARK J W. Effect of hydration time and salt addition on gelation properties of major protein additives[J]. Journal of Food Science, 2000, 65(8): 1338-1342. DOI:10.1111/j.1365-2621.2000.tb10608.x.
- [11] MOREL M H, DEHLON P, AUTRAN J C, et al. Effects of temperature, sonication time, and power settings on size distribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography[J]. Cereal Chemistry, 2000, 77(5): 685-691. DOI:10.1094/CCHEM.2000.77.5.685.
- [12] VAN DER VENC C, MURESAN S, GRUPPEN H, et al. FTIR spectra of whey and casein hydrolysates in relation to their functional properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(24): 6943-6950. DOI:10.1021/jf020387k.
- [13] XU W, LIU B, YANG H, et al. Effect of γ -irradiation on the physicochemical properties of mixed soy protein isolate/starch material[J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(28): 7238-7246.
- [14] LIU J H, RU Q M, DING Y T. Glycation a promising method for food protein modification: physicochemical properties and structure, a review[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 170-183. DOI:10.1016/j.foodres.2012.07.034.
- [15] MEDRANO A, ABIRACHED C, PANIZZOLO L, et al. The effect of glycation on foam and structural properties of β -lactoglobulin[J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 127-133. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.07.036.
- [16] JACKMAN R L, YADA R Y. Ultraviolet absorption and fluorescence properties of whey-potato and whey-pea protein composites[J]. Canadian Institute Food Science and Technology Journal, 1989, 22: 252-259. DOI:10.1016/S0315-5463(89)70392-8.
- [17] KOHYAMA K, SANO Y, DOI E. Rheological characteristics and gelation mechanism of tofu (soybean curd)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(7): 1808-1812. DOI:10.1021/jf00055a011.
- [18] KAYE Y K, EASA A M, ISMAIL N. Reducing weight loss of retorted soy protein tofu by using glucose- and microwave-pre-heating treatment[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2001, 36(4): 387-392. DOI:10.1046/j.1365-2621.2001.00471.x.
- [19] ACHOURI A, BOYE J I, YAYLAYAN V A, et al. Functional properties of glycated soy 11S glycinin[J]. Journal of Food Science, 2005, 70(4): C269-C274. DOI:10.1111/j.1365-2621.2005.tb07172.x.
- [20] MU L, ZHAO M, YANG B, et al. Effect of ultrasonic treatment on the graft reaction between soy protein isolate and gum acacia and on the physicochemical properties of conjugates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(7): 4494-4499. DOI:10.1021/jf904109d.
- [21] CHEN Lin, CHEN Jianshe, REN Jiaoyan, et al. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(6): 2600-2609. DOI:10.1021/jf103771x.
- [22] HU H, WU J H, LI-CHAN E C Y, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2): 647-655. DOI:10.1016/j.foodhyd.2012.08.001.
- [23] ARZENI C, MARTÍNEZ K, ZEMA P, et al. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality[J]. Journal of Food Engineering, 2011, 108(3): 463-472. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2011.08.018.
- [24] MALAKI N A, TOSH S M, WOODROW L, et al. Effect of soy protein subunit composition and processing conditions on stability and particle size distribution of soymilk[J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(7): 1245-1252. DOI:10.1016/j.lwt.2009.03.001.
- [25] GU Xin, CAMPBELL L J, EUSTON S R. Influence of sugars on the characteristics of glucono- δ -lactone-induced soy protein isolate gels[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(2): 314-326. DOI:10.1016/j.foodhyd.2008.01.005.
- [26] HU H, LI-CHAN E C Y, WAN L, et al. The effect of high intensity ultrasonic pre-treatment on the properties of soybean protein isolate gel induced by calcium sulfate[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(2): 303-311. DOI:10.1016/j.foodhyd.2013.01.016.
- [27] JAMBRAK A R, LELAS V, MASON T J, et al. Physical properties of ultrasound treated soy proteins[J]. Journal of Food Engineering, 2009, 93(4): 386-393. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2009.02.001.
- [28] KONTOGIORGOS V, RITZOULIS C, BILIADERIS C G, et al. Effect of barley β -glucan concentration on the microstructural and mechanical behaviour of acid-set sodium caseinate gels[J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20(5): 749-756. DOI:10.1016/j.foodhyd.2005.07.008.
- [29] LAZARIDOU A, VAIKOUSI H, BILIADERIS C G. Impact of mixed-linkage (1-3,1-4) β -glucans on physical properties of acid-set skim milk gels[J]. International Dairy Journal, 2008, 18(3): 312-322. DOI:10.1016/j.idairyj.2007.08.005.
- [30] ZHAO Chengbin, ZHOU Linyi, LIU Jinyang, et al. Effect of ultrasonic pretreatment on physicochemical characteristics and rheological properties of soy protein/sugar Maillard reaction products[J]. Journal of Food Science and Technology, 2016, 53(5): 2342-2351. DOI:10.1007/s13197-016-2206-z.
- [31] HU Hao, FAN Xin, ZHOU Zhi, et al. Acid-induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2013, 20(1): 187-195. DOI:10.1016/j.ulsonch.2012.07.011.
- [32] TANG C H, WU H, CHEN Z, et al. Formation and properties of glycinin-rich and β -conglycinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase[J]. Food Research International, 2006, 39(1): 87-97. DOI:10.1016/j.foodres.2005.06.004.
- [33] SUN Yanjun, CHEN Jianhang, ZHANG Shuwen, et al. Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 124: 11-18. DOI:10.1016/j.jfoodeng.2013.09.013.
- [34] ZHAO L, ZHANG S W, ULUKO H, et al. Effect of ultrasound pretreatment on rennet-induced coagulation properties of goat's milk[J]. Food Chemistry, 2014, 165(15): 167-174. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.05.081.
- [35] RIENER J, NOCI F, CRONIN D A, et al. A comparison of selected quality characteristics of yoghurts prepared from thermosonicated and conventionally heated milks[J]. Food Chemistry, 2010, 119(3): 1108-1113. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.08.025.