# 限制性酶解结合糖基化改性对大豆分离 蛋白乳化性质的影响

Effects of limited enzymolysis and glycosylation on emulsifying properties of soybean protein isolates

李琳 孙一熙 秦 文 张 清

LI Lin SUN Yixi QIN Wen ZHANG Qing (四川农业大学食品学院,四川 雅安 625099)

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625099, China)

摘要:目的:开发基于大豆分离蛋白(soybean protein isolate, SPI)的新型乳化剂。方法:采用限制性酶解结合 糖基化处理对 SPI 进行结构修饰,研究协同改性对 SPI 乳 化特性的影响。结果:SPI水解物(soybean protein isolate hydrolysate,SPIH)中的相对分子质量较大组分(F30)的 乳化性最佳,且糖基化反应4h的F30-葡聚糖轭合物乳 化稳定性相对最好。相较于 SPI, SPIH 与 F30, F30-葡聚 糖轭合物稳定的乳液表现出最低的初始平均粒径,并且 具有最佳的贮藏稳定性。当 pH 接近 SPI 等电点或体系 处于高盐浓度时,所有乳液均出现不稳定聚集现象。与 SPI相比, SPIH 和 F30 稳定乳液的聚集程度更高, 而 F30-葡聚糖轭合物由于共价结合的葡聚糖提供了额外的 空间位阻和亲水性,使得轭合物稳定的乳液能够耐受离 子强度和温度的变化,在不利环境条件下表现出更高的 抵抗力。结论:限制性酶解结合糖基化改性是开发 SPI 基乳化配料的潜在可靠途径。

关键词:大豆分离蛋白;酶解;糖基化;乳化特性;稳定性 Abstract: Objective: This study aimed to develop novel soybean protein isolate (SPI)-based emulsifiers. Methods: The structure of SPI was modified by limited enzymolysis combined with glycosylation and the effects of this synergistic modification on the emulsification characteristics of SPI was studied. Results: Among the different components obtained from the SPI hydrolysate (SPIH), the high molecular mass component (F30) exhibited the best emulsifying property. The emulsifying stability of F30-dextran conjugates obtained for 4 h was the best. Compared with SPI, SPIH and F30, the F30-dextran conjugates stabilized emulsions showed the lowest initial average particle size and the best storage stability. When the pH was close to the isoelectric point of SPI or the system was at a high salt concentration, all emulsions were unstable to cause aggregation. Compared with SPI, both SPIH and F30 stabilized emulsions had a higher aggregation degree. However, F30-dextran conjugates provided additional steric hindrance and hydrophilicity due to covalently bound dextran, which exhibited a higher resistance under adverse environmental conditions. **Conclusion**: Limited enzymolysis combined with glycosylation is a potential and reliable way to develop SPI-based emulsifying ingredients.

**Keywords**: soybean protein isolate; enzymolysis; glycosylation; emulsifying properties; stability

大豆蛋白作为大豆中最主要的营养成分,是一种产 量高、价格低廉的优质植物蛋白资源<sup>[1-2]</sup>,主要优点包 括:① 氨基酸组成方面具有优势,包含所有必需氨基酸; ② 含有生物活性物质,能降低胆固醇,减少高脂血症和心 血管疾病发生的风险;③ 具有极好的加工性能,如凝胶 性、乳化性和持水持油性<sup>[3-4]</sup>。在各种功能性质中,对大 豆蛋白的乳化特性研究最为广泛。然而,天然大豆蛋白 的乳化性会受到各种环境因素的影响,限制了其在食品 工业中的应用。因此,通常需要对天然大豆蛋白进行改 性处理。

目前,常用的蛋白质改性方法主要有物理改性、化学 改性和酶法改性3种<sup>[5]</sup>。协同改性是将两种或两种以上 的改性方法协同作用,可有效克服单一改性方法的局限 性以及不足。Jiang 等<sup>[6]</sup>分别用胃蛋白酶和胰蛋白酶对

**基金项目:**国家自然科学基金青年科学基金项目(编号: 32101981)

作者简介:李琳,女,四川农业大学在读硕士研究生。

通信作者:张清(1986—),男,四川农业大学教授,博士。 E-mail:zhangqing@sicau.edu.cn

收稿日期:2023-07-05 改回日期:2024-02-04

乳清蛋白-半乳糖轭合物进行水解处理,结果发现,水解 后轭合物的抗氧化活性较水解前显著提高。Song 等<sup>[7]</sup>用 碱性蛋白酶水解大豆分离蛋白--壳聚糖轭合物,得到水 解度为1%,2%,4%的水解产物,结果发现,与天然蛋白 和经轭合的蛋白相比,其结构更灵活,乳化性和抗氧化活 性更高。Zhang 等<sup>[8]</sup>研究了有限水解对大豆分离蛋白一 麦芽糊精轭合物物理化学性质的影响,结果发现,有限的 水解可以改善轭合物的结构,提高其乳化活性。除了将 蛋白质-多糖轭合物进行酶解外,对蛋白质的酶解物进 行糖基化处理也能使天然蛋白功能性质得到提升。Li 等<sup>[9]</sup>研究发现,与大米蛋白一葡聚糖轭合物相比,大米蛋 白水解物(水解度为5%)-葡聚糖轭合物的溶解度、乳化 性和乳化稳定性分别提高了 3.5,5.3,7.3 倍,与大米蛋白 水解物相比,分别提高了 1.5,2.2,8.0 倍。Yu 等<sup>[10]</sup>研究 发现,胰蛋白酶水解结合葡聚糖糖基化处理的大豆分离 蛋白乳液在经过3次冻融循环后,表现出比未处理的蛋 白乳液更高的稳定性,且较低水解度(2%)的糖基化水解 物比较高水解度(5%)的糖基化水解物表现出更优的乳 化性能。

糖基化处理与酶解处理协同改性对天然蛋白质的结构与功能特性改善效果优异,在开发新型蛋白基食品配料方面有广泛的发展前景。目前,对食品蛋白先进行糖基化处理再酶解的研究相对较多<sup>[6-8]</sup>,而先酶解后糖基化处理的报道较少<sup>[9-10]</sup>。研究以大豆分离蛋白(soybean protein isolate,SPI)为原料,采用中性蛋白酶对 SPI 先进行限制性酶水解,再利用超滤处理将酶解 SPI 分成不同相对分子质量的组分,对每个组分进行糖基化改性,考察改性后产物的乳化特性,旨在为开发基于 SPI 的新型乳化剂提供依据。

# 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白:蛋白质含量≥85%,水分含量≥7%, 灰分≤15%,pH 6.5~7.5,北京索莱宝科技有限公司;

中性蛋白酶:来源于枯草芽孢杆菌,EC 编号 3.4.24.4, 100 U/mg,上海源叶生物科技有限公司;

葡聚糖:相对分子质量为4000,上海源叶生物科技 有限公司;

其余试剂:分析纯,成都市科隆化工试剂厂。

1.2 仪器与设备

台式高速冷冻离心机:RJ-TGL-2000R型,无锡市瑞 江分析仪器有限公司;

恒温恒湿培养箱:LHS-080型,郑州生元仪器有限公司;

荧光酶标仪:Varioskan Flash型,赛默飞世尔科技有

限公司;

高速剪切均质机:AD500S-H型,上海昂尼仪器仪表 有限公司;

动态光纳米粒度电位仪:Nano ZS型,英国马尔文仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 SPI 酶水解处理 根据 Huang 等<sup>[11]</sup>的方法修改 如下:利用超纯水配制 5 g/100 mL 的 SPI 溶液,室温下磁 力搅拌 2 h,置于 4 ℃冰箱水合过夜。在 55 ℃条件下,加 入中性蛋白酶(0.5 g/100 g),恒温振荡(120 r/min)水解 20 min。水解前先将 SPI 溶液在 55 ℃恒温振荡水浴锅中 平衡 30 min,水解过程中用 1 mol/L NaOH 溶液控制体 系 pH 在 7 左右。水解完成后,将蛋白水解液置于 90 ℃ 下加热 20 min 灭酶。冷却至室温后于 4 ℃、10 000 r/min 条件下离心 10 min,收集上清液,一部分冷冻干燥后得到 SPI 水解物(soybean protein isolate hydrolysate, SPIH), 置于 -20 ℃保存备用。

1.3.2 SPIH 超滤分离处理 根据 Zhang 等<sup>[12]</sup>的方法修 改如下:将收集的另一部分上清液经过 0.45  $\mu$ m 水相滤 膜微滤后,使用不同截留相对分子质量(3 000 和 1 000) 的超滤离心管按照相对分子质量从高到低逐级超滤分级 (4 000 r/min,20 min),将 SPIH 分成相对分子质量不同 的 3 种组分: > 3 000(F30)、3 000 ~ 1 000(F30-10)和 <1 000(F10)。收集滤液,冷冻干燥后置于-20 ℃保存 备用。F30、F30-10 和 F10 的得率分别为 15.31%, 3.94%,0.84%。

1.3.3 SPIH 超滤组分糖基化处理 根据 Xue 等<sup>[13]</sup>的方 法修改如下:利用超纯水配制 2 g/100 mL 的不同相对分 子质量的水解物组分(F30、F30-10 和 F10)的分散液,加 人同等质量的葡聚糖,混匀后室温搅拌 2 h,置于 4 ℃冰 箱中过夜。将混合液冷冻干燥后得到的粉末,置于培养 皿中,在 60 ℃、相对湿度 79%的恒温恒湿培养箱中反应 2,4,6,12,18,24 h 后取出,迅速冷却以终止反应。冷冻 干燥 48 h,得 到 F30/F30-10/F10-葡聚糖 轭 合 物, -20 ℃保存备用。主要考察水解物中不同组分的糖基化 后乳化性质的改善情况,因此未对水解物整体进行糖基 化改性处理。

1.3.4 乳液制备 将样品分散于超纯水中,配制 1,2, 3 g/100 mL蛋白质溶液,用 0.5 mol/L NaOH 或 HCl 溶 液调 pH 至 7,室温下搅拌 2 h,置于 4 ℃冰箱水合过夜。 将充分水合的样品溶液在室温下平衡 30 min 后,加入大 豆油,使最终油相体积分数为 10%。在油水混合液中添 加 0.02 g/100 mL 叠氮钠后在 12 000 r/min 条件下高速 均质 2 min,制得粗乳液。再将粗乳液在 60 MPa 下高压 均质 3 次后制得细乳液。 1.3.5 乳化性质测定 乳化活性指数(emulsifying activity index, EAI)和乳化稳定性指数(emulsifying stability index, ESI)的测定根据Xu等<sup>[14]</sup>的方法修改如下:利用10 mmol/L磷酸盐缓冲液(pH7.2)配制1g/100 mL的样品溶液,漩涡振荡后于4℃冰箱中水合过夜。测试前将样品溶液在室温下平衡30 min,按最终油相体积分数为10%加入大豆油。将混合液在12 000 r/min下高速均质2 min。在均质后的第0 min和第10 min从容器底部取50  $\mu$ L乳液,与5 mL 0.1 g/100 mL SDS溶液混合,在500 nm 处测定吸光值。以SDS溶液为空白对照。根据式(1)和式(2)计算EAI和ESI。另外,用胶头滴管吸取上述新鲜制备的乳液滴于洁净的载玻片表面,将盖玻片缓缓覆盖液滴,避免出现气泡。采用光学显微镜观察乳液的微观结构并拍照。

$$E_{\rm AI} = \frac{4.606 \times A_0 \times D_{\rm F}}{c \times \varphi \times \theta \times 10^4},\tag{1}$$

$$E_{\rm SI} = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times 10, \qquad (2)$$

式中:

 $E_{AI}$ ——乳化活性指数,m<sup>2</sup>/g;

 $E_{si}$ ——乳化稳定性指数,min;

*A*<sub>0</sub>、*A*<sub>10</sub>——乳液在第 0 min 和第 10 min 时的吸光 度值;

D<sub>F</sub>----稀释倍数,100;

c----蛋白质量浓度,g/mL;

 $\varphi$ ——油相体积分数,%;

θ---光路,1 cm。

1.3.6 乳液粒径和电位测定 乳液用超纯水稀释600倍, 设置分散剂的折射率为 1.590,吸收系数为 0.010。将稀 释液放入粒度仪样品池中,在 25 ℃下平衡 2 min 后,测定 光强平均粒径及 ζ-电位。

1.3.7 乳液稳定性测定

(1) 贮藏稳定性:取4 mL新鲜乳液(pH 7)移入带盖 玻璃瓶(18 mm×40 mm)中,在4℃冰箱中静置贮藏7 d。 在第0,1,3,5,7 天时,对每个样品的粒径和电位进行 分析。

(2) pH 稳定性:用 0.5 mol/L NaOH 或 HCl 溶液将 新鲜乳液的 pH 值调至 3,5,7,9。取 4 mL 不同 pH 值的 乳液移入带盖玻璃瓶(18 mm×40 mm)中,在4 ℃冰箱中 静置贮藏 24 h后,对乳液的粒径和电位进行分析。

(3)离子强度稳定性:向新鲜乳液(pH 7)中加入不同质量的 NaCl,调整乳液的离子浓度为 0,50,100,200 mmol/L。取 4 mL不同离子浓度的乳液移入带盖玻璃瓶(18 mm×40 mm)中,在4 ℃冰箱中静置贮藏 24 h后,对乳液的粒径和电位进行分析。

(4)温度稳定性:取4 mL新鲜乳液(pH7)移入带盖 玻璃瓶(18 mm×40 mm)中,置于不同温度(30,50,70, 90 ℃)水浴锅中加热 30 min。加热后,立即取出冰水浴 冷却至室温。随后在4℃冰箱中静置贮藏 24 h后,对乳 液的粒径和电位进行分析。

1.3.8 乳液的复溶性 将新鲜乳液冷冻干燥,取冻干粉 末溶解于超纯水(pH 7.0)中,质量浓度为 0.4 g/100 mL。 将复溶后的乳液移入带盖玻璃瓶(18 mm×40 mm)中,在 4 ℃冰箱中静置贮藏 24 h后,对乳液的外观进行拍照。

## 1.4 数据处理

所有试验均进行 3 次平行重复测定。试验结果以平 均值土标准偏差表示,采用 Microsoft Office Excel 2019 对试验数据进行统计分析,用 SPSS 25.0 软件进行显著性 差异分析,采用 Origin 9.1 软件绘图。

# 2 结果与分析

#### 2.1 乳化性质分析

由表 1 可知,与 SPI 相比,SPIH 的 EAI 显著增加,但 ESI 却略微降低。这可能是 SPI 在酶解后形成了比 SPI 相对分子质量小的产物,具有更疏松的结构<sup>[15]</sup>,有利于其 在油一水界面的快速吸附。同时,酶解也降低了蛋白质 的分子质量和溶液黏度,使得 SPIH 重力分离的速度增 加,因此 SPIH 稳定乳液的稳定性降低<sup>[16]</sup>。超滤后,与 SPIH 相比,F30 的 EAI 有所降低,但仍高于 SPI。而 F30-10 和 F10 的 EAI 则显著降低,是因为 F30-10 和 F10 相对分子质量更低,不能在油一水界面形成连续的蛋白 膜,从而表现出较差的乳化性能<sup>[17]</sup>。

如表 2 所示,F30 经糖基化改性后,随着反应时间的 增加,其 EAI 和 ESI 呈先上升后下降的趋势,分别在反应 6,12 h 时达到最高值。EAI 和 ESI 提高的原因分析如 下:① 与多糖亲水基团的共价结合增加了 F30 的亲水性, 使其表面性质更活跃,在油一水界面上更容易吸附重排; ② 多糖分子链的接入增加了 F30 的空间位阻,可以防止 新形成的液滴聚集,提高乳液稳定性<sup>[18]</sup>。反应时间延长

表 1 SPI、SPIH、F30、F30-10 和 F10 的乳化性质<sup>+</sup>

Table 1 The emulsifying properties of SPI, SPIH, F30, F30-10, and F10

样品	$EAI/(m^2 \cdot g^{-1})$	ESI/min
SPI	$19.53 \pm 1.60^{\circ}$	$22.14 \pm 3.52^{\mathrm{b}}$
SPIH	$27.86 \pm 1.42^{a}$	$18.53 \pm 1.31^{ m b}$
F30	$23.02 \pm 0.31^{b}$	$16.40 \pm 0.08^{b}$
F30-10	$7.79 \pm 1.07^{d}$	$23.48 \pm 1.14^{b}$
F10	$6.35 \pm 0.15^{d}$	$55.22 \pm 5.81^{a}$

† 小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

	<b>表</b> 2	F30、F30-10 和 F	10 反应不同时间的	勺轭合物的乳化	性质 <sup>†</sup>		
Table 2	The emulsifying p	properties of F30,	$F30\mathchar`-10$ , and $F10$	and conjugates	incubated for	different	time

反应时间/h	F30-葡聚糖轭合物		F30-10-葡聚糖轭合物		F10-葡聚糖轭合物	
	$EAI/(m^2 \cdot g^{-1})$	ESI/min	$EAI/(m^2 \cdot g^{-1})$	ESI/min	$EAI/(m^2 \cdot g^{-1})$	ESI/min
0	$18.75 \pm 0.62^{d}$	$15.33 \pm 0.60^{\circ}$	$6.73 \pm 1.04^{ab}$	$26.13 \pm 3.06$	$3.80 \pm 0.42^{b}$	49.06±12.06
2	$23.11 \pm 0.29^{b}$	$18.18 \pm 0.17^{\circ}$	$5.99 \pm 0.02^{b}$	$29.87 \pm 8.70$	$4.01 \pm 0.06^{ab}$	$37.58 \pm 17.18$
4	$23.18 \pm 0.06^{b}$	$30.26 \pm 1.40^{b}$	$6.12 \pm 0.19^{b}$	$28.62 \pm 4.71$	$4.99 \pm 0.82^{a}$	$39.96 \pm 0.52$
6	$24.45 \pm 0.16^{a}$	$30.35 \pm 1.04^{b}$	$7.28 \pm 0.88^{ab}$	$29.04 \pm 3.61$	$4.50 \pm 0.50^{\rm ab}$	$54.29 \pm 18.18$
12	$20.60 \pm 0.42^{\circ}$	$47.72 \pm 4.67^{a}$	$7.75 \pm 0.58^{a}$	$30.34 \pm 4.28$	$5.02 \pm 0.19^{a}$	$36.47 \pm 0.05$
18	$20.52 \pm 0.19^{\circ}$	$18.27 \pm 0.72^{\circ}$	$8.03 \pm 0.35^{a}$	$26.67 \pm 3.29$	$5.06 \pm 0.35^{a}$	$38.11 \pm 9.18$
24	$22.52 \pm 0.38^{b}$	$18.97 \pm 0.03^{\circ}$	$8.20 \pm 0.52^{a}$	$33.29 \pm 4.19$	$4.75 \pm 0.37^{\rm ab}$	45.74±6.02

† 小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

至18~24 h时,F30-葡聚糖轭合物的ESI开始下降,可能 与过高的糖基化反应程度有关。此外,糖基化改性未能 改善 F30-10 和 F10 的乳化能力。

图 1 是 SPI、SPIH、F30 和 F30-葡聚糖轭合物稳定乳 液的微观结构,可以看出乳液的液滴均呈现规则的球形。 SPI、SPIH及F303种样品稳定的乳液分布着大小不均

匀的液滴,并且由 SPIH 稳定的乳液液滴尺寸更小。在 F30-葡聚糖轭合物稳定的乳液中,反应4h的产物稳定乳 液的液滴最小,且大小分布趋于均匀。此时,液滴间隙 小,依靠紧密,使得水相不容易下流而导致油水分层,同 时也会提升乳液稳定性<sup>[19]</sup>。图 2 和图 3 显示了 F30-10 和F30-10-葡聚糖轭合物,以及F10和F10-葡聚糖轭合物



图 1 SPI、SPIH、F30 及反应不同时间的 F30-葡聚糖轭合物稳定乳液的光学显微照片

Figure 1 Optical microscopic photos of emulsion stabilized by SPI, SPIH, F30 and F30-dextran conjugate incubated for different time



F30-10 及反应不同时间的 F30-10-葡聚糖轭合物稳定乳液的光学显微照片 图 2

Figure 2 Optical microscopic photos of emulsion stabilized by F30-10 and F30-10-dextran conjugate incubated for different time





稳定乳液的微观结构,可以看出所有样品稳定乳液的液 滴直径明显增大,且视野内液滴数量较少。综合 EAI、 ESI 及微观结构结果,重点讨论 F30 及其糖基化产物的乳 化性质,并选择反应 4 h 的 F30-葡聚糖轭合物进行后续 乳液稳定性研究。

#### 2.2 乳液粒径和电位分析

SPI、SPIH、F30 及反应 4 h 的 F30-葡聚糖轭合物稳 定的乳液平均粒径和ζ-电位如图 4 所示。观察图 4(a)可 知,与 SPI相比,SPIH 稳定的乳液粒径显著降低。这可 能是酶水解破坏了蛋白质的肽键,蛋白质结构部分展开, 使得内部疏水基团及其他活性氨基酸暴露<sup>[20]</sup>,促进了其 在油一水界面的吸附速度和重新定向。与 SPIH 相比, F30 稳定的乳液粒径则有所增加。这可能与 F30 的表面 疏水性进一步增加有关。此外,由 F30-葡聚糖轭合物稳 定的乳液平均粒径最小。这可能是多糖的大分子尺寸和 亲水性在乳液液滴表面产生了较强的空间位阻效应,增 加了液滴周围界面膜的乳化性能和物理稳定性,促进小 粒径液滴的形成[21]。

通常来说,当体系的ζ-电位绝对值>30 mV时,被认 为足以抑制静电聚集<sup>[22]</sup>。如图4(b)所示,与SPI相比, SPIH稳定乳液的ζ-电位绝对值有所增加,这与酶水解增 加了蛋白质表面可电离基团的数量有关。此外,SPIH经 超滤后,所得F30组分的表面电荷数量进一步增加,所以 乳液表现出更高的ζ-电位绝对值。然而,F30-葡聚糖轭 合物稳定的乳液却表现出比F30稳定乳液更低的ζ-电位 绝对值。这可能是与F30共价结合的葡聚糖覆盖在F30 的表面,并且提供使蛋白质电荷远离水相的静电屏蔽效 应,减少了带电蛋白质与周围液体之间的静电相互作用, 最终降低了轭合物表面的电荷数量<sup>[23-24]</sup>。因此,由轭合 物稳定的乳液表现出相对较低的ζ-电位绝对值。

## 2.3 乳液贮藏稳定性分析

由于油相与水相之间存在正的自由能,会通过絮凝、 沉淀、聚集、Ostwald 熟化和重力相分离等各种机制,导致 乳液液滴逐渐破裂,稳定性下降<sup>[25]</sup>。如图5所示,所有乳



图 4 SPI、SPIH、F30及F30-葡聚糖轭合物稳定乳液的平均粒径和ζ-电位







液液滴的平均粒径总体上均随着贮藏时间延长而逐渐增 大。其中,F30样品稳定乳液的粒径增大速度最快,而 F30-葡聚糖轭合物稳定乳液的粒径增大速度则相对较 慢。这是由于F30-葡聚糖轭合物吸附层能够提供给乳液 液滴更有效的空间位阻稳定作用,从而减缓液滴之间的 聚集。此外,在贮藏过程中,乳液的ζ-电位呈波动性变 化,说明与静电排斥相比,空间斥力对乳液的贮藏稳定性 有更大的影响。这些结果表明,酶解和进一步的糖基化 反应可以有效改善乳液在长期贮藏过程中的稳定性。虽 然乳液的粒径有所增加,但是所有样品的外观在贮藏期 间均保持稳定,未观察到明显的相分离或乳析现象。

## 2.4 乳液 pH 稳定性

由图 6 可知,随着 pH 增加,所有乳液的平均粒径呈 现出相似的趋势:在 pH 值为 3~5 时,乳液体系不稳定, 液滴大量聚集,平均粒径超过 1 000 nm。相比之下,在 pH 值为 7~9 时,乳液相对稳定,液滴分布均匀。此外, 所有乳液的 ζ-电位绝对值均随着 pH 的增大而逐渐增 加。由于乳化剂的主要成分为 SPI 或其水解物,所以乳 液体系对 pH 值比较敏感。当 pH 值接近 SPI 等电点 (pH 4.5)时,乳液液滴之间的静电斥力不够强,无法抵抗 疏水性和范德华力的吸引,导致乳化能力下降<sup>[25]</sup>。因此, 虽然葡聚糖可以增强 F30 的乳化能力,但其物理化学性 质仍然受到乳液体系 pH 值的影响。

如图 7 所示,从样品外观图中也可以看到, 3 g/100 mL SPI稳定的乳液在 pH 5 时,形成了絮凝体, 出现了明显的相分离情况。此外,1 g/100 mL SPI稳定 的乳液在 pH 5 时出现了轻微的分层。而对于 SPIH 和 F30稳定的乳液,在 pH 值为 3 和 5 时出现明显分层现 象,上层为白色乳析层,下层为透明乳清层。而且随着浓 度的降低,分层现象更加明显。值得注意的是,F30-葡聚 糖轭合物所形成的乳液,由于液滴表面高度水合的葡聚 糖极大地抑制了轭合物在不同液滴之间的相互作用,从 而降低了在 pH 值为 3 和 5 时的分层现象。可见,界面膜 的空间斥力和高度水合作用是提高乳状液稳定的必要条 件。相反,在 pH 值为 7~9 时,所有乳液保持稳定,没有 出现分层现象,这也与粒径的结果一致。

#### 2.5 乳液离子强度稳定性

在 pH 7 时,测量了 SPI、SPIH、F30 和 F30-葡聚糖轭合

物稳定的乳液在不同离子强度(0,50,100,200 mmol/L)下 粒径和 ζ-电位的变化,如图 8 所示。当 NaCl 浓度在 0~ 200 mmol/L 范围内增加时,所有乳液的粒径均逐渐增 大。并且 1 g/100 mL 的 SPI、SPIH、F30和F30-葡聚糖







图 7 pH 对不同浓度的 SPI、SPIH、F30 及 F30-葡聚糖轭合物稳定乳液的外观的影响

Figure 7 Influence of pH on the appearance of SPI, SPIH, F30 and F30-dextran conjugate stabilized emulsions

轭合物增加程度最明显。此外,随着 NaCl 浓度增加,乳 液的ζ-电位绝对值均逐渐降低。这种现象可能与盐离子 的静电屏蔽作用有关。水相中的反离子(Na<sup>+</sup>)由于静电 吸引,松散地聚集在蛋白质表面的负电荷基团 (-COO<sup>-</sup>)周围,从而屏蔽了它们的净电荷<sup>[26]</sup>。这促进 了乳液液滴之间的聚集和絮凝,增大了液滴尺寸。具体 来说,由 SPI 稳定的乳液表现出最小的粒径变化幅度,且 乳液在外观上没有明显变化(如图 9 所示)。但是,由 SPIH 稳定的乳液则表现出相对较弱的对抗离子强度稳 定性,特别是1g/100 mL的 SPI、SPIH、F30 和 F30-葡聚 糖轭合物的乳液放置 24 h 后出现了分层现象(如图 9 中 虚线位置所示)。而这种现象在 F30 稳定的乳液中更加 明显,乳液分层程度也更大。这可能是因为 F30 具有较 短的肽链和较低的相对分子质量,在油一水界面的吸附 层更薄。但是与 F30 相比, F30-葡聚糖轭合物稳定乳液 的粒径变化幅度明显减小。此外,从外观上未发现分层 现象,表明其稳定性优于 F30。

#### 2.6 乳液温度稳定性

研究了在 30~90 ℃ 热处理 30 min 后, SPI、SPIH、 F30 和 F30-葡聚糖轭合物稳定乳液的粒度和  $\zeta$ -电位变 化,如图 10 所示。从 30 ℃加热至 50 ℃时, SPI 稳定乳液 的粒径均明显降低;而当温度进一步增大至 90 ℃时,乳 液粒径则逐渐增大。由 SPIH、F30 和 F30-葡聚糖轭合物 稳定的乳液在 30~70 ℃ 热处理后,粒径增大幅度较小, 而在较高的温度 70~90 ℃下处理后,粒径明显增加,表 明乳液有聚集的趋势。但是 F30-葡聚糖轭合物稳定乳液 的粒径增加程度相对较低。此外,在热处理过程中,所有 乳液的  $\zeta$ -电位变化不明显,说明热处理未影响乳液液滴 之间的静电相互作用,而液滴粒径的增加可能是因为蛋 白质吸附层之间通过疏水或二硫键等相互作用聚集所引 起的。虽然乳液的粒径在热处理后明显增加,但仍然低 于 1 000 nm,所以从外观上未观察到分层现象。

## 2.7 复溶特性

将SPI、SPIH、F30和F30-葡聚糖轭合物稳定的乳液





冷冻干燥后,分散在一定量的去离子水中,对其复溶特性进行探究。如图 11(a)所示,由 SPI 和 SPIH 稳定的乳液

在冻干后呈淡黄色,且冻干物质地黏稠,有明显的漏油迹 象。而由F30和F30-葡聚糖轭合物稳定的乳液在冻干后



虚线表示乳液分层位置;0,50,100,200 对应的 NaCl 浓度分别为 0,50,100,200 mmol/L

图 9 离子强度对不同浓度的 SPI、SPIH、F30及 F30-葡聚糖轭合物稳定乳液的外观的影响

Figure 9 Influence of ionic strength on the appearance of SPI, SPIH, F30 and F30-dextran conjugate stabilized emulsions











(b) 复溶效果



呈白色,粉末干燥,无黏稠或漏油迹象。此外,如图 11(b) 所示,由 SPI 稳定的乳液在冻干后,几乎不溶于水,即使 在经过外力搅拌后,都很难再恢复至冻干前的状态。这 可能与 SPI 具有较低的溶解度有关。而对于 SPIH、F30 和 F30-葡聚糖轭合物稳定的乳液,冻干后加水能迅速溶 解,形成的乳液分散体系均一、流动性好。但是经过一段 时间的放置后,出现轻微的脂肪上浮现象;且该现象在 F30 稳定的乳液中更为明显。这些结果表明,经过酶水解 后,降低了蛋白质分子的相对分子质量,使其结构更加疏 松,从而提高了蛋白质的溶解度,这有利于提升乳液冻干 后的复溶效果。此外,F30-葡聚糖轭合物较 F30 表现出 更低的脂肪上浮程度,进一步说明了糖基化改性对 F30 乳化性质的改善作用。同时,良好的复溶效果也将有利 于 F30-葡聚糖轭合物稳定的乳液作为食品配料在食品体 系中的应用。

# 3 结论

通过中性蛋白酶水解和葡聚糖糖基化相结合的协同 改性对大豆分离蛋白进行改性处理,探究了改性大豆分 离蛋白在乳化特性上的变化,评估了改性大豆分离蛋白 作为乳化剂稳定乳液的能力。研究结果表明:①大豆分 离蛋白水解物中对乳化性质最有利的主要是相对分子质 量较大的组分(F30),相对分子质量较小的组分(F30-10 和 F10)乳化性质较差。②酶水解可以提高大豆分离蛋 白表面疏水性,促进水解物在油—水界面吸附,乳化活性 明显改善;但是在液滴表面形成的界面膜较薄,且水解物 之间容易因疏水相互作用发生结构重排,导致乳液在不 利环境条件下容易失稳分层。③ 糖基化后,与 F30 共价 结合的葡聚糖可以在液滴表面提供额外的空间位阻作 用,增加界面膜厚度,减缓因 NaCl 的静电屏蔽作用和热 处理导致的液滴聚集,提高乳液稳定性。综上,限制性酶 解结合糖基化改性是提高大豆蛋白乳化性能的有效手 段,后续可继续探讨该研究获得的改性大豆蛋白在稳定 新型乳液,如多重乳液、Pickering 乳液、多层乳液等方面 的潜力。

#### 参考文献

- TANG C H. Nanostructured soy proteins: Fabrication and applications as delivery systems for bioactives (a review) [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 91: 92-116.
- [2] 郭顺堂, 徐婧婷, 刘欣然, 等. 我国植物蛋白资源高效利用途径 与技术创新[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(6): 8-15.
  GUO S T, XU J T, LIU X R, et al. Efficient utilization and technological innovation of plant-based protein resources in China [J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(6): 8-15.
- [3] YAN S Z, XIE F Y, ZHANG S, et al. Effects of soybean protein isolate-polyphenol conjugate formation on the protein structure and emulsifying properties: Protein-polyphenol emulsification performance in the presence of chitosan[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2021, 609: 125641.
- [4] EVANS M, RATCLIFFE I, WILLIAMS P A. Emulsion stabilisation using polysaccharide-protein complexes [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2013, 18(4): 272-282.
- [5] 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.
  LAN Q Y, ZHANG Q, LIU L, et al. Research progress on the preparation and identification methods of proteins glycosylation[J].
  Food & Machinery, 2019, 35(2): 196-201.
- [6] JIANG Z M, LI M, ZHAO J J, et al. Effects of ultrafiltration and hydrolysis on antioxidant activities of Maillard reaction products derived from whey protein isolate and galactose [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 113: 108313.

- [7] SONG C L, REN J, CHEN J P, et al. Effect of glycosylation and limited hydrolysis on structural and functional properties of soybean protein isolate [J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018, 12: 2 946-2 954.
- [8] ZHANG Y T, TAN C, ERIC K, et al. Effect of limited enzymolysis on physico-chemical properties of soybean protein isolatemaltodextrin conjugates [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2014, 50(1): 226-232.
- [9] LI Y, ZHONG F, JI W, et al. Functional properties of Maillard reaction products of rice protein hydrolysates with mono-, oligoand polysaccharides[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30: 53-60.
- [10] YU J, WANG G R, WANG X B, et al. Improving the freeze-thaw stability of soy protein emulsions via combing limited hydrolysis and Maillard-induced glycation [J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 91: 63-69.
- [11] HUANG T, BU G H, CHEN F S. The influence of composite enzymolysis on the antigenicity of β-conglycinin in soy protein hydrolysates[J]. Journal of Food Biochemistry, 2018, 42(1): 12544.
- [12] ZHANG Q, LI L, CHEN L, et al. Effects of sequential enzymolysis and glycosylation on the structural properties and antioxidant activity of soybean protein isolate[J]. Antioxidants, 2023, 12: 430.
- [13] 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 Research International, 2013, 51 (2): 490-495.
- [14] XU J, HAN D, CHEN Z J, et al. Effect of glucose glycosylation following limited enzymolysis on functional and conformational properties of black bean protein isolate [J]. European Food Research and Technology, 2018, 244(6): 1 111-1 120.
- [15] 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]. Food Chemistry, 2021, 360: 129991.
- [16] KASRAN M, CUI S W, GOFF H D. Covalent attachment of fenugreek gum to soy whey protein isolate through natural Maillard reaction for improved emulsion stability [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30: 552-558.
- [17] 徐兴凤. 酶解大米谷蛋白性质以及多糖对其影响的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2016: 48-57.
  XU X F. Study on the properties of limited enzymatic hydrolysis rice glutelin and the effects of polysaccharides on its properties[D]. Nanchang: Nanchang University, 2016: 48-57.
- [18] 周洋莹,郑红莉,杨文钰,等.大豆分离蛋白一大豆低聚糖糖 基化产物溶解性和乳化性分析[J].食品与发酵工业,2020,46 (1):118-124.

ZHOU Y Y, ZHNEG H L, YANG W Y, et al. Modification of solubility and emulsifying properties of soybean protein isolate by

glycosylating with soybean oligosaccharide [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(1): 118-124.

 [19] 陈旭辉. 蛋白基透明状高内相乳液的制备与表征[D]. 广州: 华 南理工大学, 2020: 23-33.
 CHEN X H. Preparation and characterization of protein-based transparent high internal phase emulsions[D]. Guangzhou: South

China University of Technology, 2020: 23-33.

- [20] 董世荣, 王丽, 姜丙焱, 等. 巯基乙醇对大豆分离蛋白热致聚 合物界面性质的影响[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 30-37. DONG S R, WANG L, JIANG B Y, et al. The effect of mercaptoethanol on the interface properties of heat-induced aggregation of soy protein isolate[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(11): 30-37.
- [21] LOPES-DA-SILVA J A, MONTEIRO S R. Gelling and emulsifying properties of soy protein hydrolysates in the presence of a neutral polysaccharide[J]. Food Chemistry, 2019, 294: 216-223.
- [22] AI M, ZHANG Z, FAN H, et al. High-intensity ultrasound together with heat treatment improves the oil-in-water emulsion stability of egg white protein peptides [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106256.
- [23] SHENG L, TANG G Y, WANG Q, et al. Molecular characteristics and foaming properties of ovalbumin-pullulan conjugates through the Maillard reaction[J]. Food Hydrocolloid, 2020, 100: 105384.
- [24] LESMES U, MCCLEMENTS D J. Controlling lipid digestibility: Response of lipid droplets coated by β-lactoglobulin-dextran Maillard conjugates to simulated gastrointestinal conditions [J]. Food Hydrocolloid, 2012, 26(1): 221-230.
- [25] BAI L T, SONG Y, LI Q M, et al. Emulsifying and physicochemical properties of lotus root amylopectin-whey protein isolate conjugates [J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 111: 345-354.
- [26] DU Y X, SHI S H, JIANG Y, et al. Physicochemical properties and emulsion stabilization of rice dreg glutelin conjugated with κ-carrageenan through Maillard reaction[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(1): 125-133.