

可溶性大豆多糖对大豆分离蛋白凝胶形成的影响

葛钰鸿¹ 沈为佳¹ 赵秀兰² 张清¹

(1. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625000; 2. 四川省分析测试服务中心, 四川 成都 610011)

摘要: [目的] 探讨可溶性大豆多糖(soluble soybean polysaccharides, SSPS)对大豆分离蛋白(soybean protein isolate, SPI)凝胶形成及凝胶特性的影响。[方法] 制备不同 SSPS 添加量的 SPI 悬液和凝胶, 以未添加 SSPS 的 SPI 悬液和凝胶为对照。分别测定结构特性、理化特性以及凝胶特性。[结果] SPI 制备成凝胶的过程中, SPI 与 SSPS 之间发生了糖基化反应, SSPS 改变了蛋白的二级结构和三级结构。添加 SSPS 后样品 zeta-电位绝对值降低、热稳定性增大; 凝胶离子键、氢键、疏水相互作用及二硫键含量下降, 非二硫键的共价键含量增加。添加量为 10% 时, SPI 悬液表面疏水性降低程度最大, 达到 88.42%; SPI 凝胶硬度下降 28.85%, 持水性增加了 40.72%。扫描电镜结果表明, SSPS 的添加导致凝胶网络疏松多孔, 凝胶强度下降。[结论] SPI 凝胶制备过程中添加 SSPS, 二者会发生糖基化反应, 随 SSPS 添加量增多, 蛋白结构特性和凝胶特性改变更明显。

关键词: 大豆分离蛋白; 可溶性大豆多糖; 凝胶; 糖基化

Effects of soluble soybean polysaccharides on the formation of gel formation of soybean protein isolate

GE Yuhong¹ SHEN Weijia¹ ZHAO Xiulan² ZHANG Qing¹

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625000, China;

2. Analytical and Metrical Center of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 610011, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to investigate the effect of soluble soybean polysaccharides (SSPS) on gel formation and properties of soybean protein isolate (SPI). [Methods] SPI suspension and gels with different amounts of SSPS were prepared, and SPI suspension and gels without SSPS were used as controls. The structural properties, physicochemical properties and gel properties were determined. [Results] During the preparation of SPI into gel, glycosylation reaction occurred between SPI and SSPS, which led to the change of the secondary and tertiary structure of SPI. With the addition of SSPS, the absolute value of zeta-potential decreased and the thermal stability increased. The ionic bond, hydrogen bond, hydrophobic interaction and disulfide bond content of gel decreased, and the covalent bond content of non-disulfide bond increased. When the addition was 10%, the surface hydrophobicity of SPI suspension decreased by 88.42%, the gel hardness decreased by 28.85%, and the water holding capacity increased by 40.72%. The SEM results showed that the addition of SSPS resulted in a loose and porous gel network and a decrease in gel strength. [Conclusion] The addition of SSPS in the preparation of SPI gel resulted in glycosylation reaction. With the increase of SSPS addition, the protein structure and gel properties changed more significantly.

Keywords: soy protein isolate; soluble soy polysaccharides; gel; glycosylation reactions

传统豆腐的制作一般包括泡豆、磨浆、煮浆、过滤、点浆、挤压成型等步骤, 豆腐凝胶的成型得益于煮浆时大豆蛋白的热变性以及点浆时凝固剂的促交联作用^[1]。豆浆中存在大豆分离蛋白(soybean protein isolate, SPI), 是形

成豆腐凝胶的主要蛋白, 由大豆球蛋白(glycinin, 11S)和 β -伴大豆球蛋白(β -conglycinin, 7S)组成^[2], 含多种必需氨基酸及丰富的不饱和脂肪酸等。同时, 豆浆中含有可溶性大豆多糖(soluble soybean polysaccharides, SSPS), 是一

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(编号: 3210160546)

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: 2023-10-08 **改回日期:** 2024-04-12

类酸性多糖^[3],表现出成膜能力、抗氧化活性、分散性、稳定性、乳化性和附着力等多种功能^[4-5]。蛋白质与多糖共存于同一食品体系中时,极易发生相互作用,从而影响食品品质,豆浆加热及凝固过程中,为SPI与SSPS的反应提供了良好的环境,SSPS对SPI的凝胶行为和豆腐的理化性质都会产生影响。

蛋白质与多糖之间存在非共价相互作用和共价相互作用,当二者之间存在静电相互作用时,可促进可溶性复合物的形成、凝聚或沉淀^[6],当静电相互作用小于热力学不相容带来的排斥作用时,则可能会产生排斥絮凝作用^[7],阻碍豆腐凝胶成型。同时,SSPS的存在会提高SPI的其他凝胶特性,Zhao等^[8]研究发现棉子糖、水苏糖或SSPS可通过增强体系中的疏水相互作用和二硫键作用,增加SPI凝胶的储能模量,改善凝胶强度、硬度、持水性和微观结构。此外,豆浆加热过程为还原糖类和氨基化合物间的糖基化反应提供了良好的反应条件,可能会使SSPS与SPI之间产生共价结合,但二者间各种相互作用力对豆腐凝胶产生的影响尚不明确。糖的添加量不同对蛋白凝胶特性的影响也是不同的^[9],Xu等^[10]研究发现添加10%和20%的SSPS后,SPI凝胶强度弱于未添加SSPS和添加了30%SSPS的凝胶,而未添加SSPS形成的凝胶结构更致密,不同SSPS添加量对SPI凝胶及其特性产生的影响及其原理有待进一步研究。研究拟探讨在不同SSPS添加量下,SPI凝胶形成过程中的相互作用类型和反应程度,及其对SPI凝胶性质的影响,为揭示豆腐凝胶形成过程规律及凝胶性质呈现提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆:南夏豆25,粗蛋白含量为49.25%,粗脂肪含量15.81%,水溶性蛋白含量88.27 mg/mL,四川省南充市农业科学院;

SSPS:合肥博美生物科技有限责任公司;

葡糖酸内酯(gluconolactone, GDL):食品级,江西新黄海医药食品化工有限公司;

考马斯亮蓝:南京建成生物工程研究所;

Tris:博奥拓达科技(北京)有限公司;

广谱蛋白Marker、甘氨酸:北京索莱宝科技有限公司;

10%十二烷基硫酸钠(SDS)、四甲基乙二胺(TEMED):博士德生物工程有限公司。

1.2 仪器与设备

质构仪:Texture Analyser型,英国Stable Micro System公司;

台式高速冷冻离心机:TGL-16型,湘南湘仪实验室仪器开发有限公司;

环境扫描电镜:Quattro ESEM型,赛默飞世尔科技有

限公司;

傅里叶变换红外光谱仪:NicoletIS10型,赛默飞世尔科技有限公司;

荧光酶标仪:Varioskan Flash型,赛默飞世尔科技有限公司;

差示扫描量热仪:Q200型,美国TA公司;

电子天平:Sartorius-CP225D型,德国Sartorius公司;

数显恒温水浴锅:HH-4型,邦西仪器科技(上海)有限公司;

磁力搅拌器:MYP11-2型,上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司;

密封性摇摆式粉碎机:XL-10B型,广州市旭朗机械设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 大豆分离蛋白的制备 使用碱溶酸沉法^[11]制备大豆分离蛋白。大豆经粉碎机粉碎1 min过80目筛,与乙醚按1:4(g/mL)混匀后搅拌1 h;静置分层后收集沉淀,重复两次,将沉淀自然风干。脱脂豆粉按1:10(g/mL)分散于去离子水中,用2 mol/L NaOH调节pH至8.0,然后磁力搅拌1 h,离心(4℃,9 000×g,20 min)得到上清液,用2 mol/L的HCl将pH至4.5,离心(4℃,4 000×g,20 min)后收集沉淀,加3倍去离子水分散,离心(4℃,8 000×g,10 min)后收集沉淀,加入适量去离子水,用2 mol/L NaOH调节pH至7.0,冻干即得SPI。

1.3.2 SPI-SSPS糖基化反应及凝胶的制作 配制质量分数(ω)为6%的SPI悬液,以不同质量比加入SSPS(以SPI质量计算,0%,2%,4%,6%,8%,10%),搅拌2 h后4℃下静置过夜,使原料充分水化。以不添加多糖的处理作为对照。

将上述悬液在95℃下水浴加热30 min,冷却后,取一部分SPI悬液用于指标测定,剩余部分加入凝固剂($\omega=0.5\%$ 的GDL),85℃水浴保温1 h成型。将蛋白凝胶放入冷水中,待冷却后放入4℃冰箱过夜贮藏,将部分凝胶冻干磨粉,-18℃贮存待测。

1.3.3 蛋白—糖糖基化反应的确定

(1) 褐变程度测定:参照Han等^[12]的方法修改如下:SPI悬液取离心后的上清液测定,凝胶粉溶解在10 mmol/L PBS(pH 7.2)中,离心后取上清液进行测定。蛋白质量浓度均调为1 mg/mL,使用酶标仪在420 nm处记录溶液的吸光度以表征褐变程度。

(2) 接枝度(degree of grafting, DG)测定:采用OPA法^[4]。

(3) 蛋白亚基组成测定:分别对糖基化后的SPI悬液与凝胶进行十二烷基硫酸钠—聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDSPAGE),具体操作参照兰秋雨等^[13]的方法修改如下:将4 mg样品溶解在1 mL 2倍上样缓冲液中,离心

(10 000 r/min, 10 min)后取上清液上样。

1.3.4 蛋白—糖糖基化产物结构性质分析

(1) 傅里叶变换红外光谱(FTIR)分析:参照 Lan 等^[4]的方法。

(2) 内源荧光测定:参照 Xiong 等^[14]的方法修改如下:将凝胶冻干粉分散于超纯水中,充分搅拌,离心(10 000 r/min, 10 min)得到上清液,配制上清液蛋白质量浓度 0.2 mg/mL,狭缝宽度为 2 nm。

(3) 蛋白质溶解能力:参照 Zhang 等^[15]的方法修改如下:取 0.15 mg 凝胶粉依次溶解在 0.5 mL 的 5 种溶剂中: S1: 0.6 mol/L NaCl; S2: 0.6 mol/L NaCl+1.5 mol/L 尿素; S3: 0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素; S4: 0.6 mol/L NaCl+8 mol/L 尿素+0.5 mol/L β 巯基乙醇; S5: 1 mol/L NaOH。离心(10 000 $\times$ g, 20 min, 4 $^{\circ}$ C)后用考马斯亮蓝法测定上清液中的蛋白质浓度;各分子间作用力按式(1)~式(5)进行计算。

$$c_{ib} = \frac{\rho_1}{\rho} \times 100\%, \quad (1)$$

$$c_{hb} = \frac{\rho_2 - \rho_1}{\rho} \times 100\%, \quad (2)$$

$$c_{hi} = \frac{\rho_3 - \rho_2}{\rho} \times 100\%, \quad (3)$$

$$c_{db} = \frac{\rho_4 - \rho_3}{\rho} \times 100\%, \quad (4)$$

$$c_{ndcb} = \frac{\rho_5 - \rho_4}{\rho} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

c_{ib} ——离子键含量,%;

c_{hb} ——氢键含量,%;

c_{hi} ——疏水相互作用含量,%;

c_{db} ——二硫键含量,%;

c_{ndcb} ——非二硫键的共价键含量,%;

ρ ——凝胶粉质量浓度,0.3 mg/mL;

ρ_1 ——S1 溶液中上清液蛋白质质量浓度,mg/mL;

ρ_2 ——S2 溶液中上清液蛋白质质量浓度,mg/mL;

ρ_3 ——S3 溶液中上清液蛋白质质量浓度,mg/mL;

ρ_4 ——S4 溶液中上清液蛋白质质量浓度,mg/mL;

ρ_5 ——S5 溶液中上清液蛋白质质量浓度,mg/mL。

(4) 电位分析:参照 Zhou 等^[16]的方法修改如下:SPI 悬液离心后取上清液,凝胶粉溶于超纯水中,离心(10 000 r/min, 10 min)取上清液调节蛋白质量浓度为 2 mg/mL 进行测定。马尔文粒度仪设定温度为 25 $^{\circ}$ C,重复测定 3 次取平均值。

(5) 表面疏水性测定:参照 Achouri 等^[17]的方法修改如下:蛋白溶液上清液蛋白质量浓度为 2 mg/mL,以超纯水加 ANS 作为空白,测定空白及样品的荧光强度。

(6) 热性能分析:参照 Zhou 等^[16]的方法修改如下:从 20 $^{\circ}$ C 加热至 250 $^{\circ}$ C,升温速度为 5 $^{\circ}$ C/min,氮气流速 50 mL/min。采用美国 TA 公司提供的 TA Universal Analysis 2000 软件计算峰值温度(T_p)和热变性焓变(ΔH)。

1.3.5 凝胶性质测定

(1) 持水力(WHC):采用离心法^[18]。

(2) 脱水收缩率:参照杨飞飞等^[19]的方法修改如下,将 SPI 凝胶切成边长为 1 cm 的正方体,置于 2 层中速定性滤纸上。

(3) 质构特性:参照石彦国等^[20]的方法修改如下:将凝胶切成直径为 30 mm,高 1 cm 的圆柱体,在室温下平衡 30 min 进行测定。质构特性分析参考 TPA 模式,采用 P/36R 探头,所有样品至少测定 6 次。

(4) 微观结构:参照 Wang 等^[21]的方法对样品进行处理。将干燥后的样品用导电胶固定在样品台上,喷金后在加速电压 10 kV 下观察凝胶的形态结构。

1.4 数据统计分析

所有试验重复 3 次,采用 Excel 2013 对数据进行处理;采用 IBM SPSS Statistics 22 进行方差分析($P < 0.05$),采用 Origin Pro 8.5 绘图。

2 结果与分析

2.1 糖基化反应的鉴定

2.1.1 褐变程度及游离氨基含量分析 如图 1 所示,随着 SSPS 添加量增加,SPI 悬液及凝胶的褐变程度显著增大,SPI 凝胶 DG 显著增大。当添加量达到 6% 后,继续添加 SSPS,悬液褐变程度变化较小;SSPS 添加量为 10% 时,SPI 凝胶的 DG 达到最大,为 21.83%。这是因为对 SPI 悬液进行加热时,SPI 分子结构部分展开,蛋白质氨基侧链与还原糖的羰基共价结合,产生棕褐色产物^[22];随着 SSPS 添加量增多,自由氨基被消耗,且加热时间较短^[23],蛋白

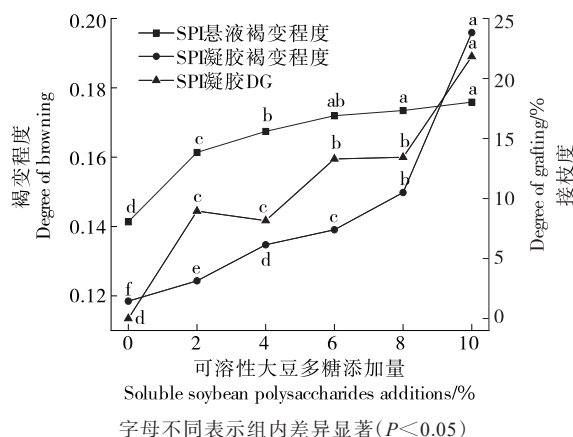


图 1 SSPS 添加量对 SPI 悬液和凝胶褐变程度及 DG 的影响
Figure 1 Effects of different SSPS additions on browning degree and DG of SPI suspension and gel

质展开不完全,反应无法继续进行而趋于平稳。同时,由于悬液糖基化反应程度较低,无法检测出纯蛋白体系与蛋白-多糖混合体系游离氨基含量的变化,即DG为0。凝胶成型过程中,蛋白质分子进一步展开,提供更多反应位点,促进与还原糖接枝反应的发生,产生更多褐色产物。以上结果表明,SPI凝胶制备过程中SPI与SSPS分子之间发生了糖基化反应。

2.1.2 SDSPAGE电泳分析 如图2所示,SSPS的加入没有改变SPI的亚基组成。加入6%,8%,10% SSPS的SPI

悬液以及加入8%和10% SSPS的SPI凝胶相对于添加量为0%的样品电泳条带颜色变浅,这可能是由于SSPS与SPI发生了糖基化反应,导致与染色剂结合的自由氨基数量减少^[24]。此外,可观察到加入8%和10% SSPS的蛋白凝胶7S亚基特征条带和11S酸性亚基的特征条带略微上移。这是由于糖基化后糖链的接入使蛋白质相对分子质量增大,在分离胶上的迁移速度变慢,条带呈现滞后现象。由此可见,糖基化反应在SPI的7S和11S球蛋白部分均有发生^[25]。

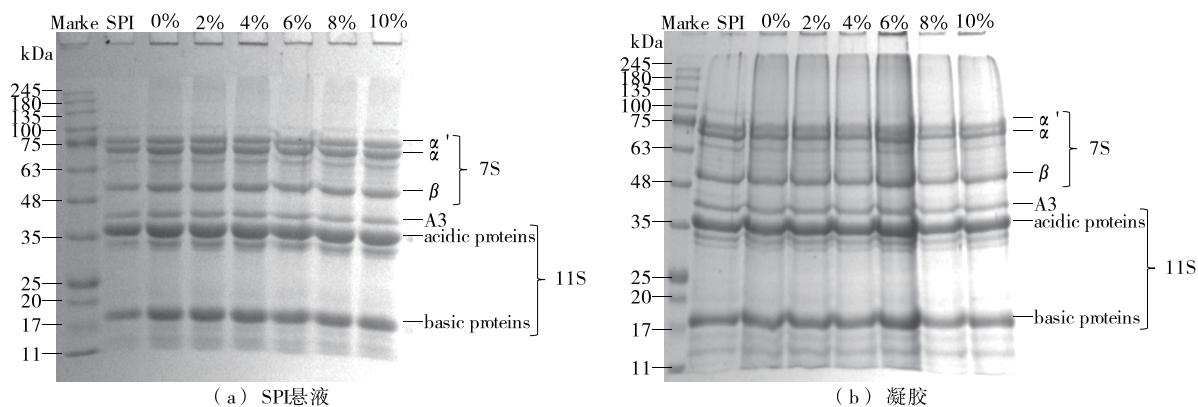


图2 SSPS不同添加量的SPI悬液和凝胶的SDSPAGE分析结果

Figure 2 SDS-PAGE analysis results of SPI suspension and gel with different SSPS additions

2.1.3 FTIR分析 如图3所示,红外光谱未出现新的特征峰,说明SSPS的加入没有形成新的基团。加入SSPS后,SPI在 $3\,300\text{ cm}^{-1}$ 的吸收峰光谱强度增大且振动谱带变宽,这是由于糖基化反应引入了糖链,增加了产物中羟基的数量^[26-27]。SPI在酰胺I带、酰胺II带和酰胺III带有3个特征吸收峰,加入6% SSPS的SPI悬液以及添加了糖的蛋白凝胶在该范围内的特征

峰吸收强度增大,表明样品中 $\text{C}=\text{C}$ 、 $\text{C}=\text{O}$ 、 $\text{C}-\text{N}$ 等共价键的形成,证实了糖基化反应的发生^[28]。SPI凝胶在 $2\,800\sim 3\,000$ 、 $1\,019\sim 1\,270\text{ cm}^{-1}$ 范围内的特征吸收峰吸收强度增大,表明SSPS结合到SPI上,改变了SPI内部甲基、亚甲基、 $\text{C}-\text{C}$ 键和 $\text{C}-\text{O}$ 键等二级结构,在 914 cm^{-1} 附近的吸收峰证实了多糖 α 糖苷键的存在^[29]。

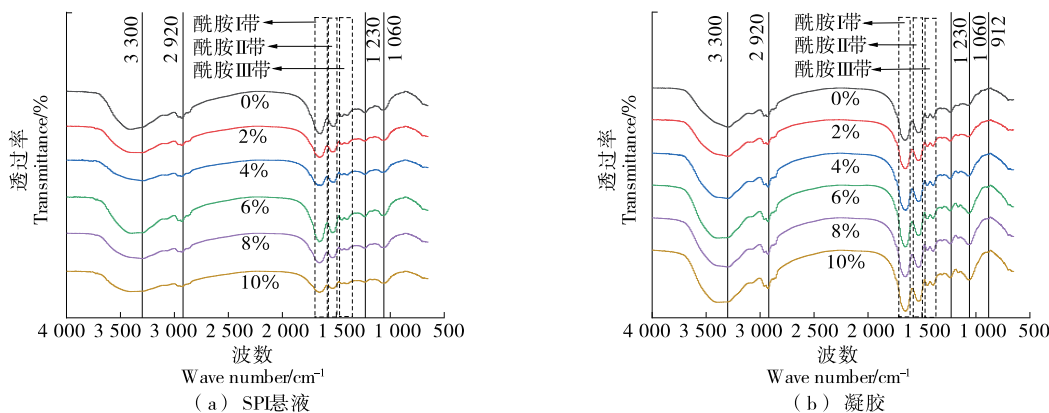


图3 SSPS不同添加量的SPI悬液和凝胶红外光谱图

Figure 3 Infrared spectra of SPI suspension and gel with different SSPS additions

2.1.4 荧光光谱分析 如图4所示,随着SSPS添加量的增多,凝胶的内源荧光强度降低,纯SPI凝胶最大荧光发

射波长 λ_{max} 为 390.5 nm ,添加6%,8% SSPS后,蛋白凝胶最大荧光发射波长 λ_{max} 分别为 $398, 397\text{ nm}$,发生了红移。

SSPS 共价接枝到 SPI 表面后, 阻断了疏水氨基酸的荧光信号, 与接枝度变化趋势一致^[30]。此外, 氨基酸残基的荧光发射波长与其有关, 糖链接入蛋白分子之后, SPI 的多肽链结构被拉伸和部分展开, 导致色氨酸残基所处的微环境发生改变, 从蛋白质内部的疏水区域暴露在亲水环境中, 环境极性增加、疏水性减小, 发生红移^[31]。

综上所述, SPI 悬液加热及制备成凝胶的过程中加入 SSPS, 二者会发生糖基化反应, 促进 SPI 三级结构展开及体系中部分共价键的形成, 改变 SPI 二级结构。结合豆腐凝胶生产流程, 煮浆以及点浆的过程为豆浆中大豆蛋白与可溶性大豆多糖的糖基化反应提供了有利条件, 可以

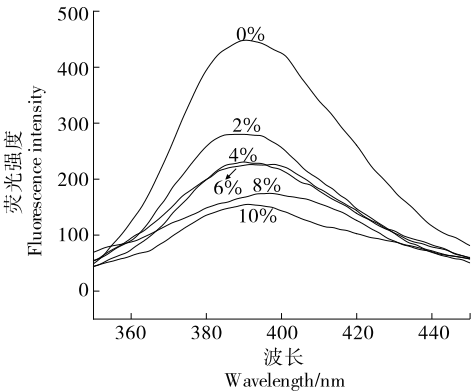


图 4 SSPS 不同添加量的 SPI 凝胶内源荧光光谱
Figure 4 Endogenous fluorescence spectra of SPI gels with different SSPS additions

推测, 豆腐凝胶形成过程体系中也会发生糖基化反应。

2.2 SSPS 对大豆分离蛋白理化特性的影响

2.2.1 蛋白质溶解度分析 蛋白凝胶网络的形成由蛋白质分子间的作用力来驱动和维持, 主要涉及离子键、氢键、疏水性相互作用等非共价相互作用以及共价键。由表 1 可知, 凝胶内部以疏水相互作用与共价键为主, SSPS 的添加使凝胶中离子键先增多后下降, 氢键、疏水相互作用及二硫键含量总体呈下降趋势, 非二硫键的共价键相对含量增加。

SSPS 添加量低时, SSPS 与 SPI 表面均带负电荷, 二者之间静电斥力较大, 离子键含量增多^[32]; 随着 SSPS 添加量增多, 通过共价键覆盖在 SPI 表面, 减少了蛋白质表面电荷与环境中其他物质之间的相互作用^[33], 蛋白质分子之间的静电斥力减小。氢键和二硫键是维持蛋白质二级结构的主要作用力, 表明糖链的引入会通过破坏蛋白质分子间的氢键和二硫键来改变蛋白质的二级结构^[34], 促进蛋白质分子展开, 进而暴露出疏水基团, SSPS 与 SPI 共价结合后, 引入的糖链会包裹或覆盖蛋白质外层的疏水性基团, 使得疏水相互作用下降^[35]。而非二硫键的共价键增多是由于 SSPS 与 SPI 之间发生了共价接枝, 促进体系中 C=C、C=O、C—N 等共价键的形成, 这与红外图谱结果一致。以上结果表明, 在制备成凝胶的过程中, SSPS 会破坏 SPI 分子内氢键和二硫键促进蛋白分子展开, 同时可能会阻碍蛋白分子间离子键的形成, 促进凝胶中非二硫键的共价键的形成, 影响凝胶特性。

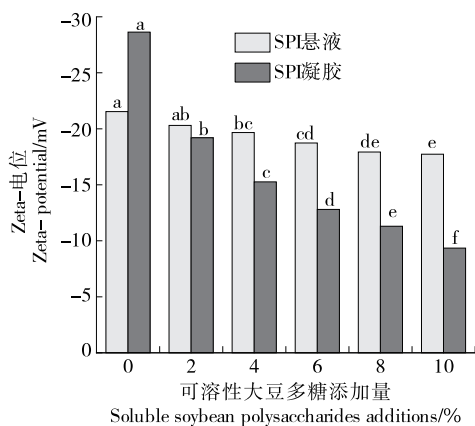
表 1 SSPS 不同添加量的 SPI 凝胶分子间作用力[†]

Table 1 Intermolecular forces of SPI gels with different SSPS dosages					%
SSPS 添加量	离子键	氢键	疏水相互作用力	二硫键	非二硫键共价键
0	0.52±0.00 ^b	0.43±0.02 ^a	12.87±0.59 ^{ab}	21.35±0.03 ^{ab}	10.06±1.33 ^c
2	0.71±0.00 ^a	0.25±0.05 ^c	13.32±0.20 ^a	21.63±0.20 ^{ab}	12.31±0.33 ^{bc}
4	0.74±0.02 ^a	0.34±0.05 ^b	11.37±0.17 ^d	20.92±1.28 ^b	14.71±0.28 ^b
6	0.49±0.02 ^b	0.27±0.01 ^{bc}	12.47±0.09 ^{bc}	16.47±0.23 ^c	13.43±1.68 ^b
8	0.45±0.01 ^c	0.33±0.01 ^b	12.09±0.29 ^c	20.18±0.41 ^b	14.29±1.20 ^b
10	0.43±0.02 ^c	0.25±0.03 ^c	11.30±0.14 ^d	22.87±0.99 ^a	34.86±1.00 ^a

[†] 字母不同表示组内差异显著 ($P<0.05$)。

2.2.2 Zeta 电位分析 如图 5 所示, 所有样品 Zeta 电位均为负值。随着 SSPS 添加量增多, 电位绝对值均减小, 凝胶电位绝对值大幅减小, 添加 10% SSPS 后 SPI 凝胶电位绝对值减小了 67%。SPI 在高于等电点的环境中表面带负电荷, SSPS 通过糖基化耦合在蛋白表面, 一定程度上起到了屏蔽作用, SPI 与 SSPS 接枝度更高, 屏蔽作用更明显^[36]。此外, 在 SPI 凝胶形成过程中, GDL 为酸性凝固剂, 产生了 H⁺, 导致 pH 下降, 更接近 SPI 等电点, 蛋白质表层电荷下降^[37]。

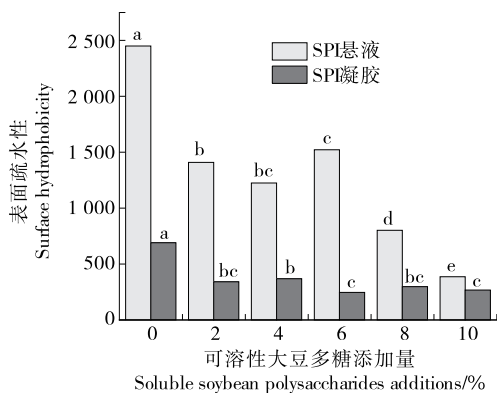
2.2.3 表面疏水性分析 如图 6 所示, 加入 SSPS 后, 样品表面疏水性显著下降。纯 SPI 悬液经过加热后, 蛋白分子结构展开, 内部疏水基团暴露, 表面疏水性较大。对 SPI 悬液进行加热时, SSPS 与 SPI 反应不充分, 导致蛋白分子易于发生自聚集, 使得暴露的疏水基团重新嵌入内部^[38], 表面疏水性下降。SPI 可通过疏水相互作用形成凝胶^[4], 使疏水基团包裹在凝胶内部, 此外, 推测糖链接枝在蛋白分子表面, 覆盖了位于蛋白质外层疏水性基团^[35,39], 导致表面疏水性下降。



字母不同表示组内差异显著 ($P < 0.05$)

图5 SSPS添加量对SPI悬液和凝胶Zeta电位的影响

Figure 5 Effects of different SSPS dosages on Zeta potential of SPI suspension and gel



字母不同表示组内差异显著 ($P < 0.05$)

图6 SSPS添加量对SPI悬液和凝胶表面疏水性的影响

Figure 6 Effects of different SSPS additions on hydrophobicity of SPI suspension and gel surface

2.2.4 热性能分析 如图7所示, SPI悬液样品 T_p 在 $119.93 \sim 143.85^\circ\text{C}$, 制备成凝胶后 T_p 在 $119.92 \sim 151.76^\circ\text{C}$, 随

着SSPS添加量增多, T_p 显著增大。SPI悬液的 ΔH 显著降低, 制备成凝胶后, 进一步降低了 ΔH , 并且随着SSPS添加量增多, ΔH 降低程度更大, 添加了10%SSPS的蛋白凝胶 ΔH 较纯SPI凝胶降低了27%。SSPS和SPI间发生化学反应并交联, GDL的加入促进了SSPS与SPI以及SPI之间的共价结合, 使得凝胶的构稳定, 加热过程中蛋白变性需要克服的分子作用力增大, 稳定性升高, 所需能量也随之升高^[40]。这表明SSPS的添加增强了SPI热稳定性, 经过糖基化改性后, 热稳定性进一步增强。

2.3 SSPS对大豆分离蛋白凝胶特性的影响

2.3.1 凝胶硬度分析 如图8所示, 随SSPS添加量增多, 凝胶硬度显著降低。这是由于糖基化反应引入的大分子多糖存在空间位阻, 凝固剂的加入促进了蛋白质的局部聚集, 导致形成了不连续的凝胶基质, 使凝胶网络疏松多孔^[41]。如前文所述, 添加SSPS后SPI凝胶中疏水相互作用及二硫键含量下降, 表明SSPS阻碍了蛋白质分子之间的相互作用; 结合热性能分析可知, SSPS可以提高SPI的热变性温度阻碍蛋白变性, 减弱GDL的助凝作用, 改变形成凝胶的键, 降低凝胶硬度^[4,39]。这一现象在豆腐凝胶中也有体现, 李景妍等^[42]研究表明生浆法制备的豆腐体系中可溶性糖含量较少, 硬度比熟浆法豆腐高, 而熟浆法豆腐感官评分更优。可见, 实际豆腐生产中, 可溶性多糖的存在会影响豆腐凝胶硬度, 同时使豆腐口感更佳。

2.3.2 脱水收缩率及持水性分析 如图9所示, 添加SSPS使蛋白凝胶脱水收缩率显著降低, 持水性增大。表明凝胶中自由水比例减少, 结合水比例增高。这可能是由于SSPS的加入导致蛋白凝胶网络疏松, 使水分易于流失。在凝胶系统中, 水可以保留在凝胶网络的孔隙中, 也可以与蛋白质和多糖的官能团结合, 由于SSPS的加入破坏了蛋白分子之间的氢键, 这部分断裂的氢键可能与水分子之间重新形成氢键; 此外, SSPS含有大量的羟基, 可在凝胶成型过程中与水分子间形成氢键^[39]。持水性也是

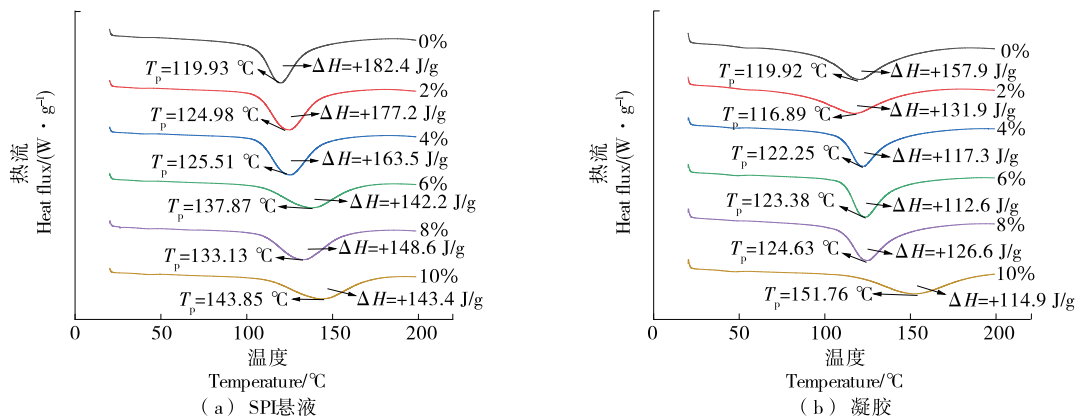
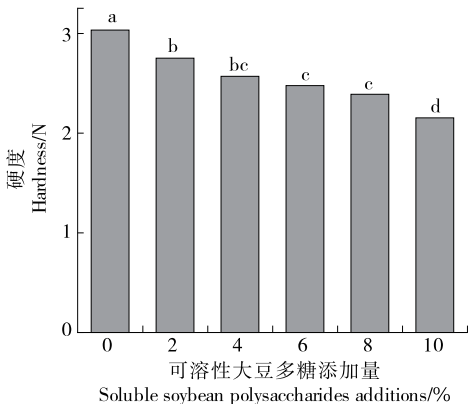


图7 SSPS不同添加量的SPI悬液和凝胶DSC谱图

Figure 7 DSC spectra of SPI suspension and gel with different SSPS additions

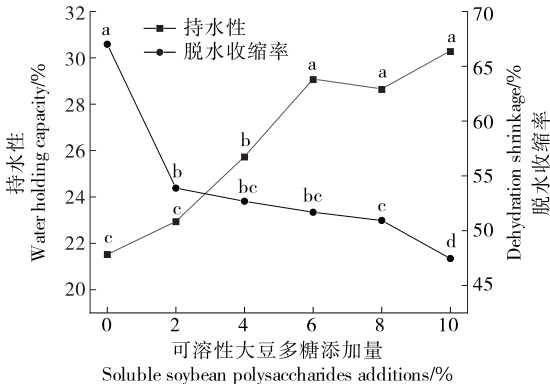


字母不同表示组内差异显著 ($P < 0.05$)

图 8 SSPS 添加量对 SPI 凝胶硬度的影响

Figure 8 Hardness analysis of SPI gel with different SSPS additions

评价豆腐品质的重要指标,宋莲军等^[43]发现豆腐的持水率和得率变化是一致的,因此通过 SSPS 增加蛋白凝胶持水性可以推测,豆浆中 SSPS 的存在可以提高豆腐得率。



字母不同表示组内差异显著 ($P < 0.05$)

图 9 SSPS 添加量对 SPI 凝胶持水性和脱水收缩率的影响

Figure 9 Water holding capacity and dehydration shrinkage of SPI gel with different SSPS additions

2.3.3 微观结构分析 如图 10 所示,纯 SPI 凝胶微观结构呈致密的蛋白质网格,微孔分布均匀,连续性较好。添加 SSPS 后,凝胶网络结构变得不均匀,产生一些较大孔隙,随着 SSPS 添加量增大,凝胶网络中孔隙进一步变大,结构变得松散。在凝胶形成过程中,SSPS 与 SPI 发生糖基化反应,引入的糖链产生空间位阻效应以及体系中存在未反应的游离 SSPS,阻碍凝胶网络结构的单元间聚集,离子键、氢键、二硫键等含量下降,从而具有更大的孔隙^[41],导致凝胶网络疏松多孔,最终导致凝胶强度下降。

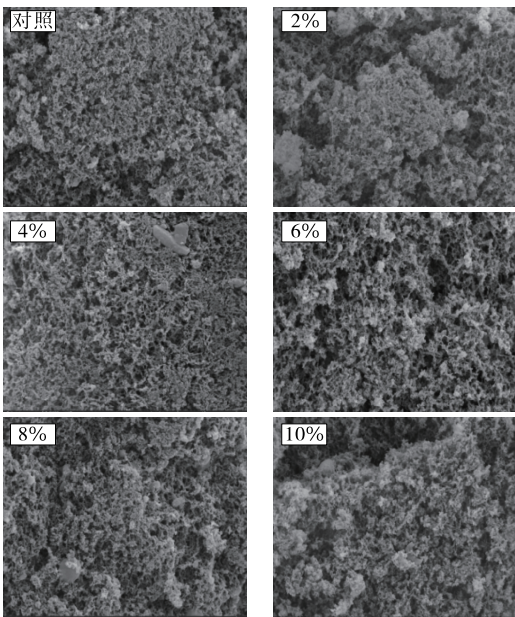


图 10 不同 SSPS 添加量下 SPI 凝胶的 SEM 图

Figure 10 SEM diagram of SPI gel under different SSPS addition amounts

3 结论

研究分析了大豆分离蛋白凝胶制备过程添加可溶性大豆多糖对蛋白分子结构及蛋白凝胶特性的影响。在悬液加热到制备成凝胶的过程中,大豆分离蛋白与可溶性大豆多糖糖基化反应程度随可溶性大豆多糖添加量的增加而增大。可溶性大豆多糖的添加改变了蛋白的二级结构和三级结构,使大豆分离蛋白凝胶中主要作用力由疏水相互作用和二硫键转变为非二硫键的共价键。随着可溶性大豆多糖添加量增多,大豆分离蛋白悬液及凝胶 Zeta 电位绝对值及表面疏水性降低,热稳定性增大。可溶性大豆多糖接枝在蛋白上会引入羟基,提高凝胶的持水性,同时由于空间位阻效应导致大豆分离蛋白凝胶网络结构更加疏松多孔,硬度降低。因此,推测在豆腐凝胶成型过程中,豆浆中的可溶性大豆多糖可以提高豆腐得率,也会影响豆腐的硬度。而多糖对豆腐凝胶品质的综合影响有待进一步探究。

参考文献

[1] 王宸之,陈宇,万重,等. 豆腐凝胶成型机理研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2017, 48(10): 88-96.
WANG C Z, CHEN Y, WANG C, et al. Research progress on gelation mechanism of soybean curd processing[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2017, 48(10): 88-96.
[2] 涂宗财,段邓乐,王辉,等. 微波处理对固相合成大豆分离蛋白-乳糖糖基化接枝物的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(13): 32-36.

- TU Z C, DUAN D L, WANG H, et al. Effect of microwave treatment on solid-phase synthesis of soy protein isolate-lactose graft[J]. Food Science, 2015, 36(13): 32-36.
- [3] YAO X Q, OUYANG J M, PENG H, et al. Inhibition on calcium oxalate crystallization and repair on injured renal epithelial cells of degraded soybean polysaccharide[J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 90(1): 392-398.
- [4] LAN Q Y, LI L, DONG H M, et al. Effect of soybean soluble polysaccharide on the formation of glucono- δ -lactone-induced soybean protein isolate gel[J]. Polymers, 2019, 11(12): 1 997.
- [5] CAI Z X, WEI Y, GUO Y L, et al. Influence of the degree of esterification of soluble soybean polysaccharide on the stability of acidified milk drinks[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 106052.
- [6] MATALANIS A, JONES O G, MCCLEMENTS D J. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(8): 1 865-1 880.
- [7] 杨晋杰, 邵国强, 王胜男, 等. 黄原胶对大豆分离蛋白乳液聚集稳定性的影响[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(7): 20-25.
- YANG J J, SHAO G Q, WANG S N, et al. Effect of Xanthan gum on the aggregation stability of soy protein isolate emulsions [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2019, 34(7): 20-25.
- [8] ZHAO H B, WANG Y S, LI W W, et al. Effects of oligosaccharides and soy soluble polysaccharide on the rheological and textural properties of calcium sulfate-induced soy protein gels[J]. Food and Bioprocess Technology, 2017, 10 (3): 556-567.
- [9] 朱秀清, 王婵, 孙禹凡, 等. 多糖对大豆分离蛋白乳液及乳液凝胶性质的影响[J]. 东北农业大学学报, 2020, 51(2): 45-52.
- ZHU X Q, WANG C, SUN Y F, et al. Effect of polysaccharides on soybean protein isolate emulsion and emulsion gel[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2020, 51(2): 45-52.
- [10] XU Y T, LIU L L. Structural and functional properties of soy protein isolates modified by soy soluble polysaccharides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(38): 7 275-7 284.
- [11] JIANG J, CHEN J, XIONG Y L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(16): 7 576-7 583.
- [12] HAN Y, WANG L X, JIANG W P, et al. An enhanced stability nanoparticle preparation by corn protein hydrolysate-carboxymethyl chitosan maillard conjugates loaded with rutin [J]. Journal of Food Science, 2019, 84(7): 1 829-1 835.
- [13] 兰秋雨, 林兆晖, 杨文钰, 等. 豆渣回添量对内酯豆腐品质特性的影响[J]. 东北农业大学学报, 2020, 51(7): 44-51.
- LAN Q Y, LIN Z H, YANG W Y, et al. Effect of okara with different additions on the quality of glucono- δ -lactone (GDL)-induced tofu[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2020, 51(7): 44-51.
- [14] XIONG T, XIONG W F, GE M T, et al. Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate[J]. Food Research International, 2018, 109: 260-267.
- [15] ZHANG Z L, XIONG Z Y, LU S F, et al. Effects of oxidative modification on the functional, conformational and gelling properties of myofibrillar proteins from Culter alburnus[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 162: 1 442-1 452.
- [16] ZHOU Y Y, YUE W T, LUO Y M. Preparation and stability characterization of soybean protein isolate sodium alginate complexes-based nanoemulsions using high-pressure homogenization[J]. LWT-Food Science & Technology, 2022, 154: 112607.
- [17] ACHOURI A, BOYE J I, BELANGER D, et al. Functional and molecular properties of calcium precipitated soy glycinin and the effect of glycation with kappa-carrageenan[J]. Food Research International, 2010, 43(5): 1 494-1 504.
- [18] SUTEERA S, APICARTSRANGKON A, BELL A E. Viscoelastic properties of high pressure and heat induced Tofu gels[J]. Food Chemistry, 2007, 107(3): 984-989.
- [19] 杨飞飞, 迟原龙, 贾冬英, 等. 鲑鱼皮胶液的凝胶特性及其结冷胶的改善作用[J]. 食品科技, 2018, 43(2): 171-174.
- YANG F F, CHI Y L, JIA D Y, et al. Improvement effect on gellan and gel properties of collagen extract from cod skin[J]. Food Science and Technology, 2018, 43(2): 171-174.
- [20] 石彦国, 李刚, 胡春林, 等. 大豆浸泡过程质构变化及其对豆腐质量的影响[J]. 食品科学, 2006(12): 167-169.
- SHI Y G, LI G, HU C L, et al. Effect of soaking time on the quality of Tofu[J]. Food Science, 2006(12): 167-169.
- [21] WANG C Z, LI J Y, ZHOU S Z S, et al. Application of transglutaminase for quality improvement of whole soybean curd[J]. Journal of Food Science and Technology-Mysore, 2019, 56(1): 233-244.
- [22] 宋春丽, 赵新淮. 食品蛋白质的糖基化反应: 美拉德反应或转谷氨酰胺酶途径[J]. 食品科学, 2013, 34(9): 369-374.
- SONG C L, ZHAO X H. A review on the glycosylation of food proteins by Maillard reaction or transglutaminase-catalyzed reaction[J]. Food Science, 2013, 34(9): 369-374.
- [23] WANG L H, SUN X, HUANG G Q, et al. Conjugation of soybean protein isolate with xylose/fructose through wet-heating Maillard reaction[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2018, 12(4): 2 718-2 724.
- [24] 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.
- XIA X F, LI F F, PAN N, et al. Antioxidant property and its mechanism of soy glycoprotein[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(2): 47-54.
- [25] 周洋莹, 郑红莉, 杨文钰, 等. 大豆分离蛋白-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, ZHENG 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.
- [26] YANG Y X, WANG Q M, LEI L, et al. Molecular interaction of soybean glycinin and β -conglycinin with (—)-epigallocatechin gallate induced by pH changes[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 106010.
- [27] SAFOURA P, ALI N, JAVAD K, et al. Structural properties of canola protein isolate-gum Arabic Maillard conjugate in an aqueous model system[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 79(1): 228-234.
- [28] ZHANG Q, LI L, LAN Q Y, et al. Protein glycosylation: a promising way to modify the functional properties and extend the application in food system[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, 59(15): 2 506-2 533.
- [29] 赵城彬, 齐宝坤, 张浩, 等. 超声预处理制备大豆分离蛋白/糖复合物及其结构与溶解性[J]. 食品科学, 2018, 39(23): 113-119.
- ZAHN C B, QI B K, ZHANG H, et al. Structure and solubility of soybean protein isolate-sugar conjugates prepared by ultrasonic pretreatment[J]. Food Science, 2018, 39(23): 113-119.
- [30] QI P X Q, XIAO Y P, WICKHAM E D. Stabilization of whey protein isolate (WPI) through interactions with sugar beet pectin (SBP) induced by controlled dry-heating[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 67: 1-13.
- [31] JOYE I J, DAVIDOV-PARDO G, LUDESCHER R D, et al. Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins[J]. Food Chemistry, 2015, 185: 261-267.
- [32] NI N, WANG Z Y, HE F, et al. Gel properties and molecular forces of lamb myofibrillar protein during heat induction at different pH values[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(4): 631-636.
- [33] 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 Hydrocolloids, 2012, 26(1): 221-230.
- [34] 布冠好, 朱婷伟, 陈复生. 糖基化改性对大豆蛋白抗原性及结构特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(1): 34-39.
- BU G H, ZHU T W, CHEN F S. Effects of glycation modification on soybean protein antigenicity and structural properties[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2017, 32(1): 34-39.
- [35] 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.
- DU Q L, ZHOU S Y, WU D Z, et al. Changes in surface activity of soybean 11S protein treated by glycosylation by means of wet-heating[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(1): 80-88.
- [36] 齐军茹, 曹静, 程萌, 等. 大豆可溶性多糖对大豆分离蛋白的物性修饰[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2017, 45(9): 60-66.
- QI J R, CAO J, CHENG M, et al. Modification of physicochemical properties of soy protein isolate by soybean soluble polysaccharide[J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2017, 45(9): 60-66.
- [37] 岳文婷, 卢丽霞, 杨文钰, 等. 不同复合凝固剂全豆豆腐营养品质分析[J]. 大豆科学, 2020, 39(1): 138-145.
- YUE W T, LU L X, YANG W Y, et al. Analysis of different compound coagulants on the nutritional quality of whole soybean tofu[J]. Soybean Science, 2020, 39(1): 138-145.
- [38] 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.
- QI B K, LI Y, WANG Z J, et al. Relationship between surface hydrophobicity and Zeta potential as well as particle size distribution of soybean protein isolates from different varieties [J]. Food Science, 2017, 38(3): 114-118.
- [39] LI L, WANG C Z, LI K X, et al. Influence of soybean protein isolate-dextran conjugates on the characteristics of glucono- δ -lactone-induced tofu[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 139: 110588.
- [40] 施永清, 郁莉萍, 潘玉盈, 等. 改性柚皮纤维大豆分离蛋白复合膜的制备[J]. 中国食品学报, 2018, 18(2): 102-111.
- SHI Y Q, YU L P, PAN W Y, et al. The preparation of the modified pomelo peel fiber and soy protein isolate composite film[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(2): 102-111.
- [41] 罗裕旻, 马钱, 徐子力, 等. 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[J]. 中国油脂, 2023, 48(4): 39-45.
- LUO Y M, MA Q, XU Z L, et al. Effect of freeze-thawing treatment on the physicochemical properties of gels of soybean isolated protein and its glycosylated products[J]. China Oils and Fats, 2023, 48(4): 39-45.
- [42] 李景妍, 郭顺堂, 陈洋. 生浆法和熟浆法加工对豆浆香气及相应豆腐产品特征的差异[J]. 大豆科技, 2012(2): 36-39.
- LI J Y, GUO S T, CHEN Y. The difference between the aroma of soy milk and the characteristics of the corresponding tofu products by raw pulp method and cooked pulp method[J]. Soybean Science & Technology, 2012(2): 36-39.
- [43] 宋莲军, 张莹, 赵秋艳, 等. 大豆品种与北豆腐得率及品质指标的关系[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(4): 321-323.
- SONG L J, ZHANG Y, ZHAO Q Y, et al. Relationship between soybean variety and northern tofu yield and quality index[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2011, 39(4): 321-323.