doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.10.044

基于辐照场糖基化改性的大豆蛋白冻融稳定性提高研究

王喜波　王玉莹　周　淼　姜　朔　付　玲
(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为了提高大豆蛋白的冻融稳定性,在辐照场下采用湿法糖基化改性大豆分离蛋白,以接枝度和冻融后的乳析指数为指标进行优化改性工艺试验。结果表明:在大豆分离蛋白(SPI)与麦芽糖(M)质量比为 4、SPI 质量浓度为 40 mg/mL、辐照剂量为 7.5 kGy 的条件下,制备的 SPI 冻融稳定性显著提高;与未改性 SPI 相比,改性 SPI 3 次冻融循环后乳液乳析指数分别降低了 22.98、28.40、30.70 个百分点,出油率分别降低了 9.7、21.2、26.4 个百分点;乳化活性指数和乳化稳定性指数比未改性的 SPI 分别提高了 9.26 m^2/g 和 3.76 min;红外光谱分析表明,麦芽糖分子以共价键的形式与大豆分离蛋白结合;扫描电镜表明,辐照 SPI-M 微观结构呈蜂窝状,呈现出良好的持水性;光学显微镜分析表明,与未改性的 SPI 乳液相比,冻融处理后的辐照 SPI-M 乳液只出现部分小油滴,乳液状态更稳定。

关键词: 大豆分离蛋白; 辐照; 冻融; 美拉德反应; 工艺优化
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-1298(2020)10-0387-08　　**OSID**:

Improvement of Soy Protein Freeze-thaw Stability by Using Glycosylation Modification Based on Irradiation Field

WANG Xibo　WANG Yuying　ZHOU Miao　JIANG Shuo　FU Ling
(*College of Food Science*, *Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030, *China*)

Abstract: In order to improve the freeze-thaw stability of soy protein, wet glycosylation modified soy protein isolate was tested in the irradiation field, and the modification process was optimized by using the degree of grafting and cream index as indicators. The results showed that the freeze-thaw stability of SPI prepared under the conditions of the mass ratio of soy protein isolate (SPI) and maltose (M) 4, SPI mass concentration 40 mg/mL, and irradiation dose 7.5 kGy was significantly improved. Compared with unmodified SPI, the emulsion cream index of the modified SPI after three freezing-thawing cycles was decreased by 22.98 percentage points, 28.40 percentage points and 30.70 percentage points, respectively, and the oiling off was decreased by 9.7 percentage points, 21.2 percentage points and 26.4 percentage points, respectively. Emulsifying activity index and emulsifying stability index were increased by 9.26 m^2/g and 3.76 min, respectively, compared with that of unmodified SPI. Infrared spectroscopy analysis indicated that the maltose molecule was bound to soy protein isolate in the form of covalent bonds. Scanning electron microscopy showed that the microstructure of SPI-M irradiated was honeycomb and showed good water holding capacity. The results of optical microscopy showed that compared with the unmodified SPI emulsion, only small oil droplets appeared in the SPI-M emulsion after freeze-thaw treatment, and the emulsion state was more stable. The research result provided theoretical and technical reference for the production of soy protein with high freeze-thaw stability.

Key words: soy protein isolate; irradiation; freeze-thaw; Maillard reaction; process optimization

0　引言

大豆分离蛋白是以低温脱脂豆粕为原料,经碱溶酸沉法制备的全价蛋白质[1]。大豆分离蛋白应用于食品中不仅能提高产品营养价值,还可以调节功能特性[2]。在运输储藏中,乳液食品通常需要冷

收稿日期: 2019-12-24　修回日期: 2020-01-24
基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0400600)
作者简介: 王喜波(1975—),男,教授,博士,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: wangxibo@neau.edu.cn

藏或冷冻来保证品质[3]或延长保质期,但乳液体系经过冷冻后,经常会出现脂肪聚结、冰晶析出、奥氏熟化等不稳定的现象,严重破坏了乳液的结构,使食品品质发生劣变[4]。大豆分离蛋白常用作乳化剂以维持乳液食品体系的稳定。天然大豆蛋白结构较为致密,在食品体系中乳化功能较差,必须对其进行适度改性才能满足食品工业的要求。

美拉德反应是一种公认的蛋白质改性方法。糖的加入会改变蛋白的空间结构,使其柔性和疏水性增大,而复合物能迅速吸附至油水界面形成立体网络,增加界面膜的厚度,抵抗外界环境造成的干扰[5]。辐照作为一种新兴的冷处理方法,能够最大程度保证食物的原有风味,同时还具有低能耗、低成本等优点[6]。2003 年国际食品法典委员会规定,在保证食品结构的完整性、功能性和安全性的情况下,辐照剂量可大于 10 kGy,这给辐照技术应用于食品行业提供了保障[7]。研究表明,辐照通过改变蛋白分子的结构进而改变蛋白质的功能特性。辐照后蛋白质的结构改变导致性质发生变化,增加辐射剂量,大豆分离蛋白乳化性提高[8],α-螺旋含量下降,荧光光谱出现蓝移[9]。经伽马射线辐照后,红豆分离蛋白蛋白质分子结构展开、疏水基团暴露,各种功能性质均有所改善,但辐照剂量进一步增加时,红豆蛋白分子发生聚集,部分功能特性下降[10]。

目前,利用辐照技术辅助糖基化改性大豆蛋白的研究鲜有报道。本文利用 γ 射线辐照处理大豆分离蛋白与麦芽糖混合物,使其发生美拉德反应,进而改善大豆蛋白质乳液体系的冻融稳定性,旨在建立 Box - Behnken 模型、优化出抗冻融大豆分离蛋白,以扩大大豆蛋白在食品中的应用范围。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

低温脱脂豆粕,山东禹王实业有限公司;麦芽糖,湖北信康药化有限公司;九三大豆油,黑龙江九三油脂有限责任公司;其他试剂均为分析纯。

FJ300S 型数显高速分散均质机,上海隆拓仪器设备有限公司; 高压均质机,常州市超力均质泵厂; 高速冷冻离心机,广州吉迪仪器有限公司; 紫外可见分光光度计,菲勒仪器有限公司; 恒温磁力搅拌器,天津合普公司;MS104TS 型分析天平,上海花潮实业有限公司;数显型恒温水浴锅,江苏盛蓝仪器制造有限公司;YS - 100YS - 100 型生物显微镜,上海蔡康光学仪器有限公司;FTIR - 1500 型傅里叶变换红外光谱仪,天津港东科技股份有限公司;扫描电子显微镜,德国卡尔蔡司公司;FD 系列冷冻干燥机,上海豫明仪器设备厂。

1.2 试验方法与指标测定

1.2.1 大豆分离蛋白制备

根据文献[11]所述方法,略有改进。将经 60 目筛磨碎的低温脱脂豆粉与去离子水按料液比 10 g/mL 混匀 2 h 后调 pH 值至 8.5,除去离心后的不溶物,用 HCl 调 pH 值至 4.5,静置 2 h 后离心得沉淀。洗涤 3 次后用 NaOH 调 pH 值至 7.0,冷冻干燥后得大豆分离蛋白。

1.2.2 辐照糖基化大豆分离蛋白制备

将大豆分离蛋白(SPI)与麦芽糖(M)以一定质量比(3、4、5)溶解于磷酸盐缓冲溶液(0.01 mol/L、pH 值 7.0)中,充分混匀配制一定质量浓度(30、40、50 mg/mL)的溶液。静置 12 h 使其完全水化。取样品溶液置于^{60}Coγ 辐射源下进行辐照反应(辐照剂量为 5、7.5、10 kGy)。将辐照后样品冷冻干燥即得辐照 SPI - M(辐照糖基化大豆分离蛋白)。

1.2.3 接枝度

根据文献[12]所述方法,略有改进。将 40 mg 邻苯二甲醛溶于 1 mL 甲醇、25 mL 的 0.1 mol/L 四硼酸钠后,分别加入 2.5 mL 质量分数为 20% 的 SDS(十二烷基硫酸钠)和 100 μL β-巯基乙醇,混匀后用超纯水定容至 50 mL 即为 OPA 试剂,OPA 试剂现配现用。将 4 mL OPA 试剂与 200 μL 样品溶液混合放入 35℃水浴锅中反应 2 min 后于 340 nm 处测吸光度,以去离子水作空白。接枝度计算公式为

$$D_G = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\% \tag{1}$$

式中 A_1——接枝反应前溶液吸光度

A_2——接枝反应后溶液吸光度

1.2.4 傅里叶红外光谱

根据文献[13]所述方法,略有改进。将样品粉末压制成薄片放于样品台的金刚石 ATR(衰减全反射)附件上,调分辨率为 4 cm^{-1},扫描次数 8 次,测量范围为 4 000 ~ 400 cm^{-1}。

1.2.5 乳化性

根据文献[14]所述方法,略有改进。取 30 mL 2 mg/mL 样品溶液与 10 mL 大豆油以转速 11 000 r/min 均质 1 min 后,分别于 0 min 和 10 min 在底部取 100 μL 分散在 10 mL 的 SDS 中,于 500 nm 测吸光度。乳化活性指数和乳化稳定性指数计算公式为

$$E_{AI} = 2T\frac{A_0 N}{1\,000\varphi LC} \tag{2}$$

式中 A_0——0 min 时的吸光度

T——常数,取 2.303

N——稀释倍数，取 100

φ——体系中油相所占的体积分数，取 25%

C——蛋白质的质量浓度，g/mL

L——比色池光径，cm

$$E_{SI}=\frac{A_0\Delta T}{A_0-A_{10}} \tag{3}$$

式中　A_{10}——10 min 时的吸光度

ΔT——时间差，取 10 min

1.2.6　乳析指数

取 90 mL 样品溶液与 10 mL 大豆油以转速 11 000 r/min 均质 3 min 后再 60 MPa 高压均质形成微乳液。将乳液于 -22℃ 冰箱中冷冻 22 h 后在水浴锅中解冻，进行 3 次冻融循环[15-16]。乳析指数计算公式为

$$C_I=\frac{H_S}{H_T}\times 100\% \tag{4}$$

式中　H_S——乳清层高度，cm

H_T——乳液总高度，cm

1.2.7　出油率

根据文献[17]所述方法，略有改进。将 8 g 样品乳液和 2 g 苏丹Ⅲ油溶液充分混合以 10 000 r/min 离心 20 min 后取上清液于 508 nm 测定吸光度，大豆油为空白。出油率计算公式为

$$\phi=\frac{m_0(a-1)}{m_e\varphi_d}\times 100\% \tag{5}$$

式中　m_0——苏丹Ⅲ油溶液的质量，g

m_e——乳液的质量，g

a——离心前后苏丹Ⅲ油溶液吸光度比值

φ_d——乳液中油相质量分数，取 20%

1.2.8　扫描电镜观察分析

取一定量冻干后的样品，采用导电胶贴于载物台上，并使用离子溅射仪镀金。之后在 S-3500N 型扫描电子显微镜放大 3 000 倍下观察样品的微观形貌，加速电压为 5 kV。

1.2.9　光学显微镜观察分析

根据文献[18-19]所述方法，略有改进。将冻融后的样品乳液摇匀后取 8 μL 置于载玻片中，盖上盖玻片后置于显微镜的观察区，调整倍数为 400 倍来观察样品乳液微观状态。

1.2.10　辐照 SPI-M 制备工艺优化

根据单因素试验的结果[20]，接枝度与第 1 次冻融后的乳析指数 Pearson 相关系数为 -0.915，呈显著负相关，以其为响应值，以 SPI 与 M 质量比、SPI 质量浓度和辐照剂量为变量，设计 Box-Behnken 试验方案，优化高冻融稳定性大豆蛋白制备工艺，因素编码见表 1。

表 1　Box-Behnken 试验因素与编码

Tab. 1　Box-Behnken experimental factors and codes

编码	因素		
	SPI 与 M 质量比	SPI 质量浓度/(mg·mL^{-1})	辐照剂量/kGy
-1	3	30	5.0
0	4	40	7.5
1	5	50	10.0

1.3　数据统计分析

所有试验均重复 3 次，采用 SPSS 19.0 软件进行试验数据分析。采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面分析，采用 PeakFit 4.12 软件对红外光谱进行拟合计算，采用 OriginPro 8 软件绘图。

2　结果与分析

2.1　响应面试验结果与分析

2.1.1　试验结果

在前期单因素试验基础上[20]，对 SPI 与 M 质量比、SPI 质量浓度和辐照剂量 3 个因素进行优化，以接枝度和第 1 次冻融后的乳析指数为响应值设计三因素三水平的响应分析试验，共 17 个试验点，其中 12 个为析因点，5 个为零点，析因点为自变量取值在 X_1、X_2、X_3（SPI 与 M 质量比、SPI 质量浓度、辐照剂量的编码值）所构成的三维顶点，零点为区域的中心点，其中零点试验重复 5 次，以估计试验误差。结果如表 2 所示。

表 2　Box-Behnken 试验结果

Tab. 2　Experimental results of Box-Behnken experiment

试验序号	X_1	X_2	X_3	接枝度/%	乳析指数/%
1	0	0	0	34.50	27.10
2	1	1	0	28.85	32.63
3	-1	0	1	25.45	34.60
4	1	0	1	25.94	34.09
5	0	-1	-1	25.71	34.87
6	0	0	0	34.56	27.19
7	0	1	1	24.29	36.40
8	0	1	-1	26.29	34.23
9	0	0	0	34.47	27.22
10	-1	-1	0	29.21	31.73
11	-1	0	-1	25.63	34.40
12	0	0	0	34.59	27.29
13	1	0	-1	26.57	34.01
14	1	-1	0	29.05	32.38
15	0	0	0	34.49	27.22
16	0	-1	1	26.97	33.05
17	-1	1	0	27.20	34.20

2.1.2　模型建立及显著性检验

采用 Design-Expert 8.0.6 软件对试验数据进行

回归拟合,得到响应值对 SPI 与 M 质量比、SPI 质量浓度和辐照剂量 3 个因素的回归方程为

$$D_G = 34.52 + 0.37X_1 - 0.54X_2 - 0.19X_3 + 0.45X_1X_2 - 0.11X_1X_3 - 0.81X_2X_3 - 2.93X_1^2 - 3.01X_2^2 - 5.69X_3^2$$

$$C_I = 27.20 - 0.23X_1 + 0.68X_2 + 0.079X_3 - 0.56X_1X_2 - 0.030X_1X_3 + 1.00X_2X_3 + 2.58X_1^2 + 2.95X_2^2 + 4.49X_3^2$$

对该回归方程进行方差分析,结果见表 3。由表 3 知,接枝度中一次项 X_1、X_2、X_3的影响均达到极显著水平,二次项中的 X_1^2、X_2^2、X_3^2 和交互项中的 X_1X_2、X_1X_3、X_2X_3也对接枝度有极显著($P<0.01$)的影响。第 1 次冻融后的乳析指数模型方程中的一次项 X_1、X_2、X_3,二次项 X_1^2、X_2^2、X_3^2 和交互项 X_1X_2、X_2X_3 也表现为极显著($P<0.01$)。接枝度和第 1 次冻融后的乳析指数回归方程模型失拟项不显著,分别为 0.802 8、0.984 3,均大于 0.05,说明该回归方程的拟合度较好,能够真实地表现 SPI 与 M 质量比、SPI 质量浓度和辐照剂量与冻融特性之间的关系。2 个模型的决定系数 R^2 均大于 0.95,表明该模型能够合理解释 95% 以上拟合数据。图 1 为预测值和实际值的对照图,图中各个点的回归性较好,预测值与实际值几乎重合,所以该模型设计真实可靠,可以利用此模型对辐照条件下美拉德反应提高大豆蛋白冻融特性进行分析和预测。

表 3 Box-Behnken 试验方差分析

Tab. 3 Variance and significant analysis of Box-Behnken design test

方差来源	接枝度			乳析指数		
	F	P	显著性	F	P	显著性
模型	14 486.76	<0.000 1	**	6 944.17	<0.000 1	**
X_1	580.37	<0.000 1	**	147.91	<0.000 1	**
X_2	1 264.42	<0.000 1	**	1 316.63	<0.000 1	**
X_3	163.53	<0.000 1	**	17.72	0.004 0	**
X_1X_2	445.99	<0.000 1	**	440.15	<0.000 1	**
X_1X_3	27.57	0.001 2	**	1.29	0.294 1	
X_2X_3	1 446.78	<0.000 1	**	1 421.80	<0.000 1	**
X_1^2	19 696.72	<0.000 1	**	10 045.19	<0.000 1	**
X_2^2	20 821.15	<0.000 1	**	13 060.98	<0.000 1	**
X_3^2	74 322.62	<0.000 1	**	30 279.79	<0.000 1	**
失拟项	0.33	0.802 8		0.048	0.984 3	
R^2	0.999 9			0.999 9		
R^2(Adj)	0.999 9			0.999 7		

注:R^2(Adj)为模型的调整决定系数;**表示影响极显著($P<0.01$)。

2.1.3 响应面分析与优化

为了更合理表现各因素交互作用对大豆分离蛋白冻融特性的影响,对各因素与响应面值构成的三维空间响应面图进行分析。由图 2 知,当 SPI 与 M 质量比、SPI 质量浓度和辐照剂量中的 1 个因素固定在 0 水平时,另外 2 个因素都对接枝度和乳析指数有交互影响。由图 2a 知,当辐照剂量一定时,随着 SPI 质量浓度的增加,辐照 SPI-M 的接枝度先上升后下降,可能是因为蛋白分子含量的增加,加大了与麦芽糖分子的碰撞几率,接枝程度增加,但蛋白含量过大导致反应体系黏度过大不利于发生美拉德反应[21]。当辐照剂量一定时,糖比例降低时,糖分子移动空间大,能迅速与蛋白分子发生接枝反应,接枝度增加,但糖进一步降低,不足以与蛋白质充分发生反应,接枝度下降[22]。同样,当 SPI 与 M 质量比和 SPI 质量浓度一定时,随着辐照剂量的增加,辐照 SPI-M 的接枝度依然呈现先上升后下降的趋势,可能是因为辐照处理打开了蛋白分子的结构,增加了与糖的结合机率[23]。接枝度和乳析指数呈负相关,接枝度越大乳析指数越小[24]。由图 2b 知,乳析指数随 SPI 质量浓度和辐照剂量的增加呈现先下降后上升的趋势,当 SPI 与 M 质量比减小的时候,也表现出了同样的变化。可能是辐照处理改变了蛋白质分子的结构,随着糖链的引入,增加了界面膜的机械强度,阻止了尖锐的冰晶对界面膜破坏,改善了冻融特性[25-26]。通过 Design-Expert 8.0.6 软件分析,预测在稳定状态下的最佳工艺条件为 SPI 与 M 质量比 4.04、SPI 质量浓度 39.01 mg/mL、辐照剂量 7.49 kGy。考虑到试验条件的可操作性,将优化的最佳条件修改为:SPI 与 M 质量比 4、SPI 质量浓度 40 mg/mL、辐照剂量 7.5 kGy。在此条件下进行 3

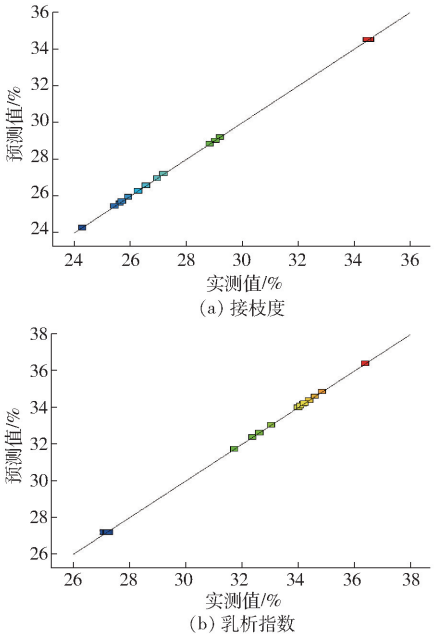


图 1 预测值和实测值的对照图

Fig. 1 Comparison of predicted and observed values

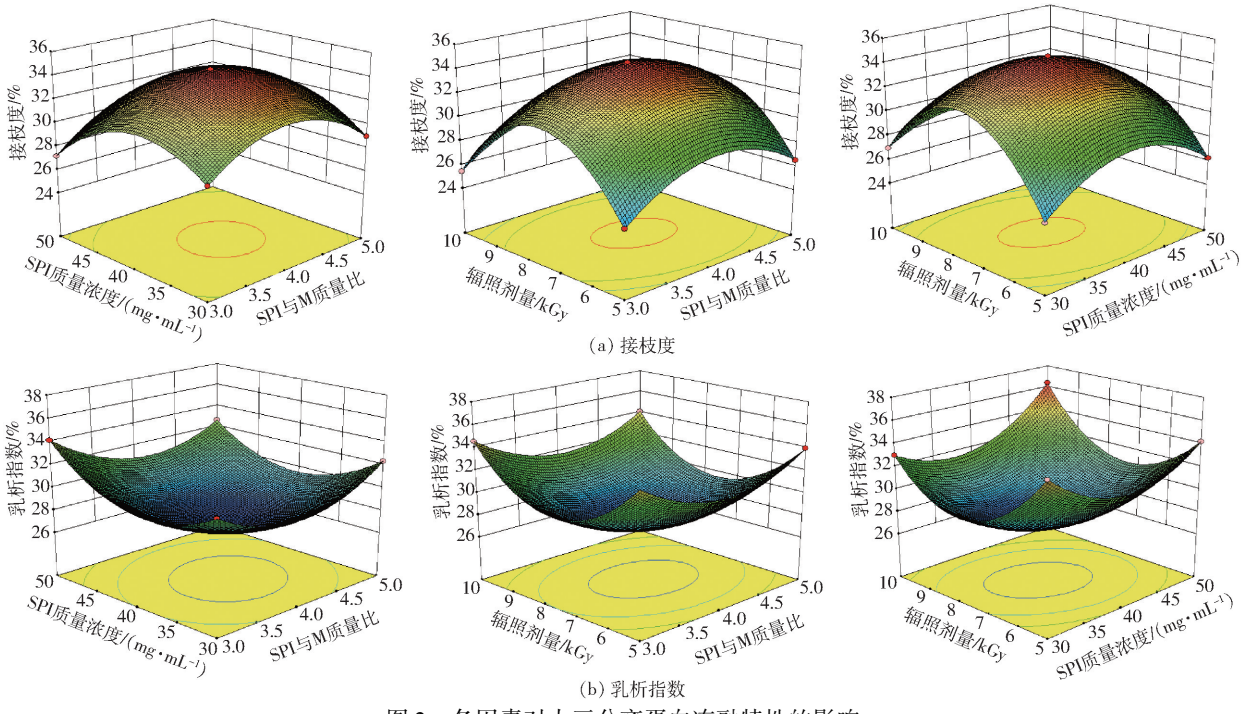


图 2　各因素对大豆分离蛋白冻融特性的影响

Fig. 2　Effect of various factors on freeze-thaw properties of soy protein isolate

次验证性试验，接枝度平均值为 34.56% 和第 1 次冻融后的乳析指数平均值为 27.18%，模型预测值接枝度为 34.55% 和第 1 次冻融后的乳析指数为 27.16%，证明本模型优化工艺参数可靠，具有实用价值。

2.2　不同样品冻融特性分析

在冷冻和解冻处理之后，由于油相和水相之间的密度差异，乳剂显示出乳化或沉降现象，乳液中的不稳定性主要归因于冷冻过程中冰晶形成的不稳定效应[3]。本试验设定了 SPI 和 SPI + M（无辐照）2 个对照组，分析进行 3 次冻融循环后样品的冻融特性。由表 4 可知，经过冻融循环后，样品乳液的乳析指数显著增加，尤其是 SPI。单纯添加麦芽糖的 SPI + M 对比 SPI 冻融特性虽有改善，但效果不明显。而辐照SPI－M 在经历冻融循环后，乳析指数相对稳定，表现出较好的冻融特性。对比 SPI，乳析指数分别降低了 22.98、28.40、30.70 个百分点。可能是因为辐照打开了蛋白分子的结构，释放了更多的游离氨基，增加了与糖分子的碰撞机会，引入的糖链在界面膜附近形成立体网络，增加了界面膜的厚度，抵抗形成的冰晶对界面膜的破坏，防止液滴间的聚集，其冻融稳定性显著提高[23,27]。文献[28]的研究表明，多糖可以吸附到蛋白质层形成较厚的界面膜，增加乳液的稳定性。

表 4　SPI、SPI + M 及辐照 SPI－M 乳析指数分析

Tab. 4　SPI, SPI + M and irradiated SPI－M creaming index analysis　%

蛋白样品	冻融 1 次	冻融 2 次	冻融 3 次
SPI	(50.16 ± 0.984)^{b}	(60.50 ± 0.851)^{b}	(64.50 ± 0.561)^{c}
SPI + M	(49.44 ± 0.365)^{b}	(59.36 ± 0.296)^{b}	(62.90 ± 0.621)^{b}
辐照 SPI－M	(27.18 ± 0.314)^{a}	(32.10 ± 0.120)^{a}	(33.80 ± 0.728)^{a}

注：每列不同字母代表有显著性差异（$P < 0.05$），相同字母代表无显著差异，下同。

表 5 为 SPI、SPI + M 及辐照 SPI－M 的乳化性和经历冻融后的出油率变化。由表 5 可知，辐照 SPI－M 乳化活性和乳化稳定性比 SPI 和 SPI + M 要好，而 SPI 和 SPI + M 乳化性相差不大，说明单纯的添加糖并不会对乳化性有所改变。文献[29]也表明蛋白质–糖缀合物的乳化性能优于蛋白质和糖的混合物。辐照 SPI－M 的乳化活性指数和乳化稳定性指数对

表 5　SPI、SPI + M 及辐照 SPI－M 乳化性和出油率分析

Tab. 5　Analysis of emulsification and oiling off of SPI, SPI + M and irradiated SPI－M

蛋白样品	乳化活性指数/($m^2 \cdot g^{-1}$)	乳化稳定性指数/min	出油率/%		
			冻融 1 次	冻融 2 次	冻融 3 次
SPI	(53.10 ± 0.670)^{a}	(21.60 ± 0.982)^{a}	(12.0 ± 0.330)^{c}	(26.0 ± 0.261)^{c}	(34.0 ± 0.451)^{c}
SPI + M	(53.90 ± 0.570)^{a}	(22.01 ± 0.872)^{a}	(9.8 ± 0.211)^{b}	(23.6 ± 0.612)^{b}	(32.1 ± 0.221)^{b}
辐照 SPI－M	(62.36 ± 0.321)^{b}	(25.36 ± 0.651)^{b}	(2.3 ± 0.343)^{a}	(4.8 ± 0.120)^{a}	(7.6 ± 0.240)^{a}

比 SPI 分别提高了 9.26 m^2/g 和 3.76 min。可能是因为辐照处理引入糖链,溶解性增加,进而提高了乳化性[22]。出油率是表征冻融特性的重要指标之一,出油率越低,乳液越稳定[30]。可从表 5 明显看出,历经冻融循环后,SPI 和 SPI + M 出油率急剧增加,SPI + M 比 SPI 虽有降低,但总体改善不大。辐照 SPI - M 具有较低出油率,与 SPI 相比,出油率分别降低了 9.7、21.2、26.4 个百分点。可能是因为乳化性增加,减少了油滴的碰撞,稳定了乳液[31]。

2.3 红外光谱分析

红外光谱是分析糖是否与蛋白质共价相连的重要手段之一,光谱图吸收峰的变化与样品各基团的改变相对应。红外光谱图上—OH 基团在 3 700 ~ 3 200 cm^{-1}处出现较宽的伸缩振动峰,C—N 键在 1 260 ~ 1 000 cm^{-1}处出现较强的振动[32-33]。由图 3 可知,与 SPI 对比,辐照 SPI - M 在 1 260 ~ 1 000 cm^{-1}范围内出现了较强的振动,新吸收峰出现,说明 C—N 键的数量增加,新生成了 C—N 基团,证明大豆分离蛋白与麦芽糖是以共价键的方式结合[34]。文献[35]通过超声波和微波辅助糖基化制备大豆分离蛋白-葡聚糖缀合物,傅里叶变换红外分析证明大豆分离蛋白和葡聚糖通过美拉德反应形成了共价键。与 SPI 对比,辐照 SPI - M 在 3 700 ~ 3 200 cm^{-1}处出现了较宽的吸收峰,是由—OH 的伸缩振动引起的,表明大豆分离蛋白与麦芽糖发生美拉德反应后,糖分子的接入使辐照 SPI - M 的亲水性羟基数量增加。SPI + M 混合物的红外光谱中并未在 3 700 ~ 3 200 cm^{-1}处出现较宽的吸收峰,表明单纯的混合糖后,SPI 结构并未产生新的基团。

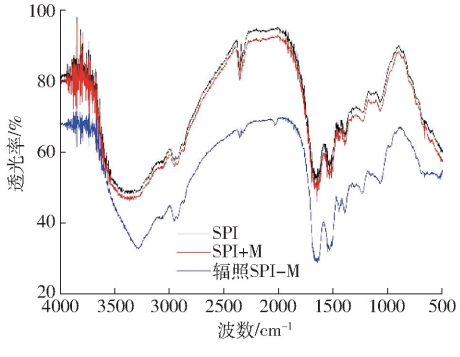
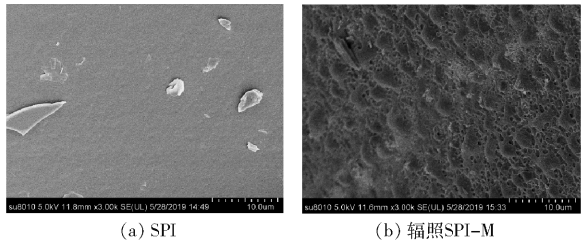


图 3 SPI、SPI + M 及辐照 SPI - M 红外光谱图

Fig. 3 SPI, SPI + M and irradiated SPI - M

2.4 扫描电镜分析

蛋白质的微观结构变化影响其功能性质,扫描电镜图像可以提供样品精细的表面形貌。图 4 为冻干后未经处理的 SPI 和辐照 SPI - M 的放大 3 000 倍的微观结构图。从图中可见辐照处理前后大豆分离蛋白的微观结构具有明显的区别。大豆分离蛋白在未处理之前表面平滑,而辐照 SPI - M 表现为出现细小空隙的凹洞,呈蜂窝状,形成疏松孔洞,呈现出良好的持水性。文献[36]也支持本文假设,即均匀的网状空间结构有利于吸水能力的提高。文献[37]表明大豆分离蛋白与葡聚糖紧密结合,得出了与本文相似的结果。



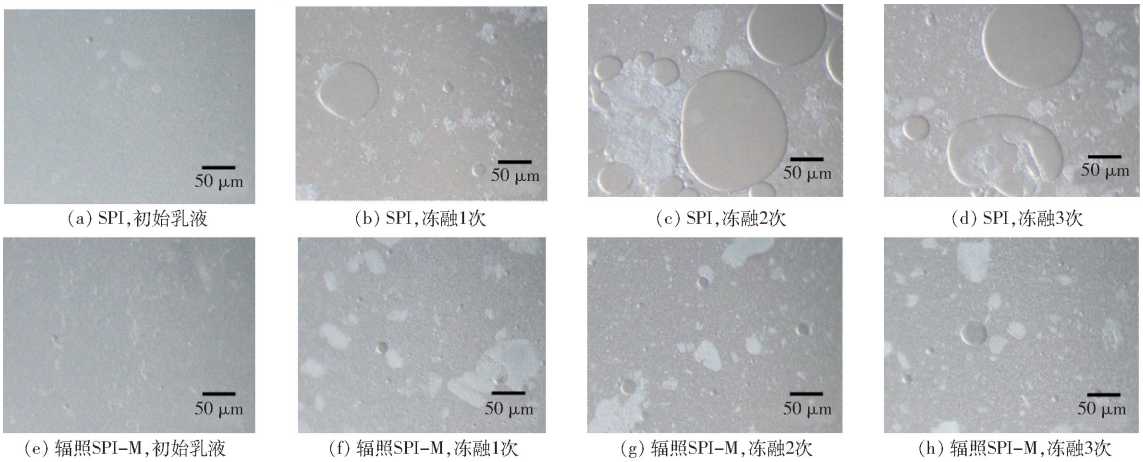
(a) SPI (b) 辐照SPI-M

图 4 SPI 及辐照 SPI - M 微观结构

Fig. 4 SPI and irradiation SPI - M microstructure

2.5 光学显微镜分析

图 5 为 SPI 及辐照 SPI - M 乳液冻融前后的光学显微结构,由图 5 可知,SPI 和辐照 SPI - M 初始乳液并没有出现明显区别,但经过冷冻处理后,可明显看出 SPI 出现许多较大油滴和团块,可能是因为



(a) SPI,初始乳液 (b) SPI,冻融1次 (c) SPI,冻融2次 (d) SPI,冻融3次

(e) 辐照SPI-M,初始乳液 (f) 辐照SPI-M,冻融1次 (g) 辐照SPI-M,冻融2次 (h) 辐照SPI-M,冻融3次

图 5 SPI 及辐照 SPI - M 乳液冻融前后的光学显微结构

Fig. 5 Optical microstructures of SPI and irradiated SPI - M emulsion before and after freeze-thaw

冷冻后，乳液中水分遇低温体积变大，形成尖锐的冰晶刺破界面膜，油滴渗透聚集形成大油滴[38]。而辐照 SPI－M 只出现部分小油滴，乳液性质稳定。文献[35，39]的研究结果也表明糖基化改性产物在冻融后表现出相对稳定的状态。

3　结束语

利用 Design-Expert 8.0.6 软件设计建立 Box－Behnken 模型，对辐照场下糖基化改性制备高冻融稳定性大豆蛋白工艺进行了优化，得出最佳制备条件为：SPI 与 M 质量比 4、SPI 质量浓度 40 mg/mL、辐照剂量 7.5 kGy。在此条件下得到的改性 SPI 与对照 SPI 相比，乳析指数分别降低了 22.98、28.40、30.70 个百分点，出油率分别降低了 9.7、21.2、26.4 个百分点。乳化活性指数和乳化稳定性指数对比 SPI 分别提高了 9.26 m^2/g 和 3.76 min。说明该模型合理、可靠，能够改善大豆分离蛋白的冻融性。红外光谱表明，大豆分离蛋白与麦芽糖发生美拉德反应。扫面电镜表明，辐照 SPI－M 呈蜂窝状，具有良好的持水性。光学显微镜分析表明，在冷冻和解冻处理之后，辐照 SPI－M 乳液更稳定。说明采用辐照处理能使大豆分离蛋白与麦芽糖发生美拉德反应，并改善大豆分离蛋白冻融特性。

参　考　文　献

[1] CHUA J Y, LIU S Q. Soy whey: more than just wastewater from tofu and soy protein isolate industry [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 91:24－32.

[2] NISHINARI K, FANG Y, GUO S, et al. Soy proteins: a review on composition, aggregation and emulsification [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39(2):301－318.

[3] PALAZOLO G G, SOBRAL P A, WAGNER J R. Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and thermally-denatured soybean isolates [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(3):398－409.

[4] MAGNUSSON E, ROSEN C, NILSSON L. Freeze-thaw stability of mayonnaise type oil-in-water emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(4):707－715.

[5] DIFTIS N G, BILIADERIS C G, KIOSSEOGLOU V D. Rheological properties and stability of model salad dressing emulsions prepared with a dry-heated soybean protein isolate-dextran mixture [J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(6):1025－1031.

[6] 邹朝晖，邓钢桥. 食品辐照技术与食品质量安全 [J]. 湖南农业科学，2006(6):70－72.
ZOU Zhaohui, DENG Gangqiao. Food irradiation technology and its application in improving food quality & safety [J]. Hunan Agricultural Science, 2006(6):70－72. (in Chinese)

[7] JOZSEF F, CSILLA M. History and future of food irradiation [J]. Trends in Food Science & Technology, 2011, 22(2－3):121－126.

[8] 莫耽，黄行健，段雅庆，等. 辐照对大豆分离蛋白功能特性影响[J]. 食品科学，2011，32(1):52－55.
MO Dan, HUANG Xingjian, DUAN Yaqing, et al. Effect of irradiation on functional properties of soybean protein isolate [J]. Food Science, 2011, 32(1):52－55. (in Chinese)

[9] 王玮，朱旭东，梁丽姣，等. ^{60}Co-γ 辐照对猪血清白蛋白免疫原性及构象的影响 [J]. 南京农业大学学报，2018，41(3):542－546.
WANG Wei, ZHU Xudong, LIANG Lijiao, et al. Effects of ^{60}Co-γ irradiation on immunogenicity and conformation of porcine serum albumin [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(3):542－546. (in Chinese)

[10] 李杨，王晶，陈勇，等. 伽马射线辐照对红豆分离蛋白功能性质的影响 [J]. 食品工业科技，2014，35(21):82－85.
LI Yang, WANG Jing, CHEN Yong, et al. Effect of different irradiation dose on functional properties of red bean protein isolates [J]. Food Industry Technology, 2014, 35(21):82－85. (in Chinese)

[11] SORGENTINI D A, WAGNER J R, ANON M C. Effects of thermal treatment of soy protein isolate on the characteristics and structure-function relationship of soluble and insoluble fractions [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1995, 43(9):2471－2479.

[12] VIGO M S, MALEC L S, GOMEZ R G, et al. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of reactive lysine in dairy products [J]. Food Chemistry, 1992, 44(5):363－365.

[13] DU Y L, HUANG G Q, WANG H O, et al. Effect of high coacervation temperature on the physicochemical properties of resultant microcapsules through induction of Maillard reaction between soybean protein and chitosan [J]. Journal of Food Engineering, 2018, 234:91－97.

[14] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidretric technique [J]. Journal of Agricultural and Food Charistry, 1978, 26(3):716－723.

[15] ZANG X D, YVE C H, LIU M J, et al. Improvement of freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with modified soy protein isolates[J]. LWT—Food Science and Technology, 2019, 102:122－130.

[16] SURH J, DECKER E A, MCCLEMENTS D J. Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-caseinate stabilized oil-in-water emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20(5):607－618.

[17] PALANUWECH J, PONITENI R, ROBERTS R F, et al. A method to determine free fat in emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17(1):55 - 62.
[18] MUN S, DECKER E A, MCCLEMENTS D J. Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan membranes [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2006, 296(2): 581 - 590.
[19] ARIYAPRAKAI S, TANANUWONG K. Freeze-thaw stability of edible oil-in-water emulsions stabilized by sucrose esters and Tweens [J]. Journal of Food Engineering, 2015, 152:57 - 64.
[20] 王玉莹, 张安琪, 王琳, 等. 辐照辅助接枝反应提高大豆蛋白乳液冻融性质 [J]. 食品科学, 2020, 41(11):135 - 140.
WANG Yuying, ZHANG Anqi, WANG Lin, et al. Improving freeze-thaw properties of soybean protein emulsion by irradiation-assisted grafting reaction [J]. Food Science, 2020, 41(11):135 - 140. (in Chinese)
[21] GHARIBZAHEDI S M T, ROSTAMI H, YOUSEFI S. Impact of whey protein-beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β-carotene emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 28(2):258 - 266.
[22] LAURA J C, MAR V, ROSINA L F. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass [J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(3):433 - 443.
[23] KUANY H, BHATR, KARIMA A. Emulsifying and foaming properties of ultraviolet-irradiated egg white protein and sodium caseinate [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(8):4111 - 4118.
[24] 张泽宇, 于洁, 徐晔晔, 等. 超声协同接枝反应改性大豆蛋白及其冻融稳定性 [J]. 中国食品学报, 2018, 18(5):127 - 134.
ZHANG Zeyu, YU Jie, XU Yeye, et al. Graft reaction and freeze-thaw stability of SPI modified by ultrasonic assisted glycosylation [J]. Chinese Journal of Food Science, 2018, 18(5):127 - 134. (in Chinese)
[25] MU M F, PAN X Y, YAO P, et al. Acidic solution properties of β-casein-graft-dextran copolymer prepared through Maillard reaction [J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2006, 301(1):98 - 106.
[26] PONGSAWATMANIT R, HARNSILAWAT T, MCCLEMENTS D J. Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by β-lactoglobulin [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2006, 287(1):59 - 67.
[27] 邓塔, 李军生, 阎柳娟, 等. 大豆蛋白乳化性的研究 [J]. 食品工业科技, 2013, 34(2):90 - 93.
DENG Ta, LI Junsheng, YAN Liujuan, et al. Study on emulsifying properties of isolated soy protein [J]. Food Industry Technology, 2013, 34(2):90 - 93. (in Chinese)
[28] ROPERS M H, NOVALES B, BOUÉ F, et al. Polysaccharide/surfactant complexes at the air-water interface-effect of the charge density on interfacial and foaming behaviors [J]. Langmuir, 2008, 24(22):12849 - 12857.
[29] SHEPHERD R, ROBERTSON A, OFAMN D. Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein-maltodextrins [J]. Food Hydrocolloids, 2000, 14(4):281 - 286.
[30] SEGALL K I, GOFF H D. A modified ice cream processing routine that promotes fat destabilization in the absence of added emulsifier [J]. International Dairy Journal, 2002, 12(12):1013 - 1018.
[31] SONG H P, KIM B, CHOE J H, et al. Improvement of foaming ability of egg white product by irradiation and its application [J]. Radiation Physics and Chemistry, 2009, 78(3):217 - 221.
[32] TURNER J A, SIVASUNDARAM L R, OTTENHOF M A, et al. Monitoring chemical and physical changes during thermal flavor generation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(19):5406 - 5411.
[33] OLIVER C M, KHER A, MCNAUGHTON D, et al. Use of FTIR and mass spectrometry for characterization of glycated caseins [J]. Journal of Dairy Research, 2009, 76(1):105 - 110.
[34] GU F L, KIM J M, ABBAS S. Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein-glucose [J]. Food Chemistry, 2010, 120(2):505 - 511.
[35] ZHANG Z, WANG X, YU J, et al. Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions stabilized by soy protein isolate-dextran conjugates [J]. LWT—Food Science and Technology, 2017, 78:241 - 249.
[36] MARIA C P, MARIA C A. Structural properties of heat-induced soy protein gels as affected by ionic strength and Ph [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(9):3583 - 3589.
[37] BOOSTANI S, AMINLARI M, MOOSAVI-NASAB M, et al. Fabrication and characterisation of soy protein isolate-grafted dextran biopolymer: a novel ingredient in spray-dried soy beverage formulation [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 102:297 - 307.
[38] AOKI T, DECKER E A, MCCLEMENTS D J. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique [J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(2):209 - 220.
[39] YU J, WANG G, WANG X, 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.