

大豆分离蛋白-葡聚糖非共价聚合物结构及功能性研究

朱秀清¹ 杜晓倩¹ 胡 淼¹ 刘冠男¹ 齐宝坤¹ 李 杨^{1,2}

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省绿色食品科学研究院, 哈尔滨 150023)

摘要: 为揭示混合体系中大豆分离蛋白(SPI)和葡聚糖(Dex)之间的相互作用以及Dex质量分数(1%、3%、5%和7%)对SPI结构和功能性质的影响,采用荧光光谱、紫外可见光谱、傅里叶变换红外光谱等表征SPI-Dex非共价聚合物构象变化,并通过粒径、表面疏水性、浊度、溶解性、乳化活性、乳化稳定性以及抗氧化性解析Dex质量分数对SPI功能性质的影响。结果表明:SPI和Dex在中性条件下可以通过疏水相互作用和氢键两种非共价力相互作用,进而改变SPI的结构和功能性质。与单独SPI相比,Dex的添加可以防止色氨酸和酪氨酸残基的暴露,形成更加紧密的三级结构。当混合体系中Dex质量分数低于5%时,随着Dex的不断增加,SPI-Dex聚合物的粒径、表面疏水性、浊度明显降低,溶解性、乳化性、抗氧化性显著提高,其中Dex质量分数为5%时效果最为显著,分别使SPI的溶解度增加了16.35%、乳化活性指数增加了18.71%、DPPH自由基清除率增加了11.30%。

关键词: 大豆分离蛋白; 葡聚糖; 结构; 功能性质

中图分类号: TS214.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2022)01-0398-08 **OSID:** 

Structure and Functional Properties of Soybean Protein Isolate – Dextran Non-covalent Polymer

ZHU Xiuqing¹ DU Xiaoqian¹ HU Miao¹ LIU Guannan¹ QI Baokun¹ LI Yang^{1,2}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2. Heilongjiang Institute of Green Food Science, Harbin 150023, China)

Abstract: With the aim to reveal the interaction between soybean protein isolates (SPI) and dextran (Dex) in the mixed system and the effect of dextran concentration (1%, 3%, 5% and 7%) on the structure and functional properties of SPI, fluorescence spectrum, ultraviolet spectrum and Fourier transform infrared spectrum were used to characterize the conformational changes of the SPI – Dex non-covalent polymer, and the effect of dextran concentration on the functional properties of SPI was analyzed through particle size, surface hydrophobicity, turbidity, solubility, emulsification activity, emulsification stability and antioxidant activity. The results showed that SPI and Dex can interact through two non-covalent forces: hydrophobic interaction and hydrogen bond under neutral conditions, thereby changed the structure and functional properties of SPI. The addition of Dex can prevent the exposure of tryptophan and tyrosine residues, and form a tighter tertiary structure compared with SPI alone. When the addition of Dex in the mixed system was less than 5%, with the increase of Dex, the particle size, surface hydrophobicity, and turbidity of SPI – Dex polymer were decreased significantly, and the solubility, emulsification, and antioxidant activity of SPI – Dex polymer were improved significantly. When the concentration of Dex in the mixed system was 5%, the improvement effect on the functional properties of SPI was the most significant, the solubility, emulsifying activity index and antioxidant activity of SPI were increased by 16.35%, 18.71% and 11.30%, respectively.

Key words: soybean protein isolate; dextran; structure; functional properties

收稿日期: 2020-12-22 修回日期: 2021-02-18

基金项目: 黑龙江省自然科学基金杰出青年科学基金项目(LH2019C032)

作者简介: 朱秀清(1964—),女,教授,博士,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: 1197942226@qq.com

通信作者: 李杨(1981—),男,教授,博士,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: yangli@neau.edu.cn

0 引言

大豆分离蛋白(Soybean protein isolates, SPI),是一种具有高蛋白含量的优质植物蛋白,可直接提供人体所需氨基酸,与动物蛋白相比,价格低廉、原料丰富^[1],具有降低患心脏病和癌症等慢性疾病风险的独特优势^[2]。但是,天然 SPI 的溶解性、乳化性、抗氧化性等功能性质与动物蛋白相比仍存在较大差距,因此需采取适当方法对其进行改性以满足生产和加工需要。葡聚糖(Dextran, Dex)是一种非离子型表面活性剂,具有良好的水溶性、无毒性 and 生物相容性^[3],可作为增稠剂、乳化剂应用于食品领域。作为一种天然生物高分子化合物,葡聚糖可与蛋白质发生相互作用。

蛋白质和葡聚糖之间的相互作用可以改变复合体系中蛋白结构和理化性质。已有研究证明,中性条件下,SPI 和 Dex 可以通过美拉德反应形成 SPI-Dex 接枝物,显著提高 SPI 的溶解性、乳化活性和乳化稳定性^[4]。文献[5]利用干热糖基化对 SPI 进行改性,发现糖化后 SPI 的空间结构发生改变,且溶解性、乳化活性和乳化稳定性均明显提高。目前,关于 Dex 改性 SPI 的研究主要集中在美拉德共价复合体系,然而,美拉德反应的反应进程很难控制,且容易导致有害物质的产生。因此,SPI-Dex 非共价复合体系是一个好的研究方向,且混合体系中 SPI 和 Dex 之间的相互作用以及 Dex 添加量对 SPI 结构和功能性质的影响研究鲜有报道。

本文选择不同质量分数的 Dex(1%、3%、5%、7%)与 SPI 形成非共价聚合物,利用荧光光谱、紫外可见光谱、傅里叶红外光谱等技术表征 SPI-Dex 非共价聚合物的结构特征,同时分析聚合物的粒径、表面疏水性、浊度、溶解性、乳化性以及抗氧化性,以明确混合体系中 SPI 和 Dex 之间的相互作用以及 Dex 质量分数对 SPI 结构和功能性质的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆,东北农业大学大豆研究所,东农-42;葡聚糖 T10,上海源叶生物科技有限公司;1-苯胺基-8-萘磺酸盐(1-anilino-8-naphthalenesulfonate),美国 Sigma 公司;BCA 试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;盐酸、氢氧化钠、正己烷、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠,均为分析纯,北京新光化工试剂厂。

1.2 仪器与设备

AL204 型分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;JJ-1 型增力电动搅拌器,江苏金城

国胜仪器厂;FJ200-SH 型数显高速分散均质机,上海标本模型厂;Allegra64R 型台式高速冷冻离心机,美国贝克曼公司;PHS-3C 型实验室 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;Mastersizer 2000 型粒度仪,英国马尔文仪器有限公司;RF-6000 型荧光分光光度计,日本 Hitachi 公司;UV-2600 型紫外-可见分光光度计、IRTracer-100 型傅里叶变换红外光谱仪,日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 SPI 制备

SPI 的制备根据文献[6]的方法并稍作修改。将脱脂大豆粉以液料比 10 mL/g 分散在去离子水中形成悬浮液并搅拌使其充分溶解。使用 2 mol/L NaOH 溶液将悬浮液的 pH 值调节至 8.0。室温(25℃)下搅拌 2 h 后,将悬浮液在 4℃ 下 9 000 g 离心 30 min,以去除不溶性物质。收集上清液,用 1 mol/L HCl 溶液将其 pH 值调节至 4.5,在室温下静置 1 h,以诱导 SPI 在等电点处沉淀。然后将其在 4℃ 下 6 500 g 离心 30 min,得到大豆蛋白沉淀物。沉淀物用去离子水水洗 3 次后,调节溶液 pH 值至 7.0,并在 4℃ 下 5 000 g 离心 5 min。最后收集上清液,于冰箱中储存 24 h 后进行冷冻干燥,即可得到 SPI 粉末。

1.3.2 SPI-Dex 聚合物制备

室温下,称取 2 g 的 SPI 分散于 100 mL 去离子水中,搅拌 2 h 后于冰箱中静置 12 h,确保 SPI 完全水化。将不同质量的葡聚糖粉末加入到 SPI 溶液中,磁力搅拌确保充分溶解,使得混合液中 SPI 质量分数为 2%,葡聚糖质量分数分别为 0.1%、3%、5% 和 7%。在冰箱中储存 24 h 后进行冷冻干燥,即可得到大豆分离蛋白-葡聚糖聚合物。

1.3.3 微观结构分析

使用 SU8010 型场发射扫描电子显微镜对 SPI/SPI-Dex 聚合物的表面形貌进行观察。将冷冻干燥后得到的 SPI/SPI-Dex 聚合物样品均匀平摊在贴有导电胶的样品台上,喷金处理,在加速电压 5 kV 下观察样品。

1.3.4 内源荧光光谱分析

采用 RF-6000 型荧光分光光度计测定 SPI/SPI-Dex 聚合物(1 mg/mL)的内源荧光光谱。参数设置如下:激发波长 290 nm,扫描波长范围 300 ~ 500 nm,激发狭缝和发射狭缝均为 5 nm。

1.3.5 傅里叶红外光谱分析

称取冷冻干燥后得到的 SPI/SPI-Dex 聚合物 1 mg 与溴化钾 100 mg 进行研磨、混匀、压片,然后通过 IRTracer-100 型傅里叶变换红外光谱仪进行傅里叶变换红外光谱(FTIR)测定。参数设置如下:分

分辨率 4 cm⁻¹,扫描波长范围 400 ~ 4 000 cm⁻¹,扫描频率 64 次/s。

1.3.6 紫外可见光谱分析

采用 UV-2600 型紫外-可见分光光度计对样品进行紫外吸收光谱采集。参数设置如下:测定速度为中速,分辨率 0.5 nm,测定波长范围 200 ~ 400 nm。

1.3.7 SDS-PAGE

SPI/SPI-Dex 聚合物的 SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)分析参考文献[7],并稍作修改。分离胶和浓缩胶的质量分数分别为 12% 和 5%。将冻干后的 SPI/SPI-Dex 聚合物以 4 mg/mL 的质量浓度重新溶解在去离子水中制备样品溶液,然后将其与上样缓冲液混合均匀后煮沸 90 s,冷却至室温后进行上样处理。初始的电泳电压设置为 80 V,待样品进入分离胶后改为 120 V;电泳结束后,取出胶片加入考马斯亮蓝染液进行 30 min 的染色处理,然后再用脱色液进行脱色以便于后续分析。

1.3.8 粒径测定

利用 Mastersizer 2000 型粒度仪测定 SPI/SPI-Dex 聚合物的粒径分布。将冻干的 SPI/SPI-Dex 聚合物以 10 mg/mL 的质量浓度复溶在去离子水中,室温下搅拌 2 h 使其充分溶解,并在测量之前进行适当稀释。参数设置如下:测定温度 25℃,平衡时间 2 min,测定次数 3 次,相对折射率 1.095。

1.3.9 浊度测定

SPI/SPI-Dex 聚合物的浊度参考文献[8]的方法进行测定,并进行适当修改。用 UV-2600 型紫外-可见分光光度计记录其在 600 nm 处的吸光度,即为浊度。

1.3.10 表面疏水性测定

根据文献[9],采用 ANS(1-苯胺基-8-萘磺酸盐)荧光探针法进行表面疏水性的测定。用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 值 7.0)配制不同浓度的蛋白质溶液(质量浓度 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg/mL)和 8.0 mmol/L 的 ANS 溶液。取 20 μL ANS 溶液加到 4.0 mL 蛋白质溶液中,混合均匀,避光反应 15 min,迅速测定混合液的荧光强度,激发波长、发射波长分别是 390、470 nm,激发和发射狭缝宽均为 5 nm。以荧光强度对样品质量浓度制图,曲线的初始斜率即为蛋白质的表面疏水性指数 H_0 。

1.3.11 溶解性测定

溶解性的测定参考文献[10]的方法并作适当修改。标准曲线以牛血清蛋白(0.5 mg/mL)为标准

进行绘制,通过计算得到标准曲线方程: $y = 1.2867x + 0.1073, R^2 = 0.996$ 。将冻干 SPI/SPI-Dex 聚合物以 1.0 mg/mL 的质量浓度重新溶解在去离子水中,室温下搅拌 2 h 使其充分溶解,12 000 g 离心 15 min。然后取上清液,并与 BCA 工作液混合,37℃ 水浴 15 ~ 30 min。用分光光度计测定其在 562 nm 处的吸光度,根据标准曲线计算上清液中可溶性蛋白质量浓度。蛋白质的溶解度表示为可溶性蛋白质量浓度占总蛋白质量浓度百分比。

1.3.12 乳化性测定

根据文献[11],采用浊度法测定 SPI/SPI-Dex 聚合物的乳化活性及乳化稳定性,并作适当修改。制备 5 mg/mL 的 SPI/SPI-Dex 溶液作为水相,玉米油为油相,油水体积比例为 1:9,用高速剪切均质机在 10 000 r/min 下均质 2 min 形成乳状液,立即从距乳状液底部 0.5 cm 处取 50 μL 新鲜乳状液以液料比 100 mL/g 分散于质量分数为 0.1% 的 SDS 溶液中。在旋涡混合器中振荡 30 s 后,用 UV-2600 型紫外-可见分光光度计在 500 nm 处测定吸光度,记作 A_0 ,以相同的方法取均质后静置 10 min 的乳状液重复上述步骤,其吸光度记作 A_{10} 。乳化活性指数以及乳化稳定性指数计算公式为

$$E_{AI} = \frac{2.303 \times 2A_0 D_F}{10\,000 \theta LC} \tag{1}$$

$$E_{SI} = \frac{10A_0}{A_0 - A_{10}} \tag{2}$$

式中 E_{AI} ——乳化活性指数, m^2/g
 E_{SI} ——乳化稳定性指数, min
 D_F ——稀释倍数, 取 100
 θ ——乳状液中油相体积分数, %
 L ——比色皿厚度, cm
 C ——制备乳液所用蛋白溶液中的蛋白质量浓度, g/mL

1.3.13 DPPH 自由基清除率

参考文献[12]的方法测定了 DPPH 自由基清除活性,并作略微修改。将冻干的 SPI/SPI-Dex 聚合物重新溶解在去离子水中,以获得 2.0 mg/mL 的质量浓度。取 2 mL 样品溶液,并加入 2 mL 浓度为 0.1 mmol/L 的 DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)溶液,充分混匀,室温下避光反应 30 min,离心取上清液后,用紫外可见分光光度计于 517 nm 波长处测定吸光度,DPPH 自由基清除率计算公式为

$$S_{DPPH} = \frac{A_s - A_c}{A_b} \times 100\% \tag{3}$$

式中 A_s ——DPPH 样品(即 2 mL 样品溶液与 2 mL DPPH 溶液混合)的吸光度

A_c ——对照样品(即 2 mL 样品溶液与 2 mL 乙醇溶液混合)的吸光度
 A_b ——空白 DPPH(即 2 mL 乙醇溶液与 2 mL DPPH 溶液混合)的吸光度

1.3.14 数据分析

所有实验均进行 3 次重复,结果表示为平均值 $\pm$ 标准差。采用 SPSS 23.0 对测定数据进行差异显著性分析(显著水平为 $P < 0.05$)。采用 Origin 2018 软件制图。

2 结果与分析

2.1 微观结构分析

扫描电镜是一种用于观察和分析物质微观结构的有效手段,有助于了解样品的可能结构形成机制。图 1 是 SPI 及 SPI-Dex 聚合物的微观结构图。如图 1 所示,单独 SPI 由众多光滑致密的无规则片状结构组成,这与文献[13]在超声对大豆分离蛋白结构和物理性质的影响研究中的结果相吻合。与 SPI 相比,SPI-Dex 聚合物表现出明显的结构差异,无规则片状结构明显变小,同时出现了孔洞结构。这可能是因为混合体系中 SPI、Dex 二者之间发生相互作用形成了可溶性聚合物,从而使得 SPI 的微观结构发生了明显改变。

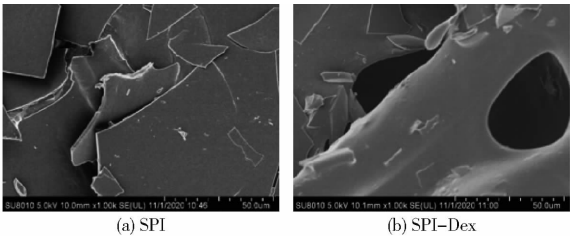


图 1 SPI、SPI-Dex 的微观结构

Fig. 1 Microstructure of SPI and SPI-Dex

2.2 内源荧光光谱

蛋白质的内源荧光是由色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸等芳香族氨基酸引起的。主要由于色氨酸残基贡献的蛋白质内源荧光对环境条件敏感,因此常被用作蛋白质构象变化的指标[14]。图 2 显示了不同质量分数 Dex 对 SPI-Dex 混合体系色氨酸荧光强度的影响。如图 2 所示,与单独 SPI 相比,SPI-Dex 聚合物的荧光强度显著降低,并且随着 Dex 质量分数的增加,荧光强度持续下降,说明 SPI 发生了荧光猝灭,产生了疏水相互作用。这一现象与文献[11]通过美拉德反应偶联葡聚糖改善花生分离蛋白功能特性的报道一致,可以归因于结合在蛋白质上的多糖链的屏蔽作用。SPI-Dex 聚合物中的色氨酸残基更容易被包围在疏水环境中,混合体系中 Dex 的加入使蛋白质形成了更紧密的三级构象[15]。此外,

从图 2 可以看到,与单独 SPI 相比,SPI-Dex 聚合物最大荧光发射峰的位置发生了微弱的蓝移,这说明混合体系中 Dex 与 SPI 的疏水性氨基酸发生了相互作用,使得它们所处的微环境极性降低。

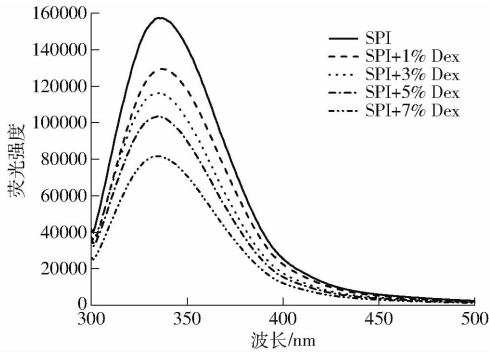


图 2 SPI、SPI-Dex 的内源荧光光谱

Fig. 2 Intrinsic fluorescence spectra of SPI and SPI-Dex

2.3 傅里叶变换红外光谱

作为鉴别物质和分析物质结构的有效手段,傅里叶变换红外光谱已被广泛用于各种物质的定性鉴定和定量分析,以及研究分子间和分子内部的相互作用[16]。图 3 显示了 SPI 与 SPI-Dex 聚合物的傅里叶变换红外光谱。如图 3 所示,与单独 SPI 相比,SPI-Dex 聚合物在 2 500 ~ 3 000 cm^{-1} 范围的峰相对较宽,表明混合体系中 SPI 和 Dex 之间发生了相互作用,因此导致峰形状的改变。同时与 SPI 相比,SPI-Dex 聚合物在 1 020 cm^{-1} 处出现了较强的吸收,这可能是由于混合体系中 Dex 的添加引起了 SPI 结构改变,从而出现 C—O 伸缩振动[17]。3 200 ~ 3 420 cm^{-1} 和 2 900 ~ 3 000 cm^{-1} 处振动峰分别由氢键—OH 和 C—H 拉伸引起。与单独 SPI 相比,SPI-Dex 聚合物在 3 200 ~ 3 420 cm^{-1} 区域的光谱强度加强(从 3 293. 01 cm^{-1} 到 3 416. 33 cm^{-1}),在 2 900 ~ 3 000 cm^{-1} 区域的光谱强度减弱(从 2 961. 10 cm^{-1} 到 2 924. 39 cm^{-1}),这表明混合体系中 SPI 和 Dex 之间的相互作用可能与氢键的形成以及 C—H 的拉伸有关。

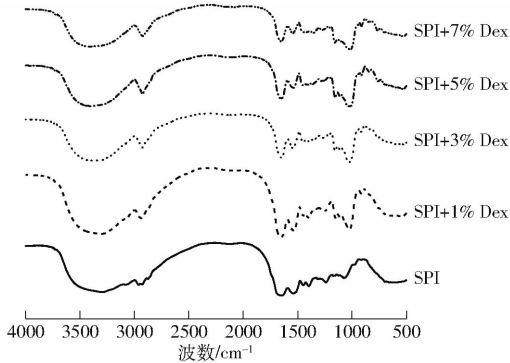


图 3 SPI、SPI-Dex 的红外光谱

Fig. 3 Infrared spectra of SPI and SPI-Dex

2.4 紫外可见吸收光谱

蛋白质三维构象的变化可以通过氨基酸残基的相对运动反映出来^[18]。大豆分离蛋白具有色氨酸和酪氨酸残基等侧链基团,其特征紫外吸收峰在260~300 nm 范围内。图4显示了SPI与SPI-Dex聚合物的紫外吸收光谱。如图4所示,与单独SPI相比,SPI-Dex聚合物的最大紫外吸收度明显降低,并且随着Dex质量分数的增加不断下降。这可能是因为Dex的加入可以在一定程度上防止色氨酸和酪氨酸残基的暴露,从而形成了一种防止SPI被破坏的保护机制。另一种可能的解释是混合体系中SPI和Dex之间聚合物的形成导致SPI肽链的延伸和空间结构的改变,因此导致了紫外吸收光谱的改变^[19]。

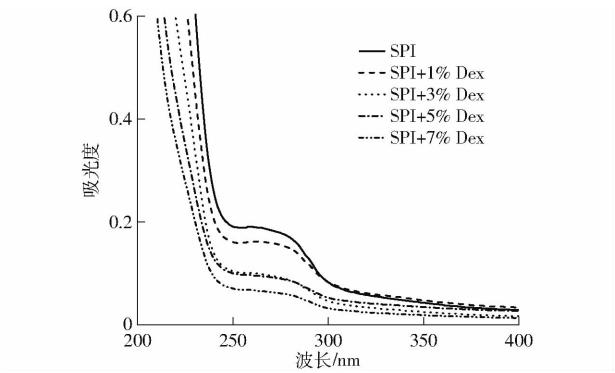


图4 SPI、SPI-Dex 的紫外光谱
Fig.4 UV spectra of SPI and SPI-Dex

2.5 SDS-PAGE

图5(图中Marker表示标准蛋白)为SPI及SPI-Dex聚合物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图。如图5所示,SPI及SPI-Dex聚合物均呈现比较完整的电泳条带。与单独SPI相比,SPI-Dex聚合物的条带位置没有发生明显变化,且在分离胶和浓缩胶相接处没有新条带出现,这说明混合体系中Dex的加入不会生成大分子量物质。但是与单独SPI相比,SPI-Dex聚合物电泳条带的颜色明显变浅,并且其颜色变浅程度与混合体系中Dex的质量分数呈正相关,这表明混合体系中Dex的加入改变了SPI的分子量,使得SPI的分子量有所减小。电泳条带颜色的变浅可能是因为混合体系中SPI、Dex二者通过非共价相互作用生成了SPI-Dex非共价聚合物,消耗了SPI上能够与考马斯亮蓝染色液相互作用的活性基团,从而使得SPI与染色液的结合减弱,因此条带颜色变浅^[20]。

2.6 平均粒径及粒径分布

图6a、6b(图中不同小写字母表示差异显著,下同)分别是具有不同Dex质量分数的SPI-Dex聚合物的平均粒径及粒径分布图。如图6a所示,与单独

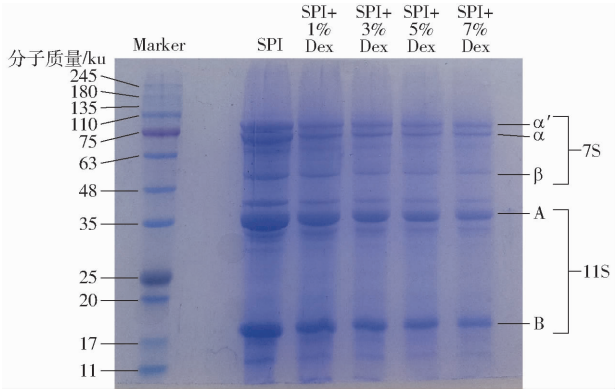


图5 SPI、SPI-Dex 的凝胶电泳图
Fig.5 SDS-PAGE of SPI and SPI-Dex

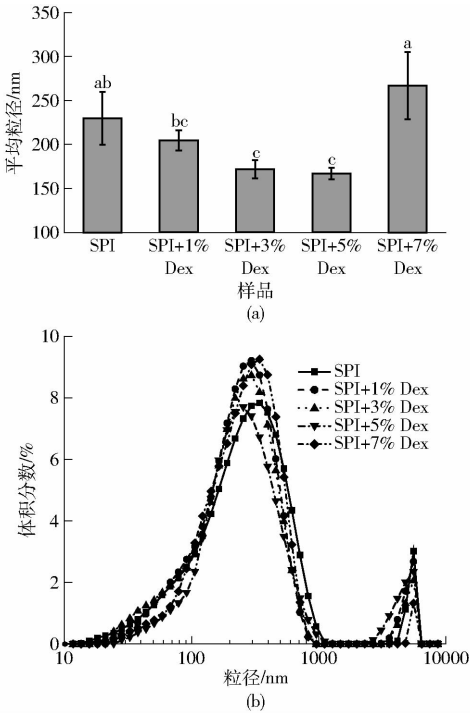


图6 SPI、SPI-Dex 的粒径分布
Fig.6 Particle size distribution of SPI and SPI-Dex

SPI相比,Dex的加入使得SPI-Dex聚合物的粒径显著减小,这可能是因为混合体系中SPI和Dex之间相互作用形成了可溶性聚合物,从而抑制了蛋白质之间的聚集,使得粒径减小。同时,Dex的加入会增加混合体系的粘度,这可能是通过降低颗粒间的碰撞频率来防止形成大的蛋白质-蛋白质聚合体,从而使粒径减小。但是,继续增加多糖的含量,即Dex质量分数为7%时,颗粒尺寸略有增大,这一现象可以解释为混合体系中一些小颗粒分子相互靠近而聚集。同样地,文献[17]在研究海藻酸钠与肌原纤维蛋白相互作用时发现了类似的现象。此外,从图6b中可以看出,SPI与SPI-Dex聚合物的粒径分布均显示双峰分布,但是与单独SPI相比,SPI-Dex聚合物的峰相对较窄,因此,推测SPI-Dex聚合物溶液的稳定性相对较好。

2.7 浊度

浊度是表征蛋白质聚集状态的重要指标,可以反映溶液中悬浮颗粒的大小和数量。具有不同 Dex 质量分数的 SPI-Dex 聚合物浊度如图 7 所示。与单独 SPI 相比,SPI-Dex 聚合物的浊度显著降低,并且随 Dex 质量分数的增加呈现有规律的下降,在 Dex 质量分数为 5% 时达到最低值。这可能是因为混合体系中,SPI、Dex 发生相互作用形成了可溶性聚合物,减少了大的蛋白质-蛋白质聚集体的形成。此外,Dex 是一种大分子物质,具有空间稳定作用,能够阻碍蛋白质分子的运动,避免蛋白质聚集沉淀,从而使浊度降低^[21]。然而,继续增加混合体系中 Dex 的质量分数,即 Dex 质量分数为 7% 时,浊度略有升高,但仍然比单独 SPI 的低。这一现象可能是由于混合体系中未参与反应的 Dex 相互靠近,造成分子间相互聚集,因此浊度升高,这与 2.6 节平均粒径及粒径分布的结果相吻合。

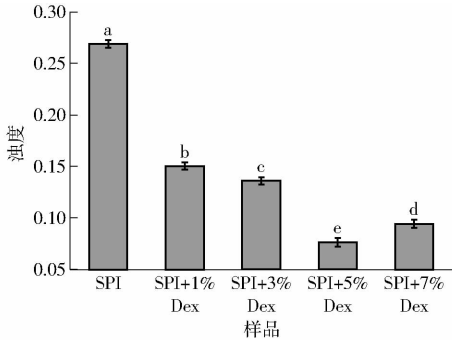


图 7 SPI、SPI-Dex 的浊度
Fig. 7 Turbidity of SPI and SPI-Dex

2.8 表面疏水性

蛋白质表面疏水性指数 H_0 是表征蛋白质表面暴露的疏水性基团数量的指标,也可以表征蛋白质分子间相互作用^[19]。表面疏水性指数不仅可以反映蛋白质的构象变化,而且与蛋白质的溶解性、乳化性等功能性性质紧密相关。如图 8 所示,与单独 SPI 相比,SPI-Dex 聚合物的表面疏水性指数显著降低,并且随着 Dex 质量分数的增加,SPI-Dex 聚合物的表面疏水性指数不断下降。一方面,Dex 的添加覆盖了蛋白质表面的疏水位点,从而使蛋白质的表面疏水性指数降低^[22]。同样,文献[23]研究发现在中性条件下卡拉胶的添加可以有效降低牛血清蛋白的表面疏水性。另一方面,SPI、Dex 之间的物理混合会导致非共价 SPI-Dex 聚合物的形成,具有大量亲水性羟基基团的 Dex 与 SPI 结合,不仅可以通过增加蛋白质分子表面的亲水性来降低表面疏水性^[24],而且 SPI 和 Dex 之间相互作用可能会通过消耗 SPI 部分反应基团来实现表面疏水性的降低,这

与 2.5 节 SDS-PAGE 电泳条带颜色的变化相吻合。同时,Dex 的添加会产生一定的空间位阻,阻止蛋白质分子内部疏水基团的暴露,进而降低表面疏水性^[5]。

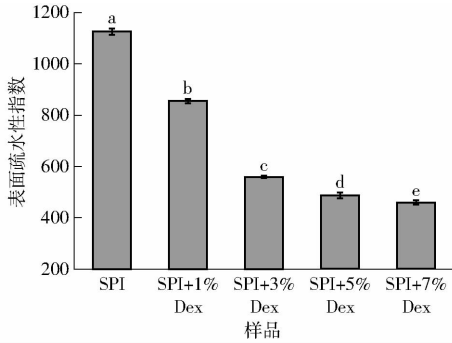


图 8 SPI、SPI-Dex 的表面疏水性指数
Fig. 8 Surface hydrophobicity of SPI and SPI-Dex

2.9 溶解性

溶解性作为蛋白质重要的基本性质之一,对蛋白质的乳化性等功能性性质有很大的影响。如图 9 所示,单独 SPI 的溶解度为 45.26%。随着 Dex 质量分数的增加,SPI 的溶解性发生显著变化,在 Dex 质量分数为 5% 时达到最大值,与单独 SPI 相比,溶解度提高 16.35%。这可能是因为 SPI、Dex 之间发生反应,形成了可溶性聚合物,与单独 SPI 相比,Dex 的加入使得混合体系中亲水性基团的数量增加,因此溶解性提高。这一结果与文献[25]一致。然而,继续增加混合体系中 Dex 的质量分数,即 Dex 质量分数为 7% 时,SPI-Dex 聚合物的溶解度反而降低。这可能是因为混合体系中 Dex 的质量分数过高,未参加反应的 Dex 与 SPI 相互竞争吸收水分子,从而使得 SPI 的溶解性降低,这与 2.7 节浊度的变化情况相吻合。

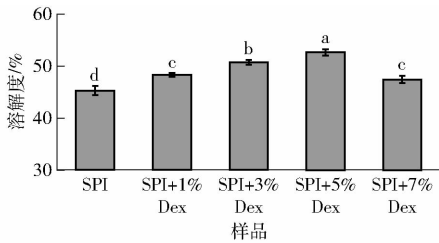


图 9 SPI、SPI-Dex 的溶解度
Fig. 9 Solubility of SPI and SPI-Dex

2.10 乳化活性和乳化稳定性

如图 10(图中不同小写字母表示乳化活性指数差异显著,不同大写字母表示乳化稳定性指数差异显著)所示,单独 SPI 稳定的乳液的乳化活性指数为 $(7.73 \pm 0.08) \text{ m}^2/\text{g}$ 。随着 Dex 质量分数的增加,SPI-Dex 聚合物稳定的乳液的乳化活性指数不断增加,在 Dex 质量分数为 5% 时达到最大值,与单独

SPI 稳定的乳液相比,乳化活性指数提高 18.71%,说明该浓度下的 Dex 对乳液的乳化活性具有明显的改善作用。乳化活性指数的增加可能的原因:一方面,Dex 的添加可以通过加强蛋白质分子侧链基团与水的相互作用,使蛋白质溶解度增加(见 2.9 节),从而使乳化活性增强^[26];另一方面,具有较高分子量的 Dex 的加入提高了混合体系的溶液黏度,形成了更加稳定的网络结构,因此乳化活性增加^[27]。随着混合体系中 Dex 质量分数的增加,乳液乳化稳定性指数的变化趋势与乳化活性指数的变化趋势大致相似,均呈现先增加后降低的变化。其中,Dex 质量分数为 3% 乳液的乳化稳定性指数最高,与单独 SPI 稳定的乳液相比,增加 34.55%,效果显著,这可能是因为 Dex 的加入使得乳液连续相的粘度增加,分散相的流动性减弱,因此稳定性增加^[28]。然而,继续增加混合体系中 Dex 的质量分数,即 Dex 质量分数为 5% 和 7% 时,乳液的乳化稳定性指数反而降低,这说明高浓度的 Dex 不利于乳液的稳定。

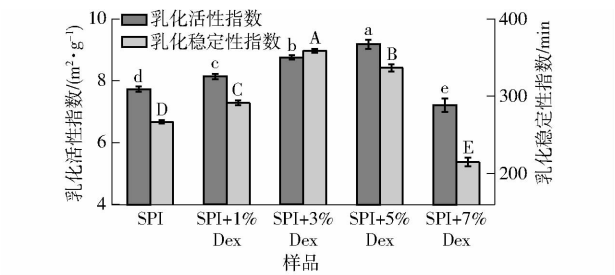


图 10 SPI、SPI-Dex 的乳化活性指数和乳化稳定性指数
Fig. 10 Emulsification activity index and emulsification stability index of SPI and SPI-Dex

2.11 抗氧化性

DPPH 自由基清除能力已被广泛应用于检测各种抗氧化剂对自由基的清除作用,可以用于反映抗氧化性的强弱^[19]。一般来说,DPPH 自由基清除能力越强,则该物质的抗氧化性越强。图 11 为 Dex 及具有不同 Dex 质量分数的 SPI-Dex 聚合物的 DPPH 自由基清除率。与单独 Dex 和 SPI 相比,SPI-Dex 聚合物的 DPPH 自由基清除能力显著增强,这说明 Dex 的添加可以改善 SPI 的抗氧化性。此外,在

Dex 质量分数 0~5% 的范围内,DPPH 自由基清除能力随着 Dex 的增加不断增强,在 Dex 质量分数为 5% 时达到最大值,与单独 SPI 相比,DPPH 自由基清除率提高 11.30%。这可能是因为随着 Dex 质量分数的增加,混合体系中 SPI 和 Dex 更好地结合,形成了更多的 SPI-Dex 聚合物,因此抗氧化性不断增强。然而,继续增加混合体系中 Dex 的质量分数,即 Dex 质量分数为 7% 时,DPPH 自由基清除能力反而降低,这说明混合体系的抗氧化性并不会随 Dex 的增加而持续增强,过量的 Dex 不利于混合体系的抗氧化性。

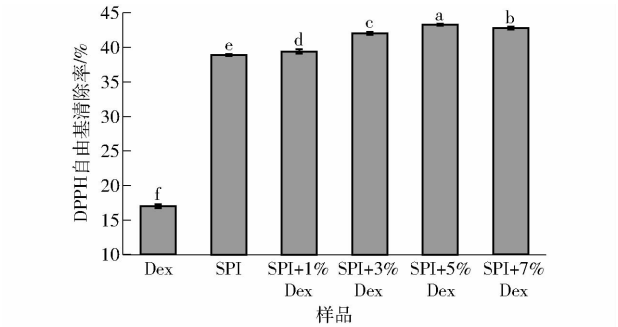


图 11 SPI、SPI-Dex 的 DPPH 自由基清除率
Fig. 11 DPPH radical scavenging activity of SPI and SPI-Dex

3 结束语

通过向 SPI 溶液中添加不同质量分数的 Dex,探究了混合体系中 SPI 和 Dex 之间的相互作用方式以及 Dex 浓度对 SPI 结构和功能性质的影响。研究发现,混合体系中 SPI 和 Dex 可以通过疏水相互作用和氢键这两种非共价力形式相互作用。Dex 的加入抑制了蛋白质的聚集,阻止了蛋白质色氨酸和酪氨酸残基的暴露,形成了更加致密的三级结构。当混合体系中 Dex 质量分数低于 5% 时,与单独 SPI 相比,SPI-Dex 聚合物的粒径、表面疏水性、浊度明显降低;溶解性、乳化性、抗氧化性显著提高。其中 Dex 质量分数为 5% 时效果最为显著,分别使 SPI 的溶解度增加 16.35%、乳化活性指数增加 18.71%、DPPH 自由基清除率增加了 11.30%。该结果为 SPI-Dex 非共价聚合物在食品领域中的有效应用提供了理论参考。

参 考 文 献

[1] XU Z, HUANG G, CHENG T, et al. Comparative study on the maillard reaction of chitosan oligosaccharide and glucose with soybean protein isolate[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131(1): 601-607.
[2] MESA M D, SILVAN J M, OLZA J, et al. Antioxidant properties of soy protein-fructo oligosaccharide glycation systems and its hydrolyzates[J]. Food Research International, 2008, 41(6): 606-615.
[3] JIN B, ZHOU X, CHEN C, et al. Preparation, characterization and in vitro evaluation of theophylline nanoparticles prepared with dextran-conjugated soy protein[J]. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 2015, 14(8): 1323-1332.
[4] 何婉莺,李小燕,孙小雯,等. 葡聚糖-大豆分离蛋白耦联接枝工艺优化及接枝产物理化特性研究[J]. 食品工业科技,

- 2018,39(4):54–59.
- HE Wanying, LI Xiaoyan, SUN Xiaowen, et al. Optimization of grafting reaction process between soy protein isolate and dextran and research on physicochemical properties of conjugates[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018,39(4):54–59. (in Chinese)
- [5] 任孟珂, 布冠好, 左颖昕. 葡聚糖接枝对大豆蛋白功能特性及结构的影响[J]. 食品研究与开发, 2020,41(6):6–12.
- [6] SUI X, BI S, QI B, et al. Impact of ultrasonic treatment on an emulsion system stabilized with soybean protein isolate and lecithin: its emulsifying property and emulsion stability[J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63(2):727–734.
- [7] ZHONG L, MA N, WU Y, et al. Characterization and functional evaluation of oat protein isolate-pleurotus ostreatus β -glucan conjugates formed via maillard reaction[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 87(39):459–469.
- [8] BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, ISHIZAKI S, et al. Differences in gelation characteristics of natural actomyosin from two species of bigeye snapper, *priacanthus tayenus* and *priacanthus macracanthus*[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(9):1311–1318.
- [9] JU M, ZHU G, HUANG G, et al. A novel pickering emulsion produced using soy protein-anthocyanin complex nanoparticles [J]. Food Hydrocolloids, 2019, 99:105329.
- [10] 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(28):216–223.
- [11] LIU Y, ZHAO G, ZHAO M, et al. Improvement of functional properties of peanut protein isolate by conjugation with dextran through maillard reaction[J]. Food Chemistry, 2012, 131(3):901–906.
- [12] JIN B, ZHOU X, LIU Y, et al. Physicochemical stability and antioxidant activity of soy protein/pectin/tea polyphenol ternary nanoparticles obtained by photocatalysis[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 116:1–7.
- [13] 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.
- [14] SPOTTI M J, MARTINEZ M J, PILOSO F A M R, et al. Influence of maillard conjugation on structural characteristics and rheological properties of whey protein/dextran systems[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39(2):223–230.
- [15] XUE F, LI C, ZHU X, 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.
- [16] WANG Y, ZHANG A, WANG X, et al. The radiation assisted-Maillard reaction comprehensively improves the freeze-thaw stability of soy protein-stabilized oil-in-water emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 103:105684.
- [17] NING Z, ZOU H N, SUN S, et al. The interaction between sodium alginate and myofibrillar proteins: the rheological and emulsifying properties of their mixture[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 161:1545–1551.
- [18] WANG S, YANG J, SHAO G, et al. pH-induced conformational changes and interfacial dilatational rheology of soy protein isolated/soy hull polysaccharide complex and its effects on emulsion stabilization[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 109:106075.
- [19] HU C, XIONG Z, XIONG H, et al. The formation mechanism and thermodynamic properties of potato protein isolate-chitosan complex under dynamic high-pressure microfluidization (DHPM) treatment [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 154:486–492.
- [20] 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 Yangying, ZHENG Hongli, YANG Wenyu, 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. (in Chinese)
- [21] 张焕丽, 肖志刚, 马慧, 等. 挤压大米蛋白-葡聚糖接枝复合物的功能性质及结构表征[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(15):122–129.
- [22] BENICHO A, ASERIN A, LUTZ R, et al. Formation and characterization of amphiphilic conjugates of whey protein isolate (WPI)/xanthan to improve surface activity[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(3):379–391.
- [23] GALAZKA V B, SMITH D, LEDWARD D A, et al. Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment[J]. Food Chemistry, 1999, 64(3):303–310.
- [24] 韩飞飞, 李杨, 王中江, 等. 绿豆分离蛋白的葡聚糖糖基化改性研究[J]. 食品工业科技, 2016,37(9):49–52,57.
- HAN Feifei, LI Yang, WANG Zhongjiang, et al. Study on glycosylation of mung bean protein isolates and dextran[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016,37(9):49–52,57. (in Chinese)
- [25] PIRESTANI S, NASIRPOUR A, KERAMAT J, et al. Effect of glycosylation with gum arabic by maillard reaction in a liquid system on the emulsifying properties of canola protein isolate[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 157:1620–1627.
- [26] LIU J, LUO D, LI X, et al. Effects of inulin on the structure and emulsifying properties of protein components in dough[J]. Food Chemistry, 2016, 210:235–241.
- [27] 张蓓, 郭晓娜, 朱科学, 等. 燕麦蛋白糖基化改性研究[J]. 中国粮油学报, 2016,31(6):41–46.
- ZHANG Bei, GUO Xiaona, ZHU Kexue, et al. Glycation reaction of oat protein isolate[J]. Chinese Journal of Food Science, 2016,31(6):41–46. (in Chinese)
- [28] 李杨, 徐清清, 韩璐, 等. 添加菊粉条件下的豌豆分离蛋白乳化特性研究[J]. 农业机械学报, 2020,51(7):382–388.
- LI Yang, XU Qingqing, HAN Lu, et al. Emulsifying properties of pea protein isolate with inulin[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020,51(7):382–388. (in Chinese)