

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2023.05.040

不同多糖条件下大豆蛋白-绿原酸凝胶特性研究

李 杨^{1,2} 满 慧¹ 贾亦佳¹ 闫馨月¹ 闫世长¹ IGOR A N³

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江绿色食品科学研究院, 哈尔滨 150030;
3. 莫斯科国立技术与管理大学食品学院, 莫斯科 109004)

摘要: 为研究添加果胶、黄原胶和 κ -卡拉胶 3 种多糖的种类和质量浓度 (0.002、0.004、0.006 g/mL) 对大豆蛋白 (SPI)-绿原酸 (CA) 水凝胶的凝胶特性和分子间作用力的影响,通过测定 SPI-CA/多糖三元凝胶的红外光谱,分子间作用力、流变学、水分分布和微观结构等指标,最终探明不同多糖与 SPI-CA 相互作用机制以及不同多糖对 SPI-CA 凝胶性质改善的差异性和相似性。结果表明,添加黄原胶和 κ -卡拉胶后,蛋白中 β -折叠相对含量从 24.59% 升高至 24.87% ~ 26.65%,无规则卷曲含量显著降低 ($P < 0.05$),这有利于凝胶网络结构的形成。3 种多糖的添加均显著增强了凝胶中氢键的作用以及凝胶中固定水的结合能力,相较于果胶和黄原胶,添加 κ -卡拉胶后凝胶中的氢键的作用更强, T_{21} 的弛豫时间更短,凝胶结构也更加致密。凝胶的储能模量 G' 、损耗模量 G'' 、硬度和咀嚼性均与 κ -卡拉胶的浓度呈正相关。适量的果胶和黄原胶的加入能够形成稳定的凝胶,但是过度填充果胶和黄原胶会降低凝胶的热稳定性,破坏凝胶网络结构。

关键词: 大豆分离蛋白; 绿原酸; 阴离子多糖; 分子间作用力; 凝胶特性

中图分类号: TS214.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2023)05-0387-09 OSID: 

Characterization of Soy Protein – Chlorogenic Acid Gels under Different Polysaccharide Conditions

LI Yang^{1,2} MAN Hui¹ JIA Yijia¹ YAN Xinyue¹ YAN Shizhang¹ IGOR A N³

(1. School of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China
2. Heilongjiang Institute of Green Food Science, Harbin 150030, China

3. School of Food Science, Moscow State University of Technologies and Management, Moscow 109004, Russia)

Abstract: With the aim to investigate the effects of adding three polysaccharide types and concentrations of pectin, xanthan gum and κ -carrageenan (0.002 g/mL, 0.004 g/mL, 0.006 g/mL) on the gel properties and molecular forces of soy protein (SPI) – chlorogenic acid (CA) hydrogels, the infrared spectra, molecular forces, rheology, water distribution and microstructure of SPI – CA/polysaccharide ternary gels were measured. Finally, the interaction mechanism between different polysaccharides and SPI – CA and the differences and similarities of different polysaccharides on the improvement of SPI – CA gel properties were confirmed. The results showed that the addition of xanthan gum and κ -carrageenan increased the β -sheets content of the protein from 24.59% to 24.87% ~ 26.65% and significantly decreased the content of random coil ($P < 0.05$), which was beneficial to the formation of the gel network structure. The addition of all three polysaccharides significantly enhanced the hydrogen bonding interactions in the gels and the binding ability of immobilized water (T_{21}) in the gels. Compared with pectin and xanthan gum, the addition of κ -carrageenan resulted in stronger hydrogen bonding interactions in the gels, shorter relaxation time of T_{21} , and denser gel structure. The storage modulus (G'), loss modulus (G''), hardness and chewiness of the gels were positively correlated with the concentration of κ -carrageenan. The addition of appropriate amounts of pectin and xanthan gum can form stable gels, but overfilling with pectin and xanthan gum can reduce the thermal stability of the gels and destroy the gel network structure. The results can provide theoretical support for introducing different polysaccharides to improve the gel properties of soy protein-chlorogenic acid hydrogels.

Key words: soy protein isolate; chlorogenic acid; anionic polysaccharide; molecular force; gel properties

0 引言

大豆蛋白基水凝胶具有高营养、高生物相容性等优点,因此被广泛应用在食品领域^[1]。酚类化合物作为蛋白交联剂,具有稳定自由基的功效,能够诱导蛋白质合成水凝胶,提高凝胶的抗氧化活性^[2-4]。但与蛋白质-多糖凝胶相比,多酚对蛋白质凝胶的黏弹性和质地的改善有限,并且单一的蛋白-多酚网络结构使得水凝胶的机械性能和稳定性都较差,这限制了具有抗氧化功能的蛋白质-多酚凝胶在食品领域的应用。

多糖在提高凝胶的性能、改善热稳定性和增强凝胶系统的凝胶网络结构强度方面起着重要作用^[5-7]。此外多糖可以与多酚和蛋白质协同作用,在水相中充当稳定剂,改善基于蛋白质的界面、流变学和凝胶性能^[8]。文献[7]通过牛血清白蛋白(BSA)、绿原酸(CA)和葡聚糖(DEX)制备三元复合物,发现与单独的蛋白质相比,在等电点附近的三元复合物能够被用来制备物理稳定性更好的乳剂。文献[9]也发现多酚、蛋白质和多糖三元共轭物,其热稳定性和乳化性能优于单独的蛋白质或二元蛋白质-多酚和蛋白质-多糖共轭物。因此,在蛋白-多酚体系中引入多糖能够改善其功能特性。文献[10]研究了亚麻籽胶(FG)对儿茶素诱导的肌原纤维蛋白(MP)弱凝胶特性的影响,发现FG的加入提高了凝胶强度、保水能力和动态流变性能,这为研究多糖的种类和浓度对大豆分离蛋白-绿原酸(SPI-CA)凝胶性质的影响提供了参考。

因此,本文旨在SPI-CA中引入果胶、黄原胶或κ-卡拉胶,考察阴离子多糖的种类和浓度对SPI-CA凝胶的分子间作用力、凝胶特性和流变的影响。通过傅里叶红外光谱以及分子间相互作用力、质构、流变、低场核磁共振(LF-NMR)和扫描电镜(SEM)等测试评估了添加不同的多糖后SPI-CA凝胶的结构特性和功能特性的变化,通过对比不同浓度下3种多糖对蛋白质-多酚水凝胶微观结构、流变学性质和稳定性等的表征评价多糖的结构和性能对蛋白-多酚凝胶性质的影响规律,以期选择合适的多糖种类和浓度改善大豆蛋白-多酚凝胶性质以及大豆蛋白-多酚/多糖三元凝胶的开发应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白(SPI)、κ-卡拉胶(K)、黄原胶(X)和绿原酸(CA),上海源叶生物科技有限公司;

果胶(P),北京博奥拓达科技有限公司;所有其他分析化学品均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Is10型傅里叶红外光谱仪,美国Thermo公司;Kinexus Pro型旋转流变仪,英国Malvern公司;TA-XT2i型质构仪,英国Stable Micro Systems公司;Netzsch型差示扫描量热仪,德国Netzsch公司;NMI20-Analyst型低场脉冲核磁共振分析仪,上海纽迈电子科技有限公司;SU8010型扫描显微镜,日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 SPI-CA和SPI-CA/多糖复合水凝胶制备

参考文献[4]的方法并加以修改,制备SPI-CA凝胶。用磁力搅拌器将SPI溶液(最终质量分数为12%)搅拌至少2h,并在4℃下储存12h以确保完全溶解。然后用0.1 mol/L NaOH将蛋白溶液的pH值调整为碱性(9.0),将绿原酸溶解在去离子水中(最终质量比为0.01 g/g),调整pH值与蛋白质溶液的pH值一致,将两种溶液混合,在25℃下连续搅拌7h,然后将一部分混合物在90℃下加热30 min,立即在冰水浴中冷却到室温(20℃)以促进凝胶化,然后在4℃下储存12h。一部分凝胶被冻干并用于结构分析。用0.1 mol/L盐酸将剩余蛋白质溶液的pH值调整到中性(7.0),将完全水合的果胶、黄原胶和κ-卡拉胶溶液(最终质量浓度0.002、0.004、0.006 g/mL)与中和的SPI-CA溶液混合并充分搅拌,SPI-CA/多糖凝胶的制备如上所述。

1.3.2 傅里叶变换红外光谱

将样品粉末与溴化钾粉末混合并压片,用傅里叶变换红外光谱仪在4 000~400 cm⁻¹范围内对冻干凝胶样品进行扫描,分辨率为4 cm⁻¹。按照文献[11]提出的程序,使用PeakFit软件v4.12分析了从酰胺I带(1 700~1 600 cm⁻¹)得出的二级结构(α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规则卷曲)。

1.3.3 蛋白质溶解度测量

采用文献[12]方法测定凝胶在不同溶剂中的蛋白质溶解度以研究SPI-CA和SPI-CA/多糖凝胶的分子间作用力,并对其进行了轻微的修改。5种溶剂由超纯水(S1)、0.086 mol/L Tris-甘氨酸缓冲液(pH值8.0)(S2)、含有0.5% SDS(十二烷基硫酸钠)的S2(S3)、含有8 mol/L尿素的S3(S4)和含有2% β-巯基乙醇的S4(S5)组成。将1 mg的SPI-CA或SPI-CA/多糖凝胶与5 mL的每种溶剂混合。将得到的溶液在25℃下孵育20 min,然后离心(5 000 g, 10 min)。通过使用BSA标准品建立标准曲线计算上清液的蛋白质含量。

1.3.4 动态流变学测定

使用旋转流变仪进行凝胶的流变特性测定。使用具有 0.1 mm 间隙的 40 mm 直径平行板进行测定,在样品线性黏弹区域内选择了一个 0.1% 的应变值,这个值被用于 0.1 ~ 10 Hz 范围内的频率扫描分析。根据文献[13]的描述,幂律模型被用来描述弹性模量与角频率的关系,公式为

$$G' = K' \omega^{n'} \tag{1}$$

式中 G' ——弹性模量,Pa
 K' ——幂律模型常数
 n' ——频率指数
 ω ——角频率,rad/s

其中指数 n' 表示 G' 对 ω 的依赖程度, K' 的增加表明样品的硬度与弹性凝胶的形成有关。

1.3.5 凝胶的质构特性

采用 TA - XT plus 型质构分析仪测定。参数如下:测定模式选择下压距离,测试前速率 5 mm/s,测试速率 1 mm/s,测试后速率 5 mm/s,下压距离为 4 mm,引发力为 5 g,探头型号选择 P/0.5s。凝胶固定在平台上以后,压缩凝胶(高 10 mm,直径 20 mm)两次,两次压缩循环之间允许有 5 s 的时间间隔。

1.3.6 差示扫描量热法

参考文献[14]的方法并加以修改,差示扫描量热法(DSC)在差示扫描量热仪上进行,在环境温度下安装空气冷却压缩机和液氮冷却器。用钢作为标准,有效地校准了温度。准确称量冷冻干燥的水凝胶样品(5 mg)并密封在铝制托盘(BO6.239.2 - 64.502)中。以扫描速度 10 K/min 将样品从 20℃ 加热到 160℃ [3]。

1.3.7 溶胀率

水凝胶的溶胀率(S_R)通过称重法测量[15]。将准备好的凝胶放在 40℃ 的干燥箱中 12 h,为实验准备干凝胶。将干凝胶放在 40 mL 蒸馏水中,在 25℃ 下放置 12 h,每小时取出并称量。快速用滤纸吸收凝胶表面的水并测量质量。水凝胶的溶胀率 S_R 计

算公式为

$$S_R = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100\% \tag{2}$$

式中 W_s ——膨胀状态下凝胶质量,g
 W_d ——干凝胶质量,g

1.3.8 低场核磁共振

采用文献[16]的方法,并做适当修改。将测试之前的凝胶放入直径 25 mm 核磁管,随后放入分析仪中。测试条件:使用 Carr - Purcellmeibom - Gill (CPMG)序列测定了 5 g 复合水凝胶的横向弛豫时间(T_2),等待时间为 2 500 ms,数据从 12 000 个回波中获取。

1.3.9 微观结构

首先用双面刀片将凝胶切成 2 mm × 5 mm 的长方形小条,然后加入 2.5% 戊二醛固定。固定后,用磷酸盐缓冲液冲洗样品,用不同浓度的乙醇进行脱水,最后用 100% 乙醇-叔丁醇(体积比 1:1)置换乙醇,将凝胶冻干。样品用导电胶带粘在 SEM 样品台上并涂上金粉。加速电压为 5.0 kV,所有的图像都是通过扫描电子显微镜摄影获得。

1.3.10 统计分析

所有实验每组样品重复测定 3 次,实验结果以平均值 ± 标准差表示。统计分析使用 SPSS 18.0 软件进行,单因素方差分析用来检测数据的差异显著性。Origin 8.6 软件进行绘图和相关性分析。

2 结果与讨论

2.1 傅里叶红外变换光谱分析

如图 1a 所示,3 278 cm⁻¹ 的宽峰是 O—H 的拉伸振动,添加果胶后,在 2 930 cm⁻¹ 和 2 855 cm⁻¹ 观察到 C—H 的不对称和对称的拉伸振动[17],C—H 的拉伸振动峰增加,这可能是由于果胶的亚甲基和 SPI 的羟基之间的氢键增强。添加高浓度(质量浓度 0.006 g/mL)的果胶后,—OH 拉伸振动的吸收带没有明显移位,表明蛋白质和果胶分子间的羟基相互作用没有明显增强[18]。如图 1b 所示,随着黄原

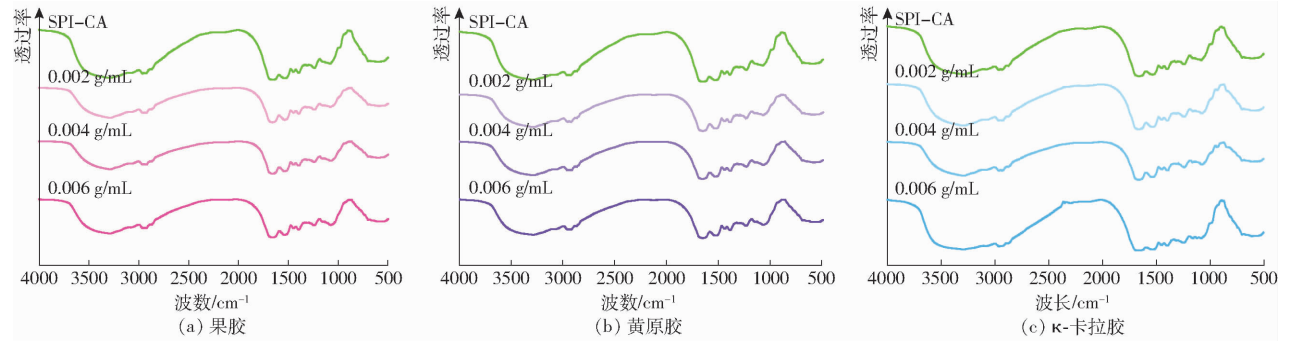


图1 添加果胶、黄原胶、κ-卡拉胶的 SPI - CA 红外光谱

Fig.1 Infrared spectra of SPI - CA with added pectin, xanthan gum and κ-carrageenan

胶浓度的增加,3 000 ~ 3 500 cm⁻¹范围内的条带逐渐增强,一方面可能是由于黄原胶和蛋白质之间的氢键的作用增强,另一方面可能是由于碳水化合物链之间通过氢键相互缠结^[19]。

添加 κ-卡拉胶后,3 289 cm⁻¹处的峰移动到 3 290 cm⁻¹,这意味着由于添加了 κ-卡拉胶,凝胶中的氢键力发生了变化^[20]。800 ~ 1 200 cm⁻¹的波数范围,代表 κ-卡拉胶的 C—C 和 C—O 伸展,C—H 弯曲,随着 κ-卡拉胶添加量的增加,1 079 cm⁻¹处的峰值移到 1 074 cm⁻¹,该范围的变化可能表明添加的 κ-卡拉胶主要负责 SPI 凝胶中凝胶网络的形成,而大豆蛋白在凝胶中的贡献较小^[20]。

2.2 二级结构分析

与对照组相比,除了 0.004 g/mL 的果胶外,添加不同浓度多糖的大豆分离蛋白的 β-折叠含量显著增加,α-螺旋显著减少 ($P < 0.05$)。一般来说,在

热诱导凝胶化过程中,β-折叠的形成与 α-螺旋的展开同步,β-折叠含量增加有助于形成更有序和紧凑的网络结构^[21]。添加 0.002 g/mL 的果胶后,β-折叠相对含量从 (24.59 ± 0.27)% 增加到 (26.46 ± 0.09)% ,添加 0.004 g/mL 的果胶的蛋白中 β-折叠含量下降,说明添加 0.004 g/mL 的果胶可抑制SPI-CA 在热诱导过程中的变性和解折叠,从而降低 SPI-CA 凝胶的稳定性^[22]。添加 0.002 g/mL 的黄原胶和 κ-卡拉胶后,β-折叠含量显著增加 ($P < 0.05$) ,但是随着多糖浓度的增加 β-折叠含量降低,可能是因为黄原胶和 κ-卡拉胶浓度增加会产生更强的静电排斥作用,不利于 β-折叠结构的形成。蛋白质中无规则卷曲的比例高时,会形成较软的凝胶^[23],从表 1 可以看出,添加了黄原胶和 κ-卡拉胶的样品的无规则卷曲含量都显著降低 ($P < 0.05$) ,这有利于凝胶质地的改善。

表 1 大豆蛋白二级结构相对含量				%
Tab.1 Effect of polysaccharides on the secondary structure of soy protein				
样品	β-折叠	无规则卷曲	α-螺旋	β-转角
SPI-CA	(24.59 ± 0.27) ^e	(20.31 ± 0.16) ^a	(19.40 ± 0.07) ^a	(35.37 ± 0.15) ^b
0.002 g/mL P	(26.46 ± 0.09) ^{ab}	(19.42 ± 0.21) ^f	(19.56 ± 0.10) ^a	(34.81 ± 0.06) ^c
0.004 g/mL P	(24.29 ± 0.06) ^f	(20.17 ± 0.14) ^{ab}	(18.83 ± 0.16) ^b	(36.56 ± 0.09) ^a
0.006 g/mL P	(26.29 ± 0.22) ^b	(19.80 ± 0.21) ^{cd}	(18.55 ± 0.21) ^e	(35.45 ± 0.08) ^b
0.002 g/mL X	(26.65 ± 0.12) ^a	(19.94 ± 0.05) ^{bcd}	(18.26 ± 0.06) ^d	(35.37 ± 0.05) ^b
0.004 g/mL X	(26.41 ± 0.11) ^{ab}	(19.95 ± 0.05) ^{bcd}	(18.04 ± 0.10) ^e	(35.56 ± 0.11) ^b
0.006 g/mL X	(26.31 ± 0.13) ^b	(19.73 ± 0.12) ^d	(18.57 ± 0.11) ^c	(35.49 ± 0.14) ^b
0.002 g/mL K	(25.85 ± 0.10) ^c	(20.02 ± 0.13) ^{bc}	(18.66 ± 0.09) ^{bc}	(35.53 ± 0.10) ^b
0.004 g/mL K	(25.74 ± 0.11) ^c	(19.97 ± 0.19) ^{bcd}	(18.72 ± 0.16) ^{bc}	(35.55 ± 0.21) ^b
0.006 g/mL K	(24.87 ± 0.10) ^d	(19.82 ± 0.13) ^{cd}	(18.87 ± 0.11) ^b	(36.47 ± 0.16) ^a

注:同行小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 分子间作用力分析

测量了复合凝胶在 5 种不同溶剂中的蛋白质溶解度,以探索热诱导 SPI-CA/多糖凝胶的分子间作用力(图 2)。溶剂之间蛋白质溶解度的差异表示分子间相互作用力的大小,其中 S2-S1、S3-S2、S4-S3 和 S5-S4 分别代表静电相互作用、疏水相互作用、氢键相互作用和二硫键相互作用^[12]。随着多糖浓度的增加,静电相互作用的影响显著减小,这是因为 SPI-CA 和 3 种多糖都带负电荷,当 SPI-CA 和多糖混合在一起时,高电荷值减少了静电引力相互作用的发生。相较于果胶和黄原胶分子骨架上的羧酸根负离子基团,κ-卡拉胶分子上的硫酸根具有极强的负电荷^[24],因此具有更强的静电排斥作用。在加热过程中,生物聚合物经历构象和结构变化,与生物聚合物的疏水段接触并相互作用^[25],然而疏水相互作用随果胶和黄原胶浓度的增加下降,可能是静电斥力的增强不利于蛋白疏

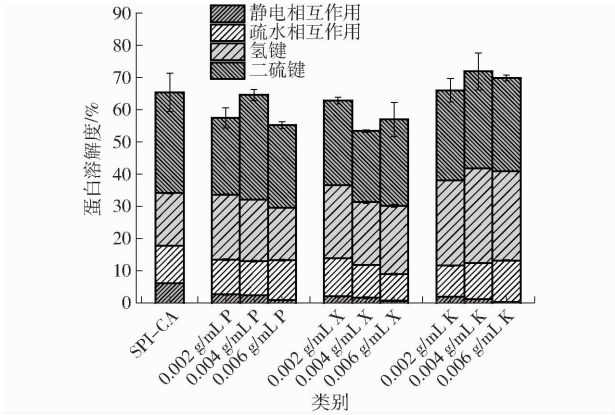


图 2 多糖对 SPI-CA 水凝胶中分子间作用力的影响

Fig.2 Effect of polysaccharides on molecular forces in SPI-CA hydrogels

水基团的暴露。添加 0.006 g/mL 的 κ-卡拉胶能显著增加疏水相互作用,说明高分子量的 κ-卡拉胶在加热过程中能够促使蛋白质的构象变化暴露出更多的疏水基团与 κ-卡拉胶相互作用。添加多

糖引入了大量的—OH,使得氢键的作用增强^[14],此外,当蛋白质具有与多糖相似的电荷时,它可以通过高于蛋白质 pI 值的宽 pH 值范围进行氢键连接^[12]。因此,氢键在三元凝胶形成过程中起着重要的作用,相较于同浓度下的果胶和黄原胶,添加κ-卡拉胶后氢键的作用更强,一方面可能是因为κ-卡拉胶和蛋白之间具有较强的氢键的作用,另一方面,可能是过量的κ-卡拉胶分子链间能够通过氢键聚集促进凝胶形成^[26]。

2.4 动态流变分析

储能模量 G' 反映了材料黏弹性的弹性部分^[13]。通过频率扫描测试分析 SPI-CA 和 SPI-CA/多糖

凝胶,如图 3 所示,所有样品的 G' 值都大于 G'' 值,表明所有样品都呈现凝胶状结构^[27]。从图 3 中可以看出,在频率扫描过程中,3 种多糖的添加均提高了对照组的黏弹性,但是添加 3 种浓度的果胶和黄原胶样品的 G' 均小于添加 0.002 g/mL 的κ-卡拉胶的凝胶样品。从图 3 可以看出,添加 0.002 g/mL 的果胶和黄原胶的样品的损耗因子 ($\tan\delta = G''/G'$) 值比添加中高浓度(质量浓度 0.004、0.006 g/mL)的多糖的样品大但受频率的影响较小,表明添加 0.002 g/mL 的果胶和黄原胶可以形成比较稳定的弱凝胶,并且这两种多糖的过度填充可能会对凝胶的稳定性产生不利影响^[28]。

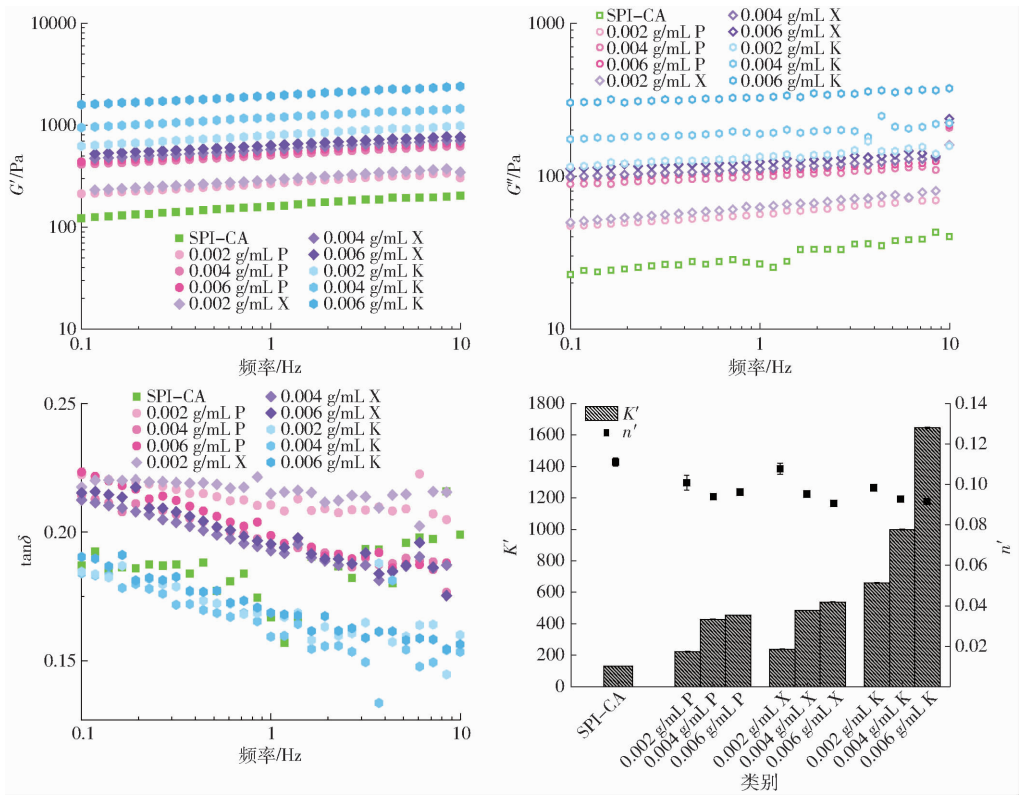


图 3 多糖对 SPI-CA 水凝胶流变特性的影响

Fig. 3 Effect of polysaccharides on rheological properties of SPI-CA hydrogels

为了进一步评估凝胶的强度,用幂律模型拟合了凝胶的 G' 的频率依赖性(图 3)^[27]。对于所有的样品,储能模量 G' 的幂律模型拟合良好($R^2 > 0.965$),指数 n' 表示 G' 对 ω 的依赖性, K' 的增加表明样品的硬度与弹性凝胶的形成有关^[13]。添加 3 种多糖的样品的 K' 值与多糖浓度呈正相关,相同浓度的果胶和黄原胶具有相似的 K' 值,由于κ-卡拉胶不仅能和蛋白相互作用,浓度增加时,也能形成κ-卡拉胶之间的凝胶网络结构,因此,与添加果胶和黄原胶的凝胶相比,凝胶分子之间的短程分子间力增加,导致更高的储能模量和 K' 值^[29]。 n' 值减小,说明三元复合凝胶的频率依赖性随着多糖的添加而降低,表明 3 种多糖均可以降低 SPI-CA 凝胶的频

率依赖性,在相同浓度下,κ-卡拉胶的频率依赖性小于黄原胶,黄原胶小于果胶。

2.5 质构分析

多糖的不同结构和分子大小导致凝胶强度和质构特性的不同。如表 2 所示,添加相同浓度的多糖,κ-卡拉胶能显著提高 SPI-CA 凝胶硬度($P < 0.05$),且呈现出浓度依赖性,这是因为在κ-卡拉胶与 SPI-CA 呈相互排斥状态时,κ-卡拉胶可以通过体系排阻与大豆分离蛋白相互作用,促进凝胶形成,提高 SPI-CA 的凝胶强度^[30]。此外,随着κ-卡拉胶浓度的增加,κ-卡拉胶之间的相互作用增强也有利于 SPI-CA 凝胶强度的增加。与κ-卡拉胶的效果不同,添加黄原胶的 SPI-CA 的凝胶强度随着黄原

胶浓度的增加而逐渐下降,这可能归因于以下原因:一方面,黄原胶倾向于在可利用水很少的状态下聚集和盘绕在自身上,从而占据较大的空间,导致蛋白质凝胶网络扭曲;另一方面,高分子量的黄原胶可能

阻碍 SPI - CA 凝胶网络结构的形成^[21]。添加 0.004、0.006 g/mL 的果胶后出现类似的现象,可能是因为过量的果胶导致过度填充,并对凝胶结构产生了不利影响^[18]。

表 2 多糖对 SPI - CA 水凝胶质构的影响
Tab.2 Effect of polysaccharides on texture of SPI - CA hydrogels

样品	强度	黏性指数	胶着性指数	咀嚼性指数
SPI - CA	(8.17 ± 0.50) ^f		(0.18 ± 0.03) ^a	(0.37 ± 0.11) ^a
0.002 g/mL P	(10.63 ± 1.86) ^{def}	(-17.14 ± 1.75) ^{ab}	(1.21 ± 0.15) ^c	(1.07 ± 0.26) ^b
0.004 g/mL P	(9.17 ± 1.01) ^{ef}	(-35.43 ± 3.02) ^d	(1.49 ± 0.17) ^{de}	(1.42 ± 0.13) ^c
0.006 g/mL P	(10.33 ± 1.00) ^{def}	(-51.83 ± 3.47) ^f	(1.83 ± 0.12) ^f	(1.62 ± 0.14) ^{cd}
0.002 g/mL X	(13.83 ± 0.92) ^d	(-17.00 ± 1.43) ^{ab}	(0.90 ± 0.10) ^b	(0.92 ± 0.05) ^b
0.004 g/mL X	(13.01 ± 0.65) ^{de}	(-38.17 ± 1.86) ^d	(1.29 ± 0.08) ^{cd}	(1.35 ± 0.27) ^c
0.006 g/mL X	(12.69 ± 0.16) ^{de}	(-43.30 ± 1.70) ^e	(1.63 ± 0.10) ^{ef}	(1.58 ± 0.16) ^{cd}
0.002 g/mL K	(43.79 ± 2.93) ^e	(-27.00 ± 2.43) ^e	(1.53 ± 0.16) ^{de}	(1.40 ± 0.13) ^c
0.004 g/mL K	(53.95 ± 3.32) ^b	(-19.41 ± 2.11) ^b	(1.82 ± 0.05) ^f	(1.79 ± 0.18) ^d
0.006 g/mL K	(64.77 ± 4.32) ^a	(-14.22 ± 0.80) ^a	(2.33 ± 0.29) ^g	(1.87 ± 0.07) ^d

注:同列小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

随着果胶和黄原胶浓度的增加,凝胶黏性分别增加(51.83 ± 3.47)%和(43.30 ± 1.70)%。然而,随着 κ-卡拉胶浓度的增加,凝胶的黏性逐渐下降,这可能是由于 κ-卡拉胶主要形成刚性和脆性的网络。此外,3 种多糖均显著增加了对照组的胶着性($P < 0.05$)和咀嚼性,添加高浓度(质量浓度 0.006 g/mL)的 3 种多糖的凝胶都有较高的咀嚼性,这是由于蛋白质和多糖分子的聚集以及蛋白质和水分子之间的相互作用,凝胶过程产生了更坚固和紧凑的网络结构,从而使胶着性和咀嚼性都更大,其中 κ-卡拉胶的咀嚼性指数最高,为(1.87 ± 0.07)g。

2.6 低场核磁分析

低场核磁共振分析通常分为 3 个峰,分别是 0 ~ 10 ms(T_{2b})、10 ~ 100 ms(T_{21})和 100 ~ 1 000 ms(T_{22})。峰 1(T_{2b})表示与亲水基团结合的水,峰 2(T_{21})表示凝胶网络中存在的固定水,峰 3(T_{22})表示自由水^[31]。添加 3 种多糖均延迟了 T_{2b} 的弛豫时间,但是添加 0.002、0.004 g/mL 果胶增加了凝胶中 T_{2b} 的面积比例,表明添加适量果胶可以提高凝胶中强结合水的含量,与对照组相比,添加 0.006 g/mL 的果胶、黄原胶、κ-卡拉胶的凝胶的 T_{21} 分别从 95.16 ms 移动到 16.04、14.82、10.86 ms,表明添加多糖可以提高凝胶中固定水的结合能力,相较于果胶和黄原胶,κ-卡拉胶能够更紧密地结合蛋白和水^[32],这与 SEM 结果一致,当加入 κ-卡拉胶到凝胶中后形成的孔隙更加均匀,导致固定水的流动性受限^[32]。此外,当凝胶中蛋白质与水相互作用形成的连接得到加强时,凝胶的强度也相应得到提高^[33]。

如图 4 所示,随着果胶、黄原胶和 κ-卡拉胶的

添加,样品中的 T_{21} 的面积百分比显著下降($P < 0.05$),样品中出现了 T_{22} 信号,说明多糖的加入改变了蛋白质与水的结合状态^[34],使凝胶中的 T_{21} 转化为 T_{22} ,相同浓度下,添加 κ-卡拉胶的 T_{22} 的面积百分比大于黄原胶,添加黄原胶的 T_{22} 的面积百分比大于果胶,说明添加 κ-卡拉胶后的凝胶能结合更多的固定水,因此,相较于黄原胶和果胶,引入 0.006 g/mL κ-卡拉胶后的样品能形成疏水相互作用增强和发达的凝胶结构,此外,水状态的转变可能是多糖和大豆蛋白之间水竞争的结果^[35]。因此,凝胶中水分状态的变化受到添加的多糖类型和 SPI - CA 相互作用的影响,进一步导致凝胶网络的不同机械性能。

2.7 差示扫描量热和溶胀率分析

DSC 可以反映蛋白质分子之间或蛋白质和多糖分子之间的相互作用^[12]。图 5 显示,添加黄原胶和 κ-卡拉胶后的样品在加热过程中都出现了 89.95℃和 98.92℃之间的吸热峰,蛋白的最大变性温度 T_{max} 均增加,表明黄原胶和 κ-卡拉胶与 SPI - CA 之间的相互作用有利于更强的交联和稳定的网络结构的构建,这有利于提高凝胶的热稳定性^[36]。添加 0.002 g/mL 的果胶使对照组中蛋白的 T_{max} 从 83.63℃降低到 82.46℃,这可能与加入 0.002 g/mL 的果胶后,凝胶中二硫键的作用显著减弱有关^[37]。添加 0.006 g/mL 的果胶和黄原胶后, T_{max} 减小,表明添加过量的果胶和黄原胶后蛋白的热稳定性降低,凝胶网络更脆弱。

凝胶的溶胀行为与凝胶网络的孔径以及体系中聚合物的溶胀特性有关^[38],溶胀率随着 κ-卡拉胶

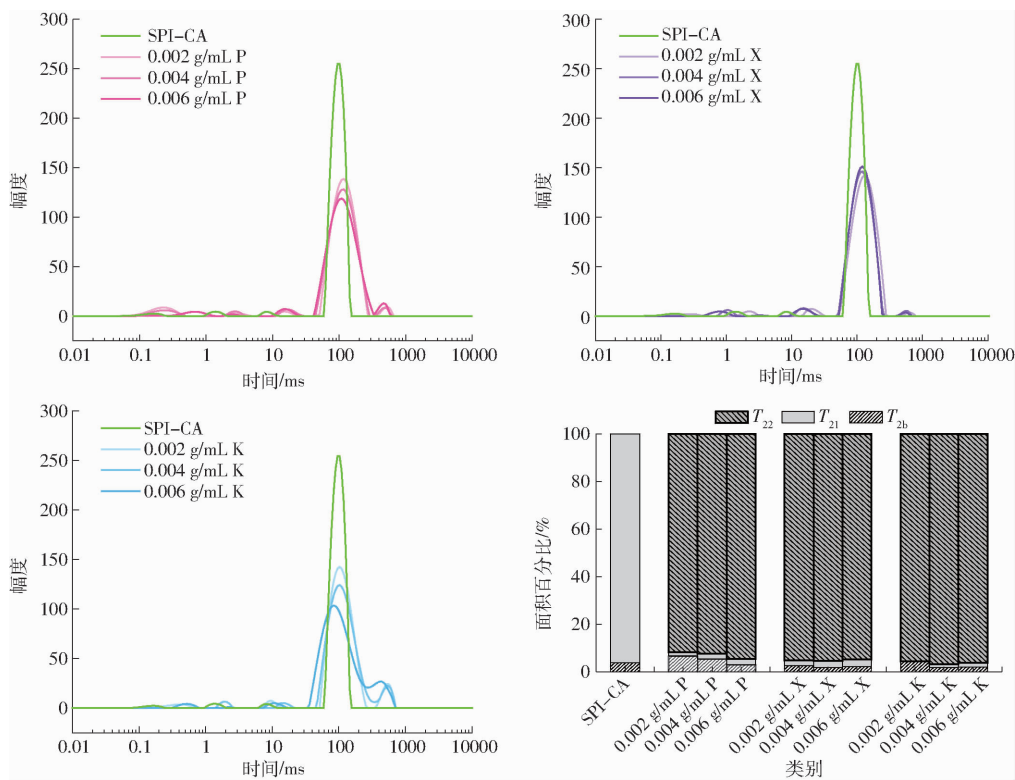


图 4 多糖对 SPI-CA 水凝胶中水分状态的影响

Fig. 4 Effect of polysaccharides on moisture state in SPI-CA hydrogels

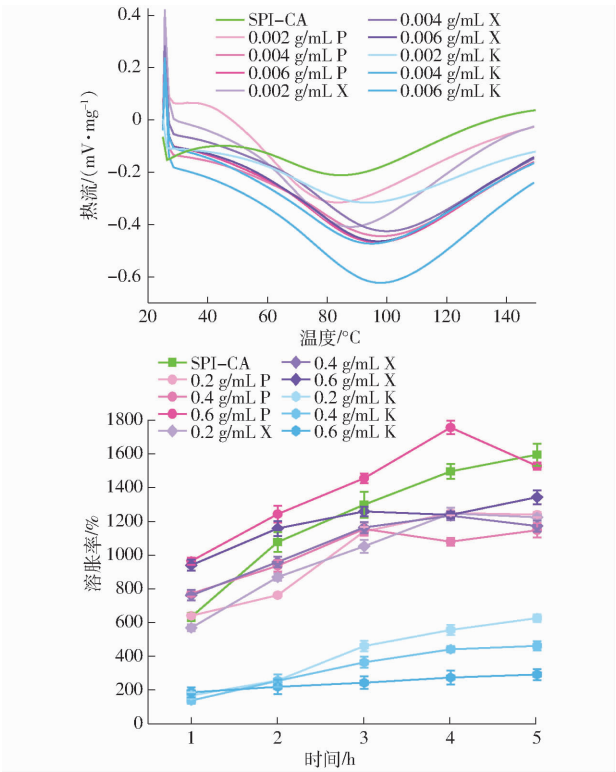


图 5 多糖对 SPI-CA 水凝胶热稳定性及溶胀率的影响

Fig. 5 Effect of polysaccharides on thermal stability and swelling rate of SPI-CA hydrogels

浓度的增加而逐渐降低,说明交联程度逐渐增加^[15],这意味着κ-卡拉胶的添加减少了SPI-CA链的运动,呈现出稳定的凝胶。0.002、0.004 g/mL的果胶和黄原胶的添加降低了对照组的溶胀率,这说

明适量的果胶和黄原胶能够促进聚合物链的延伸,提高凝胶的交联程度^[17,39],而添加高分子量的果胶后溶胀率明显增加,表明过量的果胶会阻碍凝胶网络的形成^[21]。

2.8 微观结构

与对照样品相比,在较低的多糖含量(质量浓度 0.002 g/mL)下,三元复合凝胶具有相似的特性,与对照样品相比,凝胶内部形成了均匀的小孔,凝胶网络更加致密。然而,添加 0.004、0.006 g/mL 的果胶或黄原胶后,凝胶中出现了明显的球形蛋白结构,这可能是由于多糖浓度增加时,带负电荷的多糖和蛋白的静电排斥引起了蛋白质的团聚,导致凝胶微结构的变化^[32]。此外,由于果胶和黄原胶本身具有增稠和填充的作用,这两种多糖的加入可以使蛋白质的凝胶结构更加紧密,然而当果胶和黄原胶质量浓度超过 0.002 g/mL 时,从图 6 中可以看到明显的多糖的聚集体,部分凝胶结构被破坏,这可能与果胶和黄原胶过度填充有关^[21]。当κ-卡拉胶被添加到 SPI-CA 凝胶中时,凝胶网络变得均匀而致密,此外,相较于果胶和黄原胶,当κ-卡拉胶浓度增加时,凝胶的孔隙更加均匀,并且凝胶结构致密,表面光滑平增,没有出现明显的蛋白或多糖聚集体,表明κ-卡拉胶与蛋白质之间的相互作用较强能够克服空间位阻^[40],形成微孔更小、更均匀的紧密连接的聚合体。

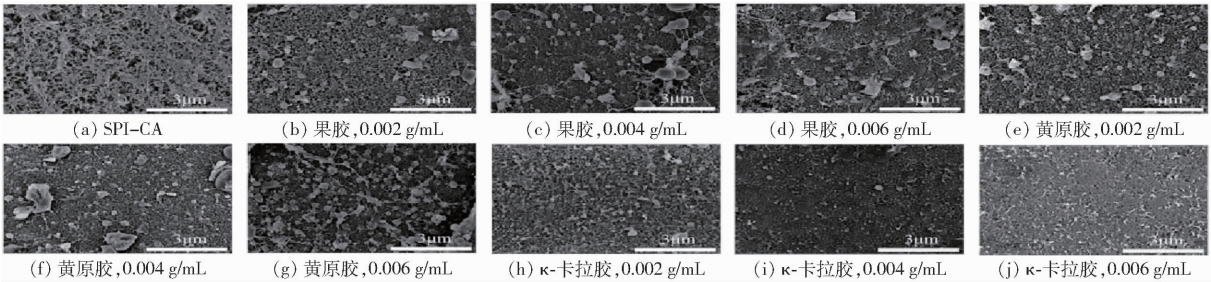


图 6 多糖对 SPI-CA 水凝胶微观结构的影响

Fig. 6 Effect of polysaccharides on microstructure of SPI-CA hydrogels

3 结束语

研究了不同浓度下果胶、黄原胶和 κ-卡拉胶对 SPI-CA 的凝胶性能和分子间作用力的影响。结果显示,黄原胶和 κ-卡拉胶明显增加了蛋白质的 β-折叠含量,减少了无规则卷曲含量,这对形成良好的凝胶结构有利。添加适量的果胶和黄原胶形成的凝胶更稳定,果胶和黄原胶浓度过高时,强烈的静电斥力会破坏凝胶的网络结构,降低凝胶的热稳定性,由于 κ-卡拉胶与蛋白质具有较强的

分子间作用力(氢键以及疏水相互作用),并且 κ-卡拉胶浓度增加时自身也能可以形成网络,提高凝胶的力学强度,因此,κ-卡拉胶浓度与凝胶硬度呈正相关。此外,相较于同浓度的果胶和黄原胶,添加 κ-卡拉胶的凝胶的 G' 和 G'' 更大,与固定水的结合能力也更强,且随着 κ-卡拉胶浓度的增加,凝胶结构更致密,孔隙更小。本研究为制备蛋白质-酚酸/多糖三元复合凝胶以及选择不同种类和浓度的多糖来改善蛋白质-酚酸凝胶的性能提供了参考。

参 考 文 献

[1] SNYDERS R, SHINGEL K I, ZABEIDA O, et al. Mechanical and microstructural properties of hybrid poly(ethylene glycol)-soy protein hydrogels for wound dressing applications[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2007, 83(1): 88-97.

[2] TRAN H Q, BENJAKUL S, SAE-LEAW T, et al. Protein-polyphenol conjugates: antioxidant property, functionalities and their applications[J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 91(8): 507-517.

[3] CAO Y, XIONG Y L. Chlorogenic acid-mediated gel formation of oxidatively stressed myofibrillar protein[J]. Food Chemistry, 2015, 180(2-3): 235-243.

[4] GUO Y, BAO Y H, SUN K F, et al. Effects of covalent interactions and gel characteristics on soy protein-tannic acid conjugates prepared under alkaline conditions[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112(14): 106293.

[5] BI C H, CHI S Y, WANG X Y, et al. Effect of flax gum on the functional properties of soy protein isolate emulsion gel[J]. LWT—Food Science and Technology, 2021, 149: 111846.

[6] VAN DEN BERG M, JARA F L, PILOSO F A M R. Performance of egg white and hydroxypropylmethylcellulose mixtures on gelation and foaming[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 48(2): 282-291.

[7] YAN Y, ZHU Q, DIAO C, et al. Enhanced physicochemical stability of lutein-enriched emulsions by polyphenol-protein-polysaccharide conjugates and fat-soluble antioxidant[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 101(1): 105447.

[8] YAN S, XIE F, 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(161): 125641.

[9] LIU F, WANG D, XU H, et al. Physicochemical properties of beta-carotene emulsions stabilized by chlorogenic acid-lactoferrin-glucose/polydextrose conjugates[J]. Food Chemistry, 2016, 196(10): 338-346.

[10] JIA N, LIN S, ZHANG F, et al. Improved effect of flaxseed gum on the weakened gelling properties of myofibrillar protein induced by catechin[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131136.

[11] ZHENG L, WANG Z, KONG Y, et al. Different commercial soy protein isolates and the characteristics of Chiba tofu[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 110(14): 106115.

[12] JIANG L, REN Y, XIAO Y, et al. Effects of Mesona Chinensis polysaccharide on the thermostability, gelling properties, and molecular forces of whey protein isolate gels[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 242(26): 116424.

[13] ZHANG Q, GU L, SU Y, et al. Development of soy protein isolate/kappa-carrageenan composite hydrogels as a delivery system for hydrophilic compounds: monascus yellow[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 172: 281-288.

[14] 潘泓彬, 马高兴, 裴斐, 等. 金针菇多糖对大豆蛋白凝胶的增强作用及其结构表征[J]. 食品科学, 2022, 43(20): 102-108.

PAN Hongbin, MA Gaoping, PEI Fei, et al. Enhancing effect of *Flammulina velutipes* polysaccharide on gelation properties of soybean protein isolate and structural characterization of mixed gels[J]. Food Science, 2022, 43(20): 102-108. (in Chinese)

[15] YAN M, LI B, ZHAO X, et al. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 907–914.

[16] 贾娜, 孙嘉, 刘丹, 等. 槲皮素对氧化条件下猪肉肌原纤维蛋白结构及凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(10): 45–51.

JIA Na, SUN Jia, LIU Dan, et al. Effect of quercetin on the structure and gel properties of pork myofibrillar protein under oxidative conditions[J]. Food Science, 2021, 42(10): 45–51. (in Chinese)

[17] KYOMUGASHO C, CHRISTIAENS S, SHPIGELMAN A, et al. FT–IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices[J]. Food Chemistry, 2015, 176: 82–90.

[18] HE Z, LIU C, ZHAO J, et al. Physicochemical properties of a ginkgo seed protein-pectin composite gel[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118(14): 106781.

[19] YANG X, LI A, LI D, et al. Applications of mixed polysaccharide-protein systems in fabricating multi-structures of binary food gels—a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 109: 197–210.

[20] ZHENG H, BEAMER S K, MATAK K E, et al. Effect of Kappa-carrageenan on gelation and gel characteristics of Antarctic krill (*Euphausia superba*) protein isolated with isoelectric solubilization/precipitation[J]. Food Chemistry, 2019, 278(12): 644–652.

[21] CHEN J, DENG T, WANG C, et al. Effect of hydrocolloids on gel properties and protein secondary structure of silver carp surimi[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(5): 2252–2260.

[22] MU Y, SUN J, OBADI M, et al. Effects of saccharides on the rheological and gelling properties and water mobility of egg white protein[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108(14): 106038.

[23] KER Y C, CHEN R H, WU C S. Relationships of secondary structure, microstructure, and mechanical properties of heat-induced gel of soy 11S globulin[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014, 57(4): 536–541.

[24] HU B, CHEN Q, CAI Q, et al. Gelation of soybean protein and polysaccharides delays digestion[J]. Food Chemistry, 2017, 221(12): 1598–1605.

[25] JONES O G, MCCLEMENTS D J. Recent progress in biopolymer nanoparticle and microparticle formation by heat-treating electrostatic protein-polysaccharide complexes[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2011, 167(1–2): 49–62.

[26] SOW L C, NICOLE C J M, LIAO Q X, et al. Effects of κ -carrageenan on the structure and rheological properties of fish gelatin[J]. Journal of Food Engineering, 2018, 239(31): 92–103.

[27] LEI Y C, ZHAO X, LI D, et al. Effects of κ -carrageenan and guar gum on the rheological properties and microstructure of phycocyanin gel[J]. Foods, 2022, 11(5): 734.

[28] ZHUANG X, JIANG X, ZHOU H, et al. Insight into the mechanism of physicochemical influence by three polysaccharides on myofibrillar protein gelation[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 229: 115449.

[29] XIE Y, YU X, WEI S, et al. Impact of homogenization on the physicochemical properties of the cod protein gel[J]. LWT—Food Science and Technology, 2021, 149: 111841.

[30] 熊拯. 大豆分离蛋白-阴离子多糖复合体系凝胶质特性研究[J]. 粮油加工, 2010(9): 133–136.

[31] SANCHEZ-ALONSO I, MARTINEZ I, SANCHEZ-VALENCIA J, et al. Estimation of freezing storage time and quality changes in hake (*Merluccius merluccius*, L.) by low field NMR[J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1626–1634.

[32] LI J, TANG W, LEI Z, et al. Effect of polysaccharides on the gel characteristics of “Yu Dong” formed with fish (*Cyprinus carpio* L.) scale aqueous extract[J]. Food Chemistry, 2021, 338: 127792.

[33] WALAYAT N, WANG X, LIU J, et al. Kappa-carrageenan as an effective cryoprotectant on water mobility and functional properties of grass carp myofibrillar protein gel during frozen storage[J]. LWT—Food Science and Technology, 2022, 154: 112675.

[34] LEE A C, HONG Y H. Coacervate formation of α -lactalbumin-chitosan and β -lactoglobulin-chitosan complexes[J]. Food Research International, 2009, 42(5–6): 733–738.

[35] LI J, YADAV M P, LI J. Effect of different hydrocolloids on gluten proteins, starch and dough microstructure[J]. Journal of Cereal Science, 2019, 87(3): 85–90.

[36] XIAO Y, LI J, LIU Y, et al. Gel properties and formation mechanism of soy protein isolate gels improved by wheat bran cellulose[J]. Food Chemistry, 2020, 324(25): 126876.

[37] GUO Z, LIU M, XIANG X, et al. Effects of inulins with various molecular weights and added concentrations on the structural properties and thermal stability of heat-induced gliadin and glutenin gels[J]. LWT—Food Science and Technology, 2021, 149: 111891.

[38] FARJAMI T, MADADLOU A, LABBAFI M. Characteristics of the bulk hydrogels made of the citric acid cross-linked whey protein microgels[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 50(2): 159–165.

[39] HOU J J, GUO J, WANG J M, et al. Edible double-network gels based on soy protein and sugar beet pectin with hierarchical microstructure[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 50(2): 94–101.

[40] REN Z, LI Z, CHEN Z, et al. Characteristics and application of fish oil-in-water pickering emulsions structured with tea water-insoluble proteins/ κ -carrageenan complexes[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 114: 106562.