

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.05.043

基于美拉德反应的酶改性大豆蛋白冻融稳定性研究

王喜波 于洁 王小丹 陈爽 崔强 江连洲

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为提高大豆分离蛋白(SPI)的冻融稳定性,利用胰蛋白酶对SPI酶解处理得到不同水解度的大豆分离蛋白水解物(SPH),随后与葡聚糖发生美拉德反应生成大豆分离蛋白-葡聚糖共聚物(SPI-D)和大豆分离蛋白水解物-葡聚糖共聚物(SPH-D),研究基于美拉德反应的酶改性SPI的冻融稳定性。接枝度、褐变指数和内源荧光光谱的测定证明了SPI-D和SPH-D有美拉德反应的特定荧光物质生成,蛋白改性朝着有利于冻融稳定的方向进行。比较发现3次冻融循环后SPH-D乳液具有更好的冻融稳定性,尤其当水解度为3%时,SPH3-D乳液的粒径尺寸、聚结程度和出油率分别比SPI-D乳液降低了48.28%、81.61%和63.81%。激光共聚焦显微镜观察发现SPH3-D乳液在3次冻融循环后蛋白没有明显的桥联絮凝现象,油滴依然被紧密地包裹在界面膜中,表现出较好的冻融稳定性。

关键词: 大豆分离蛋白; 酶改性; 美拉德反应; 冻融稳定性

中图分类号: TS201.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2018)05-0361-07

Investigation on Freeze-thaw Stability of Soy Protein via Enzymatic Modification Based on Maillard Reaction

WANG Xibo YU Jie WANG Xiaodan CHEN Shuang CUI Qiang JIANG Lianzhou
(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Soy protein due to its amphiphilic property has been widely accepted as an emulsifier in the food industry. Many emulsion products such as ice cream or other frozen food need freezing storage to either extend products shelf life and/or maintain the best sensory/texture attributes. In this case, the freeze-thaw stability is essential for this type of application. When the oil-in-water emulsions were frozen, the absorption of oil-water interface was decreased, resulting in coalescence, flocculation, sedimentation, creaming, oiling off and Ostwald ripening. Therefore, the investigation of limited hydrolysis combined with Maillard-induced glycation on improving the freeze-thaw stability of soy protein isolate (SPI) was carried out. Soy protein isolate hydrolysate (SPH) was first prepared by trypsin with different hydrolysis degrees. Afterwards, SPI and SPH were conjugated with dextran to form a covalent complex macromolecule, which were named as SPI-D and SPH-D, respectively. Covalent bond was formed between SPI/SPH and dextran molecules via the glycation reaction when it was confirmed by grafting degree, browning index and fluorescence spectra analysis. Subsequently, the freeze-thaw stability of SPI-D and SPH-D was evaluated. After three freeze-thaw cycles, the characters of SPH-D emulsions exhibited smaller values than those of SPI-D emulsions in terms of particle size, coalescence degree and oiling off. In addition, SPH3-D emulsions were more stable after freeze-thaw treatment compared with other emulsions. After three freeze-thaw cycles, the particle size, coalescence degree and oiling off of SPH3-D were decreased by 48.28%, 81.61% and 63.81% compared with SPI-D, respectively. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was used to investigate its microstructure. It was found that the fresh emulsions were distributed uniformly without obvious differences. After three freeze-thaw cycles, there was a large number of irregularly shaped individual oil droplets appeared in SPI-D emulsions. In sharp contrast, oil droplets and aggregates were all relatively small in SPH-D emulsions, which was in accordance with the results of particle size, coalescence degree and oiling off. Thus, including information on limited proteolysis composition and SPH-D structure in order to further interpret this relation was necessary.

Key words: soy protein isolate; enzymatic modification; Maillard reaction; freeze-thaw stability

收稿日期: 2017-10-30 修回日期: 2018-01-02

基金项目: 国家大豆产业技术体系项目(CARS-04-PS28)

作者简介: 王喜波(1975—),男,副教授,主要从事粮食油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: wangxibo@neau.edu.cn

0 引言

大豆分离蛋白因具有两亲结构常被当做乳化剂应用在食品加工领域^[1]。为了延长保质期和维持最佳口感,许多食品需要通过冷冻技术来保存。然而,蛋白乳化体系对环境变化极为敏感^[2],在冷冻过程中,乳液界面膜上的蛋白相互作用力减弱,尖锐的冰晶极易刺破界面膜破坏乳液的油-水平衡,使乳液出现乳析、聚结、絮凝和奥氏熟化等不稳定现象^[3],严重限制了大豆分离蛋白在植脂奶油及冷冻食品中的应用。因此,对蛋白进行改性处理以提高其功能性非常必要。

酶改性和美拉德反应是两种常用的蛋白改性方法。许多研究表明,蛋白经过酶法改性后会暴露出更多的疏水基团^[4],同时增加分子的柔性^[5],提高大豆蛋白的功能性质^[6]。美拉德反应是一种安全有效的蛋白改性方法,改性蛋白能够快速吸附至油水界面增加界面膜的厚度^[7],糖链的引入增加了油滴之间空间位阻的排斥力^[8],提高蛋白的冻融稳定性。近几年,酶改性联合美拉德反应对大豆蛋白进行改性处理已成为研究的热点。ZHANG等^[9]发现单纯的酶解可以使大豆分离蛋白的抗氧化性得到提升,而大豆分离蛋白水解物与麦芽糊精反应后,其抗氧化性进一步得到提高。WAITER等^[10]研究了限制性酶解和美拉德反应联合作用对大豆蛋白免疫反应性的影响,发现蛋白水解度为7.8%时,与多糖的共聚物可以有效降低大豆蛋白的免疫反应性。然而,目前关于酶改性联合美拉德反应提高乳液冻融稳定性的研究还未见报道。

本文利用胰蛋白酶对SPI(大豆分离蛋白)酶解处理得到不同水解度的SPH(大豆分离蛋白水解物),随后与葡聚糖发生美拉德反应生成SPI-D(大豆分离蛋白-葡聚糖)和SPH-D(大豆分离蛋白水解物-葡聚糖)。通过接枝度、褐变指数、内源荧光光谱、粒径大小、聚结程度和出油率来评价改性蛋白的冻融稳定性,选择出最优酶解体系,随后利用激光共聚焦显微镜观察最优酶解体系的微观结构,为进一步探究提高SPI冻融稳定性的方法提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白,采用碱溶酸沉法^[11]提取,凯氏定氮法测定蛋白质量分数为90.96%;胰蛋白酶,美国Sigma公司;葡聚糖(右旋糖酐分子质量40 Ku),国药集团化学试剂有限公司;九三大豆油,市售;其

他试剂均为分析纯。

T18 Basic型高速分散机,德国IKA公司;AVP-2000型高压均质机,英国Stansted Fluid Power公司;F-4500型荧光分光光度计,日本日立公司;TU-1800型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;Master Sizer 2000型激光粒度分析仪,英国Malvern公司;TCS SP2型激光共聚焦显微镜,德国Leica公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆分离蛋白水解物的制备

根据前期试验,用磷酸盐缓冲溶液(10 mmol/L, pH值8.0)将SPI配制质量浓度为2 mg/mL的溶液,加入质量分数为0.25%的胰蛋白酶,在37℃恒温水浴锅中分别反应15、120、200、255、300 min后,于90℃水浴灭活10 min,冷却至室温(20℃)后冻干,得到水解度分别为1%、2%、3%、4%和5%的SPH。

1.2.2 SPI-D和SPH-D接枝物的制备

将SPI(SPH)和葡聚糖按1:1溶于磷酸盐缓冲溶液(10 mmol/L, pH值7.0),蛋白质量浓度为2 mg/mL,并添加质量浓度为0.02 mg/mL的叠氮钠以防止微生物滋生。将混匀的样品液密封后置于95℃水浴锅中反应1.5 h,取出,冷却至室温,冻干。

1.2.3 乳液制备

用磷酸盐缓冲溶液(10 mmol/L, pH值7.0)将SPI-D和SPH-D配制质量浓度2 mg/mL的样品液,加入体积分数10%的大豆油,在10 800 r/min条件下均质处理1 min形成初乳液,然后以40 MPa的压力高压均质处理,一次得到SPI-D乳液和SPH-D乳液。

1.2.4 冻融循环

将不同样品乳液立即转移到25 mL的具塞试管中,-20℃冷冻储存22 h后,在25℃水浴中解冻2 h,取部分样品进行试验分析,如此循环3次。

1.2.5 接枝度和褐变指数测定

将SPI-D和SPH-D以2 mg/mL的质量浓度溶于去离子水中。取200 μL样品溶液加入到4 mL OPA(邻苯二甲醛)试剂中,混匀后35℃水浴保温反应2 min,以OPA试剂做空白,在340 nm紫外波长处测定吸光度,接枝反应前后吸光度的变化率即为接枝度。OPA试剂按照王喜波等^[12]的方法配制。以去离子水做空白对照,在420 nm波长下测得SPI-D和SPH-D样品溶液的吸光度即为其褐变指数。

1.2.6 内源荧光光谱测定

用磷酸盐缓冲溶液(10 mmol/L, pH值7.0)将

SPI、SPI-D 和 SPH-D 配制成质量浓度为 5 mg/mL 的样品溶液,设置激发波长 347 nm,发射波长范围 375 ~ 550 nm 进行扫描^[13]。然后将上述样品溶液稀释 20 倍使其质量浓度为 0.25 mg/mL,设置激发波长 290 nm,发射波长范围 300 ~ 400 nm 进行扫描。激发和发射狭缝为 5.0 nm,扫描速度 240 nm/min。

1.2.7 粒径测定

利用 Master Sizer 2000 型激光粒度分析仪测定乳液的平均粒径,设置分散相折射率分别为 1.460 和 0.001,连续相折射率为 1.330^[14]。将初始乳液和经过冻融循环后的乳液用质量分数为 1% 的 SDS (十二烷基硫酸钠)稀释 5 倍后,分散在去离子水中使遮光度达到 10%,测定其体积平均粒径 $D_{4,3}$ 。

1.2.8 聚结程度测定

聚结是乳液中油滴分子之间经过接触合并形成大油滴的过程。聚结程度计算公式为

$$C = \frac{D_{4,3f} - D_{4,3i}}{D_{4,3i}} \times 100\% \quad (1)$$

式中 $D_{4,3f}$ ——冻融后乳液的体积平均粒径

$D_{4,3i}$ ——初始乳液的体积平均粒径

1.2.9 出油率测定

参考 PAIANUWECH 等^[15]的方法略加改动。称取 0.015 g 苏丹 III 试剂加入到 1 000 g 大豆油中,室温搅拌 12 h 得到苏丹 III 油溶液。准确称取 4 g 苏丹 III 油溶液和 16 g 待测乳液于 50 mL 离心管中,振荡混匀,以 16 000 g (4℃) 的离心力离心 20 min,收集上层油液于 508 nm 处测定吸光度,同时以大豆油做空白。出油率计算公式为

$$\varphi = \frac{m_0(a-1)}{m_c\varphi_d} \times 100\% \quad (2)$$

式中 m_0 ——苏丹 III 油溶液的质量

m_c ——乳液的质量

a ——苏丹 III 油溶液吸光度与离心后苏丹 III 油溶液吸光度的比值

φ_d ——乳液中油相的质量分数

1.2.10 激光共聚焦显微镜分析

取 1 mL 样品乳液于试管中,加入 40 μ L 尼罗红染料和 40 μ L 尼罗蓝染料,充分振荡混匀 5 min。取 10 μ L 染色后的样品乳液滴加到载玻片中央,盖上盖玻片后分别在 488 nm 和 633 nm 激发波长下进行激光共聚焦扫描,油镜进行图像采集,红色代表油滴,绿色代表蛋白质。

1.3 数据处理

所有试验重复 3 次取平均值,采用 SPSS 19.0 进行数据处理和分析,使用 Origin 8.6 软件制图。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白样品接枝度和褐变指数分析

研究表明,美拉德反应程度越高,褐变程度越大,且蛋白的美拉德反应程度与蛋白水解程度密切相关^[9]。图 1 中 SPH1-D ~ SPH5-D 表示水解度分别为 1% ~ 5% 的大豆分离蛋白水解物与葡聚糖的接枝物。由图 1 可以看出,随着水解程度的增加,接枝度和褐变指数均呈现先降低后升高的趋势。在水解度为 2% 时,接枝度与褐变指数最低,分别为 6.32% 和 0.524,可能是由于酶解和美拉德反应共同作用导致改性产物结构发生变化^[16]。当水解度达到 4% 时,SPH-D 的接枝度明显高于 SPI-D 的接枝度,这是因为酶解使蛋白结构展开,柔性增加,暴露出更多的赖氨酸残基,更易与葡聚糖发生反应^[17]。此外,胰蛋白酶的酶切位点以及不同亚基的酶解过程不同步等因素都会影响蛋白与葡聚糖的美拉德反应。另外,SPI-D 褐变指数明显高于 SPH-D,这可能是由 SPI 比 SPH 分子量更大导致的^[18]。

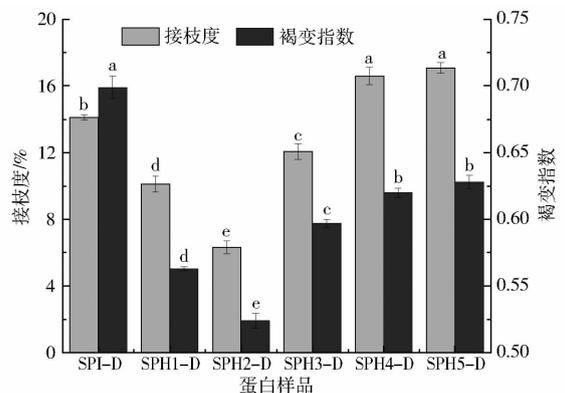


图 1 不同蛋白样品的接枝度和褐变指数

Fig.1 Grafting degree and browning index of different protein samples

注:不同字母表示不同样品之间差异显著,下同。

2.2 不同蛋白样品内源荧光光谱分析

荧光物质是美拉德反应高级阶段的小分子物质,可灵敏地反映其早期过程。固定激发波长 347 nm,扫描得到的荧光光谱如图 2a 所示,其荧光强度表征了高级阶段荧光物质的产生状态。SPI 在发射波长为 450.0 nm 处有最大荧光强度,而 SPI-D 和 SPH-D 在发射波长 439.4 ~ 443.4 nm 之间有最大荧光强度,最大荧光强度发生了蓝移(即向短波方向移动)且明显高于 SPI,说明有美拉德反应的特征荧光小分子物质生成。BENJAKUL 等^[19]和 LERTITIKUL 等^[20]研究发现,猪血浆蛋白的美拉德反应产物荧光强度明显高于猪血浆蛋白,与本试验结果一致。

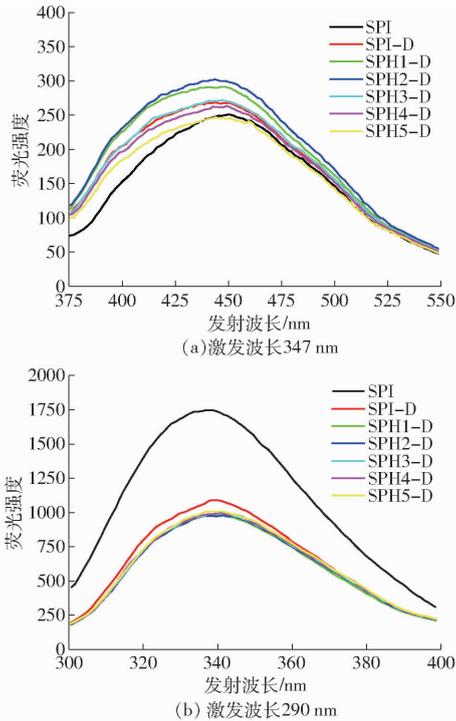


图2 不同蛋白样品的荧光光谱

Fig. 2 Fluorescence spectra of different protein samples

大豆分离蛋白中的色氨酸残基有很强的荧光性,对微观环境的变化非常敏感,因此能够灵敏地反映蛋白质的构象变化^[21]。固定激发波长290 nm,扫描不同样品的荧光光谱如图2b所示。大豆分离蛋白经过酶解和美拉德反应之后,其内源荧光光谱的最大荧光强度发生了红移(即向长波方向移动),说明糖基化反应会改变蛋白质色氨酸残基的周围环境,使其所处环境极性增加^[22],CORZOMARTINEZ等^[23]在 β -乳球蛋白-半乳糖糖基化改性的研究中也得到相似的结果,共价复合物的最大荧光强度在糖基化反应后发生红移,表明色氨酸残基向更加亲水的环境中暴露。同时可以明显看出SPH-D相较于SPI-D红移程度更大,说明酶解能使大豆分离蛋白结构展开,被包埋在结构内部的色氨酸基团暴露,增加其表面疏水性^[24]。而糖基化后的蛋白荧光强度降低,推测是大豆分离蛋白与糖结合后,取代了大豆分离蛋白表面分子的原因^[25]。

2.3 不同蛋白乳液平均粒径分析

一般来说,蛋白乳液的液滴平均粒径越小,乳液越稳定^[26]。冻融循环对乳液液滴平均粒径的影响如图3所示。在冻融循环之前,SPI-D初始乳液的粒径为 $(1.37 \pm 0.02) \mu\text{m}$,经过3次冻融循环后,SPI-D乳液粒径分别为 $(1.7 \pm 0.11) \mu\text{m}$ 、 $(3.67 \pm 0.21) \mu\text{m}$ 和 $(4.48 \pm 0.24) \mu\text{m}$ 。由此发现SPI-D乳液在冻融循环后粒径明显增加,单纯的蛋白和多糖在短时间内不能充分反应生成足够多的大分子复合

物,在油滴周围形成的界面层并不十分紧密,小油滴很容易从界面层渗透出来接触聚结成大的油滴,破坏乳液的冻融稳定性^[27]。研究表明,大豆分离蛋白在酶解后会暴露出更多的疏水基团并生成一些具有良好界面活性的多肽^[28],因此SPH-D乳液经3次冻融循环后粒径尺寸增加程度较小,相比于SPI-D乳液更加稳定。同时可以发现SPH3-D乳液的粒径明显小于其他样品乳液,经3次冻融循环后其粒径比SPI-D降低了48.28%,说明SPH3-D乳液的冻融稳定性最好。另外,虽然图1中SPH1-D和SPH2-D的接枝度均低于SPI-D,但它们的粒径明显比SPI-D小,暗示了在酶解联合糖基化反应体系中,糖基化程度的高低并不能完全代表冻融稳定性的强弱。

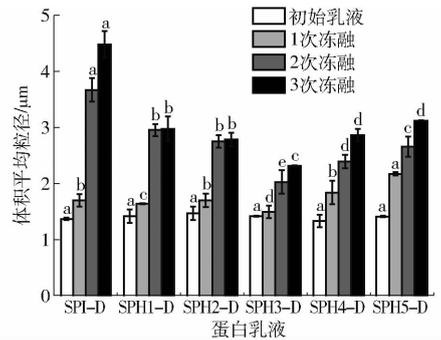


图3 冻融后不同蛋白乳液的体积平均粒径

Fig. 3 Volume average partial size of different protein emulsions after freeze-thaw cycles

2.4 不同蛋白乳液聚结程度和出油率分析

经过冻融处理后,乳液界面膜变得不稳定,油滴之间容易聚结。乳液的冻融循环次数越多,其聚结程度越大。不同乳液经冻融循环后的聚结程度变化如图4所示,由于酶解能够把大分子量的蛋白切成分子量相对较小的肽片段从而改变其柔性和空间结构^[29],更易与多糖结合形成致密的界面膜,可以有效抑制油滴聚集,因此SPH-D样品的聚结程度明显低于SPI-D。随着水解度的增大,乳液的聚结程度整体呈现先降低后升高的趋势,当水解度为3%时,乳液每次冻融循环后的聚结程度都低于其他样品乳液,分别为5.47%、38.09%和41.24%,比SPI-D的聚结程度分别降低了89.85%、68.96%和81.61%。这可能是由于适度的酶解能暴露蛋白的疏水基团,使其更易吸附在油滴表面抵抗冷冻对乳液稳定性的破坏,然而过度酶解会生成过多的小分子片段,降低多肽在界面膜中的相互作用,导致乳液中的油滴结晶刺破较薄的界面膜,发生聚结^[24]。

不同蛋白乳液的出油率与聚结程度有相似的变化规律(图5),糖链的引入以及适度的酶解作用使SPH-D共价复合物具有较好的乳化性,在油水体系

系中能够迅速地在油滴表面形成相对较厚的界面膜,抑制油滴之间聚合^[30]。ZHANG 等^[31]利用超声和微波辅助糖基化提高 SPI-D 乳液的冻融稳定性,经过 3 次冻融循环后,乳液出油率在 9% 左右,而从图 5 可以看出,SPH-D 乳液的出油率明显低于 9%。由此进一步说明酶改性联合美拉德反应可以明显提高大豆分离蛋白的冻融稳定性。当水解度为 3% 时,3 次冻融循环后乳液出油率比 SPI-D 降低了 63.81%,冻融稳定性最好。

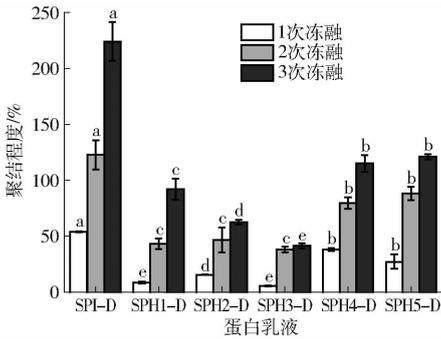


图 4 冻融后不同蛋白样品的聚结程度
Fig. 4 Coalescence degree of different protein emulsions after freeze-thaw cycles

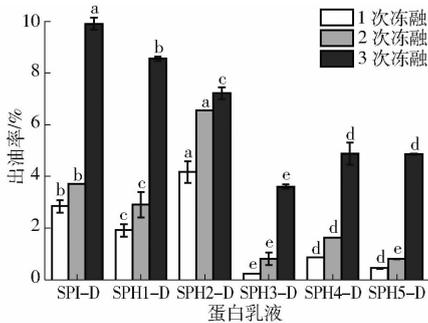


图 5 冻融后不同蛋白样品的出油率
Fig. 5 Oil production rate of different protein emulsions after freeze-thaw cycles

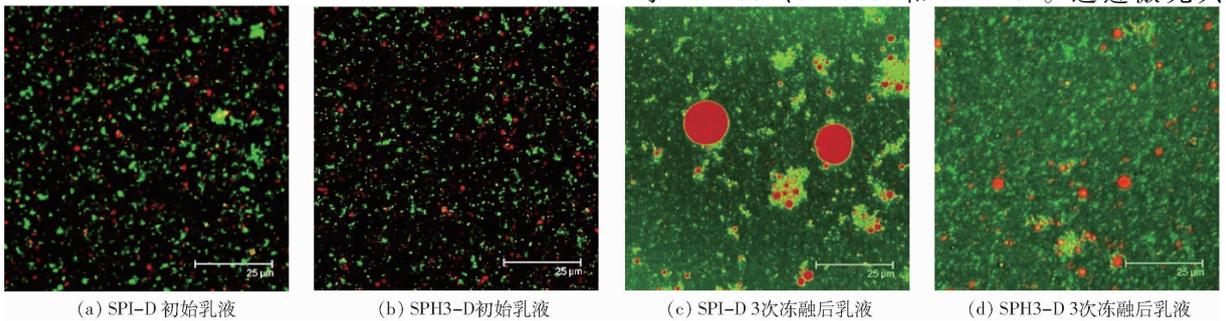


图 6 SPI-D 和 SPH3-D 冻融前后的激光共聚焦显微结构

Fig. 6 Confocal laser scanning microscopies of SPI-D and SPH3-D emulsions after three freeze-thaw cycles

焦显微镜对 SPI-D 乳液和 SPH3-D 乳液微观结构的观察,发现单纯的美拉德反应对提高乳液的冻融稳定性是有积极作用的。SPH3-D 乳液在 3 次冻融循环后蛋白没有明显的桥联絮凝现象,油滴依然被紧密地包裹在界面膜中,表现出较好的冻融稳定性。

2.5 不同蛋白乳液激光共聚焦显微镜分析

通过激光共聚焦显微镜对 SPI-D (图 6a,6c) 和 SPH3-D (图 6b,6d) 的初始乳液和经过 3 次冻融循环后乳液的微观结构进行观察,发现两种蛋白样品初始乳液的液滴分布均匀一致,油滴尺寸细小,微观结构并没有明显区别。SPI-D 乳液经过 3 次冻融循环后出现较为明显的蛋白聚集现象,部分小油滴聚结成大的油滴,油滴表面几乎观察不到绿色的蛋白界面膜,但仍然有很多小油滴被紧密地包裹在界面膜内,说明单纯的美拉德反应对提高乳液的冻融稳定性是有一定作用的,这与孙洪蕊等^[8]的观点一致。而 SPH3-D 乳液在 3 次冻融循环之后油滴尺寸略有增大,蛋白之间只出现轻微的桥联絮凝现象,表现出较高的冻融稳定性。LI 等^[32]探究了大豆分离蛋白水解物的美拉德反应并观察其微观结构,发现大豆肽-葡聚糖共聚物具有极高的乳化稳定性,能够形成较厚的吸附层防止液滴的聚集和絮凝,与本试验结果十分吻合。这是因为适度的酶解能降低蛋白中球形分子的数量,提高蛋白质的分子柔性,使得蛋白质分子在油水界面上的排列更为有序^[33-34],形成具有良好抗应变能力的界面膜,提高了乳液冻融稳定性。这与乳液平均粒径、聚结程度和出油率的测定结果一致。

3 结论

(1) 基于美拉德反应的酶改性作用可以显著提高大豆分离蛋白的冻融稳定性。经过 3 次冻融循环后,SPH-D 乳液的冻融稳定性明显高于 SPI-D 乳液,当水解度为 3% 时,SPH3-D 乳液的粒径尺寸、聚结程度和出油率分别比 SPI-D 乳液降低了 48.28%、81.61% 和 63.81%。通过激光共聚

(2) 酶改性能使蛋白暴露出更多的疏水基团并产生一些具有良好界面活性的多肽,有效改善蛋白的界面性质,多糖的空间位阻效应能增加油滴之间的排斥力,同时美拉德反应引入的糖链使蛋白水解物形成亲水基团,从而提高乳液的乳化活性和乳化稳定性。

参 考 文 献

- 1 WAGNER J R, GUEGUEN J. Surface functional properties of native, acid-treated, and reduced soy glycinin. 2. Emulsifying properties[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1999, 47(6): 2181–2187.
- 2 KIM H J, DECKER E A, MCCLEMENTS D J. Impact of protein surface denaturation on droplet flocculation in hexadecane oil-in-water emulsions stabilized by beta-lactoglobulin[J]. Journal Agricultural & Food Chemistry, 2002, 50(24): 7131–7137.
- 3 MAGNUSSON E, ROSEN C, NILSSON L. Freeze-thaw stability of mayonnaise type oil-in-water emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(4): 707–715.
- 4 BATTAGLINO R A, HUERGO M, PILOSOFF A M R, et al. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae*, in solid state fermentation[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1991, 35(3): 292–296.
- 5 赵新淮, 侯瑶. 大豆蛋白限制性酶解对乳化性质和吸油性的影响[J]. 农业机械学报, 2009, 40(12): 159–163.
ZHAO Xinhuai, HOU Yao. Limited hydrolysis of soybean proteins and modifications in emulsifying property and oil absorption capacity[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(12): 159–163. (in Chinese)
- 6 MARTINEZ K D, FARIAS M E, AMR P. Effects of soy protein hydrolysis and polysaccharides addition on foaming properties studied by cluster analysis[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(7): 1667–1676.
- 7 DIFITS 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.
- 8 孙洪蕊, 张英华, 王喜波, 等. 提高大豆蛋白冻融后乳化性改性工艺优化[J]. 农业工程学报, 2014, 30(7): 281–286.
SUN Hongrui, ZHANG Yinghua, WANG Xibo, et al. Processing optimization for improving soybean protein's emulsifying properties after freeze-thaw[J]. Transactions of the CSAE, 2014, 30(7): 281–286. (in Chinese)
- 9 ZHANG Y, TAN C, ZHANG X, et al. Effects of maltodextrin glycosylation following limited enzymatic hydrolysis on the functional and conformational properties of soybean protein isolate[J]. European Food Research & Technology, 2014, 238(6): 957–968.
- 10 WALTER J, GREENBERG Y, SRIRAMARAO P, et al. Limited hydrolysis combined with controlled Maillard-induced glycation does not reduce immunoreactivity of soy protein for all sera tested[J]. Food Chemistry, 2016, 213: 742–752.
- 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 王喜波, 张泽宇, 葛洪如, 等. 超声辅助制备抗冻融大豆分离蛋白工艺优化[J]. 农业工程学报, 2016, 32(14): 272–278.
WANG Xibo, ZHANG Zeyu, GE Hongru, et al. Processing optimization for improving freeze-thaw stability of soybean protein isolate by ultrasonic assisted glycosylation[J]. Transactions of the CSAE, 2016, 32(14): 272–278. (in Chinese)
- 13 MORALES F J, JIMENEZ P S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence[J]. Food Chemistry, 2001, 72(1): 119–125.
- 14 ZHAO L, MOUMING Z, NING L, et al. Physicochemical properties of peanut oil-based diacylglycerol and their derived oil-in-water emulsions stabilized by sodium caseinate[J]. Food Chemistry, 2015, 184: 105–113.
- 15 PAIANUWECH J, POTINENI R, RROBERTS R F, et al. A method to determine free fat in emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17(1): 55–62.
- 16 ZHANG B, GUO X, ZHU K, et al. Improvement of emulsifying properties of oat protein isolate-dextran conjugates by glycation [J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 127: 168–175.
- 17 IPSEN R, OTTE J, SHARMA R, et al. Effect of limited hydrolysis on the interfacial rheology and foaming properties of beta-lactoglobulin A[J]. Colloids & Surfaces B Biointerfaces, 2001, 21(1–3): 173–178.
- 18 NOOSHKAM M, MADADLOU A. Microwave-assisted isomerisation of lactose to lactulose and Maillard conjugation of lactulose and lactose with whey proteins and peptides[J]. Food Chemistry, 2016, 200: 1–9.
- 19 BENJAKUL S, LERTITTIKUL W, BAUER F. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein – sugar model[J]. Food Chemistry, 2005, 93(2): 189–196.
- 20 LERTITTIKUL W, BENJAKUL S, TANAKA M. Characteristics and antioxidative activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH[J]. Food Chemistry, 2007, 100(2): 669–677.
- 21 MATIACEVICH S B, BUERA M P. A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction[J]. Food Chemistry, 2006, 95(3): 423–430.
- 22 SPONTON O E, PEREZ A A, CARRARA C R, et al. Impact of environment conditions on physicochemical characteristics of ovalbumin heat-induced nanoparticles and on their ability to bind PUFAs[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 48: 165–173.
- 23 CORZOMARTINEZ M, JAVIER M F, VILLAMIEL M, et al. Characterization and improvement of rheological properties of sodium caseinate glycosylated with galactose, lactose and dextran[J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24(1): 88–97.
- 24 STANCIUC N, APRODU I, IONITA E, et al. Exploring the process-structure-function relationship of horseradish peroxidase through investigation of pH- and heat induced conformational changes[J]. Spectrochimica Acta Part A Molecular & Biomolecular Spectroscopy, 2015, 147: 43–50.

- 25 XIA S, LI Y, ZHAO Q, et al. Probing conformational change of bovine serum albumin-dextran conjugates under controlled dry heating[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2015, 63(16): 4080 – 4086.
- 26 MCCLEMENTS D J. Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability [J]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 2007, 47(7): 611 – 649.
- 27 GU Y S, DECKER E A, MCCLEMENTS D J. Formation of colloidosomes by adsorption of small charged oil droplets onto the surface of large oppositely charged oil droplets[J]. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21(4): 516 – 526.
- 28 沙小梅, 胡娑娑, 涂宗财, 等. 高压微射流压力对大豆蛋白-大豆多糖体系功能性质的影响[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(17): 281 – 286.
SHA Xiaomei, HU Zizi, TU Zongcai, et al. Effect of dynamic high-pressure microfluidization on functional properties of soy protein isolate-soybean soluble polysaccharides system[J]. *Transactions of the CSAE*, 2016, 32(17): 281 – 286. (in Chinese)
- 29 CHOBERT J M, SITOHY M, WHITAKER J R. Specific limited hydrolysis and phosphorylation of food proteins for improvement of functional and nutritional properties[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1987, 64(12): 1704 – 1711.
- 30 NOOSHKAM M, MADADLOU A, MADADLOU A. Microwave-assisted isomerisation of lactose to lactulose and Maillard conjugation of lactulose and lactose with whey proteins and peptides[J]. *Food Chemistry*, 2016, 200: 1 – 9.
- 31 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.
- 32 LI W, ZHAO H, HE Z, et al. Modification of soy protein hydrolysates by Maillard reaction: effects of carbohydrate chain length on structural and interfacial properties[J]. *Colloids & Surfaces B Biointerfaces*, 2016, 138: 70 – 77.
- 33 王喜波, 王健, 张泽宇, 等. 物理改性对大豆蛋白柔性及乳化性的影响及其相关性分析[J/OL]. *农业机械学报*, 2017, 48(7): 339 – 344. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20170743&journal_id=jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2017.07.043.
WANG Xibo, WANG Jian, ZHANG Zeyu, et al. Effect of physical modification on flexibility and emulsifying property of soy protein and its correlation analysis[J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2017, 48(7): 339 – 344. (in Chinese)
- 34 TANG C H, SHEN L. Role of conformational flexibility in the emulsifying properties of bovine serum albumin[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2013, 61(12): 3097 – 3110.