

热处理强度对大豆分离蛋白凝胶形成能力的影响

杨 岚¹,成玉梁^{1,2},郭亚辉^{1,2},谢云飞^{1,2},姚卫蓉^{1,2},钱 和^{1,2}

(1. 江南大学 食品学院/食品科学与技术国家重点实验室,江苏 无锡 214102; 2. 江南大学 食品安全国际联合实验室,江苏 无锡 214122)

摘 要:为探究不同热处理强度对大豆分离蛋白凝胶形成能力的影响,并对两者之间的关系进行研究,采用热分析、圆二色谱、质构测定、SDS-PAGE 等方法对蛋白样品的变性程度、二级结构以及凝胶性质进行分析。结果表明:SPI 中 7S 与 11S 组分完全变性拟合方程分别为 $y = 3.784\ 12 \times 10^{13} x^{-6.521\ 6}$ 和 $y = 2.925\ 07 \times 10^{11} x^{-4.818\ 1}$,凝胶强度和持水性分别在 95℃ 处理 30 和 50 min 时出现最大值 25.1 g 和 93%。凝胶强度与持水性均随着温度和时间的增加,呈现出先增加后减小的趋势。表面疏水性和表面巯基含量最大分别为 364.4 ± 23.76 和 $6.936 \pm 0.050\ 68\ \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$,表面性质测定结果表明凝胶形成能力的降低是由于加热条件较为剧烈时,蛋白质分子会重新将部分疏水区包埋,导致作用基团减少。本研究建立了热处理强度和凝胶强度与持水性的拟合方程,为目的不同的 SPI 凝胶制备提供参考,同时也为长保质期豆腐的工业化生产中煮浆工序的工艺参数提供一定指导。

关键词:凝胶强度;变性程度;表面性质;二级结构

中图分类号:S565.1 文献标识码:A DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2018.01.0141

Effect of Heat Treatment Conditions on Gel Formation Ability of Soybean Protein Isolate

YANG Lan¹, CHENG Yu-liang^{1,2}, GUO Ya-hui^{1,2}, XIE Yun-fei^{1,2}, YAO Wei-rong^{1,2}, QIAN He^{1,2}

(1. School of Food Science/State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this paper, we studied the effects of different heat treatment conditions on the gel formation ability of soybean protein isolate and described the relationship between them. The denaturation degree, secondary structure and gel properties of protein samples were analyzed by thermal analysis, circular dichroism, texture determination and SDS-PAGE. The results showed that the complete denaturation equation of 7S and 11S components in SPI were $y = 3.784\ 12 \times 10^{13} x^{-6.521\ 6}$, and $y = 2.925\ 07 \times 10^{11} x^{-4.818\ 1}$. The gel strength and water holding capacity were 25.1 g and 93% heated for 30 and 50 min at 95℃, respectively. The gel strength and water holding capacity increased firstly and then decreased with the increasing of temperature and time. The surface hydrophobicity and surface mercapto content were 364.4 ± 23.76 and $6.936 \pm 0.050\ 68\ \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$, respectively. The results of surface properties showed that the decrease of gel formation ability was due to the fact that the protein molecules could be re-embed part of the hydrophobic region, resulting in declining in the number of acting groups. In this study, the heat treatment conditions and the fitting equation of the gel strength and water holding capacity were established, which provided reference for the preparation of different SPI gels, and provided some guidance for the process parameters of the cooking process in the industrial production of long-lasting tofu.

Keywords: Gel strength; Degree of denaturation; Surface properties; Secondary structure

大豆是我国主要农作物之一,其蛋白质含量丰富且氨基酸组成合理,是植物蛋白质的优质来源^[1],大豆及其制品深受国内外人民的喜爱。豆腐作为传统豆制品之一,至今以传承了两千多年,目前常见的市售豆腐有盐卤豆腐(MgCl₂)、石膏豆腐(CaSO₄)及内脂豆腐(GDL)3种^[2],内酯豆腐以其工艺简单、质地细腻、口味香醇的优点,备受消费者青睐。内酯豆腐

的凝固剂一般为葡萄糖酸内酯(GDL),通过释放质子来中和大豆蛋白聚集体的负电荷,再通过疏水和静电相互作用进一步形成连续的三维网络结构^[3]。制备蛋白胶凝的前提条件为蛋白质热变性。刘昱彤等^[4]研究发现随着加热时间的增加,凝胶强度先增加后减小,豆浆加热到90℃后保温10 min凝胶强度最大,与李里特等^[5]的研究结果类似。但现有研究很少建立

收稿日期:2017-11-02
基金项目:江苏省林业科技创新推广项目(LYKJ[2017]26)。
第一作者简介:杨岚(1993-),女,硕士,主要从事大豆蛋白性质研究。E-mail:yanglan_amanda@163.com。
通讯作者:钱和(1962-),女,博士,教授,主要从事食品安全与质量控制研究。E-mail:amtfl68@126.com。

数量关系描述热处理强度与凝胶形成能力两者之间的联系,且对蛋白质完全变性后发生的变化研究甚少。

本研究以大豆分离蛋白(SPI)为原料,研究热处理强度与凝胶强度和凝胶持水性的数量关系,并从蛋白质的表面性质及结构等方面探讨不同热处理强度下溶液中蛋白质的状态,通过对凝胶作用力的研究,分析热处理强度对凝胶形成能力影响机制。建立了热处理强度和凝胶强度与持水性的拟合方程,为目的不同的SPI凝胶制备提供参考,同时也为长保质豆腐的工业化生产中煮浆工序的工艺参数提供一定指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆分离蛋白(SPI)为实验室自制,采用碱溶酸沉法提取^[6],凯氏定氮法测定蛋白含量为92.08%。

三羟基氨基甲烷(Tris)、盐酸(HCl)、甲醇、冰乙酸、2-巯基乙醇,国药集团;葡萄糖酸- γ -内酯(GDL),上海生工生物有限公司;1-苯胺基萘-8-硝基苯甲酸盐(ANS),Sigma-Aldrich公司;低分子量Marker,北京索莱宝科技有限公司;5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB),Sigma-Aldrich公司。

1.2 仪器与设备

CR22G II型高速冷冻离心机,日立公司;U-1800紫外分光光度计,岛津企业管理(中国)有限公司;SCIENTZ-10ND冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;恒温磁力搅拌器;RF-6000荧光分光光度计,岛津企业管理(中国)有限公司;物性分析仪,英国SMS公司;Q200差示扫描量热仪,美国TA仪器公司;MOS-450圆二色光谱仪,法国Biologic公司。

1.3 方法

1.3.1 热处理大豆分离蛋白溶液 配制质量分数为4%的SPI溶液,使用反应釜进行热处理。热处理温度为85,90,95和100℃,每隔10 min设置为一组,最长时间为200 min,从放入样品开始计时。加热后迅速冰水浴冷却样品。将一部分样品冻干用于热分析,余下样品制备凝胶。

1.3.2 完全变性测定 参考沈兰等^[7]的方法,精确称量2.0 mg冻干样品于铝制液体坩埚中,加入10 μ L去离子水后密封,室温下平衡4 h。温度范围为20~120℃,升温速率为10℃·min⁻¹,以空白铝坩埚作为对照。以DSC图中变性焓即 $\Delta H=0$ 作为蛋白质完全变性时间条件。使用TA Universal Analysis 2000分析软件对谱图进行变性温度和焓变值的计算。现以热

处理温度T为横坐标,完全变性所需热处理时间t为纵坐标,采用乘幂方程进行曲线拟合,得到T-t拟合曲线以描述热处理温度与蛋白质完全变性时间的关系。

1.3.3 蛋白质表面性质及结构测定

(1)表面疏水性:参考Huang等^[8]和齐宝坤等^[9]的方法,配制0.01 mol·L⁻¹的磷酸盐缓冲液(pH8.0),对经过热处理的SPI变性溶液进行梯度稀释,保证浓度为0.005~0.5 mg·mL⁻¹,并使用改良Bradford试剂盒测定蛋白浓度。取3 mL蛋白溶液,加入40 μ L ANS(0.01 mol·L⁻¹,pH8.0的磷酸盐缓冲液,浓度为8 mmol·L⁻¹)。充分振荡后静置3 min,测定荧光强度,测定条件为:激发波长370 nm,发射波长490 nm,狭缝均为5 nm。得到的数据以蛋白质质量浓度为横坐标,荧光强度为纵坐标作图,曲线初始阶段的斜率即为蛋白质分子的表面疏水性指数 S_0 。

(2)表面巯基含量:参考王健等^[10]和欧仕益等^[11]的方法。取1 mL不同热处理后的SPI溶液,稀释到10 mg·mL⁻¹,加入2.5 mL的Tris-Gly缓冲液,然后加入0.1 mL DTNB试剂,室温下静置15 min,测定412 nm处吸光值,以不加DTNB的溶液为空白。

游离巯基含量(μ M·g⁻¹) = $73.53 \times A_{412} \times D/C$
式中: A_{412} 为412 nm下的吸光度;C为蛋白质浓度,mg·mL⁻¹;D为稀释因子。

(3)内源性荧光:参考吴海波等^[12]的方法稍加改动,用0.01 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(pH8.0)将天然状态和变性状态SPI溶液稀释到0.2 mg·mL⁻¹测定。测定条件为激发波长290 nm,发射波长300~400 nm,狭缝宽均为5 nm,所有测定3次重复。

(4)蛋白质二级结构:参考刘西海等^[13]的方法,采用远紫外区域圆二色光谱研究变性SPI的二级结构^[14]。二级结构含量计算借助Dichro Web网站的SELCON算法完成。

1.4 凝胶性质评价

1.4.1 凝胶强度测定 取不同变性程度SPI溶液一式两份称重,加入0.3% (w/w) GDL搅拌均匀后,80℃保温30 min,冰水浴降至室温后,4℃放置过夜后熟。

凝胶强度为凝胶破裂所需应力(g)。将盛有待测样品的烧杯置于平台上,调整位置使探头对准样品中心。测定条件:P/5探头,测前速5 mm·s⁻¹,测定速度2 mm·s⁻¹,测后速度5 mm·s⁻¹,自动触发,触发力为5 g,最大位移5 mm,重复测定3次。

1.4.2 凝胶持水性的测定 参考陈振家等^[15]和 Han 等^[16]的方法,略加修改。取 5 mL 离心管,称重记为 W_1 ,放入一小块凝胶,称重记为 W_2 ,将其置于离心管中 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min。小心倒出离心管中的水,并用滤纸将残留在离心管壁及凝胶表面的水吸干净,最后称重记为 W_3 。重复测定 3 次。

$$\text{WHC} = (W_3 - W_1) / (W_2 - W_1) \times 100\%$$

式中:WHC:凝胶持水性,%; W_1 :离心管重,g; W_2 :离心前离心管和凝胶重,g; W_3 :离心后离心管和凝胶重,g。

1.5 凝胶作用力分析

1.5.1 凝胶作用力的测定 参考陈立德^[17]和 Peng 等^[18]的方法,切取 5 份 1.0 g 凝胶,分别与 10 mL $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl (SA)、 $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl (SB)、 $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl + $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素 (SC)、 $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl + $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素 (SD)、 $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl + $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素 + $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2-巯基乙醇 (SE)溶液混合后放入 15 mL 组织匀浆器内充分破碎破碎,定容至 50 mL 后 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。使用改良 Bradford 试剂盒测定上清液中蛋白质的含量。凝胶结构中静电相互作用的数量为溶解于 SB 溶液与 SA 溶液中蛋白质含量之差,氢键的数量为溶解于 SC 溶液与 SB 溶液中蛋白质含量之差,疏水性相互作用的数量为溶解于 SD 溶液与 SC 溶液中蛋白质含量之差,二硫键的数量为溶解于 SE 溶液与 SD 溶液中蛋白质含量之差。

1.5.2 还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析 参考李颖超^[19]的方法,使用还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析凝胶形成时亚基与作用力的关系。将上述样品上清液与上样缓冲液以 4:1 比例混合后煮沸 5 min,Marker 和样品上样量均为 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 12%,电压为 150 V,时间为 50 min。电泳后使用考马斯亮蓝 R-250 染色 30 min,甲醇-冰醋酸溶液 (甲醇:冰醋酸:蒸馏水 = 1:1:8) 进行震荡脱色,每 30 min 更换一次脱色液。使用凝胶成像系统得到电泳结果。

2 结果与分析

2.1 SPI 完全变性 T-t 拟合曲线

大多文献研究表明制作蛋白凝胶和豆腐等的最优热处理强度均在 7S 与 11S 的变性范围内^[20-24]。因此本论文对凝胶形成能力的研究主要在这个范围内进行。

通过差示扫描量热仪分析实验室自提 SPI 的热变性曲线,由图 1 可见 2 个吸热峰,分别为 7S 和

11S 两组分变性所产生热吸收峰。经软件分析后确定 7S 变性温度为 74.96°C ,11S 变性温度为 92.26°C 。当加热温度较低时,变性时间相对更长,经实验证明在 75°C 下加热 200 min 时 11S 尚不能完全变性,为了能更好的观察分析热处理强度与凝胶性质之间的关系,因此选择高于 7S 变性温度的温度值进行试验。

为了更好分析热处理强度与蛋白质变性之间的关系,特绘制 SPI 中 7S 和 11S 组分的完全变性时间拟合曲线即 T-t 拟合线 (图 2),以描述在不同热处理温度下,蛋白质焓变值为 0 即完全变性的时间条件。经拟合,两条完全变性曲线的方程如下:7S 完全变性曲线拟合方程 $y = 3.784\,12 \times 10^{13} x^{-6.521\,6}$,11S 完全变性曲线拟合方程为 $y = 2.925\,07 \times 10^{11} x^{-4.818\,1}$,其中 x 为热处理温度, y 为热处理时间。

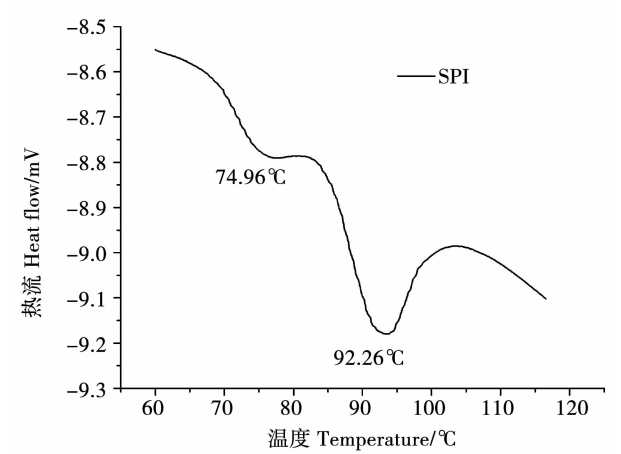


图 1 SPI 的 DSC 分析
Fig. 1 SPI DSC analysis

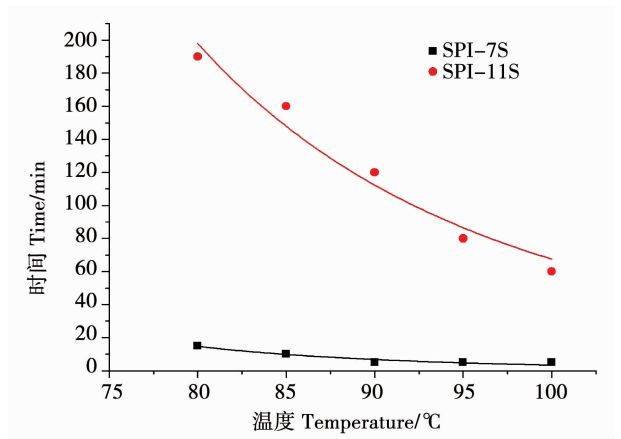


图 2 SPI 完全变性 T-t 拟合曲线

Fig. 2 SPI complete denatured T-t fitting curve

2.2 热处理强度对 SPI 表面性质及结构的影响

2.2.1 热处理强度对 SPI 表面性质的影响 表面疏水性反映了蛋白质的解折叠程度^[25]。经过测定,未经热处理的 SPI 表面疏水性值为 119.7 ± 9.405 。由图 3 可以看出经过热处理的蛋白疏水性都比空白

要高,说明热处理使球状蛋白的三级结构发生改变,疏水基团暴露。加热初期疏水性变化比较明显,最大值可达 364.4 ± 23.76 ,这说明在加热初期蛋白质分子解折叠剧烈,许多球状分子受热展开;在加热后期 S_0 大都缓慢降低,推测暴露出的疏水区由于疏水相互作用导致展开的蛋白质分子发生不同程度的疏水聚集,重新包埋部分疏水区。

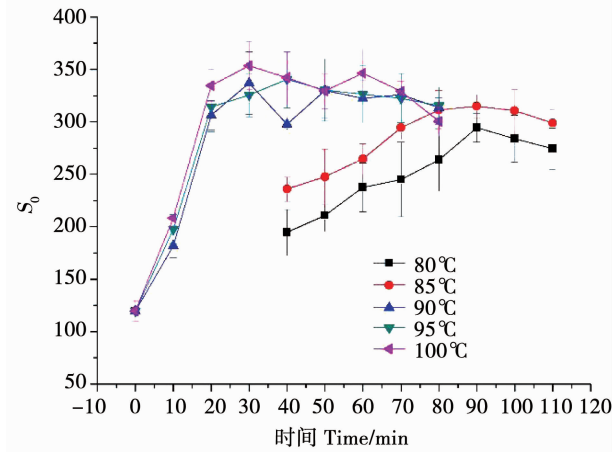


图3 不同热处理强度下SPI的表面疏水性
Fig. 3 Surface hydrophobicity of SPI under different heat treatment conditions

经过热处理后SPI的表面巯基含量明显增加,且均随着温度 and 时间的增加呈现出先增加后减少的趋势,最大值为 $6.936 \pm 0.05068 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$,是Native SPI的2.3倍(图4)。将各温度组数据比较可以发现随着热处理温度的增大,表面巯基的含量整体升高,原本在疏水核内部的表面巯基逐渐暴露出来,温度越高,这种解折叠现象发生的越剧烈,这与表面疏水性的结果相对应。另外长时间的高温加热处理很容易造成巯基的氧化,这会导致巯基生成非二硫键的产物,不利于凝胶形成^[26-27]。

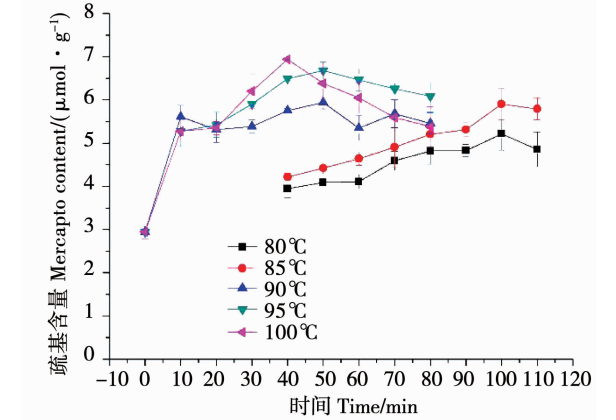


图4 不同热处理强度下SPI的表面巯基含量
Fig. 4 Surface thiol content of SPI under different heat treatment conditions

2.2.2 热处理强度对SPI结构的影响 如表1所示,与Native状态蛋白相比,变性SPI除荧光强度增加外,荧光最大发射波长 λ_{max} 也从330 nm处红移至333 nm,这说明蛋白质分子内部色氨酸残基环境已经变成极性环境,疏水核被打开,分子结构开始伸展^[28]。4个温度中只有95℃能在相对较短时间内达到最高的荧光强度FI,95℃处理40 min时,蛋白质溶液中色氨酸暴露程度最强。100℃加热处理在较短时间内FI较高,随着时间的增加,FI整体呈下降趋势,加热至80 min后FI值低于85℃热处理,说明在此温度条件下长时间热处理使得一小部分已经暴露在外的色氨酸因为部分蛋白质分子间聚合而被重新包埋进入聚集体内部,导致荧光强度有一定程度的下降,且加热条件越剧烈这种聚合发生的严重,与表面疏水性结果一致。

表1 不同热处理强度下SPI内源性荧光光强最大值
Table 1 The maximum value of SPI endogenous fluorescence intensity under different heat treatment conditions

温度 Temperature /℃	时间 Time /min	最大发射波长 Maximum emission wavelength/nm	荧光强度 The fluorescence intensity
Native	0	330	32318.1 ± 149.4415
80	110	333	36328.4 ± 257.3318
85	100	333	37113.4 ± 331.4917
90	30	333	38808.3 ± 331.3502
95	40	333	39726.9 ± 337.9263
100	40	333	36044.7 ± 270.7510

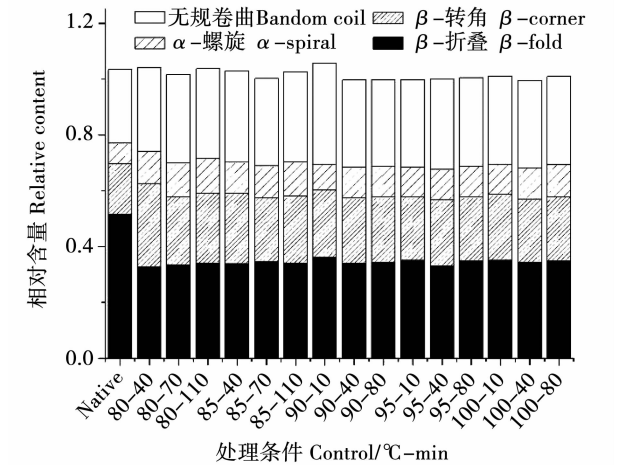


图5 不同热处理强度下SPI二级结构含量
Fig. 5 SPI secondary structure content under different heat treatment conditions

由图 5 可以看出 SPI 经过热处理后,蛋白质分子球状结构被打开,包裹在内部的 β 折叠被暴露出来受热后氢键断开,转换成少量的 β 转角、 α -螺旋以及较多的无规卷曲。 β 折叠含量下降说明蛋白质内部疏水区暴露^[29]。无规卷曲含量明显增大,但在凝胶强度最大时含量最低说明无规卷曲的柔性结构不利于凝胶网络结构形成。在持续加热过程中,随着时间的增加, α -螺旋和 β 折叠含量有小幅回升, β 转角和无规卷曲含量呈现出先降低后升高的趋势^[30]。

2.3 热处理强度对 SPI 凝胶性质的影响

2.3.1 热处理强度对 SPI 凝胶强度的影响 由图 6 可知,不同温度处理的凝胶强度基本都呈现出先升高后降低的趋势,最大值分别出现在 80℃ 处理 70 min、85℃ 处理 50 min、90℃ 处理 40 min、95℃ 处理 30 min 及 100℃ 处理 30 min 这 4 个热处理强度。80℃ 和 85℃ 处理所得凝胶的强度明显低于 90℃、95℃ 和 100℃。在热处理 10 min 时凝胶强度明显较低,这可能是因为在此较低温度下,蛋白质变性程度较低,分子解折叠程度有限,变性温度高的 11S 组分只有少部分受热变性,巯基暴露有限。因此在加入酸凝固剂后环境 pH 值逐渐降低,消除了蛋白质分子之间静电斥力,使展开的 SPI 分子可通过疏水相互作用、静电作用等非共价作用力互相连接形成网络,而二硫键的贡献十分有限,凝胶强度相对较弱。

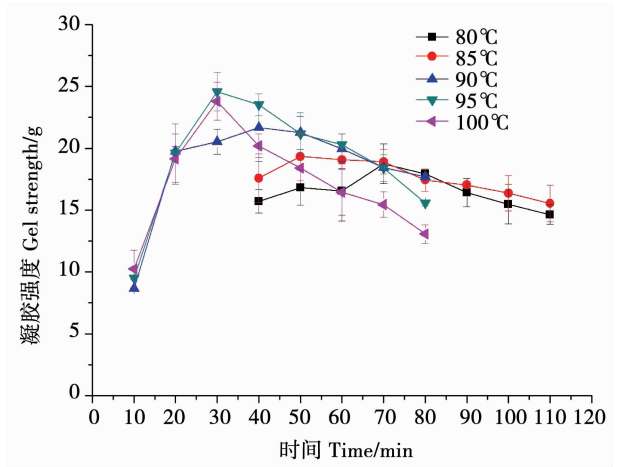


图 6 不同热处理强度制备 SPI 凝胶的凝胶强度

Fig. 6 SPI gel strength with different heat treatment conditions

不同温度加热 60 ~ 80 min 时,高温处理得到的凝胶强度反而低于较低温度处理所得。结合图 3 和 4 的结果,在 60 ~ 80 min 这段时间内表面性质有一定降低,是因为 SPI 在完全变性后持续受热会促进解折叠的蛋白质分子之间的重新聚合。还可能是

由于长时间高温处理造成 SPI 两组分完全变性的同时还存在少量蛋白质分子水解现象,生成肽链或游离氨基酸。这些小分子单位对不参与蛋白质胶凝,却能导致胶凝的亚基单位相应减少,从而降低凝胶强度。

2.3.2 热处理强度对 SPI 凝胶持水性的影响 持水性作为最重要的凝胶特性之一,可以反映凝胶内部结构的粗糙程度^[31]。凝胶结构越细密,凝胶持水性越好,反之越差。由图 7 可以看出,随着温度的升高,持水性逐渐增加,加热温度超过 90℃ 后持水性增加不明显。在每个温度下,凝胶持水性随时间变化先增加后减小,热处理 10 min 得到的凝胶持水性都不高,说明加热时间过短时,SPI 变性程度较低,只暴露出有限的疏水基团和巯基,分子解折叠程度较低,因此不能形成致密的蛋白凝胶网络,持水性较差。随着加热温度提高和加热时间增加,可形成凝胶网络的变性蛋白分子增多,同时暴露出大量有利于凝胶形成的基团,因此凝胶强度会增大,失水率减小。但当加热条件过于剧烈时,巯基氧化现象会愈发严重,负面影响凝胶强度及持水性。

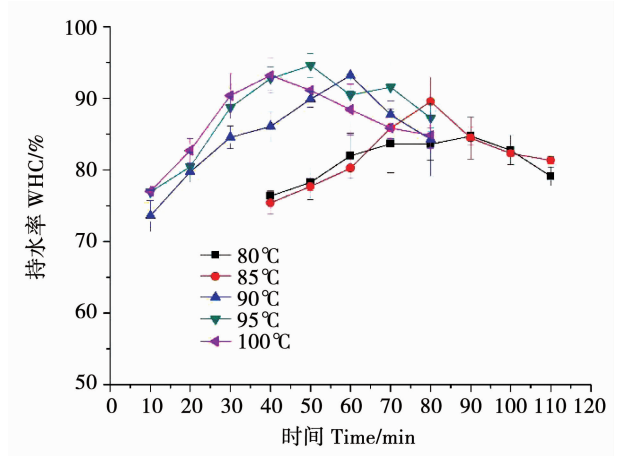


图 7 不同热处理强度制备 SPI 凝胶的持水性

Fig. 7 The WHC of SPI Gel with different heat treatment conditions

2.3.3 热处理强度、凝胶强度和凝胶持水性 3 者拟合关系 将凝胶强度及持水性的最优条件综合后经多项式拟合,最终得到凝胶强度最强及持水性最优时与热处理强度之间的关系曲线(图 8),两条拟合曲线方程分别为 $y = 1.315\ 96 \times 10^{10} x^{-4.353\ 72}$ 和 $y = 6.045\ 26 \times 10^8 x^{-3.580\ 39}$,其中 x 为热处理温度, y 为热处理时间。

2.4 热处理强度与凝胶作用力关系分析

从图 9 可以看出凝胶 4 种主要作用力中,按作用力贡献大小可排序为二硫键 > 疏水相互作用 >

氢键>静电相互作用。在凝胶强度趋近最高再逐渐降低的过程中,疏水作用力先减弱再加强,而二硫键含量先增加后降低,说明二硫键有利于凝胶的

形成。通过对比可以看出 95℃ 处理后形成的凝胶中二硫键数量明显高于其他组,验证了 95℃ 处理得到的凝胶强度最强这一结果。

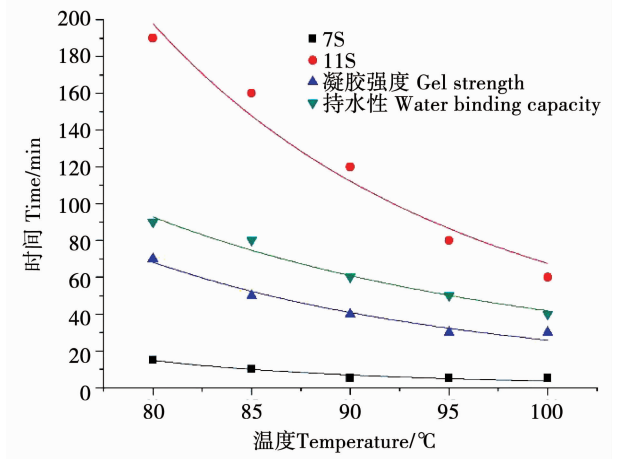


图 8 凝胶强度最强及持水性最优时与热处理强度关系拟合曲线

Fig. 8 Curve of the relationship between the strongest gel strength and the best water holding property and the heat treatment condition

如图 10 所示,对比 2~4 泳道可以看出条带逐渐加深,说明在凝胶形成过程中有离子键和氢键的参与,且主要作用于分子量 14.3~15.4 kDa 的亚基组分,即 11S 中较小的 A₅亚基^[32]。由图 10c 可以看出 95℃ 处理 80 min 后制备的凝胶在破坏氢键时得到较多的 A 亚基和 B 亚基,说明随着时间的增加,过热处理会导致凝胶过程中 11S 的 A、B 亚基通过氢键作用相互交联。疏水相互作用主要作用于亚基 α' 和 A、B 之间,且在凝胶中疏水相互作用的强

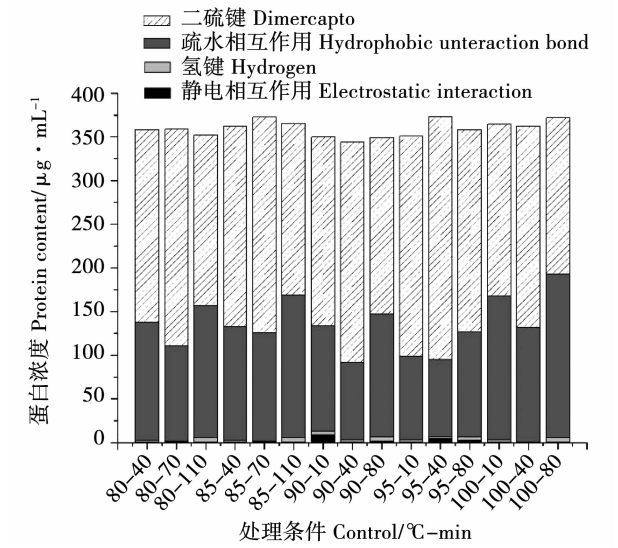


图 9 不同热处理强度下凝胶作用力分析

Fig. 9 analysis of gel force under different heat treatment conditions

度在 40 min 最弱,这与蛋白质疏水性的测定结果一致,说明疏水作用越强,凝胶强度越大。最后经过 2-巯基乙醇处理,凝胶蛋白组分基本还原成 SPI 相应组分,说明破坏二硫键后凝胶结构中的绝大部分亚基得以释放,但 1 个 7S 分子只有 2 个巯基,因此推测形成凝胶时,二硫键的形成会稳定一些由次级键交联形成的结构,当二硫键没有被破坏时,这些由次级键交联的结构也不会被破坏成单个亚基。

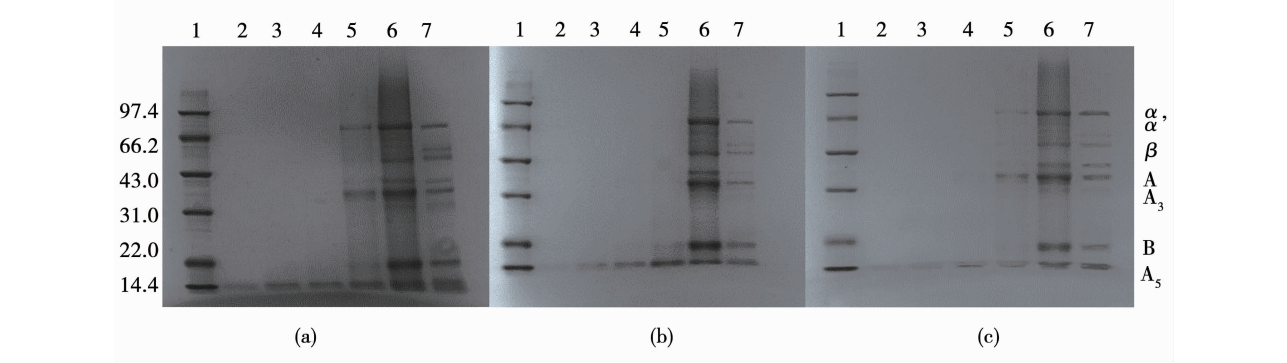


图 10 95℃ 处理不同时间所得凝胶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 10 Analysis of the force of the gel treated at 95℃ for different time

3 结论与讨论

本研究通过研究蛋白质热变性后的表面性质和凝胶性质,分析了热处理强度对大豆蛋白凝胶形成能力的影响,得到了热处理强度和蛋白热变性程度的数量关系。SPI 中 7S 组分和 11S 组分的完全变性拟合方程分别为: $y = 3.784\ 12 \times 10^{13} x^{-6.521\ 6}$; $y = 2.925\ 07 \times 10^{11} x^{-4.818\ 1}$ (其中, x 为热处理温度, y 为热处理时间)。超出 SPI 完全变性范围的热处理强度如 95℃ 加热 80 min 和 100℃ 加热 80 min,凝胶强度和持水性均有所下降,推测原因可能是完全变性后持续受热会导致部分蛋白质分子断裂成小分子多肽链,同时表面疏水性降低说明 SPI 分子之间重新聚合,包埋了凝胶作用力基团,这些因素都不利于蛋白质凝胶的形成。内源性荧光光谱结果表明随着热处理温度和热处理时间的增加,蛋白质的色氨酸暴露程度先增加后降低,且色氨酸残基暴露越多,其表面疏水性越大,表面巯基含量越高。在 100℃ 时的荧光强度最大值低于 80℃,说明高温条件下蛋白质变性后更易发生聚集,导致色氨酸重新被包埋。

通过对整体数据的计算分析,得到凝胶强度最强时及持水性最优时与热处理强度之间的关系曲线,两条拟合曲线方程分别为: $y = 1.315\ 96 \times 10^{10} x^{-4.353\ 72}$, $y = 6.045\ 26 \times 10^8 x^{-3.580\ 39}$ (其中, x 为热处理温度, y 为热处理时间)。两组方程可以通过给出的热处理温度,算得出分别以两个指标最优为目的的时间条件,从而为 SPI 凝胶的制备提供参考。对豆制品生产,如长保质期豆腐的工业化生产过程中如何通过设置煮浆工序的工艺参数,来控制大豆蛋白的热变性程度,进而有利于调控豆腐的凝胶特性提供一定的指导意义。

参考文献

[1] 刘頔, 赵晓燕, 符力丹. 大豆蛋白中 7S 与 11S 球蛋白的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2016(17): 201-204. (Liu D, Zhao X Y, Fu L D. Research progress of 7S and 11S globulin in soybean protein [J]. Food Research and Development, 2016 (17): 201-204.)

[2] 代佼, 姚灿. 壳低聚糖作为豆腐凝固剂研究进展[J]. 粮食与油脂, 2009, 22(8): 42-44. (Dai J, Yao C. Research progress of chitooligosaccharides as tofu coagulant [J]. Cereals and Oils, 2009, 22(8): 42-44.)

[3] Liu H, Meng K. Effect of microwave heating on the viscoelastic property and microstructure of soy protein isolate gel[J]. Journal of Texture Studies, 2011(47): 1-9.

[4] 刘昱彤, 钱和. 不同加工条件对全豆腐凝胶强度的影响[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 126-129. (Liu Y T, Qian H. Effect of different processing conditions on the gel strength of whole bean tofu [J]. Food Industry Technology, 2013, 34 (5): 126-129.)

[5] 李里特, 汪立君, 李再贵, 等. 大豆蛋白热变性程度对豆腐品质的影响[J]. 中国粮油学报, 2002, 17(1): 1-4. (Li L T, Wang L J, Li Z G, et al. Effect of heat denaturation of soy protein on the quality of tofu [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2002, 17 (1): 1-4)

[6] Yuan Y, Wan Z, Yin S, et al. Characterization of complexes of soy protein and chitosan heated at low pH[J]. LWT - Food Science and Technology, 2013, 50(2): 657-664.

[7] 沈兰, 王昌盛, 唐传核. 高压微射流处理对大豆分离蛋白构象及功能特性的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 72-76. (Shen L, Wang C S. Effect of high pressure micro-jet processing on conformation and functional properties of soybean protein isolate [J]. Food Science, 2012, 33 (3): 72-76.)

[8] Huang Y, Hua Y, Qiu A. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation[J]. Food Research International, 2006, 39(2): 240-249.

[9] 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 Zeta potential and particle size distribution and surface hydrophobicity of different soybean isolates [J]. Food Science, 2017, 38(3): 114-118.)

[10] 王健, 徐晔晔, 于洁, 等. 热处理对大豆蛋白柔性与结构关系的影响[J]. 食品科学, 2017: 1-9. (Wang J, Xu Y Y, Yu J, et al. Effects of heat treatment on the relationship between flexibility and structure of soy protein [J]. Food Science, 2017: 1-9.)

[11] 欧仕益, 郭乾初, 包惠燕, 等. 豆奶蛋白质中巯基含量的测定[J]. 中国食品学报, 2003, 3(2): 59-62. (Ou S Y, Guo Q C, Bao H Y, et al. Determination of soybean milk protein contents [J]. Chinese Journal of Food Science, 2003, 3(2): 59-62.)

[12] 吴海波, 齐宝坤, 江连洲, 等. 大豆分离蛋白热性质及其空间构象对表面疏水性的影响[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(10): 42-46. (Wu H B, Qi B K, Jiang L Z, et al. Effect of thermal properties and spatial conformation of soy protein isolate on surface hydrophobicity [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 29(10): 42-46.)

[13] 刘西海. 金属离子对蛋清蛋白质结构的影响研究[J]. 中国家禽, 2012, 34(1): 27-31. (Liu X H. Effects of metalions on protein structure of egg white [J]. Chinese Poultry, 2012, 34(1): 27-31.)

[14] 陈勇, 王晶, 江连洲, 等. 不同辐照剂量对红豆分离蛋白结构及特性的影响[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(4): 39-43. (Chen Y, Wang J, Jiang L Z, et al. Effects of different irradiation doses on structure and characteristics of red bean protein isolate [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2015, 34(4): 39-43.)

[15] 陈振家, 施小迪, 杜昱蒙, 等. 不同热处理大豆分离蛋白凝胶

- 冻藏特性[J]. 农业工程学报, 2016, 32(11): 283-289. (Chen Z J, Shi X D, Du Y M, et al. Development of gel-frozen characteristics of different heat-treated soybean protein isolate [J]. Journal of Agricultural Engineering, 2016, 32(11): 283-289.)
- [16] Han M, Zhang Y, Fei Y, et al. Effect of microbial transglutaminase on NMR relaxometry and microstructure of pork myofibrillar protein gel[J]. European Food Research and Technology, 2009, 228(4): 665-670.
- [17] 陈立德. 肌原纤维蛋白凝胶作用力影响因素的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2010. (Chen L D. Myogenic fibrin gel force factors[D]. Chongqing: Southwest University, 2010.)
- [18] Peng X, Guo S. Texture characteristics of soymilk gels formed by lactic fermentation: A comparison of soymilk prepared by blanching soybeans under different temperatures[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43: 58-65.
- [19] 李颖超. 加工处理对花生致敏原的影响及其机理[D]. 重庆: 江南大学, 2016. (Li Y C. Effect of processing on peanut allergen and its mechanism [D]. Chongqing: Jiangnan University, 2016)
- [20] 张青雯, 翟爱华, 杨盛楠. 不同加热条件对内酯豆腐品质的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2016, 28(3): 56-59. (Zhang Q L, Zhai A H, Yang S N. Effects of different heating conditions on the quality of lactone tofu [J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2016, 28(3): 56-59.)
- [21] 姜梅. 超高压均质和热处理对豆乳、豆腐和豆腐皮特性的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2013. (Jiang M. Effect of ultrahigh pressure homogenization and heat treatment on the properties of soymilk, tofu and tofu skin [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.)
- [22] 郑凤荣, 于美恒. 黑豆大豆复合豆腐工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2015(17): 83-85. (Zheng F R, Yu M H. Study on the technology of black bean and soybean compound tofu [J]. Food Research and Development, 2015 (17): 83-85.)
- [23] 李小雅, 许慧, 江杨娟, 等. 加工工艺对北方豆腐品质特性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(6): 261-266. (Li X Y, Xu H, Jiang Y J, et al. Effects of processing technology on quality characteristics of tofu in North China [J]. Food Science, 2017, 38(6): 261-266.)
- [24] 孙小鲁, 顾振宇, 杨玥熹. 石膏豆腐凝胶特性的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(3): 133-138. (Sun X H, Gu Z Y, Yang Y X. Studies on the gels characteristics of gypsum tofu [J]. Modern Food Science and Technology, 2017 (03): 133-138.)
- [25] Mohan M, Ramachandran D, Sankar T V. Functional properties of Rohu (Labeo rohita) proteins during iced storage[J]. Food Research International, 2006, 39(8): 847-854.
- [26] 郭丽萍, 熊双丽, 黄业传. 超高压结合热处理对猪肉蛋白质相互作用力及结构的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(2): 196-204. (Guo L P, Xiong S L, Huang Y C. Effect of ultrahigh pressure combined heat treatment on interaction force and structure of pork proteins [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(2): 196-204.)
- [27] 夏珂. 热处理对苦荞蛋白结构及功能特性的影响[D]. 上海: 上海应用技术大学, 2016. (Xia K. Effect of heat treatment on the structure and functional properties of tartary buckwheat protein [D]. Shanghai: Shanghai University of Technology, 2016.)
- [28] Vivian J T, Callis P R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins [J]. Biophysical Journal, 2001, 80(5): 2093-2109.
- [29] Mills E N C, Huang L, Noel T R, et al. Formation of thermally induced aggregates of the soya globulin v-conglycinin [J]. Biochimica et Biophysica Acta: Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001, 1547(2): 339-350.
- [30] 吴伟, 蔡勇建, 林亲录, 等. 脱脂豆粕预处理对大豆 β -伴球蛋白结构的影响[J]. 现代食品科技, 2014, 30(7): 131-135. (Wu W, Cai Y J, Lin Q L, et al. Effects of defatted soybean meal pretreatment on the structure of β -conglycinin in soybean [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(7): 131-135.)
- [31] Lakemond C M M, de Jongh H H J, Paques M, et al. Gelation of soy glycinin; influence of pH and ionic strength on network structure in relation to protein conformation[J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17(3): 365-377.
- [32] 姜振峰, 赫卫, 汪洋, 等. 大豆种子7S、11S球蛋白及7S球蛋白亚基的研究[J]. 中国油料作物学报, 2007(2): 138-141. (Jiang Z F, He W, Wang Y, et al. Studies on 7S, 11S globulin and 7S globulin subunits of soybean seeds [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2007(2): 138-141.)