



# 超高压处理对谷氨酰胺转氨酶诱导的大豆分离蛋白凝胶冻融稳定性影响研究

李丹<sup>1,2</sup>, 赵世杰<sup>3</sup>, 孙梦圆<sup>3</sup>, 王梦奇<sup>3</sup>, 崔晶琪<sup>3</sup>, 宋吉仁<sup>4</sup>, 郑环宇<sup>1,2,3</sup>

(1. 黑龙江省绿色食品科学研究院, 黑龙江 哈尔滨 150028; 2. 国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150028; 3. 东北农业大学 食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 4. 恒基利马格兰种业有限公司, 甘肃 张掖 734000)

**摘要:** 为探索提高谷氨酰胺转氨酶(transglutaminase, TG酶)诱导的大豆分离蛋白凝胶冻融稳定性的方法, 分析超高压处理对其作用效果, 采用粒径、内源性荧光光谱、傅里叶红外变换光谱分析大豆分离蛋白的结构变化, 并分析冻融循环过程中的可溶性蛋白含量、水分分布状态、持水性、质构特性、微观结构、流变特性, 探讨作用机理。结果表明: 未经超高压处理的TG酶诱导大豆分离蛋白凝胶, 随着冻融次数增加, 可溶性蛋白含量和凝胶持水性呈降低趋势, 凝胶硬度呈上升趋势, 凝胶微观结构孔缝较大, 说明凝胶品质发生劣变; 经过超高压处理的TG酶诱导大豆分离蛋白凝胶与未经超高压处理凝胶相比, 持水性、硬度呈先增加后下降趋势。当压力处理为400 MPa时, 经5次冻融循环后SPI凝胶硬度和结合水含量较未冻融样品分别增高了140.43 g和30.019, 持水性和可溶性蛋白含量分别降低了38.67%和7.87%。由此证明超高压处理是提高TG酶诱导的大豆分离蛋白凝胶冻融稳定性的有效方法。

**关键词:** 超高压; 大豆分离蛋白; 谷氨酰胺转氨酶; 凝胶; 冻融稳定性

## Effect of Ultra-high Pressure Treatment on Freeze-thaw Stability of Soybean Protein Isolate Gel Induced by Transglutaminase

LI Dan<sup>1,2</sup>, ZHAO Shijie<sup>3</sup>, SUN Mengyuan<sup>3</sup>, WANG Mengqi<sup>3</sup>, CUI Jingqi<sup>3</sup>, SONG Jiren<sup>4</sup>, ZHENG HuanYu<sup>1,2,3</sup>

(1. Heilongjiang Green Food Science Research Institute, Harbin 150028, China; 2. National Research Center of Soybean Engineering and Technology, Harbin 150028, China; 3. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 4. Hengji Limagrain Seed Industry Limited Company, Zhangye 734000, China)

**Abstract:** In order to explore the method of improving the freeze-thaw stability of soybean protein isolate gels induced by transglutaminase(TGase), the effect of ultra-high pressure(UHP) treatment on the gel was investigated. The structural changes of soybean protein isolate were analyzed by particle size, endogenous fluorescence spectrum and fourier transform spectroscopy, and the mechanism of action was discussed by the content of soluble protein, water distribution, water retention, texture properties, microstructure and rheology properties during freeze-thaw cycle. The results showed that with the increase of freeze-thaw times, the soluble protein content and water holding capacity of TGase-induced soybean protein isolate gel without ultrahigh pressure treatment showed a decreasing trend, while the gel hardness showed an increasing trend, and the pore cracks of the gel microstructure were larger, indicating that the gel quality deteriorate. Compared with the gel without UHP treatment, the water retention and hardness of TGase-induced soy protein isolate gel increased first and then decreased. When the pressure treatment was 400 MPa, the hardness and bound water content of SPI gel after 5 freeze-thaw cycles increased by 140.43 g and 30.019, respectively, compared with that of the unmodified SPI gel, and the water holding capacity and soluble protein contents decreased by 38.67% and 7.87%, respectively. It is proved that UHP treatment is an effective method to improve the freeze-thaw stability of TGase-induced soy protein isolate gel.

**Keywords:** ultra-high pressure; soy protein isolate; transglutaminase; gel; freeze-thaw stability

大豆分离蛋白(Soybean Protein Isolate, SPI)因其良好的功能特性和较高的营养价值被广泛应用到食品生产中,是食品行业使用最频繁的一种植物蛋白<sup>[1]</sup>。如今,随着生活节奏的加快,人们迎来了一个快速消费时代,速冻产品的便捷性逐渐凸显<sup>[2]</sup>。添加大豆分离蛋白可以增加食品持水能力,乳化和质构特性,在一定程度上改善速冻产品的品质<sup>[3]</sup>。但是,冷冻食品在运输以及贮藏过程中

会受到温度变化的影响,导致食品经历冻融循环过程,使食品劣变。当前冷冻食品行业对高冻融稳定性大豆蛋白有着迫切的需求,然而生产中相关技术水平较低,因此急需开展相关研究,满足行业需求。

超高压(Ultra-High Pressure, UHP)是一种新兴的非热加工技术,把待处理的样品密封在容器中,在室温下以100~1000 MPa压力进行处理,该技术使用液体作为导电介质,影响食品成分的功能特

收稿日期:2024-01-04

基金项目:黑龙江省“百千万”工程科技重大专项课题(2021ZX12B04-04);黑龙江省省属科研院所科研业务费项目(CZKYF2022-1-B009);黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2023C113)。

第一作者:李丹(1987—),女,硕士研究生,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究。E-mail:lidan213@126.com。

通讯作者:郑环宇(1975—),女,博士,教授,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究。E-mail:zhenghuanYu@163.com。

性<sup>[4]</sup>。超高压专注于获得微生物安全的食品,也可改变构成食品的大分子的结构。就蛋白质而言,二级、三级和四级结构可能会受到影响,具体取决于压力大小和保压时间<sup>[5]</sup>。其也能够诱导生物大分子的结构变化,包括蛋白质变性<sup>[6]</sup>,使蛋白质分子之间的化学力交换和相互作用,包括表面疏水性、静电相互作用和氢键<sup>[7]</sup>。超高压比热处理具有优势,例如不耐热化合物的保存和营养质量,在食品工业中可用作加热巴氏杀菌或热烫的替代方法。它的应用有助于改善食品的物理化学性质,例如颜色和持水能力<sup>[8]</sup>。Li等<sup>[9]</sup>研究表明在200 MPa超高压环境下,添加2% SPI改善了猪肉肌原纤维蛋白的凝胶特性和保水能力。

近年来,超高压协同谷氨酰胺转氨酶(TG酶)改性蛋白质凝胶性具有开阔的研究前景。超高压能够使蛋白质结构适度打开,促进TG酶交联作用。秦新生<sup>[10]</sup>研究超高压预处理对TG酶促大豆与小麦蛋白混合凝胶性质的影响,发现UHP协同酶改性处理使蛋白溶液中游离巯基含量提高,促进表面疏水基团形成与增加,有利于蛋白凝胶表现更高的凝胶强度和持水性,并具有更致密、均匀的凝胶网络三维结构。王炳智<sup>[11]</sup>研究发现,高压预处理通过增强小麦面筋蛋白分子间TG酶的交联作用,显著增强了小麦面筋蛋白分子的乳化性质和热稳定性。史乾坤等<sup>[12]</sup>对大豆分离蛋白进行超高压复合转谷氨酰胺酶处理,形成的凝胶的持水能力增强,自由水减少,凝胶的质构特性得到良好改善。才卫川等<sup>[13]</sup>超高压处理添加TG酶的鸡胸肉肌原纤维蛋白溶液,形成凝胶,结果表明TG酶和超高压结合促进肌原纤维蛋白形成良好的凝胶,提高了鸡胸肉中肌原纤维蛋白凝胶的品质。以上研究表明,超高压和TG酶协同改性有利于改善蛋白分子的乳化性质和热稳定性,形成良好的凝胶网络结构。但是对于大豆分离蛋白性质的影响及其所制备凝胶的冻融稳定性研究却少有报道。本研究以SPI为原料,采用超高压改性SPI,然后通过TG酶交联形成凝胶,研究超高压处理的TG酶诱导SPI凝胶冻融稳定性,进一步开展凝胶抗冻融性大豆分离蛋白制备的相关研究,为大豆分离蛋白凝胶改性的研究提供参考及理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白购自河南川锦生物科技有限公司;谷氨酰胺转氨酶购自北京索莱宝科技有限公司;

BILON型冷冻干燥机(上海比郎有限公司);杜马斯定氮仪(意大利VELP,德祥科技有限公司);超高压(HHP-400,仁和机电工程有限公司);GL-21M型冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司);F-4500荧光分光光度计(日本日立公司)。

FTIR-8400S型傅里叶变换红外光谱仪(日本岛津公司);Master Sizer 2000型激光粒度分析仪(英国Malvern公司);DNM-9602G酶标分析仪(北京普朗新技术有限公司);扫描电子显微镜(日立高新技术公司);TA-XT2i型质构仪(英国SMS公司)。

### 1.2 试验设计

以SPI为原料,采用超高压改性SPI,然后通过TG酶交联形成凝胶,分析其结构特性和功能特性,研究超高压处理的TG酶诱导SPI凝胶的冻融稳定性,试验流程图如图1所示。

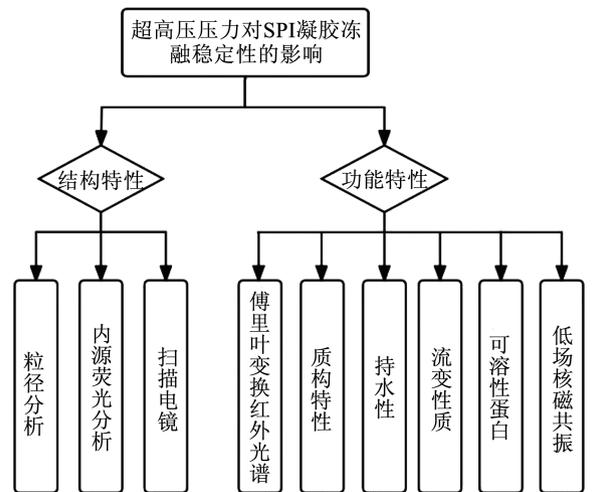


图1 试验流程图

Fig. 1 Test flow chart

### 1.3 方法

1.3.1 超高压改性 将SPI溶于去离子水中, SPI质量浓度为8%。加入叠氮钠,用保鲜膜封住杯口,4℃水合过夜。参考Peyrano等<sup>[14]</sup>方法进行超高压处理。将样品液分装至聚酰胺/聚乙烯袋中进行真空调节。采用前期基础研究已经确认的超高压处理诱导大豆分离蛋白凝胶冻融稳定性的最优条件,即保压时间为10 min,在此基础上分别设定压力100,200,300,400,500 MPa处理样品。

1.3.2 凝胶制备 将改性处理好的样品配制成蛋白质量浓度为8%的溶液,根据本实验室前期研究确认的TG酶交联SPI所制备凝胶的最优添加量,加入TG酶20 U·g<sup>-1</sup>,充分溶解,调至pH7.0。将样品液等量放入制胶瓶中,50℃水浴30 min,90℃加热灭酶10 min。将制得的凝胶4℃冷藏过夜。

1.3.3 冻融循环 参考刘竞男等<sup>[15]</sup>方法,对样品

进行冻融循环处理(Freeze-Thaw Cycle, FTC),将凝胶样品置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻储存20 h后, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 解冻4 h,该过程为1次冻融循环(1 FTC),重复进行5次(5 FTCs)。

1.3.4 粒径分布测定 根据Zhang等<sup>[16]</sup>方法,用磷酸盐缓冲液( $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH7.0)稀释样品液至蛋白浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.3.5 内源荧光光谱测定 根据Shen等<sup>[17]</sup>方法,将样品液用磷酸盐缓冲液( $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH7.0)稀释至蛋白质量浓度为 $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,并使用PerkinElmer(LS 55)光谱仪在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下测定其固有荧光光谱。设定参数激发波长为280 nm,发射波长范围300~400 nm,扫描速率为 $200\text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$ ,激发和发射狭缝均为5 nm。

1.3.6 傅里叶变换红外光谱分析 参考Yu等<sup>[18]</sup>方法,将改性处理后的样品冷冻干燥,与溴化钾粉末混合,充分研磨后压制成薄片,使用Nicolet iS50型FTIR仪进行全波段扫描,测量范围为 $4\ 000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ 。利用PeakFit v4.软件进行傅里叶去卷积处理,分析SPI中二级结构含量的变化。

1.3.7 质构测定 参考Jin等<sup>[19]</sup>方法,采用TA-XT2i质构仪进行测定,使用P/0.5柱形探头,探头下行速率为 $1\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ,上升速度为 $5\text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ,触发力5 g,下压距离为4 mm,每个样品重复测试5次,硬度是用于刺穿样品的最大力,作为质构指标进行测试。

1.3.8 持水性测定 参考Peyrano等<sup>[8]</sup>方法,取约1 g凝胶置于离心管,记录凝胶质量 $m(\text{g})$ ,离心管和凝胶总质量 $m_1(\text{g})$ , $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,除去离心管内水分,测离心管及凝胶质量 $m_2(\text{g})$ 。计算持水性,凝胶持水性( $\%$ ) =  $\frac{m - (m_1 - m_2)}{m} \times 100$ 。

1.3.9 可溶性蛋白含量测定 参考Sun等<sup>[20]</sup>方法,将凝胶静置至室温,切取定量凝胶,放入玛瑙研钵内研磨破碎,加入磷酸盐缓冲液( $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH7.0)定容,磁力搅拌60 min, $10\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min。BCA法测量其上清液的可溶性蛋白含量。

1.3.10 水分分布分析 参考Shao等<sup>[21]</sup>方法,使用低场核磁共振(LF-NMR)分析与检测系统(MesoMR23-060H-I,苏州纽迈分析仪器股份有限公司)测量弛豫时间 $T_2$ 。将凝胶样品放置待测管内。使用Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)序列记录弛豫时间 $T_2$ ,采样时间为200 kHz,主频为21 MHz,模拟增益为20 dB,回波时间设置为0.4 ms。12 000个回波的数据被采集为8次扫描重复。后续扫描之

间的重复时间为2 500 ms。扫描后,通过反演软件对每个样品的 $T_2$ 值进行拟合。

1.3.11 超高压改性SPI凝胶流变性质测定 参考Zhu等<sup>[22]</sup>方法测定流变性质,使用带有平行板测量池(狭缝距离1 mm,直径40 mm)的动态剪切流变仪(MCR302, Anton Paar, Germany)进行分析。对原始试验样品凝胶进行温度扫描振荡测量。选择1个特定的温度范围模拟大豆分离蛋白凝胶热糊化过程的条件,将原始试验样品以 $5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的恒定速率从 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热到 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.12 扫描电子显微镜分析 参考Aguirre-Mandujano等<sup>[23]</sup>方法。将凝胶切成小块( $2\text{ mm}\times 5\text{ mm}$ )。加入2.5%戊二醛溶液(pH6.8)固定, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH7.2)冲洗3次,每次10 min。再分别用体积分数为50%、70%和90%的乙醇溶液脱水1次,每次10~15 min;无水乙醇脱水3次。用无水乙醇和叔丁醇(体积比1:1)置换1次;纯叔丁醇置换2次,每次置换15 min。冷冻干燥后进行离子渐射镀金,于扫描电子显微镜(5 kv)下观察。

## 1.4 数据分析

所有试验测量均进行3次重复,结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。数据处理及显著性分析和方差分析(ANOVA)采用SPSS 25.0( $P < 0.05$ 为显著性差异),使用Origin 9.3软件作图,采用PeakFit v4.0软件分析蛋白二级结构。

## 2 结果与分析

### 2.1 粒径分析

如图2所示,经过超高压处理的SPI溶液相比未经超高压处理的SPI样品的粒径体积分布变窄,未经超高压处理的SPI样品的粒径分布较宽,表明超高压可以有效改变SPI的粒径。随着超高压压力的增大,SPI的粒径体积分布呈现先变窄后变宽的趋势, $100\sim 400\text{ MPa}$ 范围内逐渐变窄,并在400 MPa时体积分布达到最窄,可能由于SPI的结构在较低压力下打开,并且被解聚成一些更小的亚基单位,减少了蛋白质分子的体积。但当超高压压力达到500 MPa时,体积分布略有变大,但仍小于未经超高压处理的SPI样品,其原因可能是许多蛋白质倾向于在更高的压力下展开,并且从寡聚体中解离的亚基发生了重新结合<sup>[24]</sup>。随着超高压对SPI进行处理,粒径分布区域逐渐变小,并且SPI的大颗粒峰逐渐消失,就此说明超高压处理SPI可以改善其体积分布,有助于SPI功能特性的更好发挥。

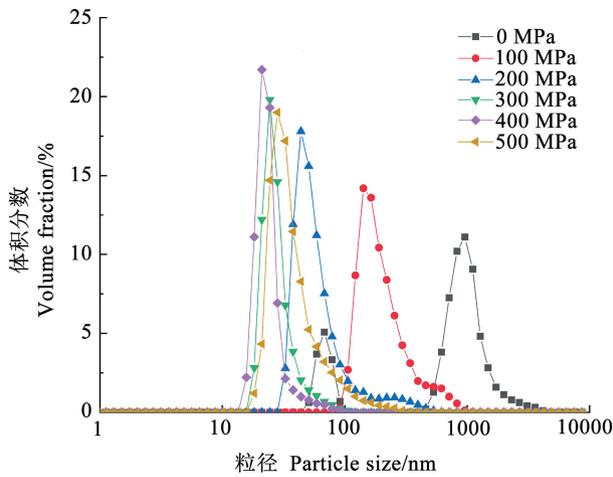


图2 超高压对SPI蛋白溶液粒径的影响

Fig. 2 Effect of ultra-high pressure on particle size of SPI solution

## 2.2 内源荧光光谱分析

内源荧光光谱对于研究蛋白质构象的转变非常有价值。3种常见的氨基酸表现出荧光,即色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)。内源荧光光谱主要是由蛋白质分子中的色氨酸(Trp)残基侧链发射产生,蛋白质中的色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr),与蛋白质的折叠展开状态有一定的相关性,因此,内源荧光光谱可以用来描述蛋白质三级结构的变化<sup>[25]</sup>。如图3所示,未经改性的SPI样品具有最小的荧光强度,经超高压处理后SPI荧光强度均提高,呈现先增大后减小的趋势。当超高压处理SPI压力为400 MPa时,荧光强度达到最高,随着压力持续增加荧光强度有所降低。产生这种现象的原因是,在相对较低的压力下(100~400 MPa)蛋白分子内部的疏水区增加,当压力达到500 MPa时,分子内部疏水区减弱。

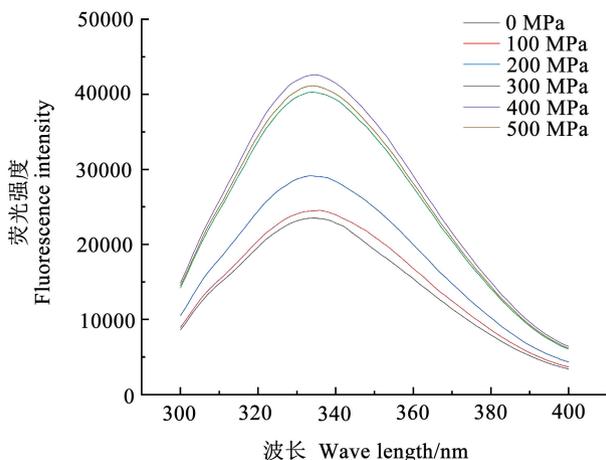


图3 超高压对SPI蛋白溶液荧光光谱的影响

Fig. 3 Effect of high hydrostatic pressure on fluorescence spectrum of SPI solution

## 2.3 傅里叶变换红外光谱分析

C=O键和N-H键都参与了不同二级结构单元之间的氢键,因此,酰胺I带和酰胺II带的位置对蛋白质的二级结构含量敏感。一般来说,傅里叶变换光谱的分析仅限于酰胺I波段区域,酰胺II波段不是量化蛋白质二级结构的良好预测因子<sup>[26]</sup>。如图4所示,傅里叶变换光谱中酰胺I区域位于1700~1600  $\text{cm}^{-1}$ 范围内<sup>[27]</sup>。对于吸收峰与二级结构的对应关系, $\alpha$ -螺旋结构出现在1650~1660  $\text{cm}^{-1}$ , $\beta$ -折叠结构出现在1610~1640  $\text{cm}^{-1}$ , $\beta$ -转角和无规则卷曲结构分别出现在1660~1670  $\text{cm}^{-1}$ 和1640~1650  $\text{cm}^{-1}$ <sup>[28]</sup>。蛋白质结构单元能够吸收红外区域中特定波长的辐射,从而产生一组特征峰。在酰胺A(3000~3500  $\text{cm}^{-1}$ )区,发现各实验组都发生了偏移,说明超高压改善了SPI的持水能力。从表1可以看出,超高压压力处理SPI的二级结构较未处理发生变化。其 $\alpha$ -螺旋结构含量减少, $\beta$ -折叠、 $\beta$ -转角和无规则卷曲结构含量增加。超高压处理的大豆蛋白样品在低于400 MPa时,随超高压压力的增加, $\alpha$ -螺旋结构逐渐降低, $\beta$ -折叠结构含量逐渐增加, $\beta$ -转角和无规则卷曲结构含量逐渐增加,这表明蛋白质由有序向无序趋势发展<sup>[29]</sup>;当超高压压力达到400 MPa时,与其他组样品相比较, $\alpha$ -螺旋结构显著降低, $\beta$ -折叠和无规则卷曲结构显著升高,而当压力持续升高到500 MPa时, $\alpha$ -螺旋结构、无规则卷曲结果升高, $\beta$ -折叠和 $\beta$ -转角含量降低。 $\beta$ -折叠相对含量能够反应蛋白质疏水作用力, $\beta$ -折叠相对含量降低表明蛋白质疏水作用力增强<sup>[30]</sup>,在疏水作用力下蛋白质聚集被破坏,这与内源荧光结果相互印证。

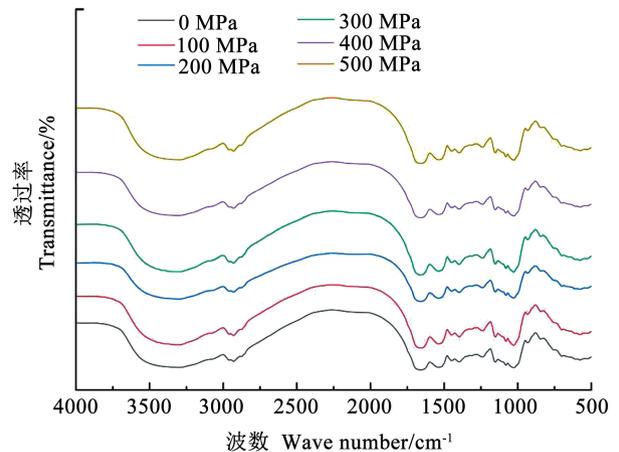


图4 超高压对SPI蛋白溶液傅里叶变换红外光谱的影响

Fig. 4 Effect of ultra-high pressure on FT-IR spectra of SPI solution

表 1 超高压对 SPI 蛋白溶液二级结构含量的影响

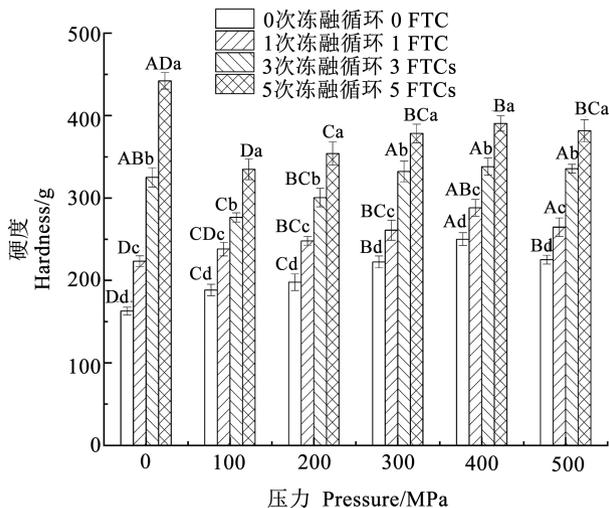
Table 1 Effect of ultra-high pressure on secondary structure content of SPI solution

单位:%

超高压压力 Ultra-high pressure/MPa	$\alpha$ -螺旋 $\alpha$ -Helix	$\beta$ -折叠 $\beta$ -Sheet	$\beta$ -转角 $\beta$ -Corner	无规则卷曲 Random coil
0	23.98 $\pm$ 0.03 ab	35.71 $\pm$ 0.10 d	18.04 $\pm$ 0.26 a	22.27 $\pm$ 0.11 d
100	22.41 $\pm$ 0.12 bc	35.89 $\pm$ 0.04 cd	18.58 $\pm$ 0.19 a	23.12 $\pm$ 0.07 cd
200	22.18 $\pm$ 0.21 bc	36.07 $\pm$ 0.21 c	18.41 $\pm$ 0.06 a	23.34 $\pm$ 0.19 c
300	21.87 $\pm$ 0.16 c	37.11 $\pm$ 0.15 b	16.51 $\pm$ 0.13 b	24.51 $\pm$ 0.05 b
400	20.11 $\pm$ 0.13 d	38.45 $\pm$ 0.22 a	16.87 $\pm$ 0.20 b	24.57 $\pm$ 0.18 b
500	20.33 $\pm$ 0.26 d	37.78 $\pm$ 0.18 ab	15.75 $\pm$ 0.22 c	26.14 $\pm$ 0.09 a

## 2.4 超高压对凝胶硬度的影响

硬度是凝胶理化性质的一个重要指标,代表凝胶能承受的最大外力,反映出蛋白质分子内部间的相互作用关系<sup>[31]</sup>。如图 5 所示,在超高压处理情况下,随着超高压压力的增加,凝胶硬度呈现先增大后减小的趋势,冻融循环 0 次,当处理压力为 400 MPa 时,凝胶硬度达到最大,为 250 g,未经超高压处理的 SPI 凝胶硬度为 160.73 g,表明超高压处理显著提高了 SPI 凝胶硬度。这可能是由于超高压处理打开了蛋白结构,展开的部分结构与 TG 酶发生交联,其三维网络结构变得更为紧密,凝胶硬度增加。当压力达到 500 MPa 时,凝胶硬度有所下降,可能是由于较大压力处理,导致蛋白内部结构破坏。上述结果均表明了超高压处理有效改善了 TG 酶诱导的 SPI 凝胶硬度。



注:大写字母代表同一 FTC 次数,不同超高压压力的凝胶硬度差异显著( $P < 0.05$ );小写字母代表同一超高压压力,不同 FTC 次数的凝胶硬度差异显著( $P < 0.05$ )。下同。

Note: The capital letters represent that the hardness of gel with the same FTC number and different ultra-high pressure has significant difference ( $P < 0.05$ ); The lowercase letters represent that the hardness of gel with the same ultra-high hydrostatic pressure and different FTC number is significantly different ( $P < 0.05$ ). The same below.

图 5 超高压对凝胶硬度的影响

Fig. 5 Effect of ultra-high pressure on gel hardness

随着冻融循环次数的增加,所有样品凝胶硬度均随之增大,冻融循环 0 次时,未经超高压处理的 SPI 凝胶硬度为 160.73 g,冻融循环 5 次后,凝胶硬度为 442 g,凝胶硬度增加了 279.27 g。当处理压力为 400 MPa 时,冻融循环 0 次时,凝胶硬度为 250 g,冻融循环 5 次后,凝胶硬度为 390.43 g,凝胶硬度增加了 140.43 g,未经处理的 SPI 凝胶硬度变化程度大于经超高压处理后的凝胶。说明一定压力范围内,超高压处理能够改善凝胶在冻融过程中的劣变程度,对冻融蛋白凝胶起到了保护作用。

## 2.5 超高压对凝胶持水性的影响

持水性反映了凝胶中蛋白质与水分子相互结合的程度,SPI 凝胶的持水能力主要取决于蛋白网络结构对水分子的束缚以及蛋白与水分子的结合程度。如图 6 所示,随着超高压压力的增大,持水性先增大后减小,冻融循环 0 次时,当处理压力为 400 MPa 时,持水性最高,为 94.32%,未经超高压处理的 SPI 凝胶持水性为 75.22%,较未经超高压处理的 SPI 凝胶增加了 19.1%。表明超高压处理可以显著提高 SPI 凝胶的持水性。这可能是由于超高压处理后蛋白分子展开,促进了其与 TG 酶的交联作用,使凝胶结构更为致密,持水能力增强。当超高压压力达到 500 MPa 时,持水性有所下降,可能是由于过高的压力破坏了蛋白结构的交联能力,导致持水性下降<sup>[32]</sup>。超高压处理还会影响蛋白质侧链的相互作用,进而引起蛋白质变性、聚集或凝胶化,但其形成的凝胶结构类似于一种“海绵状”,主要由疏水作用力维持,无法形成均匀稳定的凝胶结构<sup>[33]</sup>。

在相同超高压处理情况下,随着冻融循环次数增加,凝胶的持水性随之下降。冻融循环 5 次后,所有样品的凝胶持水性均显著低于冻融前( $P < 0.05$ ),其中未处理组持水性下降最为明显,冻融循环 0 次时,持水性为 75.22%,5 次后,持水性为 26.34%,持水性下降了 48.88%。经过 400 MPa 处理的 SPI 凝胶持水性在冻融循环 0 次时为 94.32%,5 次后为

55.65%,持水性下降了38.67%,是所有实验组中下降程度最小的,说明一定压力范围内,超高压处理对冻融处理的SPI凝胶起到改善作用。

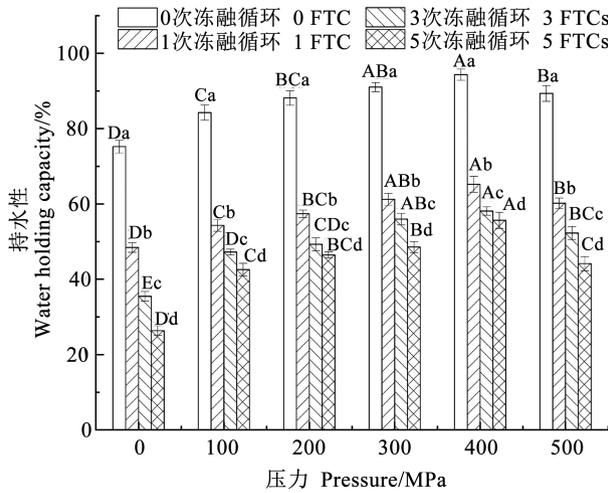


图6 超高压对凝胶持水性的影响

Fig. 6 Effect of ultra-high pressure on water holding capacity of gel

## 2.6 超高压对凝胶可溶性蛋白含量的影响

可溶性蛋白含量与凝胶网络结构的形成密不可分,通过分析可溶性蛋白的含量,可以进一步了解蛋白凝胶的特性。冻融循环过程中随压力增大,凝胶的可溶性蛋白含量的变化情况如图7所示,可溶性蛋白含量呈现先降低后升高的趋势,超高压压力为400 MPa时,可溶性蛋白含量达到了最低,为21.12%,此时未经超高压处理的SPI凝胶的可溶性蛋白含量为36.49%,表明超高压处理可以显著降低可溶性蛋白含量。主要是因为超高压处理后SPI溶解度增大,与TG酶交联作用增强,形成凝胶的蛋白分子数量骤增,导致可溶性蛋白含量降低。当超高压压力过大时,会出现可溶性蛋白含量升高的现象,这是由于过高的压力使蛋白分子网络结构改变,交联程度变弱,导致可溶性蛋白含量提高。

在冻融循环过程中,所有实验组凝胶的可溶性蛋白含量随冻融次数的增多均降低。在冻融循环过程中,蛋白分子变性,蛋白内部发生重组,蛋白结构空隙变大,使凝胶的一些特性发生劣变,例如凝胶硬度增大。分析整组数据可知,未经超高压处理的SPI凝胶在冻融循环过程中变化程度最大,冻融循环0次时,未经超高压处理的SPI凝胶的可溶性蛋白含量为36.49%,冻融循环5次后为11.27%,下降了25.22%。超高压400 MPa压力处理时变化程度最小,冻融循环0次时,可溶性蛋白含量为21.12%,冻融循环5次后为13.25%,下降了7.87%,

下降效果显著低于未经超高压处理的SPI凝胶,表明超高压可以改善TG酶交联的SPI凝胶的可溶性蛋白含量,提高其冻融稳定性。

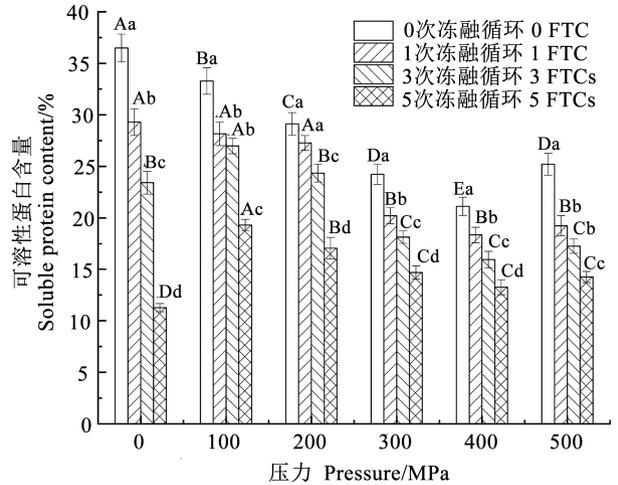


图7 超高压对凝胶可溶性蛋白含量的影响

Fig. 7 Effect of ultra-high pressure on the content of soluble protein in gel

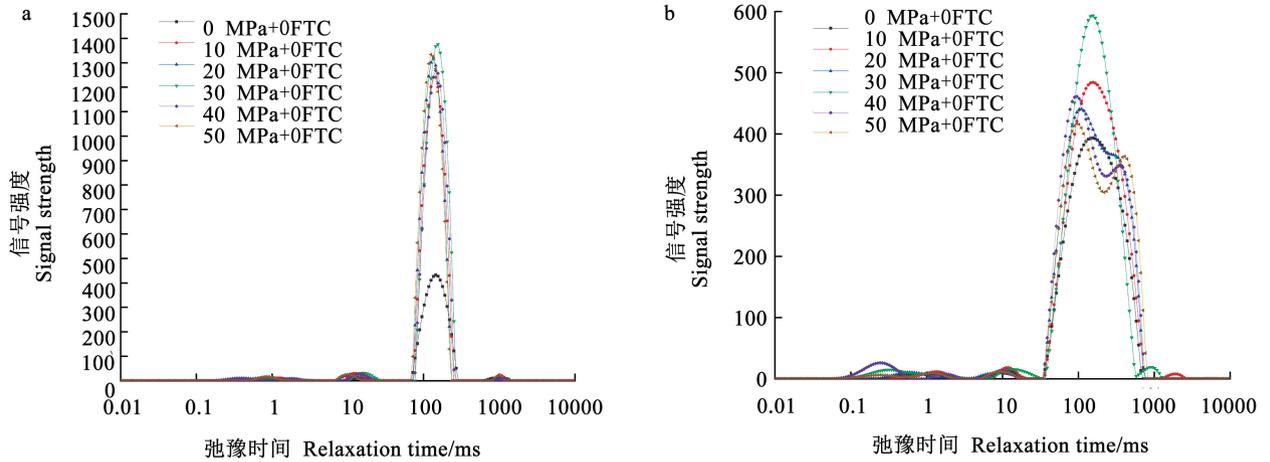
## 2.7 超高压对凝胶水分分布的影响

凝胶中的水分存在状态,自由程度可以反映凝胶的功能特性。低场核磁共振(LF-NMR)可以被视为一种强大的、非破坏性的替代方法,用于表征和量化复杂食品基质中的水。不同“水分状态”和质子种群的信息可以根据它们不同的NMR弛豫时间来表征<sup>[34]</sup>。利用LF-NMR可以分析天然胶与SPI复合凝胶中水分的迁移状态<sup>[35]</sup>。研究采用低场核磁共振法测定冻融前后凝胶的弛豫时间,通过弛豫时间来反映出水分存在状态,水分与所测样品结合越紧密横向弛豫时间越短,水分状态越自由横向弛豫时间越长。如图8a可知,所有样品的横向弛豫时间 $T_2$ 在0.01~10 000 ms的分布均呈现4个峰,其中, $T_{21}$ (0.1~9 ms)区间为结合水, $T_{22}$ (9~90 ms)区间为不易流动的水, $T_{23}$ (90~800 ms)区间为较易流动的水, $T_{24}$ (800~10 000 ms)区间为自由水<sup>[36-37]</sup>。经超高压处理的SPI凝胶的较易流动的水( $T_{23}$ )分布峰较高,这可能是由于高压处理导致蛋白结构展开,凝胶内部网络结构空隙变大,凝胶结构中会包含较为活跃的水分状态。当处理压力过大,达到500 MPa时蛋白结构被破坏,水分自由程度反而会降低。

冻融循环过程会导致蛋白凝胶的特性发生不同程度劣变。如图8b和表2可知,冻融会使结合水( $T_{21}$ )含量升高,弛豫时间的分布变宽。在冻融循环0次时未经处理的凝胶样品 $P_{21}$ 为67.159,经过5次

冻融循环后升至 162.781, 变化幅度比较大。超高压压力 400 MPa 处理的 SPI 凝胶, 冻融循环 0 次时  $P_{21}$  为 217.918, 经过 5 次冻融循环后升至 247.937,

变化幅度为 30.019, 相比较未经超高压处理组的结合水含量显著提升, 说明运用适当超高压压力处理 TG 酶诱导 SPI 凝胶对其抗冻效果是有利的。



注: a. 未经过冻融处理; b. 5 次冻融循环。

Note: a. 0 FTC; b. 5 FTCs.

图 8 超高压对凝胶水分分布的影响

Fig. 8 Effect of ultra-high pressure on water distribution in gel

表 2 超高压对凝胶  $T_{21}$  弛豫时间峰面积的影响

Table 2 Effect of ultra-high pressure on the percentage of the  $T_{21}$  relaxation time peak area of gel

超高压压力 Ultra-high pressure/MPa	$P_{21}$ 峰面积(0FTC) $P_{21}$ peak area (0FTC)	$P_{21}$ 峰面积(5FTCs) $P_{21}$ peak area (5FTCs)	峰面积变化 $\Delta P_{21}$
0	67.159 ± 2.311 e	162.781 ± 2.711 e	95.622
100	158.840 ± 5.451 d	248.864 ± 3.212 c	90.024
200	177.840 ± 4.228 c	272.098 ± 2.459 a	94.249
300	184.288 ± 3.736 b	216.607 ± 1.150 d	32.319
400	217.918 ± 2.218 a	247.937 ± 1.781 c	30.019
500	158.198 ± 1.422 d	261.810 ± 2.834 b	103.612

## 2.8 超高压对凝胶流变性质的影响

储能模量体现了凝胶的弹性和强度, 在蛋白质凝胶的三维网络中弹性和强度具有主要作用<sup>[38]</sup>。当对食品施加一个外力时, 食品会发生形变, 称之为弹性, 撤掉这个外力时, 具有了黏性特征, 流动状态也就此生成<sup>[39]</sup>。储能模量( $G'$ )代表样品形变过程中由于弹性储存的能量。如图 9 所示, 随超高压压力的增大, SPI 凝胶的储存模量( $G'$ )先增大后减小, 在处理压力为 400 MPa 时 SPI 凝胶弹性最高, 说明超高压可以改善 SPI 凝胶的弹性。超高压处理对 TG 酶诱导的 SPI 凝胶具有积极的作用, 其原因在于压力处理打开了蛋白内部结构, 蛋白分子充分交联, 形成了紧密的凝胶结构。当压力过大, 达到 500 MPa 时, SPI 凝胶的储存模量( $G'$ )下降, 这是由于压力过大破坏了蛋白内部结构, 交联能力下降。

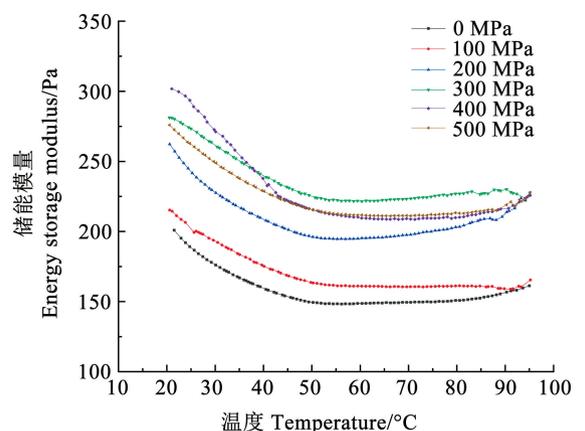


图 9 超高压对凝胶流变性质的影响

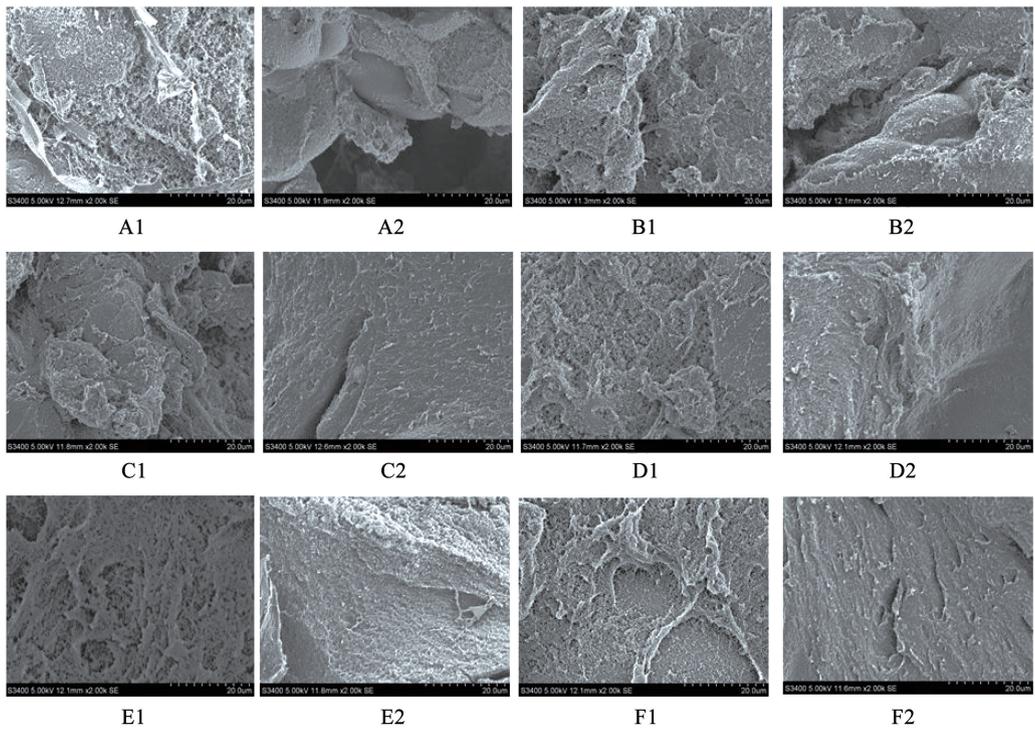
Fig. 9 Effect of ultra-high pressure on rheological properties of gel

## 2.9 超高压对凝胶微观结构的影响

扫描电子显微镜可以表征不同超高压处理条件下 TG 酶诱导 SPI 凝胶在冻融过程中微观结构的三维网络。如图 10 所示:冻融循环 0 次时,未经超高压处理的 SPI 凝胶呈现出较为细密的凝胶网络结构,孔洞较小;经超高压不同压力的处理可能对 SPI 产生了不同的断裂力,使其发生断裂位移<sup>[32]</sup>,从而导致了凝胶网络结构孔洞的增大。由于 SPI 的结构改变,TG 酶诱导形成凝胶时,交联的作用增强,导致形成的凝胶更加紧密平滑。当超高压处理压力过大时,导致 SPI 内部结构破裂,使其凝胶作用力下降。

凝胶在经冻融循环时,温度不断发生变化,冰

晶经历形成与消失到再形成的过程,冻融循环次数会造成凝胶不同程度劣变。经过 5 次冻融循环后,未经超高压处理的 SPI 凝胶网络结构破坏程度较大,形成的凝胶孔缝较大,这很可能就是冻结的冰晶作用的结果,把原本的水分子与蛋白质分子结合的部分脱离出来,聚集在此处,将孔隙撑大,从而凝胶的三维网络结构破坏<sup>[40]</sup>。相比之下,经过超高压处理的 TG 酶诱导 SPI 凝胶在 5 次冻融循环后表现出较好的三维网络结构,虽然都不同程度地变粗糙,蜂窝状的空隙变大,但相比未经超高压处理有一定提升。归因于超高压处理使 SPI 结构破裂、展开,有效促进其与 TG 酶交联,从而提高了凝胶特性。



注:A1、B1、C1、D1、E1 和 F1 分别是 0、100、200、300、400 和 500 MPa 超高压处理后未经冻融循环的 SPI 凝胶, A2、B2、C2、D2、E2 和 F2 分别是 0、100、200、300、400 和 500 MPa 超高压处理后经 5 次冻融循环后的 SPI 凝胶。

Note: A1, B1, C1, D1, E1 and F1 are the SPI gels treated by UHP at 0, 100, 200, 300, 400 and 500 MPa without FTC respectively. A2, B2, C2, D2, E2 and F2 are the SPI gels treated by UHP at 0, 100, 200, 300, 400 and 500 MPa with 5 FTCs respectively.

图 10 超高压处理后 SPI 凝胶冻融循环 0 次和 5 次凝胶微观结构电镜扫描图(2 000 倍)

Fig. 10 The microstructure images of SPI gel by scanning electron microscopy after ultra-high pressure treatment ( $\times 2\ 000$ )

## 3 讨论

大豆分离蛋白酶致使凝胶在冻融循环过程中会发生劣变。刘竞男等<sup>[15]</sup>的研究表明随着冻融循环次数的增加,凝胶的持水性和可溶性蛋白质量分数都呈下降趋势,硬度随之增加。扫描电子显微镜观察凝胶微观结构发现,冻融循环 5 次后的凝胶孔

洞大,蛋白基质松散,呈明显的蜂窝状结构。本研究结果表明当冻融循环次数增加时,凝胶的硬度和结合水含量也随之升高,持水性和可溶性蛋白含量降低。通过电镜扫描微观结构分析,对照冻融前发现凝胶网络结构变粗糙,孔洞、裂缝变大,表明冻融循环过程会使凝胶品质变差。蛋白凝胶在冷冻过后,会发生变性并且出现收缩现象,硬度变大,有水

分析出等,使凝胶品质下降。在冷冻过程中,冰晶的形成使内部网络结构产生不同程度的损伤。

超高压处理 SPI,压力在一定范围内,凝胶冻融稳定性呈正相关的趋势。当超高压处理压力过大时,许多蛋白质倾向于在更高的压力下展开,并且从寡聚体中解离的亚基重新结合,凝胶网络结构发生改变,使冻融稳定性下降。Carullo 等<sup>[41]</sup>在超高压冻藏乳清分离蛋白的研究中发现,随着冻融循环次数的增加,在一定范围内,超高压处理与 SPI 凝胶冻融稳定性呈正相关的趋势。但当超高压处理压力过大时,许多蛋白质倾向于在更高的压力下展开,并且从寡聚体中解离的亚基又重新结合,凝胶网络结构发生改变,使冻融稳定性下降,从而导致凝胶品质变差。本研究结果表明凝胶的粒径、内源荧光光谱强度、持水性和硬度含量会随着超高压压力的增大呈现先升高后降低的趋势,可溶性蛋白含量随着超高压压力的增加呈现先降低后升高的趋势,这也说明适度压力的超高压处理有利于凝胶品质特性。多数蛋白质倾向于在更高的压力下展开,并且从寡聚体中解离的亚基发生重新结合,分子内疏水区减弱,然而过度的超高压处理也会使 SPI 结构展开过度,导致过量的交联共价键,抑制均匀发展的蛋白质网络,最终影响 SPI 凝胶的冻融稳定性。

## 4 结论

运用粒径体积分布、内源荧光光谱分析和傅里叶红外光谱分析证明了超高压处理导致 TG 酶诱导的 SPI 的分子结构发生变化。随着冻融循环次数的增加,凝胶持水性和可溶性蛋白质量分数均呈下降趋势,硬度随之而增加。冻融循环过程中,冻融稳定性随超高压压力的增大先增大后减小。扫描电子显微镜观察凝胶微观结构发现,冻融循环 5 次后的凝胶孔洞较大,蛋白质松散,蜂窝状明显。说明冻融导致凝胶劣变,冻融稳定性降低。400 MPa 超高压处理后的 SPI,经 5 次冻融循环,其凝胶硬度、结合水分布含量、持水性、可溶性蛋白含量的劣变程度均大于未经超高压处理的 SPI 凝胶,流变储能模量  $G'$  提高,且 SPI 凝胶微观网络结构更加紧密、平滑,证明超高压处理可以提高 SPI 凝胶冻融稳定性。

## 参考文献

[1] NISHINARI K, FANG Y, GUO S, et al. Properties and applications of soy proteins [M]//PETER A W, GLYN O P. Gums and stabilisers for the food industry 17-The changing face of food manufacture; The role of hydrocolloids. ACS: Food Science

Subject Collection, 2014; 28-45.

- [2] 许慧,王玲,朱秀清,等.低温冷冻条件对大豆分离蛋白功能性的影响[J].食品科学,2014,35(15):49-53.(XU H, WANG L, ZHU X Q, et al. Effect of cryopreservation on functional properties of soy protein isolates [J]. Food Science, 2014, 35(15): 49-53.)
- [3] 姚美伊,郭顺堂.冷冻大豆分离蛋白凝胶的功能性分析[J].大豆科技,2013(3):82.(YAO M Y, GUO S T. Functional analysis of frozen soy protein isolate gel [J]. Soybean Science & Technology, 2013(3): 82.)
- [4] POTTIER L, VILLAMONTE G, DE LAMBALLERIE M. Applications of high pressure for healthier foods[J]. Current Opinion in Food Science, 2017, 16: 21-27.
- [5] HE R, HE H Y, CHAO D, et al. Effects of high pressure and heat treatments on physicochemical and gelation properties of rapeseed protein isolate [J]. Food and Bioprocess Technology, 2014, 7(5): 1344-1353.
- [6] KHAN N M, MU T H, ZHANG M, et al. The effects of pH and high hydrostatic pressure on the physicochemical properties of a sweet potato protein emulsion [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 35: 209-216.
- [7] 刘容旭,王语聪,谢智鑫,等.超高压处理对冰淇淋浆料及其成品品质的影响[J].食品研究与开发,2023,44(3):145-151,161.(LIU R X, WANG Y C, XIE Z X, et al. Effect of ultra-high pressure treatment on the quality of ice cream slurry and its finished products [J]. Food Research and Development, 2023, 44(3): 145-151, 161.)
- [8] PEYRANO F, DE LAMBALLERIE M, AVANZA M V, et al. Gelation of cowpea proteins induced by high hydrostatic pressure [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106191.
- [9] LI Y P, KANG Z L, SUKMANOV V, et al. Effects of soy protein isolate on gel properties and water holding capacity of low-salt pork myofibrillar protein under high pressure processing [J]. Meat Science, 2021, 176: 108471.
- [10] 秦新生.物理预处理-TG酶交联复合改性对大豆与小麦蛋白凝胶性质的影响研究[D].合肥:合肥工业大学,2017.(QIN X S. Studies on the mechanism, emulsifying application of physical pretreatment and transglutaminase-set soy protein isolate and wheat gluten mixture gelation [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2017.)
- [11] 王炳智.高压与TG酶处理对小麦面筋蛋白的凝胶性影响研究[D].合肥:合肥工业大学,2019.(WANG B Z. Effect of high pressure and MTGase treatment on gel properties of wheat gluten [D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2019.)
- [12] 史乾坤,王心雅,甄诺,等.超高压预处理对TGase交联的大豆分离蛋白凝胶的影响[J].中国粮油学报,2021,36(9):94-100.(SHI Q K, WANG X Y, ZHEN N, et al. Effects of ultra high pressure pretreatment on TGase cross-linked soy protein isolate gel [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2021, 36(9): 94-100.)
- [13] 才卫川,张坤生,任云霞.TG酶协同超高压处理对鸡胸肉中肌原纤维蛋白凝胶品质的影响[J].食品工业科技,2014,35(23):77-83.(CAI W C, ZHANG K S, REN Y X. Effects of TGase and high pressure processing treatment on the quality of myofibrillar protein gel [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(23): 77-83.)
- [14] PEYRANO F, DE LAMBALLERIE M, AVANZA M V, et al.

- Rheological characterization of the thermal gelation of cowpea protein isolates; Effect of pretreatments with high hydrostatic pressure or calcium addition [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 115: 108472.
- [15] 刘竞男, 张智慧, 王琳, 等. 超声处理对谷氨酰胺转氨酶诱导的大豆分离蛋白凝胶冻融稳定性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(13): 76-82. (LIU J N, ZHANG Z H, WANG L, et al. Effect of ultrasound on freeze-thaw stability of soy protein isolate gel induced by glutamine transaminase[J]. *Food Science*, 2020, 41(13): 76-82.)
- [16] ZHANG X, ZHANG S, ZHONG M, et al. Soy and whey protein isolate mixture/calcium chloride thermally induced emulsion gels: Rheological properties and digestive characteristics [J]. *Food Chemistry*, 2022, 380: 132212.
- [17] SHEN L, TANG C H. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate[J]. *Food Research International*, 2012, 48: 108-118.
- [18] 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.
- [19] JIN I H, KIM J E, SEO J H, et al. Physicochemical properties of soy protein isolate gels emulsified with various oils using a microbial transglutaminase[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2013, 22(S1): 129-136.
- [20] SUN Y, HAYAKAWA S, IZUMORI K. Modification of ovalbumin with a rare ketohexose through the Maillard reaction: Effect on protein structure and gel properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(5): 1293-1299.
- [21] SHAO J H, DENG Y M, JIA N, et al. Low-field NMR determination of water distribution in meat batters with NaCl and polyphosphate addition[J]. *Food Chemistry*, 2016, 200: 308-314.
- [22] ZHU Y, CHEN X Y, MCCLEMENTS D, et al. pH-, ion- and temperature-dependent emulsion gels: Fabricated by addition of whey protein to gliadin-nanoparticle coated lipid droplets [J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 77: 870-878.
- [23] AGUIRRE-MANUJANO E, LOBATO-CALLEROS C, BERISTAIN C, et al. Microstructure and viscoelastic properties of low-fat yoghurt structured by monoglyceride gels[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 42(5): 938-944.
- [24] PUPPO C, CHAPLEAU N, SPERONI F, et al. Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(6): 1564-1571.
- [25] ROYER C A. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence [J]. *Chemical Reviews*, 2006, 106(5): 1769-1784.
- [26] MURAYAMA K, TOMIDA M. Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(36): 11526-11532.
- [27] KONG J, YU S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2007, 39(8): 549-559.
- [28] HERRANZ B, TOVAR C A, BORDERIAS A J, et al. Effect of high-pressure and/or microbial transglutaminase on physicochemical, rheological and microstructural properties of flying fish surimi[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2013, 20: 24-33.
- [29] 刘容旭, 李春雨, 王语聪, 等. 超高压辅助酶解法改性汉麻分离蛋白及其理化性质的研究[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(19): 99-107. (LIU R X, LI C Y, WANG Y C, et al. Study on the modification and physicochemical properties of hemp protein isolate by ultra-high pressure assisted enzymatic hydrolysis [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(19): 99-107.)
- [30] WANG Z J, LI Y, JIANG L Z, et al. Relationship between secondary structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolate subjected to heat treatment [J]. *Journal of Chemistry*, 2014, 10(5): 1-10.
- [31] WANG C H, DAMODARAN S. Thermal gelation of globular proteins: Influence of protein conformation on gel strength [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, 39(3): 433-438.
- [32] BI C H, WANG P L, SUN D Y, et al. Effect of high-pressure homogenization on gelling and rheological properties of soybean protein isolate emulsion gel [J]. *Journal of Food Engineering*, 2020, 277: 109923.
- [33] 刘容旭, 王语聪, 刘金阳, 等. 超高压辅助酶解对汉麻分离蛋白结构和抗氧化活性的影响[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(4): 24-32. (LIU R X, WANG Y C, LIU J Y, et al. Effects of ultra-high pressure assisted enzymatic hydrolysis on structure and antioxidant activity of hemp protein isolate [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(4): 24-32.)
- [34] HANSEN C L, RINNAN A, ENGELSEN S B, et al. Effect of gel firmness at cutting time, pH, and temperature on rennet coagulation and syneresis: An *in situ* 1H NMR relaxation study [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(1): 513-519.
- [35] GROSSI A, OLSEN K, BOLUMAR T, et al. The effect of high pressure on the functional properties of pork myofibrillar proteins [J]. *Food Chemistry*, 2016, 196: 1005-1015.
- [36] QIN H, XU P, ZHOU C, et al. Effects of L-Arginine on water holding capacity and texture of heat-induced gel of salt-soluble proteins from breast muscle[J]. *LWT*, 2015, 63(2): 912-918.
- [37] GOETZ J, KOEHLER P. Study of the thermal denaturation of selected proteins of whey and egg by low resolution NMR [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2005, 38(5): 501-512.
- [38] AROGUNDADE L A, MU T H, AÑÓN M C. Heat-induced gelation properties of isoelectric and ultrafiltered sweet potato protein isolate and their gel microstructure [J]. *Food Research International*, 2012, 49(1): 216-225.
- [39] 张晶, 张美莉. 超高压处理对燕麦淀粉颗粒特性、热特性及流变学特性的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(23): 114-121. (ZHANG J, ZHANG M L. Effect of high hydrostatic pressure treatment on morphological, thermal and rheological properties of oat starch[J]. *Food Science*, 2020, 41(23): 114-121.)
- [40] ZHAO L, CHEN F, ZHAO G, et al. Isomerization of trans-Astaxanthin Induced by Copper(II) Ion in Ethanol [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(24): 9620-9623.
- [41] CARULLO D, BARBOSA-CÁNOVAS G V, FERRARI G. Changes of structural and techno-functional properties of high hydrostatic pressure (HHP) treated whey protein isolate over refrigerated storage [J]. *LWT*, 2021, 137: 110436.