

大豆蛋白-葡聚糖共价物酶法凝胶的冻融稳定性研究

张梦玥, 刘竞男, 陈鹏, 王旭, 王喜波*, 徐宁
(东北农业大学食品学院 哈尔滨 150030)

摘要 研究了冻融循环过程中,谷氨酰胺转氨酶交联的不同质量浓度(30,40,50,60 mg/mL)大豆分离蛋白-葡聚糖共价物(SPI-D)凝胶的持水性、弹性、硬度、可溶性蛋白含量、微观形貌及结构的变化。SDS-PAGE 试验证实大豆分离蛋白与葡聚糖发生美拉德反应,生成大豆分离蛋白-葡聚糖共价物。随着 SPI 质量浓度的升高,SPI-D 的接枝度先增大后减小,50 mg/mL 时达到最大值 12.54%。表面疏水性和内源荧光光谱分析表明,随着美拉德反应的进行,蛋白柔性增大,无序性增加,朝有利于冻融稳定的方向转变。与对照相比,5 次冻融循环后,SPI-D、SPI 与 D 混合物(SPI+D)、SPI 凝胶持水性分别降低了 32.46%,42.81%,44.98%,硬度分别增加了 124.66%,271.51%,343.38%,弹性分别升高了 4.38%,9.58%,11.76%,可溶性蛋白含量分别降低了 2.05%,3.61%,7.17%,SPI-D 凝胶的各项指标变化幅度均最小,冻融稳定性最好。扫描电镜图表征了凝胶微观形貌,相比 SPI+D 和 SPI,SPI-D 凝胶孔隙更小且组织状态更均匀,说明美拉德反应是提升酶法大豆分离蛋白凝胶冻融稳定性的有效方法。

关键词 大豆分离蛋白;凝胶;冻融稳定性;谷氨酰胺转氨酶;美拉德反应

文章编号 1009-7848(2023)11-0105-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.11.011

大豆分离蛋白(Soy protein isolate, SPI)不仅营养价值高,还有良好的凝胶性,常被添加于冷冻肉制品、面制品和速冻食品中,改善其质构特性,增加保水性,提高品质。然而,冷冻食品在运输和贮藏时,由于环境温度、pH 值、离子强度等发生变化,易反复经历冷冻-解冻过程(即冻融循环, Freeze-thaw cycle, FTC),SPI 凝胶有序的网络结构会被破坏,产生收缩、变硬、持水能力减弱等现象,导致食品劣变^[1-2]。因此,提高 SPI 凝胶冻融稳定性,满足冷冻食品行业需求,已成为此领域亟需攻克的技术难题。

适度的美拉德反应能够改变蛋白质结构,改善蛋白的凝胶特性,例如提升凝胶强度、持水性,改善凝胶弹性等^[3-6]。谷氨酰胺转氨酶(Transglutaminase, TG)能够催化谷氨酰基(酰基供体)和各种伯胺化合物(包括赖氨酸残基中的 ϵ -氨基,即酰基受体)之间发生酰基转移反应^[7]。蛋白质发生美拉德反应后,分子结构伸展,内部的赖氨酸残基

暴露,TG 酶的结合位点增加,更易形成蛋白质分子内和分子间的 γ -谷氨酰基- ϵ -赖氨酸异肽键,增强交联效应,使得凝胶网状结构紧密、有序,抵御外界环境对凝胶网络的破坏。

目前,Zhang 等^[8]、Yu 等^[9]、孙洪蕊等^[10]已证实葡聚糖与 SPI 发生美拉德反应可有效增强蛋白乳液抗冻性,然而,针对蛋白凝胶抗冻性的研究较少,关于 TG 酶法制备的大豆分离蛋白-葡聚糖共价物凝胶的冻融稳定性的研究也鲜有报道。本文采用 TG 酶交联不同蛋白质质量浓度(30,40,50,60 mg/mL)的 SPI-D 凝胶,通过测定接枝度、SDS-PAGE、内源荧光光谱、表面疏水性来分析 SPI-D 结构变化,再通过质构测定及扫描电镜等方法,与 SPI、D 混合物(SPI+D)凝胶、SPI 凝胶进行对比,研究其在冻融循环中持水性、硬度、弹性、可溶性蛋白含量及微观形貌变化,旨在为制备抗冻大豆分离蛋白提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

脱脂豆粕,山东禹王有限公司;葡聚糖,国药集团化学试剂有限公司;TG 酶,江苏一鸣生物有限公司;ANS 荧光探针,Sigma 公司;其它试剂均为分析纯级。

收稿日期:2022-11-03

基金项目:国家现代农业产业技术体系项目(CARS-04-PS32);黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2020106)

第一作者:张梦玥,女,硕士生

通信作者:王喜波 E-mail: wangxibo@neau.edu.cn

1.2 仪器

TU-1800型紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;F-4500型荧光分光光度计,日本日立公司;TA-XT2i型质构仪,英国SMS公司;扫描电子显微镜,日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 SPI制备 按照Wang等^[11]方法,将粉碎过筛后的脱脂豆粕以质量比1:10溶于去离子水,取2 mol/L NaOH溶液,调节pH值至8.5,室温混匀1 h后,4 000 r/min条件下离心30 min。收集上清液,用HCl溶液(2 mol/L)调节pH值至4.5,室温静置2 h后,弃去上清液,4 000 r/min离心15 min,将沉淀用去离子水洗涤3次,复溶后,用NaOH溶液(2 mol/L)中和pH值至7.0,4℃条件下透析24 h除盐,储存在-20℃冰箱内预冻,冷冻干燥后置于-20℃冰箱中备用。

1.3.2 样品制备 SPI-D制备方法如下:将SPI与葡聚糖(D)以质量比3:1(SPI质量浓度分别为30,40,50,60 mg/mL)溶于PBS缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.0)中,25℃下搅拌4 h,加入叠氮钠4℃水合过夜。密封样品液,95℃水浴搅拌3 h后,迅速冷却至室温得到SPI-D样品。未经加热的SPI与葡聚糖混合物为SPI+D样品。冷冻干燥后备用。

1.3.3 接枝度(DG)测定 取200 μL样品溶液,添加至4 mL邻苯二甲醛溶液(OPA)中,混匀后置于水浴锅内,35℃反应2 min,测量波长340 nm测量吸光度,空白对照为去离子水^[12]。其中,OPA试剂现用现配,用1 mL去离子水溶解40 mg邻苯二甲醛,再按照顺序加入2.5 mL十二烷基磺酸钠(SDS)溶液、25 mL硼砂溶液(0.1 mol/L)、0.1 mL β-巯基乙醇,最后用去离子水定容至50 mL。

$$DG(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中, A_0 ——未发生反应的吸光值; A_1 ——反应后的吸光值。

1.3.4 接枝反应程度的测定 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法,使用质量分数5%的浓缩胶和13%的分离胶,将样品溶液(质量浓度为5 mg/mL)与5×SDS上样缓冲液按体积比4:1混合,沸水浴5 min后冷却至室温备用。取10 μL样品液注入点样孔中,浓缩胶中电压为90 V,进入分离

胶后以120 V进行电泳,溴酚蓝与凝胶底部相距约1 cm时终止电泳、起胶^[13]。完成电泳后,移入考马斯亮蓝溶液中染色12 h,再使用脱色液洗脱3~4次,直至出现清晰的条带。

1.3.5 表面疏水性的测定 样品溶液处理方式如下:稀释蛋白质量浓度至0.02,0.01,0.005和0.0025 mg/mL。取8 mL样品溶液,加入20 μL的ANS荧光探针(8 mmol/L)混匀,25℃避光15 min后,进行荧光强度测定。参数设置如下:激发波长390 nm、发射波长470 nm,狭缝5 nm^[14]。以测得的荧光强度为纵坐标,蛋白质质量浓度为横坐标,进行作图,蛋白质表面疏水性指数即为线性关系良好的回归线斜率。

1.3.6 内源荧光强度的测定 将样品液用PBS缓冲溶液(0.01 mol/L,pH 7.0)稀释,蛋白质量浓度为5 mg/mL时,固定激发波长347 nm,发射波长375~550 nm;蛋白质量浓度为0.5 mg/mL时,固定激发波长290 nm,发射波长300~400 nm。狭缝5.0 nm,速度240 nm/min^[15]。

1.3.7 凝胶制备及冻融循环 用PBS缓冲溶液(0.01 mol/L,pH 7.0)溶解各组样品,并将蛋白质量浓度配制为100 mg/mL,再加入TG酶(酶与蛋白质量比3:100)溶解,调节体系pH值至7.0。在45℃水浴锅中反应2 h后,90℃加热10 min,制得的凝胶样品于4℃保存过夜。

1次冻融循环(1 FTC)流程如下:将凝胶样品放入-20℃冰箱中冷冻22 h,取出后,移至25℃的水浴锅,解冻2 h。试验中,每组样品历经5次冻融循环(5 FTCs)。

1.3.8 持水性(WHC)测定 参照Cui等^[16]的方法,取适量凝胶样品置于离心管内,4 000 r/min离心15 min,离心结束后小心弃去离心管内水分。

$$WHC(\%) = \frac{m_t - m_r}{m_t} \times 100 \quad (2)$$

式中, m_t ——离心前凝胶样品、离心管的总质量,g; m_r ——离心后凝胶样品、离心管的总质量,g。

1.3.9 质构测定 采用TA-XT2i型质构仪(探头:P/0.5柱形)进行测定,试验前,将样品在25℃下平衡0.5 h,设置每测定1次,探头下压2次,下行速度:1 mm/s,检测速度:5 mm/s,后撤速度:5

mm/s, 触发力为 5 g^[17]。

1.3.10 可溶性蛋白含量测定 按照 Zhou 等^[18]的方法, 切取凝胶样品, 研磨破碎, 溶解于 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L, pH 7.0) 中, 定容后磁力搅拌 30 min, 以 10 000 r/min 离心 0.5 h。考马斯亮蓝法测定上清液中蛋白质的含量。

1.3.11 扫描电镜测定 蛋白凝胶样品处理方法如下: 将制得的凝胶切成小块后, 在戊二醛固定液 (体积分数 2.5%, pH 6.8) 中浸泡 24 h。取出用 0.1 mol/L PBS 缓冲液冲洗后脱水: 1) 用体积分数 50%, 70%, 90% 乙醇溶液各进行一次。2) 用体积分数 100% 的乙醇溶液脱水 3 次。3) 用等体积乙醇 (100%) 和叔丁醇的混合液置换, 时间 15 min。4) 纯叔丁醇溶液置换, 时间 15 min。脱水后将样品进行冻干, 镀金 (5 kV, 15 mA, 1.5 min) 后移至扫描电子显微镜下进行观察^[19]。

1.3.12 数据处理 所有试验重复 3 次, 使用 SPSS 23.0 进行数据处理和方差分析 (单因素 ANOVA, $P < 0.05$ 表示差异显著), 采用 Origin 2018 软件作图。试验结果均以平均值 \pm 标准差表示。

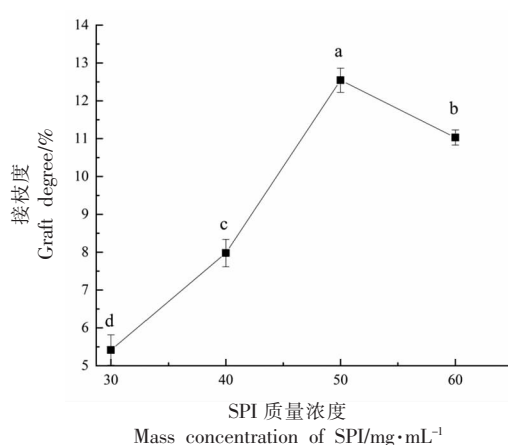
2 结果与分析

2.1 SPI 质量浓度对接枝度的影响

通常采用接枝度来反映美拉德反应进程, 不同蛋白质量浓度的 SPI-D 接枝度如图 1 所示。蛋白质中的游离氨基与多糖的羰基发生美拉德反应, 生成 SPI-D 共价物^[8], 随着 SPI 质量浓度的不断增加, SPI-D 的接枝度先升高后降低, 当 SPI 质量浓度为 50 mg/mL 时, 达到最大值 12.54%。SPI 质量分数的增加导致体系中底物浓度变大, 化学反应速度提高, 然而, 当蛋白质量浓度高于 50 mg/mL 时, 溶液黏稠度增加, 不易流动, 同时产生空间位阻效应, 阻碍美拉德反应的进行, 接枝度下降^[20]。

2.2 接枝反应进行程度分析

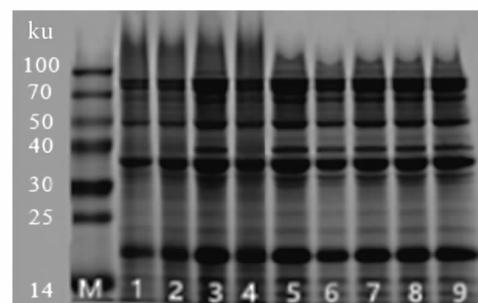
SDS-PAGE 是一种常用的蛋白质分析方法, 能够进一步证实大豆分离蛋白与葡聚糖间共价键的生成^[21]。由泳道 5~9 可以看出, 与 SPI 相比, SPI+D 条带几乎没有变化, 说明葡聚糖与 SPI 仅为简单混合, 并未发生反应; 泳道 1~4 在分离胶顶部区域 (高相对分子质量区) 出现密集的谱带, 连续性较强, 并且 1~4 泳道 SPI 质量浓度依次增加, 谱带



注: 所有试验重复 3 次, 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

图 1 SPI 质量浓度对接枝度的影响

Fig.1 Effects of SPI mass concentration on the degree of grafting



注: 泳道 M. 标准分子质量蛋白; 泳道 1~4 分别表示 3%~6% SPI-D; 泳道 5. 纯 SPI; 泳道 6~9 分别表示 3%~6% SPI+D。

图 2 SPI、SPI-D 和 SPI+D 的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE spectra of SPI, SPI-D and SPI+D

颜色逐渐变深, 其中泳道 3 的条带颜色最深, 泳道 4 次之, 证实了 SPI 与葡聚糖之间美拉德反应的进行, 有高分子质量共价物生成, 当 SPI 质量浓度为 50 mg/mL 时, 反应程度最大。

2.3 内源荧光光谱分析

荧光物质是美拉德反应中褐色色素的前体物, 可以表征反应进行程度^[15]。图 3a 为固定激发波长 347 nm 扫描得到的荧光光谱, 其荧光强度反映了高级阶段荧光物质的产生状态。由图可以看出, SPI+D 的光谱曲线与 SPI 十分接近, 没有荧光物质产生。SPI-D 的最大荧光强度 (λ_{\max}) 向短波方向移动, 发生蓝移, 显著高于对照 SPI, SPI50-D (SPI 质量浓度为 50 mg/mL) 荧光强度达到最高值, 表明了美拉德反应特征荧光小分子的生成。

色氨酸残基对微环境的变化很敏感,内源荧光光谱主要通过观察其周围构象和极性改变来呈现蛋白质三级结构的变化^[22]。如图3b所示,固定激发波长290 nm扫描时,相较SPI、SPI+D,不同蛋白质量浓度SPI-D接枝物的荧光强度均存在降低现象,这是由于糖与蛋白共价结合,对色氨酸残基

具有屏蔽作用,蛋白分子结构展开,发色基团在溶剂中暴露,导致荧光强度下降,SPI-D内源荧光光谱 λ_{\max} 发生红移(即向长波方向移动),表明葡聚糖键合对SPI有显著的荧光猝灭作用,色氨酸残基周围环境极性更高,亲水性较强,蛋白质三级结构变得松散,更易发挥功能特性^[23]。

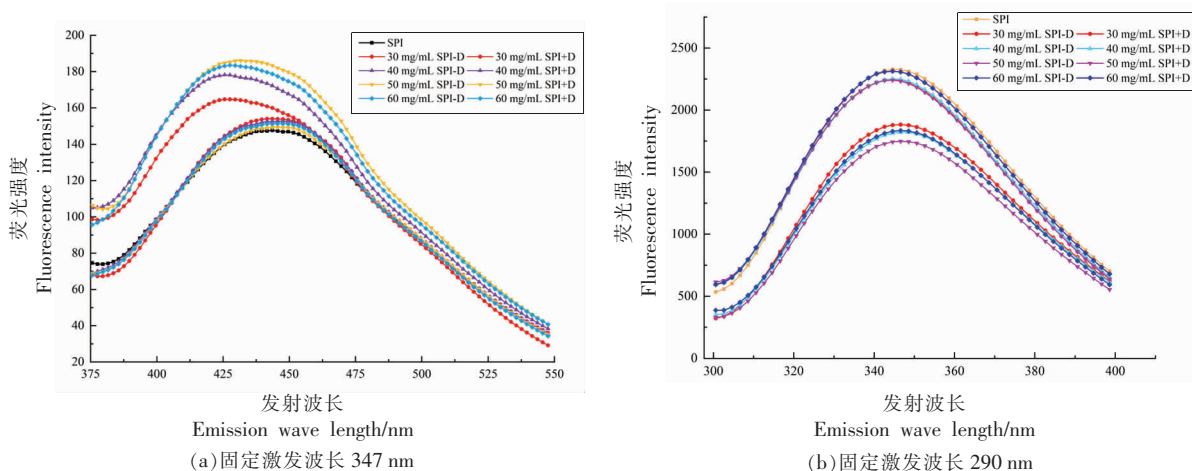


图3 不同质量浓度蛋白样品的荧光光谱图

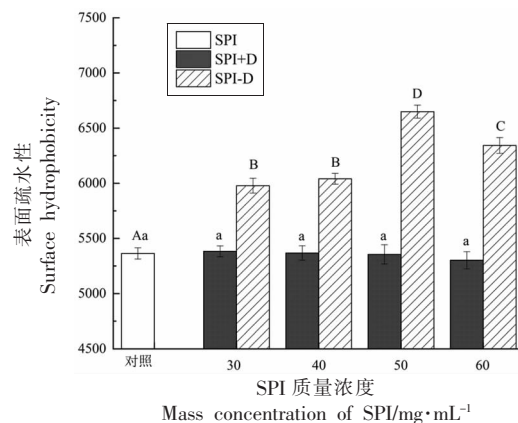
Fig.3 Fluorescence spectra of protein samples with different mass concentration

2.4 表面疏水性

表面疏水性(H_0)反映了疏水基团的分布,由蛋白质表面残基暴露的程度决定,体现了蛋白质空间结构的变化,也能够影响其功能性质^[24]。如图4所示,SPI+D混合物表面疏水性与SPI无显著差异($P < 0.05$),说明葡聚糖的单纯加入对SPI的表面疏水性不会产生影响。然而,SPI-D表面疏水性显著高于SPI、SPI+D,并且当SPI质量浓度为50 mg/mL时,表面疏水性达到最高为6649.2,较对照SPI提高了23.96%。这是由于大多数疏水基团都埋藏在致密球状区域内部,美拉德反应改变蛋白构象,导致聚集体解离或蛋白质去折叠,表面疏水性有所增加^[25]。

2.5 凝胶持水性

持水性能能够反映蛋白质-水之间在凝胶网络内的相互作用,表征凝胶吸收和保持水分的能力,是影响凝胶稳定的重要功能特性之一^[26]。如图5所示,未经冻融时,SPI₅₀-D凝胶的持水性高达91.33%,1 FTC、3 FTCs、5 FTCs后,持水性分别为67.11%、61.83%、58.87%,因为反复冷冻-解冻,

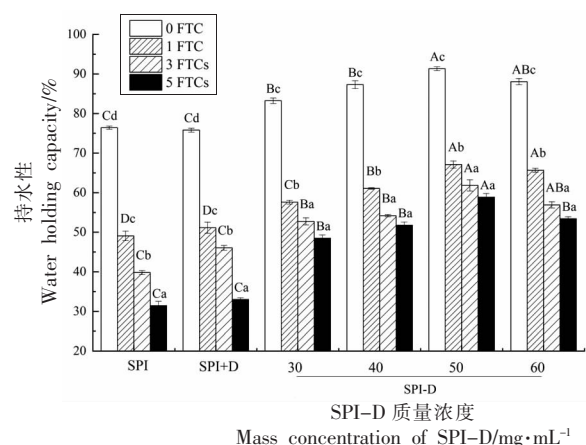


注:图中不同小写字母表示SPI+D样品间差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示SPI-D样品间差异显著($P < 0.05$)。

图4 SPI质量浓度对表面疏水性的影响

Fig.4 Effects of SPI mass concentration on surface hydrophobicity

游离水、结合水形成低密度冰晶,体积逐渐加大,凝胶结构变得粗糙,孔径随之扩大,为凝胶体系中的水分提供了更多自由流动的空间,凝胶持水性整体降低^[27]。



注:不同大写字母表示相同 FTC、不同 SPI 质量浓度时差异显著 ($P<0.05$);不同小写字母表示相同 SPI 质量浓度、不同 FTC 时差异显著 ($P<0.05$)。

图 5 SPI 质量浓度对凝胶持水性的影响

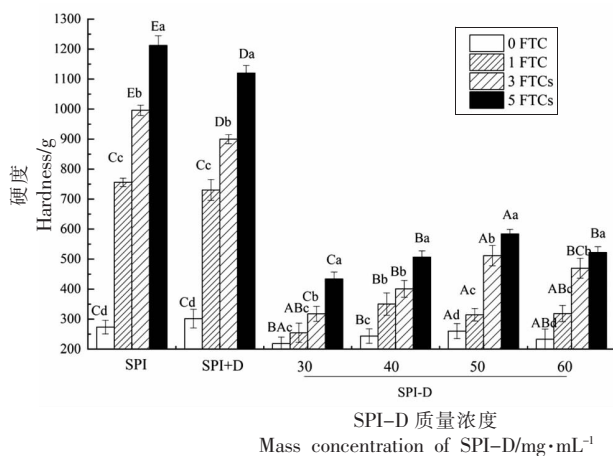
Fig.5 Effects of SPI mass concentration on water holding capacity of gel

5 次冻融后, SPI 凝胶持水性减少了 44.98%, 变化幅度在所有试验组中最大, SPI+D 凝胶的持水性降低 42.81%, 相较 SPI 凝胶无明显改善, 说明多糖的单纯加入并未提升凝胶持水性^[28], 而 SPI₅₀-D 凝胶持水性仅降低了 32.46%, 保水能力优

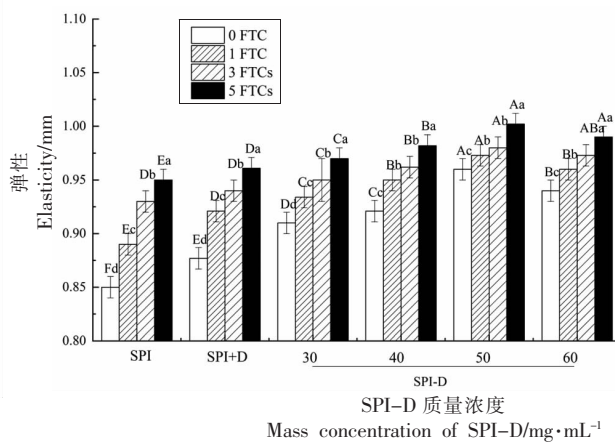
于 SPI、SPI+D 凝胶。SPI-D 引入糖分子, 比蛋白本身具有更多亲水性基团, 提升了与水分子的结合能力, 而糖链空间位阻可以防止蛋白过度交联, 糖链上的羟基与蛋白质分子部分基团结合, 抑制蛋白分子间作用, 防止其聚集^[29-30], 这些变化都能够促进平滑匀称的凝胶网络形成, 使得结构更为致密, 抵御冰晶的破坏, 束缚更多的水分子, 维持 SPI-D 较好的凝胶持水性, 提高冻融稳定性。

2.6 凝胶质构

凝胶硬度和弹性是评价质构特性的重要指标, 能够表征蛋白分子间作用力的强弱及凝胶结构致密程度、抵抗外力压缩能力^[2]。冻融后, 凝胶体系产生冷冻浓缩效应, 蛋白质分子重新紧密排列, 相互作用增强, 并伴随着水分子析出, 取代了蛋白质-水的作用^[31]。历经 5 FTCs, SPI 凝胶硬度和弹性分别增加了 938.96 g、0.10 mm, 而 SPI+D 和 SPI₅₀-D 凝胶硬度和弹性分别增加了 818.80 g、0.08 mm, 弹性分别增加了 324.03 g、0.04 mm, 变化幅度顺序为: SPI₅₀-D<SPI+D<SPI, 在冻融循环过程中, SPI₅₀-D 硬度、弹性变化程度都最小, 说明 SPI-D 凝胶抵御劣变的能力增强, 质构特性保持得最好。



(a) 硬度



(b) 弹性

注:大写字母不同表示相同 FTC、不同 SPI 质量浓度时差异显著 ($P<0.05$);小写字母不同表示相同 SPI 质量浓度、不同 FTC 时差异显著 ($P<0.05$)。

图 6 SPI 质量浓度对凝胶质构的影响

Fig.6 Effects of SPI mass concentration on gel texture

2.7 可溶性蛋白含量

蛋白质分子聚集构成了凝胶网络, 三维结构由相互连接的蛋白质骨架组成, 测定可溶性蛋白

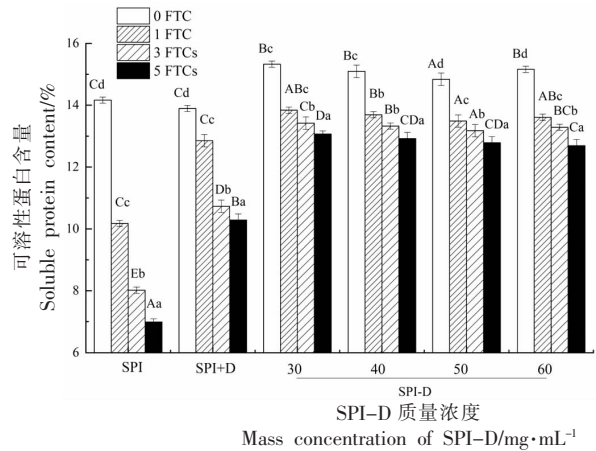
含量能够衡量蛋白质参与形成凝胶的程度^[18]。冷冻引起蛋白变性, 凝胶结构进一步重排, 蛋白质分子发生聚合, 原本的游离蛋白结合到了凝胶体系

中,引起可溶性蛋白含量降低^[31]。同时蛋白质肽链展开, 巯基总基团转化为二硫键, 疏水作用力减弱, 在蛋白质-蛋白质相互作用下, 可溶性蛋白结合到原先的凝胶网络中, 形成更粗糙、不规则的三维结构, 导致凝胶品质劣变^[32]。

5 FTCs 后, SPI、SPI+D 凝胶可溶性蛋白含量分别降低了 7.17%, 3.61%, 而 SPI50-D 凝胶可溶性蛋白含量为 12.79%, 仅降低 2.05%, 各试验组可溶性蛋白含量变化幅度为: SPI-D<SPI+D<SPI。美拉德反应减少了冻融过程中酶法凝胶可溶性蛋白的降低量, 也能防止蛋白分子因脱水形成不溶性聚集体, 抵御冻融循环对凝胶结构的破坏。

2.8 凝胶微观形貌变化

扫描电子显微镜(SEM)能够直观地展示蛋白质凝胶的微观三维网格结构, 图 8 显示了不同 SPI 质量浓度凝胶在未冻融时及冻融循环 5 次后, 放大×100 和×5 000 下的微观形貌图。5 FTCs



注: 大写字母不同表示相同 FTC、不同 SPI 质量浓度时差异显著 ($P<0.05$); 小写字母不同表示相同 SPI 质量浓度、不同 FTC 时差异显著 ($P<0.05$)。

图 7 SPI 质量浓度对凝胶可溶性蛋白含量的影响
Fig.7 Effects of SPI mass concentration on soluble protein content of gel

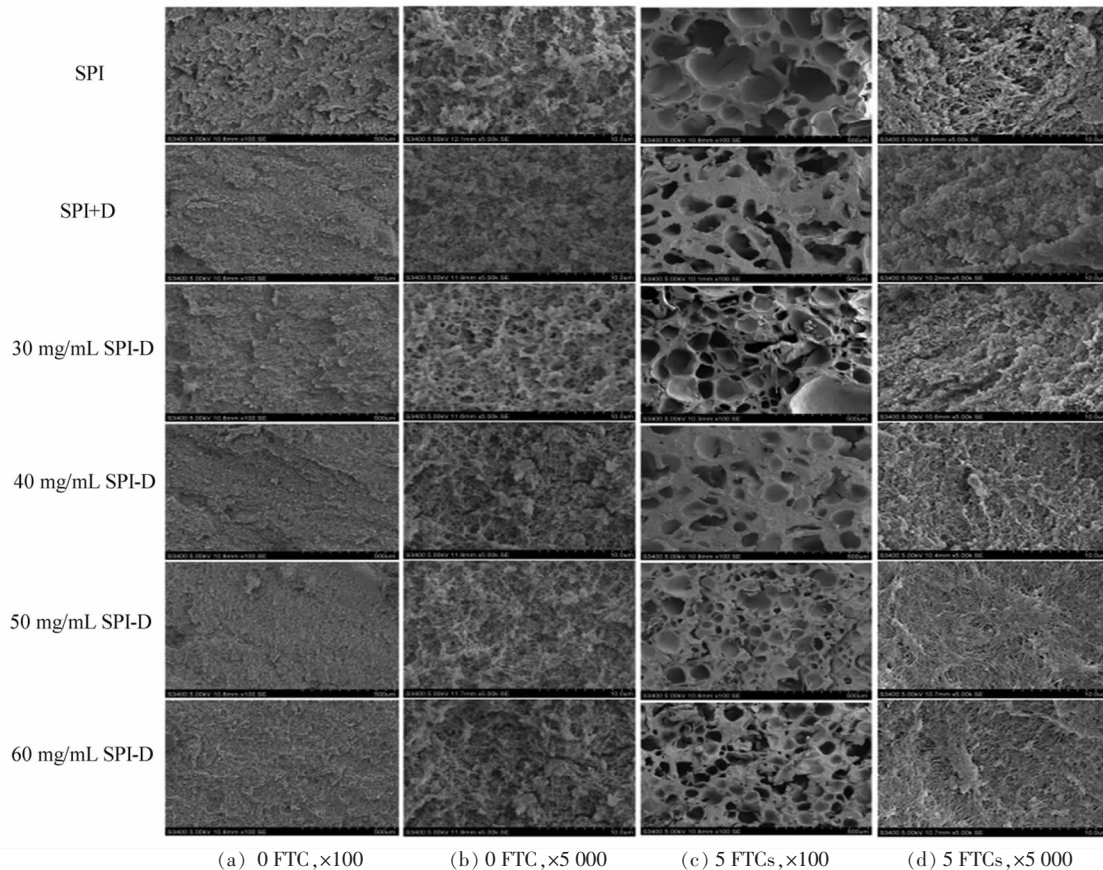


图 8 不同 SPI 质量浓度蛋白样品凝胶冻融前、后的 SEM 图

Fig.8 SEM images of protein samples with different SPI mass concentration before and after gel freeze-thaw

后,凝胶的表面结构破裂、塌陷,内部平均孔径增大,凝胶基质变得疏松,低温使得凝胶中水分冻结形成低密度冰晶,冰晶嵌入,呈蜂窝状结构,结冰膨胀压力和渗透压力也会显著破坏凝胶形貌^[33]。凝胶被破坏程度:SPI>SPI+D>SPI-D,SPI凝胶、SPI+D凝胶网络都有局部断裂现象出现,冻结形成的大冰晶破坏了三维网格结构,而SPI-D凝胶相对均匀、致密、规则,且SPI质量浓度为50 mg/mL时,凝胶微观结构保持得最好,在高放大倍数($\times 5\ 000$)下可以明显观察到致密网络结构,蛋白质间相互交联,孔洞细小、均匀,表征了较好的持水性,这是由于美拉德反应使SPI结构打开,有利于TG酶的交联作用,葡聚糖的结合也能增加蛋白表面疏水性,分子间斥力也随之增加,抑制蛋白质分子间聚集变性,减少冰晶的形成,显著提高凝胶强度^[34],提升凝胶冻融稳定性。

3 结论

1) 通过接枝度测定和SDS-PAGE试验表明大豆分离蛋白与葡聚糖发生了美拉德反应,生成大豆分离蛋白-葡聚糖共价物(SPI-D),表面疏水性和内源荧光光谱分析证明了SPI结构的变化,蛋白分子结构伸展、柔性增大,有美拉德反应的特定荧光物质生成。

2) 经过5次冻融循环,当SPI质量浓度为50 mg/mL时,TG酶交联下的SPI-D凝胶的持水性、可溶性蛋白含量与SPI、SPI+D凝胶相比,降低程度最小,硬度、弹性等质构特性也保持得最佳,同时扫描电子显微镜观察到,SPI-D凝胶冻融后呈现均匀纤维网状结构,表面平滑,基质更加紧密,凝胶形貌优于与对照组。本研究证明美拉德反应切实有效增强了TG酶法SPI-D凝胶的冻融稳定性,对制备冷冻食品专用的大豆分离蛋白具有理论与实践价值,应用前景广阔。

参 考 文 献

- [1] MAO L K, LU Y, CUI M N, et al. Design of gel structures in water and oil phases for improved delivery of bioactive food ingredients[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(10): 1651-1666.
- [2] CHEN Z J, SHI X D, XU J T, et al. Gel properties of SPI modified by enzymatic cross-linking during frozen storage[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 56: 445-452.
- [3] LIU F, FENG S R, GUO Y S, et al. The rheological characteristics of soy protein isolate-glucose conjugate gel during simulated gastrointestinal digestion[J]. *Food Structure*, 2021, 29: 100210.
- [4] LI L, HE H, WU D Z, et al. Rheological and textural properties of acid-induced soybean protein isolate gel in the presence of soybean protein isolate hydrolysates or their glycosylated products[J]. *Food Chemistry*, 2021, 360: 129991.
- [5] LI B, BAO Z J, XU W, et al. Influence of glycation extent on the physicochemical and gelling properties of soybean β -conglycinin[J]. *European Food Research and Technology*, 2015, 240(2): 399-411.
- [6] YANG Y F, HE S D, YE Y K, et al. Enhanced hydrophobicity of soybean protein isolate by low-pH shifting treatment for the sub-micron gel particles preparation[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 151: 112475.
- [7] QIN X S, CHEN S S, LI X J, et al. Gelation properties of transglutaminase-induced soy protein isolate and wheat gluten mixture with ultrahigh pressure pretreatment[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2017, 10(5): 866-874.
- [8] ZHANG Z Y, WANG X B, YU J, et al. Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions stabilized by soy protein isolate-dextran conjugates [J]. *LWT*, 2017, 78: 241-249.
- [9] YU J, WANG G R, WANG X B, et al. Improving the freeze-thaw stability of soy protein emulsions via combing limited hydrolysis and Maillard-induced glycation[J]. *LWT*, 2018, 91: 63-69.
- [10] 孙洪蕊, 王喜波, 张英华, 等. 抗冻融大豆蛋白的制备[J]. *中国粮油学报*, 2015, 30(4): 50-55.
- [10] SUN H R, WANG X B, ZHANG Y H, et al. Preparation of soy protein with high freeze-thaw stabilization[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2015, 30(4): 50-55.
- [11] WANG Y Y, ZHANG A Q, WANG X B, et al. The radiation assisted-Maillard reaction comprehensively improves the freeze-thaw stability of soy pro-

- tein-stabilized oil-in-water emulsions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 103: 105684.
- [12] VIGO M S, MALEC L S, GOMEZ R G, et al. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of reactive lysine in dairy products [J]. *Food Chemistry*, 1992, 44(5): 363-365.
- [13] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [14] LI J H, ZHANG Y F, FAN Q, et al. Combination effects of NaOH and NaCl on the rheology and gel characteristics of hen egg white proteins [J]. *Food Chemistry*, 2018, 250: 1-6.
- [15] 王喜波, 于洁, 王小丹, 等. 基于美拉德反应的酶改性大豆蛋白冻融稳定性研究[J]. *农业机械学报*, 2018, 49(5): 361-367.
- WANG X B, YU J, WANG X D, et al. Investigation on freeze-thaw stability of soy protein via enzymatic modification based on Maillard reaction [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2018, 49(5): 361-367.
- [16] CUI Q, WANG X B, WANG G R, et al. Effects of ultrasonic treatment on the gel properties of microbial transglutaminase crosslinked soy, whey and soy-whey proteins[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2019, 28(5): 1455-1464.
- [17] 高廷轩, 邓绍林, 赵雪, 等. 多糖协同超声波处理对低盐鸡肉糜凝胶特性的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(19): 148-156.
- GAO T X, DENG S L, ZHAO X, et al. Synergistic effects of polysaccharide and ultrasonic treatment on gel properties of low-salt minced chicken meat[J]. *Food Science*, 2021, 42(19): 148-156.
- [18] ZHOU G W, LIU J N, WANG G R, et al. Effect of ultrasonic treatment on freeze-thaw stability of soy protein isolate gel [J]. *Journal of Oleo Science*, 2019, 68(11): 1113-1123.
- [19] CUI Q, WANG G R, GAO D, et al. Improving the gel properties of transgenic microbial transglutaminase cross-linked soybean-whey mixed protein by ultrasonic pretreatment[J]. *Process Biochemistry*, 2020, 91: 104-112.
- [20] 张泽宇, 于洁, 徐晔晔, 等. 超声协同接枝反应改性大豆蛋白及其冻融稳定性[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(5): 122-129.
- ZHANG Z Y, YU J, XU Y Y, et al. Graft reaction and freeze-thaw stability of SPI modified by ultrasonic assisted glycosylation[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2018, 18(5): 122-129.
- [21] WANG X D, CHEN S, CUI Q, et al. Effect of pH on freeze-thaw stability of glycosylated soy protein isolate[J]. *Journal of Oleo Science*, 2019, 68(3): 281-290.
- [22] ZHAO C B, YIN H H, YAN J N, et al. Structure and acid-induced gelation properties of soy protein isolate-maltodextrin glycation conjugates with ultrasonic pretreatment [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112: 106278.
- [23] HE W Y, TIAN L, ZHANG S S, et al. A novel method to prepare protein-polysaccharide conjugates with high grafting and low browning: Application in encapsulating curcumin[J]. *LWT*, 2021, 145: 111349.
- [24] 许晶, 齐宝坤, 赵青山, 等. 大豆分离蛋白结构特性与表面疏水性的关系[J]. *中国粮油学报*, 2015, 30(8): 32-36, 41.
- XU J, QI B K, ZHAO Q S, et al. Relationship between structural properties and surface hydrophobicity of soybean protein isolate [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2015, 30(8): 32-36, 41.
- [25] TANG C H, JIANG Y. Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment[J]. *Food Research International*, 2007, 40(4): 504-509.
- [26] HAN M Y, ZHANG Y J, YING F, 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.
- [27] 王培森, 李倩如, 江文韬, 等. 可得然胶对肌球蛋白凝胶冻融稳定性的影响[J]. *食品与机械*, 2017, 33(5): 30-34, 53.
- WANG P S, LI Q R, JIANG W T, et al. Effects of curdlan on the freeze-thaw stability of myosin gel [J]. *Food & Machinery*, 2017, 33(5): 30-34, 53.
- [28] BURGARDT V C F, ZÜGE L C B, DE BONNA SARTOR G, et al. The addition of carboxymethylcellulose in caseinomacropeptide acid gels: Rheological, optical and microstructural characteristics [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 49: 11-17.
- [29] JIMÉNEZ -CASTAÑO L, LÓPEZ -FANDIÑO R,

- OLANO A, et al. Study on β -lactoglobulin glycosylation with dextran: Effect on solubility and heat stability[J]. Food Chemistry, 2005, 93(4): 689-695.
- [30] ZHU C Y, WANG X P, ZHAO X H. Property modification of caseinate responsible to transglutaminase-induced glycosylation and crosslinking in the presence of a degraded chitosan[J]. Food Science and Biotechnology, 2015, 24(3): 843-850.
- [31] 姚美伊, 郭顺堂. 冷冻大豆分离蛋白凝胶的功能性分析[J]. 食品工业科技, 2012, 33(18): 99-102.
- YAO M Y, GUO S T. Functional properties analysis of the frozen soybean protein isolate gel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(18): 99-102.
- [32] 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.
- [33] SELOMULYO V O, ZHOU W. Frozen bread dough: Effects of freezing storage and dough improvers[J]. Journal of Cereal Science, 2007, 45(1): 1-17.
- [34] ZHAO J Y, SUN F D, LI Y Y, et al. Modification of gel properties of soy protein isolate by freeze-thaw cycles are associated with changes of molecular force involved in the gelation[J]. Process Biochemistry, 2017, 52: 200-208.

Study on Freeze-thaw Stability of Enzymatic Gel of Soy Protein Isolate-dextran Conjugate

Zhang Mengyue, Liu Jingnan, Chen Peng, Wang Xu, Wang Xibo*, Xu Ning
(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract The changes of water-holding capacity, hardness, elasticity, soluble protein content, microscopic morphology and structure of soy protein isolate-dextran conjugate gels crosslinked by transglutaminase (TG) at different mass concentration (30, 40, 50, 60 mg/mL) during freeze-thaw cycling (FTC) were explored. The Maillard reaction between soy protein isolate and dextran was confirmed by the results of SDS-PAGE electrophoresis. At the same time, soy protein isolate-dextran conjugates (SPI-D) were generated. With the Maillard reaction process proceeded, the grafting degree of SPI-D increased firstly and then decreased, finally reached the maximum of 12.54% at a mass concentration of 50 mg/mL. Surface hydrophobicity and fluorescence spectroscopy proved that the structure of the protein unfolded, flexibility and disorder enhanced, which was beneficial to the freeze-thaw stability. Compared with the control, the water-holding capacity of SPI-D, SPI and dextran mixture (SPI+D) and SPI gel decreased by 32.46%, 42.81% and 44.98%, the hardness increased by 124.66%, 271.51% and 343.38%, and the elasticity increased by 4.38%, 9.58% and 11.76%, the soluble protein content decreased by 2.05%, 3.61% and 7.17%, respectively, after 5 FTCs. Among these experimental groups, SPI-D gel showed the smallest change in all indicators and the best freeze-thaw stability, the microstructure of the gel was characterized by the scanning electron microscopy images, compared with SPI + D gel and SPI gel, SPI-D gel had smaller pores and more uniform organization. The above findings suggested that Maillard reaction was an effective technical means to enhance the freeze-thaw stability of soy protein isolate gel by enzyme method.

Keywords soy protein isolate; gel; freeze-thaw stability; transglutaminase; Maillard reaction