

超声糖基化大豆分离蛋白冻融稳定性的研究

张泽宇, 王健, 葛洪如, 张旭, 江连洲, 王喜波, 宋玉莲

(东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 本文采用超声波技术促进美拉德反应改性大豆蛋白提高其冻融稳定性。比较研究了由大豆分离蛋白(SPI)、大豆分离蛋白+葡聚糖(SPI+D)混合物以及超声 SPI-D 接枝物作为乳化剂的乳液的冻融稳定性, 分析了乳析指数、出油率、絮凝程度、聚结程度、粒径、zeta 电位、显微结构等性质, 与 SPI 相比, 经过 3 次冻融循环后超声 SPI-D 制备的乳液仍保持较好的稳定性, 其乳析指数和出油率分别降低了 96.20%、80.53%, 粒径维持在 50~60 μm 范围内, 呈窄单峰分布, 絮凝程度和聚结程度分别降低了 187.8%、235.3%。zeta 电位和显微结构可以看出其乳液仍处于相对稳定的状态。扫描电镜研究得知改性后蛋白颗粒状态更加疏松, 大小均匀, 分子间聚集程度显著降低。超声 SPI-D 乳化体系具有较好的冻融稳定性, 为生产出冷冻产品专用大豆分离蛋白提供理论依据。

关键词: 超声波; 大豆分离蛋白; 乳液; 冻融循环; 冻融稳定性

文章编号: 1673-9078(2016)10-198-204

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.030

Freeze-thaw Stability of Soy Protein Isolate Modified by Ultrasonic Assisted Glycosylation

ZHANG Ze-yu, WANG Jian, GE Hong-ru, ZHANG Xu, JIANG Lian-zhou, WANG Xi-bo, SONG Yu-lian

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The ultrasound technique was adopted to improve the freeze-thaw stability of soy protein isolate (SPI) modified using Maillard reaction in this paper. The freeze-thaw stabilities of emulsions of SPI, SPI+dextran (D) mixture, and the SPI-D grafts prepared from ultrasonic assisted glycosylation were comparatively studied, and the creaming index, oiling off, flocculation degree, coalescence degree, particle size, zeta potential, and microstructure measurements were analyzed. Compared with the control SPI, the emulsions stabilized by of SPI-D still had a relatively good stability after three freeze-thaw cycles. The creaming index and oiling off were reduced by 96.20% and 80.53%, respectively. The particle size had a narrow unimodal distribution in the range of 50 to 60 μm , and the flocculation degree and coalescence degree were reduced by 187.8% and 235.3%, respectively. Zeta potential and microstructure showed that the emulsions were still in a relatively stable state. The scanning electron microscopy (SEM) images indicated that the modified protein particles became loose and had a uniform size, and the degree of intermolecular aggregation decreased significantly. The SPI-D emulsification system resulted in good freeze-thaw stability. This method provides a theoretical basis for the production of SPI specifically for frozen foods.

Key words: ultrasonic wave; soy protein isolate; emulsion; freeze-thaw cycle; freeze-thaw stability

大豆分离蛋白同时拥有亲水性和亲油性基团, 在食品工业中常用作乳化剂。由蛋白质做乳化剂的乳化体系对 pH 值、离子强度以及温度等环境的变化很敏感。很多食品乳化体系在运输或贮存过程中, 为了抑制微生物的生长或者延长货架期, 常用冷冻技术来保

收稿日期: 2016-01-01

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发计划项目 (WB13G10201); 国家大豆产业技术体系项目 (CARS-04-PS25); 国家“十二五”科技支撑计划 (2014BAD22B01)

作者简介: 张泽宇 (1991-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 粮食油脂及植物蛋白工程

通讯作者: 王喜波 (1975-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 粮食油脂及植物蛋白工程

存^[1]。当蛋白质乳化体系温度降低到-18 $^{\circ}\text{C}$ 时, 产生大量的冰晶, 一些尖锐的冰晶会刺破乳化体系的两相界面膜, 同时蛋白质吸附到冰晶体上, 失去降低油-水界面张力的稳定作用, 经过冷冻-融化的循环过程后, 出现乳析、出油、絮凝、聚结、相分离等不稳定的现象^[2], 限制了其在冷冻食品中的应用。

目前国内外学者的研究主要集中在改善大豆分离蛋白乳化性^[3-4], 以及其制备的乳化体系在外界环境因素 pH、离子强度、温度变化下的稳定性^[5-6], 对于大豆分离蛋白冻融稳定性的研究很少。孙洪蕊等^[7]通过湿法糖基化制备的大豆分离蛋白-葡聚糖接枝物相对于天然蛋白冻融后乳化性显著提高。Diftis 等^[8]研究表明大豆蛋白和多糖通过美拉德反应生成的共价复合

物可以降低蛋白乳液的粒径, 延缓乳液乳析现象的发生。窦超然等^[9]发现大豆分离蛋白-麦芽糊精接枝物与未改性蛋白相比冻融后分层系数和出油率显著降低。这些研究均采用糖基化反应方法来改善大豆蛋白的冻融性质, 未系统研究改性产物乳化体系的理化性质。本文采用超声波辅助大豆蛋白-葡聚糖接枝反应技术提高改性产物冻融稳定性, 并对产物进行性质分析, 利用超声辅助技术提高改性蛋白冻融稳定性的研究还未见报道。试验研究冻融循环对乳化体系的乳析指数、出油率、絮凝程度、聚结程度、粒径、zeta 电位、显微结构的影响来评价改性蛋白的冻融稳定性, 为生产冷冻食品专用的抗冻蛋白提供了新方法, 拓宽大豆蛋白在食品领域的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

低温脱脂豆粉, 哈高科大豆食品有限责任公司; 葡聚糖(右旋糖酐 40 ku), 国药集团化学试剂有限公司; 大豆油, 九三集团哈尔滨惠康食品有限公司; 十二烷基磺酸钠(SDS), Biotopped 公司。

1.2 仪器与设备

XH-2008D 超声波合成萃取仪(频率: 25 kHz, 探头直径: $\Phi 8$ mm), 北京祥鹤科技发展有限公司; ALPHA 1-4 LSC 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; T18 Basic 高速分散机/匀浆机, 德国 IKA 公司; TU-1800 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; Mastersizer 2000 激光粒度分析仪, 英国 Malvern 公司; Zetasizer Nano Z zeta 电位测定仪, 英国 Malvern 公司; YS 100 生物显微镜, 日本 Nikon 公司; S-3400N 扫描电子显微镜, 日本日立公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆分离蛋白的制备

参考 QI M 等^[10]的方法, 采用碱溶酸沉法从脱脂豆粉中提取。

1.3.2 超声糖基化大豆分离蛋白的制备

将 SPI 与葡聚糖按 2:3 (m/m) 溶解于磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L、pH 8.0), 使蛋白质浓度为 4% (m/V), 搅拌 2 h, 加入 0.02% (m/m) 叠氮钠以防止微生物滋生, 置于 4 °C 冰箱中水化过夜, 取出后搅拌直至室温, 取样品溶液 100 mL 置于超声反应器中, 预热到超声温度 80 °C, 以 500 W 功率超声处理 40 min。反应结束后于冰水浴中冷却 5 min, 反应液离心 10 min (4000

r/min), 上清液于蒸馏水中透析(4 °C) 24 h, 冷冻干燥即为超声糖基化大豆分离蛋白。

1.3.3 乳液的制备

将 SPI、SPI+D 混合物以及超声 SPI-D 接枝物溶解于磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L、pH 7.0), 控制蛋白质浓度为 2% (m/V)。在蛋白溶液中加入 10% (V/V) 的大豆油, 均质 3 min (11000 r/min) 形成粗乳液, 再将粗乳液超声处理 6 min 形成微乳液, 加入 0.02% (m/V) 叠氮钠, 防止微生物污染^[11]。

1.3.4 冻融循环

制备的新鲜微乳液立即分装到 10 mL 的密封塑料管内, 在 -18 °C 的冰箱中冷冻 22 h, 结束后于 20 °C 水浴锅解冻 2 h, 进行下述冻融稳定性评价指标的测定, 连续进行 3 次冻融循环。

1.3.5 乳析指数的测定

冻融处理后, 用刻度尺测量底部乳清层高度与乳液的总高度, 乳液重力分离的稳定性用乳析指数(CI)表示, 计算公式如下:

$$CI (\%) = \frac{H_s}{H_r} \times 100$$

式中, H_s : 乳清层高度, cm; H_r : 乳液总高度, cm。

1.3.6 出油率的测定

准确称取待测样品乳液 8 g, 苏丹 III 油溶液 2 g, 混合均匀, 于 10000 r/min 离心 20 min, 收集上层清液于 508 nm 下测定吸光度, 大豆油为空白^[1]。苏丹 III 油溶液的制备: 苏丹 III 色素 0.015 g, 加入到 1000 g 大豆油中在室温下低速搅拌 12 h, 使苏丹 III 完全溶解。出油率计算公式如下:

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

式中, φ : 乳液中游离态脂肪占总脂肪的比例; φ_d : 乳液中油相的质量分数; m_0 : 苏丹 III 油溶液的质量; m_e : 乳液的质量; $a = A_1/A_2$, A_1 : 离心前苏丹 III 油溶液的吸光值; A_2 : 离心后苏丹 III 油溶液的吸光值。

1.3.7 粒径的测定

制备的新鲜乳液和冻融后的乳液分成两等份分别用磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L、pH 7.0)和 1% (m/V) SDS 稀释 5 倍, 再将乳液分散在去离子水中使遮光度达到 10%, 采用 Mastersizer 2000 型激光粒度分析仪测定乳液的粒径分布、表面积平均粒径($D_{3,2}$)及体积平均粒径($D_{4,3}$)。参数设置: 颗粒折射率(1.460), 分散剂折射率(1.330)。

1.3.8 絮凝程度和聚结程度的测定

参考 Palazolo^[12]的方法, 利用激光粒度分析仪获得的乳液体积平均粒径($D_{4,3}$)数据计算新鲜乳液

和 1、2、3 次冻融循环后乳液的絮凝程度 (FD%) 和聚结程度 (CD%)，分别表示为：

$$FD (\%) = \frac{D_{4,3} - D_{4,3SDS}}{D_{4,3SDS}} \times 100$$

$$CD (\%) = \frac{D_{4,3SDSf} - D_{4,3SDS}}{D_{4,3SDS}} \times 100$$

式中， $D_{4,3}$ ：磷酸盐缓冲液稀释的乳液体积平均粒径， μm ； $D_{4,3SDS}$ ：SDS 稀释的乳液体积平均粒径， μm ； $D_{4,3SDSf}$ ：SDS 稀释的冻融后乳液体积平均粒径， μm 。

1.3.9 Zeta 电位测定

采用 Zetasizer Nano Z 型 zeta 电位测定仪分别测定新鲜乳液和 1、2、3 次冻融循环后乳液的 zeta 电位。仪器操作温度为 25℃。

1.3.10 光学显微镜

将制备的新鲜乳液和冻融后的乳液用漩涡振荡器摇匀，待气泡消去后取少量置于载玻片的中心，盖上盖玻片，将其置于显微镜的观察区，在放大 400 倍下观察乳液的表观结构。

1.3.11 扫描电镜分析

取适量冷冻干燥后的蛋白样品，将其均匀粘在扫描电镜观察台上。用 E-1010 型离子溅射镀膜仪在蛋白质表面喷金。处理好的样品置于样品盒中，用 S-3400N 型扫描电子显微镜加速电压为 5 kV，在放大 200 倍下观察蛋白样品的微观结构。

1.3.12 数据分析

每个样品测定 3 次平行，采用 SPSS 19.0 进行数据统计分析和方差分析，Origin 9 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 冻融循环对乳析指数和出油率的影响

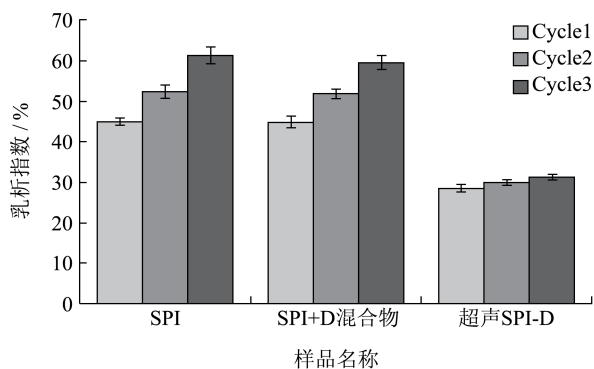


图 1 冻融循环对乳液乳析指数的影响

Fig.1 Effect of freeze-thaw cycles on the creaming index of emulsions

乳液经过冷冻-解冻循环后，由于液滴之间的相互作用，当重力作用超过布朗运动时，因为脂肪球与连

续相的密度差而出现脂肪球上浮，进而发生乳析或沉降现象。乳液粒径的变化是造成乳析现象的主要原因，乳液的粒径越小，乳析指数越小，其体系越稳定，反之亦然^[13]。由图 1 可知，SPI 制备的乳液随着冻融循环次数的增加其乳析指数急剧增加，冻融稳定性越来越差。当加入葡聚糖后，乳析指数略有下降。说明 SPI 和葡聚糖分子单一的混合后对其冻融稳定性略有提高。超声 SPI-D 样品 1、2、3 次冻融循环后乳析指数分别为 28.55%、29.95%、31.28%。随着冻融循环次数的增加其乳析指数增加不大，仍保持较好的冻融稳定性。改性产物相对于 SPI 对照组在 1、2、3 次冻融循环后乳析指数分别降低了 57.76%、75.33%、96.20%。采用 OPA 法测定超声 SPI-D 接枝度为 32.43%，证实 SPI 和葡聚糖是以共价键的方式结合，接枝反应的发生使其乳化体系冻融循环后的乳析指数显著降低。

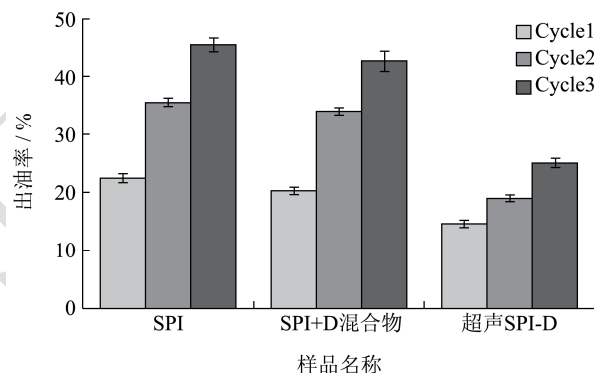


图 2 冻融循环对乳液出油率的影响

Fig.2 Effect of freeze-thaw cycles on the oiling off of emulsions

对于食品乳液而言，冻融后脂肪球的不稳定作用使乳化态的脂肪转变为游离态的脂肪，通过测定乳液中游离态脂肪来判断产生聚结的程度^[14]。如图 2 所示，SPI 制备的乳液在 1、2、3 次冻融循环后出油率分别为 22.50%、35.44%、45.33%，经历冻融后其出油率很大，且随冻融次数的增加而增大。加入葡聚糖后其出油率相对于对照 SPI 略有下降，葡聚糖的加入可以减少冷冻过程中形成的冰晶的量，增加乳液中未冷冻水的量和水相的黏度，减缓油滴分子的布朗运动，油滴间碰撞聚合的几率大大降低。超声 SPI-D 相对于对照 SPI 制备的乳液在 1、2、3 次冻融循环后出油率分别降低了 53.17%、86.92%、80.53%。原因是超声 SPI-D 具有良好的乳化性，其在油-水混合相中能够迅速地吸附到油滴表面形成一层相对较厚的界面保护膜，在 -18℃ 冷冻过程中形成的固体脂肪颗粒很难渗透和破坏该界面膜，有效抑制了油滴之间聚合^[15]。因此，超声 SPI-D 制备的乳液出油率显著降低，具有良好的冻融稳定性。

2.2 冻融循环对粒径分布、絮凝程度和聚结程

度的影响

乳液的粒径分布是影响其冻融后稳定性的关键因素,激光粒度分析仪在衍射分析过程中如果 SDS 存在,这种分子能够在油-水界面置换蛋白质,原始液滴聚集体就会消除,负电荷存在能够诱导液滴间的静电排斥,减少油滴的桥联程度。在测量时没有 SDS,稀释和搅拌均可能会破坏弱絮凝的液滴,但强烈絮凝的液滴完好无损^[1],因此测量前分别用磷酸盐缓冲溶液(PB)和 SDS 对乳液稀释来评价絮凝体的稳定性。图 3 为 SPI、SPI+D 混合物、超声 SPI-D 制备的乳液经 0、1、2、3 冻融循环后,分别用 PB(图 a、b 和 c)和 SDS(图 a'、b'和 c')稀释情况下测得的粒径分布图。

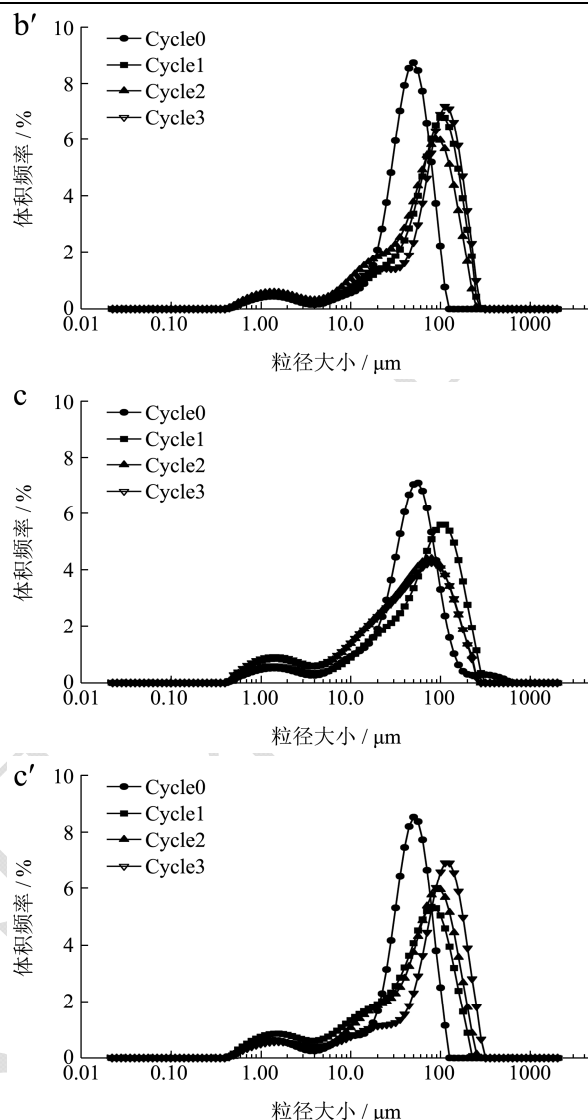
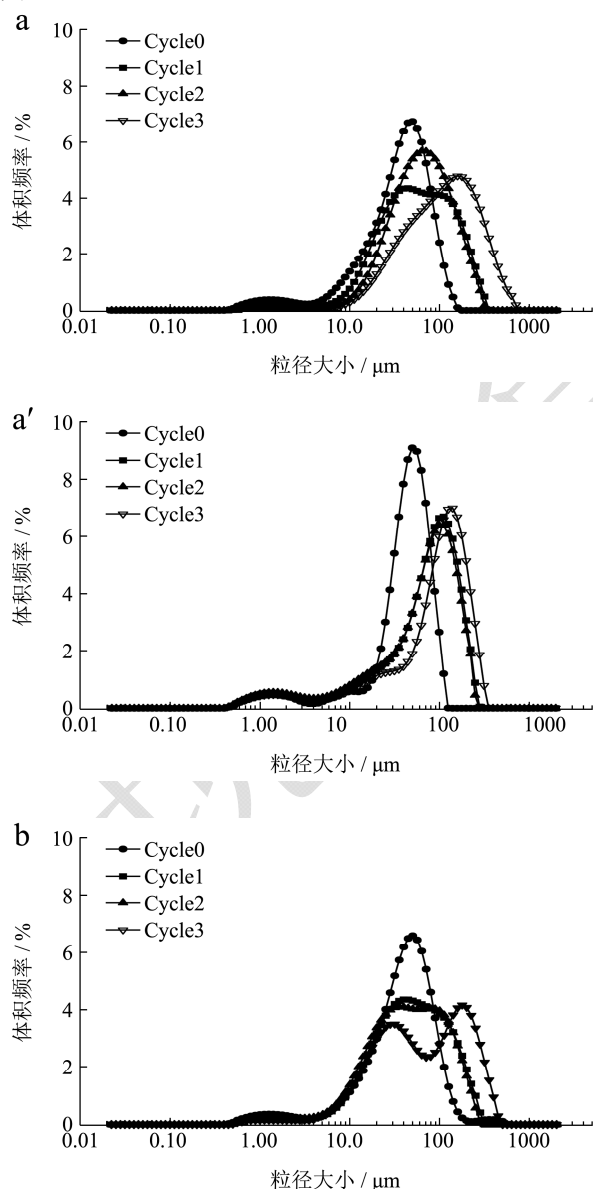


图 3 冻融循环对乳液粒径分布的影响

Fig.3 Effect of freeze-thaw cycles on the particle size distribution of emulsions

注: a 和 a'为 SPI, b 和 b'为 SPI+D 混合物, c 和 c'为超声 SPI-D。

由图 3 可知,制备的新鲜 SPI、SPI+D 混合物、超声 SPI-D 乳液粒径分布图高度相似,均为窄单峰分布,平均粒径大小分别为 46.26 μm 、48.47 μm 、51.90 μm 。当 SPI 与葡聚糖混合后,糖分子的加入其乳液粒径稍有增大。而超声辅助 SPI 接枝反应后由于糖分子接入到蛋白分子上,导致其乳液粒径增大。SDS 稀释的乳液峰变窄,峰中心体积频率增大,粒径变小,说明三个样品制备的初始乳液均出现了小程度的絮凝。SPI、SPI+D 混合物制备的乳液进行冻融处理后,乳液的粒径明显增大,峰越来越宽,峰中心体积频率越来越小,且随着冻融循环次数的增加,粒径增大的趋势更为明显,当 3 次冻融循环后,乳液粒径呈双峰分布,体积平均粒径分别增大到 119.75 μm 和 101.61 μm ,

SDS 稀释的乳液仍为单峰分布, 粒径相对较小, 表明冻融循环破坏了乳液中稳定的蛋白-蛋白之间的相互作用, 导致了液滴的严重絮凝和聚结。超声 SPI-D 制备的乳液在经历冻融循环后, 其粒径大小和分布均无

显著变化, 仍呈窄单峰分布, 其粒径一直维持在 50~60 μm 范围内, SDS 稀释后, 峰型变化不大, 由超声 SPI-D 接枝物制备的乳液经历 3 次冻融循环后仍处于相对稳定的状态。

表 1 乳液冻融前后表面积平均粒径 ($D_{3,2}$)、絮凝程度和聚结程度

Table 1 Sauter mean diameter ($D_{3,2}$), flocculation degree, and coalescence degree of emulsions before and after freeze-thaw cycles

冻融循环次数	样品名称	$D_{3,2}/\mu\text{m}$		絮凝程度 FD/%	聚结程度 D/%
		PB 稀释	SDS 稀释		
Cycle0	SPI	12.32±0.18 ^{b,D}	11.44±0.03 ^{b,C}	22.81±0.21 ^{a,D}	-
	SPI+D 混合物	13.17±0.29 ^{a,D}	12.82±0.02 ^{a,A}	13.75±0.36 ^{b,D}	-
	超声 SPI-D	11.02±0.06 ^{c,A}	10.03±0.04 ^{c,B}	4.172±0.07 ^{c,D}	-
Cycle1	SPI	18.94±0.79 ^{a,C}	13.21±0.09 ^{a,A}	36.52±0.15 ^{a,C}	81.74±1.33 ^{b,C}
	SPI+D 混合物	16.43±0.30 ^{b,B}	10.32±0.13 ^{b,C}	35.49±0.73 ^{a,C}	89.15±0.58 ^{a,C}
	超声 SPI-D	10.25±0.04 ^{c,B}	7.683±0.04 ^{c,D}	14.55±0.39 ^{b,C}	29.17±0.62 ^{c,C}
Cycle2	SPI	28.10±0.68 ^{a,B}	11.27±0.05 ^{a,C}	62.63±1.27 ^{a,B}	98.36±0.33 ^{a,B}
	SPI+D 混合物	15.18±0.15 ^{b,C}	10.32±0.03 ^{b,C}	59.38±0.74 ^{b,B}	93.49±1.51 ^{b,B}
	超声 SPI-D	7.436±0.04 ^{c,C}	8.458±0.08 ^{c,C}	25.71±0.15 ^{c,B}	31.62±0.36 ^{c,B}
Cycle3	SPI	54.57±1.37 ^{a,A}	12.72±0.28 ^{a,B}	95.36±0.93 ^{a,A}	124.0±1.78 ^{a,A}
	SPI+D 混合物	20.39±0.20 ^{b,A}	12.56±0.08 ^{a,B}	82.80±1.06 ^{b,A}	99.72±0.39 ^{b,A}
	超声 SPI-D	6.798±0.03 ^{c,D}	11.46±0.24 ^{b,A}	33.13±0.25 ^{c,A}	36.98±0.77 ^{c,A}

注: a-c 表示不同样品之间的显著性差异; A-D 表示同一样品不同冻融循环次数之间的显著性差异 ($p < 0.05$)

乳液的表面积平均粒径 ($D_{3,2}$) 可反映样品的乳化活性, 一般 $D_{3,2}$ 越小则乳化活性越好。乳液冻融前后 $D_{3,2}$ 值如表 1 所示, 初始 PB 和 SDS 稀释的乳液 $D_{3,2}$ 大小顺序均为 SPI+D 混合物>SPI>超声 SPI-D, 表明超声 SPI-D 乳液的初始稳定性较好。随着冻融循环次数的增加 SPI、SPI+D 混合物制备的乳液 $D_{3,2}$ 值逐渐增大, 且 SPI 乳液的增加幅度大于 SPI+D 混合物, 说明加入葡聚糖后在一定程度上减缓了 $D_{3,2}$ 的增加。超声 SPI-D 乳液随着冻融循环次数的增加, $D_{3,2}$ 值出现逐渐减小的趋势, 在 2、3 次冻融循环后 SDS 稀释的 $D_{3,2}$ 值反而有所增加。冷冻过程液态水减少, 分散相油的体积分数增加, 当冰晶体在水相形成时油滴被迫挤在一起, 破坏了较薄的油水界面膜, 在聚合过程中絮凝和聚结发生^[16]。体积平均粒径 ($D_{4,3}$) 比 $D_{3,2}$ 对乳液液滴聚集的过程更敏感, 因此选用 $D_{4,3}$ 的变化来评价乳液发生絮凝和聚结的程度。由表 1 可知, 初始 SPI 和 SPI-D 乳液分别出现了 22.81%和 13.75%的絮凝, 而超声 SPI-D 乳液只有 4.172%的絮凝。随着冻融循环次数的增加, 絮凝程度和聚结程度均不断增大, 3 次冻融循环后超声 SPI-D 乳液相对于 SPI 乳液絮凝程度降低了 187.8%, 聚结程度降低了 235.3%。

综上所述, 冻融处理严重破坏了大豆分离蛋白乳化体系的稳定性, 而超声波辅助美拉德反应后有效地降低了乳液的粒径、絮凝程度和聚结程度, 乳液稳定

性有了很大程度的改善。

2.3 冻融循环对 zeta 的影响

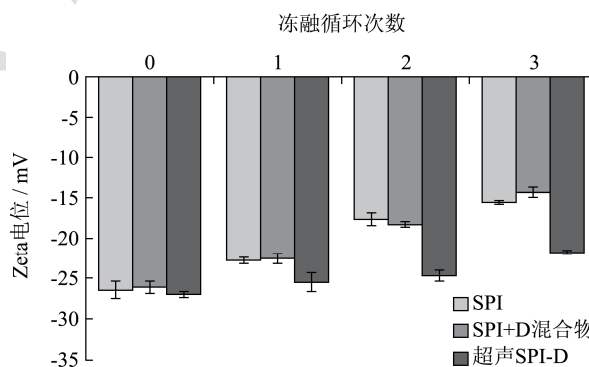


图 4 冻融循环对乳液 zeta 电位的影响

Fig.4 Effect of freeze-thaw cycles on the zeta potential of emulsions

冷冻过程水分子的结晶导致冻融集中的解冻水相形成, 水的离子强度增加, pH 值减少, 高浓度的盐可以筛选出液滴之间的静电斥力。由蛋白形成的界面膜, 通常相对较薄并且带有一定电荷, 因此, 防止乳化体系发生絮凝的主要机制是静电排斥作用, 其次是空间位阻。ζ-电位对于判定乳液的稳定性非常重要, 分散粒子越小, ζ-电位绝对值越高, 颗粒间排斥力越大, 体系越稳定。反之, ζ-电位越低, 体系中颗粒由于排斥力较小, 更加倾向于絮凝或聚结。

SPI、SPI+D 混合物、超声 SPI-D 制备的初始乳液的 ζ -电位分别为 -26.5 mV、-26.1 mV、-27.0 mV。与 SPI 相比,加入葡聚糖后的乳液 ζ -电位略有降低,可能是由于少量的中性葡聚糖吸附到油滴界面屏蔽电荷造成的。超声 SPI-D 乳液 ζ -电位绝对值略有增加,乳液体系更加稳定。随着冻融循环次数的增加,以 SPI、SPI+D 混合物作为乳化剂的乳液体系的 ζ -电位发生明显降低。SPI 乳液在 1、2、3 次冻融处理后,其 ζ -电

位由 -26.5 mV 分别降至 -22.8 mV、-17.7 mV、-15.6 mV,而超声 SPI-D 乳液 3 次冻融循环后其 ζ -电位为 -21.8 mV,冻融循环对其电位影响不大,3 次冻融循环后其乳液体系仍处于相对稳定的状态,与粒径、絮凝程度和聚结程度的结果一致。

2.4 冻融循环对乳液微观结构的影响

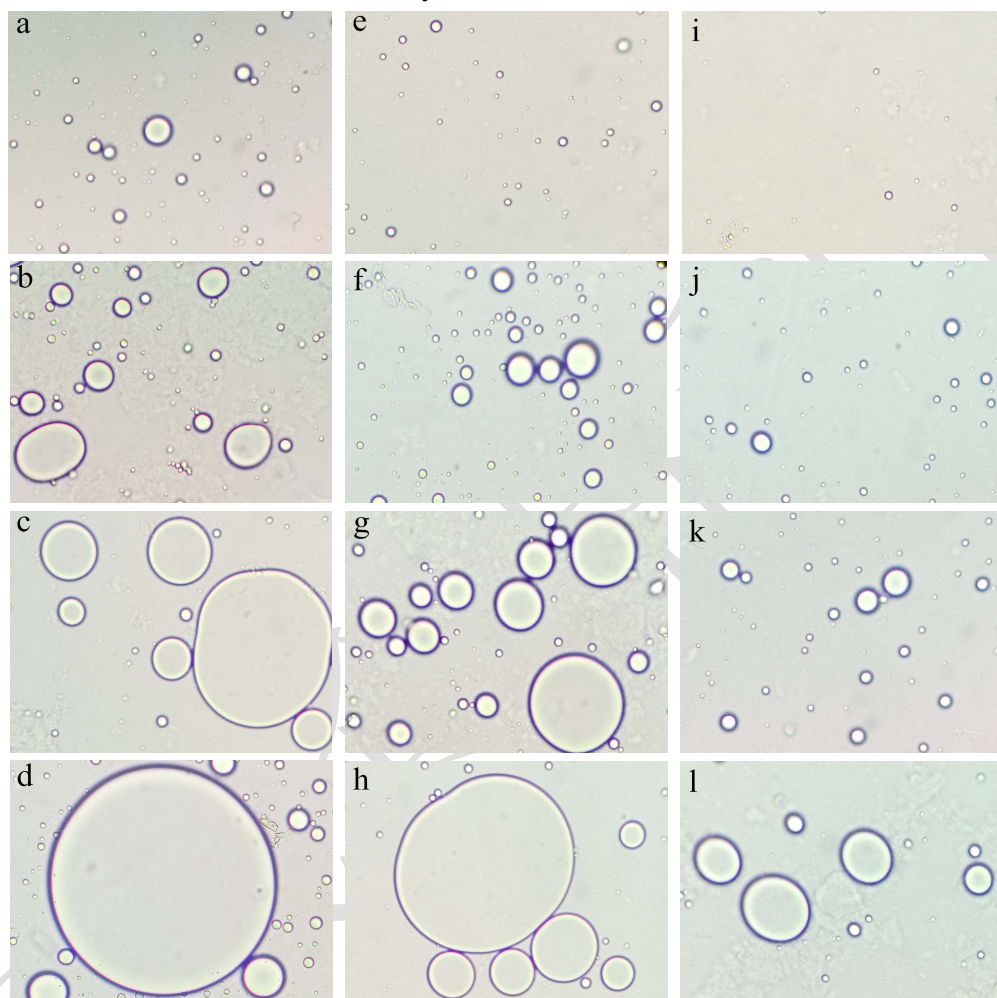


图 5 冻融循环对乳液微观结构的影响

Fig.5 Effect of freeze-thaw cycles on the microstructure of emulsions

注: a~d, SPI; e~h, SPI+D 混合物; i~l, 超声 SPI-D; a、e 和 i 未经历冻融循环, b、f 和 j 经历 1 次冻融循环, c、g 和 k 经历 2 次冻融循环, d、h 和 l 经历 3 次冻融循环。

图 5 中 a~d、e~h、i~l 分别为 SPI、SPI+D 混合物、超声 SPI-D 作为乳化剂制备的乳液在经历冻融循环后的微观结构图。从图中可以看出,在经过冻融循环后,由 SPI、SPI+D 混合物作为乳化剂制备的乳液表观结构发生了显著变化,有较大的油滴出现,而且出现了不规则的团块。当乳液在冷冻时,体系中的水分重新分布,冰晶体不断增大造成乳液的结构发生严重的破坏,脂肪结晶在油滴之间相互渗透,导致不规则团块的产生。当冷冻的体系解冻时,团块中的液滴相互

融合,造成聚结的现象,甚至会有油析出^[17]。而超声 SPI-D 乳液在经历 3 次冻融循环后只有部分小的油滴生成,糖链的引入增加了界面膜的厚度,形成更厚更有弹性的膜,阻止了冰晶体对界面膜的机械损伤,使其更容易吸附于油水界面,能够有效防止液滴之间的聚集,抵抗冰晶对界面膜的破坏^[18],从而其制备的乳液 3 次冻融循环后微观结构变化不显著。

2.5 扫描电镜分析

图6中a、b、c分别为SPI、SPI+D混合物、超声SPI-D冻干粉放大200倍的扫描电镜图。从图中可以看出经过超声辅助糖基化改性后SPI颗粒形态发生了很大程度的改变。未改性的SPI颗粒质构紧实，棱角分明，结构不规则。当SPI分子周围加入大量的糖分子后，由于其分子较小，紧紧围在蛋白分子周围，使结构更加紧密。超声SPI-D颗粒更加疏松，棱角模糊，形成细小均匀的颗粒，超声产生的空化效应和热效应使蛋白的肽链展开，多糖分子的接入使蛋白分子表面裹了一层厚厚的糖衣，大豆蛋白分子原有的刚性结构消失，降低了蛋白质分子之间因疏水相互作用而团聚，蛋白分子间聚集程度显著降低，其结构朝向有利于提高冻融稳定性方向转变。

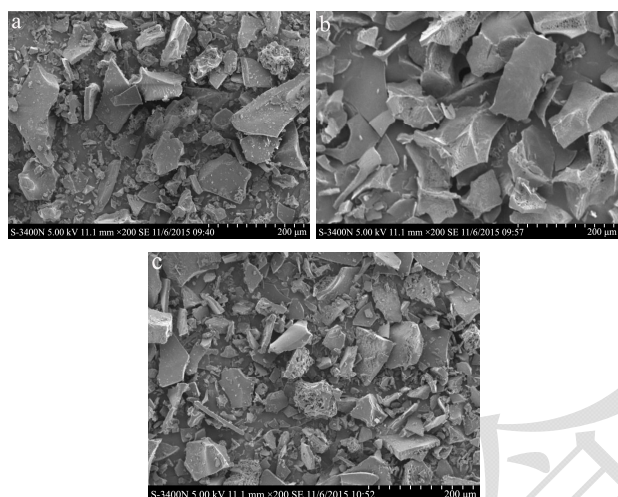


图6 SPI、SPI+D混合物及其接枝物的扫描电镜图

Fig.6 SEM images of SPI, SPI+dextran mixture, and its grafts

3 结论

本文对SPI、SPI+D混合物、超声SPI-D接枝物制备的乳液冻融稳定性进行了系统研究。SPI与葡聚糖单一的混合后其冻融稳定性略有增加，而在超声波辅助下与葡聚糖发生美拉德反应后大豆分离蛋白的冻融稳定性增加显著，经过3次冻融循环后超声SPI-D制备的乳化体系仍具有较好的稳定性，因此通过超声波协同美拉德反应改性大豆分离蛋白提高其冻融稳定性是可行的。为生产冷冻食品中专用的抗冻蛋白提供了一种新的方法，拓宽了大豆蛋白在食品领域的应用。

参考文献

- Palazolo G G, Sobral P A, Wagner J R. Freeze-thaw stability of oil-in-water emulsions prepared with native and thermally-denatured soybean isolates [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(3): 398-409
- Magnusson E, Rosén C, Nilsson L. Freeze-thaw stability of mayonnaise type oil-in-water emulsions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(4): 707-715
- Wang X B, Zhang Y H, Jiang L Z. Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate through glycosylation modification [J]. *Advanced Materials Research*, 2013, (781/782/782/784): 1495-1499
- Zhang B, Chi Y J, Li B. Effect of ultrasound treatment on the wet heating Maillard reaction between β -conglycinin and maltodextrin and on the emulsifying properties of conjugates [J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 238(1): 129-138
- Zeeb B, Gibis M, Fischer L, et al. Crosslinking of interfacial layers in multilayered oil-in-water emulsions using laccase: characterization and pH-stability [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 27(1): 126-136
- Fernández-Ávila C, Escriu R, Trujillo A J. Ultra-High pressure homogenization enhances physicochemical properties of soy protein isolate-stabilized emulsions [J]. *Food Research International*, 2015, 75(5): 357-366
- 孙洪蕊,张英华,王喜波,等.提高大豆蛋白冻融后乳化改性工艺优化[J].*农业工程学报*,2014,30(7):281-286
SUN Hong-rui, ZHANG Ying-hua, WANG Xi-bo, et al. Processing optimization for improving soybean protein's emulsifying properties after freeze-thaw [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2014, 30(7): 281-286
- Diftis N, Kiosseoglou V. Physicochemical properties of dry-heated soy protein isolate-dextran mixtures [J]. *Food Chemistry*, 2006, 96(2): 228-233
- 窦超然,于国萍,宋岩,等.冻融稳定型糖基化大豆分离蛋白的制备[J].*食品工业*,2013,34(4):3-5
DOU Chao-ran, YU Guo-ping, SONG Yan, et al. Preparation of glycosylated soy protein isolate with freeze-thaw stabilization [J]. *Food Industry*, 2013, 34(4): 3-5
- QI M, Hettiarachchy N S, Kalapathy U. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin [J]. *Journal of Food Science*, 1997, 62(6): 1110-1115
- Noshad M, Mohebbi M, Shahidi F, et al. Freeze-thaw stability of emulsions with soy protein isolate through interfacial engineering [J]. *International Journal of Refrigeration*, 2015, 58(5): 253-260
- Palazolo G G, Sorgentini D A, Wagner J R. Coalescence and flocculation in O/W emulsions of native and denatured whey soy proteins in comparison with soy proteins isolates [J].

- Food Hydrocolloids, 2005, 19(3): 595-604
- [13] Hunter T N, Pugh R J, Franks G V, et al. The role of particles in stabilising foams and emulsions [J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2008, 137(2): 57-81
- [14] Segall K I, Goff H D. A modified ice cream processing routine that promotes fat destabilization in the absence of added emulsifier [J]. *International Dairy Journal*, 2002, (12): 1013-1018
- [15] 孙炜炜. 乳清分离蛋白-葡聚糖接枝改性及功能性质研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2012
- SUN Wei-wei. Study on the physicochemical and functional properties of whey protein isolate -dextran conjugate [D]. Guang Zhou: South China University of Technology, 2012
- [16] Dickinson E. Flocculation of protein-stabilized oil-in-water emulsions [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2010, 81(1): 130-140
- [17] Aoki T, Decker E A, McClements D J. Influence of environmental stresses on stability of O/W emulsions containing droplets stabilized by multilayered membranes produced by a layer-by-layer electrostatic deposition technique [J]. *Food Hydrocolloids*, 2005, 19(2): 209-220
- [18] Pongsawatmanit R, Harnsilawat T, McClements D J. Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by β -lactoglobulin [J]. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2006, 287(1): 59-67