

超声辅助制备大豆分离蛋白-卡拉胶复合物条件的优化

周天硕¹, 陶思琪¹, 胡迎春¹, 鲍伟¹, 董世荣², 韩齐^{1*}, 李艳青^{1*}

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319)

(2. 哈尔滨学院食品工程学院, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要: 该研究以大豆分离蛋白和四种多糖(卡拉胶、黄原胶、亚麻籽胶、瓜尔豆胶)为原料制备大豆分离蛋白-多糖复合物, 通过评价浊度、表面疏水性、乳液乳化活性及乳化稳定性等确定大豆分离蛋白-卡拉胶复合物具有较好的理化性质, 用于后续超声辅助制备条件的优化。探究不同 pH 值(2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0)、超声功率(200、400、600、800 W)和时间(2、4、6、8、10 min)对蛋白-多糖复合物结构及性能的影响。采用荧光光谱探究复合物结构特征, 通过浊度、表面疏水性、粒径、电位明确复合物理化特性, 结果表明添加卡拉胶质量分数为 0.1%、pH 值为 7.0、超声功率为 400 W、超声时间为 4 min 时, 制备的复合物浊度最大为 0.44, 表面疏水性最高为 285.15 μg , 复合物粒径最小为 139.06 nm, 电位绝对值达到最大为 27.23 mV, 形成了稳定的大豆分离蛋白-卡拉胶复合物, 为后续研究蛋白-多糖乳液凝胶作为脂肪替代物提供了理论支持。

关键词: 大豆分离蛋白; 超声辅助; pH 值; 结构性质

文章编号: 1673-9078(2025)02-204-214

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.2.0002

Optimization of Ultrasonic-assisted Preparation of Soy Protein Isolate-carrageenan Complex

ZHOU Tianshuo¹, TAO Siqi¹, HU Yingchun¹, BAO Wei¹, DONG Shirong², HAN Qi^{1*}, LI Yanqing^{1*}

(1.College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

(2.College of Food Engineering, Harbin University, Harbin 150086, China)

Abstract: In this study, soybean protein isolate and four polysaccharides (carrageenan, xanthan gum, flaxseed gum, guar gum) were used as the raw materials for preparing soy protein isolate-polysaccharide complex. The turbidity, surface hydrophobicity, emulsifying activity and emulsified emulsion stability of the complex were evaluated, and the soy protein

引文格式:

周天硕,陶思琪,胡迎春,等.超声辅助制备大豆分离蛋白-卡拉胶复合物条件的优化[J].现代食品科技,2025,41(2): 204-214.

ZHOU Tianshuo, TAO Siqi, HU Yingchun, et al. Optimization of ultrasonic-assisted preparation of soy protein isolate-carrageenan complex [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(2): 204-214.

收稿日期: 2024-01-02

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(32202109); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2020039); 黑龙江八一农垦大学引进人才科研启动计划资助项目(XYB201803); 黑龙江八一农垦大学“青年创新人才”项目(CXRC2017012); 黑龙江省杂粮生产与加工优势特色学科项目(2022-78)

作者简介: 周天硕(2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 1317478988@qq.com

通讯作者: 韩齐(1988-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 畜产品加工及安全控制. E-mail: hanqihappy@foxmail.com; 共同通讯作者: 李艳青

(1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 肉制品加工, E-mail: liyanqing2003@163.com

isolate-carrageenan complex was determined to have better physicochemical properties, which was used for the optimization of the subsequent ultrasonic-assisted preparation conditions. The effects of different pH values (2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0), ultrasonic power (200, 400, 600, 800 W) and ultrasonic time (2, 4, 6, 8, 10 min) on the structure and properties of protein-polysaccharide complexes were investigated. Fluorescence spectra were used for exploring the structural characteristics of the complex, and the physico-chemical characteristics of the complex were determined based on turbidity, surface hydrophobicity, particle size and potential. The results showed that a stable soy protein isolate-carrageenan complex was formed when the mass fraction of carrageenan was 0.1%, pH value was 7.0, ultrasonic power was 400 W, and ultrasonic time was 4 min. The complex had the maximum turbidity of 0.44, the maximum surface hydrophobicity of 285.15 μg , the minimum particle size of 139.06 nm, and the maximum absolute potential of 27.23 mV. This study provides a theoretical support for the subsequent research on protein-polysaccharide emulsion gel as a fat substitute.

Key words: soybean protein isolate; ultrasonic-assisted; pH values; structural property

大豆分离蛋白 (Soybean Protein Isolate, SPI) 作为一种重要的植物蛋白, 富含多种人体必需氨基酸, 具有很高的营养价值和良好的功能特性^[1], 并且由于 SPI 是两亲性物质, 具有良好的乳化能力, 在食品加工中常作为乳化剂使用^[2]。但单一添加 SPI, 其稳定性容易受到食品加工环境中酸碱条件及其他因素的影响。多糖作为稳定剂具有来源广、亲水能力强的优点, 和蛋白结合可以通过静电相互作用改善蛋白质的功能特性^[3,4], 提高乳液的稳定性及乳化性质, 达到改善产品的功能性和质构特性的目的。当所处微环境 pH 小于 SPI 等电点时, SPI 整体带正电, 此时易发生静电相互作用, 因此本研究选择阴性多糖 κ -卡拉胶 (Kappa-Carrageenan, KC)、黄原胶 (Xanthan Gum, XG)、亚麻籽胶 (Flaxseed Gum, FG) 和中性多糖瓜尔豆胶 (Guar Gum, GG) 与 SPI 作用, 这四种多糖均可以作为增稠剂及稳定剂加入到食品中^[5-7], 具有易溶于水和能够改善乳液乳化性的特点, 并且有研究表明在肉制品中添加卡拉胶的同时加入蔗糖, 能够显著提高肉糜流变特性, 从而改善肉制品品质^[8]。

近年来, 许多研究利用超声处理来改变蛋白质空间结构进而改善蛋白质功能特性^[9-11]。超声产生的机械效应和空化作用可以使蛋白质暴露出更多的氨基酸残基, 促进蛋白质与其他物质结合。同时超声产生的能量能够打碎分散液中聚集的颗粒粉末, 破坏蛋白质之间的非共价相互作用, 改善蛋白质颗粒在乳液中的分散性, 降低分散液中的颗粒大小^[11]。超声处理能够促进蛋白质与多糖分子的键合^[10], 改善复合物的功能特性。本研究以 SPI 和多糖为主要原料, 通过对复合物浊度、表面疏水性、乳化特性、粒径、电位及荧光光谱等理化性质的测定, 探究多

糖种类及不同质量分数、pH 值、超声功率及时间等制备条件对复合物性质的影响, 以期制备高稳定性 SPI-多糖复合物, 为后续 SPI-多糖复合乳液作为脂肪替代物的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白 (蛋白质质量分数为 85%), 哈尔滨高科技有限公司; κ -卡拉胶 (KC)、亚麻籽胶 (FG)、黄原胶 (XG)、瓜尔豆胶 (GG) 均为食品级, 河南万邦化工科技有限公司; 辣木籽油, 山东粮木科技有限公司; 溴酚蓝, 国药集团化学试剂有限公司; 所有化学药品均为分析纯。

JY96-IIN 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技股份有限公司; FE28 pH 计, 美国 -Mettler Toledo 公司; RF-6000 荧光分光光度计, 日本岛津公司; SN-MS-H280D 磁力搅拌器, 上海尚仪有限公司; FA40 高剪切均质机, 上海弗洛克流体机械制备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SPI-多糖复合物的制备

参考朱秀清等^[12]方法并稍作修改。将 SPI 分散在去离子水中, 配置成 SPI 溶液 (质量分数为 1%), 室温下搅拌以确保蛋白质完全溶解。再分别加入 KC、XG、FG、GG (质量分数分别为 0.1%、0.2%、0.3% 和 0.4%, 下同), 添加过程中持续搅拌 2 h [室温 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$], 使混合物充分反应以确保二者形成复合物, 冷藏用于后续指标的测定和多糖的筛选。

1.2.2 浊度测定

将不同样品用磷酸盐缓冲液 (0.04 mol/L, pH 值

为 7.0) 稀释 40 倍, 用紫外可见分光光度计 (600 nm) 测定样品的吸光度。磷酸缓冲液作为空白对照, 根据浊度的公式进行计算^[13,14]。

$$T = 1.302 \times \frac{A \times V}{I} \quad (1)$$

式中:

A ——稀释乳液 600 nm 处的吸光度;

V ——稀释倍数;

I ——0.01 m 处的吸光度。

1.2.3 表面疏水性测定

取 1 mL 复合物溶液和 200 μ L 溴酚蓝 (1 mg/mL) 混合后振荡均匀, 放于室温静置 10 min 后, 离心 15 min (4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min), 表面疏水性 (以溴酚蓝结合量表示) 的计算公式如下^[15]:

$$B = \frac{D \times (A_{595} - A_0)}{A_0} \quad (2)$$

式中:

B ——样品溴酚蓝结合量, μ g;

D ——混合液中加入的溴酚蓝质量, 为 200 μ g;

A_{595} ——595 nm 处所测吸光度;

A_0 ——对照组, 即未添加复合物溶液的溴酚蓝溶液的吸光度。

1.2.4 乳化稳定性、乳化活性的测定

按照 1.2.1 中方法制备 SPI-多糖复合物, 以 60% 油浓度向复合物中加入辣木籽油, 采用均质机在 14 500 r/min 下高速分散 4 min, 得到新鲜乳液进行乳化活性 (Emulsifying Activity, EAI) 和乳化稳定性 (Emulsifying Stability, ESI) 的测定^[16]。从底部吸取 100 μ L 乳液, 加入 5 mL 的 0.1 wt.% 十二烷基硫酸钠溶液, 测定乳液在 0 时刻波长为 500 nm 处的吸光度的分光光度值 A_0 , 将乳液静置 10 min, 按上述步骤测波长为 500 nm 处的吸光值 A_{10} 。EAI 和 ESI 计算公式如下:

$$D_1 = \frac{2 \times 2.303 \times n}{c \times \varphi \times 10^4} \times A_0 \quad (3)$$

$$D_2 = \frac{A_0 \times t}{A_0 \times A_{10}} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

D_1 ——乳化活性 (EAI), m^2/g ;

D_2 ——乳化稳定性 (ESI), %;

c ——蛋白质质量浓度, g/mL;

φ ——油相所占体积分数;

A_0 ——0 min 时的吸光值;

A_{10} ——10 min 时的吸光值;

t ——静置时间, min;

n ——稀释倍数。

1.2.5 超声处理制备 SPI-多糖复合物条件的优化

在 1.2.1 基础上确定最优多糖种类后进行 SPI-多糖复合物制备条件的优化。

1.2.5.1 SPI-多糖比例的优化

在质量分数 1% 的 SPI 溶液中分别加入一定质量筛选后的多糖进行混合, 使 SPI 和多糖的质量比分别为 10:1、10:2、10:3、10:4, 固定 pH 值为 7.0, 室温下搅拌 2 h 后制得复合物。

1.2.5.2 pH 值的优化

在质量分数 1% 的 SPI 溶液中加入筛选所得多糖比例进行混合, 分别将溶液的 pH 值调整为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0, 室温下搅拌 2 h 后制得复合物。

1.2.5.3 超声制备条件的优化

在质量分数 1% 的 SPI 溶液中加入筛选所得多糖比例进行混合, 充分搅拌溶解。调节 pH 值为 7.0, 室温下搅拌 2 h 后进行超声处理^[17]。超声条件为: 超声功率 200、400、600 和 800 W (温度 4 $^{\circ}$ C, 时间 4 min), 时间 2、4、6、8 和 10 min (功率 400 W, 温度 4 $^{\circ}$ C) (工作与间歇时间均为 2 s)。

1.2.6 粒径的测定

采用激光粒度仪测定复合物液滴粒径尺寸, 水相和油相的折射率分别为 1.33 和 1.45, 分散剂为 10 mmol/L 的磷酸盐缓冲液, 温度为 25 $^{\circ}$ C, 测定粒径数值^[18]。

1.2.7 电位的测定

利用激光粒度仪进行测定, 取 1 mL 样品溶液用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液稀释 100 倍添加到配有电极的反应杯中, 温度为 25 $^{\circ}$ C, 测定 Zeta 电位^[19]。

1.2.8 荧光光谱的测定

利用磷酸缓冲液配制不同多糖的复合物溶液 (0.25 mg/mL), 并将其加入到光程为 1 cm 的石英比色皿中。使用荧光光谱仪 (激发波长: 295 nm, 记录光谱范围: 300~400 nm), 用于溶解样品的缓冲液作为空白^[20]。

1.2.9 数据统计与分析

所有试验均重复三次, 结果以平均数 $\pm$ 标准差的形式表示。采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计

及显著性分析 ($P<0.05$), 使用 Sigmaplot 14.0 和 Origin 2019 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 SPI-多糖复合物的制备及其理化性质评价

2.1.1 多糖种类及不同质量分数对SPI-多糖复合物浊度的影响

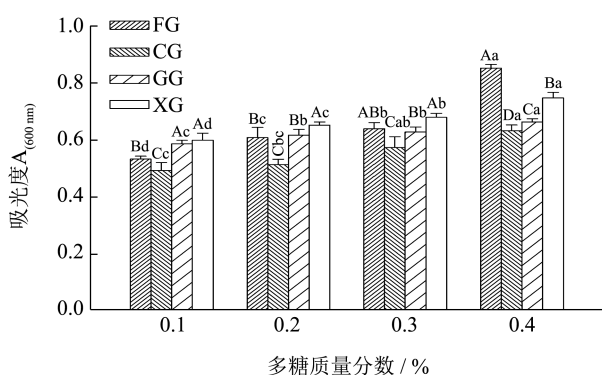


图 1 多糖种类及不同质量分数对 SPI- 多糖复合物浊度的影响

Fig.1 Effect of polysaccharide type and addition on turbidity of SPI-polysaccharide

注: A~D 表示同一多糖质量分数, 不同的处理组之间差异显著 ($P<0.05$); a~d 表示同一处理组, 不同多糖质量分数之间差异显著 ($P<0.05$)。图 2 同。

如图 1 所示, 随着多糖质量分数的增加, 不同 SPI- 多糖复合物的浊度整体变化均呈显著增加 ($P<0.05$), 这可能是由于多糖含量的增加, 使悬浮在溶液中的粒子数增多, 从而发生桥联作用, 可溶性复合物产生了聚集絮凝, 导致不同处理组复合物的浊度升高^[21,22]。而不同多糖处理组中, SPI-KC 处理组的浊度值均显著低于其他处理组 ($P<0.05$), 这可能是因为 SPI 与 KC 的结合抑制了蛋白桥联凝聚作用的发生, 从而形成了相对稳定的复合体系, 且体系中颗粒较小导致的。Lu 等^[23]评估了 κ -卡拉胶对大豆分离蛋白复合凝胶的凝胶性及分子相互作用, 卡拉胶能够促进与蛋白结合促进三维网络中氢键的形成, 使体系更加稳定, 与本研究结果一致。

2.1.2 多糖种类及不同质量分数对SPI-多糖复合物表面疏水性的影响

蛋白质表面疏水性对其功能性具有重要影响, 同时也跟乳化能力和乳化稳定性之间有着密切关系^[24,25]。SPI- 多糖复合物的表面疏水性变化趋势如

图 2 所示, 随着多糖质量分数的增加, 不同多糖处理组复合物的表面疏水性均呈显著降低的趋势 ($P<0.05$)。多糖质量分数为 0.1% 时, 不同多糖种类的表面疏水性均达到最大, 说明多糖的加入能够使 SPI 结构展开暴露出疏水基团, 从而与溴酚蓝结合导致表面疏水性增加, 但随着多糖继续添加, SPI- 多糖复合物的疏水性反而降低, 这可能是因为多糖含量增加, SPI- 多糖体系的粘度增加使蛋白展开的结构又被包裹在复合体系中, 致使体系的疏水性降低。同一添加量条件下, 添加 KC 的处理组表面疏水性最高 ($P<0.05$), 说明 KC 更有利于 SPI 结构的展开, 暴露出更多疏水基团。Gao 等^[26]发现魔芋葡甘露聚糖的添加促进了肌原纤维蛋白氨基酸残基以及疏水基团的暴露, 与本研究结论一致。

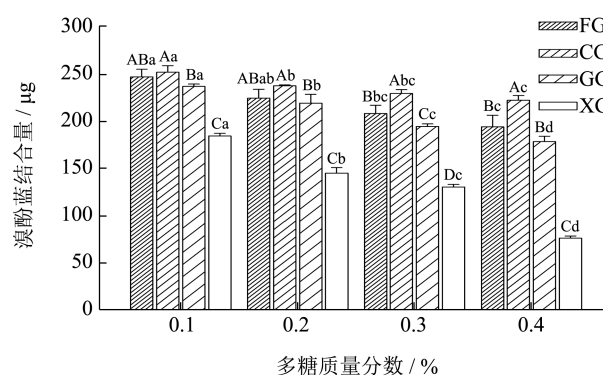


图 2 多糖种类及不同质量分数对 SPI- 多糖表面疏水性的影响

Fig.2 Effect of polysaccharide type and addition on surface hydrophobicity of SPI-polysaccharide

2.1.3 多糖种类及不同质量分数对SPI-多糖乳液乳化性的影响

以 60% 油浓度制备 SPI- 多糖乳液, 并评价不同多糖种类及质量分数对乳液乳化性质的影响。从图 3a 可以看出, 随着 FG 质量分数的增加, 乳液 EAI 值显著升高 ($P<0.05$), 这可能是由于 FG 对乳液中的脂肪颗粒产生了良好的包裹作用并阻止了脂肪颗粒之间的聚集^[27]。而随着 FG 的添加, ESI 先升高后降低, 可能是因为 FG 的添加增强了乳液的静电斥力, 抑制了颗粒的聚集, 使更多的蛋白质聚集在油滴周围。但较高的 FG 质量分数使大量游离的 FG 颗粒与蛋白质发生结合聚集, 降低了乳液体系的稳定性^[28]。如图 3b, 随着 KC 质量分数增加, 乳液乳化性呈显著降低 ($P<0.05$), 在 KC 添加质量分数为 0.1% 时, ESI 为 90%, EAI 为 32.92 m²/g 均达到最高。这可能是因为 KC 与 SPI 带正电荷部

分结合形成 SPI-KC 复合物,一定浓度的 KC 能够增加体系黏稠度、增大界面膜厚度,防止乳液液滴聚集。但随着 KC 添加量升高,ESI、EAI 呈现降低的趋势。Chen 等^[29]也发现由于多糖与蛋白质在界面上竞争吸附作用较强,使界面蛋白吸附量减小,导致乳液的乳化性降低。从图 3c、3d 可以看出,随着 GG、XG 质量分数的增加,乳液 EAI 呈现先升高后降低的趋势 ($P<0.05$),说明适宜的多糖质量分数能够有效改善乳液乳化性质。但整体比较多糖种类及不同质量分数对 SPI-多糖复合乳液乳化性质的影响,SPI 与 KC 结合能够明显改善乳液乳化性,且 EAI 相较于其他处理组最高,显示 KC 效果最优。Ren 等^[30]发现 κ -卡拉胶的添加使非水溶性茶蛋白乳液液滴小且均匀,乳化性质发生改善,与本研究结论一致。

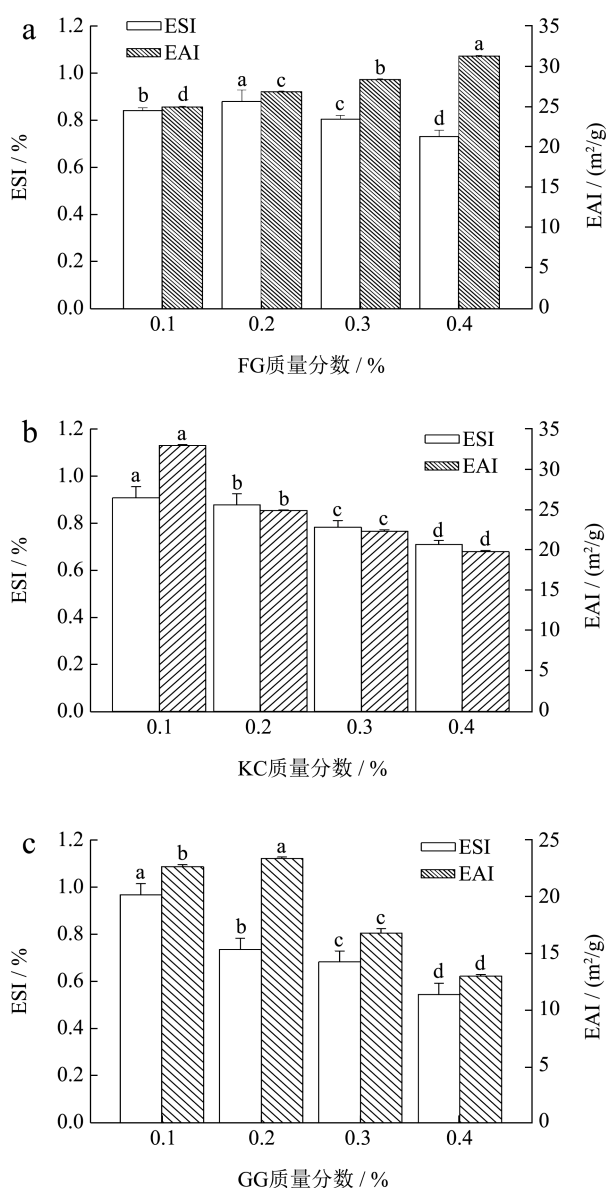


图3 多糖种类及不同质量分数对 SPI- 多糖乳液乳化性的影响

Fig.3 Effect of polysaccharide type and addition on emulsifiability of SPI-polysaccharide emulsion

注: a~d 表示同一处理组, 不同多糖质量分数之间差异显著 ($P<0.05$)。

因此, 综合比较 SPI-多糖复合物的浊度、表面疏水性及 SPI-多糖乳液的 EAI 及 ESI 等指标, KC 与 SPI 形成的复合物/乳液具有较好的表面疏水性和乳化性质, 因此确定 KC 进行后续制备条件的优化。

2.2 SPI-KC复合物制备条件的优化

2.2.1 SPI-KC比例及pH值对SPI-复合物浊度的影响

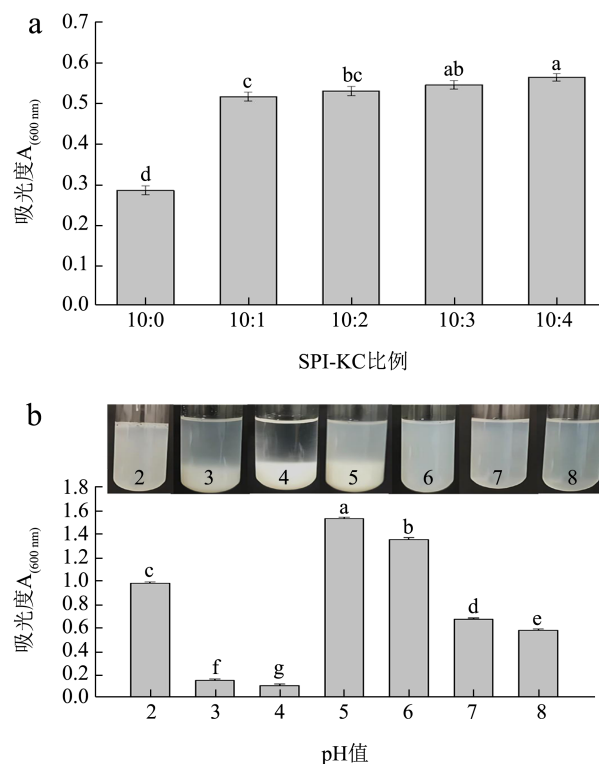


图4 SPI-KC 比例 (a) 及 pH 值 (b) 对浊度的影响

Fig.4 Effect of SPI-KC ratio (a) and pH values (b) on turbidity

注: a~g 表示不同处理组之间的差异显著 ($P<0.05$)。

如图 4a 所示,随着 KC 添加比例的增加, SPI-KC 复合体系的浊度值呈显著增加趋势 ($P<0.05$)。如图 4b 表示,制备环境 pH 值对 SPI-KC 复合体系浊度影响显著,在 pH 值 3.0 和 4.0 时体系形成大量沉淀并快速分层,因此吸取复合体系上清液进行浊度测定,显示出浊度值显著下降 ($P<0.05$)。当 pH 值大于 5 后 SPI-KC 复合体系内的浊度随着 pH 值的增加而显著下降 ($P<0.05$)。结合实际分层情况,在 pH 值 2.0~4.0 范围内观察到随着 pH 值的增加,沉淀量增加。但当 pH 值升高到 5.0~6.0 时,沉淀量逐渐减少,表明在 pH 值 5.0~6.0 范围内形成了可溶性复合物,浊度值分别为 1.53 和 1.35,复合体系在 pH 值 7.0~8.0 下 SPI 与 KC 产生交联,二者相互结合形成复合物。

2.2.2 SPI-KC比例及pH值对复合物表面疏水性的影响

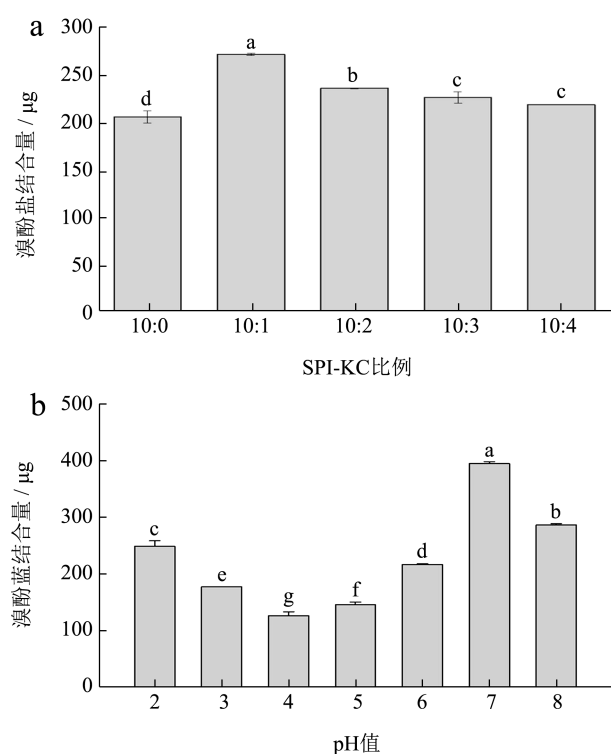


图 5 SPI-KC 比例 (a) 及 pH 值 (b) 对复合物表面疏水性的影响

Fig.5 Effect of SPI-KC ratio (a) and pH values (b) on surface hydrophobicity

注: a~d 表示不同处理组之间差异显著 ($P<0.05$)。

SPI-KC 比例对复合物的表面疏水性影响如图 5a 所示,随着 KC 添加比例的增加,复合物的表面疏水性呈现先增加后降低的趋势 ($P<0.05$),张

雪等^[31]研究也发现了相似的结果。在 10:1 时, SPI-KC 复合体系表面疏水性最高为 271.58 μg,说明 KC 改善了 SPI 的结构,暴露出更多的疏水基团,从而和溴酚蓝进行结合使表面疏水性增加。Ran 等^[32]发现魔芋葡甘露聚糖的 -OH 基团对大豆蛋白酰胺键相互作用能够改善蛋白结构。但随着更多的 KC 添加,过量 KC 相互结合将暴露出的疏水基团包裹,显示出表面疏水性降低。图 5b 为不同 pH 值处理对 SPI-KC 复合物表面疏水性的影响。随着 pH 值的升高,表面疏水性变化显著 ($P<0.05$),呈先降低后升高的趋势,这与浊度变化趋势一致。在 pH 值为 4.0 时复合物的表面疏水性最小,这可能是由于靠近等电点, SPI 溶解度最低,结合实际分层情况显示 pH 值为 4.0 时沉淀最大,只有少量的疏水基团能够结合,显示出最低表面疏水性。

2.2.3 SPI-KC比例及pH值对复合物粒径和电位的影响

乳液中液滴粒径的大小会影响乳液稳定性质,液滴粒径越小,乳液越趋于稳定^[33]。Zeta 电位是衡量颗粒之间相互作用的指标,表 1 显示出 SPI-KC 比例及 pH 值对 SPI-KC 复合物粒径、Zeta 电位的影响。未加入 KC 的 SPI 的粒径为 429.56 nm,随着 SPI-KC 比例的增加,复合物粒径呈显著增大趋势 ($P<0.05$)。在 KC 添加比例为 10:1 时,粒径大小增加量相对较小,电位绝对值最大达到 27.63 mV,说明在 KC 添加比例为 10:1 时形成的复合体系最稳定。Wang 等^[16]评估了 κ-卡拉胶对豌豆分离蛋白-葡萄籽油乳液乳化能力的影响,在不同 κ-卡拉胶的比例下也发现了同样的趋势。电位绝对值的变化体现 KC 添加比例为 10:1 时, SPI 与 KC 的硫酸基团之间形成了更强的静电相互作用^[34]。随着 KC 添加量的增加,溶液粘度升高,流动性变差,并且高浓度多糖会促进损耗絮凝的产生,形成更大的粒径。随着 pH 值的升高, SPI-KC 复合体系粒径表现出先降低后升高的趋势。当 pH 值小于蛋白质的等电点时,二者的静电相互作用越强,电位降低,浊度相对较高,粒径也逐渐增强。在 pH 值为 4.0 时,沉淀物最多,溶液中粒子数少,粒径最小。当 pH 值高于蛋白质的等电点时,蛋白质和多糖均具有负电荷,静电相互作用较弱,混合体系主要通过疏水相互作用等形式存在,显示出粒径较小,电位较高^[35]。

表 1 SPI-KC比例及pH值对SPI-KC复合物的粒径和电位
Table 1 Effect of SPI-KC ratio and pH value on particle size
and potential of SPI-KC

参数	粒径/nm	电位/mV
SPI-KC 比例	10:0	429.56 ± 65.08 ^b
	10:1	491.83 ± 43.96 ^b
	10:2	545.10 ± 85.81 ^b
	10:3	1 028.86 ± 175.94 ^{ab}
	10:4	1 400.80 ± 657.41 ^a
pH 值	2.0	1 689.00 ± 410.41 ^a
	3.0	1 822.66 ± 102.08 ^{ab}
	4.0	577.33 ± 102.08 ^b
	5.0	1 222.00 ± 154.41 ^{ab}
	6.0	949.63 ± 156.15 ^b
	7.0	724.30 ± 187.26 ^b
	8.0	937.13 ± 459.05 ^b

注: a~d 表示同一处理方式, 不同处理组之间的差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2.4 SPI-KC比例及pH值对复合物荧光强度的影响

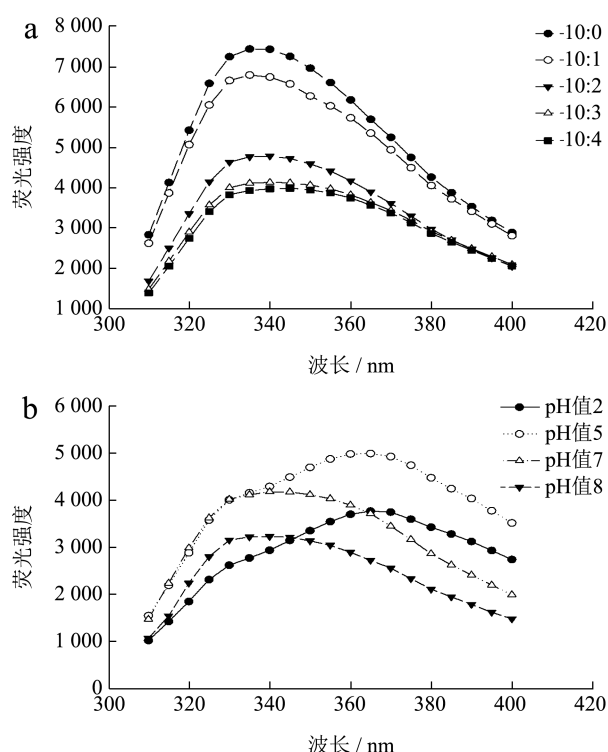


图 6 SPI-KC 比例 (a) 及 pH 值 (b) 对复合物的荧光强度的影响

Fig.6 Effect of SPI-KC ratio (a) and pH (b) on fluorescence intensity

内源荧光光谱可以用于评价蛋白质三级结构的变化以及环境之间的相互作用, 当激发波长为

295 nm 时, 主要是由色氨酸 (Trp) 残基发生变化引起荧光光谱变化^[36]。如图 6a 所示, 随着 KC 比例的增加, SPI-KC 复合体系的最大发射峰强度显著降低, 但峰的形状变化较小, 呈现典型的荧光猝灭现象, 说明 KC 与 SPI 之间存在相互作用。此外, KC 的添加, 使得 SPI 的 $\lambda_{\max}$ 从 335 nm 移至 340 nm, 最大发射波长发生了蓝移, 说明 SPI 与 KC 之间形成了复合物。这可能是因为阴离子多糖的加入增加了蛋白质粒子之间的空间位阻, 使 SPI 的构象发生变化, 色氨酸的内部微环境有由极性向非极性转变的趋势, 从而导致色氨酸最大吸收波长发生了蓝移^[37]。

SPI-KC 复合体系在 pH 值 3.0 和 4.0 时主要形成不溶复合物, pH 值 5.0 和 6.0 主要形成可溶复合物, 在 pH 值 7.0 和 8.0 时 SPI 和 KC 以共溶状态存在。因此, 分别选择 pH 值为 2.0、5.0、7.0 和 8.0 进行荧光强度的测定。图 6b 表明在酸性条件下, SPI-KC 复合体系的最大发射峰发生红移。这可能是因为蛋白中氨基酸所处微环境会受到 SPI 和 KC 的静电相互作用以及蛋白分子之间的疏水相互作用的干扰^[38]。在 pH 值为 3.0 下的强静电相互作用改变了蛋白的三级构象, 导致一些 Trp 残基被掩埋, 因此荧光强度降低。

因此, 综合比较 SPI-KC 复合体系不同比例及 pH 值的浊度、表面疏水性、粒径、电位及荧光强度等指标, KC 与 SPI 比例为 10:1, pH 值为 7.0 时形成的复合体系具有较好的粒径大小及表面疏水性, 因此确定 SPI:KC 为 10:1, pH 值为 7.0 进行后续制备条件的优化。

2.2.5 超声条件对SPI-KC复合物浊度和表面疏水性的影响

表 2 表示不同超声功率及时间对 SPI-KC 复合体系浊度及表面疏水性的影响。超声功率在 200~400 W 之间时, 复合体系浊度随着超声时间的增加显著变化 ($P < 0.05$), 呈先升高后下降的趋势, 且相同超声时间下 400 W 超声功率处理下复合体系的浊度值显著高于 200 W 处理组 ($P < 0.05$)。这可能是由于超声的空化效应使蛋白和多糖的结构发生改变, 增强了它们之间的静电相互作用^[37]。在超声功率为 600~800 W 之间时, 随着超声时间的增加浊度值呈显著下降 ($P < 0.05$)。可能是因为高强度的超声功率和较长的超声时间导致蛋白结构变化以及多糖黏度降低, 这些都可能是复合溶液浊度下降的原因^[39]。因此, SPI-KC 复合体系在较高的超声功

率下浊度降低。综合比较, 超声功率为 400 W 时间为 4 min 时复合体系的浊度值最高为 0.44。

表 2 不同超声条件对SPI-KC浊度及表面疏水性的影响
Table 2 Effects of different ultrasonic conditions on turbidity and surface hydrophobicity of SPI-KC

超声参数		浊度	表面疏水性/ μg
功率/W	时间/min		
200	2	$0.25 \pm 0.01^{\text{De}}$	$236.68 \pm 2.04^{\text{Ab}}$
	4	$0.33 \pm 0.01^{\text{Bb}}$	$248.54 \pm 2.07^{\text{Ba}}$
	6	$0.37 \pm 0.01^{\text{Aa}}$	$244.54 \pm 2.51^{\text{Ba}}$
	8	$0.30 \pm 0.01^{\text{Bc}}$	$230.45 \pm 2.33^{\text{Bc}}$
	10	$0.28 \pm 0.01^{\text{Bd}}$	$212.26 \pm 1.74^{\text{Bd}}$
400	2	$0.35 \pm 0.01^{\text{Ac}}$	$238.50 \pm 2.27^{\text{Ac}}$
	4	$0.44 \pm 0.02^{\text{Aa}}$	$285.15 \pm 2.03^{\text{Aa}}$
	6	$0.37 \pm 0.01^{\text{Ab}}$	$278.32 \pm 4.43^{\text{Aa}}$
	8	$0.34 \pm 0.01^{\text{Ad}}$	$268.10 \pm 3.92^{\text{Ab}}$
	10	$0.31 \pm 0.01^{\text{Ac}}$	$264.23 \pm 2.96^{\text{Ab}}$
600	2	$0.29 \pm 0.01^{\text{Ca}}$	$241.66 \pm 4.28^{\text{Aa}}$
	4	$0.26 \pm 0.01^{\text{Cb}}$	$231.25 \pm 6.38^{\text{Ca}}$
	6	$0.25 \pm 0.01^{\text{Bc}}$	$229.54 \pm 8.86^{\text{Ca}}$
	8	$0.19 \pm 0.01^{\text{Dd}}$	$212.61 \pm 2.44^{\text{Cb}}$
	10	$0.14 \pm 0.01^{\text{De}}$	$206.35 \pm 2.27^{\text{Db}}$
800	2	$0.32 \pm 0.01^{\text{Ba}}$	$204.14 \pm 2.74^{\text{Ba}}$
	4	$0.25 \pm 0.01^{\text{Db}}$	$195.60 \pm 6.41^{\text{Da}}$
	6	$0.23 \pm 0.01^{\text{Cc}}$	$182.40 \pm 3.48^{\text{Db}}$
	8	$0.22 \pm 0.01^{\text{Cd}}$	$173.30 \pm 5.45^{\text{Db}}$
	10	$0.21 \pm 0.01^{\text{Ce}}$	$157.20 \pm 6.46^{\text{Cc}}$

注: A~D 表示同一超声时间, 不同超声功率之间的差异显著 ($P<0.05$); a~e 表示同一超声功率, 不同超声时间之间的差异显著 ($P<0.05$)。

随着超声功率和超声时间的增加, SPI-KC 复合体系的表面疏水性变化显著 ($P<0.05$)。当超声功率为 200~400 W 间, 随着超声时间的延长, SPI-KC 复合体系的表面疏水性呈先升高后降低的趋势。当超声功率大于 600 W 时, 随着超声时间的延长, 复合体系的表面疏水性呈显著降低 ($P<0.05$), 超声处理条件为 400 W、4 min 时, 复合体系与溴酚蓝结合量最大为 285.15 μg 。这可能是由于在较低超声功率下, 超声波的高剪切力破坏了分子间的聚集, 形成粒径较小的体系颗粒, 这和粒径趋势是一致的。Hu 等^[40]评估了高强度超声对聚集大豆 β -伴大豆球蛋白和大豆球蛋白功能特性的影响, 表明高强度超声能够使蛋白质分子间聚集体减少, 增加疏水区暴

露, 获得了与本研究相同的趋势。而相同超声时间条件下, 随着超声功率的增加, 复合体系的表面疏水性均呈显著下降 ($P<0.05$)。可能是较高的超声功率和超声时间可能使 SPI-KC 复合体系结构展开后产生新的交联, 蛋白颗粒重新聚集, 从而减少了疏水基团的暴露, 表现出疏水性降低^[41]。因此, 确定超声功率为 400 W, 超声时间为 4 min 时效果最优。

2.2.6 超声条件对SPI-KC复合物粒径和电位的影响

表 3 超声条件对SPI-KC复合物粒径和电位的影响
Table 3 Effect of ultrasonic conditions on particle size and potential of SPI-KC

超声参数		粒径/nm	电位/mV
功率/W	时间/min		
200	2	$141.96 \pm 17.53^{\text{Ba}}$	$-15.43 \pm 2.40^{\text{Aa}}$
	4	$151.66 \pm 38.48^{\text{Ba}}$	$-17.50 \pm 0.77^{\text{Aab}}$
	6	$176.60 \pm 32.03^{\text{Ba}}$	$-21.43 \pm 1.10^{\text{Bbc}}$
	8	$181.63 \pm 10.02^{\text{Ba}}$	$-22.93 \pm 1.93^{\text{Bc}}$
	10	$203.13 \pm 25.51^{\text{Ba}}$	$-20.33 \pm 1.93^{\text{BCbc}}$
400	2	$181.00 \pm 42.04^{\text{ABa}}$	$-22.86 \pm 0.81^{\text{Ca}}$
	4	$139.06 \pm 12.44^{\text{Ba}}$	$-27.23 \pm 1.51^{\text{Cb}}$
	6	$174.83 \pm 25.52^{\text{Ba}}$	$-25.73 \pm 1.75^{\text{Cab}}$
	8	$183.73 \pm 15.58^{\text{Ba}}$	$-23.00 \pm 2.87^{\text{Ba}}$
	10	$188.63 \pm 22.09^{\text{Ba}}$	$-22.06 \pm 0.54^{\text{Ca}}$
600	2	$188.70 \pm 24.08^{\text{ABa}}$	$-22.00 \pm 1.39^{\text{BCa}}$
	4	$190.46 \pm 18.93^{\text{ABa}}$	$-20.70 \pm 0.99^{\text{Ba}}$
	6	$193.23 \pm 23.99^{\text{Ba}}$	$-20.16 \pm 2.02^{\text{ABa}}$
	8	$201.13 \pm 19.14^{\text{Ba}}$	$-19.26 \pm 1.13^{\text{ABa}}$
	10	$214.56 \pm 19.82^{\text{ABa}}$	$-18.76 \pm 1.74^{\text{Ba}}$
800	2	$238.83 \pm 21.58^{\text{Aa}}$	$-18.66 \pm 1.86^{\text{ABc}}$
	4	$244.76 \pm 25.01^{\text{Aa}}$	$-17.70 \pm 0.80^{\text{Abc}}$
	6	$257.86 \pm 26.53^{\text{Aa}}$	$-16.76 \pm 0.95^{\text{Abc}}$
	8	$260.86 \pm 35.00^{\text{Aa}}$	$-15.53 \pm 0.67^{\text{Aab}}$
	10	$267.30 \pm 34.57^{\text{Aa}}$	$-14.56 \pm 0.57^{\text{Aa}}$

注: A~C 表示同一超声时间, 不同的处理组之间的差异显著 ($P<0.05$); a~c 表示同一超声功率, 不同处理组之间的差异显著 ($P<0.05$)。

由表 3 可以看出, 经过超声处理的 SPI-KC 复合物粒径均小于未经处理的复合物 (表 1)。说明超声处理可以形成体系中小颗粒, 增加溶解性, 降低界面张力, 分散更均匀, 从而促进分子间的作用形成更稳定体系^[42]。但不同超声处理粒径大小不一。随着超声功率及时间的增加, 体系粒径呈增加趋势 ($P<0.05$), Zeta 电位先增加后降低的趋势

($P < 0.05$)。可能是由于超声使大豆分离蛋白中更多的阳离子基团暴露于蛋白表面,而过高的超声功率及时间导致蛋白质聚集,暴露出的阳离子基团减少,显示出电位值降低^[43]。在超声条件为 400 W, 4 min 时,粒径最小为 139.06 nm, 电位绝对值达到最大为 27.23 mV。

2.2.7 超声条件对 SPI-KC 复合物荧光强度的影响

图 7a~7d 为超声功率及时间对 SPI-KC 复合物

的荧光光谱的影响。荧光强度的改变表明蛋白结构与聚集状态随不同的超声参数而变化。在超声功率为 400 W 时, 荧光强度最强, 且时间为 4 min 时产生最强的荧光强度。随着超声功率及时间的延长荧光强度下降, 可能是因为长时间高强度的超声处理使蛋白质分子共价和非共价交联相互作用, 驱动蛋白质分子发生一定的聚集^[44], 并且随着超声时间的延长, 蛋白质分子解聚形成新的大分子物质, 与可溶性多糖间相互作用减弱。

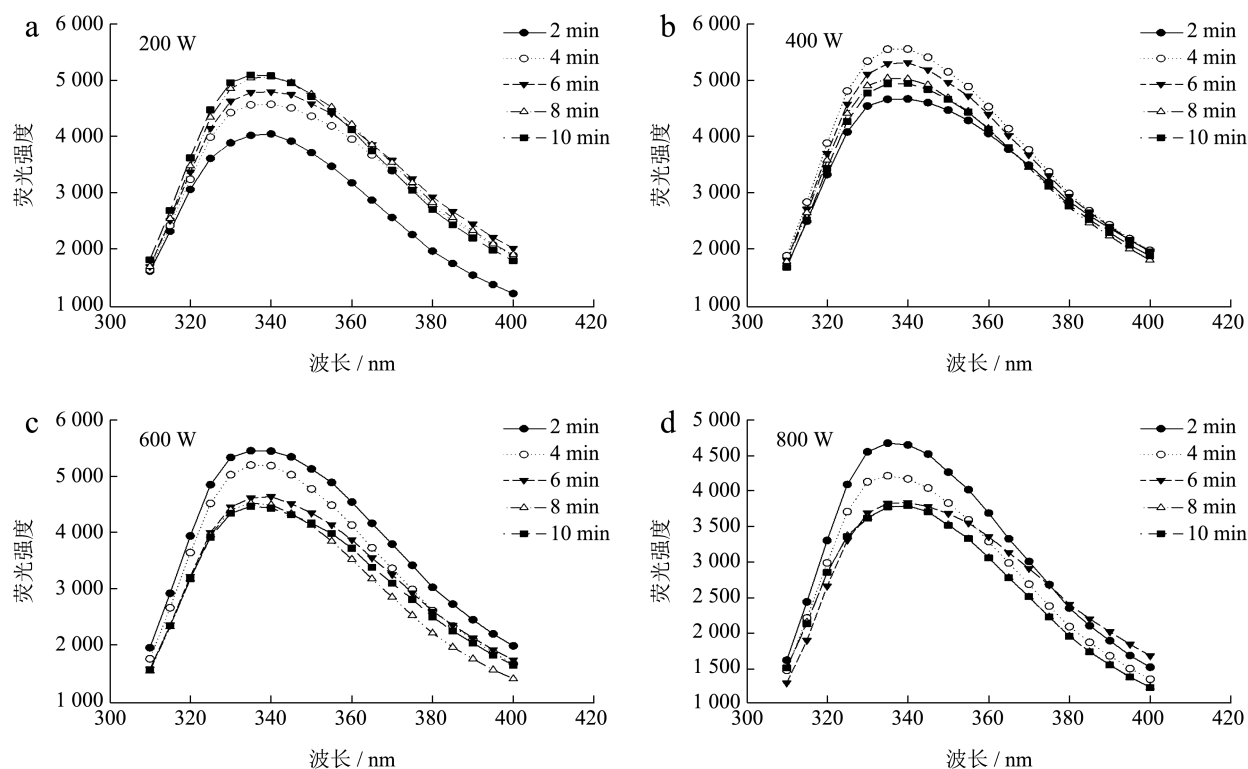


图 7 超声条件对 SPI-KC 复合物荧光强度的影响

Fig.7 Effect of ultrasonic conditions on fluorescence intensity of SPI-KC

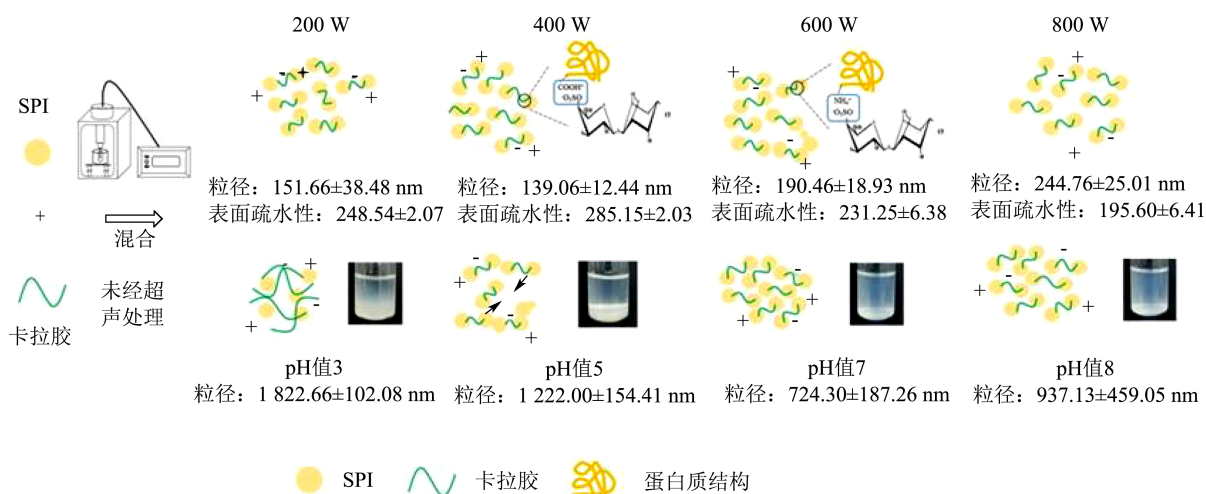


图 8 超声作用对 SPI-KC 复合物形成的机制图

Fig.8 Mechanism diagram of SPI-KC composite system formed by ultrasound

超声处理会影响蛋白与多糖之间的相互作用(如图8超声作用对SPI-KC复合物形成的机制图)。根据浊度、Zeta电位以及观察可知, SPI(等电点约为4.5)和KC在pH值为3.0时, 由于大分子聚集作用导致了不溶性聚集体的形成。在pH值为5.0时, SPI与KC局部静电结合导致不溶性聚集体拆解, 沉淀减少。在pH值为7.0时, SPI远离等电点, SPI和KC带有相同的电荷, 且SPI中多价阳离子作为胶联剂与KC结合形成亲水胶体。超声使蛋白聚集体分离, 暴露出更多疏水基团, 增强蛋白与KC之间相互疏水作用, 根据粒径等指标可知, 在适当的条件下(超声功率400 W, 时间4 min)进行处理能够促进复合物的形成。

3 结论

研究表明多糖的加入能够有效改善蛋白-多糖复合物的浊度和表面疏水性。添加卡拉胶质量分数为0.1%时, SPI-KC乳液稳定性及乳化活性最优分别为90%、32.92 m²/g。随着超声功率及时间的逐渐提高, 蛋白-多糖复合物表面疏水性先升高后降低, 电位先增加后降低, 内源荧光光谱强度逐渐降低, 表示超声使大豆分离蛋白二级结构发生改变, 疏水基团暴露。在pH值为7.0的条件下, 随超声时间及功率的升高大豆分离蛋白-卡拉胶复合物内源荧光强度逐渐降低, 粒径先增加后降低。因此本试验结果表明, 卡拉胶添加质量比为10:1, 超声功率400 W时间4 min, pH值为7.0时, 形成大豆分离蛋白-卡拉胶复合物粒径最小, 荧光强度最高, 效果最好, 这为后续研究蛋白-多糖乳液凝胶作为脂肪替代物提供了理论支持。

参考文献

- [1] HAN L, LI J H, JIANG Y T, et al. Changes in the structure and functional properties of soybean isolate protein: Effects of different modification methods [J]. Food Chemistry, 2024, 432: 137214.
- [2] MATOS M, MAREFATI A, BARRERO P, et al. Resveratrol loaded Pickering emulsions stabilized by OSA modified rice starch granules [J]. Food Research International, 2020, 139: 109837.
- [3] ZHAO Y, WANG D, XU J, et al. Effect of polysaccharide concentration on heat-induced *Tremella fuciformis* polysaccharide-soy protein isolation gels: Gel properties and interactions [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 262(P2): 129782.
- [4] WANG Y F, BAI C J, MCCLEMENTS D J, et al. Improvement of 3D printing performance of pea protein isolate Pickering emulsion gels by regulating electrostatic interaction between protein and polysaccharide [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 145: 1.1-1.14.
- [5] LOMOLINO G, VINCENZI S, ZANNONI S, et al. Emulsifying activity of potato proteins in the presence of κ -carrageenan at different pH conditions [J]. Food Chemistry: X, 2022, 13: 100232.
- [6] 杨晨, 韩雅倩, 郑凯文, 等. 大豆分离蛋白与黄原胶复合对胡麻油乳液及其模板油凝胶物理性质的影响[J]. 天津科技大学学报, 2024, 39(0): 15-21, 80.
- [7] YANG Z, YANG H J, YANG H S. Effects of sucrose addition on the rheology and microstructure of κ -carrageenan gel [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 75: 164-173.
- [8] LI J H, ZHOU Y J, LI Z P, et al. Mechanism for improving the gel properties of transglutaminase-mediated porcine myofibrillar protein by ultrasonic pretreatment combined with carrageenan [J]. Food Chemistry, 2023, 426: 136635.
- [9] 丁俭, 李杨, 史博瑞, 等. 超声改性大豆分离蛋白与大豆可溶性多糖复合乳化体系的冻融稳定性研究[J]. 食品科学, 2018, 39(9): 88-94.
- [10] WU Y M, WU Y Y, XIANG H, et al. Emulsification properties and oil-water interface properties of l-lysine-assisted ultrasonic treatment in sea bass myofibrillar proteins: Influenced by the conformation of interfacial proteins [J]. Food Hydrocolloids, 2024, 147(PB): 109405.
- [11] LIU Q Q, LIU Y T, HUANG H, et al. Improvement of the emulsifying properties of Zanthoxylum seed protein by ultrasonic modification [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2023, 100: 106638.
- [12] 朱秀清, 王婵, 孙禹凡, 等. 多糖对大豆分离蛋白乳液及乳液凝胶性质的影响[J]. 东北农业大学学报, 2020, 51(2): 45-52.
- [13] 王喜波, 曹佳, 杨赛, 等. 大豆乳清蛋白与硫酸葡聚糖相互作用及乳化特性研究[J]. 农业机械学报, 2021, 52(10): 409-416.
- [14] 白荣. 高压均质亚麻籽油双层乳液对肌原纤维蛋白及低脂猪肉糜凝胶品质的影响[D]. 新乡: 河南科技学院, 2022.
- [15] CHEN B, LIU X Y, ZHOU K, et al. Differentiating the effects of hydrophobic interaction and disulfide bond on the myofibrillar protein emulsion gels at the high temperature and the protein interfacial properties [J]. Food Chemistry, 2023, 412: 135472.
- [16] WANG W J, SUN R, JI S P, et al. Effects of κ -carrageenan on the emulsifying ability and encapsulation properties of pea protein isolate-grape seed oil emulsions [J]. Food Chemistry, 2024, 435: 137561.

- [17] 李滢溪,陈复生,张丽芬,等.超声构建花生分离蛋白-果胶复合乳液及其稳定性研究[J].食品与发酵工业,2023,49(11):191-198.
- [18] 黄国,张江江,田泽鹏,等.EGCG与大豆7S/11S蛋白互作对乳液稳定性的影响[J].中国食品学报,2022,22(12):82-93.
- [19] WEI Y, LI C, DAI L, et al. The construction of resveratrol-loaded protein-polysaccharide-tea saponin complex nanoparticles for controlling physicochemical stability and *in vitro* digestion [J]. Food & Function, 2020, 11(11): 9973-9983.
- [20] 王丹丹,毛晓英,孙领鸽,等.氢过氧化物氧化对核桃蛋白结构和乳化特性的影响[J].中国食品学报,2019,19(12):60-68.
- [21] 丰波.蛋清/枸杞多糖、黄芪多糖复合体系溶液行为及凝胶属性研究[D].武汉:华中农业大学,2023.
- [22] HOSKIN R T, XIONG J, LILA M A. Comparison of berry juice concentrates and pomaces and alternative plant proteins to produce spray dried protein-polyphenol food ingredients [J]. Food & Function, 2019, 10(10): 6286-6299.
- [23] LU Z, LEE P R, YANG H S. Kappa-carrageenan improves the gelation and structures of soy protein isolate through the formation of hydrogen bonding and electrostatic interactions [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 140: 108585.
- [24] LI F, WANG B, LIU Q, et al. Changes in myofibrillar protein gel quality of porcine longissimus muscle induced by its structural modification under different thawing methods [J]. Meat Science, 2019, 147: 108-115.
- [25] 于晶超,赵冰,王守伟,等.可得然胶对肌原纤维蛋白理化和凝胶性质的影响[J].中国食品学报,2022,22(3):27-38.
- [26] GAO Y F, LUO C, ZHANG J Y, et al. Konjac glucomannan improves the gel properties of low salt myofibrillar protein through modifying protein conformation [J]. Food Chemistry, 2022, 393: 133440.
- [27] 张风雪.亚麻籽胶对儿茶素-肌原纤维蛋白互作的抑制作用及乳化凝胶特性的影响[D].锦州:渤海大学,2020.
- [28] WANG X, LI X, XU D X, et al. Influence of unadsorbed emulsifiers on the rheological properties and structure of heteroaggregate of whey protein isolate (WPI) coated droplets and flaxseed gum (FG) coated droplets [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 80: 42-52.
- [29] CHEN Q H, ZHENG J, XU Y T, et al. Surface modification improves fabrication of pickering high internal phase emulsions stabilized by cellulose nanocrystals [J]. Food Hydrocolloids, 2018, 75: 125-130.
- [30] REN Z Y, LI Z M, CHEN Z Z, et al. Characteristics and application of fish oil-in-water pickering emulsions structured with tea water-insoluble proteins/ κ -carrageenan complexes [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 114: 106562.
- [31] 张雪,张震,邹建,等.鹰嘴豆蛋白与卡拉胶互作体系表征及其功能性研究[J].食品科技,2020,45(12):245-250.
- [32] RAN X L, LOU X W, ZHENG H Q, et al. Improving the texture and rheological qualities of a plant-based fishball analogue by using konjac glucomannan to enhance crosslinks with soy protein [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2022, 75: 102910.
- [33] DANIAL A, APOSTOLOS K, STEVEN L B. Nanoparticle stabilized oil in water emulsions: A critical review [J]. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2018, 163: 217-242.
- [34] HUANG M, MAO Y Z, LI H L, et al. Kappa-carrageenan enhances the gelation and structural changes of egg yolk via electrostatic interactions with yolk protein [J]. Food Chemistry, 2021, 360: 129972.
- [35] CHEN E, WU S, MCCLEMENTS J D, et al. Influence of pH and cinnamaldehyde on the physical stability and lipolysis of whey protein isolate-stabilized emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 69: 103-110.
- [36] 郑环宇,孔洋,郑丽,等.大豆蛋白-多糖复合物结构与性能及其稳定性研究[J].农业机械学报,2022,53(6):406-415.
- [37] MA X B, HOU F R, ZHAO H H, et al. Conjugation of soy protein isolate (SPI) with pectin by ultrasound treatment [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 106056.
- [38] ZOU W J, FAYEZ K M, ZHANG X Y, et al. Phase separation behavior and characterization of ovalbumin and propylene glycol alginate complex coacervates [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 108: 105978.
- [39] HUA J, ZHAO Q S, FENG H Y, et al. Changes on the structural and physicochemical properties of conjugates prepared by the maillard reaction of black bean protein isolates and glucose with ultrasound pretreatment [J]. Polymers, 2019, 11(5): 848.
- [40] HU H, IMELDA W C, PAN S Y, et al. Effect of high intensity ultrasound on physicochemical and functional properties of aggregated soybean β -conglycinin and glycinin [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 45: 102-110.
- [41] YAN S Z, XU J W, ZHANG S, et al. Effects of flexibility and surface hydrophobicity on emulsifying properties: Ultrasound-treated soybean protein isolate [J]. LWT, 2021, 142: 110881.
- [42] 李可,王艳秋,张怡雪,等.低钠条件下超声处理对鸡肉肌原纤维蛋白乳液稳定性的影响[J].食品科学,2023,44(9):58-65.
- [43] LI X, SHA S M, YANG H S, et al. Ultrasonic treatment regulates the properties of gelatin emulsion to obtain high-quality gelatin film [J]. Food Chemistry: X, 2023, 18: 100673.
- [44] ZHU Z S, ANTHON B P, CAO Y Q, et al. Food protein aggregation and its application [J]. Food Research International, 2022, 160: 111725.