

食品与饲料用化学品

马铃薯/乳清蛋白复合凝胶的性质和微观结构

王思念¹, 伍娟^{1,2}, 李堃芳¹, 高俊¹, 程宇^{1,2*}

(1. 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学 食品物理加工研究院, 江苏 镇江 212013)

摘要: 为减少乳清蛋白用量, 用马铃薯蛋白替代乳清蛋白质量的一半制备了热诱导凝胶。通过色度、质构、水分分布、流变考察了总蛋白质量浓度 (40~80 g/L) 对于复合凝胶物理性质的影响。结果表明, 复合凝胶最低成胶质量浓度为 50 g/L (其中乳清蛋白质量浓度为 25 g/L), 与乳清蛋白最低成胶质量浓度 80 g/L 相比, 乳清蛋白用量减少了 68.8%。总蛋白质量浓度从 50 g/L 提高到 80 g/L 时, 复合凝胶偏黄, 硬度和弹性分别增加了 5.28 倍和 5.90%, 但束缚水含量降低了 3.51%; 储能模量 (G') 显示较弱的频率依赖性。蛋白质量浓度为 80 g/L 的复合凝胶孔隙尺寸小, 具有由颗粒聚集体组成的均一致密网络结构, 因而具有较高的 G' 。复合凝胶中 β -折叠和 β -转角结构约占蛋白二级结构的 70%。维持复合凝胶结构的作用力中氢键和疏水相互作用的贡献高于二硫键。

关键词: 马铃薯蛋白; 乳清蛋白; 复合凝胶; 功能性质; 食品化学品

中图分类号: TS201.7

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2022) 12-2541-09

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Properties and microstructure of potato/whey protein mixed gels

WANG Sinian¹, WU Juan^{1,2}, LI Kunfang¹, GAO Jun¹, CHENG Yu^{1,2*}

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China; 2. Institute of Food Physical Processing, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China)

Abstract: To reduce the dosage of whey protein, heat-induced mixed gels of potato-whey protein were prepared by replacing half whey protein with potato protein. The effects of total protein mass concentration (40~80 g/L) on the physical properties of mixed protein gels were investigated by color, textural properties, moisture distribution and rheological properties. The results showed that the lowest gelation mass concentration of mixed protein gel was 50 g/L in which the concentration of whey protein was 25 g/L. Compared with whey protein gel formed at the lowest gelling mass concentration of 80 g/L, consumption of whey protein in those mixed gels decreased by 68.8%. When the mass concentration of protein increased from 50 g/L to 80 g/L, mixed protein gel exhibited yellow color in the appearance, a 5.28-fold increase in hardness, 5.90% increase in elasticity, a 3.51% decrease in the content of immobilized water, and a storage modulus G' weakly related to the frequency. The mixed protein gel at mass concentration of 80 g/L had uniform and compact gel network, small pore size, and clear spherical particle aggregation morphology, which lead to a higher G' . The amount of β -folding and β -turn structures accounted for about 70% of the secondary structures in mixed protein gel. Hydrogen bond and hydrophobic interaction, other than disulfide bond, contributed more in maintaining the structure of mixed protein gels.

Key words: potato protein; whey protein; composite gel; functional properties; food chemicals

蛋白质的凝胶性有助于食品结构的形成, 并可以稳定食品结构。利用蛋白凝胶形成的网络结构载

运水分、风味物质、脂肪、糖类等食品成分, 可以使食品具有理想的感官特性。随着碳中和战略的提

收稿日期: 2022-05-17; 定用日期: 2022-07-04; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220466

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32072349)

作者简介: 王思念 (1995—), 女, 硕士生, E-mail: 1411800334@qq.com. 联系人: 程宇 (1981—), 男, 副教授, E-mail: chengyu@ujs.edu.cn.

出, 利用碳排放低的植物源蛋白部分替代碳排放高的动物源蛋白, 以期获得营养健康双蛋白产品的研究成为近年来的研究热点^[1]。

在高蛋白食品, 如营养棒中, 乳清蛋白是使用较多的动物蛋白, 因而, 利用植物蛋白如大豆蛋白^[2-4]、豌豆蛋白^[5-6]、马铃薯蛋白^[7-8]等替代乳清蛋白开发双蛋白凝胶的研究受到关注。其中, 马铃薯蛋白相对分子质量(简称分子量)小、变性温度低、过敏性低, 在部分替代乳清蛋白开发双蛋白凝胶产品上具有较好的应用前景。MAO 等^[8]研究了蛋白比例对乳清和马铃薯混合蛋白乳液填充乳清蛋白凝胶的质构和流变特征以及消化行为的影响。但是乳清和马铃薯混合蛋白只是用于制备填充的乳液, 凝胶网络的基质为乳清蛋白, 乳清蛋白用量较高。为了降低乳清蛋白比例, ANDLINGER 等^[7]研究了不同 pH (5、7、9) 和氯化钠浓度 (0 和 100 mmol/L) 条件下不同蛋白比例的热诱导乳清和马铃薯双蛋白凝胶的流变和质构特征以及凝胶中蛋白聚集的分子间作用力。ANDLINGER 等^[7]研究的复合蛋白体系中总蛋白质量分数为 15%, 其中乳清蛋白的浓度较高, 未能实现乳清蛋白用量的降低。同时, 该研究也未报道复合凝胶微观结构和复合蛋白总浓度的变化对凝胶性质的影响。

蛋白凝胶的性质, 如质构特征和持水性会影响凝胶基食品的感官风味^[9]和消化特征^[8]。而蛋白凝胶的微观结构和分子结构特征则会影响凝胶性质。影响蛋白凝胶性质和微观结构的因素包括蛋白浓度、凝胶成胶方式、酶处理、盐浓度和 pH 等^[9]。其中, 蛋白浓度是影响凝胶特征的最直接因素和开发凝胶产品的基础。当马铃薯蛋白部分替代乳清蛋白后, 复合蛋白的最低成胶浓度与纯乳清蛋白体系相比是否会下降, 从而在开发双蛋白凝胶产品时减少乳清蛋白的用量尚不清楚。考虑到乳清蛋白凝胶成胶的最低质量浓度在 80 g/L 左右^[10-11], 本课题组前期的研究^[8]也得到类似结果, 本文在设定总蛋白质量浓度上限为 80 g/L 的前提下研究总蛋白浓度的影响。

前期研究结果^[12]表明, 经过超声辅助 pH 偏移处理的马铃薯蛋白与乳清蛋白复合溶液可形成凝胶, 但该研究中未考察总蛋白质量浓度对凝胶性质和微观结构的影响。根据前期研究结果, 本研究以马铃薯和乳清蛋白质量比为 1:1 的复合蛋白作为研究对象, 考察总蛋白质量浓度 (40、50、60、70、80 g/L) 对马铃薯乳清复合蛋白凝胶特征, 包括色度、水分分布、质构特征、流变学性质、微观结构以及凝胶中蛋白二级结构和分子间作用力的影响, 并测定了复合蛋白溶液的粒径和电位, 从多角度系统地探讨马铃薯蛋白替代降低乳清蛋白最低成胶质

量浓度的问题。本文拟在前期报道^[12]分子结构特征影响凝胶性质的基础上, 探讨凝胶物理微观结构影响凝胶性质的问题, 可为植物动物复合蛋白凝胶产品的开发提供技术依据和理论基础。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

材料: 新鲜马铃薯, 采购于江苏大学凯源超市; 乳清蛋白 (蛋白质量分数 90.9%), 美国 Hilmar 公司。

试剂: 固绿 (Fast Green)、 β -巯基乙醇 (β -ME), AR, 德国默克公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS)、尿素、戊二醛、磷酸盐 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), AR, 国药集团化学试剂有限公司; 实验用水为自制去离子水。

扫频式三频超声设备, 江苏江大五棵松生物科技有限公司; Avanti J-26XP 真空冷冻离心机, 贝克曼库尔特 (美国) 有限公司; FE20 型 pH 计, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; CR-400 色差仪, 柯尼卡美能达控股公司; Litesizer 500 型粒度电位仪, 奥地利 Anton-Paar 公司; DHR-1 旋转流变仪, 美国 TA 仪器公司; TA.XT Plus 物性测试仪, 英国 Stable Micro Systems 仪器公司; UV-2800 型紫外-可见分光光度计, 尤尼科 (上海) 科学仪器有限公司; 冷冻切片机、TCS SP 型激光共聚焦显微镜, 德国 Leica 公司; NMI20-030 V-I 型低场核磁共振分析仪, 苏州纽迈分析仪器股份有限公司; 可变真空钨灯丝扫描电子显微镜, 日本日立公司; Nicolet 傅里叶变换红外光谱仪, 美国尼高力仪器公司。

1.2 制备方法

1.2.1 马铃薯蛋白的制备

参考 MAO 等^[13]的方法制备马铃薯蛋白。称取 1 kg 去皮切块的马铃薯于匀浆机中, 按液料比 3 mL/g 加入质量浓度为 1.2 g/L 的 Na_2SO_3 水溶液进行破碎, 并用纱布过滤, 得到的滤液静置 30 min 后, 在 4000 g 离心 30 min。取上清液用 NaOH (2 mol/L) 调节 pH 至 10.0, 4 °C 搅拌 1 h 后用六层纱布过滤, 滤液在 4000 g 离心 30 min。取上清液用 HCl (1 mol/L) 调节 pH 至 4.6, 4 °C 搅拌 10 min 并静置 1 h 后在 4000 g 离心 30 min 得到蛋白沉淀。加水复溶蛋白后, 用 HCl (0.1 mol/L) 调节蛋白溶液 pH 至 7.0, 真空冷冻干燥后装于密封袋中保藏, 通过凯氏定氮法得到马铃薯蛋白粉中蛋白质量分数为 70%。

1.2.2 马铃薯/乳清复合蛋白溶液的制备

配制蛋白质量浓度分别为 20、25、30、35、40 g/L 的马铃薯蛋白水溶液, 经磁力搅拌 1 h 后, 用 2 mol/L NaOH 调节 pH 至 12.0。将装有样品的烧杯置于同步

双频超声设备中处理。超声条件参考 MAO 等^[13]设定为: 超声频率 40/60 kHz, 超声时间 7.5 min, 超声功率为 240 W, 超声脉冲和间歇时间分别为 10 s 和 2 s。样品超声结束后, 取出, 在 pH=12.0 继续偏移 52.5 min, 偏移结束后用 1 mol/L HCl 将马铃薯蛋白溶液 pH 调至 7.0, 得到改性马铃薯蛋白溶液。

称取一定量乳清蛋白(通过凯氏定氮仪测定蛋白质质量分数为 90.9%)溶于改性马铃薯蛋白溶液中, 使得复合蛋白溶液中乳清蛋白与马铃薯蛋白质量比为 1:1, 总蛋白质量浓度分别为 40、50、60、70、80 g/L, 磁力搅拌 1 h 后, 备用。鉴于乳清蛋白最低成胶质量浓度为 80 g/L^[8-10], 选择 80 g/L 为总蛋白质量浓度上限, 探讨不同总蛋白质量浓度对凝胶性质的影响。蛋白质量浓度下限选择 40 g/L, 是由于总蛋白质量浓度低于 40 g/L 时, 复合蛋白溶液已经不能形成固体凝胶。

1.2.3 复合蛋白凝胶的制备

参考 HE 等^[14]的方法, 称取 5 g 总蛋白质量浓度不同的复合蛋白溶液, 置于 10 mL 烧杯中, 用锡纸封口, 90 °C 水浴加热 30 min, 取出用冰水快速冷却至室温, 并放入 4 °C 冰箱冷藏过夜(20 h), 第 2 d 取出凝胶恢复至室温后使用。得到的凝胶样品用于后续质构、水分分布、分子间作用力、激光共聚焦显微镜以及扫描电子显微镜的测试。

1.3 结构表征与性能测定

1.3.1 复合蛋白溶液粒径和电位的测定

参考 MAO 等^[13]方法用粒度电位仪测量复合蛋白溶液的粒径和电位。参数设置: 温度 25 °C, 平衡时间 1 min; 粒径测定采用可抛弃样品池, 材料折射率为 1.45, 溶剂折射率为 1.33; 电位测定采用 Omega 样品池, 溶剂折射率为 1.33。

1.3.2 流变特性测定

参考 MAO 等^[13]的方法, 采用直径为 40 mm 的平板进行流变性分析, 上样为复合蛋白溶液。流变性分析的工作间距设置为 1 mm。在样品周围添加适量硅油防止样品水分蒸发。温度扫描条件: 设置温度循环过程应变和频率分别为 0.5%和 1 Hz, 以 5 °C/min 速率从 25 °C 升温到 90 °C, 保温 30 min 后以同样速率降温至 25 °C, 在 25 °C 保温 10 min。结束后, 凝胶样品在 25 °C 下进行频率扫描, 频率范围 0.1~10 Hz。频率扫描结束后在温度 25 °C、频率 1 Hz、应变 0.1%~50% 范围进行应变扫描。

1.3.3 凝胶色度测定

参考 HE 等^[14]的方法测定复合凝胶色度。用色差仪在凝胶表面上随机进行测量, 得到亮度 (L^*)、红/绿值 (a^*)、蓝/黄值 (b^*)。每个样品取 3 个不同位置进行分析。

1.3.4 凝胶质构测定

参考王耀松等^[15]的方法并适当修改。实验参数: 选择质地多面剖析法 (TPA) 测定凝胶样品质构, 探头型号为 P/0.5, 测前和测后速度均为 1.0 mm/s, 形变比例为 30%, 触发力为 2 g。

1.3.5 凝胶水分分布测定

参考 XIAO 等^[16]的方法, 用低场核磁 (LF-NMR) 测定凝胶中水分的分布。具体参数参考仪器说明书, 设置如下: 选择 60 mm 探头, 序列名称 QFID, 采样频率 200 kHz, 测量温度 25 °C, 等待时间 (T_w) 为 1500 ms, 射频延时 (RFD) 为 0.002 ms, 数字增益 (DRG1) 为 3, 重复采样次数为 4。将得到的 CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) 指数衰减曲线用仪器自带的 Multi Exp Inv Analysis 软件进行反演。

1.3.6 凝胶中蛋白分子间作用力测定

维持蛋白凝胶分子间的作用力是通过凝胶在不同溶剂中的溶解度来反映的。因为这些溶剂可以分别破坏凝胶中蛋白分子间的疏水相互作用, 如氢键和二硫键, 从而使蛋白分子重新溶解, 溶解度的大小则反映了分子间作用力的大小。参考 JIANG 等^[17]的方法并适当修改。分别取 1 g 捣碎的凝胶样品与 9 mL 3 种不同溶剂 [含 8 mol/L 尿素的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=7.0)、含 5 g/L SDS 的磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH=7.0)、含体积分数 0.25% β -巯基乙醇的磷酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH 7.0)] 混合, 于 80 °C 加热 30 min, 冷却至室温后离心 (5000 g、15 min) 取上清液, 用双缩脲法^[18]测定上清液中蛋白含量 (g/L), 计算蛋白溶解度。

溶解度/%=(溶解的蛋白含量/凝胶中总蛋白含量)×100

1.3.7 激光共聚焦电子显微镜 (CLSM) 测试

将制备好的蛋白凝胶切成 1 cm³ 小块, 置于体积分数 2.5% 的戊二醛/磷酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH=7.0) 中固定 4 h。取出用冷冻切片器将样品切成 50 μ m 厚度的薄片置于载玻片上, 用 Fast Green (10 g/L) 染色后盖上盖玻片, 置于激光共聚焦显微镜观察复合蛋白凝胶的微观结构。Fast Green 的激发波长设定为 633 nm。

1.3.8 SEM 测试

将经过戊二醛固定的凝胶样品用导电胶固定在金属导电台上, 喷金后置于 SEM 台面上, 在 15 kV 的电压下进行微观结构观察。

1.3.9 FTIR 测试

参考 LIU 等^[19]的方法, 利用红外光谱仪收集冷冻干燥凝胶样品的红外谱图。参数设定为: 波数范围 4000~400 cm⁻¹、扫描次数 32 次。数据分析采用 OMNIC 和 Peakfit 软件处理, 根据子峰和各类二级结构位置的对应关系, 计算蛋白各二级结构的百分含量。

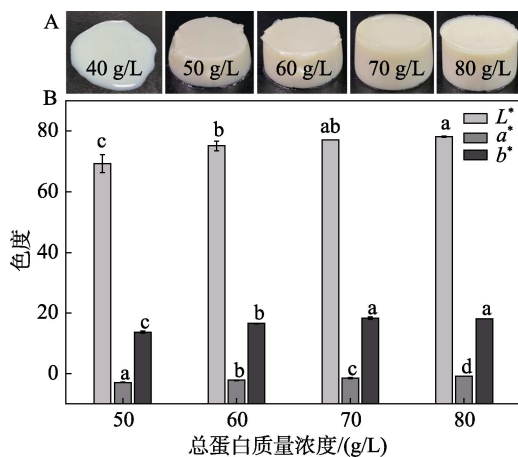
1.4 数据处理

所有实验至少重复测定 3 次, 每次重复在不同时间内进行, 每次重复实验至少设置 3 个平行。数据以平均值 \pm 标准偏差的形式表示。数据绘图采用 Origin 8.0 软件。数据的显著性分析采用 SPSS 24.0 统计分析软件进行。用 Duncan 法检验数据间的差异, 显著差异用 $p < 0.05$ 表示。

2 结果与讨论

2.1 复合蛋白凝胶的色度分析

外观和颜色是影响消费者对凝胶产品接受程度的重要感官特性。不同蛋白质质量浓度的复合蛋白凝胶的外观和色度如图 1 所示。



注: 不含有共同统计字母表示差异显著, $p < 0.05$, 下同

图 1 不同总蛋白质量浓度马铃薯乳清复合蛋白凝胶的外观 (A) 和色度 (B)

Fig. 1 Appearance (A) and chrominance (B) of mixed gels of potato and whey protein with different protein mass concentrations

从图 1A 可以看到, 马铃薯乳清复合蛋白溶液形成不透明的凝胶。这可能是由于凝胶网络结构中的蛋白聚集体较大, 凝胶网络致密, 导致透光性较差^[7]。当蛋白质质量浓度为 40 g/L 时, 复合蛋白溶液形成的是白色半固体凝胶, 蛋白质质量浓度增加到 50 g/L 后, 复合蛋白溶液形成偏黄色固体凝胶, 但是其凝胶强度和弹性较弱, 在重力作用下发生变形后的高度约为蛋白质质量浓度为 80 g/L 的复合蛋白凝胶高度的一半。结果表明, 马铃薯乳清复合蛋白溶液形成固体凝胶的最低质量浓度为 50 g/L。进一步增加蛋白浓度, 复合蛋白凝胶则可以保持较好的外形。当复合蛋白质量浓度为 50 g/L 时, 乳清蛋白用量为 25 g/L, 远低于乳清蛋白 80 g/L 左右的最低成胶质量浓度^[8-10]。复合凝胶最低成胶质量浓度为 50 g/L, 与乳清蛋白最低成胶质量浓度 80 g/L 相比, 乳清蛋白用量减少了 68.8%。

凝胶颜色可通过色度来评价, 结果如图 1B 所

示。当蛋白质质量浓度从 50 g/L 增加到 80 g/L 时, L^* 值、 a^* 值、 b^* 值分别增加了 12.8%、68.7% 和 33.0% ($p < 0.05$)。蛋白质质量浓度的增加使凝胶色度向偏白、偏红、偏黄的方向变化, 这与乳清蛋白凝胶颜色^[19]有较大区别。颜色的变化可能是由于蛋白浓度增加影响了蛋白分子的相互作用, 改变了蛋白分子聚集体的大小与凝胶网络密度, 从而改变了光散射^[7]。

2.2 复合蛋白凝胶的质构特征

为进一步了解复合蛋白凝胶的质构特征, 通过质地多面剖析法 (TPA)^[15,18] 表征了复合蛋白凝胶的硬度、弹性等性质, 如图 2 所示。

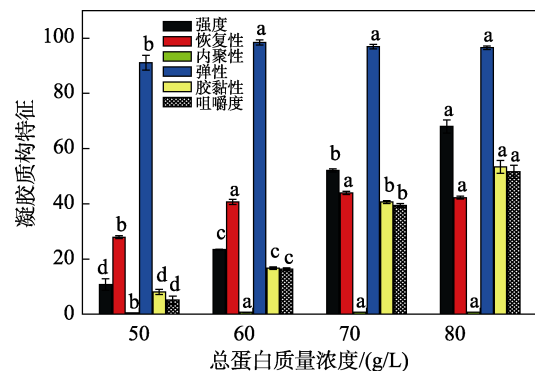


图 2 不同总蛋白质量浓度马铃薯乳清复合蛋白凝胶的质构
Fig. 2 Textural properties of mixed gels of potato and whey protein with different protein mass concentrations

结果表明, 蛋白含量对凝胶的硬度、胶黏性及咀嚼度有显著性影响 ($p < 0.05$)。复合蛋白质量浓度从 50 g/L 增加到 80 g/L 时, 凝胶样品的硬度、胶黏性及咀嚼度分别提高了 5.28、6.60 和 9.04 倍。胶黏性和咀嚼度与硬度高度相关是因为它们与人的咀嚼行为有关^[20]。硬度和弹性与食品的触觉感知特性有关^[21], 是凝胶主要的质地特性。复合蛋白质量浓度为 60~80 g/L 时, 对应凝胶的弹性之间没有显著性差异 ($p > 0.05$)。复合蛋白质量浓度从 50 g/L 增加到 80 g/L 时, 对应凝胶的弹性提高了 5.90%。但它们的弹性要显著高于蛋白质质量浓度为 50 g/L 的复合凝胶的弹性 ($p < 0.05$), 这与凝胶外观的结果一致。蛋白质质量浓度为 50 g/L 的复合凝胶的硬度与文献^[8]中 80 g/L 乳清蛋白凝胶的硬度接近, 但是弹性要弱于后者。

2.3 复合蛋白凝胶中水分分布分析

凝胶持水性是凝胶的主要性质之一。通过氢原子在 LF-NMR 中的弛豫时间分析水分子的流动性可间接反映凝胶网络的持水能力^[13]。LF-NMR 横向弛豫曲线中有 4 个弛豫时间对应不同的特征峰 (T_{2b} 、 T_{21} 、 T_{22} 和 T_{23}), 它们分别表示体系中强结合水、弱结合水、束缚水和自由水^[22]。

不同蛋白质质量浓度的复合蛋白凝胶中水分分布如图 3A 所示。结果表明, 随着蛋白质质量浓度的升高,

特征峰 T_{2b} 、 T_{21} 、 T_{22} 对应的弛豫时间降低, 凝胶中水分子的流动性有降低的趋势。这可能与复合蛋白凝胶中蛋白分子与水分子的作用增强有关。利用面积归一法对不同状态水含量进行定量分析, 结果如图 3B 所示。凝胶中绝大部分的水都是以束缚水的形式存在。这是由于凝胶形成的蛋白网络可以通过物理束缚作用以及网络中蛋白分子的氨基酸侧链与水分子形成的氢键作用将水保留在凝胶中。蛋白质量浓度的增加, 提高了结合水和自由水的含量, 但是降低了束缚水的含量。当蛋白质量浓度从 50 g/L 提高到 80 g/L 时, 结合水的含量从 4.67% 提高到 6.87%, 自由水的含量从 0.021% 提高到 0.297%, 结合水和自由水的含量分别增加了 0.47 倍和 13.14 倍; 束缚水含量从 95.72% 下降到 92.36%, 束缚水含量降低了 3.51%。尽管蛋白质量浓度增加使自由水含量大幅度增加, 但是自由水在所有水中的比例很低, 这表明复合蛋白凝胶在加工过程的蒸煮损失率可能较低。复合蛋白凝胶中较多的束缚水可以为水溶性组分提供载体, 并为产品提供多汁性。

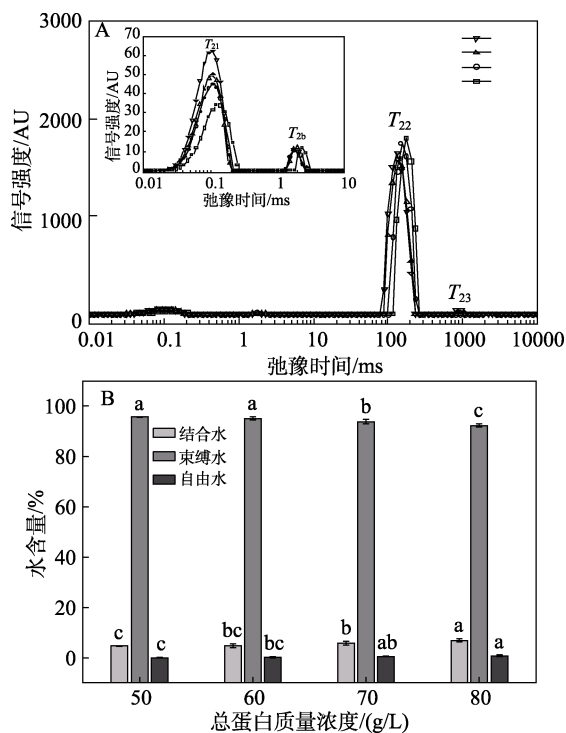


图 3 不同蛋白质量浓度马铃薯乳清复合蛋白凝胶中不同状态水的弛豫时间 (A) 和含量 (B)

Fig. 3 Relaxation time (A) and content (B) of water in different states in potato whey complex protein gel with different protein mass concentrations

以上研究结果表明, 马铃薯蛋白部分替代乳清蛋白开发双蛋白凝胶产品, 可以显著降低乳清蛋白的用量。并且, 马铃薯乳清复合蛋白凝胶在降低乳清蛋白含量的同时还保持一定的质构和持水性, 有较好应用前景。

2.4 复合蛋白溶液的粒径和电位分析

溶液中蛋白质分子的大小和表面电位会影响其

溶解性、乳化性和胶凝性^[23]。不同蛋白质量浓度的马铃薯乳清复合蛋白溶液中蛋白颗粒的平均粒径和 ζ 电位如图 4 所示。复合蛋白溶液中蛋白分子的平均粒径和 ζ 电位随着蛋白质量浓度的增加而增大。当蛋白质量浓度从 40 g/L 提高到 80 g/L 时, 蛋白颗粒的平均粒径和 ζ 电位分别增加了 65.60% 和 17.60% ($p < 0.05$)。蛋白分子粒径增加的原因可能是蛋白质分子浓度的增加使蛋白分子接触的几率增加, 蛋白分子间通过非共价相互作用自发形成了聚集体, 导致蛋白分子的平均粒径增大。蛋白分子平均粒径增大会增加蛋白分子的比表面积, 在凝胶形成过程中可能有利于蛋白分子的聚集, 从而提高凝胶的强度。蛋白分子 ζ 电位的增加表明蛋白分子表面负电荷增多, 这会增强蛋白分子氨基酸侧链与水分子的相互作用, 导致结合水含量增加。蛋白分子 ζ 电位的增加会增大蛋白分子间的静电排斥作用, 有可能降低蛋白分子的稳定性, 间接导致蛋白分子粒径变大。并且, 静电斥力的改变可能会通过调节分子间斥力和引力的平衡影响蛋白分子的聚集, 从而改变凝胶的网络结构。因此, 通过 CLSM 和 SEM 对凝胶的微观结构进行了表征。

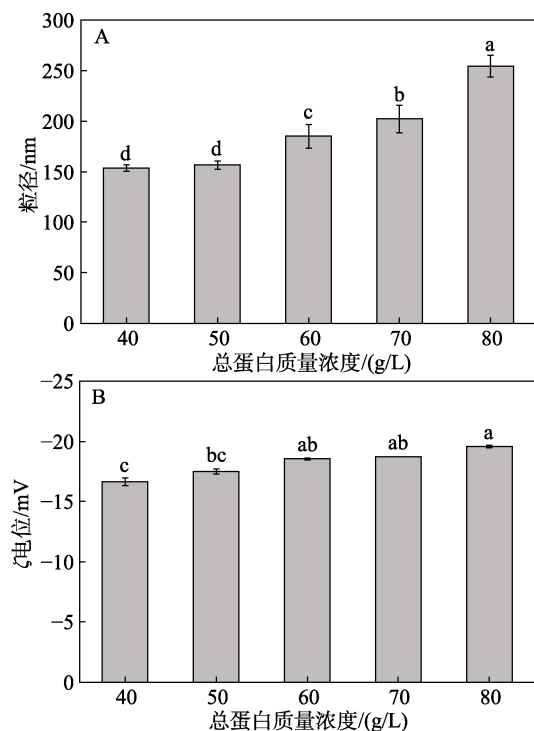


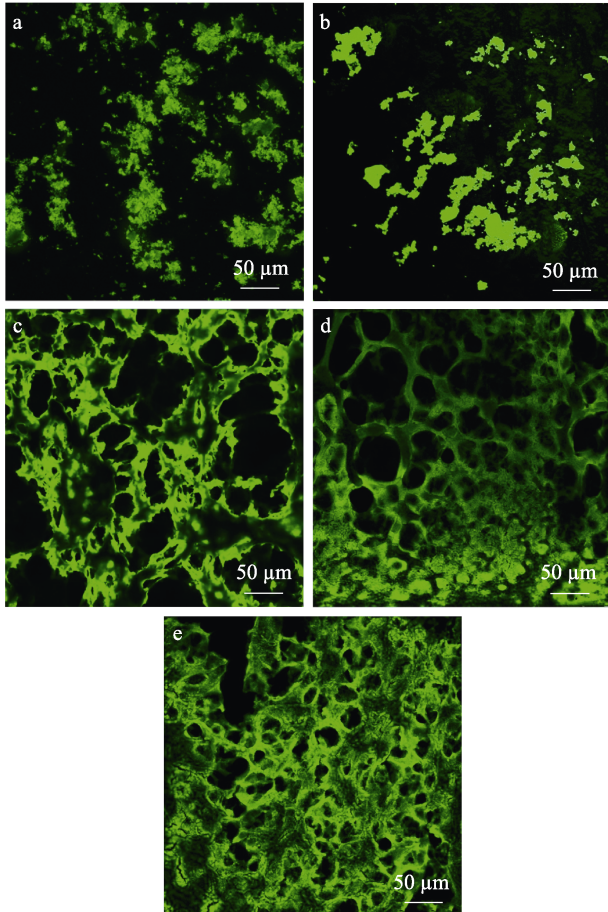
图 4 不同总蛋白质量浓度马铃薯乳清复合蛋白溶液的粒径 (A) 和 ζ 电位 (B)

Fig. 4 Particle size (A) and ζ potential (B) of mixed solution of potato and whey protein with different protein mass concentrations

2.5 复合蛋白凝胶的微观结构分析

食品凝胶的微观结构显著影响其机械性能。微观结构的评价主要包括凝胶的粗糙度、孔隙率和孔隙尺

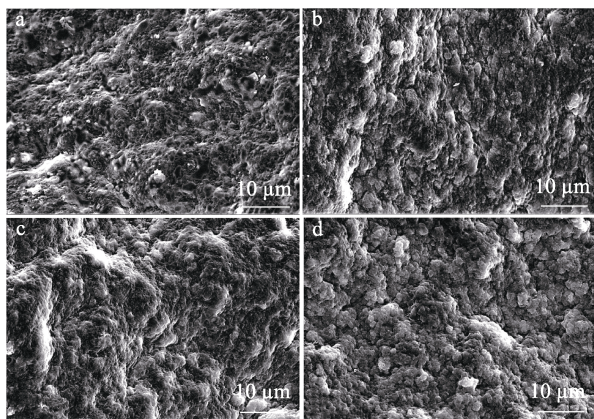
寸^[24]。凝胶微观结构的粗糙度和孔隙率以及凝胶网络的孔隙尺寸与凝胶的机械性（如：储能模量和凝胶强度）呈负相关关系^[25]。不同蛋白质量浓度复合蛋白凝胶的微观结构如图 5 和图 6 所示。



a—40 g/L; b—50 g/L; c—60 g/L; d—70 g/L; e—80 g/L

图 5 不同总蛋白质量浓度马铃薯乳清复合蛋白凝胶的激光共聚焦显微镜图

Fig. 5 Confocal fluorescence microscopy images of mixed gels of potato and whey protein with different protein mass concentrations



a—50 g/L; b—60 g/L; c—70 g/L; d—80 g/L

图 6 不同总蛋白质量浓度马铃薯乳清复合蛋白凝胶 SEM 图

Fig. 6 SEM images of mixed gels of potato and whey protein with different protein mass concentrations

由图 5 可见，蛋白质量浓度为 40 g/L 的复合蛋白溶液经过加热形成了蛋白分子聚集体，但是这些聚集体分布松散，未连接形成凝胶网络结构，证实其未形成固体凝胶，这很好地解释了其外观的特征。当蛋白质量浓度为 50 g/L 时，蛋白聚集体之间连接成松散的凝胶网络结构，尽管这一网络结构支撑复合凝胶形成固体，但是弱的网络在外力作用下易变形，凝胶较软，这与该凝胶样品的外观结果一致。继续提高蛋白质量浓度至 60~80 g/L，复合蛋白凝胶形成清晰的网络骨架，可以较好支撑凝胶的固体结构，验证了凝胶外观的结果。随着蛋白质量浓度从 60 g/L 增加到 80 g/L，凝胶网络的致密程度和均一性提高，孔隙率降低，网络中孔隙尺寸减小，这将使凝胶的凝胶强度和储能模量增加。本文中质构和流变分析的结果也验证了这一点。

由于蛋白质量浓度较低时复合蛋白溶液未形成固体凝胶，通过 SEM 观察了蛋白质量浓度分别为 50、60、70、80 g/L 的复合凝胶的三维网络形貌特征，结果如图 6 所示。与 CLSM 结果类似，蛋白质量浓度为 50 g/L 的复合凝胶的结构粗糙，孔隙较大，凝胶中蛋白分子大聚集体的尺寸较大且分布不均匀；而蛋白质量浓度为 80 g/L 的复合凝胶的结构致密，孔隙率较小，凝胶中蛋白分子大聚集体的尺寸较小且分布均匀，组成大聚集体的小聚集体尺寸均一度高，类球体的形貌特征明显且连接紧密。蛋白聚集体的特征会影响凝胶的强度，尺寸较小且形貌均一的蛋白分子聚集体易于形成均匀、交联程度高的凝胶网络结构，有助于提高凝胶抗变形的能力，凝胶具有较高的强度。然而，较大的聚集体会形成交联度低的凝胶网络结构^[26]，凝胶抵抗外力的能力较弱，凝胶中的相邻大聚集体容易在外力作用下发生相对滑动而破坏网络结构，表现出较低的凝胶强度。

2.6 复合蛋白凝胶流变特性分析

马铃薯乳清复合蛋白溶液形成凝胶过程中储能模量 (G') 和损耗模量 (G'') 变化如图 7A 所示，黏弹比（也称损耗因子， $\tan\delta=G''/G'$ ）的变化如图 7B 所示。

由图 7 可见，在升温过程中，由于温度升高减弱了蛋白分子间的氢键作用，蛋白开始变性展开，蛋白分子在剪切作用下取向有序化，流动阻力降低。复合蛋白溶液在加热的初期，模量随着温度的升高而降低。随着温度的进一步增加，蛋白发生较大程度的变性，导致结构展开，暴露出埋在蛋白内的疏水性基团和游离巯基，蛋白表面疏水性基团之间形成的疏水相互作用以及游离巯基之间形成的二硫键使蛋白分子发生聚集，复合蛋白溶液开始凝胶化，使体系的模量快速增加。此时， G' 超过 G'' ， $\tan\delta$ 小于 1 并快速下降。进入加热后期和高温保温阶段，温度的升高增强了蛋白

分子间的疏水相互作用, 蛋白分子的聚集程度增加, 形成小聚集体, 导致凝胶体系的模量继续增加。随着疏水基团的减少和蛋白分子聚集后形成的空间位阻作用, 蛋白分子间聚集的速率逐渐减小, 凝胶模量增加的速率减缓。进入降温阶段, 由于蛋白分子结构中的 O、N 与 H 的作用增强, 大聚集体形成速率增加, 导致凝胶体系模量和氢键的含量较高, 温度的降低促进了小聚集体中蛋白分子间氢键的形成, 使蛋白的小聚集体形成大聚集体, 蛋白分子间氢键的作用随着温度的降低不断快速上升^[8,27]。同时, 温度的降低使分子热运动程度减小, 大聚集体的形成增加了分子纠缠的程度, 凝胶在被剪切过程中 G'' 的变化率高于 G' 的变化率, 导致损耗因子 $\tan\delta$ 增加。降温结束进入低温的保温阶段, 大聚集体中蛋白分子间的相互作用进入动态平衡, 大聚集体形成相对稳定的结构, 因而凝胶的模量几乎不发生变化。随着复合蛋白质量浓度的增加, G' 逐渐升高; 当复合蛋白质量浓度从 40 g/L 增加到 80 g/L 时, 复合蛋白凝胶的 G' 和 G'' 分别增加了约 6.2 和 6.8 倍, 凝胶的抗变形能力得到很大提高。不同蛋白质量浓度复合蛋白凝胶的硬度与其 G' 呈现正相关的关系。

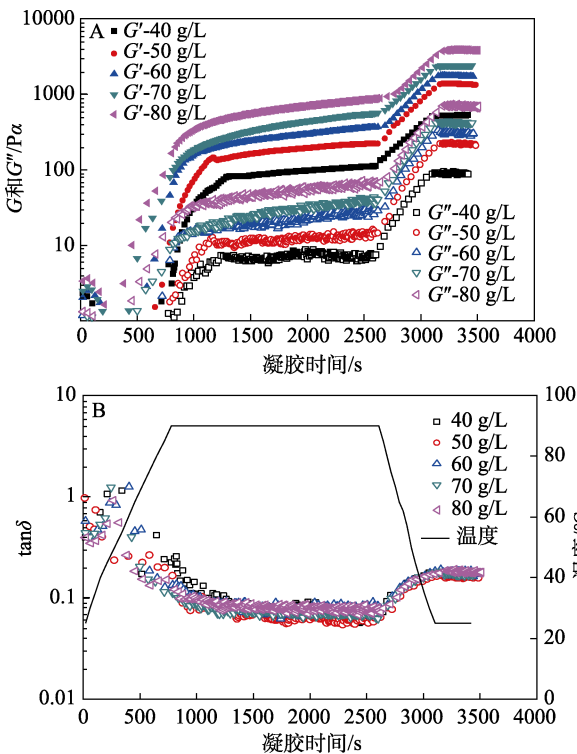


图 7 不同总蛋白质量浓度马铃薯乳清复合蛋白凝胶在成胶过程中储能和损耗模量 (A) 以及黏弹比 $\tan\delta$ (B) 的变化

Fig. 7 Storage/loss modulus (A) and $\tan\delta$ (B) during formation of mixed gels of potato and whey protein with different protein mass concentrations

频率扫描可以描述时间对凝胶性质的影响。对于完全弹性体, G' 的变化与频率无关^[28-29]。不同蛋白质

量浓度的复合蛋白凝胶在不同频率下 G' 和 G'' 的变化如图 8A 所示。

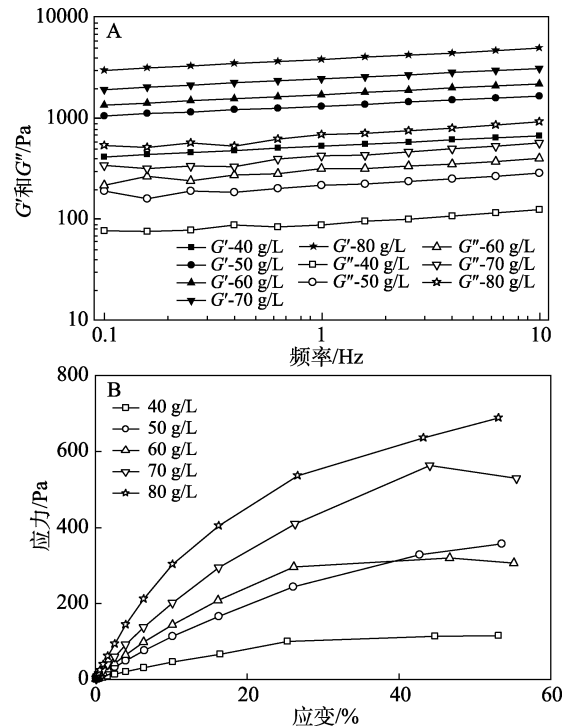


图 8 不同总蛋白质量浓度马铃薯乳清复合蛋白凝胶频率扫描 (A) 和应变扫描 (B)

Fig. 8 Frequency sweep (A) and strain sweep (B) of mixed gels of potato and whey protein with different protein mass concentrations

图 8A 结果表明, 不同蛋白质量浓度复合蛋白凝胶的 G' 都高于对应的 G'' , 不同蛋白质量浓度复合蛋白溶液都形成了半固体或是固体凝胶。不同蛋白质量浓度复合蛋白凝胶的模量随着频率的升高有很小幅度的增加, 表明凝胶的 G' 对频率的依赖性较弱, 凝胶形成稳定结构, 特征接近弹性体。

由于变温扫描和频率扫描实验都在线性黏弹区进行测试, 并未破坏凝胶结构, 无法体现应变对凝胶结构破坏的影响, 不能很好地指导食品的加工。因此, 通过大变形测量进一步表征了外力对复合蛋白凝胶结构破坏的影响^[30], 结果如图 8B 所示。凝胶的剪切应力随着应变的增加而增加, 当剪切应力超过维持凝胶结构的作用力时, 凝胶结构被破坏, 曲线上出现剪切应力的峰值, 峰值的大小可以反映凝胶的脆性^[9]。蛋白质量浓度为 60 和 70 g/L 的复合蛋白凝胶发生断裂时的应变低于蛋白质量浓度为 80 g/L 的复合蛋白凝胶。在应变达到 50% 时, 蛋白质量浓度为 80 g/L 的复合蛋白凝胶仍没达到断裂点, 说明蛋白质量浓度为 80 g/L 的复合蛋白凝胶强度最佳。

2.7 复合蛋白凝胶分子间作用力分析

蛋白凝胶三维网络结构的形成主要是由于蛋白分子依靠不同作用力形成稳定的聚集体。静电相互作用

用、氢键、疏水相互作用和二硫键是凝胶体系中蛋白质分子交联的主要作用力^[31]。尿素、SDS 和 β -巯基乙醇可用于打断蛋白分子间的氢键、疏水相互作用以及二硫键^[14]，因而，可以通过蛋白凝胶在这 3 种溶剂中的溶解度间接反映维持凝胶结构的作用力。不同蛋白质质量浓度复合蛋白凝胶在不同溶剂中的溶解度如图 9 所示。

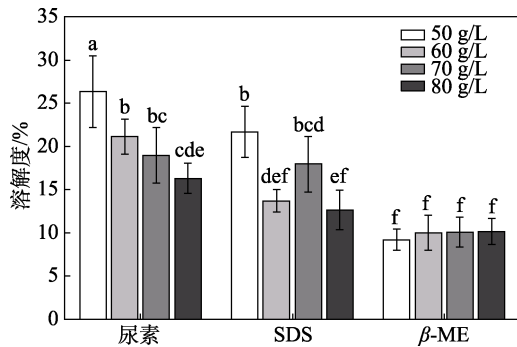


图 9 不同总蛋白质质量浓度马铃薯乳清复合蛋白凝胶在不同溶剂中的溶解度
Fig. 9 Solubility of mixed gels of potato and whey protein with different protein mass concentration in different solvents

结果表明，氢键、疏水相互作用和二硫键对维持凝胶结构的作用力都有一定贡献。这与前人报道^[7]的疏水相互作用是马铃薯乳清复合蛋白凝胶中主要作用力的研究结果不同。这可能是由于本研究中使用的马铃薯蛋白与前人不同。本研究的马铃薯蛋白经过 pH 偏移改性，蛋白结构发生了变化，与前人使用的商业马铃薯蛋白结构不同。蛋白质质量浓度的增加会降低凝胶在尿素和 SDS 中的溶解度，表明增加蛋白浓度会减少蛋白分子间的氢键和疏水相互作用。其原因可能是蛋白浓度增加，使 pH 偏移处理产生的马铃薯蛋白共价聚集体的含量增加，在成胶过程形成了不溶的大聚集体。而蛋白浓度对凝胶在 β -巯基乙醇中的溶解度没有显著影响 ($p > 0.05$)，表明蛋白浓度的改变对维持凝胶结构的二硫键并没有影响。其原因可能是马铃薯蛋白中主要蛋白 Patatin 不包含二硫键且巯基含量较低，复合蛋白凝胶中二硫键存在于乳清蛋白分子中主要蛋白 β -乳球蛋白的聚集体中，复合凝胶中蛋白比例不变，蛋白浓度的增加并不会增加二硫键的相对含量。

2.8 总蛋白质质量浓度对复合凝胶中蛋白二级结构的影响

通过 FTIR 分析得到的复合蛋白凝胶中蛋白二级结构的含量，结果如图 10 所示。

由图 10 可见，复合蛋白凝胶中蛋白的 β -折叠和 β -转角含量较高，这两种结构在蛋白二级结构中约占 70%，而蛋白聚集体中这两种结构含量较高则可能使凝胶具有较好的刚性^[27-28]，使复合蛋白凝胶在较低浓度保持了一定质构。

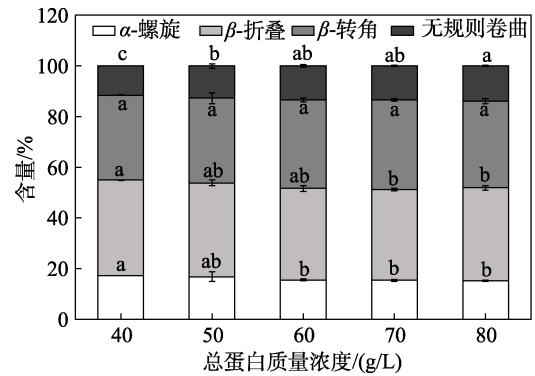


图 10 不同总蛋白质质量浓度马铃薯乳清复合蛋白凝胶中蛋白的二级结构
Fig. 10 Secondary structure of protein in mixed gels of potato and whey protein with different protein mass concentrations

当总蛋白质质量浓度从 40 g/L 增加到 60 g/L 时， α -螺旋结构含量降低了 9.5% ($p < 0.05$)；总蛋白质质量浓度从 40 g/L 增加到 70 g/L 时， β -折叠结构含量降低了 4.8% ($p < 0.05$)；蛋白质质量浓度的变化对 β -转角结构含量没有显著影响 ($p > 0.05$)；总蛋白质质量浓度从 40 g/L 增加到 50 g/L 时，无规则卷曲结构含量增加了 8.6% ($p < 0.05$)；总蛋白质质量浓度从 50 g/L 增加到 80 g/L 时，无规则卷曲结构含量增加了 10.2% ($p < 0.05$)，但是其他二级结构则无显著差异 ($p > 0.05$)。这些结果表明，蛋白质质量浓度对复合蛋白凝胶二级结构影响较小，可能维持凝胶结构的分子间作用力对凝胶性质影响较大。

3 结论

探讨了不同蛋白质质量浓度马铃薯乳清复合蛋白凝胶的质构、水分分布、微观结构、流变特征、凝胶结构作用力以及凝胶中蛋白二级结构。主要结论如下：

- (1) 马铃薯蛋白部分替代乳清蛋白形成复合蛋白凝胶可以显著减少乳清蛋白的用量，并使复合凝胶保持一定的质构和持水性。
- (2) 马铃薯乳清复合蛋白凝胶的最低成胶质量浓度为 50 g/L，低于乳清蛋白凝胶的最低成胶质量浓度。蛋白质质量浓度显著影响复合蛋白凝胶的凝胶强度、胶黏性、咀嚼度和束缚水含量，但是对凝胶的弹性、恢复性、内聚性影响较小。
- (3) 蛋白质质量浓度 80 g/L 的复合凝胶具有较好凝胶强度，与其形成致密的网络结构、网络结构孔隙尺寸小以及网络骨架中蛋白分子大聚集体的尺寸较小且分布均匀有关。
- (4) 氢键、疏水相互作用和二硫键对维持复合蛋白凝胶结构的作用力都有一定贡献。不同蛋白质质量浓度通过调控凝胶中蛋白分子间的氢键、疏水相互作用和二硫键影响凝胶性质。

总之, 马铃薯蛋白可替代 50% 的乳清蛋白, 并显著影响马铃薯乳清复合蛋白凝胶的微观结构和凝胶性质, 这为马铃薯乳清复合蛋白凝胶的开发提供了依据和理论基础。

参考文献:

- [1] WU C, WANG T, REN C, *et al.* Advancement of food-derived mixed protein systems: Interactions, aggregations, and functional properties[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020, 20(1): 627-651.
- [2] ZHANG X Y, ZHANG S, ZHONG M 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.
- [3] XIA W J, ZHU L F, DELAHAJJE R J B M, *et al.* Acid-induced gels from soy and whey protein thermally-induced mixed aggregates: Rheology and microstructure[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 125: 107376.
- [4] LIN D Q, KELLY A L, MAIDANNYK V, *et al.* Effect of structuring emulsion gels by whey or soy protein isolate on the structure, mechanical properties, and *in-vitro* digestion of alginate-based emulsion gel beads[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 110: 106165.
- [5] CHEN D, KUZMENKO I, ILAVSKY J, *et al.* Structural evolution during gelation of pea and whey proteins envisaged by time-resolved ultra-small-angle X-ray scattering (USAXS)[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 126: 107449.
- [6] KORNET R, PENRIS S, VENEMA P, *et al.* How pea fractions with different protein composition and purity can substitute WPI in heat-set gels[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 120: 106891.
- [7] ANDLINGER D J, RAMPP L, TANGER C, *et al.* Viscoelasticity and protein interactions of hybrid gels produced from potato and whey protein isolates[J]. *ACS Food Science and Technology*, 2021, 1(7): 1304-1315.
- [8] MAO C, WU J, CHENG Y, *et al.* Physicochemical properties and digestive kinetics of whey protein gels filled with potato and whey protein mixture emulsified oil droplets: Effect of protein ratios[J]. *Food & Function*, 2021, 12(13): 5927-5939.
- [9] DICKINSON E. Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets[J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 28(1): 224-241.
- [10] BOYE J I, ALLI I, ISMAIL A A, *et al.* Factors affecting molecular characteristics of whey protein gelation[J]. *International Dairy Journal*, 1995, 5(4): 337-353.
- [11] CUI X H (崔旭海), KONG B H (孔保华). Influence of environmental conditions on whey protein gels properties and gels microstructure[J]. *Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学)*, 2008, 41(3): 800-807.
- [12] WANG S N (王思念), ZHANG H W (张昊伟), WU J (伍娟). Study on the properties and microstructure of potato whey composite protein gel assisted by ultrasound[C]//Abstracts of the 18th Annual Meeting of CIFST (中国食品科学技术学会第十八届年会摘要集), 2022: 228-229.
- [13] MAO C, WU J, ZHANG X Z, *et al.* Improving the solubility and digestibility of potato protein with an online ultrasound-assisted pH shifting treatment at medium temperature[J]. *Foods*, 2020, 9(12): 1908.
- [14] HE Z D, MA T Y, ZHANG W W, *et al.* Heat-induced gel formation by whey protein isolate-*Lycium barbarum* polysaccharides at varying pHs[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 115: 106607.
- [15] WANG Y S (王耀松), MA T Y (马天怡), HU R R (胡荣蓉), *et al.* L-Histidine modifies the structure and heat-induced gel properties of whey protein [J]. *Food Science (食品科学)*, 2021, 42(6): 16-23.
- [16] XIAO Y Q, LI J M, LIU Y N, *et al.* Gel properties and formation mechanism of soy protein isolate gels improved by wheat bran cellulose[J]. *Food Chemistry*, 2020, 324: 126876.
- [17] JIANG J, XIONG Y L. Extreme pH treatments enhance the structure-reinforcement role of soy protein isolate and its emulsions in pork myofibrillar protein gels in the presence of microbial transglutaminase[J]. *Meat Science*, 2013, 93(3): 469-476.
- [18] WANG Y S (王耀松), ZHANG W W (张唯唯), MA T Y (马天怡), *et al.* Functional properties of basic amino acids modified whey protein-based gels[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2020, 37(9): 1883-1889.
- [19] LIU K, LI Q M, ZHA X Q, *et al.* Effects of calcium or sodium ions on the properties of whey protein isolate-lotus root amylopectin composite gel[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 87: 629-636.
- [20] SUEBSAEN K, SUKSATIT B, KANHA N, *et al.* Instrumental characterization of banana dessert gels for the elderly with dysphagia[J]. *Food Bioscience*, 2019, 32: 100477.
- [21] ZHANG M Q, YANG Y J, ACEVEDO N C. Effects of pre-heating soybean protein isolate and transglutaminase treatments on the properties of egg-soybean protein isolate composite gels[J]. *Food Chemistry*, 2020, 318: 126421.
- [22] TAN M Q, LIN Z Y, ZU Y X, *et al.* Effect of multiple freeze-thaw cycles on the quality of instant sea cucumber: Emphatically on water status of by LF-NMR and MRI[J]. *Food Research International*, 2018, 109: 65-71.
- [23] PEZESHK S, REZAEI M, HOSSEINI H, *et al.* Impact of pH-shift processing combined with ultrasonication on structural and functional properties of proteins isolated from rainbow trout by-products[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 118: 106768.
- [24] ZHOU L, YANG Y L, WANG J Y, *et al.* Effects of low fat addition on chicken myofibrillar protein gelation properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 90: 126-131.
- [25] CHENG Y, OFIRI D P, YEBOAH G B, *et al.* Modulating the *in vitro* digestion of heat-set whey protein emulsion gels *via* gelling properties modification with sequential ultrasound pretreatment[J]. *LWT*, 2021, 149: 111856.
- [26] RODRIGUES R M, FASOLIN L H, AVELAR Z, *et al.* Effects of moderate electric fields on cold-set gelation of whey proteins-From molecular interactions to functional properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105505.
- [27] MA T Y (马天怡), ZHANG W W (张唯唯), HE Z D (何振东), *et al.* Recent advances in basic amino acids modifying functionalities of food proteins[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(2): 294-305.
- [28] MORENO H M, DOMINGUEZ-TIMON F, DIAZ M T, *et al.* Evaluation of gels made with different commercial pea protein isolate: Rheological, structural and functional properties[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 99: 105375.
- [29] BORDERIAS A J, TOVAR C A, DOMINGUEZ-TIMON F, *et al.* Characterization of healthier mixed surimi gels obtained through partial substitution of myofibrillar proteins by pea protein isolates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 107: 105976.
- [30] NTONE E, KORNET R, VENEMA P, *et al.* Napins and cruciferins in rapeseed protein extracts have complementary roles in structuring emulsion-filled gels[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 125: 107400.
- [31] NIU H L, XIA X F, LIU Q, *et al.* Thermal stability and gel quality of myofibrillar protein as affected by soy protein isolates subjected to an acidic pH and mild heating[J]. *Food Chemistry*, 2018, 242: 188-195.