

# CaCl<sub>2</sub> 调节银杏果分离蛋白/果胶复合凝胶质构特性

何振东, 尤洁瑜, 张露妍, 张 薇, 王耀松\*

(南京林业大学 轻工与食品学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 将 CaCl<sub>2</sub> 加入质量浓度为 120 g/L 银杏果分离蛋白 (GSPI) 水溶液及质量浓度为 5 g/L 果胶 (酯化度分别为 38% 和 76%) 水溶液中, 使 Ca<sup>2+</sup> 最终质量浓度分别为 0.05、0.11 和 0.22 g/L, 基于此溶胶制备热诱导 GSPI/果胶复合凝胶。采用粒径和 ζ-电位法、流变学及质构学、SDS-PAGE、FTIR 和 SEM 测试了溶胶的物化性质、成胶过程及复合凝胶的功能性和微观结构, 探讨了 Ca<sup>2+</sup> 对蛋白/果胶复合凝胶性能的影响及其潜在的机制。结果表明, 添加 Ca<sup>2+</sup> 降低溶胶粒径, 但不改变其带电量; 降低溶胶流变学特性, 破坏复合凝胶形成; 进而弱化凝胶质构特性, 但对其持水性无显著影响。Ca<sup>2+</sup> 破坏蛋白与果胶间的作用, 竞争性地与果胶结合。随着 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度的增加, 以上效应表现更显著。相比之下, 高酯化度果胶比低酯化度果胶对 Ca<sup>2+</sup> 更为敏感。

**关键词:** 银杏果分离蛋白; 果胶; CaCl<sub>2</sub>; 质构; 食品化学品

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1003-5214 (2023) 09-2034-08

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



## Calcium chloride regulating the texture of *Ginkgo biloba* seed protein isolate/pectin composite gels

HE Zhendong, YOU Jieyu, ZHANG Luyan, ZHANG Wei, WANG Yaosong\*

(College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

**Abstract:** CaCl<sub>2</sub> was added into the composite solutions of *Ginkgo biloba* seed protein isolate (GSPI) with a mass concentration of 120 g/L and pectin (esterification degree of 38% and 76%, respectively) with a mass concentration of 5 g/L to make solutions with the final Ca<sup>2+</sup> mass concentration of 0.05, 0.11 and 0.22 g/L. The solutions obtained were then heated to develop GSPI/pectin composite gels. Physicochemical properties of gel-forming solutions, gelling process of the solutions, functionality and microstructures of the composite gels were analyzed by particle size and ζ-potential method, rheology, texture profile analysis, SDS-PAGE, FTIR and SEM. The effect of Ca<sup>2+</sup> on the properties of protein/pectin composite gels and the underlying mechanisms were further investigated. The results indicated that the addition of Ca<sup>2+</sup> reduced the particle size of GSPI/pectin but showed no influence on their electric charge, degraded the rheological properties of the heat-induced gels, and impaired the formation of fine structure of the gels. As a result, the gels' textural properties were compromised, but their water holding capacity was not affected significantly. Ca<sup>2+</sup> disrupted the balance of GSPI/pectin assembly because they bound competitively to pectin and obstructed the interaction between GSPI with pectin. The increase of Ca<sup>2+</sup> mass concentrations resulted in a more pronounced effect. In contrast, pectins with high esterification degree were more sensitive to Ca<sup>2+</sup> than pectins with low esterification degree.

**Key words:** *Ginkgo biloba* seed protein isolate; pectin; CaCl<sub>2</sub>; texture; food chemicals

银杏在中国种植广泛, 利用其果实、叶的历史悠久, 它们具有众多的食用和医药价值<sup>[1]</sup>。银杏果

中蛋白组分食用价值较为显著, 其含量为 10%~20%, 是一种球蛋白, 因其氨基酸组成及比例合理,

收稿日期: 2022-12-09; 定用日期: 2023-02-25; DOI: 10.13550/j.jxhg.20221136

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31401530); 白马未来食品研究院揭榜挂帅项目 (JBGS-2021-02)

作者简介: 何振东 (1997—), 男, 硕士生。联系人: 王耀松 (1981—), 男, 博士, 副教授, E-mail: yaosongwang@njfu.edu.cn。

是一种较为优质的食品蛋白质, 具有显著的食品开发利用价值<sup>[2-4]</sup>。蛋白资源产量也是其利用的重要因素。目前, 中国银杏果年产量已达 60000 t<sup>[5]</sup>, 对植物源性可食性蛋白资源的挖掘, 以减少对动物源性蛋白的依赖, 也契合“碳达峰、碳中和”战略目标, 对农业与食品可持续性发展有所贡献<sup>[6]</sup>。

凝胶是植物蛋白一个重要的应用方向。在制备热诱导的聚集凝胶过程中, 蛋白质分子在加热时发生变性而不同程度地展开, 促进蛋白质与蛋白质、蛋白质与溶剂间形成一定的相互作用, 部分展开的分子链间相互纠缠, 从而使蛋白质发生聚集, 形成较大分子的凝胶体<sup>[7]</sup>。在上述蛋白热凝胶体系中,  $\text{Ca}^{2+}$ 是影响蛋白质凝胶化的一个重要因素<sup>[8]</sup>。

作为代表性盐类物质, 氯化钙 ( $\text{CaCl}_2$ ) 是食品工业中常用的一种重要的钙强化剂<sup>[9-10]</sup>; 同时  $\text{Ca}^{2+}$ 作为一种良好的交联剂, 常被用于稳定食品凝胶基质, 促进各种胶凝环境下的凝胶形成<sup>[11]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ 诱导的蛋白作用包括: 静电屏蔽、离子特异性的疏水相互作用和通过蛋白- $\text{Ca}^{2+}$ -蛋白桥使相邻阴离子基团交联<sup>[12]</sup>。藜麦分离蛋白的热诱导凝胶行为会受到离子类型和浓度的调节<sup>[13]</sup>,  $\text{CaCl}_2$  也会增强豆类蛋白的凝胶性能<sup>[14]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ 除对成胶蛋白的分子行为及凝胶性能产生影响外, 还可能对果胶凝胶性产生影响, 进而改变蛋白-果胶复合凝胶的性能。 $\text{Ca}^{2+}$ 通过离子键影响高酯化度果胶多糖链间相互作用, 而形成“蛋盒”结构影响低酯化度果胶多糖链间相互作用<sup>[15]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$ 可诱导低酯化度果胶的交联<sup>[16]</sup>及果胶二聚物的形成<sup>[17]</sup>; 在多糖/离子竞争性实验中也发现,  $\text{Ca}^{2+}$ 可调节低酯化度果胶成胶性<sup>[18]</sup>。在高酯化度果胶中,  $\text{Ca}^{2+}$ 亦能促进糖链间的交联<sup>[19-20]</sup>和缔合<sup>[21]</sup>。在米蛋白/甜菜果胶复合凝胶中, 加入  $\text{Ca}^{2+}$ 则形成致密且均匀的结构, 明显提高复合凝胶的流变学性能、质构特性及持水性<sup>[22]</sup>。可见, 在蛋白-果胶复合凝胶体系中,  $\text{Ca}^{2+}$ 对成胶各组分均有潜在的影响, 从而影响着蛋白/果胶复合凝胶的性能。

在前期研究中发现, 银杏果分离蛋白 (GSPI) 具有凝胶性能<sup>[23]</sup>, 但相比其他蛋白, 其凝胶性需要提升, 为此, 在蛋白中加入不同酯化度的果胶, 有望实现凝胶性能的提升。在食品消费中, 特殊人群对凝胶的质构和营养性 (比如: 膳食纤维) 有特别的需要, 因此, 蛋白/果胶复合凝胶是良好的候选者, 能够实现对质地和营养的双向要求。基于  $\text{Ca}^{2+}$ 对成胶蛋白、果胶均有潜在在流变学性能的影响, 通过在 GSPI、不同酯化度果胶混合体系中加入  $\text{Ca}^{2+}$ 来调节复合凝胶的功能性, 实现对凝胶功能性的调控, 以评估  $\text{Ca}^{2+}$ 对蛋白/多糖二元体系的影响, 也为食品质构多样性提供一种技术策略和理论基础。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

新鲜银杏果 (即白果, 邳州大佛指)、不同酯化度 (DE, 分别为 38%和 76%) 的果胶, 杨山海升果胶有限责任公司;  $\text{HCl}$ 、 $\text{NaOH}$ 、无水  $\text{CaCl}_2$ 、酒石酸钾钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸铜和牛血清蛋白等试剂, 国药集团化学试剂有限公司; 丙烯酰胺、 $N,N'$ -甲叉双丙烯酰胺、甘油、过硫酸铵、四甲基乙二胺、溴酚蓝、 $N$ -乙基顺丁烯二酰亚胺 (NEM)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris-HCl)、 $\beta$ -巯基乙醇 ( $\beta$ -ME) 等, Sigma-Aldrich 公司, 以上所有试剂均为分析纯; 实验用水均为去离子水。

FE28 型 pH 计, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; Avanti JXN-26 型高速冷冻离心机, 贝克曼库尔特国际贸易 (上海) 有限公司; P4 PC 型紫外-可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; SCIENTZ-18N 型冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; Zetasizer Nano ZS-90 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 英国 Malvern 仪器有限公司; DHR-1 型流变仪, 美国 TA 仪器公司; Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra 型蛋白电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; TA.XT Plus 型物性测试仪, 英国 Stable Micro Systems 公司; VERTEX 80V 型傅里叶变换红外光谱仪, 德国 Bruker 公司; Quanta 200 型环境扫描电子显微镜, 荷兰 FEI 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 GSPI 的制备

参考 ZHANG 等<sup>[24]</sup>方法略作修改。将新鲜银杏果手工去壳、去外种皮, 在 40 °C 的烘箱中干燥 50 h 后, 研磨成粉过 80 目筛, 用正己烷脱脂 3 次, 室温下自然干燥后得到脱脂银杏果粉。将 1 kg 脱脂银杏果粉按料液比 (kg : L) 1 : 10 分散在去离子水中, 用 1 mol/L  $\text{NaOH}$  调节 pH 至 10.0; 室温下搅拌 2 h, 然后在 5000 g、4 °C 下离心 15 min, 收集上清液; 用 1 mol/L  $\text{HCl}$  调节 pH 至 4.4, 并在相同条件下离心, 收集沉淀。再将沉淀物以质量比 1 : 1 分散在去离子水中, 并用 1 mol/L  $\text{NaOH}$  调节 pH 至 7.0, 在 -40 °C 真空冷冻干燥后, 得到 GSPI 粉, 储存在 4 °C 冰箱中, 备用。

#### 1.2.2 成胶溶液及热诱导凝胶的制备

成胶溶液的配制: 将 12.0 g GSPI 粉加入装有 50 mL 去离子水的烧杯中, 磁力搅拌下使其完全溶解, 置于 4 °C 冰箱中保存过夜, 得到质量浓度为 240 g/L 的 GSPI 储备液。将 0.5 g 果胶 (DE 分别为 38%和 76%) 加入装有 50 mL 蒸馏水的烧杯中, 室温下磁力搅拌 6 h, 完全溶解后置于 4 °C 冰箱中保存过夜, 得到质量浓度为 10 g/L 的果胶储备液。将果胶储备

液与 GSPI 储备液按体积比 1 : 1 混合, 得到 GSPI/果胶混合液, 其中 GSPI 质量浓度为 120 g/L, 果胶质量浓度为 5 g/L。将不同质量  $\text{CaCl}_2$  粉末加入 GSPI/果胶混合液中, 使  $\text{Ca}^{2+}$  最终质量浓度分别为 0.05、0.11 和 0.22 g/L, 并用 1 mol/L HCl 调节混合液的 pH 至 6.0, 得到成胶溶液 (即 GSPI/果胶溶胶), 分别记为 GSPI/DE-38% 和 GSPI/DE-76%。

**GSPI/果胶复合凝胶的制备:** 将 6 mL 成胶溶液用保鲜膜密封在小烧杯中, 室温下磁力搅拌 1 h, 然后在恒温水浴锅中升温到 90 °C, 加热 30 min。将加热后的溶液冷却至室温, 并在 4 °C 下储存过夜, 得到固体复合凝胶。

### 1.2.3 溶胶粒径与 $\zeta$ -电位测定

参考马天怡等<sup>[25]</sup>方法作适当修改, 用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定溶胶的粒度大小和  $\zeta$ -电位。测试前, 用 20 mmol/L 的磷酸盐缓冲盐 (pH=6.0) 将溶胶中蛋白质量浓度稀释至 2 g/L, 以避免浓度过高而导致多重散射效应。

### 1.2.4 溶胶流变学特性测定

参照 HE 等<sup>[23]</sup>的方法, 用流变仪测试溶胶的流变性能。在间距 40 mm 两平行板之间放置约 1.0 mL 溶胶, 间隙的高度设置为 1 mm。开始测量前, 样品在测量温度 (25 °C) 下平衡 1 min。样品外缘涂有少量硅油, 以防止水分蒸发。在样品的线性黏弹性区域选定应变为 1.0%、频率为 1.0 Hz, 先将样品从 25 °C 加热至 90 °C (5 °C/min), 并在 90 °C 保温 10 min, 再以相同的控温速率从 90 °C 降至 25 °C。记录储存模量 ( $G'$ )、损耗模量 ( $G''$ ) 随温度的变化。

### 1.2.5 复合凝胶质构测定

参考 WANG 等<sup>[26]</sup>方法, 采用物性测试仪两次下压的模式测定凝胶的质构特性。选用 P/0.5 圆柱型探头进行质构特性实验。测试前, 将凝胶从冰箱中取出并在室温下平衡 2 h。探头测试前、中、后的速率分别设置为 1.0、2.0 和 5.0 mm/s; 下压距离 7.0 mm, 触发力 5.0 g。凝胶质地以凝胶的硬度、弹性、黏聚性、胶黏性、咀嚼性和回复性为指标。

### 1.2.6 复合凝胶持水性测定

参考 WANG 等<sup>[27]</sup>方法, 取适量 (1.0 g) 凝胶置于含滤纸的离心管中, 室温下 3000 g 离心 20 min, 称取离心后凝胶的质量。持水性 (WHC) 按下式计算:

$$\text{WHC} / \% = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100$$

式中:  $m_1$  为凝胶、离心管和滤纸的质量, g;  $m_0$  为离心管与滤纸的质量, g;  $m_2$  为离心后的离心管和滤纸的质量, g。

### 1.2.7 复合凝胶蛋白浸出率测定

参照 HE 等<sup>[23]</sup>的方法对凝胶浸出性进行评价。室温下, 将 2.0 g GSPI/果胶复合凝胶浸没在 10.0 mL

柠檬酸盐缓冲液 (50 mmol/L, pH 3.0) 中 2 h 后, 将复合凝胶在室温下 3000 g 离心 10 min。用双缩脲法<sup>[28]</sup>测定 GSPI/果胶复合凝胶溶出上清液中的蛋白含量。蛋白浸出率 (%) 为溶出的蛋白质量占凝胶中总蛋白质量的百分比。对浸出的蛋白组分进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析。

### 1.2.8 复合凝胶浸出蛋白组分的 SDS-PAGE 实验

将 1.2.7 节离心后的浸出液用去离子水稀释 10 倍后, 参照 LAEMMLI<sup>[29]</sup>的方法进行 SDS-PAGE 测试。将 GSPI/果胶复合凝胶与等体积缓冲液 (含体积分数 5%  $\beta$ -ME 或 0.125 g/L NEM) 混合, 煮沸 3 min。每孔上样量为 15  $\mu$ L。浓缩胶和分离胶质量浓度分别为 5 g/L 丙烯酰胺和 120 g/L 丙烯酰胺。电泳结束后, 用质量浓度为 10 g/L 的考马斯亮蓝 R-250 (溶于体积分数 50% 甲醇和 6.8% 冰乙酸) 染色 3 h, 然后用脱色液 (体积分数 5% 甲醇和 7.5% 冰乙酸) 脱色直至条带清晰无背景色。

### 1.2.9 复合凝胶的 FTIR 测定

用溴化钾 (KBr) 压片法对样品进行预处理, 约 1 mg 冻干复合凝胶与 KBr 混匀 (质量比 1 : 99) 研磨成细粉并压片, 测量前扫描背景通道光谱, 测试波数范围 4000~400  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数为 64, 分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ 。

### 1.2.10 复合凝胶的微观结构测定

用环境扫描电子显微镜观察凝胶的微观结构。测试前, 用双面胶带将复合凝胶固定在铜板上, 进行喷金处理以确保导电性。

## 1.3 数据处理

所有数据重复测定 3 次, 以平均值  $\pm$  标准偏差表示。用 Statistix 9 软件 (美国佛罗里达州塔拉哈西分析软件公司) 进行统计分析。显著性水平设为  $\alpha = 0.05$ ; 用最小显著性差异法检验数据间的差异显著性, 用  $p < 0.05$  表示差异显著。

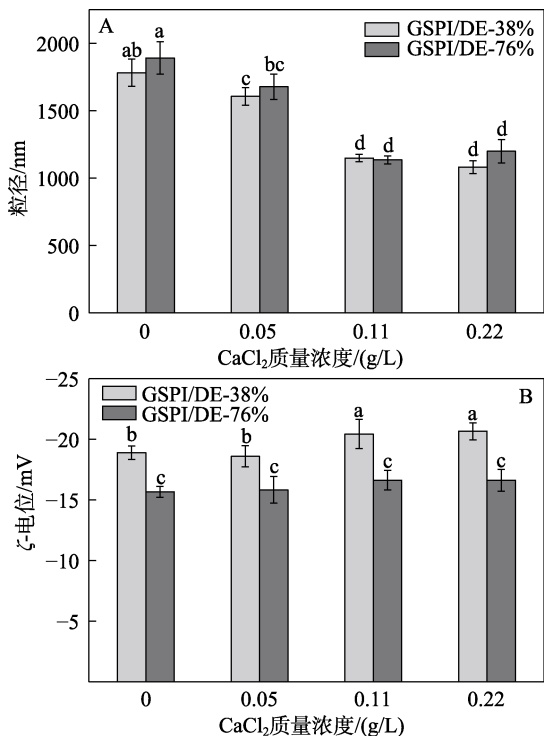
## 2 结果与讨论

### 2.1 $\text{CaCl}_2$ 质量浓度对溶胶粒径和 $\zeta$ -电位的影响

不同质量浓度  $\text{CaCl}_2$  处理对 GSPI/果胶溶胶粒径的影响如图 1 所示。

由图 1 可见, 未添加  $\text{CaCl}_2$  时 GSPI/DE-38% 与 GSPI/DE-76% 的粒径大小分别为 1782.3 和 1891.0 nm。添加  $\text{CaCl}_2$  后, GSPI/果胶溶胶粒径显著下降; 质量浓度 0.22 g/L  $\text{CaCl}_2$  处理后, 两组样品分别下降到 1082.3 和 1199.3 nm。在之前的研究中发现, 适量加入果胶可有效调节团聚体的粒径分布, 使蛋白分布更加均匀<sup>[23]</sup>, 而  $\text{CaCl}_2$  的添加使得溶胶粒径进一步降低。ZHANG 等<sup>[30]</sup>报道了蛋白的平均粒径随盐离子浓度的升高而

降低。当 CaCl<sub>2</sub> 浓度为 0.3 mol/L 时, 蛋白平均粒径最小, 为 1191.3 nm。HEBISHY 等<sup>[31]</sup>也报道了 Ca<sup>2+</sup>可抑制蛋白质的热聚集并降低平均粒径大小。此外, ζ-电位分析结果表明, 除了高质量浓度的 CaCl<sub>2</sub> 提高了 GSPI/DE-38%组的电位绝对值, CaCl<sub>2</sub> 的添加几乎不影响蛋白果胶溶胶的带电量。相同的结论也出现在先前的研究中, ZHONG 等<sup>[32]</sup>报道了 CaCl<sub>2</sub> 的添加增加了大豆亲脂蛋白凝胶的 ζ-电位。



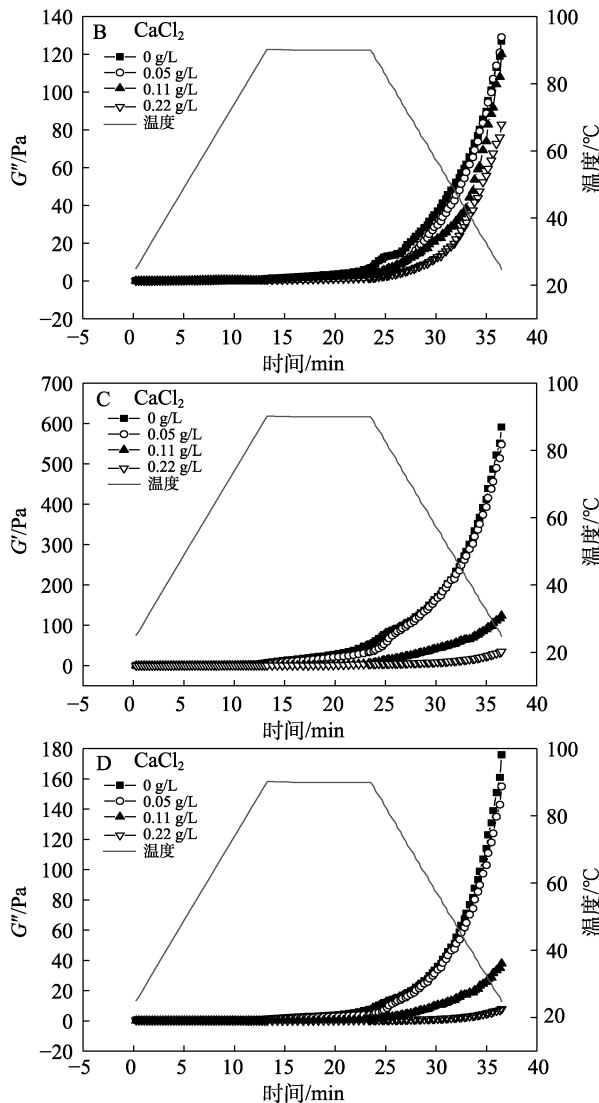
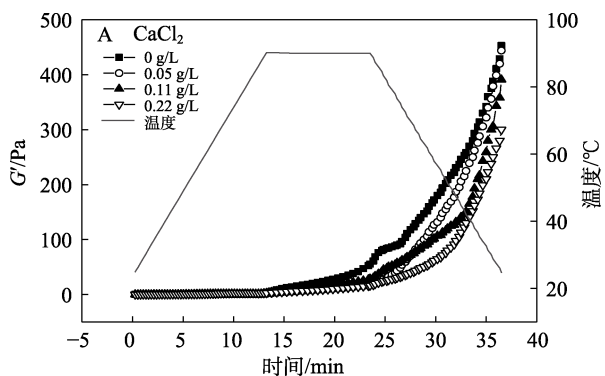
不同小写字母代表差异显著 ( $p < 0.05$ ), 下同

图 1 不同质量浓度 CaCl<sub>2</sub> 对 GSPI/果胶溶胶粒径大小 (A) 和 ζ-电位 (B) 的影响

Fig. 1 Effects of calcium chloride with various mass concentrations on particle size (A) and ζ-potential (B) of GSPI/pectin sols

2.2 CaCl<sub>2</sub> 对溶胶动态流变学的影响

通过测量加入不同质量浓度 CaCl<sub>2</sub> 后 GSPI/果胶溶胶的振荡模量随时间的变化来研究凝胶的形成, GSPI 样品在加热和冷却过程中的储存模量 ( $G'$ ) 和损耗模量 ( $G''$ ) 的变化如图 2 所示。



A、B—DE 酯化度为 38%; C、D—DE 酯化度为 76%

图 2 不同质量浓度 CaCl<sub>2</sub> 对 GSPI/果胶溶胶流变学特性的影响

Fig. 2 Effects of calcium chloride with various mass concentrations on rheological properties of GSPI/pectin sols

在保温阶段, GSPI 分子展开并聚集形成凝胶网络, 导致  $G'$  和  $G''$  的增加。冷却阶段, 除了质量浓度 0.11 g/L、0.22 g/L CaCl<sub>2</sub> 处理的 GSPI/DE-76%, 所有样品的  $G'$  急剧增加, 表明 GSPI 凝胶结构通过氢键的形成进一步增强<sup>[33]</sup>。不添加 CaCl<sub>2</sub> 时, GSPI/DE-38%的  $G'$  与 GSPI/DE-76%相近, 与之前的研究结果相同<sup>[23]</sup>。随着 Ca<sup>2+</sup> 质量浓度的增加,  $G'$  和  $G''$  逐渐降低, 其中高酯化度果胶与蛋白溶胶受到的影响较大, 高质量浓度 Ca<sup>2+</sup> (0.22 g/L) 处理的 GSPI/DE-76%最终  $G'$  仅为 7.95 Pa。可见, 增加 Ca<sup>2+</sup> 破坏 GSPI/果胶溶胶的成胶性。复合凝胶  $G'$  的下降可能是由于添加的 Ca<sup>2+</sup> 可以桥接蛋白质中带负电荷的羧基, 破坏了蛋白果胶间的静电相互作用。同样, BEAULIEU 等<sup>[34]</sup>在研究 Ca<sup>2+</sup> 对乳清分



离蛋白和果胶复合凝胶影响的过程中, 也发现 0.01 mol/L  $\text{Ca}^{2+}$  的添加会降低混合凝胶的  $G'$ , 这是果胶与蛋白质竞争  $\text{Ca}^{2+}$  导致的。

### 2.3 $\text{CaCl}_2$ 对复合凝胶质构特性的影响

图 3 为添加不同质量浓度  $\text{CaCl}_2$  对 GSPI/果胶复合凝胶质构性质的影响。

由图 3 可见, 未添加  $\text{CaCl}_2$  的两组对照凝胶的硬度分别为 79.81 g (GSPI/DE-38%) 和 68.69 g (GSPI/DE-76%),  $\text{Ca}^{2+}$  的添加降低了 GSPI/果胶复合凝胶的硬度。

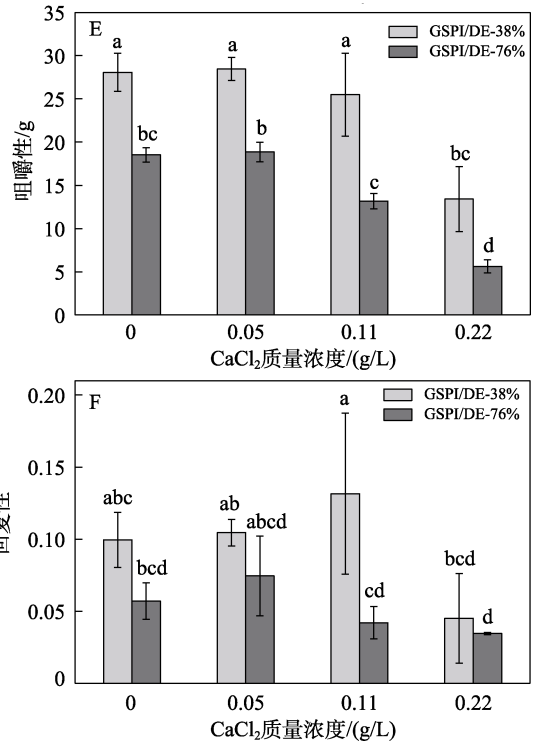
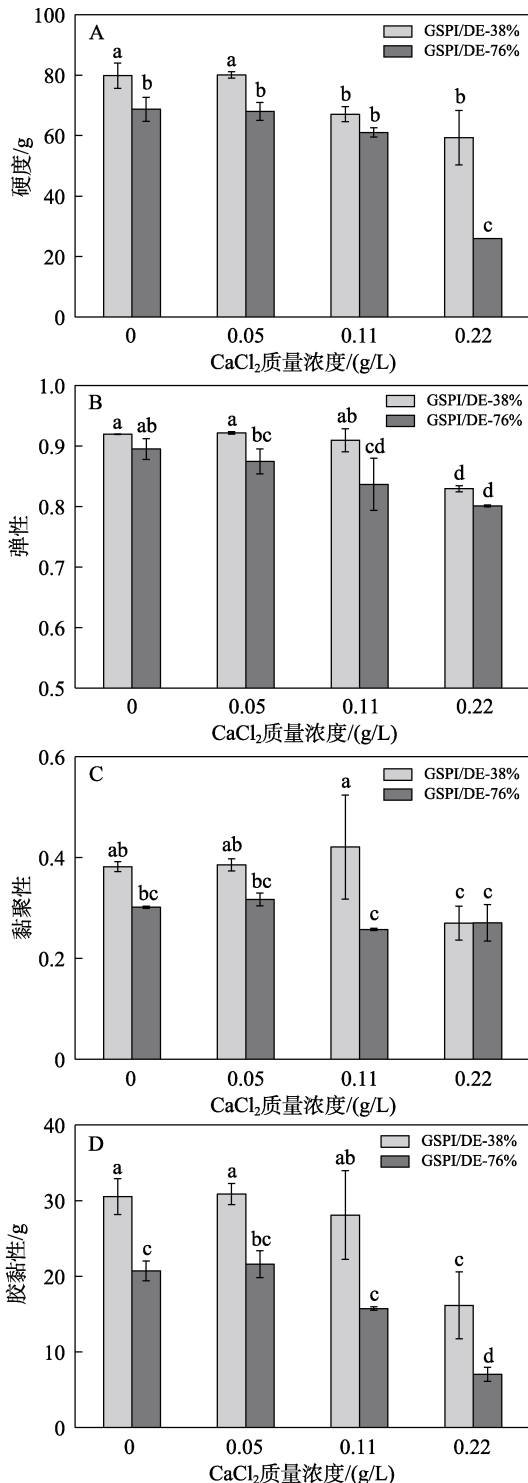


图 3 不同质量浓度  $\text{CaCl}_2$  对 GSPI/果胶复合凝胶硬度 (A)、弹性 (B)、黏聚性 (C)、胶黏性 (D)、咀嚼性 (E) 及回复性 (F) 的影响

Fig. 3 Effects of calcium chloride with various mass concentrations on hardness (A), springiness (B), cohesiveness (C), gumminess (D), chewiness (E) and resilience (F) of GSPI/pectin composite gels

其中,  $\text{Ca}^{2+}$  对高酯化度果胶和 GSPI 复合凝胶的影响较明显, 质量浓度 0.22 g/L  $\text{CaCl}_2$  处理后, 复合凝胶硬度比不加  $\text{CaCl}_2$  的凝胶下降了 62.2%。凝胶弹性在  $\text{CaCl}_2$  处理后也显著降低, 当  $\text{CaCl}_2$  质量浓度从 0 提高到 0.22 g/L 时, GSPI/DE-38% 和 GSPI/DE-76% 凝胶的弹性分别从 0.92 和 0.90 降低到 0.83 和 0.80。尽管  $\text{CaCl}_2$  的添加并没有显著影响复合凝胶的回复性, 但凝胶的其他质构属性都随着  $\text{CaCl}_2$  质量浓度的增加而减弱。当没有  $\text{Ca}^{2+}$  存在时, GSPI 与 5 g/L 的果胶通过氢键和静电相互作用, 形成了稳定的凝胶结构。当体系中添加  $\text{Ca}^{2+}$  时, 静电相互作用被屏蔽。 $\text{Ca}^{2+}$  可通过桥接带负电荷的羧基削弱蛋白与多糖之间的相互作用, 从而削弱了 GSPI 凝胶的质构属性。ZHANG 等<sup>[35]</sup>发现,  $\text{Ca}^{2+}$  与其他多糖之间产生相互作用, 减少了与蛋白的反应, 增加了蛋白质凝结而不是胶凝的趋势, 从而降低了凝胶质构性。

### 2.4 $\text{CaCl}_2$ 对复合凝胶中蛋白浸出性及持水性的影响

蛋白浸出性是指 GSPI 凝胶在酸性条件下从凝胶中逸出的百分比, 反映了凝胶内蛋白分子间相互作用以及与水作用的情况<sup>[36]</sup>。不同  $\text{CaCl}_2$  质量浓度对 GSPI/果胶复合凝胶蛋白浸出率及持水性的影响, 见图 4。如图 4A 所示, 浸没 2 h 并离心后, 大约有 10%~15% 的蛋白从凝胶基质中浸出, 其中

GSPI/DE-76%组浸出率高于 GSPI/DE-38%组, 说明蛋白更容易从前者中逸出。CaCl<sub>2</sub> 的添加对于凝胶的浸出率有显著影响。从 SDS-PAGE (图 5) 中可以看出, 从凝胶中浸出的蛋白大部分是(4.50~6.62) × 10<sup>4</sup> 的 G1 组分, 且 GSPI/DE-76%更为明显。蛋白浸出率也反映了凝胶结构的紧密程度, 而 GSPI/DE-38%组与水分子结合得更为紧密。

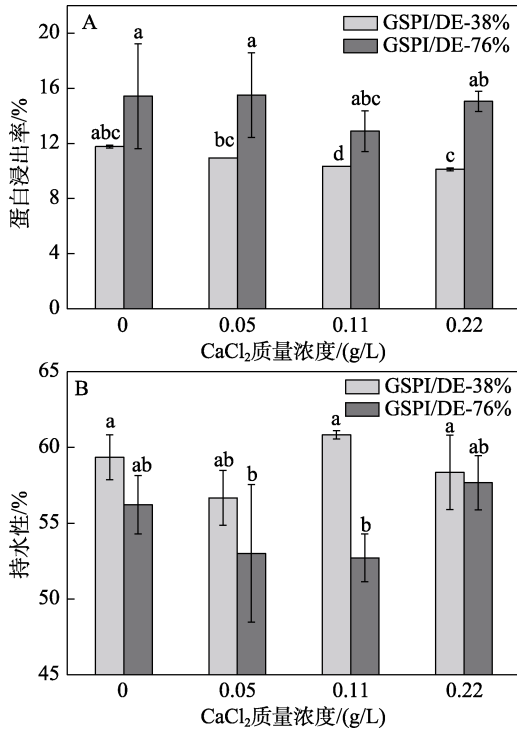


图 4 不同质量浓度 CaCl<sub>2</sub> 对 GSPI/果胶复合凝胶蛋白浸出率 (A) 及持水性 (B) 的影响

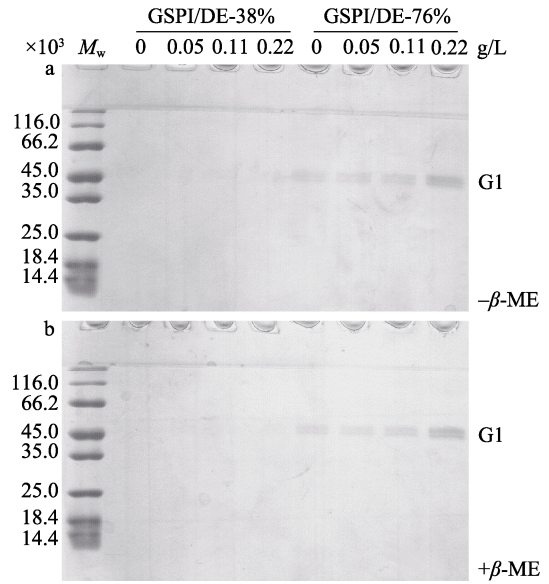
Fig. 4 Effects of calcium chloride with various mass concentrations on protein leachability (A) and water holding capacity (B) of GSPI/pectin composite gels

如图 4B 所示, 不同质量浓度 CaCl<sub>2</sub> 对同一酯化度的 GSPI/果胶复合凝胶的持水性无显著影响。低质量浓度 CaCl<sub>2</sub> 下, GSPI/DE-76%比 GSPI/DE-38%对持水性降低趋势更为明显。

### 2.5 复合凝胶的 FTIR 分析

为了探究复合凝胶中的分子作用力, 测试了 CaCl<sub>2</sub> 处理后复合凝胶的 FTIR 谱图, 结果见图 6。

由图 6 可见, 3430 cm<sup>-1</sup> 附近对应酰胺 A 带的吸收峰和 2960 cm<sup>-1</sup> 附近对应酰胺 B 带的吸收峰, 主要为 N—H 伸缩振动及氢键的耦合而产生<sup>[37]</sup>。1700~1600 cm<sup>-1</sup> 处对应酰胺 I 带的吸收峰和 1550~1530 cm<sup>-1</sup> 处对应酰胺 II 带的吸收峰, 主要归于 N、H 间氢键影响的 C=O 伸缩振动引起<sup>[38]</sup>, 其中采用酰胺 I 带较多。CaCl<sub>2</sub> 处理没有在 GSPI 红外谱图中引入新峰, 这意味着复合凝胶中没有生成新的共价键。随着 CaCl<sub>2</sub> 质量浓度的增加, 复合凝胶酰胺 A 带向更高的波数移动, 说明 CaCl<sub>2</sub> 处理不利于氢键的形成<sup>[39]</sup>。

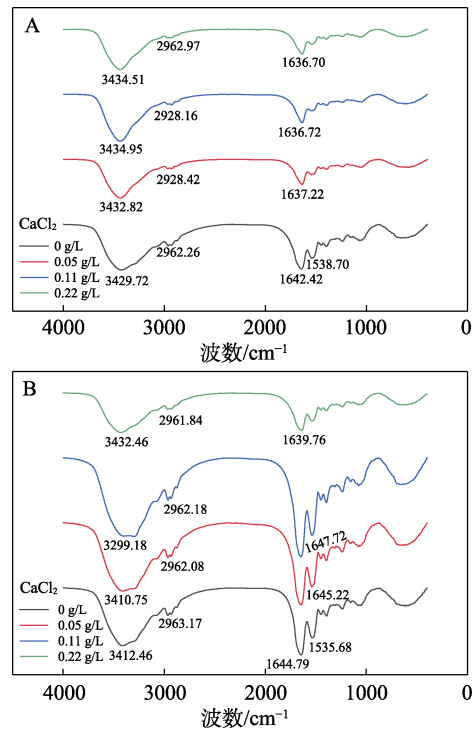


G1—Ginnacin(相对分子质量 49000)

a—非还原条件 (-β-ME); b—还原条件 (+β-ME)

图 5 不同质量浓度 CaCl<sub>2</sub> 形成的 GSPI/果胶复合凝胶中浸出蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig. 5 SDS-PAGE of proteins leaching out of GSPI/pectin composite gels in the presence of calcium chloride with various mass concentrations



A—GSPI/DE-38%; B—GSPI/DE-76%

图 6 不同 CaCl<sub>2</sub> 质量浓度下, GSPI/果胶复合凝胶的 FTIR 谱图

Fig. 6 FTIR spectra of GSPI/pectin composite gels at calcium chloride with various mass concentrations

当添加较高质量浓度 CaCl<sub>2</sub> (0.22 g/L) 后, GSPI/DE-38%和 GSPI/DE-76%凝胶的酰胺 I 带分别从

1642.42 和 1644.79  $\text{cm}^{-1}$  移动到 1636.70 和 1639.76  $\text{cm}^{-1}$ , 表明  $\alpha$ -螺旋结构比例降低。同时,  $\text{CaCl}_2$  的加入并不影响 FTIR 谱图中酰胺 II 和酰胺 III 区域。值得注意的是,  $\text{CaCl}_2$  处理后复合凝胶红外谱图中酰胺 A 带和 I 带的移动方向恰好与其功能性提升相关, 这说明  $\text{Ca}^{2+}$  与 GSPI、果胶竞争, 破坏了 GSPI 与果胶间的平衡, 削弱了两者间的相互作用, 使得凝胶网络结构松散、无序。

## 2.6 凝胶微观结构分析

持水能力是蛋白质凝胶的一个重要功能, 反映

了凝胶与水的相互作用<sup>[40]</sup>。从图 4B 可以看出, 所有 GSPI/果胶复合凝胶的持水性在 52%~61%之间, 其中 GSPI/DE-38%组比 GSPI/DE-76%组略高。这与蛋白浸出率结果相符, 证明了 GSPI/DE-38%组的凝胶与水相互作用的能力更强。而  $\text{CaCl}_2$  的添加也同样没有影响 GSPI/果胶复合凝胶的持水性。TARAPATA 等<sup>[41]</sup>也报道了低浓度  $\text{CaCl}_2$  的添加没有影响凝乳酶凝胶的持水性。

不同质量浓度  $\text{CaCl}_2$  (0~0.22 g/L) 处理的 GSPI/果胶复合凝胶的 SEM 图如图 7 所示。

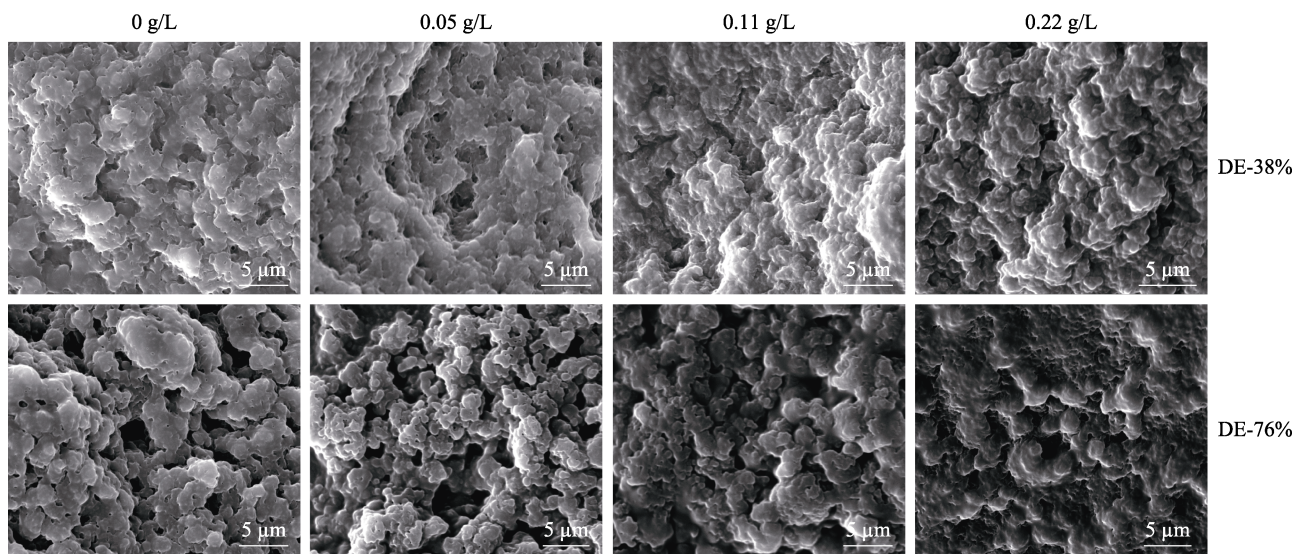


图 7 不同  $\text{CaCl}_2$  质量浓度对 GSPI/果胶复合凝胶微观结构的影响

Fig. 7 Effects of calcium chloride with various mass concentrations on microstructure of GSPI/pectin composite gels

由图 7 可见, 相比 GSPI/DE-38%组, 高酯化度果胶的添加致使凝胶内部出现更多孔隙, 结构更加疏松。 $\text{CaCl}_2$  处理后,  $\text{Ca}^{2+}$  通过与带电基团和蛋白质极性基团的静电相互作用或蛋白质分子之间的疏水相互作用改变了蛋白质构象, 使凝胶结构更加松散、无序。

## 3 结论

(1)  $\text{Ca}^{2+}$  的加入使 GSPI/果胶溶胶的粒径减小但不改变胶体粒子的带电量, 降低了复合凝胶的黏弹性, 弱化了蛋白、果胶间的相互作用, 其中 GSPI/DE-76%对  $\text{Ca}^{2+}$  更为敏感。

(2)  $\text{Ca}^{2+}$  的加入没有显著改变 GSPI/果胶复合凝胶水化性质, 但促进了胶体中蛋白组分的浸出性, 浸出组分主要是 GSPI 中的 G1 组分。在  $\text{Ca}^{2+}$  存在下, GSPI/DE-38%比 GSPI/DE-76%拥有更好的持水性。

(3)  $\text{Ca}^{2+}$  与 GSPI、果胶竞争, 破坏了 GSPI 与果胶间的平衡, 削弱了两者间的相互作用, 使得凝胶网络结构松散、无序, 降低了凝胶质构性。在分子层面上,  $\text{Ca}^{2+}$  的加入降低了蛋白间氢键作用及其

$\alpha$ -螺旋二级结构的比例。

总之, 在 GSPI/果胶二元混合体系中,  $\text{Ca}^{2+}$  与 GSPI、果胶竞争性相互作用, 从而弱化了 GSPI 与果胶之间的作用, 形成较小的聚集体, 进而降低蛋白凝胶性能。本研究揭示了  $\text{Ca}^{2+}$  弱化凝胶质构的原理, 为软化凝胶产品 (适合吞咽困难的人) 的制备提供了理论基础和技术参考, 同时也为食品制造中诸如水里含有  $\text{Ca}^{2+}$ 、果胶酯化度等因素对蛋白/果胶二元凝胶体系凝胶性影响程度的评估提供了参考。

## 参考文献:

- [1] DAS R, LAMI M S, CHAKRABORTY A J, *et al.* *Ginkgo biloba*: A treasure of functional phytochemicals with multimedicinal applications[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022, 2022: 8288818.
- [2] ZHANG W W (张唯唯), HE Z D (何振东), MA T Y (马天怡), *et al.* Extreme acid and alkaline pH-shifting processes improving the solubility and emulsifying properties of ginkgo seed protein isolate[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2021, 38(6): 1204-1211.
- [3] BOATENG I D. A review of *Ginkgo biloba* L. seed's protein: Physicochemical properties, bioactivity, and allergic glycoprotein[J]. Food Reviews International, 2022: 1-18.
- [4] LIU W N, ZOU M M, WANG Y S, *et al.* *Ginkgo* seed proteins: Characteristics, functional properties and bioactivities[J]. Plant Foods



- for Human Nutrition, 2021, 76(3): 281-291.
- [5] ZOU M M, CAO J R, ZHANG W, *et al.* Improvement of quality of *Ginkgo biloba* seeds powder by solid-state fermentation with *Eurotium cristatum* for developing high-value ginkgo seeds products[J]. Journal of Bioresources and Bioproducts, 2022, 7(2): 135-144.
- [6] WANG Y, GUO C H, CHEN X J, *et al.* Carbon peak and carbon neutrality in China: Goals, implementation path and prospects[J]. China Geology, 2021, 4(4): 720-746.
- [7] NICOLAI T, CHASSENIEUX C. Heat-induced gelation of plant globulins[J]. Current Opinion in Food Science, 2019, 27: 18-22.
- [8] TOTOSAUS A, MONTEJANO J G, SALAZAR J A, *et al.* A review of physical and chemical protein-gel induction[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2002, 37(6): 589-601.
- [9] NASRABADI M N, DOOST A S, MEZZENGA R. Modification approaches of plant-based proteins to improve their techno-functionality and use in food products[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118: 106789.
- [10] GROSSMANN L, WEISS J. Alternative protein sources as technofunctional food ingredients[J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2021, 12(1): 93-117.
- [11] SCHMITT C, SILVA J V C, AMAGLIANI L, *et al.* Heat-induced and acid-induced gelation of dairy/plant protein dispersions and emulsions[J]. Current Opinion in Food Science, 2019, 27: 43-48.
- [12] MA T T, XIONG Y L, JIANG J. Calcium-aided fabrication of pea protein hydrogels with filler emulsion particles coated by pH<sub>12</sub>-shifting and ultrasound treated protein[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 125: 107396.
- [13] YANG Z, DE CAMPO L, GILBERT E P, *et al.* Effect of NaCl and CaCl<sub>2</sub> concentration on the rheological and structural characteristics of thermally-induced quinoa protein gels[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107350.
- [14] GULDIKEN B, STOBBS J, NICKERSON M. Heat induced gelation of pulse protein networks[J]. Food Chemistry, 2021, 350: 129158.
- [15] ISHWARYA S P, SANDYHYA R, NISHA P. Advances and prospects in the food applications of pectin hydrogels[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2022, 62(16): 4393-4417.
- [16] ZHANG B, HU B, NAKAUMA M, *et al.* Modulation of calcium-induced gelation of pectin by oligogulonate as compared to alginate[J]. Food Research International, 2019, 116: 232-240.
- [17] WANG H, FEI S Y, WANG Y F, *et al.* Comparative study on the self-assembly of pectin and alginate molecules regulated by calcium ions investigated by atomic force microscopy[J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 231: 115673.
- [18] WAN L, YANG Z X, CAI R, *et al.* Calcium-induced-gel properties for low methoxyl pectin in the presence of different sugar alcohols[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 112: 106252.
- [19] LIANG W L, LIAO J S, QI J R, *et al.* Physicochemical characteristics and functional properties of high methoxyl pectin with different degree of esterification[J]. Food Chemistry, 2022, 375: 131806.
- [20] DUAN H Y, WANG X Y, AZARAKHSH N, *et al.* Optimization of calcium pectinate gel production from high methoxyl pectin[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2022, 102(2): 757-763.
- [21] AMARAL S D C, ROUX D C D, CATON F, *et al.* Rheological behavior of pectin gels obtained from Araçá (*Psidium cattleianum Sabine*) fruits: Influence of DM, pectin and calcium concentrations[J]. Polymers, 2022, 14(16): 3285.
- [22] WANG Y R, YANG Q, LI-SHA Y J, *et al.* Structural, gelation properties and microstructure of rice glutelin/sugar beet pectin composite gels: Effects of ionic strengths[J]. Food Chemistry, 2021, 346: 128956.
- [23] HE Z D, LIU C Q, ZHAO J, *et al.* Physicochemical properties of a ginkgo seed protein-pectin composite gel[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118: 106781.
- [24] ZHANG W W, LIU C Q, ZHAO J, *et al.* Modification of structure and functionalities of ginkgo seed proteins by pH-shifting treatment[J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129862.
- [25] MA T Y (马天怡), GUO F X (郭凤仙), HE Z D (何振东), *et al.* L-Arginine/L-lysine ameliorating the emulsifying properties of soy protein isolate[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(1): 150-157, 163.
- [26] WANG Y S, ZHAO J, ZHANG W W, *et al.* Modification of heat-induced whey protein gels by basic amino acids[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105397.
- [27] WANG Y S, ZHAO J, LIU C Q, *et al.* Influence of  $\gamma$ -aminobutyric acid on gelling properties of heat-induced whey protein gels[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 94: 287-293.
- [28] GORNALL A G, BARDAWILL C J, DAVID M M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction[J]. Journal of Biological Chemistry, 1949, 177(2): 751-766.
- [29] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [30] 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.
- [31] HEBISHY E, JOUBRAN Y, MURPHY E, *et al.* Influence of calcium-binding salts on heat stability and fouling of whey protein isolate dispersions[J]. International Dairy Journal, 2019, 91: 71-81.
- [32] ZHONG M M, XIE F Y, ZHANG S, *et al.* Preparation and digestive characteristics of a novel soybean lipophilic protein-hydroxypropyl methylcellulose-calcium chloride thermosensitive emulsion gel[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105891.
- [33] ZHAO H B, CHEN J, HEMAR Y, *et al.* Improvement of the rheological and textural properties of calcium sulfate-induced soy protein isolate gels by the incorporation of different polysaccharides[J]. Food Chemistry, 2020, 310: 125983.
- [34] BEAULIEU M, TURGEON S L, DOUBLIER J L. Rheology, texture and microstructure of whey proteins/low methoxyl pectins mixed gels with added calcium[J]. International Dairy Journal, 2001, 11(11/12): 961-967.
- [35] ZHANG J H, JIANG L, YANG J, *et al.* Effect of calcium chloride on heat-induced *Mesona chinensis* polysaccharide-whey protein isolation gels: Gel properties and interactions[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 155: 112907.
- [36] 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.
- [37] KUMAR L, BRENNAN M, BRENNAN C, *et al.* Thermal, pasting and structural studies of oat starch-caseinate interactions[J]. Food Chemistry, 2022, 373(Part B): 131433.
- [38] XIE J H, YANG F, SHI H M, *et al.* Protein FTIR amide bands are beneficial to bacterial typing[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 207: 358-364.
- [39] WANG Q, CAO J, YU H, *et al.* The effects of EGCG on the mechanical, bioactivities, cross-linking and release properties of gelatin film[J]. Food Chemistry, 2019, 271: 204-210.
- [40] PENG Y, KYRIAKOPOULOU K, KEPPLER J K, *et al.* Effect of calcium enrichment on the composition, conformation, and functional properties of soy protein[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 123: 107191.
- [41] TARAPATA J, SMOCZYŃSKI M, MACIEJCZYK M, *et al.* Effect of calcium chloride addition on properties of acid-rennet gels[J]. International Dairy Journal, 2020, 106: 104707.