

食品与饲料用化学品

γ -氨基丁酸/L-瓜氨酸增强白果分离蛋白凝胶性

张露妍¹, 郭凤仙², 尤洁瑜¹, 张薇¹, 王耀松^{1*}

(1. 南京林业大学 轻工与食品学院, 江苏 南京 210037; 2. 泉州师范学院 海洋与食品学院, 福建 泉州 362000)

摘要: 以白果分离蛋白 (GSPI) 为成胶基质材料, 将 γ -氨基丁酸 (GABA) 和 L-瓜氨酸 (L-Cit) 分别加入到 GSPI 水溶液中, 均质后再将溶液 pH 分别调至 5.0、6.0 和 7.0, 制备了热诱导凝胶。采用物化分析法、机械力学、蛋白凝胶电泳、SEM 及 FTIR 表征了溶胶的物性、凝胶性和微观结构, 并探讨 GABA、L-Cit 对 GSPI 凝胶性能的影响及其机制。结果表明, GABA、L-Cit 对 GSPI 溶解度无提升作用, 但能显著降低蛋白疏水性; GABA 促进溶胶聚集并降低其 ζ -电位, 而 L-Cit 在 pH 7.0 时则促进解聚和提高 ζ -电位; 两者均能促进蛋白分子疏水基团向内折叠。在 pH 5.0 和 pH 7.0 时, 以上两种氨基酸特别是 L-Cit 显著提高蛋白凝胶性能, 而在 pH 6.0 时则弱化凝胶性能。其影响机制可能是氨基酸与 GSPI 之间的静电作用, 而这种效应依赖于所在体系的 pH。

关键词: 白果分离蛋白; γ -氨基丁酸; L-瓜氨酸; 凝胶; 食品化学品

中图分类号: TS201.21 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 12-2731-08

γ -Aminobutyric acid and L-citrulline enhancing the gelation performance of *Ginkgo biloba* seed protein isolate

ZHANG Luyan¹, GUO Fengxian², YOU Jieyu¹, ZHANG Wei¹, WANG Yaosong^{1*}

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. School of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, Fujian, China)

Abstract: Thermally-induced gels were prepared from adjusting pH of the homogenized solution formed by γ -aminobutyric acid (GABA), L-citrulline (L-Cit) and *Ginkgo biloba* seed protein isolate (GSPI) aqueous solution to 5.0, 6.0 and 7.0, respectively. The physiochemical characteristics, gelation performance, and microstructure of the gels obtained were characterized by physiochemical analysis, mechanical mechanics, protein electrophoresis, SEM, and FTIR, followed by analysis on the influence of GABA and L-Cit on the gelation performance and potential mechanism of GSPI gel. The results showed that GABA and L-Cit had no effect on the solubility of GSPI, but could significantly reduce the hydrophobicity of GSPI. GABA promoted sol aggregation and decreased its ζ -potential, while L-Cit promoted sol depolymerization and increased ζ -potential at pH 7.0. Moreover, the two amino acids facilitated the folding of hydrophobic groups inside the protein molecule. Additionally, the two amino acids, especially L-Cit, significantly enhanced protein gelation at pH 5.0 and 7.0, while decreased protein gelation at pH 6.0. The mechanism might be the electrostatic interaction between amino acids and GSPI, which depended on the pH of system.

Key words: *Ginkgo biloba* seed protein isolate; γ -aminobutyric acid; L-citrulline; gelation; food chemicals

随着社会的进步以及人口的增加, 人们对食品营养的需求增加, 当动物蛋白不能满足全球人口的需求时, 植物蛋白作为可持续替代品引领着一个新

的方向^[1]。与动物源性蛋白相比, 植物源性蛋白生产对环境的破坏较小, 代表了一种更可持续的选择^[2]。中国的白果资源丰富, 且蛋白含量较高^[3], 主要以

收稿日期: 2023-02-02; 定用日期: 2023-03-18; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230059

基金项目: 白马未来食品研究院揭榜挂帅项目 (JBGS-2021-002); 国家自然科学基金青年基金项目 (31401530、32001746)

作者简介: 张露妍 (1999—), 女, 硕士生, E-mail: luyanzhang@njfu.edu.cn. 联系人: 王耀松 (1981—), 男, 副教授, E-mail: yaosongwang@njfu.edu.cn.

清蛋白和球蛋白为主,氨基酸组成合理,必需氨基酸占比高,是一种作为食品配料具有巨大发展潜力的蛋白资源^[4];对其开发与利用将会降低对动物源性蛋白需求的压力而有利于食物可持续性发展和环境保护。

可食性蛋白是以加工成凝胶的形式被食用,以赋予食品感官特性及营养价值^[5]。与传统植物蛋白相比,白果蛋白凝胶性相对较弱^[6],需要经过适当的改造才能满足人们多样性的需要。尽管传统食品加工通常采用物理、化学或酶学的手段对蛋白进行改造来获得凝胶功能性的提升,但这些手段仍有进一步改善食品加工设计的余地,在赋予食品营养功能性的同时,也可增强其凝胶功能性。

近些年来,已被批准为新食品添加剂的非蛋白氨基酸 γ -氨基丁酸 (GABA) 和 L-瓜氨酸 (L-Cit) 受到了较大的关注。研究发现, GABA 是神经传递中的一种重要物质,具有众多良好的生物活性及生理学功能^[7],而 L-Cit 也有维系人体心血管健康等作用^[8],这些生理学功效赋予了其作为功能食品因子的生物学基础。GABA 和 L-Cit 还具有良好的食品加工学性能。前期对 GABA 在不同食品体系中的研究发现,其加入会明显提升酸奶的流变学特性和最终产品的感官品质^[9];在液态奶体系中, GABA 对乳清蛋白和酪蛋白还有共价交联作用,促进乳蛋白结构展开,有效提升了这两种蛋白的溶解性^[10-11];WANG 等^[12]研究发现,结合 pH 处理, GABA 与乳球蛋白、乳白蛋白的相互作用促进了二硫键的形成,从而聚集成有序结构,进而获得改进的功能多样性凝胶。在二维薄膜体系中, GABA 能显著提高乳清蛋白膜的机械性能、热力学性能和水化性能^[13]。在大豆蛋白乳体系中, GABA 能促进大豆蛋白结构展开、降低聚集体大小、改善蛋白溶液的流变学性能和乳化性质^[14]。而 L-Cit 可在不同 pH 下与牛血清白蛋白发生淬灭作用,进而可能改变其在溶液体系中的分布行为^[15]。综上所述,这两种非蛋白氨基酸与蛋白之间的作用在不同食品体系中均有对蛋白功能性改造的潜力。

因此,本文期望将以上这两种非蛋白氨基酸加入白果蛋白中,在赋予蛋白生理活性的同时,能够增强蛋白凝胶性。由于食品加工体系的多样性,拟在不同 pH 条件下,将 GABA 和 L-Cit 加入白果分离蛋白中来制备热诱导凝胶。通过表征成胶溶液的物化性质、蛋白结构变化以及表征蛋白所成凝胶的形貌和质地性,以探究非蛋白氨基酸及 pH 对凝胶性能的增强效应,解决其凝胶性差的问题,为白果蛋白凝胶性提升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

新鲜白果(邳州大佛指),中国江苏徐州;GABA,上海邦成化工有限公司;L-Cit,华中海威基因科技有限公司;1-苯氨基萘-8-磺酸(ANS)、柠檬酸、硫酸铜、酒石酸钾钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、溴化钾、牛血清蛋白试剂、三羟甲基氨基甲烷等,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、*N*-乙基顺丁烯二酰亚胺(NEM),上海生工生物工程有限公司;甘油、过硫酸铵、四甲基乙二胺、溴酚蓝、 β -巯基乙醇(β ME)等, Sigma-Aldrich 公司(上海),以上所有试剂均为分析纯,实验中所用水均为去离子水。

FE28 pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Avanti JXN-26 高速冷冻离心机,贝克曼库尔特国际贸易(上海)有限公司;Scientz-18N 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra 蛋白电泳仪(微型垂直电泳系统),美国 Bio-Rad 公司;SpectraMax i3x 多功能酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;Zetasizer Nano ZS-90 纳米粒度电位仪,英国 Malvern 仪器有限公司;Vertex 80v 傅里叶变换红外光谱仪,布鲁克(北京)科技有限公司;TA.XT Plus 物性测试仪,英国 Stable Micro Systems 公司;Quanta 200 环境扫描电子显微镜,荷兰 FEI 公司。

1.2 方法

1.2.1 白果分离蛋白(GSPI)的制备

白果经过去壳去皮后放在 40 °C 烘箱中干燥 72 h,干燥的白果用机器磨成粉并过 80 目筛,将 1 kg 白果粉与 9 L 正己烷混合后机械搅拌 2 h,抽滤得到脱脂粉末,重复脱脂 2 次。接下来用等电点沉淀的方法提取白果蛋白^[16]。脱完脂的白果粉在通风橱风干,然后将 1 kg 粉末溶解于 10 L 去离子水中,得到溶液 A;然后,用 1 mol/L NaOH 溶液将溶液 A 的 pH 调至 9.0。溶液在室温下搅拌 30 min 后,在 10000 g、4 °C 条件下离心 15 min,用 1 mol/L HCl 溶液将得到的上清液 pH 调至 4.4,室温搅拌 30 min 后,在相同的条件下离心。收集的沉淀用去离子水洗 2 次,然后溶解在去离子水中,用 1 mol/L NaOH 溶液将其 pH 调至中性,最后经过 -55 °C、48 h 冻干的白果分离蛋白储存在 4 °C 的冰箱中待用。

1.2.2 加入 GABA/L-Cit 的白果分离蛋白成胶溶液及热诱导凝胶的制备

将白果分离蛋白和去离子水配制成质量浓度为

240 g/L 的溶液, 并在室温下搅拌 6 h, 然后在 4 °C 冰箱放置 12 h, 确保完全水化, 得到蛋白溶液。分别将 GABA、L-Cit 溶解于去离子水中, 室温下搅拌 1 h, 配制成质量浓度为 40 g/L 的 GABA、L-Cit 原溶液。将 3 mL 上述蛋白溶液分别与 GABA、L-Cit 原溶液按体积比 1:1 混合, 得到 6 mL 混合溶液, 即白果蛋白质量浓度为 120 g/L, GABA、L-Cit 质量浓度均为 20 g/L; 不加上两种氨基酸的蛋白溶液 (对照组) 与去离子水等体积混合, 然后用 1 mol/L 盐酸或 1 mol/L NaOH 将 pH 分别调至 5.0、6.0、7.0。所有的混合溶液密封, 室温搅拌 1 h, 然后 90 °C 水浴加热 30 min。待样品冷却到室温, 放入 4 °C 冰箱放置 12 h, 即为热诱导凝胶。

1.2.3 溶解度测试

按照文献[17]的方法测量蛋白溶解度。将 1.2.2 节中 pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0 的样品用同等对应的 pH、50 mmol/L 柠檬酸盐磷酸盐缓冲液稀释至蛋白质量浓度为 2.0 g/L, 然后在室温下以 5000 g 离心 10 min。离心后, 使用双缩脲法测量得到的上清液的蛋白含量。溶解度按式 (1) 计算:

$$SD/\% = \frac{c_1}{c_2} \times 100 \quad (1)$$

式中: SD 为溶解度, %; c_1 为离心后上清液中的蛋白含量, g/L; c_2 为离心前蛋白含量, g/L。

1.2.4 疏水性测试

表面疏水性测试按照文献[18]的方法并进行了一些修改。将每种蛋白溶液分别用对应相同 pH 的 50 mmol/L 柠檬酸盐磷酸盐缓冲液稀释至质量浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L。稀释后, 取 2 mL 与 20 μ L 质量浓度为 0.025 g/L 的 ANS 混合, 避光反应 15 min。使用多功能酶标仪将激发波长和发射波长分别设置为 365 和 484 nm, 测量不同蛋白溶液的荧光强度。以蛋白系列质量浓度 (g/L) 为横坐标, 每个蛋白质量浓度对应的荧光强度为纵坐标, 拟合荧光强度与蛋白质量浓度呈线性关系 (相关系数均为 0.99 以上), 其直线斜率即为蛋白疏水性指数。

1.2.5 粒径和 ζ -电位测试

将蛋白溶液用对应相同 pH 的 50 mmol/L 柠檬酸盐磷酸盐缓冲液稀释至质量浓度为 2 g/L, 以避免多重散射效应^[14]。使用纳米粒度电位仪测试粒径和 ζ -电位。

1.2.6 荧光测试

采用多功能酶标仪测试蛋白样品荧光强度。测试之前用对应相同 pH 的 50 mmol/L 柠檬酸盐磷酸盐缓冲液将蛋白溶液稀释至质量浓度为 1 g/L, 设置激发波长为 295 nm, 使用多功能酶标仪以 1 nm/s 的扫描速率, 测试 320~400 nm 之间的荧光强度^[16]。

1.2.7 质构测试

凝胶样品质构由物性测试仪测试, 使用型号为 P/0.5 的探头。测试前、后速率分别为 1 和 5 mm/s, 而测试速率为 2 mm/s, 按压距离为 7 mm, 触发力为 5 g^[19], 下压次数为 2 次。

1.2.8 蛋白浸出性测试

蛋白浸出性按照文献[19]的方法并进行了一些修改。将 2 g 白果分离蛋白热诱导凝胶分散在 20 mL 50 mmol/L 柠檬酸盐磷酸盐缓冲液 (pH 3.0) 中, 在室温下放置 2 h。随后将样品以 3000 g, 离心 10 min。离心后用双缩脲法测试上清液蛋白含量。蛋白浸出率按式 (2) 计算:

$$LE/\% = \frac{c_3}{c_4} \times 100 \quad (2)$$

式中: LE 为蛋白浸出率, %; c_3 为离心后上清液中的蛋白含量, g/L; c_4 为离心前蛋白含量, g/L。

1.2.9 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测试

将离心后的浸出液与等体积样品缓冲液 (含体积分数为 5% β ME) 混合, 然后煮沸 3 min。不加 β ME 的样品加入质量浓度为 0.125 g/L NEM 以防止蛋白样品在加热过程中形成二硫键。根据 LAEMMLI^[20] 的方法, 采用质量浓度为 50 g/L 浓缩胶和质量浓度为 125 g/L 分离胶。样品的上样量为 15 μ L, 每块浓缩胶和分离胶中电泳的恒定电流分别为 20 和 40 mA。凝胶使用考马斯亮蓝 R250 染色 3 h, 并用体积分数 7.5% 乙酸和体积分数 10% 甲醇的脱色液褪至无色。

1.2.10 FTIR 测试

分别取约 1 mg 真空冷冻干燥 48 h (冷井温度 -55 °C) 的干制蛋白凝胶样品与 100 mg 左右的溴化钾混合并在玛瑙研钵中研磨成细腻的粉末。将研磨后的粉末放入磨具中压片, 然后进行 FTIR 测试, 波数范围 4000~400 cm^{-1} 。

1.2.11 微观结构测试

将凝胶样品切成小块 (约为 2 mm \times 2 mm) 固定在铜板上, 预干燥后再进行喷金处理, 用环境扫描电子显微镜观察其微观结构, 放大倍数为 5000。

1.3 数据处理

所有测量重复 3 次, 数据以“平均值和标准差”表示。统计分析使用 Statistix 9.0 (分析软件, 美国佛罗里达州塔拉哈西) 进行。显著性水平 α 设为 0.05。不同的字母表示显著差异。

2 结果与讨论

2.1 GABA、L-Cit 对白果分离蛋白溶解度的影响

考察了 GABA、L-Cit 对白果分离蛋白溶解度的

影响, 结果见图 1。由图 1 可以发现, 由于 pH 5.0 接近白果分离蛋白的等电点 (pI 4.4), 白果分离蛋白的溶解度在 pH 5.0 时最低, 在 pH 7.0 时最高。pH 5.0 样品含有最少的电荷, 这削弱了静电排斥并导致蛋白颗粒聚集^[21]。pH 7.0 距离等电点最远, 静电排斥作用最强, 进而溶解度最高。GABA 的加入轻微地提高了白果分离蛋白的溶解度 (pH 7.0 除外), 这与之前报道 GABA 能提高乳清蛋白和大豆蛋白溶解度的研究结果类似^[11,14]。但是在 pH 7.0 时略有降低, 可能是由于 GABA 等电点在 7.2 左右^[22], 而在 pH 7.0 时, GABA 呈中性, 降低了与蛋白的静电排斥作用。L-Cit 在 3 种 pH 下均能轻微提高白果分离蛋白的溶解度, 在其 pI 5.9 时则提升幅度最小。总体上这两种氨基酸对白果分离蛋白的溶解度提高程度不大, 而 pH 的增加则能大幅度地提高蛋白溶解度。

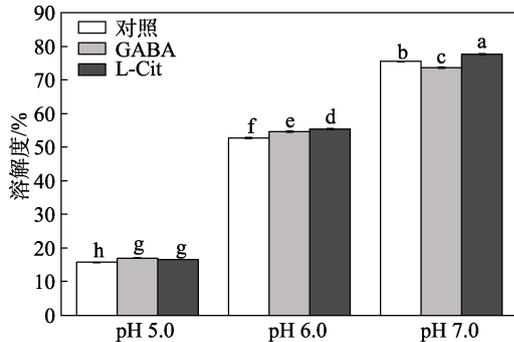


图 1 GABA/L-Cit 对白果分离蛋白溶解度的影响
Fig. 1 Effect of GABA/L-Cit on solubility of GSPI

2.2 GABA/L-Cit 对白果分离蛋白疏水性及其溶胶粒径、 ζ -电位的影响

蛋白的表面疏水性作为溶解度的相对指标与其功能特性 (例如: 乳化性和凝胶性等) 关系密切^[23], 是与蛋白的构象和柔性有关的重要性质^[24]。GABA、L-Cit 对白果分离蛋白疏水性及其溶胶粒径、 ζ -电位的影响见图 2。

白果分离蛋白的表面疏水性如图 2A 所示。由图 2A 可知, 表面疏水性的趋势与溶解度相反, pH 5.0 样品表面疏水性最高, 其次是 pH 6.0 和 pH 7.0 样品。在 pH 5.0 时, 低电荷的蛋白分子具有的静电作用较弱, 蛋白之间的疏水相互作用占主导地位, 但在 pH 6.0 和 pH 7.0 时, 由于蛋白所带负电荷的增加, 蛋白-水相互作用占主导地位^[25]。在 pH 5.0 时, 添加了 GABA、L-Cit 的样品的表面疏水性相较于对照组均有所下降, 而 pH 6.0 和 pH 7.0 样品变化不显著, 可能是因为 pH 5.0 时, GABA、L-Cit 都带正电, 与带负电的蛋白产生静电作用, 促进蛋白构象发生改变, 产生大粒径的聚集体, 导致疏水基团被埋藏,

降低了表面疏水性^[26]。

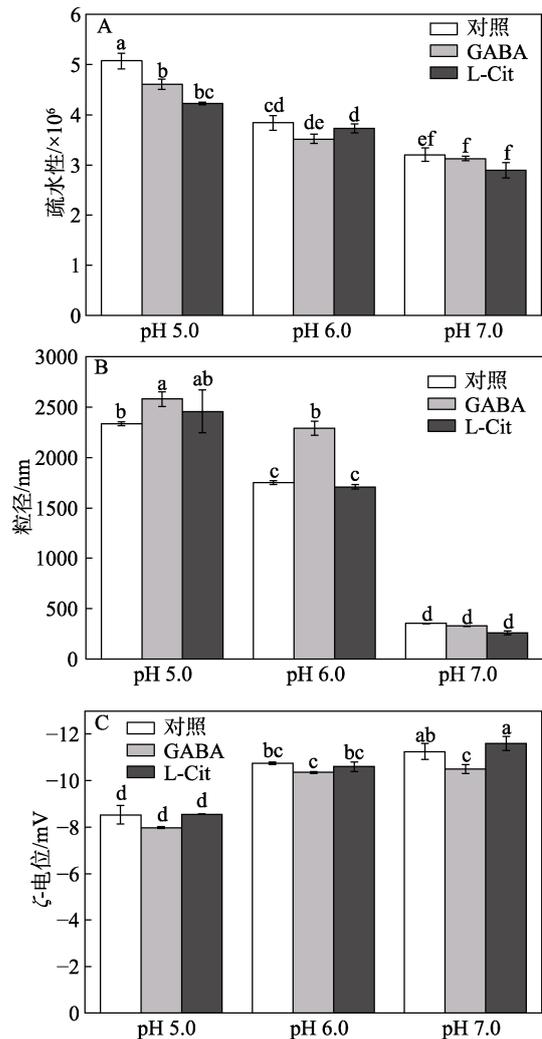


图 2 GABA/L-Cit 对白果分离蛋白疏水性 (A) 及其溶胶粒径 (B) 及 ζ -电位 (C) 的影响
Fig. 2 Effects of GABA/L-Cit on surface hydrophobicity (A), particle size (B) and ζ -potential (C) of GSPI

溶胶粒径如图 2B 所示。由图 2B 可知, 对照组在 pH 5.0 时, 溶胶粒径最大, 这可能是由于静电排斥力小, 疏水相互作用形成更多的聚集体, 其次是 pH 6.0 和 pH 7.0, 与表面疏水性趋势相同。在 pH 5.0 和 pH 6.0 时, GABA 的添加都增大了白果分离蛋白的粒径, 在 pH 7.0 时, 与对照相比, 溶胶粒径轻微降低, 可能是因为 pH 5.0 和 pH 6.0 时, 静电吸引产生更大的聚集体, 而 pH 7.0 接近 GABA 等电点, 作用不明显。类似地, 添加了 L-Cit 的样品, pH 5.0 时, 静电吸引导致粒径增加, pH 6.0 接近 L-Cit 等电点, 影响不显著, pH 7.0 时的静电排斥使得粒径有所降低。

ζ -电位与蛋白溶液系统中蛋白分子表面的电荷强度相关, 并决定静电排斥或吸引力的强度^[27]。 ζ -电位如图 2C 所示。由图 2C 可知, GABA 使样品的 ζ -电位均有所下降。这些变化可能是在 3 种 pH 条件

下带正电荷的 GABA 分子以及带负电荷的蛋白分子相互作用的结果。L-Cit 在 pH 7.0 时提高了 ζ -电位, 在 pH 5.0 和 pH 6.0 时变化不明显。原因可能是因为在 pH 5.0 和 pH 6.0 接近白果分离蛋白的等电点 (pI 4.4) 以及 L-Cit 的等电点 (pI 5.9), 而在 pH 7.0 时, L-Cit 带少量负电荷。高 ζ -电位通常会导致蛋白分子的强静电稳定性, 从而阻止蛋白分子的聚结^[28], 有利于改善凝胶质地。

2.3 GABA/L-Cit 对白果分离蛋白结构的影响

固有荧光光谱主要由色氨酸残基周围环境的极性决定, 并且可以监测蛋白的构象变化和蛋白与蛋白之间的相互作用^[29]。图 3 为白果分离蛋白的荧光光谱

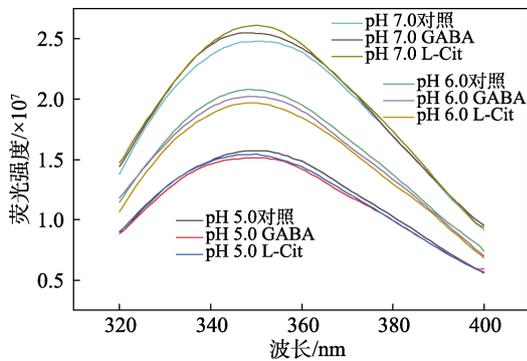


图 3 GABA/L-Cit 对白果分离蛋白荧光的影响

Fig. 3 Effects of GABA/L-Cit on fluorescence intensity of GSPI

由图 3 可见, 荧光强度在 pH 7.0 时最高, 在 pH 5.0 时最低。在 pH 5.0 时, 蛋白-蛋白相互作用增强, 因为其较高的表面疏水性占主导地位 (图 2A)。蛋白-蛋白相互作用的空间位阻可能导致荧光强度降低^[30]。在 pH 5.0 和 pH 6.0 时, GABA、L-Cit 的加入使白果分离蛋白的荧光强度降低, 在这两个 pH 下, GABA、L-Cit 与蛋白带电性相反, 从而使两种氨基酸与蛋白通过静电吸引形成较大的聚集体, 产生空间位阻。而在 pH 7.0 时, 荧光强度增加, 可能是在此 pH 时, 静电排斥作用导致蛋白分子折叠, 使更多的芳香族氨基酸转向微环境内部, 而微环境内部疏水性的提高有利于荧光的产生^[31-32]。

2.4 GABA/L-Cit 对白果分离蛋白凝胶形貌及质构的影响

白果分离蛋白在不同 pH 条件下添加 GABA、L-Cit 的热诱导凝胶照片如图 4 所示。

由图 4 可见, 没有添加两种氨基酸时, pH 5.0 和 pH 6.0 条件下的凝胶较为坚挺, 而在 pH 7.0 时形成的凝胶较为软塌, 但是前两种 pH 条件下的凝胶表面比较粗糙, 有很多小孔, 而 pH 7.0 条件下的凝胶质地比较细腻, 小孔数量大大减少。可以明显看

到, pH 7.0 时, 两种氨基酸加入后, 凝胶坍塌感减弱, 凝胶性增强, 其中, L-Cit 的提升效果最显著。另外, 两种氨基酸对白果分离蛋白凝胶的颜色在视觉上无显著影响。

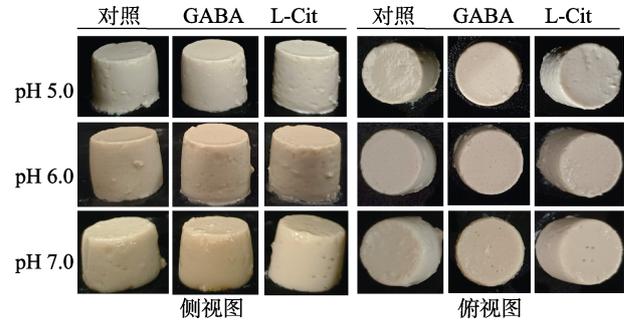
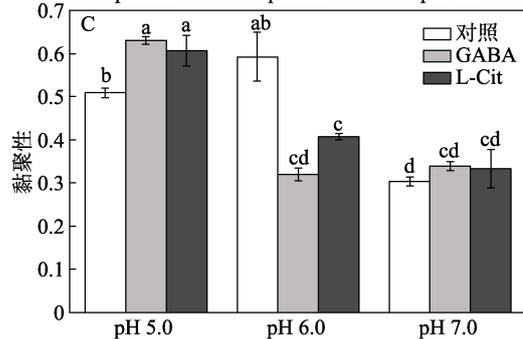
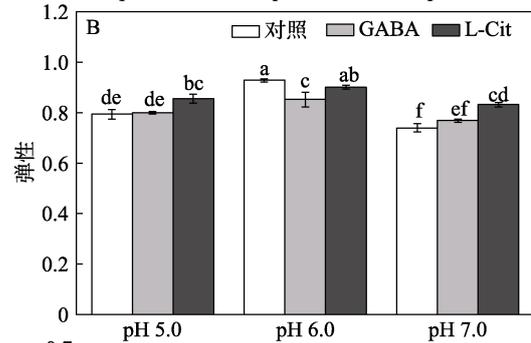
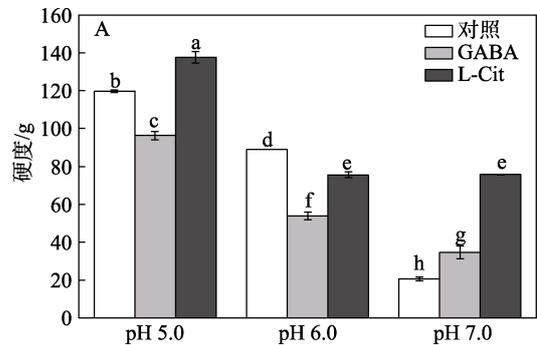


图 4 GABA/L-Cit 加入白果分离蛋白后所成凝胶的照片

Fig. 4 Photos of GABA/L-Cit-loaded GSPI gels

GABA、L-Cit 对白果分离蛋白凝胶的硬度、弹性、黏聚性、胶黏性、咀嚼性及回复性的影响见图 5。

由图 5A 可见, pH 5.0 时, 由于接近白果分离蛋白的等电点 (pI 4.4), 形成的蛋白凝胶硬度最强, 数值达到 120 g 左右, pH 7.0 时形成的凝胶强度最弱, 只有 20 g 左右。



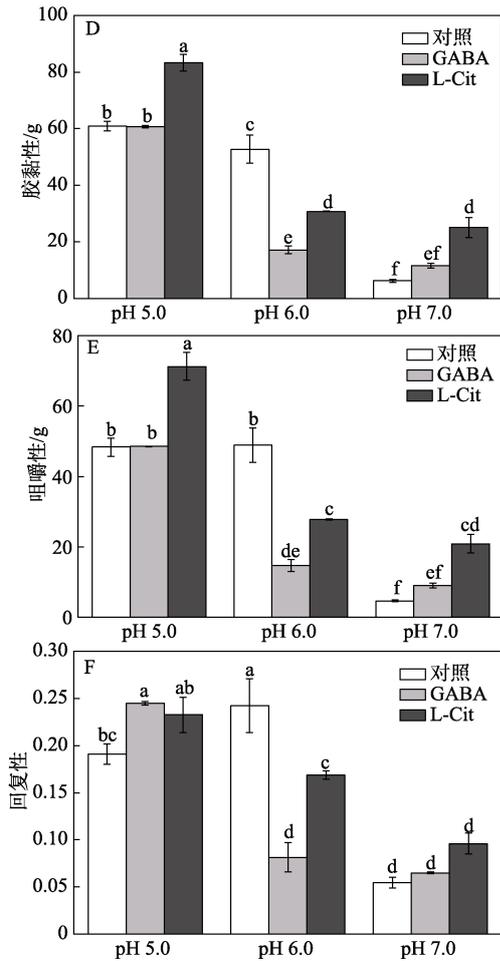


图 5 GABA/L-Cit 对白果分离蛋白凝胶的硬度 (A)、弹性 (B)、黏聚性 (C)、胶黏性 (D)、咀嚼性 (E) 及回复性 (F) 的影响

Fig. 5 Effects of GABA/L-Cit on hardness (A), springiness (B), cohesiveness (C), gummol/Liness (D), chewiness (E) and resilience (F) of GSPI gels

靠近等电点形成的蛋白凝胶静电斥力较弱, 使蛋白分子更容易聚集, 形成结构松散、硬度高, 但弹性、内聚性和回弹性差的凝胶^[33]。而远离等电点时, 静电排斥力成为主要作用力, 导致较弱的凝胶的形成^[34]。GABA 的加入在 pH 5.0 和 pH 6.0 时减小了白果分离蛋白凝胶的硬度, 而在 pH 7.0 时有增强作用。L-Cit 在 pH 5.0 和 pH 7.0 时对蛋白凝胶的硬度有增强作用, 特别是 pH 7.0 时的硬度提升到了 80 g 左右, 而在 pH 6.0 时有弱化作用。由图 5B、图 5D、图 5E 可知, 凝胶的弹性、胶黏性和咀嚼性与硬度规律类似。由图 5C 和图 5F 可知, 添加了两种氨基酸的凝胶的黏聚性和回复性在 pH 5.0 和 pH 7.0 时有所提高, 在 pH 6.0 时显著下降。在 pH 7.0 条件下, 两种氨基酸对白果分离蛋白凝胶特性的增强可能是粒径降低和形成分子间氢键的结果^[29]。LI 等^[35]研究表明, 粒径减小有助于改善凝胶特性。

2.5 GABA/L-Cit 对白果分离蛋白凝胶浸出性的影响

白果分离蛋白的浸出性可反映凝胶的完整性, GABA、L-Cit 对白果分离蛋白凝胶浸出率的影响如图 6 所示。

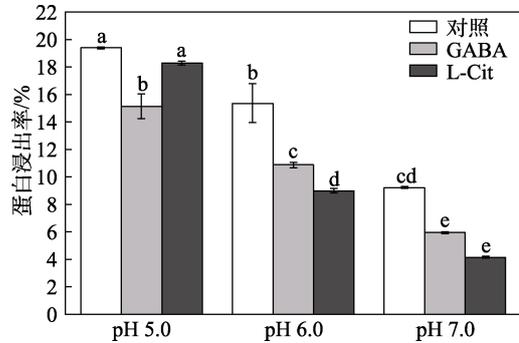
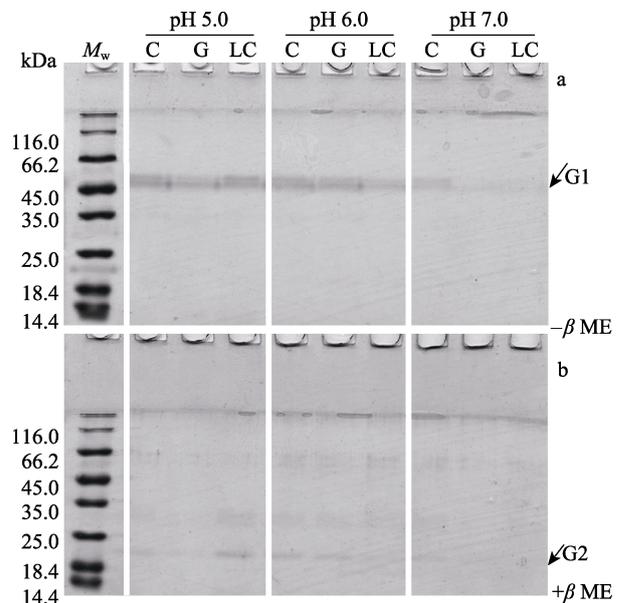


图 6 GABA/L-Cit 对白果分离蛋白凝胶中蛋白浸出率的影响

Fig. 6 Effects of GABA/L-Cit on the protein leaching rate of GSPI gels

由图 6 可知, 未添加氨基酸时, pH 5.0 的凝胶浸出性最高, 达到 19% 左右。GABA、L-Cit 的加入使 3 种 pH 条件下的凝胶浸出性有着不同程度的降低, 其中 pH 6.0 条件下的降低效果最显著, 降至 9% 左右。

浸出液经过聚丙烯酰胺凝胶电泳分析其组分, 结果如图 7 所示。



C—对照; G—GABA; LC—L-Cit; G1—Ginnacin; G2—还原的 Ginnacin; a、b 分别为非还原条件 (-βME) 和还原条件 (+βME)

图 7 GABA/L-Cit 加入白果分离蛋白所成凝胶浸出蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 7 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of leached proteins from GABA/L-Cit-loaded GSPI gels

由图 7 可以发现, 非还原条件下, 条带主要集中在 45.0~66.2 kDa 之间, 说明其中的蛋白没有参与凝胶基质的形成。未添加氨基酸时, pH 5.0 和 pH 6.0 的条带强度明显高于 pH 7.0, 这也说明在 pH 7.0 时形成的凝胶结构更紧密。氨基酸可以通过与蛋白分子的静电作用影响蛋白分子的构象, 进而影响凝胶结构^[36]。GABA 的加入使 3 种 pH 条件下的条带均淡化, 说明 GABA 抑制了蛋白的浸出。WANG 等^[12]也发现, GABA 对乳清蛋白的浸出性有抑制作用。L-Cit 的加入在 pH 6.0 和 pH 7.0 条件下的条带有所淡化, 而在 pH 5.0 时变化不显著。这与蛋白浸出性(图 6)的结果一致。还原条件下, 45.0~66.2 kDa 之间的条带消失, 表明这部分蛋白聚合物通过二硫键交联^[37]。

2.6 GABA/L-Cit 加入白果分离蛋白所成凝胶的 FTIR 分析

采用 FTIR 来检测蛋白分子在 GABA、L-Cit 作用下高级结构的变化, 结果如图 8 所示。

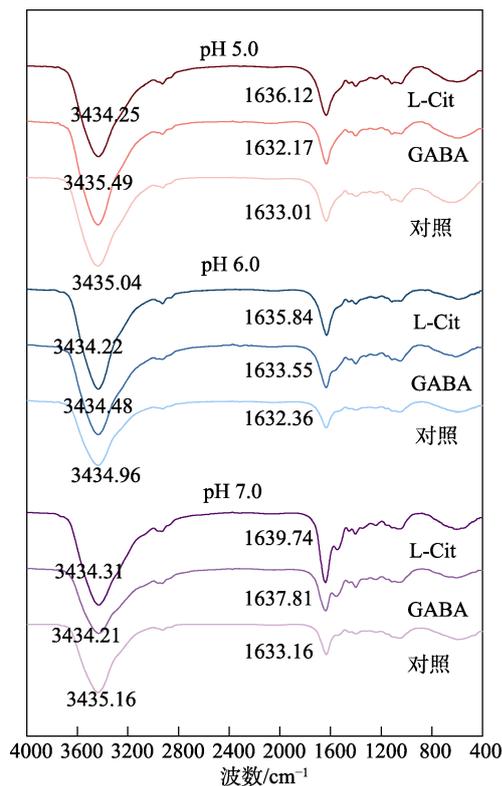


图 8 GABA/L-Cit 白果分离蛋白后所成凝胶的 FTIR 谱图
Fig. 8 FTIR spectra of GABA-loaded and L-Cit-loaded GSPI gels

由图 8 可知, 3200~3600 cm^{-1} 处(酰胺 A)的典型宽吸收峰归属于分子间氢键 N—H 和 O—H 基团的拉伸振动^[38-39], 其能够与蛋白中肽键的羰基形成氢键。形成蛋白结构的氨基酸残基最显著的光谱特征是酰胺 I 和 II 条带, 分别约为 1654 和 1540 cm^{-1} ,

是分析蛋白二级结构变化的重要区域^[40]。在 pH 7.0 时, 两种氨基酸加入后, 酰胺 A 的峰向较短的波数轻微移动, 可能是由于 GABA、L-Cit 与蛋白之间形成了氢键^[41]。GABA 的加入在 pH 7.0 时, 凝胶的酰胺 I 移至更长的波数, 表明蛋白 α -螺旋结构增加, 而在 pH 5.0 和 pH 6.0 条件下影响不显著。L-Cit 的加入在 3 种 pH 条件下都使凝胶的酰胺 I 移至更长的波数, 且在 pH 7.0 时效果最显著, 说明 L-Cit 比 GABA 更能促进 α -螺旋结构增加。

2.7 GABA/L-Cit 对白果分离蛋白凝胶微观结构的影响

为了进一步探究凝胶的质地, 采用环境扫描电子显微镜观察 GABA、L-Cit 加入白果分离蛋白所成凝胶的微观结构, 结果如图 9 所示。

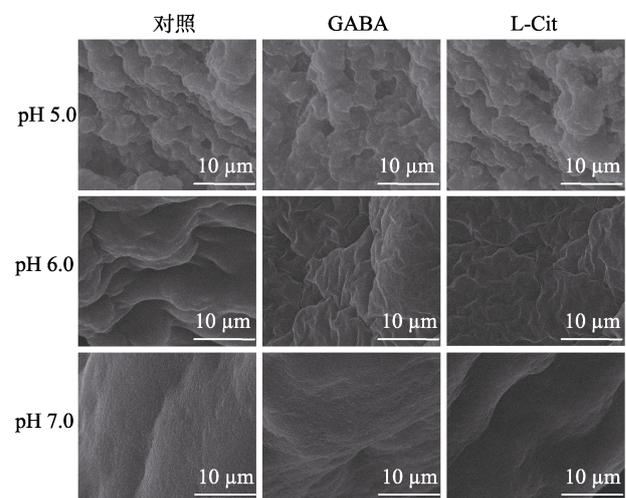


图 9 GABA/L-Cit 加入白果分离蛋白所成凝胶的 SEM 图
Fig. 9 SEM images of GABA-loaded and L-Cit-loaded GSPI gels

由图 9 可以看出, 随着 pH 的增加, 凝胶结构球状颗粒感减弱, 逐渐趋于平整; 并且 pH 5.0 时, 凝胶结构出现较多孔缝, 因为该 pH 接近白果蛋白等电点, 白果蛋白带电量显著降低, 因为絮凝作用导致颗粒聚集体形成。pH 的增加使得分子间排斥力增加, 提高了蛋白分子分散性, 从而形成质地均匀的凝胶。GABA 和 L-Cit 的加入使凝胶质地进一步紧密均匀, 在 pH 5.0 和 pH 6.0 时较为明显, 形成更紧密的凝胶网络, 有利于对蛋白的束缚。这一结果与蛋白浸出性的结果一致(图 6)。

3 结论

GABA、L-Cit 加入白果分离蛋白中结合 pH 调节处理可增强白果分离蛋白凝胶性, 形成机械强度提升、质地均匀细腻的热诱导凝胶。这两种氨基酸通过静电作用诱导蛋白分子疏水性基团向内折叠,

促进蛋白聚集并提高蛋白带电量, 增进凝胶中蛋白质间的氢键作用。白果分离蛋白的以上物化性质和凝胶性的变动可受 pH 调控。总之, GABA、L-Cit 的加入有效地提高了蛋白的凝胶特性。本研究也为凝胶功能性的调控(比如凝胶软硬)给出了参考, 有望促进非蛋白氨基酸在食品领域中的应用, 也为蛋白凝胶功能性改造提供了技术策略和理论基础。

参考文献:

- [1] ISMAIL B P, SENARATNE-LENAGALA L, STUBE A, *et al.* Protein demand: Review of plant and animal proteins used in alternative protein product development and production[J]. *Animal Frontiers*, 2020, 10(4): 53-63.
- [2] HARTMANN C, SIEGRIST M. Consumer perception and behaviour regarding sustainable protein consumption: A systematic review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 61: 11-25.
- [3] BOATENG I D. A Review of *Ginkgo biloba* L. seed's protein: Physicochemical properties, bioactivity, and allergic glycoprotein[J]. *Food Reviews International*, 2023, 39(8): 5215-5232.
- [4] DENG Q C, WANG L, WEI F, *et al.* Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from *Ginkgo biloba* seeds[J]. *Food Chemistry*, 2011, 124(4): 1458-1465.
- [5] AKHARUME F U, ALUKO R E, ADEDEJI A A. Modification of plant proteins for improved functionality: A review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(1): 198-224.
- [6] HE Z D, LIU C Q, ZHAO J, *et al.* Enhanced gelling properties and hydration capacity of ginkgo seed proteins by genipin cross-linking[J]. *Food Chemistry*, 2023, 399: 133924.
- [7] DIANA M, QUÍLEZ J, RAFECAS M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: A review[J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 10: 407-420.
- [8] ALLERTON T D, PROCTOR D N, STEPHENS J M, *et al.* L-Citrulline supplementation: Impact on cardiometabolic health[J]. *Nutrients*, 2018, 10(7): 921.
- [9] LIU M Y, WANG Y S, JIANG L H, *et al.* Effect of γ -aminobutyric acid on the physicochemical, rheological and sensory properties of yoghurt[J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2015, 68(4): 503-510.
- [10] WANG Y S, LIU M Y, ZHAO L M, *et al.* Influence of processing conditions on reducing γ -aminobutyric acid content during fortified milk production[J]. *Food Research International*, 2015, 72: 215-222.
- [11] WANG Y S, LIU M Y, ZHAO L M, *et al.* Interactions of γ -aminobutyric acid and whey proteins/caseins during fortified milk production[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(111): 91235-91245.
- [12] WANG Y S, ZHAO J, LIU C Q, *et al.* Influence of γ -aminobutyric acid on gelling properties of heat-induced whey protein gels[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 94: 287-293.
- [13] HE Z D, ZHAO J, LIU C Q, *et al.* Ameliorating effect of γ -aminobutyric acid on the physical performance of whey protein films[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 124: 107207.
- [14] WANG Y S, LIU C Q, MA T Y, *et al.* Physicochemical and functional properties of γ -aminobutyric acid-treated soy proteins[J]. *Food Chemistry*, 2019, 295: 267-273.
- [15] QU R (屈冉), ZHANG X (张骁), ZHANG P (张鹏). The interaction between L-citrulline and bovine serum albumin[J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science)* (北京化工大学学报: 自然科学版), 2012, 39(1): 77-82.
- [16] 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.
- [17] CAO Y G, MA W H, HUANG J R, *et al.* Effects of sodium pyrophosphate coupled with catechin on the oxidative stability and gelling properties of myofibrillar protein[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 104: 105722.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [21] WIJAYA W, VAN DER MEEREN P, PATEL A R. Cold-set gelation of whey protein isolate and low-methoxyl pectin at low pH[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 65: 35-45.
- [22] ROBERTS E, SHERMAN M A. GABA-The quintessential neurotransmitter: Electroneutrality, fidelity, specificity, and a model for the ligand binding site of GABA_A receptors[J]. *Neurochemical Research*, 1993, 18(4): 365-376.
- [23] ALAVI F, EMAM-DJOMEH Z, MOMEN S, *et al.* Effect of free radical-induced aggregation on physicochemical and interface-related functionality of egg white protein[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 87: 734-746.
- [24] 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-Food Science and Technology*, 2021, 142: 110881.
- [25] ALROSAN M, TAN T C, EASA A M, *et al.* Molecular forces governing protein-protein interaction: Structure-function relationship of complexes protein in the food industry[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(15): 4036-4052.
- [26] SUI X N, BI S, QI B K, *et al.* Impact of ultrasonic treatment on an emulsion system stabilized with soybean protein isolate and lecithin: Its emulsifying property and emulsion stability[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 63: 727-734.
- [27] XIA W J, ZHANG H, CHEN J Y, *et al.* Formation of amyloid fibrils from soy protein hydrolysate: Effects of selective proteolysis on β -conglycinin[J]. *Food Research International*, 2017, 100: 268-276.
- [28] MCCLEMENTS D J. Advances in fabrication of emulsions with enhanced functionality using structural design principles[J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2012, 17(5): 235-245.
- [29] MALIK M A, SAINI C S. Heat treatment of sunflower protein isolates near isoelectric point: Effect on rheological and structural properties[J]. *Food Chemistry*, 2019, 276: 554-561.
- [30] CHAO D F, ALUKO R E. Modification of the structural, emulsifying, and foaming properties of an isolated pea protein by thermal pretreatment[J]. *CyTA-Journal of Food*, 2018, 16(1): 357-366.
- [31] MOON PRESTON C, FLEMING K G. Using tryptophan fluorescence to measure the stability of membrane proteins folded in liposomes[M]. London: Academic Press, 2011, 492: 189-211.
- [32] ROYER C A. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence[J]. *Chemical Reviews*, 2006, 106(5): 1769-1784.
- [33] LIU K, KONG X L, LI Q M, *et al.* Stability and bioavailability of vitamin D3 encapsulated in composite gels of whey protein isolate and lotus root amylopectin[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 227: 115337.
- [34] PICONE C S F, TAKEUCHI K P, CUNHA R L. Heat-induced whey protein gels: Effects of pH and the addition of sodium caseinate[J]. *Food Biophysics*, 2011, 6(1): 77-83.
- [35] LI Y, WANG Q M, GUO L P, *et al.* Effects of ultrafine comminution treatment on gelling properties of myofibrillar proteins from chicken breast[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 97: 105199.
- [36] 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.
- [37] CUI X H, XIONG Y L, KONG B H, *et al.* Hydroxyl radical-stressed whey protein isolate: Chemical and structural properties[J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2012, 5(6): 2454-2461.
- [38] PAN X, FANG Y, WANG L L, *et al.* Covalent interaction between rice protein hydrolysates and chlorogenic acid: Improving the stability of oil-in-water emulsions[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(14): 4023-4030.
- [39] ZHAO G L, WANG S N, LI Y Y, *et al.* Properties and microstructure of Pickering emulsion synergistically stabilized by silica particles and soy hull polysaccharides[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 134: 108084.
- [40] ZHANG Y P, YANG R J, ZHAO W, *et al.* Physicochemical and emulsifying properties of protein extracted from soybean meal assisted by steam flash-explosion[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2014, 23: 131-137.
- [41] ZHAO H K, WANG S N, LIU X L, *et al.* Application of soy protein isolate fiber and soy soluble polysaccharide non-covalent complex: A potential way for pH-triggered release[J]. *Food Chemistry*, 2023, 402: 134494.