

食品与饲料用化学品

马铃薯乳清复合蛋白乳液凝胶的制备和特性

辛孟瑶¹, 伍娟^{1,2}, 陈力宏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: 采用碱溶酸沉法提取了马铃薯蛋白 (PP), 然后以 PP、乳清蛋白 (WP) 和大豆油为原料, 制备了马铃薯乳清复合蛋白乳液凝胶, 通过 FTIR、低场核磁 (LF-NMR)、SEM、激光扫描共聚焦显微镜 (CLSM) 表征, 结合流变、质构、色度、分子间力测试, 考察了 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 对复合蛋白乳液凝胶特性的影响。结果表明, 复合蛋白乳液凝胶综合特性要优于单一的 PP 或 WP 乳液凝胶。与 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 10 : 0$ 制备的 PP 乳液凝胶相比, $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 7 : 3, 5 : 5$ 制备的复合蛋白乳液凝胶的温度循环终点储能模量 (G') 分别提高了 114.75% 和 109.22% ($P < 0.05$); 束缚水质量分数分别提高了 2.01% 和 1.97% ($P < 0.05$); 凝胶强度、弹性、胶黏性、恢复性和咀嚼度显著增强 ($P < 0.05$)。复合蛋白乳液凝胶网络结构紧密, 凝胶网络中油滴均匀分布在蛋白凝胶网络中, 起到了更好的支撑作用。 β -折叠和 β -转角结构是马铃薯乳清复合蛋白乳液凝胶中蛋白质的二级结构, 含量合计约为 70%。

关键词: 马铃薯蛋白; 乳清蛋白; 乳液凝胶; pH 偏移; 双蛋白; 食品化学品

中图分类号: TS201.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2024) 11-2504-09

Preparation and characteristics of potato protein and whey protein composite emulsion gels

XIN Mengyao¹, WU Juan^{1,2}, CHEN Lihong¹, 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: Potato protein (PP) and whey protein (WP) composite emulsion gels were prepared from PP, extracted by alkali solution and acid precipitation method, WP and soybean oil. The effect of $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ on properties of emulsion gels obtained was analyzed via FTIR, low field nuclear magnetic (LF-NMR), SEM, laser scanning confocal laser scanning microscopy (CLSM), as well as measurements on rheological and textural properties, chrominance, and intermolecular force. The results showed that the comprehensive properties of composite protein emulsion gels were better than those of single PP or WP emulsion gel. Compared with PP emulsion gel prepared with a $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ of 10 : 0, the composite emulsion gels prepared with $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ of 7 : 3 and 5 : 5 exhibited an increment in the storage modulus (G') by 114.75% and 109.22%, respective ($P < 0.05$), an elevation in the mass fraction of bound water by 2.01% and 1.97% respectively ($P < 0.05$), and enhancement in the gel strength, elasticity, adhesiveness, resilience, and chewability ($P < 0.05$). These composite emulsion gels displayed dense networks and well-distributed emulsified oil droplets, with β -fold and β -corner structure secondary structures, about 70% of the total content.

Key words: potato protein; whey protein; emulsion gels; pH-shift; dual protein; food chemicals

乳液凝胶是由乳液通过物理法、酶法、化学法或其组合方法制成的具有三维网状结构的半固体或

固体材料^[1], 其结合了乳液和水凝胶的特性, 在食品、化妆品和制药领域具有较好的应用前景^[2]。乳

收稿日期: 2023-10-16; 定用日期: 2023-12-04; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230865

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32072349)

作者简介: 辛孟瑶 (1998—), 女, 硕士生, E-mail: 17852429608@163.com。联系人: 程宇 (1981—), 男, 副教授, E-mail: chengyu@ujs.edu.cn。

液凝胶可分为蛋白乳液凝胶、多糖乳液凝胶和蛋白多糖乳液复合凝胶^[3]。其中, 蛋白乳液凝胶常用于改善产品的质地和感观, 或开发奶酪、加工肉制品和酸奶的新产品^[4]。目前, 乳液凝胶体系通常以动物蛋白为基质, 如乳清蛋白(WP)^[5]。但随着人们对过多消耗动物蛋白带来的环境影响的关注, 利用植物蛋白替代动物蛋白开发蛋白食品成为近年的研究热点, 双蛋白食品的开发也成为国民营养计划的内容之一。

使用两种生物聚合物作为原料制备乳液凝胶能够显著提升体系的机械性能和质地结构, 可以弥补单一聚合物凝胶网络的局限性^[6]。尽管关于双蛋白凝胶的研究不断增多, 但双蛋白乳液凝胶的研究还较少。目前, 双蛋白乳液凝胶的研究多集中于蛋白乳液填充凝胶。MAO 等^[7]研究了不同比例马铃薯乳清蛋白制备乳液填充乳清蛋白凝胶的物理化学性质及消化行为, 结果发现, 马铃薯蛋白(PP)质量分数的增加可改善乳液填充凝胶的凝胶性质。为了进一步加深对乳液凝胶的研究, GRAÇA 等^[8]探讨了胶原蛋白和豌豆蛋白不同配比制备乳液凝胶的特征, 胶原蛋白和豌豆蛋白质量比为 3:1 时, 制备的乳液凝胶具有较好的质构、流变特征和令人愉悦的感官品质。ZHANG 等^[9]研究发现, 大豆和乳清蛋白双蛋白乳液凝胶比单一蛋白乳液凝胶更稳定, 但该研究中大豆蛋白质量分数仅为 10%。为提高植物蛋白在双蛋白乳液凝胶中的比例, LU 等^[10]制备了植物蛋白(大豆分离蛋白)质量分数 25% 的乳液凝胶; ZHANG 等^[11]研究发现, 由质量分数 50% 豌豆蛋白制备的豌豆乳清双蛋白乳液凝胶的各项指标均较好。可见, 植物蛋白质量分数的适当增加可以制备一定质构和营养特征的复合蛋白乳液凝胶。动植物蛋白的配比是影响双蛋白乳液凝胶性质的显著因素。

马铃薯蛋白因其过敏性低、赖氨酸含量较高以及功能性质好等特点, 在双蛋白凝胶的研究中受到特别关注^[12]。研究发现^[13-15], 马铃薯蛋白可以提高双蛋白凝胶的保水性并改善凝胶微观结构, 通过替代乳清蛋白可降低乳清蛋白最低成胶质量浓度, 当马铃薯蛋白质量分数为 50% 时, 其特性占据主导地位。但马铃薯蛋白质量分数较高时, 双蛋白凝胶的强度较低, 并且蛋白凝胶对脂溶性组分的载运能力变弱, 其应用因此受限。在蛋白凝胶中加入脂肪制备乳液凝胶, 不仅可以利用脂肪在蛋白网络中的填充作用提高凝胶的强度, 还可以利用脂肪对脂溶性营养物质和风味物质的溶解能力改善凝胶载运能力^[14], 为后续提高双蛋白凝胶的营养和感官品质提供保障。但马铃薯乳清双蛋白乳液凝胶的研究鲜见报道, 其凝胶特性尚不清楚, 有待进一步评估。

本研究拟以马铃薯蛋白、乳清蛋白和大豆油为原料来制备双蛋白乳液, 并通过热诱导形成乳液凝胶。考察 $m(\text{PP}):m(\text{WP})$ 对乳液凝胶的流变学特性、色度、质构、水分分布、微观结构以及蛋白质二级结构的影响, 为动植物复合蛋白乳液凝胶的开发提供理论依据。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

新鲜马铃薯、福临门大豆油, 江苏大学凯源旅游超市; 乳清分离蛋白粉(蛋白质量分数 90.90%), 美国 Hilmar 公司; 固绿(Fast Green)、尼罗红(Nile Red), AR, 德国 Merck KGaA 公司; 去离子水, 自制; 其他化学试剂, AR, 国药集团化学试剂有限公司。

Ymnl-10N 型冷冻干燥机, 南京以马内利仪器设备有限公司; Avanti J-26 XP 型真空冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; CR-400 型色差仪, 日本 Konica Minolta Holdings 公司; Litesizer 500 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪, 奥地利 Anton-Paar 公司; TA.XT Plus 型食品物性测试仪、TA.XT Plus 型物性测试仪, 英国 Stable Micro Systems 仪器公司; DHR-1 型旋转流变仪, 美国 TA 公司; TCS SP5 型激光扫描共聚焦显微镜(CLSM), 德国 Leica 公司; NMI20-030 V-I 型核磁共振分析仪, 苏州纽迈分析仪器股份有限公司; Nicolet iS50 型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; HG-15A 高速分散机, 韩国 DAIHAN 公司; Reguius 8010 型扫描电子显微镜(SEM)、MC1000 型喷金机, 日本 Hitachi 公司; Quorum K850 型临界点干燥仪, 英国 Quorum 公司。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯蛋白的提取

参照王思念等^[15]的方法, 采用碱溶酸沉法提取马铃薯蛋白。

碱溶过程: 新鲜马铃薯削皮切块, 按料液比(kg:L)1:3 将其放入 4℃ 预冷的 Na₂SO₃ 水溶液(质量浓度 1.2 g/L)中。在匀浆机中破碎后, 得到的浆液经双层纱布(120 目)过滤。所得滤液静置 30 min 后, 在 4℃、6000×g 离心力条件下离心 20 min。取上清液, 用 2 mol/L 的 NaOH 水溶液调节 pH 至 10, 在冰浴中磁力搅拌 1 h 后, 再次在 4℃ 和 6000×g 离心力条件下离心 20 min, 用 6 层纱布(120 目)过滤, 即得碱溶蛋白滤液。

酸沉过程: 将所得碱溶蛋白滤液用 2 mol/L 的盐酸调节 pH 至 4.6, 磁力搅拌 10 min 后冰浴静置 1 h。然后在 4℃ 和 6000×g 离心力条件下离心

20 min, 将得到的蛋白质沉淀加适量去离子水复溶后, 用 2 mol/L 的 NaOH 水溶液调节 pH 至 7.0, 最后真空冷冻干燥脱水贮藏待用。

经凯氏定氮法^[15]测定马铃薯蛋白冻干粉中蛋白质质量分数为 70%。

1.2.2 复合蛋白乳状液的制备

改性马铃薯蛋白溶液的制备: 配制蛋白质质量浓度 80 g/L 的马铃薯蛋白水溶液, 经磁力搅拌 1 h 后, 用 2 mol/L 的 NaOH 水溶液调节 pH 至 12.0, 25 °C 偏移 1 h 后, 用 2 mol/L 的盐酸调节 pH 至 7.0, 得到改性马铃薯蛋白溶液。

马铃薯乳清复合蛋白悬浊液制备: 称取一定质量的乳清分离蛋白粉, 加去离子水配制成蛋白质质量浓度 80 g/L 的乳清蛋白溶液。按照 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 10 : 0, 7 : 3, 5 : 5, 3 : 7, 0 : 10$, 将改性马铃薯蛋白溶液和乳清蛋白溶液混合, 磁力搅拌 1 h 使其混合均匀, 得到复合蛋白悬浊液。

马铃薯乳清复合蛋白乳状液的制备: 将大豆油与复合蛋白悬浊液按照质量比 1 : 9 混合后经 10000 r/min 转速高速分散 3 min 制成乳状液, 然后加入 NaCl (终浓度 25 mmol/L) 并混合均匀, 得到复合蛋白乳状液。

1.2.3 复合蛋白乳液凝胶制备

称取 5.0 g 复合蛋白乳状液, 置于平底试管 (内径 18 mm, 高 50 mm) 中, 将试管用锡纸封口后放入水浴锅中, 90 °C 加热 30 min。取出加热后的样品, 用冰水快速冷却至室温后, 放入 4 °C 冰箱冷藏 24 h 后, 取出凝胶, 恢复至室温后使用。

1.3 结构表征与性能测试

1.3.1 复合蛋白溶解度的测定

参照 MAO 等^[16]的方法, 将复合蛋白悬浊液样品用 8000 × g 离心力离心 10 min 后取上清液, 采用双缩脲法测定可溶性蛋白的质量浓度, 并根据式 (1) 计算蛋白溶解度 (%) :

$$\text{溶解度}/\% = \rho_s / \rho_t \times 100 \quad (1)$$

式中: ρ_s 、 ρ_t 分别为复合蛋白悬浊液中可溶性蛋白的质量浓度和总蛋白 (马铃薯蛋白和乳清蛋白) 的质量浓度, g/L。

1.3.2 复合蛋白游离巯基含量的测定

参照 MAO 等^[7]的方法, 取复合蛋白悬浊液进行巯基含量的测定。用 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=7.4) 将复合蛋白悬浊液稀释至质量浓度为 2 g/L。取 0.5 mL 稀释样品与 2 mL 含 8 mol/L 尿素和质量浓度为 30 g/L 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的 PBS (100 mmol/L, pH=7.4) 混合, 加入 50 μL 的 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) (DTNB, 10 mmol/L), 充分混合后在 25 °C 保温 15 min。反应结束后, 在 412 nm

处测定溶液的吸光度。用 50 μL PBS 代替 DTNB 试剂作空白对照。采用式 (2) 计算游离巯基含量:

$$\text{SH} = 1 \times 10^6 \times A \times D / (\epsilon \times \rho) \quad (2)$$

式中: SH 为游离巯基含量, μmol/g_{蛋白}; A 为吸光度; $\epsilon = 13600 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; D 为稀释倍数; ρ 为总蛋白质质量浓度, g/L。

1.3.3 乳状液 Zeta 电位的测定

参照王思念等^[15]的方法, 用 10 mmol/L 的 PBS (pH=7.0) 将复合蛋白乳状液稀释至质量浓度为 2 g/L 后用纳米粒度及 Zeta 电位分析仪测定。Zeta 电位测定采用 Omega Z 样品池。测试的溶剂折射率为 1.33。

1.3.4 流变特性的测定

参照 MAO 等^[7]的方法, 并对相关参数进行适当调整。测试模具为 40 mm 平板。平板的工作间隙为 1 mm。凝胶样品周围添加适量硅油防止样品水分蒸发。测试条件: 升温 and 降温速率均为 5 °C/min, 振荡频率和剪切应变分别为 1 Hz 和 0.5%。先将凝胶样品从 25 °C 加热到 90 °C 后保温 30 min; 再从 90 °C 下降至 25 °C 后保温 10 min, 最后在 0.1~10 Hz 下对凝胶样品进行频率扫描。

1.3.5 色度测定

乳液凝胶的色度测定采用王思念等^[15]的方法, 用白板对仪器进行校准后, 在乳液凝胶表面上随机进行测量多次。结果用亮度值 (L^*)、红色值 (a^*)、黄蓝色值 (b^*) 表示。每次重复实验中每组样品的最终结果为 3 次平行实验的算数平均值。

1.3.6 质构测定

参照张露妍等^[17]的方法测定样品的硬度、恢复性、内聚性、弹性、胶黏性、咀嚼度。将凝胶样品小心地从平底试管中取出后用食品物性测试仪进行质地剖面分析 (TPA)。实验参数设定如下: 探头型号 P/0.5, 测前和测后速度 1.0 mm/s, 形变比例 30%, 触发力 2 g。

1.3.7 低场核磁 (LF-NMR) 测定

参照王思念等^[15]的方法, 采用低场核磁测定乳液凝胶的水分分布情况。将 5.0 g 凝胶放入直径为 40 mm 的低场核磁专用测试管中, 用 CPMG 序列测量自旋-自旋弛豫时间 (t_2)。参数设置: 探头为 40 mm, QFID 序列, 工作频率 200 kHz, 工作温度 25 °C, 等待时间 (t_w) 设置 3500 ms, 射频延时 (RFD) 设置 0.002 ms, 数字增益 (DRG1) 设置 3, 重复扫描 4 次, 得到 17000 个回波, 得到的图为 CPMG 指数衰减曲线, 采用仪器自带的 Multi Exp Inv Analysis 软件进行反演得到弛豫谱图。

1.3.8 分子间作用力的测定

参照 MAO 等^[7]的方法, 将 0.5 g 凝胶破碎后与

4.5 mL 3 种不同溶液〔PBS+尿素: 50 mmol/L 的 PBS (pH=7.0) 配制 8 mol/L 的尿素; PBS+SDS: 50 mmol/L 的 PBS (pH=7.0) 配制质量分数 0.5% 的 SDS; PBS+ β -巯基乙醇: 50 mmol/L 的 PBS (pH=7.0) 配制质量分数 0.25% 的 β -巯基乙醇〕混合, 80 °C 水浴加热 30 min, 冷却至室温后以 5000 × g 离心力离心 15 min 取上清液, 用 0.45 μ m 滤膜过滤。采用双缩脲法测定上清液中蛋白质量浓度。用不同溶剂 (PBS+尿素、PBS+SDS、PBS+ β -巯基乙醇) 中的蛋白溶解度表示凝胶中蛋白的分子间作用力 (氢键、疏水相互作用、二硫键)。根据式 (3) 计算蛋白的溶解度 (%) :

$$\text{溶解度}/\% = \rho V/m \quad (3)$$

式中: ρ 为上清液蛋白质量浓度, g/L; V 为上清液蛋白体积, L; m 为凝胶样品中蛋白的质量, g。

1.3.9 CLSM 测定

参照 MAO 等^[7]的方法。用手术刀将凝胶切成约 1 mm 厚的薄片置于凹面载玻片上, 分别滴加 5 μ L Nile Red (质量浓度 1 g/L) 和 Fast Green (质量浓度 10 g/L) 对油滴和蛋白质进行染色。盖上盖玻片避光染色 30 min 后, CLSM 观察蛋白乳液凝胶的微观结构。Nile Red 和 Fast Green 的激发波长分别为 488 和 633 nm。

1.3.10 SEM 测定

参照张昊伟等^[18]的方法, 凝胶样品经过戊二醛固定以及梯度乙醇脱水后在临界点干燥仪中干燥, 利用导电碳胶将样品固定于样品台, 离子型溅射仪溅射 Pt 约 120 s。用 SEM 观察并采集图像。

1.3.11 FTIR 测定

参照王思念等^[15]的方法进行 FTIR 测定。参数设定为: 波数范围 4000~400 cm^{-1} , 扫描次数 32 次。通过 OMNIC 和 Peakfit 软件对数据进行分析, 根据峰面积归一化法计算各蛋白二级结构的含量。

1.4 数据处理

所有实验经过 3 次重复, 重复实验利用新鲜制备样品在不同时间开展。数据绘图采用 Origin 2021 软件。数据的显著性差异采用 IBM SPSS Statistics 21 统计分析软件中的 Duncan 法分析。显著性水平 α 设为 0.05, 不同的小写字母表示显著差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 复合蛋白溶解度和游离巯基含量分析

溶解度是蛋白质最基本的特性, 蛋白质的溶解度与蛋白质的结构直接相关^[19]。图 1 为 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 对复合蛋白悬浊液中复合蛋白的溶解度和游离巯基含量的影响。

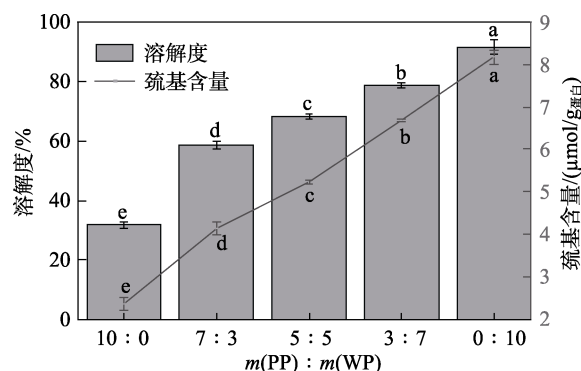


图 1 复合蛋白悬浊液的蛋白溶解度和巯基含量
Fig. 1 Solubility and free sulfhydryl content of composite protein suspensions

从图 1 可以看出, $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 对复合蛋白溶解度有显著影响。当 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 从 7:3 降为 3:7 时, 蛋白的溶解度从 58.53% 提高至 78.76% ($P < 0.05$)。尽管马铃薯蛋白的溶解度较低, 但是乳清蛋白比例的提高可以改善复合蛋白中马铃薯蛋白的溶解度。理论上 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 5:5$ 的溶解度为 61.67%, 而实际上 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 5:5$ 的溶解度为 68.16%, 高于理论值。这可能是由于马铃薯蛋白与乳清蛋白发生相互作用, 增强了复合蛋白与水之间的相互作用, 促使悬浊液中马铃薯蛋白不可溶聚集体形成可溶性聚集体, 溶解度得到提高。这种溶解度的提升可能对复合蛋白凝胶性有改善效果^[19]。

游离巯基之间可以形成二硫键, 促进蛋白分子的共价结合, 改善凝胶的性质^[20]。从图 1 可以看出, 乳清蛋白中游离巯基的含量 ($8.16 \mu\text{mol/g}$ 蛋白) 是马铃薯蛋白中游离巯基的含量 ($2.37 \mu\text{mol/g}$ 蛋白) 的 3.4 倍。提高复合蛋白悬浊液中乳清蛋白的比例可以增加游离巯基的含量。当 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 从 7:3 降为 3:7 时, 复合蛋白悬浊液中的巯基含量从 $4.15 \mu\text{mol/g}$ 蛋白增至 $6.68 \mu\text{mol/g}$ 蛋白, 提高了 60.96% ($P < 0.05$)。这可能是由于含硫氨基酸是马铃薯的限制性氨基酸, 含硫氨基酸在乳清蛋白中是非限制性氨基酸, 乳清蛋白含量增加可以提高复合蛋白中含硫氨基酸的含量。

2.2 复合蛋白乳状液 Zeta 电位分析

Zeta 电位的大小一定程度上反映乳液带电颗粒之间静电相互作用的强度, 对乳液体系的稳定性有较大影响。Zeta 电位绝对值越高, 分子之间的排斥力越大, 乳液中的分子越不容易聚集。

图 2 为复合蛋白乳状液的 Zeta 电位测试结果。

从图 2 可以看出, 复合蛋白乳状液 Zeta 电位均为负值, 这是因为, 复合蛋白乳状液 pH (7) 高于马铃薯和乳清蛋白的等电点 (4.6 和 5.0)^[13,21], 所以复合蛋白乳状液带负电荷。

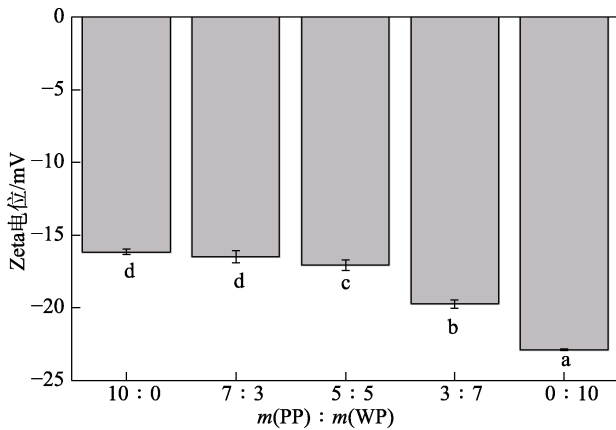


图 2 复合蛋白乳状液的 Zeta 电位
Fig. 2 Zeta potential of composite protein emulsions

Zeta 电位绝对值随着 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 的减小而增加, $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 从 10 : 0 变为 0 : 10, Zeta 电位绝对值从 16.20 mV 增至 22.87 mV, 增加了 41.17% ($P < 0.05$)。但是过高的表面 Zeta 电位绝对值可能降低凝胶强度^[22]。

2.3 复合蛋白乳液凝胶流变特性分析

2.3.1 温度循环实验

图 3 为不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 的复合蛋白乳液凝胶的储能模量 (G')、损耗模量 (G'')、损耗因子 ($\tan\delta$)。加热冷却循环实验显示了乳液凝胶从乳液转化为凝胶的动力学过程。从图 3A、B 可以看出, G' 和 G'' 在凝胶形成过程呈现相似的变化趋势。在初始加热 (25~65 °C) 阶段, G' (图 3A) 和 G'' (图 3B) 都有略微的下降, 这可能是由于溶液温度的升高, 导致蛋白质解聚造成的; 在加热阶段 (65~90 °C), G' 和 G'' 开始缓慢增加, 表明蛋白之间的相互作用随温度的升高而逐渐增强; 在 90 °C 保温阶段, G' 和 G'' 都进一步增加, 而 G' 仍高于 G'' , 这可能是由于蛋白质分子结构的展开和疏水基团的暴露, 导致其疏水性增强^[23]; 在冷却阶段 (90~25 °C), 所有样品的 G' 又从 190.10~798.59 Pa 急剧上升到 624.59~4494.20 Pa, 这是因为, 冷却促进了氢键的形成和范德华力的增强; 最后 25 °C 保温阶段, G' 和 G'' 趋于平缓。

当乳液凝胶温度扫描结束, 各乳液凝胶 G' 大小排序对应的 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 为 7 : 3 \approx 5 : 5 > 0 : 10 > 10 : 0 > 3 : 7。结果表明, 相较于马铃薯蛋白乳液凝胶的 G' (2034.00 Pa), 以 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 为 7 : 3 或 5 : 5 制备的复合乳液凝胶 G' (4368.06 和 4255.55 Pa) 分别增加了 114.75% 和 109.22% ($P < 0.05$)。这可能是因为, 蛋白质的特性 (如空间结构、相对分子质量大小、带电量和凝胶特性等) 对它们之间的相互作用产生了影响。然而, 当 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 3 : 7$ 时,

乳液凝胶的 G' (601.28 Pa) 相较于马铃薯蛋白乳液凝胶降低了 70.44% ($P < 0.05$), 说明合适的复合蛋白复配比例才是增加乳液凝胶硬度的有效方法。

$\tan\delta$ 为 G'' 与 G' 的比值, 可反映乳液凝胶形成过程中内部结构的变化。从图 3C 可以看出, 在整个过程中, 除了刚开始升温时 $\tan\delta > 1$, 后期所有样品的 $\tan\delta$ 均 < 1 , 说明马铃薯乳清复合蛋白乳液凝胶的弹性特征高于黏性特征。

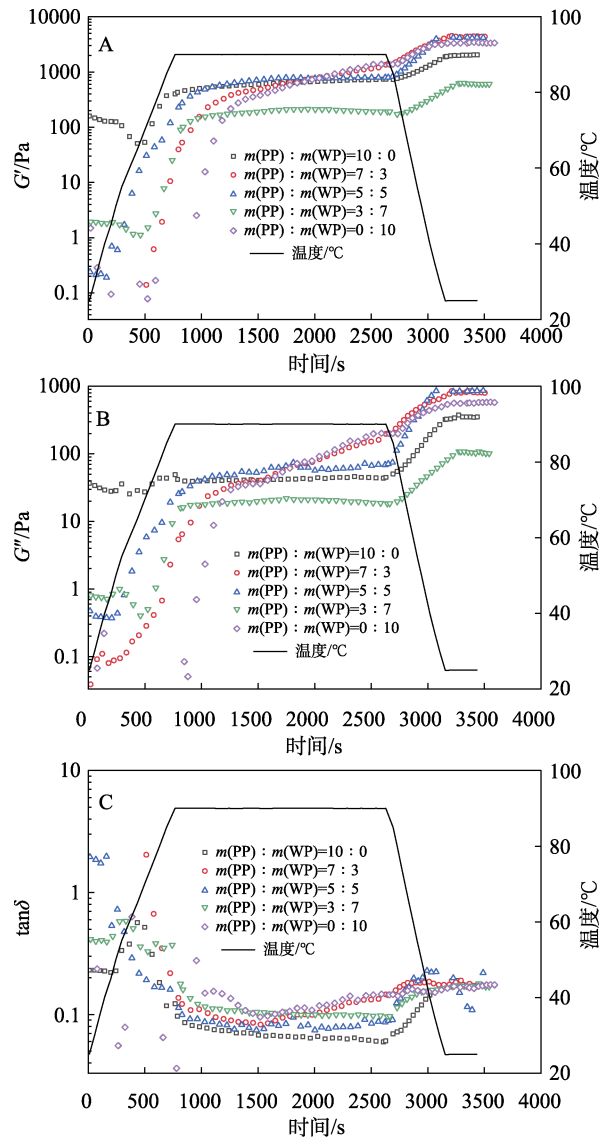


图 3 不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 制备的乳液凝胶在成胶过程中的储能模量 (A)、损耗模量 (B) 以及损耗因子 (C)
Fig. 3 Storage modulus (A), loss modulus (B) and loss factor (C) of emulsion gels prepared with different $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ during gel formation

2.3.2 频率扫描实验

图 4 为不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 制备的乳液凝胶频率扫描的 G' 和 G'' 。

从图 4 可以看出, G' 和 G'' 均随着频率的增加 (0.1~10 Hz) 呈小幅增加, G' 始终大于 G'' , 且随着

频率的增加没有交集, 说明各乳液凝胶样品具有类似固体的性质^[24]。对图中 G' 和剪切频率 (ω , Hz) 之间的关系进行幂律方程 ($\lg G' = \lg K + \lg \omega^n$, 式中: K 为幂律常数; n 为幂律指数) 拟合, 结果见表 1。

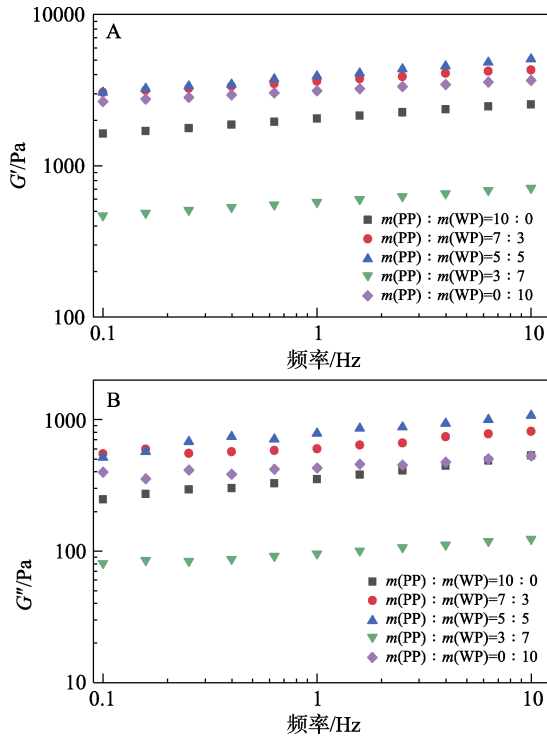


图 4 不同 $m(PP) : m(WP)$ 制备的乳液凝胶频率扫描的储能模量 (A) 和损耗模量 (B)
Fig. 4 Storage modulus (A) and loss modulus (B) of emulsion gels with different $m(PP) : m(WP)$ during frequency sweep test

由表 1 可见, 各乳液凝胶的 n 较低, 在 0.070~0.111 之间, 表明拟合曲线接近直线, 说明乳液凝胶的 G' 受 ω 的影响很弱, 凝胶网络结构较为稳定。

表 1 不同 $m(PP) : m(WP)$ 制备的乳液凝胶幂律方程参数
Table 1 Power law equation parameters of emulsion gels prepared with different $m(PP) : m(WP)$

$m(PP) : m(WP)$	K	n	R^2
10 : 0	2043.60	0.099	0.998
7 : 3	3625.02	0.077	0.997
5 : 5	3907.49	0.111	0.997
3 : 7	578.92	0.091	0.999
0 : 10	3127.35	0.070	0.999

2.4 复合蛋白乳液凝胶色度分析

图 5 为不同 $m(PP) : m(WP)$ 制备的乳液凝胶的外观和色度测定结果。

从图 5 可知, 随着 $m(PP) : m(WP)$ 的减小, 乳液凝胶的 L^* 和 b^* 先上升后下降, a^* 逐渐降低。

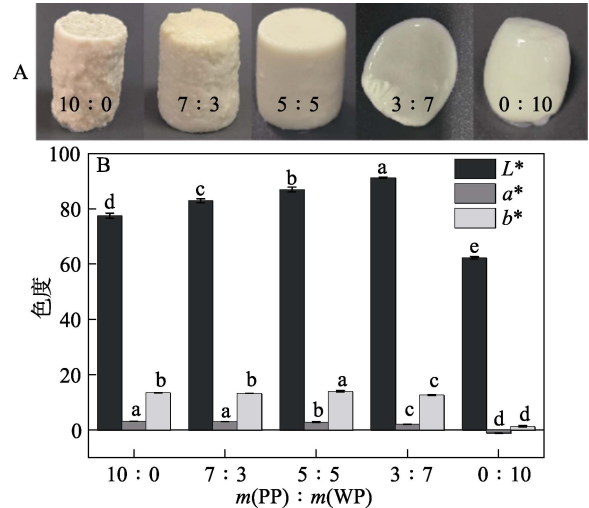


图 5 不同 $m(PP) : m(WP)$ 制备的乳液凝胶的外观 (A) 和色度 (B)
Fig. 5 Appearance (A) and chrominance (B) of emulsion gels prepared with different $m(PP) : m(WP)$

值得注意的是, 在 $m(PP) : m(WP)=0 : 10$ 时, L^* 为 77.58 ± 0.90 , 比 $m(PP) : m(WP)=3 : 7$ 样品的 L^* (91.31 ± 0.26) 降低了 15.04% ($P < 0.05$)。这是因为, 形成的乳清蛋白乳液包含油相和水相, 当乳液不稳定时, 油相和水相可能分离, 形成的凝胶存在明显的水油分界面, 这种结构会散射光线, 导致 L^* 降低。

2.5 复合蛋白乳液凝胶质构特性分析

质构分析是通过模拟牙齿对食物进行两次咀嚼来评价食品的力学特征^[10]。图 6 为不同 $m(PP) : m(WP)$ 制备的乳液凝胶的质构特性结果。由于 $m(PP) : m(WP)=0 : 10$ 、 $3 : 7$ 制备的乳液凝胶强度较弱, 所以其质构分析未得到有效数据。

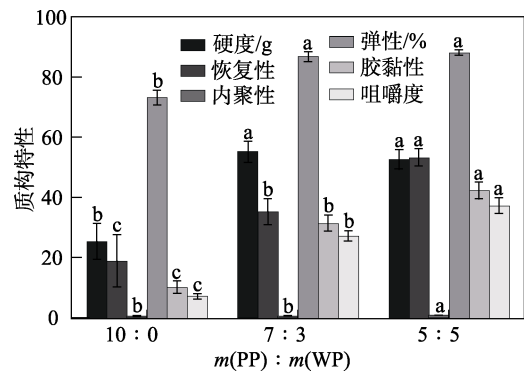


图 6 不同 $m(PP) : m(WP)$ 制备的乳液凝胶的质构特性
Fig. 6 Textural properties of emulsion gels prepared with different $m(PP) : m(WP)$

从图 6 可以看出, 与 $m(PP) : m(WP)=10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶相比, $m(PP) : m(WP)=7 : 3$ 、 $5 : 5$ 制备的复合蛋白乳液凝胶复合蛋白硬度分别提高了 117.29% 和 107.45% ($P < 0.05$), 说明乳清

蛋白的加入可以有效提升马铃薯蛋白乳液凝胶的质地。虽然制备的乳液凝胶的硬度和弹性没有显著差异 ($P>0.05$), 但 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=5 : 5$ 制备的乳液凝胶的恢复性、内聚性、胶黏性和咀嚼度比 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=7 : 3$ 制备的乳液凝胶分别高 50.67%、40.61%、34.69%、36.80% ($P<0.05$)。综合而言, $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=5 : 5$ 制备的乳液凝胶的质构特性更好。 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=7 : 3$ 、 $5 : 5$ 制备的复合蛋白乳液凝胶可以回弹到其原始高度的 85.00%以上, 表明两种乳液凝胶的弹性良好。而 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶的弹性仅有 78.29%, 可能是因为, 马铃薯蛋白具有较低的变性温度, 在受热后, 蛋白质分子会迅速聚集, 导致分子链尚未完全展开即发生随机交联, 从而形成结构较为粗糙的凝胶, 导致凝胶的弹性较低^[25]。从图 5A 也可以看出, 马铃薯蛋白乳液凝胶较为粗糙。

2.6 复合蛋白乳液凝胶水分分布分析

低场核磁共振技术可以通过测量氢原子的弛豫时间来反映食品中水的流动性。弛豫时间较慢表明水的流动性低^[26]。图 7 为不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 制备的乳液凝胶不同状态水弛豫时间和质量分数。

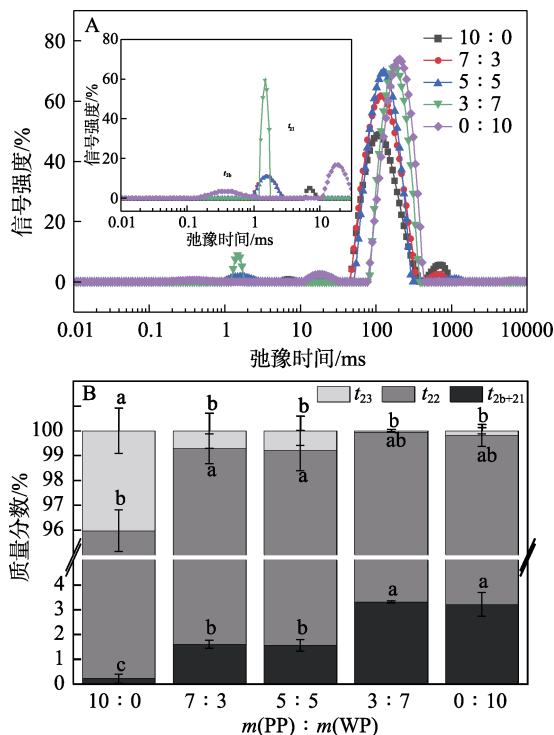


图 7 不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 制备的乳液凝胶不同状态水弛豫时间 (A) 和质量分数 (B)

Fig. 7 Relaxation time (A) and mass fraction (B) of water in different states of emulsion gels

由图 7A 可知, 复合蛋白低场核磁的结果中存在 3 个弛豫时间段: t_{2b+21} (1~10 ms)、 t_{22} (10~200 ms) 和 t_{23} (200~2200 ms) 分别对应于结合水、束缚水

和自由水, 其中, $2b$ 和 21 代表一个强结合水和一个弱结合水。

从图 7B 可以看出, 乳液凝胶中水分大部分 (质量分数 >95%) 以凝胶网络中的束缚水形式存在, 而与蛋白分子结合紧密的结合水以及凝胶表面的游离水质量分数极低。通过峰面积归一法对不同水分的质量分数进行定量分析可知, 随着乳清蛋白用量的增加, 乳液凝胶中结合水的质量分数提高。 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=3 : 7$ 制备的乳液凝胶的结合水质量分数比 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶提高了 148.09% ($P<0.05$)。这与复合蛋白乳液的表面电位呈现一定的正相关, 可能是由于蛋白表面电荷较高时, 氨基酸残基与水分子结合的能力更强。尽管 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=7 : 3$ 、 $5 : 5$ 制备的复合蛋白乳液凝胶复合蛋白的束缚水质量分数与 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=0 : 10$ 制备的乳清蛋白乳液凝胶没有显著差异 ($P>0.05$), 但其束缚水质量分数与 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶相比分别提高了 2.01% 和 1.97% ($P<0.05$), 表明马铃薯蛋白和乳清蛋白复配后, 蛋白质之间的相互作用增强, 微观结构发生改变, 使凝胶的网络结构更加致密, 这导致凝胶中发生水分迁移, 其中的一部分束缚水被转化为结合水。马铃薯蛋白乳液凝胶的游离水显著高于其他凝胶, 说明马铃薯蛋白乳液凝胶的持水性可能弱于其他凝胶。这可能是由于, 乳清蛋白表面电荷多于马铃薯蛋白, 其氨基酸残基与水有更多的结合作用。

2.7 复合蛋白乳液凝胶分子间作用力结果分析

图 8 为不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 制备的乳液凝胶在不同溶液中的溶解度。

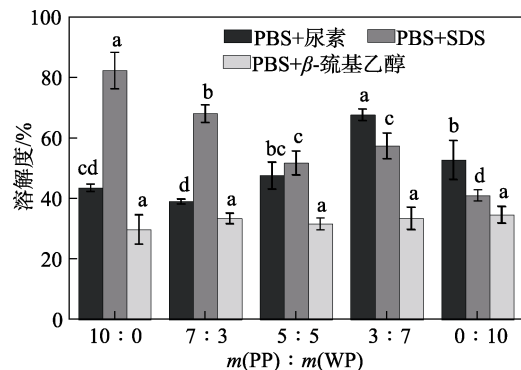


图 8 不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 制备的乳液凝胶在不同溶液中的溶解度

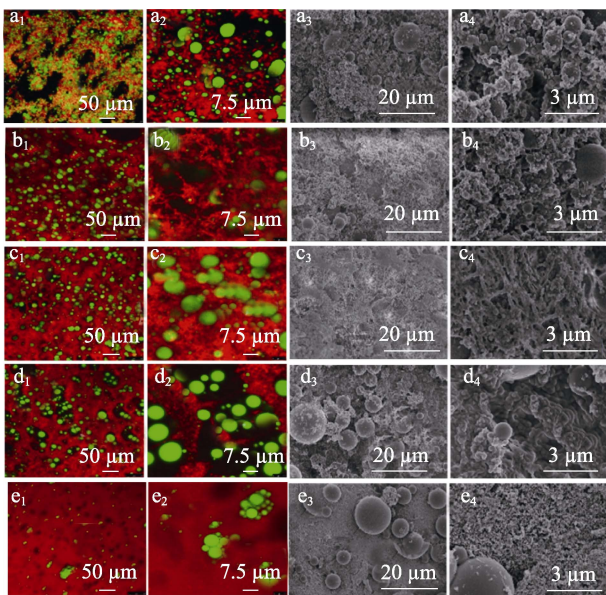
Fig. 8 Solubility of emulsion gels prepared with different $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$

从图 8 可以看出, 5 种蛋白乳液凝胶在 PBS+ β -巯基乙醇中溶解度没有显著性差异 ($P>0.05$), 全部低于其在 PBS+尿素和 PBS+SDS 中的溶解度, 表明氢键和疏水相互作用是支撑乳液凝胶结构的主要作

用力, 复合蛋白乳液凝胶中分子间的疏水相互作用大于二硫键作用, 这与马铃薯乳清复合蛋白凝胶^[13]的结果一致。 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶在 PBS+SDS 中的溶解度最高, 表明该凝胶中疏水相互作用最强。但是过高的疏水相互作用可能导致蛋白分子大聚集体的快速形成, 导致形成的凝胶网络结构粗糙, 凝胶强度降低。随着马铃薯蛋白用量的降低, 乳液凝胶在 PBS+SDS 中的溶解度降低。与 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶相比, $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 3 : 7$ 制备的复合蛋白乳液凝胶在 PBS+SDS 中的溶解度降低 30.28% ($P < 0.05$)。乳清蛋白的加入降低了复合蛋白乳液凝胶中分子间的疏水相互作用, 有利于形成较好的凝胶网络结构, 使凝胶强度得到提高。这与凝胶外观的结果一致。马铃薯蛋白乳液凝胶结构粗糙, 而 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 5 : 5$ 制备的复合蛋白乳液凝胶的外观则较光滑。

2.8 复合蛋白乳液凝胶微观结构分析

图 9 为 pH 偏移作用后的马铃薯乳清复合蛋白乳液凝胶的 CLSM 图和 SEM 图。



$a_1 \sim a_4 - 10 : 0$; $b_1 \sim b_4 - 7 : 3$; $c_1 \sim c_4 - 5 : 5$; $d_1 \sim d_4 - 3 : 7$; $e_1 \sim e_4 - 0 : 10$

图 9 不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 制备的乳液凝胶的 CLSM 图 ($a_1 \sim e_1$ 、 $a_2 \sim e_2$) 和 SEM 图 ($a_3 \sim e_3$ 、 $a_4 \sim e_4$)

Fig. 9 CLSM images of emulsion gels ($a_1 \sim e_1$ and $a_2 \sim e_2$) and SEM images ($a_3 \sim e_3$ and $a_4 \sim e_4$) of emulsion gels prepared with different $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$

从图 9 的 CLSM 图 ($a_1 \sim e_1$ 、 $a_2 \sim e_2$) 可以看出, 不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 制备的乳液凝胶在微观结构上有很大的差异, $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 3 : 7$ 制备的复合蛋白乳液凝胶蛋白质的空隙较大, 油滴填充不紧密, 这是因为, 形成的凝胶结构越松散, 脂质颗粒受到

的限制越少, 脂质颗粒越容易移动而重新聚集以变大尺寸, 导致该 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 下形成的凝胶较弱, 这与流变和质构结果一致。随着马铃薯蛋白的加入, 复合蛋白乳液凝胶的结构更加致密, 空隙更小, $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 5 : 5$ 、 $7 : 3$ 制备的复合蛋白乳液凝胶, 油滴均匀地填充在蛋白质凝胶网络中, 具有更好的凝胶性, 形成更加致密均匀的凝胶结构。 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶的蛋白结构疏松, 有较多的孔隙区域, 说明凝胶较粗糙, 结合不紧密。乳清蛋白乳液凝胶的油滴在凝胶网络中分布不均匀, 发生明显的聚集, 这可能与乳清蛋白乳液稳定性低有关。乳液颗粒的聚集减少了乳化颗粒表面蛋白与网络中蛋白质分子之间的相互作用, 减弱了乳化颗粒对凝胶网络的支撑作用, 导致其凝胶强度比较低, 易变形。

从图 9 的 SEM 图 ($a_3 \sim e_3$ 、 $a_4 \sim e_4$) 可以看出, 乳液凝胶样品的微观结构的差异。对马铃薯乳清复合蛋白乳液凝胶微观结构的评价主要取决于凝胶的粗糙度、孔隙率和孔径^[27]。 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶表面呈现明显的大空隙、油滴有明显的聚集, 而 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 0 : 10$ 制备的乳清蛋白乳液凝胶网络具有非致密的絮状结构且油滴存在于蛋白质表面。相比之下, $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 5 : 5$ 、 $7 : 3$ 制备的复合蛋白乳液凝胶具有更光滑的表面和更致密的结构, 而且油滴较为紧密地镶嵌在蛋白内部。这可能是因为, 马铃薯蛋白通过静电相互作用、氢键和范德华力与乳清蛋白形成了三维凝胶网络^[28]。而 $m(\text{PP}) : m(\text{WP}) = 3 : 7$ 制备的复合蛋白乳液凝胶, 相对较高的 WP 用量可能导致蛋白质相互作用的改变, 导致凝胶的孔隙增加和油滴聚集。

2.9 复合蛋白乳液凝胶的 FTIR 分析

图 10 为不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 制备的乳液凝胶的二级结构含量。

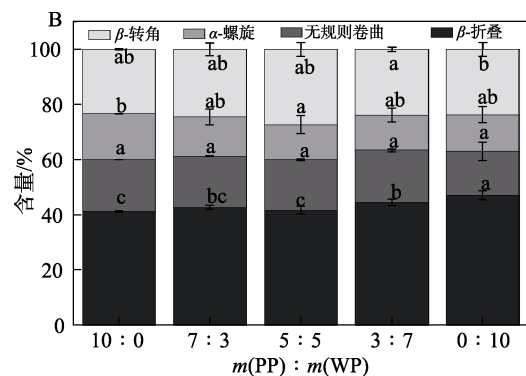


图 10 不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 制备的乳液凝胶的蛋白二级结构含量

Fig. 10 Secondary structure content of emulsion gels prepared with different $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$

酰胺 I 带 (1600~1700 cm^{-1}) 主要是由 C—O 和 C—N 键的伸缩振动引起的^[29]; 酰胺 II 带 (1510~1550 cm^{-1}) 是由 N—H 键的弯曲振动和 C—N 键的拉伸振动引起的^[30]。对两者进行数学处理可以得到不同比例复合蛋白乳液凝胶的二级结构含量。从图 10 可以看到, β -折叠结构 (41.13%±0.35%~47.02%±1.60%) 和 β -转角结构 (23.27%±0.27%~27.31%±2.49%) 是凝胶中主要的二级结构, 含量合计约为 70%。 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=3 : 7$ 制备的乳清蛋白乳液凝胶中 β -折叠结构的含量与 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶相比提高了 14.3% ($P < 0.05$)。 β -折叠含量的提高与氢键作用增加相关, 这与凝胶中分子间作用力为氢键的结论一致, 因为氢键是支撑蛋白二级结构的主要结构力。而有研究表明, 疏水性相互作用是马铃薯乳清复合蛋白凝胶的主要作用力^[13], 这与凝胶中分子间作用力的结果一致, 疏水性相互作用是维持马铃薯乳清复合蛋白乳液凝胶结构的主要分子间作用力之一。

3 结论

通过对不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 制备的乳液凝胶特性的考察, 得到如下结论:

(1) 当 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 增大时, 复合蛋白乳液凝胶综合特性要优于马铃薯蛋白或乳清蛋白乳液凝胶。

(2) $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=5 : 5$ 、 $7 : 3$ 制备的复合蛋白乳液凝胶的温度循环终点储能模量 (G') 与损耗模量 (G'') 显著高于 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶。

(3) 合适的 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 可显著提高凝胶质构特性和束缚水的质量分数。 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=5 : 5$ 、 $7 : 3$ 制备的复合蛋白乳液凝胶的强度、胶黏性、弹性和咀嚼度显著高于 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶。

(4) $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=5 : 5$ 、 $7 : 3$ 制备的复合蛋白乳液凝胶的束缚水质量分数高于 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶。

(5) 不同 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})$ 会影响凝胶的物理特性。 $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=5 : 5$ 、 $7 : 3$ 制备的复合蛋白乳液凝胶结构比较致密, 并且油滴较为紧密地镶嵌在蛋白内部; $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=10 : 0$ 制备的马铃薯蛋白乳液凝胶结构疏松; $m(\text{PP}) : m(\text{WP})=3 : 7$ 、 $0 : 10$ 制备的蛋白乳液凝胶的油滴比较聚集, 不能很好地分布在蛋白空隙中, 这是导致其成胶较弱的原因。

本研究为马铃薯蛋白替代乳清蛋白制备乳液凝胶提供了实验依据, 为马铃薯乳清复合蛋白乳液凝胶体系的实际应用提供了理论基础。

参考文献:

- [1] ZHI L Y, LIU Z, WU C, *et al.* Advances in preparation and application of food-grade emulsion gels[J]. Food Chemistry, 2023, 424: 136399.
- [2] JIANG W X, QI J R, LIAO J S, *et al.* Acid/ethanol induced pectin gelling and its application in emulsion gel[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118: 106774.
- [3] BI C H, WANG P L, SUN D Y, *et al.* Effect of high-pressure homogenization on gelling and rheological properties of soybean protein isolate emulsion gel[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 277: 109923.
- [4] CUI M N (崔梦楠), LU Y (鹿瑶), GAO Y X (高彦祥), *et al.* A review on the preparation and application of food emulsion gels[J]. Food Science (食品科学), 2019, 40(3): 323-329.
- [5] ZHU D, DAMODARAN S, LUCEY J A. Physicochemical and emulsifying properties of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates produced in aqueous solution[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(5): 2988-2994.
- [6] CHEN H, GAN J, JI A G, *et al.* Development of double network gels based on soy protein isolate and sugar beet pectin induced by thermal treatment and laccase catalysis[J]. Food Chemistry, 2019, 292: 188-196.
- [7] 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.
- [8] GRAÇA C, RAYMUNDO A, DE SOUSA I. Rheology changes in oil-in-water emulsions stabilized by a complex system of animal and vegetable proteins induced by thermal processing[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 74: 263-270.
- [9] 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.
- [10] LU Y, MAO L K, HOU Z Q, *et al.* Development of emulsion gels for the delivery of functional food ingredients: From structure to functionality[J]. Food Engineering Reviews, 2019, 11(4): 245-258.
- [11] ZHANG X G, ZHANG T H, LI S Y, *et al.* Mixed whey and pea protein based cold-set emulsion gels induced by calcium chloride: Fabrication and characterization[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 126641.
- [12] HUSSAIN M, QAYUM A, ZHANG X X, *et al.* Potato protein: An emerging source of high quality and allergy free protein, and its possible future based products[J]. Food Research International, 2021, 148: 110583.
- [13] 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 & Technology, 2021, 1(7): 1304-1315.
- [14] LIU X S (刘鑫硕), LIU Q N (刘倩楠), LIU W (刘伟), *et al.* Gelling properties of potato protein-egg white mixtures[J]. Food Science (食品科学), 2022, 43(2): 34-40.
- [15] WANG S N (王思念), WU J (伍娟), LI K F (李堃芳), *et al.* Properties and microstructure of potato/whey protein complex gels[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2022, 39(12): 2541-2549.
- [16] 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.
- [17] ZHANG L Y (张露妍), GUO F X (郭凤仙), YOU J Y (尤洁瑜), *et al.* γ -Aminobutyric acid and L-citrulline enhancing the gelation performance of *Ginkgo biloba* seed protein isolate[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2023, 40(12): 2731-2738.
- [18] ZHANG H W (张昊伟), WU J (伍娟), XIN M Y (辛孟瑶), *et al.* Gelation properties of whey protein isolate and potato protein hydrolysate composite gel after ultrasound and transglutaminase treatments[J]. Modern Food Science AND Technology (现代食品科技), 2023, 39(8): 148-155.