

酪蛋白湿法糖基化改性研究

刘娟, 卢蓉蓉

(江南大学食品学院, 江苏 无锡, 214122)

摘要 研究了酪蛋白糖基化湿法改性工艺, 分析了底物配比、浓度以及 pH 值对酪蛋白接枝度的影响, 并确定了酪蛋白-葡聚糖接枝反应的优化工艺参数。研究结果表明: pH 增大有助于该反应的进行, 底物的配比与浓度对反应的影响是双向的。正交分析表明, 最佳反应条件为: 酪蛋白浓度 2 mg/mL, 底物配比(酪蛋白与葡聚糖的质量比) 0.1, pH 7.8, 接枝度(DG) 可达到 35.10%, 且褐变指数仅为 0.198。乳化性能测定结果表明随着接枝度的增大, 乳化性逐渐增大, 当接枝度为 35% 时, 酪蛋白的乳化性提高了约 1.5 倍。SDS-PAGE 结果证实酪蛋白经湿法改性生成了接枝共聚物。

关键词 酪蛋白, 葡聚糖, 湿法, 接枝反应

酪蛋白具有较高的营养价值和功能性质^[1], 可添加到其他食品中强化蛋白质或改善食品品质。然而, 酪蛋白的功能特性依然存在着一定的缺陷, 例如低酸性条件下, 溶解性差, 且水溶性和乳化性也较差, 限制了酪蛋白的使用。因此, 为改善酪蛋白的一些功能特性, 如溶解性、乳化性以及起泡性等, 扩大酪蛋白的使用范围, 需对其进行适度改性。

蛋白质的改性有物理、化学(酰化、磷酸化、糖基化及去酰胺等)和酶(生物工程)等方法。在这些方法中, 有的效果不显著, 如物理方法; 有的使用了化学有毒试剂, 如化学方法, 从而使产品在食品工业中的应用受到限制。从 1980 年代末期开始, 国际上把研究的重点转移到蛋白质-糖接枝改性上。该反应基于美拉德反应, 不需要任何化学试剂作为催化剂, 仅加热就可使该反应自发地进行, 经接枝改性的蛋白质功能性, 如水溶性、乳化性等都有较大的提高^[2], 是目前蛋白改性众多方法中较为理想的方法。

目前, 蛋白质与还原糖通过美拉德反应进行接枝改性的方法主要有干法^[3,4]和湿法^[5~7]2 种。本文以酪蛋白为原料与葡聚糖通过美拉德反应进行湿法接枝反应, 通过对底物浓度及配比和 pH 等因素的综合考虑, 对该接枝反应及反应产物的功能性质进行分析和研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料与主要试剂

干酪素, 化学纯, 国药集团化学有限公司; 葡聚糖 2 万(右旋糖酐), 化学纯, 国药集团化学有限公司; 2,

4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS), Sigma 公司; 福临门大豆色拉油, 东海粮油; 十二烷基硫酸钠(SDS), 化学纯; 其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

HH-S 数显恒温油浴锅, 金坛市金伟实验仪器厂; 722 型分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; FJ-200 高速分散均质机, 上海标本模型厂。

1.3 接枝反应

称取一定量的酪蛋白, 加入 0.066 7 mol/L 磷酸缓冲液中, 室温下磁力搅拌 1 h。加入一定量的葡聚糖, 混合搅拌 30 min, 取 8 mL 混合液装入带旋塞的试管中, 密封后置于 110℃ 的油浴中加热 60 min; 反应结束后冰浴迅速冷却。

1.4 接枝度测定(TNBS 法)

取 0.25 mL 样品加入盛有 2 mL 的磷酸缓冲液(pH 8.2, 0.212 5 mol/L)的试管中, 混匀, 然后加入 1 mL 0.01% TNBS 溶液, 试管于 50℃ 水浴避光加热 30 min。反应完成后, 加入 2 mL 0.1 mol/L 无水亚硫酸钠终止反应, 试管于室温下放置 15 min 后, 测定 420 nm 下的吸光值, 以水为空白^[8]。

蛋白质接枝度(degree of graft, DG)的计算:

$$DG/\% = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

式中, A_0 为未反应时 TNBS 所测蛋白质自由氨基数; A_t 为反应 t 时刻蛋白质自由氨基数。

1.5 褐变指数的测定

取 2 mL 样品液加入 2 mL 稀释液(含质量分数 10% 的 SDS 及 0.05 mol/L 硼砂), 在 420 nm 下测定吸光值^[9]。 A_{420} 数值越小, 表示褐变指数越小, 对产

第一作者: 硕士研究生(卢蓉蓉教授为通讯作者)。

收稿日期: 2008-04-23, 改回日期: 2008-06-24

品的色泽越为有利。

1.6 乳化性及乳化稳定性的测定

参照文献[10]的方法,进行改进:取样溶解成蛋白含量为 1 mg/mL 的溶液,取 30 mL 该溶液和 10 mL 油,在高速分散器上以 10 000 r/min 的转速分散 1 min,制成体积分数 25% 的 O/W 乳状液。立即从底部取 50 μ L 乳状液稀释于 5 mL 质量浓度为 1 mg/mL 的 SDS 溶液,摇匀,迅速在 500 nm 下测吸光度,以吸光度值作为乳化指数。

1.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

分离胶浓度 12%,浓缩胶浓度 5%,蛋白浓度 1 mg/mL,电泳上样量 12 μ L,电泳电压 120 V,当染料前沿距橡胶框底边 1 cm 时,停止电泳。在固定液中固定 20 min 后,用考马斯亮蓝 R250 染色 20 min 后,进行洗脱。

1.8 数据统计及分析

文中数据为 3 次平行测定值的平均值。采用 SPSS 13.0 软件的 One-Way ANOVA 对数据在 $\alpha=0.05$ 水平下进行显著性分析。

2 结果与讨论

在前实验基础上,选择反应温度为 110 $^{\circ}$ C,反应时间 60 min。本实验主要研究了酪蛋白浓度、底物配比、pH 值 3 因素对接枝反应的影响。

2.1 酪蛋白浓度对反应的影响

当反应物的配比一定时,随着反应物浓度的提高,反应物分子之间碰撞的几率大大增加,有利于反应的进行。但是,浓度增加到一定程度,考虑到蛋白质分子和多糖分子的空间位阻,分子之间的碰撞几率会减少,不利于反应的进行。此外,随着糖浓度的提高,有可能加速焦糖化反应的发生,反应体系的褐变指数随着反应物的浓度的提高而加深。因此,有必要对酪蛋白浓度对反应程度的影响进行研究。控制反应条件为:温度 110 $^{\circ}$ C,反应 60 min, pH 7.4,底物配比 0.1,改变酪蛋白浓度,研究其对接枝反应的影响,结果如图 1。

统计分析表明,酪蛋白浓度对 DG 和褐变程度影响显著($P<0.05$)。从图 1 可以看出,随着酪蛋白浓度的增大,接枝度呈先增大后下降的趋势。然而,褐变指数随酪蛋白浓度的增大而逐渐增大,可见,反应底物浓度的增大对产品的色泽不利。因此,选定酪蛋白浓度为 1~3 mg/mL, DG 较大,且褐变程度相对较小,对反应的进行比较有利。

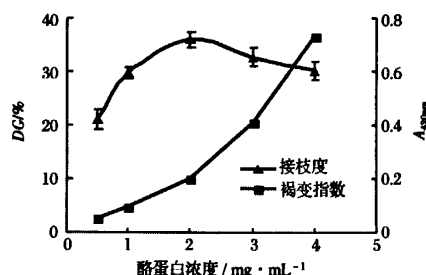


图 1 酪蛋白浓度对 DG 和褐变指数的影响

2.2 底物比对反应的影响

蛋白和多糖的分子间共价键合是在一定的基团间进行的。为得到更高的接枝度,要求反应物的配比适当,以期实现最佳比例的键合。适当的反应物配比不仅可以提高反应的速度和最终的反应程度,而且还可以减少副反应(如焦糖化)的发生。因此,对底物比对反应程度的影响进行研究。控制反应条件为:温度 110 $^{\circ}$ C,反应时间 60 min, pH 7.4,糖用量不变,改变底物配比,研究其对接枝反应的影响,结果如图 2。

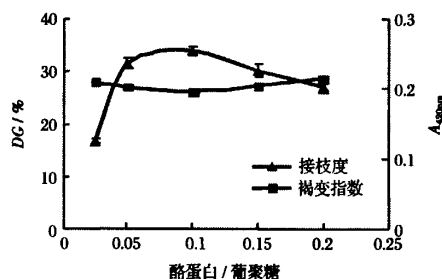


图 2 底物比对 DG 和褐变指数的影响

图 2 显示,底物比对 DG 影响显著($P<0.05$), DG 随着酪蛋白与糖的质量比呈先增后减的趋势。而底物比对褐变指数影响不显著($P>0.05$),这是因为褐变主要是由副反应——焦糖化作用引起的。因此,选取底物配比为 0.05~0.15 时,对接枝改性反应是比较适宜的。

2.3 pH 对反应的影响

控制反应条件为:反应温度为 110 $^{\circ}$ C,反应时间 60 min,酪蛋白浓度 2 mg/mL,底物配比 0.1,改变 pH,研究其对接枝反应的影响,结果如图 3。

结果显示,pH 因素对 DG 和褐变指数的影响显著($P<0.05$)。从图 3 中可以看出,随着 pH 的升高,接枝程度与褐变程度都随之增大,但当 pH 高于 7.8 后,pH 对 DG 的影响不显著,而褐变程度则随着 pH 的升高而急剧增大。美拉德反应本质上是碱催化反应,因此 pH 偏向碱性有利于反应的进行。但是碱性过强,蛋白质的一级结构可

能发生变化,如脱氨、脱羧和肽键断裂,引起“脱赖反应”,将氨基酸转变成有毒的化合物,反而不利于接枝反应的进行^[11]。因此,选取 pH 为 7.4~8.2 时,DG 较大,且褐变程度相对较小。

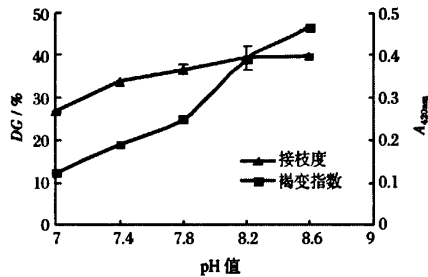


图3 pH对DG和褐变程度的影响

2.4 酪蛋白-葡聚糖湿法接枝反应工艺优化

影响蛋白质-糖接枝反应程度的主要因素有酪蛋白浓度、底物配比及缓冲液 pH。确定加热温度为 110℃,加热时间为 60 min,对酪蛋白浓度(A)、底物配比(B)及缓冲液 pH(C)进行 $L_9(3^3)$ 正交设计试验和分析,因素水平表见表 1。

表 1 $L_9(3^3)$ 正交实验因素表

水平	A(酪蛋白浓度) /mg·mL ⁻¹	B(底物配比) /g·g ⁻¹	C(pH)
1	1	0.05	7.4
2	2	0.10	7.8
3	3	0.15	8.2

DG 越大,越有利于接枝反应;但褐变程度的加深,对产品的色泽会造成负面影响。因此,正交试验利用双指标综合评价,其中最大值为 100%,最小值为 0,分别将 DG 及褐变指数按百分数换算。将 2 指标进行拟合;其中 DG 影响占综合评分的 70%,褐变指数影响为负值,占综合评分的 30%。正交试验结果及极差分析见表 2。

表 2 酪蛋白-葡聚糖接枝反应 $L_9(3^3)$ 正交实验结果

序号	A	B	C	DG/%	$A_{420\text{ nm}}$
1	1	1	1	15.33	0.220
2	1	2	2	27.71	0.197
3	1	3	3	18.73	0.152
4	2	1	2	28.54	0.546
5	2	2	3	32.20	0.368
6	2	3	1	33.18	0.163
7	3	1	3	29.77	0.757
8	3	2	1	33.69	0.435
9	3	3	2	32.24	0.326
K_1	23.77	52.50	120.13		
K_2	151.96	154.57	131.65		
K_3	136.89	83.16	91.63		
R	128.19	102.07	40.02		

从表 2 中可以看出,最佳工艺条件为 $A_2B_2C_2$,即:酪蛋白浓度 2 mg/mL,底物配比 0.1,pH 7.8;正交实验极差分析结果表明,影响酪蛋白-葡聚糖湿法

改性反应的因素依次为:酪蛋白浓度>底物配比>pH

采用优化工艺参数,验证试验结果显示反应的接枝度为 35.10%,褐变指数为 0.198。

2.5 不同 DG 对接枝物乳化性能的影响

蛋白质与多糖都有稳定的水包油乳化液的性能。一般来说,蛋白质因能在油-水或气-液界面上形成吸附层降低界面张力而多在胶体体系中充当乳化剂,多糖则由于其良好的增稠和持水特性而常用做稳定剂。蛋白质-多糖的接枝物在胶体体系中具有乳化和稳定的双重作用。接枝物的蛋白质部分可以有效地吸附在油-水界面上降低界面张力,同时,共价结合的多糖分子链在吸附膜的周围形成立体网状结构增加了膜的厚度和机械强度。就乳化性能而言,已有报告指出,这种接枝物优于某些小分子乳化剂^[12]。

从图 4 可以看出,随着 DG 的增大,酪蛋白-葡聚糖接枝物乳化性逐渐增大,当 DG 达到 35%时,酪蛋白乳化性增大了 1.5 倍。因此,利用美拉德反应改性酪蛋白,可提高酪蛋白的乳化性能。

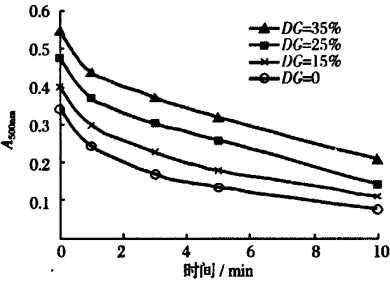
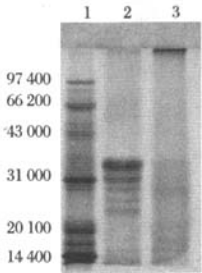


图 4 DG对酪蛋白-葡聚糖接枝物乳化性的影响

2.6 酪蛋白-葡聚糖接枝反应物的 SDS-PAGE

为了证实酪蛋白-葡聚糖之间发生接枝反应,因此进行了 SDS-PAGE 分析,来鉴别共价连结是否发生。电泳结果如图 5 所示:



1- 标准相对分子质量蛋白;兔磷酸化酶 B (97 400),牛血清白蛋白(66 200),兔肌动蛋白(43 000),牛碳酸酐酶(31 000),胰蛋白酶抑制剂(20 100),鸡蛋清溶菌酶(14 400);2- 酪蛋白;3- 酪蛋白-葡聚糖接枝反应物。

图 5 酪蛋白-葡聚糖接枝反应物的 SDS-PAGE

图谱显示,反应后,酪蛋白-葡聚糖接枝物得电泳谱带相对于酪蛋白来说,分子量在 $>30\ 000\ \text{u}$ 的蛋白条带模糊,基本消失,而在分离胶顶端出现1条明显的蛋白条带,这是由于酪蛋白-葡聚糖接枝物的分子量大,电泳速率大大减慢。证实了葡聚糖与酪蛋白的确发生了接枝反应,生成了高分子酪蛋白-葡聚糖接枝物。

3 结 论

(1)优化工艺结果表明,当酪蛋白浓度为 $2\ \text{mg/mL}$,底物配比(酪蛋白与葡聚糖的质量比)为 0.1 , pH 为 7.8 时,在 110°C 下加热时间为 $60\ \text{min}$,接枝度可达到 35.10% ,且褐变程度仅为 0.198 。

(2)正交实验结果表明:影响酪蛋白-葡聚糖湿法接枝反应的因素依次为:酪蛋白浓度 $>$ 底物配比 $>$ pH 。

(3)随着接枝度的增大,酪蛋白的乳化性逐渐增大,当接枝度达到 35% 时,酪蛋白的乳化性提高了 1.5 倍。

(4)SDS-PAGE 结果证实酪蛋白经湿法改性生成了接枝共聚物。

参 考 文 献

- 1 郭本恒. 乳品化学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2001
- 2 Kato A. Industrial applications of maillard-type protein-polysaccharide conjugates[J]. Food Sci Technol Res, 2002, 8(3): 193~199
- 3 Kato A, Sasaki Y, Furuta R. Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures[J]. Agric Biol Chem, 1990, 54 (1): 107~112
- 4 Kato A, Ryusuke M, Naotoshi M, et al. Functional casein-polysaccharide conjugates prepared by controlled dry heating[J]. Biosci Biotech Biochem, 1992, 56(4): 567~571
- 5 Chevalier F, Hobert J M, Popineau Y, et al. Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycosylated through the maillard reaction is related to the nature of the sugar[J]. Int Dairy J, 2001, 11: 145~152
- 6 Brands C M J, Van Boekel M A. Kinetic modelling of reactions in heated disaccharide-casein systems[J]. Food Chem, 2003, 83: 13~26
- 7 Jing H, Kitts D D. Chemical and biochemical properties of casein-sugar maillard reaction products [J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40: 1 007~1 015
- 8 Adler Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysis by trinitrobenzene- sulfonic acid [J]. J Agric Food Chem, 1979, 27(6): 1 256~1 262
- 9 Fogliano V, Monti S M, Musella T, et al. Formation of coloured maillard reaction products in a gluten-glucose model system[J]. Food Chem, 1999, 66: 293~299
- 10 Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins; evaluation of a turbidimetric technique[J]. J Agric Food Chem, 1978, 26(3): 718~723
- 11 管军军, 裴爱泳, 刘晓亚. 微波辐射大豆分离蛋白-糖接枝反应条件的研究[J]. 食品与技术生物学报, 2005, 24 (5): 16~20
- 12 Matsudomi N, Inoue Y. Emulsion stabilization by maillard-type covalent complex of plasama protein with galactomannan [J]. J Food Sci, 1995, 60(2): 265~268

Study of Casein-Dextran Graft Reaction by Wet-Heating

Liu Juan, Lu Rongrong

(School of Food Science and Technology, Jiangnan Univerisyt, Wuxi 214122, China)

ABSTRACT Casein-Dextran graft reaction products were prepared by Maillard reaction under wet-heating condition. In this study, the effects of the ratio and concentration of reactants and pH on the graft reaction were studied, which showed that pH could improve the reaction while the ratio and concentration of reactant have the bidirectional effects on the reaction. Furthermore the optimal processing was investigated, which led to the conclusion that casein concentration $2\ \text{mg/mL}$, casein: dextran $0.1(w/w)$, $\text{pH}\ 7.8$ at 110°C , $60\ \text{min}$ would yield Casein-Dextran graft reaction products with DG 35.10% . As the DG increasing, Casein was improved on emulsifying properties. When DG was 35% , the emulsifying activity of the production was 1.5 times higher than that of casein. Covalent attachment of dextran to casein was confirmed by SDS-PAGE.

Key words Casein, Dextran, Maillard, wet-heating, graft reaction