

微波固相合成糖基化卵清蛋白及其理化功能特性研究

段邓乐¹,涂宗财^{1,2*},王辉¹,沙小梅²,黄涛¹

1(南昌大学,食品科学与技术国家重点实验室,江西 南昌,330047)

2(江西师范大学 生命科学学院,江西 南昌,330022)

摘 要 以卵清蛋白(ovalbumin,OVA)和葡萄糖(glucose)为原料,以传统加热为对比,研究不同底物配比下微波加热协同美拉德反应对卵清蛋白的游离氨基含量、pH值、褐变程度、乳化性质和起泡性的影响。结果表明:在微波加热以及底物中蛋白质比例较低的情况下,更能促进糖基化OVA的游离氨基含量和pH值的下降,褐变程度、乳化性质及起泡性质的提高。

关键词 卵清蛋白;葡萄糖;美拉德反应;理化功能性质

鸡蛋中的卵清蛋白(ovalbumin,OVA)是一种优质蛋白,属于典型的球蛋白。此外,OVA是蛋清蛋白中的主要组成成分,而蛋清蛋白是食品加工过程中广泛应用的一种功能性食品基料^[1-2]。通过美拉德反应对蛋白质进行糖基化改性,可以明显改善其理化功能性质,从而提高食品的质量以及可利用度^[3]。影响美拉德反应的因素有很多,包括反应温度、时间和底物比例、处理方式(微波、超声波)等^[4-5]。

近年来,微波由于其高效节能的特性,已被广泛应用于食品生产加工中。TU等^[5]研究了微波功率以及微波时间协同糖基化对OVA的影响,发现随着微波功率的增大以及微波时间的延长,糖基化OVA的抗氧化活性以及乳化性等逐渐增加。然而,不同食品在加工过程中,其原料中蛋白质和糖的比例往往各不相同,且蛋白质的理化功能性质在微波场中随着糖基化反应底物比例的变化情况尚未阐明。因此,本论文主要以OVA为研究对象,采用传统加热为对比,研究微波场中不同底物比例对糖基化OVA理化功能性质的影响,主要包括游离氨基、pH值、褐变程度、乳化性质和起泡性质等。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡蛋,老南沟鸡蛋;葡萄糖、阿拉丁;邻苯二甲醛

(OPA)、赖氨酸,美国Sigma公司;大豆油,金龙鱼有限公司;十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfonate, SDS)、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$,天津市大茂化学试剂厂;HCl等均的分析纯。

1.2 仪器与设备

G80F20CN2L-B8(RO)型微波炉,广东格兰仕微波炉电器制造有限公司;DZG-6021P pH计,瑞士梅特勒-托利多有限公司;T6新世纪紫外-可见分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;LGJ-1型冷冻干燥机,北京亚泰科隆仪器技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 卵清蛋白的提取^[6]

以新鲜的老南沟鸡蛋为原料,采用盐析法分离提取卵清蛋白,冷冻干燥备用,所提蛋白纯度大于95%。

1.3.2 美拉德反应

称取适量的OVA溶于0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.8)配制0.05 g/mL的OVA溶液,按OVA:葡萄糖质量比为1:1,2:1,3:1,4:1加入葡萄糖,充分混匀后,冷冻干燥。将干燥后的样品放置于装有饱和KBr溶液的干燥器中,室温静置24 h。采用间歇式加热处理:微波功率为400 W,微波辐射1 min至最终温度 $(60 \pm 2)^\circ\text{C}$,冰水浴1 min;水浴加热温度为 60°C ,加热1 min,冰水浴1 min。重复上述操作,直至加热12 min后,冰水浴冷却终止反应后,配制蛋白质浓度为0.005 g/mL的样品溶液备用。

1.3.3 游离氨基含量的测定^[7]

第一作者:硕士研究生(涂宗财教授为通讯作者,E-mail:tuzc_mail@aliyun.com)。

基金项目:国家自然科学基金(31560458);国家高技术研究发展计划专项经费(2013AA102205)

收稿日期:2016-02-25,改回日期:2016-04-14

OPA 配制:7.620 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 和 200 mg SDS 溶于 150 mL 的蒸馏水中。取 160 mg 的 OPA 溶于 4 mL 的无水乙醇溶液中,并转移至上述溶液中。再加入 176 mg 二硫苏糖醇 (DTT),于容量瓶中定容至 200 mL。

样品测定:取 200 μL 样品与 4 mL 的 OPA 试剂反应 5 s,避光静置 2 min,340 nm 处测定吸光度值。200 μL 的蒸馏水和 4 mL 的 OPA 试剂混匀作为空白。根据赖氨酸标准溶液的标准曲线计算样品溶液中游离氨基的含量。

1.3.4 pH 值测定^[8]

用 pH 计测定制备好的样品溶液的 pH 值。

1.3.5 褐变程度的测定^[9]

采用紫外-可见分光光度计于 294 nm 和 420 nm 处测定样品溶液的吸光度值。

1.3.6 乳化性质的测定^[10]

取 3 mL 大豆油,加入 9 mL 样品,在室温下用高速分散机均质 1 min,转速为 9 500 r/min,迅速从底部吸取 100 μL 乳状液,加入到 4.9 mL 浓度为 1 mg/mL 的 SDS 溶液中,混合均匀,500 nm 波长处测定吸光度 (A_0),10 min 后,以同样方式再次测定吸光度 (A_{10})。

乳化性 (emulsion activity, EAI) 和乳化稳定性 (emulsion stability, ESI) 的计算公式如下:

$$\text{EAI}/(\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times \text{DF}}{F \times \rho \times 10\,000} \quad (1)$$

$$\text{ESI}/\text{min} = \frac{A_{10} \times \Delta t}{A_0 - A_{10}} \quad (2)$$

其中:DF 为稀释倍数,此处为 50;F 为乳状液中有体积分数,此处为 25%; Δt = 10 min; ρ 为乳化液形成前蛋白质水溶液中蛋白质量浓度, g/mL。

1.3.7 起泡性质的测定^[11]

取 25 mL 样品溶液,室温下用高速分散均质机均质 2 min,转速为 9 500 r/min,然后快速转移至 50 mL 量筒中,记录泡沫体积 (V_0),静置 30 min 后,记录泡沫体积 (V_{30})。

起泡性 (foaming ability, FA) 和起泡稳定性 (foaming stability, FS) 计算公式如下:

$$\text{FA}/\% = \frac{V_0 - 25}{25} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{FS}/\% = \frac{V_{30} - 25}{25} \times 100 \quad (4)$$

1.4 统计分析

样品做 3 次平行试验,采用 Origin 8.0 软件作图,SPSS 13.0 软件进行统计分析,每组测定 3 个平

行,取平均值。结果用 (平均值 \pm 标准偏差) 表示, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 游离氨基含量变化

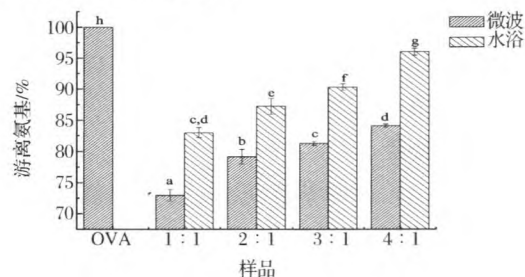


图 1 OVA 浓度对游离氨基含量的影响

Fig. 1 The effect of OVA concentration on free amino group content

注:样品 1:1 2:1 3:1 4:1 分别代表 OVA:葡萄糖样品(质量比)。图 2~图 8 同。
小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 2~图 8 同。

游离氨基含量通常用来评价美拉德反应的程度,游离氨基含量减少的越多,表明美拉德反应程度更高^[12]。由图 1 可知,微波加热和传统加热均可以降低 OVA 中游离氨基的含量,表明微波加热和传统加热都会促进美拉德反应程度,且与传统加热相比,微波加热会导致美拉德反应程度更高。这主要是因为微波可以穿透材料并且储蓄能量,可通过体积加热产生热,由于能量的传输不依赖从表面扩散的热量,因此可以实现厚材料的快速和均匀加热,从而更好地促进美拉德反应的进行^[5]。当底物质量比为 1:1 时,样品的游离氨基含量下降最多,表明当 OVA 和葡萄糖的质量比为 1:1 时,美拉德反应速率较其他底物比例快。这是因为当反应体系中葡萄糖含量越大时,糖基化反应程度更高^[13]。

2.2 pH 值

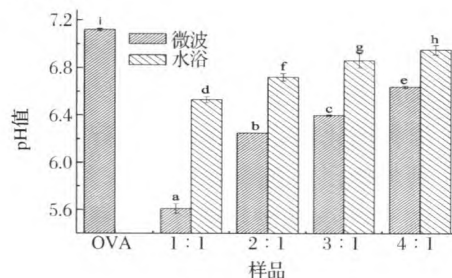


图 2 OVA 浓度对 pH 值的影响

Fig. 2 The effect of OVA concentration on pH

由图 2 可知,微波和传统加热之后, OVA 的 pH 值明显下降,且微波加热比传统加热引起 pH 值下降

的程度更大。随着 OVA 含量的增加,糖基化 OVA 的 pH 值下降程度逐渐降低。其中当 OVA-葡萄糖质量比为 1:1 时, pH 值下降最多,由未处理时的 7.12 下降到 5.61 (微波加热) 和 6.53 (传统加热)。这是因为微波加热时及当反应底物中还原糖含量较高时,能够更好的促进美拉德反应的进行,使得反应产物中有机酸(甲酸、乙酸)的生成量较高^[14-15]以及氨基的消耗量较大(图 1),因而 pH 值较低。

2.3 褐变程度

在 294 nm 处的紫外可见,吸光度值与美拉德反应的中间产物生成量有关,可用来监测美拉德反应速率;420 nm 处的吸光值与反应末期棕色聚合物生成量有关,可检测褐变反应的最终阶段^[9,16]。

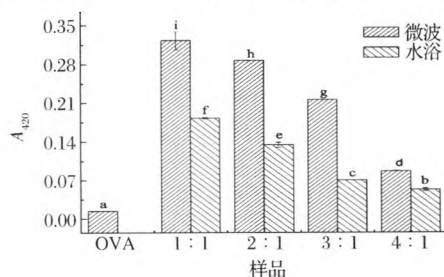


图 3 OVA 浓度对 420nm 处吸光度值的影响

Fig. 3 The effect of OVA concentration on absorbance at 420 nm

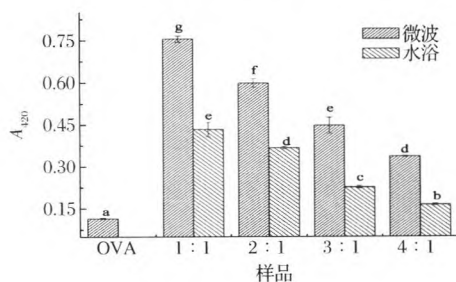


图 4 OVA 浓度对 294 nm 处吸光度值的影响

Fig. 4 The effect of OVA concentration on absorbance at 294 nm

如图 3 和图 4 可知,微波加热之后,糖基化 OVA 的褐变程度均高于传统加热。美拉德反应明显受到蛋白质和还原糖的比例以及加热方式的影响。随着反应底物中葡萄糖含量的降低,420 nm 和 294 nm 处的吸光值逐渐下降,表明美拉德反应速率和反应的最终产物随着葡萄糖含量的降低而逐渐下降。当 OVA-葡萄糖质量比为 1:1 时,褐变程度均高于其他比例,表明此时美拉德反应程度较其他比例高。当 OVA-葡萄糖质量比为 3:1 和 4:1 时,褐变程度值在 0.2 左右甚至小于 0.2,说明糖基化反应程度基本处于美拉德

反应的初期或中期阶段^[17]。

2.4 乳化性质

蛋白质在食品乳化性质的形成中起着重要的作用。由图 5 和图 6 可知,微波加热和传统加热均会增加 OVA 的乳化性和乳化稳定性。这是因为加热处理会促进蛋白质和还原糖发生美拉德反应,产生高分子质量的糖结合物。它能与疏水性蛋白质共轭结合,并牢固的吸附在水-油界面,同时亲水性的糖类物质可以被水相介质高度溶解,从而提高蛋白质的乳化性质^[18]。

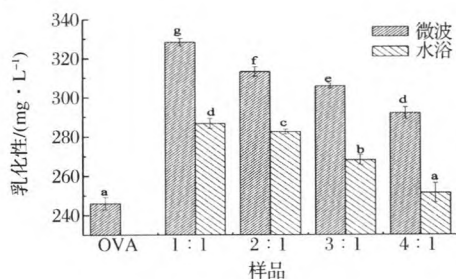


图 5 OVA 浓度对乳化性的影响

Fig. 5 The effect of OVA concentration on EAI

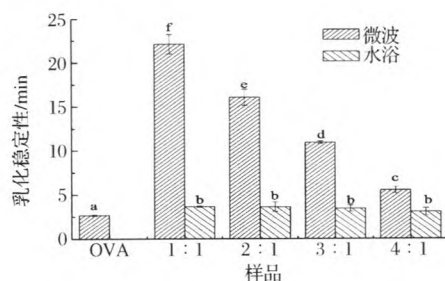


图 6 OVA 浓度对乳化稳定性的影响

Fig. 6 The effect of OVA concentration on ESI

当底物比例为 1:1 时,样品乳化性以及乳化稳定性提高最多,当采用微波加热时,乳化性由未处理的 246.06 m²/g 增加到 328.35 m²/g,乳化稳定性由未处理的 2.68% 增加到 22.10%;采用传统加热时,乳化性增加到 286.6 m²/g,乳化稳定性增加到 5.47%。这表明了与传统加热相比,微波加热对蛋白质乳化性的影响更大。

在微波加热条件下 OVA 的乳化性以及乳化稳定性逐渐降低;传统加热条件下 OVA 的乳化性逐渐降低,而乳化稳定性降低幅度不明显。这是因为当 OVA 含量越小,美拉德反应速率越高,蛋白质防止液滴聚合凝结的作用越强,从而引起蛋白质乳化性质的提高^[19]。

2.5 起泡性质

蛋白质的起泡性能是蛋白质的表面性质之一,包含蛋白质的起泡性和起泡稳定性。由图 7 和图 8 可知,未经处理的 OVA 具有一定的起泡性及起泡稳定性,经过微波加热和传统加热之后,糖基化的 OVA 起泡性和起泡稳定性都有一定程度的提高,且与传统加热相比,微波加热对蛋白质起泡性质的影响更大。这是因为微波加热促进了 OVA 与葡萄糖发生美拉德反应,提高了蛋白质-糖以及蛋白质-蛋白质发生交联反应的度使得蛋白质起泡性提高^[20]。随着美拉德反应底物中 OVA 含量的增加,葡萄糖含量降低,使得蛋白质的起泡性质逐渐降低。其中当底物比例为 1:1 时,样品起泡性及起泡稳定性较其他比例提高的多,这是因为在该比例下,美拉德反应速率更高,此外,由于糖的含量较高,导致溶液的黏度较高,并且糖可以作为胶体的一部分使得蛋白泡沫膜强度增强,最终导致泡沫稳定性增加^[21]。

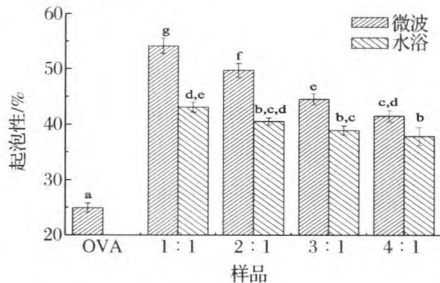


图 7 OVA 浓度对起泡性的影响

Fig. 7 The effect of OVA concentration on FA

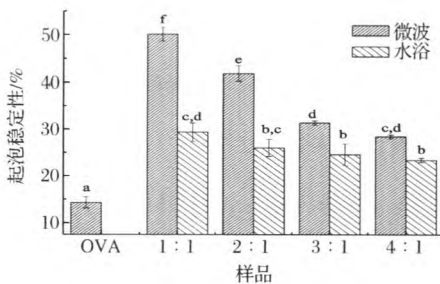


图 8 OVA 浓度对起泡稳定性的影响

Fig. 8 The effect of OVA concentration on FS

通常,糖基化会引起蛋白质的理化性质和结构的改变,进而引起蛋白质的功能特性的改变^[22]。本课题组前期研究发现,OVA 糖基化反应之后,通过糖-赖氨酸以及蛋白质分子间二硫键进行共价交联反应并形成大分子聚合物,导致其分子量增加。此外,内源性荧光强度下降, α -螺旋结构增加, β -折叠和 β -转角结构降低,说明糖基化反应之后,蛋白质的二、三级结构发生变化,从而引起蛋白质功能性质发生

改变^[5,23]。

3 结论

加热方式和反应底物比例均会影响 OVA 与葡萄糖的美拉德反应,引起 OVA 理化功能性质的改变。

(1)与传统加热相比,微波加热导致蛋白质的游离氨基含量和 pH 值下降程度更大,紫外可见吸光度和褐变程度、乳化性质和起泡性质提高程度更多,表明与传统加热相比,微波加热更能促进美拉德反应的进行,更好地提高蛋白质的功能性质。

(2)随着反应底物中 OVA 含量的增加,葡萄糖含量的减小,OVA 的游离氨基含量和 pH 下降程度逐渐减小,褐变程度、乳化性质和起泡性质提高幅度逐渐降低,表明在一定范围提高反应体系中还原糖的浓度,可以促进美拉德反应的进行,更好地提高蛋白质的功能性质。

参 考 文 献

- [1] PELLEGRINI A, HÜLSMEIER A J, HUNZIKER P, et al. Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2004, 1 672(2): 76 - 85.
- [2] 于滨,迟玉杰. 糖基化改善蛋清蛋白功能性的研究[J]. 中国家禽, 2009 (7): 15 - 18.
- [3] ZENG Y, ZHANG H, GUAN Y, et al. Comparative study on the effects of d-psicose and d-fructose in the Maillard reaction with β -lactoglobulin[J]. Food Science and Biotechnology, 2013, 22(2): 341 - 346.
- [4] 吴惠玲,王志强,韩春,等. 影响美拉德反应的几种因素研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 441 - 444.
- [5] TU Z, HU Y, WANG H, et al. Microwave heating enhances antioxidant and emulsifying activities of ovalbumin glycosylated with glucose in solid-state[J]. Journal of Food Science and Technology, 2013, 52(3): 1 453 - 1 461.
- [6] 涂宗财,钮培佩,王辉,等. 亚临界水对卵清蛋白起泡性及乳化性的影响[J]. 食品科学, 2015, 36(9).
- [7] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642 - 646.
- [8] LIU S C, YANG D J, JIN S Y, et al. Kinetics of color development, pH decreasing, and anti-oxidative activity reduction of Maillard reaction in galactose/glycine model systems[J]. Food Chemistry, 2008, 108(2): 533 - 541.
- [9] AJANDOUZ E H, DESSEAUX V, TAZI S, et al. Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelisation,

- protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems[J]. Food Chemistry, 2008, 107(3): 1 244 – 1 252.
- [10] NAGARAJAN M, BENJAKUL S, PRODPRAN T, et al. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (*Loligo formosana*) skin as affected by extraction temperatures[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 29(2): 389 – 397.
- [11] BALTI R, JRIDI M, SILA A, et al. Extraction and functional properties of gelatin from the skin of cuttlefish (*Sepia officinalis*) using smooth hound crude acid protease-aided process[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(5): 943 – 950.
- [12] LAROQUE D, INISAN C, BERGER C, et al. Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity[J]. Food Chemistry, 2008, 111(4): 1 032 – 1 042.
- [13] ZHANG X, QI J R, LI K K, et al. Characterization of soy β -conglycinin – dextran conjugate prepared by Maillard reaction in crowded liquid system[J]. Food Research International, 2012, 49(2): 648 – 654.
- [14] GU F, KIM J M, HAYAT K, et al. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system[J]. Food Chemistry, 2009, 117(1): 48 – 54.
- [15] MARTINS S I F S, VANBOEKEL M A J S. A kinetic model for the glucose/glycine Maillard reaction pathways[J]. Food Chemistry, 2005, 90(1): 257 – 269.
- [16] HUANG X, TU Z, XIAO H, et al. Characteristics and antioxidant activities of ovalbumin glycated with different saccharides under heat moisture treatment[J]. Food Research International, 2012, 48(2): 866 – 872.
- [17] 于滨, 迟玉杰. 糖基化对卵白蛋白分子特性及乳化性的影响[J]. 中国农业科学, 2009, 42(7): 2 499 – 2 504.
- [18] AKHTAR M, DICKINSON E. Whey protein-maltodextrin conjugates as emulsifying agents: an alternative to gum arabic[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(4): 607 – 616.
- [19] AKHTAR M, DICKINSON E. Emulsifying properties of whey protein-dextran conjugates at low pH and different salt concentrations[J]. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 2003, 31(1): 125 – 132.
- [20] TER HAAR R, WESTPHAL Y, WIERENGA P A, et al. Cross-linking behavior and foaming properties of bovine α -lactalbumin after glycation with various saccharides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(23): 12 460 – 12 466.
- [21] DICKINSON E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems[J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17(1): 25 – 39.
- [22] LIU J, RU Q, DING Y. Glycation a promising method for food protein modification: physicochemical properties and structure, a review[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 170 – 183.
- [23] 胡月明. 微波场内卵清蛋白糖基化反应的研究[D]. 南昌:南昌大学, 2014:37 – 41.

Physicochemical and functional properties of glycated ovalbumin in solid-state by microwave

DUAN Deng-le¹, TU Zong-cai^{1,2*}, WANG Hui¹, SHA Xiao-mei², HUANG Tao¹

1(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

2(College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

ABSTRACT Ovalbumin and glucose were used as raw materials, the effect of different substrate ratio on free amino group, pH, browning intensity, emulsifying and foaming properties of ovalbumin after glycated with glucose under microwave heating were compared with traditional heating. The results showed that under the condition of microwave heating as well as the lower protein proportion, the free amino group and pH of glycated OVA decreased significantly, but the browning intensity, emulsifying and foaming properties increased.

Key words ovalbumin; glucose; Maillard reaction; physicochemical and functional property