

大豆球蛋白(11S)-木糖接枝反应条件的研究

陈 中, 周 媛, 林伟锋, 蔡 蕾

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州, 510640)

摘 要 利用纯化的大豆球蛋白(11S)与木糖进行 maillard 接枝反应, 专一地探讨 11S 组分的羰氨反应特性, 以期将大豆蛋白应用于发酵乳的生产中, 提高发酵乳的稳定性。文中主要讨论了 5 个显著影响反应的反应条件与反应程度之间的相关关系。结果表明, 由于采用木糖及湿法反应, 只有控制好反应条件才能使得反应产物有一定的实用价值。

关键词 大豆球蛋白, 接枝, 木糖

美国化学家 Hodge^[1]曾对美拉德反应的机理作了系统的论述, 他认为美拉德反应可分成 3 阶段: 羰氨加成反应阶段, 成环、脱水、重排、异构化阶段及生成类黑素阶段。影响美拉德反应的因素有 pH 值、温度、反应时间、离子强度等。

通过美拉德反应(maillard reaction)使食品蛋白与糖进行共价交联, 从而提高蛋白质的功能性质是目前食品行业的一个研究焦点。该反应优于其它蛋白改性方法之处在于, 它仅通过加热, 而不需任何化学试剂作为催化剂即能自发进行, 是蛋白改性的理想方法之一。从目前的相关文献来看, 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 2 种: (1) 干法反应, 通过控制自发的美拉德反应来实现, 主要应用于蛋白质与多糖之间。(2) 湿法反应, 蛋白质与糖的水溶液在一定的条件下反应, 主要应用于蛋白质与单糖或双糖之间^[3~5]。研究表明, 随着糖基化程度提高, 所有糖基化蛋白在等电点 pH 范围溶解性均有显著提高, 这是由于糖类所具有的羟基为亲水基团, 从空间上保护了蛋白质, 同时也防止了蛋白的聚集^[6]。

文中以大豆球蛋白(11S)为研究对象, 着重探讨影响反应的各个因素, 包括蛋白浓度、蛋白糖配比、反应时间、反应温度、反应 pH 值 5 个因素。

1 材料和方法

1.1 主要原料及化学试剂

自制大豆球蛋白(提取方法参考文献^[5]), 经电泳测定其纯度在 90% 以上)、邻苯二甲醛、硼砂、甲醇、大豆油、木糖、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、2-巯基乙醇(2-ME)、 NaHSO_3 (SBS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、丙烯

酰胺、N,N'-二甲叉双丙烯酰胺、过硫酸氨(AP)、四甲基乙二胺(TEMED)、考马斯亮蓝 R-250, 所用试剂均为进口分析纯试剂。

1.2 主要设备

冷冻离心机、电泳仪、真空冷冻干燥机、凯氏定氮仪、凝胶扫描系统、紫外分光光度计。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白含量测定

凯氏定氮法。

1.3.2 maillard 反应

蛋白与木糖分别用磷酸盐缓冲液充分溶解, 之后混合均匀, 于盐水瓶中(铝箔纸封口), 磁力搅拌, 水浴回流反应。

1.3.3 接枝度(DG)的测定^[2]

按照 40 mg 的 OPA 溶解于 1 mL 的甲醇中, 分别加入质量分数为 20% 的 SDS 2.5 mL, 0.1 mol/L 的硼砂 25 mL 及 100 μL β -巯基乙醇, 最后用蒸馏水定容至 50 mL 的比例配制 OPA 溶液。测定时, 各取空白液(按上述比例配制溶液, 只是不加 OPA)、OPA 试剂 4 mL 于试管中, 分别注入 200 μL 经 10 000 r/min 离心的样品液的上清液部分, 混匀后于 35℃ 反应 2 min, 在 340 nm 下测其吸光值 A_{340} 。接枝度(DG%)为反应后体系自由氨基含量与反应前自由氨基含量的比值, 用前后 2 者吸光值的比值表示。

1.3.4 褐变程度的测定^[2,7]

取反应后样品液 0.2 mL, 加入 4 mL 稀释液(10% SDS, 0.05 mol/L 硼砂), 以蒸馏水做空白, 测 420 nm 处的吸光值, 褐变程度以吸光值大小表示。

1.3.5 电泳

所用分离胶浓度为 13%。

2 结果与讨论

2.1 蛋白、木糖配比对接枝反应的影响

第一作者: 博士, 副教授。

收稿日期: 2007-07-03

在本实验的反应体系中,至少有4种反应的共存与竞争:蛋白质与木糖的接枝、蛋白质加热条件下的交联、部分蛋白质的水解、木糖自身焦糖化反应。

该单因素实验所采用的条件是:反应体系 pH8.0, 80℃ 水浴回流 50 min, 蛋白浓度 0.03 g/mL, $m(\text{蛋白质}):m(\text{木糖})$ 分别为 0.4、0.5、0.67、1、1.5。

在实验中发现, $m(\text{蛋白质}):m(\text{木糖}) \geq 1.5$ 的所有样品, 反应 20 min 左右出现蛋白质絮凝, 产生的原因主要是糖比例太小, 大部分 11S 蛋白由于没有与糖发生复合反应, 而是自身发生热聚集, 已明显变性。由图 1 可以看出, 配比为 1 时接枝度已达到 30% 以上。由图 2 的电泳扫描结果可以看出, 在配比为 1 时蛋白聚合程度最小, 可以认为此时 4 个反应的共存与竞争达到了最优的效果。

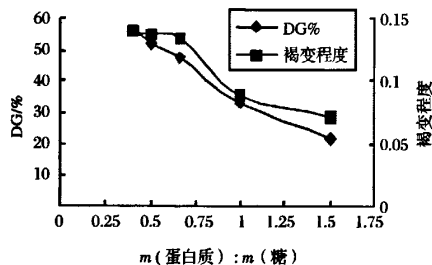


图 1 11S-木糖复合物接枝度及褐变程度

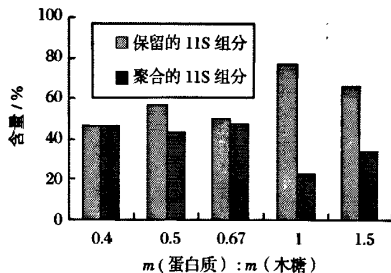


图 2 电泳光密度扫描结果

2.2 蛋白质浓度对接枝反应的影响

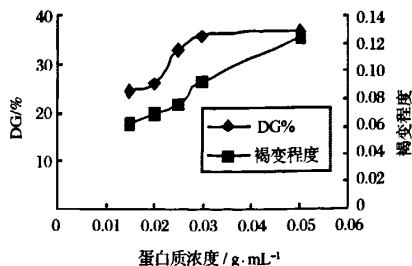


图 3 11S-木糖复合物接枝度及褐变程度

该单因素实验所采用的条件是:蛋白质、糖配比为 1, 体系 pH 8.0, 80℃ 水浴回流 50 min, 蛋白质浓度分别采用 0.015 g/mL、0.02 g/mL、0.025 g/mL、0.03 g/mL 和 0.05 g/mL。

蛋白质浓度从 0.03 g/mL 到 0.05 g/mL, 虽然褐变程度有所增加, 接枝度变化并不明显, 而且从电泳结果可以看出, 蛋白浓度在 0.03 g/mL 时, 蛋白聚集程度较小, 见图 3 和图 4。

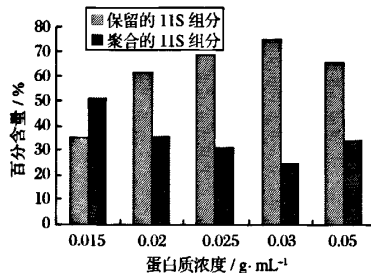


图 4 电泳光密度扫描结果

2.3 反应时间对接枝反应的影响

该单因素实验所采用的条件是:蛋白浓度 0.03 g/mL, 蛋白、木糖配比为 1, 体系 pH8.0, 80℃ 水浴回流, 分别选取反应时间为 30 min、40 min、50 min、60 min、80 min。

从图 5 和图 6 可以看出, 反应 30 min 及以下, 接枝度较小, 反应程度太低。由电泳结果可以看出, 反应 50 min 以上的样品聚合程度的差异趋于平缓。

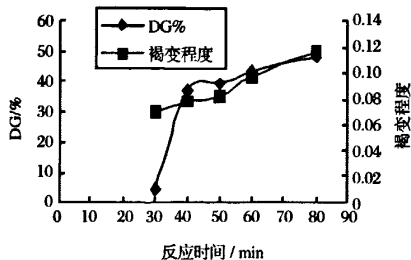


图 5 11S-木糖复合物接枝度及褐变程度

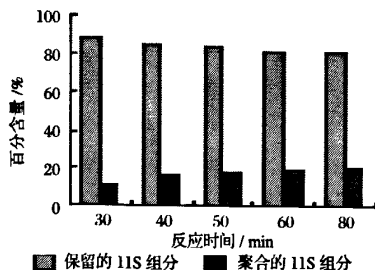


图 6 电泳光密度扫描结果

2.4 反应 pH 对接枝反应的影响

该单因素实验所采用的条件是:蛋白质浓度 0.03 g/mL,蛋白质、木糖配比为 1,80℃水浴回流 50 min。由于 pH 值太低不利于 maillard 反应,而且 11S 蛋白等电点在 6.4 左右,而 pH 超过 8.5 以后使得此后的发酵初始 pH 值过高,不利于后续发酵,因此,所考察的 pH 分别采用 7.0、7.5、7.7、8.0、8.5。

由于 pH 值对于本体系存在的 4 种反应影响均较大,因此体系 pH 值是控制本实验的一个至关重要的因素。实验中发现,pH 值低于 7.5 的反应液,在加热大约 20 min 之后均会出现不同程度的蛋白絮凝,说明这些 pH 不利于美拉德反应的顺利进行,或者是由于较低的 pH 本身不利于蛋白的完全溶解,导致蛋白由于来不及与糖复合而先发生自身的热聚集。此外,反应过程中 pH 值不断下降,初始 pH 越大,反应中下降得程度越大(见图 7 和图 8)。

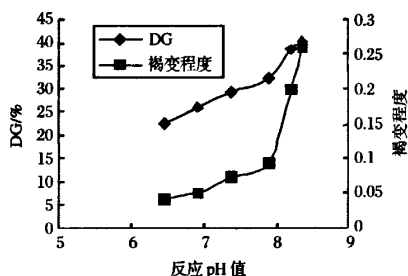


图7 11S-木糖复合物接枝度及褐变程度

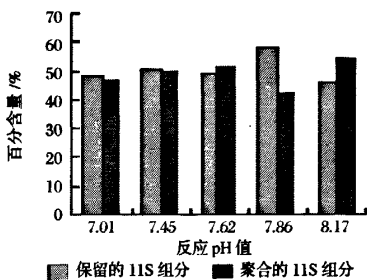


图8 电泳光密度扫描结果

2.5 反应温度对接枝反应的影响

该单因素实验所采用的条件是:蛋白浓度 0.03 g/mL,蛋白、木糖配比为 1,水浴回流 50 min,体系 pH8.0。由于 50℃以下 maillard 反应程度太小,又由 DSC 分析结果可知,所提取的 11S 球蛋白变性温度为 90℃左右,因此所选取的温度范围在 50~90℃。

从图 9 可以看出,在反应温度为 70℃以下时,接枝程度较小,在 70℃以上时有明显的突越。温度越

高,反应产物的乳化活性和乳化稳定性均随之减小。为了达到一定的接枝程度,保证酸性条件下的稳定性,选择 80℃为最适反应温度。

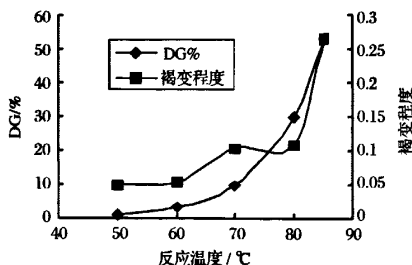


图9 11S-木糖复合物接枝度及褐变程度

3 结 论

利用纯化的大豆球蛋白(11S)与木糖进行 maillard 接枝反应。通过对接枝反应影响因素的探讨,本文确定该反应的最适反应条件为:蛋白浓度 0.03 g/mL, $m(\text{蛋白质}) : m(\text{木糖}) = 1$, 80℃水浴回流 50 min,反应初始体系 pH8.0。后续工作中将利用该反应产物添加至奶粉中进行乳酸菌发酵及调配,实现乳制品中动物蛋白与植物蛋白的结合,在食品工业上具有一定的开发前景。

参 考 文 献

- Martins S, Jongen W. A Review of maillard reaction in food and implications to kinetic modelling [J]. Trends in Food Science and Technology, 2001, 11: 364~373
- 管军军, 裴爱泳. 微波辐射合成大豆分离蛋白-糖接枝物的功能性[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 35~39
- Brands C M J, van Boekel M A J S. Kinetic modelling of reactions in heated disaccharide-Casin Systems [J]. Food Chemistry, 2003, 83: 13~26
- Chevalier F, Hobert J M. Improvement of functional properties of β -Lactoglobulin glycosylated through the maillard reaction is related to the nature of the sugar [J]. International Dairy Journal, 2001, 11: 145~152.
- H Jing, Kitts D D. Chemical and biochemical properties of casein-sugar Maillard reaction products [J]. Food and Chemical Toxicology, 2002, 40: 1 007~1 015
- 田其英, 华欲飞. 大豆蛋白溶解性研究[J]. 粮食与油脂, 2006, (6): 6~8
- Takao Nagano, Motohiko Hirotsuka. Dynamic Viscoelastic Study on the Gelation of 7S Globulin from Soybeans [J]. Agric Food chem, 1992, 40: 941~944
- 管军军, 裴爱泳. 加热方式对大豆蛋白-糖接枝反应的影响[J]. 中国油脂, 2005, 30(6): 53~56 (下转第 71 页)

$$104.31 \times X_3 + 0.031 \times X_1 \times X_2 + 0.13 \times X_1 \times X_3 + 0.62 \times X_2 \times X_3 - 0.13 \times X_1^2 - 0.22 \times X_2^2 - 14.28 \times X_3^2$$

对以上模型中变量 X_1 、变量 X_2 及变量 X_3 分别进行求导,并由求导后的 3 个式子,可求出最佳的工艺条件为: $X_1 = 50.176$, $X_2 = 10.941$, $X_3 = 4.1118$, 即加热温度为 50.18°C , 搅拌时间为 10.94 min , $n(\beta\text{-CD}) : n(\text{蛋黄液中胆固醇})$ 的添加量为 $4.11 : 1$ 。根据上述模型,在此条件下,可预测胆固醇的脱除率为 92.36% 。经验证,在此条件下所得的低胆固醇蛋黄粉中胆固醇的脱除率为 92.23% 。

4 结 论

本试验研究得出,脱除鸡蛋中胆固醇的最佳的生产工艺参数为:pH 为 10.5 ,加热温度为 50.18°C ,搅拌时间为 10.94 min , $\beta\text{-CD}$ 的添加量为 $4.11 : 1$ (其他条件为:蛋黄液与水的质量以 $3 : 1$ 混合, 3500 r/

min , 30 min),此条件下可得的胆固醇脱除率为 92.23% ,产品中胆固醇含量为 0.7536 mg/g 。

参 考 文 献

- 1 Guardoil F, Codony R, Rafecas M, et al. Selective gas chromatographic determination of cholesterol in eggs[J]. JAOCS, 1994, 71(8): 867
- 2 Franz Ulberth. Hermine Reich[J]. Food Chemistry, 1992, 43: 387~391
- 3 中国营养学会编著. 中国居民膳食营养素参考摄入量[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000. 88~98
- 4 王惠云, 高 应. 鸡蛋中胆固醇快速测定方法的研究[J]. 食品科学, 1995(6): 58~59
- 5 张佳程, 骆承庠. β -环状糊精脱除蛋黄液中胆固醇的三种工艺流程比较[J]. 食品科技, 1999(4): 27~28
- 6 曹劲松, 彭志英. β -环状糊精包合法脱除乳品中胆固醇的研究[J]. 中国乳品工业, 1996, 24(1): 15~18

Study on Cholesterol Removal from Egg Yolk by β -cyclodextrin

Chen Rucai^{1,2}, Wang Mingli¹, Shen Dan^{1,2}

1(College of Chemistry Engineering, Guizhou University, Guiyang 550003, China)

2 (Guizhou Province Key Laboratory of Fermentation Engineering and Biopharmacy, Guiyang 550003, China)

ABSTRACT Cholesterol removal from egg yolk by β -cyclodextrin ($\beta\text{-CD}$) inclusion method was studied. The DX7 Trial was used in data analysis and mathematic model creation, the optimized conditions were elicited: the heating temperature 50.18°C , the stirring time 11 min , the mol ratio of cholesterol in egg yolk and $\beta\text{-CD}$ was $4.11 : 1$. In these conditions, the maximal cholesterol removal rate was up to 92.23% and the content of cholesterol in the product was 0.7536 mg/g .

Key words egg yolk powder, β -cyclodextrin, low cholesterol

(上接第 67 页)

Research on the Conditions of the Maillard Reaction of Glycinin and Xylose

Chen Zhong, Zhou Yuan, Lin Weifeng, Cai Lei

(South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

ABSTRACT The maillard reaction can be used to promote the stability of the yogurt based on soy protein. The aim of this work was to investigate relations between the conditions and the degree on the glycation of glycinin and xylose. The results revealed that it is essential to control the parameters of the reaction considering the method we used and the application of the product.

Key words glycinin, soybean, fermentation