

文章编号 1009-038X(2004)05-0021-05

利用 Maillard 反应制备大豆蛋白-葡聚糖 共价复合物

齐军茹, 杨晓泉, 彭志英

(华南理工大学 食品与生物工程学院, 广东 广州 510640)

摘 要:研究了大豆酸沉蛋白和葡聚糖共价键合制备反应及其产物乳化性能的变化. 在干热条件下, 两种大分子通过 Maillard 反应进行共价键合并通过聚丙烯酰胺凝胶电泳验证了大分子复合物的存在. 结果表明: 产物具有比大豆酸沉蛋白更高的对油/水乳状液的乳化能力, 复合物在 pH 3.0 和 pH 10.0 时均能保持较好的乳化活性, 并且在高温、高盐条件下乳化活性变化很小.

关键词:大豆酸沉蛋白; 乳化活性; Maillard 反应; 葡聚糖

中图分类号 S 565.1

文献标识码: A

Preparation of Soy Protein-Dextran Conjugate Through the Maillard Reaction

QI Jun-ru, YANG Xiao-quan, PENG Zhi-ying

(Food and Biological Engineering College, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Soybean acid precipitated protein (SAPP) was conjugated with dextran by Maillard reaction under dry-heating condition, and the emulsifying activity of conjugate was discussed. It showed that the products have improved and excellent emulsifying activity as the biopolymers conjugated in desirable degree. The excellent emulsifying properties of SAPP-dextran conjugate could be maintained even at pH 3.0, and further improved at pH 10.0. In addition, the emulsifying properties of SAPP-dextran conjugate changed very little high temperature of 100 °C or in high concentration salt solution. Covalent attachment of polysaccharides to protein was confirmed by SDS-PAGE.

Key words: SAPP; emulsifying properties; Maillard; dextran

蛋白质属于高分子并且具备两亲结构, 具有独特的表面活性, 但是在工业应用中却有一定的局限性, 因为蛋白质遇热及有机溶剂等因素不稳定并且易分解. 所以, 若想加宽蛋白质在食品行业中的应用, 就必须修饰蛋白质使其达到一种稳定的状态. 由于多糖在液相中有增稠和凝胶作用, 所

以多糖的存在也增加了胶体的稳定性. 一些研究者致力于利用蛋白质的糖基化来改善其热不稳定性和其它功能特性. 近年来, 一些研究者开始利用单糖和寡糖对蛋白质进行糖基化作用^[1~3]. 但是, 改性后的效果仍不能满足在食品工业中的应用. 作者通过控制反应时间制备了具有优越乳化能力

收稿日期 2003-11-06; 修回日期 2003-12-18.

基金项目: 广东省“十五”攻关农产品加工重大专项项目(A20301)资助课题.

作者简介: 齐军茹(1977-), 女, 河南濮阳人, 食品科学博士研究生.

的大豆蛋白-葡聚糖共价复合产物。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

大豆酸沉蛋白:自制;葡聚糖:Sigma公司产品,相对分子质量为60 000~90 000。

1.2 主要仪器

7520型分光光度计:上海分析仪器厂产品;高速分散均质机FJ-200:上海标本模型厂产品;LGJ-10冷冻干燥机:北京四环科学仪器厂产品;pHs-25型酸度计:上海雷磁仪器厂产品;ECP3000三恒电泳仪:北京六一仪器厂产品;UVP凝胶成像系统。

1.3 实验方法

1.3.1 大豆酸沉蛋白(SAPP)的制备 脱脂豆粕(100 g)在2 L 0.03 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)中20℃溶解2 h,8 000 g离心,上清液用2 mol/L HCl调至pH 4.8,离心。沉淀物在4℃用水溶解并调至pH 8.0,8 000 g离心,上清液在4℃用蒸馏水透析24 h,然后冷冻干燥^[4]。

1.3.2 大豆蛋白-多糖交联 将大豆酸沉蛋白与葡聚糖以不同质量比混合后,用水溶解调至6 g/dL后冷冻干燥。干燥后的粉状物放置在60℃的干燥器内,保持相对湿度79%,并在容器底部放置饱和的KBr溶液,时间分别为0~7 d^[5]。

1.3.3 乳化活性的测定 1.0 mL植物油和3.0 mL 0.2%蛋白质溶解液(0.1 mol/L磷酸缓冲液pH 7.0)混合震荡并均质化(1 min,20℃,12 000 g)。从底部抽出50 μL样品并用5 mL质量分数0.1%的十二烷基硫酸钠溶液稀释,在500 nm处测吸光率^[6]。

1.3.4 高盐对乳化活性的影响 0.1 mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)中含有0.2 mol/L NaCl,将反应5 d的样品用上述缓冲液配制质量分数0.2%的溶液,乳化活性测定方法同1.3.3。

1.3.5 不同pH值条件下乳化活性的测定 样品分别用0.1 mol/L柠檬酸缓冲液(pH 3.0)、磷酸缓冲液(pH 7.0)、碳酸盐缓冲液(pH 10.0)配制质量分数0.2%的溶解液,乳化活性测定方法同1.3.3。

1.3.6 高温对乳化活性的影响 将质量分数0.2%的蛋白质溶解液(0.1 mol/L磷酸缓冲液pH 7.0)在100℃保温5 min,后测定乳化活性,乳化活性测定方法同1.3.3。

1.3.7 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 12.5

g/dL分离胶,3 g/dL浓缩胶(含质量分数0.1% SDS),蛋白样品(0.1 g/dL,20 μL)用Tris-甘氨酸缓冲液(pH 8.8),其中包括质量分数1% SDS和质量分数1%巯基乙醇。电泳时间5 h,最后用考马斯亮兰R-250和品红试剂分别染色^[7]。

1.3.8 反应物的纯化 为了除去未被交联的蛋白质和多糖,用凝胶过滤的方法。Sephacryl S-300(70 cm×3 cm)洗脱液用50 mmol/L的乙酸缓冲液(pH 5.0)洗脱,收集液在4℃条件下用去离子水透析并冷冻干燥备用^[5]。

2 结果与讨论

大豆蛋白-多糖反应物的乳化性能取决于两种大分子复合程度,即在一定的条件下取决于反应时间以及控制反应速度的因素。反应程度不够,多糖与蛋白质不能有效地共价键合,这样在乳化时表现为乳化能力基本上为蛋白质单独存在时的情况;反应过度则使得蛋白质的反应基团几乎全部用于与多糖键合,结果产物过于亲水而失去界面活性。所有这些结果均不能提高产物的乳化能力。本次实验分别探讨了反应时间和外界因素对乳化性能的影响。

2.1 大豆酸沉蛋白-葡聚糖反应物乳化活性变化

2.1.1 不同反应时间对乳化活性的影响 由图1所示,不同反应时间大豆酸沉蛋白-葡聚糖交联物的形成均较大程度提高了乳化能力。但是,样品的乳化能力经历了升高和降低两个阶段。反应开始1~5 d,多糖与蛋白质受热逐步结合,蛋白质结构部分展开,提高了大分子的表面活性,从而使乳化能力得以提高。随着反应的进行,5 d后,蛋白质由于与多糖的过度键合而变得越来越亲水,界面活性逐渐降低,乳化能力也相应下降。

2.1.2 不同反应比例乳化活性的变化 蛋白质和多糖的分子间共价键合是在一定的基团间进行的,为了得到具有一定乳化能力的复合物,要求反应物的配比适当,因为任何一种反应物的过量都会对产物的乳化效能产生影响。理想的产物应该是蛋白的一部分疏水基团与多糖发生共价键合增加复合物的亲水性,但又能保留有足够的疏水基团来维持产物的表面活性。由图2可知,不同蛋白-多糖比例在同样的反应时间其反应程度明显不同,本次实验SAPP和葡聚糖质量比为1:1时,产物具有最高的乳化效能。

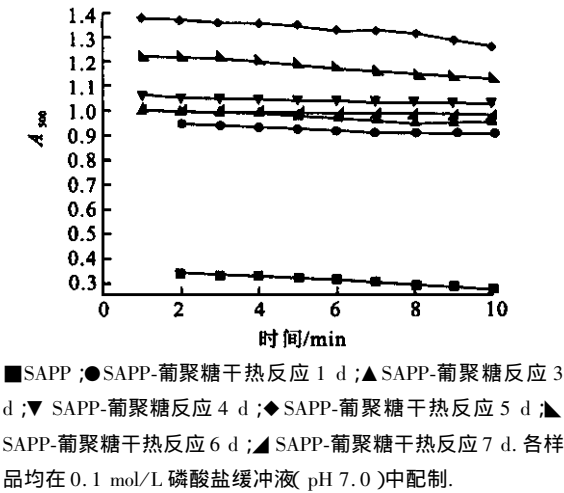


图 1 不同反应时间的乳化活性变化

Fig. 1 Effects of various times on the emulsifying properties

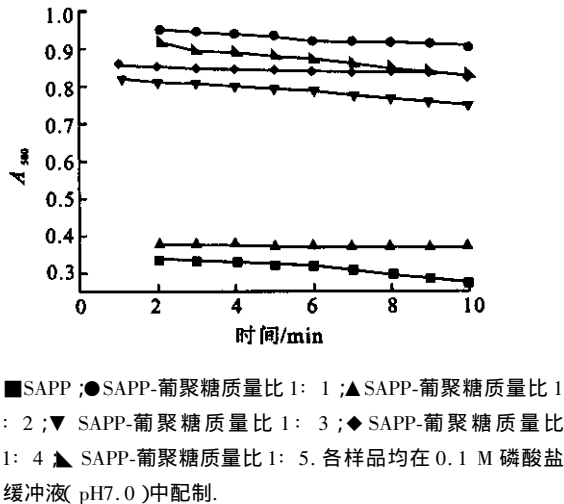


图 2 不同质量比干热反应 1 d 乳化活性变化

Fig. 2 Effects of various weight on the emulsifying properties of SAPP-Dextran conjugate, at dry-heated storage

2.1.3 高盐条件下复合物乳化活性的变化 高盐、高温及酸性条件是工业生产中经常面临的工艺条件,因此,测定在高盐情况下乳化活性的变化是必要的.图 3 所示 SAPP 与葡聚糖质量比为 1:1 干热反应 5 d 后复合物乳化活性的变化.结果表明,当缓冲液中含有 0.2 mol/L NaCl 时,其复合物的乳化活性并没有因为高盐的存在而受影响.由此看出,SAPP-多糖反应物在食品工业中有着巨大的应用潜力.

2.1.4 pH 对乳化活性的影响 图 4 显示不同 pH 条件下 SAPP-葡聚糖交联物的乳化活性.该复合物在酸性条件下乳化活性相当稳定,在强碱性条件下,该交联物的乳化性能和稳定性更加优越.这可能是由于碱性条件下更有利于蛋白质吸附在分

散粒子的表面并让其亲水链伸入水相,形成在胶粒表面的吸附膜以降低其表面张力,而交联物中的多糖则围绕着胶粒的空间保护层以阻止胶粒的聚集而使乳化稳定.

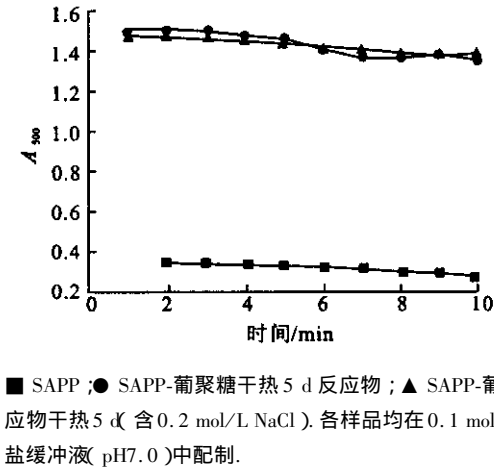


图 3 高盐对 SAPP-葡聚糖干热 5 d 反应物的影响

Fig. 3 Effects of high concentration salt on the emulsifying properties of SAPP-Dextran conjugate, at dry-heated storage for 5 days

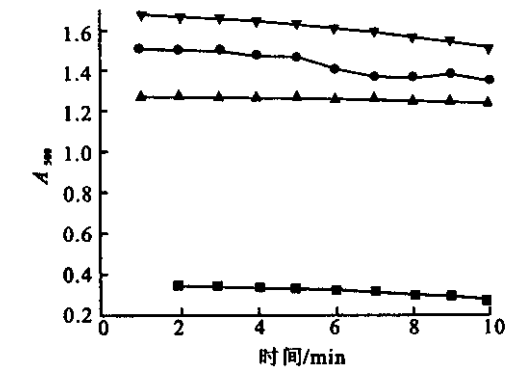


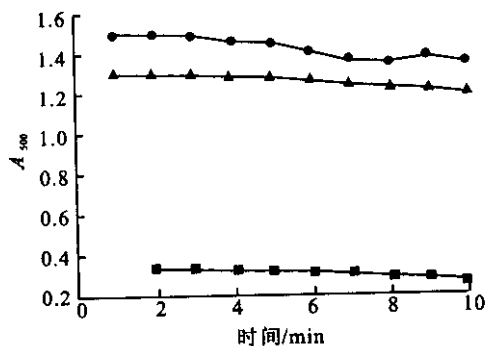
图 4 不同 pH 对 SAPP-葡聚糖反应 5 天产物乳化活性的影响

Fig. 4 Effects of various pH on the emulsifying properties of SAPP-Dextran conjugate, at dry-heated storage for 5 days

2.1.5 高温对乳化活性的影响 图 5 显示了加热对 Maillard 反应制备的 SAPP-葡聚糖共价复合物的影响.反应 5 d 后的样品在 100 ℃ 保温 3 min 后,其乳化活性改变很小,且没有发现不可溶物的产生.这对于蛋白质在食品工业中应用非常有效,众所周知,食品原料在加工过程中一般要经过巴氏灭菌,高温处理对于食品工业生产非常普遍的,所以蛋白与多糖的相互交联在各种功能蛋白食品应用中有非常广阔的前景.

2.2 大豆蛋白-葡聚糖复合反应的电泳图谱分析

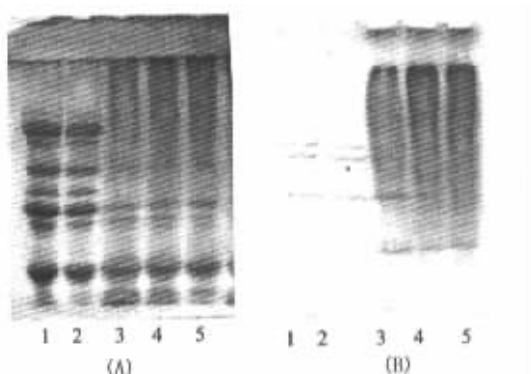
大豆蛋白-葡聚糖发生 Maillard 反应共价连结形成复合物可以通过 SDS-PAGE 得到证实. 如图 6 所示, SAPP-葡聚糖在 60℃ ,RH 为 79% 的条件下发生干热反应逐步形成了共价复合物. 复合物在蛋白染色以及糖染色图谱中均呈现一条高相对分子质量的宽带, 并且在浓缩胶与分离胶交界处以及浓缩胶顶部均出现了高分子带, 并且随着反应时间的增加, 谱带颜色逐步加深.



● SAPP-葡聚糖反应 5 d 产物, 没有经过热处理; ▲ 热处理 100℃ 保温 3 min; ■ SAPP. 各样品均在 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中配制

图 5 高温对 SAPP-葡聚糖反应 5 d 产物乳化活度的影响

Fig. 5 Effects of heating of sample on the emulsifying properties of SAPP-Dextran conjugate, at dry-heated storage for 5 days



(A) 考马斯亮兰 R250 染色 (B): 糖蛋白染色; 1. SAPP; 2. SAPP-葡聚糖质量比为 1: 1 混合物; 3. SAPP-葡聚糖反应 1 d; 4. SAPP-葡聚糖反应 2 d; 5. SAPP-葡聚糖反应 3 d. 箭头表示浓缩胶顶部以及浓缩胶与分离胶的交界处.

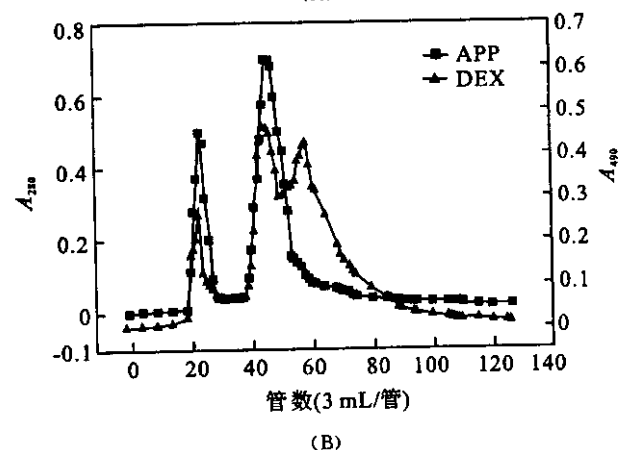
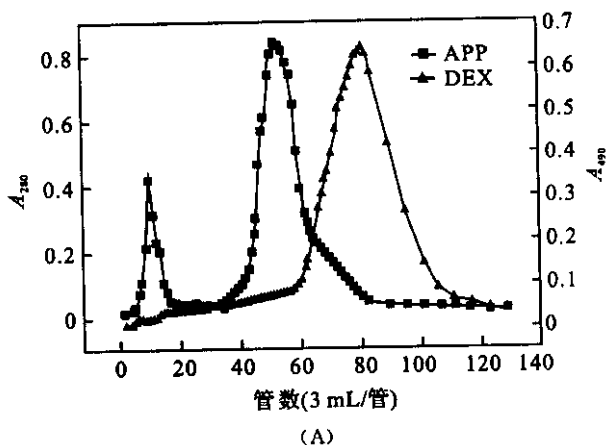
图 6 SAPP-葡聚糖质量比为 1: 1 干热反应的 SDS-PAGE

Fig. 6 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of SAPP-Dextran Conjugate, at Dry-heated Storage

着反应的发生逐步减少, 由于 SAPP 包含有不同相对分子质量的蛋白组分, 各个蛋白组分与多糖的键合反应程度也有所不同. SAPP 中高分子区呈现的主要是 7S 亚基组份, 可以看出, 7S 各组分与糖的反应比较明显, 反应后原 7S 各蛋白亚基几乎消失, 而在浓缩胶与分离胶处及浓缩胶上部呈现明显的聚合物谱带; 同样的现象也发生在 11S 酸性亚基, 其与多糖的反应也非常明显. 而 11S 碱性亚基谱带几乎与反应前没有什么区别, 以上研究结果为以后的实验提供进一步的依据, 大豆蛋白中各蛋白组分质量分数不同, 功能也有所区别, 对于生成糖蛋白复合物来说, 7S 蛋白的反应程度较高, 与功能性质的关系比较密切.

2.3 SAPP-葡聚糖复合物的纯化

为了除去没有反应的蛋白质以及多糖, 将干热法制备的 SAPP-葡聚糖共价复合物进行凝胶过滤纯化, 结果见图 7.



(A) SAPP-葡聚糖混合物的凝胶色谱图 (B): 干热反应 5 d SAPP-葡聚糖复合物的凝胶色谱图

图 7 反应前后凝胶色谱图比较

Fig. 7 Changes in the gel filtration patterns of SAPP-Dextran mixtures during storage in dry state

另外, 图谱显示 SAPP 中各个组分质量分数随

从凝胶色谱图可以明显的看出反应前后峰的

变化. 没有进行干热反应时,首先洗脱出大豆 11S 和 7S 蛋白,然后是葡聚糖;反应 5 d 后的反应物其峰的位置发生明显的变化,明显表现为葡聚糖峰位置前移,即在 280 nm 蛋白明显吸收的位置都对应的在 490 nm 处有明显糖的吸收峰. 说明蛋白与多糖发生反应得到新的糖蛋白大分子,使其同时在蛋白质与糖的特定吸收波长处均有吸收.

2.4 小 结

大豆蛋白主要由具有四级结构的结合球蛋白

构成. 利用大豆蛋白与葡聚糖干热反应生成糖蛋白复合物在高温、高盐以及酸性条件下均有很好的乳化活性. 实验表明,一般的蛋白-多糖干热反应需要一周至几周的时间才能生成具有优越乳化活性的产物,而大豆蛋白与多糖的反应在 5 d 已经达到很好的效果. 另外,大豆蛋白中的 7 S 和 11 S 组分对于反应的敏感度也有所不同,所以不同蛋白组分与多糖的反应也是值得研究的方向.

参考文献：

- [1] Marsh J W , Denis J , Wriston J C. Glycosylation of *Escherichia coli* L-asparaginase[J]. **J Biol chem** ,1977 252(21) :7678 – 7584.
- [2] Mark J Krantz , Neil A Holtzman , Christopher P Stowell , *et al.* Attachment of thioglycosides to proteins :enhancement of liver membrane binding[J]. **Biochemistry** ,1976 ,15(18) 3963 – 3968.
- [3] Naofumi Kitabatake , Jean Louis Cuq , Jean Claude Cheftel. Covalent binding of glycosyl residues to . beta. -lactoglobulin : effects on solubility and heat stability[J]. **J Agric Food Chem** ,1985 33(1) :125 – 130 .
- [4] Setsuko Iwabuchi , Fumio Yamauchi. Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean proteins by immunmological methods[J]. **J Agric Food Chem** ,1987 35(2) 200 – 205.
- [5] Akio Kato ,Youko Sasaki ,Ritsuko Furuta *et al.* Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures[J]. **Agric Biol Chem** ,1990 54(1) :107 – 112.
- [6] Akio Kato , Kazuaki Minaki , Kunihiro Kobayashi. Improvement of emulsifying properties of egg white proteins by the attachment of polysaccharide through Maillard reaction in a dry state[J]. **J Agric Food Chem** ,1993 41(4) 540 – 543.
- [7] Soichiro Nakamura ,Akio Kato ,Kunihiro Kobayashi. Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides[J]. **J Agric Food Chem** ,1992 40(11) 2033 – 2037.

(责任编辑 朱 明)