

花蛤酶解液的美拉德反应及抗氧化活性研究

张慧恩,王家宁,王江强,陈佳烨

(浙江万里学院生物与环境学院,浙江宁波 315000)

摘要:以花蛤蛋白酶解液为原料制备具有抗氧化活性的美拉德反应产物(MRPs)。结果表明,将花蛤蛋白制成10%的匀浆,加入1% Alcalase蛋白酶进行酶解,调节pH8.0,在65℃下水解3h,水解度为17.8%。酶解液通过与6%葡萄糖,在pH8.0,温度120℃下,反应1h,褐变程度最大。美拉德反应产物通过分离得到4个组分,实验证明,4个组分都具有抗氧化活性,其中组分Ma的抗氧化活性最强,对DPPH·和O₂·⁻的清除率分别为76.8%和68.6%。

关键词:花蛤酶解,美拉德反应,分离,抗氧化

Maillard reaction of *Ruditapes philippinarum* hydrolyzate and its antioxidant capacities

ZHANG Hui-en, WANG Jia-ning, WANG Jiang-qiang, CHEN Jia-ye

(College of Biological and Environmental Science, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315000, China)

Abstract: The Maillard reaction between hydrolyzate of *Ruditapes philippinarum* and glucose and the antioxidant activities of the Maillard reaction products (MRPs) were studied. Alcalase was applied to hydrolyze the *Ruditapes philippinarum* protein. Based on the result of single-factor experiment, optimum enzyme hydrolysis conditions were as follow: substrate concentration 10%, Alcalase protease concentration 1%, pH8.0, enzymolysis temperature 65℃, and enzymolysis time 3h. Under the condition, the degree hydrolysis of protein was 17.8%. The Maillard reaction was conducted as follow condition: glucose concentration 6% and pH8.0 incubation in 120℃ for 1h. The Maillard reaction products were fractionized into four fractions by gel chromatography. The result of antioxidant experiments showed that all fractions of MRPs had antioxidant activity. Among them the fraction of Ma had the strongest antioxidant activity, of which inhibitions against DPPH·, O₂·⁻ reached 76.8%, 68.6% respectively.

Key words: *Ruditapes philippinarum* hydrolysis; Maillard reaction; separation; antioxidant

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2013)06-0140-04

美拉德反应主要是指食品中的氨基化合物与羰基化合物发生的复杂反应。它是引起食品非酶褐变的主要原因,是食品加工与储藏领域研究的重点之一^[1]。近年来,美拉德反应产物(MRPs)的抗氧化性研究引起了研究者广泛的兴趣。食品在热加工过程中会导致天然抗氧化成分的损失,但是热加工会使食品中的相关组分发生美拉德反应,同时还可以生成一些具有抗氧化活性的产物^[2-3]。目前,研究者大多利用建立模式美拉德反应体系来研究生成物的性质,即用特定的糖与氨基酸反应,通过控制糖、氨基酸种类和反应条件来生成不同的产物。部分单一氨基酸与还原糖的模式美拉德反应产物的抗氧化活性已经得到了证实^[4-6]。而各种蛋白水解液中含有丰富的氨基酸和多肽,以这种蛋白水解液为原料进行美拉德

反应,并对其产物的抗氧化活性进行研究还未见相关报道。本研究以Alcalase蛋白酶水解花蛤蛋白,再以得到的酶解液为原料与还原糖发生美拉德反应,以美拉德反应褐变程度为指标,筛选合适的反应条件,利用凝胶色谱进行初步分离纯化,并检测反应产物的抗氧化活性,为进一步研究复杂体系美拉德反应提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与仪器

新鲜花蛤肉 将花蛤取肉打成浆放置-5℃冷冻保存备用;1,1-二苯基苦基苯肼(DPPH) 上海梯希爱;Alcalase蛋白酶 丹麦诺维信;Sephadex G-25 美国GE healthcare公司;葡萄糖、抗坏血酸(Vc)、无水乙醇、磷酸缓冲液、HCl、NaOH等 均为分析纯。

ESB-500匀浆机 上海易勒机电设备有限公司;冷冻干燥仪 德国CHRIST;pH计 梅特勒-托利多公司;DK2000水浴锅 天津泰斯特仪器有限公司;离心机 eppendorf 5810R;UV2400分光光度计 上

收稿日期:2012-09-20

作者简介:张慧恩(1981-),男,讲师,研究方向:食品生物技术。

基金项目:宁波市自然科学基金项目(2011A610008)。

海舜宇恒平; BSA124S天平 赛多利斯。

1.2 实验方法

1.2.1 工艺流程 花蛤→去壳→清洗→搅碎打浆→酶解→离心→上清液→加葡萄糖→加热→美拉德反应→凝胶层析→抗氧化活性检测

1.2.2 花蛤蛋白质水解度的测定 将新鲜花蛤肉洗净后用组织捣碎机捣成匀浆,用蒸馏水制成10%的匀浆,按1%的比例加入Alcalase蛋白酶,调节pH8.0,在65℃下水解3h,95℃灭酶10min,3000r/min离心10min,取上清液测定水解度。总氮量的测定采用凯氏定氮法,氨基态氮的测定采用甲醛滴定法^[7]。

水解度(DH,%)=(水解后氨基氮量-水解前氨基氮量)/(总氮量-水解前氨基氮量)×100 式(1)

1.2.3 美拉德反应褐变程度的测定 随着美拉德反应的进行,产物中类黑精类物质不断增加,颜色逐渐变深,通过测定反应产物在420nm处的吸光度来表示美拉德反应的程度^[8]。

1.2.4 葡萄糖浓度对美拉德反应的影响 取花蛤酶解液5份,每份10mL,加入葡萄糖,使糖浓度依次为2.0%、4.0%、6.0%、8.0%、10.0%,调节pH8.0,在120℃下加热1h,迅速冷却,3000r/min离心5min。取上清液稀释后测定420nm处的吸光值。

1.2.5 温度对美拉德反应的影响 取花蛤酶解液5份,每份10mL,加入葡萄糖浓度为6.0%,调节pH到8,分别在80、100、120、140、160℃条件下加热1h。迅速冷却,3000r/min离心5min。取上清液稀释后测定420nm处的吸光值。

1.2.6 时间对美拉德反应的影响 取花蛤酶解液5份,每份10mL,加入葡萄糖浓度为6.0%,调节pH到8,在120℃下分别加热反应30、60、90、120、150min。迅速冷却,3000r/min离心5min。取上清液稀释后测定420nm处的吸光值。

1.2.7 美拉德反应产物MRPs制备及层析 取花蛤酶解液10mL,加入葡萄糖使其在溶液中的浓度为6.0%,调节pH到8.0,在120℃下加热反应60min,迅速冷却,3000r/min离心5min。取上清液,冷冻干燥,得到MRPs,待用。称取一定量的MRPs,配制成质量浓度为20mg/mL的溶液,湿法上样5mL。缓慢加入层析柱(20mm×500mm)中,用洗脱剂进行洗脱,洗脱速度为1mL/min,每10min收集一管洗脱液,于420nm测定吸光值,收集洗脱液,合并相关试管,进行冷冻干燥。

1.2.8 抗氧活性的测定

1.2.8.1 DPPH·清除率的测定 将测试样品配制成10mg/mL的溶液,取0.1mL试样溶液,加0.2mmol/L DPPH/甲醇溶液3.9mL。室温下避光反应30min,以甲醇做参比,517nm波长下测其吸光值^[9]。用式(2)计算清除率:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

式中: A_1 为加试样反应30min后DPPH·溶液的吸光度; A_2 为试样溶液的吸光度; A_0 为未加试样时DPPH·溶液吸光度。

1.2.8.2 还原力的测定 取10mg/mL的测试样品溶

液1mL,加入1mL磷酸缓冲液(0.2mol/L, pH6.6)及1mL 1%的铁氰化钾溶液。50℃水浴反应20min后快速冷却至室温,加入1mL 10%的三氯乙酸终止反应,混匀后3000r/min离心10min;取1mL上清液,依次加入3mL蒸馏水及0.2mL 0.1%的三氯化铁,混合均匀,于700nm处测定吸光度。吸光值越大,表示还原力越强^[9]。

1.2.8.3 超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)清除率的测定 取10mg/mL的测试样品溶液0.1mL,加入2.8mL, Tris-HCl缓冲液(50mmol/L, pH2.8),于25℃保温10min,然后加入0.1mL 60mmol/L邻苯三酚(空白加入等量10mmol/L的HCl),总体积3.0mL,迅速摇匀,在420nm处,每隔半分钟测定一次吸光度^[9]。对 $O_2^{\cdot-}$ 的清除率为:

$$\text{清除率}(\%) = \frac{(\Delta A_{420}^1 / \Delta T - \Delta A_{420} / \Delta T) / \Delta A_{420}^1 / \Delta T}{100} \quad \text{式(3)}$$

式中: $\Delta A_{420}^1 / \Delta T$: 邻苯三酚自氧化速率; $\Delta A_{420} / \Delta T$: 添加MRPs试样的氧化速率。

1.2.9 数据分析 利用SPSS 19.0软件,使用T检验进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 花蛤蛋白质水解度

按1%的比例加入Alcalase蛋白酶,调节pH8.0,在65℃下水解3h,95℃灭酶10min,3000r/min离心10min,取上清液测定水解度为17.8%。

2.2 葡萄糖浓度对美拉德反应的影响

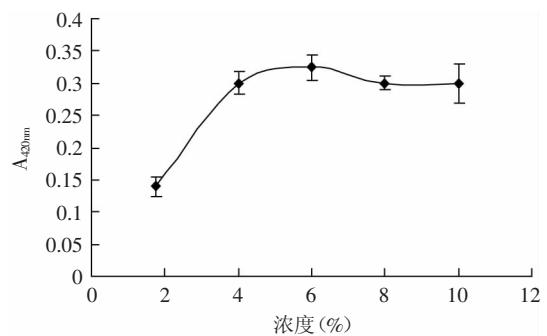


图1 葡萄糖浓度对美拉德反应的影响

Fig.1 Effect of glucose concentration on Maillard reaction

葡萄糖浓度对美拉德反应的影响见图1,随着葡萄糖浓度的增加,褐变程度逐渐增加,在葡萄糖浓度6%时反应体系的褐变程度到达最大,继续增加葡萄糖浓度,褐变程度变化不大。这可能是因为体系中的氨基酸或多肽类物质已经反应完全,再增加葡萄糖浓度对体系的褐变程度没有影响,因此确定葡萄糖浓度为6%。

2.3 温度对美拉德反应的影响

温度对美拉德反应的影响见图2,在温度低于100℃时,体系褐变程度较弱,100~120℃时,褐变程度快速增加,120℃时,褐变程度最强,继续升高温度,褐变程度变化不大。由于体系是在较高的温度下进行反应,其中存在氨基与羰基的美拉德反应,还可能存在焦糖化反应,一般认为焦糖化反应的温度在140~170℃,因此确定美拉德反应适宜的温度为120℃。

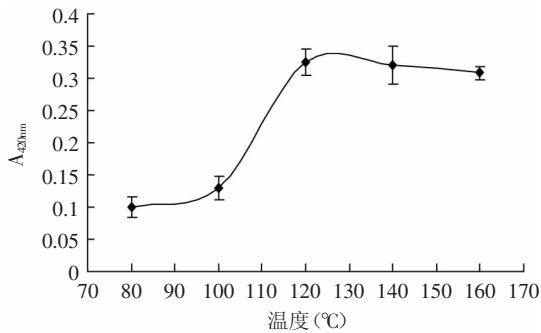


图2 温度对美拉德反应的影响

Fig.2 Effect of reaction temperature on Maillard reaction

2.4 时间对美拉德反应的影响

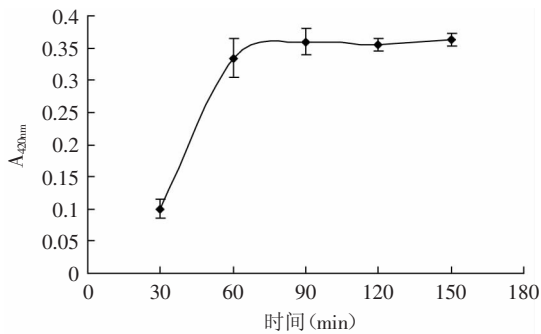


图3 时间对美拉德反应的影响

Fig.3 Effect of reaction time on Maillard reaction

时间对美拉德反应的影响见图3,在反应初期体系的褐变程度随时间的增加而增加,60min后美拉德反应褐变程度基本不变,可能是反应物已消耗完全。因此确定美拉德反应的时间为60min。

2.5 美拉德反应产物MRPs的分离纯化

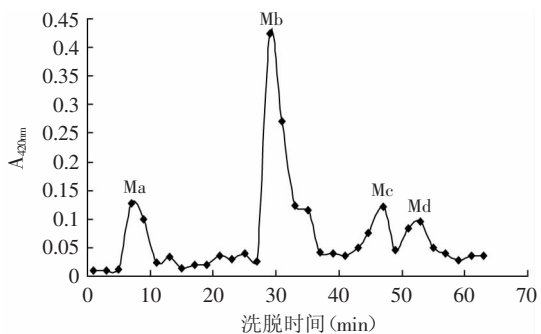


图4 美拉德反应产物Sephadex G-25层析

Fig.4 Chromatography of MRPs by Sephadex G-25

由图4可知,将美拉德反应产物经过Sephadex G-25层析分离得到4个组分,按洗脱流出的先后顺序分别为Ma、Mb、Mc、Md。收集合并试管,冷冻干燥,测得4种组分质量比为1:4:4:4。Sephadex G-25凝胶层析是根据分子量大小进行分离,因此分离得到的组分子量由大到小为:Ma>Mb>Mc>Md。

2.6 不同美拉德反应产物的抗氧化活性

美拉德反应产物通过Sephadex G-25凝胶层析得到4个组分的抗氧化活性结果见表1。由表1可知, Ma的抗氧化活性与其他组分的抗氧化活性存在显著

差异 ($p < 0.05$),明显高于原组分和其他层析流出物,对DPPH·和O₂·-的清除率分别为76.8%和68.6%。Ma的分子量及相关分子表征指标有待进一步研究。美拉德反应产物具有抗氧化性已得到广泛的认识,一般认为抗氧化物质是在反应中产生的一类高分子质量的食物类黑精^[10-11]。

表1 不同美拉德反应产物抗氧化活性

Table 1 Antioxidant activities of different MRPs

样品	DPPH·的清除率(%)	还原力A _{700nm}	对O ₂ ·-的清除率(%)
MRPs	36.6±2.5 ^a	0.207±0.042 ^b	33.4±1.3 ^l
Ma	76.8±1.8 ^b	0.330±0.032 ^γ	68.6±2.5 ^{ll}
Mb	19.2±0.3 ^c	0.114±0.020 ^α	25.6±3.6 ^{lll}
Mc	15.5±1.6 ^c	0.127±0.011 ^μ	23.8±1.5 ^{lll}
Md	23.4±2.0 ^d	0.127±0.031 ^μ	30.1±2.3 ^{lv}

注:n=3,上标不同的数据存在显著差异 ($p < 0.05$)。

3 结论

将花蛤蛋白制成10%的匀浆,加入Alcalase蛋白酶进行酶解,加酶量1%,调节pH8.0,在65℃下水解3h,水解度为17.8%。再以酶解液为原料,通过与6%葡萄糖,在pH8.0,温度120℃下,反应60min,得到美拉德反应产物。通过Sephadex G-25层析将美拉德产物分成4个组分:Ma、Mb、Mc、Md。通过抗氧化性实验分别测定了不同组分对DPPH·、O₂·-的清除率及还原力,实验结果证明,美拉德反应产物具有抗氧化活性,其中组分Ma的抗氧化活性最强,对DPPH·和O₂·-的清除率分别为76.8%和68.6%。

参考文献

- [1] 祖道海,宋焕禄,李大明,等. 脯氨酸与木糖反应产物抗氧化性能研究[J]. 食品工业科技,2006,27(6):67-69.
- [2] 沈军卫,樊金铃,朱文学,等. 模式美拉德反应产物的抗氧化性与反应进程的关系研究[J]. 食品科技,2010,35(3):253-257.
- [3] 郭祀远,李琳,吴少雄,等. 温度对美拉德反应的研究[J]. 食品科学,2005,26(7):63.
- [4] 尤新. 氨基酸和糖类的美拉德反应:开发新型风味剂和食品抗氧化剂的新途径[J]. 食品工业科技,2004,25(7):138-139.
- [5] J Wang, Y G Guan, S J Yu, *et al.* Study on the Maillard reaction enhanced by pulsed electric field in a Glycine-glucose model system[J]. Food Bioprocess Technol, 2011 (4): 469-474.
- [6] J S Kim, Y, S Lee. Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products from fructose-glycine oligomer[J]. Food Sci Biotechnol, 2010, 19(4): 929-940.
- [7] 王秀奇,秦淑媛,高天慧,等. 基础生物化学实验[M]. 北京:高等教育出版社,2005:148-149.
- [8] 项惠丹,许时婴,王璋. 蛋白质与还原糖美拉德反应产物的抗氧化活性[J]. 食品科学,2008,29(7):52-57.
- [9] 王秋霞,许琳,杨永红. 石榴籽丙酮提取物抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(8):173-177.
- [10] P Liu, M G Huang, S Q Song, *et al.* Sensory characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products from soy

小麦面粉理化性质与水饺皮质构品质的相关性研究

陈洁¹, 李刚凤¹, 尹成华², 王春¹

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450001;

2. 河南省粮油饲料产品质量监督检验站, 河南郑州 450008)

摘要: 选用我国10个省份的219份小麦样品, 进行小麦面粉理化指标和水饺皮质构品质测定, 并利用SPSS 17.0对小麦面粉理化指标与水饺皮质构品质进行了相关性分析。结果表明: 粗淀粉含量与剪切硬度呈极显著正相关($r=0.143, p<0.01$), 损伤淀粉含量与剪切硬度呈极显著负相关($r=-0.183, p<0.01$); 降落数值与TPA硬度、咀嚼度呈显著正相关(r 分别为0.163, 0.151, $p<0.05$); 沉淀值与伸展性呈极显著正相关($r=0.179, p<0.01$)。由此得出, 小麦面粉粗淀粉含量、损伤淀粉含量、沉淀值、降落数值对水饺皮质构品质影响较大。

关键词: 水饺皮, 理化性质, 质构品质, 相关性

Correlations between physico-chemical properties of wheat flour and texture analyzer quality of dumpling sheet

CHEN Jie¹, LI Gang-feng¹, YIN Cheng-hua², WANG Chun¹

(1. Grain, Oil & Food College, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. Henan cereal Oil & Feed Products Quality Supervision and Inspection Station, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: 219 wheat samples from ten provinces of our country were used to measure physico-chemical index of flour and texture analyzer index of dumpling sheet, and used SPSS 17.0 to analyze correlation between flour physico-chemical properties and texture analyzer quality of dumpling sheet. The result showed that crude starch content was significantly correlated with Firmness ($r=0.143, p<0.01$), damage starch content was negatively correlated with Firmness ($r=-0.183, p<0.01$), landing numerical was positively correlated with hardness and chewiness ($r=0.163, 0.151, p<0.05$) and sedimentation value was significantly correlated with extensibility. Thus it could be seen that the larger effect on texture analyzer quality of dumpling sheet was crude starch content, damage starch content, sedimentation value and landing numerical of flour.

Key words: dumpling sheet; physico-chemical properties; texture analyzer quality; correlation

中图分类号: TS211.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)06-0143-04

水饺是中国的传统食品, 其主要由小麦面粉组成, 小麦面粉的理化性质是影响水饺皮的品质的重要因素。张剑等^[1]对小麦的品质性状与速冻水饺品质的关系进行了研究, 研究结果表明, 湿面筋含量对速冻水饺的品质影响最大; 杨铭铎等^[2]对面粉品质性状和速冻水饺品质关系进行研究得出面粉的粗蛋白含量与冻痕率成极显著性负相关。娄爱华等^[3]对目前市场上具有代表性的9个面粉品种的理化性质和冷冻性能进行了测定, 结果得出淀粉含量和湿面筋含量

是影响速冻水饺品质的最重要因素。速冻水饺是生产和销售最大的速冻面食产品。就速冻水饺而言, 面粉理化性质直接影响其冷冻特性, 决定了成品速冻水饺质量的优劣。因而研究制作优质速冻水饺的面粉品种理化特性, 对速冻水饺品质的控制起着关键性的作用。本研究选用我国10个省份的219份小麦样品, 以研究小麦面粉理化性质与水饺皮质构品质的相关关系, 了解水饺皮对小麦面粉品质的要求, 为速冻水饺的生产提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验材料 选用2011年度10个我国小麦主产省区的小麦主要品种, 通过聚类分析的方法对样品进

收稿日期: 2012-09-03

作者简介: 陈洁(1963-), 女, 硕士, 教授, 研究方向: 面制品研究与开发。

基金项目: 科技部质检公益性行业科技专项项目(201110259)。

protein hydrolysates with different molecular weight distribution [J]. Food Bioprocess Technol, 2010(1): 356-370.

[11] J S Kim, Y S Lee. Study of Maillard reaction products in

model aqueous and water/ethanol systems containing glucose and glycine, diglycine, and triglycine[J]. Food Sci Biotechnol, 2010, 19(6): 1471-1477.