

超声强化大豆分离蛋白-糖 接枝反应作用机理的初步探讨

穆利霞¹, 赵谋明^{2,*}, 颜小平², 廖森泰¹

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所/广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610;

2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要:以大豆分离蛋白(SPI)为研究对象,初步研究了超声促进大豆分离蛋白-糖接枝反应的机理。结果表明:与普通加热相比,当超声处理 60min 时,SPI 的自由氨基含量由 0.86mol/L 增加到 0.98mol/L;表面疏水性和表观巯基含量也有一定程度的增加,蛋白的肽链更加伸展,埋藏于分子内部的自由氨基不同程度的暴露,与糖分子接触的几率增加;同时,SPI 分子中的 α -螺旋和 β -折叠明显减少,而无规则卷曲则明显增多,SPI 分子由有序结构变得无序,蛋白的空间位阻降低,使蛋白与糖分子在激烈的振动中更加充分的接触,增加接枝反应的速率。

关键词:超声处理,大豆分离蛋白(SPI),接枝反应,机制

Preliminary discussion on mechanism of ultrasonic enhanced soy protein isolates-saccharide graft reaction

MU Li-xia¹, ZHAO Mou-ming^{2,*}, YAN Xiao-ping², Liao Sen-tai¹

(1. Sericulture & Farm Produce Processing Research Institute/Guangdong Key laboratory of Agricultural Product processing, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China;

2. College of Light industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The mechanism of ultrasound promoting soy protein isolate(SPI)-saccharide graft reaction was studied by using soybean protein isolates as the research object. Compared with classical wet-heating, content of free amino acid increased from 0.86mol/L to 0.98mol/L when SPI was treated by ultrasonic for 60min. Surface hydrophobicity and content of apparent sulfhydryl content were also increased to a certain extent respectively. In this case, polypeptide chains of protein were more stretch, and part of free amino groups buried in the molecules inside were exposed. At the same time, α -helix and β -folding of SPI was significantly reduced while irregular coil was significantly increased, that showed ordered molecule structures become disordered and its steric hindrance reduced. The graft reaction of SPI-saccharide was accelerated because their more contacting led by intense vibration of ultrasound.

Key words: ultrasonic treatment; soy protein isolates(SPI); graft reaction; mechanism

中图分类号: TS210.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)07-0090-06

超声波技术作为一种物理的手段和工具,为科研工作者提供了一条能够把能量引入到分子中的高效途径和方法,它不仅可以改善反应条件,加快反应速度,提高反应产率^[1],还可以使一些难以进行的化学反应得以实现。管涌光等研究发现,超声处理可以加速氨基乙酸和葡萄糖之间的美拉德反应^[2];笔者研究发现:超声处理可以显著增加大豆蛋白与糖的接枝反应速率^[3]。然而,对超声波促进接枝反应的机理研究鲜有报道。SPI-糖接枝反应主要以美拉德反应为基础,即基于蛋白质分子中氨基酸侧链的自由氨基和糖分子还原末端的羰基之间的羰氨反应,蛋

白质或者多糖的空间位阻会影响接枝反应的程度和效率。SPI 属于高分子物质,结构复杂,影响其结构变化的因素都有可能对 SPI-糖接枝反应产生影响。本研究以自制 SPI 为研究对象,从蛋白自由氨基含量和结构的变化等方面研究超声促进 SPI-糖接枝反应的原理,并结合超声的特殊功效对其进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白 自制,低温脱脂豆粕来自山东禹王,依照 Sorgentini and Wagner 的方法稍加改进^[4],具体工艺如下:低温脱脂豆粕粉碎,200 目过筛→料:水 = 1:10(W/V)溶解→NaOH 调 pH 至 8.0,常温搅拌 2h→4℃条件下,10000g 离心 20min→上清液用 HCl 调 pH 至 4.5→4℃条件下,5000g 离心 5min→溶解→NaOH 调 pH 至 7.0→4℃条件下

收稿日期:2012-09-13 * 通讯联系人

作者简介:穆利霞(1980-),女,博士后,研究方向:农产品加工。

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金财教[2008]370 号。

透析 24h→冷冻干燥→自制 SPI;阿拉伯胶(GA)SD 型, TIC Gums Co.(Philadelphia, USA), 主要成分如下:蛋白 2.13%, 多糖 85.27%, 水分 10.59%, 灰分 2.01%; 赖氨酸 华美生物技术公司;邻苯二甲醛(OPA) Sigma 公司;乳糖、氢氧化钠、十二烷基硫酸钠(SDS)、 β -巯基乙醇、硼砂、甲醇、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾等均为分析纯。

高速冷冻离心机 CR22G, 日本日立;紫外可见分光光度计 TU-1810, 上海棱光科技有限公司;超声设备 TDS220, 广州新动力超声设备有限公司;精密 pH 计 320-S, 瑞士 Mettler Toledo;集热式磁力搅拌器 DF-1, 金坛市新一佳仪器厂;傅立叶转换红外分析仪 VECTOR 33 德国 Bruker 公司;真空冷冻干燥机 Vizared2.0, 美国 VirTris 公司;荧光分光光度计 LS55, 美国 Perkin-Elmer 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 SPI-糖接枝物的制备 将自制的 SPI 与糖按照 1:1 的比例(w/w), 蛋白浓度为 0.1%~2%(W/V), 室温下磁力搅拌器搅拌 2h, 加入 2%叠氮钠(3~5 滴/100mL)以防滋生微生物, 置于 4℃ 冰箱中水化过夜, 第 2d 取出后继续搅拌直至液体温度平衡到室温, 每个处理取样 150mL, 预热到 80℃, 混合物置于超声装置(0~600W, 15kHz)处理一定的时间。将直接水浴加热的接枝样品作为对照。反应结束后迅速冷却至室温, 测定其反应程度。

1.2.2 接枝度(degree of graft, DG)计算 邻苯二甲醛(OPA)法测定自由氨基^[5-6]:准确称取 40.0mg 的 OPA 溶解于 1.0mL 甲醇中, 此试剂要现配现用。再加入 20%(W/W)的十二烷基硫酸钠(SDS) 2.5mL, 硼砂(0.1mol/L) 25.0mL, β -巯基乙醇 100 μ L 最后用蒸馏水定容到 50mL。测定时, 取 4.0mL OPA 试剂于试管中, 加入 200 μ L 样品, 混合均匀, 放入 35℃ 水浴中反应 2min 后在 340nm 下测吸光值 A_{340} , 另取 4.0mL OPA 试剂于试管中, 加入 200 μ L 水作为空白对照。用相同的方法, 以赖氨酸代替样品作出标准曲线, 根据曲线计算样品中自由氨基的含量 C 。

接枝度可以用此公式计算:

$$\text{接枝度}(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

式中: C_0 : 接枝反应前溶液中自由氨基的含量, mol/L; C_1 : 接枝反应后溶液中自由氨基的含量, mol/L。

1.2.3 接枝产物褐变程度的测定 据文献报道^[7-8]取 2.0 mL 样品液加入 2.0 mL 稀释液(含 10%(W/W) SDS 及 0.05 mol/L 硼砂), 以稀释液作空白, 在 420nm 下测定吸光值 A_{420} 。

1.2.3 表面疏水性测定 用 0.01mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.5)配制不同浓度的蛋白质溶液(0.005%、0.01%、0.02%、0.05%、0.1% 和 0.2%) 和 8.0mmol/L 的 1-苯胺基-8-萘磺酸(1-anilino-8-naphthalene-sulfonate, ANS)溶液。取 20 μ L ANS 溶液加到 4.0mL 蛋白质溶液中, 混合均匀, 迅速测定混合液的荧光强度, 激发波长和吸收波长分别是 390nm 和 470nm, 同

时测定未加荧光探针的相应浓度的蛋白质溶液荧光强度做为空白。以蛋白质浓度对荧光强度作图, 采用最小二乘法进行曲线拟合, 直线的斜率即是蛋白质的表面疏水性(H_0)^[9-10]。

1.2.4 巯基含量的测定 参照 Beveridge 等人^[11]的 Ellman 试剂分析方法。加 4mg DTNB 试剂于 1mL 的 Tris-甘氨酸缓冲液(0.086mol/L Tris, 0.09mol/L 甘氨酸, 4mmol/L EDTA, pH 8.0)中, 配成 Ellman 试剂。称取 15mg 样品溶于 5mL Tris-甘氨酸缓冲液(测暴露 SH)中, 漩涡震荡, 加入 50 μ L Ellman 试剂, 将悬浮液置于室温(25 $\pm$ 1)℃下保温 1h, 10000 $\times$ g 离心 15min, 以未加蛋白混合液做空白, 测定 412nm 处吸光值(A_{412})。计算公式为 $\text{SH}(\mu\text{mol/g}) = 73.53 A_{412}/C$ (其中 $73.53 = 10^6/1.36 \times 10^4$, 1.36×10^4 为摩尔消光系数, C 为样品的蛋白质浓度, mg/mL)。

1.2.5 傅立叶转换红外光谱分析 实验采用傅立叶变换红外光谱仪 VECTOR 33 型(德国 Bruker 公司), 使用 55° ZnSe 晶体的衰减全反射(attenuated total reflection)附件, 检测器为 DTGS、分辨率为 4 cm^{-1} 、光谱处理软件为 OPUS4.2。称取 2~6mg 干燥样品, 加入 0.2g 左右的 KBr, 一起研磨混制均匀, 压片, 平衡 5min。然后用红外光谱仪扫描, 测定波段为 4000~400 cm^{-1} , 扫描次数为 32 次, FTIR 图谱实际上是 KBr 吸收强度 I_0 与样品吸收强度 $I_{\text{样}}$ 的比值, 与 $I_{\text{样}}$ 成比例。按照 Byler^[12]的方法, 用 PeakFit v4.12 软件对位于 1600~1700 cm^{-1} 波段属于酰胺 I 带特征峰的图谱进行分析。校正基线, 用 Gaussian 去卷积, 由二阶导数拟合, 多次拟合使残差最小。根据峰面积计算各二级结构的相对含量。其中各子峰与二级结构对应关系为: 1615~1637 cm^{-1} 和 1682~1670 cm^{-1} 为 β -折叠; 1646~1664 cm^{-1} 为 α -螺旋; 1637~1645 cm^{-1} 为无规则卷曲; 1664~1681 cm^{-1} 为 β -转角^[13-14]。

1.3 数据分析

实验中所有结果都是三次测定的平均值, 计算标准偏差。利用新复极差检验(Duncan's multiple-range test)评价样品平均值间的显著性差异($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 超声强化对 SPI-糖接枝改性的影响

乳糖属于还原性糖, 能够在湿热条件下与 SPI 的自由氨基发生美拉德反应。表 1 结果表明, 超声处理能够显著提高 SPI-乳糖的接枝反应的速度和接枝度, 且同等接枝度下其褐变程度降低, 褐变程度的降低有利于改善产品的感官色泽, 有利于接枝产物的工业化应用。在湿热反应条件下, 当 SPI-乳糖的 DG 达到 27% 时, 需要 60min, 而超声辐射条件下仅需要 20min, 反应时间为原来的 1/3, 大大缩短了达到一定反应程度所需要的时间, 极大降低了反应的能耗, 提高了反应的效率。

表 2 结果表明, 超声处理能够显著提高 SPI 和 GA 的接枝反应速率。当 DG 达到 34.08% 时, 80℃ 湿热反应条件需要 32h, 而超声促进在预热后仅需要 40min 即可以完成, 反应时间为湿热反应的 1/48, 极

大地缩短了接枝反应的时间;接枝物的褐变程度也有一定程度的改善。GA 为多糖,分子量较乳糖大,当两者质量相等时,其还原末端羰基要少,在相同的条件下,与蛋白质分子中氨基酸侧链的自由氨基碰撞并结合的几率降低,同时由于蛋白和多糖本身的空间位阻,其反应的速率也会大大降低,因此,提高 SPI-GA 的接枝反应速率,具有极为重要的理论和实践意义。

表1 超声处理对 SPI-乳糖的 DG 的影响

Table 1 The effect of ultrasonic treatment on DG values of SPI and lactose

时间 (min)	80℃湿热		超声促进	
	DG(%)	褐变 (A _{420nm})	DG(%)	褐变 (A _{420nm})
5	1.23 ± 0.12	0.07 ± 0.00	5.13 ± 0.23	0.12 ± 0.01
10	3.93 ± 0.20	0.1 ± 0.02	17.06 ± 0.17	0.15 ± 0.00
15	7.06 ± 0.17	0.15 ± 0.02	21.47 ± 0.32	0.21 ± 0.06
20	12.70 ± 0.24	0.23 ± 0.05	27.18 ± 0.47	0.27 ± 0.03
30	16.43 ± 0.41	0.29 ± 0.01	32.53 ± 0.18	0.38 ± 0.07
40	22.19 ± 0.52	0.34 ± 0.04	40.16 ± 1.53	0.51 ± 0.01
60	27.88 ± 1.02	0.49 ± 0.05	42.58 ± 0.97	0.62 ± 0.13

2.2 机理分析

SPI-糖接枝反应主要以美拉德反应为基础,即基于蛋白质分子中氨基酸侧链的自由氨基和糖分子还原末端的羰基之间的羰氨反应,蛋白质或者多糖的空间位阻会影响接枝反应的程度和效率。在本研究中,原料蛋白为 SPI, SPI 属于高分子物质,结构复杂,影响其结构变化的因素有可能对其接枝反应产生影响^[15]。

2.2.1 自由氨基的变化 在蛋白-糖接枝反应中,自由氨基是主要反应基团,不同的条件下,自由氨基的变化直接影响到反应的进行。表 3 结果表明,在普通加热条件下,蛋白质的自由氨基无显著变化,而超声处理使 SPI 的自由氨基含量显著增加,当超声处理 60min 时,自由氨基的含量由 0.86mol/L 增加到

0.98mol/L。在蛋白浓度及蛋白/糖的比值相同的条件下,经过超声处理的体系的自由氨基含量显著增加,使接枝反应更容易向底物浓度降低的方向进行,从而加速蛋白-糖的接枝反应。自由氨基的增加可能是因为超声处理导致了蛋白质肽链的断裂,即发生水解作用。Jambrak 等^[16]认为,高强度超声会引起蛋白质分子量的降低,从而使蛋白质溶解性增加。

2.2.2 表面疏水性的变化 大豆蛋白是由多种 L-型氨基酸组成的大分子,在蛋白质大分子主链上,亲水基团与水分子形成氢键,将极性的水分子吸附到蛋白分子周围,在蛋白质分子外侧形成亲水性区域;而氨基酸侧链疏水性残基则通过疏水键相互结合于蛋白质分子中心,形成疏水性区域^[17]。疏水相互作用是维持蛋白质的三级结构最重要的作用力^[18],对蛋白质的稳定性、构象和蛋白质功能具有重大意义。由于蛋白质的大分子结构,表面疏水性(Surface Hydrophobicity)影响分子间的相互作用,因此比整体的疏水性对蛋白质的功能具有更大的影响^[19]。

图 1 结果表明,普通加热和超声处理都能使 SPI 的表面疏水性显著增加,其中随着超声处理时间的延长,表面疏水性显著增加;热处理对 SPI 的表面疏水性也具有一定的影响,随着时间的延长,先增加后逐渐降低。SPI 含有大量的疏水性氨基酸侧链,尤其在分子内部,加热能有效地暴露出蛋白质分子的疏水性残基,致使肽链伸展,表面疏水性增强。尹寿伟等认为,热处理能够使包埋在球蛋白分子内部的疏水性残基暴露,从而增加蛋白的表面疏水性,进一步改善其功能特性^[20]。黄曼等研究发现,当加热继续进行时,蛋白质分子的构象变化,失去了球状构型,蛋白质通过疏水作用或 SH/SS 间相互转化开始凝沉或者聚集,表面疏水性开始下降^[21]。超声波与介质相互作用的空化效应是超声波在液体中产生超声效应的主动动力,空化泡崩溃时产生的几百个大气压的高压,以及数千度的高温,还伴随强大的冲击波(均相)和速度达 400km/s 的微射流(非均相),能够引起蛋白质的结构变化。研究表明,超声产生的空化效

表2 超声处理对 SPI-GA 的 DG 的影响

Table 2 The effect of ultrasonic treatment on DG values of SPI and GA

80℃湿热			超声促进		
时间(h)	DG(%)	褐变(A _{420nm})	时间(min)	DG(%)	褐变(A _{420nm})
4	12.99 ± 3.53	0.13 ± 0.01	5	2.52 ± 0.42	0.02 ± 0.00
8	24.33 ± 1.98	0.27 ± 0.03	10	13.85 ± 0.67	0.08 ± 0.00
12	25.53 ± 3.35	0.32 ± 0.04	15	15.11 ± 1.05	0.11 ± 0.02
16	28.65 ± 1.92	0.46 ± 0.08	20	17.13 ± 2.49	0.16 ± 0.01
24	32.96 ± 1.32	0.51 ± 0.11	30	22.17 ± 0.73	0.22 ± 0.06
32	34.08 ± 0.24	0.64 ± 0.09	40	33.27 ± 2.06	0.29 ± 0.02
48	33.89 ± 0.93	0.73 ± 0.08	60	34.11 ± 0.73	0.37 ± 0.07

表3 经过不同时间的普通加热和超声处理, SPI 的自由氨基变化(mmol/mL)

Table 3 Levels of free amino groups of SPI after ultrasonic treatment and classical heating at different times(mmol/mL)

时间(min)	0	20	40	60
普通加热(80℃)	0.86 ± 0.01	0.87 ± 0.02	0.87 ± 0.02	0.87 ± 0.02
超声处理	0.86 ± 0.01	0.90 ± 0.01	0.93 ± 0.01	0.98 ± 0.003

应和机械效应破坏了蛋白质分子的结构,导致蛋白质亚基解离^[18,22],使蛋白质分子的结构发生变化。在超声波作用下,SPI 折叠的链开始展开,分子内部的疏水性基团暴露出来,表面疏水性增加。

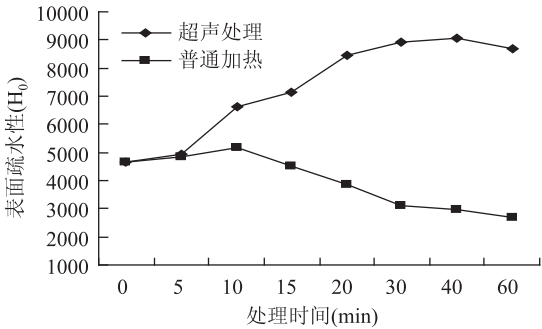


图1 超声处理对 SPI 表面疏水性的影响
Fig.1 Effect of ultrasonic treatment on the surface hydrophobicity of SPI

2.2.3 表观巯基含量的变化 游离巯基基团(-SH)和二硫键(-S-S-)是大豆蛋白中重要的功能基团,其含量变化反映了蛋白的变性程度,对蛋白质功能性质有关键的影响。而蛋白质中游离巯基分为两部分:一部分是暴露在蛋白质表面的巯基,另一部分是埋藏在分子内部的巯基^[22]。表观巯基含量变化能够反映出蛋白高级结构的变化。

为了即时地反映出 SPI 在反应中表观巯基的变化,通过在反应的过程中即时取样,现时分析,考察了普通加热和超声处理两种不同处理方式对 SPI 巯基的影响,结果如图 2 所示。随着时间的延长,SPI 在超声作用下,表观巯基的含量迅速增加,而后开始降低。而普通加热仅在较短的时间里(5min),表观巯基含量略有增加,整体呈现不断下降的趋势。超声的空化作用使 SPI 的高级结构遭到破坏,肽链伸展,疏水结合及离子结合的键被切断,必然造成某些维持蛋白质高级结构的二硫键发生断裂,使巯基暴露出来。同时,由于该处理是在有氧条件下进行的,在高速剪切和湍流的作用下,伸展的蛋白质逐渐定向排列,分子间作用加强,某些暴露出来的巯基又可能被空气中的氧气氧化,形成二硫键,从而使大豆蛋白溶液的游离巯基含量减小。短时间的热处理有利于蛋白肽链的展开,但随着时间的延长,蛋白质开始聚集,表观巯基含量降低。

2.2.4 二级结构变化-FTIR 分析 蛋白质的空间结构会影响蛋白与糖特别是多糖的接枝反应效率,因此测定 SPI 在不同的处理前后二级结构的变化具有极其重要的意义。红外光谱是一种目前最为常用的分析多肽和蛋白质二级结构的方法,能够比较准确地反映出肽链结构的变化。

表 4 结果表明,超声处理后,SPI 分子中的 α -螺旋、 β -折叠明显减少,而无规则卷曲则明显增多,说明 SPI 分子由有序结构变得无序。当 SPI 经水浴加热后,分子中的 α -螺旋也明显减少,但 β -结构增加,而无规则卷曲有所减少,说明蛋白质从一种有序结构转向另一种有序结构,这可能与前面论述的蛋白质分子发生聚集有关。

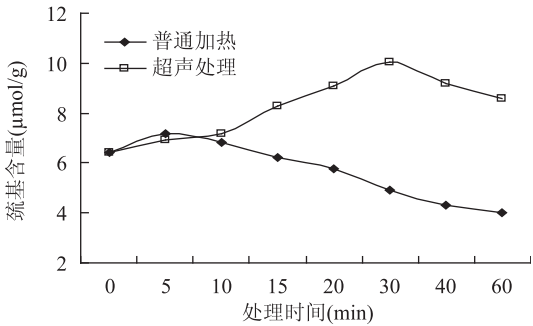


图2 不同处理方式对 SPI 巯基含量随加热时间变化的影响
Fig.2 Temporal development of the sulfhydryl content in the SPI with heating time in different condition

表 4 不同加热方式下通过 FTIR 计算所得 SPI 的二级结构含量

Table 4 Secondary-structure content of SPI treated in the different way by FTIR

处理方式	二级结构的比例(%)			
	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
SPI	10.84	36.14	18.25	34.67
水浴加热	4.59	38.34	25.56	31.51
超声处理	3.63	17.14	19.38	59.77

2.3 超声促进蛋白-糖接枝反应机理的初步探讨

超声波与介质相互作用的空化效应是功率超声波在液体中产生超声效应的主动力。超声空化是一个复杂的物理过程,指流体中的微小泡核在超声波作用下被激活,表现为泡核的振荡、生长、收缩及崩溃等一系列动力学过程,主要包括稳态空化和瞬态空化两种类型,稳态空化是在声强度较低时产生的空化泡,大小在其平衡尺寸附近振荡,振荡可以持续多个声波周期;而瞬态空化是指在较大声强作用下空化泡只能存在一个或几个声波周期时间,在声波作用下空化泡迅速增大,随之在声波正压相作用下迅速收缩至崩溃。一般认为空化泡崩溃时所产生的高温(可达 5000K 以上)和高压(可达 1000 个大气压)是声化学反应的主要动力之一^[23]。该过程被看作是聚集声场能量并迅速释放的过程,空化效应产生的示意图见图 4^[24]。

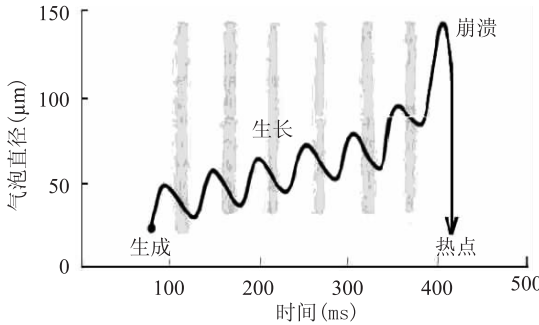


图3 超声空化引起气泡的生成和崩溃过程
Fig.3 Bubble growth and implosion irradiated by sono-cavitation

高强度的超声波在介质中传播时,会形成锯齿形波面的周期性激波,在波面处造成压强梯度,超声波振动能量不断被介质吸收,使介质自身温度升高。

有研究表明,当频率为 20kHz,声强 $I = 1 \text{ W/m}^2$ 的超声波在水中传播,取水的密度 $\rho = 1000 \text{ kg/m}^3$ ($-173 \sim 173 \text{ kPa}$),最大质点加速度达 $14.4 \text{ km/s}^{2[25]}$ 。这种激烈的机械运动完全有可能对 SPI 和糖的充分接触做出突出的贡献。蛋白与糖的反应属于合成反应,该反应的进行需要能量的输入,超声强度足够大的超声波在液体介质中形成空化泡,空化泡振荡和崩溃时产生局部、瞬时高温,空化泡崩溃时产生的几百个大气压的高压,以及数千度的高温,还伴随强大的冲击波(均相)和速度达 400 km/s 的微射流(非均相),在为蛋白与糖之间接枝反应提供能量的同时,诱导介质中蛋白和糖分子产生剧烈的振动,使反应的基团之间充分靠近,碰撞几率增加,反应加速。

超声波会使介质的组成、结构等发生变化。在蛋白-糖接枝反应中,自由氨基是主要反应基团,它的变化将会影响接枝反应的进行。有研究发现,超声产生的空化效应和机械效应破坏了蛋白质分子的四级结构,释放出小分子的亚基(11S 亚基间二硫键断裂,亚基分离)和肽(7S 的三聚体蛋白分裂)^[15]。研究表明,超声辐射使溶液中 SPI 的表面疏水性和表观疏基含量增加,表明蛋白的肽链更加伸展,使埋藏在分子内部的自由氨基暴露,使接枝反应更容易向底物减少的方向进行;肽链的断裂也导致 SPI 的自由氨基含量显著增加,从而加快蛋白-糖接枝反应的进行;同时, SPI 分子中的 α -螺旋和 β -折叠明显减少,而无规则卷曲则明显增多, SPI 分子由有序结构变得无序,蛋白的空间位阻降低,使两者在激烈的振动中更加充分的接触,加大反应的速率。

3 结论

3.1 超声波辐射作为蛋白-糖接枝反应的一种手段,可以加速蛋白与糖特别是蛋白与多糖的接枝反应,从而提高反应的效率并降低反应能耗,为蛋白质糖基化改性的工业化应用提供了一条新的思路和方法。

3.2 SPI 经过超声处理后,自由氨基含量、表面疏水性、表观疏基含量均显著增加,更多的自由氨基暴露出来,增加蛋白与糖的共价结合几率;红外结果表明,蛋白质的 α -螺旋和 β -折叠明显减少,而无规则卷曲则明显增多,蛋白的空间位阻降低,使两者在激烈的振动中更加充分的接触,加快接枝反应的进行。

参考文献

- [1] 李记太,臧洪俊.超声波应用于有机合成方面的新进展[J].河北大学学报:自然科学版,2000,20(1):96-102.
- [2] Guan Y G, Zhang B S, Yu S J, *et al.* Effects of ultrasound on a glycine-glucose model system—a means of promoting maillard reaction[J]. Food and Bioprocess Technolnoly, 2011, 4(8): 1391-1398.
- [3] Mu L X, Zhao M M, Yang B, *et al.* Effect of ultrasonic treatment on the graft reaction between soy protein isolate and gum acacia and physicochemical properties of conjugates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 4494-4499.
- [4] Sorgentini D A, Wagner J R. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins[J]. Food Chemistry, 1999, 23(5): 489-507.
- [5] Brands C M J, van Boekel M A J S. Kinetic modelling of reactions in heated disaccharide-casein systems[J]. Food Chemistry, 2003, 83(1): 13-26.
- [6] 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]. International Dairy Journal, 2001, 11(3): 145-152.
- [7] Suslick K S. The temperature of cavitation[J]. Science, 1991, 253(5026): 1397-1399.
- [8] Margulis M A. Fundamental aspects of sonochemistry[J]. Ultrasonic Sonochemistry, 1992, 30(3): 152-155.
- [9] Alizadeh-Pasdar N, Li-Chan E C. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000, 48(2): 328-334.
- [10] Molina Ortiz S E, Añón M C. Analysis of products, mechanism of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates[J]. Journal of American Oil Chemists' Society, 2000, 77(12): 1293-1301.
- [11] Beveridge T, Toma S J, Nakai S. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent[J]. Journal of Food Science, 1974, 39(1): 49-51.
- [12] Byler D M, Susi H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra[J]. Biopolymers, 1986, 25(3): 469-487.
- [13] Byler D M, Brouillette J N, Susi H. Quantitative studies of protein structure by FT-IR spectral deconvolution and curve fitting[J]. Spectroscopy, 1986(1): 29(32).
- [14] Ellepola S W, Choi S M, Ma C Y. Conformational study of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds by Fourier-transform infrared spectroscopy[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 37(1-2): 12-20.
- [15] 管军军.微波合成大豆蛋白-糖接枝物机理、机构及功能性[D].无锡:江南大学,2005.
- [16] Jambrak A R, Mason T J, Lelas V, *et al.* Ultrasonic effect on physicochemical and functional properties of α -lactalbumin[J]. LWT Food Science Technology, 2010, 43(2): 254-262.
- [17] Jun K, Matsumura Y, Tomohiko M. Characterization of texture and mechanical properties of heat-induced soy protein gels[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 1991, 68(5): 339-345.
- [18] Anfinsen C B, Scheraga H A. Experimental and Theoretical Aspects of Protein Folding[A]. Richards F. M. Advanced in Protein Chemistry[M]. New York: Academic Press Inc., 1975.
- [19] Damodaran S. Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988, 36(2): 262-269.
- [20] Yin S W, Tang C H, Cao J S, *et al.* Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of

火棘果挥发油的 GC-MS 分析及抗氧化活性

王如刚, 薛才宝, 韦梦鑫, 毕飞翔, 毕淑峰*

(黄山学院生命与环境科学学院, 安徽黄山 245041)

摘要:对火棘果挥发油的化学成分进行了气相色谱-质谱(GC/MS)分析,并以总还原力和对 ABTS 自由基的清除作用为指标,评价火棘果挥发油的抗氧化活性。研究表明:从火棘果挥发油中鉴定了 32 个化合物,占挥发油总量的 71.97%,以萜类和烷烃类成分为主;火棘果挥发油具有一定的抗氧化活性,样品量与抗氧化活性间呈明显量效关系。

关键词:火棘果,挥发油,气相色谱-质谱,抗氧化活性

GC-MS analysis and antioxidant activity of essential oil from *Pyracantha fortuneana* fruits

WANG Ru-gang, XUE Cai-bao, WEI Meng-xin, BI Fei-xiang, BI Shu-feng*

(College of Life and Environment Science, Huangshan University, Huangshan 245041, China)

Abstract: The chemical components of essential oil from *Pyracantha fortuneana* fruits were analyzed by GC-MS. The antioxidant activity of essential oil was evaluated by total reducing power, scavenging capacity against ABTS free radical. The results showed that thirty-two compounds, which occupied 71.97% of total constituents, were identified. The terpene and alkanes were dominant components in the essential oil. The essential oil exhibited some antioxidant activity in a significant concentration-dependent fashion.

Key words: *Pyracantha fortuneana* fruits; essential oil; GC-MS; antioxidant activity

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)07-0095-03

火棘(*Pyracantha fortuneana*)是蔷薇科苹果亚科火棘属的常绿灌木^[1],其果实为火棘果,又名救军粮、赤阳子、火把果。火棘果具有消积止痢、活血止血的功能,主治消化不良、肠炎、崩漏、产后腹痛等^[2]。火棘果干粉可代替粮食食用,还可用来做糕点、酿酒、酿醋和加工成果酱、饮料、化妆品等,目前火棘果已被卫生部列为食品新资源食用的果品^[3]。火棘果含

有氨基酸、果胶、黄酮、多酚等活性成分^[4-8],具有抗氧化作用^[3,9-11],而火棘果挥发油化学成分及其抗氧化活性的研究未见报道,本研究用气相-质谱(GC-MS)测定火棘果挥发油的化学成分,并以总还原力和对 ABTS(2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐)自由基的清除能力为指标评价火棘果挥发油的抗氧化活性,为火棘果的综合开发和深加工提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

火棘果 采于安徽省黄山学院校园;2,2-联氨基-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二氢盐(ABTS,批号 AD0002) Regal Biotechnology Company;铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、过硫酸钾等 分析纯。

收稿日期:2012-08-03 * 通讯联系人

作者简介:王如刚(1989-),男,本科,研究方向:天然活性成分的提取及活性测定。

基金项目:中国博士后科学基金面上项目(2011M500898);黄山学院博士启动基金项目(2012xkj002);黄山学院大学生创新基金项目(2012xdkj004)。

hemp(*Cannabis sativa* L.) protein isolate[J]. Food Chemistry. 2008,106(3):1004-1013.

[21] 黄曼,卞科.理化因子对大豆蛋白疏水性的影响[J].郑州工程学院学报,2002,23(3):5-9.

[22] 李丽娜,李军生,阎柳娟.分光光度法测定食品蛋白质中二硫键的含量[J].食品科学,2008,29(8):562-564.

[23] Ellepola S W, Choi S M, Ma C Y. Conformational study of

globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds by Fourier-transform infrared spectroscopy[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005,37:12-20.

[24] Margulis M A. Fundamental aspects of sonochemistry[J]. Ultrasonic Sonochemistry, 1992,30(3):152-155.

[25] 席细平,马重芳,王伟.超声波技术应用现状[J].山西化工,2007,27(1):25-29.