

小麦胚芽蛋白糖基化反应改性的研究

牛丽亚^{1,2}, 姜绍通^{2,*}, 潘丽军², 翟颖丝²

(1.江西农业大学食品科学与工程学院, 江西南昌 330045;

2.合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

摘 要:以葡聚糖为糖基供体,采用糖基化反应对小麦胚芽蛋白进行改性。通过单因素实验摸索和正交实验优化确定了改性的最佳工艺条件:底物浓度2%,蛋白:葡聚糖=1:1,pH11,温度110℃,时间20min。在此条件下,接枝度达到11.27%,产物溶解性达到85.91%。反应产物在激发波长347nm,发射波长422nm处有最大荧光强度,且随着反应时间的延长,荧光强度增大,符合美拉德反应产物的荧光特征。傅立叶红外分析(FTIR)结果证实了葡聚糖以共价键的形式接入了小麦胚芽蛋白。

关键词:小麦胚芽蛋白, 葡聚糖, 糖基化反应

Study on wheat germ protein modified by Maillard reaction

NIU Li-ya^{1,2}, JIANG Shao-tong^{2,*}, PAN Li-jun², ZHAI Ying-si²

(1.School of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2.School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract:Wheat germ protein was modified by Maillard reaction with dextran. The optimum condition was set through single factor experiments and orthogonal optimization experiments. Under the condition (substrate concentration of 2%, protein:dextran=1:1, pH11, temperature 110℃, time 20min), the DS reached 11.27% and NSI was 85.91%. The conjugates had the strongest fluorescence intensity when emission was 347nm and the excitation was 422nm. And fluorescence intensity increased following the reaction time increased. The FTIR analysis of the pure sample showed the same conclusion that dextran was glycosylated to wheat germ protein.

Key words:wheat germ protein; dextran; Maillard reaction

中图分类号:TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2013)08-0257-05

小麦胚芽是面粉加工工业的副产品,虽在小麦籽粒中所占比例仅为1.4%~3.9%,但蕴藏着丰富的营养成分^[1-2]。脱脂小麦胚芽中蛋白质含量高达30%以上,仅次于大豆,是一种很好的天然植物蛋白源。研究表明,脱脂小麦胚芽蛋白氨基酸组成合理,且具有一定的功能性质^[3-4]。但相对于大豆蛋白,其某些功能性质如乳化性、溶解性等仍有一定的差距,不能满足现代食品开发与加工的需要。因此对小麦胚芽蛋白进行改性以便进一步提高其功能性质,扩大其应用领域成为目前国内外研究的热点。糖基化反应是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,即为美拉德反应(Maillard reaction),属于化学改性中的一种^[5]。由于该反应是一种自发反应,且反应过程中不需另加其他化学物质,是目前研究较多的一种绿色改性方法^[6]。研究表明,经过美拉德反应改性后的蛋白,在等电点pH范围的溶解性、乳化性等有所提高^[7]。目前国内外已经有大量关于糖基化改善植物蛋白的功能性质的

研究,如大豆蛋白^[8-9]、大米蛋白^[10]等。但采用糖基化对小麦胚芽蛋白进行改性,仍未见相关报道。本实验采用糖基化方法对小麦胚芽蛋白进行改性,以接枝度和反应产物溶解性作为评价指标,通过单因素实验的摸索和正交实验优化确定了改性的工艺条件,通过对反应产物荧光光谱与红外光谱分析确定了糖基化反应发生,为小麦胚芽蛋白改性提供了一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小麦胚芽蛋白 为合肥工业大学生物与食品工程学院实验室自制,纯度为88.26%;TNBS试剂 购于Sigma公司;葡聚糖(相对分子质量20000) 购于中国医药集团(上海试剂公司);其他试剂 均为分析纯。

UV757CRT型紫外可见分光光度计 上海棱光技术有限公司;CR22GII型高速冷冻离心机 日本HITACHI公司;Alpha 1-4LSC型冷冻干燥机 德国Christ公司;FA25型高速乳分散机 上海弗鲁克流体机械制造有限公司;UDK152型全自动定氮仪 意大利VELP公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小麦胚芽蛋白-葡聚糖复合物的制备 在1%

收稿日期:2012-10-29 * 通讯联系人

作者简介:牛丽亚(1984-),女,博士,研究方向:食品化学。

基金项目:国家“863”项目(2010AA101503);“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD02B02)。

(w/v) 小麦胚芽蛋白(WGP)溶液中,按1:1(m/m)加入糖,搅拌使蛋白/糖混合均匀,并用1.0mol/L NaOH调pH至11.0。取上述混合液加入圆底烧瓶中,在100℃水浴下冷凝回流30min后立即放入冰浴中冷却5min终止反应。经8000r/min离心20min后,除去沉淀,上清液透析24h,冷冻干燥后,得到的产物即为小麦胚芽蛋白-糖复合物。

1.2.2 糖基化反应工艺的研究 以接枝度和产物溶解性为指标,分别考察不同底物浓度(1%、2%、4%)、蛋白与糖配比(1:0.25、1:0.5、1:1、1:2和1:4)、反应温度(70、80、90、100、110、120℃)、pH(8.0、9.0、10.0、11.0和12.0)、时间(0~60min)对改性效果的影响,在考察某一单因素的影响时,将上一个考察因素的水平设定在最佳水平。通过考察选择出对改性效果影响较为显著的几个因素,进行正交实验优化,进而确定最佳反应工艺参数。正交实验因素水平表如表1所示。

表1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素		
	A pH	B 温度(℃)	C 时间(min)
1	9	90	20
2	10	100	30
3	11	110	40

1.2.3 接枝度(DS)的测定 采用TNBS法测定产物接枝度。取1mL的反应液加入4mL 0.1%的SDS溶液,混合均匀。再从混合液中取0.25mL样品液,加入2mL 0.05mol/L磷酸盐缓冲液(pH8.0),再加入1mL 0.1%的TNBS试剂,混合均匀并于50℃水浴中避光反应1h后,加入4mL 0.1mol/L HCl终止反应,置于室温下放置30min后,于340nm波长处测定吸光值。DS的大小反映了糖基化反应中蛋白质上羰基接入的程度。

$$DS(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中, A_0 为未发生反应时样品吸光度; A_1 为反应t时刻后样品吸光度。

1.2.4 反应产物溶解性的测定 采用考马斯亮蓝法测定反应液中蛋白质含量。反应结束后,取5mL反应液与5mL 0.05mol/L (pH=8.0) 磷酸盐缓冲溶液混合均匀,并用1.0mol/L NaOH或HCl调溶液pH8.0,在7000r/min下离心20min后,取上清液1mL,稀释至合适倍数后,加入5mL考马斯亮蓝溶液,在595nm处测定吸光值,根据标准曲线算出上清液中蛋白质含量,并根据下式计算氮溶解性指数(NSI)。其数值用于衡量产物溶解性的大小。

$$NSI(\%) = \frac{\text{上清液中蛋白质含量}}{\text{样品中蛋白质含量}} \times 100$$

1.2.5 荧光光谱分析 用0.2mol/L硼酸盐缓冲液(pH8.5),将MRPs配成蛋白浓度为1mg/mL的溶液,于7000r/min离心20min,取上清液,使用荧光分光光度计在347nm(激发波长)进行发射波长扫描。狭缝宽5nm。

1.2.6 傅立叶红外分析 准确称取适量样品,加入

一定量的溴化钾,研磨成均匀粉末,压成薄片进行扫描。扫描条件:扫描波长4000~400 cm^{-1} ,分辨率4 cm^{-1} ,扫描次数32,检测器DTGS。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白与糖比对反应的影响

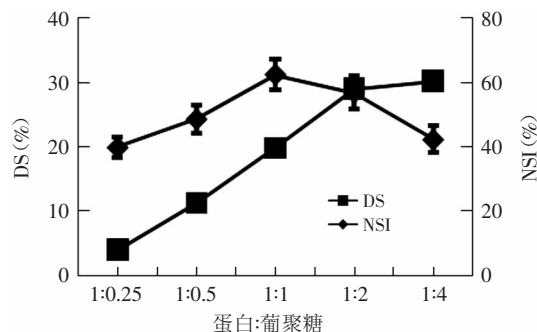


图1 不同质量比(蛋白:糖)对反应的影响

Fig.1 Effect of different weight ratio on Maillard reaction

在底物浓度为2%,反应体系pH11,温度90℃,反应30min的条件下,不同蛋白与糖配比浓度对小麦胚芽蛋白改性效果的影响如图1所示。随着反应底物中葡聚糖的增多,DS呈上升趋势,但产物NSI却呈先上升后下降的趋势。这主要是由于当底物中蛋白含量较大时,溶液粘度比较大,由于蛋白大分子的空间位阻效应,影响了反应进程,因此随着底物中葡聚糖浓度的增加,反应接枝度逐步上升。研究表明,反应接枝度的大小与蛋白改性效果并不完全呈相关性,过度接枝反而会过分消耗蛋白质中的氨基酸,影响改性效果。从图1中可以看出,DS在蛋白与糖配比1:4时达到最大,但此时NSI却仅为42.3%。在配比为1:1时,虽然此时DS仅为19.78%,但NSI达到62.42%。为了获得改性效果较好的蛋白,选择蛋白与糖配比为1:1时较为合适。

2.2 不同底物浓度对反应的影响

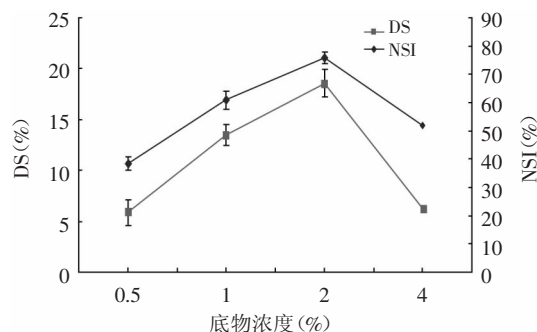


图2 不同底物浓度对反应的影响

Fig.2 Effect of different substrate concentration on Maillard reaction

在蛋白与糖配比为1:1,反应体系pH11,温度90℃,反应30min的条件下,不同底物浓度对小麦胚芽蛋白改性效果的影响如图2所示。随着底物浓度的增加,接枝度和产物溶解性均呈先增大后减少的趋势,在底物浓度为2%时,DS最大达到18.58%,NSI最大达

到75.88%。这可能是由于随着底物浓度的逐步增大,反应物分子之间碰撞几率加大,利于反应的进行,但浓度过高,蛋白质与糖大分子的空间位阻增加,使得反应位点不容易靠近,影响了反应进程和改性效果。可见,底物浓度选择2%比较合适。

2.3 不同反应时间对反应的影响

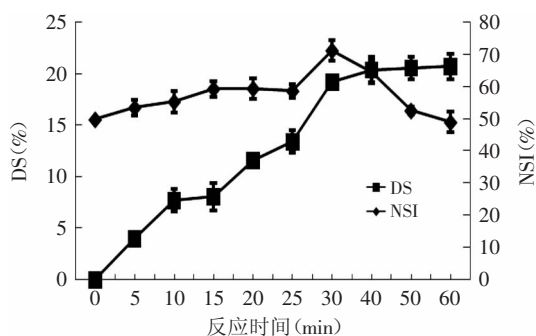


图3 不同反应时间对反应的影响

Fig.3 Effect of different reaction time on Maillard reaction

在底物浓度为2%,蛋白与糖配比为1:1,反应体系pH11,温度90℃的反应条件下,不同反应时间对小麦胚芽蛋白改性效果的影响如图3所示。随着反应时间的延长,DS呈逐步增加趋势,反应30min时DS为19.14%,此后随着反应继续进行,DS增加缓慢。从图中还可以看出,在反应初期,随着反应的进行,反应产物NSI缓慢增加,在反应30min时,NSI为71.13%,但此后随着反应进行,NSI出现下降现象。这可能是因为美拉德反应后期生成的一些不溶性物质以及蛋白的交联现象的发生。因此,反应时间选择30min较为合适。

2.4 不同反应pH对反应的影响

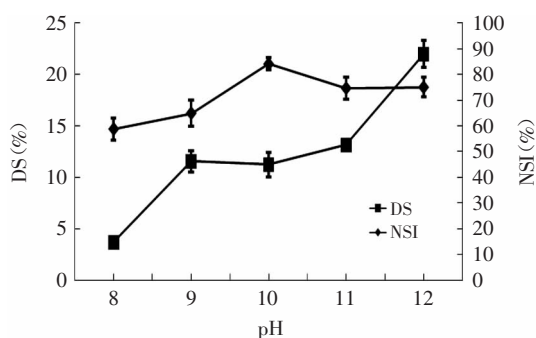


图4 不同反应pH对反应的影响

Fig.4 Effect of different pH on Maillard reaction

在底物浓度为2%,蛋白与糖配比为1:1,反应温度90℃,时间30min的条件下,不同反应pH对小麦胚芽蛋白改性效果的影响如图4所示。反应体系pH是影响糖基化反应进程的重要因素。一般在pH<5时,反应进行的程度很小,当pH>8时,反应逐步加速。从图中可以看出,随着反应pH的增加,反应速度加快,DS逐步上升,在pH12时,DS达到21.98%。这可能是因为pH8时,小麦胚芽蛋白的溶解性较差(仅为50%),在底物溶液中会出现大量沉淀,使得糖与蛋白难以

接近并发生反应。当pH为10时,蛋白溶解度都高达85%以上,利于反应进行。但pH过大,反应虽更快,但产物会更复杂,也容易出现过度接枝的现象,反而影响改性效果。因此,从图4中还可以看出,随着反应体系pH的增加,产物NSI出现先增大后减少的趋势,在pH10时达到最大值84.08%,此后再随着pH增加,NSI反而下降了。可见选择pH10较为合适。

2.5 不同反应温度对反应的影响

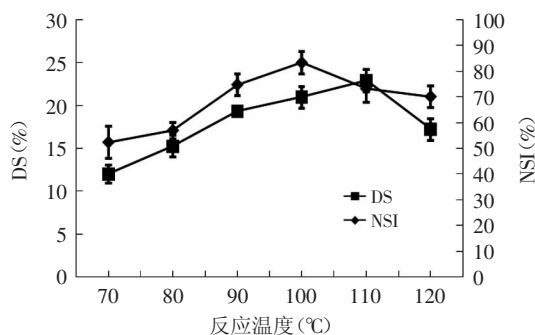


图5 不同反应温度对反应的影响

Fig.5 Effect of different temperature on Maillard reaction

在底物浓度为2%,蛋白与糖配比为1:1,反应体系pH11,时间30min的条件下,不同反应温度对小麦胚芽蛋白改性效果的影响如图5所示。众所周知,糖基化反应是一个典型的热反应,即反应温度越高,时间越长,反应程度就越大。随着反应温度的增加,DS呈逐步上升趋势,在110℃时达到最大值22.93%,但此后可能由于小麦胚芽蛋白高温分解作用,在120℃时DS出现下降,仅为17.24%,且在高温阶段,糖基化反应很快就进入了高级阶段,生成的类黑素等物质,影响改性效果^[11]。因此从图中可以看出,在100℃时NSI为83.4%,此后再升高温度,NSI略微有所下降,因此选择100℃较为合适。

2.6 正交实验优化反应条件

根据前面单因素实验结果,选择对反应接枝度及反应产物溶解性影响较为显著的3个因素(反应pH、温度和时间)的合适水平,以反应接枝度和产物溶解性为指标,选择L₉(3⁴)正交表进行正交实验进一步优化反应条件。其余实验条件为:底物浓度为2%,蛋白:葡聚糖=1:1。正交实验结果如表2所示。由DPS 6.55统计软件分析正交实验结果。

从表2可知,根据极差分析结果,各因素对反应接枝度的影响顺序依次为:时间>温度>pH;对产物溶解性的影响顺序依次为:pH>温度>时间。

从表3和表4方差分析可得,所选的3个因素对反应接枝度和产物溶解性的影响均为显著的,其中pH和温度对产物溶解性的影响极显著。通过分析可知对反应接枝度最优组合为A₁B₁C₃,对产物溶解度最优组合为A₃B₃C₂。从表3直观分析可以看出,第8组(A₃B₂C₃)反应接枝度最高,第9组(A₃B₃C₁)反应产物溶解性最大。由于接枝度与产物溶解度并无相关性,以产物溶解度为最优水平,通过验证实验结果选择A₃B₃C₁为最优组合,产物溶解性为85.91%,此时接枝

表2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	空列	DG (%)	NSI (%)
1	1	1	1	1	17.61	56.69
2	1	2	2	2	17.39	53.93
3	1	3	3	3	18.53	62.21
4	2	1	3	2	19.59	77.78
5	2	2	1	3	11.45	75.58
6	2	3	2	1	9.48	85.37
7	3	1	2	3	15.98	80.12
8	3	2	3	1	20.98	75.44
9	3	3	1	2	11.27	85.91
K ₁	53.5300	53.1800	40.3300	48.0700		
K ₂	40.5200	49.8200	42.8500	48.2500		
K ₃	48.2300	39.2800	59.1000	45.9600		
R	4.3367	4.6333	6.2567	0.7633		
K' ₁	172.8300	214.5900	218.1800	217.5000		
K' ₂	238.7300	204.9500	219.4200	217.6200		
K' ₃	241.4700	233.4900	215.4300	217.9100		
R'	22.8800	9.5133	1.3300	0.1367		

表4 反应产物溶解性方差分析表

Table 4 ANOVA of solubility

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
A	1006.8630	2	503.4315	33990.1245	0.0001	**
B	140.5190	2	70.2595	4743.7029	0.0002	**
空列	0.0296	2	0.0148			
C	2.7800	2	1.3900	93.8492	0.0105	*
误差	0.0296	2	0.0148			
总和	1150.1917					

表3 DS方差分析表

Table 3 ANOVA of DS

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	p值	显著性
A	28.5327	2	14.2663	26.3958	0.0365	*
B	35.0657	2	17.5328	32.4395	0.0299	*
C	69.1918	2	34.5959	64.0098	0.0154	*
空列	1.0810	2	0.5405			
误差	1.0810	2	0.5405			
总和	133.8711					

注: **, $p < 0.01$, 表示差异极显著; *, $0.01 < p < 0.05$, 表示差异显著; $p > 0.05$ 表示差异不显著; 表4同。

度为11.27%。

2.7 荧光光谱分析

荧光物质是糖基化反应的一个特征产物。从图6可以看出, 反应产物MRPs在激发波长347nm, 在发射波长422nm处有最大荧光强度, 符合美拉德反应产物的荧光特征^[12-13], 这也确定了小麦胚芽蛋白-葡聚糖加热后糖基化反应的发生。随着反应时间的延长, 复合产物荧光强度不断增大, 说明糖基化反应程度也在不断增大。研究发现, 糖基化反应过程中, 荧光物质在褐变物质的生成之前产生, 因此随着反应时间

的延长, 反应正向高级阶段发展。

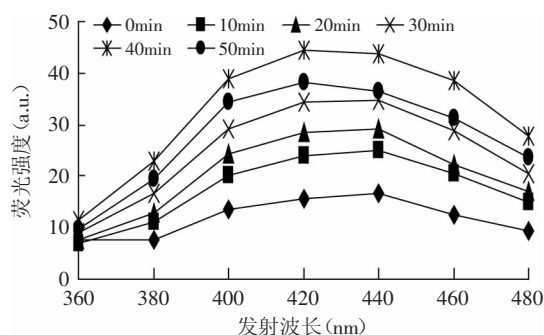


图6 小麦胚芽蛋白与葡聚糖加热反应产物荧光光谱分析

Fig.6 Fluorescence intensity of MRPs formed with Dextran at different heating time

2.8 红外光谱分析

当小麦胚芽蛋白与葡聚糖发生糖基化反应后, 反应产物最典型的特征就是蛋白分子中羟基的引入。在红外图谱上的具体体现是在3700~3200cm⁻¹出现一个更宽的吸收峰以及在1260~1000cm⁻¹也出现吸收^[14]。从图7可以看出, MRPs在3369cm⁻¹和1018cm⁻¹左右吸收峰的强度增大^[15], 可以认为, 反应产物中有多糖分子

接入,小麦胚芽蛋白与葡聚糖加热发生了糖基化反应,反应产物功能性质的改善是由糖基化反应引起的。

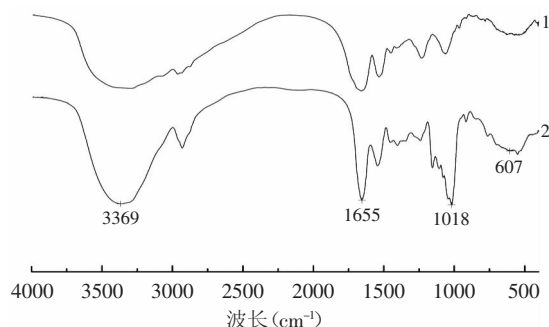


图7 小麦胚芽蛋白(WGP)及其与葡聚糖复合物(MRPs)红外光谱图

Fig.7 FT-IR analysis of WGP and MRPs formed with dextran
注:1:WGP;2:MRPs。

3 结论

通过单因素实验的摸索和正交实验优化,确定了糖基化反应改性小麦胚芽蛋白的最优工艺条件:底物浓度为2%,蛋白:葡聚糖=1:1,pH11,温度110℃,时间20min时,此时接枝度为11.27%,产物溶解性达到85.91%。通过对产物荧光光谱和红外光谱分析确定了糖基化反应的发生,因此,反应产物溶解性的改善是由糖基化反应引起的,可见利用美拉德反应对小麦胚芽蛋白进行改性是一条有效的途径。

参考文献

- [1] M Arshad, F Anjum, T Zahoor. Nutritional assessment of cookies supplemented with defatted wheat germ[J]. Food Chemistry, 2007, 102(1): 123-128.
- [2] ST Jiang, LY Niu. Optimization and evaluation of wheat germ oil extracted by supercritical CO₂[J]. Grasas Y Aceites, 2011, 62(2): 181-189.
- [3] KX Zhu, HM Zhou, HF Qian. Proteins extracted from defatted wheat germ: Nutritional and structural properties[J]. Cereal Chemistry, 2006, 83(1): 69-75.
- [4] Y Ge, A Sun, Y Ni, et al. Some nutritional and functional

- properties of defatted wheat germ protein[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(12): 6215-6218.
- [5] J Kim, Y Lee. Study of Maillard reaction products derived from aqueous model systems with different peptide chain lengths[J]. Food Chemistry, 2009, 116(4): 846-853.
- [6] A Kato. Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates[J]. Food Science and Technology Research, 2002, 8(3): 193-199.
- [7] N Decourcelle, C Sabourin, G Dauer, et al. Effect of the Maillard reaction with Xylose on the emulsifying properties of a Shrimp Hydrolysate (*Pandalus borealis*)[J]. Food Research International, 2010.
- [8] J Qi, J Liao, S Yin, et al. Formation of acid-precipitated soy protein-dextran conjugates by Maillard reaction in liquid systems[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(12): 2573-2580.
- [9] J Qi, X Yang, J Liao. Improvement of functional properties of acid-precipitated soy protein by the attachment of dextran through Maillard reaction[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2009, 44(11): 2296-2302.
- [10] Y Li, F Lu, C Luo, et al. Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar[J]. Food Chemistry, 2009, 117(1): 69-74.
- [11] E Ajandouz, V Desseaux, S Tazi, 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): 1244-1252.
- [12] 纪巍, 麻建国, 李玥, 等. 限制性水解大米蛋白-不同多糖复合产物的制备及功能性质的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 30-34.
- [13] F Gu, J Kim, K Hayat, 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.
- [14] F Gu, J Kim, S Abbas, et al. Structure and antioxidant activity of high molecular weight Maillard reaction products from casein-glucose[J]. Food Chemistry, 2010, 120(2): 505-511.
- [15] 华静娴. 米蛋白-葡聚糖微波加热接枝耦联反应的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.

(上接第256页)

- [3] Koichiro Mori, Chinatsu Kobayashi, Takako Tomita, et al. Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Nutrition Research, 2008, 28(5): 335-342.
- [4] Yu-Ling Lee, Shao-Yu Jian, Jeng-Leun Mau. Composition and non-volatile taste components of *Hypsizygus marmoreus* [J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(2): 594-598.
- [5] Akira Harada, Shozo Yoneyama, Shuichi Doi, et al. Changes in contents of free amino acids and soluble carbohydrates during fruit-body development of *Hypsizygus marmoreus* [J]. Food Chemistry, 2003, 83(3): 343-347.
- [6] 孙培龙, 魏红福, 杨开, 等. 真姬菇研究进展[J]. 食品科技,

- 2005(9): 54-57.
- [7] 李顺凤, 刘兴华, 张丽华, 等. 真姬菇子实体多糖提取工艺优化[J]. 农业工程学报, 2008, 24(2): 281-284.
- [8] Yu-Ling Lee, Ming-Tsung Yen, Jeng-Leun. Antioxidant properties of various extracts from *Hypsizygus marmoreus* [J]. Food Chemistry, 2007, 104: 1-9.
- [9] I Palacios, M Lozano, C Moro, et al. Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms[J]. Food Chemistry, 2011, 128: 674-678.
- [10] 马晓华, 连宾. 几种常见食用菌清除羟基自由基能力的研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(10): 25-27.
- [11] 陈龙, 李文峰, 令博, 等. 金耳、银耳、木耳多酚提取及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(20): 52-56.