

# 荞麦分离蛋白-葡聚糖共价复合物的制备

曹丽霞, 郭晓娜\*, 朱科学, 彭伟, 周惠明

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 以荞麦蛋白为原料, 在大分子拥挤条件下, 采用湿法制备荞麦蛋白-葡聚糖共价复合物。选择 60 ℃ 和 70 ℃ 为反应温度, 研究了不同反应条件对共价复合物溶解性、乳化性的影响, 并通过游离氨基以及褐变程度来控制反应进程。结果表明, 荞麦蛋白与葡聚糖在 70 ℃ 反应 6 h 后, 其乳化性得到明显改善。SDS-PAGE 电泳(考马斯亮蓝染色和糖蛋白染色)验证了共价复合物的生成。DSC 分析结果表明共价复合后荞麦蛋白的热稳定性得到提高。荧光光谱表明共价复合物的蛋白质极性降低, 疏水性增强。

**关键词:** 荞麦分离蛋白; 葡聚糖; 共价复合物; 乳化性

**中图分类号:** TS 201.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2014)07—0703—06

## Preparation of Buckwheat Protein Isolate-Dextran Conjugates

CAO Lixia, GUO Xiaona\*, ZHU Kexue, PENG Wei, ZHOU Huiming

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Buckwheat protein isolate (BPI)-dextran covalent conjugate was prepared by the Maillard reaction in macromolecular crowding environment in aqueous solutions. The effects of reaction time on solubility and emulsification were researched at 60 ℃ and 70 ℃. The results show that the conjugates obtained at 70 ℃ for 6 h have better emulsification and thermal stability with little browning. Besides, the formation of covalent complexes was verified by SDS-PAGE with both protein and carbohydrate staining, the fluorescence spectra showed that the protein hydrophobicity was enhanced by heating process.

**Keywords:** buckwheat protein isolate, dextran, conjugate, emulsification

蛋白质多糖可以通过共价与非共价相互作用两种方式结合, 而以非共价相互作用(如静电力、氢键、范德华力、疏水相互作用等次级力)结合的复合物由于作用力弱, 往往无法获得期望的功能性质。通过美拉德反应制备蛋白质-多糖共价复合物改善其功能性质, 越来越得到研究人员的青睐。

蛋白质-多糖共价复合物的制备工艺主要分为干法和湿法。研究较早的是干热法, 但其反应速度慢, 达到合适的反应程度往往需要数日甚至数周, 比如酪蛋白酸钠-麦芽糊精在 60 ℃ 相对湿度 79% 需要反应 4 d<sup>[1]</sup>, 乳清分离蛋白与果胶在 60 ℃ 相对湿度 80% 反应 10 天得到较好的乳化活性<sup>[2]</sup>; 相反,

收稿日期: 2013-11-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900999)。

\* 通信作者: 郭晓娜(1978—), 女, 河南新密人, 工学博士, 副教授, 主要从事植物蛋白工程研究。E-mail: gxn1978@hotmail.com

在大分子拥挤条件下,蛋白质多糖的湿热反应往往只若干小时,比如 Dan Zhu 等<sup>[3]</sup>人在 60 ℃制备乳清分离蛋白-葡聚糖共价复合物需要 24 h,而 Xi Zhang 等<sup>[4]</sup>人制备的  $\beta$ -伴大豆球蛋白-葡聚糖共价复合物仅需 6 h。

目前,采用美拉德反应制备共价复合物研究较多的蛋白包括乳清蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白、大豆蛋白、酪蛋白等。除此之外,国内还研究了一些谷类蛋白,如大米蛋白、燕麦蛋白以及小麦胚蛋白。荞麦(Buckwheat),是蓼科荞麦属作物,其蛋白质含量丰富,高于禾谷类<sup>[5]</sup>,以水溶性的清蛋白和盐溶性的球蛋白为主<sup>[6]</sup>。荞麦蛋白的氨基酸含量分布均衡,富含精氨酸及其他谷类蛋白质缺乏的赖氨酸,营养价值比较高。

作者以荞麦蛋白为原料,在大分子拥挤条件下,采用湿法制备荞麦蛋白-葡聚糖共价复合物,在预实验的基础上,选择 60 ℃和 70 ℃为反应温度,研究了不同反应条件对共价复合物溶解性、乳化性的影响,以期荞麦蛋白的深度开发利用提供一定的理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与设备

甜荞仁:内蒙古翁牛特旗陇千翔工贸有限责任公司产品;TNBS、丙烯酰胺、亚甲基双丙稀酰胺:Sigma 公司产品;考马斯亮蓝 G250、葡聚糖(相对分子质量为 40 000)、正己烷等:国药集团化学试剂有限公司产品。

真空冷冻干燥机:FREEZONE12,美国 LABCONCO 公司产品;高速分散机:IKA T18 Basic, ULTRA-TURRAX 公司产品;高速冷冻离心机:CR21GⅢ,日本 HiTachi 公司产品;紫外可见分光光度计:T6 新世纪,北京普析通用仪器有限责任公司产品;DSC:Q200;美国 TA 仪器有限公司产品;DYY-6B 型稳压稳流电泳仪:北京市六一仪器厂产品;荧光光谱仪:F-7000,HiTachi 公司产品。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 荞麦分离蛋白(BPI)的制备** 甜荞仁粉碎过 100 目,加入正己烷室温下脱脂数次,然后于通风橱中风干 48 h,得到脱脂荞麦粉。荞麦分离蛋白的制备采用碱提酸沉法。脱脂荞麦粉与去离子水以料液质量体积比 1 g:8 mL 混合,搅拌约半小时至均匀,

然后用 1 mol/L 的 NaOH 缓慢调节 pH 至 8.5,在 35 ℃水浴锅中搅拌提取 30 min,然后在室温下 4 500 r/min,离心 20 min,取上清液,用 1 mol/L 的 HCl 缓慢调节 pH 至 4.5,水洗沉淀两次后溶于少量去离子水中(蛋白质质量分数约为 3%),用 1 mol/L 的 NaOH 缓慢调节 pH 至 7.0,冷干。

**1.2.2 荞麦分离蛋白-葡聚糖共价复合物(BDC)的制备** 准确称取一定量的荞麦分离蛋白(Buckwheat Protein Isolate,简称为 BPI),溶解于 0.02 mol/L, pH 7.0 的磷酸盐缓冲液中,蛋白质质量浓度为 6 g/dL,室温下温和搅拌 3 h 至分散均匀,添加质量分数 0.2%的  $\text{NaN}_3$  抑菌,用 1 mol/L NaOH 调至中性,添加质量分数 20%的葡聚糖,搅拌,使多糖和蛋白质混合均匀,4 ℃放置过夜,使蛋白质充分水合;次日于一定温度下反应,到达反应时间后取样,并立即于冰水中冷却终止反应。样品稀释一定倍数后,在 10 000 g 离心 20 min,留上清液备用。未反应的原始蛋白(Native BPI,简称为  $\text{BPI}_N$ )、蛋白葡聚糖混合物(Mixture of BPI and Dextran,简称为 Mix)、单独加热的蛋白(Heated BPI,简称为  $\text{BPI}_H$ )和共价复合物(BPI-Dextran Conjugates,简称为 BDC)用样品缓冲液稀释,然后在 10 000 g 离心 20 min,留上清液备用。

**1.2.3 溶解度的测定** 采用牛血清蛋白绘制标准曲线,将上述离心后的上清液用缓冲液稀释一定倍数,采用考马斯亮蓝法测定溶解度,空白用 0.02 mol/L, pH 7.0 的磷酸盐缓冲液,单位为 mg/mL。

**1.2.4 乳化性质的测定** 乳化性质包括乳化活性及乳化稳定性。将蛋白上清液(适当稀释,使蛋白浓度相同)和大豆油按体积比 3:1 混合,用高速分散机均质 1 min,转速为 11 000 r/min,立即倒入 25 mL 的小烧杯中,在 0、30 min 分别从底部吸取 20  $\mu\text{L}$ ,加入 5 mL 0.1% SDS 稀释并混匀,测定 500 nm 处的吸光值(空白用质量分数 0.1% SDS),乳化活性指数(EAI,单位为  $\text{m}^2/\text{g}$ )及乳化稳定指数(ESI,单位为 1)计算如下:

$$\text{EAI} = 2 \times 2.303 \times A_0 \times N / (c \times (1 - \varphi) \times L \times 10\,000)$$

$$\text{ESI} = A_1 \times 30 / (A_0 - A_1)$$

式中,  $A_1$  为 0 min 对应的吸光值;  $N$  为稀释倍数,本实验中为 251;  $c$  为乳化液形成前样品液的蛋白质质量浓度(g/mL);  $\varphi$  为乳状液中油的体积分数,本实验中为 0.25;  $L$  为比色皿光径(cm);  $A_1$  为 30 min 后的吸光值。

**1.2.5 游离氨基的测定 (TNBS 法)** 取 200  $\mu\text{L}$  标样或者样品 (适当稀释), 加入 2 mL、1 mg/mL 的 SDS (溶于 0.2 mol/L PBS, pH 8.2), 与 1 mL 质量分数 0.01% TNBS (现用现配, 避光) 混匀, 于 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴中避光 1 h, 立即加入 2 mL 0.1 mol/L 亚硫酸钠以终止反应, 室温放置 15 min。测波长 420 nm 处的吸光值。空白用样品缓冲液取代样品。

**1.2.6 褐变程度的测定** 上清液用质量分数 0.1% SDS 稀释一定倍数, 在 420 nm 处测吸光值, 混合物 Mix 作空白。

**1.2.7 热稳定性分析** 采用差示扫描量热法 (DSC) 测定蛋白的变性温度和变性焓值。以空铝盘为对照, 取 5~10 mg 于铝盘中, 压盘, 温度扫描范围为 30~130  $^{\circ}\text{C}$ , 升温速率 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 保护  $\text{N}_2$  流速为 30 mL/min。采用 The Universal Analyzer 2000 软件计算蛋白质的变性温度和变性焓。

**1.2.8 SDS-PAGE 凝胶电泳** 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, 简写 SDS-PAGE), 凝胶配方为: 12 g/dL 分离胶和 5 g/dL 浓缩胶。凝胶加样缓冲液由 100 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8) (含 4 g/dL SDS、0.2 g/dL 溴酚兰、体积分数 20% 甘油) 配制而成。蛋白质质量浓度为 2.5 mg/mL, 上样量为 25  $\mu\text{L}$ 。

**1.2.9 荧光光谱分析** 用上述样品缓冲液稀释蛋白质质量浓度为 1 mg/mL, 使用荧光光谱仪在激发波长为 280 nm 处进行发射波长扫描 (300~400 nm)。

**1.2.10 统计分析** 使用 SPSS18.0 进行数据统计分析。各实验均做 3 个重复, 对数据进行方差分析 (ANOVA), 用最小显著性差异 (LSD) 检验 (置信区间为 95%) 其均值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应时间及温度对溶解度的影响

表 1 为 60  $^{\circ}\text{C}$  和 70  $^{\circ}\text{C}$  反应不同时间的溶解度。随着反应时间的增加, 单独加热的蛋白 BPIH 溶解度逐渐降低, 并且随着反应温度的升高, 溶解度降低的更为明显, 这可能是由于加热使蛋白质产生聚集导致沉淀析出; 对于荞麦蛋白和葡聚糖共同加热得到的共价复合物 BDC 来说, 随着反应时间的延长, 其溶解度分别在 60  $^{\circ}\text{C}$  加热 24 h 后以及 70  $^{\circ}\text{C}$  加热 6 h 后, 溶解度开始增加, 这可能是因为多糖分子

接枝到蛋白质分子上, 多糖良好的亲水性使得蛋白质溶解度增加, 从而混合物加热出现先降低后缓慢增加的趋势。对于相同的加热时间, 荞麦蛋白和葡聚糖共同加热得到的共价复合物 BDC 的溶解度低于单独加热的蛋白 (BPIH), 这可能是因为未反应的多糖竞争吸附水分子, 导致蛋白质的溶解度下降。实验同时也发现, 在相同的浓度下, 荞麦蛋白和葡聚糖简单混合, 其混合物 Mix 的溶解度 ( $4.79 \pm 0.10$ ) mg/mL 明显低于原始蛋白质 BPI<sub>N</sub> 的溶解度 ( $5.07 \pm 0.11$ ) mg/mL。

表 1 反应时间及温度对荞麦蛋白溶解度的影响

Table 1 Effects of reaction time and temperature on solubility of buckwheat protein

| 温度/ $^{\circ}\text{C}$ | 反应时间/h | BPIH 溶解度/<br>(mg/mL)       | BDC 溶解度/<br>(mg/mL)       |
|------------------------|--------|----------------------------|---------------------------|
| 60                     | 12     | $4.42 \pm 0.11\text{c}$    | $4.40 \pm 0.15\text{c}$   |
|                        | 24     | $4.37 \pm 0.03\text{c}$    | $4.11 \pm 0.02\text{ef}$  |
|                        | 36     | $4.35 \pm 0.02\text{cd}$   | $4.14 \pm 0.03\text{def}$ |
|                        | 48     | $4.27 \pm 0.04\text{cde}$  | $4.35 \pm 0.11\text{cd}$  |
| 70                     | 3      | $4.30 \pm 0.06\text{cde}$  | $3.84 \pm 0.11\text{gh}$  |
|                        | 6      | $4.21 \pm 0.05\text{cdef}$ | $3.48 \pm 0.02\text{i}$   |
|                        | 9      | $4.13 \pm 0.01\text{def}$  | $3.49 \pm 0.05\text{i}$   |
|                        | 12     | $4.04 \pm 0.09\text{fg}$   | $3.62 \pm 0.10\text{hi}$  |

### 2.2 反应时间及温度对乳化活性及乳化稳定性的影响

图 1(a) 为 60  $^{\circ}\text{C}$  反应不同时间后的乳化活性。与原始蛋白 BPI<sub>N</sub> 相比, 单独加热的蛋白 BPIH 的乳化活性略微上升, 这可能是因为加热使蛋白质链展开, 疏水基团暴露而使乳化活性提高。荞麦分离蛋白-葡聚糖的共价复合物 BDC 的乳化活性明显优于 BPI<sub>N</sub> 及 BPIH, 且随着反应时间的延长, 乳化活性缓慢增加。这可能是由于一方面加热使蛋白质链展开表面疏水性增强, 另一方面多糖接枝于蛋白质分子上使其更加有利于吸附在油水界面上; 图 1(b) 为 70  $^{\circ}\text{C}$  反应不同时间的乳化活性。与 60  $^{\circ}\text{C}$  相比, 单独加热的蛋白 BPIH 的乳化活性略有降低。而 70  $^{\circ}\text{C}$  反应后 BDC 的乳化活性发生了更加明显的改善, 反应 6 h 时, 乳化活性增加到 38.16  $\text{m}^2/\text{g}$ 。这可能是因为反应温度升高加剧了美拉德初期反应的剧烈程度, 糖基更容易与氨基发生反应, 同时加热使蛋白链更加舒展富有柔韧性。随着反应时间的延长, 发现乳化活性在快速增加后开始缓慢减小, Ulrike Einhorn-Stoll 等<sup>[9]</sup>人的研究也发现乳清蛋白与果胶的接

枝反应中乳化活性先上升后下降。减小可能是因为蛋白质发生大分子交联,偏离了原有的亲水亲油平衡。

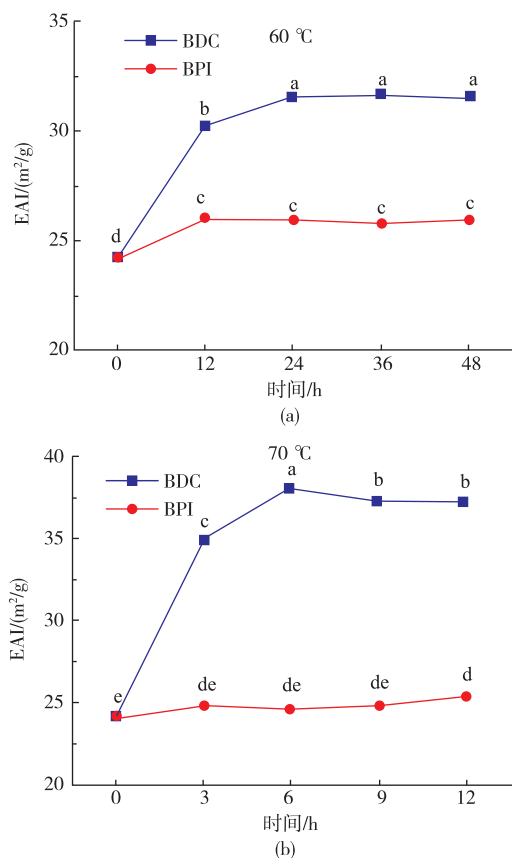


图1 反应时间及温度对荞麦蛋白乳化活性的影响

Fig. 1 Effects of reaction time and temperature on emulsifying activity of buckwheat protein isolate (BPI) and BPI-dextran conjugates (BDC)

图2为60 °C和70 °C反应不同时间后的乳化稳定性。与单独加热的蛋白  $\text{BPI}_h$  相比,接枝反应后的荞麦分离蛋白-葡聚糖共价复合物 BDC 乳化稳定性显著提高。在60 °C反应24 h或70 °C反应6 h时乳化稳定性较好,这可能是由于蛋白质与多糖形成的大分子共价复合物吸附于油滴表面,在油水界面膜之间形成一定的空间位阻效应从而减缓油滴的聚集。随着反应时间进一步延长乳化稳定性略有下降,这与Yue Li等<sup>[7]</sup>的研究一致。此外,对于高浓度下荞麦蛋白和葡聚糖的混合物 Mix 来说,其乳化活性指数( $31.11 \text{ m}^2/\text{g}$ )及稳定性指数(103.65)也有一定程度的提高,这可能是因为在制备过程中大分子拥挤条件使得多糖和蛋白由于氢键、范德华力或者热力学不相适性形成复合物,但同时这种相互作用比较弱<sup>[8]</sup>,因此其乳化活性及稳定性提高有限。

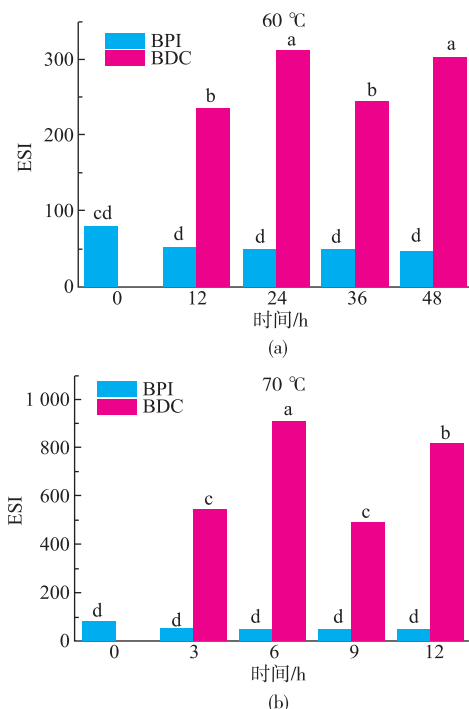


图2 反应时间及温度对荞麦蛋白乳化稳定性的影响

Fig. 2 Effects of reaction time and temperature on emulsifying stability of buckwheat protein isolate (BPI) and BPI-dextran conjugates (BDC)

### 2.3 反应时间及温度对游离氨基的影响

在美拉德反应体系中,游离氨基可能受蛋白糖基化,分子间/内交联及降解反应等的影响,可用来作为美拉德反应在初/中级阶段的评估指标<sup>[9]</sup>。从表2可以看出,荞麦分离蛋白-葡聚糖共价复合物 BDC 游离氨基的浓度随着反应时间的延长,逐渐增加,但均低于未加热的原始蛋白  $\text{BPI}_N$  ( $0.227 \pm 0.002 \text{ a}$ ) mmol/mg。这说明在反应的过程中,糖基化反应消耗了游离氨基,同时随着加热时间的延长,蛋白质链展开,游离氨基暴露。由乳化分析结果可知,60 °C反应24 h或70 °C反应6 h的乳化性较好,此时两者的游离氨基浓度相当,这说明蛋白的乳化性和反应程度之间可能存在着内在的联系。

### 2.4 反应时间及温度对褐变程度的影响

除了游离氨基以外,样品的褐变程度也可以反应美拉德反应的进程,褐变越严重,说明反应程度越大。从表3可以看出,随着反应时间的延长,共价复合物 BDC 的褐变程度逐渐加深,在70 °C反应6 h或者60 °C反应24 h后,褐变速度逐渐加快,反应可能逐渐向高级阶段发展。因此,控制70 °C反应时间为6 h和60 °C反应24 h。

表2 反应时间及温度对游离氨基浓度的影响

Table 2 Effects of reaction time and temperature on free amine content of BPI-dextran conjugates(BDC)

| 温度/℃ | 反应时间/h | BDC 游离氨基浓度/(mmol/mg) |
|------|--------|----------------------|
| 60   | 12     | 0.136±0.002e         |
|      | 24     | 0.139±0.002de        |
|      | 36     | 0.143±0.001cd        |
|      | 48     | 0.154±0.003b         |
| 70   | 3      | 0.138±0.000de        |
|      | 6      | 0.141±0.001cde       |
|      | 9      | 0.142±0.001cd        |
|      | 12     | 0.146±0.000c         |

表3 反应时间及温度对褐变程度的影响

Table 3 Effects of reaction time and temperature on the extent of browning of BPI-dextran conjugates

| 温度/℃ | 反应时间/h | $A_{420\text{ nm}}$ |
|------|--------|---------------------|
| 60   | 12     | 0.236±0.001d        |
|      | 24     | 0.291±0.004c        |
|      | 36     | 0.444±0.001b        |
|      | 48     | 0.576±0.010a        |
| 70   | 3      | 0.235±0.001d        |
|      | 6      | 0.286±0.001c        |
|      | 9      | 0.354±0.001b        |
|      | 12     | 0.470±0.002a        |

## 2.5 热稳定性分析

图3为原始蛋白BPI<sub>N</sub>、BPI<sub>H</sub> (70℃加热6h)、BDC(70℃加热6h)的DSC图谱。从图3可以看出,BPI<sub>N</sub>的变性温度为101.34℃,BPI<sub>H</sub>变性温度略微提高。BDC变性温度提高至105.45℃,同时热焓值也明显增加,说明BDC具有更好的热稳定性。这可能是因为多糖链的接入增加了体积排阻效应使得蛋白质结构更加紧密,空间构象不易被改变。

## 2.6 SDS-PAGE 电泳

图4为70℃反应不同时间的SDS-PAGE电泳。从图4(a)考马斯亮蓝染色结果来看,与BPI<sub>N</sub>相比,单独加热的蛋白质BPI<sub>H</sub>及共价复合物BDC均在刚进入分离胶的区域出现高相对分子质量蛋白条带,并且随着加热时间的延长,条带颜色逐渐加深,同时相对分子质量 $3.5 \times 10^7$ 左右的蛋白质减少,说明加热可能使蛋白质发生了聚集。结合图4(b)糖

蛋白染色结果来看,荞麦蛋白和葡聚糖共同加热6h后也在刚进入分离胶的区域出现了明显的红色条带,证明有荞麦蛋白-葡聚糖的共价复合物的生成。而BPI<sub>H</sub>没有出现相应的大分子条带,说明BPI<sub>H</sub>只是生成了简单的蛋白质聚合物。

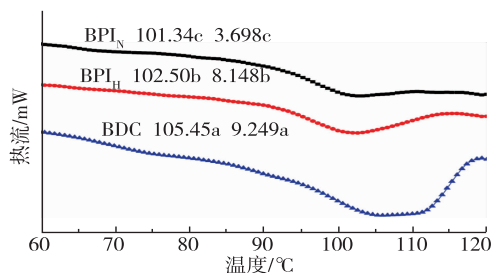
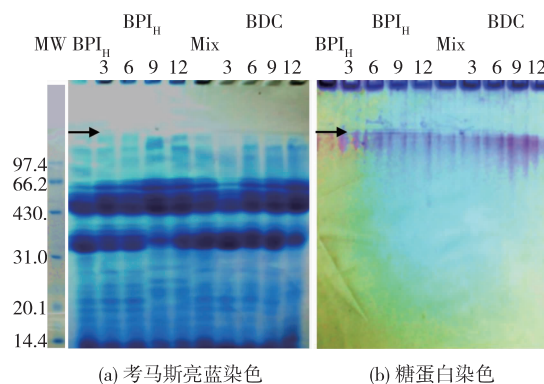
图3 原始蛋白BPI<sub>N</sub>、单独加热的蛋白BPI<sub>H</sub>、共价复合物BDC的DSC图谱Fig. 3 DSC of native (BPI<sub>N</sub>), heated (BPI<sub>H</sub>) buckwheat protein (BPI) and BPI-dextran conjugates (BDC)注:MW表示标准相对分子质量蛋白,单位为 $\times 10^3$ ;A/B两图顺序一致,从左向右依次为原始荞麦蛋白BPI<sub>N</sub>,单独加热3~12h的荞麦蛋白BPI<sub>H</sub>,蛋白糖简单混合物Mix,反应3~12h的共价复合物BDC;箭头所指为分离胶和浓缩胶分界处

图4 SDS-PAGE电泳

Fig. 4 SDS-PAGE of native (BPI<sub>N</sub>), heated (BPI<sub>H</sub>) buckwheat protein, mixture of BPI and dextran (Mix) and BPI-dextran conjugates (BDC)

## 2.7 荧光光谱分析

蛋白质分子中能发射荧光的氨基酸为芳香族氨基酸:色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)以及苯丙氨酸(Phe)。其中Trp荧光强度最大,Tyr次之,Phe荧光强度最小。从图5可以看出,BPI<sub>H</sub>(70℃加热12h)荧光强度高于原始蛋白BPI<sub>N</sub>/简单混合物Mix(两者相差不大),但不同时间之间的变化不大(图中未给出);而对于共价复合物来说,随着反应时间增加,荧光强度不断增加,而且峰出现蓝移,混合物

Mix 的最大扫描波长为 332.2 nm, 而 70 °C 反应 6 h 的 BDC 移至 325.2 nm。这说明 Trp 残基周围微环境的极性减小, 疏水性增加。这可能是因为加热时, 蛋白质分子变性展开隐藏的非极性基团暴露使得蛋白质分子间的疏水相互作用增强。

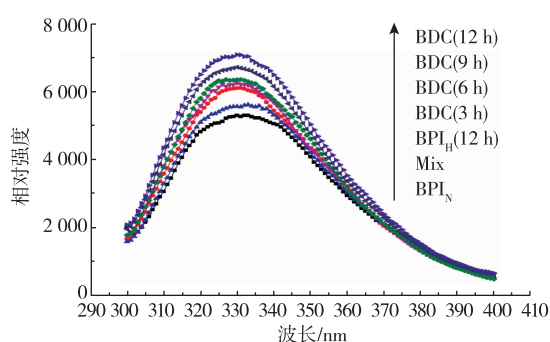


图 5 BPIN、BPIH (70 °C, 12 h)、Mix 和 BDC (70 °C, 3~12 h) 的内源荧光图

Fig. 5 Fluorescence spectra of native ( $BPI_N$ ), heated ( $BPI_H$ , 70 °C for 12 h) buckwheat protein, mixture of BPI and dextran (Mix) and BPI–dextran conjugates (BDC, 70 °C for 3–12 h)

## 参考文献:

- [1] O'Regan J, Mulvihill D M. Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate–maltodextrin conjugates[J]. **Food Chemistry**, 2009, 115(4): 1257–1267.
- [2] Einhorn–Stoll U, Ulbrich M, Sever S, et al. Formation of milk protein–pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating[J]. **Food Hydrocolloids**, 2005, 19: 329–340.
- [3] Zhu D, Damodaran S, Lucey J A. Formation of Whey Protein Isolate (WPI)–Dextran Conjugates in Aqueous Solutions[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2008, 56: 7113–7118.
- [4] ZHANG Xi, QI Junru, LI Kangkang, et al. Characterization of soy  $\beta$ -conglycinin–dextran conjugate prepared by Maillard reaction in crowded liquid system[J]. **Food Research International**, 2012, 49: 648–654.
- [5] 刘冬生, 徐若英, 汪青青. 荞麦中蛋白质含量及其氨基酸组成的分析研究[J]. 作物品种资源, 1997(2): 26–28.  
LIU Dongsheng, XU Ruoying, WANG Qingqing. The analysis and researchment on the protein contents and amino acids consistent of buckwheats[J]. **China Seeds**, 1997(2): 26–28. (in Chinese)
- [6] 郭晓娜, 姚惠源, 陈正行. 苦荞粉蛋白质的分离制备及理化性质[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(3): 88–92.  
GUO Xiaona, YAO Huiyuan, CHEN Zhengxing. Fractionation and physico-chemical properties of tartary buckwheat protein[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2006, 25(3): 88–92. (in Chinese)
- [7] LI Yue, ZHONG Fang, JI Wei, et al. Functional properties of Maillard reaction products of rice protein hydrolysates with mono-, oligo- and polysaccharides[J]. **Food Hydrocolloids**, 2013, 30: 53–60.
- [8] 麻建国, 王璋, 许时婴, 等. 蛋白质–多糖共价复合物[J]. 食品科技, 2000(5): 12–15.  
MA Jianguo, WANG Zhang, XU Shiyong, et al. Covalent conjugate of proteins and polysaccharides [J]. **Food Science and Technology**, 2000(5): 12–15. (in Chinese)
- [9] Seo S, Karboune S, L'Hocine L, et al. Characterization of glycosylated lysozyme with galactose, galactooligosaccharides and galactan: Effect of glycation on structural and functional properties of conjugates [J]. **LWT–Food Science and Technology**, 2013, 53(1): 44–53.

## 3 结语

在大分子拥挤条件下, 采用湿法制备了荞麦蛋白–葡聚糖共价复合物, 发现 70 °C 和 60 °C 反应后蛋白质的溶解度均有所下降, 但是乳化活性及乳化稳定性均得到提高。70 °C 比 60 °C 反应更加剧烈, 提高了接枝效率, 同时也加快了褐变速度。实验结果表明, 荞麦蛋白与葡聚糖在 70 °C 反应 6 h 后, 其乳化性得到较为明显的改善, 并且仅伴随轻微的褐变。

SDS–PAGE 电泳 (考马斯亮蓝染色和糖蛋白染色) 验证了共价复合物的生成。DSC 分析结果表明共价复合物的变性温度从原始蛋白的 101.34 °C 提高到 105.45 °C, 说明其热稳定性得到了提高。荧光光谱表明共价复合物的蛋白质极性降低, 疏水性得到增强。