

文章编号:1673-1689(2005)05-0016-05

微波辐射大豆分离蛋白-糖接枝反应条件的研究

管军军¹, 裘爱泳¹, 刘晓亚², 李剑³, 马云辉¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036; 2. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214036; 3. 苏州派克顿(美资)科技有限公司, 江苏 苏州 215000)

摘要:大豆分离蛋白(SPI)通过微波辐射与糖进行接枝反应,研究了微波辐射功率、pH、缓冲液的类型与浓度、无机盐、及底物的配比与浓度对该反应程度的影响.结果表明:微波辐射功率、pH及磷酸盐有助于该反应的进行,反应物的配比与浓度对反应的影响是双向的,而无机盐的加入对反应具有抑制作用.

关键词:微波辐射;大豆分离蛋白;糖;接枝反应

中图分类号:S 565.1

文献标识码:A

Effects of Conditions on Soy Protein Isolate-Saccharide Graft Reaction by Microwave Radiation

GUAN Jun-jun¹, QIU Ai-yong¹, LIU Xiao-ya², LI Jian³, MA Yun-hui¹

(1. School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, 214036 Wuxi, China; 2. School of Chemical and Material Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China; 3. Suzhou Pac-Dent (US) Technology Co., LTD., Suzhou 215000, China)

Abstract: Soy protein isolate(SPI) was grafted with saccharide by microwave radiation. In this study, the effects of the following factors on the graft reaction were studied, they are: the microwave radiation power, pH, buffers and their concentrations, inorganic salts, ratio and concentration of the reactants. The results showed that the microwave radiation power, pH, and the phosphate could buffer improving the reactive degree, the ratio and concentration of reactants having the bidirectional effects on the reaction, but adding the inorganic salts to the reactants would inhibit the graft reaction.

Key words: microwave radiation; SPI; saccharide; graft reaction

蛋白质-糖接枝反应^[1~5]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——美拉德反应(Maillard Reaction),该反应中蛋白质与糖以共价结合,不需要催化剂,仅加热就可使该反应自发地进行,经接枝改

性的蛋白质功能性(如水溶性,乳化性,热稳定性等)有很大的改善,是目前蛋白质改性中较为理想的方法.

对于美拉德反应,美国化学家 Hodge^[6]于1952年首先对该反应机理作了系统的论述,认为美拉德

收稿日期:2004-10-29; 修回日期:2004-11-28.

基金项目:国家自然科学基金项目(20374025)资助课题.

作者简介:管军军(1975-),男,湖北蕲春人,粮食、油脂与植物蛋白工程博士研究生.

反应可以分成3个反应阶段:初级阶段(羰基加成反应),高级阶段(成环、脱水、重排、异构化等)及最终反应阶段(生成类黑素).影响美拉德反应的因素有pH值、温度、反应时间、离子强度等.

从目前所报道的文献来看,蛋白质与还原糖通过美拉德反应进行接枝改性的方法主要有干法^[2,4]与湿法^[7~9]两种.但是这两种方法的反应时间较长,特别是干法反应,少则数小时,多则几天甚至几周,不利于应用.因此作者采用微波辐射方式加速蛋白质-糖枝反应,并从微波辐射时间、微波功率、pH值、缓冲液的选择、无机盐的影响、底物的配比及浓度几个方面加以研究.

1 材料与方法

1.1 主要试剂、材料

大豆分离蛋白(SPI):由日本不二公司(粗蛋白92.0%,水分5.8%); α -乳糖,葡聚糖,赖氨酸,邻苯二甲醛(OPA),十二烷基磺酸钠(SDS), β -巯基乙醇,硼砂,甲醇,磷酸氢二钠,磷酸二氢钾等均为分析纯.

1.2 主要仪器

松下 NN-S563JF 变频微波炉,3119-0050 型离心套管(Nalge, USA),弗鲁克高剪切分散乳化机,尤尼柯 UV-2100 分光光度计,磁力加热搅拌器,LD4-2 离心机.

1.3 实验方法

1.3.1 SPI溶液的制备 称取一定量的SPI,加入磷酸缓冲液中,均质1min,磁力加热搅拌2h(30℃),离心30min(2000g)后所得上清液经滤纸过滤后于4℃冰箱保存备用,凯氏定氮法测定蛋白液的质量浓度.

1.3.2 SPI-糖微波辐射接枝反应 将制备好的SPI液用相同的磷酸缓冲液稀释到1.0mg/mL,加入糖,混合液装入离心套管中,采用间歇式微波辐射加热,功率200~1000W,即微波辐射1min至最终温度(95±2)℃,冰浴1min,重复上述操作;反应结束后于冰箱保存备用.

1.3.3 自由氨基测定 采用OPA法对蛋白中自由氨基进行测定,参照文献^[7,8]方法的基础上进行改进:准确称取40mg的OPA溶解于1mL的甲醇中,分别加入质量分数20%的SDS 2.5mL,0.1mol/L的硼砂25mL及100 μ L β -巯基乙醇,最后用蒸馏水定容到50mL.测定时,各取空白液、OPA试剂4mL于试管中,分别注入200 μ L样品液,混匀后于35℃放置2min,在340nm下测其吸光值

A_{340} ,二者之差 ΔA_{340} 为自由氨基的净吸光值.以赖氨酸作出标准曲线,根据 ΔA_{340} 计算样品中自由氨基的含量.

1.3.4 褐变程度(类黑素)测定 取0.2mL样品液加入4mL稀释液(含质量分数10% SDS及0.05mol/L硼砂),在420nm下测定吸光值 A_{420} ,根据Lambert-Beer定律, $c=A_{420}/\epsilon \times N$ (稀释倍数,这里取21),可计算出类黑素的浓度(根据文献^[8], ϵ 平均值取为500mol⁻¹·L·cm⁻¹).

1.3.5 接枝度的计算

$$DG(\%) = (c_0 - c_t) / c_0 \times 100\%$$

c_0 ,未反应时蛋白质中自由氨基浓度; c_t ,反应 t 时刻蛋白质中自由氨基的浓度.

1.4 实验设计与统计分析

对于SPI与糖在某一条件上进行研究时,反应的其它条件均相同.所有实验均进行平行实验,而且重复3次;样品的测定均重复3~4次,结果取平均值;并对结果进行 t 分布检验($p < 0.05$).

2 结果与讨论

2.1 微波辐射时间的确定

SPI与糖通过微波辐射在密闭的条件下进行接枝反应,因此每次微波辐射加热时间的长短对于反应的进行及其安全性至关重要.辐射时间太短,反应的温度上不去,反应缓慢;辐射时间过长,温度上升过高,反应不便控制.实际中反应的最终温度定为95℃左右,以研究每次微波辐射的时间.图1显示SPI-糖反应混合液的温度随微波辐射时间的加长而升高,但是不同的微波辐射功率对温度的影响是很大的,加热到95℃,用1000W的火力大约需要1min,而500W要3min.因此,每次微波辐射的时间随不同的微波辐射功率而定,例如,1000W定为1min,而500W时,则为3min.

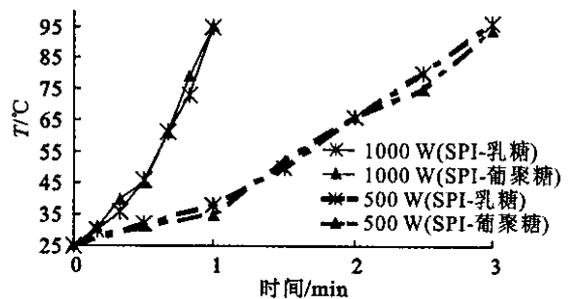


图1 微波辐射时间对SPI-糖反应混合液温度的影响

Fig. 1 Effect of the time of microwave radiation on the mixture of SPI and saccharides

微波加热其实就是介电加热;对于介电加热,有两种主要理论^[10]:一种理论是偶极极化理论,另

一种理论是传导理论。极性溶剂或离子可进行微波加热,一般认为溶剂的极性越强(比如介电常数很高),越易于吸收微波辐射能,所获得的温度越高。作者在研究中发现,除了缓冲液外,SPI与糖都是极性物质,且SPI在带有电荷,因此可用于微波加热。当底物的浓度与体积相同时,达到同一温度所需时间与微波辐射的功率有关:功率大,辐射时间短,反之则长。

2.2 微波辐射功率对反应的影响

由于微波的辐射功率对反应的温度影响很大,所以直接影响着反应的速度。对于每一种糖,在相同的微波辐射总时间内(对于乳糖定为15 min,而对于葡聚糖则为45 min),除功率不同外,其余条件相同的情况下对SPI-糖接枝反应程度进行研究。从图2可看出,在SPI与所研究的两种糖的接枝反应中,反应混合物的褐变程度与DG均随着微波辐射功率的增加而提高,当从200 W增加到1000 W,对于SPI-乳糖接枝反应,DG提高了近11倍;而对于SPI-葡聚糖接枝反应,DG则提高了近9倍,可见影响很大。但在反应混合物的颜色(褐变程度)来看,微波辐射功率低时,反应物的褐变程度较小。

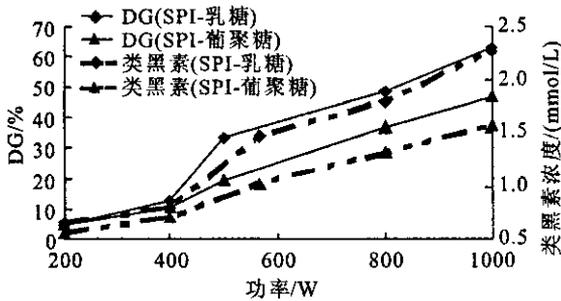


图2 微波辐射功率对DG及褐变程度的影响

Fig. 2 Effect of the power of microwave radiation on the DG and browning degree at pH 7.2

反应速度可用 Arrhenius 方程表示: $K = Ae^{\Delta G/RT}$ 。从该方程可以看出,有两个基本途径可提高化学反应的速度。第一,A,描述分子的运动性,与在反应界面的分子振动频率有关。第二, ΔG ,自由活化能。有报道指出,微波可提高分子的振动A,改变了自由活化能 ΔG ,从而加速了反应^[10]。因此,微波的辐射功率高,相同的时间内,SPI-糖接枝反应的程度大。

2.3 缓冲体系对反应的影响

蛋白质-糖的湿法接枝反应通常在一定的缓冲体系中进行,为此研究了缓冲体系对微波辐射SPI-糖接枝反应的影响。从表1可以看出,在其它条件相同的情况下,不同的缓冲体系对于SPI-糖的枝反

应的影响很大,在磷酸盐缓冲液中,SPI-糖接枝反应程度(DG与类黑素)较高。对磷酸盐缓冲体系的研究发现(图3),随着磷酸盐浓度的提高,SPI-糖接枝反应的程度提高;当浓度不大于0.2 mol/L时,DG及褐变程度增长迅速,超过0.2 mol/L时,则变化平缓。

表1 缓冲体系对微波辐射SPI-糖接枝反应的影响

Tab. 1 Effect of buffers on SPI-saccharide graft reaction

缓冲体系 (1/15 mol/L, pH 7.2)	SPI-乳糖		SPI-葡聚糖	
	DG/ %	类黑素浓度/ (mmol/L)	DG/ %	类黑素浓度/ (mmol/L)
磷酸盐	36	1.2	25	0.8
柠檬酸盐	12	0.6	8	0.4

磷酸盐加速微波辐射SPI-糖接枝反应同一些报道磷酸盐加速美拉德反应的研究基本相同。关于磷酸盐催化美拉德反应的动力学研究指出^[11]脱氢磷酸盐离子被假定为对Amadori重排有催化作用。然而,确切的磷酸盐加速反应机制并不清楚。比如,Bell最近提出^[11],磷酸盐作为双功能(酸/碱)催化剂加速氨基酸的糖基化反应。Rizzi认为^[12]磷酸盐提高了中间Amadori化合物质子被夺取的能力。

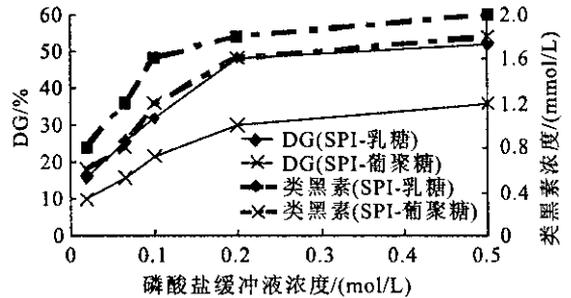


图3 磷酸盐缓冲液浓度对DG及褐变程度的影响

Fig. 3 Effect of the phosphate buffer on the DG and browning degree at pH 7.2

2.4 SPI与糖的不同配比及浓度对反应的影响

由于SPI为不同氨基酸组成的高聚物,不同于一般的有机物,也不同于人工合成的聚合高分子,所以SPI-糖的接枝反应有一定的特殊性。当糖的用量一定时,DG随着SPI与糖的质量比呈现先增后减的趋势,而褐变程度则与之相反(图4);对于SPI-乳糖的接枝反应,DG最大时SPI与乳糖的质量比为0.2左右,而对于SPI-葡聚糖则为0.1左右,而且此条件下反应混合物的颜色较浅。当SPI与糖的配比一定时,DG随着SPI浓度的增加也呈现出先增后降的趋势,但是褐变程度则呈加深的态势(图5);当SPI浓度在1.5 mg/mL左右时,DG最佳;而SPI浓度在4 mg/mL左右时,DG接近于0。

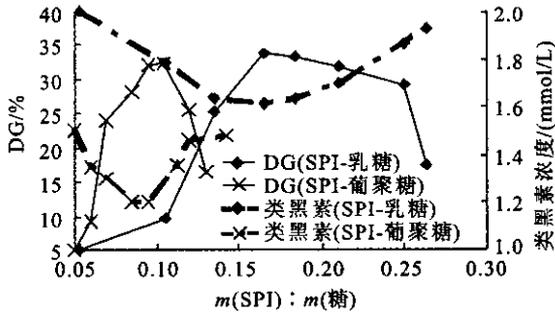


图 4 SPI 与糖的对比对 DG 及褐变程度的影响 (pH 7.2,乳糖 5 mg/mL,葡聚糖 10 mg/mL)

Fig. 4 Effect of the ratio of SPI to saccharides on the DG and browning degree

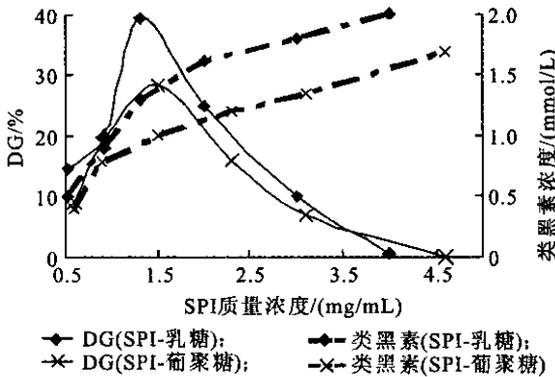


图 5 SPI 质量浓度对 DG 及褐变程度的影响 (pH 7.2, $m_{SPI} : m_{乳糖} = 0.2, m_{SPI} : m_{葡聚糖} = 0.1$)

Fig. 5 Effect of the concentration of SPI on the DG and the browning degree

2.6 pH 对反应的影响

用不同 pH 的磷酸盐缓冲液调节反应体系的 pH 值,以研究 pH 对反应的影响,如图 6 所示:总的来说,碱性条件下有利于微波辐射 SPI-糖接枝反应的进行.在 pH 7.8, SPI 与所研究的两种糖的接枝物的 DG 均较 pH 6.2 时提高了 2 倍左右;而反应褐变程度的变化则不同:SPI-乳糖接枝反应在 pH 7.8 时褐变程度较大,高出 pH 6.2 近 6 倍多,而 SPI-葡聚糖仅高出 2 倍.

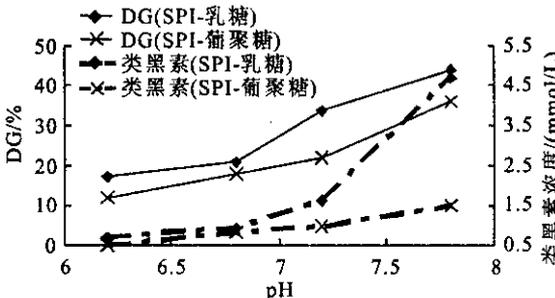


图 6 pH 对 DG 及褐变程度的影响

Fig. 6 Effect of pH on the DG and browning degree

2.7 盐离子对反应的影响

据报道盐离子对美拉德反应的颜色产生影响.

所以反应时添加一定量不同种类的无机盐改变反应物的颜色,也不失为一种较好的途径.选取 NaCl 与 Na_2SO_4 在不同浓度的条件下,研究无机盐的加入对微波辐射 SPI-糖接枝反应的影响.从图 7,8 可以看出,无机盐的加入有抑制微波 SPI-糖接枝反应的作用.盐的浓度越大,其抑制作用越强,结果是 DG 减小,褐变程度降低;无机盐对于 SPI-乳糖接枝反应的抑制作用要强于 SPI-葡聚糖接枝反应.当无机盐的浓度小于 0.1 mol/L 时,其抑制作用较大,浓度再增加无机盐的抑制作用变得平缓.不难看出, Na_2SO_4 抑制微波辐射 SPI-糖接枝反应的作用要强于 NaCl.

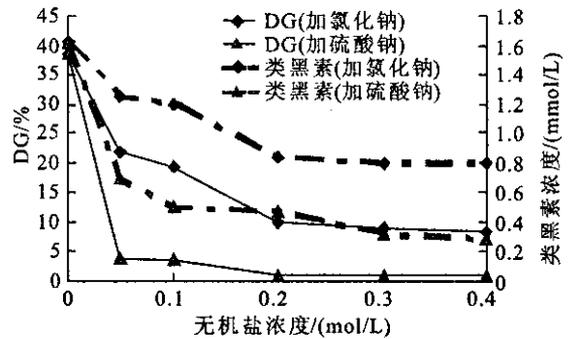


图 7 无机盐浓度对微波辐射 SPI-乳糖接枝反应的影响 (pH 7.2)

Fig. 7 Effect of the inorganic salts on the SPI-lactose graft reaction at pH 7.2

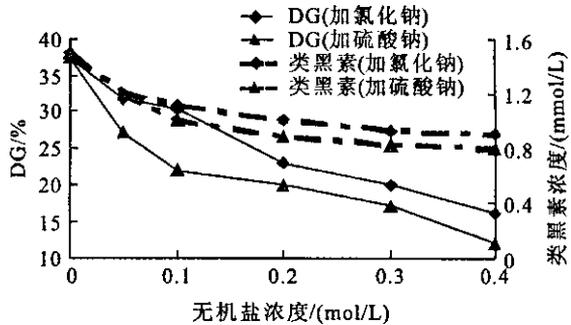


图 8 无机盐浓度对微波辐射 SPI-葡聚糖接枝反应的影响 (pH 7.2)

Fig. 8 Effect of the inorganic salts on the SPI-dextran graft reaction at pH 7.2

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微波辐射 SPI-糖接枝反应产生影响,如浓度、pH、离子浓度等.实验的结果表明微波辐射 SPI-糖接枝反应程度随着 pH、加入无机盐的增加而加深,随着 SPI 浓度、底物配比的增加而出现先增后减的趋势.而这些条件都影响着 SPI 在溶液中的结构及分子之间的聚集状态,从而影响反应的活性点氨基的暴露程度,以及与羰基碰撞机率,进而影响接枝反应程度.由于葡聚糖是多糖,分

子较大,空间位阻使得其羰基与 SPI 氨基的碰撞机率大大减小,因此微波辐射 SPI-糖接枝反应速度较 SPI-乳糖慢。

3 结 论

微波辐射 SPI-糖接枝反应是一类很复杂的反应,但是由于蛋白质与糖自身组成结构不同,则反应速度与接枝率有明显的差别。实验表明,通过外

界的条件适当调节是可以控制其反应的程度及预期的方向。通过对各因素进行研究发现,微波辐射功率、pH 及磷酸盐有助于该反应的进行,SPI 与糖的配比与浓度对反应的影响是双向的,而加入无机盐对反应具有抑制作用。但是,在微波辐射 SPI-接枝反应中,这些因素之间是否存在着交互作用以及谁占主导作用的问题还需进一步综合研究。

参考文献:

- [1] Diftis N, Diosseoglou V. Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugation with carboxymethyl cellulose[J]. **Food Chemistry**, 2003,81:1-6.
- [2] Kato A, Sasaki Y, Furuta R. Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures[J]. **Agric Biol Chem**, 1990,54(1):107-112.
- [3] Nakamura S, Kobayashi K, Kato A. Role of charge of lysozyme in the excellent emulsifying properties of maillard-type lysozyme-polysaccharide conjugate[J]. **J Agric Food Chem**, 1994,42:2688-2691.
- [4] Kato A, Shimokawa K, Kobayashi K. Improvement of the functional properties of insoluble gluten by pronase digestion followed by dextran conjugate[J]. **J Agric Food Chem**, 1991,39:1053-1056.
- [5] Nakamura S, Kato A, Kobayashi K. Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides[J]. **J Agric Food Chem**, 1992,40:2033-2037.
- [6] Martins S, Jongen W, Van Boekel. A Review of maillard reaction in food and implications to kinetic modelling[J]. **Trends in Food Science & Technology**, 2001,(11):364-373.
- [7] 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):145-152.
- [8] Brands C, Van Boekel. Kinetic modelling of reactions in heated disaccharide-casein systems[J]. **Food Chemistry**, 2003, 83:13-26.
- [9] Jing H, Kitts D D. Chemical and biochemical properties of casein-sugar maillard reaction products[J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2002,40:1007-1015.
- [10] Lidstrom P, Tierney J, Wathey B, *et al.* Microwave assisted organic synthesis-a review[J]. **Tetrahedron**, 2001,57:9225-9283.
- [11] Bell L N. Maillard reaction as influenced by buffer type and concentration[J]. **Food Chemistry**, 1997,59(1):143-147.
- [12] Rizzi G P. Role of phosphate and carboxylate ions in maillard browning[J]. **J Agric Food Chem**, 2004,52:953-957.

(责任编辑:朱明)