

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.10.034

### 3 种还原糖对芸豆清蛋白糖基化改性产物 乳化性及结构的影响

Effect of three reducing sugars on emulsifying property and  
structure of maillard products of kidney bean protein

林 巍<sup>1,2</sup> 刘晓兰<sup>1,2</sup> 任 健<sup>1,2</sup> 高 健<sup>1,2</sup> 杜 宏<sup>1,2</sup>

LIN Wei<sup>1,2</sup> LIU Xiao-lan<sup>1,2</sup> REN Jian<sup>1,2</sup> GAO Jian<sup>1,2</sup> DU Hong<sup>1,2</sup>

(1. 齐齐哈尔大学食品与生物工程学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

(1. College of Food and Bioengineering, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China;

2. Key Laboratory of Processing Agricultural Products, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

**摘要:**将葡萄糖、乳糖、果糖与紫花芸豆清蛋白(kidney bean protein, KPI)进行美拉德反应,并分析美拉德反应产物的乳化性及结构变化。结果表明,可通过与葡萄糖、果糖和乳糖发生美拉德反应来改善芸豆蛋白的乳化活性及乳化稳定性,其中果糖改善效果最好,芸豆蛋白的乳化性由原来的 37.52 m<sup>2</sup>/g 增加为 98.69 m<sup>2</sup>/g,乳化稳定性由 16.88 min 增加到 28.68 min;芸豆蛋白与还原糖发生美拉德反应后,蛋白空间结构发生变化,表现为表面疏水性增强,表面巯基和总游离巯基含量降低,紫外吸收增加,内部荧光强度降低且发生红移,更利于蛋白吸附到油水界面,增强其乳化性。

**关键词:**芸豆蛋白;还原糖;美拉德反应;乳化性;乳化稳定性;结构

**Abstract:** The purpose of this study was to investigate the effect of sugars on the structural and emulsifying property of kidney bean protein modified by Maillard reaction. The results showed that the emulsifying activity and stability of kidney bean protein could be improved by Maillard reaction with glucose, fructose and lactose, and fructose was the best one. The emulsifying ability increased from 37.52 m<sup>2</sup>/g to 98.69 m<sup>2</sup>/g, and the emulsifying stability also increased from 16.88 min to 28.68 min; After Maillard reaction, the spatial structure of protein changed, which showed

that the surface hydrophobicity increased, the content of surface sulfhydryl group and total free sulfhydryl group decreased. Moreover, the ultraviolet absorption increased, and the fluorescence intensity decreased with the red shift. These changes were more conducive to the protein adsorbing to the oil-water interface, thus enhanced the emulsification.

**Keywords:** kidney bean protein; reducing sugars; maillard; emulsifying property; emulsifying stability; structure

芸豆是黑龙江种植面积最大的豆类作物之一,营养丰富,其中清蛋白含量较高,并且所含氨基酸种类丰富,配比合理。但是由于芸豆蛋白的理化性质限制了其应用,目前芸豆蛋白在食品行业的利用率还比较低,深加工产品综合利用技术水平低且附加值不高。近年来,众多学者致力于芸豆蛋白功能特性的改善研究,如:刘高梅等<sup>[1]</sup>研究表明超声能够改善芸豆蛋白的部分理化性质和功能性质;左锋等<sup>[2]</sup>采用乙酰化处理对芸豆分离蛋白进行了改性,发现乙酰化改性后芸豆分离蛋白的表面巯基含量和表面疏水性显著提高,并且增强了凝胶形成过程中蛋白质分子相互作用;何庆燕等<sup>[3]</sup>研究了鸡肉蛋白与芸豆蛋白交联对蛋白质凝胶性、乳化性等功能性质的影响,发现 TG 酶促交联能促进鸡肉蛋白和芸豆蛋白交联,并有利于改善混合蛋白食品的功能特性。蛋白质的美拉德反应是蛋白自由氨基与还原糖羰基之间发生的非酶褐变反应,广泛存在于食品加工和贮藏过程中,此反应能够有效改善蛋白的功能性质<sup>[4-5]</sup>。但是目前关于芸豆蛋白糖基化改性的相关研究甚少,仅有冯玉超等<sup>[6]</sup>使用氨基葡萄糖对芸豆蛋白进行了糖基化改性,发现糖基化后芸豆蛋白的溶解性、乳化性、起泡性皆有所提高,表明利用

**基金项目:**国家重点研发计划重点专项项目子课题(编号:2017YFD0400200);黑龙江省教育厅科研创新团队项目(编号:135309113);齐齐哈尔大学生创新创业训练计划项目(编号:201910232145)

**作者简介:**林巍(1982—),女,齐齐哈尔大学讲师,博士。

E-mail:0qiu@163.com

**收稿日期:**2019-05-06

糖基化改善芸豆蛋白功能性具有可行性。不同的还原糖美拉德反应效果有所不同,因此研究并筛选美拉德反应最佳的还原糖,可最大程度提高芸豆蛋白的功能性。试验拟探讨3种还原糖与芸豆清蛋白美拉德反应产物的乳化性与结构之间的构效关系,以期改善芸豆蛋白的功能特性,为开发稳定的芸豆蛋白高附加值产品提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与设备

#### 1.1.1 材料

紫花芸豆:蛋白含量23.77%,市售;

5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS):分析纯,美国Sigma公司;

葡萄糖、果糖、乳糖:分析纯,天津凯通化学试剂有限公司;

其他试剂均为分析纯。

#### 1.1.2 仪器设备

多功能酶标仪:EnSpire型,美国珀金埃尔默公司;

电子分析天平:FA1004型,上海巴拓仪器有限公司;

高速离心机:CF15RXII型,日本日立公司;

真空冷冻干燥机:Alpha-4/1sc型,德国Martin Christ公司;

水浴恒温振荡器:SHZ-88型,常州润华电器有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 紫花芸豆清蛋白(KPI)的提取 根据文献[7]对紫花芸豆中清蛋白进行提取,提取物 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥48 h后, $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 芸豆蛋白美拉德反应产物的制备 将提取的芸豆蛋白配制成30 mg/mL的溶液3份,分别加入葡萄糖、果糖和乳糖,使糖与蛋白质量比为1:1,搅拌均匀后,调pH值至8.0后, $90^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应180 min,反应后迅速冷却,得到芸豆蛋白(KPI)—各还原糖美拉德反应产物(KPI与乳糖产物简称为KPI+L、KPI与葡萄糖产物简称为KPI+G、KPI与果糖产物简称为KPI+F),各产物 $-80^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥48 h后, $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 乳化性测定 根据文献[8]。

1.2.4 表面疏水性 根据文献[9],用10 mmol/L磷酸盐缓冲溶液配制浓度为0.025,0.100,0.250,0.500,1.000 mg/mL的芸豆蛋白溶液,设定激发波长374 nm,发射波长467 nm,测定芸豆蛋白的荧光强度,以荧光强度对芸豆蛋白浓度作图,曲线的初始斜率即样品的表面疏水值 $H_0$ 。

1.2.5 巯基含量测定 用pH 8.0的Tris-甘氨酸缓冲液将芸豆蛋白稀释为2 mg/mL的蛋白样品,根据文献[9]

测定芸豆蛋白表面巯基含量和游离巯基含量。

1.2.6 紫外吸收光谱分析 根据文献[10],用10 mmol/L磷酸盐缓冲溶液作为空白对照,并用其将样品稀释至蛋白质量浓度为1 mg/mL,紫外扫描光谱范围230~400 nm。

1.2.7 内源荧光光谱分析 根据文献[10],用10 mmol/L磷酸盐缓冲溶液将样品稀释至蛋白质量浓度为1 mg/mL。在激发波长280 nm条件下,发射光谱范围300~480 nm内进行扫描,激发和发射狭缝宽度均为5 nm。

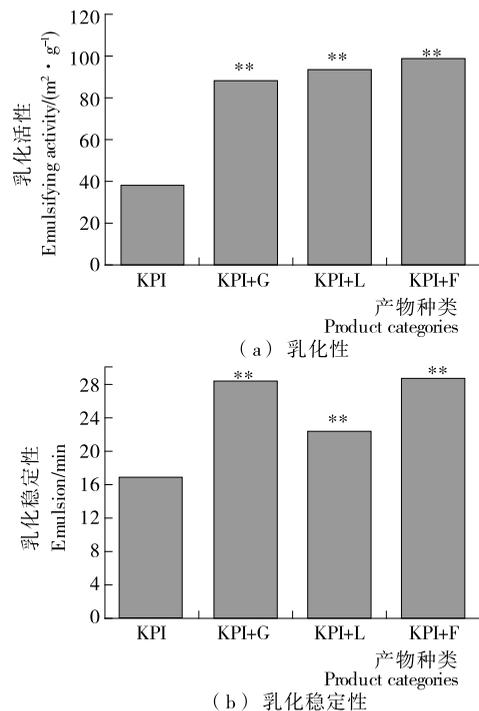
### 1.3 数据处理

应用SPSS 19.0软件,对数据进行单因素方差分析,差异显著者再进行LSD检验。各组数据结果以(平均数±标准差)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 对芸豆清蛋白美拉德产物乳化性及乳化稳定性的影响

如图1所示,3种还原糖与KPI的美拉德反应产物的EAI及ESI均极显著高于KPI的( $P<0.01$ );其中KPI+F的乳化性及乳化稳定性最理想,乳化性由原来的 $37.52\text{ m}^2/\text{g}$ 增加为 $98.69\text{ m}^2/\text{g}$ ,乳化稳定性由16.88 min



\*. 与KPI组相比差异显著( $P<0.05$ ) \*\* . 与KPI组相比差异极显著( $P<0.01$ )

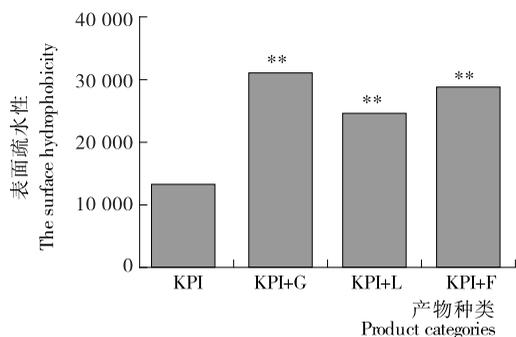
图1 糖对芸豆清蛋白美拉德产物乳化性和乳化稳定性的影响

Figure 1 Effects of sugars on ESI of maillard products of kidney bean protein

增加到 28.68 min。美拉德反应过程中糖的引入,使 KPI 空间结构发生改变,处于蛋白质内部的疏水性基团暴露出来,在油—水界面发生变性,可使蛋白具有双亲表面活性剂的功能,增强了对蛋白表面的保护,阻止油滴的聚集,使乳化活性增强<sup>[11]</sup>。

### 2.2 对芸豆清蛋白美拉德产物表面疏水性的影响

表面疏水性( $H_0$ )用来表征蛋白质在极性环境中表面疏水性氨基酸残基的数量,可反映蛋白质构象变化<sup>[12]</sup>。由图 2 可知,与芸豆蛋白的表面疏水性相比,3 种还原糖与芸豆蛋白美拉德反应产物的表面疏水性均显著增强( $P<0.01$ )。这可能是 KPI 与还原糖发生接枝反应,导致 KPI 空间结构发生改变,使蛋白质分子内氢键、静电、疏水相互作用发生变化,暴露了蛋白质分子内部的疏水性基团,掩盖周围的亲水性基团,增加了蛋白的表面疏水性,蛋白质的功能性质也随之改变。



\*. 与 KPI 组相比差异显著( $P<0.05$ ) \*\* . 与 KPI 组相比差异极显著( $P<0.01$ )

图 2 芸豆清蛋白及其美拉德产物的表面疏水性

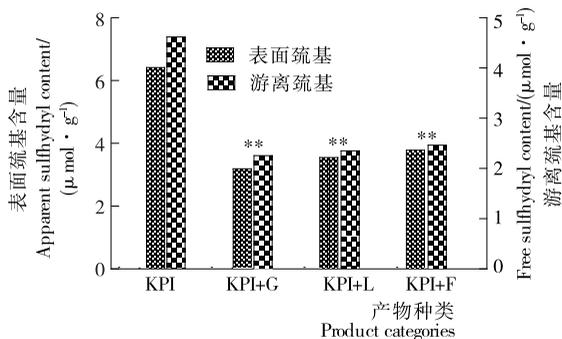
Figure 2 The surface hydrophobicity of kidney bean protein and its maillard products

### 2.3 对芸豆清蛋白美拉德产物巯基含量的影响

巯基是蛋白质中重要的官能团,参与弱次级键的形成,维持三级结构稳定,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,表面巯基含量变化还可反映出蛋白高级结构的变化<sup>[9]</sup>。由图 3 可知,还原糖的接入,使 KPI 表面巯基和总游离巯基含量均显著降低( $P<0.01$ ),可能是美拉德反应使蛋白质形成高分子多聚体,在这个过程中表面巯基可转化为二硫键,导致芸豆蛋白美拉德反应产物表面巯基含量的下降;而总游离巯基含量的显著降低也进一步证明了芸豆蛋白在与还原糖发生美拉德反应后,分子结构中的游离巯基发生反应形成二硫键,参与蛋白空间结构的改变,使蛋白的功能性质改变。

### 2.4 对芸豆清蛋白美拉德产物紫外吸收光谱的影响

蛋白质产生紫外吸收光谱主要是因为色氨酸和酪氨酸在 280 nm 波长附近有一个吸收峰。由图 4 可知,芸豆



\*. 与 KPI 组相比差异显著( $P<0.05$ ) \*\* . 与 KPI 组相比差异极显著( $P<0.01$ )

图 3 芸豆清蛋白及其美拉德产物的巯基含量

Figure 3 The sulfhydryl content of kidney bean protein and its maillard products

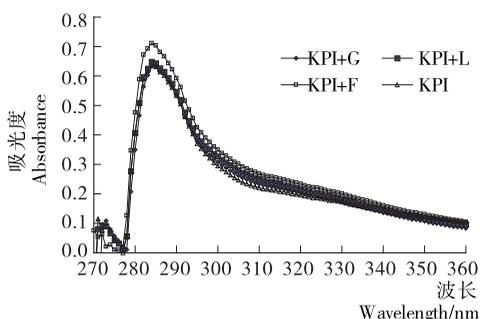


图 4 芸豆清蛋白及其美拉德产物的紫外吸收光谱

Figure 4 Changes of the UV-Vis spectra of kidney bean protein and its maillard products

清蛋白及其与 3 种还原糖的美拉德产物在 284 nm 处有最大吸收峰,其中 KPI、KPI+L 及 KPI+G 紫外吸收波谱基本一致,未见明显变化;仅芸豆蛋白与果糖的美拉德反应产物 KPI+F 的紫外吸光度明显增加,可能是 KPI+F 在溶液中的构象发生改变,蛋白分子外部生色基团暴露出来,引起紫外吸光度升高。此结果与之前测得的蛋白乳化性及其稳定性的变化相一致,表明不同还原糖对美拉德反应的影响不同,其中芸豆—果糖美拉德产物的结构变化最大,功能性质改变最明显。

### 2.5 对芸豆清蛋白美拉德产物内源荧光光谱的影响

蛋白质内源荧光光谱主要是由其分子中的色氨酸残基侧链发射产生的。色氨酸对局部环境的变化具有高灵敏性,通过蛋白分子中侧链的色氨酸残基变化可以反映美拉德反应过程中蛋白三级结构的变化<sup>[13]</sup>。由图 5 可知,3 种还原糖的美拉德产物的内部荧光强度均低于 KPI,降低程度为 KPI+F>KPI+L>KPI+G,表明 KPI 与 3 种还原糖发生美拉德反应,改变了蛋白质的三级结构,降低了 KPI 的荧光强度。最大吸收波长( $\lambda_{max}$ )与色氨酸残基所处微环境有关, $\lambda_{max}>330$  nm 表明色氨酸残基暴露于蛋白质分子外部的极性环境中, $\lambda_{max}<330$  nm 表

示色氨酸残基包埋于蛋白质分子内部的非极性环境中,  $\lambda_{\max}$  越大色氨酸残基的微环境极性越强<sup>[14]</sup>。由图 5 还可知, KPI+L 的  $\lambda_{\max}$  由 345 nm(KPI 的  $\lambda_{\max}$ ) 变为 350 nm, 而 KPI+F 和 KPI+G 的  $\lambda_{\max}$  变为 355 nm, 即发生红移, 说明 KPI 因与糖发生共价交联, 而使色氨酸残基暴露于更加亲水的环境中。3 种还原糖中, 果糖反应物的荧光强度最低, 发射波长最长, 此结果与之前测得的蛋白乳化性增强及紫外吸收光谱的改变等结果相一致, 进一步证明了果糖的反应活性最大, 美拉德反应最强烈, 用于芸豆蛋白美拉德糖基化改性的效果最好。

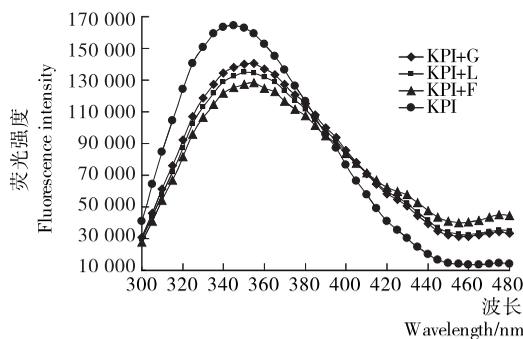


图 5 芸豆清蛋白及其美拉德产物的内源荧光光谱

Figure 5 Changes of intrinsic fluorescence spectra of kidney bean protein and its maillard products

### 3 结论

试验采用美拉德反应对芸豆清蛋白进行改性, 制备了芸豆蛋白和葡萄糖、果糖及乳糖美拉德反应产物, 通过对蛋白表面疏水性、巯基含量、内部荧光光谱和紫外吸收光谱分析得出, 芸豆蛋白与还原糖发生美拉德反应后, 空间结构发生变化, 蛋白分子内部生色基团、疏水性基团暴露, 色氨酸微环境改变, 导致紫外吸收增加, 内部荧光强度降低且发生红移, 使芸豆蛋白表面疏水性增强, 更有利于蛋白吸附到油水界面, 使乳化性增强。葡萄糖、果糖和乳糖与芸豆蛋白发生美拉德反应程度略有不同, 从改善芸豆蛋白的乳化活性及乳化稳定性角度看, 其中果糖改善效果最好。后续可对芸豆蛋白美拉德反应产物在具体食品模型中的应用进行研究, 以利于芸豆资源的合理开发和利用。

#### 参考文献

- [1] 刘高梅, 任海伟. 不同功率超声波对芸豆蛋白理化和功能性质的影响[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(12): 17-21.
- [2] 左锋, 王振忠, 钱丽丽, 等. 乙酰化改性对芸豆分离蛋白凝胶特性的影响[J]. 中国农业大学学报, 2018, 23(8): 95-100.
- [3] 何庆燕, 洪永祥, 周红, 等. 鸡肉蛋白与芸豆蛋白酶联重组及其功能性质的研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(7): 83-88.
- [4] HILLER B, LORENZEN P C. Functional properties of milk

- proteins as affected by Maillard reaction induced oligomerisation[J]. Food Research International, 2010, 43: 1 155-1 166.
- [5] GUO Xiao-na, XIONG You-lin. Characteristics and functional properties of buckwheat protein-sugar Schiff base complexes[J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 51: 397-404.
- [6] 冯玉超, 王长远, 李玉琼, 等. 芸豆蛋白与糖基化芸豆蛋白结构与功能特性研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(7): 99-106.
- [7] 林巍, 许英一, 马瑞, 等. 紫花芸豆清蛋白水解物及其膜分离产物抗氧化活性研究[J]. 食品工业, 2018, 39(11): 99-101.
- [8] 张慧莹. 碱性蛋白酶改性对葵花分离蛋白结构与功能特性的影响[D]. 齐齐哈尔: 齐齐哈尔大学, 2015: 15.
- [9] 穆利霞, 赵谋明, 颜小平, 等. 超声强化大豆分离蛋白糖接枝反应作用机理的初步探讨[J]. 食品工业科技, 2013, 34(7): 90-94.
- [10] LI Chen, XUE Hao-ran, CHEN Zhi-yan, et al. Comparative studies on the physicochemical properties of peanut protein isolate-polysaccharide conjugates prepared by ultrasonic treatment or classical heating[J]. Food Research International, 2014, 57: 1-7.
- [11] KATO A, MINAKI K, KOBAYASHI K. Improvement of emulsifying properties of egg white proteins by the attachment of polysaccharide through maillard reaction in a dry state[J]. J Agric Food Chem, 1993, 41(4): 540-543.
- [12] CHEN Lin, CHEN Jian-she, REN Jiao-yan, et al. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(6): 2 600-2 609.
- [13] 张欣, 熊幼翎, 陈洁, 等. 美拉德反应对豌豆蛋白水解物乳化性和抗氧化性的影响[J]. 食品工业科技, 2014, 35(17): 125-129.
- [14] VIVIAN J T, CALLIS P R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins[J]. Biophysical Journal, 2001, 80(5): 2 093-2 109.

(上接第 144 页)

- [8] 李来东, 金钟国, 吕英敏. 浅谈三醋酸甘油酯温度变化对滤棒硬度及丝油比的影响[C]// 黑龙江省 2009 年度烟草学术交流研讨会论文集. 哈尔滨: [出版者不详], 2009: 439-442.
- [9] 朱翠萍. 提高烟用滤棒硬度方法的探讨[J]. 财经界: 学术版, 2013(19): 206-261.
- [10] 李莉, 黄燕如, 丘萍. 增塑剂固化时间对滤棒质量的影响分析[C]// 中国烟草学会工业专业委员会烟草工艺学术研讨会论文集. 南宁: [出版者不详], 2009: 195-198.
- [11] 黄幼斌. 影响卷烟滤棒硬度的因素分析[J]. 大众科技, 2012, 14(6): 34-35.