

小麦面筋蛋白水解物及其肽美拉德反应中间体的水相制备

Preparation of wheat gluten protein hydrolysates and their aqueous intermediates for Maillard reaction

雷 声¹ 王 凯¹ 段焰青¹ 李源栋¹ 刘秀明¹

LEI Sheng¹ WANG Kai¹ DUAN Yan-qing¹ LI Yuan-dong¹ LIU Xiu-ming¹

于若禾² 崔和平² 张晓鸣² 杨乾栩¹

YU Jun-he² CUI He-ping² ZHANG Xiao-ming² YANG Qian-xu¹

(1. 云南中烟工业有限责任公司技术中心, 云南 昆明 650231; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. Technology Center, China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Kunming, Yunnan 650231, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:利用蛋白酶对小麦面筋蛋白进行可控酶解制备最适美拉德反应前体肽。以水解度和蛋白溶出率为指标,采用双酶分步水解法,并通过偏最小二乘回归分析法确定了小麦面筋蛋白肽的制备工艺为:复合蛋白酶 I 添加量 2 000 U/g 底物,酶解时间 3 h;氨肽酶添加量 400 U/g 底物,酶解时间 2 h;料液质量比 1:12。酶解液主要成分为小分子肽,酶解液中游离氨基酸占总氨基酸的 5.59%,而肽结合氨基酸占总氨基酸的 94.41%,相对分子质量 < 1 000 的组分占 92.83%。以此酶解液和木糖为原料,制备小麦面筋蛋白肽—木糖美拉德反应中间体的条件为:糖肽比 10%,初始 pH 7.5,反应温度 70 ℃,反应时间 120 min。

关键词:小麦面筋蛋白;酶解;肽;偏最小二乘回归法;肽美拉德反应中间体

Abstract: The optimum precursor peptides were prepared for Maillard reaction by using enzymatic hydrolysis of wheat gluten proteins. Setting the degree of hydrolysis (DH) and protein dissolution rate as main indexes, the optimum parameters of enzymatic hydrolysis were optimized by partial least squares regression as follows: the concentration of complex protease I (2 000 U/g), hydrolyzing with complex protease I for 3 h, aminopeptidase concentration (400 U/g), hydrolyzing with

aminopeptidase for 2 h, and water/substance ratio (1:12 g/g). The main components of the hydrolysates were small molecule peptides under the above hydrolysis conditions, and the proportion of free amino acids in the enzymatic hydrolysate was 5.59%. The proportion of peptide-bound amino acids in the enzymatic hydrolysate was 94.41%, and the proportion of components with the relative molecular weight smaller than 1 000 was 92.83%. Moreover, the obtained gluten peptides were used to prepare wheat gluten peptides-xylose (WGP-xy) Maillard reaction intermediates (MRI). Through a two-stage temperature rising process, the optimum preparation conditions of WGP-xy MRI were determined as follows: the ratio of xylose and peptides was 10%, the pH of the mixture was adjusted to 7.5 and heated at 70 ℃ for 120 min.

Keywords: wheat gluten protein; enzymatic hydrolysis; peptide; partial least squares regression; Maillard reaction intermediates

基金项目:云南省重点研发计划项目(编号:2018BA084);国家自然科学基金面上项目(编号:NSFC31671826);科技部国家重点研发计划项目(编号:2017YFD0400105)

作者简介:雷声,男,云南中烟工业有限责任公司工程师,博士。

通信作者:杨乾栩(1987—),男,云南中烟工业有限责任公司高级工程师,博士。E-mail: 18314300710@126.com

收稿日期:2020-03-01

目前,热反应香精大多为完全美拉德反应产物(Maillard reaction products, MRPs),其香气浓郁诱人,具有较大的吸引力。而 MRPs 风味主体为挥发性芳香物质,化学性质不稳定、香味不持久,且易受贮存环境的影响,造成香料的香型失真。美拉德反应中间体形成于美拉德反应的初级阶段,即醛糖或酮糖重排产生的阿玛多利重排产物(ARPs)1-氨基-1-脱氧-2-酮糖或海因斯重排产物(HRPs)2-氨基-2-脱氧醛糖^[1]。ARPs 或 HRPs 是美拉德反应中关键的中间产物,其本身无色无味,且在常温下具有相对稳定的物理、化学性质^[2]。因此这类中间产物可作为稳定的风味前体物质,将其应用于未加工或粗加工

产品中,在后续热处理过程中快速产生新鲜的风味^[3]。氨基酸和还原糖为反应物制备的美拉德反应中间体,经热处理后产品整体呈味单一、香韵不够饱满柔和。例如,2-脱氧-2-*L*-苯丙氨酸-*D*-葡萄糖只被用作花香味前体物^[4];1-脱氧-*D*-木酮糖基-1-*L*-半胱氨酸在热处理时只产生肉类风味^[5]。若使用含有不同氨基酸残基的肽和还原糖制备美拉德反应中间体,热反应后增香效果相对于氨基酸具有显著的不同。肽的不同氨基酸组成不仅可以改善食品风味特性,丰富香气类型,还可以提高食物的营养价值,为开发美拉德反应中间体型风味增强剂的优质原料,因此肽美拉德中间体具有良好的市场发展前景^[6-7]。

美拉德中间体的制备通常采用有机相制备法,该法无法获得食品级产品,中间体产率低且污染环境,还无法大规模工业化生产^[8]。此外,蛋白水解产物中游离氨基酸种类和肽的分子量分布不同,形成的 ARPs 或 HRP 种类复杂,难以定性定量分析,因而无法通过对中间体含量的监测实现其水相临界条件的确定。试验拟利用蛋白酶酶解技术实现小麦面筋蛋白肽的定向制备,并采用偏最小二乘回归分析法(PLSR)对其酶解条件进行优化。基于半胱氨酸作用于肽美拉德中间体,抑制美拉德反应终产物褐变强度的机制^[9-10],采用变温美拉德反应方法,以半胱氨酸为示踪剂,通过测定肽美拉德终产物的褐变指数,研究并优化小麦面筋蛋白肽美拉德中间体在水相介质中的制备条件。旨在为肽美拉德反应中间体的工业化绿色生产提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

D-木糖、谷胱甘肽、半胱氨酸、乙氨酸、酪氨酸、精氨酸、甘氨酸、杆菌酶、细胞色素:上海源叶生物科技有限公司;

盐酸、氢氧化钠、醋酸钠、甲醛、三氯乙酸、乙腈:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

小麦面筋蛋白、复合蛋白酶 I、复合蛋白酶 II、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、氨肽酶、味精、焦糖、柠檬酸、咖啡因:安徽强旺调味食品有限公司。

1.2 仪器与设备

电子天平:EL3002 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

pH 计:FE-20 型,梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

紫外—可见分光光度计:UV-1800 型,岛津(中国)有限公司;

高效液相色谱:Waters 1525 型,沃特世科技(上海)有限公司;

超级恒温循环水浴:MP-501A 型,上海一恒科技有限

公司;

离心机:Allegra 64R 型,贝克曼库尔特有限公司;

手持式折光仪:PAL-1 型,ATAGO(爱拓)中国分公司。

1.3 试验方法

1.3.1 小麦面筋蛋白肽的制备 取适量过 80 目筛的小麦蛋白粉,按料液质量比 1:12 添加去离子水并混合均匀,90℃加热 30 min 以灭活样品内源酶,冷却,酶添加量 3 000 U/g 底物,最适 pH 及温度下酶解 2.5 h,反应结束后立即在沸水浴中搅拌加热 15 min,冷却,4 300 r/min 离心 10 min,上清液即为小麦蛋白肽,于-20℃储存待测。

1.3.2 酶解参数的确定

(1) 复合蛋白酶 I 添加量:料液质量比 1:10,复合蛋白酶 I 添加量分别为 1 000,1 500,2 000,2 500,3 000 U/g 底物酶解 3 h,然后按氨肽酶添加量 320 U/g 底物酶解 2 h,考察复合蛋白酶 I 添加量对酶解产物水解度及蛋白溶出率的影响。

(2) 复合蛋白酶 I 酶解时间:料液质量比 1:10,复合蛋白酶 I 添加量 2 000 U/g 底物分别酶解 1,2,3,4,5 h,然后按氨肽酶添加量 320 U/g 底物酶解 2 h,考察复合蛋白酶 I 酶解时间对酶解产物水解度及蛋白溶出率的影响。

(3) 氨肽酶添加量:料液质量比 1:10,复合蛋白酶 I 添加量 2 000 U/g 底物酶解 3 h,然后按氨肽酶添加量分别为 160,240,320,400,480 U/g 底物酶解 2 h,考察氨肽酶添加量对酶解产物水解度及蛋白溶出率的影响。

(4) 氨肽酶酶解时间:料液质量比 1:10,复合蛋白酶 I 添加量 2 000 U/g 底物酶解 3 h,然后按氨肽酶添加量 400 U/g 底物分别酶解 1,2,3,4,5 h,考察氨肽酶酶解时间对酶解产物水解度及蛋白溶出率的影响。

(5) 料液质量比:料液质量比分别为 1:8,1:10,1:12,1:14,1:16,复合蛋白酶 I 添加量 2 000 U/g 底物酶解 3 h,然后按氨肽酶添加量 400 U/g 底物酶解 2 h,考察料液质量比对酶解产物水解度及蛋白溶出率的影响。

1.3.3 水解度的测定 采用甲醛滴定法^[11],按式(1)计算水解度。

$$DH = \frac{C \times (V_1 - V_2) \times V}{m \times \omega \times 8.38 \times 10} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

DH——水解度,%;

C——氢氧化钠标准溶液浓度,mol/L;

V_1 ——样品溶液在加入甲醛后滴定至终点所消耗的 NaOH 标准溶液的体积,mL;

V_2 ——空白溶液在加入甲醛后滴定至终点所消耗的 NaOH 标准溶液的体积,mL;

V——酶解上清液的体积,mL;

m ——样品质量, g;

ω ——原料中的蛋白质含量, %;

8.38——每克蛋白质所含的肽键毫摩尔数, mmol/g。

1.3.4 蛋白溶出率的测定 按 GB/T 5009.5—2010 执行。

1.3.5 感官评定 感官评定小组由 15 名经验丰富且经过专业培训的感官评定成员组成(23~54 岁, 8 女 7 男)。感官评定过程中样品以质量分数 0.1% 加入到标准参照液(质量分数 0.5% 的盐溶液)中, 60 °C 水浴 10 min, 以谷物烘烤味、焦香味、醇厚味、鲜味、酸味、苦味和整体接受性为评定指标进行评分(0~8 分), 分值越高说明作用效果越强。标准参照液: 焦香味(2.5 g 焦糖溶于 80 mL 去离子水)、醇厚味(30 mmol/L 谷胱甘肽溶液)、鲜味(0.5% 味精溶液)、酸味(5 mmol/L 柠檬酸溶液)、苦味(4 mmol/L 咖啡因溶液)。

1.3.6 氨基酸的测定

(1) 游离氨基酸前处理: 取液体样品 5 mL, 用等量 10 g/100 mL 三氯乙酸稀释后充分混匀, 室温下静置 1 h, 过滤, 取 1 mL 滤液, 10 000 r/min 离心 10 min, 取 400 μ L 上清液于液相进样瓶中进样检测。

(2) 总氨基酸前处理: 取液体样品 1 mL, 加入 1 mL 浓盐酸, 再加入 6 mL 6 mol/L HCl 溶液。充入氮气 3 min 后封管, 于 120 °C 烘箱中水解 22 h。冷却后加入 4.8 mL 10 mol/L NaOH 溶液中和盐酸, 定容, 过滤, 取 1 mL 滤液, 10 000 r/min 离心 10 min, 取 400 μ L 上清液于液相进样瓶中进样检测。

(3) 色谱条件: 色谱柱 ODS Hypersil (250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5 μ m), 柱温 40 °C, 流速 1.0 mL/min, 流动相 A 相为 0.6 mmol/L 的乙酸钠, B 相为 0.15 mmol/L 的醋酸: 甲醇: 乙腈 = 1: 2: 2 (体积比)。

1.3.7 相对分子质量分布测定 色谱柱 TSKgel2000SW_{XL} (300 mm $\times$ 7.8 mm); 柱温 30 °C, 进样体积 10 μ L, 流速 0.5 mL/min, 流动相乙腈/水/三氟乙酸(40/60/0.1, 体积比); 检测器紫外检测器, 检测波长 220 nm。校正曲线标准品: 乙氨酸—乙氨酸—乙氨酸(MW189), 乙氨酸—乙氨酸—酪氨酸—精氨酸(MW451), 杆菌酶(MW1422), 细胞色素(MW12384)。

1.3.8 小麦面筋蛋白肽美拉德中间体水相的制备 取适量小麦面筋蛋白肽, 按一定的比例添加木糖, 混合均匀, 用 6 mol/L NaOH 溶液调节初始 pH。低温阶段: 将溶液分装在耐压反应瓶中, 低温下反应一定时间, 取出冷却; 高温阶段: 添加 1% 半胱氨酸, 并重新调节 pH, 将油浴温度迅速升高至 120 °C, 加热 100 min, 立即将反应液置于冰水中终止反应, 所得反应液用于褐变指数测定。

1.3.9 褐变指数的测定 采用紫外—可见分光光度计测定 $A_{420\text{ nm}}$ 。

1.3.10 小麦面筋蛋白肽美拉德中间体水相制备条件优化

(1) 反应温度: 按糖肽比 15% 称取适量小麦面筋蛋白肽和木糖, 调节 pH 为 7.5, 低温反应温度为 70, 80, 90 °C 下反应 0~140 min, 考察反应温度及时间对褐变指数的影响。

(2) 糖肽比: 分别按糖肽比 10%, 15%, 20% 称取适量小麦面筋蛋白肽和木糖, 调节 pH 为 7.5, 最佳反应温度下反应 0~140 min, 考察糖肽比对褐变指数的影响。

(3) pH: 按最佳糖肽比称取适量小麦面筋蛋白肽和木糖, 调节 pH 分别为 6.5, 7.5, 8.5, 最佳反应温度下反应 0~140 min, 考察 pH 对褐变指数的影响。

1.3.11 数据分析 采用 Uncrambler 9.7 软件对小麦面筋蛋白的酶解指标进行 PLSR 分析从而确定最佳的酶解参数。以酶解时间、酶添加量和料液质量比等为 X 变量, 水解度和蛋白回收率为 Y 变量, 所有 X 变量在 PLSR 分析前需进行标准化(1/Sdev)。不确定性检验的回归系数采用修正的 Jack-Knife 法进行估计, 显著性水平在 $P < 0.05$ 。所有回归模型均使用完全交叉验证。

2 结果与分析

2.1 小麦面筋蛋白的酶解条件优化

2.1.1 内切蛋白酶的筛选 由表 1、图 1 可知, 复合蛋白酶 I 对小麦面筋中蛋白质的酶解能力最强, 其水解度为

表 1 蛋白酶的酶活力

Enzyme activity of several different proteases				U/g
复合蛋白酶 I	复合蛋白酶 II	中性蛋白酶	木瓜蛋白酶	氨基酸酶
1.3×10^5	7.6×10^4	2.2×10^5	3.16×10^4	3.2×10^4

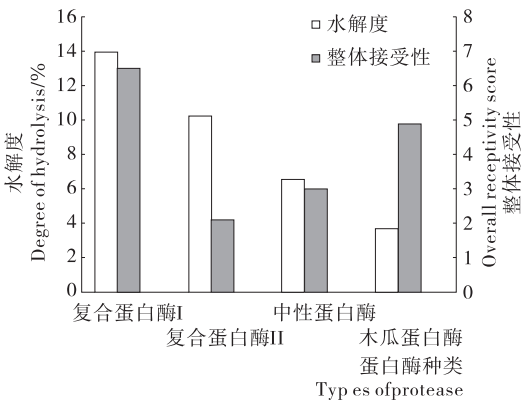


图 1 不同内切蛋白酶对酶解液水解度及整体接受性的影响

Figure 1 Effect of different proteases on DH and sensory overall acceptance of WGP after Maillard reaction

13.96%；其次为复合蛋白酶Ⅱ，其水解度为 10.32%，而木瓜蛋白酶的酶解能力最弱。不同蛋白酶酶解产物的整体接受性差异较大，复合蛋白酶Ⅰ的酶解产物的谷物烘烤味、焦香味和甜味较为柔和，香气丰富；木瓜蛋白酶的酶解产物焦香味明显，但酸味较为突出；而复合蛋白酶Ⅱ的酶解产物存在明显的不愉悦气味且苦味较重，整体接受性评分最低。综上，选取复合蛋白酶Ⅰ作为内切酶对小麦面筋进行酶解。

2.1.2 酶解参数对小麦面筋蛋白水解度和蛋白溶出率的影响 由图 2 可知，随着复合蛋白酶Ⅰ添加量的增加，酶解产物水解度和蛋白溶出率均增大。当酶添加量从 1 000 U/g 底物增加至 2 000 U/g 底物时，水解度呈线性增加，而继续增加酶用量，酶解液水解度上升幅度不大。而蛋白溶出率增幅较为明显的酶添加量为 1 500 ~ 2 000 U/g 底物。随着酶解时间的延长，酶解液的水解度和蛋白溶出率均增大，当酶解时间为 2~3 h 时，蛋白溶出率变化较大，由 68.8% 增加至 70.95%，可能是酶解初期复合蛋白酶Ⅰ的活性较高，且与底物结合充分，作用效率高。当酶解时间 > 3 h 时，水解度和蛋白溶出率变化不大，可能由于此时酶不断被消耗，活性降低，与酶作用的肽键逐渐减少。随着氨肽酶添加量的增加，酶解液的水解度和蛋白溶出率增大。当氨肽酶添加量由 320 U/g 底物增加至 400 U/g 底物时，蛋白溶出率由 68.63% 增加 71.91%，而后则增加较为缓慢。随着氨肽酶作用时间的延长，水解度增大。当氨肽酶作用时间为 1~2 h 时，蛋白溶出率变化较明显，由 67.66% 增大至 71.07%，提高了 5.04%，之后趋于缓和。这可能是酶解初期，在较高的酶

和底物浓度下，酶解速率较快。随着酶解时间的延长，酶解液 pH 不断降低，底物浓度降低，从而导致后期酶解速率下降。随着料液比值的增大，水解度和蛋白溶出率均增大。当料液质量比为 1:8~1:10 时，水解度上升幅度最明显，而蛋白溶出率在料液质量比为 1:8~1:14 间增加效果显著，而后趋于稳定。以复合蛋白酶Ⅰ添加量、复合蛋白酶Ⅰ酶解时间、氨肽酶添加量、氨肽酶酶解时间及料液质量比为 X 变量，水解度和蛋白回收率为 Y 变量进行 PLSR 分析。由图 3 可知，5 个主成分的交叉验证方差为 84%，PC1-PC3、PC1-PC4、PC1-PC5 只提高了对 X 变量的解释率，而 PC1-PC2 对 Y 变量的解释率最大，因此只讨论 PC1-PC2。

由图 3(a) 可知，蛋白溶出率和水解度都位于右侧，氨肽酶添加量和氨肽酶酶解时间与其距离较近，说明这两个参数同时与水解度和蛋白溶出率相关。此外，水解度和蛋白溶出率都位于内外椭圆之间，表明其能很好地被该模型所解释。

由图 4 可知，氨肽酶添加量和氨肽酶酶解时间与小麦面筋蛋白的水解度和蛋白溶出率显著正相关；复合蛋白酶Ⅰ酶解时间与小麦面筋蛋白的蛋白溶出率显著正相关；料液质量比与小麦面筋蛋白的水解度和蛋白溶出率显著负相关，可能是料液质量比低即底物浓度低，小麦面筋蛋白更容易分散，与酶接触更为充分，从而使水解度和蛋白溶出率增大，但由于底物浓度低，需进行浓缩才能进行后续的美拉德反应，增加了生产成本，不利于大规模生产；当料液质量比过高时，因小麦面筋蛋白的水溶性较低，浓度过大使酶解液过于黏稠，底物与酶不能充分接触，

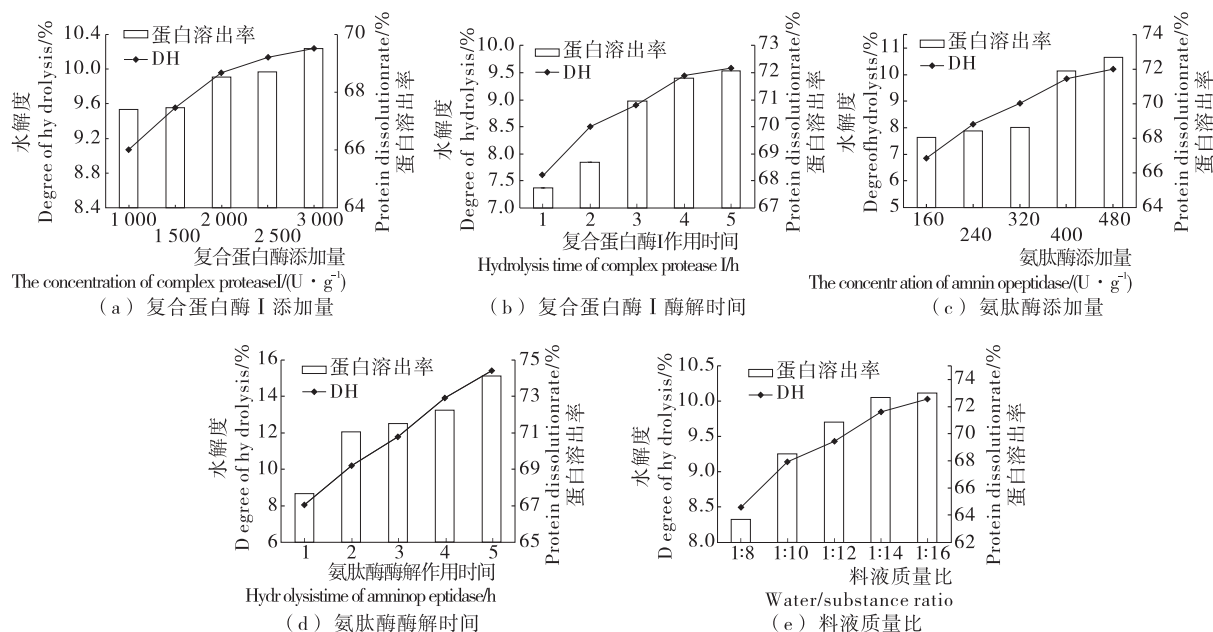
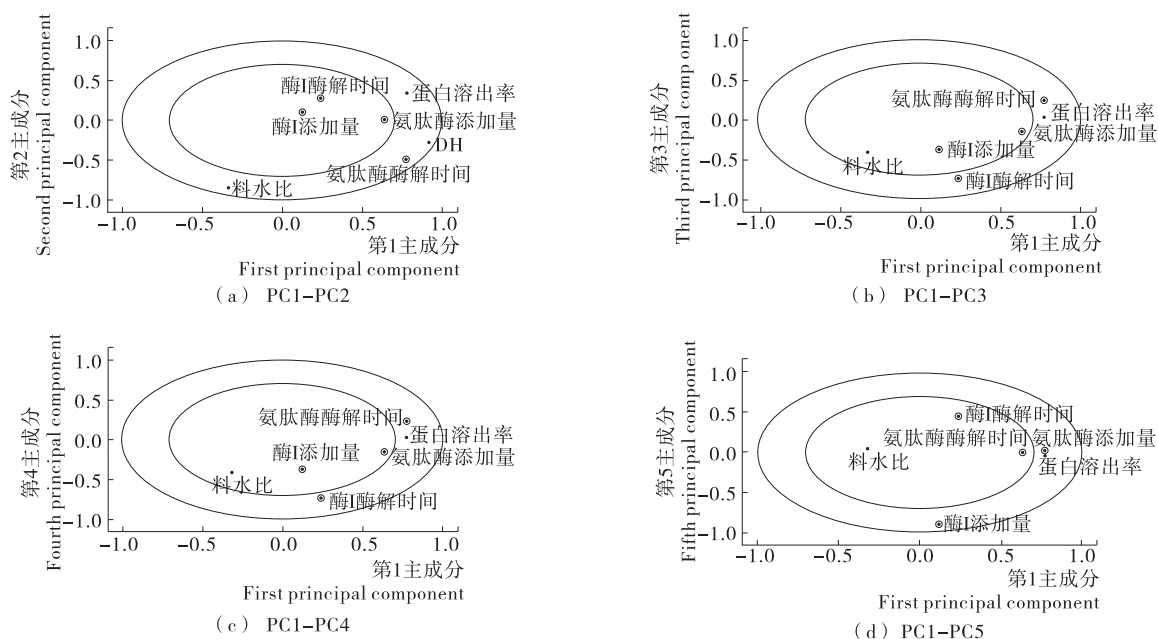


图 2 酶解参数对水解度及蛋白溶出率的影响

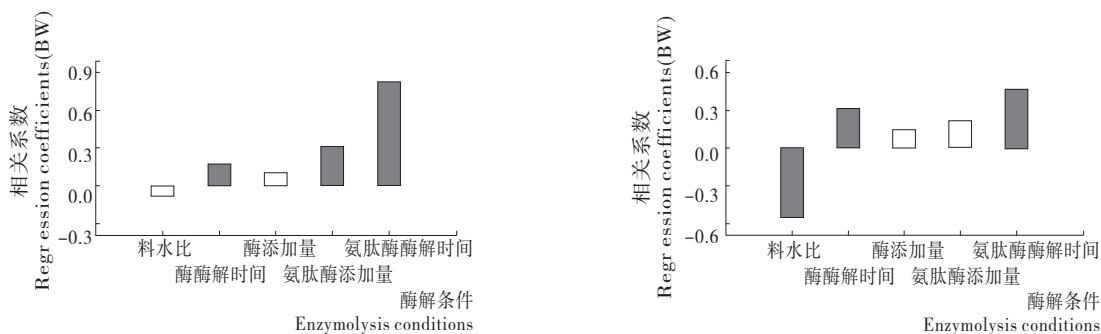
Figure 2 Effects of enzymolysis conditions on the DH and protein dissolution rate of gluten hydrolysate



小圆圈表示有显著性的变量,大椭圆分别表示 50%和 100%的解释方差

图 3 酶解条件与水解度和蛋白溶出率间的 PLSR 相关性分析

Figure 3 The correlation between the enzymolysis conditions and the DH, protein dissolution rate of gluten hydrolysate analyzed by PLSR



灰色代表显著,白色代表不显著,正负象限代表正负相关性

图 4 酶解条件对水解度和蛋白溶出率的贡献分析

Figure 4 Contribution of enzymolysis conditions on the DH and protein dissolution rate of gluten hydrolysate

反而降低酶解效率。综上,酶解的最佳条件为复合蛋白酶 I 添加量 2 000 U/g、复合蛋白酶 I 酶解时间 3 h、氨肽酶添加量 400 U/g、氨肽酶酶解时间 2 h、料液质量比 1 : 12。

2.2 小麦面筋蛋白酶解液的氨基酸组成

由表 2 可知,酶解液中游离氨基酸占总氨基酸的 5.59%,而肽结合氨基酸占总氨基酸的 94.41%,酶解液中肽结合氨基酸含量远大于游离氨基酸含量,说明酶解液中的氨基酸主要以结合态的肽类氨基酸形式存在。小麦面筋蛋白酶解液中的氨基酸组成比较齐全,共检测到 17 种氨基酸物质。其中酶解液中呈现鲜甜味的氨基酸(谷氨酸、天冬氨酸、脯氨酸、丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸和丙氨酸)含量较高,达 37.82 mg/mL,占酶解液总氨基酸含

量的 69.15%,占鲜甜味总氨基酸的 98.22%。因此,酶解液中的鲜甜味主要是小麦面筋酶解过程形成的含鲜甜味氨基酸的小分子肽造成的。

2.3 小麦面筋蛋白酶解液的相对分子质量分布

由图 5 可知,小麦面筋蛋白在双酶酶解作用下水解程度较好,大分子的小麦面筋蛋白逐渐水解成小分子肽类,相对分子质量 < 1 000 的组分占 92.83%。相对分子质量 < 500 的小肽具有更强的反应活性,更倾向于参与到美拉德反应中^[12]。综合表 3、图 4,小麦面筋蛋白在双酶酶解后产生的游离氨基酸含量较低,主要生成小分子肽。

2.4 小麦面筋蛋白肽美拉德中间体的水相制备

2.4.1 反应温度对褐变指数的影响 由图 6 可知,小麦

表 2 小麦面筋蛋白酶解液氨基酸组分[†]
Table 2 The composition of amino acid in gluten hydrolysate

种类	含量/ (mg · mL ⁻¹)	游离氨基酸含量/ (mg · mL ⁻¹)	肽结合氨基酸含量/ (mg · mL ⁻¹)	游离氨基酸占 总氨基酸比例/%	肽结合氨基酸占 总氨基酸比例/%
天冬氨酸*	1.48	0.03	1.45	2.02	98.13
谷氨酸*	24.95	0.22	24.73	0.89	99.11
丝氨酸*	2.19	0.07	2.12	3.21	96.79
组氨酸	1.03	0.09	0.95	8.64	91.36
甘氨酸*	1.97	0.06	1.91	3.09	96.91
苏氨酸*	1.38	0.16	1.22	11.88	88.12
精氨酸	1.70	0.33	1.37	19.37	80.63
丙氨酸*	1.32	0.11	1.21	8.25	91.75
酪氨酸	1.92	0.20	1.72	10.58	89.42
半胱氨酸	0.36	0.01	0.35	2.47	97.53
缬氨酸	2.11	0.22	1.88	10.57	89.43
蛋氨酸	0.70	0.14	0.56	20.46	79.54
苯丙氨酸	3.00	0.30	2.70	10.00	90.00
异亮氨酸	1.99	0.20	1.79	9.91	90.09
亮氨酸	3.47	0.74	2.73	21.26	78.74
赖氨酸	0.60	0.15	0.45	25.44	74.56
脯氨酸*	4.54	0.02	4.52	0.45	99.55
鲜甜味氨基酸总量	37.82	0.67	37.15	1.78	98.22
总量	54.69	3.06	51.64	5.59	94.41

[†] * 表示鲜甜味氨基酸。

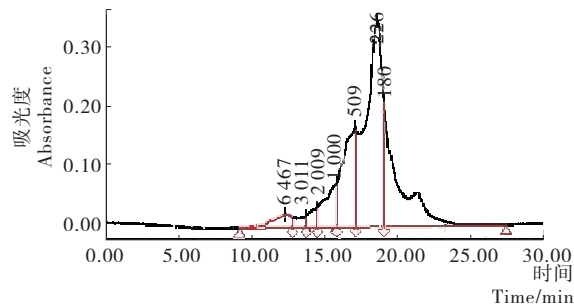


图 5 小麦面筋蛋白酶解液的相对分子质量分布
Figure 5 Relative molecular weight distribution of gluten hydrolysate

面筋蛋白肽—木糖体系在 70,80,90 ℃ 分别反应 120,80,60 min 后,终产物的褐变程度最低,即小麦面筋蛋白肽—木糖美拉德反应中间体大量生成的临界条件。低温反应温度为 70 ℃ 时终产物的褐变指数明显低于 80,90 ℃ 的,说明小麦面筋蛋白肽—木糖中间体在此温度下形成和积累的量明显高于高温反应,中间体的次级反应速率相对较慢。综上,选择 70 ℃ 反应 120 min 作为小麦面筋蛋白肽—木糖美拉德反应中间体的最佳制备温度和时间。

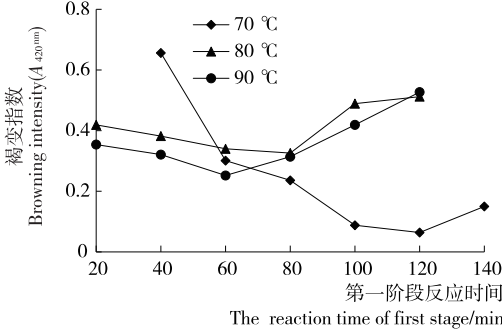


图 6 反应温度对小麦面筋蛋白肽—木糖变温美拉德反应产物褐变指数的影响
Figure 6 Effect of temperature on the color of final products under a variable temperature rising process

2.4.2 木糖添加量对褐变指数的影响 由图 7 可知,变温美拉德反应产物的褐变指数随半胱氨酸的添加时间变化幅度较大,呈先降低后升高的趋势。当糖肽比为 10%,反应时间为 120 min 添加半胱氨酸时,终产物褐变程度最小,此时小麦面筋蛋白肽—木糖美拉德反应中间体的生成量最大。研究^[13]表明,还原糖浓度的增加能加快美拉

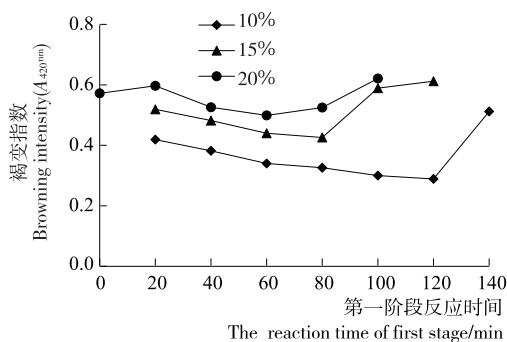


图7 木糖添加量对小麦面筋蛋白肽—木糖变温美拉德反应产物褐变指数的影响

Figure 7 Effect of xylose addition on the color of final products under a variable temperature rising process

德反应的速率,而反应速率是通过反应物的损失和色泽形成的速率来反映;当木糖添加量过多时,虽会促进美拉德反应进程,但过多的木糖会与外加的半胱氨酸反应,改变反应历程,最终生成浅色美拉德反应产物。因此选择木糖的最适添加量为糖肽比10%。

2.4.3 pH对褐变指数的影响 由图8可知,不同初始pH下变温美拉德反应产物的褐变指数存在较大差异,但同一pH下不同反应时间添加半胱氨酸后,反应终产物的褐变指数均先降低后升高。由于反应体系不同,当初始pH为6.5、7.5、8.5时,小麦面筋蛋白肽—木糖美拉德反应中间体形成量最多的时间分别为180、120、60 min。随着初始pH的增大,美拉德反应速率加快,小麦面筋蛋白肽—木糖美拉德反应中间体形成的时间缩短;同时较高的pH有利于类黑精的形成,所以在pH 8.5条件下获得的变温美拉德反应终产物的褐变指数最高。此外,初始pH 6.5的褐变指数较低,但中间体形成的时间较长,且反应180 min时的褐变指数降低不显著。因此选择pH 7.5

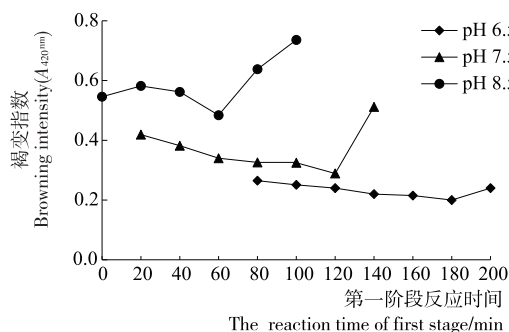


图8 初始pH对小麦面筋蛋白肽—木糖变温美拉德反应产物褐变指数的影响

Figure 8 Effect of initial pH on the color of final products under a variable temperature rising process

作为制备小麦面筋蛋白肽—木糖美拉德反应中间体的最优pH。

3 结论

研究筛选并确定了复合蛋白酶I作为蛋白内切酶,采用了双酶分步水解法,通过PLSR法考察了复合蛋白酶I和氨肽酶的添加量、作用时间及料液质量比对水解度和蛋白溶出率的影响,确定了小麦面筋蛋白肽的制备条件为料液质量比1:12,复合蛋白酶I以2 000 U/g底物的添加量酶解3 h后,再加入400 U/g底物的氨肽酶继续酶解2 h。此条件下得到的酶解液中游离氨基酸占总氨基酸的5.59%,肽结合氨基酸占总氨基酸的94.41%,相对分子质量<1 000的组分占92.83%,该酶解条件所制备的小麦面筋蛋白酶解液主要组成为小分子肽。通过变温美拉德反应,以半胱氨酸为示踪剂确定了小麦面筋蛋白肽—木糖美拉德反应中间体的水相制备条件为糖肽比10%,初始pH 7.5,反应温度70℃,反应时间120 min。试验未对肽美拉德中间体的结构特征及风味形成机制进行深入研究。后续将采用气质联用、高效液相、核磁共振、飞行质谱等分析手段,从分子水平上阐明肽美拉德中间体增强食品风味的作用规律及机制,为其在食品体系中的加工适应性研究提供更深入的理论依据。

参考文献

- [1] HODGE J E. The Amadori rearrangement[J]. Advances in Carbohydrate Chemistry, 1955, 10: 169.
- [2] 甘学文, 王光耀, 邓仕彬, 等. 美拉德反应中间体对卷烟吸品质的影响及其风味受控形成研究[J]. 食品与机械, 2017, 33(6): 46-52.
- [3] 徐慢, 孙福犁, 崔和平, 等. 谷氨酸—木糖美拉德中间体的水相制备及其在桃酥中的应用[J]. 食品与机械, 2019, 35(4): 7-13.
- [4] YANG Jun, DENG Shi-bin, YIN Jie, et al. Preparation of 1-amino-1-deoxyfructose derivatives by stepwise increase of temperature in aqueous medium and their flavor formation compared with Maillard reaction products[J]. Food and Bio-process Technology, 2018, 11(3): 694-704.
- [5] KHAN M I, JO C, TARIQ M R. Meat flavor precursors and factors influencing flavor precursors: A systematic review[J]. Meat Science, 2015(110): 278-284.
- [6] 孙福犁, 徐慢, 崔和平, 等. 谷氨酰胺美拉德反应中间体的制备及风味形成能力研究[J]. 食品与机械, 2019, 35(3): 1-7.
- [7] 甘学文, 王光耀, 邓仕彬, 等. 外源美拉德反应中间体在卷烟加工中的含量变化及致香效果[J]. 食品与机械, 2017, 33(5): 77-82.

(下转第220页)

- [2] 卢彦华, 张广喜, 孟杰, 等. 气流干燥工序山东烤烟的原料加工特性研究[J]. 安徽农学通报, 2016, 22(15): 124-128.
- [3] 崔升. HXD 工艺参数优化及其对烟丝质量的影响[J]. 贵州农业科学, 2017, 45(12): 128-132.
- [4] 刘继辉, 朱勇, 申晓峰, 等. 不同蒸汽注入位置对气流干燥烟丝品质的影响[J]. 烟草科技, 2014(11): 10-13, 21.
- [5] 乔学义, 姚光明, 王兵, 等. 气流干燥工序加工强度对烤烟烟叶感官质量的影响[J]. 河南农业科学, 2012, 41(7): 54-57, 83.
- [6] 王宗英, 彭军仓, 徐磊, 等. 两种干燥工艺下叶丝加工质量的对比分析[J]. 烟草科技, 2012(11): 5-9.
- [7] 魏硕, 李生栋, 徐宸, 等. 基于叶片保水力的烟叶烘烤水分干燥模型构建[J]. 南方农业学报, 2017, 48(8): 1 477-1 482.
- [8] 李生栋, 付宗仁, 胡蓉花, 等. 烟叶烘烤过程中水分变化及干燥数学模型构建[J]. 南方农业学报, 2018, 49(1): 121-129.
- [9] 金博闻, 戴亚. 烟草化学[M]. 北京: 清华大学出版社, 1994: 57-59.
- [10] 李峥, 邱坤, 杨鹏, 等. 烟叶烘烤过程中水分迁移干燥特性研究进展[J]. 昆明学院学报, 2017, 39(6): 37-41.
- [11] 刘新民, 杜咏梅, 程森, 等. 烤烟烟丝填充值与其理化指标和感官品质的关系[J]. 中国烟草科学, 2012(5): 74-78.
- [12] 邵惠芳. 基于化学成分的烤烟感官质量评价模型构建及工业应用[D]. 郑州: 河南农业大学, 2012: 34-36.
- [13] 吴惠玲, 王志强, 韩春, 等. 影响美拉德反应的几种因素研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 440-444.
- [14] 段鹏, 赵永振, 芦昶彤, 等. 对流干燥对烟丝表面温度及理化特性的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(10): 184-189.
- [15] 秦艳青, 李爱军, 杨兴友, 等. β -胡萝卜素的降解方法及其降解物在卷烟加香中的应用[J]. 江苏农业科学, 2014(5): 220-222.
- [16] 谢卫. 烟草制丝过程中生物碱的变化研究[J]. 福建分析测试, 2005, 14(1): 2 120-2 122.
- [17] 杨斌, 白俊海. HXD 前后烟丝中烟碱及部分香味成分的变化[J]. 烟草科技, 2006(1): 18-21.
- [18] 张欢欢. 卷烟制丝过程中烟丝化学成分和感官质量的动态变化研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014: 30-31.

(上接第 150 页)

- [15] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2 957-2 963.
- [16] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7 537-7 541.
- [17] LI Shu-yi, CHEN Lu, YANG Ting, et al. Increasing antioxidant activity of procyanidin extracts from the pericarp of Litchi chinensis processing waste by two probiotic bacteria bioconversions[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2013, 61(10): 2 506-2 517.
- [18] 潘亚平, 张振海, 丁冬梅, 等. 黄酮类化合物肠道细菌生物转化的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(19): 3 239-3 245.
- [19] 许真源, 李小雅, 许雅青, 等. 产丁酸菌调节肠道微生态及中药的干预作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 226-233.
- [20] 沙素梅. IBD 患者粪便菌群生物多样性及其主要组成的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2011: 45-47.

(上接第 189 页)

- [8] YU Jun-he, CUI He-ping, TANG Wei, et al. Interaction of (—)-epigallocatechin gallate and deoxyosones blocking the subsequent Maillard reaction and improving the yield of N-(1-Deoxy-d-xylulos-1-yl)-alanine[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68: 1 714-1 724.
- [9] HUANG Mei-gui, ZHANG Xiao-ming, ERIC K, et al. Inhibiting the color formation by gradient temperature-elevating Maillard reaction of soybean peptide-xylose system based on interaction of L-cysteine and Amadori compounds[J]. Journal of Peptide Science, 2012, 18(5): 342-349.
- [10] 黄梅桂. 大豆肽美拉德反应体系中色泽抑制及其机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 51-63.
- [11] 徐珊珊. 小麦面筋蛋白美拉德肽的制备及风味特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2018: 10-11.
- [12] LAN Xiao-hong, LIU Ping, ZHANG Xiao-ming, et al. Temperature effect on the non-volatile compounds of Maillard reaction products derived from xylose-soybean peptide system: Further insights into thermal degradation and cross-linking[J]. Food Chemistry, 2010, 120(4): 967-972.
- [13] 吴惠玲, 王志强, 韩春, 等. 影响美拉德反应的几种因素研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 441-444.