葡萄糖氧化酶对面团水分状态及蛋白质结构的影响

刘燕琪，李梦琴，周玉瑾，李超然
（河南农业大学食品科学技术学院，河南郑州 450002）

摘要：采用核磁共振和傅立叶变换红外光谱技术，研究了葡萄糖氧化酶（0~0.5%）对面团水分分布状态和蛋白质结构参数变化的影响，并结合面团热力学特性和二硫键含量变化对各实验指标进行相关性分析。结果表明：添加葡萄糖氧化酶可降低面团 T2 弛豫时间，在 0~0.5%范围内，T_{21}和T_{22}呈现先减小后增大的趋势，添加量为 0.4%时，T_{21}、T_{22}测定值最小，且添加量与T_{21}和T_{22}具有显著负相关（$p<0.05$）；β-折叠片层、β-折叠、α-螺旋、无序结构和 β-转角含量先增加后降，且添加量与 r 具有极显著正相关（$p<0.01$）；葡萄糖氧化酶可提高面团糊化温度，增强面团热稳定性，并促使面团体系中的-SH 转化为 S-S，且对 S-S 变化影响显著（$p<0.05$）；面团中水分迁移与面团糊化温度、二硫键（S-S）含量、α-螺旋、β-转角和无序结构均具有显著相关性（$p<0.05$）；团糊化峰值温度（T_p）与 S-S、α-螺旋和 β-转角具有显著正相关（$p<0.05$）。

关键词：葡萄糖氧化酶（GOD）；核磁共振；红外光谱；蛋白质二级结构；相关性
文章篇号：1673-9078(2014)10-126-133 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.022

Effect of Glucose Oxidase on Moisture Status and Protein Structure of Dough

LIU Yan-qi, LI Meng-qin, ZHOU Yu-jin, LI Chao-ran
(College of Food Science and Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) were used to study the effect of glucose oxidase (GOD) (0~0.5%) on moisture distribution and parameter changes of protein structures in dough. A correlation analysis of each experimental indicator was conducted based on the thermodynamic properties of dough and the changes in disulfide bond content. The results showed that the addition of GOD could reduce the relaxation times (T_2) for water in dough. In the range of 0~0.5%, the T_{21} and T_{22} values decreased first and then increased, whereas when the dose was 0.4%, the measured T_{21} and T_{22} values were the lowest; thus, GOD concentration had a significant negative correlation ($p < 0.05$) with T_{21} and T_{22}. The amount of β-pleated sheet, β-sheet, α-helix, unordered structure, and β-turn increased first and then decreased, and a significant positive correlation ($p < 0.01$) was found between GOD concentration and r values. GOD could increase the gelatinization temperature and thermal stability of the dough, promote sulfhydryl groups (-SH) to be converted to disulfide groups (S-S), and significantly affect changes in disulfide groups (S-S). The moisture migration in dough showed significant correlation ($p < 0.05$) with the gelatinization temperature of dough, disulfide (S-S) content, α-helix, β-turn, and unordered structure. The gelatinization peak temperature (T_p) had significant positive correlation with disulfide groups (S-S), α-helix, and β-turn ($p < 0.05$).

Key words: glucose oxidase; nuclear magnetic resonance; Fourier transform infrared spectroscopy; protein secondary structure; correlation

葡萄糖氧化酶（Glucose oxidase，简称 GOD），于 1928 年在黑曲霉和灰绿青霉中发现，具有高度专一性，且酶活力稳定，可耐受 50 ℃以上的高温。葡萄糖氧化酶在有氧气参与下能催化葡萄糖氧化成δ-D-葡萄糖酸内酯，同时产生过氧化氢（H_2O_2），H_2O_2是一种很强的氧化剂，并且葡萄糖氧化酶的活性是通过H_2O_2起作用[1]。当葡萄糖氧化酶作用于面筋蛋白时，H_2O_2分解成 H_2O 和原子态的[O]，[O]可将面筋蛋白中的巯基（-SH）氧化成二硫键（S-S），从而增强面筋网络结构，使面团具有良好的弹性和耐机械搅拌特性。另外，葡萄糖氧化酶还可作用于面团中的水溶性物质戊聚糖，生成的 H_2O_2 在过氧化物酶的作用下，产生自由基，促进水溶性戊聚糖与蛋白质、氨基酸残基发生交联，形成蛋白多糖复合大分子，使水溶性部分相对粘度增大，促进水溶性戊聚糖氧化胶凝[2-3]，从而改善

收稿日期：2014-04-15
基金项目：河南省教育厅自然科学研究计划项目（2010A550008）
作者简介：刘燕琪（1988-），女，在读硕士研究生，研究方向：农产品加工与贮藏工程
通讯作者：李梦琴(1965-)，女，教授，研究方向：谷物化学与加工工程

了面团特性和提高面制品的质量。葡萄糖氧化酶作为一种优良的新型食品添加剂，在食品工业中作用日益显著，并广泛用于乳制品、肉制品、面制品、大豆蛋白制品等。由于葡萄糖氧化酶在面包、面条制作及各种高筋粉成产中均有理想效果，是常用的面团氧化剂，可替代很多化学改良剂。

目前，关于葡萄糖氧化酶对面团及其制品的品质和特性的研究已有很多[4~5]，对葡萄糖氧化酶的作用机理也有一定的研究，但主要侧重于对面团中蛋白质巯基（-SH）、二硫键（S-S）的影响[6]，关于葡萄糖氧化酶对面团中水分和蛋白质二级结构影响的研究很少。其中核磁共振技术（NMR）是应用于食品领域的一项新技术，它可以从微观上研究食品内部水分的分布和迁移情况，具有快速、无损、准确的特点。目前已有学者利用核磁共振及其成像技术研究了面团形成的整个过程，包括面粉吸水率的研究、面团形成过程，主要是对面团不同存在状态水分的分子流动性、持水性和面筋形成情况的研究以及面团发酵过程的研究，且这些研究都取得一定的成果[7~9]。

本研究主要采用核磁共振弛豫时间（T_2）来研究面团中水分的状态，并结合傅立叶变换红外光谱技术（FT-IR）、差式扫描量热法（DSC）及二硫键（S-S）与硫氢键（-SH）含量测定，通过各指标间的相关性分析，研究葡萄糖氧化酶对面团水分分布状态、蛋白质二级结构和热力学特性的影响，探讨它们之间的关系，为其在面制品中的进一步应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦粉，郑州金苑面粉厂提供；葡萄糖氧化酶，丹麦诺和诺德公司生产；郑州市饮用水；Tris、甘氨酸、EDTA、盐酸胍、尿素、三氯乙酸等，均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

B5D 双功能搅拌机，广东省番禺市华粤电器厂；TDL-5-A 低速大容量离心机，上海安亭科学仪器厂；程控人工气候箱，上海精宏实验设备有限公司；Q20 差式扫描量热仪，美国 TA 仪器公司；722E 型分光光度计，上海光谱仪器有限公司；低场 NMR 成像仪，上海纽迈电子科技有限公司；Spectrum GX 傅立叶红外光谱仪，PerkinElmer 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品制备

将葡萄糖氧化酶按照 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5%的比例添加到小麦粉中，混匀。将混合均匀的面粉样品和空白面粉，分别称量后按加水量 38%、加盐量 2%的比例制成面团，备用。

1.3.2 核磁共振弛豫时间测定

FID 实验调节共振中心频率后，利用 CPMG 序列测定样品的横向弛豫时间（T_2），将制备的面团分别称取 1.00±0.01 g 后放入核磁小试管中，置于磁场中心位置的射频线圈中心，进行 CPMG 脉冲序列扫描。

CPMG 实验参数：采样点数 TD=80140，采样频率 SW=100，重复采样间隔时间 TR=2000 ms，重复扫描次数 NS=8，半回波时间套=200 μs。

扫描结束后用 T2Star 反演软件拟合反演出 T_2，T_2 时间计算如下：

$$T_{21}=\sum A_{21i}\times T_{21i}/A_{21总}$$

$$T_{22}=\sum A_{22i}\times T_{22i}/A_{22总}$$

$$T_{23}=\sum A_{23i}\times T_{23i}/A_{23总}$$

$$T_{2总}=\sum A_i\times T_i/A_{总}$$

1.3.3 DSC 测定

从制备好的面团样品中取出样品约 5~10 mg，放入样品皿中称量、密封，备用。

DSC 参数设定：N_2 气压 0.2 Mp，气流量 20 mL/min，DSC 分析仪升温速率为 5 ℃/min，曲线温度范围为 25~200 ℃，密封空白高压不锈钢坩埚作为对照。实验采用 TA-Universal-Analysis 软件记录和分析吸热曲线上的起始温度（T_0）、峰值温度（T_p）、结束温度（T_c）和热焓值（ΔH）。

1.3.4 巯基和二硫键测定

参照罗明江的方法，略作修改，方法如下：

称取 5 份面团样品，每份 75 mg，加 4.7 g 盐酸胍，然后用缓冲液定容至 10 mL。对照组不加任何添加剂。

测定巯基时，取 1 mL 面团溶液上清液加 4 mL 脲-酸胍溶液和 0.05 mL Ellman's 试剂，于 412 nm 处测吸光度值。

测定二硫键时，取 1 mL 面团溶液上清液，加 0.05 mL 巯基乙醇和 4 mL 脲-盐酸胍溶液，于 25 ℃保温 1 h，然后加入 10 mL 2%三氯乙酸，继续于 25 ℃下恒温 1 h，5000 r/min 离心 10 min，用 5 mL 12%三氯乙酸清洗沉淀物二次，将沉淀物溶于 10 mL 8 mol/L 脲中，加 0.04 mL Ellman's 试剂测 412 nm 处的吸光度值。

按下列公式计算游离巯基、总巯基和二硫键含量。

$$SH(\mu mol/g)=\frac{73.53A_{412}D}{C}$$

$$SS(\mu mol/g)=\frac{N_2-N_1}{2}$$

注：A_{412}：412 nm 处的吸光值；D：稀释因子，5.02（表面-SH），10（总-SH）；C：样品浓度（mg(干物)/mL）；N_1：还原前巯基数；N_2：还原后巯基数。

1.3.5 傅立叶变换红外光谱测定

将制备的面团干燥、磨粉，过 120 目实验筛后，取适量与溴化钾按 1:100 质量比混合压片，做全波段扫描测定，以溴化钾做空白。

实验参数：辨率为 4.0 cm^{-1}，扫描波数范围为 4000~400 cm^{-1}。

采用 Peakfit4.12 分峰分析软件对傅立叶变换红外光谱去卷积，进行二阶导数拟合，得到子峰数目在 6~7 之间，残差（r^2）大于 0.96。确认峰位归属，计算各子峰面积的相对百分含量。

1.4 数据处理

用 Excel 及 SPSS 16.0 软件进行数据分析，用 Origin 8.5 作图。

2 结果与分析

2.1 添加葡萄糖氧化酶对面团中水分分布的影响

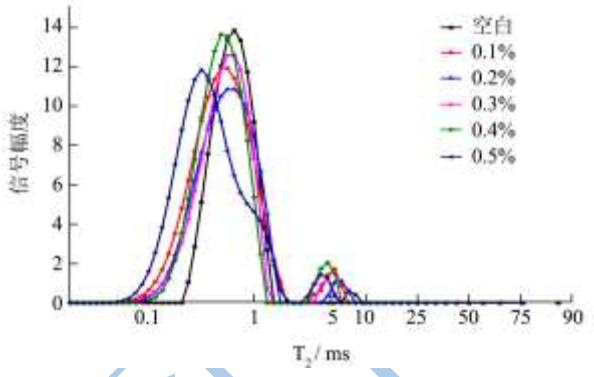


图 1 添加葡萄糖氧化酶面团的 T_2 弛豫时间反演图

Fig.1 Inversion results of T_2 relaxation time of dough with addition of glucose oxidase

表 1 葡萄糖氧化酶对面团时间 T_2 的影响

Table 1 Effect of glucose oxidase on the T_2 relaxation time of dough

添加量/%	T_{21}/ms	T_{22}/ms
0.0	0.68±0.77^a	12.46±0.15^a
0.1	0.66±0.68^a	6.93±0.84^b
0.2	0.62±0.24^a	5.87±0.95^c
0.3	0.57±0.88^b	4.55±0.32^d
0.4	0.47±0.97^c	4.13±0.16^d
0.5	0.53±0.89^b	4.47±0.26^d

注：同一列不同字母表示差异性显著，显著水平 $p<0.05$。

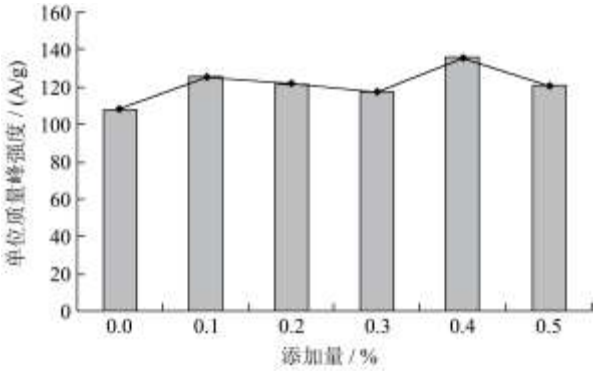


图 2 不同浓度梯度下单位质量峰强度

Fig.2 Peak intensity of unit mass with different concentration gradients

实验采用 CPMG 序列和 T_2 反演软件，获得面团体系中水分的自旋-自旋弛豫时间 T_2 数据。在相同的条件下，用核磁共振仪测定样品得到的 T_2 分为两种：T_{21} 和 T_{22}。由此可知在面筋充分形成时面团中存在的水分主要是结合水，T_{21} 表示深层结合水，主要是与蛋白质，淀粉等大分子的紧密结合的水分；T_{22} 表示半结合水，此部分水被蛋白质网络结构包裹，并存在于淀粉等大分子颗粒间隙，流动性较大[10]。所以 T_2 值越低，表示水分的自由度越低，结合越牢靠，面团持水性越好。图 1 为不同葡萄糖氧化酶添加量的面团 T_2 弛豫时间反演图，由图谱可见，面团的核磁衰减信号被拟合为 2 个峰，其中 0~3 ms（T_{21}）的峰为主峰，其信号达总信号的 80%以上，该峰代表面团体系内存在的结合水，是面团中水分的主要存在形式；3~10 ms（T_{22}）代表面团体系外的半结合水，含有一定的自由水。且与空白相比，添加葡萄糖氧化酶面团的 T_{21} 峰均向左偏移并展宽变平缓。由表 1 可知，T_{21} 和 T_{22} 明显减小，且随着添加量的增大，T_{21} 与 T_{22} 呈现出先减小后增大的趋势。同时，单位质量的峰强度也增大了（图 2 所示）。添加不同数量的葡萄糖氧化酶，面团中水分与大分子物质的结合更为紧密，水分子流动性变弱，T_2 时间减小。在 0~0.4%范围时，T_{21}、T_{22} 与葡萄糖氧化酶的添加量成反比，当添加量为 0.4%时，T_{21}、T_{22} 的测定值最小。

这是因为葡萄糖氧化酶作用的活性部分，可作用于面筋蛋白和面团的水溶性部分：首先葡萄糖氧化酶将面团中葡萄糖氧化为葡萄糖酸，使面团中羧基的数量增大，羧基（-COOH）可与水分子形成氢键，促进水分子的结合作用；其次，葡萄糖氧化酶催化后产生的 H_2O_2，作用于面团的水溶性部分，促进水溶性戊聚糖的阿魏酸活性双键与蛋白质、氨基酸残基发生交联，形成蛋白多糖复合大分子，进而使水溶性部分相对粘度增大，这在一定程度上增加了面团的胶凝性，进而

引起面制品内部水分分布状态的改变。这与林向阳等利用核磁共振技术研究添加剂对面团持水性的影响的结论相一致，在面筋网络形成和完善阶段水分与大分子物质结合最为明显，其中除了淀粉颗粒可吸水外，面粉中还有其他水溶性物质，如水溶性戊糖等也会对水分迁移产生影响。

2.2 添加葡萄糖氧化酶对面团热力学性质的影响

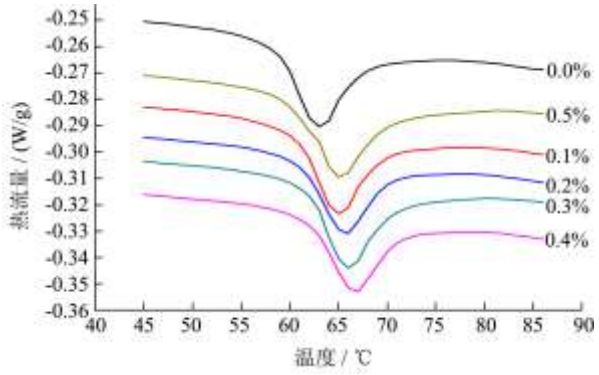


图 3 在 60 ℃~70 ℃温度范围内不同葡萄糖氧化酶添加量面团的 DSC 图谱

Fig.3 DSC curves of different amounts of glucose oxidase added in wheat dough in a temperature range of 60 ℃~70 ℃

表 2 葡萄糖氧化酶对面团糊化温度和热焓值的影响

Table 2 Effect of glucose oxidase on the gelatinization temperatures and enthalpy of wheat dough

添加量/%	起始温度/℃	峰值温度/℃	结束温度/℃	热焓值/(J/g)
0.0	54.99±1.22^{d}	64.79±1.01^{c}	69.18±0.23^{d}	6.56±0.09^{a}
0.1	58.61±1.05^{c}	66.17±1.14^{b}	70.67±0.17^{c}	4.34±0.14^{c}
0.2	61.18±0.98^{b}	66.22±1.23^{b}	70.20±0.29^{c}	2.09±0.38^{d}
0.3	61.32±1.49^{b}	66.34±0.77^{b}	74.52±1.31^{a}	2.64±0.97^{d}
0.4	61.98±0.56^{a}	67.35±0.86^{a}	74.47±0.58^{a}	2.45±1.08^{d}
0.5	60.79±0.44^{b}	67.28±0.63^{a}	72.06±0.81^{b}	5.23±0.55^{b}

注：同一列不同字母表示差异性显著，显著水平 $p<0.05$。

图 3 显示，在 60 ℃~70 ℃温度范围内，不同添加量的 DSC 图谱中均出现了一个大小不同的吸热峰，这表明在加热过程中伴随有晶体的崩解和玻璃化的转变，即为面团的糊化温度。由表 2 可知，添加量在 0~0.4%范围中，随着添加量的增加，糊化的起始温度、峰值温度和结束温度显著升高（$p<0.05$），热焓值显著降低（$p<0.05$）。可能因为葡萄糖氧化酶将葡萄糖氧化为葡萄糖酸，使面团中羧基（-COOH）的数量增大，这在一定程度上增加了面团中水溶性物质的数量。由于水溶性物质可与面粉体系中的淀粉竞争水导致淀粉吸收的自由水减小，使其糊化温度升高、热焓值减小。另外，葡萄糖氧化酶催化反应后的活性物质 H_2O_2 可与面团水溶性物质发生凝胶化作用，增大淀粉热稳定性的同时阻碍了淀粉的糊化，使得淀粉的糊化温度升高。这与 Zhou GuangYu[11]和周国燕等的研究结果相符合，其研究表明糊化过程中糊化温度面团中自由水含量正相关。添加葡萄糖氧化酶能明显降低面团中自由水含量，且当添加量大于 0.4%时，起始温度、峰值温度和结束温度有所降低，热焓值升高，这可能是因为添加量过大，造成淀粉无定形区被破坏，淀粉稳定降低。

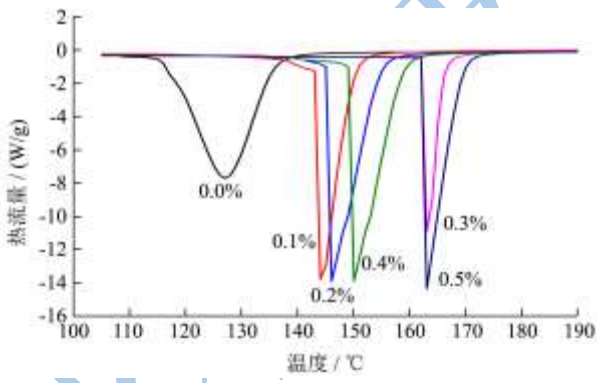


图 4 在 100 ℃~200 ℃温度范围内不同葡萄糖氧化酶添加量面团的 DSC 图谱

Fig.4 DSC curves of different amounts of glucose oxidase added in wheat dough under a temperature range of 100 ℃~200 ℃

另外，如图 4，在 100 ℃~200 ℃温度范围内，不同添加量的 DSC 图谱中也发现了大小不同的吸热峰。与空白相比，吸热峰值温度升高，说明葡萄糖氧化酶对面团结构具有很好的改良作用，在一定范围内可增强面团体系的热稳定性。在此温度范围内出现的峰值可能是面团中的直链或支链淀粉在高温下发生裂解，另外面团中含有的糖类物质在高温下发生美拉德或焦糖化反应，使糖类发生脱水与降解，从而引起面团体出现吸热峰值和热焓值的改变。也有研究显示，在此温度下产生的吸热峰，可能是淀粉-脂质复合物的峰值[12]。但由于面团是一种复杂的混合体系，吸热峰值温度的出现可能是样品中各个成分的共同作用，具体原因有待进一步的研究。

2.3 添加葡萄糖氧化酶对面团中巯基和二硫键的影响

由表 3 和图 5 可看出，添加葡萄糖氧化酶使面团中游离-SH 含量明显降低，S-S 含量增大，说明葡萄糖氧化酶的氧化作用可使面团中的-SH 部分转化为 S-S。且在一定范围内，随着添加量的增大，其氧化作用增强，促使更多的-SH 的转化为 S-S，其中添加量为 0.4%

时，-SH 含量最小，二硫键含量最大。其原因是葡萄糖氧化酶催化作用后产生的 H_2O_2 具有很强的氧化性，能使面团中半胱氨酸的-SH 氧化形成 S-S，S-S 可使更多的蛋白质分子结合成大分子网络结构骨架，并把淀粉、脂肪、酪类等颗粒填在其中，增大了面筋蛋白质的分子量，进而可以增强面筋蛋白网络结构强度。另外，由于转化的二硫键的构型不同，会引起的两个半胱氨酸残基所在肽段的相对构象改变，从而使面筋蛋白的高级结构改变，影响面团及其制品的品质。另外，添加葡萄糖氧化酶后面团中总巯基与空白相比略有增大，但各个浓度下总巯基差异性不显著（$p<0.05$），说明总巯基含量基本不变，这可能是因为葡萄糖氧化酶将葡萄糖氧化为葡萄糖酸使面团体系的亲水性增强，活性羟基有自由基清除能力，会部分阻止蛋白质的自由基累积这与自由基亲核作用机理有关使巯基含量增多。

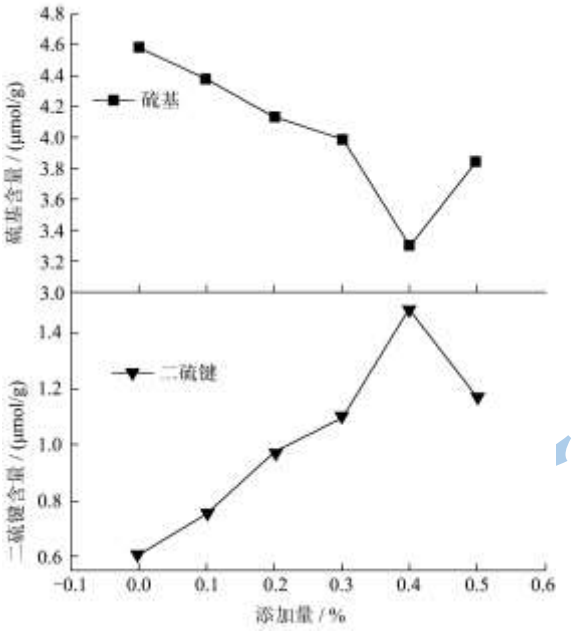


图 5 面团中巯基和二硫键的变化趋势

Fig.5 Trend of -SH and S-S in the dough

2.4 傅立叶变换红外光谱分析

表 3 葡萄糖氧化酶对面团中巯基和二硫键的影响

Table 3 Effect of glucose oxidase on the contents of sulfhydryl and disulfide bonds of the dough

添加量/%	游离-SH A_{412}	游离-SH /(μmol/g)	总-SH A_{412}	总-SH /(μmol/g)	S-S /(μmol/g)
0.0	0.093±0.003^a	4.577±0.28^a	0.059±0.001^b	5.784±0.19^b	0.604±0.08^c
0.1	0.089±0.001^b	4.380±0.16^b	0.060±0.003^a	5.882±0.10^b	0.751±0.11^c
0.2	0.084±0.005^c	4.134±0.09^c	0.062±0.002^a	6.078±0.25^a	0.972±0.07^b
0.3	0.081±0.007^c	3.987±0.17^d	0.063±0.003^a	6.176±0.11^a	1.094±0.16^b
0.4	0.067±0.005^e	3.297±0.11^e	0.064±0.009^a	6.275±0.19^a	1.439±0.09^a
0.5	0.078±0.004^d	3.839±0.18^d	0.063±0.005^a	6.177±0.15^a	1.169±0.12^b

注：同一列不同字母表示差异性显著，显著水平 $p<0.05$。

2.4.1 红外指纹区（1200～850 cm^{-1}）光谱分析

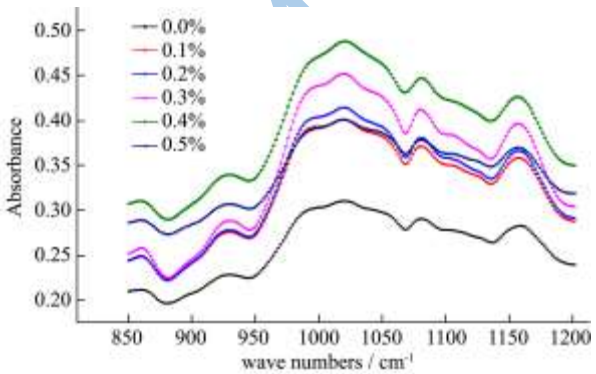


图 6 在 1200~850 cm^{-1} 范围内面条的红外光谱图

Fig.6 FT-IR spectra of noodles in the range of 1200~850 cm^{-1}

在 1200~850cm^{-1} 的范围内，也就是所谓的指纹区，各碳水化合物都有很强的特征吸收。由图 6 可明显看到，在 1017、1020、1024、1031、1028、1025 cm^{-1} 附近具有强的吸收峰，此处的吸收峰为 C-O-C 的伸缩振动和 C-C、C-H 的骨架振动；而在 1080 cm^{-1} 附近的振动则是 C-O 的伸缩振动和 C-C 的骨架振动的复合表现[13]。且随着葡萄糖氧化酶添加量的增大，吸收峰的强度变大，即 C-O-的伸缩振动和 C-C、C-H 的骨架振动加强。

这可能与葡萄糖氧化酶氧化葡萄糖生成-COOH 有关，且催化产生的活性物质 H_2O_2 可与面团中可溶性糖类发生作用也影响到 C-C、C-H 的骨架振动，这与前面探讨的葡萄糖氧化酶能间接影响面团中可溶性物质，从而影响面团的糊化温度和面团中水分分布的结论相一致。

2.4.2 酰胺 I 带（1700~1600 cm^{-1}）光谱分析

蛋白质中与二级结构有关的 C=O、C-N 和 N-H 的不同振动方式在多个波段对红外有所吸收，其中酰胺 I 带的理论研究较成熟，常被用来指认蛋白质的二级结构。蛋白质二级结构中的 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无

序结构在酰胺 I 带都有各自特殊的吸收频率，利用此吸收带并结合去卷积和曲线拟合处理可以用来研究蛋白质二级结构的相对含量。图 7 和图 8 分别为添加葡萄糖氧化酶面条酰胺 I 带红外光谱图和去卷积图谱。

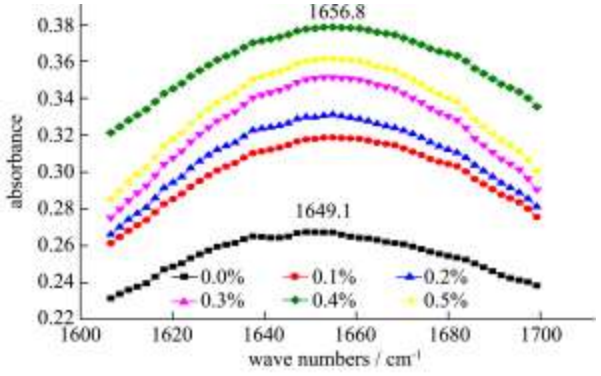
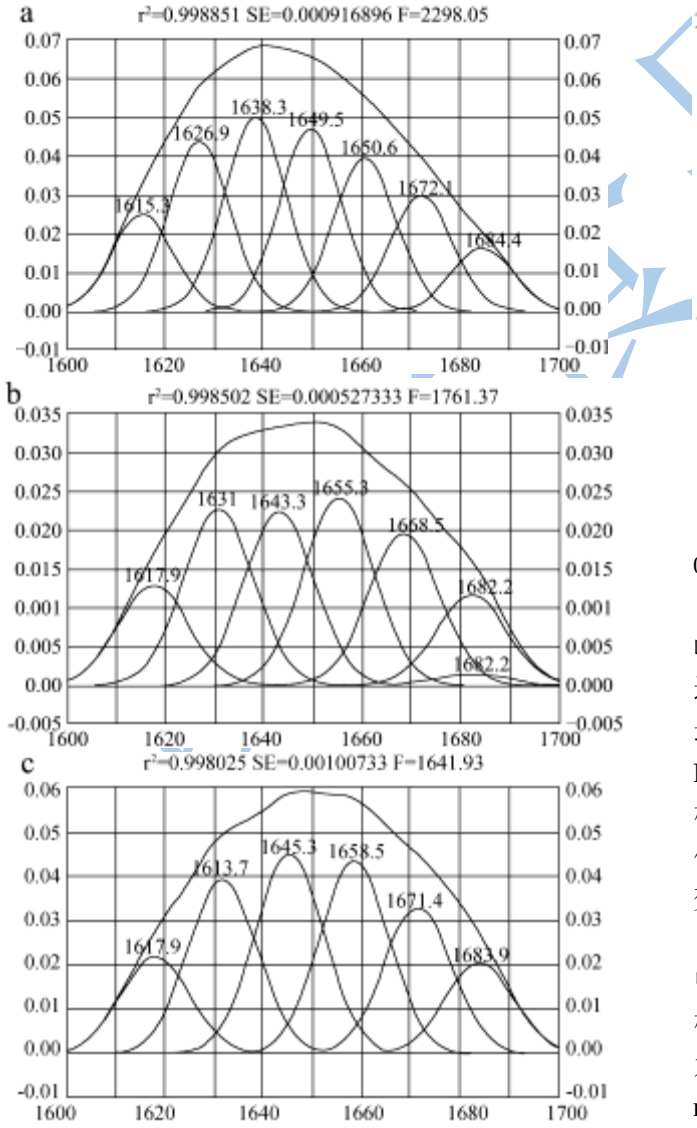


图 7 酰胺 I 带红外光谱图

Fig.7 FT-IR spectra of amide I bands

由酰胺 I 带图谱（图 7）可知，添加葡萄糖氧化酶峰位向高波数移动约 6 cm^{-1}，且葡萄糖氧化酶添加量为 0.4%时，吸收强度最大。



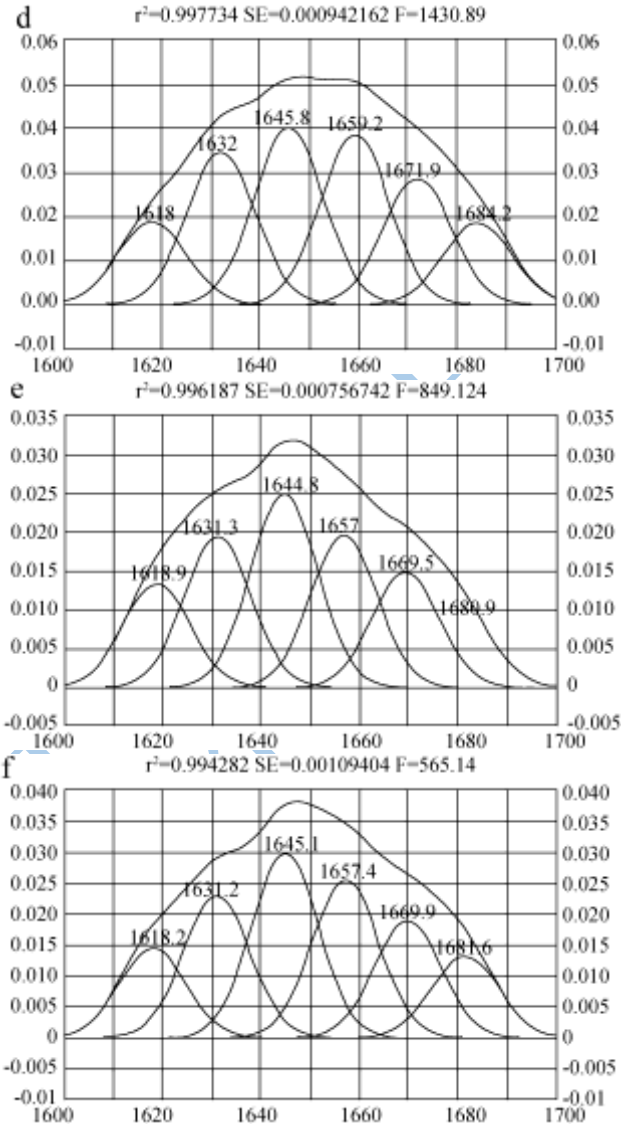


图 8 不同添加量葡萄糖氧化酶面团去卷积图谱

Fig.8 Stacked plot of deconvoluted infrared spectra of dough with different amounts of glucose oxidase added

注：a: 0.0%, b: 0.1%, c: 0.2%, d: 0.3%, e: 0.4%, f: 0.5%。

由图 8，添加葡萄糖氧化酶后面团中蛋白质特征峰的峰个数（6~7 个）、位置和峰面积均发生了变化。这是因为维持蛋白质二级结构的作用力有多种，其中最重要的是氢键，不同二级结构的氢键强度不同，而 FT-IR 光谱图的酰胺 I 带对羰基的几何振动和氢键结构都非常敏感[14]。所以当蛋白质二级结构发生相应变化，反映在 FT-IR 谱上就是谱的形状和强度发生了改变。

根据最新蛋白质二级结构认证研究[15]，现对实验中对酰胺 I 带（1600~1700 cm^{-1}）各子峰位置及二级结构的归属见表 4。由表 4 可知，面条蛋白质二级结构分为 β_1（β-折叠片层，反向平行）、β（分子内 β-折叠）、r（无规则卷曲）、α（α-螺旋）和 t（β-转角）这五种

特征峰，根据实验数据计算特征峰即蛋白质二级结构百分含量，见表 5。

表 4 酰胺 I 带各波数蛋白质二级结构指认

Table 4 Assignment of deconvoluted amide I bands in the FT-IR spectrum of protein

波数/cm^{-1}	结构名称	结构特征
1613~1622	β_1	β-折叠片层，反向平行，分子间强相互作用氢键
1625~1638	β	分子内 β-折叠
1640~1648	r	无序结构(C=O 与水形成氢键)
1650~1659	α	α-螺旋
1666~1677	t	β-转角
1680~1686	β_2	分子间非平面弱氢键（偶极子转换）

由表 5 可看出，添加葡萄糖氧化酶使蛋白质的二级结构发生变化主要体现在 β_1、β、r、α、和 t 含量的变化，其中添加量在 0~0.4%时，随着添加量的增大 β_1、β、α、r、和 t 含量均增大，当添加量增加到 0.5%时含量又降低。

葡萄糖氧化酶使面团体系中-COOH 数量增加，且氢离子活跃性增强，能够和蛋白质多肽链的有关原子或者基团形成氢键，增强了蛋白质间的氢键作用。β_1 和 β 都与氢键的作用有关，其中 β_1 是通过亲水侧链的氢键排列形成的片层结构，氢键作用的加强使 β_1 更容易形成。由于体系中亲水基团的增多，与水分子间氢键的形成使水分结合状态变得紧密，使得 C=O 与水形成氢键也加强，进而蛋白质无规则卷曲增加。另外，葡萄糖氧化酶将面筋蛋白中的巯基（-SH）氧化形成二硫键（S-S），增强了面筋蛋白的相互作用，改变了蛋白质的结构，这种变化使 α 和 t 增大。

表 5 不同葡萄糖氧化酶含量的面团中蛋白质二级结构的变化

Table 5 Changes of protein secondary structure in the dough with different amounts of glucose oxidase

添加量/%	β_1/%	β/%	r/%	α/%	t/%	β_2/%
0.0	9.84±0.04^{d}	17.38±0.13^{d}	18.73±0.08^{e}	18.83±0.03^{d}	11.88±0.13^{e}	6.44±0.33^{d}
0.1	10.51±0.04^{c}	19.22±0.08^{c}	19.57±0.04^{d}	21.13±0.04^{b}	14.64±0.06^{d}	11.22±0.14^{a}
0.2	10.77±0.11^{c}	19.40±0.15^{b}	22.21±0.14^{c}	21.48±0.08^{b}	15.96±0.11^{c}	10.02±0.21^{b}
0.3	11.15±0.06^{b}	19.48±0.07^{b}	22.49±0.02^{c}	21.53±0.09^{b}	16.12±0.16^{b}	10.25±0.09^{b}
0.4	13.15±0.08^{a}	19.82±0.12^{a}	24.65±0.07^{a}	23.40±0.06^{a}	17.12±0.05^{a}	8.99±0.18^{c}
0.5	11.60±0.04^{b}	18.42±0.09^{d}	23.92±0.09^{b}	20.43±0.04^{c}	15.13±0.17^{c}	10.52±0.14^{b}

注：同一列不同字母表示差异性显著，显著水平 $p<0.05$。

2.5 实验各主要指标的相关性分析

表 6 葡萄糖氧化酶添加量及实验主要参数相关性

Table 6 Correlation of glucose oxidase dose and main experimental parameters

	添加量	T_{21}	T_{22}	T_p	ΔH	-SH	S-S	β	α	t	r
添加量	1	-.903*	-.843*	.886*	-.509	-.755	.880*	.420	.537	.703	.944**
T_{21}		1	.749	-.901*	.501	.805	-.915*	-.489	-.695	-.739	-.951**
T_{22}			1	-.903*	.871*	.891*	-.815*	-.814*	-.801	-.937**	-.861*
T_p				1	-.704	-.817	.886*	.703	.829*	.868*	.915*
ΔH					1	-.803	-.835	-.965**	-.879*	-.952**	-.656
-SH						1	-.838*	-.783	-.81	-.930**	-.901*
S-S							1	.768	.903*	.902*	.892*
β								1	.941**	.931**	.579
α									1	.939**	.712
t										1	.834*
r											1

注：*为 $p<0.05$ 显著水平，**为 $p<0.01$ 极显著水平。

葡萄糖氧化酶使面团水分分布状态、热力学特性、巯基和二硫键数量及蛋白质二级结构含量均发生了不同程度的变化。现对实验的主要评价指标建立相关性，分析葡萄糖氧化酶添加量、热力学特及 T_2 时间等评价指标之间的相互关系，相关性分析如下表 6。

由表 6 可知，葡萄糖氧化酶的添加量能显著影响

面团中的水分分布、面团热力学特性和蛋白质二级结构，且添加量与 T_{21}、T_{22} 具有显著负相关（$p<0.05$），与 T_p、S-S 具有显著正相关（$p<0.05$），且对 r 具有极显著正相关（$p<0.01$），说明适量的葡萄糖氧化酶能使面团具有更良好性质；T_{21} 和 T_{22} 与面团 T_p 和 S-S 含量均具有显著负相关（$p<0.05$），其中 T_{22} 对面团的热力学特性和蛋白质二级结构影响显著，与ΔH 和-SH 含量呈显著正相关（$p<0.05$），与 S-S、β、r 和 t 呈显著负相关（$p<0.05$），说明面团中结合水的增加，加强了面团的热稳定性，并在一定程度上影响蛋白质的结构。T_p 与 S-S、α 和 t 具有显著正相关（$p<0.05$），可以看出，适当提高面团糊化温度可以促进二硫键的形成和蛋白质二级结构的稳定；-SH 与 S-S 显著负相关（$p<0.05$）。

3 结论

3.1 添加葡萄糖氧化酶使面团中水分结合更紧密，T_2 减小；增加面团中 S-S 含量，使面筋蛋白网络结构加强，提高面团体系的稳定性，显著提高面团的糊化温度，增强面粉的热稳定性。FT-IR 分析表明，葡萄糖氧化酶可造成指纹区碳水化合物 C-O-的伸缩振动和 C-C、C-H 骨架的振动，从而影响面团的糊化特性和面团的水分分布；蛋白质二级结构中的 β、$β_1$、α 和 β-转角 t 含量升高，使蛋白质组分交联度增加，蛋白质分子内和分子间相互作用力增强，提高了蛋白质稳定性。

3.2 各主要指标的相关性分析结果表明：T_{21} 和 T_{22} 对面团的热稳定性影响显著，T_2 时间越小则面团稳定性越强；T_{21}、T_{22} 与蛋白质无规则结构具有显著负相关，即面团中 C=O 与水形成的氢键数目越多，水分子的结合程度就越紧密；面团的热学特性对蛋白质二级结构中的，其中面团 T_p 与 α、t 和 r 具有显著正相关，ΔH 与 β、α 和 t 具有显著负相关；S-S 含量与 α、t 和 r 具有显著正相关，即 S-S 数量增多，提高了蛋白质稳定性。

参考文献

[1] Steffolani M E, Ribotta P D, Perez G T, et al. Effect of glucose oxidase, transglutaminase, and pentosanase on wheat proteins: relationship with dough properties and bread-making quality [J]. Journal of Cereal Science, 2010, 51(3): 366-373

[2] Schooneveld-Bergmans M E F, Dignum M J W, Grabber J H, et al. Studies on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans from wheat flour and wheat bran [J]. Carbohydrate Polymers, 1999, 38(4): 309-317

[3] Neukom H, Markwalder H U. Oxidative gelation of wheat flour pentosans: a new way of cross-linking polymers [J]. Cereal Foods World, 1978, 23: 374-376

[4] 袁永利,袁利娟,高晴.葡萄糖氧化酶和谷氨酰胺转胺酶在面制品中应用[J].粮食与油脂,2007,2:15-17
YUAN Yong-li, YUAN Li-juan, GAO Qing. Application of glucose oxidase and transglutaminase in flour products [J]. Journal of Cereals and Oils, 2007 ,2: 15-17

[5] 刘建新,孙艳玲.酶制剂对面团流变学特性的影响[J].中国食品添加剂,2008,3:148-150
LIU Jian-xin, SUN Yan-ling, LI Fang, et al. The effect of enzyme on dough rheology property [J]. China Food Additives, 2008, 3: 148-150

[6] 贾英民,田益玲,李慧静,等.面粉中添加葡萄糖氧化酶后巯基变化的研究[J].中国食品学报,2006,6(5):69-71
JIA Ying-ming, TIAN Yi-ling, LI Hui-jing, et al. Studies on the sulfhydryl group chang in flour added glucose oxidase [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2006, 6(5): 69-71

[7] 林向阳,张宏,林玲,等.利用核磁共振技术研究添加剂对面团持水性的影响[J].食品科学,2008,29(10):353-356
LIN Xiang-yang, ZHANG Hong, LI Ling, et al. Study of effects of additives on water holding capability of wheat dough by using NMR and MRI [J]. Food Science, 2008, 29(10): 353-356

[8] 林向阳,陈卫江,何承云,等.核磁共振及其成像技术在面团形成过程中的研究[J].中国粮油学报,2006,21(6):163-167
LIN Xiang-yang, CHEN Wei-jiang, HE Cheng-yun, et al. Study on industrial dough formation by using NMR and MRI technique [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2006, 21(6): 163-167

[9] Doona C J, Baik M Y. Molecular mobility in model dough systems studied by time-domain nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. Journal of Cereal Science, 2007, 45(3): 257-262

[10] Bosmans G M, Lagrain B, Deleu L J, et al. Assignments of proton populations in dough and bread using NMR relaxometry of starch, gluten, and flour model systems [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(21): 5461-5470

[11] Zhou Y G, Li D, Wang L J, et al. Effect of water content on thermal behaviors of common buckwheat flour and starch [J]. Journal of Food Engineering, 2009, 93(2): 242-248

[12] 黄强,王婵,罗发兴,等.玉米淀粉的热力学性质与消化性[J].华南理工大学学报:自然科学版,2011,39(9):7-11
HUANG Qiang, WANG Chan, LUO Fa-xing, et al. Thermodynamic property and digestibility of corn starches [J]. Journal of South China University of Technology (Natural

Science Edition), 2011, 39(9): 7-11

[13] Robertson G H, Gregorski K S, Cao T K. Changes in secondary protein structures during mixing development of high absorption (90%) flour and water mixtures [J]. Cereal Chemistry, 2006, 83(2): 136-142

[14] 卢雁,张玮玮,王公轲.FT-IR 用于变性蛋白质二级结构的研究进展[J].光谱学与光谱分析,2008,28(1):88-93

LU Yan, ZHANG Wei-wei, WANG Gong-ke. Progress in study of secondary structure of denaturized protein by FTIR [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2008, 28(1): 88-93

[15] Rocha L F O. Toward a better understanding of structural divergences in proteins using different secondary structure assignment methods [J]. Journal of Molecular Structure, 2014, 1063: 242-250

现代食品科技