

# 干热条件下大豆分离蛋白与核糖的美拉德反应研究

徐真真, 黄国清, 肖军霞

(青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109)

**摘要:** 美拉德反应可显著改善大豆分离蛋白(SPI)的功能性质, 本文研究了干热条件下 SPI 与核糖发生美拉德反应的可能性, 即将 SPI 和核糖粉末直接混合后, 以 290 nm 下的吸光度值和色度值 L 为指标, 研究反应温度、混合比例、相对湿度及反应时间对两者美拉德反应的影响, 并对美拉德反应产物的热性能和流变学性质进行了表征。结果表明, 在干热条件下 SPI 与核糖极易发生美拉德反应, 且最适条件为反应温度 80 °C、SPI: 核糖混合比例 1:1 (m/m)、相对湿度 26.10% 和反应时间 6 h。DSC 分析表明 SPI 和核糖通过美拉德反应产生了易分解的中间产物, 流变学研究则说明生成了大分子产物, 使得美拉德反应产物在溶液中的黏度显著增加、弹性特征明显增强。由于干热法与广泛使用的湿热法相比工艺更加简单可行, 因此在 SPI 的改性中具有很强的实际应用价值。

**关键词:** SPI; 核糖; 干热法; 美拉德反应

文章编号: 1673-9078(2015)7-248-252

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.7.039

## Maillard Reaction of Soybean Protein Isolate with Ribose during Dry Heating

XU Zhen-zhen, HUANG Guo-qing, XIAO Jun-xia

(College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** The Maillard reaction has been reported to be capable of improving the functional properties of soybean protein isolate (SPI). This work attempted to explore the possibility of the Maillard reaction between SPI and ribose under the dry heating circumstance, and the effects of temperature, SPI/ribose mixing ratio, relative humidity, and reaction duration were investigated in terms of absorbance at 290 nm and L values. In addition, thermal behavior and rheological properties of the resultant products of the Maillard reaction were characterized as well. The results indicated that the reaction occurred readily using dry heat and the optimum conditions were: temperature 80 °C, SPI to ribose ratio 1:1 (m/m), relative humidity 26.10% and reaction duration 6 h. Differential scanning calorimetry (DSC) analyses confirmed that labile intermediates were produced during the reaction. Furthermore, rheological measurements indicated that the reaction endowed the products with enhanced elastic properties and increased viscosity, implying the formation of high-molecular weight products. Compared with the widely used wet heating method, the dry heating method was simpler and more feasible, thus showing great potential for modification of SPI.

**Key words:** soybean protein isolate; ribose; dry heating method; Maillard reaction

大豆分离蛋白(soybean protein isolate, SPI)作为重要的植物蛋白之一,已在食品工业中获得了广泛应用。但是SPI的溶解性和乳化性等功能性质较差,这在一定程度上限制了其应用。因此,对SPI进行改性已成为国内外研究的重点。已报道的SPI改性方法主要有物理改性、化学改性和酶法改性。物理改性主要改变蛋白质分子间的聚集方式和高级结构<sup>[1]</sup>,常见的

收稿日期: 2014-10-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31101319); 青岛农业大学高层次人才启动基金(631415)

作者简介: 徐真真(1992-),女,硕士研究生,研究方向: 食品蛋白质资源开发与利用

通讯作者: 肖军霞(1977-),女,博士,教授,研究方向: 食品组分稳态化技术

方法有加热及超声和微波处理等<sup>[2]</sup>,这些方法能有效提高SPI的凝胶性、乳化性等功能性质,但成本高、能耗大。化学改性通过化学修饰改变蛋白质的结构、静电荷数量和疏水性<sup>[3]</sup>,常见的修饰方法包括酰化<sup>[4]</sup>、磷酸化<sup>[5]</sup>等,这些改性方式能够有效改善SPI的溶解性、起泡性及流变特性等功能性质,但存在化学试剂残留等风险。酶法改性通过蛋白酶的水解作用将蛋白质降解成小分子,该方法过程温和,且可显著提高SPI的溶解性、乳化性及起泡性<sup>[6]</sup>,但水解产物有一定的苦味或豆腥味<sup>[7]</sup>,这在一定程度上影响了SPI最终的感官质量。

由于美拉德反应可引起蛋白质的糖基化,因此已广泛应用于蛋白质的改性中<sup>[8]</sup>。美拉德反应不需要化学试剂仅加热即可使反应自发进行,极大的避免了化

学试剂残留的问题,是较为理想的一种 SPI 改性方法。目前文献报道的美拉德反应改性方法主要有两种,一种是湿热法,即将 SPI 与还原糖溶解于溶液中,加热使两者发生反应;另一种是半干热法,即将 SPI 与还原糖共同溶解后冻干,然后提供一定的相对湿度和温度使两者发生反应<sup>[9]</sup>。研究表明,这两种改性方法均可显著提高 SPI 的各种功能性质。但是,这两种方法工艺较为繁琐,能源消耗较大,这在很大程度上限制了美拉德反应在 SPI 改性中的实际应用。

为了克服上述两种美拉德反应改性方法存在的问题,本文拟将 SPI 与核糖在粉末状态下混合均匀,然后直接在恒定相对湿度下加热使两者进行美拉德反应,研究各种条件对美拉德反应的影响,并对美拉德反应产物(Maillard reaction product, MRP)的部分性质进行表征。目前关于这种工艺在 SPI 糖基化改性中的应用还鲜有报导。本研究可为推动美拉德反应在 SPI 改性中的实际应用提供理论参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白(SPI, 食品级),青岛天新食品添加剂有限公司;D-核糖(AR),上海蓝季科技发展有限公司;氯化钠(AR),天津市广成化学试剂有限公司;乙酸(AR)、氢氧化钠(AR)、盐酸(AR),莱阳市康德化工有限公司;氯化镁(AR),天津市致远化学试剂有限公司;无水氯化锂(AR),天津市瑞金特化学品有限公司;溴化钠(AR),天津市巴斯夫化工有限公司。

MS104S 分析天平、DSC822 差示扫描量热仪、Delta320 pH 计,梅特勒-托利多仪器公司;302 型电热鼓风干燥箱,中国龙口市先科仪器公司;UV-2000 紫外分光光度计,上海尤尼科仪器有限公司;Konica Minolta 色彩色差计,柯尼卡美能达投资有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 美拉德反应的检测

美拉德反应中间阶段的产物在 290 nm 波长下具有特征性吸收<sup>[10]</sup>。Tian 等<sup>[11]</sup>发现糖基化的 SPI 在酸性条件下的溶解性较好,因此将 SPI-核糖 MRP 以 0.25% 的浓度(*mV*)溶于 pH 4.0 的乙酸溶液,利用分光光度计测定 290 nm 下的吸光度值。

根据 Kato 等<sup>[12]</sup>的研究,美拉德反应末期主要生成类黑精。色差代表不同样品之间颜色的差异,常用 L、a、b 值来表示,L 值表示颜色的黑白值、a 值表示

颜色的绿红值、b 值表示颜色的蓝黄值,类黑精主要表现为黑白差异,所以通过测定产物 L 值的差异来反应美拉德反应的进程。称取不少于 3.00 g 的 MRP 置于 4 cm×4 cm 的真空袋内,用色彩色差计测定样品的 L 值。

#### 1.2.2 美拉德反应条件的优化

##### 1.2.2.1 温度对 SPI 与核糖美拉德反应的影响

称量 SPI 5 份,按 2:1 的重量比加入核糖,于研钵内充分研磨并混合均匀后置于康威氏皿内室中,外室中添加饱和 NaCl 溶液,分别放入 40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 烘箱中(此时相对湿度分别为 74.7±0.7%、74.5±0.9%、74.4±0.9%、74.1±0.9%、73.9±0.9%,差别不大,故视为相对湿度不变),反应 4h。按 1.2.1 方法检测美拉德反应发生的程度。

##### 1.2.2.2 混合比例对 SPI 与核糖美拉德反应的影响

称量 SPI 5 份,按 SPI:核糖质量比 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1 的比例加入核糖,于研钵内充分研磨后置于康威氏皿中,放入 80 °C 烘箱以饱和 NaCl 溶液提供 73.90% 的相对湿度反应 4 h。按 1.2.1 方法检测美拉德反应发生的程度。

##### 1.2.2.3 相对湿度对 SPI 与核糖美拉德反应的影响

称量 SPI 4 份,以 1:1 的比例添加核糖,于研钵内充分研磨后置于康威氏皿中,放入 80 °C 干燥箱中,分别以饱和 LiCl、MgCl<sub>2</sub>、NaBr、NaCl 溶液提供对应 10.5±0.5%、26.1±0.4%、51.4±1.5%、73.9±0.9% 的相对湿度反应 4 h。按 1.2.1 方法检测美拉德反应发生的程度。

##### 1.2.2.4 反应时间对 SPI 与核糖美拉德反应的影响

称量 SPI 5 份,按 1:1 的比例添加核糖,于研钵内充分研磨后置于康威氏皿中,放入 80 °C 烘箱以饱和 MgCl<sub>2</sub> 溶液提供 26.1±0.4% 的相对湿度条件下反应 3、4、5、6、7 h。按 1.2.1 方法检测美拉德反应发生的程度。

#### 1.2.3 SPI-核糖 MRP 的表征

##### 1.2.3.1 SPI-核糖 MRP 的热性能

测定最佳条件下 SPI-核糖 MRP 的热性能,同时将未经处理的 SPI 与核糖按相同的比例混合作为对照。DSC 的分析条件为:温度从 30 °C 升至 300 °C,升温速率为 5 °C/min,保护气为氮气。

##### 1.2.3.2 SPI-核糖 MRP 的流变学性质

将所得 SPI-核糖 MRP 溶解于 pH 4.0 的乙酸溶液中,测定其流变学特性,以未经处理的 SPI 和核糖按相同比例混合后得到的简单混合物作为对照。

在触变性质测定中,分两个区间进行测量,上升测量区间的频率变化范围为 0.3~200 s<sup>-1</sup>;下降测量区

间的频率变化范围为 200~0.3 s<sup>-1</sup>。

频率扫描测定：频率扫描范围在 0~50 Hz 之间，测定 SPI-核糖 MRP 及两者按相同比例混合所得的简单混合物的储能模量 (G') 和损失模量 (G'') 随频率的变化。

### 1.2.4 数据分析

每种样品每次均测定 3 个平行，结果以平均值±标准偏差表示，采用 SPSS17.0 (美国 SPSS 公司) 进行统计分析。组间差异显著性分析采用方差分析 (Analysis of Variance, ANOVA) 中的 Tukey HSD 测试，显著水平小于 0.05 时认为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 美拉德反应条件的优化

#### 2.1.1 温度对 SPI 与核糖美拉德反应的影响

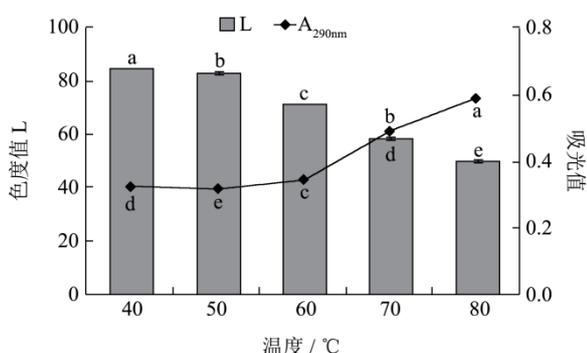


图 1 温度对 SPI-核糖美拉德反应的影响

Fig.1 Effect of temperature on the Maillard reaction between SPI and ribose

注：同一系列数据中不同小写字母表示显著差异，P<0.05，下同。

温度对 SPI 与核糖美拉德反应的影响见图 1。由图 1 可知，随着反应温度的升高，MRP 在 290 nm 下的吸光值随之显著增大，表明 SPI 与核糖之间的美拉德反应程度随着温度的升高而增强；色度值 L 随温度升高而减小，表明 MRP 的颜色逐渐加深，这与吸光值结果一致。Ajandouz<sup>[13]</sup>等人将葡萄糖与牛血清蛋白、葡萄糖和酪蛋白混合物分别从 60 °C 加热到 100 °C 过程中也发现加热混合物的温度越高，紫外吸光度和褐变程度越高。由此可知，随反应温度的升高，美拉德反应逐渐强烈，因此，在后续的实验中反应均在 80 °C 下进行。

#### 2.1.2 混合比例对 SPI 与核糖美拉德反应的影响

混合比例对 SPI 与核糖美拉德反应的影响见图 2。由图 2 可知，混合比例对 SPI-核糖的美拉德反应的进

程有显著影响。当 SPI 与核糖的混合比例为 1:1 时在 290 nm 处的吸光值最大，L 值最小，SPI-核糖 MRP 颜色最深，表明在此混合比例下 SPI 与核糖美拉德反应更充分。因此，在后续的研究中，所有的反应均选择 1:1 的混合比例。

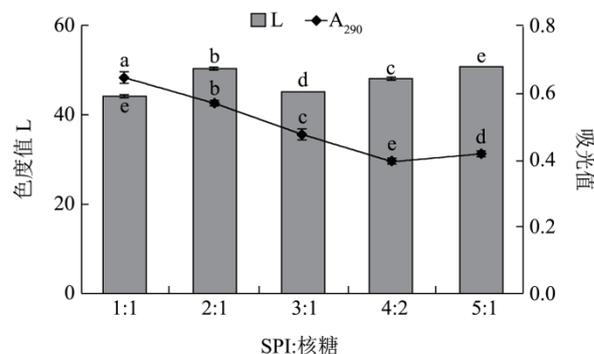


图 2 混合比例对 SPI-核糖美拉德反应的影响

Fig.2 Effect of mixing ratio on the Maillard reaction between SPI and ribose

#### 2.1.3 相对湿度对 SPI 与木糖美拉德反应的影响

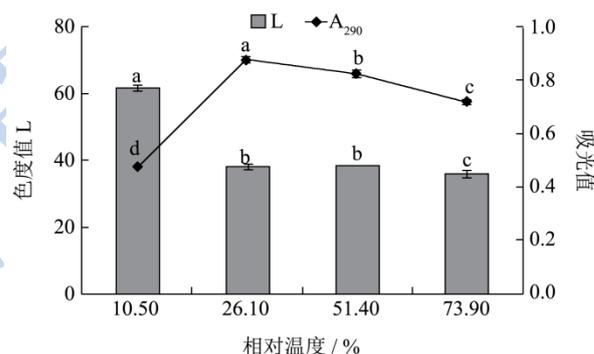


图 3 相对湿度对 SPI-核糖美拉德反应的影响

Fig.3 Effect of relative humidity on the Maillard reaction between SPI and ribose

相对湿度对 SPI 与木糖美拉德反应的影响见图 3。由图 3 可知，在相对湿度为 26.10% 时 MRP 在 290 nm 下的吸光值最大，在相对湿度为 10.50% 时吸光值最小。就 L 值的变化而言，当相对湿度为 10.50% 时，L 值最大，表明在此湿度下不利于 SPI 与核糖美拉德反应的发生，这与吸光值的测定结果一致；相对湿度为 73.90% 时 L 值最小，表明此湿度下得到的 MRP 颜色最深，但与 26.10% 时的值差异不大，综合考虑比色结果，选择 26.10% 为最佳相对湿度。

#### 2.1.4 反应时间对 SPI 与核糖美拉德反应的影响

反应时间对 SPI 与木糖美拉德反应的影响见图 4。由图 4 可知，随着反应时间的延长，290 nm 下的吸光值逐渐增大，但在 6 h 后不再显著增加；L 值则随着

反应时间的延长持续降低,表明随着反应时间的延长,美拉德反应的程度逐渐加深;但当反应时间延长至 6 h 之后,中间阶段产物的生成处于动态平衡阶段,此时虽然不断有新的中间阶段产物生成,但是同时部分中间阶段产物参与聚合反应生成了最终阶段产物,因此此时 290 nm 处的吸光值不再显著变化,但是 L 值仍然持续减小,MPRs 的颜色持续加深<sup>[14]</sup>。由于利用美拉德反应对蛋白质进行改性时一般需要使反应停留在中间阶段,因此确定 SPI-核糖的最佳反应时间为 6 h。

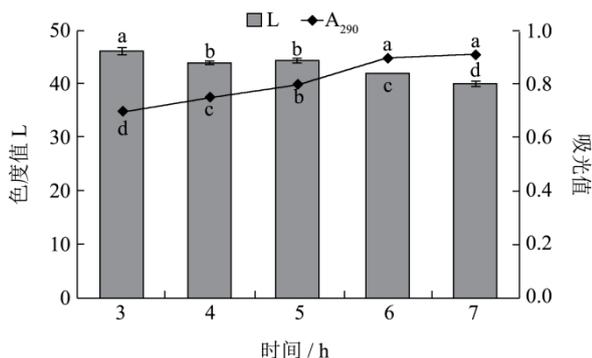


图 4 反应时间对 SPI-核糖美拉德反应的影响

Fig.4 Effect of reaction duration on the Maillard reaction between SPI and ribose

## 2.2 SPI-核糖 MPR 的表征

### 2.2.1 热性能

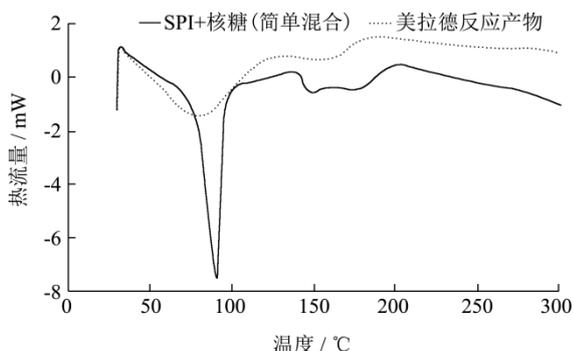


图 5 SPI-核糖 MRP 及两者混合物的 DSC 图谱

Fig.5 DSC patterns of the Maillard reaction product and mixture of SPI and ribose

SPI-核糖 MRP 及两者简单混合物的 DSC 图谱见图 5。由图 5 可知,未经处理的 SPI 与核糖的混合物在 90 °C 附近出现了一个吸热峰,这是由于混合物中水分蒸发导致出现了吸热峰;最适条件下得到的 MRP 出现吸收峰的温度比简单混合物略低,这可能是由于美拉德反应使 SPI 的结构发生了一定的变化,从而使其持水能力有所降低;SPI-核糖 MRP 在 130 °C 及 180 °C 左右出现了第一个与第二个放热峰,但是 SPI 与核糖的简单混合物出现第一与第二个放热峰则分别在 150 °C

及 200 °C 左右,均高于 SPI-核糖 MRP,这表明 SPI 和木糖通过美拉德反应生成了易分解的中间产物,从而使得放热峰提前。

### 2.2.2 SPI-核糖美拉德反应产物的流变性性质

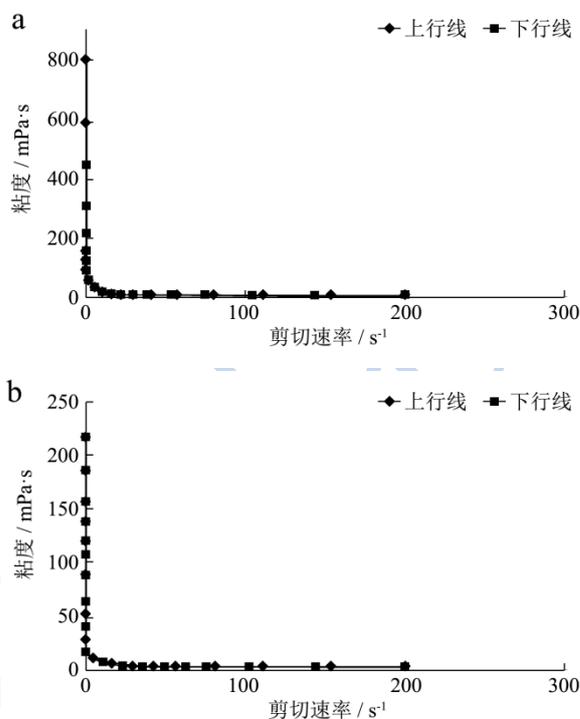


图 6 SPI-核糖 MRP (a) 及两者简单混合物 (b) 的动态黏度曲线

Fig.6 Dynamic viscosity curves of the Maillard reaction product

### (a) and mixture (b) of SPI and ribose

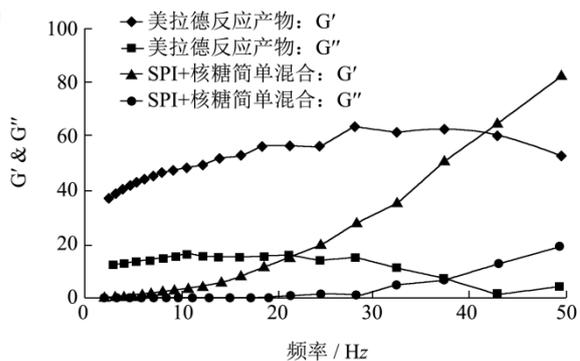


图 7 SPI-核糖 MRP 及两者简单混合物的频率扫描曲线

Fig.7 Frequency sweeping curves of the Maillard reaction product and mixture of SPI and ribose

SPI-核糖 MRP 及两者简单混合物的流变学性质见图 6 和图 7。由图 6 可知, SPI-核糖 MRP 的初始黏度远远高于两者的简单混合物,表明美拉德反应引发了大分子物质的形成,从而使得黏度剧烈增加。由图 7 可知,当扫描频率小于 42 Hz 时, SPI-核糖 MRP 在溶液中的储能模量 ( $G'$ ) 大于 SPI 和核糖简单混合物的模量值,增大扫描频率,简单混合物的  $G'$  继续增大且大于 SPI-核糖 MRP 的模量值; SPI-核糖 MRP 及两

者混合物的损失模量( $G''$ )变化趋势与 $G'$ 趋势基本一致,表明SPI和核糖通过美拉德反应生成了结构更加复杂的分子。这说明,SPI与核糖的美拉德反应可显著改变产物的粘弹性性质。

### 3 结论

本文采用干热法处理SPI与核糖的混合物,研究了反应温度、混合比例、相对湿度及反应时间对两者美拉德反应的影响,同时检测了SPI-核糖MRP的热性能和流变学性质。结果表明,在干热条件下SPI与核糖极易发生美拉德反应,且两者发生反应的最适条件为:反应温度 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,SPI:核糖的混合比例1:1( $m/m$ )、相对湿度26.10%、反应时间6 h。美拉德反应产生了加热易分解的中间产物,且美拉德反应产物在溶液中的弹性特征更加明显,黏度显著增加,表明美拉德反应改变了SPI的部分性质。本文对于推动美拉德反应在SPI改性中的实际应用具有重要参考价值。

### 参考文献

- [1] 王忠江,王晶,李杨.大豆蛋白改性修饰技术研究进展[J].中国食品与营养,2014,1:27-31  
WANG Zhong-jiang, WANG Jing, LI Yang. Research Advancement in the Modification Techniques of Soy Protein [J]. Food and Nutrition in China, 2014, 1: 27-31
- [2] May Rose G, Evelyn M, Bunzo M, et al. Molecular design of seed storage proteins for enhanced food physicochemical properties [J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2011, 2: 59-73
- [3] 陈伟斌.大豆分离蛋白的功能性和改性研究进展[J].粮食加工,2006,4: 67-71  
CHEN Wei-bin. Functions and Study Progress in Modifications of Soy Protein Isolates [J]. Grain Processing, 2006, 4: 67-71
- [4] 赵国华,熊正俊.酰化对大豆蛋白结构和功能性质影响[J].粮食与油脂,2001,9:5-7  
ZHAO Guo-hua, XIONG Zheng-jun. Effects of Acylation on Functionalities and Structure of Soy Protein [J]. Cereals & Oils, 2001, 9: 5-7
- [5] 田少君,李小阳,曾艳菊,等.大豆分离蛋白的磷酸化改性[J].中国粮油学报,2003,18(2): 46-49  
TIAN Shao-jun, LI Xiao-yang, ZENG Yan-ju, et al. The Modification of Soybean Proteins by Phosphorylation [J]. Journal of the Chinese Cereals 2003, 18(2): 46-49
- [6] Chee G, Lai C, Azhar E. Physicochemical properties and microstructures of soy protein isolate gels produced using combined cross-linking treatments of microbial transglutaminase and Maillard cross-linking [J]. Food Research International, 2008, 41(6): 600-605
- [7] 钟振声,陈钰,文锡莲.木瓜蛋白酶与中性蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究[J].现代食品科技,2009,25(3):1039-1041  
ZHONG Zhen-sheng, CHEN Yu, WEN Xi-lian. Hydrolysis of Soybean Protein Isolate by Papain and Neutral Protease [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(3): 1039-1041
- [8] Miralles B, Adolfo MR, Santiago A, et al. The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between  $\beta$ -lactoglobulin and chitosan [J]. Food Chemistry, 2007, (100):1071-1075
- [9] Chevalier F, Hobert J, Popineau Y, et al. Improvement of functional properties of  $\beta$ -Lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar [J]. International Dairy Journal, 2001, 11(3): 145-152
- [10] Chen XM, Kitts DD. Antioxidant activity and chemical properties of crude and fractionated Maillard reaction products derived from four sugar and Maillard reaction model systems [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008, 1126: 220
- [11] Tian SJ, Jie C, Small DM. Enhancement of solubility and emulsifying properties of soy protein isolates by glucose conjugation [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2011, 35(1): 80-95
- [12] Kato Y, Matsuda T, Kato N, et al. Browning and protein polymerization induced by amino carbonyl reaction of ovalbumin with glucose and lactose [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1988, 36(4): 806-809
- [13] Ajandouz E H, Desseaux V, Tazi S, et al. Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelization, protein cross-linking and Maillard reactions in aqueous model systems [J]. Food Chemistry, 2008, 107(3): 1244-1252
- [14] 孙丽平,庄永亮,张莉.酶解小麦蛋白产物-还原糖美拉德反应的光谱研究[J].分析化学,2009,37(9): 1359-1362  
SUN Li-ping, ZHUANG Yong-liang, ZHANG Li. Spectroscopic Studies on Maillard Reaction of Wheat Protein Hydrolysates and Reducing Sugars [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2009, 37(9): 1359-1362