

漆酶催化大米蛋白与阿魏酸交联及其结构和抗氧化活性的变化

贾潇¹, 赵谋明^{1,2}, 贾春晓¹, 滕建文¹, 韦保耀¹, 黄丽¹, 夏宁¹

(1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530004) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文研究了大米蛋白(Rice protein, RP)与阿魏酸(Ferulic acid, FA)的酶法交联及其在水相和乳液中的抗氧化能力, 通过HPLC分析FA的含量以及SDS-PAGE、紫外光谱、红外光谱和扫描电子显微镜分析RP的结构变化。HPLC分析表明FA易被漆酶催化氧化, 且FA的氧化产物与RP的亚基反应, 从而引起大米蛋白分子量的增加; 随着FA浓度的增加, RP的紫外图谱在300~350 nm处的吸收逐渐增加, 交联样品呈现橘黄色, 说明氧化阿魏酸能共价结合大米蛋白; RP与FA经酶法交联后RP二级结构发生变化, α -螺旋和 β -转角含量分别降低了13%与2%, 无规卷曲和 β -折叠含量分别提高了11%与4%, 蛋白的显微结构从聚集变为松散; FA与RP交联产物的清除DPPH自由基能力和清除ABTS自由基能力分别从32.31%增加到71.43%和从3.34%增加到77.61%, FA与RP交联产物可显著降低乳液中氢过氧化值、TBARS值、己醛的含量, 说明交联可有效提高大米蛋白的抗氧化活性。

关键词: 大米蛋白; 阿魏酸; 酶法交联; 抗氧化活性; 油脂氧化

文章编号: 1673-9078(2016)11-98-105

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.11.015

Laccase-mediated Cross-linking of Rice Protein with Ferulic Acid: Changes in Structural Properties and Antioxidant Activity

JIA Xiao¹, ZHAO Mou-ming^{1,2}, JIA Chun-xiao¹, TENG Jian-wen¹, WEI Bao-yao¹, HUANG Li¹, XIA Ning¹

(1. College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The enzymatic cross-linking of rice protein (RP) and ferulic acid (FA) and the antioxidant activity of the resultant product in the aqueous phase and emulsion were studied, and the FA content was investigated by high performance liquid chromatography (HPLC). Changes in the structural properties of RP were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), ultraviolet (UV) spectroscopy, Fourier transformed infrared (FT-IR) spectroscopy, and scanning electron microscopy. HPLC results showed that the FA easily underwent laccase-catalyzed oxidation, and the oxidation product could react with the subunits of RP, resulting in an increase of RP protein molecular weight. With increasing FA concentration, the absorbance band between 300 and 350 nm in the UV/visible spectra of RP gradually increased, and the cross-linked products had an orange-yellow color, indicating that the oxidation products bound covalently to the free amino groups of RP. After the enzymatic cross-linking of RP and FA, the secondary structure of RP changed, the contents of β -turn and α -helix were reduced by 13% and 2%, respectively, the contents of random coil and β -sheet were increased by 11% and 4%, respectively, and the microstructure of RP became loosened from the aggregated state. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radical scavenging abilities of the RP-FA cross-linked product were increased from 32.31% to 71.43% and from 3.34% to 77.61%, respectively, compared to those of RP. RP-FA cross-linked product could significantly reduce the level of hydroperoxide, 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and hexanal in the emulsion, suggesting that cross-linking of RP can effectively enhance the antioxidant activity of RP.

Key words: rice protein; ferulic acid; enzymatic cross-linking; antioxidant activity; oil oxidation

收稿日期: 2015-11-26

基金项目: 广西科技攻关项目(14122006-2); 广西科技攻关项目(14121003-6-1); “广西八桂学者团队项目”及广西高校“广西特色农产品精深加工及安全控制”重点实验室项目资助

作者简介: 贾潇(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 粮食油脂植物蛋白工程

通讯作者: 夏宁(1977-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 粮食油脂植物蛋白工程

漆酶 (Laccase, LAC) 是一种多酚氧化酶, 能结合多个铜离子, 属于铜蓝氧化酶, 漆酶作为一种生物催化剂, 不仅具有高效率的催化效果, 而且其催化的最终产物是水, 因此也是一种绿色催化剂。越来越多的研究发现, 漆酶催化酚酸与蛋白质交联可有效改善蛋白的功能性质和生理活性。Tantoush等^[1]发现漆酶和樱桃酚酸提取物催化 β -乳球蛋白形成交联物, 通过模拟胃肠道实验, 该交联物的胰蛋白酶水解产物较交联前的水解产物的自由基清除活性增加了57%, 并降低消化后乳球蛋白肽的致敏性。Kim等^[2]通过漆酶催化酪蛋白/黄酮类化合物交联后形成的蛋白/黄酮交联物具有更好的抗氧化, 可能归因于酚类具有较强的抑菌作用以及抗氧化性, 从而提高蛋白质的天然属性, 这些产物可以应用到一些抗氧化能力强的医疗、食品与高分子领域。

大米蛋白作为从谷物籽实体中提取出的蛋白质, 具有高生物价、氨基酸组成合理和低过敏性等特点, 但是由于其低的溶解特性以及在乳液体系中抗氧化能力较差, 易引起乳液的分层、絮凝和聚集, 导致油脂的氧化降解^[3]。酚类化合物是一种天然的抗氧化剂, 能够有效预防脂质体系的氧化降解, 它以氢键、疏水相互作用、离子键和共价键等方式与蛋白质相互作用, 从而改善蛋白质的功能特性。阿魏酸作为稻米中含量丰富的酚酸类物质, 具有很强的抗氧化活性, 作为蛋白质的交联剂应用在食品工业中。研究发现阿魏酸/大豆分离蛋白形成的复合物薄膜比蛋白膜具有更好的机械性能以及更高的抗氧化活性, 此外, 氧化的阿魏酸与大豆分离蛋白复合薄膜特性进一步改善^[4]。漆酶催化氧化阿魏酸与酪蛋白的交联, 获得坚实的细小均匀酪蛋白酸钠凝胶网络结构^[5], 并且在乳液界面上漆酶催化酪蛋白和阿魏酸交联, 也能有效的改善酪蛋白酸钠的乳化特性及流变学性质^[6], 这种交联的机制可能是由于氧化阿魏酸与蛋白质分子中的巯基、氨基和亚氨基等发生亲核加成反应, 使多酚和蛋白质之间形成C-N或C-S共价键^[7]。本文旨在利用漆酶催化大米蛋白与阿魏酸交联形成复合物, 研究交联前后蛋白质结构的变化以及大米蛋白/阿魏酸交联物的抗氧化活性, 从而获得含有阿魏酸活性基团的功能性大米蛋白配料。

1 材料与方法

1.1 材料

阿魏酸, 武汉远程共创有限公司, 纯度>98%; 大米蛋白, 实验室自制, 纯度>90%; 玉米油, 南宁百货

超市; 漆酶 (CLEA \geq 0.3 U/mg)、1,1-二苯-2-苦基肼 (DPPH)、偶氮二异丁脒盐酸盐 (AAPH)、奎诺二甲基丙烯酸酯 (Trolox)、过氧化氢异丙苯、1,1,3,3-四乙氧基丙烷、甲醇、乙腈和己烷 (色谱纯), 美国 Sigma 公司; 低分子量蛋白质标准品 (14.4~97.0 ku), 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

YLB-TW12 数显恒温水浴锅, 德国 JULABO 公司; ST16R 高速冷冻离心机, 美国热电公司; S 25 磁力搅拌机, 德国 IKA 公司; RW 16 电子搅拌机, 德国 IKA 公司; T 25 高速均质机, 德国 IKA 公司; 高压均质机, 上海东华高压均质机厂; Waters e2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司; 伯乐 Protean 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; UV-1601 紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; Nicolet iS10 傅立叶变换红外光谱仪, 美国热电公司; Agilent 7890B 气相色谱, 美国 Agilent 公司; S-3400N 扫描电子显微镜, 日本日立公司。

1.3 试验方法

1.3.1 酶催化反应

为了评估在水相体系中漆酶催化氧化FA的能力, 设计了三个不同反应体系: (I) 反应体系中含有大米蛋白、漆酶和 FA; (II) 反应体系中含有大米蛋白和 FA; (III) 反应体系中含有漆酶和 FA。对于反应 (I): 10 mg/mL 大米蛋白溶液, 1 mg/mL FA 溶液, 0.15 mg/mL 漆酶; 对于反应 (II): 10 mg/mL 大米蛋白溶液, 1 mg/mL FA 溶液; 对于反应 (III): 1 mg/mL FA 溶液, 0.15 mg/mL 漆酶, 混合物在 25 °C 磁力搅拌 4 h, 所有的试剂均溶于 pH=7.0、50 mM 磷酸缓冲溶液。

FA 的含量通过 HPLC 测定, 方法参照 Mattinen 等^[8], 略有修改。吸取 100 μ L 不同反应时间下 (15、30、45、60、90、120、150、180 和 240 min) 反应样液, 酶终止反应通过加入 100 μ L、1 mM EDTA 溶液^[1], 再加入 0.8 mL 甲醇溶液, 4 °C 储存, 样品通过 0.45 μ m 膜过滤。色谱柱: ZORBAX SB-C18 (4.6 \times 250 mm, 5 μ m), 流动相包括 A 相 (0.4%冰醋酸水溶液) 和 B 相 (乙腈), 洗脱梯度: 0~5 min, 5% B; 5~25 min, 25% B; 25~30 min, 50% B; 30~35 min, 5% B, 流速 1 mg/mL, 进样量 10 μ L, 柱温 25 °C, 检测波长: 320 nm,

$$\text{FA 的相对含量 (\%)} = A_i/A_0 \times 100\%$$

式中, A_i , 酶催化不同反应时间下 FA 的峰面积; A_0 , 酶催化前 FA 的峰面积。

1.3.2 大米蛋白/阿魏酸交联物的制备

为了研究漆酶催化不同质量浓度 (0.1、0.2 和 0.4

mg/mL)的FA对大米蛋白交联特性的影响,反应体系(I)中含有:10 mg/mL大米蛋白、0.1 mg/mL FA溶液和0.025 mg/mL漆酶;反应体系(II)中含有:10 mg/mL大米蛋白、0.2 mg/mL FA溶液和0.05 mg/mL漆酶;反应体系(III)中含有:10 mg/mL大米蛋白、0.4 mg/mL FA溶液和0.1 mg/mL漆酶;空白体系(IV)中含有:10 mg/mL大米蛋白和0.1 mg/mL漆酶;空白体系(V)中含有:10 mg/mL大米蛋白。反应温度25 °C,反应4 h后的样品在4 °C下透析24 h,冷冻干燥。

1.3.3 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

SDS-PAGE凝胶电泳分析参考Laemmli等^[9]。称取一定量的蛋白样,用6 mol/L尿素将样品溶解,电泳前将样品与还原型样品缓冲液以及非还原性样品缓冲液混合,沸水浴5 min。配置14%T分离胶和5%T浓缩胶。将10 μL样品注入样品池,样品在浓缩胶中时电流定为15 mA,进入分离胶后电流调为30 mA。电泳完成后凝胶采用考马斯亮蓝法R-250染色1 h。染色后于脱色液中脱色2 d。脱色完成后胶片拍照分析。以标准蛋白质分子量的对数对相对迁移率作标准曲线,据大米蛋白的相对迁移率从标准曲线上查出各蛋白组分的分子量。

1.3.4 紫外光谱

将蛋白样品溶解在PBS缓冲液(pH 7.0, 50 mM)形成大米蛋白分散液,6000 r/min离心10 min,取上清液,通过紫外可见分光光度计测定其在240~600 nm波长范围下的光谱,以PBS缓冲液(pH 7.0, 50 mM)作为空白对照。

1.3.5 红外光谱

取1 mg无水样品粉末,加入100 mg溴化钾,共混,研细,在压片机上压成厚度为0.1 mm左右的薄片,采用红外光谱仪在波长范围在400~4000 cm⁻¹范围类扫描之间进行扫描,采用peatfit 14.0软件和高斯拟合计算酰胺I带中蛋白质二级结构组成。

1.3.6 扫描电子显微镜(SEM)

通过使用扫描电镜(SEM)观察粒子形态学。用导电胶将样品固定在样品台上,采用真空离子喷溅器喷涂金属,涂抹到样品表面,用二次电子探测器的扫描电子显微镜来获取样品数字的图像,加速电压为20 kV。

1.3.7 色差

使用色度计测定样品色泽变化,直接测定参数L*(亮度)、a*(红度)和b*(黄度),平行三次,其中白度差异(ΔL);红-绿色差(Δa);黄-蓝色差(Δb)

和总颜色差异(ΔE)可以通过以下公式计算。

$$\Delta E = (\Delta L + \Delta a + \Delta b)^{1/2}$$

其中,Δa=a_i-a₀; Δb=b_i-b₀; ΔL=L_i-L₀, i表示不同质量浓度的阿魏酸; 0表示大米蛋白。

1.3.8 体外抗氧化能力

漆酶催化阿魏酸与大米蛋白交联前后的抗氧化活性通过测定清除DPPH自由基能力和清除ABTS自由基能力。清除DPPH自由基能力的测定参照Qiu等^[10],清除ABTS自由基能力的测定参照wang等^[11]。

1.3.9 乳液的制备及油脂的氧化降解

分别将大米蛋白、漆酶和FA溶于50 mM PBS(pH 7.0)中,搅拌4 h后,添加10% (m/V)玉米油,并加入0.02% (m/V)叠氮钠抑制微生物生长。混合物充分混匀后经高速剪切机(14000 r/min)预乳化1 min,得到粗乳浊液,然后经高压微射流均质处理二次(60 MPa),得到的乳液中含有大米蛋白的质量浓度为10 mg/mL、FA的质量浓度分别为0.4 mg/mL、漆酶的质量浓度为0.1 mg/mL。将制备的乳液放在50 °C放置12 d,测定贮藏期间乳液的氢过氧化物含量、TBARS值及己醛的含量。

1.3.9.1 氢过氧化物含量

乳液中氢过氧化物含量的测定参照Matalanis等^[12],取0.3 mL乳液加入1.5 mL异辛烷+异丙醇(3:1, V/V)混合溶剂,涡流混合3次,每次10 s,然后再6000 r/min离心10 min。取0.2 μL上清液与2.8 mL甲醇:正丁醇(2:1, V/V)混合,接着加入15 μL亚铁溶液(等体积的0.132 M BaCl₂和0.144 M FeSO₄混合溶液)以及15 μL(30 g 硫氰酸铵溶解在100 mL蒸馏水中),20 min后在510 nm处测定其吸光度值,氢过氧化物浓度通过标准物过氧化氢异丙苯的标准曲线来确定。

1.3.9.2 TBARS值

乳液中TBARS值的测定参照Mei等^[13],2 mL乳液混合4 mL TBA试剂(混合15 g三氯乙酸,0.375 g 2-巯代巴比妥酸,溶于100 mL、2.5 M HCl溶液中2:1, V/V)在沸水中加热15 min,冷却10 min后6000 r/min离心15 min。在532 nm测定其吸光度值。TBARS根据标准物1,1,3,3-四乙氧基丙烷的标准曲线来确定。

1.3.9.3 己醛的含量

己醛是乳液中脂类氧化降解的主要产物之一,己醛的含量通过GC方法测定^[14],略有修改。取6 mL蛋白乳液于样品瓶中,用密封圈密封,50 °C储藏10 d。采用75 mm Carboxen/PDMS固相萃取纤维头插入样品瓶中,55 °C萃取10 min,气相色谱参数:HP-5毛细管柱(30 m×0.32 mm, 0.25 μm),氮气作为载气,

进样口温度 290 °C, 检测器温度 300 °C, 分流比 1:10, 柱箱温的升温程序: 起始温度 40 °C 保持 2 min, 以 5 °C/min 的速率升温至 60 °C, 保持 2 min, 以 15 °C/min 的速率升温至 150 °C, 以 30 °C/min 速率升温至 210 °C, 保持 2 min。

$$\text{己醛的含量 (mg/L)} = A_x \times C_0 / A_0$$

式中: A_0 , 己醛标准品的峰面积; A_x , 样品中己醛的峰面积; C_0 , 标准己醛标准品的浓度 (1 mg/mL)。

1.3.10 数据处理

数据统计分析采用 Origin 8 和 SPSS 14.0 分析软件进行处理。每组数据重复三次, 结果表达式为平均值±标准方差。

2 结果与讨论

2.1 阿魏酸的含量

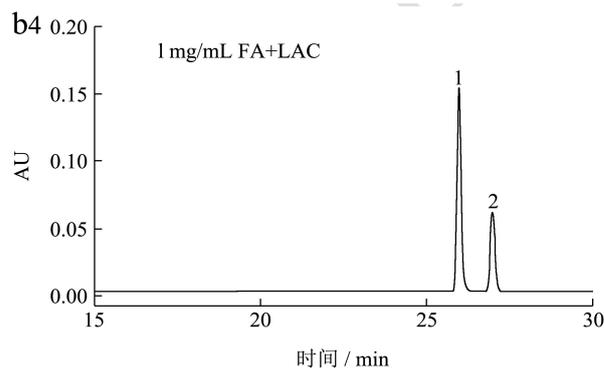
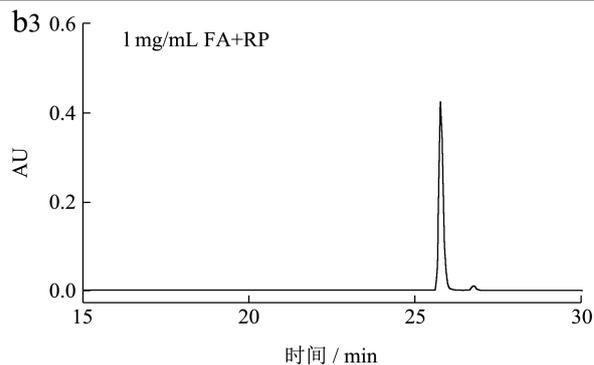
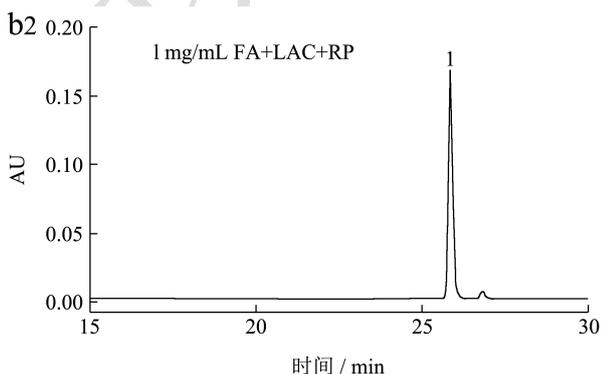
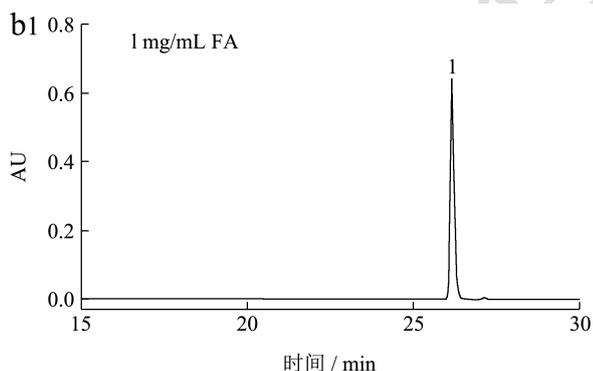
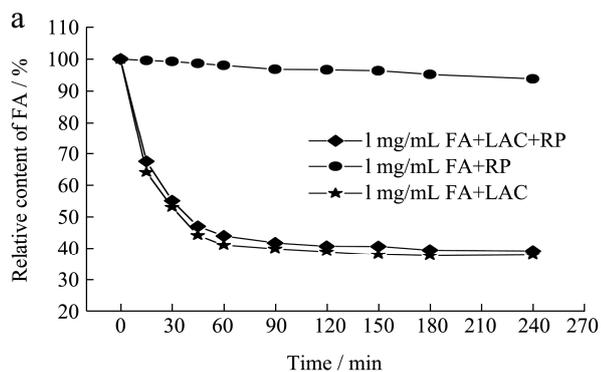


图 1 FA 的含量

Fig.1 FA content

注: a, 在不同酶反应时间下 FA 的相对含量; b1~b4, 反应 4 h 后 FA 的 HPLC 图。

大米蛋白 (RP) 与阿魏酸 (FA) 相互作用后 FA 的含量如图 1a 所示, 在不添加漆酶 (LAC) 的时候, RP 与 FA 相互反应后 FA 的峰面积减少了 6.2%, 然而在漆酶的存在下, 随着酶反应的进行, FA 的含量显著减少 60%, 说明 FA 极易被漆酶催化氧化^[15], 且反应 90 min 后 FA 的含量基本不变, 可能是随着时间的延长酶反应逐渐达到平衡。从图 1b 可以发现, FA (峰 1) 经过漆酶催化氧化后, HPLC 图出现了新的物质 (峰 2), 可能是 FA 被漆酶催化氧化后形成的氧化产物, 如醌类物质^[16]。然而, 在添加大米蛋白的阿魏酸与漆酶体系中, FA 的 HPLC 图中峰 2 明显降低, 推断可能的原因是阿魏酸的氧化产物能够与大米蛋白中氨基、巯基发生反应^[17]。

2.2 大米蛋白的亚基组成

图2为RP和RP/FA交联物在还原与非还原条件下的SDS-PAGE图谱。大米蛋白的主要成分为谷蛋白, 其含量占大米蛋白总量的80%左右, 包括相对分子量为51 ku的谷蛋白聚肽、34~37 ku与21~22 ku的谷蛋白酸性亚基和碱性亚基以及26 ku的球蛋白亚基^[18]。在非还原条件下, RP (lane 1) 主要表现在浓缩胶顶部高分子量的蛋白聚集体、谷蛋白聚肽、球蛋白、谷蛋白酸性亚基及谷蛋白碱性亚基的形式, 而RP-FA交联物

(Lane 2、3和4)中缺乏相应的球蛋白亚基,且谷蛋白酸性亚基、碱性亚基和谷蛋白聚肽的光密度明显减少;在还原条件下,经过 β -巯基乙醇处理后,RP(Lane 1)与RP-FA交联物(Lane 2、3和4)的浓缩胶顶部高分子量的蛋白聚集体会被还原成小分子量的肽,这表明漆酶催化FA可能会与RP中的球蛋白结合,生成分子量较大的结合物,且这种结合物的含量随着含量的增加相应增加。研究表明漆酶氧化FA与某些氨基酸如酪氨酸、色氨酸和半胱氨酸反应,导致肽聚合和某些蛋白质的交联^[19]。

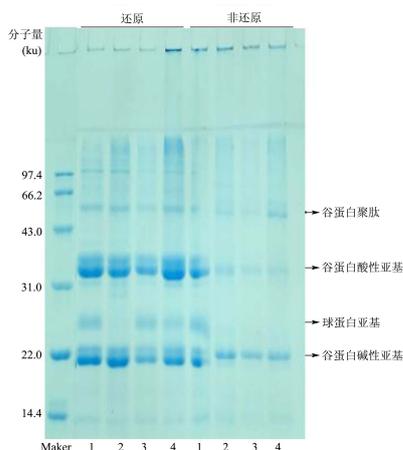


图2 RP与RP-FA交联物的SDS-PAGE图谱

Fig.2 SDS-PAGE profiles of RP and RP-FA cross-linked product

表1 RP与RP-FA交联物的二级结构组成

Table 1 Secondary-structure contents of RP and RP-FA cross-linked product

阿魏酸浓度	无规卷曲/%	α -螺旋/%	β -转角/%	β -折叠/%	
	1638~1640 cm^{-1}	1648~1659 cm^{-1}	1660~1670 cm^{-1}	1681~1682 cm^{-1}	1694~1697 cm^{-1}
RP	5.52±1.01 ^a	41.63±1.69 ^a	12.81±0.27 ^a	10.41±0.15 ^a	29.63±0.71 ^a
RP+LAC+0.1 mg/mL FA	7.29±0.09 ^b	37.31±1.15 ^b	11.88±1.11 ^a	10.53±0.46 ^a	32.99±0.46 ^b
RP+LAC+0.2 mg/mL FA	11.67±1.32 ^c	34.23±0.73 ^c	11.06±0.33 ^a	9.87±0.66 ^a	33.17±1.03 ^b
RP+LAC+0.4 mg/mL FA	16.53±0.86 ^d	28.42±1.08 ^d	10.71±0.65 ^b	10.24±0.07 ^a	34.10±1.83 ^c

根据酰胺 I (1600~1700 cm^{-1}) 带是蛋白质在红外光谱区的特征吸收谱带,将酰胺 I 带用 peakfit 软件进行二阶求导后用高斯曲线拟合可以得到大米蛋白二级结构的近似分布见表 1。大米蛋白的二级结构包括: 41.36% α -螺旋 (1655 cm^{-1})、40.04% β -折叠 (1680 cm^{-1} 和 1695 cm^{-1})、12.81% β -转角 (1672 cm^{-1}) 和 5.52% 无规卷曲 (1640 cm^{-1})。经过漆酶和不同含量的 FA 处理后,FA 与 RP 交联使得蛋白的 α -螺旋和 β -转角结构的含量逐渐减少,而无规卷曲和 β -折叠结构的含量逐渐增加,当向大米蛋白中加入阿魏酸的浓度达到 0.4 mg/mL 时, α -螺旋含量和 β -转角分别降低了 13% 和 2%, 无规卷曲和 β -折叠分别提高了 11% 和 4%, 无规卷曲含量的增加意味着漆酶诱导 FA 与大米蛋白交联

注: 带 1, 2, 3, 4 分别表示 RP、RP+LAC+0.1 mg/mL FA、RP+LAC+0.2 mg/mL FA 和 RP+LAC+0.4 mg/mL FA。

2.3 紫外光谱

由图3可知: 相比较大米蛋白, 大米蛋白与阿魏酸复合物在300~350 nm处的紫外吸收显著增加, 而且随着FA浓度的增加, 吸收增强, 此外, 大米蛋白/阿魏酸复合物在可见的波长 (400~600 nm) 处有吸收 (溶液呈黄色), 可能的原因是漆酶催化FA的氧化能与蛋白质中游离氨基反应, 并且能够共价接枝到大米蛋白^[20]。

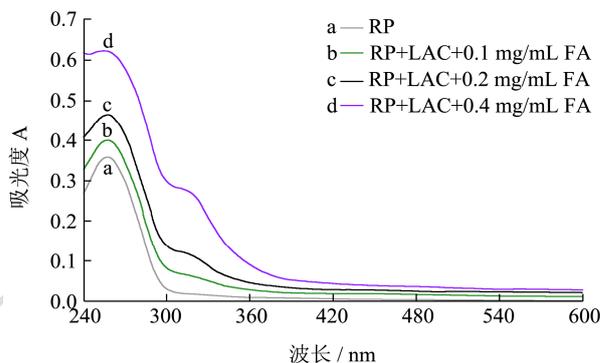


图3 RP与RP/FA交联物的紫外光谱图

Fig.3 UV/Vis spectra of RP and RP-FA cross-linked product

2.4 红外光谱

会使得大米蛋白的结构更为灵活和延伸^[21], 其研究发现谷氨酰胺转氨酶诱导大米谷蛋白发生交联会引起 α -螺旋含量降低和无规卷曲含量增加, 且大米谷蛋白分子的聚合能力被削弱。

2.5 大米蛋白的微观结构

大米蛋白分子的链内或链间通过氢键及疏水作用等聚集成致密分子, 形成一种大分子的蛋白质聚合体。以扫描电子显微镜观察大米蛋白的超显微结构, 如图 4, 未经酶处理的大米蛋白明显聚集抱团, 结构紧密, 没有疏松的孔隙结构。加入漆酶和 FA 后, 蛋白结构聚集体开始松散, 出现孔隙, 说明蛋白分子聚合体逐渐解聚, 孔隙增多, 结构变得越来越松散, 这与红外

光谱的结果保持一致。

注：其中 b 为 RP+LAC+0.4 mg/mL FA。

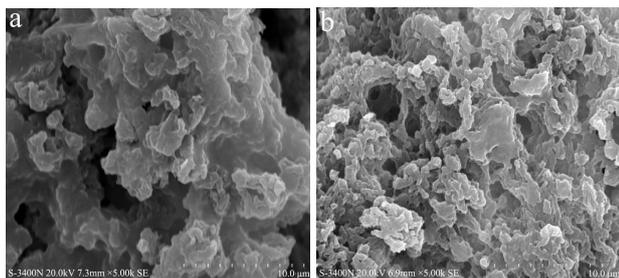


图 4 RP (a) 与 RP-FA 交联物 (b) 的 SEM 图

Fig.4 SEM images of RP (a) and RP-FA cross-linked product

(b)

表 2 RP 与 RP-FA 交联物的色泽参数 (白度、红度和黄度) 和颜色差异 (ΔE)

Table 2 Color parameters (L, a, and b) and color difference (ΔE) of RP and RP-FA cross-linked product

阿魏酸浓度	白度 (L)	红度 (a)	黄度 (b)	ΔE
RP	92.83±0.01 ^a	-0.16±0.02 ^a	5.49±0.02 ^a	0 ^a
RP+LAC+0.1 mg/mL FA	87.85±1.44 ^b	1.89±0.36 ^b	16.29±0.88 ^b	12.09±1.49 ^b
RP+LAC+0.2 mg/mL FA	88.88±0.07 ^b	1.30±0.02 ^b	18.77±0.09 ^c	13.93±0.09 ^c
RP+LAC+0.4 mg/mL FA	87.57±0.14 ^b	2.32±0.03 ^c	19.71±0.30 ^c	16.80±0.32 ^d

2.7 体外抗氧化活性

大米蛋白与 FA 交联前后的抗氧化活性见表 3, 大米蛋白清除 DPPH 自由基能力和清除 ABTS 自由基能力分别为 32.31% 和 3.34%。随着 FA 浓度的增加, 大米蛋白与 FA 混合液的清除 DPPH 自由基能力和清除 ABTS 自由基能力都显著提高, 主要是归因于混合液中游离的 FA 具有显著的抗氧化能力。此外, 漆酶催化 FA 与 RP 结合的抗氧化能力较 RP-FA 混合液中的抗氧化能力有所下降, 这是由于 DPPH 自由基清除法和 ABTS 自由基清除法测定的主要是体系中由游离多酚决定的抗氧化能力, FA 易被漆酶催化氧化, 因此蛋白

2.6 色泽的变化

大米蛋白的白度值、红度值、黄度值和 ΔE 值见表 2。漆酶催化阿魏酸 FA 与大米蛋白交联后, 蛋白的白度值逐渐减少、红度值和黄度值逐渐增加, 当 FA 的浓度增加到 0.4 mg/mL 时, 颜色的差异值 ($\Delta E=16.80$) 显著高于大米蛋白, 交联后的样品颜色呈现橘黄色, 意味着漆酶催化氧化 FA 与大米蛋白发生交联后会改变大米蛋白的颜色^[20], 这可能与 FA 氧化生成有色的醌类物质有关。

多酚的共价相互作用明显使抗氧化能力削弱^[22]。但是漆酶催化 FA 与大米蛋白交联的抗氧化活性高于大米蛋白, 当 FA 的添加量达到 0.4 mg/mL 时, 交联物的清除 DPPH 自由基能力和清除 ABTS 自由基能力分别为 71.43% 和 77.61%, 说明漆酶催化大米蛋白与 FA 的交联后较未处理的大米蛋白的抗氧化活性明显提高, 可能的原因是大米蛋白与 FA 交联保留了阿魏酸的抗氧化基团。这与漆酶催化氧化 FA 形成的氧化产物(醌类)与壳聚糖上的氨基通过席夫碱或迈克尔加成反应发生共价作用生成抗氧化活性更高的 FA-壳聚糖衍生物的结果类似^[20]。

表 3 RP 与 RP-FA 交联物的抗氧化活性

Table 3 Antioxidant activity of RP and RP-FA cross-linked product

FA 的浓度 (mg/mL)	清除 DPPH 自由基能力/%		清除 ABTS 自由基能力/%	
	RP+FA	RP+FA+LAC	RP+FA	RP+FA+LAC
0	32.31±1.37(RP) ^a	29.73±1.75(RP+LAC) ^a	3.34±0.20(RP) ^a	3.03±0.12(RP+LAC) ^a
0.1	60.01±1.22 ^b	56.44±1.78 ^b	52.07±2.63 ^b	37.44±1.01 ^b
0.2	72.61±0.81 ^c	68.07±0.40 ^c	73.20±1.52 ^c	60.07±0.40 ^c
0.4	80.72±0.31 ^d	71.43±0.99 ^d	90.20±1.33 ^d	77.61±0.15 ^d

注：所有数据表示为平均值±标准差, n=3。同列中标注不同角标者具有显著性差异($p<0.05$)。

2.8 乳液中油脂的氧化

油脂氧化的初始产物主要是氢过氧化物, 通过对大米蛋白乳液在储藏过程中脂质氢过氧化物的变化曲线可知 (图 4a), 在储藏的第 8 d, 大米蛋白乳液中的氢过氧化物达到最大值 11.12 mmol/kg, 添加 FA 和漆

酶后, 显著降低了氢过氧化物产生(3.59 mmol/kg oil), 其原因可能是漆酶催化 FA 的氧化共价结合到大米蛋白上, 在乳液的界面处具有更好的抗氧化活性。TBARS 可以评价不饱和脂肪酸的氧化产物醛类(如丙二醛)的变化, 由图 4b 可知: 添加漆酶和 FA 后 TBARS 值从最初的 0.73 mmol/kg 降低到 0.24 mmol/kg, 结

果与氢过氧化物的结果保持一致。同样,作为玉米油氧化的主要副产品己醛的含量也呈现相同的变化规律(图5c),即添加FA和漆酶的乳液中己醛的浓度为0.19 mg/L,远低于未添加的0.99 mg/L,说明交联后的大米蛋白有效提高乳液中油脂的氧化稳定性,这在芦丁与大豆分离蛋白形成的复合物稳定的乳液中也可观察同样的现象^[14]。

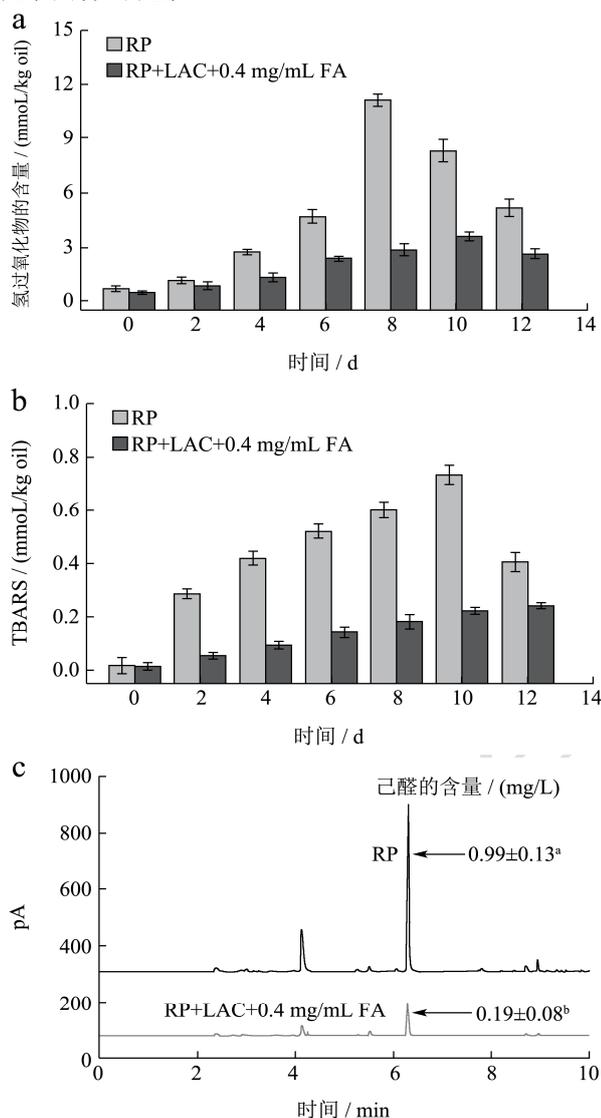


图5 乳液中油脂氧化产物的含量

Fig.5 Content of oil oxidation products in the emulsion-stabilized RP and RP-FA cross-linked product

注: a, 氢过氧化物; b, TBARS; c, 50 °C储存10 d后乳液中己醛的含量。

3 结论

漆酶催化FA氧化形成的氧化产物与大米蛋白中氨基酸反应, SDS-PAGE分析表明FA能够与谷蛋白的碱性亚基(21~22 ku)、酸性亚基(34~37 ku)和球蛋白亚基(26 ku)反应;且随着FA浓度的增加,RP的

紫外图谱在300~350 nm处的吸收逐渐增加,交联后样品的白度值是逐渐减少、红度值和黄度值逐渐增加,当阿魏酸浓度增加到0.4 mg/mL时,颜色的差异值($\Delta E=16.80$)显著高于大米蛋白,可能是由于FA的氧化后能共价交联到大米蛋白分子上从而使蛋白呈现橘红色;RP与FA经酶法交联后RP二级结构发生变化,其中 α -螺旋和 β -转角含量分别降低了13%与2%、无规卷曲和 β -折叠分别提高了11%与4%;SEM观察RP的超显微结构发现酶法交联后的蛋白结构变得越来越松散,孔隙增多,也意味着大米蛋白结构的变化。交联前后大米蛋白清除DPPH自由基能力从32.31%增加到71.43%;清除ABTS自由基能力分别从3.34%和77.61%、FA/RP复合乳液显著降低乳液中氢过氧化值、TBARS值和己醛的含量,说明交联有效提高大米蛋白在水相和乳液中的抗氧化活性。

参考文献

- [1] Tantoush Z, Stanic D, Stojadinovic M, et al. Digestibility and allergenicity of β -lactoglobulin following laccase-mediated cross-linking in the presence of sour cherry phenolics [J]. Food Chemistry, 2011, 125(1): 84-91
- [2] Kim S, Cavaco-Paulo A. Laccase-catalysed protein-flavonoid conjugates for flax fibre modification [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 585-600
- [3] Behzad Gazme A M. Fabrication of whey protein-pectin conjugate particles through laccase-induced gelation of microemulsified nanodroplets [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 40: 189-195
- [4] Ou S, Wang Y, Tang S, et al. Role of ferulic acid in preparing edible films from soy protein isolate [J]. Journal of Food Engineering, 2005, 70(2): 205-210
- [5] Ercili Cura D, Lantto R, Lille M, et al. Laccase-aided protein modification: Effects on the structural properties of acidified sodium caseinate gels [J]. International Dairy Journal, 2009, 19(12): 737-745
- [6] A C K Sato, F A Perrechil, A A S Costa, et al. Cross-linking proteins by laccase: Effects on the droplet size and rheology of emulsions stabilized by sodium caseinate [J]. Food Research International, 2015, 75: 244-251
- [7] Steffensen C L, Andersen M L, Degn P E, et al. Cross-linking proteins by laccase-catalyzed oxidation: importance relative to other modifications [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(24): 12002-12010
- [8] Mattinen M, Kruus K, Buchert J, et al. Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides [J]. FEBS

- Journal, 2005, 272(14): 3640-3650
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685
- [10] Qiu Y, Liu Q, Beta T. Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids [J]. *Food Chemistry*, 2010, 121(1): 140-147
- [11] Wang L L, Xiong Y L. Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(23): 9186-9192
- [12] Matalanis A, Decker E A, McClements D J. Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres [J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(2): 766-772
- [13] Long-yuan Mei, D J M J, et al. Iron-catalyzed lipid oxidation in emulsion as affected by surfactant, pH and NaCl [J]. *Food Chemistry*, 1998, 61(3): 307-312
- [14] Cui Z, Kong X, Chen Y, et al. Effects of rutin incorporation on the physical and oxidative stability of soy protein-stabilized emulsions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 41: 1-9
- [15] Steffensen C L, Andersen M L, Degn P E, et al. Cross-linking proteins by laccase-catalyzed oxidation: importance relative to other modifications [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(24): 12002-12010
- [16] Adelakun O E, Kudanga T, Parker A, et al. Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 74(1-2): 29-35
- [17] Steffensen C L, Stensballe A, Kidmose U D P E. Modifications of amino acids during ferulic acid-mediated, laccase-catalysed cross-linking of peptides [J]. *Free Radical Research*, 2009, 43(12): 1167-1178
- [18] Xia N, Wang J, Gong Q, et al. Characterization and *In Vitro* digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: Comparison to alkaline extraction [J]. *Journal of Cereal Science*, 2012, 56(2): 482-489
- [19] Selinheimo E, Lampila P, Mattinen M B J. Formation of protein-oligosaccharide conjugates by laccase and tyrosinase [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(9): 3118-3128
- [20] Abdulhadi Aljawisha I C B P, Michel Girardina J J J S. Functionalization of chitosan by laccase-catalyzed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate under heterogeneous reaction conditions [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2012, 87: 537-544
- [21] Liu Y, Li X, Zhou X, et al. Effects of glutaminase deamidation on the structure and solubility of rice glutelin [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2011, 44(10): 2205-2210
- [22] Dubeau S, Samson G, Tajmir-Riahi H. Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas [J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(3): 539-545