

美拉德反应制备等电点澄清透明的乳清分离蛋白研究

袁旦¹, 秦新光^{1,2}, 刘刚^{1,3,4}, 胡中泽^{1,3}, 李书艺¹, 祝振洲¹, 何静仁^{1,3}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北武汉 430023) (2. 暨南大学生命科学技术学院, 广东广州 510632) (3. 农产品加工湖北省协同创新中心, 湖北武汉 430023) (4. 大宗粮油精深加工教育部省部共建重点实验室, 湖北武汉 430023)

摘要: 本文旨在以乳清分离蛋白(WPI)为原料, 研究其与糖类物质的美拉德反应制备得到产物在等电点附近的溶解性、乳化性(EAI)、乳化稳定性(ESI)和热稳定性等功能特性, 为其在透明饮料中的应用奠定基础。在相对湿度79%, 温度70℃的反应条件下制备得到乳清分离蛋白与L-乳糖的美拉德反应产物, 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)实验结果证实了美拉德反应使WPI中 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白分子量分别增加2~3 ku左右; 邻苯二甲醛(OPA)结果表明在美拉德反应时间为12 h时, WPI中游离氨基酸含量减少35%左右; 美拉德反应改性使其溶解性、乳化性(EAI)、乳化稳定性(ESI)和热稳定性都有显著提高(在10 min时EAI和ESI分别为0.35 m²/g和20 min, 为WPI的1.5倍和1.7倍); 电位和粒径结果显示, 乳清分离蛋白糖基化产物的溶解性和热稳定性增强是因为蛋白质表面引入糖分子的位阻效应所致, 而非静电作用。

关键词: 乳清分离蛋白; 美拉德反应; 功能特性; 电位; 粒径

文章编号: 1673-9078(2017)2-160-166

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.025

Study on the Preparation of Transparent Whey Protein Isolate at Isoelectric Point by Maillard Reaction

YUAN Dan¹, QIN Xin-guang^{1,2}, LIU Gang^{1,3,4}, HU Zhong-ze^{1,3}, LI Shu-yi¹, ZHU Zhen-zhou¹, HE Jing-ren^{1,3}

(1.College of Food Science & Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China) (2.College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China) (3.Hubei Collaborative Innovation Center for Processing of Agricultural Products, Wuhan 430023, China) (4.Key Laboratory of the Hubei province for Processing and Transformation of Agricultural Products, Wuhan 430023, China)

Abstract: Whey protein isolate (WPI) was used as the raw material for this study. The solubility, emulsifying activity index (EAI), emulsifying stability index (ESI), thermal stability, and other functional properties of WPI and its Maillard reaction products (MRPs) around the isoelectric point were studied, to lay a basis for their application in transparent-type beverages. The MRPs of WPI and L-lactose were formed by the reaction between WPI and L-lactose at a relative humidity of 79% and a temperature of 70 °C. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) results suggested that the molecular weights of α -lactalbumin and β -lactoglobulin were increased by about 2~3 ku. The o-phthalaldehyde (OPA) results showed that the free amino acid content in WPI was reduced by about 35% after the Maillard reaction for 12 h. The solubility, EAI, ESI, and thermal stability were enhanced remarkably (EAI and ESI were 0.35 m²/g and 20 min, respectively, which were 1.5 times and 1.7 times as much as those of WPI). Zeta-potential and particle size analysis indicated that the enhancement of the solubility and thermal stability of the MRPs was induced by the steric hindrance of the saccharides introduced to the protein surface, instead of the electrostatic interactions.

Key words: whey protein isolate; Maillard reaction; functional property; zeta potential; particle size

收稿日期: 2016-11-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401640); 武汉市青年科技晨光计划(2014072704011258); 湖北省科技支撑项目研发与示范(2015BBA167)

通讯作者: 秦新光(1983-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 蛋白质及天然产物化学

牛奶乳清分离蛋白是乳制品加工过程中的副产物, 干基蛋白含量超过90%。除了具备丰富的营养功能外, 其还被广泛应用于表面活性剂^[1]、生物活性物质的载体^[2]和医药产品中^[3], 也可作为商业化生产透明蛋白饮料的丰富蛋白来源^[4]。然而, 在乳制品加工过

程中,随着溶液浓度、pH、溶剂和热处理条件的显著变化^[5-8],蛋白质容易发生变性。这是因为,乳清蛋白中的三种主要蛋白成分: β -球蛋白, α -球蛋白和牛血清蛋白,热变性温度分别是 78、62、和 64 °C^[5],高温灭菌会造成会使蛋白质的聚集成团,导致其失去流动性;同时,由于这三种蛋白的等电点均偏酸性(pH 5 左右)^[10,11],在酸性食品饮料过程中添加蛋白时容易产生聚集^[12,13];这些都是目前饮料生产过程中亟待解决的难题。不仅如此,饮料生产过程中还会添加其他的配料,如糖和盐类等物质,都会促进蛋白质的变性或凝集。因此,欲将乳清蛋白应用到食品饮料中,首先要解决蛋白耐高温、耐盐和耐酸值等问题。

美拉德反应可以提高蛋白的溶解性、乳化性和热稳定性等^[5]。WPI 改性的方法有很多,包括美拉德反应、交联反应以及水解等。美拉德反应由于具有不添加任何化学成分,安全等特点而成为国内外学者研究的热门^[6,11]。美拉德反应就是由蛋白质的氨基与还原糖类末端的羰基而发生的糖基化反应^[12]。Dickinson 等人将 WPI 与多糖进行共价聚合来改善其界面特性^[13]。Liu Qian 等人利用美拉德反应将 WPI 与葡萄糖聚合后研究了其抗氧化性^[14]。结果表明 WPI 在与糖共价聚合后抗氧化性明显增强。此外,利用蛋白与还原糖进行美拉德反应后的产物可作为乳液形成的表面活性剂^[15]。Yang 等人利用大豆分离蛋白与多糖进行美拉德反应,然后利用此产物形成乳液包埋柠檬醛,结果发现该乳液稳定性好,包埋率高,可作为疏水性天然产物的载体^[16]。大量研究表明,蛋白-多糖美拉德反应产物可以增强乳液稳定性^[17]。然而,少有文献研究 WPI 与糖美拉德反应后的在热处理及高盐离子浓度环境下稳定性。

目前针对制备澄清透明的 WPI 溶液的研究尤其甚少,绝大多数品种的 WPI 溶于水后呈浑浊状,可能是因为乳清蛋白中含有部分酪蛋白。本文通过研究可以在适当条件下澄清透明的 WPI 样品,着重系统地研究 WPI 改性后的溶解性、乳化性、起泡性、热稳定性以及电位和粒径分布,为制备透明蛋白饮料奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乳清分离蛋白(WPI, 蛋白含量 96.88%)购于美国 Hilmar Ingredients 公司; L-乳糖(分析纯)购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司; SDS-PAGE 电泳试剂及耗材购于 Biorad 公司;其他分析化学试剂,包括氢氧

化钠(分析纯)均购于国药集团。

1.2 仪器和设备

Zetasizer Nano ZS 粒径仪:英国 Malvern 公司; T-18 型高速分散仪:德国 IKA 工业设备集团; ALPHA 2-4 LD plus 冻干机:德国 Christ 公司; TU-1800 紫外-可见分光光度计:Jasco 日本分光公司; BSC-400 恒温恒湿培养箱:上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 方法

1.3.1 WPI 与乳糖美拉德反应产物(WPI-Lac)的制备

将 WPI 与 L-乳糖按质量比 2:1、1:1 和 1:2 溶解于去离子水中,使其固形物含量在 5~10%之间。搅拌 12 h,分别调节溶液 pH 值至 4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0,然后进行冷冻干燥。将冻干后的粉末置于相对湿度 79%,温度为 70 °C 恒温恒湿培养箱中 24 h,并每隔 6 h 取样若干冻存。

1.3.2 SDS-PAGE 分析

取反应 24 h 后的样品,配制成 1 mg/mL 的溶液。参考布冠好等人^[17,18]的方法,稍有改动。采用不连续的缓冲体系进行 SDS-PAGE 电泳。使用 12% 的分离胶,5% 的浓缩胶,上样量 15 μ L,调节电压至 60 V,即可开始电泳。当溴酚蓝指示剂前沿进入到分离胶时将电压调至 120 V。电泳完成后,将凝胶固定 1 h,取出,用考马斯亮蓝染色,最后用脱色液脱色至蛋白质条带清晰,拍照,导出,以备分析。

1.3.3 氨基酸含量分析

参考孙炜炜^[8]的方法,准确称取 40 mg 邻苯二甲醛(OPA)溶解于 1 mL 的甲醇中,分别加入 20% (m/V) 的 SDS 溶液 2.5 mL、0.1 mol/L 的硼砂溶液 25 mL、100 μ L β -巯基乙醇,最后用蒸馏水定容至 50 mL,此为 OPA 试剂。取反应 0、6、12、18 和 24 h 的美拉德反应并配制成 5 mg/mL 的样品溶液。测定时,取 OPA 试剂 4 mL 于试管中,分别注入 200 μ L 样品液,混匀后于 35 °C 反应 2 min,340 nm 下测其吸光值,以在 OPA 试剂中加入 200 μ L 水为空白样,二者之差 ΔA 为自由氨基的净吸光值。以赖氨酸作出标准曲线,根据 ΔA 计算样品中自由氨基的含。以相同条件处理的乳清分离蛋白为标准,计算各样品中游离氨基含量的相对百分比。

1.3.4 pH 值对乳清分离蛋白美拉德反应的影响

取不同 pH 下反应 24 h 后的样品,配制成 5 mg/mL 的溶液,分别测每个样品在 294 nm 和 400 nm 下的吸

光值。

1.3.5 WPI 美拉德反应产物功能特性的分析

1.3.5.1 起泡性分析

称取一定量的 WPI 以及反应 24 h 后的 WPI 美拉德产物配制成 5 mg/mL 浓度的溶液。使用 0.1 mol/L NaOH (HCl) 调至 pH 至 7.0, 在 8000 r/min 下剪切 60 s, 立即移入量筒中并记录此时体积 V_0 (mL), 30 min 后再记录体积 V_1 (mL), 计算 $\Delta V(V_0-V_1)$, 起泡量即为 ΔV ^[1]。

1.3.5.2 乳化性以及乳化稳定性

参考梁蓉等人^[19]的方法, 取反应 0 h 和 24 h 的样品。将 4 mL 的蛋白溶液 (质量分数为 0.5%, 溶于 pH 7.0 的 0.067 mol/L 磷酸盐缓冲液) 及 1 mL 玉米油用高速均质机在 24000 r/min 及室温条件下混合 1 min, 得到 (O/W) 乳液。然后在不同的时间从均匀乳液底部取出 50 μ L 乳液, 用质量分数 0.1% 的 SDS 溶液以体积比 1:100 的比例稀释并用涡旋仪混合器混合均匀, 用紫外分光光度计测量 500 nm 处的吸收值。乳化稳定性的实验中的样品为反应 24 h 后的美拉德反应产物。

乳化活性指数公式:

$$EAI=(2.303 \times 2 \times OD_{500}) / (C \times \Phi \times L) (m^2/g \times 10^{-5}) \quad (1)$$

乳化稳定性指数公式:

$$ESI=OD_{500} \times \Delta t / \Delta OD_{500} \quad (2)$$

式(1)和(2)中, OD_{500} 为溶液在 500 nm 处的吸光值。EAI 为每克蛋白质的乳化面积, m^2/g ; Φ 为油相所占的分数, 在本实验中油相占 1/5; C 为蛋白质的浓度; L 为光路长度, 10 cm。

实验中改性后的蛋白为实验组, 未改性的作为对照组。通过测得乳化前后 (10 min) 的乳化容量差和乳化液在 500 nm 处的吸光值来算出 EAI。

1.3.5.3 WPI 美拉德反应产物热稳定性分析

称取反应 24 h 的样品, 配制成 1 mg/mL 的溶液。将溶液置于恒温水浴锅中, 加热后立即放入均匀的冰水混合物中冷却 20 min, 然后 8000 r/min 离心 15 min。蛋白质含量测定采用紫外分光光度法。蛋白质热稳定性以加热离心后上清液蛋白质含量与待测液总蛋白质含量的百分比表示, 如下式(3)。

美拉德反应的温度和乳清蛋白与糖类的质量比可以影响乳清蛋白美拉德产物稳定性。在较低温度下 (40 $^{\circ}$ C), 设置不同乳清蛋白与乳糖质量比 (WPI:Lac=1:2, 1:1, 2:1); 在较高温度下 (80 $^{\circ}$ C) 设置不同乳清蛋白与乳糖质量比 (WPI:Lac=1:2、1:1、2:1) 来研究温度质量比对美拉德反应产物热稳定性影响。在高质量比 (WPI:Lac) 为 2:1 时, 设置不同的温度热稳定性(%)=离心后上清液蛋白含量 (mg/mL) / 离心前溶液中总蛋白质含量(mg/mL) \times 100% (3)

度梯度 (40、50、60、70 和 80 $^{\circ}$ C) 来研究其热稳定性的变化, 在低质量比 (WPI:Lac) 为 1:2 时; 设置不同的温度梯度 (40、50、60、70 和 80 $^{\circ}$ C) 来研究其热稳定性的变化。

1.3.5.4 WPI 美拉德反应产物溶解性分析

称取反应 24 h 的产物配制成 5 mg/mL 的溶液, 分别调 pH 至 3.0、5.0 和 7.0, 与未糖基化改性的 WPI 对比, 拍照。

1.3.6 WPI 美拉德反应产物电位分析

取反应 24 h 后的样品, 配制成 1 mg/mL 的溶液。采用 ZS 型马尔文纳米粒度分布仪测定乳液的 Zeta 电位 (ζ -potential)。仪器操作温度为室温, 波长和散射角度分别固定在 632 nm 和 90 $^{\circ}$ 。

1.3.7 WPI 美拉德反应产物粒径分析

取反应 24 h 后的样品, 配制成 1 mg/mL 的溶液。并将乳液稀释至颗粒浓度为 0.005% (m/V), 使用马尔文激光散射仪测量乳液的颗粒尺寸分布。根据参考文献设定操作参数, 在整个测量过程中不停地搅拌以保证试样的均匀。

1.3.8 数据处理

采用 Excel 12.0 处理各组试验数据, 结果表示为平均值 \pm 标准差; 绘图和统计学分析通过 Origin 8.0 软件完成。

2 结果与讨论

2.1 SDS-PAGE

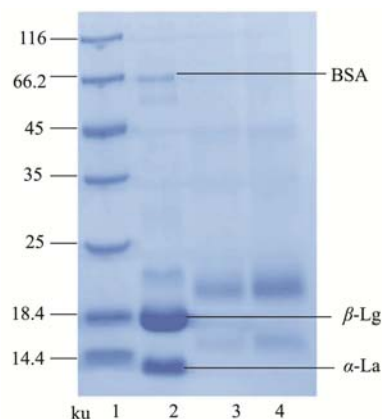


图 1 乳清分离蛋白-乳糖接枝物电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE profiles of WPI-lactose conjugate

注: 1, 蛋白标准品; 2, 0 h 产物; 3, 12 h 产物; 4, 24 h 产物; α -La, α -乳清蛋白; β -Lg, β -乳球蛋白; BSA, 牛血清蛋白。反应条件: pH 7.0, 温度 70 $^{\circ}$ C, 蛋白与乳糖比 1:1。

电泳图谱是分析蛋白质组成成分的重要手段, 常使用考马斯亮蓝染色来分析糖基化产物中糖链接入后

蛋白质分子量的变化^[17]。电泳结果如图 1 所示, 条带 1 代表蛋白标准品特征条带, 分子量分布范围为 14.4~116 ku。条带 2 为未反应的 WPI 条带, 在 13、18 及 70 ku 附近的条带分别为 α -乳清蛋白、 β -乳球蛋白及牛血清蛋白^[17]。由图 1 中电泳图谱可知, 反应 12 和 24 h 后, α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白分子量分别增加到 16 和 20 ku 左右, 牛血清蛋白在反应后条带消失, 可能原因是其浓度占总蛋白中比例较低, 此现象与 Liu^[12] 等人利用 WPI 和 D-乳糖在温度 80 °C, 相对湿度 80% 条件下反应 2 h 得到的结果相符; 研究结果表明 WPI 各组分均与 L-乳糖有共价聚合, 分子量都有所增加 (美拉德反应改性使 WPI 中 α -乳清蛋白和 β -乳球蛋白分子量分别增加 2~3 ku 左右)。

2.2 游离氨基酸含量分析

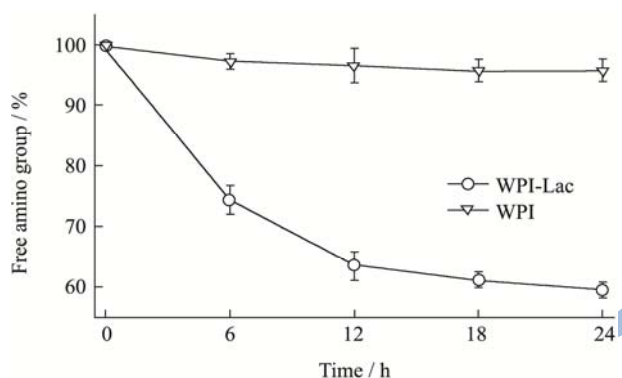


图 2 WPI 中的游离氨基酸含量随美拉德反应时间变化

Fig.2 Change of free amino content in heated WPI over the Maillard reaction time

注: WPI-Lac 表示乳清蛋白-乳糖美拉德产物。

随着美拉德反应的不断进行, 蛋白质中游离氨基酸含量的变化常被用来衡量蛋白质与糖反应的程度^[29]。美拉德反应时, 糖基的还原末端与氨基结合, 从而导致游离氨基酸含量减小。如图 2 所示, 在反应物 pH 7.0, 温度 70 °C, 蛋白与乳糖比 1:1, 美拉德反应的前 12 h 内, 游离氨基酸含量很快减少到 65% 左右。WPI 与 L-乳糖发生美拉德反应在 18 h 内速度较快, 反应 18 h 之后, 游离氨基酸含量变化不显著。游离氨基酸含量的减少也进一步证明了美拉德反应的发生, 这与 M.S.Martinez^[16] 等人利用乳清分离蛋白与麦芽糊精, 在温度 60 °C, 相对湿度 80% 下游离氨基酸含量的变化相吻合。

2.3 pH 对乳清分离蛋白美拉德反应的影响

A₂₉₄ 特征吸收值常被用来检测美拉德反应体系中间产物的形成, 蛋白质与糖的接枝反应常伴随有褐色物质(A₄₂₀)的生成^[29]。因此, 在 294 nm 和 420 nm 处吸

光值可以用来间接反映美拉德反应进行的程度。从图 3 中可以看出, 在 pH 值 4.0~5.0 时, A₂₉₄ 由 0.421 上升至 0.694, 这与孙炜炜^[8] 利用乳清分离蛋白与葡聚糖在温度 70 °C, 相对湿度 79% 时美拉德产物的最大褐变程度 0.685 大致吻合。在反应温度 70 °C, 蛋白与乳糖比 1:1, 反应时间 24 h 条件下, 反应体系在 pH 值 4.0~7.0 变化时, 反应程度逐步增加; 可能原因是在 pH 值 4.0~5.0 时, 接近 WPI 的等电点 4.8~5.2^[4], 蛋白质中的氨基酸与氢离子结合, 蛋白质结构较为紧密, 阻碍了其与糖中的还原性羰基的结合, 导致其反应缓慢。在 pH 7.0 时, WPI 溶解性好, 与糖接触充分, 反应程度高。当 pH 大于 7.0 时, 反应环境为碱性, 反应速率又下降。

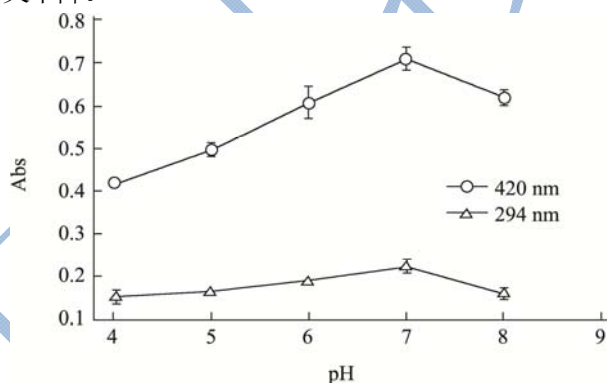


图 3 不同 pH 值对乳清蛋白美拉德反应的影响

Fig.3 Effect of different pH values on the Maillard reaction of WPI

2.4 WPI 糖基化产物功能特性分析

2.4.1 起泡性分析

表 1 乳清蛋白改性前后起泡性

Table 1 Foaming volume of WPI and WPI-Lac samples

组别	美拉德反应改性前后乳清蛋白起泡性变化	
	WPI sample 起泡量(ΔV)/mL	WPI-Lac sample 起泡量(ΔV)/mL
1	9.82±0.05	1.25±0.03
2	10.56±0.16	0.83±0.03
3	11.27±0.19	1.56±0.02

蛋白质起泡能力主要取决于其可溶部分, 蛋白质高溶解性有良好的起泡能力和稳定性的先决条件, 但不溶解的蛋白质粒子在稳定泡沫中也能起着有益作用, 这是由于它们提高了表面粘度。通过对乳清蛋白实验组和空白组气泡容量平均值就可以看出乳清蛋白在改性前后起泡性的变化。反应温度 70 °C, 蛋白与乳糖比 1:1, 反应时间 24 h, 反应体系 pH 7.0, 在表 1 中我们可以明显的看出美拉德反应改性前的乳清蛋白 (起泡量=10.56±0.13 mL) 比改性后的乳清蛋白(起

量=1.56±0.02 mL)起泡性更好。这可能是由于 WPI 改性之后表面粘度下降。这与陆访^[31]利用大米蛋白和葡聚糖改性后的起泡性结果有所差异,其实验结果表明大米蛋白与多糖经美拉德共价聚合后蛋白粘度增加,界面张力增强,起泡性增加。该差异产生的原因可能是蛋白质分子量不同所导致。

2.4.2 乳化性以及乳化稳定性分析

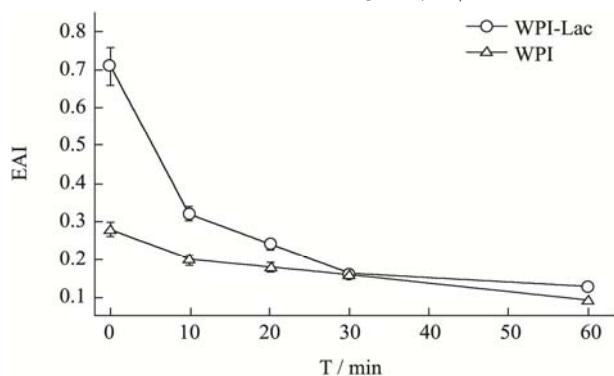


图4 乳清蛋白美拉德反应前后的乳化能力

Fig.4 Emulsifying ability of WPI and WPI Maillard reaction products

注: WPI-Lac 为乳清蛋白-乳糖美拉德产物。

蛋白质乳化性质的评价指标是乳化活性 (Emulsifying Activity, EA)。乳化活性是指蛋白质能够参与形成乳液的能力。在 O/W 乳液中,蛋白质分子聚集在油-水界面上,疏水性多肽部分朝向油相,极性部分朝向水相,在均质过程中,蛋白质能够迅速吸附到油滴表面形成保护膜以降低油-水界面张力,阻止油滴的聚集和乳化状态的破坏^[16]。由图 4 可知,美拉德反应产物 WPI-Lac 乳化能力较 WPI 有较大提高,在 0 min 时, EAI 为 0.7, 为 WPI 的 3 倍左右, 在 10 min 时 EAI 为 0.35, 为 WPI 的 1.5 倍; 随着放置时间的延长, 乳化性降低。

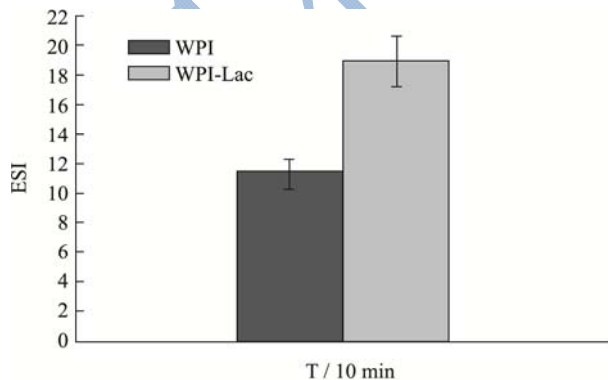


图5 乳清蛋白反应前后乳化稳定能力

Fig.5 Emulsifying stability of WPI and WPI Maillard reaction products

从图 5 中可以看出, WPI 在美拉德反应改性后的乳化性以及乳化稳定性能均明显优于改性前。

WPI-Lac 的 ESI 为 20 min, 较 WPI 的 ESI 值 12 min 有显著的提高。糖基通过美拉德反应与蛋白质的氨基缩合。蛋白质的表面疏水性降低,使其溶解度显著提高,从而提高了乳清分离蛋白的乳化性和乳化稳定性。这与布冠好^[27]等人利用大豆蛋白与乳糖在温度 60 °C, 相对湿度 79%, 反应时间 24 h 的美拉德产物的乳化性最佳吻合。其结果也表明糖与蛋白共价交联,蛋白亲水基团增加,增加了美拉德产物界面活性,其产物乳化性提高。

2.4.3 热稳定性分析

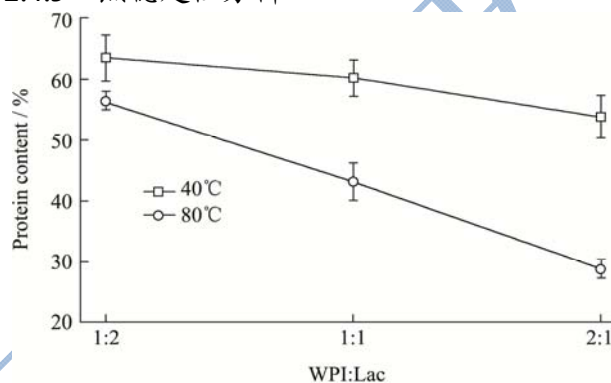


图6 质量比对乳清分离蛋白美拉德产物热稳定性影响

Fig.6 Effect of mass ratio on the thermal stability of WPI MRPs

由图 6 可以看出,在保持较低的温度(40 °C)的条件下, WPI 与乳糖(Lac)质量比在 1:2、1:1 和 2:1 时上清液与母液的比值分别为 63.4%、60.2%和 53.8%,而在 80 °C 的条件下,上清液与母液的比值分别为 56.3%、42.6%和 28.5%。这表明在美拉德反应后,糖基的接入提高了蛋白质的热稳定性;乳清蛋白的热稳定性随着质量比(WPI:Lac)的增高而热稳定性降低。在较高的温度(80 °C)处理下,热稳定性降低比在低温处理条件下更为显著。这可能是因为(1)糖分子占的比例高时,蛋白与其接触的概率增大,反应速度提高,稳定性增加更为显著。(2)由于当蛋白质发生热变性时,蛋白质分子需要吸收能量来进行伸展,而在糖基化反应后,肽链的接枝位点处空间位阻较小,对蛋白质肽链伸展行为有抑制作用。这与徐彩虹^[29]利用大豆分离蛋白和葡聚糖美拉德反应产物的热稳定性研究结果一致。

图 7 显示了不同蛋白乳糖比例美拉德反应产物在不同温度条件下的热稳定性,在 60 °C 时乳清分离蛋白美拉德产物热稳定性最高,这表明该产物对温度的最大耐受能力为 60 °C。当温度高于 60 °C 时,蛋白由于热聚集作用导致溶解性能降低。而乳糖与蛋白比例较高时,该产物在高温下抗热聚集能力要优于乳糖与蛋白在低比例时的能力。这可能因为(1)糖占的比例高时,蛋白与糖反应速度提高,分子量增加,蛋白

表面糖分子更多。(2)当蛋白质肽链上共价接入糖链后,多羟基的亲水特性显著提高了蛋白质分子的溶解性能,并且多糖链引入的空间位阻效应也减弱了肽链对热的吸收从而降低蛋白质结构的破坏。这与徐彩虹^[29]研究其产物 DSC 图谱表明蛋白接入糖基后蛋白热变性温度提高相符。

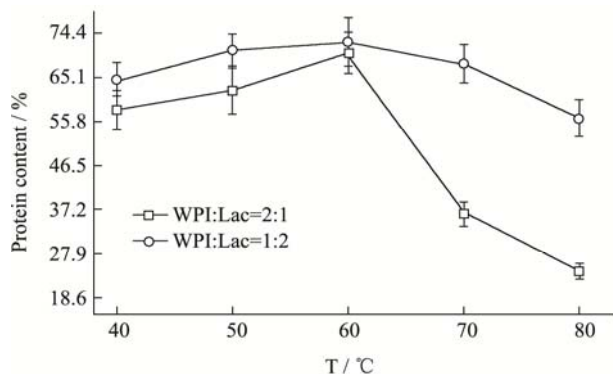


图7 不同蛋白乳糖比例对乳清分离蛋白美拉德产物的热稳定性

Fig.7 Thermal stability of WPI-Lac MRPs in different mass ratios

2.4.4 溶解性分析

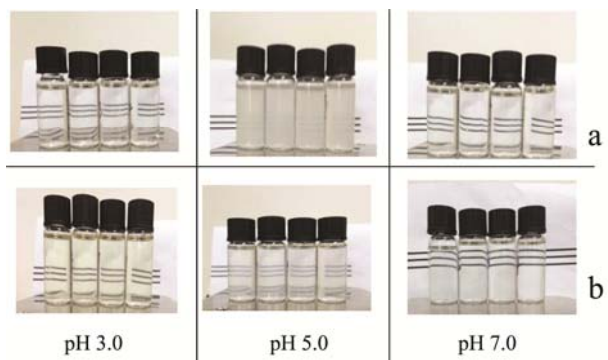


图8 WPI-Lac(蛋白浓度为5 mg/mL)分散液溶解性结果

Fig.8 Solubility test of aqueous solutions containing 5 mg/mL protein

注: a 表示反应 0 h WPI-Lac; b 表示反应 24 h WPI-Lac; 样品分别调 pH 至 3.0、5.0 和 7.0; 每张图片从左至右的 NaCl 浓度为 0、50、100 和 150 mmol/L。

如图 8a 所示,乳清分离蛋白的等电点(pI)在 5.0 左右,此时蛋白由于静电荷为零,静电斥力减弱导致蛋白溶解性最小,从而使蛋白发生聚集,分散系变浑浊,而美拉德反应之后的 WPI-lac 分散系在 pH 5.0 时比未改性的 WPI 澄清(图 8b)。这可能因为 WPI 在美拉德反应后:(1)糖分子的引入,导致静电作用力增强,足以维持体系的稳定;(2)蛋白质表面多糖的位阻效应对蛋白的聚集有阻碍作用。产物在 pH 值 3~7 内保持热稳定,并且其产物在 150 mmol/L NaCl 离子范围内保持澄清。说明美拉德反应之后的 WPI-lac 溶

液能抗高离子强度及酸碱度的改变。这与孙炜炜^[15]研究 WPI 和葡聚糖美拉德反应产物的浊度结果吻合。

2.5 电位分析

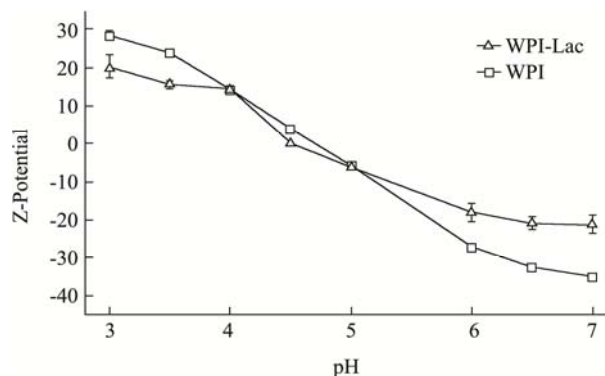


图9 WPI 和 WPI-Lac 在不同 pH 值条件下电位变化

Fig.9 Changes in the Z-potential of WPI and WPI-Lac as a function of pH value

为了研究清楚到底是蛋白质的表面引入糖基的静电作用还是其位阻作用导致美拉德反应产物的溶解性及热稳定性增强,我们对其表面电势进行了研究。研究表明(如图 9 所示):在 pH 值小于等电点时,WPI 的电位要高于糖基化后产物的电位,在 pH 值大于等电点时,WPI 的电位高于改性后 WPI-lac 的电位,这与 Liu^[18]等人利用 WPI 与不同类型糖进行美拉德反应产物的电位变化一致,其结果表明糖分子接入 WPI 后,赖氨酸含量减少,导致正电荷减少,相对负电荷增加。从而说明图 9 中 WPI-lac 溶液热稳定性的增加不是因为静电作用力增强来维持体系的稳定,而是蛋白质表面多糖的位阻效应对蛋白的聚集有阻碍作用。同时,WPI 在美拉德反应改性后,等电点有所减小。这是因为当还原糖分子的还原末端接入乳清分离蛋白的游离氨基位点时,减少了乳清分离蛋白所带的正电荷,相对增加了乳清分离蛋白所带的负电荷,从而导致其等电点向酸性方向偏移。

2.6 粒径分析

为了研究美拉德反应对产物在粒径上的影响,我们分析了其在 pH 7.0 条件下粒径的分布情况,结果如图 10 所示。在 pH 7.0 时,WPI-Lac 的粒径小于 WPI,其 PDI 为 0.267,表明其分散系数较小,说明 WPI 美拉德反应改性后在水分散系中呈均匀分布。可能原因是蛋白质表面多糖的位阻效应对蛋白的聚集有阻碍作用。这与 YANG^[24]等人研究大豆分离蛋白与大豆可溶多糖美拉德产物粒径的变化结果吻合,其结果表明大豆分离蛋白接入糖基后粒径减小,糖基的接入减弱了蛋白间的交互作用。

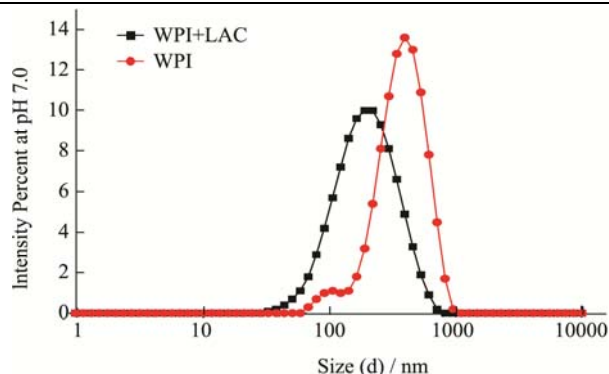


图 10 WPI 和 WPI-Lac 在 pH 7.0 条件下的粒径分布

Fig.10 Particle size distribution of WPI and WPI-Lac at pH 7.0

3 结论

利用干热法制备得到乳清分离蛋白-L-乳糖的美拉德反应产物,在美拉德反应时间为 12 h 时, WPI 中游离氨基酸含量减少 35%左右; SDS-PAGE 从蛋白质分子量的角度证实了美拉德反应的发生。美拉德反应产物的溶解性、乳化性 (EAI)、乳化稳定性 (ES) 和热稳定性都有显著提高 (在 10 min 时 EAI 和 ES 分别为 WPI 的 1.5 倍和 1.7 倍), 电位和粒径结果显示 WPI 功能特性的改善是可能是由于其表面引入的糖分子的位阻效应所致。WPI 美拉德反应产物在其等电点附近热稳定性显著提高, 甚至在高盐浓度条件下依然能保持澄清透明, 这些结果都为制备澄清透明的蛋白质饮料奠定了基础。

参考文献

- [1] Dickinson E. Milk protein interfacial layers and the relationship to emulsion stability and rheology [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2001, 20: 197-210
- [2] Chen L, Remondetto G E, Subirade M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems [J]. *Trend in Food Science & Technology*, 2006, 17(5): 272-283
- [3] Livney Y D. Milk proteins as vehicles for bioactives [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2010, 15(1-2): 73-83
- [4] Vardhanabhuti B, Yucel U, Coupland J N, et al. Interactions between β -lactoglobulin and dextran sulfate at near neutral pH and their effect on thermal stability [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(6): 1511-1520
- [5] WANG Wen-qiong, BAO Yi-hong, CHEN Ying. Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system [J]. *Food Chemistry*, 2013, 139(4): 355-361
- [6] 李燕,刘成梅,刘伟,等.乳清蛋白-麦芽糖糊精的 Maillard 反应复合物制备 β -胡萝卜素纳米乳液[J]. *食品工业科技*, 2013, 2(2):279-282
LI Yan, LIU Cheng-mei, LIU Wei, et al. Preparation β -carotene nanoemulsions stabilized by Maillard reaction products of whey protein isolate and maltodextrin [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 2(2): 279-282
- [7] Martinez-Alvarenga M S, Martinez-Rodriguez E Y, Garcia-Amezquita L E, et al. Effect of Maillard reaction conditions on the degree of glycation and functional properties of whey protein isolate-maltodextrin conjugates [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 38(6): 110-118
- [8] 孙炜炜.乳清分离蛋白-葡聚糖接枝改性及功能性质研究 [D].广州:华南理工大学,2012
SUN Wei-wei. Study on the physicochemical and functional properties of whey protein isolate-dextran conjugate [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012
- [9] LIU G, Zhong Q. Thermal aggregation properties of whey protein glycated with various saccharides [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 32(1): 87-96
- [10] Al-Hakkak J, Al-Hakkak F. Functional egg white-pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction [J]. *Journal of Food Engineering*, 2010, 100(1): 152-159
- [11] Liu Q, Kong B, Han J, et al. Structure and antioxidant activity of whey protein isolate conjugated with glucose via the Maillard reaction under dry-heating conditions [J]. *Food Structure*, 2014, 1(2): 145-154
- [12] Liu G, Zhong Q. High temperature-short time glycation to improve heat stability of whey protein and reduce color formation [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 44(4): 53-60
- [13] Dickinson E, Galazka V B. Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides [J]. *Food Hydrocolloids*, 1991, 5(9): 281-296
- [14] Liu J, Ru Q, Ding Y. Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review [J]. *Food Research International*, 2012, 49(1): 170-183
- [15] YANG Yue-xi, CUI S W, GONG Jian-hua, et al. A soy protein-polysaccharides Maillard reaction product enhanced the physical stability of oil-in-water emulsions containing citral [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 48(2015): 155-164
- [16] Evans M, Ratcliffe I, Williams P A. Emulsion stabilisation using polysaccharide-protein complexes [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2013, 18(4): 272-282

- [17] 布冠好,朱婷伟,陈复生.大豆蛋白-葡萄糖复合物的抗原性及结构特性研究[J].现代食品科技,2014,11(11):28-33
BU Guan-hao, ZHU Ting-wei, CHEN Fu-sheng. Antigenicity and structural properties of soybean protein-glucose conjugates [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 11(11): 28-33
- [18] 布冠好,朱婷伟,陈复生.大豆蛋白-乳糖复合物的结构及功能特性研究[J].中国粮油学报,2014,7(7):40-44
BU Guan-hao, ZHU Ting-wei, CHEN Fu-sheng. Structural and functional properties of soybean protein-lactose conjugations [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2014, 7(7): 40-44
- [19] MENG Ling-min, LIANG Rong, SHI Ke, et al. Synthesis of (PAA-b-F-(127)-b-PAA)- β -lactoglobulin conjugate with improved emulsifying properties [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2011, 32(11): 2680-2684
- [20] 许彩虹.大豆球蛋白糖基化接枝改性及其热聚集行为研究[D].广州:华南理工大学,2010
XU Cai-hong. Research on the glycosylation and thermal aggregation of soybean globulin-polysaccharide [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010
- [21] Izlia J, Arroyo-Maya, David J M. Biopolymer nanoparticles as potential delivery system for anthocyanins: Fabrication and properties [J]. Food Research International, 2015, 69: 1-8
- [22] 陆访.美拉德反应改进大米蛋白功能性质的研究[D].无锡:江南大学,2008
LU Fang. Study on the rice protein reacted with sugar by Maillard reaction [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008