

乳清分离蛋白-甜菜果胶共价复合物理化特性分析

许朵霞¹, 曹雁平¹, 袁芳², 高彦祥²

(1. 北京工商大学食品学院, 北京工商大学食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 北京工商大学北京市食品风味化学重点实验室, 北京 100048) (2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 蛋白质-多糖通过 Maillard 反应生成共价复合物, 其乳化稳定性等功能特性得到提高, 为研究与开发新型食品添加剂提供了一条新的途径, 但共价复合物的乳化稳定性提高机理尚不明确。本研究通过界面张力仪测定界面张力、红外光谱分析二级结构, 并结合 GPC-动态光散射法考察其分子量分布, 初步探讨乳清分离蛋白(WPI)-甜菜果胶(BP)共价复合物乳化稳定提高原因。研究表明: WPI-BP 共价复合物与混合物相比, 界面张力降低; WPI-BP 共价复合作用使得蛋白质分子中的羟基含量增加, 亲水性增强; 共价复合物的分子量增大, dn/dc 降低, 分子量分布更集中, 提高其在乳状液界面上的空间位阻作用, 从而提高其乳化稳定性。因此, 界面张力降低、亲水性增强与空间位阻增大是 WPI-BP 共价复合物乳化稳定性提高的主要原因。

关键词: 蛋白质-多糖共价复合物; 界面张力; 羟基; 分子量分布

文章编号: 1673-9078(2013)9-2102-2105

Physicochemical Properties of Whey Protein Isolate-Beet Pectin Conjugate

XU Duo-xia¹, CAO Yan-ping¹, YUAN Fang², GAO Yan-xiang²

(1. College of Food and Chemical Engineering, Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China) (2. College of Food Science & Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The protein-polysaccharide conjugate via Maillard reaction showed improved emulsification property, which can be served as new multifunctional food additives. To make clear of the mechanism, the interfacial tension, secondary structure and molecular weight distribution of whey protein isolate (WPI)- beet pectin (BP) mixture and conjugate were studied by the interfacial tensionmeter, FTIR and GPC-dynamic light scattering, respectively. Compared with mixture, WPI-BP conjugate showed lower interfacial tension and an increase in hydrogen bonds of the secondary structure. A higher molecular weight and more homogeneous distribution of the conjugate were also observed by the analysis of GPC-dynamic light scattering. Therefore, the improved emulsification property of WPI-BP conjugate might be due to the decreased interfacial tension, increased hydrogen bonds and steric hindrance.

Key words: protein-polysaccharide conjugate; interfacial tension; hydrogen bonds; molecular weight distribution

在食品工业中, 人们逐渐利用天然乳化剂来替代合成乳化剂。蛋白质可以从许多天然物质中提取获得, 形成具有一定理化特性的 O/W 乳状液。蛋白质通过降低界面张力及包埋油滴形成界面保护膜, 从而稳定乳状液^[1]。许多研究证明, 多糖可吸附至蛋白质界面上, 使得界面层变厚及致密, 形成多层界面, 从而使得乳状液的稳定性得到提高^[2]。因此, 可利用多糖提高蛋白质乳状液的稳定性。但是, 由蛋白质多糖混合物形

成的界面层包埋油滴会出现交联或絮凝等不稳定现象。

蛋白质与多糖之间的相互作用力主要包括: 共价作用、静电作用、氢键、范德华力及疏水作用等。在一定温度、湿度条件下, 蛋白质的 ϵ -氨基与多糖的还原性末端经一定程度的 Maillard 反应通过共价相互作用可形成共价复合物^[3]。研究表明, 蛋白质-多糖共价复合物的溶解性、乳化性、抗氧化性及抗菌性得到提高^[4-5]。因此, 通过 Maillard 反应研制蛋白质多糖共价复合物作为一种优良的多功能食品添加剂具有一定的理论意义及广阔的应用前景。

蛋白质-多糖共价复合物在高温、酸性环境, 较高离子强度下保持良好的乳化性及形成的乳状液具有较高的稳定性, 且其乳化特性优于一些商品乳化剂^[6]。

收稿日期: 2013-05-30

基金项目: 北京工商大学 2013 年度青年基金 (QNUJ2013-18)

作者简介: 许朵霞 (1986-), 女, 博士, 讲师, 主要从事食品添加剂与功能性配料的研究

通讯作者: 高彦祥 (1961-), 男, 博士, 教授, 主要从事食品添加剂与功能性配料的研究

蛋白质-多糖形成的共价复合物作为乳化剂及稳定剂在食品乳状液中的应用已成为研究热点^[7], 但其乳化稳定性得到提高的原因尚不明确。

基于前期已有的研究结果: WPI-BP 共价复合物的乳化稳定性得到提高^[8]。本研究以 WPI, BP 为研究对象, 分别通过研究二者混合物与共价复合物的界面张力、羟基含量及分子量分布, 初步探讨蛋白质-多糖共价复合物乳化稳定提高机制, 为其在食品工业中的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

乳清分离蛋白(WPI), 蛋白质含量 97.6%, 美国 Davisco 国际食品公司; 甜菜果胶(BP), CPKelco 公司; 中链甘油三酯(MCT), 奎斯特国际有限公司; KBr、NaCl、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄, 均为分析纯, 北京化学试剂厂。

DSA100 界面张力仪, 德国 Kruss 公司; Spectrum 100 傅立叶红外光谱仪, 美国 PerkinElmer 公司; GPC-动态激光光散射仪 DAWN EOS 型号 WEHC-01, 美国 Wyatt 公司; S22-2 型恒温磁力搅拌器, 上海司乐仪器有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 WPI-BP 共价复合物的制备

将 WPI 与 BP 以质量比 1:2 溶解于 pH 7.0, 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液中。溶液冷冻干燥后, 将冻干粉置于底部盛有饱和 KBr (相对湿度 79%) 的干燥器中, 采用高温短时反应, 80 °C, 5 h 制备 WPI-BP 共价复合物, 所得产物置于 -20 °C 冰箱中贮存^[8]。

1.2.2 界面张力的测定

将 WPI (0.05%, *m/m*)、BP (0.1%, *m/m*)、WPI-BP 混合物、共价复合物分别溶解于 10 m M, pH 4.0, 7.0 的磷酸盐缓冲液中, 加入 NaN₃ (0.01 %, *m/m*), 溶胀过夜。采用 DSA100 界面张力仪测定不同溶液与 MCT 混合后的界面张力, 测量时用注射器吸取 MCT 注入测量毛细管, 通过进样系统在溶液中形成液滴, 用照相机记录液滴形状轮廓, 基于液滴轮廓仪器通过 SCA22 软件计算溶液的界面张力。

1.2.3 傅立叶红外光谱分析

准确称取 WPI-BP 混合物、共价复合物样品适量, 加入一定量的溴化钾, 用研磨研成均匀的粉末, 压成薄片, 再用傅立叶红外分光光度计作全波段 (4000~400 cm⁻¹) 扫描, 扫描 16 次。

1.2.4 凝胶渗透色谱 (GPC) 与动态光散射联用分析

采用 Wyatt 公司生产的动态激光光散射仪 DAWN EOS 型号 WEHC-01, 激光波长 690 nm; Optilab DSP 示差折光仪。分离柱为 TSK PXw1, 预柱与 TSK G4000 PXw1 串联。通过 GPC-动态光散射联用分别测定 WPI-BP 混合物、共价复合物的重均分子量, 数均分子量, Z 均分子量及多分散系数。

1.2.5 数据分析方法

数据统计分析使用 SPSS12.0 for Windows 软件 (SPSS Inc., Chicago, USA) 进行方差分析 (ANOVA), 显著性水平为 0.05, 所有试验均重复三次。

2 结果与讨论

2.1 WPI-BP 共价复合物的界面张力测定

油水两相之所以不相溶, 是由于两相间存在界面张力, 即油和水的界面上有相互排斥和各自尽量缩小彼此接触面积的两种相互作用力, 在油水体系中添加表面活性剂后, 它们可降低界面张力。蛋白质和部分多糖作为乳化剂和稳定剂, 可显著降低油水之间的界面张力, 此外, 其在界面上吸附并形成一定的界面膜, 该膜具有一定的强度, 对于分散相液滴能够起到保护作用, 使其在布朗运动碰撞后不发生聚结。因此, 主要通过界面张力来评价两种天然高分子物质 WPI、BP、二者混合物及共价复合物的乳化特性。

从图 1 可以看出, WPI、BP 可降低界面张力, pH 4.0 时, WPI 界面张力为 11.91 mN/m, 表明 WPI 可显著降低界面张力, 具有良好的乳化特性; BP 界面张力为 24.98 mN/m, 表明其降低界面张力能力较弱, 乳化活性较弱; WPI-BP 混合物界面张力为 11.86 mN/m, 其与单一 WPI 相比有少许降低, 该研究结果同 Speicience 等人研究结果一致, 其研究表明, 壳聚糖的添加可少许降低 WPI 界面张力, 可能是由于混合物的形成取决于蛋白质的热动力学特征及界面活性, 因此, 壳聚糖的添加可通过影响蛋白质的热动力学特性来提高其界面活性^[9]。WPI-BP 共价复合物界面张力为 11.59 mN/m, 与 WPI-BP 混合物相比, 其界面张力发生微小降低, 表明共价复合物可降低界面张力, 提高其乳化活性, 可能是因为共价复合物溶解性得到提高, 具有较好的分散性, 使得油滴更均匀地分布于水溶液中, 减少油相聚合能力, 使得更多的共价复合物吸附于油水界面上, 从而提高其乳化能力。pH 7.0 时, WPI、BP、二者混合物及共价复合物的界面张力, 其变化趋势同 pH 4.0 时一致。

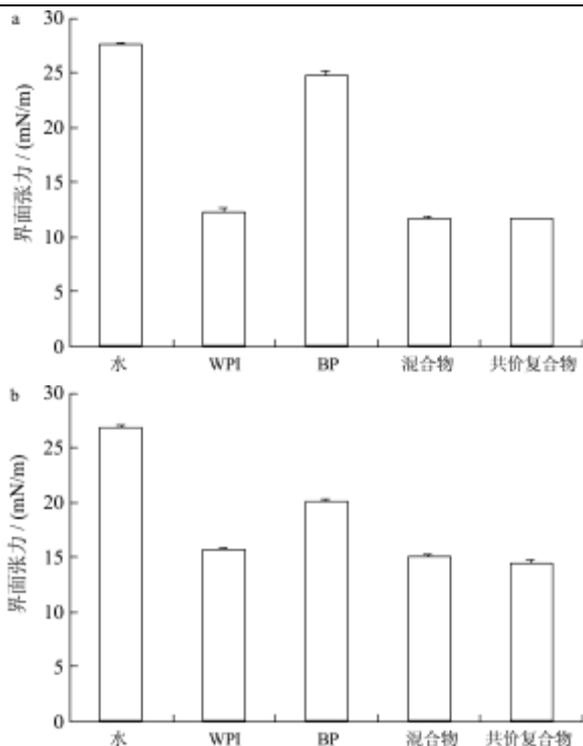


图1 WPI、BP、WPI-BP 混合物、共价复合物在 pH 4.0 (a) 及 pH 7.0 (b) 条件下的界面张力

Fig.1 Interfacial tensions at oil-water interface of water, WPI, BP, WPI-BP mixture and WPI-BP conjugate at pH 4.0 (a), pH 7.0 (b)

2.2 WPI-BP 共价复合物的红外光谱分析

图2为WPI-BP混合物与共价复合物的FTIR图谱。从图中可以看出，当WPI和BP反应时，BP末端的羧基与WPI的氨基以共价键结合，从而引起末端BP环内的羟基发生变形振动，表明二者发生了共价结合。共价复合物在3700~3200 cm⁻¹及1260~1000 cm⁻¹处的吸收较混合物增强，可能是因为BP分子的引入，造成N-H键变形振动与O-H面内变形振动。由此可见，WPI-BP以共价键形成的共价复合物羟基含量增

表1 GPC-动态光散射法测定WPI-BP混合物及共价复合物分子量及其分布结果

Table 1 Molecular mass and their distribution of WPI-BP mixture and conjugate by GPC-laser light scattering

WPI-BP	M _w /(e ⁵ g/mol)	M _n /(e ⁵ g/mol)	M _z /(e ⁶ g/mol)	M _w /M _n	M _z /M _n	dn/dc
混合物	7.143	3.71	1.088	1.925±0.091	2.933±0.247	0.072
共价复合物	9.077	3.138	1.714	2.893±0.119	5.461±0.407	0.060

本研究通过GPC-动态光散射联用，测定WPI-BP混合物与共价复合物分子量分布与多分散系数的变化。由表1所示，WPI-BP混合物与共价复合物的重均、数均、Z-均分子量大小分别为7.143×e⁵、3.71×e⁵、1.088×e⁶ g/mol；9.077×e⁵、3.318×e⁵、1.714×e⁶ g/mol。混合物的M_w/M_n、M_z/M_n为1.925±0.091、2.933±0.247，共价复合

物，提高其亲水性，从而使其乳化活性增强。

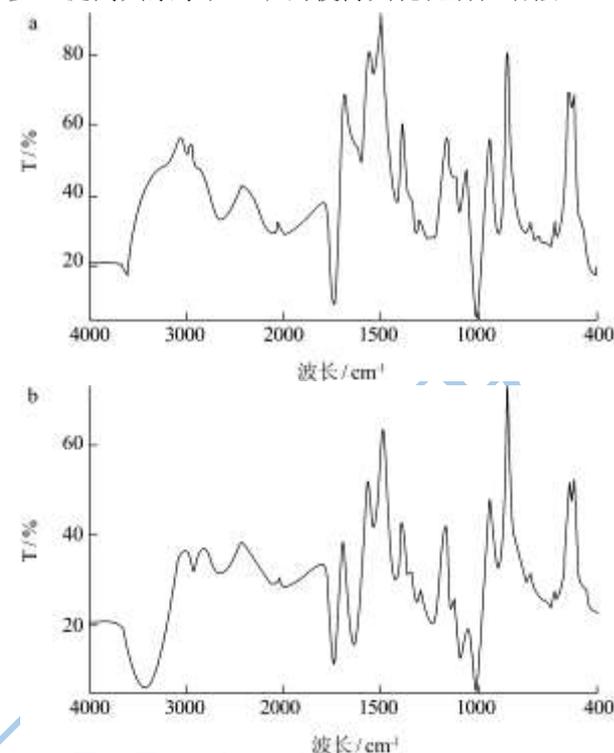


图2 WPI-BP混合物(a)及共价复合物(b) FTIR图谱

Fig.2 FTIR spectra of WPI-BP mixture (a) and conjugate (b)

2.3 WPI-BP 共价复合物的 GPC-动态光散射

研究

蛋白质-多糖复合物的乳化稳定性除了受羟基等亲水性基团的影响，可能还受复合物的空间位阻作用的影响。复合物的分子量增大与分布变宽可增大复合物的空间位阻作用。分子量大小和多分散性是复合物的两个重要特征。同时，复合物的其他性质如：流变性、溶解性等重要性质也与复合物的分子量大小与分布有关。

物的M_w/M_n、M_z/M_n分别为2.893±0.119、5.461±0.407；二者的dn/dc分别为0.072，0.060。结合图3可以看出，经过共价复合后高分子量的聚合物形成，原有的低分子量组分分布减少，高分子量组分分布增多，分子粒度大小分布集中，可通过提高其在界面上吸附的空间位阻作用，使得共价复合物的乳化稳定性得到提高。

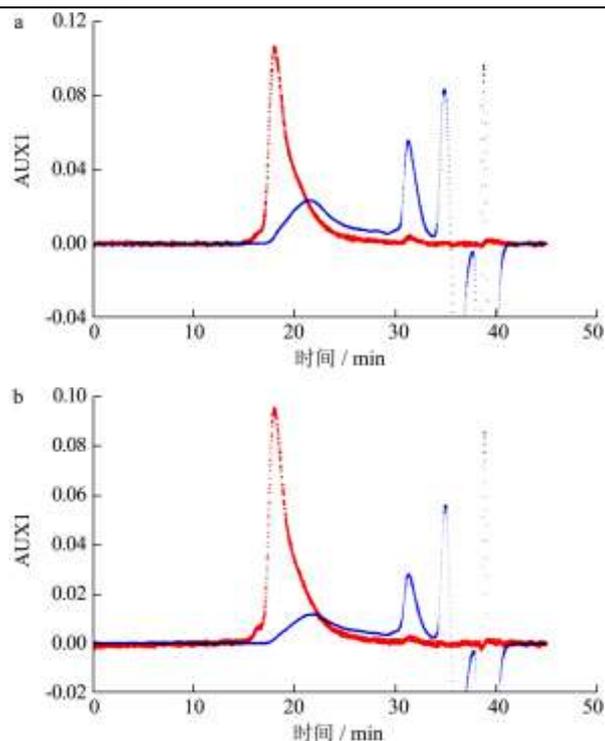


图3 GPC-激光光散射法测定WPI-BP混合物(a)与共价复合物(b)的分子量分布

Fig.3 Molecular distribution of WPI-BP mixture and conjugate by GPC-laser light scattering

注：红线代表光散射信号，蓝线代表示差信号。

3 结论

研究表明：WPI-BP共价复合物与其混合物相比，可降低界面张力；WPI-BP共价复合作用使得蛋白质分子中的羟基含量增加，提高其亲水性；共价复合物形成的分子量较大，分子量分布更集中，提高其界面空间位阻作用，从而提高其乳化性。本研究对探讨蛋白质-多糖共价复合物理化特性及空间结构奠定理论基础，且对制备具有良好乳化稳定特性的蛋白质多糖共价复合物具有一定的理论指导作用。

参考文献

- [1] Ercebebi E A, Ibanoglu E. Characterization of phase separation behavior, emulsion stability, rheology, and microstructure of egg white protein-polysaccharide mixtures [J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74(6): C506-C512
- [2] 郜现良, 易美华. 罗非鱼油乳状液体系稳定性影响因素的研究[J]. *中国食品学报*, 2009, 9(4): 124-128
- [3] Lopez-Fandino R. Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of beta-lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction [J]. *Food Hydrocolloids*, 2005, 19(5): 831-837
- [4] Gu F, Kim J M, Hayat K, et al. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system [J]. *Food Chemistry*, 2009, 117(1): 48-54
- [5] Miralles B, Martinez-Rodriguez A, Santiago A, et al. The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between beta-lactoglobulin and chitosan [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100(3): 1071-1075
- [6] Wooster T J, Augustin M A. Rheology of whey protein-dextran conjugate films at the air/water interface [J]. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21(7): 1072-1080
- [7] Xu D, Wang X, Jiang J, et al. Impact of whey protein-beet pectin conjugation on the physicochemical stability of beta-carotene emulsions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 28(2): 258-266
- [8] 许朵霞, 王小亚, 尤嘉, 等. 乳清分离蛋白-甜菜果胶共价复合物对 beta-胡萝卜素乳液稳定性的影响[J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(4): 9-13
- [9] Speiciene V, Guilmineau F, Kulozik U, et al. The effect of chitosan on the properties of emulsions stabilized by whey proteins [J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(4): 1048-1054