

大豆蛋白-多糖干热制备复合物及其反应机理研究

(I) 共价复合物的制备及生成机理探讨

齐军茹¹, 杨晓泉¹, 廖劲松², 彭志英¹

(1. 华南理工大学食物蛋白工程研究中心, 广东 广州 510640

2. 华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631)

摘 要: 通过干热反应制备大豆蛋白-多糖共价复合物, 并结合聚丙烯酰胺凝胶电泳验证了大分子复合物的共价结合。对于蛋白与多糖生成共价复合物的 Maillard 反应路线进行了分析, 阐明对于蛋白与多糖在相对温和的反应条件下得到的主要是 Maillard 反应步骤中的第二步, 属于 Amadori 产物中的一类, 并采用红外光谱分析了产物分子结构特征。

关键词: 大豆酸沉蛋白; 葡聚糖; 乳化活性; Maillard 反应; 反应路线

Preparation and Reaction Mechanism of Soy Protein-Polysaccharide Conjugate Obtained by Dry-heat Medium Temperature Treatment

(I) Preparation of Protein-dextran Conjugates and Forming Mechanism of Protein-polysaccharide Conjugate

QI Jun-ru¹, YANG Xiao-quan¹, LIAO Jin-song², PENG Zhi-ying¹

(1. Food Protein Engineering Research Center, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China 2. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: A functional soybean acid-precipitated protein (SAPP)-polysaccharide conjugate was prepared by dry-heat medium temperature (60°C) treatment. The covalent attachment of polysaccharides to protein was confirmed by SDS-PAGE. The reaction path of protein-polysaccharide Maillard reaction was analyzed. It was reported that the protein-polysaccharide products were obtained in 2 steps, and could be acceptably put in the products as the Amadori groups. The molecular structure features of conjugate were analyzed through IR-spectrums.

Key words: SAPP; glucan; emulsifying properties; Maillard reaction route

中图分类号 Q51; Q539

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2006)01-0065-04

蛋白质因能在油水或气液界面上形成吸附层降低界面张力而多在胶体体系中充当乳化剂, 多糖则由于其良好的增稠和持水特性而常用做稳定剂。提高蛋白质的乳化能力、乳化稳定性以及适用范围一直是食品科学领域的一个研究热点。通过有控制地干热法使其自发地发生 Maillard 反应, 使蛋白质的 ϵ -氨基基团与多糖的还原性羰基末端反应得到共价复合物, 其乳化性能优于目前商业乳化剂^[1]。

曾经有学者研究分析了卵清蛋白-葡聚糖和溶菌酶-葡聚糖复合物的交联模式^[2], 预测并描述了蛋白与多

糖的反应模式。Maillard 反应是蛋白与糖之间自动发生的一个十分复杂的反应过程, 中间产物众多, 终产物结构十分复杂。对于蛋白与多糖之间所发生的反应属于 Maillard 反应的哪一阶段、是一种怎样的反应方程步骤至今没有相关的详细报道。

本文通过聚丙烯酰胺凝胶电泳以及红外光谱验证和分析了新化合物的生成, 对其反应机制进行了分析和探讨, 通过一系列检测结果及其分析讨论逐步建立了 Maillard 反应产生蛋白-多糖复合物的反应路线以及具体的反应模型。

收稿日期: 2005-01-17

基金项目: 广东省自然科学基金博士科研启动基金资助项目(05300173)

作者简介: 齐军茹(1977-), 女, 讲师, 博士, 主要从事粮油、食品及植物蛋白工程的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆低温脱脂豆粕 山东东营蛋白厂; 葡聚糖 60000~90000 购自Sigma公司。

1.2 仪器与设备

高速分散均质机FJ-200 上海标本模型厂; LGJ-10 冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂; ECP3000 三恒电泳仪 北京六一仪器厂; UVP凝胶成像系统(White/Ultraviolet Transillum inator) 美国 红外光谱仪Vector 33 德国BREKER OPTIK GABH 公司。

1.3 方法

1.3.1 大豆酸沉蛋白(SAPP)的制备

SAPP的制备根据Iwabuchi等(1987)^[3]的方法。100g 脱脂豆粕溶于2L 0.03mol/L Tris-HCl缓冲液(pH8.0)中2h, 8000 × g 离心, 上清液用2mol/L HCl调至pH4.8, 8000 × g 离心。沉淀物在4℃溶解并调至pH8.0, 8000 × g 离心, 上清液于4℃时渗析24h, 冷冻干燥。

1.3.2 SAPP—糖交联

SAPP与糖混合, 用水溶解调至6%(W/V)冷冻干燥。物料过120目筛后放置在有饱和的KBr容器内60℃下恒温, 时间0~7d。

1.3.3 乳化活性的测定^[4]

1.0ml植物油和3.0ml 0.2%样品溶解液(0.1mol/L磷酸缓冲液pH7.0)混合震荡并均质化(1min、20℃、12000 × g)。底部抽出50μl样品用5ml 0.1%的十二烷基硫酸钠溶液稀释, 500nm测吸光率。

1.3.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)^[5]

12.5%分离胶, 3%浓缩胶(含0.1% SDS), 样品用Tris-甘氨酸缓冲液(pH8.8)配制, 其中包括1% SDS和1%巯基乙醇。电泳时间5h, 最后用考马斯亮兰R-250和品红试剂分别染色。

1.3.5 傅立叶红外光谱(FT-IR)

取SAPP:葡聚糖1:1混合物以及1:1干热反应5d的复合物适量, 加入一定量的KBr, 用研钵研磨成均匀的粉末, 压成薄片, 再用Vector 33 红外光谱仪做全波段(400~4000cm⁻¹)扫描。

2 结果与讨论

2.1 SAPP—葡聚糖共价复合物的制备

如图1所示, SAPP—葡聚糖1:1混合物的乳化活性比SAPP乳化活性偏低, 显然多糖的单纯加入没有为蛋白的乳化活性提供有效的帮助。反应开始1~5d, 蛋白乳化活性随着时间的增加而逐步提高, OD₅₀₀原来的0.386升高至1.501; 当反应到第6d时, OD₅₀₀降至1.220, 反

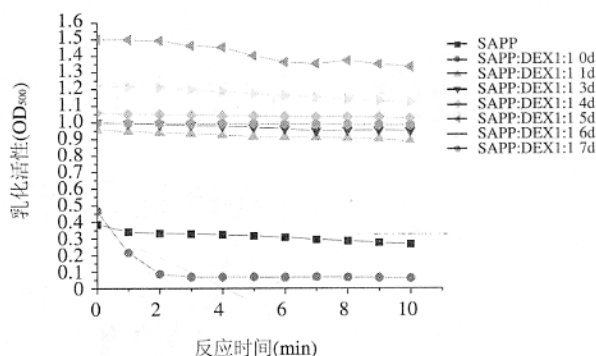
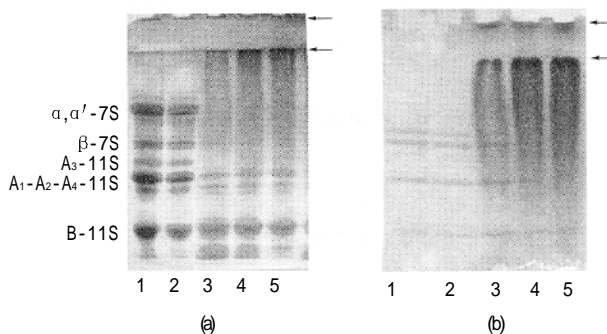


图1 不同反应时间的乳化活性变化

Fig.1 Effects of various times on the emulsifying properties

应时间越长, 乳化活性下降程度越大。

2.2 蛋白—多糖复合反应的电泳图谱分析



a 考马斯亮兰 R250 染色; b 糖蛋白染色。1 SAPP; 2 SAPP-葡聚糖 1:1 混合物; 3 SAPP-葡聚糖反应 1d; 4 SAPP-葡聚糖反应 3d; 5 SAPP-葡聚糖反应 5d。箭头表示浓缩胶顶部以及浓缩胶与分离胶的交界处。

图2 SAPP-葡聚糖 1:1 干热反应的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of SAPP-dextran conjugate obtained by dry-heated storage

如图2所示, 2槽的电泳图谱与1槽没有任何明显差异; 第3槽在浓缩胶与分离胶之间开始明显出现了谱带, 随着反应时间的增加, 谱带颜色变深、变宽; 第4槽在浓缩胶顶部开始出现谱带, 5槽则更加明显, 说明共价结合反应不断发生, 聚合程度不断增加, 分子量也逐步增大。

同样条件下经Schiff试剂染色后得到的电泳图谱如图2(b)显示。1~5d干热反应后, 图2(a)中考马斯亮兰染色所显示的谱带在图2(b)中均有对应显示, 不同的是图2(b)中是经过糖蛋白染色的谱带。即干热反应后蛋白染色以及糖染色图谱中均呈现了高分子量的宽带。

2.3 傅立叶红外光谱(FT-IR)

对比SAPP与葡聚糖1:1混合物以及干热反应5d后产物的红外光谱图, 干热5d后产物在3351cm⁻¹处的吸收峰迁移至3401cm⁻¹处, 一是由于共价交联反应出现了新的N-H键, 导致吸收峰的强度增大; 另外, N-H键变

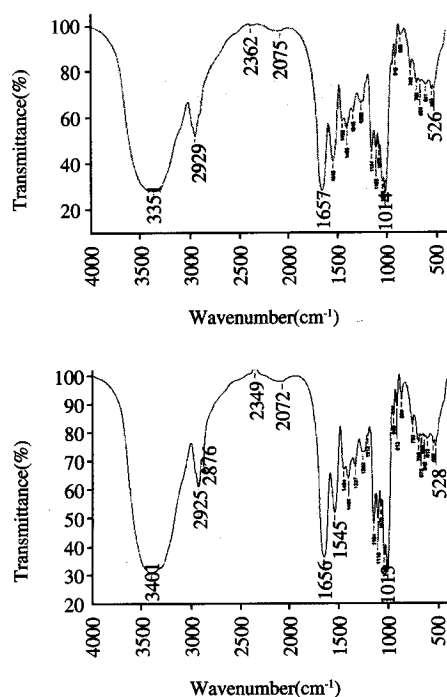


图3 干热反应后产物红外扫描

Fig.3 FT-IR spectrum of products during storage in dry state

成 = N - H，键长缩短，伸缩振动波数反而升高^[6]；1213cm⁻¹处属于C-N键的伸展^[7]，与图4反应路线中的(3)、(4)步骤中均出现了新的C-N键对应，该处新吸收峰的出现证实出现了新的共价键基团；949cm⁻¹属于C=C-H处的面外弯曲振动($\delta_{\text{面外}}$)^[8]，与Maillard反应路线中的步骤(3)对应。949cm⁻¹处和1213cm⁻¹处出现的吸收峰说明模拟的Maillard反应过程是正确的。

此外，反应前后的SAPP与葡聚糖的各自的特征吸收峰没有明显的位移现象，说明反应后蛋白质分子的空间结构没有发生展开等一些其它改性方法所导致的分子结构的变化，只是在蛋白分子中共价结合了糖链来改善其功能性质。

2.4 蛋白-多糖反应路线以及生成机理探讨

图4表示的是蛋白与多糖经过Maillard反应得到共价复合物的过程。第(1)步显示早期Maillard反应，即糖分子与赖氨酸或羟赖氨酸的 ϵ -氨基形成可逆的醛亚胺(Aldimine或Schiff碱)；中期Maillard反应则由(2)~(4)步表示，Schiff碱形成后，Schiff碱上电荷与双键的重排形成糖-蛋白质酮胺结合物(Ketoamine或Amadori型产物)，此时得到的这种糖-蛋白产物比较稳定且为可逆性产物，均属于非酶糖基化中间产物。

对于蛋白与多糖通过Maillard反应生产稳定的共价复合物来说，目的是要得到中期Maillard反应产物，所以在制备实验中无论从温度或者相对湿度条件选择的都是比较温和的反应条件，目的是既能保证Maillard反应

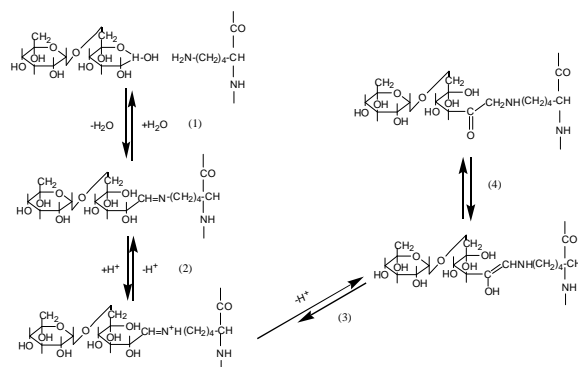


图4 蛋白-多糖Maillard反应生成机理

Fig.4 Mechanism of maillard reaction of protein with polysaccharide

进行又要求适宜的反应程度。依照固相反应机理，一些介稳中间物或动力学控制的化合物往往只能在较低温度下存在^[9]，所以为了得到介稳态固相反应产物，就有必要降低固相反应温度，使其在比较温和的条件下发生Maillard反应得到我们所期望的、具有优越功能性质的糖-蛋白复合物。

3 结论

SAPP与糖共价结合反应生成新型功能性大分子具有优越的乳化活性；我们研究的主要目的在于通过控制反应条件来得到这类比较稳定的糖-蛋白产物。采用红外光谱探讨了该蛋白与多糖发生Maillard反应机理；蛋白-多糖之间的干热反应属于固相反应中的一类—低热固相反应；阐明了Maillard反应中间产物与低温固相反应过程中的介稳中间物理论的一致性。

参考文献：

- [1] A Kato, Y Sasaki, R Furuta, et al. Functional protein-polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures[J]. Agric Biol Chem, 1990, 54(1): 107-112.
- [2] A Kato, K Kobayashi. Microemulsions and emulsions in foods (M. E1-Nokaly and D. Cornell, eds.) [C]. ACS Symposium Series, 1991, (448): 213-229.
- [3] Setsuko Iwabuchi, Fumio Yamauchi. Determination of glycinin and β -conglycinin in soybean proteins by immunological methods[J]. J Agric Food Chem, 1987, 35(2): 200-205.
- [4] Akio Kato, Kazuaki Minaki, Kunihiro Kobayashi. Improvement of emulsifying properties of egg white proteins by the attachment of polysaccharide through Maillard reaction in a dry state[J]. Agric Food Chem, 1993, 41(4): 540-543.
- [5] Soichiro Nakamura, Akio Kato, Kunihiro Kobayashi. Enhanced antioxidative effect of ovalbumin due to covalent binding of polysaccharides [J]. Agric Food Chem, 1992, 40(11): 2033-2037.
- [6] 谢晶曦. 红外光谱在有机化学和药物化学中的应用[J]. 北京: 科学出版社, 1987. 8-13.
- [7] 肖海英, 薛英, 徐学军, 等. FC(0)NCS分子振动光谱的理论研究[J].

菌核侧耳 β - 葡萄糖苷酶产酶条件研究

包水明, 李荣同, 余志坚, 陈传红
(东华理工学院生物系, 江西 抚州 344000)

摘 要: 通过单因素和正交试验, 对菌核侧耳产 β - 葡萄糖苷酶液体培养条件进行优化。结果表明: 以黄豆浆为氮源, 葡萄糖为碳源, 初始 pH 为 6.0 产酶条件最优。培养温度为 25℃、装液量 50ml/250ml、摇瓶转速为 150r/min 培养 72h 后, 酶活力达最高, 为 1.86U/g(湿菌丝体)。

关键词: 菌核侧耳; β - 葡萄糖苷酶; 液体培养

Study on Conditions of Producing β -glucosidase from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing

BAO Shui-ming, LI Rong-tong, YU Zhi-jian, CHEN Chuan-hong
(Department of Biology, East China Institute of Technology, Fuzhou 344000, China)

Abstract: The optimum liquid culture conditions producing β -glucosidase from *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing were studied. The optimum conditions for fermentation were: the soybean milk as the nitrogen source, the glucose as the carbon source, the initial optimum pH was 6.0. Under the optimal incubation condition: culture temperature was 25℃, volume 50ml/250ml, rotate speed 150r/min and culture time 72h, the highest β -glucosidase activity was obtained at wet weight of 1.86U/g (wet mycelium).

Key words: *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing liquid culture β -glucosidase

中图分类号 Q936

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2006)01-0068-03

菌核侧耳(*Pleurotus tuber-regium*(Fr.) Sing)别名虎奶菌^[1], 隶属担子菌纲(Basidiomycetes)侧耳科(Pleurotaceae), 是一种具有很大开发前景的食药两用真菌^[2~4]。菌核侧耳能在富含纤维素的基质(如棉子壳、木屑、农作物秸秆)中生长。 β -葡萄糖苷酶(EC.3.2.21)是一种能将纤维素水解成葡萄糖的水解酶类, 国内外研究的材料以微生物^[5,6]和植物为主, 而以食用真菌为材料的研究较少。笔者曾以菌核侧耳为材料, 对其 β -葡萄糖苷酶进行了初步研究^[7]。在此基础上, 我们通过单因素和正交试验, 对其产 β -葡萄糖苷酶液体培养条件进行了优化研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

菌核侧耳菌株由东华理工学院生物系食用菌研究中心提供。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基

马铃薯 200g(取煮液), 酵母浸膏 5g, 葡萄糖 20g, 琼脂 20g, 水 1000ml, pH 自然。

1.2.2 摇瓶菌种培养基

马铃薯 200g(取煮液), 酵母浸膏 5g, 葡萄糖 20g, 水 1000ml, pH 自然。

1.2.3 基本产酶摇瓶培养基

黄豆 12.5g(制浆), 葡萄糖 20g, 水 1000ml, pH 6.0。

1.3 样品酶活的测定

收稿日期: 2005-03-29

基金项目: 抚州市科技局资助项目

作者简介: 包水明(1963-), 男, 副教授, 主要从事动物学和菌物学研究。

化学学报, 2000, 58(4): 414-417.

[8] 温国华, 旭昀, 罗美华, 等. 一些双二茂铁基烷的合成与表征[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2000, 31(6): 600-604.

[9] Stein A, Keller S W, Mallouk T E. Turning down the heat: design and mechanism in solid-state synthesis[J]. Science, 1993, 259: 1558-1564.