

稳定型色素—糖基化亚硝基血红蛋白的研制

杨锡洪¹, 解万翠¹, 王维民¹, 夏文水²

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524025; 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 亚硝基血红蛋白作为多元腌制系统中的红色素, 用来替代亚硝酸钠在肉类腌制中的发色作用, 增加安全性, 但色素的稳定性和分散性尚不理想。采用多糖处理亚硝基血红蛋白, 形成的糖基化亚硝基血红蛋白色素的光、热稳定性明显提高。通过选择糖基化反应的糖类, 并优化反应条件制备出新型腌制色素, 再采用紫外-可见光吸收曲线、红外光谱和 DSC 吸收曲线等, 初步探讨了其性质。

关键词: 亚硝基血红蛋白; 糖基化; 特性

Research on Stable Pigment—Glycosylated Nitroso-Hemoglobin

YANG Xi-hong¹, XIE Wan-cui¹, WANG Wei-min¹, XIA Wen-shui²

(1. School of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Nitroso-hemoglobin acted as pigment in multi-component curing system instead of nitrite was developing color in meat-curing. But its stability and dispersivity was not ideal. Nitroso-hemoglobin was treated with polysaccharide to prepare glycosylated nitroso-hemoglobin, stabilities of new pigment were enhanced obviously under light and heat. The new pigment was prepared by selection of polysaccharide and optimization of experiment condition. Then characteristic of the pigment was discussed by UV, IR and DSC.

Key words nitroso-hemoglobin; glycosylation; property

中图分类号: TS264.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0204-04

亚硝基血红蛋白是由血红蛋白与亚硝酸钠或 NO 反应制得, 常作为红色素用于肉制品加工中, 替代亚硝酸盐的发色作用, 明显降低了肉制品中亚硝酸钠的残留量, 增加了安全性。但色素的分散性和热稳定性均不理想, 经微胶囊包埋处理, 成为水不溶性的粉末状固体, 限制了它的使用。

蛋白质经糖基化处理后, 溶解性、抗氧化性、抗菌性以及热稳定性等性能都将明显提高^[1]。因此通过蛋白质的非酶糖基化作用, 改善亚硝基血红蛋白的理化性状, 色素除在肉制品加工中使用外, 还可以应用到果蔬汁饮料、雪糕、果冻等调色的食品, 这对于提高畜禽血中蛋白质和优质铁资源——血红素的利用率, 减少对环境的污染具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 材料

猪血 无锡肉联厂; 亚硝酸钠、异柠檬酸钠、葡萄糖、蔗糖为市售分析纯; 糊精、壳聚糖、阿拉伯

胶、黄原胶为食品添加剂。

1.2 仪器

UV1100 紫外扫描分光光度计 瑞利(北京)公司; Nicolet Nexus FT-IR spectrometer 红外色谱仪 (美国) 米高力公司; PyrisZ DSC 差示扫描量热仪 (美国) PE 公司。

1.3 方法

1.3.1 血红蛋白的制备

于新鲜采集的猪血中, 加入 0.5% 柠檬酸钠抗凝后, 3000r/min 离心分离 15min。倾去上层血浆后, 红细胞用等体积的生理盐水洗涤, 再离心, 重复两次, 然后加入等体积的蒸馏水, 搅拌 30min 使红细胞破壁, 释放出血红蛋白。将血红蛋白液真空脱气后, 避光条件下 60℃ 加热 30min, 3000r/min 离心 15min, 去除变性的杂蛋白。

1.3.2 亚硝基血红蛋白

于血红蛋白液中加入异抗坏血酸钠、亚硝酸钠, 调整 pH 为 6.1, 在 4℃ 下发色 24h^[4]。

1.3.3 糖的种类对糖基化反应的影响

收稿日期: 2007-07-20

作者简介: 杨锡洪(1963-), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品添加剂。

分别将葡萄糖、蔗糖、糊精、壳聚糖、阿拉伯糖和黄原胶配成1%液,与亚硝基血红蛋白液混和,于40、60℃条件下分别加热10min,再于75℃加热10min,比较加热后混合液的热稳定性。

1.3.4 糖基化条件的优化

用选定的壳聚糖,采用四因素三水平 $L_9(3^4)$ 的正交试验,四因素三水平为pH5、6、7;调整1%壳聚糖与5%亚硝基血红蛋白的体积比为1:2、2:2、2:1,加热温度40、50、60℃,加热时间5、10、15min。其后将各样品于75℃加热10min,过滤后于540nm测吸光度A,确定最佳合成条件。

1.3.5 色素的制品

将加热处理的糖基化反应液过滤,去除未反应、变性的蛋白质后,冷冻干燥,得到粉末状色素产品。

1.4 分析

1.4.1 紫外-可见光吸收光谱

将糖基化处理前后的亚硝基血红蛋白,在400~600nm波长范围内进行扫描。

1.4.2 红外光谱

分别将亚硝基血红蛋白和糖基化亚硝基血红蛋白的冻干粉以溴化钾压片,测定红外吸收光谱。

1.4.3 差示扫描量热分析

扫描速率为5℃/min,范围60~100℃。

1.4.4 蛋白质、水分、灰分和亚硝酸钠含量的测定

2 结果与分析

2.1 糖基化亚硝基血红蛋白的制备

2.1.1 糖类的选择

选用的几种糖类与亚硝基血红蛋白混和液经反应后,再于75℃加热10min,其结果见表1。

由表1可见,采用壳聚糖处理亚硝基血红蛋白,生成糖基化蛋白质的热稳定性较为理想。

表1 不同糖类处理亚硝基血红蛋白后的热稳定性
Table 1 Heat stability of NO-Hb treated with different polysaccharides

糖类	葡萄糖	蔗糖	壳聚糖	阿拉伯胶	糊精
现象	红色沉淀	红色沉淀	红色溶液	红色沉淀	红色沉淀

2.1.2 糖基化反应条件的优化

正交试验结果见表2,计算各因素的R值,可见pH的R值为0.677,对糖基化反应的影响最大。将各因素影响的趋势图绘为图1。

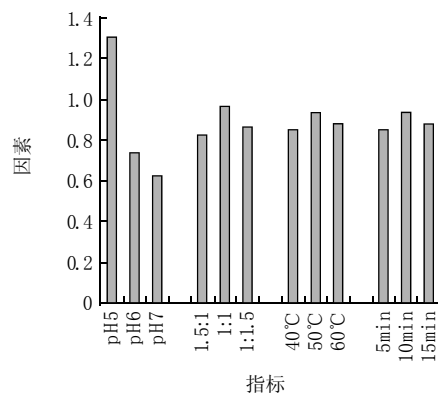


图1 各因素趋势图
Fig.1 Trends of factors

最终选择糖基化反应的实验条件为:pH5;糖液与蛋白液体积比为1:1;加热温度60℃;时间10min。

2.2 紫外-可见光吸收曲线

糖基化反应前后亚硝基血红蛋白的紫外-可见光吸收曲线的变化见图2。

糖基化亚硝基血红蛋白的紫外可见吸收光谱完全不同于其原料组分亚硝基血红蛋白的吸收特征。亚硝基血红蛋白为血红蛋白中的血红素铁与亚硝基形成了六配位的结构,具有血红素铁六配合物的显著特征。而糖基化反应后^[5],壳聚糖与亚硝基血红蛋白为共价结合,肽链在新的分子结构中的伸展完全发生了改变,引起糖基化产物的Soret峰红移至433nm,可见区形成从530~

表2 正交试验方案及结果
Table 2 Project and result of orthogonal test

试验号	因素				指标
	pH	糖液与蛋白体积比	热处理温度(℃)	处理时间(min)	75℃加热10min后滤液稀释30倍的540nm处吸光度
1	5	1.5:1	60	10	0.423
2	6	1.5:1	40	5	0.202
3	7	1.5:1	50	15	0.199
4	5	1:1	50	5	0.462
5	6	1:1	60	15	0.268
6	7	1:1	40	10	0.233
7	5	1:1.5	40	15	0.410
8	6	1:1.5	50	10	0.271
9	7	1:1.5	60	5	0.186
R	0.677	0.139	0.087	0.077	

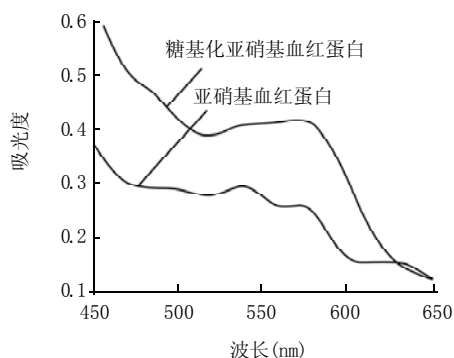


图2 紫外-可见光吸收曲线
Fig.2 Visible absorption of the pigments

570 nm 一个大的、缓慢上升的峰。但从峰型看, 血红素铁仍为六配位状态。

2.3 红外光谱

蛋白与多糖经过 Maillard 反应, 形成共价复合物, 会有反应基团的消失和新官能团的出现, 由此揭示糖基化反应机理。红外光谱见图 3。

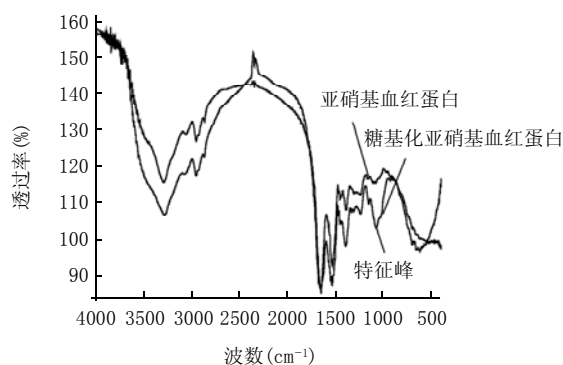


图3 红外光谱
Fig.3 IR spectrum

由图 3 可见, 血红蛋白与亚硝酸钠反应生成亚硝基血红蛋白, 配合物在 $3200\sim3400\text{cm}^{-1}$ 处均可观察到尖锐的吸收峰, 可将其归属为 N-H 伸缩振动吸收峰。亚硝与铁卟啉配位后其 N-O 振动频率较相应游离亚硝的 N-O 振动频率大约低 $50\sim100\text{cm}^{-1}$, 这是由于 Fe-N 配位键的生成削弱了 N-O 键的强度, 使得 VN-H 伸缩频率降低。

糖基化反应的壳聚糖, 其特征红外吸收表现在: $3600\sim3200\text{cm}^{-1}$ 处出现的宽峰为 O-H、N-H 的伸缩振动, 2950cm^{-1} 处有一弱峰为 C-H 吸收峰, $1665\sim1635\text{cm}^{-1}$ 处的较宽吸收峰为糖的水合物所持有, $1400\sim1200\text{cm}^{-1}$ 处的峰为 C-H 的变角振动, $1150\sim1060\text{cm}^{-1}$ 处的较宽峰为 C-O 伸缩振动(为糖的特征峰)。在 1709.2cm^{-1} 为醛基吸收峰, 与亚硝基血红蛋白反应后, 1709.2cm^{-1} 吸收峰消失, 在 1650cm^{-1} 和 1530cm^{-1} 出现两个亚胺吸收峰, 其中 1650cm^{-1} 被水合吸收峰所掩盖,

红外光谱表明, 壳聚糖的醛基与亚硝基血红蛋白上的氨基发生了羰胺反应, 形成了共价结合。

糖基化亚硝基血红蛋白是亚硝基血红蛋白与壳聚糖发生了共价键合的产物, 在亚硝基血红蛋白的红外光谱中表现出多糖的吸收特征。图 3 显示, 糖化蛋白在 $1000\sim1300\text{cm}^{-1}$ 处有一明显的 C-OH 键吸收, 而亚硝基血红蛋白则没有。由于糖化蛋白是经过凝胶柱分离纯化, 在 pH5.0 的缓冲液中两者带相同的电荷, 不会因带电不同而吸引, 因此纯化后的样品中不会附带游离的多糖, 可以表明多糖和蛋白质发生了共价结合。

2.4 DSC 曲线

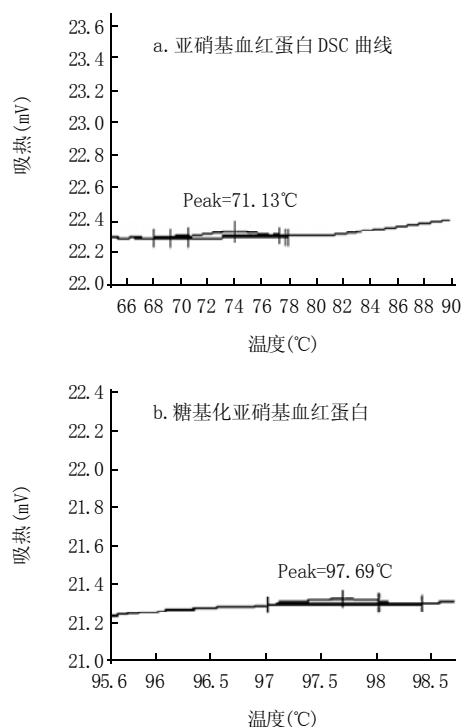


图4 两种色素 DSC 吸收曲线
Fig.4 Absorption curve of DSC

由图 4 可见, 亚硝基血红蛋白的最大吸收峰为 74.13°C , 通过糖基化处理新的色素在 97.69°C 有一最大吸收峰。结果表明新色素热稳定性明显提高。

亚硝基血红蛋白经微胶囊包埋后, 蛋白质分子禁锢在多糖壁材包裹的空间内, 加热时肽链的伸展受到一定的限制, 因此, 热稳定性有所提高。糖基化亚硝基血红蛋白是壳聚糖与亚硝基血红蛋白发生了共价结合, 如同多糖链在球蛋白上以及血红素口袋边上打了结, 使蛋白在加热时难以伸展, 保持了亚硝基血红素铁立体结构的稳定。同时带同种电荷的壳聚糖, 阻止了蛋白间的相互碰撞, 提高了蛋白的热稳定性^[6]。

2.5 色素的组成

冻干后粉末状色素的组成见表 3。

微波辅助法提取牛蒡根中菊糖的研究

徐 鑫, 陈小辉, 刘国艳, 于 海

(扬州大学食品科学与工程学院, 江苏 扬州 225001)

摘 要: 本实验采用微波辅助热水提取法以牛蒡根为原料制备具有良好生物活性的菊糖。微波辅助提取法和传统的水提取法的菊糖提取率分别为 58.18% 和 50.19%, 表明采用微波辅助法可以将菊糖的提取率提高 15.92%, 效果显著。利用单因素试验分别考察了料液质量比、微波提取时间、水提取温度、热水提取时间在不同水平下对菊糖提取率的影响程度。通过正交试验结果显示影响因素从大到小依次为: 热水提取时间>微波提取时间>水提取温度>料液质量比。最佳提取条件为: 料液质量比 1:20、微波提取时间 240s、水提取温度 70℃、热水提取时间 1.5h, 在此条件下菊糖的提取率可达到 91.40%。产品外观呈微黄色絮状固体、易吸湿、易结块、微甜、无臭、易溶于水、热稳定性好, 有着良好的应用前景。

关键词: 牛蒡根; 菊糖; 微波辅助热水提取法; 优化

Study on Microwave-assisted Extraction of Inulin from Burdock Root

XU Xin, CHEN Xiao-hui, LIU Guo-yan, YU Hai

(College of Food Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract: In the experiment, inulin was prepared from burdock root by microwave-assisted hot water extraction. The extraction rate of inulin by microwave-assisted extraction and traditional water extraction were 58.18% and 50.19% respectively. Single factor analysis of a number of major factors to choose ratio of solid to liquid, microwave extraction, water extraction temperature, water extraction time four factors as the rate of extraction to determine their conditions. The results showed that the orthogonal factors affecting ranking: water extraction time>microwave extraction time>water extraction temperature>ratio of solid to liquid. In hot water extraction, microwave extraction and water extraction, temperature is a major factor. The best combination of factors

收稿日期: 2007-07-20

作者简介: 徐鑫(1977-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为功能性食品。

表 3 色素产品的组成
Table 3 Composition of pigments

组分	血红蛋白(%)	水分(%)	灰分(%)	亚硝酸钠(mg/kg)
冷冻干燥产品	77.8	3.34	3.56	890

3 结 论

3.1 糖基化亚硝基血红蛋白制备的最优条件为: pH5.0; 壳聚糖: 亚硝基血红蛋白为 1:5; 加热温度 60℃; 时间 10min。

3.2 壳聚糖与亚硝基血红蛋白反应制备的糖基化亚硝基血红蛋白的热稳定性显著提高, 紫外-可见光吸收和红外光谱表明形成的产物为蛋白-多糖共价复合物。

3.3 冻干的粉末状色素经加水溶解后为红色液体, 可作为红色素用于肉制品加工中。

参考文献:

- [1] KATO A, SASAKI Y, FURUTA R, et al. Functional protein-polysaccharide conjugated by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures[J]. Agric Biol Chem, 1990, 54(1): 107-112.
- [2] NAKAMURA S, KOBAYASHI K, KATO A, et al. Role of lysozyme in the excellent emulsifying properties of maillard-type lysozyme-polysaccharide conjugate[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42: 2688-2691.
- [3] SHU Yu-wei, SAHARA S. Effect of the length of polysaccharide chains on the functional properties of the Maillard-type lysozyme-polysaccharide conjugate[J]. J Agric Food Chem, 1996, 44: 2544-2548.
- [4] MATSUDOMI N, INOUE Y, NAKASHINA H, et al. Emulsion stabilization by Maillard-type covalent complex of pilsama protein with galactomannan[J]. J Food Sci, 1995, 60(2): 265-268.
- [5] 钟芳, 麻建国, 王璋, 等. 蛋白质-多糖共价复合物[J]. 食品科技, 2000(5): 12-15.
- [6] 张旭, 黄秉仁. 蛋白质糖基化工程[J]. 生物工程进展, 1995, 15(2): 30-38.