

鸡肉味风味基料中蛋白黑素的初步分析

郑捷, 刘学勤, 柳亚静, 刘东岳, 曹蓓, 石龙贵, 刘安军

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 利用鸡骨架酶解液为原料, 通过美拉德反应制备鸡肉味风味基料。通过大小排阻高压液相色谱对鸡肉味风味基料中的蛋白黑素进行分子量(M_w)分析, 发现其大小约为 11561.1D; 对使用 0.2mol/L 和 0.5mol/L NaCl 溶液洗脱出的蛋白黑素进行傅里叶变换红外光谱分析, 鉴定出部分 C—H、C=O 以及 C—N 等吸收峰, 说明蛋白黑素是一类复杂的有机化合物, 可能由氨基酸复合物聚合、交联和美拉德反应的早期阶段的糖降解产物形成的, 具体结构仍需深入研究。

关键词: 鸡骨架; 酶解物; 蛋白黑素; 大小排阻高压液相色谱; 傅里叶变换红外光谱

Preliminary Analysis of Melanoidin in Chicken Flavor Matrix

ZHENG Jie, LIU Xue-qin, LIU Ya-jing, LIU Dong-yue, CAO Bei, SHI Long-gui, LIU An-jun

(College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Chicken bone hydrolysate was used to prepare chicken flavor matrix via Maillard reaction in this work. The molecular weight of melanoidin in the prepared flavor matrix was determined to be approximately 11561.1 D by size-exclusion high-performance liquid chromatography(HPSEC). The FT-IR results revealed that melanoidin fractions separated by 0.2 mol/L and 0.5 mol/L NaCl solutions had characteristic absorption peaks of C—H, C=O and C—N, suggesting that melanoidin in chicken flavor matrix was organic compound formed by polymerization and cross-linking of amino acid mixtures and degraded products in an early stage of Maillard reaction. The structure of melanoidin needs to be further investigated.

Key words: chicken bone; protein hydrolysates; melanoidin; size exclusion high performance liquid chromatography; fourier transform infrared spectroscopy

中图分类号: TS251.94

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0066-04

蛋白黑素是由羰基化合物(一般指糖类)与带有自由氨基的含氮化合物(如氨基酸、肽、蛋白质等)之间发生美拉德反应, 产物通过进一步环化、脱水、逆缩、重排、异构化、缩合而形成的一种褐色物质, 也称类黑精^[1-2]; 蛋白黑素具有抗氧化^[3-4]、抗菌^[5]、降糖、降压^[6]等生理功能, 且其功能性已得到初步验证。蛋白黑素结构复杂、聚合度不等, 是一种复杂的聚合物^[7]。在不同反应条件下, 不同反应物反应得到的蛋白黑素的组成成分与结构均存在差异。目前, 人们也逐渐开始对蛋白黑素的具体组成、分子结构及作用机理展开深入研究。Mundt 等^[8]对蛋白黑素的组成成分进行了比较研究, 结果显示, 蛋白黑素主要由降解反应的产物氨基

酸、糖结构片断、醛等部分组成。Martins 等^[9]的研究表明, 蛋白黑素的形成主要有以下 3 种途径: 1) 低分子质量的有色物质以及低分子质量的发色物质交联蛋白质中 Lys 和 Arg 中游离氨基基团; 2) 呋喃或吡咯通过缩聚反应、氨基酸复合物聚合、交联; 3) 美拉德反应的早期阶段的糖降解产物。

在食品加工过程中, 蛋白黑素与相关食品的营养有密切关系, 其广泛分布于咖啡、可可、面包、麦芽、蜂蜜等食品中, 与人类关系密切。但在热解蛋白质和氨基酸过程中, 有机体突变物质的发现增加了对这些食物安全性的关注。Taylor 等^[10]应用 Ames、Vitotox 和微核实验对 Glu-Lys 模型体系产生蛋白黑素的基因毒性进行

收稿日期: 2011-06-17

基金项目: 天津市农业科技成果转化与推广项目(201002090); 天津市科技成果转化及产业化推进计划项目(09ZXHCNC04900); 天津东丽科委科技成果转化项目(2010301; 2010303)

作者简介: 郑捷(1972—), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为水产品、畜产(副产)品高附加值的开发利用及功能性食品。

E-mail: jane@tust.edu.cn

评价,实验表明,在正常食用浓度范围,食品中蛋白黑素无基因毒性,高浓度的低分子质量的蛋白黑素具有毒性。Borrelli等^[11]研究发现可溶性的蛋白黑素有较强的氧化能力,对Caco-2细胞不产生细胞毒性。

本实验使用大小排阻高压液相色谱对鸡肉风味基料中蛋白黑素的分子质量进行测定,并使用傅里叶变换红外光谱对其结构进行分析,初步探索鸡肉风味基料中蛋白黑素的分子结构,为今后进一步就其结构的研究提供有益借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜鸡骨架 大成(天津)集团; Flavourzyme 诺维信复合风味蛋白酶($1.0 \times 10^5 \text{U/g}$)、Protamex 蛋白酶($1.2 \times 10^5 \text{U/g}$) 丹麦(中国)诺维信公司; 中低分子质量标准蛋白质(生化试剂) 美国Sigma公司; 丙氨酸(生化试剂) 天津颖洋生物制品有限公司; 盐酸(分析纯) 天津文达稀贵试剂化工厂; 氢氧化钠(分析纯) 天津市北方化玻购销中心; 氯化钠、葡萄糖等均为分析纯 天津江天化工有限公司; 各种调味料 天津市塘沽区乐购超市。

1.2 仪器与设备

ESJ205-4型电子天平 沈阳龙腾电子称量仪器有限公司; PHS-3B型精密pH计 上海雷磁仪器厂; TJS12-H绞肉机 广东恒联食品机械有限公司; 胶体磨 廊坊通用机械制造有限公司; FJ-200型高速分散均质机 上海标本模型厂; HH-8型数显恒温水浴锅 金坛市金城国胜实验仪器厂; LS-B50L型立式压力蒸汽灭菌器 上海华线医用核子仪器有限公司; LD4-40型低速大容量离心机 北京医用离心机厂; Waters 600高效液相色谱仪(配有配2487紫外检测器和M32工作站) 岛津(香港)有限公司; Vector 22傅里叶变换红外光谱仪 德国布鲁克公司。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理

取一定量的新鲜鸡骨架,去皮及油脂,用绞肉机将鸡骨架充分绞碎,将其置于 120°C 、 0.1MPa 高压加热处理20min;加适量的蒸馏水于胶体磨中研磨鸡骨颗粒,制得鸡骨糜。

1.3.2 鸡骨架酶解液的制备

向上述鸡骨糜中加入蒸馏水,高速均质混匀配制成25%的鸡骨悬浮液,用 3mol/L HCl或NaOH调溶液pH值至蛋白酶的最适pH值。置于500mL的烧杯中,采用恒温水浴锅维持酶的最适反应温度 55°C ,并保证均匀受热。加入 600U/g Flavourzyme风味蛋白酶和 360U/g

Protamex蛋白酶(以底物蛋白计算)水解反应3h,然后在 95°C 条件下加热10min使酶失活终止反应。水解液离心后,保留上清液以备用。

1.3.3 鸡肉风味基料的制备

取40g的鸡骨架蛋白酶解液,加入HAP 50g(水解蛋白酶)、 1.0g L-半胱氨酸盐酸盐、2g味精、0.8g硫酸胺、0.5g食盐、2g丙氨酸、1g木糖、0.5g葡萄糖, 120°C 进行美拉德反应20min制备鸡肉风味基料。

1.3.4 鸡肉风味基料中蛋白黑素的分析

1.3.4.1 低分子质量标准蛋白分子质量标准曲线的测定
色谱条件^[12]: Waters 600高效液相色谱仪(配2487紫外检测器和M32工作站); TSKgelG4000PWXL色谱柱($300\text{mm} \times 7.8\text{mm}$, $10\mu\text{m}$); 流动相: 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液; UV220nm检测器; 流速: 0.6mL/min ;

标准品: 兔磷酸化酶B(M_w 97.4kD)、牛血清白蛋白(M_w 66.2kD)、兔肌动蛋白(M_w 43kD)、牛碳酸酐酶(M_w 31kD)、胰蛋白酶抑制剂(M_w 20.1kD)、鸡蛋清溶菌酶(M_w 14.4kD)。

1.3.4.2 鸡肉风味基料中蛋白黑素的分离

对蛋白黑素分离、分析的方法主要有等电聚焦、金属离子亲和色谱、凝集素亲和层析色谱等方法^[13]。目前,在蛋白黑素的制备方面普遍采用的方法是:将美拉德反应的产物MRPs通过透析、Sephadex、超滤等技术进行分离,即可得到不同相对分子质量范围的蛋白黑素。

本实验将鸡肉风味基料置于3000D的透析袋中,流水透析48h,然后用DEAE-Sephadex A-25凝胶柱分离,分别用 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 0.5mol/L NaCl溶液洗脱^[14-15]。

1.3.4.3 大小排阻高压液相色谱(HPSEC)分析蛋白黑素分子质量

大小排阻高压液相色谱条件同1.3.4.1节中所述;样品制备:样品用微孔过滤膜过滤后,吸取 $15\mu\text{L}$ 进样。

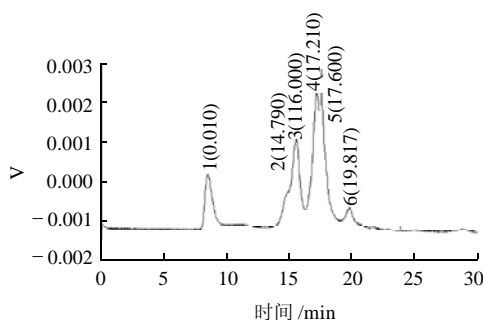
1.3.4.4 傅里叶变换红外光谱初测结构

将分离出的蛋白黑素冻干后与溴化钾混匀压片,置于Vector 22傅里叶变换红外光谱仪中进行分析。分辨率: 4cm^{-1} , 扫描次数: 16。

2 结果与分析

2.1 低分子质量标准蛋白分子质量校正曲线的确定

低分子质量标准蛋白大小排阻高压液相分子凝胶色谱图如图1所示,分别选取标准品的保留时间(x)与分子质量的对数值($\lg M_w$)为横纵坐标作出分子质量校正曲线,并得出分子质量校正曲线方程为: $\lg M_w = -0.135X + 6.789 (R^2 = 0.943)$ 。



1.兔磷酸化酶B(M_w 97.4kD); 2.牛血清白蛋白(M_w 66.2kD);
3.兔肌动蛋白(M_w 43kD); 4.牛碳酸酐酶(M_w 31kD); 5.胰
蛋白酶抑制剂(M_w 20.1kD); 6.鸡蛋清溶菌酶(M_w 14.4kD)。

图1 低分子质量标准蛋白高压液相分子凝胶色谱图
Fig.1 HPSEC of peptide standards with low molecular weight

2.2 蛋白黑素分子质量的确定

采用 DEAE-Sephadex A-25 凝胶柱对鸡肉风味基料进行分离(图2), 用 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mol/L 的 NaCl 溶液洗脱出蛋白黑素。对 5 种蛋白黑素用大小排阻高压液相色谱进行分子质量分析, 分子质量经校正曲线方程计算, 发现其分布在同一范围内, 约为 11561.1D。DEAE-Sephadex A-25 凝胶颗粒大小为 4~120 μ m, 适用于分离小蛋白及巨大分子, 5 种浓度 NaCl 洗脱液洗脱出同样分子质量的样品, 可能是由于样品分子质量不在凝胶洗脱范围内, 因此仅以其离子强度大小被分离。

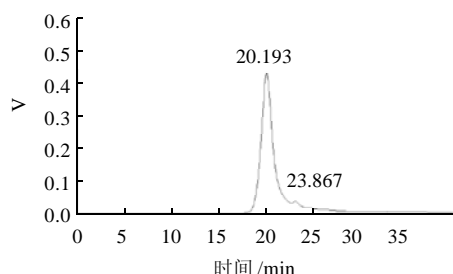


图2 蛋白黑素高压液相分子凝胶色谱图
Fig.2 HPSEC of melanoidin sample

2.3 蛋白黑素结构的红外光谱初步测定

选取 0.2mol/L 和 0.5mol/L NaCl 溶液洗脱出蛋白黑素, 对其进行傅里叶变换红外光谱分析, 红外光谱图见图3。用 0.2mol/L NaCl 溶液洗脱出的蛋白黑素在 3080 cm^{-1} 处可能存在 $=\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动吸收峰, 也可能是 $\text{C}-\text{X}$ 吸收振动峰($\text{X}=\text{O}, \text{N}, \text{C}, \text{S}$)。3306、2977、2836 cm^{-1} 处可能存在 $\text{C}-\text{X}$ 吸收振动峰。1651 cm^{-1} 处存在不对称烯烃 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动吸收峰, 980 cm^{-1} 处存在 $=\text{C}-\text{H}$ 面外弯曲振动吸收峰, 3306 cm^{-1} 处存在末端炔烃 $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动吸收峰, 1723 cm^{-1} 处存在 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动吸收峰。0.5mol/L NaCl 溶液洗脱出的蛋白黑素

在波数 2925 cm^{-1} 处存在 $\text{C}-\text{H}$ 甲基和亚甲基伸缩振动吸收峰, 1641 cm^{-1} 处存在不对称烯烃 $\text{C}=\text{C}$ 伸缩振动吸收峰, 928 cm^{-1} 和 858 cm^{-1} 处存在末端炔烃 $=\text{C}-\text{H}$ 面外弯曲振动吸收峰, 1384 cm^{-1} 处存在 $\text{C}-\text{H}$ 甲基和亚甲基剪切振动吸收峰。

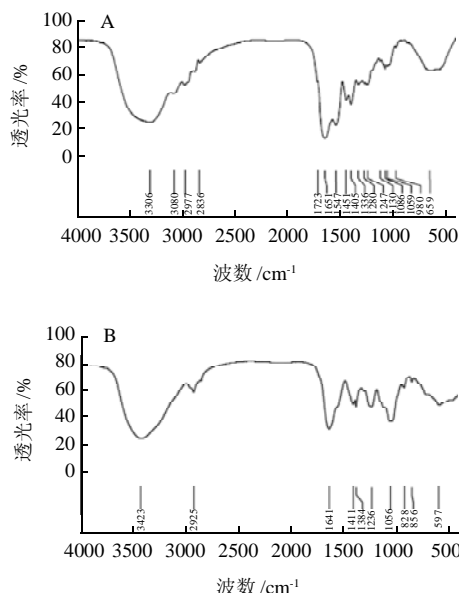


图3 0.2mol/L(A)和0.5mol/L(B)NaCl 溶液洗脱出的蛋白黑素
红外光谱图

Fig.3 Infrared spectra of melanoidin eluted by 0.2 mol/L and 0.5 mol/L NaCl solutions

本实验鉴定出部分 $\text{C}-\text{H}$ 、 $\text{C}=\text{O}$ 以及 $\text{C}-\text{N}$ 等吸收峰, 说明蛋白黑素是一类复杂的化合物, 有可能是由氨基酸复合物聚合、交联和美拉德反应的早期阶段的糖降解产物形成的, 其具体结构需进一步检测才能得出。

3 结 论

实验利用 DEAE-Sephadex A-25 凝胶柱分离鸡肉风味基料中的蛋白黑素, 并使用大小排阻高压液相色谱对其进行分子质量分析得出其分子质量约为 11561.1D; 对使用 0.2mol/L 和 0.5mol/L NaCl 溶液洗脱出的蛋白黑素进行傅里叶变换红外光谱分析, 鉴定出部分 $\text{C}-\text{H}$ 、 $\text{C}=\text{O}$ 以及 $\text{C}-\text{N}$ 等吸收峰, 说明蛋白黑素是一类复杂的有机化合物, 有可能是由氨基酸复合物聚合、交联和美拉德反应的早期阶段的糖降解产物形成的, 具体结构仍需深入研究。

参考文献:

- [1] 崔畅, 张永忠, 李文滨. 蛋白黑素的研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28

- (8): 517-520.
- [2] 徐清萍. 食品类黑精的功能、结构及制备研究进展[J]. 中国酿造, 2008, 27(22): 13-15.
- [3] 秦礼康, 丁霄霖. 陈窖豆豉粬类黑精组分体外抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(1): 88-92.
- [4] DELGADO-ANDRADE C, RUFIAN-HENARES J A, MORALES F J. Assessing the antioxidant activity of melanoidins from coffee brews by different antioxidant methods[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(20): 7832-7836.
- [5] HIRAMOTO S, ITOH K, SHIZUUCHI S, et al. Melanoidin, a food protein: derived advanced Maillard reaction product, suppresses *Helicobacter pylori* *in vitro* and *in vivo*[J]. Helicobacter, 2004, 9(5): 429-435.
- [6] 五明纪春, 陈晓光, 刘宇峰. 大豆豆酱、酱油中褐色色素的生理功能作用[J]. 大豆通报, 2001(1): 28-29.
- [7] 吕承秀, 王帅, 于晓旭. 类黑精研究进展[J]. 粮食与油脂, 2009(12): 45-47.
- [8] MUNDT S, WEDZICHA B L. Comparative study of the composition of melanoidins from glucose and maltose[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(13): 4256-4260.
- [9] MARTINS S I F S, van BOEKEL M A J S. Melanoidins extinction coefficient in the glucose/glycine Maillard reaction[J]. Food Chemistry, 2003, 83(1): 135-142.
- [10] TAYLOR J L S, DEMYTTENAERE J C R, TEHRANI K A, et al. Genotoxicity of melanoidin fractions derived from a standard glucose-glycine model[J]. Agric Food Chem, 2004, 52(2): 318-323.
- [11] BORRELLI R C, MENNELLA C, BARBA F, et al. Characterization of coloured compound sobtained by enzymatic extraction of bakery products [J]. Food and Chemical Toxicology, 2003, 41(10): 1367-1374.
- [12] 谭斌. Maillard 反应体系制备热加工牛肉风味基料的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2005.
- [13] MORALES F J, FERNÁNDEZ-FRAGUAS C, JIMENÉZ-PÉREZ S. Iron-binding ability of melanoidins from food and model systems[J]. Food Chemistry, 2005, 90(4): 821-827.
- [14] CHANG H Y, YANG Xiaolu. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(4): 821-846.
- [15] XU Qingping, TAO Wenyi, AO Zonghua. Antioxidant activity of vin-egar melanoidins[J]. Food Chemistry, 2007, 102(3): 841-849.