

糖基化处理对蛋清粉凝胶性与物化特性的影响

迟玉杰¹, 胥 伟¹, 洪煜淼²

(1.东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2.中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009)

摘 要: 为研究糖基化蛋清蛋白质的分子特点, 对糖基化蛋清蛋白的凝胶性、巯基数、疏水性、分子柔性和Zeta电位进行测定。结果表明: 糖基化改性可使蛋清蛋白质的凝胶强度增加112.51%, 持水性增加18.89%。在糖基化反应过程中, 蛋清蛋白的构象发生了两方面的变化: 一是蛋白质分子部分展开, 包含于分子内部的疏水性基团暴露出来, 二是蛋白质分子间或分子内形成了二硫键, 使总巯基含量下降。此外, 糖基化反应使蛋清蛋白的表面游离 $\epsilon\text{-NH}_2$ 数目减少, 使得蛋清蛋白所带正电荷数减少, 从而降低了蛋清蛋白的等电点。

关键词: 蛋清粉; 糖基化; 凝胶性; 疏水性; 分子柔性

Effect of Glycosylation on Gelling and Physicochemical Properties of Egg White Powder

CHI Yu-jie¹, XU Wei¹, HONG Yu-miao²

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. College of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Molecular characteristics of glycosylated egg white proteins (GEWP), including gelling properties, the number of sulfhydryl groups, hydrophobicity, molecular flexibility and Zeta potential were investigated. The results showed that gel strength and water holding capacity of glycosylated egg white proteins increased by 112.51% and 18.89%, respectively, when compared to control. After glycosylation, the protein molecules were partially unfolded, thus exposing the internal hydrophobic groups. At the same time, inter- and intra-protein disulfide bonds were formed, resulting in decreased total sulfhydryl content. In addition, glycosylation decreased the number of free $\epsilon\text{-NH}_2$ on the surface of egg white protein molecules, reducing the positive charges, and thus, the isoelectric point of egg white proteins.

Key words: egg white powder; glycosylation; gelling properties; hydrophobicity; molecular flexibility

中图分类号: S879.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)07-0082-04

蛋清粉作为蛋清液的理想替代品, 具有营养价值高, 稳定性好, 便于生产、运输和贮藏等优点, 同时它还具有多种功能性质, 如凝胶性、起泡性和乳化性等, 因此蛋清粉作为一种重要的成分配料被广泛应用于食品工业中, 蛋清粉的凝胶性多用于鱼糜制品、肉制品中^[1-2]。

糖基化反应是蛋白质分子侧链上的自由氨基与还原糖末端的羰基之间发生的羰氨反应——美拉德反应(Maillard reaction), 在此反应过程中蛋白质与糖以共价键结合, 无需使用催化剂, 仅加热就可使其自发进行, 可以显著改善蛋白质的乳化性、溶解性、凝胶性、起泡性、热稳定性等, 是提高蛋清粉凝胶性比较理想的一种方法^[3-7]。目前, 人们对糖基化改性提高蛋清蛋白凝胶性的研究多集中在改性条件的优化、改性前后蛋白理化性质的变化等方面, 而对糖基化蛋清蛋白分子特点的研究还不够深入。因此, 本实验在前人研究基础上, 对糖基化反应过程中蛋清蛋白的巯基数、疏水性、分子柔性和

Zeta电位的变化进行测定, 以期对糖基化改性在食品工业中的广泛应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

蛋清粉 大连韩伟食品有限公司; 葡聚糖 山东富欣生物科技股份有限公司; Tris、甘氨酸和磷酸盐等其他化学试剂(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

SHD型恒温恒湿试验箱 上海一实仪器设备厂; FDU-1100冷冻干燥机 日本Eyela公司; PHS-3C型酸度计 上海精密仪器有限公司; TA-XTplus2质构仪 英国SMS公司; LD4-2A离心机 北京医用离心机厂; F-4500荧光分光光度计 日本日立公司; Zeta电位分析仪 英国马尔文公司。

收稿日期: 2012-01-05

基金项目: 农业部蛋鸡产业技术体系岗位科学家项目(nycyt-41-g23)

作者简介: 迟玉杰(1963—), 女, 教授, 博士, 主要从事食品化学及农产品加工研究。E-mail: yjchi@126.com

1.3 方法

1.3.1 糖基化蛋清粉的制备

参照于滨等^[3]的制备方法并稍作修改,将蛋清粉与葡聚糖按质量比100:8混合、溶解,经冷冻干燥制得蛋清粉-葡聚糖混合物,然后将其置于含有饱和碘化钾溶液(相对湿度65%)的密闭容器中,60℃条件下反应1~5d,制得糖基化蛋清粉。

1.3.2 糖基化蛋清粉凝胶强度与持水性的测定

参照于滨等^[3]的方法制备蛋清粉凝胶,并测定其凝胶强度与持水性。

1.3.3 蛋清粉糖基化改性程度的测定

采用邻苯二甲醛(OPA)法对蛋白中糖基化程度进行测定^[8]:OPA试剂4mL于试管中,注入200μL 10mg/mL样品液,混匀后于35℃反应2min,以OPA试剂中加入200μL水为空白,在340nm波长处测定其吸光度。反应的糖基化程度(DG)按式(1)计算。

$$DG/\% = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: A_t 为 t 时刻样品的吸光度; A_0 为未反应样品的吸光度。

1.3.4 游离巯基含量的测定

暴露游离巯基含量的测定:取4mL pH8.5、浓度为0.1mol/L的Tris-甘氨酸缓冲液,其中含0.01mol/L的乙二胺四乙酸(EDTA),加入到1mL 4g/100mL蛋白质溶液中,40℃保温30min,加入125μL的5,5-二巯基-2,2-二硝基苯甲酸(DTNB)试剂(20mg DTNB溶于5mL 0.1mol/L、pH8.0的Tris-甘氨酸缓冲液),再在25℃显色10min,测定412nm波长处的吸光度,以13600L/(mol·cm)消光系数计算巯基含量。

总游离巯基含量的测定:所用的Tris-甘氨酸缓冲液中另含有0.25g/100mL SDS,蛋白质含量为0.4g/100mL,其他同表面巯基含量的测定^[9]。

1.3.5 蛋白疏水性分析

用0.02mol/L、pH7.4的磷酸缓冲液稀释至蛋白质量浓度至1~5mg/mL之间,取不同质量浓度的稀释样品4mL,加入20mL的8-苯胺萘磺-1-酸盐(ANS)溶液(采用0.02mol/L, pH7.4磷酸缓冲液)作为荧光探针并于室温条件下保持1h。采用荧光分光光度计在370nm波长处的激发波长和470nm波长处的发射波长测定样品的荧光强度,以荧光强度对蛋白质质量浓度作曲线,曲线斜率即为蛋白质分子的表面疏水性^[10]。

1.3.6 蛋白分子柔性的测定

蛋白的分子柔性以蛋白消化初始速率表示。取4mL质量浓度为0.1g/100mL的蛋白溶液,加入250μL 0.1g/100mL的胰蛋白酶溶液,在37℃反应5min,蛋白消化完毕,加入4mL 5g/100mL的三氯乙酸终止反应,在

4000r/min离心10min,根据Lowry方法测定上清液中的蛋白含量,采用凯氏定氮法测定总蛋白含量,蛋白分子柔性按式(2)进行计算^[11]。

$$\text{蛋白柔性}/(\%/min) = \frac{\text{上清液蛋白含量}}{\text{总蛋白含量} \times 5min} \times 100 \quad (2)$$

1.3.7 Zeta电位测定

配制pH7.4的0.02mol/L的Tris-HCl缓冲液,加入适量的0.01mol/L NaCl溶液,溶液脱气后,再加入待测样品充分溶解,0.45μm微滤膜过滤,用马尔文Zeta电位测定仪分析Zeta电位,测定温度为25℃^[12]。

1.4 数据分析

通过SPSS Statistics 18.0的One-way ANOVA对结果进行分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 糖基化蛋清蛋白的凝胶性

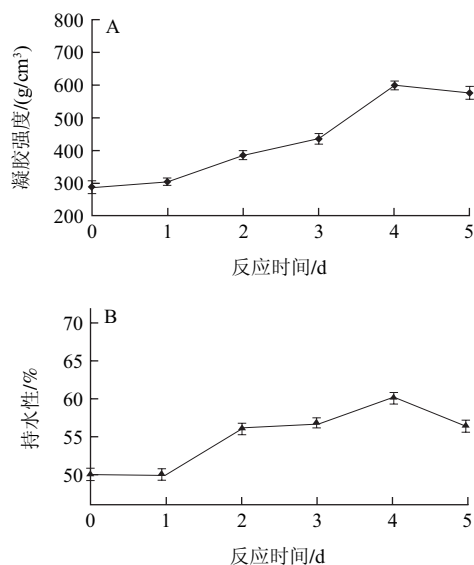


图1 糖基化蛋清蛋白的凝胶强度(A)和持水性(B)

Fig.1 Gel strength (A) and water holding capacity (B) of GEWP

由图1可知,蛋清蛋白的凝胶强度变化与持水率的变化趋势一致。二者都是随反应时间的延长而增加,在反应4d时达到最大值,此时凝胶强度增加了112.51%,持水性增加了18.89%,超过4d后二者又同时下降,这可能是由于时间过长,葡聚糖与蛋白过度结合所导致的。

2.2 蛋清蛋白质糖基化程度的测定

由图2可知,在反应的前4d,蛋清蛋白质的糖基化程度随反应时间的延长而逐渐增大,反应第4天的糖基化程度较第1天增加107.38%,而反应4d后蛋白的糖基化程度保持不变。

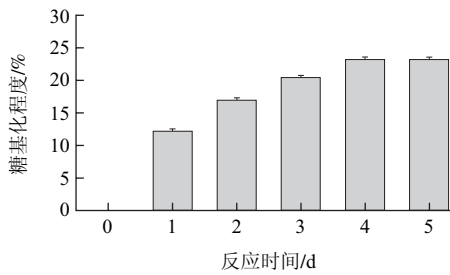


图2 反应过程中蛋清蛋白质的糖基化程度

Fig.2 Change in glycosylation degree of EWP during glycosylation reaction

2.3 糖基化蛋白游离巯基数目变化

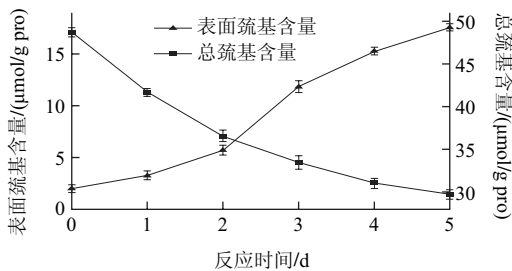


图3 糖基化蛋清蛋白巯基含量的变化

Fig.3 Change in surface thiol groups of EWP during glycosylation reaction

分子间二硫键是维持凝胶结构的重要作用力。因此通过分析糖基化蛋白表面游离巯基与总游离巯基含量的变化,可以研究糖基化反应过程中蛋白质分子的空间伸展状况。由图3可知,随反应时间的延长,表面巯基含量增加,而总巯基含量减少,这说明在加热过程中蛋白质在发生糖基化反应的同时,其蛋白质构象同时发生了两方面的变化:一是蛋白质分子部分展开,将原来包含于内部的巯基暴露出来,二是蛋白质分子间或分子内形成了二硫键,使得总巯基含量下降。

2.4 糖基化蛋白疏水性变化

蛋白质氨基酸残基的疏水性是影响蛋白质理化和功能性质的一项重要因素。蛋白质表面疏水性反映的是蛋白质分子表面疏水性氨基酸的相对含量。由于疏水性能反映蛋白质结构的微妙变化,因此它被作为评价蛋白质结构的一个重要参数^[13]。对于凝胶形成而言,疏水作用是维持凝胶结构的重要作用力,而蛋白质的表面疏水性与分子间疏水作用紧密相关。由图4可知,随反应时间延长,荧光强度随之线性增加,它可较好地反映蛋白质的疏水性。在本实验中采用ANS作为荧光探针测定糖基化蛋白的疏水性,根据Townsen等^[14]的观点,ANS连接到芳香族氨基酸如苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸的支链上,因而荧光强度与蛋白质的疏水性直接相关。未经处理的蛋清蛋白的大多数疏水基团分布在蛋清蛋白分子的内部^[15],糖基化蛋白的疏水性分析表明糖基化使得包埋

于天然蛋清蛋白内部的疏水性基团暴露出来,使得蛋白质的结构伸展。

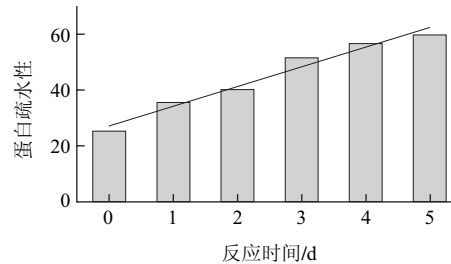


图4 糖基化蛋清蛋白疏水性随时间的变化

Fig.4 Change in hydrophobicity of EWP during glycosylation reaction

2.5 糖基化蛋白柔性变化

蛋白柔性是表示在酶的作用下,蛋白质分子结构不断打开的难易程度,是描述生物大分子活动程度与结构的重要指标,它和蛋白质分子内部的疏水作用强度、蛋白质形状等都有密切关系。糖基化过程中蛋白质分子结构不断改变,使其空间伸展状况也发生了变化。由图5可以看出,随反应时间延长,蛋白质的柔性不断增加,但是0、1d处理的样品差异不显著($P>0.05$),这可能是由于糖基化反应过程中,一方面糖分子的连接减少了赖氨酸的数量,另一方面蛋白质分子空间结构不断伸展,胰蛋白酶的活性中心很容易与蛋白质的水解位点相互作用,综合体现为柔性没有变化,而处理2~5d的样品更易于进行酶水解,进而表现为蛋白柔性不断增加。

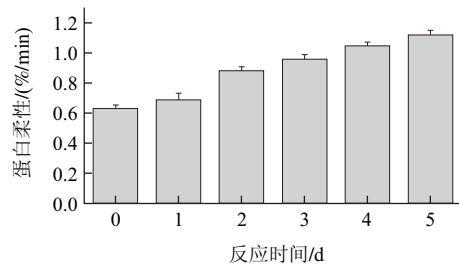


图5 糖基化蛋清蛋白柔性随反应时间的变化

Fig.5 Change in flexibility of EWP during glycosylation reaction

2.6 糖基化蛋白Zeta电位变化

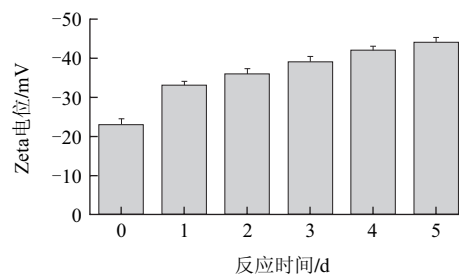


图6 糖基化蛋白Zeta电位的变化

Fig.6 Change in Zeta potential of EWP during glycosylation reaction

葡聚糖的羰基与赖氨酸 ϵ -氨基反应,减少了蛋白质表面游离氨基的数目,蛋白质以兼性离子的形式存在,由于游离氨基减少,导致蛋白质表面电荷变化,而表征蛋白质表面电荷最直接的指标就是Zeta电位,因此本实验通过分析不同糖基化反应时间样品的Zeta电位的变化,来表征糖基化蛋白电荷的变化。由图6可知,Zeta电位随反应时间的延长不断降低,从0d的-24mV降至5d的-44mV,说明蛋白质表面所带负电荷明显增加。经糖基化反应1d后,Zeta电位增幅降低,这是由于蛋白质经过1d反应后,游离氨基数明显降低,在随后的反应中游离氨基的变化相对减少,这主要是由于在反应初期有较多的 ϵ -NH₂参与反应,随反应的进行,蛋白质的柔性和 ϵ -NH₂的可及性都有所降低^[16]。游离氨基的减少必然导致蛋白质表面电荷的变化,而Zeta电位可以表征蛋白质表面电荷的变化情况,它主要受蛋白质的电荷数以及周围离子环境的影响^[17]。在整个糖基化反应中,蛋清蛋白携带负电荷,这是由于蛋清蛋白的等电点4.6低于缓冲溶液的pH7.4,糖基化蛋清蛋白所带负电荷随着处理时间的增加而增加,这表明葡聚糖不断与蛋清蛋白表面的游离 ϵ -NH₂发生反应,使得蛋白所带正电荷减少,从而降低了蛋清蛋白的等电点,这也被其他学者^[18]验证。

3 结 论

3.1 糖基化改性可以改善蛋清粉的凝胶性,经糖基化反应4d后,蛋清粉的凝胶强度可增加112.51%,持水性增加18.89%,此时蛋清蛋白质的糖基化程度达最大值,较第1天增加了107.38%。

3.2 蛋清蛋白在糖基化反应过程中,蛋白质构象发生了两方面的变化:一是蛋白质分子部分展开,将原来包含于内部的巯基暴露出来,二是蛋白质分子间或分子内形成了二硫键,使得总巯基含量下降。

3.3 糖基化改性使包埋于天然蛋清蛋白内部的疏水性基团暴露出来,使蛋清蛋白的结构变得更加伸展。此外,在糖基化反应过程中,葡聚糖不断与蛋清蛋白表面游离的 ϵ -NH₂发生反应,使得蛋清蛋白所带正电荷数减少,进而降低了蛋清蛋白的等电点。

参考文献:

- [1] ALLEONI A C C. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming[J]. *Sci Agric*, 2006, 63(3): 291-298.
- [2] 迟玉杰. 鸡蛋深加工系列产品综合开发技术概况[J]. *中国家禽*, 2004, 26(23): 6-9.
- [3] 于滨, 迟玉杰. 糖基化改善蛋清蛋白功能性的研究[J]. *中国家禽*, 2009, 31(7): 15-18.
- [4] KATO A. Industrial applications of Maillard-type protein-polysaccharide conjugates[J]. *Food Science and Technology Research*, 2002, 8(3): 193-199.
- [5] AI-HAKKAK J, AI-HAKKAK F. Functional egg white-pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction[J]. *Journal of Food Engineering*, 2010, 100(1): 152-159.
- [6] NAOTOSHI M, KATORI N, AKIKO S, et al. Improvement of gel properties of dried egg white by modification with galactomannan through the Maillard reaction[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(14): 4113-4118.
- [7] 罗永康, 张爱荣. 糖基化反应改善蛋白质功能性质的研究进展[J]. *食品科技*, 2004(7): 4-10.
- [8] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. *Journal of Food Science*, 2001, 66(5): 642-646.
- [9] PLANCKEN I V D, LOEY A V, IENDRICKX M E G. Changes in sulfhydryl content of egg white protein due to heat and pressure treatment[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53(14): 5726-5733.
- [10] NAKAI S, LI-CHAN E. *Hydrophobic interactions in food systems*[M]. Boca Raton: CRC Press, 1988: 47-48.
- [11] MESTE M L, COLAS B, SIMATOS D, et al. Contribution of protein flexibility to the foaming properties of casein[J]. *Journal of Food Science*, 1990, 55(5): 1445-1447.
- [12] 叶进富, 林东强, 姚善泾. 蛋白质Zeta电位与离子交换层析容量因子的相关研究[J]. *高校化学工程学报*, 2007, 21(3): 381-385.
- [13] SANTE LV, AUBRY L, GATELLIER P. Effect of oxidation on *in vitro* digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(13): 5343-5348.
- [14] TOWNSEN A, NAKAI S. Relationship between hydrophobicity and foaming characteristics of food protein[J]. *Journal of Food Science*, 1983, 48(2): 588-594.
- [15] SHIRAI N, TANI F, HIGASA T, et al. Linear polymerization caused by the defective folding of a noninhibitory serpin ovalbumin[J]. *Journal of Biochemistry*, 1997, 121(4): 787-797.
- [16] ACHOURI A, BOYE J I, YAYLAYAN V A, et al. Functional properties of glycated soy 11S glycinin[J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(4): 269-274.
- [17] SURH J, DECEER E A, MCCLEMENTS D J. Influence of pH and pectin type on properties and stability of sodium-cascinate stabilized oil-in-water emulsions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(5): 607-618.
- [18] CROGUENNEC T, NAU E, BRULE G. Influence of pH and salts on egg white gelation[J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67(2): 608-614.