

高凝胶性大豆球蛋白制备工艺优化*

迟玉杰 范 淼

(东北农业大学教育部大豆生物学重点实验室, 哈尔滨 150030)

【摘要】 以脱脂豆粕为材料,分离纯化后得到大豆球蛋白(11S)。通过添加葡萄糖进行糖基化改性,单因素试验初步得到改性的工艺条件,并在此基础上采用 Box-Behnken 模型对工艺条件进行优化,测定并分析了改性产物在各个条件下的凝胶强度。结果表明,最佳工艺条件为:反应温度 78.61℃、反应时间 60.36 min 和葡萄糖质量分数 2.84%,凝胶强度达到 271.37 g。根据实际情况,将反应温度设定为 80℃,反应时间设定为 60 min,葡萄糖质量分数确定为 3.0%,在此条件下进行验证试验,凝胶强度为 270.52 g,是未改性大豆球蛋白的 3.07 倍。试验证明优化工艺能有效且显著提高大豆球蛋白的凝胶强度。

关键词: 大豆球蛋白 糖基化改性 凝胶强度 Box-Behnken 模型

中图分类号: TS201.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2012)10-0124-07

Preparation Technology of Glycinin with High Gel Strength

Chi Yujie Fan Miao

(Key Laboratory of Soybean Biology, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract

Aimed at increasing the gel strength of product, the experiment employed defatted soybean meal as raw material, and obtained soybean glycinin through separation and purification (11S). Glycosylation modification was realized by adding glucose. The operation conditions for modification were established by single factor experiment. On the basis, Box-Behnken model was used to optimize technological conditions, test and analyze the gel strength of modified products under various conditions. The results illustrated the optimum reaction conditions as follows, reaction temperature was 78.61℃, reaction time was 60.36 min, the augmenter of glucose was 2.84%, and the gel strength could achieve 271.37 g. According to actual situation, reaction temperature was set to 80℃, reaction time was set to 60 min, and the augmenter of glucose was set to 3.0%. Under these conditions, the proof test's result was 270.52 g which was 3.07 times of the unmodified glycinin. The experiment proved that the modification technology can effectively and significantly increase gel strength of glycinin.

Key words Glycinin, Glycosylation modification, Gel strength, Box-Behnken model

引言

大豆分离蛋白具有独特的功能性质,在食品加工业中作为功能性辅料而得到广泛应用^[1]。凝胶性是大豆分离蛋白最主要的功能特性之一,球蛋白形成的热致凝胶网络能同时束缚水、脂类、风味物质、色素和其他成分,并使它们在分散相中保持稳

定,所以凝胶性对于食品加工有着重要作用^[2]。大豆分离蛋白凝胶性受环境因素、制备条件和自身组成结构的影响。大豆中近 90% 的蛋白质以贮藏蛋白的形式存在,其中主要是大豆球蛋白(11S)和β-伴球蛋白(7S),因此大豆分离蛋白的凝胶性主要由 11S 和 7S 球蛋白分子结构基础上的理化性质来体现。11S 球蛋白是分子量在 300~360 kDa 之间的

收稿日期: 2012-01-12 修回日期: 2012-03-04

* 黑龙江省自然科学基金重点资助项目(ZD200902)和教育部大豆生物学省部共建教育部重点实验室开放基金资助项目(SB08C03)

作者简介: 迟玉杰,教授,博士生导师,主要从事食品化学及农产品深加工研究, E-mail: yjchi@126.com

六聚体,分为酸性亚基 A_{1a} 、 A_{1b} 、 A_2 、 A_3 、 A_4 、 A_5 和碱性亚基 B_{1a} 、 B_{1b} 、 B_2 、 B_3 、 B_4 等 11 个亚基,酸性和碱性亚基通过二硫键交互对应形成比较稳定的结构形式^[3],分子中巯基含量比 7S 高,所以 11S 蛋白具有较好的凝胶性。Utsumi 也曾报道 11S 球蛋白的凝胶性明显高于 7S 球蛋白^[4]。

糖基化反应是基于蛋白质分子中氨基酸侧链的自由氨基和糖分子还原末端的羰基之间的羰氨反应——美拉德反应 (Maillard reaction),该反应中蛋白质与糖以共价键结合,不需要催化剂,仅加热就可使该反应自发地进行。蛋白质和糖共价结合的糖基化产物对于外部条件具有较高的稳定性,与蛋白质和糖非共价结合相比,其结合不受热或 pH 值的变化而被破坏^[5-6]。此方法可以显著改善蛋白质乳化性、溶解性、凝胶性和起泡性等,是蛋白质改性中较为理想的方法^[7-11]。但是关于糖基化改性的技术多应用于大豆分离蛋白^[12-15],而应用于大豆球蛋白方面的研究却鲜见报道。

本文是在分子水平上探究大豆球蛋白结构变化与其凝胶性的内在联系,并采用 Box-Behnken 模型对影响大豆球蛋白糖基化反应的因素进行优化,以期为进一步开展糖基化改性影响大豆蛋白结构凝胶性质的研究提供指导,为建立专用型、功能型大豆蛋白制品提供理论基础和技术支持。

1 试验材料与试验方法

1.1 试验材料与设备

低温脱脂豆粕,哈高科大豆食品有限公司提供,经粉碎过 60 目筛得脱脂豆粉。

葡萄糖,天津市天理化学试剂有限公司;邻苯二甲醛 (OPA),Sigma 公司。

TA-XT Plus 质构仪,Stable Micro System Ltd.; TD5M 型离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司; DGG-9023A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海森信实验仪器有限公司; FDU-1100 型冷冻干燥机,日本 EYELA 公司; TU-1810 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司; AVATA360 型傅里叶红外光谱仪,美国 Nicolet 公司; S-3400N 型扫描电镜,日本日立公司。

1.2 试验方法

1.2.1 11S 球蛋白制备

采用碱溶酸沉法制备 11S 球蛋白。选用过 60 目的脱脂豆粉,按料液比 1:20 (豆粉质量 (g):0.03 mol, pH 值 8.5, Tris-HCl 缓冲溶液 (mL)) 配成物料溶液。室温下搅拌 1 h,4℃ 冷藏 2 h。离心得上清液并加入亚硫酸氢钠至 0.01 mol/L,充分搅拌后,将该液用

1 mol/L HCl 调 pH 值至 6.4,4℃ 下冷藏 2 h,离心沉淀即为 11S 球蛋白。沉淀 11S 球蛋白加 4 倍体积的蒸馏水充分搅拌,加入 1 mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0。置于分子量为 10 kDa 透析袋,并用蒸馏水冷藏透析 48 h。冷冻干燥机进行冻干^[16]。

1.2.2 糖基化蛋白凝胶制备

分别将不同质量的葡萄糖与蒸馏水充分混匀,再与纯化后的 11S 球蛋白进行混合 (蛋白质质量分数为 10%)。在热恒温鼓风干燥箱内于一定的温度、时间反应后立即将该混合物冷却至室温,再进行冷冻干燥得到 11S 球蛋白-葡萄糖混合粉。将糖基化改性后的该粉与一定量的蒸馏水混匀 (蛋白质质量分数为 12%),置于离心管中,2 500 r/min 离心 5 min。用保鲜膜封口,90℃ 水浴 30 min 后,于 4℃ 条件下冷却 12 h。待样品恢复室温制成厚度为 3 cm 的样品,样品底部用于凝胶测定^[17]。

1.2.3 糖基化蛋白疏水性性质测定

用 0.02 mol/L、pH 值 7.4 磷酸缓冲液稀释至蛋白质量浓度为 1~5 mg/mL,取不同质量浓度的稀释样品 4 mL,加入 20 μL 的 ANS 溶液 (采用 0.02 mol/L、pH 值 7.4 磷酸缓冲液) 作为荧光探针并于室温条件下保持 1 h。采用荧光分光光度计在激发波长 370 nm 和发射波长 470 nm 下测定样品的荧光强度,以荧光强度对蛋白质浓度作曲线,曲线斜率即为蛋白质分子的表面疏水性^[18-19]。

1.2.4 糖基化蛋白巯基含量测定

表面巯基含量测定:取 4 mL、0.1 mol/L Tris-甘氨酸缓冲液 (pH 值 8.5,含 0.01 mol/L EDTA) 加入到 1 mL 质量分数为 4% 的蛋白质溶液中,40℃ 保温 30 min,加入 125 μL 的 DTNB 试剂 (20 mg DTNB 溶于 5 mL、0.1 mol/L、pH 值 8.0 的 Tris-甘氨酸缓冲液),再在 25℃ 下显色 10 min,测定波长 412 nm 处的吸光度,以 13 600 M/cm 消光系数计算巯基含量。

总巯基含量测定:所用的 Tris-甘氨酸缓冲液中含有 0.25% SDS,蛋白质质量分数改为 0.4%,其他同表面巯基的测定。

1.2.5 糖基化蛋白凝胶性质测定

采用 TA-XT plus 质构仪进行测定。采用 P0.5 柱形探头,每个样品做 3 组平行,取平均值。设置探头最小感知力为 5 g,穿刺前探头运行速度为 5.0 mm/s,穿刺的运行速度为 2.0 mm/s,穿刺后返回的运行速度为 2.0 mm/s,穿刺距离为 5 mm,间隔时间为 1 s,检测温度为 (25±2)℃。凝胶强度用硬度 (Hardness),即探头下压过程中的最大感应力 (单位 g) 表示^[13]。

1.2.6 糖基化程度测定

采用 OPA 法对蛋白中糖基化程度 (DG) 进行测定^[13]。取 OPA 试剂 4 mL 置于试管中,注入 200 μL 样品液 (10 mg/mL),混匀后于 35℃ 反应 2 min,以 OPA 试剂中加入 200 μL 水为空白,在波长 340 nm 下测定其吸光度。反应的糖基化程度计算式为

$$D_G = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\%$$

式中 A_t 、 A_0 —— t 时刻样品、空白样品的吸光度

1.2.7 糖基化反应验证

采用傅里叶红外光谱仪对空白 11S 球蛋白和优化后的 11S 球蛋白进行红外吸收光谱分析,对糖基化反应的实质进行验证。分析方法:取适量待测蛋白样品,同磨碎的 KBr 粉末混合,压片后置于红外光谱仪中全波段 (波数 400 ~ 4 000 cm^{-1}) 扫描分析,以 KBr 作为空白,每个样品的红外光谱为多次扫描的叠加图。

1.2.8 凝胶微观结构观察

取待测凝胶样品,切成约 2 mm × 5 mm 的小条,用体积分数为 2.5%、pH 值 6.8 的戊二醛浸泡过夜固定,再用 0.1 mol/L、pH 值 6.8 磷酸缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min。然后分别用体积分数为 50%、70%、80% 和 90% 的乙醇进行脱水,每次 10 min;再用无水乙醇脱水 3 次,每次 10 min。之后再用氯仿脱脂 1 h,再分别用质量比为 1 的 100% 乙醇与叔丁醇混合液和叔丁醇进行置换各 1 次,每次 15min。用冷冻干燥仪对样品进行干燥。扫描时将凝胶样品观察面向上黏贴在扫描电镜样品台上,用离子溅射镀膜仪进行离子溅射喷金,将处理好的样品放入样品盒中待检^[20]。

1.2.9 糖基化蛋白溶解性测定

蛋白质溶解性采用氮溶解指数 (NSI 值) 表示。将质量分数 0.1% 的样品溶液调节 pH 值为 3 ~ 10,震荡 10 min,然后于 20℃ 条件下置于离心管中,12 000 r/min 离心 30 min,上清液中的蛋白质含量采用改进的 Lowry 法测定^[21],利用牛血清蛋白 (BSA) 作标准曲线,测定波长 500 nm 处的吸光度。根据样品中蛋白质含量和溶液中蛋白质含量计算 NSI 值。

1.2.10 响应面设计方案

在单因素试验的基础上,以反应温度、反应时间葡萄糖质量分数为自变量,11S 球蛋白凝胶强度为响应值,设计三因素三水平的二次回归方程拟合自变量和凝胶强度之间的函数关系,采用响应面分析方法优化提取工艺。试验设计因素水平如表 1 所示。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 反应温度

图 1 为反应温度与凝胶强度的关系曲线。由图 1 可知,在葡萄糖质量分数 3%、反应时间 60 min 条件下,产物凝胶强度随着反应温度的升高呈现先上升后下降,反应温度为 80℃ 时所得产物凝胶强度最大。这是由于大豆球蛋白的空间构像发生了变化,导致蛋白质表面疏水性发生变化,即蛋白质分子部分展开后暴露出了原本埋藏在内部的巯基^[22]。而反应温度过高,蛋白质和葡萄糖反应剧烈,导致葡萄糖-蛋白复合物部分不能溶解,形成粗糙、富含不溶物的凝胶,从而使凝胶的强度有所下降。

表 1 试验因素水平
Tab.1 Levels and factors

编码	因素		
	反应温度 $x_1/^\circ\text{C}$	反应时间 x_2/min	葡萄糖质量 分数 $x_3/\%$
-1	70	50	2
0	80	60	3
1	90	70	4

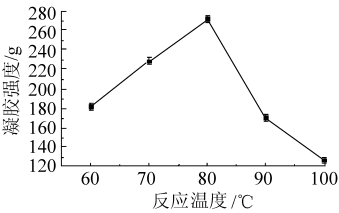


图 1 反应温度与凝胶强度的关系曲线
Fig.1 Effects of different reaction temperatures
on gel strength

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力紧密相关。图 2 为不同反应温度的糖基化蛋白疏水性,图中 $k_1 \sim k_5$ 为 60 ~ 100℃ 糖基化蛋白的表面疏水性。由图 2 可知,随着蛋白质质量分数的增加,荧光强度随之线性增加,能够较好地反映蛋白质的疏水性。随着糖基化温度的升高,糖基化蛋白疏水性不断增加,而这与凝胶强度增长规律相似,说明疏水性变大可能是凝胶强度变化的重要原因之一。

2.1.2 反应时间

图 3 为反应时间与凝胶强度的关系曲线。由图 3 可知,在葡萄糖质量分数 3%、反应温度 80℃ 条件下,产物的凝胶强度随着反应时间的增加呈现先上升后下降,反应时间为 60 min 时所得产物凝胶强

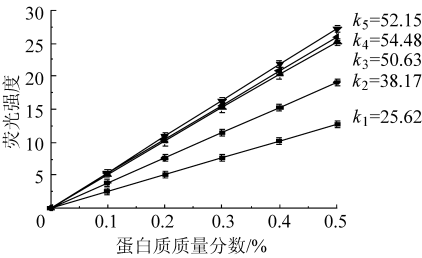


图 2 糖基化蛋白与温度变化的关系曲线

Fig. 2 Effects of glycosylated protein on temperature

度最大。大豆球蛋白反应活性随着反应时间的增加而逐步提高,而随着反应时间的继续增加,蛋白质分子内或分子间的巯基交联形成了 S-S,致使总巯基数目的下降,并且过度的结合反应使得能源消耗且不能达到最好的效果,致使产物凝胶强度出现下降。

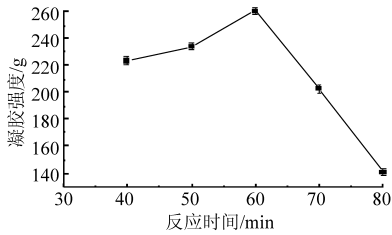


图 3 反应时间与凝胶强度的关系曲线

Fig. 3 Effects of different reaction time on gel strength

由图 4 可知,随着反应时间的延长,表面巯基含量增加,而总巯基含量减小。这说明加热过程中蛋白质发生糖基化反应的同时,其蛋白质构象也发生了变化,蛋白质分子部分展开,将原来包含于内部的巯基暴露出来,同时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。

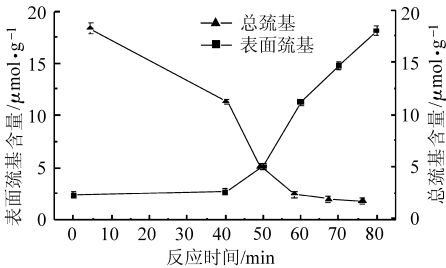


图 4 糖基化蛋白巯基含量随反应时间的变化曲线

Fig. 4 Change of sulfhydryl groups content of glycosylated protein

2.1.3 葡萄糖质量分数

图 5 为葡萄糖质量分数与凝胶强度的关系曲线。由图 5 可知,在反应温度 80℃、反应时间 60 min 条件下,产物凝胶强度随着葡萄糖质量分数的增大呈现先上升后下降,葡萄糖质量分数为 3% 时所得产物凝胶强度最大。由于两种分子的反应机理还有待于进一步研究,因此正确认识葡萄糖的添加量还需要深入的探究。

单因素试验结果表明:反应温度为 80℃、反应

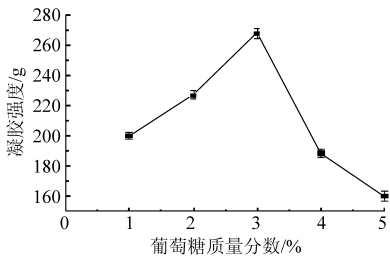


图 5 不同葡萄糖添加质量分数对凝胶强度的影响

Fig. 5 Effects of adding contents of different glucose on gel strength

时间为 60 min、葡萄糖质量分数为 3% 时,大豆球蛋白凝胶强度最大,糖基化反应的效果最好。各因素在较低水平均对凝胶强度有促进作用,而在较高的水平下产物凝胶强度下降,这可能是由糖基化产物溶解性差、携带电荷多等因素所导致的。因此选取葡萄糖质量分数 2% ~ 4%,反应温度 70 ~ 90℃,反应时间 50 ~ 70 min 为响应面试验因素水平的范围(表 1)。

2.2 响应面试验结果

2.2.1 糖基化反应模型

应用 Design Expert 7.1 软件,对表 2 中的数据进行多元回归拟合,可得反应温度(X_1)、反应时间(X_2)、葡萄糖添加质量分数(X_3)编码值与产物凝胶强度的二次多项回归方程为

$$Y = 268.43 - 21.35X_1 - 0.68X_2 - 17.82X_3 + 1.22X_1X_2 - 28.81X_1X_3 - 18.82X_2X_3 - 59.64X_1^2 - 61.88X_2^2 - 43.27X_3^2$$

表 2 试验设计条件及结果

Tab. 2 Design and results of experiment					
试验序号	X_1	X_2	X_3	凝胶强度 Y/g	$D_c/\%$
1	1	-1	0	126.34	43.39
2	-1	-1	0	177.68	14.54
3	0	-1	1	161.71	25.30
4	1	0	-1	195.08	44.94
5	0	0	0	257.53	31.23
6	0	0	0	260.38	29.43
7	1	1	0	118.93	58.48
8	-1	1	0	165.41	21.58
9	1	0	1	99.82	55.34
10	0	0	0	285.20	29.76
11	0	-1	-1	157.71	23.13
12	0	0	0	270.94	30.73
13	-1	0	-1	173.97	20.03
14	0	1	-1	202.49	40.65
15	0	1	1	131.20	48.23
16	-1	0	1	193.93	25.52
17	0	0	0	268.09	32.20

由表 3 的方差分析可以看出,凝胶强度的失拟 $P>0.05$,这说明其他因素对试验结果干扰较小,模型能较好地反映数据;而凝胶强度的模型 $P<0.05$,说明方程与实际情况拟合良好,能够反映凝胶强度与反应温度、反应时间、葡萄糖添加质量分数之间的关系;同时模型的决定系数 R^2 为 0.987 3,说明 98.73% 的变更可通过该模型解释;模型的调整决定系数是 0.970 9,说明该模型可以解释 97.09% 影响值的变化,进而表明此模型拟合度高,试验误差较小。因此可以利用此模型对糖基化改性反应过程进行分析和预测。

表 3 凝胶强度的方差分析
Tab.3 Variance analysis of gel strength

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	54 256.86	9	6 028.54	60.25	<0.000 1 ***
X_1	3 647.43	1	3 647.43	36.46	0.000 5 ***
X_2	3.66	1	3.66	0.037	0.853 8 *
X_3	2 541.49	1	2 541.49	25.40	0.001 5 ***
X_1X_2	5.90	1	5.90	0.06	0.815 0 *
X_1X_3	3 318.91	1	3 318.91	33.17	0.000 7 ***
X_2X_3	1 417.15	1	1 417.146	14.16	0.007 0 ***
X_1^2	14 885.15	1	14 885.15	148.77	<0.000 1 ***
X_2^2	16 122.80	1	16 122.80	161.15	<0.000 1 ***
X_3^2	7 883.43	1	7 883.43	78.79	<0.000 1 ***
残差	700.36	7	100.05		
失拟	229.01	3	76.37	0.65	0.624 1 *
纯误差	471.26	4	117.82		
总和	54 957.22	16			

注: $P<0.01$ 极显著(***); $P>0.05$ 不显著(*)。

2.2.2 响应面优化

图 6 为回归方程的响应曲面及等高线图。由图可知,当反应温度、反应时间、葡萄糖质量分数固定在零水平,高凝胶强度集中在中心区域,最高可达到 271.37 g。各因素在较低水平均对凝胶强度有促进作用,而在较高的水平下产物的凝胶强度明显下降,这可能是由于糖基化改性后产物溶解性差所导致的。糖基化反应受到多种因素的影响,其中反应物浓度和温度是影响反应的关键因素^[23]。主要是由于葡萄糖的浓度随着温度增加而增加,所以温度影响葡萄糖的反应活性^[24]。关于反应因素对凝胶强度影响程度没有统一的说法,这可能是由于各研究间的反应条件不同造成的。本试验结果表明各因素对凝胶强度的影响从大到小依次为:反应温度、葡萄糖添加质量分数和反应时间。

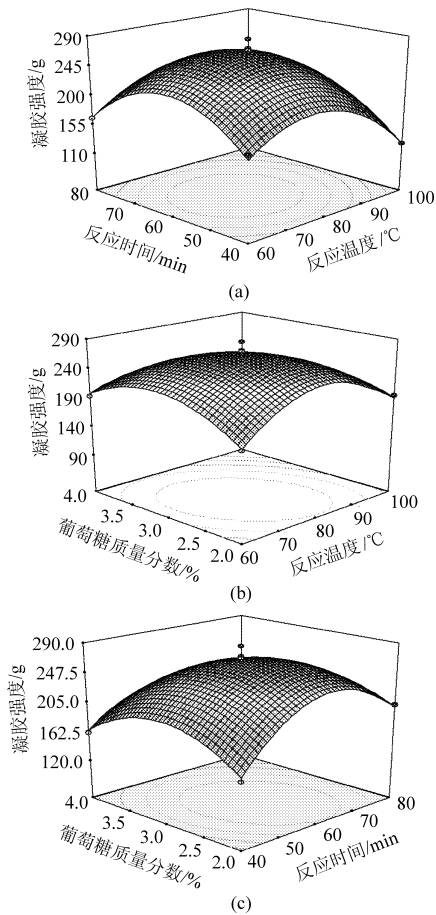


图 6 凝胶强度影响因素的响应面分析
Fig.6 Response surface analysis of influencing factors of gel strength

2.2.3 最适条件的确定和模型的验证

利用 Design Expert 7.1 软件对糖基化改性工艺进行优化。当反应温度为 78.61℃、反应时间为 60.36 min 和葡萄糖质量分数为 2.84% 时凝胶强度可达到 271.37 g。根据实际情况,将反应温度设定为 80℃,反应时间设定为 60 min,葡萄糖质量分数设定为 3.0%,在此条件下进行验证试验,凝胶强度为 270.52 g,相对偏差为 0.31%。表明 Box-Behnken 模型优化可成功用于糖基化反应的优化,所得参数准确可靠,具有使用价值。根据上述优化的试验条件进行验证试验,将空白与改性后 11S 球蛋白凝胶性能进行比较,采用 SPSS 13.0 分析软件进行数据处理得到,空白样品凝胶强度为 (88.11 ± 0.4) g,糖基化改性样品凝胶强度为 (270.52 ± 0.8) g,改性后样品是空白样品凝胶强度 3.07 倍,糖基化改性的 11S 球蛋白凝胶性能大幅度提高。改性样品的糖基化程度为 30.67%,说明约有 30.67% 的大豆球蛋白进行糖基化反应。

2.3 红外光谱分析

由图 7 可见,经糖基化处理的样品只有部分吸收峰发生了变化,表明糖基化改性只是对某些特殊

的氨基酸残基起作用,对于大多数氨基酸残基没有影响。当蛋白质共价结合糖分子后,一个典型的特征是蛋白质分子中的羟基增加,在红外图谱中的具体体现是波数 $3\,700\sim3\,200\text{cm}^{-1}$ 时($\nu_{\text{C-H}}$)出现一个较宽峰^[25]。从图 7 中可知,糖基化 11S 样品较空白 11S 样品在波数 $3\,700\sim3\,200\text{cm}^{-1}$ 的峰型变宽,因此可以认为葡萄糖分子以共价键的形式接入到 11S 球蛋白分子上。有文献报道,美拉德反应的中间产物席夫碱含有 $\text{C}=\text{N}$,波数 $\nu_{\text{C}=\text{N}}$ 为 $1\,690\sim1\,640\text{cm}^{-1}$,吸收强度随化合物而异^[26]。但是,酰胺中的羰基在波数 $1\,690\sim1\,630\text{cm}^{-1}$ 处也有吸收,加上美拉德产物本身的复杂性,因此从红外图谱中判断反应物中是否含有 $\text{C}=\text{N}$ 还有待进一步的研究。

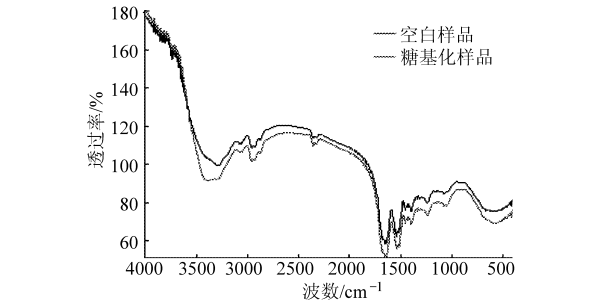


图 7 样品的红外图谱
Fig.7 FT-IR spectrum of samples

2.4 凝胶微观结构观察

空白 11S 球蛋白(图 8a)凝胶呈多孔、疏松不规则的网状结构,形成的胶束多是由单一颗粒的链接而成“串球状”,而经过糖基化改性优化处理的样品(图 8b),凝胶结构发生明显变化,糖基化蛋白凝胶样品的微观结构非常紧密,网状空隙很小,细胶束的聚集增加,形成纤细状的凝胶,以至于在 5 000 倍的观察下,凝胶网络显现得非常光滑,只有在更高的放大倍数下才能观察到其微观结构的特点。凝胶网络结构随着糖基化改性变得规则、致密,从宏观上体现为凝胶硬度的提高。这主要是由于糖基化蛋白结构发生了变化,导致在凝胶网络形成过程中氢键、疏水和静电相互作用等各种作用力发生改变,整体上提高了形成三维网状结构的作用力,从而产生了致密凝胶网络结构^[20]。

2.5 糖基化蛋白溶解性分析

图 9 表明糖基化蛋白的溶解性均随着反应时间的增加呈现先增加后变化平缓。这是由于在反应初

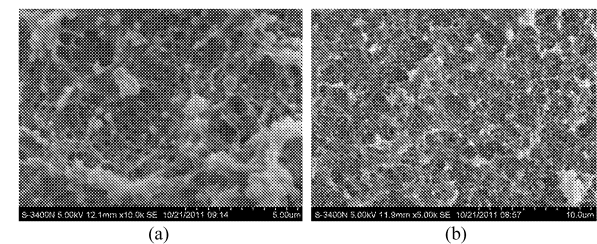


图 8 样品的微观结构图
Fig.8 Microstructrue of samples

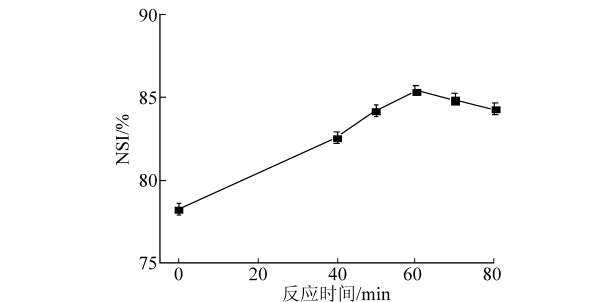


图 9 糖基化蛋白溶解性随反应时间的变化曲线
Fig.9 Change in solubility of glycosylated protein

期,糖链的引入为 11S 球蛋白带来亲水性羟基,增加蛋白的亲水性,同时适当的热处理有助于蛋白质溶解性的改善。随着反应的进行,亲水性羟基的增加对蛋白溶解性的影响不显著,故溶解性变化不明显。另外,随着反应时间的延长,可能会造成部分蛋白分子的聚集,故溶解性略有降低。

3 结论

(1) 红外光谱分析证实,葡萄糖分子以共价键的形式接入到 11S 球蛋白分子上。对照试验显示,改性后的 11S 球蛋白凝胶强度得到大幅度提高,证实是糖基化改性的结果。

(2) 扫描电镜观察到空白、糖基化改性 11S 球蛋白凝胶的微观结构明显不同,凝胶网络结构随着糖基化改性变得规则、致密,从宏观上体现为凝胶硬度和持水性的提高。从分子水平上揭示了大豆球蛋白结构变化与凝胶性内在的联系。

(3) 优化后的工艺条件为:反应温度 78.61°C 、反应时间 60.36min 和葡萄糖质量分数 2.84% ,凝胶强度可达到 271.37g 。根据实际情况,确定反应温度为 80°C 、反应时间为 60min 和葡萄糖质量分数为 3.0% ,在此条件下作验证试验,凝胶强度为 270.52g ,是未改性大豆球蛋白的 3.07 倍。

参 考 文 献

1 黄友如,华欲飞,裴爱泳. 大豆分离蛋白功能性质及其影响因素[J]. 粮食与油脂,2003,5(5):12~15.
2 Shand P J, Ya H, Pietrasik Z, et al. Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels[J]. Food Chemistry,2007,102(4):1 119~1 130.

- 3 Saiok W T. Differences in functional properties of soybean proteins[J]. Texture Studies, 1978,3(9):1 335 ~ 1 357.
- 4 Utsumi S, Matsumura Y, Mori T. Structure-function relationships of soy proteins[M] // Damodaran S, Paraf A. Food proteins and their applications. New York: Marcel Dekker, 1997:257 ~ 291.
- 5 Kato Y, Aoki T, Kato N, et al. Modification of ovalbumin with glucose 6-Phosphate by amino-carbonyl reaction. Improvement of protein heat stability and emulsifying activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995,43(2):301 ~ 305.
- 6 Aoki T, Hiidome Y, Kitahata K, et al. Improvement of heat stability and emulsifying activity of ovalbumin by conjugation with glucuronic acid through the Maillard reaction[J]. Food Research International, 1999,32(4):129 ~ 133.
- 7 Akhtar M, Dickinson E. Emulsifying properties of whey protein-dextran conjugates at low pH and different salt concentration [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003,31(1~4):125 ~ 132.
- 8 Aoti T, Hiidome Y, Sugimoto Y, et al. Modification of ovalbumin with oligogalacturonic acids through the Maillard reaction [J]. Food Research International, 2001,34(23):127 ~ 132.
- 9 Kato A, Shimokawa K, Kobayashi K. Improvement of the functional properties of insoluble gluten by pronase digestion followed by dextran conjugation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(6):1 053 ~ 1 056.
- 10 Sun Y, Hayakawa S, Izumori K. Modification of ovalbumin with a rare ketohexose through the Maillard reaction: effect on protein structure and gel properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004,52(5):1 293 ~ 1 299.
- 11 Dickinson E, Izgi E. Foam stabilization by protein-polysaccharide complexes[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 1996,113(1~2):191 ~ 201.
- 12 张华江,迟玉杰.两种改性技术提高大豆分离蛋白凝胶性能的研究[J].中国粮油学报,2008,23(4):56 ~ 60.
Zhang Huajiang, Chi Yujie. Two kinds of modification for improving gel characteristics of soybean protein isolate[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2008,23(4):56 ~ 60. (in Chinese)
- 13 刘燕,裴爱泳.大豆蛋白与多糖的接枝改性[J].中国油脂,2006,31(1):39 ~ 41.
Liu Yan, Qiu Aiyong. Modification of soyprotein by graft with polysaccharide[J]. China Oils and Fats, 2006,31(1):39 ~ 41. (in Chinese)
- 14 范森,迟玉杰,姜剑.Box-Behnken 模型优化大豆分离蛋白共价改性[J].食品与发酵工业,2011,37(6):60 ~ 64.
- 15 齐军茹,杨晓泉,廖劲松.大豆蛋白多糖干热制备复合物及其反应机理研究[J].食品科学,2006,27(1):65 ~ 67.
Qi Junru, Yang Xiaoquan, Liao Jinsong. 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[J]. Food Science, 2006,27(1):65 ~ 67. (in Chinese)
- 16 姜剑,迟玉杰,孙艳梅,等.分离 β -伴大豆球蛋白和大豆球蛋白工艺研究[J].食品科学,2011,32(6):11 ~ 15.
Jiang Jian, Chi Yujie, Sun Yanmei, et al. An investigation into the separation process for β -conglycinin and glycinin[J]. Food Science, 2011,32(6):11 ~ 15. (in Chinese)
- 17 Jing H, Kitts D D. Chemical and biochemical properties of asen-sugar Maillard reaction products[J]. Food and Chemical Toxicology, 2002,40(2):1 007 ~ 1 015.
- 18 Alizadeh-Pasdar N, Li-Chan E C. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2000,48(2):328 ~ 334.
- 19 Molina Ortiz S E, Aón M C. Analysis of products, mechanism of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates[J]. Journal of American Oil Chemists' Society, 2000,77(12):1 293 ~ 1 301.
- 20 Zhao Xiaoyan, Jun Chena, Zhua Qingjun. Surface characterization of 7S and 11S globulin powders from soy protein examined by X-ray photoelectron spectroscopy and scanning electron microscopy[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2011, 86(2):260 ~ 266.
- 21 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A, et al. Protein measurement with the Folinphenol reagent[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1951,193(6):265 ~ 275.
- 22 A Ruqaie M, Kasap S, Abeysekera R. Structural properties of pectin-gelatin gels. Part II. Effect of sucrose /glucosesyrup [J]. Carbohydrate Polymers, 1997, 34(4):309 ~ 321.
- 23 阚建全.食品化学[M].北京:中国农业大学出版社,2002:54 ~ 55.
- 24 van Boekel M A J S. Kinetic aspects of the Maillard reaction; a review[J]. Nahrung Food, 2001,45(3):150 ~ 159.
- 25 赵瑶兴,孙祥玉.有机分子结构光谱鉴定[M].北京:科学出版社,2003:201 ~ 203.
- 26 Mazdak Khajehpour, Jennifer L Dashnau, Jane M Vanderkooi. Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins [J]. Analytical Biochemistry, 2006, 348(1):40 ~ 48.