

食品与饲料用化学品

# 酪蛋白酸钠-燕麦 $\beta$ -葡聚糖美拉德产物的制备及其性质

张园园<sup>1</sup>, 黄欣<sup>1</sup>, 颜丹云<sup>1</sup>, 赵祎瑾<sup>1</sup>, 郝建雄<sup>1,2\*</sup>, 刘俊果<sup>1,2\*</sup>

(1. 河北科技大学 食品与生物学院, 河北 石家庄 050000; 2. 河北省功能食品技术创新中心, 河北 石家庄 050000)

**摘要:** 以酪蛋白酸钠 (SC) 和燕麦  $\beta$ -葡聚糖 (OG) 为原料, 利用干法美拉德反应制备了酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物。以接枝度和褐变度为评价指标, 通过单因素实验对其制备条件进行优化, 确定酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物最佳反应条件为: 酪蛋白酸钠与燕麦  $\beta$ -葡聚糖质量比为 1 : 2, 反应温度为 60 °C, 反应时间为 24 h, 湿度为 78%, pH 为 7。SDS-PAGE 电泳结果表明, 酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖之间共价交联形成大分子聚合物。FTIR 分析表明, 糖苷键成功连接到蛋白质分子。内源荧光光谱表明, 多糖亲水性羟基的引入使酪蛋白酸钠空间结构改变。最终得到美拉德产物的接枝度为 54.01%, 褐变  $L$  值为 87.7, 较酪蛋白酸钠乳化活性提高了 83.5%, 乳化稳定性提高了 12.7%。

**关键词:** 酪蛋白酸钠; 燕麦  $\beta$ -葡聚糖; 美拉德反应; 溶解性; 乳化性; 食品化学品

中图分类号: TS202.3 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2022) 09-1901-07

## Preparation and properties of sodium caseinate-oat $\beta$ -glucan conjugates obtained by the Maillard reaction

ZHANG Yuanyuan<sup>1</sup>, HUANG Xin<sup>1</sup>, YAN Danyun<sup>1</sup>, ZHAO Yijin<sup>1</sup>,  
HAO Jianxiong<sup>1,2\*</sup>, LIU Junguo<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Food and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 2. Hebei Innovation Centre of Functional Food Technology, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

**Abstract:** Sodium caseinate-oat  $\beta$ -glucan conjugate was prepared by dry Maillard reaction with sodium caseinate (SC) and oat  $\beta$ -glucan (OG) as substrate. The preparation conditions were optimized via single factor experiment using grafting degree and browning degree as performance evaluation index, and the optimal reaction conditions were as follows: the mass ratio of SC to OG 1 : 2, reaction temperature 60 °C, reaction time 24 h, reaction humidity 78%, and reaction pH 7. SDS-PAGE electrophoresis results showed that SC and OG were covalently cross-linked forming macromolecular polymer complex. FTIR results indicated that the glycosidic bond was successfully linked to the protein molecule. Endogenous fluorescence spectra revealed that the introduction of hydrophilic hydroxyl group of polysaccharides resulted in spatial structure change of sodium caseinate. The final sodium caseinate-oat  $\beta$ -glucan conjugate obtained displayed a grafting degree of 54.01% and a browning  $L$  value of 87.7, with emulsion activity and stability improved by 83.5% and 12.7% respectively, compared with those of sodium caseinate.

**Key words:** sodium caseinate; oat  $\beta$ -glucan; Maillard reaction; solubility; emulsion stability; food chemicals

酪蛋白酸钠 (SC) 是食品医药行业常用的高效乳化剂, 然而, 酪蛋白酸钠在酸性条件下易沉淀、

在高盐浓度条件下易盐析, 因而存在乳化性不稳定等问题<sup>[1]</sup>。为了改善酪蛋白酸钠的功能特性, 如乳

收稿日期: 2022-03-23; 定用日期: 2022-05-31; DOI: 10.13550/j.jxhg.202200263

基金项目: 河北省重点研发计划项目 (20327104D)

作者简介: 张园园 (1997—), 女, 硕士生, E-mail: 624057920@qq.com。联系人: 郝建雄 (1979—), 男, 博士, 教授, E-mail: cauhjx@163.com; 刘俊果 (1970—), 女, 博士, 副教授, E-mail: 1308676013@qq.com。

化性、溶解性, 拓宽酪蛋白酸钠的应用范围, 需要对酪蛋白酸钠进行适度改性。

酪蛋白酸钠的改性方法主要有物理法<sup>[2]</sup>、酶解法<sup>[3]</sup>、化学法<sup>[4]</sup>。但物理法存在能耗问题; 酶解法可提高溶解度, 但乳化性能基本消失; 化学法存在毒理问题。美拉德反应是食物体系中天然存在的反应, 可作为优化酪蛋白酸钠乳化性、溶解性的有效方法, 具有安全、效率高等优点。美拉德反应是通过蛋白质中游离的氨基与还原糖或酮中的羰基发生羰胺反应来实现蛋白和多糖的共价连接<sup>[5]</sup>。美拉德反应方法主要分为干热法和湿热法。湿热法所需反应时间较短、效率高, 但反应温度高易造成蛋白质变性, 不易控制反应程度, 反应易进入高级阶段, 产生类黑精等有毒物质<sup>[6]</sup>。与湿热法相比, 干热法反应产物接枝度较高, 更适用于多糖和蛋白质的反应, 具有反应条件温和、易于控制反应进程、工艺简单、成本低等优点<sup>[7]</sup>。

燕麦  $\beta$ -葡聚糖(OG)是多分散性大分子化合物, 亲水性强。且与单糖相比, 具有较长的糖链可以提供更强的空间阻力, 提高美拉德产物的稳定性。与环糊精相比, 燕麦  $\beta$ -葡聚糖作为一种天然保健型多糖具有调节人体免疫功能、降血脂、降血糖、调节肠道菌群并增强抵抗力等功能特性<sup>[8]</sup>。

鉴于此, 本文通过干热法将燕麦  $\beta$ -葡聚糖连接到酪蛋白酸钠上制备酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物, 并对影响美拉德反应的因素, 如温度、pH、时间等进行优化, 对产物结构进行表征及性能测试。旨在制备出一种既具有良好的乳化性、溶解性, 又具有营养保健功能的天然乳化剂, 以此来提高酪蛋白酸钠在食品乳化剂行业的应用。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

酪蛋白酸钠(质量分数 98%)、邻苯二甲醛(OPA, 分析纯)、 $\beta$ -巯基乙醇(分析纯), 上海易恩化学技术有限公司; 燕麦  $\beta$ -葡聚糖(质量分数 98%), 民生食品添加剂有限公司; 大豆油: 海嘉里金龙鱼粮油食品股份有限公司; 电泳试剂盒: 索莱宝生物科技有限公司。

FD-1A-50 型冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; pHS-3C 型 pH 计, 雷磁上海仪电仪器有限公司; FS-1 型可调高速均质机, 方科仪器常州有限公司; CR400 型色差仪, 日本柯尼卡美能达公司; DH4000 型恒温培养箱, 天津泰斯特仪器有限公司; Nicolet 6700 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司; F-4600 型荧光光谱仪, 日本日立有限

公司; 752 型紫外-可见分光光度计, 上海光谱仪器有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物的制备  
精确称量酪蛋白酸钠 2.0000 g 和燕麦  $\beta$ -葡聚糖 4.0000 g (两者质量比为 1:2) 溶解于 100 mL 去离子水中, 充分搅拌 2 h, 水合 12 h 后, 于  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻干燥 48 h。将冻干粉末粉碎后过 120 目筛, 平铺在培养皿内, 用锡纸包裹并扎小孔, 之后放置在底部装有饱和 KBr 溶液的干燥器内, 放置于恒温培养箱反应, 保持恒定的湿度(78%)和温度, 每天取样并搅拌均匀, 得到酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物, 经  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻干燥 6 h 后放置于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存待用。

#### 1.2.2 接枝度的测定

采用 LUO 等<sup>[9]</sup>方法稍作修改。以水为溶剂配成质量浓度为 6 g/L 的样品液, 取 200  $\mu\text{L}$  样品液于试管中, 加入 4 mL OPA, 混合均匀后, 在  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴锅中反应 2 min, 用紫外-可见分光光度计在 340 nm 处测定其吸光值(以 OPA 为空白对照)。接枝度按式(1)计算:

$$\text{接枝度}/\% = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $A_0$  为反应前样品在 340 nm 处吸光度;  $A_1$  为反应后样品在 340 nm 处吸光度。

#### 1.2.3 褐变度的测定

用色差仪测定样品的褐变度。用白板对设备进行校正, 其中  $L$  值表示亮度, 定义黑色  $L=0$ , 白色  $L=100$ , 以  $L$  值为褐变指标。

#### 1.2.4 十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)实验

将酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物(PAGE)冻干的样品粉末溶于水配成质量浓度为 1 g/L 的样品液, 取 12  $\mu\text{L}$  样品液与 3  $\mu\text{L}$  5X buffer 混合后沸水浴加热 5 min, 于 10000 r/min 离心 10 min。采用体积分数为 12% 分离胶、5% 浓缩胶, 取上清液, 上样量 10  $\mu\text{L}$ , 电压先 80 V 后 120 V, 当指示剂前沿距电泳槽胶底 1.0 cm 时, 停止电泳关闭电源。取下凝胶后用考马斯亮蓝 R-250 试剂进行蛋白质染色后, 进行脱色。

#### 1.2.5 溶解度的测定

参照 ZHA 等<sup>[10]</sup>方法稍作修改。准确称取一定量不同反应时间(0、12、24、36、48 h)的美拉德反应产物溶解在去离子水中, 在室温中搅拌 1 h, 于 3500 r/min 离心 15 min, 离心后取上清液稀释成合适的浓度后加入考马斯亮蓝 G-250 试剂中, 室温下反应 5 min, 以空白溶液作参比溶液, 用紫外-可见

分光光度计在 595 nm 处测定样品组的吸光度, 代入到标准曲线 ( $y=0.0057x-1\times 10^{-4}$ ,  $R^2=0.9996$ ) 中计算蛋白质质量浓度 (mg/L), 溶解度按式 (2) 计算:

$$\text{溶解度}/\% = \left( \frac{\text{上清液中蛋白质质量}}{\text{样品中蛋白总质量}} \right) \times 100 \quad (2)$$

### 1.2.6 乳化性和乳化稳定性的测定

参照 ZHAO 等<sup>[11]</sup>方法并作修改。取 10 mg 美拉德产物溶解于水中配成质量浓度为 10 g/L 的溶液, 再以溶液与油体积比 4:1 加入 2.5 mL 玉米油, 于 15000 r/min 均质 1 min, 制备得到白色乳液。乳液形成后, 分别在 0 和 10 min 从底部取 100  $\mu$ L 乳液与 5.0 mL 质量浓度为 1 g/L 的 SDS 溶液混合, 漩涡振荡 15 s 后, 适当倍数稀释后在 500 nm 处测定溶液的吸光度, 以质量浓度为 1 g/L SDS 溶液作为空白对照。测定 0 min 时溶液的吸光度 ( $A_0$ ), 放置 10 min 后再取样检测溶液的吸光度 ( $A_{10}$ )。注意乳液放置 10 min 后会有分层现象, 因此, 取乳液时需穿入乳液下层。乳化活性 (EAI) 用  $A_0$  表示, 乳化稳定性 (ESI) 按式 (3) 计算:

$$\text{ESI} = \frac{A_0}{A_0 - A_{10}} \times 10 \quad (3)$$

### 1.2.7 FTIR 的测定

采用溴化钾压片法测定。将样品粉末与溴化钾按 1:100 的质量比混合, 用研钵研磨均匀, 用压片机压成片状。条件为: 波数范围 4000 ~ 500  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数 64 次, 分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ 。以溴化钾片作为空白对照, 在相同实验条件下, 每个样品的红外光谱采集至少重复 3 次。

### 1.2.8 内源性荧光光谱的测定

将酪蛋白酸钠、酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖以质量比 1:2 的物理混合物以及反应后的酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物溶于 50 mmol/L pH=7.4 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 配成质量浓度为 1.0 g/L 的样品液。激发波长为 290 nm, 扫描波长为 300~550 nm, 激发和发射的狭缝宽度是 5 nm, 扫描速度 1500 nm/min, 电压为 400 V, 每次测量前用空白溶液归零校正。

## 2 结果与讨论

### 2.1 美拉德反应条件对接枝度和褐变度的影响

#### 2.1.1 pH 对产物接枝度和褐变度的影响

固定酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖的质量比为 1:2, 反应湿度为 78%, 反应温度为 60  $^{\circ}\text{C}$ , 反应时间 24 h, 考察反应 pH (分别为 6、7、8、9、10) 对接枝度和褐变度的影响, 结果见图 1。

由图 1 可见, 随着 pH 的增加, 美拉德产物的

接枝度整体呈现增加趋势, 但 L 值迅速下降。当 pH 大于 8 后, L 值下降迅速, 表明美拉德产物褐变严重, 产物呈现棕褐色, 并且接枝度增加较为缓慢。这是因为, 氨基酸是一种两性离子, 在酸性环境中反应速度较慢, 在碱性环境中氨基反应较强烈, 也更易发生褐变反应。但是碱性过强, 蛋白质的空间结构可能会被破坏, 如氢键、肽键断裂, 造成蛋白质变性甚至会将氨基酸转变成有毒的化合物, 反而不利于接枝反应的进行<sup>[12]</sup>。考虑到过碱 (pH 超过 10) 会引起酪蛋白酸钠变性, 所以, 本实验没有设置更高 pH, 当 pH 为 7 时接枝度相对较大, 褐变度相对较小, 为最适反应 pH。

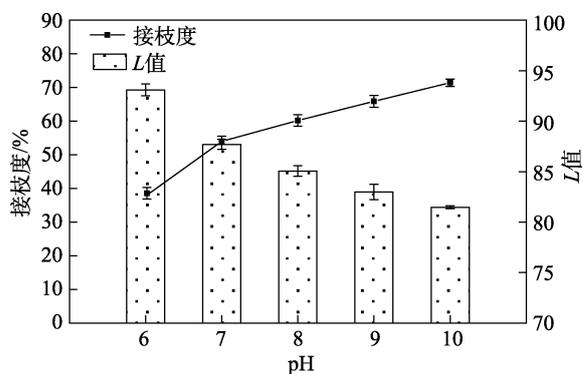


图 1 反应 pH 对美拉德产物接枝度及褐变度的影响  
Fig. 1 Effects of reaction pH on grafting degree and browning of Maillard conjugates

#### 2.1.2 反应时间对产物接枝度和褐变度的影响

固定酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖混合物质量比为 1:2, 反应湿度为 78%, 反应温度为 60  $^{\circ}\text{C}$ , 反应 pH 为 7, 考察反应时间 (分别为 12、24、36、48 h) 对接枝度和褐变度的影响, 结果见图 2。

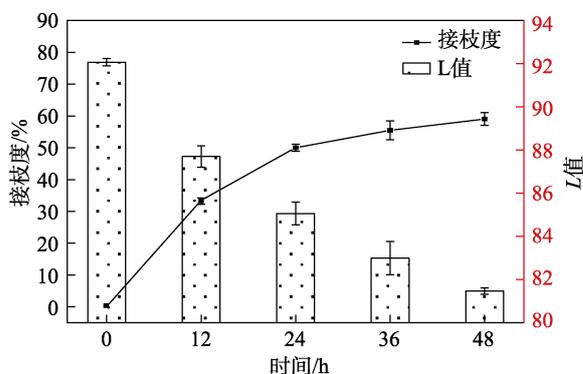


图 2 反应时间对美拉德产物接枝度及褐变度的影响  
Fig. 2 Effects of reaction time on grafting degree and browning of Maillard conjugates

由图 2 可知, 随着反应时间的增加, 酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物的接枝度逐渐增大, 且在反应初期阶段迅速增加, 24 h 后反应逐渐趋于

平缓, 延长反应时间对接枝度的影响不大。L 值则随着时间的延长持续降低, 表明随着反应时间的延长美拉德反应程度逐渐剧烈, 美拉德产物颜色逐渐变深。这是因为, 反应初期阶段蛋白质中的游离氨基没有完全暴露出来, 没有完全参与到反应中, 导致蛋白质与多糖结合程度较低, 接枝度较低<sup>[13]</sup>。随着蛋白质受热时间延长, 其结构伸展, 与多糖逐步结合, 接枝程度不断增大, 但是随着反应时间的延长, 美拉德反应进入后期生成类黑精等水不溶性有毒物质<sup>[14]</sup>。考虑到美拉德反应产物作为食品添加剂, 需要使反应停留在初始阶段不能生成过多类黑精, 因此, 选取美拉德反应时间为 24 h。

### 2.1.3 反应温度对产物接枝度和褐变度的影响

固定酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖混合物质量比为 1 : 2, 反应湿度为 78%, 反应 pH 为 7、反应时间为 24 h, 考察反应温度分别为 (40、50、60、70、80 °C) 对接枝度和褐变度的影响, 结果见图 3。

由图 3 可知, 随着反应温度的升高, 接枝度不断增加, L 值快速下降, 褐变程度不断增加。当反应温度为 40 °C 时, 反应速率较慢, 反应 24 h 时接枝度仅为 9.56%, 但产物褐变程度很小。随着反应温度继续升高, 卷曲的蛋白质肽链伸展开来, 一些存在于折叠区的游离氨基暴露出来和糖链发生反应, 反应速率逐渐增加, 反应越来越剧烈<sup>[15]</sup>。当反应温度超过 60 °C 后, 继续升高反应温度, 接枝度变化趋于平缓, 但褐变度迅速下降, 这是由于温度较高导致蛋白质被破坏且生成许多类黑精等不溶性有毒物质, 不利于反应的进行且不符合实验所需。在保证接枝度较高、褐变度要尽可能小的条件下, 选取反应温度 60 °C 进行后续实验。

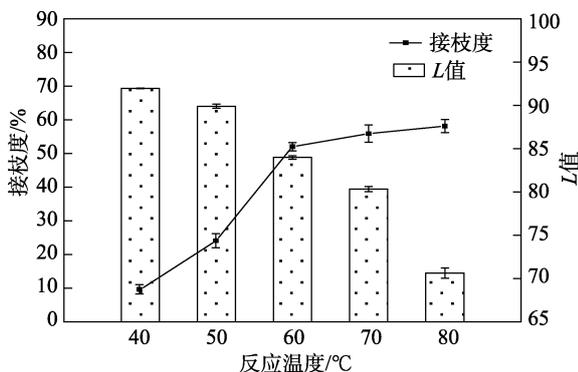


图 3 反应温度对美拉德产物接枝度及褐变度的影响  
Fig. 3 Effect of reaction temperature on grafting degree and browning of Maillard conjugates

### 2.1.4 反应物质量比对产物接枝度和褐变度的影响

蛋白质中的疏水基团和多糖的亲水性羟基的平衡可使美拉德产物既能增加亲水性又能保持乳化性。因此, 适当的底物配比对改善酪蛋白酸钠的乳

化性和水溶性至关重要<sup>[16]</sup>。固定反应温度 60 °C、反应湿度为 78%、反应 pH 为 7、反应时间为 24 h, 考察酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖质量比分别为 2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3、1 : 4 对美拉德产物接枝度和褐变度的影响, 结果见图 4。

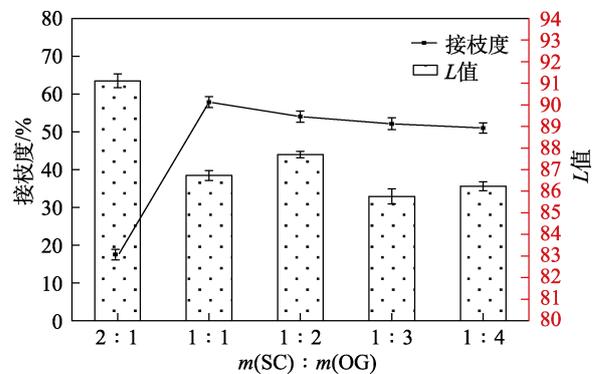


图 4 反应物质量比对美拉德产物接枝度及褐变度的影响  
Fig. 4 Effects of mass ratio on grafting degree and browning of Maillard conjugates

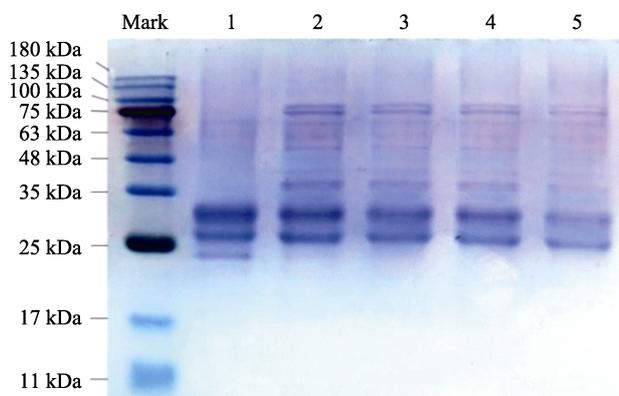
由图 4 可知, 当酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖质量比为 1 : 1 时接枝度最高, 随着 OG 含量的增加, 美拉德产物的接枝度逐渐降低, 这可能是因为, 随着 OG 含量的增加, 大分子糖链形成的空间位阻不利于底物的充分接触, 降低了反应程度, 接枝度下降<sup>[17]</sup>。产物褐变度则随着酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖质量比的降低呈现波动, 这可能是因为, 酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖质量比为 1 : 1 时, 分子间碰撞几率增大, 充分反应, 因此褐变度增大, 这与接枝度结果相同<sup>[18]</sup>。当酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖质量比为 2 : 1 时产物褐变度最低, 但由于糖分子含量较少不能充分与酪蛋白酸钠发生反应, 因此接枝度较低。当酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖质量比为 1 : 3 和 1 : 4 时褐变度加深, 可能是因为糖含量过多会造成焦糖化反应。综合考虑接枝度和褐变度, 采用酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖质量比为 1 : 2 为最佳比例。

通过单因素实验确定美拉德反应的最佳条件为固定酪蛋白酸钠 (g) 和燕麦  $\beta$ -葡聚糖的质量比为 1 : 2、反应湿度为 78%、反应温度为 60 °C、反应时间为 24 h、pH 为 7, 在此条件下制备的美拉德产物接枝度为 54.01%, 且 L 值为 87.7。后续表征与分析均用最佳条件产物。相较于湿热法<sup>[19]</sup>, 干热法制备的美拉德产物接枝度效率提高, 且产物颜色较浅, 类黑精含量少, 更有利于向初级阶段进行。

## 2.2 SDS-PAGE 分析

图 5 为酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物不同反应时间的 SDS-PAGE 图。结果显示, 酪蛋白酸钠图主要由两条明显的条带组成, 分别是  $\alpha$ -酪蛋白酸钠和  $\beta$ -酪蛋白酸钠, 在相对分子质量 (简称分子

量) 35 kDa~25 kDa 之间<sup>[20]</sup>。反应 12 h 时, 相较于未处理酪蛋白酸钠, 条带开始模糊, 并且在高分子量 75 kDa 出现新的条带, 说明此时已经发生了美拉德反应, 酪蛋白酸钠亚基的分子量增大。随着反应时间延长到 48 h 时,  $\alpha$ -酪蛋白酸钠和  $\beta$ -酪蛋白酸钠这两条特征条带逐渐消失, 同时在分离胶界面有大分子量的物质连续向下扩散, 形成拖带的现象。这说明酪蛋白酸钠和糖链发生接枝反应, 大分子糖链以共价键形式连接<sup>[21]</sup>在酪蛋白酸钠上。由于生成的酪蛋白酸钠-多糖美拉德产物分子量太大, 三级结构发生巨大变化, 在分离胶和浓缩胶的界面堆积, 难以穿透分离胶<sup>[22]</sup>。



Mark—标准蛋白; 泳道 1~5 依次为酪蛋白酸钠, 酪蛋白酸钠-燕麦 $\beta$ -葡聚糖反应 12、24、36、48 h

图 5 酪蛋白酸钠-燕麦 $\beta$ -葡聚糖美拉德反应不同时间的 SDS-PAGE 图

Fig. 5 SDS-PAGE image of sodium caseinate-oat  $\beta$ -glucan grafting reactants at different reaction times

### 2.3 FTIR 分析

通过对比 FTIR 谱图上吸收峰的变化来推断美拉德反应前后酪蛋白酸钠结构的变化以及化学键的改变, 进一步证实酪蛋白酸钠和燕麦 $\beta$ -葡聚糖是否发生美拉德反应以及美拉德反应的作用位点, 结果见图 6。

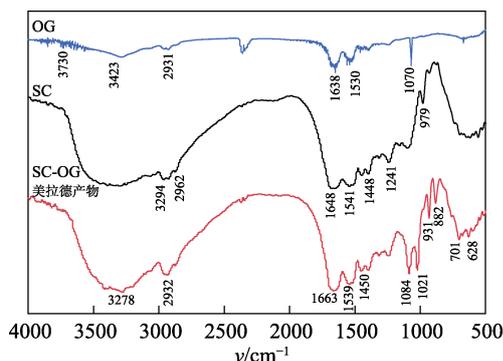


图 6 原料及最佳条件下产物的 FTIR 谱图

Fig. 6 FTIR spectra of raw material and conjugate

由图 6 可知, 燕麦 $\beta$ -葡聚糖在 1070  $\text{cm}^{-1}$  处出现糖苷键 C—O—C 的伸缩振动峰, 酪蛋白酸钠在此处无峰, 但美拉德产物在 1084  $\text{cm}^{-1}$  处形成新的属于糖苷键的吸收峰, 这可能是因为燕麦 $\beta$ -葡聚糖共价连接到酪蛋白酸钠上, 引入了糖苷键, 导致蛋白分子侧链振动, 并产生了相应的吸收峰。

蛋白质中酰胺 I 带的特征吸收峰 (1600~1700  $\text{cm}^{-1}$ ) 能够表现蛋白质化学基团和二级结构的变化。酪蛋白酸钠在 1648  $\text{cm}^{-1}$  处归属于酰胺 I 带的特征吸收峰在美拉德产物中迁移至 1663  $\text{cm}^{-1}$  处, 可能是由于美拉德反应过程中酪蛋白酸钠的伯氨基与燕麦 $\beta$ -葡聚糖的羰基发生缩合反应形成了含有 C=N 键的席夫碱产物, 释放出水并消耗氨基。美拉德产物在 1663 和 1539  $\text{cm}^{-1}$  处吸收峰均增强, 这可能是由于在美拉德反应过程中, 生成羰胺化合物、初级产物希夫碱等, 使得此处的吸收峰强度升高<sup>[23]</sup>。3700~3200  $\text{cm}^{-1}$  范围内出现的吸收峰是游离羟基的伸缩振动引起的。与酪蛋白酸钠相比, 美拉德产物在此处的吸收峰变宽, 可能是由于燕麦 $\beta$ -葡聚糖含有大量的羟基, 和酪蛋白酸钠发生共价结合后 O—H 伸缩振动加强<sup>[24]</sup>。结果表明, 酪蛋白酸钠与燕麦 $\beta$ -葡聚糖分子之间发生了复杂的交联和聚合反应, 最终通过共价连接形成新的产物。

### 2.4 内源荧光光谱分析

蛋白质是由氨基酸通过肽键连接形成的两性大分子物质, 随环境的变化而变化。酪蛋白中的色氨酸、酪氨酸是内源荧光的主要来源<sup>[25]</sup>。蛋白质的荧光特性与色氨酸和酪氨酸结构以及其所处的微环境紧密联系。可通过内源荧光光谱来分析蛋白质与其他物质反应引起的构象变化, 从而进一步判断美拉德反应对蛋白功能特性的改变。图 7 是酪蛋白酸钠、酪蛋白酸钠-燕麦 $\beta$ -葡聚糖物理混合物、酪蛋白酸钠-燕麦 $\beta$ -葡聚糖美拉德产物的内源荧光光谱。

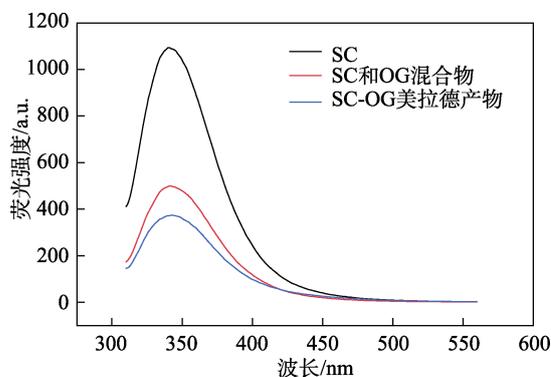


图 7 酪蛋白酸钠、酪蛋白酸钠和燕麦 $\beta$ -葡聚糖混合物、美拉德产物的荧光光谱图

Fig. 7 Fluorescence spectra of sodium caseinate, sodium caseinate and oat  $\beta$ -glucan mixture as well as Maillard conjugate

可以看出,酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物的荧光强度较酪蛋白酸钠、酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖物理混合物有明显下降,这是由于在较高反应温度下,蛋白质构象不稳定,美拉德反应使色氨酸和酪氨酸含量降低发生荧光猝灭,同时外界环境的改变使蛋白质由原本的折叠状态逐渐展开呈伸展状态,蛋白质此时发生去折叠化,由顺序结构向无序结构化转变。在 290 nm 的激发波长下,酪蛋白酸钠和酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖混合物的  $\lambda_{\max}$  为 340 nm;酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物的  $\lambda_{\max}$  为 342 nm,相比较出现红移,这说明改性使燕麦  $\beta$ -葡聚糖亲水性羟基接枝到酪蛋白酸钠上,增加了酪蛋白酸钠的亲水性,从而使色氨酸和酪氨酸所处的微环境疏水性减小,极性增加,表明酪蛋白酸钠空间结构发生了变化。

### 2.5 溶解性分析

图 8 为 pH 对美拉德反应前后酪蛋白酸钠溶解性的影响。由图 8 可知,经过美拉德反应改性后的产物在 pH 2~3 和 pH 6~9 范围内的溶解性显著提升,在等电点处改善不明显,但美拉德产物的等电点向酸性方向偏移。这可能是因为,随着接枝度的增加,多糖亲水性羟基的引入使共聚物溶解性增大,并且糖分子的还原末端与蛋白质分子中的自由氨基反应,减少了游离氨基所带的正电荷;另外,可能是多糖的引入造成的,过长的糖链形成空间位阻使得聚合物相互排斥,从而达到防止蛋白质聚集的作用<sup>[26]</sup>。

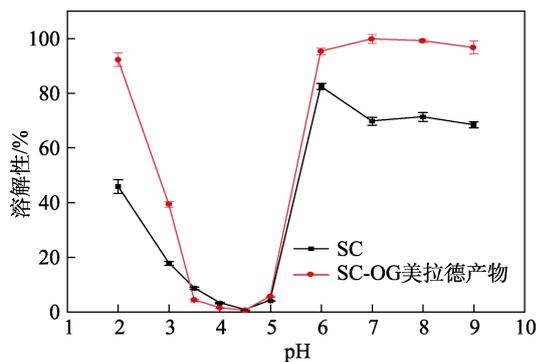


图 8 pH 对美拉德反应前后酪蛋白酸钠溶解性的影响  
Fig. 8 Effect of pH on solubility of sodium caseinate before and after Maillard reaction

### 2.6 乳化性和乳化稳定性分析

图 9 是未处理酪蛋白酸钠、加热的酪蛋白酸钠(加热至 60 °C, 24 h)、酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖物理混合物以及酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物在不同 pH 的 PBS 溶液中的乳化活性和乳化稳定性。乳化是通过酪蛋白酸钠分子中的疏水性残基锚定在油滴中,而亲水性基团则锚定在水相一侧,降低界面张力,乳液周围形成厚层来阻止油滴的聚

集。乳化性是衡量蛋白质促进油-水型乳状液形成能力的指标,乳化稳定性是指维持乳状液稳定存在的能力<sup>[27]</sup>。由图 9 可见,随着 pH 的增加酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物的乳化活性和乳化稳定性普遍高于酪蛋白酸钠、加热的酪蛋白酸钠、酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖物理混合物,尤其是在 pH 3~7 区域,乳化活性和乳化稳定性改善明显,当 pH 为 7 时,乳化活性较酪蛋白酸钠提高了 83.5%,乳化稳定性较酪蛋白酸钠提高了 12.7%,使得燕麦  $\beta$ -葡聚糖接枝后的共聚物比酪蛋白酸钠更加适用于近中性或者偏酸性的条件。这是由于蛋白质和多糖通过共价键连接,多糖亲水性羟基的引入使得蛋白质溶解性增加,同时美拉德反应加热会使蛋白质结构由卷曲变为伸展,疏水性基团暴露更多,使蛋白质更容易吸附到油-水界面,降低界面张力,提高乳化性。并且大分子多糖链会增加空间位阻,更加有效地阻止了油滴的聚集以及提高乳液稳定性<sup>[28]</sup>。关于酪蛋白酸钠和燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物的乳化性和乳化活性的研究结果和 ZHONG 等<sup>[29]</sup>对燕麦分离蛋白和平菇  $\beta$ -葡聚糖乳化性的研究结果一致。

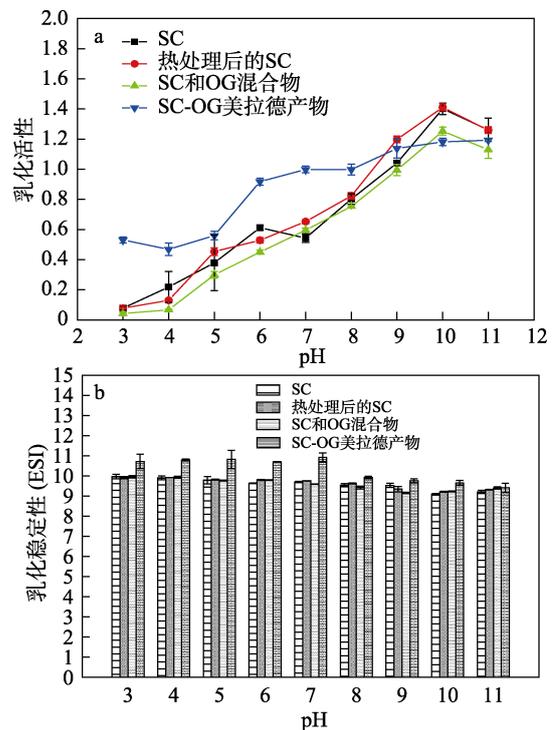


图 9 不同 pH 对乳化活性 (a) 和乳化稳定性 (b) 的影响  
Fig. 9 Effect of different pH on emulsification activity (a) and emulsification stability (b)

## 3 结论

采用美拉德干热法反应制备了酪蛋白酸钠-燕麦  $\beta$ -葡聚糖美拉德产物,考察了反应时间、pH、反

应温度对酪蛋白酸钠-燕麦 $\beta$ -葡聚糖美拉德反应的影响,同时用 SDS-PAGE 和 FTIR 验证了美拉德反应的进行及作用位点,并且验证了美拉德产物的功能特性。结果表明,在干热条件下,酪蛋白酸钠和燕麦 $\beta$ -葡聚糖可发生美拉德反应,最适反应条件为:反应温度 60 °C,酪蛋白酸钠与燕麦 $\beta$ -葡聚糖质量比为 1:2,反应湿度 78%,pH 为 7,反应时间 24 h。美拉德产物较改性前酪蛋白酸钠有更好的溶解性、乳化活性和乳化稳定性,说明美拉德反应有效提高了酪蛋白酸钠的部分功能特性,使得糖基化酪蛋白酸钠在食品添加剂领域有更加广泛的应用。并且燕麦 $\beta$ -葡聚糖作为天然成分具有降血压、血脂等保健优势,可将制备的美拉德产物作为一种新型食品添加剂应用到食品、医药行业中,符合食品添加剂逐渐由合成到天然的转变趋势。但本实验对酪蛋白酸钠等电点处溶解性的提高还有待进一步研究,后续实验还应研究其他不同糖类对蛋白质等电点处溶解性的影响。

#### 参考文献:

- [1] SHEPHERD R, ROBERTSON A, OFMAN D. Dairy glycoconjugate emulsifiers casein-maltodextrins[J]. *Food Hydrocolloids*, 2000, 14: 281-286.
- [2] JIN Z M (靳紫梦), ZHAO Q S (赵青山), CHEN Y Z (陈泳政), *et al.* Effect of ultrasound on the gel properties of soyprotein emulsion and the carrying capacity properties of quercetin[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(5): 963-971.
- [3] ARCAN I, YEMENICIOGLU A. Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins[J]. *Food Research International*, 2010, 43(1): 140-147.
- [4] MALHOTRA A, COUPLAND J N. The effect of surfactants on the solubility, Zeta potential, and viscosity of soy protein isolates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2004, 18(1): 101-108.
- [5] GU F, KIM J M, HAYAT K, *et al.* Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system[J]. *Food Chemistry*, 2009, 117(1): 48-54.
- [6] LIN H (林花), YU S J (于淑娟). Maillard reaction between bovine serum albumin and dextran ( I ) [J]. *Food Science (食品科学)*, 2010, 31(5): 18-22.
- [7] ZHAO L (赵磊), WANG X (王旋), SONG Y X (宋亚旭), *et al.* Preparation and emulsifying property of soy protein isolate polysaccharide conjugates by Maillard reaction[J]. *Food Technology (食品科技)*, 2015, 40(8): 256-261.
- [8] DAOU C, ZHANG H. Oat beta-glucan: Its role in health promotion and prevention of diseases[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2012, 11(4): 355-365.
- [9] LUO Y T, TU Y Q, REN F Z, *et al.* Characterization and functional properties of Maillard reaction products of beta-lactoglobulin and polydextrose[J]. *Food Chemistry*, 2021, 377: 131749.
- [10] ZHA F C, DONG S Y, RAO J J, *et al.* Pea protein isolate-gum arabic Maillard conjugates improves physical and oxidative stability of oil-in-water emulsions[J]. *Food Chemistry*, 2019, 285: 130-138.
- [11] ZHAO S L, HUANG Y, MCCLEMENTS D J, *et al.* Improving pea protein functionality by combining high-pressure homogenization with an ultrasound-assisted Maillard reaction[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 126: 107441.
- [12] WU H L (吴惠玲), WANG Z Q (王志强), HAN C (韩春), *et al.* Factors affecting the Maillard reaction[J]. *Modern Food Science and Technology (现代食品科技)*, 2010, 26(5): 441-444.
- [13] CHEN C (陈晨), CHEN F S (陈复生), LIU B Y (刘伯业), *et al.* Research advances on protein-polysaccharide compounds[J]. *Food Industry (食品工业)*, 2019, 40(2): 225-229.
- [14] AMINLARI M, RAMEZANI R, JADIDI F. Effect of Maillard-based conjugation with dextran on the functional properties of lysozyme and casein[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005, 85(15): 2617-2624.
- [15] XU C H (许彩虹). Research on the glycosylation and thermal aggregation of soybean globulin-polysaccharide[D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2010.
- [16] QI J R (齐军茹), YANG X Q (杨晓泉), PENG Z Y (彭志英). Preparation of soy protein-dextran conjugate through the Maillard reaction[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry (无锡轻工大学学报)*, 2004, 23(5): 5.
- [17] LI J Y (李家燕), TANG C H (唐传核), CAO J S (曹劲松), *et al.* Functional properties of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolation. Effect of glycosylation[J]. *Modern Food Science and Technology (现代食品科技)*, 2009, 25(6): 584-587.
- [18] PIRESTANI S, NASIRPOUR A, KERAMAT J, *et al.* Preparation of chemically modified canola protein isolate with gum arabic by means of Maillard reaction under wet-heating conditions[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 155: 201-207.
- [19] ZHANG Q, LI L, LAN Q Y, *et al.* Protein glycosylation: A promising way to modify the functional properties and extend the application in food system[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(15): 2506-2533.
- [20] TANG C H (唐传核). Study on enzymatic polymerization of food proteins and mechanism of its modification[D]. Guangzhou: South China University of Technology (华南理工大学), 2002.
- [21] GAO W (高威). The research on gel properties of casein modified by Maillard reaction[D]. Dalian: Dalian Polytechnic University (大连工业大学), 2014.
- [22] MIN M (闵敏). Properties and application of glycosylated casein[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Commerce and Industry (浙江工商大学), 2017.
- [23] WANG W, ZHONG Q X. Properties of whey protein-maltodextrin conjugates as impacted by powder acidity during the Maillard reaction[J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 38: 85-94.
- [24] YANG L S (杨龙松). Preparation of potato protein-polysaccharide complex and its effect on the quality of dumpling wrappers[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University of Light Industry (郑州轻工业大学), 2021.
- [25] VIVIAN J T, CALLI P R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins[J]. *Biophysical Journal*, 2001, 80(5): 2093-2109.
- [26] CHENG Y H, MU D C, FENG Y Y, *et al.* Glycosylation of rice protein with dextran via the Maillard reaction in a macromolecular crowding condition to improve solubility[J]. *Journal of Cereal Science*, 2022, 103: 103374.
- [27] XIAO Q, WOO M W, HU J, *et al.* The role of heating time on the characteristics, functional properties and antioxidant activity of enzyme-hydrolyzed rice proteins-glucose Maillard reaction products[J]. *Food Bioscience*, 2021, 43: 101225.
- [28] WANG X, HOU Z Q, YUAN P, *et al.* Development of germinated brown rice protein and dextran conjugate as an emulsifier: Evaluation of physicochemical properties and emulsion stability[J]. *Food Chemistry*, 2019, 40(12): 46-54.
- [29] ZHONG L, MA N, WU Y L, *et al.* Characterization and functional evaluation of oat protein isolate-pleurotus ostreatus  $\beta$ -glucan conjugates formed via Maillard reaction[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 87: 459-469.