

乳清分离蛋白与壳聚糖美拉德反应初级阶段产物乳化性研究

许朵霞, 包亚妮, 闫冰, 房子舒, 高彦祥, 袁芳*
(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 采用干热美拉德反应制备乳清分离蛋白(WPI)-壳聚糖复合物, 通过对复合物的乳液粒径及稳定性分析, 研究反应温度、WPI与壳聚糖质量比及反应时间对复合物乳化性的影响。荧光光谱分析表明: WPI和壳聚糖在干热反应后发生共价交联并且结构发生了变化。WPI与壳聚糖在50℃、相对湿度79%干热条件下, 反应1~4d的产物为Maillard反应初级阶段产物, 该产物的乳化性质得到改善。其中, WPI与壳聚糖以质量比1:4混合, 50℃反应1d的产物乳化稳定性是反应前的10倍。

关键词: 乳清分离蛋白(WPI); 壳聚糖; 美拉德反应; 乳化性

Emulsifying Properties of Whey Protein Isolate-Chitosan Conjugates Prepared from the Primary Stage of Maillard Reaction

XU Duo-xia, BAO Ya-ni, YAN Bing, FANG Zi-shu, GAO Yan-xiang, YUAN Fang*
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In this study, the conjugation of whey protein isolate (WPI) and chitosan through Maillard reaction under different dry heating conditions was studied. Emulsifying properties of WPI-chitosan conjugates were compared at different reaction temperatures, WPI-pectin mass ratios and reaction time by determining the changes in droplet size, emulsifying stability and turbiscan analysis. The fluorescence spectra of WPI-chitosan conjugates confirmed the conjugation of WPI and chitosan. Meanwhile, the primary stage of Maillard reaction was completed after 1-4 days of reaction under the conditions of 50 °C and a relative humidity of 79%, and reaction products with improved emulsifying properties were obtained. The product formed after 1 day of reaction between WPI and chitosan at a mass ratio of 1:4 at 50 °C showed a 10-fold increase in emulsion stability compared to their physical mixture.

Key words: whey protein isolate (WPI); chitosan; Maillard reaction; emulsifying property

中图分类号: TQ936.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)07-0016-04

乳清蛋白是一种天然高分子乳化剂, 具有良好的两亲性, 通过分子间 β -sheet相互作用进行自我聚合, 形成连续且均一的膜吸附在油滴表面, 但由于蛋白质形成的油水界面膜较薄, 容易受到温度、离子强度、pH值等因素的影响, 限制了其应用范围^[1-2]。

多糖具有良好的增稠和持水性, 可通过美拉德反应引入蛋白质从而改善蛋白质的功能特性^[3]。Sun Changhui等^[4]研究了WPI-黄原胶复合物在水包油体系中的乳化性质, 复合物可有效阻止乳状液的沉淀和上浮。Akhtar等^[5]研究了WPI-葡聚糖在低pH值、不同离子强度条件下的

乳化能力, 证明该复合物制备的乳状液在3个月贮藏中有良好的稳定性。芦晶等^[5]研究表明乳清蛋白-壳寡糖复合物可改善乳清蛋白在较酸性条件下的乳化性及乳化稳定性, 壳寡糖的引入可扩大乳清蛋白的应用范围。因此, 研究蛋白质多糖复合物作为一种优良的多功能食品添加剂具有一定的理论意义及广阔的应用前景。

壳聚糖因其具有良好的生物相容性、生物可降解性、吸湿性和保湿性、抗菌抑菌性、表面多孔性在化学改性方面受到国内外学者的广泛关注^[6-10]。本研究将壳聚糖引入乳清分离蛋白(whey protein isolate, WPI)旨

收稿日期: 2011-03-11

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研项目(200800190027); “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD27B04)

作者简介: 许朵霞(1986—), 女, 博士研究生, 研究方向为天然产物与食品添加剂。E-mail: xuduoxia1986@yahoo.com.cn

*通信作者: 袁芳(1967—), 女, 副教授, 硕士, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: yuanfang0220@163.com

在制备 WPI-壳聚糖 Maillard 反应初级阶段的产物,即将 WPI 和壳聚糖反应控制在交联而没有开始降解阶段,以生成具有良好乳化性的复合产物。

1 材料与amp;方法

1.1 材料、试剂与仪器

乳清分离蛋白(WPI, 蛋白含量 97.6%) 美国 Davisco 国际食品公司;壳聚糖(医药级) 浙江金壳生物化学有限公司;葵花籽油 北京爱森绿宝油脂有限公司;溴化钾、醋酸、醋酸钠(分析纯) 北京化学试剂公司。

970CRT 荧光分光光度计 上海现科仪器有限公司;HD-1 型高速乳化均质机 北京华远航实验设备厂;NS1001L2K 型高压均质机 意大利 Niro-Soavi 公司;Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度仪 英国 Malvern 公司;Turbiscan Lab Expert 浓缩体系稳定性分析仪 法国 Formulation 公司。

1.2 方法

1.2.1 WPI 与壳聚糖复合物的制备

将 WPI 和壳聚糖以质量比 1:1、1:2、1:4 溶解于 pH6.0、0.1mol/L 醋酸盐缓冲溶液中。溶液冷冻干燥后,将冻干粉置于底部盛有饱和 KBr(相对湿度 79%)的干燥器中,分别采用 50、65、80℃ 反应温度,反应 1~15d,在不同的反应时间后取样,所得产物置于 -20℃ 冰箱中贮存。

1.2.2 荧光光谱扫描^[11-12]

将 WPI 与壳聚糖质量比 1:4、50℃ 条件下反应 1d 和 3d 的复合物溶于醋酸盐缓冲液(pH4.0)中,配成 1mg/mL 溶液,原料 WPI 与壳聚糖为对照。荧光光谱分析参数为:激发波长 274nm,入射缝宽为 5nm,出射缝宽 10nm,灵敏度 3,扫描速率为高速,扫描波长 200~500nm。

1.2.3 乳状液的制备

以 0.2g/100mL WPI 的质量浓度反应前后的样品溶解于 90mL 醋酸盐缓冲液(pH4.0)中,搅拌放置,溶胀过夜,至完全溶解,形成水相。在高速乳化均质机的搅拌下缓慢将 10mL 葵花籽油加入水相中,以 5000r/min 剪切 10min,形成粗乳状液。再将粗乳状液通过高压均质机进一步均质(均质温度 25℃,均质压力 50MPa)得到 WPI-壳聚糖复合物乳状液。

1.2.4 乳状液粒径分析

将制备的乳状液用 pH6.0、0.1mol/L 醋酸盐缓冲溶液稀释 1000 倍后,采用 Zetasizer Nano-ZS90 激光粒度仪室温分析乳液粒径大小,通过平均粒径(nm)表示。

1.2.5 乳化稳定性测定^[13]

乳状液制备后立即从其底部吸取 100μL,用

0.1%SDS 稀释至 50mL,于 500nm 波长处测定吸光度 A_0 。放置 30min 后,再从乳状液底部吸取 100μL 测定吸光度 A_{30min} 。

$$ES = \frac{A_0}{A_0 - A_{30min}} \times t$$

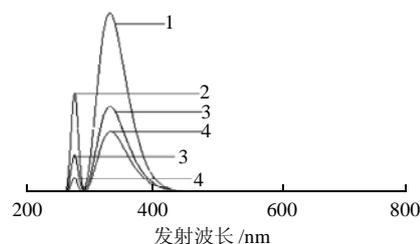
式中:ES 为乳化稳定性 /min; t 为两次测定乳化稳定性时间间隔 /min; A_0 为起始吸光度; A_{30min} 为 30min 时吸光度。

1.2.6 乳状液物理稳定性快速评价

采用 Turbiscan Lab Expert 浓缩体系稳定性分析仪对乳状液的稳定性进行快速分析。仪器采用脉冲近红外光源($\lambda=880nm$)自下而上扫描样品,两个同步光学探测器分别搜集透射光和背散射光。在一定时间内连续扫描样品,获得透射光与背散射光信号对样品高度的函数曲线图,即可反映出样品中颗粒运动趋势,进而预测出纳米乳状液的稳定性。实验选用背散射光值(BS)来分析乳状液的稳定性。实验中,每个样品取 20mL 置于 Turbiscan 测试瓶中(样品高度约为 43mm),将测试瓶放入检测池中,温度设定为常温 25℃,每 30min 扫描一次,扫描 4h,记录扫描图谱。

2 结果与分析

2.1 荧光光谱分析



1. WPI; 2.壳聚糖; 3. WPI-壳聚糖复合物(质量比 1:4, 50℃ 反应 1d); 4. WPI-壳聚糖复合物(质量比 1:4, 50℃ 反应 3d)。

图 1 WPI-壳聚糖复合物荧光光谱

Fig.1 Fluorescence spectra of WPI-chitosan conjugates

由图 1 可知, WPI 和壳聚糖对照实验出峰明显,且互不干扰。WPI 和壳聚糖干热反应后,产物的荧光光谱中出现两个峰,且吸收峰随着反应时间的延长呈减小趋势。吸收峰的减小说明产物保留部分反应物的特征,并可能有新的物质的生成。证明 WPI 和壳聚糖发生交联,蛋白分子中糖链的加入使得分子的空间结构发生变化,导致色氨酸和酪氨酸的吸收变弱,明显的特征吸收峰减弱。同时,壳聚糖的发色团也有可能因为反应而吸收变弱。且 WPI-壳聚糖反应后吸收峰出现红移现

象, 反应产物的第一个峰和对照壳聚糖的峰都出现在 $(279.6 \pm 0.1)\text{nm}$ 处, 几乎无变化; 而反应产物的第 2 个峰和 WPI 的出峰处稍有变化。WPI 是在 334.1nm 波长处、反应后的产物分别在 335.4nm 和 335.5nm 波长处。吸收峰出现红移现象的原因可能是: 蛋白质发生变性后肽键伸展, 将藏在分子内部疏水区的生色团暴露出来或原来亲水区的生色基团被某些基团包围; 蛋白质与多糖干热反应所得的复合物, 其分子质量较大, 从而致使空间位阻效应较为突出; 壳聚糖的活性还原末端与 WPI 中氨基酸残基的氨基结合生成新的结构等^[14]。荧光光谱分析表明 WPI 和壳聚糖在干热反应后产物结构发生了变化及复合物的形成。

2.2 反应温度对 WPI-壳聚糖复合物乳化性的影响

WPI-壳聚糖在 65 、 80°C 条件下反应 1d 后产物的褐变程度较高, 溶解度较低, 制备的乳状液极不稳定, 放置 0.5h 内均有明显的油滴上浮现象。可能是因为反应温度较高, 导致反应速度过快, 褐变程度加深, 反应过程不易控制, 且温度过高容易引起蛋白质变性, 从而引起一些功能基团的破坏, 乳化性大大降低。同时 50°C 条件下反应 5d 后的产物褐变亦较明显, 溶解度降低, 制备的乳状液不稳定, 也不适宜作为乳化剂。温和的反应条件可保证 Maillard 反应进行到适宜程度, 确保制备的蛋白质多糖复合物具有良好的功能特性^[11]。因此, 采用反应温度 50°C , 反应时间 1~4d 制备 Maillard 反应初级阶段产物并研究其乳化性能。

2.3 不同质量比及不同反应时间对 WPI-壳聚糖复合物乳状液粒径的影响

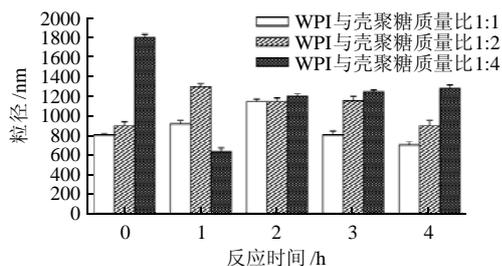


图2 WPI-壳聚糖不同质量比及反应时间对其复合物制备乳液粒径的影响

Fig.2 Effects of WPI/chitosan mass ratio and reaction time on the droplet size of emulsified products

文献[15]报道, 不同蛋白质-多糖质量比对复合物乳化活性有一定的影响, 所以分别考察 WPI-壳聚糖质量比 1:1、1:2、1:4, 在不同反应时间(0、1、2、3、4d)的产物制备乳液对其粒径大小的影响。反应时间和质量比对美拉德反应的影响较大, 质量比不同, 反应的进程不同, 产物制备的乳液粒径呈现不同大小。由图 2 可知, 随着壳聚糖含量增大, 复合物制备的乳液粒

径增大。在相同质量比条件下, 不同反应时间生成的复合物制备的乳液粒径不同。WPI-壳聚糖复合物(质量比 1:1、1:2)随着反应的进行, 乳液粒径呈先增大后减小的趋势, 粒径变化不显著。WPI-壳聚糖质量比 1:4 时, WPI-壳聚糖复合物与原料对照相比制备的乳液粒径均减小, 说明 WPI-壳聚糖经过共价复合后乳化性得到提高。在反应时间为 1d 时, 产物制备的乳液粒径最小, 这是因为壳聚糖与 WPI 发生共价交联, 由于壳聚糖的亲水性使得复合物的表面活性得到提高, 同时壳聚糖分子上的一 COO^- 所带的电荷可通过静电排斥作用阻止油滴间聚合, 提高其乳化能力, 而后随着反应时间的延长, 复合物制备的乳液粒径逐渐增大。可能是由于反应时间过长导致复合物过于亲水使得其表面活性降低, 从而降低了复合物的乳化性^[16]。

2.4 不同质量比及不同反应时间对 WPI-壳聚糖复合物乳化稳定性的影响

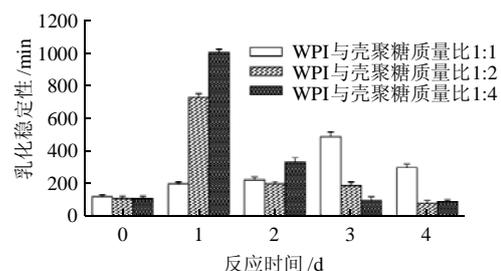


图3 WPI-壳聚糖不同质量比及反应时间对其复合物乳化稳定性的影响

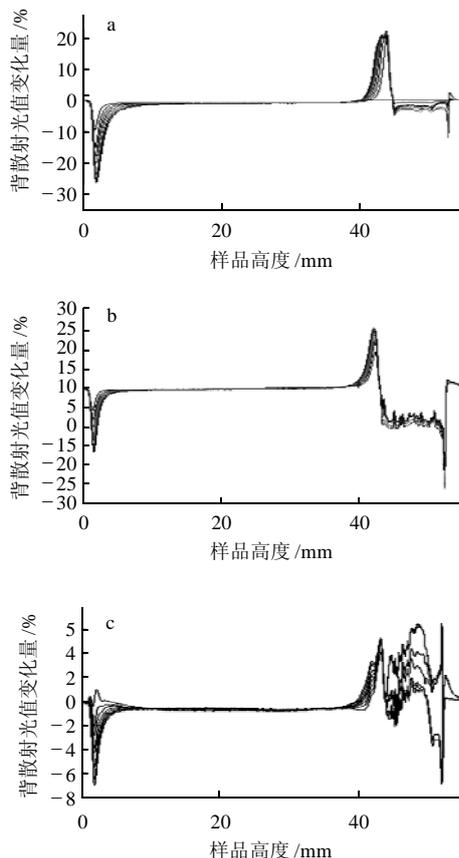
Fig.3 Effects of WPI/chitosan mass ratio and reaction time on the stability of emulsified products

由图 3 可知, 通过 Maillard 反应, 不同质量比的 WPI-壳聚糖复合物制备的乳液稳定性均随着反应时间的延长呈现先提高而后降低。二者质量比 1:1 在反应时间为 3d 时产物制备的乳液稳定性最大; 质量比 1:2 在反应时间为 2d 时产物制备的乳液稳定性最大; 质量比 1:4 在反应时间为 1d 时产物制备的乳液稳定性最大, 其乳液稳定性是未反应前混合物的 10 倍, 并且质量比 1:4 复合物制备的乳液稳定性要优于质量比 1:1、1:2 的复合物。因为当与蛋白质共价结合的多糖分子较少时, 形成的蛋白质多糖复合物不能有效增加吸附层的厚度和强度, 因而不能有效提高乳状液的稳定性; 若反应时间过长结合在蛋白质分子上的多糖过多, 形成的复合物的亲水性过大, 降低其乳化性。因此, 形成具有理想乳化特性的蛋白质多糖复合物应具有适量的多糖结合蛋白质以提高复合物乳化性的同时也具有一定的疏水性, 从而使复合物能快速且紧密地吸附在油水界面上。

Maillard 反应一般分为 3 个阶段, 蛋白质-多糖复

合物主要是第一阶段的 Amadori 重排产物中的一类, 反应时间过短或过长将影响复合物的功能性^[17]。因此, 要控制反应物比例及反应时间。结合乳液粒径分析及乳液稳定性分析, WPI 和壳聚糖质量比为 1:4 反应时间为 1d 时, 乳化活性及乳化稳定性相对较好且反应时间较短。

2.5 WPI-壳聚糖复合物乳状液物理稳定性快速分析



a. WPI 乳液; b. WPI-壳聚糖(质量比 1:4)混合物冻干粉; c. 50℃反应 1d 的 WPI-壳聚糖(质量比 1:4)复合物。

图 4 WPI-壳聚糖复合物制备乳液 Turbiscan 扫描图谱

Fig.4 Turbiscan profiles of emulsified products prepared with WPI, WPI-chitosan physical mixture, WPI-chitosan conjugate

BS 绝对值越小, 说明乳液稳定性越好。由图 4 可知, WPI、WPI-壳聚糖冻干粉混合物、WPI-壳聚糖复合物制备乳液样品顶部和底部均发生变化, 底部出现澄清层, 顶部出现乳析层, 粒子有向上迁移的趋势。因为乳状液是热力学不稳定体系, 随着贮藏时间延长会出现絮凝、聚集及乳析等现象, 样品乳化稳定性提高后可延缓乳状液分层、絮凝和聚集的发生。在 Turbiscan 扫描 4h 后, WPI 制备乳液顶部及底部 Δ BS 值为 22% 和 -26%; WPI-壳聚糖冻干粉制备乳液顶部及底部 Δ BS 值为 15% 和 -16%; WPI-壳聚糖复合物(质量比 1:4, 50℃, 反应时间 1d)制备乳液顶部及底部 Δ BS 值为 5% 和 -7%。再次证明 WPI-壳聚糖复合物乳化稳

定性得到大大提高, 在油水界面上能以适宜的构象排列, 具有更好的乳化特性^[18]。

3 结论

WPI 和壳聚糖在干热反应后产物结构发生了变化, 通过荧光光谱分析, 出现吸收峰减小和最大发射波长稍有变化的现象, 证明 WPI-壳聚糖复合物的形成。根据褐变程度及制备的乳状液的稳定性得出在反应温度 50℃, 反应 1~4d 的产物为 Maillard 反应的初级阶段产物, 且产物适宜做乳化剂。研究发现不同制备条件生产的 WPI-壳聚糖复合物乳化性和乳化稳定性不同, WPI 和壳聚糖质量比 1:4、温度 50℃ 不同反应时间的反应产物乳化性变化趋势稳定易控制, 乳化稳定性良好。

参考文献:

- [1] EINHORN-STOLL U, ULBRICH M, SEVER S, et al. Formation of milk protein-pectin conjugates with improved emulsifying properties by controlled dry heating[J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(2): 329-340.
- [2] DICKINSON E, GALAZKA V. Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides[J]. Food Hydrocolloids, 1991, 5(3): 281-296.
- [3] AKHTAR M, DICKINSON E. Emulsifying properties of whey protein-dextran conjugates at low pH and different salt concentrations[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003, 31(1/4): 125-132.
- [4] SUN Changhui, GUNASEKARAN S, RICHARDS M P. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(4): 555-564.
- [5] 芦晶, 布冠好, 罗永康. 乳清蛋白-多糖的制备及功能特性的研究[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(5): 4-8.
- [6] BABIKER E E. Effect of chitosan conjugation on the functional properties and bactericidal activity of gluten peptides[J]. Food Chemistry, 2002, 79(3): 367-372.
- [7] MIRALLES B, MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ A, SANTIAGO A, et al. The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between β -lactoglobulin and chitosan[J]. Food Chemistry, 2007, 100(3): 1071-1075.
- [8] KANATT S R, CHANDER R, SHARMA A. Chitosan glucose complex: a novel food preservative[J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 521-528.
- [9] 郭兴风, 王延青, 胡婷婷. 大豆蛋白-壳聚糖复合物制备研究[J]. 粮食与油脂, 2010(8): 8-11.
- [10] 王惠英, 孙涛, 周冬香. 壳聚糖的美拉德反应及其产物的抗氧化性能研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(10): 91-93.
- [11] JIMÉNEZ-CASTAÑO L, LÓPEZ-FANDIÑO R, OLANO A, et al. Study on β -lactoglobulin glycosylation with dextran: effect on solubility and heat stability[J]. Food Chemistry, 2005, 93(4): 689-695.
- [12] 王世平, 王静, 仇厚援. 现代仪器分析原理与技术[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 1999.
- [13] EINHORN-STOLL U, WEISS M, KUNZEK H. Influence of the emulsion components and preparation method on the laboratory-scale preparation of O/W emulsions containing different types of dispersed phases and/or emulsifiers[J]. Nahrung Food, 2002, 46(4): 294-301.
- [14] WOOSTER T J, AUGUSTIN M A. β -Lactoglobulin-dextran Maillard conjugates: their effect on interfacial thickness and emulsion stability[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2006, 303(2): 564-572.
- [15] 毛立科, 许朵霞, 杨佳, 等. 不同乳化剂制备 β -胡萝卜素纳米乳液研究[J]. 食品工业科技, 2008(4): 64-67.
- [16] NAKAMURA S, KATO A, KOBAYASHI K. Bifunctional lysozyme-galactomannan conjugate having excellent emulsifying properties and bactericidal effect[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40(5): 735-739.
- [17] 许朵霞, 许洪高, 毛立科, 等. 蛋白质多糖复合物的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(11): 186-190.
- [18] DICKINSON E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems[J]. Food Hydrocolloids, 2003, 17(1): 25-39.