

加工条件对BSA-Glucose模拟体系中晚期糖基化末端产物形成的影响

房红娟, 李红姣, 张双凤, 刘荟萃, 李巨秀*

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 建立牛血清白蛋白-葡萄糖(BSA-Glucose)热加工模拟体系, 用荧光光谱法测定激发光谱/发射光谱($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$)=370nm/440nm荧光值, 研究加热温度、加热时间、初始pH值、蛋白质浓度、抗氧化剂对晚期糖基化末端产物(advanced glycation end products, AGEs)形成的影响。结果表明: 随着加热温度升高和加工时间延长, AGEs含量呈现先增加后减少的趋势, 分别在100℃、60min时达到最大值; 初始pH值对AGEs形成具有重要影响, pH7.0时产生AGEs最多, 碱性条件次之, 酸性条件最少; 茶多酚、迷迭香酸、甘草黄酮对AGEs的生成具有显著的抑制作用; 金属离子中 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 、 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 对AGEs的形成无显著影响。因此, 加工条件如加热时间、加工温度及初始pH值对BSA-Glucose模拟体系中AGEs的形成具有重要影响, 且食品级天然抗氧化剂茶多酚、迷迭香酸和甘草黄酮可抑制AGEs形成, 金属离子对AGEs形成无影响。

关键词: 食品; 美拉德反应; 晚期糖基化末端产物; 荧光光谱法; 抗氧化剂

Effect of Process Conditions on Advanced Glycation End Product Formation in BSA-Glucose System

FANG Hong-juan, LI Hong-jiao, ZHANG Shuang-feng, LIU Hui-cui, LI Ju-xiu*

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: This paper reports on the results of an investigation into the effects of temperature, heating time, initial pH, protein concentration and antioxidant type on the formation of advanced glycation end products (AGEs) in a simulated thermal processing system consisting of BSA and glucose. Fluorescence intensity at an excitation/emission wavelength of 370 nm/440 nm was used as a measure of the formation of AGEs. The results showed that the production of AGEs tended to first increase to the maximum at 100 °C and 60 min, respectively, and then decrease with increasing temperature and prolonged heating time. Initial pH was an important variable that influences the formation of AGEs; the largest amount of AGEs were formed at pH 7.0, followed by alkaline conditions, and the formation of AGEs was minimized under acid conditions. The formation of AGEs was substantially affected by tea polyphenols, liquorice flavonoids and rosemary acid but little affected by Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Zn^{2+} or Ca^{2+} . Hence, the formation of AGEs is affected importantly by process conditions including heating time, temperature and initial pH, and is inhibited by tea polyphenols, liquorice flavonoids and rosemary acid as food-grade natural antioxidants but is not affected by metal ions.

Key words: food; Maillard reaction; advanced glycation end products; fluorescence spectrometry; antioxidant

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)21-0006-05

晚期糖基化末端产物(advanced glycation end products, AGEs)是美拉德反应(Maillard reaction)晚期(advanced stage)产生的一类不可逆产物^[1], 在体内大量积累可导致糖尿病、肾病(尿毒症)、动脉粥样硬化、衰老和阿茨海默尔等疾病的发生^[2-5]。AGEs既可以在体内生成(内源性)也可以通过食物摄入(外源性)^[6-7]。据估计, 通过食物摄入的AGEs有大约

10%进入血液循环, 其中2/3在体内积累造成疾病发生^[8]。食品中的AGEs形成与食品的成分和加工方式有关^[9], 热加工可导致食品中AGEs急剧增加, 随着加热时间的延长和暴露于热环境中的程度增加, AGEs的形成增多^[10-11]。AGEs具有自发荧光性, 用于测定AGEs的激发光谱(λ_{ex})为340~370nm, 发射光谱(λ_{em})为420~440nm, 其荧光强

收稿日期: 2012-06-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101217); 西北农林科技大学科技创新专项(QN 2012034)

作者简介: 房红娟(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品化学。E-mail: fanghj2010@163.com

*通信作者: 李巨秀(1972—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品化学和功能食品。E-mail: juxiuli@msn.com

度随AGEs浓度增加而升高^[12]。因此,本研究拟通过建立BSA-Glucose加热模拟体系,测定荧光值来研究加工条件对AGEs形成的影响规律,为研究食品加工和贮藏过程中AGEs形成的机制和调控措施提供数据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

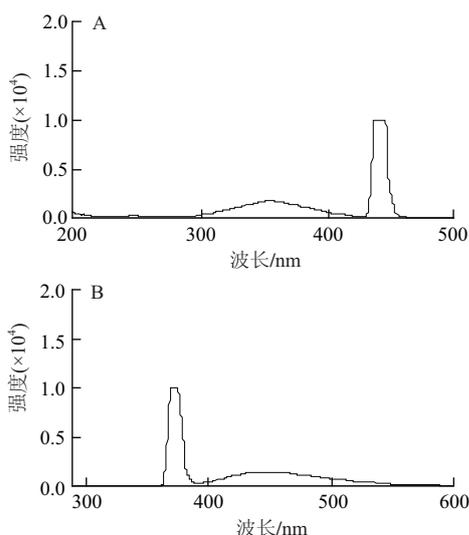
牛血清白蛋白(BSA)、葡萄糖(Glucose)、氨基胍、丁基羟基甲苯(BHT)、丁基羟基茴香醚(BHA)、没食子酸丙酯(PG) 美国Sigma公司;茶多酚(98%)、迷迭香酸(10%)、甘草提取物(35%)(均为食品级抗氧化剂) 西安源森生物科技有限公司;桑椹醇提取物及石榴花色苷均为本实验室提取;磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(分析纯) 天津市博迪化工股份有限公司;氢氧化钠、氯化铁、氯化亚铁、氯化铜、氯化钙、氯化锌、氯化铝、三氯乙酸、盐酸(均为分析纯) 西陇化工有限公司。

1.2 仪器与设备

F-4500荧光分光光度计 日本岛津公司;Vortex-5旋涡混合器 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司;BT25S电子天平 北京赛多利斯科学仪器有限公司;PHS-3C+ pH计 成都世纪方舟科技有限公司;HC-3018R高速冷冻离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司;DKU-3油浴锅 上海精宏实验设备有限公司;HX-C12冻存管(5mL) 海门市盛邦实验器材有限公司。

1.3 方法

1.3.1 荧光光谱法测定AGEs含量



A.激发波长扫描图谱; B.发射波长扫描图谱。

图1 激发波长和发射波长扫描图谱

Fig.1 Fluorescence excitation and emission spectra of AGEs

依据文献^[12]的测定方法加以改进,分别固定激发

波长370nm、发射波长440nm,扫描BSA-Glucose反应液的发射波长和激发波长。由图1可以看出激发波长在300~400nm范围内有吸收,发射波长在400~500nm范围内有吸收。本研究采用 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=370\text{nm}/440\text{nm}$ 波长处测样品的荧光值表示AGEs的含量。

仪器设定参数为:激发波长370nm,狭缝宽度5.0nm;发射波长440nm,狭缝宽度5.0nm,光电倍增管电压700V,响应时间0.5s,扫描方式为时间扫描20s。

1.3.2 加热温度对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

用磷酸盐缓冲液(PB, 0.05mol/L, pH7.4)溶解BSA和Glucose,并定容至50mL,使BSA质量浓度为0.8mg/mL和Glucose浓度为200mmol/L,分装于5mL冻存管(或10mL血清瓶)中,4mL/管,拧紧管盖,分别在25、50、75、100℃水浴条件下,或125、150℃油浴,加热60min,置于4℃冰箱冷却。取1mL反应液,加入100 μ L 4℃预冷的三氯乙酸(1g/mL),混匀,15000r/min、4℃离心4min,弃上清液,将沉淀以pH10.0的磷酸盐缓冲液PBS(氯化钠0.8006g,磷酸氢二钠0.2901g,氯化钾0.0200g,磷酸二氢钾0.0200g溶于100mL水中,以0.05mol/L氢氧化钠调节pH值至10.0)溶解,测定 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=370\text{nm}/440\text{nm}$ 荧光值。

1.3.3 加热时间对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

用PB缓冲液(0.05mol/L, pH7.4)溶解BSA和Glucose,并定容至50mL,使BSA质量浓度为0.8mg/mL和Glucose浓度为200mmol/L,分装于5mL冻存管中,4mL/管,拧紧管盖,100℃水浴条件下分别加热10、20、30、60、90、120、150、180、210min,置于4℃冰箱冷却。取1mL反应液,加入100 μ L 4℃预冷的三氯乙酸(1g/mL),混匀,15000r/min、4℃离心4min,弃上清液,将沉淀以pH10.0的PBS缓冲液溶解,测定 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=370\text{nm}/440\text{nm}$ 荧光值。

1.3.4 pH值对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

以4mL pH值为1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0的磷酸盐-氢氧化钠缓冲液溶解BSA和Glucose,使BSA质量浓度为0.8mg/mL和Glucose浓度为200mmol/L,分装于5mL冻存管中,100℃水浴加热60min,置于4℃冰箱冷却。取1mL反应液,加入100 μ L、4℃预冷的三氯乙酸(1g/mL),混匀,15000r/min、4℃离心4min,弃上清液,将沉淀以pH10.0的PBS缓冲液溶解,测定 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=370\text{nm}/440\text{nm}$ 荧光值。

1.3.5 金属离子对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

向冻存管中加入4mL含有浓度为40mmol/L的FeCl₃、FeCl₂、AlCl₃、ZnCl₂和CaCl₂的PB缓冲液(0.05mol/L, pH7.4),并以此溶解BSA和Glucose,使BSA质量浓度为0.8mg/mL和Glucose浓度为200mmol/L,拧紧管盖,100℃

水浴加热60min, 结束后置于4℃冰箱冷却。取1mL反应液, 加入100 μ L 4℃预冷的三氯乙酸(1g/mL), 混匀, 15000r/min、4℃离心4min, 弃上清液, 将沉淀以pH10.0的PBS缓冲液溶解, 测定 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=370\text{nm}/440\text{nm}$ 荧光值。

1.3.6 抑制剂对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

用PB缓冲液(0.05 mol/L, pH7.4)溶解BSA和Glucose, 并定容至50mL, 使BSA质量浓度为0.8mg/mL和Glucose浓度为200mmol/L使BSA质量浓度为0.8mg/mL和Glucose浓度为200mmol/L, 分装于5mL冻存管中, 4mL/管, 加入氨基胍(阳性对照)、BHT、BHA、PG和天然抗氧化剂桑椹醇提取物、茶多酚、甘草提取物、迷迭香酸、石榴花色苷溶液, 使终质量浓度为100 μ g/mL, 以不加任何抑制剂作为阴性对照, 拧紧管盖, 100℃水浴加热60min, 结束后, 置于4℃冰箱冷却。取1mL反应液, 加入100 μ L 4℃预冷的三氯乙酸(1g/mL)混匀, 15000r/min 4℃离心4min, 弃上清液, 将沉淀以pH10.0的PBS缓冲液溶解, 测定 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=370\text{nm}/440\text{nm}$ 荧光值。

1.4 统计分析方法

采用Excel 2010软件进行统计分析数据, DPS v7.05软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 加热时间对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

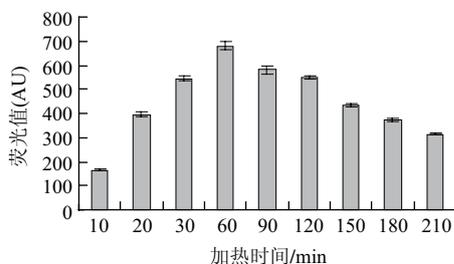


图2 加热时间对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

Fig.2 Effect of heating time on AGE formation in BSA-glucose system

由图2可知, 在10~60min范围内随着加热时间延长, 荧光值不断增大, 反应液颜色呈黄色, 且逐渐加深, 在60min时荧光值达到最大, 表明BSA与葡萄糖反应生成了大量AGEs。加热60~210min范围内, 随着加热时间延长, 反应进一步进行, 荧光性的AGEs逐渐生成了棕色的类黑素, 而导致荧光值逐渐减少, 这可能是由于具有荧光性的AGEs聚合为无荧光的AGEs。说明AGEs是美拉德反应产生的一类黄色的晚期产物, 荧光性的AGEs并不是随着加热时间延长而一直增加。

2.2 加热温度对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

由图3可知, 在加热时间均为60min时, 在25、50℃条件下反应后, 荧光值无明显变化, 而75℃加热后荧光

值明显升高, 100℃处理后, 体系中的BSA和葡萄糖快速反应生成AGEs, 导致荧光值急剧增大; 在更高温度(125、150℃)下, 反应液颜色加深, 荧光值减少。这是由于高温促进了美拉德反应的进程, 加热温度 ≤ 100 ℃时, 反应速度较慢, 在100℃时生成AGEs最多, 温度继续升高, 底物更快地生成类黑素等不具有荧光性的物质而导致荧光值减少。

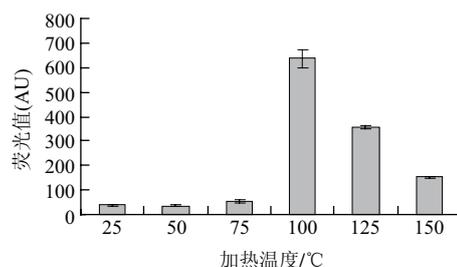


图3 加热温度对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

Fig.3 Effect of temperature on AGE formation in BSA-glucose system

2.3 pH值对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

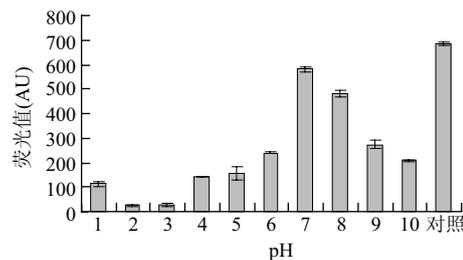


图4 加工pH值对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

Fig.4 Effect of initial pH on AGE formation in BSA-glucose system

由图4可知, pH值为1~3范围内, 随着pH值增大, 荧光值逐渐减小; pH值为3~7范围内, 荧光值随酸性减弱而增大, 在pH值为7时达到最大; 碱性条件下, 荧光值随着pH值增大而减少, 反应液颜色逐渐加深; 总体来说碱性条件下荧光值高于酸性条件。这是由于在偏酸性环境中, N-葡萄糖胺容易被水解, 而N-葡萄糖胺是Maillard反应的前体物质从而导致反应速率降低^[13]。碱性条件促进美拉德反应, 尤其是对后期反应的进行。pH>3时, 美拉德反应随着pH值增加而加快, 这与本实验结果一致。

2.4 金属离子对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响

由图5可知, Fe²⁺、Ca²⁺、Fe³⁺、Al³⁺、Zn²⁺对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成均无显著影响。金属离子可以催化过氧化物的降解, 从而促进自由基生成, 自由基在AGEs形成中起着重要的作用, 所以研究金属离子对AGEs形成具有重要意义。而本实验结果显示, 金属离子对AGEs形成影响不是很大, 与文献报道结果不同, 这可能与模拟体系条件不同有关, 具体机理有待进一步研究。

表1 抗氧化剂对于AGEs的抑制作用($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Inhibitory effect of antioxidants on AGE formation($\bar{x} \pm s$)

抗氧化剂	PG	BHT	黑色素	BHA	桑葚提取物	石榴花色苷	氨基胍	甘草提取物	迷迭香酸	茶多酚
抑制率/%	-1.43±1.11*	2.16±1.18	1.44±1.31	4.35±0.83	5.34±0.22	7.46±0.51	13.51±0.52	22.02±0.71	47.58±0.56	69.97±0.14

注：*。负值表示没有抑制作用。

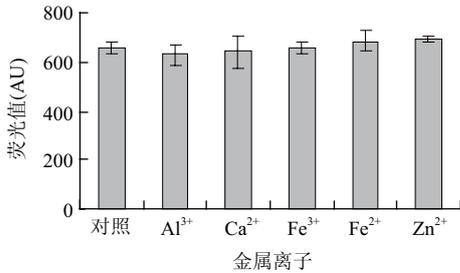
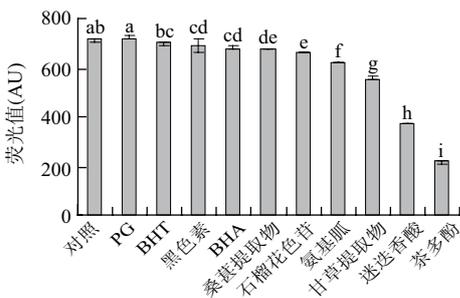


图5 金属离子BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响
Fig.5 Effect of metal ions on AGE formation in BSA-glucose system

2.5 抗氧化剂对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响



不同字母表示差异显著(P<0.05); 相同字母表示差异不显著(P>0.05)。

图6 抗氧化剂对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成的影响
Fig.6 Effect of antioxidants on AGE formation in BSA-glucose system

由图6、表1可以看出,天然抗氧化剂对于BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成具有显著的抑制作用,茶多酚>迷迭香酸>甘草提取物>石榴花色苷>桑葚醇提取物>黑色素,其中茶多酚(69.97%)、迷迭香酸(47.58%)和甘草提取物(22.02%)的抑制效果均比氨基胍(13.51%)好,BHT、PG等常用的脂溶性食品抗氧化剂对于AGEs无明显抑制作用。

3 讨论

随着加工时间的延长,AGEs呈现先增加后减少的趋势,而反应液颜色不断加深。由于荧光性AGEs不是美拉德反应的最终产物,而是反应的中间产物,所以随反应时间延长AGEs会进一步生成不具有自发荧光性类黑精等最终产物,导致荧光值下降。Matiacevich等^[14]提出AGEs形成的两种机制:1)活性羰基化合物→荧光性物质→类黑素,即氨基化合物和羰基化合物结合生成薛夫碱,经过Amadori重排形成Amadori产物,进一步生成活性二羰基化合物如丙酮醛(MGO)和乙二醛(GO)等,再经过一系

列重排、氧化、还原等生成荧光性AGEs,最后生成类黑素;2)荧光性物质和类黑素的形成是并列的过程,即,活性羰基化合物→荧光性物质;活性羰基化合物→类黑素。本研究结果显示,BSA-Glucose模拟体系中AGEs的形成是通过1)途径的,即荧光性AGEs为美拉德反应后期形成的一类产物,是类黑素的前体物质。

加热时间相同的条件下,随着加热温度升高,AGEs呈现先增加后减少的趋势,而反应液颜色不断加深。说明高温促进美拉德反应进行,温度越高,反应越快。60min时,100℃条件下形成的AGEs最多,而随着温度继续升高,反应更快进入最后阶段,生成不具有荧光性质的色素类物质,荧光值降低,颜色加深。

在中性pH值环境下,AGEs形成最多,碱性条件次之,酸性条件最少。有报道称,碱性条件促进Amadori化合物转变为CML^[15]。在碱性环境下,Amadori化合物更多地转变成非荧光性的CML等物质,而导致其荧光值随pH值增大而减少;这与Uribarri等^[10]研究结果一致,他们发现酸性条件可以抑制AGEs的形成,即以醋和柠檬浸泡的食物中AGEs显著减少。

金属离子Fe²⁺、Ca²⁺、Fe³⁺、Al³⁺、Zn²⁺对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成无显著影响,Cu²⁺表现出显著的抑制作用。文献[16]报道称过渡金属离子如Fe³⁺、Fe²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺等会通过催化作用形成自由基而促进内源性AGEs形成。而对于外源性的AGEs来说,金属离子对AGEs形成影响作用不一,其作用机制有待进一步研究。金属离子在体内会催化过氧化氢降解产生自由基,而促进AGEs的生成。

天然抗氧化剂对BSA-Glucose模拟体系中AGEs形成具有显著的抑制作用,茶多酚>迷迭香酸>甘草提取物>石榴花色苷>桑葚醇提取物>黑色素,其中茶多酚(69.97%)、迷迭香酸(47.58%)和甘草提取物(22.02%)的抑制效果均比氨基胍(13.51%)好。天然抗氧化剂抑制AGEs形成的机制主要有3种:自由基清除、羰基捕获和金属离子螯合^[17]。而在BSA-Glucose加热模拟体系中,PG和BHT等主要以清除自由基而发挥作用的常用的脂溶性抗氧化剂对AGEs形成并未有显著影响,可能是抗氧化剂对AGEs抑制的机制为羰基化合物的捕获,即酚类物质与活性中间体MGO、GO等结合而抑制AGEs形成,而不是通过清除自由基的途径抑制AGEs的形成。

4 结论

BSA-Glucose加热模拟体系中形成产物具有AGEs特征波长 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=370\text{nm}/440\text{nm}$, 可用来进行AGEs研究。加工条件如加热时间、加工温度及初始pH值对BSA-Glucose模拟体系中AGEs的形成具有重要的影响, 且食品级天然抗氧化剂茶多酚、迷迭香酸和甘草黄酮可抑制AGEs形成, 金属离子对于AGEs形成无影响。

参考文献:

- [1] DAN T, van YPERSELE de STRIHOUC, MIYATA T. Advanced glycation end products inhibitor. Studies on renal disorders[M]. American Clifton: Humana Press, 2011: 389-406.
- [2] SINGH R, BARDEN A, MORI T, et al. Advanced glycation end-products: a review[J]. Diabetologia, 2001, 44: 129-146.
- [3] 彭扬, 潘作东, 李慧, 等. 糖基化终产物对凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体1表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(7): 559-562.
- [4] 孙编恩, 杜冠华. 晚期糖基化终产物的病理意义及其机制[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(3): 246-249.
- [5] 郑晓新, 徐尚华. 晚期糖基化终末产物与动脉粥样硬化的关系[J]. 临床心血管病杂志, 2009, 25(10): 748-751.
- [6] CONTRERAS C, NOVAKOFSKI K. Dietary advanced glycation end products and aging[J]. Nutrients, 2010, 2: 1247-1265.
- [7] URIBARRI J, CAI W, SANDU O, et al. Diet-derived advanced glycation end products are major contributors to the body's AGE pool and induce inflammation in healthy subjects[J]. Ann N Y Acad Sci, 2005, 1043: 461-466.
- [8] KOSCHINSKY T, HE C J, MITSUHASHI T, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(12): 6474-6479.
- [9] KRAJCOVICOVÁ-KUDLÁCKOVÁ M, SEBEKOVÁ K, SCHINZEL R, et al. Advanced glycation end products and nutrition[J]. Physiological Research, 2002, 51(3): 313-316.
- [10] URIBARRI J, WOODRUFF S, GOODMAN S, et al. Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet[J]. J Am Diet Assoc, 2010, 110(6): 911-916.
- [11] GOLDBERG T, CAI W, PEPPA M, et al. Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods[J]. J Am Diet Assoc, 2004, 104(8): 1287-1291.
- [12] LOURDES B, AMPARO A, ROSAURA F, et al. Fluorescence and color as markers for the Maillard reaction in milk-cereal based infant foods during storage[J]. Food Chemistry, 2007, 105(3): 1135-1143.
- [13] 肖怀秋, 李玉珍, 林亲录. 美拉德反应及其在食品风味中的应用研究[J]. 中国食品添加剂, 2005, 69(2): 27-30.
- [14] MATIACEVICH S, BUERA M. A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction[J]. Food Chemistry, 2006, 95(3): 423-430.
- [15] NAGAI R, IKEDA K, KAWASAKI Y, et al. Conversion of Amadori product of Maillard reaction to N^ε-(carboxymethyl)lysine in alkaline condition[J]. FEBS Letters, 1998, 425(2): 355-360.
- [16] RAMONAITYTE D, KERŠIENE M, ADAMS A, et al. The interaction of metal ions with Maillard reaction products in a lactose-glycine model system[J]. Food Research International, 2009, 42(3): 331-336.
- [17] WU Chihao, HUANG Shangming, LIN Jeran, et al. Inhibition of advanced glycation endproduct formation by foodstuffs[J]. Food & Function, 2011, 2: 224-234.