

亚麻籽胶-紫花苜蓿叶蛋白改性物的制备及乳化性能研究

高 红, 张 炜*, 辛小丽, 王志娟, 甘文梅, 乜世成, 宋 林

青海师范大学化学化工学院, 西宁 810008

摘要:利用亚麻籽胶(flaxseed gum, FG)对紫花苜蓿叶蛋白(alfalfa leaf protein concentrates, ALPCs)进行糖基化改性,以乳化性为考察指标,通过 BOX-Behnken 响应面优化得最佳反应条件为:pH = 8.0、底物配比[m (ALPCs) : m (FG)]为1:1、反应温度为90 °C、反应时间为124 min。此时的乳化性最显著达200.78 m²/g,与未改性的蛋白相比乳化性提高了12.20%,乳化稳定性提高了31.83%,此时接枝度达23.9%。并对复合物(ALPCs-FG)进行红外、粒径、扫描电镜结构分析,结果为:制备的ALPCs-FG复合物中含有糖环结构,晶粒尺寸变大且结晶结构越来越趋于无定形。表明糖基化修饰可以显著提高ALPCs-FG的乳化性和乳化稳定性。

关键词:紫花苜蓿叶蛋白;亚麻籽胶;乳化性;响应面法;结构表征

中图分类号:O629.9

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)6-0982-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.6.012

Study on the preparation and emulsification property of flaxseed gum-alfalfa leaf protein concentrates

GAO Hong, ZHANG Wei*, XIN Xiao-li,
WANG Zhi-juan, GAN Wen-mei, NIE Shi-cheng, SONG Lin

School of Chemistry and Chemical Engineering, Qinghai Normal University, Xining 810008, China

Abstract: The present work was the alfalfa leaf protein concentrates (ALPCs) were glycosylated with flaxseed gum (FG), with emulsification as the investigation index, and the experiments of BOX-Behnken response surface method was used to optimized, the most significant conditions were pH = 8.0, substrate ratio of [m (leaf protein concentrates) : m (flaxseed gum)] was 1:1, reaction temperature was 90 °C and reaction time was 124 min. Under these conditions, the emulsification of the product was the most significant up to 200.78 m²/g, compared with the unmodified protein, the emulsification was improved by 12.20%, and the emulsification stability was improved by 31.83%. At this time, and the graft degree reached 23.9%. The structure of the complex (ALPCs-FG) was analyzed by IR, particle size and scanning electron microscopy. The results showed that the complex of ALPCs-FG contained sugar ring structure, the crystal grain size became larger and the crystal structure became more and more amorphous. Meanwhile, it was indicated that glycosylation modification can significantly improve the emulsification and emulsification stability of ALPCs-FG.

Key words: leaf protein concentrates; flaxseed gum; emulsification property; response surface method; structural characterization

紫花苜蓿(*Medicago sativa L.*)是一种优质豆科类牧草,由于其营养成分丰富、品质优良、蛋白含量高等特点而被国内外研究学者所青睐^[1]。紫花苜蓿产量高、市场价格低,是一种优质的天然资源。此外紫花苜蓿叶中的粗叶蛋白含量可达70%左右,且氨基酸种类丰富,其中含有人体必需氨基酸含量达

40.6%^[2,3]。由于其自身的功能特性优于动物蛋白,所以常做为动物的辅助饲料。然而紫花苜蓿蛋白(alfalfa leaf protein concentrates, ALPCs)功能性质存在局限性,乳化活性不显著,在应用时往往需要添加具有高乳化活性的糖类物质,来提高其在食品、医药等领域的利用价值。对ALPCs进行糖基化改性,提高其乳化性能具有潜在的利用价值。目前,常用的蛋白乳化改性方法有化学改性法、物理改性法和酶改性法等。其中化学改性法中的糖基化改性法

是一种温和绿色的蛋白质改性方法。通过控制时间、温度、pH 及加热蛋白质与糖类接枝反应程度,以期实现产物的改性。已有研究表明糖基化改性可改善蛋白质的乳化性,乳化稳定性及抗氧化能力等。目前对 ALPCs 的研究只停留在产物制备及抗氧化活性的研究^[4],对其乳化性及乳化稳定性的研究尚未报道。因此,为了弥补 ALPCs 乳化性方面的不足,本研究采用糖基化改性法优化制备复合物,对其复合物的乳化性能进行研究。

研究报道多糖可以改善蛋白质的乳化性能,亚麻籽胶 (flaxseed gum, FG), 又称为富兰克胶, 是由酸性多糖和中性多糖组成的一种天然新型亲水胶体^[5]。研究表明亲水胶体由于其含有一定量的结合蛋白,使得 FG 本身持有良好的乳化性,增稠性及起泡性。此外,FG 是国家绿色食品发展中心认定的绿色健康安全的食品专用添加剂^[6,7]。将 FG 与 ALPCs 糖基化结合,在改善蛋白质性能方面表现出来巨大的潜力,已成为食品领域研究热点之一。

目前常用的糖基化改性方法主要有干法改性法和湿法改性法^[8], 干法反应温度受限,一般为 60~65 ℃,而湿法反应温度较广泛,一般包括低温反应(60~62 ℃)和高温反应(100~120 ℃)。由于湿热反应具有反应周期短,与底物接触充分等的优势,故本实验在湿热高温条件下进行改性,利用响应面优化制备复合物,采用 FG 对 ALPCs 进行糖基化修饰研究,通过 ALPCs-FG 的乳化性能测定及对 ALPCs-FG 的官能基团变化和微观结构进行表征,为 ALPCs 资源的开发和 ALPCs-FG 的乳化性能研究提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

紫花苜蓿(采集于青海大学试验田);亚麻籽胶(北京索莱宝科技有限公司,分析纯);邻苯二甲醛(购于上海麦克林生化科技有限公司);盐酸、氢氧化钠(购于天津市恒兴化学试剂制造有限公司);所有试剂均为分析纯,除非另有说明。

1.2 仪器与设备

101A-1E 电热鼓风干燥箱(上海仪器实验厂有限公司);磁力搅拌器(广州仪器设备有限公司);PB-10pH 计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);高压灭菌器(上海审安医疗器械厂);IKA 分散均质机(广州仪科实验室技术有限公司);DelsaMax PRO 型激光粒度分析仪;X—射线粉末衍射仪(日本岛津公司);傅里叶变换红外光谱仪(美国赛默飞公司);扫

描电子显微镜(日本 JEOL 公司);高速离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限责任公司)

1.3 试验方法

1.3.1 紫花苜蓿叶蛋白(ALPCs)的提取

参考 Liu 等^[9]的提取方法,略微改动。将提取的 ALPCs 在其等电点(pH = 4.0)下,70 ℃条件下絮凝 10 min。用无水乙醇洗去 ALPCs 中的色素,直至洗出液接近无色,冷冻干燥得 ALPCs。

1.3.2 单因素条件下紫花苜蓿叶蛋白-亚麻籽胶 (ALPCs-FG) 的制备

1.3.2.1 不同 pH 值下 ALPCs-FG 的制备

按照 1:1 的底物比($m(\text{ALPCs}) : m(\text{FG})$)准确称取五份 0.2 g 的 ALPCs 于五个锥形瓶中,并分别加入 0.1 g 的 FG,随后加入 100 mL 蒸馏水将其配成溶液,超声 10 min 使其溶解。用 0.1 mol/L 的盐酸、氢氧化钠溶液调配五份溶液,其 pH 调为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0。将调好 pH 值的五份溶液放入高压灭菌器中反应,设定反应温度为 90 ℃、反应时间为 2 h,反应结束后立即用冷水停止其反应。随后溶液用离心机离心 5 min,其转速为 8 000 rpm,上清液保留并除去未反应的杂质,得到 ALPCs-FG,对 ALPCs-FG 的功能性质进行测定(乳化性及其乳化稳定性)。单因素试验均做三次。

1.3.2.2 不同配比下 ALPCs-FG 的制备

按照 1:1、2:1、3:1、1:2、1:3 的底物($m(\text{ALPCs}) : m(\text{FG})$)配比准确称取质量为 0.1、0.2、0.3、0.1、0.1 g 的 ALPCs 于五个锥形瓶中,并依次加入质量为 0.1、0.1、0.1、0.2、0.3 g 的 FG,随后加入 100 mL 蒸馏水将其配成溶液,超声 10 min 使其溶解。用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节五份溶液的 pH 值都为 8.0。将调好 pH 值的五份溶液放入高压灭菌器中反应,设定反应温度为 90 ℃,时间为 2 h,反应结束后立即用冷水中止其反应。随后溶液用离心机离心 5 min,其转速为 8 000 rpm,上清液保留并除去未反应的杂质,得到 ALPCs-FG,对 ALPCs-FG 的功能性质进行测定(乳化性及其乳化稳定性)。单因素试验均做三次。

1.3.2.3 不同时间下 ALPCs-FG 的制备

准确称取 0.1 g ALPCs 于五个锥形瓶中并加入 0.1 g 的 FG,随后加入 100 mL 蒸馏水将其配成溶液,超声 10 min 使其溶解。用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节五份溶液的 pH 值都为 8.0。将调好 pH 值的五份溶液放入高压灭菌器中反应,反应温度设

为 90 °C, 反应时间分别设为 30、60、90、120、150 min, 反应结束后立即用冷水中止反应。随后溶液用离心机离心 5 min, 其转速为 8 000 rpm, 上清液保留并除去未反应的杂质, 得到 ALPCs-FG, 对 ALPCs-FG 的功能性质进行测定(乳化性及其乳化稳定性)。单因素试验均做三次。

1.3.2.4 不同温度下 ALPCs-FG 的制备

准确称取五份 0.1 g ALPCs 于五个锥形瓶中并分别加入 0.1 g 的 FG, 随后加入 100 mL 蒸馏水将其配成溶液, 超声 10 min 使其溶解。用 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液调节五份溶液的 pH 值都为 8.0。

将调好 pH 值的五份溶液放入高压灭菌器中反应, 反应时间设为 2 h, 反应温度分别设为 30、50、70、90、110 °C, 反应结束后立即用冷水中止反应。随后溶液用离心机离心 5 min, 其转速为 8 000 rpm, 上清液保留并除去未反应的杂质, 得到 ALPCs-FG, 对 ALPCs-FG 的功能性质进行测定(乳化性及其乳化稳定性)。单因素试验均做三次。

1.3.3 响应面试验方案

在单因素试验的基础上, 以 ALPCs-FG 的乳化性作为响应值, 采用 BOX-Behnken 试验原理设计进行工艺条件优化, 各因素水平设计如表 1 所示。

表 1 响应面因素水平设计

Table 1 Horizontal design of response surface factors

水平 Level	A pH 值	B 时间 Time (min)	C 温度 Temperature (°C)	D 底物配比 Substrate ratio (g/g)
-1	6	90	70	2:1
0	8	120	90	1:1
1	10	150	110	1:2

1.3.4 乳化的测定方法

根据 Turgeon 等^[10]的研究方法, 略有修改。利用浊度法进行测定, 选取波长在 500 nm 处对 ALPCs-FG 的乳化性(EAI)及其乳化稳定性(ESI)进行计算。

取适量冷冻干燥后的 ALPCs 和 ALPCs-FG 与一定量溴化钾混合, 研磨成粉末后压片, 设置分辨率为 4 cm⁻¹, 扫描次数 32 次, 随后用 Nicolet iS50FT-IR 型傅里叶变换红外光谱仪作全波段(4 000~400 cm⁻¹)扫描。

1.3.5 接枝度测定

参考 Hu^[18]的方法, 略有改动。配置质量浓度为 1.0% (W/V) 蛋白溶液(ALPCs 和 ALPCs-FG), 将蛋白溶液溶于 0.01 mol/L (pH = 7.0) 磷酸盐溶液中。添加微量 0.02% NaN₃, 其目的防止微生物污染。室温磁力搅拌 2 h, 4 °C 过夜, 使蛋白充分水合。次日离心 10 min, 取上清液, 加入大豆油(油相比 φ = 25%), 在转速为 5 000 rpm 下高速均质乳化 5 min, 得测样乳液, 将乳液置于 DelsaMax PRO 型激光粒度分析仪比色皿中测定其粒径大小。

1.3.6 X-射线衍射分析

采用 X-射线粉末衍射仪(日本岛津公司)铜靶 Ka 射线(40 kv, 30 mV), 将膜样品用橡皮泥固定在检测器上, 记录样品在 2θ = 10° 到 2θ = 80° 之间的 X-射线衍射(XRD)强度并用 jade 6.0 分析软件分析样品晶体结构变化。

1.3.7 扫描电镜分析

用导电双面胶将样品固定在检测台上, 将样品

$$\text{公式为: } EAI (\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303}{c \times \varphi \times \theta \times 10^4} \times A^0 \times DF \quad (1)$$

$$ESI (\text{min}) = \frac{A^0}{A^0 - A^{10}} \times t \quad (2)$$

其中:DF-稀释倍数, 100; φ-比色皿光程; C-蛋白质量浓度, g/mL; θ-乳液中油相所占比, 25%; A⁰-0 min 时的吸光度; A¹⁰-10 min 时的吸光度; t-10 min

1.3.7 粒径分布测定

参考 Church 等^[11]的方法, 稍作修改, 采用 OPA 法测定接枝度。80 μL 1 mg/mL 的样品溶液中加入 4 mL 邻苯二甲醛试剂, 混合均匀, 35 °C 水浴 2 min, OPA 试剂为空白对照。在 340 nm 下测吸光值。

$$\text{接枝度} = \frac{A_0}{A_0 - A_1} \times 100\% \quad (3)$$

其中: A₀: ALPCs 的吸光值; A₁: ALPCs-FG 的吸光值。

1.3.8 X-射线衍射分析

参考 Wu 等^[12]的方法, 采用 KBr 压片法。分别

(ALPCs 和 ALPCs-FG) 撒在双面胶上, 吹去多余的粉末, 真空下喷金后置于 KYKY-EM3200 型扫描电子显微镜对样品进行表面结构分析。

2 结果与分析

2.1 不同因素对紫花苜蓿叶蛋白乳化性、乳化稳定性的影响

由图 1 可知 ALPCs 在 pH 值为 4.0 时有最低的乳化性, 而乳化稳定性在 pH 值为 4.0 时最高, 这主要是因为 ALPCs 的等电点在 3.2~4.4 之间。当 pH 值为 4.0 时, ALPCs 在蒸馏水中几乎没有溶解性, 这也间接表明 ALPCs 与 FG 之间没有发生糖基化反应。改性的 ALPCs 的乳化性在 pH 值为 4.0 时呈现最低值, 而此时的乳化稳定性最好。由于本文是以乳化性为响应值, 从图中可以看出 ALPCs 在碱性溶液中具有较好的乳化性, 在 pH 为 8.0 时具有较高的乳化性, 因此, 选定 pH 8.0 作为最佳条件。

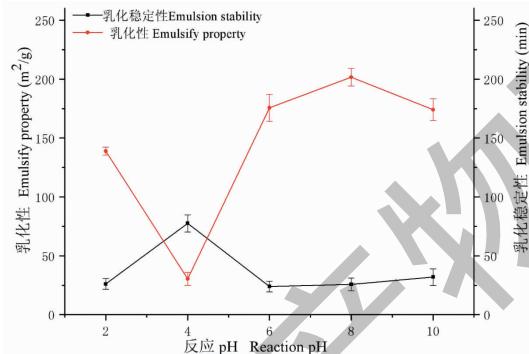


图 1 反应 pH 对乳化性、乳化稳定性的影响

Fig. 1 The effect of reaction pH on emulsification and emulsification stability

2.1.2 底物配比对改性后紫花苜蓿叶蛋白乳化性、乳化稳定性的影响

由图 2 可知, 当 ALPCs 与 FG 的质量比从 3:1 变化到 1:3 时, ALPCs 的乳化性、乳化稳定性变化与 ALPCs 和 FG 之间的配比变化非常显著, 这主要是因为 FG 本身具有较强的乳化性, 将其接枝到 ALPCs 中致使 ALPCs 乳化能力增强, FG 在产物的乳化能力中起主导作用, 但当 FG 含量持续增加后反而使美拉德产物中具有乳化能力的位点减少, 导致其乳化能力降低、乳化稳定性下降。因此, 确定 ALPCs 与 FG 质量比 1:1 为最佳比例。

2.1.3 时间对改性后紫花苜蓿叶蛋白乳化性、乳化稳定性的影响

由图 3 可知, 改性的 ALPCs 的乳化性随反应时间的变化呈现先慢慢增加后急剧下降的趋势, 乳化性在 120 min 时达到最大值, 而乳化稳定性随反应时间变化不明显, 表明乳化稳定性跟反应时间相关性差。乳化性变化明显是因为随着反应时间的延长, 反应更加充分, 使 ALPCs 中被引入更多亚麻籽胶的亲水基团, 反应时间在 150 min 时乳化性最小, 可能是因为 ALPCs-FG 体系中油-水分界面间的平衡被破坏, 从而降低 ALPCs 乳液的乳化性。因此, 选择反应时间为 120 min 时为最佳反应时间。

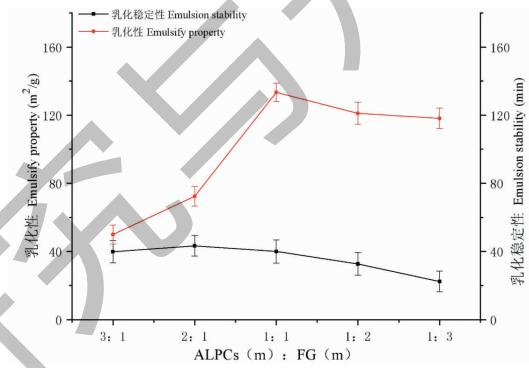


图 2 底物配比对乳化性、乳化稳定性的影响

Fig. 2 The effect of substrate ratio on emulsification and emulsification stability

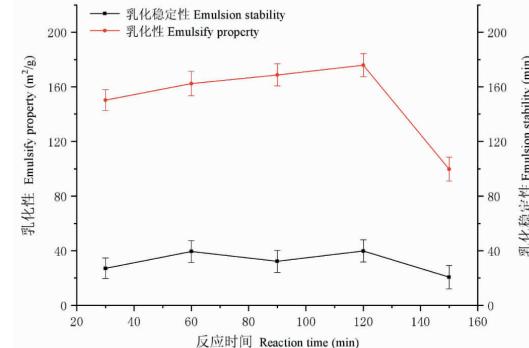


图 3 反应时间对乳化性、乳化稳定性的影响

Fig. 3 The effect of reaction time on emulsification and emulsification stability

2.1.4 温度对改性后紫花苜蓿叶蛋白乳化性、乳化稳定性的影响

从图 4 中可知, 反应体系温度在 30~90 °C 之间, ALPCs-FG 的乳化性随着反应温度的上升而逐渐变大。在这个温度范围内, 乳化稳定性在 68 °C 左

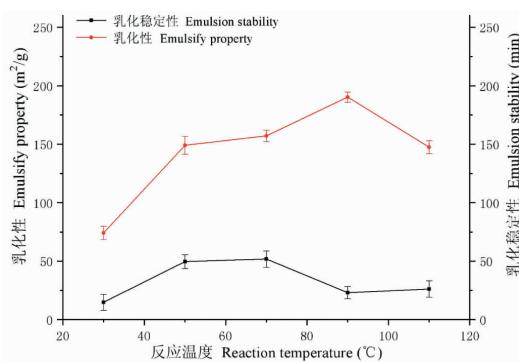


图 4 反应温度对乳化性、乳化稳定性的影响

Fig. 4 The effect of reaction temperature on emulsification and emulsification stability

右时达到最大值。这主要是因为反应速率跟体系的温度有关,在适宜的温度下可促使 ALPCs 结构伸展,使 ALPCs 中更多的疏水基团暴露,导致大量亲

水基团、疏水基团分别与水层、油层相结合。而反应温度在 90 ℃时具有良好的乳化性,温度在 110 ℃左右时乳化性降低,可能是由于温度升高导致 ALPCs 质发生聚集。因此,选择 90 ℃作为最佳反应温度。

2.2 响应面试验设计及方差检验分析

通过响应面试验设计对表 2 数据进行多元回归拟合,得出回归方程:

$$R = 203.73 - 21.94A + 9.052B + 9.56C - 1.53D - 13.51AB - 16.95AC - 6.22AD - 5.57BC + 1.36BD - 7.94CD - 52.68^2 - 21.64B^2 - 51.54C^2 - 27.09^2 \quad (4)$$

由表 3 可知,该模型 $F = 183.27$, $P < 0.001$,说明该模型达到极显著水平,模拟失拟项 $P = 0.2447 > 0.05$,不显著,表明建模成功^[13]。试验结果可用于该模型结果的描述,模型的调整确定系数 $R^2 = 0.9946$;修正后相关系数 $R_{\text{Adj}}^2 = 0.9891$;变异系数 $CV < 5\%$,说明模型置信度较高,重现性较好。由

表 2 响应面设计及结果
Table 2 Response surface design and result

组序 Group	pH	时间 Time (min)	温度 Temperature (°C)	底物配比 Substrate ratio (g/g)	乳化性 Emulsification (m^2/g)
1	0.000	0.000	0.000	0.000	200.38 ± 0.03
2	0.000	0.000	-1.000	1.000	117.09 ± 1.21
3	0.000	1.000	-1.000	0.000	124.38 ± 0.79
4	0.000	0.000	1.000	-1.000	149.65 ± 0.89
5	0.000	0.000	0.000	0.000	206.11 ± 0.04
6	-1.000	0.000	0.000	1.000	90.48 ± 2.34
7	1.000	-1.000	0.000	0.000	137.71 ± 0.56
8	-1.000	1.000	0.000	0.000	92.37 ± 1.89
9	1.000	0.000	0.000	1.000	151.36 ± 0.57
10	0.000	1.000	0.000	1.000	168.96 ± 0.34
11	0.000	0.000	1.000	1.000	132.86 ± 0.67
12	0.000	-1.000	1.000	0.000	147.16 ± 0.87
13	0.000	-1.000	0.000	1.000	152.26 ± 0.39
14	-1.000	0.000	1.000	0.000	75.44 ± 2.58
15	1.000	0.000	-1.000	0.000	95.29 ± 2.14
16	-1.000	0.000	0.000	-1.000	105.58 ± 0.99
17	0.000	0.000	-1.000	-1.000	102.11 ± 1.13
18	1.000	0.000	0.000	-1.000	141.17 ± 0.78
19	0.000	0.000	0.000	0.000	200.38 ± 0.53
20	0.000	0.000	0.000	0.000	207.77 ± 0.07
21	0.000	-1.000	-1.000	0.000	107.54 ± 0.79
22	0.000	-1.000	0.000	-1.000	152.51 ± 0.59

续表2(Continued Tab. 2)

组序 Group	pH	时间 Time(min)	温度 Temperature(℃)	底物配比 Substrate ratio(g/g)	乳化性 Emulsification(m ² /g)
23	-1.000	-1.000	0.000	0.000	120.45 ± 0.43
24	1.000	0.000	1.000	0.000	149.22 ± 0.62
25	0.000	1.000	0.000	-1.000	163.77 ± 0.74
26	1.000	1.000	0.000	0.000	162.58 ± 0.78
27	0.000	0.000	0.000	0.000	204.27 ± 0.18
28	-1.000	0.000	-1.000	0.000	89.76 ± 1.79
29	0.000	1.000	1.000	0.000	141.7 ± 0.69

表3中的P值可知A、C、AB、AC、AD、CD、 A^2 、 B^2 、 C^2 、 D^2 差异极显著,BC差异显著,其余项均不显著。由表中各因素F值的大小可知,各因素对改性后AL-

PCs乳化性的影响大小顺序为:A(pH值)、C(温度)>D(底物配比)>B(时间)。

表3 改性后紫花苜蓿叶蛋白乳化性线性回归分析表

Table 3 linear regression analysis of emulsification

来源 Source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F值 F value	P值 P value	显著性 Significance
模型 Model	41 880.82	14	2 991.49	183.27	<0.001	**
A	5 775.05	1	353.81	353.81	<0.001	**
B	8.864 0	1	8.864 0	5.293	0.994 3	
C	962.92	1	962.92	58.99	<0.001	**
D	24.71	1	24.71	1.51	0.238 8	
AB	783.93	1	783.93	48.03	<0.001	**
AC	1 233.88	1	1 233.88	75.59	<0.001	**
AD	166.29	1	166.29	10.19	0.006 5	**
BC	124.32	1	124.32	7.62	0.015 3	*
BD	7.40	1	7.40	0.45	0.511 8	
CD	252.33	1	252.33	15.46	0.001 5	**
A^2	13 418.47	1	13 418.47	822.06	<0.001	**
B^2	3 038.47	1	3 038.47	186.15	<0.001	**
C^2	17 231.86	1	17 231.86	1 055.70	<0.001	**
D^2	4 760.93	1	4 760.93	291.68	<0.001	**
残差 Residual	228.52	14	228.52			
失拟 Lack of fit	192.19	10	192.19	2.12	0.244 7	Not significant
纯误差 Pure error	36.33	4	36.33			
总和 Cor total	42 109.33	28				

注: * 差异显著($P < 0.05$); ** 差异极显著($P < 0.01$); $R^2 = 0.974\ 2$; $R_{Adj}^2 = 0.941\ 1$ 。

Notes: * Significant difference($P < 0.05$); ** Extremely significant difference($P < 0.01$); $R^2 = 0.974\ 2$; $R_{Adj}^2 = 0.941\ 1$.

2.3 响应面3D分析图及最佳条件确定

根据回归方程得出不同因素交互作用的响应面3D图,如下图5所示。

根据拟合模型得出:当反应pH值为8.47,反应

时间为123.63 min,反应温度为89.62 ℃,底物配比为1:1.07时,ALPCs的乳化性达206.94 m²/g,为了验证模型的可靠性,从实际情况出发,对最佳条件进行调整:选取反应pH值为8.0,反应温度为90 ℃,

反应时间为 124 min, 底物配比 [m(ALPCs) : m(FG)] 为 1:1 作为最佳反应条件, 最优条件下进行三次平行验证试验, 得到改性后 ALPCs 乳化性为 200.78 m²/g, 与理论预测值的相对误差为 3%, 表明

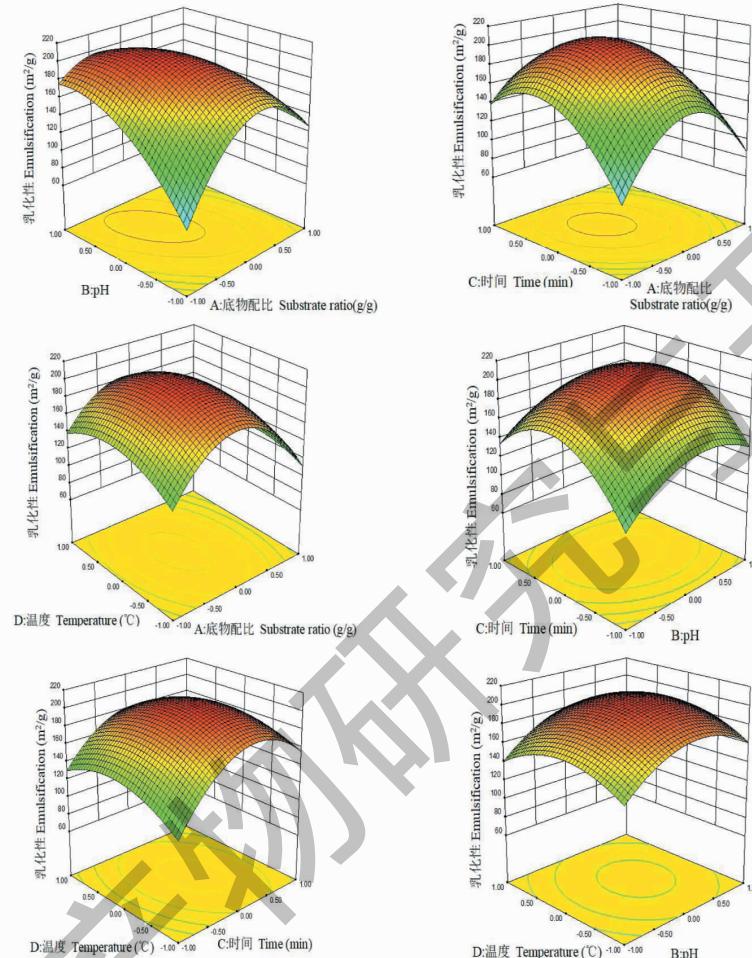


图 5 两因素相互作用对改性后 ALPCs 乳化性影响的响应面图

Fig. 5 Response surface plots for the effect of the interaction of two factors on the emulsification of ALPCs after modification

2.4 傅里叶红外光谱分析

ALPCs 和 FG 价接后, 蛋白质分子中羟基含量增加, 3 500~3 200 cm⁻¹ 是-OH 的特征官能团吸收峰, 3 200~2 800 cm⁻¹ 是 C-H 的特征伸缩振动吸收峰。蛋白质的特征官能团吸收峰是: 酰胺 I 带-NH 的特征吸收峰, 其位置在 1 690~1 630 cm⁻¹ 之间; 酰胺 II 带-NH 的弯曲振动吸收峰, 其位置在 1 530~1 560 cm⁻¹ 之间; 酰胺 III 带 分别是 C-N 和 N-H 的弯曲振动吸收, 其特征峰在 1 240~1 450 cm⁻¹ 之间。从红外图(图 6)中可以看出 FG 在 3 390~3 429 cm⁻¹ 处具有较宽的吸收峰, 在 2 930 cm⁻¹ 处有 C-H 伸缩振动峰。图中两个峰比较得出: 酰胺 I 带处的特征

结果可行, 该模型结果与模拟结果基本一致。在此条件下的接枝度达 23.9%, 优化后的 ALPCs 乳化性比未改性的 ALPCs 乳化性提高了 12.20%, 乳化稳定性提高至 31.06 min, 比未改性蛋白提高了 31.83%。

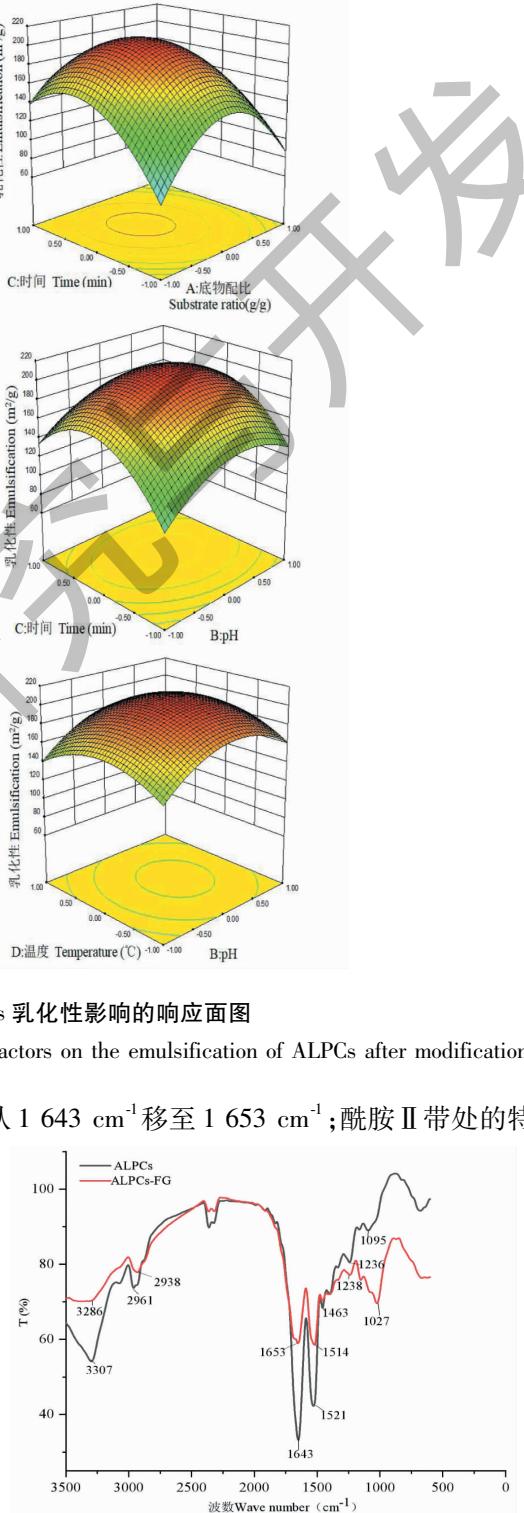


图 6 ALPCs 及 ALPCs-FG 红外光谱图

Fig. 6 FTIR spectra of ALPCs and ALPCs-FG

吸收峰从 1521 cm^{-1} 处移至 1514 cm^{-1} ;酰胺Ⅲ带的特征吸收峰从 1238 cm^{-1} 移至 1236 cm^{-1} 。由于发生蓝移现象导致吸收峰变小,改性后的 ALPCs-FG 在 1027 cm^{-1} 处有强的吸收峰,该吸收峰是糖分子中 C-O-C 官能团的伸缩振动同时也是糖环存在的特征吸收峰。说明糖基化反应可以提高复合物的乳化性和乳化稳定性^[14]。

2.5 粒径分析

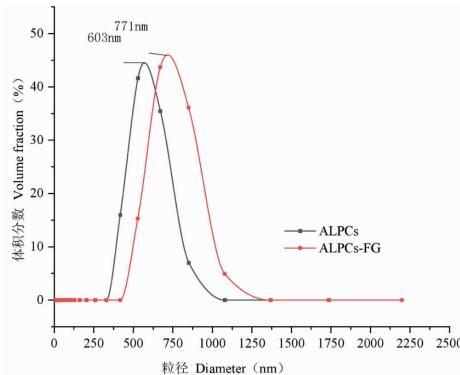


图 7 ALPCs 及 ALPCs-FG 粒径分布图

Fig. 7 Diameter distribution of ALPCs and ALPCs-FG

粒径的变化与 ALPCs 聚集程度及与 FG 反应的糖基化程度有关。两种物质的粒径分布如下,从图 7 中可以看出 ALPCs-FG 粒径比 ALPCs 的粒径大。本研究中 ALPCs 的粒径为 603 nm ,而 ALPCs-FG 的粒径为 771 nm 。表明糖基化反应显著增大了 ALPCs-FG 的粒径,该现象与 Wang 等^[15]、Mou 等^[16]、Hu 等^[17]研究结果一致。主要原因可能是高温糖基化反应导致蛋白质发生热聚变^[18],致使 ALPCs-FG 粒径增大。此现象与 Rao 等^[19]的研究现象不一致,可能是由于蛋白成分不同,且乳液体系成分多而复杂。体系之间发生的反应都将影响粒径的变化,具体影响机理有待进一步研究讨论。但就本文而言,ALPCs-FG 的乳液微粒显著大于 ALPCs,FG 和 ALPCs 发生糖基化反应形成了共价键,糖基化反应通过对 ALPCs 的包覆提高了乳液的稳定性^[17]。由于嫁接的亲水性多糖能够在蛋白质表面迅速吸附,形成水-油膜层厚度增大^[20],对维持整个体系的乳化稳定性也有作用。此外,ALPCs-FG 共价复合物的空间位阻效应会对乳液中液滴的聚集和大液滴的形成起到抑制作用,从而进一步提高其有乳液的乳化性和稳定性^[21],可见糖基化反应对修饰后的共价复合物乳化性及乳化稳定性有所提高。

2.6 X-射线衍射分析

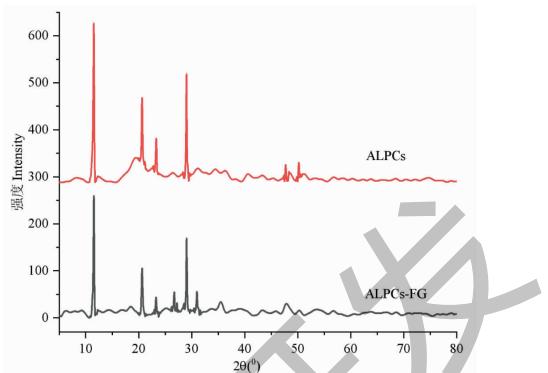


图 8 ALPCs 和 ALPCs-FG 的 XRD 谱图

Fig. 8 XRD spectra of ALPCs and ALPCs-FG

XRD 衍射图谱主要是由结晶衍射形成的尖峰与无定形区域组成的。ALPCs 和 ALPCs-FG 的衍射图谱如图 8 所示。ALPCs 的衍射图谱在 $2\theta = 11.50^\circ, 2\theta = 29^\circ$ 处有两个强峰,在 $2\theta = 20.60^\circ$ 和 $2\theta = 23.30^\circ$ 处有两个弱峰。ALPCs-FG 在 $2\theta = 11.60^\circ$ 和 $2\theta = 29.40^\circ$ 处有两个强峰,在 $2\theta = 20.60^\circ, 2\theta = 23.10^\circ, 2\theta = 27.40^\circ$ 和 $2\theta = 31.80^\circ$ 处出现了四个弱峰,表明经过美拉德反应后的产物结晶结构发生了显著的变化。糖基化产物的结晶结构越来越趋于无定形结构,这与 Li 等^[22]的研究现象一致。经过 jade 软件对 X 射线衍射图谱进一步分析后结果表明:ALPCs 的晶粒尺寸范围在 $348 \sim 534\text{ nm}$,而 ALPCs-FG 的晶粒尺寸范围在 $422 \sim 537\text{ nm}$ 。主要原因可能是蛋白质与多糖的糖基化反应增加了蛋白质聚合链的分子流动性,进而扰乱了蛋白质分子内部的排列次序,降低了空间位阻效应,导致晶粒尺寸增大^[23]从而进一步提高复合物的乳化性和乳化稳定性。有关报道也表明糖基化反应可以增加复合物的晶粒尺寸^[24]。

2.7 扫描电镜分析

蛋白质的结构在一定程度上与蛋白质所持有的功能性质有着很大的联系。用扫描电镜观察他们的颗粒特征。如图 9 所示,ALPCs 是一种无序不规则的颗粒结构,表面凹凸不平,有空洞现象。当与 FG 发生糖基化反应时,其表面微观结构发生了显著变化,后者结构表面密集程度增加,ALPCs 不规则颗粒的刚性结构消失,形成了表面无定形的颗粒^[25]。因此,可以推断出由于多糖分子(FG)与 ALPCs 发生糖基化反应,导致蛋白肽链断裂分子扩散,进而有利

于多糖分子嵌入蛋白空隙中,使得共价复合物表面更加紧密。有关研究表明随着多糖分子的引入增加了乳液的粘度,使得蛋白质肽链之间的相互作用减弱。

弱,空间位阻效应降低,表明糖基化反应对乳液的乳化性和乳化稳定性有明显的改善作用^[26]。

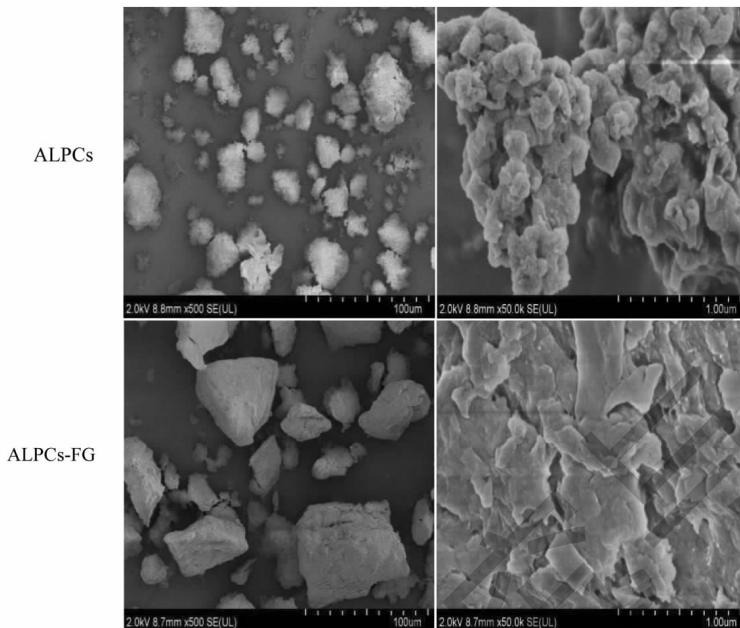


图9 不同比例尺寸下 ALPCs 和 ALPCs-FG 的 SEM 图

Fig. 9 SEM of ALPCs and ALPCs-FG in different scale sizes

3 结论

本研究通过 BOX-Behnken 响应面法优化制备 ALPCs-FG 共价复合物,最优条件为:pH 值为 8.0,温度为 90 ℃,反应时间为 124 min,底物配比[m(紫花苜蓿蛋白):m(亚麻籽胶)]为 1:1 作为最佳反应条件时乳化性最好。该条件下产物的乳化性最显著可达 200.78 m²/g,与未改性的蛋白相比乳化性提高了 12.20%。乳化稳定性提高了 31.83%,最优条件下的接枝度达 23.9%。对其 ALPCs-FG 结构表征分析发现:红外图谱中存在糖环结构,表明 FG 成功嫁接在紫花苜蓿蛋白上;粒径分析结果表明糖基化反应使得粒径增大;X-射线衍射图谱表明了复合物晶粒尺寸发生了变化,说明糖基化反应发生;扫描电镜结果表明复合物表面密集程度增加且结构不定型。综上分析,糖基化反应可以显著提高 ALPCs-FG 的乳化性和乳化稳定性。

参考文献

- Ibrahim RS, El-Mezayen NS, Khairy A, et al. Biologically-Guided isolation of natural lead antithyroid drug from *Medicago sativa* L. sprouts and its toxic profile in comparison with propylthiouracil[J]. J Food Drug Anal, 2020, 28:407-448.

- Zhang Q, Yu Z, Wang X, et al. Effects of chlorpyrifos and chlorantraniliprole on fermentation quality of alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage inoculated with or without *Lactobacillus plantarum* LP[J]. Anim Sci J, 2017, 88:456-462.
- Shi WM, Wang MF, Luo SH, et al. Study on the extraction of total flavonoids from alfalfa by ultrasonic-enzyme synergistic method and their antioxidation activities[J]. Crops (作物杂志), 2015(6):64-69.
- Bialy Z, Jurzysta M, Oleszek W, et al. Saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) root and their structural elucidation [J]. J Agr Food Chem, 1999, 47:3185-3192.
- Yoshie-Stark Y, Muller K, Kawarada H, et al. Functional properties of linseed meal fractions: application as nutraceutical ingredient[J]. Food Sci Technol Res, 2011, 17:301-310.
- Shim YY, Gui B, Arnison PG, et al. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: a review[J]. Trends Food Sci Technol, 2014, 38(1):5-20.
- Udenigwe CC, Lin YS, Hou WC, et al. Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions [J]. J Funct Foods, 2009, 1:199-207.
- Jambrak AR, Mason TJ, Lelas V, et al. Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein

- suspensions [J]. J Food Eng, 2007, 86:281-287.
- 9 Liu HB, Zhang W, Cheng YT, et al. Technology optimization of *Medicago sativa* leaf protein separation with foam fractionation [J]. Trans Chin Soc Agr Eng(农业工程学报), 2016, 32(9):271-276.
- 10 Turgeon SL, Gauthier SF, Paquin P. Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength [J]. J Food Sci, 2010, 57:601-604.
- 11 Church FC, Swaisgood HE, Porter DH, et al. Spectrophotometric assay using o-phthalodialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins [J]. J Dairy Sci, 1983, 66:1219-1227.
- 12 Wu H, Zhen TY, Chen CK, et al. Enzymatic synthesis of chitosan-gallic acid derivative and its preservation effect on fresh-cut apple [J]. Trans Chin Soc Agr Eng(农业工程学报), 2017, 33(4):285-292.
- 13 Tian JH, Zhang CY, Wei L. Study on the extraction technology and antioxidant activity of total flavonoids from the pomace of sea buckthorn [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33:65-72.
- 14 Su JF, Huang Z, Yuan XY, et al. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films cross linked by maillard reactions [J]. Carbohydr Polym, 2010, 79(1):145-153.
- 15 Wang JQ. Study on the effects of dry/moist glycosylation on the physicochemical and antioxidant properties of whey protein-inulin complex [D]. Jilin: Jilin University(吉林大学), 2018.
- 16 Mou QS, Yang M, Wang YC, et al. Maillard reaction degree and product functional properties of proteins-glucose in skim milk system [J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技), 2019, 40(12):1-6.
- 17 Hu M, Zhao CB, Li Y, et al. Effect of glycation reaction on spatial structure conformation and emulsion properties of mung bean protein isolate [J]. J Chin Inst Food Sci Technol (中国食品学报), 2018, 18(11):50-56.
- 18 Du Y, Shi S, Jiang Y, et al. Physicochemical properties and emulsion stabilization of rice dreg glutelin conjugated with κ -carrageenan through Maillard reaction [J]. J Sci Food Agr, 2012, 93(1):125-133.
- 19 Zha FC, Dong S, Rao J, et al. Pea protein isolate-gum Arabic Maillard conjugates improves physical and oxidative stability of oil-in-water emulsions [J]. Food Chem, 2019, 285:130-138.
- 20 Setiowati AD, Saeedi S, Wijaya W, et al. Improved heat stability of whey protein isolate stabilized emulsions via dry heat treatment of WPI and low methoxyl pectin: effect of pectin concentration, pH, and ionic strength [J]. Food Hydrocolloid, 2017, 63:716-726.
- 21 Du YX, Shi SH, Jiang Y, et al. Physicochemical properties and emulsion stabilization of rice dreg glutelin conjugated with κ -carrageenan through Maillard reaction [J]. J Sci Food Agr, 2013, 93(1):125-133.
- 22 LI C. Study on the film-forming property and flavor release effect of peanut protein based on glycosylation reaction [D]. Jiangsu: Jiangnan University(江南大学), 2015.
- 23 Garcia MA, Martino MN, Zaritzky NE. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch - based films and coatings [J]. J Food Sci, 2010, 65:941-944.
- 24 Pirestani S, Nasirpour A, Keramat J, et al. Structural properties of canola protein isolate-gum arabic maillard conjugate in an aqueous model system [J]. Food Hydrocolloid, 2018, 79:228-234.
- 25 Mu LX, Zhao MM, Yang B, et al. Effect of ultrasonic treatment on the graft reaction between soy protein isolate and gum acacia and on the physicochemical properties of conjugates [J]. J Agr Food Chem, 2010, 58:4494-4499.
- 26 Mu LX, Zhao H, Zhao MM, et al. Physicochemical properties of soy protein isolates-acacia gum conjugates [J]. Czech J Food Sci, 2011, 29:129-136.