

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.08.013

小扁豆分离蛋白-阿拉伯胶偶联物的制备与结构表征

杜亚男, 陈寒青

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:文章通过湿热法美拉德反应制备小扁豆分离蛋白(lentil protein isolate, LPI)-阿拉伯胶(gum Arabic, GA)偶联物,并对其结构进行表征。当 LPI 与 GA 质量比大于 1:1 时,美拉德反应程度随 GA 比例的增加而增大;当两者质量比小于 1:1 时,美拉德反应程度随 GA 比例的增加而降低。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)和傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared, FTIR)表征结果表明,LPI 与 GA 之间形成了共价键;内源荧光光谱和表面疏水性分析证实 GA 的引入改变了天然 LPI 的构象,增加了它的表面疏水性;X 射线衍射(X-ray diffraction, XRD)分析和扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)表征结果表明,美拉德反应降低了 LPI-GA 偶联物的结晶度,使其成为松散、易碎的片状结构。该文研究结果为提高 LPI 的高值化利用提供了一定的理论基础。

关键词:小扁豆分离蛋白(LPI);阿拉伯胶(GA);美拉德反应;偶联物

中图分类号:TS202.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2025)08-1092-06

Preparation and characterization of lentil protein isolate-gum Arabic conjugates

DU Yanan, CHEN Hanqing

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: In this paper, the conjugates of lentil protein isolate(LPI) and gum Arabic(GA) were prepared by the wet-heating Maillard reaction, and their structures were characterized. When the mass ratio of LPI to GA was larger than 1:1, the degree of the Maillard reaction increased with the increase of GA proportion. When the mass ratio was less than 1:1, the degree of the Maillard reaction decreased with the increase of GA proportion. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) and Fourier transform infrared(FTIR) spectra results indicated that covalent bonds were formed between LPI and GA. Endogenous fluorescence spectra and surface hydrophobicity analysis confirmed that the introduction of GA changed the conformation of natural LPI and enhanced its surface hydrophobicity. X-ray diffraction(XRD) and scanning electron microscope(SEM) results showed that the crystallinity of the LPI-GA conjugates was reduced by the Maillard reaction, resulting in a loose and brittle sheet-like microstructure. This study provides a theoretical basis for improving the high-value utilization of LPI.

Key words: lentil protein isolate(LPI); gum Arabic(GA); Maillard reaction; conjugates

小扁豆分离蛋白(lentil protein isolate, LPI) 50%~65%和 10%~25%。LPI 中赖氨酸含量高、消化性好且营养价值高,是一种优良的植物蛋
主要由球蛋白和清蛋白组成,分别占总蛋白的

收稿日期:2023-04-28;修回日期:2023-05-09

基金项目:安徽省科技重大专项资助项目(202103a06020001)

作者简介:杜亚男(1996—),女,安徽舒城人,合肥工业大学硕士生;

陈寒青(1970—),男,安徽桐城人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师,通信作者, E-mail: hanqchen@hfut.edu.cn.

白资源^[1]。LPI 具有良好的溶解性、乳化性和起泡性功能特性,但其胶凝性较差。已有研究^[2]表明,与大豆、豌豆和鹰嘴豆蛋白相比,LPI 凝胶的机械性能较弱,从而限制了其在食品工业中的应用。

蛋白与多糖通过美拉德反应形成偶联物是一种提高其功能性质的有效方法。与其他方法相比,美拉德反应是一种绿色安全的方法,不会引入其他化学试剂,在控制 pH 值、温度、时间等条件的情况下可以自发进行^[3]。美拉德反应主要有干热法和湿热法。相较于干热法,湿热法操作步骤少、速度快、耗时短且共轭程度深^[4]。蛋白-多糖美拉德反应偶联物具有优异的溶解性和乳化性,对 pH 值、温度和离子不敏感,稳定性好^[5]。目前,关于单糖、双糖与蛋白共价结合来增加蛋白乳化性和水溶性的研究较多,然而,与这两者的高反应性相比,多糖由于其空间位阻可以防止过量蛋白聚合物的形成。此外,多糖具有丰富的亲水性基团(如羟基),因此对蛋白的修饰比单糖或低聚糖更有效^[6]。

阿拉伯胶(gum Arabic,GA)是一种具有高度分枝结构的阴离子亲水性杂多糖,溶解度高、黏度低且乳化性良好。GA 在食品工业中被广泛用作稳定剂、乳化剂和增稠剂,是目前食品工业中用途最广、用量最大的多糖之一^[7]。已有研究证明,GA 与大豆蛋白^[8]、豌豆蛋白^[9]、油菜籽蛋白^[7]及乳清蛋白^[10]等蛋白质通过美拉德反应共价结合,可以使蛋白具有更好的功能特性和物理稳定性,同时还能缓解豆科蛋白中的豆腥味。

因此,本文以 LPI 和 GA 为原料,通过湿热法美拉德反应制备了 LPI-GA 偶联物,以褐变程度、接枝度等变化监测美拉德反应程度,利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)测定偶联物分子量,通过傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared, FTIR)、内源荧光光谱等技术手段对偶联物的结构进行表征。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

小扁豆购于北京金禾绿源农业科技有限公司;GA 购于上海源叶生物科技有限公司;考马斯亮蓝 R250/G250 购于生工生物工程上海股份有限公司;十二烷基硫酸钠、8-苯胺-1-萘磺酸

(ANS)均购于美国 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

本实验所用仪器与设备有:Z326K 高速冷冻离心机(德国 HERMLE 公司);U-T1810DA 紫外可见分光光度计(上海屹谱仪器制造公司);Mini PROTEIN 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪(美国 Thermo Electric 公司);F97 Pro 荧光分光光度计(上海棱光科技有限公司);SU8020 场发射扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)(日本日立仪器公司);D/MAX 2500V X 射线衍射仪(X-ray diffractometer, XRD)(上海尤尼柯仪器公司)。

1.3 LPI 的提取

将小扁豆脱皮、磨粉,加入石油醚(豆粉质量与石油醚体积之比为 1:3)并在室温下搅拌 4 h,重复该操作直到石油醚褪色,然后将脱脂豆粉在通风橱中放置 24 h。取 100 g 脱脂豆粉与超纯水按 1:10 比例混合,用 2.0 mol/L NaOH 调节悬浮液 pH 值至 9.0,在室温下以 1 000 r/min 搅拌 2 h,期间始终保持 pH 值为 9.0。离心后(15 000g, 15 min, 4 °C)收集上清液,用 2.0 mol/L HCl 调节其 pH 值至 4.5,再次离心(4 000 r/min, 15 min, 4 °C),收集沉淀并复溶于超纯水,透析 48 h,冷冻干燥后得到 LPI。用凯氏定氮法测定 LPI 纯度为(91.27±1.31)% (以干基计)。

1.4 LPI-GA 偶联物的制备

1.4.1 制备过程

将 LPI 与 GA 按不同质量比(4:1、2:1、1:1、1:2、1:4)混合,加超纯水溶解,磁力搅拌 2 h 后置于 4 °C 冰箱过夜;将分散液的 pH 值用 1 mol/L NaOH 调为 7,在 90 °C 下加热 45 min,反应结束后立即冰浴 10 min;接着将其离心(1 000g, 10 min),取上清液冻干即获得 5 种 LPI-GA 偶联物^[11],分别命名为 LPI-GA-C₁、LPI-GA-C₂、LPI-GA-C₃、LPI-GA-C₄、LPI-GA-C₅。以天然 LPI(N-LPI)、加热的 LPI(H-LPI)以及 LPI 与 GA 混合物(LPI-GA-M)作为对照样品。

1.4.2 反应中间产物和褐变程度的测定

将偶联物分散液用超纯水稀释至 2 mg/mL,用紫外可见分光光度计测定其在 294、420 nm 波长处的吸光度^[12]。

1.4.3 接枝度的测定

LPI 与 GA 的接枝度(D_G)采用邻苯二甲醛(OPA)法测定^[13]。将 80 mg OPA 溶于 2 mL

95%的乙醇中,与 50 mL 四硼酸钠缓冲液(0.1 mol/L,pH 值 9.5)、5 mL 十二烷基硫酸钠溶液(200 mg/mL)、0.2 mL β -巯基乙醇混合,用超纯水将混合溶液稀释至 100 mL,即得新鲜 OPA 试剂。4 mL OPA 试剂与 0.2 mL LPI-GA 偶联物溶液(2 mg/mL)混合,在 35 °C 下水浴 2 min 后,测定偶联物在 340 nm 波长下的吸光度。通过吸光度计算接枝度,其计算公式如下:

$$D_G = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

其中: A_0 为天然 LPI 的吸光度; A_1 为偶联物的吸光度。

1.5 LPI-GA 偶联物的结构表征

1.5.1 分子量测定

将 10 μ L 偶联物分散液与 50 μ L 还原型上样缓冲溶液混合均匀,沸水浴 5 min 后冷却至室温。取 10 μ L 混合溶液注入 SDS-PAGE 预制凝胶中,电压为 120 V,电泳结束后取出凝胶,用染色液(0.1%考马斯亮蓝 R250+45%甲醇+10%冰乙酸)染色 20 min 后,再用脱色液(10%甲醇+10%冰乙酸)脱色,直至蛋白质条带清晰^[14]。

1.5.2 FTIR 测定

将偶联物和溴化钾粉末按 1:100 质量比混合研磨后,压缩成透明薄片,在室温下,利用 FT-IR 光谱仪对样品进行扫描,波数扫描范围为 400~4 000 cm^{-1} 。

1.5.3 内源荧光光谱测定

将偶联物粉末分散在超纯水中,最终质量浓度为 0.1 mg/mL。荧光分光光度计参数设置如下:激发波长为 280 nm,发射波长范围为 300~420 nm,扫描速度为 1 000 nm/min^[15]。

1.5.4 表面疏水性测定

样品的表面疏水性采用 ANS 荧光探针法^[12]测定。将偶联物粉末溶解在磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L,pH 值为 7.0)中以形成一系列质量浓度(0.05、0.10、0.20、0.50、1.00 mg/mL)的样品溶液。向样品溶液中加入 20 μ L 8 mmol/L ANS 溶液,震荡、静置 3 min 后,用荧光分光光度计记录样品的荧光强度。激发波长设置为 390 nm、发射波长为 400~650 nm。利用荧光强度与蛋白质质量浓度绘制函数曲线,曲线的初始斜率即为表面疏水性指数 H_0 。

1.5.5 微观结构测定

利用 XRD 记录偶联物样品在衍射角 2θ 为 $5^\circ\sim 40^\circ$ 范围内的 XRD 图谱。

将偶联物样品涂在双面导电胶上,然后在真空条件下喷金 30 s;在 5 kV 加速电压下,放大 1 000 倍观察偶联物的微观形貌^[16]。

1.6 数据处理分析

所有实验至少平行测定 3 次,结果均以平均值 \pm 标准差表示。使用 SPSS 25.0 软件对所有数据进行单因素方差分析,并利用 Tukey's 检验进行数据间的多重比较, $P<0.05$ 表明数据间存在显著性差异,不同字母表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 美拉德反应程度分析

在波长 294 nm 和 420 nm 处的吸光度可以反映美拉德反应中间产物的形成情况和褐变程度,不同 LPI 与 GA 质量比的偶联物在 294、420 nm 处的吸光度如图 1 所示。由图 1 可知: A_{294} 随着 LPI 与 GA 质量比的降低而增加,当 LPI 与 GA 质量比为 1:1 时达到最大值;当质量比继续降低时,即 GA 比例增加,吸光度却减小。 A_{420} 也有类似的变化趋势,可能是多糖的空间位阻限制了美拉德反应的程度^[16]。

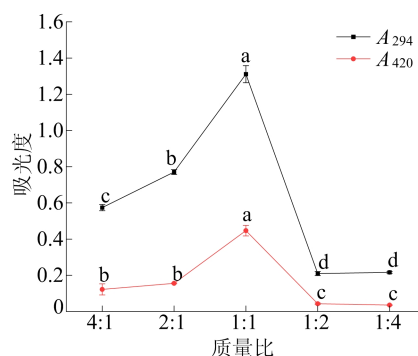


图 1 不同 LPI 与 GA 质量比下偶联物的吸光度

LPI 和 GA 在不同质量比下偶联物的接枝度如图 2 所示。

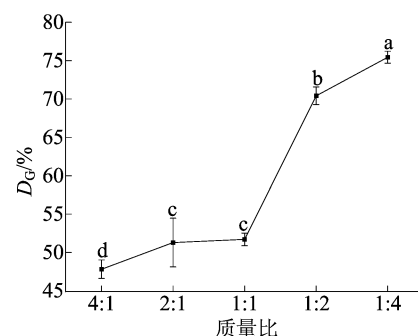


图 2 LPI-GA 偶联物接枝度随质量比的变化

由图 2 可知:随着 LPI 与 GA 质量比的下降,接枝度先缓慢增加而后大幅度升高,说明 LPI 与 GA 之间已经发生了美拉德反应,且反应程度随质量比的降低而降低;当 LPI 与 GA 质量比小于 1:1 时,偶联物的接枝度显著增加,但其 A_{294} 和 A_{420} 显著下降。故后续实验选择 LPI 与 GA 质量比为 4:1、2:1 和 1:1 制备偶联物。

2.2 LPI-GA 偶联物的结构分析

2.2.1 分子量分布分析

样品的分子量分布如图 3 所示。图 3 中:M 代表蛋白 Marker;泳道 1~泳道 6 分别表示 N-LPI、H-LPI、LPI-GA-M、LPI-GA-C₁、LPI-GA-C₂、LPI-GA-C₃。

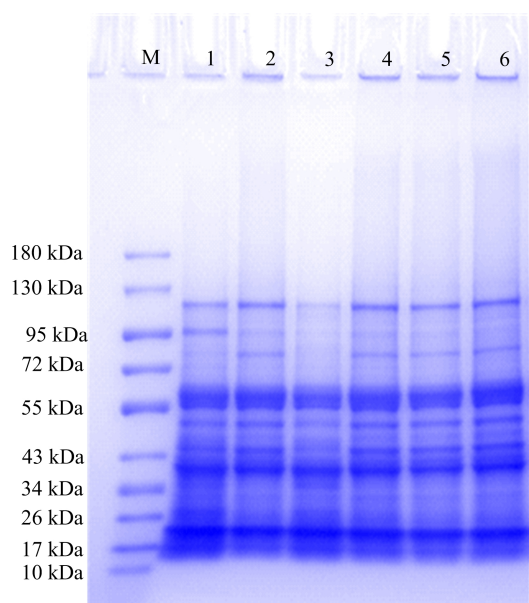


图 3 LPI-GA 偶联物的分子量分布

从图 3 可以看出:N-LPI 有 2 个明显的小分子量(40 kDa 和 20 kDa)条带,分别对应 11 S 球蛋白多肽中的酸性亚基和碱性亚基;另外,55 kDa 的深色条带是 7 S 豌豆球蛋白中分子量较小的伴豌豆球蛋白^[1]。LPI-GA 偶联物的条带分布与 N-LPI 相似,不过偶联物在 26~34 kDa 的条带变浅,而在 72~95 kDa 的条带变深。H-LPI 的条带与之有类似的现象,但混合物的条带与之不同。此外,在浓缩胶的顶部 3 种偶联物都出现了一个新的条带,并且条带颜色随 LPI 与 GA 质量比的降低而加深。表明 LPI 与 GA 之间可能已经形成了共价键,且质量比降低会促进二者共价结合。

2.2.2 FTIR 分析

样品 FTIR 光谱如图 4 所示。由图 4 可知:

N-LPI 在 $3\ 200\sim 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$ 处出现的吸收峰归因于 O—H 键伸缩振动;酰胺 I 带和酰胺 II 带的吸收峰分别在 $1\ 600\sim 1\ 650\ \text{cm}^{-1}$ 和 $1\ 500\sim 1\ 600\ \text{cm}^{-1}$ 处,由 C=O 键伸缩振动、N—H 键弯曲振动和 C—N 键伸缩振动引起;另外,C—O 伸缩振动造成的吸收峰出现在 $1\ 000\sim 1\ 200\ \text{cm}^{-1}$ 处^[11,16]。LPI 与 GA 共价结合后,O—H 键的吸收峰向左移动,宽度变大,且酰胺 I 带和酰胺 II 带的峰强度呈下降趋势。另外,C—O 键吸收峰的强度也因美拉德反应而明显增加。因此,GA 的羧基与 LPI 的氨基成功结合。

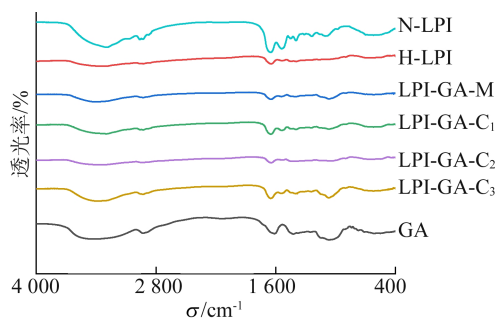


图 4 样品的 FTIR 谱图

2.2.3 内源荧光光谱分析

蛋白质的构象变化可通过主要发色团(如色氨酸)激发的荧光光谱来表征^[17]。样品的内源荧光光谱图如图 5 所示。

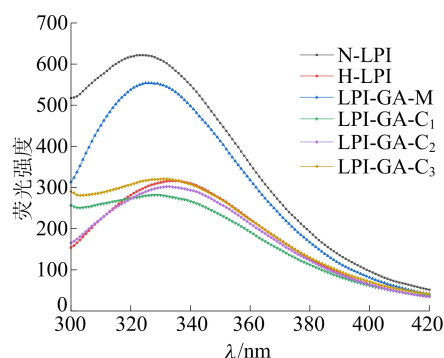


图 5 样品的内源荧光光谱图

从图 5 可以看出,H-LPI、LPI-GA-M、LPI-GA-C₁、LPI-GA-C₂ 和 LPI-GA-C₃ 的荧光强度均低于 N-LPI,且 3 种偶联物荧光强度的依次降低,表明美拉德反应可以促进多糖链对色氨酸残基周围区域的屏蔽作用,并且随着 GA 比例的增加而增强。同时,3 种偶联物的最大荧光发射峰波长发生明显红移,说明色氨酸残基被暴露在更极性的微环境中,即 LPI 的构象在美拉德反应过程中

发生了变化。

2.2.4 表面疏水性分析

样品的表面疏水性分析如图 6 所示。由图 6 可知, H-LPI 比 N-LPI 具有更高的 H_0 值, 加热会导致蛋白质结构展开, 从而暴露内部疏水性基团^[16]。LPI-GA 偶联物的 H_0 值也高于 N-LPI, 且随着 GA 比例的增加而降低, 这是由于美拉德反应改变了天然 LPI 的构象, 抑制了部分疏水基团的暴露。另外, GA 的加入增加了羟基等亲水基团的数量, 也有利于降低 H_0 值^[15]。总之, 美拉德反应增强了 LPI 的表面疏水性, 并且这种效果随着 LPI 与 GA 质量比的降低而增强。

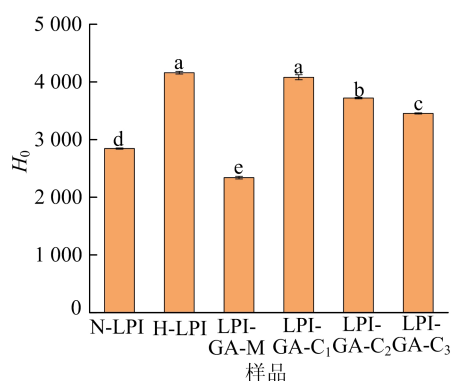


图 6 样品的表面疏水性

2.2.5 XRD 分析

样品的 XRD 图谱如图 7 所示。

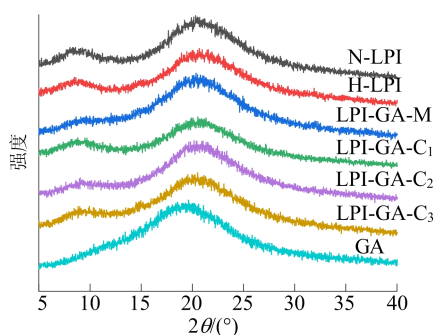


图 7 样品的 XRD 图谱

从图 7 可以看出: N-LPI 的衍射光谱在 2θ 为 10° 和 20° 附近分别存在一个宽峰, 而 GA 的衍射光谱仅在 19° 附近有一个强峰; 加热后, N-LPI 的衍射光谱 2 个特征峰变化不明显; LPI 与 GA 的混合物和偶联物中的衍射峰强度随质量比的降低而减弱; LPI-GA-C₁、LPI-GA-C₂ 和 LPI-GA-C₃ 在 20° 附近的特征峰的位置向低衍射角度方向略有偏移, 尤其是 LPI-GA-C₃。结果表明, 美拉德

反应可以降低 LPI 的结晶度, 且 LPI 与 GA 质量比越小, LPI 结晶度越小。

2.2.6 微观形貌

样品的微观形貌如图 8 所示。从图 8 可以看出: N-LPI 具有大且光滑的片状结构; 加热后, LPI 表面变得粗糙, 出现少量孔洞; LPI-GA-M 的表面出现大量的孔隙, 但并不粗糙; 相比之下, LPI-GA 偶联物呈现出松散、易脆的片状结构, 这是由于美拉德反应展开和延伸了蛋白质的结构, 有利于蛋白质和多糖的共价结合, 进而提高美拉德反应效率^[16]。此外, 在 3 种偶联物中, LPI-GA-C₂ 和 LPI-GA-C₃ 具有更完整的薄片结构, 可能是 GA 比例增加的缘故。

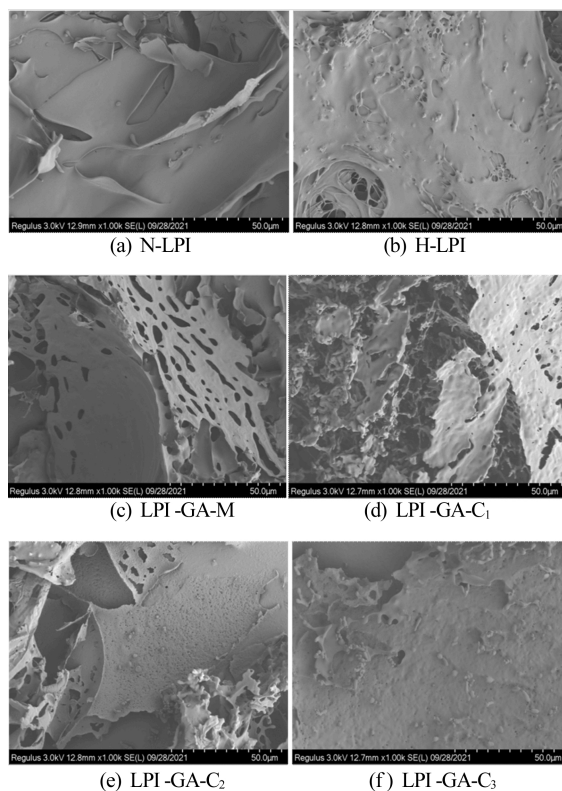


图 8 样品的微观形貌

3 结 论

本文通过湿热法美拉德反应制备了 LPI-GA 偶联物。当 LPI 与 GA 的质量比大于 1:1 时, 美拉德反应程度随 GA 比例的增加而增加。当两者质量比小于 1:1 时, 美拉德反应程度随 GA 比例的增加而降低。结构表征结果表明, 美拉德反应会改变 LPI-GA 偶联物的构象, 增加表面疏水性, 同时, 美拉德反应也会降低 LPI 的结晶度, 改变其结构, 使之成为松散、易碎的片状结构。这种结

构的变化可能对改善 LPI 的功能特性有重要作用,因此可进一步研究 LPI-GA 偶联物的功能性质。

[参 考 文 献]

- [1] JO Y J, HUANG W J, CHEN L Y. Fabrication and characterization of lentil protein gels from fibrillar aggregates and the gelling mechanism study[J]. *Food & Function*, 2020, 11:10114.
- [2] PARRA M J, BAMDAD F, WANG Y, et al. Optimization of lentil protein extraction and the influence of process pH on protein structure and functionality [J]. *LWT*, 2014, 57: 461-469.
- [3] XUE F, LI C, ZHU X W, et al. Comparative studies on the physicochemical properties of soy protein isolate-maltodextrin and soy protein isolate-gum acacia conjugate prepared through Maillard reaction[J]. *Food Research International*, 2013, 51:490-495.
- [4] 陈豪. 基于糖基化反应下乳清分离蛋白/乳糖凝胶的流变行为及其机制研究[D]. 南昌:南昌大学, 2019.
- [5] NOOSHKAM M, VARIDI M. Maillard conjugate-based delivery systems for the encapsulation, protection, and controlled release of nutraceuticals and food bioactive ingredients; a review [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100:102389.
- [6] ZHANG Q, ZHOU Y Y, YUE W T, et al. Nanostructures of protein-polysaccharide complexes or conjugates for encapsulation of bioactive compounds[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 109:169-196.
- [7] 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 Hydrocolloids*, 2018, 79:228-234.
- [8] YANG Y X, CUI S W, GONG J H, et al. A soy protein-polysaccharides Maillard reaction product enhanced the physical stability of oil-in-water emulsions containing citral[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 48:155-164.
- [9] ZHA F C, DONG S Y, RAO J J, et al. The structural modification of pea protein concentrate with gum Arabic by controlled Maillard reaction enhances its functional properties and flavor attributes [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 92: 30-40.
- [10] SHAO P, FENG J R, SUN P L, et al. Improved emulsion stability and resveratrol encapsulation by whey protein/gum Arabic interaction at oil-water interface[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 133: 466-472.
- [11] HU Q H, WU Y L, ZHONG L, et al. *In vitro* digestion and cellular antioxidant activity of β -carotene-loaded emulsion stabilized by soy protein isolate-pleurotus eryngii polysaccharide conjugates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112:106340.
- [12] ZHAO C B, YIN H H, YAN J N, et al. Structure and acid-induced gelation properties of soy protein isolate-maltodextrin glycation conjugates with ultrasonic pretreatment [J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112:106278.
- [13] PIRESTANIA S, NASIRPOURA A, KERAMATA 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.
- [14] WANG Y R, ZHANG B, FAN J L, et al. Effects of sodium tripolyphosphate modification on the structural, functional, and rheological properties of rice glutelin [J]. *Food Chemistry*, 2019, 281:18-27.
- [15] SHENG L, TANG G Y, WANG Q, et al. Molecular characteristics and foaming properties of ovalbumin-pullulan conjugates through the Maillard reaction[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100:105384.
- [16] ZHONG L, MA N, WU Y L, et al. Characterization and functional evaluation of oat protein isolate-pleurotus ostreatus β -glucan conjugates formed via Maillard reaction [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 87:459-469.
- [17] WANG K, LI W, WANG K, et al. Structural and inflammatory characteristics of Maillard reaction products from litchi thaumatin-like protein and fructose[J]. *Food Chemistry*, 2022, 374:131821.

(责任编辑 闫杏丽)