

生理温度下苯丙氨酸-葡萄糖模式体系 Maillard 反应的影响因素研究

夏炳乐, 刘永军

(中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026)

摘要:测试了 D-葡萄糖和 L-苯丙氨酸在 37 °C, pH 6.5 的条件下反应 1~35 d 所得 Maillard 反应产物的颜色强度, 研究了溶剂水分含量以及金属离子 Fe^{2+} , Cu^{2+} 对 D-葡萄糖和 L-苯丙氨酸模式 Maillard 反应体系的影响. 结果表明: 在本实验条件下模式体系 Maillard 反应速率和体系水分含量成反比关系, 随着水分含量的降低反应速率逐渐升高; 金属离子 Fe^{2+} , Cu^{2+} 能促进模式体系 Maillard 反应, 有效缩短反应时间, 并且随着金属离子浓度的增加其催化作用先增强后减小; 当 Fe^{2+} , Cu^{2+} 的浓度为 0.2 mmol/L 时, 其催化作用最强, 并且 Cu^{2+} 的催化作用大于 Fe^{2+} .

关键词: Maillard 反应; 苯丙氨酸; 金属离子; 催化

中图分类号: TS201.2 **文献标识码:** A doi:10.3969/j.issn.0253-2778.2011.05.007

Study on the influencing factors of the model Maillard reaction of L-phenylalanine/D-glucose at physiological temperature

XIA Bingle, LIU Yongjun

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: The color intensity of Maillard reaction products (MRPs), between D-glucose and L-phenylalanine at 37 °C and pH 6.5 for 1~35 d, was analyzed. The effects of metal ions (Fe^{2+} and Cu^{2+}) and the water content in solvent on Maillard browning were also monitored. The results show that the rate of the model Maillard reaction is inversely proportional to water content, the reaction rate increasing with the decrease of the water content. Browning tends to be accelerated in the presence of Fe^{2+} and Cu^{2+} and the reaction time is shortened effectively. Their catalysis increases first and then decreases with the increase in the concentration of metal ions. The catalysis is strongest when the concentrations of Fe^{2+} and Cu^{2+} are 0.2 mmol/L, and the browning reaction is somewhat faster in the presence of Cu^{2+} than of Fe^{2+} .

Key words: Maillard reaction; phenylalanine; metal ions; catalysis

收稿日期: 2010-11-17; 修回日期: 2011-04-22

基金项目: 国家烟草专卖局科研基金(1002001041)资助.

作者简介: 夏炳乐(通讯作者), 男, 1963年生, 博士/副教授. 研究方向: 生物无机化学. E-mail: xiabl@ustc.edu.cn

0 引言

Maillard 反应是还原糖与氨基酸或蛋白质等含氨基化合物之间发生的复杂反应,又称为非酶褐变反应(nonenzymatic browning reaction),是食品颜色、香气和香味前体形成的重要反应^[1-3]。

Maillard 反应在食品的生产、加工和储存过程中均可能发生,所以对食品的品质有着重要的影响。同时实验研究表明食品中含有的大量的金属离子能够促进 Maillard 反应,尤其是铁离子通过催化氧化促进 Maillard 反应^[4]。Maillard 反应十分复杂,反应机理以及反应终产物的性质及结构不仅受氨基酸及糖的种类、性质的影响,而且还与反应时的溶剂水分含量、pH 值、反应温度和时间、金属离子等有关。近年来关于金属离子和溶剂水分含量对 Maillard 反应影响的研究较多,但是主要是在较高温度条件下进行^[4-9],而对生理学温度下金属离子和溶剂水分含量对模式体系 Maillard 反应的影响研究鲜见报道。所以本文主要研究了在 37 °C, pH 6.5 时,溶剂水分含量以及金属离子 Fe²⁺, Cu²⁺ 对 D-葡萄糖和 L-苯丙氨酸的 Maillard 反应体系的影响,旨在为食品加工和储存过程中对 Maillard 反应的控制以及低温条件下 Maillard 反应型香味料的催化合成提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

(I) 试剂: D-葡萄糖(Glu)(AR, 中国医药集团); 氯化亚铁、硫酸铜、氢氧化钠、盐酸、甲苯、1,2-丙二醇(AR, 中国国药集团); L-苯丙氨酸(Phe)(BR, 中国国药集团)。

(II) 仪器: VIS-723 型分光光度计(上海第三分

析仪器厂); HH·B11 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械一厂); FA1104 电子天平(0.1 mg, 上海天平仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 模式体系 Maillard 反应产物的制备^[5]

按照摩尔比 2 : 1 将葡萄糖与 L-苯丙氨酸混合,用含水量分别为 30%, 50% 和 100% (体积比)的丙二醇水溶液溶解、定容至葡萄糖浓度为 0.1 mol/L。用 1 mol/L 氢氧化钠水溶液或盐酸分别将各溶液的 pH 调节至 6.5。然后分成 50 mL 每份,各取一份作为对照,其余分别加入 0.1, 0.2, 0.5 mmol/L (最终浓度)的 Fe²⁺, Cu²⁺ 离子。各加入几滴甲苯,密封,置于 37 °C 的恒温培养箱中。每一种反应体系均为一式三份(n=3)。

1.2.2 模式体系 Maillard 反应产物颜色强度的测定

以去离子水作参比,用 VIS-723 型分光光度计测定各反应混合物放置 1, 10, 15, 20, 25, 30, 35 d 在 420 nm 处的吸光度 A₄₂₀ (样品无稀释)。

2 结果与讨论

2.1 模式体系 Maillard 反应程度与反应时间的相关性

对本实验中建立各模式 Maillard 反应体系的反应时间与相应反应产物的 A₄₂₀ 进行双变量相关性分析,结果如表 1 所示。由各模式体系反应时间和 A₄₂₀ 的相关性系数可知,它们间存在显著相关性(相关性系数均大于 0.800)。由于在所有模式体系中, A₄₂₀ 和反应时间的相关性系数都非常高,因此在不同反应时间模式体系 Maillard 反应产物的 A₄₂₀ 可以作为评价 Maillard 反应程度的重要指标来研究反应物种类、反应温度、pH、反应溶剂以及金属离子等

表 1 各模式 Maillard 反应体系反应时间和 A₄₂₀ 的相关性分析

Tab. 1 Correlation analysis between reaction time and A₄₂₀ of all the model Maillard reaction

反应体系	相关性系数	反应体系	相关性系数
Glu+Phe+溶剂含水量 30%	0.991**	Glu+Phe+溶剂含水量 50%+0.2 mmol/L Cu ²⁺	0.951**
Glu+Phe+溶剂含水量 50%	0.991**	Glu+Phe+溶剂含水量 100%+0.2 mmol/L Cu ²⁺	0.950**
Glu+Phe+溶剂含水量 100%	0.969**	Glu+Phe+溶剂含水量 30%+0.1 mmol/L Fe ²⁺	0.969**
Glu+Phe+溶剂含水量 30%+0.2 mmol/L Fe ²⁺	0.978**	Glu+Phe+溶剂含水量 30%+0.5 mmol/L Fe ²⁺	0.951**
Glu+Phe+溶剂含水量 50%+0.2 mmol/L Fe ²⁺	0.937**	Glu+Phe+溶剂含水量 30%+0.1 mmol/L Cu ²⁺	0.968**
Glu+Phe+溶剂含水量 100%+0.2 mmol/L Fe ²⁺	0.969**	Glu+Phe+溶剂含水量 30%+0.5 mmol/L Cu ²⁺	0.962**
Glu+Phe+溶剂含水量 30%+0.2 mmol/L Cu ²⁺	0.904**		

【注】 ** 表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关。

对 Maillard 反应的影响。

2.2 溶剂水分含量对模式体系 Maillard 反应的影响

图 1 是在 37 °C, pH 6.5 的反应条件下, 反应溶剂中水含量的变化对模式体系 Maillard 反应棕色化程度的影响。由图 1 中含水量分别为 30%, 50% 和 100% 的三个反应体系在试验选定反应条件下反应 1~35 d 的棕色化程度变化趋势可知, 随着含水量的降低, 模式体系 Maillard 反应的棕色化程度逐渐增强, 说明降低反应溶剂中水含量有利于模式体系 Maillard 反应的进行。同时在含水量分别为 30%, 50% 和 100% 的三个反应体系中加入 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 离子 (如图 2、图 3), 和对照体系相比, Fe^{2+} , Cu^{2+} 离子的加入较大的促进了模式体系的反应程度, 并且随着水含量的降低, 金属离子 Fe^{2+} , Cu^{2+} 对模式体系的催化作用逐渐增强。由图 1 和图 2 可知,

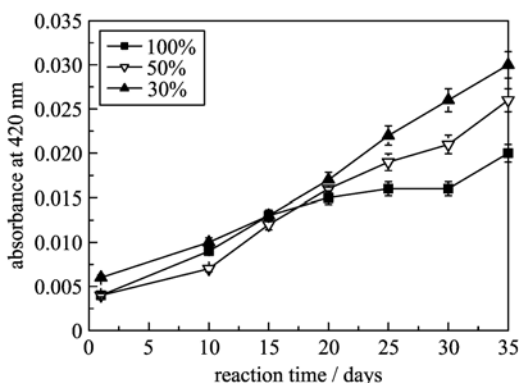


图 1 溶剂水分含量对模式体系 Maillard 反应的影响

Fig. 1 The effect of the water content in solvent on the model Maillard reaction

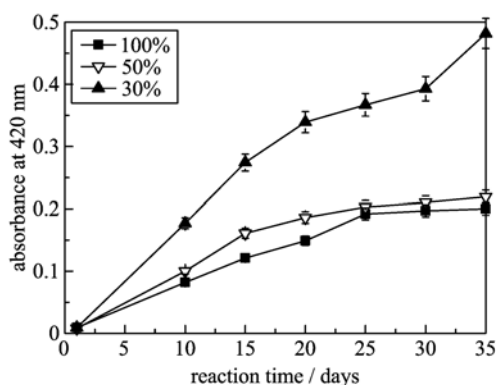


图 2 Fe^{2+} 在不同溶剂水含量下对模式体系 Maillard 反应的影响

Fig. 2 The effect of Fe^{2+} on the model Maillard reaction in the different water content

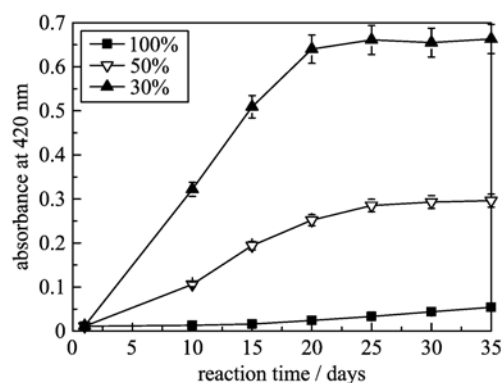


图 3 Cu^{2+} 在不同溶剂水含量下对模式体系 Maillard 反应的影响

Fig. 3 The effect of Cu^{2+} on the model Maillard reaction in the different water content

在铁离子的存在下含水量分别为 30%, 50% 和 100% 三个反应体系经反应 35 d 所得的棕色化产物的颜色强度分别是相应对照体系的 16.1, 8.4 和 10 倍。而在铜离子的存在下分别为 22.1, 11.4 和 2.7 倍 (图 3)。并且由图 2 和图 3 可知, 各模式体系在金属离子的参与下反应开始前 20 d 的棕色化产物的积累速率最大, 之后棕色化产物颜色强度趋于平衡, 而图 1 中各对照体系反应产物颜色强度曲线呈现一近似直线增加, 说明金属离子的加入有效地促进了模式体系 Maillard 反应, 并且其催化的主要是 Maillard 反应的初级阶段。

Maillard 反应速率与底物浓度成正比, 也与水是否参与反应有关^[10]。食品中水分含量在 10%~15% 时容易发生褐变, 在 3% 以下时, 非酶褐变反应可受到抑制^[11]。含水量较高有利于反应物和产物的流动, 也可能因水过多会将反应物稀释, 使反应速率下降。水不仅作为溶剂并且还参与反应, 如当糖胺经重排形成 Amadori 产物时水既是溶剂又是反应物^[12]。并且在多元醇如丙二醇、乙二醇、丙三醇等的存在下, 由于多元醇溶液中存在的某种溶剂化作用进而加快 Maillard 反应进程^[13]。这或许可以解释降低反应体系溶剂水含量反而有利于 Maillard 反应的原因 (图 1、图 2、图 3)。所以为了进一步研究金属离子对模式体系 Maillard 反应的影响, 我们选用含水量为 30% 的丙二醇水溶液为反应溶剂。

2.3 金属离子浓度对模式体系 Maillard 反应的影响

图 4 和图 5 是苯丙氨酸和葡萄糖模式体系在

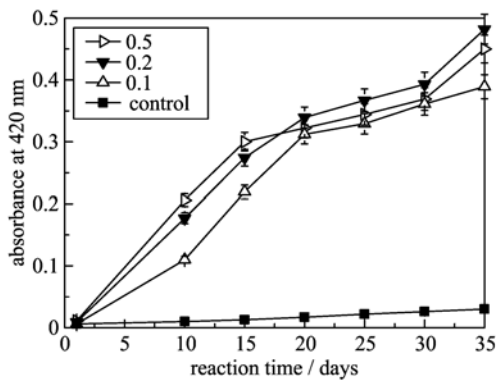


图 4 Fe²⁺ 对模式体系 Maillard 反应的影响

Fig. 4 The effect of Fe²⁺ on the model Maillard reaction

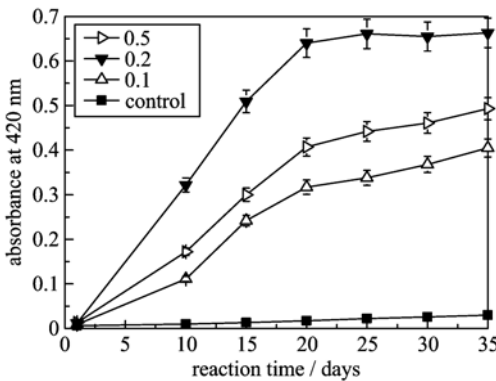


图 5 Cu²⁺ 对模式体系 Maillard 反应的影响

Fig. 5 The effect of Cu²⁺ on the model Maillard reaction

37 °C, pH 6.5, 溶剂含水量为 30% 以及不同金属离子加入量的反应条件下, 反应 1~35 d 所得棕色化产物在 420 nm 处的吸光度的变化趋势. 在参照样和含金属离子体系的整个反应过程中, 尽管参照样模式体系的棕色化程度逐渐增强, 但是整个反应体系的棕色化程度非常低. 而金属离子的加入使模式体系 Maillard 反应的棕色化产物的积累速率大大增加, 并且随着反应的进行, 各含金属离子模式体系的棕色化程度迅速增高. 加入 Fe²⁺, Cu²⁺ 的 6 个样品呈现出棕色化反应速率大大加快, 特别是在整个反应的前 20 d, 棕色化反应产物的积累几乎呈直线增加. 在含 Fe²⁺ 的模式体系中, Fe²⁺ 的浓度越高对模式体系反应的影响越显著; 反应 20 d 之后, 各模式体系棕色化反应速率降低, 并且含 0.2 mmol/L 的 Fe²⁺ 的模式体系棕色化程度超过含 0.5 mmol/L 的 Fe²⁺ 的模式体系. 然而, Fallico 等^[14] 研究发现, 在葡萄糖与苯丙氨酸体系中加入 Fe²⁺ 却抑制了 Maillard 反应的进行, 可能是因为反应体系的组成以及反应温度、pH 和金属离子浓度

等反应条件的不同引起反应机理的变化, 从而表现出催化效果上的不同. 在含 Cu²⁺ 的 3 个模式体系的整个反应过程中始终以含 0.2 mmol/L 的 Cu²⁺ 的模式体系棕色化程度最高, 说明在本实验中当 Cu²⁺ 的含量为 0.2 mmol/L 时, 其催化作用最强, 并且在反应进行 20 d 以后模式体系棕色化产物的积累速率几乎为零. 以上说明金属离子的加入能够有效地催化 Maillard 反应, 并且显著地缩短反应时间. 由图 3 和图 4 可知, 模式体系中当两种金属离子的浓度均为 0.2 mmol/L 时, Cu²⁺ 对模式体系的催化作用更强.

金属离子对 Maillard 反应的催化作用不仅和反应物类型、反应温度、pH、反应时间以及反应介质等有关, 而且和金属离子本身有关, 并且在反应的不同阶段, 其影响程度不同. 如图 2~5, 在各含金属离子体系中反应开始前 20 d 各体系棕色化产物的积累随着反应的进行几乎呈直线增加, 之后棕色化产物的积累速率逐渐减小; 并且在含 Cu²⁺ 的模式体系中反应进行 20 d 以后棕色化产物吸光度几乎趋于平衡, 说明两种金属离子主要催化初级 Maillard 反应. 但是由于 Maillard 反应的复杂性, 目前金属离子在 Maillard 反应的各个阶段的作用机理尚不清楚. 研究表明在含水介质中, 当 pH 接近中性时, Maillard 反应是通过离子机理进行的, 因此易于受到各种离子的影响^[6]. 据 Gomyo 等^[15] 报道, 在有不同离子存在的情况下, Maillard 反应中类黑精的凝聚受抑制. Kwak 等^[5] 在 Maillard 反应模型体系中分别加入 Fe²⁺, Cu²⁺, Al³⁺, Zn²⁺, Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 等金属离子, 结果表明, 在金属离子尤其是二价铁离子和二价铜离子存在下, 褐变趋于加快. 过渡金属离子对 Maillard 反应的催化作用主要是通过氧化路径^[16], 促进 Schiff 碱形成 Amadori 产物^[17], 同时又催化 Amadori 产物自动氧化^[7], 即催化初级 Maillard 反应. 这也许可以解释在 Cu²⁺ 作用下部分模式 Maillard 反应体系反应前 20 d 的棕色化产物的积累速率最大的原因. 此外, 葡萄糖在过渡金属离子(如 Cu²⁺) 的作用下氧化形成活性二羰基化合物以及活性氧自由基^[18], 进而促进 Maillard 反应. Ramonaityte 等^[7] 通过对总反应产物的吸光度和不可透析产物的吸光度对比推测, 认为 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 在反应过程中抑制了反应中间体之间的相互作用, 使其不能继续反应形成高分子类黑精或者促进了反应中形成高分子产物的降解. 而 Fe²⁺ 却与 Cu²⁺,

Zn²⁺ 正好相反,是促进了反应中间体之间的相互作用,形成高分子产物.并且认为,当金属离子浓度较低时,大部分金属离子被螯合成复合物,随着金属离子浓度的增加,反应体系中出现自由金属离子,它的存在可以通过氧化/还原效应催化 Maillard 反应的进行.但同时也可能会由于副反应的诱导而抑制 Maillard 反应,如金属离子被氨基酸中的氨基或羧基(或单糖中的 OH)螯合,随着金属离子浓度的增加可抑制 Maillard 反应.这也许可以解释随着反应体系中 Cu²⁺, Fe²⁺ 浓度的增加,模式体系反应速率先增大后减小的原因(如图 4、图 5).此外,反应过程中形成的金属离子复合物,在反应一定时间后通过自身或和其他反应产物之间的进一步反应可能使复合物中的金属离子以活性更强的自由金属离子的形式被重新释放出来(如金属离子催化 Amadori 产物的自动氧化过程),进而催化 Maillard 反应^[7].这或许可以解释图 4 中,反应进行 25 d 后各含 Fe²⁺ 体系棕色化产物积累速率突然增大的原因.

3 结论

通过研究在 37 °C, pH 6.5 的反应条件下溶剂水含量以及金属离子 Fe²⁺, Cu²⁺ 对葡萄糖和苯丙氨酸模式 Maillard 反应体系的影响,对比分析各模式体系反应 1~35 d 所得棕色化产物在 420nm 处的吸光度发现:

(I) 随着反应溶剂中水含量的降低,各模式 Maillard 反应体系的棕色化程度反而逐渐增高.

(II) 金属离子 Fe²⁺ 和 Cu²⁺ 的存在能够明显促进葡萄糖和苯丙氨酸模式体系的 Maillard 反应.金属离子的催化作用和浓度有关,随着金属离子浓度的增加其催化能力先增大后减小,当 Fe²⁺ 和 Cu²⁺ 的浓度为 0.2 mmol/L 时其催化作用最强,并且 Cu²⁺ 比 Fe²⁺ 的催化作用更强.

参考文献(References)

- [1] Silván J M, Van de Lagemaat J, Olano A, et al. Analysis and biological properties of amino acid derivatives formed by Maillard reaction in foods[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(5):1 543-1 551.
- [2] Zhang Qibin, Ames J M, Smith R D, et al. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: Probing the pathogenesis of chronic disease[J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(2):754-769.
- [3] Van Boekel M A J S. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction[J]. *Biotechnol Adv*, 2006, 24(2):230-233.
- [4] Kato Y, Watanabe K, Sato Y. Effect of some metals on the Maillard reaction of ovalbumin[J]. *J Agric Food Chem*, 1981, 29(3):540-543.
- [5] Kwak E J, Lim S I. The effect of sugar, amino acid, metal ion and NaCl on model Maillard reaction under pH control[J]. *Amino Acids*, 2004, 27(1): 85-90.
- [6] Rizzi G P. Effects of cationic species on visual color formation in model Maillard reactions of pentose sugar and amino acids[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 7 160-7 164.
- [7] Ramonaityte D T, Keršienė M, Adams A, et al. The interaction of metal ions with Maillard reaction products in a lactose-glycine model system[J]. *Food Res Int*, 2009, 42:331-336.
- [8] Wu Huiling, Wang Zhiqiang, Han Chun, et al. Factors affecting the Maillard reaction[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(5): 441-444.
吴惠玲, 王志强, 韩春, 等. 影响美拉德反应的几种因素研究[J]. *现代食品科技*, 2010, 26(5):441-444.
- [9] Leclere J, Birlouez-Aragon I, Meli M. Fortification of milk with iron-ascorbate promotes lysine glycation and tryptophan oxidation[J]. *Food Chem*, 2002, 76(4): 491-499.
- [10] Qi Yinxia, Cheng Jian. The influence of environmental factors on the formation of meat aroma by Maillard reaction [J]. *China Condiment*, 2009, 34(7):27-30.
齐银霞, 成坚. 环境因子对 Maillard 反应形成肉香味的影响[J]. *中国调味品*, 2009, 34(7):27-30.
- [11] Wang Dongfen, Sun Liping, Zhang Li. Research progress on nonenzymatic browning reaction [J]. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2006, (10):9-19.
汪东风, 孙丽平, 张莉. 非酶褐变反应的研究进展[J]. *农产品加工(学刊)*, 2006, (10):9-19.
- [12] Van Boekel M A J S. Kinetic aspects of the Maillard reaction: A critical review[J]. *Nahrung-Food*, 2001, 45(3):150-159.
- [13] Liu Guozhen, Zhu Wei, Huang Long, et al. Maillard reaction of glucose and glutamic acid [J]. *Tobacco Science & Technology*, 2002(10):30-33.
刘国珍, 朱巍, 黄龙, 等. 谷氨酸和葡萄糖的 Maillard 反应[J]. *烟草科技*, 2002(10):30-33.

- [14] Fallico B, Ames J M. Effect of hexanal and iron on color development in a glucose phenylalanine model system[J]. *J Agric Food Chem*, 1999, 47(6):2 255-2 261.
- [15] Gomyo T, Horikoshi M. On the interaction of melanoidin with metallic ions [J]. *Agric Biol Chem*, 1976(40): 33-40.
- [16] Morita J, Kashimura N. The Maillard reaction of DNA with D-fructose 6-phosphate [J]. *Agric Biol Chem*, 1991,50:1359-1366.
- [17] Hayase F, Shibuya T, Sato J, et al. Effects of oxygen and transition metals on the advanced maillard reaction of proteins with glucose [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1996, 60(11):1 820-1 825.
- [18] Sajithlal G B, Chithra P, Chandrakasan G. The role of metal-catalyzed oxidation in the formation of advanced glycation end products: An in vitro study on collagen [J]. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25 (3): 265-269.

(上接第 398 页)

- 李强, 席光, 王尚锦. NURBS 表示圆弧曲线的实用方法[J]. *计算机辅助设计与图形学学报*, 1999,11(5): 467-469.
- [9] Jaklić G, Kozak J, Krajnc M, et al. Approximation of circular arcs by parametric polynomial curves [J]. *Annali dell'Università di Ferrara*, 2007, 53 (2): 271-279.
- [10] Peters G J. Interactive computer graphics application of the bi-cubic parametric surface to engineering design problems [C]//*Computer Aided Geometric Design*, New York: Academic Press, 1974: 259-302.
- [11] Dokken T, Daehlen M, Lyche T, Morken K. Good approximation of circles by curvature-continuous Bézier curves[J]. *Computer Aided Geometric Design*, 1990, 7(1): 33-41.
- [12] Goldapp M. Approximation of circular arcs by cubic polynomials[J]. *Computer Aided Geometric Design*, 1991, 8(3): 227-238.
- [13] Ahn Y J, Kim H O. Approximation of circular arcs by Bézier curves [J]. *Journal of Computational and Applied Mathematics*, 1997, 81(1): 145-163.
- [14] Zhang Weihong, Cai Yiqing, Feng Yuyu. Arc-length-preserving approximation of circular arcs by quintic PH curves [J]. *Journal of Computer-Aided Design and Computer Graphics*, 2010,22(7):1 082-1 086.
张伟红, 蔡亦青, 冯玉瑜. 圆弧的五次 PH 曲线等弧长逼近[J]. *计算机辅助设计与图形学学报*, 2010,22(7): 1 082-1 086.
- [15] Farouki R T, Sakkalis T. Pythagorean hodographs [J]. *IBM Journal of Research and Development*, 1990, 34(5): 736-752.
- [16] Farouki R T. *Pythagorean-Hodograph Curves-Algebra and Geometry Inseparable* [M]. New York: Springer, 2008.