

# 谷氨酰胺转氨酶对米渣蛋白糖基化反应产物结构和流变性的影响

朱小燕, 毛锦远, 赵强, 雷莉, 熊华

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

**摘要:** 为了探讨谷氨酰胺转氨酶(TG)对植物蛋白美拉德反应改性的作用, 本文利用米渣蛋白(RDP)分别与葡萄糖、核糖、麦芽糊精 1:1 进行干法糖基化反应, 研究 TG 的添加(10  $\mu\text{g}$  的 RDP)对反应产物结构和流变学特性的影响。结果表明: 随着反应的进行, 核糖与 RDP 糖基化反应的接枝度最大, TG 酶能够提高糖基化反应接枝度; 内源荧光  $\lambda_{\text{max}}$  红移且强度降低, 红外光谱显示不同产物的结构变化显著, 但 TG 对产物的结构影响不大; 糖基化反应可降低表面疏水性, 而 TG 促其增大; 糖基化反应主要是 Lys 和 Arg 含量减少, 组氨酸含量增加, 且核糖更利于与自由氨基的反应, TG 对产物氨基酸组成无影响; 糖基化产物溶液都是假塑性流体, 核糖接枝产物表观粘度最大, TG 促使表观粘度增高; 三种糖基化产物动态模量随剪切频率增大而变化较大, 其中核糖反应产物表现出类似凝胶特性,  $G' > G''$  且较 RDP 均增加, TG 提高核糖、葡萄糖反应产物的  $G'$  与  $G''$ 。

**关键词:** 米渣蛋白; 糖基化反应; 谷氨酰胺转氨酶; 流变性

文章编号: 1673-9078(2016)3-98-105

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.017

## Effects of Transglutaminase on the Structure and Rheological Properties of Products from the Glycosylation of Rice Dreg Protein

ZHU Xiao-yan, MAO Jin-yuan, ZHAO Qiang, LEI Li, XIONG Hua

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** In order to investigate the role of transglutaminase (TG) on the modification of vegetable proteins using Maillard reaction, rice dreg protein (RDP) was used in the present study for glycosylation reactions in a dry state with glucose, ribose, and maltodextrin separately in a mass ratio of 1:1, and the effect of adding TG (10  $\mu\text{g}$  RDP) on the structure and rheological properties of RDP-sugar conjugates was studied. The results showed that the Maillard reaction products (MRPs) of RDP with ribose exhibited the highest degree of substitution (DS) and TG could enhance the DS. The  $\lambda_{\text{max}}$  of the intrinsic fluorescence was redshifted and their intensity decreased. Additionally, FTIR spectra showed significant changes in the structure of different products, while TG had little effect on the structure of the products. Glycosylation reaction could reduce the surface hydrophobicity, while TG could increase it. During the Maillard reaction, lysine (Lys) and arginine (Arg) contents were reduced and the histidine (His) content was increased. Additionally, ribose was conducive for the reaction with free amino groups, while TG had no impact on the amino acid composition. Rheology measurement indicated that all MRP solutions were pseudoplastic fluid. The maximum apparent viscosity was detected in ribose-grafted products and TG promoted the increase in apparent viscosity. Mechanical spectra showed that the dynamic shear moduli of the three kinds of MRPs displayed significant changes with increasing frequency. The MRPs of RDP-ribose exhibited gel-like characteristics with  $G' > G''$  and both values were higher than that of RDP. TG increased  $G'$  and  $G''$  values of MRPs from ribose or glucose glycosylated and cross-linked RDP.

**Keywords:** glycosylation; rheological properties; rice dreg protein; transglutaminase

米渣是大米深加工生产糖浆、味精的副产物, 产

收稿日期: 2015-05-15

基金项目: 国家“863”计划基金(2013AA102203-5); 江西省自然科学基金(20142BAB213006); 科技支撑计划(20151BBF60041); 教育厅青年基金(GJJ13020)

作者简介: 朱小燕(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学

通讯作者: 赵强(1981-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为植物蛋白质化学与营养、食品资源开发与综合利用、食品乳液及微胶囊等

量, 价格便宜, 一般含有 50% 以上的蛋白, 是一种优质蛋白资源<sup>[1]</sup>, 由于其加工性能差, 利用率低。本课题组前期在米渣蛋白(RDP)的改性研究方面做过一些工作, 如 RDP 的糖基化<sup>[1]</sup>、酶法水解<sup>[2]</sup>及米肽提高乳液物理、化学稳定性<sup>[3]</sup>等, 为提高蛋白的溶解性、乳化性等功能性质, 使其得到开发利用。

谷氨酰胺转氨酶(TG, EC 2.3.2.13), 全称蛋白质-谷氨酸- $\gamma$ -谷氨酰胺基转移酶, 能够催化蛋白质分子

中赖氨酸残基上的  $\epsilon$ -氨基和谷氨酰胺残基上的  $\gamma$ -羟酰胺基之间发生结合反应,使蛋白质分子内和分子间形成  $\epsilon$ -( $\gamma$ -谷氨酰基)赖氨酸肽键,通过此交联反应使较小蛋白质分子形成大分子的蛋白质聚合物,从而改善蛋白的功能性质,如弹性、黏合性、保水性等<sup>[4]</sup>。据文献报道, TG 可以交联小麦或大米中的谷蛋白形成高聚物因而可以改良面包或米粉的质构<sup>[5,6]</sup>。

糖基化是近年来食品蛋白质改性中另一种很有前途的方法,可以充分利用蛋白的表面性能(空气/水或油/水界面的吸附能力)与还原糖具有的较好持水、增稠性能<sup>[7]</sup>,并已在酪蛋白<sup>[7,8]</sup>、乳清蛋白<sup>[9]</sup>、花生蛋白<sup>[10]</sup>、大豆分离蛋白<sup>[11]</sup>等的改性应用方面显现优势。但是美拉德类糖基化反应也有很多的不足,如产生有毒和致畸化合物、褐变、营养丢失及反应时间长等问题存在<sup>[12]</sup>。酶促糖基化,被认为是一种有潜力的蛋白改性方法,相关报道较少,主要是利用 TG 可以与氨基葡萄糖交联,促进与蛋白糖基化反应。Gan<sup>[13]</sup>用 TG 酶交联后的大豆蛋白与核糖、葡萄糖发生美拉德反应,结果显示流变学性能有一定的提高。然而,非氨基葡萄糖类还原糖与食品蛋白质在 TG 参与下的糖基化反应如何, TG 能否对糖基化产物的结构和性能产生影响,尚未见文献报道。

因此,本实验将研究葡萄糖与核糖两种单糖及麦芽糊精分别与 RDP 进行的糖基化反应中 TG 的加入对产物的结构以及流变学特性的影响,为蛋白质酶法或化学法改性的进一步研究提供理论依据,同时为 RDP 的综合开发和应用研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

#### 1.1.1 材料与试剂

米渣,江西恒天实业有限公司;谷氨酰胺转氨酶,江苏一鸣生物科技有限公司;葡萄糖、核糖、麦芽糊精,天津光复精细化工有限公司;大豆油,市售;2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)、1-苯胺基萘-8-磺酸(ANS)、美国 Sigma 公司;磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、盐酸、氢氧化钠等试剂,均为分析纯。

#### 1.1.2 主要仪器与设备

LXJ-IIB 离心机,上海安亭析科学仪器厂;新世纪 T6 紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限公司;S-433 全自动氨基酸分析仪,德国 SYKAM 公司;F-4500 荧光分光光度计,日本日立公司;Nicolet 5700 傅里叶变换红外光谱仪,美国 Thermo Nicolet 公司;DHR-2 流变仪,美国 TA 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 米渣蛋白(RDP)的提取及糖基化产物(MRP)制备

RDP 的提取:采用本课题组已报道的方法进行<sup>[14]</sup>。采用凯氏定氮法测定所得 RDP 的蛋白含量约为 90%,氮转化系数为 5.95。

糖基化产物的制备:将 RDP 分别与葡萄糖、核糖、麦芽糊精按照质量比 1:1 进行配制,加入去离子水配成 10% 的悬浮液,然后以 10  $\mu$ g RDP 加入 TG,以未加入 TG 的反应体系作为对照,用 0.1 M NaOH 溶液调 pH 至 7.0,充分混合均匀后冻干。将冻干后的样品在温度为 60  $^{\circ}$ C,湿度为 79% 的环境下反应,分别取出反应 0、1、3、5、7 d 后的样品即 MRPs,放到 -18  $^{\circ}$ C 冰箱里待用。

#### 1.2.2 接枝度(DS)的测定

接枝度的测定参考 Li 等人<sup>[15]</sup>的方法。准确称取一定量的样品,用去离子水配成 2% (*m/V*) 溶液,取 0.5 mL 样品溶液于试管中,加入 0.1% (*m/V*) SDS 溶液 3 mL,涡旋振荡混合均匀;从中取出 0.5 mL 加入 PBS (0.05 M, pH 8.2) 溶液 2 mL 于试管中,再加入 0.1% (*m/V*) TNBS 溶液 1 mL,混合均匀,在 50  $^{\circ}$ C 水浴中避光反应 1 h;取出后加入 0.1 mol/L 的三氯乙酸 1 mL 终止反应,室温下放置 30 min 后,在 340 nm 波长下测定其吸光度。

$$\text{计算式为: } DS (\%) = (A_0 - A_t) \times 100 / A_0$$

其中:  $A_0$  为接枝反应前样品的吸光度;  $A_t$  为反应 t 时刻后样品的吸光度。

#### 1.2.3 表面疏水性的测定

MRPs 表面疏水性的测定采用荧光探针剂 ANS (1-苯胺基-8-萘磺酸、1-anilino-8-naph-thalene sulfonic acid) 法<sup>[16]</sup>。用磷酸缓冲液 (pH 7.0) 配制 0.05% (*m/V*) 的 MRPs 溶液,利用分散机以 12000 r/min 均质 1 min 后,用磷酸缓冲液逐步稀释浓度至 0.005%~0.025% (*m/V*),取不同浓度的样品各 4 mL,分别加入 8 mmol/L 的 ANS 溶液 20  $\mu$ L,立即漩涡混匀 5 s,避光静置 10 min,在激发波长 390 nm,发射波长 470 nm 下检测发射荧光强度,用荧光强度对 MRPs 溶液质量浓度进行线性回归作图,以斜率作为表面疏水性指数 ( $H_0$ )。

#### 1.2.4 内源荧光的测定

将 MRPs 溶解在磷酸缓冲液 (pH 7.0) 中配成 5 mg/mL,利用分散机分散均匀,在激发波长为 280 nm,发射波长从 290 nm~500 nm,狭缝宽度为 5 nm 下进行荧光扫描。

### 1.2.5 傅里叶红外光谱 (FT-IR) 分析

蛋白样品与 KBr 经干燥处理后, 称取 5 mg 样品粉末与 200 mg KBr 研磨均匀, 然后压片, 测定 FT-IR。扫描范围 4000~400  $\text{cm}^{-1}$ , 分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ , 扫描次数为 32 次。

### 1.2.6 氨基酸分析

精确称取 100 mg 蛋白样品于 20 mL 安培管中, 加入 6 mol/L HCL 溶液 10 mL, 配制的盐酸溶液中有 0.1% 的苯酚, 充氮气约 15 min 以排除空气, 封管; 在 110  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中水解 24 h, 水解完成后, 冷却, 混匀, 开管, 过滤; 用超纯水定量至 50 mL; 取适量 (0.5 mL 左右) 滤液置于干净培养皿中, 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴蒸干, 重复蒸干 1~2 次; 加入 3~5 mL 样品稀释液 (pH 2.2), 使氨基酸浓度达到 50~250 nmol/mL。震荡混匀, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后, 供日立 L-8800 型氨基酸自动分析仪测定使用。

### 1.2.7 流变性质的测定

用去离子水将样品配制成质量浓度为 10% 的溶液, 分散均匀后 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 24 h 后进行测试。设定 DHR-2 型流变仪的实验参数: 在 25  $^{\circ}\text{C}$  下, 40 mm 平板夹具, 间隙设为 1 mm, 1% 应变条件下, 测定表观粘度及剪切应力随剪切速率 (0.1~100  $\text{s}^{-1}$ ) 的变化。粘弹性质的测试, 选择线形粘弹性范围内 1% 的应变, 对样品进行频率扫描 ( $f=0.1\sim 1000 \text{ rad/s}$ ), 测定弹性模量 ( $G'$ ) 和黏性模量 ( $G''$ )。

### 1.2.8 实验数据处理

采用 origin 8.5 软件对实验数据进行 ANOVA 统计分析, 差异显著性分析限定为  $p<0.05$ , 并采用 Tukey test 检验, 实验都是三次平行两个重复。

## 2 结果与讨论

### 2.1 接枝度

图 1 显示, DS 随着反应的进行而增大, 初始阶段, 增加得比较快, 这是因为溶液中的自由氨基消耗迅速, 接着趋于平缓, 最后 DS 呈现降低的趋势, 原因可能是接枝物部分降解或者接枝物进一步聚合使反应体系颜色降低所造成; 但是随着糖的分子量的增大而减少, 糖基化反应中 DS 最高的是核糖, 其次是葡萄糖和麦芽糊精; 这与 Li<sup>[15]</sup>、Corzo-Martínez<sup>[17]</sup> 等人的研究结果一致, DS 和糖的分子量大小有一定线性关系, 分子量小、分子链短并伸展开易与自由氨基反应有利于接枝反应的进行, 较大的分子量形成一定的空间位阻影响反应的进行<sup>[18]</sup>。加入 TG 能增加糖基化反应的 DS, 反应到 7 d 时, 加入 TG 后, 与葡萄糖和

核糖反应的 DS 分别由 10.30% 增加到 16.64%, 和由 24.53% 增加到 39.94%, 其中与麦芽糊精反应的 DS 最低, 仅在 10% 左右。据此可知, TG 可以进一步促进美拉德反应的进行, 可能的原因是 TG 促进 RDP 交联, 进而催化了 RDP 中的自由氨基与还原糖发生糖基化交联反应。

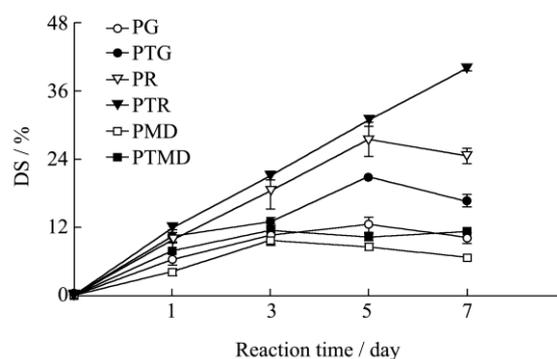


图 1 米渣蛋白糖基化反应过程接枝度的变化

Fig.1 Changes in the degree of substitution (DS) during the glycosylation of RDP

注: P为RDP, G为葡萄糖, R为核糖, MD为麦芽糊精, T为TG, 下同。

### 2.2 内源荧光

图 2 反映了米渣蛋白与不同分子量糖进行糖基化反应, 以及加入 TG 对荧光强度的影响。随着糖基化反应的进行, 荧光强度不断地降低, Sun<sup>[19]</sup>、Spotti<sup>[20]</sup> 以及 Jim énez-Castaño<sup>[21]</sup> 等人也发现了相似的结果, 可能是由于多糖链的产生对蛋白造成屏蔽效果, 因而荧光强度降低。从图中不难发现, 与核糖反应得到的 MRPs 的荧光强度变化最为明显, 其次是葡萄糖、麦芽糊精, 这与接枝度的结果变化相一致。同时, 从荧光图谱中可知, 随着反应的进行, 所有荧光曲线最大发射波长 ( $\lambda_{\text{max}}$ ) 都存在一定程度的红移, 一方面说明色氨酸荧光  $\lambda_{\text{max}}$  发生变化, 即代表蛋白质中的色氨酸残基的相对位置发生了移动, 表明蛋白质三级结构发生了变化, 从而导致了荧光的变化; 另一方面, 红移表明色氨酸残基亲水性增加从而使 MRPs 的溶解性增强<sup>[22]</sup>。此外, 相比于未加 TG, 在整个反应过程中, TG 酶对反应产物的荧光  $\lambda_{\text{max}}$  及强度影响较小。

### 2.3 FT-IR

蛋白糖基化反应过程中蛋白结构的变化, 可以通过红外光谱法检测得到。图 3 显示糖基化 RDP 的红外光谱, 有很明显的糖类物质的特征吸收峰。波数 3600~3000  $\text{cm}^{-1}$  吸收峰是糖分子内或分子间-OH 的伸缩振动所引起, 1000~1070  $\text{cm}^{-1}$  吸收峰是糖分子中 C-O-C 官能团的伸缩振动和糖环存在的典型特征。由

于肽键是一种酰胺键，蛋白质的特征吸收谱带酰胺 I 带  $1632\text{ cm}^{-1}$ ，酰胺 II 带  $1537\text{ cm}^{-1}$ ，酰胺 III 带  $1241\sim 1472\text{ cm}^{-1}$ ，氨基酸残基变化可引起蛋白质结构的变化<sup>[12]</sup>。不同的分子量的糖与蛋白的 MRP 在酰胺带 ( $1700\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ ) 以及糖类物质的特征吸收峰 ( $3600\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ ) 有明显的不同，但是加入 TG 与未加入 TG 的糖基化产物的红外光谱没有显著区别，说明 TG 对糖基化蛋白的结构影响较小，此结果和内源荧光的测试结果相一致。

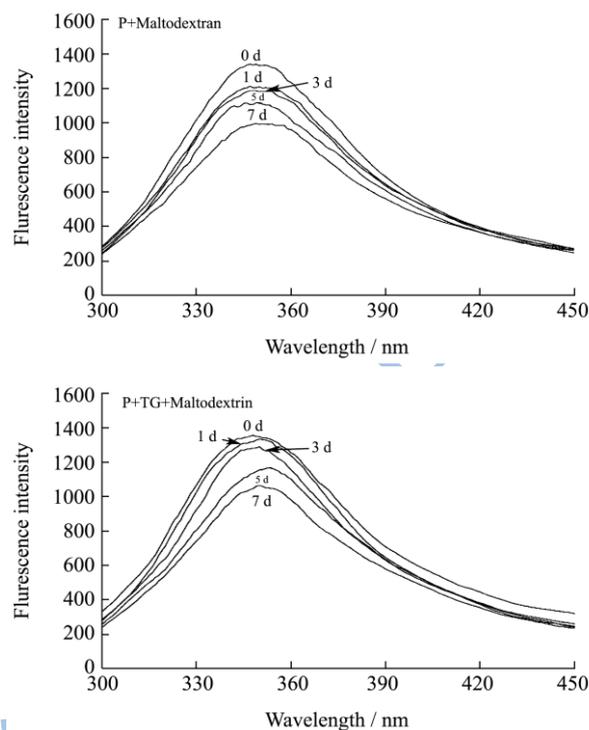
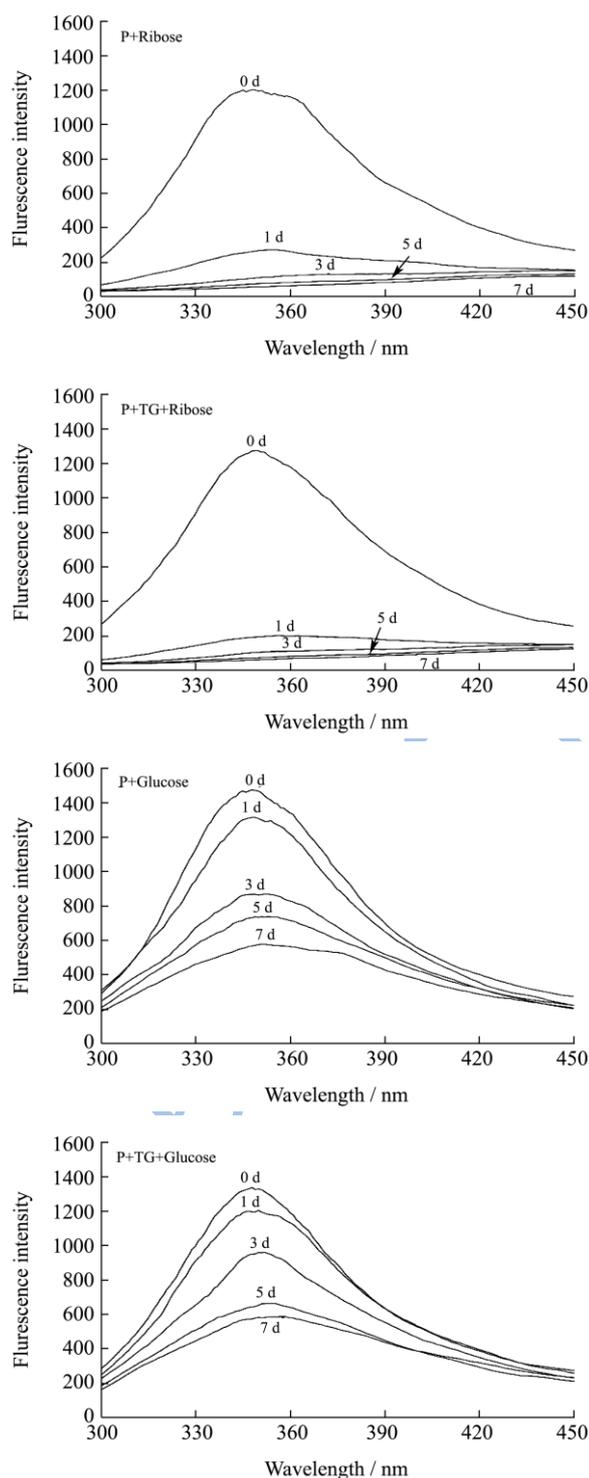


图 2 米渣蛋白糖基化反应产物的荧光发射光谱

Fig.2 Emission fluorescence spectra of the products from the glycosylation of RDP

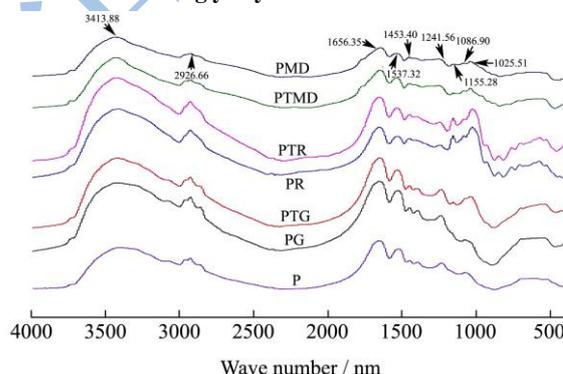


图 3 糖基化反应 5 d 后样品的红外谱图

Fig.3 FT-IR spectra of the samples after five days of glycosylation

## 2.4 表面疏水性

RDP 与不同分子量糖以及有无 TG 的糖基化反应进行 5 d 后产物的  $H_0$  变化见图 4。由图可知，米渣蛋白的表面疏水值达到 10095，而 MRP 的  $H_0$  明显降低，此结果与 Zhang<sup>[23]</sup> 等人采用葡聚糖与  $\beta$  伴大豆球蛋白糖基化反应的发现一致，美拉德反应一方面使得蛋白质分子间暴露的疏水基团数目减少，另一方面，蛋白质与糖形成的接枝物由于糖链的引入，多羟基的亲水特性可使整个分子表面的疏水性减弱，溶解性提高；糖与蛋白糖基化反应，未加入 TG 的 MRP 分别来自于葡萄糖、麦芽糊精、核糖的  $H_0$  依次为 738、2358、3547，

同是单糖的葡萄糖较核糖-OH 基团更多, 可能是其对应的 MRP 表面疏水性相对较小的原因, 而对于较大分子的麦芽糊精与蛋白接枝反应, 其  $H_0$  也可能是由于蛋白疏水性基团相互交联或是 S-H/S-S 的相互转化导致的结果, Huang 等人<sup>[24]</sup>报道, 蛋白分子失去球状构象时长时间加热、蛋白质分子出现老化、通过疏水相互作用的聚集、或 S-H/S-S 的相互转化, 可导致表面疏水性下降。加入 TG 后, 葡萄糖、麦芽糊精、核糖对应的 MRP 的  $H_0$  值均增加, 依次为 1370、2984、3849, 此结果与 Jiang<sup>[11]</sup>等人报道 TG 会促进蛋白分子间或分子内的交联使蛋白的  $H_0$  增加一致。由此可知, 在还原糖与蛋白糖基化反应的过程中, TG 的添加促进了蛋白之间的交联, 这与接枝度结果一致, 进而催化了糖与蛋白之间的糖基化反应, 使得加入 TG 的反应体系  $H_0$  更高。

### 2.5 氨基酸组成

在美拉德反应过程中, 氨基酸会发生热降解, 与还原糖发生接枝反应, 以及蛋白之间的交联都会导致氨基酸的消耗。因此, 通过对氨基酸组成变化的分析可以对美拉德反应程度, 以及反应产物的营养价值提供数据参考。对 RDP 及糖基化反应 5 天后几种产物的氨基酸组成分析见表 1。通过对氨基酸含量进行分析, RDP 氨基酸中主要是 Lys 和 Arg 的含量减少, 这是由于 Lys 和 Arg 的侧链上存在自由氨基, 直接参与了糖

基化反应。从表中可知, RDP 与葡萄糖、核糖、麦芽糊精糖基化反应过程中 Lys 的含量分别从 2.7 下降到 1.5、0.8、2.1, 说明核糖相比于另外两种糖有利于 RDP 中 Lys 自由氨基的反应, 同样 Arg 也由 10.8 分别降至 6.2、2.0、10.1, 这与 DS、内源荧光的结果一致, 表明核糖较葡萄糖、麦芽糊精更易与 RDP 发生糖基化反应。糖基化反应过程中有 TG 参与后, 产物中 Lys 和 Arg 的含量几乎无变化, 与内源荧光强度的结果是一致的。另外从表中可知, 组氨酸的含量在糖基化反应后有显著提高, 表明美拉德产物部分降解产生了组氨酸, 其它氨基酸的含量均未有明显变化, 整体上看, 糖基化反应不会影响 RDP 的营养价值。

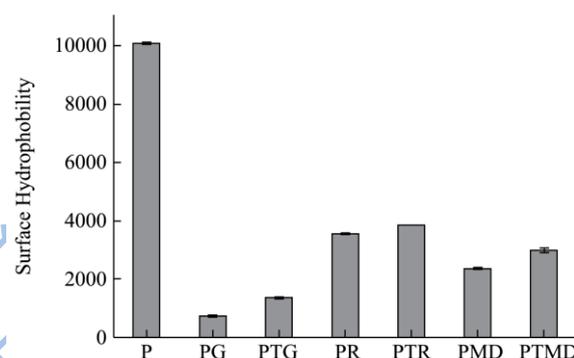


图 4 糖基化反应 5 d 后 MRP 的表面疏水性

Fig.4 Surface hydrophobicity of MRPs after five days of glycosylation

表 1 糖基化反应 5 天后 MRP 的氨基酸组成 (g/100 g 氨基酸)

Table 1 Amino acid components of MRPs after five days of glycosylation (g/100 g amino acid)

氨基酸组成	P	P+G	P+TG+G	P+R	P+TG+R	P+MD	P+TG+MD
天冬氨酸 (Asp)	10.1	10.7	10.7	11.2	11.2	10.4	10.2
苏氨酸 (Thr)	3.5	3.7	3.7	3.9	3.8	3.6	3.5
丝氨酸 (Ser)	5.6	6.0	5.8	6.4	6.2	5.8	5.7
谷氨酸 (Glu)	20.9	22.0	22.2	23.0	23.3	21.6	21.2
甘氨酸 (Gly)	5.5	5.4	5.4	5.5	5.5	5.2	4.9
丙氨酸 (Ala)	5.4	5.6	5.7	5.6	5.5	5.4	4.9
半胱氨酸 (Cys)	0.8	0.7	0.7	1.0	1.0	0.7	1.3
缬氨酸 (Val)	6.1	6.4	6.0	6.7	6.8	6.3	6.0
蛋氨酸 (Met)	1.2	1.2	1.1	1.1	1.3	1.0	1.2
异亮氨酸 (Ile)	4.1	4.3	4.3	4.4	4.5	4.1	4.0
亮氨酸 (Leu)	8.2	8.4	8.5	8.8	8.9	8.2	8.0
酪氨酸 (Try)	5.3	4.8	4.9	4.8	4.5	4.4	4.9
苯丙氨酸 (Phe)	5.9	6.1	6.1	6.8	6.8	6.1	6.4
组氨酸 (His)	<b>4.0</b>	<b>6.9</b>	<b>6.7</b>	<b>8.0</b>	<b>7.9</b>	<b>5.1</b>	<b>6.2</b>
赖氨酸 (Lys)	<b>2.7</b>	<b>1.5</b>	<b>1.4</b>	<b>0.8</b>	<b>0.6</b>	<b>2.1</b>	<b>2.1</b>
精氨酸 (Arg)	<b>10.8</b>	<b>6.2</b>	<b>6.1</b>	<b>2.0</b>	<b>1.9</b>	<b>10.1</b>	<b>9.5</b>
总量	100.1	99.9	99.3	100	99.7	100.1	100

## 2.6 流变性质

### 2.6.1 表观粘度

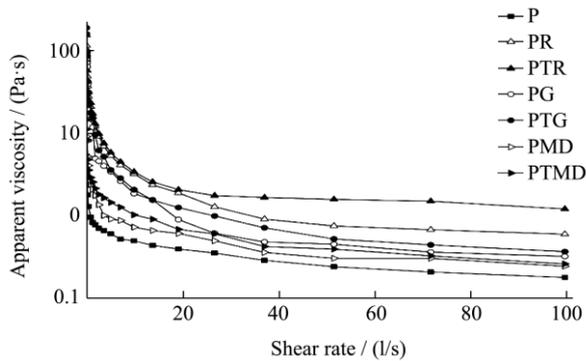


图5 糖基化反应 5 d 后 MRPs 的表观粘度-剪切速率的关系  
**Fig.5 Relationship between viscosity and shear rate of MRPs after five days of glycosylation**

图 5 为样品在 10% 的浓度下表观粘度与剪切速率之间的关系。图中显示，所有的样品的表观粘度随剪切速率的增大而降低，当剪切速率达到  $20\text{ s}^{-1}$  时，溶液的表观粘度趋于平缓，这是假塑性流体所特有的剪切变稀现象；与原 RDP 相比，MRPs 的溶液表现出更高的表观粘度，说明糖基化反应对蛋白溶液的粘稠性有增强作用，这是由于糖基化反应会增加蛋白分子之间以及蛋白与水分子之间的吸引力<sup>[17]</sup>；从图中可知，RDP 与核糖反应得到的 MRPs 的表观粘度最大，是原 RDP 的 10 多倍，葡萄糖次之，麦芽糊精相对最小，可能是由于核糖分子量小，避免了大分子共价交联使得空间位阻增大，易与 RDP 中自由氨基接触进而反应，糖基化反应程度更高，所得产物的表观粘度越大。

加入 TG 后反应体系中的 MRPs 的表观粘度均更高，Jiang<sup>[11]</sup>、Gan<sup>[13]</sup>、Song<sup>[25]</sup>等人用 TG 处理大豆蛋白后表观粘度也都有一定的提高，可能是 TG 可使蛋白分子内或分子间交联形成大分子的聚合物，提高了反应产物的表观粘度。分析 TG 加入体系前后的结果，表明 TG 与糖基化反应对提高蛋白的表观粘度可能有协同效应。

### 2.6.2 动态粘弹性

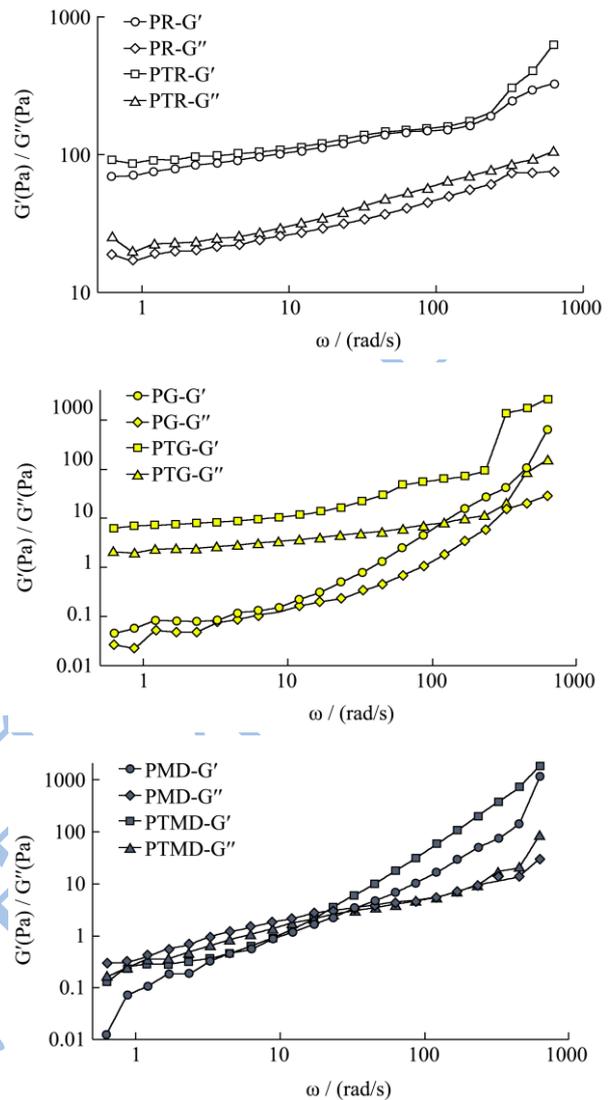
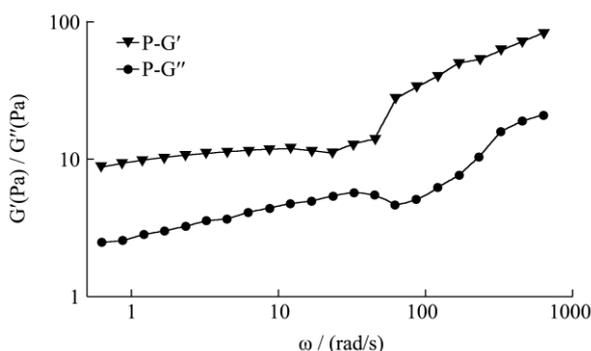


图 6 糖基化反应 5 天后 MRPs 的动态粘弹性-频率的关系  
**Fig.6 Relationship between dynamic viscoelasticity and frequency sweeps of MRP after five days of glycosylation**

MRPs 及 RDP 的动态粘弹性与频率的关系见图 6。从图中可知，所有样品的弹性模量和黏性模量都随着剪切频率的增大而升高；与 RDP 相比，核糖糖基化产物的模量都大于 RDP，弹性模量一直大于黏性模量，表现出类似凝胶特性，而对于葡萄糖和麦芽糊精，分别在剪切频率小于  $325\text{ rad/s}$  和  $234\text{ rad/s}$  时两种模量均小于 RDP。相比之下，随着剪切速率的增加，核糖模量的变化较葡萄糖、麦芽糊精整体趋缓，变化不大，可能是核糖更易和蛋白发生糖基化反应，且产物的网络结构比较紧密，因而增强了网络结构的稳定性，能够抵抗高频剪切对体系内部结构的影响<sup>[17]</sup>。葡萄糖糖基化产物的弹性模量大于黏性模量，但没有表现出很好的凝胶性能，另外，尽管数值上两者随着剪切速率的升高而增大，但在低频时均小于 1 且小于 RDP，表现为牛顿或稍假塑性流体特性，可能是美拉德共价交

联部分改变了 RDP 的二级结构或巯基组成,使其凝胶网络结构稳定性变差所致;还可能是反应过程中大量分子间、分子内的交联造成高分子聚合产物的形成,不便于蛋白结构的展开及凝胶网络发展,影响其凝胶特性<sup>[9, 20]</sup>。对于麦芽糊精糖基化反应产物,在低频率区 ( $<45 \text{ rad/s}$ )  $G' < G''$ , 表现为流体特性,以黏性特征为主,随着频率的增加,  $G' > G''$ , 样品以弹性特征为主,整个过程中模量的增加依赖于频率的变化。

当体系中加入 TG 酶后,葡萄糖、核糖与蛋白反应产物的模量均有较大提高,而麦芽糊精反应产物的黏性模量和在中间频率的弹性模量几乎无变化。Truong<sup>[9]</sup>、Song<sup>[25]</sup>等人研究用 TG 分别促进乳清蛋白、酪蛋白交联同样得到了模量提高的结果。关联前文所述,葡萄糖、核糖较麦芽糊精分子量小、分子链短易与自由氨基反应,以致于小分子的糖与暴露的蛋白疏水性基团交联,可促进蛋白质的凝胶化,同时有限的交联可提高凝胶网络结构的强度<sup>[9]</sup>,且从结果来看,核糖较葡萄糖通过羟基可能是更有利于形成氢键,从而提高凝胶性<sup>[25]</sup>;相反,麦芽糊精较大的分子量形成一定的空间位阻影响反应的进行,同时可能是分子间高聚物的形成、交联蛋白分子内键可阻碍蛋白去折叠,从而抑制凝胶网络的形成。

### 3 结论

3.1 随着反应的进行, RDP 与核糖进行糖基化反应的产物接枝度最高, TG 酶在一定程度上可以提高反应的接枝度;荧光强度明显降低,与核糖进行反应的 MRPs 的变化最为明显,其次是葡萄糖、麦芽糊精;红外光谱显示不同的 MRPs 的结构不同,但是 TG 酶对反应产物的结构影响较小;糖基化反应可以降低表面疏水性从 10095 到 737,而 TG 促进  $H_0$  增大; RDP 氨基酸中主要是 Lys 和 Arg 的含量减少,组氨酸含量增加,核糖相比于另外两种糖有利于 RDP 中 Lys 和 Arg 自由氨基的反应, TG 参与对反应体系氨基酸组成无影响;

3.2 考察流变学特性,所有样品都表现出假塑性流体所特有的剪切稀化的现象, MRPs 的表现粘度高于 RDP;同时核糖糖基化产物较 RDP 的弹性模量和黏性模量均有一定的提高,且随着频率的增加,模量变化趋缓,结构比较稳定。TG 可以提高 MRPs 的表现粘度,对核糖、葡萄糖 TG 交联 RDP 的 MRPs 的  $G'$ 、 $G''$  有较大提高。

### 参考文献

[1] Du Y, S Shi, Y Jiang, et al. Physicochemical properties and

emulsion stabilization of rice dreg glutelin conjugated with  $\kappa$ -carrageenan through Maillard reaction [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2013, 93(1): 125-133

[2] Zhao Q, H Xiong, C Selomulya, et al. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins [J]. Food Chemistry, 2012, 134(3): 1360-7

[3] Zhao Q, C Selomulya, S Wang, et al. Enhancing the oxidative stability of food emulsions with rice dreg protein hydrolysate [J]. Food Research International, 2012, 48(2): 876-884

[4] De Jong G, S Koppelman. Transglutaminase catalyzed reactions: impact on food applications [J]. Journal of Food Science, 2002, 67(8): 2798-2806

[5] Renzetti S, F Dal Bello, E K Arendt. Microstructure, fundamental rheology and baking characteristics of batters and breads from different gluten-free flours treated with a microbial transglutaminase [J]. Journal of Cereal Science, 2008, 48(1): 33-45

[6] Renzetti S, J Behr, R F Vogel, et al. Transglutaminase treatment of brown rice flour: A chromatographic, electrophoretic and spectroscopic study of protein modifications [J]. Food chemistry, 2012, 131(4): 1076-1085

[7] Flanagan J, H Singh. Conjugation of sodium caseinate and gum arabic catalyzed by transglutaminase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(19): 7305-7310

[8] Jiang S J, X H Zhao. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation of casein and some functional properties of the modified product [J]. International Dairy Journal, 2011, 21(4): 198-205

[9] Truong V D, D A Clare, G L Catignani, et al. Cross-Linking and rheological changes of whey proteins treated with microbial transglutaminase [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(5): 1170-1176

[10] Feng X L, H Z Liu, A M Shi, et al. Effects of transglutaminase catalyzed crosslinking on physicochemical characteristics of arachin and conarachin-rich peanut protein fractions [J]. Food Research International, 2014, 62(0): 84-90

[11] Jiang S J, X H Zhao. Transglutaminase-induced cross-linking and glucosamine conjugation in soybean protein isolates and its impacts on some functional properties of the products [J]. European Food Research and Technology, 2010, 231(5): 679-689

[12] Song C L, X H Zhao. Structure and property modification of an oligochitosan-glycosylated and crosslinked soybean protein generated by microbial transglutaminase [J]. Food

- Chemistry, 2014, 163: 114-9
- [13] Gan C Y, A A Latiff, L H Cheng, et al. Gelling of microbial transglutaminase cross-linked soy protein in the presence of ribose and sucrose [J]. *Food Research International*, 2009, 42(10): 1373-1380
- [14] Zhao Q, H Xiong, C Selomulya, et al. Effects of spray drying and freeze drying on the properties of protein isolate from rice dreg protein [J]. *Food and Bioprocess Technology*, 2012, 6(7): 1759-1769
- [15] Li Y, F Lu, C Luo, et al. Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar [J]. *Food Chemistry*, 2009, 117(1): 69-74
- [16] Kato A, Nakai S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 1980, 624:13-20
- [17] Corzo-Mart ínez M, F J Moreno, M illamiel, et al. Characterization and improvement of rheological properties of sodium caseinate glycated with galactose, lactose and dextran [J]. *Food Hydrocolloids*, 2010, 24(1): 88-97
- [18] Nacka F, J M Chobert, T Burova, et al. Induction of new physicochemical and functional properties by the glycosylation of whey proteins [J]. *Journal of Protein Chemistry*, 1998, 17(5): 495-503
- [19] Sun Y, S Hayakawa, K Izumori. Modification of ovalbumin with a rare ketohexose through the Maillard reaction: effect on protein structure and gel properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(5): 1293-1299
- [20] Spotti M J, M J Martinez, A M R Pilosof, et al. Influence of Maillard conjugation on structural characteristics and rheological properties of whey protein/dextran systems [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 39: 223-230
- [21] Jiménez-Castaño L, M Villamiel, R López-Fandiño. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass [J]. *Food Hydrocolloids*, 2007, 21(3): 433-443
- [22] Vivian J T, Callis P R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins [J]. *Biophysical Journal*, 2001, 80(5): 2093-2109
- [23] Zhang X, J R Qi, K K Li, et al. Characterization of soy  $\beta$ -conglycinin-dextran conjugate prepared by Maillard reaction in crowded liquid system [J]. *Food Research International*, 2012, 49(2): 648-654
- [24] 黄曼, 卞科. 理化因子对大豆蛋白疏水性的影响[J]. *郑州工程学院学报*, 2002, 23(3): 5-9  
HUANG Man, BIAN Ke. Effects of physicochemical factors on the hydrophobicity of soybean protein [J]. *Journal of Zheng Zhou Institute Technology*, 2002, 23(3) :5-9
- [25] Song C L, X H hao. Rheological, gelling and emulsifying properties of a glycosylated and cross-linked caseinate generated by transglutaminase [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2013, 48(12): 2595-2602