

TGase酶促对蚕蛹蛋白肽组分的鲜味增强作用及伴生危害物分析

杨秋智^{1,2}, 钟赛意¹, 王思远², 王卫飞², 罗东辉³, 田文礼⁴, 方晓明⁴, 李伟欣², 穆利霞^{2,3*}, 邹宇晓^{2,3*}
(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 5240088) (2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (3. 化学与精细化工广东省实验室潮州分中心, 广东潮州 521000) (4. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

摘要: 该研究旨在通过转氨酶诱导糖基化制备蚕蛹蛋白糖肽, 探讨其鲜味增强作用及其危害物分析。首先, 以感官评分、接枝度为评价指标, 在单因素试验的基础上, 通过响应面优化确定 TGase 酶促反应的最佳条件, 再比较高温美拉德反应产物 (High Temperature Maillard Reaction Products, HMP) 与低温酶促反应产物 (Low-Temperature Enzymatic Glycosylation Reaction Products, LEP) 的滋味和危害物之间的差异。结果表明, 低温酶促反应的最佳工艺条件为: 肽/糖比 2.2:1, 蛋白肽质量分数为 6.5%, 反应初始 pH 值为 6.9, 反应温度为 50 °C, TGase 酶质量分数为 3%, 反应时间 4 h。在相同浓度和糖基化程度下, HMP 的丙烯酰胺含量为 113.3 μg/mL; 5-羟甲基糠醛 3.0 μg/mL; 糠醛 1.76 μg/mL, LEP 的丙烯酰胺含量降低至 64.05 μg/mL; 5-羟甲基糠醛 1.96 μg/mL; 糠醛 0.01 μg/mL。LEP 的三大危害物含量均显著低于 HMP, 证明低温酶促反应优于美拉德反应。感官结果显示 HMP 和 LEP 的滋味无显著差异, 与对照组相比, LEP 的感官评分显著增加, 说明低温酶促反应可作为蚕蛹蛋白肽组分增鲜的另外一种有效手段, 研究表明, 综合危害物、感官评价结果分析, 低温酶促反应对蚕蛹蛋白肽组分有增鲜和降低危害物生成的作用。

关键词: 蚕蛹蛋白肽组分; 糖基化; 鲜味; 转谷氨酰胺酶

文章编号: 1673-9078(2025)03-124-133

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.3.1467

Analysis of the Umami-enhancing Effect of TGase-catalyzed Reaction on Peptide Components of Silkworm Pupae Protein and Associated Hazards

YANG Qiuzhi^{1,2}, ZHONG Saiyi¹, WANG Siyuan², WANG Weifei², LUO Donghui³, TIAN Wenli⁴,
FANG Xiaoming⁴, LI Weixin², MU Lixia^{2,3*}, ZOU Yuxiao^{2,3*}

引文格式:

杨秋智, 钟赛意, 王思远, 等. TGase酶促对蚕蛹蛋白肽组分的鲜味增强作用及伴生危害物分析[J]. 现代食品科技, 2025, 41(3): 124-133.

YANG Qiuzhi, ZHONG Saiyi, WANG Siyuan, et al. Analysis of the umami-enhancing effect of tgase-catalyzed reaction on peptide components of silkworm pupae protein and associated hazards [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(3): 124-133.

收稿日期: 2023-12-11

基金项目: 化学与精细化工广东省实验室潮州分中心科技计划项目 (HJL202202B001); 广州市科技计划项 (2023E04J1271); 广东省农业科学院农业优势产业学科团队建设项目 (202119TD); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助 (CARS-18-ZJ0503); 佛山市财政专项资金-2022年高水平广东省农业科技示范市建设资金市院合作项目

作者简介: 杨秋智 (1999-), 女, 硕士, 研究方向: 食品加工与安全; E-mail: 2712781312@qq.com

通讯作者: 邹宇晓 (1973-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 主要从事功能食品方面的研究; E-mail: zouyuxiao@gdaas.cn; 共同通讯作者:

穆利霞 (1980-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 主要从事食品风味方面的研究; E-mail: lisa1980119@126.com

(1.College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)
(2.Sericultural & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Functional Food, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangdong Province, Guangzhou 510610, China)(3.Chaozhou Branch of Chemistry and Chemical Engineering Guangdong Laboratory, Chaozhou 521000, China)(4.Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: The purpose of this study was to prepare silkworm pupa protein glycopeptides by transglutaminase-induced glycosylation, and explore their umami taste-enhancing effect and hazardous substances. On the basis of single factor experiments, the conditions of TGase enzymatic reaction were optimized by the response surface methodology with sensory score and grafting degree as the evaluation indexes. Then, the differences in taste and hazardous substances between the high temperature Maillard reaction products (HMP) and low-temperature enzymatic glycosylation reaction products (LEP) were compared. The results showed that the optimum conditions for low-temperature enzymatic reaction were as follows: peptide/sugar ratio, 2.2:1; protein peptide mass fraction, 6.5%; initial pH of the reaction, 6.9; reaction temperature, 50 °C. mass fraction of TGase enzyme, 3%; reaction time, 4 h. At the same concentration and degree of glycosylation, the contents of acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural and furfural were 113.3 µg/mL, 3.0 µg/mL and 1.76 µg/mL in HMP, respectively. However, in LEP, the contents of acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural and furfural were reduced to 64.05 µg/mL, 1.96 µg/mL and 0.01 µg/mL, respectively. The contents of the three major hazards of LEP were significantly lower than those of HMP, indicating that the low-temperature enzymatic reaction was superior to the Maillard reaction. The sensory results showed that there was insignificant difference in the taste between HMP and LEP. Compared with the control group, the sensory score of LEP was significantly increased, indicating that the low-temperature enzymatic reaction can be used as another effective approach for increasing the umami of silkworm pupa protein peptide components. The results showed that the low-temperature enzymatic reaction could enhance the umami and reduce the formation of hazard substances in silkworm pupa protein peptide fractions on the basis of the hazard and sensory analyses.

Key words: silkworm pupa protein peptide components; glycosylation; umami; transglutaminase

蚕蛹是卫生部批准的“作为普通食品管理的食品新资源名单”中唯一的昆虫类食品,是优质的动物蛋白来源^[1,2]。干蚕蛹中蛋白质含量高达49%~54%,蚕蛹蛋白酶解后有大量呈味氨基酸释放,含量占总氨基酸的40%以上,是制备呈味基料的最佳来源^[3,4]。鲁珍等^[5]发现蚕蛹蛋白酶解后的溶液具有良好的鲜味。杨波等^[6]则发现蚕蛹酶解产物的分子量集中在<1 ku, 鲜甜味氨基酸占总肽类氨基酸约50%。Yu等^[7]从蚕蛹酶解液中分离纯化得到VPY、TAY、AAPY、GFP四种鲜味肽,均有协同增鲜的特性。

然而酶解产物呈味单一,在一定程度上鲜味强度有限,限制了其在食品工业中的发展。而酶解产物的美拉德反应可以弥补其滋味单一的问题^[8,9]。Zhang等^[10]发现花生肽EP-葡萄糖体系在美拉德反应过程中生成焦谷氨酰基脯氨酸和Glu-Pro与葡萄糖的Amadori重排产物两种化合物,后者具有比EP更显著的增鲜效果。Zhang等^[11]发现五种肽(EP、AH、EE、β-AH、RFPHADP)的葡糖胺重排反应产

物均表现出更显著的增鲜效果。尽管美拉德反应可改变食品的风味和颜色,但控制不当会产生有害衍生物,如丙烯酰胺等,危害人体健康,导致癌症和慢性疾病^[12,13]。林光月^[14]发现蚕蛹酶解液经过美拉德反应后会产生伴生危害物质。Habinshtuti等^[15]发现五种蛋白质水解产物美拉德反应后均有5-羟甲基糠醛和羧甲基赖氨酸。

转谷氨酰胺酶(Transglutaminase, TGase)可以催化食品蛋白质/肽中谷氨酰胺残基的γ-酰胺基与含有伯氨基团的糖发生共价结合反应,即酶促糖基化反应^[16]。与美拉德糖基化修饰相比,酶促糖基化反应有反应条件温和、反应速度快、生物安全性好等优势,还可以不同程度地改善蛋白质/肽的功能性质,包括溶解性、热稳定性等^[17]。有研究表明:酶促糖基化反应能改善酶解产物的滋味并降低产物的伴生危害物含量^[18,19]。Wang等^[18]通过TGase酶催化寡聚糖和谷氨酰胺发生糖基化反应,将反应产物添加到海鲷鱼肉肠中,发现显著抑制晚期糖基化

终末产物生成。Guo 等^[19]利用 TGase 酶诱导糖基化法制备胶原糖肽, 当 TGase 酶质量分数为 1.0% 时, 糖肽产品的盐味增强率为 59.0%。

项目组前期研究发现, 蚕蛹蛋白限制性酶解-超滤后可以获得小于 5 ku 的肽组分, 该组分具有突出的鲜甜味, 经美拉德反应后鲜味显著增强, 但有丙烯酰胺、糠醛等伴生危害物产生^[14]。因此, 本实验以蚕蛹蛋白肽组分为原料, 研究 TGase 酶促氨基葡萄糖与蚕蛹蛋白肽组分的共价结合对其鲜味的影响, 在此基础上, 比较低温酶促反应与美拉德反应产生的伴生危害物含量, 明确 TGase 酶促对蚕蛹蛋白肽组分鲜味增效作用的可行性, 以期绿色制备健康的鲜味肽产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 原料与试剂

蚕蛹蛋白: 桑蚕蛹购于黄沙海鲜市场, 灭酶打浆后冻干成粉, 石油醚脱脂过筛除壳后低温风干, 置于 -20 °C 冰箱中备用。

风味蛋白酶 (Flavourzyme 500 mg), 诺维信 (中国) 生物技术有限公司; 转谷氨酰胺酶, 深圳恒生生物科技有限公司; 氨基葡萄糖, 西安超邦生物科技有限公司, 感官评价标准物 (柠檬酸、亮氨酸、谷氨酸钠, 食品级), 广州利成实业有限公司; β -巯基乙醇, 福晨 (天津) 化学试剂有限公司; 邻苯二甲醛 (O-Phthalaldehyde, OPA), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 其余化学试剂 (分析纯), 天津大茂化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市予华仪器有限责任公司; FDU-2110 EYELA 冷冻干燥机, 上海爱朗仪器有限公司; CR22G III 大容量冷冻离心机; 天美科学仪器有限公司广州分公司, Mini Pellicon 超滤系统, 密理博 (中国) 有限公司; METTLER TOLEDO pH 计, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; DU800 紫外可见分光光度计, 岛津企业管理 (中国) 有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蚕蛹蛋白肽组分 (<5 ku) 的制备

在课题组的前期研究上稍作修改^[5]。取适量脱

脂蚕蛹蛋白, 加蒸馏水制备质量分数为 4% 的蛋白匀浆液, 搅拌并均质 30 min, 用摩尔浓度为 6 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0, 添加总蛋白质量分数 8% 的风味蛋白酶, 在 45 °C 水浴锅中酶解 8 h, 反应结束后沸水浴灭酶 15 min, 待样品冷却后使用离心机以 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 使用带有 5 ku 超滤膜的超滤系统, 得到小于 5 ku 的透过液, 真空冷冻干燥 48 h, 保存于 -20 °C 备用。

1.2.2 低温酶促反应产物的制备

将 1.2.1 中制备的蚕蛹蛋白肽组分配制成一定浓度的溶液, 加入适量氨基葡萄糖混合均匀, 用摩尔浓度为 6 mol/L NaOH 或质量分数为 3% 的柠檬酸调节至最适 pH 值, 加入 TGase 酶, 于最适温度下发生反应, 反应结束后于 90 °C 水浴锅钝化 10 min, 冷却至室温得到低温酶促反应产物 (LEP)。

1.2.3 单因素实验

以 1.2.2 方式处理样品, 探究蛋白肽质量分数为 4%、6%、8%、10%、12%, 肽与氨基葡萄糖的质量分数比 (*m/m*) 为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3, TGase 酶质量分数 (按蛋白含量计) 为 1%、3%、5%、7%、9%, 反应 pH 值为 5、6、7、8、9, 反应温度 40、50、60、70、80 °C, 反应时间 2、4、6、8、10 h 等因素对糖基化反应的影响, 通过单因素实验结果确定基本工艺, 在此基础上通过响应面优化, 获得最佳制备工艺。

1.2.4 响应面实验设计

为优化 TGase 修饰糖基化反应工艺, 以蛋白肽质量分数、肽糖比和 pH 值为单因素, 感官评分为响应值, 使用 Design-Expert 13.0 软件进行响应面优化设计。设计因素水平表见表 1。

表 1 响应面实验因子水平

Table 1 Response surface test factor levels

水平	因素		
	A 肽与氨基葡萄糖的质量分数比	B 蛋白肽质量分数/%	C pH 值
1	3:1	4	6
0	2:1	6	7
-1	1:1	8	8

1.2.5 高温美拉德反应产物的制备

将冻干的蚕蛹蛋白肽组分配制成质量分数为 6% 的溶液, 再添加质量分数为 3% 的氨基葡萄糖, pH 值调至 7.0, 在 110 °C 下反应 10 min, 反应结束

后冷却至室温得到高温美拉德反应产物 (HMP)。

1.2.6 接枝度的测定

参考刘俊雅^[20]的方法稍作修改。采用邻苯二甲醛 (OPA) 法测定, OPA 反应试剂的配制方法: 称取 80 mg OPA 置于烧杯中, 加入 2 mL 甲醇溶解, 再加入 5 mL 质量分数为 20% 的十二烷基硫酸钠、200 μL β - 巯基乙醇以及 50 mL 浓度为 0.1 mol/L 的硼砂, 并超声 20 min 溶解混匀, 最后用蒸馏水定容至 100 mL。试剂现配现用, 且在配制和测试时应避光处理。测试时取 200 μL 样品与 4 mL OPA 试剂混合摇匀, 于 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中反应 2 min。反应结束后用冰水终止反应, 在波长为 340 nm 的紫外可见分光光度计测定吸光度, 以 4 mL OPA 试剂和 200 μL 超纯水混合溶液作为空白对照。

接枝度为反应体系中反应前后游离氨基含量的变化率, 按式 (1) 计算。

$$B = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B——接枝度 (DG), %;

A_0 ——未反应结束时样品所对应的吸光度;

A——反应结束时样品所对应的吸光度。

1.2.7 伴生危害物的测定

1.2.7.1 5-羟甲基糠醛与糠醛的测定

根据黄晓雯等^[21]的方法略作修改。将不同样品制备同一浓度的溶液, 并统一过 0.22 μm 水相膜, 用高效液相色谱法测定, 色谱柱条件为: 色谱柱为 Agilent SB-C18 型 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm), 流动相为水: 甲醇 (90:10), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流量 1.0 mL/min, 波长 280 nm, 进样量 20 μL 。以标准品溶液质量浓度 x ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标, 峰面积 y 为纵坐标, 绘制出标准曲线 (质量浓度为 5、25、50、100、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。最后由标准曲线计算得到样品危害物的含量。

1.2.7.2 丙烯酰胺的测定

根据战旭梅等^[22]的方法略作修改。将不同样品制备同一浓度的溶液, 并统一过 0.22 μm 水相膜, 用高效液相色谱法测量, 色谱柱条件为: 色谱柱为 Agilent SB-C18 型 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm), 流动相为水: 乙腈 (80:20), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流量 1.0 mL/min, 波长 200 nm, 进样量 10 μL 。以标准品溶液质量浓度 x ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标, 峰面积 y 为纵坐标, 绘制出标准曲线 (质量浓度为 4、40、80、160、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

最后由标准曲线计算得到样品危害物质的含量。

1.2.8 感官评价

表 2 感官评分表

Table 2 Sensory score table

项目	名称	标准	评分
鲜味 (50%)		鲜味浓郁	9~10
		鲜味明显	7~8
		有鲜味, 较突出	5~6
		有鲜味, 不突出	3~4
		无鲜味	1~2
苦味 (10%)		无苦味	9~10
		略有苦味	7~8
		有苦味, 苦味不明显	5~6
		有苦味, 苦味明显	3~4
		明显苦味	1~2
滋味 80%		无酸味	9~10
		略有酸味	7~8
		有酸味, 酸味不明显	5~6
		有酸味, 酸味明显	3~4
		明显酸味	1~2
酸味 (10%)		无腥味	9~10
		略有腥味	7~8
		腥味一般	5~6
		腥味浓郁	3~4
		腥味刺鼻	1~2
腥味 (10%)		整体口感好, 鲜味突出, 无苦、酸味, 三者协调	9~10
		整体口感较好, 鲜味明显, 存在苦、酸味, 可接受, 三者协调较好	7~8
		整体口感一般, 鲜味不明显, 存在苦、酸味, 可接受, 三者协调一般	5~6
		整体口感差, 无鲜味, 存在苦、酸味, 可接受, 三者协调较差	3~4
		整体口感差, 无鲜味, 苦、酸味明显, 三者协调性差	1~2

注: 表格的百分号表示占总得分的百分比。

由 6 名食品专业成员组成感官小组 (2 名男性, 4 名女性), 并根据 ISO 标准 3972 (2011) 的指南进行训练。对酶解产物和 TGase 酶交联产物的滋味 (鲜味、苦味、酸味、腥味) 及协调性进行评分 (表 2), 以质量分数为 0.05% 亮氨酸 (苦味)、质量分数为 0.35% 谷氨酸钠 (鲜味)、质量分数 0.08% 柠檬酸 (酸味) 为参考溶液, 记为 5 分, 每组反应产物分别量取质量分数为 4% 10 mL 样品并随机编

号, 与 3 种标准品分别进行比较打分, 记录结果。

1.2.9 数据分析

试验数据均为 3 次平行测定结果的平均值, 使用 Excel 2021 和 SPSS 26.0 进行数据统计分析, 所有实验数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 采用 Pro GraphPad Prism 8 软件进行图表绘制。

2 结果与讨论

2.1 低温酶促反应的单因素实验

2.1.1 蛋白肽质量分数对低温酶促反应的影响

由图 1 所示, 在蚕蛹蛋白肽组分与氨基葡萄糖的质量分数比、TGase 酶质量分数、反应时间、pH 值、反应温度等因素恒定的条件下, 蛋白肽质量分数对其接枝度和感官评分具有不同程度的影响。随着蛋白肽质量分数的增加, 低温酶促反应产物 (LEP) 的接枝度显著提高 ($P < 0.05$), 蛋白肽质量分数的增加, 导致自由氨基与羰基碰撞的几率增加, 糖基化反应更容易发生; 蛋白肽质量分数在 12% 时, 接枝度达到 27.44%, 但蛋白肽质量分数在 4%~12% 内未出现下降拐点表明所选浓度未达反应体系的最大值^[23,24]。该研究结果与田洋等^[25]的研究结果类似。在肽质量浓度 $< 15 \text{ mg/mL}$ 范围内, 样品的接枝度随肽浓度的增加呈上升趋势。感官结果表明, LEP 的感官评分随蛋白肽质量分数的增加呈现先增加后降低的趋势, 蛋白肽质量分数为 6% 时, LEP 的感官评分最高 (6.44)。因此, 选择蛋白肽质量分数为 4%、6% 和 8% 进行后续响应面优化。

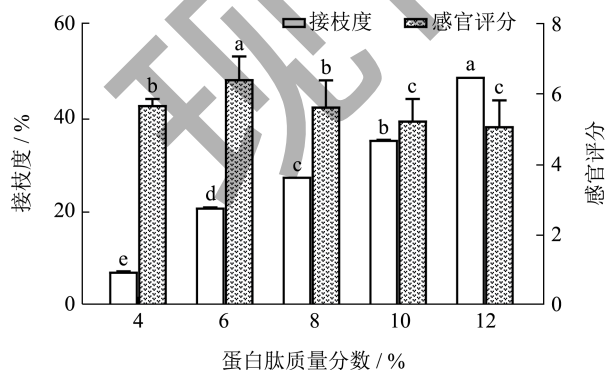


图 1 蛋白肽质量分数对糖基化反应的影响
Fig.1 Effect of protein peptide mass fraction on glycosylation reactions

注: 相同指标标注不同角标者具有显著性差异, $P < 0.05$ 。下图同。

2.1.2 肽糖比对低温酶促反应的影响

由图 2 所示, 在其他因素 (蛋白肽质量分数、TGase 酶质量分数、反应时间、pH 值、反应温度) 恒定的条件下, 蚕蛹蛋白肽组分与氨基葡萄糖的质量分数比对 LEP 的接枝度和感官评分具有不同程度的影响。随着氨基葡萄糖添加量的增加, LEP 的接枝度呈现先升高后降低的趋势。当两者比例为 2:1 时, 其接枝度最高, 达 22.87%, 推测其糖含量的增加有助于提高溶液中游离氨基端与氨基葡萄糖还原末端碰撞的几率, 然而随着糖含量的进一步增加, 游离氨基端含量没有变化, 即参与反应的底物达到饱和^[25]。该研究结果与王晓杰等^[26]的研究结果无显著差异, 即酰基供体一定时, 增大酰基受体达到极限时, 接枝度会逐渐降低。LEP 的感官评分呈现先升高后降低的趋势, 其中两者比例为 2:1 时得分最高, 达 6.90 分, 因此选择蚕蛹蛋白肽组分: 氨基葡萄糖比例为 1:1、2:1、3:1 进行后续的响应面优化。

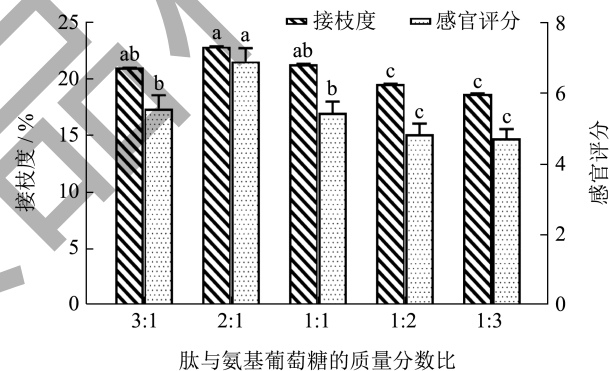


图 2 肽与氨基葡萄糖的质量分数比对糖基化反应的影响
Fig.2 Effect of the mass fraction ratio of peptide to glucosamine on the glycosylation reaction

2.1.3 TGase酶质量分数对低温酶促反应的影响

如图 3 所示, 在其他因素 (蚕蛹蛋白肽组分与氨基葡萄糖的质量分数比、蛋白肽质量分数、反应时间、pH 值、反应温度等) 恒定的条件下, TGase 酶质量分数对 LEP 的接枝度和感官评分具有不同程度的影响。LEP 的接枝度随着 TGase 酶质量分数的增加而增加, 在 TGase 酶质量分数为 7% 时糖基导入最多, 达到 25.59%, 继续增大 TGase 酶质量分数, 接枝度平缓升高。这可能是由于当蛋白肽质量分数一定时, 酶促反应速率与酶质量分数成正比^[27]。但当 TGase 酶质量分数过高时, 增加了蚕蛹蛋白肽组分间互相交联的机会, 较大的空间位阻阻碍糖基的导入, 从而影响蚕蛹蛋白肽组分与氨基葡萄糖的结合^[28]。Guo 等^[19]表明酶添加量过量时会影响酶促反

应的速率,使得胶原蛋白肽的接枝度呈缓慢增加的趋势。感官评分结果显示,当TGase酶质量分数为3%时,LEP的鲜味最突出,感官评分达6.93分。因此选择TGase酶质量分数为3%进行后续的糖基化条件。

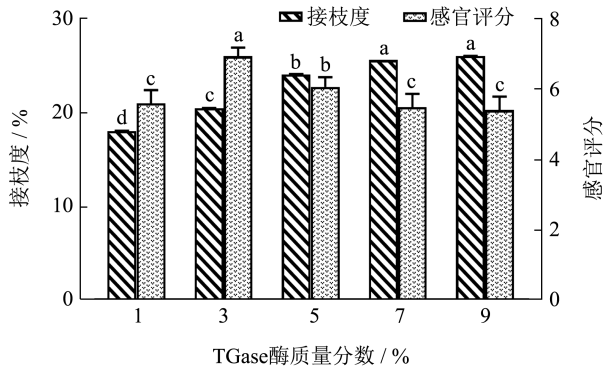


图3 TGase酶质量分数对糖基化反应的影响

Fig.3 Effect of TGase enzyme mass fraction on glycosylation reactions

2.1.4 反应pH值对低温酶促反应的影响

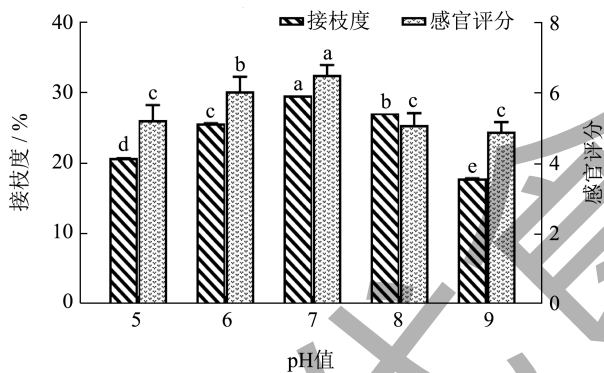


图4 pH值对糖基化反应的影响

Fig.4 Effect of pH on glycosylation reaction

由图4所示,在蚕蛹蛋白肽组分与氨基葡萄糖的质量分数比、蛋白肽质量分数、TGase酶质量分数、反应时间、反应温度等因素恒定的条件下,pH值对LEP的接枝度和感官评分具有不同程度的影响,随着pH值的增大,接枝度呈先升高后降低的趋势,在pH值为7时,接枝度达到最大值(29.51%)。pH值是影响TGase酶催化活力和氨基葡萄糖中氨基解离的一个重要因素^[26]。这可能是由于pH值大于7时,TGase酶催化活力下降或氨基葡萄糖的氨基发生质子化,影响了蚕蛹蛋白肽组分与氨基葡萄糖之间的共价结合反应,导致蚕蛹蛋白肽组分的糖基导入量降低^[29]。该研究结果与汪燕^[30]的研究结果部分吻合,即当pH值为7时,TGase酶的相对活力最大,酶活力大小直接影响酶促反应的速率。感

官评分结果显示,当pH值为7时,LEP的感官评分最高,达6.48分,且鲜味最突出。因此选择pH值为6、7、8进行后续的响应面优化。

2.1.5 反应温度对低温酶促反应的影响

由图5所示,在蚕蛹蛋白肽组分与氨基葡萄糖的质量分数比、蛋白肽质量分数、TGase酶质量分数、反应时间、pH值等因素恒定的条件下,LEP的接枝度和感官评分均随着温度的改变呈现出先升高后降低的趋势。其中反应温度从40℃上升至60℃时,接枝度逐渐增加,在60℃时达到最高,接枝度为29.11%,这可能是由于温度升高导致肽的结构松散,使得蛋白质肽组分内的自由氨基暴露出来,同时温度升高使溶液中的分子运动加快,增加了体系内自由氨基和羰基的碰撞几率,但随着温度的继续升高(60~80℃),接枝度呈现下降趋势,推测可能是高温导致TGase酶活力下降^[31],使得酶促反应速率降低。全越等^[29]研究证明TGase酶的最适温度为50℃,而且样品在50℃和60℃间的接枝度无显著差异。LEP的感官评分在50℃时最高,评分达6.73分,且鲜味突出,因此,选定50℃作为后续糖基化反应的温度。

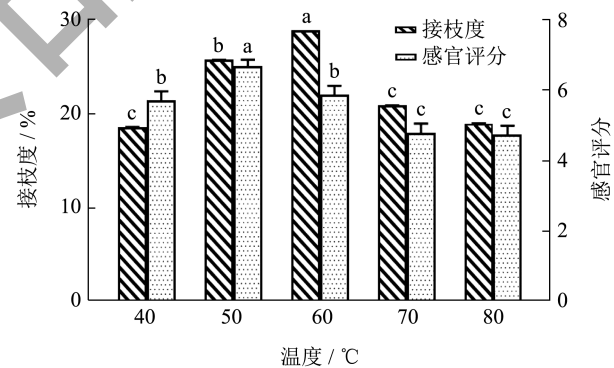


图5 温度对糖基化反应的影响

Fig.5 Effect of temperature on glycosylation reaction

2.1.6 反应时间对低温酶促反应的影响

由图6所示,在蚕蛹蛋白肽组分与氨基葡萄糖的质量分数比、蛋白肽质量分数、TGase酶质量分数、pH值、反应温度等因素恒定的条件下,LEP的接枝度和感官评分均随着反应时间的延长呈现出先升高后降低的趋势。其中反应时间为8h时,接枝度达到29.04%,当反应时间大于8h时,接枝度逐渐下降。可能是由于反应达到一定时间后,酶促反应趋于平衡,产物增加的同时使分子的空间位阻效应更加明显,从而抑制酶促反应的发生,不利于氨基葡萄糖的接入^[26]。Xu等^[32]表明酶促反应经过一定

时间后达到最高值，延长反应时间会导致接枝度呈下降的趋势。在反应至 4 h 时，LEP 的感官评分达到最高，为 6.41 分，因此，选择反应 4 h 为后续的糖基化条件。在最佳的蚕蛹蛋白肽组分与氨基葡萄糖的质量分数比、蛋白肽质量分数、TGase 酶质量分数、pH 值、反应温度条件下，随着反应时间的延长，感官评分和接枝度同步上升，当反应时间大于 4 h 时，LEP 的接枝度持续升高，感官评分反而降低，其中接枝度在 24% 左右时 LEP 的感官评分最高，表明 LEP 的接枝度与感官评分存在一定的相关性。

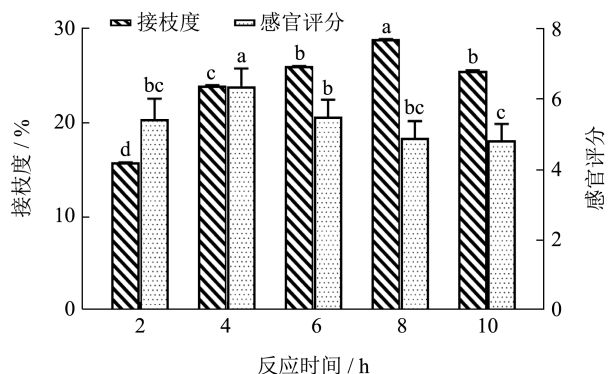


图 6 反应时间对糖基化反应的影响

Fig.6 Effect of reaction time on glycosylation reaction

2.2 响应面优化实验

在单因素试验的基础上，选取肽与氨基葡萄糖的质量分数比 (A)、蛋白肽质量分数 (B) 和 pH 值 (C) 为自变量，以感官评价为响应值，试验结果如表 3 所示。运用 Design-Expert 13.0 软件对试验结果进行回归拟合，得到的回归方程：

$$Y=7.10-0.086A-0.26B-0.14C-0.053AB-0.25AC-0.21BC-0.20A^2-0.43B^2-0.28C^2$$

为了验证上述方程的可靠性，运用 Design-Expert 13.0 软件对试验结果进行数据分析，由表 4 可知，该模型相关系数 R^2 为 0.99，模型的相关系数接近 1，表明模型拟合度高；模型的变异系数为 1.64%，数值越小表明置信度越好，说明模型对感官评分的置信度高，该模型可以较好地反映真实的实验结果^[33]。由表 5 可知，该模型 P 值小于 0.01，表明该模型是极显著的；同时模型失拟项 P 值大于 0.05，表明该模型失拟项不显著，试验误差小。

为了更直观地反映各因素对响应值的影响，对回归模型的三维空间曲面图和二维等高线图进行分析，其中三维曲面图直接反应不同因素间交互作用对响应值的影响^[34]。二维等高线图的形状可以反应各因素间交互作用的显著性^[35]。图 7a 结果表明随

着肽糖比和蛋白肽质量分数水平的增加，感官评分呈现先升高后降低的趋势，且二维等高线图偏椭圆形，表明两个因素之间交互作用显著；图 7b 结果表明随着肽糖比和 pH 值水平的增加，感官评分呈现先升高后降低的趋势，且二维等高线图偏椭圆形，表明两个因素之间交互作用显著；图 7c 结果表明随着蛋白肽质量分数和 pH 值水平的增加，感官评分先增加后降低，其等高线图偏椭圆形，表明两个因素之间交互作用显著。结合表 5 中三因素的 P 值可知，三因素对感官评分的影响力为：B-蛋白肽质量分数 > C-pH 值 > A-肽糖比。

经 Design-Expert 13.0 软件分析得到最佳工艺条件为肽糖比 2.17:1，蛋白肽质量分数 6.52%，pH 值 6.85，感官评分 7.17。为验证该响应面优化方案的可行性，考虑到实际操作问题，选取最佳制备工艺为肽糖比 2.2:1，蛋白肽质量分数 6.5%，pH 值 6.9，重复三次实验的得到感官评分 7.21，与回归方程预测值相近，说明低温酶促反应制备肽糖化合物工艺是可行的。

表 3 响应面试验设计和结果

Table 3 Response surface test design and results

试验号	A 肽糖 质量分数比	B 蛋白肽 质量分数 /%	C pH	感官评分
1	0	1	1	6.85 ± 0.87
2	0	0	0	7.06 ± 0.84
3	1	1	0	6.75 ± 0.45
4	0	0	0	7.12 ± 0.89
5	-1	0	-1	6.81 ± 0.74
6	0	0	0	7.18 ± 0.86
7	1	0	-1	6.90 ± 0.72
8	0	0	0	7.02 ± 0.65
9	1	-1	0	6.40 ± 0.74
10	0	-1	-1	6.37 ± 0.73
11	1	0	1	6.51 ± 0.89
12	-1	0	1	6.32 ± 0.32
13	-1	1	0	6.66 ± 0.80
14	-1	-1	0	6.12 ± 0.66
15	0	-1	1	5.84 ± 0.53
16	0	0	0	7.14 ± 0.78
17	0	1	-1	6.54 ± 0.36

表 4 模型的可信度分析

Table 4 Reliability analysis of model

响应值	结果 /%	R^2	校正后 R^2	变异系数 /%
感官评分	6.68 ± 0.10	0.965 3	0.920 6	1.64

表 5 回归方程方差分析

Table 5 Regression equation analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2.34	9	0.260 1	21.61	0.000 3	**
A-肽糖比	0.059 5	1	0.059 5	4.94	0.061 5	
B-蛋白肽质量分数	0.546 0	1	0.546 0	45.37	0.000 3	**
C-pH	0.156 8	1	0.156 8	13.03	0.008 6	**
AB	0.011 0	1	0.011 0	0.916 1	0.370 4	
AC	0.002 5	1	0.002 5	0.207 7	0.662 4	
BC	0.176 4	1	0.176 4	14.66	0.006 5	**
A ²	0.169 7	1	0.169 7	14.10	0.007 1	**
B ²	0.763 2	1	0.763 2	63.42	<0.000 1	**
C ²	0.326 0	1	0.326 0	27.09	0.001 2	**
残差	0.084 2	7	0.012 0			
失拟值	0.067 9	3	0.022 6	5.55	0.065 6	
纯误差	0.016 3	4	0.004 1			
总离差	2.43	16				

注: ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

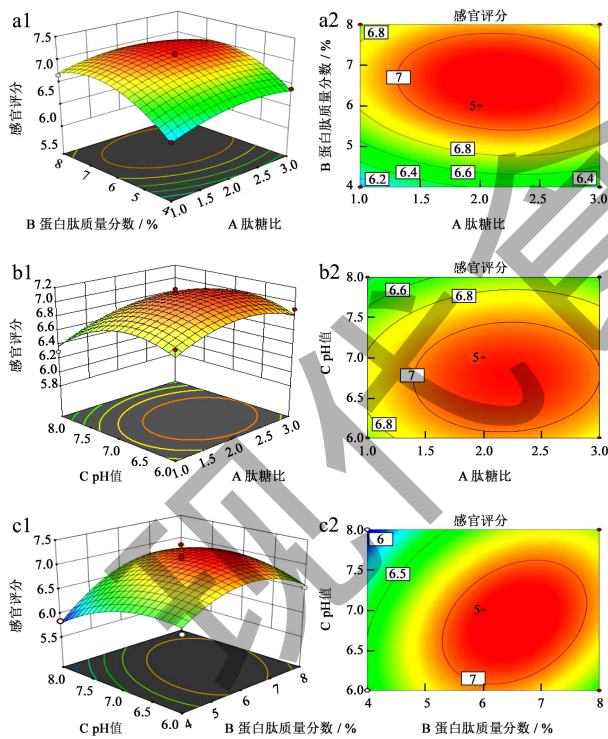


图 7 肽糖比、蛋白肽质量分数和 pH 值交互作用对感官评分的影响

Fig.7 The influence of the interaction of peptide to sugar ratio, Protein peptide mass fraction and pH on amount of sugar and sensory score

注: (a) 肽糖比和蛋白肽质量分数对感官评分的影响, (b) 肽糖比和 pH 值对感官评分的影响, (c) 蛋白肽质量分数和 pH 值对感官评分的影响。

2.3 伴生危害物

美拉德反应过程会产生呋喃衍生物、羰基化合物、芳香烃等对产品滋味、风味有重要影响的风味物质, 当反应过程控制不当时, 可能会产生对人体有害的伴生危害物, 其中以丙烯酰胺最为突出, 该物质已被国际癌症研究组织列为 2A 组“可能人类致癌物”^[36,37]。

丙烯酰胺、5-羟甲基糠醛、糠醛的含量变化可反映美拉德反应特定反应阶段的进程^[38]。由图 7 可知, 在蚕蛹蛋白肽浓度和接枝度相同的条件下, LEP 的丙烯酰胺含量仅有 64.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5-羟甲基糠醛 1.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 糠醛 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而 HMP 的丙烯酰胺含量达到 113.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5-羟甲基糠醛 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 糠醛 1.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LEP 的丙烯酰胺、5-羟甲基糠醛、糠醛均显著低于 HMP ($P < 0.05$)。林光月^[14]发现蚕蛹酶解液的美拉德反应产物在不同温度下的危害物质含量有显著差异, 其中 100 $^{\circ}\text{C}$ 下危害物含量最低。危害物质含量结果表明低温酶促反应优于美拉德反应。

2.4 感官差异

由图 8a、8b 可知, 超滤液和糖肽混合物的感官评分最低, 两者无显著差异 ($P < 0.05$), 分别为 5.95 和 5.86 分, 鲜味强度分别为 6.08 和 5.82, 而 LEP 的感官评分为 6.80, 鲜味强度为 7.24。与超滤

液和糖肽混合物相比,低温酶促反应能显著提高蚕蛹蛋白肽组分的感官特性和鲜味强度,表明该方法对蚕蛹蛋白肽组分有鲜味增强作用。该结果与其他研究结果部分吻合,如 Su 等^[39]发现豌豆蛋白水解液经 TGase 酶处理后鲜味强度显著上升而苦味值显著下降。同时 HMP 的感官评分和鲜味强度分别为 7.45 和 7.80,与 LEP 无显著差异 ($P>0.05$),HMP 与 LEP 的整体滋味相差不大,表明低温酶促反应可以作为蛋白肽组分增鲜的另外一种有效手段。

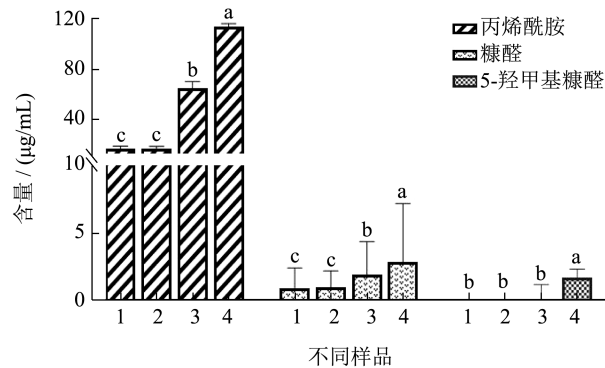


图 8 不同样品的有害物质含量变化

Fig.8 The contents of hazardous substances in different samples changed

注: 1 超滤液, 2 糖肽混合物, 3 低温酶促反应, 4 美拉德反应。

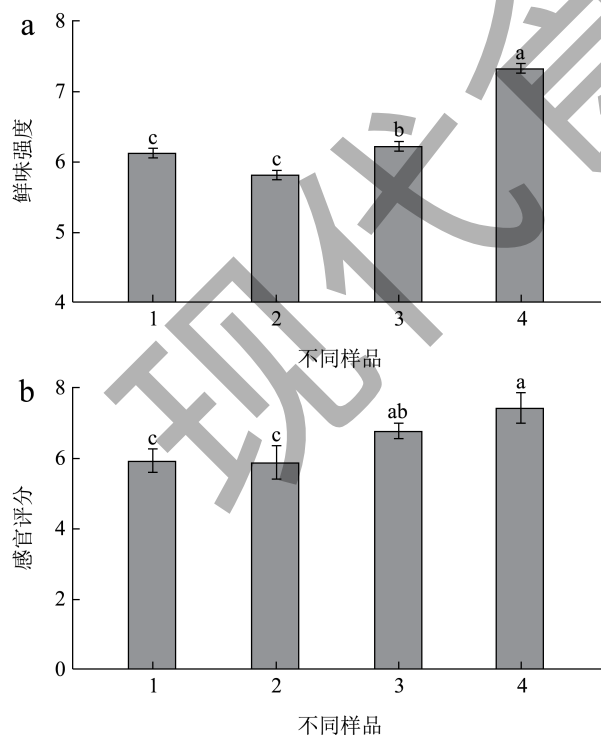


图 9 不同样品的感官评价

Fig.9 Sensory evaluation of different samples

注: 1 超滤液, 2 糖肽混合物, 3 低温酶促反应, 4 美拉德反应, 不同字母具有显著性差异, $P<0.05$ 。

3 结论

本研究利用转谷氨酰胺酶诱导糖基化制备蚕蛹蛋白糖肽,在单因素试验的基础上通过响应面优化试验确定其最佳工艺为:肽糖比 2.2:1,蛋白肽质量分数为 6.5%,反应初始 pH 值为 6.9,反应温度 50 °C, TGase 酶质量分数为 3%,反应时间 4 h。感官结果表明:低温酶促糖基化反应与高温美拉德反应均能提高蚕蛹蛋白肽组分的鲜味强度和整体感官评分,且两者无显著差异。伴生有害物质结果显示:HMP 与 LEP 间有显著差异,其中 HMP 的丙烯酰胺含量为 113.30 μg/mL,5-羟甲基糠醛 2.90 μg/mL,糠醛 1.76 μg/mL;而 LEP 的丙烯酰胺、5-羟甲基糠醛、糠醛的含量分别降为 64.05、1.96、0.01 μg/mL。由此可见,低温酶促反应是蚕蛹蛋白肽组分鲜味增强和降低有害物质含量的有效手段,这为制备绿色健康的鲜味肽产品提供理论依据和技术参考。

参考文献

- [1] 沈圆圆.蚕蛹蛋白肽的制备及其抗炎活性研究[D].南宁:广西大学,2022.
- [2] 刘敏,张海涛,孙广文,等.水产饲料中动物性蛋白源替代鱼粉的研究进展[J].饲料工业,2019,40(22):48-54.
- [3] WU X, HE K, VELICKOVIC T C, et al. Nutritional, functional, and allergenic properties of silkworm pupae [J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(8): 4655-4665.
- [4] DEBNIRMALYA G, MRINAL R, SUJATA S. Comparison of amino acid profiles and vitamin contents of male and female prepupae and pupae of eri silkworm, *Samia ricini* [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 113: 104723.
- [5] 鲁珍,穆利霞,秦小明,等.蚕蛹蛋白酶法水解及美拉德反应改良其产物风味的研究[J].食品工业科技,2012,33(24):242-245,252.
- [6] 杨波,刘小玲,赵谋明,等.酶解脱脂蚕蛹蛋白过程中鲜味规律研究[J].食品科学,2017,38(18):119-125.
- [7] YU Z, JIANG H, GUO R, et al. Taste, umami-enhance effect and amino acid sequence of peptides separated from silkworm pupa hydrolysate [J]. Food Research International, 2018, 108: 144-150.
- [8] 刘慧,张苗,孙红男,等.超声波与美拉德反应改善食源性肽风味的研究进展[J].食品科技,2022,47(8):207-213.
- [9] 丁俭,黄祯秀,杨梦竹,等.食源蛋白水解物/多肽与糖类物质美拉德反应产物在食品应用中的研究进展[J].食品科学,2023,44(1):305-318.
- [10] ZHANG J, SUN-WATERHOUSE D, FENG Y, et al. The

- umami intensity enhancement of peanut protein isolate hydrolysate and its derived fractions and peptides by Maillard reaction and the analysis of peptide (EP) Maillard products [J]. *Food Research International*, 2019, 120: 895-903.
- [11] ZHANG J, SU G, ZHAO T, et al. Preparation, sensory characterization, and umami-enhancing mechanism of novel peptide glycoconjugates [J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2022, 70(26): 8043-8051.
- [12] ALJAHDALI N, CARBONERO F. Impact of Maillard reaction products on nutrition and health: Current knowledge and need to understand their fate in the human digestive system [J]. *Critical Reviews Food Science Nutrition*, 2019, 59(3): 474-487.
- [13] 扶晓菲,吕红,游春苹,等.热加工食物中糠醛类化合物的剂量安全与减控研究进展[J].*食品安全质量检测学报*, 2022,13(24):8050-8757.
- [14] 林光月.蚕蛹酶解液美拉德反应特性分析及在咸味饼干中的应用[D].广州:华南农业大学,2017.
- [15] ILDEPHONSE H, ZHANG M, SUN H N, et al. Comparative study of antioxidant and flavour characteristics of Maillard reaction products from five types of protein hydrolysates [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2022, 57(6): 3652-3664.
- [16] 王晓杰.转谷氨酰胺酶途径的酶法糖基化修饰在蛋白质/多肽改性中的研究进展[J].*中国油脂*,2022,47(10):25-32.
- [17] ZHAO M G, HE H, MA A M, et al. Sources, chemical synthesis, functional improvement and applications of food-derived protein/peptide-saccharide covalent conjugates: a review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(23): 5985-6004.
- [18] WANG J, ZOU L, YUAN F, et al. Inhibition of advanced glycation endproducts during fish sausage preparation by transglutaminase and chitosan oligosaccharides induced enzymatic glycosylation [J]. *Food & Function*, 2018, 9(1): 253-262.
- [19] GUO M, FU Y, MA L, et al. Collagen glycopeptides from transglutaminase-induced glycosylation exhibit a significant salt taste-enhancing effect [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023, 71(22): 8558-8568.
- [20] 刘俊雅,施文正,朱学伸,等.不同还原糖对鲢鱼肉糜凝胶品质的影响[J].*肉类研究*,2023,37(2):6-11.
- [21] 黄晓雯,冯笑军.固相萃取-高效液相色谱法测定酱油专用焦糖中5-羟甲基糠醛和糠醛[J].*中国酿造*,2014,33(1): 133-136.
- [22] 战旭梅,刘萍,祁兴谱,等.高效液相色谱法测定高温加工食品中丙烯酰胺[J].*食品安全质量检测学报*,2020, 11(22):8496-8501.
- [23] REUVENI S, URBACH M, KLAFTER J. Role of substrate unbinding in Michaelis-Menten enzymatic reactions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(12): 4391-4396.
- [24] 栾慧琳,华晓晗,戴澍涵,等.湿法糖基化改性大豆分离蛋白在低致敏千页豆腐中的应用[J].*食品工业科技*,2024, 45(2):59-66.
- [25] 田洋,汤木果,周艳,等.不同分子量糖基化核桃肽的制备及功能特性分析[J].*食品科学*,2023,44(10):205-214.
- [26] 王晓杰,刘晓兰,丛万锁,等.D-氨基半乳糖酶法糖基化修饰玉米醇溶蛋白的条件优化及产物部分功能性质研究[J].*中国调味品*,2018,43(5):13-19.
- [27] 王晓杰,刘晓兰,石彦国,等.玉米肽的酶法糖基化修饰及产物溶解性的研究[J].*中国油脂*,2019,44(11):70-74.
- [28] 周利敏,刘晓兰,刘玥,等.TGase催化玉米醇溶蛋白糖基化改性[J].*食品科学*,2014,35(24):15-19.
- [29] 全越,王长远,李玉琼,等.响应面优化转谷氨酰胺酶催化燕麦麸皮球蛋白糖基化接枝条件[J].*天然产物研究与开发*,2016,28(7):1121-1127,1101.
- [30] 汪燕.TGase发酵工艺优化及其在枯草芽孢杆菌表达研究[D].合肥:合肥工业大学,2015.
- [31] 曹琳,欧阳及锦,韩梅,等.糖基化对罗非鱼皮胶原蛋白肽热滞活性及结构特征的影响[J].*食品与发酵工业*,2023, 49(1):176-184.
- [32] XU Y, ZHAO X, BIAN G, et al. Structural and solubility properties of pale, soft and exudative (PSE)-like chicken breast myofibrillar protein: Effect of glycosylation [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2018, 95: 209-215.
- [33] 孙建瑞,符丹丹,赵君峰,等.响应面法优化*Chlamydomonas sp.* 212产胞内多糖发酵工艺及其抑菌活性[J].*食品科学*,2017,38(18):1-7.
- [34] 杨大俏,王锦旭,李来好,等.响应面法优化褶牡蛎多糖多肽联产工艺[J].*食品科学*,2019,40(20):269-278.
- [35] 惠珍珍,李娜,王晓萱,等.文蛤免疫活性肽酶解条件的优化及其活性研究[J].*中国食品学报*,2023,23(11):161-169.
- [36] SVENSSON K, ABRAMSSON L, BECKER W, et al. Dietary intake of acrylamide in Sweden [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2003, 41(11): 1581-1586.
- [37] ASHBALA S, ZHANG C, XIE J, et al. Maillard reaction chemistry in formation of critical intermediates and flavour compounds and their antioxidant properties [J]. *Food Chemistry*, 2022, 393: 133416.
- [38] LIN H V, CHAN D S, KAO L Y, et al. Effect of hydroxymethylfurfural and low-molecular-weight chitosan on formation of acrylamide and hydroxymethylfurfural during Maillard reaction in glucose and asparagine model systems [J]. *Polymers*, 2021, 13(12): 1901.
- [39] SU G, XIE Y, LIU R, et al. Effect of transglutaminase on taste characteristics of pea protein hydrolysates through altering the composition of amino acids and peptides [J]. *Food Bioscience*, 2023, 56: 103261.