

文蛤分离蛋白糖基化产物的制备及其结构表征

步 营¹, 王雯瑄^{1,2}, 徐文婷¹, 朱文慧^{1*}, 李学鹏¹, 励建荣¹, 张 怡³, 于志国⁴

(¹渤海大学食品科学与工程学院/生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心 辽宁锦州 121013

²大连工业大学海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034

³福建农林大学食品科学学院 福州 350000

⁴丹东泰丰食品有限公司 辽宁丹东 118300)

摘要 文蛤是我国海水养殖的重要经济贝类之一,蛋白含量高且氨基酸种类齐全。以文蛤为原料,提取文蛤分离蛋白,通过湿热糖基化反应法制备文蛤分离蛋白-葡聚糖糖基化合物。以乳化活性及乳化稳定性为判定指标,通过单因素结合响应面法优化糖基化反应条件,结果表明:最佳糖基化反应条件为温度 109 ℃、时间 89 min、pH 11、蛋白/葡聚糖质量比 1:1,此条件下的乳化活性和乳化稳定性分别为 1.22 和 75.56。游离氨基含量、傅里叶红外光谱、热稳定性、荧光光谱分析和扫描电子显微镜等结果分析表明文蛤分离蛋白和葡聚糖通过糖基化反应生成了糖基化产物,改善了文蛤蛋白的功能特性。本研究为扩展文蛤蛋白在食品工业中的应用提供了理论参考。

关键词 文蛤分离蛋白; 糖基化; 响应面优化; 结构表征

文章编号 1009-7848(2024)03-0099-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.010

文蛤 (*Meretrix meretrix* Linnaeus), 俗称花蛤、黄蛤、海蛤等,是我国海水养殖的重要经济贝类之一^[1]。文蛤肉质鲜美,蛋白质中氨基酸种类齐全、组成合理,富含糖蛋白、EPA、DHA 和无机离子^[2],深受消费者喜爱。目前,我国对文蛤的开发利用仍处于初级加工阶段,多以鲜食形式出现在市场中,有少量加工品即以即食罐头、调味品和干制品等简单加工为主,缺少高值化深加工。文蛤蛋白为一种海产品蛋白资源,尚未得到充分利用。近年,人们对文蛤蛋白质、品质和风味有一些研究。Zhu 等^[3]将制备的文蛤蛋白纳米乳液添加到鱼糜肠中,改善了肠的风味和凝胶性。谢晓霞^[4]以文蛤和蓝蛤为原料,经水煮和酶解处理制备出风味丰富的呈味基料,并研究了风味成分对鲜味的影响,这为呈味基料作为制备海鲜调味料的理想原料提供了依据。然而,文蛤蛋白的热稳定性和乳化特性相对较差^[5],限制了其广泛的应用。

糖基化反应是一种基于美拉德反应的 Amadori 重排的反应^[6],是一种安全有效的蛋白质修

饰改性方法。目前,已有许多蛋白质通过糖基化反应被成功修饰以改善其功能特性,例如玉米醇溶蛋白^[7]、大豆分离蛋白^[8]、燕麦分离蛋白^[9]和花生蛋白^[10]等。葡聚糖因还原性、中性和高溶解性而被广泛应用于糖基化反应中^[11]。由蛋白质和葡聚糖制备的偶联物已被证明可显著改善蛋白质的功能特性。此外,大豆分离蛋白-葡聚糖偶联物显示出改善大豆蛋白的溶解度和乳化性能的作用^[8]。大米蛋白经超声辅助糖基化反应后,起泡和乳化性能均得到改善,溶解度明显增加^[12],这表明葡聚糖-蛋白偶联物作为食品工业用成分的巨大潜力。然而,传统的糖基化反应时间长,能耗高,难以实现工业化。蛋白质在高温或长时间加工过程中容易变性和聚集,会降低蛋白质-糖结合物的功能特性。鉴于此,有必要优化蛋白质和糖之间的糖基化反应条件。

本文以文蛤蛋白和葡聚糖为反应底物,在单因素实验的基础上应用响应面法优化糖基化反应条件,并对糖基化产物进行表征。以期通过糖基化反应改善文蛤蛋白的乳化性、乳化稳定性、热稳定性等功能特性,扩展文蛤蛋白在食品工业中的应用。

收稿日期: 2023-03-06

基金项目: 辽宁省海洋经济发展专项(2022-33)

第一作者: 步营,男,博士生,副教授

通信作者: 朱文慧 E-mail: wenhuiy130@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

文蛤(*Meretrix meretrix* Linnaeus)冷冻肉,丹东泰丰食品有限公司;大豆色拉油,上海福临门食品有限公司;葡聚糖(40 ku)、邻苯二甲醛(OPA)、L-亮氨酸、 β -巯基乙醇、十二烷基硫酸钠(SDS),北京索莱宝科技有限公司;盐酸、硼砂、乙醇,福晨(天津)化学试剂有限公司;氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠,科密欧(天津)化学试剂有限公司;冰乙酸,上海阿拉丁生化科技股份有限公司,本试验所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

PHS-3C型pH计,仪电科学仪器(上海)股份有限公司;Sorvall Stratos冷冻高速离心机,美国Thermo公司;Free Zone真空冷冻干燥机,美国Labconco公司;DU-20电热恒温油浴锅,一恒科学仪器(上海)有限公司;UV-2550紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;IRTRACE-100傅里叶变换红外光谱仪,德国瓦瑞安;S-4800场发射扫描电镜,日本日立公司;Mettler Toledo热重分析仪,瑞士梅特勒公司。

1.3 试验方法

1.3.1 文蛤分离蛋白的提取 参考薛高瞻等^[13]方法稍作修改。将冷冻的文蛤肉解冻并搅碎至浆状态,按料液比1:3加入预冷超纯水得到混合溶液。首先在13 000 r/min条件下高速均质1 min,用1 mol/L的NaOH调节pH值至12,接着在冰浴条件下搅拌15 min,然后以9 500 r/min转速离心20 min,取出上清液并用1 mol/L HCl调节pH值至4.2,静置30 min,9 500 r/min条件下再次离心20 min,去除上清液,得到沉淀并用少量超纯水溶解,再用1 mol/L NaOH调节pH值至中性,最后进行真空冷冻干燥,即得文蛤分离蛋白(Clam protein isolate, CPI)。

1.3.2 文蛤分离蛋白粗蛋白含量的测定 粗蛋白含量参考GB/T 5009.5-2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》中半自动凯氏定氮仪方法进行测定。

1.3.3 文蛤分离蛋白SDS-PAGE分析 取适量冻干后的CPI粉用超纯水配制成蛋白质量浓度为3~5 mg/mL的溶液,随后取10 μ L蛋白溶液加入

等体积的上样缓冲液(含20 mmol/L Tris-HCl,2% SDS,20%甘油,0.016%溴酚蓝,100 mmol/L DTT),置于沸水浴中加热(5~8 min),使之充分变性。使用4%浓缩胶,12%分离胶,上样量为10 μ L。开始电泳时,调节电压为80 V,当样品跑入分离胶时,调节电压为120 V。电泳完成后,将凝胶放在考马斯亮蓝溶液中轻微振荡和染色30~60 min,结束后,取出脱色至蛋白条带清晰为止,最后用Quantity One软件对凝胶进行扫描和分析。

1.3.4 葡聚糖糖基化文蛤分离蛋白的制备 称取一定量的CPI冻干粉,倒入适量去离子水搅拌溶解30 min后用1 mol/L NaOH调节pH值至12。加入一定质量比的葡聚糖搅拌均匀并使用1 mol/L HCl调节pH值。取混合液进行油浴反应,反应一段时间后立即置于冰浴中冷却。最后,使用真空冷冻干燥机将反应液进行冷冻干燥,收集干燥样品即为文蛤分离蛋白-葡聚糖共价复合物,简记为CPI-Dex Con。将CPI冻干粉和葡聚糖的简单混合粉简记为CPI-Dex Mix。

1.3.5 单因素实验 称取一定量的CPI冻干粉,量取适量去离子水搅拌溶解,NaOH调节pH值至12。按质量比为1:1加入多糖后搅拌均匀,再用1 mol/L的HCl调至反应所需pH值,4 $^{\circ}$ C过夜使蛋白质完全水合,次日等量分装在具塞试管中。在以上条件不变的情况下,选择不同反应温度(80,90,100,110,120 $^{\circ}$ C)、反应时间(60,75,90,105,120 min)、反应pH值(8,9,10,11,12)进行糖基化反应。最后,在最优的反应温度、反应时间和反应pH值下进行不同蛋白/多糖质量比(1:4,1:2,1:1,2:1,4:1)下的糖基化反应,确定最佳的蛋白/多糖质量比。

1.3.6 响应面优化试验 根据单因素实验结果,以温度、时间、pH值为自变量,蛋白/葡聚糖比例为1:1,以接枝度、乳化活性和稳定性为响应值,利用Box-Behnken进行响应面优化试验。

1.3.7 褐变程度的测定 参考王治平等^[14]方法稍作修改,取1 mL反应后的样品,加入5 mL 0.1% SDS溶液,分别于294,420 nm波长处测定吸光度,每组测定3个平行,取平均值。

1.3.8 乳化性的测定 采用浊度法^[15]稍作修改。按体积比3:1混合样品溶液与大豆色拉油,

12 000 r/min 条件下均质机均质 1 min。取 50 μ L 均质后的乳液静置 10 min, 重新取样, 并加入 5 mL 0.1% SDS, 测定吸光值 $A_{500\text{nm}}$ 。乳化稳定性 (Emulsification stability, ES) 用以下公式计算。

$$ES = \frac{A_0 \times 10}{A_0 - A_{10}} \quad (1)$$

式中: A_0 ——0 min 时测得的吸光值, 代表乳化活性 EA; A_{10} ——放置 10 min 后测得的乳化活性值。

1.3.9 游离氨基含量的测定 根据 Benjakul 等^[16]和罗艳华等^[17]方法稍作修改。量取 200 μ L 样品溶液, 加入 4 mL OPA 试剂, 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 3 min, 测定吸光值 $A_{340\text{nm}}$ 。测定 L-亮氨酸标准溶液 (0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L) 吸光值。根据吸光值建立标准曲线, 计算样品中游离氨基含量。试验中, CPI 组使用纯水替代多糖的量, 保证 3 组样品中原始蛋白含量一致。

1.3.10 FT-IR 的测定 按一定质量比混合样品和 KBr, 充分研磨。压片机压制成薄片, 以 4 cm^{-1} 光谱分辨率扫描 32 次, 扫描范围 4 000~400 cm^{-1} 。室温条件下以 KBr 薄片为背景, 相同条件下测定样品。

1.3.11 热稳定性的测定 参考 Liu 等^[18]方法, 精确称取 5.0 mg 样品置于固体铝坩埚中进行差式扫描分析。在氮气流量为 20 cm^3/min , 40~180 $^{\circ}\text{C}$, 升温速率为 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的参数条件下进行 DSC 分析, 计算变性温度和变性焓。

1.3.12 荧光光谱的测定 荧光光谱测定参考胡森等^[19]的方法稍作修改, 将得到的蛋白样品用超纯水稀释至 0.5 mg/mL。发射波长扫描范围 300~400 nm, 激发波长 290 nm, 狭缝宽 5 nm。

1.3.13 扫描电镜观察 使用研钵分别将 CPI 和 CPI-Dex Con 样品研磨成粉末状, 将其固定在导电盘上, 真空条件下进行喷金 (20~30 nm), 加速电压为 10 kV, 观察其微观结构。

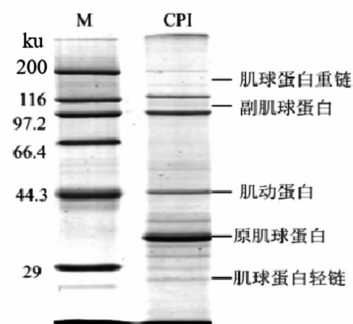
1.4 数据统计分析

使用 SPSS 19.0 软件对数据进行 ANOVA 分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异显著, 差异显著性采用 Duncan 法进行多重比较, 结果采用 “均值 \pm 标准差”, 并用 Origin 9.0 作图。

2 结果与分析

2.1 CPI 粗蛋白含量及聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

经测定 CPI 粗蛋白含量为 68%, 说明文蛤粗蛋白含量较高, 可以单独作为一种加工蛋白和葡聚糖形成共价复合物。经过 pH 值调节法所获得的分离蛋白主要由肌原纤维蛋白组成, 肌原纤维蛋白由肌球蛋白重链、轻链、肌动蛋白等组成^[13]。图 1 为通过 SDS-PAGE 得到的 CPI 电泳图。从图可以看出, CPI 的条带主要在分子质量为 38.0, 44.3, 97.2 和 116 ku 的几个范围。CPI 由肌球蛋白重链、副肌球蛋白、肌动蛋白和原肌球蛋白等组成, 其中肌球蛋白重链条带较浅, 这可能是提取蛋白过程中溶液浓度 (NaOH、HCl) 影响了提取分离蛋白的形态, 从而导致肌球蛋白部分发生降解使条带变浅。图谱中小分子蛋白条带的出现可能是在蛋白提取过程中, 蛋白酶发生降解所产生^[20]。



注: M 为标准蛋白分子质量, CPI 为文蛤分离蛋白。

图 1 文蛤分离蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE of clam protein isolate

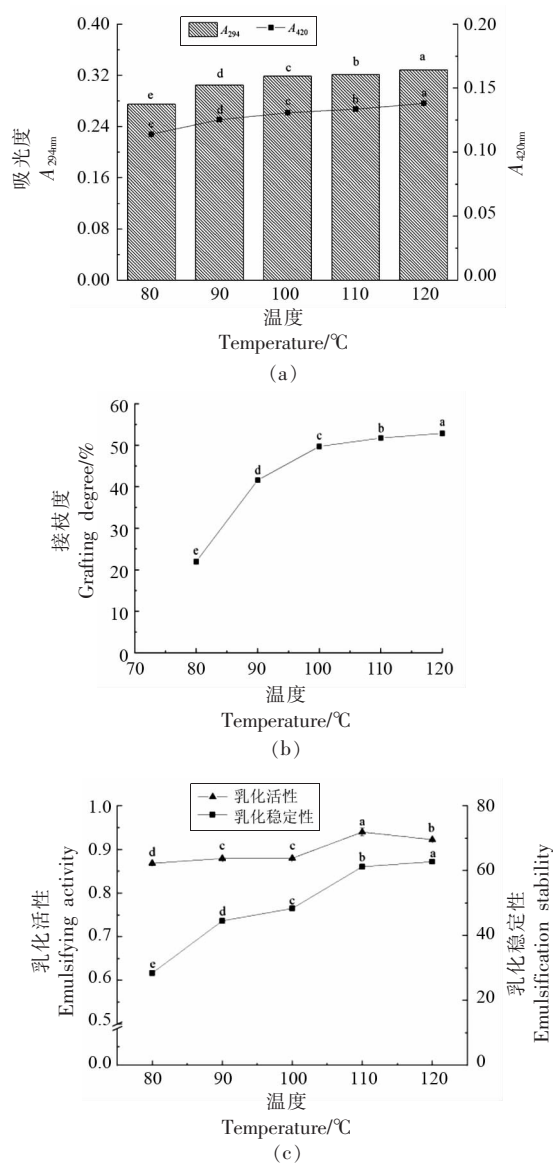
2.2 单因素实验

2.2.1 反应温度 从图 2a、2b 可知, 共价物的褐变程度和接枝度与反应温度呈正相关。但图 2c 中, 随着温度的升高, 乳化活性呈先升高后降低的趋势, 且在 110 $^{\circ}\text{C}$ 时, 乳化活性最好, 这是由于加热处理会使蛋白分子逐渐伸展开, 暴露出隐藏在分子内部的疏水性基团, 同时复合物表面羟基含量增多, 从而避免了油滴的相互靠近。但温度过高会破坏蛋白质分子结构, 增加分子间作用力, 使蛋白分子发生凝聚并产生沉淀, 最终乳化性降低^[21]。综合考虑, 选择温度为 110 $^{\circ}\text{C}$ 进行后续试验。

2.2.2 反应 pH 值 从图 3a、3c 可知, 产物的褐变程度和乳化稳定性随着 pH 值的增大逐渐升高。

图 3b 中, 反应产物的接枝度在 pH 值为 11 之前呈上升趋势, pH 值为 11 时产物的接枝度最高, 随后迅速下降, 这可能由于强碱性环境致使蛋白质变性交联进而使接枝度降低。在图 3c 中, 当溶液 pH 值为 11 时, 乳化活性最好。当 pH 值继续增加时, 乳化活性呈逐渐降低的趋势, 由于提取的 CPI

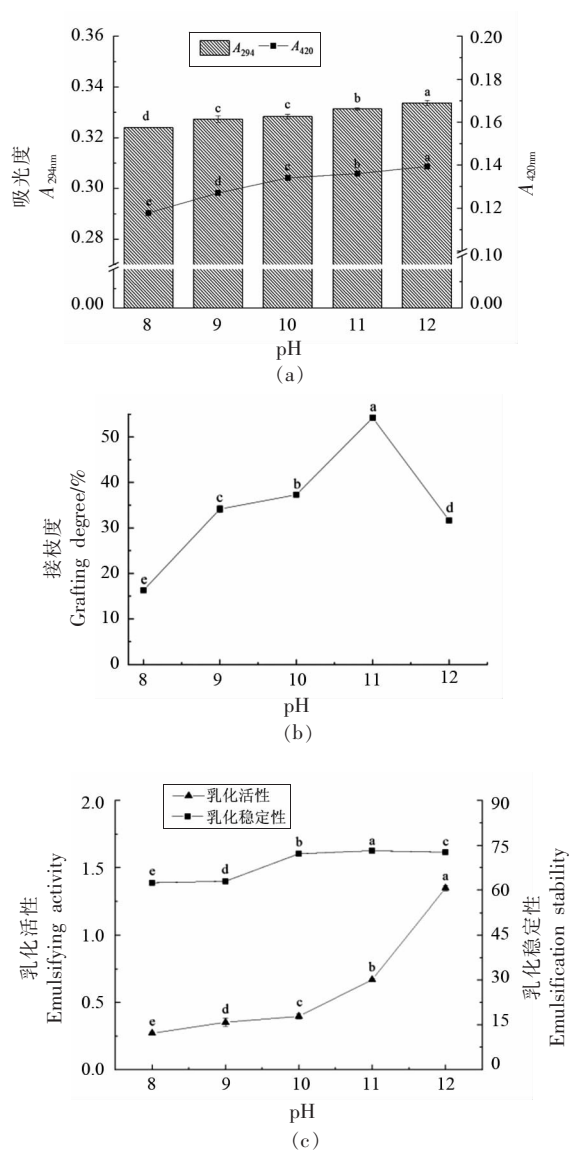
为碱性蛋白, 碱性条件下提高蛋白质溶解度, 增加蛋白和葡聚糖分子接触的机会, 从而改善产物溶液的乳化性, 但是过高碱性环境会造成蛋白变性, 从而导致乳化性有所降低。因此, 选择 pH 值为 11 进行后续试验。



注: 不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

图 2 反应温度对葡聚糖接枝文蛤分离蛋白褐变程度 (a)、接枝度 (b) 和乳化性 (c) 的影响

Fig.2 Effects of reaction temperature on browning degree (a), grafting degree (b) and emulsifying properties (c) of dextran grafted clam protein isolate



注: 不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$).

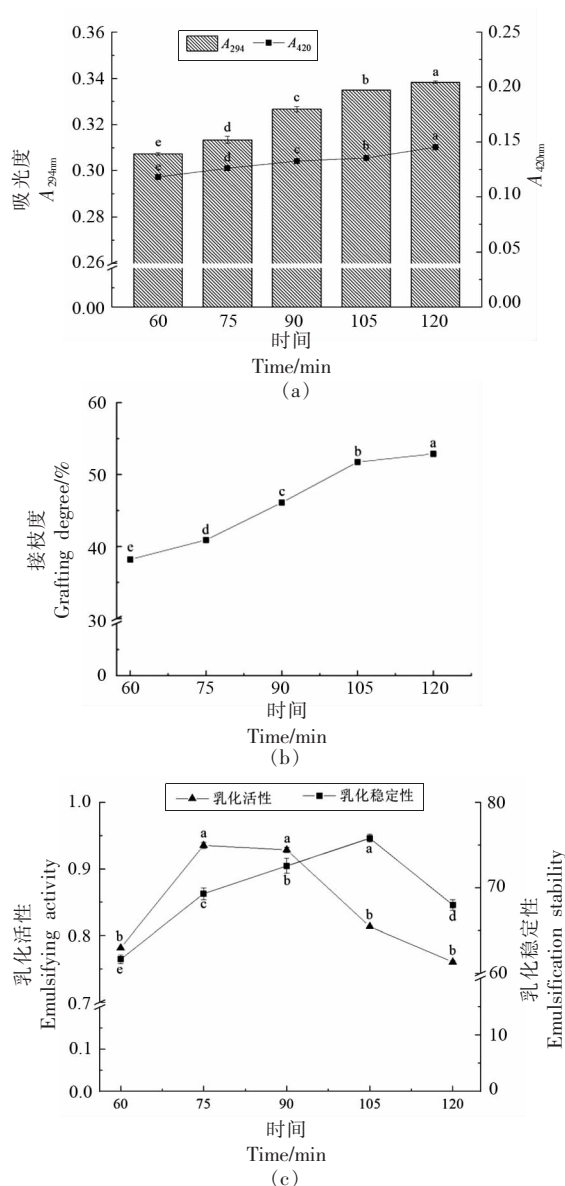
图 3 反应 pH 值对葡聚糖接枝文蛤分离蛋白褐变程度 (a)、接枝度 (b) 和乳化性 (c) 的影响

Fig.3 Effects of reaction pH on browning degree (a), grafting degree (b) and emulsifying properties (c) of dextran grafted clam protein isolate

2.2.3 反应时间 在图4a、4b中,产物的褐变程度、接枝度随时间的延长而升高。在反应初期,蛋白质的氨基基团未完全暴露,在反应中后期,更多的氨基基团暴露并与葡聚糖末端的羰基发生反应,蛋白和多糖偶联增加^[22-23],这是导致接枝度增加的原因。在图4c中,当反应进行到75 min时乳化活性最好,但随后乳化活性逐渐降低,这是因为

反应初期蛋白表面暴露大量亲水基团和疏水基团,使其更加快速的在油/水界面迁移和吸附,亲、疏水性基团达到平衡,导致乳化性增强。但当反应完全时,蛋白质更加偏于亲水方面,破坏反应体系中油-水分界面间的平衡^[24],从而使共价产物的乳化性降低。

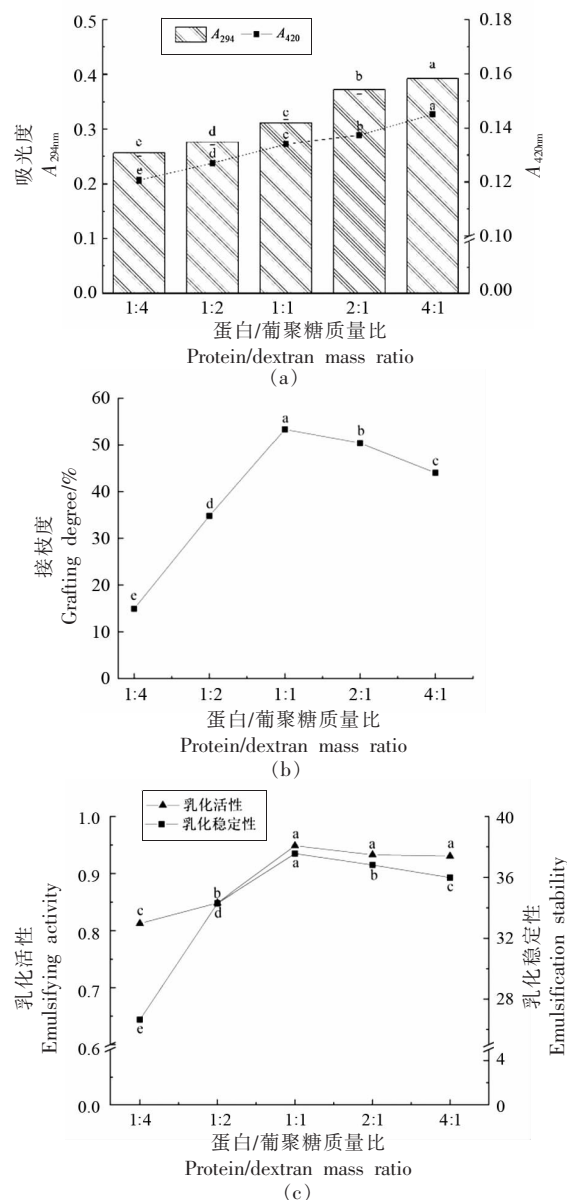
2.2.4 蛋白/葡聚糖质量比 图5a可知,随着蛋



注:不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

图4 反应时间对葡聚糖接枝文蛤分离蛋白褐变程度(a)、接枝度(b)和乳化性(c)的影响

Fig.4 Effects of reaction time on browning degree (a), grafting degree (b) and emulsifying properties (c) of dextran grafted clam protein isolate



注:不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。

图5 蛋白/葡聚糖质量比对葡聚糖接枝文蛤分离蛋白褐变程度(a)、接枝度(b)和乳化性(c)的影响

Fig.5 Effects of protein/dextran mass ratio on browning degree (a), grafting degree (b) and emulsifying properties (c) of dextran grafted clam protein isolate

白/葡聚糖质量比增加,复合产物褐变程度逐渐增加。在图 5b、5c 中,伴随着蛋白/糖质量比的变化,反应终产物的接枝度、乳化活性和乳化稳定性均呈先增加后降低的趋势。并且在蛋白/糖质量比为 1:1 时,最终产物的 3 个测试指标数值均达到峰值随后下降。可能受到多糖的特性影响,当混合溶

液中的添加过量葡聚糖时,整个蛋白和多糖的混合反应体系黏度增加,分子流动性变低,不利于共价反应发生^[25],导致接枝度、乳化性降低。最后,选择蛋白/糖质量比为 1:1 进行后续试验。

2.3 响应面分析

响应面试验结果见表 1,复合产物的接枝度、

表 1 响应面试验结果
Table 1 Results of response surface experiments

序号	A	B	C	接枝度	乳化活性	乳化稳定性
1	-1	-1	0	34.357	0.650	72.791
2	1	-1	0	31.647	0.780	60.610
3	-1	1	0	33.679	0.670	72.143
4	1	1	0	37.744	0.760	66.364
5	-1	0	-1	30.969	0.760	67.692
6	1	0	-1	36.389	0.870	58.462
7	-1	0	1	18.775	0.610	62.419
8	1	0	1	33.679	0.780	57.833
9	0	-1	-1	51.292	0.712	64.902
10	0	1	-1	26.227	0.762	69.804
11	0	-1	1	39.099	0.800	61.136
12	0	1	1	18.775	0.810	61.852
13	0	0	0	49.938	1.300	73.079
14	0	0	0	49.915	1.290	74.950
15	0	0	0	50.981	1.150	75.152
16	0	0	0	50.102	1.320	75.134
17	0	0	0	51.064	1.210	76.125

表 2 多元回归模型方差分析表
Table 2 Multivariate regression model analysis of variance

指标	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P
接枝度	模型	1 596.94	9	177.44	3.34	0.06
	残差	371.78	7	53.11		
	失拟项	370.46	3	123.49	375.42	<0.0001
	纯误差	1.32	4	0.33		
	总差	1 968.71	16			
				$R^2 = 0.8112$	$R_{adj}^2 = 0.5684$	
乳化活性	模型	0.949	9	0.105	18.874	0.0004
	残差	0.039	7	0.006		
	失拟项	0.019	3	0.006	1.207	0.4147
	纯误差	0.021	4	0.005		
	总差	0.988	16			
				$R^2 = 0.9604$	$R_{adj}^2 = 0.9095$	
乳化稳定性	模型	649.757	9	72.195	44.548	<0.0001
	残差	11.344	7	1.621		
	失拟项	6.408	3	2.136	1.731	0.2984
	纯误差	4.937	4	1.234		
	总差	661.101	16			
				$R^2 = 0.9828$	$R_{adj}^2 = 0.9608$	

乳化活性和乳化稳定性的多元回归式拟合模型如下所示:其中 Y_1 表示接枝度, Y_2 表示乳化活性, Y_3 表示乳化稳定性。

$$Y_1=50.40+2.71A-5.00B-4.32C+1.69AB+2.37AC+1.19BC-9.97A^2-6.07B^2-10.48C^2$$

$$Y_2=1.25+0.063A+7.500E-003B-0.013C-0.014B+0.015AC-1.000E-002BC-0.28A^2-0.26B^2-0.22C^2$$

$$Y_3=74.89-3.97A+1.34B-2.20C+1.6AB+1.16AC-1.05BC-4.87A^2-2.04B^2-8.42C^2$$

表 3 因变量回归系数的检验

Table 3 The test of regression coefficients of dependent variable

差异来源	接枝度			乳化活性			乳化稳定性		
	回归系数	F 值	P	回归系数	F 值	P	回归系数	F 值	P
常数项	50.40			1.25			74.89		
A	2.71	1.11	0.33	0.063	5.596	0.0499	3.97	77.881	<0.0001
B	-5.00	3.76	0.09	7.5×10^{-3}	0.081	0.7847	1.34	8.870	0.0206
C	-4.32	2.81	0.14	-0.013	0.242	0.6378	-2.20	23.947	0.0018
AB	1.69	0.22	0.66	-0.01	0.072	0.7967	1.60	6.323	0.0401
AC	2.37	0.42	0.54	0.015	0.161	0.7001	1.16	3.327	0.1109
BC	1.19	0.11	0.75	1.0×10^{-2}	0.072	0.7967	-1.05	2.703	0.1442
A ²	-9.97	7.88	0.03	-0.28	58.059	0.0001	-4.87	61.530	0.0001
B ²	-6.07	2.92	0.13	-0.26	51.557	0.0002	-2.04	10.860	0.0132
C ²	-10.48	8.70	0.02	-0.22	36.991	0.0005	-8.42	184.196	<0.0001

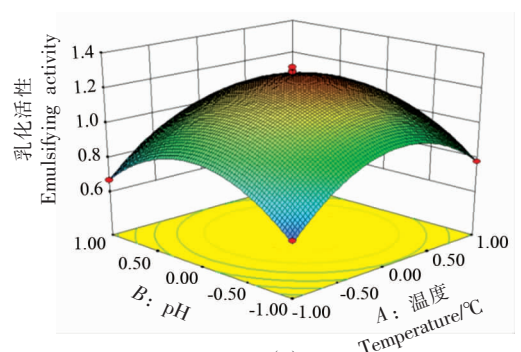
表 2 为回归模型方差分析结果,以接枝度为响应值得到的回归模型不显著,同时方程拟合度低。以乳化活性和乳化稳定性为响应值建立模型的 P 值都小于 0.01,说明两个回归方程模型都显著。失拟项大于 0.05,表明模型稳定。以乳化活性和乳化稳定性建立的模型的 R^2 和 R^2_{Adj} 都大于 0.8,表明这两个模型用来预测其指标的实际值时可信度较高。通过观察表 3 中 F 值可知,以乳化活性、乳化稳定性建立模型的响应值的影响顺序为 $A>C>B$,即温度>时间>pH 值。以乳化活性为响应值建立的模型来说,一次项 A 对结果影响显著 ($P<0.05$), A^2 、 B^2 和 C^2 对结果影响极显著 ($P<0.01$)。以乳化稳定性建立模型来说,一次项 (A 、 B 、 C)、交互项 AB 和二次项 (A^2 、 B^2 、 C^2) 对结果影响都显著 ($P<0.05$)。由于以接枝度为响应值建立的模型不显著,因此后面选择乳化活性和乳化稳定性进行响应图分析。

结合回归方程得到对应的 3D 效果图如图 6 和图 7 所示。图中反映出了三者相互交互作用(反应温度、反应 pH 值和反应时间)对复合物乳化活性和乳化稳定性的影响效果。试验数据经过 Design Expert 响应面软件分析,试验优化目标以乳

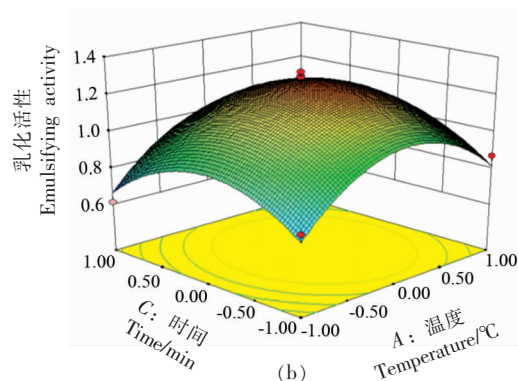
化活性和乳化稳定性最高的为最佳工艺,得出以下结论:反应温度 109.10 ℃,反应 pH 11.08,反应时间 88.55 min,该模型预测的乳化活性和乳化稳定性的值为 1.24 和 75.44。根据实际情况修正后为:反应温度 109 ℃,反应 pH 11,反应时间 89 min,在此条件下,乳化活性和乳化稳定性的值为 1.22 和 75.56,试验结果与模型预测值接近,表明试验选择的最佳条件具有可行性。

2.4 游离氨基含量分析

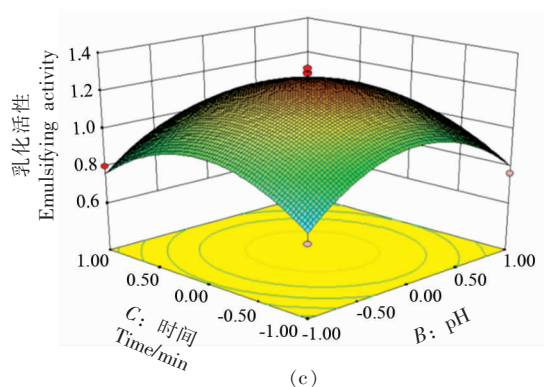
糖基化作为美拉德反应的初期阶段反应,是氨基酸的 ϵ -氨基或蛋白质的 n 端氨基与还原糖的羰基之间的偶联反应,因此,游离氨基含量变化可以反映糖基化反应程度^[26]。从图 8 可知,与 CPI (1.36 mmol/L) 相比,葡聚糖存在时, CPI-Dex Mix 和 CPI-Dex Con 中游离氨基含量均不同程度降低,说明文蛤分离蛋白中的氨基与葡聚糖中的羰基发生交联并形成糖基化产物。CPI-Dex Con 热处理下的游离氨基含量较 CPI-Dex Mix 处理的含量降低了约 53%,这可能是加热改变反应体系中分子的构象,暴露出分子核心的氨基,导致其更易与葡聚糖反应^[27]。齐明^[28]研究表明与单独苦荞蛋白水解物相比,苦荞蛋白水解物与还原糖进行糖



(a)



(b)



(c)

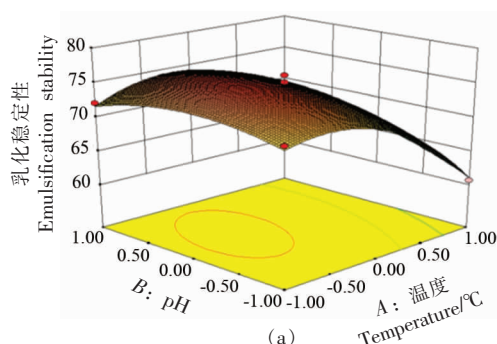
图6 各因素交互作用对葡聚糖接枝文蛤分离蛋白乳化活性影响的响应面图

Fig.6 The response surface of the interaction of various factors on the emulsifying activity of dextran grafted clam protein isolate

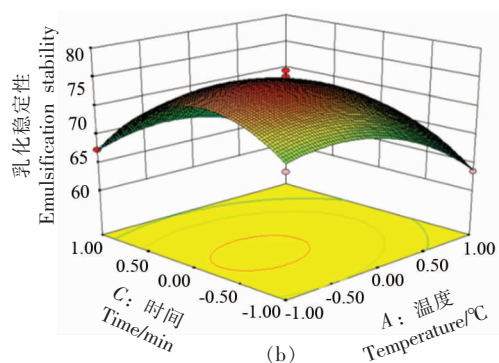
基化反应后的游离氨基含量显著降低,同时伴有糖基化复合物生成。

2.5 FT-IR 分析

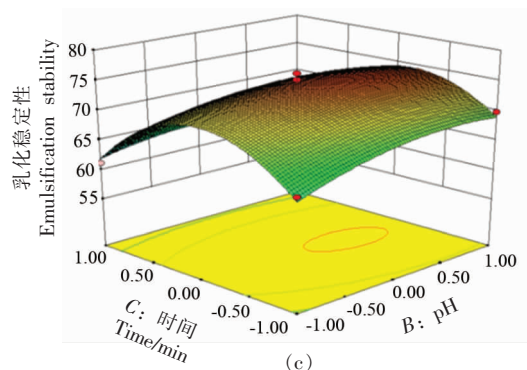
从图9中可知,CPI-Dex Con在 $3\,700\sim 3\,200\text{ cm}^{-1}$ 内出现了比CPI更宽的吸收峰,这是游离-OH伸缩振动引起,说明CPI与葡聚糖通过共价键相互连接;同时,CPI-Dex Con在 $1\,200\sim 1\,000\text{ cm}^{-1}$ 内由糖苷键C-O-C振动,而出现了较CPI更



(a)



(b)



(c)

图7 各因素交互作用对葡聚糖接枝文蛤分离蛋白乳化稳定性影响的响应面图

Fig.7 The response surface of the interaction of various factors on the emulsifying stability of dextran grafted clam protein isolate

强的吸收峰^[29]。这两处峰值和峰形的变化表明CPI与葡聚糖发生了糖基化反应。 $1\,649\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,545\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰分别为酰胺I(C-O伸缩振动)和酰胺II(N-H弯曲振动和C-N伸缩振动),是蛋白质最明显的特征结构^[30],CPI-Dex Con在这两个波数范围内吸收峰强度比CPI略微降低,表明了糖基化共价反应消耗了文蛤分离蛋白中的氨基,也侧面证实CPI以共价结合方式引入了葡聚糖分

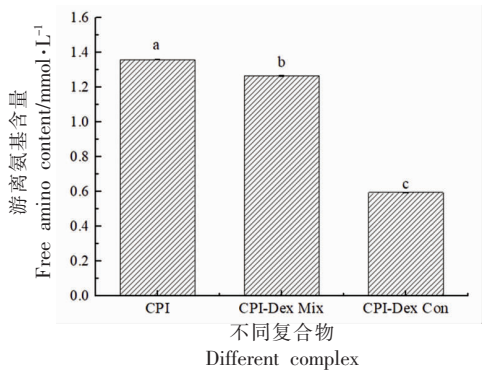


图 8 CPI、CPI-Dex Mix 及 CPI-Dex Con 的游离氨基含量变化

Fig.8 Changes of free amine content in CPI, CPI-Dex Mix and CPI-Dex Con

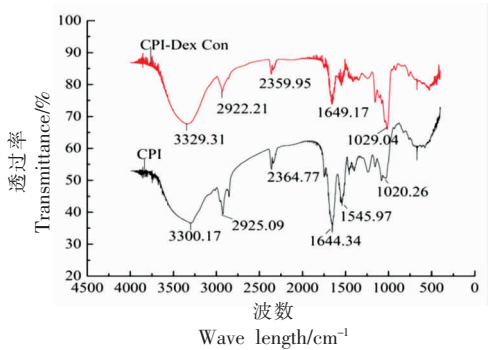


图 9 CPI 和 CPI-Dex Con 的 FT-IR 图谱

Fig.9 FT-IR images of CPI and CPI-Dex Con

子。与 CPI 相比,CPI-Dex Con 在 1 260~900 cm^{-1} 的范围内,出现一个较强吸收峰,这是葡聚糖与蛋白质通过共价键形成偶联物的典型特征^[31]。同时,也可以观察到 CPI-Dex Con 与 CPI 的特征吸收峰位置无明显变化,说明糖基化反应并未改变 CPI 的分子结构。

2.6 DSC 分析

蛋白质的热稳定性分析是通过外部加热破坏蛋白质的空间结构,进而测量蛋白质在变性过程中的能量变化。蛋白质的结构和功能特性易受热处理的影响,导致热变性的不可逆变化。图 10 和表 4 为 CPI、CPI-Dex Mix 和 CPI-Dex Con 的热稳定性变化,从图及表可以看出,CPI-Dex Con 的变性温度(140.35 $^{\circ}\text{C}$)明显高于 CPI(132.87 $^{\circ}\text{C}$),说明 CPI 经糖基化反应后热稳定性增加,这可能是由于 CPI 共价结合了葡聚糖后体积排阻效应显著增强^[32],同时,增加了蛋白质之间的静电斥力,使

得蛋白质结构和空间构象更加牢固,进而提高了蛋白质的热稳定性。一般来说,共价复合物焓变要高于单独的蛋白质,本试验结果与他人研究结果不一致^[33],CPI-Dex Con 的变性焓显著低于 CPI 和 CPI-Dex Mix 的,这可能是由于糖基化反应为放热反应,降低了 CPI 与葡聚糖交联过程中的焓变^[34]。

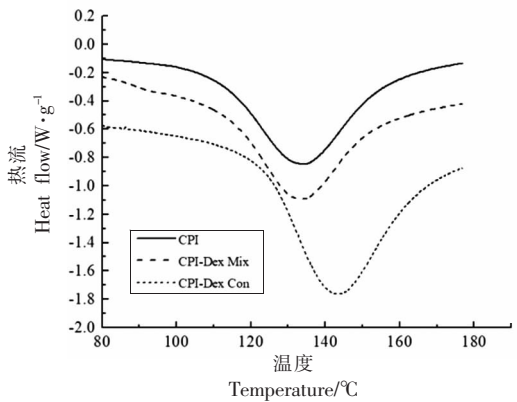


图 10 CPI、CPI-Dex Mix 及 CPI-Dex Con 的 DSC 图谱

Fig.10 DSC images of CPI, CPI-Dex Mix and CPI-Dex Con

表 4 CPI、CPI-Dex Mix 及 CPI-Dex Con 的热变性温度和焓变

Table 4 Thermal denaturation temperature and enthalpy change of CPI, CPI-Dex Mix and CPI-Dex Con

样品	变性温度/ $^{\circ}\text{C}$	变性焓/ $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$
CPI	132.87 ± 0.71^b	59.29 ± 0.73^a
CPI-Dex Mix	135.07 ± 0.72^b	43.81 ± 0.69^b
CPI-Dex Con	140.35 ± 1.83^a	41.52 ± 0.85^c

注:同一列上标字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

2.7 内源荧光分析

荧光光谱法常用来评价色氨酸残基的构象变化^[35],表征芳香族氨基酸残基的微环境变化^[36]。蛋白质变性时,会表现出荧光强度减小和最大发射波长红移的现象。由图 11 可知,CPI 与 CPI-Dex Mix 的荧光光谱变化基本一致,CPI-Dex Mix 的荧光强度仅略微下降,这表明葡聚糖和蛋白质的简单混合对偶联产物的结构影响很小。在 290 nm 激发下,CPI 的最大荧光强度在 345 nm,当 CPI 与葡聚糖接枝后,最大荧光强度出现在 348 nm 处。

CPI 的 λ_{max} 没有明显红移, Liu 等^[37]也报道过相似现象,说明文蛤分离蛋白的肽链部分展开。共价反应后荧光强度显著降低, 荧光强度下降表明色氨酸残基到达了一个更隐蔽和非极性的微环境^[27]。也有研究发现,糖基化反应引起蛋白质变性,改变蛋白质的三级或四级结构, 导致其荧光强度降低^[38]。以上现象都证实文蛤分离蛋白与葡聚糖发生了共价反应。

2.8 SEM 分析

图 12 的 SEM 显示, 2 个冻干样品的微观结构存在显著差异。对于文蛤分离蛋白, 观察到无序的网络结构, 孔径大小存在差异。文蛤分离蛋白经糖基化反应后, 其表面微观结构发生很大变化。虽然糖基化后的文蛤分离蛋白仍有不规则网状结构存在, 但是其孔隙结构更小, 微观结构表面更加均匀有序, 尤其是孔隙边缘变得更加光滑。由此可见, 糖基化对蛋白质的均匀性和致密性有积极的影响。这可能由于 CPI 与多糖共价结合后使复合产物均匀扩散, 从而减少了 CPI 的聚集。

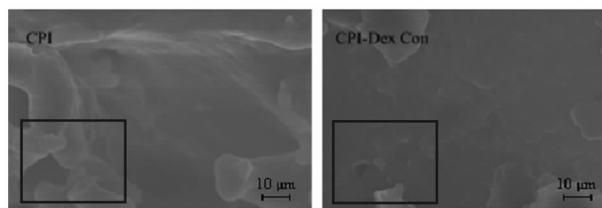


图 12 CPI 和 CPI-Dex Con 的 SEM 图($\times 7\,000$)

Fig.12 The SEM images of CPI and CPI-Dex Con ($\times 7\,000$)

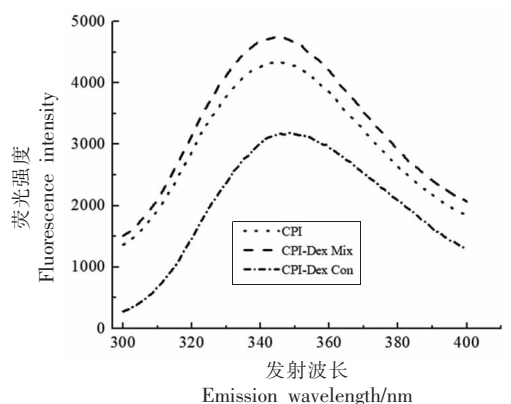


图 11 CPI、CPI-Dex Mix 和 CPI-Dex Con 的荧光光谱图

Fig.11 Fluorescence spectra of CPI, CPI-Dex Mix and CPI-Dex Con

3 结论

本试验将提取的文蛤分离蛋白采用湿热法糖基化反应制备 CPI-Dex Con, 并对复合物进行表征。结果表明: 响应面优化得出糖基化反应条件为糖基化温度 $109\text{ }^{\circ}\text{C}$, 糖基化时间 89 min , pH 11, 文蛤蛋白/葡聚糖质量比 1:1 时, CPI-Dex Con 的乳化活性和乳化稳定性分别为 1.22, 75.56。游离氨基含量表明文蛤分离蛋白中的氨基与葡聚糖中的羰基发生交联并形成糖基化产物从而导致糖基化产物中游离氨基含量降低。FT-IR 和荧光光谱分析表明葡聚糖与蛋白质通过共价键形成偶联物, 但糖基化反应并未改变 CPI 的分子结构。DSC 分析表明 CPI 经糖基化反应后热稳定性增加。SEM 验证了糖基化对蛋白质的均匀性和致密性有积极的影响。本研究通过优化文蛤分离蛋白糖基化反应条件, 使文蛤蛋白的功能特性得到改善, 为后期扩展文蛤蛋白在食品工业中的应用提供了理论基础。

参 考 文 献

- [1] ZHUANG S H, LIU X M. The influence of fresh weight and water temperature on metabolic rates and the energy budget of *Meretrix meretrix* Linnaeus [J]. Marine Biology, 2006, 150(2): 245-252.
- [2] 杨晋, 陶宁萍, 王锡昌. 文蛤的营养成分分析及其用于海味香精的酶解液制备[J]. 食品工业科技, 2007, 28(4): 146-149.
YANG J, TAO N P, WANG X C. Analysis of nutritional components of clam meat and preparation of its hydrolysate for marine savory flavor[J]. Science and Technology of Food Industry, 2007, 28(4): 146-149.
- [3] ZHU W H, XU W T, HAN M L, et al. Preparation, characterization, and gel characteristics of nanoemulsions stabilized with dextran-conjugated clam *Meretrix meretrix* linnaeus protein isolate[J]. Food Chemistry, 2022, 375: 131664.
- [4] 谢晓霞. 文蛤与蓝蛤鲜味肽的呈味特性及其与鲜味受体 T1R1/T1R3 的分子作用研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2019.
XIE X X. Flavor characteristics of umami peptides from *Meretrix meretrix* (Linnaeus) and *Aloididae*

- aloidi* and their interactions with umami receptor T1R1/T1R3[D]. Jinzhou: Bohai University, 2019.
- [5] 唐小艳, 郑惠娜, 章超桦, 等. 文蛤蛋白质组成分析及其分子量分布研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 362–366.
- TANG X Y, ZHENG H N, ZHANG C H, et al. Protein composition analysis and molecular weight-distribution of *Meretrix lusoria*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(22): 362–366.
- [6] SHEPHERD R, ROBERTSON A, OFMAN D. Dairy glycoconjugate emulsifiers: Casein –maltodextrins[J]. Food Hydrocolloids, 2000, 14(4): 281–286.
- [7] WANG X J, ZHENG X Q, LIU X L, et al. Preparation of glycosylated zein and retarding effect on lipid oxidation of ground pork[J]. Food Chemistry, 2017, 227(1): 335–341.
- [8] BOOSTANI S, AMINLARI M, MOOSAVI-NASAB M, et al. Fabrication and characterisation of soy protein isolate-grafted dextran biopolymer: A novel ingredient in spray-dried soy beverage formulation[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 102(4): 297–307.
- [9] 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(8): 459–469.
- [10] TIAN Y, LIU C L, ZHANG K, et al. Glycosylation between recombinant peanut protein Ara h 1 and glucosamine could decrease the allergenicity due to the protein aggregation[J]. LWT–Food Science and Technology, 2020, 127: 109374.
- [11] SPOTT M J, PERDUCA M J, PIAGENTINI A, et al. Does dextran molecular weight affect the mechanical properties of whey protein/dextran conjugate gels[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(1): 204–210.
- [12] CHEN X W, ZHAO H Q, WANG H, et al. Preparation of high-solubility rice protein using an ultrasound-assisted glycation reaction[J]. Food Research International, 2022, 161: 111737.
- [13] 薛高瞻, 张凯, 郑尧, 等. pH调节法提取三种贝类分离蛋白及其组成、特性分析[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(10): 145–151.
- XUE G Z, ZHANG K, ZHENG Y, et al. Extraction of three shellfish protein isolates by isoelectric solubilisation/precipitation and their composition and characteristics analysis[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(10): 145–151.
- [14] 王治平, 何荣海, 丁文慧, 等. 葡萄糖接枝改性对米渣分离蛋白乳化性及结构的影响[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(2): 43–48.
- WANG Z P, HE R H, DING W H, et al. Effects of glycosylation on emulsification property and structure of rice residue protein isolate[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2017, 32(2): 43–48.
- [15] LI C, HUANG X J, PENG Q, et al. Physicochemical properties of peanut protein isolate–glucosaminoglycans conjugates prepared by ultrasonic treatment[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2014(21): 1722–1727.
- [16] BENJAKUL S, MORRISSEY M T. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid waste[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(9): 3423–3430.
- [17] 罗艳华, 王全杰, 陈沛海, 等. 蛋白水解物水解度测定方法的研究[J]. 皮革与化工, 2017, 34(2): 26–31.
- LUO Y H, WANG Q J, CHEN P H, et al. Study on determination method for hydrolyzed degree of protein hydrolysate[J]. Leather and Chemicals, 2017, 34(2): 26–31.
- [18] LIU F G, MA C C, MCCLEMENTS D J, et al. Development of polyphenol–protein–polysaccharide ternary complexes as emulsifiers for nutraceutical emulsions: Impact on formation, stability, and bioaccessibility of β -carotene emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 61: 578–588.
- [19] 胡森, 赵城彬, 李杨, 等. 糖基化反应对绿豆分离蛋白空间结构及乳液性质的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(11): 50–56.
- HU M, ZHAO C B, LI Y, et al. Effect of glycation reaction on spatial structure conformation and emulsion properties of mung bean protein isolate[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(11): 50–56.
- [20] MARMON S K, UNDELLAND I. Protein isolation from gutted herring (*Clupea harengus*) using pH-shift processes[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2010, 58(19): 10480–10486.
- [21] 穆利霞. 大豆蛋白–糖接枝改性及其结构与功能特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- MU L X. The Research of conformation and func-

- tional properties of soy protein-saccharide conjugates [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.
- [22] GENG X P, CUI B, LI W Y, et al. Preparation and characterization of ovalbumin and carboxymethyl cellulose conjugates via glycosylation[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 37: 86-92.
- [23] WANG Y Q, GAN J A, LI Y, et al. Conformation and emulsifying properties of deamidated wheat gluten-maltodextrin/citrus pectin conjugates and their abilities to stabilize β -carotene emulsions[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 129-141.
- [24] 高红, 张炜, 辛小丽, 等. 亚麻籽胶-紫花苜蓿叶蛋白改性物的制备及乳化性能研究[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(6): 982-991.
- GAO H, ZHANG W, XIN X L, et al. Study on the preparation and emulsification property of flaxseed gum-alfalfa leaf protein concentrates[J]. Natural Product Research and Development, 2021, 33(6): 982-991.
- [25] 张玥. 苦杏仁谷蛋白-糖复合物的制备及多级结构与功能特性的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2021.
- ZHANG Y. Study on the preparation, multilevel structure and functional properties of bitter apricot kernel gluten-sugar conjugates[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2021.
- [26] SEO S, KARBOUNE S, L'HOCINE L, et al. Characterization of glycated lysozyme with galactose, galactooligosaccharides and galactan: Effect of glycation on structural and functional properties of conjugates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 53(1): 44-53.
- [27] SHENH L, LIU Q, DONG W Y, et al. Effect of high intensity ultrasound assisted glycosylation on the gel properties of ovalbumin: Texture, rheology, water state and microstructure[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 131215.
- [28] 齐明. 美拉德反应改善苦荞蛋白水解物乳化性的研究[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(10): 51-56.
- QI M. Research on the improvement of emulsification of tartary buckwheat protein hydrolysates by-Maillard reaction[J]. Food Research and Development, 2020, 41(10): 51-56.
- [29] 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.
- [30] LI S G, ZHANG S, LIU Y, et al. Effects of ultrasound-assisted glycosylation on the interface and foaming characteristics of ovotransferrin[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2022, 84: 105958.
- [31] ZHANG X L, YUE X J, MA B, et al. Ultrasonic pretreatment enhanced the glycation of ovotransferrin and improved its antibacterial activity[J]. Food Chemistry, 2020, 346: 128905.
- [32] WEN C T, ZHANG J X, QIN W, et al. Structure and functional properties of soy protein isolate-lentinan conjugates obtained in Maillard reaction by slit divergent ultrasonic assisted wet heating and the stability of oil-in-water emulsions[J]. Food Chemistry, 2020, 331: 127374.
- [33] 曹丽霞. 荞麦分离蛋白-葡聚糖共价复合物的制备及乳化性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- CAO L X. Study of preparation and emulsifying properties of buckwheat protein isolate-dextran conjugates[D]. Wuxi: Jingnan University, 2014.
- [34] 王雪. 发芽糙米蛋白-葡聚糖共价复合物的乳化特性及其荷载益生菌的应用研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2018.
- WANG X. Study on emulsifying properties of germinated brown rice protein-dextran conjugate and its ability to encapsulate probiotics[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2018.
- [35] ALAVI F, CHEN L Y, WANG Z G, et al. Consequences of heating under alkaline pH alone or in the presence of maltodextrin on solubility, emulsifying and foaming properties of faba bean protein[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 112: 106335.
- [36] LI Z Y, ZHENG Y M, SUN Q, et al. Structural characteristics and emulsifying properties of myofibrillar protein-dextran conjugates induced by ultrasound Maillard reaction[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 72: 105458.
- [37] LIU G X, LIU J, TU Z C, et al. Investigation of conformation change of glycated ovalbumin obtained by Co-60 gamma-ray irradiation under drying treatment[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2018, 47: 286-291.
- [38] CHANG C H, SU Y J, GU L P, et al. Microwave

induced glycosylation of egg white protein; study on
physicochemical properties and baking performance

[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 118: 106569.

Preparation and Structural Characterization of Clam Protein Isolate Glycosylated Product

Bu Ying¹, Wang Wenxuan^{1,2}, Xu Wenting¹, Zhu Wenhui^{1*}, Li Xuepeng¹, Li Jianrong¹, Zhang Yi³, Yu Zhiguo⁴

(¹College of Food Science and Technology, Bohai University/National & Local Joint Engineering Research Center
of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products,
Jinzhou 121013, Liaoning

²Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning

³Fujian Agriculture and Forestry University, College of Food Science, Fuzhou 350000

⁴Dandong Taifeng Foodstuff Co., Ltd., Dandong 118300, Liaoning)

Abstract Clam is one of the important economic shellfish in mariculture in China, with high protein content and complete amino acid species. In this paper, clam was used as experimental material to extract clam protein isolate, and clam protein isolate-dextran conjugates were prepared by wet heat glycosylation reaction. With emulsifying activity and emulsifying stability as the evaluation indexes, the conditions of glycosylation reaction were optimized by single factor combined with response surface method. The result showed that the optimal conditions were 109 °C, 89 min, pH 11, mass ratio of protein to dextran was 1:1. Under these conditions, the emulsifying properties and emulsifying stability of glycosylated compound were 1.22 and 75.56, respectively. The results of free amino group content, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), thermal stability, fluorescence spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM) showed that the glycosylated product was formed by glycosylation of clam protein isolate and dextran. This study improved the functional properties of clam protein and provided a theoretical basis for expanding the application of clam protein in food industry.

Keywords clam protein isolate; glycosylation; response surface optimization; structural characterization