

葡聚糖对鱼糜凝胶体外消化特性和糖基化的影响

阙凤^{1,2}, 石柳¹, 吴文锦¹, 陈胜¹, 汪超², 汪兰^{1*}

¹湖北省农业科学院 农产品加工与核农技术研究所 农业农村部农产品冷链物流技术重点实验室 武汉 430064

²湖北工业大学生物工程与食品学院 武汉 430068)

摘要 以草鱼为研究对象,葡聚糖(7 000 u)为抗冻剂,探讨葡聚糖对鱼糜凝胶消化特性的影响。采用体外消化模型模拟胃肠道消化过程,研究鱼糜凝胶在不同消化阶段的消化率、水解度、游离氨基酸、消化产物结构和晚期糖基化末端产物(AGEs)的变化,分析添加葡聚糖对鱼糜凝胶消化特性的影响,并通过糖组学鉴定葡聚糖化位点。结果表明:模拟消化末期,鱼糜凝胶的消化率为(69.56±0.59)%,水解度为(1.91±1.27)%,鱼糜凝胶的消化主要发生在小肠阶段,且添加葡聚糖不影响鱼糜凝胶的消化性。消化后鱼糜凝胶中蛋白的 α -螺旋结构相对含量减少了28.55%, β -折叠结构相对含量增加了41.04%。与CA组相比,添加葡聚糖的鱼糜凝胶在消化过程中产生的AGEs含量显著降低($P < 0.05$)。采用LC-MS/MS质谱共鉴定到69个N-糖基化蛋白质,70个N-糖基化肽段,122个N-糖基化位点。葡聚糖参与鱼糜凝胶糖基化反应的主要作用位点为A0A3N0Y8X2(N698、N699)和A0A3N0Z907(N74)。

关键词 葡聚糖;草鱼鱼糜凝胶;消化特性;N-糖基化位点

文章编号 1009-7848(2024)10-0093-12 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.10.009

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*),是鲤科、草鱼属鱼类,生长周期短,养殖容易,营养价值高,成本低;其肉质细嫩,个体大,肌间刺少,是重要的淡水水产养殖品种,是我国总产量高、价格最低的养殖淡水鱼,具有“四大家鱼”之称^[1]。草鱼富含蛋白质、脂肪、维生素、糖类以及多种矿物元素,其中草鱼鱼肉粗蛋白含量占18.41%,脂质约占4.3%^[2]。因此草鱼是一种优质的高蛋白质、低脂肪动物源性食品,是加工成鱼糜及鱼糜制品的主要原料之一^[1]。鱼糜是精制鱼肌原纤维蛋白,生产工艺包括去头、去内脏、切片、去骨、清洗、脱水、切碎,与冷冻保护剂混合等步骤,鱼糜被加工成一定的形状再通过热处理制成鱼糜制品^[3]。鱼糜凝胶在加工过程中通常采用两步式加热,热处理引起的蛋白质变性和聚集通过增加表面疏水性和改变蛋白质结构导致蛋白质的消化率降低^[4]。蛋白质消化率对于评估鱼糜凝胶产品的质量非常重要。为了满足鱼糜产品品质特性和感官特性的多样化,通常向鱼糜中添加多糖、酚类和抗冻蛋白等以延缓鱼糜制品的货

架期和改善鱼糜凝胶特性^[5]。前期研究发现葡聚糖能有效延缓草鱼蛋白的冷冻变性,其与鱼糜蛋白之间的相互作用能改善鱼糜凝胶的凝胶特性^[6],而葡聚糖对鱼糜凝胶蛋白质的消化特性的影响尚未见广泛研究。

肌肉蛋白因具有良好的必需氨基酸结构,高生物价值和理想的消化率,故被视为补充人体需求的“优质营养成分^[7]。其营养质量很大程度取决于蛋白质的消化率。消化率与蛋白质的展开或降解程度密切相关。此外,蛋白质和脂质的氧化会加速食品中内源性有害化学物质的形成,如丙二醛、丙烯醛和晚期糖基化终产物(Advanced glycation end-products, AGEs)。AGEs是通过缩合、异构化、裂解和在非酶促条件下用反应性羰基氧化修饰游离氨基形成一系列结构复杂的共价加合物^[8]。膳食中摄入的AGEs可通过AGEs受体促进AGEs的形成和积累,会增加糖尿病、心脑血管病、肾病等多种慢性疾病的发病率^[9-10]。在日常饮食中,大部分口服吸收的食源性AGEs在体内代谢、积累,其余主要以尿液形式通过肾脏排泄清除,而与蛋白质结合的AGEs排泄率有限^[11]。糖化蛋白是由蛋白质的非酶性糖化和氧化形成的最常见的食源性AGEs形式。在到达小肠前,与蛋白质结合的AGEs可在胃肠消化过程中,被消化酶水解并释放为游

收稿日期: 2023-10-22

基金项目: 国家自然科学基金面上基金项目(31871870);湖北省青年拔尖人才培养计划项目

第一作者: 阙凤,女,硕士生

通信作者: 汪兰 E-mail: 2005lily@gmail.com

离 AGEs 和寡肽 AGEs,并在体内循环。因此,限制食源性 AGE 的摄入或控制糖化蛋白质在胃肠道内通过酶水解释放 AGEs,对于减少与 AGEs 有关的潜在危害至关重要^[12]。Li 等^[13]研究发现,在冻融循环过程中,脂质氧化和蛋白质降解促进了鱼糜制品中 AGEs 的化学合成。Wang 等^[14]研究了水产品中 AGEs 的抑制作用,发现不同比例的转谷氨酰胺酶和壳寡糖通过保护赖氨酸不受蛋白质交联化学修饰而具有显著的抑制作用。

目前,对消化性能的研究主要是关于不同的烹饪方式和新技术,而添加糖后对鱼糜凝胶消化特性以及糖基化的影响鲜有报道。本试验以草鱼鱼糜为原料,添加质量分数 0.5%的葡聚糖作为凝胶改良剂,通过体外模拟消化模型探究添加葡聚糖后鱼糜凝胶的消化特性、消化产物的二级结构变化以及消化过程对 AGEs 含量的影响,并建立葡聚糖-肌球蛋白糖基化模型,分析葡聚糖参与的 N-糖基化结合位点,为多糖在鱼糜凝胶产品中的应用提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

鲜活草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*), (2 500±50)g, 湖北省武汉市白沙洲水产市场; 葡聚糖 (Dextran, BR, 7 000 u), 上海源叶生物科技有限公司; 山梨糖醇和蔗糖为分析纯级。

乙腈、甲醇、 α -淀粉酶 (150 U/mg), Sigma 公司; 胃蛋白酶 (1:10 000, 高纯)、胰蛋白酶 (1:250, BR)、猪胆盐, 上海源叶生物科技有限公司; 甲醛、硫酸铜、硫酸钾、浓硫酸、硼酸、氢氧化钠、盐酸、乙酸钠, 国药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯级。

1.2 设备与仪器

采肉机, 潍坊增硕食品机械厂家; 脱水离心机, 泰州市佰利佳洗涤机械有限公司; SHZ-82 数显水浴恒温振荡器, 金坛华峰仪器有限公司; CF16RXII 高速冷冻离心机, 日本 Hitachi 公司; F6/10 手持均质机, 上海净信实业发展有限公司; SKD-08S2 红外智能消化炉, 上海沛欧分析仪器有限公司; LE2002E 电子分析天平、FiveEosy plus pH 计, Mettler Toledo 国际有限公司; Nicolet-iS50

傅里叶变换红外光谱仪, 美国热电公司; K9860 全自动凯氏定氮仪, 山东海能科学仪器有限公司; F-4700 荧光分光光度计, 日本 Hitachi 公司; Waters e2695 高效液相色谱仪, 美国 Waters 公司。

1.3 方 法

1.3.1 草鱼鱼糜及凝胶的制备 参考 Zhang 等^[15]的方法, 击晕草鱼后, 去掉头、尾、内脏和鱼骨, 清洗干净后, 取背脊肉, 用采肉机进行采肉处理, 将得到的碎鱼肉称重, 用 5 倍体积的预冷蒸馏水漂洗, 离心后的碎肉用含质量分数 0.5%的 NaCl 的 5 倍预冷蒸馏水再次漂洗, 最后用 5 倍体积的预冷蒸馏水漂洗, 脱水以获得鱼肉糜, 整个处理过程温度保持在 10℃以下。取部分鱼肉糜样品测其水分含量并计算制备鱼糜配方。称取一定质量的鱼肉糜, 分别加入鱼肉糜质量分数 0.5%的葡聚糖 (DX) 以及质量分数 8%的商业抗冻剂 (4%山梨糖醇+4%蔗糖), 将糖-鱼糜混合物的水分含量调整至 80%, 用斩拌机中速 (7 档) 斩拌 3 min, 每 30 s 停顿 1 次, 使其混合均匀。以未添加抗冻剂的鱼糜为空白对照组 (CK), 添加商业抗冻剂为阴性对照 (CA)。取适量的鱼糜, 加入鱼糜质量分数 2%的 NaCl, 用斩拌机高速 (7 档) 斩拌 3 min, 使其凝胶化。将斩拌好的鱼糜装入 50 mL 离心管中, 采用离心法排气, 离心条件: 3 000 r/min, 10 min, 4℃。采用两步式加热, 第一阶段: 40℃加热 60 min, 第二阶段: 90℃加热 30 min^[16]。迅速流水冷却 15 min, 置于 4℃冰箱过夜平衡, 次日取出测定相关指标。

1.3.2 凝胶强度 将凝胶样品置于室温平衡 1 h, 然后待其温度降为室温后, 将样品统一切成 20 mm 厚度的圆柱体。将待测样品放置在质构仪载体台上, 参数设定为: P5S 探头, 穿刺前探头运行速度为 1.00 mm/s, 穿刺过程中的运行速度为 1.00 mm/s, 返回速度 10 mm/s, 压缩距离为 5 mm, 最小感应力 5 g。每个样品测定 6 次平行。筛选葡聚糖添加量用于后续试验。

1.3.3 体外静态模拟消化 体外静态模拟胃肠消化方法参考 Minekus 等^[17]、张诗雯^[18]和 Wu 等^[19]方法, 按表 1 配制相应的电解质唾沫模拟液 (Saliva simulation fluid, SSF)、模拟胃液 (Simulated gastric fluid, SGF) 和模拟肠液 (Simulated intestinal

fluid, SIF)电解质储备溶液。在初始口腔阶段,将5 g 凝胶样品加入3.5 mL SSF 电解质储备液混合并一起剁碎。加入0.5 mL 在SSF 电解质原液中配制的1 500 U/mL的唾液 α -淀粉酶溶液,然后加入25 μ L 0.3 mol/L CaCl_2 和975 μ L 去离子水,调节pH值为7,用手持均质机匀浆2 min,转速2 000 r/min。随后将10 mL 上述口腔液与7.5 mL SGF 电解质储备溶液、1.6 mL 25 000 U/mL 的猪胃蛋白酶储备溶液、5 μ L 0.3 mol/L CaCl_2 、0.2 mL 1 mol/L HCl 和0.695 mL 去离子水混合,调整pH值为2.0。将反应容器置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温振荡器中振荡2 h,在消化过程中,保持消化体系pH值为2.0。在肠阶段,将上述20 mL 胃食糜与11 mL SIF 电解质储备溶液、5.0 mL 胰酶溶液800 U/mL 由基于胰蛋白酶活性的SIF 电解质储备液、2.5 mL 160 mmol/L 新鲜胆汁、40 μ L 0.3 mol/L CaCl_2 、0.15 mL 1 mol/L NaOH 和1.31 mL 去离子水,以达到pH 7.0,在37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养箱中振荡2 h,保持消化体系pH值为7.0。沸水浴3 min 灭酶活,终止消化反应。收集每个消化阶段的样品,在4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 \times g 下离心15 min,分离上清液与沉淀,液氮速冻,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3.4 蛋白质体外消化率的测定 参考《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》(GB 5009.5-2016)^[20]测定鱼糜凝胶蛋白质含量和消化产物的蛋白质含量,每个样品重复3次,参考张诗雯^[18]的方法,鱼糜凝胶消化率按公式(1)计算:

$$\text{蛋白质消化率}(\%) = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100 \quad (1)$$

式中: M_1 为消化前样品蛋白质含量,g/100 g; M_2 为消化后沉淀物中蛋白质含量,g/100 g。

1.3.5 蛋白质水解度的测定 参考张诗雯^[18]的方法,略加修改。样品氨基态氮含量参考《食品安全国家标准 食品中氨基酸态氮的测定》(GB 5009.235-2016)^[21],样品中总含氮量参考《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》(GB 5009.5-2016)^[20]。步骤如下:取2 mL 样液,加5 mL 双蒸水、200 μ L 0.5%酚酞指示剂、2 mL 中性甲醛(现配现用),用0.01 mol/L 标准NaOH溶液滴定至微粉色,记录NaOH溶液消耗体积,以双蒸水为空白对照组,每个样品重复3次。蛋白质的水解度按公式(2)计

表1 模拟消化液电解质液制备表

Table 1 Preparation of simulated digestive solution electrolyte

成分	SSF(pH 7)	SGF(pH 2)	SIF(pH 7)
	浓度/ (mmol/L)	浓度/ (mmol/L)	浓度/ (mmol/L)
KCl	15.1	6.9	6.8
KH_2PO_4	3.7	0.9	0.8
NaHCO_3	13.6	25.0	85.0
NaCl	—	47.2	38.4
MgCl_2	0.15	0.1	0.33
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	0.06	0.5	—

算:

$$\text{蛋白水解度}(\%) = \frac{N_1}{N_2} \times 100 \quad (2)$$

式中: N_1 为样品中总氮量,g/100 mL; N_2 为蛋白水解度以消化后上清液中的氨基态氮含量,g/100 mL。

1.3.6 消化产物的傅里叶变换红外光谱分析 参考Li等^[22]的方法,用傅里叶变换红外光谱仪来描述鱼糜凝胶消化产物的二级结构变化。冷冻干燥后的样品置于-18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱存放。用Nicolet FTIR 光谱仪(Nicolet-50, Madison, WI, USA)记录样品的FTIR 光谱,波长范围设定为4 000~400 cm^{-1} ,扫描时间为32次,分辨率为4 cm^{-1} 。

1.3.7 消化道中AGEs的测定 荧光AGEs的测量方法参考Wu等^[19]的方法,扫描参数:激发波长370 nm,发射波长440 nm,狭缝2.5 nm,扫描速度1 200 nm/s,电压500 V。

1.3.8 糖化位点分析 为探究葡聚糖对鱼糜蛋白糖基化位点,参考1.3.7节的方法,建立葡聚糖-肌球蛋白糖化蛋白模型。采用LC-MS/对糖化蛋白N-糖基化肽段进行蛋白质鉴定与分析。缓冲液A液为0.1%甲酸水溶液,B液为0.1%甲酸乙腈水溶液(乙腈为84%)。色谱柱以95%的A液平衡,样品由自动进样器进样到上样柱(Thermo Scientific Acclaim PepMap100,100 μm \times 2cm,nanoViper C18),经过分析柱(Thermoscientific EASY column,10 cm,ID75 μm ,3 μm ,C18-A2)分离,流速为300 nL/min。样品经色谱分离后用Q-Exactive系列质谱仪进行质谱分析,蛋白质相互作用(PPI)信息是通过

其基因符号或 STRING 软件 (<http://string-db.org/>) 从 IntAct 分子相互作用数据库 (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>) 中检索所得。

1.3.9 数据处理 每组试验至少做 3 次重复,并以“平均值±标准差”表示试验结果,试验数据采用软件 GraphPad Prism9、Origin Pro 2021 处理绘图,用软件 SPSS 20.0 进行显著性差异分析 ($P < 0.05$)。

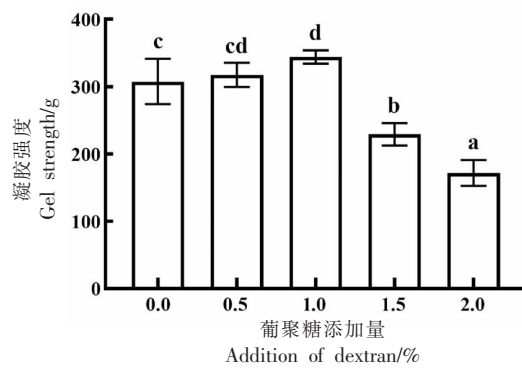
2 结果与分析

2.1 蛋白质体外消化率

葡聚糖不同添加量对鱼糜凝胶强度的影响,如图 1 所示。草鱼鱼糜凝胶强度为 (307.64 ± 27.42) g, 鱼糜凝胶强度随葡聚糖添加量的增加呈先增加后降低的趋势。与空白组相比,添加 0.5% 和 1% 葡聚糖显著增强鱼糜凝胶强度 ($P < 0.05$)。添加 1.0% 葡聚糖时,鱼糜凝胶强度最大为 (343.89 ± 8.17) g, 与空白组相比,增加 38.22%。然而,过量添加葡聚糖会导致鱼糜凝胶强度显著降低 ($P < 0.05$),这可能是由于葡聚糖阻碍了蛋白与蛋白之间的相互作用,降低了蛋白溶液的流动性,导致凝胶强度降低。因此,选择 0.5% 葡聚糖添加到鱼糜凝胶中,探究葡聚糖对草鱼鱼糜贮藏过程中的冷冻保护效果。

2.2 蛋白质体外消化率

体外模拟消化是指模拟食物在人体内的消化过程,可用来分析模拟胃肠道环境下食物中营养成分的消化率和释放行为^[23]。蛋白质体外消化率可以反映食物中蛋白质在胃肠道中的消化情况^[23]。添加葡聚糖对鱼糜凝胶蛋白质消化率的影响如图 2 所示,在胃消化阶段,与 CK、CA 组相比,添加葡聚糖的鱼糜凝胶消化率显著提高 ($P < 0.05$);在肠消化阶段,添加葡聚糖的鱼糜凝胶样品与 2 个对照组相比无差异。这表明添加葡聚糖不影响草鱼鱼糜凝胶的肠消化。肠消化阶段的消化率远高于胃消化阶段 ($P < 0.05$),说明鱼糜凝胶的消化主要发生在肠消化阶段。有研究表明肉类和肉产品的营养质量在很大程度上取决于蛋白质的消化率^[24-25]。Abdel-Aal^[26]报道称,消化率的差异反映的是蛋白质水解酶、消化条件以及蛋白质来源状况。肠消化阶段消化率的上升与胃蛋白酶作用下的蛋



注:不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),下同。

图 1 不同添加量葡聚糖对草鱼鱼糜凝胶强度的影响

Fig.1 Effect of different amounts of dextran on the strength of grass carp surimi gel

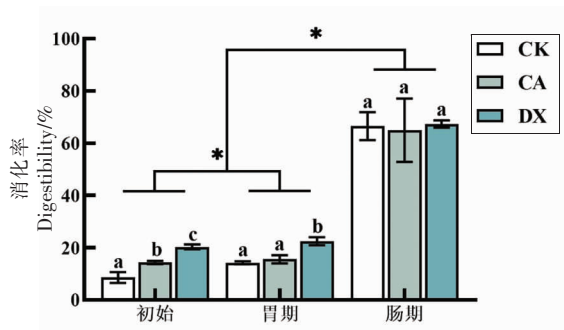
白水解有关。胃蛋白酶是一种消化蛋白酶,其功能是将食物蛋白质分解成小肽片段。胃蛋白酶作用的主要部位是疏水氨基酸的氨基组成的肽键^[27],苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、亮氨酸等疏水性氨基酸为主要酶切位点^[28]。各组在初始和胃消化阶段的消化率存在差异,可能是因为鱼糜经加热后,葡聚糖与鱼糜蛋白相互作用,使蛋白中的疏水性氨基酸暴露,有利于胃蛋白酶的酶切作用,从而增加了蛋白质的消化率。此外,添加葡聚糖可影响复合鱼糜凝胶硬度、弹性和凝胶强度,也可能会影响凝胶的体外消化率^[29]。

2.3 蛋白质水解度

水解度是蛋白质酶切效率的表征,蛋白质水解是一种基团转换,例如将侧链上的酰胺基转换为羧基,深度水解所产生的是小分子肽类及游离氨基酸^[18]。图 3 显示的是葡聚糖对鱼糜凝胶消化水解度的影响。消化后的样品在肠消化阶段的水解度均高于胃消化阶段,说明鱼糜凝胶的消化主要发生在肠阶段,葡聚糖对鱼糜凝胶肠消化的影响较小,与蛋白质消化率的结果一致。

2.4 消化产物的红外光谱及二级结构含量测定结果

鱼糜凝胶体外模拟消化产物的傅里叶红外变换光谱及拟合定量图谱如图 4 所示。经消化后样品的蛋白质特征峰发生改变,消化程度越大,3 247 cm^{-1} (-OH 拉伸)处的特征峰变宽,2 927.41 cm^{-1} (-CH₂ 对称伸缩振动)、2 852.68 cm^{-1} 和 1 080.42 cm^{-1} (C-O、C-C 和 O-H 伸缩振动)处的特征峰变



注:不同小写字母表示组内差异显著 ($P < 0.05$), *. 组间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

图 2 葡聚糖对鱼糜凝胶体外模拟消化后蛋白质消化率的影响

Fig.2 Effect of dextran on protein digestibility of surimi gels after *in vitro* simulated digestion

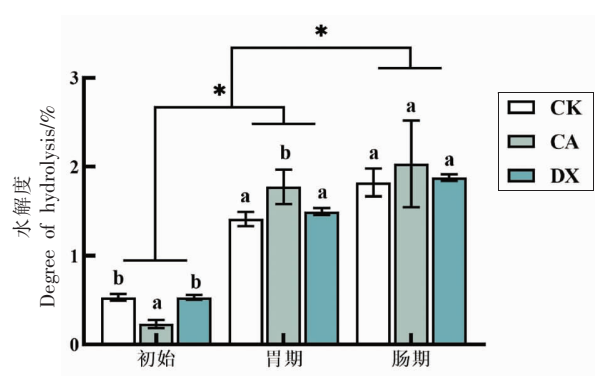


图 3 葡聚糖对鱼糜凝胶体外模拟消化后蛋白质水解度的影响

Fig.3 Effect of dextran on protein digestibility of surimi gels after *in vitro* simulated digestion

尖。鱼糜凝胶消化产物的二级结构比率是根据酰胺 I 带 ($1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$) 中峰面积计算得出^[30]。选取酰胺 I 带 $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ 波段利用 Peak Fit 软件对鱼糜凝胶体外模拟消化产物的 FTIR 曲线经高斯去卷积、二阶导数和曲线拟合进行拟合处理,得到蛋白二级结构的定量信息,如图 4b 所示。与空白对照组 CK 相比,添加葡聚糖的鱼糜凝胶蛋白质二级结构含量无明显差异;经过胃肠消化阶段后的鱼糜凝胶样品的 α -螺旋相对含量减小

了 22.73%, β -折叠相对含量增加了 41.18%。在胃消化阶段,鱼糜凝胶的 β -转角相对含量减小,经过胰蛋白酶水解后,其相对含量相差不大,无规则卷曲相对含量变化与之相同。在胃肠阶段,经过消化液中胃蛋白酶和胰蛋白酶的作用,鱼糜凝胶中氨基酸水解,肽链紊乱,蛋白质结构稳定性降低,蛋白质分子间或多糖与蛋白质间的氢键被破坏,最终导致蛋白质构象改变^[31]。

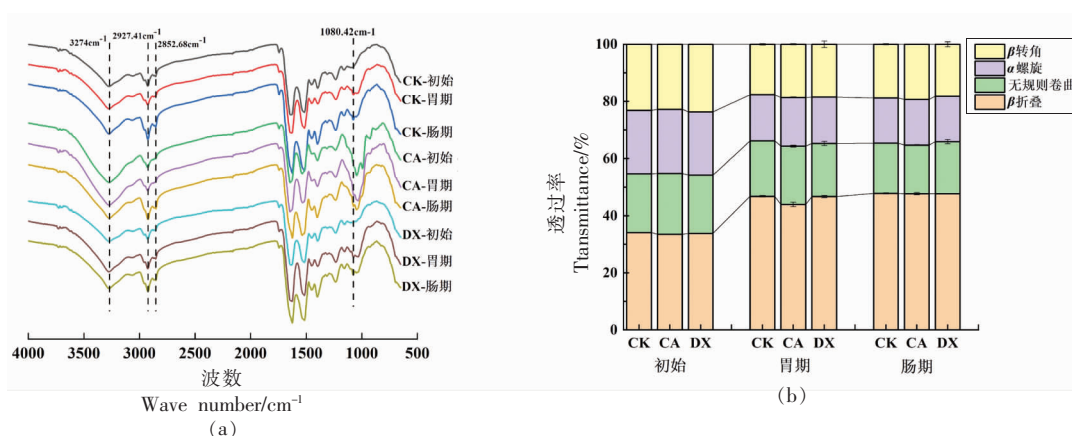


图 4 葡聚糖对鱼糜凝胶体外模拟消化产物的傅里叶变换红外光谱图 (a) 和二级结构含量 (b)

Fig.4 Fourier transform infrared spectra of dextran on *in vitro* simulated digestion products of surimi gels (a) and secondary structure content (b)

2.5 消化道中 AGEs 的测定结果

AGEs 即晚期糖基化终末产物 (Advanced glycation end-products, AGEs) 是蛋白质侧链上的游离氨基在非酶条件下与还原羰基经过一系列不可

逆的裂解、缩合、重排美拉德反应形成糖蛋白的共价交联反应^[8]形成的比较稳定的一类共价化合物的总称,包括戊糖苷等荧光产物和羧甲基赖氨酸等非荧光产物。AGEs 是一类有害美拉德反应产

物,对人体有负面影响^[32]。AGEs 在食品加工中的研究主要以糖化蛋白和糖化氨基酸为主^[33]。食源性糖化蛋白经过胃肠道消化后,会转化为游离 AGEs 和糖化肽与体内蛋白质结合形成内源性糖化蛋白。

图 5 为葡聚糖对鱼糜凝胶体外模拟消化后 AGEs 含量的测定结果,在整个消化过程中,鱼糜凝胶的荧光 AGEs 释放程度为:肠消化阶段>胃消化阶段>初始。在初始阶段,各组鱼糜样品之间的荧光 AGEs 含量无显著变化,这表明添加多糖作为抗冻剂的鱼糜凝胶对于加热凝胶化过程中产生荧光 AGEs 的影响不大。在胃消化阶段,添加葡聚糖的鱼糜凝胶样品的荧光 AGEs 显著高于 CK($P<0.05$),同时与商业鱼糜凝胶相比有显著的优越性($P<0.05$); 各组鱼糜凝胶样品在肠消化阶段与胃消化阶段结果趋势一致,这与样品中糖基化反应中还原糖(葡萄糖)的消耗有关。而商业抗冻剂为 4%蔗糖+4%山梨糖醇,其含量为葡聚糖添加量的 16 倍,导致商业鱼糜凝胶在消化过程中所表现出较大的荧光 AGEs。消化后,小分子糖化氨基酸和糖化肽通过简单扩散直接进入肠上皮细胞,而大分子糖化蛋白则不完全通过肠道细胞单层运输,可能是由肽转运体(PepT-1)穿过顶端膜进入肠道细胞^[34]。它使内源性糖化蛋白更容易在体内形成,而特异性结合的糖化蛋白会诱发人类巨噬细胞的促炎症反应。因此,抑制糖化蛋白在胃肠道的形成和吸收具有重要意义^[35]。糖基化程度受许多因素的影响,包括蛋白质与多糖的物质的量比、蛋白质的氨基酸组成以及可用于偶联形成的氨基的数量^[36]。

2.6 糖化模型建立

为深入探究添加葡聚糖与鱼糜凝胶发生糖基化反应作用位点,以肌球蛋白为研究对象,建立葡聚糖-肌球蛋白模型(DX-Myosin),通过测定不同加热时间的 DX-Myosin 荧光 AGEs 含量监测其糖化程度。如图 6 所示,随着加热时间的延长,蛋白的荧光 AGEs 显著性增大($P<0.05$),加热时间为 3.5 h 时,其荧光 AGEs 不再增加。此时的荧光值达到最高,为 (248.32 ± 35.78) a.u.,此时的糖化程度也最大。

2.7 数据与质控

本试验采用具有高质量精度、高分辨率的 Q

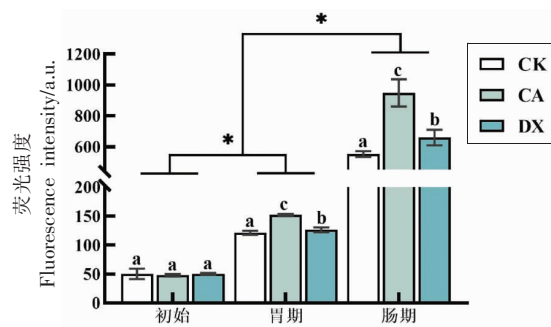
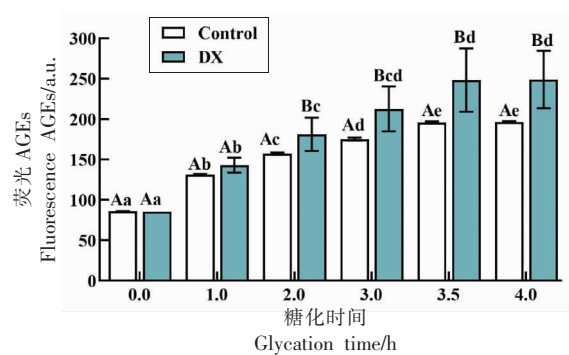


图 5 葡聚糖对鱼糜凝胶体外模拟消化 AGEs 的测定
Fig.5 Determination of AGEs by dextran on *in vitro* simulated digestion of fish surimi gels



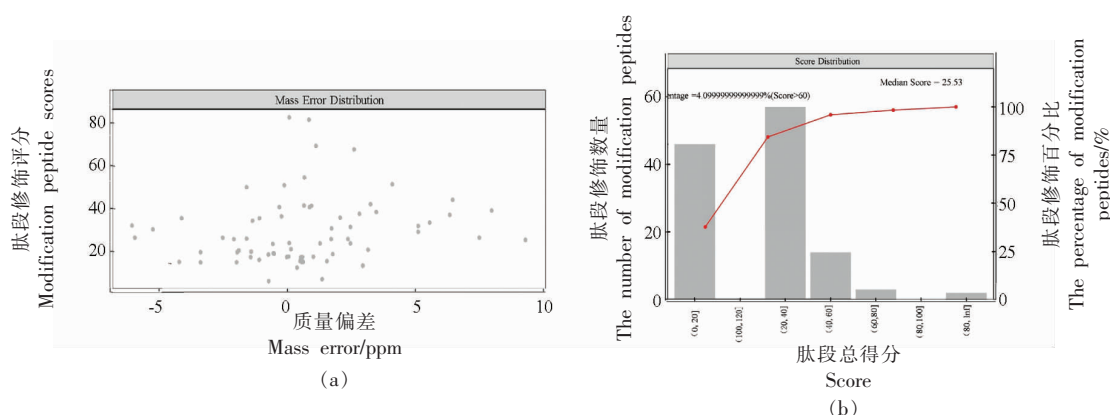
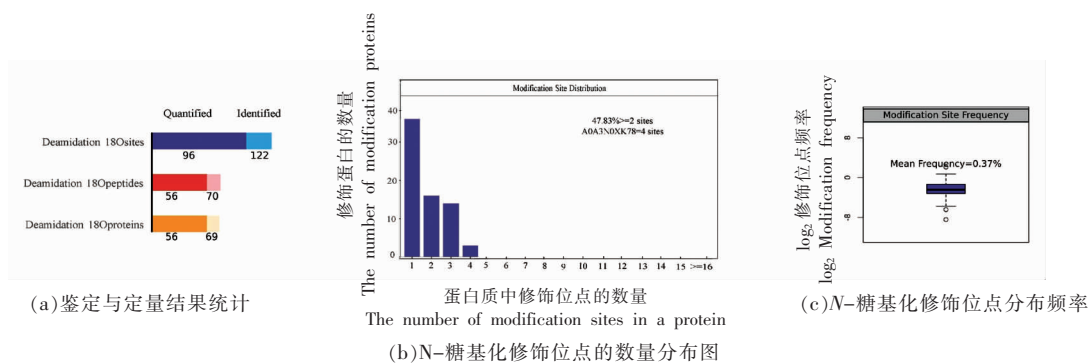
注:不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示组内差异显著($P<0.05$)。

图 6 葡聚糖与草鱼肌球蛋白糖化程度时间监测
Fig.6 Time monitoring of the degree of glycation of dextran and grass carp myosin

Exactive 系列质谱仪,在数据采集过程中可以保持良好的质量偏差,并最终获得高质量的 MS1 和 MS2 图谱。如图 7a 所示,所有鉴定 N-糖基化肽段的质量偏差主要分布在 10 ppm 以内,说明鉴定结果准确可靠。图 7b 表明,MS2 的 Andromeda 得分较为理想,约 4.099999999999999%以上的修饰肽段得分在 60 分以上。肽段得分中位数为 25.53 分。

2.8 N-糖基化蛋白质鉴定和分布

在 Q-Exactive LC-MS/MS 质谱中共鉴定到的 N-糖基化蛋白质、N-糖基化肽段、N-糖基化位点的数目分别为 69, 70, 122(图 8a),其中 56 个修饰蛋白上有 56 条可定量 N-糖基化肽段,96 个可定量 N-糖基化位点。47.83%蛋白质上分布 2 个及以上修饰位点,其中 A0A3N0XK78 蛋白质上含有多达 4 个修饰位点(图 8b)。此外,所有鉴定的修饰

图 7 *N*-糖基化肽段离子质量偏差分布图(a)和离子得分分布图(b)Fig.7 Mass deviation distribution of *N*-glycosylated peptide ions (a) and Ion score distribution (b)图 8 *N*-糖基化蛋白质鉴定和分布结果Fig.8 *N*-glycosylation protein identification and distribution results

蛋白质中,每 100 个氨基酸上发生 *N*-糖基化修饰位点的平均数量为 0.37(图 8c)。

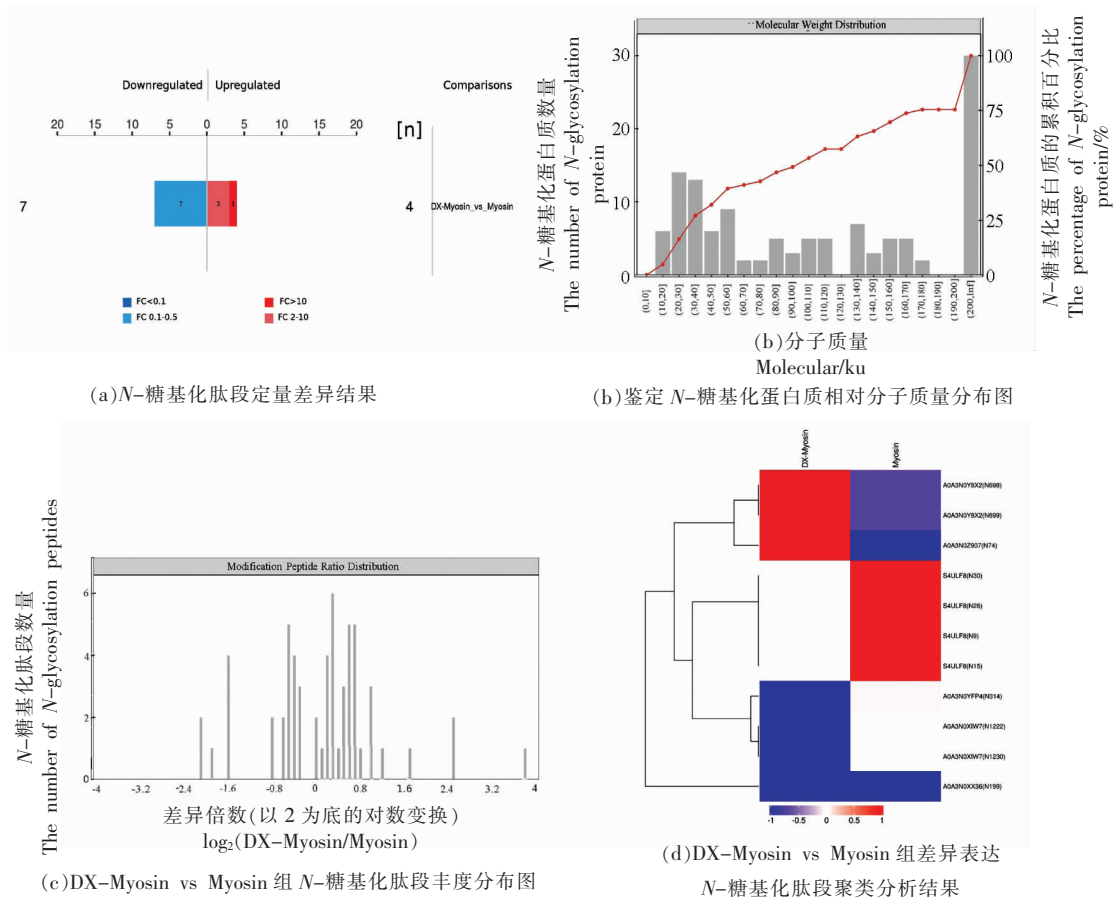
2.9 *N*-糖基化蛋白差异鉴定与位点分析

为探讨葡聚糖对草鱼肌球蛋白糖基化差异的影响,在显著性差异修饰肽段筛选中,以表达倍数(Fold Change, FC)>2 倍,且 $P<0.05$ 为标准,测定样品修饰肽段数目。在两组样品中共检测到 11 个差异修饰肽,将结果以柱状图形式呈现(图 8a),DX-Myosin 与 Myosin 相比有 4 个差异修饰肽上调,7 个差异修饰肽下调。结果表明,葡聚糖参与多个 *N*-糖基化修饰位点。

DX-Myosin 糖基化后用胰蛋白酶酶解后,采用 LC-MS/MS 进行数据采集。*N*-糖基化蛋白质相对分子质量分布图如图 8b 所示,在分子质量为 200 ku 处的 MHC 有 30 个 *N*-糖基化蛋白质,另外,在 10~60 ku 分布着较多的糖基化蛋白质,这表明葡聚糖与肌球蛋白糖基化反应的糖基化蛋白

主要集中在肌球蛋白重链(Myosin heavy chain, MHC)、肌球蛋白轻链(Myosin light chain, MLC)上。Myosin 的糖基化主要发生在 S4ULF8 蛋白质的 N9、N15、N26、N30 氨基酸上较为显著,而 DX-Myosin 组在蛋白 A0A3N0Y8X2 (N698、N699)、蛋白 A0A3N0Z907(N74)表现为显著性上调。因此,推测葡聚糖糖基化反应对蛋白 A0A3N0Y8X2 (N698、N699)和蛋白 A0A3N0Z907 (N74)这 3 个位点作用较强,而对于 A0A3N0YPF4(N314),葡聚糖组的样品不明显,可能是葡聚糖与蛋白分子间相互作用,使其 *N*-糖基化位点变弱。

葡聚糖与蛋白质在美拉德反应过程中的主要糖基化修饰位点是赖氨酸和精氨酸^[37-38]。胰蛋白酶没有特异性,对糖基化产物有很多酶切位点,可以根据相应糖基化片段鉴定出其它的显著性糖化肽段信息(表 2),A0A3N0YFP4(N314)、A0A059PBU4 (N591、N593)、A0A3N0XKJ3 (N425、N426),研究



注:图 d 中色轴显示蛋白质在各组样品中相对上下调的程度,红色代表上调,蓝色代表下调。

图 9 N-糖基化蛋白差异鉴定与位点分析结果

Fig.9 N-glycosylation protein identification and distribution results

表 2 DX-Myosin 糖基化位点显著性差异

Table 2 Significant differences in DX-Myosin glycosylation sites

蛋白质登录号	蛋白质名	蛋白质的理论分子量/ku	修饰位点的位置	序列窗口	修饰位点的可能性	DX-Myosin/Myosin
S4ULF8	MHC class II beta antigen (Fragment)	10.925	9,15,26,30	NGYYESRWNRCIYSN RDFSDMVFI	WN(0.982)RCIYSN (0.982)RDFSDMVFIDN (0.518)YAFN(0.518)K	0.341651738
A0A3N0YFP4	Troponin C, skeletal muscle	44.217	314	KSEEEAECFRVL DKNGDGYIDREEF AEIIR	N(1) GDGYIDREEFAEIR	0.282344606
A0A059PBU4	Myosin heavy chain a	221.23	591,593	EAHFSLVHYAGTVD YNINGWLDKNKDPL NDS	EAHFSLVHYAGTVDYN (0.5)IN(0.5)GWLDK	0.678116321
A0A3N0XKJ3	Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	143.76	425,426	EGDLKLSQESVMDL EN NKQQSDEKIKKKDFE	LSQESVMDLEN(1)N(1) KQQSDEK	1.653095577

发现,葡聚糖主要抑制了肌球蛋白 MHC 上原来的糖基化位点。在不存在任何化学试剂的情况下,蛋白质氨基酸侧链中的游离氨基(主要是 ϵ -氨基)通过自发的美拉德反应与糖的还原性羰基端共价交联,从而产生具有优异功能特性的蛋白质-糖复合物,并避免产生对健康有害的二级产物^[37]。

3 结论

本试验对草鱼鱼糜凝胶进行体外模拟胃肠消化,分析葡聚糖对鱼糜凝胶各消化阶段的消化率、消化产物结构和 AGEs 含量的变化,探讨葡聚糖参与的糖基化反应位点。鱼糜凝胶的消化主要发生在小肠阶段,添加葡聚糖能提高鱼糜凝胶胃消化阶段的消化率;添加葡聚糖不影响鱼糜凝胶的相对二级结构含量,鱼糜凝胶的消化产物发生明显变化,各组的 α -螺旋、 β -转角和无规则卷曲相对含量减少, β -折叠相对含量持续增加。在消化过程中,添加葡聚糖的鱼糜凝胶与商业鱼糜凝胶有相似的消化性,并且显著性降低了 AGEs 在消化过程中的危害。肌球蛋白上鉴定到 96 个可定量 N-糖基化位点,其 N-糖基化反应主要发生在肌球蛋白重链上,葡聚糖能够抑制肌球蛋白原来的糖基化位点,主要与蛋白 A0A3N0Y8X2(N698、N699)和 A0A3N0Z907(N74)等位点发生糖基化反应。因此,葡聚糖可提高鱼糜凝胶在胃阶段的消化率;与商业鱼糜凝胶相比,显著降低消化过程中 AGEs 的含量,并且能够抑制肌球蛋白原本的糖基化位点。

参 考 文 献

- [1] SUN L, SUN J, THAVARAJ P, et al. Effects of thinned young apple polyphenols on the quality of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) surimi during cold storage[J]. Food Chemistry, 2017, 224: 372–381.
- [2] 林昊. 草鱼鱼肉蛋白酶解物及糖基化物的制备以及提高冻藏鱼糜稳定性的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2020.
LIN H. Study on the preparation of protease hydrolysate and glycosylation of grass carp meat and the improvement of the stability of frozen surimi[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2020.
- [3] PARK S H, LEE H J, YOON I S, et al. Protein functionality of concentrates prepared from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) roe by cook-dried process [J]. Food Science and Biotechnology, 2016, 25(6): 1569–1575.
- [4] VERONIQUE S, LAURENT A, GATELLIER A P. Effect of oxidation on *in vitro* digestibility of skeletal muscle myofibrillar proteins[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 5343–5348.
- [5] RAMÍREZ J A, URESTI R M, VELAZQUEZ G, et al. Food hydrocolloids as additives to improve the mechanical and functional properties of fish products: A review[J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(8): 1842–1852.
- [6] 阙凤, 高天麒, 汪超, 等. 不同糖类对草鱼鱼糜凝胶的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 48–55.
QUE F, GAO T Q, WANG C, et al. Effect of different carbohydrates on gel properties of grass carp surimi[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(5): 48–55.
- [7] CHEN X, CHEN K W, CHENG H, et al. Soluble aggregates of myofibrillar proteins engineered by gallic acid: Colloidal structure and resistance to *in vitro* gastric digestion[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(13): 4066–4075.
- [8] CHEN X, TUME R K, XU X L, et al. Solubilization of myofibrillar proteins in water or low ionic strength media: Classical techniques, basic principles, and novel functionalities[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2017, 57(15): 3260–3280.
- [9] WU S, HUANG Y, CHEN M, et al. Protein-bound N-carboxymethyllysine and N-carboxyethyllysine in raw and heat treated whites and yolks of hen eggs [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2020, 90(1): 103491.
- [10] LI Y, XUE C Y, QUAN W, et al. Assessment the influence of salt and polyphosphate on protein oxidation and nepsilon-(carboxymethyl)lysine and nepsilon-(carboxyethyl)lysine formation in roasted beef patties[J]. Meat Science, 2021, 177: 108489.
- [11] MEHTA B M, DEETH H C. Blocked lysine in dairy products: Formation, occurrence, analysis, and nutritional implications[J]. Comprehensive Re-

- views in Food Science and Food Safety, 2016, 15 (1): 206–218.
- [12] SNELSON M, CLARKE R E, COUGHLAN M T. Stirring the pot: Can dietary modification alleviate the burden of CKD? [J]. *Nutrients*, 2017, 9 (3): 265.
- [13] LI T, NIU L H, LI X H, et al. Formation of advanced glycation end-products in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi products during heat treatment as affected by freezing-thawing cycles [J]. *Food Chemistry*, 2022, 395: 133612.
- [14] WANG J, ZOU L, YUAN F Z, 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.
- [15] ZHANG L T, LI Q, LV J, et al. The impact of stunning methods on stress conditions and quality of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) filets stored at 4 °C during 72 h postmortem [J]. *Food Chemistry*, 2017, 216: 130–137.
- [16] FAN M C, HU T, ZHAO S M, et al. Gel characteristics and microstructure of fish myofibrillar protein/cassava starch composites [J]. *Food Chemistry*, 2017, 218: 221–230.
- [17] MINEKUS M, ALMINGER M, ALVITO P, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus [J]. *Food & Function*, 2014, 5(6): 1113–1124.
- [18] 张诗雯. 芹菜对鱼糜制品凝胶品质及体外消化特性的影响[D]. 锦州: 渤海大学, 2019.
ZHANG S W. Effects of celery on gel quality and *in vitro* digestion characteristics of surimi-based production [D]. Jinzhou: Bohai University, 2019.
- [19] WU Q, OUYANG Y, FENG Y N, et al. Comparative study of the inhibitory effects of lotus seedpod oligomeric procyanidins on dietary AGE released from glycated casein during digestion [J]. *Food Research International*, 2022, 152: 110912.
- [20] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中蛋白质的测定: GB 5009.5–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 12. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. Determination of protein in foods: GB 5009.5–2016[S]. Beijing: Standard Press of China, 2016: 12.
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中氨基酸态氮的测定: GB 5009.235–2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016: 12. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Determination of amino acid nitrogen in food: GB 5009.235–2016[S]. Beijing: Standard Press of China, 2016: 12.
- [22] LI X H, LI S G, SHI G P, et al. Quantitative proteomics insights into gel properties changes of myofibrillar protein from *Procambarus clarkii* under cold stress [J]. *Food Chemistry*, 2022, 372: 130935.
- [23] 钟坦君, 洪鹏志, 周春霞, 等. 没食子酸对金线鱼鱼糜凝胶特性及其体外消化产物活性的影响 [J]. *食品科学*, 2022, 43(14): 76–84.
ZHONG T J, HONG P Z, ZHOU C X, et al. Effect of gallic acid on gel properties and *in vitro* activity of digested products of *Nemipterus virgatus* surimi [J]. *Food Science*, 2022, 43(14): 76–84.
- [24] 孟粉, 秦求思, 董焱, 等. 蛋白质氧化和酶对草鱼重组鱼肉品质及体外模拟消化的影响 [J]. *中国食品学报*, 2021, 21(9): 288–295.
MENG F, QIN Q S, DONG Y, et al. Effects of protein oxidation and TGase on the quality of restructured minced grass carp and *in vitro* simulated digestion [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(9): 288–295.
- [25] SUN W Z, ZHOU F B, ZHAO M M, et al. Physicochemical changes of myofibrillar proteins during processing of Cantonese sausage in relation to their aggregation behaviour and *in vitro* digestibility [J]. *Food Chem*, 2011, 129(2): 472–478.
- [26] ABDEL-AAL E S M. Effects of baking on protein digestibility of organic spelt products determined by two *in vitro* digestion methods [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2008, 41(7): 1282–1288.
- [27] FANG M B, XIONG S B, HU Y, et al. *In vitro* pepsin digestion of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi gels after cross-linking by Microbial Transglutaminase (MTGase) [J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 95: 152–160.
- [28] MOHAMMADIAN M, MADADLOU A. Cold-set hydrogels made of whey protein nanofibrils with different divalent cations [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 89: 499–506.
- [29] 游刚, 张自然, 李莹, 等. 钙离子对仙草胶-鱼糜凝

- 胶特性和体外消化性的影响[J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 100–106.
- YOU G, ZHANG Z R, LI Y, et al. Effects of Ca^{2+} on the gel properties and *in vitro* digestibility of HG-added surimi gel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 100–106.
- [30] KOBAYASHI Y, MAYER S G, PARK J W. FT-IR and Raman spectroscopies determine structural changes of tilapia fish protein isolate and surimi under different comminution conditions[J]. Food Chemistry, 2017, 226: 156–164.
- [31] 毛小雨, 许馨予, 杨鹤隽, 等. 紫花芸豆蛋白体外消化产物的抗氧化活性及结构特征分析[J]. 食品科学, 2021, 42(3): 56–62.
- MAO X Y, XU X Y, YANG H J, et al. Antioxidant activity and structural characteristics of *in vitro* digestion products of purple speckled kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Protein[J]. Food Science, 2021, 42(3): 56–62.
- [32] WU Q, ZHAO K Q, CHEN Y Y, et al. Effect of lotus seedpod oligomeric procyanidins on AGEs formation in simulated gastrointestinal tract and cytotoxicity in Caco-2 cells[J]. Food & Function, 2021, 12(8): 3527–3538.
- [33] GUILBAUD A, NIQUET-LERIDON C, BOULANGER E, et al. How can diet affect the accumulation of advanced glycation end-products in the human body?[J]. Foods, 2016, 5(4): 84.
- [34] LIANG Z L, CHEN X, LI L, et al. The fate of dietary advanced glycation end products in the body: From oral intake to excretion[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(20): 3475–3491.
- [35] RASHEED S, SANCHEZ S S, YOUSUF S, et al. Drug repurposing: *In-vitro* anti-glycation properties of 18 common drugs[J]. PLoS One, 2018, 13(1): e0190509.
- [36] JIMÉNEZ-CASTAÑO L, VILLAMIEL M, LÓPEZ-FANDIÑO R. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21: 433–443.
- [37] 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.
- [38] 黄小琴. 基于质谱技术的蛋白质组学方法对食品蛋白质糖基化的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2013.
- HUANG X Q. Food protein glycation studied by mass spectrometry-based proteomics[D]. Nanchang: Nanchang University, 2013.

Effect of Dextran on the *in Vitro* Digestive Properties and Glycosylation of Surimi Gels

Que Feng^{1,2}, Shi Liu¹, Wu Wenjin¹, Chen Sheng¹, Wang Chao², Wang Lan^{1*}

¹Institute of Agricultural Products Processing and Nuclear Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Agricultural Products Cold Chain Logistics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430064

²School of Biological Engineering and Food, Hubei University of Technology, Wuhan 430068

Abstract The effect of dextran (7 000 u) on the digestive properties of surimi gel was investigated using grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) and dextran as an antifreeze agent. An *in vitro* digestion model was used to simulate the gastrointestinal digestion process and to study the changes in digestibility, hydrolysis, free amino acids, digestion product structure and advanced glycation end-products (AGEs) of surimi gels at different digestion stages, to analyze the effects of dextran addition on the digestive properties of surimi gels, and to identify the dextranization sites by glycomics. The results showed that the digestibility of surimi gel was $(69.56 \pm 0.59)\%$ and the degree of hydrolysis was $(1.91 \pm 1.27)\%$ at the end of simulated digestion, that the digestion of surimi gel occurred mainly in the small intestine stage, and that the addition of dextran did not affect the digestibility of surimi gel. The relative content of α -helical results of proteins in the gel of minced fish after digestion decreased by 28.55% and the relative content of β -folded structures increased by 41.04%. In the surimi gel with dextran added, there were substantially less AGEs formed after digestion than in the

CA group ($P < 0.05$). The main sites of action of dextran involved in the glycosylation reaction of surimi gel were A0A3N0Y8X2 (N698, N699) and A0A3N0Z907, and there were a total of 122 *N*-glycosylation sites, 69 *N*-glycosylated proteins, 70 *N*-glycosylated peptides (N74) identified in the LC-MS/MS mass spectrometry.

Keywords dextran; grass carp surimi gel; digestive properties; *N*-glycosylation