

# 丙酮醛改性对麦醇溶蛋白功能特性及结构的影响

杨士娣<sup>1,2</sup>, 张烘焜<sup>1,2</sup>, 庞鑫鑫<sup>1,2</sup>, 陈展鹏<sup>1,2</sup>, 杨容<sup>1,2</sup>, 郑文宇<sup>1,2</sup>, 吴晓梅<sup>1,2</sup>, 曾新安<sup>1,2,3</sup>, 廖兰<sup>1,2\*</sup>

(1. 广东省食品智能制造重点实验室, 广东 佛山 528225; 2. 佛山科学技术学院 食品科学与工程学院, 广东 佛山 528225; 3. 华南理工大学 食品科学与工程学院, 广东 广州 510640)

**摘要:** 该文模拟小麦制品热加工条件, 建立麦醇溶蛋白(gliadin, Gli)-丙酮醛(methylglyoxal, MGO)体系, 用邻苯二甲醛法和荧光光谱法测定不同丙酮醛添加量、糖化温度、糖化时间下, 体系中游离氨基含量变化及晚期糖基化终产物(advanced glycation end-products, AGEs)生成规律, 并对改性后的麦醇溶蛋白的功能特性和结构特性进行表征。结果表明, 在麦醇溶蛋白与丙酮醛质量比 1:6、反应温度 140 °C、反应时间 75 min 时, 产物游离氨基含量较低, AGEs 生成量较少。麦醇溶蛋白与丙酮醛反应后的样品(methylglyoxal-gliadin, MGO-Gli)的乳化活性较未处理的麦醇溶蛋白(native-gliadin, N-Gli)提高 50.03%, 乳化稳定性提高 79.51%; 起泡性和泡沫稳定性分别提高 13.33%、28.20%; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明, 麦醇溶蛋白与丙酮醛发生糖基化反应; MGO-Gli 的紫外光谱结果显示, 光谱峰值发生红移, 说明 MGO-Gli 的内部结构发生伸展, 使内部的色氨酸暴露; 傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)结果表明, Gli 经 MGO 糖基化改性后  $\alpha$ -螺旋结构含量减少、 $\beta$ -折叠结构含量增加、 $\alpha$ -螺旋/ $\beta$ -折叠由 0.608 降为 0.508, 说明 MGO-Gli 的分子柔性增加。

**关键词:** 麦醇溶蛋白; 丙酮醛; 游离氨基含量; 糖基化; 功能特性; 结构

## Effects of Modification with Methylglyoxal on Functional Properties and Structure of Wheat Gliadin

YANG Tu-di<sup>1,2</sup>, ZHANG Hong-kun<sup>1,2</sup>, PANG Xin-xin<sup>1,2</sup>, CHEN Zhan-peng<sup>1,2</sup>, YANG Rong<sup>1,2</sup>,  
ZHENG Wen-yu<sup>1,2</sup>, WU Xiao-mei<sup>1,2</sup>, ZENG Xin-an<sup>1,2,3</sup>, LIAO Lan<sup>1,2\*</sup>

(1. Guangdong Key Laboratory of Food Intelligent Manufacturing Department of Food Science, Foshan 528225, Guangdong, China; 2. College of Food Science and Engineering, Foshan University, Foshan 528225, Guangdong, China; 3. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China)

**Abstract:** The gliadin-methylglyoxal (Gli-MGO) system was established and used for the simulated thermal processing of wheat products. The effects of different MGO additions, modification temperature and time, free amino content, and the formation rule of advanced glycation end-products (AGEs) were determined by o-phthalaldialdehyde (OPA)-based spectrophotometric assay and fluorescence spectroscopy. The effect of MGO on the functional properties and structure modification of gliadin were evaluated. The results showed that the reaction with the Gli-to-MGO mass ratio of 1:6 at 140 °C for 75 min had the product with low free amino content and moderate formation of AGEs. Compared with native gliadin (N-Gli), MGO-Gli showed the emulsion capacity, emulsion stability, foaming capacity, and foaming stability increasing by 50.03%, 79.51%, 13.33%, and 28.20% respectively. The result of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) indicated the occurrence of glycation between Gli and MGO. The result of ultraviolet spectroscopy showed a red shift in the peak, implying the structure of Gli-MGO was extended, leading to exposure of tryptophan residues. The result of Fourier transform-infrared spectroscopy showed that the  $\alpha$ -helix content decreased while the  $\beta$ -sheet content

基金项目: 广东省教育厅佛山科学技术学院省下达 2019 年教育发展专项基金高等教育“冲一流, 补短板, 强特色”重点项目(CGZ07309); 佛山科学技术学院高层次人才科研启动项目(CGZ07001)

作者简介: 杨士娣(1996—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术。

\* 通信作者: 廖兰(1982—), 女(汉), 副教授, 博士, 研究方向: 食品生物技术。

increased and the  $\alpha$ -helix/ $\beta$ -sheet ratio decreased from 0.608 to 0.508 after modification with MGO, indicating that the molecular flexibility of MGO-Gli was improved.

**Key words:** gliadin; methylglyoxal; free amino content; glycation; functional properties; structure

引文格式:

杨土娣,张烘焜,庞鑫鑫,等.丙酮醛改性对麦醇溶蛋白功能特性及结构的影响[J].食品研究与开发,2023,44(5):48-56.

YANG Tudi, ZHANG Hongkun, PANG Xinxin, et al. Effects of Modification with Methylglyoxal on Functional Properties and Structure of Wheat Gliadin[J]. Food Research and Development, 2023, 44(5):48-56.

小麦是我国加工面粉的原料,主要用于生产面条、馒头、饼干和蛋糕。小麦面筋蛋白是生产小麦淀粉的副产品<sup>[1]</sup>,其氨基酸组成比较完整,是营养丰富的优质植物蛋白源。麦醇溶蛋白(gliadin, Gli)占总面筋蛋白的40%~50%,根据酸性条件下的电泳迁移率,醇溶蛋白可分为 $\alpha$ -型、 $\beta$ -型、 $\gamma$ -型和 $\omega$ -型,分别占总量的25%、30%、30%和15%<sup>[2]</sup>。糖和蛋白质是各种小麦制品中最常见的成分,因此,糖基化反应(美拉德反应)在食品加工过程中广泛发生,从而影响产品的色、香、质和保质期<sup>[3-4]</sup>。热加工过程中的糖基化反应会提高蛋白质组分的热稳定性、乳化稳定性和溶解性<sup>[5-6]</sup>,表明糖基化反应可有效改善食品质量。然而糖基化反应除改善蛋白质的功能性质外,还会产生有害物质,不利于保障食品安全<sup>[7]</sup>。

小麦产品在热加工过程中会发生美拉德反应,产生 $\alpha$ -二羰基化合物。 $\alpha$ -二羰基化合物的生成主要发生在美拉德反应的中间阶段,同时它也可由食品体系中碳水化合物的焦糖化或氧化产生<sup>[8]</sup>。在美拉德反应中,醛基与游离氨基反应形成席夫碱,然后重排形成可逆的阿马道里产物,经过氧化、脱水、还原等一系列反应,化学重排、缩合产生大量晚期糖基化终末产物。 $\alpha$ -二羰基化合物作为高活性晚期糖基化中间产物,能与蛋白质中的赖氨酸和精氨酸残基迅速反应,产生羧甲基赖氨酸[N<sub>ε</sub>-(carboxymethyl)lysine, CML]、羧乙基赖氨酸[N<sub>ε</sub>-(carboxyethyl)lysine, CEL]、乙二醛基二聚赖氨酸(glyoxal derived lysine dimer, GOLD)、丙酮醛基二聚赖氨酸(methylglyoxal derived lysine dimer, MOLD)等晚期糖基化终产物(advanced glycation end-products, AGEs)。

AGEs是葡萄糖或其他还原糖与脂类、蛋白质、多肽和氨基酸发生美拉德反应生成的一系列复杂的共价加合物<sup>[9]</sup>。研究发现,AGEs可与人体组织蛋白结合改变组织蛋白的结构和功能,也可与晚期糖基化终产物受体(the receptor of advanced glycation endproducts, RAGEs)发生特异性的结合导致炎症,从而危害人体健康。因此,对于控制小麦制品热加工过程中糖基反应

形成的AGEs生成量的研究引起了广泛的关注。

美拉德反应过程的每个步骤几乎都是可逆和开放的,因此糖基化蛋白质中的糖基化结构类型很复杂。以还原糖为原料制备糖基化蛋白,系统产物复杂,不能很好地反映 $\alpha$ -二羰基化合物与蛋白质的相互作用。因此,本文以AGEs的重要前体—— $\alpha$ -二羰基化合物[丙酮醛(methylglyoxal, MGO)]作为糖基化试剂,模拟小麦产品的热加工条件,探究麦醇溶蛋白与不同丙酮醛添加量在不同糖化温度和时间下,其游离氨基含量变化及AGEs生成的规律,通过分析糖化蛋白的结构以及功能特性的变化,揭示AGEs的生成机理,对小麦制品热加工过程中控制AGEs的生成量及提高热加工小麦制品的质量、营养和安全性具有重要的理论价值和现实意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

麦醇溶蛋白(98%):佛山科学技术学院广东省食品智能制造重点实验室自制;MGO(40%水溶液):上海易恩化学技术有限公司;石油醚、无水乙醇:天津市百世化工有限公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA):合肥博美生物科技有限责任公司;氢氧化钠、尿素、考马斯亮蓝R-250、盐酸胍、三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris]、甘氨酸、三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)、考马斯亮蓝G-250:国药集团化学试剂有限公司;硫酸铜、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、四硼酸钠、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS):西陇科学股份有限公司;酒石酸钾钠:天津市恒兴化学试剂制造有限公司;邻苯二甲醛:上海易汇生物科技有限公司; $\beta$ -巯基乙醇(2-mercaptoethanol,  $\beta$ -ME):上海麦克林生化科技有限公司;乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA):美国Sigma公司;大豆油:益海嘉里金龙鱼粮油食品股份有限公司;5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)[5,5'-dithio bis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB]:上海阿拉丁生化科技股

份有限公司。所有试剂均为分析纯。

## 1.2 仪器与设备

磁力搅拌器(ZNCL-BS):河南爱博特科技发展有限公司;高速冷冻离心机(TGL-20MB):长沙湘智离心机仪器有限公司;pH计(PHS-3E):上海仪电科学仪器股份有限公司;电子分析天平(JA2003):宁波市华丰仪器厂;冷冻干燥机(Scientz-30N):上海泰坦科技股份有限公司;紫外可见分光光度计(EU-2600A):上海昂拉仪器有限公司;高速剪切机(BRT):安徽博进化工机械有限公司;油水浴锅(WO-2L):上海东玺制冷仪器设备有限公司;紫外分光光度计(UV-2700):岛津实验器材有限公司;多功能酶标仪(Thermo-Varioskan.Flash):北京九宇金泰生物技术有限公司;电泳仪(DYCZ-24-DN):北京六一仪器厂;傅里叶变换红外光谱仪(SHIMADZU-IRT racer-100):日本岛津企业有限公司。

## 1.3 方法

### 1.3.1 麦醇溶蛋白及悬浮液的制备

参考文献[10]的方法,称取0.1 g麦醇溶蛋白,加入100 mL的50 mmol/L、pH7.0磷酸盐缓冲溶液,使用高速剪切机以10 000 r/min将麦醇溶蛋白悬浮液均质化,以实现在缓冲液中的均匀分散。

### 1.3.2 游离氨基含量的测定

采用邻苯二甲醛(o-phthaldialdehyde,OPA)法测定蛋白质游离氨基含量<sup>[10]</sup>。OPA试剂配制:称取40 mg邻苯二甲醛,溶于25 mL 10 mmol/L四硼酸钠,加入2.5 mL 20% SDS和100  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇,用超纯水定容至50 mL。将蛋白样品液稀释一定倍数,取1 mL蛋白液与2 mL OPA液混合后摇匀,50  $^{\circ}$ C水浴5 min,冷却至室温(25  $^{\circ}$ C~27  $^{\circ}$ C),在波长340 nm处测定吸光度,游离氨基含量按下式计算,做3组平行。

$$\text{游离氨基含量}/\%=(A-A_0)/(B-B_0)$$

式中:A为糖化蛋白液与OPA液反应后在340 nm处的吸光度; $A_0$ 为糖化蛋白液和缓冲溶液混合后在340 nm处的吸光度;B为未糖化蛋白液与OPA液反应后在340 nm处的吸光度; $B_0$ 为未糖化蛋白液和缓冲溶液混合后在340 nm处的吸光度。

### 1.3.3 荧光分光光度法检测样品中AGEs生成量

参考文献[11]的方法,将糖化蛋白液稀释一定倍数,控制荧光强度在1 000以下,在电压700 V、激发波长370 nm、发射波长440 nm下进行扫描,测定糖化蛋白的荧光强度,所有试样做3组平行。

### 1.3.4 麦醇溶蛋白改性过程中游离氨基含量和AGEs生成量的影响因素分析

#### 1.3.4.1 丙酮醛添加量的影响

取5 mL 1 mg/mL麦醇溶蛋白悬浮液于血清瓶中,分别加入不同添加量MGO(40%),使麦醇溶蛋白和

MGO的质量比分别为1:1、1:2、1:4、1:6、1:8、1:10。然后将混合液于100  $^{\circ}$ C油水浴锅中加热30 min,反应结束后置于冰水浴中冷却至室温(25  $^{\circ}$ C~27  $^{\circ}$ C),分别按照1.3.2和1.3.3所述方法检测游离氨基含量和AGEs生成量。将不含MGO的麦醇溶蛋白悬浮液于100  $^{\circ}$ C油水浴锅中加热30 min作为对照。

#### 1.3.4.2 糖化温度的影响

取5 mL 1 mg/mL麦醇溶蛋白悬浮液于血清瓶中,加75  $\mu$ L 40%MGO到悬浮液中,然后将混合液分别在80、100、120、140、160、180  $^{\circ}$ C下加热30 min。将不含MGO的麦醇溶蛋白悬浮液作为对照。反应结束后置于冰水浴中冷却至室温(25  $^{\circ}$ C~27  $^{\circ}$ C),分别按照1.3.2和1.3.3所述方法检测游离氨基含量和AGEs生成量。

#### 1.3.4.3 糖化时间的影响

取5 mL 1 mg/mL麦醇溶蛋白悬浮液于血清瓶中,加75  $\mu$ L 40%MGO到悬浮液中,使麦醇溶蛋白和MGO的质量比为1:6。然后将混合液在140  $^{\circ}$ C油水浴锅中分别加热15、30、45、60、75、90 min。用pH7.0的磷酸盐缓冲溶液代替丙酮醛溶液作为对照。反应结束后置于冰水浴中冷却至室温(25  $^{\circ}$ C~27  $^{\circ}$ C),分别按照1.3.2和1.3.3所述方法检测游离氨基含量和AGEs生成量。

### 1.3.5 糖基化改性对麦醇溶蛋白结构和功能的影响

#### 1.3.5.1 样品的制备

根据1.3.4的结果,糖化蛋白的制备:取5 mL 1 mg/mL原始麦醇溶蛋白(native-gliadin,N-Gli)悬浮液于血清瓶中,加75  $\mu$ L 40%MGO到悬浮液中,使麦醇溶蛋白和MGO的质量比为1:6,然后将混合液在140  $^{\circ}$ C油水浴锅中加热75 min,反应结束后于冰水浴中冷却至室温(25  $^{\circ}$ C~27  $^{\circ}$ C)后置于-10  $^{\circ}$ C下保存;加热麦醇溶蛋白(heated-gliadin,H-Gli)的制备:取5 mL 1 mg/mL原始麦醇溶蛋白(native-gliadin,N-Gli)悬浮液于血清瓶中,加75  $\mu$ L pH7.0的磷酸盐缓冲溶液代替丙酮醛溶液,其余操作同糖化蛋白的制备。

#### 1.3.5.2 乳化性能测定

根据Bi等<sup>[12]</sup>的方法测定样品乳化活力指数(emulsion capacity,EAI)和乳化稳定性(emulsion stability,ESI),准确称取一定量N-Gli、H-Gli和MGO-Gli样品溶解于磷酸盐缓冲溶液(50 mmol/L、pH7.0)中,配制成蛋白浓度为3 mg/mL的样品溶液。取9 mL蛋白溶液置于烧杯,加入3 mL大豆油,利用高速剪切机对溶液进行均质处理(19 000 r/min)1 min,然后从乳液底部取样50  $\mu$ L,于10 mL预先配制的SDS溶液(0.1%)中混合均匀,然后分别在0、30 min取样,于500 nm波长处测定吸光度,空白液为SDS溶液,根据以下公式计算EAI、ESI。

$$EAI/(m^2/g) = 2 \times (2.303 \times A_{500}) \times N \times 10^{-4} / (\Phi LC)$$

式中:  $A_{500}$  为样品在 500 nm 处的吸光度;  $N$  为稀释倍数;  $\Phi$  为玉米油的体积分数, 0.25;  $L$  为比色池光径, 1 cm;  $C$  为蛋白浓度, 3 mg/mL。

$$ESI/\% = A_0 \times \Delta t / (A_0 - A_{30})$$

式中:  $A_0$ 、 $A_{30}$  为 0、30 min 时样品于 500 nm 处的吸光度;  $\Delta t$  为时间差, 30 min。

### 1.3.5.3 起泡性能测定

参考文献[13]的方法, 将蛋白样品溶于磷酸盐缓冲液中, 配制蛋白浓度为 5 mg/mL 的溶液, 利用高速剪切机对溶液进行均质处理(19 000 r/min) 1 min, 分别准确记录蛋白溶液搅打后 0、30 min 时的泡沫体积高度, 根据以下公式计算起泡性(foaming capacity, FC)和起泡稳定性(foaming stability, FS)。

$$FC/\% = (V_0 - V) / V \times 100$$

$$FS/\% = (V_{30} - V) / (V_0 - V) \times 100$$

式中:  $V$  为蛋白原液体积, mL;  $V_0$ 、 $V_{30}$  为蛋白溶液经高速均质机搅打后 0 min 和 30 min 的体积, mL。

### 1.3.5.4 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳的测定

根据 Xue 等<sup>[14]</sup>方法并作修改, 聚丙烯酰胺电泳试验对不同处理蛋白样品蛋白亚基条带进行测定的具体操作: 1) 配制质量分数为 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶; 2) 蛋白变性处理: 取约 2 mg 蛋白样品于 2 mL 离心管中, 加入含有 5%  $\beta$ -巯基乙醇、2% SDS、10% 丙三醇和 0.002% 溴酚蓝的 Tris-HCl 缓冲液(pH 6.7, 0.5 mol/L), 充分溶解配制成 2 mg/mL 蛋白溶液, 并置于沸水 5 min; 3) 进样: 将变性蛋白溶液离心(5 000 r/min, 5 min), 取 15  $\mu$ L 上清液于电泳进样槽中, 电压 120 V 直至样品达底部; 4) 电泳凝胶采用考马斯亮蓝 R-250(0.1%)染色, 并使用脱色液(含乙酸 40%)多次脱色至条带清晰, 于凝胶成像系统拍照观察。

### 1.3.5.5 紫外光谱的测定

参考文献[15]的方法, 准确称量 N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 样品溶解于磷酸盐缓冲溶液(50 mmol/L、pH 7.0)中, 配制蛋白浓度为 1 mg/mL 的 N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 蛋白溶液, 样品的扫描波长范围为 290 nm~600 nm。

### 1.3.5.6 傅里叶红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)分析

根据 Ai 等<sup>[16]</sup>的方法稍作修改, 分别取 N-Gli、H-Gli 和 Gli-MGO 与 KBr 按质量比 1:100 混合, 研磨并压成 1 mm 的薄膜, 在 4 000  $cm^{-1}$ ~400  $cm^{-1}$  波数、以分辨率为 2  $cm^{-1}$  扫描 128 次。使用 Peak Fit 软件对酰胺 I 带(1 700  $cm^{-1}$ ~1 600  $cm^{-1}$ )去卷积处理, 计算蛋白质的二级结构含量。

### 1.3.5.7 游离巯基和二硫键的测定

根据 Wang 等<sup>[17]</sup>的方法并略作修改。具体操作: 称取 75 mg 冻干样品, 加入 4.7 g 盐酸胍, 并用 Tris-Gly 缓冲液(pH 8.0)定容至 10 mL。然后取 1 mL 样液再加入 4 mL 8 mol/L 尿素振荡均匀, 25  $^{\circ}C$  放置 30 min, 每隔 10 min 混匀 1 次, 离心(4  $^{\circ}C$ , 5 000 $\times g$ , 10 min)后得到上清液。将部分上清液用考马斯亮蓝 G-250 测蛋白含量; 另外取 1 mL 上清液加入 20  $\mu$ L Ellman 试剂[将含 1.04% Tris、0.69% 甘氨酸和 0.12% EDTA 的 Tris-Gly 缓冲液(pH 8.0)配制成 4 mg/mL 的 DNTB 溶液]迅速混合, 于 25  $^{\circ}C$  下避光反应 30 min, 在 412 nm 下测定吸光度, 空白对照为上述缓冲液。

总巯基含量的测定: 取 75 mg 冻干样品, 加入 4.7 g 盐酸胍, 并用 Tris-Gly 缓冲液(pH 8.0)定容至 10 mL, 样液加入 4 mL Urea-GuHCl 溶液(含 8 mol/L 尿素和 5 mol/L 盐酸胍的 Tris-Gly 缓冲液)、0.05 mL  $\beta$ -巯基乙醇, 25  $^{\circ}C$  保温 1 h, 再加入 10 mL 12% TCA 溶液, 继续 25  $^{\circ}C$  保温 1 h 后离心(4  $^{\circ}C$ , 5 000 $\times g$ , 10 min), 将样品中的沉淀分散于 10 mL TCA(12%)溶液中后离心(4  $^{\circ}C$ , 5 000 $\times g$ , 10 min)以除去  $\beta$ -ME, 重复 2 次后再将沉淀溶解于 10 mL 8 mol/L 尿素中, 振荡均匀至溶解完全。取一部分上清液用考马斯亮蓝 G-250 测蛋白含量, 再取 1 mL 上清液加入 20  $\mu$ L Ellman 试剂, 避光反应 30 min, 测定上清液在 412 nm 下的吸光度。

巯基(-SH)含量和二硫键(-S-S-)含量的计算公式如下。

$$-SH/(\mu\text{mol/g}) = (73.53 \times A_{412} \times D) / C$$

$$-S-S-/(\mu\text{mol/g}) = (SH_{\text{total}} - SH_{\text{free}}) / 2$$

式中: 73.53 为 Ellman 试剂的摩尔吸光系数;  $A_{412}$  为样品在 412 nm 下所测的吸光度;  $D$  为稀释因子;  $C$  为样品浓度, mg/mL;  $SH_{\text{total}}$  为总巯基含量,  $\mu\text{mol/g}$ ;  $SH_{\text{free}}$  为游离巯基含量,  $\mu\text{mol/g}$ 。

## 1.4 数据统计与分析

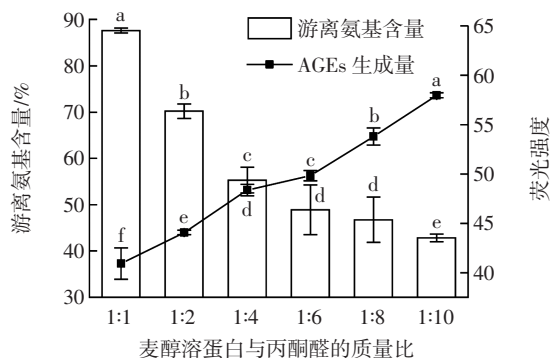
所有试验均进行 3 次平行试验, 结果采用 SPSS 13.0 软件中最小显著法(least significance difference method, LSD)进行方差和显著性分析, 以  $P < 0.05$  表示差异显著, 采用 Origin 8.0 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 丙酮醛添加量对醇溶蛋白改性过程中游离氨基酸含量和 AGEs 生成量的影响

丙酮醛添加量对醇溶蛋白改性过程中游离氨基酸含量和 AGEs 生成量的影响见图 1。

由图 1 可知, 随着丙酮醛添加量的增大, 糖化蛋白的游离氨基酸含量逐渐下降, 从 88% 下降到 43%, 当丙酮醛添加量大于 75  $\mu$ L (Gli 与 MGO 的质量比为 1:6),



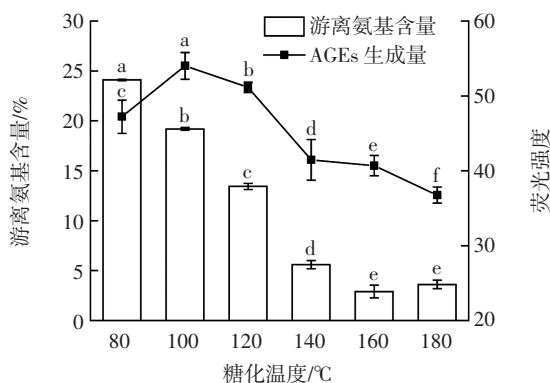
同组不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

图1 丙酮醛添加量对糖化蛋白游离氨基含量和 AGEs 生成量的影响  
Fig.1 The effect of the amount of MGO added on the content of free amino groups and the amount of AGEs in glycated protein

糖化蛋白的游离氨基含量下降缓慢,这可能是由于随着 MGO 添加量的增加,MGO 和 Gli 碰撞的几率会增大,反应程度也随之增大。但随着反应的进行会产生一定的空间位阻,使得过多的 MGO 无法继续与蛋白游离氨基接触反应<sup>[18]</sup>。另一方面,随着丙酮醛添加量的增大,糖化蛋白的荧光强度逐渐增大,即 AGEs 的生成量逐渐增多。因此,为提高其安全性,在确保糖基化改性效果的前提下,应优先选择适中的丙酮醛添加量,即丙酮醛添加量应控制在  $75\ \mu\text{L}$ (1:6) 以内以减少有害物质 AGEs 的产生。

## 2.2 糖化温度对醇溶蛋白改性过程中游离氨基含量和 AGEs 生成量的影响

图2为糖化温度对醇溶蛋白改性过程中游离氨基含量和 AGEs 生成量的影响。



同组不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

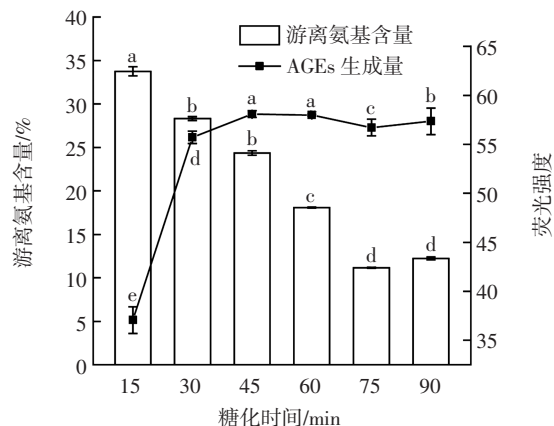
图2 糖化温度对糖化蛋白游离氨基含量和 AGEs 生成量的影响  
Fig.2 The effect of glycation temperature on the content of free amino groups and the amount of AGEs in glycated protein

由图2可知,游离氨基含量随着糖化温度的升高而逐渐下降,从24%降低到3%,140℃之后下降缓慢。这是因为温度越高,糖基化反应程度越大,是典型的热反应<sup>[19]</sup>。另一方面,随着糖化温度的升高,AGEs 的

生成量先上升,当糖化温度大于100℃时,荧光性 AGEs 生成量急剧下降最后趋于稳定。推测是100℃处理后,模拟体系中的麦醇溶蛋白会加速与 MGO 反应生成 AGEs,引起荧光值迅速增大;但在更高温度(140、160℃)下,糖基化程度加剧,荧光性 AGEs 生成量减少。其原因是升温加快了美拉德反应速率,在100℃时 AGEs 生成最多,但随着温度的升高,反应中荧光性 AGEs 迅速转化成类黑素等不具有荧光性的物质而导致荧光值降低<sup>[20]</sup>。由此发现在糖化温度140℃的反应条件下,其糖基化程度较高,而 AGEs 的生成量较低。因此,为了降低体系中美拉德反应过程有害产物的生成量,应选择在140℃下进行糖化反应。

## 2.3 糖化时间对醇溶蛋白改性过程中游离氨基含量和 AGEs 生成量的影响

糖化时间对醇溶蛋白改性过程中游离氨基含量和 AGEs 生成量的影响如图3所示。



同组不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

图3 糖化时间对糖化蛋白游离氨基含量和 AGEs 生成量的影响  
Fig.3 The effect of glycation time on the content of free amino groups and the amount of AGEs in glycated protein

由图3可知,糖化蛋白的游离氨基含量随糖化时间的延长逐渐下降,从34%降低到11%,糖化75min后游离氨基含量的变化不显著( $P>0.05$ ),表明糖基化程度逐渐加深并趋于平缓。这是由于前期丙酮醛会迅速与暴露在蛋白质表面的游离氨基发生反应,随着反应程度的加深,丙酮醛的接入产生一定的空间位阻,从而限制了反应的进行。另一方面,随着糖化时间的延长,糖化蛋白的荧光强度逐渐增大,但45min之后,AGEs 的生成量随着糖化时间的延长而减少,与刘慧琳等<sup>[21]</sup>的结果相同。推测是由于随着糖基化反应时间的延长,荧光性 AGEs 进一步转变成不具荧光性的物质(如类黑素)。由于有害产物 AGEs 生成量与糖化时间成正比,因此改性时间不宜过长,选择75min作为糖化时间,此时具有较好的糖基化效果和较低的有害物生成量。

## 2.4 糖基化改性对麦醇溶蛋白结构和功能的影响

N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 的功能特性如表 1 所示。

表 1 N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 的功能特性

Table 1 The functional properties of N-Gli, H-Gli and MGO-Gli

| 样品      | 乳化性/<br>(m <sup>2</sup> /g) | 乳化稳定性/%                   | 起泡性/%                     | 起泡稳定性/%                   |
|---------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| N-Gli   | 4.295±0.510 <sup>a</sup>    | 18.333±2.250 <sup>b</sup> | 38.333±0.020 <sup>b</sup> | 17.424±0.010 <sup>c</sup> |
| H-Gli   | 3.271±0.690 <sup>b</sup>    | 17.778±8.650 <sup>b</sup> | 26.667±0.050 <sup>c</sup> | 30.952±0.030 <sup>b</sup> |
| MGO-Gli | 6.444±0.820 <sup>a</sup>    | 32.910±9.860 <sup>a</sup> | 51.667±0.020 <sup>a</sup> | 45.625±0.200 <sup>a</sup> |

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

## 2.4.1 乳化性和乳化稳定性分析

由表 1 可知,经糖基化处理后的 MGO-Gli 乳化性最高,为 6.444 m<sup>2</sup>/g,较 N-Gli 提高了 50.03%,而经加热处理后 H-Gli 的乳化性较 N-Gli 下降了 23.84%( $P<0.05$ )。这可能是因为 MGO 的糖基化修饰使分子大小和溶解度增加,提高了 MGO-Gli 的可溶性蛋白含量,从而使吸附到乳液液滴表面的蛋白质增多,乳滴之间的絮凝减少,麦醇溶蛋白的乳化能力随之增加。经丙酮醛糖基化修饰后的麦醇溶蛋白容易相互交联形成更大尺寸的分子,由于这种大分子聚合物在乳化过程中有利于抑制液滴的聚集和破裂,从而有效提高蛋白的乳化性和乳化稳定性<sup>[22]</sup>。而在仅加热的过程中蛋白质发生变性,引发多聚集体的产生,降低了蛋白分子的柔顺性和溶解度,使蛋白更难分散于乳化界面中,这在一定程度上降低蛋白的乳化性<sup>[23]</sup>。

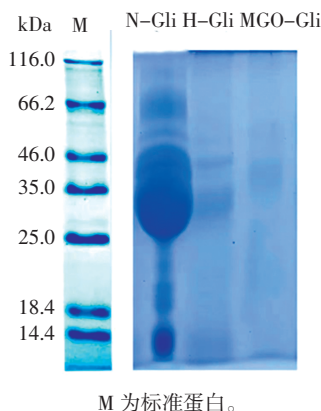
## 2.4.2 起泡性和起泡稳定性分析

由表 1 可知,MGO-Gli 的起泡性和泡沫稳定性较 N-Gli 均有明显提高,原因可能是 MGO 和麦醇溶蛋白之间的共价结合,导致麦醇溶蛋白上亲水基团的数量增加,从而提高了麦醇溶蛋白的溶解度,进一步导致 MGO-Gli 的起泡性增加<sup>[24]</sup>。但 H-Gli 较 N-Gli 的起泡性轻微减弱,这可能是由于加热导致蛋白质大量变性,蛋白质分子结构展开,从而提高内部的疏水基团和巯基暴露程度,麦醇溶蛋白分子通过非共价键重新连接,形成更大的分子聚集体,从而降低了水-空气界面膜的稳定性,使蛋白的起泡性下降<sup>[25]</sup>。

## 2.4.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱分析

本文将麦醇溶蛋白与丙酮醛反应后的样品(MGO-Gli)进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析,以未处理的麦醇溶蛋白(N-Gli)和加热时不加丙酮醛的样品(H-Gli)作为对照,电泳结果如图 4 所示。

由图 4 可知,N-Gli 分子量主要分布在 25 kDa~46 kDa,分别对应  $\alpha$ - $\beta$ -和  $\gamma$ -醇溶蛋白,并且在 66.2 kDa 处出现浅色条带,与其他文献<sup>[26-27]</sup>结果一致。与 N-Gli 相比,H-Gli 在低分子量的条带消失,出现的条带主要



M 为标准蛋白。

图 4 N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 的电泳图谱

Fig.4 Electrophoresis patterns of N-Gli, H-Gli and MGO-Gli

分布在 28.1 kDa 和 46 kDa,推测是由于加热导致蛋白发生聚集,分子量聚集。而相比 N-Gli 和 H-Gli,糖化蛋白(MGO-Gli)亚基条带的颜色较浅,这是因为考马斯亮蓝主要以非共价作用与蛋白质分子上游离氨基、巯基等活性基团相结合,呈现颜色反应<sup>[28]</sup>。当 MGO-Gli 进行糖基化反应时,游离氨基和巯基含量迅速减少,阻碍了考马斯亮蓝与蛋白质分子的结合,导致电泳凝胶用考马斯亮蓝染色时不显色,这一现象也间接表明麦醇溶蛋白与 MGO 是以共价键结合,而且在浓缩胶与分离胶分界线处观察到染色现象,同时低分子量处的蛋白条带消失,这说明小分子蛋白质经过 MGO 修饰糖化反应生成了分子量较大、难以通过浓缩胶进入分离胶的大分子聚合物。电泳的试验结果进一步证实了丙酮醛和麦醇溶蛋白发生了糖基化反应,形成了以共价键结合的糖蛋白聚合物。

## 2.4.4 紫外光谱分析

图 5 为 N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 的紫外光谱。

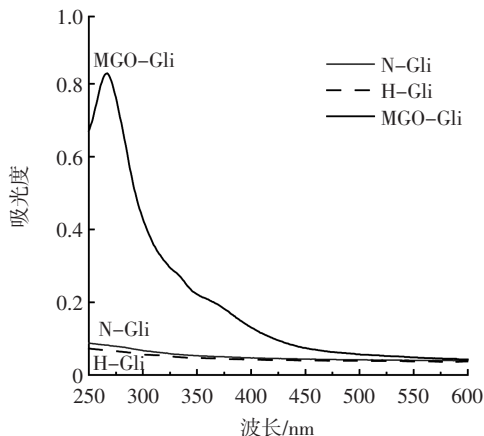


图 5 N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 的紫外光谱

Fig.5 UV spectrum of of N-Gli, H-Gli and MGO-Gli

蛋白质本身含有带芳香环的色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸残基,并在 280 nm 处具有特殊的紫外吸收<sup>[29-30]</sup>。如图 5 所示,MGO-Gli 与 H-Gli、N-Gli 的紫外光谱曲

线有着明显的不同,丙酮醛糖化过程中除了提高糖化蛋白在 280 nm 处的紫外吸收峰峰值,也在 330 nm 左右出现了新的吸收峰,说明糖基化过程改变了基团的微环境,暴露了肽链上具有紫外吸收的色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸残基<sup>[31]</sup>,且伴随糖基化反应的进行产生了新的具有紫外吸收的结构物质。

#### 2.4.5 红外光谱分析

N-Gli、H-Gli 及糖基化 MGO-Gli 的红外光谱如图 6 所示。

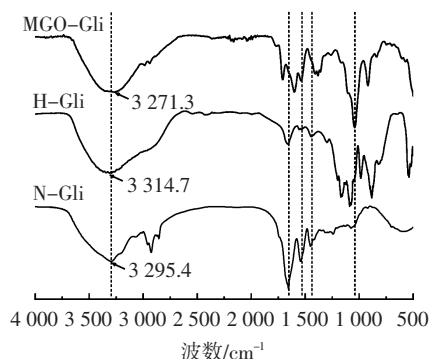


图 6 N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 的红外光谱  
Fig.6 FT-IR spectra of N-Gli, H-Gli and MGO-Gli

由图 6 可知,当麦醇溶蛋白肽链上的游离氨基与丙酮醛发生糖基化反应,最直观的表现就是蛋白质的游离氨基减少,多肽链上引入了丙酮醛的羰基,在红

外光谱中,3 400  $\text{cm}^{-1}$  左右的吸收峰代表 O-H 键和 N-H 键伸缩振动,N-Gli 出峰在 3 295.4  $\text{cm}^{-1}$ ,而 MGO-Gli 出峰在 3 301.3  $\text{cm}^{-1}$ ,发生了蓝移,说明糖基化后 Gli 引入了 MGO 分子,MGO 分子的共价接入影响了 N-H 键的振动,氢键作用力减弱<sup>[32]</sup>。与 N-Gli 相比,糖基化产物 MGO-Gli 在波数 1 640  $\text{cm}^{-1}$  左右的吸收峰发生了蓝移且吸收强度减弱,表明糖基化反应的发生引起了 C=O 键的伸缩振动变化,这与 Greene 等<sup>[33]</sup>的研究结果基本一致。在 1 539  $\text{cm}^{-1}$  处,MGO-Gli 较 N-Gli 的吸收强度减弱,这表明分子中-NH<sub>2</sub> 的弯曲振动减弱。Gu 等<sup>[34]</sup>研究发现蛋白质发生糖基化反应后,蛋白质中的-NH<sub>2</sub> 等功能性基团会减少,会导致此处的吸收峰强度下降;此外 1 250  $\text{cm}^{-1}$  左右的峰代表 C-N 键伸缩振动,发现 MGO-Gli 在该处的吸收峰出现蓝移,并且吸收峰强度增大,说明糖基化反应增大了分子中新形成的 C-N 共价键吸收强度,由此可以证明,经过糖基化反应,麦醇溶蛋白以共价键的形式引入丙酮醛分子<sup>[35]</sup>。从图 6 中可以发现,糖基化产物 MGO-Gli 在 1 050  $\text{cm}^{-1}$  处的吸收峰强度明显增大,说明糖基化反应使麦醇溶蛋白的侧链上引入了对应的功能基团,从而促使蛋白质的侧链发生了振动<sup>[36]</sup>。

N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 的二级结构组成如表 2 所示。

由表 2 可以看出,与 N-Gli 相比,MGO-Gli 中  $\alpha$ -

表 2 N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 的二级结构组成  
Table 2 Secondary structural contents of N-Gli, H-Gli and MGO-Gli

| 样品      | 分子内 $\beta$ -折叠       |                               | 水化伸展 $\beta$ -折叠      |                               | $\alpha$ -螺旋          |                               | $\beta$ -转角           |                               | 伸展 $\beta$ -折叠        |                               |
|---------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
|         | 峰位置/ $\text{cm}^{-1}$ | 含量/%                          | 峰位置/ $\text{cm}^{-1}$ | 含量/%                          | 峰位置/ $\text{cm}^{-1}$ | 含量/%                          | 峰位置/ $\text{cm}^{-1}$ | 含量/%                          | 峰位置/ $\text{cm}^{-1}$ | 含量/%                          |
| N-Gli   | 1 610.270             | 10.65 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup> | 1 630.519             | 20.83 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup> | 1 650.768             | 28.71 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup> | 1 671.017             | 24.08 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup> | 1 690.301             | 15.74 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup> |
| H-Gli   | 1 609.305             | 5.84 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>  | 1 631.483             | 17.75 $\pm$ 0.45 <sup>c</sup> | 1 650.767             | 28.99 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup> | 1 670.052             | 30.11 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup> | 1 688.373             | 17.30 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup> |
| MGO-Gli | 1 611.234             | 11.06 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup> | 1 631.483             | 25.53 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup> | 1 649.803             | 27.45 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup> | 1 670.052             | 18.51 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup> | 1 690.301             | 17.45 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup> |

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

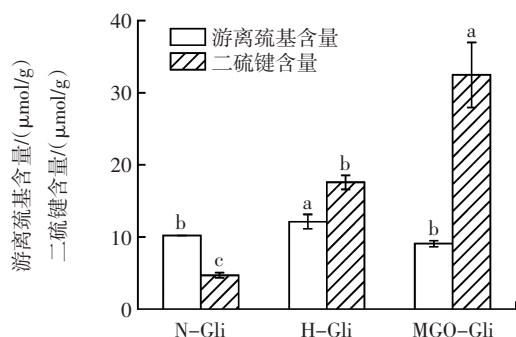
螺旋含量从 28.71%下降到 27.45%,而  $\beta$ -折叠含量从 47.22%增加到 54.04%, $\alpha$ -螺旋结构含量的减少,表明蛋白质分子间的氢键被破坏,致使游离氨基和丙酮醛发生糖基化反应,这与 Zhao 等<sup>[37]</sup>的研究结果一致。与  $\alpha$ -螺旋结构相比, $\beta$ -折叠结构构象的稳定性较差,有利于功能特性所需要的某些构象变化, $\alpha$ -螺旋/ $\beta$ -折叠代表蛋白分子柔性,比例越高,分子柔性越低<sup>[38]</sup>。研究发现,MGO-Gli 样品中的  $\alpha$ -螺旋与  $\beta$ -折叠之比为 0.508,明显低于 N-Gli 样品中的 0.608,这说明糖基化改性后,经丙酮醛分子修饰的麦醇溶蛋白的二级结构发生改变,蛋白的分子柔性增强,利于蛋白质的功能特性的改善<sup>[39]</sup>。这与 2.4.1 中的 MGO-Gli 的乳化性得

到较大改善的结果一致。

#### 2.4.6 游离巯基和二硫键含量的分析

N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 的游离巯基和二硫键含量结果如图 7 所示。

如图 7 所示,随高温加热的进行,麦醇溶蛋白结构趋于暴露式,H-Gli 的游离巯基含量增加,而 MGO-Gli 样品的游离巯基含量较 N-Gli 进一步降低,但二硫键含量高于 N-Gli 和 H-Gli,表明糖基化加剧了一些被掩蔽游离巯基的暴露,随后暴露的游离巯基氧化形成新的二硫键。这种巯基与二硫键含量的变化对于维持蛋白分子空间结构稳定以及改变功能特性起到了关键作用<sup>[40]</sup>,这也解释了前文提到的糖基化前后功能特



同组不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

图7 N-Gli、H-Gli 和 MGO-Gli 的游离巯基和二硫键含量

Fig.7 The free -SH and -S-S- contents of N-Gli、H-Gli and MGO-Gli

性和结构的变化。

### 3 结论

本文以麦醇溶蛋白和丙酮醛为研究对象,通过模拟小麦制品热加工体系进行糖基化反应。结果表明,麦醇溶蛋白与丙酮醛质量比 1:6、糖化温度 140 ℃、糖化时间 75 min 时,MGO-Gli 的游离氨基含量较少,糖基化效果好,且有害物质荧光性 AGEs 生成量少。针对 Gli 以及糖基化改性的 MGO-Gli 的功能性质及结构进行研究,得出以下结论:糖基化后的 MGO-Gli 的乳化活性较 N-Gli 提高了 50.03%,乳化稳定性提高了 79.51%,起泡性和起泡稳定性分别提高了 13.33%、28.20%,表明糖基化改性有利于功能特性的改善。电泳结果分析表明,小分子量蛋白经 MGO 修饰后共价结合形成蛋白-MGO 共聚物。由于其分子量大,无法进入分离凝胶并聚集在浓缩凝胶和分离凝胶的交界处;紫外光谱结果显示光谱峰值发生红移,说明糖基化过程改变了基团的微环境,暴露了肽链上具有紫外吸收的色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸残基。通过红外光谱分析,与 N-Gli 相比,糖基化改性后 MGO-Gli 的  $\alpha$ -螺旋含量减少,而  $\beta$ -折叠的含量增加,说明糖基化反应影响了麦醇溶蛋白的二级结构含量。

### 参考文献:

- [1] 臧艳妮. 物理预处理对小麦蛋白糖基化改性的影响[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2017.  
ZANG Yanni. Effect of physical pretreatment on wheat protein glycosylation modification[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2017.
- [2] XIONG L J, WANG J R, ZHENG Y L. Analysis of LMW-GS,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -gliadin gene coding sequences from *Triticum macha*[J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(2): 163-169.
- [3] 王硕, 王娅娅, 王俊平, 等. 热加工过程中植物源蛋白的糖基化作用研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2020, 38(5): 1-9.  
WANG Shuo, WANG Yaya, WANG Junping, et al. Latest research

on glycation of plant-based protein during heat processing[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020, 38(5): 1-9.

- [4] CHANG H L, CHEN Y C, TAN F J. Antioxidative properties of a chitosan-glucose Maillard reaction product and its effect on pork qualities during refrigerated storage[J]. Food Chemistry, 2011, 124(2): 589-595.
- [5] 陈晓旭, 吴玥琨, 张燕.  $\beta$ -伴大豆球蛋白糖基化产物的致敏性研究[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(10): 1-6.  
CHEN Xiaoxu, WU Yuekun, ZHANG Yan. Study on allergenicity of  $\beta$ -conglycinin glycosylation products[J]. Food Research and Development, 2021, 42(10): 1-6.
- [6] WANG Q, ISMAIL B. Effect of Maillard-induced glycosylation on the nutritional quality, solubility, thermal stability and molecular configuration of whey protein[J]. International Dairy Journal, 2012, 25(2): 112-122.
- [7] 徐正华, 梁玉桑, 朱克卫, 等. 食品中晚期糖基化中间产物及终末产物研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(5): 1496-1501.  
XU Zhenghua, LIANG Yushen, ZHU Kewei, et al. Research progress on advanced glycation end products and intermediate products in foods[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(5): 1496-1501.
- [8] 卢永翎, 陆敏, 王茜, 等. 1, 2-二羰基化合物及晚期糖基化终产物在蒸蛋糕中的形成及调控[J]. 食品与机械, 2019, 35(2): 1-6.  
LU Yongling, LU Min, WANG Xi, et al. Formation and regulation of 1, 2-dicarbonyl compounds and AGEs in steamed cakes[J]. Food & Machinery, 2019, 35(2): 1-6.
- [9] 李普, 刘贵梅, 卢永翎, 等. 小麦醇溶蛋白糖基化改性过程中有害产物形成的影响因素分析[J]. 食品科学, 2018, 39(15): 10-16.  
LI Pu, LIU Guimei, LU Yongling, et al. Analysis of factors influencing on the formation of harmful products during glycosylation of wheat gliadin[J]. Food Science, 2018, 39(15): 10-16.
- [10] 赵迪. 蛋白-AGEs 复合物的胃肠消化、酵解机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.  
ZHAO Di. Study on the gastrointestinal digestion and fermentation mechanism of protein-AGEs complex[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018.
- [11] SPOTTI M J, MARTINEZ M J, PILOSOFF A M R, et al. Influence of Maillard conjugation on structural characteristics and rheological properties of whey protein/dextran systems[J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 223-230.
- [12] BI W W, GE W, LI X D, et al. Effects of ultrasonic pretreatment and glycosylation on functional properties of casein grafted with glucose[J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2017, 41(5): e13177.
- [13] JIN H, ZHAO Q S, FENG H Y, et al. Changes on the structural and physicochemical properties of conjugates prepared by the Maillard reaction of black bean protein isolates and glucose with ultrasound pretreatment[J]. Polymers, 2019, 11(5): 848.
- [14] XUE L M, LI Y, LI T T, et al. Phosphorylation and enzymatic hydrolysis with alcalase and papain effectively reduce allergic reactions to gliadins in normal mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(22): 6313-6323.
- [15] 薛雨菲, 张玥, 程怡媚, 等. 酶法改性对核桃谷蛋白微观结构及功能特性的影响[J]. 食品与机械, 2019, 35(10): 18-23.  
XUE Yufei, ZHANG Yue, CHENG Yimei, et al. Effect of enzymatic modification on microstructure and functional properties of walnut glutenin[J]. Food & Machinery, 2019, 35(10): 18-23.
- [16] AI M M, TANG T, ZHOU L D, et al. Effects of different proteases on the emulsifying capacity, rheological and structure characteristics of

- preserved egg white hydrolysates[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 87: 933–942.
- [17] WANG Y Y, WANG J P, WANG S J, et al. Modification of glutenin and associated changes in digestibility due to methylglyoxal during heat processing[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(38): 10734–10743.
- [18] 房红娟, 李红姣, 张双凤, 等. 加工条件对 BSA-Glucose 模拟体系中晚期糖基化末端产物形成的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(21): 6–10.
- FANG Hongjuan, LI Hongjiao, ZHANG Shuangfeng, et al. Effect of process conditions on advanced glycation end product formation in BSA-glucose system[J]. Food Science, 2012, 33(21): 6–10.
- [19] KSONTINI H, KACHOURI F, HAMDI M. Impact of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* bio adhesion on pathogenic *Bacillus cereus* biofilm on silicone flowing system[J]. Indian Journal of Microbiology, 2013, 53(3): 269–275.
- [20] 艾正文, 于鹏, 糖敏. 糖基化反应对乳清蛋白功能特性影响的研究进展[J]. 食品科技, 2020, 45(10): 248–252.
- AI Zhengwen, YU Peng, GUI Min. Research progress on the effect of glycosylation on the functional properties of whey protein[J]. Food Science and Technology, 2020, 45(10): 248–252.
- [21] 刘慧琳, 陈晓默, 吴春玲, 等. 不同加工条件对模拟体系中晚期糖基化终产物生成的影响[J]. 食品工业科技, 2017, 38(7): 96–100, 110.
- LIU Huilin, CHEN Xiaomo, WU Chunling, et al. Effects of different processes on the formation of advanced glycation end products in the model system[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(7): 96–100, 110.
- [22] 郭子璇, 陈慧, 王震宇, 等. 热处理对牡蛎蛋白结构及功能特性的影响[J]. 大连工业大学学报, 2020, 39(4): 235–240.
- GUO Zixuan, CHEN Hui, WANG Zhenyu, et al. Effect of heat treatment on the structure and functional properties of oyster protein[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2020, 39(4): 235–240.
- [23] SALAMI M, YOUSEFI R, EHSANI M R, et al. Enzymatic digestion and antioxidant activity of the native and molten globule states of camel  $\alpha$ -lactalbumin: Possible significance for use in infant formula[J]. International Dairy Journal, 2009, 19(9): 518–523.
- [24] PURWANTI N, VAN DER GOOT A J, BOOM R, et al. New directions towards structure formation and stability of protein-rich foods from globular proteins[J]. Trends in Food Science & Technology, 2010, 21(2): 85–94.
- [25] HONG G P, AVRAMENKO N, STONE A, et al. Extractability and molecular modifications of gliadin and glutenin proteins withdrawn from different stages of a commercial ethanol fuel/distillers dried grains with solubles process using a wheat feedstock[J]. Cereal Chemistry Journal, 2012, 89(6): 276–283.
- [26] 仇超颖. 脱酰胺小麦醇溶蛋白结构、界面性质及其乳液稳定性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.
- QIU Chaoying. Conformation, interfacial characteristics and emulsion stability of deamidated wheat gliadin[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014.
- [27] 冯玉超, 王长远, 李玉琼, 等. 芸豆蛋白与糖基化芸豆蛋白结构与功能特性研究[J]. 中国食品学报, 2019, 19(7): 99–107.
- FENG Yuchao, WANG Changyuan, LI Yuqiong, et al. Studies on the structure and functional characteristics of the kidney bean protein and the modified kidney bean protein[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(7): 99–107.
- [28] BEAVER G H, HOLIDAY E R. Ultraviolet absorption spectra. IX. Analysis of the absorption spectra of proteins in terms of tyrosine and tryptophan content[J]. Advances in Protein Chemistry, 1952, 7: 319–386.
- [29] MARZBAN G, HERNDL A, PIETROZOTTO S, et al. Conformational changes of Mal d 2, a thaumatin-like apple allergen, induced by food processing[J]. Food Chemistry, 2009, 112(4): 803–811.
- [30] 周昊, 王成章, 叶建中, 等. 高静压处理改善白果蛋白致敏性和功能特性[J]. 农业工程学报, 2016, 32(8): 292–298.
- ZHOU Hao, WANG Chengzhang, YE Jianzhong, et al. Improvement of allergenicity and functional properties of proteins from *Ginkgo* seeds by high hydrostatic pressure treatment[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2016, 32(8): 292–298.
- [31] 詹玲, 潘思轶. 大豆糖蛋白的分离纯化及结构分析[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 594–596.
- ZHAN Ling, PAN Siyi. Isolation, purification and analysis of glycoprotein from soybean[J]. Food Science, 2006, 27(12): 594–596.
- [32] MOHSIN G F, SCHMITT F J, KANZLER C, et al. Structural characterization of melanoidin formed from d-glucose and l-alanine at different temperatures applying FTIR, NMR, EPR, and MALDI-ToF-MS[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 761–767.
- [33] GREENE G W, THAPA R, HOLT S A, et al. Structure and property changes in self-assembled lubricin layers induced by calcium ion interactions[J]. Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids, 2017, 33(10): 2559–2570.
- [34] GU F L, KIM J M, HAYAT K, et al. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system[J]. Food Chemistry, 2009, 117(1): 48–54.
- [35] 张瑶. 不同糖化方法对提高大豆分离蛋白功能性质的对比研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- ZHANG Yao. Research on comparison of functional properties of soy protein isolate prepared by different saccharification methods[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2017.
- [36] 李灵诚. 大米蛋白糖基化接枝产物的制备及理化与功能特性研究[D]. 南宁: 广西大学, 2020.
- LI Lingcheng. Study on the preparation, physicochemical and functional properties of rice protein glycosylated graft products[D]. Nanning: Guangxi University, 2020.
- [37] ZHAO X Y, CHEN F S, XUE W T, et al. FTIR spectra studies on the secondary structures of 7S and 11S globulins from soybean proteins using AOT reverse micellar extraction[J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(4): 568–575.
- [38] 廖兰, 韩雪跃, 李章发, 等. 小麦面筋蛋白分子聚集态对脱酰胺程度的影响[J]. 现代食品科技, 2015, 31(10): 80–85, 62.
- LIAO Lan, HAN Xueyue, LI Zhangfa, et al. Effect of the aggregation state of wheat gluten on the degree of deamidation as a function of concentration[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(10): 80–85, 62.
- [39] 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 Lixia. The research of conformation and functional properties of soy protein-saccharide conjugates[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010.
- [40] MAO X Y, HUA Y F. Composition, structure and functional properties of protein concentrates and isolates produced from walnut (*Juglans regia* L.)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(2): 1561–1581.