

糖基化-酰化修饰改善菜籽蛋白凝胶 结构和功能性质

何 荣, 黄家强, 张倩玉

(南京财经大学 食品科学与工程学院, 南京 210023)

摘要:以菜籽分离蛋白为原料,在琥珀酸酐酰化改性的基础上采用3种多糖(羧甲基壳聚糖、氧化葡聚糖、羧甲基纤维素)协同TG酶催化对菜籽蛋白进行了糖基化修饰,再通过热诱导制备改性菜籽蛋白凝胶,研究不同多糖与酰化协同修饰对菜籽蛋白凝胶结构和功能性质的影响。结果表明:糖基化-酰化修饰菜籽蛋白,形成了致密且均匀的凝胶网络结构,使其溶胀性能、流变性能和凝胶强度均得到了改善。其中,羧甲基壳聚糖协同琥珀酸酐酰化修饰菜籽蛋白,获得的菜籽蛋白凝胶硬度最大,为92.337 g,弹性较好,为0.960,溶胀率为8.432 g/g;其表面疏水性最高,为1305.1,自由巯基含量最低,为1.73 $\mu\text{mol/g}$;其内部形成的网络结构整齐,呈规则且密集的圆形。糖基化-酰化修饰后,菜籽蛋白功能性质的改变可能与其二级结构中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲含量均有不同程度的变化有关。

关键词:菜籽分离蛋白;凝胶;糖基化;酰化;修饰

中图分类号:TS221;TQ427.26 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)03-0047-08

Improvement of structure and functional properties of rapeseed protein gel by glycosylation - acylation modification

HE Rong, HUANG Jiaqiang, ZHANG Qianyu

(College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance & Economics, Nanjing 210023, China)

Abstract: Based on the acylation modification with succinic anhydride, rapeseed protein isolate was modified with three kinds of polysaccharides (carboxymethyl chitosan, oxidized dextran, carboxymethyl cellulose) and TG enzyme. Modified rapeseed protein gel was prepared by heat induction to study the effects of different polysaccharides and acylation modification on the structure and functional properties of rapeseed protein gel. The results showed that glycosylation - acylation modified rapeseed protein to form a compact and uniform gel network structure, which improved its swelling properties, rheological properties and gel strength. When the rapeseed protein was modified with carboxymethyl chitosan and succinic anhydride, the hardness of rapeseed protein gel was the best (92.337 g), elasticity was better (0.960), the swelling rate was 8.432 g/g, the surface hydrophobic was the highest (1305.1), the free sulfhydryl group content was the lowest (1.73 $\mu\text{mol/g}$), and the internal network formed uniform structure with regular and dense circle. After the modification of glycosylation - acylation, the change of functional properties of rapeseed protein was possibly related to the changes of the contents of α - helix, β - folding, β - turning and random coil.

Key words: rapeseed isolate protein; gel; glycosylation; acylation; modification

收稿日期:2021-11-08;修回日期:2022-01-07

作者简介:何 荣(1983),男,副教授,博士,研究方向为植物油脂与蛋白质工程(E-mail)ronghe_nufe@163.com。

在各种凝胶中,蛋白质凝胶具有优异的功能性质、两亲性、生物相容性及生物降解性等^[1],在组织工程、组织修复及药物传递等方面具有广阔的应用

前景^[2-3]。天然蛋白质较易从天然物质中分离纯化获得,并广泛用于凝胶的制备。

植物蛋白具有很高的营养价值,为扩大其应用范围,常采用化学、物理以及生物等改性方法改善其功能性质^[4-6],使其达到特定产品所需的品质特性。其中,化学改性是植物蛋白改性常用的手段,主要包括酸碱化、脱酰胺、酰化和糖基化。其中糖基化反应可以改善蛋白质的乳化性、凝胶性、溶解性和热稳定性,具有良好的应用前景。转谷氨酰胺酶(TG酶)作为一种生物酶交联剂,可催化蛋白质、多肽发生分子内和分子间共价交联,进一步改善蛋白质的结构和功能^[7],如保水性和凝胶性等,进而改善食品的风味、口感、质地和外观等。目前对于多联合改性技术协同TG酶交联处理对植物蛋白凝胶理化性质、凝胶特性影响的报道较少。本研究以菜籽分离蛋白为原料,在酰化改性的基础上协同TG酶催化作用对菜籽蛋白进行了糖基化修饰制备菜籽蛋白凝胶,测定糖基化修饰前后菜籽蛋白凝胶的结构和功能性质,探究多联合改性技术对菜籽蛋白凝胶结构和功能性质的影响,以期对菜籽蛋白的多联合改性处理提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菜籽粕,羧甲基壳聚糖(CMCS)、葡聚糖、羧甲基纤维素(CMC)、乙二醇、无水乙醇、溴化钾、氯化钠、氯化钾、琥珀酸酐、高碘酸钠、2-硝基苯甲酸(DTNB)、8-苯胺基-1-萘磺酸(ANS)、Tris-甘氨酸(Tris-Gly)、乙二胺四乙酸(EDTA)、盐酸、氢氧化钠等均为分析纯。

TA.XTH plus 质构仪,英国 Stable Micro System 公司;pH计,瑞士梅特勒-托利多公司;IKA 磁力搅拌器,德国 IKA 仪器设备有限公司;HH-6B 数显恒温水浴锅,常州国华电器有限公司;MCR302 型旋转流变仪,奥地利安东帕公司;TM3000 扫描电子显微镜,日本日立公司;Tensor 27 傅里叶红外光谱仪,德国布鲁克公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菜籽分离蛋白的制备

根据戴彩霞等^[8]的方法制备菜籽分离蛋白。将适量的菜籽粕按料液比 1:10 分散于去离子水中,用 1 mol/L 的 NaOH 调 pH 至 11,在 50 °C 条件下搅拌 3 h 后,4 °C、10 000 g 下离心 30 min,收集上清液。用 1 mol/L 的 HCl 将上清液的 pH 调至 4.5,在 4 °C 下静置沉淀 2 h,10 000 g 下离心 30 min,收集沉淀。用无水乙醇洗涤沉淀,去除多酚成分,冷冻干

燥,得到菜籽分离蛋白(RPI)。

1.2.2 酰化菜籽蛋白的制备

参考 Wang 等^[9]的方法制备酰化菜籽蛋白。将菜籽分离蛋白溶解于去离子水中,制备菜籽分离蛋白质量分数为 2% 的溶液,并用 2 mol/L 的 NaOH 将溶液 pH 调至 10.5。然后缓慢分次加入 5% 的琥珀酸酐(以菜籽分离蛋白质量计),搅拌反应。在反应过程中,用 2 mol/L 的 NaOH 保持溶液的 pH 为 10.5,当末次加入琥珀酸酐,调溶液 pH 至 10.5 后,将混合溶液用截留分子质量为 7 kDa 的透析袋透析 48 h,冷冻干燥,得到酰化度为 5% 的酰化菜籽蛋白(ARPI)。

1.2.3 氧化葡聚糖的制备

采用 Liu 等^[10]的方法,用高碘酸钠引入醛基氧化葡聚糖,制备氧化葡聚糖。将 4 g 葡聚糖和 3.3 g 高碘酸钠溶解于适量的去离子水中,在室温下黑暗中搅拌反应 24 h。然后加入适量的乙二醇结束反应,用截留分子质量为 500 Da 的透析袋透析处理 48 h,以除去未反应的高碘酸钠和用于终止反应的乙二醇,冷冻干燥,得氧化葡聚糖(DAD)。

1.2.4 菜籽蛋白凝胶的制备

在前期菜籽蛋白凝胶制备条件优化的基础上,采用以下工艺分别制备糖基化-酰化菜籽蛋白凝胶、菜籽分离蛋白凝胶和酰化菜籽蛋白凝胶。

糖基化-酰化菜籽蛋白凝胶的制备:按羧甲基壳聚糖(CMCS)添加量 10%、氧化葡聚糖(DAD)添加量 12% 和羧甲基纤维素(CMC)添加量 15% (多糖添加量以酰化菜籽蛋白质量计),分别与适量的酰化菜籽蛋白溶解在 5 mg/mL NaCl 溶液中,得到酰化菜籽蛋白质量分数为 15% 的悬浮液,再加入 100 U/g (以酰化菜籽蛋白质量计)的 TG 酶。混合均匀后,加入 1 mol/L 的 NaOH 将混合溶液的 pH 调节至 9,反应 8 h。然后移取 3 mL 悬浮液到直径为 28 mm、高度为 57 mm 的圆柱形玻璃小瓶中。将小瓶放置于 90 °C 水浴中加热 30 min,然后立即在冰浴中冷却至室温,在 4 °C 条件下保存过夜,得到糖基化-酰化菜籽蛋白凝胶。

菜籽分离蛋白(RPI)凝胶和酰化菜籽蛋白(ARPI)凝胶的制备:分别以菜籽分离蛋白和酰化菜籽蛋白为原料,不添加多糖和 TG 酶,其他条件同糖基化-酰化菜籽蛋白凝胶的制备。

1.2.5 凝胶性能测定

使用配备有 P/0.5 不锈钢探针(直径为 12.7 mm,圆柱形探针)的质构仪分析菜籽蛋白凝胶的凝胶特性(硬度和弹性)。参数设置如下:测试前速度

0.5 mm/s; 测试速度 0.2 mm/s; 测试后速度 0.5 mm/s; 触发力 5 g, 应变 30% (TPA 测试)。

1.2.6 接枝度测定

根据 Guan 等^[11]的邻苯二甲醛(OPA)法并稍加改进,通过测定糖基化反应后菜籽蛋白游离氨基数量的变化,从而测定 3 种多糖与酰化菜籽蛋白的接枝度(DG)。取 200 μ L 糖基化反应后悬浮液(PSA 法测定蛋白质质量浓度为 2.5 mg/mL)与 4 mL 现配的 OPA 混合,置于 35 $^{\circ}$ C 水浴中反应 3 min。然后测量溶液在 340 nm 处的吸光度。按下式计算接枝度(D_c)。

$$D_c = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_0 和 A_1 分别为糖基化前后溶液的吸光度。

1.2.7 溶胀性能测试

将冻干后的凝胶样品制备成质量相等的近似形状,在 37 $^{\circ}$ C 下浸泡于去离子水中,间隔预定时间(t)后取出称重,直至凝胶样品达到溶胀平衡(质量恒定)。根据下式计算凝胶的溶胀率(S)。

$$S = \frac{m_t - m_0}{m_0} \quad (2)$$

式中: m_0 、 m_t 分别为冻干后的凝胶和 t 时刻凝胶的质量, g。

1.2.8 截面形貌观察

将冻干的凝胶样品喷金后,在加速电压为 15 kV 的条件下,用扫描电子显微镜对横截面进行观察拍照,选取 500 倍的图片进行分析。

1.2.9 流变性能测试

采用旋转流变仪配合 20 mm 平行板装置进行流变实验。分别制备质量浓度为 150 mg/mL 的凝胶样品溶液。流变仪设置条件为:平行板间隙 1 mm,应变 1%;频率扫描范围 0.01 ~ 100 Hz;温度从 20 $^{\circ}$ C 升高到 90 $^{\circ}$ C,升温速率 5 $^{\circ}$ C/min;角频率 1 Hz。记录储能模量(G')和耗能模量(G'')的变化。

1.2.10 表面疏水性测定

改性前后菜籽蛋白凝胶的表面疏水性采用 ANS 探针法测定^[12]。将一定量的凝胶样品溶解在 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 8.0)中,并稀释至 50 ~ 250 μ g/mL。每种质量浓度样品各取 4 mL,分别加入 20 μ L 8 mmol/L 的 ANS 溶液(溶解于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液中)。通过酶标仪在激发波长 390 nm、发射波长 470 nm 下测定样品的荧光强度。用荧光强度-样品质量浓度曲线的初始斜率(线性回归分析计算)作为表面疏水性指标。

1.2.11 自由巯基含量测定

根据 Boostani 等^[13]的方法测定自由巯基含量。将 4 mg 2-硝基苯甲酸溶解在 1 mL Tris-甘氨酸缓冲液(0.086 mol/L Tris, 0.09 mol/L 甘氨酸, 0.004 mol/L EDTA, pH 8.0)中用以制备 Ellman's 试剂。在含有 8 mol/L 尿素的 Tris-甘氨酸缓冲液中加入菜籽蛋白凝胶溶液,使其最终质量浓度为 1 mg/mL。然后与 50 μ L 的 Ellman's 试剂混匀,在室温下反应 30 min,然后在 8 000 g 下离心 20 min,取上清液,测定 412 nm 处的吸光度,按下式计算蛋白凝胶溶液中自由巯基含量,然后再换算为蛋白凝胶样品中自由巯基含量(W)(以蛋白质质量计)。

$$W = 73.53 \times A_{412} \times \frac{D}{C} \quad (3)$$

式中:73.53 = $10^6 / (1.36 \times 10^4)$, 1.36×10^4 为摩尔消光系数; D 为样品稀释倍数; C 为样品质量浓度。

1.2.12 傅里叶红外光谱测定

按照 Brindha 等^[7]的方法并稍加修改。将冻干凝胶样品进行研磨,过 0.12 mm(120 目)筛,将样品粉末与溴化钾粉末充分混合后压成片剂,在 400 ~ 4 000 cm^{-1} 范围内测定红外光谱。

红外数据通过 OPUS7.2 转化为吸收谱图,截取 1 600 ~ 1 700 cm^{-1} 波段的红外光谱,进行傅里叶退卷积处理,再用 PeakFitv 4.12 进行分峰拟合处理,最后用 Origin 2019 绘制分峰拟合图。根据拟合子峰的积分计算蛋白质 4 种二级结构的相对含量。

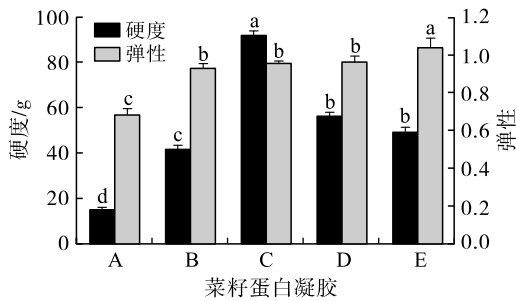
1.2.13 数据分析

每个实验至少重复 3 次,结果采用“平均值 \pm 标准差”表示。数据由 IBM SPSS 26.0 软件的单因素方差分析(ANOVA)进行分析,显著性 $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 菜籽蛋白凝胶性能分析

按 1.2.4 分别制备 CMCS-ARPI 凝胶、DAD-ARPI 凝胶、CMC-ARPI 凝胶、RPI 凝胶和 ARPI 凝胶,测定 5 种菜籽蛋白凝胶的凝胶性能,结果如图 1 所示。由图 1 可知,CMCS-ARPI 凝胶、DAD-ARPI 凝胶和 CMC-ARPI 凝胶的硬度分别为 92.337、56.814、49.700 g,弹性分别为 0.960、0.967、1.043。ARPI 凝胶、CMCS-ARPI 凝胶、DAD-ARPI 凝胶和 CMC-ARPI 凝胶的硬度和弹性都显著高于 RPI 凝胶,且 CMCS-ARPI 凝胶的硬度最高。有研究显示,酰化和糖基化分别作用均可以提高菜籽蛋白凝胶的硬度和弹性^[14]。糖基化修饰协同酰化作用后菜籽蛋白凝胶的硬度和弹性均得到改善。



注: A. RPI 凝胶; B. ARPI 凝胶; C. CMCS - ARPI 凝胶; D. DAD - ARPI 凝胶; E. CMC - ARPI 凝胶。菜籽蛋白凝胶同一指标不同小写字母表示差异显著, $p < 0.05$ 。下同

图1 菜籽蛋白凝胶的凝胶性能

2.2 菜籽蛋白凝胶的接枝度

羧甲基壳聚糖、氧化葡聚糖、羧甲基纤维素分别与酰化菜籽蛋白进行糖基化反应,接枝度随反应时间的变化如图2所示。

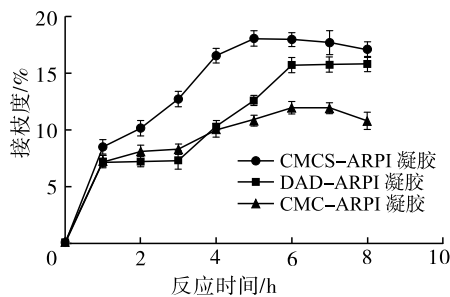


图2 菜籽蛋白凝胶接枝度随反应时间的变化

由图2可知,随反应时间的延长,酰化菜籽蛋白与羧甲基壳聚糖、氧化葡聚糖、羧甲基纤维素的接枝度显著增加,分别在5、6、6 h接枝度达到最高。但随着反应时间进一步延长,接枝度降低。这可能是由于在酰化菜籽蛋白与多糖完全反应后,菜籽蛋白变性程度增加,蛋白质发生再聚集,导致接枝度降低。羧甲基壳聚糖与酰化菜籽蛋白的接枝度最高,其次是氧化葡聚糖和羧甲基纤维素。

2.3 菜籽蛋白凝胶的溶胀性能

菜籽蛋白和多糖都是大分子物质,具有高度亲水性,制备的凝胶也具有较好的吸水性能。菜籽蛋白凝胶的溶胀率见图3。

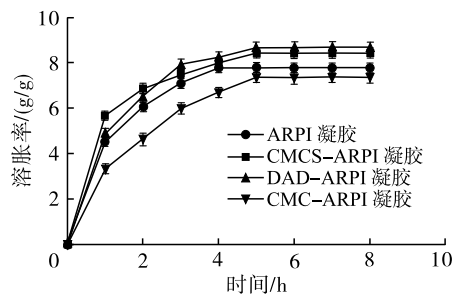
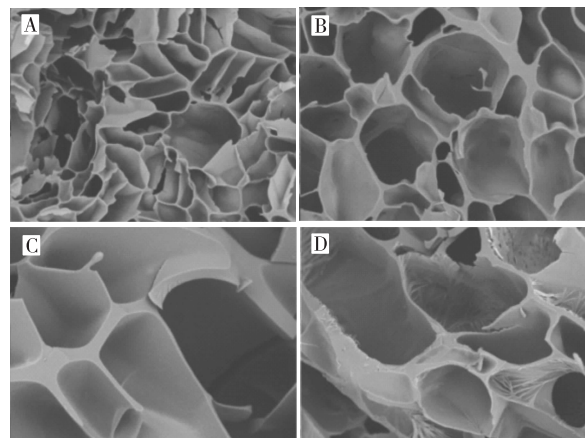


图3 菜籽蛋白凝胶的溶胀率

从图3可知,ARPI凝胶、CMCS - ARPI凝胶、DAD - ARPI凝胶和CMC - ARPI凝胶在去离子水中达到平衡时的溶胀率分别为7.769、8.432、8.667 g/g和7.360 g/g。其中CMCS - ARPI凝胶和DAD - ARPI凝胶的溶胀性能都高于未经糖基化修饰的ARPI凝胶,这可能是因为羧甲基壳聚糖和氧化葡聚糖与酰化菜籽蛋白接枝度较高,形成的凝胶结构网络的交联密度较大,孔洞直径和数量较为适中,因此能截留并包裹住更多的水分子,表现出更好的溶胀性能。CMC - ARPI凝胶的弹性优于其他凝胶样品,但是接枝度较低,形成的凝胶结构网络孔洞直径较大,内部的网络结构也较为稀疏,容易使水分子流失,导致其溶胀性能相对较差。同时,糖基化修饰的酰化菜籽蛋白凝胶在5 h时达到溶胀平衡,而未经修饰的酰化菜籽蛋白凝胶在4 h就已达到溶胀平衡,这是因为交联密度的增加减慢了水分子扩散到凝胶内部的速率。Sharma等^[15]在研究抗菌型壳聚糖基凝胶时测得其溶胀率为3.9 g/g,与之相比,糖基化协同酰化改性制备的菜籽蛋白凝胶溶胀性能更好,且具备适宜的吸湿速率。

2.4 菜籽蛋白凝胶的截面形貌

菜籽蛋白凝胶截面扫描电镜图如图4所示。



注: A. ARPI 凝胶; B. CMCS - ARPI 凝胶; C. DAD - ARPI 凝胶; D. CMC - ARPI 凝胶。

图4 菜籽蛋白凝胶的截面扫描电镜图

由图4可知,4种凝胶冻干后的截面均有许多孔洞、腔室的存在,ARPI凝胶呈现出数量最多、排列最为紧密的孔洞结构,且孔洞形状多为扁状椭圆形。糖基化修饰的酰化菜籽蛋白凝胶结构上的孔洞数量都少于ARPI凝胶,其中CMCS - ARPI凝胶与DAD - ARPI凝胶形成的网络结构整齐,且呈规则、密集的圆形,因而能截留更多的水分子,使溶胀性能提升。

而 CMC - ARPI 凝胶的孔洞直径最大,网络结构稀疏,易使水分子流失,相应硬度不理想,溶胀性能较差,与前述结果一致。

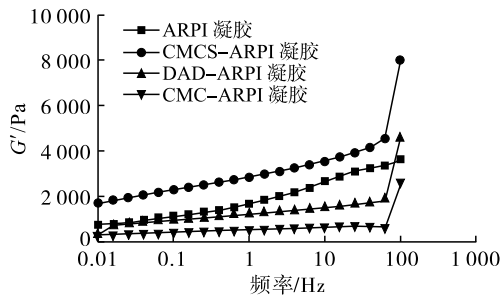
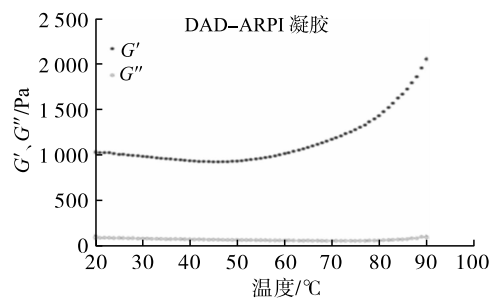
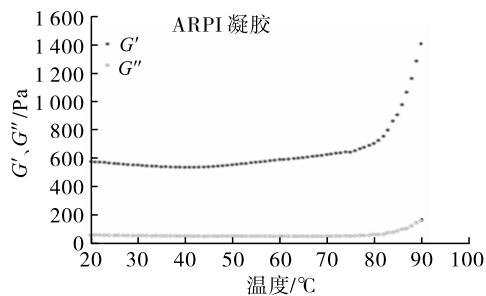


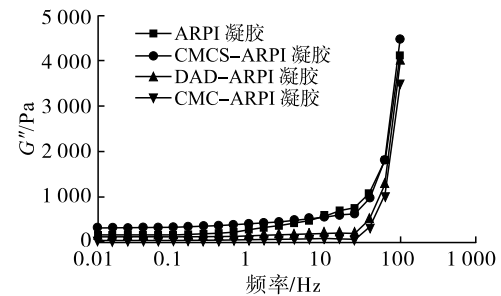
图5 菜籽蛋白凝胶的储能模量(G')和耗能模量(G'')

从图5可以看出,菜籽蛋白凝胶的储能模量(G')随着频率增加而增加,与文献[16-17]报道一致。其中CMCS-ARPI凝胶的 G' 最高,即凝胶强度最高,这与CMCS与ARPI的接枝度最高有关。另



2.5 菜籽蛋白凝胶的流变性能

菜籽蛋白凝胶的储能模量和耗能模量见图5。



外,菜籽蛋白凝胶的耗能模量(G'')也随着频率的增加而增加。

菜籽蛋白凝胶样品储能模量和耗能模量的温度依赖性如图6所示。

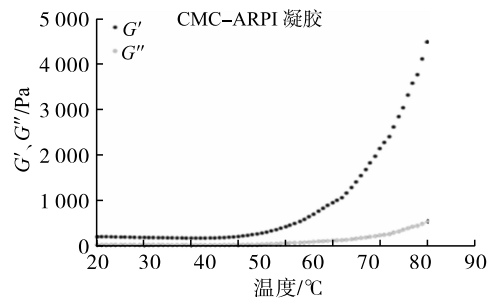
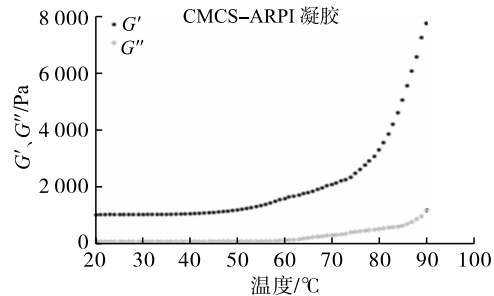


图6 菜籽蛋白凝胶样品储能模量和耗能模量的温度依赖性

由图6可知,ARPI凝胶、CMCS-ARPI凝胶、DAD-ARPI凝胶和CMC-ARPI凝胶的 G' 均随着温度升高而增加,这可能是由于加热改变了凝胶网络的结构,逐渐加强了凝胶结构^[18]。 G' 大于 G'' 时的温度通常作为凝胶点^[19]。ARPI凝胶、CMCS-ARPI凝胶、DAD-ARPI凝胶和CMC-ARPI凝胶的 G' 总是大于 G'' ,这表明它们的 $\tan \delta$ 值($\tan \delta = G''/G'$)接近于0,在室温下就已接近凝胶状态^[20]。而RPI凝胶的 G' 先小于 G'' ,后大于 G'' ,凝胶点超过50℃(图略)。这说明适度的酰化改善了菜籽蛋白的凝胶性能,而在糖基化修饰的协同作用下,凝胶性能又得到了显著的提升,尤其是CMCS-ARPI凝胶的凝胶强度最大,达到了较为理想的效果。

2.6 菜籽蛋白凝胶的结构

2.6.1 表面疏水性和自由巯基含量

菜籽蛋白凝胶的表面疏水性和自由巯基含量分别见图7、图8。

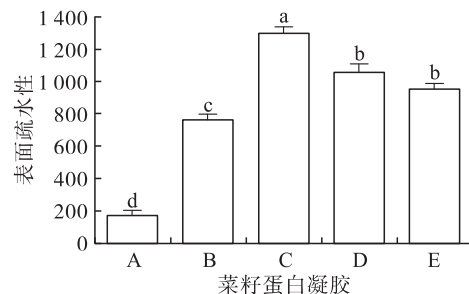


图7 菜籽蛋白凝胶的表面疏水性

由图7可以看出,经过酰化处理和糖基化-酰

化修饰的菜籽蛋白凝胶表面疏水性显著提高,其中CMCS-ARPI凝胶的表面疏水性最高,为1 305.1。表明酰化处理和糖基化修饰都可以诱导蛋白质中疏水性氨基酸基团的暴露。然而,与不同的多糖进行糖基化反应后ARPI凝胶的疏水性变化不同,这可能是由于不同糖基化引起的电荷频率和电负性的变化不同^[21]。也有研究显示,蛋白质经糖基化改性后由于糖链上的羟基可以增加蛋白质的亲水性,改变亲水性和疏水性的平衡,并且部分屏蔽表面疏水基团,从而使得表面疏水性降低^[22]。CMCS-ARPI凝胶表面疏水性最高,这可能是由于羧甲基壳聚糖与酰化菜籽蛋白的接枝度最高,交联较为紧密,因此减少了较多蛋白质的正电荷,增加了亚基之间的排斥,展开了蛋白质结构,最终暴露了更多疏水基团,提高了表面疏水性,疏水相互作用的提高进一步增强了蛋白质凝胶的硬度和弹性。

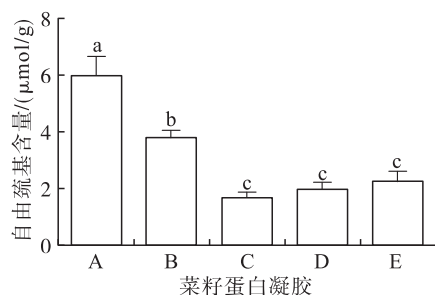


图8 菜籽蛋白凝胶的自由巯基含量

此外,热诱导凝胶的形成与硫醇基团向二硫键的转化有关,这是维持凝胶结构的重要力量^[23]。由图8可知,与RPI凝胶相比,糖基化协同酰化修饰的菜籽蛋白凝胶中自由巯基含量显著减少,其中CMCS-ARPI凝胶的自由巯基含量最低,为1.73 $\mu\text{mol/g}$,这归因于蛋白质疏水相互作用导致的蛋白质聚集和二硫键的形成^[24]。酰化和糖基化修饰后,自由巯基含量降低,形成了更多的二硫键。与RPI凝胶和ARPI凝胶相比,CMCS-ARPI凝胶、DAD-ARPI凝胶和CMC-ARPI凝胶的自由巯基含量更少,硬度和弹性均有所提高,尤其是CMCS-ARPI凝胶的硬度和弹性分别达到92.337 g和0.960。因此,二硫键是影响菜籽蛋白凝胶硬度和弹性的重要因素。

2.6.2 二级结构分析

一般而言, α -螺旋和 β -折叠都是依靠氢键维持,不同的改性方法可能会改变蛋白质分子链中氢键的生成或断裂,从而会改变 α -螺旋和 β -折叠的相对含量。基于菜籽蛋白的红外光谱,在酰胺I带($1\ 600\sim 1\ 700\ \text{cm}^{-1}$)区域分析改性对菜籽蛋白凝胶二级结构的影响。酰胺I带主要为C=O的伸缩振

动(80%)和少部分的C-N的伸缩振动(20%)^[25]。由于酰胺I带是蛋白质的红外光谱中最为敏感的区域,因此通过对该区段进行多重峰拟合分析,与RPI对比来分析蛋白质的二级结构含量的变化。糖基化协同酰化改性前后菜籽蛋白凝胶二级结构含量变化如图9所示。

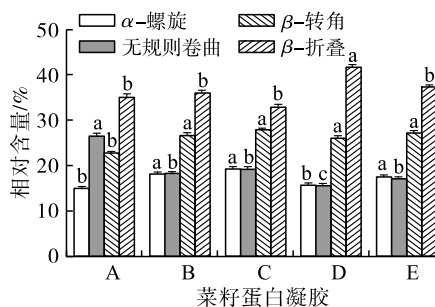


图9 菜籽蛋白凝胶蛋白质的二级结构含量

由图9可知,与RPI凝胶相比,ARPI凝胶中 α -螺旋和 β -转角的含量增加, β -折叠的含量没有变化,无规则卷曲含量降低,即ARPI凝胶中有序结构增加。这些结果表明,在琥珀酸基团缀合后,蛋白质的结构发生了显著变化,酰化作用诱导无规则卷曲向有序结构转变。在芸豆蛋白的二级结构中也有类似的发现^[26]。这可能是由于酰化反应中大量的阴离子琥珀酰基团的共轭作用在RPI内产生空间位阻,引起了RPI内强烈的静电排斥作用。糖基化协同酰化改性后,与ARPI凝胶蛋白质二级结构相比,CMC-ARPI凝胶未发生明显变化,DAD-ARPI凝胶的有序结构增加,表现为 β -折叠含量的增加,且有一小部分 α -螺旋转变为 β -折叠,这与氧化葡聚糖的修饰改变了蛋白质和蛋白质之间相互作用和持水性,增加了凝胶的动态黏弹性有关^[27]。CMCS-ARPI凝胶蛋白质的 α -螺旋含量是凝胶样品中最高的。相比于其他二级结构而言, α -螺旋是一种相对规则且稳定性较高的构象,这可能也是CMCS-ARPI凝胶内部网络结构最为紧密有序,硬度和弹性较佳的一个重要原因。综上所述,酰化改性和糖基化协同酰化改性都改变了菜籽蛋白的分子结构,在一定程度上使修饰后的菜籽蛋白凝胶的凝胶性质得到了改善。

3 结论

本研究在酰化改性的基础上,分别以羧甲基壳聚糖、氧化葡聚糖和羧甲基纤维素协同TG酶催化作用对菜籽蛋白进行糖基化修饰,并对糖基化修饰前后的凝胶产物进行了结构和功能性质测定。研究发现,羧甲基壳聚糖协同琥珀酸酐酰化修饰菜籽蛋白,获得的菜籽蛋白凝胶硬度最高,为92.337 g,弹

性较好,为0.960;其表面疏水性最高,为1305.1,自由巯基含量最低,为1.73 $\mu\text{mol/g}$ 。红外光谱结果显示,糖基化-酰化修饰后,菜籽蛋白凝胶的 α -螺旋、 β -转角、 β -折叠和无规则卷曲含量都有不同程度的变化,糖基化修饰改变了酰化菜籽蛋白的分子结构,这与凝胶强度、弹性等功能性质的变化相关。糖基化修饰的酰化菜籽蛋白凝胶的结构和功能也发生了改变,相较于糖基化修饰前形成了更加致密且均匀的凝胶网络结构,使其凝胶强度、流变性能和溶胀性能均得到了改善。

参考文献:

- [1] GUL K, GAN R Y, SUN C X, et al. Recent advances in the structure, synthesis, and applications of natural polymeric hydrogels [J/OL]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2021; 1-16[2021-11-08]. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1870034>.
- [2] 王盼,朱晨辉,赵婧,等.合成生物学在蛋白质功能材料领域的研究进展[J].*合成生物学*,2021,2(1):46-58.
- [3] LI J L, JIA X, YIN L J. Hydrogel: diversity of structures and applications in food science[J]. *Food Rev Int*, 2021, 37(3): 313-372.
- [4] LIU H, YUAN M, SONAMUTHU J, et al. A dopamine-functionalized aqueous-based silk protein hydrogel bioadhesive for biomedical wound closure[J]. *New Chem*, 2020, 44(3): 884-891.
- [5] SOSULSKI F W, JONES J D. Functional properties of rapeseed flours, concentrates and isolates[J]. *J Food Sci*, 1976, 41:1346-1352.
- [6] ZHU D, DAMODARAN S, LUCEY J A. Formation of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates in aqueous solutions [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(16): 7113-7118.
- [7] BRINDHA J, CHANDA K, BALAMURALI M M. Revisiting the insights and applications of protein engineered hydrogels [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019, 95:312-327.
- [8] 戴彩霞,何荣.超高压和加热处理对菜籽蛋白功能性质和结构的影响研究[J].*中国油脂*,2019,44(7):68-74.
- [9] WANG Z, ZHANG R X, ZHANG C, et al. Fabrication of stable and self-assembling rapeseed protein nanogel for hydrophobic curcumin delivery[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(3): 887-94.
- [10] LIU J, LI Z, LIN Q, et al. A robust, resilient, and multi-functional soy protein-based hydrogel[J]. *ACS Sustain Chem Eng*, 2018, 6(11): 13730-13738.
- [11] GUAN J J, ZHANG T B, HUI M, et al. Mechanism of microwave-accelerated soy protein isolate-saccharide graft reactions[J]. *Food Res Int*, 2011, 44(9): 2647-2654.
- [12] PIRESTANI S, NASIRPOUR A, KERAMAT J, et al. Preparation of chemically modified canola protein isolate with gum Arabic by means of Maillard reaction under wet-heating conditions [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, 155:201-207.
- [13] 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]. *Int J Biol Macromol*, 2017, 102:297-307.
- [14] WANG Z G, ZHANG C, ZHANG T, et al. Effects of acylation and glycation treatments on physicochemical and gelation properties of rapeseed protein isolate [J]. *RSC Adv*, 2018, 8(70): 40395-40406.
- [15] SHARMA S, KUMAR R, KUMARI P, et al. Mechanically magnified chitosan-based hydrogel as tissue adhesive and antimicrobial candidate [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 125:109-115.
- [16] SITTIKIYOTHIN W, SAMPAIO P, GON ALVES M P. Microstructure and rheology of β -lactoglobulin-galactomannan aqueous mixtures [J]. *Food Hydrocolloid*, 2010, 24(8): 726-734.
- [17] WANG K Q, LUO S Z, ZHONG X Y, et al. Changes in chemical interactions and protein conformation during heat-induced wheat gluten gel formation [J]. *Food Chem*, 2017, 214:393-399.
- [18] VERHEUL M, ROEFS S P F M. Structure of whey protein gels, studied by permeability, scanning electron microscopy and rheology [J]. *Food Hydrocolloid*, 1998, 12(1): 17-24.
- [19] SONG X, PEI Y, QIAO M, et al. Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles [J]. *Food Hydrocolloid*, 2015, 45:256-263.
- [20] GLUSAC J, DAVIDESKO-VARDI I, ISASCHAR-OVDAT S, et al. Gel-like emulsions stabilized by tyrosinase-crosslinked potato and zein proteins [J]. *Food Hydrocolloid*, 2018, 82:53-63.
- [21] GALAZKA V B, SMITH D, LEDWARD D A, et al. Complexes of bovine serum albumin with sulphated polysaccharides: effects of pH, ionic strength and high pressure treatment [J]. *Food Chem*, 1999, 64(3): 303-310.
- [22] 张燕鹏,张曼君,齐玉堂,等.微波-超声波协同影响菜籽蛋白糖基化改性[J].*食品科学*,2017,38(17):114-119.

- Risks for human health related to the presence of 3 - and 2 - monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food[J/OL]. EFSA J, 2016, 14(5): 4426 [2021 - 05 - 31]. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4426>.
- [6] HUANG G, XUE J, SUN X, et al. Suppression of tlymphocyte activation by 3 - chloro - 1,2 - propanediol mono - and di - palmitate esters in vitro[J]. Toxicol In Vitro, 2018, 51: 54 - 62.
- [7] Amending regulation (EC) No1881/2006 as regards maximum levels of glycidyl fatty acid esters in vegetable oils and fats, infant formula, follow on formula and foods for special medical purposes intended for infants and young children[J]. Off J Eur Union, 2018(55): 27 - 29.
- [8] 刘春梅,刘玉兰,马宇翔,等. 油菜籽炒籽温度对其油脂风味及综合品质的影响[J]. 中国粮油学报,2020,35(3):67 - 74,83.
- [9] 王永瑞. 炒籽胡麻油中3 - MCPD酯的消长规律研究[D]. 新疆石河子:石河子大学,2018.
- [10] 苗雨田,杨悠悠,王浩,等. 气相色谱 - 质谱法测定食用油中3 - 氯丙醇酯[J]. 中国粮油学报,2016,31(11):135 - 139.
- [11] 王璐阳. 油脂精炼过程氯离子含量变化对3 - 氯丙醇酯和缩水甘油酯形成影响的研究[D]. 郑州:河南工业大学,2018.
- [12] 马靖轩,马传国,李利君,等. 酶法催化酯交换制备甘油二酯工艺优化研究[J]. 中国油脂,2020,45(1): 51 - 55.
- [13] 温运启,刘玉兰,王璐阳,等. 不同食用植物油中维生素E组分及含量研究[J]. 中国油脂,2017,42(3): 35 - 39.
- [14] 朱宗瑛. 施用含氯肥料对柑橘产量品质及土壤氯离子残留的影响[D]. 武汉:华中农业大学,2018.
- [15] 王永瑞,王丹,徐宇丽,等. 温度和氯离子对初榨胡麻油中3 - MCPD酯生成的影响[J]. 中国粮油学报,2018,33(5):43 - 48.
- [16] 周红茹,金俊,杨娇,等. 油脂中3 - 氯丙二醇酯形成的化学反应机制[J]. 中国粮油学报,2012,27(10): 118 - 122.
- [17] 吴少明,傅武胜,杨贵芝. 食用植物油中脂肪酸氯丙醇酯形成机制的研究进展[J]. 食品科学,2014,35(1): 266 - 270.
- [18] RAHN A K K, YAYLAYAN V A. What do we know about the molecular mechanism of 3 - MCPD ester formation? [J]. Eur J Lipid Sci Tech, 2011, 113(3): 323 - 329.
- [19] 张家枫,刘玉兰,孙国昊,等. 不同食用油的甘油酯组成、3 - MCPD酯和GEs含量研究[J]. 中国油脂,2020,45(12):38 - 43.
- [20] 周洋,杨文婧,操丽丽,等. 生育酚抑制油脂氧化机制研究进展[J]. 中国油脂,2018,43(8):32 - 38.
- [21] POTOCNIK T, CIZEJ M R, KOSIR I J. Influence of seed roasting on pumpkin seed oil tocopherols, phenolics and antiradical activity[J]. J Food Compost Anal, 2018, 69: 7 - 12.
- [22] AHMED I A M, USLU N, ÖZCAN M M. Effect of conventional oven roasting treatment on the physicochemical quality attributes of sesame seeds obtained from different location [J/OL]. Food Chem, 2021, 338: 128109 [2021 - 05 - 31]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128109>.
- [23] 杨金娥,黄庆德,郑畅,等. 烤籽温度对压榨亚麻籽油品质的影响[J]. 中国油脂,2011,36(6):28 - 31.
- (上接第53页)
- [23] SHEN X, ZHAO C H, GUO M R. Effects of high intensity ultrasound on acid - induced gelation properties of whey protein gel[J]. Ultrason Sonochem, 2017, 39: 810 - 815.
- [24] QIN X S, LUO S Z, CAI J, et al. Transglutaminase - induced gelation properties of soy protein isolate and wheat gluten mixtures with high intensity ultrasonic pretreatment [J]. Ultrason Sonochem, 2016, 31:590 - 597.
- [25] ZANDOMENEGHI G, KREBS M R H, MCCAMMON M G, et al. FTIR reveals structural differences between native β - sheet proteins and amyloid fibrils[J]. Protein Sci, 2004, 13(12):3314 - 3321.
- [26] YIN S W, TANG C H, WEN Q B, et al. The relationships between physicochemical properties and conformational features of succinylated and acetylated kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates[J]. Food Res Int, 2010, 43(3): 730 - 738.
- [27] ALVAREZ P A, RAMASWAMY H S, ISMAIL A A. High pressure gelation of soy proteins: effect of concentration, pH and additives[J]. J Food Eng, 2008, 88(3): 331 - 340.