

罗非鱼肌纤维蛋白糖基化工艺优化

Optimization of glycosylation process of tilapia myofibrillar protein

林泽钊^{1,2,3,4}白卫东^{1,2,3,4}刘巧瑜^{1,2,3,4}LIN Ze-qian^{1,2,3,4}BAI Wei-dong^{1,2,3,4}LIU Qiao-yu^{1,2,3,4}曾晓房^{1,2,3,4}陈海光^{1,2,3,4}黄 桢¹ZENG Xiao-fang^{1,2,3,4}CHEN Hai-guang^{1,2,3,4}HUANG Zhen¹

(1. 仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东 广州 510225; 2. 仲恺农业工程学院广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室, 广东 广州 510225; 3. 农业农村部岭南特色食品绿色加工与智能制造重点实验室, 广东 广州 510225; 4. 仲恺农业工程学院现代农业工程创新研究院, 广东 广州 510225)

(1. College of Light Industry and Food Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Lingnan Specialty Food Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China; 3. Key Laboratory of Green Processing and Intelligent Manufacturing of Lingnan Specialty Food, Ministry of Agriculture, Guangzhou, Guangdong 510225, China; 4. Academy of Contemporary Agricultural Engineering Innovations, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225, China)

摘要:目的:改善罗非鱼肌纤维蛋白的乳化特性和溶解度,开发新型乳化剂和功能食品。方法:利用低聚半乳糖(GOS)修饰罗非鱼肌纤维蛋白(TMP),探究不同TMP/GOS质量浓度、pH值、温度、时间等工艺条件对TMP-GOS缀合物接枝度、溶解度、乳化活性和乳化稳定性的影响;以乳化稳定性为响应值,对TMP-GOS缀合物制备工艺进行响应面优化;通过内源性荧光光谱、表面疏水性、傅里叶红外光谱和peaking乳液显微观察,分析验证TMP-GOS缀合物功能特性。结果:TMP/GOS($m_{\text{TMP}}:m_{\text{GOS}}=1:1$)质量浓度27.34 mg/mL、pH 11.2、反应温度79.9℃、反应时间4.09 h。该工艺下,糖基化罗非鱼肌纤维蛋白的乳化稳定性为 (90.30 ± 1.44) min、乳化活性为 (4.70 ± 0.03) m²/g、溶解度为 $(66.09 \pm 0.52)\%$ 。较改性前分别提升了112.97%,62.07%,129.39%。罗非鱼肌纤

维蛋白糖基化接枝度为34.17%,蛋白水解程度大,蛋白结构展开,表面疏水性指数下降55.68%。结论:低聚半乳糖对罗非鱼肌纤维蛋白结构性质的修饰作用明显,可明显改善罗非鱼肌纤维蛋白的乳化活性和溶解度。

关键词:罗非鱼;肌纤维蛋白;低聚半乳糖;糖基化;乳化特性;蛋白结构

Abstract: **Objective:** This study aimed to improve the emulsifying and processing properties of tilapia myofibrillar protein. **Methods:** The tilapia muscle fibrin (TMP) was modified with galactose oligosaccharide (GOS). The effects of TMP/GOS concentrations, pH values, temperature, time and other technological conditions on the grafting degree, solubility, emulsifying activity and emulsifying stability of TMP-GOS conjugation were investigated. The preparation process of TMP-GOS conjugate was optimized using emulsion stability as response surface. The functional properties of TMP-GOS conjugation were analyzed and verified by endogenous fluorescence spectroscopy, surface hydrophobicity, Fourier infrared spectroscopy and peaking emulsion microscopy. **Results:** The optimal process conditions were as follows: tilapia myofibrillar protein/ galactooligosaccharides ($m_{\text{TMP}}:m_{\text{GOS}}=1:1$) mass concentration is 27.34 mg/mL, pH value is 11.2, temperature is 79.9℃, time is 4.09 h. The emulsifying stability, emulsifying activity and solubility of glycosylated TMP were

基金项目:广东省岭南特色食品科学与技术重点实验室项目(编号:2021B1212040013);广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(编号:2022KJ117);广东茂名滨海新区海洋渔业产业园—现代渔业全产业链技术研究项目(编号:0835-220FA8102621)

作者简介:林泽钊,男,仲恺农业工程学院在读硕士研究生。

通信作者:刘巧瑜(1977—),女,仲恺农业工程学院副教授,博士。
E-mail:qiaoyuli123@163.com

收稿日期:2022-06-15 **改回日期:**2023-03-17

(90.30±1.44) min, (4.70±0.03) m²/g and (66.09±0.52) %。Compared with before modification, they increased by 112.97%, 62.07% and 129.39% respectively. The glycosylation grafting degree of TMP was 34.17%; The protein hydrolysis degree was large, and the protein structure was expanded; The surface hydrophobicity index decreased by 55.68%. **Conclusion:** Galactose oligosaccharide can significantly modify the structural properties of TMP and improve the emulsification activity and the solubility of TMP.

Keywords: tilapia; myofibrillar protein; galactooligosaccharides; glycosylation; emulsification characteristics; protein structure

罗非鱼肌纤维蛋白(Tilapia myofibrillar protien, TMP)是一种氨基酸组成比例平衡、易消化的优质动物蛋白^[1],占罗非鱼蛋白总量的70%~80%^[2]。肌纤维蛋白(Myofibrin protien,MP)被认为是制备蛋白 peaking 乳液的重要原料,但 MP 存在乳化性差、溶解度低、热不稳定等缺陷^[3-4],限制了其在食品工业中的应用。蛋白质空间结构与其功能性质密切相关,通过蛋白改性可优化 MP 的乳化性,提高其溶解度。

糖基化修饰蛋白质成本低、效果好,被广泛应用于改善蛋白质的乳化性和溶解度^[3-4]。糖基化反应主要分为干法和湿法,其中干法条件严格、成本高、反应缓慢且难控制,不适合工业应用^[5]。而湿法操作简单、反应时间短、产品性能更稳定。然而,传统湿法糖基化反应中,蛋白质容易发生变性和聚集,降低了其与糖的共价结合能力,导致其接枝率低、利用效率低^[6]。如 Xu 等^[7]通过传统湿法制备了接枝率仅为 8.8%的 MP-葡萄糖缀合物,虽然其乳化性能和溶解度优于天然 MP,但低接枝率限制了糖基化 MP 结构和功能性能的进一步改善;Li 等^[8]采用超声辅助制备 MP-葡聚糖缀合物,但其接枝率小于 20%,说明原料没有得到充分利用。因此,亟需开发一种新型的湿法糖基化工艺来解决提高蛋白质的利用价值。

蛋白质和糖结构特征的差异会影响糖基化程度,形成不同的功能和应用效果^[9]。低聚半乳糖(Galactooligosaccharides,GOS)是人乳中的天然益生成分^[10],采用 GOS 修饰 TMP,改善蛋白质功能性质的同时引入了益生元,对罗非鱼蛋白深加工与功能性食品开发具有重要意义。研究拟利用 GOS 修饰 TMP,探究不同 TMP/GOS 质量分数、pH 值、温度、时间等工艺条件对 TMP-GOS 缀合物接枝率、溶解率、乳化活性和乳化稳定性的影响,优化 TMP-GOS 缀合物制备工艺,并通过内源性荧光光谱、表面疏水性、傅里叶红外光谱和 peaking 乳液显微观察分析验证 TMP-GOS 缀合物功能特性,旨在为制备稳定的乳化型活性物质包埋和传递体系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

罗非鱼:市售;

低聚半乳糖、四硼酸钠、邻苯二甲醛、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、丝氨酸:分析纯,上海源叶生物技术有限公司;
溴化钾、考马斯亮蓝、ANS:上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

氯化钠、氢氧化钠、盐酸:分析纯,天津市永大化学试剂有限公司;

金龙鱼大豆油:益海嘉里(武汉)粮油工业有限公司。

1.2 仪器与设备

高速均质机:F60 型,上海弗鲁克流体机械制造有限公司;

冷冻离心机:H2050R 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

紫外分光光度计:UV-1780 型,岛津仪器(苏州)有限公司;

电泳仪:JY600C 型,北京君意东方电泳设备有限公司;

荧光光谱仪:RF-6000 型,岛津仪器(苏州)有限公司;

傅里叶红外光谱仪:IRAffinity-1 型,岛津仪器(苏州)有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 肌纤维蛋白的提取 参照 Jiang 等^[11]的方法,取罗非鱼背脊两侧白肉,按 $m_{\text{罗非鱼肉}} : m_{\text{磷酸缓冲溶液}} = 1 : 4$ 加磷酸缓冲溶液(PBS)高速匀浆过 40 目筛后,10 000 r/min 离心 15 min,沉淀即为粗 TMP。将粗 TMP 加 PBS 重复以上步骤 3 次,获得纯 TMP。全程均在 4 ℃下进行。

1.3.2 肌纤维蛋白的糖基化 将 TMP 与 GOS 粉末($m_{\text{TMP}} : m_{\text{GOS}} = 1 : 1$)混合后,将混合粉末按一定质量浓度加入磷酸缓冲溶液中,磁力搅拌 30 min 充分水合,调 pH 值,水浴加热。冷却至室温,冻干待用。

1.3.3 单因素试验 以 TMP-GOS 缀合物乳化稳定性为指标,乳化活性、接枝率、溶解度为参考,固定 pH 值为 11,反应温度为 80 ℃,反应时间为 4 h,考察 TMP/GOS 质量浓度(10,20,30,40,50 mg/mL)对 TMP-GOS 缀合物乳化稳定性、乳化活性、接枝率、溶解度的影响;固定 TMP/GOS 质量浓度为 30 mg/mL,反应温度为 80 ℃,反应时间为 4 h,考察 pH 值(9,10,11,12,13)对 TMP-GOS 缀合物乳化稳定性、乳化活性、接枝率、溶解度的影响;固定 TMP/GOS 质量浓度 30 mg/mL,pH 值为 11,反应时间为 4 h,考察反应温度(70,75,80,85,90)对 TMP-GOS 缀合物乳化稳定性、乳化活性、接枝率、溶解度的影响;固定 TMP/GOS 质量浓度 30 mg/mL,pH 值为 11,反应温度为 80 ℃,考察反应时间(2,3,4,5,6)对 TMP-GOS 缀合物乳化稳定性、乳化活性、接枝率、溶解度的影响。

1.3.4 响应面试验 根据单因素的试验结果,选择反应浓度、反应 pH、反应温度、反应时间为自变量,以乳化稳定性为响应值,运用 Designer-Expert 12.0 软件进行四因素三水平试验设计与分析优化。

1.3.5 溶解度的测定 参照李锦锦等^[12]的方法,并稍作

修改。配制适宜质量浓度 C_1 肌纤维蛋白溶液, 10 000 r/min 离心 15 min 后, 测定其上清液蛋白浓度 C_2 。按式(1)计算溶解度。

$$\bar{\omega} = \frac{C_1}{C_2} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

$\bar{\omega}$ ——溶解度, %;

C_1 ——离心前溶液蛋白质质量浓度, mg/mL;

C_2 ——离心后上清液蛋白质质量浓度, mg/mL。

1.3.6 接枝率的测定 参照 Safoura 等^[13]的方法, 配制 OPA 溶液(0.64% OPA, 0.78% DDT, 0.8% SDS, 3.048% $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)。400 μL 0.1 mg/mL 蛋白溶液与 3 mL OPA 溶液反应 2 min, 测定吸光值。按式(2)计算接枝率。

$$G_{\text{TMP-GOS}} = \frac{A_1 - A_2}{A_1 - A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

$G_{\text{TMP-GOS}}$ ——接枝率, %;

A_0 ——空白组吸光度;

A_1 ——对照组吸光度;

A_2 ——试验组吸光度。

1.3.7 乳化活性和乳化稳定性的测定 根据 Yan 等^[14]的方法。在 500 nm 吸收波长分别测定吸光度 A_0 和 A_{10} 。按式(3)和式(4)分别计算乳浊液的乳化活性指数(I_{EA})和乳化稳定性指数(I_{ES})。

$$I_{\text{EA}} = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{\rho \times \phi \times 10\,000}, \quad (3)$$

$$I_{\text{ES}} = \frac{A_0 \times 10}{A_0 - A_{10}}, \quad (4)$$

式中:

I_{EA} ——乳化活性指数, g/m²;

I_{ES} ——乳化稳定性指数, min;

N ——稀释倍数;

ρ ——蛋白质量浓度, mg/mL;

ϕ ——油相体积分数, %;

A_0 ——0 min 反应溶液吸光度;

A_{10} ——10 min 反应溶液吸光度。

1.3.8 SDS-PAGE 电泳 参照 Xia 等^[15]的方法, 将 5 mg/mL 蛋白溶液与上样缓冲液等体积混合后, 沸水浴 5 min, 13 000 r/min 离心 3 min。在垂直电泳仪中, 制备质量分数 4% 的浓缩凝胶和质量分数 12% 的分离凝胶, 加样量为 10 μL , 设置电压为 80 V 运行 40 min 后, 调整电压为 120 V 运行 80 min 结束, 并取出凝胶。以考马斯亮蓝染色液 R-250 染色 20 min, 纯水脱至背景清晰后拍照。

1.3.9 内源性荧光光谱 参照 Yan 等^[14]的方法, 配制 2 mg/mL 蛋白溶液, 设定激发波长为 295 nm, 狭缝为 5 nm, 扫描波长为 300~400 nm。

1.3.10 表面疏水性的测定 参照 Yan 等^[16]的方法, 配制不同质量浓度(0.02~2.00 mg/mL)的蛋白溶液, 取

40 μL 8 mmol/L ANS 溶液加入 8 mL 蛋白溶液中, 振匀, 避光静置 2 min。设定激发波长为 390 nm, 发射波长 470 nm, 狭缝为 5 nm, 测定荧光强度。以荧光强度对蛋白质质量浓度作曲线, 曲线斜率即蛋白质的表面疏水性指数(H_0)。

1.3.11 傅里叶红外光谱 根据 Wang 等^[17]的方法, 采用溴化钾压片法, $m_{\text{蛋白}} : m_{\text{溴化钾}}$ 为 1 : 200, 光谱分辨率为 4 cm^{-1} , 扫描 32 次, 扫描范围为 4 000~400 cm^{-1} 。

1.3.12 光学显微观察 根据 Wang 等^[3]的方法, 稍作修改, 将 10 mg/mL 蛋白溶液与大豆油按 $V_{\text{蛋白}} : V_{\text{大豆油}} = 9 : 1$ 混匀, 665 W 超声乳化 1 min, 制得乳液。乳液稀释 5 倍后, 抽取 10 μL 转移到玻片上, 用玻片覆盖后观察。

1.4 数据处理

采用 SPSS 2020 对单因素数据进行方差统计分析($P < 0.05$), Design-Export 12.0 软件对响应面试验结果进行分析, 用 Origin 2020 绘制图表, 所有数据均为 3 次重复试验的平均值。

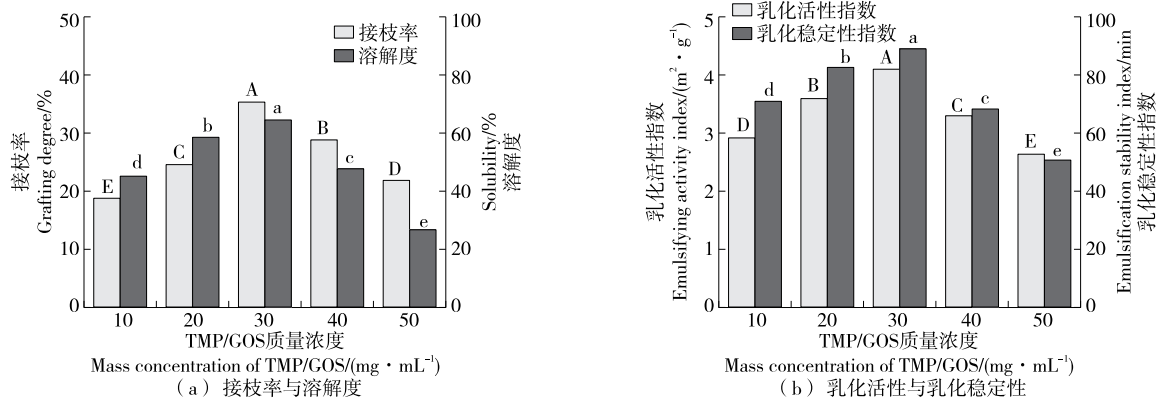
2 结果与分析

2.1 TPM/GOS 质量浓度对罗非鱼肌纤维蛋白糖基化的影响

由图 1 可知, 随着 TPM/GOS 质量浓度的增加, 糖基化罗非鱼肌纤维蛋白产物(TMP-GOS)的接枝率、溶解度、乳化活性、乳化稳定性均呈先增加后减小趋势, 在 TPM/GOS 质量浓度为 30 mg/mL 时, 均达到最大值($P < 0.05$), 分别为 35.37%, 64.81%, 4.10 m^2/g , 87.35 min。随着 TPM/GOS 质量浓度的增加, 单位体积内 TMP/GOS 分子接触概率增加, 更易反应形成 TMP-GOS 缀合物。TMP-GOS 获得大量—OH, 亲水性增加、界面张力减小, 溶解性、乳化活性和乳化稳定性显著提高($P < 0.05$)。当 TMP/GOS 浓度过大时, 单位体积内 TMP 分子间和 GOS 分子间的相互作用增强, 蛋白质聚集明显, 甚至出现焦糖化等副反应, 阻碍了糖基化反应的进行, 导致 TMP-GOS 接枝率、溶解度、乳化活性、乳化稳定性均显著下降($P < 0.05$)。

2.2 pH 对罗非鱼肌纤维蛋白糖基化的影响

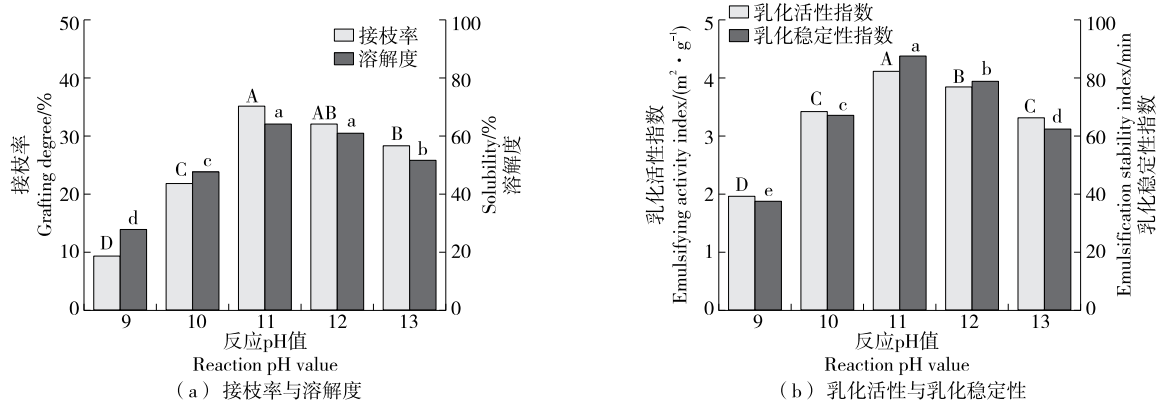
pH 值的变化会改变蛋白质分子的构象, 影响蛋白质的功能特性^[18]。由图 2 可知, 随着 pH 值的提高, TMP-GOS 的接枝率、溶解度、乳化活性、乳化稳定性均呈先增加后减小趋势, 当 pH 值为 11 时, 四者均达到最大值($P < 0.05$)。当 pH 值较低时, TMP 构象为复杂且紧密堆积的球状^[19], 分子柔性低^[20]、尺寸大^[21], 不利于糖基化反应的发生。随着 pH 值的提高, 蛋白质分子展开^[21], 可溶性蛋白聚集体变小^[19], 暴露出更多的反应结合位点, 促进了糖基化反应的进行。当 pH 值继续提高时, 其对美拉德反应的影响减弱, 而蛋白质分子碱水解增强, 导致 TMP-GOS 的接枝率、溶解度、乳化活性、乳化稳定性均显著降低($P < 0.05$)。



字母不同表示同一指标不同水平的差异显著 ($P < 0.05$)

图 1 TMP/GOS 浓度对罗非鱼肌纤维蛋白糖基化的影响

Figure 1 Effects of TMP/GOS concentrations on the glycosylation of tilapia muscle fibrin



字母不同表示同一指标不同水平的差异显著 ($P < 0.05$)

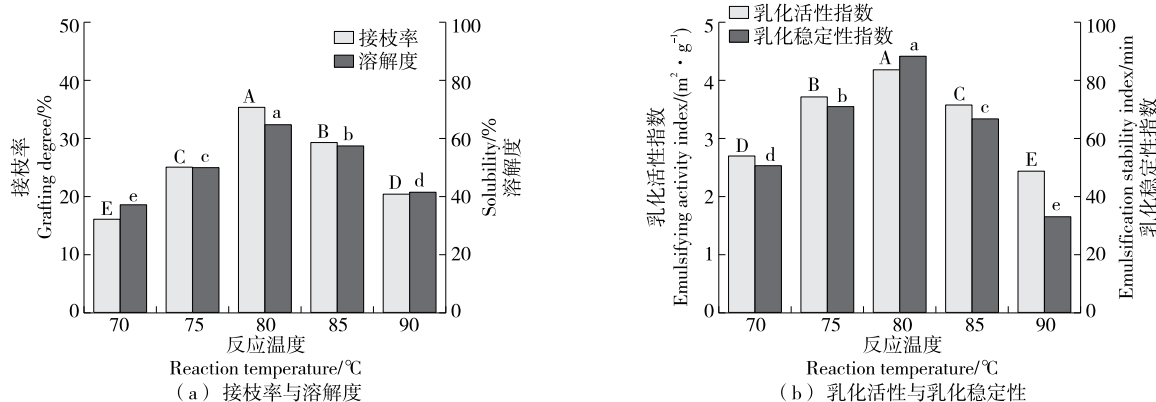
图 2 pH 值对罗非鱼肌纤维蛋白糖基化的影响

Figure 2 Effects of pH value on glycosylation of tilapia muscle fibrin

2.3 反应温度对罗非鱼肌纤维蛋白糖基化的影响

图 3 中,随着反应温度的升高,TMP-GOS 的接枝率、溶解度、乳化活性和乳化稳定性均呈先增加后减小趋势,当反应温度为 80 ℃ 时,四者均达到最大值 ($P < 0.05$)。

当反应温度较低时,系统糖基化反应缓慢。随着反应温度的升高,TMP 结构稍微展开,糖基化反应加快,TMP-GOS 的接枝率、溶解度、乳化活性和乳化稳定性增加 ($P < 0.05$)。当温度过高时,TMP 结构进一步扩大,与 GOS 通



字母不同表示同一指标不同水平的差异显著 ($P < 0.05$)

图 3 反应温度对罗非鱼肌纤维蛋白糖基化的影响

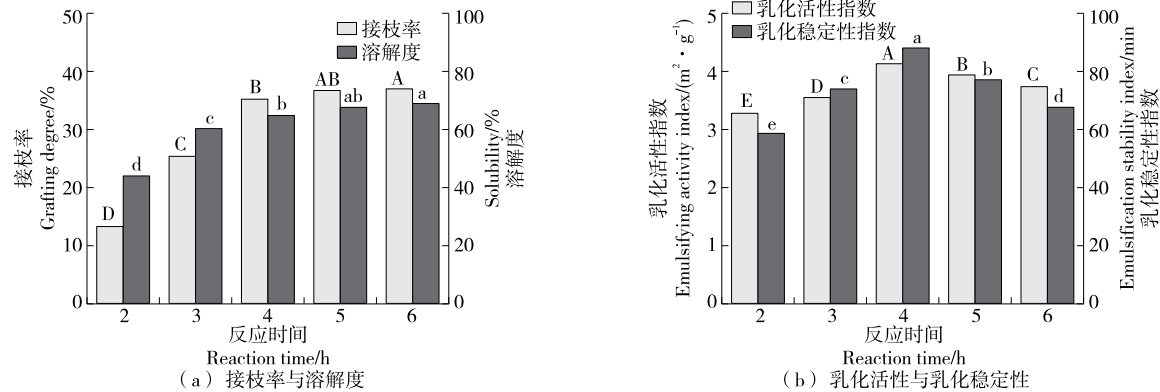
Figure 3 Effects of different temperature on the glycosylation of tilapia muscle fibrin

过分子间接触和碰撞发生了剧烈的接枝反应。一个 TMP 分子可能接枝多个 GOS,而 GOS 的焦糖化与蛋白质的热聚集和热降解等副反应也会增强^[22]。这导致 TMP-GOS 的接枝率、溶解度、乳化活性、乳化稳定性均显著减小($P<0.05$)。

2.4 反应时间对罗非鱼肌纤维蛋白糖基化的影响

由图 4 可知,随着反应时间的增加,TMP-GOS 的接

枝率和溶解度呈持续上升趋势($P<0.05$),与 Wang 等^[23]和谢思怡等^[24]的研究结果一致。而 TMP-GOS 的乳化活性、乳化稳定性,随着时间增加均呈先增加后减小趋势($P<0.05$),在 4 h 时达到最大。TMP-GOS 可增加油水界面上蛋白的吸附层厚度,进而阻止油滴聚集,提高体系乳化稳定性。但当糖基化程度过高时,TMP-GOS 亲水能



字母不同表示同一指标不同水平的差异显著($P<0.05$)

图 4 反应时间对罗非鱼肌纤维蛋白糖基化的影响

Figure 4 Effects of time on the glycosylation of tilapia muscle fibrin

力进一步提高,界面吸附能力和界面张力降低,导致其乳化活性和乳化稳定性降低^[25]。

2.5 响应面试验分析

2.5.1 响应面回归方程的建立 根据单因素试验结果,TMP/GOS 质量浓度、pH 值、反应温度、反应时间的因素水平见表 1,以 TMP-GOS 乳化稳定性为响应值,采用 Box-Behnken 法进行试验设计,试验结果见表 2。

表 1 响应面试验设计水平编码表

Table 1 Response surface test design factor level table

水平	A TMP/GOS 质量浓度/ (mg · mL ⁻¹)	B 反应 pH	C 反应温 度/℃	D 反应时 间/h
—1	20	10	75	3
0	30	11	80	4
1	40	12	85	5

表 2 响应面试验设计方案及结果

Table 2 Response surface test design scheme and results

序号	A	B	C	D	乳化稳定性/min	序号	A	B	C	D	乳化稳定性/min
1	0	0	1	—1	55.97	16	0	—1	0	1	53.33
2	0	0	—1	1	57.24	17	0	1	0	1	63.92
3	—1	0	0	—1	60.76	18	—1	0	0	1	72.46
4	1	0	0	1	55.91	19	0	—1	1	0	46.67
5	—1	0	1	0	64.42	20	1	0	0	—1	58.14
6	0	0	0	0	86.51	21	—1	0	—1	0	63.97
7	0	1	0	—1	57.92	22	0	—1	—1	0	47.48
8	0	—1	0	—1	48.99	23	1	0	—1	0	56.89
9	—1	1	0	0	72.67	24	1	0	1	0	56.42
10	1	—1	0	0	46.17	25	0	0	0	0	88.92
11	0	0	1	1	56.42	26	0	0	—1	—1	55.97
12	—1	—1	0	0	60.01	27	0	0	0	0	89.24
13	0	0	0	0	87.60	28	0	1	1	0	59.86
14	0	1	—1	0	61.76	29	0	0	0	0	89.29
15	1	1	0	0	60.03						

2.5.2 回归模型拟合及方差分析 利用 Design-Expert 12.0 对表 3 的结果进行响应面分析,得到关于 TMP-GOS 乳化稳定性(Y)对 TMP/GOS 质量浓度、pH 值、反应温度、反应时间的二次多项回归方程:

$$Y=88.51-5.06A+6.13B-0.2958C+1.79D+0.3AB-0.23AC-3.48AD-0.27BC+0.42BD-0.21CD-11.23A^2-17.36B^2-16.83C^2-15.08D^2。$$

由表 3 可知,试验 TMP-GOS 的乳化稳定性二次多项回归方程模型 $P<0.000\ 1$,该预测模型极为显著;失拟项 $P=0.183\ 8>0.05$,失拟项差异不显著;相关系数 R^2 为 0.990 8,校正决定系数 R_{adj}^2 为 0.981 6,变异系数 CV 值为 2.83%,拟合度和可信度高,表明此模型可以很好地反映 TMP-GOS 质量浓度、pH 值、反应时间和反应温度各因素之间的关系,描述该工艺各因素对 TMP-GOS 乳化稳定性影响的情况。从 F 值可知,4 个因素对 TMP-GOS 乳化稳定性影响程度为 $B>A>C>D$ 。

2.5.3 响应面各因素间交互作用分析 为探究 4 个因素对 TMP-GOS 乳化稳定性的交互影响,由回归模型得出相应的响应面交互图(图 5)。3D 响应曲面图中,随着 TMP/GOS 质量浓度、pH 值、反应温度和反应时间 4 个因素增大,TMP-GOS 稳定性均呈先上升后下降,在设定的自变量范围内均存在响应曲面最高点,说明各因素之间的影响显著。随着 TMP/GOS 质量浓度、pH 值的提高,TMP-GOS 乳化稳定性增加幅度最大,二者的曲面相对较陡,反应温度与反应时间的影响次之。图 5(a)、

表 3 TMP-GOS 乳化稳定性试验回归模型及方差分析结果[†]

Table 3 Regression model and variance analysis results of TMP-GOS emulsion stability test

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	4 819.69	14	344.26	107.69	<0.000 1	*
A	307.34	1	307.34	96.14	<0.000 1	**
B	450.31	1	450.31	140.86	<0.000 1	**
C	1.05	1	1.05	32.85	0.025 6	**
D	38.63	1	38.63	12.08	0.003 7	**
AB	0.36	1	0.36	0.11	0.742 2	
AC	0.21	1	0.21	0.07	0.800 7	
AD	48.51	1	48.51	15.17	0.001 6	
BC	0.30	1	0.30	0.09	0.765 0	
BD	0.69	1	0.69	0.22	0.649 6	
CD	0.17	1	0.17	0.05	0.821 9	
A ²	818.36	1	818.36	255.99	<0.000 1	**
B ²	1 955.34	1	1 955.34	611.65	<0.000 1	**
C ²	1 837.24	1	1 837.24	574.71	<0.000 1	**
D ²	1 476.00	1	1 476.00	461.71	<0.000 1	**
残差	44.76	14	3.20			
失拟项	38.81	10	3.88	2.61	0.183 8	不显著
误差项	5.94	4	1.49			
总和	4 864.45	28				

[†] $R^2=0.990\ 8$; $R_{adj}^2=0.981\ 6$; ** 为极显著; * 为显著。

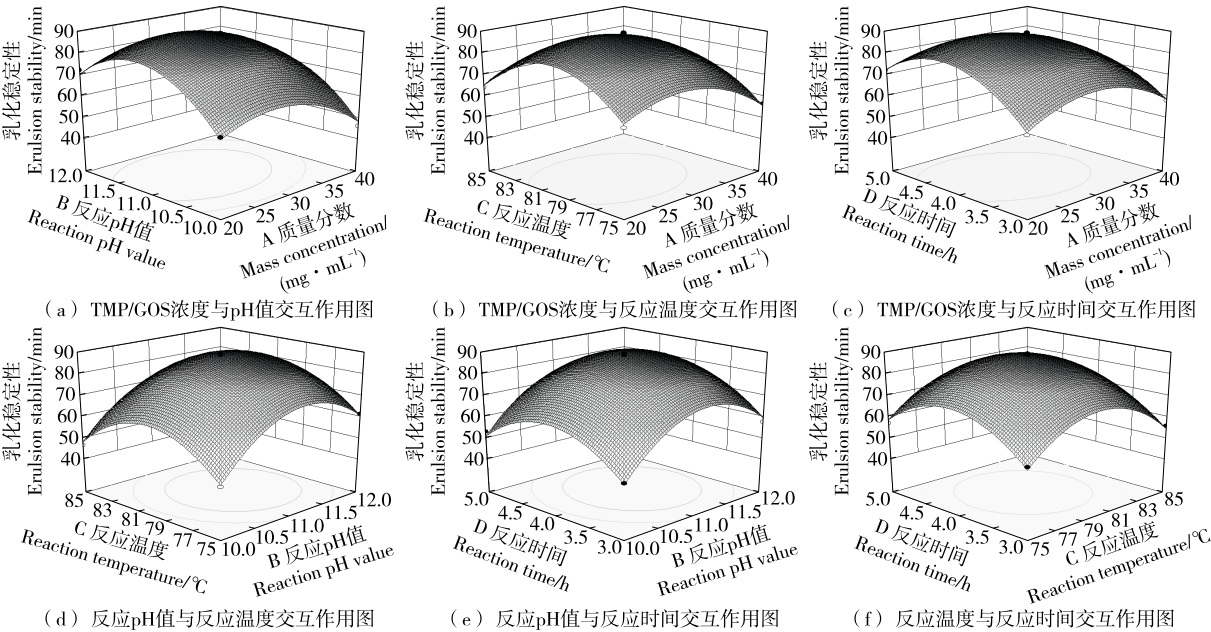


图 5 各因素交互作用对糖基化罗非鱼肌纤维蛋白乳化稳定性的影响

Figure 5 Effects of interaction of factors on emulsion stability of glycosylated tilapia muscle fibrin

图 5(d)和图 5(e)椭圆效果最明显,等高线也相对密集,说明 pH 值与 TMP/GOS 总浓度、反应温度和反应时间的交互作用明显,对乳化稳定性的影响较大。

2.5.4 验证实验及结果 运用 Design-Expert 12.0 软件对试验结果进行分析优化,得出 TMP-GOS 制取的理论最优工艺为:TMP/GOS 质量浓度 27.34 mg/mL,反应 pH 值 11.2,反应温度 79.9 ℃,反应时间 4.09 h,由此预测制取的 TMP-GOS 乳化稳定性为 90.60 min。由数学模型预测所得最佳工艺进行 3 次验证性实验,乳化稳定性结果为 (90.30 ± 1.44) min,与预测值比较接近,表明响应面法对罗非鱼肌纤维蛋白糖基化工艺条件进行的优化是稳定可行的,对实践具有一定指导意义。改性前后罗非鱼肌纤维蛋白理化性能的比较见表 4。

表 4 改性前后罗非鱼肌纤维蛋白的理化性能

Table 4 Physicochemical properties of tilapia myofibrillar protein before and after modification ($n=3$)

样品	乳化稳定性/min	乳化活性/ ($\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)	溶解度/ %	接枝率/ %
TMP-GOS	90.30 ± 1.44	4.70 ± 0.03	66.09 ± 0.52	34.17 ± 0.86
TMP	42.40 ± 0.53	2.90 ± 0.02	28.81 ± 0.53	

2.6 SDS-PAGE 凝胶电泳

由图 6 可知,与 TMP 相比,未经糖基化反应的 TMP+GOS 混合物的蛋白条带并无明显差异,而糖基化后的 TMP-GOS 中肌动蛋白和肌动蛋白重链产物等条带明显淡化,与谢思怡等^[24]的研究结果类似,表明 TMP 分子在糖基化反应中,发生了蛋白质的交联反应和热降解反应。此外,GOS 与 TMP 发生共价结合,也可能影响考马斯亮蓝与 TMP 的共价结合。

2.7 内源性荧光光谱与表面疏水性分析

色氨酸(Thr)具有荧光性强、敏感度高、干扰少等优点,常作为蛋白质的典型内源性荧光物质。由图 7、图 8

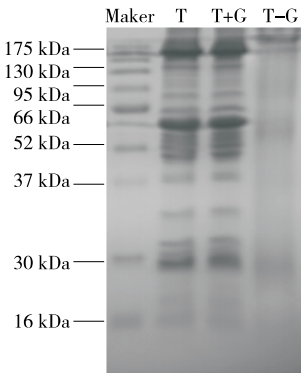


图 6 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Figure 6 Map of SDS-PAGE gel electrophoresis

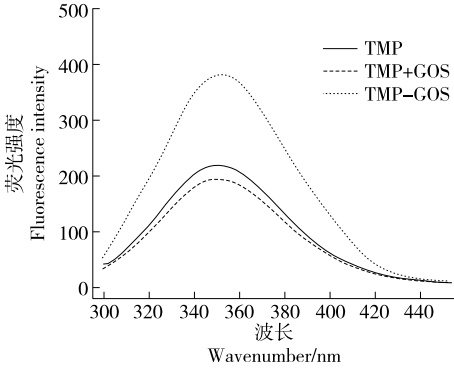


图 7 TMP、TMP+GOS、TMP-GOS 的荧光谱图

Figure 7 Fluorescence spectra of TMP, TMP+GOS and TMP-GOS

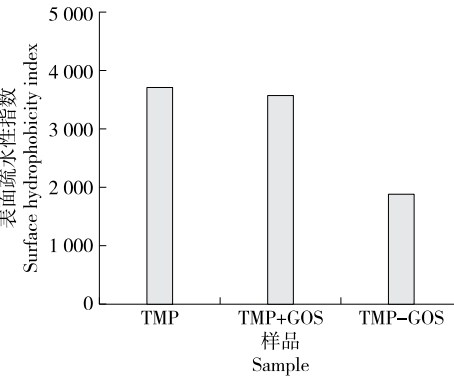


图 8 TMP、TMP+GOS、TMP-GOS 表面疏水性分析图

Figure 8 Surface hydrophobicity analysis of TMP, TMP+GOS and TMP-GOS

可知,与 TMP 相比,TMP-GOS 荧光强度峰值增大了 76.19%,最大发射波长红移 5 nm,表面疏水性指数也减少了 55.68%。这表明糖基化反应使 TMP 结构展开,Thr 基团暴露,其氨基酸趋向于在更灵活的构象下向亲水性环境转变。GOS 缀合 TMP 上,亲水性增加,表面疏水性下降。与 TMP 相比,TMP+GOS 荧光强度峰值和表面疏水性指数稍有下降,但最大发射波长并无移动,表明 GOS 对 Thr 基团的荧光性具有一定的屏蔽效应。

2.8 傅里叶红外光谱分析

由图 9 可知,TMP 在 1650 cm^{-1} 附近的峰属于酰胺 I,与 $\text{C}=\text{O}$ 拉伸有关; 1530 cm^{-1} 处属于酰胺 II,与 $\text{C}-\text{N}$ 拉伸有关; 1150 cm^{-1} 处属于酰胺 III,由 $\text{N}-\text{H}$ 角振动和 $\text{C}-\text{N}$ 拉伸振动相互作用形成; 2930 cm^{-1} 处的峰与 $\text{C}-\text{H}$ 拉伸有关; 3350 cm^{-1} 处的峰与蛋白质分子 $\text{O}-\text{H}$ 弯曲变化有关。

相对于 TMP,TMP-GOS 酰胺 I、酰胺 II 和酰胺 III 的吸收峰发生不同程度的红移,与 Li 等^[8]的研究结果一致。酰胺 I 和酰胺 II 峰面积比值增大,表明糖基化后蛋白结构明显发生变化;酰胺 III 吸收峰强度增加,表明美拉德反

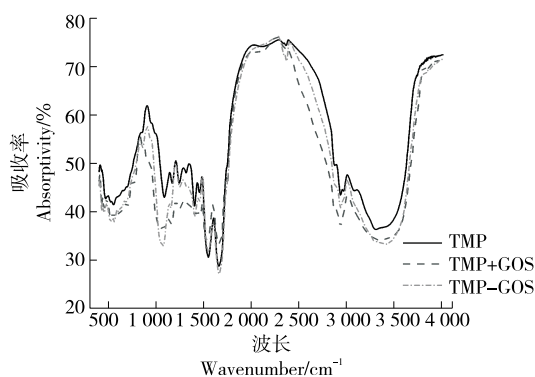


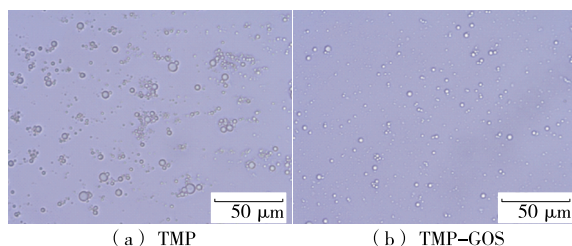
图 9 傅里叶红外光谱图

Figure 9 Fourier transform infrared spectroscopy

应涉及席夫碱 ($C=N$)、吡嗪 ($C-N$) 等数量增加; 2930 cm^{-1} 处吸收峰的强度增加, 3350 cm^{-1} 处吸收带变宽、吸收强度变强, 表明糖基化反应后蛋白上 $C-H$ 和 $O-H$ 数量增加, 说明 GOS 对 TMP 结构性质的修饰作用明显。

2.9 光学显微镜观察

图 10 中, 相对于 TMP 制备的乳液, TMP-GOS 制备的乳液的平均粒径相对较小且均匀, 表明通过糖基化反应共价键形成的 TMP-GOS 缀合物提高了纳米乳液的稳定性。这是因为相对于 TMP 制备的乳液, TMP-GOS 制备的乳液在油滴表面上形成较厚的界面层, 可以有效抵抗油滴之间的聚集, 防止油滴发生絮凝。



(a) TMP (b) TMP-GOS

图 10 乳液微观结构

Figure 10 Microstructure of emulsion

3 结论

罗非鱼肌纤维蛋白—低聚半乳糖最佳制取工艺为罗非鱼肌纤维蛋白/低聚半乳糖质量浓度 27.34 mg/mL 、 $\text{pH } 11.2$ 、反应温度 $79.9\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、反应时间 4.09 h 。该工艺下罗非鱼肌纤维蛋白—低聚半乳糖乳化稳定性为 $(90.30 \pm 1.44)\text{ min}$ 、乳化活性指数为 $(4.70 \pm 0.03)\text{ m}^2/\text{g}$ 、溶解度为 $(66.09 \pm 0.52)\%$ 、接枝度为 $(34.17 \pm 0.86)\%$ 。该工艺下, 湿美拉德反应程度高, 伴随蛋白热聚集和降解; 罗非鱼肌纤维蛋白展开, 表面疏水性显著下降; 低聚半乳糖对罗非鱼肌纤维蛋白结构性质的修饰作用明显, 罗非鱼肌纤维蛋白—低聚半乳糖缀合物制备的乳液平均粒径相对减小

且均匀。

该研究主要解决了湿法糖基化蛋白改性接枝率低的难题, 显著提高了改性蛋白的两亲性。这为罗非鱼肌纤维蛋白—低聚半乳糖缀合物成为食品和制药中的挥发油、香料和生物活性化合物等的包封剂和传递系统提供了一定可能性。同时, 美拉德反应也为改性蛋白提供了一定的风味成分, 可应用于一些食品开发与改良中, 如 Zhu 等^[26]将糖基化文蛤分离蛋白应用于鱼肠中, 显著提高了鱼肠的凝胶性质和感官评分。然而, 该方法也存在一些缺点, 如褐变程度大、副产物多、焦糖化等, 其会限制接枝产物的应用性。而这主要是碱性反应环境加快了美拉德反应和焦糖化反应的进行, 可采用其他方法结合, 如与超声、微波、酶法等方法联用, 减少糖基化副反应的发生, 以获得更高质量的改性蛋白。

参考文献

- [1] 刘诗长, 周春霞, 洪鹏志, 等. 罗非鱼肉分离蛋白的营养成分分析[J]. 现代食品科技, 2011, 27(7): 843-846, 834.
- [2] LIU S C, ZHOU C X, HONG P Z, et al. Analysis components of protein isolates from tilapia [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(7): 843-846, 834.
- [3] KRISTINSSON H G, HULTIN H O. Changes in conformation and subunit assembly of cod myosin at low and high pH and after subsequent refolding [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(24): 7187-7196.
- [4] WANG K, LI Y, ZHANG Y M, et al. Improving myofibrillar proteins solubility and thermostability in low-ionic strength solution: A review[J]. Meat Science, 2022, 189: 108822.
- [5] LIU H T, ZHANG H, LIU Q, et al. Filamentous myosin in low-ionic strength meat protein processing media: Assembly mechanism, impact on protein functionality, and inhibition strategies[J]. Trends in Food Science & Technology, 2021, 112: 25-35.
- [6] DE OLIVEIRA F C, COIMBRA J S, DE OLIVEIRA E B, et al. Food protein-polysaccharide conjugates obtained via the maillard reaction: A review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2016, 56(7): 1108-1125.
- [7] HE W Y, TIAN L, ZHANG S S, et al. A novel method to prepare protein-polysaccharide conjugates with high grafting and low browning: Application in encapsulating curcumin [J]. LWT-Food Science & Technology, 2021, 45: 111349.
- [8] XU Y J, ZHAO Y Q, WEI Z X, et al. Modification of myofibrillar protein via glycation: Physicochemical characterization, rheological behavior and solubility property [J]. Food Hydrocolloids, 2020, 105: 105852.
- [9] 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.

- [9] KAN X H, CHEN G J, ZHOU W T, et al. Application of protein-polysaccharide Maillard conjugates as emulsifiers: Source, preparation and functional properties [J]. Food Research International, 2021, 150(1): 110740.
- [10] AARON G, GEOFF W S, ANDREW R B, et al. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 307-318.
- [11] JIANG Q Q, RU J, NAHO N, et al. Changes in protein properties and tissue histology of tuna meat as affected by salting and subsequent freezing[J]. Food Chemistry, 2019, 271: 550-560.
- [12] 李锦锦, 唐善虎, 李思宁, 等. 大蒜粉对牦牛肉肌原纤维蛋白体外氧化保护作用的研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(14): 145-152.
- LI J J, TANG S H, LI S N, et al. Oxidative protection effect of garlic powder on yak myofibrillar protein in vitro[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(14): 145-152.
- [13] SAFOURA P, ALI N, JAVAD K, et al. Preparation of chemically modified canola protein isolate with gum Arabic by means of Maillard reaction under wet-heating conditions[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 155: 201-207.
- [14] YAN S Z, XIE F Y, ZHANG S, et al. Effects of soybean protein isolate-polyphenol conjugate formation on the protein structure and emulsifying properties: Protein-polyphenol emulsification performance in the presence of chitosan[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2020, 609: 125641.
- [15] XIA X F, KONG B H, LIU J, et al. Influence of different thawing methods on physicochemical changes and protein oxidation of porcine longissimus muscle [J]. LWT-Food Science and Technology, 2012, 46(1): 280-286.
- [16] YAN S Z, XU J W, ZHANG S, et al. Effects of flexibility and surface hydrophobicity on emulsifying properties: Ultrasound-treated soybean protein isolate [J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 142: 110881.
- [17] WANG W Q, BAO Y H, CHEN Y. Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system[J]. Food Chemistry, 2013, 139(1): 355-361.
- [18] ANDRÉ C D, AARON M C, ERIC W K, et al. Effects of pH on protein-protein interactions and implications for protein phase behavior[J]. Science Direct, 2008, 1 784(4): 600-610.
- [19] GAO H, MA L, LI T Q, et al. Impact of ultrasonic power on the structure and emulsifying properties of whey protein isolate under various pH conditions[J]. Process Biochemistry, 2019, 81: 113-122.
- [20] ALEXOV E G, GUNNER M R. Incorporating protein conformational flexibility into the calculation of pH-dependent protein properties[J]. Biophysical Journal, 1997, 72(5): 2 075-2 093.
- [21] LEE H, YILDIZ G, DOS SANTOS L C, et al. Soy protein nano-aggregates with improved functional properties prepared by sequential pH treatment and ultrasonication [J]. Food Hydrocolloids, 2015, 15: 200-209.
- [22] 邹良亮, 康怀彬, 张慧芸, 等. 高温处理对牛肉蛋白质组分及其降解的影响[J]. 食品与机械, 2017, 33(11): 18-22, 27.
- ZHOU L L, KAN H B, ZHANG H Y, et al. Effect of high temperature on protein components and their degradation in beef [J]. Food & Machinery, 2017, 33(11): 18-22, 27.
- [23] WANG C Y, REN X D, SU Y J, et al. Application of glycation in regulating the heat-induced nanoparticles of egg white protein[J]. Nanomaterials, 2018, 8(11): 943.
- [24] 谢思怡, 付余, 邬威. 核糖糖基化修饰对猪肉肌原纤维蛋白功能特性和抗氧化活性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(20): 90-96.
- XIE S Y, FU Y, WU W. Impacts of ribose-induced glycosylation on functional property and antioxidant of porcine myofibrillar protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(20): 90-96.
- [25] 杨宇鸿, 董士远, 靳卫亚, 等. 草鱼肌原纤维蛋白-葡萄糖糖基化产物的理化特性及乳化特性研究[J]. 食品工业科技, 2018, 39(18): 77-82, 142.
- YANG Y H, DONG S Y, GAN W Y, et al. Chemical characterization and emulsifying properties of grass carp myofibrillar protein glycosylated with glucose [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(18): 77-82, 142.
- [26] 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.

(上接第 149 页)

- [25] WANG L, ZHANG P Z, SHEN J W, et al. Physicochemical properties and bioactivities of original and Se-enriched polysaccharides with different molecular weights extracted from *Pleurotus ostreatus* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 141: 150-160.
- [26] HU Z Y, YU R Y, SUN J F, et al. Static decolorization of polysaccharides from the leaves of *Rhododendron dauricum*: Process optimization, characterization and antioxidant activities[J]. Process Biochemistry, 2022, 121: 113-125.
- [27] ZHOU N, ZHAO Y, ZHANG L G, et al. Protective effects of black onion polysaccharide on liver and kidney injury in T2DM rats through the synergistic impact of hypolipidemic and antioxidant abilities[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 223: 378-390.