

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.02.037

蛋白质糖基化改性方法和产物验证方法研究进展

Research progress on the preparation and identification methods of proteins glycosylation

兰秋雨 张清 刘琳 王宸之

LAN Qiu-yu ZHANG Qing LIU Lin WANG Chen-zhi

李美丽 秦文 杨文钰

LI Mei-li QIN Wen YANG Wen-yu

(四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014)

(School of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

摘要:介绍了近年来国内外蛋白质糖基化改性方法和产物鉴定方法的研究现状,系统综述了蛋白质糖基化的影响因素,对干热法、湿热法和基于湿热法衍生出的辅助方法在内的蛋白质糖基化方法进行比较分析,总结归纳了产物鉴定方法的原理和使用情况,并展望通过非热加工较为精准的控制糖基化程度,同时保证产物的安全性与营养性。

关键词:蛋白质;糖基化;产物鉴定

Abstract: In this review, the research situation of the preparation and identification methods of proteins glycosylation in recent years at home and abroad were introduced. Moreover, the factors affecting protein glycosylation were systematically reviewed, and the methods of protein glycosylation including those of dry heat, moist heat and the auxiliary one derived from moist heat method were compared and analyzed. In addition, the principle and application of product identification method were also reviewed.

Keywords: protein; glycosylation; identification of products

蛋白质改性是通过一定的方法改变天然蛋白质原有结构或化学基团的存在形式,以实现其功能特性的改变,从而满足多种多样的食品加工要求。蛋白质的改性方法主要包括物理法、化学法、生物法和基因工程法^[1]。糖基化改性以反应过程温和,无有毒有害试剂添加,改性后蛋

白性质稳定等优点成为一种理想的蛋白质改性方法^[2]。相对于单糖、二糖或寡糖糖基化所得产物而言,蛋白质-多糖糖基化表现出了更加优越的功能性质^[1]。本文中提到的蛋白质糖基化,如无特别说明,均为蛋白质与多糖的糖基化反应。

蛋白质糖基化改性主要基于美拉德反应,利用蛋白质与多糖进行初级糖基化反应,获得的改性蛋白不仅集合了蛋白质和多糖原有的功能特性,蛋白质的乳化性、泡沫稳定性、溶解性、致敏性、抗菌性、抗氧化性等功能特性也得到了改善^[3]。蛋白质糖基化改性研究自 20 世纪 90 年代初开始,经过 30 年的发展,已经成为蛋白质改性的重要方法。本文综述了近年来不同蛋白质糖基化改性方法的优缺点,糖基化影响因素及如何选择糖基化方法。并对蛋白质糖基化产物鉴定方法的检验原理,优缺点以及使用情况进行介绍。

1 蛋白质糖基化改性方法

目前蛋白质糖基化方法主要包括干热法、湿热法和基于湿热法衍生的一些辅助方法。干热法糖基化具有操作简单,反应条件容易控制,无需加入其他试剂,反应产物接枝度高等优点,但反应时间较长。湿热法糖基化具有反应时间短,反应迅速等优点,但反应较为剧烈不易控制,反应产物接枝度较低。不同的蛋白质糖基化方法制备糖基化产物时在反应速度、接枝度、可控性、产物空间结构、功能特性上存在差异^[4-5]。因此,在糖基化方法的选择上需要对蛋白质和糖发生糖基化的难易程度、糖基化效果、糖基化所需时间和温度等因素进行综合考虑。

1.1 干热法糖基化

干热法糖基化是最先使用的蛋白质糖基化方法,也是蛋白质糖基化处理的最主要方法。通常,先将蛋白质

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:31401329);四川省科技厅科技支撑计划重大项目(编号:035Z1108);国家自然科学基金项目(编号:31301277)

作者简介:兰秋雨,女,四川农业大学在读硕士研究生。

通信作者:张清(1986—),男,四川农业大学副教授,博士。

E-mail: zhangqing@sicau.edu.cn

收稿日期:2018-08-23

和多糖按一定比例在水溶液中进行混合,经干燥得到两者的混合粉末,然后在一定的温度、湿度和时间条件下诱导糖基化反应,反应完毕后迅速冷却以终止糖基化反应。反应时间通常为几天到几周。

干热法糖基化过程中的主要影响因素包括反应温度、湿度、时间、底物的结构和比例等^[6]。其中反应温度对糖基化效果有很大影响,温度过低,反应时间较长,反应过程难以控制,温度过高,容易导致过度糖基化,使美拉德反应进入中后期,产物组成复杂,甚至产生有致癌作用的 AGEs(晚期糖基化终末产物)。因此,干热法糖基化的反应温度一般控制在 40~60 °C,以 60 °C 最为常见。反应湿度是指蛋白质糖基化过程中的环境相对湿度。反应湿度的高低会影响反应过程中的水分活度进而影响反应速率。目前,对于反应湿度的控制一般通过在干燥器中放置饱和的盐溶液来实现。反应湿度的选择要根据蛋白质和多糖发生美拉德反应的难易程度来确定。

反应时间直接影响蛋白质糖基化的效果。由于干法糖基化只是将蛋白质与多糖的混合粉末在一定温度和湿度下进行处理,蛋白质与糖接触不充分,一般反应时间较长。反应时间和温度是美拉德反应的重要影响因素,两者相互影响。随着温度的升高,反应时间相应缩短,进而提高蛋白质糖基化效率。Zhang 等^[7]将对对比分析了大豆分离蛋白(Soy protein isolate, SPI)与麦芽糖糊精在不同温度条件下干法反应 2 h 产生糖基化程度和理化性质,结果显示 140 °C 下生成的糖基化程度最高(26%),环境稳定性更好。Liu 等^[8]将麦芽糖糊精和乳清分离蛋白在 80 °C 下进行了干法糖基化处理 2 h,发现改性后的乳清分离蛋白在 pH 值 3~7、0.00~0.15 mol/L 的氯化钠或氯化钙溶液等条件下表现良好的透明分散状态;并且热变性温度也得到提高。之后, Liu 等^[9]在对麦芽糖糊精改性乳清分离蛋白时的糖基化时,温度提高到 130 °C,时间缩短至 30 min 以下,结果显示乳清分离蛋白-麦芽糖糊精糖基化产物具有较高的热稳定性、溶解性和盐离子耐受性;并且糖基化产物的颜色或 5-羟甲基-2-糠醛含量均比在 80 °C 和 2 h 条件下所得糖基化产物的浅或低。高温干热法蛋白质糖基化方法有效缩短了蛋白质糖基化改性所需时间,甚至还获得了更好的品质特性。然而,目前此法仅应用于 SPI 和乳清分离蛋白的糖基化中,该方法是否具有广普性还需要进一步研究。

糖基化反应底物的比例也是影响蛋白质糖基化效果的重要因素。一般情况下蛋白质和糖的比例是指蛋白质和糖的质量比。也有学者^[10]根据蛋白质和多糖的结合位点将蛋白质糖基化底物质量比细化为氨基和羰基的摩尔比例。此外,糖的分子量大小和糖链的长度会影响蛋白质糖基化效果^[11]。因此在反应时间的控制上还需要考虑蛋白质结构的影响。

干热法糖基化所需反应时间较长,耗能高,产出效率低,是干法糖基化工业化的难点。使用干热法进行蛋白质糖基化时,为了使两者能够充分接触,通常要将其溶解后进行干燥,然后进行糖基化反应。目前常用冷冻干燥,能够避免干燥过程中糖和蛋白质发生反应,产生具有致癌性的晚期糖基化终末产物。而冷冻干燥的成本较高,增加了蛋白的干法糖基化处理的工业化应用成本。

1.2 湿热法糖基化

1.2.1 传统湿热法

蛋白质湿热法糖基化是基于液相相对蛋白质和糖进行热处理从而使蛋白质糖基化改性的一种方法,多用于蛋白质与小分子糖之间的接枝反应^[3]。由于蛋白质和多糖基于液相反应,两者充分接触,反应迅速,能够大大缩短糖基化反应时间。但是由于美拉德反应的初级反应为可逆反应,水作为初级反应的反应产物在体系中大量存在,抑制了糖基化反应的进行。另一方面,蛋白质在水中高温处理容易发生变性聚集,加速反应向高级阶段进行,甚至生成有毒有害物质,如丙烯酰胺和 4-甲基咪唑等^[1]。因此湿热法糖基化存在反应不完全,接枝度低,产物复杂,反应难控制的问题。目前已有研究通过添加转谷氨酰胺酶(TGase)^[12]、超声波技术^[13]、脉冲电场技术^[14]和高压处理技术^[15]等辅助措施来提高蛋白质糖基化效果控制反应程度。

1.2.2 酶法糖基化

转谷氨酰胺酶(TGase)能够催化蛋白质分子中谷氨酰胺残基(γ -甲酰胺基)与赖氨酸残基(ϵ -氨基)生成共价键,形成交联蛋白,发生交联后的蛋白质分子中的赖氨酸残基又易被伯胺类物质所取代。湿热法糖基化利用 TGase 该特性催化具有伯氨基的多糖与蛋白质发生反应,制备糖基化交联蛋白。TGase 催化糖基化反应所得的糖基化产物具有更好的溶解性、乳化稳定性、起泡性、泡沫稳定性和凝胶特性^[16]。全越等^[12]利用响应面法优化了转谷氨酰胺酶催化燕麦麦麸球蛋白糖基化接枝条件,得到当氨基糖与蛋白浓度比为 0.94 : 1.00、TGase 酶添加量为 57.59 U/g、pH 值为 7.65、时间为 4 h、温度为 45 °C 时糖基化接枝度最高(45.677 4%)。TGase 能够对蛋白质进行酶法改性,同时也是催化蛋白质糖基化反应的进行,是一种绿色健康的蛋白质改性方式。

1.2.3 旋转圆盘反应器

旋转圆盘反应器是一种多级串联混合反应器,主要用于聚酯缩聚反应。目前有学者^[17]提出将其用于蛋白质糖基化处理中的可能性。蛋白质-多糖混合液进入旋转圆盘中,在加热和离心力的作用下形成微米级的薄膜,提高圆盘和混合液之间的传热系数。混合液在反应器中循环直至得到目标糖基化产物。旋转圆盘反应器能够明显缩短反应时间,降低能耗^[18]。目前,尚未有关于旋转圆盘反应器应用于蛋白质糖基化反应处理的报道。

1.2.4 超声波辅助法

超声波是一种常见的物理方法,

因其机械作用和空化作用被广泛应用于食品加工和品质改良方面^[19]。与传统的湿式加热相比,超声辅助法可以提高接枝反应的效率,缩短反应时间,提高蛋白质—多糖复合物的溶解度、乳化性质、表面疏水性和凝胶特性^[19]。Zhang 等^[20]对比传统湿热法和超声辅助湿热法制备 β -大豆球蛋白—麦芽糊精复合物,结果表明超声处理能够加速接枝过程并且获得功能特性更加优异的蛋白质—多糖复合物。Li 等^[21]将超声波技术应用于花生分离蛋白分别与葡聚糖和阿拉伯胶之间的湿法糖基化处理,同时与传统的湿热法处理对比。结果发现经超声处理后,花生分离蛋白与 2 种多糖的接枝度显著增加,且所得糖基化产物的 L 值变大而 b 值变小。从结构特点来看,超声处理后的糖基化产物具有更少的 α -螺旋和较为松散的三级结构,以及更多的 β -折叠、 β -转角和更高的表面疏水结构;从功能特性来看,超声处理所得的 2 种花生分离蛋白糖基化产物的溶解性和乳化性都得到了提高。所以,在相同糖基化处理条件下,超声波有助于蛋白质糖基化反应的进行,从而制备出颜色较浅和功能特性更优的改性蛋白质^[22]。超声辅助处理不仅能够缩短接枝反应时间,还能改善接枝产物功能特性,是一种快速有效的蛋白质湿热糖基化的辅助方法。

1.2.5 脉冲电场辅助法 高压脉冲电场(pulsed electric fields, PEF)是一种液态食品非热处理加工技术,主要用于食品杀菌、提高酶活、物质提取,改善食品品质和食品保鲜等方面^[23-25]。Guan 等^[14]将 400 mg BSA 与 400 mg 葡聚糖混合,然后溶于 190 mL 去离子水。将溶液的初始 pH 调节至 10.0 后定容到 200 mL。使用脉冲持续时间为 25 μ s,脉冲频率为 1.04 kHz 的脉冲电场处理牛血清蛋白和葡聚糖混合溶液,结果表明脉冲电场能够促进美拉德反应的进行。涂宗财等^[26]研究了高压脉冲电场对 β -乳球蛋白(β -Lg)糖基化的抗原性和结构的影响,结果显示 PEF 处理能够明显降低 β -Lg 糖基化产物的抗原性。但是未对高压脉冲电场处理前后的糖基化产物的抗原性进行比较。脉冲电场能够促进糖基化进行,改善蛋白功能特性,提高产物接枝度,抑制美拉德反应高阶产物的生成。

1.2.6 其他辅助方法 一些非热加工技术也被用于蛋白质的湿热法糖基化改性过程,如高压处理,微波处理,动态高压微射流等。有学者^[15]在 10 MPa 的条件下对葡聚糖和 β -大豆球蛋白进行湿热法糖基化处理,发现高压情况下接枝反应加速并且降低了褐变速率。与常压下所获得的复合物相比,高压处理所得的复合物具有更高的接枝度和更好的乳化性。孟祥勇等^[27]对米渣蛋白和海藻酸钠进行了相同的处理,发现微波处理能够提高接枝速度,操作简单,方便控制,是一种高效、安全的蛋白质改性方法。钟俊桢等^[28]对 β -Lg 进行动态高压微射流技术协同

葡聚糖糖基化处理,结果表明动态高压微射流处理会使 β -Lg 的表面疏水性明显升高,内源荧光光强降低,并且改变其二级结构,促进蛋白质糖基化的进行。此外,一些非热处理如高静压、高密度二氧化碳等也具备用于蛋白质糖基化改性的可能。

2 蛋白质糖基化的鉴定方法

蛋白质糖基化改性主要是利用美拉德反应的初期反应,使蛋白质和多糖生成美拉德初级产物即蛋白质—多糖复合物。但是由于美拉德反应较为复杂,如果控制不当,反应很容易进入中期甚至末期,产生黑色素和有毒有害物质。因此需要采取适当的方法对糖基化产物或糖基化反应进程进行检测分析。目前常用的方法有分光光度法、凝胶电泳、色谱法、光谱法、显微分析法和质谱法等。在鉴定蛋白质糖基化过程时,往往需要选择几种方法来综合评价。

2.1 分光光度法

分光光度法可以通过测定复合物中蛋白质的自由氨基含量来表示复合物的接枝程度,即接枝度,也可以通过测定美拉德反应中呈色物质的含量表示美拉德反应进程,即褐变程度。常用的接枝度测定方法有邻苯二甲酸(OPA)法和 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)法。其中 OPA 法快速,显色剂稳定性好,安全性较好,是目前最常用的测定自由氨基含量的方法。褐变程度测试只需要将糖基化产物加入 SDS 使其充分溶解后在 420 nm 下测定吸光度。在以往的研究中使用较少。另外,褐变程度还可以利用色差仪进行测定。分光光度法具有检测快速、操作简单、对设备要求低、样品前处理方便等优点,但也存在精确度不高的缺点,通常要结合其他检测方法使用。

2.2 凝胶电泳分析

聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)是常见的判断糖基化反应程度的鉴定方法,通常参考 Laemmli^[29]的方法。其中染色方法包括考马斯亮蓝染色和 PAS (Periodic Acid-Schiff stain)染色 2 种。考马斯亮蓝染色法得到的凝胶可以通过对比原蛋白质和蛋白质—多糖复合物的蛋白质条带判断糖基化反应是否进行,是最常用的染色方法。PAS 染色是通过过碘酸的氧化作用,使多糖暴露出醛基,醛基与无色碱性品红结合反应,与多糖存在的部位形成新的紫红色复合物,使糖蛋白条带呈红色。PAS 染色通常结合考马斯亮蓝染色使用,能够更加准确地表现出糖链的结合情况^[30]。SDS-PAGE 能够直观地显示出蛋白质与多糖的结合情况,能够有效鉴定蛋白质糖基化反应是否发生,但是不能进行定量。

2.3 高效排阻色谱法

由于蛋白质和多糖都是大分子物质,很多蛋白质和多糖的复合物分子量较大。针对性分析大分子物质的特

点,排阻色谱法通过将溶质分子尺寸进行分离,分子量级范围为 10~2 000 kDa,很好地解决了经典高效液相色谱难以检测大分子物质的难题^[31]。高效排阻色谱法(HPSEC)利用孔径不同的填料,溶剂中的大分子不能进入孔内直接流出,小分子后流出,将溶质分子按照体积大小分离,是蛋白质糖基化改性后的产物分子量分布分析的常用手段之一。HPSEC 可以提供较为清晰的表征糖基化产物的分子量分布色谱图,相对于原蛋白或原蛋白和多糖混合物的色谱图而言,糖基化产物的 HPSEC 图谱在更少的保留体积范围内有出峰,表明有分子量更大的糖基化产物产生^[32]。然而,HPSEC 只能显示是否有分子量更大的物质产生、生成物分子量分布情况和相对定量,而并不能准确对糖基化反应的程度进行定量分析。

2.4 拉曼光谱法

拉曼光谱是一种研究分子结构的分析方法,凭借其样品前处理简单、样品无损、操作简单、检出快速等优点被广泛应用于物理、化学、生物学和医学等领域^[33]。基于对拉曼光谱吸收峰变化的对比分析,实现对蛋白质—多糖糖基化产物的鉴别。Wang 等^[34]利用表面增强拉曼光谱技术对乳清分离蛋白和葡聚糖的糖基化产物进行了鉴别研究,结果显示在乳清分离蛋白—葡聚糖糖基化产物在 983 cm^{-1} 处出现了特征峰,该特征峰主要与羰基和氨基发生美拉德反应生成的 C—N 键相对应,反映了蛋白质糖基化位点处的蛋白骨架的构型变化。此外,有学者^[35]利用临界干燥态拉曼光谱技术对乳清分离蛋白—葡聚糖糖基化产物进行了鉴别。拉曼光谱测定时所需样品量少,操作简单,检出迅速。拉曼光谱技术是糖基化蛋白鉴别的又一快速有效的方法。

2.5 傅立叶红外光谱法

傅立叶红外光谱(Fourier Transform Infrared, FTIR)可以对蛋白质的肽链结构变化进行表征,是一种常用的分析蛋白质结构变化的方法。蛋白质与多糖分子发生接枝反应后,蛋白质分子的羟基含量增加,在红外光谱中表现为羟基的吸收峰峰面积增大。另一方面,蛋白质与多糖分子糖基化后蛋白质的分子结构发生变化,在红外光谱中的酰胺 I 带、酰胺 II 带和酰胺 III 带的吸收峰变化。其中酰胺 I 带 1 600~1 700 cm^{-1} 能够反映蛋白质的二级结构变化。宋永令等^[36]通过 FTIR 证实葡聚糖与谷朊粉发生糖基化反应。Oliver 等^[37]借助多元统计分析、主成分分析等化学计量学方法,对糖基化酪蛋白和酪蛋白之间的分子结构差异进行分析判定。傅立叶红外光谱通常采用透射法对样品进行检测,对一些难溶、难粉碎的样品的测试存在困难。衰减全反射(ATR)方法基于光内反射原理进行检测,能够很好地解决上述问题。并且简化了样品的制作过程。

2.6 圆二色谱法

圆二色谱法(circular dichroism, CD)是测定蛋白质二级结构最有效的方法之一,通过分析接入糖链后蛋白质部分 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角和无规则卷曲 4 种二级结构的变化情况,对蛋白质的糖基化改性产物进行鉴定。也有研究^[38]采用 CD 对乳清分离蛋白用葡聚糖糖基化前后的二级结构进行了分析,发现糖基化处理对其 4 种二级结构的组成并没有显著性影响,这可能与糖基化的蛋白种类、多糖种类和糖基化程度有关。然而,多糖链接入蛋白质分子中后,会引起各种二级结构含量变化,所以圆二色谱法在对蛋白质糖基化进行表征时具有针对性强、结果准确性高等优点。

2.7 荧光光谱法和紫外光谱法

荧光光谱利用美拉德反应有呈色物质生成,荧光物质是美拉德反应的高阶产物的前体物,通过对比荧光强度,反映糖基化反应的程度。张曦^[39]利用大豆 7S 蛋白的内荧光基团在 270~500 nm 有吸收峰的特性,通过对吸收峰的对比判断糖基化产物偶联程度。紫外光谱是一种常见的蛋白质构象研究方法。其中远紫外区吸收光信号来源于肽链,能够反映蛋白质的二级结构变化,近紫外区吸收的则来源于芳香族化合物,能够反应蛋白质侧链和二硫键变化。李晓明等^[40]采用紫外分光光度法对不同活性羰基与 β -Lg 糖基化产物进行全波长扫描,通过对比原蛋白与糖基化蛋白的近紫外分光光谱发现在 280 nm 波长处存在酪氨酸和色氨酸的特征峰,糖基化产物在此处的吸光度增强,进而判断糖基化蛋白的蛋白质结构发生了变化。

2.8 差示扫描量热法

差示扫描量热法(Differential Scanning Calorimeter, DSC)可以对蛋白质的变性温度和热焓进行测定,被用于表征蛋白质糖基化的结构变化。一般情况下,糖链的接入能够增加蛋白质的热稳定性,表现为热变性温度升高。Boostani 等^[41]利用 DSC 对大豆分离蛋白—右旋糖酐糖基化产物的变性温度进行测定,结果表明糖基化后的蛋白质热变性温度明显增加。对于大部分蛋白质来讲,糖基化改性后其热变性温度都有所升高,但是当糖链较短时,糖链的接入不能充分发挥其空间位阻效应会抑制展开的蛋白质发生聚合,从而对蛋白质的热稳定性影响较小^[42]。故 DSC 不适合对短链糖基化产物进行鉴定。作为一种基于热力学性质探究的方法,蛋白质的热分析可以有效从分子结构层面探讨蛋白质糖基化改性进程。

2.9 电子显微分析法

电子显微分析方法是一种分析物体形态微观形貌、结构特征观察手段,能够直观地表现原子或分子水平的大分子物质的结构、形态。其中扫描电镜主要是通过通过对

比原蛋白与糖基化蛋白的表面微观结构,分析蛋白质与糖是否发生接枝反应。由于单糖和部分低聚糖分子量小,对蛋白质结构改变较小,电子显微分析方法不能直接观察到其结构变化。Yadav 等^[43]对乳清蛋白与玉米纤维胶糖基化反应前后的扫描电镜图进行对比,结果表明糖基化产物的微观结构与原蛋白或者两者混合物的微观结构相比,表面粗糙、形态不规则和更加紧凑,说明发生了接枝反应,从而与 SDS-PAGE 和 FTIR 的鉴定结果相呼应。其他蛋白质糖基化改性后,也表现出更紧凑和非均一的微观结构,如大豆蛋白与梧桐胶缀合物^[44]、豌豆蛋白与果胶缀合物^[45]、大豆蛋白与葡聚糖缀合物^[46]。

3 结论

蛋白质糖基化方法多种多样,在方法选择时需要根据底物种类结合的难易程度、目标改性效果、反应时间和反应温度等方面进行综合考虑。目前,对于不常见多糖对蛋白质进行糖基化改性时一般采用干热法。而对湿热法的研究主要集中在对湿热法糖基化反应条件的优化,湿热法糖基化的机理,辅助处理对湿热法糖基化产物的影响等方面。随着蛋白质糖基化改性的广泛应用,对糖基化改性方法也有了更高的要求。如何根据生产要求选择蛋白质种类,如何对糖基化方法进行合理设置,如何对蛋白质糖基化程度进行精准控制,如何在保证糖基化蛋白的安全性及营养的同时实现对其更好的利用都是现代食品工业生产面临的问题。所以,需要对蛋白质糖基化产物有更精准的鉴别。蛋白质—多糖缀合物与原蛋白质相比,在分子结构和理化性质等方面表现了截然不同的特点,如氨基酸组成变化、分子量增大、蛋白质二级结构组成变化、增加多糖—蛋白质共价键(如 C—N)、光谱吸收变化、微观形态变化和热变性温度变化等。所以基于这些特点,可以选择适当的检测方法对蛋白质的糖基化过程进行鉴定。在现有报道的各种检测方法中,每种方法都有其侧重点,使得在实际鉴定蛋白质糖基化过程时,往往都需要选择几种方法来综合评价。

参考文献

[1] 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.

[2] OLIVER C M, MELTON L D, STANLEY R A. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2006, 46(4): 337-350.

[3] 许彩虹,王金梅,姚玉静,等.食品中蛋白质糖基化接枝的研究进展[J].现代食品科技,2017(8):306-312.

[4] 许彩虹,王金梅,杨晓泉,等.糖基化方法对于大豆 7S 球蛋白糖基化产物构象及功能特性的影响[J].食品工业科技,

2018(3):52-55.

[5] 许彩虹,王金梅,杨晓泉,等.糖基化方法对于大豆 7S 球蛋白糖基化反应及产物的影响[J].食品工业科技,2018(1):17-21.

[6] JIMÉNEZ-CASTAÑO L, VILLAMIEL M, MARTÍN-ÁLVAREZ P J, et al. Effect of the dry-heating conditions on the glycosylation of β -lactoglobulin with dextran through the Maillard reaction[J]. Food Hydrocolloids, 2005, 19(5): 831-837.

[7] ZHANG Jin-bo, WU Na-na, LAN Ting, et al. Improvement in emulsifying properties of soy protein isolate by conjugation with maltodextrin using high-temperature, short-time dry-heating Maillard reaction[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2014, 49(2): 460-467.

[8] LIU Gang, ZHONG Qi-xin. Thermal aggregation properties of whey protein glycosylated with various saccharides[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 32(1): 87-96.

[9] LIU Gang, ZHONG Qi-xin. High temperature-short time glycation to improve heat stability of whey protein and reduce color formation[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 44: 453-460.

[10] 张英华,刘艳乐,刘天舒,等. RP-HPLC 测定乳清蛋白糖基化产物中的氨基葡萄糖[J].东北农业大学学报,2017,48(5):58-64.

[11] JIMENEZCASTANO L, VILLAMIEL M, LOPEZFANDINO R. Glycosylation of individual whey proteins by Maillard reaction using dextran of different molecular mass[J]. Food Hydrocolloids, 2007, 21(3): 433-443.

[12] 全越,王长远,李玉琼.响应面优化转谷氨酰胺酶催化燕麦麸皮球蛋白糖基化接枝条件[J].天然产物研究与开发,2016(7):1121-1127.

[13] 宋启东,涂宗财,王辉,等.超声协同糖基化对蛋清粉致敏性及结构的影响[J].食品与机械,2018,34(5):1-5,26.

[14] GUAN Yong-guang, LIN Hua, HAN Zhong, et al. Effects of pulsed electric field treatment on a bovine serum albumin-dextran model system, a means of promoting the Maillard reaction[J]. Food Chemistry, 2010, 123(2): 275-280.

[15] XU Cai-hong, YU Shu-juan, YANG Xiao-quan, et al. Emulsifying properties and structural characteristics of β -conglycinin and dextran conjugates synthesised in a pressurised liquid system[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(5): 995-1001.

[16] 王长远,全越,李玉琼,等.燕麦麸皮球蛋白的糖基化结构修饰及功能性变化[J].食品科学,2017,38(9):143-148.

[17] AKHTAR M, DING R. Covalently cross-linked proteins & polysaccharides: Formation, characterisation and potential applications[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2017, 28: 31-36.

[18] BURNS J R, RAMSHAW C, JACHUCK R J. Measurement of liquid film thickness and the determination

- of spin-up radius on a rotating disc using an electrical resistance technique[J]. *Chemical Engineering Science*, 2003, 58(11): 2 245-2 253.
- [19] 毕爽, 马文君, 李杨, 等. 脉冲电场-超声波作用对黑豆球蛋白功能性质的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(9): 7-12.
- [20] ZHANG Bo, CHI Yu-jie, LI Bing. Effect of ultrasound treatment on the wet heating Maillard reaction between β -conglycinin and maltodextrin and on the emulsifying properties of conjugates[J]. *European Food Research and Technology*, 2013, 238(1): 129-138.
- [21] LI Chen, XUE Hao-ran, CHEN Zhi-yan, et al. Comparative studies on the physicochemical properties of peanut protein isolate-polysaccharide conjugates prepared by ultrasonic treatment or classical heating[J]. *Food Research International*, 2014, 57: 1-7.
- [22] ZHANG Bo, CHI Yu-jie, LI Bing. Effect of ultrasound treatment on the wet heating Maillard reaction between β -conglycinin and maltodextrin and on the emulsifying properties of conjugates[J]. *European Food Research & Technology*, 2014, 238(1): 129-138.
- [23] 刘曦然, 方婷. 高压脉冲电场在提取天然产物中的应用[J]. *食品工业*, 2017(1): 249-253.
- [24] 张良, 王丽娟, 钱建亚. 脉冲电场处理油菜籽对菜籽油品质的影响[J]. *中国油脂*, 2017, 42(11): 33-37.
- [25] 王丽平, 李苑, 余海霞, 等. 高压电场对生鲜食品保鲜机理研究进展[J]. *食品科学*, 2017, 38(3): 278-283.
- [26] 涂宗财, 田明, 王辉, 等. 高压脉冲电场结合糖基化对 β -乳球蛋白抗原性与结构的影响[J]. *现代食品科技*, 2016(11): 203-208.
- [27] 孟祥勇, 张慧恩, 宋腾, 等. 响应面法优化微波辅助米渣蛋白糖基化改性工艺[J]. *食品工业科技*, 2018(1): 156-161.
- [28] 钟俊桢, 涂越, 刘伟, 等. 动态高压微射流协同糖基化对 β -乳球蛋白乳化性和结构的影响[J]. *食品科学*, 2014, 35(1): 7-11.
- [29] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5 259): 680-685.
- [30] LI Chen, WANG Jie, SHI Jing, et al. Encapsulation of tomato oleoresin using soy protein isolate-gum arabic conjugates as emulsifier and coating materials[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 45: 301-308.
- [31] MENGÍBAR M, MIRALLES B, HERAS Á. Use of soluble chitosans in Maillard reaction products with β -lactoglobulin: Emulsifying and antioxidant properties[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 75: 440-446.
- [32] YANG Yue-xi, CUI Steve W, GONG Jian-hua, et al. A soy protein-polysaccharides Maillard reaction product enhanced the physical stability of oil-in-water emulsions containing citral[J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, 48: 155-164.
- [33] 刘燕德, 靳县县. 拉曼光谱技术在农产品质量安全检测中的应用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2015, 35(9): 2 567-2 572.
- [34] WANG Qian, HE Li-li, LABUZA T P, et al. Structural characterisation of partially glycosylated whey protein as influenced by pH and heat using surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. *Food Chem*, 2013, 139 (1/2/3/4): 313-319.
- [35] DAI Qing-yuan, ZHU Xiu-ling, YU Jing-yang, et al. Critical desiccation state Raman spectroscopy for simple, rapid and sensitive detection of native and glycosylated protein[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 66: 90-98.
- [36] 宋永令, 李江河, 王若兰. 谷朊粉糖基化改性对其结构及溶解性的影响[J]. *中国粮油学报*, 2016, 31(12): 125-131.
- [37] OLIVER C M, KHER A, MCNAUGHTON D, et al. Use of FTIR and mass spectrometry for characterization of glycosylated caseins[J]. *J Dairy Res*, 2009, 76(1): 105-10.
- [38] FAN Yu-ting, YI Jiang, ZHANG Yu-zhu, et al. Physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of β -carotene nanoemulsions stabilized with whey protein-dextran conjugates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 63: 256-264.
- [39] 张曦. 大分子拥挤环境下葡聚糖对大豆 7S 球蛋白的物性修饰研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2013: 29-33.
- [40] 李晓明, 孔阳辉, 吕丽爽. 糖基化对 β -乳球蛋白结构的影响[J]. *食品科学*, 2015, 36(15): 75-80.
- [41] 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.
- [42] 许彩虹, 王金梅, 姚玉静, 等. 糖链长度对于大豆 7S 球蛋白糖基化产物构象及乳化特性的影响[J]. *现代食品科技*, 2017(7): 112-117.
- [43] YADAV M P, STRAHAN G D, MUKHOPADHYAY S, et al. Formation of corn fiber gum & ndash; milk protein conjugates and their molecular characterization [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 26(2): 326-333.
- [44] SHEKARFOROUSH E, MIRHOSSEINI H, SARKER M Z I, et al. Soy protein-gum karaya conjugate: emulsifying activity and rheological behavior in aqueous system and oil in water emulsion[J]. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 2016, 93(1): 1-10.
- [45] TAMNAK S, MIRHOSSEINI H, TAN C P, et al. Physicochemical properties, rheological behavior and morphology of pectin-pea protein isolate mixtures and conjugates in aqueous system and oil in water emulsion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2016, 56: 405-416.
- [46] BOOSTANI S, AMINLARI M, MOOSAVINASAB M, et al. Fabrication and characterisation of soy protein isolate-grafted dextran biopolymer: A novel ingredient in spray-dried soy beverage formulation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 102: 297-307.