齐 齐 哈 尔 大 学

毕业设计(论文)

|  |  |
| --- | --- |
| 题 目 | 氨基葡萄糖糖基化修饰玉米肽的分离及部分物化性质研究 |
| 学 院 | 食品与生物工程学院 |
| 专业班级 | 食安142 |
| 学 号 | 2014152084 |
| 学生姓名 | 赵美晨 |
| 指导教师 | 王晓杰 |
| 成 绩 |  |

2018年6月19日

郑 重 声 明

本人呈交的学位论文，是在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果，所有数据、图片资料真实可靠。尽我所知，除文中已经注明引用内容外，本学位论文的研究成果不包含他人享有著作权的内容。对本论文所涉及的研究工作做出贡献的其他个人和集体，均已在文中以明确的方式标明。本学位论文的知识产权属于培养单位。

本人签名： 日期：

# 摘 要

以玉米醇溶蛋白为原料，利用碱性蛋白酶Alcalase进行酶解制备玉米肽，再在谷氨酰胺转氨酶的催化下，使玉米肽与氨基葡萄糖之间发生酶法糖基化反应，制备出玉米糖肽。首先，采用亲和层析和凝胶层析法对玉米糖肽进行分离，然后通过MALDI-TOF-MS进行分子量测定，以表征酶法糖基化反应的发生，最后对玉米糖肽的部分物化性质（包括起泡性、乳化性、溶解性和表观黏度）、DSC热稳定性及游离氨基含量进行研究。实验结果表明:(1)采用亲和层析和凝胶层析法分离获得富含玉米糖肽的组分，通过对比玉米肽与其糖基化反应产物的MALDI-TOF-MS一级质谱图，确认氨基葡萄糖与玉米肽之间发生TGase催化的糖基化反应，同时也伴随发生美拉德反应。(2)蛋白酶酶解反应使玉米醇溶蛋白的热稳定性显著降低，而游离氨基含量显著增加；糖基化修饰使玉米肽的热稳定性升高，游离氨基含量降低。(3)与玉米醇溶蛋白相比，玉米肽的起泡性和乳化性分别升高了80%和193；与玉米肽相比，玉米糖肽的起泡性下降了18%，乳化性升高了7。与玉米醇溶蛋白相比，玉米肽的溶解性显著增加，且受pH值的影响较小；糖基化修饰使玉米肽的溶解性增加，pH5.0为糖肽的等电点。在剪切速率0.1-1.0s-1范围内，玉米肽和玉米糖肽具有剪切稀化的性质；在剪切速率1.0-100s-1范围内，两者具有剪切变稠趋势，且玉米糖肽的表观黏度大于玉米肽。

关键词：玉米肽；酶法糖基化；糖肽；亲和层析；物化性质

# **Abstract**

In this presented work, the transgluminase was applied as the catalyst, glucosamine as the acyl acceptor to modify the corn peptide by glycosylation reaction. The corn peptide from zein was prepared by enzymatic hydrolysis using Alcalase. Firstly, corn glycopeptides were separated by affinity chromatography and gel chromatography, and then the molecular weights of corn peptide and it's modified product were measured by MALDI-TOF-MS to characterize the occurrence of enzymatic glycosylation reactions. Finally, partial physicochemical properties(including foaming, emulsifying, solubility and apparent viscosity) , DSC thermal stability and content of free amino groups of corn glycopeptides were studied. The results showed that: (1)Enrich the glycopeptides from glycosylation systems were obtained by affinity chromatography and gel chromatography, and mass spectra of the MALDI-TOF-MS of corn peptides were compared with their glycosylation reaction products. It was confirmed that the TGase-catalyzed glycosylation reaction occurred between glucosamine and corn peptides, and the Maillard reaction occurred simultaneously. (2)The thermal stability of zein was significantly decreased by the enzymatic hydrolysis, while content of the free amino group increased significantly. The thermal stability of the corn peptide was increased by the glycosylation modification, while content of the free ammo group decreased significantly. (3) Compared with zein, the foaming and emulsifying properties of corn peptide increased by 80% and 193, respectively; compared with corn peptide, the foaming property of corn glycopeptide decreased by 18%, and the emulsification increased by 7. Compared with zein, the solubility of corn peptide was significantly increased and the isoelectric point was not detected in the tested pH range. The corn glycopeptide had higher solubility than original one, and it's isoelectric point was pH 5.0. The dispersion prepared by the corn peptide and corn glycopeptide behaved shear thinning behaviour at shearing rate ranging from 0.1-1.0s-1, while behaved shear thickning behavious at shearing rate ranging from 1.0-100s-1, and apparent viscosity of corn glycopeptide was higher than corn peptide.

**Key words:** corn peptide; enzymatic glycosylation; glycopeptides; affiniity chromatography; physicochemical properties

# 目 录

[摘 要 I](#_Toc16378)

[Abstract II](#_Toc20959)

[第1章 绪论 1](#_Toc3817)

[1.1 玉米醇溶蛋白 1](#_Toc7441)

[1.2 玉米肽 1](#_Toc28064)

[1.3 玉米肽的糖基化修饰 1](#_Toc10314)

[1.4 本课题的研究目的和意义 1](#_Toc23291)

[1.5 本课题的国内外研究现状 2](#_Toc9167)

[1.5.1 酶法糖基化的国内外研究进展 2](#_Toc19404)

[1.5.2 肽的酶法糖基化修饰研究进展 4](#_Toc7386)

[1.5.3 亲和层析在糖蛋白分离纯化中的应用 5](#_Toc7508)

[1.6 本实验的研究内容 6](#_Toc5351)

[1.6.1 玉米肽和玉米糖肽的制备 6](#_Toc1878)

[1.6.2 玉米糖肽的亲和层析分离与凝胶层析脱盐 6](#_Toc6151)

[1.6.3 玉米糖肽的质谱分析 6](#_Toc5033)

[1.6.4 玉米糖肽的DSC热稳定性和游离氨基含量的分析 7](#_Toc9870)

[1.6.5 玉米糖肽部分物化性质的测定 7](#_Toc28590)

[第2章 材料与方法 8](#_Toc5458)

[2.1 实验材料与仪器 8](#_Toc19979)

[2.1.1 实验材料 8](#_Toc24800)

[2.1.2 实验仪器 9](#_Toc917)

[2.2 实验方法 10](#_Toc4937)

[2.2.1 氨基葡萄糖糖基化修饰玉米肽 10](#_Toc8286)

[2.2.2 糖基化修饰玉米肽的亲和层析分离 10](#_Toc6527)

[2.2.3 糖基化修饰玉米肽的凝胶层析分离脱盐 11](#_Toc3633)

[2.2.4 糖基化玉米肽的质谱分析 11](#_Toc3150)

[2.2.5 糖基化修饰玉米肽的DSC热稳定性分析 11](#_Toc18444)

[2.2.6 糖基化修饰玉米肽的物化性质研究 11](#_Toc21117)

[2.2.7 游离氨基含量的测定 12](#_Toc6748)

[第3章 结果与讨论 14](#_Toc27802)

[3.1 糖基化修饰玉米肽的分离纯化与质谱分析 14](#_Toc6651)

[3.1.1 亲和层析分离 14](#_Toc124)

[3.1.2 凝胶层析脱盐 14](#_Toc12354)

[3.1.3 糖基化修饰玉米肽的质谱分析 15](#_Toc10626)

[3.2 糖基化修饰对玉米肽热稳定性的影响 17](#_Toc19644)

[3.3 糖基化修饰对玉米肽游离氨基含量的影响 18](#_Toc31763)

[3.4 糖基化修饰对玉米肽物化性质的影响 19](#_Toc4395)

[3.4.1 糖基化修饰对玉米肽起泡性及泡沫稳定性的影响 19](#_Toc24056)

[3.4.2 糖基化修饰对玉米肽乳化性及乳化稳定性的影响 20](#_Toc13061)

[3.4.3 糖基化修饰对玉米肽表观黏度的影响 20](#_Toc8820)

[3.4.4 糖基化修饰对玉米肽溶解性的影响 21](#_Toc26005)

[结 论 23](#_Toc4180)

[参考文献 24](#_Toc31329)

[致 谢 27](#_Toc26956)

# 第1章 绪 论

## 1.1 玉米醇溶蛋白

我国玉米的产量占世界玉米总产量的20%左右，是世界第二大玉米生产国。在北方，玉米是高产粮食作物，也是重要工业原料。[玉米蛋白粉](http://www.yumidanbai.com/" \t "http://www.yumidanbai.com/chanpin/_blank" \o "玉米蛋白粉)是以玉米为原料，经过脱胚、粉碎、去渣、提取淀粉后的黄浆水，再经过浓缩和干燥得到的富含蛋白质的产品[1]。玉米醇溶蛋白是玉米蛋白粉中的主要蛋白质，由于它不溶于水且缺乏赖氨酸、色氨酸等必需氨基酸，还存在色泽和气味等问题，因而较少作为食品原料应用[2]。

## 1.2 玉米肽

玉米肽是以玉米醇溶蛋白为底物，用相应蛋白酶水解后得到的分子量小而具有一定生物活性的多肽分子。玉米肽中富含疏水性氨基酸，如丙氨酸、赖氨酸等，以及谷氨酸和脯氨酸。特殊的氨基酸组成和连接方式赋予玉米肽多种生物活性，如抑制血管紧张素转换酶、促进乙醇代谢、抗氧化、抗疲劳、抗癌等。因此，关于玉米肽生物活性的研究与应用逐年增加[3]。

## 1.3 玉米肽的糖基化修饰

玉米肽的糖基化修饰是将亲水性的糖类物质以共价键链接的形式导入蛋白质分子之中，使修饰产物即糖蛋白既具有蛋白质的大分子特性，同时又具有糖类物质的亲水特性。糖基化修饰的玉米肽使蛋白质能够抵抗消化酶的作用；能够赋予蛋白质传导信号的功能；可以使某些蛋白只有在糖基化之后才能正确折叠[4]。蛋白质的糖基化修饰可以扩大蛋白质在食品工业中的应用。

## 1.4 本课题的研究目的和意义

目前，对于转谷氨酰胺酶（TGase）催化的酶法糖基化反应机制的研究，主要集中在如何确认蛋白质与氨基糖之间发生了共价结合方面，采用的方法有SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法（SDS-PAGE）、反相高效液相色谱法（RT-HPLC）和红外光谱法（FT-IR）和质谱法四种。(1)SDS-PAGE法：在糖基化过程中，由于糖连接到蛋白质分子上，会导致蛋白质分子质量的增加，用希夫试剂染色时会生成糖蛋白所特有的粉红色[5]；(2)RT-HPLC法：将糖基化修饰产物经盐酸水解后，水解物与邻氨基苯甲酸于柱前衍生，根据衍生产物的RT-HPLC出峰时间，与标准氨基葡萄糖的出峰时间进行对比，确认是否有氨基葡萄糖的导入[6]；(3)FT-IR法：蛋白质/肽与酰基受体发生糖基化反应时，蛋白质/肽分子中会引入糖分子，羟基含量增加的同时会有吡喃环的导入。在红外光谱中，表现在3500-3200cm-1的O-H键的伸缩振动信号增强，1260-950cm-1的C-C、C-O键的伸缩振动和O-H键的变形振动区域的信号增强[7]；(4)质谱法：蛋白质/肽与氨基葡萄糖发生酶法糖基化反应时，蛋白质/肽的质量会增加162Da（氨基葡萄糖分子量179Da减去 NH3的分子量17Da）或其整数倍。通过对比糖基化反应前后的MALDI-TOF-MS或ESI-MS一级质谱图，就可确认TGase催化的酶法糖基化反应发生[8]。

但是，在研究过程中发现，在糖基化反应过程中，除了蛋白质/肽与氨基糖的共价结合反应外，还会有一部分氨基糖以物理吸附的方式与蛋白/肽相结合，且这部分糖不能用常规的透析方法去除[9]。上述普遍采用的RT-HPLC法、FT-IR法和SDS-PAGE法均不能区分糖基化产物中的糖分子是共价结合导入的，还是物理吸附导入的，即不能准确说明酶法糖基化的反应机制。质谱法虽然能够通过质量差证明氨基糖的共价结合，但同样不能区分物理吸附过程。又由于酶法糖基化反应效率偏低，导致糖基化反应产物的分子量变化小，再加上反应体系复杂，会给结果分析造成一定困难及误差，同样不能准确说明酶法糖基化的反应机制。

本实验以玉米醇溶蛋白为原料，先利用碱性蛋白酶Alcalase进行酶解制备玉米肽，再在谷氨酰胺转氨酶的催化下，使玉米肽与氨基葡萄糖之间发生酶法糖基化反应，制备出玉米糖肽。首先，采用亲和层析和凝胶层析法对玉米糖肽进行分离，获得富含玉米糖肽的组分，然后通过MALDI-TOF-MS进行分子量测定，以表征酶法糖基化反应的发生，最后对玉米糖肽的部分物化性质（包括起泡性、乳化性、溶解性）、DSC热稳定性及游离氨基含量分析进行研究，为玉米糖肽在食品工业中的应用奠定理论基础。

## 1.5 本课题的国内外研究现状

### 1.5.1 酶法糖基化的国内外研究进展

TGase广泛地存在于动物、植物和微生物体内。商品化的TGase最初是从豚鼠肝脏中提取的，由于酶的原料来源较少、分离纯化工艺复杂，导致酶的价格十分昂贵，仅限于基础研究中应用。因此早期关于TGase应用的研究较少。1993年日本味之素公司将微生物TGase实现了工业化生产，使TGase的工业应用具有可行性。此后，关于TGase催化蛋白质的交联反应改善蛋白质功能性质的研究相当多，应用于众多类型的食品，如海洋食品、肉制品、乳制品、面制品、烘焙食品、豆制品等[10]。

相对于TGase催化的蛋白质交联反应的研究，TGase途径的蛋白质糖基化修饰的研究较少。所研究的蛋白质包括酪蛋白、大豆蛋白、鸡肌动球蛋白、玉米醇溶蛋白和玉米谷蛋白等。研究发现，酶法糖基化修饰产物的功能性质有不同程度的改善。

**① 溶解性和表面疏水性**

蛋白质分子中糖基化的引入会增加蛋白质的溶解性。Colas等用来源于猪肝脏的TGase催化豌豆球蛋白、小麦醇溶蛋白与氨基半乳甘露聚糖之间的糖基化反应，糖基化使每摩尔的β-小麦醇溶蛋白和豌豆球蛋白分别导入18和57个糖基单位，在蛋白的等电点附近，新合成糖蛋白的溶解度增加了20%[11]。Jiang和Zhao用微生物TGase分别催化氨基葡萄糖与大豆分离蛋白（SPI）和酪蛋白之间的糖基化反应。1mol SPI和1mol酪蛋白的氨基葡萄糖的接入量分别为3.3mol和1.15mol。与原蛋白和交联蛋白相比，糖基化修饰产物具有较低的表面疏水性，更好的溶解性[12]。Song等利用微生物TGase催化酪蛋白（酰基供体）和SPI与壳寡糖（分子量1000Da）发生交联反应和糖基化，制备糖基化蛋白质。酪蛋白与壳寡糖发生交联反应时，修饰产物中氨基葡萄糖的含量为4.74g/kg蛋白质。糖基化修饰反应改善了酪蛋白的溶解性，尤其是在碱性条件下；酪蛋白的表面疏水性从15.9下降到14.1[13]。Hrynets等利用TGase催化鸡肌动球蛋白与氨基葡萄糖发生糖基化反应。与未糖基化的肌动球蛋白相比，糖基化修饰产物在等电点处的溶解性从8.7%增加到34%。周利敏利用TGase催化玉米醇溶蛋白与氨基葡萄糖盐酸盐（GAH）发生糖基化反应。以玉米醇溶蛋白糖基化修饰产物中GAH导入量为指标，优化糖基化反应条件，并对玉米醇溶蛋白糖基化修饰样品的溶解性进行了表征。结果表明，与玉米醇溶蛋白相比，玉米醇溶蛋白交联样品与糖基化修饰样品的溶解性均得到提高，玉米醇溶蛋白糖基化修饰样品的溶解性最高[14]。

不过，也有研究结果表明TGase酶法糖基化反应会使蛋白质的溶解性降低，如SPI与壳寡糖发生交联与糖基化反应时，修饰产物中氨基葡萄糖的含量为12.06g/kg蛋白质，修饰反应改善了SPI的持水性、吸油性、泡沫稳定性，但溶解性降低。

**② 乳化性质**

TGase酶法糖基化修饰对蛋白质乳化性质的影响，与底物蛋白质种类、氨基糖种类等因素有关。一般而言，TGase催化的蛋白质的交联会降低蛋白质的乳化活性和乳化稳定性，与此相反，糖基的导入能够增加蛋白质的乳化稳定性。酪蛋白与壳寡糖发生糖基化反应时，与酪蛋白相比，修饰酪蛋白的乳化活性从47.5m2/g下降到34.1~39.6m2/g，乳化稳定性从92.6%下降到60.6%~83.3%[15]。玉米醇溶蛋白与壳寡糖发生糖基化反应时，乳化性和乳化稳定性也均降低。而TGase催化鸡肌动球蛋白与氨基葡萄糖发生糖基化反应时，与未糖基化肌动球蛋白相比，糖基化修饰产物的粒径大小和分布分析表明，在37℃条件下氨基葡萄糖的共价结合提高了肌动球蛋白的乳化活性和稳定性，特别是在蛋白质的等电点处。酪蛋白与氨基葡萄糖的糖基化修饰产物的乳化性和乳化稳定性分别为100.9 m2/g和84.3%，与原酪蛋白相比，分别增加12m2/g和20%[16]。

**③ 流变学性质**

酶法糖基化修饰可以在一定程度上改善蛋白质的流变学性质。TGase催化酪蛋白与壳寡糖发生糖基化反应时，产物的表观黏度显著提高( 剪切速率为1s-1时，反应4h的修饰产物的表观黏度增加了约10倍)，且表现出剪切稀释特性；同时，频率扫描实验表明，产物分散液由类固体性质转变为类流体性质[17]。Jiang的研究结果也表明，糖基化修饰会使产物的表观黏度显著提高。

**④ 抗氧化活性**

目前，对蛋白质进行酶法糖基化改性的研究，主要集中在对产物的结构和物化性质的研究方面，而对产物生理功能性质的研究相对较少，仅有1篇报道。Wang等采用分子量为1500Da的壳寡糖对玉米醇溶蛋白进行糖基化修饰。建立的壳寡糖糖基化修饰玉米醇溶蛋白的最优条件为：反应初始pH 7.7，温度37℃，底物浓度3%、酰基供体与酰基受体的摩尔比1:3，加酶量60U/g蛋白，反应时间8h。在此条件下，壳寡糖的接入量最大，为97.48mg氨基葡萄糖/g蛋白。在蛋白浓度为4mg/mL时，玉米醇溶蛋白糖基化样品的DPPH自由基清除活性、还原力、铁离子螯合能力、羟基自由基清除活性和超氧阴离子自由清除活性均显著提高，尤其是DPPH自由基清除活性，其EC50值为3.1mg/mL。同时，糖基化修饰玉米醇溶蛋白可以有效地抑制生猪肉糜中脂肪的氧化[18]。

综合以上研究，TGase催化的蛋白质糖基化反应机制清楚，反应条件温和，反应速度较快，可通过供糖体的量来控制蛋白质的糖基化度，生成的糖蛋白安全性好，能克服美拉德反应不易控制糖基化度和产生致突变物而存在安全隐患的缺点。但是，由于玉米蛋白在水相中溶解度低，导致进行糖基化修饰时的空间位阻大，反应转化率偏低。又由于糖基化玉米蛋白分子量较大，不利于机体的消化吸收，在食品工业中应用会受到一定的限制。

### 1.5.2 肽的酶法糖基化修饰研究进展

近三年来，开始有通过TGase生物催化多肽与氨基糖合成糖肽的报道。Betti课题组用TGase分别催化鱼胶原肽、小麦谷蛋白肽与氨基葡萄糖合成了新型糖肽。与未糖基化的肽相比，糖肽的抗氧化活性和抗菌活性都显著提高。将鱼胶原肽与氨基葡萄糖的糖基化修饰产物经伴刀豆凝集素A亲和层析分离后，与原水解物相比，富含糖肽的部分对耐热性大肠杆菌AW 1.7菌株的最低抑制浓度提高1.2倍[19]。Liu等用TGase催化分子量为700Da的丝肽去修饰羧甲基壳聚糖，制备一种生物相容性共聚物。FT-IR和NMR光谱学证实了丝肽成功嫁接到羧甲基壳聚糖分子上。体外抗氧化活性研究表明，在研究范围内，糖基化修饰产物的DPPH自由基、羟基自由基和H2O2的清除活性分别为24.86%，91%和36.8%，且对NIH-3T3小鼠成纤维细胞没有细胞毒性[20]。Fan等用TGase来催化合成胶原肽-羧甲基壳聚糖，发现制备的糖基化胶原肽能促进小鼠成纤维细胞生长，显示了其在创伤敷料中的应用潜力[21]。王晓杰等用TGase催化D-氨基葡萄糖与玉米六肽（Gln-Gln-Pro-Gln-Pro-Trp）共价结合制备玉米糖肽。结果表明有一分子D-氨基葡萄糖与玉米六肽共价连接，且糖基化修饰改善了玉米六肽的抗氧化活性和乙醇脱氢酶激活率[22]。

### 1.5.3 亲和层析在糖蛋白分离纯化中的应用

亲和层析是利用生物分子间专一的亲和力进行分离的一种层析技术。目前，亲和层析技术被广泛的应用在蛋白质研究和制备领域，是分离纯化生物大分子，尤其是蛋白质的有力工具。用Con A作为亲和介质的配基对糖蛋白的富集可以应用于植物、动物、微生物和病毒糖蛋白的分离。以Con A为配基的亲和层析可实现对动物细胞中的糖蛋白高度富集。Yang等利用Con A、WGA和木菠萝凝集素等多种凝集素协同作用，对血清中的糖蛋白进行富集，三种凝集素混合作用除去了血清中的六个主要的非糖基化修饰蛋白，将糖基化蛋白的丰度提高到了50%[23]。Jana V.B.Jovanovic等利用离子交换色谱、凝胶色谱和Con A-Sepharose 4B亲和层析从血清蛋白溶酶体同工酶中分离出两种同工酶[24]。Anastasiya S.Soper等利用Con A-Sepharose 4B亲和层析分离纯化水腹蛇毒素,通过调整洗脱时长、暂停时间、竞争性洗脱剂浓度、pH和NaCl浓度等条件,确定了结合过于牢固的糖蛋白的洗脱方案,在洗脱过程中暂停4-6次可以显著提高回收率。以Con A为配基的亲和层析可对植物中的糖蛋白进行分离纯化[25]。陈刚等利用Con A对硅胶基质进行了改良,并以标准糖蛋白核糖核酸酶B(RNase B)为目标物，分析了所制备的色谱柱的性能,并研究了分离条件,随后对洗脱剂的浓度和洗脱流速进行了探索，得到了对RNase B的纯化策略样品在用结合缓冲液平衡亲和柱后进样，流速为0.5mL/min，然后用2CV积的结合缓冲液液洗去杂质，再用含0.2M甲基-α-D-吡喃甘露糖苷洗脱液液进行脉冲洗脱的[26]。Jana Krenkova等利用Con A亲和层析从多种蛋白混合物中分离纯化出核糖核酸酶B及辣根过氧化物酶,用含0.2M甲基-α-D-吡喃甘露糖苷溶液进行洗脱，并用MALDI-MS对洗脱液和洗涤液进行测定,洗ss脱液中仅含糖蛋白，洗涤液中几乎无糖蛋白，糖蛋白得到很好的纯化[27]。Lee等用Con A-Sepharose 4B分离纯化栀子花糖蛋白，用含0.5 M甲基-α-D-吡喃葡萄糖的溶液在pH7.4时对目标物洗脱，得到分子量为27 kDa的糖蛋白[28]。程玉祥等在分离纯化茶树叶糖蛋白时，通过Con A-Sepharose 4B亲和层析，将经Sephadex G-100凝胶过滤的粗糖蛋白进一步纯化，电泳结果表明糖蛋白分子量分别为63000Da和54000Da。以Con A为配基的亲和层析可对病毒活性物质进行提取分离[29]。Guan-Yu Chen等首次利用Con A亲和层析对杆状病毒进行了分离，通过识别病毒表面的GP64糖蛋白实现了纯化，以病毒回收率和生理活性为指标，调整结合条件和洗脱条件，获得了高生物活性(75%病毒转换滴定度、82%病毒碎片)、高纯度(>99%)的杆状病毒[30]。

利用一些技术手段对Con A配基进行改性，可显著提高其对糖蛋白的特异性吸附能力，提高目标物的纯度，对于发展更高效的糖蛋白富集方法具有很大的潜力。目前，磁性改性已经得到一定程度的利用。李凤等利用短链聚乙二醇使Con A以共价键合的形式固定在Fe3O4磁性粒子表面，实现了人血清中特异性糖蛋白的高效富集[31] 。Liping Dong等开发了一种温和的磁性纳米粒子对糖蛋白进行选择性分离，将Con A通过Cu(II)固定到EDTA-MNPs上，形成了Con A-MNPs磁性粒子，上述粒子可实现从糖蛋白∶非糖蛋白=1∶600的混合物中对糖蛋白进行分离，并用其对卵清蛋白中的糖蛋白进行纯化，显示了很高的糖蛋白吸附性[32]。

Con A亲和层析现已在天然糖蛋白的分离纯化方面有较广泛的应用，该方法在天然糖蛋白、人工糖基化蛋白分离纯化等方面的应用将会越来越广泛。

## 1.6 本实验的研究内容

以玉米醇溶蛋白为原料，先利用碱性蛋白酶Alcalase进行酶解制备玉米肽，再在TGase的催化下，使玉米肽与氨基葡萄糖之间发生酶法糖基化反应，制备出玉米糖肽。首先，采用亲和层析和凝胶层析法对玉米糖肽进行分离，然后通过MALDI-TOF-MS进行分子量测定，以表征酶法糖基化反应的发生，最后对玉米糖肽的部分物化性质和结构性质进行研究，为玉米糖肽在食品工业中的应用奠定基础。

### 1.6.1 玉米肽和玉米糖肽的制备

以玉米醇溶蛋白为原料，在Alcalase碱性蛋白酶最适酶解条件下水解2h制备玉米肽。然后以氨基葡萄糖为酰基受体，TGase为生物催化剂，使玉米肽与氨基葡萄糖之间发生共价结合制备玉米糖肽。

### 1.6.2 玉米糖肽的亲和层析分离与凝胶层析脱盐

以HitrapTM Con A 4B亲和层析柱对氨基葡萄糖糖基化修饰玉米肽进行初步分离，获得富含糖肽的组分，然后采用凝胶层析法对富含糖肽的组分进行脱盐处理，获得富含糖肽的组分。

### 1.6.3 玉米糖肽的质谱分析

采用MALDI-TOF-MS测定玉米糖肽的分子量，根据分子量迁移情况，确认酶法糖基化反应是否发生。

### 1.6.4 玉米糖肽的DSC热稳定性和游离氨基含量的分析

差式扫描热量仪可测定物质的焓变温度（包括起始温度、外推起始温度和峰温）并以此来评价糖基化修饰玉米糖肽的热稳定性，通过OPA法测定玉米糖肽的游离氨基含量，以表征糖基化修饰对玉米肽结构性质的影响。

### 1.6.5 玉米糖肽部分物化性质的测定

对玉米糖肽的起泡性、乳化性及乳化稳定性、起泡性和泡沫稳定性、表观黏度和溶解性等物化性质进行测定。

# 第2章 材料与方法

## 2.1 实验材料与仪器

### 2.1.1 实验材料

本实验所采用的原料及试剂如表2-1所示。

表2-1 实验原料与试剂一览表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名 称 | 规 格 | 生 产 厂 家 |
| 玉米醇溶蛋白 | —— | Sigma-Aldrich公司 |
| D-氨基葡萄糖 | —— | 生工生物（上海）股份有限公司 |
| TGase | —— | 江苏一鸣生物股份有限公司 |
| 氢氧化钠 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 氯化钠 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 氯化锰 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 氯化钙 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| Tris | 分析纯 | 生工生物（上海）股份有限公司 |
| 盐酸 | 分析纯 | 辽宁泉瑞试剂有限公司 |
| 甲基-α-D-甘露糖苷 | 色谱纯 | Sigma公司 |
| 硼酸 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 硼砂 | 分析纯 | 天津市科密欧化学试剂有限公司 |
| 磷酸氢二钠 | 分析纯 | 天津市科密欧化学试剂有限公司 |
| 磷酸二氢钠 | 分析纯 | 天津市光复科技发展有限公司 |
| 碳酸氢钠 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 柠檬酸 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 柠檬酸钠 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 无水碳酸钠 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 硫酸铜 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 酒石酸钾钠 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 十二烷基磺酸钠 | 分析纯 | 生工生物（上海）股份有限公司 |
| OPA | 分析纯 | 生工生物（上海）股份有限公司 |
| 无水乙醇 | 分析纯 | 天津市科密欧化学试剂有限公司 |
| β-巯基乙醇 | 分析纯 | 生工生物（上海）股份有限公司 |

### 

### 2.1.2 实验仪器

本实验采用的仪器如表2-2所示。

表2-2 实验仪器一览表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 名称 | 规格 | 生产厂家 |
| 电子天平 | BSA1245 | 赛多利斯科学仪器（北京）有限公司 |
| pH计 | PB-10 | 赛多利斯科学仪器（北京）有限公司 |
| 集热式磁力加热搅拌器 | DF-1 | 常州市荣华仪器制造有限公司 |
| 冰箱 | BCD-216F TB | 青岛海尔股份有限公司 |
| 超低温冷冻冰箱 | BM515 | Froilabo BIO Memory公司 |
| 离心机 | TDL-5-A | 上海安亭科学仪器厂 |
| 高速冷冻离心机 | CF15RXⅡ | 日本日立公司 |
| 真空冷冻干燥机 | LD-53 | MILLROCK TECHNOLOCY |
| 智能蛋白质纯化色谱仪 | AKTA AVANT25 | 美国GE公司 |
| 高级旋转流变仪 | KinexusPro+ | 马尔文公司 |
| 全玻璃换膜过滤器 | JFC-160型 | 金鼎科技 |
| 循环水式真空泵 | SHZ-D（Ⅲ） | 巩义市予华仪器有限责任公司 |
| 定时数显恒流泵 | HL-2D | 上海嘉鹏科技有限公司 |
| 差示扫描量热仪（DSC） | Q-20 DSC | 美国TA 公司 |
| 双光束紫外可见分光光度计 | TU-1901 | 北京普析通用仪器有限责任公司 |
| 快速混匀器 | SK-1 | 江苏省金坛市荣华仪器制造公司 |
| 水浴恒温振荡器 | SHZ-A | 上海跃进医疗器械厂 |
| 电热恒温鼓风干燥箱 | 101-0-BS | 上海跃进医疗器械厂 |
| HitrapTM Con A 4B | Con A 4B | 美国GE 公司 |
| SephadexG-25 | G-25 | 美国GE 公司 |

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 氨基葡萄糖糖基化修饰玉米肽

(1)玉米肽的制备：

取5g玉米醇溶蛋白于150mL三角瓶中，加入100mL蒸馏水，搅拌均匀，配制成底物浓度5%（w/v）的悬浮液，加入大小合适的转子后，将烧杯放入60℃水浴磁力搅拌器中央，将pH计电极插入悬浮液中，用移液枪少量多次加入0.5mol/L NaOH调pH至8.5，维持3min不变后加入0.15g碱性蛋白酶Alcalase，开始酶解反应，酶解过程中通过不断滴加0.5mol/L NaOH使pH维持在8.5，酶解2h后取出立即放入沸水浴中灭酶15min，冷却至室温后一部分放入4℃冰箱中冷藏待用，一部分经4000r/min离心15min后取上淸液放于超低温冰箱中冻结，冷冻干燥48h。将冷冻干燥好的玉米肽贴好标签备用。

(2)玉米肽的氨基葡萄糖糖基化修饰

①向(1)制备的5%玉米肽溶液中添加D-氨基葡萄糖4.7295g，保证反应体系中蛋白质酰基供体与氨基葡萄糖酰基受体摩尔比为1:1。用2mol/L NaOH调初始pH至8.0。

②配置酶液：称取TGase0.25g于1.5mL离心管中，移取1mL蒸馏水，充分上下颠倒摇匀。

③用移液枪将TGase加入到玉米肽溶液中，封膜放入44℃恒温水浴振荡器，开始糖基化修饰反应。

④每隔1h取出，用2mol/L NaOH调pH至8.0。

⑤糖基化反应7h后，冷却至室温后，样品经4000r/min离心15min，取上清液放于超低温冰箱中冻结，冷冻干燥48h。将干燥好的玉米糖肽贴好标签备用。

### 2.2.2 糖基化修饰玉米肽的亲和层析分离

样品预处理：将样品以100mg/mL的蛋白基浓度配置成悬浮液，然后4000r/min离心10min，取上清液，过0.22μm微孔滤膜后上样，上样量为5mL。

(1)样品吸附阶段：

①Binding Buffer的配置：20mM pH 7.4的Tris-HCl溶液（含有0.5M NaCl,1mM MnCl2，1mM CaCl2）：准确称取2.4228gTris，29.25gNaCl，0.1110gCaCl2，各自加入少量双蒸水溶解后，混合在一起，加水至800mL左右。用6M HCl调节pH至7.4，另外再称取0.1619g MnCl2，加到之前的溶液中，搅拌定容到1000mL。该溶液要过0.22μm的微孔滤膜之后再使用。

②检测条件：色谱柱：HitrapTM Con A 4B（1cm×4cm）；流动相:Bingding Buffer；洗脱条件：10CV流动相冲出柱子中保存液，柱子平衡后，5CV流动相使糖蛋白与Con A充分结合；紫外检测器，检测波长214nm；进样量：5mL；流速：1mL/min。

(2)样品洗脱阶段：

①Elution Buffer的配置：0.2M甲基-α-D-甘露糖苷溶液：准确称取3.8837g甲基-α-D-甘露糖苷，用Binding Buffer 定容至100mL。

②检测条件：样品吸附阶段结束后，利用2CV Elution Buffer洗脱，其他检测条件相同。

### 2.2.3 糖基化修饰玉米肽的凝胶层析分离脱盐

(1)取亲和层析分离之后的样品0.3g溶于1mL蒸馏水，4000r/min 离心10 min，取上清液小心地加载到凝胶层析SephadexG-25（1.6cm×90cm)柱上，流速2mL/min，每管2min进行收集。

(2)对收集的液体用紫外可见分光光度计在214nm处测定吸光度值，绘制洗脱曲线。

### 2.2.4 糖基化玉米肽的质谱分析

与玉米肽做对比，通过MALDI-TOF-MS质谱分析，确定玉米肽是否发生氨基葡萄糖的共价结合。

### 2.2.5 糖基化修饰玉米肽的DSC热稳定性分析

利用Q-20型差示扫描量热仪（DSC，TA仪器公司）测定。精确称取2.0mg样品放入铝盒中，密封，置于DSC仪器的样品支持器上，以密封空铝盒作为对照。氮气压力0.05MPa，升温速率10℃/min，温度范围20-180℃，每样品重复测定3次。采用Instrument Universal Analynsis 2000 data analysis softwar得到吸热曲线数据，峰值点温度为变性温度。

### 2.2.6 糖基化修饰玉米肽的物化性质研究

2.2.6.1 溶解性的测定

(1)取9个试管加入0.0600（蛋白基）样品，分别加入10mL pH3-11的缓冲溶液，加入缓冲液后漩涡混匀30s，置于4℃冰箱中过夜，以使样品能够充分水合。

(2)将溶液倒入离心管中，离心10000r/min×10min×4℃。

(3)取出上清液，进行适当的稀释。

(4)取11个干燥的试管，前两个为空白管，在标号3-11的试管中分别移取0.4mL的样液，在前两个试管中加入0.5mL的蒸馏水，在标号3-11的试管中依次加入0.1mL的蒸馏水，所有试管都加完蒸馏水后再向其中依次加入2.5mL的Folin-酚甲液，混匀并静置10min，之后再向每个管中加入0.25mL的Folin-酚乙液，迅速摇匀并静置30min，最后在640nm处测定吸光值，用空白管进行调零，每个样品平行三次。

溶解性(％)＝上清液中蛋白质含量×100/总蛋白质含量。

2.2.6.2 表观黏度的测定

将样品配制成浓度为5%和10%的蛋白质分散液，用漩涡混合器混合均匀后将样品分散液缓慢倾倒充满夹具中（直径60mm、锥角0.5°锥板），在25℃条件下保温5min，测定剪切速率在0.1-100s-1范围内样品的表观黏度。

2.2.6.3 起泡性及泡沫稳定性的测定

采用搅打法：取15mL蛋白质浓度为10％的蛋白质分散液于50mL的小烧杯中，用游标卡尺测定其起始体积V0，在高剪切均质机的3档(其对应转速为13500r/min)，均质30s，连续搅打4次，共2min。记录均质停止时和均质停止30min后的泡沫体积V1及V2。

起泡性（%）=V1/V0×100%；

泡沫稳定性（%）=V2/V0×100%

式中 V0—样液搅打前的体积（mL）；

V1—样液刚搅打完的体积（mL）；

V2—样液搅打完静置30min后的体积（mL）。

2.2.6.4 乳化性及乳化稳定性的测定

采用浊度法：取15mL蛋白质浓度为10%的蛋白质分散液于50mL小烧杯中，加入大豆色拉油5mL，在13500r/min 的转速下乳化2min，用移液枪迅速从底部吸取100μL的乳状液，用25mL0.1%的SDS溶液将其稀释，以0.1% SDS作为对照在500nm波长处测定吸光度值A0，15min后再次测定吸光度值A1。

乳化性（EA）=100×A0；

乳化稳定性（ES）=15×A1/A0

式中 A0—乳化刚结束时样液的吸光度值：

A1—乳化结束15min后样液的吸光度值。

### 2.2.7 游离氨基含量的测定

采用邻苯二甲醛（OPA）法测定游离氨基含量。

(1)主要试剂的配制

OPA试剂：准确称取2.00g十二烷基磺酸钠（SDS），加入30mL0.4moL/L的硼酸缓冲液（pH9.5)，水浴加热使其完全溶解，冷却至室温后再加入1mL 浓度为80mg/L的OPA乙醇溶液和200μL β-巯基乙醇，最后用pH9.5的硼酸缓冲液定容至100mL。放入棕色瓶。此溶液现用现配。

0.6g/L的亮氨酸标准溶液：精确称取亮氨酸0.3000g，加入5mL浓度为1mol/L的盐酸溶液使其完全溶解，用蒸馏水定容至100mL，其浓度为3g/L，再取此液10mL，用蒸馏水定容至50mL，即配成0.6g/L的亮氨酸标准溶液。

(2)标准曲线的绘制

取一定体积的0.6g/L标准亮氨酸溶液，稀释制得系列浓度的亮氨酸溶液（0、0.012、0.018、0024、0.030、0.036g/L)，再各取稀释液3mL，与同体积的OPA溶液混合并开始计时，准确计时5min，立即在340nm处测定溶液吸光度值。每个浓度做3个平行，以亮氨酸浓度为横坐标，吸光度值的平均值为纵坐标，绘制标准曲线为：y=51.683x－0.3426（R2=0.9975）。

(3)样品中游离氨基含量的测定

将待测样品按一定倍数稀释后，取稀释液3mL，按照标准出线制作步骤，测定其吸光度值，然后利用标准曲线计算出样品中的游离氨基的含量（以mmol/kg蛋白质表示）。

# 第3章 结果与讨论

## 3.1 糖基化修饰玉米肽的分离纯化与质谱分析

### 3.1.1 亲和层析分离

使用Con A凝集素亲和层析从氨基葡萄糖糖基化修饰玉米肽反应体系中捕获和富集糖类，希望分离出TGase诱导合成的糖肽。亲和层析色谱的洗脱图谱如图3-1所示。

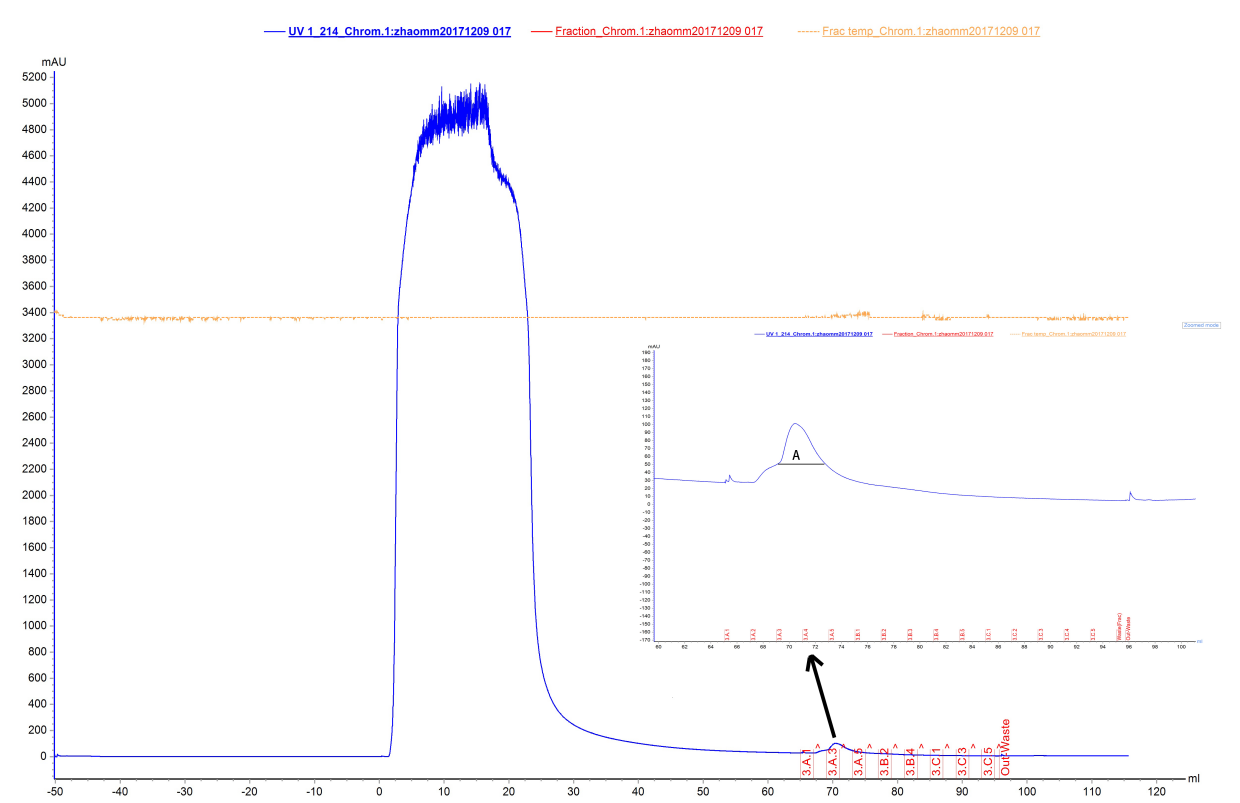


图3-1 氨基葡萄糖糖基化修饰玉米肽的亲和层析洗脱曲线

由图3-1所示，本实验所分离的样品，由于其酰基受体为D-氨基葡萄糖，符合外源凝集素特异性结合非还原性末端α-D-甘露糖基或α-D-葡糖基部分的特异性吸附特征[33]，则洗脱阶段所得洗脱峰A可初步确定为糖基化样品峰。但是，由于流动相中含有无机盐类，导致洗脱峰中盐分含量高，还需要进行脱盐进行处理。

### 3.1.2 凝胶层析脱盐

取亲和层析后富含糖肽的样品进行凝胶层析脱盐，收集分离后的样品绘制洗脱曲线，实验结果如图3-2所示。

图3-2 玉米糖肽的凝胶层析洗脱曲线

由图3-2可以看出，吸光度值在第10管开始升高，至第19管达到峰值，然后开始逐渐波动下降，第52管至第82管的吸光度值接近于0。考虑到凝胶层析的洗脱原理，盐在洗脱曲线后期出现，因此，收集第12管至第38管的富含玉米糖肽样品用于MALDI-TOF-MS质谱分析。

### 3.1.3 糖基化修饰玉米肽的质谱分析

将玉米肽和经D-氨基葡萄糖糖基化修饰生成的糖肽进行MALDI-TOF-MS质谱分析，通过分子量迁移表征D-氨基葡萄糖是否成功连接到玉米肽分子上，实验结果如图3-3和图3-4所示。

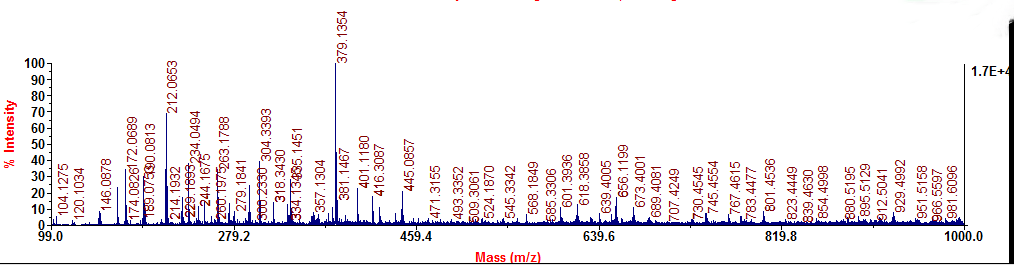


图3-3 玉米肽的MALDI-TOF-MS质谱图

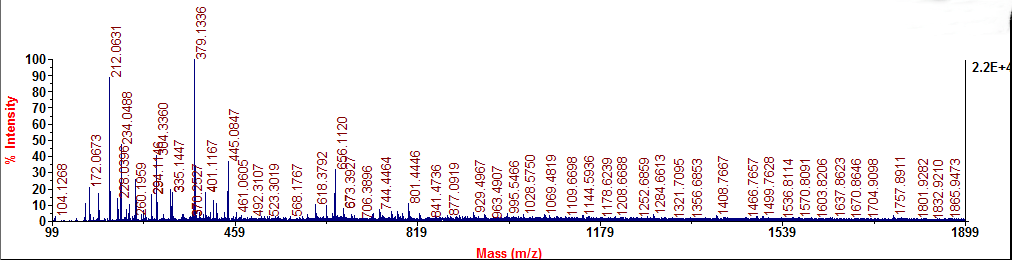


图3-4 玉米糖肽的MALDI-TOF-MS质谱图

在TGase 催化的肽与氨基葡萄糖的糖基化反应中，当一些肽段发生了酶法糖基化反应时，糖肽的质量增加162 Da（氨基葡萄糖分子量179 Da减去一分子NH3的分子量17 Da）或其倍数。而如果有美拉德反应发生时，则糖肽的质量增加161Da或其倍数。通过对比玉米肽与其糖基化反应产物的MALDI-TOF-MS一级质谱图，就可确定生成的糖肽峰位置、糖肽数量及其分子量，确认氨基葡萄糖与肽之间发生TGase催化的糖基化反应。玉米肽和玉米糖肽的分子量迁移情况总结于表3-1。对比玉米肽和玉米糖肽的分子量，在酶法糖基化修饰过程中，美拉德反应也同时发生。

表3-1 玉米糖肽与玉米肽的质量迁移情况及糖基化类型

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 玉米肽的分子量 | 玉米糖肽的分子量 | 糖基化类型 |
| 294 | 618 | 酶法糖基化，连接2分子氨基葡萄糖 |
| 304 | 627 | 酶法糖基化和美拉德反应同时发生，各连接1分子氨基葡萄糖 |
| 372 | 534 | 酶法糖基化，连接1分子氨基葡萄糖 |
| 493 | 655 | 酶法糖基化，连接1分子氨基葡萄糖 |
| 503 | 664 | 美拉德反应，连接1分子氨基葡萄糖 |
| 511 | 673 | 酶法糖基化，连接1分子氨基葡萄糖 |
| 545 | 706 | 美拉德反应，连接1分子氨基葡萄糖 |
| 801 | 963 | 酶法糖基化，连接1分子氨基葡萄糖 |
| 854 | 1178 | 酶法糖基化，连接2分子氨基葡萄糖 |

## 3.2 糖基化修饰对玉米肽热稳定性的影响

热稳定性反映物质在一定条件下发生化学反应的难易程度。蛋白质表面有疏水基团也有带电基团，从热力学角度来说，疏水基团对蛋白质稳定性是不利的[34] 。以玉米醇溶蛋白和玉米肽为对照，测定玉米糖肽的热稳定性，实验结果如图3-5、图3-6和图3-7所示。变性温度和总变性焓列于表3-2中。



图3-5 玉米醇溶蛋白的DSC曲线



图3-6 玉米肽的DSC曲线

2017.10.27糖肽（3）

图3-7 玉米糖肽的DSC曲线

表3-2玉米醇溶蛋白、玉米肽和糖肽的相变温度、变性温度和变性焓

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品 | 相变温度/℃ | 变性温度/℃ | 变性焓/J/g |
| 玉米醇溶蛋白 | 93.90±2.44 | 136.27±4.52 | 25.30±1.89 |
| 玉米肽 | 36.92±1.94 | 48.71±1.75 | 8.41±2.97 |
| 玉米糖肽 | 42.18±0.40 | 51.65±0.43 | 9.30±0.76 |

由图3-5、图3-6、图3-7和表3-2可以看出，玉米肽的相变温度、变性温度和总变性焓均显著低于玉米醇溶蛋白；玉米糖肽的相变温度、变性温度及变性焓均略高于玉米肽。实验结果表明与玉米醇溶蛋白相比，酶解反应使玉米醇溶蛋白高级结构的价键和肽链多数被打开，从而使玉米醇溶蛋白的热稳定性降低；与玉米肽相比，玉米糖肽的热稳定性得到提高，这可能是由于氨基葡萄糖与玉米肽共价连接形成异肽键，异肽键比肽键对热更稳定而导致的。

## 3.3 糖基化修饰对玉米肽游离氨基含量的影响

在糖基化反应过程中，游离氨基含量可以作为判定反应程度的指标。以玉米醇溶蛋白和玉米肽为对照，测定玉米糖肽的游离氨基含量，实验结果如表3-3所示。

表3-3 玉米醇溶蛋白、玉米肽和糖肽的游离氨基含量

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 样品 | 玉米醇溶蛋白 | 玉米肽 | 玉米糖肽 |
| 游离氨基含量（mmol/kg） | 0.031±0.44 | 0.092±0.24 | 0.080±0.33 |

由表3-3可以看出，与玉米醇溶蛋白相比，玉米肽的游离氨基含量升高了0.049mmol/kg，说明是由蛋白酶的酶解作用将玉米醇溶蛋白的肽键切开，暴露出肽段末端的氨基导致的；与玉米肽相比，玉米糖肽的游离氨基含量下降了0.012mmol/kg，说明随着糖基化反应的进行，游离氨基参与反应，不断地被消耗，呈下降趋势，也可以间接说明酶法糖基化反应的发生。

## 3.4 糖基化修饰对玉米肽物化性质的影响

### 3.4.1 糖基化修饰对玉米肽起泡性及泡沫稳定性的影响

蛋白质起泡性体现了蛋白质液相体系形成稳定的包裹小气体的黏层能力。采用搅打法测定玉米醇溶蛋白、玉米肽和玉米糖肽的起泡性和泡沫稳定性，结果如图3-8所示。

图3-8 糖基化修饰对玉米肽的起泡性及泡沫稳定性的影响

由图3-8可以看出，与玉米醇溶蛋白相比，玉米肽的起泡性提高了80%；与玉米肽相比，玉米糖肽的起泡性下降了18%。玉米醇溶蛋白的起泡性低主要是因为玉米醇溶蛋白在水溶液中的溶解性差，不易于起泡的形成而导致的。玉米肽起泡性增大可能是因为蛋白酶的酶解作用导致玉米醇溶蛋白溶解性增强，在搅拌时产生大的界面面积进而增强起泡的能力。玉米糖肽起泡性的略微下降可能是由于糖基化反应使玉米肽的亲水性进一步增大，起泡能力下降。

### 3.4.2 糖基化修饰对玉米肽乳化性及乳化稳定性的影响

蛋白质的乳化能力包括乳化性和乳化稳定性两个指标。乳化性指每克蛋白质在转变前所能乳化油的体积，而乳化稳定性指蛋白质维持稳定的分散体系而不被外界破坏的能力[35]。分别测定玉米醇溶蛋白、玉米肽和玉米糖肽的乳化性和乳化稳定性，实验结果如图3-9所示。

图3-9糖基化修饰对玉米肽的乳化性及乳化稳定性的影响

由图3-9可以看出，与玉米醇溶蛋白相比，玉米肽的乳化性显著升高，达193；与玉米肽相比，玉米糖肽的乳化性升高了7；三种样品的乳化稳定性之间无显著性差异。蛋白质的乳化性与其溶解性及表面疏水性等因素有关，与玉米醇溶蛋白相比，玉米肽和糖肽的溶解性升高，吸附在油-水界面的蛋白增多，形成乳状液液面面积大，因此乳化活力高。

### 3.4.3 糖基化修饰对玉米肽表观黏度的影响

黏度随剪切速率的变化而改变的流体被定义为非牛顿流体。非牛顿流体一般分为两大类，一种是随着剪切速率的增加黏度逐渐增大，即具有剪切变稠的性质；另一种是随着剪切速率的增加黏度逐渐降低, 即具有剪切变稀的性质[36]。底物浓度为10%的玉米肽和玉米糖肽的表观黏度随剪切速率的变化曲线如图3-10所示。

图3-10 糖基化修饰对玉米肽表观黏度的影响

由图3-10可以看出，在剪切速率0.1-1.0s-1时，玉米肽和玉米糖肽的表观黏度均呈逐渐下降的变化趋势，具有剪切变稀的性质；在剪切速率1.0-100s-1时，表观黏度呈逐渐上升的变化趋势，具有剪切变稠趋势。玉米肽具有剪切变稠趋势的原因可能是蛋白酶酶解作用使多肽分子在相对运动时产生的位阻增大，从而提高了反应产物的表观黏度；玉米糖肽具有剪切变稠的原因可能是糖基化反应使肽链伸展，分子间的相互作用与水合作用都得到一定增强，使黏度增强。

### 3.4.4 糖基化修饰对玉米肽溶解性的影响

溶解性是蛋白质一个重要的功能特性，在蛋白质的生产、加工过程中有着非常重要的作用。以玉米醇溶蛋白和玉米肽为对照，测定在pH3.0-11.0范围内玉米糖肽的溶解性，结果如图3-11所示。

图3-11糖基化修饰对玉米肽的溶解性的影响

由图3-11可以看出，在pH3.0-8.0范围内，玉米醇溶蛋白的溶解性较小，但在碱性条件下，玉米醇溶蛋白溶解性逐渐升高，在pH值为11.0时，其溶解性达到最大值，为9.81%；经蛋白酶酶解后，产物玉米肽的溶解性显著升高，且在pH值3.0-11.0范围内未出现等电点。经氨基葡萄糖糖基化修饰后，玉米肽的溶解性进一步提高，但在pH5.0时，玉米糖肽的溶解性最低，可能是玉米糖肽的等电点，说明糖基化修饰改善了玉米肽的带电荷性质。

# 结 论

本实验以玉米醇溶蛋白为原料，先利用碱性蛋白酶Alcalase进行酶解制备玉米肽，再在TGase的催化下，使玉米肽与氨基葡萄糖之间发生酶法糖基化反应，制备出玉米糖肽。采用亲和层析和凝胶层析法对玉米糖肽进行分离，然后通过MALDI-TOF-MS进行分子量测定，以表征酶法糖基化反应的发生，最后对玉米糖肽的部分物化性质（包括起泡性、乳化性、溶解性）、DSC热稳定性及游离氨基含量分析进行研究。实验得出以下结论：

(1)经亲和层析和凝胶层析分离后，对富含糖肽的部分进行MALDI-TOF-MS分析，通过对比玉米肽的MALDI-TOF-MS一级质谱图，确认氨基葡萄糖与肽之间发生TGase催化的糖基化反应，美拉德反应也同时发生。

(2)与玉米醇溶蛋白相比，蛋白酶酶解反应使玉米醇溶蛋白的相变温度、变性温度和总变性焓均显著降低，而游离氨基含量显著增加；经氨基葡萄糖共价结合后，玉米肽的热稳定性增加，游离氨基含量略降低。

(3)在蛋白质浓度为10%时，与玉米醇溶蛋白相比，玉米肽的起泡性、乳化性分别提高了80%和177；而与玉米肽相比，玉米糖肽的起泡性下降了18%，乳化性升高了7。与玉米醇溶蛋白相比，玉米肽的溶解性显著升高，且在pH3.0-11.0范围内，玉米肽的溶解性受pH值的影响较小；经糖基化修饰后，玉米肽的溶解性进一步增加，且在pH5.0时出现等电点。在剪切速率0.1-1.0s-1范围内，玉米肽和玉米糖肽的表观黏度逐渐下降，具有剪切变稀的性质；在剪切速率1.0-100s-1时呈逐渐上升趋势，具有剪切变稠趋势，且在剪切速率0.1-100s-1范围内，玉米糖肽的表观黏度均大于玉米肽。

综上所述，TGase催化的酶法糖基化反应使玉米肽的热稳定性增强的同时，改变了玉米肽的物化性质，可以进一步开展玉米糖肽的生物活性方面的研究，为玉米糖肽在食品工业中的应用奠定理论基础。

# 参考文献

[1]段纯明,董海洲.玉米醇溶蛋白的特性及应用研究[J].粮食与食品工业,2007,12(01):27-31.

[2]Bai YJ, Zhu YJ, Dai YJ, et al. Extraction and application of zein[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2001,26(01):34-35.

[3]李艳丽.玉米肽的制备,特性及活性研究[D].长春:吉林农业大学硕士论文,2003:2-4.

[4]Laura J,Mar V,Rosina L.Glycosylation of individual wheyproteins by Maillard reaction using dextran of differentmolecular mass[J]. Food Hydrocolloids,2007,20(08):34-36.

[5]刘贵梅,章鼎敏,李普,等.大豆7S蛋白-糖体系晚期糖基化终产物形成因素[J].食品科学,2017,38(15):20-25.

[6]孙涛,江波,潘蓓蕾.酶法糖基化芦丁的高效液相色谱法测定[J].食品工业科技,2010,31(09):358-360.

[7]王晓,江连洲,李杨,等.糖基化处理对绿豆分离蛋白功能特性的影响[J].食品工业科技,2014,35(20):97-101.

[8]黄小琴.基于质谱技术的蛋白质组学方法对食品蛋白质糖基化的研究[D].南昌大学博士论文,2013:3-5.

[9]宋春丽,赵新淮.食品蛋白质的糖基化反应:美拉德反应或转谷氨酰胺酶途径[J].食品科学,2013,34(09):369-374.

[10]吴炼.生物粘合剂—转谷氨酰胺酶的研究进展[J].山东食品发酵,2012,38(01):41-46.

[11]Araceli AB,Gerardo ML.Estimation of endogenous protein and amino acid ileal losses in weaned piglets by regression analysis using diets with graded levels of casein[J].Journal of Animal Science and Biotechnology,2014,5(01):74-79.

[12]王辰,江连洲,魏冬旭,等.不同品种大豆分离蛋白结构与表面疏水性的关系[J].食品科学,2012,33(09):54-57.

[13]宋春丽,陈佳鹏,任健.壳寡糖糖基化修饰对酪蛋白分子特性及流变性质的影响[J].中国油脂,2017,42(03):95-98.

[14]周利敏,刘晓兰,郑喜群,等.TGase催化玉米醇溶蛋白糖基化改性[J].食品科学,2014,35(24):15-19.

[15]宋春丽,陈佳鹏,任健.糖基化交联反应对酪蛋白胶凝和乳化性质的影响[J].中国油脂,2017,42(02):98-101.

[16]韩晶,李开雄,贺家亮.谷氨酰胺转胺酶的功能特性及在动物性食品中的应用研究[J].中国食品添加剂,2008,32(05):96-100.

[17]姚欣彤.酪蛋白和大豆蛋白的脱酰胺和酶法糖基化交联修饰及产物性质[D].东北农业大学硕士论文,2014:3-5.

[18]王晓杰,曲悦,丛万锁.玉米肽的抗氧化活性及其对熟猪肉糜脂质氧化抑制作用的研究[J].食品科技,2018,43(04):251-257.

[19]Hong PK,Davide G, Betti. Glycation and transglutaminase mediated glycosylation of fish gelatin peptides with glucosamine enhance bioactivity[J].Food Chemistry,2014, 142(07):285-293.

[20]刘水莲.生物可降解羧甲基壳聚糖—聚乳酸水凝胶的药物释放研究[D].青岛科技大学硕士论文,2015:12-15.

[21]刘水莲,周洋,陈福花,等.新型羧甲基壳聚糖水凝胶流变性能,药物释放及细胞相容性研究[J].化学学报,2015,73(01):47-52.

[22]王晓杰,刘晓兰,丛万锁,等.玉米六肽的酶法糖基化修饰对产物生物活性的影响[J].中国酿造,2018,37(03):78-83.

[23]Yang ZP,William SH. Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column[J]. Journal of Chromatography A,2004,1053(1):79-88.

[24][Vesan B,Jovan M.How the sialylation level of serum N-acetyl-β-D-glucosaminidase A form in Type 1 diabetes mellitus influences their activity[J].Serb.Chem.Soc,2014,79(3):1-20](http://scholar.cnki.net/result.aspx?q=How the sialylation level of serum N-acetyl-%CE%B2-D-glucosaminidase A form in Type 1 diabetes mellitus influences their activity?" \o "VESNA B.JOVANOVIĆ,JELENA M.AĆIMOVIĆ.How the sialylation level of serum N-acetyl-β-D-glucosaminidase A form in Type 1 diabetes mellitus influences their activity?[J].Serb.Chem.Soc.2014,79:1-20" \t "http://kns.cnki.net/KXReader/_blank).

[25]Anastasiya S,Steven D.Elution of tightly bound solutes from concanavalin A Sepharose[J]. Journal of Chromatography A,2007,1154(1):12-18.

[26]陈刚,白泉,耿信笃.伴刀豆球蛋白亲和色谱柱的制备及其在糖蛋白核糖核酸酶B结构分析中的应用[J].色谱,2006,42(05):425-431.

[27][Jana K,Peter C,Frantisek F.Macroporous Cryogel Based Spin Column With Immobilized Concanavalin A For Isolation Of Glycoproteins[J].Journal of Electrophoresis](http://scholar.cnki.net/result.aspx?q=Macroporous Cryogel Based Spin Column With Immobilized Concanavalin A For Isolation Of Glycoproteins" \o "Jana Krenkova,Petr Cesla,Frantisek Foret.Macroporous Cryogel Based Spin Column With Immobilized Concanavalin A For Isolation Of Glycoproteins[J/OL].2014,www.Electrophoresis-journal.com" \t "http://kns.cnki.net/KXReader/_blank),2009,115(04):12

-18.

[28]Jin L,Kye T.Inhibitory effect of plant-originated glycoprotein on expression of matrix metalloproteinase-9 in cadmium chloride-induced BNL CL.2 cells[J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology,2011,25(4):239-246.

[29][程玉祥.茶树叶糖蛋白的纯化研究[D].安徽农业大学硕士论文,2002](http://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CMFD&filename=2002123865.nh&v=MDkyMTA1NE8zenFxQnRHRnJDVVJMS2ZZZVpuRmlEbVZMM0FWMTI3SExLNkhkbktxcEViUElRS0RIODR2UjRUNmo=&uid=WEEvREcwSlJHSldRa1Fhb09jSnZqem43UnZKblRoT3I2ai93RkVkVWd5VT0=$9A4hF_YAuvQ5obgVAqNKPCYcEjKensW4ggI8Fm4gTkoUKaID8j8gFw!!" \o "程玉祥.茶树叶糖蛋白的纯化研究[D].合肥:安徽农业大学,2002" \t "http://kns.cnki.net/KXReader/_blank):16-18.

[30][Yu GC,Yuan C.Concanavalin A Affinity Chromatography for Efficient Baculovirus Porification[J].Al Ch E,2009,66(3):1668-1678](http://scholar.cnki.net/result.aspx?q=Concanavalin a affinity chromatography for efficient baculovirus purification" \o "Guan-Yu Chen,Chi-Yuan Chen.Concanavalin A Affinity Chromatography for Efficient Baculovirus Porification[J].Al Ch E,2009:1668-1678" \t "http://kns.cnki.net/KXReader/_blank).

[[31]李凤,康经武.伴刀豆凝集素修饰磁性纳米粒子富集人血清中糖蛋白及质谱鉴定[J].色谱,2014,32(4):369-375](http://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&filename=SPZZ201404008&v=MDIyNTh0R0ZyQ1VSTEtmWWVabkZpRG1WTDNBTmozUmRMRzRIOVhNcTQ5RmJJUUtESDg0dlI0VDZqNTRPM3pxcUI=&uid=WEEvREcwSlJHSldRa1Fhb09jSnZqem43UnZKblRoT3I2ai93RkVkVWd5VT0=$9A4hF_YAuvQ5obgVAqNKPCYcEjKensW4ggI8Fm4gTkoUKaID8j8gFw!!" \o "李凤,康经武.伴刀豆凝集素修饰磁性纳米粒子富集人血清中糖蛋白及质谱鉴定[J].色谱,2014,32(4):369-375" \t "http://kns.cnki.net/KXReader/_blank).

[32]Dong [LP,Feng S,Li SS,et al.Preparation of Concanavalin A-Chelating Magnetic Nanoparticles for Selective Enrichmentof Glycoprotein[J].Anal.Chem,2015,87(2):6849-685](http://scholar.cnki.net/result.aspx?q=Preparation of Concanavalin A-Chelating Magnetic Nanoparticles for Selective Enrichmentof Glycoproteins" \o "Liping Dong,Shun Feng,Shanshan Li,et al.Preparation of Concanavalin A-Chelating Magnetic Nanoparticles for Selective Enrichmentof Glycoproteins[J].Anal.Chem.,2015,87:6849-6853" \t "http://kns.cnki.net/KXReader/_blank)3.

[33]王桂珍.亲和层析技术的研究及应用[D].暨南大学硕士论文,2011:10-13.

[34]沈菊林,王保怀,刘京生.差示扫描量热技术在生物大分子体系研究中的应用[J].保定师专学报,1999,12(2):34-40.

[35]赵剑飞.大豆分离蛋白与糖基化分离蛋白乳化性的研究[J].食品工业科技,2005,26(12),76-78.

[36]朱立光,袁志鹏,许莹,等.非牛顿流体保护渣剪切变稀特性分析[J].炼钢,2017,33(03):25-30.

# 致 谢

首先，我要感谢我的论文指导老师，齐齐哈尔大学食品与生物工程学院的王晓杰老师。王老师是一个特别严谨、特别认真也特别有热情的人，她总是以最饱满的状态对待工作，在做实验时一直秉承着严谨认真的态度，总是想尽一切办法避免任何误差和失误。在我做毕业实验的这段时间，王老师一直耐心的指导我，对我不会的、不熟悉的实验内容老师总是一遍一遍的教我，指导我。同时，王老师在论文撰写过程中及时对我遇到的困难和疑惑给予悉心指点，提出了许多有益的改善性意见，投入了特别多的心血和精力。在生活上王老师也格外地照顾我，在我迷茫的时候总是给予我帮助和关心。在此，我对王老师的帮忙和关怀表示诚挚的谢意。同时，还要感谢食品质量与安全专业的授课老师们和所有同学们，大家在这段时间互相学习，互相帮忙，共同度过了一段完美难忘的时光，让我有了一段毕生难忘的经历。

此外，还要感谢室友们在论文编写中带给我的大力支持和帮忙，给我带来极大的启发。也要感谢参考文献中的作者们，透过他们的研究文章，使我对研究课题有了很好的出发点。

最后，谢谢论文评阅老师们的辛苦工作，也衷心感谢我的家人、朋友，以及同学们，在他们的鼓励和支持下我才得以顺利完成此论文。