齐 齐 哈 尔 大 学

毕业设计(论文)

|  |  |
| --- | --- |
| 题 目 | 双酶协同水解制备玉米肽及其促酒精代谢活性的研究 |
| 学 院 | 食品与生物工程学院 |
| 专业班级 | 食安153 |
| 学 号 | 2015152175 |
| 学生姓名 | 韦秋莹 |
| 指导教师 | 王晓杰 |
| 成 绩 |  |

2019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，先利用麦芽粉进行第一步酶解，再利用碱性蛋白酶Alcalase进行第二步酶解制备玉米肽，以水解度、可溶性蛋白含量，促酒精代谢活性为指标，对第二阶段酶解的底物浓度，加酶量等参数进行优化，以确定双酶分步水解玉米醇溶蛋白获得高促酒精代谢活性的玉米肽。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：玉米醇溶蛋白；玉米肽；水解度；可溶性蛋白含量；高促酒精代谢活性

# **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](#_Toc16378)

[Abstract](#_Toc20959)

[第1章 绪论](#_Toc3817)

[1.1 玉米醇溶蛋白](#_Toc7441)

[1.2 玉米肽](#_Toc28064)

[1.3 玉米肽的糖基化修饰](#_Toc10314)

[1.4 本课题的研究目的和意义](#_Toc23291)

[1.5 本课题的国内外研究现状](#_Toc9167)

[1.5.1 酶法糖基化的国内外研究进展](#_Toc19404)

[1.5.2 肽的酶法糖基化修饰研究进展](#_Toc7386)

[1.5.3 亲和层析在糖蛋白分离纯化中的应用](#_Toc7508)

[1.6 本实验的研究内容](#_Toc5351)

[1.6.1 玉米肽和玉米糖肽的制备](#_Toc1878)

[1.6.2 玉米糖肽的亲和层析分离与凝胶层析脱盐](#_Toc6151)

[1.6.3 玉米糖肽的质谱分析](#_Toc5033)

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

[1.6.5 玉米糖肽部分物化性质的测定](#_Toc28590)

[第2章 材料与方法](#_Toc5458)

[2.1 实验材料与仪器](#_Toc19979)

[2.1.1 实验材料](#_Toc24800)

[2.1.2 实验仪器](#_Toc917)

[2.2 实验方法](#_Toc4937)

[2.2.1 氨基葡萄糖糖基化修饰玉米肽](#_Toc8286)

[2.2.2 糖基化修饰玉米肽的亲和层析分离](#_Toc6527)

[2.2.3 糖基化修饰玉米肽的凝胶层析分离脱盐](#_Toc3633)

[2.2.4 糖基化玉米肽的质谱分析](#_Toc3150)

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

[2.2.6 糖基化修饰玉米肽的物化性质研究](#_Toc21117)

[2.2.7 游离氨基含量的测定](#_Toc6748)

[第3章 结果与讨论](#_Toc27802)

[3.1 糖基化修饰玉米肽的分离纯化与质谱分析](#_Toc6651)

[3.1.1 亲和层析分离](#_Toc124)

[3.1.2 凝胶层析脱盐](#_Toc12354)

[3.1.3 糖基化修饰玉米肽的质谱分析](#_Toc10626)

[3.2 糖基化修饰对玉米肽热稳定性的影响](#_Toc19644)

[3.3 糖基化修饰对玉米肽游离氨基含量的影响](#_Toc31763)

[3.4 糖基化修饰对玉米肽物化性质的影响](#_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](#_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](#_Toc13061)

[3.4.3 糖基化修饰对玉米肽表观黏度的影响](#_Toc8820)

[3.4.4 糖基化修饰对玉米肽溶解性的影响](#_Toc26005)

[结 论](#_Toc4180)

[参考文献](#_Toc31329)

[致 谢](#_Toc26956)

# 第1章 绪 论

## 1.1 玉米醇溶蛋白

我国玉米产量高，价格低廉但利用率低，因此大力促进了对玉米深加工的研究。玉米淀粉的副产物很多未经利用即自然排放，这不仅是对可利用粮食资源的极大浪费，而且对环境造成一定程度的污染，所以对玉米蛋白进行深加工生产高营养的肽类食品，不但能够提高其营养价值，而且为玉米副产物的加工提供新的途径[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。现主要体现在食品领域，它可作为一种功能食品推向市场。[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

玉米蛋白粉为玉米淀粉厂的主要副产物，蛋白质含量达60%以上，其中68%以上是醇溶蛋白，22%是谷蛋白，另有少量的球蛋白和白蛋白，还含有15种无机盐及玉米独有的黄色素。由于玉米蛋白的氨基酸不平衡，尤其是必需氨基酸如赖氨酸、色氨酸等较缺乏，导致玉米蛋白水溶性差，限制了它在食品工业的应用。在通常条件下，蛋白质只有处于溶解状态时才能表现良好的功能特性。目前玉米蛋白的主要用途是作饲料，有些未经处理而自然排放，我国每年随废液排走的玉米蛋白质高达8万吨，造成了蛋白资源的极大浪费和环境污染。玉米肽的开发使玉米蛋白粉由不溶变为高度可溶。此外，玉米肽具有的抗疲劳、抗氧化、促进乙醇代谢、降血压、保肝等生理活性，使其极具开发前景，可以被广泛地应用于食品及相关领域。但是，目前玉米肽多采用单一酶水解方法制备，肽的产率较低，蛋白酶加入量偏高。

为了解决上述问题，本研究尝试采用麦芽粉和Alcalase碱性蛋白酶进行双酶分步水解，首先利用麦芽粉中蛋白酶的水解作用将玉米醇溶蛋白的高级结构破坏，将埋藏在分子内部的活性位点暴露出来，为第二阶段酶解创造有利条件的同时，降低第二阶段酶的使用量，为玉米肽更好地开发利用奠定基础。

## 1.5 本课题的国内外研究现状

### 1.5.1 玉米肽的国内外研究进展

国外对于玉米肽的食品开发技术比较成熟，早在20世纪90年代，日本已经利用玉米肽开发出了一种低热量早餐饮料，这种饮料利用了玉米肽的低粘度、高溶解性等特点，是一种具有酸奶酪风味的饮料。

在当今社会人们对酒的消费越来越多，而过度饮酒会对肝造成很大的损害，这就促进了人们对于醒酒产品的研究。来源于植物蛋白的天然多肽分子以其无毒副作用的优势受到了人们的青睐，而玉米肽醒酒产品的研究是当前的热点之一。当前，日本食品化工开发公司以玉米蛋白粉为原料生产的玉米肽饮料已经上市。韩国制药公司应用玉米肽开发的醒酒饮料也已开始进入国际市场。

### 1.5.2 双酶法制备玉米肽研究进展

在玉米肽的酶法制备方面，多数采用单酶水解方法，但是由于单酶的酶切位点相对较少，使蛋白质的水解受到一定的限制；采用多种酶协同水解，可以增加蛋白酶的特异性催化位点，从而提高蛋白质的水解度及多肽产率；但是由于酶本身也是蛋白质，同时加入两种不同的酶，可能引起两种蛋白酶之间的相互水解，或者不同蛋白酶之间产生竞争性抑制作用从而影响水解速度；而且不同蛋白酶的最佳水解条件也存在差异性。为了解决这个问题，通常采用分步酶解法，又可称双酶协同水解法。 除此之外，采用微生物发酵来直接制备玉米肽的研究也较少。微生物发酵可以减少玉米肽制备过程中的苦味，简化工艺流程，降低成本，这将会成为玉米肽制备产业化发展的重要趋势。

麦芽粉是小麦在特定的条件下发芽后干燥粉碎而成的物质。小麦芽粉中含3%～4%的还原糖、2%～4%的可溶性胶、10%以上的纤维素与半纤维素,2%～3%的类脂、1%～2%的氨基酸与多肽及大量的具有生物活性的铁、锌、硒、钙等人体极易缺少的元素，是一种营养丰富的物质，在食品加工中应用可以提高食品的营养价值。在玉米淀粉生产中加入适量的小麦芽粉，可以补充玉米淀粉中没有或不足的一些营养成分，诸如还原糖、纤维素与铁、钙、硒等微量元素等，使人们得到更多更全面的营养成分。并且，在麦芽中已经发现40多种内切蛋白酶，根据蛋白酶催化反应的活性位点，有四类主要的蛋白酶：天冬氨酸类蛋白酶、半胱氨酸类蛋白酶、丝氨酸类类蛋白酶和金属类蛋白酶。大部分内生的天冬氨酸、半胱氨酸、丝氨酸类蛋白酶存在于液泡中。根据蛋白酶对蛋白质的催化部位可以分为内肽酶、羧肽酶、氨肽酶、二肽酶等，根据蛋白酶的酸碱性分为酸性蛋白酶、碱性蛋白酶和中性蛋白酶。但是，还没有将麦芽粉作为蛋白酶制剂应用于玉米肽的制备中。[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，先利用麦芽粉进行第一步酶解，再利用碱性蛋白酶Alcalase进行第二步酶解制备玉米肽，以水解度、可溶性蛋白含量，促酒精代谢活性为指标，对第二阶段酶解的底物浓度，加酶量等参数进行优化，以确定双酶分步水解玉米醇溶蛋白获得高促酒精代谢活性的玉米肽，为玉米肽更好地开发利用奠定基础。

### 1.6.1 玉米醇溶蛋白的第一步酶解

以玉米醇溶蛋白为原料，再以30%比例加入麦芽粉，在该酶解条件下酶解3h进行第一步酶解制备酶解液。

### 1.6.2 玉米醇溶蛋白的第二步酶解

以第一步酶解液用NaOH调节pH值至8.5，在Alcalase碱性蛋白酶最适酶解条件下进行第二步酶解，酶解2h制备玉米肽。

### 1.6.3 样品可溶性蛋白含量的测定

采用Folin-酚法测定可溶性蛋白含量。以标准蛋白质溶液做梯度稀释，测定光密度值，取两组测定的平均值，以蛋白质浓度为横坐标，光密度值为纵坐标，绘制标准曲线作为定量的依据。根据样品测定的吸光值与标准曲线对比求出蛋白质含量。

### 1.6.4 样品羟基自由基清除活性的测定

H2O2/Fe2+通过Fenton反应产生羟基自由基，H2O2+Fe2+=OH+H2O+Fe3+，向反应体系中加入具有清除羟基自由基功能的待测物，就会减少羟基自由基的生成，从而使有色化合物的生成量相应减少，采用固定时间反应法，在532nm处测量含被测物反应液的吸光度值，样品对532nm吸光度值的抑制程度，反映了样品清除羟基自由基的能力。

### 1.6.5 玉米肽底物浓度的优化

通过对玉米肽测定的蛋白质含量及羟基自由基清除率确定玉米醇溶蛋白的最适底物浓度。

# 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 |
| 麦芽粉 | —— | 生工生物（上海）股份有限公司- |
| 碱性蛋白酶 | —— | Novozymes公司 |
| 牛血清蛋白 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司- |
| 钨酸钠 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司- |
| 钼酸钠 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司- |
| 磷酸 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司- |
| 硫酸锂 | 分析纯 | 生工生物（上海）股份有限公司- |
| 液溴 | 色谱纯 | Sigma公司- |
| 盐酸 | 分析纯 | 辽宁泉瑞试剂有限公司 |
| 双氧水 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司- |
| 硫代巴比妥酸 | 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 |
| 三氯乙酸 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 乙二胺四乙酸二钠 | 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 |
| 氢氧化钠 | 分析纯 | 天津市凯通化学试剂有限公司 |
| 2-脱氧核糖 | 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 |
|  |  |  |

### 

### 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 玉米肽酶解条件的优化

(1)玉米醇溶蛋白的第一步酶解：

取10g玉米醇溶蛋白放于250mL烧杯中，加入100mL蒸馏水，搅拌均匀，配制成底物浓度10%（w/v）的悬浮液，按30%比例加入麦芽粉，搅拌均匀，取样2mL装入离心管中标记为1号样品，放入沸水浴中灭酶5min。再向烧杯中加入大小合适的转子后，将烧杯放入50℃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5.5，开始水解反应，水解过程中通过滴加0.5mol/L NaOH使pH维持在5.5，水解3h后，取样2mL装入离心管中标记为2号样品，放入沸水浴中灭酶5min。

(2)玉米醇溶蛋白的第二步酶解

将第一步酶解液用NaOH调节pH值至8.5，加入1% / 0.75% / 0.5%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0.5h、1h、1.5h、2h时分别取样2mL装入离心管中标记为3、4、5、6号样品，放入沸水浴中灭酶5min。将所有样品放入冰箱冷藏备用。

### 2.2.2 样品可溶性蛋白含量的测定

样品预处理：将样品以4000r/min离心10min，取上清液。

(1)标准曲线的制作：

取18支试管分成三组，分别加入 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mL标准蛋白质溶液(250μg /mL)，用蒸馏水补足到0.5mL，加入2.5 mL试剂甲，混匀，于 18-20℃放置 10 min，再加入0.25mL试剂乙，立即摇匀，在 18-20℃保温 30 分钟，然后于640nm 处比色。测定光密度值，取三组测定的平均值，以蛋白质浓度为横座标，光密度值为纵座标，绘制标准曲线为定量的依据。

(2)样品中可溶性蛋白含量的测定：

取20支试管，其中18支试管分成三组，加入 0.1待测样品溶液，用蒸馏水补足到0.5mL；2支试管作空白对照，加入0.5mL蒸馏水代替样品。加入2.5 mL试剂甲，混匀，于 18-20℃放置 10 分钟，再加入0.25mL试剂乙，立即摇匀，在 18-20℃保温 30 min，然后于640nm 处比色，比色前使用空白对照组进行调零，再测定样品光密度值，取三组测定的平均值，与标准曲线对比求出蛋白质含量。

### 2.2.3 样品羟基自由基清除活性的测定

按表1加入各种相应反应液到相同规格的试管中，摇匀后将所有试管放入37℃水浴中保温1h，然后再分别向测试管中加入1mL的2.0%硫代巴比妥酸，1mL的2.0%三氯乙酸，摇匀，放入沸水中煮30min，取出立即冷却，然后在波长532nm处测吸光值（若有浑浊，加入3mL正丁醇萃取后再比色）。

表1 2-脱氧核糖法的加样表

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 样品（mL） | 水（mL） | 磷酸钠缓冲液（mL） | 2-脱氧核糖（mL） | FeSO4-EDTA（mL） | H2O2（mL） |
| 空白  对照  样品 | - | 0.9 | 0.2 | 0.2 | - | - |
| - | 0.5 | 0.9 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 0.5 | - | 0.9 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |

羟基自由基清除计算公式：羟基自由基清除率（%）=（A+﹣A样）/（A+-A-）×100%

式中A+ —表示对照管的吸光

A-—表示空白管的吸光度值；

A样—表示样品管的吸光度值。

### 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。

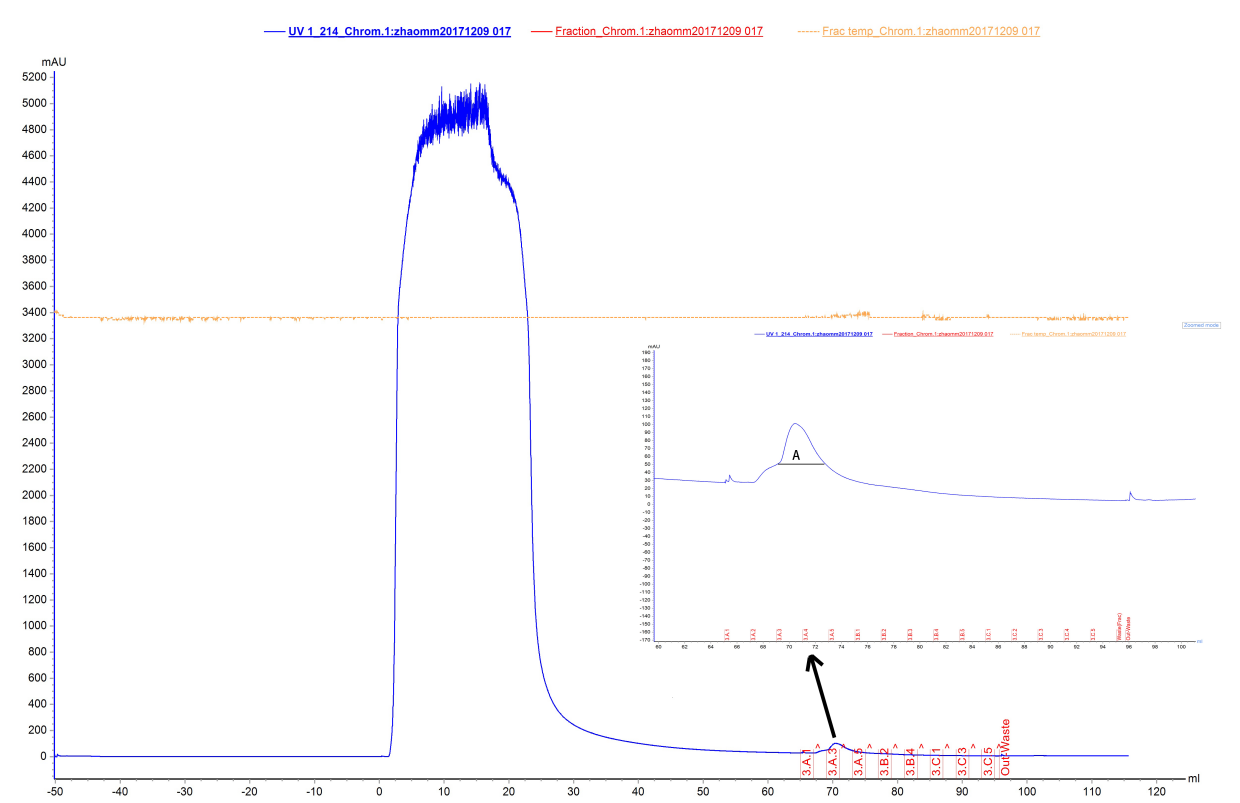


图3-1 氨基葡萄糖糖基化修饰玉米肽的亲和层析洗脱曲线

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。

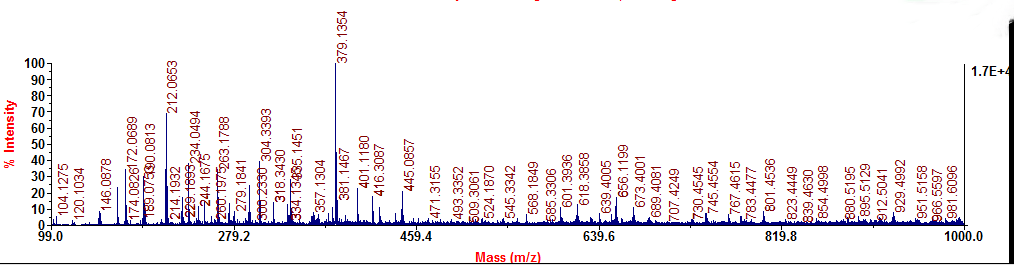


图3-3 玉米肽的MALDI-TOF-MS质谱图

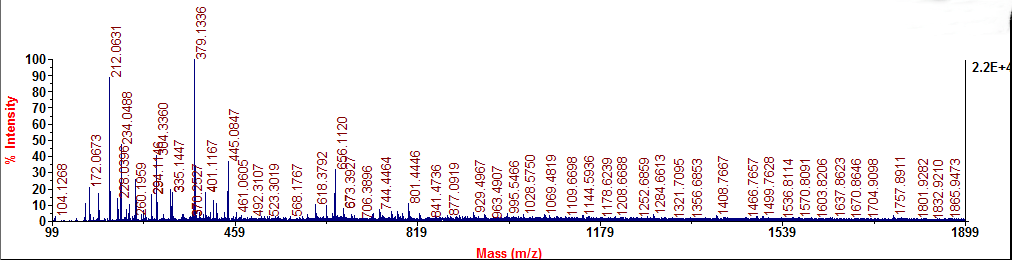


图3-4 玉米糖肽的MALDI-TOF-MS质谱图

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%20the%20sialylation%20level%20of%20serum%20N-acetyl-%CE%B2-D-glucosaminidase%20A%20form%20in%20Type%201%20diabetes%20mellitus%20influences%20their%20activity?" \t "http://kns.cnki.net/KXReader/_blank" \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).

[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%20Cryogel%20Based%20Spin%20Column%20With%20Immobilized%20Concanavalin%20A%20For%20Isolation%20Of%20Glycoproteins),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!!):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%20a%20affinity%20chromatography%20for%20efficient%20baculovirus%20purification" \t "http://kns.cnki.net/KXReader/_blank" \o "Guan-Yu Chen,Chi-Yuan Chen.Concanavalin A Affinity Chromatography for Efficient Baculovirus Porification[J].Al Ch E,2009:1668-1678).

[[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!!).

[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%20of%20Concanavalin%20A-Chelating%20Magnetic%20Nanoparticles%20for%20Selective%20Enrichmentof%20Glycoproteins" \t "http://kns.cnki.net/KXReader/_blank" \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)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。