

曾冰蕙, 郝梦真, 刘桂蓉, 等. 酪蛋白糖基化改性的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 477-484. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050351

ZENG Binghui, HAO Mengzhen, LIU Guirong, et al. Research Progress of Casein Glycosylation and Changes in Functional Properties[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 477-484. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050351

· 专题综述 ·

酪蛋白糖基化改性的研究进展

曾冰蕙, 郝梦真, 刘桂蓉, 熊文文, 车会莲*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要:随着人们对食物的营养要求提高以及食品加工工业技术的发展, 蛋白质的修饰加工已成为食品工业关注热点之一。相比于其它化学修饰, 糖基化修饰产物的安全性更高, 在改善食品感官特性方面应用潜力巨大。本文综述了酪蛋白糖基化反应的研究进展, 包括共价连接糖基化反应和非共价连接糖基化反应, 以及糖基化反应对酪蛋白功能特性的影响, 综合分析影响酪蛋白糖基化改性的糖基化方法和糖基种类。糖基化改性是一种具有广阔应用前景及社会意义的蛋白质改性手段, 可以从多个方面提高酪蛋白的功能特性, 以期为乳制品加工产业乃至食品开发研究提供一定的帮助。

关键词:酪蛋白, 糖基化反应, 蛋白质修饰, 功能

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2023)06-0477-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022050351



本文网刊:

Research Progress of Casein Glycosylation and Changes in Functional Properties

ZENG Binghui, HAO Mengzhen, LIU Guirong, XIONG Wenwen, CHE Huilian*

(Food Science and Nutrition Engineering College, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: With the rising nutritional requirements of food and the advancement of technology in the food industry, protein modification has become one of the food industry's top concerns. Glycosylation products are safer than other chemical modifications ones and have a significant deal of potential to enhance food's sensory qualities. This article summarizes the progression of casein glycosylation interactions, including covalently bonded and non-covalently linked reactions, and analyses the effect of glycosylation on the functional properties of casein. Glycosylation is a promising and socially significant protein modification strategy that can improve the functional qualities of casein in a number of ways, potentially helping the dairy processing industry and even food innovation research.

Key words: casein; glycosylation; protein modification; function

酪蛋白含量约占牛奶蛋白 80% 左右^[1], 分子量约为 19~25 kDa, 是牛乳中含量最多的蛋白质。酪蛋白分为 4 种组分: α_{s1} -酪蛋白、 α_{s2} -酪蛋白、 β -酪蛋白和 κ -酪蛋白, 它们在牛奶中的比例约为 40:10:35:15^[2]。酪蛋白是牛乳中营养价值最高的蛋白质, 含有 8 种人体必需氨基酸, 是氨基酸的优质食源^[3], 可以通过膳食为人体发育提供必要的营养物质^[4]。故酪蛋白已作为原辅料应用于食品工业, 如用作乳化剂^[5-6]等。但酪蛋白本身特性具有一定的局限性, 研

究人员着眼于通过物理、化学反应研发一系列酪蛋白衍生品, 为酪蛋白的广泛应用奠定基础。

相比于其它化学修饰, 糖基化反应是一种较为安全的蛋白质改性手段^[7], 使亲水性较高的碳水化合物(一般是单糖或寡糖)连接到蛋白质分子中的部分氨基酸残基上, 从而改变蛋白质的构象、溶解度、热稳定性、乳化性等功能特性, 并对其抗氧化、免疫原性、免疫活性等体内活性也造成一定的影响^[8]。酪蛋白糖基化复合物可以作为功能成分添加到食品中, 以

收稿日期: 2022-05-30

基金项目: 北京市自然科学基金(7202100)。

作者简介: 曾冰蕙(1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食物过敏及营养, E-mail: zengbinghui0831@sina.com。

* 通信作者: 车会莲(1977-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全、过敏及营养, E-mail: chehuilian@cau.edu.cn。

改善食品的质地、口感、功能等特性。

了解不同糖基化方法、不同糖基对酪蛋白功能特性的影响,对酪蛋白的广泛应用以及高效开发蛋白质类食品有重要意义。本文将首次综述近年来在酪蛋白糖基化反应领域的研究方法、影响因素及研究结果,旨在为新产品的研发乃至乳制品加工产业提供一个宏观视角及理论支撑。

1 糖基化反应

1.1 糖基化反应的定义

理论上,蛋白质与糖类溶液混合时所形成的体系有5种可能^[9]:可溶性复合物、不溶性复合物、共溶体系、热力学不相容体系和胶体絮凝。糖基化反应是指亲水性较高的碳水化合物(一般是单糖或寡糖)共价或非共价地连接到蛋白质分子的部分氨基酸残基上,形成可溶性复合物和/或不溶性复合物的体系。

1.2 共价连接糖基化反应

1.2.1 美拉德反应(非酶法糖基化) 美拉德反应又称羰氨反应,是还原糖的羰基与多肽或蛋白质氨基酸残基的氨基之间的反应^[10](图1),被认为是一种有效的且有应用前景的蛋白质修饰方法,以改善蛋白质或多肽的体内外功能活性。

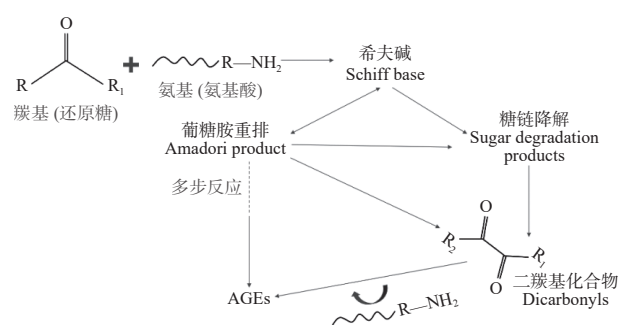


图1 美拉德反应过程简图

Fig.1 Simplified scheme of Maillard reaction

美拉德反应有三个阶段,分别产生不同的产物,本综述研究对象为酪蛋白糖基化复合物,其是美拉德反应的初始阶段和/或中间阶段的产物,不包含危害人体健康的晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)。美拉德反应末期在一定条件下会产生AGEs,这是一类复杂的化合物,有着各自不同的理化特性,例如有的呈现棕色,有的具有荧光特性等^[11]。美拉德反应根据反应环境可分为湿法与干法。

1.2.1.1 湿法 湿法的操作简单,糖基接枝速度快、效率高,反应时间较短,适用于小分子糖类的糖基化反应。将酪蛋白溶液与糖液混合,以溶液的形式进行水浴加热,之后迅速冷却、干燥成粉等到糖基化产物^[12]。但湿法反应温度高会导致糖基化产物褐变严重^[13],同时还会使一些热敏感的蛋白质发生变性,产物得率变低。

但酪蛋白由于热稳定性较好,故采用湿法制备糖基化酪蛋白的研究较多。如徐世涛等^[3]通过湿法研究了不同糖基种类的糖基化对酪蛋白特性的影响;Jing等^[14]用湿法制备了葡萄糖、果糖、核糖的糖基化酪蛋白产物;Wang等^[15]研究了木糖与酪蛋白的湿法产物等。

超声处理有利于底物分子之间接触更为均匀,增加分子碰撞的概率。且高强度超声波独特的物理、机械和化学效应,有利于蛋白质表面活性的增加^[16]及自由巯基、二级结构的改变^[17]。一些研究显示^[7,18],使用超声辅助预处理底物溶液后,再进行湿法加热,结果显示超声预处理可以显著提高反应的效率。这一发现给今后的湿法糖基化反应乃至所有糖基化反应的底物预处理提供了一种可行的优化方案。

1.2.1.2 干法 将混合底物溶液先冻干成粉,而后置于一定温度(50~130℃)与一定湿度(60%~80%)的环境中孵化称为干法^[12]。此方法适用于大分子多糖与蛋白质的反应。

干法以空气作为反应介质,故存在糖基化速率较慢,反应时间较长,且反应底物容易接触不均匀^[19]等缺点。本文所筛选查阅的文章中,仅有两项研究使用干法成功制备了酪蛋白糖基化复合物^[20-21]。总体而言,大多研究制备酪蛋白糖基化复合物采用的是湿法,可能与实验条件较为简单、实验周期较短、实验可控性较强有关。

1.2.2 酶法糖基化 转谷氨酰胺酶是酶法糖基化最常用的一种酶,其可以催化蛋白质分子中谷氨酸残基与赖氨酸残基的ε-氨基之间发生反应,在分子间和/或分子内形成异肽键。伯胺类物质与赖氨酸残基具有相似结构,例如具有伯胺活性的壳寡糖^[22],故使用壳聚糖制备酪蛋白糖基化复合物时,多采用转谷氨酰胺酶催化。

该方法效率高、安全性高、特异性高、糖类接枝度高^[23]。较于美拉德反应,酶法突出优点有:a.反应条件温和,不涉及高温加热,很大程度上保护了酪蛋白的天然结构;b.特异性高,专一催化酰基转移的反应,产物单纯;c.安全性高,不会发生降解重排而产生有害副产物,如AGEs。

已有多项研究在低温条件下、短时间内利用转谷氨酰胺酶对酪蛋白进行专一性修饰,制备了壳寡糖-酪蛋白复合物^[24-26]。转谷氨酰胺酶催化酪蛋白中的谷氨酰胺残基与壳聚糖上的氨基发生酰基转移反应,使得酪蛋白与壳聚糖交联。但该方法会不可避免地让酪蛋白分子内或分子间发生反应形成异肽键。故转谷氨酰胺酶催化蛋白质糖基化的研究目前仍处于基础研究阶段,还未大规模推广。值得注意的是,此法仅限于壳寡糖与酪蛋白的交联,因为尚未发现其它具有伯胺活性的糖类对蛋白质进行糖基化改性。

1.3 非共价连接糖基化反应

不论是非酶法糖基化还是酶法糖基化, 糖链均以共价键连接到酪蛋白的 ϵ -氨基或 α -氨基上。物理相互作用则可以使二者通过非共价键相互交联形成复合物, 其接枝度、物化性质、生理功能等特性与共价连接的糖基化复合物存在一定差异。

刘郁琪^[27] 将酪蛋白与不同酯化度的果胶溶液混合反应, 酸性滴定制备出可溶性复合物, 分子动力学模拟结果证实, 静电相互作用力主导了酪蛋白与果胶的结合。但该研究并未具体指出静电作用力结合而成的酪蛋白糖基化复合物与共价连接糖基化产物的特性差异及功能差异, 这一方面还有待更多研究阐明。

1.4 糖基化反应的影响因素

关于影响因素, 目前探讨得最多的酪蛋白糖基化反应是美拉德反应。其影响反应的因素有很多, 包括底物类别、反应环境(温度、pH、水分活度、含氧量)、催化剂及抑制剂(金属、反应抑制剂)等^[28-29]。其中, 在底物类别相同的情况下, 反应时间是影响反应过程和蛋白质糖基化程度的最关键的因素^[30]。控制以上条件可以防止糖基化反应发展到更高级的阶段, 从而防止有害成分 AGEs 的形成^[31]。

1.4.1 底物类别 底物类别是影响酪蛋白糖基化的首要因素。醛糖中分子质量较小的葡萄糖更容易与酪蛋白发生糖基化, 且醛糖的糖基化程度显著高于酮糖^[3]。一般情况下, 不同糖类反应的简易性可以归结为^[32]: a. 酮糖<醛糖; b. 多糖<双糖<己糖<戊糖<丁糖<丙糖。所以, 还原糖种类是影响酪蛋白糖基化生成荧光性 AGEs 最重要的影响因素, 其次为时间、温度^[11]。故选择合适的糖基种类是高效生产安全的糖基化酪蛋白的一个重要环节。

为了说明蛋白质结构对反应时间的影响, Akio 等^[33] 和 Nakamura 等^[34] 分别研究了 α -酪蛋白和溶菌酶与半乳甘露聚糖形成共轭物的时间。 α -酪蛋白是一种具有柔性结构的蛋白质, 很容易与糖类形成共轭物, 结果显示, α -酪蛋白的四个赖氨酸残基与多糖反应只需不到 24 h。相反, 溶菌酶作为一种球状蛋白, 形成共轭物的速度很慢。两周之后, 仅有两个赖氨酸残基与多糖连接。糖基化反应底物有糖基与蛋白质, 二者种类不同均会影响糖基化进程。酪蛋白具有的柔性结构使其较容易发生糖基化反应, 是糖基化底物的优良选择。同时产品研发还需要根据改性需求及糖基化程度选择合适的糖基种类, 以制备出高质量的酪蛋白改性产品。

1.4.2 水分活度 由于反应物在水环境中的稀释效应, 通常, 糖基化反应在干热条件下进行的速度比在水环境中进行的速度更快。且有研究表明, 当蛋白质在溶液中加热或在干燥状态下加热时, β -乳球蛋白的乳糖化位点不同。在溶液中加热时, ⁴⁷Lys^[35] 和 ¹⁰⁰Lys^[36] 优先被乳糖糖基化, 而⁴⁷Lys 和⁹¹Lys 在干燥

状态下加热时被乳糖糖基化^[37]。即水分活度还影响着糖基化反应的部位特异性, 不同的反应位点是否会影响酪蛋白的改性结果是值得思考的。

1.4.3 金属、反应抑制剂 金属离子和反应抑制剂对糖基化反应的影响也不容忽视。硫酸锌和氯化铜可以促进木糖和酪蛋白水解物的糖基化反应^[15], 且木糖糖基化显著提高了酪蛋白水解物的抗氧化活性, 提高程度具有硫酸锌和氯化铜的浓度依赖性。虽然该研究选用了二价和三价金属离子, 但只有 Zn^{2+} 、 Cu^{3+} 的数据, 不足以说明所有的金属离子是否会有相似的促进作用, 需要更多其他离子如 Fe^{3+} 、 Na^{+} 的研究。Akillioglu 等^[21] 首次对卵清蛋白的葡萄糖糖基化动力学数据进行评估, 结果表明, 钙和单宁酸的存在均显著抑制了干燥状态下卵清蛋白-葡萄糖产物的形成。此外, 钙在干燥状态和溶液条件下都会以混合非竞争方式抑制糖基化反应, 而单宁酸仅在干燥状态下以纯非竞争方式抑制糖基化反应。

研究显示, 大豆异黄酮可以作为糖基化反应抑制剂显著抑制糖链与大豆蛋白的结合^[38]。今后还需要进一步研究分析大豆异黄酮或是其他多酚类物质是否会影响酪蛋白糖基化反应进程, 因为现有研究尚未发掘其对大豆蛋白的抑制机制。

2 糖基化酪蛋白的体外功能探究

糖基化反应已被证明可以从多方面影响酪蛋白的功能活性(图 2), 本文主要从体外功能与体内活性展开讨论。

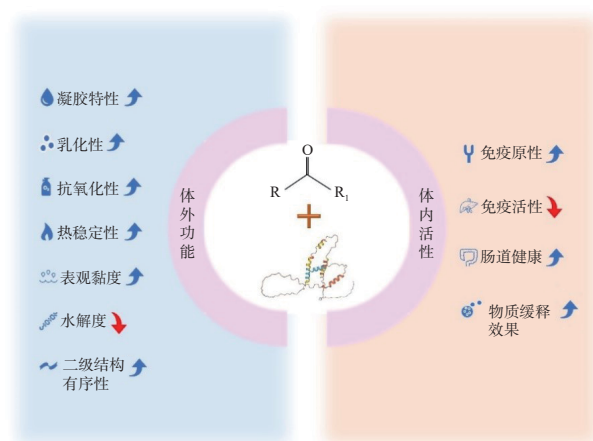


图 2 糖基化酪蛋白功能活性变化趋势
Fig.2 Changes in the functional properties of glycosylated casein

2.1 糖基化对酪蛋白凝胶特性的影响

蛋白质凝胶是一种重要的食品体系, 由于其具备良好的质构与感官特性, 还常常作为一种智能的活性物质包埋载体, 实现物质在体内的可控释放。蛋白质凝胶已在食品、化妆品及其它相关的化工领域广泛应用。酪蛋白水凝胶能够对多种材料如钛、木头、塑料、玻璃、橡胶和皮肤等产生强力粘结作用^[39]。现有研究显示糖基化修饰将会对酪蛋白的凝胶性能产

生明显影响。

研究结果显示,壳寡糖与葡萄糖形成的酪蛋白糖基化复合物的凝胶时间缩短^[25,40]、凝胶强度增加、凝胶持水性增加^[18],这可能与凝胶结构变为紧密有关。葛伟等^[18]指出超声辅助美拉德反应可以显著提高酪蛋白的凝胶强度(1.16倍)和持水性(1.39倍);Bi等^[7]通过同样方法得到的糖基化酪蛋白具有最高的持水能力 $67.81\%\pm 1.72\%$,凝胶强度 165.05 ± 2.72 g。超声预处理使得酪蛋白糖基化复合物空隙小而密,尺寸更均匀,引起的酪蛋白结构变化包括疏水基团暴露以及 β -折叠结构增加^[7]。值得注意的是,凝胶强度会随着超声波的预处理时间延长而降低,因为长时间超声波处理会使酪蛋白变性而难以形成凝胶。

酪蛋白糖基化复合物持水性的提高以及凝胶强度的增加得益于凝胶微观结构的显著变化^[40],糖基化反应时间越长,越有利于酪蛋白凝胶结构趋于紧密。合适的糖基种类(壳寡糖、葡萄糖等)对酪蛋白胶凝也十分重要,而其它糖基种类(如乳糖、木糖、果糖等)对酪蛋白凝胶性质影响的研究数据尚少。

2.2 糖基化对酪蛋白乳化性的影响

关于酪蛋白糖基化后乳化活性、乳化稳定性变化的研究结果有较多出入。徐世涛^[3]、葛伟^[18]等认为葡萄糖-酪蛋白糖基化复合物的乳化活性有所提高,而崔心禹^[23]、宋春丽^[40]、樊永康^[41]等认为壳寡糖-酪蛋白糖基化复合物的乳化活性呈现降低的趋势。研究结果不一致可能是归结于糖基的种类不同,即葡萄糖糖基化有潜力提升酪蛋白的乳化活性,而壳寡糖糖基化则会降低酪蛋白的乳化活性,这一结果也将为今后酪蛋白的糖基化改性方向起到一定指导性作用。

而葡萄糖、D-果糖、麦芽糊精、麦芽糖、葡聚糖、 β -环糊精、乳糖、壳寡糖均会使酪蛋白的乳化稳定性提高,其中酪蛋白-葡聚糖 40000 复合物的乳化稳定性较酪蛋白提高 85.91% ^[3]。但宋春丽等^[40]研究结果显示壳寡糖糖基化会使酪蛋白乳化稳定性降低,这与实验方法相同的崔心禹^[23]、樊永康^[41]等的研究结果相悖。这可能是由于前者所用糖基化方法为酶法,容易导致酪蛋白分子间交联,影响酪蛋白糖基化复合物的乳化稳定性。未来研究可以考虑在分子水平探究其影响机制,从结合键类型、酪蛋白结构的变化等角度讨论糖基化对酪蛋白乳化性质的影响。

产品开发方面,张铁华等^[42]利用低聚木糖-酪蛋白开发了一种乳化性能好、稳定性高、蛋白含量高、色泽风味良好天然大分子乳化剂。目前关于糖基化酪蛋白的产品研发较少,未来研究可考虑将前人科研成果转化,推动食品工业化发展。

2.3 糖基化对酪蛋白其他特性的影响

糖基化酪蛋白的理化特性研究并不止于上述研究较为广泛的方面,还有学者提出了新的视角,如樊永康等^[41]指出壳寡糖-酪蛋白复合物的热稳定性得

到了增强;王小鹏等^[24]经过体外模拟消化发现酪蛋白-壳寡糖的水解度和三氯乙酸可溶性氮均低于酪蛋白,增多了消化物中的大分子肽段的数量。表明酶法糖基化一定程度上降低了酪蛋白的体外消化能力。崔心禹^[23]、樊永康^[41]等均认为酪蛋白与壳寡糖交联之后,酪蛋白的二级结构更为有序。这是由于酪蛋白本身的二级结构比较松散,糖基化后会在分子内部形成共价键,增加分子内部的空间位阻,使分子结构更为紧凑,这与酪蛋白糖基化复合物凝胶强度、持水性等凝胶特性的增强是一致的。宋春丽等^[22]指出不同反应时间下糖基化产物的表观黏度均有显著提高,表现出剪切稀释的特性,且产物分散液由类固体性质转变为类流体性质。综上可以看出酪蛋白经糖基化后,结构发生显著改变,进而导致稳定性、表观黏度等理化特性产生不同程度变化。

酪蛋白作为生物活性肽在生物体内发挥着巨大的作用,如营养供给、抗氧化、提高免疫活性等。近年来已有大量研究证据表明,糖基化可以从多个方面改变酪蛋白的体内活性。

3 糖基化酪蛋白的体内活性探究

3.1 糖基化对酪蛋白抗氧化性的影响

过量的活性氧会导致氧化应激,并会攻击细胞的生物分子,如脂质、蛋白质和脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid, DNA)。这种氧化应激诱导的损伤会破坏细胞膜的完整性以及损害细胞功能,从而导致细胞死亡。

人体摄入酪蛋白后经过胃蛋白酶、胰蛋白酶等蛋白水解酶产生酪蛋白酶解物进行消化吸收^[43]。探究人体吸收形式的酪蛋白酶解物能否通过糖基化改性是具有重要生理意义的。赵玉滨等^[44]将酪蛋白酶解产物分别与葡萄糖、木糖、果糖进行糖基化改性,发现在 pH7.0 时,木糖、果糖糖基化产物羟基自由基清除率达到最大,三种糖的糖基化使得酪蛋白酶解产物的抗氧化活性均高于未经处理的酶解产物。通过清除 1,1-二苯基-2-苦肟基(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Free Radical, DPPH)自由基活性、还原能力、 Fe^{2+} 螯合活性和卵磷脂氧化实验考察酪蛋白酶解产物各组分的抗氧化活性,也可以发现不同相对分子质量的糖基化产物具有显著不同的抗氧化活性^[45]。现有研究已证实可以通过糖基化改性增强酪蛋白酶解物的抗氧化性,有望进一步通过体内实验证实。

Hwa 等^[46]指出糖基化后,酪蛋白的还原能力即清除 DPPH 自由基的能力显著提高。有研究从细胞水平验证了酪蛋白糖基化产物的抗氧化活性,Jing 等^[14]指出葡萄糖-酪蛋白和果糖-酪蛋白可显著降低 Int-407 细胞的抗氧化性超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽还原酶的活性,但是不会影响 Caco-2 细胞的抗氧化酶状态。这个结果表明了酪蛋白的糖基化产物具有一定的细胞毒性,细胞毒性的程度因糖链种类以及细胞种类而不同。Oh 等^[47]

用四甲基偶氮唑盐比色法,发现糖基化产物抑制了 HepG2 细胞中还原型谷胱甘肽浓度的耗竭。HepG2 细胞系是一种人肝癌细胞系,适合用于肝细胞代谢方面的研究。它保留了许多正常人类肝细胞特有的特殊功能^[48]。现有细胞实验的结果局限于酪蛋白的抗氧化效果与指标,缺乏糖基化对酪蛋白改性的具体机制(如影响二级结构或三级结构等)探究及改性后的酪蛋白糖基化复合物降低细胞抗氧化酶水平的通路机制探讨。

3.2 糖基化对酪蛋白免疫原性的影响

在近些年,牛奶在一些西方国家的销售量呈现下降的趋势。除了个体的饮食习惯差异外,还有一个主要的因素是乳及乳制品容易造成食用者胃肠不适,严重者会休克甚至死亡。现有研究结果表明糖基化改性并不能降低牛奶中酪蛋白的致敏性,反之还会增强其免疫原性及免疫反应性。

杨峥^[49]、夏薇等^[20]研究了低聚半乳糖糖基化对重要过敏原 α_{s1} -酪蛋白的性质影响,体外试验结果表明糖基化产物的抗原抗体结合常数较 α_{s1} -酪蛋白提高了 3.7 倍,即低聚半乳糖糖基化显著提高了 α_{s1} -酪蛋白的免疫反应性,进一步地,体内实验结果证实了糖基化产物可以显著提高 BALB/c 小鼠血清中的特异性 IgG 水平,暗示了糖基化可以提高 α_{s1} -酪蛋白的免疫原性。但现在酪蛋白糖基化的反应糖类探究限于低聚半乳糖,其他糖类是否会对酪蛋白的免疫原性产生相同影响以及增强其免疫原性的机制还需要进一步研究。

3.3 糖基化对酪蛋白免疫活性的影响

蛋白质是机体免疫系统运作和产生免疫应答的物质基础与重要媒介,可以有效提高机体免疫应答和特异性抗体的水平^[50-51],在促进免疫器官发育、脾淋巴细胞增殖、降低迟发性过敏反应发病率等方面均具有积极作用。

为了探究糖基化酪蛋白复合物对机体免疫状况是否有改善作用,现已有体内外的研究数据。有趣的是,乳糖化酪蛋白会降低酪蛋白水解物的体外免疫活性,而壳寡糖化酪蛋白可以增强酪蛋白水解物的体外免疫调节能力,激活淋巴细胞、免疫细胞、自然杀伤细胞等细胞^[52]。动物实验中,酪蛋白酶解产物及糖基化酪蛋白酶解产物均可以显著改善小鼠的免疫状况^[8],血清生化指标提高,免疫器官指数、免疫球蛋白质量浓度、脾淋巴细胞增殖指数、自然杀伤细胞活力等指标均有显著的提升趋势。但是酪蛋白酶解产物比糖基化酪蛋白酶解产物显示出了更好的免疫提升活性,即酪蛋白经美拉德反应与乳糖发生糖基化后可能会降低蛋白质酶解产物的免疫活性。这可能与乳糖化酪蛋白水解物种赖氨酸的丢失有关^[52],因为在分析氨基酸含量时,仅发现乳糖化酪蛋白水解物中赖氨酸、组氨酸、酪氨酸和缬氨酸含量的减少,而壳寡糖化酪蛋白水解物无此现象。

肠道屏障与免疫系统的平衡息息相关,在抵抗外来抗原入侵方面起到非常重要的作用。朱必洋^[26]指出壳寡糖—酪蛋白磷酸肽能维持回肠绒毛的结构完整性和正常的结构形态,且有效发挥益生元作用,促进丁酸等短链脂肪酸的合成,维护肠道健康。但该研究并未设置酪蛋白磷酸肽的对照组,故无法评估壳寡糖化对酪蛋白磷酸肽免疫活性的影响趋势。

3.4 糖基化对酪蛋白缓释包埋物的影响

许多小分子或矿物质在体内的可控释放需要载体递送,日前对于智能化载体的研究热度不减,不少研究人员也探讨了糖基化酪蛋白作为递送载体的潜力。樊永康等^[53]指出经过壳寡糖糖基化之后能显著提高酪蛋白对槲皮素的包埋效果及保护效果,同时还可以保持和/或提高槲皮素的稳定性和水溶性,有望作为其他的多酚类物质的优质载体。

酪蛋白糖基化产物对色素的负载能力也较为可观,刘郁琪^[27]发现果胶—酪蛋白对姜黄素的负载率最大可达 96%,可实现缓释姜黄素的缓释,同时显著提高姜黄素的生物利用率,从 31.6% 提高至 79.1%。闵敏^[54]指出卡拉胶—酪蛋白与羧甲基壳聚糖—酪蛋白可以包埋辣椒红素,有效防止胃蛋白酶消化辣椒红素,并使其在肠道中迅速释放。其中,酪蛋白糖基化后提高包埋物质的生物利用率的功能还有进一步探讨的必要,其作用是归因于包埋物质的缓释还是由于糖基化酪蛋白复合物作用于小肠吸收细胞,或是其他途径,还需要新的研究数据补充。

朱必洋^[26]通过酶法糖基化与非酶法糖基化制备了两种壳寡糖—酪蛋白磷酸肽复合物作为钙质载体,发现两种钙递送体系均能可以促进 Caco-2 细胞对 Ca^{2+} 的转运吸收,体内研究证明两种钙递送体系均可显著提高小鼠骨骼的抗疲劳能力,并降低其骨质疏松的发生率,暗示了此载体对 Ca^{2+} 的良好递送能力,但该研究并未对释放速度即载体智能化水平进行评估,未来研究可着眼于糖基化酪蛋白的可控缓释能力,减轻骨质疏松患者长期频繁用药的不便。

基于以往研究结果,本文总结了不同方法及糖基种类对糖基化酪蛋白功能特性的影响(表 1),为今后的研究提供系统性理论数据。

4 结论与展望

酪蛋白是乳源的优质蛋白质之一,在改善机体功能、调节食品质地等方面具有重要意义。随着酪蛋白制备加工和修饰研究的不断深入,酪蛋白的应用前景越来越广阔。面对全球对食物营养要求和感官品质的提高,选择合适的方法对酪蛋白进行改性是非常必要的,对提高酪蛋白的商业价值有重要意义。本文综述了酪蛋白糖基化方法及其对体内性质影响,阐明了酪蛋白糖基化复合物改性效果及可能的改性机制。糖基化的酪蛋白结构趋于紧密,从而显著提升凝胶、乳化等体外功能,更引人注意的是可以改变抗氧化性、免疫原性、改善机体免疫以及作为物质载

表1 不同方法及糖基种类对糖基化酪蛋白功能特性的影响
Table 1 Functional effect of different methods and glycosyl types on casein glycosylation

糖基化方法	糖基种类	酪蛋白改性	参考文献
湿法	葡萄糖	抗氧化能力增强; 乳化活性提高; 乳化稳定性提高; 凝胶强度增加; 凝胶持水性增加; 具有细胞毒性	[3,7-8,14,18,26,44,54-58]
	木糖	抗氧化能力增强	
	果糖	抗氧化能力增强; 乳化活性提高; 乳化稳定性提高; 具有细胞毒性	
	麦芽糖	乳化活性提高; 乳化稳定性提高	
	葡聚糖	乳化活性提高; 乳化稳定性提高	
	乳糖	乳化活性提高; 乳化稳定性提高; 降低酪蛋白酶解物的免疫活性; 改善肠道屏障受损; 改善肠上皮细胞活性	
	壳寡糖	载钙; 改善肠道健康	
	核糖	具有细胞毒性	
	卡拉胶	负载辣椒红素	
	羧甲基壳聚糖	负载辣椒红素; 增强纳米级乳液的冻融稳定性	
干法	低聚半乳糖	提高免疫原性	[20]
酶法糖基化	壳寡糖	负载鞣皮素; 降低体外消化能力; 表观黏度提高; 转变为类流体性质; 胶凝时间缩短; 乳化活性降低; 乳化稳定性提高; 载钙; 改善肠道健康; 热稳定性增强; 二级结构更有序, 提高免疫活性	[22-24,26,40-41,53,58]
物理相互作用	果胶	负载姜黄素	[27]

体等生理功能,但大都停留在效果层面,具体机制的深入研究尚少。糖基化在保持酪蛋白原有优点的基础上,赋予了它更多的可能,也为人们更好地利用酪蛋白提供了一个新思路,酪蛋白糖基化产物也因其可获得性与丰富的生物活性具有相当的社会经济学意义。

但目前的研究结果均存在着一定的局限性,结合现实生产中存在的问题,未来的研究方向可以从这几个方面进行考虑: a.当前研究大多着眼于糖基化对酪蛋白理化性质及功能特性的体外研究,较少研究者采用体内实验评估糖基化对酪蛋白的营养利用度、毒理性的影响; b.美拉德反应即非酶法糖基化容易产生不想要的副产物,且反应条件对蛋白质活性不太友好,需要开发新方法对美拉德反应进程进行精准阻断,保证糖基化的程度的同时减少有害副产物的生成; c.酶法糖基化所用的酶制剂价格通常比较昂贵,增加了生产成本,不适于工业化大规模生产糖基化酪蛋白,有必要研发其他方法联合使用,例如利用物理方法、微生物方法等,在保证糖基化交联度的同时降低成本; d.较少研究指出糖基化对酪蛋白一级结构、高级结构的影响以及结构变化与功能活性变化之间的关联,未来可以探究糖基化酪蛋白功能活性改变的机制原理,有利于开发出具有独特功能特性的酪蛋白产品。

参考文献

- [1] REITER M, REITMAIER M, KULOZIK U. Compositional changes of casein micelles induced by calcium or chelant addition at threefold and natural casein concentration[J]. *International Dairy Journal*, 2022, 130: 105365.
- [2] FOX P, SWEENEY P. Advanced dairy chemistry-proteins [M]. 3th Ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003: 1-48.

- [3] 徐世涛, 朱秋劲, 胡颖, 等. 不同种类糖对酪蛋白糖基化接枝改性的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(20): 118-123,131. [XU S T, ZHU Q J, HU Y, et al. Effect of different types of sugars on the modification of casein by glycosylated grafting[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2019, 45(20): 118-123,131.]
- [4] RAAK N, CORREDIG M. Kinetic aspects of casein micelle cross-linking by transglutaminase at different volume fractions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 128: 107603.
- [5] ZHOU X L, YANG J, SALA G, et al. Are micelles actually at the interface in micellar casein stabilized foam and emulsions?[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 129: 107610.
- [6] LEMAN J, KINSELLA J E. Surface activity, film formation, and emulsifying properties of milk proteins[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1989, 28(2): 115-138.
- [7] BI W W, GE W, LI X, et al. Effects of ultrasonic pretreatment and glycosylation on functional properties of casein grafted with glucose[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2017, 41(5): e13177.
- [8] 时佳, 赵新淮. 糖基化酪蛋白消化物对正常小鼠免疫调节作用的影响[J]. *食品科学*, 2020, 41(7): 140-145. [SHI J, ZHAO X H. Immunoregulatory effect of glycosylated casein digest in normal mice[J]. *Food Science*, 2020, 41(7): 140-145.]
- [9] KKTG A, AT B, AS C, et al. Milk protein-polysaccharide interactions[J]. *Milk Proteins (Third Edition)*, 2020: 499-535.
- [10] CHEN K, ZHAO J, SHI X, et al. Characterization and antioxidant activity of products derived from xylose-bovine casein hydrolysate Maillard reaction: Impact of reaction time[J]. *Foods*, 2019, 8(7): 242.
- [11] 刘贵梅, 夏秋琴, 李普, 等. 影响酪蛋白糖基化的因素分析[J]. *食品科学*, 2016, 37(21): 14-20. [LIU G M, XIA Q Q, LI P, et al. Analysis of the factors affecting casein glycosylation[J]. *Food Science*, 2016, 37(21): 14-20.]
- [12] 艾正文, 于鹏, 桂敏. 糖基化反应对乳清蛋白功能特性影响

- 的研究进展[J]. *食品科技*, 2020, 45(10): 248–252. [AI Z W, YU P, GUI M. Research progress on the effect of glycosylation on the functional properties of whey protein[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(10): 248–252.]
- [13] 王松, 夏秀芳, 黄莉, 等. 湿法糖基化改性对大豆分离蛋白功能性质的影响[J]. *食品科学*, 2014, 35(9): 38–42. [WANG S, XIA X F, HUANG L, et al. Effect of glycosylation under wet-heating condition on functional properties of soybean protein isolate[J]. *Food Science*, 2014, 35(9): 38–42.]
- [14] JING H, KITTS D D. Redox-related cytotoxic responses to different casein glycation products in Caco-2 and int-407 cells[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2004, 52(11): 3577–3582.
- [15] WANG X D, TIAN R, SHI X H, et al. Characterisation and antioxidant activity of glycated casein hydrolysate with xylose: Impacts of zinc sulphate and cupric chloride[J]. *International Dairy Journal*, 2021, 114: 104932.
- [16] DEMET G, İBRAHİM G, BARRY B, et al. Interfacial properties and structural conformation of thermosonicated bovine serum albumin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2006, 20(5): 669–677.
- [17] GÜLSEREN I, GÜZEY D, BRUCE B D, et al. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2007, 14(2): 173–183.
- [18] 葛伟, 李晓东, 夏琪娜, 等. 超声协同美拉德反应对酪蛋白乳化性和凝胶性的影响[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(10): 73–79. [GE W, LI X D, XIA Q N, et al. Effect of ultrasound synergistic Maillard reaction on casein emulsification and gelation[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2016, 16(10): 73–79.]
- [19] ZHUO X Y, QI J R, YIN S W, et al. Formation of soy protein isolate-dextran conjugates by moderate Maillard reaction in macromolecular crowding conditions[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(2): 316–323.
- [20] 夏薇, 张帆, 赖莹, 等. 低聚半乳糖糖基化法降低牛乳 α_{s1} -酪蛋白抗原性和免疫原性[J]. *中国食物与营养*, 2011, 17(1): 50–53. [XIA W, ZHANG F, LAI Y, et al. Reduction of bovine milk α_{s1} -casein antigenicity and immunogenicity by oligogalactose glycosylation[J]. *Food and Nutrition in China*, 2011, 17(1): 50–53.]
- [21] AKILLIOĞLU H, GOKMEN V. Kinetic evaluation of the inhibition of protein glycation during heating[J]. *Food Chemistry*, 2016, 196(Apr.1): 1117–1124.
- [22] 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(3): 95–98. [SONG C L, CHEN J P, REN J. Effects of oligochitosan glycation modification on molecular characteristics and rheological properties of casein[J]. *China Oils and Fats*, 2017, 42(3): 95–98.]
- [23] 崔心禹, 樊永康, 夏琛, 等. 转谷氨酰胺酶促壳聚糖/壳聚糖衍生物对蛋白质糖基化作用的研究进展[J]. *化工进展*, 2019, 38(7): 3341–3348. [CUI X Y, FAN Y K, XIA C, et al. A review on glycosylation of protein catalyzed by transglutaminase with chitosan/chitosan derivatives[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2019, 38(7): 3341–3348.]
- [24] 王小鹏, 赵新淮. 酶法糖基化修饰对酪蛋白体外消化能力的影响[J]. *食品科学*, 2019, 40(20): 47–53. [WANG X P, ZHAO X H. Impact of enzymatic glycosylation on *in vitro* digestibility of casein[J]. *Food Science*, 2019, 40(20): 47–53.]
- [25] 宋春丽, 陈佳鹏, 任健. 糖基化交联酪蛋白乳液凝胶特性[J]. *食品与发酵工业*, 2016, 42(12): 73–75. [SONG C L, CHEN J P, REN J. Glycosylated cross-linked casein emulsion gel properties[J]. *Food and Fermentation Industry*, 2016, 42(12): 73–75.]
- [26] 朱必洋. 基于酪蛋白磷酸肽和壳寡糖的三种新型钙递送体系组装、评价及体内活性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2020. [ZHU B Y. Assembly, evaluation and *in vivo* activity of three novel calcium delivery systems based on casein phosphopeptides and chitosan oligosaccharides[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2020.]
- [27] 刘郁琪. 基于酪蛋白与多糖相互作用的产物制备及性能应用研究[D]. 重庆: 西南大学, 2021. [LIU Y Q. Study on the preparation and application of products based on the interaction between casein and polysaccharide[D]. Chongqing: Southwest University, 2021.]
- [28] MARTINS S, JONGEN W, BOEKEL M. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2000, 11(9-10): 364–373.
- [29] KENNEDY J F, KNILL C J. Maillard reactions in chemistry, food and health[J]. *Carbohydrate Polymers*, 1998, 27(3): 241–242.
- [30] SARKAR N, GHOSH S K, BANNERJEE S, et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview[J]. *Renewable Energy*, 2012, 37(1): 19–27.
- [31] ESTHER S, JUAN C A, MAR V, et al. Recent advances in the recovery and improvement of functional proteins from fish processing by-products: Use of protein glycation as an alternative method[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2009, 8(4): 332–344.
- [32] WANG S. Chemical hazards in thermally-processed foods [M]. Germany: Springer, 2019: 122–125.
- [33] AKIO K, RYUSUKE M, NAOTOSHI M, et al. Functional casein-polysaccharide conjugates prepared by controlled dry heating[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1992, 56(4): 567–571.
- [34] NAKAMURA S, KATO A, KOBAYASHI K. Bifunctional lysozyme-galactomannan conjugate having excellent emulsifying properties and bactericidal effect[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40(5): 735–739.
- [35] MELTRETTER J, SEEGER S, HUMENY A, et al. Site-specific formation of Maillard, oxidation, and condensation products from whey proteins during reaction with lactose[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(15): 6096–6103.
- [36] FRANÇOIS C, JEAN M C, DANIEL M, et al. Maillard glycation of β -lactoglobulin with several sugars: Comparative study of the properties of the obtained polymers and of the substituted sites[J]. *Dairy Science & Technology*, 2001, 81(5): 651–666.
- [37] FENAILLE F, MORGAN F, PARISOD V, et al. Solid-state glycation of beta-lactoglobulin by lactose and galactose: Localiza-

- tion of the modified amino acids using mass spectrometric techniques[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2004, 39(1): 16–28.
- [38] SILVAN J M, SREY C, AMES J M, et al. Glycation is regulated by isoflavones[J]. *Food & Function*, 2014, 5(9): 2036–2042.
- [39] 吕书宇. 酪蛋白基导电水凝胶的制备及其应用[D]. 长春: 长春工业大学, 2020. [LÜ S Y. Preparation and application of casein based conductive hydrogel[D]. Changchun: Changchun University of Technology, 2020.]
- [40] 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(2): 98–101. [SONG C L, CHEN J P, REN J. Effects of glycation cross-linking reaction on gelling and emulsifying properties of casein[J]. *China Oils and Fats*, 2017, 42(2): 98–101.]
- [41] 樊永康, 项婷, 吴晓琴, 等. 酶法糖基化修饰对酪蛋白结构及性质的影响[J]. *食品与营养科学*, 2019, 8(4): 296–303. [FAN Y K, XIANG T, WU X Q, et al. Effect of enzymatic glycosylation modifications on the structure and properties of casein[J]. *Hans Journal of Food and Nutrition Science*, 2019, 8(4): 296–303.]
- [42] 张铁华, 陈思如, 罗鸿远, 等. 一种糖基化酪蛋白天然大分子乳化剂的制备方法: 中国 202110399983[P]. 2021-06-18. [ZHANG T H, CHEN S R, LUO H Y, et al. A preparation method of natural macromolecular emulsifier of glycosylated casein: China 202110399983[P]. 2021-06-18.]
- [43] FONTES C C, JIMÉNEZ B P, MIRALLES B, et al. Development of polysaccharide-casein gel-like structures resistant to *in vitro* gastric digestion[J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 127: 107505.
- [44] 赵玉滨, 穆秋霞, 曲柳青, 等. 糖基化改性对酪蛋白酶解产物抗氧化活性的影响[J]. *食品与机械*, 2019, 35(10): 223–226, 231. [ZHAO Y B, MU Q X, QU L Q, et al. Effect of glycosylation modification on the antioxidant activity of casein-enzymatic hydrolysate[J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(10): 223–226, 231.]
- [45] GU F, KIM J M, HAYAT K, et al. Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein-glucose model system[J]. *Food Chemistry*, 2009, 117(1): 48–54.
- [46] HWA B, JY A, MIN Y A, et al. Antioxidant activity of Maillard reaction products from a Yak casein-glucose model system[J]. *International Dairy Journal*, 2019, 91: 55–63.
- [47] OH N S, LEE J Y, LEE H A, et al. Chemical characteristics and enhanced hepatoprotective activities of Maillard reaction products derived from milk protein-sugar system[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(2): 947–958.
- [48] KNASMULLER S, PARZEFALL W, SANYAL R, et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens[J]. *Mutation Research: International Journal on Mutagenesis, Chromosome Breakage and Related Subjects*, 1998, 402(1/2): 185–202.
- [49] 杨铮. 低聚糖糖基化法降低牛乳蛋白免疫原性的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010. [YANG Z. Study on reducing immunogenicity of milk protein by oligosaccharide glycosylation[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2010.]
- [50] WILSON J K, RUIZ L, DAVIDOWITZ G. Dietary protein and carbohydrates affect immune function and performance in a specialist herbivore insect (*Manduca sexta*)[J]. *Physiol Biochem Zool*, 2019, 92(1): 58–70.
- [51] AWAD A B, FINK C S. Phytosterols as anticancer dietary components: Evidence and mechanism of action[J]. *Journal of Nutrition*, 2000, 130(9): 2127–2130.
- [52] SHI J, ZHAO X H. *In vitro* immuno-modulatory ability of tryptic caseinate hydrolysate affected by prior caseinate glycation using the Maillard reaction or transglutaminase[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2017, 28(6): 1029–1045.
- [53] 樊永康, 刘健华, 刘尧, 等. 负载槲皮素的酶法糖基化酪蛋白复合纳米粒子的构建与表征[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(8): 49–57. [FAN Y K, LIU J H, LIU Y, et al. Construction and characterization of quercetin-loaded enzymatic glycosylated casein composite nanoparticles[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(8): 49–57.]
- [54] 闵敏. 糖基化酪蛋白的制备、及其性能和应用研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2017. [MIN M. Preparation, properties and application of glycosylated casein[D]. Hangzhou: Zhejiang Business University, 2017.]
- [55] LIXIN W, SHUANGLING Z, WENPING J, et al. Ability of casein hydrolysate-carboxymethyl chitosan conjugates to stabilize a nanoemulsion: Improved freeze-thaw and pH stability[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101(Apr.): 105452.1–105452.8.
- [56] WANG X P, ZHAO X H. Prior lactose glycation of caseinate via the Maillard reaction affects *in vitro* activities of the pepsin-trypsin digest toward intestinal epithelial cells[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(7): 5125–5138.
- [57] XU W, ZHAO X. Structure and property changes of the maltose-glycated caseinate prepared through the Maillard reaction in an ionic liquid medium[J]. *LWT-Food Science & Technology*, 2019, 99: 483–489.
- [58] SHI J, ZHANG Q, ZHAO X H, et al. The impact of caseinate oligochitosan-glycation by transglutaminase on amino acid compositions and immune-promoting activity in BALB/c mice of the tryptic caseinate hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2021, 350(4): 129302.