

引用格式: 廖彦超, 刘妍, 张钧橙, 等. 糖基化改性对核桃肽结构及功能特性的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 42(X): 1-11. LIAO Yanchao, LIU Yan, ZHANG Juncheng, et al. Effect of glycosylation modification on structure and functional properties of walnut peptides[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2025, 42(X): 1-11.

糖基化改性对核桃肽结构及功能特性的影响

廖彦超^{1,2,3}, 刘妍^{2,3}, 张钧橙^{1,2,3}, 闵伟红^{2,3}

(1. 吉林农业大学 食品科学与工程学院, 吉林 长春 130118; 2. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300; 3. 浙江农林大学 食品与健康学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】探究干热条件下核桃肽 (walnut peptides, WP) 与碳水化合物的美拉德反应对改性前后结构的影响, 分析了美拉德反应前后的抗氧化活性、热稳定性等功能特性, 为核桃肽在食品工业中的应用提供理论依据。【方法】采用干热法将核桃肽分别与阿拉伯木聚糖 (arabinoxylan, AX) 和低聚木糖 (xylo-oligosaccharides, XOS) 进行美拉德反应, 以接枝度、褐变指数反映糖基化程度, 测定不同碳水化合物对核桃肽的分子量、微观结构、粒径、热稳定性、抗氧化活性等指标的影响。【结果】阿拉伯木聚糖是以阿拉伯糖和木糖为主要成分的高分子量多糖, 核桃肽主要由小于 2 000 Da 的肽段组成。核桃肽与阿拉伯木聚糖进行糖基化反应后, 寡肽含量得到了提高, 反之, 与低聚木糖进行糖基化反应后, 寡肽含量却降低了。核桃肽美拉德产物的平均粒径减小, 总巯基和游离巯基质量摩尔浓度增加, 结构更加无序松散, 热稳定性以及抗氧化活性都得到了提高。【结论】糖基化有利于改善核桃肽的结构和功能性质, 可提升核桃肽在食品工业中应用的可行性。图 7 表 2 参 45

关键词: 美拉德; 糖基化; 核桃肽; 功能特性

中图分类号: TS201 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2025)00-0001-11

Effect of glycosylation modification on structure and functional properties of walnut peptides

LIAO Yanchao^{1,2,3}, LIU Yan^{2,3}, ZHANG Juncheng^{1,2,3}, MIN Weihong^{2,3}

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China; 2. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China; 3. College of Food and Health, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to explore the effects of the Maillard reaction between walnut peptides (WP) and carbohydrates under dry heat conditions on the structural modifications before and after the reaction. It also analyzed the functional characteristics such as antioxidant activity and thermal stability before and after the Maillard reaction, providing a theoretical basis for walnut peptides application in the food industry. [Method] The Maillard reaction between walnut peptides and arabinoxylan (AX) or xylo-oligosaccharides (XOS) was conducted using dry heat. The degree of grafting and the browning index were used to reflect the extent of glycosylation. The impacts of different carbohydrates on the molecular weight, microstructure, particle size, thermal stability, and antioxidant activity of walnut peptides were measured. [Result] Arabinoxylan is a high-molecular-weight polysaccharide mainly composed of arabinose and xylulose, while walnut peptides are primarily composed of peptide fragments less than 2 000 Da. After glycosylation with arabinoxylan, the content

收稿日期: 2024-11-25; 修回日期: 2025-01-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (22378368)

作者简介: 廖彦超 (ORCID: 0009-0003-9170-5697), 从事功能活性蛋白肽功能评价研究。E-mail: 1795751436@qq.com。通信作者: 闵伟红 (ORCID: 0000-0002-6093-2104), 教授, 博士, 从事功能活性蛋白肽高效制备、功能评价、营养机制、靶向递送及产品创制研究。E-mail: minwh2000@zafu.edu.cn

of oligopeptides increased, whereas it decreased when reacting with xylo-oligosaccharides. The average particle size of the Maillard products of walnut peptides decreased, while the total and free thiol contents increased, leading to a more disordered and loose structure. Furthermore, both thermal stability and antioxidant activity improved. [Conclusion] Glycosylation is beneficial for improving the structure and functional properties of walnut peptides, and can enhance the feasibility of their application in the food industry. [Ch, 7 fig. 2 tab. 45 ref.]

Key words: Maillard; glycosylation; walnut peptides; functional properties

麸皮是小麦 *Triticum aestivum* 加工工业的副产物, 约占小麦籽粒质量的 26%。小麦麸皮中含有丰富的阿拉伯木聚糖, 占小麦麸皮干质量的 18.8%~21.4%^[1]。虽然小麦麸皮在食品工业中有应用, 但是大部分小麦麸皮被用作动物饲料或酿造原料。此外, 小麦麸皮未充分利用及产生的废物也会造成环境问题。

全球范围内, 中国的核桃 *Juglans regia* 种植量稳居首位。随着核桃产业的迅猛发展, 核桃榨油副产物——核桃饼粕数量急剧增加。这些副产品不仅对环境造成了负担, 而且在一定程度上阻碍了核桃类产品的进一步开发和利用^[2]。为了突破这一瓶颈, 利用核桃饼粕生产核桃肽, 是对核桃饼粕的综合利用, 实现核桃饼粕的价值增值、开辟核桃饼粕的应用途径, 成为核桃加工新的利润增长点, 但是制备核桃活性多肽在提高核桃粕工业价值的同时, 也会使生产成本大幅提升^[3]。

美拉德反应是还原糖的羰基与氨基酸、肽或蛋白质的氨基之间复杂的非酶褐变反应^[4-5], 具有绿色、高效、温和等优点, 被认为是修饰天然蛋白质结构和功能特性的最有前途的方法之一^[6], 可以改善蛋白或肽的乳化性、发泡性; 增加溶解度、抗菌活性、抗氧化性、热稳定性; 改善食物质地、风味等^[7]。目前大多研究集中在大豆肽、鱼肽等肽类与碳水化合物的美拉德反应方面, 但有关核桃肽的研究较少。因此, 本研究以核桃肽 (WP)、阿拉伯木聚糖 (AX) 和低聚木糖 (XOS) 为原料, 研究阿拉伯木聚糖、核桃肽及其美拉德反应产物理化性质的变化以及糖基化对核桃肽功能特性的影响, 为核桃肽功能性食品的开发提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

材料主要包括麸皮 (徐州宏昌, 中国)、核桃粕 (长春, 中国)、低聚木糖 (上海源叶, 中国)

1.2 方法

1.2.1 样品的制备 基于前期研究结果^[8], 核桃肽通过酶促水解制备。按质量体积比为 9:100 的料液比在核桃粉中加入去离子水, 进行 15 min 超声后, 在 90 °C 条件下处理 15 min, 冷却至 50 °C, 用 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠调至 pH 9.0, 加入 7 000 × 16.67 nkat·g⁻¹ 的碱性蛋白酶, 在 50 °C 下搅拌 2 h, 沸水浴 15 min 以灭活酶, 通过 4 500 r·min⁻¹ 离心 15 min 分离水解物的可溶性和不溶性部分, 将核桃肽的可溶性部分冷冻干燥备用。

基于前期研究结果^[9], 阿拉伯木聚糖通过碱提醇沉法制备。按质量体积比为 1:20 的料液比在麸皮中加入去离子水, 加入耐高温的 α -淀粉酶, 在 95 °C、pH 6.0 条件下持续搅拌 3 h。冷却至室温后加入糖化酶, 然后在 37 °C、pH 4.5 条件下搅拌过夜, 离心得到沉淀, 烘干。沉淀按质量体积比为 1:20 的料液比加入 0.2 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠溶液, 常温搅拌提取 12 h。离心并收集上清液, 上清液 pH 调至 4.0。上清液中加入无水乙醇, 离心得到粗多糖沉淀, 沉淀加入适量去离子水复溶, 加入蛋白酶持续搅拌 4 h, 然后灭活 10 min 并再次离心去除蛋白。取上清液进行透析后, 经离心除去不溶性多糖, 收集上清液进行旋蒸浓缩后冻干, 得到阿拉伯木聚糖样品, 保存备用。

将 1 g 核桃肽、2 g 阿拉伯木聚糖或低聚木糖溶于 100 mL 去离子水中, 之后将样品进行冻干, 收集冻干粉, 放置于预热到 80 °C 的干燥器中, 利用饱和氯化钾溶液控制体系内相对湿度为 79%, 反应 5 h 得到核桃肽的糖基化产物。将产物加蒸馏水溶解, 进行透析和离心, 以去除游离氨基酸和不溶

性成分。

1.2.2 理化性质的测定 (1) 蛋白质量分数测定参考 GB 5009.5—2016 凯氏定氮法^[10], 根据标准曲线, 采用 BCA 试剂盒法进行测定。

(2) 总糖质量分数测定使用苯酚-硫酸法^[11], 根据标准曲线, 测定波长 490 nm 处的吸光度。

(3) 溶解度测定: 称取 10 mg 的阿拉伯木聚糖、核桃肽或糖基化产物于 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 去离子水, 在室温下混合 90 min(每 30 min 摇匀 5 s), 9 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 去除上清液, 将离心管及内部沉淀真空冷冻干燥后称量^[12]。每份样品平行 3 次。

(4) 根据标准曲线, 相对分子量测定采用高效液相色谱仪 (HPLC)。①多糖分子量测定^[13]: 以不同分子量的葡聚糖 (分子量分别为 10、40、70、500、2 000 kDa) 作为标准品。色谱条件如下: Ultrahydrogel Column Linear 凝胶色谱柱 (10 μm, 7.8 mm×300.0 mm), 柱温 40 °C, 流速 0.6 mL·min⁻¹, 流动相为 0.1 mol·L⁻¹ 的硝酸钠溶液, 进样量 20 μL, 运行时间 25 min。②肽分子量测定^[14]: 以不同分子量的物质作为标准品。色谱条件如下: TSKgel 2000 SWXL 色谱柱 (5 μm, 7.8 mm×300.0 mm), 柱温 30 °C, 流速 0.5 mL·min⁻¹, 流动相为 V(乙腈):V(水):V(三氟乙酸)=450:550:1, 进样量 20 μL, 运行时间 40 min。

(5) 单糖组成成分的测定采用气相色谱法测定阿拉伯木聚糖的单糖组成, 参考 WANG 等^[15] 的方法, 并稍作修改。以标准单糖 (鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、半乳糖、葡萄糖) 做混合标准单糖简称混标。称取 5 mg 阿拉伯木聚糖或标准品于三氟乙酸中, 120 °C 水解 4 h 后用硼氢化钠还原, 再经 V(乙酸酐):V(吡啶)=1:1 进行乙酰化, 过 0.22 μm 有机滤膜待测。测定参数如下: HP-5MS 色谱柱, 进样口温度 250 °C, 进样量 2 μL, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 氮气载气分流体积比为 1:20。

1.2.3 接枝度和游离氨基测定 参考文献 [16] 的方法测定接枝度。精准称取 40 mg 的邻苯二甲醛 (OPA) 溶于 1 mL 的甲醇中, 与质量浓度为 20% 的十二烷基硫酸钠 (SDS) 2.5 mL、0.1 mol·L⁻¹ 的四硼酸钠 25.0 mL 以及 100.0 μL 的 β-巯基乙醇混合, 然后用蒸馏水定容至 50.0 mL, 得到 OPA 试剂, 现配现用。测定时, 在 200 μL 样品溶液加入 4 mL 的 OPA 试剂, 室温避光保存 5 min。然后测定波长 340 nm 处的吸光度。以 OPA 试剂中加入 200 μL 蒸馏水的混合物作为空白。同时, 用 L-亮氨酸标准溶液 (0~0.5 g·L⁻¹) 校准曲线计算游离氨基质量浓度。

1.2.4 褐变指数测定 糖基化产物用蒸馏水分别稀释至 0.05 和 0.50 g·L⁻¹, 以蒸馏水作为空白对照, 分别在波长 294 和 420 nm 下测定吸光度, 重复 3 次取平均值。波长 294 nm 处的吸光度表示美拉德反应的中间产物含量; 波长 420 nm 处的吸光度表示反应过程中最终产物含量, 例如类黑素^[17]。

1.2.5 粒径和 Zeta 电位分析 粒径是影响肽功能特性的重要因素之一, 因此分析糖基化改性前后核桃肽的平均粒径。使用 Malvern Mastersizer 2000 型激光粒度仪和 Hydro 2000S 取样装置测定样品的平均粒径。使用乙醇作为分散剂材料来读取样品, 每个样品平行测量 3 次, 最后取平均值。Zeta 电位是表征分散系稳定性的重要指标之一。使用 Malvern Zetasizer Nano-Z 设备测量样品的 Zeta 电位, 以 2 g·L⁻¹ 的质量浓度制备样品溶液, 在室温下测定溶液的 Zeta 电位, 每个样品平行测量 3 次, 最后取平均值^[18]。

1.2.6 扫描电镜分析 将待测样品涂抹于导电胶的表面, 喷涂约 10 nm 的电镀层, 在 15 kV 加速电压下进行电镜扫描, 放大 500 倍^[19], 观察阿拉伯木聚糖、低聚木糖、核桃肽及其糖基化产物的微观形态。

1.2.7 差示扫描量热分析 差示扫描量热法是评估蛋白质、肽等物质热稳定性的常用技术手段, 可通过变性温度 (T_d) 和焓值变化 (ΔH) 来表示稳定性的大小。 T_d 用于描述蛋白的热稳定性, 而 ΔH 则表示克服变性过程中非共价所需的能量。在通氮气条件下, 利用差示扫描量热仪对样品的热稳定性进行测定。将 5~10 mg 样品装入 DSC 坩埚中, 采用铝片进行密封处理。仪器参数设定如下^[20]: 升温速率为 10 °C·min⁻¹, 温度为 25~110 °C, 气体流速为 50 mL·min⁻¹。以空铝坩埚作为空白对照。

1.2.8 巯基及二硫键测定 在糖基化反应中, 游离巯基和二硫键交换在蛋白质交联和聚集中起着重要作用。参考文献 [21], 准确称取 40 mg 5,5-硫硝基苯甲酸溶于 10 mL 的 Tris-甘氨酸缓冲液 (0.086 mol·L⁻¹ Tris, 0.090 mol·L⁻¹ 甘氨酸, 4.000 mmol·L⁻¹ 乙二胺四乙酸, pH 8.0) 中, 配制成 Ellman 试剂。用 Tris-HCl 缓冲液将样品配制成质量浓度为 6 g·L⁻¹ 的溶液, 在 10 000 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min。吸取 2 mL 离心后的样品, 加入 80 μL Ellman 试剂混均, 反应 5 min, 测定波长 412 nm 处的吸光度, 即为游离

巯基质量摩尔浓度。吸取 2 mL 样品上清液, 加入 β -巯基乙醇溶液 (体积分数为 0.2%) 混匀, 反应 2 h 后加入 4 mL 三氯乙酸溶液 (质量浓度为 12%), 反应 1 h, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min, 再用三氯乙酸溶液重复洗涤沉淀, 将沉淀用 3 mL Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 溶解, 测定波长 412 nm 处的吸光度, 即为总巯基质量摩尔浓度。

1.2.9 抗氧化活性测定 ABTS 自由基清除能力的测定参考 LIU 等^[22] 的方法, DPPH 自由基清除能力的测定参考 SUN 等^[23] 的方法, 羟基自由基清除能力的测定参考 ZHANG 等^[24] 的方法, 氧自由基吸收能力 (ORAC) 的测定参考 ZHANG 等^[25] 的方法。

1.3 数据分析

采用 SPSS 26.0 进行 *t* 检验和方差分析, 结果以平均值 \pm 标准差表示, 显著水平为 0.05。利用 Origin 2022 作图。

2 结果与分析

2.1 阿拉伯木聚糖的理化性质分析

通过高效液相色谱图 (图 1A) 可知: 信号峰在 13.56 min, 主要为高相对分子质量组分。通过气相色谱图 (图 1B) 可知: 混标从左至右出峰顺序为阿拉伯糖 (Ara)、木糖 (Xyl)、葡萄糖 (Glu)、半乳糖 (Gal), 发现阿拉伯木聚糖主要由阿拉伯糖、木糖、葡萄糖和半乳糖组成。从表 1 可见: 阿拉伯木聚糖的蛋白和总糖质量分数分别为 0.73% 和 81.39%, 相对分子量为 413.45 kDa, 阿拉伯糖和木糖的质量分数之和约占整体的 90%。

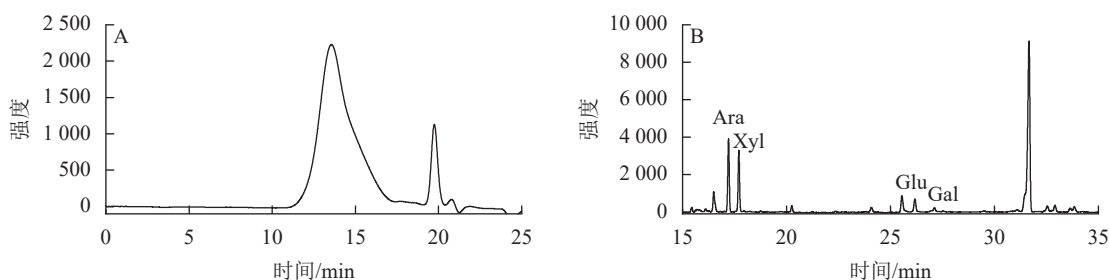


图 1 阿拉伯木聚糖的高效液相色谱图 (A) 和气相色谱图 (B)
Figure 1 High performance liquid chromatogram (A) and gas chromatogram (B) of arabinoxylan

表 1 阿拉伯木聚糖的理化性质

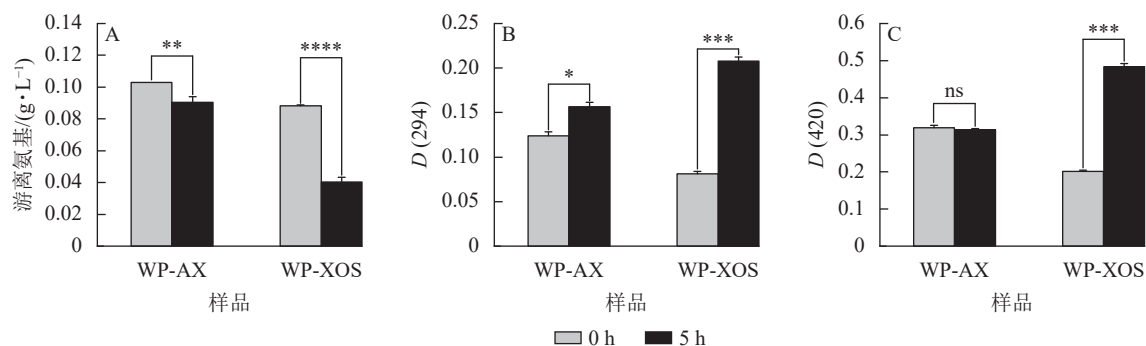
Table 1 Physical and chemical properties of arabinoxylan

样品	相对分子量/kDa	总糖质量分数/%	蛋白质量分数/%	溶解度/%	各单糖质量分数/%			
					阿拉伯糖	木糖	葡萄糖	半乳糖
阿拉伯木聚糖	413.45 \pm 1.98	81.39 \pm 2.05	0.73 \pm 0.11	72.00 \pm 2.65	61.52 \pm 2.10	27.27 \pm 2.48	8.48 \pm 0.45	2.73 \pm 0.07

2.2 美拉德反应程度分析

为确定核桃肽-阿拉伯木聚糖的反应产物 (WP-AX) 和核桃肽-低聚木糖的反应产物 (WP-XOS) 的美拉德反应程度, 对接枝度和褐变程度进行了分析。如图 2A 所示: WP-AX 在美拉德反应前后的游离氨基质量浓度分别为 0.10 和 0.09 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, WP-XOS 在美拉德反应前后的游离氨基质量浓度分别为 0.09 和 0.04 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 表明游离氨基质量浓度在美拉德反应后有所降低。经计算, WP-AX、WP-XOS 的接枝度分别为 12.31% \pm 3.52% 和 54.46% \pm 3.26%, 表明核桃肽中分别有 12.31% 和 54.46% 的游离氨基在美拉德反应后分别与阿拉伯木聚糖和低聚木糖结合。

D(294) 和 *D*(420) 能够分别反映美拉德反应中无色中间体化合物生成量和糖基化产物褐变程度^[26]。吸光度越低, 褐变程度越小, 说明糖基化反应程度越小, 反之越大。如图 2B 所示: WP-AX 和 WP-XOS 的中间产物显著上升 ($P < 0.05$), 而且 WP-XOS 比 WP-AX 产生了更多的中间产物——还原酮和高级产物类黑素。如图 2C 示: WP-XOS 的褐变程度具有显著差异 ($P < 0.05$), 且 WP-XOS 的褐变程度明显高于 WP-AX。

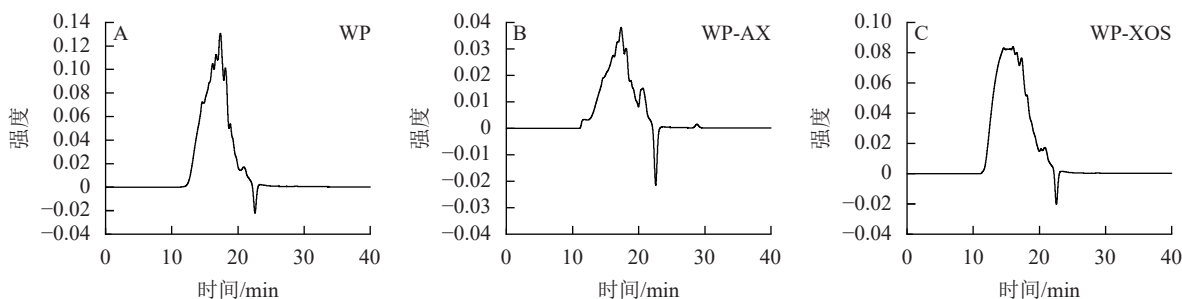


WP-AX为核桃肽和阿拉伯木聚糖的美拉德反应产物；WP-XOS为核桃肽和低聚木糖的美拉德反应产物。*表示 $P<0.05$ ；**表示 $P<0.01$ ；***表示 $P<0.001$ ；****表示 $P<0.0001$ ；ns表示差异不显著。

图 2 美拉德反应前后对游离氨基 (A)、中间产物生成量 (B) 和褐变程度 (C) 的影响
Figure 2 Effect of Maillard reaction on free amino groups (A), intermediate product formation (B) and browning degree (C)

2.3 分子量分布分析

核桃肽美拉德反应后的分子量分布如图 3 所示。图 3A 为核桃肽分子量的 HPLC 洗脱，核桃肽中存在多种大小不一的多肽片段，其分子量主要分布在 3 000 Da 以下，其中小于 2 000 Da 的占 64.35%，小于 1 000 Da 的占 37.28%，表明核桃肽富含由 2~10 个氨基酸残基组成的寡肽。图 3B 为 WP-AX 分子量的 HPLC 洗脱，WP-AX 小于 1 000 Da 的占 43.59%，相比于核桃肽，WP-AX 寡肽部分的含量有一定程度的提高。图 3C 为 WP-XOS 分子量的 HPLC 洗脱，而 WP-XOS 小于 1 000 Da 的只占 26.30%，但分子量大于 3 000 Da 部分占 40.20%，相对于核桃肽有明显的提高。这 2 种不同的情况可能是因为肽在美拉德反应过程中存在 2 种转化方式：①肽直接参与美拉德反应生成产物；②通过热降解形成小分子肽，这些小分子肽再参加美拉德反应生成产物，说明美拉德反应的最佳肽段可能存在原料差异性。



AX为阿拉伯木聚糖；WP-AX为核桃肽和阿拉伯木聚糖的美拉德反应产物；WP-XOS为核桃肽和低聚木糖的美拉德反应产物。

图 3 WP(A)、WP-AX(B)、WP-XOS(C) 的高效液相色谱图 (HPLC)

Figure 3 High performance liquid chromatograms (HPLC) of WP (A), WP-AX (B), and WP-XOS (C)

2.4 巯基及二硫键质量摩尔浓度分析

如表 2 所示：与核桃肽相比，引入碳水化合物进行糖基化后，WP-AX 和 WP-XOS 的游离巯基和总巯基显著增加 ($P<0.05$)。与 WP-AX 相比，WP-XOS 的二硫键质量摩尔浓度更高 ($P<0.05$)。因此，可推断出 WP-XOS 的结构更稳定。

2.5 粒径分布和 Zeta 电位分析

由图 4A 可知：未处理的核桃肽颗粒相对较大，经过糖基化反应后，WP-AX 和 WP-XOS 的粒径显著降低 ($P<0.05$)，分别为 66.45 和 10.93 μm ，这可能是核桃肽与碳水化合物共价结合后，其结构发生了变化，从而使原有的片状结构被破坏，形成粒径更小的体系。

由图 4B 可知：WP-AX 的 Zeta 电位绝对值显著低于 WP-XOS ($P<0.05$)，这可能是引入的阿拉伯木聚糖的 Zeta 电位绝对值低于低聚木糖 ($P<0.05$)，说明 WP-XOS 溶液的稳定性比 WP-AX 好。

2.6 扫描电镜分析

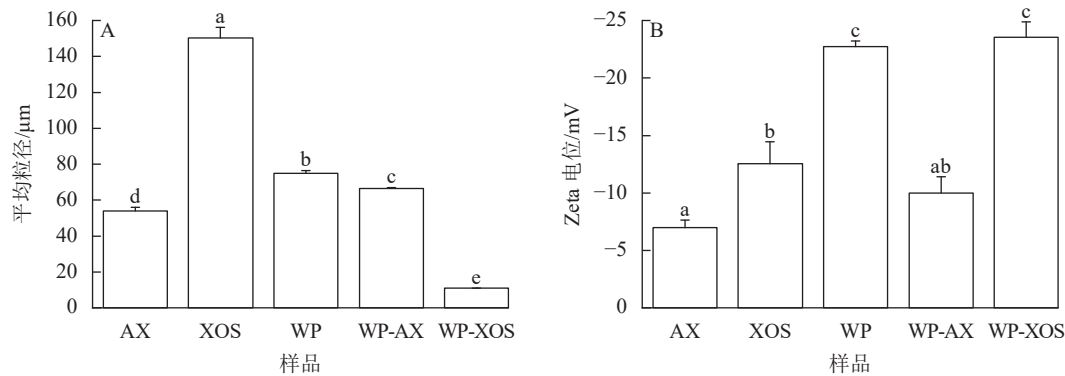
由图 5 所示：阿拉伯木聚糖呈现丝状的纤维结构，没有规律性；低聚木糖表面光滑，呈相互连接的状态；核桃肽呈现不同大小的片状结构。经过糖基化反应后，WP-AX 和 WP-XOS 呈丝状分支结构，这

表2 WP、WP-AX 和 WP-XOS 的巯基及二硫键质量摩尔浓度分析

Table 2 Analysis of thiol and disulfide bond content in WP, WP-AX, and WP-XOS

样品	总糖质量分数/%	蛋白质质量分数/%	溶解度/%	总巯基/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	游离巯基/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	二硫键/($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)
WP	9.96±0.24 c	77.28±0.10 a	99.68±0.55 a	7.49±0.01 c	5.66±0.25 c	0.91±0.12 b
WP-AX	36.27±0.77 a	23.82±0.30 c	94.75±1.19 b	24.79±0.02 a	23.01±0.28 a	0.89±0.13 b
WP-XOS	19.18±0.75 b	50.15±1.11 b	96.35±1.56 b	10.97±0.03 b	7.18±0.23 b	1.90±0.10 a

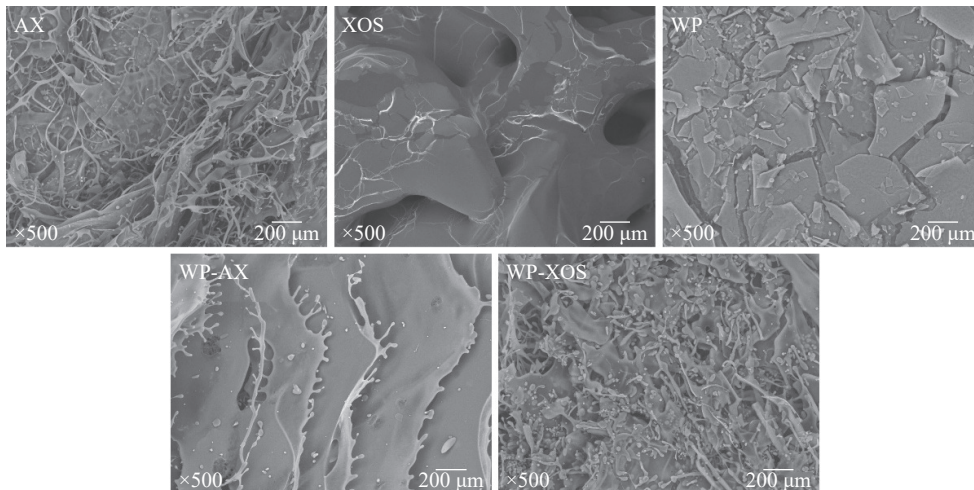
说明: WP 为核桃肽; WP-AX 为核桃肽和阿拉伯木聚糖的美拉德反应产物; WP-XOS 为核桃肽和低聚木糖的美拉德反应产物。同列不同小写字母表示不同样品间差异显著 ($P<0.05$)。



AX为阿拉伯木聚糖; XOS为低聚木糖; WP为核桃肽; WP-AX为核桃肽和阿拉伯木聚糖的美拉德反应产物; WP-XOS为核桃肽和低聚木糖的美拉德反应产物。不同字母表示不同样品间差异显著($P<0.05$)。

图4 不同样品美拉德反应前后的粒径图(A)和Zeta电位图(B)

Figure 4 Particle size plots (A) and Zeta potential plots (B) before and after the Maillard reaction of different samples



AX为阿拉伯木聚糖; XOS为低聚木糖; WP为核桃肽; WP-AX为核桃肽和阿拉伯木聚糖的美拉德反应产物; WP-XOS为核桃肽和低聚木糖的美拉德反应产物。

图5 不同样品美拉德反应前后的扫描电镜图

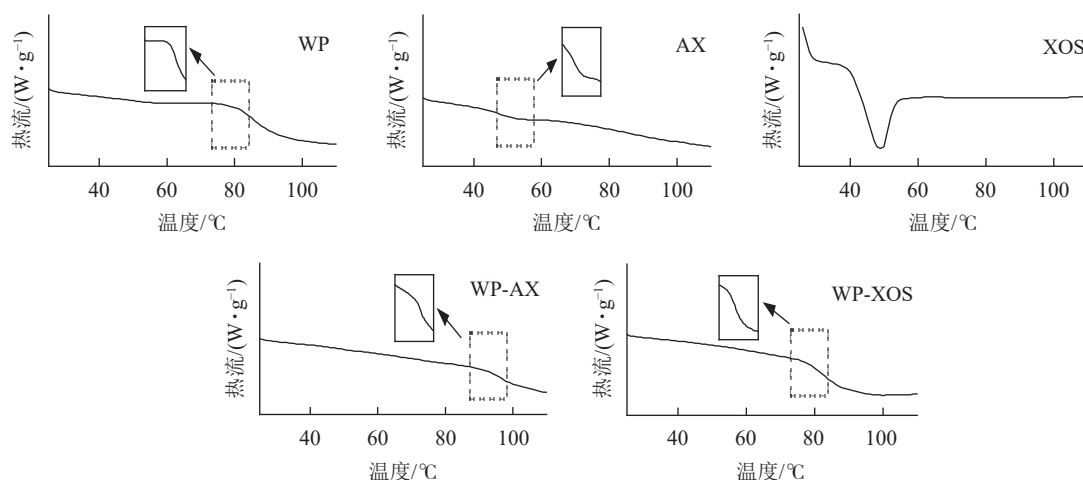
Figure 5 Scanning electron microscopy images of different samples before and after Maillard reaction

可能是因为核桃肽分别与阿拉伯木聚糖和低聚木糖发生了共价结合, 导致核桃肽的结构遭到破坏, 分子充分展开, 从而使核桃肽从片状结构变为片状带有丝状分支的结构。因为 WP-XOS 的接枝程度比 WP-AX 高, 所以表现出更多的丝状无序结构。

2.7 热稳定性分析

如图6所示: WP、AX 和 XOS 的变性温度 (T_d) 分别为 82.18、53.23、48.52 $^{\circ}\text{C}$, 焓值变化 (ΔH) 分别为 3.11、0.60、9.66 $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$, WP-AX 和 WP-XOS 的玻璃化转变温度 (T_g) 为 95.78、83.53 $^{\circ}\text{C}$ 。WP 经过糖基化改性后, WP-AX 和 WP-XOS 并未出现热变形峰, 而是出现了玻璃化转变峰, 热变形峰是样品不稳定

或者样品结构破坏带来的，这是不可逆的，但是玻璃化转变是可逆的，说明经糖基化改性后热稳定性增加。



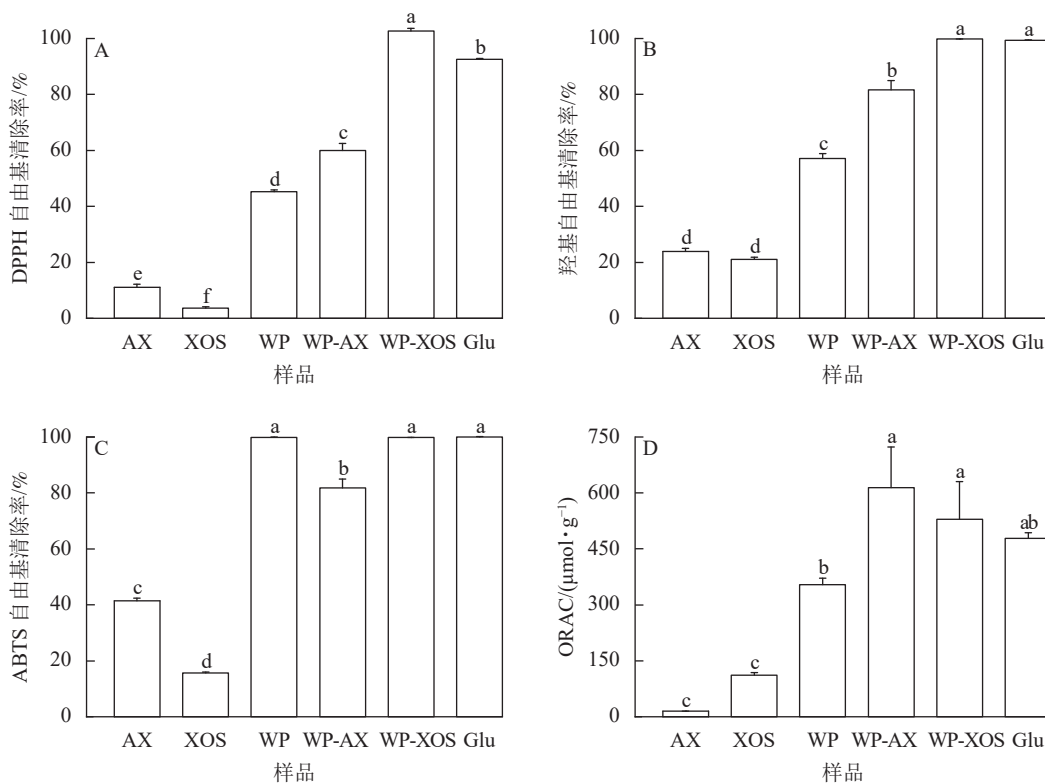
WP为核桃肽；AX为阿拉伯木聚糖；XOS为低聚木糖；WP-AX为核桃肽和阿拉伯木聚糖的美拉德反应产物；WP-XOS为核桃肽和低聚木糖的美拉德反应产物。

图 6 不同样品美拉德反应前后的热分析图谱

Figure 6 Thermal analysis profiles of different samples before and after the Maillard reaction

2.8 抗氧化活性分析

如图 7A 所示：与核桃肽相比，当阿拉伯木聚糖和低聚木糖分别与核桃肽共价结合时，产物的清除能力显著提升 ($P < 0.05$)。与 WP-AX 相比，WP-XOS 表现出了更强的自由基清除能力 ($P < 0.05$)。



AX为阿拉伯木聚糖；XOS为低聚木糖；WP为核桃肽；WP-AX为核桃肽和阿拉伯木聚糖的美拉德反应产物；WP-XOS为核桃肽和低聚木糖的美拉德反应产物；Glu为谷胱甘肽，作为阳性对照组。

图 7 不同样品美拉德反应前后的抗氧化活性比较

Figure 7 Comparison of antioxidant activity before and after Maillard reaction of different samples

如图 7B 所示：当阿拉伯木聚糖和低聚木糖分别与核桃肽进行糖基化反应后，其羟基自由基清除能力得到了显著提高 ($P < 0.05$)，同时，WP-XOS 表现出了更强的自由基清除能力 ($P < 0.05$)。

如图 7C 所示：由于核桃肽本身的 ABTS 自由基清除能力已经很高，当阿拉伯木聚糖和低聚木糖分别与核桃肽进行糖基化反应后，WP-AX 和 WP-XOS 并未表现出更强的自由基清除能力。这是因为 WP-AX 的接枝度较低，引入了清除能力较低的阿拉伯木聚糖，从而导致了 WP-AX 比核桃肽表现出了更弱的自由基清除能力 ($P < 0.05$)。

如图 7D 所示：与核桃肽相比，经过糖基化后，WP-AX 和 WP-XOS 的氧自由基吸收能力 (ORAC) 显著提升 ($P < 0.05$)，其中 WP-AX 表现出了更强的氧自由基吸收能力 ($P < 0.05$)。

3 讨论

现阶段大量研究发现：阿拉伯木聚糖具有抗氧化、抗炎和改善记忆等多种生物活性，是蛋白质和多肽等生物活性物质的理想载体^[27-29]。低聚木糖生物活性范围较宽，具有抗氧化活性、抗菌、抗感染、抗过敏以及抗炎特性，能选择性增加细胞活性，进行免疫调节等^[30]，是一种理想安全的食品原料^[31]。此外核桃肽的生物活性潜力巨大，具有抗氧化、降血压、提高免疫活性、抗疲劳和改善记忆等功效^[32]。美拉德反应可以提高蛋白质和肽的抗氧化、乳化等性能^[33]。

本研究表明：核桃肽 2 种不同底物的美拉德反应导致了终产物中肽分子量分布的不同变化，说明小分子肽和碳水化合物的交联作用跟大分子肽的热降解作用有关^[34]。核桃肽糖基化后，游离巯基和总巯基质量摩尔浓度都得到了显著增加，一方面，可能是由于核桃肽在糖基化反应过程中，空间结构改变，使得嵌入内部的游离巯基暴露，从而质量摩尔浓度增加^[35]；另一方面，可能是糖基化反应导致二硫键断裂，使二硫键转化成新的巯基^[36]，游离巯基质量摩尔浓度随着反应的加深而增加，这与现有的研究结果一致^[37]。美拉德反应后样品粒径均减小，这是由于核桃肽与碳水化合物的结合改善了肽的热变性，破坏了表面水合层，从而使得粒径下降^[38]；也有可能是在糖基化反应过程中，肽的表面电荷减少，肽和碳水化合物之间的静电相互作用减少，导致粒径减小^[39]。有研究表明：糖基化显著降低了肌源性纤维连接蛋白的粒径，表明共价接枝可以有效抑制加热过程中的蛋白质聚集^[40]。通过扫描电镜发现糖基化反应后，出现了纤维结构，缀合物的结构变得更加无序，这与已有的研究结果一致^[41]。通过差示扫描热分析发现：美拉德反应能提高肽的热稳定性，缀合物在 110 °C 内未出现热变形，这可能得益于疏水的相互作用和氢键的增加^[42]。有研究表明：蛋白质与碳水化合物经过糖基化后，变性温度都有不同程度的提高，可见，可通过提供碳水化合物来增加蛋白质的热稳定性或三级构象的稳定性^[43]。将核桃肽分别与阿拉伯木聚糖和低聚木糖进行美拉德反应，成功提高了核桃肽的抗氧化活性，这可能与非挥发性美拉德中间产物还原酮和高级阶段产物蛋白黑素具有较强的抗氧化活性有关同时，也与挥发性含氮、硫的杂环化合物等低分子量物质较强的抗氧化性能有关^[44-45]。本研究通过美拉德反应制备的糖肽，在降低肽成本的同时，可提高肽的功能特性，可为以糖肽为原料的保健品或功能食品的应用提供数据支持。

4 结论

本研究表明：WP-XOS 的接枝度和褐变程度都比 WP-AX 高。核桃肽美拉德产物的平均粒径降低，负电荷降低，活性巯基质量摩尔浓度增大。扫描电镜结果表明：碳水化合物的加入使肽的片状结构更加松散，呈现丝状分支结构。热分析图谱显示：核桃肽的变性温度为 82.18 °C，其美拉德反应产物并未出现热变形的现象。此外，WP-AX、WP-XOS 的 DPPH 自由基清除率、羟基自由基清除率和 ORAC 都比核桃肽显著提高了；而 ABTS 自由基清除率由于核桃肽本身就拥有较高的清除能力，所以并未得到提高，反而 WP-AX 由于引入了阿拉伯木聚糖且接枝度低，导致其 ABTS 自由基清除率比核桃肽低。综上所述，糖基化改性核桃肽是提升其热稳定性和抗氧化性的有效途径，可为核桃肽在食品工业生产中的应用提供参考依据。

5 参考文献

- [1] ZHOU Sumei, LIU Xiuzhen, GUO Yan, *et al.* Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, **81**(4): 784-789.
- [2] 刘润民, 魏冰, 宁德鲁, 等. 核桃肽生产工艺的探讨 [J]. *粮食与食品工业*, 2019, **26**(3): 38-40.

- LIU Runmin, WEI Bing, NING Delu, *et al.* Study on the production technology of walnut peptide [J]. *Cereal & Food Industry*, 2019, **26**(3): 38–40.
- [3] 韦雅虹. 酶解法制备核桃肽及其相关产品开发[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2024.
WEI Yahong. *Preparation of Walnut Peptide by Enzymatic Hydrolysis and Development of Related Products*[D]. Ala'er: Tarim University, 2024.
- [4] FU Jingjing, HE Fanyu, ZHU Xingtong, *et al.* Structural characteristics and antioxidant activity of Chinese giant salamander enzymatic hydrolysate-glucose conjugates induced by ultrasound Maillard reaction[J/OL]. *Food Bioscience*, 2024, **58**: 103654[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.fbio.2024.103654](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103654).
- [5] SHAKOOR A, ZHANG Chenping, XIE Jianchun, *et al.* Maillard reaction chemistry in formation of critical intermediates and flavour compounds and their antioxidant properties[J/OL]. *Food Chemistry*, 2022, **393**: 133416[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.foodchem.2022.133416](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133416).
- [6] KE Chuxin, LI Liang. Influence mechanism of polysaccharides induced Maillard reaction on plant proteins structure and functional properties: a review[J/OL]. *Carbohydrate Polymers*, 2023, **302**: 120430[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.carbpol.2022.120430](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120430).
- [7] OLIVER C M, MELTON L D, STANLEY R A. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: a review [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2006, **46**(4): 337–350.
- [8] 崔玲玉. 长白山核桃蛋白肽的制备及功能活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016.
CUI Lingyu. *Preparation and Functional Activity of Walnut Protein Peptide from Changbai Mountain*[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016.
- [9] GUO Rui, XU Zhongxiang, WU Shengfang, *et al.* Molecular properties and structural characterization of an alkaline extractable arabinoxylan from hull-less barley bran [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, **218**: 250–260.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定: GB 5009.5—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission, State Food and Drug Administration. *National Food Safety Standard Determination of Protein in Food: GB 5009.5—2016*[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [11] GUO Qingbin, CUI S W, WANG Qi, *et al.* Extraction, fractionation and physicochemical characterization of water-soluble polysaccharides from *Artemisia sphaerocephala* Krasch seed [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, **86**(2): 831–836.
- [12] XU Guanyi, LIAO Aimei, HUANG Jihong, *et al.* Evaluation of structural, functional, and anti-oxidant potential of differentially extracted polysaccharides from potatoes peels [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, **129**: 778–785.
- [13] JIN Mingyu, LI Meiyang, HUANG Riming, *et al.* Structural features and anti-inflammatory properties of pectic polysaccharides: a review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, **107**: 284–298.
- [14] HUANG Meigui, LIU Ping, SONG Shiqing, *et al.* Contribution of sulfur-containing compounds to the colour-inhibiting effect and improved antioxidant activity of Maillard reaction products of soybean protein hydrolysates [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, **91**(4): 710–720.
- [15] WANG Shengnan, NI Liying, FU Xiaoting, *et al.* A sulfated polysaccharide from *Saccharina japonica* suppresses LPS-induced inflammation both in a macrophage cell model via blocking MAPK/NF- κ B signal pathways *in vitro* and a zebrafish model of embryos and larvae *in vivo* [J/OL]. *Marine Drugs*, 2020, **18**(12): 593[2024-11-01]. DOI: [10.3390/md18120593](https://doi.org/10.3390/md18120593).
- [16] HE Wanying, TIAN Liang, ZHANG Shanshan, *et al.* A novel method to prepare protein-polysaccharide conjugates with high grafting and low browning: application in encapsulating curcumin[J/OL]. *LWT*, 2021, **145**: 111349[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.lwt.2021](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021).
- [17] ZHANG Anqi, YU Jie, WANG Guorong, *et al.* Improving the emulsion freeze-thaw stability of soy protein hydrolysate-dextran conjugates[J/OL]. *LWT*, 2019, **116**: 108506[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.lwt.2019.108506](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108506).
- [18] TELLO F, FALFAN-CORTÉS R N, MARTINEZ-BUSTOS F, *et al.* Alginate and pectin-based particles coated with globular proteins: production, characterization and anti-oxidative properties [J]. *Food Hydrocolloids*, 2015, **43**: 670–678.

- [19] ZHANG Jixian, JI Tao, YANG Xue, *et al.* Properties of selenium nanoparticles stabilized by *Lycium barbarum* polysaccharide-protein conjugates obtained with subcritical water [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, **205**: 672–681.
- [20] NIU Yuge, XIA Qi, JUNG W, *et al.* Polysaccharides-protein interaction of *Psyllium* and whey protein with their texture and bile acid binding activity [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, **126**: 215–220.
- [21] TAN T C, ALKARKHI A F M, EASA A M. Ribose-induced Maillard reaction as a quality index in frozen minced chicken and pork meats [J]. *Journal of Food Quality*, 2013, **36**(5): 351–360.
- [22] LIU Lu, LI Xiaodong, DU Lingling, *et al.* Effect of ultrasound assisted heating on structure and antioxidant activity of whey protein peptide grafted with galactose [J]. *LWT*, 2019, **109**: 130–136.
- [23] SUN Xianbao, WU Xuejiao, CHEN Xiangyu, *et al.* Casein-maltodextrin Maillard conjugates encapsulation enhances the antioxidative potential of proanthocyanidins: an *in vitro* and *in vivo* evaluation[J/OL]. *Food Chemistry*, 2021, **346**: 128952[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.foodchem.2020.128952](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128952).
- [24] ZHANG Xiuxiu, LI Xiaodong, LIU Lu, *et al.* Covalent conjugation of whey protein isolate hydrolysates and galactose through Maillard reaction to improve the functional properties and antioxidant activity[J/OL]. *International Dairy Journal*, 2020, **102**: 104584[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.idairyj.2019.104584](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104584).
- [25] ZHANG Ruifen, KHAN S A, CHI Jianwei, *et al.* Different effects of extrusion on the phenolic profiles and antioxidant activity in milled fractions of brown rice [J]. *LWT*, 2018, **88**: 64–70.
- [26] ZHANG Xinliu, GAO Hao, WANG Chunyan, *et al.* Characterization and comparison of the structure and antioxidant activity of glycosylated whey peptides from two pathways [J]. *Food Chemistry*, 2018, **257**: 279–288.
- [27] MALUNGA L N, IZYDORCZYK M, BETA T. Effect of water-extractable Arabinoxylans from wheat aleurone and bran on lipid peroxidation and factors influencing their antioxidant capacity [J]. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2017, **10**: 20–26.
- [28] AGUEDO M, FOUGNIES C, DERMIENCE M, *et al.* Extraction by three processes of arabinoxylans from wheat bran and characterization of the fractions obtained [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, **105**: 317–324.
- [29] KIM C Y, LEE G Y, PARK G H, *et al.* Protective effect of arabinoxylan against scopolamine-induced learning and memory impairment [J]. *Biomolecules & Therapeutics*, 2014, **22**(5): 467–473.
- [30] 翟征远, 白晓悦, 靖一志, 等. 食品中益生元的研发和应用研究进展[J]. *食品科学技术学报*, 2024, **42**(2): 10–18.
ZHAI Zhengyuan, BAI Xiaoyue, JING Yizhi, *et al.* Research progress on development and application of prebiotic in foods [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2024, **42**(2): 10–18.
- [31] 聂卉, 李晓静, 李坚斌. 低聚木糖的生物活性、制备及应用研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2016, **37**(14): 210–213.
NIE Hui, LI Xiaojing, LI Jianbin. The research development on bioactivity, preparation and application of xylooligosaccharides [J]. *Food Research and Development*, 2016, **37**(14): 210–213.
- [32] 李丽琪. 核桃生物活性评价及其乳剂制备工艺研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2017.
LI Liqi. *Evaluation of Biological Activity of Walnut and Study on Preparation Technology of Its Emulsion*[D]. Wuhan: Wuhan Institute of Technology, 2017.
- [33] YANG Huayu, YAN Bowen, CHEN Wei, *et al.* Prediction and innovation of sustainable continuous flow microwave processing based on numerical simulations: a systematic review[J/OL]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2023, **175**: 113183[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.rser.2023.113183](https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113183).
- [34] SUN Ao, CHEN Lining, WU Wei, *et al.* The potential meat flavoring generated from Maillard reaction products of wheat gluten protein hydrolysates-xylose: impacts of different thermal treatment temperatures on flavor[J/OL]. *Food Research International*, 2023, **165**: 112512[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.foodres.2023.112512](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112512).
- [35] LI Rui, WANG Xibo, LIU Jingnan, *et al.* Relationship between molecular flexibility and emulsifying properties of soy protein isolate-glucose conjugates [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, **67**(14): 4089–4097.
- [36] HUANG Liurong, ZHANG Wenxue, YAN Dongguang, *et al.* Solubility and aggregation of soy protein isolate induced by different ionic liquids with the assistance of ultrasound [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, **164**:

2277–2283.

- [37] XI Chunyu, KANG Naixin, ZHAO Changhui, *et al.* Effects of pH and different sugars on the structures and emulsification properties of whey protein isolate-sugar conjugates[J/OL]. *Food Bioscience*, 2020, **33**: 100507[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.fbio.2019.100507](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100507).
- [38] MENG Yao, ZHAO Xiao, JIANG Yunqing, *et al.* Effect of Maillard reaction conditions on the gelation and thermal stability of whey protein isolate/d-tagatose conjugates[J/OL]. *Food Chemistry*, 2023, **405**: 134928[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.foodchem.2022.134928](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134928).
- [39] SONG Yongbo, ZHOU Ying, CHEN Lingyun. Wood cellulose-based polyelectrolyte complex nanoparticles as protein carriers [J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2012, **22**(6): 2512–2519.
- [40] LI Ruiling, XUE Hui, GAO Binghong, *et al.* Physicochemical properties and digestibility of thermally induced ovalbumin-oil emulsion gels: effect of interfacial film type and oil droplets size[J/OL]. *Food Hydrocolloids*, 2022, **131**: 107747[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.foodhyd.2022.107747](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.107747).
- [41] HONG Zehan, XIAO Nan, LI Lu, *et al.* Glycation of whey protein isolate and emulsions prepared by conjugates[J/OL]. *Journal of Food Engineering*, 2022, **316**: 110852[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.jfoodeng.2021.110852](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110852).
- [42] LIU Gang, WANG Qi, HU Zhongze, *et al.* Maillard-reacted whey protein isolates and epigallocatechin gallate complex enhance the thermal stability of the Pickering emulsion delivery of curcumin [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, **67**(18): 5212–5220.
- [43] LIU Ping, LI Yalong, GAO Liu, *et al.* Effect of different carbohydrates on the functional properties of black rice glutelin (BRG) modified by the Maillard reaction[J/OL]. *Journal of Cereal Science*, 2020, **93**: 102979[2024-11-01]. DOI: [10.1016/j.jcs.2020.102979](https://doi.org/10.1016/j.jcs.2020.102979).
- [44] CHEN Xiumin, KITTS D D. Correlating changes that occur in chemical properties with the generation of antioxidant capacity in different sugar-amino acid Maillard reaction models [J]. *Journal of Food Science*, 2011, **76**(6): C831–C837.
- [45] XU Haining, ZHANG Xiaoming, KARANGWA E, *et al.* Correlating enzymatic browning inhibition and antioxidant ability of Maillard reaction products derived from different amino acids [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, **97**(12): 4210–4218.