

乳糖和 2'-岩藻糖基乳糖对绿豆蛋白糖基化程度、结构及功能特性的比较

袁雪¹, 苏洋¹, 王鑫², 于祝萍², 纪春雨³, 都启晶¹, 姜洪宁¹, 韩荣伟¹, 杨永新¹, 范荣波^{1*}

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109) (2. 恒源生物科技有限公司, 山东烟台 265400)

(3. 青岛日辰食品股份有限公司检测中心, 山东青岛 266200)

摘要: 植物蛋白因溶解性及界面功能较差, 在食品体系中的应用受到限制, 通过糖基化改性提升其功能特性具有重要意义。为探究不同分子结构对绿豆蛋白糖基化结构及功能特性的影响, 以绿豆蛋白为原料, 在 65 ℃、相对湿度 74% 条件下分别与乳糖 (Lac) 和 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-FL) 进行糖基化。以接枝度为评价指标, 确定蛋白与糖的最佳配比及反应时间, 并对接枝度最高的糖基化产物进行结构表征及功能特性分析。研究表明, Lac 体系在 10 h 达到最大接枝度 42.67%, 2'-FL 体系在 12 h 达到最大接枝度 39.11%, 存在显著性差异。当糖: 蛋白质量比为 2:1 时, 两体系的接枝度最高。SDS-PAGE 结果显示糖基化产物出现高分子量聚集条带, 进一步证实了蛋白与糖之间的共价结合; 同时, 粒径增大、 ζ 电位绝对值升高及二级结构的变化表明糖基化显著引起绿豆蛋白结构改变, 并显著改善蛋白的溶解性、乳化性及起泡性。其中, Lac 体系起泡性由 67.40% 提高至 89.93%, 表现出更强界面活性; 2'-FL 体系泡沫稳定性由 51.87% 提高至 80.13%, 界面稳定性提升更为突出。本研究为植物蛋白结构优化及为活性低聚糖在植物蛋白功能化改性中的应用提供了理论依据。

关键词: 绿豆蛋白; 乳糖; 2'-岩藻糖基乳糖; 糖基化改性; 结构特性; 功能性质

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.8.0992

Comparison of Lactose and 2'-Fucosyllactose On The Glycosylation Level, Structure, and Functional Characteristics of Mung Bean Protein

YUAN Xue¹, SU Yang¹, WANG Xin², YU Zhuping², JI Chunyu³, DU Qijing¹, JIANG Hongning¹, HAN Rongwei¹, YANG Yongxin¹, FAN Rongbo^{1*}

(1.College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

(2.Hengyuan Biotechnology Co. Ltd., Yantai 265400, China)

(3.Testing Center of Qingdao Rizhen Food Co. Ltd., Qingdao 266200, China)

Abstract: Plant proteins are limited in food applications due to their poor solubility and interfacial properties. Therefore, improving their functional properties through glycosylation modification is of great significance. This study aimed to investigate the effects of different molecular structures on the glycosylation structure and functional properties of mung bean protein. Mung bean protein was subjected to glycosylation with Lactose (Lac) and 2'-Fucosyllactose (2'-FL) at 65 ℃ and a relative humidity of 74%. The degree of grafting (DG) was used as an evaluation indicator to determine the optimal protein-to-sugar ratio and reaction time, and the glycosylation products with the highest DG were selected for structural characterization and functional property analysis. The results showed that the maximum DG of grafting reached 42.67% after 10 h for the Lac system and 39.11% after 12 h for the 2'-FL system, with a significant difference between the two systems. When the sugar-to-protein mass ratio was 2:1, both systems exhibited the highest DG. SDS-PAGE results showed that glycosylated products exhibited high-molecular-weight aggregated bands, further confirming the covalent binding between proteins and sugars. Meanwhile, the increased particle size, higher absolute value of ζ -potential, and changes in secondary structure indicated that glycosylation significantly altered the structure of mung bean protein and improved its solubility, emulsifying properties, and foaming properties. Specifically, the foaming capacity of the Lac system increased from 67.40% to 89.93%, indicating stronger interfacial activity, while the foam stability of the 2'-FL system increased

收稿日期: 2026-07-03; 修回日期: 2026-08-21; 接受日期: 2026-08-22

基金项目: 烟台市科技计划项目 (2025ZDCX016)

作者简介: 袁雪 (2002-), 女, 硕士, 研究方向: 乳与乳制品加工, E-mail: 1598908294@qq.com

通讯作者: 范荣波 (1973-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 乳与乳制品加工, E-mail: fanrongbo@qau.edu.cn

from 51.87% to 80.13%, showing a more pronounced improvement in interfacial stability. This study provides a theoretical basis for the structural optimization of plant proteins and the application of functional oligosaccharides in plant protein functionalization.

Key words: mung bean protein; lactose; 2'-Fucosyllactose; glycosylation modification; structural characteristics; functional properties

植物蛋白因来源广泛、环境负荷较低且具有较高营养价值,被认为是替代动物蛋白的重要资源。随着植物基食品产业的发展,其加工性能和功能特性逐渐成为限制应用的关键因素。然而,天然植物蛋白由于结构特征限制,通常表现出溶解性较低、结构稳定性不足及界面功能受限等缺陷,从而限制其在食品体系中的应用^[1]。因此,开发温和、安全的改性策略以提升植物蛋白功能特性具有重要意义。

糖基化改性是基于美拉德反应的共价修饰方式,相较于传统物理或化学改性,具有反应条件温和、无需添加化学试剂、产物安全性高等优势,在改善蛋白质溶解性、乳化性及热稳定性等方面展现出良好效果^[2-4]。近年来,糖基化改性在植物蛋白领域的应用受到广泛关注。已有研究表明,葡萄糖、乳糖、麦芽糊精等还原糖可有效改善大豆分离蛋白^[5]、豌豆蛋白^[6]及花生蛋白^[7]的乳化稳定性和凝胶特性。然而,现有研究主要依赖结构相对简单的单糖、二糖或常规多糖作为糖供体,其调控作用通常集中于提高蛋白亲水性和界面性能,而对糖链结构差异引起的反应行为、蛋白构象变化及功能特性调控规律认识仍较有限。

绿豆蛋白作为典型植物蛋白之一,氨基酸组成均衡、致敏性较低,且具有一定的抗氧化和生物活性,在植物基乳饮料、营养食品及益生菌载体等领域具有较好的应用潜力^[8-13]。然而,对其糖基化改性的研究仍相对有限。Zhou 等^[14]采用葡聚糖对绿豆蛋白进行糖基化改性,显著提升了其乳化活性和热稳定性;Aziznia 等^[15]发现麦芽糊精修饰可改善其溶解性和起泡性能。但上述研究主要集中于改善绿豆蛋白加工性能,对不同结构糖供体调控绿豆蛋白结构及功能特性的差异性作用仍缺乏深入研究。因此,探究糖分子结构对绿豆蛋白糖基化及功能特性的影响具有重要意义。

乳糖(Lactose, Lac)作为典型的还原性二糖,分子结构简单、反应活性较高,是蛋白糖基化研究中最常用的糖供体之一^[16]。2'-岩藻糖基乳糖(2'-Fucosyllactose, 2'-FL)是人乳中含量最丰富的低聚糖之一,由岩藻糖、半乳糖和葡萄糖通过特定的 α -1,2-和 β -1,4-糖苷键连接而成,具有较乳糖更为复杂的糖链结构^[17]。由于额外岩藻糖基的引入及分子尺寸增加,2'-FL可能改变糖链与蛋白之间的相互作用方式,并影响糖链在蛋白表面的空间分布,从而产生不同于传统糖供体的结构调控效应。此外,2'-FL作为功能性低聚糖,其引入可为植物蛋白功能化改性提供新的研究方向^[18]。目前,2'-FL在蛋白糖基化中的应用研究主要集中于乳蛋白体系^[19],其对植物蛋白尤其是绿豆蛋白结构和功能特性的影响尚缺乏系统研究。

基于上述背景,本研究以绿豆蛋白为研究对象,首次将2'-FL引入绿豆蛋白糖基化体系,并与乳糖体系对比,探究不同糖结构对糖基化程度、结构及功能特性的影响,阐明糖分子结构对改性效果的调控作用,为植物蛋白糖基化及功能化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

81.3%蛋白含量的绿豆蛋白,烟台鼎丰生物科技有限公司;乳糖(纯度98%),中国索莱宝科技有限公司;2'-岩藻糖基乳糖(98.7%),青岛开元恒洋食品配料有限公司;邻苯二甲醛(OPA),中国索莱宝科技有限公司;四硼酸钠,中国索莱宝科技有限公司; β -巯基乙醇,中国索莱宝科技有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS),美国Bio-Rad公司;BCA试剂盒,中国碧云天生物技术有限公司;BeyoGel™PlusPAGE预制胶,中国碧云天生物技术有限公司,考马斯亮蓝快速染色液,北京兰博利德商贸有限公司。

1.2 主要仪器与设备

Infinite M Plex 多功能微孔板读板仪,瑞士Tecan Austria GmbH公司;Nicolet iS 10 傅立叶变换红外光谱仪,美国Thermo公司;Chirascan 圆二色光谱仪,英国Applied Photophysics Ltd公司;Nano ZS90 纳米粒度及ZETA电位分析仪,中国马尔文公司;日立F2700 荧光分光光度计,日本日立公司;T25 digital ULTRA TURRAX®数显型高速均质机,德国IKA公司;DYY-6C 型电泳仪电源,北京市六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 糖基化产物的制备

将绿豆蛋白分别与 Lac 和 2'-FL 按照糖与蛋白质量比分别为 1:1、2:1、3:1、1:2 和 1:3 进行混合。参考已有蛋白-糖美拉德反应的干热处理方法^[20], 并结合预实验结果, 本研究将反应条件设定为 65 ℃、相对湿度 74% 的恒温恒湿环境: 将样品置于密闭反应容器中, 容器底部放置饱和氯化钠溶液, 使容器内的相对湿度维持在 74%, 将该容器置于 65 ℃ 的恒温环境中反应 14 h, 每隔 2 h 取一次样, 置于 -20 ℃ 储存备用。

1.3.2 接枝度的测定

通过测定糖基化前后的游离氨基含量来计算接枝度 (Degree of Grafting, DG), 游离氨基含量采用 OPA 法^[21]进行测定并做一些修改。

称取 40 mg OPA 置于 50 mL 容量瓶中, 加入 1 mL 无水乙醇使其溶解; 称取 SDS 0.5 g 和四硼酸钠 0.503 g 于小烧杯中, 加水 10 mL 溶解, 再加 10 mL 润两次; 再吸取 100 μ L β -巯基乙醇加入容量瓶, 最后定容至 50 mL。

样品取 0.1 g 加入 10 mL 水进行充分混匀, 浓度为 10 mg/mL。

取 20 μ L 样品与 200 μ L OPA 溶液混匀, 在 340 nm 处测定吸光值。计算公式为:

$$D = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D ——为接枝度 (DG), %;

A_0 ——为糖基化前溶液中蛋白质的吸光度;

A_1 ——为糖基化后溶液中蛋白质的吸光度。

1.3.3 结构性质的测定

根据接枝度测定结果, 分别选取 Lac 和 2'-FL 体系接枝度最高的时间点作为代表样品, 同时保留各体系糖基化 0 h 的样品, 以及未进行糖基化的纯绿豆蛋白作为对照。以下指标均在这 5 组样品中进行测定。

1.3.3.1 SDS-PAGE 凝胶电泳

凝胶电泳采用 Wagner 等^[22]的方法, 并稍作修改。吸取 20 μ L 10 mg·mL⁻¹ 的蛋白溶液与 5 μ L 速溶型蛋白上样缓冲液混合, 置于 100 ℃ 下加热 10 min, 冷却后吸取 5 μ L 样品加入凝胶槽, 在 135 V 下电泳 40 min, 电泳结束后对凝胶进行考马斯亮蓝染色 40 min, 之后脱色至背景透明。

1.3.3.2 傅里叶变换红外光谱

0.1 g 样品与 10 g 溴化钾混合后, 充分碾磨, 压制成薄片, 采用 NicoletIS 10 傅里叶变换红外光谱仪在 4 000~400 cm⁻¹ 波数范围内扫描, 分辨率为 4 cm⁻¹, 扫描次数为 64 次。

1.3.3.3 圆二色性 (CD) 光谱学

将样品溶解至蛋白浓度为 0.1 mg/mL, 用 CD 光谱仪在 25 ℃ 下从 180 nm 到 260 nm 扫描稀释的样品, 使用直径为 0.1 cm 的比色管记录光谱, 扫描速度为 500 nm/min, 带宽为 1 nm。

1.3.3.4 内源荧光光谱

参照 Xiong 等^[23]的方法并适当修改, 将 0.2 g 样品溶解于 1 mL pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液中, 测定荧光强度。

参数设置: 激发波长为 280 nm, 发射光谱扫描范围设置为 300~500 nm, 以 12 000 nm min⁻¹ 扫描速率采集。为了保证光谱的准确性, 激发波长和发射波长的采样间隔及狭缝宽度均设置为 5 nm。

1.3.3.5 粒径与电位分析

采用赵丹等^[21]的方法进行粒径和电位的测定, 将 0.1 g 样品溶于 1 mL 的水中再稀释 10 倍, 使用 Zeta Energy 分析仪测量其颗粒尺度分布和 ζ 电位。

1.3.4 功能特性的测定

1.3.4.1 溶解度

将 0.1 g 样品溶于 10 mL 的水中, 使用离心机将糖基化蛋白质溶液在以 4 000 $\times g$ 离心 10 min, 采用 BCA 法测定上清液和初始样品中的蛋白质含量。

1.3.4.2 乳化性能

乳化性的分析包括乳化活性指数 (Emulsifying Activity Index, EAI) 和乳化稳定性指数 (Emulsifying Stability Index, ESI)。采用 Xu 等^[24]的测量方法, 样品溶解在 pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液中, 18 mL 样品溶液和 2 mL 大豆油混合后, 用高速均质机在 12 000 rpm 下均质 2 min。在 0、10 min 从均质后的乳液底部取 50 μL , 与 5 mL 0.1 wt.% SDS 溶液均匀混合后, 在 500 nm 波长处测定吸光度, 以 0.1 wt.% SDS 为空白。计算公式为:

$$R = \frac{4.606 \times A_0 \times DF}{c \times \varphi \times \theta \times 1} \times 100\% \quad (2)$$

$$S = \frac{A_0}{(A_0 - A_1)} \times 10 \quad (3)$$

式中:

R ——为乳化活性指数 (EAI), m^2g ;

S ——为乳化稳定性指数 (ESI), min;

DF ——为稀释倍数 100;

c ——为初始蛋白质的质量浓度 mg mL^{-1} ;

θ ——为光路 (1 cm); φ 为乳液中油相的体积分数 (0.1);

A_0 和 A_{10} ——分别为 0、10 min 时的吸光度值。

1.3.4.3 起泡性和泡沫稳定性

该步骤测定的是起泡性 (Foaming capacity, FC) 和泡沫稳定性 (Foam stability, FS)。

将 0.1 g 的样品溶于 10 mL 水中, 在高速均质机以 10 000 rpm 速度均质 2 min 后, 迅速转移到刻度量筒里。记录均质化之后 0 min 和 30 min 的体积^[25]。计算公式为:

$$Q = \frac{V_1}{V_0} \times 100\% \quad (4)$$

$$W = \frac{V_2}{V_1} \times 100\% \quad (5)$$

式中:

Q ——为起泡性 (FC), %;

W ——为泡沫稳定性 (FS), %;

V_0 ——为原始体积, mL;

V_1 ——为 0 min 泡沫体积, mL;

V_2 ——为 30 min 后泡沫体积, mL。

1.4 数据分析

每组样品共进行了三次生物学重复。运用 SPSS 26.0 软件进行单因素分析, $P < 0.05$ 表示差异显著; 单因素分析时选用邓肯多重比较法, 实验结果表示为平均值 $\pm$ SD。

2 结果与讨论

2.1 糖-蛋白产物接枝度测定

如图 1 所示, Lac 和 2'-FL 体系接枝度均随反应时间延长而显著增加 ($P < 0.05$), 随后趋于稳定。Lac 体系于 10 h 达到最大接枝度 42.67%, 10~14 h 间差异不显著; 2'-FL 体系于 12 h 达到最大接枝度 39.11%, 12 h 与 14 h 间无显著差异, 说明继续延长反应时间难以进一步提高接枝程度。不同糖:蛋白质质量比对接枝度均具有显著影响

($P<0.05$), 其中 2:1 组始终表现出最高接枝度, 显著高于其他配比 ($P<0.05$), 过高或过低的糖量均会降低接枝效率^[26], 过量的糖虽然会提供更多反应基团, 但因空间位阻作用抑制了进一步的接枝。El Hosry 等^[27]的实验中也发现还原糖的浓度也会显著影响反应速率和产物形成。

综合比较两种糖体系发现, 在相同反应条件下, Lac 体系的糖基化程度整体高于 2'-FL 体系, 并较早达到稳定水平, 表明乳糖在该体系中具有更高的反应活性。这可能与两种糖分子的结构差异有关: 乳糖分子结构相对简单, 其还原端羰基更易与蛋白质游离氨基接触并发生美拉德反应; 而 2'-FL 具有较大的分子结构和支链化特点, 会降低糖分子与蛋白反应位点的有效接触, 从而导致其糖基化程度略低^[28]。

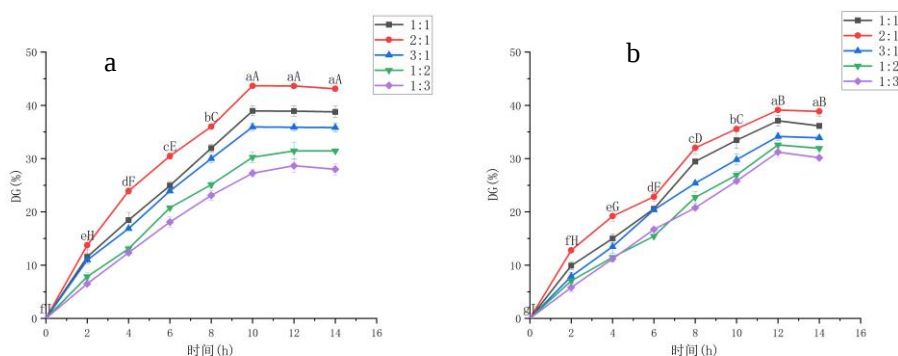


图1 绿豆蛋白与乳糖 (a)、2'-FL (b) 以不同比例与时间糖基化后的接枝度

Fig.1 Grafting degree of mung bean protein, Lac and 2'-FL after glycosylation at different ratios and for different durations

注: 不同小写字母表示同一糖体系不同反应时间之间差异显著, 不同大写字母表示同一反应时间下不同糖体系之间差异显著 ($P<0.05$)。

2.2 结构性质

根据接枝度测定结果, 从乳糖和 2'-FL 两个体系中分别选出接枝度最高的样品, 共得到五组: 对照组 (绿豆蛋白); Lac-0 h (乳糖: 绿豆蛋白=2:1, 0 h, 未糖基化); Lac-10 h (相同比例, 糖基化 10 h, 接枝度最高); 2'-FL-0 h (2'-FL: 绿豆蛋白=2:1, 0 h, 未糖基化); 2'-FL-12 h (相同比例, 糖基化 12 h, 接枝度最高)。

2.2.1 SDS-PAGE 凝胶电泳

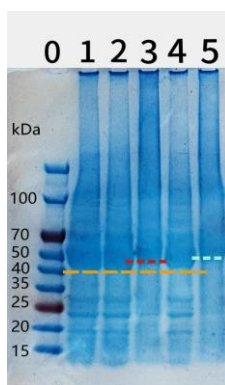


图2 糖基化绿豆蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of glycosylated mung bean protein

注: 0 号条带: 蛋白质分子量标准; 1 号条带: 绿豆蛋白; 2 号条带: Lac-0 h; 3 号条带: Lac-10 h; 4 号条带: 2'-FL-0 h; 5 号条带: 2'-FL-12 h。

如图 2 所示, 绿豆蛋白主要在 70、50、40 和 20 kDa 附近出现明显蛋白条带, 这与绿豆蛋白中 7S vicilin 和 11S legumin 亚基的组成特征相一致。其中, 约 50~70 kDa 区域条带主要对应 7S 球蛋白亚基, 而 35~40 kDa 和 20 kDa 附近条带分别对应 11S 球蛋白的酸性亚基和碱性亚基^[15]。

与未糖基化绿豆蛋白相比, Lac-0 h 和 2'-FL-0 h 样品的蛋白条带位置未发生明显变化, 表明糖的简单添加并未改变蛋白的分子量分布。经糖基化处理后, Lac-10 h 和 2'-FL-12 h 样品的条带向高分子量区域发生轻微偏移,

并伴随条带扩散增强及高分子区域染色强度增加,表明乳糖和 2'-FL 与绿豆蛋白发生结合,使蛋白-糖结合物的表观分子质量增加。由于糖基化反应过程中不同蛋白分子结合糖链数量存在差异,形成的蛋白-糖结合物具有较宽的分子质量分布^[29],因此 SDS-PAGE 通常表现为条带扩散,而非形成单一明显的新条带。

值得注意的是,糖基化后条带变化程度较小,这与植物蛋白糖基化体系的特点有关。一方面,乳糖和 2'-FL 分子质量相对较小,即使发生结合,对蛋白整体分子质量的贡献有限;另一方面,本研究采用的干热糖基化条件主要促进蛋白表面活性氨基与糖分子的接枝,且处于美拉德反应初期阶段,所以并不一定导致大量蛋白交联聚合^[30]。因此,SDS-PAGE 主要反映糖基化引起的蛋白迁移行为变化,而糖基化程度的差异仍需结合接枝度、红外光谱及其他结构表征指标进行综合分析。

2.2.2 红外光谱分析

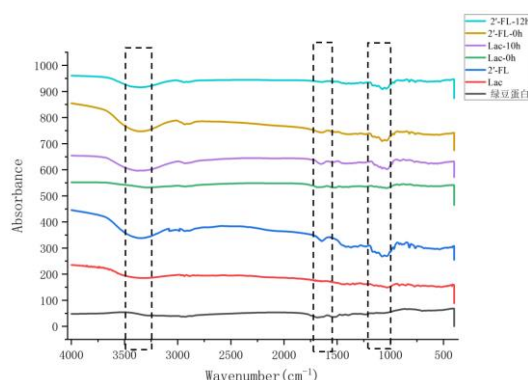


图3 绿豆蛋白与两种糖糖基化后的傅里叶变换红外光谱

Fig.3 Fourier transform infrared spectra of mung bean protein glycosylated with Lac and 2'-FL

如图3所示,为进一步分析 Lac 和 2'-FL 参与绿豆蛋白糖基化反应后的结构变化,引入 Lac 和 2'-FL 单独组分进行比较。绿豆蛋白及糖基化样品均表现出蛋白质的典型吸收特征,其部分特征峰的峰形及吸收强度发生变化,表明糖基化反应改变了蛋白质相关官能团所处的局部化学环境。

在 3 200~3 500 cm^{-1} 区域,主要对应 O-H 和 N-H 伸缩振动吸收。Lac 和 2'-FL 单独样品均在该区域表现出明显宽峰,其中 2'-FL 吸收强度较高,与其分子结构中含有额外岩藻糖基团及更多羟基有关。糖基化后,Lac-10 h 和 2'-FL-12 h 样品该区域峰形发生变化,说明糖分子的引入改变了蛋白质周围羟基和氨基相关官能团的振动环境,并可能伴随氢键作用变化。糖基化后,各样品该区域吸收峰均出现不同程度的展宽,并伴随轻微向低波数方向偏移,其中 Lac-10 h 样品变化最为明显。上述变化表明糖基化反应改变了蛋白质周围官能团的化学环境,这与糖链引入后羟基数量增加及氢键重新分布有关。

酰胺I带(约 1 650 cm^{-1})主要来源于 C=O 伸缩振动,酰胺II带(约 1 540 cm^{-1})主要来源于 N-H 弯曲振动及 C-N 伸缩振动,两者均对蛋白质构象变化较为敏感。与未处理绿豆蛋白相比,糖基化样品上述区域均出现一定程度的峰形变化,其中 Lac 体系变化幅度较大,而 2'-FL 体系变化相对较小,说明两种糖基化处理对蛋白质局部构象环境的影响存在差异^[31]。且结合接枝度分析可知,Lac 体系的光谱变化整体大于 2'-FL 体系,与其较高的糖基化程度相一致,说明糖分子结构差异会影响糖基化反应的进行。

在 1 000~1 200 cm^{-1} 区域,Lac 和 2'-FL 单独样品均出现明显吸收峰,该区域主要归属于糖结构中 C-O 和 C-O-C 键的伸缩振动。与未糖基化绿豆蛋白相比,Lac-10 h 和 2'-FL-12 h 样品均保留了该区域的糖类特征吸收,表明糖结构参与了糖基化体系的变化。需要指出的是,由于 Lac 和 2'-FL 自身均含有丰富的糖苷键和羟基结构,该区域峰强主要反映糖分子的结构特征,而不能单独用于评价糖基化程度。Lavai 等^[32]研究发现,大豆分离蛋白与糖类发生糖基化反应后,1 000~1 200 cm^{-1} 区域吸收增强,主要来源于糖链结构中醚键及羟基相关振动,该变化可用于表征糖分子参与蛋白修饰过程。本研究观察到类似的光谱变化,进一步证明 Lac 和 2'-FL 均能够与绿豆蛋白发生有效糖基化反应。

综上,FTIR 分析表明,糖基化处理能够改变绿豆蛋白部分官能团所处的局部化学环境,酰胺I带峰形的变化提示糖基化可能引起蛋白质二级结构重排,但 FTIR 主要反映官能团振动环境的变化,该区域峰变化可作为蛋白质构象调整的间接证据,具体的二级结构组成变化进一步通过圆二色谱进行分析。

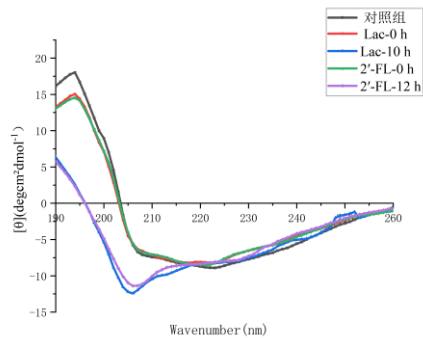


图 4 绿豆蛋白与 Lac、2'-FL 糖基化后的 CD 谱图

Fig.4 CD spectra of mung bean protein after glycosylation with Lac and 2'-FL

为进一步分析糖基化对绿豆蛋白二级结构的影响，对不同样品进行了圆二色谱分析。如图 4 所示，绿豆蛋白及各糖基化样品均呈现蛋白质典型的圆二色谱特征，且糖基化处理后谱图的峰形及信号强度发生明显变化，表明表明 Lac 和 2'-FL 的引入对绿豆蛋白的构象产生了影响。为进一步明确糖基化引起的二级结构组成变化，对 CD 谱图进行拟合分析，各二级结构组分的相对含量见表 1。

表 1 Lac 与 2'-FL 糖基化后绿豆蛋白二级结构组成 (%)

Table 1 Secondary structure composition of mung bean protein after glycosylation with Lac and 2'-FL (%)				
Sample	α -helix	β -sheet	β -turn	random coil
对照组	18.7 $\pm$ 0.06 ^{aD}	24.7 $\pm$ 0.06 ^{aC}	25.3 $\pm$ 0.10 ^{dB}	34.3 $\pm$ 0.00 ^{dA}
Lac-0 h	18.6 $\pm$ 0.06 ^{aD}	24.7 $\pm$ 0.06 ^{abC}	25.2 $\pm$ 0.10 ^{dB}	34.5 $\pm$ 0.06 ^{cA}
Lac-10 h	11.3 $\pm$ 0.12 ^{cD}	22.6 $\pm$ 0.12 ^{cC}	26.5 $\pm$ 0.06 ^{bB}	39.6 $\pm$ 0.16 ^{bA}
2'-FL-0 h	18.4 $\pm$ 0.06 ^{bD}	24.5 $\pm$ 0.03 ^{bC}	25.7 $\pm$ 0.06 ^{cB}	34.4 $\pm$ 0.06 ^{cA}
2'-FL-12 h	10.9 $\pm$ 0.07 ^{dD}	21.8 $\pm$ 0.20 ^{dC}	27.0 $\pm$ 0.17 ^{aB}	40.3 $\pm$ 0.03 ^{aA}

注：同列不同小写字母表示不同处理组间差异显著 ($P<0.05$)；同一行不同大写字母表示同一样品中不同二级结构组分含量差异显著 ($P<0.05$)。

表 1 显示，对照组与 Lac-0 h 样品的各二级结构组分含量整体较为接近，表明单纯添加 Lac 对绿豆蛋白二级结构的影响较小。2'-FL-0 h 样品部分二级结构组分与对照组存在统计学差异，但其变化幅度较小，说明单纯添加 2'-FL 对蛋白二级结构的影响亦较为有限。

随着糖基化反应进行，Lac-10 h 和 2'-FL-12 h 样品的 α -螺旋含量分别由 18.7%降至 11.3%和 10.9%，无规卷曲含量分别增加至 39.6%和 40.3%，均有显著差异 ($P<0.05$)。上述结果表明，糖基化处理导致绿豆蛋白二级结构发生调整，使蛋白由相对有序的构象向较为松散的构象转变。且可以发现 2'-FL-12 h 表现出更低的 α -螺旋和更高的无规卷曲，说明糖分子结构特征同样影响蛋白质构象变化的程度。Dong 等^[33]在葡萄糖诱导种子蛋白糖基化研究中同样发现，糖基化处理后蛋白质 α -螺旋和 β -折叠比例降低，而 β -转角和无规卷曲含量增加，认为糖链结合能够诱导蛋白质构象柔性增强。

结合 FTIR 分析可知，糖基化后样品在 3 200~3 500 cm^{-1} 区域 O-H/N-H 伸缩振动峰发生展宽，酰胺I带和酰胺 II带峰形发生变化，说明糖基化改变了蛋白质官能团周围的化学环境及分子间相互作用；而 CD 结果进一步证明这种结构扰动导致蛋白二级结构重新分布。两种光谱表征结果相互印证，表明糖基化导致蛋白质二级结构发生重排。

2.2.4 粒径和电位

如图 5 所示，糖基化处理后绿豆蛋白粒径显著增大 ($P<0.05$)。对照组粒径为 526.50 nm，Lac 体系由 0 h 的 683.93 nm 增加至 10 h 的 857.73 nm；2'-FL 体系粒径变化趋势相似，其中 2'-FL-12 h 达到 924.43 nm，显著高于其他处理组 ($P<0.05$)。动态光散射测得的粒径反映颗粒在溶液中的水动力学尺寸，因此粒径增加说明糖基化处理改变了蛋白颗粒在分散体系中的存在状态^[34]。Chen 等^[35]在豌豆分离蛋白与阿拉伯糖糖基化体系中也观察到类似现

象。

各样品 ζ 电位均为负值,且糖基化后 ζ 电位绝对值显著增加($P<0.05$)。对照组 ζ 电位为-23.03 mV, Lac 体系由-23.93 mV 降低至-29.87 mV; 2'-FL 体系进一步降低至-31.27 mV。 ζ 电位变化表明糖基化处理改变了蛋白颗粒表面的电荷分布。一般认为,较高的 ζ 电位绝对值有助于增强颗粒间静电排斥作用,从而降低颗粒间聚集倾向。因此,糖基化后样品尤其是 2'-FL-12 h 组,理论上具有更高的胶体分散稳定性。

综合分析发现,两种糖基化体系均表现出粒径增大和 ζ 电位绝对值增加的特征。其中,2'-FL 体系变化幅度大于 Lac 体系,这可能与 2'-FL 分子结构有关。相比乳糖,2'-FL 由乳糖核心与末端岩藻糖残基组成,具有更大的分子尺寸和更复杂的空间结构,同时含有更多可与水分子形成氢键的羟基基团。糖基化后,2'-FL 糖链的引入可能促进蛋白表面形成更加充分的水化层,增加颗粒的水动力尺寸,从而导致粒径进一步增大。此外,暴露的亲水糖链改变了蛋白颗粒表面的电荷环境,使 ζ 电位绝对值进一步提高^[36]。二者共同说明糖基化反应不仅改变了蛋白分子结构,还进一步影响了颗粒层面的理化性质,为后续溶解性、乳化性和起泡性的改善提供了结构基础。

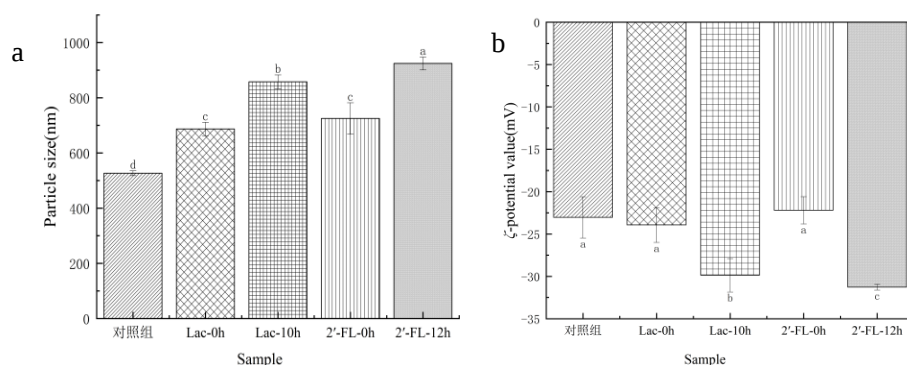


图5 绿豆蛋白与 Lac、2'-FL 糖基化后的粒径(a)与电位(b)变化

Fig.5 Changes in particle size (a) and charge (b) after glycosylation of mung bean protein with Lac and 2'-FL

注: 不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

2.2.5 内源荧光光谱

内源荧光光谱用于评估蛋白质的结构变化,方法包括激发色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基,然后测量其内源荧光光谱^[19]。

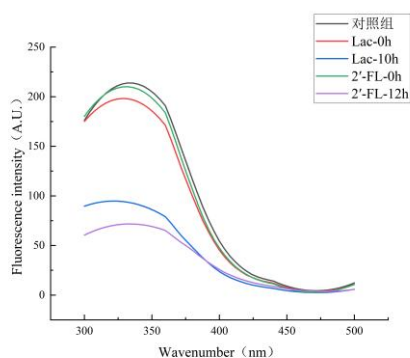


图6 绿豆蛋白与 Lac、2'-FL 糖基化后的内源荧光光谱图

Fig.6 Fluorescence spectra of endogenous fluorescence of mung bean protein after being glycosylated with Lac and 2'-FL

如图6所示,未处理绿豆蛋白在330~340 nm附近表现出明显的特征发射峰,荧光强度约为200 A.U.。经糖基化处理后,各体系荧光强度均显著降低,表明美拉德反应过程中糖分子与蛋白质侧链发生共价结合,改变了芳香族氨基酸残基周围的微环境^[37],并对内源荧光基团产生一定的屏蔽与猝灭作用。Xiang等^[36]在乳清蛋白-岩藻糖多糖体系中同样观察到糖基化导致的荧光强度下降现象,说明糖链接枝会影响蛋白色氨酸残基的局部环境及构象状态。

Lac 体系在反应10 h后荧光强度由约200 A.U.下降至90 A.U.,且最大发射峰出现一定程度红移,说明糖基化诱导蛋白分子发生部分展开,使原本埋藏于疏水区域的色氨酸残基逐渐暴露于更高极性的水相环境中^[38]。相比之

下, 2'-FL 体系荧光强度由约 210 A.U.降低至 70 A.U., 下降幅度高于 Lac 体系, 但未发生明显红移, 表明 2'-FL 糖基化主要改变了色氨酸残基周围的局部微环境, 而未导致蛋白三级结构发生明显展开。由于 2'-FL 含有额外的岩藻糖残基, 具有更大的分子尺寸和更丰富的亲水基团, 其接枝后可能增强糖链与蛋白表面的相互作用及对荧光基团的空间屏蔽, 从而产生更强的荧光猝灭效应; 但较大的空间结构限制了糖链对蛋白内部构象区域的影响, 因此未引起明显峰位移动。Li 等^[28]的研究也表明, 相较于结构更复杂的糖链, 小分子糖修饰更容易引起蛋白荧光峰位偏移和构象变化, 说明糖结构差异会影响糖基化过程中蛋白微环境的改变程度。这与本研究中 Lac 和 2'-FL 体系表现出的差异相一致。

2.3 功能性质分析

表 2 Lac 与 2'-FL 糖基化对绿豆蛋白溶解性、乳化性及起泡性影响

Table 2 Effects of glycosylation by Lac system and 2'-FL system on the solubility, emulsifying property and foaming property of mung bean protein

Sample	Solubility/%	EAI/(m ² /g)	ESI/min	FC/%	FS/%
对照组	40.05±0.19 ^{dC}	16.89±0.06 ^{dE}	39.29±0.02 ^{eD}	67.40±0.90 ^{eA}	51.87±0.70 ^{eB}
Lac-0 h	42.77±0.58 ^{cC}	18.75±0.40 ^{cD}	42.83±0.43 ^{dC}	71.03±0.38 ^{dA}	53.07±0.15 ^{dB}
Lac-10 h	63.29±0.41 ^{bC}	29.67±0.17 ^{aE}	58.57±0.20 ^{cD}	89.93±0.42 ^{bA}	72.17±0.42 ^{aB}
2'-FL-0 h	43.14±0.46 ^{cD}	17.10±0.19 ^{dE}	45.40±0.21 ^{bC}	73.53±0.85 ^{cA}	54.70±0.56 ^{cB}
2'-FL-12 h	65.42±0.84 ^{aC}	25.98±0.02 ^{bE}	60.76±0.62 ^{aD}	88.10±0.20 ^{aA}	80.13±0.31 ^{bB}

注: 同列数据中不同小写字母表示不同处理组间差异显著 ($P<0.05$); 同一处理组内不同大写字母表示不同功能特性指标间差异显著 ($P<0.05$)。

表 2 汇总了不同糖基化条件下绿豆蛋白的溶解度、乳化活性指数、乳液稳定指数、起泡性及泡沫稳定性。表中同时对比了 Lac 体系与 2'-FL 体系在相同反应条件下的差异, 以反映糖类型及接枝程度对蛋白溶解性和界面活性行为的调控作用。

2.3.1 溶解度

表 2 显示, 不同糖基化处理显著提高了绿豆蛋白溶解度 ($P<0.05$)。对照组溶解度为 40.05%, Lac 和 2'-FL 处理后均升高, 未糖基化时分别为 42.77%和 43.14%, 无显著差异; 糖基化后, Lac-10 h 和 2'-FL-12 h 溶解度显著升至 63.29%和 65.42%, 且 2'-FL 组显著高于 Lac 组 ($P<0.05$)。

结果表明, 糖基化后绿豆蛋白溶解度显著提高。同时, 粒径和 ζ 电位结果表明, 糖基化后蛋白颗粒水动力尺寸增加且表面电荷绝对值提高, 说明糖链的引入改变了蛋白颗粒的分散状态, 降低了分子间聚集倾向, 从而促进蛋白溶解。值得注意的是, 2'-FL 体系溶解度高于 Lac 体系, 尽管其接枝度略低于 Lac, 但由于 2'-FL 含有额外的岩藻糖残基, 具有更大的分子尺寸和更复杂的糖链结构, 接枝后可形成更明显的亲水外层和空间位阻效应, 这与其较大的粒径及更高的 ζ 电位绝对值相一致, 最终表现出更优的溶解性能。这类现象也见于其他蛋白-多糖体系, 如 Kutzli 等^[6]证明, 多糖接枝可大幅提高豌豆蛋白的溶解度。

2.3.2 乳化性以及乳化稳定性

绿豆蛋白经糖基化处理后, EAI 和 ESI 均显著提高 ($P<0.05$), 而单纯混合糖的 Lac-0 h 和 2'-FL-0 h 对乳化性能影响不显著。糖基化后, Lac-10 h 组 EAI 和 ESI 分别升至 29.67 m²/g 和 58.57 min, 2'-FL-12 h 组 EAI 为 25.98 m²/g, ESI 为 60.76 min, EAI 提升略低于 Lac 组, 但 ESI 显著高于 Lac 组。

糖基化显著改善了绿豆蛋白的乳化性以及乳化稳定性, Wang 等^[38]也发现糖基化蛋清蛋白后, 其乳液稳定性提高。乳化性能结果显示, Lac 体系在 EAI 方面提升更为显著, 而 2'-FL 体系在 ESI 方面表现更优。这表明 Lac 接枝后蛋白更易在油水界面快速吸附与展开, 而 2'-FL 由于结构复杂、分子体积较大, 可在界面形成更厚的吸附层并提供更强的空间位阻效应, 从而抑制油滴聚集。Nazanin 等^[39]亦发现蛋白-多糖偶联物表现出更高溶解度及结构无序性, 有利于乳化性能的提升。

2.3.3 起泡性与泡沫稳定性

如表 2 所示, 糖基化显著提高了绿豆蛋白的起泡性 (FC) 和泡沫稳定性 (FS) ($P<0.05$)。对照组 FC 和 FS 分别为 67.4%和 51.87%, 糖基化后, Lac-10 h 组 FC 和 FS 分别升至 89.93%和 72.17%, 2'-FL-12 h 组分别为 88.10%

和 80.13%，均显著高于对照组，说明糖基化能够有效改善绿豆蛋白的界面功能特性^[40]。结合结构表征结果，糖基化后蛋白表面引入亲水糖链，提高了蛋白溶解性和分散性，同时粒径增加及 ζ 电位绝对值提高增强了颗粒稳定性，有利于蛋白向气-水界面迁移并形成稳定泡沫^[41]。

Lac-10 h 组 FC 略高于 2'-FL-12 h 组，这与乳糖较高的接枝度及较小的分子结构有关。较高的接枝程度有利于促进蛋白构象调整，使部分疏水基团暴露，提高蛋白在气-水界面的吸附效率，从而增强起泡能力^[42]。相比之下，2'-FL 体系 FS 高于 Lac 体系，达到 80.13%。结合粒径和 ζ 电位结果，2'-FL 较大的糖链结构会在蛋白表面形成更厚的水化层，并增强空间位阻作用，降低气泡间的聚集和破裂。同时，其荧光强度显著降低但未出现明显红移，说明 2'-FL 主要通过改变蛋白表面微环境而非诱导大范围构象展开，从而形成更稳定的界面膜。综合说明，糖结构差异会进一步影响蛋白在气-水界面的吸附行为及界面膜稳定性^[28]。Dong 等^[33]在对葡萄糖诱导的糖基化中发现可以通过增强气泡的界面膜强度来改善 TPI 的起泡性能。

3 结论

本研究在 65 °C、相对湿度 74%条件下，采用乳糖（Lac）和 2'-岩藻糖基乳糖（2'-FL）对绿豆蛋白进行了干法糖基化，系统比较了不同糖供体对绿豆蛋白糖基化程度、结构特征及功能性质的影响。结果显示两种糖均可有效促进绿豆蛋白发生糖基化反应，其中 Lac 体系在 10 h 时的最大接枝度高于 2'-FL 体系在 12 h 达到的最大接枝度，说明小分子糖更有利于提高糖基化效率。SDS-PAGE 结果显示，糖基化处理后蛋白条带向高分子量区域迁移，表明蛋白-糖结合的形成；结合红外光谱、圆二色谱、荧光光谱、粒径及 ζ 电位分析发现，糖基化可使绿豆蛋白结构变化，并显著改善其溶解性、乳化性及起泡性。其中，Lac 体系在乳化活性和起泡能力方面提升更明显，而 2'-FL 体系在溶解性、乳液稳定性和泡沫稳定性方面表现更优。综上，糖供体分子结构差异可调控绿豆蛋白糖基化程度、结构特征及功能性质，本研究为植物蛋白功能化改性及活性低聚糖的应用提供了理论依据。

参考文献

- [1] KUTZLI I, WEISS J, GIBIS M. Glycation of plant proteins via Maillard reaction: reaction chemistry, technofunctional properties, and potential food application [J]. *Foods*, 2021, 10(2): 376.
- [2] CHEN J J, ZHANG W, CHEN Y, et al. Effect of glycosylation modification on structure and properties of soy protein isolate: a review [J]. *Journal of Food Science*, 2024, 89(8): 4620-4637.
- [3] LU F, MA Y, ZANG J, et al. High-temperature glycosylation modifies the molecular structure of ovalbumin to improve the freeze-thaw stability of its high internal phase emulsion [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 233: 123560.
- [4] GAO K, ZHAO F, RAO J, et al. Nonenzymatic glycation as a tunable technique to modify plant proteins: a comprehensive review on reaction process, mechanism, conjugate structure, and functionality [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2024, 23(1): e13269.
- [5] WANG S, YANG J, SHAO G, et al. pH-induced conformational changes and interfacial dilatational rheology of soy protein isolated/soy hull polysaccharide complex and its effects on emulsion stabilization [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 109: 106075.
- [6] KUTZLI I, GRIENER D, GIBIS M, et al. Influence of Maillard reaction conditions on the formation and solubility of pea protein isolate-maltodextrin conjugates in electrospun fibers [J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 101: 105535.
- [7] HUANG Y, XU J, CHEN K, et al. The effects of ultrasound-assisted glycation on the allergenicity and functional properties of peanut proteins [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 282: 136664.
- [8] HOU D, ZHAO Q, CHEN B, et al. Dietary supplementation with mung bean coat alleviates the disorders in serum glucose and lipid profile and modulates gut microbiota in high-fat diet and streptozotocin-induced prediabetic mice [J]. *Journal of Food Science*, 2021, 86(9): 4183-4196.
- [9] MEKKARA NIKARTHIL SUDHAKARAN S, D S BUKKAN. A review on nutritional composition, antinutritional components and health benefits of green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) [J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2021, 45(6): e13743.
- [10] WANG Y, ZHAO J, ZHANG S, et al. Structural and rheological properties of mung bean protein emulsion as a liquid egg substitute: The effect of pH shifting and calcium [J]. *Food Hydrocolloids*, 2022, 126: 107485.
- [11] TANG D M, DONG Y, REN H, et al. A review of phytochemistry, metabolite changes, and medicinal uses of the common food mung

- bean and its sprouts (*Vigna radiata*) [J]. Chemistry Central Journal, 2014, 8(1): 4.
- [12] NARUMON S, PIYAWAN R, NOPPAWAN L, et al. High moisture extrusion of meat analogues using mung bean (*Vigna radiata* L.) protein and flour blends: investigations on morphology, texture and rheology [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2023, 58(4): 1922-1930.
- [13] GUO Q, SU J, YUAN F, et al. Preparation, characterization and stability of pea protein isolate and propylene glycol alginate soluble complexes [J]. LWT, 2019, 101: 476-482.
- [14] ZHOU L, WU F, ZHANG X, et al. Structural and functional properties of Maillard reaction products of protein isolate (mung bean, *Vigna radiata* (L.)) with dextran [J]. International journal of food properties, 2017, 20(sup2): 1246-1258.
- [15] AZIZNIA S, ASKARI G, EMAM Z, et al. Effect of ultrasonic assisted grafting on the structural and functional properties of mung bean protein isolate conjugated with maltodextrin through maillard reaction [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 254: 127616.
- [16] HANNß M, HUBBE N, HENLE T. Acid-induced gelation of caseins glycated with lactose: Impact of Maillard reaction-based glycoconjugation and protein cross-linking [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(43): 11477-11485.
- [17] YU S, LIU J J, EUN J Y, et al. Production of a human milk oligosaccharide 2'-fucosyllactose by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 101.
- [18] REN X, XIAO M, ZHANG L, et al. Impact of 2'-fucosyllactose on adult gut microbiota composition and metabolome based on colonic fermentation and prebiotic quantitative evaluation [J]. Journal of Food Science, 2025, 90(3): e70084.
- [19] TU Y, XU Y, REN F, et al. Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products from α -lactalbumin and 2'-fucosyllactose [J]. Food Chemistry, 2020, 316: 126341.
- [20] DOOST A S, NASRABADI M N, GOLIS A H, et al. Maillard conjugation of whey protein isolate with water-soluble fraction of almond gum or flaxseed mucilage by dry heat treatment [J]. Food Research International, 2020, 128: 108779.
- [21] 赵丹,孙一熙,张清.响应面优化豌豆分离蛋白-木聚糖复合物的制备及结构功能研究[J].中国粮油学报,2023,38(2):118-125.
- [22] WAGNER L J, SUZIN A M, ISMAIL B P, et al. Glycation of pea protein isolate with different manno oligosaccharides to improve solubility [J]. European Food Research and Technology, 2026, 252(3): 116.
- [23] XIONG T, XIONG W, GE M, et al. Effect of high intensity ultrasound on structure and foaming properties of pea protein isolate [J]. Food Research International, 2018, 109: 260-267.
- [24] XU J, HAN D, CHEN Z, et al. Effect of glucose glycosylation following limited enzymatic hydrolysis on functional and conformational properties of black bean protein isolate [J]. European Food Research and Technology, 2018, 244(6): 1111-1120.
- [25] 刘巧珍,代养勇,侯汉学,等.研磨对豌豆分离蛋白应用特性的影响[J].食品研究与开发,2021,42(5):9-14.
- [26] TAS O, SUMNU G, OZTOP M. H. Structural and functional modifications of pumpkin seed protein concentrate via glycation with fructose and allulose [J]. Food Chemistry, 2026, 515: 149222.
- [27] EL HOSRY L, ELIAS V, CHAMOUN V, et al. Maillard reaction: mechanism, influencing parameters, advantages, disadvantages, and food industrial applications: a review [J]. Foods, 2025, 14(11): 1881.
- [28] LI M Y, MCCLEMENTS D. J, YUE Y H, et al. Effect of saccharide structure on pea protein glycosylation and functionality [J]. Food Hydrocolloids, 2026, 173: 112272.
- [29] WONG B T, DAY L, AUGUSTIN M A. Deamidated wheat protein-dextran Maillard conjugates: Effect of size and location of polysaccharide conjugated on steric stabilization of emulsions at acidic pH [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(6): 1424-1432.
- [30] JIN H, ZHAO Q, FENG H, et al. Changes on the structural and physicochemical properties of conjugates prepared by the Maillard reaction of black bean protein isolates and glucose with ultrasound pretreatment [J]. Polymers, 2019, 11(5): 848.
- [31] SUN C, FU J J, TAN Z, et al. Improved thermal and oxidation stabilities of pickering high internal phase emulsions stabilized using glycated pea protein isolate with glycation extent [J]. LWT, 2022, 162: 113465.
- [32] LAVAEI Y, VARIDI M, NOOSHKAM M. Gellan gum conjugation with soy protein via Maillard-driven molecular interactions and subsequent clustering lead to conjugates with tuned technological functionality [J]. Food Chemistry: X, 2022, 15: 100408.
- [33] DONG P, HUANG W J, BAO H X, et al. Glucose-induced glycation enhances the foaming properties of *Trichosanthes kirilowii* seed protein isolate: insights into structure, interfacial behavior, and proteomics [J]. Food Hydrocolloids, 2024, 157: 110444.

- [34] ZHANG Z, WANG B, CHEN J, et al. Modification of plant and algal proteins through the Maillard reaction and complex coacervation: mechanisms, characteristics, and applications in encapsulating oxygen-sensitive oils [J]. *Sustainable Food Technology*, 2024, 2: 567-593.
- [35] CHEN X, DAI Y, HUANG Z, et al. Effect of ultrasound on the glycosylation reaction of pea protein isolate–arabinose: Structure and emulsifying properties [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 89: 106157.
- [36] XIANG H Y, JIANG Z M, TAO W B, et al. Insight into structural changes in heat-induced whey protein-fucoidan hydrogel by SR-IR and molecular docking techniques [J]. *Food Research International*, 2024, 197: 115222.
- [37] WANG H M, BI K X, PIAO Z Y, et al. Construction of a gluten-like system via *Auricularia auricula* polysaccharide-mediated glycosylation of zein: interactions, gel properties, and applications in gluten-free staple foods [J]. *Food Hydrocolloids*, 2025, 172: 111888.
- [38] WANG C Y, LI J H, LI X, et al. Emulsifying properties of glycation or glycation-heat modified egg white protein [J]. *Food Research International*, 2019, 119: 227-235.
- [39] NAZANIN M, MASOUD H, ZAHRA P-V, et al. The structural and physiochemical properties of conjugated form of pea protein isolate with inulin and its influences on encapsulation of ferulic acid [J]. *LWT*, 2025, 215: 117213.
- [40] ZHANG S S, LIU Y B, WU W H, et al. Study on the structural characteristics and foaming properties of ovalbumin–citrus pectin conjugates prepared by the Maillard reaction [J]. *Foods*, 2024, 13(22): 3542.
- [41] MENG Y, WEI Z H, XUE C H, et al. Correlation among molecular structure, air/water interfacial behavior and foam properties of naringin-treated chickpea protein isolates [J]. *Food Hydrocolloids*, 2024, 147: 109309.
- [42] JIAN W, HE J, SUN Y, et al. Comparative studies on physicochemical properties of bovine serum albumin-glucose and bovine serum albumin-mannose conjugates formed via Maillard reaction [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2016, 69: 358-364.