

外源氨基酸修饰的类蛋白反应对鸡肺抗氧化肽结构与功能的影响

尹家琪^{1,2}, 余军军⁴, 康明丽³, 杨露⁴, 韩敏义^{1,2,4*}, 徐幸莲^{1,2}

(¹南京农业大学食品科技学院 南京 210095

²农业部肉品加工重点实验室 江苏省肉类生产与加工质量安全控制协同创新中心 南京 210095

³河北科技大学食品与生物学院 石家庄 050018

⁴温氏食品集团股份有限公司 广东云浮 527400)

摘要 天然生物活性肽往往功能特性和热稳定性差。为改善鸡肺肽的抗氧化能力和热稳定性,采用胃蛋白酶和外源氨基酸参与的类蛋白反应对鸡肺抗氧化肽进行处理。利用高效液相色谱测定反应前、后的分子量变化,利用紫外光谱、荧光光谱、X 射线衍射图谱、扫描电镜对反应前、后物质的性质进行表征,通过傅里叶变换红外光谱、圆二色光谱分析蛋白质二级结构的变化。结果表明,添加 3% 的半胱氨酸处理后其 DPPH· 自由基清除率、Fe²⁺ 螯合能力和·OH 清除率分别提升了 51.85%, 31.11%、31.30%,热变性温度从 122.06 °C 提至 136.15 °C。类蛋白反应使产物的分子量和表面疏水性增大。紫外和荧光光谱表明氨基酸微环境的变化改善了抗氧化活性。X 射线衍射图谱显示类蛋白反应发生后样品主衍射峰变宽,强度降低。扫描电镜结果表明反应涉及分子的水解与再聚合。红外光谱和圆二色光谱结果显示:多肽分子舒展,疏水基团暴露,这可能是多肽抗氧化能力改善的原因。综上,类蛋白反应改变了蛋白质的二级和三级结构,从而有效改善了生物活性肽的抗氧化能力与热稳定性。

关键词 抗氧化肽; 氨基酸修饰; 类蛋白反应; 结构

文章编号 1009-7848(2023)04-0022-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.04.003

自由基和活性氧是有氧生物呼吸过程中不可避免的产物,正常情况下这些分子会被体内的抗氧化酶和化合物有效清除^[1]。当这些物质积累过多时,引起的氧化应激会对蛋白质、DNA 和膜脂质体造成损伤,还会增加患癌症、骨质疏松症、心血管疾病与老年痴呆症的风险^[2]。利用蛋白酶水解动、植物或微生物蛋白制备抗氧化肽,具有抗氧化能力强、来源广泛、特异性强、反应条件温和的优点,可能成为新型抗氧化剂。近年来,许多屠宰副产物来源的酶解产物被发现具有良好的抗氧化活性。Idowu 等^[3]发现金枪鱼肝脏水解物对 DPPH· 自由基有良好的清除能力。Fu 等^[4]用 10 种蛋白酶水解猪血浆时发现碱性蛋白酶酶解产物还原力较强,表明利用副产物制备生物活性肽是废物高值

化利用的有效途径。由于生物来源的活性肽不够稳定,功能活性和热稳定性会受到环境影响,因此需要寻找一种安全、有效的方法来改善生物活性肽的性能。

类蛋白反应是浓缩的蛋白水解物在适宜条件下经蛋白酶作用形成触变性胶体的过程^[5]。类蛋白反应通常包含以下几个过程:1)低质量分数(3%~5%)蛋白质水解。2)通过旋蒸或冻干等方式浓缩蛋白水解物。3)用适当的蛋白酶孵育浓缩(质量分数 30%~50%)水解物^[6]。类蛋白产物的形成通常归因于肽缩合、转肽、物理聚集和疏水相互作用^[7]。该反应无需添加化学试剂且反应过程温和安全,在改善多肽生物功能性与营养特性方面有巨大的优势,已在食品工业展现出良好的前景。高丹丹等^[8]利用木瓜蛋白酶和组氨酸对泥鳅抗氧化肽进行修饰,类蛋白修饰产物的 DPPH· 自由基清除率达到 77.98%,是修饰前的 1.99 倍。韩青等^[9]对牡蛎水解物进行类蛋白修饰,血管紧张素转换酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)抑制率最高可达 82.13%,比修饰前增加了 19%。目前关于类蛋白反应的研究报告主要是针对反应条件的优化与

收稿日期: 2022-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(32272252);温氏股份科技重大专项(WENS-2020-1-ZDZX-007);国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-41);江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

第一作者: 尹家琪,女,硕士生

通信作者: 韩敏义 E-mail: myhan@njau.edu.cn

生物活性研究,而鲜有类蛋白反应前、后底物的微观结构与性质的系统研究。

本研究通过游离氨基减少量和抗氧化能力来确定外源氨基酸的种类与添加量;通过类蛋白反应修饰提高肽抗氧化能力与热稳定性。采用紫外扫描、X 射线衍射、表面疏水性、内源荧光光谱和扫描电镜对多肽和类蛋白进行结构表征,利用傅里叶变换红外光谱与圆二色光谱研究蛋白质二级结构的变化,推断涉及的反应类型。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜鸡肺,取自养殖 40~45 d 的 818 肉杂鸡(公鸡),新兴县温氏佳丰食品有限公司;胃蛋白酶(1.5×10^5 U/g)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、邻苯二甲醛(O-phthalaldehyde, OPA)、L-赖氨酸、L-半胱氨酸、L-正亮氨酸、L-苯丙氨酸、二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)、菲啰嗪一钠盐、氯化亚铁(四水)、8-苯胺基-1-萘磺酸钠(ANS),上海源叶生物科技有限公司;十二烷基磺酸钠,上海麦克林生化科技有限公司;四硼酸钠,天津市大茂化学试剂厂;氢氧化钠、盐酸,国药集团化学试剂有限公司;细胞色素 C(MW12384)、抑肽酶(MW6500)、杆菌肽(MW1422)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(MW451)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(MW189)均为标准品,美国 Sigma 公司。除特殊说明外,所有试剂均为分析纯级。

1.2 设备与仪器

HH-6 孔电热恒温水浴锅,绍兴市苏珀仪器有限公司;PD 500 高速均质机,英国普律玛仪器有限公司;Allegar-64R 离心机,美国贝克曼库尔特公司;SCIENTZ-10N 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技有限公司;S2-Food Kit pH 计,瑞士梅特勒托利多公司;Vortex-2 涡旋混匀仪,上海沪析实业有限公司;MS304TS/02 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;INFINITE 200 PRO 酶标仪,瑞士帝肯公司;LC-20AT 高效液相色谱仪,日本岛津公司;Empyrean 锐影 X 射线粉末衍射仪,荷兰帕纳科公司;sigma300 扫描电镜,德国蔡司公司;is50 傅里叶变换红外光谱仪,美国赛默飞公司;Chirascan V100 圆二色谱仪,英国应用光物理

公司;DSC3 差示扫描量热仪,瑞士梅特勒托利多公司。

1.3 试验方法

1.3.1 鸡肺抗氧化肽制备 鸡肺用清水清洗后沥水,剪去气管和大体积脂肪块,冲洗 3 次,去除表面杂质,绞碎,加入去离子水使料液比为 1:3,倒入烧杯匀浆(10 000 r/min, 20 s 重复 3 次),调 pH 3.6 后放入水浴锅中 37 °C 预热 10 min,加胃蛋白酶 4 200 U/g(底物蛋白质量),保持 37 °C 恒温水解(水解过程中用 1 mol/L 稀盐酸和 NaOH 溶液调节 pH 3.6,不变),酶解完成后将反应液 pH 值调至 7.0,沸水浴 10 min 灭酶,酶解液冰浴、离心,取上清液(4 °C, 10 000 r/min, 15 min),旋蒸浓缩,冷冻干燥得到鸡肺抗氧化肽,产物于-20 °C 冰箱保存。

1.3.2 类蛋白产物的制备

1.3.2.1 氨基酸种类的选择 配制质量分数 40% 的多肽溶液,加入质量分数 1.5% 的胃蛋白酶,样品分为 4 份,分别加入质量分数 2% 的赖氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸、亮氨酸,调 pH 5.0,于 37 °C 水浴反应 6 h 后 100 °C 灭酶 10 min,冰浴冷却至室温,真空冷冻干燥 48 h,得到外源氨基酸修饰的类蛋白产物。

1.3.2.2 氨基酸添加量的选择 配制质量分数 40% 的多肽溶液,加入质量分数 1.5% 的胃蛋白酶,样品分为 5 份,分别加入质量分数 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 的半胱氨酸,调 pH 5.0,于 37 °C 水浴反应 6 h, 100 °C 灭酶 10 min,冰浴冷却至室温,真空冷冻干燥 48 h,得到半胱氨酸修饰的类蛋白产物。

1.3.3 游离氨基含量的测定 参考杨逸鹏^[10]的方法并稍作修改。采用邻苯二甲醛(OPA)法,将 40 mg OPA 溶解于 1 mL 95% 乙醇中,与 25 mL 100 mmol/L 四硼酸钠溶液混匀,加入 2.5 mL 20% 十二烷基磺酸钠溶液,40 mg 二硫苏糖醇和 22.5 mL 去离子水,涡旋混匀得到 OPA 试剂。将样品用磷酸钠缓冲液配成质量浓度 0.2 mg/mL 的溶液,按体积比 1:4 与 OPA 试剂混匀,避光反应 4 min,测定波长 340 nm 处的吸光值。采用 0~1.5 mmol/L 亮氨酸溶液制作标准曲线,结果以相对于多肽的游离氨基含量的百分比表示。

1.3.4 抗氧化指标的测定

1.3.4.1 DPPH·自由基清除率的测定 参考 Liu

等^[11]的方法,将 DPPH 用 95%乙醇溶液配制 0.2 mmol/L DPPH 溶液。样品组为 1 mL DPPH 溶液与 1 mL 样品液的混合液,对照组为 1 mL DPPH 溶液与 1 mL 95%乙醇溶液的混合液,空白组为 1 mL 磷酸钠缓冲液和 1 mL 95%乙醇溶液的混合液。室温 25 ℃避光反应 30 min,测定各组在 517 nm 处的吸光值,DPPH·自由基清除能力计算公式:

$$\text{DPPH}\cdot\text{自由基清除率}(\%)=(1-\frac{A_{\text{样品}}-A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}}-A_{\text{空白}}})\times 100 \quad (1)$$

式中, $A_{\text{样品}}$ ——样品与含 DPPH 溶液反应后的吸光度; $A_{\text{空白}}$ ——磷酸钠缓冲液与 95%乙醇混合液反应后的吸光度; $A_{\text{对照}}$ ——DPPH 溶液与 95%乙醇反应后的吸光度。

1.3.4.2 Fe^{2+} 螯合能力的测定 参考邢路娟等^[12]的方法。将多肽和类蛋白用磷酸钠缓冲液(pH 7.0, 20 mmol/L)配成质量浓度 2 mg/mL 的溶液。取 1 mL 样品液与 0.05 mL 2 mmol/L FeCl_2 溶液涡旋混匀,螯合 1~2 min 后加入 200 μL 5 mmol/L 菲啰啉启动反应,剧烈涡旋后室温静置 10 min,于波长 562 nm 处测定混合液吸光值为 $A_{\text{样品}}$,以磷酸钠缓冲液代替样品的吸光值为 $A_{\text{对照}}$ 。肽与类蛋白的 Fe^{2+} 螯合能力公式:

$$\text{Fe}^{2+}\text{螯合能力}(\%)=\frac{A_{\text{对照}}-A_{\text{样品}}}{A_{\text{对照}}}\times 100 \quad (2)$$

式中, $A_{\text{样品}}$ ——样品与 FeCl_2 和菲啰啉反应后的吸光度; $A_{\text{对照}}$ ——磷酸钠缓冲液与 FeCl_2 和菲啰啉反应后的吸光度。

1.3.4.3 清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)的测定 参考文献^[13]的方法。样品管:于 0.6 mL 5 mmol/L 邻菲罗啉溶液中加入 0.4 mL 磷酸钠缓冲液,混匀后加入 0.6 mL 样品溶液和 0.6 mL 15 mmol/L EDTA-二钠,剧烈混匀,加入 0.6 mL 5 mmol/L FeSO_4 溶液,剧烈混匀后加入 0.8 mL 0.1% H_2O_2 ,剧烈混匀后 37 ℃孵育 1 h,测定波长 536 nm 处吸光值,记为 A_s 。以超纯水代替样品,所测吸光值记 A_c ;以超纯水代替样品和 H_2O_2 ,所测吸光度计为 A_w 。以谷胱甘肽为阳性对照。 $\cdot\text{OH}$ 清除率计算公式:

$$\cdot\text{OH}\text{清除率}(\%)=\frac{A_s-A_c}{A_w-A_c}\times 100 \quad (3)$$

式中, A_s ——样品与混合液反应后的吸光度; A_c ——超纯水代替样品后与混合液反应后的吸光度; A_w ——超纯水代替样品和 H_2O_2 后与混合液反应后的吸光度。

1.3.5 热学特性分析 称取约 6.0 mg 样品于铝盘中,密封,铝盖中央扎孔,以空盘为对照。惰性气体流速 30 mL/min,升温范围 30~180 ℃,升温速率 10 ℃/min。利用 STAR 软件分析样品的变性温度^[14]。

1.3.6 肽分子量分布 采用高效液相色谱仪配合核酸蛋白紫外检测器测定类蛋白反应前、后样品的肽分子量分布^[15]。配制 1 mg/mL 的标准品溶液方法:乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(M_w 189)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(M_w 451)、杆菌肽(M_w 1422)、抑肽酶(M_w 6500)、细胞色素 C(M_w 12384),上样量 10 μL ,经 TSKgel 凝胶色谱柱等度洗脱,流动相组成: $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}:V_{\text{三氟乙酸}}=40:60:0.1$,柱温 30 ℃,流速 0.5 mL/min,绘制标准品-洗脱时间标准曲线。样品液经 0.22 μm 滤膜过滤,在标品同样的条件下洗脱,参考标准曲线计算样品的分子量分布。

1.3.7 肽与类蛋白产物的结构表征

1.3.7.1 紫外光谱扫描 多肽和类蛋白粉末溶于磷酸钠缓冲液中配成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液,在波长 230~350 nm 范围进行紫外吸收光谱扫描^[16]。

1.3.7.2 X 射线衍射图谱测定 取 15 mg 干燥的样品于样品槽中,玻璃板压平,置于 X 射线衍射仪中。参数设置:波长 $\lambda=0.156$,管压 40 kV、管流 20 mA、Cu 靶,扫描速度 2°/min,衍射角扫描范围 2~40°,步宽 0.02°^[17]。

1.3.7.3 表面疏水性的测定 参考 Zhu 等^[18]的方法并略作修改。使用磷酸钠缓冲液配制质量浓度为 0.125~2 mg/mL 的样品溶液,取 4 mL 不同质量浓度的样品溶液,加入 20 μL 8 mmol/L ANS 溶液涡旋混匀,室温避光反应 20 min,于激发波长 $\lambda_{\text{ex}}=374$ nm、发射波长 $\lambda_{\text{em}}=485$ nm 处测定荧光强度。以样品浓度为横坐标,荧光强度为纵坐标绘制标准曲线,曲线斜率 H_0 代表表面疏水性强度。

1.3.7.4 内源荧光光谱扫描 参考曲玲玲^[19]的方法并略作修改。多肽和类蛋白粉末溶于磷酸钠缓

冲液中,配成质量浓度 0.25 mg/mL 的溶液,以磷酸钠缓冲液为空白,在激发波长 $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$ 、发射波长 $\lambda_{em} = 300 \sim 400 \text{ nm}$ 范围获得扫描图谱。

1.3.7.5 扫描电镜分析 取适量肽与类蛋白粉末分别用双面胶粘在铝制样品台上,喷金,在扫描电镜下观察样品微观形态并照相,加速电压 10 kV,放大倍数 100 倍^[20]。

1.3.7.6 傅里叶变换红外光谱分析 将 1 mg 样品与 100 mg 干燥 KBr 在研钵中混匀,充分研磨至粒度在 2.5~2.0 μm 以下。将混合物均匀放入固体压模模具,在 20 MPa 的压力下保持 1~2 min,取出压片,呈半透明状态。将锭片在波数 4 000~400 cm^{-1} 范围进行红外光谱扫描。

1.3.7.7 圆二色光谱扫描 将样品配成质量浓度 0.5 mg/mL 的溶液,扫描速度 60 nm/min,带宽 1.0 nm,测试波段 190~260 nm,步长 0.2 nm,温度 25 $^{\circ}\text{C}$,比色皿光程 0.5 mm,以 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液作为溶剂背景,分别将样品和背景注入比色皿进行测试扫描,采用 CDpro 软件对测试结果进行二级结构拟合^[21]。

1.4 数据处理

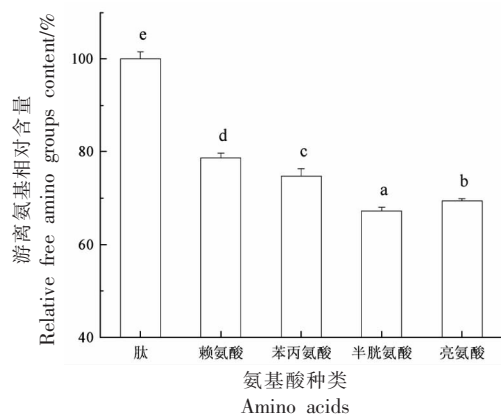
试验重复 3 次,数据以“平均值 \pm 标准偏差”表示,采用 IBM SPSS Statistics 25 软件(IBM,USA)进行单因素方差分析、独立样本 t 检验。如果方差分析效应显著,采用 Duncan's 法进行多重比较,显著水平设为 $P < 0.05$ 。运用 Origin 2021b (美国 OriginLab 公司)绘图。

2 结果与分析

2.1 类蛋白产物

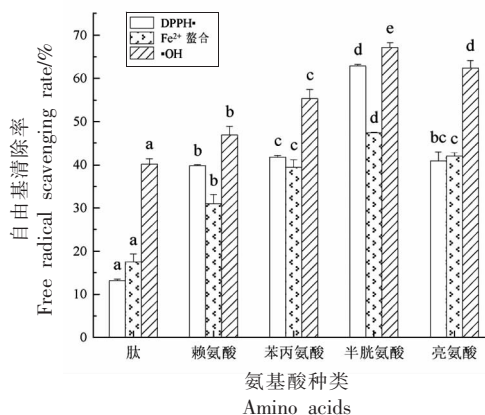
2.1.1 氨基酸种类 生物活性肽的潜在功能取决于氨基酸的种类、序列和肽链长度等,而天然蛋白质自身的氨基酸组成缺陷会对其生物价值产生影响。研究发现多肽的抗氧化能力通常与疏水氨基酸和芳香族氨基酸有关,通过补充上述外源氨基酸进行类蛋白反应修饰,能够改善多肽的抗氧化活性^[22]。本试验选择芳香族氨基酸苯丙氨酸、疏水氨基酸亮氨酸以及在文献[23]中具有较好改善抗氧化作用的赖氨酸和半胱氨酸进行修饰。从图 1 可知,类蛋白反应修饰产物的游离氨基含量相对于肽显著降低($P < 0.05$),减少量排序为半胱氨酸

(32.79%)>亮氨酸(30.61%)>苯丙氨酸(25.21%)>赖氨酸(21.39%)。类似的,从图 2 可看出类蛋白产物的抗氧化能力显著提高($P < 0.05$),且抗氧化能力排序与游离氨基减少量一致,其中半胱氨酸处理组的 DPPH· 自由基清除率为 62.94%, Fe^{2+} 螯合率为 47.39%, $\cdot\text{OH}$ 清除率为 67.07%,分别比处理前提高了 4.77,2.69,1.66 倍。游离氨基减少量是评价类蛋白反应程度的重要指标,肽的 N 端被认为参与酰胺键和环酸酐的形成和肽缩合,从而形成大分子的聚集物,游离氨基含量减少^[24]。类蛋白反应要求蛋白质表面的氨基酸侧链具有化学选择性,氨基酸在蛋白质表面含量低且具有独特的反应活性,并特别适合于进行位点选择性修饰化学



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),图 3 同。

图 1 不同氨基酸修饰对游离氨基含量的影响
Fig.1 Effect of different amino acid modification on free amino content



注:同一指标各组间不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),图 4 同。

图 2 不同氨基酸修饰对抗氧化能力的影响
Fig.2 Effect of different amino acid modification on antioxidant ability

反应。符合这些标准的最重要的天然氨基酸被证明是表面暴露的半胱氨酸(Cys)残留物,Cys可在N端选择性地与硫酯衍生物反应,形成天然肽键^[25]。综上所述,选择半胱氨酸作为后续试验的修饰物。

2.1.2 氨基酸添加量 为了确定半胱氨酸添加水平,设计氨基酸添加量单因素实验。从图3和图4可看出在半胱氨酸添加量1%~3%范围,随着添加量的增加游离氨基含量显著降低($P<0.05$),在添加量3%时类蛋白的游离氨基相对含量降至肽的52.14%,添加量增至4%及以上时游离氨基相对含量趋于平稳($P>0.05$),说明类蛋白反应达到饱和。自由基清除率变化趋势与游离氨基含量相类似,DPPH·和·OH清除率在Cys添加量为3%时升至65.03%和75.51%, Fe^{2+} 螯合能力在Cys添加量为4%时达到50.21%,随后继续增加Cys添加量, Fe^{2+} 螯合能力无显著变化($P>0.05$)。曾凤仙等^[26]在研究波纹巴非蛤水解物的类蛋白修饰时也得出自由基清除率随外源氨基酸添加量的增加先上升后平稳的结论。类蛋白反应促进自由基清除率的提升可归因于转肽作用,外源氨基酸与短肽在蛋白酶的催化下发生肽键断裂与重新拼接,形成与原先序列和长度不同的肽段,进而影响其生物活性^[3]。值得注意的是,Udenigwe等^[6]发现类蛋白修饰会导致产物表面阴离子强度降低,使改性大豆水解物的 Fe^{2+} 螯合活性下降,与本研究结果相反,推测可能是本研究测定 Fe^{2+} 螯合所用的磷酸钠缓冲液对体系的电荷强度有影响。综合类蛋白反应程度、抗氧化能力与经济成本,选择3%的半胱氨酸添加量用于后续试验样品制备。

2.2 热稳定性分析

采用差示扫描量热法分析类蛋白反应对肽热稳定性的影响。从图5和表1可以看出在升温过程中肽发生2次吸热转变,热转变温度分别为122.06℃和150.58℃。类蛋白反应后第1次热转变温度升至136.15℃,说明类蛋白反应能有效改善多肽的热稳定性。类似的,Jiang等^[27]认为类蛋白反应使海地瓜蛋白水解物的热变性温度从120℃提至134℃,归因于类蛋白反应后分子内部或表面更强的结合力。类蛋白的第1次热变性焓

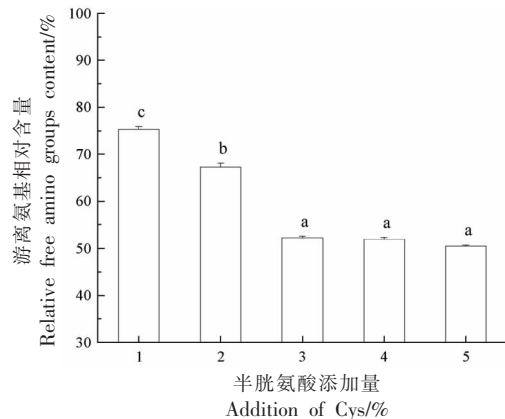


图3 不同半胱氨酸添加量对游离氨基含量的影响
Fig.3 Effects of different Cys supplemental levels on free amino content

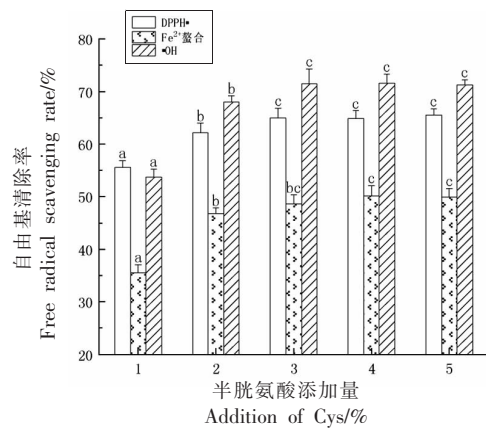


图4 不同半胱氨酸添加量对抗氧化能力的影响
Fig.4 Effects of different Cys supplemental levels on antioxidant capacity

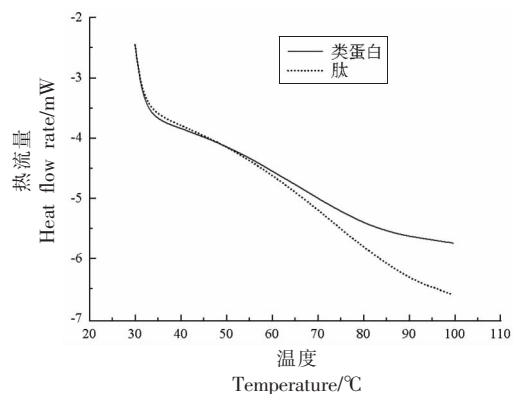


图5 肽与类蛋白反应产物的差示扫描量热图谱
Fig.5 Differential scanning calorimetric analyses of peptide and plastein

(67.12 J/g)显著低于多肽(140.13 J/g)($P < 0.05$),推测可能是由于酶促修饰的类蛋白反应使底物蛋白

的某些区域部分展开,使得 ΔH 降低并提高了其它区域的稳定性,从而导致热变性温度升高^[28]。

表 1 肽与类蛋白反应产物的变性温度和变性焓

Table 1 The scanning calorimetric thermal denaturation temperature and denaturation enthalpy of peptide and plastein

样品	变性温度/ $^{\circ}\text{C}$		变性焓/ $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$	
	T_1	T_2	ΔH_1	ΔH_2
肽	122.06 ± 0.45	150.58 ± 0.21	140.13 ± 1.22	43.84 ± 0.52
类蛋白	$136.15 \pm 0.72^*$	—	$67.12 \pm 0.76^*$	—

注: T_n 代表第 n 次热变性温度, ΔH_n 代表第 n 次热变性时的变性焓, ($n=1, 2, \dots$), “—”代表未检出。采用独立样本 T 检验, 同列“*”表示差异显著($P < 0.05$), 表 3 同。

2.3 肽与类蛋白产物的分子量分布

液相色谱能够从各分子量范围的角度较为准确地反映样品的分子量。从图 6 和表 2 可以看出肽和类蛋白的分子量都是连续分布的, 两者的分子量分布无显著差异($P < 0.05$)。Hofsten 等^[29]报道乳清和鱼蛋白来源的类蛋白中没有高分子量产物, 认为转肽过程是类蛋白形成的部分原因, 氨基酸序列的改变会对抗氧化性产生影响。本研究也同样发现类蛋白产物分子量分布在 5 000 u 以上的部分较少, 占 9.61%。从整体上看, 类蛋白反应发生后样品的分子量分布向较大分子量的方向迁移, 说明该过程中有大分子聚合物形成的缩合反应, 与 2.1.1 节相对应。

表 2 肽与类蛋白产物的分子量分布

Table 2 Molecular weight distribution of peptide and plastein

分子量范围/u	峰面积百分比/ % ($\lambda_{220\text{nm}}$)	
	肽	类蛋白
>10 000	6.14 ± 0.14	6.46 ± 0.06
10 000~5 000	2.19 ± 0.02	3.15 ± 0.02
5 000~3 000	4.35 ± 0.02	5.30 ± 0.02
3 000~2 000	7.48 ± 0.03	7.85 ± 0.04
2 000~1 000	14.64 ± 0.07	14.16 ± 0.04
1 000~500	17.11 ± 0.13	16.05 ± 0.05
500~180	34.35 ± 1.24	33.27 ± 0.62
<180	13.74 ± 1.33	13.78 ± 0.73

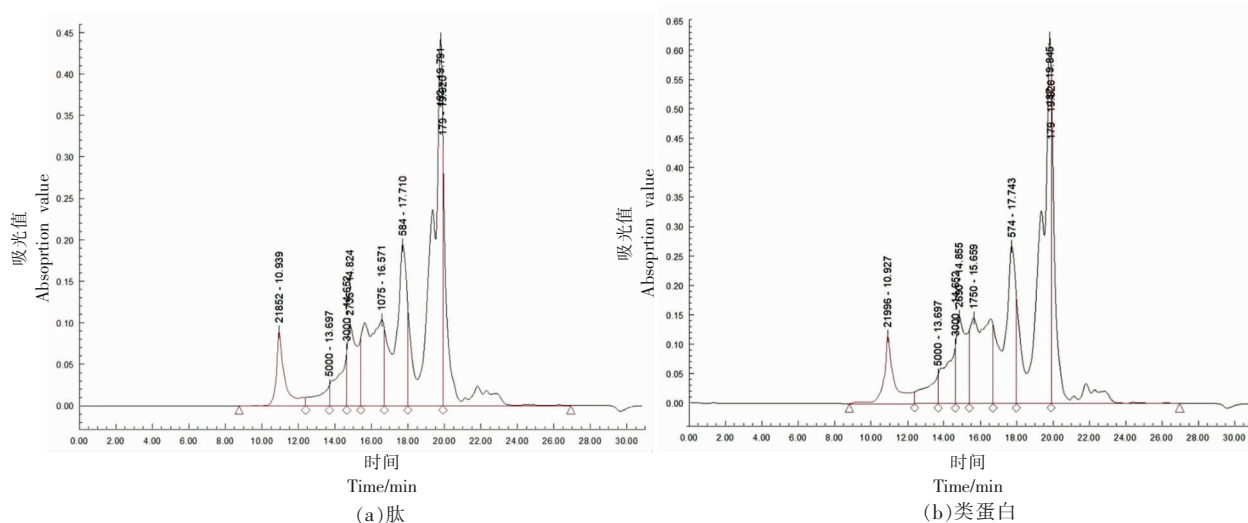


图 6 肽和类蛋白的凝胶色谱图

Fig.6 Gel chromatogram of peptide and plastein

2.4 肽与类蛋白产物的结构表征

2.4.1 紫外光谱扫描 由于特定氨基酸的侧链基团能够吸收一定波长范围的紫外光,因此紫外光谱扫描广泛应用于多肽结构分析^[30]。如图7所示,鸡肺抗氧化肽与类蛋白反应产物的紫外扫描图谱整体较为接近,肽在波长244 nm处有最大吸收峰,这是肽键上的C=O电子跃迁的结果,而发生类蛋白反应后最大吸收峰红移至波长246 nm处,证明底物结构发生改变,该反应生成新的物质。推测其主要原因是肽键中羰基 π 电子与相邻氨基的孤对电子发生 $p-\pi$ 共轭,使电子 $\pi-\pi^*$ 跃迁产生的吸收峰发生红移^[21]。

2.4.2 X射线衍射图谱 类蛋白反应前、后样品的X射线衍射图谱如图8所示,可以得到类蛋白反应产物在 2θ 为 21.8° 处出现强度较低且较宽的结晶衍射峰,说明类蛋白产物为不规则且无定形态^[17]。肽在 6.2° 和 20.8° 处出现较为尖锐、强度更强的结晶衍射峰。Jiang等^[27]在研究海地瓜水解物时同样发现类蛋白反应发生后主衍射峰变宽、强度降低,通过谱图差异可以得出类蛋白反应导致原子的空间排列发生改变。

2.4.3 表面疏水性 疏水相互作用是维持蛋白质三级结构的主要作用力,可以用来评价功能特性变化与构象变化的关系^[31]。它既能衡量暴露在溶液中的氨基酸残基的数量,也能反映蛋白质疏水与亲水基团之间的平衡关系,表明蛋白质的展开程度。从图9可知类蛋白反应发生后,底物的 H_0 从5460.9显著增至13526.0($P<0.05$),蛋白质三级结构发生改变。Udenigwe等^[32]采用胰蛋白酶和木瓜蛋白酶对鸡肉水解物进行类蛋白反应,结果表面疏水性增加,与本研究一致。蛋白内的肽主要通过疏水键连接在一起,表面疏水性的增加可归因于小分子多肽的聚集增加了分子相互作用,暴露在表面的疏水基团增多,从而增加了与ANS的结合位点^[33]。此外,胃蛋白酶参与的类蛋白反应使蛋白分子结构部分展开,将包埋在内部的疏水基团暴露,对表面疏水性的增加和自由基捕捉也有一定贡献^[34]。

2.4.4 内源荧光光谱 采用内源荧光光谱,通过分析蛋白质荧光基团周围微环境的变化来研究其三级结构的改变。蛋白质的内源荧光主要来自色

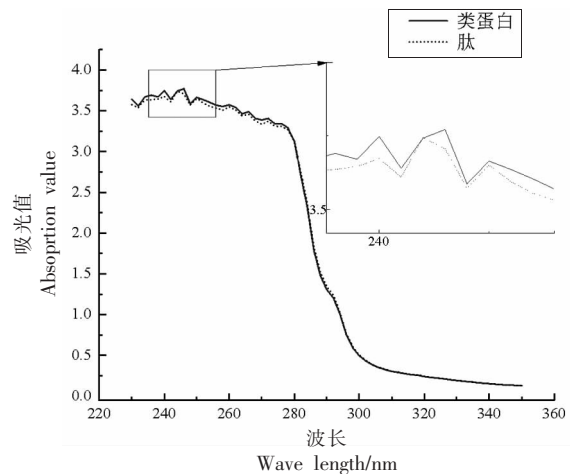


图7 肽与类蛋白产物的紫外扫描图谱

Fig.7 The UV spectra of peptide and plastein

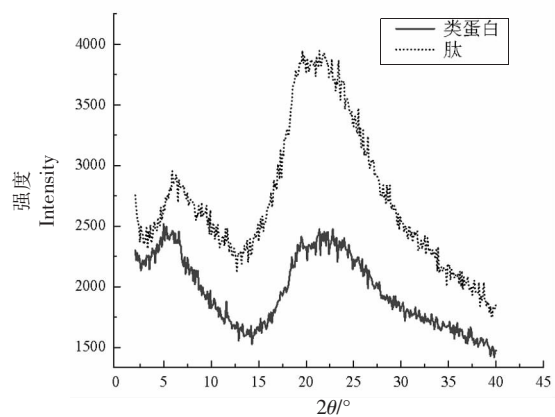
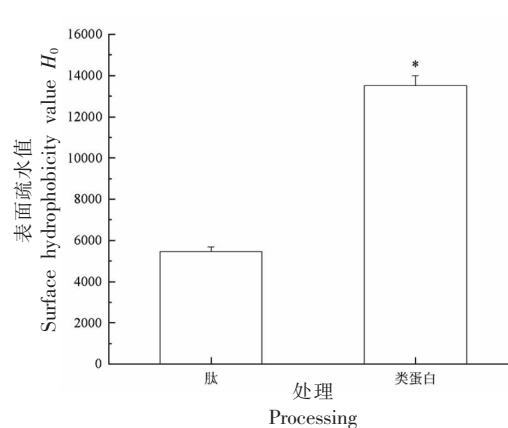


图8 肽与类蛋白产物的X射线衍射图谱

Fig.8 X-ray diffraction spectra of peptide and plastein



注:采用独立样本 t 检验,“*”表示差异显著($P<0.05$)。

图9 类蛋白反应前、后抗氧化肽表面疏水性的变化
Fig.9 Changes of surface hydrophobicity of antioxidant peptides before and after plastein reactions

氨酸和赖氨酸,在激发波长 280 nm 下均能发射荧光^[35]。由图 10 可知,与肽相比,类蛋白反应产物的荧光强度明显升高。荧光强度的升高说明半胱氨酸、底物与蛋白酶发生相互作用,分子内部疏水区域遭到破坏,色氨酸基团暴露于环境中或蛋白质分子间交联,于表面形成新的生色团,而色氨酸作为疏水氨基酸,暴露在环境中能够增加多肽的抗氧化能力^[19]。此外,还发现类蛋白反应使肽的最大发射波长蓝移 6 nm,从 346 nm 移至 340 nm。曲玲玲^[19]在研究大豆蛋白-酪蛋白水解物的类蛋白反应时样品的最大发射波长从 349.8 nm 蓝移至 348.8 nm。该现象说明底物的三级结构发生改变,色氨酸残基处于一个更为疏水的微环境中,与前文表面疏水性增加相对应。酶的作用使蛋白内部的疏水氨基酸暴露出来,通过相互作用形成聚合物,可见疏水相互作用是类蛋白形成的重要机制^[19,24]。

2.4.5 扫描电镜分析微观结构 通过扫描电镜分析微观结构,发现结构的变化影响蛋白的功能性质。利用扫描电镜观察肽和类蛋白粉末的微观表面结构,将其在电镜下放大 100 倍,其中每个处理组的两个图不为不同角度照相所得。从图 11 可看出多肽表面凹凸不平且有不规则形状的突起,孔径较为疏松,小颗粒物质聚集呈致密的网状结构,表

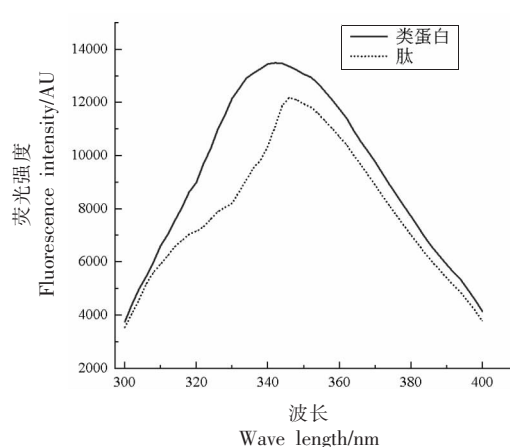


图 10 肽与类蛋白反应产物的内源荧光光谱图

Fig.10 Intrinsic fluorescence spectra of peptide and plastein

明底物不稳定,往往通过疏水作用和氢键形成复杂结构。曲玲玲^[19]在观察大豆蛋白-酪蛋白类蛋白产物后发现类蛋白产物表面不光滑且有棱状突起,整体相对于多肽更偏向片状结构,质地疏松,紧密性较弱,表面出现细小微孔。反应涉及分子的水解与再聚合,该过程中呈较链状聚集,形成较大的片状聚合物,使更多巯基和疏水性基团暴露在蛋白表面,促进疏水基团与自由基结合的同时引起表面疏水性的提高。

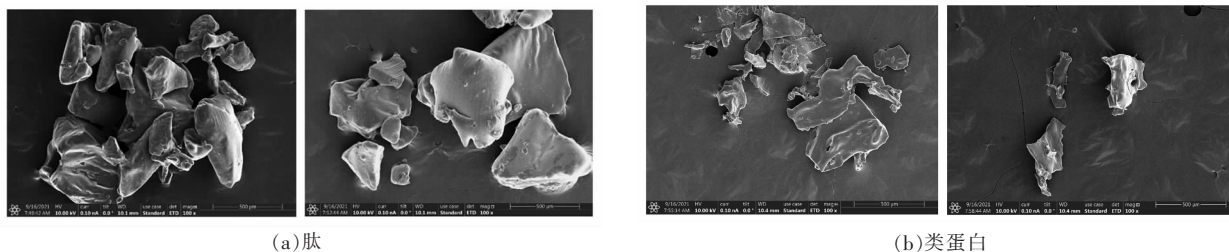


图 11 肽与类蛋白反应产物的扫描电镜图

Fig.11 Scanning electron micrographs of peptide and plastein

2.4.6 傅里叶变换红外光谱分析微观结构 傅里叶变换红外光谱法是分析多肽或蛋白质二级结构的常用工具,利用红外光谱对肽和类蛋白的化学结构进行表征。4 000~1 300 cm^{-1} 区域被称为特征区域或功能区^[27],肽与类蛋白在功能区的吸收特性较为接近,也有不同。3 400~3 200 cm^{-1} 主要为 O-H 和 N-H 伸缩特征峰,分子内或分子间氢键的

形成导致游离态-OH 的吸收峰朝低波数移动^[36]。从图 12 可看出类蛋白反应发生后 3 254.41 cm^{-1} 处的吸收峰向低波长方向移动至 3 212.54 cm^{-1} ,表明类蛋白分子中存在大量分子内或分子间氢键。

蛋白的二级结构基于酰胺 I,II 和 III 带分析。酰胺 I 带(1 700~1 600 cm^{-1})主要由 C=O 伸缩振动产生,酰胺 II 带(1 600~1 500 cm^{-1})主要由 N-H 变

形振动和 C-N 伸缩振动产生, 酰胺 III 带(1 330~1 200 cm^{-1}) 主要由 C-N 拉伸耦合到平面内 N-H 弯曲得到^[37]。酰胺 I 带吸收峰从 1 628.57 cm^{-1} 移动至 1 621.46 cm^{-1} , 表示结构从 α -螺旋向无规则卷曲和 β -折叠转变, -COOH 峰从 1 453.39 cm^{-1} 移动到 1 455.18 cm^{-1} , 说明羧基的 C=O 参与反应; 酰胺 II 带吸收峰从 1 516.35 cm^{-1} 移动至 1 515.74 cm^{-1} , 峰强度略有增加, 可以解释为 N-H 和 O-H 键的键常数降低, 对应基团的振动偶极距变化增大^[38], 表明分子的二级结构发生改变。在 1 350~650 cm^{-1}

的指纹图谱区域, 两者的吸收峰位置存在显著差异, 发现单键伸缩振动与变形带振动引起的吸收峰。1 220~1 250 cm^{-1} 为蛋白分子 β -折叠上 C-N 伸缩振动和 N-H 弯曲振动^[39], 反应后吸收峰从 1 234.69 cm^{-1} 蓝移至 1 238.61 cm^{-1} , β -折叠中 C-N 变形振动所需能量变高, 进而引起整体热稳定性增强。类蛋白反应导致水解物在 1 027.96 cm^{-1} 处的吸收峰移动到 1 028.22 cm^{-1} , 此外在 1 074 cm^{-1} 处峰强度增加。这些结果表明类蛋白反应后水解产物的结构发生变化。

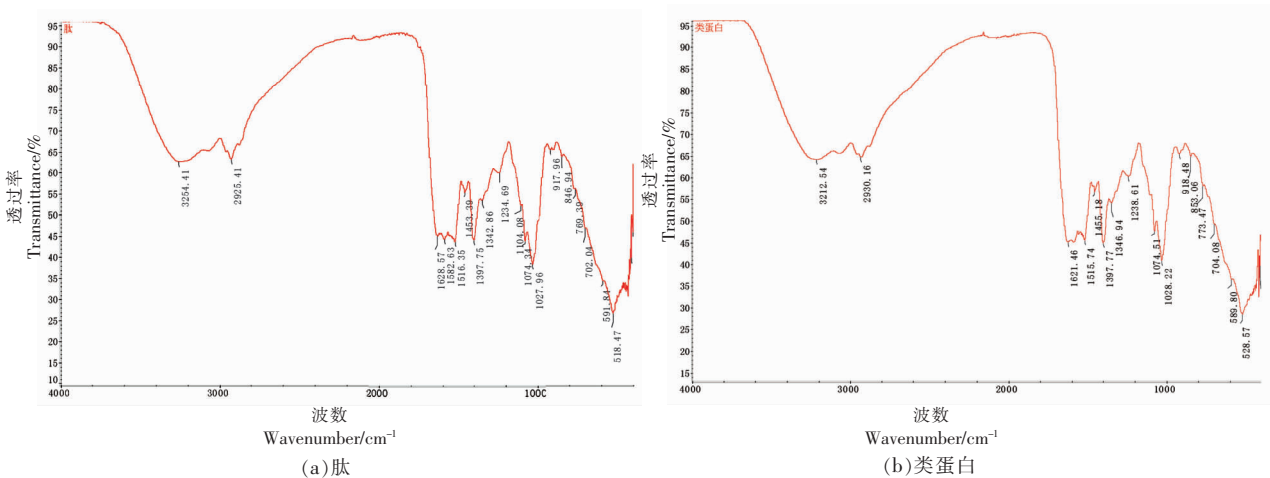


图 12 肽与类蛋白反应产物的傅里叶变换红外光谱分析

Fig.12 Fourier transform infrared spectra of peptide and plastein

2.4.7 蛋白质二级结构分析微观结构 圆二色谱法凭借快速、准确的优点, 广泛应用于蛋白质二级结构的测定。从表 3 可以得到类蛋白产物和肽的二级结构-螺旋含量均较低, 整体结构以 α -折叠为主。王昌盛^[40]研究大豆球蛋白时同样发现其二级结构以 β -折叠为主。 α -螺旋是通过分子内氢键维持的分子内有序排列, 而 β -折叠是通过分子间氢键维持的分子间有序排列^[41]。类蛋白反应导致蛋白质二级结构中 α -螺旋含量从 4.60% 显著降

至 3.60% ($P < 0.05$), α -螺旋含量降低通常与抗氧化性增加相关^[42]。 β -折叠含量从 40.15% 显著升至 44.26%, 而 β -折叠含量的增多通常与蛋白质由天然折叠态到去折叠态的变性过程关联, 并最终形成多聚体^[43]。上述结果说明类蛋白反应使蛋白质分子内氢键作用减弱, 蛋白质分子舒展程度变大; 分子间氢键相互作用增强, 蛋白质分子间聚合程度上升。

紧密且无空腔的 α -螺旋结构含量的下降与

表 3 肽与类蛋白的二级结构含量

Table 3 Secondary structure relative contents of peptide and plastein

样品	二级结构组成/%			
	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规则卷曲
肽	4.60 ± 0.17	40.15 ± 0.42	21.75 ± 0.08	33.50 ± 0.29
类蛋白	3.60 ± 0.10*	44.26 ± 0.78*	15.25 ± 1.67*	36.89 ± 1.23*

β -折叠、无规则卷曲含量的上升(从 33.50%增至 36.89%)均意味着分子结构展开,整体变得更加灵活和有序,内部被掩盖的疏水基团暴露,导致表面疏水性增加^[44]。暴露的疏水位点能更好地与自由基结合,提升抗氧化效果。类似的,Zhang 等^[37]在研究大豆多肽时发现类蛋白反应后样品的 α -螺旋从 3.9%减至 3.5%, β -折叠从 41.3%增至 49.3%, β -转角从 21.7%降至 8.8%,无规则卷曲从 33.3%升至 38.4%。综上,类蛋白产物在溶液中的二级结构显著改变,整体从有序向无序变化。

3 结论

4 种外源氨基酸中半胱氨酸对多肽的抗氧化能力改善效果最明显,类蛋白反应程度最大。随着半胱氨酸添加量的增加,产物的抗氧化能力先升高后趋于平稳。热稳定性分析显示类蛋白产物的热变性温度较多肽提升 14.09 °C。从凝胶色谱图可得知类蛋白反应使样品的分子量向增大的方向迁移。类蛋白反应发生后,样品的最大吸收波长发生红移,X 射线衍射图谱在 $2\theta=21.8^\circ$ 处出现强度较低且较宽的结晶衍射峰。在胃蛋白酶参与的类蛋白反应下蛋白质的结构部分展开,内部的疏水基团如色氨酸等暴露,表面疏水性增加,荧光最大发射波长蓝移,暴露的疏水基团促进了肽与自由基的结合。扫描电镜结果显示类蛋白更偏向片状结构,质地疏松,紧密性较弱。利用傅里叶变换红外光谱和圆二色光谱分析蛋白二级结构,发现 β -折叠吸收峰从 $1\ 234.69\ \text{cm}^{-1}$ 蓝移至 $1\ 238.61\ \text{cm}^{-1}$, β -折叠中 C-N 变形振动所需能量变高,进而引起整体热稳定性增强。 α -螺旋含量的降低促进多肽抗氧化能力的提升,同时 β -折叠和无规则卷曲含量显著提高,蛋白质分子二级结构变得更加无序。综上,类蛋白反应改变了蛋白质的二级和三级结构,从而提升了多肽的抗氧化能力和热稳定性。本研究将为生物活性肽的功能改善与性质研究提供理论参考。

参 考 文 献

- [1] AHN C B, LEE K H, JE J Y. Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: Effects of enzymes and molecular weight on bioactivity[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2010, 45(3): 562-568.
- [2] LAFARGA T, HAYES M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: Generation, functionality and application as functional ingredients[J]. *Meat Science*, 2014, 98(2): 227-239.
- [3] IDOWU A T, BENJAKUL S. Bitterness of fish protein hydrolysate and its debittering prospects[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2019, 43(9): e12978.
- [4] FU Y, LIU J, HANSEN E T, et al. Structural characteristics of low bitter and high umami protein hydrolysates prepared from bovine muscle and porcine plasma[J]. *Food Chemistry*, 2018, 257: 163-171.
- [5] WILLIAMS R J H, BROWNSSELL V L, ANDREWS A T. Application of the plastein reaction to mycoprotein: I. Plastein synthesis[J]. *Food Chemistry*, 2001, 72(3): 329-335.
- [6] UDENIGWE C C, RAJENDRAN S R C K. Old products, new applications? Considering the multiple bioactivities of plastein in peptide-based functional food design[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2016, 8: 8-13.
- [7] 侯钰柯, 石金明, 曾宪明, 等. 类蛋白反应及其在肉类中的应用[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(8): 261-267.
HOU Y K, SHI J M, ZENG X M, et al. Plastein reactions and its application in meat[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(8): 261-267.
- [8] 高丹丹, 程浩, 马忠仁, 等. 泥鳅蛋白抗氧化肽的 Plastein 反应修饰研究[J]. *浙江农业学报*, 2018, 30(8): 1312-1320.
GAO D D, CHENG H, MA Z R, et al. Modification of antioxidant peptide from loach protein by Plastein reaction[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, 30(8): 1312-1320.
- [9] 韩青, 周丽杰, 李智博, 等. 酶法制备联合 Plastein 反应修饰牡蛎 ACE 抑制肽工艺优化[J]. *食品科学*, 2017, 38(6): 104-110.
HAN Q, ZHOU L J, LI Z B, et al. Optimized preparation of ACE inhibitory peptides from oyster by enzymatic hydrolysis coupled with plastein reaction[J]. *Food Science*, 2017, 38(6): 104-110.
- [10] 杨逸鹏. 糖基化修饰制备低敏卵清蛋白及其机初探[D]. 南昌: 南昌大学, 2020.

- YANG Y P. Preparation of hyposensitive ovalbumin by glycosylation and its mechanism[D]. Nanchang: Nanchang Unniversity, 2020.
- [11] LIU D M, CHEN X, HUANG J C, et al. Generation of bioactive peptides from duck meat during post-mortem aging[J]. Food Chemistry, 2017, 237: 408-415.
- [12] 邢路娟, 胡亚亚, 周光宏, 等. 宣威火腿中粗肽的提取与抗氧化活性鉴定[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(4): 661-666.
- XING L J, HU Y Y, ZHOU G H, et al. The extraction and antioxidant activities of crude peptides from Xuanwei ham[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2015, 38(4): 661-666.
- [13] LI Y H, JIANG B, ZHANG T, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate(CPH)[J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 444-450.
- [14] 刘夫国. 蛋白质-多酚-碳水化合物共价复合物制备及其对功能因子稳态作用[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- LIU F G. Preparation of protein-polyphenol-carbohydrate covalent complex and its homeostasis effect on functional factors[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.
- [15] 刘伯业. 小麦蛋白低苦味肽的制备及其脱苦机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- LIU B Y. Preparation and mechanism of wheat protein low bitterness peptide[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [16] LIU W Y, LU J, GAO F, et al. Preparation, characterization and identification of calcium-chelating Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ossein oligopeptides[J]. European Food Research and Technology, 2015, 241(6): 851-860.
- [17] 王娟, 曹龙奎, 魏春红, 等. 小米硒化水溶性膳食纤维的抗氧化活性及对小鼠肠道菌群产色氨酸能力的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 144-153.
- WANG J, CAO L K, WEI C H, et al. Antioxidant activity of selenium-modified soluble eietary fiber from millet and Its effect on the Tryptophan-producing capability of mouse intestinal flora[J]. Food Science, 2021, 42(11): 144-153.
- [18] ZHU C Z, ZHANG W G, KANG Z L, et al. Stability of an antioxidant peptide extracted from Jinhua ham[J]. Meat Science, 2014, 96(2): 783-789.
- [19] 曲玲玲. 温度调控下大豆蛋白-酪蛋白类蛋白反应及特征表征[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2016.
- QU L L. Characterization of soybean protein-casein protein reactions under temperature control [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2016.
- [20] LIU M, WU N N, YU G P, et al. Physicochemical properties, structural properties, and *in vitro* digestibility of pea starch treated with high hydrostatic pressure: Properties of high hydrostatic pressure treated pea starch[J]. Starch - Stärke, 2018, 70(1/2): 1700082.
- [21] 刘文颖, 冯晓文, 程青丽, 等. 小麦低聚肽的结构特征及其体外抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 1-9.
- LIU W Y, FENG X W, CHENG Q L, et al. Structure characteristics and antioxidant activity in vitro of wheat oligopeptides[J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 1-9.
- [22] 王思文. 外源氨基酸修饰的类蛋白产物对细胞氧化损伤的保护作用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2014.
- WANG S W. Protective effects of exogenous amino acid modified protein-like products on oxidative damage of cells[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014.
- [23] GONG M, MOHAN A, GIBSON A, et al. Mechanisms of plastein formation, and prospective food and nutraceutical applications of the peptide aggregates[J]. Biotechnology Reports, 2015, 5: 63-69.
- [24] LI Q, FU Y, ZHANG L T, et al. Plastein from hydrolysates of porcine hemoglobin and meat using Alcalase and papain [J]. Food Chemistry, 2020, 320: 126654.
- [25] KRALL N, DA CRUZ F P, BOUTUREIRA O, et al. Site-selective protein-modification chemistry for basic biology and drug development[J]. Nature Chemistry, 2016, 8(2): 103-113.
- [26] 曾凤仙, 周道志, 谢燕. 外源氨基酸酶促修饰对波纹巴非蛤酶解肽抗氧化活性的影响[J]. 现代食品, 2018(6): 134-144.
- ZENG F X, ZHOU D Z, XIE Y. Effects of enzymatic modification of exogenous amino acids on antioxidant activity of hydrolysate peptides from Paphia undulata[J]. Modern Food, 2018(6): 134-144.
- [27] JIANG S S, ZHAO Y H, SHEN Q Q, et al. Modification of ACE-inhibitory peptides from Acaudina molpadioidea using the plastein reaction and exami-

- nation of its mechanism[J]. *Food Bioscience*, 2018, 26: 1–7.
- [28] ALI M, HOMANN T, KHALIL M, et al. Milk whey protein modification by coffee-specific phenolics: Effect on structural and functional properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(28): 6911–6920.
- [29] VAN HOFSTEN B, LALASIDIS G. Protease-catalyzed formation of plastein products and some of their properties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1976, 24(3): 460–465.
- [30] 柯泉, 胡晓, 杨贤庆, 等. 罗非鱼皮胶原蛋白肽-锌螯合物的制备及结构表征与体外消化分析[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(14): 38–44.
- KE X, HU X, YANG X Q, et al. Preparation, structure characterization and in vitro gastrointestinal digestion of tilapia skin collagen peptide-zinc chelate[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(14): 38–44.
- [31] 王晨, 马艳秋, 张梓湘, 等. 不同处理方法对蛋清蛋白免疫原性及结构的影响[J]. *食品科学*, 2022, 43(15): 1–13.
- WANG C, MA Y Q, ZHANG Z X, et al. Effects of different processing methods on the immunogenicity and structure of egg white protein[J]. *Food Science*, 2022, 43(15): 1–13.
- [32] UDENIGWE C C, MOHAN A, WU S. Peptide aggregation during plastein reaction enhanced bile acid-binding capacity of enzymatic chicken meat hydrolysates[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2015, 39(3): 344–348.
- [33] MOHAN A, UDENIGWE C C. Towards the design of hypolipidaemic peptides: Deoxycholate binding affinity of hydrophobic peptide aggregates of casein plastein[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 129–136.
- [34] AVRAMENKO N A, LOW N H, NICKERSON M T. The effects of limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate[J]. *Food Research International*, 2013, 51(1): 162–169.
- [35] LIANG L, SUBIRADE M. Study of the acid and thermal stability of β -lactoglobulin-ligand complexes using fluorescence quenching [J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(4): 2023–2029.
- [36] JR H M F, WICKHAM E D, UNRUH J J, et al. Secondary structural studies of bovine caseins: Temperature dependence of β -casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization[J]. *Food Hydrocolloids*, 2001, 15(4/5/6): 341–354.
- [37] ZHANG N, GUO Q Q, SHI Y G, et al. Preparation of casein non-phosphopeptide-soybean polypeptide complex, its structure and emulsifying properties' evaluation [J]. *European Food Research and Technology*, 2019, 245(2): 355–363.
- [38] DONG X, WANG J, RAGHAVAN V. Impact of microwave processing on the secondary structure, in-vitro protein digestibility and allergenicity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) proteins [J]. *Food Chemistry*, 2021, 337: 127811.
- [39] NARA M, TANOKURA M. Infrared spectroscopic study of the metal-coordination structures of calcium-binding proteins[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 369(1): 225–239.
- [40] 王昌盛. 大豆球蛋白自组装纤维的形成及静电屏蔽调控研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2011.
- WANG C S. Study on the formation and electrostatic shielding of soybean globulin self-assembled fibers [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2011.
- [41] SUN X D, ARNTFIELD S D. Gelation properties of chicken myofibrillar protein induced by transglutaminase crosslinking[J]. *Journal of Food Engineering*, 2011, 107(2): 226–233.
- [42] 曹振海, 乐彩虹, 陶宁萍, 等. 体外模拟消化对暗纹东方鲀鱼皮胶原蛋白肽结构特征及抗氧化活性的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(23): 1–12.
- CAO Z H, LE C H, TAO N P, et al. Effects of structural characteristics and antioxidant activity of collagen bioactive peptides from Takifugu obscurus skin during simulated gastrointestinal digestion [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(23): 1–12.
- [43] TAGHAVI F, HABIBI-REZAEI M, AMANI M, et al. The status of glycation in protein aggregation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 100: 67–74.
- [44] 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(9): 54–57.
- WANG C, JIANG L Z, WEI D X, et al. Relation-

ship between structure and surface hydrophobicity of soybean protein isolates from different varieties [J].

Food Science, 2012, 33(9): 54–57.

Effects of Exogenous Amino Acid Modified Plastein Reactions on the Structure and Functions of Antioxidant Peptides from Chicken Lung

Yin Jiaqi^{1,2}, Yu Junjun⁴, Kang Mingli³, Yang Lu⁴, Han Minyi^{1,2,4*}, Xu Xinglian^{1,2}

(¹College of Food Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095

²Key Laboratory of Meat Products Processing, Ministry of Agriculture, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Meat Production and Processing, Quality and Safety Control, Nanjing 210095

³College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018

⁴Wens Food Group Co., LTD., Yunfu 527400, Guangdong)

Abstract Natural bioactive peptides often have poor functional properties and thermal stability, in order to improve the antioxidant ability and thermal stability of chicken lung peptides, plastein reaction involving pepsin and exogenous amino acids was used to treat peptides from chicken lung. High performance liquid chromatography (HPLC) was applied to compare the molecular weight changes before and after the reaction, while the properties of the substances were characterized by UV spectra, fluorescence spectrum, X-ray diffraction spectrum, scanning electron micrographs (SEM). Meanwhile, Fourier transform infrared spectrum (FTIR) and circular dichroism (CD) spectrum were employed to explore the changes of the secondary structure of peptide and plastein. The results showed: Firstly, the DPPH free radical scavenging rate, chelating ability of Fe²⁺ and ·OH scavenging rate increased by 51.85%, 31.11% and 31.30% while the thermal denaturation temperature raised from 122.06 °C to 136.15 °C after 3% Cysteine supplementation. Secondly, the molecular weight and surface hydrophobicity increased, UV and fluorescence spectra showed that the changes of amino acid microenvironment improved the antioxidant activity. Thirdly, the X-ray diffraction pattern revealed that the main diffraction peak widened but the intensity decreased after the reaction, the SEM results displayed that the process involved hydrolysis and repolymerization of molecules. Finally, the results of FTIR and CD showed that the peptide molecules were stretched and the hydrophobic groups were exposed, which might be the reason for the improved antioxidant capacity of the peptides. In summary, plastein reactions changed the secondary and tertiary structures of proteins, thus effectively improving the antioxidant capacity and thermal stability of bioactive peptides.

Keywords antioxidant peptide; amino acid modification; plastein reaction; structure