

DOI: 10.12161/j.issn.1005-6521.2024.07.007

# 过氧自由基氧化对花生球蛋白结构及聚集行为的影响

汪海燕, 李玟君, 李玉蝶, 宋青云, 庞子皓, 肖一郎, 汪超, 李玮\*  
(湖北工业大学 生物工程与食品学院, 湖北 武汉 430000)

**摘要:** 采用不同浓度的 2,2'-盐酸脒基丙烷[2,2'-azobis(2-amidinopropane), AAPH]有氧热分解产生的过氧自由基氧化花生球蛋白, 研究 AAPH 氧化对花生球蛋白分子结构及聚集行为的影响。结果显示:随着 AAPH 浓度的增加, 花生球蛋白表示浊度的吸光度由  $0.20 \pm 0.01$  增加至  $0.44 \pm 0.01$ , 平均粒径从  $(153.94 \pm 3.31)$  nm 增加到  $(196.80 \pm 3.06)$  nm, 而游离巯基含量从  $(14.62 \pm 0.08)$   $\mu\text{mol/g}$  下降到  $(7.77 \pm 0.25)$   $\mu\text{mol/g}$ , Zeta 电位绝对值从  $(24.17 \pm 0.06)$  mV 下降到  $(15.93 \pm 0.05)$  mV。对荧光最大发射波长的研究表明, 在 AAPH 浓度为 0~1 mmol/L 时, 内源荧光最大荧光峰位红移, 在 AAPH 浓度为 5~15 mmol/L 时, 内源荧光最大荧光峰位蓝移。过氧自由基氧化导致花生球蛋白  $\alpha$ -螺旋结构含量下降,  $\beta$ -折叠和无规则卷曲含量上升, 呈现出  $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -折叠和无规则卷曲转化的趋势。扫描电镜观察结果显示, 花生球蛋白经过氧自由基氧化后, 蛋白由聚集坚实逐渐变得发散, 浓度从 10 mmol/L 升高到 15 mmol/L 时, 花生球蛋白表面形态变疏松, 孔隙显著增大。因此, AAPH 适度氧化可以通过改变花生球蛋白的结构影响其聚集行为, 特别是浓度为 5~10 mmol/L 时有利于花生球蛋白的聚集。

**关键词:** 花生球蛋白; 过氧自由基氧化; 二级结构; 红外光谱; 聚集行为

## Effect of Peroxide Free Radical Oxidation on the Structure and Aggregation Behavior of Arachin

WANG Haiyan, LI Wenjun, LI Yudie, SONG Qingyun, PANG Zihao, XIAO Yilang, WANG Chao, LI Wei\*  
(College of Biological Engineering and Food, Hubei University of Technology, Wuhan 430000, Hubei, China)

**Abstract:** Arachin was oxidized by peroxide free radicals derived from aerobic thermal decomposition of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (AAPH) at different concentrations, and the effects of AAPH oxidation on the molecular structure and aggregation behavior of arachin were investigated. The results showed that with the increase of AAPH concentration, the absorbance representing turbidity of arachin increased from  $0.20 \pm 0.01$  to  $0.44 \pm 0.01$ , the average particle size increased from  $(153.94 \pm 3.31)$  nm to  $(196.80 \pm 3.06)$  nm, and the content of free sulfhydryl group decreased from  $(14.62 \pm 0.08)$   $\mu\text{mol/g}$  to  $(7.77 \pm 0.25)$   $\mu\text{mol/g}$ . The absolute value of Zeta potential decreased from  $(24.17 \pm 0.06)$  mV to  $(15.93 \pm 0.05)$  mV. The study on the maximum emission wavelength of fluorescence showed that when the AAPH concentration was 0~1 mmol/L, the maximum fluorescence peak of intrinsic fluorescence red-shifted, and when the AAPH concentration was 5~15 mmol/L, the maximum fluorescence peak of intrinsic fluorescence blue-shifted. Peroxide free radical oxidation resulted in the decrease of  $\alpha$ -helix content of arachin but an increase of  $\beta$ -sheet and random coil, showing a trend of transformation from  $\alpha$ -helix to  $\beta$ -sheet and random coil. The scanning electron microscopy results showed that after peroxide free radical oxidation, arachin gradually dispersed from a tightly aggregated state. Especially, when the concentration increased from 10 mmol/L to 15 mmol/L, the surface morphology of arachin became loose, and the pores increased significantly. Therefore, moderate oxidation by AAPH can affect the aggregation behavior of arachin by changing its structure, particularly at the concentrations of 5~10 mmol/L, which is conducive to the aggregation of arachin.

**Key words:** arachin; peroxide radical oxidation; secondary structure; infrared spectrum; aggregation behavior

基金项目: 国家自然科学基金项目(31901643)

作者简介: 汪海燕(1994—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质化学。

\*通信作者: 李玮(1985—), 男(汉), 副教授, 博士, 研究方向: 蛋白质化学。

引文格式:

汪海燕,李玟君,李玉蝶,等.过氧自由基氧化对花生球蛋白结构及聚集行为的影响[J].食品研究与开发,2024,45(7):49-54,65.

WANG Haiyan, LI Wenjun, LI Yudie, et al. Effect of Peroxide Free Radical Oxidation on the Structure and Aggregation Behavior of Arachin[J]. Food Research and Development, 2024, 45(7):49-54, 65.

花生蛋白由90%的盐溶性蛋白和10%的水溶性蛋白组成,而盐溶蛋白中含有73%的花生球蛋白<sup>[1]</sup>。花生中的球蛋白具有良好的热稳定性、复杂的空间构象以及维持空间构象所需要的疏水键、二硫键和离子键等功能性官能团,可作为一种优良原料广泛应用于食品领域<sup>[2]</sup>。花生球蛋白是花生蛋白中最重要的组分,直接影响花生蛋白的结构和理化性质。因此花生球蛋白更适于花生蛋白的结构和理化性质改性机理的深入研究。

花生在日常贮藏和加工过程中,容易发生脂质氧化反应,导致产品保质期缩短并产生异味,影响食用价值。蛋白质经氧化后羰基化合物含量增加,蛋白的分子间作用力被破坏,高级结构改变并形成交联聚集,因此通过研究蛋白质的理化性质、光谱特征、反应位点等可反映氧化对蛋白质的作用规律<sup>[3]</sup>。已有研究人员使用了各种活性氧或脂质过氧化的副产物来模拟蛋白质氧化,发现蛋白质的氧化会影响食物蛋白质的结构和功能特性,例如肉蛋白<sup>[4]</sup>和大豆蛋白<sup>[5]</sup>。另外李志豪<sup>[6]</sup>研究2,2'-盐酸脒基丙烷对瓜籽蛋白的影响发现,在低氧化度(0~1 mmol/L)时,籽瓜种仁分离蛋白质产生可溶性聚集体。随着蛋白质氧化程度的增加,共价键交联可能导致这些可溶性聚集体进一步聚集,产生不溶性聚集体,导致籽瓜种仁分离蛋白质溶解度降低。

目前,对于花生球蛋白的改性研究主要集中在物理研究方面,如热处理和高压处理<sup>[7]</sup>,而对花生球蛋白氧化的研究较少。2,2'-盐酸脒基丙烷[2,2'-azobis(2-amidinopropane), AAPH]有氧热分解产生的过氧自由基是脂质过氧化反应中最主要的自由基中间体<sup>[8]</sup>。因此,本研究采用AAPH在有氧条件下热分解产生的过氧自由基代表花生蛋白氧化酸败中产生的脂质自由基,研究脂质自由基氧化对花生球蛋白结构的影响,以期更深入地了解花生蛋白的氧化机理,为合理开发花生蛋白提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

花生蛋白粉:上海源叶生物科技有限公司; AAPH:上海麦克林生化科技有限公司;三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris]、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、5,5'-二

硫代双(2-硝基苯甲酸)[5,5'-dithio bis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB]、甘氨酸:广州赛国生物科技有限公司;硫酸铵、无水磷酸二氢钠、十二水合磷酸氢二钠:国药集团化学试剂有限公司。所用试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

FreeZone12L真空冷冻干燥机:美国LABCONCO公司;F-7000荧光分光光度计:日本日立公司;M200 PRO酶标仪:瑞士Tecan公司;Zetasizer Nano-ZS型纳米粒度和Zeta电位分析仪:英国Malvern公司;JSM-6390LV扫描电子显微镜:日本电子JEOL公司;Vertex 70傅里叶红外光谱仪:德国Bruker公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 花生球蛋白的提取

参考陈鹏泉等<sup>[9]</sup>的方法并加以修改,称取适量花生蛋白粉溶于0.5 mol/L NaCl、pH7.9的磷酸盐缓冲液中,在室温下搅拌2 h后,于4℃环境下,以4 000 r/min离心30 min,取沉淀用上述磷酸盐缓冲液按1:5(g/mL)复溶,然后透析48 h,冻干备用。

#### 1.3.2 过氧自由基氧化花生球蛋白的制备

参考杨曦等<sup>[10]</sup>的方法并略加修改,称取1 g花生球蛋白溶于100 mL 0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.4),分别加入浓度为0.5、1.0、5.0、10.0、15.0 mmol/L的AAPH,37℃避光反应24 h后,冰浴降温至4℃,于4℃透析72 h,冻干后为氧化花生球蛋白,以不加AAPH的花生球蛋白作为空白对照。

#### 1.3.3 花生球蛋白浊度的测定

称取10 mg样品溶于10 mL 0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.0),在40℃的水浴锅中水浴30 min后取出,冷却后在600 nm处测定吸光度,以吸光度代表浊度。

#### 1.3.4 游离巯基含量的测定

参考范婷等<sup>[11]</sup>的方法并略加修改,称取9 mg的样品溶于3 mL的Tris-甘氨酸缓冲液(pH8.0)中,取2.5 mL上述溶液并在其中加入20 μL DTNB试剂,混合均匀避光反应10 min,在412 nm处测上清液吸光度。游离巯基含量(X, μmol/g)的计算公式如下。

$$X=73.53 \times A_{412 \text{ nm}} \times D/C$$

式中:  $A_{412 \text{ nm}}$  为吸光度;  $D$  为稀释倍数, 1.01;  $C$  为蛋白浓度, mg/mL。

#### 1.3.5 粒径的测定

参考杨晨<sup>[12]</sup>的方法并略加修改,称取10 mg样品

溶于 10 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液中(pH7.0),搅拌均匀后 4 000 r/min 离心 20 min,取上清液,然后将上清液通过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜除去不溶性的杂质后进行粒径的测定。

### 1.3.6 Zeta 电位的测定

参考李学鹏等<sup>[13]</sup>的方法并略加修改,称取 10 mg 样品溶于 10 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液中(pH7.0),搅拌均匀后 4 000 r/min 离心 20 min 取上清液,然后将上清液通过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜除去不溶性的杂质后进行 Zeta 电位的测定,测定温度为 25  $^{\circ}\text{C}$ ,温度平衡时间为 2 min。

### 1.3.7 内源荧光的测定

参考朱增芳<sup>[14]</sup>的方法并略加修改,称取 10 mg 样品溶于 10 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液中(pH7.0),使用荧光分光光度计测定蛋白质的固有发射荧光光谱,在 290 nm 处激发,扫描波段为 300~400 nm,狭缝宽为 5  $\mu\text{m}$ ,灵敏度为 1,记录光谱的最大发射波长以进行分析。

### 1.3.8 傅里叶红外光谱的测定

参考沈明娟等<sup>[15]</sup>的方法略作修改,称取 1 mg 冻干氧化花生球蛋白和 100 mg 干燥的 KBr 粉末在研钵中混匀并充分研磨,称取适量进行压片,在 4 000~400  $\text{cm}^{-1}$  内测定红外吸收光谱,吸光分辨率 2  $\text{cm}^{-1}$ ,扫描次数 32 次,利用 OMNIC 软件对图谱进行分析,并利用 Peakfit Version 4.12 软件对图谱中酰胺 I 区(1 700~1 600  $\text{cm}^{-1}$ )进行解析,根据二级结构分区计算各区域内子峰面积占总峰面积之比,确定蛋白质 4 种二级结构的相对含量。

### 1.3.9 扫描电子显微镜测定

参考王莉<sup>[16]</sup>的方法略作修改,采用扫描电子显微镜,取冻干后少量花生球蛋白样品,将样品均匀涂抹在带导电胶的干净样品台上,随后样品经喷金处理 30 min,在 20 kV 电压下用扫描电子显微镜观察其微观形貌,放大倍数为 800 倍。

## 1.4 数据处理与分析

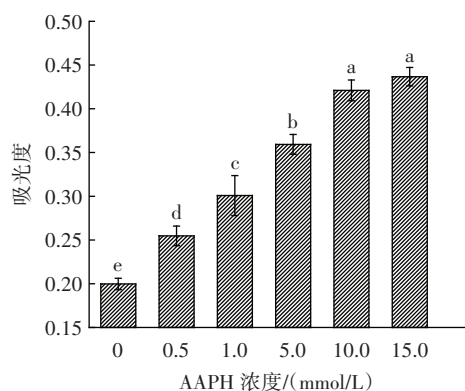
所有试验均重复 3 次以上,试验结果采用 Origin Pro 2021 软件分析作图,SPSS 25.0 软件进行显著性分析。 $P < 0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 过氧自由基氧化对花生球蛋白浊度的影响

浊度是指溶液对光线通过时所产生的阻碍程度,包括悬浮物对光的散射和溶质分子对光的吸收,可以反映氧化过程中蛋白质的聚集状态。样品在 600 nm 下的吸光度表示其浊度,其结果如图 1 所示。

由图 1 可知,花生球蛋白随浓度的增加其浊度也显著增加( $P < 0.05$ ),表示其浊度的吸光度由  $0.20 \pm 0.01$



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

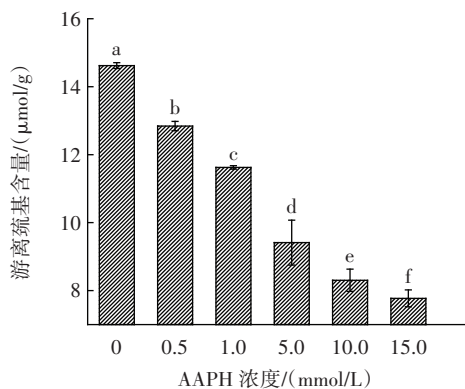
图 1 不同浓度的 AAPH 对花生球蛋白浊度的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of AAPH on the turbidity of arachin

增加至  $0.44 \pm 0.01$ , 15.0 mmol/L 氧化时导致浊度上升程度最高,上升了 1.2 倍。氧化后的花生球蛋白浊度明显上升,说明羟自由基氧化使蛋白质之间发生交联反应,导致蛋白溶液光学密度增加<sup>[15]</sup>。这表明氧化使蛋白质分子结构发生了变化,形成了小分子聚集体,且随氧化程度的上升,小分子聚集体逐渐增多,浊度上升,这也与 Jiang 等<sup>[17]</sup>的结果一致。魏娜<sup>[18]</sup>的研究结果也表明,在同一温度下,鸭肉肌原纤维蛋白的浊度大小与羟自由基浓度成正比,氧化作用会影响鸭肉肌原纤维蛋白不可溶聚集体的生成,导致其浊度的增加。

### 2.2 过氧自由基氧化对花生球蛋白游离巯基的影响

巯基以自由基形式存在或形成二硫键,在蛋白质的二级、三级结构中发挥重要作用。游离巯基含量可以用来表征花生球蛋白的氧化程度,不同浓度的 AAPH 对花生球蛋白的游离巯基的影响如图 2 所示。



不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

图 2 不同浓度的 AAPH 对花生球蛋白游离巯基的影响

Fig.2 Effect of different concentrations of AAPH on free sulfhydryl group of arachin

由图 2 可知,随着氧化程度的增加,花生球蛋白的游离巯基含量显著下降( $P < 0.05$ ),从  $(14.62 \pm$



0.08)  $\mu\text{mol/g}$  下降到  $(7.77\pm 0.25) \mu\text{mol/g}$ 。当 AAPH 浓度为 15.0 mmol/L 时,游离巯基含量相比对照组降低了 48.62%,表明花生球蛋白经 AAPH 氧化后,可能会发生可逆的氧化反应,使巯基氧化为二硫键和次磺酸状态,同时也可能发生不可逆的氧化,导致花生球蛋白游离巯基的下降<sup>[3]</sup>。杨曦等<sup>[19]</sup>也发现自由基氧化可导致蛋白质的游离巯基含量降低,自由基氧化可影响巯基和二硫键交互反应平衡常数的改变。巯基是维持蛋白质结构的一种重要的作用力,巯基含量的降低意味着蛋白质结构发生改变。

### 2.3 过氧自由基氧化对花生球蛋白粒径的影响

不同浓度的 AAPH 对花生球蛋白粒径的影响如图 3 所示。

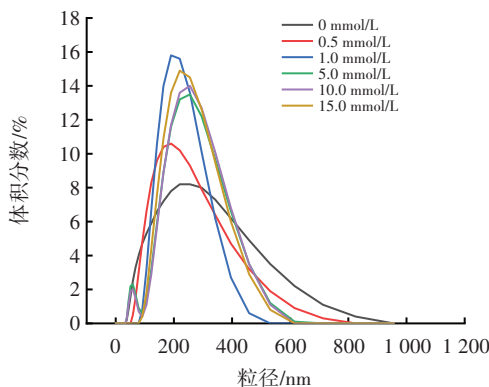


图 3 不同浓度的 AAPH 对花生球蛋白粒径的影响

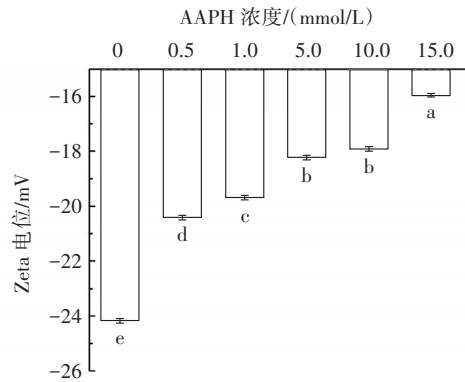
Fig.3 Effect of different concentrations of AAPH on the particle size of arachin

由图 3 可知,不同 AAPH 浓度下,花生球蛋白的粒径总体分布在 100~1 000 nm 之间,未氧化的花生球蛋白的粒径明显低于氧化后的花生球蛋白的粒径,且随着 AAPH 浓度的增加氧化花生球蛋白粒径分布开始向大尺寸方向移动,平均粒径也从  $(153.94\pm 3.31) \text{ nm}$  增加到  $(196.80\pm 3.06) \text{ nm}$ 。这可能是氧化使蛋白分子的疏水基团暴露,在二硫键和次级键的作用下空间结构发生交联,生成较大的蛋白质聚集体,表现为蛋白的平均粒径增大<sup>[3]</sup>。Ye 等<sup>[20]</sup>的研究也出现了同样的结果,AAPH 氧化可导致形成花生蛋白可溶性聚集体。尤翔宇<sup>[21]</sup>在采用 AAPH 氧化米糠蛋白时,氧化米糠蛋白粒径分布也随 AAPH 浓度的增加呈上升趋势。本研究中,浊度的试验结果与粒径变化的结果一致,进一步说明氧化会使蛋白质分子发生聚集,从而使其粒径增大。

### 2.4 过氧自由基氧化对花生球蛋白 Zeta 电位的影响

Zeta 电位的绝对值可以表征溶液的稳定性。氧化花生球蛋白的电位变化如图 4 所示。

由图 4 可知,加入 0.5 mmol/L AAPH 后,电位绝对值开始降低,当 AAPH 浓度为 1.0 mmol/L 时,电位绝



不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

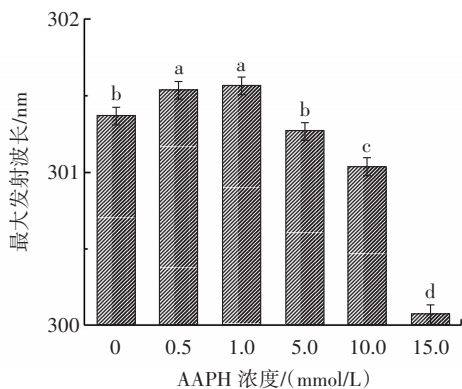
图 4 不同浓度的 AAPH 对花生球蛋白 Zeta 电位的影响  
Fig.4 Effect of different concentrations of AAPH on Zeta potential of arachin

对值降低幅度明显没有 AAPH 浓度为 0.5 mmol/L 时降低幅度大,说明氧化改变了花生球蛋白的电位绝对值,从而改变了蛋白溶液的稳定性。然而随着 AAPH 浓度的增加,电位绝对值又呈现不同程度的下降,在 AAPH 浓度为 15.0 mmol/L 时,电位绝对值降低幅度最大,从  $(24.17\pm 0.06) \text{ mV}$  下降到  $(15.93\pm 0.05) \text{ mV}$ ,降低了 34.09% ( $P < 0.05$ ),说明高浓度的氧化剂会较大程度地影响溶液的稳定性。蛋白质带电荷主要是因为氨基酸带电荷,蛋白质在过氧自由基的攻击下,一些氨基酸被氧化,导致蛋白质电荷绝对值降低,由于所带电荷绝对值的减少,蛋白质之间静电相互作用力减小,这也是蛋白质在氧化后溶解度降低的原因之一<sup>[22]</sup>,此结果与本试验的氧化后花生球蛋白浊度的变化相互印证。这说明 AAPH 氧化使得花生球蛋白氨基酸残基发生变化,从而破坏花生球蛋白溶液的稳定性,改变花生球蛋白的结构。

### 2.5 过氧自由基氧化对花生球蛋白荧光光谱的影响

色氨酸最大荧光发射波长可以表示色氨酸残基在蛋白质中的相对位置,通常用作检测蛋白质构象变化<sup>[23]</sup>的标记物。色氨酸残基在 290 nm 激发下,可以在 300~400 nm 内发出荧光<sup>[5]</sup>。不同浓度的 AAPH 对花生球蛋白荧光扫描图谱的影响如图 5 所示。

由图 5 可知,在 0~1.0 mmol/L AAPH 之间,最大发射波长从 301.4 nm 逐渐增加到 301.6 nm,然后在 5.0 mmol/L AAPH 时开始下降,在 15.0 mmol/L AAPH 下,最大发射波长降到 300.1 nm。荧光发射向较长波长的位移(红移)表明发色团(色氨酸残基)更容易暴露于亲水环境中,而较短的波长(蓝移)更容易暴露于疏水环境中<sup>[23]</sup>。这可能是因为在较低的氧化剂浓度时,花生球蛋白暴露出色氨酸残基,随着 AAPH 浓度的增加,一些暴露的疏水基团参与了疏水作用,形成了不可溶性聚集体,这也与前面的试验结果(浊度增加、粒径



不同小写字母表示差异显著,  $P < 0.05$ 。

图5 不同浓度的 AAPH 对花生球蛋白荧光扫描图谱的影响  
Fig.5 Effect of different concentrations of AAPH on fluorescence scanning spectra of arachin

增大)相一致,说明氧化致使花生球蛋白发生聚集。

### 2.6 过氧自由基氧化对花生球蛋白红外扫描光谱的影响

傅里叶变换红外光谱表征蛋白质二级结构的主要技术方法之一,酰胺 I 带( $1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ ),是反映蛋白质二级结构变化最常用的谱带<sup>[24]</sup>。红外光谱中蛋白酰胺 I 带常被划分为  $\beta$ -折叠( $1636 \sim 1620 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1696 \sim 1677 \text{ cm}^{-1}$ )、无规则卷曲( $1648 \sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ )、 $\alpha$ -螺旋( $1658 \sim 1649 \text{ cm}^{-1}$ )、 $\beta$ -转角( $1670 \sim 1659 \text{ cm}^{-1}$ )<sup>[15]</sup>。经 AAPH 氧化后,花生球蛋白的二级结构变化如图 6 所示。

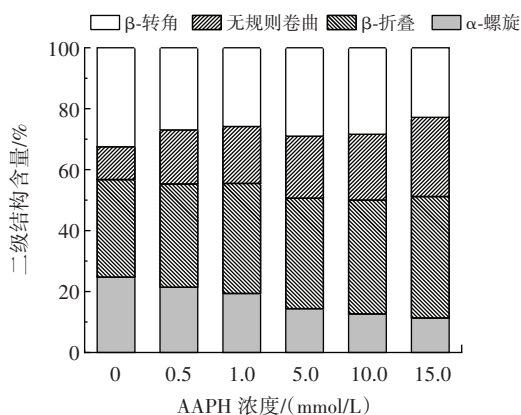


图6 不同浓度的 AAPH 对花生球蛋白二级结构的影响  
Fig.6 Effect of different concentrations of AAPH on the secondary structure of arachin

由图 6 可知,随着 AAPH 浓度的上升, $\alpha$ -螺旋明显下降, $\beta$ -折叠和无规则卷曲明显上升,说明氧化使花生球蛋白的二级结构发生了较大变化,呈现由  $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -折叠和无规卷曲转变的趋势。陈晓思等<sup>[22]</sup>的研究发现,随着 AAPH 浓度的升高,兔肉肌原纤维蛋白的  $\alpha$ -螺旋含量逐渐降低,这与本研究结果一致。 $\alpha$ -螺旋结构主要依靠蛋白质分子内的氢键维持,而自由基攻击

蛋白质的氨基使得蛋白质分子内氢键减少,从而导致蛋白质去折叠化<sup>[25]</sup>。魏娜<sup>[18]</sup>的研究表明过氧自由基氧化可使鸭肉肌原纤维蛋白的  $\alpha$ -螺旋的含量减小, $\beta$ -折叠和无规则卷曲含量增大,表明过氧自由基能促进氢键的断裂,使鸭肉肌原纤维蛋白朝着不稳定的方向转变。

为进一步研究氧化后花生球蛋白二级结构的变化,绘制了 AAPH 浓度与花生球蛋白二级结构的相关性热图,如图 7 所示。

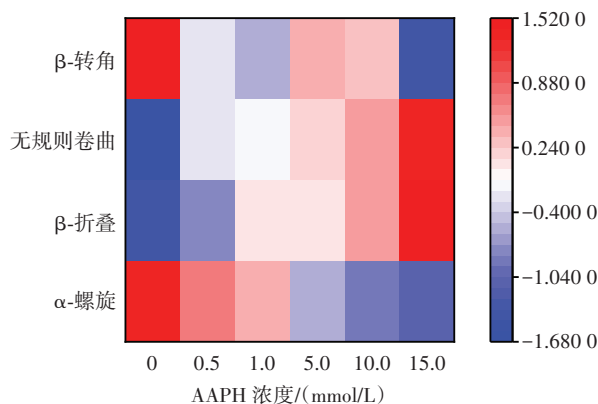


图7 AAPH 浓度与花生球蛋白二级结构的相关性热图  
Fig.7 Heatmap of correlation between AAPH concentration and the secondary structure of arachin

热图中颜色越接近红色,表示相对值越高,越接近蓝色,表示相对值越低。从图 7 可看出,AAPH 浓度与  $\beta$ -折叠和无规则卷曲的变化有较强的正相关,与  $\alpha$ -螺旋有较强的负相关。

### 2.7 过氧自由基氧化对花生球蛋白微观形态的影响

花生球蛋白过氧自由基氧化的微观形态如图 8 所示。

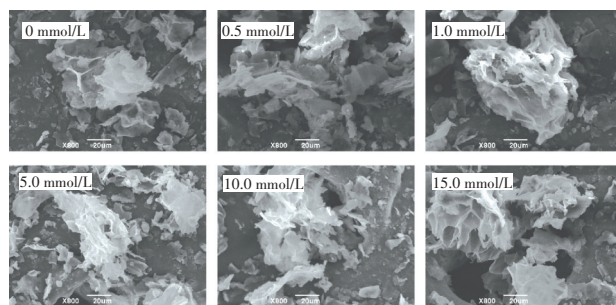


图8 不同浓度的 AAPH 氧化后花生球蛋白的扫描电子显微镜图  
Fig.8 Scanning electron microscope of arachin oxidized by different concentrations of AAPH

由图 8 可知,经对比发现,经  $0.5 \text{ mmol/L}$  AAPH 氧化后,花生球蛋白明显聚集起来;当 AAPH 浓度为  $1.0 \text{ mmol/L}$  时,花生球蛋白分子聚集变得更加紧实;  $5.0 \text{ mmol/L}$  时,可看出蛋白分子内部结构逐渐变得松散;当 AAPH 浓度为  $15.0 \text{ mmol/L}$  时,相比 AAPH 浓度为  $10.0 \text{ mmol/L}$  花生球蛋白表面孔隙明显增大,且呈现

明显的“蜂窝”状结构,这与张雪春等<sup>[3]</sup>的研究结果相似。可能是 AAPH 氧化使花生球蛋白分子结构变化,内部松散结构伸展,巯基和疏水基团暴露,并发生相互作用,形成聚集体,这也与花生球蛋白经氧化游离巯基含量逐渐降低,浊度逐渐上升,粒径增大的结果相对应。周非白<sup>[26]</sup>研究的猪肉肌原纤维蛋白氧化后的微观形态也呈现同样的结果,表明氧化使得蛋白质结构发生了变化。

### 3 结论

本研究通过 AAPH 氧化花生球蛋白,分析其对花生球蛋白结构和聚集行为的影响。结果表明,经 AAPH 氧化后花生球蛋白溶液浊度显著增加( $P<0.05$ ),这是由氧化后形成蛋白聚集体所造成,这与氧化后花生球蛋白的粒径显著增加,形貌孔径显著增大的现象相一致。同时 AAPH 对花生球蛋白的氧化使其游离巯基含量和电位绝对值下降,降低了花生球蛋白的稳定性,经氧化后花生球蛋白的二级结构显示由  $\alpha$ -螺旋向  $\beta$ -折叠和无规则卷曲转化的趋势。氧化后花生球蛋白荧光最大发射波长的蓝移与红移,与花生球蛋白中色氨酸及其残基在低浓度氧化剂下结构稳定性降低、高浓度氧化剂下参与聚集体有关。由此可见,花生球蛋白经过 AAPH 氧化后会发生聚集且其结构稳定性降低,可对花生球蛋白的改性机理研究提供依据。

### 参考文献:

- [1] 黎鹏. 动态超高压微射流技术对花生球蛋白功能性质的影响及其机理研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2008.  
LI Peng. Influence of high pressure microfluidization on the functional properties of arachin and its mechanism study[D]. Nanchang: Nanchang University, 2008.
- [2] 刘岩, 赵冠里, 苏新国. 花生球蛋白和伴球蛋白的功能特性及构象研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(9): 2095-2101.  
LIU Yan, ZHAO Guanli, SU Xinguo. Functional and conformational properties of arachin and conarachin[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(9): 2095-2101.
- [3] 张雪春, 李如蕊, 程群, 等. 羟自由基氧化对核桃蛋白性质和结构的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(18): 107-112.  
ZHANG Xuechun, LI Rurui, CHENG Qun, et al. Effect of hydroxyl radical oxidation on properties and structure of walnut protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(18): 107-112.
- [4] SUN W Z, ZHOU F B, SUN D W, et al. Effect of oxidation on the emulsifying properties of myofibrillar proteins[J]. Food and Bioprocess Technology, 2013, 6(7): 1703-1712.
- [5] CHEN N N, ZHAO M M, SUN W Z, et al. Effect of oxidation on the emulsifying properties of soy protein isolate[J]. Food Research International, 2013, 52(1): 26-32.
- [6] 李志豪. 籽瓜种仁蛋白质及其加工功能特性研究[D]. 武汉: 湖北工业大学, 2019.  
LI Zhihao. Study on the protein and processing characteristics of seed-watermelon kernels[D]. Wuhan: Hubei University of Technology, 2019.
- [7] 赵谋明, 辛佩贤, 陈楠楠, 等. 花生球蛋白和伴花生球蛋白在酸性条件下亚基结构的变化规律[J]. 现代食品科技, 2016, 32(3): 30-35, 55.  
ZHAO Mouming, XIN Peixian, CHEN Nannan, et al. Structural variations in the subunits of arachin and conarachin under acidic conditions[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(3): 30-35, 55.
- [8] 尤翔宇, 黄慧敏, 吴晓娟, 等. 过氧自由基氧化对米糠蛋白结构和功能性质的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 34-41.  
YOU Xiangyu, HUANG Huimin, WU Xiaojuan, et al. Effects of oxidative modification by peroxyl radicals on the structural and functional properties of rice bran protein[J]. Food Science, 2019, 40(4): 34-41.
- [9] 陈鹏泉, 刘磊, 陈楠, 等. 不同干燥预处理下储藏条件对花生品质变化影响研究[J]. 花生学报, 2022, 51(1): 30-41.  
CHEN Pengqiao, LIU Lei, CHEN Nan, et al. Study on the effect of storage conditions on peanut quality under different dry pretreatment[J]. Journal of Peanut Science, 2022, 51(1): 30-41.
- [10] 杨曦, 程群, 刘江, 等. 脂质自由基诱导氧化对花生蛋白功能特性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(10): 87-91.  
YANG Xi, CHENG Qun, LIU Jiang, et al. Effect of lipid free radical-mediated oxidation on the functional properties of peanut proteins[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(10): 87-91.
- [11] 范婷, 赵强, 赵小莉, 等. 脂质自由基 AAPH 体外氧化对富硒大豆分离蛋白性质和结构的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(2): 100-106, 92.  
FAN Ting, ZHAO Qiang, ZHAO Xiaoli, et al. Effects of peroxyl radical produced by *in vitro* oxidation by lipid radical AAPH on properties and structure of selenium-enriched SPI[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(2): 100-106, 92.
- [12] 杨晨. 南瓜籽 ACE 抑制肽制备及其活性的研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2021.  
YANG Chen. Study on the preparation and hypertensive effect of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from pumpkin seed protein[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2021.
- [13] 李学鹏, 刘慈坤, 王金厢, 等. 烷过氧自由基氧化对草鱼肌原纤维蛋白热聚集行为的影响[J]. 食品科学, 2020, 41(17): 9-16.  
LI Xuepeng, LIU Cikun, WANG Jinxiang, et al. Effect of alkylperoxyl radical oxidation on heat-induced aggregation behavior of myofibrillar protein from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Food Science, 2020, 41(17): 9-16.
- [14] 朱增芳. 蛋白质氧化对鹰嘴豆蛋白结构、理化性质及功能性的影响[D]. 石河子: 石河子大学, 2021.  
ZHU Zengfang. Effects of protein oxidation on structure, physicochemical properties and function of chickpea protein isolate[D]. Shihezi: Shihezi University, 2021.
- [15] 沈明娟, 尹可宏, 杨曦, 等. 三种多酚对羟自由基氧化花生球蛋白的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(8): 27-32.  
SHEN Mingjuan, YIN Kehong, YANG Xi, et al. Effects of three polyphenols on hydroxyl radical oxidation of arachin[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(8): 27-32.
- [16] 王莉. 海藻酸复合水凝胶的制备及其蛋白质控制释放行为研究[D]. 兰州: 兰州交通大学, 2020.  
WANG Li. Preparation of alginate composite hydrogels and their controlled release for protein[D]. Lanzhou: Lanzhou Jiatong University, 2020.
- [17] JIANG S S, DING J Z, ANDRADE J, et al. Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 38: 835-842.



- [13] CHEN D W, ZHANG M. Non-volatile taste active compounds in the meat of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Food Chemistry, 2007, 104(3): 1200-1205.
- [14] SASAKI K, TANI F, SATO K, et al. Analysis of pork extracts by taste sensing system and the relationship between umami substances and sensor output[J]. Sensors and Materials, 2005, 17(7): 397-404.
- [15] KOMIYA Y, MIZUNOYA W, KAJIWARA K, et al. Correlation between skeletal muscle fiber type and responses of a taste sensing system in various beef samples[J]. Animal Science Journal, 2020, 91(1): e13425.
- [16] IZAWA K, AMINO Y, KOHMURA M, et al. Human-environment interactions-taste[M]//Comprehensive Natural Products II. Amsterdam: Elsevier, 2010: 631-671.
- [17] 都甲洁. 舌尖上的味道分析[M]. 耿利华, 崔红, 编译. 北京: 中国质检出版社, 2013.  
Toko Kiyoshi. Taste analysis on the tip of the tongue[M]. GENG Lihua, CUI Hong, Compiled. Beijing: China Quality Inspection Press, 2013.
- [18] KOMATA Y. Umami taste of seafoods[J]. Food Reviews International, 1990, 6(4): 457-487.
- [19] COUPLAND J N, HAYES J E. Physical approaches to masking bitter taste: Lessons from food and pharmaceuticals[J]. Pharmaceutical Research, 2014, 31(11): 2921-2939.
- [20] OGASAWARA M, KATSUMATA T, EGI M. Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1 000 to 5 000 Da peptide[J]. Food Chemistry, 2006, 99(3): 600-604.
- [21] HAYASHI N, CHEN R G, IKEZAKI H, et al. Evaluation of the astringency of black tea by a taste sensor system: Scope and limitation[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(2): 587-589.
- [22] LEGIN A, RUDNITSKAYA A, VLASOV Y, et al. Tasting of beverages using an electronic tongue[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 1997, 44(1/3): 291-296.
- [23] MENDEZ M L R. Electronic noses and tongues in food science[M]. London: Academic Press, 2016.
- [24] ZHANG H M, ZOU G Y, LIU X P, et al. Identification of Xinyang Maojian tea taste using electronic tongue[J]. Sensors and Materials, 2019, 31(7): 2347.

责任编辑:冯娜

收稿日期:2022-07-27

(上接第54页)

- [18] 魏娜. 羟自由基和过氧自由基氧化对鸭肉肌原纤维蛋白结构及凝胶特性的影响[D]. 重庆:西南大学, 2021.  
WEI Na. Effects of hydroxyl radical and peroxy radical oxidation on the structure and gel properties of duck myofibrillar protein[D]. Chongqing: Southwest University, 2021.
- [19] 杨曦, 程群, 常陆望, 等. 羟自由基和过氧自由基氧化对美藤果蛋白功能性质的影响[J]. 中国油脂, 2020, 45(10): 35-40.  
YANG Xi, CHENG Qun, CHANG Luwang, et al. Effect of hydroxyl radical and peroxy radical oxidation on functional properties of sachalin protein[J]. China Oils and Fats, 2020, 45(10): 35-40.
- [20] YE L, LIAO Y, ZHAO M M, et al. Effect of protein oxidation on the conformational properties of peanut protein isolate[J]. Journal of Chemistry, 2013, 2013: 423254.
- [21] 尤翔宇. 过氧自由基和丙二醛氧化对米糠蛋白结构、功能性质和消化性质的影响[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2019.  
YOU Xiangyu. Effects of oxidative modification on structure functional properties and digestibility of rice bran protein by peroxy radicals and malondialdehyde[D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2019.
- [22] 陈晓思, 贺稚非, 王泽富, 等. 过氧自由基对兔肉肌原纤维蛋白理化性质及结构的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(8): 54-61.  
CHEN Xiaosi, HE Zhifei, WANG Zefu, et al. The effect of peroxy radicals on the physicochemical properties and structure of rabbit meat myofibrillar protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(8): 54-61.
- [23] KEERATI-U-RAI M, MIRIANI M, IAMETTI S, et al. Structural changes of soy proteins at the oil-water interface studied by fluorescence spectroscopy[J]. Colloids and Surfaces B, Biointerfaces, 2012, 93: 41-48.
- [24] SUREWICZ W K, MANTSCH H H, CHAPMAN D. Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment[J]. Biochemistry, 1993, 32(2): 389-394.
- [25] JACKSON M, HARIS P I, CHAPMAN D. Fourier transform infrared spectroscopic studies of lipids, polypeptides and proteins[J]. Journal of Molecular Structure, 1989, 214: 329-355.
- [26] 周非白. 氧化修饰对猪肉肌原纤维蛋白结构与功能特性的调控研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.  
ZHOU Feibai. Oxidative modification on porcine myofibrillar protein in relation to structural changes and functional properties[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016.

加工编辑:张岩蔚

收稿日期:2023-01-04