翟娅菲, 王宇浩, 汤国新, 等. 介质阻挡放电等离子体辅助糖基化对 β-乳球蛋白抗氧化活性的影响及构效关系研究 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(19): 75−84. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024090294
ZHAI Yafei, WANG Yuhao, TANG Guoxin, et al. Effect of Dielectric Barrier Discharge Plasma-assisted Glycation on the Antioxidant Activity of β-Lactoglobulin and Its Structure-Activity Relationship[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(19): 75−84. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024090294

·研究与探讨·

介质阻挡放电等离子体辅助糖基化对 β-乳球蛋白抗氧化活性的影响及构效关系研究

翟娅菲, 王宇浩, 汤国新, 牛力源, 张艳艳, 相启森*
(郑州轻工业大学食品与生物工程学院, 冷链食品加工与安全控制教育部重点实验室（培育）, 食品生产与安全河南省协同创新中心, 河南郑州 450001)

摘　要: 本文研究了介质阻挡放电（dielectric barrier discharge，DBD）等离子体辅助糖基化处理对 β-乳球蛋白（β-lactoglobulin，β-LG）及其水解产物抗氧化能力的影响；通过测定其内源荧光、紫外吸收光谱、巯基含量、表面疏水性、平均粒径以及二级结构等，分析 β-LG 结构变化与抗氧化活性之间的关系。结果表明，经 DBD 等离子体辅助糖基化处理 5 min 后，糖基化 β-LG 的 DPPH·清除能力达到 129.8 μmol trolox equivalent（TE）/g，铁还原能力达到 75.1 μmol Fe^{2+}/g；经水解后，糖基化 β-LG 的 DPPH·清除能力和铁还原力分别进一步提高到 193.5 μmol TE/g 和 95.5 μmol Fe^{2+}/g。DBD 等离子体辅助糖基化处理 5 min 时 β-LG 的内源荧光和紫外吸收强度降低，巯基含量和表面疏水性显著降低（$P<0.05$），平均粒径增大，α-螺旋相对含量降低而 β-折叠相对含量增多。综上，DBD 等离子体辅助糖基化处理可以通过改变 β-LG 蛋白的结构，显著增强其抗氧化活性。

关键词: 介质阻挡放电等离子体, 糖基化, β-乳球蛋白, 抗氧化活性, 分子结构
中图分类号: TS201.2　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2025)19−0075−10
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024090294
本文网刊:

Effect of Dielectric Barrier Discharge Plasma-assisted Glycation on the Antioxidant Activity of β-Lactoglobulin and Its Structure-Activity Relationship

ZHAI Yafei, WANG Yuhao, TANG Guoxin, NIU Liyuan, ZHANG Yanyan, XIANG Qisen*
(College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Key Laboratory of Cold Chain Food Processing and Safety Control, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Production and Safety, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: This study examined the antioxidant activity of β-lactoglobulin (β-LG) and its hydrolysate after the treatment of dielectric barrier discharge (DBD) plasma-assisted glycation. The relationship between the structure and antioxidant activity of β-LG was analyzed by measuring the internal fluorescence, ultraviolet absorption spectrum, sulfhydryl content, surface hydrophobicity, average particle size, and secondary structure of treated β-LG. The results showed that after DBD plasma-assisted glycation for 5 min, the DPPH radical scavenging capacity of β-LG reached 129.8 μmol trolox equivalent (TE)/g, and the iron reduction capacity was increased to 75.1 μmol Fe^{2+}/g. The hydrolysate exhibited further enhancement in both DPPH radical scavenging capacity and iron reduction capacity, reaching 193.5 μmol TE/g and 95.5 μmol Fe^{2+}/g, respectively. After DBD plasma-assisted glycation for 5 min, the endogenous fluorescence, ultraviolet absorption intensity, the relative content of α-helix, sulfhydryl group content and surface hydrophobicity ($P<0.05$) of β-LG significantly

收稿日期: 2024−09−23
基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目（32102135）; 河南省科技攻关项目（242102110109）。
作者简介: 翟娅菲（1987−）, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品非热加工, E-mail: yafei827@126.com。
*** 通信作者:** 相启森（1984−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品非热加工, E-mail: xiangqisen2006@163.com。

decreased, whereas the average particle size and the relative content of β-fold increased. In conclusion, DBD plasma-assisted glycation can effectively improve the antioxidant activity of β-LG by changing its structure.

Key words: dielectric barrier discharge plasma; glycation; β-lactoglobulin; antioxidant activity; molecular structure

β-乳球蛋白(β-lactoglobulin, β-LG)是一种具有球状结构的可溶性蛋白质, 由 162 个氨基酸残基组成, 分子量为 18.4 kDa, 包含一个游离半胱氨酸和两个二硫键[1], 存在于大多数哺乳动物的乳汁中, 约占乳汁总蛋白质的 10% 或乳清蛋白的 50%[2]。由于其独特的理化性质、脂质转运功能以及免疫调节、抗氧化和降低胆固醇等多种生物活性[3], β-LG 可作为食品乳化剂、稳定剂和营养补充剂等被广泛应用于各种食品体系中[4]。β-LG 是一种温和的抗氧化剂, 高温加热会导致其抗氧化活性显著降低[5]。此外, β-LG 虽然可以作为生物活性物质的天然载体, 但仅凭其固有的抗氧化能力不足以保护其他成分免受脂质氧化[6]。为进一步提高其在食品工业中的需求, 需要对其进行加工改性, 以增强其抗氧化性。

蛋白质的糖基化修饰是增强天然蛋白质功能特性的有效途径, 能够改善包括溶解度、黏度、乳化能力、胶凝能力、热稳定性和抗氧化活性在内的多种功能特性[5]。糖基化反应主要是糖的羰基与蛋白质氨基的共价结合。Dong 等[7] 将水解的 β-乳球蛋白与葡萄糖在 90 ℃ 下加热 18 h, 发现 β-乳球蛋白的抗氧化活性有所提高。然而单独的糖基化反应消耗时间较长, 需要温度高, 对有些蛋白的改性效果不够显著。研究表明, 非热加工与糖基化协同处理可缩短处理时间, 提高改性效果。通过动态高压微射流联合糖基化修饰 β-LG, 可显著降低 β-LG 的致敏性[8]。脉冲电场(PEF)辅助糖基化处理可以促进乳清分离蛋白的糖基化, 提高蛋白的溶解度和乳化性[9]。常压介质阻挡放电(DBD)等离子体是一种温度接近室温(30~60 ℃)的等离子体, 在其工作过程中, 氮气(N_2)和氧气(O_2)等粒子与电子碰撞从而产生臭氧(O_3)、羟基自由基(·OH)和氮氧化物等活性氧和活性氮, 这些高能自由基可断裂共价键并引发一系列化学反应[10]。有文献报道等离子体可以促进蛋白糖基化发生, Yu 等[11] 和 Ji 等[12] 通过冷等离子体处理花生蛋白和乳糖或葡聚糖混合物, 结果发现花生蛋白可在 2 min 内发生糖基化, 并可使产物的溶解性和乳化性增加。而且, 有研究发现等离子体单独处理也可以显著改善花生蛋白的发泡能力和乳化特性[13]。因此, DBD 等离子体处理不仅可以通过自身产生的多种活性物质改变蛋白的功能特性, 还可促进蛋白质糖基化的发生, 从而进一步改变其功能特性[14]。然而, 目前国内外对等离子体辅助糖基化改性蛋白的抗氧化能力研究很少, 对其作用机制尚不明确。

本论文以 β-LG 为研究对象, 采用单独 DBD 等离子体处理及 DBD 等离子体辅助糖基化处理对 β-LG 进行改性, 并将改性后的样品酶解, 测定其抗氧化活性的变化及结构变化, 并建立两者间的构效关系, 为 DBD 等离子体辅助糖基化技术在蛋白改性领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

β-乳球蛋白、1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical, DPPH) 中国上海源叶生物科技有限公司; α-乳糖 天津市科密欧化学试剂有限公司; 8-苯胺-1-萘磺酸(8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, ANS)、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)、胃蛋白酶(3000 U/mg)、胰蛋白酶(250 U/mg) 中国上海麦克林生化有限公司; 三吡啶三吖嗪(tripyridine triazine, TPTZ) 上海阿拉丁试剂有限公司; Bradford 蛋白检测试剂 上海碧云天生物技术股份有限公司; 氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠 天津市大茂化学试剂厂。

CTP-2000K 型等离子体实验装置 南京苏曼电子有限公司; Multiskan GO 型全波长酶标仪 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 5427R 型高速冷冻离心机 德国 Eppendorf 公司; UV-1800PC 型紫外-可见分光光度计 上海美析仪器有限公司; Spark 型多功能酶标仪 瑞士 Tecan 公司; PHSJ-3F 型 pH 计 上海仪电科学仪器有限公司; Chirascan 圆二色光谱仪 英国 Applied Photophysics 公司; F-7000 型荧光分光光度计 日本 Hitachi 公司; ChemiDoc Go 型化学发光成像系统 美国 Bio-Rad 公司; Nano-ZS90 型纳米激光粒度仪 英国 Malvern 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品处理 将 β-LG 和乳糖以 1:1 的质量比溶解于磷酸缓冲液(0.01 mol/L, pH6.5)中, 使蛋白浓度为 4 mg/mL, 室温下混合均匀。使用 DBD 等离子体在 57.6 W 功率下分别对 β-LG 溶液以及 β-LG 和乳糖混合溶液处理 1、3 和 5 min, 使 β-LG 与乳糖发生糖基化反应, 以未经处理的 β-LG 作为对照。所有样品经 3K 超滤管在 10000 r/min 超滤 10 min, 弃去滤出液并在内管中加入磷酸缓冲液, 重复以上超滤过程五次, 以去除未反应的糖和小分子活性粒子。将 DBD 等离子体处理 1、3 和 5 min 的样品分别命名为 P1、P3 和 P5, 等离子体辅助糖基化处理 1、3、5 min 的样品分别命名为 G1、G3 和 G5, 所得样品保存在 4 ℃ 冰箱中用于后续分析, 最多保存 2 d。

1.2.2 糖基化程度(DG)的测定 参考 Yu 等[11] 的方法, 并稍作改动, 将邻苯二甲醛(o-phthalaldehyde,

OPA)(40.0 mg)溶于 1.0 mL 甲醇中，加入 20%(w/w)十二烷基硫酸钠(SDS)2.5 mL、硼砂(0.1 mol/L)25.0 mL、β-巯基乙醇 100 μL，用去离子水定容至 50.0 mL，制备成 OPA 试剂。取 1.0 mL OPA 试剂与 50.0 μL 经 DBD 等离子体辅助糖基化处理以及未处理的样品混合，以 1.0 mL OPA 和 50.0 μL 蒸馏水为空白对照，室温反应 5 min，在 340 nm 处测定吸光度。DG 的计算公式见式(1)：

$$DG(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \qquad 式（1）$$

式中，A_0 为 β-LG 样品的吸光度值，A_1 为等离子体辅助糖基化后样品的吸光度值。

1.2.3　蛋白酶解　将处理 5 min 的 β-LG 溶解于去离子水中，用盐酸调整 pH 至 2.5，加入胃蛋白酶(2000 U/mL)，并使蛋白终浓度为 1 mg/mL，混匀后在 37 ℃ 恒温水浴锅中酶解 120 min。利用 1 mol/L NaOH 将胃蛋白酶酶解液的 pH 调至 7.5，加入胰蛋白酶(100 U/mL)，混匀后在 37 ℃ 酶解 120 min。结束后加入胰蛋白酶抑制剂以终止反应，分别在酶解 0、60、120、180 和 240 min 时取样。β-LG、P5 和 G5 样品经酶解 240 min 后的样品分别命名为 β-LG-X、P5-X 和 G5-X。

1.2.4　DPPH 自由基清除能力的测定　采用贾飞鸿等[15]的方法加以改动后测定未处理、单独等离子体处理不同时间、等离子体辅助糖基化处理不同时间和酶解后样品的 DPPH 自由基清除能力。配制一定浓度的 Trolox 标准溶液(0、50、100、150、200 和 250 μmol/L)，取 1 mL 标准溶液或浓度为 1 mg/mL 的样品溶液与 4 mL DPPH 溶液(0.2 mmol/L 溶于甲醇)均匀混合后，避光反应 30 min，517 nm 波长处测定其吸光度。对照采用 PBS 溶液代替样品溶液，根据标准曲线(y=−0.0027x+0.7567，R^2=0.9995)计算样品的 DPPH 自由基清除能力，结果表示为每 g 蛋白所含 Trolox 当量(μmol TE/g)。

1.2.5　铁还原能力(FRAP)的测定　采用 Zagury 等[16]的方法加以改动后测定 FRAP。将乙酸钠缓冲液(300 mmol/L，pH3.6)、TPTZ 溶液(10 mmol/L)和 $FeCl_3$(20 mmol/L)三种溶液按 10∶1∶1(v/v/v)混合均匀得到 TPTZ 工作液。配制浓度为 0、25、50、75 和 100 μmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液作为一系列标准溶液。取 1 mL 上述样品溶液或标准溶液($FeSO_4$ 溶液)与 4 mL TPTZ 工作液混合，593 nm 波长处测定其吸光度，对照使用 TPTZ 工作液。根据标准曲线(y=0.003x+0.0978，R^2=0.9996)计算出样品的铁还原能力，结果表示为每 g 蛋白所含 Fe^{2+}的当量(μmol Fe^{2+}/g)。

1.2.6　结构测定

1.2.6.1　SDS-PAGE 分析　采用 Luo 等[17]的方法加以改动，调节蛋白质浓度为 1 mg/mL，取 80 μL 未处理、单独等离子体处理 5 min、等离子体辅助糖基化处理 5 min 及其酶解后的样品，加入等量的上样缓冲液，煮沸 5 min，冷却后吸取 10 μL 上样，分离胶浓度为 15%，浓缩胶浓度为 6%。电泳分离在 70 V 下进行 30 min，然后在 120 V 下进行直至结束。结束后取出胶板，用 0.5% 考马斯亮蓝 R-250 染色凝胶，并在成像前脱色。

1.2.6.2　粒径和电位测定　采用 Ma 等[18]的方法加以改动后测定上述样品的粒径、电位。用磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L，pH6.5)将不同样品溶液稀释至 0.5 mg/mL，用离心机在 10000 r/min 下离心 10 min，然后在 25 ℃ 下使用纳米激光粒度仪测定其粒径和电位。设置程序为 11 次单独运行 10 s、平衡 120 s，在 173°散射角下进行检测。结果由马尔文标准操作程序(SOP)软件自动获得。

1.2.6.3　内源荧光光谱扫描　参考杜童申等[19]的方法，用 0.01 mol/L、pH7.0 的磷酸盐缓冲溶液将上述样品稀释至质量浓度为 0.5 mg/mL，测定参数设置为：激发波长 280 nm，扫描速度 1200 nm/min 和范围 300~420 nm，电压为 400 V，激发和发射狭缝宽度均为 5 nm，平行测三次。

1.2.6.4　紫外吸收光谱检测　参考 Ma 等[18]的方法，将上述样品使用去离子水调整为浓度 0.05%(w/v)，使用紫外可见分光光度计在 25 ℃ 下进行测定，记录 UV 光谱扫描范围为 250~400 nm，采样间隔为 1.0 nm，扫描速度设置为高速，每个样品扫描三次。

1.2.6.5　游离巯基和总巯基含量的测定　采用 Liu 等[20]的方法加以改动后测定上述样品的巯基含量。将 4 mg 5,5-二硫代-双 2-硝基苯甲酸(DTNB)溶解在 1 mL Tris-甘氨酸-SDS 缓冲液(0.1 mol/L Tris、0.1 mol/L 甘氨酸、4 mmol/L EDTA、0.5% SDS(w/v)、pH8.0)中制备 Ellman 试剂。将样品溶于含 8 mol/L 尿素的 Tris-甘氨酸-SDS 缓冲液中，使其终浓度为 1 mg/mL，取 1 mL 与 5 μL 的 Ellman 试剂混合，并将混合物在室温下避光放置 30 min。在 412 nm 的波长下测定吸光度值，以计算总巯基含量。使用与上述相同的方法测定游离巯基含量，但使用 PBS 缓冲液代替 8 mol/L 尿素。分别根据公式(2)和(3)计算总巯基和游离巯基含量：

$$总巯基(\mu mol/g) = \frac{73.53 \times As_1}{C} \qquad 式（2）$$

$$游离巯基(\mu mol/g) = \frac{73.53 \times As_2}{C} \qquad 式（3）$$

式中：As_1 为溶于含尿素溶液的样品在 412 nm 处的吸光度，As_2 为溶于不含尿素溶液的样品在 412 nm 处的吸光度，C 为样品浓度(mg/mL)。

1.2.6.6　表面疏水性测定　根据 Wang 等[21]的方法，采用 ANS 荧光探针法测定各组样品的表面疏水性，用 0.01 mol/L 的 PBS 溶液配制浓度分别为 0.02、

0.1、0.25 和 0.5 mg/mL 的 β-LG 溶液，取 1 mL 稀释后的 β-LG 溶液和 10 μL 8 mmol/L 的 ANS 溶液（0.01 mol/L，pH7.0）混合，检测荧光强度。参数设定：激发波长为 390 nm、发射波长为 470 nm、狭缝宽度均为 10 nm。以 β-LG 的浓度为横坐标，以荧光强度为纵坐标制作曲线，表面疏水性（H_0）为拟合曲线的斜率。

1.2.6.7 圆二色光谱测定 采用李雪等[22]的方法加以改动，利用圆二色谱仪对 β-LG 的二级结构进行测定。将上述样品浓度调至 0.2 mg/mL，装入光径为 1 mm 的比色皿中，以去离子水作为空白组，扫描速度、扫描范围和带宽分别设置为 100 nm/min、190~260 nm 和 1 nm，每个样品重复三次测定。然后用 CDNN Pro 软件计算 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规卷曲的相对含量。

1.3 数据处理

所有数据结果均表示为平均值±标准差，每组数据做 3 个平行。采用 SPSS 27.0 软件中方差分析（Analysis of variance，ANOVA）模块的最小显著性差异分析和 Duncan 法对实验数据进行差异显著性分析，采用 Origin 2021 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 糖基化程度分析

在 DBD 等离子体的作用下，β-LG 的氨基与还原糖的羰基发生缩合，蛋白的游离氨基含量降低[23]。如图 1 所示，DBD 等离子体处理 1 min 时，β-LG 的糖基化程度为 20.3%，处理 5 min 时糖基化程度显著增加到 40.1%（$P<0.05$）。这一现象可能是因为 DBD 等离子体处理过程中产生的活性物质可活化蛋白质表面基团，促进了与还原糖的缩合反应[24]。同样的，Ji 等[12]将花生分离蛋白与葡聚糖混合溶液加热到 60 ℃ 后，使用 DBD 等离子体处理 1.5 min 后，糖基化程度达到 21.62%，与本文结果相似。这表明等离子体处理可以有效地促进蛋白与还原糖的结合，与其他研究相比反应温度更低，速度更快。Nooshkam 等[25]将乳清蛋白分离物在 90 ℃ 下与低酰基结冷胶

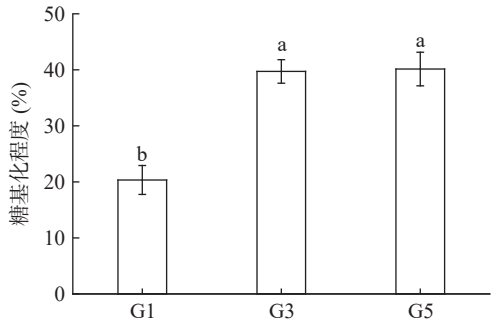

图 1 DBD 等离子体辅助糖基化对 β-LG 糖基化程度的影响

Fig.1 Effect of DBD plasma-assisted glycosylation on the glycosylation degree of β-LG

注：不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）；图 2~图 4、图 6、图 8~图 9 同。

通过糖基化反应偶联 90 min，发现乳清蛋白的抗氧化活性显著提升。Mengíbar 等[26]将不同分子量的可溶性壳聚糖与 β-LG 在 40 ℃ 下反应 7 d，发生糖基化后 β-LG 的抗氧化活性提高了 2~3 倍。蛋白质糖基化产物的还原能力提升可能与它们增加的羟基和吡咯基团的电子供体以及还原酮化合物的氢原子供体能力有关[25]。此外，在反应过程中，蛋白质结构也可能发生明显变化，导致更多具有电子供体效应的氨基酸残基暴露[27]。

2.2 DBD 等离子体辅助糖基化处理对 β-LG DPPH·清除能力的影响

如图 2 所示，β-LG 的 DPPH·清除能力随着处理时间的延长逐渐增强。单独 DBD 等离子体处理 1 min 和 3 min 与 DBD 等离子体辅助糖基化处理 1 min 时，β-LG 的 DPPH·清除能力与未处理组相比没有显著变化（$P>0.05$）。当单独 DBD 等离子体处理时间增加到 5 min 时，Trolox 当量达到 117.7 μmol TE/g，DBD 等离子体辅助糖基化处理 5 min 时 Trolox 当量达到 129.8 μmol TE/g，与未处理组相比显著提高（$P<0.05$）。这可能是因为 DBD 等离子体处理过程中，蛋白中的天冬氨酸残基在高能电子束胁迫下受到·OH 和 HO_2·的攻击，生成了具有抗自由基特性的二羰基化合物，形成了具有高抗氧化性能的产物[28]。此外，糖基化产物可提供氢自由基，从而与 DPPH·形成稳定的 DPPH-H 化合物[29]，而 DBD 等离子体能够促进糖基化反应，因此，DBD 等离子体辅助糖基化处理后样品的 DPPH·清除能力进一步提升。

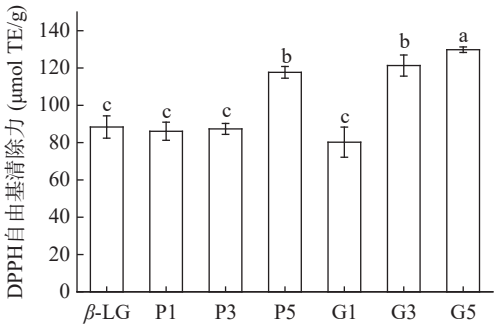

图 2 不同处理对 β-LG DPPH·清除能力的影响

Fig.2 Effects of different treatments on the DPPH scavenging ability of β-LG

2.3 DBD 等离子体辅助糖基化处理对 β-LG 的铁还原能力的影响

FRAP 法通常用于测定具有抗氧化能力的蛋白水解产物和多肽作为还原剂的能力，过程是将多余的电子提供给 Fe^{3+}，将其还原为更稳定的二价铁离子 Fe^{2+}[16]。如图 3 所示，经单独 DBD 等离子体处理和 DBD 等离子体辅助糖基化处理的 β-LG 的铁还原能力与未处理组相比显著提高（$P<0.05$），并且随着处理时间的增加，各处理组中 β-LG 的铁还原能力不断提

高。处理 5 min 时，单独 DBD 等离子体处理和 DBD 等离子体辅助糖基化处理使 β-LG 的铁还原能力从 20.8 μmol Fe^{2+}/g 分别显著提高到了 56.7 μmol Fe^{2+}/g 和 75.1 μmol Fe^{2+}/g（P<0.05）。从结果可知，经 DBD 等离子体辅助糖基化处理相同时间的 β-LG 的铁还原能力高于单独 DBD 等离子体处理的蛋白，结果与 DPPH·清除能力一致。不同处理后 β-LG 抗氧化能力的提升差别可能与 β-LG 结构的不同改变以及具有自由基清除能力基团的不同程度增加有关。Ma 等[30] 也发现，超声辅助 α-乳清蛋白与木糖的糖基化产物的总抗氧化能力显著高于单独超声处理的 α-乳清蛋白。通过对 DPPH 自由基清除效率和铁还原活性的数据分析，发现 β-LG 在这两个反应体系中展现出了差异化的自由基清除能力，这表明同一物质，在不同的抗氧化评价系统中，其表现出来的自由基清除潜力也可能存在显著差异，这与 Li 等[31] 的研究相似。由结果可得 P5 与 G5 抗氧化能力最强，因此将 P5、G5 组样品酶解，进行后续研究。

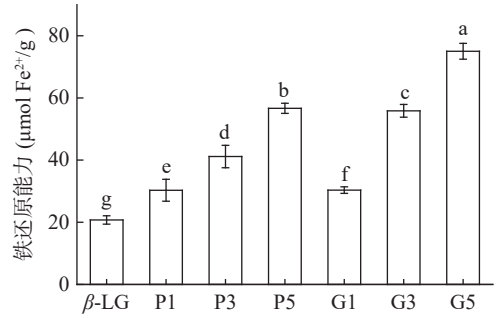

图 3　不同处理对 β-LG 铁还原能力的影响

Fig.3　Effects of different treatments on the FRAP of β-LG

2.4　水解对 β-LG 抗氧化能力的影响

蛋白质经酶水解之后，结构会发生改变，从而影响其抗氧化活性[32]。如图 4A 所示，随着水解时间的延长，β-LG 的 DPPH 自由基清除能力不断提高。可能是酶解之后，β-LG 水解成了小分子量的活性肽，暴露出 Cys、Trp 和 Tyr 等更多具有强抗氧化活性的氨基酸残基[33]。在水解过程中，改性处理的 β-LG 的 DPPH 自由基清除能力高于未处理组，其中 DBD 等离子体辅助糖基化组的最高，G5-X 组 DPPH 自由基清除能力达到 193.5 μmol TE/g，显著高于单独 DBD 等离子体处理组（170.2 μmol TE/g）和未处理组（137.7 μmol TE/g）（P<0.05）。在图 4B 中，样品的铁还原能力在水解过程中的变化趋势与 DPPH 自由基清除能力基本一致，P5-X 和 G5-X 组铁还原能力达到 93.0 μmol Fe^{2+}/g 和 96.5 μmol Fe^{2+}/g，显著高于未处理组的 44.6 μmol Fe^{2+}/g（P<0.05）。类似地，Li 等[34] 研究发现糖基化处理的乳清蛋白经水解后比单独糖基化处理的乳清蛋白表现出更强的抗氧化活性，酶解可以改变乳清蛋白的结构，产生更多具有强抗氧化能力的肽或游离氨基酸，以达到清除自由基的目的。Zou 等[35] 通过质谱分析发现 DBD 等离子体辅助糖基化处理可以通过改变蛋白的结构增加胰蛋白酶的切割位点，并提高某些位点的水解效率，从而降低虾原肌球蛋白的消化稳定性。因此，DBD 等离子体辅助糖基化处理可能会通过降低 β-LG 的消化稳定性，产生更多分子量较小的肽，提供更多的自由基反应位点[35−36]，从而提高了处理组酶解产物的抗氧化活性。

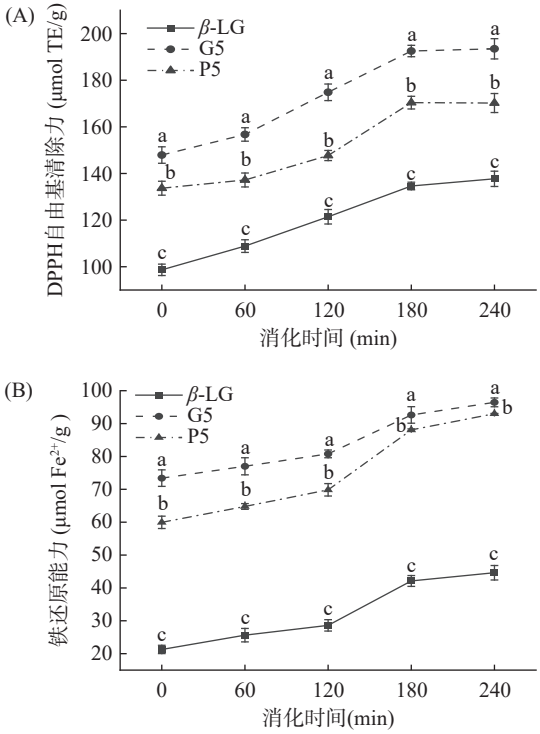

图 4　水解对 β-LG 抗氧化能力的影响

Fig.4　Effect of hydrolysis on antioxidant capacity of β-LG

2.5　β-LG 结构特性分析

2.5.1　SDS-PAGE 分析　图 5 为不同处理对 β-LG 分子量的影响，β-LG 在 18 kDa 附近出现特征条带，DBD 等离子体处理后条带发生变化，说明可能在

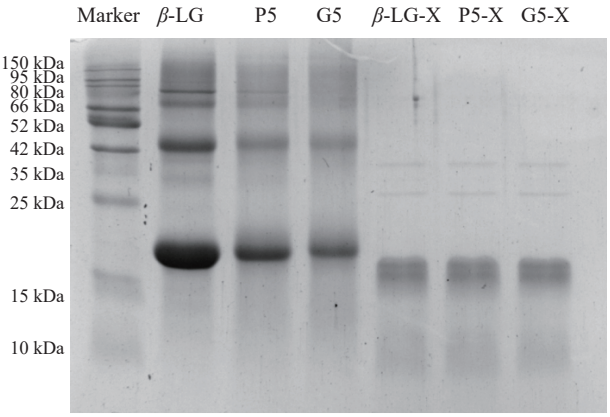

图 5　不同处理后 β-LG 的 SDS-PAGE 图

Fig.5　SDS-PAGE diagram of β-LG after different treatments

注：Marker：标准蛋白条带；β-LG：未处理组；P5：单独 DBD 等离子体处理 5 min 组；G5：DBD 等离子体辅助糖基化处理 5 min 组；β-LG-X：未处理水解组；P5-X：P5 水解组；G5-X：G5 水解组。

DBD 等离子体的活性粒子作用下，氨基酸残基被氧化[37]。DBD 等离子体辅助糖基化处理后 β-LG 条带出现明显上移，分子量增大，说明处理后乳糖共价连接在了 β-LG 上。这一观察结果与 Luo 等[17] 的研究结果一致，β-LG 与葡聚糖进行糖基化处理后，β-LG 的条带向更高分子量的位置移动，且其条带强度降低。Chen 等[38] 也发现 β-LG 与半乳糖结合后，蛋白条带的分子量增大。酶水解之后各样品的分子条带下移，β-LG 被水解成分子量更小的肽段。以上结果进一步证明了 DBD 等离子体处理可以有效促进 β-LG 的糖基化反应，并且酶解后 β-LG 的完整结构发生改变。

2.5.2 平均粒径和 Zeta 电位分析 不同处理后 β-LG 的平均粒径和 Zeta 电位结果如图 6 所示，单独 DBD 等离子体处理和 DBD 等离子体辅助糖基化处理后，β-LG 的粒径增大，这可能是由于氧化和糖基化作用使蛋白的结构展开或发生分子间聚集[39]。经水解后产物粒径继续增大，可能是因为肠消化液的弱碱性环境，诱导这些带正电荷的碎片与周围带负电荷的环境发生非共价键聚合[40]，使消化产物发生聚集。Ma 等[39] 也有相似的研究结果，超声波辅助糖基化修饰的 β-LG 在酶水解后粒径显著增大。

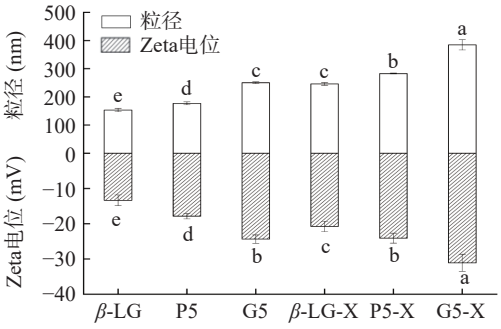

图 6 不同处理后 β-LG 平均粒径和 Zeta 电位的变化

Fig.6 Changes in the average particle size and Zeta potential of β-LG after different treatments

由于 β-LG 在中性溶液中的电负性，所有样品的 Zeta 电位均为负值。DBD 等离子体产生的活性粒子与 β-LG 之间相互作用诱导了蛋白质分子结构的展开以及蛋白质内部带电氨基酸残基的暴露[41]，从而使样品的 Zeta 电位绝对值增大。DBD 等离子体辅助糖基化与酶水解之后 β-LG 的结构进一步改变，可能使内部带电氨基酸残基暴露的更多，从而使 Zeta 电位绝对值显著增大（$P<0.05$），这与光谱分析结果一致。

2.5.3 内源荧光和紫外吸收光谱分析 荧光强度的变化可以反映芳香族氨基酸暴露于溶液中的程度，常用以表征蛋白质的三级构象变化[42]。结果如图 7A 所示，β-LG 在 332 nm 处荧光强度的峰值最大，经 DBD 等离子体和 DBD 等离子体辅助糖基化处理 5 min 后 β-LG 的最大荧光强度分别下降了 76.91% 和 81.74%。酶解后 β-LG 的荧光强度进一步下降，最大波长（λ_{max}）发生红移，蛋白质的局部环境变得更亲水，β-LG 分子的芳香氨基酸（色氨酸和酪氨酸）残基被转移到外部极性环境中[43]。该结果说明 DBD 等离子体处理导致 β-LG 的结构改变，扰乱了 Trp 的微环境，糖基化过程进一步改变了 β-LG 的结构。由于芳香族氨基酸暴露于溶剂中，可以向缺乏电子的自由基提供质子[44]，从而提高 β-LG 的抗氧化活性。

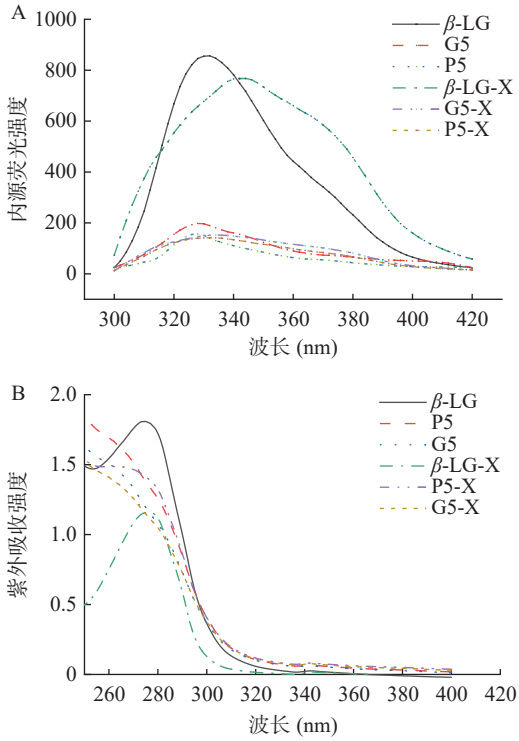

图 7 不同处理后 β-LG 的内源荧光光谱（A）和紫外吸收光谱（B）

Fig.7 Intrinsic fluorescence spectroscopy (A) and ultraviolet absorption spectra (B) of β-LG after different treatments

利用紫外吸收光谱进一步分析了单独 DBD 等离子体处理与 DBD 等离子体辅助糖基化处理对 β-LG 三级结构的影响。结果如图 7B 所示，在 275 nm 处观察到 β-LG 的强吸收峰。经 DBD 等离子体处理后在 275 nm 处 β-LG 的紫外吸收强度降低，DBD 等离子体辅助糖基化处理后其紫外吸收强度进一步降低。这表明 β-LG 结构展开，色氨酸（Trp）和酪氨酸（Tyr）残基所处微环境的极性发生变化[18]。另外，色氨酸和酪氨酸特征吸收峰逐渐消失，其可能的原因为色氨酸和酪氨酸残基被 DBD 等离子体产生的活性粒子氧化[45]。酶解之后的 β-LG 吸收强度继续降低，可能是结构的改变使内部的芳香氨基酸进一步暴露在溶剂中，与内源荧光结果一致。

2.5.4 游离巯基和总巯基含量分析 二硫键是维持蛋白质高级结构的主要化学键。游离巯基含量的变化可以被认为是蛋白质结构展开和变性的指示，反映了蛋白质三级和四级结构的改变程度[46]。游离和总巯基（-SH）的含量变化如图 8 所示，单独 DBD 等离子体处理和 DBD 等离子体辅助糖基化处理后，β-

LG 的总巯基含量与未处理组相比均显著降低（$P<0.05$），从 12.8 μmol/g 分别降低至 9.3 和 8.5 μmol/g。此外，单独 DBD 等离子体处理和 DBD 等离子体辅助糖基化处理后，β-LG 的游离巯基含量从 11.2 μmol/g 分别降低至 8.7 和 8.5 μmol/g，水解之后各组样品的游离巯基含量进一步降低至 8.9、8.1 和 7.5 μmol/g。游离巯基含量降低是由于 DBD 等离子体处理产生的活性粒子具有氧化游离巯基的能力。同时，处理引起的蛋白结构变化使包裹在蛋白内部的巯基暴露并被活性粒子氧化，从而使总巯基含量降低。另外，G5 和 G5-X 组的总巯基含量与游离巯基含量差值最低，说明此时隐藏在内部的巯基已基本完全暴露，等离子体辅助糖基化处理可以对蛋白的结构造成更大的改变。从结果可知，DBD 等离子体辅助糖基化处理后，β-LG 中有更多的巯基被活性氧氧化。其氧化产物中的亚磺酸衍生物可以高效地还原过氧自由基（ROO）等自由基[47]，这可能造成了 β-LG 的抗氧化能力提升。

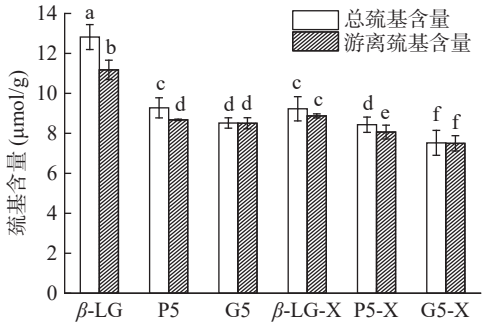

图 8　不同处理后 β-LG 的巯基含量

Fig.8　Sulfhydryl content of β-LG after different treatments

2.5.5　表面疏水性分析　蛋白质分子中疏水氨基酸的疏水相互作用是维持蛋白质高级结构的关键因素。结果如图 9 所示，单独 DBD 等离子体处理与 DBD 等离子体辅助糖基化处理后，β-LG 的表面疏水性分别降低了 48.1% 与 55.2%（$P<0.05$），这可能是由于 DBD 等离子体处理导致 β-LG 的三维结构被破坏，疏水性氨基酸残基被 DBD 等离子体产生的活性粒子氧化，从而使 β-LG 的表面疏水性降低[48]。另外，当 DBD 等离子体辅助糖基化处理后，连接的糖基可能会阻碍 β-LG 表面疏水基团与 ANS 的结合[49]，使蛋白的表面疏水性降低。此外，各组样品在水解之后表面疏水性继续降低，其原因可能是暴露的疏水基团通过疏水相互作用形成聚集体，导致这些疏水基团被埋在结构中导致测得的表面疏水性降低[50]。β-LG 经水解后，肽键被酶切割断裂，导致蛋白质的高级结构被破坏，不再保持原有的紧密折叠状态。这种结构的变化虽然可能使得原本位于内部的疏水基团更多地暴露到分子表面，但由于水解产生的多肽片段通常较小，这些片段上形成的疏水区域相对较少且更容易通过水分子的重排来缓解疏水效应[51]，因此整体上蛋白质水解产物的表面疏水性是降低

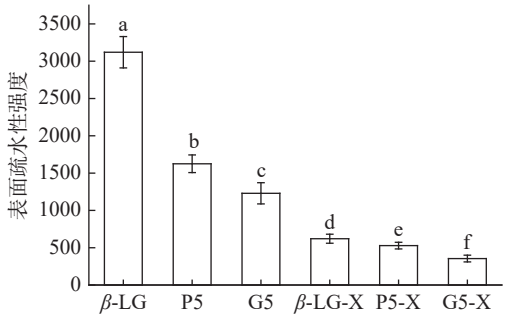

图 9　不同处理对 β-LG 表面疏水性的影响

Fig.9　Effect of different treatments on surface hydrophobicity of β-LG

的。此外，酶解过程中新形成的多肽链末端可能更加亲水，从而进一步增加了亲水性。

2.5.6　不同处理对 β-LG 二级结构的影响　圆二色谱（CD）是一种用于分析蛋白质二级结构的光谱技术[52]。由图 10A 可知，对于未处理的 β-LG，在 214 nm 附近有一个负峰，表明 β-LG 有明确的 β-折叠结构。改性处理后，β-LG 的 CD 光谱中的峰值发生变化，其对应的波长出现明显左移，表明经不同处理后 β-LG 的二级结构发生了明显的变化。从图 10B 中可知单独 DBD 等离子体处理与 DBD 等离子体辅助糖基化处理后 α-螺旋和无规卷曲结构的相对含量明显降低，β-折叠的相对含量从未处理的 23.65% 显著增加到 33.39% 与 37.92%（$P<0.05$），水解后 α-螺旋相对含量继续减少，而 β-折叠的相对含量继续增大。α-螺旋主要由相邻螺旋匝间的氢键稳定，DBD 等离子

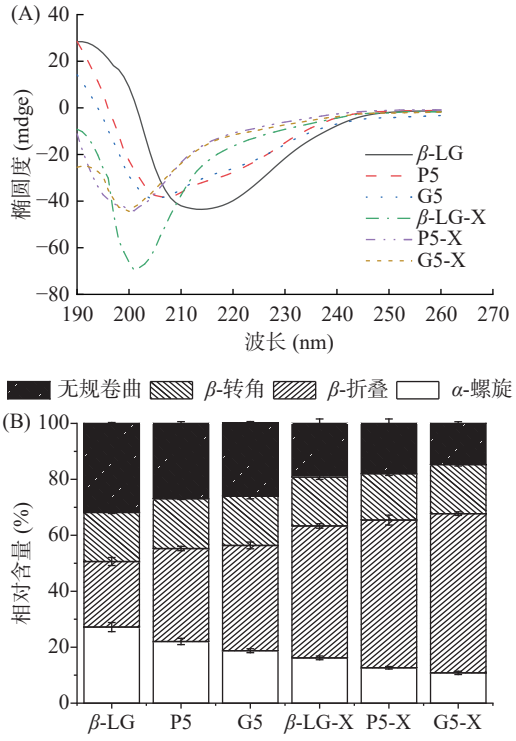

图 10　不同处理对 β-LG 二级结构的影响

Fig.10　Effect of different treatments on β-LG secondary structure

注：A.CD 光谱；B.二级结构相对含量变化。

体产生的活性粒子会破坏氢键，导致 α-螺旋结构解体。α-螺旋结构的展开，暴露出更多的抗氧化氨基酸，使得样品的抗氧化能力提升。酶解之后 β-折叠结构进一步增加，蛋白结构展开，使得更多的抗氧化位点暴露，从而进一步提高了产物的抗氧化能力[53]。

2.6 β-LG 抗氧化性与结构变化的相关性分析

以上结果表明，DBD 等离子体辅助糖基化后 β-LG 的抗氧化活性增强，酶解后其抗氧化活性进一步增强。不同处理后 β-LG 结构和抗氧化活性的 Pearson's 相关性分析结果如图 11 所示，β-折叠结构相对含量与 DPPH·清除能力（r=0.907，P<0.01）以及铁还原能力（r=0.807，P<0.01）呈极显著正相关，α-螺旋结构相对含量与 DPPH·清除能力（r=−0.944，P<0.01）、铁还原能力（r=−0.859，P<0.01）呈极显著负相关，表明 β-LG 二级结构的变化是抗氧化活性提高的重要原因之一。DPPH·清除能力和铁还原能力分别与紫外吸收强度、内源荧光强度、表面疏水性强度和巯基含量呈极显著负相关（P<0.01），与粒径、电位绝对值大小呈极显著正相关（P<0.01），表明 β-LG 抗氧化活性的大小与三级结构的变化具有显著相关性。酶解后 β-LG 的结构出现更明显的变化，芳香氨基酸暴露程度增大，α-螺旋相对含量进一步降低、β-折叠相对含量进一步提升。由于等离子体处理暴露出了更多的酶切位点，使得 β-LG 酶解后可以产生更多的抗氧化活性肽。β-LG 的抗氧化肽主要为肌肽和谷胱甘肽，可通过螯合促氧化金属离子直接清除活性氧[54]，因此经过酶解后其抗氧化活性进一步增强。

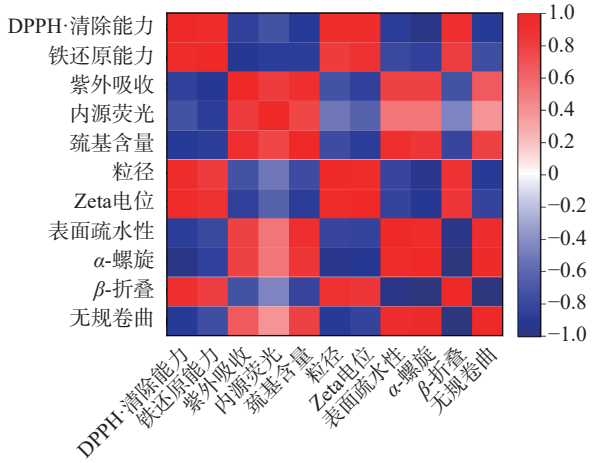

图 11 不同处理后 β-LG 结构和抗氧化活性的 Pearson's 相关性分析热图

Fig.11 Pearson's correlation analysis heat map of β-LG structure and antioxidant activity after different treatments

基于上述分析，DBD 等离子体辅助糖基化促使 β-LG 抗氧化活性提高的原因总结如下：a. 等离子体处理过程中形成具有高抗氧化性能的产物，具有抗自由基的特性；b. 糖基化产物可以作为供氢体，从而使得糖基化改性后的 β-LG 的自由基清除能力进一步提高；c. 改性处理后更多的芳香氨基酸暴露于溶剂中，可以向缺乏电子的自由基提供质子，以增加抗氧化活性；d. 游离-SH 基团的含量降低，由 ROS 与硫醇反应形成的亚磺酸衍生物可以高效地还原自由基；e. 二级结构的展开暴露了蛋白质中潜在的抗氧化位点。

3 结论

本研究采用 DBD 等离子体辅助糖基化对 β-LG 进行改性处理，并将改性后的样品进行水解，研究改性处理对 β-LG 抗氧化活性的影响，并建立构效关系。结果发现 DBD 等离子体可以在低温、短时间内高效地促进 β-LG 发生糖基化，并显著提高了 β-LG 的 DPPH 自由基清除能力和铁还原能力。处理后 β-LG 的结构发生了明显变化，更多的芳香氨基酸暴露于溶剂中，游离-SH 基团的含量降低，α-螺旋相对含量降低、β-折叠相对含量提高，这些结构变化是 β-LG 抗氧化活性改善的主要原因。综上所述，本研究的展开为 DBD 等离子体辅助糖基化处理在蛋白抗氧化能力改善方面提供了新思路，为蛋白质功能特性改善提供了技术指导和理论支撑。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] 简清梅，索化夷，张喜才，等. 分子动力学模拟超高压结合热处理对 β-乳球蛋白结构的影响[J]. 食品科学，2021，42(23)：57−63. [JIAN Q M, SUO H Y, ZAHNG X C, et al. Effect of combined high pressure and thermal treatment on structure of β-lactoglobulin evaluated by molecular dynamics simulation[J]. Food Science, 2021, 42(23): 57−63.]

[2] ZHANG Q, WANG R, HE J, et al. Innovative multistep modifications of β-lactoglobulin for enhanced emulsifying and antioxidant activities[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 148: 109465.

[3] HU S, WANG B, ZENG R, et al. Recent advances, challenges and functional applications of protein glycosylation modification in food industry[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2024, 59(7): 4403−4419.

[4] SONG G, ZHOU L, ZHAO L, et al. Analysis of non-covalent interaction between β-lactoglobulin and hyaluronic acid under ultrasound-assisted treatment: Conformational structures and interfacial properties[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 256: 128529.

[5] LIU H C, CHEN W L, MAO S J T. Antioxidant nature of bovine milk β-lactoglobulin[J]. Journal of Dairy Science, 2007, 90(2): 547−555.

[6] PU P, DENG Z, CHEN L, et al. Reducing antigenicity and improving antioxidant capacity of β-lactoglobulin through covalent interaction with six flavonoids[J]. Foods, 2023, 12(15): 2913.

[7] DONG S, PANYA A, ZENG M, et al. Characteristics and antioxidant activity of hydrolyzed β-lactoglobulin-glucose Maillard reaction products[J]. Food Research International, 2012, 46(1): 55−61.

[8] ZHONG J, TU Y, LIU W, et al. Antigenicity and conformational changes of β-lactoglobulin by dynamic high pressure mi-

crofluidization combining with glycation treatment[J]. Journal of Dairy Science, 2014, 97(8): 4695−4702.
[9] SUN W W, YU S J, ZENG X A, et al. Properties of whey protein isolate-dextran conjugate prepared using pulsed electric field [J]. Food Research International, 2011, 44(4): 1052−1058.
[10] WANG S, LIU Y, ZHANG Y, et al. Processing sheep milk by cold plasma technology: Impacts on the microbial inactivation, physicochemical characteristics, and protein structure[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 153: 112573.
[11] YU J J, JI H, CHEN Y, et al. Analysis of the glycosylation products of peanut protein and lactose by cold plasma treatment: Solubility and structural characteristics[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 158: 1194−1203.
[12] JI H, TANG X, LI L, et al. Improved physicochemical properties of peanut protein isolate glycated by atmospheric pressure cold plasma (ACP) treatment[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 109: 106124.
[13] SHARAFODIN H, SOLTANIZADEH N. Potential application of DBD plasma technique for modifying structural and physicochemical properties of soy protein isolate[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 122: 107077.
[14] TANG P P, ZHANG L L, XIONG Y X, et al. Reduction of antigenicity and emulsibility improvement of ovalbumin by dielectric-barrier discharge plasma treatment induced structure modification[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2024, 92: 103602.
[15] 贾飞鸿, 江宁, 杨慧晶, 等. 超声-微波预处理协同复合酶法制备壳寡糖的工艺优化及其抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2024, 45(17): 190−199. [JIA F H, JIANG N, YANG H J, et al. Preparation of chitosan oligosaccharide by pre-ultrasound-microwave assisted composite enzymatic method and its antioxidant[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(17): 190−199.]
[16] ZAGURY Y, KAZIR M, IVNEYL Y D. Improved antioxidant activity, bioaccessibility and bioavailability of EGCG by delivery in β-lactoglobulin particles[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 52: 121−130.
[17] LUO Y, TU Y, REN F, et al. Characterization and functional properties of Maillard reaction products of β-lactoglobulin and polydextrose[J]. Food Chemistry, 2022, 377: 131749.
[18] MA S, YANG X, ZHAO C, et al. Ultrasound-induced changes in structural and physicochemical properties of β-lactoglobulin[J]. Food Science & Nutrition, 2018, 6(4): 1053−64.
[19] 杜童申, 刘悦, 马骏骅, 等. 超声预处理对亚麻籽胶-大豆分离蛋白复合凝胶凝胶特性及结构的影响[J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 83−90. [DU T S, LIU Y, MA J H, et al. Effect of ultrasonic pretreatment on the gel properties and structure of flaxseed gum-soybean protein isolate composite gels[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 83−90.]
[20] LIU X, LIU J, ZHANG W, et al. Electron beam irradiation-induced structural changes increase the antioxidant activities of egg white protein[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 111: 846−852.
[21] WANG S, DING Y, HUO Z, et al. Conjugation of dual-natural milk-derived proteins with fucoidan to prepare controllable glycosylation products via dielectric barrier discharge cold plasma[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 255: 128035.
[22] 李雪, 涂宗财, 齐午城, 等. 超声波处理对 β-乳球蛋白结构和抗原性的影响[J]. 食品工业科技, 2016, 37(18): 106−110. [LI X, TU Z C, QI W C, et al. Effect of ultrasound treatment on structure and antigenicity of β-lactoglobulin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(18): 106−110.]
[23] LIU J, RU Q, DING Y. Glycation a promising method for food protein modification: Physicochemical properties and structure, a review[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 170−183.
[24] KUSANO Y. Plasma surface modification at atmospheric pressure[J]. Surface Engineering, 2009, 25(6): 415−416.
[25] NOOSHKAM M, VARIDI M. Whey protein isolate-low acyl gellan gum Maillard-based conjugates with tailored technological functionality and antioxidant activity[J]. International Dairy Journal, 2020, 109: 104783.
[26] MENGÍBAR M, MIRALLES B, HERAS Á. Use of soluble chitosans in Maillard reaction products with β-lactoglobulin. Emulsifying and antioxidant properties[J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 75: 440−446.
[27] NOOSHKAM M, VARIDI M, BASHASH M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems[J]. Food Chemistry, 2019, 275: 644−660.
[28] SHUMAEV K, LANKIN V, KONOVALOVA G, et al. The interaction of superoxide radicals with active dicarbonyl compounds[J]. Biophysics, 2017, 62: 172−176.
[29] ZHANG Q, LI L, CHEN L, et al. Effects of sequential enzymolysis and glycosylation on the structural properties and antioxidant activity of soybean protein isolate[J]. Antioxidants, 2023, 12(2): 430.
[30] MA Y, LIU Y, YU H, et al. Biological activities and *in vitro* digestion characteristics of glycosylated α-lactalbumin prepared by microwave heating: Impacts of ultrasonication[J]. LWT-Food Science and Technology, 2022, 158: 113141.
[31] LI Y, ZHOU L, ZHANG H, et al. Preparation, characterization and antioxidant activity of glycosylated whey protein isolate/proanthocyanidin compounds[J]. Foods, 2023, 12(11): 2153.
[32] TKACZEWSKA J, BORAWSKA-DZIADKIEWICZ J, KULAWIK P, et al. The effects of hydrolysis condition on the antioxidant activity of protein hydrolysate from *Cyprinus carpio* skin gelatin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2020, 117: 108616.
[33] SHAO Y H, ZHANG Y, LIU J, et al. Influence of ultrasonic pretreatment on the structure, antioxidant and IgG/IgE binding activity of β-lactoglobulin during digestion *in vitro*[J]. Food Chemistry, 2020, 312: 126080.
[34] LI M, YU R, FU R, et al. Limited hydrolysis of glycosylated whey protein isolate ameliorates the oxidative and physical stabilities of conjugated linoleic acid oil-in-water emulsions[J]. Food Chemistry, 2021, 362: 130212.
[35] ZOU S, WANG F, CHENG J H, et al. Mechanism of cold plasma combined with glycation in altering IgE-binding capacity and digestion stability of tropomyosin from shrimp[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(42): 15796−15808.
[36] YANG J K, LEE E, HWANG I J, et al. β-Lactoglobulin peptide fragments conjugated with caffeic acid displaying dual activities for tyrosinase inhibition and antioxidant effect[J]. Bioconjugate Chemistry, 2018, 29(4): 1000−1005.
[37] LIU Z W, LIU L J, ZHOU Y X, et al. Dielectric-barrier discharge (DBD) plasma treatment reduces IgG binding capacity of β-lactoglobulin by inducing structural changes[J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129821.
[38] CHEN Y, TU Z, WANG H, et al. Glycation of β-lactoglobu-

lin under dynamic high pressure microfluidization treatment: Effects on IgE-binding capacity and conformation[J]. Food Research International, 2016, 89: 882−888.
[39] MA Q P, WANG H, TU Z C, et al. Effects of ultrasound-assisted glycation on the allergenicity of β-lactoglobulin during digestion[J]. Food and Machinery, 2021, 37(4): 6−11.
[40] YAN Y, SEEMAN D, ZHENG B, et al. pH-Dependent aggregation and disaggregation of native β-lactoglobulin in low salt [J]. Langmuir, 2013, 29(14): 4584−93.
[41] HU H, WU J, LI E C, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions[J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2): 647−55.
[42] MA Y, ZANG J, QING M, et al. Glycosylation of egg white protein with maltodextrin in the dry state: Changes in structural and gel properties[J]. Food Chemistry, 2023, 401: 134113.
[43] 杨子滢, 葛新宇, 闫欣, 等. 活性氧对牛乳β-乳球蛋白结构、功能特性和致敏性的影响[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(21): 18−25. [YANG Z Y, GE X Y, YAN X, et al. Effects of reactive oxygen species on structure, functional properties and sensitization of bovine milk β-lactoglobulin[J]. Food Research and Development, 2023, 44(21): 18−25.]
[44] CHANG K, LIU J, JIANG W, et al. Structural characteristics and foaming properties of ovalbumin-caffeic acid complex[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 146: 111383.
[45] MEHR H M, KOOCHEKI A. Effect of atmospheric cold plasma on structure, interfacial and emulsifying properties of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) protein isolate[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 106: 105899.
[46] CHEN H, BIAN Z, WEN P, et al. Insight into the molecular mechanism underlying the enhancement of antioxidant activity in ovalbumin by high-energy electron beam irradiation[J]. Food Chemistry, 2024, 433: 137384.
[47] MEDINA-NAVARRO R, DURÁN-REYES G, DÍAZ-FLORES M, et al. Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8971.
[48] ZHANG Y, WANG S, NIU D, et al. Effects of moderate dielectric barrier discharge (DBD) plasma treatment on the structure, antigenicity, and digestibility of casein[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 153: 109973.
[49] DU Q, TANG J, XU M, et al. Whey protein and maltodextrin-stabilized oil-in-water emulsions: Effects of dextrose equivalent[J]. Food Chemistry, 2021, 339: 128094.
[50] JIANG S, ZHANG J, LI S, et al. Effect of enzymatic hydrolysis on the formation and structural properties of peanut protein gels[J]. International Journal of Food Engineering, 2021, 17(3): 167−176.
[51] DABBOUR M, HE R, MINTAH B, et al. Changes in functionalities, conformational characteristics and antioxidative capacities of sunflower protein by controlled enzymolysis and ultrasonication action[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2019, 58: 104625.
[52] 马寅龙, 郭锐斌, 孔祥丽, 等. 超高压对乳清浓缩蛋白结构的影响及其体外模拟消化产物的功能性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(8): 93−104. [MA Y L, GUO R B, KONG X L, et al. Effect of ultra high pressure on the structure of whey protein concentrate and functional analysis of simulated digestion products *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(8): 93−104.]
[53] KARBASI M, SÁNCHEZ-FERRER A, ADAMCIK J, et al. Covalent β-lactoglobulin-maltodextrin amyloid fibril conjugate prepared by the Maillard reaction[J]. Food Chemistry, 2021, 342: 128388.
[54] SONG J J, WANG Q, DU M, et al. Identification of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from mare whey protein hydrolysates[J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(9): 6885−6894.