

酶解—糖基化对猪皮胶原蛋白特性的影响

Effects of enzymolysis and glycosylation on the characteristics of porcine skin collagen

卢玉婷^{1,2,3,4} 刘丽莉^{1,2,3,4} 于影^{1,2,3,4} 苏克楠^{1,2,3,4} 吴彤^{1,2,3,4}

LU Yuting^{1,2,3,4} LIU Lili^{1,2,3,4} YU Ying^{1,2,3,4} SU Kenan^{1,2,3,4} WU Tong^{1,2,3,4}

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023; 2. 河南科技大学食品加工与安全国家级教学示范中心, 河南 洛阳 471023; 3. 河南省食品加工与质量安全控制河南省国际联合实验室, 河南 洛阳 471023; 4. 食品微生物河南省工程技术研究中心, 河南 洛阳 471023)

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023; 2. National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Processing and Security, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023; 3. International Joint Laboratory of Food Processing and Quality Safety Control of Henan Province, Luoyang, Henan 471023; 4. Henan Engineering Technology Research Center of Food Microbiology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China)

摘要: [目的] 改善胶原蛋白加工特性。 [方法] 以猪皮胶原蛋白 (pig collagen, PC) 为研究对象, 以胶原蛋白、酶解后的胶原蛋白 (enzymatic hydrolysis pig collagen, H-PC) 为对照, 分析了酶解—糖基化协同改性后的复合物 (glucose complex enzymatic hydrolysis pig collagen, HG-PC) 的抗氧化、乳化等功能特性, 利用紫外可见光谱、荧光光谱和傅里叶红外光谱对 HG-PC 的结构进行研究。 [结果] 相较于 PC 与 H-PC, HG-PC 的 DPPH 自由基清除率、持水性、乳化性、乳化稳定性、起泡性及起泡稳定性均显著提高 ($P < 0.05$); 持油性、表面疏水性和浊度显著下降 ($P < 0.05$); 紫外吸收强度有所增加, 荧光强度降低, 蛋白质二级结构被破坏。 [结论] 酶解—糖基化协同改性能明显改变 PC 的性质, 且协同改性效果优于单一改性。

关键词: 胶原蛋白; 糖基化; 协同改性; 功能特性; 结构特性

Abstract: [Objective] This study aimed to improve the processing characteristics of collagen. [Methods] Using pig skin collagen and enzymatic hydrolysis pig skin collagen (H-PC) as a control, the antioxidant, emulsification, and other functional properties of the

complex after enzymatic hydrolysis and glycosylation (HG-PC) were analyzed. The structure of HG-PC was studied by UV-VIS spectrum, fluorescence spectrum, and Fourier infrared spectrum. [Results] The results showed that compared with PC and H-PC, the DPPH free radical scavenging rate, water retention, emulsification, emulsification stability, foaming stability, and foaming stability of HG-PC were significantly increased ($P < 0.05$). While the oil retention, surface hydrophobicity, and turbidity of HG-PC were significantly decreased ($P < 0.05$). The UV absorption intensity of HG-PC was increased, and the fluorescence intensity was decreased, the protein secondary structure of which was destroyed. [Conclusion] The synergistic modification of enzymatic hydrolysis and glycosylation can significantly change the properties of PC, and the synergistic modification effect is better than single modification.

Keywords: collagen; glycosylation; cooperative modification; functional characteristics; structural characteristic

基金项目: 洛阳市社会发展专项 (编号: 2101021A); 国家重点研发计划项目 (编号: 2022YFF1101600); 河南省重大科技专项 (编号: 221100110500)

作者简介: 卢玉婷, 女, 河南科技大学在读硕士研究生。

通信作者: 刘丽莉 (1974—), 女, 河南科技大学教授, 博士。

E-mail: yangliuyilang@126.com

收稿日期: 2023-09-11 **改回日期:** 2024-03-08

猪皮资源丰富, 价廉易得。猪皮中胶原蛋白含量高达 87.8%^[1], 且猪皮胶原蛋白具有溶解、乳化、起泡、凝胶等性质, 常被应用于食品、美容、生物医药、化工、纺织等领域。但胶原蛋白本身也存在很多缺点, 诸如溶解性不好, 易受蛋白酶水解, 对热、有机溶剂都不稳定等, 这些缺点都大大限制了其应用。为了提高猪皮胶原蛋白 (pig skin collagen, PC) 的稳定性, 改善其功能特性, 需要对其进行改性。蛋白改性技术通常分为物理改性、化学改性、

生物改性 3 种。物理改性包括加热、低温冷冻、超声波、超高压、微波、伽马射线等;化学改性包括磷酸化、酰胺化、糖基化等;生物改性包括酶法、生物发酵等。物理改性费用低,无毒副作用,不改变蛋白质的一级结构;化学改性可引入化学基团从而改变蛋白质的功能特性,但安全性相对较低;生物改性条件温和,但周期长,见效慢。其中酶解法主要通过操纵蛋白酶切割分解蛋白质特定部位实现,选择性高、反应条件安全温和,无需考虑副反应。而糖基化处理条件简单、无需加入任何种类的化学催化剂,能够使蛋白质的一些物理或化学性质得到改善。

胶原蛋白肽是胶原蛋白经过水解后生成的产物,其相对分子质量小于 5 000,因此极易被人体消化吸收,而且具有了多种功能特性,如抑菌性、抗氧化活性、血管紧张素转换酶(ACE)抑制活性等,在食品和医疗保健领域越来越受到人们的关注^[2]。Indriani 等^[3]采用超声辅助木瓜蛋白酶水解亚洲牛蛙皮胶原蛋白,发现其生物活性特别是抗氧化性显著增强。孔惠等^[4]采用木瓜蛋白酶水解鲑鱼皮胶原蛋白,得到最佳工艺条件为加酶量 7%,温度 55 ℃,底物质量分数 10%,pH 8.0,酶解时间 2.5 h,在此条件下得到相对分子质量小于 1 000 的胶原蛋白肽,更易被人体吸收。

糖基化反应是蛋白分子侧链氨基与还原糖末端羟基发生的非酶促反应,属于美拉德反应机理的羰氨缩合反应^[5]。研究^[6]证明,糖基化改性可以有效提高天然蛋白质及其肽的活性。曹琳等^[7]利用葡萄糖与罗非鱼胶原蛋白肽发生糖基化反应,结果表明糖基化是一种有效的增强罗非鱼皮胶原蛋白肽热滞活性的方法。罗非鱼皮胶原蛋白肽经糖基化处理后,有望被开发成新型环保的高效抗冻剂。宋红新^{[8]37-38}以林蛙残体胶原蛋白多肽与葡聚糖、果糖发生美拉德反应,得到的反应产物抗氧化性显著提升,且其 ACE 抑制活性也明显改善。

目前有关胶原蛋白的改性多以单一的糖基化改性或酶解改性,而关于酶解与糖基化结合改变胶原蛋白性质的研究却少有报道。研究拟采用协同改性—酶解和糖基化相结合的方法对 PC 进行改性,并对 HG-PC 的功能和结构性质进行研究,以期改善 PC 的功能特性研究提供新思路,拓展其在食品、生物、医药、化妆品等领域的应用范围。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

PC:胶原蛋白含量 $\geq 99\%$,广州康达生物科技有限公司;

木瓜蛋白酶:1.0 $\times 10^4$ U/g,上海蓝季生物有限公司;

中性蛋白酶:5.0 $\times 10^4$ U/g,上海蓝季生物有限公司;

葡聚糖:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;

维生素 C(V_C):分析纯,上海麦克林生化科技股份有限公司。

1.2 仪器与设备

紫外可见分光光度计:UV-2600 型,日本日立公司;

真空冷冻干燥机:LG-0.2 型,美国惠普公司;

超速离心机:H-1650 型,长沙湘锐离心机有限公司;

荧光光谱仪:Cary eclipse 型,美国 Aglient 公司;

傅里叶红外光谱仪:Vector33 型,德国 Bruker 公司。

1.3 方法

1.3.1 H-PC 及 HG-PC 的制备 称取一定量 PC 粉溶解于热水中配成 6% 的溶液,采用分步酶解法进行酶解。参照肖岚等^[9]的方法,先用木瓜蛋白酶进行酶解,再用中性蛋白酶进行酶解。结束后,灭酶(90 ℃、10 min),离心(10 000 r/min,10 min),取上清液冷冻干燥,得到 H-PC。

称取 1 g 的 H-PC 溶于蒸馏水中,按糖肽质量比 2:1 加入葡聚糖,充分搅拌溶解。调节溶液为 pH 8.0,在 70 ℃下反应 4 h,冷冻干燥后得到 HG-PC。

1.3.2 DPPH 自由基清除率的测定 参照文献^[10]。

1.3.3 功能特性测定

(1) 持水性和持油性:参照文献^[11]。

(2) 乳化性能:参照文献^{[12]22},修改如下:配制质量浓度为 5 mg/mL 待测样品。乳化性和乳化稳定性分别按式(1)、式(2)计算。

$$E = \frac{V_2}{V_1} \times 100\%, \quad (1)$$

$$S = \frac{V_3}{V_2} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

E——乳化性,%;

S——乳化稳定性,%;

V₁——乳浊液体积,mL;

V₂——离心后乳化层体积,mL;

V₃——加热后再离心乳化层体积,mL。

(3) 起泡性能:参照文献^{[12]21-22},修改如下:取质量浓度为 5 mg/mL 的待测样品,搅打后将溶液静置 5 min。起泡能力和泡沫稳定性按式(3)、式(4)计算。

$$P = \frac{V_2 - V_1}{V_1} \times 100\%, \quad (3)$$

$$S = \frac{V_4}{V_3} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

P——起泡能力,%;

S——起泡稳定性,%;

V₁——搅打前体积,mL;

V₂——搅打后体积,mL;

V₃——搅打后泡沫体积,mL;

V_4 ——静置 5 min 后的泡沫体积, mL。

(4) 表面疏水性: 参照文献[13]。

(5) 浊度: 将适量的 PC、H-PC 和 HG-PC 与 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.4)混合配制成 2.5 mg/mL 的溶液, 于高速分散均质机均质(10 000 r/min, 1 min), 充分溶解后, 在 500 nm 处测吸光度。

1.3.4 结构特性测定

(1) 紫外吸收光谱分析: 取 5 mg/mL 的待测溶液, 按照 10 nm/s 速率采用紫外可见分光光度计进行扫描(200~400 nm)。

(2) 荧光光谱分析: 取 5 mg/mL 的待测溶液, 采用荧光光谱仪进行扫描(300~450 nm), 激发波长为 295 nm, 狭缝 10 nm。

(3) 傅里叶红外光谱分析: 将 PC、H-PC、HG-PC 与溴化钾按质量比 1:100 混匀, 采用红外光谱仪进行扫描(400~4 000 cm^{-1})。使用 Peak Fit v4.12 软件分析 PC、H-PC 和 HG-PC 酰胺 I 带处的蛋白质二级结构相对含量变化。

(4) 粒径分析: 分别用蒸馏水配制 5 mg/mL 的 PC、H-PC 和 HG-PC 溶液, 采用微米激光粒度仪对溶液的平均粒径进行测定。

1.3.5 数据分析 用 Origin 8.5 作图, SPSS 26.0 分析数据, 所有试验均做 3 次重复, 取平均值。

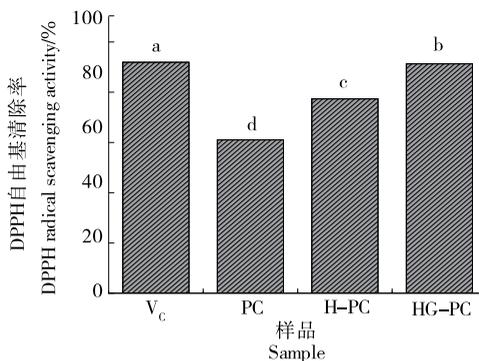
2 结果与分析

2.1 DPPH 自由基清除率

由图 1 可知, PC、H-PC、HG-PC、 V_c 的 DPPH 自由基清除率分别为 60.77%, 77.00%, 90.90%, 91.50% ($P < 0.05$)。HG-PC 相较于 PC 与 H-PC, DPPH 自由基清除率显著提高 ($P < 0.05$), 略低于同等条件下 V_c 的抗氧化能力, 其抗氧化活性顺序为 $V_c > \text{HG-PC} > \text{H-PC} > \text{PC}$, 存在显著性差异 ($P < 0.05$)。原因可能是加入的葡聚糖与蛋白质发生反应生成了美拉德反应产物, 这些产物可提供氢与 DPPH 自由基结合形成稳定的 DPPH-H 分子, 因此呈现出较好的清除 DPPH 自由基的能力。这与宋红新^[8]³⁷⁻³⁸ 在林蛙胶原蛋白多肽中的研究结果一致。证明糖基化处理是提高 PC 抗氧化性的一种非常高效的方法。

2.2 功能特性分析

由表 1 可知, HG-PC 的持水性与 PC 相比提高了 0.71 g/g ($P < 0.05$), 与 H-PC 相比提高了 0.25 g/g ($P < 0.05$)。究其原因, 是酶解造成蛋白分子链断裂成小分子肽链, 继而使 PC 结合水能力增强^[14]; 糖基化后亲水基团数量增加, 使 H-PC 持水性进一步增强。HG-PC 的持油性较 PC 与 H-PC 均有所降低 ($P < 0.05$), 这是由于蛋白持油性与表面疏水性紧密相连, 表面疏水基团减少导致与油结合机会减少。由表 1 还可知, HG-PC 的表面疏水



字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 1 处理方式对 PC 清除 DPPH 自由基能力的影响
Figure 1 Effects of different treatments on DPPH free radical scavenging ability of PC

表 1 PC、H-PC 和 HG-PC 的功能性质[†]

Table 1 Functional properties of PC, H-PC and HG-PC

样品	持水性/ ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	持油性/ ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	表面疏水 性/%	浊度
PC	1.52±0.03 ^c	3.52±0.38 ^a	86.22±0.01 ^a	0.38±0.03 ^a
H-PC	1.98±0.05 ^b	2.88±0.42 ^b	78.78±0.01 ^b	0.35±0.05 ^b
HG-PC	2.23±0.04 ^a	2.21±0.45 ^c	67.36±0.02 ^c	0.31±0.03 ^c

[†] 同列字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

性较 PC 降低了 7.44% ($P < 0.05$), 较 H-PC 降低了 11.42% ($P < 0.05$), 原因是加入葡聚糖的同时也会带来部分羟基, 增强了体系整体的吸水性, 降低了疏水性^[12]⁴²⁻⁴³。HG-PC、H-PC 的浊度相较于 PC 均有所下降 ($P < 0.05$), 原因可能是 PC 酶解后形成了小相对分子质量的多肽, 多肽与水形成氢键, 导致其溶解度增大, 进而降低了浊度; 在糖基化过程中, 导入的葡聚糖糖基增加了肽中的亲水性羟基, 使溶解度进一步升高浊度下降^[13]。

由表 2 可知, HG-PC 的乳化性和乳化稳定性相较于 PC 分别提高了 44.93% 和 23.30% ($P < 0.05$), 相较于 H-PC 分别提高了 26.09% 和 14.10% ($P < 0.05$)。这可能是因为酶解使 PC 的亲水基团暴露出来, 结合油的能力增强, 且糖基化处理后生成的糖-蛋白复合物分子会聚集起来形成保护膜并会附着在液滴周围以阻碍液滴凝聚, 以此提高乳液的稳定性^[15]。H-PC、HG-PC 的起泡性和泡沫稳定性较 PC 均有所改善 ($P < 0.05$)。HG-PC 起泡性和起泡沫稳定性较 PC 分别提高了 28.69% 和 36.45% ($P < 0.05$), 较 H-PC 分别提高了 20.69% 和 20.58% ($P < 0.05$)。原因是蛋白质起泡性随溶解度变化而变化, 并随之成正比, 酶解和协同改性均增大了 PC 的溶解度, 则起泡性也随之提高。此外, 葡聚糖的添加会引入多羟基, 作用于 H-PC 导致分子间的静电作用力进一步增强, 同时增大蛋白质膜的厚度和硬度, 从而改善 HG-PC 的泡沫稳定性^[16]。

表 2 PC、H-PC 和 HG-PC 的功能性质[†]

Table 2 Functional properties of PC, H-PC and HG-PC

样品	乳化性	乳化稳定性	起泡性	起泡稳定性
PC	33.33±0.19 ^c	50.03±0.29 ^c	24.67±0.36 ^c	28.57±0.14 ^c
H-PC	52.17±0.23 ^b	69.23±0.76 ^b	32.67±0.41 ^b	44.44±0.35 ^b
HG-PC	78.26±0.14 ^a	83.33±0.43 ^a	53.36±0.52 ^a	65.02±0.31 ^a

† 同列字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 结构性质分析

2.3.1 紫外吸收光谱分析 如图 2 所示,波长为 280~290 nm 时,3 种物质均有强烈吸收,但最大吸收峰的位置发生了改变。PC 最大吸收峰位于 284 nm 处,H-PC 最大吸收峰位于 286 nm 处,HG-PC 最大吸收峰位于 285 nm 处。显然 H-PC、HG-PC 相对于 PC 发生了红移,原因可能是改性使 PC 的色氨酸、酪氨酸残基暴露出来,产生了较多的具有紫外光吸收特性的物质,导致 H-PC 与 HG-PC 在此波长区间吸收强度增加^[17]。同时,HG-PC 相对于 H-PC 发生了蓝移,且吸收峰低于 H-PC,原因可能是糖基化改性过程中形成了一层糖膜,覆盖在 H-PC 上,阻碍了发色基团的暴露,发生减色效应,导致峰值下降,这与刘建奎^[18]在牛血清蛋白中的研究结果一致。

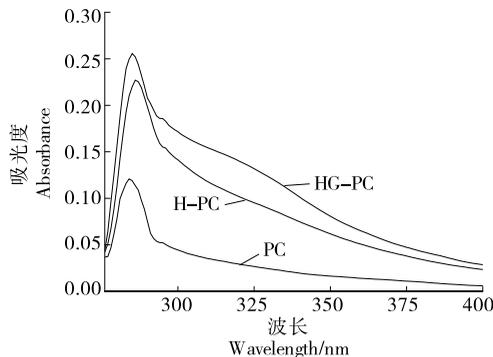


图 2 紫外吸收光谱分析

Figure 2 Analysis of ultraviolet absorption spectrum

2.3.2 荧光光谱分析 糖基化反应进行到后期会生成大量的有色物质,它是该反应的一个代表性特征^[19]。由图 3 可知,相较于 PC、H-PC, HG-PC 荧光强度显著增强,PC 最大吸收峰在 434 nm 处,而 H-PC、HG-PC 的最大吸收峰相较于 PC 分别蓝移至 429 nm 与 415 nm 处。原因可能是酶解使得蛋白质的结构遭到破坏,结构变得更加松散,大量色氨酸暴露在溶剂中导致的。加入葡聚糖后,还原物质与胺之间不可逆的反应,导致荧光物质的积累,从而使荧光吸收强度增加^[20]。

2.3.3 傅里叶红外光谱分析 由图 4 可知,3 种物质在 2 900~3 300 cm^{-1} 均有振动吸收,是 N—H 键变形振动的结果。在酰胺 I 带,PC、H-PC 均有强烈吸收,但最大

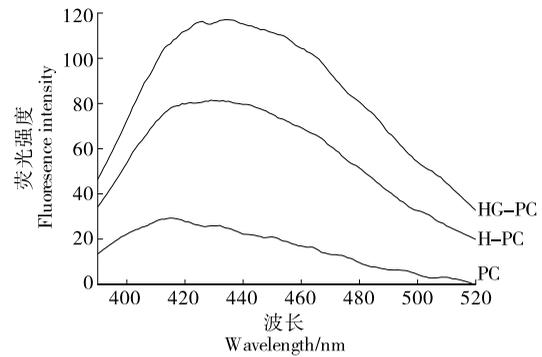


图 3 荧光吸收光谱

Figure 3 Analysis of fluorescence absorption spectrum

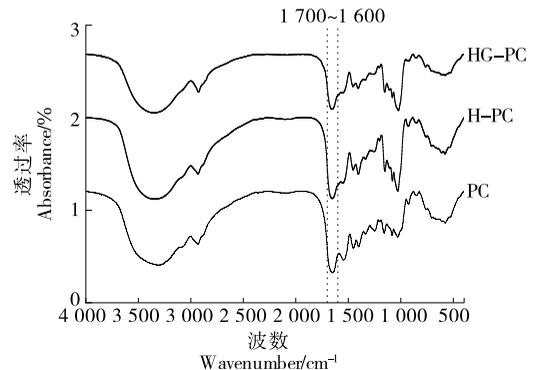


图 4 傅里叶红外光谱图分析

Figure 4 Analysis of fourier transform infrared spectrometer

吸收峰的位置发生了改变,PC、H-PC、HG-PC 在酰胺 I 带的峰分别位于 1 651.01, 1 654.86, 1 658.72 cm^{-1} , 显然相较于 PC 与 H-PC, HG-PC 均发生了红移。酰胺 I 带是 C=O 伸缩振动的结果,是由于 H-PC 中的 N—H 与葡聚糖上的羰基反应,影响了 C=O 的伸缩振动,导致吸收峰红移。谱图上 C=O 和 N—H 的变形振动表明 H-PC 的氨基与糖的羰基产生了共价键^[21],进一步证明了糖基化反应的存在。

由表 3 可知, HG-PC 的二级结构发生明显变化,其中 β -折叠含量显著增加, β -折叠的形成多与分子间氢键的作用相关。相较于 PC 和 H-PC 而言, β -折叠含量分别增加了 2.96%, 2.83% ($P < 0.05$), α -螺旋含量分别减少了 0.57%, 0.11% ($P < 0.05$), β -转角含量分别减少了 4.16%, 3.09% ($P < 0.05$), 无规卷曲含量分别减少了 0.73%, 0.11% ($P < 0.05$)。这与 Pirestani 等^[22]在糖基化油菜籽分离蛋白中的研究结果一致。结果表明,改性处理破坏了维持 PC 二级结构的分子间力,使 PC 的一些理化性质和功能特性发生改变。

2.3.4 粒径分析 由图 5 可知,相较于 PC, H-PC 粒径分布向粒度小的方向偏移。原因可能是 PC 经过酶解反应后,由于酶的加入使 PC 的三股螺旋结构展开,形成相对

表 3 协同改性前后 PC 酰胺 I 带二级结构相对含量[†]

Table 3 Collagen amide I band secondary structure relative content before and after co-modification

样品	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
PC	17.09±0.45 ^a	25.92±0.87 ^c	42.38±0.37 ^a	16.26±0.48 ^a
H-PC	16.63±0.07 ^b	26.05±0.11 ^b	41.31±0.09 ^b	15.66±0.57 ^b
HG-PC	16.52±0.43 ^c	28.88±0.16 ^a	38.22±0.34 ^c	15.48±0.26 ^c

[†] 同列字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。

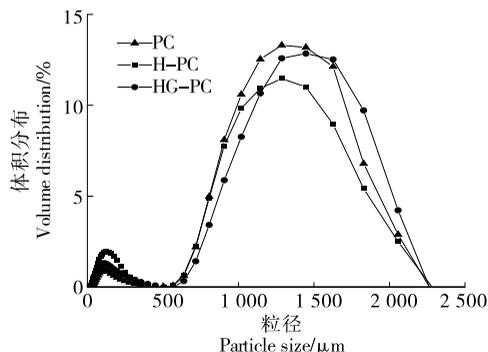


图 5 粒径分布图

Figure 5 Particle size distribution

分子质量更小的肽,更易溶解,进而粒径减小。这与胡硕^[23]在研究牛骨 PC 酶解后粒径的变化趋势一致。相较于 H-PC, HG-PC 粒径分布向粒度大的方向偏移,原因可能是糖的引入使得 H-PC 在溶液中产生了一定的可溶性聚集颗粒体。

2.4 相关性分析

PC、H-PC、HG-PC 的功能特性与其自身内部的结构变化紧密相关。由表 4 可知,PC、H-PC、HG-PC 的乳化性和乳化稳定性与 β -折叠呈正相关,与 β -转角呈负相关,相关系数分别为 0.92, 0.84 与 -0.98, -0.94。PC、H-PC、HG-PC 的表面疏水性与 β -折叠呈负相关,与 β -转角呈正相关,相关系数分别为 -0.93 和 0.99。说明样品中 β -折

表 4 PC 改性前后功能特性与结构变化间的相关关系

Table 4 Correlation between functional properties and structural changes of collagen before and after modification

指标	乳化性	乳化稳定性	表面疏水性	β -折叠	β -转角
乳化性	1.00				
乳化稳定性	0.98	1.00			
表面疏水性	-1.00	-0.98	1.00		
β -折叠	0.92	0.84	-0.93	1.00	
β -转角	-0.98	-0.94	0.99	-0.98	1.00

叠结构含量越多,样品溶液的乳化性及表面疏水性越强。此外,乳化性与表面疏水性之间也存在较为明显的相关系数为 1 的负相关关系,说明样品溶液的乳化性随表面疏水性的减小而增大。

3 结论

研究对猪皮胶原蛋白、酶解后的胶原蛋白和酶解—糖基化协同改性后的复合物的功能特性及结构进行了测定。结果表明,酶解—糖基化协同改性后的复合物在抗氧化性、持水性、乳化性、乳化稳定性、起泡性及起泡稳定性等方面均呈显著增强的优势 ($P < 0.05$),持油性显著降低 ($P < 0.05$),表面疏水性相较于猪皮胶原蛋白、酶解后的胶原蛋白分别降低了 7.44%, 11.42% ($P < 0.05$),浊度呈下降趋势,大小为酶解—糖基化协同改性后的复合物 < 酶解后的胶原蛋白 < 猪皮胶原蛋白。为了更加深入地了解猪皮胶原蛋白相关性性质变化的机理,对猪皮胶原蛋白、酶解后的胶原蛋白、酶解—糖基化协同改性后的复合物进行了紫外、荧光、红外、粒径分析,结果表明酶解—糖基化协同改性后的复合物相较于猪皮胶原蛋白、酶解后的胶原蛋白,荧光强度与紫外吸收强度均有所增加;蛋白的二级结构被破坏,葡聚糖连接到酶解后的胶原蛋白上,部分吸收峰变强; β -折叠相对含量显著增加 ($P < 0.05$),而 α -螺旋、无规卷曲和 β -转角相对含量减少 ($P < 0.05$);其粒径分布呈增大的趋势。说明酶解—糖基化可以有效改善猪皮胶原蛋白的功能特性。同时,证明了酶解—糖基化协同改性相比于单一改性具有较强改善蛋白质功能特性的能力。

参考文献

[1] 黄正芬. 猪皮蛋白粉的理化、功能特性及其应用研究[D]. 南宁: 广西大学, 2014: 1.
HUANG Z F. Physicochemical properties, functional properties and application of pigskin protein powder [D]. Nanning: Guangxi University, 2014: 1.

[2] 张丰文, 董超, 周丽亚, 等. 抗氧化多肽来源、提取及检测的研究进展[J]. 生物技术, 2021, 31(1): 96-103, 64.
ZHANG F W, DONG C, ZHOU L Y, et al. Research progress of antioxidant peptides[J]. Biotechnology, 2021, 31(1): 96-103, 64.

[3] INDRIANI S, SAE-LEAW T, BENJAKUL S, et al. Impact of different ultrasound-assisted processes for preparation of collagen hydrolysates from Asian bullfrog skin on characteristics and antioxidative properties[J]. Ultrason Sonochem, 2022, 89: 106163.

[4] 孔惠, 邢晓平, 曹玉华, 等. 鲑鱼皮明胶的提取及胶原蛋白肽的制备[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(10): 1 042-1 047.
KONG H, XING X P, CAO Y H, et al. Preparation of gelatin and collagen peptides from salmon skin[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2018, 37(10): 1 042-1 047.

- [5] 赵玉滨, 穆秋霞, 董宪慧, 等. 糖基化改性对英国红芸豆抗氧化肽抗氧化活性的影响[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(8): 128-136.
ZHAO Y B, MU Q X, DONG X H, et al. Effect of glycosylation modification on the antioxidant activity of british red kidney bean antioxidant peptides[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2022, 37(8): 128-136.
- [6] 马双双. 美拉德反应对玉米蛋白水解物功能特性的影响[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(19): 69-73.
MA S S. Effect of Maillard reaction on functional properties of zein protein hydrolysate[J]. Food Research and Development, 2020, 41(19): 69-73.
- [7] 曹琳, 欧阳及锦, 韩梅, 等. 糖基化对罗非鱼皮胶原蛋白肽热滞活性及结构特征的影响[J]. 食品与发酵工业, 2023, 49(1): 176-184.
CAO L, OUYANG J J, HAN M, et al. Effects of glycosylation on thermal hysteresis activity and structural characteristics of collagen peptides from tilapia skin[J]. Food and Fermentation Industries, 2023, 49(1): 176-184.
- [8] 宋红新. 林蛙残体胶原蛋白多肽的结构修饰及稳定性关键技术研究[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
SONG H X. Study on structural modification and stability of collagen polypeptide from rana residues [D]. Changchun: Jilin University, 2018.
- [9] 肖岚, 李诚, 付刚, 等. 5种蛋白酶对猪皮胶原蛋白水解效果的比较研究[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(17): 10-14.
XIAO L, LI C, FU G, et al. Hydrolyzing effect comparative studies on of five proteases on pigskin collagen[J]. Food Research and Development, 2015, 36(17): 10-14.
- [10] 刘玥, 刘晓兰, 郑喜群, 等. 复合蛋白酶水解玉米谷蛋白产物的抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 141-145.
LIU Y, LIU X L, ZHENG X Q, et al. Antioxidant activity of hydrolysate from corn glutelin by protamex[J]. Food & Machinery, 2015, 31(1): 141-145.
- [11] 刘丽莉, 陈珂, 李媛媛, 等. 喷雾干燥入口温度对鸡蛋清蛋白粉功能特性和结构的影响[J]. 河南科技大学学报(自然科学版), 2020, 41(6): 65-72.
LIU L L, CHEN K, LI Y Y, et al. Effect of spray drying inlet temperature on functional properties and structure of egg white protein powder[J]. Journal of Henan University of Science and Technology (Natural Science), 2020, 41(6): 65-72.
- [12] 赵玉滨. 英国红芸豆蛋白抗氧化肽糖基化改性及产物功能性研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2021.
ZHAO Y B. Study on the glycosylation modification of british red kidney bean protein antioxidant peptide and the functional properties of the product [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2021.
- [13] 刘丽莉, 陈珂, 李玉, 等. 复合酶水解卵白蛋白及其特性与结构分析[J]. 食品与机械, 2018, 34(9): 47-53.
LIU L L, CHEN K, LI Y, et al. Complex enzyme hydrolysis of ovabumi and its characteristics and structure analysis[J]. Food & Machinery, 2018, 34(9): 47-53.
- [14] NIU L Y, JIANG S T, PAN L J, et al. Characteristics and functional properties of wheat germ protein glycosylated with saccharides through Maillard reaction[J]. Int J Food Sci Technol, 2011, 46(10): 2 197-2 203.
- [15] 刘静媛. 化学改性对大豆蛋白和蛋黄性质的影响[D]. 北京: 北京农学院, 2018: 38-39.
LIU J Y. Effect of chemical modification on the properties of soy protein isolate and egg yolk [D]. Beijing: Beijing University of Agriculture, 2018: 38-39.
- [16] LI S G, ZHANG S, LIU Y, et al. Effects of ultrasound-assisted glycosylation on the interface and foaming characteristics of ovotransferrin[J]. Ultrason Sonochem, 2022, 84: 105958.
- [17] LI N, ETZEL M R. Hydrolysis of whey protein-dextran glycosylates made using the Maillard reaction[J]. Foods, 2019, 8(12): 686.
- [18] 刘建奎. 糖基化对牛血清白蛋白与槲皮素纳米颗粒的形成及其肠细胞吸收的影响[D]. 北京: 中国农业大学, 2017: 36-37.
LIU J L. Effect of glycation on the formation and intestinal cell absorption of bovine serum albumin bound quercetin nanoparticle [D]. Beijing: China Agricultural University, 2017: 36-37.
- [19] GAO P, XIA W S, LI X Z, et al. Optimization of the Maillard reaction of xylose with cysteine for modulating aroma compound formation in fermented tilapia fish head hydrolysate using response surface methodology[J]. Food Chem, 2020, 331: 127353.
- [20] FU Y, LIU J, ZHANG W, et al. Exopeptidase treatment combined with Maillard reaction modification of protein hydrolysates derived from porcine muscle and plasma: structure-taste relationship[J]. Food Chem, 2020, 306: 125613.
- [21] MILLER L M, BOURASSA M W, SMITH R J. FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells[J]. Biochim Biophys Acta BBA Biomembr, 2013, 1828(10): 2 339-2 346.
- [22] PIRESTANI S, NASIRPOUR A, KERAMAT J, et al. Preparation of chemically modified canola protein isolate with gum Arabic by means of Maillard reaction under wet-heating conditions [J]. Carbohydr Polym, 2017, 155: 201-207.
- [23] 胡頔. 牛骨胶原蛋白酶解物制备及其生理活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2020: 34.
HU Y. Preparation and physiological activity evaluation of bovine bone collagen hydrolysates [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020: 34.