

# PEF 技术对抗氧化活性肽 MMCTD 的 DPPH 自由基清除活性和结构的影响

张鸣镛, 邢杰, 李幸芳, 梁荣, 林松毅

(吉林大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130062)

**摘要:** 本研究以前期研究所得的 Met-Met-Cys-Thr-Asp (MMCTD) 抗氧化肽为研究载体, 以 DPPH 自由基清除能力为抗氧化活性衡量指标, 借助中红外光谱 (Mid-infrared spectroscopy, MIR)、圆二色谱 (Circular dichroism spectrum, CD)、Zeta 电位以及核磁共振 (Nuclear magnetic resonance, NMR) 技术, 深入探究高压脉冲电场 (pulsed electric field, PEF) 技术对 MMCTD 抗氧化肽活性的影响。研究表明在电场强度为 5 kV/cm、电场频率为 2400 Hz 时, MMCTD 的自由基清除能力达到最大值  $94.27\% \pm 0.03\%$  且 MMCTD 的 Zeta 电位值下降到  $10.85 \pm 0.98$  mV。MIR 和 NMR 结果表明经 PEF 处理后 MMCTD 的官能团并未发生改变但所含的 H 质子所处的化学环境有所改变。经 CD 分析, 其二级结构中的  $\beta$ -折叠的含量从 13.70% 下降至 0.00%,  $\beta$ -转角以及无规则卷曲的含量都有着明显的增加。这些变化不仅初步揭示了 PEF 可以通过改变 MMCTD 的二级结构以及表面电荷分布来提高它抗氧化活性, 更为进一步探究 PEF 提高抗氧化肽活性的机理奠定基础。

**关键词:** 高压脉冲电场 (PEF); 抗氧化肽; 圆二色谱 (CD); 机理

文章编号: 1673-9078(2016)9-180-185

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.027

## Effects of a Pulsed Electric Field on DPPH Radical-scavenging Activity and Structure of Antioxidant Peptide MMCTD

ZHANG Ming-di, XING Jie, LI Xing-fang, LIANG Rong, LIN Song-yi

(College of Food Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130062, China)

**Abstract:** The antioxidant peptide Met-Met-Cys-Thr-Asp (MMCTD) obtained in the previous study was analyzed in this work, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH·) radical-scavenging capacity served as an indicator of antioxidant activity. Mid-infrared spectroscopy (MIR), circular dichroism (CD) spectroscopy, zeta-potential, and nuclear magnetic resonance (NMR) were used for an in-depth analysis of the effects of a pulsed electric field (PEF) on the antioxidant activities of peptide MMCTD. The results showed that when the electric field intensity was 5 kV/cm and pulse frequency was 2400 Hz, the DPPH radical-scavenging capacity reached a peak value ( $94.27\% \pm 0.03\%$ , mean $\pm$ SD) and the zeta-potential of peptide MMCTD being treated was reduced to  $10.85 \pm 0.98$  mV. The MIR and NMR results revealed that after the PEF treatment, the functional groups of peptide MMCTD were not changed, but the chemical environment of the hydrogen ion (proton) was changed. The CD analysis indicated that the proportion of the  $\beta$ -sheet in the secondary structure decreased from 13.7% to 0%, and the relative amounts of the  $\beta$ -turn and random coil increased significantly. These changes not only preliminarily reveal that PEF can enhance the antioxidant activity of peptide MMCTD by changing the secondary structure and surface charge distribution but also lay the foundation for identification of the mechanism underlying the enhancement of antioxidant activity by PEF.

**Key words:** pulsed electric field; antioxidant peptide; circular dichroism spectrum; mechanism

将我国优质的植物蛋白资源开发为具有多重功能活性、高额附加值的生物活性肽类是未来植物资源精

收稿日期: 2015-10-26

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目 (2012BAD33B03)

作者简介: 张鸣镛 (1971-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 营养与功能食品

通讯作者: 林松毅 (1970-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品加工质量控制技术与原理

深加工的必然趋势, 其中具有抗氧化功能的植物源生物活性肽占有重要地位。人们在不断从植源性蛋白中获取高活性的不同氨基酸残基数量的抗氧化肽, 例如 GSQ<sup>[1]</sup>、LIPF<sup>[2]</sup>、TYQTF<sup>[3]</sup>和 QQPQPW<sup>[4]</sup>。它们大多表现出了较好的自由基清除能力, 一些活性肽还表现出了螯合金属离子的能力、抑制脂质过氧化的能力。高压脉冲电场 (Pulsed electric field, PEF) 技术是一种非热、快速、高效、低能耗的重要加工技术<sup>[5]</sup>。近

年来被广泛应用于蛋白质以及多肽的研究中。Lin 等人在最优酶解条件下获得蛋清蛋白肽并经 PEF 处理后发现,分子量<1 ku 的蛋清蛋白组分的抗氧化活性在 5 h 内得到显著提高<sup>[6]</sup>。Wang 等人研究发现 PEF 技术能够使分子量 10~30 ku 蛋清源抗氧化肽的 FRAP 值增加至 44.23%, 显著的提高了其抗氧化活性<sup>[7]</sup>。外加高压脉冲电场对抗氧化肽活性提高的积极作用有据可循, 但 PEF 技术影响抗氧化肽活性作用机理的研究尚未深入。Jia 等研究表明, PEF 技术可以显著增强谷胱甘肽 (GSH) 的抗氧化活性, 并借助中红外 (Mid-infrared spectroscopy, MIR) 分析了 PEF 处理对 GSH 结构的影响<sup>[8]</sup>。Zhao 等人利用 PEF 钝化胃蛋白酶并借助圆二色谱 (Circular dichroism spectrum, CD) 发现 PEF 可以有效破坏胃蛋白酶中的  $\beta$ -折叠结构, 且  $\beta$ -折叠的变化规律与胃蛋白酶的活性变化规律保持一致<sup>[9]</sup>。本研究以经酶解、分离纯化以及结构鉴定所得的大豆源抗氧化肽 (Met-Met-Cys-Thr-Asp, MMCTD) 为载体, 利用 PEF 处理技术提高其抗氧化活性的同时, 借助圆二色谱、中红外光谱、核磁共振等技术详细分析了 PEF、肽的抗氧化活性以及其结构三者之间的关系。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

MMCTD 抗氧化肽(纯度 $\geq 98\%$ ) (MMCTD 的质谱图 1 所示), 上海强耀生物科技有限公司; DPPH (2,2-二苯基-1-苦肼基)、溴化钾、氘代诱导剂、分析纯, 美国 Sigma 公司生产; 乙醇、氢氧化钠、甲醇等试剂、分析纯, 北京化工厂生产。

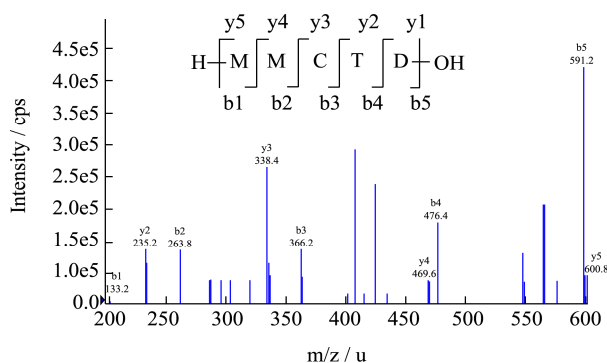


图 1 MMCTD 质谱图

Fig.1 An MS spectrum of peptide MMCTD

### 1.2 仪器设备

高压脉冲电场装置, 吉林大学殷涌光教授设计<sup>[10]</sup>; PH-070A 干燥箱/培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; BT25S 电子分析天平 (精度 0.01 mg) RT-6000 酶

标仪, 美国雷杜 Rayto 酶标仪有限公司; ZG-2 真空冷冻干燥机, 杭州创意真空冷冻干燥设备厂; IR Prestige-21 傅里叶红外光谱仪, 日本岛津公司; Jasco J-810 圆二色谱仪, 日本 JASCO 公司; NanoZS90 Zeta 粒度仪, 英国 Malvern 公司; 500 MHz 液体核磁共振波谱仪, 美国 Bruke 公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 PEF 处理方案设计

以电场强度、电场频率为实验因素设计双因素实验探究 PEF 对化学合成的抗氧化肽 MMCTD 的 DPPH 自由基清除能力的影响。电场强度选定为 5 kV/cm、10 kV/cm、15 kV/cm 和 20 kV/cm 4 个水平; 电场频率选定为 1800 Hz 和 2400 Hz 两个水平。

表 1 PEF 试验方案设计表

电场频率/Hz	电场强度/(kV/cm)			
	5	10	15	20
1800				
2400				

### 1.3.2 高压脉冲电场 (PEF) 处理

本实验所采用的 PEF 处理装置由料泵、加热装置以及高压脉冲电场处理装置共同组成。利用去离子水和乙醇将物料泵及 PEF 系统管路清洗两至三遍后, 在室温 25 °C 下, 将质量浓度为 8 mg/mL 的 MMCTD 抗氧化肽溶液通过物料泵抽取至高压脉冲电场处理装置中, 并以 3.2 mL/min 的流速在装置中循环流动。随后按照方案调节电场强度和脉冲频率, 处理 3 min 后收集样品, 进行下一步实验。

### 1.3.3 DPPH 自由基清除率测定方法

参照 Jia<sup>[4]</sup>所述的实验方法并稍加改进: 在室温 25 °C 下, 向 96 孔板中依次加入 100  $\mu$ L 经过不同 PEF 条件处理的抗氧化肽 MMCTD 样品肽液、100  $\mu$ L 甲醇及 100  $\mu$ L 浓度为 0.6 mmol/L 的 DPPH 甲醇溶液, 并充分混合均匀。避光反应 90 min 后, 用酶标仪在 515 nm 处测定其吸光度  $A_S$ 。并在相同条件下, 用 100  $\mu$ L 甲醇代替样品肽液作为空白对照, 测定其吸光度  $A_B$ , DPPH 清除率计算公式如下:

$$\text{DPPH 清除率} = \frac{A_B - A_S}{A_B} \times 100\%$$

式中:  $A_B$  为 200  $\mu$ L 甲醇与 100  $\mu$ L DPPH 甲醇溶液的吸光度;  $A_S$  为 100  $\mu$ L 测试液、100  $\mu$ L 甲醇与 100  $\mu$ L DPPH 甲醇溶液的吸光度。

### 1.3.4 MIR 的测定

红外光谱用于分析抗氧化肽 MMCTD 中官能团

以及其结构的改变。依据 Jia<sup>[8]</sup>等人所选用的中红外光谱分析方法,将傅里叶红外检测光谱仪的测试范围设定为 400~4000  $\text{cm}^{-1}$ ,分辨率为 4  $\text{cm}^{-1}$ 。将溴化钾在 130  $^{\circ}\text{C}$  环境下干燥 8 h,以备压片。将经 PEF 处理后的化学合成的抗氧化肽 MMCTN 进行真空冷冻干燥制成冻干粉。200 mg 溴化钾压片作为空白样,1 mg 冻干粉和 200 mg 溴化钾研磨混匀,压片后作为处理样,将处理样和空白样在处理室内以 2.8 mm/s 的扫描速度自动识别,扣除溴化钾的空白背景以及校准基线后获得样品的 MIR 光谱图。

### 1.3.5 $^1\text{H-NMR}$ 的测定

核磁共振技术用于分析 MMCTD 抗氧化肽的结构变化。参照杜天鹏等人所采用的方法<sup>[11]</sup>,将待测样品与  $\text{D}_2\text{O}$  诱导剂按一定比例混合后放置于 5 mm 核磁管中。设置检测条件为 5 mm BBFO 探头,500 MHz,脉冲宽度为 13  $\mu\text{s}$ ,采样延迟时间为 6 s,采样次数为 32 次。在此条件进行 MMCTD 抗氧化肽的  $^1\text{H}$  谱 NMR 检测。

### 1.3.6 CD 的测定

圆二色谱用于分析抗氧化肽 MMCTD 的二级结构的变化。根据 Zhao<sup>[5]</sup>等人所描述的方法,设定圆二色谱仪的测定波长为 190~270 nm,样品浓度为 8 mg/mL,扫描速度 100 nm/min,每个样品重复扫描 3 次。将石英样品池用去离子水润洗两遍后,再用经 PEF 处理后的待测样品润洗一遍,随后加入样品至石英池的 2/3 处并放入圆二色谱仪的样品槽中进行测量。

### 1.3.7 Zeta 电位的测定

Zeta 电位的测定用于分析 MMCTD 抗氧化肽整体电势的变化。将待测的 MMCTD 样品放入 Zeta 粒度仪中,设定测量时间为 2 min,溶剂的 RI 值为 1.330,温度为 25  $^{\circ}\text{C}$  并进行测定。

### 1.3.8 数据处理与统计方法

试验数据采用 SPSS 17.0 (美国,芝加哥,SPSS 公司) 统计软件进行单因素方差分析、相关性分析。用独立样品的 t 检验差异显著性检验,结果用平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm\text{S.D.}$ ) 表示,显著性水平为  $p<0.05$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 PEF 处理对 MMCTD 清除 DPPH 自由基

能力的影响

抗氧化肽 MMCTD 经不同电场强度和电场频率处理后的 DPPH 自由基清除率变化规律如图 2 所示。未经 PEF 处理的 MMCTD 抗氧化肽液对 DPPH 自由

基的清除率达到 93.80 $\pm$ 0.13%,且经过 PEF 处理后 MMCTD 抗氧化肽的活性有一定的提高。分别调节高压脉冲电场频率至 1800 Hz 和 2400 Hz,随着电场强度从 0 kV/cm 提高至 5 kV/cm,两个频率下的 DPPH 清除率能力都有明显的提高,并都在电场强度为 5 kV/cm 时达到该频率下 DPPH 清除率的最大值,分别为 94.11 $\pm$ 0.2%和 94.27 $\pm$ 0.03%。当电场从 5 kV/cm 继续提高至 15 kV/cm 时,两个频率下的 MMCTD 清除 DPPH 自由基的能力都呈现出不同程度的下降。在相同场强的条件下,频率为 2400 Hz 时 MMCTD 的 DPPH 自由基清除能力都要高于频率为 1800 Hz 时的清除能力。然而,随着电场强度从 15 kV/cm 增加至 20 kV/cm 时,电场频率为 2400 Hz 处理下的 DPPH 清除率仍保持下降的趋势,但电场频率为 1800 Hz 处理下的 DPPH 清除率却略有提高,从 93.82 $\pm$ 0.50%增加至 93.90 $\pm$ 0.00%。

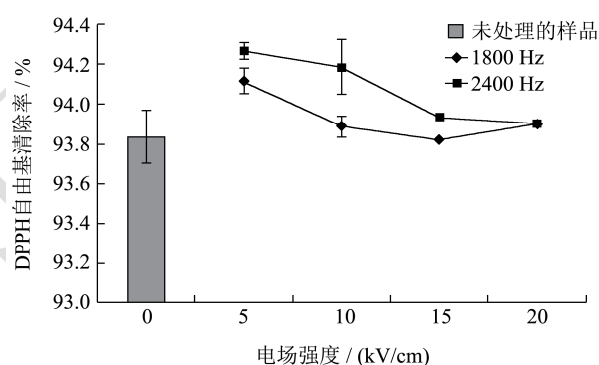


图 2 PEF 对 MMCTD 抗氧化肽 DPPH 自由基清除能力的影响  
Fig.2 Effects of PEF on the DPPH radical-scavenging capacity of peptide MMCTD

由图 2 中对比可以看出,在电场强度为 2400 Hz、电场强度为 5 kV/cm 时 PEF 对 MMCTD 抗氧化肽的活性提高最为显著,达到最高的 94.11 $\pm$ 0.2%。根据前人研究的基础<sup>[8]</sup>,我们推测在肽溶液流经高压脉冲电场装置的正负两极时,由于受到较强的电场力牵引,MMCTD 分子的内部结构发生改变,且瞬间高强的电压可能会对肽分子中某些具有极性的官能团以及不稳定的结构产生影响。这些改变都可能使得肽的活性位点能和 DPPH 自由基更好的接触,使得抗氧化肽 MMCTD 具有更强的清除自由基的能力。

### 2.2 MIR 分析

图 3 为所获得 MMCTD 抗氧化肽的 MIR 扫描光谱。从图中我们可以看出,在 400~4000  $\text{cm}^{-1}$  波长范围内,经过电场频率为 2400 Hz 和电场强度为 5 kV/cm 处理后的样品与未处理的样品的特征吸收峰在化学位移上基本保持相同,但是某些吸收峰的强度发生了轻

微的改变<sup>[12]</sup>。由此我们推测高压脉冲电场正负两级所产生的电场力并未改变了 MMCTD 抗氧化肽上的官能团但可能改变了其所处的化学环境。随后通过对 MIR 图谱进行进一步解析我们发现两种样品都具有不饱和 C-H (超过  $3000\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{NH}_2^+$  ( $3100\sim 2200\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{-C=O}$  ( $1850\sim 1725\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{COO-}$  ( $1420\sim 1390\text{ cm}^{-1}$ ), C-N ( $1360\sim 1180\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{-CH}_2$  ( $1385\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ ), 酰胺带 ( $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ ),  $\text{-NO}_2$  ( $1600\sim 1500\text{ cm}^{-1}$  和  $1300\sim 1250\text{ cm}^{-1}$ ), C-S ( $730\sim 600\text{ cm}^{-1}$ ), C-Br ( $700\sim 500\text{ cm}^{-1}$ ) 的特征吸收峰, 且吸收峰的峰值偏差并不大仅是强度有细微的差别。因此, 我们推断 MMCTD 清除自由基能力的提高并不是由其本身的官能团变化引起的。

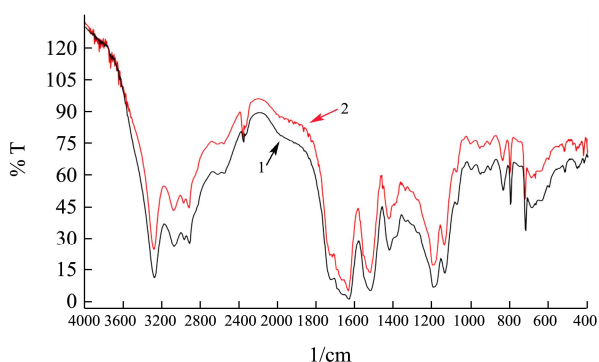


图3 MMCTD 的 MIR 光谱图

Fig.3 MIR spectra of peptide MMCTD

注: 光谱 1 代表未处理样品, 光谱 2 代表经最优 PEF 条件处理的样品。

### 2.3 $^1\text{H-NMR}$ 分析

我们分别对处理前后的 MMCTD 进行  $^1\text{H-NMR}$  检测 (如图 4 所示)。a 为未经过 PEF 处理的 MMCTD 抗氧化的  $^1\text{H-NMR}$  谱图, b 为经  $2400\text{ Hz}$ ,  $5\text{ kV/cm}$  条件下 PEF 处理的 MMCTD 抗氧化的  $^1\text{H-NMR}$  谱图。通过对比我们发现, 两个图中的氢质子峰的位移基本相同。这表明在经过 PEF 处理后, MMCTD 抗氧化肽上并未产生新类型的 H 质子产生即并没有新的官能团产生, 这也与中红外的检测结果一致。但通过对 H 质子峰的进一步归属, 我们发现在相近位移处的氢质子峰劈裂的数目并不完全相同, 这表明在经过 PEF 处理后, MMCTD 抗氧化肽上所含的 H 质子所处的化学环境发生了改变<sup>[13]</sup>。

### 2.4 CD 分析

从 PEF 对 MMCTD 清除自由基能力的影响中我们可以看出, 当电场频率为  $2400\text{ Hz}$ , 电场强度达到  $5\text{ kV/cm}$  时, 其清除自由基的能力达到最大, 所以我们选取经过该电场条件处理的样品和未经电场处理的样

品进行圆二色性的检测 (如图 5 所示)。从图 5 中我们可以看出未经处理和经过 PEF 处理的 MMCTD 抗氧化肽都在  $245\sim 250\text{ nm}$  之间达到最小值, 这说明了两者有着相似的二级结构组分。而当 MMCTD 抗氧化肽经过 PEF 处理后其吸收的最小值较未经处理的样品有着明显的下降, 这表明经过 PEF 处理后的样品其二级结构发生了一定的改变<sup>[9]</sup>。随后我们对两种样品中不同二级结构的含量分别进行计算 (如图 6 所示)。我们发现经过 PEF 处理后, MMCTD 抗氧化肽的  $\alpha$ -螺旋的含量基本保持不变, 但  $\beta$ -折叠的含量从  $13.70\%$  下降至  $0.00\%$ , 这说明 PEF 破坏了 MMCTD 水溶液中形成的  $\beta$ -折叠结构。研究表明 PEF 会破坏胃蛋白酶中  $\alpha$ -螺旋<sup>[14]</sup> 以及  $\beta$ -折叠<sup>[15]</sup> 结构使得蛋白失去活性。因此我们推断 PEF 可以提高 MMCTD 抗氧化肽清除自由基的能力可能与破坏其中的  $\beta$ -折叠结构有关。在  $\beta$ -折叠含量减少的同时,  $\beta$ -转角以及无规则卷曲的含量都有着明显的增加, 我们推测 PEF 处理可使得 MMCTD 的  $\beta$ -折叠被破坏, 转变为  $\beta$ -转角以及无规则卷曲结构。这种二级结构的改变可能使得 MMCTD 抗氧化肽的活性位点更容易的与自由基相结合, 从而达到清除自由基的目的。

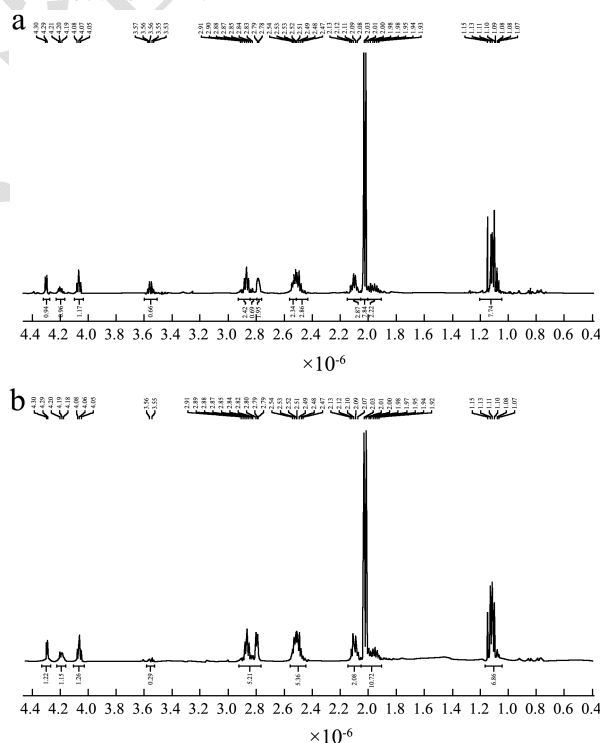


图4 MMCTD 的  $^1\text{H-NMR}$  谱图

Fig.4  $^1\text{H-NMR}$  spectra of peptide MMCTD

注: a 为未经过 PEF 处理的 MMCTD  $^1\text{H-NMR}$  谱图, b 为经最优条件下 PEF 处理的 MMCTD  $^1\text{H-NMR}$  谱图。



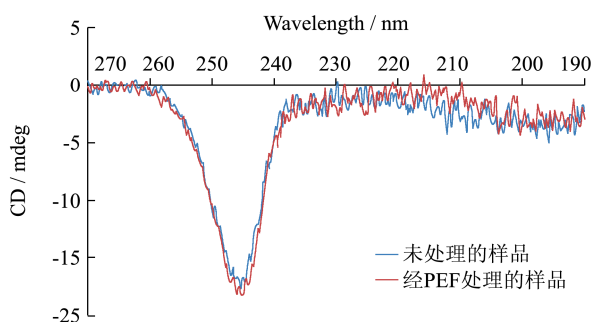


图5 MMCTD的圆二光谱图

Fig.5 CD spectra of peptide MMCTD

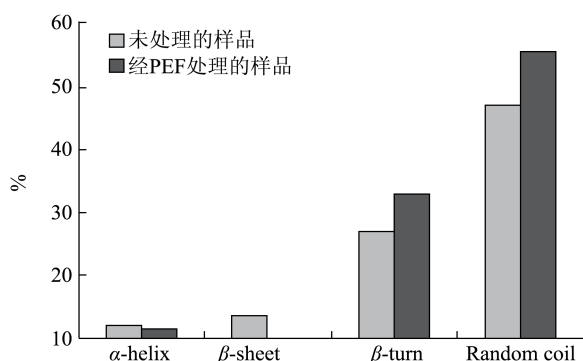


图6 MMCTD 二级结构变化

Fig.6 Changes in the secondary structure of peptide MMCTD

## 2.5 Zeta 电位分析

Zeta 电位反应的是带电微粒水力学剪切面处的电势, 常用来表示溶液中带电粒子的表面点电荷, 而蛋白质的表面电荷是由其所包含的多种氨基酸残基的局部电离来决定的<sup>[16]</sup>。通常我们认定当一个溶液的 Zeta 电位的绝对值越大则溶液的稳定性越强。因此, 我们分别测定了未经 PEF 处理和经过 PEF 处理的 MMCTD 肽溶液的 Zeta 电位值。并发现相对于未经 PEF 处理的 MMCTD 抗氧化肽溶液, 经 2400 Hz, 5 kV/cm 条件下 PEF 处理后的样品的 Zeta 电位值从  $16.07 \pm 1.50$  mV 下降到  $10.85 \pm 0.98$  mV。MMCTD 抗氧化肽溶液的稳定性受到 PEF 的影响。故我们推测, PEF 装置正负两极产生的强大电场力改变了 MMCTD 抗氧化肽双电层的电荷分布, 使得阳离子离开 MMCTD 的表面, 从而导致整体的 Zeta 电位值降低, 整个体系趋于不稳定, 增加了 MMCTD 抗氧化肽提供电子和与自由基结合的能力, 最终表现为 MMCTD 清除自由基的能力得到增强。

## 3 结论

本文借助 PEF 技术, 以 MMCTD 抗氧化肽的空间构象为切入点, 初步揭示了 PEF、MMCTD 的抗氧

化活性以及其结构三者之间的关系。双因素实验表明 MMCTD 的 DPPH 自由基清除能力在电场强度为 5 kV/cm 和电场频率为 2400 Hz 时达到最大值  $94.27\% \pm 0.03\%$ 。因此我们分析了此条件下 MMCTD 抗氧化肽结构的变化并发现, 经过 PEF 处理后, MMCTD 中所含有的官能团以及肽链结构并未发生明显的改变, 但是其所形成的  $\beta$ -折叠的含量从 13.70% 下降至 0.00%,  $\beta$ -转角以及无规则卷曲的含量都有着明显的增加。因此我们推断  $\beta$ -折叠结构阻碍了 MMCTD 与自由基的接触, 当 PEF 破坏了其二级结构,  $\beta$ -折叠转化为  $\beta$ -转角以及无规则卷曲结构, MMCTD 可与自由基更加紧密的结合, 其抗氧化值也随之增加。与此同时, 我们也发现 PEF 可以改变 MMCTD 抗氧化肽双电层的电荷分布, 导致整体的 Zeta 电位值降低, 体系趋于不稳定, 从而也增加了 MMCTD 肽溶液提供电子和与自由基结合的能力。

## 参考文献

- [1] Hong J, Chen T T, Hu P, et al. Purification and characterization of an antioxidant peptide (GSQ) from Chinese leek (*Allium tuberosum* Rottler) seeds [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 10: 144-153
- [2] Zhuang H, Tang N, Yuan Y. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4): 1810-1821
- [3] Zhang M, Mu T H, Sun M J. Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7(2):191-200
- [4] Wang X J, Zheng X Q, Kopparapu N K, et al. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(9): 1562-1569
- [5] Wei Z, Ruijin Y, Rongrong L, et al. Investigation of the mechanisms of pulsed electric fields on inactivation of enzyme: lysozyme [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(24): 9850-9858
- [6] Lin S, Yan J, Liu M, et al. Research on the preparation of antioxidant peptides derived from egg white with assisting of high-intensity pulsed electric field [J]. Food Chemistry, 2013, 139(1-4): 300-306
- [7] Wang K, Wang J, Zhao P, et al. Optimized PEF treatment for antioxidant polypeptides with  $M_w$  10~30 ku and preliminary analysis of structure change [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2012, 51(5): 819-825

- [8] Jia W, Ke W, Ying W, et al. A novel application of pulsed electric field (PEF) processing for improving glutathione (GSH) antioxidant activity [J]. *Food Chemistry*, 2014, 161(11): 361-366
- [9] Zhao W, Yang R. Effect of high-intensity pulsed electric fields on the activity, conformation and self-aggregation of pepsin [J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(3): 777-781
- [10] He G, Yin Y, Yan X, et al. Optimisation extraction of chondroitin sulfate from fish bone by high intensity pulsed electric fields [J]. *Food Chemistry*, 2014, 164(3): 205-210
- [11] 杜天鹏.几个多肽的液体核磁共振结构研究[D].武汉:中国科学院研究生院(武汉物理与数学研究所),2014  
DU Tian-peng. NMR Based structural studies of several peptides [D]. Wuhan: Chinese Academy of Science (Wuhan Institute of Physics and Mathematics), 2014
- [12] Ke W, Jia W, Bo L, et al. Effects on DPPH inhibition of egg-white protein polypeptides treated by pulsed electric field technology [J]. *Journal of the Science of Food & Agriculture*, 2013, 93(7): 1641-1648
- [13] Sharma S C, Armand T, Ball K A, et al. A facile method for expression and purification of <sup>15</sup>N isotope-labeled human Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptides from *E. coli* for NMR-based structural analysis [J]. *Protein Expression & Purification*, 2015, 116: 82-89
- [14] Yang R, Li S Q, Zhang Q H. Effects of pulsed electric fields on the activity and structure of pepsin [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2004, 52(24): 7400-7406
- [15] Zhong K, Wu J, Wang Z, et al. Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO [J]. *Food Chemistry*, 2007, 100(1): 115-123
- [16] 叶进富.蛋白质 zeta 电位与离子交换层析分离的相关性研究[D].浙江:浙江大学,2006  
YE Jin-fu. Zeta potential of protein and its correlation to separation behavior of ion exchange chromatography [D]. Zhejiang: Zhejiang University, 2006