

琥珀酰化改性对豌豆蛋白性能与结构的影响

王双莉¹, 曾海^{1,2}, 黄伟¹, 林卫东¹, 李少康¹, 藏小丹^{1*}

(1. 牡丹江医科大学公共卫生学院, 黑龙江牡丹江 157011)

(2. 牡丹江医科大学附属红旗医院, 黑龙江牡丹江 157041)

摘要: 豌豆蛋白因溶解性差、乳化性能不足等问题限制了其在食品工业中的应用与发展。本研究采用琥珀酸酐 (Succinic Anhydride, SA) 对豌豆分离蛋白 (Pea Protein Isolate, PPI) 进行改性, 考察不同 SA 添加量对蛋白分子构象及功能特性的影响。结果表明, SA 添加量与 PPI 酰化度呈正相关; 当 SA 与 PPI 质量比为 0.1:1 时, PPI 的结构与功能性质改善最为显著。改性后 PPI 的 Zeta 电位绝对值显著增加, 表面疏水性降低, 傅里叶变换红外光谱显示蛋白二级结构中 α 螺旋含量减少, 无规卷曲和 β 折叠增加, 表明蛋白发生去折叠且构象柔性增强。与此同时, PPI 的溶解度、乳化活性及乳化稳定性均显著提升, 粒径减小, 分散性改善。扫描电镜观察到改性蛋白呈现更舒展、松散的游离结构。综上, 琥珀酰化改性通过改变 PPI 的电荷分布和构象特征, 有效改善了其溶解性和乳化性能, 显著提升了 PPI 的性质, 为豌豆蛋白的大规模产业化应用提供了理论基础。

关键词: 豌豆分离蛋白; 琥珀酰化; 结构特征; 功能特性

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0661

The Effects of Succinylation Modification on The Properties and Structure of Pea Protein

WANG Shuangli¹, ZENG Hai^{1,2}, HUANG Wei¹, LIN Weidong¹, LI Shaokang¹, ZANG Xiaodan^{1*}

(1. Mudanjiang Medical University School of Public Health, Mudanjiang 157011, China)

(2. Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157041, China)

Abstract: The application and development of pea protein in the food industry are limited by issues such as poor solubility and insufficient emulsifying properties. In this study, succinic anhydride (SA) was used to modify pea protein isolate (PPI), and the effects of different SA addition levels on the molecular conformation and functional properties of the protein were investigated. The results showed that the SA addition level was positively correlated with the acetylation degree of PPI; when the mass ratio of SA to PPI was 0.1:1, the structural and functional properties of PPI improved most significantly. The absolute value of the zeta potential of the modified PPI increased significantly, and surface hydrophobicity decreased. Fourier transform infrared spectroscopy revealed a reduction in the α -helix content in the protein's secondary structure, along with an increase in random coils and β -sheets, indicating protein denaturation and enhanced conformational flexibility. At the same time, the solubility, emulsifying activity, and emulsifying stability of PPI were all significantly improved, particle size decreased, and dispersibility improved. Scanning electron microscopy revealed that the modified protein exhibited a more extended and loose free structure. In summary, succinylation modification effectively improved the solubility and emulsifying properties of PPI by altering its charge distribution and conformational characteristics, significantly enhancing the properties of PPI and providing a theoretical basis for the large-scale industrial application of pea protein.

Key words: pea protein isolate; succinylation; physicochemical structure; functional properties

植物蛋白种类和来源十分丰富, 其可基础分类为豆类、谷物类、油籽类和坚果类等^[1], 植物蛋白相较于动物蛋白的独特优势在于, 产出比高, 环境友好^[2], 且各类蛋白都具有独特的结构与功能特性^[2,3]。豌豆 (*Pisum sativum*

收稿日期: 2026-04-28; 修回日期: 2026-07-06; 接受日期: 2026-07-07

基金项目: 2025 年度黑龙江省省属本科高校基本科研课题 (2025-KYYWF-ZR0811); 牡丹江市重点研发计划项目 (HA25BR088); 黑龙江省卫生健康委科研项目 (20251212020512); 博士科研启动基金 (2021-MYBSKY-063)

作者简介: 王双莉 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白质工程, E-mail: wshuangli111@163.com

通讯作者: 藏小丹 (1984-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 蛋白质工程, E-mail: dlzxd23@163.com

L.)，属豆科豌豆属一年生攀援草本植物，主要种植于南欧及环地中海地区^[4,5]。豌豆营养价值丰富，其籽粒中富含铜、铬等微量元素，对神经及骨骼系统发育具有促进作用^[6,7]；其中铬有助于糖脂代谢并辅助胰岛素发挥作用^[7]。此外，豌豆中的胆碱可预防动脉硬化，鲜豌豆的维生素 C 含量在豆类中最高。干豌豆营养物质基本构成为 53% 淀粉，25% 蛋白质，10% 粗纤维，其余组成为矿物质、维生素等^[8]。除食用外，豌豆还广泛用作动物饲料和覆盖作物。

随着人们对低热量，低风险饮食模式关注度的不断提高，植物蛋白逐渐成为动物蛋白的替代品，豌豆蛋白质成分相对均衡，含丰富的赖氨酸，可作为人体必需氨基酸的来源^[9]，在食品科学的研究领域和食品工业研究领域均有较好的前景^[10]。但在一般食品加工过程中，豌豆蛋白稳定性、溶解性差等制约了其当前的发展规模与应用，基于上述原因，对豌豆分离蛋白（Pea Protein Isolate, PPI）进行改性处理，可使其功能特性更加满足未来发展的需求。琥珀酰化改性是一种衍生的化学改性技术，本质为亲核取代反应。已有研究表明对鹰嘴豆蛋白进行琥珀酰化改性，可使其持水性、持油性、溶解度、乳化性等均有不同程度的提升^[11]。此外，酰化改性还可改变蛋白的凝胶与质构特性^[12]。但目前琥珀酰化改性对 PPI 结构与性质的影响尚不明确。基于此，本研究以 PPI 为研究对象，探究不同琥珀酸酐（Succinic Anhydride, SA）添加量对 PPI 的酰化改性效果，并分析酰化改性对 PPI 理化结构及功能特性的影响，为 PPI 的琥珀酰化改性提供技术参考与理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

干豌豆粒（中豌 6 号），购自甘肃，密封干燥存放；丁二酸酐（AR，99%），上海源叶生物科技有限公司；透析袋（7 000），上海源叶生物科技有限公司；玉米油（食用级），九三食品股份有限公司，其余所用试剂皆为分析纯。

1.2 仪器和设备

H97 恒温磁力搅拌器，上海梅颖浦仪器仪表有限公司；PHSJ-4F pH 计，上海仪电科学仪器股份有限公司；F-7000 荧光分光光度计，日本东京日立高科技公司；UV-1000 紫外可见分光光度计，北京莱伯泰科仪器科技有限公司；SN-TDL-40D 离心机，上海尚仪精密仪器有限公司；LGJ-18 真空干燥机，河南信陵仪器设备有限公司；JD20-5 电子分析天平，沈阳龙腾电子有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 PPI 的制备

1.3.1.1 豌豆粉的制备

选择圆润饱满的干豌豆粒，进行清洗后晾干，再使用破碎机进行破碎，少量多次进行破碎操作，确保全部过程温度不超过 40 °C，避免蛋白质出现高温变性，且破碎后的豌豆粉需过 200 目筛。

1.3.1.2 PPI 的制备

采用碱溶酸沉的方法，使用正己烷对豌豆粉进行脱脂操作。称取脱脂之后一定量的豌豆粉与去离子水（m/m）比为 1:10，室温下磁力搅拌 2 h，搅拌结束后 4 °C 静置过夜，确保其充分水合。充分水合后用 2 mol L⁻¹ 的 NaOH 调节蛋白溶液 pH 值至 9.0，离心收集上清液（4 °C，9 000 r min⁻¹，15 min），再用 2 mol L⁻¹ 的 HCl 调节收集的上清液 pH 值为 4.5，在 4 °C，9 000 r min⁻¹ 离心 15 min 收集沉淀，最后将沉淀冷冻干燥，得到 PPI。

1.3.1.3 PPI 的化学成分组成测定

水分含量的测定，参考（GB.5009.3-2016）：直接干燥法^[13]。灰分测定，参考（GB.5009.4-2016）：干法灰化法^[14]。蛋白质含量的测定，参考（GB5009.5-2016）：微量凯氏定氮法^[15]。脂肪测定，参考（GB5009.4-2016）：索氏抽提法^[16]。总糖含量的测定，参考（GB/T15672-2009）：苯酚硫酸法^[17]。氨基酸组成测定，参考（GB5009.124-2016）：茚三酮柱后衍生离子交换色谱法^[18]。

1.3.1.4 PPI 溶解度测定

为减少溶解度对实验的影响，且避免强碱环境对蛋白结构的破坏，选择适度碱性条件（pH 值为 8~9.4）增加其溶解度。通过考马斯亮蓝法来测定可溶性蛋白的溶解度，蛋白浓度与吸光度呈线性正相关。标准曲线构建流程

如下:将牛血清蛋白标准品按 $0\sim 1.52\text{ mg mL}^{-1}$ 浓度梯度稀释,精密移取 $5\text{ }\mu\text{L}$ 各梯度溶液至 96 孔板,随后在每孔中加 $250\text{ }\mu\text{L}$ 考马斯亮蓝液,通过酶标仪在 595 nm 波长下测量其吸光度。三次平行测定的均值进行标准曲线拟合。依据实验过程得出的牛血清蛋白在浓度为 $0\sim 100\text{ mg mL}^{-1}$ 的范围内,标准曲线为 $y=0.00287x+0.15733$, $R^2\geq 0.99$ 。将待测样品稀释至线性响应区间,按相同操作测定其吸光度值,将值代入标准曲线方程,计算蛋白浓度。溶解度计算公式(1)如下:

$$S = \frac{w_1}{w_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

S ——蛋白溶解度, %;

w_1 ——上清液蛋白含量, g;

w_2 ——初始蛋白含量, g。

1.3.2 PPI 的琥珀酰化

称取一定量 PPI 溶解于去离子水中,配置成质量浓度为 2.5% (m/m) 的蛋白溶液,于室温下充分搅拌 2 h 使蛋白溶解,搅拌完成后将其置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下充分水合 8 h ,用 2 mol L^{-1} 的 NaOH 调节蛋白溶液 pH 值为 9.0 ,再加入不同浓度的琥珀酸酐使 PPI 与琥珀酸酐的质量比为 $1:0.02$ 、 $1:0.05$ 、 $1:0.1$ 、 $1:0.15$,酰化过程中确保反应体系的 pH 值在 9.0 ± 0.2 ,当体系稳定在 9.0 ± 0.2 时继续搅拌 1.5 h 。搅拌结束后,在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下用 7 kDa 透析袋透析 24 h ,每隔 8 h 换水一次,确保脱盐充分,并去除小分子杂质干扰,最后冷冻干燥得到 4 个酰化度的样品,分别为 SPPI-I, SPPI-II, SPPI-III, SPPI-IV。

1.3.3 PPI 与 SPPI 的性质测定

1.3.3.1 表面疏水性 (H_0) 和分子柔韧性 (F_0) 的测定

将 4 mL 不同浓度的用磷酸盐缓冲溶液 (0.01 mol L^{-1} , pH 值=7.0) 配置的 PPI/SPPI 溶液 (质量浓度 0.10 、 0.12 、 0.14 、 0.16 、 0.18 mg mL^{-1}) 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ ANS ($8\times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$, pH 值为 7.0),充分搅拌,于黑暗中反应 15 min 。以磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 代替蛋白溶液作为空白对照,同法加入 ANS 并测定荧光强度。在 390 nm 的激发波长、发射波长 470 nm 、狭缝宽度 5 nm 条件下,利用荧光光谱分别测量样品和空白溶液的荧光强度。样品的荧光强度减去空白值后,得到校正荧光强度。以校正荧光强度对蛋白质浓度做线性回归,所得斜率即为表面疏水性指数 (H_0)。

在质量浓度 1 mg mL^{-1} 的磷酸盐缓冲液 (0.01 mol L^{-1} , pH 值=7.0) 中溶解 PPI/SPPI。制备 1 mg mL^{-1} (质量浓度) 的中性蛋白酶溶液,将其溶解在 Tris-HCl 缓冲溶液中,浓度为 0.05 mol L^{-1} , pH 值=8.0。将 3 mL 的样本溶液与 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的酶液相混合,于 $38\text{ }^\circ\text{C}$ 下反应 10 min ,再添加 3 mL 浓度 4% (m/V) 的 TCA 循环结束,使未经消化的蛋白质沉淀,在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、 4000 g 下离心 30 min ,在 280 nm 用紫外光谱法测量它的吸收度,以表达分子柔韧性 (F_0)。

1.3.3.2 酰化度测定

N-酰化度的测定,参照 Lu 等^[19]方法并稍作修改。称取适量样品溶于去离子水中配置成质量比为 1% 的蛋白溶液,每种溶液吸取 1 mL ,在吸取 1 mL 的 2% 茚三酮溶液在试管中混合均匀。将混合液沸水浴 10 min 后,转移到冰水浴,使其快速冷却。向每只试管中分别加入 5 mL 去离子水,并用紫外分光光度计在 570 nm 波长下,测量样品的吸光度。样品酰化度计算方法如公式(2)所示:

$$D = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

D ——酰化度;

A_0 ——酰化样品的吸光度;

A ——未酰化样品的吸光度。

O-酰化度测定,参照 Zhao 等^[20]方法,以 $1:2:1$ 的体积比混合 3.5 mol L^{-1} 的 NaOH、 2 mol L^{-1} 的盐酸羟胺 ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$) 及去离子水,配置为测试溶液。取 5 mg mL^{-1} (质量浓度) 的样品溶液 1.0 mL 与 2.0 mL 测试溶液混合,于 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴反应 2 h ,随后加入 3 mol L^{-1} HCl 溶液 1 mL 终止反应,再加入 0.37 mol L^{-1} FeCl_3 溶液 1 mL

显色, 室温静置 20 min, 离心后取上清液, 测其在 540 nm 波长处吸光度值, 为 O-酰化度。

1.3.3.3 PPI/SPPI 溶解度与浊度

同 1.3.2 的方法, 制备蛋白溶液, 将 PPI/SPPI 的 pH 值均用 0.1 mol L⁻¹ NaOH 或 0.1 mol L⁻¹ HCL 调整至 7.0, 测定其溶解度。将 PPI/SPPI 用去离子水溶解并稀释至 2 mg mL⁻¹ (质量浓度), 以去离子水为空白, 测量其在 600 nm 处吸光度值, 该读数值即代表浊度。

1.3.3.4 乳化性和乳化活性的测定

将 PPI/SPPI 用去离子水配制成 5 mg mL⁻¹ (质量浓度) 的溶液, 按油/水比 1:9 加入玉米油, 高速剪切匀浆机 (12 000 r min⁻¹) 均质 1 min, 形成乳液, 全程维持体系在冰浴状态下。

分别于乳液制备完成时 (t 为 0) 及静置 30 min 后 (t 为 30), 从距管底 10 mm 处精密吸取 10 μL 乳液样品, 加入 5 mL 0.1% (m/V) SDS 溶液, 涡旋振荡 40 s 实现液滴单分散。随即在 500 nm 波长处测定乳液吸光度值 A₀ 与 A₃₀。乳化性 (EAI) 是评价蛋白质乳化能力的重要参数, 它反映了单位质量蛋白质可稳定的油-水界面面积。计算公式 (3) 如下:

$$EAI = \frac{2 \times 2.303 \times A_0 \times N}{210000 \times (1 - \phi) \times c \times l} \quad (3)$$

式中:

EAI——乳化性, m² g⁻¹;

N——稀释倍数;

φ——油相占比;

A₀——新鲜乳液制备完成时于 500 nm 处的吸光值;

c——蛋白溶液中每体积蛋白质的重量, g mL⁻¹;

l——为 1 cm 的光透路径。

乳化稳定性 (ESI): 指数反映体系抗相分离能力。计算公式 (4) 为:

$$ESI = \frac{A_0}{A_0 - A_{30}} \times T \quad (4)$$

式中:

ESI——乳化稳定性, min;

A₀——新鲜乳液制备完成时于 500 nm 处的吸光值;

A₃₀——乳液制备完成并静置 30 min 后在 500 nm 处的吸光值;

T——为 30 min 的静置时间。

1.3.3.5 Zeta 电位、粒径与多分散指数

取样品用去离子水稀释至 0.5 mg mL⁻¹ (质量浓度), 使用马尔文粒度分析仪测其 Zeta 电位、粒径与多分散指数 (PDI)。为防止出现光散射现象, 粒径测定时设置相对折射率为 1.09, 该值为豌豆蛋白的折射率 (约 1.52) 与分散介质 (水, 折射率 1.33) 的比值 (约为 1.14, 实际仪器默认蛋白通用相对折射率为 1.09 至 1.15, 本研究中采用仪器内置蛋白数据库推荐的 1.09)。其他测定参数: 温度 25 °C, 平衡 2 min, 每个样品重复测定 3 次。

1.3.3.6 持水性和持油性

取 100 mg 样品 (m₀) 置于 5 mL 离心管中, 记录离心管连同样品的总质量, 记作 m₁。向管内加入 3.5 mL 去离子水 (用于持水性测定) 或大豆油 (用于持油性测定), 涡旋混合, 移除上清液, 并用滤纸条吸净管壁残留的液体。再次称量离心管与剩余样品的总质量, 记为 m₂。按照公式 (5) 分别计算持水性及持油性。

$$R_w / R_o = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \quad (5)$$

式中:

R_w——持水性;

R_o——持油性;

m₀——样品初始质量;

m₁——离心管连同样品初始质量的总质量;

m_2 ——加入水/油涡旋混合，移除上清液后离心管与剩余样品的总质量。

1.3.3.7 内源荧光测定

将 PPI 及 SPPI 溶解于 0.01 mol L⁻¹ 磷酸盐缓冲溶液（pH 值 7.0）中，配成质量浓度为 0.1 mg mL⁻¹ 的溶液。采用荧光光度计测量样品的荧光光谱，参数设置：激发波长设定为 280 nm，激发与发射狭缝宽度为 5 nm，在 290~400 nm 范围下进行扫描。

1.3.3.8 红外光谱

将溴化钾与样品（光谱级）研磨混合、压片，进行红外光谱扫描。扫描参数：扫描范围 400~4 000 cm⁻¹，扫描次数 64 次，分辨率 4 cm⁻¹，并用 Omnicv 8.0 软件进行分析。

1.3.3.9 扫描电子显微镜（Scanning electron microscope, SEM）

SEM 在 5.0 kV 电压下检测冻干样品的形貌。为了防止在电子束下带电，在观察之前，在样品表面上溅射镀一层金涂层。

1.4 数据处理

每组实验平行重复 3 次，所得结果以均值±标准差（SD）来表示。使用单因素方差分析（ANOVA）和邓肯模型检验来进行统计。 $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 PPI 的一般化学组分构成

表 1 PPI 基本组成成分
Table 1 Basic Components of PPI

粗蛋白/%	水分/%	灰分/%	总糖/%	粗脂肪/%
74.5±0.2	5.8±0.3	5.1±0.2	6.2±0.4	5.4±0.3

注：蛋白质换算系数为 5.5。

如表 1 所示，PPI 干基的蛋白含量达 74.5±0.2%，显示出较高的纯度，表明其可作为优质的植物蛋白来源。若按照蛋白换算系数 6.25 来换算，其蛋白量高达 84.66%±0.2%。

2.2 PPI 氨基酸构成测定

表 2 PPI 中氨基酸组成及总氨基酸含量
Table 2 Amino acid composition and total amino acid content in PPI

氨基酸	g/100 g	占总体百分比/%
甘氨酸（Gly）	2.44±0.26	3.90±0.42
丙氨酸（Ala）	2.61±0.24	4.17±0.38
丝氨酸（Ser）	3.28±0.32	5.24±0.51
苏氨酸（Thr）	2.37±0.27	3.79±0.43
脯氨酸（Pro）	2.36±0.27	3.77±0.43
谷氨酸（Glu）	11.77±1.66	18.81±2.65
天冬氨酸（Asp）	7.46±0.87	11.93±1.39
异亮氨酸（Ile）	3.09±0.38	4.93±0.61
亮氨酸（Leu）	5.74±0.57	9.18±0.91
精氨酸（Arg）	5.40±0.51	8.63±0.82
缬氨酸（Val）	3.19±0.35	5.10±0.56
甲硫氨酸（Met）	0.41±0.04	0.66±0.06
酪氨酸（Tyr）	2.24±0.30	3.58±0.48
苯丙氨酸（Phe）	3.67±0.29	5.87±0.46

赖氨酸 (Lys)	4.75±0.48	7.59±0.77
组氨酸 (His)	1.54±0.16	2.47±0.26
半胱氨酸 (Cys)	0.23±0.02	0.37±0.03
氨基酸总计/%	62.55±2.30	100
支链氨基酸 (BCAA) /%	12.01±0.53	19.21±0.85

根据表 2 可知，本实验所制 PPI 总氨基酸含量为 62.55 g/100 g（以干基计）。在氨基酸组成中，谷氨酸所占比例最高，高达 18.81%，天冬氨酸次之。支链氨基酸（BCAA）占比达 19.21%，其中亮氨酸 9.18%、异亮氨酸 4.93%、缬氨酸 5.10%。BCAA 在促进蛋白质合成及肌肉生长方面具有重要作用，表明 PPI 在运动营养及功能性食品研发领域具有一定的应用价值。

2.3 PPI 溶解度

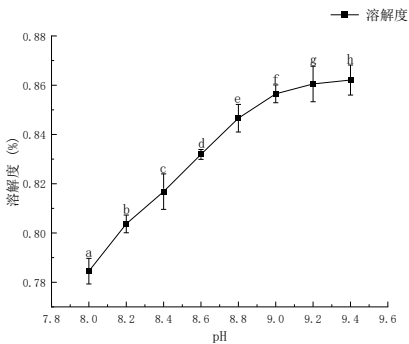


图 1 PPI 的溶解度图

Fig.1 Solubility Chart for PPI

注：图中不字小写字母表示不同 pH 条件下 PPI 溶解度有显著性差异（ $P<0.05$ ）。图中误差棒表示标准差，每组 $n=3$ 。

经测定 PPI 的溶解度随 pH 值变化逐渐升高，其中 pH 值在 8.0、8.2、8.4、8.6、8.8、9.0、9.2、9.4 时，溶解度分别为 78.45%、80.37%、81.68%、83.19%、84.66%、85.65%、86.05%、86.21%。溶解度如图 1 所示，pH 值在 9 附近时，PPI 的溶解度变化不大。

2.4 SPPI 琥珀酰化度的变化

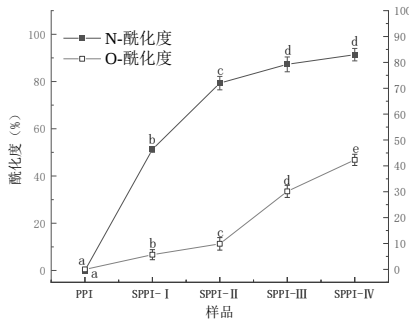


图 2 样品的酰化度变化

Fig.2 Changes in the degree of acetylation of the samples

注：图中不字小写字母表示不同琥珀酸酐添加量条件下 PPI 酰化度有显著性差异（ $P<0.05$ ）。图中误差棒表示标准差，每组 $n=3$ 。

琥珀酰化过程的使用了丁二酸酐，即琥珀酸酐，其酰化反应包括氨基酰化（N-酰化）和脂肪族羟基酰化（O-酰化）。如图 2 所示，随着琥珀酸酐添加比例的提高，PPI 酰化度逐渐增加。由于 SA 与 PPI 的反应具有位点选择性，当不同浓度的琥珀酸酐加入反应后，不同酰化的趋势不同，其中 N-酰化度出现较早，在 SPPI-I 组中的酰化程度即

达到了 $51.26\% \pm 1.21\%$, 其后酰化度呈缓慢增长的趋势, 在 SPPI-IV 组达到了 $91.37\% \pm 2.64\%$ 。但在 O-酰化中, SPPI-I 组的酰化度仅为 $5.67\% \pm 1.95\%$, 而 SPPI-III 组的酰化度则增加至 $30.15\% \pm 2.34\%$, SPPI-IV 组则达到了 $42.32\% \pm 2.17\%$ ($P < 0.05$)。这一差异主要是因反应位点的可及性与反应活性, 蛋白质表面的 ϵ -氨基 (赖氨酸侧链) 及 N-端氨基暴露充分、亲核性强, 优先与琥珀酸酐反应, 因此 N-酰化在低浓度下快速饱和; 而羟基 (丝氨酸、苏氨酸侧链) 通常埋藏于蛋白质内部或参与氢键网络, 可及性较低, 需要更高的酰化剂浓度及更充分的蛋白质去折叠才能有效反应。与酰化芸豆蛋白的酰化类似^[21], 反映了酰化反应的位点选择性及蛋白构象对反应进程的调控作用。

2.5 PPI 与 SPPI 的表面疏水性 (H_0) 和分子柔韧性 (F_0) 测定

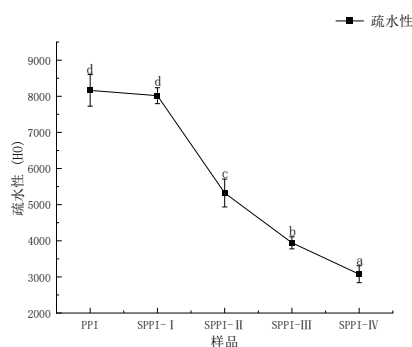


图3 表面疏水性的变化

Fig.3 Changes in surface hydrophobicity

注: 图中不字小写字母表示不同琥珀酸酐添加量条件下 PPI 表面疏水性有显著性差异 ($P < 0.05$)。图中误差棒表示标准差, 每组 $n=3$ 。

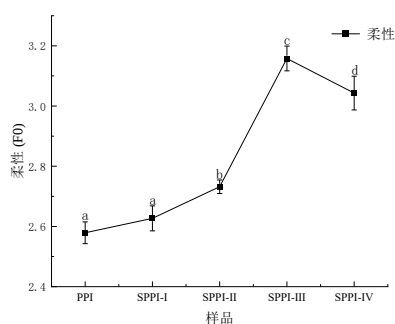


图4 分子柔性的变化

Fig.4 Changes in molecular flexibility

注: 图中不字小写字母表示不同琥珀酸酐添加量条件下 PPI 的分子柔性有显著性差异 ($P < 0.05$)。图中误差棒表示标准差, 每组 $n=3$ 。

如图3所示, 随着酰化度增大, PPI 的表面疏水性显著降低, 与 He 等^[22]研究一致。表面疏水性降低的原因可能是琥珀酰改性引入了亲水的丁二酰胺基团, 改变了蛋白质的结构, 使其表面疏水膜面积减少, 从而降低了蛋白质的疏水性^[23]; 同时, 酰化后, 蛋白的电荷密度、电负性等都显著提高, 从 Zeta 电位图可以看出, 由于蛋白质具有较高的负电性或较大的电负性时会产生静电排斥作用, 阻碍靠近和与暴露的疏水区域相结合, 使其表面疏水性能下降。

蛋白质分子柔性是影响蛋白质表面性能的关键因素之一。与未酰化的豌豆分离蛋白相比, 在酰化度不同的条件下, 出现分子柔性先增大后减小的现象。SA 和 PPI 的质量比在 0.10:1 以下时, 蛋白质的柔性随 SA 的增加而增大。蛋白质的柔性主要受氢键、范德华力、静电作用力和疏水性作用力等因素的影响。因此, 当琥珀酸酐与豌豆分离蛋白质量之比为 0.15:1 时, 其分子柔性稍有减小, 原因是丁二酸酐基团与蛋白相互作用时, 由于长链型结构

的影响，使其具有较大的空间位阻，使其具有一定的柔性。结果如下图 4。

2.6 溶解度

如图 5 所示，在 pH 值为 7 时 PPI 溶解度最低，随着琥珀酰化改性程度的增加，SPPI 溶解度呈先上升后降低的趋势，其中 SPPI-III 溶解度最大（61.67%）。经琥珀酰化修饰后，带负电的亲水性琥珀酰基被引入蛋白分子内部，增强了蛋白分子间的静电斥力，蛋白构象向疏松状态转变。这一结构变化扩大了蛋白质表面与水分子的有效接触范围，同时使原本包埋于分子内部的亲水基团得以暴露，为蛋白质的水合提供了有利条件，因此酰化能有效提高蛋白溶解度^[24]。但在过度酰化的过程中，可能会出现疏水作用与静电斥力等的反转，使其溶解度下降。

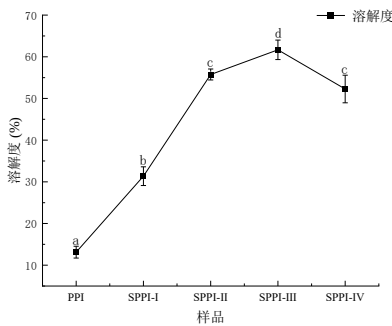


图 5 不同样品在 pH 值为 7 时的溶解度

Fig.5 Solubility of different samples at pH 7

注：图中不字小写字母表示不同琥珀酸酐添加量，pH 值为 7 的条件下溶解度有显著性差异 ($P < 0.05$)。图中误差棒表示标准差，每组 $n=3$ 。

2.7 浊度

浊度的变化与溶解度呈相反趋势，总的来说，浊度随改性程度增加而逐渐下降，在 SPPI-III 时达到最低。这是因为琥珀酰化修饰破坏了 PPI 的天然构象，带负电的酰基显著提升了蛋白质表面的电荷密度，原本聚集的蛋白分散，增加了光散射的比表面积，从而导致 SPPI 浊度下降^[25]。如图 6 所示，继续增加其琥珀酰化程度（SPPI-IV），浊度略微升高。

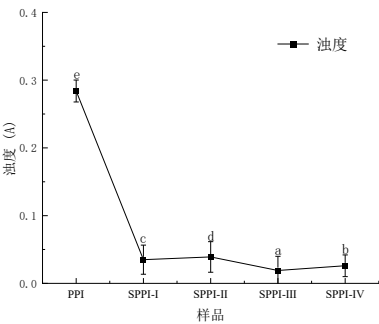


图 6 不同样品的浊度

Fig.6 Turbidity of different samples

注：图中不字小写字母表示不同琥珀酸酐添加量条件下 PPI 的浊度有显著性差异 ($P < 0.05$)。图中误差棒表示标准差，每组 $n=3$ 。

2.8 PPI/SPPI 的乳化性和乳化活性

乳化性是植物蛋白最重要的功能特性之一，是蛋白质作为乳化剂促进两种不相溶液体（通常为油和水）形成均匀稳定乳状液的能力；乳化活性是乳化性的一个重要量化维度，特指蛋白质在乳化过程中快速吸附到油-水界面、

降低界面张力并形成小液滴的能力。它反映了蛋白质作为乳化剂的“瞬时效能”，强调蛋白质在均质化瞬间将油相分散为小液滴的能力^[26,27]。通过改变蛋白在油-水界面的吸附，可以使其发生较快的构象转变，从而改善其乳化性，如下图7所示，豌豆分离蛋白的乳化性随琥珀酸基修饰程度的提高呈先上升后下降的趋势，其中当PPI和琥珀酸酐质量比为1:0.02、1:0.05、1:0.1时，PPI的乳化性都在上升。这是因为在蛋白互作体系中添加丁二酸基团后引入了羰基，增强蛋白质在水-油界面的吸附能力，使蛋白的构象及界面性质发生变化，从而改善了PPI的乳化性能。而当质量比达到1:0.15时，乳化性稍微有所下降。发生这一现象的原因是当丁二酸酐与PPI的质量配比为0.15:1时，丁二酸链所产生的立体位阻效应使得油-水界面的静电排斥效应大大增加，影响了蛋白质膜的稳定性，进而降低了PPI的乳化性。与此同时，乳化性和乳化活性的变化趋势也基本一致，当丁二酸酐与PPI的质量比为0.1:1时，乳化活性达到最大值，继续增加至0.15:1时，乳化活性有所下降。结果表明，适度酰化可诱导分子柔性增加有利于蛋白质在油-水界面的快速吸附和重排，从而提升乳化性能；但过量酰化可能导致分子过度去折叠或空间位阻增大，反而不利于界面稳定。乳化活性及乳化稳定性的变化趋势与分子柔性基本一致，均在SA与PPI质量比为0.15:1时最佳。

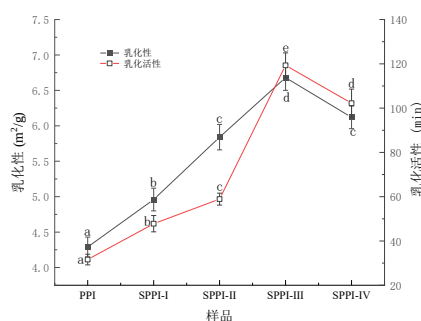


图7 乳化性及乳化活性的变化

Fig.7 Changes in emulsifiability and emulsifying activity

注：图中不字小写字母表示不同琥珀酸酐添加量条件下PPI乳化性和乳化活性有显著性差异 ($P < 0.05$)。图中误差棒表示标准差，每组 $n=3$ 。

2.9 粒径电位 PDI

根据胶体化学原理，Zeta 电位绝对值与溶液稳定性呈正相关关系，该值越高，表明带电粒子间的静电斥力越强，体系愈容易保持分散稳定性^[28]。蛋白质颗粒大小及蛋白质与水的相互作用对蛋白质的功能、感官性质有着重要影响，PDI 可作为评价样品溶液均一程度的指标，该数值越大，表明颗粒粒径的分布跨度越宽。大于 0.7 表示 SPI 的粒径分布非常广泛，而小于 0.4 表明其分散性良好并且粒径分布较窄^[29]。Zeta 电位是粒子表面电荷指示物，一般来说，分散粒子尺寸越小，Zeta 电位绝对值越高，体系稳定性越好^[30]，由此可见，粒径较小、PDI 较低、Zeta 电位的绝对值较高的 SPPI-III 与 SPPI-IV 具有自稳定性，增强的电荷可以防止聚集体形成，提高了其稳定性（图 8、图 9）。

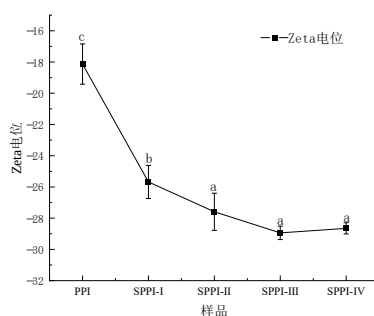


图8 电位图

Fig.8 Potentiogram

注：图中不字小写字母表示不同琥珀酸酐添加量条件下 PPI 的 Zeta 电位有显著性差异 ($P < 0.05$)。图中误差棒表示标准差，每组 $n=3$ 。

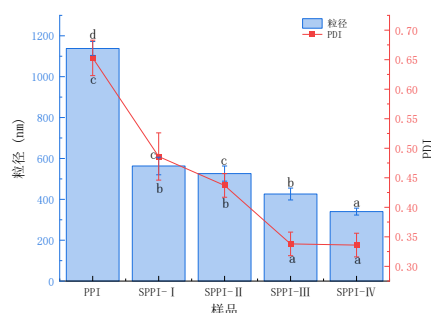


图9 粒径、PDI 图

Fig.9 Particle size-potential diagram

注：图中不字小写字母表示不同琥珀酸酐添加量条件下 PPI 的粒径、PDI 有显著性差异 ($P < 0.05$)。图中误差棒表示标准差，每组 $n=3$ 。

2.10 持水性与持油性

蛋白质的持水性即其截留水的能力，是反映蛋白质水合能力的重要指标。酰化后持水性提升可能是因为琥珀酸酐亲水基团的参与，使蛋白质更易结合水分子，从而增加持水性^[31]。由图 10 可以看出，少量的琥珀酰化改性没有显著改变 PPI 的持水能力，较高剂量的琥珀酰化处理则使 PPI 的持水能力显著提升。出现这一现象的原因与蛋白质的疏水性质密切相关，由 2.5 可知，琥珀酰化的过程中使 PPI 暴露出更多的疏水基团，使其持水能力与疏水特性呈相反的趋势。

蛋白质的持油性，即蛋白质对油脂的截留能力，是评价其亲脂能力的重要参数。如图 11 所示，经酰化处理后 PPI 的持油能力显著，且持油性的提升与改性程度呈正相关。蛋白质的持油能力受到其来源、种类、粒径、温度及加工方式等多种因素共同调控^[32]。蛋白颗粒越小，疏水性基团数量越多，相应总比表面积就越大，蛋白的持油能力就越高。短链的琥珀酸酐与蛋白质结合后，蛋白质的表面积增大，这为油相与蛋白质提供了更多的接触位点，进而增强了蛋白与脂肪间的相互作用，因此持油性得到提升^[33]。卢家维等^[24]研究发现，琥珀酰化改性可使蛋白质分子结构伸展，形成疏松的片层结构，这种结构变化有利于增强蛋白质与油相之间的相互作用。从蛋白质-油脂相互作用的分子机制来看，未酰化 PPI 因结构紧凑、粒径较大而对油脂的物理截留能力有限。经琥珀酰化修饰后，蛋白分子粒径减小、构象展开、有效表面积增加，从而增强了对油相的保留能力，表现为持油性升高。但当酰化程度超过一定阈值时，持油性反而下降。这一逆转现象是因过度酰化引入了高密度电荷，使蛋白质极性显著增强，这是导致持油性下降的关键原因。蛋白极性过度升高会干扰极性/非极性脂质与氨基酸残基间的吸引-排斥平衡，进而导致持油能力降低^[34]。

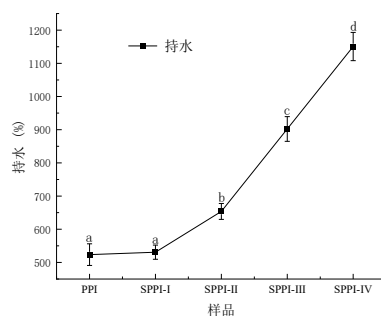


图10 样品的持水性

Fig.10 Water retention of the sample

注：图中不字小写字母表示不同琥珀酸酐添加量条件下 PPI 的持水性和持油有显著性差异 ($P < 0.05$)。图中误差棒表示标准差，

每组 $n=3$ 。下图同。

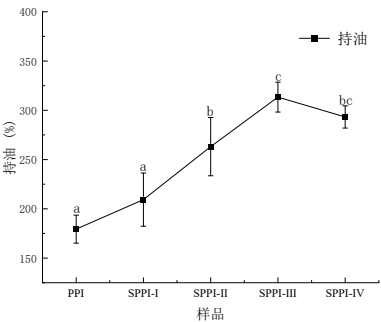


图 11 样品的持油性

Fig.11 Oil retention of the sample

2.11 内源荧光

色氨酸残基的荧光发射行为对其微环境极性的变化极为灵敏，基于这一特性，可利用测定蛋白质内源荧光发射光谱的手段来监测其三级结构的构象变化。该光谱能够有效反映色氨酸残基周边微环境的极性状态^[35]。如图 12 所示，各组蛋白吸收峰从 333.2 nm 红移到 340.8 nm，这一现象与色氨酸残基在蛋白质分子结构中所处的位置有关，提示在 SPPI 形成的过程中蛋白结构舒展，色氨酸残基随之暴露于亲水环境，导致了红移。酰化引入的额外负电荷，增强了 SPPI 的静电斥力，色氨酸残基的暴露程度增加、蛋白质结构进一步展开，SPPI 荧光强度增强。然而随着琥珀酰化程度的增加，产生的链状基团增多，导致部分色氨酸基团被掩盖，蛋白内部的疏水作用破坏，表现为荧光强度降低。以上结果表明，SPPI 的蛋白分子结构舒展，构象变化，在结构层面证实了蛋白功能性质的改善^[36]。

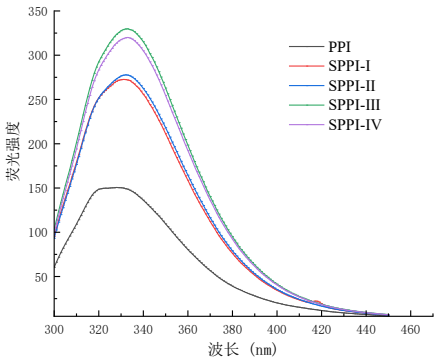


图 12 荧光光谱图

Fig.12 Fluorescence spectrum

2.12 傅里叶红外光谱

红外光谱(FTIR)对二级结构的分析具有不可替代的作用，其通过分子振动信号解析蛋白质构象变化，进而揭示结构与功能的关系^[37]。在红外光谱中，蛋白质的酰胺 I 带 ($1\,600\sim1\,700\text{ cm}^{-1}$) 被视为分析其二级结构的关键光谱区域，该区域携带大量构象信息，包括 α 螺旋、 β 转角、 β 折叠以及无规则卷曲等^[38]。如图 13 所示，PPI 与 SPPI 图谱相似，表明它们在主体蛋白质结构上存在相似性，但在每个条带中仍存在轻微但明显的差异。SPPI 在 $1\,659\text{ cm}^{-1}$ 与 $1\,537\text{ cm}^{-1}$ 处的特征峰吸收峰均呈现红移，是 SPPI 中的酰胺带分别发生着 C=O 伸缩振动、C-N 伸缩振动、N-H 弯曲振动。 $3\,292\text{ cm}^{-1}$ 处其 N-H 键转变为 C-N 键，特征峰逐渐变窄。随着琥珀酰化程度的提高，各酰胺带的特征峰从均发生红移，这可能是因为 SPPI 反应过程中-NH₂ 基团的丢失所引起。 $1\,397\text{ cm}^{-1}$ 处的特征应与 COO-基团的对称伸缩振动相关。以上分析可知，PPI 酰化过程中以共价键形式生成酰化产物，引入了新的 O-H、C-N 键和 C=O 键。

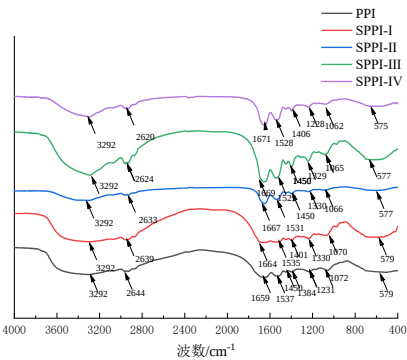


图 13 傅里叶红外光谱图

Fig.13 Fourier-transform infrared spectrum

如图 14 所示，随着 SA 添加量的增加，蛋白质的二级结构组成发生了明显变化， α 螺旋相对含量由 28.36% 降至 11.94%；无规卷曲含量从 23.51% 上升至 31.76%， β 转角和 β 折叠的相对含量均发生了不同幅度的升高，与鹰嘴豆分离蛋白的酰化相似^[24]，琥珀酰化修饰诱导了蛋白质分子从有序的 α 螺旋结构向较为松散的无规卷曲及 β 转角结构转变，反映出蛋白构象灵活性的增强， α 螺旋的减少及无规卷曲的增加有助于暴露更多相互作用位点，有利于蛋白质在油-水界面形成稳定的膜，对 PPI 功能特性的改善产生了积极影响。

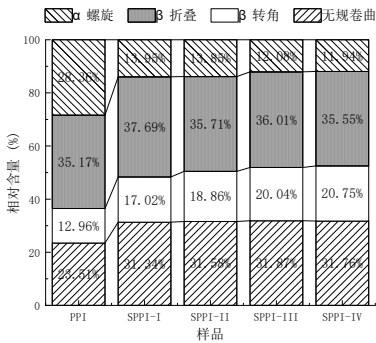
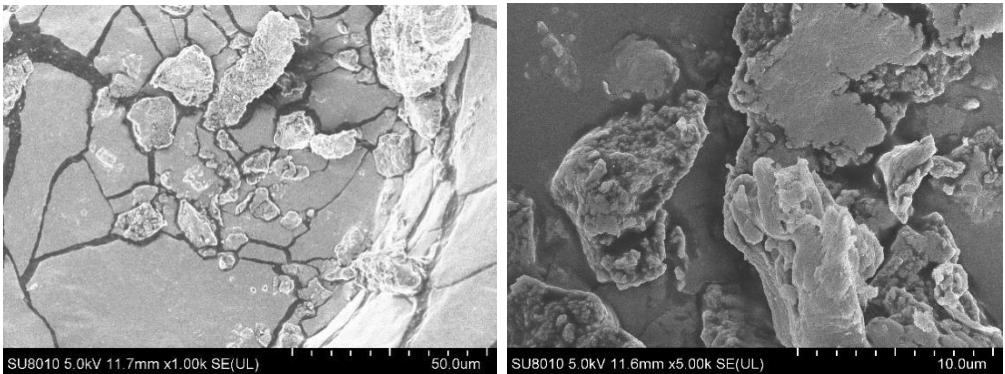


图 14 二级结构占比图

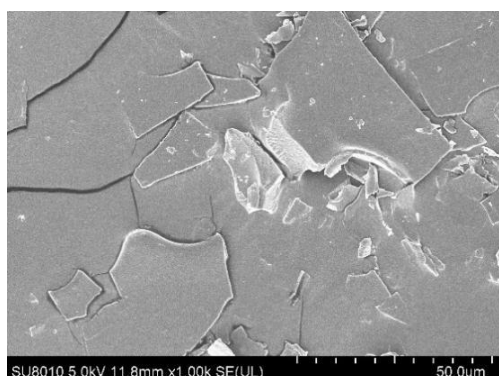
Fig.14 Breakdown of secondary structures

2.13 SEM

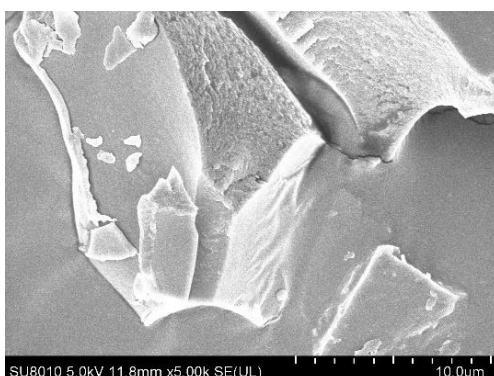
PPI/SPPI 微观结构变化如图 15 所示，在未酰化改性状态下 PPI 呈现为大块的片状（1 000 $\times$ ），蛋白表面较平整光滑（5 000 $\times$ ）。经琥珀酰化修饰后，PPI 发生了亲核取代反应，亲水性提升，蛋白聚集体趋于分散状态，SPPI 虽仍是以片状结构存在，但其结构有序度降低，表面粗糙度增加，同时出现不同程度的破碎。随着酰化度的提高，以 SPPI-III 和 SPPI-IV 为代表的高改性改性程度蛋白表现出更为细碎的形态，在更高放大倍率下（10 000 $\times$ ），可以清晰观察到蛋白表面分布有大量细小孔穴，片层边缘呈现明显的破碎和卷曲，整体转变为疏松的片层结构。结果表明，随着酰化反应的持续深入，形成了更加疏松的蛋白构象，这种构象变化有利于 SPPI 快速向油水界面迁移并吸附，进而使其溶解性和乳化性得到显著提升。



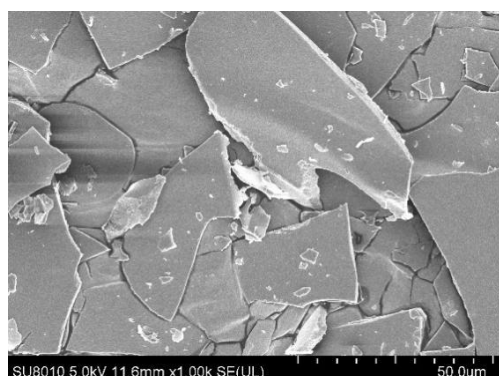
PPI (1 000×)



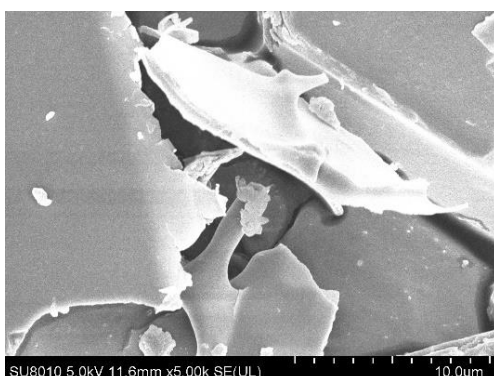
PPI (5 000×)



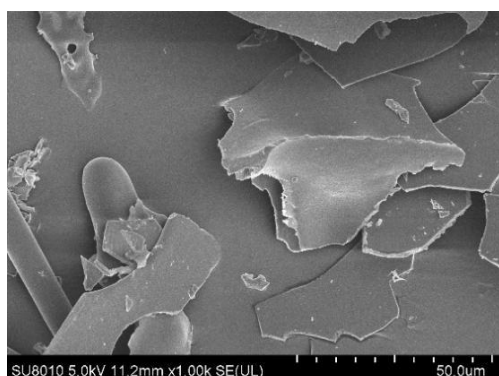
SPPI-I (1 000×)



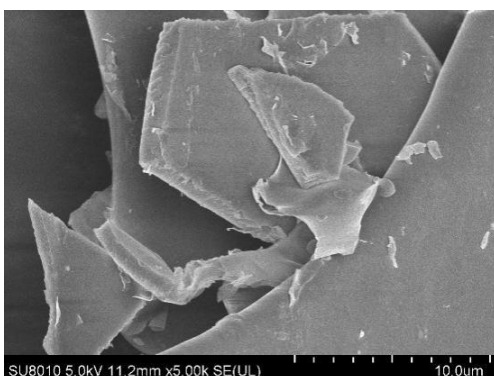
SPPI-I (5 000×)



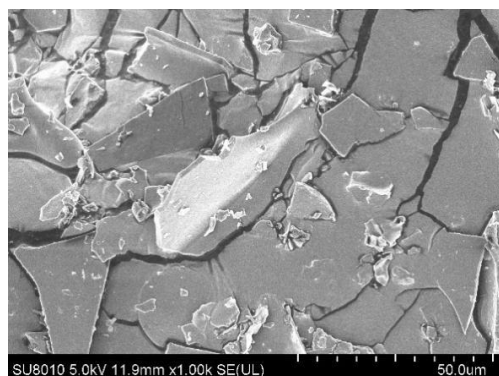
SPPI-II (1 000×)



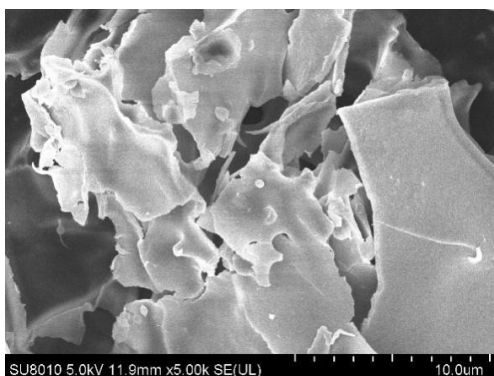
SPPI-II (5 000×)



SPPI-III (1 000×)



SPPI-III (5 000×)



SPPI-IV (1 000×)



SPPI-IV (5 000×)



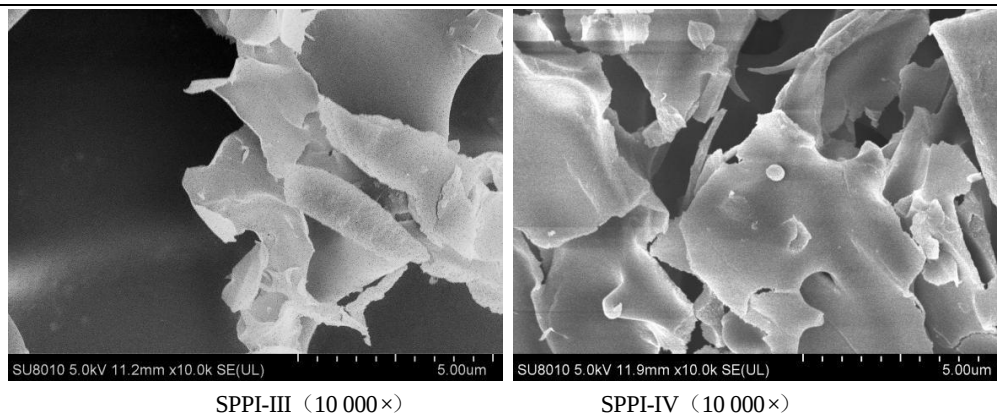


图 15 PPI/SPPI 微观结构

Fig.15 PPI/SPPI microstructure

3 结论

本研究通过制备 PPI 和 SPPI, 并研究琥珀酰化改性对 PPI 结构特征与理化性质的影响。结果显示 PPI 本身具有优异的氨基酸组成模式, 其支链氨基酸的含量较高, 占比达 19.21% 是优质的植物蛋白源。琥珀酰化反应优先发生于蛋白质表面的 ϵ -氨基 (N-酰化), 低酰化度下即快速饱和; 随着酰化程度加深, 蛋白构象逐渐去折叠, 内部羟基暴露, O-酰化度显著升高。当丁二酸酐与 PPI 的质量比为 0.1:1 时, PPI 的结构性质和功能性质均处于最佳状态。荧光光谱显示, 改性过程中发生荧光淬灭, 表明琥珀酰化改性通过疏水相互作用结合。傅里叶变换红外光谱表明酰化改性以共价键形式引入了琥珀酰基。改性后蛋白表面负电荷密度增加, 表面疏水性降低, 分子间静电斥力增强, 有效促进了蛋白聚集体的解离和结构舒展。扫描电镜观察及粒径分析表明, SPPI 呈更细碎、疏松的片层结构, 尺寸减小、分散性改善。上述结构变化协同作用, 显著提升了 PPI 在中性条件下的溶解度、乳化性及乳化稳定性, 持油持水性亦有所改善。因此通过琥珀酰化改性豌豆分离蛋白可有效改善其理化性质, 对豌豆蛋白在食品工业的大规模产业化应用具有积极促进作用。

参考文献

- [1] TAN M, NAWAZ M A, BUCKOW R. Functional and food application of plant proteins – a review [J]. Food Reviews International, 2023, 39(5): 2428-2456.
- [2] KUMAR M, TOMAR M, PUNIA S, et al. Plant-based proteins and their multifaceted industrial applications [J]. LWT, 2022, 154: 112620.
- [3] SARATHY S P, RAVIKUMAR H, NANJAN P, et al. Plant-based protein: a multi-nutritional sustainable alternative to animal foods and their structure, functions, and relationship: a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 321(Pt 3): 146465.
- [4] 王林, 黄韬睿, 李维. 正交试验优化紫薯豌豆凉粉制备工艺与物性评价 [J]. 食品工业, 2021, 42(2): 126-129.
- [5] RUIZ-ZAMBRANO N L, PÉREZ-CARRILLO E, SERNA-SALDÍVAR S O, et al. Effect of thermal, nonthermal, and combined treatments on functional and nutritional properties of chickpeas [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2024, 64(31): 11356-11374.
- [6] MURSALIN S, FORGHANI B, VATE N K, et al. Combined effects of isolation temperature and pH on functionality and beany flavor of pea protein isolates for meat analogue applications [J]. Food Chemistry, 2023, 412: 135585.
- [7] GRAVEL A, DUBOIS-LAURIN F, DOYEN A. Effects of hexane on protein profile and techno-functional properties of pea protein isolates [J]. Food Chemistry, 2023, 406: 135069.
- [8] BOYE J, ZARE F, PLETCH A. Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed [J]. Food Research International, 2009, 43(2): 414-431.
- [9] WU D T, LI W X, WAN J J, et al. A comprehensive review of pea (*Pisum sativum* L.): chemical composition, processing, health benefits, and food applications [J]. Foods, 2023, 12(13): 2527.
- [10] AN N, LI X, JI G, et al. A comprehensive review on composition to application of pea protein and its components [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282(Pt 5): 137273.

- [11] PATIL N D, BAINS A, KAUR S, et al. Influence of dual succinylation and ultrasonication modification on the amino acid content, structural and functional properties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate [J]. Food Chemistry, 2024, 445: 138671.
- [12] YANG M, LI N, TONG L, et al. Comparison of physicochemical properties and volatile flavor compounds of pea protein and mung bean protein-based yogurt [J]. LWT - Food Science and Technology, 2021, 152: 112390.
- [13] GB5009.3-2016 食品安全国家标准食品中水分的测定[S].
- [14] GB5009.4-2016 食品安全国家标准食品中灰分的测定[S].
- [15] GB5009.5-2016 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S].
- [16] GB5009.6-2016 食品安全国家标准食品中脂肪的测定[S].
- [17] GB/T15672-2009 食用菌中总糖含量的测定[S].
- [18] GB5009.124-2016 食品安全国家标准食品中氨基酸的测定[S].
- [19] LU Y Y, AN D D, XIA Q, et al. Impact of pH-dependent succinylation on the structural features and emulsifying properties of chicken liver protein [J]. Food Chemistry, 2021, 358: 129868.
- [20] ZHAO C B, ZHANG H, VU X Y, et al. Effect of acetylation and succinylation on physicochemical properties and structural characteristics of oat protein isolate [J]. Process Biochemistry, 2017, 57: 117-123.
- [21] 范静美,魏子淇,徐航,等.琥珀酰化处理对芸豆蛋白乳化性和体外消化性的影响[J].现代食品科技,2012,28(10):1277-1280+1373.
- [22] HE M Y, ZHANG M, GAO T, et al. Fabrication and characterization of succinylated and glycosylated soy protein isolate and its self-assembled nanogel [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 244: 125104.
- [23] XU F Y, WEN Q H, WANG R, et al. Enhanced synthesis of succinylated whey protein isolate by pulsed electric field pretreatment [J]. Food Chemistry, 2021, 363: 129892.
- [24] 卢家维,李甜甜,吴淼,等.琥珀酰化改性对鹰嘴豆分离蛋白结构和功能特性的影响[J].食品与发酵工业,2024,50(17):169-177.
- [25] HE D B, LV Y, TONG Q, et al. Succinylation improves the thermal stability of egg white proteins [J]. Molecules, 2019, 24(20): 3783.
- [26] ZHANG X Y, WANG Q, LIU Z, et al. Plant protein-based emulsifiers: mechanisms, techniques for emulsification enhancement and applications [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 144: 109008.
- [27] MCCLEMENTS D J, LU J, GROSSMANN L. Proposed methods for testing and comparing the emulsifying properties of proteins from animal, plant, and alternative sources [J]. Colloids and Interfaces, 2022, 6(2): 19.
- [28] ZHANG B, QI L, XIE X H, et al. Emulsifying properties of O/W emulsion stabilized by soy protein isolate and γ -polyglutamic acid electrostatic complex [J]. Journal of Food Science, 2024, 89(1): 174-185.
- [29] HU J L, ZHU L, YIN X T, et al. Effects of protein morphological structures on the cereal processing, sensorial property and starch digestion: a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2025, 65(17): 3365-3379.
- [30] 齐宝坤,李杨,王中江,等.不同品种大豆分离蛋白 Zeta 电位和粒径分布与表面疏水性的关系[J].食品科学,2017,38(3):114-118.
- [31] 王晨曦,夏志远,刘鹏飞,等.琥珀酸酐改性对甘薯蛋白结构及功能特性的影响[J].食品研究与开发,2025,46(11):37-44.
- [32] BAROZZI L, PLAZZOTTA S, NUCCI A, et al. Elucidating the role of compositional and processing variables in tailoring the technological functionalities of plant protein ingredients [J]. Current Research in Food Science, 2025, 10: 100971.
- [33] SHEN Y T, LI Y H. Acylation modification and/or guar gum conjugation enhanced functional properties of pea protein isolate [J]. Food Hydrocolloids, 2021, 117: 106686.
- [34] LIAN Z T, YANG S, CHENG L, et al. Emulsifying properties and oil-water interface properties of succinylated soy protein isolate: affected by conformational flexibility of the interfacial protein [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 136(PA): 108224.
- [35] CARABADJAC I, HEERKLOYZ H. Time-resolved fluorescence of tryptophan in biophysical chemistry and pharmaceutical research - the pleasures and nightmares dealing with nature's own fluorophore [J]. Quarterly Reviews of Biophysics, 2025, 58: e18.
- [36] BARIK S, ALDAR K S, CHAKRABORTY A, et al. Understanding the structural and functional implications of lysine succinylation in *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 16.3 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 307(Pt 3): 142046.
- [37] BONDU C, GIMENOF, EVON P, et al. Use of FTIR to study secondary structure of texturized plant proteins by high moisture extrusion cooking, a comprehensive review [J]. Food Research International, 2024, 197(Pt 1): 115147.
- [38] YANG S N, ZHANG Q L, YANG H Y, et al. Progress in infrared spectroscopy as an efficient tool for predicting protein secondary structure [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 206: 175-187.