

球磨处理对南瓜籽蛋白结构的影响

梁英杰¹, 杨晨¹, 陈哲^{2,3}, 郑竟成^{1,3}, 何东平^{1,3}, 王澍^{2,3}, 雷芬芬^{1,3}

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 武汉食品化妆品检验所, 武汉 430040;
3. 国家市场监督管理总局重点实验室(食用油质量与安全), 武汉 430040)

摘要:为探究球磨处理促进南瓜籽蛋白酶解的机制, 以未处理的南瓜籽蛋白为对照, 研究球磨处理对南瓜籽蛋白二级、三级结构, 溶解性, 热力学特性以及微观结构的影响。结果表明: 南瓜籽蛋白经不同时间球磨处理后, 其结构有所改变; 傅里叶变换红外光谱显示, 球磨处理造成南瓜籽蛋白二级结构发生变化, 球磨处理 15 min 时, α -螺旋和无规卷曲结构分别由处理前的 19.98% 和 14.28% 增加至 20.59% 和 16.51%; 内源荧光光谱和紫外吸收光谱分析结果表明, 球磨处理后的南瓜籽蛋白三级结构变得更加疏散; 球磨处理提高了南瓜籽蛋白的溶解度, 球磨处理 5 min 时, 溶解度提高了 16.92 百分点; DSC 图谱表明, 球磨处理使南瓜籽蛋白的变性温度降低; 粒径分布和扫描电镜图显示, 球磨处理 15 min 时, 峰顶的粒径从 217.3 nm 下降至 159.8 nm, 整体结构被破坏。综上, 适度球磨处理可以改变南瓜籽蛋白分子结构, 使酶容易与南瓜籽蛋白的酶切位点结合, 从而促进酶解。

关键词: 南瓜籽蛋白; 球磨处理; 结构; 性质; 酶解

中图分类号: TS201.1; TS223.2 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)05-0020-06

Effect of ball milling treatment on structure of pumpkin seed protein

LIANG Yingjie¹, YANG Chen¹, CHEN Zhe^{2,3}, ZHENG Jingcheng^{1,3},
HE Dongping^{1,3}, WANG Shu^{2,3}, LEI Fenfen^{1,3}

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;
2. Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan 430040, China; 3. Key Laboratory of Edible
Oil Quality and Safety for State Market Regulation, Wuhan 430040, China)

Abstract: In order to explore the mechanism of ball milling treatment to promote the enzymatic hydrolysis of pumpkin seed protein, the effects of ball milling treatment on the secondary and tertiary structures, solubility, thermodynamic properties and microstructure of pumpkin seed protein were studied with untreated pumpkin seed protein as the control. The results showed that the structure of protein changed after ball milling treatment for different time. Fourier transform infrared spectroscopy showed that the secondary structure of pumpkin seed protein changed after ball milling treatment. After 15 min of ball milling treatment, the α -helix structure and random coil structure increased from 19.98% and 14.28% to 20.59% and 16.51%, respectively. The results of intrinsic fluorescence spectrum and ultraviolet absorption spectrum showed that the tertiary structure of pumpkin seed protein became more evacuated after ball milling treatment. Ball milling treatment improved the solubility of pumpkin seed protein. After 5 min of ball milling treatment, the solubility increased by 16.92 percentage point. DSC spectra showed

that ball milling treatment reduced the denaturation temperature of pumpkin seed protein. The particle size distribution and scanning electron microscopy showed that when the ball milling treatment time was 15 min, the peak particle size decreased from 217.3 nm to 159.8 nm, and the overall structure was destroyed. In summary, moderate ball milling

收稿日期: 2021-12-06; 修回日期: 2023-01-25

基金项目: 中国科协青年人才托举工程项目 (YESS20200380); 湖北省技术创新专项重大项目 (2019ABA117)

作者简介: 梁英杰 (1997), 女, 在读硕士, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白 (E-mail) 3310322118@qq.com。

通信作者: 雷芬芬, 讲师, 博士 (E-mail) fiona_lei@126.com。

treatment can change the molecular structure of pumpkin seed protein, and make enzyme easy to combine with the enzyme cleavage site of pumpkin seed protein, thus promoting the enzymatic hydrolysis.

Key words: pumpkin seed protein; ball milling treatment; structure; property; enzymatic hydrolysis

近些年来,随着人们消费观念的转变及政策支持,植物蛋白市场潜力巨大。Markets and MarketsTM《2020年植物蛋白》预测,未来五年植物蛋白市场将以14%年复合增长率发展,且分离蛋白将会是市场主导产品^[1]。南瓜籽富含蛋白质,蛋白质含量约30%,其饼粕中蛋白质含量超过40%^[2]。南瓜籽蛋白含有人体必需的8种氨基酸,含量较联合国粮农组织(FAO)与世界卫生组织(WHO)规定的标准高,且组成与人体所需氨基酸组成模式相似^[3-4]。因此,南瓜籽蛋白营养价值高,极具开发潜力。

球磨法是通过外部机械力作用,使物料与研磨介质在高转速下高频碰撞挤压,促使物料断裂、变形呈微粉状的一种物理改性技术,具有操作简单、工艺流程短、能耗低、污染小的特点,是一种便捷安全的操作技术。唐永康等^[5]研究表明,将球磨作为蛋白提取的一种预处理方式,可提高榛子蛋白提取率。谭文等^[6]研究表明,球磨预处理可改变蛋清蛋白的分子结构,使蛋清蛋白暴露出更多的酶切位点,从而增加对胰蛋白酶的敏感性。本课题组前期研究表明,球磨处理后南瓜籽蛋白酶解产物的ACE抑制率显著高于未经处理的南瓜籽蛋白酶解产物,且球磨处理时间有较明显影响^[7]。

本研究采用红外光谱、荧光光谱、紫外光谱、差示扫描量热仪、纳米粒度及电位分析仪和扫描电子显微镜分析不同球磨处理时间下南瓜籽蛋白分子构象及表观形态变化,旨在探究球磨处理促进南瓜籽蛋白酶解的机制,以期为蛋白质酶解特性的改变提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

脱脂南瓜籽粕(蛋白质含量56.10%),宝得瑞(湖北)健康产业有限公司提供;磷酸盐缓冲液、溴化钾等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

P-7 PL微型行星式球磨机,德国飞驰仪器公司;TDZ5-WS台式离心机;HH-6型数显恒温水浴锅;FD-8型冷冻干燥机,北京博医康公司;NEXUS670傅里叶红外光谱仪,美国尼高力公司;F-4600荧光光谱仪,日本日立公司;Evolution220

紫外可见分光光度计,美国 Thermo Fisher 公司;DSC-Q10 型差示扫描量热仪,美国 TA 公司;Zetasizer 3000 HSA 纳米粒度及电位分析仪,英国马尔文仪器公司;S-3000N 扫描电子显微镜,日本 HITACHI 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 南瓜籽蛋白的制备与球磨处理

取脱脂南瓜籽粕按照料液比1:5加水混合,调节pH至9.5,于50℃水浴处理2h,冷却至20℃后,以1000×g离心10min,取上清液并调节其pH至4.5,于50℃水浴处理2h,冷却至室温后,以1000×g离心10min,取沉淀并用蒸馏水洗至中性,真空冷冻干燥得到南瓜籽蛋白(蛋白质含量98%左右)。将南瓜籽蛋白用球磨机分别处理5、10、15min,得到球磨处理的南瓜籽蛋白。

1.2.2 傅里叶红外光谱(FTIR)分析

取2mg南瓜籽蛋白与200mg干燥的KBr粉末在玛瑙研钵中混匀并充分研磨,取适量压片并进行傅里叶红外光谱分析。分析条件:扫描范围400~4000cm⁻¹,分辨率2cm⁻¹,扫描次数32次。利用OMNIC软件对图谱进行分析,并对图谱中酰胺I区(1600~1700cm⁻¹)进行解析,确定蛋白质4种二级结构的相对含量。

1.2.3 内源荧光光谱分析

用磷酸盐缓冲液(0.01mol/L,pH7.0)配制1mg/mL的南瓜籽蛋白溶液,以4000r/min离心20min,取上清液进行内源荧光光谱分析(以磷酸盐缓冲液作为空白)。分析条件:激发波长290nm,扫描范围300~500nm,扫描速度1200nm/min。

1.2.4 紫外吸收光谱分析

取1.2.3中的上清液进行紫外吸收光谱分析(以磷酸盐缓冲液作为空白)。分析条件:扫描范围200~400nm,扫描速度100nm/min。

1.2.5 溶解性测定

按1.2.3方法,取一定的南瓜籽蛋白,用磷酸盐缓冲液配制1mg/mL的南瓜籽蛋白溶液,离心取上清液稀释至合适的浓度,再按文献[8]的操作测定并计算蛋白质溶解度指数,以表征南瓜籽蛋白的溶解度。

1.2.6 热力学特性测定

利用差示扫描量热仪测定南瓜籽蛋白的热力学

特性。取 4~5 mg 南瓜籽蛋白于铝制样品皿中,放入压片机压片密封,以空铝制样品皿为参比,以氮气为载气,在流速 20 mL/min、温度扫描范围 20~200 °C、升温速率 10 °C/min 条件下进行测试,记录并计算变性温度(T_d)和变性所需要的能量(变性焓, ΔH)。

1.2.7 粒径分布测定

参考方海砚等^[9]的方法,用磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.0)配制 1 mg/mL 的南瓜籽蛋白溶液,将溶液通过 0.45 μm 滤膜除去不溶性杂质后,采用纳米粒度及电位分析仪进行粒径分布的测定。

1.2.8 扫描电子显微镜观察

将南瓜籽蛋白样品固定在干净的样品台上,对样品进行喷金后用扫描电子显微镜观察,放大倍数分别为 250 倍和 1 000 倍。

2 结果与分析

2.1 球磨处理对南瓜籽蛋白 FTIR 谱图的影响

FTIR 是研究蛋白质二级结构良好方式,其需要的蛋白量少,且不受原料状态和环境等因素的影响,因此成为研究蛋白质二级结构的重要方法^[10]。不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白 FTIR 谱图如图 1 所示。参考文献[11-12]并结合图 1 可知,经球磨处

理后,南瓜籽蛋白 FTIR 谱图中特征峰的变化主要在 1 500~1 600 cm^{-1} 处的酰胺 II 带、1 600~1 700 cm^{-1} 处的酰胺 I 带、2 961 cm^{-1} 处的—CH 的特征吸收峰和 3 424 cm^{-1} 处的单强峰。经球磨处理后,南瓜籽蛋白 FTIR 谱图中特征峰位置发生了偏移,强度也明显减弱,说明球磨处理破坏了南瓜籽蛋白的结构。

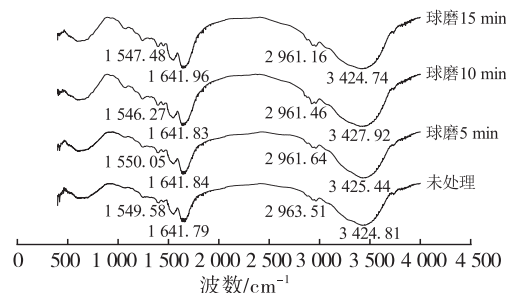


图 1 不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白的 FTIR 谱图

将蛋白质中红外区的酰胺 I 带经傅里叶去卷积处理后二阶求导并绘制二阶导数图谱,可根据图谱准确估算蛋白质各二级结构的比例^[13-15]。目前公认的酰胺 I 带二级结构的区域指 α -螺旋(1 650~1 660 cm^{-1})、无规卷曲(1 640~1 650 cm^{-1})、 β -折叠(1 600~1 640 cm^{-1})和 β -转角(1 660~1 700 cm^{-1})^[16]。不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白二级结构含量见表 1。

表 1 不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白二级结构含量($n=3$)

项目	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
未处理	19.98 \pm 0.05 ^d	37.16 \pm 0.06 ^e	28.58 \pm 0.05 ^a	14.28 \pm 0.07 ^d
球磨 5 min	22.31 \pm 0.07 ^a	35.93 \pm 0.06 ^d	24.80 \pm 0.08 ^b	16.96 \pm 0.04 ^b
球磨 10 min	20.28 \pm 0.08 ^e	38.98 \pm 0.08 ^a	23.53 \pm 0.08 ^e	17.21 \pm 0.07 ^a
球磨 15 min	20.59 \pm 0.09 ^b	38.08 \pm 0.08 ^b	24.82 \pm 0.08 ^b	16.51 \pm 0.06 ^c

注:同列不同字母表示差异显著($p < 0.05$)

由表 1 可知,未处理的南瓜籽蛋白二级结构的主要组成为 β -折叠,占二级结构总量的 37.16%。经过球磨处理后,南瓜籽蛋白的主要二级结构也是 β -折叠,但随着球磨处理时间的延长, β -折叠含量总体呈先减少后增加的趋势;与未处理相比,在球磨 5 min 时, β -折叠含量显著下降($p < 0.05$),在球磨 10、15 min 时, β -折叠含量显著增加($p < 0.05$)。经过球磨处理后,南瓜籽蛋白二级结构的 α -螺旋和无规卷曲的含量均显著增加($p < 0.05$), β -转角含量则显著降低($p < 0.05$)。本研究发现,南瓜籽蛋白经球磨处理一定时间后, β -转角结构会转化为 α -螺旋、 β -折叠和无规卷曲结构。赵飞^[17]研究表明,一个 β -转角结构中的 4 个氨基酸残基由氢键来稳定,氢键在稳定蛋白二级结构中起主要作用力。因此,球磨处理会破坏蛋白质肽链间或链内

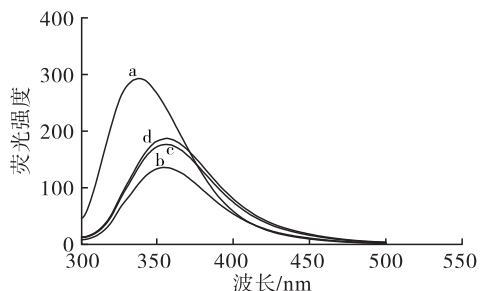
的氢键,改变南瓜籽蛋白的二级结构,暴露其结合位点,从而更有利于酶与底物结合。

2.2 球磨处理对南瓜籽蛋白内源荧光光谱的影响

内源荧光光谱可反映蛋白质构象的变化,主要取决于芳香族氨基酸的环境极性,特别是色氨酸。不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白荧光光谱图如图 2 所示。

由图 2 可见,未处理的南瓜籽蛋白最大荧光发射波长为 337.2 nm,经过球磨处理 5、10、15 min 后其最大荧光发射波长分别红移至 353.8、355.4 nm 和 356.0 nm。这可能是因为球磨处理使南瓜籽蛋白的空间构象发生变化,芳香族氨基酸残基的极性环境增大,更多的芳香族氨基酸残基暴露,而肽链结构的舒展使南瓜籽蛋白的三级结构变得更加疏散,这使酶与南瓜籽蛋白的酶切位点有更大概率接触,

从而可促进酶解^[18]。尹燕霞等^[19]研究表明红移程度越大则蛋白质构象变化的程度越大。本研究中,随着球磨处理时间的延长,红移量和荧光强度增加,说明球磨处理使南瓜籽蛋白的空间构象改变,结构展开。



注:a.未处理;b.球磨5 min;c.球磨10 min;d.球磨15 min。下同

图2 不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白的荧光光谱图

2.3 球磨处理对南瓜籽蛋白紫外吸收光谱的影响

蛋白质在紫外线区域具有特定的吸收光谱,其中260~280 nm的吸收峰代表芳香族氨基酸残基的吸收^[20]。对南瓜籽蛋白进行全波长(200~400 nm)紫外吸收光谱扫描,结果如图3所示。

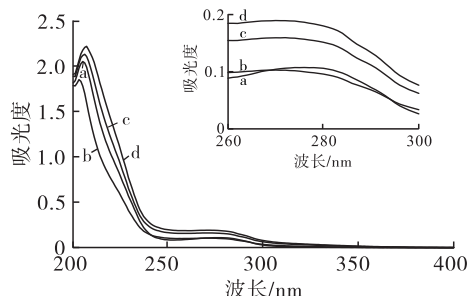


图3 不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白的紫外吸收光谱图

由图3可见,南瓜籽蛋白在260~280 nm范围内有吸收峰,但是强度较弱,这是因为南瓜籽蛋白中芳香族氨基酸含量较低。在260~280 nm范围内,未处理的南瓜籽蛋白最大吸收峰的位置为275.94 nm,经过球磨处理5、10、15 min后,最大吸收峰的位置分别蓝移至269.83、271.87、270.17 nm,表明球磨处理改变了南瓜籽蛋白的三级结构;随着球磨处理时间的延长,南瓜籽蛋白紫外吸收强度不断升高,表明南瓜籽蛋白结构舒展促使芳香族氨基酸残基暴露。

2.4 球磨处理对南瓜籽蛋白溶解性的影响

影响溶解性的因素主要有蛋白质分子形状、大小、电荷分布^[21]。不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白的溶解度如图4所示。

由图4可见:随着球磨处理时间的延长,南瓜籽蛋白的溶解度呈先增加后降低的趋势;与未处理的

南瓜籽蛋白相比,当球磨处理时间为5 min时,溶解度从47.83%增加到64.75%,提高了16.92个百分点,当球磨处理时间超过10 min,溶解度的增加程度逐渐降低。经过球磨处理,南瓜籽蛋白分子舒展,增大了蛋白质与水的接触面积^[22],同时蛋白质内部的极性基团和疏水基团被暴露出来,蛋白质分子表面电荷发生改变,水化作用增强,从而使南瓜籽蛋白溶解度提高。房岩强等^[23]的研究也证明了机械力可以导致部分蛋白质结构发生改变,活性基团暴露,强化了蛋白质-水的相互作用,提高了其溶解性。本研究中,当球磨处理时间超过10 min时,长时间的机械力作用可能导致南瓜籽蛋白结构受到破坏,疏水基团大量暴露,南瓜籽蛋白溶解度的增加量下降。

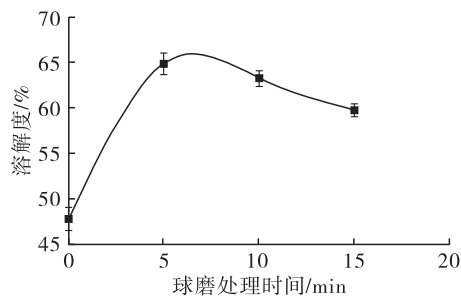


图4 不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白的溶解度

2.5 球磨处理对南瓜籽蛋白热力学特性的影响

差示扫描量热(DSC)技术可分析评价蛋白质热变性,变性温度常可表征蛋白质的热稳定性,而变性焓则可评价不同蛋白质分子的亲、疏水性大小,此外还可表征不同蛋白质分子的有序性^[24]。不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白的DSC图如图5所示。

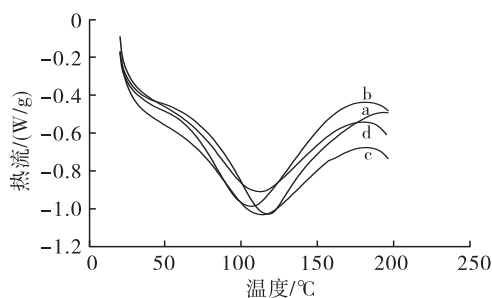


图5 不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白的DSC图

由图5可见,不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白的峰形相似,均只有1个变性峰。未处理的南瓜籽蛋白变性温度为117.71℃,变性焓为210.1 J/g,经过球磨处理5、10、15 min后,变性温度分别降低为107.36、108.89、109.91℃,变性焓分别降低至204.4、171.6、170.0 J/g。这表明球磨处理改变了南瓜籽蛋白的空间构象,使南瓜籽蛋白的变性温度和变性焓降低,变性程度增加,减小了南瓜籽蛋白结构的稳定性,这与紫外吸收光谱和内源荧光光谱的

分析结果吻合。

2.6 球磨处理对南瓜籽蛋白粒径分布的影响

粒径分布规律可有效表征蛋白质聚集、解聚等行为^[25]。图6为不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白的粒径分布。

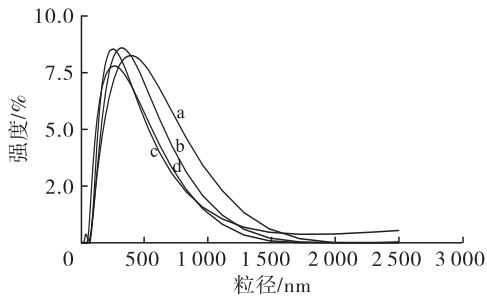


图6 不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白的粒径分布

由图6可知,南瓜籽蛋白的粒径主要分布在

1 000 nm 以内,未处理的南瓜籽蛋白峰顶的粒径为217.3 nm。随着球磨处理时间的延长,南瓜籽蛋白的粒径分布逐渐向小粒径处移动,在球磨处理时间为5、10、15 min时,峰顶的粒径分别为190.3、175.9 nm和159.8 nm。这是因为南瓜籽蛋白经过球磨处理后,由于冲击动量和摩擦力,南瓜籽蛋白被高强度粉碎,粒径变小,从而导致南瓜籽蛋白在溶液中趋于分散,可提高酶解效率。吴长玲等^[26]在研究超微粉碎豆渣蛋白以及薛健翼等^[27]在研究球磨发芽糙米浆的粒径变化时,均得出了与本研究结果一致的结论。

2.7 球磨处理对南瓜籽蛋白微观结构的影响

不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白扫描电镜图如图7所示。

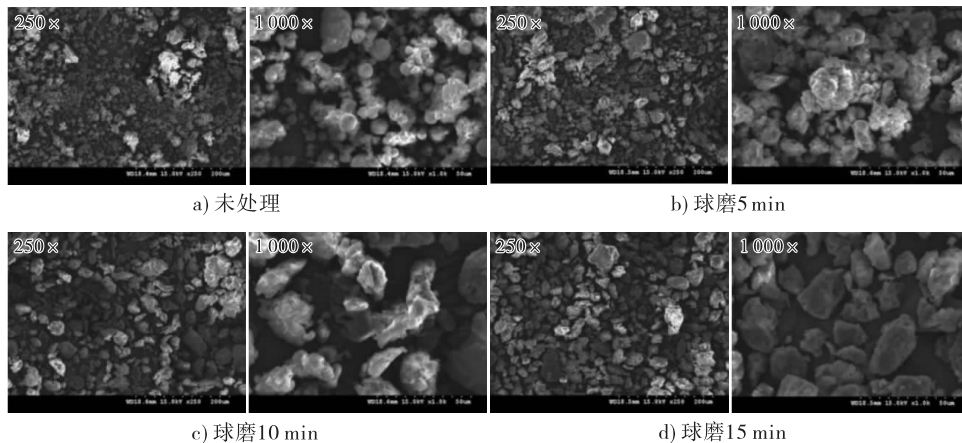


图7 不同球磨处理时间的南瓜籽蛋白的扫描电镜图

由图7可见:未处理的南瓜籽蛋白呈球形,颗粒大小不均匀但结构紧密;经过球磨处理的南瓜籽蛋白的微观结构均有显著变化,整体结构被破坏,呈块状结构;球磨处理5 min,南瓜籽蛋白呈现部分聚集现象,球形结构已经消失,随着球磨处理时间的延长,块状颗粒逐渐变细,质地变得疏松,表明球磨处理破坏了南瓜籽蛋白的球状致密结构。查越^[28]研究表明,球磨产生的高碰撞力、剪切力以及摩擦力改变了紫贻贝蛋白的表面形态,使得蛋白质分子粒径变小,与本研究结果相符。南瓜籽蛋白的粒径减小,酶更易进入南瓜籽蛋白颗粒内部,从而促进酶解,这与纳米粒度及电位分析仪检测南瓜籽蛋白粒径分布的结果一致。

3 结论

本研究探究了球磨处理对南瓜籽蛋白的影响。球磨处理造成了南瓜籽蛋白 FTIR 谱图中特征峰峰强明显减弱,特征峰的位置也发生了偏移,南瓜籽蛋白的二级结构改变, β -转角结构转化为 α -螺旋结

构, β -折叠结构和无规卷曲结构,且 α -螺旋和无规卷曲的含量均显著增加, β -折叠含量先减小后增加;球磨处理的南瓜籽蛋白更多的芳香族氨基酸残基逐渐暴露在外部的亲水环境中,水化作用增强,溶解度提高,而过长时间的机械力作用会导致南瓜籽蛋白结构受到破坏,疏水基团大量暴露,溶解度降低;球磨处理的南瓜籽蛋白的变性温度降低,且球磨处理时间越长,变性程度越大;南瓜籽蛋白的粒径随着球磨处理时间延长而减小。上述结构变化使酶更易与南瓜籽蛋白的酶切位点结合,从而提高了南瓜籽蛋白的酶解效率,可为进一步开发利用南瓜籽蛋白提供参考。

参考文献:

- [1] 翟晓娜, 师建芳, 赵慧凝, 等. 菜籽饼粕蛋白的提取、功能特性及其在食品中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12):389-397.
- [2] 范三红, 刘艳荣, 原超. 南瓜籽蛋白质的制备及其功能性质研究[J]. 食品科学, 2010, 31(16):97-100.

- [3] 张海龙, 叶小方, 吴清孝, 等. 南瓜籽分离蛋白功能性研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(12): 41-45.
- [4] 李洋, 么恩悦, 张广宁, 等. 籽用南瓜副产物用作反刍动物饲料的可行性分析[J]. 动物营养学报, 2019, 31(3): 994-1000.
- [5] 唐永康, 俞建峰, 夏晓露. 球磨联合超声波提取榛子蛋白的研究[J]. 现代化工, 2021, 41(9): 149-154.
- [6] 谭文, 张钦俊, 万鹏宇, 等. 球磨处理对鸡蛋清蛋白结构、性质及起泡性的影响[J]. 食品科学, 2021, 42(11): 124-129.
- [7] 杨晨, 孔凡, 雷芬芬, 等. 球磨辅助酶解制备南瓜籽ACE抑制肽[J]. 中国油脂, 2021, 46(9): 22-27.
- [8] 敬思群, 王德萍, 周苗苗, 等. 动态高压微射流对大豆分离蛋白性质和结构的影响[J]. 食品工业, 2021, 42(12): 318-322.
- [9] 方海砚, 苑歆, 刘友明, 等. 羟自由基氧化对鲢鱼肌原纤维蛋白结构的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(4): 6-12.
- [10] 林素丽. 超高压处理对米糠蛋白功能及结构特性的影响研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [11] 刘燕燕, 曾新安, 陈晓东. FTIR分析脉冲电场和热处理后的大豆分离蛋白结构变化[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(9): 2340-2344.
- [12] 蓝蔚青, 胡潇予, 阮东娜, 等. 傅里叶红外结合拉曼分析卡拉胶寡糖对南美白对虾蛋白结构影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2019, 39(8): 2507-2514.
- [13] 张雪莹, 郭超凡, 陶飞, 等. 不同热处理方式对玉米醇溶蛋白特性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 112-118.
- [14] CARBONARO M, NUCARA A. Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region [J]. Amino Acids, 2010, 38(3): 679-690.
- [15] 何建川, 邵阳, 张波, 等. 蛋白质和变性蛋白质二级结构的FTIR分析进展[J]. 化学研究与应用, 2012, 24(8): 1176-1180.
- [16] 江明珠. 超声波预处理辅助酶解制备大豆降糖肽及其作用机理[D]. 江苏 镇江: 江苏大学, 2018.
- [17] 赵飞. 物理预处理对大豆分离蛋白结构和理化性质的影响机制[D]. 山东 泰安: 山东农业大学, 2019.
- [18] 李杨, 和铭钰, 吴长玲, 等. 空化射流条件下酶法制油豆渣蛋白结构与理化特性研究[J]. 农业机械学报, 2020, 51(12): 332-340.
- [19] 尹燕霞, 向本琼, 佟丽. 荧光光谱法在蛋白质研究中的应用[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(2): 33-36, 40.
- [20] YANG X Y, SU Y, LI L. Study of soybean gel induced by *Lactobacillus plantarum*: protein structure and intermolecular interaction [J/OL]. LWT - Food Sci Technol, 2020, 119: 108794 [2021-12-06]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108794>.
- [21] 张晶, 丁芳, 邹晴晴, 等. 高压均质对大米蛋白功能特性及物化特性的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(6): 9-12, 33.
- [22] 刘巧珍. 干法研磨对豌豆分离蛋白功能特性的影响[D]. 山东 泰安: 山东农业大学, 2021.
- [23] 房岩强, 魏益民, 张波. 蛋白质结构在挤压过程中的变化[J]. 中国粮油学报, 2013, 28(5): 100-104.
- [24] MORAS B, REY S, VILAREM G, et al. Pressurized water extraction of isoflavones by experimental design from soybean flour and soybean protein isolate [J]. Food Chem, 2017, 214: 9-15.
- [25] 黄艳玲, 任昊天. 喷雾干燥温度对生物解离浓缩蛋白粉微观结构的影响[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 50-54.
- [26] 吴长玲, 田甜, 王冬梅, 等. 低温超微粉碎对豆渣蛋白结构及功能性质的影响[J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 50-55.
- [27] 薛健翼, 陈玮, 贾才华, 等. 球磨微细化研磨对发芽糙米粉物性特征的影响[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(7): 26-32.
- [28] 查越. 物理加工对紫贻贝(*Mytilus edulis*)蛋白结构和功能性质的影响[D]. 辽宁 大连: 大连工业大学, 2019.