

不同空化射流条件下大豆蛋白—白藜芦醇互作结合机制与抗氧化活性研究

王中江^{1,2} 孙福伟¹ 任双鹤¹ 沈路路¹ 张硕¹ 郭增旺¹

(1. 东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030;

2. 国家粮食产业(食用油料蛋白高值化加工)技术创新中心, 哈尔滨 150030)

摘要: 为探究空化射流预处理对大豆分离蛋白—白藜芦醇(SPI—RES)复合物的影响, 对SPI进行空化射流预处理(0、2、4、6、8、10 min)后, 与RES非共价结合形成复合物。通过荷载量和包埋率研究了SPI对RES的结合情况, 采用内源荧光光谱、傅里叶红外光谱及分子对接技术研究了SPI和RES之间的相互作用机制, 通过粒径、 ζ -电位、表面疏水性、抗氧化活性等考察了复合物的物理化学性质和功能特性。结果表明: 经过一定时间的空化射流处理后, SPI对RES包埋率和荷载量显著增加, 复合物粒径和 ζ -电位分别减小和增大。内源荧光光谱表明RES对SPI的淬灭为静态淬灭, 反应是自发进行的。傅里叶红外光谱表明适当的空化射流预处理促进了SPI从有序结构转变为无序结构, 从而结合更多的RES。热力学参数和分子对接结果表明疏水相互作用是主要作用力, 还涉及氢键。此外, 适当的空化射流预处理后, SPI—RES复合物表面疏水性及抗氧化活性均有所增加。本研究为空化射流预处理大豆分离蛋白应用领域的开拓和脂溶性活性物质保健食品的开发提供了前期理论基础。

关键词: 大豆分离蛋白; 白藜芦醇; 空化射流; 非共价复合物

中图分类号: TS210 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2024)06-0353-12 OSID: 

Effect of Cavitation Jet on Interaction and Antioxidant Activity of Soybean Protein – Resveratrol

WANG Zhongjiang^{1,2} SUN Fuwei¹ REN Shuanghe¹ SHEN Lulu¹ ZHANG Shuo¹ GUO Zengwang¹

(1. School of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

2. National Grain Industry (High Value Processing of Edible Oil Protein) Technology Innovation Center, Harbin 150030, China)

Abstract: To investigate the effect of cavitation jet pretreatment on soybean protein isolate – resveratrol (SPI – RES) complexes, SPI was subjected to cavitation jet pretreatment (0 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min and 10 min) before non-covalent binding with RES to form complexes. The binding of SPI to RES was studied through loading amount and encapsulation efficacy. The interaction and binding mechanism between SPI and RES were studied by using fluorescence spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, and molecular docking techniques. In addition, the physical and chemical properties and functional characteristics of the SPI – RES complexes were investigated, including ζ -potential, surface hydrophobicity, and antioxidant activity. The results indicated that after a certain period of cavitation jet pretreatment, SPI significantly increased the encapsulation efficacy and loading amount of RES, and the particle size and ζ -potential of complexes was decreased and increased respectively. The fluorescence spectrum indicated that the quenching of SPI by RES was static quenching, and the reaction was spontaneous. Fourier transform infrared spectroscopy indicated that appropriate cavitation jet pretreatment promoted the transition of SPI from ordered to disordered structures, thereby combining more RES. The thermodynamic parameters and molecular docking results indicated that hydrophobic interactions were the main forces and involved hydrogen bonds. In addition, after appropriate cavitation jet pretreatment, the

收稿日期: 2023-10-19 修回日期: 2023-11-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(32202228)、山东省重点研发计划项目(2022CXGC010603)、国家重点研发计划项目(2021YFD2100401)、中央支持地方高校改革发展资金人才培养项目、黑龙江省优秀青年科学基金项目(YQ2022C021)和东北农业大学青年领军人才支持计划项目(NEAU2023QNLJ-007)

作者简介: 王中江(1987—), 男, 教授, 博士, 主要从事粮食、油脂及植物蛋白研究, E-mail: wzjname@126.com

通信作者: 郭增旺(1992—), 男, 副教授, 博士, 主要从事粮食、油脂及植物蛋白研究, E-mail: gzwname@163.com

surface hydrophobicity and antioxidant activity of SPI-RES complexes were increased. The research result can provide a preliminary theoretical basis for the exploration of the application field of cavitation jet pretreatment of soybean protein isolate and the development of fat-soluble active substances in health food.

Key words: soybean protein isolate; resveratrol; cavitation jet; non-covalent complexes

0 引言

白藜芦醇(RES)是在葡萄叶和葡萄皮中合成的多酚,它是葡萄酒和葡萄汁中的一种生物活性成分^[1]。然而,由于其化学不稳定性和疏水性,RES作为一种营养素在食品工业中的应用有限^[2]。蛋白质作为一种天然传递系统,可以促进RES作为一种功能性成分在食品和制药行业的应用。大豆分离蛋白(Soybean protein isolates, SPI)具有很高的营养价值,美国食品药品管理局(FDA)认证可应用于食品工业中^[3]。SPI主要以球状纳米絮凝的颗粒形式存在于水溶液中。由于它们具有大量带电氨基酸和疏水氨基酸残基,可以通过静电和疏水相互作用与可电离或疏水的小分子结合^[4]。SPI中的疏水区是结合脂溶性多酚的活性区域。然而,由于其球状结构,疏水区域包裹在内部,因此无法很好地携带多酚。研究发现空化射流处理SPI有助于打开蛋白质内部结构,断开蛋白质肽链之间的化学键,破坏分子之间或分子内的密切关系,并暴露更多疏水区域,这种结构变化有利于结合多酚^[5]。

空化射流是外场辅助手段的一种方法,它产生的空化效应可以使蛋白质发生改性。空化射流诱导液体产生空泡在溃灭的瞬间,空泡周围的极小空间内能形成强烈的冲击力和速度高达100 m/s的微射流。并伴随高压等极端物理现象,这种极端条件可使在一般条件下难以实现的物理、化学反应得以进行^[6-9]。文献[10]研究空化射流处理对大豆分离蛋白理化特性的影响,发现适度空化射流可以改善SPI的溶解性、乳化性、持油性和表面疏水性。但空化射流技术对植物蛋白运载脂溶性活性物质构建和生物利用度的影响尚不清楚。

因此,为了探究空化射流预处理对SPI-RES复合物的影响,本文以SPI、RES为原料,采用空化射流预处理SPI与RES形成非共价复合物,通过测定复合物包埋率、荷载量、粒径、 ζ -电位、内源荧光、FTIR(傅立叶变换红外光谱)、表面疏水性、抗氧化性及分子对接,探讨空化射流预处理时间(2、4、6、8、10 min)对SPI-RES复合物结构特性、相互作用及抗氧化活性的影响,以期为大豆分离蛋白应用领域的开拓和脂溶性活性物质保健食品的开发提供前

期理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

白藜芦醇(Resveratrol, ≥98%)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼均购自上海源叶生物技术有限公司;大豆分离蛋白(SPI,纯度98%以上),临邑禹王植物蛋白有限公司;无水乙醇、盐酸、氢氧化钠均购自天津市博迪化工有限公司;N-苯基-1-萘胺-8-磺酸,美国Sigma公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

空化射流机,北京中森汇嘉科技发展有限责任公司;FL8500型荧光分光亮度计,美国Perkin Elmer公司;Five Easy Plus型pH计,梅特勒-托利多仪器有限公司;ALPHAL-2 LD plus型Christ冷冻干燥机,北京奥创兴业有限公司;THERMO X1R型冷冻高速离心机,美国Thermo公司;Scimitar 2000型傅里叶变换红外光谱仪,美国Agilent公司;MS2000型Masterizer激光粒度仪,英国Malvern公司;UV-2700型紫外可见分光亮度计,日本岛津公司。

1.3 大豆分离蛋白-白藜芦醇复合物制备

取一定量的SPI粉末用0.01 mol/L PBS(磷酸盐)缓冲液(pH值为7.2~7.4)配制成质量浓度为0.5 mg/mL溶液,室温(20℃)下磁力搅拌2 h,封口,置于4℃冰箱,水化12 h,取出恢复至室温后,得初始SPI溶液。用空化射流机分别辅助处理0、2、4、6、8、10 min,所得溶液为空化射流处理SPI溶液。

准确称取一定量的白藜芦醇粉末,用无水乙醇充分溶解,得到质量浓度为10 mg/mL的白藜芦醇-乙醇溶液。将白藜芦醇溶液按体积比1:45逐滴加入到原始及空化射流处理SPI溶液中,磁力搅拌60 min,使SPI与白藜芦醇充分复合,并避光静置4 h,将混合液在4℃、8 000 r/min下离心15 min,除去游离白藜芦醇,收集沉淀,并取上清液进行物质性能分析,余下样品置于-80℃超低温冰箱内冷冻24 h后真空冷冻干燥从而获得大豆分离蛋白-白藜芦醇复合物粉末,其中真空冷冻干燥参数为:真空度50 Pa、板层温度-30℃、冷凝温度-50℃。

1.4 SPI-RES复合物的包埋率和荷载量测定

包埋率E和荷载量L的测定参照文献[11]的

方法稍作改动。包埋率测定:取1.3节样品制备过程中离心后的沉淀物,用无水乙醇充分溶解,在9000g条件下离心15min除去蛋白质聚集体,以无水乙醇作为空白,上清液用紫外-分光光度法在306nm处测定吸光度,并根据标准曲线计算白藜芦醇的含量。SPI-RES复合物对白藜芦醇包埋率E计算公式为

$$E = \left(1 - \frac{S_0}{S_1} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中 S_0 —未结合RES质量,mg

S_1 —总结合RES质量,mg

荷载量测定:SPI对RES的荷载量采用萃取-分光亮度法分析,吸取2mL的复合物溶液于离心管中,并加入20mL乙酸乙酯溶液,用涡旋振荡仪混合均匀,在20℃下避光静置,待溶液分层后通过紫外分光亮度计测定上层液体在306nm处的吸光度,计算白藜芦醇的含量。SPI-RES复合物对白藜芦醇荷载量L计算公式为

$$L = \frac{A_0 - A_1}{C_1} \quad (2)$$

式中 A_0 —总RES质量,μg

A_1 —未结合RES质量,μg

C_1 —总SPI质量,mg

1.5 粒径和 ζ -电位测定

参考文献[12]的方法,采用动态散射技术测定SPI-RES复合物粒径,将1.3节中制备的样品稀释1000倍,在23℃下测定,测定过程中样品添加量约为1mL,测试仪器选用He-Ne(633nm)作为激光器,散射角设定为173°,输出功率为4mW。

利用MS2000型激光粒度分析仪测定所用样品,测试温度为23℃,颗粒吸收率设定为0.001,选择去离子水为分散剂,分散剂折射率设定为1.330,用针头取适量新鲜样品缓慢加入到带有电极的马尔文杯中,此过程应当避免气泡存在。

1.6 内源荧光光谱测定

内源荧光猝灭类型测定参照文献[13]的方法稍作改动:取1.3节中空化射流处理后的蛋白质溶液,并将其平均分成若干等份,以20μL为梯度分别加入空化射流处理后的SPI溶液中,使用混匀器充分混合,每组样品分别置于298、306、314K保温5min,恢复至室温后加入适量样品于1cm石英比色皿中,并在280nm激发波长、室温条件下进行荧光测定,记录绘制波长300~400nm范围的荧光光谱。应用Stern-Volmer方程对猝灭类型进行判断,计算公式为

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}Q = 1 + K_q\tau_0Q \quad (3)$$

式中 F_0 、 F —未加入、加入淬灭剂RES时SPI溶液荧光强度

Q —RES的浓度,mmol/L

K_q —淬灭速率常数,L/(mol·s)

K_{sv} —动态淬灭常数,L/mol

τ_0 —未含有淬灭剂时荧光体寿命,生物大分子平均寿命约为10⁻⁸s

结合位点数测定:分别将0~100μL浓度为10mmol/L的白藜芦醇-乙醇溶液添加到质量浓度为0.5mg/mL的大豆分离蛋白缓冲溶液(0.01mol/L,pH值7.2~7.4)中,磁力搅拌10min,混合均匀,分别置于298、306、314K保温5min得测定样品,其中白藜芦醇浓度分别为0、20、40、60、80、100μmol/L。测定过程中,样品的发射信号在290~450nm范围内收集,激发波长为280nm,测定温度为297K,激发和发射狭缝宽度为5.0nm,扫描速率为200nm/min。RES与SPI之间相互作用过程中的结合位点数计算可采用静态淬灭公式,即

$$\lg\left(\frac{F_0}{F} - 1\right) = \lg K_s + n \lg Q \quad (4)$$

式中 K_s —表观结合常数,mol/L

n —结合位点数

结合作用力类型测定:本实验依据Van't Hoff方程,通过式(3)、(4)进行计算,并对比和分析ΔH、ΔS及ΔG的数值来推测判断样品中RES与SPI结合的相互作用力类型, Van't Hoff方程为

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = -\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (5)$$

$$\Delta G = -RT\ln K \quad (6)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (7)$$

式中 K —相应温度下体系结合常数

R —理想气体常数,取8.314J/(mol·K)

ΔH —焓变

ΔS —熵变

T —温度,K

ΔG —吉布斯自由能

1.7 FTIR测定

FTIR的测定参照文献[14]的方法稍作改动。采用傅里叶变换红外光谱法对SPI、RES和SPI-RES复合物的结构特点进行测定与分析。取1~5mg粉末样品,按质量比1:100与溴化钾粉末混合、研磨、压片,测定参数为:扫描范围400~4000cm⁻¹、扫描分辨率4cm⁻¹,且每个样品重复扫描32次。

1.8 表面疏水性测定

表面疏水性测定参照文献[15]的方法稍作改

动。避光条件下,精确称取 N-苯基-1-萘胺-8-磺酸(ANS试剂)4.768 mg,充分溶解于2 mL PBS溶液中,得8 mmol/L ANS溶液。SPI及SPI-RES复合物样品溶解为质量浓度0.4 mg/mL的待测样品。在10 mL EP管中分别加入1~5 mL蛋白溶液,所有待测样品用PBS溶液补充至8 mL,并加入40 μL ANS溶液,即刻混合均匀,暗处反应8 min,在激发光波长390 nm、发射光波长470 nm、狭缝宽度5 nm处测定荧光强度。样品荧光强度除以试剂空白值即可得到样品相对荧光强度。分别以SPI质量浓度(mg/mL)、相对荧光强度为横、纵坐标绘制散点图,并进行线性拟合,方程初始阶段斜率即为样品表面疏水性指数。

1.9 抗氧化活性测定

DPPH(2,2-二苯基-1-苦基肼)自由基清除能力的测定参照文献[16]的方法稍作改动。准确称取0.008 g DPPH药品,用无水乙醇定容至100 mL,得到浓度为 2×10^{-4} mol/L的DPPH醇溶液,吸取3 mL样品溶液和等体积的DPPH醇溶液混匀,室温条件下,暗处孵育30 min,用紫外分光光度计在517 nm波长处测定吸光度;对照组以乙醇替代DPPH醇溶液,空白组以无水乙醇替代样液,进行测定。DPPH自由基清除率计算公式为

$$D = \left(1 - \frac{A^{(1)} - A^{(2)}}{A^{(3)}} \right) \times 100\% \quad (8)$$

式中 $A^{(1)}$ ——样品组吸光度

$A^{(2)}$ ——对照组吸光度

$A^{(3)}$ ——空白组吸光度

ABTS(2,2'-联氮双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐)自由基清除率的测定参照文献[17]的方法稍作改动,将等体积7.4 mmol/L的ABTS溶液和2.6 mmol/L过硫酸钾水溶液混匀,在25℃下避光静置12 h后得到ABTS母液。对母液进行稀释得到ABTS工作液。将样品溶液加入到ABTS工作液,反应30 min后测734 nm吸光度。ABTS自由基清除率计算方法同DPPH自由基清除率。

1.10 分子对接

7S和11S蛋白的晶体结构取自蛋白质数据库PDB,白藜芦醇结构从PubChem数据库下载,采用AutoDock Tools-1.5.6软件进行分子对接,Pymol软件用于研究7S/11S-RES复合物的结合机制。

1.11 数据统计及分析

所有实验重复3次,结果用平均值±标准差表示,采用SPSS 19.0软件对实验数据进行ANOVA显著性分析, $P < 0.05$ 为显著性差异,采用Origin 9.1软件制图对实验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 包埋率和荷载量

表1显示了不同空化射流预处理时间的SPI对RES的包埋率和荷载量的影响。随着空化射流时间的延长,SPI对RES的包埋率和荷载量均先增大后减小,且在处理时间为6 min时,包埋率(90.40%)和荷载量(2.782 μg/mg)达到最高。大豆分离蛋白中的疏水区是结合脂溶性多酚的活性区,但是由于天然的SPI是球状结构,其疏水区域被包裹在内部。这严重限制了SPI和多酚类活性物质的结合。课题组前期实验表明空化射流物理场所具有的空化和高剪切效应能够破坏SPI的分子间相互作用力和打破化学键诱导其空间结构展开,有助于蛋白分子内部的疏水性基团暴露出来^[18]。因此,经空化射流预处理后的SPI对RES的吸附能力增强,导致了包埋率和荷载量增加。但是当空化射流处理时间超过6 min时,SPI对RES的包埋率和荷载量却呈现降低趋势。其原因可能是长时间空化射流预处理能诱导SPI形成大粒径、分子柔性较低的蛋白聚集体并且破坏其疏水结构域,导致与RES的结合区域减少,使包埋率和荷载量降低^[19]。文献[20]研究表明经pH值变化结合热处理后的大豆亲脂蛋白对RES的包埋率为78%。而本研究显示空化射流预处理后的SPI对RES的包埋率为89.72%。这表明经过空化射流法预处理改性SPI有助于SPI和脂溶性多酚构建复合体系,是一种制备水溶性白藜芦醇快捷有效的方法。因此,适当的空化射流预处理可以有效提高SPI对脂溶性多酚的运载能力。

表1 空化射流预处理对SPI-RES复合体系包埋率和荷载量的影响

Tab. 1 Effect of cavitation jet pretreatment on encapsulation efficacy and loading amount of SPI-RES complexes system

样品	包埋率/%	荷载量/(μg·mg ⁻¹)
SPI-RES	(82.14 ± 0.32) ^f	(2.14 ± 0.07) ^f
SPI-RES-2 min	(85.67 ± 0.87) ^{cd}	(2.36 ± 0.05) ^d
SPI-RES-4 min	(87.56 ± 0.86) ^b	(2.55 ± 0.04) ^b
SPI-RES-6 min	(90.40 ± 0.56) ^a	(2.78 ± 0.03) ^a
SPI-RES-8 min	(86.14 ± 0.49) ^e	(2.41 ± 0.05) ^c
SPI-RES-10 min	(84.60 ± 0.03) ^e	(2.30 ± 0.04) ^{de}

注:同列数据后不同字母表示差异显著,下同。

2.2 粒径和ζ-电位

SPI和空化射流预处理SPI-RES复合物粒径和ζ-电位如图1所示,图中不同字母表示差异显著,下同。由于SPI在中性溶液中的电负性,所有样品的ζ-电位均为负值,复合物粒径可能受到SPI和

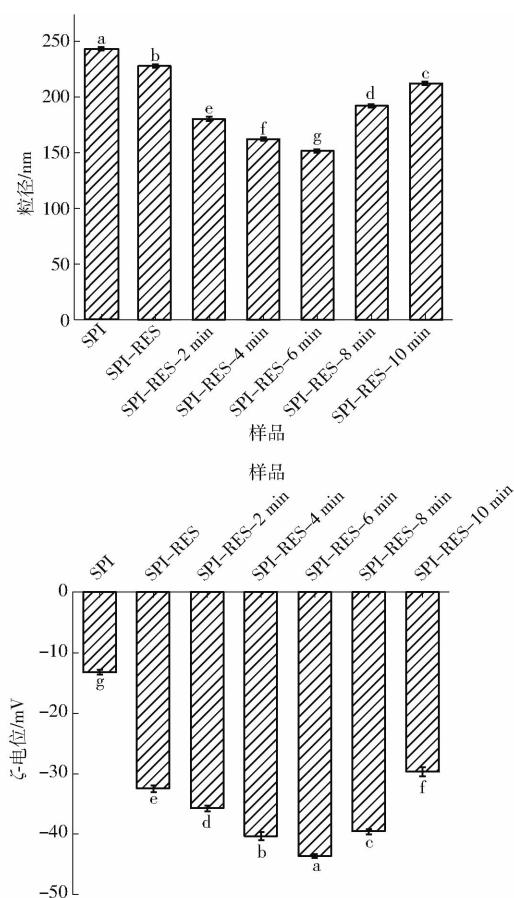


图 1 不同空化射流预处理下 SPI-RES 复合物粒径和 ζ -电位

Fig. 1 Particle size and ζ -potential of SPI-RES complexes under different cavitation jet pretreatments

RES 相互作用的影响。SPI-RES 复合物比 SPI 有更低的粒径和更高的负 ζ -电位, 这可能是 SPI 和 RES 之间的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^[21]。SPI-RES 复合物表面的高负电性增加了颗粒之间的排斥, 防止蛋白质聚集。随着空化射流预处理时间从 0 min 增加到 6 min, SPI-RES 复合物颗粒尺寸进一步较小, ζ -电位电负性更大。这是因为空化射流所产生的湍流和高剪切效应能够诱导蛋白质结构打开和发生空间解离, 减小蛋白粒径并暴露出更多的疏水区域与 RES 结合, RES 的结合促进了蛋白质带电氨基酸的暴露^[22]。但空化射流预处理时间过长会导致溶液中 SPI 分子重新聚合形成一些较大的聚集体, 掩埋蛋白表面带负电荷的氨基酸残基, 而且还会引起对 RES 的结合程度降低, 从而使复合物粒径变大, ζ -电位电负性减小。

2.3 内源荧光光谱

蛋白质和多酚结合过程实质是蛋白的侧链基团(色氨酸)和多酚的小分子官能团(酚羟基)发生共价/非共价结合, 根据荧光分光光度计测定色氨酸的

数量来表征蛋白质微环境的变化及其与 RES 的结合程度^[23]。空化射流预处理 SPI 内源荧光发射光谱随着 RES 添加量及温度变化的图谱如图 2 所示, 随着不同浓度 RES 的加入, SPI 荧光强度显著降低, 峰型不变且均呈单峰正态分布。文献[24]在研究麦醇溶蛋白和 RES 结合也发现了类似的现象, 且与两者之间通过疏水相互作用结合有关。这一结果表明 RES 结合后 SPI 中的色氨酸残基在所处微环境中排列顺序发生位移, 导致亲水性增强, 疏水性降低, 间接说明了 RES 和 SPI 是通过疏水相互作用结合的。随着空化射流处理时间的增加, 复合物荧光强度降低幅度变小并且荧光最大值始终向光谱的红色端移动, 这表明 RES 和 SPI 发生相互作用, 并改变了 SPI 的结构, 进而使色氨酸的微环境变得更加亲水^[25]。这可能是因为空化射流产生的空化效应能促使蛋白质结构变得松散, 从而导致蛋白质发生水解反应, 暴露出更多的疏水区域, 进而促进 SPI 与 RES 通过疏水相互作用结合, 而过度空化处理会破坏蛋白质这种良好的伸展结构, 不利于两者之间的结合^[26]。这与表面疏水性结果一致。此外, 随着温度的升高, 荧光强度基本也呈下降的趋势, 这是因为热处理暴露了更多的色氨酸残基, 从而增强了与 RES 苯环的疏水相互作用, 导致了更强的色氨酸荧光淬灭^[27]。

2.4 淬灭类型与结合程度

在研究蛋白质与多酚相互作用时, 可利用 Stern-Volmer 方程来判断其淬灭类型。如图 3 所示, RES 浓度与 SPI 的 F_0/F 值呈良好的线性正相关, 且随着温度由 298 K 升高至 314 K 时, 同一空化射流处理条件下 SPI 的 Stern-Volmer 方程斜率 K_{sv} 表现为不断降低的趋势, 这说明 RES 对 SPI 的淬灭类型为静态淬灭。在所有 SPI-RES 复合物中, K_q 数量级达到 10^{12} , 远超过淬灭剂对于大分子生物活性物质最大淬灭常数 $2.0 \times 10^{10} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{s})$ 。这进一步说明 RES 对 SPI 的淬灭过程均是由于分子之间结合形成化合物所引起的静态淬灭, 而不是分子碰撞所引起的动态淬灭^[28]。

本研究根据静态淬灭公式可以得出不同温度条件下 RES 对 SPI 的结合常数 K_b 和结合位点数 n 。如表 2 所示, 在同一空化射流处理时间下, 复合物的结合常数随着温度的升高而降低, 这表明 SPI 和 RES 之间的结合是放热的; 在相同温度下, 相对于未空化射流处理的 SPI-RES 复合物, 结合常数的值均有所增加。此外, K_b 值高于 10^5 mol/L 表明 RES 对 SPI 表现出较强的结合能力。这充分说明空化射流处理可以增加 SPI 和 RES 之间的结合亲和力, 从而增强

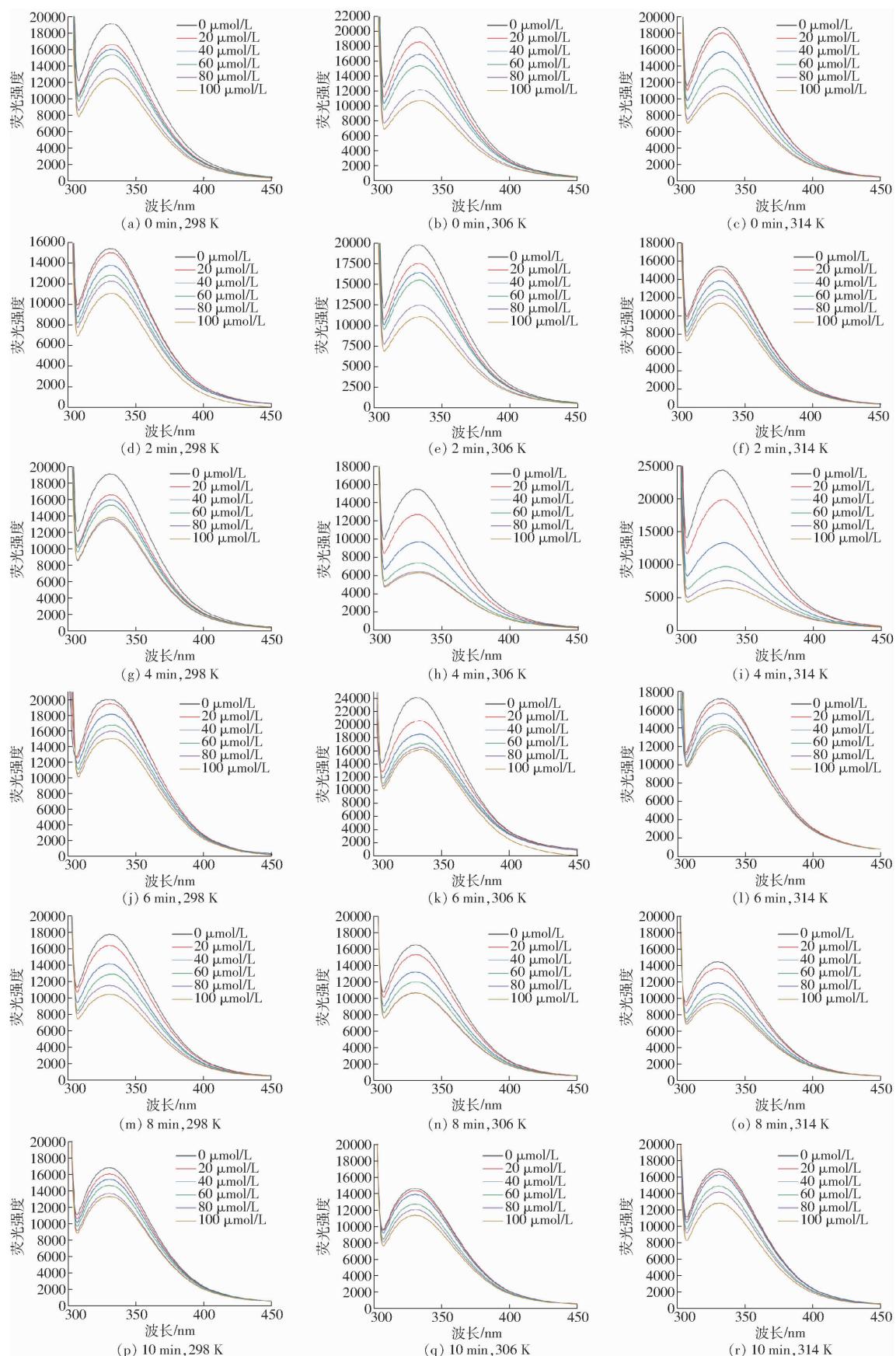


图 2 白藜芦醇浓度对空化射流预处理 SPI 溶液荧光光谱的影响

Fig. 2 Effects of resveratrol on fluorescence spectra of SPI solution pretreated with cavitation jet

复合物的稳定性。出现这种现象的原因可能是空化射流处理导致更大程度的蛋白质去折叠和变性, 这

可能会增加蛋白质的表面疏水性, 从而导致 SPI 与 RES 更好的结合^[29]。从表中可以看出, 空化射流处

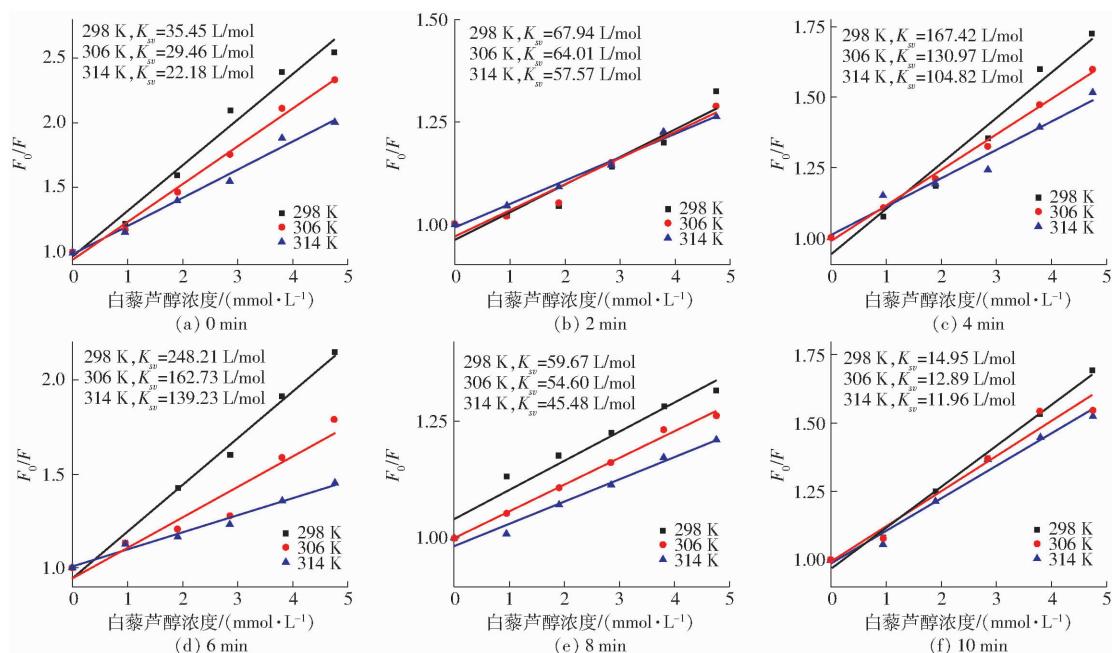


图3 不同温度下荧光淬灭 Stern - Volmer 方程

Fig. 3 Stern - Volmer plots for fluorescence quenching at different temperatures

表2 不同温度 SPI 与 RES 复合物的结合常数、淬灭速率常数、结合位点数和热力学参数

Tab. 2 Binding constants, quenching rate constant, binding sites numbers and thermodynamic binding parameters of SPI with resveratrol at different temperatures

样品	温度/K	$K_b/(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	$K_q/(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	n	$\Delta H/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta S/(\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G/(\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
SPI - RES	298	2.3215×10^5	6.9756×10^{12}	1.4356			-16.35
	306	9.5230×10^4	6.1438×10^{12}	1.2365	142.65	0.36	-13.28
	314	4.8220×10^4	5.4623×10^{12}	1.1452			-11.86
SPI - RES - 2 min	298	4.0635×10^5	7.5623×10^{12}	2.1245			-20.36
	306	2.3625×10^5	6.4563×10^{12}	1.8546	182.57	0.38	-21.32
	314	1.2368×10^5	5.8254×10^{12}	1.5418			-18.65
SPI - RES - 4 min	298	5.6384×10^5	8.6542×10^{12}	2.1563			-19.65
	306	3.5698×10^5	7.4521×10^{12}	1.8654	210.68	0.43	-18.78
	314	1.6742×10^5	6.3218×10^{12}	1.6591			-20.18
SPI - RES - 6 min	298	7.2312×10^5	8.9635×10^{12}	2.1857			-21.36
	306	4.5326×10^5	7.8643×10^{12}	1.9021	254.39	0.44	-19.26
	314	2.1438×10^5	6.7564×10^{12}	1.7728			-15.68
SPI - RES - 8 min	298	4.2316×10^5	7.2315×10^{12}	1.3124			-18.64
	306	1.8975×10^5	6.4235×10^{12}	1.2104	206.52	0.37	-15.84
	314	9.8260×10^4	5.6345×10^{12}	1.0238			-17.62
SPI - RES - 10 min	298	2.4956×10^5	6.5423×10^{12}	1.1032			-19.51
	306	1.0365×10^5	5.8965×10^{12}	0.8458	173.65	0.37	-17.23
	314	5.6230×10^4	4.7542×10^{12}	0.7312			-15.42

理时间可以影响复合物的n值,形成复合物的n多数在1~2之间,这表明SPI有1或2个结合位点与RES结合。在温度298 K下,空化射流处理时间2~6 min的SPI-RES复合物的n在2左右。然后,当空化射流处理时间增大至10 min时,复合物的n小于1,这表明适当的空化射流处理有助于蛋白质结构的舒展,暴露出其中有效的结合位点,

从而促进与RES的结合。但空化射流处理时间过长会导致解聚的亚基以及小分子蛋白发生聚集,而聚集后掩埋了SPI表面的结合位点,降低二者结合作用^[30]。

2.5 作用力及热力学参数分析

多酚和蛋白质之间的主要结合机制包括氢键、范德华力、静电和疏水相互作用^[31]。根据Van't Hoff

方程对 SPI-RES 复合物的热力学参数评价如表 2 所示。当 $\Delta H > 0, \Delta S > 0$ 时, 表明这种结合主要是疏水相互作用力调节的; 当 $\Delta H < 0, \Delta S > 0$ 时, 表明是静电作用力起主要结合作用; 当 $\Delta H < 0, \Delta S < 0$ 时复合物之间可能以范德华力和氢键作用而相互结合^[32]。 ΔH 和 ΔS 的正值表明疏水相互作用是 SPI 与 RES 之间的主要相互作用。 ΔG 值为负, 表明 SPI 和 RES 的相互作用过程是自发的。因此, RES 和 SPI 可以形成自组装的复合物且主要以疏水相互作用结合。

2.6 FTIR 分析结果

利用傅里叶变换红外光谱法研究 SPI-RES 复合物以及不同空化射流预处理的 SPI-RES 复合物的相互作用和结构变化。RES、天然 SPI 以及不同空化射流处理时间的 SPI-RES 傅里叶红外光谱图如图 4 所示。从图中可以看出, RES 的加入以及不同时间的空化射流处理都降低了 SPI 酰胺 I 的吸收峰, 并且 SPI 酰胺 II 带的红外吸收峰出现了不同程度的蓝移, 这表明 RES 的加入使 SPI 的二级结构发生了改变。与 SPI 相比, 在 $3100 \sim 3600 \text{ cm}^{-1}$ 波数范围内, SPI-RES 复合物吸收峰宽度和强度发生了一定变化, 表明氢键参与了与 RES 的结合^[33]。酰胺 I 带主要反映肽键的 C=O 和 N-H 伸缩振动, 该带出现在 $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$; 酰胺 II 带主要反映 C-N

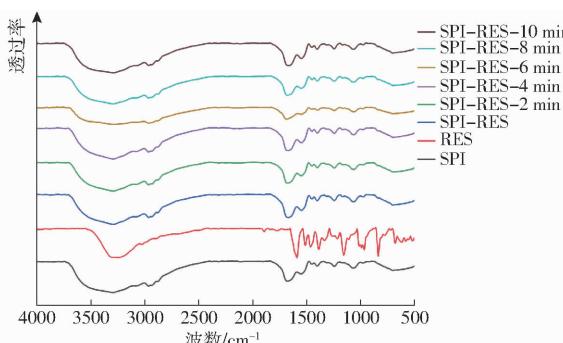


图 4 SPI 及不同空化射流预处理时间 SPI-RES 复合物的傅里叶红外光谱

Fig. 4 FTIR spectra of SPI and SPI-RES complexes at different pretreatment times of cavitation jet

的伸缩振动和 N-H 的弯曲振动, 该带出现在 $1500 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$ 处^[34]。与 SPI 相比, SPI-RES 复合物的酰胺 I 带和酰胺 II 带的吸收强度明显增加, 表明复合物在形成过程中, SPI 与 RES 发生了疏水相互作用。另外, 可以观察到随着空化射流处理时间的增加, 复合物吸收强度仍在变化, 这可能是因为不同空化射流处理时间下, 蛋白质分子发生折叠和展开的程度不同, 导致蛋白内部暴露的疏水基团数量不同, 进而影响了 SPI 与 RES 通过疏水相互作用结合。

表 3 显示了不同时间空化射流预处理下 SPI-RES 复合物二级结构相对含量的变化。与 SPI 相比, SPI-RES 复合物的 α -螺旋和 β -折叠含量降低, 无规则卷曲含量增加, β -转角没有显著变化。这表明 RES 的加入使 SPI 的二级结构变得无序。此外随着空化射流预处理时间的增加, SPI-RES 复合物的 α -螺旋和 β -折叠含量呈现先降低后增加的趋势, β -转角和无规则卷曲含量则是先增加后降低的趋势。这说明短时间的空化射流预处理能够使复合物的二级结构由 α -螺旋和 β -折叠转变为 β -转角和无规则卷曲, 这种转变在空化射流预处理时间为 6 min 时最明显。 α -螺旋和 β -折叠主要与肽键的氢键有关, 适当的空化射流预处理导致蛋白质分子重排并展开, 削弱了蛋白质内部的氢键, 从而使蛋白质从有序结构变得更加无序、灵活, 这也可能是空化射流预处理 SPI 能与更多的 RES 结合的原因, 进而改善了蛋白质的功能特性^[35]。文献[36]发现空化效应可以破坏蛋白质的氢键, 进而影响 α -螺旋和 β -折叠结构; 文献[37]发现多酚的非共价结合可以引起蛋白质二级结构的重组。因此 SPI-RES 复合物的二级结构变化受到空化射流和 RES 的共同影响。

2.7 表面疏水性

空化射流处理对 SPI-RES 复合物表面疏水性的影响如图 5 所示。从图中可以看出, 与 SPI 相比, SPI-RES 复合物的表面疏水性显著降低, 表明 RES 和 SPI 结合影响了复合物的表面疏水性。随着 RES

表 3 SPI 及不同空化射流预处理时间 SPI-RES 复合物的二级结构相对含量

Tab. 3 Secondary structure of SPI and SPI-RES complexes at different pretreatment times of cavitation jet %

样品	α -螺旋结构	β -折叠结构	β -转角结构	无规则卷曲结构
SPI	$(15.23 \pm 0.18)^a$	$(38.82 \pm 0.14)^a$	$(20.32 \pm 0.16)^e$	$(18.24 \pm 0.48)^f$
SPI-RES	$(14.12 \pm 0.09)^b$	$(32.18 \pm 0.24)^b$	$(20.36 \pm 0.13)^e$	$(24.28 \pm 0.11)^d$
SPI-RES-2min	$(13.28 \pm 0.52)^c$	$(29.45 \pm 0.45)^c$	$(21.43 \pm 0.24)^d$	$(25.85 \pm 0.14)^c$
SPI-RES-4min	$(12.98 \pm 0.06)^c$	$(27.48 \pm 0.29)^c$	$(23.26 \pm 0.04)^b$	$(27.23 \pm 0.17)^b$
SPI-RES-6min	$(12.09 \pm 0.32)^d$	$(25.37 \pm 0.23)^g$	$(24.73 \pm 0.56)^a$	$(28.00 \pm 0.12)^a$
SPI-RES-8min	$(12.86 \pm 0.15)^c$	$(26.54 \pm 0.07)^f$	$(22.43 \pm 0.17)^c$	$(24.32 \pm 0.37)^d$
SPI-RES-10min	$(13.65 \pm 0.13)^c$	$(28.49 \pm 0.15)^d$	$(22.06 \pm 0.77)^c$	$(22.43 \pm 0.71)^e$

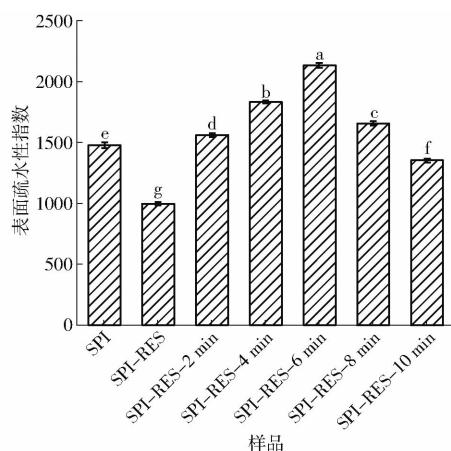


图5 SPI及不同空化射流预处理时间 SPI-RES 复合物的表面疏水性指数

Fig. 5 Surface hydrophobicity of SPI and SPI-RES complexes at different pretreatment times of cavitation jet

的加入,SPI-RES复合物表面疏水性降低,这可能是由于添加RES引入了亲水性羟基,从而导致复合物整体的疏水性下降^[38]。随着空化射流处理时间的延长,SPI-RES复合物的表面疏水性呈先升高后降低的趋势,这可能是因为适当的空化射流诱导的空化现象使蛋白质的去折叠和局部水解,这有利于SPI内部的疏水基团暴露在极性环境中,并且空化射流处理对SPI表面疏水性的增加作用大于RES对表面疏水性的降低作用,从而导致SPI-RES复合物表面疏水性的升高。但空化射流预处理时间过长也会导致蛋白质通过非共价相互作用发生聚集,导致部分暴露的疏水性基团又被重新掩埋,过度空化处理和RES的加入共同导致SPI-RES复合物表面疏水性降低。

2.8 抗氧化活性测定

抗氧化活性是酚类物质与蛋白质相互作用时最常见的研究活性之一。由图6可知,随着空化射流预处理时间的延长,DPPH自由基清除率和ABTS自由基清除率均呈现先升高后下降的趋势。当空化射流预处理时间为6 min时,与未经处理SPI-RES复合物相比,SPI-RES-6 min样品的DPPH自由基清除率和ABTS自由基清除率分别为(78.65±1.36)%和(82.85±0.62)%,是SPI-RES复合物的1.8倍和1.5倍。抗氧化活性的提高与空化射流预处理SPI结合更多的RES有关。这可能是由于适当的空化射流预处理使SPI的结构更加灵活,暴露更多的疏水基团与RES结合,RES羟基提供的H⁺可以与DPPH形成DPPH·H并终止自由基链式反应,以及更好地清除ABTS自由基,增强复合物的抗氧化能力^[39]。过长时间的空化射流预处理降低了SPI-RES复合物的抗氧

化活性,可能由于长时间的空化射流引起的空化和热效应使SPI发生聚集,掩盖了RES结合位点,导致结合率降低,抗氧化能力减弱。

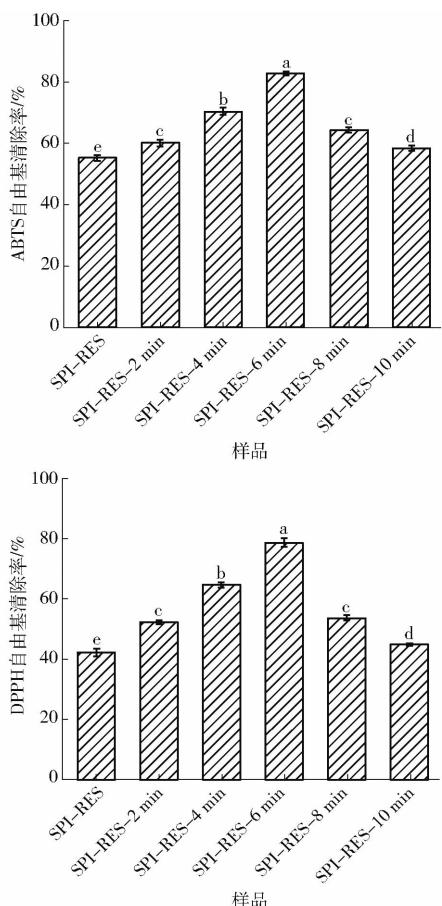


图6 SPI及不同空化射流预处理时间 SPI-RES 复合物的 DPPH 自由基清除率和 ABTS 自由基清除率

Fig. 6 DPPH radical and ABTS radical cation scavenging rates of SPI and SPI-RES complexes at different pretreatment times of cavitation jet

2.9 分子对接分析结果

为了进一步研究SPI和RES之间的特定分子间相互作用,使用分子对接模拟进行分析。SPI的主要成分为7S和11S,共占SPI的70%左右。因此,在同源性建模中使用的受体是7S/11S。负结合亲合能值代表合理结合的可能性。一般来说,该值小于-6 kcal/mol时,更容易出现结合。在本研究中,7S-RES和11S-RES的亲合能分别为-7.6 kcal/mol和-6.3 kcal/mol,这意味着RES对7S和11S均具有潜在的主动结合作用。

7S/11S-RES的对接结果如图7所示。由图7可知,RES的-OH能够与7S蛋白中的Phe176、Ile7、Thr133、Gly177形成氢键相互作用,这有利于配体小分子在7S蛋白活性位点上更好地发挥靶向作用。RES还能够与7S蛋白中的Pro6、His175、Val132形成疏水相互作用。此外,RES能够与11S

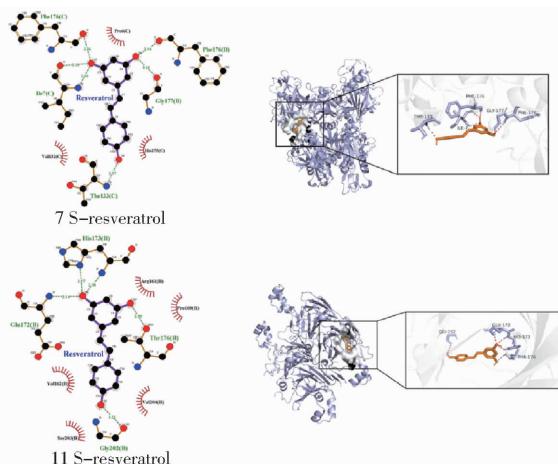


图 7 7S/11S 和 RES 的分子对接结果

Fig. 7 Molecular docking results of 7S/11S with RES

的 4 个氨基酸位点 (His173、Glu172、Gly202、Thr176) 形成氢键相互作用以及与 5 个氨基酸位点 (Val162、Ser203、Val204、Pro160、Arg161) 形成疏水相互作用。这些相互作用可以有效促进 RES 与 SPI 之间稳定复合物的形成。分子对接结果表明, SPI 与 RES 的非共价结合作用力除了疏水相互作用还包括氢键,这与 FTIR 结果一致。

3 结束语

研究了 SPI 在空化射流处理下对 SPI-RES 复合物结合机制及功能特性的影响,在空化射流处理时间 6 min 时,SPI 对 RES 的包埋率最高,复合物的粒径最小且溶液体系最稳定。通过荧光光谱、傅里叶红外光谱发现 RES 对 SPI 起静态淬灭,主要通过疏水相互作用使蛋白基疏水区域与脂溶性物质结合;适当空化射流预处理使复合物的 α -螺旋和 β -折叠含量显著降低, β -转角和无规则卷曲含量显著增加,表明适当空化射流处理导致蛋白质变得更加无序,从而有利于结合更多的 RES。而空化射流预处理时间过长会导致溶液中大豆分离蛋白分子重新聚合形成一些较大的聚集体,使蛋白质与蛋白质之间的相互作用增强,掩埋蛋白表面带负电荷的氨基酸残基,而且还会引起对 RES 的结合程度降低,导致 SPI-RES 复合物的 ζ -电位绝对值降低、粒径增大、表面疏水性和抗氧化活性降低。本研究可为空化射流技术辅助提升蛋白运载脂溶性活性物质能力提供参考依据。

参 考 文 献

- [1] 田艳杰,石爱民,刘红芝,等.白藜芦醇的生物活性及其运载体系研究进展[J].食品科学,2023,44(1):371-379.
TIAN Yanjie, SHI Aimin, LIU Hongzhi, et al. Progress in research on biological activities and delivery systems of resveratrol [J]. Food Science, 2023, 44(1): 371 - 379. (in Chinese)
- [2] 张文君,吴梦婷,张国锋,等.白藜芦醇纳米传递系统的研究进展[J].食品科学,2022,43(3):371-377.
ZHANG Wenjun, WU Mengting, ZHANG Guofeng, et al. Progress in resveratrol nanodelivery systems [J]. Food Science, 2022, 43(3): 371 - 377. (in Chinese)
- [3] LUO K, LIU S, MIAO S, et al. Effects of transglutaminase pre-crosslinking on salt-induced gelation of soy protein isolate emulsion[J]. Journal of Food Engineering, 2019, 263: 280 - 287.
- [4] LI Q, ZHENG J, GE G, et al. Impact of heating treatments on physical stability and lipid-protein co-oxidation in oil-in-water emulsion prepared with soy protein isolates[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105167.
- [5] 江连洲,杨宗瑞,任双鹤,等.空化射流对大豆分离蛋白结构及乳化特性的影响[J].农业工程学报,2021,37(3):302-311.
JIANG Lianzhou, YANG Zongrui, REN Shuanghe, et al. Effect of cavitation jet on structure and emulsifying properties of soy protein isolate[J]. Transactions of the CSAE, 2021, 37(3): 302 - 311. (in Chinese)
- [6] 管金发,邓松圣,雷飞东,等.空化水射流理论和应用研究[J].石油化工应用,2010,29(12):15-19.
GUAN Jinfa, DENG Songsheng, LEI Feidong, et al. Research on the theory and application of cavitation water jet [J]. Petrochemical Industry Application, 2010, 29(12): 15 - 19. (in Chinese)
- [7] 古颖龙,王海燕,吴羽,等.空化微流体在生物医学方面的应用[J].激光生物学报,2014,23(4):289-293.
GU Yinglong, WANG Haiyan, WU Yu, et al. Cavitated microfluidic for applications in biomedicine[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2014, 23(4): 289 - 293. (in Chinese)
- [8] DENG J, WANG A H, WANG C W. Experimental investigation on enhancive effect of hydrodynamic cavitation[J]. Advanced Materials Research, 2013, 781: 2865 - 2869.
- [9] 任晓敏,黄永春,杨锋,等.基于撞击流—射流空化效应的羟自由基制备工艺优化[J].食品与机械,2018,34(6):197-201.
REN Xiaomin, HUANG Yongchun, YANG Feng, et al. Optimization of the preparation process of hydroxyl radicals based on impinging stream jet cavitation effect[J]. Food and Machinery, 2018, 34(6): 197 - 201. (in Chinese)
- [10] 白银,高悦,王中江,等.射流空化对大豆分离蛋白的理化性质及结构的影响[J].食品科学,2020,41(7):110-116.
BAI Yin, GAO Yue, WANG Zhongjiang, et al. Effect of jet cavitation on physicochemical properties and structure of soy protein isolate[J]. Food Science, 2020, 41(7): 110 - 116. (in Chinese)

- [11] XIANG H, SUN-WATERHOUSE D, CUI C, et al. Modification of soy protein isolate by glutaminase for nanocomplexation with curcumin[J]. *Food Chemistry*, 2018, 268: 504 – 512.
- [12] ZHANG J, YIN T, XIONG S, et al. Thermal treatments affect breakage kinetics and calcium release of fish bone particles during high-energy wet ball milling[J]. *Journal of Food Engineering*, 2016, 183: 74 – 80.
- [13] ZHANG Y, CHEN S, QI B, et al. Complexation of thermally-denatured soybean protein isolate with anthocyanins and its effect on the protein structure and in vitro digestibility[J]. *Food Research International*, 2018, 106: 619 – 625.
- [14] KHALIFA I, PENG J, JIA Y, et al. Anti-glycation and anti-hardening effects of microencapsulated mulberry polyphenols in high-protein-sugar ball models through binding with some glycation sites of whey proteins [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 123: 10 – 19.
- [15] LI C, XUE H, CHEN Z, et al. Comparative studies on the physicochemical properties of peanut protein isolate-polysaccharide conjugates prepared by ultrasonic treatment or classical heating[J]. *Food Research International*, 2014, 57: 1 – 7.
- [16] BLOIS M S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical[J]. *Nature*, 1958, 181(4617): 1199 – 1200.
- [17] 迟云峰, 迟治平, 王喜刚, 等. 大豆蛋白-多酚在加工过程中功能特性及抗氧化性的研究[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(8): 122 – 128.
- CHI Yunfeng, CHI Zhiping, WANG Xigang, et al. Study on functional properties and antioxidant activity of soybean protein – polyphenols during processing[J]. *China Food Additives*, 2022, 33(8): 122 – 128. (in Chinese)
- [18] 臧艳妮, 赵妍嫣, 罗水忠, 等. 超声波和糖基化复合改性对小麦面筋蛋白性质和结构的影响[J]. *食品科学*, 2017, 38(5): 122 – 128.
- ZANG Yanni, ZHAO Yanyan, LUO Shuizhong, et al. Effect of ultrasonic treatment and glycosylation modification on characteristics and structure of wheat gluten[J]. *Food Science*, 2017, 38(5): 122 – 128. (in Chinese)
- [19] 汤婷. 脉冲电场协同金属离子影响蛋白质微观结构和功能特性的试验研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- TANG Ting. Experimental study on the effects of pulse electric field combined with metal ions on the microstructure and functional properties of protein[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018. (in Chinese)
- [20] MINGMING Z, YUFAN S, YUANDA S, et al. Soy lipophilic protein self-assembled by pH-shift combined with heat treatment: structure, hydrophobic resveratrol encapsulation, emulsification, and digestion[J]. *Food Chemistry*, 2022, 394: 133514.
- [21] HU H, WU J, LI-CHAN E C Y, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions[J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30(2): 647 – 655.
- [22] ARZENI C, MARTINEZ K, ZEMA P, et al. Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality[J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 108(3): 463 – 472.
- [23] BOBONE S, VAN DE WEERT M, STELLA L. A reassessment of synchronous fluorescence in the separation of Trp and Tyr contributions in protein emission and in the determination of conformational changes[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2014, 1077: 68 – 76.
- [24] JOYE I J, DAVIDOV-PARDO G, LUDESCHER R D, et al. Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: towards a more rational approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins[J]. *Food Chemistry*, 2015, 185: 261 – 267.
- [25] 刘勤勤, 朱科学, 郭晓娜, 等. 茶多酚与大豆分离蛋白的相互作用[J]. *食品科学*, 2015, 36(17): 43 – 47.
- LIU Qinjin, ZHU Kexue, GUO Xiaona, et al. Spectroscopic analysis of interaction between tea polyphenol and soy protein isolate[J]. *Food Science*, 2015, 36(17): 43 – 47. (in Chinese)
- [26] ZHANG Q A, FU X Z, GARCIA-MARTIN J F. Effect of ultrasound on the interaction between (–)-epicatechin gallate and bovine serum albumin in a model wine[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 37: 405 – 413.
- [27] CRANFILL P J, SELL B R, BAIRD M A, et al. Quantitative assessment of fluorescent proteins[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(7): 557 – 562.
- [28] ABOU-ZIED O K, AL-SHIHI O I K. Characterization of subdomain IIA binding site of human serum albumin in its native, unfolded, and refolded states using small molecular probes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(32): 10793 – 10801.
- [29] RAWAT R, SAINI C S. High-intensity ultrasound treatment: an effective way of modifying thermal and rheological properties of sunnhemp (*Crotalaria juncea*) protein isolate (SHPI) by varying ultrasound amplitude and time[J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2023, 46(4): e14290.
- [30] LIU F, SUN C, YANG W, et al. Structural characterization and functional evaluation of lactoferrin-polyphenol conjugates formed by free-radical graft copolymerization[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(20): 15641 – 15651.
- [31] BI H, TANG L, GAO X, et al. Spectroscopic analysis on the binding interaction between tetracycline hydrochloride and bovine proteins β -casein, α -lactalbumin[J]. *Journal of Luminescence*, 2016, 178: 72 – 83.
- [32] LIANG W, ZHANG Z, ZHU Q, et al. Molecular interactions between bovine serum albumin (BSA) and trihalophenol: insights from spectroscopic, calorimetric and molecular modeling studies[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, 287: 122054.

- [33] 林泽鉞, 白卫东, 刘巧瑜, 等. 微波-超声辅助乳清分离蛋白糖基化工艺优化[J]. 中国调味品, 2023, 48(10): 98–104,21.
LIN Zeqian, BAI Weidong, LIU Qiaoyu, et al. Optimization of microwave – ultrasound assisted glycosylation process of whey protein isolate[J]. China Condiment, 2023, 48(10): 98 – 104 ,21. (in Chinese)
- [34] 薛丽莹, 田泽鹏, 陈若桐, 等. pH 处理对 EGCG 与大豆蛋白相互作用的影响[J]. 食品科技, 2022, 47(7): 121 – 128.
XUE Liying, TIAN Zepeng, CHEN Ruotong, et al. Effect of pH treatment on the interaction between EGCG and soy protein [J]. Food Science and Technology, 2022, 47(7): 121 – 128. (in Chinese)
- [35] JANIN J, MILLER S, CHOTHIA C. Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins[J]. Journal of Molecular Biology, 1988, 204(1): 155 – 164.
- [36] 周麟依, 王辰, 王中江, 等. 空化微射流对米糠蛋白热聚集体结构及特性的影响[J]. 农业机械学报, 2020, 51(3): 341 – 349.
ZHOU Linyi, WANG Chen, WANG Zhongjiang, et al. Effect of cavitation microjet on structure and properties of rice bran protein thermal aggregates[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(3): 341 – 349. (in Chinese)
- [37] LINLIN H, JINWEI S, MENGQI P, et al. Impact of non-covalent bound polyphenols on conformational, functional properties and in vitro digestibility of pea protein[J]. Food Chemistry, 2022, 383: 132623.
- [38] 李亚丽, 许玉娟, 徐幸莲. 多酚对肌原纤维蛋白结构与功能特性的影响研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(19): 296 – 306.
LI Yali, XU Yujuan, XU Xinglian. Research progress on the effect of polyphenols on the structural and functional properties of myofibrillar protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(19): 296 – 306. (in Chinese)
- [39] SUBRAMANIAN R, SUBBRAMANIYAN P, RAJ V. Antioxidant activity of the stem bark of *Shorea roxburghii* and its silver reducing power[J]. SpringerPlus, 2013, 2(1): 1 – 11.

(上接第 331 页)

- [20] 牛智有,李晓金,高海龙. 高光谱成像技术快速检测生物质秸秆元素含量[J]. 农业工程学报, 2014, 30(22): 181 – 187.
NIU Zhiyou, LI Xiaojin, GAO Hailong. Rapid detection of element content in straw biomass using hyperspectral imaging technology[J]. Transactions of the CSAE, 2014, 30(22): 181 – 187. (in Chinese)
- [21] 石海波. 固定床生物质热解炭化系统设计与实验研究[D]. 天津:河北工业大学, 2013.
SHI Haibo. The design and test research on biomass pyrolysis carbonization in fixed-bed[D]. Tianjin: Hebei University of Technology, 2013. (in Chinese)
- [22] 肖陆飞,哈云,孟飞,等. 生物质气化技术研究与应用进展[J]. 现代化工, 2020, 40(12): 68 – 72, 76.
XIAO Lufei, HA Yun, MENG Fei, et al. Research and application progress on biomass gasification technologies[J]. Modern Chemical Industry, 2020, 40(12): 68 – 72, 76. (in Chinese)
- [23] 杨敏. 水稻秸秆生物质炭在稻田土壤中的稳定性及其机理研究[D]. 杭州:浙江大学, 2013.
YANG Min. Stability of rice straw-derived biochar and its mechanism in paddy soil [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013. (in Chinese)
- [24] 赵立欣,田利伟,贾吉秀,等. 移动式玉米秸秆热解炭化原位还田设备研究[J]. 农业机械学报, 2023, 54(1): 357 – 363.
ZHAO Lixin, TIAN Liwei, JIA Jixiu, et al. Mobile equipment study of corn stalk in-situ returning carbonization [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2023, 54(1): 357 – 363. (in Chinese)
- [25] 牛文娟,阮桢,钟菲,等. 保温时间与粒度对稻秆和棉秆热解产物组成及能量转化影响[J]. 农业工程学报, 2018, 34(22): 212 – 219.
NIU Wenjuan, RUAN Zhen, ZHONG Fei, et al. Effects of holding time and particle size on physicochemical properties and energy conversion of pyrolysis product component of rice straw and cotton stalk[J]. Transactions of the CSAE, 2018, 34(22): 212 – 219. (in Chinese)
- [26] 刘朝霞,刘鸣,牛文娟,等. 保温时间对不同秸秆生物炭肥料化利用理化特性的影响[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(4): 182 – 192.
LIU Zhaoxia, LIU Ming, NIU Wenjuan, et al. Effects of holding time on physical and chemical properties of utilizing different straw biochar fertilizer[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(4): 182 – 192. (in Chinese)
- [27] 姚锡文,周浩东,齐鹏远,等. 氮气和含氧气氛下玉米秸秆热解气化产气规律研究[J]. 农业机械学报, 2024, 55(5): 375 – 385.
YAO Xiwen, ZHOU Haodong, QI Pengyuan, et al. Gas production law during corn stalk pyrolysis and gasification under pure nitrogen and oxygen-containing atmospheres[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2024, 55(5): 375 – 385. (in Chinese)