doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2020.02.039

超声处理对大豆亲脂蛋白结构及溶解性的影响

李　杨　王迪琼　齐宝坤　钟明明　徐清清　谢凤英
(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 为探明超声处理对大豆亲脂蛋白(Lipophilic protein, LP)结构及溶解性的影响,将分离提取的 LP 在不同条件下进行超声处理,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、傅里叶变换红外光谱(FITR)、内源和外源荧光强度、差示扫描量热法(DSC)分析超声处理对 LP 结构及溶解性的影响。结果表明:SDS-PAGE 显示,超声处理并不能改变 LP 的分子量分布,但能改变亚基的含量;红外光谱及内源、外源荧光光谱显示,不同的超声处理条件对 LP 的二、三级结构均会产生不同程度的影响,随着超声强度的增加,α-螺旋先减少、后增加,β-折叠先增加、后减少,在 360 W 超声功率下处理 10 min 时内源、外源荧光强度最强;在 360 W 超声功率下处理 10 min 和 240 W 超声功率下处理 20 min 时对 LP 的热稳定性、溶解性的改善效果最佳,变性温度提高 6~7℃,溶解度提高约 20 个百分点,而超声功率过大时则会对 LP 的功能性质产生负面影响。通过试验得出最佳超声条件为:在 360 W 超声功率下处理 10 min,LP 理化性质最适合应用于食品工业。

关键词: 大豆亲脂蛋白; 超声; 结构; 溶解性
中图分类号: TS214.2　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-1298(2020)02-0357-06　　**OSID**:

Effect of Ultrasonic Treatment on Structure and Solubility of Soybean Lipophilic Protein

LI Yang　WANG Diqiong　QI Baokun　ZHONG Mingming　XU Qingqing　XIE Fengying
(*College of Food Science*, *Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030, *China*)

Abstract: Aiming to investigate the effects of ultrasonic treatment on the structure and solubility of soybean lipophilic protein (LP). The extracted LP was ultrasonically separated under different conditions, and the effect of ultrasonic treatment on the structure and solubility of LP was analyzed by using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), Fourier transform infrared spectroscopy (FITR), endogenous, exogenous fluorescence intensity and differential scanning calorimetry (DSC). The results showed that SDS-PAGE showed that the ultrasonic treatment could not change the molecular weight distribution of LP, but could change the content of subunits, infrared spectrum and endogenous and exogenous fluorescence spectra. It was showed that different ultrasonic treatment conditions had different effects on the second and third structures of LP. With the increase of ultrasonic intensity, α-helix was firstly decreased and then increased, β-fold was increased first and then decreased. The endogenous and exogenous fluorescence intensity was the strongest when treated at 360 W ultrasonic power for 10 min, and the thermal stability and solubility of LP were improved after treatment with 360 W ultrasonic power for 10 min and 240 W ultrasonic power for 20 min. The denaturation temperature was increased by 6~7℃, the solubility was increased by 20 percentage points, and it would have a negative impact on the functional properties of LP when the ultrasonic power was too large. Combined with the test results, it was concluded that the physicochemical properties of LP were most suitable for food applications after treatment at 360 W ultrasonic power for 10 min.

Key words: soybean lipophilic protein; ultrasound; structure; solubility

收稿日期: 2019-05-15　修回日期: 2019-05-30
基金项目: 中国博士后科学基金面上项目(2018M631902)
作者简介: 李杨(1981—),男,教授,博士,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: liyanghuangyu@163.com
通信作者: 谢凤英(1975—),女,讲师,博士,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: spxfy@163.com

0 引言

长期以来,大豆分离蛋白(Isolated soybean protein, SPI)被认为由两种储存蛋白组成,即大豆球蛋白(11S)和 β-伴大豆球蛋白(7S),且 SPI 的功能特性取决于这两种蛋白质之间的相互作用[1]。大豆储存蛋白组分中含有一种占 SPI 30% 左右的亲脂性蛋白质(Lipophilic protein, LP),有望作为天然乳化剂在食品工业中得到广泛应用[2]。因此,SPI 的其他功能特性应基于这 3 种蛋白质组分的性质重新考虑。文献[3]研究发现,SPI 较低的溶解度可以通过 LP 的存在来解释。现有文献对 11S 和 7S 的相关研究较多,对 LP 的相关研究较少。LP 的主要成分是油体蛋白-磷脂,它是油体的原始成分,且具有较强的亲油性[2],可作为乳化剂提高乳液的稳定性。由于 LP 水溶性差,降低了其乳化效果,因此提高 LP 溶解性对其应用至关重要。

文献[4]研究发现,将 LP 超声处理 5 min 可使其在磷酸缓冲液中均匀分散,但未详细论述不同超声条件对 LP 结构及溶解性的影响。目前,国内外对蛋白改性的方法主要有物理法、化学法和酶法等,超声波改性作为一种有效的物理改性手段被广泛使用。如文献[5]采用超声处理显著提高了花生分离蛋白的表面疏水性,进而改善其乳化性;文献[6]采用超声处理使大豆分离蛋白形成可溶性聚集体,进而提高其溶解度;文献[7]证明,采用超声处理可减小液滴尺寸,进而提高小麦蛋白和大豆分离蛋白的乳化性。故超声可作为提高 LP 溶解性及结构特性的手段,而目前超声条件处理对 LP 的影响研究尚属空白。

本文探究超声处理对 LP 的结构及溶解性的影响,在超声功率(120 ~ 480 W)和超声时间(10、20 min)处理条件下,研究超声对 LP 的物化作用,并确定最佳的超声条件,在保留 LP 必要结构特性的基础上,提高其溶解度及其他功能特性,以期为 LP 的进一步应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆,东北农业大学大豆研究所;氢氧化钠、氯化钠,天津市光复精细化工研究所;硫酸,北京新光化工试剂厂;磷酸二氢钠、磷酸氢二钠,天津市东丽区天大化学试剂厂;8-苯胺基-1-萘磺酸(8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, ANS),美国 Sigma 公司;其他试剂为分析纯。

1.2 仪器与设备

AL204 型分析天平,梅勒特-托利多仪器(上海)有限公司;CL-2 型恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司;6 L 落地式冻干机,上海汇分电子科技有限公司;LGR20-W 型台式高速冷冻离心机,北京京立离心机有限公司;Delta320 型 pH 计,梅特勒-托利多仪器公司;FJ200-SH 型数显高速分散均质机,上海标本模型厂;MAGNA-IR560 型傅里叶变换红外光谱仪,美国 NICOLET 公司;F-4500 型荧光分光光度计,日本 HITACHI 公司;Q1000 型差示扫描量热仪,美国 TA 仪器;UV-5100 型高性能紫外可见分光光度计,上海奥析科学仪器;Phomo 型酶标仪,郑州安图实验仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆亲脂蛋白提取

大豆 LP 组分的分离由文献[2]的方法经修改后使用。将大豆磨粉,过 60 目筛后使用正己烷进行脱脂,并在 70℃干热处理 2 h,此时氮溶解指数降至 75%,可有效防止 LP 与 11S 共沉淀。干热处理后的脱脂豆粉按料液比 8 g/mL 加入到蒸馏水中,用 NaOH 调节 pH 值至 8.0。在 20℃下搅拌 1 h 后 3 000 *g*离心 10 min。分离上清液并加入 10 mmol/L Na_2SO_3,然后用 H_2SO_4 调节 pH 值至 5.8,随后 3 000 *g* 离心 10 min 分离上清液,将上清液用 H_2SO_4 调节 pH 值至 5.0,并在 55℃下处理 15 min。然后加入 50 mmol/L NaCl 并用 NaOH 调节 pH 值至 5.5,3 000 *g* 离心 10 min,沉淀即为 LP 组分,冻干备用。

1.3.2 超声处理

将 4.8 g LP 溶解在 240 mL 的磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L, pH 值 7.0),在室温(20℃)下搅拌 2 h,制得质量浓度为 20 mg/mL 的大豆亲脂蛋白溶液,将超声处理器的钛探头(直径 0.636 cm)插入液面,进行超声处理,本试验选择在 20 Hz 下,超声功率为 0、120、240、360、480 W,超声时间为 10、20 min,样品编号见表 1,每超声处理 4 s,间隔 2 s。

表 1 不同超声处理样品编号

Tab.1 Numbers of samples under different ultrasonic treatments

参数	样品编号								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
超声波功率/W	0	120	240	360	480	120	240	360	480
超声时间/min	0	10	10	10	10	20	20	20	20

1.3.3 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

根据文献[8]的方法进行 SDS-PAGE 电泳试验。分别配置 12% 的分离胶与 5% 的浓缩胶,将

5% 的 2-巯基乙醇(2-ME)加入到样品缓冲液中。将样品和缓冲液的混合物在沸水中加热 5 min,用于电泳运行的缓冲液是 0.025 mol/L Tris - HCl, 0.192 mol/L甘氨酸和 0.1% SDS,上样量为 10 μL,之后凝胶采用 0.1% 考马斯亮蓝(R - 250)染色液(含 45% 甲醇和 10% 冰乙酸)染色 30 min,并用脱色溶液洗涤脱色后分析。

1.3.4　傅里叶红外光谱(FITR)

将超声处理后的大豆分离蛋白溶液进行冻干,冻干后的样品置于干燥器中用 P_2O_5 充分干燥,取样品 1.5 mg,与 200 mg 溴化钾研磨混匀后压片进行红外光谱测定。在试验过程中,为了减少蒸汽的干扰,用干燥的 N_2 持续注入测量室。测定时波数范围为 4000 ~ 400 cm^{-1},扫描次数为 64 次,分辨率 4 cm^{-1},得到的红外吸收曲线采用 Peak fitting 软件和高斯曲线拟合,分析大豆亲脂蛋白不同超声功率下二级结构含量的变化[9]。

1.3.5　内源荧光光谱

将 20 mg/mL 大豆蛋白溶液用 pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲溶液稀释到 0.1 mg/mL,取一份稀释液 3 mL 置于石英比色皿中扫描荧光图谱。扫描条件为:记录发射波长 200 ~ 500 nm,激发波长设置为 290 nm,增长间隔为 10 nm。

1.3.6　外源荧光强度

参照文献[10]的方法稍作修改,采用 ANS 作为荧光探针测定蛋白质的外源荧光强度。分别称取 0.025 g 不同品种蛋白样品溶于 50 mL 磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L,pH 值 7.0)中,在室温条件下搅拌 1.0 h 后离心(10 000 *g*,30 min),取上清液用聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)法测定蛋白质量浓度,并用磷酸盐缓冲液(0.01 mol/L,pH 值7.0)依次稀释蛋白,使其质量浓度在 0.005 ~ 0.1 mg/mL 之间,将所得梯度的上清液溶液与 8.0 mmol/L ANS 以体积比 100∶1混合,静置 3 min 后测其荧光强度。激发波长 390 nm,发射波长 4 970 nm,夹缝为 5 nm。以荧光强度对蛋白质质量浓度制图,初始段斜率即为蛋白质分子的外源荧光强度。

1.3.7　差示扫描量热法(DSC)

参照文献[11]的方法,用铝制坩埚称取 3.0 mg(干基)样品,按料液比 6 mL/g 加入去离子水,压盖密封后,置于室温平衡后测定,差示扫描量热法(DSC)测量使用 Q1000 型差示扫描量热计以 10℃/min 的扫描速率在 30 ~ 140℃ 范围内进行。使用热分析系统(TA - 60WS)软件测定变性峰的温度。

1.3.8　溶解性

参照文献[12]的方法稍作修改测定大豆分离蛋白溶解性,用质量浓度约为 10 mg/mL 的蛋白质溶液(pH 值 8.0),搅拌 1 h 使样品溶解,静置 2 min 后,将上清液倒入离心管中离心 15 min(10 000 *g*)。取上清液 2 μL 稀释 10 倍,采用 BCA 法测定蛋白质质量浓度。以牛清蛋白为标准物,蛋白质溶解度为上清液中蛋白的质量浓度占样品中总的蛋白质量浓度的百分比。

1.4　**数据处理**

本试验数据均为 3 个平行样的平均值,结果采用 SPSS 22.0 分析软件和 Origin 8.0 软件进行处理,采用 ANOVA 对数据进行差异显著性分析($P < 0.05$)。

2　结果和讨论

2.1　SDS - PAGE 凝胶电泳分析

不同超声条件下 LP 的 SDS - PAGE 图谱显示如图 1(图中 M 表示标准牛血清蛋白)所示,LP 中包含 7S 和 11S 的亚基以及脂氧合酶、膜蛋白,34 ku 蛋白存在于蛋白质的储存液泡中,24、18、17 ku 为来自油体蛋白[2-3,13],LP 中脂类质量分数为(7.48 ± 0.049)%,较 11S(2.36 ± 0.026)% 与 7S(1.45 ± 0.047)% 高很多[3],其脂质组分经薄层色谱分析显示主要为磷脂,如磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱和磷脂酰肌醇[2],而由于含有较高含量磷脂,因此膜蛋白对考马斯亮蓝具有较低的染色敏感性[3],其电泳图上条带强度较 7S、11S 的亚基弱。而本研究旨在探明超声处理对 LP 结构特性的影响,如图 1 所示,与未超声处理的 LP 相比,超声处理后的 LP 亚基含量出现不同程度的改变,当超声时间为 10 min,超声功率在 120 ~ 360 W 时,分子质量 48 ku 以上的亚基含量都明显降低,这是因为超声产生的空化效应破坏了大亚基结构;当超声功率增加到 480 W 时,亚基含量整体降低,48 ku 以上亚基条带几乎消失,这说明高强度超声功率会引发 LP 亚基结构破碎和解离。结果表明,适当条件的超声处理可有效保留 LP 亚基结构,并在此基础上改善 LP 的物化性质。图谱显示超声后亚基种类并没有太大变化,表明超声

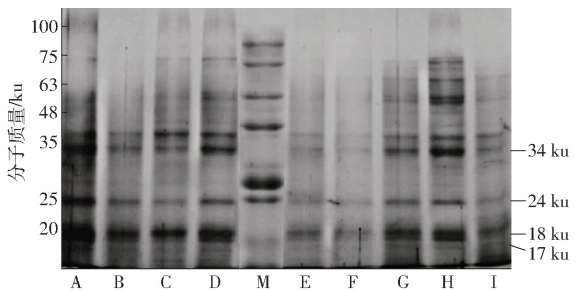

图 1　不同超声处理下 LP 的 SDS - PAGE 图谱

Fig. 1　SDS - PAGE of LP under different ultrasonic treatments

处理不会对 LP 的一级结构产生太大影响,与文献[14 -15]研究结果一致。

2.2 FITR 分析

超声处理后,LP 的 FITR 光谱图如图 2 所示,波数从 1 640 cm^{-1}到 1 650 cm^{-1}变化时透光率增加,超声处理的空化效应会导致 β-转角的展开,而无规则卷曲增加,使用傅里叶自反卷积(FSD)拟合和二阶导数分析来实现最大频带变窄,降低信噪比并鉴定 LP 中存在的不同类型二级结构,之后采用杨氏方程计算 LP 的二级结构,结果如表 2 所示,超声处理 10 min 时,随超声功率的增加 α-螺旋减少,β-折叠先增加后减少,无规则卷曲增加,与超声处理牛血清蛋白和乳清蛋白的结果一致[16-17],而超声处理 20 min 时,随超声功率的增加 α-螺旋先增加后减少,β-折叠先增加后减少,再略有增加。此结果可能是由于超声处理的空化效应使气泡振荡并破裂,从而产生坍塌压力、湍流和剪切应力,影响了氨基酸的局部序列以及分子之间的相互作用并使 β-转角展开,无规则卷曲减少[18]。

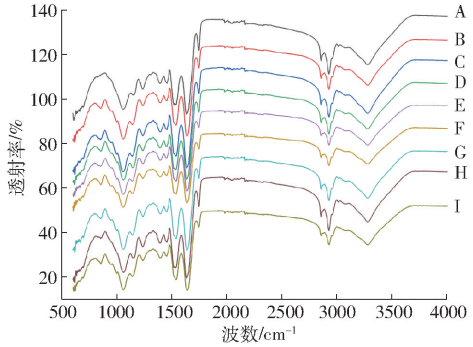

图 2 不同超声处理条件下 LP 的 FITR 光谱图

Fig. 2 FITR spectra of LP under different ultrasonic treatment conditions

表 2 不同超声处理下 LP 的二级结构相对含量

Tab. 2 Secondary structure content of LP under different ultrasonic treatments %

样品编号	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规则卷曲
A	(28.5 ±0.91)^{a}	(40.2 ±0.50)^{e}	(19.2 ±0.8)^{e}	(2.4 ±0.4)^{f}
B	(28.0 ±0.70)^{a}	(53.2 ±0.40)^{b}	(18.7 ±0.3)^{f}	(5.9 ±0.9)^{d}
C	(27.6 ±1.50)^{b}	(54.6 ±0.90)^{a}	(17.7 ±0.5)^{g}	(5.9 ±1.2)^{d}
D	(27.4 ±1.10)^{b}	(53.8 ±0.80)^{b}	(17.5 ±0.9)^{g}	(8.5 ±1.3)^{c}
E	(19.1 ±0.40)^{f}	(45.7 ±0.40)^{d}	(21.7 ±1.0)^{d}	(9.8 ±0.8)^{a}
F	(22.2 ±0.70)^{e}	(53.9 ±1.10)^{b}	(25.0 ±0.9)^{c}	(8.9 ±1.2)^{b}
G	(27.1 ±0.20)^{c}	(54.4 ±0.40)^{a}	(27.5 ±1.1)^{b}	(2.3 ±0.8)^{g}
H	(23.0 ±1.20)^{d}	(52.4 ±0.50)^{c}	(28.3 ±0.7)^{a}	(2.2 ±1.0)^{h}
I	(23.0 ±1.00)^{d}	(52.8 ±0.90)^{c}	(28.9 ±0.6)^{a}	(3.6 ±1.1)^{e}

注:同列不同字母表示有显著性差异($P<0.05$)。

2.3 内源荧光光谱分析

大豆蛋白所表现出的内源荧光强度主要是因其含有色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)[19],激发波长为 280 nm,主要依靠 Trp 和 Tyr 发射荧光[20],Trp 荧光强度较强是由于 Tyr 与 Trp 之间发生了能量转移,而荧光的变化可反映色氨酸微环境的变化[21],因此色氨酸的荧光峰可近似看作大豆蛋白的荧光峰,从而反映大豆蛋白的三级结构。由图 3 可知,超声处理后,LP 的内源荧光强度均发生不同程度的增加,在超声处理时间为 10 min 时,内源荧光强度随着超声功率的增加先增大后减小,并且最大波长(λ_{max})发生不同程度的红移,可能由于超声处理期间,LP 分子通过水解解折叠,破坏其疏水作用[22],Trp 的微环境由疏水变为亲水,一般情况下荧光波长会随着溶剂极性的增大而红移,内源荧光强度也会有所增加,因为在极性溶剂中$\pi\rightarrow\pi^{*}$跃迁所需的能差减小,跃迁概率增加。而超声强度过大时会导致暴露于溶剂的生色团数量增加,从而导致内源荧光强度降低。

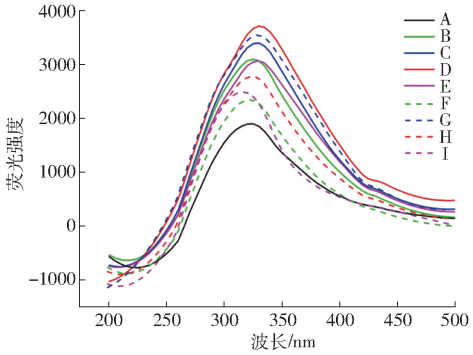

图 3 不同超声处理下 LP 的内源荧光光谱

Fig. 3 Endogenous fluorescence spectra of LP under different ultrasonic treatments

2.4 外源荧光强度分析

外源荧光强度反映蛋白质分子表面上存在的疏水基团数量,文献[19]研究认为疏水相互作用对蛋白质构象、功能和稳定性有重要影响。如图 4(图中不同小写字母表示差异显著)所示,超声 10 min、功率为 360 W 以及超声 20 min、功率为 240 W 时外源荧光强度较强,并且功率较低时呈现递增趋势。超

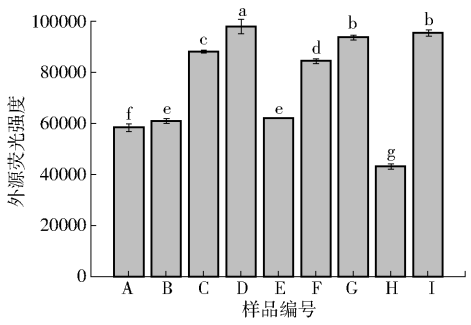

图 4　不同超声处理下 LP 的外源荧光强度

Fig. 4　Exogenous fluorescence intensity of LP under different ultrasonic treatments

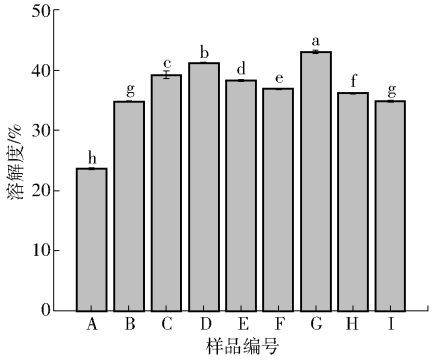

图 5　不同超声处理下 LP 的溶解性

Fig. 5　Solubility of LP under different ultrasonic treatments

声波处理会破坏蛋白质的非共价键引起蛋白质分子一定程度的展开,以及最初在蛋白质分子内的疏水基团暴露于外部环境,因此增加了疏水基团的数量[23],而超声强度较大时,外源荧光强度下降,超声强度极强时可能导致 LP 聚集,疏水区封闭[24],而持续增加超声功率及时间,可能由于超声波诱导蛋白质彻底变性,疏水残基暴露,疏水性增加。本研究中,由图 4、5 可看出,蛋白质的外源荧光强度越大溶解度越大,文献[23 - 24]也得出此结果。

2.5　差示扫描量热法

DSC 的峰值温度 T_2 反映蛋白质结构的稳定性,焓变 ΔH 是引起蛋白质变性所需的能量,较高的焓值表示更有序稳定的蛋白质结构[25],通过检测不同超声条件下 LP 热变性温度及其焓变,分析 LP 的热稳定性,超声处理后,LP 的 T_2 有所升高,360 W 和 240 W时的 T_2 最高,提高了 6 ~ 7℃,如表 3 所示。文献[26 - 29]认为,由于超声处理时产生的剪切力,导致分子间二硫化物和非共价键被破坏,并且游离巯基失活,有效减少了超声过程中蛋白质的再聚集,当超声功率过大时,LP 的变性温度下降,可以推测此时蛋白质分子结构被大量破坏。而 LP 经超声处理后,焓值明显下降,这可能与 LP 分子的展开有关,之后焓值随超声功率的增加而增加,可能与分子间疏水键部分重组有关[30]。因此,适度超声可以提高 LP 的变性温度,并且提高其结构稳定性。

表 3　不同超声处理下 LP 的 DSC

Tab. 3　DSC of LP under different ultrasonic treatments

参数	样品编号								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
T_2/℃	109.45	111.70	111.79	115.13	105.36	113.14	115.17	115.32	114.02
ΔH/(J·g^{-1})	1.565	1.150	1.335	1.475	1.148	1.335	1.383	1.447	1.513

2.6　溶解性

溶解性会促成或影响大多数蛋白质所表现出的功能性质,而 LP 由于含大量磷脂,相比 7S、11S,其溶解性较差,图 5(图中不同小写字母表示差异显著)显示,超声处理后,LP 的溶解性得到了显著改善,样品 D 和 G 的溶解性最好,溶解度为 41.1% 和 43.0%,提高了 20 个百分点左右。在超声处理过程中发生的空化效应会产生大量的空化气泡,这会增加周围塌陷气泡区域的局部温度和压力[31],导致蛋白质的去折叠,构象改变,进而使其内部亲水性氨基酸残基暴露[32],并且由于超声处理期间促使蛋白中的不溶性沉淀物形成可溶性聚集体[33],因此溶解性得到显著提升。而与肽键的水解关系不大,因为超声处理后 LP 的 SDS - PAGE 图谱并无太大变化,此结果与文献[23]的研究一致,由图中样品 E、F、H 可知,持续增加超声功率及时间会导致再次溶解性降低,可能是由于不溶性聚集体的形成[34]。溶解性会影响大多数蛋白质的功能性质,因此有必要确定最佳的超声功率及时间,为改善 LP 的理化性质及功能性质提供最佳的预处理条件。经试验确定最佳超声条件为:在 360 W 超声功率下处理 10 min。

3　结束语

超声处理对 LP 的结构及溶解性具有相当大的影响,超声处理后在电泳图中分子量未发现明显变化,亚基含量有所改变,经红外、荧光光谱分析后发现,其二级、三级结构发生明显变化。超声处理后 LP 分子间的非共价键减少,分子解折叠,减少了蛋白质分子的再聚集,提高了其变性温度及结构稳定性,而结构的改变导致功能性质改变。本研究中,超声功率为 360 W 时处理 10 min 和超声功率为 240 W

时处理 20 min,对 LP 的溶解性及疏水作用的改善效果最佳,而继续增加超声功率及超声时间,则会对 LP 的性能产生负面影响。这是由于过剩的能量导致蛋白质过度解折叠,大量疏水残基暴露,重新形成了不溶性聚集体。经试验确定最佳超声条件为:在 360 W 超声功率下处理 10 min。

参 考 文 献

[1] MATSUMURA Y, SIRISON J, ISHI T, et al. Soybean lipophilic proteins—origin and functional properties as affected by interaction with storage proteins [J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2017, 28: 120 - 128.

[2] SAMOTO M, MAEBUCHI M, MIYAZAKI C, et al. Abundant proteins associated with lecithin in soy protein isolate [J]. Food Chemistry, 2007, 102(1): 317 - 322.

[3] GAO Z M, WANG J M, WU N N, et al. Formation of complex interface and stability of oil-in-water (O/W) emulsion prepared by soy lipophilic protein nanoparticles [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2013, 61(32): 7838 - 7847.

[4] SIRISON J, MATSUMIYA K, SAMOTO M, et al. Solubility of soy lipophilic proteins: comparison with other soy protein fractions [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2017, 81(4): 790 - 802.

[5] ZHANG Q T, TU Z C, XIAO H, et al. Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate [J]. Food and Bioproducts Processing, 2014, 92(1): 30 - 37.

[6] HU H, WU J H, 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.

[7] O'SULLIVAN J, PARK M, BEEVERS J. The effect of ultrasound upon the physicochemical and emulsifying properties of wheat and soy protein isolates [J]. Journal of Cereal Science, 2016, 69: 77 - 84.

[8] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227(5259): 680 - 685.

[9] SUREWICZ W K, MANTSCH H H. New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Protein Structure and Molecular Enzymology, 1988, 952: 115 - 130.

[10] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Protein Structure, 1980, 624(1): 13 - 20.

[11] YU S F, ZHANG Y C, GE Y, et al. Effects of ultrasound processing on the thermal and retrogradation properties of nonwaxy rice starch [J]. Journal of Food Process Engineering, 2013, 36(6): 793 - 802.

[12] SMITH P K, KROHN R I, HERMANSON G T, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid [J]. Analytical Biochemistry, 1985, 150(1): 76 - 85.

[13] CHEN Y M, ONO T. Simple extraction method of non-allergenic intact soybean oil bodies that are thermally stable in an aqueous medium [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2010, 58(12): 7402 - 7407.

[14] CHEN L, CHEN J S, REN J Y, et al. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates [J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 2011, 59(6): 2600 - 2609.

[15] ZHAO G L, LIU Y, ZHAO M M, et al. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate [J]. Food Chemistry, 2011, 127(4): 1438 - 1443.

[16] CHANDRAPALA J, ZISU B, PALMER M, et al. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18(5): 951 - 957.

[17] GULSEREN L, GUZEY D, BRUCE B D, et al. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2007, 14(2): 173 - 183.

[18] KHATKAR A B, KAUR A, KHATKAR S K, et al. Characterization of heat-stable whey protein: impact of ultrasound on rheological, thermal, structural and morphological properties [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2018, 49: 333 - 342.

[19] LI J F, LI Y T, GUO S T. The binding mechanism of lecithin to soybean 11S and 7S globulins using fluorescence spectroscopy [J]. Food Science Biotechnology, 2014, 23(6): 1785 - 1791.

[20] LI C R, FU X P, QI X, et al. Protein association and dissociation regulated by ferric ion: a novel pathway for oxidative deposition of iron in pea seed ferritin [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(25): 16743 - 16751.

[21] 丁俭, 齐宝坤, 姜楠, 等. 超声处理大豆分离蛋白-壳聚糖复合物结构性质研究 [J/OL]. 农业机械学报, 2017, 48(9): 352 - 358.
DING Jian, QI Baokun, JIANG Nan, et al. Structural properties of soybean protein isolate-chitosan complex treated by ultrasonic [J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(9): 352 - 358. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? file_no=20170945&flag=1. DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2017.09.045. (in Chinese)

[22] SUBHEDAR P B, GOGATE P R. Enhancing the activity of cellulase enzyme using ultrasonic irradiations [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2014, 101: 108 - 114.

(下转第 373 页)