微波致米蛋白的自由基生成及氧化特性研究

胡博[1]，范大明[1]，乌斯嘎勒[1]，连惠章[2]，张灏[1]，陈卫[1]
（1.江南大学食品学院，食品科学与技术国家重点实验室,江苏无锡 214122）
（2.无锡华顺民生食品有限公司，江苏无锡 214218）

摘要：本文研究了大米蛋白在微波场中自由基生成及氧化特性之间的关系。以电子自旋共振（ESR）为检测手段，对微波处理大米蛋白产生的自由基进行研究，验证了大米蛋白在微波处理后产生以碳为中心的自由基。对比实验结果可知，自由基不仅在微波加热后产生，原样本身也存在少量自由基。在微波场中，自由基信号随着水分活度的降低和微波功率的增加而逐渐增大。随处理时间延长，自由基信号强度增加，且增长速率递增。通过测定羰基、巯基、游离氨基及表面疏水性等蛋白氧化指标发现，微波处理过程中蛋白受热分解，内部疏水侧链暴露且部分肽链断裂，结合微波加热过程自由基的生成情况，可推测微波加热至 80 ℃以上，以 C 为中心自由基的增长速率显著上升，且与氧化特性变化结果相符。

关键词：微波；大米蛋白；自由基；电子自旋共振；氧化

文章篇号：1673-9078(2015)4-151-156 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.024

The Radical Production and Oxidative Properties of Rice Protein under Microwave Radiatio

HU Bo[1], FAN Da-ming[1], Wusgal[1], LIAN Hui-zhang[2], ZHANG Hao[1], CHEN Wei[1]
(1.State Key Laboratory of Food Science and Technology, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China) (2.Wuxi Huashun Minsheng Food Co. Ltd., Wuxi 214218, China)

Abstract: The relationship between radical production and oxidative properties of rice protein under microwave irradiation was investigated. Electron spin resonance (ESR) studies proved that the radicals produced in the microwaved rice protein samples were carbon-centered. Comparative studies revealed that radicals were not only produced in thermally treated materials, but also in small quantities in native samples of rice protein. Under microwave irradiation, the ESR signals for radicals gradually increased with the reduction of water activity as well as with the increase of microwave power. With the increase of irradiation time, the intensities increased, and the rate of increase of intensities of radical signals also increased. By measuring the surface hydrophobicity and the contents of carbonyl, sulfhydryl, and free amino groups, it was found that the internal hydrophobic side-chains of the protein were exposed and some of the peptide bonds were broken. Combined with the production of radicals during microwave irradiation, it was proposed that when microwaved to over 80 ℃, the increase rate of production of carbon-centered radicals would be significantly higher, and was consistent with oxidation characteristics.

Key words: microwave; rice protein; radical; electron spin resonance; oxidation;

微波作为一种新型的加热技术，由于其简便快速的特点广泛用于食品的干燥[1]、焙烤[2]、杀菌[3]及灭酶[4]等。而蛋白质作为大部分加工食品的主要成分之一，同样也是微波食品领域的主要研究对象，是许多学术研究和应用研究关注的重点。目前，针对微波加热过程中食品蛋白体系产生自由基的研究甚少，因此，开展微波蛋白质物料的自由基生成研究有助于我们分析蛋白质物料经微波处理后的变化，从蛋白氧化角度理解蛋白质在微波场中结构变化的机制。

自由基(free radicals，FRs)化学反应性极强，极不稳定，半衰期短，其化学反应性的特点是连锁反应，一经启动即可连续发生[5]。由于 FRs 具有活泼的化学反应特性，因而在生物体内具有重要的生理及病理功能和重要的生物学意义[6]。蛋白质自由基可由蛋白质残基如酪氨酸、色氨酸、半胱氨酸和甘氨酸等在几种酶的催化作用下产生。自由基攻击将引起蛋白质氧化进而导致蛋白质结构的破坏[7]。李艳青等[8]研究表明，羟基自由基攻击会引起肌原纤维蛋白质氧化，其羰基

收稿日期：2014-08-19
基金项目："十二五"国家科技支撑计划（2014BAD04B03）；无锡市科技创新与产业升级引导资金项目（0302-B010504-130003-PB）
作者简介：胡博（1991-），女，研究生，研究方向：食品加工及生物技术
通讯作者：范大明（1983-），男，博士，校聘副教授，研究方向：食品加工及生物技术

含量增加，总巯基含量减少，表面疏水性也呈增加趋势。Byaruhanga 等[9]采用 FTIR 对微波加热的高粱醇溶蛋白的结构进行研究时发现微波加热后高粱醇溶蛋白二级结构中 β-折叠结构含量增加。因而解读微波处理对蛋白产生自由基的作用及其氧化特性对微波食品的安全性研究具有一定意义。

目前在微波处理蛋白的化学结构变化和自由基反应的研究在食品领域鲜有报道，对微波产生自由基的现象和机理还不明确。但 Thostenson 等[10]提出微波通过电磁场能引起物料内部分子间发生摩擦，物料原子间的摩擦引起分子间共价键或非共价键的断裂，所以可推测微波热解蛋白分子链的断裂将导致自由基的生成，或蛋白自由基的产生会进一步促进分子化学键的断裂。本研究主要探究在民用微波频率（2450 kHz）下，不同水分活度（尤其是低水活度）大米蛋白自由基的生成规律及其氧化特性。通过电子自旋共振仪检测自由基的种类和信号强度，结合蛋白氧化指标的测定，浅析微波致米蛋白自由基生成及氧化特性间的关系。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

大米蛋白：江西金农生物科技有限公司。

氯化镁（$MgCl_2$），碳酸钾（K_2CO_3），氯化钠（NaCl），氯化钾（KCl），5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸 DTNB），乙二胺四乙酸（EDTA），十二烷基硫酸钠（SDS），十二水合磷酸氢二钠（$Na_2HPO_4\cdot12H_2O$），二水合磷酸二氢钠（$NaH_2PO_4\cdot2H_2O$），2，4-二硝基苯肼(DNPH)，盐酸(HCl)，三氯乙酸(TCA)，乙酸乙酯（$C_4H_8O_2$），无水乙醇（C_2H_6O），盐酸胍（$CH_5N_3\cdot HCl$），甘氨酸（$C_2H_5NO_2$），皆购于国药集团；1-苯胺基-8 萘基磺酸盐(ANS)，2,4,6-三硝基苯磺酸（TNBS），购于美国 Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

MultiSYNTH 微波单模多模合成仪，意大利 milestone 公司；EMX-8/2.7 型电子自旋共振仪，德国 Bruker 公司；FA-st lab 水分活度仪，法国 GBX 公司；光纤温度探针、温度测定系统，加拿大 Fiso 公司；FLUORMAX-4 荧光光谱仪，美国 HORIBA 公司；Multiskan GO 全波酶标仪，美国 Thermo Scientific 公司；水浴锅，南京先欧仪器制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大米蛋白水分调节

将 $MgCl_2$、K_2CO_3、NaCl、KCl 的饱和盐溶液分别置于 4 个玻璃干燥器中（干燥器底部应有过量的盐晶体存在），称取 2 g 蛋白质 16 份分别置于 4 个盛有饱和溶液的玻璃干燥器中平衡 2 周，在 25 ℃下保存，平衡得到的蛋白水分活度采用水分活度仪 GBX FA-st lab 测定。每隔 1 d 测定一次，直至蛋白样品达到恒定的水分活度。

1.3.2 大米蛋白的微波加热方法

称取 1.0 g±0.005 g 经过水分活度调节的大米蛋白于内径 1.2 cm 的石英试管内，试管套于不产生电磁吸收的聚酯套管内，置于 milestone 公司的 MultiSYNTH 微波合成仪腔体样品池内，进行微波单模处理，微波频率 2450 kHz，最大功率 400 W/g。设定温度，加热时间，微波功率。系统可通过红外温度探头实时探测试管温度。微波合成仪通过调节样品池的振动频率来保证样品接受辐射的均匀性和温度分布的均衡，消除辐射不均匀带来的误差，设置振动频率 60%。处理完成后立即进行顺磁共振检测及相关氧化指标的测定，每组样品平行测定 3 次。

1.3.3 大米蛋白的传导加热方法

称取 1.0 g±0.005 g 经过水分活度调节的大米蛋白于内径 1.2 cm 的石英试管内，用试管塞封口，置于沸水浴中进行水浴加热处理。加热至指定温度后，分别取不同位置的 3 个试管作为平行样品，测定其相应的氧化指标。

1.3.4 自由基的顺磁共振测定

准确称取 60.0 mg±0.5 mg 微波处理前后的大米蛋白样品于内径 3 mm 的样品核磁管内，样品管置于谐振腔。仪器的微波频率为 9.85 Hz，调试频率为 100 kHz。图谱在室温 20 ℃下测定，中心磁场（Center Field）=350 mT，扫场宽度（Sweep Width）=10 mT，调制幅度（Modulate Amplitude）=0.6 T，微波功率设定为 20 mW。g 值采用比较法测定，将一个已知 g 值的标准样品(Bruker 公司的 mark，g=1.9800)和待测样品分别置于双样品谐振腔的前后腔中，分别记录两样品的谱图。由于两样品在同一微波频率 ν 下产生共振，则由共振条件式得：

$$h\nu = g_s\beta H_s = g_x\beta H_x$$

得：$g_x = g_s H_s / H_x$

式中：下标 s、x 分别表示标准样品和未知样品，H_s 和 H_x 可用核磁共振高斯计测得，则 g_x 可由上式求得。

1.3.5 大米蛋白浓度的测定

采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。

1.3.6 游离氨基含量的测定

参考 Lertittikul 等[11]的方法，利用 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)测定。取 0.5 mL 蛋白的液样与 25 μL 0.03 M TNBS 溶液振荡混匀，在 50 ℃避光条件下水浴中放置 1 h。随后加入 0.5 mL 的 0.24 M 盐酸溶液终止反应，反应液在 335 nm 处测定吸光度。自由氨基含量根据甘氨酸含量的标准曲线来确定。

1.3.7 羰基含量的测定

参考 Levine 等[12]的方法，即 DNPH 比色法。取 0.4 mL 的氧化的蛋白液放入 EP 管中，每管中加入 0.4 mL 含浓度 10 mmol/L 2,4-二硝基苯肼(DNPH)的 2 mol/L 的 HCL，30 ℃下避光水浴 l h(每隔 10 min 旋涡 1 次)，然后加入 0.5 mL 质量分数 40%的三氯乙酸(TCA)，静置 15 min，然后在 11000 r/min 离心 15 min，弃清液，用 l mL 乙酸乙酯:乙醇(*V*/*V*=l:1)洗涤沉淀，洗 3 次，在 10000 r/min 下离心 5 min 以去除未反应的试剂，加 1 mL 盐酸胍溶液(6 mol/L)，在 37 ℃下溶解沉淀 20 min(每隔 5 min 旋涡 1 次)，最后取上清液在 367 nm 处测吸光值。对照组开始时用 0.4 mL 不含 DNPH 的 2 mol/L 的 HCL，其余操作相同。离心和弃上清液前均要静止 10 min。计算羰基的分子吸光系数 22000 M^{-1}/cm。

羰基摩尔浓度计算公式为：

$C_0=A/\varepsilon\times D/C$

式中：C_0：羰基的摩尔浓度，mol/g；A：367 nm 处的吸光度；ε：消光系数，22000 M^{-1}/cm；D：稀释倍数；C：蛋白质浓度，mg/mL。

1.3.8 巯基含量的测定

根据 Hoshi 和 Yamauchi 等[13]的方法测定巯基，即 Ellman 试剂法。将 0.4 mL 氧化后的蛋白质液样加入 0.02 mL DTNB（5,5'-二硫代双）（39.6 mg DTNB 溶于 10 mL 0.1 M pH 8 磷酸盐缓冲液），再加入 0.8 mL 0.1 M 含有 1 mM EDTA 和 1% SDS 的 pH8 磷酸盐缓冲液，然后将混合液在 25 ℃保温 1 h，在 412 nm 下测定吸光度。巯基的分子吸光系数 13600 M^{-1}/cm。

巯基摩尔浓度计算公式为：

$C_0=A/\varepsilon\times D/C$

式中：C_0：羰基的摩尔浓度，mol/g；A：412 nm 处的吸光度；ε：消光系数，13600 M^{-1}/cm；D：稀释倍数；C：蛋白质浓度，mg/mL。

1.3.9 表面疏水性的荧光强度测定

根据 Kato 等[14]的方法，采用 1-苯胺基-8 萘基磺酸(ANS)荧光探针，取 4 mL 不同稀释浓度的氧化的蛋白液(最终使蛋白质浓度在 0~0.5 mg/mL 范围内)，在暗处加入 50 μL 0.8 mM ANS 后混合均匀，然后用荧光光谱仪测定其荧光强度。测定条件为：激发波长 365 nm，发射波长 484 nm，狭缝 5 nm。以荧光强度对蛋白质浓度作图，曲线初始阶段的斜率即为蛋白质分子的表面疏水性指数。

1.3.10 数据分析

绘图采用 Excel 2013 软件；数据用平均值±标准偏差表示。

2 结果与讨论

2.1 微波加热大米蛋白自由基的种类

为了鉴别微波处理后产生的大米蛋白自由基类型以及产生信号的相对强度，对不同水分活度大米蛋白微波处理前后的样品进行了 EPR 检测。图 1 中我们发现，未经微波处理的大米蛋白，其自由基信号弱但有着较明显的信号峰，可推测蛋白质本身含有一定量的自由基，Maria 等人[15]研究加热前后米粉自由基信号强度的结果显示，米粉本身也存在较弱的自由基信号，这与本实验研究结果相符。而微波处理后自由基信号显著增强，且观察微波处理前后的自由基 EPR 谱线，其峰形基本一致，表明自由基种类未发生变化。而通过比较法与顺磁共振仪中所带的标准样品 mark 的 g 值计算得到的样品自由基信号 g 值均在 2.0041~2.0054 范围内，是典型的碳自由基的 g 值[16~17]。因此可以判定本研究中大米蛋白产生的自由基是以 C 为中心的自由基。

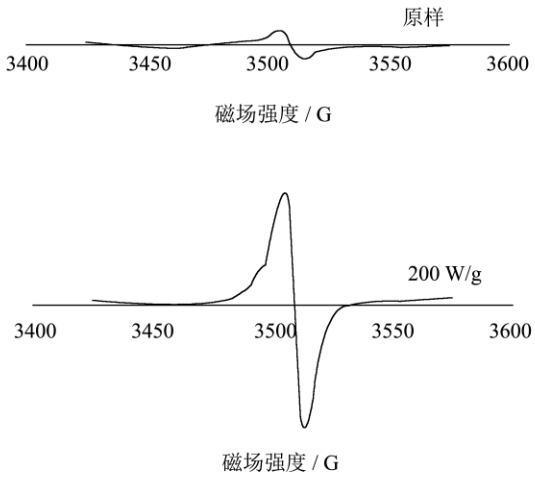


图 1 Aw=0.42 大米蛋白在 200 W/g 处理 3 min 前后的 EPR 谱线

Fig.1 EPR spectrum (Aw = 0.42) of rice protein before and after 3 min of microwave treatment at 200 W/g

2.2 微波加热大米蛋白自由基的生成规律

实验设定微波功率为 40 W/g~240 W/g，将水分活度为 0.42~0.78 的大米蛋白置于不同功率的微波场中

处理 3 min 后利用顺磁共振波谱仪对自由基进行检测，得到大米蛋白不同微波功率处理后的自由基信号增长曲线。

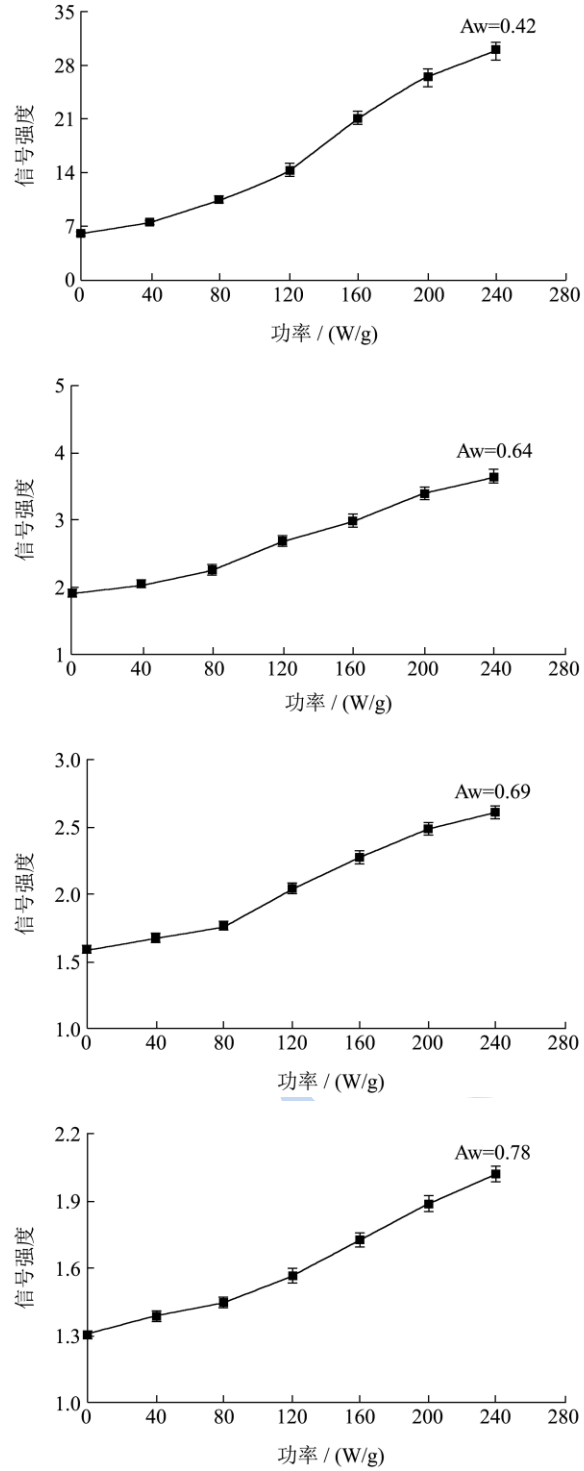


图 2 微波功率 40 W/g~240 W/g 下加热 3 min 的自由基增长曲线

Fig.2 The growth curve of rice protein radicals under microwave irradiation of 40~240 W/g for 3 min

将得到的自由基 EPR 信号图谱峰高值进行计算，做出自由基信号强度与微波功率的关系图（图 2）。由结果可知，微波处理功率越大，自由基信号强度越大。然而在微波功率大于 160 W/g 时，观察到微波后大米蛋白样品颜色发生明显变化，部分样品颜色转为褐色，蛋白可能已发生降解，并且随着功率增大测定得到的自由基信号强度绝对误差也增大；而当微波功率小于 80 W/g 时，微波后的蛋白质自由基信号强度小，不易检测，信噪比较大。分析原因，可能是由于样品体系中的水分对自由基具有较强的猝灭作用，或者是样品体系还未将电磁能转化为足以引发自由基反应的热能和化学能。

为了获得在不同处理时间下，大米蛋白在微波场中产生自由基的响应情况，选取 80 W/g 和 160 W/g 这两个检测结果稳定、信号相对明显且区分度较大的功率参数进行微波处理。微波处理时间分别为 3 min、5 min。通过比较在 80 W/g 和 160 W/g 下处理的蛋白样品得到的自由基信号强度，发现 160 W/g 下自由基增长速率明显高于 80 W/g 下的增长速率。然而，在信号增长的同时，绝对误差也随之增大。Aw=0.42 的蛋白在 160 W/g 功率下微波辐射 3 min/5 min 信号强度增加量约为 80 W/g 功率下辐射 3 min/5 min 信号增加量的 3 倍（图 2）。Aw=0.78 的大米蛋白在 80 W/g 和 160 W/g 功率下微波辐射的信号增加量分别小于 Aw=0.42 的蛋白在微波处理相同时间过后的信号增加量，约为其增加量的 40%。Aw=0.64 的蛋白在 160 W/g 功率下微波辐射 3 min 信号强度增加量比在 80 W/g 功率下辐射 3 min 信号增加量大了约 2 倍，160 W/g/5 min 信号强度增加量比在 80 W/g 大 24%。Aw=0.69 的蛋白经过 160 W/g/3 min 微波辐射比 80 W/g/3 min 增加 2.5 倍，160 W/g/5 min 微波辐射比 80 W/g/5 min 增加 27%。

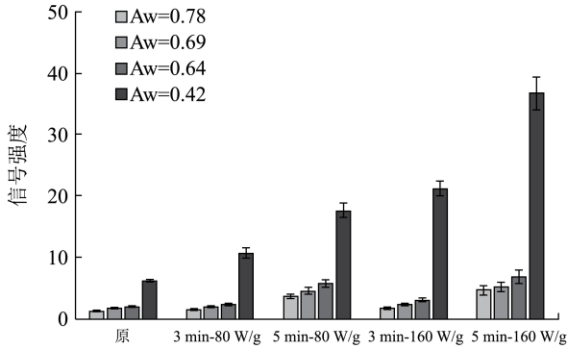


图 3 80 W/g 和 160 W/g 下微波加热 3 min/5 min 后大米蛋白自由基信号强度比较

Fig.3 The signal intensities for rice protein radicals under microwave irradiation of 80 W/g and 160 W/g for 3min/5min

2.3 微波加热对大米蛋白氧化特性的影响

2.3.1 羰基含量的变化

羰基含量是评价蛋白质的氧化程度的重要指标之一。蛋白质的氧化主要是在氧气及金属离子(Fe^{3+})的存在下，发生自由基传递反应，一般参与氧化反应的有N-末端的α-氨基、脯氨酸、精氨酸和赖氨酸侧链以及半胱氨酸等。由表1中数据可知，羰基含量整体呈上升趋势。在升温过程中，水浴加热的羰基含量上升趋势较明显，这可能是由于加热至相同温度，水浴加热用时相对较长，导致蛋白氧化程度更高。

2.3.2 巯基含量的变化

巯基氧化转变为二硫键以及二硫键的断裂都会造成巯基含量的变化。随着加热温度的升高，巯基含量呈下降趋势，其原因可能是蛋白质中的巯基在热处理条件下生成二硫键、亚磺酸或磺酸，导致蛋白巯基含量下降。微波加热与传统加热巯基含量变化的趋势相同，但同等温度下样品对应的巯基含量差别不大。

2.3.3 游离氨基含量的变化

游离氨基含量的变化常常被用来表征蛋白质的水解程度。微波加热大米蛋白后其游离氨基含量随着温度的升高，其含量先急剧上升而后趋于平缓，表明热处理会造成大米蛋白分解，且主要发生在微波加热初期。但随着热处理时间的延长，游离氨基含量没有显著性变化，说明蛋白的分解受热处理时间的影响较小。水浴加热亦如此，但水浴加热过程中游离氨基增加量大于微波加热，可能是由于相比微波加热，水浴加热至某一温度时所需时间更长，在此过程中发生了较大程度的氧化。

2.3.4 表面疏水性的变化

表1 微波加热与水浴加热下大米蛋白的氧化指标

Table 1 Oxidation indices of rice protein under microwave heating and water bath heating

加热温度	羰基含量/(μmol/g)	巯基含量/(μmol/g)	游离氨基/(μmol/g)	表面疏水性
未加热	6.29±0.21	3.41±0.08	171.79±10.23	132.57±15.41
水浴加热				
40	9.65±0.23	2.82±0.21	331.66±14.15	208.82±13.23
60	12.67±0.32	2.63±0.11	298.12±16.23	325.89±17.72
80	13.72±0.41	1.78±0.29	305.22±20.04	577.74±13.41
90	14.17±0.40	1.52±0.22	289.39±23.52	491.56±20.14
100	15.26±0.27	1.13±0.09	291.81±23.74	328.19±19.31
微波加热（100 W/g）				
40	6.38±0.23	2.82±0.14	289.04±12.38	235.92±15.73
60	6.61±0.31	2.56±0.13	268.19±15.16	338.14±18.32
80	7.21±0.23	2.47±0.21	316.68±19.21	397.78±22.14
90	8.02±0.34	2.07±0.18	299.55±22.37	289.41±20.28
100	10.88±0.31	1.88±0.21	252.12±24.21	206.52±18.91

疏水性可表征蛋白质的构象变化。微波加热至80 ℃，大米蛋白表面疏水性随温度上升而增加，可能是因为热变性导致蛋白结构变得松散，使得原本处于蛋白内部的疏水侧链暴露出来。然而随着加热温度的上升，其疏水性缓慢下降，这很可能是蛋白氧化导致极性基团（如羰基等）增多或者是形成不可溶的蛋白聚集体导致的。水浴加热与微波加热的表面疏水性变化趋势基本相似，但前者变化幅度更大，这与前述羰基、巯基等变化趋势相符。

2.4 微波致米蛋白氧化与自由基生成的关系浅析

为了研究微波场下米蛋白氧化及自由基生成的规律，将微波（100 W/g）蛋白样品处理至40、60、80、90、100 ℃后同时进行电子自旋共振和相关氧化指标的检测。以羰基、巯基含量变化作为表征蛋白氧化的重要指标，与相对应的自由基信号强度作比较，结果表明，微波加热初期，各信号变化缓慢，加热至80 ℃之后，羰基含量有明显的增加，巯基在整个加热过程中呈缓慢下降趋势。自由基信号强度的增长速率逐渐增加，当温度加热至100 ℃时，自由基含量比90 ℃时增加了35%。由此可以推断，在微波加热过程中，前期主要发生了热解并生成了分子内或分子间二硫键，生成了少量自由基，而后期随着样品温度升高，部分肽链断裂，并生成大量的自由基。从而我们推测以C为中心自由基的生成主要集中在微波加热至80 ℃以后。

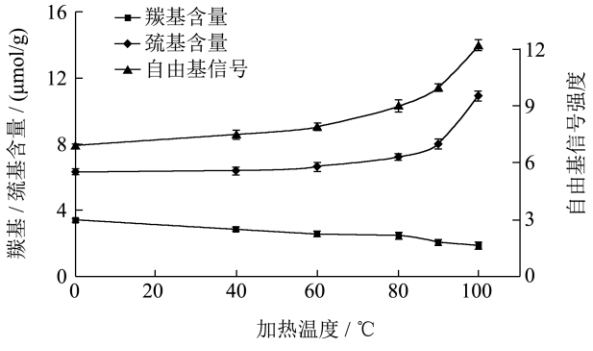


图4 微波加热过程羰基/巯基含量及自由基信号强度变化曲线

Fig.4 Changes in carbonyl and sulfhydryl contents and signal intensities of radicals during microwave irradiation

3 结论

本研究通过对微波处理大米蛋白的自由基生成和氧化特性的研究，验证了大米蛋白自由基是以碳为中心的自由基。微波加热不同水分活度大米蛋白，微波

处理功率越大，自由基信号强度越大，信噪比越小。随处理时间延长，样品体系温度升高，自由基信号强度呈增长的趋势，且增长速率递增。蛋白氧化测定结果显示，加热前期蛋白受热分解，分子内或分子间形成二硫键，升温至 80 ℃后，部分肽链断裂，内部疏水基团暴露，导致蛋白部分展开。水浴加热因其达到相同温度所需时间长，其氧化程度略高于微波加热。结合自由基与蛋白氧化数据可推测，微波加热前期主要发生热解并生成少量自由基，而后期部分肽链断裂，自由基增长迅速。

参考文献

[1] Wei-Qiang Yan, Min Zhang, Lue-Lue Huang. et al. Influence of microwave drying method on the characterintics of the sweet potato dices [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2013, 37(5): 662-669

[2] Özge Şakıyan. Optimization of formulation of soy-cakes baked in infrared-microwave combination oven by response surface methodology [J]. Journal of Food Science and Technology, 2014

[3] Jing Peng, Juming Tang, Yang Jiao, et al. Dielectric properties of tomatoes assisting in the development of microwave pasteurization and sterilization processes [J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 54(2): 367-376

[4] 殷爱红,胡家,阮晶,等.微波辅助的蛋白质酶解方法[J].首都医科大学学报,2012,33(4):549-551
YIN Ai-hong, HU Jia, RUAN Jing, et al. Method of microwave-assisted protein digestion [J]. Journal of Capital Medical University, 2012, 33(4): 549-551

[5] Shiv Kumar. Free radicals and antioxidants: human and food system [J]. Advances in Applied Science Research, 2011, 2(1): 129-135

[6] 李伟明.基于电子自旋共振ESR波谱的辐照食品鉴定检测方法的研究[D].北京:中国农业科科学院农产品加工所,2011
LI Wei-ming. Research of irradiated food detection method based on electron spin resonance (ESR) [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), 2011

[7] O. Augusto, S. Muntz Vaz. EPR spin-trapping of protein radicals to investigate biological oxidative mechanisms [J]. Amino Acids, 2007, 32(4): 535-542

[8] 李艳青.蛋白质氧化对鲤鱼蛋白结构和功能性的影响及其控制技术[D].哈尔滨:东北农业大学,2013
LI Yan-qing. The impact and control technology on carp protein structure and function by protein oxidation [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2013

[9] Byaruhanga Y B, Emmambux M N, Belton P S, et al. Alteration of kafirin and kafirin film structure by heating with microwave energy and tannin complexation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(12): 4198-4207

[10] Thostenson E T, Chou T W. Microwave processing: fundamentals and applications [J]. Composites: Part A, 1999, 30(9): 1055-1071

[11] Lertittikul W, Benjakul S, Tanaka M. Characteristics and antioxidative activity of maillard reaction products from a porcine plasma protein-glucose model system as influenced by pH [J].Food Chemistry, 2007, 100(2):669-677

[12] Levine RL, Garland D, Oliver CN, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins [J]. Methods Enzymol, 1990, 186: 464-542

[13] Hoshi Y, Yamauchi F. Determination of sulfhydryl and disulfide contents of soybean 11s globulin and their change by lyophilization [J]. Agric. Biol. Chem., 1983, 47(11): 2435-2440

[14] Kato A, Sasaki Y, Furuta R. Functional protein polysaccharide conjugate prepared by controlled dry-heating of ovalbumin-dextran mixtures [J]. Agric. Biol. Chem., 1990, 54(1): 107-119

[15] Maria Łabanowska, Magdalena Kurdziel, Maria Filek, et al. The influence of the starch component on thermal radical generation in flours [J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 101, 846-856

[16] Łabanowska M, Wesełucha-Birczynska A, Kurdziel M, et al. The mechanism of thermal activated radical formation in potato starch studied by electron paramagnetic resonance and raman spectroscopies [J]. Carbohydrate Polymers, 2013a, 91(1): 339-347

[17] Łabanowska M, Wesełucha-Birczynska A, Kurdziel M, et al. Thermal effects on the structure of cereal starches. epr and raman spectroscopy studies [J]. Carbohydrate Polymers, 2013b, 92(1): 842-848