

酶辅助亚临界水提取高温豆粕蛋白及其性质研究

卢薇, 丁简, 官燕华, 王金梅, 杨晓泉

(淀粉与植物蛋白深加工教育部工程研究中心, 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文以高温豆粕为原料, 采用 β -葡萄糖苷酶辅助亚临界水提取大豆分离蛋白, 对提取工艺进行优化, 并对产物的理化、结构及抗氧化等性质进行表征。结果表明, 高温豆粕在 β -葡萄糖苷酶的作用下, 糖苷型大豆异黄酮基本转化为生物活性较高的苷元型大豆异黄酮。亚临界水法显著提高了高温豆粕蛋白和大豆异黄酮的溶出率, 强化了二者之间的疏水相互作用, 获得了一种富集苷元型异黄酮的大豆分离蛋白。鉴于 β -葡萄糖苷酶对大豆纤维部分酶解释放较多的还原糖和亚临界水所提供的高温高湿环境, 蛋白发生去折叠, 表面疏水性显著提高, 形成可溶性蛋白聚集体且发生美拉德反应。高温豆粕蛋白中苷元型异黄酮的富集和接枝产物的形成使蛋白表现出良好的 DPPH 和 ABTS 自由基清除率。

关键词: 高温豆粕; β -葡萄糖苷酶; 亚临界水; 理化性质; 结构性质

文章编号: 1673-9078(2015)1-126-130

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.023

Extraction and Properties of Soy Protein from Heat-denatured Soy Meal Using Enzyme-Assisted Subcritical Water Treatment

LU Wei, DING Jian, GUAN Yan-hua, WANG Jin-mei, YANG Xiao-quan

(Engineering Research Center of Starch and Vegetable Protein Processing, Ministry of Education, Department of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The extraction process to obtain soy protein isolate (SPI) was optimized from heat-denatured soy meal (TDSM) by using enzyme-assisted subcritical water treatment. The physicochemical properties, structural properties, and antioxidant activity of SPI were investigated. The results showed that with the addition of β -glucosidase to TDSM, the isoflavone in glucoside form in TDSM was converted to the aglycone form, which showed higher biological activity. Subcritical water treatment increased the water solubilities of SPI and soybean isoflavone and strengthened the hydrophobic interactions between them, thus producing a form of aglycone-enriched SPI. While soybean cellulose was partially hydrolyzed into reducing sugar by β -glucosidase, high temperature and high humidity provided by the subcritical water treatment caused protein unfolding. Consequently, the surface hydrophobicity significantly increased, leading to the formation of soluble protein aggregates and causing the Maillard reaction. Enrichment of the isoflavone in the aglycone form in TDSM and the formation of grafting products may enhanced the DPPH and ABTS free-radical scavenging activities of the protein.

Key words: heat-denatured soy meal; subcritical water; β -glucosidase; physicochemical property; structural property

大豆作为我国居民膳食中蛋白质的重要来源, 除了含有丰富的植物蛋白, 也含有大量具有生物活性的多酚, 如大豆异黄酮。异黄酮具有弱雌激素活性、抗氧化活性、抗肿瘤、改善心血管功能、有效预防和减轻骨质疏松等多种疾病^[1]。普遍认为, 大豆异黄酮以糖苷型和苷元型形式存在^[2], 其中糖苷型异黄酮含量虽高, 但几乎不能为人体细胞所吸收, 只有在人体消

收稿日期: 2014-03-18

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目 (SCUT, 2013ZM0052); 淀粉与植物蛋白深加工教育部工程研究中心开放课题 (2012-ERC-04); 粤港关键领域重点突破项目 (2012A080107006)

作者简介: 卢薇 (1989-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物蛋白加工与利用

通讯作者: 王金梅 (1982-), 女, 讲师, 主要从事植物蛋白加工与利用

化酶 (特别是 β -葡萄糖苷酶) 作用下转化为苷元才能被吸收, 表现出较高的生物活性^[3]。从食品行业发展趋势看, 开发价格低廉、富含苷元型异黄酮大豆蛋白将满足特殊人群特别是更年期妇女对功能性大豆食品的强大市场需求。

高温脱脂豆粕是大豆加工的副产物, 产量丰富, 但蛋白变性程度高, 用常规碱溶酸沉法难以提取, 故其在食品中的应用较为局限^[4], 主要用于饲料行业, 附加值较低。对于难溶蛋白质资源, 现有提取方法主要集中在酶法等化学方法。然而, 所得产品多为苦味多肽, 限制了其作为蛋白配料在食品中的应用。近年来, 水热处理 (120 °C) 被证实可以有效改善热/醇变性大豆蛋白的溶解性, 蛋白乳化性良好^[5]。Xia 等^[6]

采用喷射蒸煮这一动态水热处理 (>100 °C) 成功地实现了从稳定化米糠中提取蛋白, 提取率达到 50%。郑田要等^[4]采用热压法 (121 °C) 有效提取了高温豆粕中蛋白, 提取率达 59.03%。

以上方法相似之处在于提取温度均高于 100 °C, 水在 100 °C 至临界温度 374.2 °C 的范围内, 通过施加低于临界压力 22.1 MPa 的压力, 使水保持液体状态, 此状态下的水称为亚临界水^[7], 介电常数显著降低。亚临界水对于疏水物质具有良好的溶解能力, 且对极性较强和相对分子质量大的物质仍具有足够的溶解性。基于此, 亚临界水的高温高压环境可能显著提高蛋白溶解性^[8], 同时加速非极性物质如大豆异黄酮的溶解^[9], 有利于异黄酮提取及在蛋白中的富集。本文以高温脱脂豆粕为原料, 利用 β -葡萄糖苷酶辅助亚临界水提取其中的蛋白质, 实现糖苷型异黄酮向苷元型的生物转化, 制备富含苷元型异黄酮的大豆分离蛋白, 探究了酶解时间对蛋白的接枝度、表面疏水性等理化及结构性质的影响, 表征了蛋白的抗氧化性质。

1 材料与方法

1.1 原料

高温脱脂豆粕: 购于广州金肽阳有限公司, 粉碎 60 目备用; β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase, 1200 U/g 以上, 最适 pH4.5, 最适温度 60 °C), 日本天野酶制品株式会社。异黄酮标准品, 美国西格玛奥里奇公司。其他试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

主要仪器: 高压反应釜 5500, 美国 PARR 公司; CR22 冷冻离心机, 日本 Hitachi 公司; DELTA 冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; KDN-102C 凯式定氮仪, 上海纤检仪器有限公司; Waters 1525 高效液相色谱, 美国 Waters 公司; UV2300 紫外可见分光光度计, 上海 Techcomp 公司; F7000 荧光分光光度计, 日本 Hitachi 公司。

1.3 实验方法

1.2.1 高温豆粕大豆分离蛋白的制备^[4]

以料液比 1:10 向高温脱脂豆粕加入去离子水, 调节 pH 至 4.5 后按比例加入 β -葡萄糖苷酶, 60 °C 下搅拌反应不同时间 (0、10、30、120 min, 分别为 β -0、 β -10、 β -30、 β -120) 后调节 pH 至 9.0, 沸水加热 5 min 灭酶。室温搅拌 2 h 后于亚临界水条件下置于高压反应釜中, 105 kPa、121 °C 处理 20 min。将所得浆液迅速冷却后

6000 r/min 离心 20 min。将上清液 pH 调至 4.5 进行酸沉, 4500 r/min 离心 10 min 后将蛋白沉淀按 1:10 (m/m) 的比例重新分散于去离子水中, 调节其 pH 至 7.5, 蛋白溶液经过 36 h 透析后冻干备用。采用碱溶酸沉方法^[4]制备低温粕大豆分离蛋白 (NSPI) 和高温豆粕大豆分离蛋白 (HSPI) 作为对照样品。

1.2.2 大豆分离蛋白得率和蛋白纯度的测定

大豆蛋白得率=(大豆蛋白质量×大豆蛋白纯度)/(豆粕质量×豆粕中蛋白含量)

蛋白纯度含量的测定参见 GB/T 5009.5-03: 微量凯式定氮法。

1.2.3 大豆蛋白中异黄酮含量的测定

依据 Malaypally^[10]方法处理蛋白样品, 方法稍有改动, 具体如下: 取蛋白含量为 0.1 g 的样品溶于 1.5 mL 去离子水中, 加入 20 mg 木瓜蛋白酶 (2400 U/g 蛋白), 37 °C 下搅拌 1 h 后向其加入 1.8 mL 乙腈和 0.1 mL 1 mol/L HCl, 室温搅拌 2 h 后 10000 g 离心 10 min, 取上清液进行测定, 参见 GB/T 23788-2009: 保健食品中大豆异黄酮的测定方法 高效液相色谱法^[11]。

1.2.4 大豆蛋白中还原糖和接枝度的测定

还原糖的测定采用 3, 5-二硝基水杨酸法, 糖基化产物接枝度的测定采用 OPA 法。

1.2.5 大豆分离蛋白表面疏水性的测定

使用 ANS 荧光滴定法评价大豆分离蛋白表面疏水性变化, 测试方法见 Wang^[12]等方法。1 mL 样品溶液置于 F7000 荧光分光光度计样品池中, 滴定加入 10 μ L ANS 溶液 (5.0 mM, pH 7.2) 至 ANS 终浓度为 50 μ M。ANS 的摩尔吸光系数为 5000 M⁻¹ cm⁻¹, 用于测定 ANS 浓度。测定参数: 激发波长为 390 nm, 发射波长 470 nm, 激发和发射狭缝宽均为 5 nm。测定结果重复 3 次, 使用 Lineweaver-Burk 方程计算表面疏水性参数:

$$1/F = 1/F_{\max} + (K_d/L_0)(1/F_{\max})$$

注: L_0 为 ANS 浓度/ μ M, F_{\max} 为探针浓度饱和时最大相对荧光强度, K_d 为蛋白分子与 ANS 复合物的表观结合解离常数。 F_{\max} 和 K_d 可以通过线性拟合计算获得。蛋白质的表面疏水性指数 (PSH) 为 F_{\max} 和 K_d 的比例 $PSH = F_{\max}/K_d \times (\text{protein concentration})$, 反映了蛋白表面疏水位点的数量和亲和性。

1.2.6 蛋白内源荧光的测定

蛋白分散于 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中, 蛋白浓度为 0.15 mg/mL。采用 F-7000 荧光分光光度计测定蛋白的荧光光谱。为了降低酪氨酸的贡献, 荧光光谱在 290 nm 激发, 扫描发射光谱为 310~400 nm, 激发和发射狭缝宽均为 5 nm。

1.2.7 大豆蛋白抗氧化性的测定

将蛋白分散于去离子水中, 蛋白浓度为 40 mg/mL,

测试方法见 Gülçin^[13]等方法。

1.2.8 数据分析

实验中所有数据都是三次测定的平均值，利用 SPSS 7.0 分析比较样品平均值之间的差异显著性 ($p < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 β -葡萄糖苷酶添加量的选择

β -葡萄糖苷酶用量对异黄酮成分的影响见图 1。未进行酶解作用时，大豆蛋白中的异黄酮主要以生物活性较低的 β -葡萄糖苷型异黄酮即大豆苷 (daidzin)、大豆黄苷 (glycitin) 和染料木苷 (genistin) 为主，高生物活性的苷元型异黄酮即大豆素 (daidzien)、大豆黄素 (glyciten) 和染料木素 (genistein) 含量较少。经过 30 min 酶解作用后，不同添加量的 β -葡萄糖苷酶均对糖苷型异黄酮产生极为显著的转化作用，且三种糖苷的转化率随着 β -葡萄糖苷酶用量的增加而提高。当添加量达到 0.05% (E/protein) 时，转化率随着酶量提高而提高趋势不再明显，糖苷达到最大程度转化，故选用 0.05% (E/protein) 的 β -葡萄糖苷酶添加量作为下文参考用量。在此用量及酶解时间下，大豆黄苷的转化率可达 70.90%，大豆苷和染料木苷的转化率接近 100%。

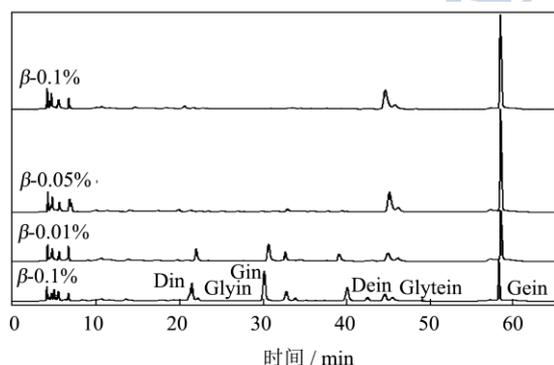


图 1 β -葡萄糖苷酶添加量对异黄酮成分的影响

Fig.1 The effect of β -glucosidase dosage on the conversion of glucosides

注: Din: 大豆苷; Glyin: 大豆黄苷; Gin: 染料木苷; Dein: 大豆素; Glyciten: 大豆黄素; Gein: 染料木素。

2.2 酶解时间对蛋白得率及纯度的影响

碱溶酸沉法制备的高温豆粕蛋白 (HSPI) 的得率低，不具备工业化价值，而经过亚临界水处理后，高温豆粕蛋白的得率得到显著改善，这与郑田要的研究结果一致^[4]。鉴于此，后文均使用碱溶酸沉法制备的低温豆粕蛋白 (NSPI) 作为对照样品。由于 Wang 等^[5]对喷

射蒸煮改性蛋白的机制做了尺度层面上的阐述，认为超高温加热使变性蛋白颗粒变小，减小了分散相和连续相之间的密度差，提高了蛋白的溶解性和分散性。另一个不容忽视的作用为，亚临界水状态下，蛋白质可能发生了结构展开，分子发生重排，导致聚集现象的产生，蛋白聚集体表面的亲水/疏水基团平衡分布，从而使蛋白质仍具有较高的溶解性。

本文以低温粕经碱溶酸沉提取的大豆分离蛋白为对照，分析不同酶解时间条件下高温豆粕蛋白的得率和纯度，见图 2。由图可知，高温豆粕经亚临界水处理后，蛋白得率高于天然大豆蛋白，这可能是由于高温豆粕蛋白在亚临界水条件下形成大分子可溶性聚集体，提高了蛋白的溶出率，但蛋白纯度有一定的下降，这可能是由于高温豆粕蛋白含量略低于低温粕，也可能是高温高湿条件下高温豆粕蛋白质与糖类的接枝反应，降低了蛋白纯度。 β -葡萄糖苷酶酶解不同时间后蛋白得率与蛋白纯度基本不变，说明对高温豆粕蛋白的得率与纯度的主要影响因素是亚临界水的作用。

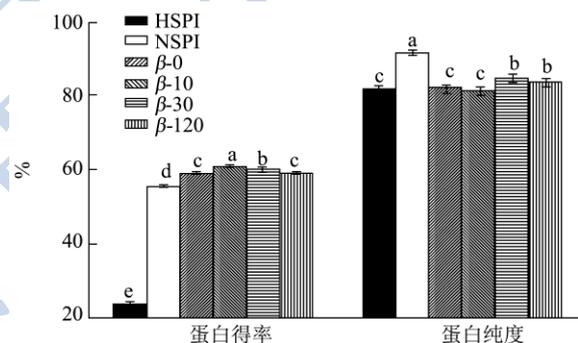


图 2 不同处理条件下大豆分离蛋白的得率与纯度 (%)

Fig.2 Protein yield and protein purity of soy protein prepared from different extraction methods

2.3 高温豆粕蛋白的理化及结构性质表征

2.3.1 蛋白中异黄酮含量的变化

酶辅助亚临界水提取高温豆粕蛋白和天然蛋白的异黄酮含量见表 1。高温豆粕蛋白的异黄酮总量较天然蛋白有显著的提升。仅经亚临界水处理后的高温豆粕蛋白中，异黄酮中作为主要成分的糖苷型异黄酮有了明显的富集效果，说明亚临界水不仅能促进蛋白的溶出，也可能促进异黄酮的溶出，减少其在碱溶过程中的沉淀以降低损失。Chang^[9]通过优化豆粉的亚临界水提取条件，异黄酮提取率接近用 80% 甲醇进行索式抽提的提取率，说明此时亚临界水的极性类似与甲醇，可显著提高异黄酮的提取率，与本文研究结果一致。经过 β -葡萄糖苷酶的酶解后，蛋白中糖苷型异黄酮基本转化为苷元型异黄酮，且异黄酮总量不随着酶解时间的

增长而改变。

表 1 不同处理条件下大豆分离蛋白中异黄酮的含量

Table 1 Isoflavone content of soy protein prepared from different extraction methods

	异黄酮含量(μmol/g)						总量
	糖苷型			苷元型			
	大豆苷	大豆黄酮	染料木苷	大豆素	大豆黄酮	染料木素	
NSPI	0.19±0.02 ^c	0.63±0.03 ^c	0.34±0.02 ^b	1.24±0.13 ^d	0.54±0.01 ^d	1.97±0.03 ^d	4.90±0.10 ^d
β-0	1.32±0.09 ^a	1.66±0.10 ^a	3.87±0.15 ^a	1.29±0.14 ^d	0.96±0.07 ^c	1.09±0.03 ^e	10.19±0.40 ^e
β-10	0.67±0.01 ^b	1.12±0.00 ^b	0.86±0.05 ^b	2.80±0.08 ^c	1.33±0.12 ^b	4.26±0.03 ^c	11.05±0.15 ^a
β-30	0.13±0.01 ^d	0.07±0.00 ^d	0.23±0.00 ^b	3.60±0.06 ^b	1.46±0.02 ^b	4.99±0.06 ^b	10.48±0.03 ^e
β-120	0.08±0.00 ^d	0.05±0.00 ^d	0.21±0.01 ^b	4.14±0.08 ^a	1.34±0.01 ^a	5.11±0.05 ^a	10.93±0.16 ^b

2.3.2 高温豆粕蛋白中还原糖和接枝度的变化

一般认为,β-葡萄糖苷酶不仅可以转化糖苷型异黄酮,也可酶解纤维素释放糖类。许彩虹^[14]等报道大豆蛋白和葡聚糖经高于100℃的水热处理后,蛋白与多糖发生了美拉德反应,乳化性等功能性质获得了改善。由此,亚临界水提取蛋白过程中,蛋白可能会与释放的糖类发生美拉德反应,改变蛋白的理化及其功能性质。本文测定了酶辅助亚临界水提取高温豆粕蛋白和天然蛋白的还原糖和接枝度,见图3。由图可知,相对于天然大豆蛋白,高温豆粕提取蛋白酶解后还原糖含量明显提高且随着酶解时间的增长,还原糖含量不断提高。在亚临界水的高温高湿环境下,酶解释放的还原糖与大豆蛋白发生糖基化反应,产物蛋白也产生明显的焙烤香味,且色泽较深。随着酶解时间的增长,糖基化反应加剧,接枝度提高。酶解30 min后,接枝度不随着酶解时间的增长而变化,可能是由于β-葡萄糖苷酶对纤维素的已经达到最大程度的酶解,还原糖含量的提高已不明显,故糖基化反应达到最大程度。

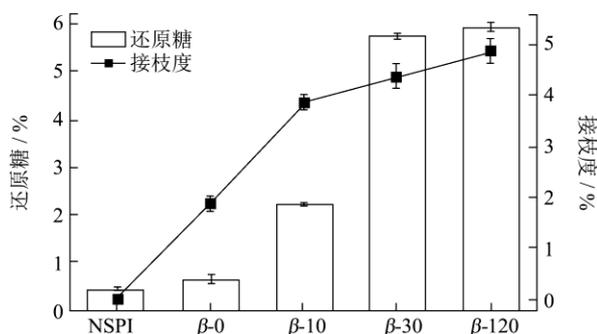


图 3 不同处理条件下大豆分离蛋白的还原糖含量和接枝度

Fig.3 Reducing sugar and DG of soy protein prepared from different extraction methods

2.3.3 高温豆粕蛋白表面疏水性的变化

蛋白质的表面疏水性通过反应蛋白表面疏水基团的情况来间接反应蛋白结构的变化。表 2 为酶辅助亚临界水提取高温豆粕蛋白和天然大豆蛋白的表面疏水

性参数 (F_{max} 、 K_d 和 PSH), PSH 反映了蛋白分子表面疏水位点的数量和亲和力。高温豆粕蛋白的 PSH 明显高于天然蛋白,说明大豆蛋白在亚临界水作用下部分展开,蛋白分子内部的疏水基团转移到分子表面。随着酶解时间的增长,PSH 逐渐下降,这是蛋白中苷元型异黄酮与蛋白质发生疏水相互作用,疏水性的苷元增多占据蛋白表面疏水结合位点的结果。亚临界水处理后,蛋白的最大荧光强度 (F_{max}) 基本不变但表观解离常数 (K_d) 显著降低,说明亚临界水处理提能高蛋白表面的疏水结合位点与 ANS 的结合能力,而β-葡萄糖苷酶的酶解作用会降低这种结合力,故随着酶解时间的增长,表观解离常数 (K_d) 逐渐提高。

表 2 不同处理条件下大豆分离蛋白的表面疏水性

Table 2 Surface Hydrophobicity of soy protein prepared from different extraction methods

样品	表面疏水性		
	F_{max}	$K_d/\mu M$	PSH/(F/mg μM)
NSPI	285.36±0.50 ^a	24.17±0.53 ^a	73.89±1.60 ^d
β-0	277.99±7.72 ^b	12.94±0.34 ^d	143.47±7.70 ^e
β-10	227.35±5.17 ^c	15.97±0.60 ^c	94.96±2.27 ^b
β-30	224.75±3.57 ^c	18.12±0.48 ^b	82.72±0.87 ^e
β-120	227.39±7.31 ^c	19.38±0.70 ^b	78.34±5.32 ^d

注: F_{max} : ANS饱和时最大荧光强度; K_d : 蛋白质-ANS复合物的表观解离常数; PSH: 表面疏水性指数。

2.3.4 高温豆粕蛋白内源荧光光谱的变化

采用 290 nm 处激发所得的内源荧光光谱主要是通过蛋白中色氨酸微环境的极性变化来间接反映蛋白去折叠的情况。当最大荧光峰波长发生红移,表明蛋白内部的色氨酸发射基团位于更为亲水的微环境中,反之则表明发射基团位于更为疏水的微环境中。高温豆粕蛋白和天然大豆分离蛋白的内源荧光光谱如图 4 所示。未经酶解处理的高温豆粕大豆蛋白的最大荧光发射波长较天然大豆蛋白发生明显红移,最大荧光强度也出现显著下降,说明亚临界水处理导致大豆蛋白

的结构展开,更多疏水基团暴露,与表面疏水性数据一致(表2)。酶解处理后的高温豆粕大豆蛋白荧光强度继续下降,但最大荧光发射波长基本不变,这可能是由于 β -葡萄糖苷酶酶解后,蛋白中结合的苷元型异黄酮含量逐步增多,对其相对荧光强度产生影响。

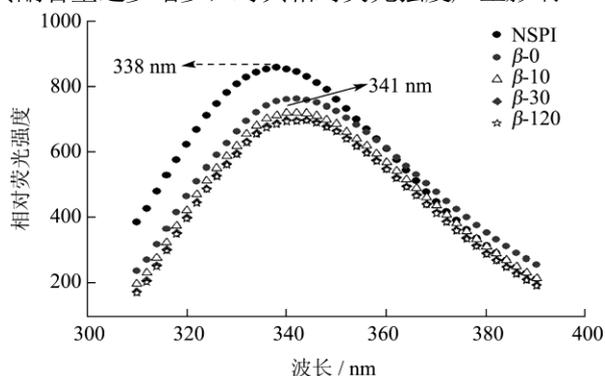


图4 不同处理条件下大豆分离蛋白的荧光扫描图

Fig.4 Emission fluorescence spectra of soy protein prepared from different extraction methods

2.3.5 高温豆粕蛋白抗氧化性质的变化

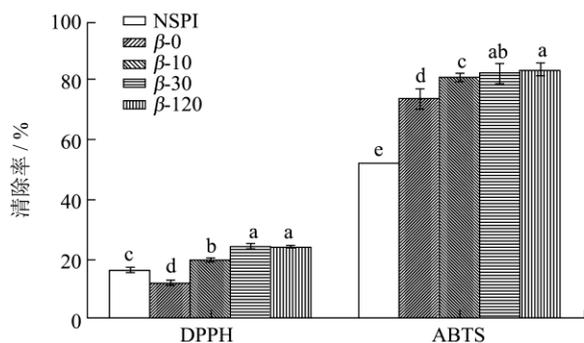


图5 不同处理条件下大豆分离蛋白的DPPH和ABTS自由基清除率

Fig.5 DPPH and ABTS radical-scavenging activity of soy protein prepared from different extraction methods

考虑到苷元型异黄酮具有较高的生物活性且高温豆粕蛋白发生了美拉德反应(图3),高温豆粕蛋白可能具有较高的抗氧化性。本文测定了酶辅助亚临界水提取的高温豆粕蛋白和天然蛋白的DPPH和ABTS自由基清除率,见图5。未经酶解处理时,高温豆粕蛋白的ABTS自由基清除率显著高于天然蛋白,而DPPH自由基清除率略低于天然蛋白,这可能是由于高温粕蛋白在亚临界水处理中形成的大量疏水性聚集体影响了异黄酮在有机醇溶剂中与DPPH自由基孤电子的配对。经 β -葡萄糖苷酶酶解后,蛋白质对两种自由基的清除能力均有明显提升,且高温粕蛋白的DPPH自由基清除力高于天然蛋白。这不仅是由于蛋白质中具有生物活性的苷元型异黄酮含量大幅提高所致,也是酶解作用下促进了美拉德反应,产生具有抗氧化能力的类黑精等产

物的结果。总体而言,高温粕蛋白对ABTS自由基清除力的提升速率更快,进一步说明高温粕蛋白更适用于清除水相体系的自由基。酶解30 min后,蛋白质中的苷元型异黄酮含量和接枝度基本不变,故蛋白的两种自由基清除力不随着酶解时间的增长而提高,与上文的研究结果一致(表1和图3)。

3 结论

高温豆粕在 β -葡萄糖苷酶的作用下,糖苷型异黄酮大量转化为生物活性较高的苷元型异黄酮,且大豆纤维被部分降解,产生还原糖。亚临界水可显著改善高温豆粕蛋白和大豆异黄酮的溶解性,提高蛋白得率且强化了二者的结合,获得高温豆粕蛋白富含较高含量的苷元型异黄酮。同时,高温高湿环境也有利于美拉德反应的发生。酶辅助亚临界水法制备的高温豆粕大豆蛋白,蛋白得率高于碱溶酸沉法制备的低温粕天然大豆蛋白,且苷元型异黄酮的含量为天然大豆蛋白的2.84倍,达到了富集的效果。以高温豆粕为原料,采用酶辅助亚临界水法所得大豆蛋白中含有一定的接枝产物,表面疏水性较高,抗氧化活性明显高于天然大豆蛋白。

参考文献

- [1] 李艳艳,周光明,辛丹敏,等.HPLC法测定豆奶粉中四种大豆异黄酮含量[J].现代食品科技,2009,25(10):1227-1230
LI Yan-yan, ZHOU Guang-ming, XIN Dan-min, et al. Determination of four isoflavone in soybean milk powder by HPLC [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(10): 1227-1230
- [2] 钱丽丽,左锋,刘志明.微波预处理提取大豆异黄酮的研究[J].现代食品科技,2007,23(1):38-39
QIAN Li-li, ZUO Feng, LIU Zhi-ming. Extraction of soybean isoflavones by microwave pretreatment [J]. Modern Food Science and Technology, 2007, 23(1): 38-39
- [3] 张永忠,李木子,孙艳梅,等.“Amanoz” β -糖苷酶水解大豆异黄酮技术的研究[J].食品科学,2008,29(5):254-258
ZHANG Yong-zhong, LI Mu-zi, SUN Yan-mei, et al. Study on hydrolysis of soybean isoflavones by β -Glycosidase “Amano” [J]. Food Science, 2008, 29(5): 254-258
- [4] 郑田要.物理法提取高温豆粕中蛋白的研究[D].广州:华南理工大学,2010
- [5] Zheng H G, Yang X Q, Tang C H, et al. Preparation of soluble soybean protein aggregates (SSPA) from insoluble soybean protein concentrates (SPC) and its functional properties [J]. Food Research International, 2008, 41: 154-164

- [6] Ning Xia, Jin-Mei Wang, Xiao-Quan Yang, et al. Preparation and characterization of protein from heat-stabilized rice bran using hydrothermal cooking combined with amylase pretreatment [J]. *Journal of Food Engineering*, 2012, 110: 95-101
- [7] Min-Jung Ko, Chan-Ick Cheigh, Sang-Woo Cho, et al. Subcritical water extraction of flavonol quercetin from onion skin [J]. *Journal of Food Engineering*, 2011, 102: 327-333
- [8] S C Ndlela, J M L N de Moura, N K Olson, L A Johnson. Aqueous extraction of oil and protein from soybeans with subcritical water [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2012, 89: 1145-1153
- [9] CHANG Li-hsun, CHENG Ya-chuan, CHANG Chieh-ming. Extracting and purifying isoflavones from defatted soybean flakes using superheated water at elevated pressures [J]. *Food Chemistry*, 2004, 84: 279-285
- [10] Sravanthi P Malaypally, Baraem Ismai. Effect of protein content and denaturation on the extractability and stability of isoflavones in different soy systems [J]. *Agric. Food Chem.*, 2010, 58: 8958-8965
- [11] 中华人民共和国国家标准[S]-保健食品中大豆异黄酮的测定方法,高效液相色谱法.2009,6(146)
Determination of soybean isoflavone in health-care food-high-performance liquid chromatography
- [12] Jin-Mei Wang, Xiao-Quan Yang, Shou-Wei Yin, et al. Structural rearrangement of ethanol-denatured soy proteins by high hydrostatic pressure treatment [J]. *Agric., Food Chem.*, 2011, 59: 7324-7332
- [13] İlhami Gülçin. Antioxidant properties of resveratrol: a structure-activity insight [J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2010, 11: 210-218
- [14] 许彩虹.大豆球蛋白糖基化接枝改性及其热聚集行为研究[D].广州:华南理工大学,2010
XU Cai-hong. Research on the glycosylation and thermal aggregation of soybean glubulin-polysaccharide [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010