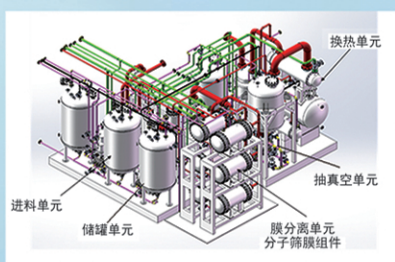




浙江汇甬新材料有限公司

微波合成第二代脱水膜

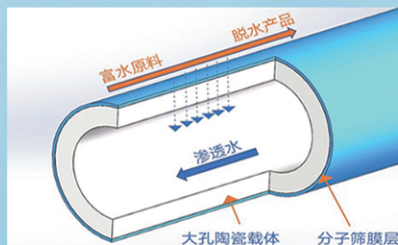


国家自然科学基金二等奖 成果转化

IChemE全球 创新产品冠军

微波分子筛膜 脱水性能遥遥领先

共沸体系、热敏体系、含水有机物脱水精制换代技术



收率高、能耗低、连续脱水、无需再生

在如下领域的有机物脱水精制已有工业化应用

锂电池电解液溶剂及NMP生产、回收
BDO产业链、煤化工、石油化工精细化学品
制药行业、溶媒回收、燃料乙醇、超纯溶剂

广泛适用于醇类、醚类、酯类、酮类、苯系物、卤代烃的脱水精制



网址: www.hymater.com

固定电话: 0574-87648996

电话: 13396592011

地址: 浙江省宁波市江北高新园区庆丰路联东U谷国际港56号楼

银杏果分离蛋白-普鲁兰多糖共聚物的 凝胶质构可调控特性

秦佳伟, 程 巧, 王耀松*

(南京林业大学 轻工与食品学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 首先将配制的银杏果分离蛋白(GSPI)与普鲁兰多糖(PULL)混合溶液经冻干处理, 然后采用干热法(干热温度 70 °C, 相对湿度 63%)经共聚反应制备了 GSPI-PULL 共聚物。基于 GSPI-PULL 共聚物的物化性质、其凝胶流变特性和微观结构的表征和测试, 在保持 GSPI 质量浓度为 120 g/L 的条件下, 考察了 PULL 质量浓度(0、25、50 和 100 g/L)和反应时间(0、1、4、7 d)对 GSPI-PULL 共聚物热诱导胶体质地的影响。结果表明, PULL 与 GSPI 发生共聚反应生成不同 PULL 接枝度的 GSPI-PULL 共聚物, 其接枝度依赖于 PULL 质量浓度和反应时间; 延长干态加热时间促使 GSPI 结构展开并形成二硫键, 表现为疏水性提高、溶解性下降; 亲水性基团降低了 GSPI-PULL 的疏水性, 提高了其溶解性。加热时间和多糖质量浓度均能显著弱化 GSPI 的凝胶性且有叠加作用, 致使 GSPI 凝胶质地从“站立性固态”转变为“半固态/溶胶态”, 实现了蛋白热诱导凝胶质地的可调性。

关键词: 银杏果分离蛋白; 普鲁兰多糖; 共聚反应; 凝胶; 食品化学品

中图分类号: TS201.2 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2025) 02-0378-10

Ginkgo seed isolate protein-pullulan copolymer gels with tunable textural properties

QIN Jiawei, CHENG Qiao, WANG Yaosong*

(College of Light Industry and Food Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: GSPI-PULL copolymer was prepared from copolymerization of frozen dried ginkgo seed protein isolate (GSPI) and pullulan (PULL) mixture by dry heat method (dry heat temperature 70 °C, relative humidity 63%). The effects of PULL mass concentration (0, 25, 50 and 100 g/L) and reaction time (0, 1, 4 and 7 d) on the heat-induced gel texture was analyzed at GSPI mass concentration of 120 g/L by characterizing and testing the physicochemical properties of GSPI-PULL copolymers, along with the gel rheological properties and microstructure. The results demonstrated that GSPI-PULL copolymers with different PULL grafting degrees were formed through the copolymerization of PULL and GSPI, and the grafting degree depended on the PULL mass concentration and reaction time. Prolongation of dry heating time promoted the unfolding of GSPI structure and the formation of disulfide bond, which was reflected by increase in hydrophobicity and decrease in solubility. Hydrophilic groups reduced the hydrophobicity of GSPI-PULL and improved its solubility. The heat time and polysaccharide mass concentration could significantly weaken the GSPI gelling properties and had a superposition effect, resulting in GSPI gels changing from a "standing solid" to a "semisolid/sol", which made the heat-induced protein gels achieving tunable textural properties.

Key words: ginkgo seed protein isolate; pullulan; copolymerization; gels; food chemicals

收稿日期: 2024-01-31; 定用日期: 2024-03-21; DOI: 10.13550/j.jxhg.20240112

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31401530); 白马未来食品研究院揭榜挂帅项目(JBGS-2021-002)

作者简介: 秦佳伟(1998—), 女, 硕士生, E-mail: qinjiawei123@njfu.edu.cn。联系人: 王耀松(1981—), 男, 博士, 副教授, E-mail: yaosongwang@njfu.edu.cn。

银杏果分离蛋白(GSPI)是从银杏种子中分离提取出来的一种营养价值较为丰富的食品组分,其含有清蛋白和球蛋白,可以为食品蛋白原料的生产提供一种来源补充^[1]。将GSPI作为食材应用到食品加工中,将会促进其资源应用,扩大食材来源范围,提高食物多样性和营养价值。蛋白基质的食品体系较多,其中以凝胶形式呈现的食品较为普遍^[2],表现为特定的食品营养功能性和加工学性能^[3]。食品加工新技术的出现促进了食品蛋白加工产品的多样性,可以满足不同消费者对食品的需求及目的^[4]。其中,有食物口腔吞咽困难症的人群,对食品的营养性及质构有特殊的要求^[5]。

研究者在对GSPI凝胶性进行研究的过程中发现,未改性的GSPI在水中溶解度较低,可交换自由巯基较少,导致其凝胶性较差^[6]。GSPI具有一定的质构强度,通过调节成胶溶液的pH^[7],添加CaCl₂^[8]或 γ -氨基丁酸、L-瓜氨酸等物质^[7]到成胶溶液中,能够在一定程度上弱化GSPI凝胶质构性;或者添加过多的其他小分子多酚类物质^[9]、大分子多糖^[10],也能较大程度上弱化其质构强度。尽管如此,GSPI凝胶依然难以达到吞咽障碍患者膳食质构的标准。

共聚反应为蛋白质凝胶质地特性调节提供了一种技术手段^[11]。通过共聚反应可降低右旋糖苷糖基化乳清蛋白凝胶的强度^[12]、果糖糖基化乳清蛋白凝胶的胶黏性^[13];通过调整塔格糖加入量,也可弱化蛋白的凝胶性^[14]。在大豆蛋白体系中,结合延长超声时间催化麦芽糊精糖基化,可显著弱化凝胶性^[15]。以上研究表明,通过糖与蛋白间的共聚反应有可能改造球蛋白凝胶质构性。其中,湿热法和干热法是蛋白质和糖共聚反应的两种加热方式。湿热法的反应条件难以控制^[16],而干热法工序简单、处理阶段所形成的二硫键阻断凝胶的形成,有利于弱化凝胶质地^[17]。

普鲁兰多糖(PULL)是由 α -1,4键和 α -1,6键连接的线型同多糖,具有良好的水溶性、抗氧化性和抗菌性。近年来,PULL在食品领域的应用越来越广泛^[18]。在PULL与蛋白质共聚反应中,其特殊的线型结构有助于提高共聚反应的效率,促进蛋白各类功能性的改造^[19]。在蛋白凝胶性方面,通过调节pH及PULL添加量,与乳清蛋白复合,可用于凝胶质地的改造^[20],形成特殊的结构^[21-22],尤其是特定的用途。可见,PULL具有与球蛋白相互作用而形成特殊质构的潜力。

本文拟通过GSPI与PULL间在干热法条件下的共聚反应制备GSPI-PULL共聚物,分析共聚反应对其诱导凝胶质构性的影响。通过调节PULL加入

量及与GSPI的反应时间,制备具有不同软化度质构的复合凝胶;通过表征反应产物的物化性质、所成凝胶的流变学特性及其微观结构,确定GSPI与PULL间的反应性及与GSPI凝胶质地可调性的关系,解决GSPI基质凝胶质构软化的问题。以期制备的复合凝胶能够满足口咽吞咽困难症者对营养物质质构的特殊要求,并为GSPI的食品制造提供理论基础和技术参考。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

银杏种子(又称白果,品种为邳州大佛指),产地江苏徐州。

PULL,中海威基因科技有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、柠檬酸、磷酸氢二钠、硫酸铜、正己烷、氢氧化钠、盐酸(质量浓度437.52 g/L)、溴酚蓝,国药集团化学试剂有限公司;邻苯二甲醛,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;丙烯酰胺、甘油、过硫酸铵、*N*-乙基马来酰亚胺(NEM)、 β -巯基乙醇(β ME),德国Merck公司;柠檬酸-磷酸盐缓冲液(50 mmol/L, pH=7.0),现用现配。上述试剂均为分析纯;实验用水为去离子水。

SpectraMax i3x型多功能酶标仪,美谷分子仪器(上海)有限公司;P4 PC型紫外-可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra型蛋白电泳仪,美国Bio-Rad公司;VERTEX 80v型傅里叶变换红外光谱仪(FTIR),德国Bruker公司;DHR-1型流变仪,美国TA Instruments公司;Quanta 200 FEG型扫描电子显微镜(SEM),美国FEI公司。

1.2 方法

1.2.1 GSPI的制备

参考ZHANG等^[23]的碱溶酸沉法并略作修改制备GSPI。具体步骤为:首先,将银杏种子在40℃的烘箱中干燥60 h、去皮、磨粉并过80目筛,得到银杏果粉末;然后,按固液比1:9(g:mL)将银杏果粉末分散到正己烷中去脂,过滤,再加入正己烷去脂,重复3次,得到脱脂银杏果粉;将脱脂银杏果粉按料液比为1:10(kg:L)分散到去离子水中,用浓度为1 mol/L的NaOH水溶液调pH=10.0,室温下搅拌2 h;最后,在5000×g离心力、4℃条件下离心15 min,收集上清液。用浓度为1 mol/L的盐酸调节上清液pH=4.4,用同样方法离心,收集沉淀。将沉淀分散在去离子水(两者质量比1:1)中,用浓度为1 mol/L的NaOH水溶液调节pH=7.0,

在 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥 48 h, 得到棕黄色、质地细腻的 GSPI 粉末, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。通过双缩脲法^[23]测得 GSPI 中蛋白质量分数 $>90\%$ 。

1.2.2 GSPI-PULL 共聚物的制备

采用干热法制备 GSPI-PULL 共聚物。

混合溶液的配制: 首先, 将 GSPI 粉末分散在去离子水中, 得到质量浓度为 240 g/L 的 GSPI 分散液, 并在室温下磁力搅拌 6 h, 然后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中水化 12 h; 将 PULL 溶解在去离子水中, 室温下磁力搅拌 6 h, 得到质量浓度分别为 50 、 100 、 200 g/L 的 PULL 储备液。然后, 将 GSPI 分散液与 PULL 储备液按体积比 $1:1$ 混合, 最终得到 GSPI 质量浓度为 120 g/L 、PULL 质量浓度分别为 25 、 50 、 100 g/L 的不同混合液。最后, 用浓度为 1 mol/L 盐酸调节上述混合液的 $\text{pH}=7.0$, 即 GSPI-PULL 混合溶液。

共聚化处理样品的制备: 将 GSPI-PULL 混合溶液于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥 48 h, 然后采用干热法将冻干后样品置于干燥器中, 在 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 63% 条件下保存 1、4、7 d, 得到 GSPI-PULL 共聚物。

成胶溶液的配制: 首先将 GSPI-PULL 共聚物用去离子水复溶, 得到最终 GSPI 质量浓度为 120 g/L 、PULL 质量浓度分别为 25 、 50 、 100 g/L 的成胶溶液。

固体复合凝胶的制备: 通过热诱导法制备。取 6 mL 成胶溶液密封在烧杯中, 在 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中加热 30 min, 再冷却至室温, 最后在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存 12 h, 得到固体复合凝胶。

1.3 表征和测试

1.3.1 FTIR 和 SEM 测试

FTIR 测试: 取约 1 mg GSPI-PULL 共聚物样品与 100 mg 溴化钾混匀, 研磨后压片。在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 内扫描和分析, 分辨率设为 4 cm^{-1} , 扫描信号累计 64 次。

SEM 测试: 在铜板上进行喷金处理, 采用 SEM 观察固体复合凝胶的微观结构。

1.3.2 荧光光谱测定

将成胶溶液用柠檬酸-磷酸盐缓冲液稀释至质量浓度为 1.0 g/L , 采用酶标仪检测样品的荧光光谱, 具体参数设置: 激发波长 280 nm , 发射波长 $300\sim 450\text{ nm}$, 扫描速率 2 nm/s 。

1.3.3 共聚反应程度及接枝度测定

测定前将成胶溶液涡旋, 确保样品溶液无沉淀。用柠檬酸-磷酸盐缓冲液稀释成质量浓度为 1 g/L , 用酶标仪测定其在 294 nm 处的吸光度 (A_{294}), 表示共聚反应过程中中间产物的形成; 测定其在 420 nm 处的吸光度 (A_{420}), 表示后期产物 (类黑素) 的形成, 反映共聚反应的程度。

采用邻苯二甲醛 (OPA) 法测定共聚反应过程中自由氨基含量的变化, 并计算接枝度。OPA 试剂根据 ZHANG 等^[24]的方法新鲜配制。将成胶溶液用柠檬酸-磷酸盐缓冲液稀释成质量浓度 5 g/L , 取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 稀释液与 4 mL 的 OPA 试剂混合为待测液; 使用 $200\text{ }\mu\text{L}$ 去离子水与 4 mL 的 OPA 试剂混合物作为空白液, 待测液和空白液均在 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下反应 2 min, 然后分别测定样品在 340 nm 处的吸光度。使用赖氨酸 (质量浓度为 $0\sim 0.5\text{ g/L}$) 构建吸光度 (y)-溶液质量浓度 (x) 标准曲线 ($y=0.2565x+0.1728$, $R^2=0.9965$), 计算样品中自由氨基含量。根据公式 (1) 计算接枝度:

$$\text{接枝度}/\%=(A_0-A_t)/A_0\times 100 \quad (1)$$

式中: A_0 为反应 0 d 时, 不同 PULL 质量浓度 (25 、 50 和 100 g/L) 的 GSPI-PULL 共聚反应前的混合溶液的吸光度; A_t 为反应 $t\text{ d}$ 时, 对应 PULL 质量浓度的 GSPI-PULL 共聚物的吸光度。

1.3.4 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定

将成胶溶液用柠檬酸-磷酸盐缓冲液稀释至质量浓度为 2 g/L , 将稀释后的溶液分别与非还原条件的缓冲液 [含 40 g/L 的 SDS、 252.26 g/L 的甘油、 15.14 g/L 的 Tris-HCl ($\text{pH}=6.8$)、 0.05 g/L 的溴酚蓝、 0.125 g/L 的 NEM]、还原条件的缓冲液 [含 40 g/L 的 SDS、 252.26 g/L 的甘油、 15.14 g/L 的 Tris-HCl ($\text{pH}=6.8$)、 0.05 g/L 的溴酚蓝、 55.5 g/L 的 βME] 等体积混合, 于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 煮沸 3 min, 每孔上样量为 $15\text{ }\mu\text{L}$, 对 50 g/L 浓缩凝胶和 125 g/L 分离凝胶进行电泳分析。然后用染色液 (考马斯亮蓝 R250) 染色 3 h, 在脱色液 (体积分数 5.0% 甲醇和体积分数 7.5% 冰醋酸水溶液) 中脱色至条带清晰, 无背景色。

1.3.5 表面疏水性测定

用 1-苯胺-萘-8-磺酸 (ANS) 法测定了样品的表面疏水性。将成胶溶液用柠檬酸-磷酸盐缓冲液分别稀释成 0.1 、 0.2 、 0.3 、 0.4 、 0.5 g/L , 取 2 mL 稀释样品与 $20\text{ }\mu\text{L}$ 的 ANS (现配现用, 质量浓度 0.025 g/L) 混合, 避光反应 15 min。分别在激发波长 365 nm 和发射波长 484 nm 处测量混合后样品的荧光强度。以荧光强度对成胶溶液中 GSPI 的质量浓度作图, 得到回归线性方程的斜率即为蛋白的表面疏水性指数。

1.3.6 溶解度和浊度测定

参考 ZHANG 等^[23]的方法测定蛋白溶解度, 用柠檬酸-磷酸盐缓冲液将成胶溶液分散液稀释至 5.0 g/L 。蛋白质分散液在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, $5000\times g$ 离心力下离心 10 min, 得到上清液; 用双缩脲法测定其中的蛋白质质量浓度, 用牛血清白蛋白制作吸光度 (y)-

溶液质量浓度 (x) 标准曲线 ($y=0.0254x+0.0733$, $R^2=0.9998$)。根据公式 (2) 计算溶解度。

$$\text{溶解度}/\%=\rho_1/\rho_2\times 100 \quad (2)$$

式中: ρ_1 为离心后上清液中的蛋白质量浓度, g/L; ρ_2 为离心前分散液中蛋白质量浓度, g/L。

将成胶溶液用柠檬酸-磷酸盐缓冲液稀释至 1.0 g/L, 在 600 nm 下使用酶标仪检测样品的浊度。

1.3.7 流变特性测定

使用流变仪测试固体复合凝胶的储能模量 (G') 和损耗模量 (G'')。取 0.5 g 固体复合凝胶, 放置在 40 mm 的平行板之间, 具体参数设置如下: 选定恒定应变幅度 1.0%, 频率 1.0 Hz, 角速度 0.5~100 rad/s, 温度为 25 °C, 记录固体复合凝胶的黏弹性随角速度的变化。

1.4 数据处理

所有实验平行重复 3 次, 结果以算数平均值 $\pm$ 标准差表示。实验结果采用 Statistix 9.0 进行分析, 以最小显著差异法检验数据间的差异显著性, 以 $P<0.05$ 表示数据差异显著。

2 结果与讨论

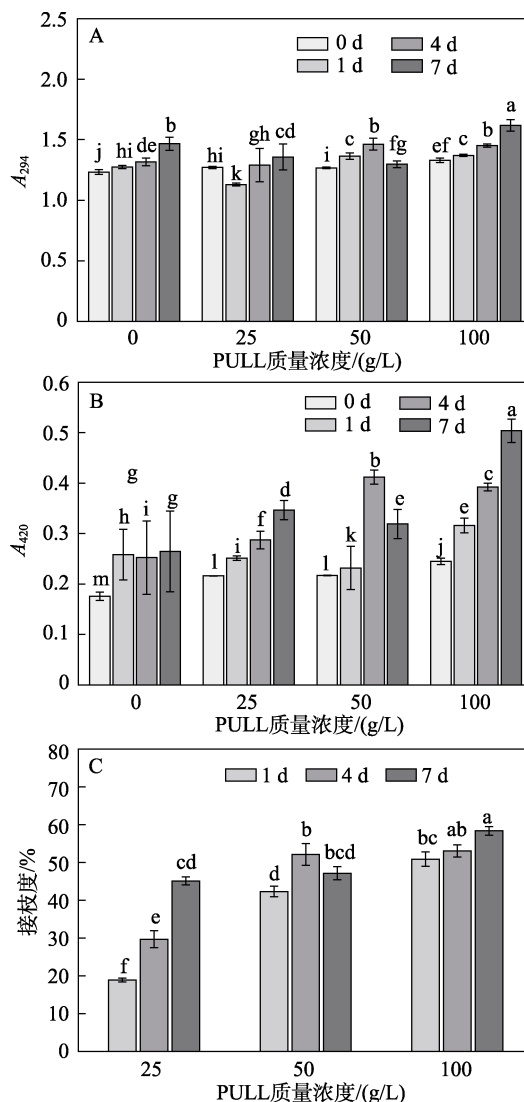
2.1 共聚反应程度及接枝度结果分析

共聚反应是基于蛋白质的自由氨基和多糖的还原羰基之间的羰氨反应, 该反应由 3 个阶段组成, 即起始、中期和后期阶段, 其特点是在特定波长处吸光度会随着反应的进行而变化。在 294 nm 处的吸光度可评估共聚反应中期产物 (如席夫碱和 Amadori 化合物) 的存在, 而在 420 nm 处的吸光度可用于确定共聚反应后期产物 (类黑素) 的形成^[25]。

图 1 为不同 PULL 质量浓度和反应时间制备的 GSPI-PULL 共聚物在 294、420 nm 处的吸光度 (即入射光强和透射光强比值的对数) 和接枝度。

从图 1 可以看出, GSPI-PULL 共聚物在 294 nm (图 1A)、420 nm (图 1B) 处的吸光度随着 PULL 质量浓度和反应时间的增加大致呈增加趋势, 表明 GSPI 和 PULL 的共聚反应形成了更多的中间产物和类黑素。同时, GSPI-PULL 共聚物的接枝度 (图 1C) 随着 PULL 质量浓度的增加和反应时间的延长, PULL 接枝度从 18.91% 增加到 58.34%。这可能是因为, 随着共聚反应的进行, 蛋白的结构和构象发生改变, 暴露出更多的氨基酸反应位点。然而, 当 PULL 质量浓度 50 g/L 时, 与反应 4 d 相比, 反应 7 d 时 294 和 420 nm 处的吸光度和接枝度都略有下降。这是因为, 长时间的共聚反应可能会导致蛋白质发生聚合, 通过蛋白质间的氢键或疏水相互作用形成一些不溶性的共聚物, 产生屏蔽效应, 隐藏活性的反应基团。这与 LI 等^[26]报道的过长共聚反

应时间导致大豆分离蛋白-葡萄糖的接枝度降低现象相似。



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$), 下同

图 1 不同 PULL 质量浓度和反应时间制备的 GSPI-PULL 共聚物在 294 nm (A)、420 nm (B) 处的吸光度和接枝度 (C)

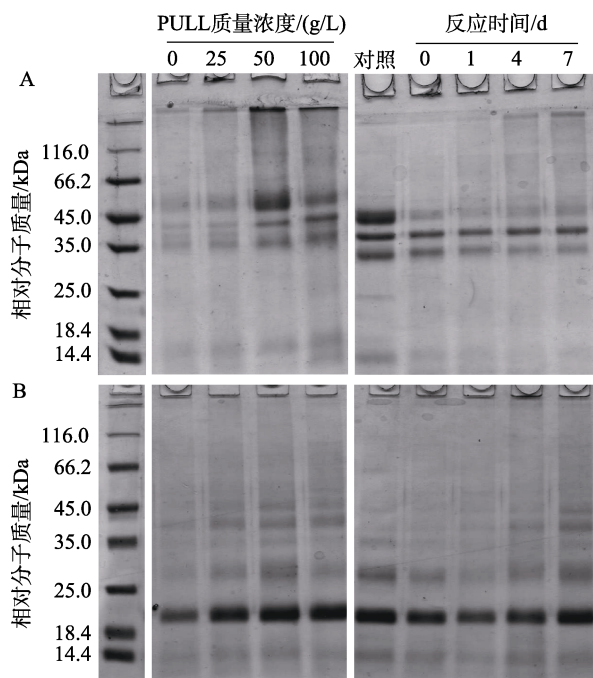
Fig. 1 Absorbance at 294 nm (A) and 420 nm (B) respectively, and grafting degree (C) of GSPI-PULL copolymers prepared with different PULL mass concentrations and reaction time

2.2 共聚反应对 GSPI-PULL 共聚物溶胶相对分子质量的影响

图 2 为 PULL 与 GSPI 共聚程度的 SDS-PAGE 分析结果。

从图 2 可以看出, 在非还原性条件下 (图 2A), 随着 PULL 质量浓度的增加, GSPI 相对分子质量明显提高, 共聚物出现在分离胶的上部。当 PULL 质量浓度为 100 g/L 时, 反应时间也会显著提高 GSPI 相对分子质量。表明 PULL 糖链被接枝到 GSPI 分子上, 形成高相对分子质量共聚物, 且共聚物的形成受共聚反应强度的影响。在还原条件下 (图 2B),

45.0~66.2 kDa 的条带消失, GSPI 的酸性和碱性亚基的相对分子质量分别为 28.0 和 20.0 kDa, 显著小于在非还原条件下 GSPI 的相对分子质量(35.0 和 49.0 kDa)。上述结果佐证了 GSPI 与 PULL 之间形成非还原性共价键, 促进了 GSPI-PULL 共聚物的形成。



A—非还原条件(不加入 β ME); B—还原条件(加入 β ME); 对照为提取的 GSPI

图 2 不同 PULL 质量浓度(时间 7 d)、不同反应时间(PULL 质量浓度 100 g/L)制备的 GSPI-PULL 共聚物的 SDS-PAGE 谱图

Fig. 2 SDS-PAGE spectra of GSPI-PULL copolymers prepared at different PULL mass concentrations (time 7 d) and different reaction time (PULL mass concentration 100 g/L)

2.3 共聚反应对 GSPI-PULL 共聚物溶胶表面疏水性的影响

图 3 为不同 PULL 质量浓度和反应时间制备的 GSPI-PULL 共聚物的表面疏水性。

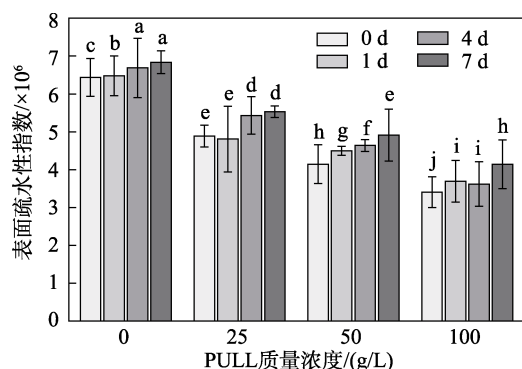


图 3 不同 PULL 质量浓度和反应时间制备的 GSPI-PULL 共聚物的表面疏水性指数

Fig. 3 Surface hydrophobicity index of GSPI-PULL copolymers prepared at different PULL mass concentrations and reaction time

从图 3 可以看出, GSPI-PULL 共聚物的表面疏水性指数随着 PULL 质量浓度的增加而降低。这是因为, PULL 提供了大量的亲水基团, 同时, PULL 容易覆盖在蛋白质表面的疏水基团上, 使 ANS 对疏水基团的可及性降低, 导致蛋白的表面疏水性下降^[27]。另外, 随着反应时间的增加, GSPI-PULL 共聚物的表面疏水性指数增加。这可能是因为, 长时间的热处理促进了蛋白质肽链的展开和疏水基团的暴露^[28]。

2.4 共聚反应对 GSPI-PULL 共聚物结构的影响

图 4 为不同 PULL 质量浓度(时间 7 d)(A)和反应时间(PULL 质量浓度 100 g/L)(B)制备的 GSPI-PULL 共聚物的 FTIR 谱图。

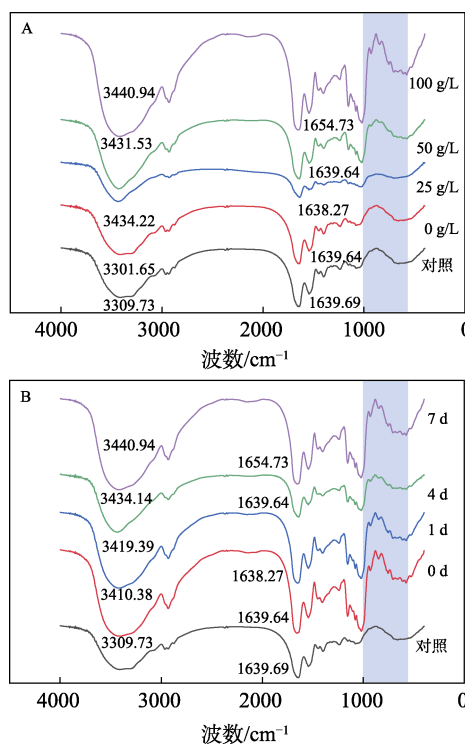


图 4 不同 PULL 质量浓度(时间 7 d)(A)和反应时间(PULL 质量浓度 100 g/L)(B)制备的 GSPI-PULL 共聚物的 FTIR 谱图

Fig. 4 FTIR spectra of GSPI-PULL copolymers prepared at different PULL mass concentrations (time 7 d) and reaction time (PULL mass concentration 100 g/L)

FTIR 可用于评价蛋白质的二级结构变化。在共聚反应过程中, 蛋白质的氨基和酰胺结构会发生变化, 主要是典型特征峰酰胺 A 带 $3700\sim 3200\text{ cm}^{-1}$ (N—H、O—H 和 C—H 基团的拉伸振动) 和酰胺 I 带 $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ (C=O 键的拉伸振动)。PULL 的特征峰位于 930 、 850 和 755 cm^{-1} 处, 分别代表 α -1,6-D-葡萄糖苷键、 α -构型、 α -1,4-D-葡萄糖苷键^[29]。从图 4 可以看出, PULL 的特征峰出现在 GSPI-PULL 共聚

物的 FTIR 谱图中,特征峰的强度也随着 PULL 质量浓度的增加而显著增强。表明 PULL 成功共价结合到 GSPI 分子上。当反应时间为 7 d 时,GSPI 与 PULL 共聚后,酰胺 A 带的吸收峰强度增强(图 4A)。这是因为,PULL 的共聚引入了大量的糖分子,导致 O—H 拉伸^[30]。此外,1639.69 cm^{-1} 处对应于 GSPI 共聚反应后的条带发生了不同程度的红移和蓝移,表明蛋白在共聚反应后二级结构发生了变化。当 PULL 质量浓度为 100 g/L 时,随着反应时间的增加,酰胺 A 带的峰向较高的波数移动(图 4B)。这可能是因为,GSPI 与 PULL 共聚后,分子间 N—H 和 O—H 基团的拉伸振动与蛋白中肽键的羰基形成氢键,同时 GSPI 与 PULL 共聚程度随着共聚反应时间的增加而增加,共聚物中氢键数量增加,这与 SDS-PAGE 分析结果(图 2)一致。与 GSPI 样品(对照)相比,发生共聚反应后的蛋白在酰胺 I 带的相关吸收带的位置发生了变化,GSPI-PULL 共聚物的酰胺 I 带吸收强度都高于对照样品。

图 5 为不同 PULL 质量浓度(时间 7 d)和反应时间(PULL 质量浓度 100 g/L)制备的 GSPI-PULL 共聚物的荧光光谱。

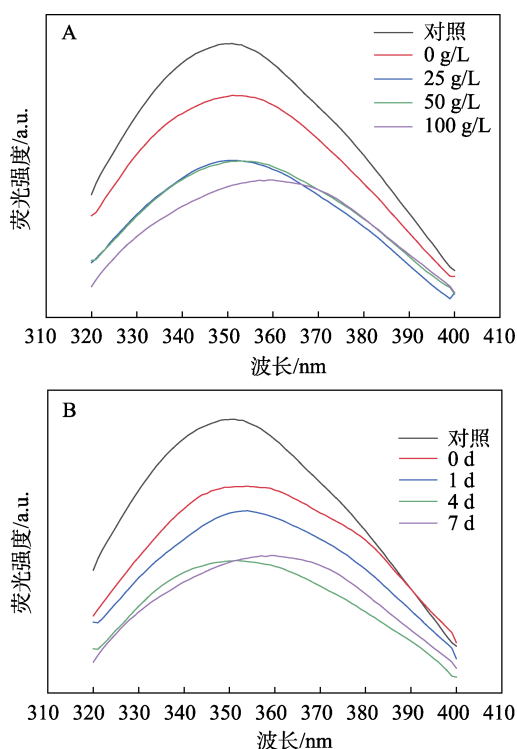


图 5 不同 PULL 质量浓度(时间 7 d)(A)和反应时间(PULL 质量浓度 100 g/L)(B)制备的 GSPI-PULL 共聚物的荧光光谱

Fig. 5 Fluorescence spectra of GSPI-PULL copolymers prepared at different PULL mass concentrations (time 7 d) (A) and reaction time (PULL mass concentration 100 g/L) (B)

荧光光谱可用于监测蛋白质的三级结构。从图 5A 可以看出,样品在干热条件下放置 7 d 时,荧光强度随着 PULL 质量浓度的增加而下降。这可能是因为,PULL 与 GSPI 充分反应产生了较强的立体位阻效应,抑制了 Trp 残基的荧光信号,降低了荧光信号强度。ZHANG 等^[31]研究也发现,多糖链在蛋白分子上会发生屏蔽作用,从而降低蛋白的荧光强度。从图 5A 还可以看出,PULL 质量浓度的增加导致 GSPI-PULL 共聚物最大发射波长发生红移。这可能是因为,PULL 的加入使 GSPI 暴露出更多的发色基团,同时蛋白质分子的原始结构变得更加松散。

从图 5B 可以看出,当 PULL 质量浓度为 100 g/L 时,GSPI-PULL 共聚物的荧光强度随着反应时间的延长而降低。这是因为,共聚反应导致 GSPI 的三级结构发生去折叠化,更多的 Trp 残基暴露,导致 GSPI 致密的三级结构减少。此外,当反应时间为 1~4 d 时,GSPI-PULL 共聚物的最大荧光发射波长发生蓝移,证实了 GSPI 与 PULL 之间通过共聚化反应形成了新的共价键。当反应 7 d 时,最大波长发生红移,这可能是因为,在干热反应过程中,反应性中间化合物之间可能存在多聚反应,形成了新的复杂的化学结构,改变了蛋白的分子结构。

2.5 共聚反应对 GSPI-PULL 共聚物溶胶溶解度和浊度的影响

图 6 为不同 PULL 质量浓度和反应时间制备的 GSPI-PULL 共聚物的溶解度和浊度。

从图 6A 可看出,GSPI-PULL 共聚物的溶解度随着 PULL 质量浓度的增加而增加(反应 0 d 时,从 45.42% 提高到 87.39%),却随着反应时间的增加而减小(PULL 质量浓度为 100 g/L 时,从 87.39% 降至 49.36%),这与表面疏水性变化相反(图 3)。这是因为,PULL 具有亲水性,可以提供酚羟基和羰基等亲水基团,增加蛋白与水分子的结合程度^[32]。然而,随着干热反应时间的增加,GSPI 与 PULL 发生了共聚,蛋白的结构展开并形成二硫键,样品的溶解度下降。另外,共聚反应会降低 PULL 亲水基团的可及性,且共聚反应高级阶段的产物与氨基酸残基发生分子内或分子间的交联,形成蛋白质分子聚合物,进一步降低蛋白质的溶解度^[33]。

浊度可以评估蛋白质分子聚集的程度,与液滴的大小和形状有关。从图 6B 可以看出,经干热处理的 GSPI-PULL 共聚物的浊度明显高于未处理的 GSPI 样品。这可能是由于,共聚反应促进了蛋白质分子展开并与 PULL 共聚化,进而形成了相对分子质量更大的 GSPI-PULL 共聚物。

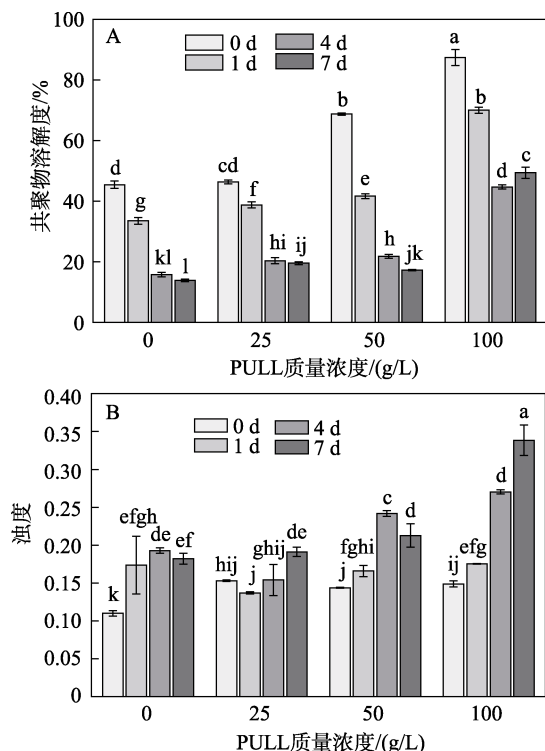


图 6 不同 PULL 质量浓度和反应时间制备的 GSPI-PULL 共聚物的溶解度 (A) 和浊度 (B)

Fig. 6 Solubility (A) and turbidity (B) of GSPI-PULL copolymers prepared at different PULL mass concentrations and reaction time

2.6 共聚反应对 GSPI-PULL 共聚物凝胶形貌的影响

图 7 为不同 PULL 质量浓度和反应时间制备的 GSPI-PULL 共聚物凝胶的外观图。

从图 7 可以看出, 当 PULL 质量浓度增加至 50~100 g/L 时, GSPI-PULL 共聚物才形成半固体状凝胶, 并具有一定的流动性。这可能是因为, PULL 质量浓度越大, 样品黏度越高, 导致传质和扩散效率降低, 不利于凝胶的形成^[34]。LIU 等^[35]报道, 在豌豆蛋白和黄原胶的复合蛋白凝胶中, 由于相分离效应添加低浓度的多糖能增加凝胶强度, 但加入高浓度的多糖会降低凝胶强度。

从图 7 还可以看出, 随着反应时间的增加, 样品逐渐呈现液体状, 对照样品 (未添加 PULL) 则出现分层现象, 而原本软塌的样品难以形成热诱导凝胶。这是因为, 共聚反应破坏了蛋白质的天然结构, 蛋白质分子间的颗粒重排受阻, 导致样品的网络结构不稳定, 凝胶强度下降, 甚至难以形成凝胶^[36]。对照样品和质量浓度为 25 g/L 的 PULL、反应时间 1 d 的 GSPI-PULL 共聚物形成的凝胶有良好的站立性, 无明显的坍塌感。ZHAO 等^[15]也报道, 蛋白质与多糖的共价共聚反应会降低凝胶特性。上述结果表明, 多糖的添加和加热时间的延长在弱化凝胶质地方面有协同作用。

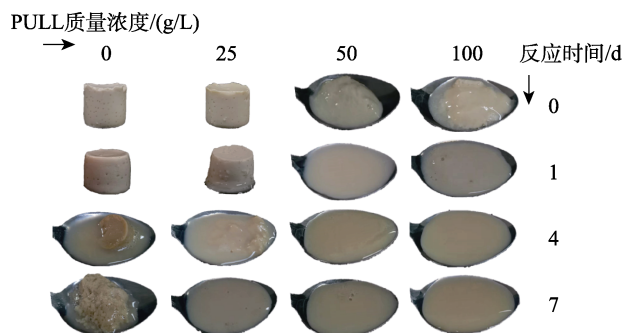
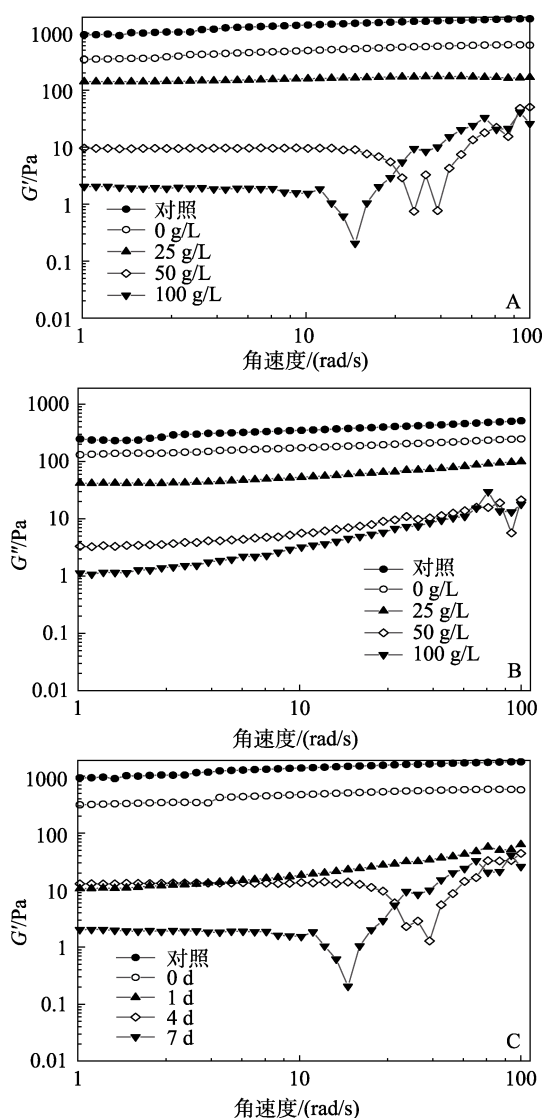


图 7 不同 PULL 质量浓度和反应时间制备的 GSPI-PULL 共聚物凝胶的外观图

Fig. 7 Visual appearance of GSPI-PULL copolymers prepared at different PULL mass concentrations and reaction time

2.7 共聚反应对 GSPI-PULL 共聚物凝胶流变特性的影响

图 8 为不同 PULL 质量浓度 (时间 7 d) 和反应时间 (PULL 质量浓度 100 g/L) 制备的 GSPI-PULL 共聚物的流变特性。



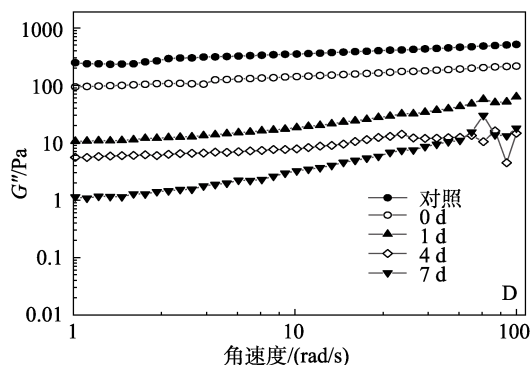


图8 不同 PULL 质量浓度 (时间 7 d) (A、B) 和反应时间 (PULL 质量浓度 100 g/L) (C、D) 制备的 GSPI-PULL 共聚物的流变特性

Fig. 8 Rheological properties of GSPI-PULL copolymers prepared at different PULL mass concentrations (time 7 d) (A, B) and reaction time (PULL mass concentration 100 g/L) (C, D)

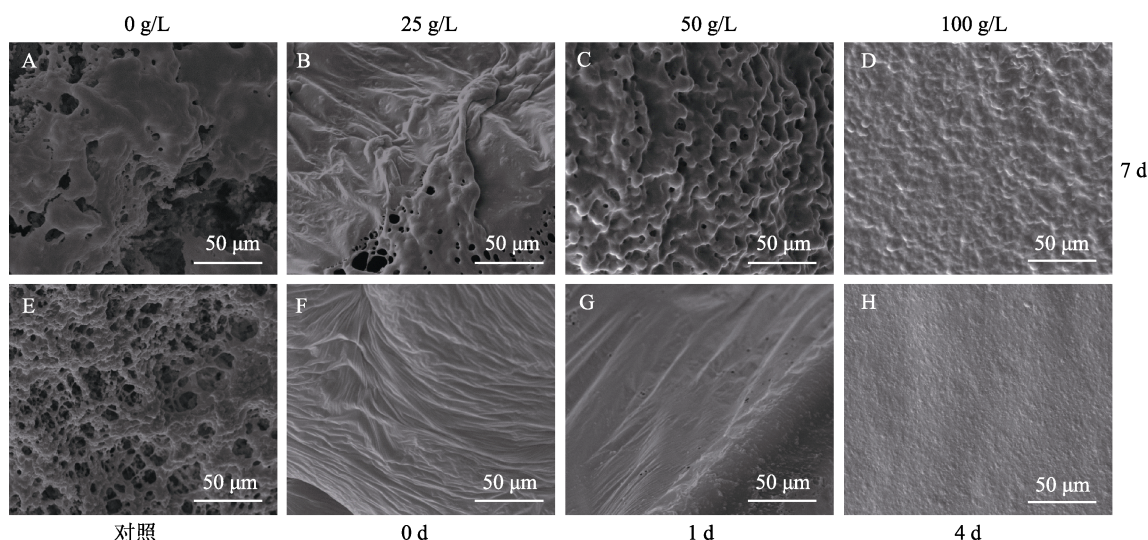
G' 和 G'' 可以反映样品凝胶网络的质地性, 分别描述凝胶的弹性特征和黏性特征。从图 8 可以看出, 在不同 PULL 质量浓度和反应时间条件下, GSPI-PULL 共聚物的 G' 始终显著大于 G'' , 表明样品偏向于凝胶化的结构。此外, 样品的 G' 和 G'' 的斜率较小, 曲线接近平行于 x 轴, 表明其对频率的依赖性较弱, 证实凝胶化体系形成了相对稳定的凝胶^[37]。

从图 8 还可以看出, 随着 PULL 质量浓度和反应时间的增加, GSPI-PULL 共聚物的 G' 和 G'' 显著

下降 (反应 7 d 时随着 PULL 的质量浓度从 0 g/L 增加到 100 g/L, 在角速度为 100 rad/s 时, G' 从 614.31 Pa 降低到 25.78 Pa, G'' 从 274.67 Pa 降低到 17.89 Pa; PULL 质量浓度为 100 g/L 时, 反应时间从 0 d 延到 7 d, G' 从 575.28 Pa 降低到 25.78 Pa, G'' 从 215.51 Pa 降低到 17.89 Pa)。表明在一定条件下, PULL 质量浓度和反应时间抑制了蛋白凝胶的形成。这与蛋白凝胶照片 (图 7) 结果一致。这是因为, PULL 质量浓度和反应时间的增加, 加深了 GSPI-PULL 共聚物共聚化程度, 共聚反应削弱了氨基酸残基之间相互作用, 阻碍蛋白凝胶的形成。同时, PULL 的空间位点阻断效应也会抑制水溶液中相邻聚集体之间的进一步结合。PENG 等^[38]报道的流变特性也有类似的结果。此外, 反应时间对 GSPI-PULL 共聚物的影响显著大于 PULL 质量浓度, 说明共聚反应过程中, 加热时间对蛋白凝胶性的影响大于多糖的质量浓度。这可能是因为, 长时间的干热反应使蛋白质的结构展开, 这与蛋白疏水性结果一致 (图 3)。MENG 等^[14]报道乳清蛋白和塔格糖的共聚时也有类似的现象。

2.8 共聚反应对 GSPI-PULL 共聚物凝胶微观结构的影响

图 9 为不同 PULL 质量浓度 (时间 7 d) 和反应时间 (PULL 质量浓度 100 g/L) 制备的 GSPI-PULL 共聚物的 SEM 图。



A—0 g/L, 7 d; B—25 g/L, 7 d; C—50 g/L, 7 d; D—100 g/L, 7 d; E—对照; F—100 g/L, 0 d; G—100 g/L, 1 d; H—100 g/L, 4 d
图9 不同 PULL 质量浓度 (时间 7 d) 和反应时间 (PULL 质量浓度 100 g/L) 制备的 GSPI-PULL 共聚物凝胶的 SEM 图
Fig. 9 SEM images of GSPI-PULL copolymer gels prepared at different PULL mass concentrations (time 7 d) and reaction time (PULL mass concentration 100 g/L)

从图 9 可以看出, GSPI (图 9E) 表面多孔、粗糙且不平整, 样品的球状颗粒感明显。当加热反应时间为 7 d, 随着 PULL 质量浓度的增加, GSPI-PULL

共聚物的结构逐渐规则、孔径逐渐减小 (图 9A~D)。这与 LIU 等^[39]观察乳清蛋白与 PULL 复合凝胶的微观结构的结果一致。此外, 当 PULL 质量浓度为

100 g/L 时,随着加热反应时间的增加(图 9F~H、D), GSPI-PULL 共聚物表面变得均匀光滑。表明共聚反应后, GSPI 与 PULL 紧密结合,并形成了非均质化的网络结构^[40]。据报道^[41],共聚物中平坦均匀的结构与共聚物的溶解能力降低有关。

3 结论

通过 GSPI 与 PULL 在干热法条件下的共聚反应制备了 GSPI-PULL 共聚物,分析了共聚反应对其诱导凝胶质构性的影响。

(1) 干热法(温度 70 °C、湿度 63%下放置)可使 GSPI、PULL 通过共价作用形成蛋白多糖共聚物。通过调节 PULL 质量浓度(25、50 和 100 g/L)和加热时间(1、4 和 7 d),可获得不同 PULL 接枝度的 GSPI-PULL 共聚物。随着多糖质量浓度的增加、加热时间的延长, PULL 接枝度从 18.91%增加到 58.34%。

(2) 共聚反应促进 GSPI 结构展开,增加共聚物的相对分子质量。随着 PULL 质量浓度的增加,降低了共聚物的疏水性,提高了其溶解性;而延长加热时间,共聚物的疏水性和溶解性与上述效应呈现相反作用。GSPI-PULL 共聚物的溶解度随着 PULL 质量浓度的增加而增加(反应 0 d 时,从 45.42%提高到 87.39%),却随着反应时间的增加而减小(PULL 质量浓度为 100 g/L 时,从 87.39%降至 49.36%),这归因于共聚反应引入了亲水基团,加热处理增加了蛋白的疏水性。

(3) 干热处理中的加热温度效应及 PULL 接枝蛋白的共聚反应均能显著弱化 GSPI 凝胶的站立性和质地,二者处理有叠加作用;凝胶的 G' 、 G'' 随着 PULL 质量浓度和反应时间的增加而显著下降(反应 7 d 时增加 PULL 的质量浓度, G' 从 614.31 Pa 降低到 25.78 Pa, G'' 从 274.67 Pa 降低到 17.89 Pa; PULL 质量浓度为 100 g/L 时,延长反应时间, G' 从 575.28 Pa 降低到 25.78 Pa, G'' 从 215.51 Pa 降低到 17.89 Pa),显著降低了凝胶的流变学性能;结构上表现为更均匀。

将 PULL 引入 GSPI 体系中,通过控温控湿的干热加工,可获得质地具有显著弱化差异的凝胶或溶胶。本文解释了蛋白与多糖共聚化对蛋白结构与成胶行为的影响,为制备质地要求特殊的食品提供了一种技术参考和理论依据。

参考文献:

[1] LIU W N, ZOU M M, WANG Y S, *et al.* Ginkgo seed proteins: Characteristics, functional properties and bioactivities[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2021, 76(3): 281-291.
[2] BANERJEE S, BHATTACHARYA S. Food gels: Gelling process and new applications[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*,

2012, 52(4): 334-346.
[3] WANG S N (王思念), WU J (伍娟), LI K F (李堃芳), *et al.* Properties and microstructure of potato/whey protein mixed gels[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(12): 2541-2549.
[4] WILLIAMS R A. Opportunities and challenges for the introduction of new food proteins[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2021, 12: 75-91.
[5] MUNIALO C D, KONTOGIORGOS V, EUSTON S R, *et al.* Rheological, tribological and sensory attributes of texture-modified foods for dysphagia patients and the elderly: A review[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2020, 55(5): 1862-1871.
[6] SILVA J V C, COCHEREAU R, SCHMITT C, *et al.* Heat-induced gelation of mixtures of micellar caseins and plant proteins in aqueous solution[J]. *Food Research International*, 2019, 116: 1135-1143.
[7] ZHANG L Y (张露妍), GUO F X (郭凤仙), YOU J Y (尤洁瑜), *et al.* γ -Aminobutyric acid and L-citrulline enhancing the gelation performance of *Ginkgo biloba* seed protein isolate[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(12): 2731-2738.
[8] HE Z D (何振东), YOU J Y (尤洁瑜), ZHANG L Y (张露妍), *et al.* Calcium chloride regulating the texture of *Ginkgo biloba* seed protein isolate/pectin composite gels[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2023, 40(9): 2034-2041.
[9] ZHANG W, LIU C Q, ZHAO J, *et al.* Alkali-induced phenolic acid oxidation enhanced gelation of ginkgo seed protein[J]. *Foods*, 2023, 12(7): 1506.
[10] HE Z D, LIU C Q, ZHAO J, *et al.* Physicochemical properties of a ginkgo seed protein-pectin composite gel[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 118: 106781.
[11] DUMITRAȘCU L, BORDA D, APRODU I. Alternative processing options for improving the proteins functionality by Maillard conjugation[J]. *Foods*, 2023, 12(19): 3588.
[12] SPOTTI M J, LOYEAU P A, MARANGÓN A, *et al.* Influence of Maillard reaction extent on acid induced gels of whey proteins and dextran[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 91: 224-231.
[13] WANG W Q, YUAN P P, ZHOU Y Y, *et al.* Effect of temperature and pH on the gelation, rheology, texture, and structural properties of whey protein and sugar gels based on Maillard reaction[J]. *Journal of Food Science*, 2021, 86(4): 1228-1242.
[14] MENG Y, ZHAO X, JIANG Y Q, *et al.* Effect of Maillard reaction conditions on the gelation and thermal stability of whey protein isolate/D-tagatose conjugates[J]. *Food Chemistry*, 2023, 405: 134928.
[15] ZHAO C B, YIN H H, YAN J N, *et al.* Structure and acid-induced gelation properties of soy protein isolate-maltodextrin glycation conjugates with ultrasonic pretreatment[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 112: 106278.
[16] XIAO Y P, QI P X, WICKHAM E D. Interactions, induced by heating, of whey protein isolate (WPI) with sugar beet pectin (SBP) in solution: Comparisons with a dry-state Maillard reaction[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 83: 61-71.
[17] CHEN B, ZHOU K, WANG Y, *et al.* Insight into the mechanism of textural deterioration of myofibrillar protein gels at high temperature conditions[J]. *Food Chemistry*, 2020, 330: 127186.
[18] SINGH R S, KAUR N, KENNEDY J F. Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 217: 46-57.
[19] SHENG L, SU P, HAN K, *et al.* Synthesis and structural characterization of lysozyme-pullulan conjugates obtained by the Maillard reaction[J]. *Food Hydrocolloids*, 2017, 71: 1-7.
[20] ZHANG M H, SUN H Y, LIU Y K, *et al.* Effect of pullulan concentration and pH on the interactions between whey protein concentrate and pullulan during gelation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2021, 101(2): 659-665.
[21] ZHANG M H, SUN H Y, WANG Y, *et al.* Preparation and characterization of a novel porous whey protein concentrate/pullulan gel induced by heating for Cu^{2+} absorption[J]. *Food Chemistry*, 2020, 322: 126772.
[22] SUN H Y, ZHANG M H, LIU Y K, *et al.* Improved viability of *Lactobacillus plantarum* embedded in whey protein concentrate/pullulan/trehalose hydrogel during freeze drying[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 260: 117843.
[23] ZHANG W W, LIU C Q, ZHAO J, *et al.* Modification of structure and functionalities of ginkgo seed proteins by pH-shifting treatment[J]. *Food Chemistry*, 2021, 358: 129862.
[24] ZHANG Z J, HOLDEN G, WANG B, *et al.* Maillard reaction-based conjugation of *Spirulina* protein with maltodextrin using wet-heating

- route and characterisation of conjugates[J]. Food Chemistry, 2023, 406: 134931.
- [25] KIM Y J, YONG H I, CHUN Y G, *et al.* Physicochemical characterization and environmental stability of a curcumin-loaded Pickering nanoemulsion using a pea protein isolate-dextran conjugate via the Maillard reaction[J]. Food Chemistry, 2024, 436: 137639.
- [26] LI R, CUI Q, WANG G R, *et al.* Relationship between surface functional properties and flexibility of soy protein isolate-glucose conjugates[J]. Food Hydrocolloids, 2019, 95: 349-357.
- [27] AI M M, XIAO N, JIANG A M. Molecular structural modification of duck egg white protein conjugates with monosaccharides for improving emulsifying capacity[J]. Food Hydrocolloids, 2021, 111: 106271.
- [28] YILDIZ G, ANDRADE J, ENGESETH N E, *et al.* Functionalizing soy protein nano-aggregates with pH-shifting and mano-thermosonication[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2017, 505: 836-846.
- [29] SHENG L, TANG G Y, SU P, *et al.* Understanding the influence of Tween 80 on pullulan fermentation by *Aureobasidium pullulans* CGMCC1234[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 136: 1332-1337.
- [30] SHENG L, TANG G Y, WANG Q, *et al.* Molecular characteristics and foaming properties of ovalbumin-pullulan conjugates through the Maillard reaction[J]. Food Hydrocolloids, 2020, 100: 105384.
- [31] ZHANG Q, YUE W T, ZHAO D, *et al.* Preparation and characterization of soybean protein isolate-dextran conjugate-based nanogels[J]. Food Chemistry, 2022, 384: 132556.
- [32] DE SOUZA C K, GHOSH T, LUKHMANA N, *et al.* Pullulan as a sustainable biopolymer for versatile applications: A review[J]. Materials Today Communications, 2023, 36: 106477.
- [33] KE C X, LI L. Influence mechanism of polysaccharides induced Maillard reaction on plant proteins structure and functional properties: A review[J]. Carbohydrate Polymers, 2023, 302: 120430.
- [34] RYU J, MCCLEMENTS D J. Impact of heat-set and cold-set gelling polysaccharides on potato protein gelation: Gellan gum, agar, and methylcellulose[J]. Food Hydrocolloids, 2024, 149: 109535.
- [35] LIU Z B, CHEN X, DAI Q Y, *et al.* Pea protein-xanthan gum interaction driving the development of 3D printed dysphagia diet[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 139: 108497.
- [36] ZHANG Z, CHEN W C, ZHOU X, *et al.* Astaxanthin-loaded emulsion gels stabilized by Maillard reaction products of whey protein and flaxseed gum: Physicochemical characterization and *in vitro* digestibility[J]. Food Research International, 2021, 144: 110321.
- [37] CHOI H W, HAM S H, HAHN J, *et al.* Developing plant-based mayonnaise using pea protein-xanthan gum conjugates: A Maillard reaction approach[J]. LWT, 2023, 185: 115137.
- [38] PENG Z W, ZHANG Y, WANG H Q, *et al.* Effects of arginine-glucose Maillard reaction products on the physicochemical and gel properties of chicken myofibrillar protein[J]. LWT, 2021, 152: 112244.
- [39] LIU Y K, LI X, SUN H Y, *et al.* Whey protein concentrate/pullulan gel as a novel microencapsulated wall material for astaxanthin with improving stability and bioaccessibility[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 138: 108467.
- [40] YADAV M P, STRAHAN G D, MUKHOPADHYAY S, *et al.* Formation of corn fiber gum-milk protein conjugates and their molecular characterization[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 26(2): 326-333.
- [41] ZHAO F C, DONG S Y, RAO J J, *et al.* Pea protein isolate-gum Arabic Maillard conjugates improves physical and oxidative stability of oil-in-water emulsions[J]. Food Chemistry, 2019, 285: 130-138.
- (上接第377页)
- [17] LIANG Z Y (梁宗瑶), WEI Y Y (魏园园), REN W W (任维维), *et al.* Composition analysis and inhibitory effect against α -amylase and α -glucosidase of acorn kernel extractions[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2021, 42(17): 47-55.
- [18] LIU C Y (刘承毅), WU X H (吴雪辉). Purification and inhibitory effect on α -amylase activity of proanthocyanidins from *Camellia oleifera* shell[J]. The Food Industry (食品工业), 2021, 42(8): 142-146.
- [19] HOU X D (侯旭东), HU Q (胡倩), MA L J (马丽娟), *et al.* Recent advances on pancreatic lipase inhibitors from Chinese herbs[J]. Acta Pharmaceutica Sinica (药学报), 2020, 55(7): 1478-1493.
- [20] LI X, MORITA S, YAMADA H, *et al.* Free linoleic acid and oleic acid reduce fat digestion and absorption *in vivo* as potent pancreatic lipase inhibitors derived from sesame meal[J]. Molecules, 2022, 27(15): 4910.
- [21] CAO Y X (曹叶霞), LI H Q (李慧卿), YIN A P (尹爱萍), *et al.* Study on the inhibitory effect of leek extracts on pancreatic lipase[J]. Cereals & Oils (粮食与油脂), 2023, 36(4): 141-144, 159.
- [22] RIBEIRO P M G, FERNANDES H S, MAIA L B, *et al.* The complete catalytic mechanism of xanthine oxidase: A computational study[J]. Inorganic Chemistry Frontiers, 2021, 8(2): 405-416.
- [23] EL DIN U A S, SALEM M M, ABDULAZIM D O. Uric acid in the pathogenesis of metabolic, renal, and cardiovascular diseases: A review[J]. Journal of Advanced Research, 2017, 8(5): 537-548.
- [24] LI Y H (李雨鸿), YIN C M (殷朝敏), FAN X Z (范秀芝), *et al.* *In vitro* anti-oxidant, hypoglycemic, and hypouricemic activities of *Sanguangporus vaninii* extracts[J]. Modern Food Science and Technology (现代食品科技), 2022, 38(5): 71-80.
- [25] HUO J W (霍俊伟), GUO W R (郭文荣), QIAO J L (乔锦莉), *et al.* Identification of polyphenols in white currant fruit and their antioxidant activity[J]. Food Science (食品科学), 2023, 44(8): 219-227.
- [26] ZOU Y (邹毅). New progress in research on active ingredients of traditional chinese medicine α -glucosidase inhibitor and its screening mode[J]. Modern Chemical Research (当代化工研究), 2021, 18: 172-174.
- [27] WANG J B, YU L Y, ZENG X, *et al.* Screening of probiotics with efficient α -glucosidase inhibitory ability and study on the structure and function of its extracellular polysaccharide[J]. Food Bioscience, 2022, 45: 101452.
- [28] SHEN H Y (沈荷玉), LI M Y (李梦阳), AO J F (敖婧芳), *et al.* Inhibitory effect and mechanism of gallic acid on α -amylase and α -glucosidase activities[J]. Food Science (食品科学), 2023, 44(22): 31-38.
- [29] RIYAPHAN J, PHAM D C, LEONG M K, *et al.* In silico approaches to identify polyphenol compounds as α -glucosidase and α -amylase inhibitors against type-II diabetes[J]. Biomolecules, 2021, 11(12): 1877.
- [30] ZHANG J F, LI C X, WANG G D, *et al.* α -Amylase inhibition of a certain dietary polyphenol is predominantly affected by the concentration of α -1, 4-glucosidic bonds in starch and artificial substrates[J]. Food Research International, 2022, 157: 111210.
- [31] WANG L (王露), HUANG L X (黄立新), LIU L (刘磊). Inhibitory effect of food derived polyphenols on activity of α -amylase with rice starch[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association (中国粮油学报), 2023, 38(8): 131-137.
- [32] YU Q, TIAN Y, FAN L P. Inhibition mechanisms of wounded okra on the α -glucosidase/ α -amylase[J]. Food Bioscience, 2023, 51: 102333.
- [33] YI L, CUI J, WANG W, *et al.* Formononetin attenuates airway inflammation and oxidative stress in murine allergic asthma[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 533841.
- [34] WU S Y (吴思毅), LIANG Y Y (梁远盈), WENG Y J (翁依佳), *et al.* Study on the effect and mechanism of fraxetin on atherosclerosis based on ferroptosis regulation[J]. Journal of Guangxi Medical University (广西医科大学学报), 2023, 40(5): 716-723.
- [35] ZHAO L (赵琳), ZHU H F (朱宏飞). Effects of daphnetin on the proliferation, apoptosis and chemosensitivity of breast cancer by regulating the Shh/Gli1 signaling pathway[J]. Hebei Medical Journal (河北医药), 2024, 46(4): 534-538.
- [36] YANG C K, LI S H, LIU X Y, *et al.* The active ingredient of Ligusticum sinense 'Chuanxiong' acid has a protective mechanism of cardiovascular action[J]. World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine, 2024, 19(1): 199-206.
- [37] YANG W (杨雯), HU H M (胡海明), LIU H T (刘洪涛), *et al.* Screening and identification of two human intestinal strains metabolizing caffeic acid and exploring their metabolic processes[J]. Science and Technology of Food Industry (食品工业科技), 2024, 45(3): 137-145.