

物理双场耦合酶解对亚麻籽植物乳酚类物质溶出及黏度的影响

谭霄, 郝倩, 邓乾春, 程园梦, 吴传江, 吴茜, 陈亚淑

Effect of Physical Dual-field Coupled Enzymolysis on Phenolics Solubilization and Viscosity of Flaxseed Plant-based Milk

TAN Xiao, HAO Qian, DENG Qianchun, CHENG Yuanmeng, WU Chuanjiang, WU Qian, and CHEN Yashu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2024090312>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

高压电场低温等离子体对红枣干果的冷杀菌工艺优化及其对品质的影响

Optimization of Cold Sterilization Process and Its Effect on Quality of Dried Jujube by High Voltage Electric Field Cold Plasma

食品工业科技. 2021, 42(16): 317-324 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020120235>

干法脱胶对亚麻籽植物乳稳定性和营养特性的影响

Effect of Dry Degumming on the Stability and Nutritional Properties of Flaxseed Plant Milk

食品工业科技. 2024, 45(18): 202-209 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023110150>

低温等离子体杀灭食源性致病菌的研究进展

Research Progress of Cold Plasma in Killing Foodborne Pathogens

食品工业科技. 2021, 42(6): 363-370,382 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020060072>

驼乳与牛乳乳清蛋白酶解工艺优化及其产物抗氧化能力分析

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Camel Milk and Milk Whey Protein and Analysis of Its Antioxidant Capacity

食品工业科技. 2020, 41(13): 187-194,201 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.13.030>

高压电场低温等离子体对马拉硫磷的降解效能及降解途径

Degradation Efficiency and Pathway of Malathion Treated by High Voltage Electric Field Cold Plasma

食品工业科技. 2020, 41(21): 37-42,47 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019120131>

低温等离子体在农产品加工保藏中应用的研究进展

Research Progress on the Application of Cold Plasma in Food Sterilization and Preservation

食品工业科技. 2021, 42(11): 390-396 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020070214>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

谭霄, 郝倩, 邓乾春, 等. 物理双场耦合酶解对亚麻籽植物乳酚类物质溶出及黏度的影响 [J]. 食品工业科技, 2025, 46(19): 85–94.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024090312

TAN Xiao, HAO Qian, DENG Qianchun, et al. Effect of Physical Dual-field Coupled Enzymolysis on Phenolics Solubilization and Viscosity of Flaxseed Plant-based Milk[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(19): 85–94. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024090312

· 研究与探讨 ·

物理双场耦合酶解对亚麻籽植物乳酚类物质溶出及黏度的影响

谭 霄^{1,2}, 郝 倩^{1,2}, 邓乾春², 程园梦², 吴传江², 吴 茜^{1,*}, 陈亚淑^{2,*}

(1.湖北工业大学生命科学与健康工程学院, 湖北武汉 430068;

2.中国农业科学院油料作物研究所, 油料脂质化学与营养湖北省重点实验室, 湖北武汉 430062)

摘 要:为探究物理场耦合酶解处理对亚麻籽植物乳的影响, 本研究首先使用了低温等离子体对纤维素酶进行处理以提高其酶活, 并根据酶活变化确定了最佳处理时间, 然后使用荧光光谱、紫外光谱、圆二色光谱分析 (Circular Dichroism spectra, CDs) 对酶结构进行分析, 探索其酶活改变机制; 其次, 研究了低温等离子体 (Cold Plasma, CP) 或脉冲电场 (Pulsed Electric Field, PEF) 单物理场协同酶解处理对亚麻籽乳酚类物质溶出及黏度的影响, 并根据实验结果确定了 PEF 最佳处理电压。最后, 使用 CP (处理时间 15 s)、PEF (处理电压 3.7 kV/cm) 物理双场协同纤维素酶对亚麻籽乳进行处理, 探究了物理双场耦合酶解 (Cold Plasma and Pulsed Electric Field coupled Enzymatic treatment, CP-PEF-EN) 对亚麻籽植物乳总酚含量与黏度的影响。结果表明: 使用 CP 处理纤维素酶时, 纤维素酶酶活呈现先升高 (15 s, 最高 89%) 后降低趋势, 光谱结果显示 CP 产生的活性离子和酶分子发生了相互作用, 使得酶的催化活性中心以及官能团改变, 导致酶结构改变, 其 β -折叠含量先增加后下降。CP 或 PEF 单场耦合酶解均可提高亚麻籽植物乳总酚含量 (提升率分别为 CP: 44.44%、PEF: 46.97%), 且 CP-PEF-EN 处理效果更好, 总酚含量达 0.327 g/100 g (提升率为 65.15%), 黏度为 77.47 mPa·s (降黏 39.92%)。本研究表明 CP-PEF-EN 处理可显著提高亚麻籽植物乳的总酚溶出率并降低其黏度, 为新型绿色植物乳加工技术提供了参考。

关键词: 亚麻籽乳, 脉冲电场 (PEF), 低温等离子体 (CP), 酶解

中图分类号: TS275.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2025)19-0085-10

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024090312



本文网刊:

Effect of Physical Dual-field Coupled Enzymolysis on Phenolics Solubilization and Viscosity of Flaxseed Plant-based Milk

TAN Xiao^{1,2}, HAO Qian^{1,2}, DENG Qianchun², CHENG Yuanmeng², WU Chuanjiang²,
WU Qian^{1,*}, CHEN Yashu^{2,*}

(1.School of Life Sciences and Health, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China;

2.Hubei Key Laboratory of Lipid Chemistry and Nutrition, Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

Abstract: In order to investigate the impact of physical field-coupled enzymatic treatments on flaxseed plant-based milk, this investigation was conducted in a phased manner. Firstly, cellulase was modified by using low temperature plasma treatment (cold plasma) to increase its enzyme activity, and the optimal treatment time was determined based on the results of enzyme activity changes, and then the structural alterations of the enzyme were characterized using fluorescence

收稿日期: 2024-09-23

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFD2100405); 湖北省重点研发计划项目 (2023BBB048); 中国农科院青创专项 (Y2024QC22); 湖北省自然科学基金创新群体项目 (2023AFA042); 国家现代农业产业技术体系 (cars-14)。

作者简介: 谭霄 (2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物乳创制及风味稳定性探究, E-mail: 2390018900@qq.com。

*** 通信作者:** 吴茜 (1988-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品营养与安全, E-mail: wuqian@hbut.edu.cn。

陈亚淑 (1993-), 女, 博士, 特聘研究员, 研究方向: 油料加工与植物基食品, E-mail: chenashu@caas.cn。

spectroscopy, ultraviolet spectroscopy, and circular dichroism spectra (CDs) to explore the mechanism of enzyme activity changes. Secondly, this study probed the influence of cold plasma (CP) or pulsed electric field (PEF) respectively, when coupled with enzymatic treatment, on the solubilization of phenolic compounds and the rheological properties of flaxseed plant-based milk, and according to the experimental results, the optimal PEF treatment voltage was determined. Finally, the flaxseed plant-based milk was treated with CP (time: 15 seconds) and PEF (voltage: 3.7 kV/cm) coupled with cellulase to assess the effectiveness of the cold plasma and pulsed electric field coupled enzymatic treatment (CP-PEF-EN) on the total phenolic content and viscosity of flaxseed plant-based milk. The findings revealed that the enzymatic activity of cellulase exhibited an initial surge (up to 89% at 15 seconds) followed by a decline upon CP treatment. Spectroscopic analyses indicated that the reactive ions generated by CP interacted with the enzyme molecules, leading to alterations in the enzyme's catalytic sites and functional groups. Additionally, the enzyme's secondary structure was changed, from an initial increase and subsequent decrease in β -sheet content. The results demonstrated that both CP and PEF single-field coupled enzymatic treatments could enhance the total phenolic content of flaxseed plant-based milk (increase rates were 44.44% and 46.97%, respectively). Notably, the CP-PEF-EN proved more efficient, increasing the total phenolic content to 0.327 g/100 g (a 65.15% increase) and reducing the viscosity to 77.47 mPa·s (a 39.92% decrease). This study underscores the potential of CP-PEF-EN treatment to significantly increase the total phenol dissolution rate and mitigate the viscosity of flaxseed plant-based milk, providing a reference for the processing technologies of innovative eco-friendly plant-based milk.

Key words: flaxseed plant-based milk; pulsed electric field (PEF); cold plasma (CP); enzymolysis

随着“大食物观”“大农业观”“双碳”等政策出台,“营养健康”“清洁标签”类植物基食品发展迅速,特别是植物奶(乳)产业在我国的新型研究技术领域得到了广泛关注^[1]。除了传统的豆奶、花生奶、椰奶等,新一代营养型植物基饮品,如富含 Omega-3 脂肪酸的亚麻籽植物乳在国内具有较大发展潜力^[2-3]。亚麻籽富含优质植物蛋白(~30%)、功能性膳食纤维(~20%)和 α -亚麻酸(α -Linolenic Acid, ALA)、植物多酚等营养素,是一种公认具有多重促健康效应的药食同源油料作物^[4]。其包含的木酚素、酚酸等多酚是保护其内源 Omega-3 脂肪酸即 ALA、构成亚麻籽内源性抗氧化体系的关键组分,且其自身或与 ALA 协同具有改善年龄相关性退行性疾病发生发展、减少慢性病发生的功效^[5-6],因此木酚素溶出率即其在亚麻籽植物乳中含量是评价亚麻籽营养品质的重要指标。此外,由于亚麻籽中富含天然亲水胶体-亚麻籽胶,其含量约为种子干重的 8%^[7],其溶于水后使得亚麻籽植物乳黏度较高,呈现果冻状,严重影响了亚麻籽乳的感官品质,因此黏度是评价亚麻籽品质的另一个重要指标^[8]。

目前国内外植物乳研制过程中对其自身的营养属性、清洁标签属性也越来越关注,如何利用绿色低碳的加工工艺提高其品质已成为国内外的研究热点^[9]。酶作为绿色催化剂已广泛应用于肉类、水果、啤酒等食品加工中,近年来酶解处理逐渐成为改善植物乳品质的高效手段^[10]。其中,纤维素酶能够进攻植物细胞壁纤维素中的 β -1,4-糖苷键并作用于其还原性和非还原性末端,从而将大分子纤维素水解为小分子糖^[11],促进纤维素网络和植物细胞壁的降解,降低植物乳的黏度,同时还可以促进植物细胞中的营养物质如多酚等的溶出^[12],且相较于传统方法具有显著的绿色和高效优势。但由于酶的专一性以及对环境敏感性,其在实际食品加工生产中应用时酶解效率与效

果易受限,物理场辅助酶解改善食物品质是一种比较新颖的方法,适度的物理场处理能够对酶进行改性,激活其活性,提高生化反应效率^[13]。同时物理场处理还具有在不对食品营养成分造成损失的同时延长储藏时间的优势,是食品加工领域重点关注的绿色低碳新技术,主要包括超声处理、脉冲电场处理和微波处理等。Manzoor 等^[14]报道了使用脉冲电场 PEF (28 kV/cm)的处理能够降低杏仁奶体系中的沉淀量,也有研究^[15]表明,使用 PEF 处理可以提高葡萄渣提取液中总酚、类黄酮、总花青素以及单宁含量(+15%、+60%、+23% 和+42%)。物理场联合酶解的研究也显示其具有提高酶解效率的作用,Shaghaleh 等^[16]报道了使用低温等离子体 CP 协同酶解处理麦秸秆(90 s)总糖产量较未处理组有较大提升。双物理场联合处理研究^[17]报道超声、辐照联合酶解处理后,蓝莓发酵饮料蛋白消化率提高了 90%,高于超声辐照组(17%)和超声酶解组(77%)。另一项研究^[18]则报道了使用超声和微波双物理场联合处理有助于提高蝴蝶花饮料的稳定性和品质。然而,目前关于使用低温等离子体和脉冲电耦合酶解处理植物乳的研究尚未见报道。

基于此,本研究旨在探究低温等离子体(Cold Plasma, CP)、脉冲电场(Pulsed Electric Field, PEF)以及物理双场耦合酶解(Cold Plasma and Pulsed Electric Field coupled Enzymatic treatment, CP-PEF-EN)处理对亚麻籽植物乳总酚含量与黏度的影响,首先采用 AKSU043M 纤维素酶活性检测试剂盒、荧光光谱、紫外光谱、圆二色光谱综合分析了 CP 处理对酶活性和酶结构的影响,然后分别分析了单物理场耦合酶解和双物理场耦合酶解处理对亚麻籽乳酚类物质溶出率和黏度变化的影响,相关研究结果可为植物乳绿色、低碳、高效加工技术创新提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

纤维素酶 CTS(10000 U/g) 潍坊康地恩生物科技有限公司;干法脱胶亚麻籽 由甘肃省农业科学院提供;海沙、浓硫酸(分析纯)、硼酸(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;福林酚 源叶生物有限公司;AKSU043M 纤维素酶活性检测试剂盒 北京盒子生工科技有限公司。

HH-6 恒温水浴锅 金坛市鸿科仪器厂;卧式 60 型胶体磨 深圳市雷通实业有限公司;101-1AB 电热鼓风干燥箱 天津市泰斯特仪器有限公司;K9860 全自动凯氏定氮仪 海能未来科技集团股份有限公司;SNB-1 数字黏度计 上海精密科学仪器有限公司;脉冲电源驱动的等离子体放电装置

华中科技大学研制;THU-PEF4 高压脉冲电场发生仪

清华大学自主研制;UV-1900 紫外分光光度计 岛津仪器苏州有限公司;F-7000 荧光光谱仪 日立科学仪器北京有限公司武汉分公司;J-1500 圆二色光谱仪 沈阳佳士科商贸有限公司;TGL-24M 冷冻高速离心机 湖南平科科学仪器有限公司;TJFL-18 干磨脱胶系统 武汉中油康尼科技有限公司;密闭式微波快速萃取系统 美国 CEM 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 纤维素酶溶液的制备 称取 15 g 纤维素酶 CTS 于 50 mL 去离子水中混合均匀,冰水浴搅拌 30 min,获得酶溶液。

1.2.2 CP 单物理场处理纤维素酶 参考 Holubová 等^[19] 和 Tolouie 等^[20] 的方法对纤维素酶进行 CP 处理,并根据实验条件作出了一定的修改。分别吸取 1 mL 酶溶液于一次性塑料培养皿(直径 35 mm)中,将其置于等离子体发生器喷嘴下方,设置脉冲放电电压为 18 kV,频率 1000 Hz,脉宽为 200 ns。待等离子体稳定(无明显丝状火花)时,启动定时器,分别设置处理时间为 0、15、30、60、90、120 s,收集处理后的酶溶液于 4 ℃,5000 r/min 离心 10 min,取上清在 4 ℃ 下密封保存备用。

1.2.3 纤维素酶活性测定 纤维素酶活性的测定参考 Silvello 等^[21] 和邓乾春等^[22] 的方法,并根据实验进行了一些改动。首先将 CP 处理后的酶溶液于 4 ℃ 离心 10 min,取上清液备用。使用 AKSU043M 纤维素酶活性检测试剂盒测定纤维素酶活性,按照试剂盒提供的方法对纤维素酶酶活进行测定并绘制标准曲线。根据标准液的吸光值绘制标准曲线,酶活性按以下公式进行计算:

$$\text{纤维素酶活性(U/mL)} = \frac{V_1 \times x}{V_2 \times T} \times 1000$$

式中: V_1 为反应体系总体积,0.35 mL; V_2 为反应体系中加入粗酶液的体积,0.05 mL; x 为标准曲线中计算出的酶浓度(mg/mL); T 为糖化时间,30 min; 1000 为单位换算系数。

1.2.4 纤维素酶结构光谱学测定

1.2.4.1 荧光发射光谱测定 纤维素酶的本征荧光光谱测定参考了 Stănciuc 等^[23] 的方法,并作出了一定的修改。将经 CP 处理好的纤维素酶用去离子水稀释 100 倍后进行本征荧光测定。使用荧光分光光度计设置激发波长(λ_{ex})为 280 nm,在 300~450 nm 波长范围内,测定荧光发射光谱。发射(E_m)和激发(E_x)狭缝均为 5 nm,扫描速度为 240 nm/min,响应时间 0.1 s,步长为 1 nm 进行数据采集。

1.2.4.2 紫外吸收光谱测定 紫外吸收光谱的测定参考了 Meng 等^[24] 的方法,并作出了一些改动。将按上述荧光测试方法处理好的酶溶液使用紫外分光光度计于 255~330 nm 范围内进行扫描,狭缝宽度 1 nm。

1.2.4.3 圆二色性光谱(Circular Dichroism spectra, CDs)测定 圆二色性光谱测定参考 Yu 等^[25] 的方法,并作出了一定的修改。经 CP 处理好的酶溶液使用 CD 分光光度计,1 mm 石英比色皿进行测定,样品浓度为 0.025 mg/mL,测定范围 200~260 nm,间隔 0.2 nm,测定得到圆二色光谱图,并采用 BESTSEL 分析软件进行二级结构分析。

1.2.5 物理场耦合酶解处理亚麻籽乳工艺流程

1.2.6 亚麻籽匀浆的制备 亚麻籽按照图 1 所示的流程图进行处理。参考陶彩艳等^[8] 的方法,首先取一定量亚麻籽,使用干磨脱胶系统循环打磨 11 次,得到脱胶亚麻籽。然后参考全双等^[26] 的方法,将一定量脱胶亚麻籽调水至含水量为 19%,在 720 W 功率下微波 10 min,得到微波脱胶亚麻籽。最后取 30 g 微波脱胶亚麻籽按亚麻籽:水比例(质量比,后同)为 1:7 浸泡 2 h,弃掉浸泡液,再按照物料:水为 1:7 比例加入纯水,使用胶体磨循环打磨 12 min,收集亚麻籽匀浆。

1.2.7 单物理场耦合酶解处理亚麻籽乳 按照图 1 所示的加工流程,对处理完成的亚麻籽匀浆分别进行酶解以及物理场耦合酶解加工,具体流程如下。

1.2.7.1 低温等离子体耦合酶解(Cold Plasma coupled Enzymolysis, CP-EN)亚麻籽乳的制备 对制备好的亚麻籽匀浆进行酶解处理。向亚麻籽匀浆中分别添加亚麻籽干重质量 0.1% 经过 CP 处理和未经 CP 处理的纤维素酶溶液,然后于 50 ℃ 酶解 30 min,酶解结束后于 90 ℃ 灭酶 15 min,待冷却至室温后用 200 目滤袋过滤,得到亚麻籽植物乳分别命名为 CP-EN 亚麻籽乳和 EN 亚麻籽乳,同时以不添加酶的亚麻籽乳作为空白对照。

1.2.7.2 脉冲电场耦合酶解(Pulsed Electric Field coupled Enzymolysis, PEF-EN)亚麻籽乳的制备 参考 Salee 等^[27] 的方法对亚麻籽匀浆进行 PEF 处理,本研究中根据实验条件对方法作出了一定的修改,设置脉冲次数 3 次,脉宽 500 μs ,频率 1 kHz,流速

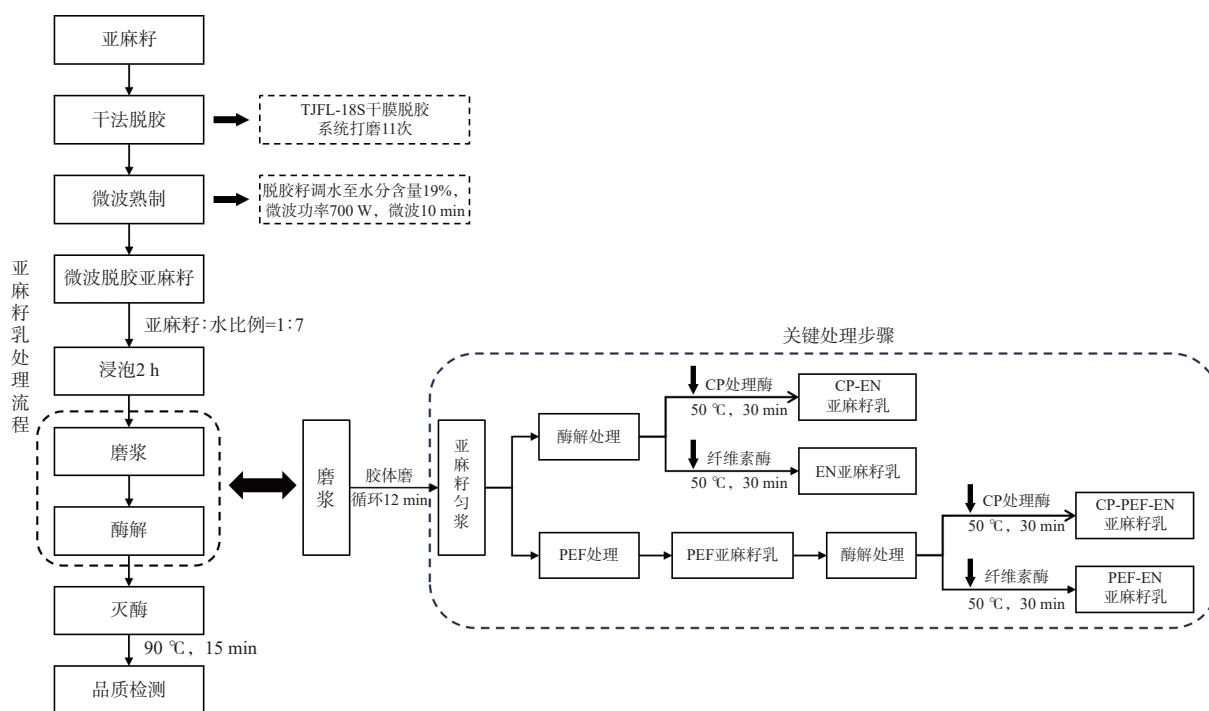


图1 物理场耦合酶解处理亚麻籽乳工艺流程

Fig.1 Process of physical field-assisted enzymatic hydrolysis treatment of flaxseed plant-based milk

40 r/min, 电场强度分别为 0、1.3、2.0、2.7、3.3、3.7 kV/cm, 处理时间 60 s, 处理完成后得到处理液。然后向上述处理液中添加亚麻籽干重质量 0.1% 未经 CP 处理的纤维素酶溶液, 然后于 50 °C 酶解 30 min, 酶解结束后于 90 °C 灭活酶 15 min, 待冷却至室温后用 200 目滤袋过滤, 得到亚麻籽乳。将未添加纤维素酶的亚麻籽乳命名为 PEF 亚麻籽乳, 添加纤维素酶的命名为 PEF-EN 亚麻籽乳。

1.2.8 双物理场耦合酶解处理亚麻籽乳 选择在 CP 处理时间为 15 s, 脉冲电场强度为 3.7 kV/cm 的条件下进行 CP-PEF-EN 处理实验。对制备好的亚麻籽匀浆进行 PEF 预处理(电压 3.7 kV/cm、其余参数不改变), 处理完成后添加亚麻籽干重质量 0.1% 的经 CP 处理的纤维素酶(CP 时间 15 s, 其余参数不改变)溶液进行酶解, 酶解温度 50 °C, 时间 30 min, 酶解结束后于 90 °C 灭酶 15 min, 待冷却至室温后用 200 目滤袋过滤, 收集亚麻籽植物乳, 将其命名为 CP-PEF-EN 亚麻籽乳。

1.2.9 亚麻籽乳中总酚含量及其黏度的测定 亚麻籽乳中的总酚含量按照全双等^[26]的方法, 称取没食子酸、儿茶素和咖啡酸各 10 mg, 并用甲醇作为溶剂配制成浓度为 1 mg/mL 的储备液, 然后将储备液分别使用甲醇稀释为浓度为 25、30 和 120 μg/mL 的溶液, 以此为对照组, 取该溶液各 0.5 mL 至试管中, 加入 2.5 mL 经稀释后的 Folin-Ciocalteu 试剂以及 2.0 mL 浓度为 75% 的碳酸钠溶液, 混合均匀后于常温放置 30 min, 然后于 10000 r/min 转速下离心 10 min, 取上清液, 使用紫外-可见分光光度计在 760 nm 处测定其吸光值, 以此为标曲。取和对照组

等量的处理好的亚麻籽乳样品, 按上述方法测定亚麻籽乳吸光值, 并根据标曲计算其总酚含量。

亚麻籽乳的黏度按照 GB/T 22235-2008《液体黏度的测定》中的方法进行测定。

1.3 数据处理

所有分析结果平行测定 3 组, 数据分别采用 Origin 2022 和 SPSS 27.0 软件进行分析及绘图, 并采用 ANOVA 和 Duncan 多重比较进行显著性分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 CP 处理对纤维素酶的影响

2.1.1 不同时间下 CP 处理对纤维素酶活性的影响 不同 CP 处理时间下, 酶溶液活性变化如图 2 所示。从图 2 可以看出, 酶活性提高率随处理时间呈先提高后降低的趋势, 在 CP 处理时间为 15 s 时, 纤维素酶活性提升率最高, 达到了 89%。有文献 [28-29] 报道了类似的结果, 随着 CP 处理时间的改变, 酶活性呈现出先增加后降低的趋势。CP 处理使纤维素酶活性提高的原因可能是 CP 产生的活性离子和酶分子发生了相互作用, 使得酶的催化活性中心以及官能团外露和增加^[30]。随着处理时间增加, 酶活性发生下降的原因可能是 CP 产生的物理轰击影响了酶的二级结构以及分子聚集状态, 使得酶的构象在一定程度上发生改变, 其活性中心进一步暴露在极性环境中, 导致活性位点被破坏并影响了酶和底物结合的能力, 引起酶活性下降^[31]。

2.1.2 CP 处理改变纤维素酶的酶活机制研究

2.1.2.1 荧光光谱分析 根据上述酶活性的变化, 本研究进一步探究了 CP 处理对纤维素酶结构的影

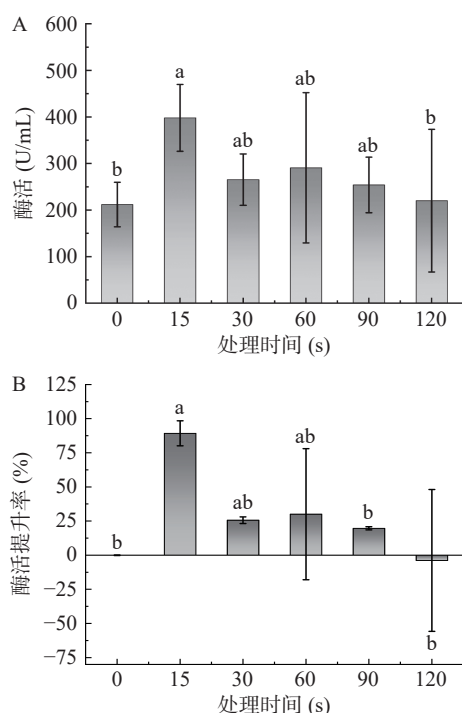


图2 CP处理前后纤维素酶的酶活(A)及酶活提升率(B)的变化

Fig.2 Changes in enzyme activity (A) and enzyme activity increase rate (B) of cellulase before and after CP treatment

注:不同小写字母代表组间差异显著($P < 0.05$),图6~图8同。

响。纤维素酶中存在像色氨酸(Tryptophan, Trp)、酪氨酸(Tyrosine, Tyr)以及苯丙氨酸(Phenylalanine, Phe)这样的特定芳香氨基酸残基,这些残基大多分布于蛋白质的内部,并且与蛋白质的三级结构息息相关。使用一定波长的光照射后,这些基团会产生自发荧光,而当这些基团暴露在极性很强的环境中时会发生荧光猝灭现象^[32-33]。荧光分析结果显示经CP处理后,纤维素酶在300~450 nm处的荧光发射强度发生了变化,如图3所示,经CP处理15 s后,纤维素酶的荧光强度略有升高,其最大吸收波长($\lambda_{\max}$)从342.4 nm移动到343 nm, $\lambda_{\max}$ 的红移预示着Trp、Tyr以及Phe所处的环境极性变高,表明氨基酸残基向着纤维素酶的表面移动,酶结构在一定程度上展开,其疏水活性中心被包埋的程度下降^[34],这可能提高了酶与底物接触的概率,从而在一定程度上提高酶的活性。

另一方面,图3还显示了随着处理时间的增加,纤维素酶的荧光强度出现进一步下降,最大吸收波长($\lambda_{\max}$)出现更大的红移(从342.4 nm移动到345.8 nm(30 s)、347.2 nm(120 s)),其原因可能是芳香残基过多暴露在极性环境中发生了荧光猝灭现象。这样的结果表明酶的构象进一步发生改变,其活性结构被破坏的程度增加,活性位点减少,从而导致了纤维素酶活性的降低^[35]。有研究指出,产生这种现象的原因可能是CP在气相中产生多种离子和自由基,这些自由基与水反应产生过氧化氢、臭氧、羟自由基以及超氧

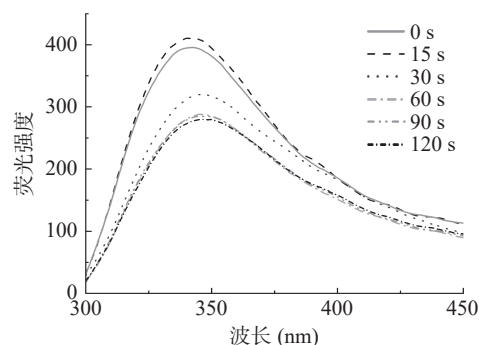


图3 CP处理前后纤维素酶的荧光发射光谱

Fig.3 Fluorescence emission spectra of cellulase before and after CP treatment

化物和单线态氧等物质,当这些物质短时间作用于纤维素酶时会诱导其三级结构展开,破坏酶的活性结构^[36]。除此之外,当长时间使用CP处理纤维素酶后,由等离子产生的活性物质会触发纤维素酶分子之间的聚集,阻碍酶和底物的相互接触,从而影响甚至降低酶催化活性^[37]。

2.1.2.2 紫外光谱分析 如图4所示,纤维素酶在280 nm处有较大的紫外吸收,其主要是由蛋白质肽链上的Trp、Tyr以及Phe等残基的芳香杂环发生 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁所引起的^[38]。未经处理的纤维素酶在270~285 nm范围内的最大紫外吸收值为2.848,经CP处理15 s后,纤维素酶的最大吸收值增加为3.112,这可能表明CP处理使酶的构象发生改变,其内部芳香残基中疏水芳香环朝着酶表面移动,从而使吸光度增加,这种变化可能更有利于酶与底物的接触^[39]。当处理时间为30 s和60 s时,纤维素酶的紫外吸收值较15 s时出现了下降,产生这种现象的原因可能是长时间的CP处理引发了酶蛋白之间的聚集,导致紫外吸收强度发生下降^[40],这一结果会阻碍酶活性位点和底物之间的接触,从而影响酶的催化效率。随着处理时间增加到90 s和120 s时,纤维素酶的吸收强度出现了上升,原因可能是CP处理进一步破坏了酶结构中的肽键,蛋白质折叠展开,使酰胺基进一步暴露出来,同时,CP处理产生的活性氧和活性氮会一定程度增加体系酸度,并攻击活性基团,从而破坏芳香氨基酸^[41]。

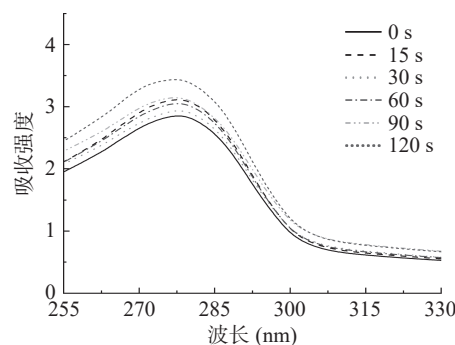


图4 CP处理前后纤维素酶的紫外吸收光谱

Fig.4 Ultraviolet absorption spectra of cellulase before and after CP treatment

2.1.2.3 圆二色光谱分析 CDs 可以被用来分析蛋白质二级结构(α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、无规则卷曲)及其变化。在本研究中使用 CDs 分析了不同 CP 处理时间对纤维素酶二级结构的影响。如图 5A 所示,未经处理的纤维素酶在 210 nm 和 215 nm 附近处出现了两个极小值,这被认为是具有“ $\alpha+\beta$ ”结构的特征吸收峰^[42],该结果与 Cui 等^[43]的研究结果类似。经 CP 处理 15 s 后,纤维素酶的椭圆度(θ 值)减小,表明 CP 处理改变了纤维素酶的二级结构,图 5B 所示的二级结构含量变化也证明了这个结果,经 CP 处理 15 s 后,纤维素酶无规则卷曲含量减少, α -螺旋含量没有明显变化,处理前后分别为 41.6% 和 41.1%, β -折叠含量从 11.4% 增加到 15.5%。上述实验现象表明 CP 处理 15 s 后,纤维素酶的二级结构含量发生变化,纤维素酶构象改变,这一结果可能会在一定程度上改变酶的催化活性。结合荧光光谱分析的结果, β -折叠结构含量的变化表明纤维素酶结构展开,其催化活性中心朝着极性更强的环境移动,这将有利于酶与底物的接触,从而提高酶的催化活性^[44]。Chen 等^[45]报道了使用 3 kV 低压等离子体处理糙米 10 min 后,其中的 α -淀粉酶活性与对照组相比提高了 62%。Lee 等^[46]的研究也证明了类似的结果。

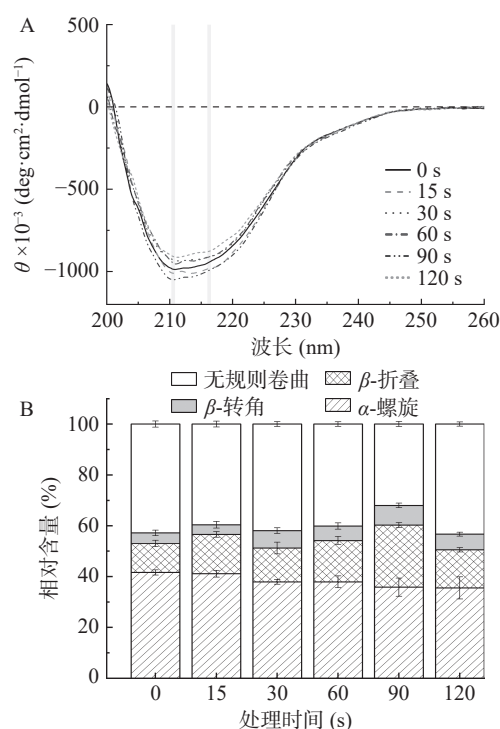


图 5 CP 处理前后纤维素酶的圆二色性光谱(A)和二级结构相对含量(B)

Fig.5 Circular dichroism spectrum (A) and secondary structure relative content (B) of cellulase before and after CP treatment

随着处理时间的增加,纤维素酶的负椭圆度出现了减小(90 s 除外),这可能是由于长时间的 CP 处理破坏了纤维素酶中的氢键,改变了 α -螺旋结构^[47],导致纤维素酶构象发生变化。当处理时间为 90 s

和 120 s 时,与未处理纤维素酶相比 CP 处理后 α -螺旋的含量发生下降,分别从 41.6% 下降至 35.8% 和 35.5%,这一结果与 Attri 等^[48]的研究类似。发生变化的原因可能是 CP 处理产生的活性物质诱导了 α -螺旋中氢键断裂,从而破坏了 α -螺旋结构,导致纤维素酶疏水活性中心直接暴露在极性环境中而失去活性。Guo 等^[49]的研究表明,在 50 kV 电压下,使用 CP 处理胃蛋白酶以及 α -凝乳蛋白酶会导致其构象发生显著变化,引起 α -螺旋结构的减少以及无序结构的增加,无序结构增加的原因可能是在长时间的 CP 处理下,CP 处理使得酶构象进一步改变,酶结构发生一定程度的解构,结构中 β -折叠和 α -螺旋向无规则卷曲转变^[50],与本研究在 CP 处理 120 s 后的结果相符合。以上的结果表明,CP 处理时间是其影响酶结构和活性的关键因素,短时间的 CP 处理可能会促进酶结构的展开,增加活性中心和底物接触的概率,提高酶催化效率。另一方面,长时间的 CP 处理会导致酶构象改变,引起活性中心所处极性环境的变化,使得活性位点失活,酶活性下降。这种差异的产生可能与 CP 处理产生的活性物质和酶的相互作用程度有关。

2.2 单物理场及其耦合酶解处理对亚麻籽植物乳黏度和酚类物质溶出的影响

2.2.1 CP-EN 处理对亚麻籽植物乳黏度和酚类物质溶出的影响 根据上述实验的结果,选择 CP 处理 15 s 后的酶溶液对亚麻籽乳进行酶解处理,处理后亚麻籽乳中总酚含量以及黏度变化分别如图 6A、B 所示。从图中可以看出,与空白对照组及 EN 组亚

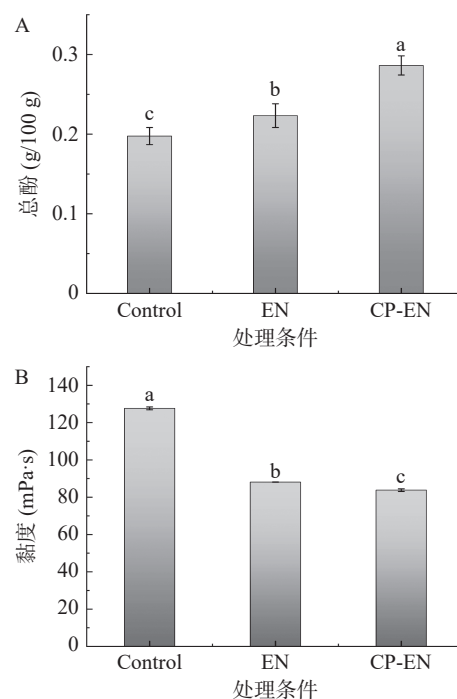


图 6 CP-EN 处理对亚麻籽乳的总酚含量(A)和黏度(B)的影响

Fig.6 Effect of CP-EN treatment on total phenolic content (A) and viscosity (B) of flaxseed plant-based milk

麻籽乳相比, CP-EN 亚麻籽乳具有更高的总酚含量 (0.286 g/100 g) 以及更低的黏度 (83.81 mPa·s), 从图 6B 中可以看出, CP-EN 处理组黏度下降率显著高于 EN 组 ($P < 0.05$), 进一步表明了 CP 处理可显著提高亚麻籽植物乳酶解效率。一项关于使用不同酶提取葡萄渣中酚类物质的研究表明, 酶解后葡萄渣中的总酚含量提高了 11%, 其原因是纤维素酶降解了植物细胞壁, 加速了酚类物质的溶出^[51]。经 CP 处理 15 s 后酶活性得到提高, 与 EN 处理的亚麻籽乳相比能进一步加速植物细胞壁的水解, 促进多酚类物质的溶出, 使得 CP 亚麻籽乳总酚含量高于 EN 处理的亚麻籽乳。由于纤维素酶对多糖链之间的 1,4- β -糖苷键的切割作用, 可使得亚麻籽胶中的一些多糖分子发生断裂, 减小其分子量, 导致较弱网络结构的形成^[52], 从而进一步促进亚麻籽植物乳黏度下降, 增强流动性。

2.2.2 PEF 处理对亚麻籽酚类物质溶出的影响

2.2.2.1 PEF 处理对亚麻籽植物乳酚类物质溶出的影响 图 7A 显示了不同脉冲电场强度对亚麻籽乳中总酚类物质含量的影响, 结果显示 PEF 处理后亚麻籽乳中总酚含量呈先减少后上升的趋势。当电场强度为 3.7 kV/cm 时, 亚麻籽乳中总酚含量最高, 为 0.247 g/100 g。这与 Zderic 等^[53]的研究结果相符合, 在低电场强度处理下多酚含量下降的原因可能是脉冲电场破坏了原有体系中多酚类物质的结构, 并在一定程度上使部分多酚降解失活, 随着电场强度的增加, 亚麻籽乳中多酚提取总量增加, 原因是 PEF 处理

加快了亚麻籽细胞向周围溶剂中释放多酚的速度。由于本文所用 PEF 频率较大, 实验发现高于 3.7 kV/cm 电压的 PEF 处理会使亚麻籽乳温度升高从而破坏植物乳风味, 因此没有继续加大电压进行研究^[54]。

2.2.2.2 PEF-EN 处理对亚麻籽植物乳酚类物质溶出的影响 如图 7B 所示, 与空白对照组相比, 较高电场强度 PEF-EN 处理的样品具有更高的多酚溶出量, 当电场强度为 3.7 kV/cm 时, PEF-EN 亚麻籽乳中总酚含量最高, 为 0.291 g/100 g。PEF 具有典型的细胞结构破坏效应^[55], 同时也有文献报道 PEF 处理可显著减小植物乳粒径并降低沉淀量, 因此在酶解亚麻籽植物乳之前, 将酶解底物亚麻籽乳进行 PEF 处理可能会使得亚麻籽植物乳中植物碎片组织进一步裂解, 形成更多酶解位点, 使得酶解效率提升, 多酚更多溶解在植物乳连续相中^[56]。

2.3 CP-PEF-EN 处理对亚麻籽植物乳酚类物质溶出和黏度的影响

根据上述实验的结果, 当脉冲电场强度为 3.7 kV/cm 时, 亚麻籽乳中总酚含量最高; 当低温等离子体处理时间为 15 s 时, 所得到的纤维素酶活性最高。因此, 选择在这两个条件下进行 CP-PEF-EN 处理实验, 其总酚含量和黏度结果如图 8A、B 所示。从图 8A 可以看出, 经 CP-PEF-EN 处理后亚麻籽乳总酚含量达 0.327 g/100 g, 与空白对照组、PEF 组、PEF-EN 组相比, 分别提高了 65.15%、36.82% 和 12.37%, 与图 6 中 EN 组、CP-EN 组相比分别提高了 46.64% 和 14.34%, CP-PEF-EN 处理对亚麻籽乳品质的改善效率优于单种因素处理; 表明 CP-PEF-

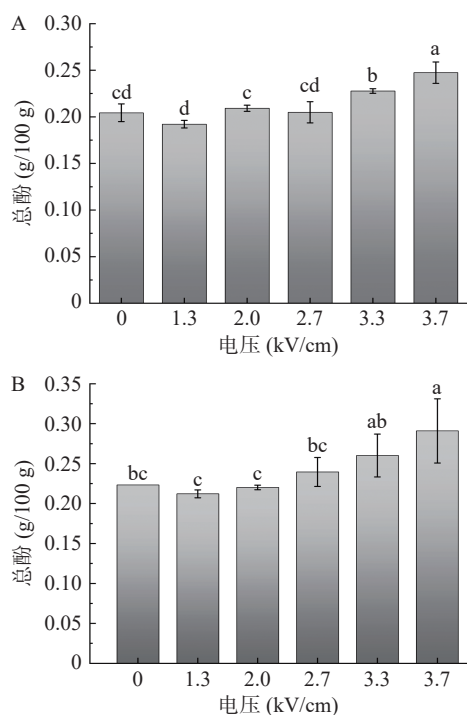


图 7 PEF(A)及 PEF-EN(B)处理对亚麻籽乳总酚含量的影响

Fig.7 Effect of PEF (A) and PEF-EN (B) treatment on total phenol content of flaxseed plant-based milk

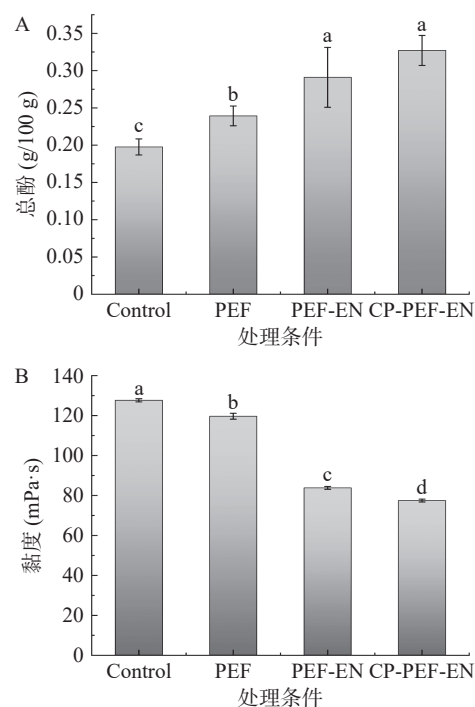


图 8 不同处理方式下亚麻籽乳总酚含量(A)和黏度(B)对比
Fig.8 Comparison of total phenolic content (A) and viscosity (B) of flaxseed plant-based milk under different treatments

EN 既提高了酶催化活性^[57], 又加速传质, 破坏细胞壁网络结构促进纤维素酶进一步与多糖分子接触反应, 进一步降解细胞壁, 促进多酚物质溶出, 表明低耗物理双场实现了耦合增效^[58-59]。

图 8B 显示了不同处理后亚麻籽乳黏度的变化, 物理场处理组植物乳显示出更低的黏度, 经 PEF 和 PEF-EN 处理后, 亚麻籽乳黏度分别为 119.65 mPa·s 和 83.81 mPa·s, 较空白对照组相比黏度分别下降了 6.27%、34.34%。而经过 CP-PEF-EN 处理后, 乳液的黏度仅为 77.47 mPa·s, 比原乳液降低了 39.92%, 产生这一现象的原因一方面可能是脉冲电场产生的电击和穿孔效应破坏了植物的细胞壁以及乳液中的纤维素网络, 并在一定程度上引发乳液中大分子物质的解聚, 从而导致乳液整体黏度降低^[60], 同时, 纤维素酶能够将体系中的膳食纤维和多种多糖类物质水解, 破坏多糖网络结构, 进一步将亚麻籽植物乳体系中存在的果胶、亚麻籽胶等多糖物质水解, 降低体系黏度^[61-63]。综上所述, 利用双场耦合酶解能够提高单一条件处理对植物乳品质改善的效率, 特别是在促进营养物质溶出以及改善体系黏度方面表现出了较好的效果, 其具有作为改善植物乳品质的绿色高效方法的潜力。

3 结论

本文研究表明, 在 CP 处理 15 s 条件下纤维素酶活性提高了 89%, 多谱学综合分析证明 CP 处理导致纤维素酶构象发生改变, 增加其与底物的接触, 提高酶解效率。当 CP 处理 15 s 时, CP-EN 亚麻籽乳中的总酚含量达到 0.286 g/100 g, 较对照组提高 44.44%; 当脉冲电场强度为 3.7 kV/cm 时, PEF-EN 亚麻籽乳中的总酚含量达到 0.291 g/100 g, 较对照组提高 46.97%。两种物理场耦合处理的结果表明与单个物理场处理相比, 两种物理场耦合能够更好地改善亚麻籽乳黏度和酚类物质溶出, CP-PEF-EN 亚麻籽乳总酚含量为 0.327 g/100 g, 比对照组提高 65.15%; 黏度为 77.47 mPa·s, 比对照组降低 39.92%。综上所述, 耦合物理场协同酶解处理可以作为一种新的改善植物乳黏度和酚类物质溶出的方法。然而, 低温等离子体和脉冲电场处理在工业生产中的应用存在局限性, 后续扩大规模如中试等研究仍有待开展。

© The Author(s) 2025. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

[1] 陈亚淑, 刘锐, 陈洪建, 等. 植物乳(奶)物质组成、加工难题及其创新技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(18): 20-33. [CHEN Yashu, LIU Rui, Chen Hongjian, et al. Research progress on material composition, processing problems and innovative technology of plant-based milk[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(18): 20-33.]

[2] MCCARTHY K S, PARKER M, AMEERALLY A, et al. Drivers of choice for fluid milk versus plant-based alternatives: What are consumer perceptions of fluid milk?[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(8): 6125-6138.

[3] 任艺, 晏永球, 涂宏建, 等. 植物基食品资源在饮料中的应用与发展[J]. 食品安全导刊, 2022(32): 167-171, 175. [REN Yi, YAN Yongqiu, TU Hongjian, et al. Application and development of plant-based resources in beverages[J]. *China Food Safety Magazine*, 2022(32): 167-171, 175.]

[4] OOMAH B D. Processing of flaxseed fiber, oil, protein, and lignan[J]. *Agricultural and Food Sciences*, 2003; 363-403.

[5] 禹晓, 黄沙沙, 聂成镇, 等. 亚麻籽酚类化合物抗氧化和油相迁移特性研究进展[J]. *中国油料作物学报*, 2019, 41(4): 643-649. [YU Xiao, HUANG Shasha, NIE Chengzhen, et al. Research progress on antioxidant potential and migration characteristics into oil phase for flaxseed phenolic compounds[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2019, 41(4): 643-649.]

[6] LORENZO D, CHIARA, COLOMBO F, et al. Polyphenols and human health: The role of bioavailability[J]. *Nutrients*, 2021, 13(1): 273.

[7] 祁惠芳, 程子良, 孔维宝, 等. 亚麻籽有效成分的提取及其综合利用研究进展[J]. 中国油脂, 2019, 44(11): 102-107. [QI Hui-fang, CHENG Ziliang, KONG Weibao, et al. Progress in extraction and comprehensive utilization of effective components in flaxseed[J]. *China Oils and Fats*, 2019, 44(11): 102-107.]

[8] 陶彩艳, 邓紫珂, 邓乾春, 等. 干法脱胶对亚麻籽植物乳稳定性和营养特性的影响[J]. 食品工业科技, 2024, 45(18): 202-209. [TAO Caiyan, DENG Ziyu, DENG Qianchun, et al. Effect of dry degumming on the stability and nutritional properties of flaxseed plant milk[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(18): 202-209.]

[9] WONG Wai, MANOJ G. Using microwave energy to synthesize light weight/energy saving magnesium based materials: A review[J]. *Technologies*, 2015, 3(1): 1-18.

[10] GUO Shengyuan, HU Yichen, ZHAO Chaofan, et al. Effects of enzymatic hydrolysis technology on the physicochemical properties and biological activities of american ginseng beverages[J]. *Food Science & Nutrition*, 2024, 12(5): 3674-87.

[11] 郝倩, 邓乾春, 周彬, 等. 植物细胞壁多糖高效酶解技术及其在食品加工中应用研究进展[J]. 食品科学, 2024, 45(12): 304-314. [HAO Qian, DENG Qianchun, ZHOU Bin, et al. Progress on efficient techniques for enzymatic hydrolysis of plant cell wall polysaccharides and their application in food processing[J]. *Food Science*, 2024, 45(12): 304-314.]

[12] LIU Chen, HAO Lihua, CHEN Fusheng, et al. Study on extraction of peanut protein and oil bodies by us enzymatic extraction and characterization of protein[J]. *Journal of Chemistry*, 2020, 2020 (January): 1-11.

[13] POTKULE, JAYASHREE B, SURAJ P K, et al. Impact of non-thermal techniques on enzyme modifications for their applications in food[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 275(August): 133566.

[14] MANZOOR M F, ZENG Xinan, AHMAD N, et al. Effect of pulsed electric field and thermal treatments on the bioactive compounds, enzymes, microbial, and physical stability of almond milk during storage[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2020; 59.

[15] CARPENTIERI S, GIOVANNA F, GIANPIERO P. Pulsed electric fields-assisted extraction of valuable compounds from red

- grape pomace: Process optimization using response surface methodology[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10(March): 1158019.
- [16] SHAGHALEH H, XU X, LIU H, et al. The effect of atmospheric pressure plasma pretreatment with various gases on the structural characteristics and chemical composition of wheat straw and applications to enzymatic hydrolysis[J]. *Energy*, 2019, 176 (JUN.1): 195–210.
- [17] ALBERT B, MARA C G NOELIA P, FRANCISCO J B, et al. Impact of INED processes involving ultrasound and pulsed electric fields on enns, and ota mitigation of an orange juice-milk based age[J]. *Foods*, 2023, 12: 1582.
- [18] MUHAMMAD A, ABDUL G, MALIK M, et al. Sonication and wave processing of phalsa drink: A synergistic approach[J]. *International Journal of Fruit Science*, 2021, 21(1): 993–1007.
- [19] HOLUBOVÁ, Ľ RENÁTA Š, ĽUDMILA S, et al. Cold atmospheric pressure plasma treatment of maize grains—induction of growth, enzyme activities and heat shock proteins[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(16): 8509.
- [20] TOLOUIE, HANIYE, MOHAMMAD A M, et al. The impact of atmospheric cold plasma treatment on inactivation of lipase and lipoxygenase of wheat germs[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2018, 47(June): 346–52.
- [21] SILVELLO M A D C, JULIAN M, GOLDBECK R. Low-frequency ultrasound with short application time improves cellulase activity and reducing sugars release[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2020, 191(13): 1042–1055.
- [22] 邓乾春, 陈亚淑, 郝倩, 等. 一种低耗物理双场协同提高植物乳酶解效率的方法: 中国, CN202211281330.3[P]. 2023-01-24.
- [DENG Qianchun, CHEN Yashu, HAO Qian, et al. A method for improving the efficiency of plant milk enzymatic hydrolysis through low-energy physical dual-field synergy: China, CN202211281330.3[P]. 2023-01-24.]
- [23] STĂNCIUC N, APRODU I, GABRIELA R, et al. Fluorescence spectroscopy and molecular modeling investigations on the thermally induced structural changes of bovine β -lactoglobulin[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2012, 15: 50–56.
- [24] MENG Huanmei, LI Dan, ZHU Chuanhe. The effect of ultrasound on the properties and conformation of glucoamylase[J]. *International Journal of Biological Macromolecules: Structure, Function and Interactions*, 2018, 113: 411–417.
- [25] YU Qun, FAN Liuping, DING Zhongyang. The inhibition mechanisms between asparagus polyphenols after hydrothermal treatment and tyrosinase: A circular dichroism spectrum, fluorescence, and molecular docking study[J]. *Food Bioscience*, 2022, 48: 101790.
- [26] 全双, 陈亚淑, 孙梦嘉, 等. 亚麻籽—火麻仁植物乳制备工艺对其稳定性和营养成分的影响研究[J]. *中国油料作物学报*, 2022, 44(6): 1357–1367. [QUAN Shuang, CHEN Yashu, SUN Mengjia, et al. Effect of preparation technology on stability and nutritional composition of flaxseed-hemp seed plant-based milk[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2022, 44(6): 1357–1367.]
- [27] SALEE N, WANTIDA C, ARTIT Y, et al. Optimization of the pulse electric field assisted extraction of black rice grain for antioxidant and sirtuin1 enzyme stimulation activities[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 6459.
- [28] JIN Xing, LIU Zhe, WU Wenfu. POD, CAT and SOD enzyme activity of corn kernels as affected by low plasma pretreatment[J]. *International Journal of Food Properties*, 2022(26): 38–48.
- [29] FARASAT M, ARJMAND S, SIADAT S O R, et al. The effect of non-thermal atmospheric plasma on the production and activity of recombinant phytase enzyme[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 16647.
- [30] 汤云高. 低温等离子体对苧麻脱胶生物酶活性及其结构影响[D]. 苏州: 苏州大学, 2021. [TANG Yungao. Effect of low temperature plasma on the activity and structure of ramie degumming enzyme[D]. Suzhou: Soochow University, 2021.]
- [31] 成军虎, 汪慧芬, 韩永旭. DBD 低温等离子体处理对多酚氧化酶活力及构象的影响[J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 2021, 49(9): 29–36. [CHENG Junhu, WANG Huifen, HAN Yongxu. Effect of DBD cold plasma treatment on activity and conformation of polyphenol oxidase[J]. *Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition)*, 2021, 49(9): 29–36.]
- [32] 韩美玲, 边禄森, 姜宏浩, 等. 不同碳氮源对糙皮侧耳木质纤维素酶活性的影响[J]. *菌物学报*, 2020, 39(8): 1538–1550. [HAN Meiling, BIAN Lusen, JIANG Honghao, et al. Effects of different carbon and nitrogen sources on lignocellulolytic enzyme activities of pleurotus ostreatus[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(8): 1538–1550.]
- [33] 付玉洁, 于海龙. 纤维素酶的低共熔溶剂双水相萃取研究[J]. *青岛科技大学学报(自然科学版)*, 2023, 44(3): 23–29, 37. [FU Yujie, YU Hailong. Deep eutectic solvent aqueous two-phase system for cellulase extracting[J]. *Journal of Qingdao University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2023, 44(3): 23–29, 37.]
- [34] NEMTSEVA E V, GULNOV D V, GERASIMOVA M A, et al. Bacterial luciferases from *Vibrio harveyi* and *Photobacterium leiognathid* demonstrate different conformational stability as detected by time-resolved fluorescence spectroscopy[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10449.
- [35] LI Hongyan, XU Minghao, YAO Xu, et al. The promoted hydrolysis effect of cellulase with ultrasound treatment is reflected on the sonicated rather than native brown rice[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2022, 83: 105920.
- [36] ANNALISA S, MISRA N N, CULLEN P J, et al. Effect of atmospheric pressure cold plasma (ACP) on activity and structure of alkaline phosphatase[J]. *Food & Bioproducts Processing*, 2016, 98: 181–88.
- [37] WEI Yang, FAN Huan, ZHOU Min, et al. Synergistic effect of ionic liquid and surfactant for enzymatic hydrolysis of lignocellulose by *Paenibacillus* sp. LLZ1 cellulase[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2020, 142: 105760.
- [38] 张剑, 刘忠义. 草鱼胰蛋白酶 GT-A 的紫外光谱及结构特性[J]. *光谱实验室*, 2010, 27(3): 1098–1102. [ZHANG Jian, LIU Zhongyi. Ultraviolet spectra and structural properties of trypsin isozyme GT-A from the grass carp intestines[J]. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 2010, 27(3): 1098–1102.]
- [39] 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 Qinqin, 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.]
- [40] 佟抒洋, 张书琪, 郭雨晴, 等. Ba^{2+} 对南美白对虾酚氧化酶活性和结构的影响[J]. *食品工业*, 2020, 41(11): 181–185. [TONG Shuyang, ZHANG Shuqi, GUO Yuqing, et al. Effects of barium ions on the activity and structure of phenoloxidase[J]. *The Food Industry*, 2020, 41(11): 181–185.]
- [41] WANG Yijie, YE Zichong, LI Jiahui, et al. Effects of dielectric barrier discharge cold plasma on the activity, structure and con-

- formation of horseradish peroxidase (HRP) and on the activity of litchi peroxidase (POD)[J]. *LWT*, 2021, 141: 111078.
- [42] KUZNETSOVA IM, STEPANENKO OV, TUROVEROV KK, et al. Unraveling multistate unfolding of rabbit muscle creatine kinase[J]. *Biochimica et Biophysica acta: International Journal of Biochemistry and Biophysics*, 2002, 1596(1): 138–155.
- [43] CUI Can, YAN Cancan, WANG Ailin, et al. Understanding the inhibition mechanism of lignin adsorption to cellulase in terms of changes in composition and conformation of free enzymes[J]. *Sustainability*, 2023, 15(7): 6057.
- [44] TODOROVA Y, YOTINOV I, TOPALOVA Y, et al. Evaluation of the effect of cold atmospheric plasma on oxygenases' activities for application in water treatment technologies[J]. *Environmental Technology*, 2018, 40(3): 1–28.
- [45] CHEN Huahan, CHANG Hungchia, CHEN Yukuo, et al. An improved process for high nutrition of germinated brown rice production: Low-pressure plasma[J]. *Food Chemistry*, 2016, 191: 120–127.
- [46] LEE K H, KIM H J, WOO K S, et al. Evaluation of cold plasma treatments for improved microbial and physicochemical qualities of brown rice[J]. *LWT*, 2016, 73: 442–447.
- [47] 秦嘉乐, 李重言, 刘茜, 等. 等离子体处理对小米内源酶活性及其品质的影响[J]. *现代食品科技*, 2022, 38(8): 62–72. [QIN Jiale, LI Chongyan, LIU Qian, et al. Effects of plasma treatment on the endogenous enzyme activity and quality of foxtail millet[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(8): 62–72.]
- [48] ATTRI P, VENKATESU P, KAUSHIK N, et al. Effects of atmospheric-pressure non-thermal plasma jets on enzyme solutions[J]. *Journal of the Korean Physical Society*, 2012, 60(6): 959–964.
- [49] GUO Xiaoxiao, MUBANGO E, CHEN Jing, et al. The effect of cold atmospheric plasma treatment on the aggregation and conformational change of pepsin and alpha-chymotrypsin under physiological pH condition[J]. *Food Bioscience*, 2023, 56: 103451.
- [50] CHEN Yang, YAO Mengying, YANG Tianyi, et al. Changes in structure and emulsifying properties of coconut globulin after the atmospheric pressure cold plasma treatment[J]. *Food Hydrocolloids*, 2023, 136: 108289.
- [51] FERRI M, LIMA V, ZAPPI A, et al. Phytochemicals recovery from grape pomace: Extraction improvement and chemometric study[J]. *Foods*, 2023, 12(5): 959.
- [52] DRANCA F, VARGAS M, OROIAN M. Physicochemical properties of pectin from malus domestica 'fälticeni' apple pomace as affected by non-conventional extraction techniques[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 100: 105383–105396.
- [53] ZDERIC A, ZONDERVAN E. Polyphenol extraction from fresh tea leaves by pulsed electric field: A study of mechanisms[J]. *Chemical Engineering Research and Design*, 2016, 109: 586–592.
- [54] 王艳芳, 杨瑞金, 赵伟, 等. 高压脉冲电场对牛奶中风味物质的影响[J]. *食品科学*, 2009, 30(11): 43–46. [WANG Yanfang, YANG Ruijin, ZHAO Wei, et al. Comparative study of effects of pulsed electric field (PEF) and ultra-high temperature (UHT) processing on flavor compounds in milk[J]. *Food Science*, 2009, 30(11): 43–46.]
- [55] TURK M F, BARON A, VOROBIEV E. Effect of pulsed electric fields treatment and mash size on extraction and composition of apple juices[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2010, 58(17): 9611.
- [56] CHEN C, SUN R, LIU P, et al. Study on active particles in air plasma and their effect on α -amylase[J]. *Foods*, 2022, 11(18): 2896.
- [57] BOUSSETTA N, SOICHI E, LANOISELLÉ J L, et al. Valorization of oilseed residues: Extraction of polyphenols from flaxseed hulls by pulsed electric fields[J]. *Industrial Crops and Products*, 2014, 52: 347–353.
- [58] LIU Zhiwei, ZENG Xinan, NGADI M. Enhanced extraction of phenolic compounds from onion by pulsed electric field (PEF)[J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2018, 42(9): e13755.
- [59] MANZOOR M F, AHMAD N, AADIL R M, et al. Impact of pulsed electric field on rheological, structural, and physicochemical properties of almond milk[J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2019, 42(8): e13299.
- [60] BI Xiufang, LIU Fengxia, RAO Lei, et al. Effects of electric field strength and pulse rise time on physicochemical and sensory properties of apple juice by pulsed electric field[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2013, 17: 85–92.
- [61] AMABOLO M M, TABIT F T. Process optimisation for enzymatic clarification of indigenous wild watermelon (*Citrullus lanatus*) juice[J]. *Food Science and Technology International*, 2023, 29(8): 779–788.
- [62] GAO Wenhong, LIU Jiajing, ZHANG Peilin, et al. Physicochemical, structural and functional properties of pomelo peel pectin extracted by combination of pulsed electric field and cellulase hydrolysis[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 278: 134469.
- [63] THIKHAM S, SITTHIDAT T, KANTALA C, et al. Enhancing enzymatic production efficiency of crude pectic oligosaccharides by pulsed electric field and study of prebiotic potential[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2024, 61(2): 320–330.