

# 脂肪氧合酶催化亚油酸氧化与大豆蛋白相互作用过程中自由基迁移的电子顺磁共振研究(II)

## 自由基类型的确定

黄友如<sup>1</sup>, 华欲飞<sup>2</sup>, 王雪峰<sup>1</sup>, 顾建华<sup>1</sup>, 陈义勇<sup>1</sup>

(1. 常熟理工学院生物与食品工程系, 江苏 常熟 215500 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

**摘 要:** 模拟大豆蛋白制取过程, 建立由亚油酸(LA)、脂肪氧合酶(LOX)和低脂质含量的大豆蛋白(LRSP, lipid reduced soybean protein)所组成的模拟体系并制备大豆蛋白, 应用电子顺磁共振(EPR)比较研究了不同微波功率下的大豆蛋白EPR波谱, 探讨了制备方法对自由基浓度和种类的影响, 确定了四种类型的自由基。g值范围在2.0041~2.0054之间的碳自由基源于蛋白质肽链骨架 $\alpha$ -碳原子或其侧链其他碳原子, 其中场信号或称自由基浓度随微波功率的增加而降低。g值范围在2.019~2.028之间的硫自由基源于蛋白质中甲硫氨酸、半胱氨酸等含硫氨基酸残基侧链, 它在室温下稳定, 在不同微波功率下检测, 在两个样品中均可观察到。羟基自由基 $\cdot\text{OH}$ 在两个样品中均可观察到, 它源于自由基链反应和水分子, 与前述大豆蛋白氧化性修饰的二酪氨酸形成有关。醛自由基一定源于大豆蛋白与LOX催化LA氧化产生的降解产物的酶促反应。它包含在中场碳自由基信号中, 但稍稍偏向高场区。

**关键词:** 大豆蛋白; 脂肪氧合酶; 亚油酸; 自由基; 电子顺磁共振

### Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy (EPR) Study on Free Radical Transfer in Lipoyxygenase I-B-Catalyzed Linoleic Acid-Soybean Protein Interaction (II) Determination of Free Radicals

HUANG You-ru<sup>1</sup>, HUA Yu-fei<sup>2</sup>, WANG Xue-feng<sup>1</sup>, GU Jian-hua<sup>1</sup>, CHEN Yi-yong<sup>1</sup>

(1. Department of Biological Science and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China;

2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**Abstract:** Soybean proteins were prepared from the model systems consisting of lipid-reduced soybean proteins, linoleic acid and lipoxygenase, and the EPR spectra of the proteins were investigated and compared with at different microwaves. The effects of preparation methods on the free radical concentration and species were examined. Four different type free radicals were identified as the damage of protein side chains or free radical chain reaction. The carbon radicals (g value range 2.0041 to 2.0054) formed at either on the backbone of the  $\alpha$ -carbon or on the side chains of the proteins, while the free radical concentration or central singlet signal decreased with increased microwaves. Sulphur radicals (g value range 2.019 to 2.028) attributed to sulfur-containing side-chain of methionine or cysteine in the proteins were all detected at different microwaves, and were stable even at room temperature as observed in two samples. The radical  $\cdot\text{OH}$  was originated from free radical chain reaction and water molecules, and related to dityrosine formation from oxidative modification of soybean proteins examined in the previous study. Aldehyde radical must be originated from the enzymatic reactions which occurred between soybean proteins and the degradation product of linoleic acid oxidation catalyzed by lipoxygenase I-B (LOX). It was contained in the central carbon signal, but shifted in some sort to high magnetic field.

**Key words** soybean proteins; lipoxygenase; linoleic acid; free radicals; EPR

中图分类号: 0482.533 Q505

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0041-05

收稿日期: 2007-02-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(20476040)

作者简介: 黄友如(1966-), 男, 副教授, 博士, 主要从事植物蛋白的基础研究与开发。E-mail: huangyours@yahoo.com.cn

前期的研究通过建立由 LA、LOX 和 LRSP 所组成的模拟反应体系,应用 EPR 波谱研究了模拟体系中导致大豆蛋白聚集体形成的自由基由氧化亚油酸到大豆蛋白的迁移。经脂肪氧合酶催化亚油酸的诱导,在大豆蛋白 EPR 波谱中检测到一个很强的源于肽链骨架  $\alpha$ -碳原子或其侧链其他碳原子的自由基信号,其  $g$  值范围在 2.0041~2.0054 之间。此外,在碳自由基中场信号的低场区尚有一个额外的肩峰,它是硫自由基信号,其  $g$  值范围在 2.019~2.028 之间。在大豆蛋白与脂肪氧合酶和亚油酸混合反应前,添加天然抗氧化剂如 VC 和  $\alpha$ -生育酚或人工合成的抗氧化剂 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)均能抑制自由基信号和荧光的发展;可使中场碳自由基信号降低 35%~65%。为更好地了解自由基的性质,阐明发生在模拟体系中的化学反应过程,进一步探讨 LOX 催化 LA 氧化所引起的大豆蛋白质聚集的机理,本实验继续以由 LA、LOX 和 LRSP 所组成的模拟反应体系为研究对象,确定导致大豆蛋白聚集体形成的部分自由基类型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

低温脱脂豆粕 山东禹王实业有限公司植物油厂。

脂肪氧合酶(LOX I-B, 70800 单位/mg)和亚油酸(色谱纯,含量 $\geq 99.0\%$ ) Sigma 公司;其他试剂均为分析纯。

LRSP 的制备、底物 LA 溶液(0.107mol/L)和 LOX I-B 酶液(1.8mg/ml)的配制见参考文献[1]和[2]。将 LRSP 溶于去离子水中配制成 5% 的 LRSP 溶液,用 1mol/L NaOH 调 pH 至 9.0。

### 1.2 自由基类型的确定

为了确定 LOX 催化 LA 氧化与大豆蛋白相互作用过程中衍生的蛋白质自由基类型,我们曾尝试将反应后冷冻干燥的样品放在液氮温度下测量,改变微波功率在 1~20mW 范围之类均未达到满意的结果,遂放弃该尝试,改在常温下,通过改变微波功率的方法测量。具体过程如下:将由 4.0ml 底物 LA 溶液、5ml LOX I-B 酶液和 50ml 5% 的 LRSP 溶液组成的反应体系,置入 30℃ 的恒温水浴中振荡反应 2.0h 后取出,冰浴冷却至 0℃ 后等分成两份分别处理。一份直接冷冻干燥;另一份调 pH4.5 酸沉,离心(5000  $\times$  g, 30min)所得蛋白沉淀分散于去离子水中并用 2mol/L NaOH 调 pH 值至 7.0,然后将其蛋白溶液冷冻干燥。所得两份样品分别命名为 ESR1 和 2。准确称取 20mg 过 80 目标标准筛的冷冻干燥样品,将其转移至内径 3.5mm 石英样品管中,应用 JES-FA200 EPR 谱仪检测,检测条件如下:调制频率 100kHz,微波频率 9441.566MHz,微波功率 1~50mW,中心磁场 337.144mT,扫描宽度 15mT,调制幅度 0.35mT,信号增益范围 200~2000。

### 1.3 $g$ 值的计算

采用双标样法测量  $g$  因子,即采用锰标的第 3 和第 4 条峰做参考,其  $g$  值分别为 2.0357 和 1.9804,校正  $\Delta H = 0.449\text{mT}$ 。根据下列共振公式<sup>[2]</sup>计算

$$g = h\nu / \beta H = 0.7144\nu/H$$

式中, $h$  为普朗克(Planck)常数; $\beta$  为玻尔磁子; $\nu$  为微波频率,单位 GHz; $H$  为磁场,单位 kG (1G = 0.1mT),这里  $H = H_{\text{测}} - \Delta H$ 。

## 2 结果与分析

测定自由基浓度及其类型,有助于了解发生在食品和生物体系中的化学反应,包括衰老过程中的生理现象<sup>[1-4]</sup>。但迄今为止,对食品体系中自由基形成的动态过程依然不甚了解,相应的研究方法也未完全建立<sup>[5-6]</sup>。为更好地了解自由基的性质,人们曾尝试采用低温处理的方法,通常在液氮的条件下进行<sup>[7]</sup>。在此条件下,自由基的转换速度降低,这为研究自由基的转换提供了可能。由于本实验中模拟体系的反应温度较高(30℃),尝试将反应后冷冻干燥的样品放在液氮温度下测量,改变微波功率在 1~20mW 范围之类均未达到满意的结果,遂放弃该尝试,改为在常温下,通过改变微波功率的方法测量。

对任一自旋体系,在产生共振吸收后,都存在使自旋再返回基态的弛豫过程。若微波功率非常大,以致弛豫过程不能使足够的自旋回到基态,以维持平衡集居数分布,这就产生了所谓饱和<sup>[8]</sup>。当未达到饱和时,信号幅度随微波功率增大而增加。开始饱和时,如继续增加微波功率,信号强度增加的速度减慢,接着谱线展宽或幅度降低,以致消失。达到饱和和所需的微波功率决定于自旋体系的弛豫时间。弛豫时间愈短,愈不容易达到饱和<sup>[8]</sup>。对于由多种自由基组成的复合 SPR 波谱的解析可部分采用饱和技术,因为每种自由基达到饱和和所需的微波功率不同。顺序增加微波功率,某些自由基信号可能降低甚至消失,但先前不太明显的较弱的信号则有可能增加至检测限以上。在检测较弱的硫自由基信号时,该技术特别有用。由于碳自由基信号容易饱和,因此当微波功率增加时,硫自由基信号逐渐增强。

图 1 为改变微波功率(1~50mW)所得到的大豆蛋白自由基信号的典型饱和曲线。可见位于中场的  $\alpha$ -碳原子信号( $g=2.0050$ )容易达到饱和,在微波功率达到 1mW 以上时,其信号强度逐渐降低。此外,由图 1 还可以看出,随着微波功率的改变,样品 SPR 波谱的线型也随之改变,这意味着这些 SPR 波谱是由不同类型的自由基组成。这些自由基的未偶电子具有不同的自旋-自旋弛豫时间( $T_2$ )和自旋-晶格弛豫时间( $T_1$ )。由于微波功率与  $H_1^2$  成正比,因此随着磁场幅值的改变, $H_1$  由微波功率来决定。由下面的关系式可知<sup>[6]</sup>,SPR 波谱中各线强

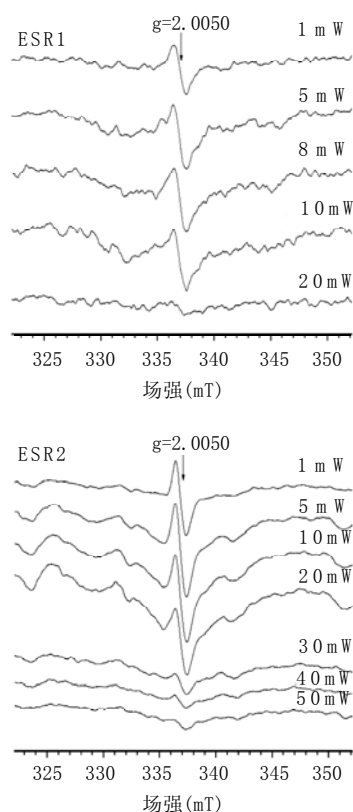


图1 不同微波功率下的大豆蛋白 EPR 波谱

Fig.1 Comparison of saturation characteristics of soybean protein EPR spectra measured at different microwave powers

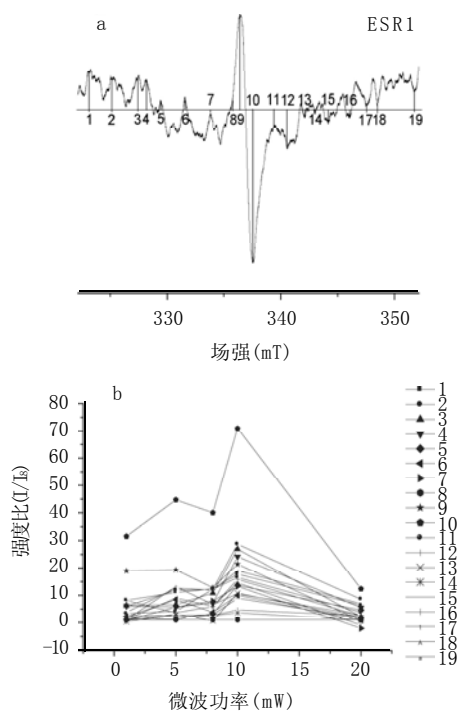


图2 微波功率为 1mW 时 ESR1 样品 SPR 波谱中各特征谱线的位置 (a) 及不同微波功率下的 ESR1 样品 EPR 波谱中各特征谱线的饱和曲线 (b)

Fig.2 Saturation curves for different components of EPR spectra of sample ESR1 measured by different microwave powers

度的相对比率  $I$  随微波功率的变化而变化。

$$I \sim H_1^2 \times \omega \omega_0 [T_2/1 + T_2^2(\omega_0 - \omega)^2 + \gamma^2 H_1^2 T_1 T_2]$$

式中,  $\chi_0$  为磁化率;  $\omega$  为微波频率;  $\omega_0$  为共振微波频率;  $H_1$  为磁场幅值;  $\gamma$  为电子回转磁率。

对 ESR1 样品而言, 我们改变微波功率在 1、5、8、10 和 20 mW 条件下分别测得该样品的不同 SPR 波谱 (图 1)。可以看出, 随着微波功率的改变, 该样品 SPR 波谱中, 对应磁场强度为 335.690 mT 的谱线 (谱线 8) 强度不随微波功率的改变而变化, 这意味着该谱线所在自由基未偶电子的自旋-晶格弛豫时间 ( $T_1$ ) 最短。据此我们分别讨论 ESR1 样品的 19 个特征谱线 (图 2a), 将每个特征谱线在不同微波功率下所对应的信号强度与谱线 8 的信号强度作比较, 通过计算其比率来比较各特征谱线所在自由基未偶电子的自旋-晶格弛豫时间 ( $T_1$ ) 的长短。以此判定它们是否属于不同类型的自由基。图 2b 为不同微波功率下的 ESR1 样品 SPR 波谱中各特征谱线的饱和曲线。从图 2b 可以看出, 有五组不同类型的特征谱线, 其自由基未偶电子的自旋-晶格弛豫时间 ( $T_1$ ) 不同。它们分别是: 组 I (谱线 1、8、14 和 16); 组 II (谱线 2、3、4、5、11、12、13 和 15); 组 III (谱线 6、7、17、18 和 19); 组 IV (谱线 9); 组 V (谱线 10)。这五组不同类型的特征谱线表明它们分属不同类型的自由基, 其自由基未偶电子的自旋-晶格弛豫时间  $T_1(I) < T_1(III) < T_1(II) < T_1(IV) < T_1(V)$ 。

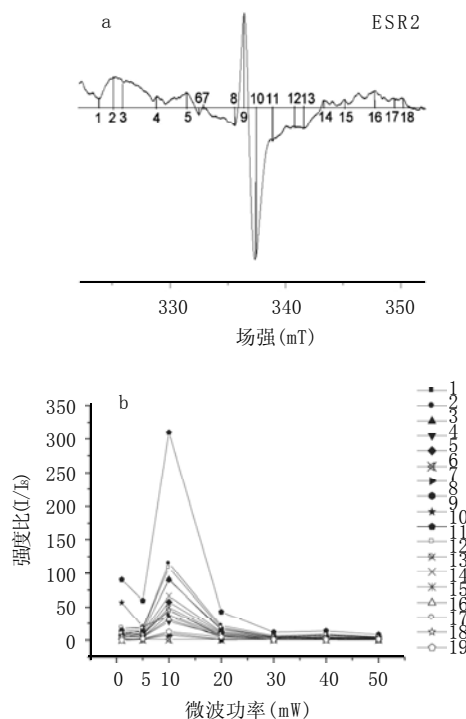


图3 微波功率为 1mW 时 ESR2 样品 SPR 波谱中各特征谱线的位置 (a) 及不同微波功率下的 ESR2 样品 SPR 波谱中各特征谱线的饱和曲线 (b)

Fig.3 Saturation curves for different components of SPR spectra of sample ESR2 measured by different microwave powers

同样对 ESR2 样品而言, 改变微波功率在 1、5、10、20、30、40 和 50mW 条件下分别测得该样品的不同 SPR 波谱(图 1)。可以看出, 随着微波功率的改变, 该样品 SPR 波谱中, 对应磁场强度为 332.108mT 的谱线(谱线 6)强度不随微波功率的改变而变化, 这意味着该谱线所在自由基未偶电子的自旋-晶格弛豫时间( $T_1$ )最短。据此我们分别讨论 ESR2 样品的 18 个特征谱线(图 3a), 将每个特征谱线在不同微波功率下所对应的信号强度与谱线 6 的信号强度作比较, 通过计算其比率来比较各特征谱线所在自由基未偶电子的自旋-晶格弛豫时间( $T_1$ )的长短。以此判定它们是否属于不同类型的自由基。图 3b 为不同微波功率下的 ESR2 样品 SPR 波谱中各特征谱线的饱和曲线。从图 3b 可以看出, 有四组不同类型的特征谱线, 其自由基未偶电子的自旋-晶格弛豫时间( $T_1$ )不同。它们分别是: 组 I (谱线 6); 组 II (谱线 7、14 和 18); 组 III (谱线 1、2、3、4、5、8、11、12、13、15、16 和 17); 组 IV (谱线 9 和 10)。这四组不同类型的特征谱线表明它们分属不同类型的自由基, 其自由基未偶电子的自旋-晶格弛豫时间  $T_1(I) < T_1(II) < T_1(III) < T_1(IV)$ 。

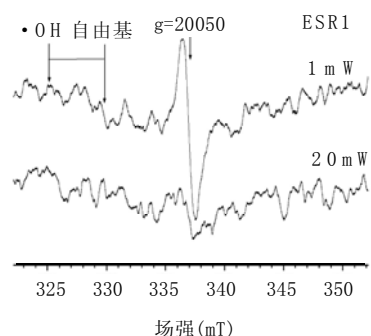


图 4 微波功率分别为 1mW 和 20mW 时 ESR1 样品的 SPR 波谱  
Fig.4 SPR spectra of sample ESR1 measured at 1 mW and 20 mW microwave power respectively(recorded at 25°C)

图 4 为改变微波功率分别为 1mW 和 20mW 时所测得的 ESR1 样品 SPR 波谱。由图可见, 改变微波功率该样品 SPR 波谱在 323.870~331.553mT 磁场范围内的线型变化不大, 由前面各特征谱线的饱和曲线分析可知(图 2), 在该磁场范围内有三组不同类型的特征谱线, 其自由基未偶电子的自旋-晶格弛豫时间( $T_1$ )不同。它们分别是: 组 I (谱线 1)、组 II (谱线 2、3、4、5)和组 III (谱线 6、7)。这三组不同类型的特征谱线可能分属三种类型的自由基, 其自由基未偶电子的自旋-晶格弛豫时间  $T_1(I) < T_1(III) < T_1(II)$ 。也就是说谱线 2、3、4、5 属于同一自由基类型。从谱线的裂分(不对称的 3 线裂)和 g 值( $g_1 = 2.049$ ,  $g_2 = 2.030$ ,  $g_3 = 2.010$ )范围来看, 与文献报道的  $\bullet OH$  自由基特征相符合<sup>[6,9]</sup>, 因此组 II 应是  $\bullet OH$  自由基信号(表 1)。谱线 6 和 7 同属硫自由基, 从谱线的裂分(不对称的 3 线裂)和 g 值( $g = 2.019 \sim 2.028$ )范围来看,

与文献报道的  $\bullet S$ -自由基特征相符合<sup>[10-11]</sup>(表 1)。在 ESR1 样品中, 随着微波功率的改变, 位于中场的碳自由基信号强度逐渐减弱, 而谱线 6 和 7 的信号强度却逐渐增强, 从以上饱和曲线的分析也可知, 谱线 6 和 7 自旋-晶格弛豫时间小于谱线 9 和 10(碳自由基信号)。这说明碳自由基的信号较易达到饱和, 而硫自由基信号需要增加微波功率才能饱和。

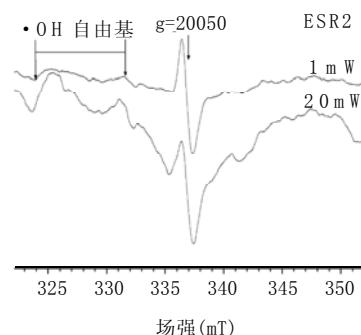


图 5 微波功率分别为 1mW 和 20mW 时 ESR2 样品的 SPR 波谱  
Fig.5 SPR spectra of sample ESR2 measured at 1 mW and 20 mW microwave power respectively(recorded at 25°C)

图 5 为改变微波功率分别为 1mW 和 20mW 时所测得的 ESR2 样品 SPR 波谱。由图 5 可见, 在微波功率为 20 mW 时, 可明显地观察到  $\bullet OH$  自由基信号。这主要是因为一般顺次粒子(如碳自由基)的自旋弛豫时间稍长, 通常在低微波功率下(如 1mW)即可获得相应的 SPR 波谱; 而  $\bullet OH$  自由基的自旋弛豫时间较短, 通常需要在较高的微波功率下才能获得相应的 SPR 波谱。这与前面的各特征谱线的饱和曲线分析结论一致(图 3), 即在 323.870~331.553mT 磁场范围内, 谱线 1~5 属于同一自由基类型, 其自由基未偶电子的自旋-晶格弛豫时间  $T_1$  相同。

随着微波功率的增加, 在样品 ESR1 和 2 中可以鉴定出的另一种自由基即是醛自由基<sup>[5,10-12]</sup>(图 2 ESR1 和图 3 ESR2 的谱线 10, 包含在中场碳自由基信号中, 稍微偏向高场区)。其超精细耦合常数为 120G, 与现有资料相比<sup>[13]</sup>, 各向同性的 g 值为 2.0035。

由图 4~6 可以看出, 没有经过等电点沉淀过程的 ESR1 样品, 其 EPR 波谱的线型较经过等电点沉淀处理的 ESR2 样品复杂, 自由基信号较为丰富; 且 EPR 波谱中场信号强度较低, 仅为 ESR2 样品的 40%(图 6)。这说明同一样品在反应后的处理过程不同, 其自由基重组的方式也有差异。对 ESR2 样品而言, 在等电点沉淀的过程中某些自由基发生了转换, 部分类型自由基湮灭了, 因而自由基的类型减少了。换句话说某些自由基类型消失了, 而位于中场典型的碳自由基信号( $g = 2.0050$ )却明显加强了。

随着微波功率的增加, EPR 波谱的线型发生了改变, 这表明不同顺磁粒子中场信号的检测可在不同的微

表1 根据EPR波谱分析确定的模拟反应体系产生的自由基类型<sup>a</sup>Table 1 Free radicals in LOX-catalyzed LA-soybean proteins interaction proposed by EPR spectra analysis<sup>a</sup>

自由基类型	裂分线数	ESR 参数	ESR1		ESR2		参考资料
			信号强度	微波功率 (mW)	信号强度	微波功率 (mW)	
肽链骨架 $\alpha$ -碳原子或侧链碳原子的自由基 -S·	中场单线	$g = 2.0041 - 2.0054$	强	1、5、8、10、20	强	1、5、10、20、30、40、50	[16]
	不对称	$g = 2.0191 - 2.028$	中等在5、10、20 mW 时很强	1、5、8、10、20	弱、在30、40、50 mW 时中等	1、5、10、20、30、40、50	[10-11]
	3线裂分	$g = 2.0035$	很强	1、5、8、0、20	很强	1、5、10、20、30、40、50	[6,10-12]
·CH <sub>2</sub> O	2个双线裂分	$\alpha = 120G$					
·OH	不对称	$g_1 = 2.049$	很强	1、5、8、10、20	很强	1、5、10、20、30、40、50	[6,9]
	3线裂分	$g_2 = 2.030$					
		$g_3 = 2.010$					

注: <sup>a</sup>g 为因子;  $\alpha$  为超精细耦合常数。

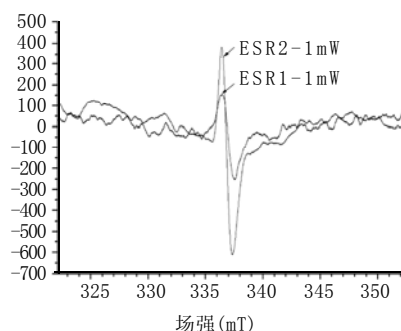


图6 微波功率为1mW时两种不同方法制备样品的EPR波谱

Fig.6 EPR spectra of samples prepared with different methods

波功率下进行。在两种样品 SPR 波谱的饱和曲线中, 根据弛豫时间的不同可区分出 4~5 种类型的波谱成分, 分别代表不同类型的自由基。表 1 总结了本研究所涉及的较为重要的自由基。其中处于中场源于肽链骨架的  $\alpha$ -碳原子或其侧链的其他碳原子上的碳自由基信号最强, 其  $g$  值范围在 2.0041~2.0054 之间。硫自由基在室温下稳定, 在不同微波功率下检测, 在两个样品中均可观察到, 其中 ESR1 样品更为明显; 它源于蛋白质中甲硫氨酸残基的 -C-S-C-、胱氨酸的 -S-S-, 以及半胱氨酸的游离 -SH。羟基自由基 ·OH 在两个样品中均可观察到, 它源于自由基链反应和水分子。在 LOX 催化 LA 氧化过程中产生的脂质过氧化物如 LOOH, 可通过光解形成 ·OH 自由基和脂质氧自由基 LO·:  $LOOH \xrightarrow{h\nu} LO· + ·OH$ 。·OH 自由基具有较高的反应活性, 是已知的化学性质最活泼的活性氧, 可无选择性和所有的物质成分发生反应, 速度常数很高<sup>[8]</sup>。·OH 自由基可参与抽氢、加成和电子转移反应, 其中抽氢常见于脂质过氧化中。前面研究结论<sup>[14]</sup>中二酪氨酸形成机制就与 ·OH 自由基的参与有关。

表 1 中醛自由基一定源于大豆蛋白与 LOX 催化 LA 氧化产生的降解产物的酶促反应。在 ESR1 和 ESR2 两个样品中, 它均包含在中场碳自由基信号中, 稍微偏向高场区。它在干制鱿鱼和经蒸煮后冷冻保藏鱼类等加

工处理的食品中也经常被检测到<sup>[15]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] DADAYLI D, SUNNETCIOGLU M, KOKSEL H, et al. Detection of irradiated wheat using the electron paramagnetic resonance[J]. Cereal Chemistry, 1997, 74(4): 375-378.
- [2] YAMAGUCHI F, YOSHIHIRO Y, NAKAZAWA H, et al. Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/NaOH/DMSO system[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 2544-2548.
- [3] SUNNETCIOGLU M M, DADAYLI D, CELIK S, et al. Application of the electron paramagnetic resonance spin probe technique for detection of irradiated wheat[J]. Cereal Chemistry, 1998, 75(6): 875-878.
- [4] RAFFI J. Identifying irradiated foods[J]. Trends in Analytical Chemistry, 1998, 17(4): 226-233.
- [5] LEE E J, VOLKOV V I, BYUN M W, et al. Detection of free radicals in gamma-irradiated soybean paste and model system by electron spin resonance spectroscopy[J]. Radiation Physics and Chemistry, 2002, 64: 61-66.
- [6] LEE E J, VOLKOV V I, LEE C H. Electron spin resonance studies of free radicals in  $\gamma$ -irradiated soybean paste[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(7): 3457-3462.
- [7] WAIK R J, BUSHUK W. Free radicals in flour, starch and gluten produced by ball-milling, electric discharge and gamma-irradiation[J]. Cereal Chemistry, 1973, 50: 654-660.
- [8] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 155; 924-939.
- [9] PSHEZHETSKII S Y, KOTOV A G, MILINCHUK V K, et al. EPR of free radicals in radiation chemistry[J]. New York: Halsted Press: 1972.
- [10] HENRIKSEN T, SANNER T, PIHL A. Secondary processes in proteins irradiated in the dry state[J]. Radiation Research, 1963, 18: 147-162.
- [11] HENRIKSEN T, SANNER T, PIHL A. Transfer of radiation-induced unpaired spins from proteins to sulfur compounds. Radiation Research, 1963, 18: 163-176.
- [12] SCHAICH K M, REBELLO C A. Extrusion chemistry of wheat flour proteins: I. Free radical formation[J]. Cereal Chemistry, 1999, 76(5): 748-755.
- [13] HOLMÉR R W. ESR study of HCO in single crystals of formic acid at 77 K[J]. The Journal of Chemical Physics, 1969, 51: 3255-3260.
- [14] HUANG Y R, HUA Y F, QIU A Y. Soybean protein aggregation induced by lipoxigenase catalyzed linoleic acid oxidation[J]. Food Research International, 2006, 39(2): 240-249.
- [15] BECHMANN I E. Comparison of the formaldehyde content found in boiled and raw mince of frozen saithe using different analytical methods[J]. Lebensmittelwiss u Technol, 1998, 31: 449-453.
- [16] SCHAICH K M, KAREL M. Free radical reactions of peroxidizing lipids with amino acids and proteins: an ESR study[J]. Lipids, 1975(11): 392-400.