

pH 值对大豆分离蛋白构象及表面疏水性的影响

王中江¹, 江连洲^{1,2,*}, 魏冬旭^{1,3}, 李 杨¹, 王 辰¹, 李 丹^{1,4}

(1.东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2.国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150030;

3.黑龙江出入境检验检疫局, 黑龙江 哈尔滨 150001; 4.宁德师范学院, 福建 宁德 352100)

摘 要:采用 Lowery 法、ANS 荧光探针法、圆二色光谱、荧光光谱方法分别对不同 pH 值大豆分离蛋白溶解度、表面疏水性、蛋白质二级、三级结构进行分析。结果表明:随着 pH 值的升高,大豆分离蛋白的二级结构发生由 β -折叠结构向 α -螺旋结构的转变,其 Trp 残基所处微环境极性增强。大豆分离蛋白表面疏水性与溶解度呈负相关关系,同时大豆分离蛋白表面疏水性也与 α -螺旋结构含量呈负相关关系。

关键词:大豆分离蛋白; pH 值; 表面疏水性; 构象

Effect of pH on Conformation and Surface Hydrophobicity of Soybean Protein Isolate

WANG Zhong-jiang¹, JIANG Lian-zhou^{1,2,*}, WEI Dong-xu^{1,3}, LI Yang¹, WANG Chen¹, LI Dan^{1,4}

(1. College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. National Soybean Engineering Technology Research Center, Harbin 150030, China; 3. Heilongjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Harbin 150001, China;

4. Ningde Normal University, Ningde 352100, China)

Abstract: Lowry method, ANS fluorescence probe, circular dichroism and fluorescent spectroscopy were applied to explore the solubility, surface hydrophobicity, secondary structure and tertiary structure of soybean protein isolate at different pH conditions. The results showed that the transformation from β -sheet structure to α -helix structure, and the microenvironment polarity of Trp residues revealed an obvious increase with increasing pH. A negatively linear correlation between the surface hydrophobicity and solubility of soybean protein isolate was observed. Meanwhile, the surface hydrophobicity of soybean protein isolate was negatively correlated with the amount of α -helix structure.

Key words: soybean protein isolate; pH; hydrophobicity; structure

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0047-05

在我国的大豆蛋白质市场上,大豆分离蛋白是产量最大的一种产品。目前大豆分离蛋白被广泛应用于食品加工中的各个领域,这一方面是由于大豆蛋白质自身丰富的营养价值,而更重要的另一方面是由于大豆分离蛋白具有许多优良的功能特性。针对不同的功能性质,大豆分离蛋白被应用在不同食品及化工领域,化工及材料工业主要利用了大豆分离蛋白的表面疏水性质。

蛋白质是由多种氨基酸相互联结构成的具有特定空间结构的生物大分子,而维持蛋白质的三级结构最重要的作用力是疏水基之间的相互作用。疏水作用是一种配位体间非共价键相互作用,它在生物体内的许多精细化学和物理特性以及对其反应性的研究方面的知识迄今仍很不完全。一般来说,多数构成蛋白质的非极性氨基

酸侧链分布在分子内部形成疏水内核,而极性氨基酸分布在表面的亲水环境中。对于一些已知结构的蛋白质表面性质的分析表明,一些疏水基团也会出现在蛋白质表面,使蛋白质表面也具有一定的疏水性。疏水作用对蛋白质的稳定性、构象和蛋白质功能具有重大意义。由于蛋白质是大分子结构,表面疏水性影响分子间的相互作用,因此比整体的疏水性对蛋白质的功能具有更大的影响^[1]。蛋白质表面疏水性可作为疏水基团和极性溶液环境结合数目的指标,而疏水基团和极性溶液环境结合数目可衡量分子间相互作用的强弱,因而表面疏水性是蛋白质一种很重要的表面性质。

研究表明,蛋白质的表面疏水性不仅与其来源、加工条件、加工方法等有关,而且与蛋白质的物理化

收稿日期: 2011-06-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(C200101)

作者简介: 王中江(1987—),男,硕士研究生,研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: zibeizhe@126.com

* 通信作者: 江连洲(1960—),男,教授,博士,研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: jljzname@163.com

学性质、结构特征等密切相关,包括蛋白质的大小、形状、氨基酸组成及序列及其含量分布、三级及四级结构、分子内或分子间交联等^[2-3]。本实验通过圆二色光谱、荧光光谱检测方法,系统研究 pH 值对大豆球蛋白表面疏水性和结构的影响,从而可进一步探讨 pH 值与大豆蛋白表面疏水性之间的关系,期望为大豆精深加工及高值化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆(东农-46号)由东北农业大学大豆研究所提供。大豆粉碎后过 60 目筛,用石油醚脱脂,得脱脂大豆粉。所用试剂最低纯度为分析纯。

1.2 仪器与设备

J-815 圆二色光谱仪 日本 Jasco 公司; CR22G 高速冷冻离心机、F-4500 型荧光分光光度计 日本日立公司; PHS-3D pH 计 上海雷磁仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 大豆分离蛋白制备工艺流程

脱脂豆粉→pH8.0 碱提→离心→pH4.5 酸沉→溶解→冷冻干燥→成品

工艺条件:用水以料液比 1:10(m/V)的比例溶解豆粕,用 2mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 8.0,在磁力搅拌下提取 3h;然后 10000 × g 离心 30min;上清液用 2mol/L HCl 溶液调节 pH 值至 4.5,再 10000 × g 离心 30min;沥去上清液,用水洗沉淀 3 次,加少量的水溶解沉淀,用 2mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 7.0;最后冷冻干燥得到大豆分离蛋白成品(蛋白质含量为 88.89%)。

1.3.2 不同 pH 值缓冲液的配制

配制 0.01mol/L 的 pH 值为 2~6 的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲液, pH 值为 7~9 的 Tris-HCl 缓冲液, pH10 的甘氨酸-HCl 缓冲液, pH11 和 pH12 的 NaOH-Na₂HPO₄ 缓冲液(离子浓度约为 0.05mol/L)。

1.3.3 溶解度测定

称取 100mg 蛋白样品分散于 10mL 的去离子水中,磁力搅拌 30min,然后用 1mol/L 的 NaOH 或 HCl 溶液调节溶液的 pH 值,搅拌 30min 后离心(12000 × g, 20min, 20℃)。上清液经适度稀释,采用 Lowery 法测定蛋白质含量^[4],以牛血清白蛋白为标准物制作标准曲线。以上清液蛋白质量浓度占总蛋白质量浓度的百分比表示蛋白质的溶解度。

1.3.4 表面疏水性的测定

采用 ANS 荧光探针法。将蛋白质样品溶于 0.01mol/L 不同缓冲液中,配成 10mg/mL 的溶液,均质 1min 后 8000 × g

离心 20min,取上清液用 Lowery 法测定溶液中大豆蛋白的质量浓度,然后将上清液稀释成不同的梯度后,取不同的样品溶液 10mL,分别加入 50μL 8mmol/L 的 ANS 溶液,振荡,静置 10min 后测其荧光强度(FI)。在本实验中激发波长 330nm,发射波长 490nm。以荧光强度对蛋白质作图,初始段的斜率即为蛋白质分子的表面疏水值^[5-6]。

1.3.5 圆二色光谱分析

采用远紫外区域圆二色光谱用于研究不同 pH 值对蛋白二级结构的影响。准确称取一定量的蛋白样品,溶于不同 pH 值缓冲液中,蛋白质量浓度为 0.4mg/mL,室温下将样品放置 4h。样品 pH 值采用高精度的 pH 酸度计进行监控。采用圆二色光谱仪在 190~250nm 之间扫描,实验温度为 20℃,样品池光程为 1mm,灵敏度为 100mdeg/cm,扫描速度率为 100nm/min,分辨率 0.1nm,实验值为 5 次扫描的均值。蛋白二级结构组成采用 CDPro 曲线拟合软件包,使用的算法为 CONTIN/LL,使用的参考蛋白为 SMP56,取蛋白平均残基摩尔质量(MRW)为 115g/mol,计算波长范围为 200~240nm,每个样品重复 3 次测定。

1.3.6 荧光光谱分析

采用 F-4500 型荧光分光光度计测定大豆分离蛋白的荧光光谱。蛋白分散于不同 pH 值缓冲液中,蛋白质量浓度为 0.2mg/mL,激发波长为 295nm,发射光谱范围为 300~400nm,激发和发射狭缝均为 5nm,扫描 5 次。

1.3.7 数据统计方法

用 SAS 8.12 进行相关分析和方差分析,如果方差分析效应显著,使用 Duncan multiple range test 进行多重比较($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 值的大豆分离蛋白溶解度曲线

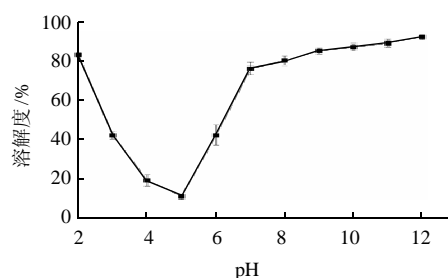


图1 不同 pH 值对大豆分离蛋白溶解度的影响
Fig.1 Effect of pH on solubility of soybean protein isolate

大豆分离蛋白的等电点在 4.2~4.6,由图 1 可知,大豆分离蛋白的溶解度在 4.5 附近出现最小值(约为 7%),

而在 pH4.5 两侧的 pH 值范围内溶解性均有显著升高 ($P < 0.05$), 同时可以看出大豆分离蛋白在强酸及碱性范围内表现出良好的溶解性。

由于工业上生产大豆分离蛋白的 pH 值范围在 4~9, 因而选取这一区段进行研究, 如溶解度曲线所示, 大豆分离蛋白的溶解度在 pH4~5 时, 溶解度在 19% 以下, 呈现出较差的溶解性, 并伴有沉淀及聚集体的形成, 因而在后期的光谱分析中, 未选取这一区段的 pH 值, 主要由于光谱分析要求样品具有良好的溶解性, 否则图谱将无法表现出典型的结构特征。

2.2 不同 pH 值的大豆分离蛋白表面疏水性曲线

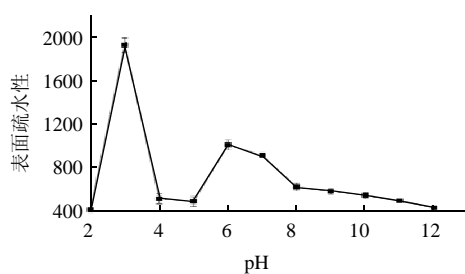


图2 不同 pH 值对大豆分离蛋白表面疏水性的影响
Fig.2 Effect of pH on surface hydrophobicity of soybean protein isolate

由图 2 可知, 大豆分离蛋白的表面疏水性在等电点两侧呈现显著下降趋势, 并在等电点附近出现最大值。与溶解度曲线的比较发现, 在等电点以外的其他 pH 值下大豆分离蛋白的表面疏水值与溶解度呈现负相关, 这与 Hayakawa 等^[7]的研究相符。分析其原因在于蛋白质的溶解性取决于蛋白质分子的亲水性/疏水性的平衡, 这种平衡取决于蛋白质分子的氨基酸组成, 尤其取决于暴露于蛋白质分子表面的氨基酸组成^[8]。在氨基酸侧链残基中, 亮氨酸、异亮氨酸等疏水性残基, 通过疏水键相互结合于蛋白质分子中心, 形成疏水性区域; 另一方面, 谷氨酸、天门冬氨酸、精氨酸、赖氨酸等亲水性残基, 配列于能够与水分子接触的蛋白质分子外侧, 形成亲水性区域^[9]。非极性基团转向分子内部, 形成疏水键; 极性基团转向分子内部的, 可以相互作用形成氢键和盐键, 转向分子表面的, 可与水分子相互作用。蛋白质的非极性疏水基团常趋向于分子结构域的内部, 形成一个疏水核, 这种聚集是由于水对非极性基团的排斥造成的, 疏水侧链基团从水介质转到蛋白质内部的疏水环境是受熵增的驱动自发进行的^[10]。蛋白质结构复杂、种类繁多, 并非上述一种结构模式, 疏水核如果不在核心而暴露在分子表面, 则表现为一定的疏水性, 而亲水溶解性降低, 由于疏水、亲水程度不同, 造成

蛋白质不同的溶解分散性^[11]。同时研究表明, 具有较高的溶解性蛋白质其分子表面存在较少数量的疏水性残基^[5]。

2.3 pH 值对大豆分离蛋白的二级结构的影响

圆二色光谱可以表征不同 pH 值对大豆分离蛋白二级结构的影响, 图 3A 表示不同 pH 值的大豆分离蛋白圆二色光谱图, 图 3B 为不同 pH 值大豆分离蛋白在 208nm 及 222nm 波长处的平均残基摩尔椭圆度(θ), 用于直观的分析 α -螺旋的变化趋势。

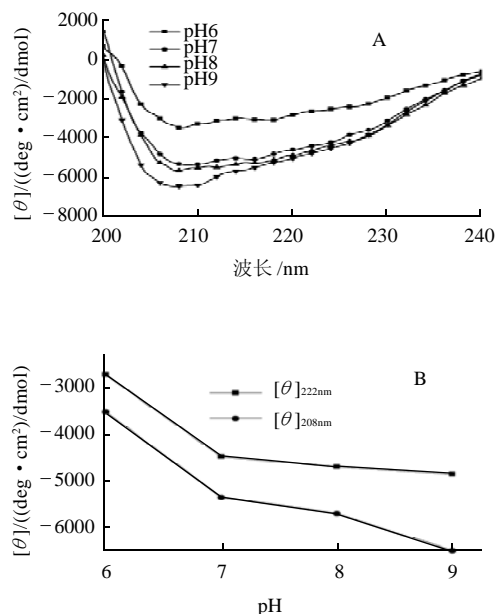


图3 pH 值对大豆分离蛋白二级结构的影响
Fig.3 Effect of pH on secondary structure of soybean protein isolate

由图 3A 可知, 大豆分离蛋白在 194nm 附近显示一个正峰, 218nm 波长处显示一个负肩峰, 208nm 和 222nm 显示出两个负凹槽, 并且还在 220~230nm 之间存在一个很微弱的正峰。194nm 正峰和 218nm 负肩峰的存在表示大豆蛋白中存在 β -折叠结构, 208nm 和 222nm 负凹槽则是由于 α -螺旋结构引起的负科顿效应引起的, 220~230nm 之间的微弱正峰则可表征蛋白质中存在无规卷曲结构。由此可见大豆分离蛋白包含 4 种类型的二级结构组分: α -螺旋, β -转角, β -折叠以及无规卷曲, 其中 β -折叠以及无规卷曲含量较多^[12], 这与通过 CONTIN/LL 程序分析出的结果相吻合, 见表 1。通过拟合分析发现, 大豆分离蛋白随着 pH 值的升高, α -螺旋结构的含量逐渐增大, β -折叠结构逐渐降低, 而无规卷曲结构略微降低, 表明大豆分离蛋白的二级结构发生由 β -折叠结构向 α -螺旋结构的转变。图 3B 可以看出, 由于 α -螺旋结构的含量会随 208 和 222nm 处峰强

的负增长而增大,因此通过 $[\theta]_{208\text{nm}}$ 及 $[\theta]_{222\text{nm}}$ 数值的降低趋势可以看出, α -螺旋结构的含量随pH值升高而增大,与CONTIN/LL程序分析结论一致。

表1 CONTIN/LL程序分析出不同pH值的大豆分离蛋白二级结构含量

Table 1 Secondary structure contents of soybean protein isolate at different pH conditions				%
pH	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
6	8.8	37.4	21.4	32.4
7	12.8	34.2	22.5	30.5
8	15.6	32.6	21.9	30
9	17.3	31.3	21.9	29.5

与中性及碱性条件比较发现pH6(弱酸性)时大豆分离蛋白的 α -螺旋结构相对较低,分析其原因可能为: α -螺旋结构主要由多肽链上羧基($-\text{CO}$)和氨基($\text{NH}-$)之间的氢键稳定^[13-14],而大豆分离蛋白的等电点约为4.5,这说明在中性条件下,蛋白是呈负电荷的,酸性环境可能会增加蛋白间因为电荷中和而产生的静电作用,从而影响氢键的稳定性^[14]。静电作用和氢键稳定性的变化会依次引起在酸性条件下 α -螺旋的丢失^[15]。

Kato等^[16]通过对卵白蛋白和溶菌酶的CD谱图波长为220nm处椭圆率的测定发现,蛋白质的表面疏水性和 α -螺旋结构呈现负相关,即蛋白质分子内 α -螺旋结构含量降低时,分子内部“埋藏”的疏水性位点的暴露程度增大,表现出更强的表面疏水性。因此,大豆分离蛋白在pH6~9的范围内,随着pH值的降低, $[\theta]_{222\text{nm}}$ 的数值逐渐升高,表明分子内 α -螺旋结构含量逐渐降低(图3B),分子内部“埋藏”的疏水性位点的暴露程度增大,表现出更大的表面疏水性,这与大豆分离蛋白的表面疏水性曲线所表现出的增大趋势相符。

2.4 pH值对大豆分离蛋白的三级结构的影响

在295nm激发的大豆分离蛋白样品荧光发射光谱主要是由色氨酸所发射的,和其他含色氨酸和酪氨酸残基的球蛋白一样,由于其分子中从酪氨酸残基到色氨酸残基之间发生了能量转移,从而导致了酪氨酸残基的荧光熄灭和色氨酸残基的荧光增加。因此大豆分离蛋白的荧光峰实际上是色氨酸残基的荧光峰,其峰位在325~350nm波长之间^[17]。

蛋白质是两性物质,在不同的环境中具有不同的状态,这是由于蛋白中所含的羧基和氨基个数和所处的环境决定的。蛋白质中可离解的基团除了一端的 α -氨基和另一端 α -羧基外,大多数是侧链的基团,如天冬氨酸的 β -羧基、组氨酸的咪唑基、赖氨酸的 ϵ -氨基、酪氨酸的羟基等。蛋白质可解离基团的电离情况随着溶液中pH值的变化而改变,从而导致蛋白质中的构象的

变化。因而,通过研究溶液中酸碱度的变化对大豆分离蛋白荧光性质的影响,可以得出其结构信息。通过实验,在溶液酸碱度从pH 6.0到pH 9.0环境中,发现不同pH值对大豆分离蛋白的荧光光谱形状几乎没有影响(图4),而对其 λ_{max} 及荧光强度有改变,其变化情况见表2。

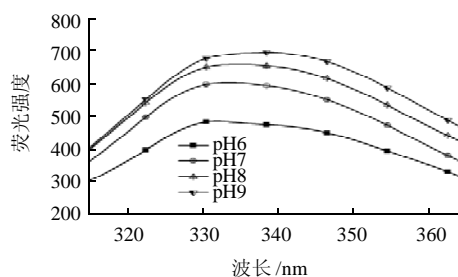


图4 不同pH值大豆分离蛋白的荧光光谱

Fig.4 Fluorescence spectra of soybean protein isolate at different pH conditions

表2 不同pH值的大豆分离蛋白的荧光强度及 λ_{max}

Table 2 Fluorescence intensity and λ_{max} of soybean protein isolate at different pH conditions				
pH	6	7	8	9
荧光强度	482.7	600.9	656.9	693.9
$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	331.2	333.4	335.2	338.4

大豆分离蛋白的 λ_{max} 分布在331.2~338.4nm范围内,有研究表明 λ_{max} 与Trp残基所处微环境的有关, λ_{max} 小于330nm表示Trp残基位于蛋白质分子内部的非极性环境中, λ_{max} 大于330nm时表明Trp残基位于蛋白质分子外部的极性环境中^[18]。由此可见,大豆分离蛋白在pH6~9的范围内,其Trp残基主要分布于蛋白质分子外部的极性环境中。由表2可知,随着pH值增大,大豆分离蛋白的 λ_{max} 向长波方向移动(红移),表明原来处于球状结构内部非极性环境中的Trp残基转移到蛋白质分子外部,其所处的微环境极性有所提高。

另一方面,大豆分离蛋白在pH6~9的范围内,荧光强度随pH值增大而增强。分析其荧光强度的变化可能与大豆分离蛋白中Trp残基的量子产率及Tyr→Trp残基能量传递有关^[19]。由于实验研究选择的pH值范围在微酸性及碱性范围内,因而pH值的变化对大豆分离蛋白电荷分布影响较小,表现在对Trp残基的发光效率影响不大。而Tyr→Trp能量传递可能受pH值变化的影响,从而导致Trp残基总的荧光强度随pH值的变化而改变。另外,随着pH值的增大,受质子解离作用影响,原本带负电荷且靠近Trp残基的带电基团离开,解除了对Trp荧光的猝灭作用。

蛋白质中的3种芳香氨基酸残基与其他氨基酸相比疏水性较强,其中Trp和Phe残基是高度疏水的非极性基团,Tyr残基是中度疏水的极性基团。目前关于利用上述疏水性氨基酸微环境变化预测表面疏水性关系的研究较多,但主要用于蛋白变性过程中,利用在酸碱变性时,蛋白质分子的空间结构会发生变化,结构的变化对疏水性氨基酸残基在蛋白质分子内外的分配产生影响,从而改变了蛋白质分子的表面疏水性,使蛋白质分子表面功能发生变化。

在本研究中主要的研究对象为Trp残基,其在pH值的增大过程中的“暴露”在一定意义上表明大豆分离蛋白的三级结构发生变化,但这种“暴露”并未带来类似于蛋白质变性过程中疏水性氨基酸“暴露”而引起的表面疏水性降低,关于上述现象的原因仍需进一步研究。结合2.3节关于二级结构的分析考虑,原因可能在于在非变性状态下大豆分离蛋白的三级结构未发生类似变性过程中发生的解折叠现象,“包裹”在球状结构内部的疏水性基团并未完全“暴露”出来^[20],而是在二级结构基础上伴随着多肽链逐步卷曲为其它特定构象而使疏水性氨基酸残基发生“暴露”,这种“暴露”对表面疏水性的影响不具有代表意义。综上所述,疏水性较强的芳香氨基酸残基微环境变化目前仍无法用于预测非变性蛋白质表面疏水性的变化。

3 结 论

3.1 大豆分离蛋白的表面疏水性随pH值的变化趋势为:在等电点两侧呈现显著下降趋势,并在等电点附近出现最大值。

3.2 结合溶解性研究发现大豆分离蛋白表面疏水性与溶解度呈现负相关。

3.3 圆二色光谱分析表明,随着pH值的升高,大豆分离蛋白的二级结构发生由 β -折叠结构向 α -螺旋结构的转变。这种变化进一步验证了蛋白质的表面疏水性和 α -螺旋结构呈现负相关。

3.4 荧光光谱分析表明,随着pH值的增大,大豆分离蛋白的荧光强度及 λ_{\max} 均呈现增大趋势,表明大豆分离蛋白中Trp残基所处微环境极性增强,这种变化对表面疏水性的影响尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] SHEARD P R, FELLOWS A, LEDWARD D A, et al. Macromolecular charges associated with the heat treatment of soya isolate[J]. Food Technology, 1988, 21(12): 55-60.
- [2] HUANG Weining, SUN Xiuzhi. Adhesive properties of soy protein modified by sodium dodecyl sulfate and sodium dodecylbenzenz sulfonate [J]. JAOCS, 2000, 77(7): 705-708.
- [3] FUKUSHIMA D. Recent progress of soybean protein isolate foods: chemistry, technology and nutrition[J]. Food Reviews International, 1991, 7(3): 323-351.
- [4] LOWRY O H, ROSENBROUG H J, LEWIS A, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. Journal of Biological Chemistry, 1951, 193(1): 265-275.
- [5] KATO A, NAKAI S. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins[J]. Biochem Biophys Acta, 1980, 624(1): 13-20.
- [6] HUANG Weining, SUN Xiuzhi. Adhesive properties of soy proteins modified by urea and guanidine hydrochloride[J]. JAOCS, 2000, 77(1): 101-104.
- [7] SHIGERU H, SHURYO N. Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins[J]. Journal of Food Science, 1985, 50(2): 486-491.
- [8] ANDRÉS M, SINEIRO J, HERMINIA D, et al. Functionality of oilseed protein products: a review[J]. Food Research International, 2006, 39(9): 945-963.
- [9] SHURYO N. Structure-function relationships of food proteins with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1983, 31(4): 676-683.
- [10] PETRUECELLI S, ANON M C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates.2.Surface properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(10): 2170-2176.
- [11] CHERRY J P. Protein functionality in foods[M]. Washington, D C: ACS Symposium, 1980: 147.
- [12] SREERAMA N, VENYAMINOV S Y U, WOODY R W. Estimation of the number of α -helical and β -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy[J]. Protein Science, 1999, 8(2): 370-380.
- [13] SANO T, OHNO T, OTSUKA-FUCHINO H, et al. Carp natural actomyosin: thermal denaturation mechanism[J]. Journal of Food Science, 1994, 59(5): 1002-1008.
- [14] DAMODARAN S. Amino acids, peptides, and proteins[M]. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 1996: 321-429.
- [15] LIU Ru, ZHAO Siming, XIONG Shanbai, et al. Role of secondary structure in the gelation of porcine myosin at different pH values[J]. Meat Science, 2008, 80(3): 632-639.
- [16] KATO A, TSUTSUI N, MATSUDOMI N, et al. Effects of partial denaturation on surface properties of ovalbumin and lysozyme[J]. Agricultural and Biological Chemistry. 1981, 45(12): 2788-2760.
- [17] KALAPATHY U, HETTIARACHCHY N S, RHEE K C. Effect of drying methods on molecular properties and functionalities of disulfide bond-cleaved soy proteins[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1997, 74(3): 195-199.
- [18] VIVIAN J T, CALLIS P R. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins[J]. Biophysical Journal, 2001, 80(5): 2093-2109.
- [19] 刘清亮, 吴双顶, 张玉慧, 等. 皖南尖吻蛇毒糖增水解酶的荧光光谱研究[J]. 无机化学学报, 1998, 14(1): 53-57.
- [20] ANNA M, ZOFIA D. Differential scanning microcalorimetry study of the thermal denaturation of haemoglobin[J]. Biophysical Chemistry, 2005, 118(2): 93-101.