

超声预处理对麦胚蛋白结构的影响

Effect of Ultrasonic Pretreatment on the Structure of Wheat Germ Protein

颜辉¹ 张琦¹ 聂旭东² 朱胜虎²

YAN Hui¹ ZHANG Qi¹ NIE Xu-dong² ZHU Sheng-hu²

余永建² 熊孟¹ 江明珠¹

YU Yong-jian² XIONG Meng¹ JIANG Ming-zhu¹

(1. 江苏科技大学生物技术学院, 江苏 镇江 212018; 2. 江苏恒顺集团有限公司, 江苏 镇江 212028)

(1. School of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China;

2. Jiangsu Hengshun Group Co., Ltd, Zhenjiang, Jiangsu 212028, China)

摘要:采用超声波对麦胚蛋白进行不同时间的预处理,并利用荧光、拉曼光谱分析溶液中蛋白的结构,红外光谱分析冻干后蛋白结构。结果显示,超声预处理会影响酶解法制备降血糖肽的活性,30 min时活性最高。荧光光谱分析提示超声预处理能够引起麦胚蛋白中色氨酸残基由疏水区向亲水区转移,但蛋白结构未发生重大破坏。拉曼光谱分析超声预处理30 min时对蛋白结构的影响最大, β -折叠含量降低最多。红外光谱分析显示蛋白结构随时间变化,在35 min时变化最大, α -螺旋含量显著降低,无规则卷曲含量显著升高。拉曼和红外光谱提供的信息比荧光丰富,拉曼光谱能够提供更准确的水溶液酶催化体系中的底物结构,对于蛋白的酶解反应更有指导意义。

关键词:超声预处理;麦胚蛋白;降血糖肽;荧光光谱;拉曼光谱;红外光谱

Abstract: Ultrasound pretreatment of wheat germ protein can increase the activity of hypoglycemic peptides prepared from enzymatic hydrolysis, and it is of great theoretical and practical significance to clarify the effect of ultrasonic wave on the structure of wheat germ protein. In this study, wheat germ protein was pretreated by ultrasonic wave with different time, and the structure of the protein was analyzed by fluorescence and Raman spectroscopy, and then the structure of lyophilized protein was analyzed by IR spectroscopy. The results showed that ultrasonic pretreatment influenced the enzymatic hydrolysis of hypoglycemic peptides, and the activity raised to the highest at 30 min. The fluorescence spectroscopy indica-

ted that the pretreatment could induce the transferring of tryptophan residues from hydrophobic to hydrophilic regions in wheat germ protein. However, the protein structure was not found significant damage. Raman spectroscopy showed that protein structure was strongly affected at 30 min, and the content of β -sheet decreased to the lowest. Infrared spectroscopy analysis showed that protein structure changed with time, and the maximum change was at 35 min. Moreover, the α -helix content decreased significantly, while the random-coil content increased significantly. Raman spectroscopy and infrared spectroscopy provided more information than the fluorescence. Raman spectroscopy provided more accurate substrate structure in water-soluble enzyme catalytic system, and this showed more instructive for the protein enzymatic reactions.

Keywords: Ultrasound pretreatment; Wheat germ protein; Hypoglycemic peptide; Fluorescence spectroscopy; Raman spectroscopy; Infrared spectroscopy

超声波是一类频率高于18 kHz声波,具有定向、聚束、投射、反射等特性^[1]。频率范围20~100 kHz的高能量超声波用于声化学,能够产生空化效应、热效应和机械作用,改变物质组织或分子结构、状态、功能^[2],在食品^[3]、生物工程^[4]等领域应用广泛。

蛋白预处理是提高酶解效率及转化率最有效的方法之一。由于高压、高温、微波辐照、酸碱处理及高速剪切等方法存在成本高、设备要求高、操作条件不易控制及易造成环境污染等缺点,超声波预处理技术在食品生产及研发领域中的应用越来越广泛^[5],其中酶解前底物预处理是重要的应用之一。超声波的空化效应在介质中产生强剪切力及高温高压效应,样品因组织结构被破坏变得蓬松,有利于酶与底物的接触。蛋白质经超声波处理后,空间构象会发生一定程度的

基金项目:镇江市重点研发计划——产业前瞻与共性关键技术(编号:GY2015006)

作者简介:颜辉(1971—),男,江苏科技大学副教授,博士。

E-mail: yanh1006@163.com

收稿日期:2017-01-24

改变,更有利于与酶结合^[6],加快酶促反应。

蛋白酶解反应中,合适的蛋白底物结构有利于酶促反应。X射线衍射、核磁共振技术、圆二色谱等是研究蛋白质分子构象的常用方法。X射线衍射分析要求待测大分子须为单晶^[7],很难测定混合蛋白质结构;核磁共振主要用于研究分子量小于20 kDa的小分子蛋白质,且后续的解谱工作繁琐^[8];圆二色谱用于极稀浓度条件下的澄清溶液的测定,高浓度、浑浊蛋白的结构分析通常受限。因此,这些分析方法难以用于食品加工过程中复杂的混合蛋白结构分析。

荧光光谱则是通过测定蛋白质分子中部分能产生荧光发射的氨基酸残基来推测其构象的变化^[9]。红外光谱适用于蛋白质等生物大分子的测定,通过去卷积和曲线拟合^[10]等方法处理可以定量分析蛋白质二级结构。相对于红外对水的高敏感性,拉曼光谱对水不敏感,在分析水溶液中的蛋白结构时有巨大的优势^[11]。因此这些分析可以用于食品加工中高浓度、浑浊蛋白的结构分析。

虽然超声预处理有利于酶解蛋白反应,但超声预处理对麦胚蛋白结构的影响,并由此引起酶解效果变化的规律不清楚。本研究拟利用荧光光谱、拉曼光谱和红外光谱研究超声预处理对麦蛋白结构变化的影响,并探讨结构变化与酶解产物活性的关系,旨在为建立高效的酶解反应体系提供依据,并且也可作为酶解反应过程的监控提供有效手段,建立实时过程分析方法,达到提高产品质量的目的。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

小麦胚芽脱脂粉:河南省鲲鹏华生物科技有限公司;

胰蛋白酶:酶活 $\geq 2\ 500\ \text{U/mg}$,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器

荧光光谱仪:F-4600型,日本日立公司;

光谱仪:QE65Pro型,美国海洋光学仪器公司;

傅立叶红外变换光谱仪:Tensor27型,德国布鲁克光学仪器公司;

超声波反应器:自制。

1.3 方法

1.3.1 小麦胚芽蛋白的制备 称取50 g小麦胚芽脱脂粉加入500 mL的蒸馏水,用5 mol/L的 Na_2CO_3 调节pH到11,50℃超声(200 W)水浴间歇(1次/30 min,每次3 min)搅拌2 h,3 800 r/min离心15 min,所得沉淀重复提两次,合并3次提取所得上层溶液,5 mol/L的醋酸调节pH至6.3,加入1 mL(酶活力3 000 U/mL)淀粉酶,37℃水解1 h,调pH至4.5,再以3 800 r/min离心15 min,取沉淀冷冻干燥,即得小麦胚芽蛋白。

1.3.2 超声波预处理 使用频率为65 kHz的超声波,功率60 W,在48℃水浴条件下对0.8%的麦胚蛋白进行超声预处理,时间分别为0,5,10,15,20,25,30,35,40,45 min。

1.3.3 麦胚降血糖肽的酶解制备 分别将不同预处理时间后的溶液冷却至37℃,加胰蛋白酶酶解,加酶量25 000 U/g,用

1 mol/L Na_2CO_3 维持反应体系pH 8左右。反应17 min,沸水浴10 min灭酶,待用。

1.3.4 α -葡萄糖苷酶制备及活性检测 脱臼处死小鼠,取小肠浸泡于0℃生理盐水中,洗去杂物,液氮研磨。将研磨粉与0.05 mol/L pH 6.8的PBS缓冲液按1:10(g/mL)的比例加入,涡旋振荡30~60 s,4℃8 000 r/min离心10 min,取上清。酪氨酸标准曲线与酶活力的测定方法参照周景祥^[12]的方法; α -葡萄糖苷酶抑制率测定参照Lee等^[13]的方法。

1.3.5 荧光光谱分析 在不同预处理时间点取样50 μL ,加入4 mL pH 8.0浓度0.05 mol/L的PBS缓冲液。使用F-4600荧光光谱仪检测,激发波长280 nm,发射波长300~500 nm,扫描速度1 200 nm/min,发射波长间隔0.2 nm,电压700 V进行扫描。将光谱数据进行1阶导数处理,数值分析获得1阶导数值为0时对应的荧光波长值,即为荧光光谱的峰位值。

1.3.6 近红外拉曼光谱分析 在不同超声预处理时间点,将超声预处理后的蛋白溶液放入石英比色皿进行拉曼光谱扫描。激光光源波长785 nm,功率350 mW,拉曼探头焦距7.5 mm,QE65Pro微型光谱仪采集拉曼光谱,积分时间10 s,取3次平均,拉曼位移范围0~2 790 cm^{-1} ,采样温度室温。

其中剪切1 700~1 645 cm^{-1} 拉曼光谱用于结构分析,5点平滑,Rubberband基线校正、基线点数64,傅立叶自退卷积选择Lorentzian函数(退卷积因子2、噪声减低因子0.5,退卷积结束进行基线校正,参数同上),谱线拟合在1 700~1 645 cm^{-1} 范围内分配15个拟合峰进行拟合。

1.3.7 FTIR光谱分析 在不同超声预处理时间点,取样放入-70℃冰箱速冻,完全凝固后冻干。溴化钾压片,使用布鲁克Tensor 27 FTIR光谱仪扫描光谱,波数范围4 000~400 cm^{-1} ,分辨率4 cm^{-1} ,扫描次数16次。

剪切1 700~1 600 cm^{-1} 光谱,9点平滑,Rubberband方法基线校正、基线点数64,傅立叶自退卷积选择Lorentzian函数、退卷积因子2、噪声减低因子0.5,设定15个拟合子峰进行拟合。

1.3.8 软件 光谱剪切、傅立叶自退卷积和子峰拟合在布鲁克OPUS 5.5上进行。

2 结果

2.1 预处理时间对酶解多肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率

超声预处理对蛋白的结构产生影响,进而影响到蛋白酶解反应。本试验中,随着超声预处理时间的增加,酶解麦胚多肽对 α -葡萄糖苷酶抑制率出现先升高后下降。由图1可知,在30 min时达到最高点。这些结果与其他多肽制备的结果相似。这可能由于超声波空化效应产生的高压和作用力使得蛋白分子结构发生改变,进而容易被蛋白酶水解,产生更多的活性多肽。但是随着超声时间的延长,蛋白分子结构进一步变化,反而不利于蛋白酶解^[14]。

2.2 荧光光谱分析

蛋白质内有3种芳香族氨基酸残基能够产生荧光,分别

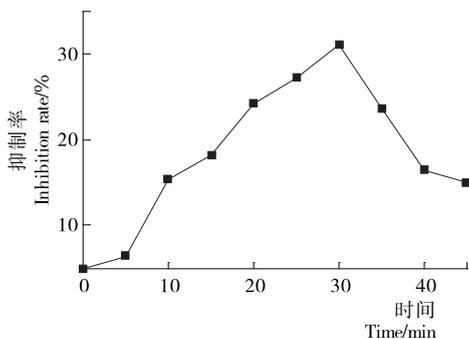


图 1 预处理时间对麦胚降血糖肽抑制率的影响

Figure 1 Effects of different pretreatment time on the inhibition rate of hypoglycemic peptides from wheat germ

是色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe),三者荧光强度之比为 200:9:0.5^[15]。经测麦胚蛋白中这 3 种氨基酸组含量分别为 0.81%, 2.67%, 6.6%, 荧光强度之比为 162:24.03:3.3, 因而 Trp 的荧光占主导地位。当色氨酸残基从蛋白质分子内部的疏水性区域逐渐向亲水性区域暴露时, 荧光强度逐渐增加^[16]。Burststein^[17]提出色氨酸 3 种微环境特征: 色氨酸完全包裹在蛋白质分子内部时, 发射波长峰位在 330~332 nm; 蛋白质结构未完全打开致使色氨酸附着在蛋白质表面时, 发射波长峰位在 340~342 nm; 蛋白质结构完全打开色氨酸暴露在水环境中时, 发射波长峰位在 350~352 nm。因此, 根据色氨酸发射波长峰位的变化, 可以获得色氨酸所处微环境的改变, 进而了解蛋白质结构变化信息^[15-17]。

图 2 是麦胚蛋白在超声波预处理过程中的荧光光谱, 图 3 是荧光峰位的强度变化图, 随着超声的不断进行, 总体上看, 峰强变化大于峰位变化, 峰强从 1 941 上升到 2 329, 说明在超声波预处理过程中, 麦胚蛋白质分子结构发生变化。在 20 min 第一次达到高点, 到 30 min 下降到低点, 然后再不断上升, 提示色氨酸残基首先从蛋白质分子内部的疏水性区域逐渐向亲水性区域暴露^[15], 然转向疏水性区域, 再向亲水性区域暴露。图 4 是荧光光谱的峰位变化图, 由图 4 可知色氨酸峰位变化较小, 在 337~338 nm, 提示色氨酸残基所处微环境基本无变化, 表明蛋白质分子在超声波预处理过程中结构未遭到破坏。从色氨酸荧光强度和峰位变化推测: 超声预处理引起色氨酸残基发生了改变, 从麦胚蛋白质分子内部向外部区域暴露, 但蛋白的整体结构变化轻微。30 min 时, 色氨酸部分回退到疏水区, 此时酶解制备 α -葡萄糖苷酶的活性最高。

本试验中, 超声预处理对荧光峰位的影响不明显, 提示蛋白的结构尚未发生重大变化。仅从荧光光谱很难细致了解蛋白二级结构的变化情况, 需要借助于其他手段才能获得蛋白结构改变信息。

2.3 近红外拉曼光谱分析

拉曼光谱是一种散射光谱, 通过样品对光的散射得到分子振动、转动能级的信息, 进而对分子结构进行分析。由于

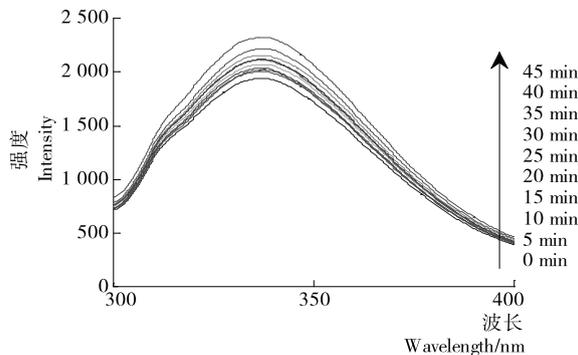


图 2 不同超声预处理时间下麦胚蛋白的荧光光谱

Figure 2 Fluorescence spectra of wheat germ protein under different ultrasonic pretreatment time

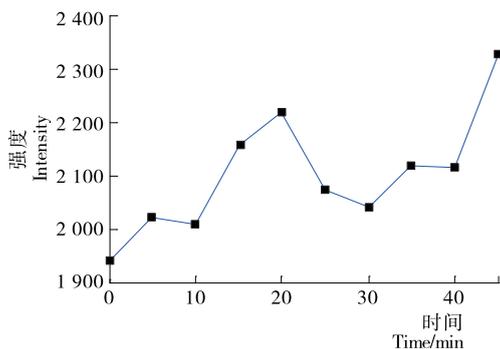


图 3 不同超声预处理时间下麦胚蛋白的荧光峰强

Figure 3 Intensity of fluorescence peak of wheat germ protein under different ultrasonic pretreatment time

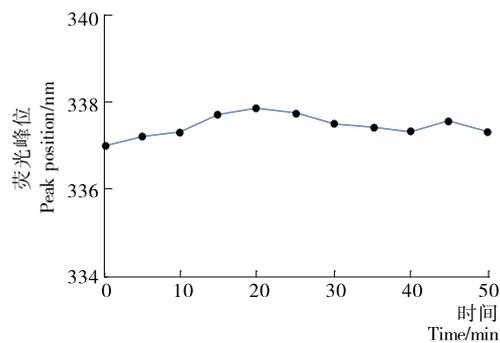


图 4 不同超声预处理时间下麦胚蛋白的荧光峰位

Figure 4 Fluorescence peak position of wheat germ protein under different ultrasonic pretreatment time

拉曼光谱对水不敏感, 因而拉曼光谱在检测含水样品时比红外光谱具备极大的优势。最常用于蛋白结构分析的拉曼谱带是酰胺 I 带($1\ 645\sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$), 4 种蛋白二级结构的划归区间是: $1\ 650\sim 1\ 660\text{ cm}^{-1}$ 为 α -螺旋, $1\ 660\sim 1\ 665\text{ cm}^{-1}$ 为无规则卷曲, $1\ 665\sim 1\ 680\text{ cm}^{-1}$ 为 β -折叠, $1\ 680\sim 1\ 700\text{ cm}^{-1}$ 为 β -转角^[18]。

图 5 为超声波预处理麦胚蛋白 5 min 后的拉曼光谱图, 在 $1\ 500\sim 2\ 200\text{ cm}^{-1}$ 间有明显的拉曼峰。剪切酰胺 I 带、基线校正、傅立叶自退卷积、在 $1\ 700\sim 1\ 645\text{ cm}^{-1}$ 范围内分配 15 个子峰进行拟合, 见图 6。

通过拉曼光谱分析获得超声预处理对麦胚蛋白质二

级结构的影响,结果见图7。由图7可见 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲4种结构因超声预处理而产生变化。 α -螺旋起初无改变,在15 min后增加,30 min后有下降趋势。 β -折叠在超声波预处理的起初也无变化,然后下降,在30 min时到达最低点,然后不断上升。 β -转角从开始到结束,不断下降。无规则卷曲无明显变化趋势。

在整个超声预处理期间, β -转角不断下降,提示蛋白质结构的复杂性降低。超声预处理15 min后, β -折叠下降, α -螺旋上升,30 min时酶解多肽对 α -葡萄糖苷酶抑制率最高时, β -折叠达到最低点,是最明显的特征。由此反映出超声预处理影响到蛋白的结构,使其复杂性降低,15 min后结构变化

明显,尤以 β -转角含量变化最明显,达到最低点。这些结构的变化可能是胰蛋白酶降解麦胚蛋白获得高活性降血糖肽的原因。何秋实等^[19]超声处理红豆蛋白后,拉曼光谱分析显示超声处理促进了红豆蛋白二级结构由折叠构象转变为螺旋结构及转角结构,这与本试验预处理15 min后的结果有相似之处。

2.4 傅立叶红外变换光谱分析

傅立叶变换红外光谱是分析蛋白质结构常用方法之一,通常采用酰胺I带进行二级结构的指认为:1 600~1 640 cm^{-1} 为 β -折叠,1 640~1 650 cm^{-1} 为无规则卷曲,1 650~1 660 cm^{-1} 为 α -螺旋,1 660~1 700 cm^{-1} 为 β -转角^[20]。

超声预处理麦胚蛋白5 min,经灭酶、冻干后采集红外光谱,经剪切、基线校正,自退卷积等,分配15个峰进行拟合,结果见图8。由图8可见,拟合效果较好,自退卷积光谱和拟合后的光谱吻合性好。

根据不同预处理时间的红外光谱结合退卷积拟合,获得不同预处理时间下麦胚蛋白的二级结构,结果见图9。由图9可见, α -螺旋、无规则卷曲变化明显,而 β -折叠、 β -转角整体变化幅度较小。对于 α -螺旋含量,超声处理的初始阶段变化较小,20 min后含量下降,在35 min达最低点,然后略有上升。无规则卷曲含量起初变化也较小,20 min后开始上升,35 min达最高点。 β -折叠在整个阶段变化都较小。 β -转角含量起初缓慢下降,在30 min时达最低点,然后缓慢上升。

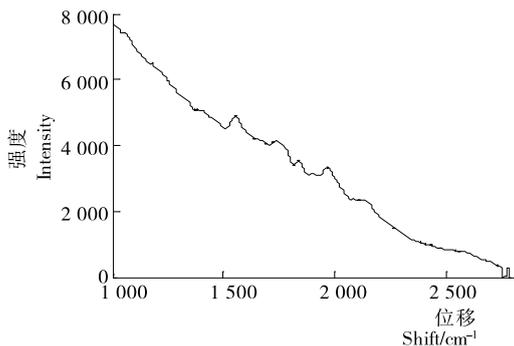


图5 超声预处理麦胚蛋白的拉曼光谱

Figure 5 Raman spectra of wheat germ protein pretreated by ultrasound

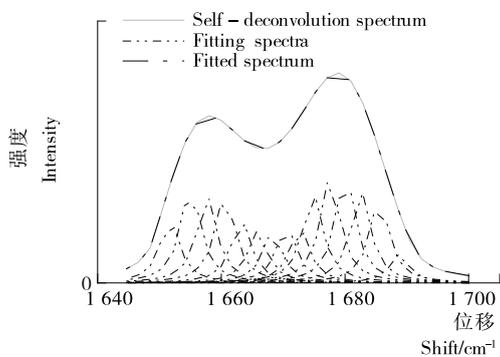


图6 拉曼光谱拟合子峰图

Figure 6 The fitted peaks of Raman spectrum

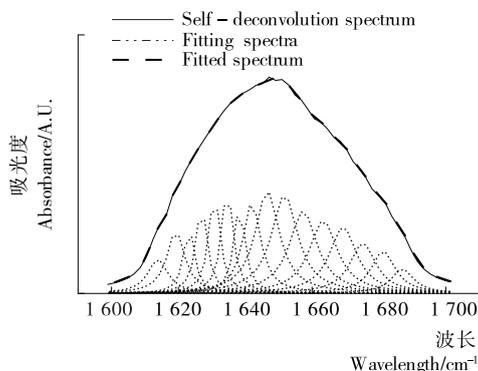


图8 红外光谱拟合子峰图

Figure 8 The fitted infrared spectrum

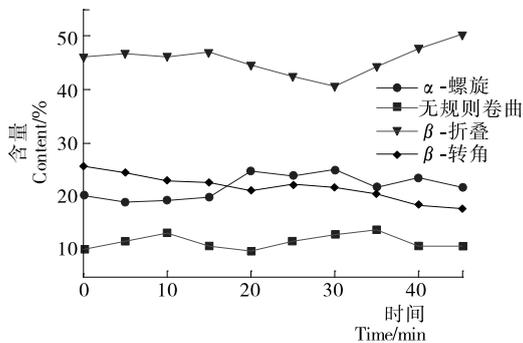


图7 拉曼光谱分析超声波预处理对蛋白质二级结构的影响

Figure 7 The effect of ultrasonic pretreatment on protein secondary structure based on Raman spectroscopy analysis

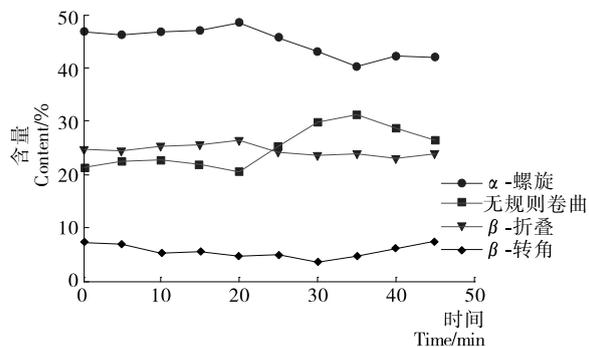


图9 红外光谱分析不同超声处理时间下麦胚蛋白的结构

Figure 9 The effect of different ultrasonic treatment times on wheat germ structure based on Infrared spectrum analysis

这些变化反映出超声预处理麦胚蛋白冻干后的结构存在差异,20 min 前差异较小,然后 α -螺旋和无规则卷曲有明显的变化,在 35 min 时变化最大,无规则卷曲含量最高,表明麦胚蛋白原有的有序结构被破坏得最严重。

刘斌等^[8]应用 FTIR 研究超声对牛血清白蛋白二级结构的影响,发现多肽链中 α -螺旋含量明显降低,而 β -转角含量增加。胡爱军等^[5]超声处理鱼肉蛋白,红外分析表明蛋白中 α -螺旋和 β -转角的含量下降, β -折叠结构含量略有上升,无规则卷曲结构含量上升了 8.2 倍。毕爽等^[21]采用中功率超声波处理大豆蛋白,红外光谱分析发现蛋白二级结构中 β -折叠含量较多,而 α -螺旋结构含量较少。从现有报道看,红外光谱分析提示不同蛋白样品的结构不同,经超声波处理后的结构变化也不同,可能与蛋白自身特性有关。

结合现有文献的报道可以看出,超声波对蛋白结构的影响不全相同,与本试验的研究结果也有所不同。此外,近红外拉曼所测样品是水溶性环境,FTIR 所测样品是冻干的无水状态。水可以与蛋白氨基酸残基形成氢键,对蛋白构相产生很大的影响^[19]。本试验中 FTIR 的结果与近红外拉曼结果相差很大,原因可能是样品所处的环境不同。蛋白酶催化酶解反应多数在水溶液中进行,底物(蛋白)的结构影响酶催化的反应速度。为获得高产、高效的催化产物,需要提供合适的蛋白结构,这就需要准确表征催化反应体系中蛋白的结构,拉曼光谱是比较有效的表征手段之一。

3 结论

本试验采用荧光光谱、拉曼光谱和红外光谱分析超声预处理对麦胚蛋白结构的影响,结果表明拉曼光谱和红外光谱能够提供更丰富的蛋白结构信息。超声预处理可以改变麦胚蛋白的二级结构,蛋白结构的改变进而影响到酶解产物的活性。麦胚蛋白在超声预处理过程中,结构处于动态变化过程,可能是不同预处理时间对酶解反应的效果影响不同的原因。

荧光光谱、拉曼光谱能够提供溶液状态下蛋白结构信息,因而对于构建高效酶反应体系及过程分析方法更有意义。目前,基于光谱分析的用于酶解反应过程监控的分析技术鲜有报道,这将是很有意义的研究方向之一。

参考文献

[1] 江玉龙,赵兵,杜新刚,等. 超声新技术在新资源食品行业中的应用[J]. 农业工程, 2012, 2(5): 37-39.

[2] 黄卓烈,陈小丽,巫光宏,等. 超声波对胰蛋白酶活力影响的机理研究[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(4): 230-238.

[3] SORIA A C, VILLAMIEL M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review [J]. Trends in Food Science & Technology, 2010, 21(7): 323-331.

[4] AGUIRRE D B, MOBBS T, CÁNOVAS G V B. Ultrasound Applications in Food Processing [M]// Springer Science + Business Media: Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing, LLC. New York: Springer, 2011: 65-66.

[5] 胡爱军,李倩,郑捷,等. 双频超声对红薯淀粉结构和性质的影

响[J]. 高校化学工程学报, 2014, 28(2): 370-375.

[6] 黄卓烈,陈小丽,巫光宏,等. 超声波对胰蛋白酶活力影响的机理研究[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(4): 230-238.

[7] HU Hao, WU Jia-hui, LI-CHAN E C, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2): 647-655.

[8] 刘斌,马海乐,李树君,等. 应用 FTIR 研究超声对牛血清白蛋白二级结构的影响[J]. 光谱学与光谱分, 2010, 30(8): 2 072-2 076.

[9] 张悦,马睿,赵冠超,等. 同步荧光法对三种芳香族氨基酸的测定[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 204-207.

[10] SRIVASTAVA A K, ICONOMIDOU V A, CHRYSIKOS G D, et al. Secondary structure of chorion protein of the Lepidoptera *Pericallia ricini* and *Ariadne merione* by ATR FT-IR and micro-Raman spectroscopy [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49(3): 317-322.

[11] 任皓威,张婉舒,李相怡,等. pH 对中国人乳 β -酪蛋白二级结构的圆二色谱和拉曼特征影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(2): 384-389.

[12] 周景祥,王桂芹,余涛. 蛋白酶和淀粉酶活性检测方法讨论[J]. 中国饲料, 2001(11): 23-24.

[13] LEE H J, LEE H S, CHOI J W, et al. Novel Tripeptides with α -Glucosidase Inhibitory Activity Isolated from Silk Cocoon Hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(21): 11 522-11 525.

[14] 贾俊强,马海乐,赵伟睿,等. 超声波处理对小麦胚芽蛋白理化和功能性质的影响[J]. 农业机械学报, 2009, 40(8): 105-110.

[15] PORTUGAL C A. M, TRUCKENMÜLLER R, STAMATIALIS D, et al. Effect of tissue scaffold topography on protein structure monitored by fluorescence spectroscopy[J]. Journal of Biotechnology, 2014(189): 166-174.

[16] 邓乾春,黄庆德,黄凤洪,等. 蛋白质溶液构象的研究方法[J]. 生物物理学报, 2009, 25(4): 237-243.

[17] BURSTEIN E A, VEDENKINA N S, IYKOA M N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in molecules[J]. Photochemistry and Photobiology, 1973, 18(4): 263.

[18] 任皓威,张婉舒,李相怡,等. pH 对中国人乳 β -酪蛋白二级结构的圆二色和拉曼特征影响[J]. 光谱学与光谱分析, 2015, 35(2): 384-389.

[19] 何秋实. 超声处理对红豆蛋白结构及功能性影响的研究[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(7): 49-53.

[20] 谢孟峡,刘媛. 红外光谱酰胺 III 带用于蛋白质二级结构的测定研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(2): 226-231.

[21] 毕爽,张巧智,丁俭,等. 红外光谱研究超声促聚集作用对大豆蛋白-磷脂结构与功能的影响[J/OL]. 食品科学(2016-06-07) [2016-11-12]. <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20160607.1428.066>.