

木糖醇和甘露醇对花生蛋白结构和功能特性的影响

Effects of xylitol and mannitol on the structural and functional properties of peanut proteins

周向军 杨雪纯 刘海玉 高义霞

ZHOU Xiang-jun YANG Xue-chun LIU Hai-yu GAO Yi-xia

(天水师范学院生物工程与技术学院, 甘肃 天水 741001)

(College of Bioengineering and Technology, Tianshui Normal University, Tianshui, Gansu 741001, China)

摘要:利用 8-苯胺基-1-萘磺酸钠荧光探针法、紫外光谱法和荧光光谱法,研究木糖醇和甘露醇对花生蛋白溶解性、乳化性、紫外吸收光谱、荧光发射光谱及表面疏水性的影响。结果表明:随木糖醇和甘露醇质量分数的增加,在 pH 3.0~6.0 时,花生蛋白溶解性均呈增加趋势,且均在 pH 4.0 处最低,乳化性呈先增加后降低趋势;随木糖醇和甘露醇质量分数的增加,酪氨酸被包裹进花生蛋白分子内部,而色氨酸暴露于分子表面,花生蛋白荧光强度均降低;在木糖醇作用下,花生蛋白表面疏水性逐渐增加,但在甘露醇作用下,其表面疏水性先增加后降低。

关键词:花生蛋白;木糖醇;甘露醇;特性

Abstract: The changes of solubility, emulsibility, ultraviolet absorption spectroscopy, fluorescence emission spectroscopy and surface hydrophobicity of peanut proteins (PP) were investigated using the methods of 1-naphthalenesulfonic acid-8-(phenylamino)-sodium salt (ANS), ultraviolet and fluorescence spectroscopy. The results showed that, with the increasing of xylitol and mannitol, the solubility of PP increased within pH 3.0~6.0, reached minimum value almost at pH 4.0, while the emulsibility increased first and declined finally. We supposed that the tyrosine was wrapped into the inner core of PP, while the tryptophan exposed to the surface of PP, resulting in the fluorescence intensity of them reduced with the increasing of xylitol and mannitol. The surface hydrophobicity was found increasing gradually when treated with xylitol, while that of mannitol increased first and then declined finally.

Keywords: peanut protein; xylitol; mannitol; properties

花生蛋白含量约为 26%~30%^[1],约占植物蛋白总量的 11%^[2]。花生蛋白含有大量的必需氨基酸,是一种优质植物

蛋白资源和食品基料,包括花生球蛋白、伴花生球蛋白 I 和 II 及少量清蛋白,主要用于花生蛋白粉、饮料、花生多肽、膨化食品和发酵食品等领域^[3],但其功能特性并不突出,不能满足工业化生产需要,因此,需要通过一定手段进行改性。在食品行业中,花生蛋白能否提供人们期望的功能特性,主要取决于其分子柔性、氨基酸组成、所处溶剂体系、表面亲/疏水性、电荷分布、加工工艺和改性手段等,而蛋白质功能特性的改进主要有超声波、高压均质、热处理、挤压处理和小分子食品添加剂等物理改性,酸碱处理、酰化、磷酸化和接枝等化学改性,以及以谷氨酰胺转氨酶为代表的酶法改性。其中,物理改性虽然改性范围窄、效果不明显,但无毒且营养价值损失小;化学改性虽然效果明显,但易产生副产物和残留毒性试剂;酶法改性存在成本高和难以产业化等问题^[4-5]。

在食品加工过程中,常需要添加一些木糖醇或甘露醇类多元醇化合物以改善食品蛋白质的各种功能特性。大量研究表明,这些糖醇类化合物安全无毒,可较高剂量添加于食品体系,从而不同程度降低食品水分活度,改善蛋白质的溶解性、甜度、质构、起泡性、乳化性、吸水性、黏度、热稳定性和胶凝性等^[6-8]。糖醇的种类、大小、形状及其与蛋白质间作用力不同,则蛋白质功能特性的改善程度不同。潘明喆等^[9]研究显示,木糖醇可增加大豆分离蛋白溶解性,但表面疏水性和荧光强度均相应降低,表明糖醇类助溶剂有望增强蛋白质的各种功能特性。然而,有关木糖醇或甘露醇对花生蛋白结构和功能特性的影响,目前还未见报道。因此,本试验拟以花生蛋白为研究对象,采用 8-苯胺基-1-萘磺酸钠荧光探针法、紫外吸收光谱及荧光光谱法,研究木糖醇和甘露醇对花生蛋白溶解性、乳化性、紫外及荧光光谱和表面疏水性的影响,进一步拓展花生蛋白在食品行业中的应用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料与amp;试剂

花生蛋白:陕西森弗天然制品有限公司;

基金项目:天水师范学院“青蓝”工程人才基金(编号:TS201406)

作者简介:周向军(1980-),男,天水师范学院副教授,硕士。

E-mail: zhouxiangjun125@126.com

收稿日期:2018-03-09

8-苯胺基-1-萘磺酸钠:东京化成工业株式会社;

甘露醇、木糖醇、牛血清白蛋白:生工生物工程(上海)股份有限公司;

考马斯亮蓝 G-250:分析纯,生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.2 仪器设备

荧光分光光度计:RF-5301PC型,岛津(香港)有限公司;

紫外可见分光光度计:UV-1800型,岛津(香港)有限公司;

pH计:PHS-3D型,上海精密科学仪器有限公司;

冷冻离心机:TGL-20M型,湖南湘仪离心机有限公司;

电子天平:AL-204型,梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;

磁力搅拌器:90-3型,上海亚荣生化仪器厂;

定氮仪:KDF-103F型,上海纤检仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 溶解性测定 采用 Wang 等^[10]方法。标准曲线方程为 $Y = 12.135X + 0.0277$, $R^2 = 0.992$, X 为蛋白质质量, mg, Y 为 OD_{595} 。取 0.05 g/mL 花生蛋白 1 mL 共 60 份, 分别加入质量分数为 40% 的木糖醇和甘露醇, 分别用 pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 磷酸缓冲液补至 10 mL, 使其质量分数分别为 0.0%, 2.5%, 5.0%, 10.0%, 20.0%。磁力搅拌 2 h, 5 000 r/min 离心 15 min, 取 1 mL 上清液定容至 25 mL。取 0.5 mL 同标准曲线方法测定光吸收值。以每克花生蛋白上清液中蛋白质毫克数表示溶解性, mg/g; 总蛋白含量采用 Kjeldahl 法测定。

1.2.2 乳化性及乳化稳定性测定 参照 Li 等^[11]方法。用 0.01 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液配置 1% 花生蛋白 100 mL, 搅拌 2 h, 分别加入 40% 木糖醇和甘露醇 0.000, 0.625, 1.250, 3.750, 5.000 mL, 使其质量分数分别为 0.0%, 2.5%, 5.0%, 10.0%, 20.0%。搅拌 2 h, 取 8.0 mL 加入 2 mL 菜籽油, 均质 2 min 后吸取 50 μ L, 加入 3 mL 0.1% SDS, 于 500 nm 处测定 A_0 及 A_{10} , 按式(1)、(2)分别计算乳化性和乳化稳定性。

$$EAI = \frac{2 \times (2.303 \times A_0) \times N \times 10^{-4}}{\Phi LC}, \quad (1)$$

$$ESI = \frac{A_{10}}{A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

EAI ——乳化性, cm^2/g ;

ESI ——乳化稳定性, %;

N ——稀释倍数;

C ——蛋白浓度, g/mL;

Φ ——油相体积比;

A_0 ——0 min 吸光值;

A_{10} ——10 min 吸光值;

L ——光程, 1 cm。

1.2.3 紫外和荧光光谱测定 用 0.01 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲液配置 1% 花生蛋白, 搅拌 2 h, 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 1 mL 分别加入 40% 木糖醇和甘露醇 0.000, 0.625,

1.250, 3.750, 5.000 mL, 使其质量分数分别为 0.0%, 2.5%, 5.0%, 10.0%, 20.0%, pH 7.0 磷酸缓冲液补至 10 mL。磁力搅拌 2 h, 8 000 r/min 离心 15 min。取上清液于 270~310 nm 内进行紫外光谱扫描, 在激发波长 280 nm、发射波长 340~360 nm 内进行荧光光谱扫描。

1.2.4 表面疏水性测定 参照文献[12]。用 0.01 mol/L pH 7.0 的磷酸缓冲液配置 2% 花生蛋白 100 mL, 搅拌 2 h, 5 000 r/min 离心 15 min。取 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 mL 上清液, 分别加入 40% 木糖醇和甘露醇 0.000, 0.625, 1.250, 3.750, 5.000 mL, 使其质量分数分别为 0.0%, 2.5%, 5.0%, 10.0%, 20.0%, pH 7.0 磷酸缓冲液补至 10 mL, 加 ANS 50 μ L 后测定荧光强度。木糖醇和甘露醇处理组激发和发射波长分别为 390, 492 nm 和 390, 503 nm, 激发和发射狭缝宽 5 nm。以表面疏水性指数对木糖醇或甘露醇质量分数作图。

2 结果与讨论

2.1 溶解性

木糖醇和甘露醇对花生蛋白溶解性的影响分别见图 1、2。随木糖醇和甘露醇质量分数增加, 在 pH 3.0~6.0 时, 花生蛋白溶解性基本呈逐渐增加趋势, 几乎均在 pH 4.0 处溶解性最低。分析原因: ① 木糖醇和甘露醇分子表面大量羟基与花生蛋白分子形成氢键的同时, 也与溶液中大量水分子形成氢键, 最终形成花生蛋白-糖醇-水分子三元复合物, 即由于糖醇亲水性强于花生蛋白而间接增加了花生蛋白溶解性^[13]; ② 花生蛋白等电点约为 pH 4.41^[14], 等电点附近花生蛋白分子净电荷为零, 分子间不存在静电斥力而相互作用力增加, 从而使得花生蛋白与水分子间作用力降至最低, 故各组几乎均在 pH 4.0 处溶解性最低。pH 2.0 和 pH 7.0 处理组由于远离等电点, 故溶解性高于其它处理组。pH 2.0 处理组溶解性高于 pH 7.0 处理组, 原因是当木糖醇和甘露醇处于 pH 7.0 时, 花生蛋白解离程度较低, 主要以中性分子形式存在, 当处于 pH 2.0 时, 花生蛋白质子化程度均急剧增加, 相当于强化了花生蛋白-糖醇复合物与水分子的离子-偶极作用, 因此溶解性增加。

但随木糖醇和甘露醇质量分数增加, pH 2.0 和 pH 7.0 处理组溶解性均出现一定波动。对 pH 2.0 处理组, 当木糖醇质量分数在 0.0%~10.0% 时, 溶解性逐渐下降, 在 10.0%~20.0% 时不断增加, 可能是低浓度木糖醇主要表现为夺取花生蛋白表面水分子, 而高浓度木糖醇则表现为逐渐降低花生蛋白分子间作用力, 相当于增强了花生蛋白与水分子间作用力, 故溶解性增强。当甘露醇质量分数在 0.0%~2.5% 时, 溶解性增加, 在 2.5%~20.0% 时基本逐渐降低, 原因是 pH 2.0 时, 2 种糖醇均被质子化而带正电荷, 但由于甘露醇羟基数比木糖醇多, 故甘露醇虽然也可降低花生蛋白分子间作用力, 但同时与花生蛋白的离子-偶极作用更加占优势, 最终表现为花生蛋白表面水分子被夺取, 因而溶解性几乎逐渐下降; 对 pH 7.0 处理组, 当木糖醇和甘露醇质量分数在 0.0%~20.0% 时, 花生蛋白溶解性先增加后降低再逐渐

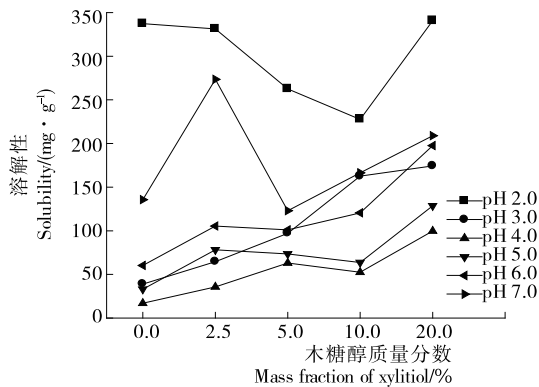


图 1 木糖醇对 PP 溶解性的影响

Figure 1 Effects of xylitol on solubility of PP

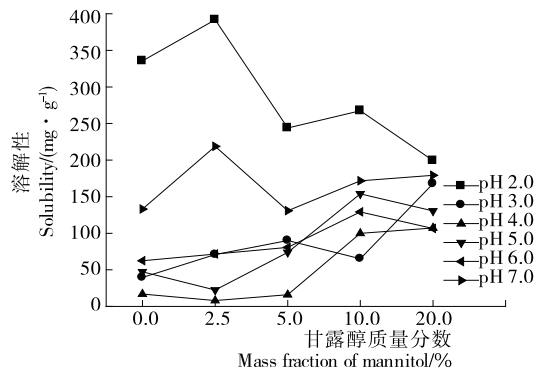


图 2 甘露醇对 PP 溶解性的影响

Figure 2 Effects of mannitol on solubility of PP

增加,原因是质量分数在 0.0%~2.5%时,上述 2 种糖醇均分别与花生蛋白暂时形成二元复合物,并借助于其羟基的高水溶性相应增加了花生蛋白的溶解性;在质量分数为 2.5%~5.0%时,糖醇与糖醇分子间作用力不断增强而占优势,最终夺取花生蛋白表面部分水分子而破坏上述二元复合物,因而花生蛋白分子溶解性降低;在质量分数 5.0%~20.0%时,高浓度糖醇分子通过其多羟基结构诱导水分子发生某种重排,该水分子的重排结构使花生蛋白亲水性逐渐恢复,因而溶解性增加^[15]。

2.2 乳化性及乳化稳定性

木糖醇和甘露醇对花生蛋白乳化性影响见图 3,对花生蛋白乳化稳定性影响见图 4。由图 3 可知,当木糖醇质量分数在 0.0%~2.5%时,花生蛋白乳化性略有降低,继续增加质量分数至 10.0%时,花生蛋白乳化性呈增加趋势($P < 0.05$),随后逐渐降低,可能是在 pH 7.0 时,木糖醇作为弱酸性多元醇,主要通过氢键与花生蛋白相互作用而使花生蛋白表面活性降低,不利于花生蛋白迁移至水-油界面。当甘露醇质量分数在 0.0%~10.0%时,花生蛋白乳化性逐渐增加,随后乳化性逐渐降低。原因是随糖醇质量分数的增加,花生蛋白疏水基团不断外露,因而乳化性逐渐增强,但当进一步增加糖醇质量分数时,花生蛋白已暴露疏水基团的相互聚集作用逐渐增强,影响了花生蛋白在油-水界面的结合与吸附,因而乳化性逐渐降低^[16]。

由图 4 可知,当木糖醇质量分数在 0.0%~5.0%时,花生

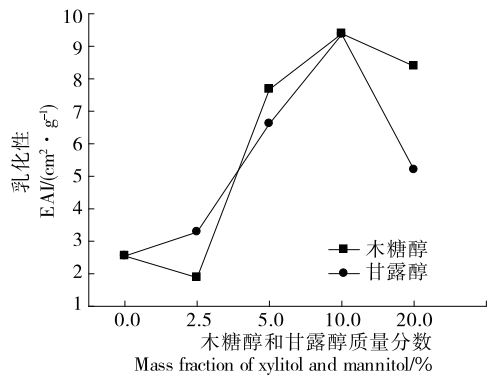


图 3 木糖醇和甘露醇对 PP 乳化性的影响

Figure 3 Effects of xylitol and mannitol on emulsibility of PP

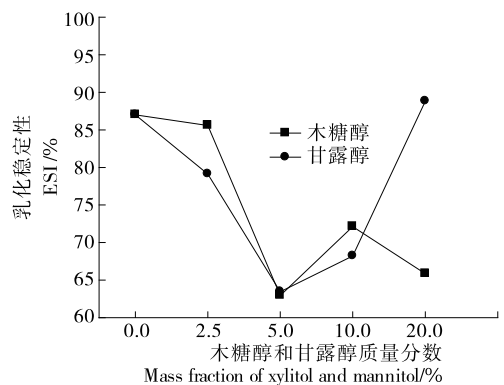


图 4 木糖醇和甘露醇对 PP 乳化稳定性的影响

Figure 4 Effects of xylitol and mannitol on emulsion stability of PP

蛋白乳化稳定性呈逐渐降低趋势,继续增加质量分数至 20.0% 时则出现一定波动,原因是此时花生蛋白疏水基团被部分包裹在分子内部,分子柔性降低,不利于其扩散至油-水界面,乳化稳定降低^[17]。当甘露醇质量分数在 0.0%~5.0%时,花生蛋白乳化稳定性逐渐降低,随后乳化稳定性增加。原因是低浓度木糖醇和甘露醇处理,有助于降低花生蛋白乳化液表观黏度,使乳化液微粒间碰撞频率增加^[18],乳化稳定性降低,但高浓度木糖醇和甘露醇反而增加了乳化液黏度,因而乳化稳定性增加。

2.3 紫外二阶导数光谱

木糖醇和甘露醇对花生蛋白紫外光谱的影响见图 5、6。由于 Phe、Tyr 和 Trp 在 280 nm 处均有紫外吸收(主要是 Tyr 和 Trp 残基吸收),导致峰信号重叠而难以辨认,故可利用紫外二阶导数光谱描述 Trp 和 Tyr 微环境变化^[19]。在 280~300 nm 时,木糖醇处理组出现 2 个正吸收峰(287, 294 nm)和 2 个负吸收峰(283, 290 nm),甘露醇处理组出现 2 个正吸收峰(288, 294 nm)和 2 个负吸收峰(284, 290 nm),这些位置变化主要取决于氨基酸残基所处溶剂亲/疏水性的影响。294 nm 处吸收峰被认为是 Trp 单独贡献的结果^[20],木糖醇和甘露醇处理组均在该波长处未发生明显红移或蓝移,结合荧光光谱结果,可认为经过木糖醇和甘露醇分别处理 2 h 后,Trp 残基已充分暴露在花生蛋白分子表面,处于极

性溶剂环境中。

由于260~290 nm吸收峰归属于 Trp 和 Tyr 残基^[21],且木糖醇和甘露醇处理后,各二阶导数光谱峰的位置几乎未发生变化,因此需采用导数光谱法生成 a/b 来分析 Tyr 残基微环境^[22]。由图 5、6 可知,当木糖醇和甘露醇在 2.5%~10.0% 时,各处理组峰-谷间纵向距离 a 和 b 值之比(a/b)均低于未处理组,说明在木糖醇和甘露醇作用下,原来部分暴露的 Tyr 残基重新被翻转到分子内部疏水腔中^[23]。当木糖醇和甘露醇在 10.0%~20.0% 时, a/b 均急剧增加,但木糖醇高于未处理组,可能是高浓度木糖醇通过大量羟基与 Tyr 形成氢键而使 Tyr 暴露于分子表面,而甘露醇羟基数目低于木糖醇。紫外二阶导数光谱与荧光光谱结果基本一致。

2.4 荧光光谱

木糖醇和甘露醇对花生蛋白荧光光谱的影响见图 7、8。内源性荧光可用于分析花生蛋白分子中 Tyr 和 Trp 残基微环境的变化情况^[24]。在激发波长 270~290 nm 时,可认为荧光来自 Tyr 和 Trp 残基,当激发波长大于 290 nm 时,可认

为荧光来自 Trp 残基^[25]。Trp 残基的荧光光谱对微环境的变化很敏感,通常认为,其荧光峰在非极性环境中约为 310~324 nm,包埋于蛋白质分子内部约为 326~332 nm,暴露于分子表面约为 350~353 nm^[26]。本试验发现,木糖醇和甘露醇处理组几乎均在 304 nm 未见荧光峰,而在 352 nm 出现较强荧光峰,原因是花生蛋白发生分子内 Tyr 到 Trp 能量转移,导致 Tyr 荧光猝灭和 Trp 荧光强度增强^[27-28]。当木糖醇或甘露醇处理 2 h 后,花生蛋白分子空间结构均充分伸展,Trp 残基大部分暴露在溶剂中,增加了与溶剂分子碰撞的几率,因而荧光强度降低。

随木糖醇和甘露醇质量分数的增加,二者的荧光峰形和 352 nm 处峰位均未发生明显变化,仅是荧光强度降低,且木糖醇对花生蛋白荧光的猝灭程度较大,表明木糖醇与花生蛋白间相互作用较强,疏水键和氢键等被破坏,分子充分伸展而松散,降低了 Tyr 到 Trp 间的能量传递,导致花生蛋白荧光强度逐渐降低。低浓度甘露醇与花生蛋白分子结合作用较弱,几乎不影响荧光强度,仅高浓度时可使 Trp 残基荧光强度降低,可能是甘露醇溶解性明显低于木糖醇,而花生蛋白分子猝灭程度与猝灭剂浓度在一定范围内呈线性关系,故甘露醇处理的花生蛋白荧光强度降低程度低于木糖醇处理的。

另外,在木糖醇和甘露醇处理过程中,花生蛋白分子基本结构未发生变化,发生了 Trp 残基到木糖醇或甘露醇的非辐射能量转移,从而导致花生蛋白荧光猝灭^[29-30]。杨国平

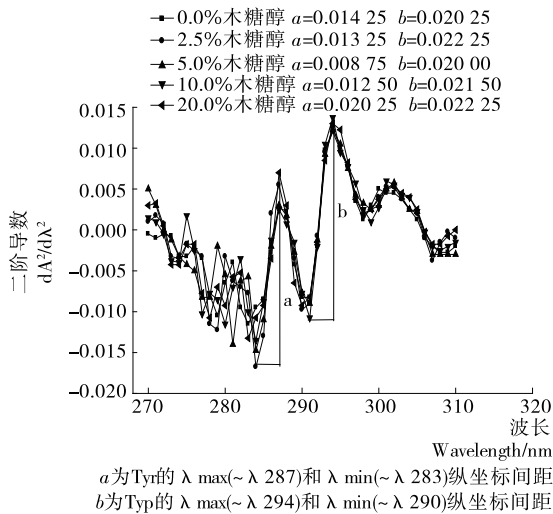


图 5 木糖醇对 PP 紫外光谱的影响

Figure 5 Effects of Xylitol on ultraviolet spectrum of PP

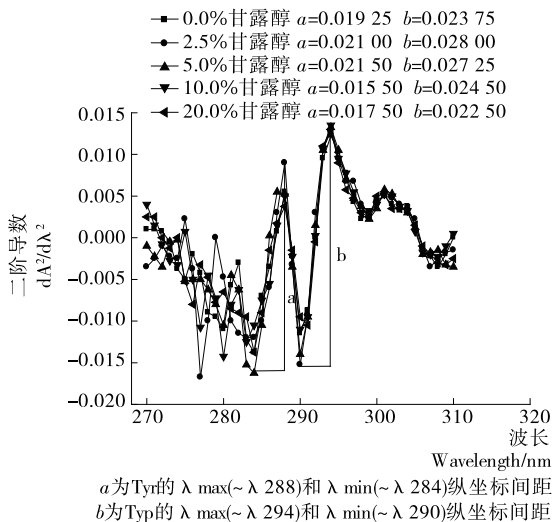


图 6 甘露糖醇对 PP 紫外光谱的影响

Figure 6 Effects of mannitol on ultraviolet spectrum of PP

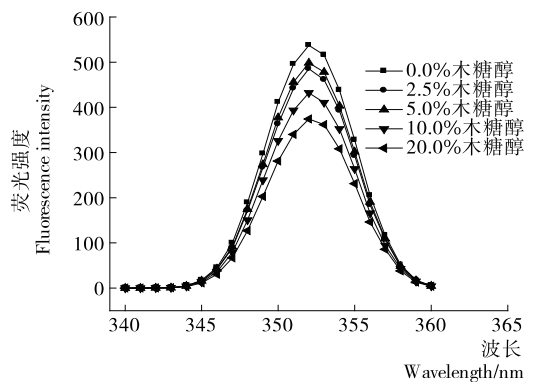


图 7 木糖醇对 PP 荧光光谱的影响

Figure 7 Effects of Xylitol on fluorescence spectrum of PP

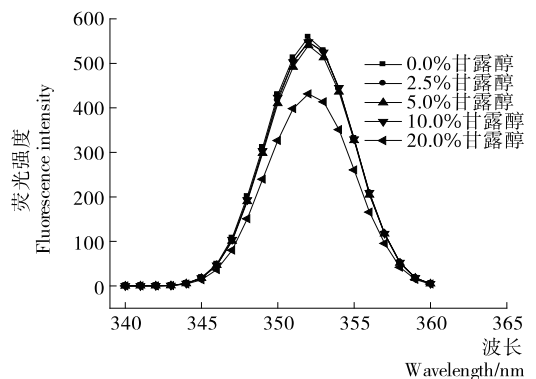


图 8 甘露糖醇对 PP 荧光光谱的影响

Figure 8 Effects of mannitol on fluorescence spectrum of PP

等^[31]研究发现,木糖醇的紫外一可见吸收光谱与花生蛋白的荧光光谱有一定程度重叠,木糖醇与蛋白质残基距离为 2.39 nm,小于 7 nm,符合能量转移理论,可认为木糖醇与花生蛋白间的结合作用力主要是静电引力,一方面阻止 Tyr 残基与 Trp 残基间的能量转移,另一方面通过静态猝灭和非辐射能量转移机制而使花生蛋白荧光猝灭,与本试验结论相符。

2.5 表面疏水性

木糖醇和甘露醇对花生蛋白表面疏水性的影响见图 9。当激发波长为 390 nm 时,单纯 ANS 荧光峰在 509 nm 附近^[32],且荧光强度较小。当加入花生蛋白、木糖醇/甘露醇作用 2 h 后,随木糖醇/甘露醇浓度增加,花生蛋白-ANS-木糖醇和花生蛋白-ANS-甘露醇复合物的荧光强度均显著增强,且最大荧光发射峰(λ_{\max})发生明显蓝移,说明 ANS 作为阴离子非极性荧光探针,通过疏水作用与花生蛋白非极性区域结合后,可使花生蛋白疏水性明显增强,溶液微环境发生改变^[33]。

当木糖醇和甘露醇质量分数在 0.0%~10.0% 时,花生蛋白表面疏水性指数均显著增加($P < 0.05$),可能是 2 种糖醇分别与花生蛋白分子相互作用,均可使疏水基团外露,花生蛋白分子间暂未发生聚集^[34]。但当木糖醇和甘露醇的质量分数继续增至 20.0% 时,前者表面疏水性指数明显缓慢增加,后者反而开始下降,可能是:① 由于甘露醇羟基数目多于木糖醇,甘露醇通过氢键作用占据花生蛋白分子表面,形成花生蛋白-甘露醇-花生蛋白复合物的能力较强,因而相当于减少了 ANS 结合位点;② 花生蛋白分子受甘露醇影响较为明显,其表面结构发生重排而导致疏水残基相互聚集,与 ANS 结合位点减少,因而表面疏水性降低^[35-37]。

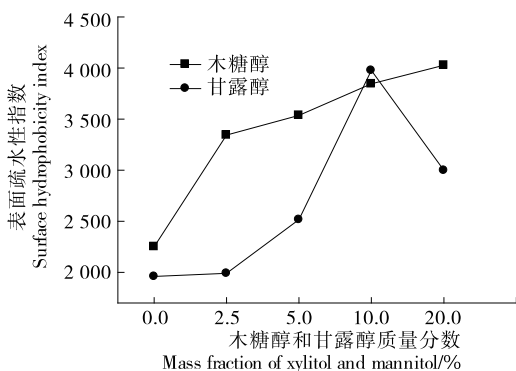


图 9 木糖醇和甘露醇对 PP 表面疏水性的影响

Figure 9 Effects of xylitol and mannitol on surface hydrophobicity of PP

3 结论

研究表明,随甘露醇质量分数的增加,花生蛋白溶解性基本均在 pH 4.0 处最低,花生蛋白表面疏水性和乳化性均先增加后降低,荧光强度均不同程度降低,花生蛋白的酪氨酸被包裹进分子内部,而色氨酸暴露于分子表面,同时由于发生分子内 Tyr 到 Trp 能量转移,花生蛋白荧光强度降低。

一般而言,蛋白质分子的表面疏水性越高,溶解性越低。然而,本试验采用不同质量分数的木糖醇和甘露醇处理后,花生蛋白表面疏水性与溶解性并无对应关系,说明表面疏水性并非导致溶解性变化的唯一因素。不同质量分数木糖醇和甘露醇作用 2 h 后,Trp 残基“暴露”在分子表面极性微环境,表明花生蛋白三级结构发生一定程度变化,且这种 Trp 残基“暴露”与图 9 中花生蛋白表面疏水性均高于未添加糖醇组的结果相一致,但不能由此将花生蛋白表面疏水性简单归因于表面疏/亲水性残基比。目前主流观点认为,蛋白质分子的表面疏水性还应充分考虑其空间构象差异,且 Trp 等疏水性残基的微环境变化并不代表非变性条件下表面疏水性变化^[38]。Pan 等^[39]研究表明,大豆分离蛋白与甘露醇、山梨醇和木糖醇作用后,表面疏水性和荧光强度降低,酪氨酸和色氨酸残基被包裹进分子内部,与本试验不完全一致,可能是使用的蛋白质材料不同。另外,木糖醇作用后,花生蛋白的表面疏水性和乳化性出现一定波动,表明花生蛋白乳化性与表面疏水性并非完全正相关,原因是蛋白质的乳化性不仅与其表面疏水性有关,也与柔性等有关,与 Damodaran 等^[40]的一致。

不同质量分数木糖醇和甘露醇作用后,花生蛋白起泡性、胶凝性、表面微观结构、巯基和二硫键以及二级结构含量等的变化有待进一步研究。其中,二级结构如 α 螺旋和 β 折叠含量等变化可通过圆二色谱、拉曼光谱或红外光谱等进行分析;乳化性可通过其它辅助手段减少二硫键含量以提高花生蛋白分子柔性;胶凝性通过质构仪进行分析;表面微观结构可通过扫描电镜测定。

参考文献

- [1] 叶林. 花生蛋白质氧化作用及其对花生乳饮料稳定性影响研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2014: 1.
- [2] RAMACHANDRAN S, SINGH S K, LARROCHE C, et al. Oil cakes and their biotechnological applications-a review[J]. *Biore-source Technology*, 2007, 98(10): 2 000-2 009.
- [3] 刘阳, 邢福国. 花生蛋白的开发和利用现状[J]. *食品科技*, 2008, 33(12): 173-176.
- [4] 王漳, 许时婴, 江波, 等. 食品化学[M]. 3 版. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 302-327.
- [5] 汪东风. 高级食品化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 62-67.
- [6] CHANASATTRU W, DECKER E A, MCCLEMENTS D J. Modulation of thermal stability and heat-induced gelation of β -lactoglobulin by high glycerol and sorbitol levels[J]. *Food Chemistry*, 2007, 103(2): 512-520.
- [7] CHANASATTRU W, DECKER E A, MCCLEMENTS D J. Impact of cosolvents (polyols) on globular protein functionality: ultrasonic velocity, density, surface tension and solubility study[J]. *Food Hydrocolloids*, 2008, 22(8): 1 475-1 484.
- [8] USHA R, RAMAN SS, SUBRAMANIAN V, et al. Role of polyols (erythritol, xylitol and sorbitol) on the structural stabilization of collagen[J]. *Chemical Physics*, 2006, 430(4/5/6): 391-396.

- [9] 潘明喆, 李斌, 孟宪军. 木糖醇对大豆分离蛋白结构和起泡特性的影响[J]. 食品科学, 2016, 37(15): 63-68.
- [10] WANG Yan-ping, LI Shuang-xi, ZAHEER A, et al. Extraction of broad bean protein and effects of NaCl concentration and pH value on its solubility and emulsibility[J]. Transactions of the CSAE, 2010, 26(1): 380-384.
- [11] LI Xing-ke, XIA Wen-shui. Effects of concentration, degree of deacetylation and molecular weight on emulsifying properties of chitosan[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 48(5): 768-772.
- [12] 胡雪娇, 陈永浩, 张春红, 等. 改性方法对核桃浓缩蛋白凝胶性的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(10): 17-21.
- [13] SEMENOVA M G, ANTIPOVA A S, BELYAKOVA L E. Food protein interactions in sugarsolutions[J]. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2002, 7(5/6): 438-444.
- [14] 齐向春, 刘志同. 花生蛋白制备工艺研究[J]. 中国油脂, 2008, 33(4): 22-24.
- [15] ANTIPOVA A S, SEMENOVA M G. Influence of sucrose on the thermodynamic properties of the 11S globulin of Vidafabax-dextran-aqueous solvent system[J]. Food Hydrocolloids, 1997, 11(4): 415-421.
- [16] 顾楠, 张子沛, 吴锦波, 等. 不同处理方式对鹰嘴豆分离蛋白乳化性质的影响[J]. 食品工业科技, 2011, 32(12): 158-161.
- [17] 张燕鹏, 张曼君, 齐玉堂, 等. 微波-超声波协同影响菜籽蛋白糖基化改性[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 114-119.
- [18] 潘明喆. 环境因素和糖醇化合物对大豆蛋白结构和功能特性的影响[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016: 62.
- [19] RAGONE R, COLONNA G, BALESTRIERI C, et al. Determination of tyrosine exposure in proteins by second derivativespectroscopy[J]. Biochemistry, 1984, 23(8): 1 871-1 875.
- [20] JIANG Jiang, CHEN Jie, XIONG You-ling L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(16): 7 576-7 583.
- [21] 彭钢, 刘白玲, 赵春霞, 等. 导数紫外光谱法研究 pH 诱导牛血清蛋白构象变化[J]. 中国科学院研究生院学报, 2011, 28(1): 12-18.
- [22] RAGONE R, COLONNA G, BALESTRIERI C, et al. Determination of tyrosine exposure in proteins by second-derivativespectroscopy[J]. Biochemistry, 1984, 23(8): 1 871-1 875.
- [23] LANGE R, BALNY C. UV-visible derivative spectroscopy under highpressure[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1 595(1/2): 80-93.
- [24] 吴伟, 吴晓娟, 蔡勇建, 等. 米糠贮藏期间米糠球蛋白的结构变化[J]. 食品科学, 2017, 38(1): 252-257.
- [25] 罗海梅, 肖杰, 邹玉兰, 等. 椰子花粉过敏原 profilin 蛋白体外重折叠过程的光谱学研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2010, 30(9): 2 428-2 432.
- [26] 吴守锋. 重金属离子与菠菜 23 kD 和 17 kD 蛋白相互作用的光谱学研究[D]. 成都: 四川大学, 2006: 16.
- [27] 尹燕霞, 向本琼, 佟丽. 荧光光谱法在蛋白质研究中的应用[J]. 实验技术与原理, 2010, 27(2): 33-36.
- [28] 闫爽, 王黎颖, 王聪, 等. 色氨酸荧光猝灭法测定海带中碘离子[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(3): 139-142.
- [29] 聂丽华, 赵慧春, 王学斌, 等. 荧光法研究氟罗沙星与牛血清白蛋白的相互作用[J]. 北京师范大学学报: 自然科学版, 2001, 37(1): 87-91.
- [30] 吴根华, 汪婕, 陈金龙, 等. 荧光光谱法研究锌(II)存在下诺氟沙星与牛血清白蛋白的结合作用[J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(4): 913-916.
- [31] 杨国平, 杨峰. 光谱法研究木糖醇与人血清白蛋白的相互作用[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2014, 32(1): 95-99.
- [32] 刘微, 李萌, 任皓威, 等. 荧光、紫外和红外光谱分析人乳和牛乳 β -酪蛋白的功能和构象差异[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(12): 3 281-3 287.
- [33] OMANA D A, XU Yan, MOAYEDI V, et al. Alkali-aided protein extraction from chicken dark meat: Chemical and functional properties of recovered proteins[J]. Process Biochemistry, 2010, 45(3): 375-381.
- [34] 吕艳芳, 张艳平, 蔡路响, 等. 曲酸对南美白对虾酚氧化酶活性和结构的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 22-28.
- [35] GUZEY D, MCCLEMENTS D J, WEISS J. Adsorption kinetics of BSA at air-sugar solution interfaces as affected by sugar type and concentration[J]. Food Research International, 2003, 36(7): 649-660.
- [36] RAIBEKAS A A, MASSEY V. Glycerol-assisted restorative adjustment of flavoenzyme conformation perturbed by site-directed mutagenesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(35): 22 248-22 252.
- [37] ALIZADEH-PASDAR N, LI-CHAN E C Y. Comparison of protein surface hydrophobicity measured at various pH values using three different fluorescent probes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(2): 328-334.
- [38] 王中江, 江连洲, 魏冬旭, 等. pH 值对大豆分离蛋白构象及表面疏水性的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(11): 47-51.
- [39] PAN Ming-zhe, MENG Xian-jun, JIANG Lian-zhou, et al. Effect of Cosolvents (polyols) on structural and foaming properties of soy protein isolate[J]. Czech Journal of Food Sciences, 2017, 35(1): 57-66.
- [40] DAMODARAN S, PARKIN K L, FENNEMA O R. Fennema's food chemistry [M]. 4th ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2007: 276.