

赤小豆凝集素的分离纯化及电泳分析

Isolation, purification and electrophoretic analysis of rice bean lectin

肖俊琪¹翟爱华^{1,2,3}张东杰^{1,2,3}XIAO Jun-qi¹ ZHAI Ai-hua^{1,2,3} ZHANG Dong-jie^{1,2,3}

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江 大庆 163319;

2. 黑龙江省农产品加工与质量安全重点实验室, 黑龙江 大庆 163319;

3. 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江 大庆 163319)

(1. College of Food Science Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Helongjiang 163319, China;

2. Key Laboratory of Agro-Products Processing and Quality Safety of Heilongjiang Province, Daqing, Helongjiang

163319, China; 3. National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing, Helongjiang 163319, China)

摘要:以赤小豆凝集素为研究对象,采用响应面实验对其提取工艺进行优化。采用硫酸铵分级沉淀法、Q Sepharose XL 阴离子交换色谱、Phenyl FF HP 疏水层析色谱和 Sephadex G-50 凝胶过滤色谱进一步纯化,通过 SDS-PAGE 电泳对其蛋白质进行分析。结果表明,赤小豆凝集素的最优提取条件为:以 PBS 为浸提液,料液比 1:23 (g/mL),pH 7.8,持续时间 14 h,此条件下凝集活性为 (37.18±0.18) HU;纯化后的凝集素凝集活性达 127 HU,经鉴定目标凝集素具有两条亚基,分子量分别在 55 kDa 和 27 kDa 附近。

关键词:赤小豆;凝集素;分离;纯化;电泳分析

Abstract: The *Vigna umbellata* lectin as the research object, based on the results of single factor experiments, the extraction process is optimized by response surface experiments. Further purification was made by using ammonium sulfate fractionation precipitation method, Q Sepharose XL anion exchange chromatography, phenyl FF HP hydrophobic chromatography and Sephadex G-50 gel filtration chromatography, and the protein was analyzed by SDS-PAGE electrophoresis. The results showed that the optimum extraction parameters were as follows: PBS is used as the extracting solution, the ratio of material to liquid was 1:23 (g/mL), pH value was 7.8, and the duration was 14 h and the agglutination activity of lectin was (37.18±0.18) HU. The agglutination activity of the purified lectin reached 127 HU. Identifi-

cation of purified lectin has two subunits and the molecular weights were around 55 kDa and 27 kDa.

Keywords: *Vigna umbellata*; lectin; isolation; purification; electrophoresis analysis

赤小豆 [*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi and Ohashi] 是亚洲豇豆属中的罕见亚种,由于具有丰富的营养价值和独特的药用价值在中国被广泛食用^[1]。其蛋白质含量为 22%,脂肪含量为 0.3%,碳水化合物含量为 65%^[2],还含有一定的儿茶素、表儿茶素、槲皮素-3'-O- α -L-鼠李糖苷和(±)二氢槲皮素等活性物质^[3]。赤小豆可用于治疗慢性复发皮炎、小儿急性肾小球肾炎和一些慢性皮肤病^[4],并具有重要的营养调节功能^[5]和药用价值^[6-7]。

目前,已发现的凝集素有 57 000 余种,其中豆科凝集素有 1 600 多种,且有近 400 种凝集素具有 3D 构象^[8]。凝集素是一类能结合糖结构域的非免疫性糖蛋白或碳水化合物结合蛋白^[9],可用于凝集素—捕获酶联免疫吸附试验 (Lectin-Capture ELISA) 中快速捕获和定量样品中的 HCV E1E2 抗体^[10];在病原体感染的先天免疫应答中起重要作用并具有潜在的免疫调节活性^[11];凝集素还具有抗生物膜特性和抑菌特性,可成为治疗疾病的潜在工具^[12]。凝集素由于能特异性识别血细胞而被应用于血型检测中^[13-14]。试验拟对赤小豆凝集素提取工艺进行优化,以凝集活性为指标评价其分离纯化效果。通过 SDS-PAGE 电泳、Q Sepharose XL 阴离子交换色谱、Phenyl FF HP 疏水层析色谱和 Sephadex G-50 凝胶过滤色谱技术进行纯化,旨在为提高赤小豆种质资源优势和豆科凝集素的开发利用提供依据。

基金项目:国家重点研发计划;(编号:2018YFE0206300);黑龙江省优势特色学科资助项目;(编号:黑教联[2018]4号)

作者简介:肖俊琪,男,黑龙江八一农垦大学在读硕士研究生。

通信作者:翟爱华(1970—),女,黑龙江八一农垦大学教授,博士。

E-mail: zhaiahua@sina.com

收稿日期:2020-03-28

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料来源

赤小豆:大庆瑞泽丰农业技术有限公司。

1.1.2 仪器与试剂

快速低压液相色谱系统:ÄKTA™ prime plus 型,美国通用电气公司;

超微量分光光度计:NanoDrop 2000c 型,美国赛默飞世尔公司;

超纯水仪器:Thermo Scientific Barnstead GenPure 型,美国赛默飞世尔公司;

小型垂直电泳槽:BIO-RAD MINI 4 型,美国伯乐 Bio-rad 公司;

冷冻干燥机:Alpha 1-2 LD plus 型,德国 CHRISTA 公司;

PBS 磷酸盐缓冲溶液、PB 磷酸盐缓冲液、硫酸铵、氯化钠:分析纯,中国 Biosharp 公司;

琼脂糖凝胶、苯基琼脂糖凝胶:分析纯,瑞典乌普萨拉公司;

交联葡聚糖凝胶:分析纯,美国通用电气公司;

电泳试剂:分析纯,美国 Bio-Rad 生命医学产品有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 提取条件优化

(1) 浸提液种类:料液比 1:15 (g/mL), pH 7.5, 提取时间 12 h, 考察浸提液种类(ddH₂O、0.01 mol/L PB、0.01 mol/L Tris-HCl、0.01 mol/L 生理盐水、0.01 mol/L PBS)对凝集活性的影响。

(2) 料液比:以 PBS 为浸提液, pH 7.5, 提取时间 12 h, 考察料液比[1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25 (g/mL)]对凝集活性的影响。

(3) pH:以 PBS 为浸提液, 料液比 1:20 (g/mL), 提取时间 12 h, 考察 pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0)对凝集活性的影响。

(4) 浸提时间:以 PBS 为浸提液, 料液比 1:20 (g/mL), pH 7.5, 考察浸提时间(4, 8, 12, 16, 20 h)对凝集活性的影响。

1.2.2 响应面优化试验 在单因素试验的基础上, 以料液比、pH 和提取时间为试验因素, 以凝集活性为响应值, 运用 Design Expert 8.0 设计三因素三水平响应面试验。

1.2.3 硫酸铵分级沉淀 根据文献[15-16]修改如下:向粗提液中加入饱和硫酸铵溶液, 分别调节饱和硫酸铵浓度至 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%。4 ℃ 静置 4 h, 11 000 r/min 离心 10 min, 分别收集沉淀和上清液。不同饱和浓度下的沉

淀物以 ddH₂O 复溶, 并充分透析(14 kDa, 36 mm), 测定复溶液凝集活性, 选取硫酸铵分级沉淀范围。

1.2.4 凝集活性测定 参照 Park 等^[17]的方法。按式(1)计算凝集活性。

$$Y = \frac{2^n}{C \times V}, \quad (1)$$

式中:

Y——凝集活性, HU;

n——凝集孔的最大数量;

C——蛋白浓度, mg/mL;

V——样品体积, μ L。

1.2.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳 根据文献[18-19]修改如下:凝胶以 5 mg/100 mL 堆叠在上层, 下部凝胶为 12 mg/100 mL; 起始电压 80 V, 保持 15 min; 分离标记后将电压调至 120 V, 连续运行 30 min; 用考马斯亮蓝 R-250 振荡染色 15 min; 使用 5 mL/100 mL 乙醇和 10 mL/100 mL 乙酸混合溶液脱色。

1.2.6 蛋白质浓度测定 使用 NanoDrop 2000C 测定蛋白质浓度, PBS 溶液为空白组, 选取 2 μ L 样品。

1.2.7 离子交换色谱 缓冲溶液 A (20 mmol/L Tris-HCl pH 7.8) 溶解样品, 用预平衡的阴离子交换柱 Q Sepharose XL (Q XL 1 mL) 和缓冲溶液 B (1 mol/L NaCl + 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8) 对蛋白质进行梯度洗脱 (0%~100%), 流速 0.5 mL/min, 洗脱体积 20 mL。收集洗脱组分用于凝血活性检测和 SDS-PAGE 分析。

1.2.8 疏水层析色谱 缓冲溶液 C (2.4 mol/L (NH₄)₂SO₄ + 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8) 用于平衡色谱柱 Phenyl FF HP (HiTrap™ 1 mL), 缓冲溶液 A (20 mmol/L Tris-HCl) 梯度洗脱柱上蛋白质 (0%~100%), 流速 0.5 mL/min, 洗脱体积 20 mL。收集洗脱组分用于凝血活性检测和聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分析。

1.2.9 凝胶过滤色谱 将富集的组分加载到已用缓冲溶液 A (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8) 平衡的 Sephadex G-50 凝胶过滤层析柱上, 流速 0.5 mL/min。收集洗脱组分用于凝血活性检测和 SDS-PAGE 分析。

1.2.10 数据处理 运用 Origin 8.0、SPSS 19.0、MaxQuant 1.6.1.0、PrimeView 5.0 和 Design Expert 8.0 软件对数据进行分析 and 数据图像处理。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 浸提液对凝集素提取效果的影响 由图 1 可知, 生理盐水组和 PBS 组的凝集活性明显高于其他组, 其中 PBS 组的更高, 可能与 PBS 缓冲液具有较强的缓冲作用有关, 能更好地维持凝集素的结构和活性, 与苏艳玲等^[20]的研究结果一致。因此, PBS 溶剂为赤小豆凝集素的最

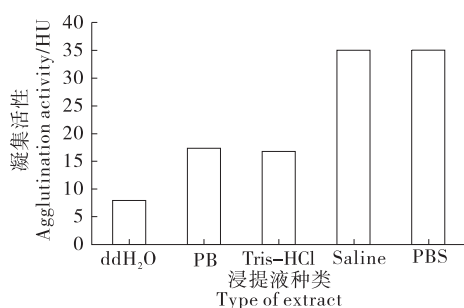


图1 浸提液种类对凝集素提取效果的影响

Figure 1 Effects of extract type on extraction effect of lectin

优提取剂。

2.1.2 料液比对凝集素提取效果的影响 由图2可知,凝集活性随料液比的增加呈先增加后降低趋势。随着料液比的增加,可溶性蛋白传质动力增加,蛋白质溶解度增大^[21];当可溶性蛋白浓度达最大值后,料液比的增加反而会使蛋白质浓度降低^[22]。故选择料液比为1:20(g/mL)进行赤小豆凝集素粗提取。

2.1.3 pH对凝集素提取效果的影响 凝集素具有两性解离性质,溶液pH与蛋白等电点会影响凝集活性^[23]。豆科植物凝集素等电点多为5.4~6.5,当提取剂pH接近赤小豆凝集素等电点时,凝集素聚沉凝集活性降低,偏离等电点后凝集素逐渐溶解,凝集活性增大^[24]。由图3可知,当pH为6.0~6.5时,凝集活性较低且变化不明显,

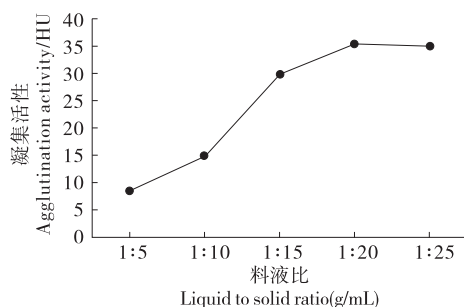


图2 料液比对凝集素提取效果的影响

Figure 2 Effects of material-liquid ratio on extraction effect of lectin

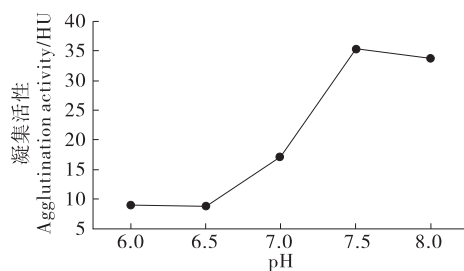


图3 pH对凝集素提取效果的影响

Figure 3 Effects of pH on extraction effect of lectin

当pH值继续增大至偏离凝集素等电点时,凝集素逐渐溶解,凝集活性逐渐上升,并在pH 7.5附近达最大值。因此,选择pH 7.5作为赤小豆凝集素浸提液的最佳pH值。

2.1.4 提取时间对凝集素提取效果的影响 由图4可知,凝集活性随提取时间的延长呈先上升后下降趋势,当浸提时间为16h时,凝集活性达到峰值(35.10 HU),说明提取时间的适当延长有利于赤小豆凝集素的提取。因此,选择16h作为赤小豆凝集素提取的最优浸提时间。

2.2 响应面优化试验

2.2.1 试验设计与结果分析 根据单因素试验结果,以凝集活性为响应值,根据Box-Behnken中心组合原理进行响应面设计,试验因素水平见表1,试验设计与结果见表2。

2.2.2 模型的建立及显著性检验 使用Design Expert 8.0软件对表2的结果进行多元回归分析,得凝集活性(Y)的二次多项式回归方程:

$$Y = 34.91 + 2.99X_1 + 6.13X_2 - 3.72X_3 - 0.85X_1X_2 + 1.51X_1X_3 - 6.19X_2X_3 - 1.44X_1^2 - 8.84X_2^2 - 5.38X_3^2 \quad (2)$$

对回归模型进行方差分析,结果见表3。由表3可知,模型具有极显著性, $R^2 = 0.9944$, $R_{adj}^2 = 0.9872$,表明方程拟合度好,可用于赤小豆凝集素提取工艺的参数模型分析。各因素对凝集活性的影响顺序为pH>浸出时间>料液比。

2.2.3 交互作用分析与验证 由图5可知,料液比与pH之间对凝集活性的影响不显著、料液比与浸提时间之间对凝集活性的影响显著、pH与浸提时间之间对凝集活性的影响极显著,说明各因素间的交互作用极显著,与方差

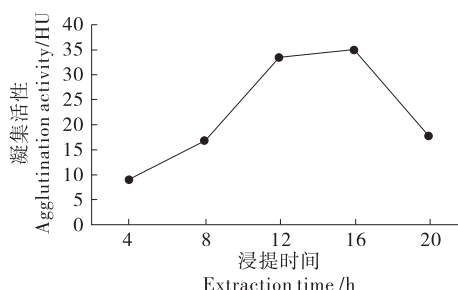


图4 浸提时间对凝集素提取效果的影响

Figure 4 Effects of time on extraction effect of lectin

表1 响应面因素水平表

Table 1 Response surface test factor level coding table

水平	X ₁ 液料比(mL/g)	X ₂ pH	X ₃ 浸提时间/h
-1	15	7.0	12
0	20	7.5	16
1	25	8.0	20

分析结果一致。该模型得到的凝集素最佳提取工艺参数为料液比 1 : 22.96 (g/mL), pH 7.76, 浸提时间 13.77 h, 该条件下凝集活性预测值为 38.08 HU。结合实际, 将各因素修正为料液比 1 : 23 (g/mL), pH 7.8, 浸提时间 14 h, 实测凝集活性为 (37.18 ± 0.18) HU ($n=3$), 与预测

表 2 响应面试验设计结果

Table 2 Design and results of response surface experiment

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	凝集活性/HU
1	-1	-1	0	14.29±0.70
2	1	-1	0	22.64±1.42
3	-1	1	0	28.31±1.23
4	1	1	0	33.26±1.72
5	-1	0	-1	30.31±1.43
6	1	0	-1	32.59±1.16
7	-1	0	1	20.56±0.54
8	1	0	1	28.90±1.12
9	0	-1	-1	12.47±0.66
10	0	1	-1	37.06±1.36
11	0	-1	1	16.71±1.43
12	0	1	1	16.54±0.48
13	0	0	0	35.35±1.67
14	0	0	0	33.01±1.26
15	0	0	0	35.43±0.63
16	0	0	0	35.39±0.75
17	0	0	0	35.39±1.88

表 3 二次模型的方差分析[†]

Table 3 Analysis of variance for the quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	1 142.49	9	126.94	138.09	<0.000 1	**
X ₁	71.52	1	71.52	77.80	<0.000 1	**
X ₂	300.71	1	300.71	327.11	<0.000 1	**
X ₃	110.45	1	110.45	120.14	<0.000 1	**
X ₁ X ₂	2.87	1	2.87	3.12	0.119 6	
X ₁ X ₃	9.17	1	9.17	9.97	0.016 0	*
X ₂ X ₃	153.28	1	153.28	166.74	<0.000 1	**
X ₁ ²	8.80	1	8.80	9.58	0.017 5	*
X ₂ ²	329.23	1	329.23	358.13	<0.000 1	**
X ₃ ²	121.72	1	121.72	132.41	<0.000 1	**
残差	6.43	7	0.92			
失拟项	1.91	3	0.64	0.56	0.67	
纯误差	4.53	4	1.13			
总离差	1 148.93	16				

[†] * 表示显著($P<0.05$), ** 表示极显著($P<0.01$); $R^2=0.994\ 4$, $R_{adj}^2=0.987\ 2$ 。

值接近, 表明优化的工艺条件可靠, 方程拟合良好, 具有实际应用价值。

2.3 硫酸铵分级沉淀

由表 4 可知, 当混合液中硫酸铵饱和度提高到 45% 时, 开始出现凝集活性(0.06 HU), 且随混合液中硫酸铵饱和度的增加出现两个凝集活性增加区间(45%~65% 和 70%~85%), 直至混合液中硫酸铵饱和度为 85% 时达到最大(178.32 HU); 当混合液中硫酸铵饱和度由 65% 增加至 70% 时, 凝集活性下降(17.44 HU), 说明在此分级区间内有更多杂蛋白被沉淀出来; 为保证凝集素含量并减少试剂用量, 选择赤小豆凝集素的硫酸铵分级沉淀范围为 45%~80%。

2.4 离子交换色谱

由图 6 可知, 相比于 DEAE 填料, Q Sepharose XL 填料具有更好的分离效果。经 Q Sepharose XL 层析分离出

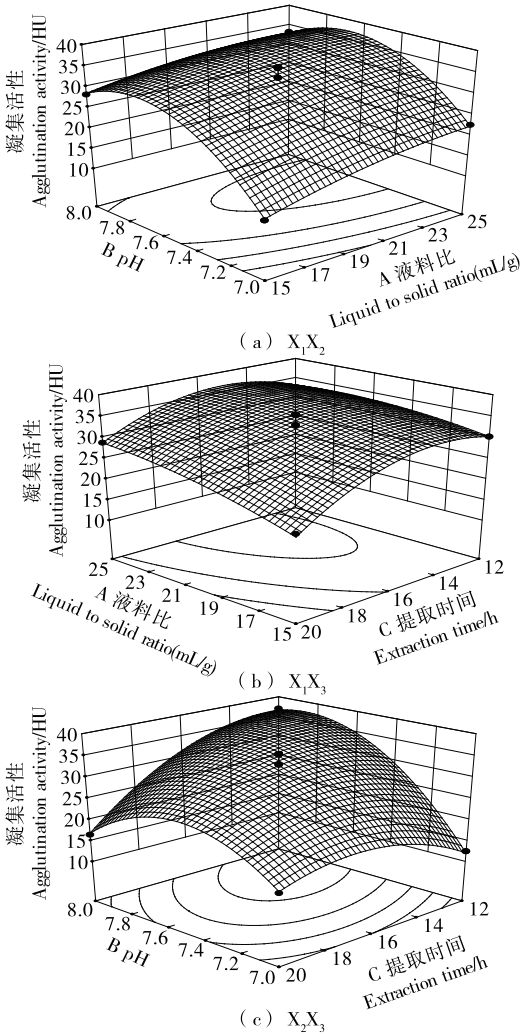


图 5 各因素交互作用响应面曲面图

Figure 5 Response surface plot of interaction of various factors

表 4 硫酸铵分级沉淀结果

Table 4 The result of ammonium sulfate

饱和硫酸铵浓度/%	凝集活性/HU	凝集活性梯度差/HU
0~35	0.00	0.00
0~40	0.00	0.00
0~45	0.06	0.06
0~50	34.27	34.21
0~55	37.74	3.47
0~60	79.88	42.14
0~65	143.71	63.83
0~70	126.27	-17.44
0~75	165.40	45.63
0~80	171.90	6.50
0~85	178.32	12.92

具有凝集活性的组分 F1 和 F2,其中组分 F2 的凝集活性更高,而 F3 未观察到凝集现象。因此,收集组分 F1 和 F2 的峰部分,富集后用于疏水层析色谱进一步分析。

2.5 疏水层析色谱

由图 7 可知,经疏水层析梯度洗脱分离出了两个具有凝集活性的组分 F4 和 F5,其峰型变化趋势与凝集活性变化趋势相同,说明组分 F4 与 F5 中可能存在两种具有不同疏水性质的凝集素。凝集素种类的多样性可能是表 4 中出现两个凝集活性增加区间的原因。对比 SDS-PAGE 电泳,组分 F5 中的蛋白组成更为复杂,因此重复提取并富集组分 F4 中的第 15 管用于进一步分析。

2.6 凝胶过滤色谱

由图 8 可知,经凝胶过滤色谱分离出了具有高凝集活性(127 HU)的组分 F6。目标蛋白在 SDS-PAGE 电泳中显示 2 条电泳条带,分子量在 55 kDa 和 27 kDa 附近,

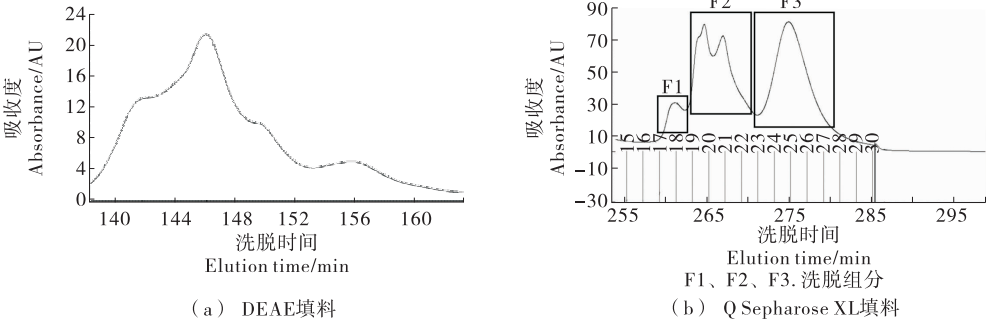
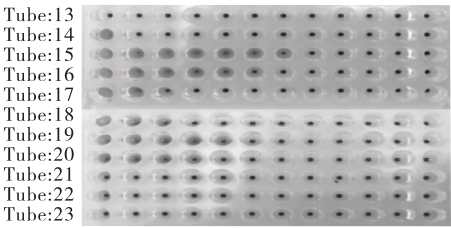
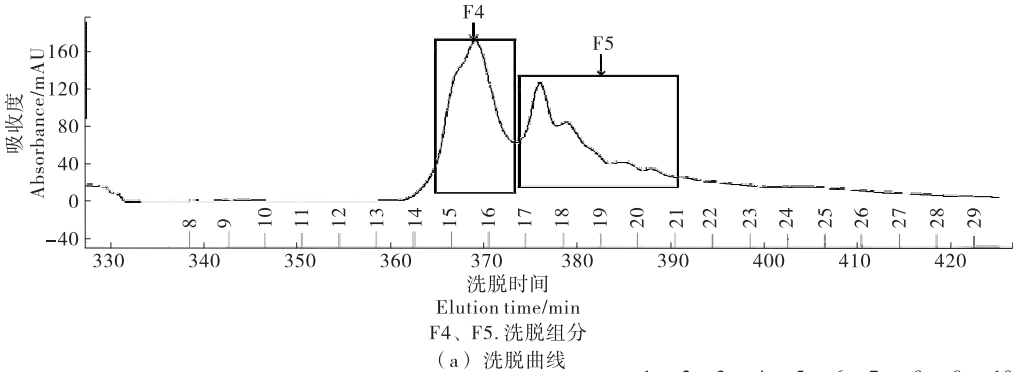
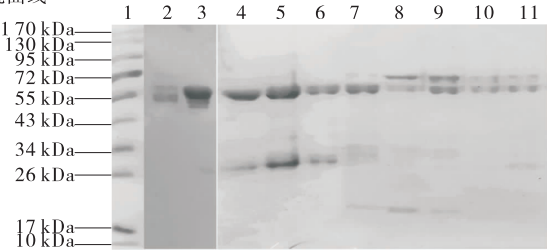


图 6 离子交换色谱

Figure 6 Ion exchange chromatography results



(b) 血凝反应



1. 蛋白Marker 2~11. 洗脱样品
(c) SDS-PAGE电泳

图 7 疏水层析色谱

Figure 7 Hydrophobic chromatography results

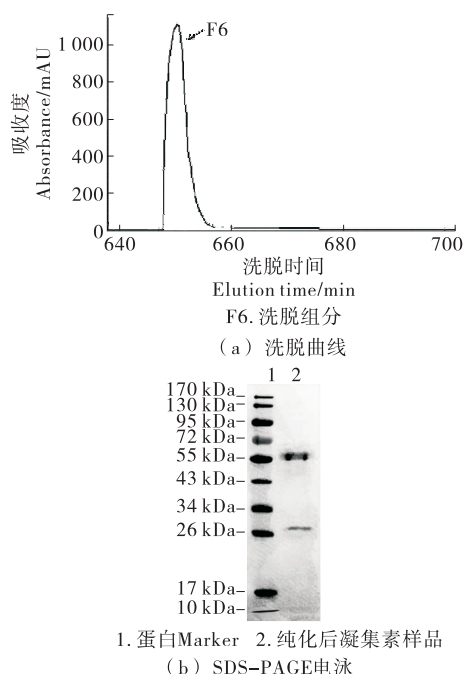


图 8 凝胶过滤层析色谱

Figure 8 Gel filtration chromatography results

与 Pradip 等^[25]的研究结果相似。SDS-PAGE 电泳中,十二烷基硫酸钠通过断裂凝集素与其他分子间的非共价键使蛋白分子去折叠,强还原剂(巯基乙醇)能通过断裂半胱氨酸残基间的二硫键(S—S)使凝集素分子解聚成多肽链^[26]。因此,凝胶过滤色谱的单一峰型表明目标蛋白纯化水平较高,并且在溶液中以稳定的多聚体形式存在^[27];结合 SDS-PAGE 凝胶电泳和凝集活性可以说明,纯化的蛋白是单体蛋白,在具有强还原剂条件下,蛋白中的二硫键断裂解聚为两条亚基并且该亚基具有凝集活性。纯化结果表明,赤小豆凝集素的两条亚基分子量为 55 kDa 和 27 kDa 左右。

3 结论

以赤小豆为原料提取凝集素,利用单因素结合响应面试验得到赤小豆凝集素的最优粗提条件为:以 PBS 磷酸盐缓冲液为浸提剂,料液比 1:23 (g/mL),pH 7.8,浸提时间 14 h;粗提物经 65%~80%饱和硫酸铵分级沉淀、Q Sepharose XL 阴离子交换层析、phenyl FF HP 疏水层析、Sephadex G-50 凝胶过滤层析后获得赤小豆凝集素。其中,Q Sepharose XL 阴离子层析填料比 DEAE 阴离子层析填料更适合赤小豆凝集素的初步分离;聚丙烯酰胺凝胶电泳表明,赤小豆凝集素的两条亚基分子量分别在 55 kDa 和 27 kDa 附近。后续还需从以下几个方面开展研究:① 通过液相色谱—串联质谱方法对赤小豆凝集素进行蛋白质鉴定;② 探究赤小豆凝集素基础理化特性,如金属离子特异性、细胞凝集特异性和糖特异性等。

参考文献

- [1] PATTANAYAK A, ROY S, SOOD S, et al. Rice bean: A lesser known pulse with well-recognized potential [J]. *Planta*, 2019, 250(3): 873-890.
- [2] 戴聪杰, 龚梅桂. 赤豆与赤小豆的营养分析及比较[J]. *粮油加工*, 2010(9): 61-64.
- [3] 陈俏, 刘晓月, 石亚囡, 等. 赤小豆化学成分的研究[J]. *中成药*, 2017, 39(7): 1419-1422.
- [4] 万国平. 麻黄连翘赤小豆汤及其加减方治疗急性肾小球肾炎的临床疗效[J]. *全科口腔医学电子杂志*, 2019, 6(32): 182-188.
- [5] 王卫军, 段红梅, 吴淑清, 等. 长白穗木赤小豆薏米蛋糕的研制[J]. *科技资讯*, 2018, 16(23): 227-228.
- [6] 郭晓燕, 王奇. 常见种子类食物的药用性研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2019, 35(15): 2320-2322.
- [7] 李婧楠. 麻黄连翘赤小豆汤治疗尿毒症皮肤瘙痒的效果观察[J]. *中国医药指南*, 2020, 18(8): 181.
- [8] SHAKHSHEER B, ANDERSON M, KHATIB K, et al. SugarBind database (SugarBindDB): A resource of pathogen lectins and corresponding glycan targets[J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2013, 26(9): 426-431.
- [9] 王钰清, 邢雪聪, 柴许然, 等. 植物凝集素的生物学功能与应用[J]. *广西科学*, 2020, 27(1): 27.
- [10] MAJOR M, LAW M. Detection of antibodies to HCV E1E2 by lectin-capture ELISA[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 1911(2): 422.
- [11] LIU Xiao-bing, LI Xue-mei, PENG Mei-ting, et al. A novel C-type lectin from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus* possesses antibacterial and anti-inflammatory activity[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92(9): 11.
- [12] ELUMALAI P, ABDUL S R, BASKARALINGAM V, et al. Anti-biofilm properties and immunological response of an immune molecule lectin isolated from shrimp *Metapenaeus monodactylus*[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 94(11): 897.
- [13] SILVA A J, CAVALCANTI V L R, PORTO A L F, et al. The green microalgae *Tetradismus obliquus* (*Scenedesmus acutus*) as lectin source in the recognition of ABO blood type: Purification and characterization [J]. *Journal of Applied Phycology*, 2020, 32(1): 104.
- [14] 聂佳慧. 红芸豆抗黑色素瘤活性成分及机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2019: 8-20.
- [15] GRODZKI A C, BERENSTEIN E. Antibody purification: Ammonium sulfate fractionation or gel filtration [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 588(8): 15-26.
- [16] ITO Y. Centrifugal precipitation chromatography: Principle, apparatus, and optimization of key parameters for protein fractionation by ammonium sulfate precipitation[J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, 277(1): 143-153.

(下转第 200 页)

- 锡: 江南大学, 2017: 27.
- [15] 谢靓. 南方臭豆腐卤水挥发性风味物质指纹图谱研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017: 37.
- [16] 周典飞. 冷冻草莓汁异味成分鉴别与控制技术研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2012: 14.
- [17] 庞雪威, 王积武, 吴志莲, 等. 植物性食品原料中单萜类化合物形成机理及生物活性综述[J]. 中国酿造, 2016, 35(6): 24-29.
- [18] DAMBOLENA J S, LÓPEZ A G, CÁNEPA M C, et al. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B₁ biosynthesis[J]. *Toxicon Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2008, 51(1): 37-44.
- [19] NÚÑEZ A J, BEMELMANS J M H, MAARSE H. Isolation methods for the volatile components of grapefruit juice: Distillation and solvent extraction methods[J]. *Chromatographia*, 1984, 18(3): 153-158.
- [20] 常思盎, 惠腾, 刘毅, 等. 杀菌和复热工艺对黄焖鸡挥发性风味物质的影响[J]. 肉类研究, 2018, 32(4): 20-26.
- [21] 田怀香, 王璋, 许时婴. GC-O 法鉴别金华火腿中的风味活性物质[J]. 食品与发酵工业, 2004(12): 117-123.
- [22] 常海军, 彭荣, 唐春红. 重庆城口腊肉挥发性风味化合物分析[J]. 食品科学, 2016, 37(4): 120-126.
- [23] 吴幼茹, 刘诗宇, 樊晓璐, 等. GC-O-MS 分析 5 种酿酒原料中蒸煮香气成分[J]. 食品科学, 2016, 37(24): 94-98.
- [24] 李小林, 陈诚, 黄羽佳, 等. 顶空固相微萃取-气质联用分析 4 种野生食用菌干品的挥发性香气成分[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(9): 174-180.
- [25] 冯聂聂. 柠檬醛/一氯三嗪- β -环糊精包合物的制备及其芳香整理应用[D]. 上海: 上海应用技术学院, 2015: 21.
- [26] SHAHIDI F, RUBIN L J, DSOUZA L A. Meat flavor volatiles: A review of the composition, techniques of analysis, and sensory evaluation[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1986, 24(2): 141-243.
- [27] 张杰, 程伟, 潘天全, 等. 浓香型白酒风味成分研究现状及展望[J]. 酿酒, 2019, 46(1): 29-32.
- [28] 王春燕. 九峰山南坡栽培的两种酿酒葡萄及其葡萄酒品质研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018: 39.
- [29] LIU Yuan, XU Xing-lian, OU-YANG Gang-feng, et al. Changes in volatile compounds of traditional chinese nanjing water-boiled salted duck during processing[J]. *Journal of Food Science*, 2006, 71(4): S371-S377.
- [30] 吴金凤. 重庆农家腊肉风味物质研究及其安全性评价[D]. 重庆: 西南大学, 2008: 25.
- [31] 李佳佳. 秀珍菇水解物美拉德反应制备调味核心基料的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017: 38.
- [32] 秦晓, 王锡昌, 陶宁萍. 养殖暗纹东方鲀蒸制鱼肝中特征气味物质的鉴定[J]. 食品工业科技, 2015, 36(14): 57-62, 68.
- [33] 刘晓庚, 陈优生. 香料 2-甲基四氢呋喃-3-酮的合成研究[J]. 食品科学, 2005(5): 165-167.
- [34] 江新业, 宋焕禄, 夏玲君. GC-O/GC-MS 法鉴定北京烤鸭中的香味活性化合物[J]. 中国食品学报, 2008(4): 160-164.
- [35] 高韶婷. 基于多指纹图谱技术的我国三大干腌火腿风味品质评价研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 30.

(上接第 166 页)

- [17] PARK W B, JU Y J, HAN S K. Isolation and characterization of beta-galactoside specific lectin from Korean mistletoe (*Viscum album* var. *coloratum*) with lactose-BSA-Sepharose 4B and changes of lectin conformation[J]. *Archives of Pharmacal Research*, 1998, 21(4): 429.
- [18] LAEMMLI B U K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5 259): 683.
- [19] LAEMMLI U K, FAVRE M. Gel electrophoresis of proteins[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1973, 80(4): 573-599.
- [20] 苏艳玲, 韩红艳, 杨艳君. 杏仁凝集素提取条件的优化及性质[J]. 食品工业, 2016, 37(6): 88-91.
- [21] 张舒, 王长远, 谭朝印, 等. 绿豆清蛋白 Osborne 分级提取工艺优化及亚基组成分析[J]. 食品与机械, 2019, 35(10): 174-178.
- [22] 肖俊琪, 翟爱华, 李嘉庆, 等. 蒸汽爆破预处理辅助提取米糠蛋白的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2018, 175(9): 137.
- [23] BENILDO S C, ALFA U B, VANIR R P, et al. Purification and partial characterization of a new lectin from *Parkia panurensis* Benth. ex H.C. Hopkins seeds (Leguminosae family; Mimosoideae subfamily) and evaluation of its biological effects[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 145(4): 845-855.
- [24] WELCH C J, TALAGA M L, KADAV P D, et al. A capture and release method based on noncovalent ligand cross-linking and facile filtration for purification of lectins and glycoproteins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(1): 223-236.
- [25] PRADIP K D, PRANAB S B, TAPASH K D. Purification of human erythrocytes specific lectins from rice bean, *Phaseolus calcaratus* syn. *Vigna umbellata*, by high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography*, 1988, 431(1): 37-44.
- [26] PARGER M J. Differentiation of rennet from other milk-clotting enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis[J]. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1977(60): 6.
- [27] 张家源, 陈舜胜, 张洪才. 暗纹东方鲀鱼精蛋白的纯化及抑菌活性研究[J]. 食品与机械, 2020, 36(1): 171-174.