

酸性条件下花生分离蛋白亚基结构的变化规律

赵谋明, 辛佩贤, 赵强忠, 陈楠楠, 蔡孟森

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文通过 SDS-PAGE 凝胶电泳、Zeta 电位、溶解性、内源荧光光谱以及粒径的测定分析, 探讨了酸性条件下花生分离蛋白亚基结构的变化规律。电泳分析表明, 当 pH<3.5 时, 部分亚基酸解产生约 33 ku 的新条带, 18 ku 条带亮度增加。亚基的酸解受时间和离子强度的影响。花生分离蛋白亚基在常温 pH 2.5 的条件下处理 10 min 后开始酸解, 且随着时间的延长高分子量的亚基逐渐减少; 在离子强度 0~0.1 mmol/L 时酸解程度较大, 当离子强度大于 0.2 mmol/L 时, 酸解作用被抑制。进一步研究表明, 在 pH 2.0~2.5 间, 花生分离蛋白结构较为伸展, 内部基团暴露, 溶解性较高, 荧光光谱最大吸收波长比中性条件时红移约 13 nm; 当 pH 进一步降低时, Zeta 电位较低, 花生分离蛋白形成大分子量的可溶性聚集体, 荧光光谱最大吸收波长蓝移至 335.27 nm。

关键字: 花生分离蛋白; 亚基; 酸性条件; 酸解

文章编号: 1673-9078(2014)12-37-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.12.007

Structural Variations in the Subunits of Peanut Protein Isolates under Acidic Conditions

ZHAO Mou-ming, XIN Pei-xian, ZHAO Qiang-zhong, CHEN Nan-nan, CAI Meng-sen

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Structural variations in the subunits of peanut protein isolates under acidic conditions were investigated using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), zeta potential, solubility, endogenous fluorescence spectroscopy, and particle size distribution analyses. The electrophoresis analysis indicated that when the pH value was <3.5, a portion of the subunits unfolded, a new 33 ku band was produced, and the intensity of the 18 ku band increased. The acid-hydrolysis of the subunits was affected by time and ionic strength. The peanut protein isolate subunits were subjected to acid-hydrolysis at pH 2.5 after 10 min at room temperature, and the amount of high molecular weight subunits decreased over time. When the ionic strength ranged from 0~0.1 mmol/L, there was a higher degree of acid-hydrolysis, which was inhibited when the ionic strength was above 0.2 mmol/L. Moreover, at pH values ranging from 2.0~2.5, the peanut protein isolate unfolded, interior groups were exposed, solubility was relatively high, and the maximum emission wavelength in the fluorescence spectra was red-shifted by 13.47 nm as compared to that under neutral conditions. When the pH was further decreased, the zeta potential was relatively low, peanut protein isolates formed high molecular weight soluble aggregates, and the maximum emission wavelength in the fluorescence spectra was blue-shifted to 335.27 nm.

Key words: peanut protein isolate; subunits; acidic conditions; acid hydrolysis

花生是一种重要的油料蛋白资源, 蛋白质含量为 21%以上^[1], 其中约含 10%水溶性清蛋白和 90%球蛋白。球蛋白由花生球蛋白和花生伴球蛋白 I、花生伴球蛋白 II 三部分组成。杜寅^[2]对 170 种花生进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 发现花生分离蛋白能被分离成 8 个明显的条带。其中花生球蛋白共 4 个条带, 分子量分别为 40.5、37.5、35.5 和 23.5 ku; 花生伴球

收稿日期: 2014-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171783); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 课题 (2013AA102201)

作者简介: 赵谋明 (1964-), 男, 教授, 博导, 主要从事蛋白质化学与工程、食品生物技术方面的研究

蛋白 I 有 3 个条带, 分子量分别为 18、17 或 15.5 ku; 花生伴球蛋白 II 有 1 个条带, 分子量为 61 ku。不同的花生蛋白组分均含有 18 种氨基酸, 含量较高的是天冬氨酸、精氨酸、谷氨酸。其中天冬氨酸占花生分离蛋白中总蛋白的 12.29%, 分别占花生球蛋白的 12.68%、花生伴球蛋白 II 的 12.68%、花生伴球蛋白 I 的 7.95%^[3]。

温和的酸碱处理能使氨基酸带电, 使带同种电荷的蛋白分子相互排斥, 引起球蛋白二级、三级结构变化, 导致亚基的解离和结构展开^[4]。蒋将^[6]把大豆分离蛋白进行 pH 偏移处理, 使大豆分离蛋白产生熔球态, 可明显改善乳化性和成膜性。源博恩^[7]研究证明酸性

条件下,大豆分离蛋白各亚基由于静电斥力作用,发生亚基解离。高温下长时间对蛋白质进行酸碱处理,甚至会引起肽链上的肽键断裂,使其水解成氨基酸。Naotoshi^[5]对大豆蛋白进行酸热处理(0.05 mol/L HCl, 95 °C加热 30 min)后发现大豆蛋白部分天冬氨酸残基前后的肽键断裂和谷氨酸脱氨。

通过酸碱处理改变大豆蛋白亚基构成,改善其某种功能特性的研究已成为植物蛋白改性的研究热点,但对花生蛋白亚基解离及功能特性改善鲜有报道。本文旨在通过探究酸性条件下花生分离蛋白亚基结构的变化,为花生分离蛋白改性及其功能特性改善提供理论和方法指导。

1 材料与方法

1.1 主要原料

低温脱脂花生粕,山东禹王实业有限公司生产;牛血清蛋白(BSA),北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司生产;BCA试剂盒,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司生产;其它试剂为分析纯。

1.2 仪器和设备

多功能全波段扫描仪, Thermo scientific 生产; pH S-25 数显 pH 计, 瑞士梅特勒-托利多公司生产; 电泳槽, 美国 Bio-Rad 生产; IEC MicroMax RF 离心机, Thermo Electron Corporation 生产; CS150NX 超速离心机, 日本 HITACHI 公司生产; F-7000 荧光分光光度计, 日本 HITACHI 公司生产; Nano-ZS&MPT-2Zeta 电位及纳米粒度分布仪, 英国 Malvern 公司生产。

1.3 方法

1.3.1 花生分离蛋白的制备

取一定量花生粕,料水比 1:15 混合搅拌,用 2 mol/L NaOH 调节 pH 至 8.0,浸提 2 h 后,8000 r/min 离心 15 min,过滤取上清液,用 2 mol/L 调节 pH 至 4.5,搅拌 30 min,酸沉后 8000 r/min 离心 15 min,过滤除去清液,收集沉淀称重,按 1:5 比例加水复溶,用 2 mol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.0,透析 24 h,冷冻干燥得花生分离蛋白。

1.3.2 酸处理方法

取一定量冻干后的花生分离蛋白溶解于去离子水中,配制成 2% 的花生分离蛋白溶液,搅拌 2 h 后,用 2 mol/L HCl 分别调节 pH 至 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、7.0,搅拌 2 h 后分别取样进行溶解度及内源性荧光分析,上述样品稀释至 0.1% 进行 Zeta 电位及

粒径测定;用 2 mol/L 的 NaOH 将不同 pH 处理 2 h 后的花生分离蛋白溶液回调至中性,取样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。用 2 mol/L HCl 调节花生分离蛋白溶液 pH 到 2.5 后,分别处理 0、10、20、30、60、90、120、150 min 后调回中性,取样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。取 pH 2.5 的花生分离蛋白溶液,分别添加 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 mmol/L 的 NaCl,处理 2 h 后用 2 mol/L NaOH 回调至中性,取样进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析。

1.3.3 酸性条件下花生分离蛋白溶液的 Zeta 电位变化

利用马尔文纳米粒度分布仪测定 0.1% 的花生分离蛋白溶液的 Zeta 电位,其 pH 从 1.0 变化至 7.0。测定条件:比色池规格为 1 cm 聚苯乙烯池,采用一对 0.45 cm² 铂电极,间距为 0.4 cm。测定温度为 25 °C,温度平衡时间为 2 min。

1.3.4 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析

根据 Laemmli^[8]的方法进行 SDS-PAGE 电泳分析,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 4%。蛋白样品溶于 SDS-PAGE 样品缓冲液,电泳前煮沸 6 min 后离心。取清液上样,上样量为 10 μL,凝胶电泳于恒流模式下进行,在浓缩胶中电流 25 mA,进入分离胶后增加至 40 mA。凝胶染色液采用 0.25% 考马斯亮蓝(R-250)溶液,采用甲醇醋酸溶液脱色。以标准蛋白分子量的常用对数值为纵坐标,相对迁移率为横坐标作标准曲线,按照标准曲线计算新条带的分子量。

1.3.5 高速离心及超速离心溶解度测定

取不同 pH 条件下的花生分离蛋白,10000 r/min 离心 20 min 后,取上清液进行蛋白质溶解度测定。根据 Wolf^[9]方法,取 1 mL 不同 pH 的花生分离蛋白溶液于 Beckman 离心管中,在 20 °C 下,以 80000 r/min 的转速离心 40 min,用 BCA 法测定其上清液中的蛋白含量。按体积比 50:1 混合 BCA 试剂 A 溶液和 B 溶液,充分混匀备用。向 96 孔平板加入 10 μL 稀释至一定浓度的样品和 200 μL BCA 工作液。将平板放入酶标仪中。酶标仪程序设定为轻微震荡,混匀,37 °C 中孵育 30 min 后,于 562 nm 处测定吸光值。以牛血清白蛋白(BSA)为标准物做标准曲线。按照标准曲线计算蛋白质含量。

1.3.6 荧光光谱分析

取不同 pH 条件下的花生分离蛋白,10000 r/min 离心 15 min 后,取上清液,采用 F-7000 荧光分光光度计进行荧光光谱测定。蛋白浓度为 0.1 mg/mL。荧光发散光谱分析以蛋白质分子内部的荧光基团为探

针, 为降低酪氨酸的荧光吸收, 荧光光谱在 290 nm 激发, 扫描发散光谱为 300~400 nm, 激发和发射狭缝宽均为 5 nm, 电压为 500 mV。

1.3.7 粒度测定

将 1% 的花生分离蛋白分别调节 pH 值至 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、7.0, 室温下搅拌并稳定 1 h, 10000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 采用激光纳米粒度测定仪进行粒度测定。

1.3.8 数据分析

数据平行测定 3 次取平均值, 并用 Origin Pro 8.0 作图。

2 结果与讨论

2.1 酸性条件下花生分离蛋白的 Zeta 电位变化

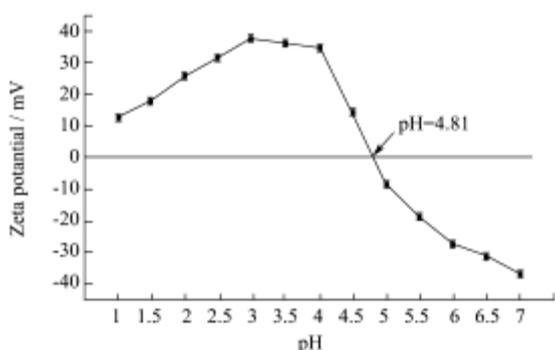


图 1 酸性条件下花生分离蛋白溶液的 Zeta 电位

Fig.1 Zeta potential of peanut protein isolates under acid conditions

酸性条件下花生分离蛋白溶液的 Zeta 电位如图 1 所示。由图 1 可知, 随着花生分离蛋白溶液 pH 的下降, Zeta 电位从负值逐渐升高为正值。在 pH<3 时, Zeta 电位开始下降。pH 通过影响蛋白质侧链羧基及氨基的解离程度来影响蛋白表面所带电荷。当 pH 值在 7.0 时, 花生分离蛋白表面羧基解离, 使蛋白质表面带负电荷, 蛋白质之间以负静电斥力相互排斥而使溶液稳定; 随着 pH 的下降, 蛋白表面的羧基解离被逐步抑制, Zeta 电位逐渐增大。蛋白间的负静电斥力逐渐减少, 蛋白分子开始聚集。当 pH 达到 4.81 时, Zeta 电位为零, 为花生分离蛋白的等电点, 与文献记载的花生蛋白的等电点 4.5~5.5 相符^[10]。当 pH 继续下降, 羧基解离受到限制, 氨基发生了质子化^[11], 蛋白质表面带正电荷, 此时蛋白间的作用力为正的静电排斥力。pH 1.0 时 Zeta 电位仅为 11.8 mV。可能是因为在这种极端酸性情况下, 溶液中含有大量的盐离子。盐离子

具有电荷屏蔽作用, 中和了蛋白质表面电荷, 使 Zeta 电位下降, 蛋白质间的静电斥力减少, 蛋白质分子间因聚集而使结构变得紧密。

2.2 不同 pH 条件下花生分离蛋白电泳分析

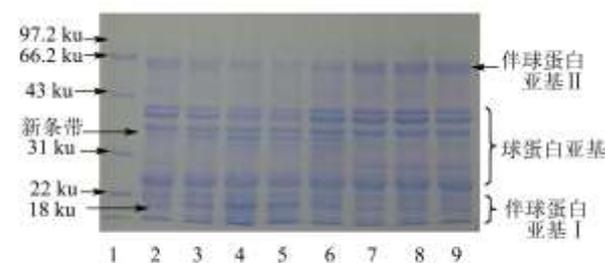


图 2 花生分离蛋白溶液在 pH 7.0 及酸性条件下的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE of peanut protein isolates under different pH conditions

注: 1: 标准蛋白质; 2~9: 分别代表 pH 值 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、7.0 的花生分离蛋白溶液。

不同 pH 处理的花生分离蛋白的 SDS-PAGE 图谱如图 2 所示。从图 2 可见, 在酸性条件 pH 1.0~3.0 的条件下, 花生伴球蛋白亚基 II (61 ku) 及花生球蛋白亚基 (40.5、37.5、35.5 ku) 条带亮度显著减弱, 出现了一条约 33 ku 新条带且 18 ku 条带亮度增加。说明在 pH<3.0 的酸性环境下, 花生球蛋白和伴球蛋白发生了不可逆的降解, 生成了分子量更小的亚基。这种降解作用在 pH 2.0 和 2.5 时尤其明显。在 pH 1.0 时, 新条带亮度开始明显下降。这是因为在极端酸性的条件下蛋白质分子间的静电斥力因离子静电屏蔽而减弱, 蛋白质聚集而使结构变得紧密, 抑制了酸解, 故该条带在电泳图谱中亮度较低。肽链上的天冬氨酸对酸水解十分敏感, 因此推测其肽键的断裂位置可能在肽链上天冬氨酸残基的前后^[12]。在低 pH (<3.0) 条件下蛋白质分子氨基发生质子化, 静电斥力增强, 使其结构发生一定程度的展开, 暴露出更多的酸敏感基团。结构展开后的花生分离蛋白在酸的作用下易发生肽键断裂, 产生新的亚基。源博恩^[8]等对比了常温下酸处理的大豆分离蛋白和天然大豆分离蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱, 发现两者的亚基组成无明显差别, 酸处理后无新的亚基条带出现。酸性条件下热处理一段时间后, 大豆球蛋白的碱性亚基和酸性亚基间出现了新的亚基条带, 说明常温下酸处理不会破坏大豆蛋白亚基结构, 使肽键断裂成新亚基, 需要酸性条件下加热才能使大豆蛋白的亚基断裂。但在常温下, 相同的

酸性环境却破坏了花生蛋白的亚基结构,使其肽键断裂,酸解出新的小分子量亚基。说明花生分离蛋白亚基的酸解敏感性高于大豆分离蛋白。

2.3 酸性条件下处理不同时间后花生分离蛋白电泳分析

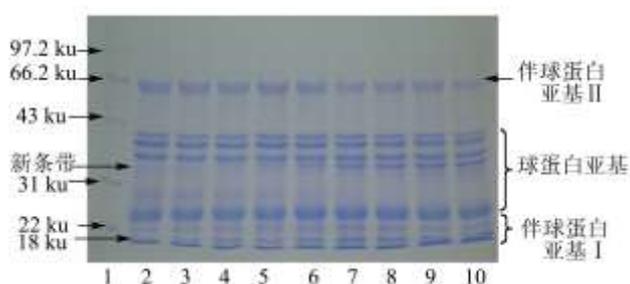


图3 花生分离蛋白溶液在 pH 7.0 和 pH 2.5 条件下处理不同时间的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 SDS-PAGE of peanut protein isolates at pH 7.0 and for different durations at pH 2.5

注:1: 标准蛋白质; 2: pH 7.0 的花生分离蛋白溶液; 3~10: pH 2.5 的条件下处理 0 min、10 min、20 min、30 min、60 min、90 min、120 min、150 min 的花生分离蛋白溶液。

花生分离蛋白溶液在 pH 2.5 的条件下处理不同时间后 SDS-PAGE 图谱如图 3 所示。由图 3 所见,花生分离蛋白在 pH 2.5 条件下,酸处理 10 min 后即开始出现酸解,花生分离蛋白亚基的原始条带亮度开始减弱,33 ku 的新亚基条带出现,18 ku 条带亮度变深。酸处理 60 min 后,33 ku 条带亮度明显,继续延长酸处理时间至 150 min,新亚基条带亮度变化不大。说明了在该条件下花生分离蛋白酸解出新条带的最短时间为 10 min,酸解 60 min 后酸解程度基本达到最大化。

2.4 酸性条件下不同离子强度的花生分离蛋白电泳分析

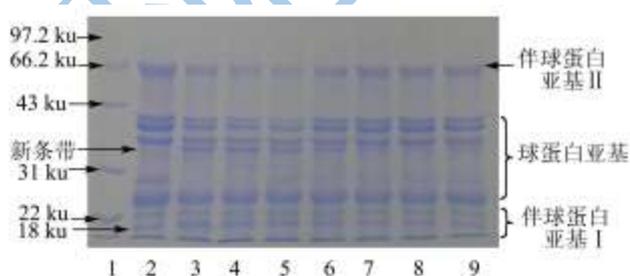


图4 pH2.5 的条件下不同离子强度的花生分离蛋白溶液的 SDS-PAGE 图谱

Fig.4 SDS-PAGE of peanut protein isolates treated with varying ionic strengths at pH 2.5

注:1: 标准蛋白质; 2: pH 7.0 的花生分离蛋白溶液; 3~9: 分别代表在 pH 2.5 的条件下离子强度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mmol/L 的花生分离蛋白溶液。

酸性条件下不同离子强度的花生分离蛋白溶液的 SDS-PAGE 图谱如图 4 所示。由图 4 可见,在 pH 2.5 的条件下,样品条带 3~6 均出现分子量约 33 ku 的新条带,说明在低离子强度 (0~0.2 mmol/L) 下花生分离蛋白发生酸解,产生新的亚基。当离子强度高于 0.2 mmol/L 时,花生分离蛋白的新条带亮度开始下降,酸解开始被抑制;当离子强度高于 0.5 mmol/L 后,新条带基本消失。当离子强度较小时,由于蛋白质间的静电斥力较大,花生分离蛋白在酸性环境下蛋白分子结构伸展,肽链中对酸敏感的部分暴露并被酸解成新的小分子量亚基。随着离子强度的增加,蛋白质表面的水化膜被破坏,溶解度下降,而且压缩了双电层的厚度,削弱了蛋白质之间的静电作用^[13]。蛋白质聚集,分子结构不能充分伸展,肽链中对酸敏感部分被包裹在紧密的蛋白质内部结构中,因此不能酸解成 33 ku 的亚基及其他低分子量亚基。这验证了对图 2 中花生分离蛋白亚基在 pH 1.0 和 1.5 的条件下酸降解被抑制原因的假设。

2.5 高速离心及超速离心下不同 pH 值的花生分离蛋白溶解性分析

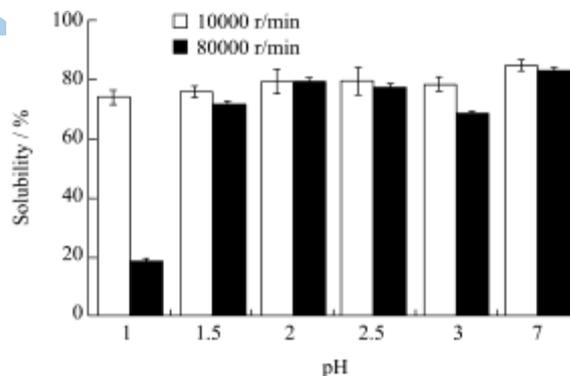


图5 酸性和中性条件下花生分离蛋白经高速离心 (10000 r/min) 及超速离心 (80000 r/min) 后的溶解性

Fig.5 Proteinsolubility of peanut protein isolates separated at 10000 r/min and 80000 r/min under acidic conditions

酸性和中性条件下花生分离蛋白溶液经高速离心 (10000 r/min) 及超速离心 (80000 r/min) 后上清液的蛋白溶解性如图 5 所示。由图 5 可见,高速离心 (10000 r/min) 后,酸性条件下花生分离蛋白的溶解性与中性条件下的差异不大,证明在酸性条件下花生分离蛋白仍保持良好的溶解性,有利于其他功能特性的发挥。pH 为 2.0~2.5 时,花生分离蛋白的溶解度相

对其他酸性条件下的高。这是因为花生蛋白被酸分解成较多小分子量的亚基,与水的相互作用增强,故在此 pH 范围溶解性相对较高。超速离心(80000r/min)后, pH 为 1.0 的花生分离蛋白溶解度迅速下降到 18.66%。这是由于在极端酸性条件下,离子强度较高,

使蛋白质分子相互碰撞而聚集成可溶性聚集体,可溶性大分子聚集体和不溶性聚集体经过超速离心后被沉淀下来,导致上清液中的蛋白含量显著下降。

2.6 酸性条件下花生分离蛋白荧光光谱分析

表 1 酸性条件下花生分离蛋白内源性荧光扫描最大吸收波长

Table 1 Maximum emission wavelengths in the fluorescence spectra of peanut protein isolates under acidic conditions

pH	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	7.0
最大吸收波长/nm	335.27±0.50	340.27±0.50	343.67±0.12	342.60±0.35	337.87±0.46	330.20±0.40

内源性荧光最大吸收波长的改变反映了花生分离蛋白内部的色氨酸残基所处微环境的变化程度。酸性条件下花生分离蛋白的内源性荧光最大吸收波长如表 1 所示。由表 1 可见,中性条件下的花生分离蛋白最大吸收波长为 330.20 nm。经不同的酸性条件处理后,最大吸收波长均发生不同程度的红移。最大吸收波长随着 pH 的下降先增加后减少。在 pH 为 2.0~2.5 时,最大吸收波长达最高值,比中性条件下的花生分离蛋白最大吸收波长红移 12.20 nm~13.47 nm。说明在该 pH 范围,花生分离蛋白亚基结构适度展开。当 pH<2.0 时,最大吸收波长开始蓝移。这是由于盐离子浓度过大,产生了静电屏蔽作用,分子间的静电排斥作用减弱,开始趋向形成聚合物,结构紧密,色氨酸暴露程度减少。虽然 pH<1.5 时花生分离蛋白发生了聚集,但在酸作用下,蛋白结构仍有所变化,部分基团暴露,因此酸处理后的花生分离蛋白的色氨酸暴露程度仍高于未处理的花生分离蛋白。Tang^[4]的研究结果表明,大豆蛋白在酸性条件 pH 1.5~2.0 下会发生亚基解离,结构展开,疏水基团暴露等现象。这与我们的结果相一致。

2.7 酸性条件下花生分离蛋白分子粒径的变化

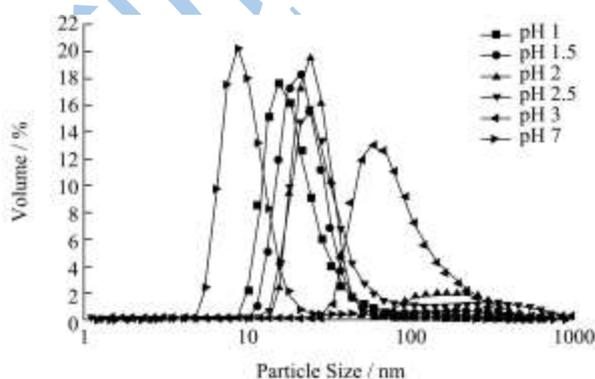


图 6 酸性条件下花生分离蛋白分子粒径分布

Fig.6 Particle size distribution of peanut protein isolates under acidic conditions

酸性条件下花生分离蛋白的粒径分布如图 6 所示。由图 6 可见,酸性条件下的花生分离蛋白粒径均比中性条件下的粒径大,结合内源性荧光分析其原因为酸性条件下,花生分离蛋白结构展开且酸解出了新的 33 ku 亚基,蛋白结构展开后不如原始蛋白的结构紧密,因此水化半径较中性条件的大。在酸性条件下,随着 pH 的降低,大颗粒逐渐变成小颗粒。在 pH 3.0 可溶性蛋白的粒径较大,因此在超速离心中, pH 3.0 的溶解性低于 pH 2.0 和 2.5。当 pH 小于 2.0 时,由于盐离子浓度较高,产生了静电屏蔽作用,使花生分离蛋白的部分可溶性聚集体转变成不溶性聚集体或分子量较大的可溶性聚集体,在离心后,只有更小粒径的颗粒存在于上清液中,因此粒径较 pH 2.0~3.0 时小。

3 结论

3.1 常温下,酸处理一段时间后,花生分离蛋白在 pH 1.5~3.5 间部分亚基酸解成分子量约 33 ku 的新亚基,18 ku 亚基条带亮度提高,说明部分大分子量的亚基被酸降解;在 pH 2.0~2.5 时,酸解作用最强,荧光扫描最大吸收波长比中性条件红移约 13 nm,水化粒径增加,溶解度最高;在 pH 1.0 时 Zeta 电位较低,静电斥力较小,花生蛋白分子的亚基结构聚集,不能充分伸展,抑制了花生分离蛋白的酸解。

3.2 花生分离蛋白在 pH 2.5 时处理 10 min 后,球蛋白和伴球蛋白亚基开始被酸解。花生分离蛋白在离子强度 0~0.1 mmol/L 时酸解程度较大,但高于 0.2 mmol/L 后由于离子屏蔽作用,酸解被抑制。

3.3 本文证明了花生分离蛋白在常温酸性条件下的亚基结构变化与大豆分离蛋白亚基解离变化趋势相近。但花生蛋白发生了不可逆的酸解,出现了分子量小的新亚基条带,说明花生分离蛋白大分子量亚基对酸的敏感性高于大豆蛋白。

参考文献

- [1] 董新红,赵谋明,蒋跃明.花生蛋白改性的研究进展[J].中国粮油学报,2011,26(12):109-117

- DONG Xin-hong, ZHAO Mou-ming, JIANG Yue-ming. Progress in modification of peanut protein property [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2011, 26(12): 109-117
- [2] 杜寅.花生蛋白主要组分的制备及凝胶特性研究[D].北京:中国农业科学院
- DU Yin. Study on the preparation and gel properties of the peanut protein fractions [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences
- [3] Monteiro P V, Prakash V. Effect of proteases on arachin, conarachin I, and conarachin II from peanut (*Arachis hypogaea L.*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(2): 268-273
- [4] Kristinsson H G, Hultin H O. Changes in conformation and subunit assembly of cod myosin at low and high pH and after subsequent refolding [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(24): 7187-7196
- [5] Matsudomi N, Sasaki T, Kato A, et al. Conformational changes and functional properties of acid-modified soy protein [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1985, 49(5): 1251-1256
- [6] 蒋将.pH 偏移处理诱导熔球态大豆蛋白的结构变化及功能性质的改善[D].无锡:江南大学,2011
- JIANG Jiang. pH-shifting induced structural changes and functionality enhancements of soy proteins in molten globule state [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011
- [7] 源博恩.亚基解离与重聚集对大豆蛋白结构和功能特性的影响[D].广州:华南理工大学,2012
- YUAN Bo-en. Effect of subunits dissociation and aggregation on structure and functional properties of soy protein [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012
- [8] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685
- [9] Studies on the cold-insoluble fraction of the water-extractable soybean proteins. II. Factors influencing conformation changes in the 11S component
- [10] 曾卫国.花生蛋白溶解性和乳化性的研究[J].农产品加工. 学刊,2005(1):16-18
- ZENG Wei-guo. Study on solubility and emulsibility of peanut protein [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2005, 1: 16-18
- [11] Catsimpoalas N, Campbell T G, Meyer E W. Association-dissociation phenomena in glycinin [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1969, 131(2): 577-586
- [12] Schultz J, Allison H, Grice M. Specificity of the cleavage of proteins by dilute acid. I. release of aspartic acid from insulin, ribonuclease, and glucagon [J]. Biochemistry, 1962, 1(4): 694-698
- [13] Filius J D, Lumsdon D G, Meeussen J C L, et al. Adsorption of fulvic acid on goethite [J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2000, 64(1): 51-60
- [14] Tang C H, Wang X S, Yang X Q. Enzymatic hydrolysis of hemp (*Cannabis sativa L.*) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1484-1490