

芡实谷蛋白的结构及热力学性质研究

黎卫¹, 毛健¹, 齐斌^{1,2}

(1. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122) (2. 常熟理工学院生物与食品工程学院, 江苏常熟 215500)

摘要: 采用 Osborne 分级法制备芡实谷蛋白, 并采用还原与非还原聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、示差扫描量热仪 (DSC) 和傅里叶红外光谱 (FT-IR) 分别对芡实谷蛋白亚基分子量、热学性质以及二级结构作初步研究。结果表明: 芡实谷蛋白主要含有 6 个亚基, 大部分高分子量的多肽链以分子间或分子内二硫键连接; 在等电点 (pH=5.0) 时, 芡实谷蛋白的变性温度和变性焓最高; 在 pH=9.0 溶液中变性温度和变性焓最低; 随着盐浓度的升高, 芡实谷蛋白的变性温度显著升高, 而变性焓变化不显著, 表明有更高热稳定性的结构出现; 芡实谷蛋白中主要为有序结构, 二级结构中 β 折叠所占比例最高, 比例为 31.16%。研究表明芡实谷蛋白含丰富的二硫键, 有较强的热稳定性, 结构较稳定, 可为后续研究芡实谷蛋白的功能特性以及应用提供理论依据。

关键词: 芡实; 谷蛋白; 示差扫描量热仪; 傅里叶红外光谱

文章编号: 1673-9078(2015)10-129-133

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.022

Structure and Thermal Properties of Glutelin from *Euryale ferox* Seeds

LI Wei¹, MAO Jian¹, QI Bin^{1,2}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

(2. College of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract: The Osborne procedure was used to extract glutelin from *Euryale ferox*, and the subunit molecular weight, thermal properties, and secondary structures of glutelin were preliminarily studied using reducing and non-reducing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), differential scanning calorimetry (DSC), and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), respectively. The results showed that *E. ferox* glutelin mainly contained six subunits, and most of the high-molecular-weight polypeptide chains were connected through intermolecular or intramolecular disulfide bonds. The highest denaturation enthalpy (ΔH) and temperature (T_d) of *E. ferox* glutelin were observed at the isoelectric pH (pH 5.0), while the lowest ΔH and T_d were observed at an alkaline pH (pH 9.0). The progressive increase in the T_d of *E. ferox* glutelin and no pronounced changes in the ΔH were observed with increasing salt concentrations, suggesting salt-induced formation of a conformation with higher thermal stability for *E. ferox* glutelin. FTIR analysis indicated that the main structure of *E. ferox* glutelin was ordered, and the proportion of β -sheet (31.16%) was the highest in the secondary structures. The present results indicate that *E. ferox* glutelin has numerous disulfide bonds, good thermal stability, and a stable structure. These results provide a theoretical basis for future studies of the functional characteristics and application of *E. ferox* glutelin.

Key words: *Euryale ferox*; glutelin; differential scanning calorimetry (DSC); Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

芡实 (*Euryale ferox*), 又名鸡头米、鸡头莲, 是传统的中药材和珍贵的天然补品, 具有药食同源性, 素有“水中人参”和“水中桂圆”的美誉。芡实主要分布在东亚、南亚及东南亚等温带及亚热带区^[1]。芡实中含有丰富的蛋白质, 其蛋白质含量与金针菜、银耳、木耳等相当^[2]。芡实不仅营养丰富, 而且还有养血安神、益肾滋阴等食疗功效, 在食品保健与医药领域具

收稿日期: 2015-01-12

基金项目: 国家“863”计划项目 (2013AA102203-03)

作者简介: 黎卫 (1990-), 女, 在读研究生, 研究方向: 粮食油脂与植物蛋白工程

通讯作者: 齐斌 (1965-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 粮食油脂与植物蛋白工程

有广阔的应用前景。

国内外关于芡实蛋白的研究较少, 主要集中在芡实蛋白的营养价值^[2-4]、凝胶性及流变特性^[5]等方面。本实验室利用 Osborne 分级法, 对芡实蛋白中清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白的含量组成进行分析, 研究发现谷蛋白含量最高。

目前, 国内外关于谷蛋白的研究主要集中在米糠^[6-8]、小麦^[9-11]等农作物, 主要研究米糠谷蛋白的结构与功能特性的关系, 小麦谷蛋白的结构变化对面团性能的影响。Wang 等^[12]研究指出, 米糠谷蛋白分子是由多肽链彼此通过二硫键连接而成, 链内或链间通过氢键及疏水作用等聚集成致密分子, 形成大分子蛋白质聚合物, 导致其溶解度较低, 限制了米糠谷蛋白在

液态食品及饮料中的应用。李学红等^[9]发现冻藏处理后的麦谷蛋白二硫键、 α -螺旋和 β -转角结构含量的减少,对冻藏后面团的性能有重要影响。目前,关于芡实谷蛋白的结构及其功能特性的研究未见报道,由于蛋白质的功能特性与其结构关系密切,食品加工会不同程度的改变蛋白质的结构,影响食品蛋白质的功能特性,且蛋白质变性是最常见的变化之一。因此,研究芡实谷蛋白的结构及热学性质,可为后续研究芡实谷蛋白的功能特性以及扩大其应用范围提供理论基础。

本试验通过还原与非还原 SDS-PAGE 凝胶电泳对芡实谷蛋白中亚基分子量以及二硫键分布情况进行分析,利用 DSC 研究了芡实谷蛋白在不同 pH 以及不同盐浓度下的热学性质,采用 FTIR 分析芡实谷蛋白的二级结构分布,为进一步开发利用芡实谷蛋白提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

芡实:购于苏州创德兴芡实有限公司;SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒:碧云天生物技术研究所;其他试剂:均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;所用水为蒸馏水。

水浴恒温振荡器:SHZ-28A,太仓市华美生化仪器厂;高速冷冻离心机:CR22G II,日本 HITACHI 公司;紫外可见分光光度计:UVmini-1240,日本 SHIMADZU 公司;冷冻干燥机:Alpha 1-2 LD plus,德国 CHRIST 公司;pH 计:Seven Easy S20K,瑞士 METTLER TOLEDO 公司;分析天平:XS105 DualRange,瑞士 METTLER TOLEDO 公司;电泳仪:Mini-PROTEAN Tetra,美国 Bio-Rad 伯乐公司;综合热分析仪:STA449F3C,德国 Netzsch 公司;傅里叶红外光谱仪:NICOLET IS10,美国热电 Thermo 公司。

1.2 方法

1.2.1 芡实谷蛋白的制备

参考米糠谷蛋白^[8]提取方法,略作改动。称取 10.0 g 芡实粉,依次用 10 倍体积的水、0.1 mol/L NaCl 溶液和 70%乙醇溶液提取芡实清蛋白、球蛋白和醇溶蛋白组分,重复提取两次,12000 r/min,4 °C 离心 20min 去除上清液后,收集沉淀,洗涤 2 次,加入 NaOH 溶液搅拌,提取谷蛋白。重复提取两次,将上清液混合,用 1 mol/L 的 HCl 调至其等电点 5.0,离心(12000 r/min、20 min、4 °C),沉淀用 1:2 (m/V) 水洗涤两次。

沉淀加水溶解,用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0,4 °C 透析 48 h 脱盐。脱盐后的蛋白溶液冷冻干燥。冷冻干燥后的样品即为芡实谷蛋白。每组试验重复三次,取平均值。采用凯氏定氮法测定芡实谷蛋白的蛋白含量(蛋白含量为 94.46% (干基))。

1.2.2 芡实谷蛋白的 SDS-PAGE 电泳

参照 Laemmli^[13]的方法,并加以改进。取芡实谷蛋白粉 2 mg,加入 1 mL 上样 Buffer,还原电泳中上样缓冲液含巯基乙醇量为 2%,100 °C 煮沸 5 min 后,取 15 μ L 上样,采用 5%浓缩胶及 12%分离胶进行不连续垂直电泳,浓缩胶电压为 70 V,分离胶电压为 100 V,待溴酚蓝条带移动到距离分离胶下边缘 1 cm 左右时关闭电源,结束电泳,凝胶进行考马斯亮蓝 G-250 染色,脱色后拍照保存。

1.2.3 芡实谷蛋白 DSC 测定

参考 Meng GT^[14]的方法稍作改变。取 5 mg 左右的芡实谷蛋白,溶于 50 μ L 0.01 mol/L 的不同 pH 的磷酸缓冲液或不同浓度的 NaCl 溶液中,准确称取 5 mg 左右的样品于铝盘中,密封铝盘,以空铝盘作参比,从 40 °C 加热至 140 °C,升温速率为 5 °C/min。试验重复三次。

1.2.4 芡实谷蛋白 FT-IR 测定

采用溴化钾压片法:将芡实谷蛋白 1 mg 与 100 mg KBr 混匀,压制成片,光谱扫描范围为 500~4000 cm^{-1} ,分辨率为 4 cm^{-1} 。

图谱处理:取 1700~1600 cm^{-1} 的酰胺 I 带图谱,用 PeakFit v4.12 软件进行分析。对曲线依次进行平滑、基线校正、Gaussian 去卷积、二阶导数拟合等数据处理。

1.2.5 数据分析

采用 Origin 8.6 和 SPSS 软件对数据进行作图和统计分析。

2 结果与分析

2.1 芡实谷蛋白的 SDS-PAGE 分析

由图 1 泳道 1 可看出,芡实谷蛋白分子量分布较广,主要有 7 个条带,分子量由大到小分别为 120 ku、112 ku、74 ku、65 ku、55 ku、49 ku、15 ku。在还原条件下,芡实蛋白中的二硫键被破坏,部分芡实蛋白大分子变为小分子。由图 1 泳道 2 可知,还原条件下芡实谷蛋白主要有 6 个亚基,分子量由大到小分别为 74 ku、65 ku、58 ku、49 ku、33 ku、15 ku。对比还原与非还原电泳,芡实谷蛋白经还原后,120 ku、112 ku、55 ku 条带消失,65 ku 条带颜色明显减弱,另外新出

现了 58 ku、33 ku 条带, 其中 58 ku 条带分布范围较宽, 包括 56 ku 到 60 ku 的亚基。因此, 可以推测, 120 ku、112 ku、65 ku 条带分别是由两个 60 ku、56 ku、33 ku 条带以二硫键连接构成的。而 55 ku 条带中可能有分子内二硫键, 谷蛋白经还原后, 二硫键打开, 表观分子质量增大, 还原后为 60 ku 左右。这在 Diana Gazzola^[15]等研究的葡萄籽胚乳球蛋白中也出现类似情况。这说明芡实谷蛋白中大部分高分子量的多肽链以分子内或分子间二硫键存在, 结构较稳定。

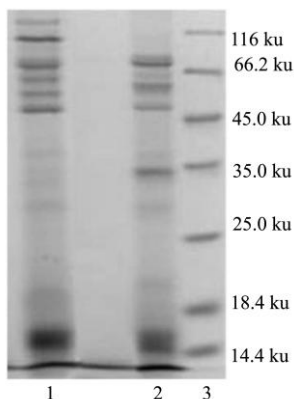


图 1 芡实谷蛋白 SDS-PAGE 电泳

Fig.1 SDS-PAGE profiles of *Euryale ferox* glutelin

注: 1: 非还原; 2: 还原; 3: marker。

2.2 芡实谷蛋白的热变性分析

2.2.1 不同 pH 对芡实谷蛋白热变性的影响

由图 2 和表 1 可看出, 芡实谷蛋白的变性温度较高, 最低为 85.5 ± 0.2 °C, 比 Adebisi^[16]研究的米糠谷蛋白的变性温度($T_d=75.4 \pm 0.2$ °C)要高, 说明芡实谷蛋白比米糠谷蛋白更稳定。芡实谷蛋白的变性温度随着 pH (5.0~9.0) 升高而降低, 在 pH 为 5.0 处, 变性温度最高 (93.4 ± 0.2 °C), 在西瓜籽谷蛋白^[17]中也出现类似情况。这是由于谷蛋白等电点在 5.0 左右, 蛋白质在等电点附近 (5.0 和 7.0) 时, 蛋白质所带净电荷少, 净静电排斥能量小于其它稳定谷蛋白质的相互作用的能量, 谷蛋白较稳定, 从而其变性温度较高^[14]。而在强碱性 pH 条件下, 部分埋藏在芡实谷蛋白分子内部羧基、酚羟基和巯基离子化, 这些离子化基团暴露于水环境中, 造成多肽链的散开, 因此其变性温度较低。

由图 2 和表 1 可知, 芡实谷蛋白的变性焓随着 pH (5.0~9.0) 升高而降低, 在 pH 为 5.0 处, 变性焓值最大 (11.37 ± 0.01 J/g)。蛋白质的焓值越低, 其有序结构所占比例越低, 分子相对伸展, 分子内部疏水性残基暴露较多^[18]。pH 为 9.0 时, 芡实谷蛋白所带净电荷比 pH 为 5.0 和 7.0 条件下的要多, 较强的静电排斥力促使蛋白质分子伸展, 使蛋白发生部分变性, 因此其变

性焓较小。

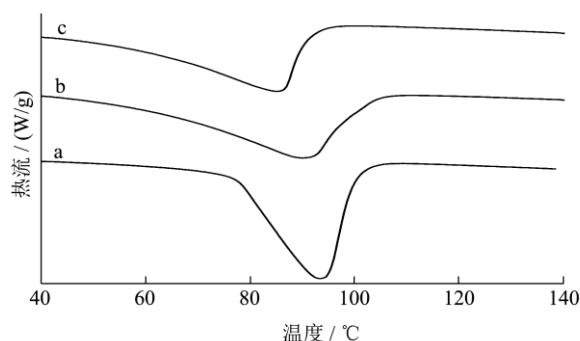


图 2 不同 pH 对芡实谷蛋白热变性的影响

Fig.2 Effect of different pH conditions on thermal denaturation of *Euryale ferox* glutelin

注: a: pH 5.0; b: pH 7.0; c: pH 9.0。

表 1 不同 pH 条件对芡实谷蛋白 T_d 和 ΔH 的影响

Table 1 Effect of different pH conditions on T_d and ΔH of *Euryale ferox* glutelin

因素	pH		
	5.0	7.0	9.0
$T_d/^\circ\text{C}$	93.4 ± 0.2^a	90.6 ± 0.1^b	85.5 ± 0.2^c
$\Delta H/(\text{J/g})$	11.37 ± 0.01^a	10.37 ± 0.02^b	9.36 ± 0.01^c

注: 采用 Duncan's multiple range test 方法分析, 同一行不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$, $n=3$)。

2.2.2 不同 NaCl 浓度对芡实谷蛋白热变性的影响

由图 3 和表 2 可看出, 随着 NaCl 浓度的升高, 芡实谷蛋白的主要组分和次要组分变性温度 T_d 值显著增加, 表明 NaCl 溶液对芡实谷蛋白具有稳定作用。在低 NaCl 浓度 (< 1.0 mol/L) 时, 离子通过非特异性静电作用与芡实谷蛋白质作用, 促进芡实谷蛋白质的水合作用, 从而使蛋白质变性所需的能量更多, 故其变性温度较高。在高 NaCl 浓度 (> 1.0 mol/L) 时, 芡实谷蛋白的变性温度升高, 这是由于 NaCl 与芡实谷蛋白分子骨架及侧链上的基团竞争形成氢键, 而使芡实谷蛋白发生了盐析, 从而溶解度降低, 导致芡实谷蛋白沉淀或聚集。

由表 2 可知, 随着 NaCl 浓度的升高, 芡实谷蛋白的变性焓无明显变化, 说明 NaCl 对芡实谷蛋白的结构无显著影响。Meng G T 等在研究红豆球蛋白中也有类似情况出现^[14]。对比图 3 中的 b 和 c 可知, 随着 NaCl 浓度的升高, 主要组分和次要组分的吸热峰的分辨率增加。此现象在红豆球蛋白中也有报道^[14]。在图 a 中未观察到次要组分的吸热峰, 这可能是在低 NaCl 浓度下, 吸收峰焓值较小, 又与主要组分吸收峰位置较近, 所以未能表现出来。

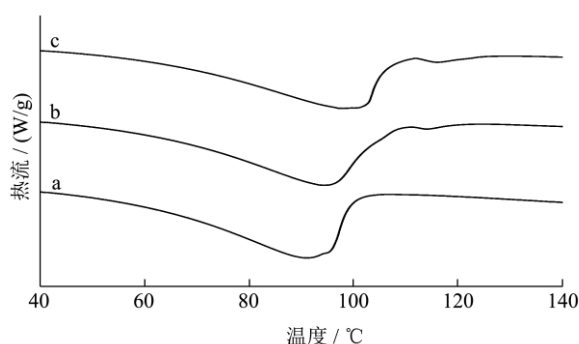


图3 不同盐浓度对芡实谷蛋白热变性的影响

Fig.3 Effect of different salt concentrations on thermal denaturation of *Euryale ferox glutelin*

注: a: 0.5 mol/L NaCl; b: 1.0 mol/L NaCl; c: 1.5 mol/L NaCl.

表2 不同盐浓度对芡实谷蛋白 T_d 和 ΔH 的影响

Table 2 Effect of different salt concentrations on T_d and ΔH of

因素	<i>Euryale ferox glutelin</i>		
	盐浓度/(mol/L)		
	0.5	1.0	1.5
$T_d/^\circ\text{C}$	92.1 ± 0.1^c	95.5 ± 0.2^b	114.1 ± 0.1^b
$\Delta H/(\text{J/g})$	5.46 ± 0.01^a	5.46 ± 0.01^a	0.07 ± 0.01^a

注: 采用 Duncan's multiple range test 方法分析, 同一行不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$, $n=3$).

2.3 芡实谷蛋白的红外光谱分析

由图4可知, 在 3421 cm^{-1} 有强而宽的吸收峰, 对应的是蛋白质的 O-H 和 N-H 的伸缩振动, 表明有分子间或分子内氢键形成。 2928 cm^{-1} 处有吸收, 是烷烃的 C-H 伸缩振动。 1400 cm^{-1} 的吸收峰为 C-N 伸展, 1036 cm^{-1} 左右的吸收峰可能是芡实谷蛋白中的 C-C、C-O、C-OH 等基团的振动。蛋白质红外光谱图上的特征吸收主要分为三组: $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 、 $1580\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ 以及 $1340\sim 1220\text{ cm}^{-1}$, 分别对应的蛋白质的酰胺 I 带 (C=O 伸缩振动)、酰胺 II 带 (C-N 伸缩振动和 N-H 变形)、酰胺 III 带 (C-N 伸缩振动)。酰胺 I 带的吸收峰一般能反应蛋白质的二级结构, 本试验重点分析酰胺 I 带, 研究芡实谷蛋白中各二级结构所占比例, 其对应关系如下: β 折叠 ($1615\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ 和 $1689\sim 1698\text{ cm}^{-1}$), 无规卷曲 ($1641\sim 1649\text{ cm}^{-1}$), α 螺旋 ($1650\sim 1659\text{ cm}^{-1}$), β 转角 ($1660\sim 1688\text{ cm}^{-1}$)。^[11, 19, 20]

运用 PeakFit v4.12 软件对 $1700\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ 图谱进行拟合, 结果如表3, 可知芡实谷蛋白中 β 折叠所占比例最高 (31.16%), 其次是 β 转角 (23.29%), α 螺旋 (22.86%) 和无规卷曲 (22.69%)。其中 α 螺旋和 β

折叠的总和为 54.02%。Choi S M^[21]报道 α 螺旋和 β 折叠是比较有序的蛋白结构, 具有较高的稳定性, β 转角和无规卷曲是无序结构。这就说明芡实谷蛋白中主要为有序结构, 结构较稳定。

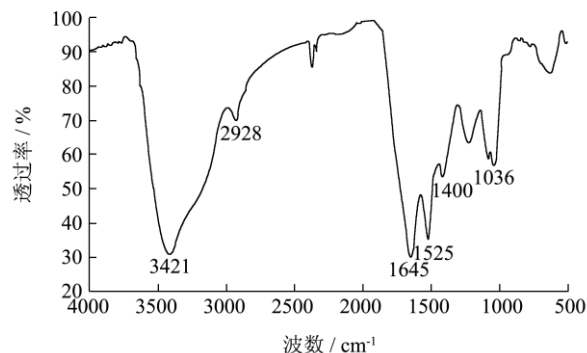


图4 芡实谷蛋白的 FT-IR 图谱

Fig.4 FT-IR spectra of *Euryale ferox glutelin*

表3 芡实谷蛋白二级结构的比例

Table 3 Proportion of secondary structures of *Euryale ferox glutelin*

二级结构	β 折叠	无规卷曲	α 螺旋	β 转角
峰位置/ cm^{-1}	1618	1631	1644	1656
面积/%	11.46	19.70	22.69	22.86
各二级结构比例/%	31.16	22.69	22.86	23.29

3 结论

本试验研究结果表明: 芡实谷蛋白主要含有 6 个亚基, 大部分高分子量的多肽链以分子间或分子内二硫键连接; 在其等电点 ($\text{pH}=5.0$) 时, 变性温度和变性焓最高; 在 pH 为 9.0 时, 变性温度和变性焓最低, 可能是芡实谷蛋白发生部分变性, 导致热稳定性降低。随着盐浓度的增加, 芡实谷蛋白的变性温度显著升高, 而变性焓变化不显著, 表明有更高热稳定性的结构出现。而芡实谷蛋白中主要为有序结构, 二级结构中 β 折叠所占比例最高。实验结果表明芡实谷蛋白含丰富的二硫键, 有较强的热稳定性, 结构较稳定, 这可为进一步研究芡实谷蛋白的结构与功能特性之间的关系提供理论参考, 为开发利用芡实谷蛋白提供科学依据。

参考文献

[1] Jha V, Barat GK, Jha UN. Nutritional evaluation of *Euryale ferox salisb.* (Makhana) [J]. Journal of Food Science and Technology, 1991, 28(5): 326-328
 [2] 张余, 张国权, 郑建梅, 等. 安徽芡实营养特性分析 [J]. 中国食品添加剂, 2010, 2: 206-209
 ZHANG Cuan, ZHANG Guo-quan, ZHENG Jian-mei, et al.

- Analysis of Nutritional Constitutes in Gorgon Nut (*Euryale Ferox* Sails) from Anhui [J]. *China Food Additives*, 2010, 2: 206-209
- [3] Alfasane MA, Khondker M, Begum ZT, et al. Fruit production and biochemical aspects of seeds of *Euryale ferox* Salisb. under ex-situ conditions [J]. *Bangladesh Journal of Botany*, 2008, 37(2): 179-181
- [4] Jha V, Kargupta AN, Dutta RN, et al. Utilization and conservation of *Euryale ferox* Salisbury in Mathila (North Bihar), India [J]. *Aquatic Botany*, 1991, 39(3): 295-314
- [5] 周香云,程琦,李春云,等. 芡实分离蛋白的凝胶特性及流变特性[J]. *食品科学*, 2011, (15): 144-147
ZHOU Xiang-yun, CHENG Qi, LI Chun-yun, et al. Gelation characteristics and rheological behavior of *Semen Euryale* protein isolate [J]. *Food Science*, 2011, (15): 144-147
- [6] Fabian C, Ju YH. A review on rice bran protein: its properties and extraction methods [J]. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2011, 51(9): 816-827
- [7] Adebisi AP, Adebisi AO, Hasegawa Y, et al. Isolation and characterization of protein fractions from deoiled rice bran [J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 228(3): 391-401
- [8] 王长远,许凤. 米糠谷蛋白提取工艺的优化及其亚基组成分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 7: 940-944
ZHANG Chang-yuan, XU Feng. Optimization of extraction procedure and analysis of subunit component of rice bran glutelin [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2014, 7: 940-944
- [9] 李学红,胡钟毓,陆勇,等. 冻藏时间对麦谷蛋白和麦醇溶蛋白二级结构及面团性能的影响研究[J]. *食品工业科技*, 2014, 1: 83-86
LI Xue-hong, HU Zhong-yu, LU Yong, et al. Effect of the time of frozen on secondary structure of glutenin and gliadin and textural properties of dough [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 1: 83-86
- [10] 王若兰,刘晓林,赵妍,等. 储藏微环境对小麦中蛋白质含量变化规律的影响[J]. *现代食品科技*, 2014, 6: 47-51
WANG Ruo-lan, LIU Xiao-lin, ZHAO Yan, et al. Effect of storage microenvironment on the variation of wheat protein [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 6: 47-51
- [11] Mejri M, Rogé B, Bensouissi A, et al. Effects of some additives on wheat gluten solubility: A structural approach [J]. *Food chemistry*, 2005, 92(1): 7-15
- [12] Wang M, Hettiarachchy NS, Qi M, et al. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(2): 411-416
- [13] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685
- [14] Meng GT, Ma CY. Thermal properties of *Phaseolus angularis* (red bean) globulin [J]. *Food Chemistry*, 2001, 73(4): 453-460
- [15] Gazzola D, Vincenzi S, Gastaldon L, et al. The proteins of the grape (*Vitis vinifera* L.) seed endosperm: Fractionation and identification of the major components [J]. *Food Chemistry*, 2014, 155: 132-139
- [16] Adebisi AP, Adebisi AO, Hasegawa Y, et al. Isolation and characterization of protein fractions from deoiled rice bran [J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 228(3): 391-401
- [17] Wani AA, Sogi DS, Singh P, et al. Characterisation and functional properties of watermelon (*Citrullus lanatus*) seed proteins [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2011, 91(1): 113-121
- [18] 吴海波,齐宝坤,江连洲,等. 大豆分离蛋白热性质及其空间构象对表面疏水性的影响[J]. *中国粮油学报*, 2014, 10: 42-46
HU Hai-bo, QI Bao-kun, JIANG Lian-zhou, et al. Effect of thermal properties and spatial conformation of soybean protein isolate on surface hydrophobicity [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2014, 10: 42-46
- [19] Achouri A, Nail V, Boye JI. Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties [J]. *Food Research International*, 2012, 46(1): 360-369
- [20] Kudre TG, Benjakul S, Kishimura H. Comparative study on chemical compositions and properties of protein isolates from mung bean, black bean and bambara groundnut [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(10): 2429-2436
- [21] Choi S, Ma C. Structural characterization of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) using circular dichroism and Raman spectroscopy [J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(1): 150-160