

# 变性剂对橡胶籽中 $\beta$ -葡萄糖苷酶结构及酶活的影响

刘宇, 刘畅, 刘石生

(海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 海南大学食品学院, 海南海口 570228)

**摘要:** 本文以橡胶籽蛋白溶液为原料, 分离得到提取  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 研究了不同浓度的变性剂对  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活的影响, 并通用激光粒径分析和分子荧光光谱分析等方法研究了变性剂对酶的空间结构的影响。结果表明:  $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活随变性剂浓度的增加大体上呈现下降趋势, 温度的增加会加速下降的速度。通过对  $\beta$ -葡萄糖苷酶的空间结构分析发现尿素变性酶后, 酶溶液的分子粒径变小, 推断为  $\beta$ -葡萄糖苷酶的多聚体结构发生解聚。低浓度尿素在 1 h 时间内对  $\beta$ -葡萄糖苷酶有激活作用, 酶活力明显提高, 表明酶的空间结构变化与尿素浓度大小有关。通过分子荧光光谱分析发现随酶溶液中尿素浓度增加, 荧光峰位红移, 表明色氨酸残基不断暴露, 蛋白质分子结构不断展开。本研究为进一步开发利用橡胶籽中  $\beta$ -葡萄糖苷酶提供了实验依据。

**关键词:** 橡胶籽;  $\beta$ -葡萄糖苷酶; 变性特点; 尿素

文章编号: 1673-9078(2016)12-120-124

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.019

## Effect of Denaturants on the Structure and Enzyme Activity of $\beta$ -Glucosidase from Rubber Seeds

LIU Yu, LIU Chang, LIU Shi-sheng

(Key Laboratory of Tropical Biological Resources of Ministry of Education, College of Food Science, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:**  $\beta$ -Glucosidase extract was separated from a rubber seed protein solution to study the effect of different concentrations of denaturants on  $\beta$ -glucosidase activity, and laser particle size analysis and molecular fluorescence spectroscopy were used to study the effect of denaturants on the spatial structure of  $\beta$ -glucosidase.  $\beta$ -Glucosidase activity showed a declining trend with increased denaturant concentration, and increased temperature accelerated the pace of this decline. Analysis of the spatial structure of  $\beta$ -glucosidase showed that the molecular particle size in the enzyme solution decreased after the enzyme was denatured by urea, implying that the polymeric structure of  $\beta$ -glucosidase was depolymerized.  $\beta$ -Glucosidase could be activated at a low urea concentration within one hour, and enzyme activity improved significantly, which shows that the spatial structure changes of the enzyme were related to urea concentration. Analysis of fluorescence spectra showed that the location of the fluorescence peak moved with increased urea concentration in the enzyme solution, indicating that tryptophan residues were continuously exposed and the protein structure was continuously opened.

**Key words:** rubber seed;  $\beta$ -glucosidase; the characteristics of degeneration; urea

$\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -Glucosidase, EC 3.2.1.21) 可以水解结合于末端的非还原性  $\beta$ -D-葡萄糖苷键, 释放相应的配基和葡萄糖。 $\beta$ -葡萄糖苷酶在纤维素降解、食品增香、功能性食品生产及脱除氰苷物质等方面有广泛的应用<sup>[1]</sup>。橡胶籽中  $\beta$ -葡萄糖苷酶可以水解大豆异黄酮而得到更具生物活性的苷元, 还可以作为外源酶

收稿日期: 2015-10-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31460407); 海南大学青年基金项目 (qnjj1228)

作者简介: 刘宇 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品蛋白质资源开发与利用

通讯作者: 刘石生 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然植物资源开发与利用

添加在酿酒或果汁加工过程中, 催化香气前体物质的转化。橡胶籽中  $\beta$ -葡萄糖苷酶具有特异性降解生氰糖苷的能力, 因此可使用酶解法脱除植物中氰苷物质<sup>[2]</sup>。

尿素是常用的蛋白变性剂, 能够和各种极性氨基酸残基的侧链, 以及肽键中羰基和亚氨基形成氢键, 使酶蛋白肽链伸展而导致蛋白质变性<sup>[3]</sup>。对于不同的酶蛋白, 引起其变性失活所需的变性剂浓度也不相同<sup>[4]</sup>。研究  $\beta$ -葡萄糖苷酶在变性剂-水混合溶剂中构象变化, 有助于了解酶蛋白失活过程中构象变化的机理<sup>[5,6]</sup>。低浓度变性剂对一些酶蛋白酶活有激活作用, 可能由于酶蛋白的活性部位构象发生变化, 催化区域成为一种开放式的结构。变性剂影响酶蛋白的研究发现, 尿素和盐酸胍对多聚半乳糖醛酸酶有激活作用, 当起

最大激活作用时,酶活性分别是处理前的 257.79%和 157.64%<sup>[7]</sup>。林轮辉等<sup>[8]</sup>发现低浓度的盐酸胍对碱性磷酸酶有激活作用。焦铭等<sup>[9]</sup>的研究表明,低浓度的尿素和盐酸胍对过氧化氢酶既有稳定作用又有激活作用。

天然条件下橡胶籽中 $\beta$ -葡萄糖苷酶以多聚体形式存在,它会在外界环境的影响下发生解离现象<sup>[10]</sup>。通过内源荧光光谱、紫外吸收、激光粒径和检测酶活变化等方法可以获得变性剂诱导酶蛋白解离并去折叠的变化规律<sup>[11,12]</sup>。蛋白质分子中有内源的生色基团,除黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)外,其荧光性是由色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸引起。由于这三种氨基酸的侧链为疏水性,在蛋白中主要分布于内核的疏水区域,在变性条件下会逐渐暴露并引起荧光谱的变化。荧光光谱的灵敏度很高,可以判断蛋白质生色团微环境极性是否改变<sup>[13,14]</sup>。激光粒径分析是利用蛋白质分子对光的散射现象测量蛋白质的粒径及其分布。李向荣等研究了牛血红蛋白在尿素环境下构象发生变化的规律,发现尿素达到 6 M 以上时,牛血红蛋白结构完全展开,暴露出原来位于结构内部的基团<sup>[15]</sup>。

李斐然等研究了橡胶籽 $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶学性质及分离纯化方法<sup>[2]</sup>。田维敏等通过免疫胶体金技术对橡胶籽 $\beta$ -葡萄糖苷酶进行了亚细胞定位<sup>[16]</sup>。在实际应用中纯化后的酶容易受外界因素的影响,发生构象变化而活性下降。对橡胶籽中 $\beta$ -葡萄糖苷酶在变性过程中空间构象及酶活变化的研究,有利于了解其酶学性质,同时对酶的化学修饰有一定指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

橡胶籽,采自海南省儋州;对硝基苯- $\beta$ -D-葡萄糖苷、凝胶 Sephadex-G 200(分析纯):美国 sigma 公司;尿素(分析纯):广州化学试剂厂。

### 1.2 仪器与设备

TU-1901 型紫外-可见分光光度计:北京普析通用仪器有限公司;PHS-3C 型 pH 计:上海雷磁仪器厂;F-7000 型分子荧光光谱仪:日本日立公司;Zetasizer Nano S90 型激光粒度和 zeta 电位分析仪:英国马尔文仪器有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 $\beta$ -葡萄糖苷酶的制备

将橡胶籽外壳敲除,种仁磨碎成粉,用适量丙酮

冲洗抽滤挥干后制成干粉。待干粉中丙酮完全挥发后,称取一定质量的干粉加蒸馏水均质,均质后 6000 r/min 离心 20 min,取上清液加入等体积预冷的丙酮产生沉淀,待沉淀中丙酮挥发后重新溶解,再次以 6000 r/min 离心 20 min,取上清液得到粗酶溶液,4 °C 保存备用。

#### 1.3.2 $\beta$ -葡萄糖苷酶的分离纯化

用适当浓度盐酸溶液调粗酶液 pH 值为 5,静置 2 h 后 8000 r/min 离心 10 min,取上清液透析浓缩,得到初步纯化的酶液。然后按照常规方法处理的 Sephadex-G 200 装入层析柱进行纯化,洗脱后分管收集活性组分,透析浓缩。将收集得到的酶液使用非变性电泳法分离纯化,用切胶的方法回收酶蛋白。

#### 1.3.3 $\beta$ -葡萄糖苷酶的活力测定

酶活力单位(U)定义:以对硝基苯- $\beta$ -D-葡萄糖苷为底物,在一定分析反应条件下,1 min 生成 1  $\mu$ mol 对硝基苯酚所需要的酶量。测定方法如下:向 10 mL 比色管中加入 0.1 mL 适当稀释的酶液或适当质量的固定化酶,同时加入 0.3 mL、pH=6.0 的磷酸盐缓冲溶液和 0.1 mL、10 mmol/L p-NPG,42 °C 下水浴保温 30 min,取出后立即加 1 mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 终止其反应,加蒸馏水至 5 mL,于 400 nm 下测定吸光度。空白对照采用 0.1 mL 蒸馏水代替酶液进行操作。

#### 1.3.4 变性剂对 $\beta$ -葡萄糖苷酶的影响

将纯化后的酶溶液加入一定质量尿素,配制成 0.5 M、1 M、2 M、4 M、6 M 和 8 M 六种不同尿素浓度的酶蛋白溶液(以不含尿素的酶溶液为对照),分别在 50 °C、55 °C、60 °C、65 °C 和 70 °C 下水浴 30 min,在常温下静置 2 h 后测定蛋白含量及酶活力,并计算比活力。

配置浓度分别为 0.125 M、0.25 M、0.5 M、1 M、2 M 和 4 M 六种不同尿素浓度的酶蛋白溶液,在 55 °C 下水浴 30 min,分别在 0 min、20 min、40 min、60 min 和 120 min 测定其酶活力,绘制酶活变化图,观察低浓度变性剂环境下 $\beta$ -葡萄糖苷酶的酶活随时间变化趋势。

#### 1.3.5 $\beta$ -葡萄糖苷酶的激光纳米粒径分析

将电泳纯化后的酶溶液经 3000 g/min 离心 10 min 后取上清用 0.45  $\mu$ m 的醋酸纤维素膜过滤,得到酶蛋白溶液。取部分酶溶液加入一定量尿素,使尿素浓度达到 6 M,55 °C 下水浴 30 min 后静置 2 h,进行激光纳米粒径分析,以未加尿素和水浴处理的酶蛋白溶液作为对比。

激光粒度分析参数设定:粒度检测角度 90 度,光源为 4 mW He-Ne,波长 633 nm,粒度测量范围为

0.3~1000 nm。

### 1.3.6 $\beta$ -葡萄糖苷酶的内源性荧光光谱分析

将纯化后的酶溶液加入一定质量尿素，配制成为 0.5 M、1 M、2 M、3 M、4 M、6 M 和 8 M 不同尿素浓度的酶蛋白溶液（以不含尿素的酶溶液为对照），在 55 °C 下水浴 30 min，常温下静置 2 h 后，分别取 4 mL 溶液在标准石英比色皿中，进行内源性荧光测定。

分子荧光光谱仪参数设置为：激发波长为 280 nm，分辨率 1.0 nm，测量波长范围为 250 nm 到 500 nm，其它参数设为默认值。

### 1.3.7 数据统计分析

实验中所有数据都是三次测定的平均值，数据处理采用 Microsoft Excel 软件进行标准方差分析，并在图例中用误差线表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 变性剂浓度及温度对酶活性的影响

测量不同浓度变性剂及温度对酶活影响，结果如图 1 所示。

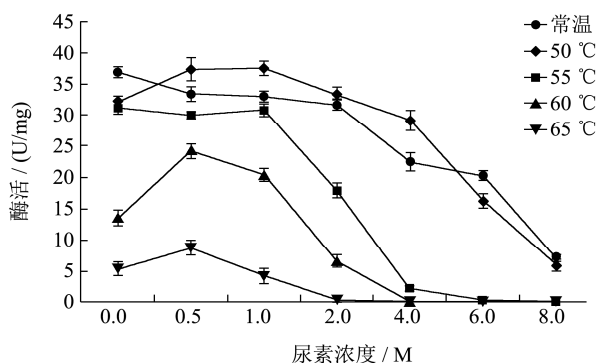


图 1 不同尿素浓度及温度对酶活的影响

Fig.1 Effect of different concentrations of urea and temperature on  $\beta$ -glucosidase activity

由图 1 可知， $\beta$ -葡萄糖苷酶比活力随尿素浓度和温度的增加大体上呈现下降趋势。在常温条件下，酶液在尿素浓度为 0 M 至 2 M 范围内变化不大，在 2 M 后随尿素浓度增长，酶比活力快速下降，当尿素浓度为 8 M 时，酶比活力只有 7.17 U/mg；在加热条件下促进了尿素变性  $\beta$ -葡萄糖苷酶这一过程，从图中 55 °C 这条曲线可以看出，酶液的比活力从尿素浓度为 1 M 时开始快速下降，在 4 M 尿素环境下比活力降至 2.2 U/mg， $\beta$ -葡萄糖苷酶基本失活；观察图中常温和 60 °C 两条曲线可看出，在低浓度尿素环境下，酶比活力有一定提高，这种现象可能与尿素作用  $\beta$ -葡萄糖苷酶的空间构象有关。

### 2.2 变性剂浓度及时间对酶活性的影响

在不同尿素浓度的条件下，在室温环境中测量  $\beta$ -葡萄糖苷酶溶液的比活力随时间的变化趋势，结果如图 2 所示。

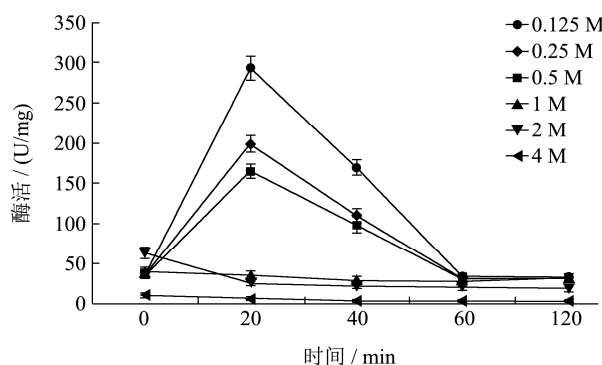


图 2 不同尿素浓度下  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活变化折线图

Fig.2  $\beta$ -glucosidase activity as a function of time in different urea concentrations

由图 2 可知，低浓度的尿素能在 1 h 时间内对  $\beta$ -葡萄糖苷酶有激活作用，并且对提高其比活力作用明显。在尿素浓度增至 0.5 M 以上时，对酶没有激活作用；低尿素浓度下在时间为 20 min 至 40 min 范围内， $\beta$ -葡萄糖苷酶比活力达到 150 U/mg 以上，将近为原活力的 5 倍左右。当尿素对酶的作用稳定后，1 h 后酶的比活力恢复到原来范围内，由此可分析，低浓度尿素对酶的激活作用是短时间内的可恢复过程，此现象可能与其改变其活性位点的构象有关，待变性作用稳定后，酶恢复原构象。这种空间结构的变化还需进一步研究。

### 2.3 $\beta$ -葡萄糖苷酶的粒径分析

已知天然条件下  $\beta$ -葡萄糖苷酶以多聚体形式存在，且尿素能够使酶变性，改变酶的空间结构，因此一定浓度变性剂会解离多聚体，使  $\beta$ -葡萄糖苷酶以亚基结构存在。通过非变性电泳切胶回收酶后，经尿素变性及未变性的酶溶液粒径分布图如图 3 和图 4 所示。

蛋白质是生物高分子化合物，一般其分子颗粒直径在 1 至 100 nm 之间，因此酶蛋白溶液是稳定的胶体溶液，具有胶体溶液的特征。在激光粒径分析中，在粒径为 100 nm 以下部分可视为酶蛋白，超过部分为杂质。由图 3 和图 4 的对比可见，变性后酶蛋白的平均粒径变小，可见  $\beta$ -葡萄糖苷酶在尿素环境下发生变性过程中，酶的活性丧失同时其空间结构发生变化，据此推测  $\beta$ -葡萄糖苷酶的多聚体结构发生解聚，分离为粒径较小的亚基结构。

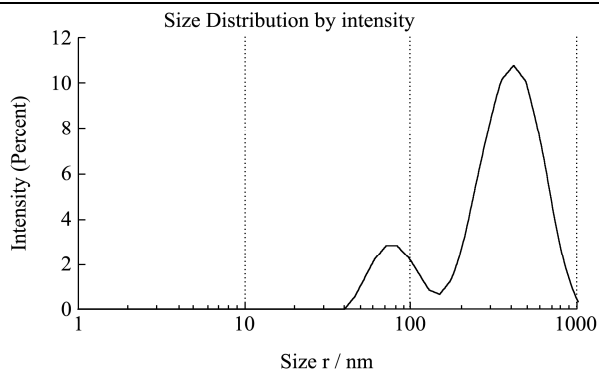


图3 未变性酶蛋白溶液的粒径分布

Fig.3 Particle size distribution of non-denatured  $\beta$ -glucosidase

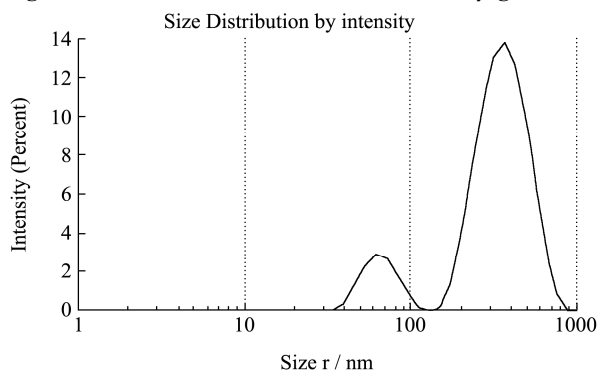


图4 尿素变性后酶蛋白的粒径分布

Fig.4 Particle size distribution of urea-denatured  $\beta$ -glucosidase

### 2.4 $\beta$ -葡萄糖苷酶的内源性荧光光谱分析

纯化后酶液在不同浓度尿素条件下, 55 °C水浴 30 min 并静置 2 h 后, 对  $\beta$ -葡萄糖苷酶液进行内源性荧光测定分析, 结果如图 5 所示。

由图 5 所示, 当尿素变性浓度分别为 0 M、0.5 M、1 M、2 M、3 M、4 M、6 M 和 8 M 时, 酶液样品的荧光峰位分别位于 335.4 nm、336.6 nm、334.8 nm、335.8 nm、340.6 nm、339.6 nm、344.6 nm 和 345.2 nm。在 0 M 至 2 M 范围内光谱的峰型变化不大并且荧光峰位保持在 335 nm 左右, 说明酶蛋白内色氨酸残基仍保留在内核中,  $\beta$ -葡萄糖苷酶在展开程度上变化不大。随尿素浓度增加, 光谱的荧光强度逐渐下降, 说明酶的结构在未展开的情况下仍有构象变化, 推测酶蛋白的疏水核发生膨胀现象, 溶质分子与荧光物质色氨酸相互作用, 导致荧光强度下降; 在尿素浓度由 2 M 增至 3 M 时, 荧光峰位向长波长方向移动较大距离, 说明色氨酸残基暴露在蛋白质分子的表面, 蛋白质结构发生展开, 并且通过尿素对酶活性影响的实验结果发现此范围内酶活力快速下降, 推测  $\beta$ -葡萄糖苷酶发生解聚现象, 并且四级结构和三级结构均遭到破坏, 此过程中其疏水性内核发生展开。当尿素浓度达到 6 M 时光谱峰型变化较大, 在 313 nm 左右出现较小的荧

光峰, 这是由于色氨酸与酪氨酸引起的荧光峰位不同, 随色氨酸逐渐暴露而荧光峰位不断红移, 两者的荧光峰发生分离; 在尿素浓度在 3 M 到 8 M 范围内, 随变性强度加强, 蛋白质分子结构不断被展开, 色氨酸残基暴露引起荧光峰位红移且荧光强度不断加大, 在 8 M 尿素浓度时, 荧光强度最大, 此时色氨酸残基暴露的程度最大, 同时酶的活性降至最低。

低浓度尿素引起酶的构象发生一定变化, 但整体结构没有发生剧烈的展开变化, 达到一定阈值后, 导致多聚体解离和蛋白结构发生展开现象, 结果表明变性的阈值在 2 M 至 3 M 这一范围内。高浓度尿素引起色氨酸不断暴露, 蛋白质展开程度逐渐加强。

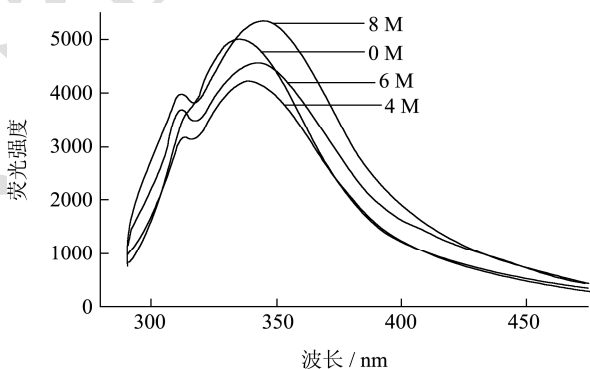
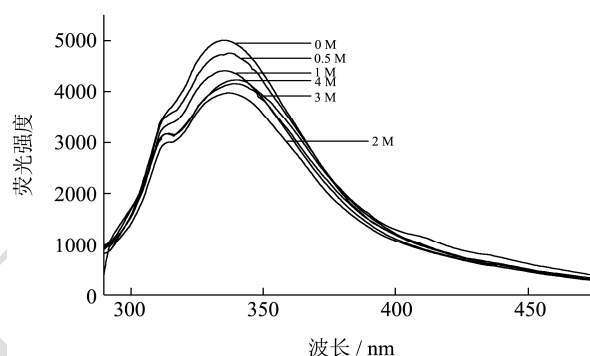


图5 不同浓度尿素变性后的  $\beta$ -葡萄糖苷酶的内源性荧光发射光谱

Fig.5 Endogenous fluorescence emission spectra of  $\beta$ -glucosidase denatured with different urea concentrations

### 2.5 $\beta$ -葡萄糖苷酶的蛋白展开变化

常温下, 不同浓度尿素变性  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 静置 2 h 后, 分别以酶活残留率确定酶蛋白展开百分比; 在 55 °C 条件下, 不同浓度尿素变性  $\beta$ -葡萄糖苷酶, 以酶活残留率, 确定酶蛋白展开百分比, 得到的酶蛋白展开图如图 6 所示。

由图 6 可见, 在尿素变性  $\beta$ -葡萄糖苷酶时, 随着尿素浓度的增加, 展开的蛋白质分子数目也增加。常温下, 当尿素浓度达到 6.28 M 时, 蛋白质分子展开比例为 50%。在 55 °C 条件下,  $\beta$ -葡萄糖苷酶蛋白质分

子展开比例为 50% 时的尿素浓度则降低到了 2 M。两种条件下当尿素浓度均为 4 M 时, 温度因素对蛋白质分子展开率影响最大。对于 4 M 尿素变性条件下, 未经加热的样品, 蛋白质展开结构的比例为 39.16%, 经 55 °C 加热的样品, 蛋白质展开结构的比例达到 94.04%。对于 8 M 尿素变性条件下则无论酶蛋白质是否经过加热, 其中含有展开结构的比例都在 80% 以上。

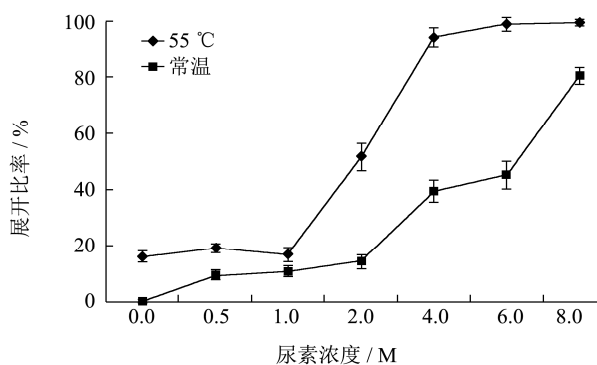


图 6 尿素引起的  $\beta$ -葡萄糖苷酶结构展开曲线

Fig.6 Urea-induced unfolding of  $\beta$ -glucosidase

### 3 结论

3.1  $\beta$ -葡萄糖苷酶比活力随变性剂浓度和温度的增加大体呈现下降趋势。温度的增加能促进变性剂对酶的变性作用。常温下 8 M 尿素环境中,  $\beta$ -葡萄糖苷酶比活力下降为 7.17 U/mg。低浓度的变性剂对  $\beta$ -葡萄糖苷酶酶活有激活作用, 在 20 min 至 40 min 内酶活力达到 150 U/mg 以上, 1 h 后恢复原酶活。因此说明对酶蛋白进行一定的结构改造可以提高其催化效率。

3.2  $\beta$ -葡萄糖苷酶在一定浓度的尿素环境下空间结构发生变化, 其分子颗粒直径变小, 可推测  $\beta$ -葡萄糖苷酶的多聚体结构发生解聚, 分离为亚基结构。 $\beta$ -葡萄糖苷酶的构象具有柔性, 在变性剂环境中酶蛋白内部的疏水残基伸展和溶解, 同时酶蛋白构象的破坏造成酶活力的下降。在低浓度尿素环境中,  $\beta$ -葡萄糖苷酶基本维持原有活力, 酶结构没有发生展开; 随尿素浓度的增加, 酶活力大小不断下降, 色氨酸残基不断暴露, 蛋白质分子结构不断被展开, 最终酶活完全丧失。

### 参考文献

- [1] Chen L, Li N, Zong M H. A glucose-tolerant  $\beta$ -glucosidase from *Prunus domestica* seeds: purification and characterization [J]. Process Biochemistry, 2011, 47(1): 127-132
- [2] 李斐然. 橡胶籽中  $\beta$ -葡萄糖苷酶的分离纯化及性质研究 [D]. 海口: 海南大学食品学院, 2012
- [3] Saeed E, Maliheh B. A comparative study on the aggregating effects of guanidine thiocyanate, guanidine hydrochloride and urea on lysozyme aggregation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 450(4): 1339-1344
- [4] Magali S, Wolfgang B, Ulrich A. Striking stabilization of *Rana catesbeiana* ribonuclease 3 by guanidine hydrochloride [J]. FEBS Letters, 2013, 587(6): 737-742
- [5] Devaraj K B, Parigi Ramesh K, Prakash V. Comparison of activity and conformational changes of ficin during denaturation by urea and guanidine hydrochloride [J]. Process Biochemistry, 2011, 46(2): 458-464
- [6] 马林, 魏志强, 黄爱民, 等. 光谱法研究尿素对水溶液中血红蛋白构象的影响 [J]. 物理化学学报, 2009, 25(9): 1816-1822  
MA Lin, WEI Zhi-qiang, HUANG Ai-min, et al. Spectroscopic studies on the influence of urea on the conformation of hemoglobin in aqueous solutions [J]. Acta Physico-Chimica Sinica, 2009, 25(9): 1816-1822
- [7] 刘小林, 伍志权, 黄磊, 等. 蛋白变性剂对多聚半乳糖醛酸酶及其化学修饰酶催化活性的影响 [J]. 高校化学工程学报, 2012, 26(6): 1009-1013  
LIU Xiao-Lin, WU Zhi-quan, HUANG Lei, et al. Effects of protein denaturants on the activities of polygalacturonase and chemically modified polygalacturonase [J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2012, 26(6): 1009-1013
- [8] Lin L H, Yan S X. Study on the Amphioxus alkaline phosphatase structure and its catalytic activity under the denaturant role [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science Edition), 1990, 29(6): 689-693
- [9] Jiao M, Liang Y, Li H T, et al. Studies on the unfolding of catalase induced by urea and guanidine hydrochloride [J]. Acta Chimica Sinica, 2003, 61(9): 1362-1368
- [10] 刘宇. 橡胶籽中  $\beta$ -葡萄糖苷酶分离鉴定、变性特点及结构性质的研究 [D]. 海口: 海南大学食品学院, 2015  
LIU Yu. Study on the isolation and identification, degeneration characteristics and structure properties for  $\beta$ -glucosidase from *Hevea brasiliensis* seed [D]. Haikou: Food College Hainan University, 2015
- [11] Bogumil Z, Kim A S, Jane M V. Differential scanning calorimetry and fluorescence study of lactoperoxidase as a function of guanidinium-HCl, urea, and pH [J]. Biochimica et

- Biophysica Acta, 2010, 1804(7): 1508-1515
- [12] 邵思蜜,苏海楠,张熙颖,等.光谱学方法对钝顶螺旋藻异藻蓝蛋白活性构象研究[J].光谱学与光谱分析,2010,30(6): 1643-1646  
SHAO Si-mi, SU Hai-nan, ZHANG Xi-ying, et al. The active conformation of Allophycocyanin from *Spirulina platensis* studied with spectroscopic analysis [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2010, 30(6): 1643-1646
- [13] John C C, David D J, Robert R L. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: Teaching basic principles with visual demonstrations [J]. Biochem. Mole. Biology. Edu., 2001, 29(2): 60-65
- [14] 刘里,彭洪生,伏云红.荧光光谱法研究头孢孟多脂与牛血清白蛋白的相互作用[J].中国测试,2014,40(3):64-67  
LIU Li, PENG Hong-sheng, FU Yun-hong. Study on interaction between cefamandole and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy [J]. China Measurement & Test, 2014, 40(3): 64-67
- [15] 李向荣,陈得军,杨海艳,等.尿素诱导牛血红蛋白变性的微量热和平衡透析研究[J].中国科学,2010,40(9):1415-1421  
LI Xiang-rong, CHEN De-jun, YANG Hai-yan, et al. Denaturation study of bovine hemoglobin induced by the urea by microcalorimetry and equilibrium dialysis [J]. Scientia Sinica Chimica. 2010, 40(9): 1415-1421
- [16] Tian W M, Zhang H, Yang S G, et al. Molecular and biochemical characterization of a cyanogenic  $\beta$ -glucosidase in the inner bark tissues of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. Journal of Plant Physiology, 2013, 170(8): 723-730