

杨恒,盛伟,张新笑,等. 不同超声处理时间对鸡血血浆蛋白物化性质和结构的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(24):177-182.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.042

# 不同超声处理时间对鸡血血浆蛋白物化性质和结构的影响

杨恒<sup>1,2</sup>, 盛伟<sup>2</sup>, 张新笑<sup>2</sup>, 李鹏鹏<sup>2</sup>, 王道营<sup>2</sup>, 邹焯<sup>2</sup>, 徐为民<sup>2</sup>

(1. 南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏南京 210023; 2. 江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏南京 210014)

**摘要:**我国的畜禽血液年产量达到上百万 t, 营养价值极高, 但利用率低、浪费严重。其中血浆蛋白营养丰富, 可发展潜力大, 需更多地探索研究。本研究通过鸡血浆蛋白经 150 W 固定频率超声处理 0、5、10、20、30 min 处理后, 利用 SDS-PAGE 探究鸡血血浆蛋白的亚基组成, 圆二色谱研究蛋白质的二级结构, 荧光光谱分析蛋白质分子构象的变化, 表面疏水性测定超声波处理对疏水基团的影响, 自由巯基含量测定蛋白质的变性程度、粒径分布, 研究超声处理对血浆蛋白的分解作用, Zeta 电位仪测定表面电荷来研究血浆蛋白的稳定性及扫描电镜研究蛋白质微观表面结构等, 全面透彻地研究超声处理对血浆蛋白的影响。结果表明, 不同时间的超声处理不会破坏鸡血浆蛋白的亚基组成和二级结构, 但会显著影响蛋白的三级结构、表面性质、粒径分布和表面微观形态。同时, 超声波会引起蛋白质分子间的相互作用从而使自由巯基含量因先暴露增加后又部分包埋而减少, 经过超声处理的血浆蛋白平均粒径明显低于未超声处理的样品, 疏水性先增加后因亚基聚集而减弱并保持稳定。本试验为扩大血浆蛋白的应用提供了一定的理论依据。

**关键词:** 超声处理; 血浆蛋白; 物化性质; 结构特性

**中图分类号:** TS251.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)24-0177-06

动物血浆年产量大, 营养丰富, 血浆中含有纤维蛋白、白蛋白、球蛋白以及其他少量脂蛋白、糖蛋白等<sup>[1-3]</sup>, 而血浆中的蛋白质总称为血浆蛋白<sup>[4]</sup>。血浆蛋白中含有人体所需的 18 种氨基酸, 其中包括 8 种必需氨基酸, 其中赖氨酸(Lys)可达 6.50% 以上<sup>[5]</sup>, 血浆蛋白中含有丰富的矿物质, 磷含量约占血浆蛋白总量的 1.78%, 钙含量达到 0.20%, 铁含量达到 78 mg/kg<sup>[6]</sup>, 另外, 血浆蛋白中还含有较多的促生长因子、干扰素、激素、溶菌酶等其他功能成分<sup>[7]</sup>。

我国每年的肉鸡屠宰量达 10 亿多羽, 鸡血来源丰富。鸡血中含大量蛋白质、氨基酸、微量元素、维生素、酶类和其他生物活性物质, 而脂肪和糖类含量较低, 其中含干物质 17.90%、矿物质 5.90% (大部分为铁)、必要元素 2.30%、磷 0.56%<sup>[8-9]</sup>, 而鸡血细胞中必需氨基酸含量在畜禽动物中最高, 但目前对鸡血的研究较少, 而且大量的鸡血作为废弃物排放, 造成资源浪费和环境污染。

本研究旨在通过测定不同超声处理时间下鸡血血浆蛋白的多种理化特性, 全面分析超声作用对血浆蛋白性质和结构的影响, 为血浆蛋白的应用提供理论基础, 使其在医药工业、食

品工业和饲料工业等方面有更广阔的前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

1.1.1 材料 鸡血浆蛋白冻干品: 实验室自制。主要操作: 取少量柠檬酸三钠饱和溶液加入现取鸡血血浆并搅拌均匀, 后采用 60 mL 离心管分装, 以 3 000 ~ 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清液装入表面皿, 用保鲜膜、橡皮筋封存, 放入 -40 °C 冰箱保藏。待样品完全冻结后放入冻干机 42 ~ 45 h 后取出即得到试验用血浆蛋白粉。

1.1.2 主要试剂 1-苯氨基-8-萘磺酸盐(ANS)、 $\beta$ -巯基乙醇(购自美国 Sigma 公司); Marker(购自上海源叶生物科技有限公司); 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠(购自西陇化工股份有限公司); 考马斯亮蓝(购自南京建成生物科技有限公司); Tris、甘氨酸、十二烷基硫酸钠(购自南京荣胜达实验仪器有限公司); 盐酸(购自扬州沪宝化学试剂有限公司)。

1.1.3 主要仪器 FL-4600 荧光分光光度计, 购自日本日立高新技术公司; UV-6100 紫外/可见分光光度计, 购自上海元析仪器有限公司; T-25 型数显匀浆机, 购自德国 IKA 公司; M124A 电子天平, 购自意大利 Bel 公司; 便携式 pH 计, 购自美国奥豪斯公司; HJ-8(DF-1) 集热式磁力搅拌器, 购自常州国华电器有限公司; Jasco-715 圆二色谱仪, 购自日本 Jasco 公司; 真空冷冻干燥机, 购自德国 Christ 公司; Uni Cen MR 冷冻离心机, 购自德国 Herolab 公司; 超声波细胞破碎仪, 购自宁波新芝生物科技股份有限公司; 多功能微孔板检测仪, 购自美国 Bio Tek 公司; 激光粒度分析仪(Nano-ZS 90), 购自英国 Malvern 公司; 超纯水机(Milli-Q), 购自美国 Millipore 公司; Q20 差式量热扫描仪, 购自美国 TA 公司; JS-

收稿日期: 2018-08-23

基金项目: 国家现代农业(肉鸡)产业技术体系建设专项(编号: CARS-41); 江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(18)1006]; 江苏省自然科学基金(编号: BK20180300); 江苏省重点研发计划(编号: BE2016320)。

作者简介: 杨恒(1994—), 男, 浙江湖州人, 硕士研究生, 研究方向为肉品科学。E-mail: heng199491@126.com。

通信作者: 邹焯, 博士, 研究方向为肉品加工与质量控制, E-mail: zouye@jaas.ac.cn; 徐为民, 博士, 研究员, 研究方向为肉品加工与质量控制, E-mail: weiminxu2002@aliyun.com。

680C全自动凝胶成像分析仪,购自上海培清科技有限公司。

## 1.2 试验方法

1.2.1 不同超声时间试验用血浆蛋白粉制取 将未经超声处理的血浆蛋白粉 20 g 溶于 400 mL 双蒸水中获得 5% 溶液,分别将溶液经超声波细胞破碎仪用固定频率 150 W 超声处理 0、5、10、20、30 min,得到 5 种不同处理的样品。对不同超声时间的溶液表面皿封存,冻干得到蛋白粉备用。

### 1.2.2 血浆蛋白物化性质的测定

#### 1.2.2.1 SDS-PAGE 凝胶电泳测蛋白分子量及蛋白质种类

上样前处理:取 20  $\mu$ L 蛋白样品,加入 5  $\mu$ L 上样缓冲液(pH 值 8.8 的 0.06 mol/L Tris-HCl 缓冲液、2.0% SDS、5.0%  $\beta$ -巯基乙醇、25.0% 甘油、0.1% 溴酚蓝)混合,于 95  $^{\circ}$ C 条件下反应 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,取 15~20  $\mu$ L 处理后样品上样,同时制备 12% 分离胶和 5% 浓缩胶。采用分子量蛋白 Marker(11~135 ku)作为对照。电泳缓冲液为 0.025 mol/L Tris-HCl、0.192 mol/L 甘氨酸、0.1% SDS,电泳先在电压 80 V 进行 20~30 min,后在 120 V 电泳至条带与胶底面平行。电泳结束后,采用考马斯亮蓝 R-250 染色 20~30 min,然后用脱色液(甲醇:乙酸:水=1:1:8)脱色,直至可清楚地辨别条带。

1.2.2.2 圆二色谱测蛋白质二级结构 采用圆二色谱仪测定样品溶液的近紫外圆二光谱变化。将制备的样品配制成浓度为 0.5 mg/mL 蛋白溶液,注入 1 mm 厚的样品池。设定圆二色谱仪参数为:扫描范围 190~250 nm,扫描速度 50 nm/min,光谱间隔 1.0 nm。得到 CD 数据以平均椭圆率表示,采用 CDPro 软件进行二级结构分析。

1.2.2.3 荧光光谱 采用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.0)将样品溶液配制成蛋白浓度为 0.2 mg/mL。荧光光谱采用激发波长为 290 nm 扫描,测定的发射波长范围为 300~460 nm,狭缝宽度均为 2.5 nm。每个样品测定重复 3 次。

1.2.2.4 表面疏水性的测定 将样品配制成 10 mg/mL 的蛋白溶液,后采用 0.01 mol/L PBS 缓冲溶液(pH 值 7.0)将样品液稀释 1、2、4 倍。取 4.0 mL 稀释后的蛋白溶液与 20  $\mu$ L 80 mmol/L ANS 磷酸盐缓冲液(0.1 mol/L, pH 值为 7.0)混匀,室温下放置 2 min 后测定荧光强度。设置参数为:激发波长 371 nm,发射波长 467 nm,扫描速率 240 nm/min,狭缝宽度 10 nm。得到数据以蛋白质质量浓度(mg/mL)对荧光强度作图,采用线性回归分析进行曲线拟合,直线斜率即是蛋白质的表面疏水性( $H_0$ )指数。

1.2.2.5 自由巯基含量测定 准确量取 0.5 mL 质量浓度为 10 mg/mL 的蛋白液样品,后加入 2.50 mL Tris-Gly-8M Urea 溶液和 0.02 mL 4 mg/mL 的 DTNB 溶液,迅速混合后于 25  $^{\circ}$ C 反应 25 min,波长 412 nm 下测定吸光度( $D_{412\text{ nm}}$ ),并以蒸馏水作空白对照。每个样品做 3 次平行试验,最终结果取其平均值,并按公式(1)进行计算:

$$\text{自由巯基含量} = 73.53 \times D_{412\text{ nm}} \times D \div C \quad (1)$$

式中:73.53 =  $10^6 / (1.36 \times 10^4)$ ,  $1.36 \times 10^4$  为 Ellman 试剂的摩尔消光系数; $D_{412\text{ nm}}$  为波长 412 nm 下所测得的吸光值; $C$  为蛋白质样品的质量浓度,单位为 mg/mL; $D$  为稀释因子,在游离巯基测定中  $D$  值取为 6.04。

1.2.2.6 差式扫描量热 取样品 3~6 mg 用差示量热扫描

仪(DSC)进行扫描,扫描温度为室温至 20  $^{\circ}$ C,扫描速度为 5  $^{\circ}$ C/min(程序升温),所有的测定都要在氮气环境下进行。最大变性温度( $T_{\text{max}}$ )用 Ver 1.2 N Software(TA Instruments)分析。

1.2.2.7 粒径分布 超声处理和未超声的血浆蛋白粒度分布采用 Nano-ZS90 激光粒度仪进行测定,介质为蒸馏水,折射率为 1.361,测定时以蒸馏水为背景。设置物质折射率为 1.52,加入样品至遮光率达 10%~20% 后,进行信息采集。每个样品平行采集 3 次,取平均图谱。

1.2.2.8 Zeta 电位分析 Zeta-电位( $\zeta$ , mV)也用 Nano-ZS90 激光粒度仪来测定。采用超纯水将蛋白质溶液稀释成 0.5% (质量分数),加入样品电位测量池测量。 $\zeta$  是通过电导迁移率(UE)采用激光多普勒测速技术结合相分析光散射来计算。

1.2.2.9 扫描电镜 将超声处理和未超声的蛋白冷冻干燥后进行扫描电子显微镜观测。操作流程:将样品置于样品台,经离子溅射仪真空干燥、金粉喷镀后,调节电镜加速电压为 20 kV,对样品进行观测摄图。

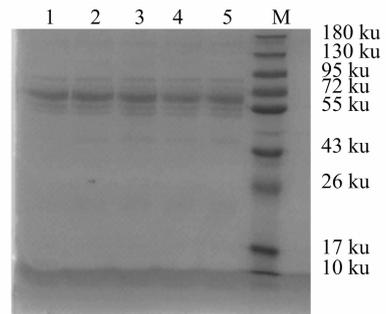
## 1.3 数据统计

上述所有试验均 3 次重复,结果表示为“平均值  $\pm$  标准差”。采用 SPSS 18.0 统计软件进行处理,Origin 9.0 作图,采用组间 ANOVA 进行统计分析,Turkey 检验用于组间数据分析, $P < 0.05$  表示两组间差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 血浆蛋白凝胶电泳分析

将不同超声处理时间的鸡血血浆蛋白样品上样进行 SDS-PAGE 分析,检测并比较不同超声处理时间鸡对血浆蛋白亚基组成的影响。由图 1 可知,不同超声时间的鸡血浆蛋白条带其清晰度和数目均无明显差异<sup>[10]</sup>,各鸡血浆蛋白的亚基分子量主要集中在 43~95 ku,蛋白条带完整,无杂碎条带,该结果表明不同超声时间处理并未改变鸡血血浆蛋白的亚基组成<sup>[11]</sup>。



1~5 分别表示超声处理 0、5、10、20、30 min

图1 不同超声时间处理鸡血浆蛋白电泳

### 2.2 圆二光谱

圆二色性主要由肽键的电子跃迁引起,因此圆二色谱可反映蛋白质主链肽键的构象,其远紫外(190~250 nm)能够提供蛋白质二级结构( $\alpha$ -螺旋, $\beta$ -折叠, $\beta$ -转角和无规卷曲)含量信息<sup>[12-13]</sup>,是检测蛋白质结构变化的重要指标,可根据远紫外圆二光谱来分析蛋白质的二级结构。由图 2 可

知,鸡血浆蛋白在超声功率 150 W 下处理 0、5、10、20、30 min,鸡血浆蛋白在 209 nm 和 222 nm 处有 2 个负峰,在 193 nm 处有 1 个正峰,这是典型的  $\alpha$ -螺旋结构特征峰<sup>[14]</sup>。不同超声时间处理的蛋白其图谱几乎无改变,且  $\alpha$ -螺旋含量大致相同,此结果与表 1 数据相符,说明本试验中不同的超声处理时间并没有破坏血浆蛋白的二级结构,这与王金梅等的结论<sup>[15]</sup>一致。 $\beta$ -折叠含量高则  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角含量低, $\beta$ -折叠含量低则  $\alpha$ -螺旋和  $\beta$ -转角含量高,而无规则卷曲几乎不变,这说明  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角和  $\beta$ -折叠之间存在着一种相互转化关系,维持一种动态平衡。

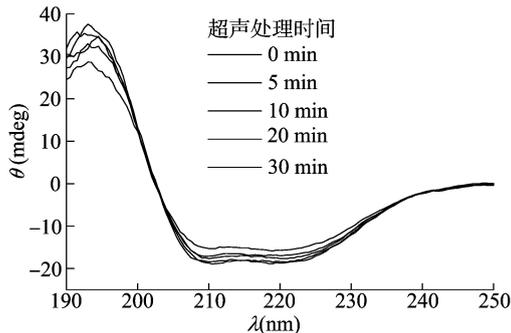


图2 不同超声时间血浆蛋白的圆二色谱

### 2.3 荧光光谱

荧光光谱通过测定样品蛋白质中部分能产生荧光的氨基

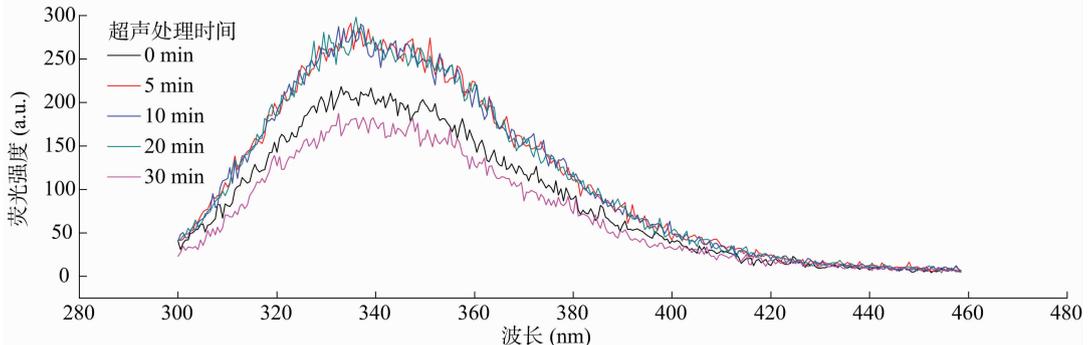


图3 不同超声时间血浆蛋白荧光

### 2.4 鸡血浆蛋白表面疏水性测定

表面疏水性是蛋白质重要的表面性质,研究表明表面疏水性是影响蛋白质功能特性的重要因素,对保持蛋白质稳定构象和生物活性具有重要作用<sup>[22]</sup>。荧光探针法是测定蛋白质疏水性最广泛的方法,其优点是蛋白用量少,操作简单便捷<sup>[23]</sup>。ANS 探针荧光在水溶液中单独存在时,荧光量子产量较低,随着 ANS 与蛋白质结合,荧光强度显著增强,通过这一特性可以表征鸡血浆蛋白的表面疏水性<sup>[24]</sup>。由图 4 可知,经过不同超声时间处理的鸡血浆蛋白表面疏水性显著提高,这可能是由于超声波的空穴效应,导致鸡血浆蛋白质相互碰撞后发生卷曲、折叠,蛋白结构被破坏,在水溶液中暴露出疏水性氨基酸残基,更多的血浆蛋白与 ANS 相结合,荧光强度增强,其表面疏水性显著提高<sup>[25]</sup>。贾俊强等发现通过超声频率为 1 800 W 的超声波处理后小麦胚芽球蛋白溶液的表面疏水性提高了<sup>[26]</sup>。超声 10 min 鸡血浆蛋白与超声 5 min 鸡血浆蛋白相比表面疏水性下降了,但是其差值不及超声 20 min 与超声 10 min 的差值。表面疏水性下降可能是因为随着超声

表 1 蛋白质二级结构含量信息

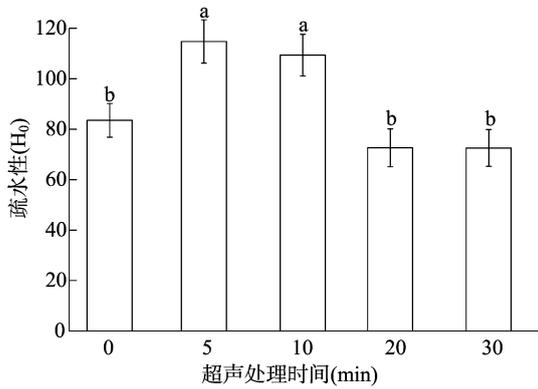
超声处理时间(min)	含量(%)			
	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规则卷曲
0	18.3	61.7	2.4	17.6
5	20.7	58.9	2.7	17.7
10	17.4	63.8	1.2	17.6
20	20.2	60.0	2.5	17.3
30	17.4	63.5	1.6	17.5

酸残基(色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)可推测其蛋白构象的变化趋势,这是表征蛋白质分子构象发生变化的一种常用手段<sup>[16]</sup>,通过荧光强度和峰位变化可反映蛋白质局部三级结构的变化<sup>[17]</sup>。由图 3 可知,鸡血浆蛋白的最大发射荧光强度在 335 nm 处改变,但不同处理时间鸡血浆蛋白的最大发射荧光强度波长位置基本不变,但是超声处理 5、10、20 min 的血浆蛋白荧光强度高于超声 0 min 血浆蛋白,这可能是由于鸡血浆蛋白经超声处理后,超声波产生的机械效应和空化效应使蛋白内部肽链伸展程度变大,暴露出部分掩埋于分子内部的疏水基团,从而荧光强度发生了增强<sup>[18]</sup>。贾俊强等通过超声处理麦胚清蛋白后其荧光强度发生明显增强<sup>[19]</sup>,本结果与之一致。而超声 30 min 鸡血浆蛋白荧光强度明显下降且最大发射峰峰位较对照组有较小程度的红移,这可能是由于蛋白质分子间作用力而发生了荧光猝灭作用<sup>[20]</sup>。该结果还说明不同超声处理时间可改变鸡血浆蛋白分子的高级构象<sup>[21]</sup>。

处理时间的提高,蛋白质间相互作用加强,蛋白质的表面疏水性增加,当表面疏水相互作用达到一定程度时蛋白质的亚基聚集形成共价键及氢键等结构,使得一部分疏水基团被包埋,疏水相互作用减弱,疏水性降低<sup>[27-28]</sup>。超声处理 20 min 和 30 min 的血浆蛋白疏水性显著低于超声处理 10 min 的蛋白样品,这可能是超声处理使鸡血浆蛋白间的相互作用达到稳定状态,疏水性保持稳定。

### 2.5 自由巯基

巯基基团含量变化可反映蛋白质变性程度,对探究蛋白的功能性质利用有重要作用<sup>[29]</sup>。由图 5 可知,在超声 5 min、超声 10 min、超声 20 min 组别中,经过超声处理的血浆蛋白其自由巯基含量提高,这可能是由于超声处理破坏了蛋白分子间的二硫键和巯基互相转化<sup>[30]</sup>,使埋藏在蛋白分子内的巯基暴露出来,蛋白分子空间结构得到伸展<sup>[31]</sup>。Hu 等发现,超声处理增加了大豆分离蛋白的游离巯基含量<sup>[32]</sup>,本试验结果与之一致。在超声处理 30 min 组自由巯基含量出现明显下降,这可能是由于长时间超声处理使得蛋白质中部分-SH 被



不同小写字母表示组间具有显著性差异,  $P < 0.05$ 。下同  
图4 不同超声时间的鸡血浆蛋白表面疏水性

重新氧化成 S—S<sup>[33]</sup>,使巯基基团被重新包埋。蛋白质自由巯基含量还受到其他因素影响,试验操作中温度的改变或样品溶液的复杂性都会改变自由巯基含量<sup>[27,34]</sup>。同时,不同超声处理时间下鸡血浆蛋白样品的巯基变化趋势与疏水性相似,这可能是由于超声时间增加,蛋白质变性程度增加,同时蛋白质分子间相互作用形成更多的蛋白质聚集体。

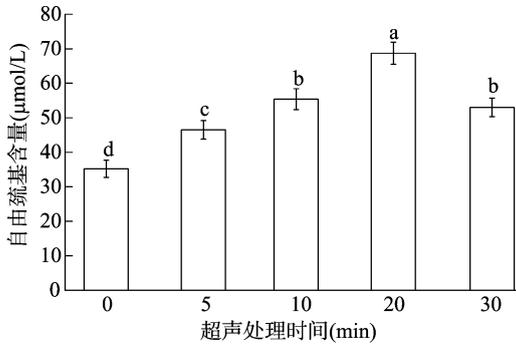


图5 不同超声时间的鸡血浆蛋白自由巯基含量

## 2.6 差式扫描量热

由表2可知,鸡血浆蛋白热扫描出现2组温度数据,这是血浆蛋白中2种主要蛋白(白蛋白和球蛋白)的变性温度及热焓变,与Dergez等研究<sup>[35]</sup>一致。经过超声处理的血浆蛋白变性温度较对照组均有所下降,且大致呈逐步下降趋势,鸡血浆蛋白对热的敏感性增强。这可能是超声处理影响了血浆蛋白的热稳定性,使血浆蛋白的三级结构发生了改变,空间立体性增加,蛋白与蛋白之间的交联发生改变,这与史培磊等的试验结果<sup>[36]</sup>相类似。

## 2.7 粒径分布

不同超声处理时间(0、5、10、20、30 min)对鸡血浆蛋白粒径的影响见图6。由图6可知,经过超声处理的血浆蛋白明显平均粒径均低于未超声处理的样品<sup>[37]</sup>。但还可以看到粒径并没有随着超声时间的增加而持续减小,超声30 min鸡血浆蛋白粒径大于超声20 min组,同时超声5 min的血浆蛋白粒径跨度即粒径图宽度显著变大,而其他超声时间下蛋白粒径又存在减小现象,说明可能蛋白分子一部分发生了分解作用,一部分发生了聚集作用。这一结果与叶钰等的研究结果<sup>[38]</sup>一致,而出现这一现象的本质原因可能是超声过程中的

表2 血浆蛋白的差式量热扫描数据

超声处理时间 (min)	$T_1$ (°C)	$\Delta H_1$ (J/g)	$T_2$ (°C)	$\Delta H_2$ (J/g)
0	71.45	9.175	146.9	115.9
5	58.40	6.570	138.5	137.2
10	55.96	5.263	141.8	146.5
20	52.17	3.685	141.5	158.8
30	54.77	4.688	139.4	172.4

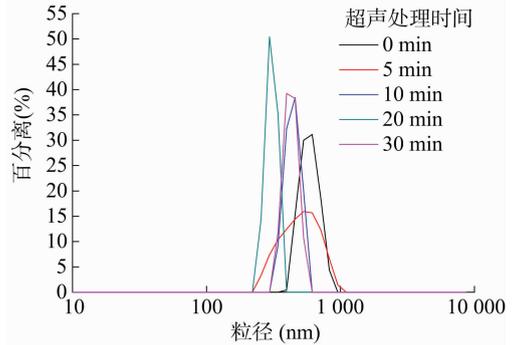


图6 不同超声时间的鸡血浆蛋白粒径分布

空化作用产生极强的剪切力,破坏了蛋白质分子间的共价或非共价作用<sup>[39]</sup>,使粒径分布较大的血浆蛋白分子分解成较小的蛋白质分子。

## 2.8 蛋白表面电荷

Zeta电位是表征胶体分散系稳定性的重要指标,可近似用来表示表面电荷。Zeta电位的绝对值越大,说明胶体的体系越稳定;反之,Zeta电位绝对值越小,蛋白质分子排斥力会小于吸引力,分子会有吸引聚集的趋势<sup>[40]</sup>。由图7可知,经过固定频率超声处理的血浆蛋白其Zeta电位绝对值都大于未超声处理组,这与Ryan等的研究结果<sup>[41]</sup>一致。Schmitt等认为Zeta电位绝对值大于20 mV,胶体较稳定<sup>[42]</sup>,所以经过超声处理的血浆蛋白稳定性增强。本研究中经过超声处理的血浆蛋白稳定性增强明显。

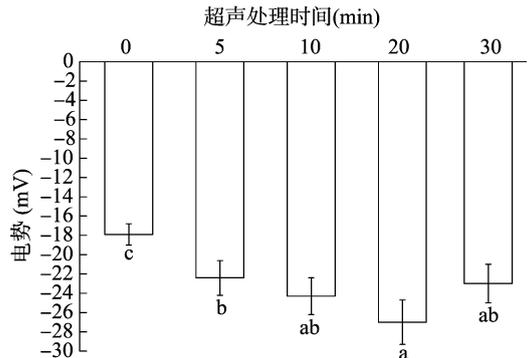


图7 不同超声时间鸡血浆蛋白表面电荷

## 2.9 扫描电镜

由图8可知,随着超声时间的增加,蛋白质的结构出现孔隙,变得疏松甚至分离,表面结构发生改变,这符合超声处理产生的剪切力破坏了分子间氢键和范德华力,使蛋白质发生分散,形成更加宽松的层状结构<sup>[43]</sup>。这与冯景丽等采用超声处理酪蛋白表面微观结构变得片层化和“空洞”化<sup>[44]</sup>是一致的。

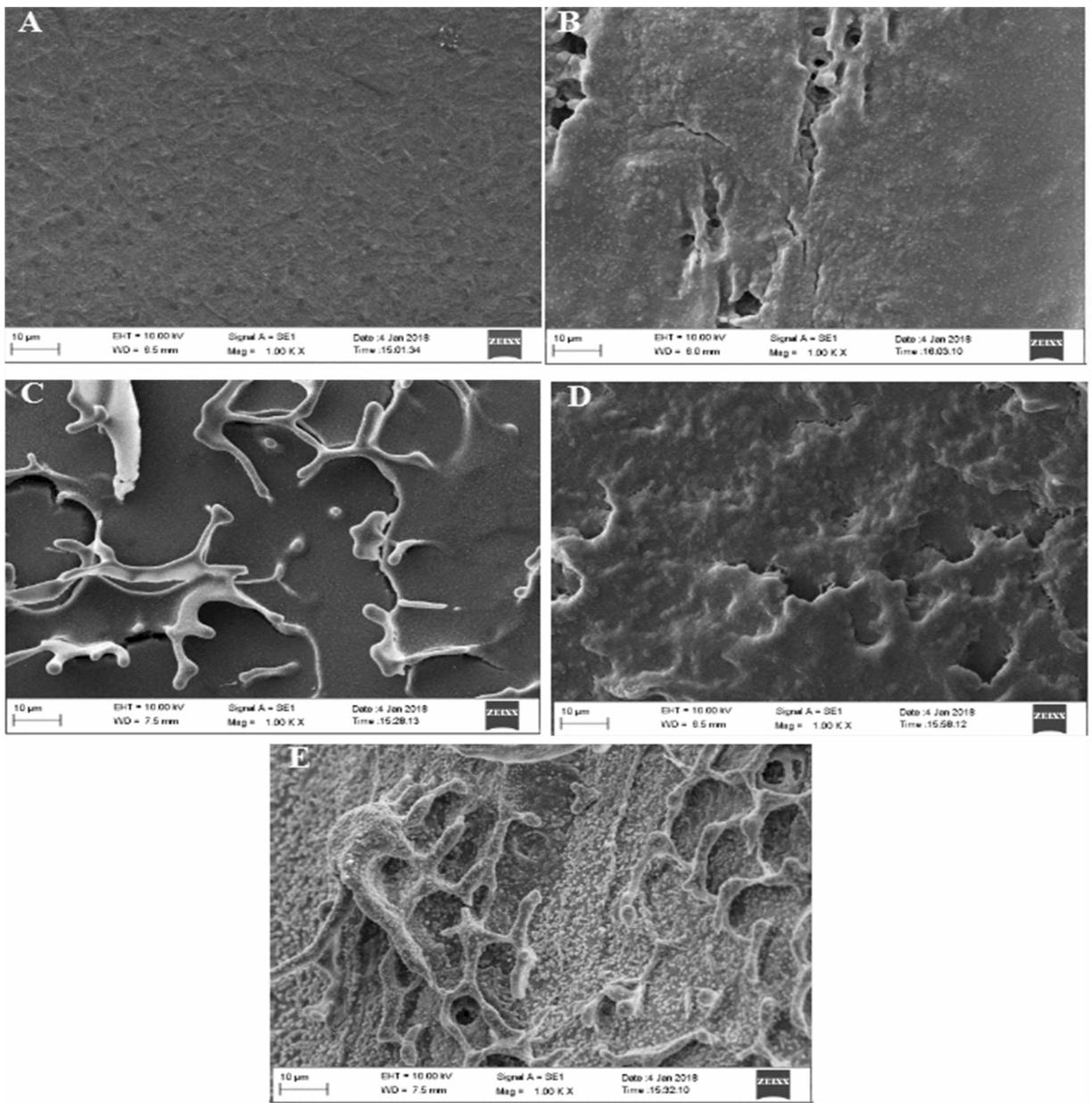


图8 不同超声时间血浆蛋白的电镜

### 3 结论

试验结果表明,超声处理不会破坏鸡血浆蛋白的亚基组成和二级结构,但会显著影响蛋白的三级结构、表面性质、粒径分布和表面微观形态。在超声频率不变时,改变超声时间对血浆蛋白的作用效果不是呈现相关性增长,而是一种不确定的改变,并不是超声时间越长达到的效果越好,根据实际需要达到的效果可选择最适超声时间。而本研究证明超声对改变蛋白质功能结构的有效性,为超声处理蛋白质改善蛋白质的功能特性利于其应用于生活中提供了理论基础。

#### 参考文献:

- [1] 张玉斌,曹 晖,郭兆斌,等. 牛血资源综合开发利用研究进展[J]. 肉类研究,2011,25(9):30-34.
- [2] Zhang H, Zhang B R, Zheng Y N, et al. Neutral protease expression

and optimized conditions for the degradation of blood cells using recombinant *Pichia pastoris* [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, 93.

- [3] 王春维. 功能性蛋白源——血浆蛋白粉的研究与开发[J]. 粮食与饲料工业, 2001(9):26-27.
- [4] 盛国华. 蛋白质资源的开发与利用[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1988.
- [5] 孙忠敏,刘季高. 超滤及其在血液制品中的应用[J]. 国际生物制品学杂志, 1992, 15(1):14-18.
- [6] 张映玉,成国才,陈耀明. 猪血浆蛋白的营养评价及氨基酸平衡的实验研究[J]. 第四军医大学学报, 1987(2):105-109.
- [7] 孔保华,张立娟,刁新平. 影响猪血浆蛋白热诱导凝胶质构特性及持水性因素的研究[J]. 食品科学, 2010, 31(7):75-80.
- [8] 高薇薇,邓海燕,谢 苗,等. 鸡血的利用现状与展望[J]. 肉类工业, 2004(2):42-46.
- [9] Márquez E, Bracho M, Archile A, et al. Proteins, isoleucine, lysine

- and methionine content of bovine, porcine and poultry blood and their fractions [J]. *Food chemistry*, 2005, 93(3): 503–505.
- [10] 边艳杰, 李庆章, 张 岚, 等. 用于双向凝胶电泳分析的奶牛乳清蛋白样品制备方法的比较[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(5): 486–492.
- [11] Jackson M, Mantsch H. Halogenated alcohols as solvents for proteins; FTIR spectroscopic studies [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1118(2): 139–143.
- [12] 叶进富. 蛋白质 zeta 电位与离子交换层析分离的相关性研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [13] Serpone N, Colarusso P, Cheminform abstract: sonochemistry. Part 1. Effect of ultrasound on the heterogeneous chemical reactions – a useful tool to generate radicals and to examine reaction mechanisms [J]. *Cheminform*, 1995, 26(2): 635–679.
- [14] 田素燕, 李连之, 高 磊, 等. 圆二色光谱法研究环境因素对细胞红蛋白二级结构的影响[J]. *分析化学*, 2009, 37(8): 1097–1101.
- [15] 王金梅, 包建强. 超声波辅助鱼皮胶原蛋白提取及其性质研究 [J]. *上海农业学报*, 2017, 33(2): 114–119.
- [16] Song J, Tao W Y, Chen W Y. Ultrasound – accelerated enzymatic hydrolysis of solid leather waste [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2008, 16(5): 591–597.
- [17] 刘 斌, 马海乐, 李树君, 等. 超声波处理对脱脂麦胚分离蛋白结构的变化研究 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2011, 31(8): 2220–2225.
- [18] Li S Y, Yang X, Zhang Y Y, et al. Effects of ultrasound and ultrasound assisted alkaline pretreatments on the enzymolysis and structural characteristics of rice protein [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016, 31: 20–28.
- [19] 贾俊强, 马海乐, 赵伟睿, 等. 超声波处理对麦胚清蛋白结构和功能性质的影响 [J]. *过程工程学报*, 2009, 9(1): 107–112.
- [20] 王晓霞, 李松波, 马力通, 等. 三维荧光光谱法和圆二色光谱法研究氨基比林与牛血清白蛋白分子的相互作用 [J]. *中国测试*, 2017, 43(9): 74–80.
- [21] Zhou C S, Ma H L, Yu X J, et al. Pretreatment of defatted wheat germ proteins (by – products of flour mill industry) using ultrasonic horn and bath reactors; effect on structure and preparation of ACE – inhibitory peptides [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2013, 20(6): 1390–1400.
- [22] 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, 29(10): 42–46.
- [23] And C A H, Lichan E C Y. Hydrophobicity of bovine serum albumin and ovalbumin determined using uncharged (PRODAN) and anionic (ANS) fluorescent probes [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 1998, 46(7): 2671–2677.
- [24] 余晶梅. 荧光探针法和疏水相互作用层析法分析蛋白表面疏水性 [D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [25] 金 建. 基于计算机模拟与超声辅助酶法制备高生物利用度玉米蛋白的研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2015.
- [26] 贾俊强, 马海乐, 赵伟睿, 等. 超声波处理对小麦胚芽球蛋白理化及功能性质的影响 [J]. *农业机械学报*, 2009, 40(8): 105–110.
- [27] Chandrapala J, Zisu B, Palmer M, et al. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2011, 18(5): 951–957.
- [28] 陶汝青, 夏 宁, 滕建文. 热处理对大豆蛋白结构和凝胶性的影响 [J]. *食品科学*, 2018(9): 60–66.
- [29] 毕 爽, 齐宝坤, 隋晓楠, 等. 超声处理对黑豆蛋白结构和功能性质的影响 [J]. *中国食品学报*, 2016, 16(6): 153–160.
- [30] 任晓锋. 扫频超声预处理对玉米醇溶蛋白特性及其酶法制备 ACE 抑制肽的影响 [D]. 镇江: 江苏大学, 2014.
- [31] Chandrapala J, ZISU B, KENTISH S, et al. The effects of high – intensity ultrasound on the structural and functional properties of alpha – lactalbumin, beta – lactoglobulin and their mixtures [J]. *Food Research International*, 2012, 48(2): 940–943.
- [32] Hu H, Li – Chan E C Y, Li W, et al. The effect of high intensity ultrasonic pre – treatment on the properties of soybean protein isolate gel induced by calcium sulfate [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 32(2): 303–311.
- [33] Hu H, Wu J, Li – Chan E C Y, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions [J]. *Food Hydrocolloids*, 2013, 30(2): 647–655.
- [34] 胡爱军, 卢秀丽, 郑 捷, 等. 超声处理对鲢鱼鱼肉蛋白结构的影响 [J]. *现代食品科技*, 2012, 28(8): 894–897.
- [35] Dergez T, Lorinczy D, Konczol F, et al. Differential scanning calorimetry study of glycerinated rabbit psoas muscle fibres in intermediate state of ATP hydrolysis [J]. *BMC Structural Biology*, 2007, 7(1): 41.
- [36] 史培磊, 闵辉辉, 李春保, 等. 滚揉腌制前后鹅肉品质的变化 [J]. *食品科学*, 2011, 32(11): 88–92.
- [37] Jambrak A R, Lelas V, Mason T J, et al. Physical properties of ultrasound treated soy proteins [J]. *Journal of Food Engineering*, 2009, 93(4): 386–393.
- [38] 叶 钰, 高金燕, 陈红兵, 等. 超声波加工对蛋清蛋白质结构和凝胶特性的影响 [J]. *食品科学*, 2018(21): 45–52.
- [39] 沈 雪. 乳清蛋白的超声改性及其包埋体系的应用研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- [40] Akbari A, Wu J. Cruciferin nanoparticles; Preparation, characterization and their potential application in delivery of bioactive compounds [J]. *Food Hydrocolloids*, 2016(54): 107–118.
- [41] Ryan K N, Vardhanabhuti B, Jaramillo D P, et al. Stability and mechanism of whey protein soluble aggregates thermally treated with salts [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 27(2): 411–420.
- [42] Schmitt C, Bovay C, Rouvet M, et al. Whey protein soluble aggregates from heating with NaCl: physicochemical, interfacial, and foaming properties [J]. *Langmuir the ACS Journal of Surfaces & Colloids*, 20017, 23(8): 4155–4166.
- [43] Wang Z, Lin X, Li P, et al. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 117(10): 222–227.
- [44] 冯景丽, 贾 峰, 王金水, 等. 超声波处理对酪蛋白结构特性的影响 [J]. *中国乳品工业*, 2015, 43(6): 20–23.