

蛋白质熔球态结构的形成 及其加工特性研究进展

高 健,李祥鹏,石彦国,王 冰,刘琳琳,张 娜*

(哈尔滨商业大学食品工程学院,黑龙江省食品科学与工程重点实验室,黑龙江哈尔滨 150076)

摘 要:球蛋白在经过一定条件处理时会形成熔球态蛋白质,本文对蛋白质折叠与去折叠过程中熔球态的诱导方法和捕获技术进行综述,并系统阐述了熔球态蛋白加工性质相比于天然状态蛋白质的改善程度,对于提升相关产品的技术水平提供了理论依据和实践价值。

关键词:球蛋白,熔球态,折叠,结构,功能

Research Progress on the Formation and Processing Characteristics of Molten Globule Structure Protein

GAO Jian, LI Xiang-peng, SHI Yan-guo, WANG Bing, LIU Lin-lin, ZHANG Na*

(Key Laboratory of Food Science and Engineering, College of Food Science
and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: The globulins will form molten globule when processed under certain conditions. In this paper, induction methods and capture techniques of molten globule during protein folding and unfolding were reviewed, and the improvement of the processing properties of molten globule compared with the native state was systematically explained. It provides a theoretical basis and practical value for enhancing the technological level of related products.

Key words: globulins; molten globule; fold; structure; function

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)09-0351-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.09.060

引文格式: 高健,李祥鹏,石彦国,等.蛋白质熔球态结构的形成及其加工特性研究进展[J].食品工业科技,2019,40(9):351-356.

蛋白质是食品中重要的组分之一,是衡量食品营养价值的重要目标,其氨基酸残基线性链折叠成具有生物活性的复杂的空间立体三维结构,结构上的特点对加工特性具有重要的作用。Ohgushi等^[1]和Wada首次发现并证明,马细胞色素C在低pH或者变性剂存在的条件下,在折叠与去折叠的过程中形成一种新的结构状态,并将其命名为“熔球态”,熔球态结构具有与天然态相似的二级结构与特性粘度,但是缺少由侧链产生的特定的三级结构,蛋白质分子的半径比天然状态大10%~30%,结构中存在的松散堆积的疏水核心,使得疏水表面积比天然态有所增加^[2-3]。有研究发现蛋白质的熔球态结构具有更加良好的溶解性、乳化性、起泡性、凝胶性、酶消化能力及抗氧化活性^[4-5],可应用于食品产品中,因此,对熔球态蛋白质进行相关研究具有深远的意义。本文对蛋白质折叠与去折叠过程中的熔球态的结构特点

进行讨论,并将系统阐述部分球蛋白熔球态的诱导方法,指出熔球态蛋白的加工特性与部分功能性。

1 蛋白质折叠与去折叠过程中的中间态

早期的研究认为蛋白质折叠与去折叠的过程中不存在中间态,是一种“突变”过程,通常用二态模型表示。但Levinthal悖论中提出,多肽链中可能存在大量的天然构象,蛋白质必须通过一系列中间体折叠途径然后形成天然结构^[6],Ptitsyn^[7]在此基础上提出的“框架模型”进一步证明蛋白质折叠至少包括三个阶段(图1),第一阶段:在展开的链中形成波动二级结构,构成该结构的键主要是肽链的氢键;第二阶段:将之前的存在波动的二级结构与二级结构合并为中间球状结构,构成该结构的主要的力是疏水相互作用;第三阶段:将中间结构调整到最终的特定天然三级结构,这个阶段主要的力为范德华力。

收稿日期:2018-09-11

作者简介:高健(1995-),男,硕士研究生,研究方向:食品科学,E-mail:gaojian1504518547@163.com。

*通讯作者:张娜(1979-),女,博士,教授,研究方向:食品安全与食品化学,E-mail:foodzhangna@163.com。

基金项目:国家自然科学基金面上项目(31871747);国家自然科学基金青年科学基金项目(31301602);国家重点研发计划(2016YFD0400402);哈尔滨商业大学2018年研究生创新科研资金项目(YJSCX2018-541HSD)。

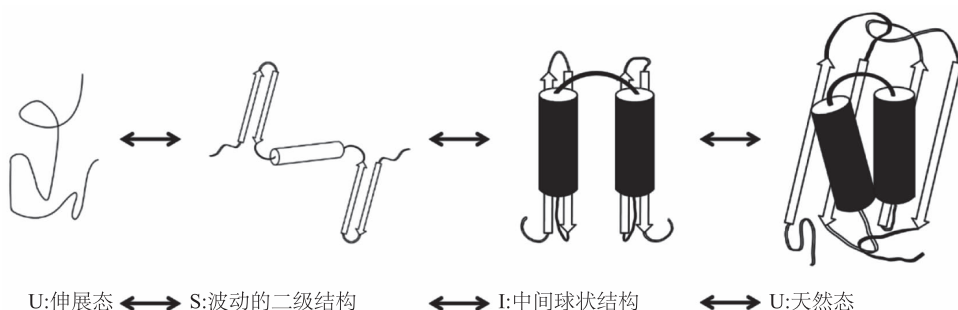


图1 Ptitsyn 提出的“框架模型”

Fig.1 “Framework model” proposed by Ptitsyn

Kuwajima 等人与 Ikeguchi 等人通过圆二色谱 (CD) 测量 α -乳白蛋白的去折叠中间态和盐酸胍诱导的 α -乳白蛋白重折叠动力学的瞬时折叠中间态表现出相同的状态^[8-9], 而且有多项研究证明 α -乳白蛋白^[10-12]和脱辅基肌红蛋白^[13-14]的去折叠过程中观察到的熔球态与各自重新折叠过程中形成的熔球态极为相似。并且在萨楚尔夫等人研究 β -乳球蛋白重折叠的动力学特征中发现, 蛋白质折叠和去折叠过程与二态模型描述的过程并不相符, 蛋白质折叠与去折叠过程是经历许多中间态的构象渐变过程^[15], 熔球态是蛋白质折叠与去折叠构象渐变过程的一种中间态^[16]。Cleland 等^[17]在研究牛碳酸酐酶 B 重折叠过程发现, 去除复性剂或降低复性剂浓度后, 变性蛋白从伸展态迅速卷曲形成第一中间态, 即熔球态, 在这种状态下, 蛋白的疏水基团暴露于蛋白的表面, 这一过程约在数百毫秒内就完成了, 之后熔球态蛋白表面的疏水性残基向蛋白内部折叠形成疏水核心, 即转变为第二中间态, 这一过程相对缓慢, 大约为数百秒。不论是变性还是复性的过程, 熔球态蛋白过渡到其下一个状态的速度都相对缓慢, 整个过程受到动力学的控制。

2 熔球态蛋白的结构特点

球形蛋白质的二级结构包括 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲, 三级结构是氢键、离子键、二硫键等力的作用下, 在二级结构的基础上进一步折叠卷曲形成复杂紧密的接近球形或椭圆形的三维空间分子结构。球蛋白结构具有如下特点: a. 都含有二硫键、游离巯基, 以保证该蛋白质的高级结构的稳定 (部分球蛋白中二硫键与巯基数量如表 1 所示); b. 含有胱氨酸和半胱氨酸残基的蛋白质混合物能发生巯基-二硫键交换反应及巯基氧化反应, 巯基-二硫键交换反应通常导致蛋白质分子的稳定性降低。经过变性条件处理后, 疏水基团暴露, 如在极端碱性或酸性 pH 条件下, 球蛋白部分展开, 增加分子内带电侧链基团之间的排斥, 形成更为柔韧的结构, 即熔球态结构蛋白^[18]。

表征熔球态结构的常规技术包括:

a. 检测蛋白质二级和三级结构的圆二色谱。如 Vassilenko 等^[19]通过分析天然状态和 pH 诱导的九种蛋白质的熔球态的远紫外 CD 光谱得出熔球态下蛋白质的二级结构接近于天然状态。Kumari 等^[20]发现在 pH 为 2.0 时使用十二烷基硫酸钠对丝氨酸蛋白酶

表 1 部分球蛋白二硫键与巯基的数量

Table 1 The number of partial globulin disulfide bonds and sulfhydryl groups

来源	种类	-S-S- 数量 (个)	-SH 数量 (个)
大豆	7S	2	0
	11S	20	2
蛋	卵清蛋白	1	4
	β -乳球蛋白	2	1
	α -乳白蛋白	4	0
乳	血清白蛋白	17	1
	α_2 -酪蛋白	1	0
	κ -酪蛋白	1	0

进行诱导处理可以得到一个具有与天然状态二级结构相似, 含有大量的疏水表面且没有刚性的三级结构的中间状态。

b. 检测蛋白质粒径、分子大小的流体力学技术如粘度测量和分子排阻色谱。蛋白质的粒径, 分子大小, 粘度等指标也反映出了蛋白质的紧密性, 熔球态结构的蛋白质结构是紧凑的, 近似于天然态的蛋白质。如 Dolgikh 等^[21]通过测定牛乳和人乳中的 α -乳白蛋白在酸、温度处理下的熔球态以及完全变性呈展开态的特性黏度发现, 酸处理或热处理的 α -乳白蛋白熔球态的特性黏度在 $3\sim 4\text{ cm}^3/\text{g}$, 与天然态 ($3.1\sim 3.4\text{ cm}^3/\text{g}$) 非常接近; 而去折叠态是 $6.1\sim 6.6\text{ cm}^3/\text{g}$ 。Dar 等^[22]用尿素诱导绵羊血清白蛋白形成熔球态蛋白, 通过动态光散射法测得绵羊血清白蛋白天然态、熔球态和完全变性态的流体力学半径分别为 3.60、6.73、11.00 nm。

c. 检测蛋白质松散疏水基团的形成的疏水染料 (ANS) 结合实验。熔球态蛋白具有一定柔性, 内部的一些非极性基团暴露在溶剂中, 从而表现出疏水表面积比天然状态蛋白质更大。ANS 是一种荧光疏水染料, 用于监测折叠和展开过程中蛋白质疏水表面的暴露情况^[23-24]。它对蛋白质中间状态的亲和力高于天然或完全未折叠状态的蛋白质^[2, 25-26]。Dave 等^[27]在研究碱性条件诱导茎菠萝蛋白酶发现 ANS 荧光在 pH7~9 时没有变化, 但在 pH10.0 时突然出现三倍的峰值, 随着 pH 的进一步升高消除了酶与 ANS 的结合, 这些结果表明在 pH10.0 条件下茎菠萝蛋白酶中存在大量溶剂可及的疏水表面, 证实在 pH10.0 下出现茎菠萝蛋白酶的熔球态结构。

熔球态蛋白的稳定性是决定其应用的重点,有研究人员在诱导熔球态结构的同时添加一些外源性物质来稳定熔球态结构,确保该结构可以稳定长时保存。在极端 pH 下,可通过盐^[28-31]、糖、多元醇^[32-35]稳定熔球态蛋白,并将酸变性蛋白质转化为熔球态^[36-37]。同时也有蛋白质在中性 pH 条件下添加变性剂(尿素)^[38]或大分子拥挤剂形成稳定的熔球态蛋白^[39-41]。

3 部分球蛋白的熔球态的诱导方法

3.1 肌红蛋白

近年来,一些研究针对肌红蛋白熔球态结构,尤其是大分子挤压诱导肌红蛋白形成熔球态结构的方法逐渐得到重视,用大分子拥挤剂模拟出一个拥挤的环境,当体系中存在大分子拥挤剂时,大分子之间遵循分子排斥容积理论,会促使蛋白质向体积减小的方向,既结合方向移动,变性程度降低,使熔球态蛋白结构更加稳定。大量研究表明,高浓度的拥挤剂使得折叠和部分折叠的蛋白质的结构含量增加,并且稳定性也随之增强^[42-48]。目前发现聚蔗糖 70(非可 70)、聚乙二醇、葡聚糖等作为大分子拥挤剂可促进熔球态肌红蛋白稳定结构的形成^[40-41,49]。在这些大分子拥挤剂作用下,肌红蛋白均呈现出熔球态的结构特征,非可 70 和聚乙二醇都是通过与肌红蛋白的血红素相互作用诱导肌红蛋白成熔球态构象^[40-41]。与天然状态的蛋白质相比,通过聚乙二醇作用下的熔球态具有疏水区域和更大的流体动力学体积^[41]。而且有研究发现在 pH2.0 时,盐浓度或葡聚糖浓度的增加,会导致熔球态结构的增加^[49]。另外,还有通过添加变性剂诱导肌红蛋白形成熔球态结构^[50],他们所使用的变性剂 2,2,2-三氟乙醇(TFE)是极性较小、疏水性较强的溶剂,可破坏疏水相互作用,并可作为三级结构的变性剂,在一定 pH 环境与变性剂浓度条件下,可诱导肌红蛋白成熔球态蛋白。

3.2 乳蛋白

多种方式均可诱导乳蛋白形成熔球态。在对于 α -乳白蛋白的研究发现,在极端 pH,热处理、去除结合的 Ca^{2+} 、添加变性剂(如尿素,盐酸胍)的方法可以诱导 α -乳白蛋白达到稳定熔球态结构,并诱导出熔球态结构的表面疏水性增加^[51-53,24]。通过核磁共振光谱学分析发现,由尿素诱导的牛 α -乳白蛋白与人 α -乳白蛋白的熔球态展开的残基的特异性信息是一致的,但牛 α -乳白蛋白与人 α -乳白蛋白相比,在相同的 pH 环境和温度环境下,牛 α -乳白蛋白需要添加比较少的变性剂即可诱导成熔球态,说明牛 α -乳白蛋白的抗展开能力较弱,比人 α -乳白蛋白更容易形成熔球态结构^[53]。对于 β -乳球蛋白熔球态的研究,使用酸、热或者酸热协同处理的方法诱导熔球态比较多^[54-57]。 β -乳球蛋白在 67.5 °C 的聚集过程中显示出典型的熔球态特征,但是仍然有一部分处于变性状态^[36],在 85 °C 加热 5 min 后 4 °C 冷却 1 h, β -乳球蛋白的 Cys 119 单体显示出分子重排形成非天然二硫键链接的熔球态^[54]。Yamamoto 等^[56]用核磁共振法分析发现,马的 β -乳球蛋白在经过低 pH

(pH < 4.0)的条件处理后,其呈现出熔球态构象。Tavel 等^[57]用酸热协同处理方法发现 pH2.59 条件下 80 °C 热处理诱导天然 β -乳球蛋白转化成熔球状态。还有通过高压与热联合处理的方法诱导 β -乳球蛋白的形成,在 600 MPa/50 °C 和 294 MPa/62 °C 联合作用诱导 β -乳球蛋白形成一种含有 α -螺旋的熔球结构^[58-59]。对于高压诱导深入研究发现,由于 α -乳白蛋白本身缺少游离巯基,所以本质上不易受高压诱导,所以在 200 MPa 时,才能形成可复性的熔球态结构,在 400 MPa 发生不可逆的变性,而 β -乳球蛋白则是在 50 MPa 条件下才可形成熔球态结构,150 MPa 发生不可逆的变性^[60-62]。

3.3 植物蛋白

大多采用 pH 偏移方法处理形成熔球态结构的植物蛋白,大多数植物中的蛋白质具有由多个亚基组成的紧密结构,当蛋白质分子处于极端 pH 条件时,生成高度带电结构(氨基质子化和羧基的去质子化),促进分子电荷排斥,然后调整至中性使分子内电荷排斥大大减少,发生一定程度的重折叠,四元结构被破坏并且单个单体获得熔球态。蒋将等^[63-64]利用这一性质研究了 pH 偏移处理对大豆分离蛋白(SPI)、 β -伴球蛋白(7S)和球蛋白(11S)的二、三级结构的影响。经极端 pH(1.5 和 12.0)偏移处理后, SPI 基本维持原二级结构但失去大部分三级结构,可认为此改性 SPI 处于熔球态。经 pH12.0 偏移处理后,豌豆蛋白处于熔球态,二级结构部分展开^[65]。Alam 等^[66]确认了大豆凝集素在酸性 pH2.2 形成熔球态,并添加半乳糖来探究对大豆凝集素熔球态稳定性的影响,在 pH2.2 下,50 mmol/L 半乳糖稳定了大豆凝集素的二级结构。

4 熔球态蛋白质的加工特性

熔球态蛋白在溶解性、乳化性、起泡性、凝胶性、酶消化能力及抗氧化活性方面展现了良好的作用效果^[4-5]。蒋将研究了 pH1.5 与 pH12.0 偏移处理大豆蛋白形成熔球态蛋白质的溶解性,发现经过 pH1.5 与 pH12.0 偏移处理后,在不同的离子强度下,溶解度曲线发生了改变,对于大豆分离蛋白、11S 蛋白,处理后的样品溶解度增加,并且在低盐溶液中,极端碱性偏移处理溶解性增大显著,但是对于偏移诱导后的 7S 蛋白,影响不大^[62]。相似的, pH12.0 偏移处理和超声联合工艺成功地提高了豌豆蛋白的溶解度,并显著降低了可溶性蛋白质聚集体的大小^[65]。pH 偏移处理后,大豆蛋白成为熔球态结构,保持了原有的二级结构和整体致密性,但三级结构松散,表面疏水性增加。这些结构的改变导致 SPI 的乳化活性及乳化稳定性显著改善^[67]。7S 的乳化性适度提高,但是 11S 对 pH 偏移处理更敏感,尤其是 pH12.0 偏移处理,也说明偏移处理后 11S 乳化性的增加决定 SPI 乳化性的变化^[64],证明富含大豆球蛋白的 SPI 特别适用于在生产中作为食品表面活性功能成分。同样的处理方法也适用于豌豆蛋白,碱性 pH 偏移处理改善了豌豆蛋白的乳化性^[68]。

目前研究骆驼中乳蛋白形成熔球态蛋白功能性

质的研究比较多,Lajnaf 等^[69]利用了熔球态结构的特性研究了 pH(4.3 和 6.5)和热处理(70 °C 和 90 °C, 30 min)对骆驼乳中 α -乳白蛋白起泡性和界面性质的影响,高温处理改变了骆驼 α -乳白蛋白溶液的起泡特性和在空气-水界面展开的能力。在中性 pH 下,发现热处理改善了起泡性,而在酸性(pH4.3)条件下,该性质降低。由于在低 pH 下蛋白质聚集的水平较高,泡沫在 pH4.3 的热处理之后比在 pH6.5 更稳定。在 90 °C 热处理 30 min,通过增加游离巯基浓度,在 pH6.5 下影响骆驼乳白蛋白的物理化学性质,热处理也引起 α -乳白蛋白表面电荷的变化^[69]。Salami^[5]报道了可用于婴幼儿配方粉的天然状态下和熔球态的骆驼 α -乳白蛋白,并评价了酶消化和抗氧化活性,并与牛 α -乳白蛋白进行对比,发现骆驼蛋白质比牛蛋白质更快水解和更大的抗氧化活性。

对于混合蛋白体系,熔球态的大豆蛋白作为辅料添加到其他产品中也有其他功能性质的改善。Niu 等^[70]研究了 pH1.5 与 60 °C 加热诱导的大豆蛋白分离物与肌原纤维蛋白混合物的凝胶化和流变学特性。与天然大豆蛋白分离物相比,加入酸热诱导的大豆分离蛋白之后,凝胶渗透力,储能模量值和损耗模量值显著增加,并且提高了体系凝胶的保水性。适用于生产粉碎的肉制品^[70]。蒋将等人研究了 pH 偏移处理大豆蛋白将其添加到肉蛋白中,观察能否对肉蛋白凝胶网络结构起到支撑作用和提高其持水性及乳化性。发现与单纯的肌原纤维分离蛋白凝胶相比,未经处理的大豆分离蛋白添加进去后降低了混合凝胶的强度,随着大豆分离蛋白添加量的增加,凝胶强度明显降低。但是经过 pH 偏移处理之后的大豆分离蛋白大豆蛋白亚基发生解离,有助于大豆分离蛋白和肌原纤维分离蛋白亚基相互作用,促进凝胶形成^[64]。类似的研究发现 pH1.5 偏移结合 60 °C 加热处理 5 h 的大豆蛋白与肌原纤维蛋白按照质量比 1:12、1:6、1:4 复配,肌原纤维蛋白的溶解度随比例增加而增大,浊度降低^[71]。

5 结语

随着经济的发展与人们对良好产品的诉求,蛋白质产品已经广泛应用于食品工业,良好的加工特性必然成为食品工业着重关注的对象。熔球态蛋白作为一个良好功能性表达的载体,已然成为优良的研究对象,但是现在仍有一部分蛋白质的熔球态结构表述不够完善,对于其亚基水平和结构成键角度的方向缺少更加细致的描述;当其被用于食品行业时,缺少更经济的熔球态结构稳定剂;无法确认熔球态结构与部分加工特性的关系。基于熔球态蛋白对于食品工业发展的益处,进行相关研究更具有深远的意义,也将成为未来的发展趋势。

参考文献

- [1] Ohgushi M, Wada A. 'Molten-globule state': A compact form of globular proteins with mobile side-chains[J]. FEBS letters, 1983, 164(1): 21-24.
- [2] Ptitsyn O B. Molten globule and protein folding[J]. Adv

Protein Chem, 1995, 47(47): 221-229.

- [3] Kataoka M, Tokunaga F, Kuwajima K, et al. Structural characterization of the molten globule of α -lactalbumin by solution X-ray scattering[J]. Protein Science, 1997, 6(2): 422-430.
- [4] Hirose M. Molten globule state of food proteins[J]. Trends in Food Science & Technology, 1993, 4(2): 48-51.
- [5] Salami M, Yousefi R, Ehsani M R, et al. Enzymatic digestion and antioxidant activity of the native and molten globule states of camel α -lactalbumin: Possible significance for use in infant formula[J]. International Dairy Journal, 2009, 19(9): 518-523.
- [6] Zwanzig R, Szabo A, Bagchi B. Levinthal's paradox[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, 89(1): 20-22.
- [7] Ptitsyn O B. Stages in the mechanism of self-organization of protein molecules[J]. Doklady Akademii Nauk SSSR, 1973, 210(5): 1213-1215.
- [8] Kuwajima K. Circular dichroism[J]. Methods Mol Biol, 1995, 49(539): 115-135.
- [9] Ikeguchi M, Kuwajima K, Mitani M, et al. Evidence for identity between the equilibrium unfolding intermediate and a transient folding intermediate: A comparative study of the folding reactions of α -lactalbumin and lysozyme[J]. Biochemistry, 1986, 25(22): 6965-6972.
- [10] Arai M, Kuwajima K. Rapid formation of a molten globule intermediate in refolding of α -lactalbumin[J]. Folding and Design, 1996, 1(4): 275-287.
- [11] Forge V, Wijesinha R T, Balbach J, et al. Rapid collapse and slow structural reorganisation during the refolding of bovine α -lactalbumin[J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 288(4): 673-688.
- [12] Arai M, Ito K, Inobe T, et al. Fast compaction of α -lactalbumin during folding studied by stopped-flow X-ray scattering[J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 321(1): 121-132.
- [13] Hughson F M, Wright P E, Baldwin R L. Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate[J]. Science, 1990, 249(4976): 1544-1548.
- [14] Morikis D, Wright P E. Hydrogen exchange in the carbon monoxide complex of soybean leghemoglobin[J]. European Journal of Biochemistry, 1996, 237(1): 212-220.
- [15] 萨梦尔夫·罗辽复伸展态 β -乳球蛋白重折叠过程的动力学特性[J]. 内蒙古师范大学学报:自然科学版, 2002(2): 108-111.
- [16] Lindhoud S, Pirchi M, Westphal A H, et al. Gradual folding of an off-pathway molten globule detected at the single-molecule level[J]. Journal of Molecular Biology, 2015, 427(19): 3148-3157.
- [17] Cleland J L, Wang D I C. Transient association of the first intermediate during the refolding of bovine carbonic anhydrase B[J]. Biotechnology Progress, 1992, 8(2): 97-103.
- [18] Mach H, Ryan J A, Burke C J, et al. Partially structured self-associating states of acidic fibroblast growth factor[J]. Biochemistry, 1993, 32(30): 7703-7711.
- [19] Vassilenko K S, Uversky V N. Native-like secondary

- structure of molten globules [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2002, 1594 (1): 168–177.
- [20] Kumari N K P, Jagannadham M V. SDS induced molten globule state of heynein; a new thiol protease: Evidence of domains and their sequential unfolding [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011, 82 (2): 609–615.
- [21] Dolgikh D A, Gilmanshin R I, Brazhnikov E V, et al. α -Lactalbumin: Compact state with fluctuating tertiary structure? [J]. *FEBS Letters*, 1981, 136 (2): 311–315.
- [22] Dar M A, Haque M A, Islam A, et al. Characterisation of molten globule-like state of sheep serum albumin at physiological pH [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 89: 605–613.
- [23] Semisotnov G V, Rodionova N A, Razgulyaev O I, et al. Study of the “molten globule” intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe [J]. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 1991, 31 (1): 119–128.
- [24] Naseem F, Ahmad B, Ashraf M T, et al. Molten globule-like folding intermediate of asialofetuin at acidic pH [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, 2004, 1699 (1–2): 191–199.
- [25] Edwin F, Jagannadham M V. Sequential unfolding of papain in molten globule state [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 252 (3): 654–660.
- [26] Welfle K, Misselwitz R, Hausdorf G, et al. Conformation, pH-induced conformational changes, and thermal unfolding of anti-p24 (HIV-1) monoclonal antibody CB4-1 and its Fab and Fc fragments [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1999, 1431 (1): 120–131.
- [27] Dave S, Mahajan S, Chandra V, et al. Specific molten globule conformation of stem bromelain at alkaline pH [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 499 (1–2): 26–31.
- [28] Kumar R, Prabhu N P, Rao D K, et al. The alkali molten globule state of horse ferricytochrome c: Observation of cold denaturation [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2006, 364 (3): 483–495.
- [29] Rao D K, Kumar R, Yadaiah M, et al. The alkali molten globule state of ferrocycytochrome c: Extraordinary stability, persistent structure, and constrained overall dynamics [J]. *Biochemistry*, 2006, 45 (10): 3412–3420.
- [30] Rami B R, Krishnamoorthy G, Udgaonkar J B. Dynamics of the core tryptophan during the formation of a productive molten globule intermediate of barstar [J]. *Biochemistry*, 2003, 42 (26): 7986–8000.
- [31] Rami B R, Udgaonkar J B. Mechanism of formation of a productive molten globule form of barstar [J]. *Biochemistry*, 2002, 41 (6): 1710–1716.
- [32] Davis-Searles P R, Morar A S, Saunders A J, et al. Sugar-induced molten-globule model [J]. *Biochemistry*, 1998, 37 (48): 17048–17053.
- [33] Saunders A J, Davis-Searles P R, Allen D L, et al. Osmolyte-induced changes in protein conformational equilibria [J]. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 2000, 53 (4): 293–307.
- [34] Kamiyama T, Sadahide Y, Nogusa Y, et al. Polyol-induced molten globule of cytochrome c: An evidence for stabilization by hydrophobic interaction [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1999, 1434 (1): 44–57.
- [35] Nakamura S, Seki Y, Katoh E, et al. Thermodynamic and structural properties of the acid molten globule state of horse cytochrome c [J]. *Biochemistry*, 2011, 50 (15): 3116–3126.
- [36] Sasahara K, McPhie P, Minton A P. Effect of dextran on protein stability and conformation attributed to macromolecular crowding [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2003, 326 (4): 1227–1237.
- [37] Hatters D M, Minton A P, Howlett G J. Macromolecular crowding accelerates amyloid formation by human apolipoprotein C-II [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277 (10): 7824–7830.
- [38] Dar M A, Haque M A, Idrees D, et al. Characterization of folding intermediates during urea-induced denaturation of human carbonic anhydrase II [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 95: 881–887.
- [39] Mendes L F S, Garcia A F, Kumagai P S, et al. New structural insights into golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in solution [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 29976.
- [40] Nasreen K, Ahamad S, Ahmad F, et al. Macromolecular crowding induces molten globule state in the native myoglobin at physiological pH [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 106: 130–139.
- [41] Parray Z A, Shahid S, Ahmad F, et al. Characterization of intermediate state of myoglobin in the presence of PEG 10 under physiological conditions [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 99: 241–248.
- [42] Stagg L, Zhang S Q, Cheung M S, et al. Molecular crowding enhances native structure and stability of α/β protein flavodoxin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104 (48): 18976–18981.
- [43] Cheung M S, Klimov D, Thirumalai D. Molecular crowding enhances native state stability and refolding rates of globular proteins [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102 (13): 4753–4758.
- [44] Wang Y, Sarkar M, Smith A E, et al. Macromolecular crowding and protein stability [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134 (40): 16614–16618.
- [45] Erlkamp M, Grobelny S, Winter R. Crowding effects on the temperature and pressure dependent structure, stability and folding kinetics of staphylococcal nuclease [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014, 16 (13): 5965–5976.
- [46] Cheung M S, Thirumalai D. Effects of crowding and confinement on the structures of the transition state ensemble in proteins [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007, 111 (28): 8250–8257.
- [47] Zhai Y, Winter R. Effect of molecular crowding on the temperature-pressure stability diagram of ribonuclease A [J]. *Chem Phys Chem*, 2013, 14 (2): 386–393.
- [48] Christiansen A, Wittung-Stafshede P. Synthetic crowding agent dextran causes excluded volume interactions exclusively to

tracer protein apoazurin [J]. FEBS Letters, 2014, 588 (5): 811-814.

[49] McPhie P, Ni Y, Minton A P. Macromolecular crowding stabilizes the molten globule form of apomyoglobin with respect to both cold and heat unfolding [J]. Journal of Molecular Biology, 2006, 361 (1): 7-10.

[50] Talele P, Kishore N. Thermodynamic analysis of partially folded states of myoglobin in presence of 2,2,2-trifluoroethanol [J]. The Journal of Chemical Thermodynamics, 2015, 84: 50-59.

[51] Matsumura Y, Mitsui S, Dickinson E, et al. Competitive adsorption of α -lactalbumin in the molten globule state [J]. Food Hydrocolloids, 1994, 8 (6): 555-566.

[52] Lam R S H, Nickerson M T. The effect of pH and temperature pre-treatments on the structure, surface characteristics and emulsifying properties of α -lactalbumin [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 163-170.

[53] Wijesinha-Bettoni R, Dobson C M, Redfield C. Comparison of the denaturant-induced unfolding of the bovine and human α -lactalbumin molten globules [J]. Journal of Molecular Biology, 2001, 312 (1): 261-273.

[54] Carrotta R, Bauer R, Waninge R, et al. Conformational characterization of oligomeric intermediates and aggregates in β -lactoglobulin heat aggregation [J]. Protein Science, 2001, 10 (7): 1312-1318.

[55] Croguennec T, Mollé D, Mehra R, et al. Spectroscopic characterization of heat-induced nonnative β -lactoglobulin monomers [J]. Protein Science, 2004, 13 (5): 1340-1346.

[56] Yamamoto M, Nakagawa K, Fujiwara K, et al. A native disulfide stabilizes non-native helical structures in partially folded states of equine β -lactoglobulin [J]. Biochemistry, 2011, 50 (49): 10590-10597.

[57] Tavel L, Moreau C, Bouhallab S, et al. Interactions between aroma compounds and β -lactoglobulin in the heat-induced molten globule state [J]. Food Chemistry, 2010, 119 (4): 1550-1556.

[58] Yang J, Dunker A K, Powers J R, et al. β -Lactoglobulin molten globule induced by high pressure [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49 (7): 3236-3243.

[59] Aouzelleg A, Bull L A, Price N C, et al. Molecular studies of pressure/temperature-induced structural changes in bovine β -lactoglobulin [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2004, 84 (5): 398-404.

[60] McGuffey M K, Epting K L, Kelly R M, et al. Denaturation and aggregation of three α -lactalbumin preparations at neutral pH

[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53 (8): 3182-3190.

[61] Stapelfeldt H, Skibsted L H. Pressure denaturation and aggregation of β -lactoglobulin studied by intrinsic fluorescence depolarization, Rayleigh scattering, radiationless energy transfer and hydrophobic fluoroprobing [J]. Journal of Dairy Research, 1999, 66 (4): 545-558.

[62] Considine T, Singh H, Patel H A, et al. Influence of binding of sodium dodecyl sulfate, all-trans-retinol, and 8-anilino-1-naphthalenesulfonate on the high-pressure-induced unfolding and aggregation of β -lactoglobulin B [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53 (20): 8010-8018.

[63] Jiang J, Wang Q, Xiong Y L. A pH shift approach to the improvement of interfacial properties of plant seed proteins [J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 19: 50-56.

[64] 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.

[65] Jiang S, Ding J, Andrade J, et al. Modifying the physicochemical properties of pea protein by pH-shifting and ultrasound combined treatments [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2017, 38: 835-842.

[66] Alam P, Naseem F, Abdelhameed A S, et al. Effect of galactose on acid induced molten globule state of soybean agglutinin: Biophysical approach [J]. Journal of Molecular Structure, 2015, 1099: 149-153.

[67] Jiang J, Chen J, Xiong Y L. Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57 (16): 7576-7583.

[68] Jiang J, Zhu B, Liu Y, et al. Interfacial structural role of pH-shifting processed pea protein in the oxidative stability of oil/water emulsions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62 (7): 1683-1691.

[69] Lajnaf R, Picart-Palmade L, Attia H, et al. The effect of pH and heat treatments on the foaming properties of purified α -lactalbumin from camel milk [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2017, 156: 55-61.

[70] Niu H, Li Y, Han J, et al. Gelation and rheological properties of myofibrillar proteins influenced by the addition of soybean protein isolates subjected to an acidic pH treatment combined with a mild heating [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 70: 269-276.

[71] 耿蕊. pH 偏移结合温和热处理对大豆分离蛋白结构及功能性的影响及其与肌原纤维蛋白的互作 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.

and anti-viral activity [J]. Phytochemistry, 2010, 71 (2-3): 235-242.

[42] Mandal P, Mateu C G, Chattopadhyay K, et al. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica* [J]. Antiviral Chemistry & Chemotherapy, 2007, 18 (3): 153-162.

(上接第 350 页)

2010, 24 (9): 1384-1391.

[40] Jiao G, Yu G, Zhang J, et al. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from Marine algae [J]. Marine Drugs, 2011, 9 (2): 196-223.

[41] Sinha S, Astani A, Ghosh T, et al. Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: Structural features, chemical modification