

热处理对蘑菇多酚氧化酶活性及结构的影响

周磊, 邹立强, 刘伟*, 方志超, 刘军平

(南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘要:以蘑菇多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)为原料,研究不同温度热处理对PPO活性的影响。选取不同温度(50、55、60、65℃)处理10 min后的PPO样液,应用圆二色光谱(circular dichroism, CD)和荧光光谱研究热处理对PPO二级结构和三级结构的影响。结果表明:在各温度下进行热处理的PPO活性均随着处理时间的延长逐渐降低,热处理温度越高抑制效果越明显;CD光谱表明热处理后的PPO二级结构发生了改变,主要表现在 α -螺旋含量下降, β -折叠含量升高,而 β -转角及无规卷曲含量则没有太大的变化;荧光光谱表明热处理后的PPO三级结构发生改变,表现在最大荧光发射峰发生了明显红移。

关键词:多酚氧化酶;热处理;二级结构;三级结构

Effect of Heat Treatment on Activity and Conformation of Mushroom Polyphenol Oxidase

ZHOU Lei, ZOU Li-qiang, LIU Wei*, FANG Zhi-chao, LIU Jun-ping

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The effect of heat treatment on the relative activity of polyphenol oxidase (PPO) from mushroom was investigated. The changes of secondary and tertiary structure of PPO after heat treatment at various temperatures (50, 55, 60 and 65 °C) for 10 min were analyzed by circular dichroism (CD) spectroscopy and fluorescence emission spectroscopy. The results showed that the relative activity of PPO decreased gradually with increasing treatment time at each investigated temperature. CD spectral analysis also showed that the secondary structure of PPO was changed after the heat treatment, which was reflected by a decrease of α -helix content and an increase of β -sheet content. However, no obvious difference was observed for β -turn and random coil contents. Meanwhile, fluorescence emission spectral analysis showed that the tertiary structure of PPO was changed after the heat treatment with an apparent red shift in the maximum peak wavelength.

Key words: polyphenoloxidase; heat treatment; secondary structure; tertiary structure

中图分类号: Q554.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2014)17-0160-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201417031

多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)催化的酶促反应是果蔬贮运及加工过程中引起褐变和品质劣变的主要原因之一,其中褐变反应在很大程度上影响果蔬的感官和营养品质。PPO普遍存在于真菌、植物、昆虫的质体中,在植物细胞组织中,PPO存在的位置因原料的种类、品种及成熟度的不同而有差异^[1-2]。PPO可以使单酚羟基转化为邻苯二酚,也可以催化邻苯二酚氧化成为醌类物质,这种醌类物质不稳定,容易进一步形成黑色素^[3]。PPO的抑制及钝化一直是研究的热点,应用手段主要有:加热法^[4-8]、物理方法(如超静高压^[9]、脉冲电场^[10])、化学方法(如亚硫酸盐^[11-12]、有机酸^[13])、以及多种处理手段相结合的方法(如超声结合水杨酸^[14]、高压结合温度^[15]、加热法结合抗坏血酸^[16])。在本课题

组先前的研究中则发现动态高压微射流能提高早酥梨PPO的活性^[17]。

加热法是抑制PPO酶活性简单而有效的方法,Ndiaye等^[4]报道了蒸汽热烫对PPO的抑制以达到对芒果片的护色效果。Schweiggert等^[5]报道了热处理对辣椒粉中多酚氧化酶的抑制效果,发现PPO热稳定性较差,在80℃条件下加热10 min后完全失活。Gouzi等^[6]报道了热抑制对蘑菇PPO动力学及热力学方面的影响,在65℃条件下加热4.8 min后蘑菇PPO基本失活。Chutintrasri等^[7]对菠萝片PPO的热抑制及动力学进行了研究。Ciou等^[8]研究了在加热过程中由于菱角PPO而引起的褐变问题。

然而,目前有关PPO热处理的报道主要集中在PPO活性、热力学及动力学方面,关于热处理对蘑菇PPO结

收稿日期: 2013-10-10

基金项目: 江西省青年科学家培养对象计划项目(20112BCB23003)

作者简介: 周磊(1990—),男,硕士研究生,研究方向为食品加工与安全。E-mail: ncuskzhoulei@163.com

*通信作者: 刘伟(1972—),男,教授,博士,研究方向为食品高新技术与资源综合利用。E-mail: liuwei@ncu.edu.cn

构的影响报道较少。光谱技术是研究蛋白质的构象与其功能关系的有效途径,其中圆二色光谱(circular dichroism, CD)可以灵敏地反映蛋白质构象的变化,已经被广泛的应用于蛋白质的构象研究中^[9,13,18]。蛋白质的内源荧光是由蛋白质分子内部色氨酸(tryptophan, Trp)和酪氨酸(tyrosine, Tyr)残基激发所产生,当蛋白质于280 nm波长下激发,Trp与Tyr能同时发生感应,因此可以反映蛋白质的三级结构。Sun等^[19]运用荧光光谱考察了高压对蘑菇PPO三级结构的影响,Liu Wei等^[13]运用荧光光谱考察了柠檬酸对蘑菇PPO三级结构的影响。本实验运用CD和荧光光谱研究热处理对蘑菇PPO二、三级结构的影响,从机理上分析PPO活性变化的原因,为进一步研究热处理对PPO的抑制机理提供一定的理论依据。酶学性质与酶的构象变化有着密切的关系,了解热处理对PPO结构的改变有利于更好地利用热处理来控制PPO的活性,对果蔬的贮藏和运输具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蘑菇PPO(酶活力700 U/mg) 美国Worthington Biochemical公司。

邻苯二酚、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠 天津市大茂化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

PC-1600紫外光谱仪 上海美谱达公司; MOS-450型圆二色光谱 法国Bio-Logic公司; F-7000型荧光光度计 日本日立公司; 超纯水系统 美国Millipore公司; 数显恒温水浴锅 江苏省荣华有限公司。

1.3 方法

1.3.1 PPO溶液的热处理

PPO热稳定性的实验参照Gouzi等^[6]的方法,作了部分修改:准确称取25.00 mg PPO溶解于100 mL 50 mmol/L、pH 6.8的磷酸缓冲液配制成PPO溶液。热处理在恒温水浴中进行,设定温度梯度为50、55、60、65℃。将2 mL的PPO溶液加入到在固定温度下预热后的试管中,加热固定的时间后取出,立即于冰水浴中冷却至常温。50℃条件下样品的处理时间分别为10、20、30、40、50、60 min; 55℃条件下样品的处理时间分别为5、10、15、20、25、30 min; 60、65℃条件下样品的处理时间分别为5、10、15、20 min。

1.3.2 PPO活性的测定

PPO活性的测定参照Liu Wei等^[20]的方法。反应底物包括2.7 mL 50 mmol/L、pH 6.8的磷酸缓冲溶液与0.2 mL 2 mmol/L的邻苯二酚溶液,底物溶液预先在水浴锅(37℃)内恒温20 min。迅速将反应底物与0.1 mL

热处理后的PPO混合,立即于420 nm波长处测定其吸光度,待反应5 min后再测定一次吸光度。每个样品的活性平行测定3次。

酶活力单位的定义:1 min内,每毫升酶液吸光度变化0.001定义为1个酶活力单位(U)。

$$\text{相对酶活力}/\% = \frac{\text{经处理后样品的酶活力}/(\text{U/mL})}{\text{未处理样品的酶活力}/(\text{U/mL})} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 热处理对PPO失活曲线的分析

酶的热失活动力学数据分析可用一级方程来描述:

$$\frac{dA_t}{dt} = -k \times A_t \quad (2)$$

式中: A_t 为处理 t min后的相对酶活力%; k 为失活速率常数/ min^{-1} 。

上述一级反应方程式可进行转变,得到公式:

$$\ln \left(\frac{A_t}{A_0} \right) = -k \times t \quad (3)$$

式中: A_0 是原酶活力/(U/mL); A_t 是处理 t min后的相对酶活力%; k 是失活速率常数/ min^{-1} 。根据上述公式作图并计算出各温度处理的PPO的 k 值。

1.3.4 CD光谱扫描及分析

利用MOS-450型圆二色光谱仪进行CD波谱采集。参照Liu Wei^[20]和Yi Jianyong^[9]的方法,作了部分修改。取0.35 mL经各温度(50、55、60、65℃)热处理10 min后的PPO置于样品池后立即扫描,扫描波长范围为250~190 nm,在室温(25±1)℃条件下重复扫描4次,取其平均值,用磷酸盐溶液(50 mmol/L、pH 6.8)作空白溶液。CD数据用平均残基椭圆率 θ 表示,单位为($\text{mdeg} \cdot \text{cm}^2$)/dmol。采用SELCON 3程序分析蘑菇PPO中 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲等二级结构的含量^[9],其中蘑菇PPO的平均残基量为113.7。用快速傅里叶转换将4次扫描所得结果的平均值进行平滑处理。

1.3.5 荧光光谱扫描

利用F-7000型荧光光度计在室温(25±1)℃条件下测定蘑菇PPO溶液的荧光光谱。参照Liu Wei等^[20]的方法,做了部分修改。发射和激发光路的狭缝宽度均设为5 nm,激发波长 λ_{ex} 设定为280 nm,扫描波长 λ_{em} 范围设定为290~450 nm,取2.5 mL经各温度(50、55、60、65℃)热处理10 min后的PPO置于样品池后立即扫描,用磷酸盐溶液(50 mmol/L、pH 6.8)作空白溶液。

1.4 数据分析及处理

采用SAS软件进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 不同温度热处理对PPO相对酶活性的影响

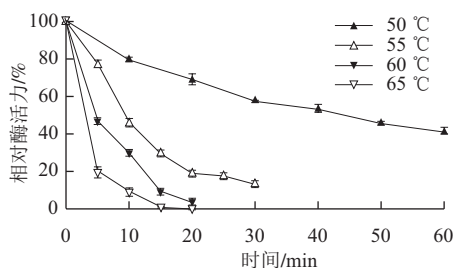


图1 不同温度热处理对PPO相对酶活性的影响

Fig.1 Effect of heat treatment on relative activity of PPO

如图1所示,在各处理温度(50、55、60、65 °C)条件下随处理时间延长,PPO的相对酶活性逐渐下降,抑制效果越明显。当热处理温度为50 °C时PPO的活性变化相对缓慢,处理30 min后相对酶活力为57.7%;55 °C处理30 min后相对酶活力为13.3%,PPO显著失活;60 °C处理10 min后相对酶活力为29.7%;热处理温度为65 °C时PPO的活性变化最快,处理10 min后相对酶活力仅为9.1%,PPO基本失活。根据图1计算出各曲线的斜率并得出失活速率常数(k), k 值随温度的升高而变大,50、55、60、65 °C对应的 k 值分别为0.014、0.071、0.159、0.262 min⁻¹。由此可见,在一定温度范围内,PPO的 k 值与热处理温度呈正相关性,热处理温度越高抑制效果越明显,热稳定性越差。

在之前的研究^[13]中也发现随着热处理温度升高抑制效果增强,且随着处理时间的延长抑制效果越明显, k 值随温度的升高而变大。Gouzi等^[6]报道了热处理对蘑菇PPO粗酶液热处理的抑制效果:热处理温度越高抑制效果越明显,45、50、55 °C加热30 min后相对酶活性依次降低,在60 °C条件下加热30 min后PPO则完全失活; k 值随温度升高而变大,50、55、60、65 °C时分别为0.009、0.018、0.059、0.480 min⁻¹,这与本研究结果相似。易建勇等^[21]也报道了热处理温度越高蘑菇PPO的抑制效果越明显,失活速率常数随着温度的升高而变大。不同种类的PPO其热稳定性存在差异,Gnangui等^[22]等报道了山药PPO的热稳定性,50、55、60、65 °C时其失活速率常数分别为0.025、0.028、0.046、0.057 min⁻¹,除50 °C外其 k 值均小于蘑菇PPO,故在55、60、65 °C条件下其热稳定性比蘑菇PPO更好;Rapeanu等^[23]等研究发现维多利亚葡萄PPO在55、60、65 °C时其 k 值分别为0.017 2、0.055 9、0.200 0 min⁻¹,均小于蘑菇PPO的 k 值,其热稳定性好于蘑菇PPO。

2.2 热处理对PPO酶液CD光谱的影响

由图2可知,CD光谱在208 nm及222 nm两处有负的吸收峰,表明蘑菇PPO含较多的 α -螺旋。各温度热处理后的PPO在200~230 nm波段的负椭圆值变大,这表明热处理后PPO的二级结构发生了变化。利用程序SELCON3计算出蘑菇多酚氧化酶二级结构的含量,如表1所示,未

处理的PPO其 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规卷曲的含量分别为37.2%、11.8%、26.0%、25.0%。经50、55、60、65 °C热处理10 min后其 α -螺旋含量分别下降至30.2%、29.1%、29.4%、25.8%; β -折叠含量分别增加至19.0%、20.2%、17.3%、20.5%; β -转角和无规卷曲的含量则无太大变化。热处理后的PPO相对酶活性变化较小时其二级结构也会有较大变化,如50 °C处理10 min后其PPO相对酶活力为79.6%,而 α -螺旋含量从37.2%下降至30.2%, β -折叠含量则从11.8%增加至19.0%。由此可见,PPO在热处理后即使活性变化不大,其二级结构也会发生较大的变化。总体而言,蘑菇PPO经热处理后其二级结构发生明显改变,其中 α -螺旋含量的下降导致酶活性中心的构象遭到破坏,从而使PPO失活^[9]。Yi Jianyong等^[9]研究了高压对PPO二级结构的影响,经不同压力处理后的PPO其 α -螺旋含量下降, β -折叠含量增加。同样的变化出现在先前的研究^[13]中,PPO经柠檬酸处理后其 α -螺旋含量下降, β -折叠含量增加, β -转角和无规卷曲的含量变化则较小。已有文献报道了蘑菇酪氨酸酶经高温处理后 α -螺旋有所损失^[18],但 β -折叠、 β -转角及无规卷曲的变化情况及各含量的数值未报道。PPO的种类不同其二级结构元件的含量存在差异,但经过不同手段处理后活性发生下降的PPO其 α -螺旋含量也会降低,如Kanade等^[24]报道未经处理的扁豆PPO其 α -螺旋含量为29%,十二烷基硫酸钠以及酸性条件均可导致其活性下降、 α -螺旋含量降低,这与本实验结果类似。

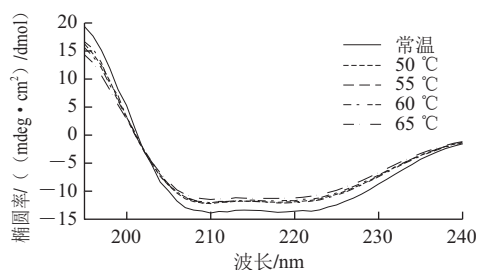


图2 不同温度处理10 min后PPO酶液的CD光谱

Fig.2 CD spectra of PPO subjected to heat treatment at different temperatures for 10 min

表1 热处理后PPO二级结构的含量
Table 1 Secondary structure contents of heat-treated PPO

温度/°C	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
常温	37.2±1.1 ^a	11.8±0.9 ^c	26.0±0.7 ^a	25.0±0.8 ^d
50	30.2±0.7 ^b	19.0±0.4 ^{ab}	22.7±0.2 ^b	28.1±0.6 ^{bc}
55	29.1±0.9 ^b	20.2±0.6 ^a	23.3±0.8 ^b	27.4±0.9 ^c
60	29.4±0.7 ^b	17.3±1.2 ^b	24.1±0.4 ^b	29.2±0.6 ^{ab}
65	25.8±1.0 ^c	20.5±0.9 ^a	23.7±0.4 ^b	30.0±0.3 ^a

注:同列字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

本研究发现热处理能使PPO α -螺旋含量下降, β -折叠含量增加, 这可能是热处理导致 α -螺旋向 β -折叠发生转变, 在部分研究中已提出了相关观点。如有研究^[25]报道玉米蛋白的这一变化, 玉米蛋白自组装后 α -螺旋向 β -折叠发生转变; Sugiyama等^[26]则利用原子力显微镜和透射电镜研究了这一转变。

2.3 热处理对PPO酶液荧光光谱的影响

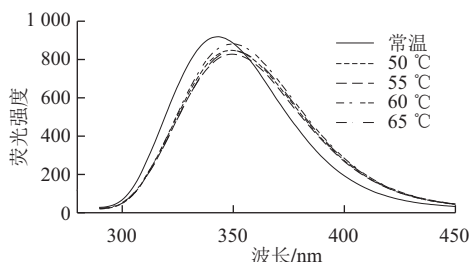


图3 不同温度处理10 min后PPO酶液的荧光光谱

Fig.3 Fluorescence emission spectra of PPO subjected to heat treatment at different temperatures for 10 min

图3为不同温度处理10 min后PPO酶液在激发波长 λ_{ex} 为280 nm条件下扫描得到的荧光光谱, 可见, 不同温度处理后的PPO荧光光谱的荧光强度略有下降, 但并不明显。最大荧光发射峰则发生明显的红移, 经50、55、60、65 °C热处理10 min后, 最大荧光发射峰从343.6 nm分别移动至349.6、350.2、350.2、350.4 nm, 这比本课题组先前研究^[13]报道的PPO经60 mmol/L的柠檬酸处理后最大荧光发射峰红移(341 nm→344 nm)的效果更加明显。本实验中, 热处理后的PPO相对酶活性变化较小时其最大荧光发射峰也会发生明显的红移, 如50 °C处理10 min后PPO相对酶活力为79.6%, 最大荧光发射峰从343.6 nm移动至349.6 nm。由此可见, PPO在热处理后即使活性变化不大, PPO酶液荧光光谱也会发生较大的变化。Yi Jianyong等^[9]报道了PPO经高压处理后活性下降, 荧光强度降低, 最大荧光发射峰发生红移; Hu Wanfeng等^[18]发现蘑菇酪氨酸酶经过一定温度和时间的超临界CO₂处理后其荧光光谱的最大发射峰也发生了移动。蛋白质荧光光谱的变化对应着蛋白质三级结构的改变^[27], 发射波长在320~350 nm时, 蛋白质荧光光谱主要表现为色氨酸的特征, 通过扫描所得到的最大荧光发射峰以及峰强度受到发射基团和周围溶液环境的影响^[28]。最大荧光发射峰的红移及荧光强度的下降表明PPO分子中一些色氨酸残基周围环境的疏水性降低, PPO发生部分去折叠, 芳香族氨基酸暴露在分子表面^[9]。经不同温度热处理后的PPO最大荧光发射峰明显红移, 三级结构发生改变。

3 结论

在各温度下进行热处理的PPO随处理时间增长其活性逐渐降低, 在一定温度范围内, PPO的失活速率常数

(k)与热处理温度呈正相关性, 热处理温度越高抑制效果越明显; 经不同温度热处理10 min后PPO二级结构发生变化, 主要表现在 α -螺旋含量下降, β -折叠含量增加, β -转角和无规卷曲的含量则无太大变化; 经不同温度热处理10 min后PPO三级结构发生改变, 最大荧光发射峰发生明显的红移。

参考文献:

- [1] GARCÍA S C, BUZALEH A M. Polyphenoloxidase: an enzyme widespread in fruits[J]. Biochemical Education, 1994, 22(3): 152-153.
- [2] DICKO M H, HILHORST R, GRUPPEN H, et al. Comparison of content in phenolic compounds, polyphenol oxidase, and peroxidase in grains of fifty sorghum varieties from burkina faso[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(13): 3780-3788.
- [3] ISMAYA W T, ROZEBOOM H J, WEIJN A, et al. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone[J]. Biochemistry, 2011, 50(24): 5477-5486.
- [4] NDIAYE C, XU Shiyong, WANG Zhang. Steam blanching effect on polyphenoloxidase, peroxidase and colour of mango (*Mangifera indica* L.) slices[J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 92-95.
- [5] SCHWEIGGERT U, SCHIEBER A, CARLE R. Inactivation of peroxidase, polyphenoloxidase, and lipoxygenase in paprika and chili powder after immediate thermal treatment of the plant material[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2005, 6(4): 403-411.
- [6] GOUZI H, DEPAGNE C, CORADIN T. Kinetics and thermodynamics of the thermal inactivation of polyphenol oxidase in an aqueous extract from *Agaricus bisporus*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(1): 500-506.
- [7] CHUTINTRASRI B, NOOMHORM A. Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree[J]. LWT-Food Science and Technology, 2006, 39(5): 492-495.
- [8] CIOU J Y, LIN H H, CHIANG P Y, et al. The role of polyphenol oxidase and peroxidase in the browning of water caltrop pericarp during heat treatment[J]. Food Chemistry, 2011, 127(2): 523-527.
- [9] YI Jianyong, JIANG Bin, ZHANG Zhong, et al. Effect of ultrahigh hydrostatic pressure on the activity and structure of mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenoloxidase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(2): 593-599.
- [10] ZHONG Kui, WU Jihong, WANG Zhengfu, et al. Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO[J]. Food Chemistry, 2007, 100(1): 115-123.
- [11] ZHAO Zhengang, ZHU Licai, YU Shujuan, et al. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)[J]. Sugar Industry-Zuckerindustrie, 2011, 136(5): 296-301.
- [12] PALMA-OROZCO G, ORTIZ-MORENO A, DORANTES-ÁLVAREZ L, et al. Purification and partial biochemical characterization of polyphenol oxidase from mamey (*Pouteria sapota*)[J]. Phytochemistry, 2011, 72(1): 82-88.
- [13] LIU Wei, ZOU Liqiang, LIU Junping, et al. The effect of citric acid on the activity, thermodynamics and conformation of mushroom polyphenoloxidase[J]. Food Chemistry, 2013, 140(1/2): 289-295.
- [14] YANG Zhenfeng, CAO Shifeng, CAI Yuting, et al. Combination of salicylic acid and ultrasound to control postharvest blue mold caused by *Penicillium expansum* in peach fruit[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2011, 12(3): 310-314.

- [15] TEREFE N S, YANG Y H, KNOERZER K, et al. High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11(1): 52-60.
- [16] CHOW Y N, LOUARME L, BONAZZI C, et al. Apple polyphenoloxidase inactivation during heating in the presence of ascorbic acid and chlorogenic acid[J]. Food Chemistry, 2011, 129(3): 761-767.
- [17] LIU Wei, LIU Jianhua, XIE Mingyong, et al. Characterization and high-pressure microfluidization-induced activation of polyphenoloxidase from Chinese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(12): 5376-5380.
- [18] HU Wanfeng, ZHANG Yan, WANG Yuanyuan, et al. Aggregation and homogenization, surface charge and structural change, and inactivation of mushroom tyrosinase in an aqueous system by subcritical/supercritical carbon dioxide[J]. Langmuir, 2010, 27(3): 909-916.
- [19] SUN N, LEE S, SONG K B. Effect of high-pressure treatment on the molecular properties of mushroom polyphenoloxidase[J]. LWT-Food Science and Technology, 2002, 35(4): 315-318.
- [20] LIU Wei, LIU Jianhua, LIU Chengmei, et al. Activation and conformational changes of mushroom polyphenoloxidase by high pressure microfluidization treatment[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009, 10(2): 142-147.
- [21] 易建勇, 姜斌, 董鹏, 等. 高压和热处理对蘑菇多酚氧化酶的钝化动力学分析[J]. 农业机械学报, 2012, 43(9): 136-142.
- [22] GNANGUI S N, DUÉ E A, KOUADIO P E N, et al. Effect of heat treatment on edible yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata* cv Longbô) polyphenol oxidase activity: kinetic and thermodynamic analysis[J]. Journal of Animal and Plant Sciences, 2009, 2(3): 128-137.
- [23] RAPEANU G, VAN LOEY A, SMOUT C, et al. Biochemical Characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*)[J]. Food Chemistry, 2006, 94(2): 253-261.
- [24] KANADE S R, PAUL B, RAO A G A, et al. The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichlos lablab*) upon SDS and acid-pH activation[J]. The Biochemical Journal, 2006, 395(3): 551-562.
- [25] WANG Y, PADUA G W. Nanoscale characterization of zein self-assembly[J]. Langmuir, 2012, 28(5): 2429-2435.
- [26] SUGIYAMA Y, INOUE Y, MUNYUKI E, et al. AFM and TEM observations of α -helix to β -sheet conformational change occurring on carbon nanotubes[J]. Journal of Electron Microscopy, 2006, 55(3): 143-149.
- [27] ZHOU Linyan, WU Jihong, HU Xiaosong, et al. Alterations in the activity and structure of pectin methylesterase treated by high pressure carbon dioxide[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(5): 1890-1895.
- [28] WEEMAES C, LUDI KHUYZE L, BROECK I, et al. High pressure inactivation of polyphenoloxidases[J]. Journal of Food Science, 1998, 63(5): 873-877.