

天然生物防腐剂溶菌酶的改性研究进展

赵电波¹, 白艳红¹, 张小燕², 毋尤君³

- (1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 郑州 450002
- 2 郑州科技学院, 郑州 450064;
- 3 新郑市河南正龙食品有限公司, 郑州 450002)

摘要: 溶菌酶是一种专门作用于微生物细胞壁的糖苷水解酶, 作为天然生物防腐剂可广泛用于食品、医药和日化用品等领域。但是, 天然溶菌酶为非广谱抗菌剂, 主要作用于革兰氏阳性细菌, 在于能够水解细胞壁的主要成分肽聚糖, 而革兰氏阴性菌细胞壁中肽聚糖含量很少, 且被一层较厚的脂多糖类物质所覆盖, 所以对革兰氏阴性细菌几乎没有作用。一些学者通过改性研究以实现天然溶菌酶对革兰氏阴性细菌的杀灭或抑制作用。文中概述了国内外对溶菌酶的化学改性、生物改性以及物理法超高压改性的研究进展, 分析了不同改性方法的效果、优点与不足, 并对应用前景进行了展望, 拓宽天然溶菌酶的抗菌谱和使用范围, 对天然溶菌酶改性研究和作为广谱抗菌剂的使用提供了重要依据。

关键词: 溶菌酶; 改性; 革兰氏阴性细菌; 抑菌
中图分类号: Q946.5 文献标识码: A 文章编号: 1006—2513(2010)05—0200—05

Research progress of modification of natural
biological preservative lysozyme

ZHAO Dianbo, BAIYanhong, ZHANG Xiaoyan, WU Youjun

- (1. College of Food and Biological Engineering, Zhengzhou University of Light Industry
Zhengzhou 450002, 2. Science and Technology College of Zhengzhou, 450064
3. Henan Zhenglong Food Ltd., Xinzheng 450002)

Abstract: Lysozyme is a kind of glycoside hydrolase which especially acts on microbial cell walls. It is widely used as a sort of natural biological preservative in some areas such as food industry, pharmaceutical industry and daily chemical articles. However, natural lysozyme is the non-broad-spectrum antimicrobial agent which mainly works on gram-positive bacteria and nearly has no effect on gram-negative bacteria because lysozyme can hydrolyze peptidoglycan, however, content of peptidoglycan is little and peptidoglycan was covered by lipopolysaccharide in gram-negative bacteria. Some researchers have done researches on modification of lysozyme in order to enable it to act on gram-negative bacteria. This paper summarized research progress of chemical modification, biological modification and physical modification (ultra-high pressure) of lysozyme. It also analyzed the impacts, advantages and disadvantages of different ways of modification, broaden the antimicrobial spectrum and the use scope of natural lysozyme and gave a prospect of practical application of modification of lysozyme. This paper offered significant basis for researches on modification of natural lysozyme and the usage of natural lysozyme as a kind of broad-spectrum antimicrobial agent.

Key words: lysozyme; modification; gram-negative bacteria; antimicrobial

收稿日期: 2010-09-03
基金项目: 河南省教育厅自然科学研究计划项目 (2009A550008)。
作者简介: 赵电波 (1975-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事食品加工与质量安全控制方面的研究工作。

1 引言

溶菌酶 (Lysozyme EC3.2.1.17) 又称胞壁质酶 (Muramidase), 是一种专门作用于微生物细胞壁的糖苷水解酶, 广泛存在于人体的心、肝、脾、肺和肾等多种组织器官以及血液、汗液等分泌物中, 多数商品溶菌酶是从蛋清中分离纯化得到的。1963年 Jolles和 Canfield研究测定了鸡蛋清溶菌酶的一级结构^[1]。1965年 Phillips等用 X射线衍射法解析了溶菌酶的立体结构^[2-3]。其活性中心由 Glu35和 Asp53残基组成, 四个分子内二硫键对空间结构的维持起着重要作用。溶菌酶被 FAO/WHO食品添加剂委员会认定在食品中使用是安全的^[4], 目前已广泛用于食品、医药和日化用品等领域。但天然溶菌酶为非广谱抗菌剂, 主要作用于革兰氏阳性细菌, 对革兰氏阴性细菌几乎没有作用。因为溶菌酶能够水解细菌细胞壁的主要成分肽聚糖, 水解位点是 N-乙酰胞壁酸 (NAM) 的 C和 N-乙酰葡萄糖胺 (NAG) 的 C之间的 $\beta-1, 4$ -糖苷键, 革兰氏阳性菌细胞壁肽聚糖层较厚, 而且位于最外层, 溶菌酶能够有效对其水解; 而革兰氏阴性菌细胞壁中肽聚糖含量很少, 而且被一层较厚的脂多糖类物质 (Lipopolysaccharides, LPS 主要由脂多糖、脂质双层、脂蛋白组成) 所覆盖, 溶菌酶很难通过外膜而进入革兰氏阴性菌细胞壁的肽聚糖层进行水解, 限制了溶菌酶作为一种天然广谱生物抗菌剂的广泛应用。近年来, 一些学者通过物理或化学的方法对溶菌酶进行改性研究, 以期获得对革兰氏阴性菌的抑制或杀灭效果。

2 天然溶菌酶的化学改性研究

2.1 天然溶菌酶与其他试剂的协同使用

早在 19世纪 60年代, Shivel^[5]就指出可以利用一些细胞膜干扰剂如三聚磷酸钠和 EDTA来增强革兰氏阴性菌对溶菌酶的敏感性。其机理主要在于细胞膜干扰剂能够络合细胞膜肽聚糖层上作为盐桥的二价金属离子, 破坏细胞膜的稳定性。Jil^[6]研究指出, EDTA能够提高溶菌酶对 *E. coli*和 *L. monocytogenes*的抑制效果, 主要原因在于 EDTA能够螯合去除细胞壁周围的 Ca^{2+} 和

Mg^{2+} 。国内一些学者也通过溶菌酶与 EDTA复配使用, 通过 EDTA螯合剂破坏革兰氏阴性菌脂多糖的结构稳定性, 使肽聚糖层暴露出来, 实现了对革兰氏阴性菌的抑制作用^[7-8]。Rao等^[9]研究了几丁寡糖 (COS) 和溶菌酶对肉类保鲜的协同效果, 相比较于单独使用溶菌酶, COS和溶菌酶结合使用对革兰氏阴性菌的杀灭作用增强, 减少了肉中 *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*和 *Bacillus cereus*的初始菌数, 延长了肉的货架期, 主要原因在于 COS在 C-2位置上存在正电荷, 形成多聚阳离子结构, 能和革兰氏阴性菌表面的主要的阴离子组分反应。

2.2 天然溶菌酶的化学修饰研究

近年来一些学者通过试验, 尝试对天然溶菌酶进行化学修饰, 增强其向革兰氏阴性细菌肽聚糖层渗透的能力, 希望获得对革兰氏阴性菌的杀灭或抑制效果, 为天然溶菌酶的改性研究奠定了基础。Ibrahim等^[10]用紫苏醛对溶菌酶进行修饰, 合成了对 *Staphylococcus aureus*和 *Escherichia coli*有抑制能力的 Perillaldehyde-Lysozyme 聚合物。Zahra Alahdadi和 Roghaye Ramezan等^[11-12]用葡聚糖硫酸酯对溶菌酶进行修饰后, 发现对革兰氏阴性菌也有一定的抑制作用。Li和 Bemko-Schnuch等^[13-14]利用溶菌酶和一些疏水配体 (例如: 脂肪酸, 肉桂酸, 咖啡酸) 共价结合, 使其能与革兰氏阴性菌细胞膜相互作用, 达到杀菌的效果。Visalakshy Touch等^[15]利用 2mm二硫苏糖醇在 pH8.0 30℃条件下处理溶菌酶 0.5~4h 结果增强了溶菌酶对革兰氏阴性菌的杀菌效果, 杀菌程度取决于溶菌酶的还原程度和细菌菌株的类型, 原因可能是二硫苏糖醇使溶菌酶二硫键还原, 导致分子有更大的柔韧性, 暴露了更多的表面疏水区域, 改变了它的圆二特性, 从而增强了和细胞膜结合的亲和力 (affinity), 更利于杀灭革兰氏阴性菌。Burn^[16]研究指出, 疏水配基和溶菌酶结合可以生成一种 amphitropic蛋白, 可以穿过革兰氏阴性菌的外膜, 达到灭菌的效果。Andreas Bemko-Schnuch等^[17]研究指出, 相比较于天然的溶菌酶, 溶菌酶和咖啡酸和肉桂酸通过共价结合的改性产物, 对 *Escherichia coli* (ATCC 8739) 的抑制作用更强。

2.3 天然溶菌酶的热改性研究

Hisham等^[18-19]在研究溶菌酶的化学修饰过程中, 无意中发现溶菌酶经加热部分变性后, 可抑制革兰氏阴性菌 *Escherichia coli* k12 的生长, 同时对革兰氏阳性菌的杀菌效果下降不明显; Hisham还发现定点突变后溶菌酶的水解活性下降, 但对 *Staphylococcus aureus* 和 *Bacillus subtilis* 的抑制作用却是增强的^[20]。可见, 溶菌酶的水解活性(即催化活性)与抑菌功能是相互独立的, 其结构变化与对革兰氏阴性菌的抑制功能有着密切的联系。Hisham等^[21]研究指出, 溶菌酶在 pH 6.0 80℃热处理 20 min (HI80/6) 后, 保留了天然溶菌酶活性的 54%, 在不影响对革兰氏阳性菌杀菌效果的同时, 对革兰氏阴性菌的生长也起到抑制作用, 使 HI80/6 成为一种广谱抗菌剂, 蛋白质疏水基团的暴露是其活性增强的主要原因。实际上, 抗菌体系必须和食品组分配合, 同时, 研究还指出蔗糖和盐都是 HI80/6 的增效剂, 使其在食品中有更加广泛的应用。Klaus Düring^[22]也指出, 热变性后的溶菌酶对革兰氏阴性菌的杀菌效果增强, 主要原因在于形成的二聚体形式插入到细胞膜内, 造成细胞破裂。

3 天然溶菌酶的生物改性研究

Hileyuk等^[23]研究基因改性对溶菌酶抑菌活性的影响, 通过对其 C-末端添加疏水肽类, 溶菌酶对大肠杆菌的抑菌活性明显增强, 主要原因可能是疏水肽类能穿透细胞外膜, 达到水解肽聚糖的目的。Benkop-Schnurch^[14]利用疏水配基对溶菌酶进行分子改性, 溶菌酶的抑菌活性增强, 扩大了溶菌酶的作用范围。

4 天然溶菌酶的超高压改性研究

超高压技术 (Ultra High Pressure UHP 或 High Hydrostatic Pressure HHP) 是纯物理过程, 是在常温或较低温度下采用 100 ~ 1000 MPa 的静态液压力作用于物料, 使之理化性质发生变化, 同时达到灭菌、酶钝化和改善品质等效果。曾庆梅^[24]等人指出在 200 ~ 300 MPa 压力下处理梨汁时, 多酚氧化酶 (PPO) 被激活, 活性最高; 500 MPa 压力时酶活性下降到 75.3%, 且随着压

力的升高, 酶活性呈下降趋势; 通过圆二色谱测定, 发现其活性与二级结构中的 β -折叠片含量呈相关性。Snelle等^[25]采用超高压技术研究蛋白质的折叠中发现, 一部分结构变化在卸压后不会回复到原来的状态, 而另一部分又重新折叠为原来的构象。Mozhaev^[26]则把这种中间状态称为“熔球态” (molten globule states), 解压后这种中间态也能够稳定地存在^[27]。一些学者也研究了超高压对溶菌酶的作用效果, 观察到当溶菌酶空间结构部分展开时, 在不失去对革兰氏阳性菌活性的同时对革兰氏阴性菌的作用效果也增强了。Iuccci Parigiani Vallicelli Guerzoni and Lancotti^[28]也得到了同样的结果, 研究发现, 经高压均质化处理 (100 MPa) 的溶菌酶对 *Listeria monocytogenes* 的抗菌活性增强。Alline等^[29]研究了溶菌酶和超高压均质化协同对 *Lactobacillus brevis* 的影响, 指出二者存在协同增效作用, 相比较于单独的处理, 对 *Lactobacillus brevis* 的抑菌作用更强。早在 1988 年, Proctor^[30]就指出此协同作用归因于溶菌酶的作用方式, 溶菌酶对细胞壁的部分裂解作用, 降低了其对压力处理的破裂阈值。同时也指出当压力水平分别为 250 MPa 和 300 MPa 时, 使酶活分别下降 12% 和 50%, 300 MPa 时 50% 的酶活丧失, 相当于在 pH 6.0 80℃加热 20 min Dorothy Nakinbugwe等^[31]研究了超高压和溶菌酶结合处理对牛奶和香蕉汁中革兰氏阴性菌的抑制作用, 研究指出, 对于牛奶和香蕉汁中的四种革兰氏阴性菌 (*Escherichia coli* O157, *H. Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* 和 *Salmonella typhimurium*) 的抑制作用而言, 超高压结合 λ 溶菌酶的处理较蛋清溶菌酶更有效, 单独超高压处理可是菌落总数下降 0.4 ~ 2.7 个对数单位, 而添加 224 U/mL 的 λ 溶菌酶后, 菌落数下降将增加到 3.6 ~ 6.5 个对数单位。Ann M. J. Diels等^[32]研究指出, 在大于 150 MPa 的压力水平时, 高压均质化 (HPH) 处理前加入溶菌酶, 可使得大肠杆菌对溶菌酶变的敏感, 但是, 经 HPH 处理后, 再加入溶菌酶, 大肠杆菌对溶菌酶的敏感性消失, 因为 HPH 不同于超高压, 不会引起细胞的亚致死损伤, 便不会扰乱细菌的稳定性, 可是和超高压处理一样, HPH 也会引起细胞膜瞬间的透化作用, 但不会引起物理破裂, 且处理后变化立

即恢复。Vannini, Lanciotti, Baldi and Guerzoni (2004)^[33]报道当溶菌酶被施加 50MPa 和 75MPa 的压力时, 高压均质化处理促使了溶菌酶活性中心结构的变化, 增强了对 *Lactobacillus Plantarum* 的抗菌活性。Dorothy Nakhugwe^[34]比较了六种溶菌酶在常压和超高压条件下分别对五种革兰氏阳性菌 (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* 和 *Micrococcus lysodeikticus*) 和五种革兰氏阴性菌 (*Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* O157, *H7*, *Pseudomonas aeruginosa* 和 *Salmonella typhimurium*) 的抑菌活性, 结果表明: 常压下, 每一种溶菌酶对革兰氏阴性菌都没有抑菌作用, 经 130 ~ 300MPa 在 25℃ 处理 15min 后, *M. lysodeikticus* 和 *P. aeruginosa* 对所有的溶菌酶都变的敏感, 而 *S. typhimurium* 对所有溶菌酶仍不敏感, 其他菌株对部分溶菌酶表现出一定的敏感性。Guerzoni et al.^[35]指出溶菌酶的活性取决于其分子三维构象, 结构的轻微变化都会使酶的活性增强或降低, 高压均质化处理后溶菌酶抑菌活性的增强主要是由于蛋白质疏水基团的暴露。

5 展望

溶菌酶的改性研究通过化学修饰或热改性的方法来探索 and 实现, 化学修饰后, 酶的空间构象会发生变化, 但不能准确地解释其结构和功能的关系, 是溶菌酶通过构象变化实现了对革兰氏阴性菌的作用, 还是化学修饰后的复合物发挥了抑制作用; 更重要的是, 如果所使用的化学修饰剂是非食品级的, 则化学修饰后的溶菌酶在食品、医药、日化等领域的使用就存在安全隐患。虽然热改性后的溶菌酶对革兰氏阴性菌有抑制功能, 但对革兰氏阳性菌的作用效果会降低。此外, 改性的温度过高, 会导致蛋白质的凝聚, 使酶活性完全丧失; 温度太低, 导致改性后蛋白质又重新回复到天然构象, 无法进行中间态的结构观察^[36-38]。而超高压技术具有一些独特的优点, 在合适的压力下, 蛋白质空间结构发生变化后不会发生凝聚现象, 并且构象变化是不可逆的, 可以观察和分析折叠的中间态, 使得对改性过程中构象变化的研究成为可能。

以分子生物学对溶菌酶研究的理论为基础, 以超高压改性为手段, 通过不同的压力、温度、保压时间和施压方式使溶菌酶的结构发生连续变化; 通过溶菌酶在超高压处理条件下静态吸收光谱的变化, 分析其改性后空间构象变化规律以及构象变化与抑菌功能的关系。采用超高压技术进行酶的改性, 能够拓宽天然溶菌酶的抗菌谱, 避免化学修饰和热改性的弊端, 为天然溶菌酶的改性研究提供新途径和方法。同时, 溶菌酶作为一种天然的模型蛋白, 能够为超高压条件下蛋白质结构变化与功能关系的研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] Canfield R E, Kammerman S, Sobel J H, Morgan F J. Primary structure of lysozyme from man and goose [J]. *Nature* 1971, 232: 16-17.
- [2] Blake C C F. Structure of hen egg-white lysozyme: A three-dimensional Fourier at 2 Å resolution [J]. *Nature* 1972, 206: 757-761.
- [3] Philip D C. The three-dimensional structure of an enzyme molecule [J]. *Sci Amer*, 1965, 215: 78-90.
- [4] Jolles P, Jolles J. What's new in lysozyme research—always a model system today as yesterday [J]. *Alol Cell Biochem*, 1984, 63: 165-189.
- [5] Alexander O, Gill R, Richard A, Holley. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24 C [J]. *International Journal of Food Microbiology* 2003, 80 (3): 251-259.
- [6] Jill K Brannen, P Michael Davidson. Enhancement of nisin lysozyme and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediamine, tetraacetic acid and lactoferrin [J]. *International Journal of Food Microbiology* 2004, 90: 63-74.
- [7] 吴希, 张双全. 抗菌肽对细菌杀伤作用的分子机制 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32 (12): 1109-1113.
- [8] 杨帆, 杨秀荣. 脂多糖 (LPS) 与生物分子的相互作用及动力学分析 [J]. *分析化学*, 2007, 35 (35): 677-680.
- [9] M S Rao, R Chandar, A Shama. Synergistic effect of chitosan, galactaric acid and lysozyme for meat preservation [J]. *LWT—Food Science and Technology* 2008, 41 (10): 1995-2001.
- [10] Ibrahim H R, Hata H, Fujiki M, Kim M, Yamamoto T. Enhanced antimicrobial action of lysozyme against Gram-negative and Gram-positive Bacteria due to modification with Perillaldehyde [J]. *J Agri Food Chem*, 1994, 42: 1813-1817.
- [11] Zahra A, Elhaddad R, Oghaeyeh R, Ramezani M, Mahmoud A, Aminlari. Improvement of functional properties and anti-bacterial activity of lysozyme by modification with dextran-sulfate. Abstract book of

- The 7th International Conference of Food Science and Technology Wuji 2007 100
- [12] Ansari S Ramezani R Aminjari M Effect of maillard— based conjugation of lysozyme on functional properties of beta— glucan Abstract book of The 7th International Conference of Food Science and Technology Wuji 2007 101.
- [13] STLü T Sugimori H Azakami A Kato Lipophilization of lysozyme by short and middle chain fatty acids [J. Journal of Agricultural & Food Chemistry 2000 48 265—269.
- [14] Bemkop— Schnich SKrist M Vehabovic C Valenta Synthesis and evaluation of lysozyme derivatives exhibiting an enhanced antimicrobial action [J. European Journal of Pharmaceutical Science 1998 6 301 306
- [15] Visalak Touch Shigeru Hayakawa Koichi Saitoh Relationship between conformational changes and antimicrobial activity of lysozyme upon reduction of its disulfide bonds [J. Food Chemistry 2004 84 (3): 421—428
- [16] Bum P Amphitropic proteins— a new class of membrane proteins [J. Trends Biochem Sci, 1988 13 79 83
- [17] Andreas Bemkop— Schnich Sabine Krist Mihai Vehabovic Claudia Valenta Synthesis and evaluation of lysozyme derivatives exhibiting an enhanced antimicrobial action [J. European Journal of Pharmaceutical Sciences 1998 6 301—306
- [18] Hisham R J A structural phase of heat— denatured lysozyme with novel antimicrobial action [J. Biosci Biotech Biochem, 1996 60 (3): 416—423.
- [19] Hisham R J Partially unfolded lysozyme at neutral pH aggregates and kills Gram— negative bacteria through membrane [J. Biosci Biotech Biochem, 1996 60 (8): 3799—3806
- [20] Hisham R J Tetsuji Matsuzaki Takayoshi Aoki Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function [J. FEBS Letters 2001 506 27—32
- [21] Hisham R Ibrahim Shinhji Ghosh Ghosh Yasushi Sugimori et al Antimicrobial synergism of partially— denatured lysozyme with glycine effect of sucrose and sodium chloride [J. Food Research International 1996 29 (8): 771—777
- [22] Klaus D rü ng Petra Pösch Andreas Mahn et al The non— enzymatic microbicidal activity of lysozymes [J. FEBS Letters 1999 449 93—100
- [23] Hideyuki Arita Hisham Radwan Ibrahim Takeshi Kinoshita et al Bactericidal action of lysozymes attached with various sizes of hydrophobic peptides to the C— terminal using genetic modification [J. FEBS Letters 1997 415 114—118
- [24] 曾庆梅, 潘见, 谢慧明, 等. 超高压对多酚氧化酶活性的影响 [J. 高压物理学报, 2004 18 (2): 144—148.
- [25] Sneller L Meersman F Heremans K Refolding studies using pressure [J. Biochimica et Biophysica Acta 2006 1764 497—505.
- [26] Mozhaev V V Lange R Balny C Application of high hydrostatic pressure for increasing activity and stability of enzyme [J. Biotechnol Bioeng 1996 52 (2): 320—331
- [27] Andres N McCarthy J Raul Grigera Effect of pressure on the conformation of proteins A molecular dynamics simulation of lysozyme [J. Journal of Molecular Graphics and Modelling 2006 24 254—261.
- [28] Iucci L Patrignani F Vallicelli M Guerzoni M E Lanciotti R Effects of high pressure homogenization on the activity of lysozyme and lactoferrin against Listeria monocytogenes [J. Food Control 2007 18 558—565.
- [29] Alline A L Tribst Mark A Franchi Marcelo Cristianini Ulua— high pressure homogenization treatment combined with lysozyme for controlling Lactobacillus brevis contamination in model system [J. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2008 9 (3): 265—271
- [30] Proctor V A The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical [J. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 1988 26 359—395
- [31] Dorothy Nakimbugwe Barbara Masschalck Grace Anfin et al Inactivation of gram— negative bacteria in milk and banana juice by hen egg white and lambda lysozyme under high hydrostatic [J. International Journal of Food Microbiology 2006 112 19—25
- [32] Ann M J Diels Jan De Taeye Chris W Michiels Sensitization of Escherichia coli to antibacterial peptides and enzymes by high— pressure homogenisation [J. International Journal of Food Microbiology 2005 105 165—175.
- [33] Vannini L Lanciotti R Baldi D et al Interaction between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase [J. International Journal of Food Microbiology 2004 94 123—135
- [34] Dorothy Nakimbugwe Barbara Masschalck Miroslava Anassova et al Comparison of bactericidal activity of six lysozymes at atmospheric pressure and under high hydrostatic pressure [J. International Journal of Food Microbiology 2006 108 355—363
- [35] Guerzoni M E Vannini L Chaves— L Pez C et al Effect of high pressure homogenization on microbial and chemical— physical characteristics of goat cheeses [J. Journal of Dairy Science 1999 82 851—862
- [36] Takatoshi Ohkuri Seiji Shoji Taiji Imoto Tadashi Ueda Effect of the structure of the denatured state of lysozyme on the Aggregation Reaction at the Early Stages of Folding from the Reduced Form [J. Mol Biol, 2005 347 159—168.
- [37] 方盈盈, 胡新根, 林瑞森, 等. 溶菌酶热变性的 DSC 研究 [J. 物理化学学报, 2007 23 (1): 84—87
- [38] Christina Schamagl Maria Reif Josef Friedrich Stability of proteins temperature pressure and the role of the solvent [J. Biochimica et Biophysica Acta 2005 1749 187—213