

# 糖基化反应对大豆蛋白-乳糖复合物抗原性及结构的影响

张楠, 布冠好, 朱婷伟, 陈复生

(河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450001)

**摘要:** 本文将乳糖通过糖基化反应引入到大豆分离蛋白(SPI)上制备大豆分离蛋白-乳糖复合物, 采用间接竞争 ELISA 法测定不同温度、不同质量比、不同反应时间下大豆分离蛋白-乳糖复合物中  $\beta$ -伴大豆球蛋白的抗原性变化, 并对糖基化产物进行了结构特性的研究。结果表明, 糖基化能有效降低  $\beta$ -伴大豆球蛋白的抗原性, 其抗原性从 93.79% 降到 37.75%。糖基化改性后, 大豆蛋白中游离氨基含量降低, 在反应 60 h 时, 游离氨基含量下降最大; 傅里叶红外光谱结果表明, 与原大豆分离蛋白相比, 大豆分离蛋白-乳糖糖基化产物的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、无规卷曲的含量下降, 而  $\beta$ -折叠的含量增加; SDS-PAGE 电泳及 PAS 染色结果表明, 随着糖基化反应的程度增加, SPI 谱带逐渐的减弱, 说明 SPI 与乳糖分子发生了共价连接。

**关键词:** 大豆分离蛋白; 乳糖; 糖基化; 抗原性; 结构特性

文章编号: 1673-9078(2015)8-117-121

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.020

## Effect of Glycosylation on the Antigenicity and Structural Properties of Soybean Protein Isolate-lactose Conjugate

ZHANG Nan, BU Guan-hao, ZHU Ting-wei, CHEN Fu-sheng

(College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** Lactose was introduced into soybean protein isolate (SPI) via glycosylation to produce an SPI-lactose conjugates, under different temperatures, protein and sugar mass ratios, as well as reaction durations. Subsequent changes in the antigenicity of  $\beta$ -conglycinin in the SPI-lactose conjugates was estimated by indirect-competition enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA). The structural properties of the SPI-lactose conjugates were also studied. The results indicated that glycosylation reduced the antigenicity of  $\beta$ -conglycinin from 93.79% (control) to 37.75% (conjugates). Compared to SPI, the content of free amino groups in the complex also decreased after glycosylation. The reduction was highest at 60 hours after the of the reaction. Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR) showed that the quantity of  $\alpha$ -helices,  $\beta$ -turns, and random coil structures were lower in the SPI-lactose glycosylation product than that in the SPI, while that of  $\beta$ -sheet increased. Results of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and periodic acid-Schiff (PAS) staining showed that the SPI band gradually became weaker with the progress in glycosylation reaction, indicating that the glycosylation reaction occurred between SPI and lactose molecules.

**Key words:** soy protein isolate; lactose; glycosylation; antigenicity; structural properties

大豆营养丰富, 是一种重要的植物蛋白资源, 具有较高的营养价值和独特的功能性质。但同时大豆也是世界上公认的八大食物过敏原之一。大豆中的蛋白

收稿日期: 2014-11-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201293; 21176058; 31171790); 国家 863 科技计划项目 (2013AA102208-5); 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (14B550013)

作者简介: 张楠 (1991-), 女, 硕士, 研究方向为食品蛋白质资源开发与利用

通讯作者: 布冠好 (1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为食品蛋白质资源开发与利用

质主要包括: 大豆疏水蛋白、大豆壳蛋白、大豆抑制蛋白、大豆空泡蛋白、大豆球蛋白(glycinin)和  $\beta$ -大豆伴球蛋白( $\beta$ -conglycinin)等, 其中, 大豆球蛋白和  $\beta$ -伴大豆球蛋白是大豆中的主要致敏蛋白, 两者占总蛋白质的 70%<sup>[1]</sup>。有报道显示, 在婴幼儿中患有大豆过敏症的机率约为 0.3%~0.4%, 对大豆过敏的成年人发病率在不断上升<sup>[2]</sup>。从而限制了大豆及其制品在食品及其它工业领域中的应用。

随着食品工业的快速发展, 大豆过敏已成为一个重要的公共健康和安全问题。因此如何去除大豆中的过敏原成为目前亟待解决的问题。随着研究的不断深

入, 通过蛋白质改性可有效控制和消除大豆过敏原, 是一种较有效的方法。据研究, 能够降低大豆蛋白致敏性的改性方法主要有热处理改性、酶解改性、发酵改性和糖基化改性等方法。这些改性方法均在一定程度上降低了致敏性, 但都存在着不足和缺陷。近年来, 蛋白质与多糖的糖基化改性受到广泛关注, 经糖基化改性, 食物的过敏原表位被掩盖, 抗原性可降低, 此方法可以在较温和, 并且无需添加任何化学试剂的条件下进行反应, 是一种安全性高、快速、应用前景较好的蛋白改性方法<sup>[5]</sup>。Achouri 等<sup>[4]</sup>将葡萄糖与大豆球蛋白的 11S 组分在 50 °C、65% RH 条件下进行美拉德反应, 发现反应产物的免疫原性大幅度降低, 甚至完全去除。

本研究以大豆分离蛋白和乳糖为原料, 通过干法糖基化反应将乳糖引入到大豆分离蛋白中, 制备大豆蛋白-乳糖共价复合物。探索不同温度, 反应时间和蛋白与糖的比例对大豆分离蛋白-乳糖中  $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原性及其结构特性的影响, 拓宽大豆蛋白在食品工业中的应用范围, 为糖基化能有效降低大豆过敏性的研究提供技术基础和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

大豆分离蛋白 (SPI, 蛋白质含量 92.46%), 山东谷神生物科技集团有限公司; 乳糖, 天津市科密欧化学试剂有限公司;  $\beta$ -伴大豆球蛋白 ( $\beta$ -conglycinin, G3171), 酶标二抗 (HRP 标记的羊抗兔 IgG, A6154), Sigma 公司; 兔抗  $\beta$ -conglycinin 血清 (自制); 牛血清蛋白 (BSA)、TMB 单组份显色液、低分子量的标准蛋白 (14.4~97.4 Ku), 北京索莱宝科技有限公司; PAS 试剂盒 (BSP035), 生物生工工程股份有限公司; 其他试剂均为分析纯。

FC 型酶标仪, 赛默飞世尔仪器有限公司; LRH-150F 型恒温生化培养箱, 上海一恒科技有限公司; 96 孔酶标板, Coming Costar 公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 大豆分离蛋白-乳糖复合物的制备

将 SPI 与乳糖按一定的比例 (1:1、2:1、3:1、4:1、5:1) 溶解于蒸馏水中, 使溶液最终浓度为 6%, 混合均匀后进行真空冷冻干燥。取冻干的样品置于铝盒内, 并将其放入装有饱和 KBr 溶液的干燥器内, 然后将干燥器置于恒温培养箱内, 在不同温度 (50、55、60 °C) 下制取不同反应时间的大豆分离蛋白-乳糖复合物。

#### 1.2.2 大豆蛋白-乳糖复合物抗原性的测定

采用间接竞争 ELISA 方法测定糖基化产物的抗原性大小<sup>[5]</sup>。

(1) 抗原包被: 以 0.3  $\mu\text{g/mL}$  浓度的  $\beta$ -伴球蛋白标准抗原包被 96 孔酶标板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 4 °C 冰箱过夜。

(2) 抗原与初级抗体反应: 将稀释度 1:3200 的抗血清与蛋白浓度为 2 mg/mL 的糖基化样品液等体积加入离心管中, 混匀, 4 °C 冰箱过夜。

(3) 洗涤: 次日甩去孔内液体, PBST 洗涤四次, 每次 3 min, 用吸水纸拍干。

(4) 封闭: 加 100  $\mu\text{L}$ /孔封闭液进行封闭, 37 °C 孵育 1 h 后, PBST 洗涤 4 次, 拍干。

(5) 抗原抗体反应: 将 (2) 中离心管中预混液加入酶标板内, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37 °C 孵育 1 h 后, PBST 洗涤 4 次, 拍干。

(6) 加入酶标二抗: 每孔加入稀释度为 1:10000 的二抗 100  $\mu\text{L}$ , 37 °C 孵育 1 h 后, PBST 洗涤 4 次, 拍干。

(7) 显色: 加入新鲜配制的 TMB 单组份显色液, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 37 °C 暗处显色 10 min, 显示蓝色。

(8) 终止反应: 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应。利用酶标仪双波长测定各孔的 OD 值:

$$\text{实际OD值} = \text{OD}_{405} - \text{OD}_{620}$$

通常抗原性的大小用抑制率来表示, 抑制率表示样品中  $\beta$ -伴大豆球蛋白抑制抗血清与酶标板上包被的标准抗原  $\beta$ -伴大豆球蛋白结合能力的大小, 可记为  $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原抑制率; 抑制率越低, 则样品中的  $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原性越低, 二者呈正比关系; 计算公式如下:

$$\beta\text{-伴大豆球蛋白抗原抑制率}/\% = (1 - \text{OD}/\text{OD}_0) \times 100$$

注: OD 表示被测样品的吸光值,  $\text{OD}_0$  为无竞争体系的吸光值。

#### 1.2.3 游离氨基含量的测定

采用三硝基苯磺酸法 (TNBS)<sup>[6]</sup>。取 0.25 mL 的样品与 2 mL pH 8.2 磷酸缓冲液和 2 mL 质量分数为 0.1% 的 TNBS 溶液混合, 在 50 °C 的暗室中放置 60 min。反应完毕后, 最后加入 4 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 HCl 终止反应, 在室温下避光放置 30 min, 于 420 nm 下测其吸光值。用浓度为  $0 \sim 5 \times 10^{-3}$  mol/L 亮氨酸作标准曲线, 通过标准曲线计算样品中游离氨基的含量。

#### 1.2.4 SDS-PAGE 电泳<sup>[7]</sup>

染色液配制: 0.25 g 考马斯亮蓝 R-250 溶在 250 mL 的脱色液中。

脱色液配制: 250 mL 95% 乙醇加 80 mL 冰醋酸再

用蒸馏水加至 1000 mL。

采用分离胶的单体质量分数为 12%，浓缩胶为 4%，将糖基化样品与 SPI 进行处理，使最终样品蛋白浓度为 2 mg/mL（称取不同反应时间的糖基化样品 0.0042 g, SPI 0.0034 g, 加水 1.5 mL），上样量为 10  $\mu$ L，加样后开始电泳，开始电流 20 mA，进入分离胶后，改为 40 mA，当距电泳槽橡胶底边 1.5 cm 时，停止电泳，关闭电源。胶片剥离后，分别用考马斯亮蓝和 PAS 试剂盒进行蛋白及糖染色；考马斯亮蓝染色 1.5 h，然后脱色液脱色大约 12 h，中间不断换取染色液。

### 1.2.5 傅里叶红外光谱分析糖基化复合物结构

准确称取糖基化样品适量，加入一定量的溴化钾，用研磨研成均匀粉末，压成薄片，

在恒温箱里平衡温度 5 min，再用傅立叶红外光谱仪测定波数范围 4000~400  $\text{cm}^{-1}$  内的吸收光谱，分辨率 4  $\text{cm}^{-1}$ ，波数精度 0.01  $\text{cm}^{-1}$ ，扫描次数 32 次，环境温度 25  $^{\circ}\text{C}$ <sup>[8]</sup>。最后利用 Peakfit 4.20 软件分析蛋白质的二级结构变化。

### 1.2.6 数据处理与统计分析

数据处理采用 SPSS 软件进行单因素方差分析，其中所有实验数据为三次测定的平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 反应条件对糖基化产物抗原性的影响

通过美拉德反应制备糖基化共价复合物，需要较温和的反应条件，既要保证反应的正常进行又要得到理想的糖基化产物。因此，在试验中温度、反应时间及蛋白与糖比例等条件的选择尤为重要。选取大豆蛋白与乳糖比例、反应温度、反应时间作为主要的因素进行试验，时间选择在 0、12、24、36、48、60、72、84、96 h 范围内。以  $\beta$ -伴球蛋白抗原抑制率为指标。

#### 2.1.1 温度与时间对抗原性的影响

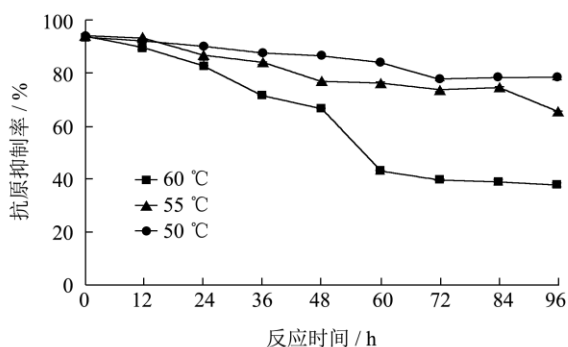


图 1 不同温度和反应时间下糖基化复合物抗原性的变化

Fig.1 Variation in the antigenicity of the glycosylated products under different temperatures and reaction durations

在相对湿度为 79%、大豆蛋白与乳糖比例为 4:1，温度分别为 50、55、60  $^{\circ}\text{C}$ ，反应时间为 12、24、36、48、60、72、84、96 h 的条件下制备系列大豆蛋白-乳糖复合物。温度与时间对大豆蛋白-乳糖中  $\beta$ -伴大豆球蛋白的抗原性影响如图 1 所示。

由图 1 可以看出，不同温度下的 SPI-乳糖中  $\beta$ -conglycinin 的抑制率随反应时间的延长逐步降低，即糖基化产物中的  $\beta$ -conglycinin 的抗原性呈逐渐下降的趋势，同时，随着反应温度的增加，糖基化复合物抗原性也呈现出逐渐降低的趋势。在反应温度 60  $^{\circ}\text{C}$ 、反应 96 h 后，糖基化产物中的  $\beta$ -conglycinin 的抑制率从 93.79% 降低到 37.75%；说明糖基化改性能明显降低 SPI-乳糖中的  $\beta$ -conglycinin 的抗原性。卢家成<sup>[9]</sup>将果糖引入  $\beta$ -伴大豆球蛋白制备果糖- $\beta$ -伴大豆球蛋白复合物，发现糖基化修饰后的  $\beta$ -伴大豆球蛋白的抗原性明显降低。

#### 2.1.2 蛋白糖比例与时间对抗原性的影响

利用间接竞争 ELISA 法测定不同反应时间及不同质量比对大豆蛋白-乳糖中的  $\beta$ -伴球蛋白在温度 60  $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 79%、蛋白与糖比例 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1，分别反应 12、24、36、48、60、72、84、96 h 下的复合物抗原性的影响，结果如图 2 所示。

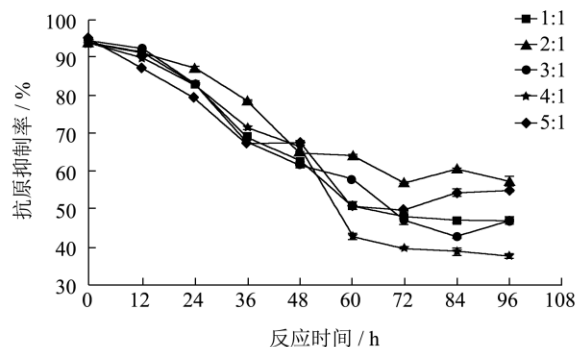


图 2 不同比例和反应时间下糖基化复合物抗原性的变化

Fig.2 Variation in the antigenicity of the glycosylated products under different reagent ratios and reaction durations

由图 2 可以看出，随着反应时间的延长，SPI-乳糖中的  $\beta$ -conglycinin 的抑制率总体逐渐下降，也就是糖基化产物的抗原性呈下降趋势。并且随着 SPI-乳糖质量比的增加， $\beta$ -conglycinin 的抗原性也总体呈下降趋势。SPI 与乳糖质量比为 4:1 时能够最大程度的降低  $\beta$ -conglycinin 的抗原性。在反应前 60 h，抗原性下降速度较快，60 h 之后，速度逐渐平缓。这表明乳糖糖基化对降低大豆蛋白的抗原性有一定作用，经糖基化生成的 SPI-乳糖复合物被乳糖屏蔽了抗原活性部位，使抗原性发生改变。Van de<sup>[10]</sup>等通过将低聚果糖引入到大豆蛋白上进行糖基化修饰，结果表明，糖基化产

物的抗原性降低了约 90%左右, 与本研究结果一致。

由以上研究可知, 经糖基化处理后,  $\beta$ -伴大豆球蛋白的抗原性总体上呈下降的趋势, 但在大豆分离蛋白与乳糖质量比 4:1, 反应温度为 60 °C 时, 抗原性降低最好, 因此选择蛋白与糖比例为 4:1, 温度为 60 °C, 不同反应时间下的糖基化产物进行结构的分析。

## 2.2 游离氨基含量分析

图 3 为 SPI、SPI 与乳糖质量比 4:1, 反应温度为 60 °C, 反应时间对糖基化复合物中游离氨基酸残留量的影响, 糖基化反应会引起蛋白中游离氨基酸的变化。

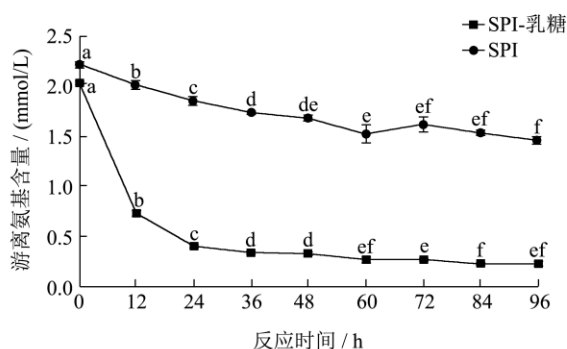


图 3 不同反应时间对 SPI 乳糖复合物中游离氨基含量的影响

Fig.3 Variation in the free amino content of the SPI-lactose conjugates with different reaction durations

注: 采用 Duncan' multiple range test 方法分析, 小写字母表示 0.05 水平的差异显著性 ( $p < 0.05$ ), 不同字母表示差异性显著, 有相同字母的表示差异不显著。

游离氨基含量的变化常被用来衡量蛋白质与糖糖基化反应的程度。由图 3 可以看出, 大豆分离蛋白与乳糖经干热法处理后, 其产物和 SPI 的游离氨基含量随反应时间的增加都呈现一定下降趋势, 但是纯蛋白中游离氨基含量比糖基化复合物中高。这表明 SPI 中的氨基基团与乳糖中的羟基之间发生了交联, 两者发生了糖基化反应。在反应 60 h 时, 游离氨基含量下降 24.89%, 60 h 之后游离氨基含量呈现稳定趋势, 这可能是由于在干热反应过程中蛋白质分解产生了游离氨基酸, 而糖基化反应又消耗了部分氨基酸所致<sup>[11]</sup>。

## 2.3 SDS-PAGE 电泳分析

电泳图谱是分析蛋白质组成成分, 包括亚基、分子量分析等的主要手段。在本实验中, SPI 与乳糖进行共价结合后, 分子量发生了变化, 因此, 可以使用考马斯亮蓝染色显示蛋白质分子量的分布和是否有大分子糖链的接入, 用 PAS 与糖基化复合物中的多糖分子进行颜色反应, 从而检测多糖分子的存在<sup>[12]</sup>。

图 4(a)为不同反应时间的 SPI-乳糖的蛋白电泳图

谱。条带 1 代表 SPI 的特征条带, 从图中显示可知, 大豆分离蛋白与乳糖经干热处理后, 随着反应时间的增加, 7S、11S 的各亚基明显减弱, 7S、11S 的各亚基相对于 SPI 的亚基明显上移, 说明有大分子糖生成。因为考马斯亮蓝通常在酸性条件下与蛋白质分子上自由氨基等活性基团通过非共价作用结合, 呈现颜色反应<sup>[13]</sup>。当 SPI-乳糖进行糖基化反应时, 自由氨基减少, 也减少了考马斯亮蓝与蛋白质分子的结合, 使谱带减弱。而图 4(b)为 PAS 糖染色图谱, 随着反应时间的增加, 糖染色图谱在分离胶与浓缩胶交界处大分子物质越来越多, 颜色越来越深, 这进一步证明, 经干热法处理, 大豆分离蛋白与乳糖确实发生了以共价键形式的反应, 生成了分子量较大的物质。

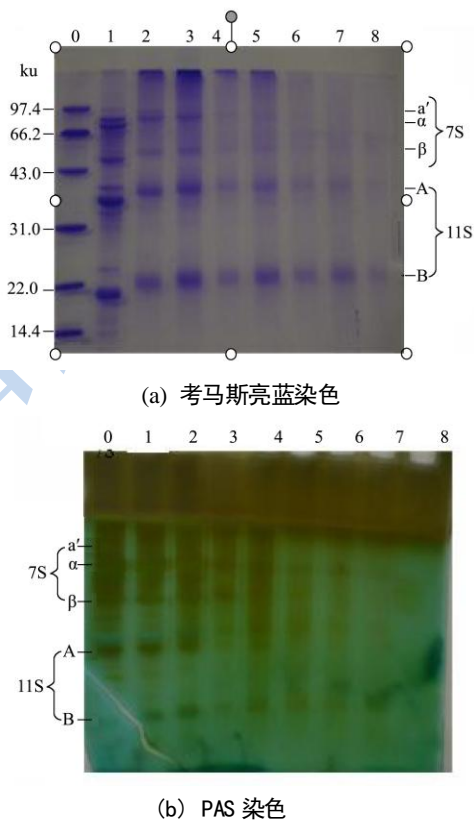


图 4 不同反应时间下糖基化复合物的 SDS-PAGE 图

Fig.4 SDS-PAGE patterns of the glycosylated products at different reaction durations

注: 0 泳道是标准蛋白条带; 1 是 SPI 条带; 2、3、4、5、6、7、8 分别为反应时间为 24、36、48、60、72、84、96 h 后的产物 (蛋白与糖比例为 4: 1, 温度 60 °C, 相对湿度 79%)。

## 2.4 傅里叶红外光谱分析

傅里叶红外光谱常用来分析蛋白质分子二级结构的变化, 通过推断不同物质中存在的基团, 从而确定分子结构的改变。而蛋白质二级结构的特征吸收光谱带通常在酰胺 I 区 1700~1600  $\text{cm}^{-1}$  范围内。据报道,

蛋白质二级结构如  $\beta$ -折叠结构在  $1610\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ 、 $1670\sim 1680\text{ cm}^{-1}$  有吸收峰； $\alpha$ -螺旋结构为  $1650\sim 1660\text{ cm}^{-1}$ ； $\beta$ -转角结构为  $1660\sim 1700\text{ cm}^{-1}$ ；无序结构在  $1640\sim 1650\text{ cm}^{-1}$  产生伸缩振动<sup>[14]</sup>。通过相关软件分析得到 SPI-乳糖糖基化产物的酰胺 I 区域，并得出蛋白质二级结构含量的变化如表 1 所示。

表 1 SPI-乳糖糖基化产物中蛋白质的二级结构变化

Table 1 Content of secondary structure elements in SPI-lactose glycosylated products

样品	二级结构/%			
	$\alpha$ -螺旋	$\beta$ -折叠	$\beta$ -转角	无规卷曲
SPI	13.18	36.96	36.51	13.35
SPI-乳糖(12h)	12.49	38.70	36.13	12.70
SPI-乳糖(24h)	11.45	43.41	33.82	11.43
SPI-乳糖(36h)	12.35	39.95	35.01	12.69
SPI-乳糖(48h)	12.41	39.94	34.88	12.77
SPI-乳糖(60h)	12.51	37.21	37.80	12.48
SPI-乳糖(72h)	12.08	39.63	36.4	11.88
SPI-乳糖(84h)	12.39	39.36	35.61	12.64
SPI-乳糖(96h)	12.33	40.22	34.75	12.70

由表 1 可以看出，大豆分离蛋白及其糖基化产物中蛋白质的二级结构主要以  $\beta$ -折叠为主。与原大豆分离蛋白相比，SPI-乳糖糖基化产物的  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -转角、无规卷曲的含量下降，而  $\beta$ -折叠的含量增加，这说明糖基化改性后接枝物在溶液中的状态变得更加有序，另外，由于蛋白质多肽链中引入了多糖链，多糖链的空间效应引起无规则卷曲含量降低及  $\beta$ -折叠含量增加；同时，蛋白质中游离氨基参与反应，分子间氢键遭到破坏，减弱了蛋白质分子间的相互作用力，导致蛋白质分子结构的改变<sup>[13]</sup>。由此可见，糖基化反应对蛋白质的二级结构产生一定的影响。Geng 等<sup>[8]</sup>人研究发现卵清蛋白与糖分子的反应同样会影响蛋白质二级结构的变化。美拉德反应的发生，导致蛋白二级结构发生改变，其中，螺旋和折叠等二级结构的变化可能会影响大豆蛋白抗原性的改变。

### 3 小结

本研究以大豆分离蛋白与乳糖为原料， $\beta$ -伴大豆球蛋白抗原抑制率为指标，通过干热糖基化方法制备大豆分离蛋白-乳糖共价复合物，结果表明不同温度、不同质量比、不同反应时间均对 SPI-乳糖复合物中  $\beta$ -伴大豆球蛋白的抗原性有明显影响，可降低 SPI 中  $\beta$ -伴大豆球蛋白的抗原性。随反应时间的延长，游离氨基含量降低，即糖基化程度增加；SDS-PAGE 电泳结果表明，随着反应时间延长，SPI 亚基谱带逐渐减弱，

SPI-乳糖接枝物的糖基谱带越来越明显；红外光谱的结果表明，糖链的引入使蛋白质的空间结构发生改变，从而引起抗原性的改变。研究结果为开发低敏性豆粉生产技术提供了实验依据。

### 参考文献

- [1] Hei W J, Li Z, Ma X, et al. Determination of beta-conglycinin in soybean and soybean products using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 734: 62-68
- [2] Savage J H, Kaeding A J, Matsui E C, et al. The natural history of soy allergy [J]. *Allergy Clin Immunol*, 2010, 125(3): 683-686
- [3] Zhang M, Zheng J Y, Ge K S, et al. Glycation of  $\alpha$ -lactalbumin with different size saccharides: effect on protein structure and antigenicity [J]. *International Dairy Journal*, 2014, 34: 220-228
- [4] Achouri A, Boye J I, Yaylayan V A, et al. Functional properties of glycosylated soy 11S glycinin [J]. *Journal of Food Science*, 2005, 70(4): 269-274
- [5] Zhang M, Zheng J Y, Ge K S, et al. Glycation of  $\alpha$ -lactalbumin with different size saccharides: effect on protein structure and antigenicity [J]. *International Dairy Journal*, 2014, 34: 220-228
- [6] 李铮,冯力更,郑喆.糖基化反应条件对乳清蛋白-麦芽糖复合物抗原性的影响[J].*中国乳品工业*,2011,39(1):8-11  
LI Zheng, FENG Li-geng, ZHENG Zhe, et al. Effect of glycosylation reaction conditions on the antigenicity of WPI-maltose conjugate [J]. *Dairy Industry*, 2011, 39(1): 8-11
- [7] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685
- [8] Geng X P, Bing C, Yan L, et al. Preparation and characterization of ovalbumin and carboxymethyl cellulose conjugates via glycosylation [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 37: 86-92
- [9] 卢家成.果寡糖糖基化去除大豆抗原蛋白免疫原性的研究[D].长春:吉林农业大学,2012  
LU Jia-cheng. Studies on the removal of soybean antigen immunogenicity by fructooligosaccharide glycosylation [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2012
- [10] Van de Lagemaat J, Manuel Silvn J, Javier Moreno F, et al. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins [J]. *Food Research international*, 2007, 40(1): 153-160
- [11] 赵艳娜.乳清蛋白糖基化反应特性与抗氧化活性的研究

- [D].哈尔滨:东北农业大学,2012
- ZHAO Yan-na. Characteristics and antioxidant activities of glycosylation products derived from whey protein [D]. Ha Erbin: Northeast Agricultural University, 2012
- [12] Zhu D, Damodaran S, Lucey J A. Formation of whey protein isolate (WPI)-dextran conjugates in aqueous solutions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(16): 7113-7118
- [13] 穆丽霞.大豆蛋白-糖接枝改性及其结构与功能特性研究 [D].广东:华南理工大学,2010
- MU Li-xia. The research of conformation and functional properties of soy protein-saccharide conjugates [D]. Guang Dong: South China of University, 2010
- [14] Chen X Y, Ru Y, Chen FL, et al. FTIR spectroscopic characterization of soy proteins obtained through AOT reverse micelles [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 31: 435-437
- [13] 穆丽霞.大豆蛋白-糖接枝改性及其结构与功能特性研究

现代食品科技