

大豆球蛋白酸、碱性链分离及其酶交联特性的研究

夏佳恒^{1,2}, 龚育清^{1,2}, 吴蕾蕾¹, 王艳^{1,2}, 杨安树^{1,2}, 陈红兵^{1,2}

(1. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 江西南昌 330047)

(2. 南昌大学中德联合研究院, 江西南昌 330047)

摘要: 本文以大豆为原料, 分离大豆球蛋白中酸、碱性链, 并探讨酸、碱性链在微生物转谷氨酰胺酶(MTG)介导下参与交联反应的差异性。利用等电点沉淀、凝胶过滤层析以及亲和层析分离得到纯度大于94%的大豆球蛋白, 再通过热变性、 β -巯基乙醇(β -ME)还原和等电点沉淀分离大豆球蛋白酸和碱性链, 并对其进行了电泳鉴定和氨基酸分析; 进一步以 MTG 催化大豆球蛋白及其酸、碱性链交联, 利用 SDS-PAGE 和溶解性试验探讨大豆球蛋白酸、碱性链交联特性和交联产物的溶解性。结果表明大豆球蛋白酸、碱性链都是 MTG 的有效底物, 均可参与交联反应并形成高聚物, 但碱性链反应率较酸性链低, 两者参与交联反应差异受其谷氨酰胺和赖氨酸残基含量的影响较小, 而受其疏水性氨基酸含量影响较大。

关键词: 大豆球蛋白; 酸性和碱性链; 分离; 微生物转谷氨酰胺酶; 酶交联

文章编号: 1673-9078(2017)2-55-60

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.2.009

Isolation of Acidic and Basic Polypeptides in Soybean Glycinin and Their Characteristics in Enzymatic Cross-linking

XIA Jia-heng^{1,2}, GONG Yu-qing^{1,2}, WU Lei-lei¹, WANG Yan^{1,2}, YANG An-shu^{1,2}, CHEN Hong-bing^{1,2}

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

(2. Sino-German Joint Research Inst. Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Using soybean as the raw material, the acidic and basic polypeptides of glycinin were isolated, and the differences between their effects in microbial transglutaminase (MTG)-mediated cross-linking were explored. Glycinin was obtained with a purity of more than 94% from soybean protein by isoelectric precipitation, gel filtration chromatography, and affinity chromatography. The acidic and basic polypeptides were isolated by isoelectric precipitation after heat denaturation and reduction with β -mercaptoethanol, and then characterized by electrophoresis and amino acid analysis. Furthermore, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and dissolution experiments were performed to determine the effects of acidic and basic polypeptides on enzymatic cross-linking and the solubility of the cross-linked products. The results suggested that both the acidic and basic polypeptides were effective substrates for MTG and could participate in the cross-linking reaction to form polymers with high molecular weight; however, the reaction rate of basic polypeptides was lower than that of acidic polypeptides. The differences between the acidic and basic polypeptides in the cross-linking reaction were slightly affected by the glutamine and lysine residue content, and were significantly affected by the hydrophobic amino acid content.

Key words: glycinin; acidic and basic polypeptides; protein purification; microbial transglutaminase; enzymatic cross-linking

大豆球蛋白(Glycinin, 11S)是大豆中一种主要贮藏蛋白, 占种子总蛋白的 19.5%~23.1%, 占总球蛋白的 40%, 具有大约 3000 个氨基酸残基, 分子量为 320~360 ku^[1]。它是一种几乎不含任何糖基的六聚体

收稿日期: 2016-01-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460439); 国家自然科学基金项目(31460439); 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2013AA102205)

作者简介: 夏佳恒(1991-), 男, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术与食品营养与安全

通讯作者: 杨安树(1972-), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事食品安全方面研究

寡蛋白, 每个单聚体亚基通常由一个酸性多肽链(A, 分子量约为 38 ku)和一个碱性多肽链(B, 分子量约为 20 ku)通过二硫键(S-S)连接形成 A-S-S-B 单体形式^[2]。大豆球蛋白的溶解度较高, 具有一定的乳化性、起泡性、持水性和凝胶性等特性, 但这些特性不是很理想, 难以满足现代食品工业发展的需要^[3]。因此有必要对大豆分离蛋白进行改性以满足人们的各种需求。

生物来源的转谷氨酰胺酶(MTG)酶促修饰过程中, 蛋白质或多肽上谷氨酰胺残基的 γ -羧酰胺基作为酰基供体, 受体可以是肽链或游离氨基酸上的伯胺基

或伯胺类化合物和水。当蛋白质或多肽中赖氨酸残基的 ϵ -氨基作为酰基受体时,可形成蛋白质分子内及或分子间的 ϵ -(γ -谷氨酰)-赖氨酸异肽键^[4]。交联产物具有较好的热稳定性和酸碱稳定性,还能够改善蛋白质凝胶性、流变性、溶解性、乳化性和保水性等加工特性^[5,6],赋予大豆蛋白产品如豆腐、酸豆奶等特殊的理化性质和感官性质,因而在大豆蛋白产品的生产中被大量使用。然而, Tang 等^[7]在研究 MTG 催化交联富含大豆球蛋白的大豆分离蛋白(SPI)时,发现大豆球蛋白中只有酸性链发生交联,而其碱性链在与 MTG 孵育 6 h 后几乎没有任何变化; Yang 等^[8]研究发现,在 MTG 酶促 SPI 稳定乳化凝胶中大豆球蛋白酸性链几乎全部交联形成高聚物,而碱性链几乎不受影响; Hsieh 等^[9]通过 2D 电泳进一步研究发现,将豆奶与 MTG 于合适的温度孵育 2 h 后,只有包括 B1a、B1b 和 B3 在内的部分碱性链参与了交联反应。这些文献表明 MTG 催化大豆球蛋白中酸、碱性链的交联反应存在差异,但没有阐明其本质原因。

本文以大豆为原料,通过等电点沉淀、凝胶过滤层析和亲和层析获得大豆球蛋白,根据等电点的差异分离其酸、碱性链,采用酸水解法分析大豆球蛋白及其酸、碱性链的氨基酸组成,进一步利用 SDS-PAGE 鉴定和溶解性试验,探讨了 MTG 催化大豆球蛋白中酸性链和碱性链发生交联反应的差异,以期为更好的利用 MTG 修饰改性大豆蛋白提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大豆品种“东农 42”(东北农业大学); Sphacryl S-300 HR, Con-A Sepharose 4B, 美国 GE 公司; 预染 marker, 德国 Fermentas 公司; MTG(TG-H), 泰兴一鸣精细化工有限公司; β -巯基乙醇(β -ME), 上海生工生物有限公司; 其他试剂均为分析纯。

PB-10 型酸度计, 德国 Sartorius 公司; 超纯水系统, 美国 Milipore 公司; 迷你型蛋白垂直电泳仪, 美国 Bio-RAD 公司; SQ-GS 800 光密度扫描仪, 北京宇艾奇电子科技有限公司; 恒温水浴锅, 德国 Kottermann 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆球蛋白的制备

挑选新鲜大豆,采用超细粉碎机加液氮低温粉碎,然后正己烷脱脂(m/V , 1:10),再利用 Tris-HCl 蛋白

浸提液浸提脱脂大豆粉,离心(9000 r/min, 30 min)弃沉淀,于上清液中加入亚硫酸氢钠至 0.01 mol/L,准确调 pH 值至 6.4, 4 °C 冷沉 4 h,并在 4 °C 下离心(6500 r/min、20 min)得沉淀即为 11 S 粗蛋白;再按 1:15 的料液比,将 11S 粗蛋白用 Tris-HCl 蛋白浸提液复溶,调 pH 值至 6.4, 4 °C 冷沉 4 h, 4 °C 离心(6500 r/min、20 min),沉淀即为 11S 球蛋白;再先后经 Sephacryl S-300 HR 凝胶过滤层析和 Con-A Sepharose 4B 亲和层析分离纯化得到大豆球蛋白。

1.2.2 大豆球蛋白酸和碱性链的分离

将已纯化的大豆球蛋白溶解于 0.025 mol/L, pH 8.0 的磷酸盐缓冲液,配制浓度为 5 mg/mL,加入浓度为 20 mmol/L 的 β -ME,于 90 °C 加热 30 min,待其冷却至室温后,4 °C 离心 30 min (9000 r/min)。所得沉淀用磷酸盐缓冲液(0.025 mol/L, pH 8.0)漂洗 3 次后,使其复溶于含 0.1% SDS 的磷酸盐缓冲液(0.025 mol/L, pH 7.0)中,再置于磷酸盐缓冲液(0.025 mol/L, pH 7.0)中透析 24 h,每 8 h 换液一次,即得大豆球蛋白碱性链溶液。继续调节上述上清液 pH 至 5.0, 4 °C 离心 30 min (9000 r/min),所得沉淀用 pH 5.0 的磷酸盐缓冲液(0.025 mol/L)将沉淀漂洗 3 次后,复溶于 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液(0.025 mol/L)中即为大豆球蛋白酸性链溶液。

1.2.3 SDS-PAGE

采用 SDS-PAGE 电泳检测大豆球蛋白及其酸、碱性链样品,分离胶浓度为 12%,浓缩胶浓度为 4%,上样量为 10 μ L (样品:上样缓冲液为 1:1),维持电流为 6 mA 电泳 30 min 后,再维持电流为 12 mA 电泳 2 h,待溴酚蓝指示剂到达分离胶底部后停止电泳。凝胶经固定、染色和脱色后,采用 SQ-GS800 凝胶成像系统对电泳凝胶进行图象采集,并通过 Quantity One 软件对目标条带进行定量分析。

1.2.4 氨基酸组成分析

分别称取 7.5~25 mg 大豆球蛋白及其酸性链、碱性链冻干样品于 20 mL 安培管中,分别加入 10 mL 溶有 0.1%苯酚的 6 M HCl 溶液,氮吹 15 min 后封管,110 °C 加热 48 h。水解完成后,冷却至室温,滤纸过滤并用超纯水定量至 20 mL,取 1 mL 水解液置于培养皿中,60 °C 水浴蒸干,再加 3 mL 超纯水,继续蒸干除去盐酸,最后加入 2 mL 样品稀释液(pH 2.2),并转移至 EP 管中。取 1 mL 待测样品用 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤,最后通过氨基酸分析仪检测蛋白中氨基酸组分的含量。

1.2.5 MTG 交联修饰大豆球蛋白酸和碱性链

1.2.5.1 MTG 催化交联大豆球蛋白酸、碱性链

将 0.6 mg/mL 酸性链溶液、0.6 mg/mL 碱性链溶液以及含有 0.6 mg/mL 酸性链和 0.6 mg/mL 碱性链的混合液(溶剂为 0.025 M, pH 7.0 磷酸盐缓冲液)于 50 °C 预热 10 min, 然后以酶活底物比为 30 U/g 的比例加入 MTG 酶液, 对照组分别加入等量灭活的 MTG, 于恒温摇床中 50 °C 反应 2 h, 反应体系于 85 °C 水浴 5 min 灭酶。样品直接用于还原型 SDS-PAGE 分析, 或于 -20 °C 保存备用。

1.2.5.2 交联产物的可溶性分析

交联后将交联产物溶液充分振荡并于室温保持 2 h 后, 观察试管底物沉淀的多少即可初步判断交联产物溶解性的差异。将样品离心(10000 r/min、4 °C)、20 min, 采用 Bradford 法对上清液中蛋白质的含量进行检测。蛋白质的溶解度通过蛋白质分散指数即上清液中蛋白质含量占总蛋白质含量的百分比表示, 并将酸性链的交联对照产物的蛋白质分散指数规定为 100%。

1.2.6 数据分析

本论文实验均至少重复 3 次, 所得实验数据利用 SPSS 19.0 进行单因素方差比较分析(One-way ANOVA), 其中均值差采用 LSD 齐性方差分析或 Tamhane's T2 非齐性方差分析, $p < 0.05$ 表示显著性差异, $p < 0.01$ 表示极显著性差异。所有柱状图中样品均值的差异用字母标识, 标注不同字母表示样品间存在显著性差异($p < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 大豆球蛋白的分离纯化

将两次等电点沉淀后得到的大豆 11S 蛋白通过凝胶过滤层析, 洗脱曲线如图 1a 图所示, 洗脱得到几个不同的峰, 根据各洗脱峰分别收集洗脱液, 并利用 SDS-PAGE 电泳进行检测(如图 2a), 其中泳道 1~3 分别对应图 1a 中三个主要洗脱峰。通过电泳图可知, 三个洗脱峰对应的蛋白组分的亚基分布与文献报道的大豆球蛋白的各亚基的分子量相吻合^[10], 灰度扫描其纯度约为 85%。该大豆球蛋白粗品再采用亲和层析进一步纯化, 得到高纯度的大豆球蛋白, 洗脱曲线如图 1b 所示, SDS-PAGE 图谱如图 2a 中泳道 4 所示, 通过灰度扫描分析表明得到大豆球蛋白的纯度大于 94%。

大豆球蛋白是由多种含不同酸性链和碱性链的单聚体组成的六聚体大分子, 分子量为 320~360 ku, 与大豆中其它主要蛋白质分子量相差较大, 然而其六聚体形式受溶液的 pH 和离子强度影响较大, 但在 pH 为 7.6、离子强度为 0.5 的缓冲体系中六聚体形式较稳定

^[11]。因而在这种缓冲液体系中通过凝胶过滤层析可得到较高纯度的大豆球蛋白。同时, 大豆球蛋白又是一种几乎不含任何糖基的蛋白质, 而大豆中 β -伴大豆球蛋白和 Gly m Bd 30K 等蛋白质均为糖蛋白, 因此, 可以利用能特异性结合甘露糖和葡萄糖残基的亲和层析柱材 Con-A Sepharose 4B 进一步纯化, 以得到更高纯度的大豆球蛋白。

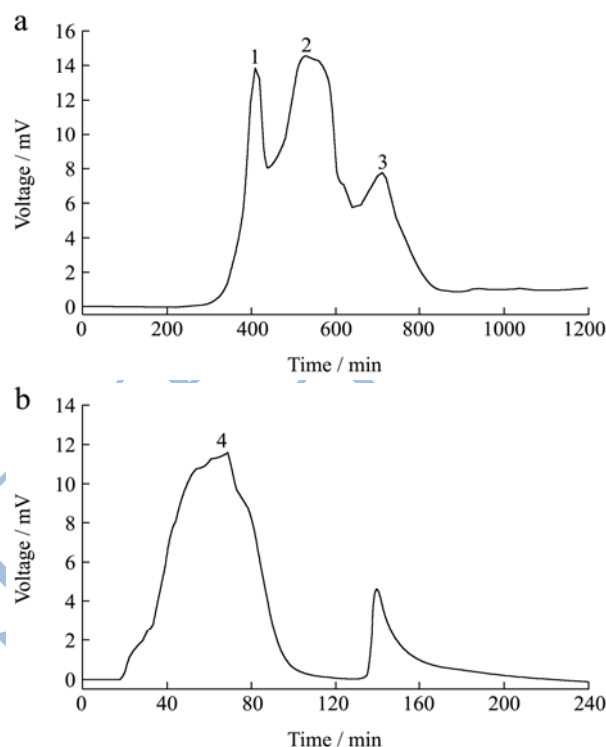


图 1 大豆球蛋白分离纯化的凝胶层析(a)和亲和层析(b)图谱

Fig.1 Elution curve of glycinin purified by gel filtration chromatography (a) and affinity chromatography (b)

2.2 大豆球蛋白酸和碱性链的分离

根据大豆球蛋白酸和碱性链等电点的差异^[12], 将大豆球蛋白加热变性并用 β -ME 还原二硫键使酸和碱性链解离, 再采用等电点沉淀法可分别获得大豆球蛋白酸性链和碱性链。如图 2b 所示, SDS-PAGE 图谱中, 大豆球蛋白酸性链在分子量大约为 42 ku 和 38 ku 处出现两个明显条带, 分别对应于 A3 酸性链和其它酸性链, 大豆球蛋白碱性链在分子量约为 20 ku 处出现单一的条带。酸性链和碱性链的分离为后续探讨酸、碱性链组成分析和交联特性的差异提供了材料保障。

2.3 氨基酸组成分析

大豆球蛋白及其酸、碱性链的氨基酸组成如表 1 所示, 所采用的蛋白质水解方法是酸水解法, 样品中的谷氨酰胺和天冬酰胺分别以谷氨酸和天冬氨酸的形式测出。大豆球蛋白及其酸性链中谷氨酸和谷氨酰胺

的总含量分别为(22.11±0.13)%和(26.55±0.49)%，而碱性链中谷氨酸和谷氨酰胺的总含量相对较低，为(14.99±0.72)%。大豆球蛋白及其酸、碱性链中均含有较高比例的赖氨酸，分别占总氨基酸含量的(4.91±0.37)%、(5.17±0.49)%和(4.19±0.54)%。不同特征氨基酸的比例如表 2 所示，大豆球蛋白酸性链、碱性链中酸性氨基酸和疏水性氨基酸的含量存在较大差异，其中，酸性链含有较高含量的酸性氨基酸，而疏水性氨基酸在碱性链中的含量显著高于其在酸性链中的含量，与文献报道一致^[10]。

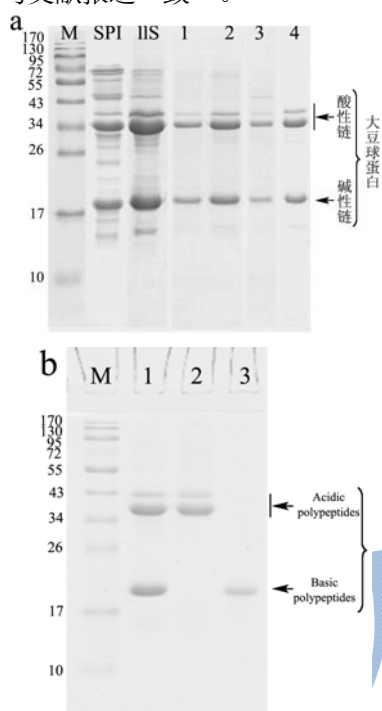


图 2 凝胶过滤层析和亲和层析所得样品 SDS-PAGE 图谱 (a) 和大豆球蛋白及其酸、碱性链的 SDS-PAGE 图谱 (b)

Fig.2 SDS-PAGE of glycinin obtained by gel filtration chromatography and affinity chromatography (a)

and SDS-PAGE patterns of purified glycinin and its acidic and basic polypeptides (b)

注：a 中 SPI-大豆分离蛋白；IIS-两步等电点沉淀分离所得大豆 11S 球蛋白；Lane 1~3-对应凝胶层析图谱(图 1a)中峰 1~3；Lane 4-对应亲和层析图谱(图 1b)中峰 4。b 中 M-marker；Lane 1-大豆球蛋白；Lane 2-大豆球蛋白酸性链；Lane 3-大豆球蛋白碱性链。

表 1 大豆球蛋白及其酸、碱性链的氨基酸组成

Table 1 Amino acid compositions of glycinin and its acidic and basic polypeptides

氨基酸	大豆 球蛋白/%	大豆球蛋白 酸性亚基/%	大豆球蛋白 碱性亚基/%
Asp	11.93±0.13	11.72±0.00	12.83±0.90
Thr	3.51±0.13	3.45±0.49	3.94±0.18

Ser	5.09±0.37	4.66±0.24	5.84±0.36
Glu	22.11±0.13	26.55±0.49	14.99±0.72
Gly	4.39±0.62	4.66±0.24	4.19±0.18
Ala	3.86±0.13	2.76±0.24	5.21±0.18
Cys	1.23±0.50	0.69±0.24	0.51±0.00
Val	4.56±0.50	3.79±0.00	6.35±0.36
Met	1.05±0.00	1.03±0.00	1.02±0.00
Ile	4.39±0.25	4.14±0.73	4.70±0.18
Leu	7.37±0.75	5.86±0.24	9.78±0.54
Tyr	3.68±0.00	3.45±0.24	4.57±0.36
Phe	4.91±0.00	4.48±0.49	5.84±0.36
His	2.98±0.62	3.10±0.00	3.18±0.18
Lys	4.91±0.37	5.17±0.49	4.19±0.54
Arg	7.89±0.25	7.93±0.24	7.88±0.36
Pro	5.26±0.00	5.52±0.24	4.83±0.36

注：N=3。

表 2 大豆球蛋白及其酸、碱性链中不同特征氨基酸的比例

Table 2 Percentage of amino acids with different characteristics in glycinin and its acidic and basic polypeptides

氨基酸	大豆 球蛋白/%	大豆球蛋白 酸性亚基/%	大豆球蛋白 碱性亚基/%
酸性氨基酸 ^a	34.04	38.27	27.82
碱性氨基酸 ^b	15.78	16.20	15.25
极性不带电荷氨基酸 ^c	17.90	16.91	19.05
疏水性氨基酸 ^d	31.40	27.58	37.73

注：a 表示天冬氨酸和谷氨酸；b 表示赖氨酸、精氨酸和组氨酸；c 表示甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸和酪氨酸；d 表示丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和蛋氨酸。

2.4 大豆球蛋白酸、碱性链酶交联产物的

SDS-PAGE 分析

大豆球蛋白酸性链、碱性链以及酸、碱性链混合物分别经 MTG 催化交联，利用还原型 SDS-PAGE 电泳分析交联产物，如图 3 所示。从电泳图谱可知，经 MTG 催化交联修饰后，大豆球蛋白酸性链和碱性链均形成了大量高分子聚合物。与 MTG 孵育 2 h 后，无论是否添加碱性链，大豆球蛋白酸性链几乎全部参与交联反应形成高聚物；而对于碱性链，无论是否添加酸性链，交联反应后仍有少量未形成高聚物的碱性链存在。结果表明：与酸性链相比，大豆球蛋白中碱性链参与交联反应的反应率相对较低。

通过对氨基酸组成分析可知：大豆球蛋白中酸性链和碱性链中均含有较丰富的谷氨酰胺和赖氨酸残

基。因此,从理论上讲,大豆球蛋白中酸性链和碱性链都应是 MTG 的有效底物,但是之前文献报道:MTG 仅能交联大豆球蛋白酸性链,而很难催化天然大豆球蛋白中碱性链参与交联反应^[9]。这可能是对于天然大豆球蛋白而言,碱性链包埋于大豆球蛋白六聚体结构的内部,空间位阻的影响使得碱性链中能参与交联反应的残基不能很好的靠近 MTG,因此,碱性链参与交联反应的反应率较低。而分离得到的碱性链则能较好的与 MTG 接触并发生交联,但结合 SDS-PAGE 图谱可发现,仍有部分碱性链未参与交联,碱性链同 MTG 孵育后,能使其发生分子内以及分子间的交联反应,形成进一步折叠、相互包裹的高分子聚合物;同时碱性链中疏水性氨基酸含量高,其水溶性较差,部分未交联碱性链在水溶液中依靠强大的疏水作用力形成低聚物,两者同时作用使 MTG 作用位点减少,从而导致碱性链相对于酸性链而言交联率较低。

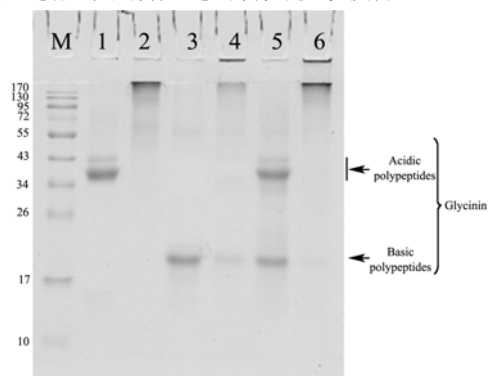


图3 大豆球蛋白酸、碱性链交联修饰产物的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE of glycinin and its acidic and basic polypeptide products after MTG-mediated modification

注: M 表示 Marker; 1 表示大豆球蛋白酸性链; 2 表示大豆球蛋白酸性链交联产物; 3 表示大豆球蛋白碱性链; 4 表示大豆球蛋白碱性链交联产物; 5 表示大豆球蛋白酸、碱性链混合物; 6 表示大豆球蛋白酸、碱性链混合物的交联产物。

2.5 交联修饰对大豆球蛋白酸、碱性链溶解性的影响

经 MTG 催化交联修饰后,大豆球蛋白酸性链、碱性链以及酸性链和碱性链混合物的溶解性呈现出不同的变化趋势。如图 4a 所示,酸性链的交联产物中无明显的沉淀出现,碱性链的交联产物中则有大量沉淀出现,而酸、碱性链混合物的交联产物中则仅有少量沉淀出现。考虑到酸、碱性链混合物组中所含碱性链的含量与碱性链组中碱性链的含量是相同的,而前者交联产物中的沉淀明显少于后者,因此,可初步断定:

在交联反应中,酸性链的参与有利于提高碱性链交联产物的溶解性,这跟徐锦丽^[14]报道转谷氨酰胺酶交联后大豆球蛋白溶解度增加相符合。各实验组与对照组所得样品的相对溶解度(将酸性链的交联对照组的溶解度规定为 100%)如图 4b 图所示,交联修饰后,酸性链交联产物的溶解度与其对照组相近;碱性链交联产物的溶解度仅为 7%,低于其对照组 (B, 13%);酸、碱性链混合物交联产物的溶解度达到 63%,显著高于其对照组 (A 和 B, 17%)。

因此,上述结果说明大豆球蛋白中酸性链和碱性链都是微生物转谷氨酰胺酶 (MTG) 的有效底物,但是由于大豆球蛋白酸和碱性链中疏水性氨基酸的不同导致了两者交联反应的差异。

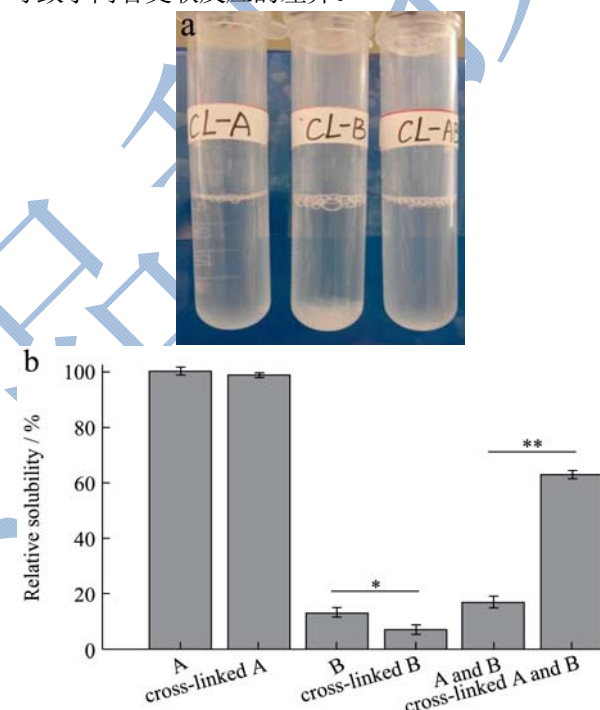


图4 大豆球蛋白酸、碱性链交联修饰产物的外观状态(a)和溶解度(b)

Fig.4 Appearance (a) and solubility (b) of glycinin and its acidic and basic polypeptide products after MTG-mediated modification

注: CL-A 表示酸性链交联组; CL-B 表示碱性链交联组; CL-AB 表示酸、碱性链交联组。

3 结论

利用等电点沉淀法、凝胶过滤层析和亲和层析法分离纯化大豆球蛋白, SDS-PAGE 分析表明制备的大豆球蛋白纯度大于 94%,进一步利用其酸、碱性链等电点差异获得了高纯度的酸性链和碱性链;氨基酸组成分析表明大豆球蛋白酸、碱性链氨基酸组成存在差异,酸性链中谷氨酸、赖氨酸和酸性氨基酸高于碱性

链, 而疏水性氨基酸含量低于碱性链; 酶交联结果表明酸、碱链都能发生交联反应, 但是碱性链参与交联反应程度较低, 结合溶解性试验表明: 酸和碱性链参与交联反应的差异受其谷氨酰胺和赖氨酸残基含量的影响较小, 而受其疏水性氨基酸含量影响较大。

参考文献

- [1] Wang T, Qin G X, Sun Z W, et al. Advances of research on glycinin and beta-conglycinin: a review of two major soybean allergenic proteins [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2014, 54(7): 850-862
- [2] Yuan B E, Ren J Y, Zhao M M, et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with pepsin and high-pressure homogenization on the functional properties of soybean protein isolate [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2012, 46(2): 453-459
- [3] 刘少博,陈复生,刘昆仑,等.酶改性大豆分离蛋白的研究进展[J].食品工业科技,2013,34(24):376-379
LIU Shao-bo, CHEN Fu-sheng, LIU Kun-lun. et al. Effect of transglutaminase on characteristics of soybean protein isolate gel [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(24): 376-379
- [4] Kieliszek M, Misiewicz A. Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review [J]. *Folia Microbiologica*, 2014, 59(3): 241-250
- [5] Giosafatto C, Rigby N, Wellner N, et al. Microbial transglutaminase-mediated modification of ovalbumin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2012, 26(1): 261-267
- [6] Monogioudi E, Faccio G, Lille M, et al. Effect of enzymatic cross-linking of β -casein on proteolysis by pepsin [J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(1): 71-81
- [7] Tang C H, Wu H, Chen Z, et al. Formation and properties of glycinin-rich and β -conglycinin-rich soy protein isolate gels induced by microbial transglutaminase [J]. *Food Research International*, 2006, 39: 87-97
- [8] Yang M, Liu F, Tang C H. Properties and microstructure of transglutaminase-set soy protein-stabilized emulsion gels [J]. *Food Research International*, 2013, 52: 409-418
- [9] Hsieh J F, Yu C J, Chang J Y, et al. Transglutaminase-induced polymerization of β -conglycinin and glycinin in soymilk: A proteomics approach [J]. *Food Hydrocolloid*, 2014, 35: 678-685
- [10] Yuan D B, Yang X Q, Tang C H, et al. Physicochemical and functional properties of acidic and basic polypeptides of soy glycinin [J]. *Food Research International*, 2009, 42(5-6): 700-706
- [11] Mills E C, Marigheto N A, Wellner N, et al. Thermally induced structural changes in glycinin, the 11S globulin of soya bean (*Glycine max*)-an in situ spectroscopic study [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2003, 1648(1-2): 105-114
- [12] Mo X Q, Zhong Z K, Wang D H, et al. Soybean glycinin subunits: Characterization of physicochemical and adhesion properties [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(20): 7589-7593
- [13] 徐锦丽.酶法改善大豆 11S 球蛋白溶解性和乳化性及蛋白质组学研究[D].哈尔滨:哈尔滨商业大学,2014
XU Jin-li.The enzyme modification and proteomics research on soybean 11S globulin's solubility and emulsification [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2014