

# 酶法疏水修饰大豆球蛋白对其色素结合能力的影响

杨晓泉, 严江殷, 侯俊杰

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 为提高天然红曲色素的光稳定性, 利用具有严格底物专一性的谷氨酰内肽酶对大豆球蛋白(11S)进行轻度水解, 分析了11S酶解后表面疏水性的变化, 并将水解产物与红曲色素形成蛋白/色素复合物, 对两者之间的结合特性(结合常数、结合量)和复合物的光稳定性进行了研究。研究发现, 谷氨酰内肽酶对11S的表面性质及红曲色素稳定性均具有显著影响。经谷氨酰内肽酶修饰后, 由于内部疏水基团的暴露, 11S的表面疏水性随水解度的增加而增加, 与红曲色素的结合位点也随之变多。在中性条件下, 水解度为1.50%、质量分数为3%的11S与红曲色素的结合常数达到最大值, 最大结合量为215.00 U/g pro。复合物经24 h光照后, 红曲色素的色价保留率达90%, 大大提高了红曲色素的光稳定性。

**关键词:** 大豆球蛋白; 色素; 谷氨酰内肽酶; 表面疏水性; 结合

**文章编号:** 1673-9078(2013)11-2566-2570

## Effect of Enzymatic Modification on Binding Capacity between Pigment and Glycinin

YANG Xiao-quan, YAN Jiang-yin, HOU Jun-jie

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** To enhance photostability of *Monascus* pigment, glycinin was modified via glutamyl endopeptidase (GE), which had strict substrate specificity. The surface hydrophobicity of the 11S globulin after hydrolysis was analyzed, and protein/pigment complex was produced after enzymatic modification of the 11S. The binding properties (binding constant and binding capacity) and the light stability of protein/pigment complex were investigated. The results showed that GE had a significant effect on 11S surface character and *Monascus* pigment photostability. Surface hydrophobicity of 11S increases with the degree of hydrolysis (DH) increased after GE modifying as the inner hydrophobic groups exposed. At pH 7.0, the binding constants of *Monascus* pigment and 3% (m/V) 11 S reached the maximum of 215.00 U/g pro when the DH was 1.50%. After 24 h light exposure, the protein/pigment complex had the color value retention rate of 90% which highly improved the light stability of *Monascus* pigment

**Key words:** glycinin; pigment; glutamyl endoproteinase; surface hydrophobicity; binding

红曲色素 (*Monascus* pigment) 是由红曲霉 (*Monascus*) 生成的天然食用色素, 是一类聚酮体化合物的混合物<sup>[1]</sup>, 包括红曲红色素、醇溶性黄色素和水溶性黄色素。我国长期的食用历史证明红曲色素是一类安全性高的食用色素, 同时它还可抑菌防腐、降血压等, 因此可以说红曲色素具有“天然、营养、安全、多功能”的多重优点。目前红曲色素已被应用于肉制品<sup>[2]</sup>、乳制品<sup>[3]</sup>等食品, 如火腿肠、盐焗鸡、冰淇淋、酸奶等。但是, 与合成色素相比, 天然红曲色素最大缺点是光稳定性差, 易受光照的影响而引起变色或褪色<sup>[4]</sup>。前期研究表明, 可通过加入色素稳定剂,

收稿日期: 2013-05-08

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31130042); 国家科技支撑计划项目(2012BAD34B04)

作者简介: 杨晓泉(1965-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 蛋白质化学工程

如 $\beta$ -环糊精<sup>[5]</sup>、抗氧化剂<sup>[6]</sup>等提高红曲色素的光稳定性。而蛋白质作为食品中的主要成分, 探究色素与其之间的相互作用可为色素的使用提供更科学的指导。

大豆蛋白由于其来源丰富、价格低廉而被广泛应用, 如仿肉制品、乳制品。但大豆蛋白产品的色泽限制了其被人们接受的程度, 随着大豆营养价值的认可及大豆深加工的发展, 赋予豆制品鲜艳的颜色尤为重要。大豆蛋白质是一种重要的植物蛋白, 主要由大豆球蛋白(11S)和伴球蛋白(7S)组成, 其中11S约占42%。作为贮藏蛋白, 大豆蛋白质结构中疏水基团倾向于埋藏在分子内部, 使得亲水性过高, 缺乏相应的运载小分子的疏水腔。因此, 本文选取作用位点在酸性氨基酸(Glu/Asp)<sup>[7]</sup>的谷氨酰内肽酶(glutamyl endoproteinase, GE, EC 3.4.21.19), 对11S进行疏水性酶法修饰。研究11S经GE酶修饰后, 表面疏水性

和结合红曲色素的能力及其稳定性,以期获得具有良好光稳定性的蛋白/色素产品。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料和仪器

材料:低温脱脂大豆粕,山东禹王有限公司;红曲色素(38.5 U/mL),东莞市天益生物工程有限公司;Alcalase 2.4 L,丹麦诺维信公司;Suc-Ala-Ala-Phe.pNA (s.AAF.pNA)和 acetyl-Glu.pNA (Ac.glu.pNA),上海生基公司;ANS 荧光探针,美国 Sigma 公司;所用化学试剂均为分析纯。

仪器:生物分子纯化仪,瑞典 GE 公司;F7000 荧光分光光度计,日本日立公司;UV2300 紫外-可见分光光度计,日本岛津;CR22G 高速冷冻离心机,日本日立公司;电热恒温水浴锅,江苏金坛市宏华仪器有限公司;pH-stat,瑞士万通公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 11S 的制备

采用 Nagano 的方法<sup>[8]</sup>制备,杜马斯定氮法测得蛋白质含量 95% (m/m) 以上。

#### 1.2.2 GE 酶的分&纯化及酶活测定

参考 Svendsen 等<sup>[7]</sup>的方法采用 CM 阳离子交换柱从 Alcalase 2.4L 中分离纯化 GE 酶。准备缓冲液 A (10 mM 磷酸缓冲液, pH 6.20) 和缓冲液 B (1 M NaCl 溶于 10 mM 磷酸缓冲液中, pH 6.20),所有缓冲液在使用前通过 0.45 μm 膜过滤,超声脱气 20 min。Alcalase 2.4L 按 1:4 稀释,调节 pH 为 6.20, 6500 r/min 离心 10 min 取上清上柱纯化。收集含有水解底物 Ac.glu.pNA 活力的洗脱液,在缓冲液 A 中透析过夜除盐。重复过柱,直到洗脱液中不含水解底物 s.AAF.pNA 的活力为止,以除去枯草芽孢杆菌蛋白酶 (*Subtilisin*)。得到纯化后的 GE 酶,保存于 4 °C 冰箱备用。

GE 酶和 *Subtilisin* 的酶活测定根据 Spellman<sup>[9]</sup> 的方法稍做调整,具体如下:向 1.4 mL 磷酸缓冲液 (10 mM, pH 7.0) 中加入 50 μL 酶溶液和 50 μL 相应的底物, s.AAF.pNA 或 Ac.glu.pNA (4 mM)。40 °C 水浴 30 min 后加入 1 mL 1.5 M 醋酸终止反应,测定混合液在 410 nm 处的吸光值。酶活定义为每分钟每毫克酶蛋白释放的对硝基苯胺 (pNA) 数量。用对硝基苯胺作标准曲线。

#### 1.2.3 蛋白含量的测定

酶溶液的蛋白含量使用 Lowry 法<sup>[10]</sup>进行定量,使用牛血清白蛋白作为标准。

#### 1.2.4 大豆 11S 的酶解

配制 3% (m/V) 大豆 11S 溶液,室温搅拌 2 h 后置 4 °C 冰箱过夜,以达到完全溶解。待水解蛋白溶液于 40 °C 预热 10 min,调节初始 pH 值 7.0,然后加入一定量的 GE 酶液,调节 pH 值 7.0,此时为 0 时刻,然后随反应的进行向蛋白溶液中滴加 0.15 M 的 NaOH 保持 pH 值 7.0。以消耗 NaOH 体积来计算蛋白溶液的水解度 (DH)<sup>[11]</sup>。计算公式如下:

$$DH = \frac{B \times N_b}{\alpha \times M_p \times h_{tot}} \times 100\%$$

注: B 为碱液的体积 (mL), N<sub>b</sub> 为碱液的浓度 (mol/L), α 为氨基的离解度, M<sub>p</sub> 为底物中蛋白质总含量 (g), h<sub>tot</sub> 为底物中蛋白质中肽键的总数 (mmol/g(protein))。当 pH 值 7.0, 温度 40 °C 时, α=3.00; 大豆球蛋白 h<sub>tot</sub>=8.85。

#### 1.2.5 电泳分析 (SDS-PAGE)

向 100 μL 天然和水解 11S 溶液 (3%, m/V) 中加入 400 μL 样品缓冲液 (包含 1% SDS 和 2% 2-巯基乙醇),电泳前沸水加热 5 min 后 10000 r/min 离心 5 min,准备上样。分离胶浓度为 12.0%, 浓缩胶浓度为 5%, 上样量为 2 μL。电泳于恒流下进行,在浓缩胶时电流为 40 mA,进入分离胶后电流调至 80 mA。染色液采用 0.1% 考马斯亮蓝 R250,脱色使用 0.5 mol/L NaCl 溶液。

#### 1.2.6 表面疏水性的测定

使用 ANS 荧光探针法测定蛋白聚集体的表面疏水性。0.8 mL 样品溶液置于荧光分光光度计样品池中,滴定加入 10 μL ANS 溶液 (2.5 mM, pH 7.0) 至 ANS 终浓度为 30 μM。ANS 的摩尔吸光系数为 5000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,用于测定 ANS 浓度。测定参数:激发波长为 390 nm,发射波长 470 nm,激发和发射狭缝宽均为 5 nm。测定结果重复三次,使用 Lineweaver-Burk 方程计算表面疏水性参数:

$$1/F = 1/F_{max} + (K_d/L_0)(1/F_{max}) \quad (1)$$

注: L<sub>0</sub> 为 ANS 浓度 (μM), F<sub>max</sub> 为探针浓度饱和时最大相对荧光强度, K<sub>d</sub> 为蛋白分子与 ANS 复合物的表观结合解离常数。F<sub>max</sub> 和 K<sub>d</sub> 可以通过线性拟合计算获得。蛋白质的表面疏水性指数 (PSH) 为 F<sub>max</sub> 和 K<sub>d</sub> 的比例 [PSH=F<sub>max</sub>/K<sub>d</sub>\*(protein concentration)],反映了蛋白表面疏水位点的数量和亲水性。

#### 1.2.7 荧光光谱测定

向不同水解度的 1% (m/V) 蛋白溶液中依次添加 0、0.77、1.54、2.31、3.08、3.85 U (记作 A 到 F) 红曲红色素,振荡混匀,于 40 °C 水浴结合 4 h 后,测定内置荧光光谱。激发波长为 285 nm,发射波长为 300 nm~420 nm,激发和发射狭缝均为 5 nm,用蒸馏水作空白。重复测定三次。根据下列方程计算结合常数:

$$\frac{1}{\Delta FI} = \frac{1}{\Delta FI_{max}} + \frac{1}{K_b \Delta FI_{max}} \cdot \frac{1}{[Q]} \quad (2)$$

注:  $\Delta FI$  为添加色素的样品与空白样之间相对荧光强度的差值,  $\Delta FI_{max}$  为相对荧光强度差值的最大值,  $K_b$  为结合常数 ( $U^{-1}$ ),  $[Q]$  为添加色素的色价 ( $U$ )。

1.2.8 大豆 11S 与红曲红色素结合性质的测定  
选取结合常数最大的水解度, 向 3% ( $m/V$ ) 11S 溶液中依次添加 0、21、43、64、86、107、128、150、171、192、215、235、257、278 U/g pro 红曲色素, 振荡混匀, 于 40 °C 水浴结合 4 h。测定水浴前后溶液在 500 nm 处的吸光值, 根据吸光值的变化值计算最大结合量。

向 11S 水解液中加入最大结合量的红曲色素, 调整溶液初始吸光值为 0.6~0.8 之间, 选择光照高度为 16 cm, 样品液层厚度为 5 mm, 灯源为 60 W, 光照时间为 24 h。于 0h、2h、4h、6h、9h、12h、18h、24 h 取样测定 500 nm 处的吸光值, 并计算其色价保存率 (保存率 =  $A/A_0$ ,  $A_0$  是初始吸光度,  $A$  是光照后吸光度), 以此判断混合物的光稳定性。以不加蛋白的

红曲色素作空白, 未水解的蛋白溶液结合色素作对照。重复测定三次。

### 1.3 数据统计

所用数据为重复实验的平均值, 误差项为标准差; 数据标注字母不同者为差异显著 ( $P < 0.05$ )。数据使用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 GE 酶的提纯

利用阳离子交换柱从 Alcalase 2.4L 中分离纯化 GE 酶, 分别测定纯化前后酶液的蛋白含量、subtilisin 酶活力和 GE 酶活力, 结果如表 1 所示。从表 1 可知, 经过纯化后, 水解底物 s.AAF.pNA 的活力减少了 95%, GE 酶的回收率达 75.81%, 高于参考文献<sup>[7,12]</sup>所报道的回收率。可见阳离子交换柱分离法可有效地除去 subtilisin, 得到高纯度的 GE 酶, 同时回收率高。

表 1 纯化过程和结果评价

Table 1 Purification procedure and result evaluation

步骤	总体积 /mL	总蛋白 /mg	s.AAF.pNA / [ $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ]	ac.glu.pNA / [nmol/(min·mg)]	回收率 /%
纯化前	49.00±0.50	11.24±0.20	0.16±0.18	55.00±0.45	
纯化后	65.00±1.50	8.08±0.01	0.007±0.00	58.00±1.41	75.81±1.58

### 2.2 GE 酶解对大豆 11S 性质的影响

#### 2.2.1 SDS-PAGE 电泳分析

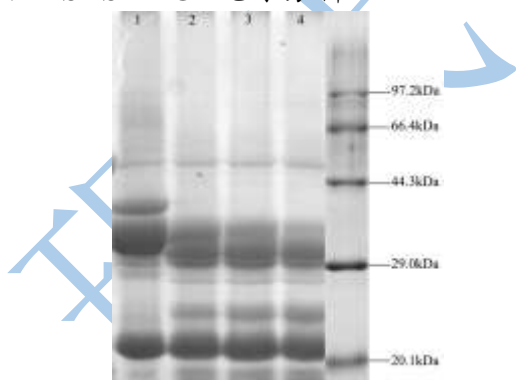


图 1 不同水解度大豆 11S 的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.1 SDS-PAGE patterns of 11S protein with different DHs

注: 1: 11S, 2: DH 0.50%, 3: DH 1.00%, 4: DH 1.50%。

本文测定了 GE 酶解的不同水解度 11S 的电泳图谱。从图 1 可以看出, 与天然 11S 相比, 酶解过的 11S 中, 酸性亚基减少, 碱性亚基条带明显增加, 且变化量随着水解度的增大而增加。其中酸性亚基中分子量为 41 kDa 的条带在水解度为 0.5% 时即消失, 并在分

子量约为 25 kDa 处出现了新的较明显的条带; 在碱性亚基条带下方也形成了新条带。说明 GE 酶对大豆 11S 中的酸性亚基和碱性亚基都有一定的水解作用。

#### 2.2.2 11S 表面疏水性的变化

表面疏水性能够反映出蛋白质疏水基团暴露以及连续疏水区域的形成情况。11S 经 GE 酶解处理后, 表面疏水性呈增加的趋势 (见表 2), 且存在显著性差异。天然 11S 的表面疏水性为 129.65 F/mg· $\mu\text{M}$ , 水解度为 1.50% 时增加至 191.25 F/mg· $\mu\text{M}$ 。

11S 是一个六聚体, 它由六个酸性亚基 (A) 和六个碱性亚基 (B) 通过二硫键连接组成。酸性亚基亲水性强, 而碱性亚基疏水性强<sup>[13]</sup>。在天然状态下, 碱性亚基趋向于埋于六聚体大分子内部, 把疏水性亚基埋藏起来, 酸性亚基更多地暴露在外面。从电泳结果可知, GE 不仅水解了酸性亚基, 对碱性亚基也有所作用。11S 经 GE 酶解后, 蛋白质内部肽键被切开, 从而原本埋藏在内的疏水基团更多地暴露在外, 导致表面疏水性的变大。证实采用 GE 酶对 11S 进行疏水性修饰是可行的。

蛋白酶特异性断裂蛋白质的肽键, 蛋白质分子量

变小，酶解使得蛋白质分子折叠结构部分打开并发生重要的结构重排，一些原先包埋在蛋白质分子内部的疏水区域暴露到水相溶液中，引起疏水性的变化。

表 2 不同水解度大豆 11S 的表面疏水性

**Table 2 Surface hydrophobicity of 11S protein with different DHs**

样品	F <sub>max</sub>	Kd/μM	PSH/(F/mg·μM)
11S-native	203.23±7.15 <sup>a</sup>	9.83±0.79 <sup>a</sup>	129.65±6.63 <sup>a</sup>
11S-DH 0.50%	227.60±9.59 <sup>b</sup>	9.21±0.56 <sup>a</sup>	154.60±3.13 <sup>b</sup>
11S-DH 1.00%	250.39±11.44 <sup>c</sup>	9.65±0.62 <sup>a</sup>	165.43±6.54 <sup>b</sup>
11S-DH 1.50%	277.78±0.00 <sup>d</sup>	9.08±0.26 <sup>a</sup>	191.25±5.64 <sup>c</sup>

注：<sup>a</sup> 各列不同数字代表样品间的显著差异 (p<0.05)。

### 2.3 大豆 11S 与红曲红色素的结合

#### 2.3.1 GE 酶对大豆 11S 与红曲红色素结合常数的影响

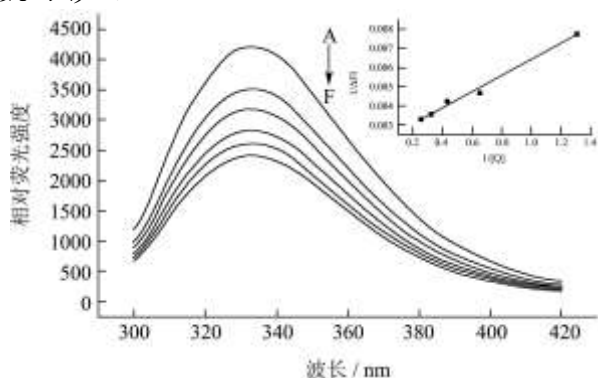


图 3 不同红曲色素添加量对 11S 水解物荧光光谱的影响

**Fig.3 Effect of Monascus pigment on the fluorescence spectra of 11S hydrolysis**

表 3 不同水解度 11S 与红曲色素的结合常数

**Table 3 Binding constant of Monascus pigment and 11S of different DHs**

样品	Kb/U <sup>-1</sup>	R <sup>2</sup>	SD
11S-native	0.48	0.999	0.16
11S-DH 0.50%	0.61	0.988	0.06
11S-DH 1.00%	0.63	0.961	0.04
11S-DH 1.50%	0.78	0.988	0.11

采用荧光猝灭方法研究大豆 11S 与红曲红色素之间的结合行为。从图 3 可以看到，随着红曲红色素添加量的增加，混合溶液的相对荧光强度依次减弱。而图 3 中的附图表明红曲红色素的添加量与混合溶液相对荧光强度间存在良好的线性关系。根据公式 (2) 计算大豆 11S 与红曲红色素的结合常数，如表 3 所示。随着大豆 11S 水解度的增加，结合常数 K<sub>b</sub> 也在变大，由 0.475 U<sup>-1</sup> (天然 11S) 增加至 0.775 U<sup>-1</sup> (DH 1.50%)。说明 GE 酶的水解有利于加强大豆 11S 和红

曲红色素两者的结合能力，且水解度为 1.50% 时结合能力最强。

一方面，11S 经酶解后，肽链被切断，生成了更多小分子肽段，一定程度上增加了与色素分子结合的位点。另一方面，GE 酶对 11S 起到疏水性修饰作用，显露出来的疏水基团与色素分子中的非极性基团通过疏水作用连接在一起，也使得 11S 与红曲红色素的结合常数变大。

#### 2.3.2 红曲色素的最大结合量

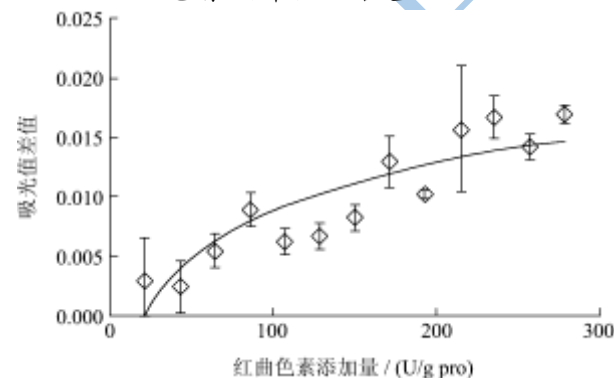


图 5 水解度 1.50% 的 11S 与红曲色素的结合量

**Fig.5 Binding capacity between Monascus pigment and 11S of 1.50%DH**

大豆 11S 水解度为 1.50% 时，与红曲色素的结合常数最大，因此选择 DH 1.50% 的 11S 水解液研究红曲红色素的最大结合量。从图 5 上看，随着色素添加量的增加，结合前后 500 nm 处吸光值的差值在变大。当添加量大于 200 U/g pro 时，继续增加红曲红色素的添加量，吸光值差值变化不大。因此确定 DH 1.50% 的大豆 11S 与红曲红色素的最大结合量为 215.00 U/g pro。

当蛋白溶液浓度固定，即与色素结合位点相同的情况下，随着色素添加量的增加，结合位点从不饱和状态到饱和状态。当全部结合位点都与色素分子作用后，由于处于过饱和状态，色素的结合量不会随着色素添加量的增加而继续变大。游离的色素分子与结合态色素分子处于动态平衡。

#### 2.3.3 蛋白-色素结合物的光稳定性

色素的光稳定性选取 DH 1.50% 11S 与红曲色素的结合物 (DH 1.50% 11S-pigment) 作为研究对象，未加蛋白的天然红曲色素 (pigment) 作空白，而未水解 11S 与红曲色素的结合物 (11S-pigment) 作对比，结果如图 6 所示。在光照 2 h 时，11S-pigment 混合物色价保留率变大，其余两者均变小。2 h 后，11S-pigment 混合物色价保留率迅速减小，其余两者缓慢变小。总体上看，在 24 h 光照过程中，DH 1.50% 11S-pigment 混合物的色价保留率在初期稍微变小后，后期一直保

持在 90% 左右; 11S-pigment 混合物的色价保留率在初期变大而后迅速变小, 光照结束时约为 80%; red 的色价保留率则持续变小, 最后只有 70%。因此, 大豆 11S 经 GE 酶水解后, 不仅与红曲色素之间的结合能力增强, 而且提高了红曲色素的光稳定性。

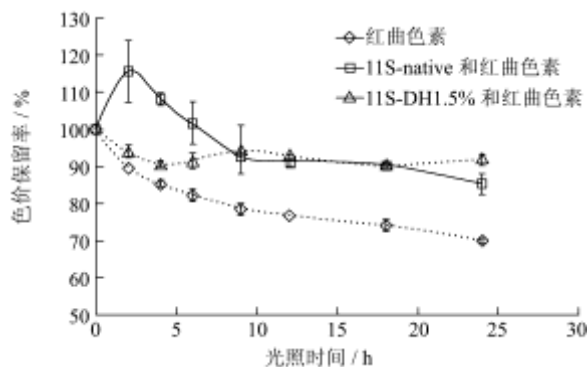


图 6 不同处理红曲色素的光稳定性

Fig.6 Light stability of *Monascus* pigment with different treatments

红曲色素分子结构中包含苯环体、脂肪酸侧链和碳碳双键, 极易发生自由基反应的光氧化过程。连喜军<sup>[4]</sup>等人提出的红曲红色素褪色机理指出, 在有氧条件下, 红曲红色素水溶液产生 3 种自由基: 羟自由基 ( $\text{OH}\cdot$ )、超氧阴离子 ( $\text{O}_2\cdot^-$ ) 和脂肪族侧链断裂产生自由基, 导致褪色。根据红曲色素的光褪色机理, 添加色素稳定剂一般是从两种途径提高天然色素的稳定性<sup>[4]</sup>: 一是添加抗氧化剂, 代替色素的发色团与助色团被氧化; 二是在不影响发色基团与助色团的情况下, 稳定剂与色素形成结构稳定的物质。

本文向天然红曲色素中添加大豆 11S 蛋白, 二者结合形成稳定的混合物。不管是天然 11S 还是酶解后的 11S, 都可与红曲色素结合, 降低其结构破坏的几率, 降低色素的降解速率, 因此两者的色价保留率都比天然红曲色素的高。而 11S 经过 GE 酶解后, 表面疏水性增加, 疏水基团可形成一个疏水腔, 使得红曲色素分子进入其中, 减少了与光作用的机会, 因而跟天然 11S 相比, 对红曲色素起到了更好的护色作用。

### 3 结论

3.1 大豆球蛋白 (11S) 经 GE 酶轻度水解后, 酸性亚基和碱性亚基都被水解, 表面疏水性随着水解度的增加而增加。说明 GE 酶对 11S 起到了疏水性修饰的作用, 为结合色素提供了结构基础。

3.2 中性条件下, 水解度为 1.50% 的 11S 与红曲色素的结合常数最大, 二者最大结合量为 215.00 U/g pro。且 11S 酶解产物荷载红曲色素可提高色素的光稳定性。经过 24 h 光照后, 色素的色价保留率达 90%, 不

存在暴释情况。

### 参考文献

- [1] Feng Y L, Shao Y C, Chen F S. *Monascus* pigments [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 96: 1421-1440
- [2] 王也, 胡长利, 崔建云. 红曲红色素替代亚硝酸钠作为腊肉中着色剂的研究 [J]. 中国国家农产品加工信息, 2006, 2: 26-30  
Wang Y, Hu C L, Cui J Y. Research on Red Yeast Rice as an Alternative to Sodium Nitrite in Bacon Colorant [J]. Agricultural Product Processing of China, 2006, 2: 26-30
- [3] Che S, Lv B, Du X Z, et al. Pigment from red fermented rice as colouring agent for stirred skimmed milk yoghurts [J]. International Journal of Dairy Technology, 2012, 65(2): 287-292
- [4] 杨玲, 江丹, 周波, 等. 环境因素对红曲色素稳定性的影响及其光稳定性提高的方法 [J]. 食品研究与开发, 2009, 30(5): 186-188  
YANG L, JIANG D, ZHOU B, et al. Effect of Environmental Factors on the Stability of *Monascus* Pigment and Enhancing its Photostability [J]. Food Research and Development, 2009, 30(5): 186-188
- [5] 乔华, 李美萍, 冯彦琳, 等. 红曲色素与  $\beta$ -环糊精包合物的研究 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(7): 161-166  
Qiao H, Li M P, Feng Y L, et al. Study on Inclusion Compound of *Monascus* Pigment with  $\beta$ -cyclodextrin [J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(7): 161-166
- [6] 连喜军, 王红娟, 王昌禄, 等. 各类抗氧化剂对红曲红色素中红色素的护色作用 [J]. 中国食品添加剂, 2004, 1: 60-61  
Lian X J, Wang H J, Wang C L, et al. Increasing Photostability of Red Pigments of *Monascus* Pigments by Water Soluble Antioxidant [J]. China Food Additives, 2004, 1: 60-61
- [7] Svendsen I, Breddam K. Isolation and amino acid sequence of a glutamic acid specific endopeptidase from *Bacillus licheniformis* [J]. Eur. J. Biochem, 1992, 204: 165-171
- [8] Nagano T, Hirotsuka M, Mori H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1992, 40(6): 941-944
- [9] Spellman D, Kenny P, Ocuinn G, et al. Aggregation Properties of Whey Protein Hydrolysates Generated with *Bacillus licheniformis* Proteinase Activities [J]. Agric. Food Chem, 2005, 53: 1258-1265

- [10] Lowry O H, Rosebrough N J, Lewis Farr A, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. Biol. Chem, 1951, 193: 265-275
- [11] Chen L, Chen J S, Ren J Y. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25: 887-897
- [12] Kalyankar P, Zhu Y, Keeffe M, et al. Substrate specificity of glutamyl endopeptidase (GE) Hydrolysis studies with a bovine  $\alpha$ -casein preparation [J]. Food Chemistry, 2013, 136: 501-512
- [13] 于泓鹏,唐传核,曾庆孝,等.蛋白酶对大豆分离蛋白的降解模式研究[J].食品研究与开发,2006,27(4):13-15 转 12
- Yu H P, Tang C H, Zeng Q X, et al. Comparative Digestibility of Spi by Several Commercial Proteinase [J]. Food Research and Development, 2006, 27(4): 13-15 to 12
- [14] 连喜军,王昌禄.W-红色素的光褪色研究[J].光学学报,2006, 26(8):1257-1259
- Lian X J, Wang C L. Study on Mechanism of Photobleaching for W-Red Pigment [J]. Acta Optica Sinica, 2006, 26(8): 1257-1259