

大豆蛋白-木糖复合物的抗原性、致敏性及结构特性研究

布冠好, 张楠, 陈复生

(河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450001)

摘要: 大豆是营养丰富的植物蛋白资源, 但也是八大过敏原之一; 糖基化修饰是一种降低食物过敏原的有效方法。本文将木糖通过糖基化的方法引入大豆分离蛋白制备大豆分离蛋白-木糖复合物, 采用间接竞争 ELISA 法, 测定在一定温度、一定质量比、不同反应时间条件下, 大豆分离蛋白-木糖复合物中大豆球蛋白的抗原性和过敏原性的变化, 并且对糖基化产物进行了结构特性的研究。结果表明, 糖基化能有效降低大豆球蛋白的抗原性和过敏原性, 其抗原性从 83.01% 降到 67.43%; 过敏原性从 46.32% 降低到 29.48%; 两者在反应 10 h 时免疫活性都较低。通过三硝基苯磺酸(TNBS)法、SDS-PAGE 电泳证明了糖基化反应的发生; 傅里叶红外光谱结果表明, 与大豆分离蛋白相比, SPI-木糖糖基化产物的 α -螺旋、 β -转角的内容下降, 而无规卷曲、 β -折叠的含量增加。

关键词: 大豆分离蛋白; 木糖; 糖基化; 抗原性; 过敏原性

文章编号: 1673-9078(2015)11-33-38

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.11.006

Antigenicity, Allergenicity, and Structural Properties of Soy Protein Isolate-Xylose Conjugates

BU Guan-Hao, ZHANG Nan, CHEN Fu-Sheng

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

Abstract: Soybean is a high-quality plant protein source, but it is also one of the top eight food allergens. Glycosylation is an effective method to reduce the allergenic potential of food protein allergens. Xylose was conjugated to soy protein isolate (SPI) by means of glycosylation to form SPI-xylose conjugates. The changes in the antigenicity and allergenicity of glycinin in SPI-xylose conjugates at a specific temperature, specific mass ratio of the protein and sugar, and different reaction times were determined by the indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, and the structural properties of SPI-xylose conjugates were also studied. The results indicate that glycosylation can effectively reduce the antigenicity and allergenicity of glycinin. The antigenicity of glycinin was reduced from 83.01% to 67.43%; the allergenicity of glycinin was reduced from 46.32% to 29.48%, and both immunoreactivities were relatively low after ten hours of reaction. Glycosylation was confirmed by trinitrobenzene sulfonic acid and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The Fourier transform infrared spectroscopy results showed that compared with SPI, the α -helix and β -turn content in SPI-xylose conjugates decreased, while the β -sheet and random coil contents increased.

Key words: soy protein isolate; xylose; glycosylation; antigenicity; allergenicity

大豆由于其平衡的氨基酸比例, 具有较高的营养价值, 成为人和畜禽最重要植物性蛋白资源来源之一, 除此之外, 大豆蛋白还具有优越的加工性能以及良好

收稿日期: 2015-01-14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201293, 21176058, 31171790); 国家 863 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: 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

通讯作者: 陈复生 (1963-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品蛋白质资源开发与利用

的生理功能^[1]。但大豆同时也是八大类主要致敏原之一, 其中, 引起致敏反应的物质主要为大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白。大豆蛋白的广泛使用, 给对大豆过敏的人群带来不可避免的安全健康问题。据报道, 全世界有将近 0.3%~0.4% 的人口对大豆过敏^[2]。而且随着大豆蛋白制品的广泛使用, 成年人对大豆过敏的发病率也在不断上升, 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。

因此如何去除大豆中的主要过敏原成为目前亟待解决的问题。随着研究的不断深入, 通过蛋白质改性的方法可有效降低和消除大豆中的过敏原。近年来,

蛋白质与多糖的糖基化改性受到广泛关注,经糖基化改性后,食物的过敏原表位被掩盖,抗原性及过敏性可明显降低,并且此方法简单、安全性高、快速、并且无需添加任何化学试剂,应用前景较好^[3]。已有相关研究证实糖基化反应能有效降低蛋白质的抗原性和过敏性。齐晓彦等^[4]人将黑木耳多糖引入到乳清蛋白上,发现糖基化能有效降低乳清蛋白的抗原性。阮韦伟研究了糖基化修饰改性对拟穴青蟹过敏原的免疫活性,同样可降低拟穴青蟹的过敏性^[5]。

本研究以大豆分离蛋白和木糖为原料,通过干法糖基化反应将木糖引入到大豆分离蛋白上,制备大豆蛋白-木糖共价复合物。探索在一定温度,一定蛋白与糖的比例下,不同反应时间对大豆分离蛋白-木糖中大豆球蛋白抗原性、过敏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,为探究糖基化修饰对大豆蛋白致敏性影响的作用机理、开发低敏性大豆蛋白制品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;木糖:天津市科密欧化学试剂有限公司;大豆球蛋白(glycinin, G3171),酶标二抗(HRP标记的羊抗兔IgG, A6154),酶标二抗(HRP标记的羊抗人IgE, A9667):Sigma公司;过敏人血清:浙江大学医学院附属儿童医院;兔抗glycinin血清(自制);牛血清蛋白(BSA)、TMB单组份显色液:北京索莱宝科技有限公司;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:Corning Costar公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆分离蛋白-木糖复合物的制备^[6]

将SPI与木糖按质量3:1的比例溶解于蒸馏水中,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(相对湿度79%)的干燥器内,然后将干燥器置于恒温培养箱内,在温度55℃下制取不同反应时间的大豆分离蛋白-木糖复合物,对照为大豆分离蛋白在相同条件下反应不同时间的产物,即将大豆分离蛋白放入干燥器(RH79%)中,在55℃制取0、2、4、6、8、10、24、36h的产物。

1.2.2 大豆蛋白-木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^[7]。

(1)抗原包被:以0.025 μg/mL浓度的大豆球蛋白标准抗原包被96孔酶标板,每孔100 μL,4℃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℃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 μL/孔封闭液进行封闭,37℃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 μL,37℃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 μL,37℃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 μL,37℃显色10 min,显示蓝色。

(8)终止反应:每孔加入50 μL 2 mol/L H₂SO₄终止反应。利用酶标仪双波长测定各孔的OD值,实际OD值=OD₄₅₀-OD₆₂₀。通常抗原性的大小用抑制率来表示,抑制率表示样品中大豆球蛋白抑制抗血清与酶标板上包被的标准抗原大豆球蛋白结合能力的大小,可记为大豆球蛋白抗原抑制率;抑制率越低,则样品中的大豆球蛋白抗原性越低,二者呈正比关系;计算公式如下:

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

其中:OD表示被测样品的吸光值,OD₀为无竞争体系的吸光值。

1.2.3 大豆蛋白-木糖复合物过敏原性的测定^[7]

采用间接竞争ELISA法测定样品中大豆球蛋白的过敏性,方法与步骤同1.2.2中的步骤(1)至(8)。其中抗体为由大豆过敏患者血清制备的血清池,酶标二抗为HRP-羊抗人IgE,酶标二抗的稀释倍数为1:1000,过敏患者血清稀释倍数为1:2,抗原包被浓度为10 μg/mL,其他步骤相同。

数据处理:样品过敏性的大小即样品与人血清IgE结合能力的大小用抑制率来表示,计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - \text{B}/\text{B}_0) \times 100 \quad (2)$$

其中 B 表示各被测样的吸光值, B_0 为无竞争体系的吸光值。抑制率表征样品中大豆球蛋白抑制抗血清 IgE 与酶标板上包被的相应抗原结合的能力的大小。

1.2.4 接枝度的测定

采用三硝基苯磺酸法 (TNBS) [8]。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 $0\sim5\times 10^{-3}$ mol/L 亮氨酸作标准曲线, 通过标准曲线转换成亮氨酸的浓度。根据标准曲线计算接枝度。

接枝度可以用此公式计算:

$$\text{接枝度}(\%) = (C_0 - C_1) / C_0 \times 100 \quad (3)$$

其中: C_0 : 接枝反应前溶液中自由氨基的含量, mol/L;

C_1 : 接枝反应后溶液中自由氨基的含量, mol/L。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳分析

采用 Laemmli [9] 的方法并进行改进, 将样品进行处理, 使最终样品的蛋白浓度为 2 mg/mL, 使用 12% 的分离胶和 4% 的浓缩胶, 上样量为 10 μ L。电泳开始时电流为 20 mA, 染料进入分离胶后, 改为 40 mA, 当染料前沿距硅胶底边 1 cm 时, 停止电泳, 关闭电源。取出凝胶放入固定液中 1 h, 固定完之后用考马斯亮蓝染色 1.5 h, 然后用脱色液脱色直到背景色脱去为止。

1.2.6 紫外光谱分析 [10]

准确称取一定量不同反应时间的糖基化样品及大豆分离蛋白溶于去离子水中 (蛋白浓度 1 mg/mL), 以蒸馏水作空白样, 在 190~350 nm 范围内进行全波长扫描。

1.2.7 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, 用傅立叶红外光谱仪测定波数范围 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 内的吸收光谱, 分辨率 4 cm^{-1} , 波数精度 0.01 cm^{-1} , 扫描次数 32 次, 环境温度 25 °C [10]。

1.2.8 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 \pm 标准差。

2 结果与分析

2.1 反应时间对糖基化产物抗原性的影响

在相对湿度为 79%、大豆蛋白与木糖质量比为 3:1, 温度为 55 °C, 反应时间为 0、2、4、6、8、10、

24、36 h 的条件下制备系列大豆蛋白-木糖复合物。不同反应时间对 SPI 及 SPI-木糖中大豆球蛋白抗原性的影响如图 1 所示。

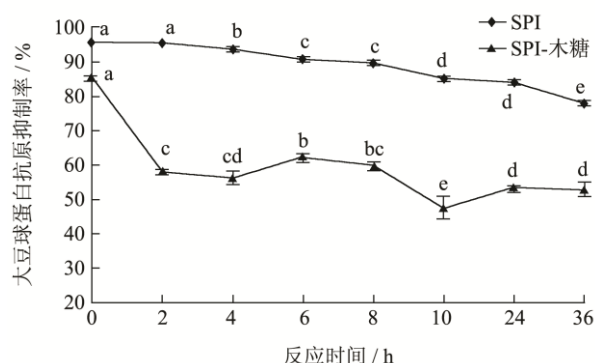


图 1 不同反应时间下糖基化复合物抗原性的变化

Fig.1 Antigenicity variation of glycosylated conjugates under different reaction times

注: 图中不同字母表示显著性差异 ($P < 0.05$), 有相同字母的表示差异不显著 ($P > 0.05$); 下同。

由图 1 可以看出, 随糖基化反应时间的增加, 糖基化复合物中大豆球蛋白的抗原抑制率整体上呈下降趋势, 即大豆分离蛋白-木糖糖基化复合物的抗原性降低。大豆分离蛋白的抗原抑制率变化不显著, 在反应 10 h 后, 抗原抑制率仅降低 10% 左右, 原因可能是一定程度加热使部分大豆蛋白发生聚合及交联, 原存在于分子表面的表位被破坏或掩盖 [11]。而糖基化产物中的大豆球蛋白的抗原抑制率从 85.52% 降低到 47.59%, 这可能是糖链的引入使蛋白质的结构发生改变, 从而对某些抗原表位有一定的掩盖作用; 但随后又出现略有升高的趋势, 这是因为在干热处理中, 大豆分离蛋白又不断暴露出新的抗原表位, 进一步增强了免疫活性。Van de [12] 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, 大豆蛋白-低聚果糖糖基化产物的抗原性降低了约 90% 左右, 抗原性降低较本研究大, 原因可能是两者制备糖基化复合物的条件不同, 其湿热糖基化温度为 95 °C, 本研究为干热糖基化, 温度为 55 °C。

2.2 反应时间对糖基化产物过敏原性的影响

在温度 55 °C、相对湿度 79%、蛋白与糖质量比为 3:1 条件下, 利用间接竞争 ELISA 法测定不同反应时间对 SPI、SPI-木糖中的大豆球蛋白过敏原性 (抑制率) 的影响, 结果如图 2 所示。

从图 2 中可以看出, 大豆分离蛋白的过敏原抑制率高于糖基化产物的过敏原抑制率, 且变化不显著, 随糖基化反应时间的增加, 糖基化复合物中大豆球蛋白的过敏原抑制率在整体上呈下降趋势, 这与抗原性

的变化趋势相似,只是过敏原抑制率变化的幅度较小,这表明糖基化过程中大豆球蛋白过敏原性的变化与抗原性的变化具有很好的相关性。在反应 36 h 后,糖基化产物中的大豆球蛋白的过敏原性抑制率从 46.32% 降低到 29.48%,但总体来看过敏原性的降低程度均没有抗原性的降低程度大,因此推断在糖基化过程中,糖链的引入对大豆蛋白与人血清 IgE 的结合位点以及过敏原表位的破坏程度较小,对大豆蛋白与兔血清 IgG 的结合位点以及抗原性表位的破坏程度较大^[7]。麻小娟^[13]研究了糖基化对卵白蛋白的构象及其过敏原性的影响,发现随反应时间延长糖基化卵白蛋白的 IgE 结合能力逐渐降低,呈现与本研究相似的变化趋势。

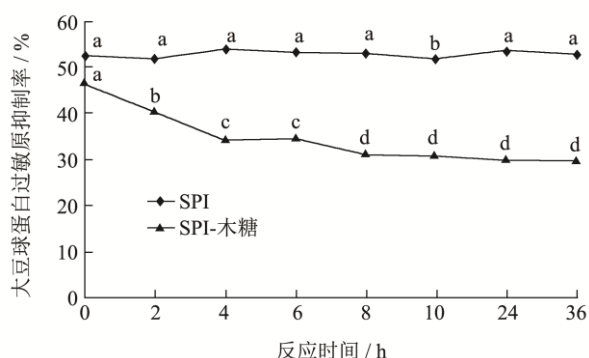


图 2 不同反应时间下糖基化复合物过敏原性的变化

Fig.2 Allergenicity variation of glycosylated conjugates under different reaction times

2.3 接枝度 (DG) 分析

以接枝度为指标,在大豆分离蛋白与木糖质量比为 3:1,反应温度 55 °C 下进行糖基化反应,不同反应时间对大豆分离蛋白-木糖复合物的接枝度的影响如图 3 所示。

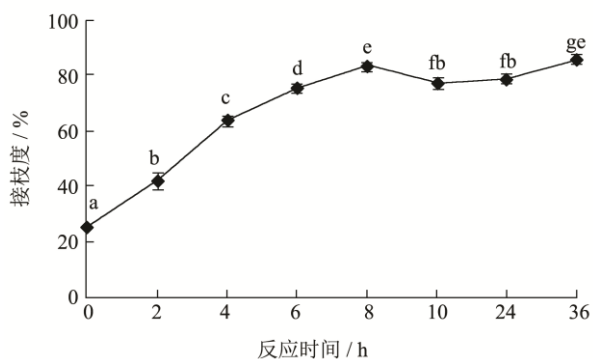


图 3 不同反应时间对大豆蛋白-木糖复合物接枝度变化的影响

Fig.3 Effect of different reaction times on graft reaction of SPI-xylose conjugates

接枝度主要是基于蛋白质分子中氨基酸侧链的自由氨基和糖分子还原末端的羰基之间的羰氨反应,可

反映出蛋白质与糖糖基化反应的程度。由图 3 可以看出,随着美拉德反应的不进行,蛋白质的游离氨基不断参与反应,大豆蛋白-木糖的接枝反应程度呈现逐渐上升的趋势,在反应的最初阶段,反应速度显著加快,反应 8 h 后,蛋白-糖接枝反应的接枝度增加变缓,这可能是因为随着反应时间增加,加热也将导致蛋白在与糖发生反应的同时,蛋白与蛋白之间也发生了不同程度的聚集,反应体系中分子物质组分显著增多,不利于糖基化反应的进行^[14]。

2.4 SDS-PAGE 电泳分析

在温度 55 °C,大豆分离蛋白与木糖质量比为 3:1,反应不同时间下大豆蛋白糖基化产物的 SDS-PAGE 电泳图谱如图 4 所示。

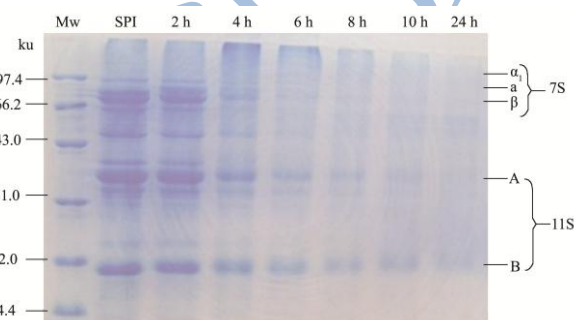


图 4 不同反应时间下糖基化复合物的 SDS-PAGE 图

Fig.4 SDS-PAGE image of glycosylated conjugates at different reaction times

MW: 低分子量标准蛋白; SPI: 大豆分离蛋白; 2-24h: 不同时间下大豆分离蛋白-木糖糖基化产物。

SDS-PAGE 电泳图可从蛋白质分子质量变化的角度证明美拉德反应的发生。由图 4 可知,大豆分离蛋白与木糖经美拉德反应后,随着反应时间的增加,7S、11S 的各亚基明显减弱,并且 7S、11S 的各亚基条带相对于 SPI 的亚基条带有一定上移,说明有大分子聚合物生成。大分子量物质的形成可能会掩盖蛋白过敏原上的某些 IgE 和 IgG 抗原结合表位,从而使糖基化产物抗原性及过敏原性降低。

2.5 紫外光谱扫描分析

SPI 及 SPI 与木糖质量比 3:1,反应温度 55 °C,不同反应时间下的 SPI-木糖复合物的紫外光谱扫描如图 5 所示。

目前,紫外光谱法已被用作研究蛋白质构象的一种常用方法。糖基化产物在紫外区 260~320 nm 范围内有吸收是美拉德反应高级阶段产物的性质,并且蛋白质本身也能够吸收一定波长的紫外光,主要是由于芳香族氨基酸中的色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)及苯丙氨

酸(Phe)残基对紫外光有一定的吸收^[10]。它们的特征吸收区分别在 275~290 nm、290~305 nm、250~265 nm 处。图 5 中对不同反应时间的糖基化产物及大豆分离蛋白的紫外扫描图谱进行了比较, 结果发现糖基化产物的紫外吸收光谱与大豆分离蛋白相比, 糖基化产物的最大吸收峰都向短波方向移动, 发生了蓝移, 原因是糖链的引入, 使蛋白质肽链展开, 暴露内部的氨基酸, 其中的助色团与糖链中的羰基产生共轭, 进而所在电子轨道能级有所提高, 电子跃迁所需能量变大, 引起吸收带蓝移^[15]。此外糖基化产物的紫外吸收强度均降低, 但是不同反应时间的糖基化产物之间的紫外光谱扫描曲线变化相近。这说明糖基化反应使已展开的大豆分离蛋白结构部分折叠、包裹, 同时紫外吸收强度的降低也有可能是芳香族氨基酸参与了糖基化交联反应。也就是糖链的引入导致蛋白分子空间结构发生改变。

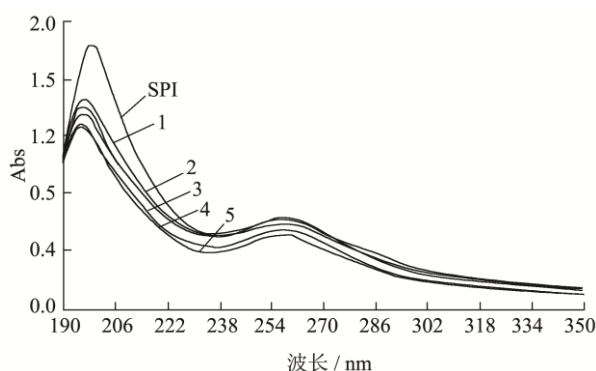


图 5 糖基化复合物的紫外光谱图

Fig.5 UV spectra of glycosylated conjugates

注: 1~5 分别为: 反应 2 h、4 h、6 h、8 h、24 h 的 SPI-木糖复合物。

2.6 傅里叶红外光谱分析 (FT-IR)

傅里叶红外光谱是目前常用的分析多肽和蛋白质结构的方法之一, 通过分析物质中存在的化学基团和二级结构含量, 从而灵敏地反映出蛋白质结构的变化。据报道, 红外区域的蛋白具有几个特征吸收带, 包括酰胺 I (1600 至 1700 cm^{-1})、酰胺 II (1530~1550 cm^{-1}) 和酰胺 III (1260~1330 cm^{-1})^[14]。图 5 为大豆分离蛋白及其糖基化产物的红外光谱图, 由图 6 可知, 糖基化产物在 3700~3200 cm^{-1} 范围内的峰宽与大豆分离蛋白相比均增大, 并在 1260~1000 cm^{-1} 、1500~1350 cm^{-1} 的吸收峰强度增加, 这说明糖基化反应能引起 C-H 的振动及 C-OH 振动的增加。根据这几组峰的变化可以进一步推断糖基化复合物中糖类物质的存在^[14]。此外, 能够反应蛋白质二级结构变化的是蛋白质的特征吸收光谱带酰胺 I 区。 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角、

无规卷曲产生伸缩振动的吸收峰分别为 1650~1660 cm^{-1} 、1610~1640 cm^{-1} 、1660~1700 cm^{-1} 、1640~1650 cm^{-1} ^[16]。根据 peakfit 软件分析可知, 其 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角及无规则卷曲四种结构含量如表 1 所示。

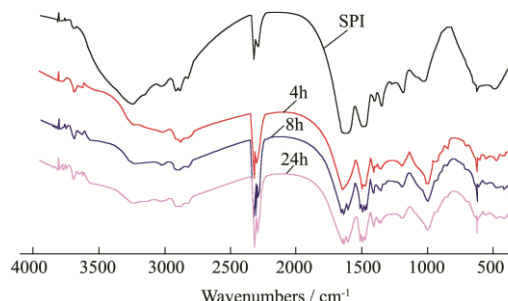


图 6 大豆分离蛋白-木糖复合物红外图谱的变化

Fig.6 Changes in FTIR spectra of SI and SPI-lactose conjugates

表 1 SPI-木糖糖基化产物中蛋白质的二级结构变化

Table 1 Changes in the secondary structure of glycosylated conjugates

样品	二级结构/%			
	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无序结构
SPI	12.70	37.52	37.03	12.75
SPI-木糖/0 h	11.56	44.76	31.17	12.89
SPI-木糖/2 h	12.06	44.26	30.71	12.97
SPI-木糖/4 h	12.13	43.20	31.77	12.90
SPI-木糖/6 h	12.20	43.51	31.34	12.95
SPI-木糖/8 h	12.29	42.48	32.33	12.91
SPI-木糖/10 h	12.15	44.01	30.87	12.98
SPI-木糖/24 h	12.22	43.15	31.69	12.94
SPI-木糖/36 h	11.90	47.21	27.73	13.16

从表 1 可以看出, 样品中蛋白的二级结构主要以 β -折叠和 β -转角为主, 并且, 糖基化改性后主要改变了 β -折叠和 β -转角。大豆分离蛋白经糖基化改性后, 与原大豆分离蛋白相比, 二级结构呈现 α -螺旋和 β -转角的含量减少, β -折叠含量和无规则卷曲显著增加的趋势, 说明糖基化制备的 SPI-木糖复合物在干热处理中的二级结构发生了变化, 由有序变为无序。分析其可能的原因有: 一方面, 糖基化能够促使大豆蛋白和糖分子间形成氢键; 另一方面, 糖链的引入使 SPI 分子原有的刚性结构消失, 肽链伸展, 分子之间的空间位阻增加, 分子扩散开来, 蛋白质颗粒出现一定程度的聚结, 导致蛋白质的结构发生改变^[14]。有相关报道研究了卵白蛋白的糖基化, 同样发现引入糖链后主要改变了 β -折叠和 β -转角结构, 并推测出糖基化后卵白蛋白 β -折叠和 β -转角的变化是导致其过敏原性和抗原性改变的主要原因^[10]。

3 小结

大豆球蛋白是大豆蛋白中除 β -伴大豆球蛋白以外的又一重要过敏原蛋白,关于糖基化方法降低大豆球蛋白抗原性及过敏原性的研究报道较少。本研究选择木糖对大豆蛋白进行糖基化改性,发现糖基化反应可有效降低大豆球蛋白的抗原性及过敏原性,其中抗原性降低的程度大于过敏原性;TNBS法测定接枝度的变化证明了糖基化反应的发生,随着反应时间延长,接入的糖越多,糖基化反应程度越高;紫外及红外光谱结果表明:糖链的引入使蛋白质分子的二级结构和空间结构发生了改变,进而影响蛋白的过敏原表位和抗原结合表位,改变大豆蛋白的抗原性和过敏原性。此外,关于糖基化降低抗原性和过敏原性的机制以及两者之间的关系还需进一步探讨。

参考文献

- [1] Zheng S G, Qin G X, Tian H, et al. Role of soybean β -conglycinin subunits as potential dietary allergens in piglets [J]. The Veterinary Journal, 2014, 199 (3) : 434-438
- [2] Rouquié Capt A, Eby W H, et al. Investigation of endogenous soybean food allergens by using a 2-dimensional gel electrophoresis approach [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2010, 58(3): S47-S53
- [3] Corzo-Martinez M, Soria A C, Belloque J, et al. Effect of glycation on the gastrointestinal digestibility and immunoreactivity of bovine β -lactoglobulin [J]. International Dairy Journal, 2010, 20(11): 742-752
- [4] 齐晓彦,李春,张微,等.黑木耳多糖-乳清蛋白复合物的制备及其抗原性的研究[J].食品工业科技,2012,33(19):232-235
QI Xiao-yan, LI Chun, ZHANG Wei, et al. Study on preparation and antigenicity activity of glycosylation products derived from whey protein and auricularia auricula polysaccharide [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(19): 232-235
- [5] 阮韦伟.糖基化修饰改性对拟穴青蟹过敏原性质的影响[D].福建:集美大学,2012
RUAN Wei-wei. Effects of glycosyl modification on the allergens form mud crab (*Scylla paramamosain*) [D]. Fu Jian: Ji Mei University, 2012
- [6] 李铮,冯力更,郑喆,等.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] Jing S, Luo Y K, Yang X, et al. Effects of fermentation by *Lactobacillus casei* on the antigenicity and allergenicity of four bovine milk proteins [J]. International Dairy Journal, 2014, 35: 75-80
- [8] Nissen J N. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1979, 27(6): 1256-1263
- [9] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227 (5259): 680-685
- [10] 许彩虹.大豆球蛋白糖基化接枝改性及其热聚集行为研究[D].广东:华南理工大学,2010
XU Cai-hong. Research on the glycosylation and thermal aggregation of soybean globulin-polysaccharide [D]. Guang Dong: South China University of Technology, 2010
- [11] 史晓霞,马美湖,王丽英,等.热处理对蛋清卵类粘蛋白过敏原性及构象的影响[J].光谱学与光谱分析, 2012, 32(9): 2487-2491
SHI Xiao-xia, MA Mei-hu, WANG Li-ying, et al. Effects of heating on allergenicity and conformation of chicken ovomucoid [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2012, 32(9): 2487-2491
- [12] Van de Lagemaat J, Manuel Silván J, Javier Moreno F, et al. In vitro glycation and antigenicity of soy proteins [J]. Food Research International, 2007, 40(1): 153-160
- [13] 麻小娟.糖基化对卵白蛋白的构象及其抗原性和过敏原性的影响[D].江西:南昌大学,2010
Ma Xiao-juan. Effect of glycation on conformation, antigenicity and allergenicity of egg ovalbumin [D]. Jiang Xi: Nanchang University, 2010
- [14] 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
- [15] 布冠好,朱婷伟,陈复生.大豆蛋白-葡萄糖复合物的抗原性及结构特性研究[J].现代食品科技,2014,30(11):28-33
BU Guan-hao, ZHU Ting-wei, CHEN Fu-sheng. Antigenicity and structural properties of soybean protein-glucose conjugates[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(11): 28-33
- [16] Ulrichs T, Drotleff A M., Ternes W, et al. Determination of heat-induced changes in the protein secondary structure of reconstituted livetins (water-soluble proteins from hen's egg yolk) by FTIR [J]. Food Chemistry, 2015, 172: 909-920

现代食品科技