

可降解大豆过敏原蛋白酶的纯化与酶学性质

付 欧^{1,4,5}, 张 娟^{1,5}, 堵国成^{2,5}, 陈 坚^{*3,5}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 4. 江南大学 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡 214122; 5. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 将前期筛选获得的芽孢杆菌 *Bacillus* sp. BBE201108 发酵培养后, 以其发酵上清液作为蛋白酶的粗酶液, 经硫酸铵分级沉淀、透析除盐、Q FF 阴离子交换层析和 Superdex 75 凝胶过滤层析, 蛋白酶的比酶活达到 2 575.45 U/mg, 纯化倍数为 10.55, 回收率为 6.48%, 经 SDS-PAGE 电泳显示为单一条带, 该蛋白酶的表观相对分子质量约为 46 000。该酶与大豆分离蛋白在 pH 8.0, 50 °C 下反应 30 min, 可有效降解 β -伴大豆球蛋白的 α 亚基和 α' 亚基。在 pH 7.0~9.0 以及 30~40 °C 下的稳定较好; Ca^{2+} 存在的情况下, 酶活提高了 5% 左右, 而 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 在不同程度上对该蛋白酶有抑制作用; 苯甲基磺酰氟 (PMSF) 对该蛋白酶的抑制作用较为显著。酶学性质分析表明, 该蛋白酶的 K_m 为 4.19 g/L, $V_{\max}$ 为 4.04 g/(L·s), K_{cat} 为 107.73 s⁻¹, K_{cat}/K_m 为 25.71 L/(g·s)。

关键词: 大豆过敏原; 芽孢杆菌; 蛋白酶; 分离纯化; 酶学性质

中图分类号: O 814.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)04—0350—07

Purification and Enzyme Characterization of Protease with Anti-Allergic Activity of Soy Sauce

FU Ou^{1,4,5}, ZHANG Juan^{1,5}, DU Guocheng^{2,5}, CHEN Jian^{*3,5}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 5. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The protease isolated from *Bacillus* sp. BBE201108 was purified using ammonium sulfate fractional precipitation, dialysis, Q FF anion exchange chromatography and Superdex 75 gel filtration chromatograph after fermentation. A purified protease with a recovery of 6.48% had an overall purification of 10.55 fold and a specific enzyme activity of 2 575.45 U/mg. The molecular weight was approximately 46 000 as determined by SDS-PAGE. The α -subunit and α' -subunit of β -conglycinin could be effectively degraded after reaction with the soybean protein isolate (SPI) at

收稿日期: 2014-12-08

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAK10B03); 国家自然科学基金项目(31470160); 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT1135)。

* 通信作者: 陈 坚(1962—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵过程优化与控制、酶技术、食品生物技术研究。E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

pH 8.0 under 50 °C for 30 min. The protease was relatively stable over the pH range of 7.0-9.0 at 30~40 °C. The protease activity enhanced by 5% in the presence of Ca^{2+} , and inhibited by Mn^{2+} , Fe^{2+} and Cu^{2+} . A significant negative effect of phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) was observed on the protease activity. The values of K_m , V_{max} , K_{cat} and K_{cat}/K_m for the protease were 4.19 g/L, 4.04 g/(L·s), 107.73 s^{-1} and 25.71 L/(g·s), respectively.

Keywords: soybean allergen, *Bacillus* sp. BBE201108, protease, purification, protease properties

大豆具有丰富的必需氨基酸组分,是人和畜禽的优质植物性蛋白源,具有很高的营养价值,此外,大豆蛋白还具有优越的加工性能如乳化性和起泡性等^[1],以及良好的生理功能,能降低胆固醇、减少患心脏疾病的危险等^[2-4]。随着大豆蛋白分离技术的改进,大豆蛋白作为营养性和功能性成分得到了广泛的应用,以大豆蛋白为基础的加工食品是目前食品工业中增长最快的一类^[5]。但是,大豆蛋白也是主要致敏原之一,全球有近 0.3%-0.4% 的人口对大豆过敏^[6]。研究发现,约有 0.3%-0.4% 的婴幼儿会对大豆蛋白过敏,而且随着大豆蛋白制品被广泛使用,成人对大豆蛋白过敏的发病率也在不断地攀升^[7]。大豆过敏症状表现出多种不同形式,常见的包括湿疹、过敏性皮炎和哮喘等^[8-9]。此外,大豆蛋白作为动物饲料的主要蛋白源,其致敏成分会损伤动物肠道,不利于动物的生长^[10-12]。

大豆蛋白分为 15S 球蛋白、11S 球蛋白、7S 球蛋白和 2S 球蛋白,其中 11S 球蛋白和 7S 球蛋白约占大豆蛋白总质量的 70%^[13]。 β -伴大豆球蛋白是 7S 组分的主要成分,由 α' (76×10^3), α (72×10^3) 和 β (53×10^3) 亚基组成的相对分子质量为 1.50×10^5 的三聚体化合物,约占大豆蛋白总质量的 20%~30%^[14]。Ogawa 等按照致敏能力和蛋白含量,把 Gly m Bd 60K、Gly m Bd 30K 和 Gly m Bd 28K 作为主要大豆致敏原^[15]。Gly m Bd 60K 即 β -伴大豆球蛋白的 α 亚基,是一种糖蛋白,可被 25% 左右的大豆敏感患者的血清识别^[16]。Krishnan 等发现 Gly m Bd 60K、 α' 亚基和 β 亚基都是能引发大豆过敏反应的潜在致敏原。引起过敏反应的过敏原阈值水平通常很低,很少量的致敏原就足以引发过敏反应^[17-20]。

目前,国内外已经开展了部分关于消除 Gly m Bd 60K 或 β -伴大豆球蛋白的研究。Tsumura 等发现 Proleather FG-F 碱性蛋白酶能够降解致敏蛋白 β -伴球蛋白 α 亚基、Gly m Bd 30K 及 Gly m Bd

28K^[21]。贾振宝选择外源蛋白酶(木瓜蛋白酶、Alcalase、Nutrase 和 AS1.398)对大豆蛋白进行水解处理,以完全降解 7S 球蛋白^[22]。由于当前所尝试的商品酶在对大豆蛋白进行脱敏时,不能专一性地识别过敏原,因此会在脱敏的同时降解大豆非过敏原成分的其他蛋白,而大豆蛋白往往因在该过程中被降解得过于彻底而破坏其加工性能。目前,尚未寻找到专一性的酶对 β -伴大豆球蛋白 α 亚基和 α' 亚基进行有效降解,也缺乏对大豆蛋白有特异性脱敏效果的酶的进一步探索。

在前期研究中,作者通过筛选获得了一株可有效降解大豆蛋白过敏原的野生菌 *Bacillus* sp. BBE201108。该野生菌发酵上清液与大豆分离蛋白在 50 °C 下反应 10 min,可特异性降解 β -伴大豆球蛋白 α 亚基,当反应时间延长至 2 h 时, β -伴大豆球蛋白 α' 亚基也被完全降解^[23]。在上述研究的基础上,对该菌株所产的蛋白酶进行了分离纯化,并对其酶学性质进行了分析,从而为深入认识该蛋白酶的特性,并进一步将其应用于特异性高效降解大豆过敏原的工业化生产奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 酪蛋白和福林酚购自上海生工生物工程公司;Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒和蛋白质分子量标准均购自碧云天生物技术有限公司;酵母粉和蛋白胨购自 Oxoid 公司;其他试剂均为国产分析纯。PXX-DHS-40X50-S 恒温培养箱购自上海跃进医疗器械厂;5804R 台式高速冷冻离心机购自 Eppendorf 公司;蛋白电泳仪和 GelDoc 凝胶成像仪购自 Bio-Rad 公司;AKTA pure 层析系统、Q FF 1mL 和 Superdex G 75 均购自 GE Health 公司。

1.1.2 菌株 芽孢杆菌 *Bacillus* sp. BBE201108 为

实验室保存。

1.2 培养基及培养条件 种子培养基和发酵培养基及其培养条件:参考朱婷等的文献操作^[23]。

1.3 制备大豆分离蛋白

大豆分离蛋白(SPI)参考 Pandjaitan 的方法进行制备并稍加改动^[24]。将 100 g 大豆粉碎成粉,加入 500 mL 正己烷充分搅拌混匀提取 1 h,于 4℃,10 000 r/min 离心 10 min 后去除上清液,在通风橱中挥发完全去除多余正己烷,得到脱脂豆粉。按照 1:10 的比例向脱脂豆粉中加入去离子水,充分震荡搅拌提取 2 h,于 4℃,10 000 r/min 离心 10 min 后取上清,用 HCl 将上清液调至 pH 4.5,静置 1 h,于 4℃,10 000 r/min 离心 10 min 后去除上清,用少量的去离子水溶解沉淀,再用 NaOH 溶液将其调至 pH 7.0,静置 1 h,冷冻干燥后得到大豆分离蛋白(SPI)以备用。

1.4 酶解大豆分离蛋白

从菌株 *Bacillus* sp. BBE201108 中分离得到的酶与大豆分离蛋白溶液进行反应 30 min,反应条件为 pH 8.0,50℃。通过 SDS-PAGE 判断其是否能够降解大豆分离蛋白过敏原的 β -伴大豆球蛋白的 α 亚基(Gly m Bd 60K)和 α' 亚基。

1.5 酶活测定

以 2 g/dL 酪蛋白溶液为底物,利用福林酚法^[25]测定蛋白酶的活力。酶活力定义为:1 mL 酶液在 pH 8.0,50℃下,每分钟水解酪蛋白产生 1 μ g 酪氨酸的酶量为一个酶活力单位,U/mL。利用酪氨酸绘制标准曲线。

1.6 蛋白浓度测定

按照 Bradford 法对蛋白浓度进行测定^[26],以牛血清白蛋白(BSA)为标准品绘制标准曲线。

1.7 蛋白酶的分离纯化

所有的纯化步骤都在 4℃下进行。

1.7.1 粗酶液的制备 发酵液于 4℃,10 000 r/min 离心 10 min 后得到发酵上清液,即为粗酶液。

1.7.2 硫酸铵分级沉淀 向粗酶液中一边搅拌一边缓慢加入硫酸铵粉末饱和度达到 50%,静置 2 h 后,于 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,继续向上清液中加入硫酸铵粉末至饱和度为 80%,静置 2 h 后,于 10 000 r/min 离心 10 min,取沉淀。将沉淀溶解于 50 mmol/L,pH 9.0 的 Tris-HCl 溶液中,然后透析除盐,得到初步纯化的酶液。

1.7.3 阴离子交换层析 将上述得到的酶液上 Q FF 柱进行阴离子交换层析。用 0~1 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 溶液(50 mmol/L,pH 9.0),以 1 mL/min 的流速进行洗脱,紫外检测器检测波长 280 nm 的吸收值,收集洗脱阶段的酶活组分并测定其蛋白浓度,得到中度纯化的酶液。

1.7.4 凝胶过滤层析 将阴离子交换层析所得的酶液经浓缩后,上样到 Superdex 75 10/300 GL 凝胶柱(已用 25 mmol/L,pH 8.0 的磷酸钠缓冲液平衡),用平衡液以 0.8 mL/min 的流速进行洗脱,紫外检测器检测波长 280 nm 的吸收值,收集洗脱阶段的酶活组分并测定其蛋白浓度,得到最终纯化的纯酶。

1.8 纯化得到的蛋白酶酶学性质分析

1.8.1 酶的最适反应 pH 和温度 纯化后的蛋白酶分别在 pH 6.0~10.0 不同缓冲液体系下于 50℃测定酶活,最高酶活者设为 100%。实验所用缓冲液:pH 6.0~8.0,磷酸钠缓冲液;pH 9.0~10.0,Gly-NaOH 缓冲液。在最适反应 pH 的条件下,于 30~70℃不同温度下测定蛋白酶酶活,酶活力最高者设为 100%。

1.8.2 酶的 pH 和温度稳定性 将纯酶液置于 25 mmol/L,pH 6.0~10.0 不同缓冲液中,于 25℃下保温 0~60 min,每 10 min 取样,在最适反应温度和 pH 下测定其剩余酶活力。未保温直接测定酶液,所测得的酶活设为 100%。实验所用缓冲液:pH 6.0~8.0,磷酸钠缓冲液;pH 9.0~10.0,Gly-NaOH 缓冲液。将纯酶液置于 pH 8.0(25 mmol/L,磷酸钠缓冲液)分别于 30,4℃,50,60℃下保温 0~60 min,每隔 10 min 取样,在最适反应温度和 pH 下测定其剩余酶活。未保温直接测定酶液,所测得的酶活设为 100%。

1.8.3 金属离子对酶活力的影响 分别向酶液中添加 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 、 K^{+} 和 Li^{+} ,终浓度达到 0,1,5,10 mmol/L,于 pH 8.0,25℃下保温 60 min,测定其剩余酶活。未添加任何金属离子样品的酶活为 100%。

1.8.4 酶抑制剂对酶活力的影响 分别向酶液中添加苯甲基磺酰氟(PMSF)、EDTA、碘乙酰胺(Iodoacetamide)和二硫代二硝基苯甲酸(DNTB),达到 0,1,5,10 mmol/L,于 pH 8.0,25℃下保温 60 min,测定其剩余酶活。未添加任何酶抑制剂样品的酶活为 100%。

1.8.5 酶动力学参数测定 纯化后的酶液在最适反应温度和 pH 条件下,以不同浓度的酪蛋白溶液

为底物,测定产物酪氨酸的产量,计算相应的反应速度,用双倒数作图法(Lineweaver-Burk 法)作图,求得 K_m 和 V_{max} 。再根据酶浓度计算 K_{cat} 值,算出 K_{cat}/K_m 值。

2 结 果

2.1 蛋白酶的分离纯化

蛋白酶在硫酸铵饱和度 50%~80%下沉淀,充分透析除盐后,蛋白酶有较高的比酶活 569.27 U/mg,发酵上清液的比酶活 244.20 U/mg,在硫酸铵饱和度 50%~80%时有较好的浓缩效果。上述得到的酶液经 Q FF 阴离子交换层析,在 0.1~0.3 mol/L NaCl 处的洗脱峰检测到蛋白酶酶活,而在其他的洗脱峰中未检测到蛋白酶酶活(图 1)。经过超滤离心管浓缩后,再经 Superdex 75 10/300 GL 凝胶过滤层析,蛋白酶被进一步纯化洗脱下来(图 2)。经一系列的纯化后,该蛋白酶的纯化倍数为 10.55 倍,回收率为 6.48%,分离纯化结果见表 1。

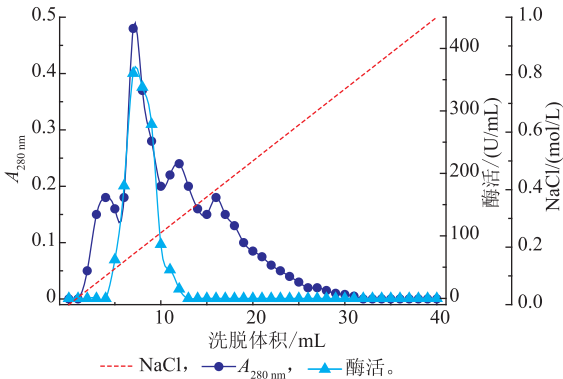


图 1 蛋白酶 Q FF 层析纯化图谱

Fig. 1 Purification of protease by Q FF column chromatography

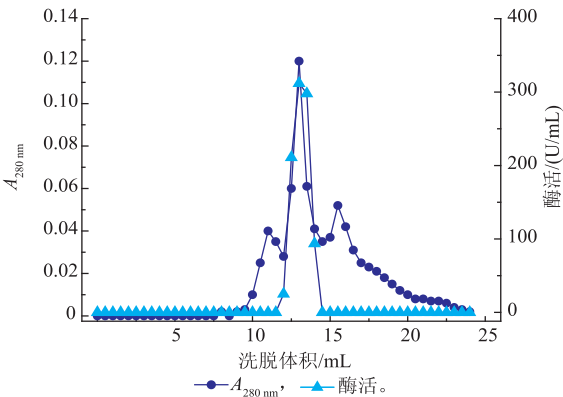


图 2 蛋白酶 Superdex 75 层析纯化图谱

Fig. 2 Purification of protease by Superdex 75 column chromatography

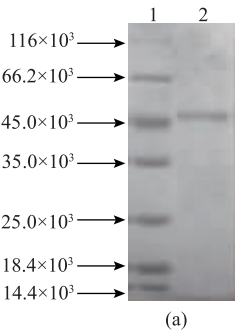
表 1 蛋白酶的纯化

Table 1 Purification of protease

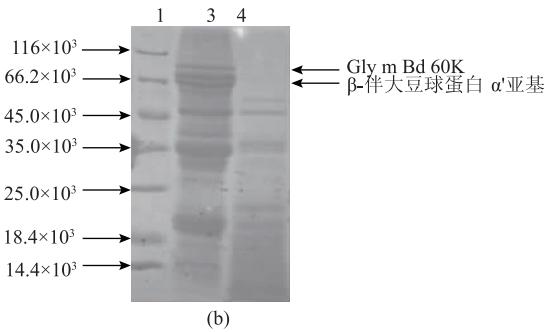
样品	总蛋白 质/mg	总酶活 力/U	比酶活 力/ (U/mg)	纯化 倍数	回收率/ %
发酵上清液	526.78	128 640.20	244.20	1.00	100.00
硫酸铵沉淀	72.15	41 074.75	569.27	2.33	31.93
Q FF 阴离子 交换层析	7.57	16 412.30	2 035.56	8.34	11.98
Superdex 75 凝胶过滤层析	3.24	8 332.38	2 575.45	10.55	6.48

2.2 SDS-PAGE 验证

利用 SDS-PAGE 检验最终纯化所得蛋白纯度,图 3(a)显示,该样品得到单一条带,说明该酶纯化达到电泳纯。结合凝胶过滤层析图谱以及 SDS-PAGE 结果分析,推测该蛋白酶的相对分子质量大小约为 4.6×10^4 。将得到的纯酶与大豆分离蛋白(SPI)反应后,利用 SDS-PAGE 检验其降解大豆过敏原的能力,如图 3(b)所示,所获得的纯酶能够水解大豆过敏原的 β -伴大豆球蛋白 α' 亚基(Gly m Bd 60K)和 α' 亚基。



(a)



(b)

Lane 1: Molecular weight marker; Lane 2: Purified protease; Lane 3: SPI; Lane 4: desensitized SPI

图 3 纯化后的蛋白酶及其与大豆分离蛋白的反应液的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 3 SDS-PAGE of protease and desensitized SPI

2.3 酶学性质

2.3.1 酶的最适反应 pH 和温度 酶的最适反应 pH 实验结果见图 4(a), 该蛋白酶在 pH 8.0 的缓冲体系下测定得到的酶活明显高于 pH 6.0 和 pH 10.0, 略高于 pH 7.0 和 pH 10.0, 说明该酶的最适反应 pH 值为 8.0。酶的最适反应温度结果如图 4(b) 所示, 该蛋白酶在 50 °C 下测得酶活显著高于在 30, 40, 60, 70 °C 下的酶活, 表明该蛋白酶的最适反应温度为 50 °C。

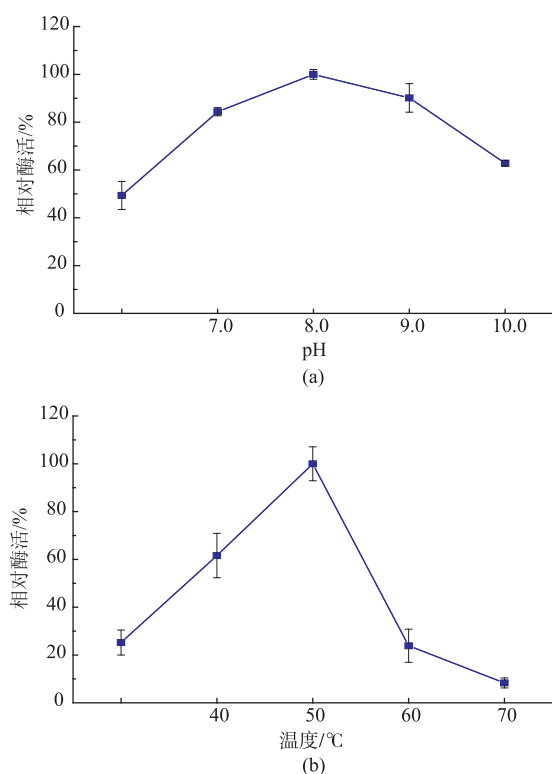


图 4 蛋白酶的最适反应 pH 值和温度

Fig. 4 Effects of pH and temperature on protease activity

2.3.2 pH 和温度的稳定性 pH 稳定性研究显示 (图 5(a)), 该纯酶在 pH 7.0~9.0 的范围内于 25 °C 保温 60 min 后, 仍能维持 80% 以上的酶活力。温度稳定性实验结果 (图 5(b)) 显示, 该纯酶于 30~40 °C 保温 60 min, 稳定性较好, 酶活力仍能够维持 80% 以上; 于 50 °C 保温 10 min 后, 剩余酶活力为 77%, 保温 60 min 后降至 8%; 在 60 °C 保温 40 min 后, 酶活力完全丧失。

2.3.3 金属离子对酶活力的影响 不同金属离子对酶活力的影响如图 6 所示。Ca²⁺ 对酶活力有着一定的激活作用, Ca²⁺ 浓度在 1, 5, 10 mmol/L 时, 酶活力分别升高到 105.32%, 104.66% 和 104.66%。Mg²⁺、

Zn²⁺、K⁺ 和 Li⁺ 对酶活力的影响不大, 而研究中所选择的其它试剂对酶活力均有不同程度的抑制作用。其中 Mn²⁺ 和 Fe²⁺ 以及高浓度 (10 mmol/L) 的 Cu²⁺ 对酶活的抑制作用最为显著。随着 Fe²⁺、Mn²⁺ 和 Cu²⁺ 浓度的升高, 酶活力均呈现显著的下降趋势。当 Fe²⁺ 浓度增至 5 mmol/L, Mn²⁺ 和 Cu²⁺ 浓度增至 10 mmol/L 时, 剩余酶活力均不足初始酶活的 50%。

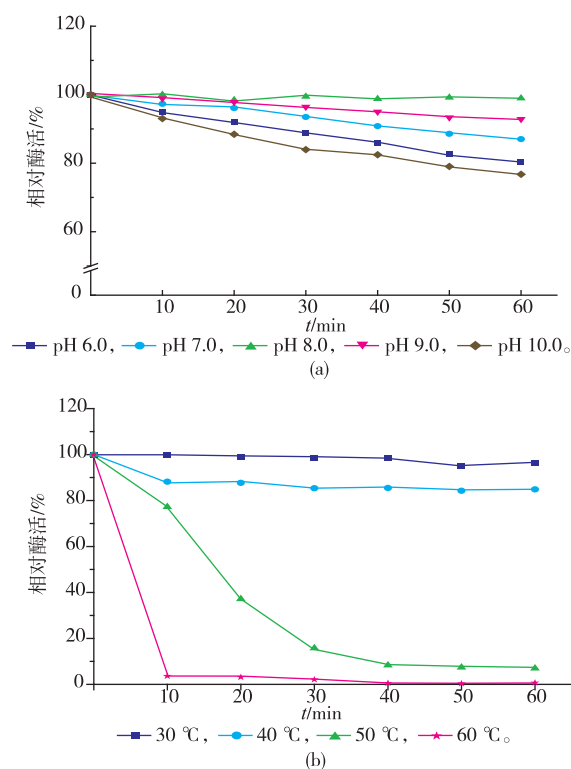


图 5 蛋白酶的 pH 和温度稳定性

Fig. 5 Effects of pH and temperature on protease activity stability

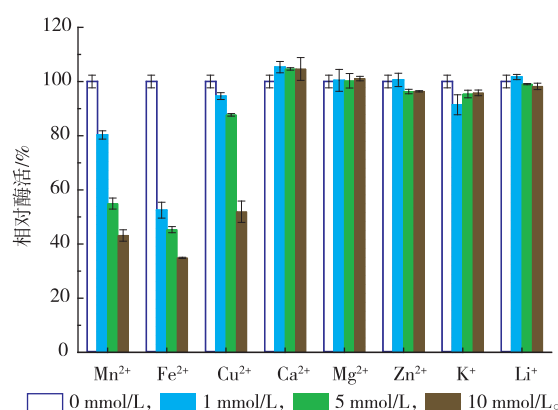


图 6 金属离子对蛋白酶活力的影响

Fig. 6 Effects of various metal ions on the protease activity

2.3.4 酶抑制剂对酶活力的影响 PMSF 可抑制丝氨酸蛋白酶和巯基蛋白酶;DNTB 抑制巯基蛋白酶;EDTA 抑制以金属离子为活性中心的酶。由图 7 可知,PMSF 对该纯酶的抑制作用最为明显,在 1,5,10 mmol/L 的浓度下,酶活力为初始酶活的 18.68%、16.46%和 13.02%,EDTA 对该酶的抑制作用也较明显。据此推测该酶为丝氨酸金属蛋白酶。

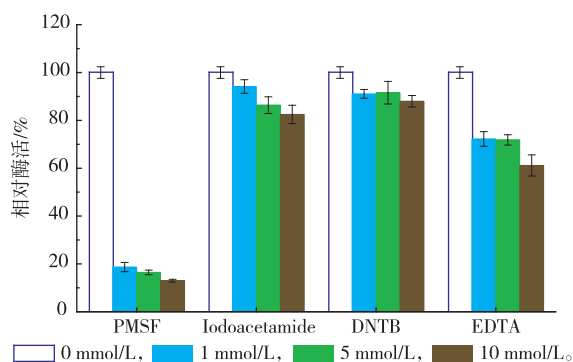


图 7 酶抑制剂对蛋白酶活力的影响

Fig. 7 Effects of inhibitors on the protease activity

2.3.5 酶动力学参数的测定 测定不同[S]所对应的 v ,以 $1/v$ 对 $1/[S]$ 绘制得到双倒数曲线如图 8 所示,经米氏方程计算得到 K_m 为 4.19 g/L, V_{max} 为 4.04 g/(L·s),再换算出 K_{cat} 为 107.73 s⁻¹, K_{cat}/K_m 为 25.71 L/(g·s)。

3 结 语

将 *Bacillus* sp. BBE201108 发酵液中的蛋白酶,经过硫酸铵分级沉淀、Q FF 阴离子交换层析和 Superdex 75 凝胶过滤层析这 3 个阶段的纯化,最终

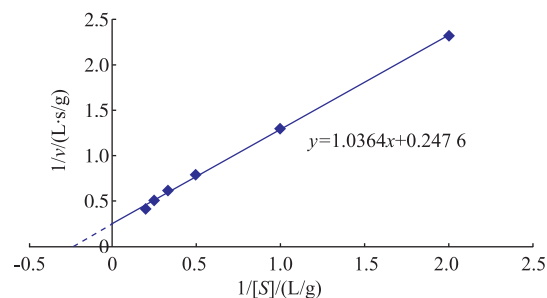


图 8 该蛋白酶的 Lineweaver-Burk 关系

Fig. 8 Lineweaver-Burk plot of protease kinetics

纯化倍数达到 10.55 倍,比酶活达到 2 474.45 U/mg。纯化得到的蛋白酶,SDS-PAGE 电泳显示,其相对相对分子质量约 4.6×10^4 ,并且能够有效降解大豆蛋白过敏原 β -伴大豆球蛋白的 α 亚基和 α' 亚基。这一系列的纯化方法达到了较好的纯化结果。

将纯化后的蛋白酶进行酶学性质分析,发现该蛋白酶在 pH 7.0~9.0 以及 30~40 °C 下的稳定较好;有 Ca²⁺存在的情况下,酶活提高了 5%左右。PMSF 对该蛋白酶有着显著地抑制作用而 DNTB 对该蛋白酶几乎没有影响,在 Ca²⁺存在的情况下,酶活有所提高,推测该酶为丝氨酸金属蛋白酶,可被 Ca²⁺激活;该蛋白酶的 $K_m=4.19$ g/L, $V_{max}=4.04$ g/(L·s), K_{cat} 为 107.73 s⁻¹, K_{cat}/K_m 为 25.71 L/(g·s)。上述研究表明,该蛋白酶适用于非发酵大豆制品的处理及加工工艺。通过对其性质的进一步研究,将为在保持大豆蛋白营养价值的基础上完善大豆蛋白脱敏工艺,开发可安全摄入的大豆全系列产品开辟新的有效途径。

参考文献:

- [1] Liu K. Expanding soybean food utilization[J]. *Food Technology*, 2000, 54(7):46.
- [2] Anderson J W, Johnstone B M, Cook-Newell M E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids [J]. *New England Journal of Medicine*, 1995, 333(5):276.
- [3] Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, et al. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (yellow KK)[J]. *Nutrition*, 2000, 16(5):349.
- [4] Friedman M, Brandon D L. Nutritional and health benefits of soy proteins [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49(3):1069.
- [5] Tsumura K, Saito T, Tsuge K, et al. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis [J]. *Lwt-food Science and Technology*, 2005, 38(3):255.
- [6] Becker W, Brasseur D, Bresson J, et al. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes (Request nr EFSA-Q-2003-016)[J]. *EFSA Journal*, 2004, 321.

- [7] Savage J H, Kaeding A J, Matsui E C, et al. The natural history of soy allergy[J]. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2010, 125(3):683.
- [8] Sampson H A. Food anaphylaxis[J]. **British Medical Bulletin**, 2000, 56(4):925.
- [9] Sampson H A. Update on food allergy[J]. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2004, 113(5):805.
- [10] Johnston C. Effect of injecting lambs with soyflour extract on serum soy protein antibody concentration and rate of gain[J]. **Small Ruminant Research**, 1996, 21(2):149.
- [11] Sun P, Li D, Li Z, et al. Effects of glycinin on IgE-mediated increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine[J]. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2008, 19(9):627.
- [12] Lallè s J, Dreau D, Salmon H, et al. Identification of soyabean allergens and immune mechanisms of dietary sensitivities in preruminant calves[J]. **Research in Veterinary Science**, 1996, 60(2):111.
- [13] 李玥, 钟芳, 麻建国. 大豆蛋白组分 7S 和 11S 的凝胶特性[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(6):19.
LI Yue, ZHONG Fang, MA Jianguo. Gelation properties of 7S and 11S of soybean protein [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(6):19. (in Chinese)
- [14] Thanh V H, Shibasaki K. Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1977, 490(2):370.
- [15] Ogawa T, Tsuji H, Bando N, et al. Identification of the soybean allergenic protein, Gly m Bd 30K, with the soybean seed 34-kDa oil-body-associated protein[J]. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 1993, 57(6):1030.
- [16] Ogawa T, Samoto M, Takahashi K. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products [J]. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, 2000, 46(6):271.
- [17] Krishnan H B, Kim W S, Jang S, et al. All three subunits of soybean β -conglycinin are potential food allergens [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009, 57(3):938.
- [18] Bindslev-Jensen C, Briggs D, Osterballe M. Can we determine a threshold level for allergenic foods by statistical analysis of published data in the literature?[J]. **Allergy**, 2002, 57(8):741.
- [19] Fiocchi A, Travaini M, D'Auria E, et al. Tolerance to a rice hydrolysate formula in children allergic to cow's milk and soy[J]. **Clinical and Experimental Allergy**, 2003, 33(11):1576.
- [20] L'Hocine L, Boye JI, Munyana C. Detection and quantification of soy allergens in food: study of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays[J]. **Journal of Food Science**, 2007, 72(3):C145.
- [21] Tsumura K, Kugimiya W, Bando N, et al. Preparation of hypoallergenic soybean protein with processing functionality by selective enzymatic hydrolysis[J]. **Food Science and Technology Research**, 1999, 5(2):171.
- [22] 贾振宝. 利用外源蛋白酶失活大豆中抗原蛋白的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2002.
- [23] 朱婷, 张娟, 陈坚, 等. 降解 β -伴大豆球蛋白菌株的筛选及其发酵条件优化[J]. 食品科技, 2013, 38(5):2.
ZHU Ting, ZHANG Juan, CHEN Jian, et al. Screening of strains for degradation of soybean β -conglycinin and fermentation optimization[J]. **Food Science and Technology**, 2011, 38(5):2. (in Chinese)
- [24] Pandjaitan N, Hettiarachchy N, Ju Z, et al. Evaluation of genistin and genistein contents in soybean varieties and soy protein concentrate prepared with 3 basic methods[J]. **Journal of Food Science**, 2000, 65(3):399.
- [25] 姜锡瑞. 酶制剂应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.