

糖基化大豆分离蛋白制备工艺优化及其性质的影响

赖 颖,李青芝,钟 可

(周口师范学院 生命科学与农学院,河南 周口 466001)

摘 要:以大豆分离蛋白为试验材料,优化糖基化大豆分离蛋白制备工艺并研究经过葡萄糖处理对大豆分离蛋白溶解度、凝胶强度、乳化性以及热稳定方面的影响。结果表明:糖基化大豆分离蛋白最佳制备工艺为反应温度 69.49℃、反应时间 46.64 min、糖的添加量 10.64%,凝胶强度最高为 76.03;在相同 pH 下,经葡萄糖处理后的大豆分离蛋白溶解度较大,沉淀较少,而未糖基化的大豆分离蛋白沉淀量增加。糖基化处理的大豆分离蛋白乳化稳定性(emulsifying stability,ES)和热稳定性均有所增强。糖基化改性过程可显著提高大豆分离蛋白的溶解性和乳化性能,这为拓宽其在食品工业中的应用提供了理论基础。

关键词:大豆分离蛋白;糖基化;功能特征

中图分类号:TS214.2;S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.03.0452

Optimization of Glycosylation of Soy Protein Isolate Preparation Process and Its Effect on the Properties

LAI Ying, LI Qing-zhi, ZHONG Ke

(College of Life Science and Agriculture, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

Abstract: Using the soy isolated protein as experimental materials, this paper mainly studied the glycosylation modification conditions optimized by central composite design and the effects on solubility, gelation, emulsification and heat stability of isolated soybean proteins after glucose treatment. The results showed the optimum reaction conditions were: Reaction temperature 69.49℃, reaction time 46.64 min, the glycosylation was 10.64%, the gel strength could achieve 76.03. Under the same pH, its solubility significantly increased through the glycosylation of the protein than soy protein isolate. In the aspect of emulsifying property, the emulsifying property was also obviously enhanced after glycosylation. This paper provided a theoretical basis for the application of glycosylation modification in the food processing industry.

Keywords: Soybean protein isolate; Glycosylation; Function characteristics

蛋白质的糖基化是指在糖基转移酶作用下将糖转移至蛋白质,和蛋白质上的氨基酸残基形成糖苷键的过程^[1]。为了拓宽大豆分离蛋白(soy protein isolate solution, SPI)的应用范围,对其进行改性处理,糖基化改性之后,新合成的糖基化蛋白在乳化性、溶解性等功能特性方面都有不同程度的提高^[2],就如溶解度而言,经过糖基化处理之后,等电点附近也呈现较好的溶解性^[3]。在改善大豆蛋白功能特征方面,它可以成为一种安全有用的处理方式,在食品行业中具有很大的发展空间。目前国内学者的研究主要集中在改善大豆分离蛋白乳化性^[4-5],以及其制备的乳化体系在外界环境因素 pH、离子强度、温度变化下的稳定性^[6-7]。夏秀芳等^[8]利用湿热法制备葡萄糖-SPI 复合物,产物的溶解度、乳化活性和乳化稳定性均有明显提高。之前已有人研究了糖基化改性对蛋白质(包括 SPI)功能特性的影响,湿热法研究的较少,而对于糖基化大豆分离蛋白制备的优化工艺多为单因素试验。因此,

本试验通过响应面法优化糖基化湿热法制备大豆分离蛋白的工艺,并测定大豆分离蛋白糖基化产物的溶解性、乳化性和凝胶强度等,系统分析糖基化对其功能性质的影响,寻找出可应用于多种食品中的高性能食品添加剂。本试验以大豆分离蛋白为试验材料,研究经过葡萄糖处理之后对大豆分离蛋白溶解度、凝胶性、乳化性以及热稳定方面的影响,并通过响应面试验确定最佳工艺条件。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 试验样品 大豆分离蛋白、金龙油,购于周口万果园超市。
- 1.1.2 试验试剂 盐酸、OPA、SDS、2-巯基乙醇、硼砂,葡萄糖。
- 1.1.3 溶液配制 将葡萄糖与大豆分离蛋白按质量比 1:4 溶解在蒸馏水中配制成浓度为 0.02 g·mL⁻¹ 的混合液。

将葡萄糖与大豆分离蛋白按质量比 1:4 溶解在蒸馏水中配制成蛋白质质量浓度为 $0.01\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合液。

称取 10 g 大豆分离蛋白溶解在蒸馏水中配制成蛋白质质量浓度为 $0.02\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合液。

将上述混合液放在恒温振荡器中,温度调节为 60°C ,条件下反应 5 h,得到糖基化产物。

经过不同的条件改变,分析大豆蛋白和糖基化产物在性质上的差异。

1.1.4 主要仪器 E-201-9 PH 计,上海佑科仪器仪表有限公司;THZ-98AB 恒温振荡器,上海一恒科学仪器有限公司;BCD-215-KCM 冰箱,青岛海尔股份有限公司;JJ-2 组织捣碎机,常州华冠仪器制造有限公司;723 可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;HWS24 电热恒温水浴锅,上海一恒科技有限公司;AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-S 型水浴锅,巩义市英峪予华仪器厂等。

1.2 方法

1.2.1 糖基化大豆分离蛋白工艺优化 最适反应温度的确定:将反应时间设置为 50 min,糖的添加量为 8%,在此基础上设置温度梯度 $40,50,60,70,80,90^{\circ}\text{C}$,得到不同反应温度的糖基化产物,测定凝胶强度。

最适反应时间的确定:将反应温度设置为 70°C 以及糖的添加量为 8%,在此基础上设置时间梯度, $20,30,40,50,60\text{ min}$,得到不同反应时间的糖基化产物,测定凝胶强度。

最适糖添加量的确定:将反应温度设置为 70°C ,反应时间设置为 50 min,在此基础上依次添加 5%、10%、15%、20%、25% 的葡萄糖,得到糖基化产物,测定凝胶强度。

响应面法的优化试验设计:以单因素试验中确定的反应时间、反应温度、糖的添加量的最佳配比范围为自变量,凝胶强度为响应值进行响应面试验。按照软件设计的试验方案,进行试验研究。

凝胶强度的测定采用 OPA 比色法,即邻苯二甲醛比色法^[9]。

OPA 试剂的配制:准确称取邻苯二甲醛 50 mg,溶解在 1 mL 的甲醛溶液中,加入 5 mL 质量分数为 10% 的 SDS,100 μL 的 2-巯基乙醇和 25 mL 的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硼砂充分混均,最后定容至 100 mL,现配现用。

凝胶强度测定过程:用移液管量取 OPA 试剂 5 mL 置于试管中,然后用移液枪取 200 μL 的样品液($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),充分混均后,在 35°C 水浴反应

3 min,并对 OPA 试剂中加入 200 μL 的蒸馏水为试验对照,测量 340 nm 处吸光度。

凝胶强度计算公式: $\text{DG}\% = (A - B)/A \times 100$,其中 A 和 B 分别为 t 时刻样品溶液和试验对照样品的吸光度。

1.2.2 糖基化处理对大豆分离蛋白溶解性的影响 分别取 $0.02\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大豆分离蛋白、 $0.02\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 糖基化大豆分离蛋白、 $0.01\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 糖基化大豆分离蛋白 10 mL 于烧杯中,取 10 mL 试验前配制好的 $1.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸倒入小烧杯中,用胶头滴管分别滴加 1 000,20,300,400 μL 盐酸调节 pH,分析糖基化大豆分离蛋白的溶解性。

1.2.3 糖基化处理对大豆分离蛋白乳化程度的影响 改良 Pearce 和 Kinsella 的试验方法^[10]。将 $0.01\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大豆分离蛋白溶液和 $0.01\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的糖基化大豆分离蛋白溶液,分别量取 25 mL,定容至 100 mL,得 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,接着按金龙油:待测液 = 1:3 添加 66 mL 待测液、22 mL 金龙油,倒入高速匀浆机中, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌 1 min,取 200 μL ,用质量分数为 0.1% 的 SDS 稀释到 10 mL,用质量分数为 0.1% 的 SDS 作为试验对照,500 nm 下测吸光值,即为乳化值(EA),记作 A,5 min 后仍然使用相同的方法取出 200 μL ,用 0.1% 的 SDS 稀释到 10 mL,用 0.1% 的 SDS 作为试验对照,于 500 nm 波长下测吸光值,记作 B。乳化稳定性公式如下: $\text{ES} = A/B \times 100$ 。

按照上述方法分别配制 0.01,0.03,0.05,0.07 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的糖基化大豆分离蛋白溶液,按照上述方法分别处理 10,30,50,80,110 min,取出 200 μL ,用 0.1% 的 SDS 定容到 10 mL,用 0.1% 的 SDS 作为试验对照,于 500 nm 波长下测吸光值,分析糖基化蛋白的浓度和处理时间对其乳化稳定性的影响。

1.2.4 糖基化处理对大豆分离蛋白热稳定性的影响 将 $0.02\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大豆分离蛋白溶液和 $0.02\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 糖基化大豆分离蛋白溶液置于试管中,然后将分别将其放在水浴锅中, $40,50,60,70,80^{\circ}\text{C}$,观察沉淀情况。

2 结果与分析

2.1 糖基化大豆分离蛋白制备工艺优化

2.1.1 单因素试验结果与分析 如图 1 所示,反应温度为 $40\sim70^{\circ}\text{C}$ 时,凝胶强度先上升后下降,初步确定较适宜的反应温度为 70°C 。

如图 2 所示,反应时间为 $20\sim40\text{ min}$ 时,凝胶强度呈现出先上升后下降趋势,较适宜的反应时间为 40 min。

如图 3 所示,随糖添加量的增加凝胶强度呈现先上升后下降的趋势。当添加量为 10% 时,凝胶强度最高。

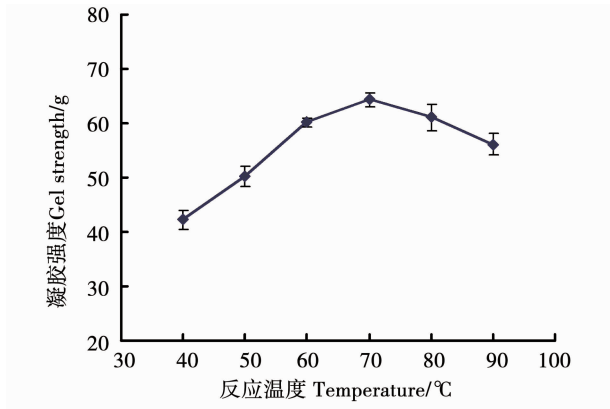


图 1 反应温度对凝胶强度的影响

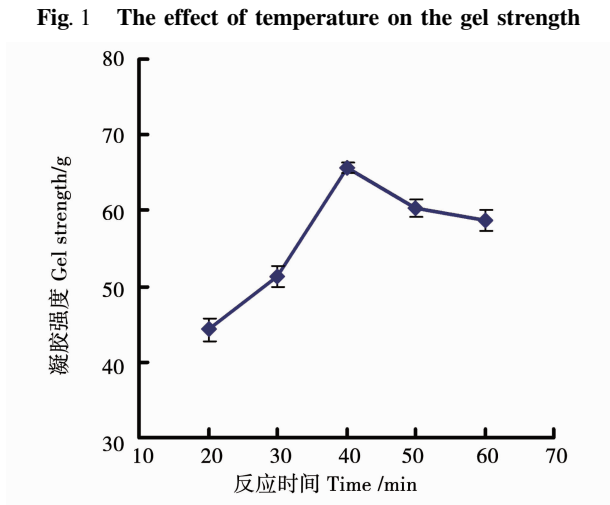


图 2 反应时间对凝胶强度的影响

Fig. 2 The effect of reaction time on the gel strength

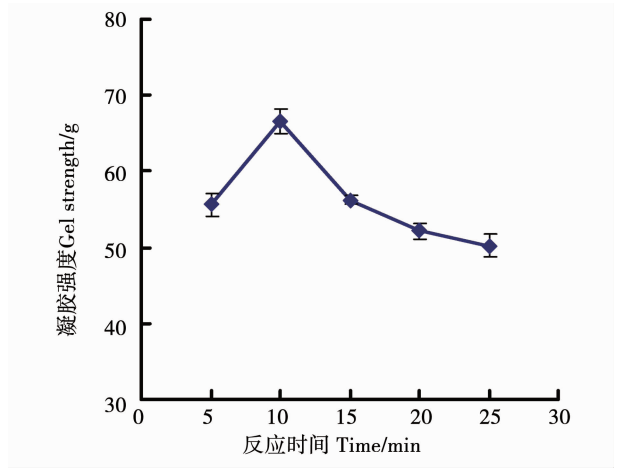


图 3 糖的添加量对凝胶强度的影响

Fig. 3 The effect of sugar added amount on the gel strength

2. 1. 2 响应面法分析方案及试验结果 依据单因素试验结果,以温度(A)、时间(B)、糖的添加量(C)为自变量,凝胶强度为响应值进行响应面试验,试验方案如表 1,结果如表 2 所示。

表 1 响应面试验设计因素水平表

水平 Level	因素 Factor		
	A 温度 Temperature/℃	B 时间 Time/min	C 糖添加量 Sugar added amount/%
-1	60	30	5
0	70	40	10
+1	80	50	15

表 2 三因素三水平中心组合试验结果

Table 2 Three factors and three levels of central composite experiment scheme and results				
试验号 Experiment numble	A 温度 Temperature/℃	B 时间 Time/min	C 糖添加量 Sugar added amount/%	凝胶强度 Gel strength/g
1	1	0	-1	74. 87
2	0	0	0	67. 07
3	-1	1	0	71. 83
4	0	0	0	70. 20
5	0	1	1	63. 20
6	1	1	0	76. 87
7	-1	-1	0	75. 86
8	0	-1	1	63. 20
9	-1	0	-1	63. 50
10	0	0	0	74. 99
11	0	1	-1	71. 87
12	0	-1	-1	69. 90
13	0	0	0	61. 70
14	1	-1	0	70. 20

续表 2

试验号 Experiment numble	A 温度 Temperature/℃	B 时间 Time/min	C 糖添加量 Sugar added amount/%	凝胶强度 Gel strength/g
15	0	0	0	61. 32
16	1	0	1	65. 40
17	-1	0	1	59. 80

根据表 2 数据,利用软件 Design Exper 进行温度、时间、糖的添加量 3 个因素对凝胶性的回归分析,建立三元二次响应面回归方程: $y = 74.89 - 0.52A + 1.79B + 2.19AB - 0.72AC + 1.21BC - 3.59A^2 - 8.36B^2 - 1.97C^2$ 。

由回归方程可知, $R^2 = 0.8910$,表明模型显著,预测值与试验值具有高度的相关性,模型可以反应

响应值的变化,此试验方法可行,利用该方程模拟真实的三因素三水平的分析研究可靠。由表 3 可以看出,各因素的交互作用对凝胶强度的影响不显著,说明试验因素与响应值之间并不是简单的线性关系。因此,用此模型来分析和预测糖基化工艺参数是可行的。

表 3 回归系数显著性检验表

Table 3 The significance test of regression coefficients

方差来源 Soruces of variation	自由度 Degree of freedom	平方和 Sum of square	均方 Mean square	<i>F</i>	<i>P</i>	显著性 Statistical significance
回归模型 Regression mode	448. 17	9	49. 80	6. 36	0. 0117	*
A	2. 16	1	2. 16	0. 28	0. 6154	
B	25. 74	1	25. 74	3. 92	0. 1127	
C	0. 75	1	0. 75	0. 10	0. 7659	
A ²	54. 14	1	54. 14	6. 91	0. 0339	*
B ²	294. 52	1	294. 52	37. 61	0. 0005	**
C ²	16. 41	1	16. 41	2. 09	0. 1911	
AB	19. 23	1	19. 23	2. 64	0. 1611	
AC	2. 06	1	2. 06	0. 26	0. 6239	
BC	5. 81	1	5. 81	0. 74	0. 4177	
残差 Residual	54. 82	7	7. 83			
失拟项 Lack of fit	40. 83	3	13. 61	3. 89	0. 1112	
净误差 Net error	13. 99	4	3. 50			
总和 Total	502. 99	16				

* 及 ** 分别表示处理间存在显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) 差异。

* and **: indicate significant difference and 0.05 and 0.01 level, respectively.

2.1.3 糖基化蛋白凝胶性响应面分析与优化 响应曲面反映了反应温度、反应时间以及糖的添加量 3 个因素的任何一个变量与其它两个因素的交互作用对凝胶强度的影响情况。曲面陡表明该因素对凝胶强度的影响显著,曲面平缓表明该因素对凝胶强度的影响不显著^[11]。由图 4 可知,相对于试验温度来讲,时间对凝胶性的影响显著;反应时间与反应温度的交互作用较弱,对凝胶性的影响不显著。从图 5 能够看出,与糖的添加量相比,反应温度对凝

胶强度的影响显著;温度与糖的添加量的交互作用较弱,对凝胶性影响不显著。由图 6 可知,与糖的添加量相比,反应时间对凝胶强度影响显著;糖的添加量和反应时间的交互作用对凝胶强度影响不显著。从图 4、图 5、图 6 中可以看出,最佳条件是:在反应温度 69.49℃、反应时间 46.64 min、糖的添加量 10.64%。为了检验响应曲面法所得结果的可靠性,采用上述优化提取条件进行模型验证,在此优化条件下重复实验 3 次,算出它的凝胶强度为

76.03,与响应面法预测值 75.05 非常接近,说明预测模型可用。

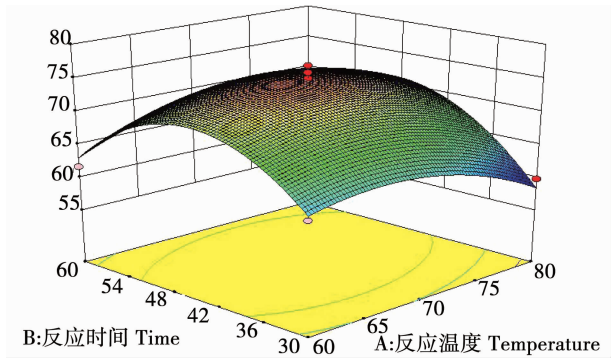


图 4 反应时间与反应温度的交互作用
对凝胶强度影响的响应面
Fig. 4 The response surface of the interaction
between reaction time and reaction
temperature to the gel strength

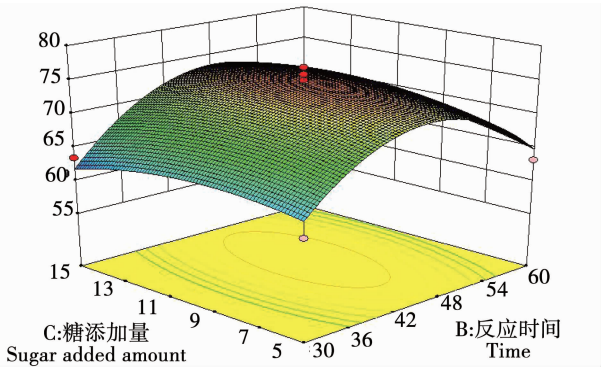


图 6 糖的添加量和反应时间的交互作用
对凝胶强度影响的响应面
Fig. 6 The response surface of the interaction
between the sugar added amount and
reaction time to the gel strength

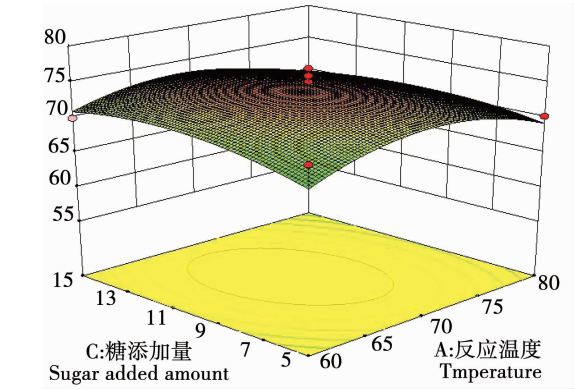


图 5 反应温度和糖添加量交互作用
对凝胶强度影响的响应面
Fig. 5 The response surface of the reaction
temperature and sugar added
amount to the gel strength

2.2 溶解度定性结果分析

表 4 为不同的盐酸添加量所对应的 pH,表 5 为沉淀分析,可以看出 pH5.67 ~ 7.74 时,在相同 pH 下,经葡萄糖处理后的大豆分离蛋白溶解度较大,沉淀较少,而未糖基化的大豆分离蛋白沉淀量增加,0.02 g·mL⁻¹大豆分离蛋白溶液表现得更为明显,且随着 pH 的降低,沉淀量增加越大。说明葡萄糖与蛋白质通过美拉德反应形成的共价复合物中由于糖基的引入,羟基的亲水特性可使得整个分子的溶解性能显著提高,另外蛋白和多糖通过次级力形成较弱的复合物,有利于蛋白的溶解。然而对于同一种溶液来说,即 0.02 g·mL⁻¹糖基化大豆分离蛋白溶液和 0.01 g·mL⁻¹糖基化大豆分离蛋白,它们浓度不同,沉淀的程度也不同。也就是说它的溶解性不仅仅与 pH 有关,还与其他因素有关。有待于进一步的试验分析。

表 4 不同的盐酸添加量所对应的 pH 值

Table 4 Add different number of hydrochloric acid solution to the specific pH value measured

大豆分离蛋白溶液 Soy protein isolate solution	盐酸添加量 Hydrochloric acid added amount /μL			
	100	200	300	400
0.02 g·mL ⁻¹ 大豆分离蛋白溶液 0.02 g·mL ⁻¹ soy protein isolate solution	7.74	6.85	6.55	6.25
0.02 g·mL ⁻¹ 糖基化大豆分离蛋白溶液 0.02 g·mL ⁻¹ soy protein isolate solution	7.46	6.73	6.13	5.67
0.01 g·mL ⁻¹ 糖基化大豆分离蛋白溶液 0.01 g·mL ⁻¹ soy protein isolate solution	7.49	6.98	6.72	6.52

表 5 3 种溶液的沉淀程度

Table 5 The degree of precipitation exhibited by pH in 3 solution

沉淀程度 The degree of precipitation exhibited	盐酸的添加量 Hydrochloric acid added amount/ μL			
	100	200	300	400
0.02 g $\cdot\text{mL}^{-1}$ 大豆分离蛋白溶液 0.02 g $\cdot\text{mL}^{-1}$ soy protein isolate solution	+++	+++	++++	+++++
0.02 g $\cdot\text{mL}^{-1}$ 糖基化大豆分离蛋白溶液 0.02 g $\cdot\text{mL}^{-1}$ glycosylated soy protein isolate solution	+	++	+++	++++
0.01 g $\cdot\text{mL}^{-1}$ 糖基化大豆分离蛋白溶液 0.01 g $\cdot\text{mL}^{-1}$ glycosylated soy protein isolate solution	+	+	++	++++

- :表示几乎没有沉淀出现; + :出现沉淀的程度,该符号越多表示沉淀程度越大。
- : There was almost no precipitation; + : The degree of precipitation, the more symbols mean the greater degree of precipitation.

2.3 乳化性的分析

糖基化大豆分离蛋白的乳化稳定性为 94.42。糖基经测定,大豆分离蛋白的乳化稳定性为 92.55, 化处理后乳化稳定性增强。

表 6 乳化稳定性的测定

Table 6 Measurement of emulsifying stability

沉淀程度 The degree of precipitation exhibited	乳化值 EA		乳化稳定性 ES
	A	B	
大豆分离蛋白 Soy protein isolate	1.405	1.518	92.55
糖基化大豆分离蛋白 Glycosylated soy protein isolate	1.433	1.520	94.42

利用上述试验方法,将稀释成不同浓度的样品 示。糖基化蛋白的浓度越高,糖基化大豆蛋白乳乳化处理不同时间,进行乳化性分析,结果如表 7 所 稳定性越高,处理时间越短乳化稳定性越高。

表 7 糖基化蛋白的浓度和处理时间对糖基化产物乳化稳定性的影响 (25℃)

Table 7 The effect of concentration and time on the emulsifying stability of the glycosylated products (25℃) (%)					
糖基化蛋白的浓度 Glycosylated soy protein isolate solution/(g $\cdot\text{mL}^{-1}$)	处理时间 Time/min				
	10	30	50	80	110
0.01	61	51	40	33	25
0.03	68	50	44	38	33
0.05	75	63	57	50	45
0.07	90	70	64	59	55

2.4 不同温度对热稳定性的影响

试验结果表明:在 60℃ 的水浴锅中,没有糖基化的蛋白质先出现沉淀,而糖基化蛋白质在没有糖基化的蛋白质变质后才慢慢开始出现沉淀,表明在 60℃ 下糖基化的蛋白对热处理更稳定。在正常情况下,蛋白质在高于 60℃ 时就会产生变质,蛋白质在变性之后,它的组织构象变得松散无序,不出现结晶现象,从而使蛋白酶很容易把它水解。蛋白质发生变质归根结底是因为蛋白质内部的组织构象被破坏,它就从原本有序的卷曲的紧密结构变为无序的松散的伸展状结构,所以它原来的疏水基团被大量的暴露在分子表面,而亲水基团面的分布就减少

了,由于这种原因使蛋白质颗粒不能与水相溶,从而失去水膜,很容易引起分子间相互碰撞而产生聚集沉淀^[12-13]。

3 结论与讨论

蛋白质作为一种表面活性物质,它能够降低油和水的表面作用力,使它更易于乳化。此外,蛋白质是分布在连续相和非连续相两相之间的接触面上的,能够更好的阻止非连续相的汇聚,从而更好的稳定乳状液。同样的样品,受测试条件的影响很大。经过试验数据表明:对于浓度相同的两种物质而言,经过糖基化处理之后,它的 ES 乳化稳定性

降低,而其 EAI 乳化活性增强。而对于通过调节糖基化蛋白的浓度来讲,随着浓度的增加,乳化性增强。表明其乳化性和乳化稳定性与其浓度有着直接的关系。由于蛋白质分子的质量分数的增多,界面膜的厚度也变厚,进而膜的强度增强,乳化的能力也随之提高。

经过糖基化处理之后的大豆分离蛋白的功能性质都在往一个好的方向改性,这对于其在食品方面的应用来说是非常重要的。在溶解度方面,经过糖基化处理的大豆分离蛋白,溶解度是增加的。经过糖基化处理之后,采用响应面优化的工艺来分析研究凝胶性质:最佳反应温度 69.49℃、最佳反应时间 46.64 min、最佳糖的添加量 10.64%,在这种最优条件下,糖基化凝胶强度最好。响应面优化法,既考虑了在试验过程中产生的随机误差,又将复杂的函数关系在较小的范围内用简单的一次或二次多项式模型来拟合,计算起来较为简单,是降低开发成本、优化加工条件、提高产品质量、解决生产过程中的实际问题的一种有效方法。在乳化性质方面,糖基化修饰之后,乳化性也明显增强。当然,经过糖基化处理之后的大豆分离蛋白在其他方面也有一定的提高,这些都有待于进一步的试验研究。

参考文献

[1] 吴慧. 糖基化在 KSHV 编码 vGPCR 中的功能研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2013. (Wu H. Studies G protein-coupled receptor encoded KSHV (vGPCR) [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2013).

[2] 布冠好, 刘伯业, 陈复生, 等. 糖基化修饰对大豆蛋白功能特性的影响[J]. 农业机械, 2011, 15(11): 77-80. (Bu G H, Liu B Y, Chen F S, et al. The effect of glycosylation treatment on the properties of the soy protein isolate[J]. Sinofarm, 2011, 15(11): 77-80.)

[3] 张琳静, 于国萍. 木瓜蛋白酶水解大豆浓缩蛋白及糖基化修饰对水解产物溶解性的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 1-4. (Zhang L J, Yu G P. Effect of papain hydrolysis an glycosylation on solubility of soybean protein concentrate[J]. Food Science, 2011, 32(16): 1-4.)

[4] Wang X B, Zhang Y H, Jiang L Z. Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate through glycosylation modifi-

cation [J]. Advanced Materials Research, 2013 (781-784): 1495-1499.

[5] Zhang B, Chi Y J, Li B. Effect of ultrasound treatment on the wet heating Maillard reaction between β -conglycinin and maltodextrin and on the emulsifying properties of conjugates [J]. European Food Research and Technology, 2014, 238(1): 129-138.

[6] Zeeb B, Gibis M, Fischer L, et al. Crosslinking of interfacial layers in multilayered oil-in-water emulsions using laccase: Characterization and pH-stability [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 27(1): 126-136.

[7] Fernández-Ávila C, Escriu R, Trujillo A J. Ultra-high pressure homogenization enhances physicochemical properties of soy protein isolate-stabilized emulsions [J]. Food Research International, 2015, 75(5): 357-366.

[8] 夏秀芳, 洪岩, 郑环宇, 等. 湿法糖基化改性对大豆分离蛋白溶解性和乳化能力的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 167-172. (Xia X F, Hong Y, Zheng H Y, et al. Effect of wet glycosylation modification on sobubility and emulsifying activity of soybean protein isolate[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2016, 16(1): 167-172.)

[9] 于莉萍, 迟玉杰, 刘红玉. 糖基化提高大豆分离蛋白凝胶性的工艺条件[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(3): 100-104. (Yu L P, Chi Y J, Liu H Y. Study on the optimization of improving gelling stability of soy protein isolate by glycosylation [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(3): 100-104.)

[10] 管军军, 裘爱泳, 周瑞宝. 提高大豆分离蛋白乳化性和乳化稳定性的研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(11): 38-42. (Guan J J, Qiu A Y, Zhou R B. Improvement of emulsifying and emulsion-stabilizing properties of soybean protein isolate [J]. China Oils and Fats, 2003, 28(11): 38-42.)

[11] Cai M H, Zhou X S, Sun X Q, et al. Statistical optimization of medium composition for aspergillide a production by marine-derived fungus a spergillus glaucus[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(3): 381-389.

[12] 郑跃, 丁伟. 蛋白质盐析实验条件的探究[J]. 化学教学, 2012(6): 49-50. (Zheng Y, Ding W. Study of protein salting-out experimental conditions [J]. Chemistry Teaching, 2012(6): 49-50.)

[13] 齐祥明. 加压 CO₂-乙醇-水体系等电沉淀蛋白质过程的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2004. (Qi X M. Study on isoelectric precipitation of proteins in compressed carbon dioxide-ethanol-aqueous solution system [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004.)