

β -伴大豆球蛋白酶解物抑制致病菌粘附 Caco-2 细胞

王 瑾, 杨柏崇, 吕 莹, 郭顺堂

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘 要:以黄大豆和黑大豆为原料调制了 β -伴大豆球蛋白, 用 SDS-PAGE 和 PAS 染色分析了黄大豆及黑大豆来源的 β -伴大豆球蛋白各个亚基构成及糖含量, 并通过体外模拟人体消化方法制备了胃蛋白酶及胰蛋白酶酶解物, 利用动物细胞培养的方法分析了两种 β -伴大豆球蛋白酶解物对肠道致病菌大肠杆菌 (*Escherichia coli* strains serotype O26) 和沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium* LT2) 粘附 Caco-2 细胞的抑制作用。结果表明: 黄大豆及黑大豆来源的 β -伴大豆球蛋白均含有相同的亚基, 糖含量上基本一致, 为 3.5%~3.7%; 二者加热处理后再体外消化得到的酶解产物与未加热处理相比可以显著抑制大肠杆菌对 Caco-2 细胞的粘附, 而对鼠伤寒沙门氏菌的抑制作用不明显。这一结果说明, 摄取加热后的 β -伴大豆球蛋白, 在经胃蛋白酶、胰蛋白酶等消化作用后, 其消化产物有可能具有保护肠道上皮细胞不被大肠杆菌致病菌粘附的作用。

关键词: 黄大豆; 黑大豆; β -伴大豆球蛋白酶解物; 抑制粘附; Caco-2 细胞

中图分类号: Q556

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)05-0845-05

Inhibition of Adhesion of in Vitro Hydrolysate of β -conglycinin to Caco-2 Cell by Enteropathogens

WANG Jin, YANG Bai-chong, LU Ying, GUO Shun-tang

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agriculture University, Beijing 100083, China)

Abstract: The materials of this study were β -conglycinins extracted from yellow soybean and black soybean, of which we detected the construction of subunits and the content of combining-sugar by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and periodic acid-Schiff (PAS). To investigate the effect on intestinal microbial community, in vitro experiments were conducted using Caco-2 cell line to confirm that in vitro pepsin and trypsin hydrolysates of β -conglycinin from yellow soybean and black soybean had an antiadhesive effect on human intestinal cells against the enteropathogens (*Escherichia coli* strains serotype O26, *Salmonella typhimurium* LT2). The results showed that there was no disparation in both construction of subunits and sugar content of β -conglycinins from the two kinds of soybeans, of which sugar content were 3.5%~3.7%, and their hydrolysates after heat treatment could significantly inhibit the adhesion of *Escherichia coli* O26 to Caco-2 cells, while there was no effect against *Salmonella typhimurium* LT2. Our findings indicated that β -conglycinin probably had an antiadhesive effect on protecting human intestinal cells against the *Escherichia coli* O26.

Key words: Yellow soybean; Black soybean; Hydrolysate of β -conglycinin; Inhibition of adhesion; Caco-2 cell

大豆含有丰富的蛋白质, 按种皮颜色大豆可分为黄大豆, 黑大豆, 青大豆, 褐大豆等九种, 其中与人们日常饮食密切相关的主要是黄大豆及黑大豆。

大豆蛋白主要由大豆球蛋白及 β -伴大豆球蛋白组成, 其中 β -伴大豆球蛋白不同于大豆球蛋白, 是一种含有高甘露糖型的糖链^[1]的糖蛋白。研究表明, β -伴大豆球蛋白具有降低血胆固醇, 防止肥

胖的功效^[2], 而且, 近年来的研究发现, β -伴大豆球蛋白酶解物具有抗氧化性^[3], 调节胃肠道功能^[4,5]等生理活性。相对于黄大豆, 有关黑大豆种皮色素的抗氧化性^[6]的研究报道较多, 对其蛋白质研究较少。阮禹松等^[7]通过 Native-PAGE 及双向 SDS-PAGE 电泳分析表明: 黑大豆 7S 球蛋白(主要成分为 β -伴大豆球蛋白)是由 3 个以非共价键相结合的

收稿日期: 2008-03-21

作者简介: 王瑾(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为蛋白质加工与利用。E-mail: wangjin1219@gmail.com。

通讯作者: 郭顺堂, 教授, 博士生导师。E-mail: shuntang@cau.edu.cn。

亚基(MW:84.7 kD,72.6 kD 和 49.2 kD)构成,与黄大豆的蛋白相似。然而,黑大豆中 β -伴大豆球蛋白结合情况及其酶解消化产物生理活性是否不同于黄大豆,尚未见报道。因此,通过 SDS-PAGE 与 PAS 染色确定黑大豆中 β -伴大豆球蛋白结合型糖的分布,采用体外模拟人体消化的方法,从抑制致病菌对肠道细胞粘附的角度,分析了黄大豆及黑大豆中 β -伴大豆球蛋白经过人体消化作用得到的酶解物的调节肠道内微生物菌群平衡的作用,进而对黄大豆及黑大豆的营养价值进行了评价。

1 材料与方法

1.1 原料及处理

黄大豆,黑大豆均为市售。将大豆在 40℃ 干燥 4 h 后,用研磨机粉碎,过 60 目筛。用 10 倍体积的正己烷进行搅拌浸提,处理 3 h 后,静置沉降,除去正己烷,重复处理 3 次,然后在常温下干燥即得脱脂豆粉。

1.2 药品及仪器

胃蛋白酶(1:10 000),胰蛋白酶(1:250)均为 Sigma 分装;葡聚糖凝胶 Sephadex G-25。

Urbane TSK-U9285 研磨机;台式离心机 TDL-40B,TDL-16C;PHS-3C 型酸度计;HL-2 恒流泵;DYY-III8B 型稳压稳流定时电泳仪;BIO-RAD III Mini cell 电泳槽;Spectrum SP-2100UV 紫外分光光度计;XZQ-XL 振荡培养箱;Huarui HR-G1 干胶仪;超净工作台;FD-1 冷冻干燥机;BSZ-100 自动部分收集器;二氧化碳培养箱,Thermo Electron 等。

1.3 细菌菌株及细胞株

1.3.1 细菌菌株及培养 致病性大肠杆菌 *Escherichia coli* O26 及 *Salmonella typhimurium* LT2 (ccpm 0374) 由本实验室保存。

贮存细菌于含有 60% 甘油的 LB 肉汤中,加入冻存管置于 -80℃ 超低温冰柜保存,试验前取贮存冻存管,用接种环挑取少量菌液接种于营养琼脂,培养 18~24 h,观察生长状态,然后挑取单菌落,再培养于营养琼脂平板上备用。使用前挑取单菌落于营养肉汤中培养 18~24 h 后,传代于肉汤中再培养 24 h 后使用。

1.3.2 Caco-2 细胞培养 Caco-2 细胞购于美国模式菌种收集中心(ATCC);培养基为 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium;含有 4.5 g·L⁻¹ D-葡萄糖,2.0 g·L⁻¹ NaHCO₃),培养时加入 10% 优质胎牛血清,1% 非必需氨基酸,100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 U·mL⁻¹ 链霉素。细胞培养环境为 5% CO₂,

37℃,饱和湿度。所用的细胞传代数为从 ATCC 购买回来后第 10~20 代之间。传代所用的消化液为 0.25% 胰蛋白酶+0.005% EDTA。

1.4 方法

1.4.1 大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白的分离提取 参考 Nagano 等^[8]的方法,将脱脂豆粉用 15 倍体积的水溶解,调整 pH7.5,搅拌提取 1 h 后离心(4 000 r·min⁻¹,20 min)去除残渣,向上清液中按 0.98 g·L⁻¹加入 NaHSO₃,并用 2 mol·L⁻¹HCl 调节溶液 pH 值至 6.6,放置过夜后离心(4 000 r·min⁻¹,10 min),得到沉淀即大豆球蛋白。向得到的上清液中加入等体积水后,调节 pH 至 4.5,再离心(3 000 r·min⁻¹,5 min),所得沉淀即为粗 β -伴大豆球蛋白。

1.4.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 参照 Guo 等^[9]方法,进行 SDS-PAGE 分析,凝胶浓度为 12%~14%,交联度为 2.6%。分别采用考马斯亮蓝 G-250 及 PAS 糖蛋白染色两种方法进行染色分析。

1.4.3 PAS 糖蛋白染色分析 PAS 染色(Periodic Acid-Schiff Reagent,PAS)-糖蛋白染色:参考 Zacharius 等^[10]方法,并作适当改进:将电泳胶片浸入 12.5% 的三氯乙酸溶液中振荡固定 60 min,用蒸馏水漂洗 25 s,再浸入含有 1% 高碘酸的 3% 的乙酸溶液中振荡 60 min,蒸馏水清洗过夜后将胶片浸入 Schiff 试剂进行染色 60 min,染色过程中要避光,染色后移入新鲜配制的含有 0.2% 偏重亚硫酸氢钾的 5% 乙酸溶液中避光清洗过夜,最后用蒸馏水清洗至胶片背景退为无色。

Schiff 试剂配制^[11]:称取碱性品红(Fuchsin basic)1 g 加入 200 mL 刚煮沸后的蒸水中,摇动数分钟彻底溶化,冷却至 50℃ 滤纸过滤,加入 1 mol·L⁻¹ HCl 20 mL,再冷至 25℃ 时,加入偏重亚硫酸钠 1~1.5 g,盖紧摇溶化,于暗处静置 24 h,后变成稻草色,加入活性炭 1~1.5 g,振摇 1~2 min,过滤,放入棕色瓶 4℃ 下保存,染色前现配,7 d 内使用。

1.4.4 蛋白含量及糖含量的测定 蛋白质含量测定:凯氏定氮法(GB/T5009.5-1985);糖含量测定:苯酚-硫酸法^[12],以甘露糖为标准。

1.4.5 体外消化及水解度测定 根据 Nunes 等^[13]和 Njintang 等^[14]的方法略加改动,样品在消化前进行加热(80℃,10 min)和不加热两种处理进行对比:将 β -伴大豆球蛋白配成 1% (M/V)的溶液,用 1 mol·L⁻¹HCl 调 pH 到 2.0,按 1% (E/S)加入胃蛋白酶,置于 37℃ 培养箱,95 r·min⁻¹振荡酶解 2 h,然后用 1 mol·L⁻¹NaOH 调 pH 到 7.5,按 3% (E/S)加入

胰蛋白酶,继续 $95\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡酶解 2 h,将酶解液 100°C ,10 min 灭酶,冷却到室温后调 pH 到 4.5,离心($4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,20 min),上清冷冻干燥。

消化过程中水解度的测定采用 SN-TCA 指数法^[15]。

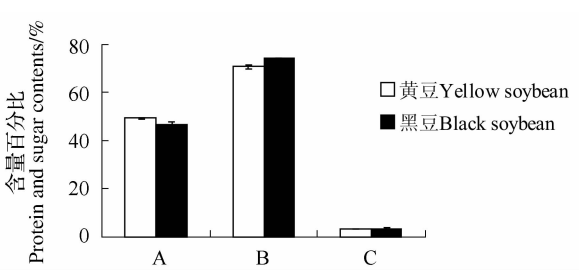
1.4.6 细菌粘附 Caco-2 细胞的效果分析^[16] Caco-2 细胞以 1×10^5 /孔的浓度接种到 24 孔培养板上,每孔加 1 mL 培养基,培养 14 d,根据培养基颜色进行更换;试验前一天,除去培养基,换上 0.8 mL 无抗生素培养基,每孔中加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的样品,以 PBS 为对照,在 37°C 震荡 1h,每孔中再加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 菌个数为 108 CFU mL^{-1} 的菌悬液, 37°C 震荡 90 min,未粘附到细胞上的菌用 1 mL 的 PBS 洗 3 次而除去,粘附着菌的细胞用 1 mL 含有 1% (v/v) TritonX-100 的 PBS 在室温下浸泡震荡 10 min,然后用十倍稀释法涂布平板进行计数,从而得到粘附细菌的个数。

2 结果与讨论

2.1 β-伴大豆球蛋白蛋白纯度及糖含量

由图 1 可以看出,黄豆及黑豆的蛋白含量相当,其中黄豆为 49.54%,黑豆中蛋白含量为 46.92%;以黄豆和黑豆为原料,通过碱溶酸沉的方法提取出的 β-伴大豆球蛋白的蛋白纯度略有差别,黄豆 β-伴大豆球蛋白纯度为 70.96%,黑豆 β-伴大豆球蛋白纯度为 73.88%,符合要求;由于 β-伴大豆球蛋白为糖蛋白,因此对其蛋白中糖含量也进行了测定,含量分

5%,可



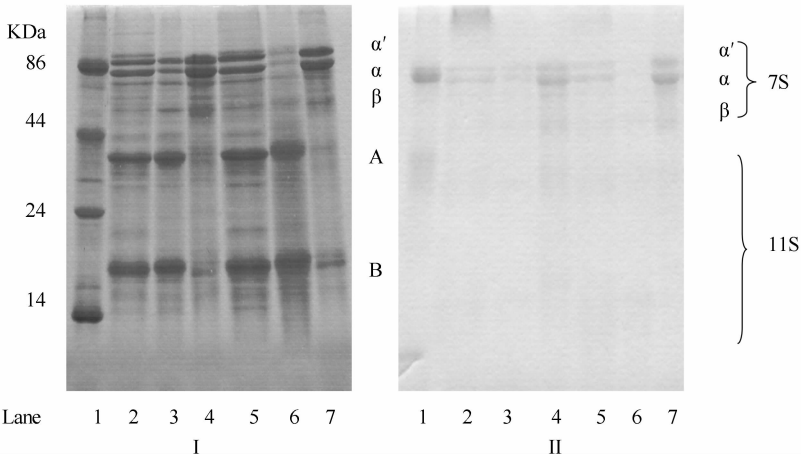
A: 豆粉蛋白含量;B:β-伴大豆球蛋白蛋白含量;C:β-伴大豆球蛋白糖含量
A: Protein contents; B: Protent contents of β- conglycinin; C: Sugar contents of β- conglycinin

图 1 黄大豆及黑大豆中蛋白及糖含量

Fig. 1 Contents of protein and sugar of β- conglycinin in different soybeans

2.2 黄大豆及黑大豆 β-伴大豆球蛋白的组成

对黄大豆及黑大豆得蛋白组成进行了 SDS-PAGE 电泳,并用考马斯亮蓝 G250 及 PAS 两种染色方法进行了分析,结果如图 2。(I)为考马斯亮蓝 G250 染色结果,泳道 2 和 5 中各条带分布一致,颜色深浅相似,说明黄大豆及黑大豆蛋白具有相同的亚基组成,含量也无明显差异,这与文献^[7]报道相一致。泳道 3,4,6,7 分别为黄大豆及黑大豆大豆球蛋白组分,β-伴大豆球蛋白组分;(II)为 PAS 染色结果,可以看出两种大豆蛋白中与糖结合的部分均分布在 β-伴大豆球蛋白上,并且主要分布在其 α'亚基及 α 亚基上。结果表明,黄大豆及黑大豆无论在蛋白质含量还是在组成上,二者基本一致,没有显著差异。



1. 标样;2. 黄大豆蛋白;3. 黄大豆大豆球蛋白蛋白组分;4. 黄大豆 β-伴大豆球蛋白组分;5. 黑大豆蛋白;6. 黑大豆大豆球蛋白组分;7. 黑大豆 β-伴大豆球蛋白组分;(I)考马斯亮蓝 G250 染色,(II)PAS 染色
1. Marker;2. soy protein of yellow soybean;3. glycinin fraction of yellow soybean;4. β- conglycinin fraction of yellow soybean;5. soy protein of black soybean;6. glycinin fraction of black soybean;7. β- conglycinin fraction of black soybean;(I) Comssie bright blue G-250 staining, (II) PAS staining

图 2 黄大豆及黑大豆蛋白中各组分的电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis patterns of constitutes in protein of yellow soybean and black soybean

2.3 β-伴大豆球蛋白体外消化过程中的水解度变化

为了解 β-伴大豆球蛋白的体内消化情况,对 β-伴大豆球蛋白加热(80℃,10 min)前后体外的胃蛋白酶和胰蛋白酶的水解作用进行了分析。结果如图 3 所示,加热处理后的样品在胃蛋白酶消化阶段(0~120 min),水解反应进行剧烈,随着消化过程的进行水解度不断增大,在前 90 min 曲线大幅上升,单位时间内水解度增加较快,90 min 时达到最大值,黄豆 β-伴大豆球蛋白水解度为 7.10%,黑豆 β-伴大豆球蛋白水解度为 6.04%,之后曲线略有下降;在

胰蛋白酶消化阶段(120~240 min),水解度变化不大,反应终点时,水解度略有增加,黄豆 β-伴大豆球蛋白水解度达到 7.44%,而黑豆的为 6.22%(图 3-A)。与加热处理相比,未加热处理的 β-伴大豆球蛋白在胃蛋白酶消化阶段的水解度增长缓慢,胰蛋白酶消化阶段,曲线平稳,消化终点时黄豆 β-伴大豆球蛋白水解度达到 5.68%,黑豆 β-伴大豆球蛋白水解度为 5.53%(图 3-B),终水解度明显低于加热处理。说明加热处理可以使蛋白质粒子打开,暴露出更多的酶切位点,从而有利于加大水解作用。

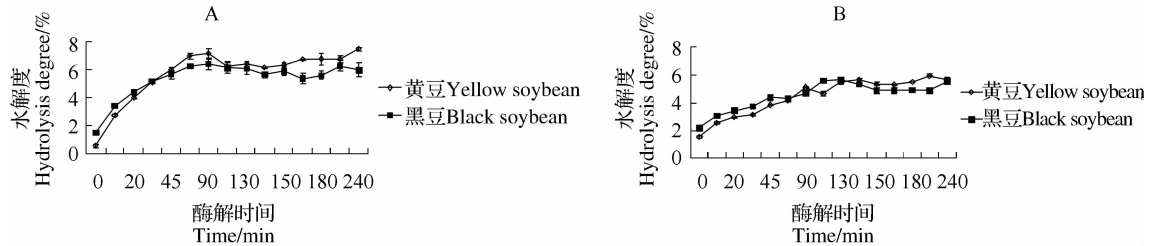
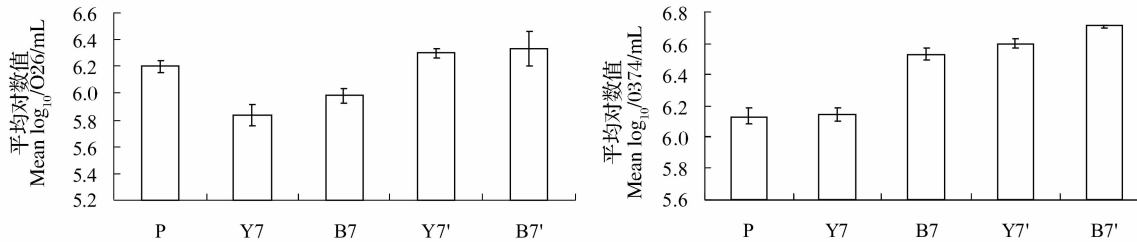


图 3 加热及未加热处理大豆 β-伴大豆球蛋白体外消化水解度变化曲线(A:加热;B:未加热)
Fig.3 In vitro digested hydrolysis degree of heated and unheated β-conglycinin (A:heated;B:unheated)

2.4 酶解物对致病菌粘附 Caco-2 细胞的抑制作用

黄大豆及黑大豆来源的 β-伴大豆球蛋白体外消化酶解物对大肠杆菌 O26 及鼠伤寒沙门氏菌 0374 粘附 Caco-2 细胞的抑制效果如图 4。结果显示,在抑制大肠杆菌 O26 的试验中,PBS 空白对照(P)中所粘附菌数的对数值是 $6.20 \pm 0.04 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,而加热的 β-伴大豆球蛋白酶解物 Y7 和 B7 粘附的菌数分别为 5.84 ± 0.08 和 5.98 ± 0.06 ,显著低于对照,单因素方差分析结果显示此二者与对照相比均具有显著性差异($P_{Y7} < 0.05, P_{B7} < 0.05$),而二者之间无显著性差异,说明黄大豆及黑大豆的 β-伴大豆球蛋白加热酶解物均能显著性抑制大肠杆菌 O26 对 Caco-2 细胞的粘附,二者抑制效果相

似。与加热处理不同,未加热处理的酶解物 Y7' 和 B7' 的粘附值却高于对照,与对照相比无显著性差异($P_{Y7'} > 0.05, P_{B7'} > 0.05$),说明未加热的酶解物不能抑制大肠杆菌 O26 对 Caco-2 细胞的粘附。同样,从抑制鼠伤寒沙门氏菌 0374 的结果中可以看出,空白对照中所粘附的菌数的对数值是 $6.13 \pm 0.05 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,除了 Y7 所粘附的值基本与持平外,无论加热处理与否,其粘附值均高于空白,说明 β-伴大豆球蛋白体外消化酶解物对鼠伤寒沙门氏菌 0374 对 Caco-2 细胞的粘附无抑制作用。结果表明,摄取加热后的 β-伴大豆球蛋白,在经胃蛋白酶、



Y7. 黄豆 β-伴大豆球蛋白加热酶解物;B7. 黑豆 β-伴大豆球蛋白加热酶解物;Y7'. 黄豆 β-伴大豆球蛋白未加热酶解物;B7'. 黑豆 β-伴大豆球蛋白未加热酶解物;* 表示有显著性差异,P<0.05。

Y7. heated hydrolysate of β-conglycinin in yellow soybean;B7. heated hydrolysate of β-conglycinin in black soybean;Y7'. unheated hydrolysate of β-conglycinin in yellow soybean;B7'. unheated hydrolysate of β-conglycinin in black soybean;*. P<0.05.

图 4 黄大豆及黑大豆 β-伴大豆球蛋白体外消化酶解物对大肠杆菌 O26 及鼠伤寒沙门氏菌 0374 抑制粘附效果
Fig.4 Eliminating effects of different hydrolysates against Escherichia coli O26;K60 and Salmonella typhimurium LT2 (ccpm0374)

胰蛋白酶等消化作用后,其消化产物有可能具有保护肠道上皮细胞不被大肠杆菌致病菌粘附的作用。

3 结论

黄大豆及黑大豆来源的 β-伴大豆球蛋白在蛋白含量及糖含量上没有明显差异,SDS-PAGE 电泳结果显示两种大豆来源的 β-伴大豆球蛋白在亚基构成及糖含量上相似。采用体外消化的方法酶解加热与未加热处理的黄大豆及黑大豆来源的 β-伴大豆球蛋白,得到的加热处理的 β-伴大豆球蛋白酶解物可以显著性抑制大肠杆菌 O26 对 Caco-2 细胞的粘附,而未加热酶解物却没有效果;在抑制鼠伤寒沙门氏菌 0374 粘附方面,各种酶解物均无效果。此结果说明,加热处理后的 β-伴大豆球蛋白通过人体自身的消化作用可以产生抑制大肠杆菌粘附小肠上皮细胞的物质,此类物质对鼠伤寒沙门氏菌无相似的抑制效果,且黄豆及黑豆来源的 β-伴大豆球蛋白体外消化酶解物在抑制大肠杆菌粘附细胞的效果上无显著性差异。

参考文献

- [1] Kimura Y, Ohno A, Takagi S. Structural analysis of N-glycans of storage glycoproteins in soybean (*Glycine max.* L) seed. [J]. *Bio-science Biotechnology Biochemistry*, 1997, 61(11): 1866-1871.
- [2] Lovati M R, Manzoni C, Gianazza E. Soybean protein products as regulators of liver low-density lipoprotein receptors I. Identification-ofactive β-conglycinin subunits [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1998, 46: 2474-2480.
- [3] Chen H M, Mutamoto K, Yamauchi F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β-conglycinin [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1995, 43: 574-578.
- [4] Nishi T, Hara H, Tomita F. Soybean β-conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats [J]. *Journal of Nutrition*, 2003, 133(2): 352-357.
- [5] Shen C L, Chen W H, Zou S X. In vitro and in vivo effects of hydrolysates from conglycinin on intestinal microbial community of mice after *Escherichia coli* infection [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(1): 283-289.
- [6] 徐金瑞, 张名位, 刘兴华, 等. 黑豆种皮花色苷的提取及其抗氧化作用研究 [J]. *农业工程学报*, 2005, 21(8): 161-164. (Xu J R, Zhang M W, Liu X H, et al. Extraction and antioxidation of anthocyanin of black soybean seed coat [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2005, 21(8): 161-164.)
- [7] 阮禹松, 赵文明. 黑豆盐溶球蛋白的研究 [J]. *西北植物学报*, 2003, 23(4): 581-585. (Ruan Y S, Zhao W M. Study of salt-soluble globulin in from black soya; *Semenglycine G.* [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2003, 23(4): 581-585.)
- [8] Nagano T, Hirotauka M, Mori H. Dynamic viscoelastic study on the gelation of β-conglycinin globulin from soybeans [J]. *Journal and Agriculture of Food Chemistry*, 1992, 40: 941-944.
- [9] Guo S T, Tomotada O, Masayuki M. Interaction between protein and lipid in soybean milk at elevated temperature [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1997, 45(12): 4601-4605.
- [10] Zacharius R M, Zell T E, Morrison J H. Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1969, 30(1): 148-152.
- [11] 王正义, 汪维伟. Lyon's PAS 标准化染色方法与传统 PAS 法的比较研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2005, 30(5): 663-665. (Wang Z Y, Wang W W. Comparison between the Lyon's PAS standardized staining and traditional PAS staining [J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2005, 30(5): 663-665.)
- [12] Dubois M, Gilles K A, Hamilton J K. Calorimetric method for determination of sugars and related substances [J]. *Analytical Chemistry*, 1956, 28: 350-356.
- [13] Nunes A, Correia I, Barros A, et al. Sequential in vitro pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2004, 52: 2052-2058.
- [14] Njintang N Y, Mbofung C M F, Waldron K W. In vitro protein digestibility and physicochemical properties of dry red bean flour: Effect of processing and incorporation of soybean and cowpea flour [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2001, 49: 2465-2471.
- [15] 檀志芬, 生庆海, 邱泉若, 等. 蛋白质水解度的测定方法 [J]. *食品工业科技*, 2005, 7: 174-176. (Tan Z F, Sheng Q H, Qiu Q R, et al. Methods to determinate the degree of hydrolysis of protein [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2005, 26(7): 174-175.)
- [16] Kassaify Z G, Li E W Y, Mine Y. Identification of antiadhesive fractions in nonimmunized egg yolk powder: invitro study [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2005, 53: 4607-4614.
- [17] Koshiyama I. Carbohydrate Component in 7S protein of soybean Casein Fraction [J]. *Agriculture Biology Chemistry*, 1966, 30(7): 646-650.