

大豆蛋白偶联壳聚糖微球介质提取纳豆激酶的研究

苏俊彩¹,董超²,史延茂²,张聪莎²,王辉³

(1. 河北医科大学 第三医院,河北 石家庄 050051; 2. 河北省科学院 生物研究所,河北 石家庄 050081; 3. 河北工业大学 化工学院,天津 300130)

摘要:采用液体反相悬浮法制取壳聚糖微球,在微球表面偶联纳豆激酶的亲和配体—大豆蛋白,作为纳豆溶栓酶的亲和吸附介质。结果表明:壳聚糖微球本身对纳豆激酶没有特异吸附,偶联大豆蛋白的壳聚糖微球对发酵粗酶液中的纳豆激酶的吸附性能符合 Langmuir 方程,吸附平衡时间约为 60 min,最大吸附量为 $3\,926.56\text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。纳豆激酶发酵液的上样量与柱体积比为 1:9 时,纳豆激酶的收率可以达到 52.3%,纯化倍数可以达到 18.1 倍。

关键词:纳豆激酶;壳聚糖微球;大豆蛋白;偶联;亲和层析

中图分类号:R945

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)04-0652-05

Extraction of Nattokinase by Soybean Protein Cross-linked Chitosan Microsphere

SU Jun-cai¹, DONG Chao², SHI Yan-mao², ZHANG Cong-sha², WANG Hui³

(1. The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050081, Hebei; 2. Hebei Institute of Biology, Shijiazhuang 050081, Hebei; 3. Chemical College, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

Abstract: Chitosan microspheres were obtained by inverse phase suspension method. After being cross-linked with soybean protein on its surface, the chitosan microspheres became affinity adsorbent of Nattokinase. This study verified that there were no affinity binding between the chitosan microspheres and Nattokinase. The affinity adsorption was researched between the soybean protein cross-linked microspheres and Nattokinase. Results indicated that the adsorption isotherm was accorded with Langmuir, the time of adsorption balance was 60 min, the maximum of adsorption capacity was $3926.56\text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$. When the ratio of sample weight and column volume was 1:9, the purification fold and recovery of Nattokinase activity reached 18.1 times and 52.3%, respectively.

Key words: Nattokinase; Chitosan microspheres; Cross-link; Affinity Chromatography

纳豆激酶(Nattokinase, NK)是一类丝氨酸蛋白酶(subtilisin),可以用于治疗血栓性疾病,具有安全高效、体内半衰期长、没有出血倾向的特点,是新一代溶栓药物的生物制剂之一^[1-2]。纳豆激酶常规的分离提取方法,普遍存在分离步骤多、收率低、介质价格昂贵和扩大化生产困难等缺点^[3-5]。亲和层析技术具有专一性强、操作条件温和、过程简单和效率高等优点,但是选择理想的亲和配体是限制亲和层析技术普遍应用的瓶颈^[6-7]。大豆蛋白作为纳豆激酶的底物,可能含有纳豆激酶的配体结构^[8]。作者前期采用处理后的大豆颗粒作为吸附介质装柱,动态吸附、解析,结果使提取收率高于80%,纯化倍数也高达30倍^[9]。但是如果环境洁净度不达标易造成大豆颗粒污染,操作压力控制不好易堵塞,抗压机械强度低,装柱不能太高,这些缺点会影响大豆颗粒在提取过程中的使用效果。壳聚糖(Chi-

tosan)生物相容性好,广泛用于药物载体和医疗辅助材料^[10],其结构中的氨基和羟基,可以进一步偶联固定其它蛋白。虽然壳聚糖在酸性条件下易溶解,但交联剂处理成微球后机械强度可以明显提高,并且在一定 pH 范围内不会溶解。该文采用液体反相悬浮法制取壳聚糖微球,同时在其表面偶联大豆蛋白,作为纳豆激酶的亲和介质;测定了新型介质对纳豆激酶的静态吸附特性,并与大豆颗粒的动态吸附提取结果进行对比,为纳豆激酶的亲和吸附应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

纳豆芽孢杆菌(*Bacillus subtilis natto*)由河北省科学院生物研究所生化实验室保存。

收稿日期:2011-01-04

基金项目:河北省科学技术研究与发展计划资助项目(08276413D)。

第一作者简介:苏俊彩(1962-),女,大专,医师,研究方向为微生物医药应用。E-mail: sjcymjr@126.com。

通讯作者:董超(1970-),男,高级工程师,主要从事药用益生菌微生物发酵技术与应用开发。E-mail: dongchao8605@sina.com。

1.2 仪器设备

凝血酶、牛纤维蛋白原(Sigma 公司);低分子量 Marker(Takara 公司);尿激酶(辽宁卫星制药厂);20 L 全自动发酵罐(镇江东方生物工程设备技术公司);HD-21-88 紫外检测仪(上海淇特分析仪器有限公司);N2000 双通道色谱工作站(浙江大学智达信息工程有限公司);0.22 μm 、10 KD、100 KD 滤膜及小型过滤设备:天津膜天膜工程技术公司。

1.3 试验设计

1.3.1 纳豆激酶发酵液的处理 纳豆芽孢杆菌在 20 L 发酵罐中发酵 24 h,将发酵液过 0.22 μm 膜除菌体,得到纳豆激酶粗酶液,酶活力为 $7\,500\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$;将粗酶液冷冻干燥得到粗酶冻干粉,其酶活为 $136.76\text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

1.3.2 壳聚糖微球的制备 参照党明岩等^[11]的方法,用 2% 的醋酸溶液配制 2% (w/w) 的壳聚糖溶液,分别向 1 L 的烧瓶中加入 200 mL 壳聚糖溶液和 200 mL 液体石蜡,搅拌 10 min,水浴升温到 50°C ,再加入几滴司班,乳化 30 min,升温到 60°C ,用稀 NaOH 溶液调整 pH 9~10,保持搅拌速度,至 pH 稳定不变,再搅拌 30 min 后,取出微球,分别用水、石油醚洗,再用乙醇抽提,最后得到壳聚糖微球。将做好的壳聚糖微球过 20 目和 60 目筛,截取中间部分,备用。

1.3.3 大豆蛋白的提取 参照刘健敏等^[12]的方

法,称取 100 g 充分浸泡的大豆,加入 500 mL 水,打碎用水浸取, $4\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,取上清液。将预冷的丙酮等体积加入到上清液中,再滴加 $6\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸,调整 pH 至 4.5~5.0, 4°C 冷藏过夜,离心,取沉淀,冷冻干燥。

1.3.4 交联壳聚糖微球 (Agent0) 的制备 称取 50 g 湿的壳聚糖微球加入 100 mL 蒸馏水中,水浴升温到 50°C ,用稀 NaOH 溶液调至 pH 9~10 稳定,再加入 10 mL 环氧氯丙烷, 70°C 水浴搅拌 8~9 h,期间保持 pH 在 9~10 之间。交联反应完毕后,将壳聚糖微球分别用水、 $2\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、水和 pH 6 的 $0.01\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液浸泡冲洗,备用,用符号 Agent0 表示。

1.3.5 偶联大豆蛋白的壳聚糖微球 (Agent1) 制备 称取 50 g 湿的壳聚糖微球与 3 g 大豆蛋白干粉共加入 100 mL 蒸馏水中,其它反应步骤同 1.3.4,处理后的介质用符号 Agent1 表示。在碱性条件下,环氧氯丙烷可以与羟基反应去掉 HCl,形成醚键,然后环氧基再打开固定配基 ($-\text{NH}_2$ 或 $-\text{OH}$),壳聚糖的羟基和氨基可以与环氧氯丙烷交联成网状结构,所以交联后的壳聚糖微球的机械强度有所增强,并且在酸性环境下不溶解;同时大豆蛋白的氨基或羟基也可与环氧氯丙烷交联,即将大豆蛋白偶联到壳聚糖微球表面。相关反应式如图 1。

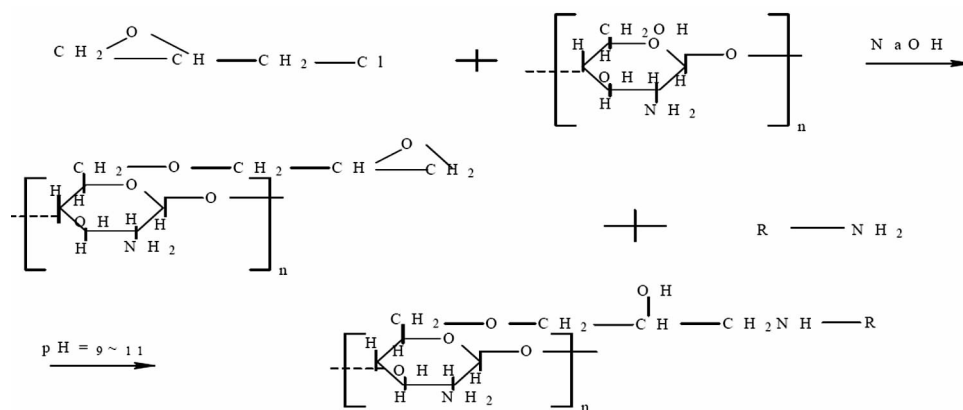


图 1 壳聚糖交联合偶联蛋白的示意图

Fig. 1 The chemical equation of chitosan cross-linked with soybean protein

1.3.6 Agent1 的吸附性能测定 将处理好的壳聚糖微球 (Agent1),用 pH 6 的 PBS 缓冲液充分平衡,称取不同质量的粗酶冻干粉溶于一定量的缓冲液中得不同浓度的纳豆激酶粗酶液,取 10 支试管,每个管中加 1.0 g 平衡好的 Agent1,加入不同浓度的纳豆激酶粗酶液,先后在 5°C 和 25°C 摇床震荡吸附 4 h,测粗酶液初始和吸附平衡后的酶活,按下式计算吸附量,绘制吸附等温线。

$$Q = (\text{Co} - \text{Ce}) V / W$$

式中: Q-吸附量 ($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$); Co-起始酶活 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$); Ce-平衡酶活 ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$); V-溶液体积 (mL); W-亲和介质重量 (g)。

称 15 g 壳聚糖微球 (Agent1) 加到 60 mL 粗酶液中, 25°C 摇床震荡吸附,每隔一定时间取样测酶活,按公式计算吸附量。并绘制大豆颗粒对纳豆激酶的静态吸附动力学曲线。

1.3.7 Agent1 的动态层析色谱穿透过程 (1)将 Agent1 介质微球装入层析柱,直径 2 cm,介质高度 14 cm,径/高为 1/7。(2)用 pH 6.0 的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液平衡,至色谱线走平。(3)上样纳豆激酶粗酶液,记录开始时间和流速。(4)上样至色谱线走至最高,再继续上样 60 min。

1.3.8 以 Agent0 和 Agent1 分别为介质的动态层析过程 (1)将 Agent0 和 Agent1 介质微球分别装入层析柱,直径 2 cm,介质高度 14 cm,径/高为 1/7,介质体积为 45 mL。(2)用 pH 6.0 的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液平衡,至色谱线走平,流速与 1.3.6 同。(3)参照 1.3.7,上样纳豆激酶粗酶液 5 mL。(4)用 pH 6.0 的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液淋洗。(5)用 $0 \sim 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 的溶液梯度洗脱。(6)收集洗脱峰,冷冻干燥。

1.3.9 纳豆激酶粗酶活性和纯度测定 参照杨明等^[13]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 壳聚糖微球的制备

壳聚糖微球制备后在显微镜下如图 2,白色微球,粒径范围 $25 \sim 65 \mu\text{m}$,平均约 $40 \mu\text{m}$ 。



图 2 壳聚糖微球的显微镜图

Fig. 2 Microphotograph of the chitosan microspheres

2.2 Agent1 介质微球对纳豆激酶的吸附等温线

在 pH = 6 时,Agent1 介质微球在不同温度下对纳豆激酶的吸附等温线如图 3,吸附等温线与 Langmuir 方程的拟合曲线如图 4。

图 3 是在不同温度下 Agent1 介质对纳豆激酶的吸附等温线,Agent1 对纳豆激酶的吸附量随平衡浓度的增大而增大,随温度的升高而降低,这是由于亲和吸附过程一般伴随熵的降低,吸附作用随温度升高而减小,所以可以选择 5°C 低温上样吸附,而升至 25°C 解吸洗脱。图 4 中用 Langmuir ($C_e/Q_e = C_e/q_m + 1/Kq_m$) 等温方程对图 3 中 5°C 数据拟合,方程为 $C_e/Q_e = 5 \times 10^{-5} C_e + 0.13$, $R^2 = 0.9697$,该吸附平衡的结合常数 K

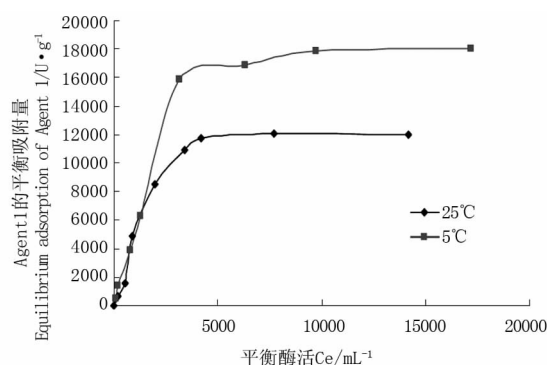


图 3 Agent1 的吸附等温线

Fig. 3 Adsorption isotherms of Agent1

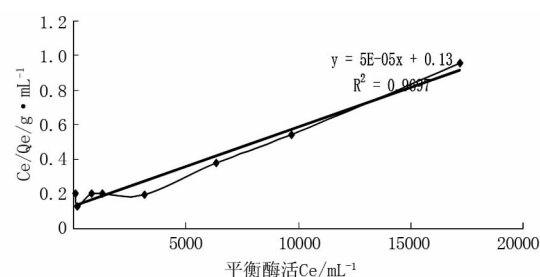


图 4 5°C 时吸附等温线的 Langmuir 拟合曲线

Fig. 4 Curve fitting of adsorption isotherms with langmuir

为 $1.5 \times 10^5 \text{ mL} \cdot \text{U}^{-1}$ 。虽然该吸附等温线可用 Langmuir 方程来拟合,但吸附机理不能用单分子理论来解释,实际的吸附随介质表面的立体结构、蛋白质分子大小和介质的处理方式等影响而非常复杂。

2.3 Agent1 介质微球对纳豆激酶的静态吸附

Agent1 对纳豆激酶的吸附动力学曲线如图 5 所示,随着时间的延长,Agent1 对纳豆激酶的吸附量逐渐增大,当时间在 $0 \sim 40 \text{ min}$ 范围时,吸附量随着时间的增大接近线性,40 min 以后吸附量增加缓慢,60 min 可以认为介质对纳豆激酶的吸附已经达到饱和,其最大吸附量为 $3926.56 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

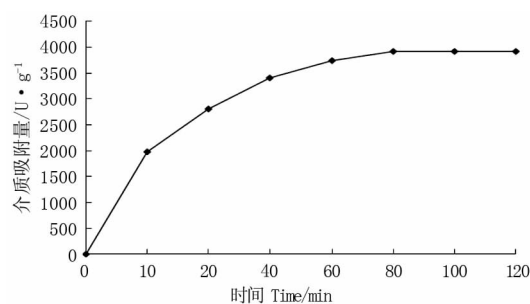


图 5 Agent1 对纳豆激酶的吸附动力学曲线

Fig. 5 Adsorption dynamics of Agent1

2.4 Agent1 的动态层析穿透过程

采用 Agent1 介质的动态层析色谱穿透曲线如图 6 所示,按照 2.3 结果 60 min 达到吸附平衡,那么 $60 \text{ min} \geq \text{介质体积} \div \text{流速}$,则流速 $\leq \pi r^2 \cdot 60 \text{ h}^{-1} = 0.73 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

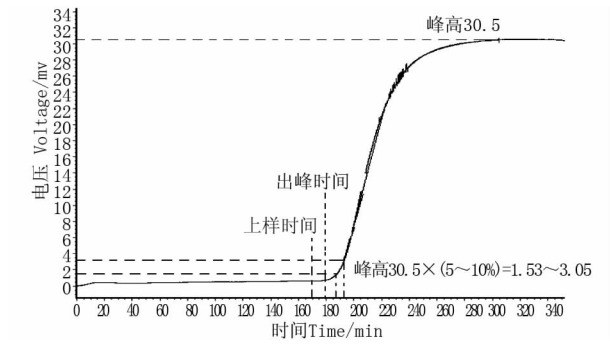


图6 Agent1 的动态层析穿透曲线

Fig.6 Breakthrough curves of Agent1

在 170 min 时开始上样,在 180 min 时开始出现蛋白上扬曲线。吸附过程中吸附柱出口溶质浓度的变化曲线称为穿透曲线,出口处溶质浓度开始上升的点称为穿透点,达到穿透点所用的时间称为穿透时间,习惯上将出口浓度达到入口浓度 5% ~ 10% 的时间称为穿透时间^[14]。当吸附操作达到穿透点时,继续进料不仅对增加吸附量的效果不大,而且由于出口溶质浓度迅速增大,造成酶的损失,所以实际上样量要远远小于穿透点时的流过总量,穿透时流过总量 = $0.7 \times (187 \sim 193 - 170) = 11.9 \sim 16.1$ mL。所以选择上样量 5 mL,流速为 $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

2.5 介质 Agent0 和 Agent1 的动态层析

没有偶联大豆蛋白的壳聚糖微球 (Agent0) 的色谱在线图如图 7 所示,可以看出除了淋洗峰,没有洗脱峰,说明壳聚糖微球本身不吸附纳豆激酶,即壳聚糖微球表面与纳豆激酶发生特异吸附作用的基团很少,所以纳豆激酶与杂质一起流过淋洗峰;偶联处理后的壳聚糖微球 (Agent1) 的色谱在线图如图 8 所示,可以看出峰 1 是淋洗峰,但是淋洗不能回到基线,换成梯度洗脱后,出现峰 2,即洗脱峰,收集,经酶活测定结果如表 1。

酶活测定结果显示偶联大豆蛋白的壳聚糖微球 (Agent1) 表现出了对纳豆溶栓酶的特异吸附,收率达到 52.3%;而壳聚糖微球介质 (Agent0) 本身对纳豆激酶无吸附特性。

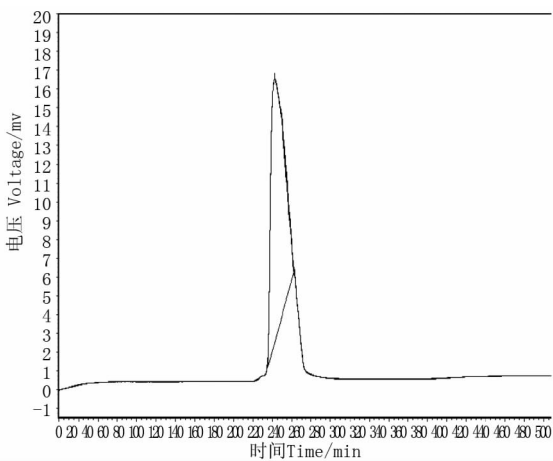


图7 未偶联的壳聚糖微球的层析色谱在线图

Fig.7 Chromatography of chitosan microspheres

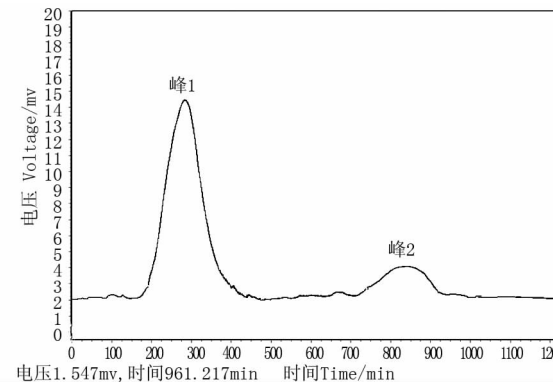


图8 壳聚糖微球偶联大豆蛋白后的亲和色谱在线图

Fig.8 Chromatography of soybean protein cross-linked chitosan microspheres

2.6 介质 Agent1 对纳豆激酶粗酶液的吸附收率和纯度

由表 1 可以看出,采用介质 Agent1 微球对纳豆激酶发酵液进一步的层析提取收率可以达到 52.3%,纯化倍数可以达到 18.1 倍。但是该介质的吸附性能不如大豆颗粒,并且由洗脱峰发现其稍有色素,可见色素在壳聚糖微球表面有非特异吸附,并且高盐会将之洗脱,从而使产物不纯,而大豆颗粒介质的洗脱峰没有色素。图 9 为亲和提取纳豆激酶发酵液的电泳图,亲和吸附后即可达到 1 条带。

表 1 不同分离提取纳豆激酶的工艺与亲和提取的比较 (5 mL 发酵液)

Table1 Comparison between affinity extraction and other extraction method of Nattokinase (5 mL fermented fluid)

	总酶活	比活力	收率	总收率	纯化倍数
	General enzyme	Specific activity	The step yields	Total yield	Purification
	activity/ $\times 10^4 \text{ U}$	/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	rate/ %	rate/ %	multiple
发酵粗酶液 Fermented crude enzyme solution	3.75	136.76	100.0	100.0	1.0
20% 盐析 20% Salting out	3.41	138.80	90.8	90.8	1.0
60% 盐析 60% Salting out	2.76	441.57	81.2	73.7	3.2
大豆颗粒介质的亲和吸附 Affinity adsorption of soybean microspheres	3.05	4134.25	81.3	59.1	30.2
介质 Agent1 亲和吸附 Affinity adsorption of Agent1	1.96	2475.36	52.3	52.3	18.1

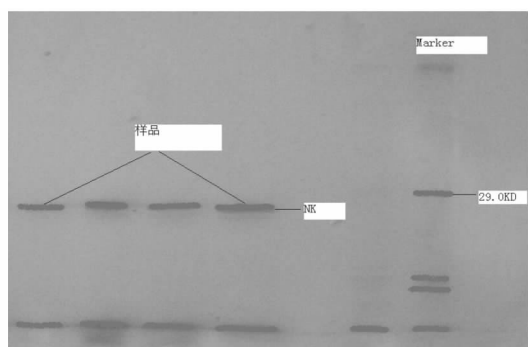


图9 亲和层析提取纳豆激酶的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 9 SDS-PAGE of Nattokinase by affinity chromatography

3 结论与讨论

壳聚糖是一种生物相容性较好的材料,反相悬浮制成的壳聚糖微球交联后,具有一定的机械强度和弹性,承受的压力范围较宽,可以作为层析介质的新材料。壳聚糖微球表面有很多氨基和羟基,以环氧氯丙烷做偶联剂,将大豆蛋白偶联到微球表面后,该介质保持对发酵液中纳豆激酶的亲和吸附特性,吸附等温线符合 Langmuir 方程,吸附平衡时间约为 60 min,最大吸附量为 $3\,926.56\text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。采用 Agent1 提取纳豆激酶的动态层析过程中纳豆激酶发酵液的上样量与柱体积比为 1:9 时,纳豆激酶收率可以达到 52.3%,纯化倍数可以达到 18.1 倍。Agent1 与大豆颗粒介质相比,机械强度高,但是收率和提取倍数略低。这可能是由于微球表面偶联的大豆蛋白密度小于大豆颗粒,也可能由于部分大豆蛋白结构中的亲和部分参与了偶联反应,致使与纳豆激酶的亲和结构减少。但是与传统提取工艺相比,效率有明显提高,如高大海等^[3]采用硫酸铵沉淀与层析结合的方法收率为 49%,吕莹等^[14]采用类似方法收率为 45.2%,同时步骤多而操作繁杂;郭勇等公布了一种采用亲和层析分离纤溶酶的专利,利用人血纤维蛋白原为亲和配体,交联到琼脂糖微球上,收率可以达到 70% 以上,但是原材料价格昂贵,规模扩大困难^[15]。

试验过程中发现大豆颗粒对色素没有吸附作用,但是壳聚糖微球介质易吸附色素,可能属于非特异吸附,色素会随洗脱峰的纳豆激酶一起流出,这个缺点会使提取纳豆激酶发酵工艺的后处理步骤增加。研究发现壳聚糖本身对纳豆激酶没有特异吸附,偶联大豆蛋白后具有特异洗脱峰,酶活测定和电泳证实为纳豆激酶。该方法从反面证明大豆蛋白中确实存在与纳豆激酶有特异吸附的亲和配体。有研究指出尿激酶或组织型纤溶酶原激活剂的亲和配体是含精氨酸的三肽,可以用精氨酸作纤溶酶亲和配体,还有用精

氨酸类似物对氨基苯甲脒的,一般的提取收率都在 60%~70%,由此推测大豆蛋白中与纳豆激酶亲和吸附的结构也可能是精氨酸的小肽结构^[16]。

参考文献

- [1] Fujita M, Nomura K, Kong K. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993, 197 (3): 1340-1347.
- [2] Sumi H, Hamada H, Tsumura H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet[J]. Experientia, 1987, 43 (20): 1110-1111.
- [3] 高大海, 梅乐和, 盛清, 等. 硫酸铵沉淀和层析法分离纯化纳豆激酶的研究[J]. 高校化学工程学报, 2006, 20 (1): 63-67. (Gao D H, Mei Y H, Sheng Q, et al. Separation and purification of Nattokinase produced by bacillus subtilis with ammonium sulfate precipitation and chromatography[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2006, 20 (1): 63-67.)
- [4] 阳承利, 邢建民, 刘俊果, 等. 纳豆激酶分离纯化技术的研究进展[J]. 现代化工, 2004, 24 (2): 23-25. (Yang C L, Xing J M, Liu J G, et al. Progress in separation and purification technology of nattokinase[J]. Modern Chemical Industry, 2004, 24 (2): 23-25.)
- [5] 张锋, 金杰, 解成俊. 纳豆激酶的最新研究进展[J]. 中国调味品, 2008, 347: 29-34. (Zhang F, Jin J, Xie C J. New research progress in nattokinase[J]. China Condiment, 2008, 347: 29-34.)
- [6] 孙彦. 生物分离工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 189-191. (Sun Y. Bioprocess engineering[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 189-191.)
- [7] 陈勇, 徐毅, 应汉杰, 等. 亲和层析研究进展[J]. 离子交换与吸附, 2001, 17 (3): 276-280. (Chen Y, Xu Y, Ying H J, et al. Researches and developments of affinity chromatography[J]. Ion Exchange and Adsorption, 2001, 17 (3): 276-280.)
- [8] 陆健. 蛋白质纯化技术及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 120-122. (Lu J. Protein purification and application[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 120-122.)
- [9] 马跃华, 董超, 杨明, 等. 纳豆激酶的亲和吸附工艺研究[J]. 大豆科学, 2010, 29 (2): 306-309. (Ma Y H, Dong C, Yang M, et al. Adsorption of Nattokinase by soybean microspheres[J]. Soybean Science, 2010, 29 (2): 306-309.)
- [10] 唐雪娇, 曹梦, 毕成良, 等. 球形交联壳聚糖吸附剂的多胺化及其对 Ni^{2+} 的吸附性能[J]. 离子交换与吸附, 2008, 24 (1): 47-54. (Tang X J, Cao M, Bi C L, et al. Study on the synthesis and characterization of a novel polyaminated and Ni^{2+} templated cross-linked chitosan bead and its adsorption[J]. Ion Exchange and Adsorption, 2008, 24 (1): 47-54.)
- [11] 党明岩, 张延安, 李薇, 等. 新型交联壳聚糖树脂颗粒对铂的吸附行为[J]. 过程工程学报, 2008, 8 (1): 60-64. (Dang M Y, Zhang Y A, Li W, et al. Adsorption of platinum by novel cross-linked chitosan resin particles[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2008, 8 (1): 60-64.)

(下转第 662 页)

综合以上分析发现,豆乳对钙离子的凝聚特性是大豆中多种化学组分综合作用的结果,不同组分对曲线变化的影响程度不同,并且这一结果在大豆品种间存在很大差异。该研究只讨论了大豆中几种主要组分与豆乳凝固特性的关系,而大豆的其它组分与豆乳凝固特性的相关性还需进一步研究。

致谢:该研究的完成得益于中国农业科学院作物科学研究所、吉林省农业科学院大豆研究中心、黑龙江省农业科学院佳木斯分院、安徽省农业科学院作物研究所的品种支持,在此表示衷心的感谢!

参考文献

- [1] Hou H J, Chang K C, Shih M C. Yield and textural properties of soft tofu as affected by coagulation method [J]. Food Science, 1997, 62: 824-827.
 - [2] 帖向宇. 豆奶中大豆乳清蛋白与球蛋白的相互作用及其影响 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006: 29-31. (Tie X Y. Interaction between soybean whey protein and globulins in soymilk and its effect [D]. Beijing: China Agricultural University, 2006: 29-31.)
 - [3] Yagasaki K, Kousaka F, Kitamura K. Potential improvement of soymilk golation properties by soybeans with modified protein subunit compositions [J]. Breed Science, 2000, 50(2): 101-107.
 - [4] 孟岩. 亚基缺失特异大豆品种的筛选及 β 亚基对大豆加工特性的影响 [D]. 北京: 中国农业大学, 2004: 31-33. (Meng Y. Screening of soybean varieties lacking subunits and the effect of β -subunit on properties of soybean products [D]. Beijing: China Agricultural University, 2004: 31-33.)
 - [5] Saio K, Koyama E, Yamazaki S, et al. Protein-Calcium-Phytic acid relationship in soybean (III): Effect of phytic acid on coagulative reaction in tofu-making [J]. Agricultural Biological Chemistry, 1969, 33: 36-42.
 - [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantization of protein utilizing the principle of protein-dye-binding [J]. Analytical Biochemistry, 1978, 72: 248-258.
 - [7] Guo S T, Tsukamoto C, Takahasi K, et al. Incorporation of soymilk lipid into soy protein coagulum by the addition of calcium chloride [J]. Food Science, 2002, 67(9): 3215-3219.
 - [8] 韩雅珊. 食品化学实验指导 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1992. (Han Y S. Experiment guidance of food chemistry [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1992.)
 - [9] Guo S T, Tomotada O, Masayuki M, et al. Incorporation of soy milk lipid into protein coagulum by addition of calcium chloride [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 901-905.
 - [10] Wang C C R, Chang S K C. Physicochemical properties and tofu quality of soybean cultivar Proto [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43: 3029-3034.
 - [11] de Man J M, deMan R I, Buzzell R I. Composition and properties of soymilk and tofu made from Ontario light hilum soybeans [J]. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, 1987, 20: 363-367.
 - [12] Skurray G, Cunich J, Carter O. The effect of different varieties of soybean and calcium ion concentration on the quality of tofu [J]. Food Chemistry, 1979, 7: 89-95.
 - [13] 帖向宇, 郭顺堂. 大豆乳清蛋白的热稳定性分析及其与球蛋白的相互作用研究 [J]. 食品工业科技, 2006, 27(9): 77-80. (Tie X Y, Guo S T. The thermal stability analysis of soybean whey protein and interaction between soybean whey protein and soybean globulins [J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(9): 77-80.)
 - [14] Ono T, Choi M R, Ikeda A, et al. Changes in the composition and size distribution of soymilk protein particles by heating [J]. Agricultural Biology Chemistry, 1991, 55(9): 2291-2297.
 - [15] Ono T, Katho S, Mothizuki K. Influence of calcium and pH on protein solubility in soybean milk [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1993, 57(1): 24-28.
 - [16] Schaefer M J, Love J. Relationships between soybean component and tofu texture [J]. Food Quality, 1992, 15: 53-58.
-
- (上接第 656 页)
- [12] 刘健敏, 钟芳, 麻建国. 大豆生理活性肽的研究 II 抗氧化性和 ACE 抑制活性的初步研究 [J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(4): 50-55. (Liu J M, Zhong F, Ma J G, et al. Soybean bioactive peptides (II)-antioxidant activity and ACE inhibitory activity of the hydrolysates [J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2004, 23(4): 50-55.)
 - [13] 杨明, 董超, 史延茂, 等. 纤维蛋白平板法测定纳豆激酶方法的改进 [J]. 中国酿造, 2008, (7): 77-80. (Yang M, Dong C, Shi Y M, et al. Improvement on the method of measuring the activity of Nattokinase with agarose-fibrin plate [J]. China Brewing, 2008, (7): 77-80.)
 - [14] 吕莹, 张露, 冯雷, 等. 纳豆激酶的纯化及性质研究 [J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(3): 122-124. (Lu Y, Zhang L, Feng L, et al. Purification and characterization of Nottokinase from *Bacillus subtilis* [J]. Food and Fermentation Industries, 2004, 30(3): 122-124.)
 - [15] 华南理工大学. 一种利用亲和层析法分离纯化纤溶酶的方法 [P]. 中国发明专利申请公开说明书, CN101067131A. 2007-11-7. (South China University of Technology. Purification of fibrinolytic enzyme by affinity chromatography [P]. China Patent, CN101067131A. 2007-11-7.)
 - [16] 上海交通大学. 降纤酶的亲和分离材料和降纤酶的亲和纯化方法 [P]. 中国发明专利申请公开说明书, CN1884507A. 2006-12-27. (Shanghai Jiao Tong University. Media and purification of defibrase with affinity chromatography [P]. China Patent, CN1884507A. 2006-12-27.)