

两种交联酶对大豆-牛奶双蛋白混合物中 主要致敏蛋白的影响

卢洪亮, 付泽世, 曲浩雯, 郑晓艳, 蒋南玥, 李萌*

(东北农业大学食品学院, 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 随着植物蛋白与动物蛋白复配产品开发日益增多, 双蛋白体系的营养互补优势受到广泛关注, 但其潜在致敏性问题仍限制了相关产品的进一步应用。为降低大豆-牛奶双蛋白混合物的致敏性, 本研究采用碱性蛋白酶 (Alkaline Proteinase) 水解, 并结合转谷氨酰胺酶 (Transglutaminase, TG) 和漆酶 (Laccase, LAC) 交联进行酶法改性。通过单因素试验和响应面优化, 考察碱性蛋白酶水解后两种交联酶的酶底比、温度、时间和 pH 值对混合蛋白 (体积比 1:1) 致敏性的影响, 并采用间接酶联免疫吸附法 (ELISA)、免疫印迹法及 ANS 荧光探针法分析其 IgE 结合能力和表面疏水性。结果表明, TG 酶改性最优条件为 49 °C、2 h、5 U g⁻¹、pH 值 7.5, 两种致敏蛋白降低率分别为 71.36% 和 87.03%; LAC 酶改性最优条件为 44.5 °C、8 h、54 U g⁻¹、pH 值 4.5, 降低率分别为 58.24% 和 77.93% ($P<0.05$)。两种酶改性均可降低混合蛋白表面疏水性、IgE 结合能力及致敏蛋白分子量, 其中 TG 酶效果优于 LAC 酶。本研究可为低致敏双蛋白产品开发及工艺优化提供实验依据。

关键词: 酶法改性; 双蛋白; 低致敏; 大豆; 牛奶

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.5.0341

Effect of Two Cross-Linking Enzymes on the Major Allergenic Proteins in Soy-Milk Dual Protein Mixtures

LU Hongliang, FU Zeshi, QU Haowen, ZHENG Xiaoyan, JIANG Nanyue, LIMENG*

(School of Food, Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: With the increasing development of plant-animal protein blended products, the nutritional complementarity of dual-protein systems has attracted widespread attention; however, their potential allergenicity still limits further application. To reduce the allergenicity of a soy-milk dual-protein mixture, an enzymatic modification strategy was applied using alkaline proteinase hydrolysis followed by cross-linking with transglutaminase (TG) or laccase (LAC). Single-factor experiments and response surface methodology were used to investigate the effects of enzyme-to-substrate ratio, temperature, reaction time, and pH of the two cross-linking enzymes after alkaline proteinase hydrolysis on the allergenicity of the mixed protein system (1:1, V/V). Changes in IgE-binding capacity and surface hydrophobicity of the mixed proteins were analyzed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunoblotting, and 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) fluorescence probe analysis. The results showed that under the optimal TG modification conditions of 49 °C, 2 h, an enzyme-to-substrate ratio of 5 U g⁻¹, and pH 7.5, the reduction rates of the two allergenic proteins were 71.36% and 87.03%, respectively. Under the optimal LAC modification conditions of 44.5 °C, 8 h, an enzyme-to-substrate ratio of 54 U g⁻¹, and pH 4.5, the corresponding reduction rates were 58.24% and 77.93%, respectively ($P<0.05$). Both enzymatic treatments decreased the surface hydrophobicity, IgE-binding capacity, and molecular weight of the allergenic proteins in the mixed protein system, with TG showing a stronger effect than LAC. This study provides an experimental basis for process optimization and the development of hypoallergenic dual-protein products.

Key words: enzymatic modification; dual protein; hypoallergenic; soy; milk

“双蛋白工程”旨在开发包括植物蛋白和动物蛋白在内的多种蛋白质资源, 并通过先进技术实现不同蛋白质的

收稿日期: 2026-03-06; 修回日期: 2026-05-03; 接受日期: 2026-05-09

作者简介: 卢洪亮 (2002-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 乳成分功能与营养, E-mail: qwer163202202@163.com

通讯作者: 李萌 (1980-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 乳成分功能与营养, E-mail: limeng@neau.edu.cn

精准配比和营养互补,以满足不同人群的营养需求。目前,根据中国居民的膳食结构和饮食习惯,我国“双蛋白”食品的发展主要以大豆蛋白和乳蛋白为基础^[1]。双蛋白体系富含多种人体必需氨基酸和矿物质,其氨基酸组成接近标准模式,能够实现动植物蛋白之间的营养互补,同时具有低脂、低胆固醇等营养特点^[2-4]。

然而,牛奶和大豆均属于常见食物致敏原。牛奶是婴幼儿食品中最常见的致敏成分之一,其过敏发病率约为2.69%^[5,6]。牛奶致敏蛋白主要包括酪蛋白和乳清蛋白两大类,其中 β -乳球蛋白是乳清蛋白中的主要致敏组分之一,因其具有较强免疫反应性,常被作为评价牛奶蛋白致敏性变化的重要指标。随着大豆制品消费量不断增加,大豆过敏的发生率也逐渐受到关注,在中国的婴儿过敏发病率约为0.3%~0.4%^[1,7,8]。大豆致敏蛋白主要包括 β -伴大豆球蛋白、糖球蛋白及其他储藏蛋白,其中 β -伴大豆球蛋白被认为是大豆中重要的致敏蛋白组分之一,在大豆制品致敏性研究中具有较好的代表性。目前针对大豆和牛奶过敏尚缺乏有效的治疗方法,因此开发低致敏性的双蛋白产品,使过敏人群在补充营养的同时降低过敏反应风险,具有重要的研究意义。

目前,降低蛋白致敏性的技术主要包括加热、发酵、超声、糖基化、高压均质、高静水压和酶法改性等方法^[9]。其中,酶法改性被认为是降低蛋白致敏性较为有效的技术之一^[10]。该方法具有反应条件温和、专一性强、安全性高以及对蛋白营养价值影响较小等优点^[11]。常用的酶包括碱性蛋白酶、风味蛋白酶、转谷氨酰胺酶(Transglutaminase, TG)和漆酶(Laccase, LAC)等^[12,13]。其中,碱性蛋白酶作为一种水解酶,在降低蛋白致敏性方面表现出显著效果。研究表明,碱性蛋白酶水解蛋白质可显著提高水解度并降低其致敏性^[14-18]。此外, TG酶和 LAC酶作为食品加工中常用的交联酶,也被证实能够通过改变蛋白结构降低蛋白致敏性^[9]。例如, TG酶交联可降低大豆分离蛋白和酪蛋白酸钠体系的致敏性^[19], LAC酶交联也被发现能够有效降低鱼蛋白的潜在致敏性^[20]。相关研究还表明,酶解结合酶交联的方式能够进一步降低蛋白的致敏性^[21]。然而,目前多数研究集中于单一蛋白体系,对于双蛋白混合体系中联合酶改性降低致敏性的研究仍较为有限。

因此,本研究以大豆-牛奶双蛋白混合物为研究对象,采用两步酶法改性:利用碱性蛋白酶对双蛋白体系进行预水解,以暴露/破坏部分致敏表位;随后分别采用 TG酶或 LAC酶对水解产物进行交联改性,通过单因素试验和响应面优化试验分析两种交联酶对混合蛋白致敏性的影响,并筛选酶法改性的最佳工艺条件。同时,对酶法改性过程中蛋白质结构变化进行系统分析,以期降低双蛋白混合体系中主要致敏蛋白的致敏性。与已有单一大豆蛋白、单一乳蛋白及 TG酶作用于双蛋白体系的研究相比,本文的特点在于:采用“碱性蛋白酶预水解+交联酶后改性”的两步复合酶法,在同一体系中系统比较 TG酶与 LAC酶对代表性动植物致敏蛋白的降敏效果,并结合免疫学与结构性质指标对其差异进行初步分析。该研究不仅拓展了双蛋白体系降敏的工艺路线,也为不同交联酶在双蛋白低致敏化中的应用评价提供了比较依据。

1 材料与方法

1.1 原料

大豆、脱脂牛奶均购自黑龙江比优特超市。碱性蛋白酶(2 400 U mg⁻¹),诺维信(中国)生物技术有限公司;转谷氨酰胺酶(100 U g⁻¹),北京索莱宝科技有限公司;漆酶(100 U g⁻¹),北京夏盛生物科技开发有限公司;十二烷基硫酸钠、考马斯亮蓝 R-250、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白、预染的蛋白 Marker(10~250 kDa),上海雅酶生物医药科技有限公司;明矾佐剂,赛默飞世尔科技公司;大豆 7S 蛋白 ELISA 科研试剂盒、牛 β -乳球蛋白 ELISA 科研试剂盒,江苏酶标生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

HH-4 水浴锅,常州赛普试验仪器厂;TGL-23 高速冷冻离心机,四川蜀科仪器有限公司;SCIENTZ 18N 真空冷冻干燥机,宁波新芝冻干设备有限公司;D-8 紫外-可见光光度计,南京菲勒仪器有限公司;SPectraMax reg iD3 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;DYY-6C 型电泳仪、DYY-24D 型电泳槽、DYCZ-40D 转印电泳仪,上海雅酶生物医药科技有限公司;BSA124S-CW 分析天平、pb-10 pH 计,德国 Sartorius 公司;521-1 恒温磁力搅拌器,上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司。

1.3 混合蛋白样品的制备

1.3.1 大豆-牛奶混合物的制备

将 150 g 大豆用质量分数为 0.5%的 NaHCO_3 溶液在室温下浸泡 12 h，冲洗沥干后与 600 mL 水一起加入豆浆机中进行磨浆处理，之后热水煮沸 5 min，用 200 目筛（74 μm ）过筛，在 95 $^\circ\text{C}$ 下煮沸 30 min 得到豆浆。将等量牛奶于 60 $^\circ\text{C}$ 水浴预热 10 min 后与豆浆按体积比 1:1 混合，得到豆奶混合物。

1.3.2 脱脂大豆-牛奶混合蛋白提取液的制备

取适量豆奶混合物样品，将 pH 值用 NaOH 调整至 8.0，并按 1:1（ m/V ）加入 Tris-HCl 缓冲液，以提高样品中蛋白组分的分散性并维持处理过程中的体系稳定性。随后按 1:2（ V/V ）加入正己烷，于 4 $^\circ\text{C}$ 下磁力搅拌萃取 4 h，以降低样品中脂质成分对后续酶法改性及免疫学检测的干扰。萃取后于 8 000 r min^{-1} 离心 30 min，收集去脂后的含蛋白样品层，分装并于 -20 $^\circ\text{C}$ 保存，作为后续酶法改性和相关检测所用样品。

1.4 试验方法

1.4.1 碱性蛋白酶水解工艺

碱性蛋白酶预处理的目的在于对双蛋白体系进行水解，降低部分大分子致敏蛋白完整性，并为后续交联酶改性提供较一致的底物基础。参考张贤莉等^[22]的方法，取适量样品加热至 55 $^\circ\text{C}$ ，用 2 mol L^{-1} NaOH 溶液调至 pH 值 8.5。按照酶-底物质量分数为 0.5%的比例加入碱性蛋白酶，反应开始并计时，整个反应过程中通过滴加 2 mol L^{-1} NaOH 溶液维持反应体系中 pH 值的稳定，反应达到 1.5 h 后，取样于沸水浴中保温 10 min 进行灭酶，得到碱性蛋白酶水解物^[23]。

1.4.2 两种交联酶工艺单因素试验

将 1.4.1 得到的碱性蛋白酶水解物分别与两交联酶进行交联反应，根据所选的交联酶种类，分别考察酶改性时间、温度、pH 值、酶/底物百分比 $[E]/[S]$ （以样品质量计）对水解物中主要致敏蛋白（ β -乳球蛋白和 β -伴大豆球蛋白）含量的影响，对上述酶改性产物进行单因素（ANOVA）试验。由于 TG 酶与 LAC 酶的最适催化条件存在差异，本研究在单因素和响应面试验中分别设置适宜的温度范围，以保证各酶在接近自身最适催化环境下评估其降敏效果。各因素设置水平见表 1 和表 2。

表 1 TG 酶单因素水平表

Table 1 Single-factor experimental levels for TGase treatment				
水平	因素			
	A 时间/h	B 温度/ $^\circ\text{C}$	C pH 值	D 酶底比 $[E]/[S]$
1	1	35	7	1
2	1.5	40	8	3
3	2	45	9	5
4	2.5	50	10	7
5	3	55	11	9

表 2 LAC 酶单因素水平表

Table 2 Single-factor experimental levels for LACase treatment				
水平	因素			
	A 时间/h	B 温度/ $^\circ\text{C}$	C pH 值	D 酶底比 $[E]/[S]$
1	4	30	3	30
2	6	40	4	40
3	8	50	5	50
4	10	60	6	60
5	12	70	7	70

1.4.3 两种交联酶工艺响应面试验

通过 Design-Expert 软件设计试验，根据 2 种交联酶改性工艺单因素试验结果，以单因素筛选得到的较优区域为中心点，并结合工艺可操作性设置上下水平。选用温度（ X_1 ）、时间（ X_2 ）、酶底比（ X_3 ）、pH 值（ X_4 ）4 个因素为自变量对 2 种交联酶改性的混合体系分别进行四因素三水平的响应面优化试验，通过熵权法进行多目标优化，

以 2 种致敏蛋白 (β -乳球蛋白与 β -伴大豆球蛋白) 降低率的综合评分为响应变量, 建立响应面的回归模型, 评估模型显著性、失拟项及交互作用效应。寻求最优响应值的因素水平, 以获得酶法改性的最佳工艺参数。

熵权法的具体步骤为: 对 2 种致敏蛋白降低率进行归一化处理, 将指标绝对值转化为相对值, 各指标数值压缩在 0~1 之间, 具体公式如式 (1) 所示; 随后计算各项指标权重 W_j , 具体公式如式 (2) 所示; 最后计算综合评分, 具体公式如式 (3) 所示:

$$X_{ij}^1 = \frac{X_{ij} - \min(X_{1j}, \dots, X_{mj})}{\max(X_{1j}, \dots, X_{mj}) - \min(X_{1j}, \dots, X_{mj})} \quad (1)$$

$$w_j = \frac{d_j}{\sum_{j=1}^n d_j} \quad (2)$$

$$M_i = \sum_{j=1}^m (X_{ij}^1 / \max(X_j) * w_j) \quad (3)$$

式中:

i ——第 i 个样本;

j ——第 j 个指标;

m ——样品数量;

X_{ij} ——标准化后的值;

$\min(x_j)$ ——第 j 个指标的最大值和最小值;

X_{ij}^1 ——每个样本在各项指标下的概率值;

d_j ——变异系数, $d_j = 1 - e_j (j = 1, 2, \dots, n)$;

n ——指标的数量;

W_j ——各项指标的权重;

M_i ——综合评分。

1.4.4 夹心式酶联免疫法测定豆奶混合物主要致敏蛋白含量

采用酶标仪测定样品在 450 nm 波长处的吸光度, 并绘制标准曲线, β -乳球蛋白与 β -伴大豆球蛋白的标准曲线经线性回归分析得到数学表达式分别为 $Y=0.015\ 3X-0.022\ 9$ ($R^2=0.999\ 1$) 与 $Y=0.013\ 3X+0.021$ ($R^2=0.999\ 3$), 其中, Y 为蛋白过敏原含量, (mg g^{-1}); X 为样品测试液于 450 nm 波长处的吸光度。对照组即不进行酶改性处理的混合蛋白样品, 根据试剂盒说明书的步骤测定主要致敏蛋白含量。致敏蛋白降低率按式 (4) 计算:

$$S = \frac{m_0 - m_1}{m_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

m_0 ——对照致敏蛋白含量, 即未经酶改性处理的部分致敏蛋白含量, mg g^{-1} ;

m_1 ——样品致敏蛋白含量, 即经酶改性处理的部分致敏蛋白含量, mg g^{-1} ;

S ——致敏蛋白降低率, %。

1.4.5 表面疏水性的测定

将样品经过研磨匀浆, 采用去离子水进行稀释, 使测试样品中蛋白质质量浓度为 $1.0\ \text{mg mL}^{-1}$, 取 $20\ \mu\text{L}$, $8.0\ \text{mmol L}^{-1}$ 的 ANS 溶液加入 $4.0\ \text{mL}$ 的样品液中, 混合均匀, 常温条件下暗反应 20 min, 测定前设置相应空白对照, 并以空白信号扣除背景荧光。ANS 荧光探针的激发波长设为 390 nm, 发射扫描范围为 400~600 nm, 激发狭缝和发射狭缝均固定为 5 nm。采用荧光强度表示样品中蛋白质表面疏水性的大小, 每个样品进行 3 次重复测定^[24]。

1.4.6 致敏小鼠血清样品的制备

本试验经东北农业大学校试验动物伦理委员会批准 (动物实验的伦理许可证号: NEAUEC2024 0454)。

4 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠（生产许可证号：SCXK（京）2016-0006），在适应性喂养 7 d 后随机分为 4 组，每组 10 只，并按实验分组进行饲养和处理。饲养环境温度 20~25 ℃，相对湿度 40%~70%。试验前，所有小鼠在动物房环境中进行适应性喂养 7 d。采用不含大豆蛋白、牛奶蛋白小鼠饲料 5 g d⁻¹，给予 BALB/c 小鼠分笼（10 只/笼）；自由饮用去离子水与进食，采用凯氏定氮法用于小鼠致敏和激发的豆奶混合样品蛋白质含量测定，并据此配制给样液。致敏阶段：在第 7、14、21、28 天试验组小鼠分别注射 0.3 mL 混合蛋白溶液（含 5 mg 混合蛋白+10 μg 明矾佐剂）于小鼠腹腔内腔。激发阶段：试验第 28 天用 0.5 mL 相应的蛋白溶液（含 20 mg 混合蛋白）灌胃激发小鼠。对小鼠禁食一夜后，处死小鼠并进行采血，将全血于室温静置 30 min 使其自然凝固，随后在 4 ℃ 下以 5 000 r min⁻¹ 的转速离心 10 min，收集上清样品，用于后续检测^[22,25]。

小鼠致敏模型制备血清样品简图见图 1。

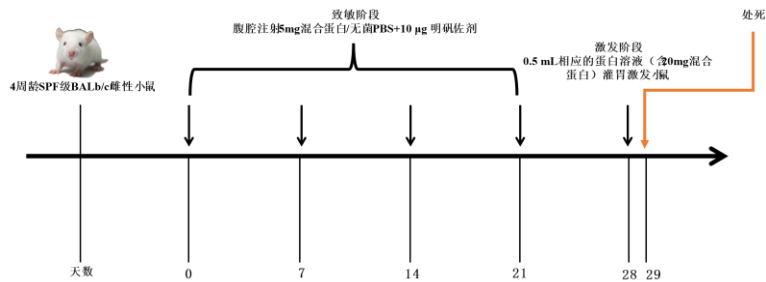


图 1 小鼠致敏模型制备血清样品简图

Fig.1 Schematic diagram of serum sample preparation from a mouse sensitization model

1.4.7 小鼠过敏症状评分

使用间接 ELISA 检测小鼠血清中过敏原特异性 IgE 水平。将豆奶混合蛋白抗原包被于酶标板中，4 ℃ 过夜，将样品封闭后与小鼠血清反应，并加入酶标二抗山羊抗小鼠 IgE 抗体。最后加入 TMB 溶液反应 15 min，用 2 mol L⁻¹ 稀硫酸终止反应，并在 450 nm 处测定吸光度，每次检验重复 3 次^[22]。

小鼠过敏症状评分标准见表 3。

表 3 小鼠过敏症状评分标准表

Table 3 Scoring criteria for allergic symptoms in mice

评分范围	过敏反应表现
0	无症状，状态正常。
0.1~1.9	轻微过敏反应：15 min 内鼻部和口部抓挠少于 10 次。
2~2.9	轻度过敏反应：眼睛和口周轻度浮肿，或 15 min 内鼻部和口部抓挠超过 10 次。
3~3.9	中度过敏反应：眼睛和口周明显浮肿，并伴有频繁抓挠等较明显局部过敏症状。
4~4.9	较重过敏反应：出现喘息、呼吸困难、口周和尾部发绀、腹泻、行走困难等全身性症状。
5~5.9	重度过敏反应：刺激后无活动，呈明显衰竭状态。
≥6	极重度过敏反应：濒死或死亡。

1.4.8 免疫印迹法

采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳后参照 PI 等^[26]的方法，并稍加改动，将凝胶中的样品转移到 PVDF 转移膜（0.45 μm）上 1.5 h。用 5% 脱脂奶粉（m/V）在 37 ℃ 的 TBST 中封闭 PVDF 膜 60 min，用 TBST 洗涤 3 次，每次 15 min，并与致敏小鼠血清（稀释 1:70）在 4 ℃ 下孵育过夜。洗涤后，将 PVDF 膜与山羊抗鼠 IgE HRP 偶联物（稀释 1:3 000）在 37 ℃ 下孵育 60 min。洗涤后，将 PVDF 膜与超级 ECL 蛋白质印迹底物在 25 ℃ 下孵育 10 min，然后使用 Western-bolt 增强型新型化学发光检测器进行检测。

1.5 数据分析

采用统计学软件 SPSS24 对试验数据进行方差分析、相关性和差异显著性（P<0.05）分析；采用 Origin 2020 软件作图；数据及方差分析利用响应面分析的 Design-Expert 软件进行^[27]。

2 结果与讨论

2.1 酶改性工艺单因素试验结果

2.1.1 时间对主要致敏蛋白含量的影响

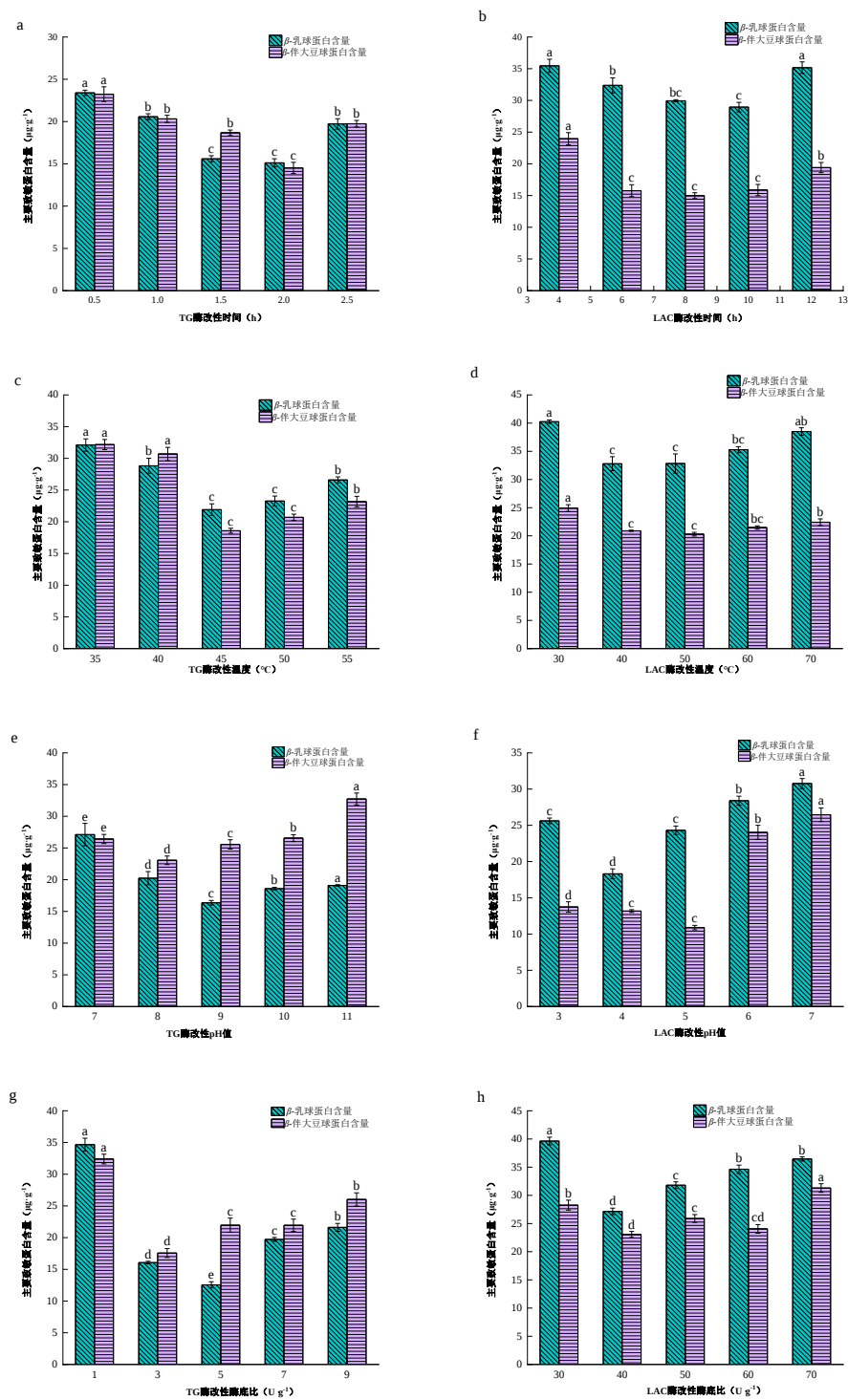


图 2 不同因素对主要致敏蛋白含量的影响

Fig.2 Effect of different factors on the content of major sensitizing proteins

注：上标字母表示不同交联酶的单因素分析图，数据以均值±标准差表示（ $n=3$ ），误差线表示标准差，不同小写字母表示组间差异显著（ $P<0.05$ ），下同。

不同时间对致敏蛋白含量的影响如图 2a、b 所示。当两种交联酶改性温度分别固定为 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、pH 值 8 和 4、酶底比 3 U g^{-1} 和 40 U g^{-1} 时，随着两种交联酶改性时间的延长，致敏蛋白含量整体呈先下降后升高的趋势，

当TG酶改性2 h时、LAC酶改性8 h时,两种致敏蛋白总含量达到最低。由于在酶改性初期,酶活力较强,底物质量浓度也相对较高,两种酶的结合位点较多,致敏蛋白被改性的速度较快,随着时间的推移和酶改性产物质量浓度的积累,致敏蛋白对酶改性反应产生了抑制作用,进而使得酶改性反应的速率降低^[28]。综上,选择两种交联酶的改性时间分别为2 h和8 h进行后续优化试验。

2.1.2 温度对主要致敏蛋白含量的影响

不同温度对致敏蛋白含量的影响如图2c、d所示。本试验分析30~70℃温度范围内致敏蛋白的变化,当两种交联酶改性时间分别固定为2 h和8 h、pH值8和4、酶底比3 U g⁻¹和40 U g⁻¹时,随着两种交联酶改性温度的升高,致敏蛋白含量整体呈先减少后增加的趋势,当两种酶改性温度分别为35℃和30℃时,致敏蛋白含量均较高,可能是因为低温条件不利于酶交联反应。当温度由40℃升至45℃过程中混合体系的总致敏蛋白逐渐下降,45℃时TG酶改性混合体系总致敏蛋白达到最低值;50℃时LAC酶改性混合体系总致敏蛋白达到最低值。而当温度高于50℃时,两种酶改性混合体系致敏蛋白含量又逐步升高,这是因为温度过高会导致酶的失活。综上,选择两种交联酶的改性温度分别为45℃和50℃进行后续优化试验。

2.1.3 pH值对主要致敏蛋白含量的影响

不同pH值对致敏蛋白的影响如图2e、f所示。当两种交联酶改性时间分别固定为2 h和8 h、温度为45℃和50℃、酶底比为3 U g⁻¹和40 U g⁻¹时,pH值对混合体系的影响主要体现在pH值对两种交联酶活性的影响上,TG酶最适pH值在9左右,当pH值大于9时致敏蛋白含量逐渐增加;LAC酶最适pH值在4左右,当pH值大于4时致敏蛋白含量逐渐增加。考虑到pH值会对酶处理底物产生影响,进而影响酶改性效率,且过高的pH值会在酸碱调节过程中引入过多盐分,进而影响后续混合物的风味,因此选择TG酶最适pH值为8,LAC酶最适pH值为4进行后续优化试验。

2.1.4 酶底比对主要致敏蛋白含量的影响

不同加酶量对致敏蛋白含量的影响如图2g、h所示。当两种交联酶改性时间分别固定为2 h和8 h、温度为45℃和50℃、pH值为8和4时,随着酶量的增加,豆奶混合体系的总致敏蛋白含量逐渐下降,当TG酶的酶底比为3 U g⁻¹,LAC酶的酶底比为40 U g⁻¹时,混合体系总致敏蛋白含量达到最低水平,这是因为随着酶添加量的提高,底物与酶结合概率更大,使致敏蛋白进一步水解与交联。当TG酶的酶底比从7~9 U g⁻¹,LAC酶的酶底比从50~70 U g⁻¹时,致敏蛋白含量上升,继续提高酶量对混合蛋白体系致敏性影响较小。这可能因为随着酶量的增加,由前期酶解产生的小分子肽与两交联酶结合,从而使酶与底物的结合受限。从效率与节约成本的角度考虑,选择两交联酶的酶底比分别为3 U g⁻¹和40 U g⁻¹进行后续优化试验。

2.2 酶改性工艺响应面优化试验结果

2.2.1 响应面试验设计及结果

两种酶改性工艺优化试验设计方案与结果如表4和表5所示。

表4 TG酶响应面试验方案及结果

Table 4 Design and results of the response surface experiment for TGase modification							
试验编号	温度	时间	酶底比	pH值	β-乳球蛋白降低率	β-伴大豆球蛋白降低率	综合评分
1	45	2	5	9	39.82±0.12 ^a	34.89±0.39 ^b	0.46
2	45	1.5	7	7	73.82±1.52 ^a	66.79±0.14 ^b	0.86
3	45	1	3	8	47.21±0.21 ^b	66.15±0.11 ^a	0.70
4	45	1.5	5	8	74.95±0.69 ^a	74.11±2.10 ^b	0.91
5	50	1.5	5	9	48.03±2.12 ^a	18.00±0.36 ^a	0.40
6	45	1.5	5	8	73.43±1.34 ^b	76.58±3.78 ^a	0.92
7	40	2	5	8	53.62±1.12 ^b	72.01±0.79 ^a	0.77
8	45	2	3	8	46.14±0.48 ^b	57.96±1.04 ^a	0.64
9	45	1.5	5	8	75.89±0.56 ^a	72.01±0.11 ^b	0.90
10	45	2	5	7	68.50±0.82 ^b	82.98±1.47 ^a	0.93
11	50	1.5	5	7	76.82±0.31 ^a	69.41±1.79 ^b	0.89

12	40	1.5	7	8	50.28±2.32 ^a	43.48±1.01 ^b	0.57
13	40	1	5	8	44.27±2.21 ^a	36.52±0.84 ^b	0.49
14	45	1.5	5	8	76.08±0.79 ^b	78.58±3.24 ^a	0.94
15	45	1.5	5	8	73.35±1.32 ^a	69.77±3.15 ^b	0.87
16	45	1	7	8	48.21±1.43 ^b	58.00±0.79 ^a	0.65
17	45	2	7	8	47.79±2.13 ^b	59.42±3.01 ^a	0.66
18	50	1	5	8	55.19±0.62 ^b	66.07±1.03 ^a	0.74
19	45	1.5	7	9	45.14±2.17 ^a	23.09±1.08 ^b	0.41
20	45	1.5	3	7	69.86±0.32 ^b	86.72±2.03 ^a	0.96
21	45	1	5	7	69.00±0.52 ^b	69.93±1.89 ^a	0.85
22	40	1.5	3	8	59.45±0.11 ^b	64.05±1.70 ^a	0.76
23	40	1.5	5	7	70.19±2.14 ^a	63.09±0.32 ^b	0.81
24	40	1.5	5	9	49.80±1.77 ^a	42.39±1.45 ^b	0.56
25	50	1.5	3	8	54.95±1.25 ^a	48.13±0.83 ^b	0.63
26	50	1.5	7	8	57.63±3.79 ^b	59.40±0.21 ^a	0.72
27	45	1.5	3	9	47.18±2.02 ^a	40.37±1.65 ^b	0.53
28	45	1	5	9	42.49±1.21 ^a	29.79±0.75 ^b	0.44
29	50	2	5	8	48.34±2.72 ^a	46.17±0.39 ^b	0.58

注：表中上标不同小写字母表示差异性显著（ $P<0.05$ ）。下表同。

表5 LAC 酶响应面试验方案及结果

Table 5 Design and results of the response surface experiment for laccase modification

试验编号	温度	时间	酶底比	pH 值	β -乳球蛋白降低率	β -伴大豆球蛋白降低率	综合评分
1	30	8	50	3	45.51±2.81 ^b	52.62±0.62 ^a	0.72
2	40	10	40	4	52.78±1.79 ^b	61.07±2.12 ^a	0.83
3	50	8	40	4	43.4±0.54 ^b	44.54±0.81 ^a	0.64
4	40	10	50	5	45.20±0.15 ^b	51.06±1.32 ^a	0.70
5	40	8	50	4	58.02±0.23 ^b	71.98±0.39 ^a	0.94
6	40	6	50	3	50.33±1.56 ^a	48.60±1.24 ^b	0.72
7	30	8	50	5	52.20±1.03 ^a	37.75±0.49 ^b	0.68
8	40	8	50	4	60.88±0.63 ^b	72.11±1.32 ^a	0.96
9	50	8	60	4	41.89±0.12 ^a	41.25±0.81 ^b	0.62
10	40	8	50	4	59.96±0.62 ^b	70.92±2.24 ^a	0.95
11	40	8	50	4	59.95±2.79 ^b	74.3±1.34 ^a	0.97
12	50	10	50	4	48.10±1.54 ^a	46.01±0.15 ^b	0.69
13	30	8	60	4	46.58±2.02 ^a	36.50±0.31 ^b	0.61
14	40	8	40	5	53.63±0.02 ^a	49.55±1.79 ^b	0.76
15	40	10	60	4	38.63±1.04 ^b	42.33±0.56 ^a	0.59
16	40	8	40	3	58.23±1.23 ^a	43.33±2.72 ^b	0.74
17	50	8	50	3	46.36±0.11 ^a	39.83±0.34 ^b	0.64
18	40	6	50	5	48.95±0.38 ^b	51.94±1.23 ^a	0.74
19	30	8	40	4	45.49±1.09 ^b	56.83±1.01 ^a	0.76
20	40	6	60	4	50.28±1.29 ^b	56.68±2.19 ^a	0.78
21	50	6	50	4	41.68±0.21 ^a	38.40±1.39 ^b	0.59
22	40	8	60	5	48.30±0.32 ^a	41.15±0.03 ^b	0.66
23	40	6	40	4	48.52±2.24 ^b	49.00±1.36 ^a	0.71

24	40	10	50	3	44.11±1.17 ^b	55.76±0.42 ^a	0.73
25	30	10	50	4	45.20±0.19 ^b	47.91±0.63 ^a	0.68
26	50	8	50	5	40.72±0.62 ^a	32.68±1.35 ^b	0.55
27	30	6	50	4	49.19±1.09 ^b	61.83±0.76 ^a	0.80
28	40	8	60	3	48.58±1.74 ^a	45.50±2.49 ^b	0.69
29	40	8	50	4	59.68±1.26 ^b	77.77±0.53 ^a	0.98

2.2.2 模型的建立与方差分析

利用 Design-Expert 软件对上述结果进行分析,得出 TG 酶改性后致敏蛋白降低率综合评分 Y_1 对酶改性温度(A)、时间(B)、酶底比(C)、pH 值(D)编码值的二次多项回归方程:

$$TG_{Y1} = -23.14 + 0.604A + 0.063B - 0.046C + 2.141D - 0.001AB + 0.007AC - 0.012AD + 0.003BC - 0.001BD - 0.002CD - 0.005A^2 - 0.001B^2 - 0.028C^2 - 0.109D^2$$

LAC 酶改性后致敏蛋白降低率综合评分 Y_2 对酶改性温度(A)、时间(B)、酶底比(C)、pH 值(D)编码值的二次多项回归方程:

$$LAC_{Y2} = -8.955 + 0.105A + 0.509B + 0.143C + 1.223D + 0.003AB + 0.001AC - 0.001AD - 0.004BC - 0.006BD - 0.001CD - 0.002A^2 - 0.026B^2 - 0.001C^2 - 0.134D^2$$

方差分析结果见表 6 和表 7,该模型的拟合方程线性关系显著,模型回归项显著 ($P < 0.0001$),失拟项不显著 ($P > 0.05$),模型拟合度 TG (R^2): 0.980, LAC (R^2): 0.983; TG (R^2_{Adj}) 为 0.961, LAC (R^2_{Adj}) 为 0.965,表明这两种模型均可有效模拟试验数据,故可利用这两种模型对响应最优值进行理论推测。通过 F 检验比较得知 TG 酶的各因子贡献率依次为: $D > C > B > A$,即 pH 值 > 酶底比 > 时间 > 温度。LAC 酶的各因子贡献率依次为: $A > C > D > B$,即温度 > 酶底比 > pH 值 > 时间。

表 6 TG 酶响应曲面回归模型方差分析

Table 6 Analysis of variance of the response surface regression model for TGase modification

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.8653	14	0.0618	50.1197	<0.0001**
A-温度	0.0000	1	0.0000	0.0082	0.9292
B-时间	0.0021	1	0.0021	1.6656	0.2178
C-酶底比	0.0100	1	0.0100	8.1365	0.0128*
D-pH 值	0.5196	1	0.5196	421.3251	<0.0001**
AB	0.0495	1	0.0495	40.1441	<0.0001**
AC	0.0184	1	0.0184	14.8881	0.0017**
AD	0.0148	1	0.0148	11.9705	0.0038**
BC	0.0011	1	0.0011	0.8565	0.3704
BD	0.0010	1	0.0010	0.8046	0.3849
CD	0.0001	1	0.0001	0.0732	0.7907
A ²	0.1125	1	0.1125	91.2426	<0.0001**
B ²	0.1168	1	0.1168	94.7392	<0.0001**
C ²	0.0806	1	0.0806	65.3425	<0.0001**
D ²	0.0770	1	0.0770	62.4442	<0.0001**
残差	0.0173	14	0.0012		
失拟项	0.0146	10	0.0015	2.2359	0.2276
纯误差	0.0026	4	0.0007		
总和	0.8826	28			

注: “**”表示高度显著 $P < 0.01$; “*”表示显著 $P < 0.05$,下同。

表 7 LAC 酶响应曲面回归模型方差分析

Table 7 Analysis of variance of the response surface regression model for laccase modification

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.410 2	14	0.029 3	56.400 5	<0.000 1**
A-温度	0.021 7	1	0.021 7	41.724 9	<0.000 1**
B-时间	0.001 2	1	0.001 2	2.387 7	0.144 6
C-酶底比	0.019 8	1	0.019 8	38.202 8	<0.000 1**
D-pH 值	0.001 9	1	0.001 9	3.706 3	0.074 8
AB	0.012 7	1	0.012 7	24.363 6	0.000 2**
AC	0.003 9	1	0.003 9	7.519 6	0.015 9*
AD	0.000 7	1	0.000 7	1.301 3	0.273 1
BC	0.022 7	1	0.022 7	43.602 3	<0.000 1**
BD	0.000 5	1	0.000 5	0.931 7	0.350 8
CD	0.000 7	1	0.000 7	1.301 3	0.273 1
A ²	0.203 7	1	0.203 7	392.041 9	<0.000 1**
B ²	0.070 4	1	0.070 4	135.553 8	<0.000 1**
C ²	0.100 0	1	0.100 0	192.588 7	<0.000 1**
D ²	0.117 2	1	0.117 2	225.690 7	<0.000 1**
残差	0.007 3	14	0.000 5		
失拟项	0.005 8	10	0.000 6	1.515 4	0.366 4
纯误差	0.001 5	4	0.000 4		
总和	0.417 5	28			

2.2.3 响应面优化试验结果

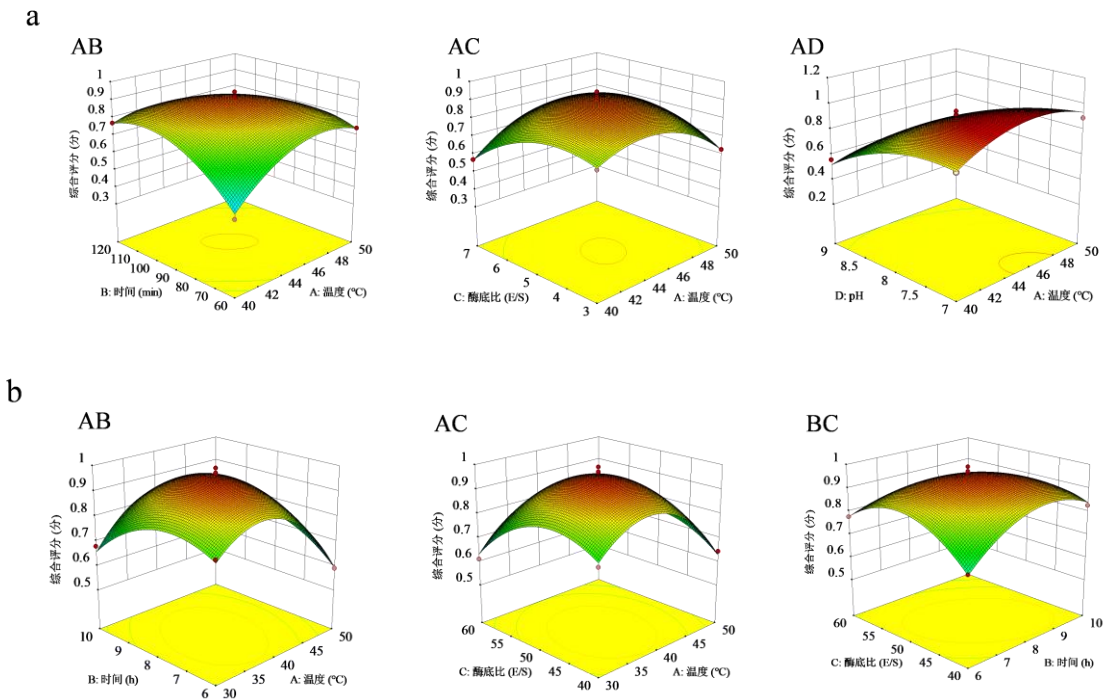


图 3 两种交联酶交互作用因素响应曲面

Fig.3 Factor response surface for the interaction of two cross-linking enzymes

注：a 表示 TG 酶因素交互作用；b 表示 LAC 酶因素交互作用。

通过 Design-Expert 软件深入分析各个因素之间的交互作用如图 3 所示，TG 酶的 AB、AC、AD 之间；LAC

酶的 AB、AC、BC 之间具有显著的交互作用 ($P<0.05$)。

基于响应面回归方程模拟优化,确定的 TG 酶最优工艺参数为:温度 49.39 °C,酶促时间 1.85 h,酶底比 5.43 U g⁻¹,pH 值 7.59,致敏蛋白降低率综合评分为 0.96,此时 2 种致敏蛋白降低率分别为:β-乳球蛋白降低率 70.12%;β-伴大豆球蛋白降低率 86.91% ($P<0.05$)。LAC 酶最优工艺参数为温度 44.55 °C,酶促时间 9.24 h,酶底比 53.78 U g⁻¹,pH 值 4.48,致敏蛋白降低率综合评分为 0.99,此时 2 种致敏蛋白降低率分别为:β-乳球蛋白降低率 59.73%;β-伴大豆球蛋白降低率 78.26% ($P<0.05$)。为了验证该模型准确性,使用优化后的参数再次进行试验,为方便操作,两酶条件参数分别设为温度 49 °C 和 44.5 °C,pH 值 7.5 和 4.5,酶底比 5 U g⁻¹ 和 54 U g⁻¹,酶改性时间 2 h 和 8 h。在此条件下试验 3 次,得出的综合评分最优值均为 0.98,此时 2 种致敏蛋白(β-乳球蛋白与 β-伴大豆球蛋白)降低率分别为 TG 酶:71.36%、87.03%;LAC 酶:58.24%、77.93%,与模型预测值在 5%偏差范围内,验证回归模型精度和边界参数可靠性^[29]。本研究结果显示,碱性蛋白酶预水解结合 TG 酶或 LAC 酶交联,均能显著降低双蛋白体系中 β-乳球蛋白和 β-伴大豆球蛋白含量,其中 TG 酶处理效果优于 LAC 酶。酶解处理可显著降低乳清蛋白和大豆蛋白的抗原性,而交联酶改性则可通过改变蛋白空间排布和表位可及性进一步降低 IgE 反应性。

2.3 表面疏水性对比分析

表面疏水性是表示蛋白质分子与水之间互相排斥的物理性质,对保持蛋白质的稳定性起到重要作用^[30]。图 4 表示两种交联酶处理后的蛋白表面疏水性的变化图。与未处理组相比,两种酶处理组的疏水性明显下降,且 TG 酶处理后的疏水性要比 LAC 酶处理后的疏水性显著降低,造成疏水性降低的原因可能是在交联酶存在的条件下,蛋白质分子内或者分子间发生交联反应形成高分子量的聚合物,将疏水性基团及疏水性的氨基酸包埋起来,从而使蛋白表面疏水性下降。Gauche 等^[31]的研究中发现,乳清蛋白经过 TG 酶处理后,谷氨酰胺和氨基会发生部分脱酰胺反应,产生带有负电荷的氨基酸(如谷氨酸和天冬氨酸),这可能也是导致蛋白表面疏水性下降的原因。另有关于高压均质联合酶法改性大豆蛋白的研究也发现,抗原性降低常与蛋白结构特征改变同步发生^[30]。表面疏水性仅能作为辅助性结构指标,应与 ELISA 及免疫印迹结果结合解释,而不能单独作为致敏机制的直接证据。

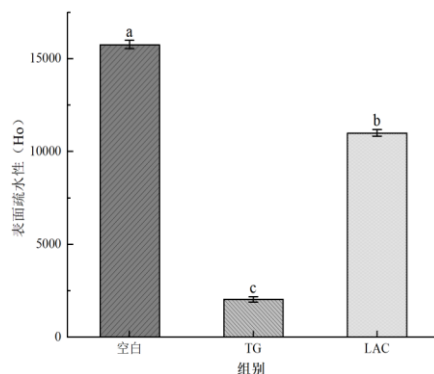


图 4 两种交联酶改性对豆奶混合蛋白表面疏水性的影响

Fig.4 Effect of two cross-linking enzyme treatments on the hydrophobicity of soy milk protein blends

2.4 小鼠过敏症状评分

在对 BALB/c 小鼠大剂量口服激发后,小鼠过敏症状评分结果如图 5a 所示。PBS 组没有明显的过敏反应,相比之下,混合蛋白致敏组的小鼠过敏评分最高,出现了刺激后无运动迹象、严重腹泻等明显的过敏反应。TG 酶和 LAC 酶改性组致敏能力显著减弱,仅观察到轻微的过敏反应。在食物过敏反应期间,免疫系统产生 IgE 抗体是评估体内致敏性的重要指标。如图 5b 所示,与 PBS 组相比,混合蛋白致敏组的 IgE 抗体水平显著升高,TG 酶和 LAC 酶改性组的 IgE 抗体水平显著低于致敏组 ($P<0.05$),且 TG 酶改性组 IgE 抗体水平最低。这是因为特异性抗体的产生需要淋巴细胞识别过敏原表位,而经酶改性后的混合蛋白表位被酶改性破坏,其诱导机体产生特异性抗体的能力急剧降低,从而导致过敏介质的减少。这一结果与已有低致敏乳清蛋白研究结果相一致,即酶解处理后蛋白的致敏性下降可同时体现在抗原水平降低和特异性 IgE 应答减弱两个层面^[32]。相比 LAC 酶处理组,TG 酶处理组表现出更低的 IgE 水平,说明其对抗原表位掩蔽或结构改变的作用更明显。

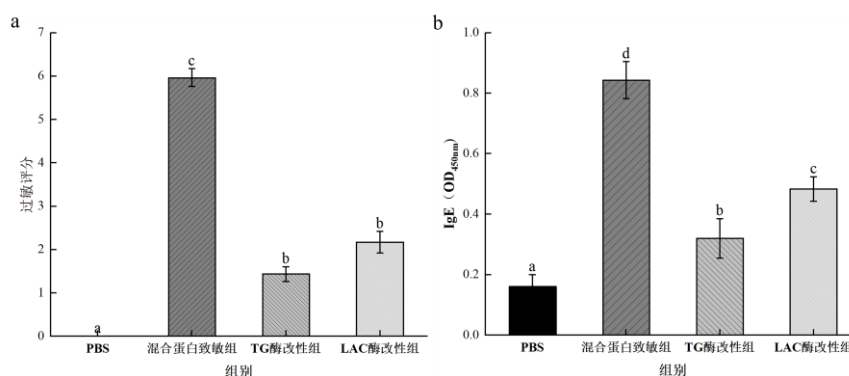


图5 不同酶改性处理对小鼠过敏反应症状评分及血清特异性 IgE 水平的影响

Fig.5 Effects of different enzymatic modification treatments on allergic symptom scores and serum specific IgE levels in mice (n=4)

注: a: 过敏反应症状评分; b: 血清特异性 IgE 水平。

2.5 蛋白质免疫印迹结果分析

不同酶改性蛋白免疫印迹结果见图 6。免疫印记结果表明对照中的两种蛋白质组分均发生了 IgE 抗体结合, 部分 β -乳球蛋白及分子质量低于 17 kDa 的小分子肽进一步降解为游离氨基酸^[33]。但 TG 酶改性 (泳道 2) 和 LAC 酶改性 (泳道 3) 两种致敏蛋白条带的 IgE 免疫反应信号未检出, 表明酶处理可能影响了相关蛋白组分的 IgE 结合特性。该结果表明, 两种交联酶均抑制了 IgE 与过敏原的结合, 表明两种交联酶改性产物中 IgE 结合能力降低。这直接证明了酶改性有效降低了混合蛋白的 IgE 结合能力, 从而可能降低了其致敏性。进一步比较发现, TG 酶改性产物的结合能力弱于 LAC 酶, 表明 TG 酶比 LAC 酶更有效地修饰或破坏了 IgE 结合位点, TG 酶催化的交联反应更有效地掩盖了抗原表位。酶法改性降低 IgE 结合能力的机制主要包括: 酶改性破坏了蛋白质中的线性和构象表位结构; 水解作用将大分子蛋白水解为小分子肽段, 降低了单个肽段携带完整表位的可能性; 交联反应掩盖或改变了原有的 IgE 结合位点。已有研究表明, 酶解可通过切断大分子致敏蛋白、降低完整表位连续性来削弱 IgE 识别, 而交联改性则可能通过空间位阻效应掩蔽表位^[19]。TG 酶比 LAC 酶更有效地修饰或破坏了 IgE 结合位点, TG 酶催化的交联反应更有效地掩盖了抗原表位, 因此表现出更低的 IgE 结合能力。

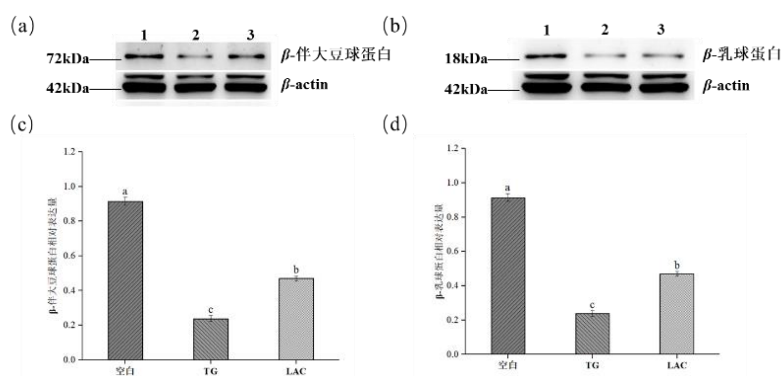


图6 豆奶混合蛋白经酶改性后的免疫印迹图

Fig.6 Immunoblotting of soy milk blend protein after enzymatic modification

注: 泳道 1: 未改性样品; 泳道 2: TG 酶改性样品; 泳道 3: LAC 酶改性样品。

3 结论

本研究以大豆-牛奶双蛋白混合物为原料, 采用“先水解后交联”的复合酶改性策略, 利用碱性蛋白酶联合转谷氨酰胺酶和漆酶处理混合蛋白, 并通过单因素试验和响应面优化, 系统考察温度、时间、酶底比及 pH 值对致敏性的影响。结果表明, TG 酶和 LAC 酶改性的最佳工艺参数分别为 49 °C、2 h、5 U g⁻¹、pH 值 7.5, 以及 44.5 °C、8 h、54 U g⁻¹、pH 值 4.5, 在此条件下, 两种代表性致敏蛋白降低率分别为 TG 酶处理组 71.36%和 87.03%, LAC

酶处理组 58.24%和 77.93%, 综合评价结果表明 TG 酶处理效果优于 LAC 酶。经两种交联酶改性后, 混合蛋白表面疏水性和 IgE 结合能力均显著下降, 说明酶法改性可降低样品中代表性致敏蛋白的 IgE 识别能力, 并减弱致敏相关反应, 其中 TG 酶处理效果优于 LAC 酶。其原因可能在于 TG 酶促进蛋白分子间形成更紧密的交联网络, 掩盖了更多疏水基团和致敏表位, 而 LAC 酶形成的交联结构相对疏松。免疫印迹结果进一步表明, 改性处理促进了 β -伴大豆球蛋白、部分 β -乳球蛋白及小分子肽的降解或结构改变, 从而削弱了蛋白的免疫识别能力。总体来看, 本研究为低致敏豆奶粉的制备提供了技术依据和理论支持, 也为酶法改性降低大豆及牛奶蛋白致敏性的机制研究奠定了基础。需要说明的是, 本文结论更适用于说明酶法改性对双蛋白体系中代表性动植物致敏蛋白及相关免疫反应的影响, 而非对牛奶和大豆全部致敏蛋白谱的完整评价。鉴于蛋白酶解可能导致苦味肽生成, 而交联改性可能影响风味释放行为, 后续仍需开展感官评价及风味组分分析, 以验证工艺的实际应用适宜性。

参考文献

- [1] 邢广良. 乳酸菌-MTG 酶共诱导条件下双蛋白乳的凝胶行为及其蛋白体外消化率和抗原性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019.
- [2] LIU L L, LI S Y, WANG S, et al. Mechanism of ultrasonic treatment affecting the conformation and properties of oat-whey dual-protein gel [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2026, 124: 107734.
- [3] LI X D, DAI H H, BAI Y H, et al. Enhancing the nutritional profile and in vitro digestion properties of dual-protein extrudates by blending surimi with soybean flour [J]. *LWT*, 2026: 119246.
- [4] LV W, CHEN W, TAN S, et al. Effects of removing phytic acid on the bioaccessibility of Ca/Fe/Zn and protein digestion in soymilk [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2024, 104(9): 5262-5273.
- [5] HENDERSON D, MURPHY C A, GLYNN A C, et al. Feeding practices and the prevalence of cow's milk protein allergy in Irish preterm infants [J]. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 2022, 35(3): 535-541.
- [6] YANG M, TAN M Z, WU J L, et al. Prevalence, characteristics, and outcome of cow's milk protein allergy in Chinese infants: a population-based survey [J]. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 2019, 43(6): 803-808.
- [7] RIASCOS J J, WEISSINGER S M, WEISSINGER A K, et al. The seed biotinylated protein of soybean (*Glycine max*): A boiling-resistant new allergen (Gly m 7) with the capacity to induce IgE-mediated allergic responses [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(19): 3890-3900.
- [8] WIEDERSTEIN M, BAUMGARTNER S, LAUTER K. Soybean (*Glycine max*) allergens: a review on an outstanding plant food with allergenic potential [J]. *ACS Food Science & Technology*, 2023, 3(3): 363-378.
- [9] 马晓明, 范俐妹, 张泽军, 等. 酶水解降低牛奶蛋白致敏性研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2024, 52(7): 53-59.
- [10] GOLKAR A, MILANI J M, VASILJEVIC T. Altering allergenicity of cow's milk by food processing for applications in infant formula [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(1): 159-172.
- [11] 喻晨, 詹飞, 苏爱华, 等. 蛋白质谷氨酰胺酶和复配蛋白酶对豌豆蛋白酶解的改性及其功能特性优化[J]. *现代食品科技*, 2025, 41(4): 46-53.
- [12] MAZEN KHALED A, SAMI K, HANI ABDULWAHID A, et al. Immobilization strategies for alkaline protease: a comprehensive overview from fundamental knowledge to recent advances in techniques and applications [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2026, 71: 103900.
- [13] ZHANG C Y, WANG C, ZHANG X M, et al. Recent advances in laccase: from molecular characteristics to advanced applications in biocatalysis, immobilization, and nanozymes [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2026, 14(1): 121035.
- [14] 谭宏凯, 邱毓, 陈思懿, 等. 低致敏水解乳清粉的制备及其致敏性评估[J]. *食品科学技术学报*, 2024, 42(5): 168-178.
- [15] CHAEYOON L, WONHUI L, YOUNGSHIN H, et al. Effect of proteolysis with alkaline protease following high hydrostatic pressure treatment on IgE binding of buckwheat protein [J]. *Journal of Food Science*, 2017, 82(3): 834-839.
- [16] LIANG X N, YANG H, SUN J, et al. Effects of enzymatic treatments on the hydrolysis and antigenicity reduction of natural cow milk [J]. *Food Science & Nutrition*, 2021, 9(2): 985-993.
- [17] YIN H C, ZHANG X R, HUANG J. Study on enzymatic hydrolysis of soybean β -conglycinin using alkaline protease from *Bacillus subtilis* ACCC 01746 and antigenicity of its hydrolysates [J]. *Grain & Oil Science and Technology*, 2021, 4(1): 18-25.
- [18] 卢洪亮, 郑晓艳, 付泽世, 等. 豆奶粉主要致敏蛋白及降低致敏性方法研究进展[J]. *食品科学*, 2024, 45(22): 329-340.

- [19] XING G L, HUI T R, LIU J, et al. Impact of transglutaminase-mediated crosslinking on the conformational changes in a dual-protein system and IgE reactivity of soy protein [J]. *Molecules*, 2024, 29(14): 3371.
- [20] LIANG L T, TIAN S L, AHMED I, et al. Effect of laccase-catalyzed cross-linking on the structure and allergenicity of *Paralichthys olivaceus* parvalbumin mediated by propyl gallate [J]. *Food Chemistry*, 2019, 297: 124972.
- [21] YU X X, LIU C, LU M H, et al. Impact of enzymatic hydrolysis followed by transglutaminase-induced cross-linking on decreasing antigenicity and reserving partial interfacial properties of whey protein isolate [J]. *Food & Function*, 2019, 10(3): 1653-1660.
- [22] 张贤莉,黄玉浩,韩玥颖,等.两步酶解法制备低致敏性乳清蛋白及其致敏性评价[J].食品安全质量检测学报,2024,15(7):103-112.
- [23] 王章存,袁路阳,张露,等.酶解大豆分离蛋白的抗原活性变化及其抗原表位分析[J].食品科学,2019,40(10):64-69.
- [24] HAN S, CUI F, MCCLEMENTS D J, et al. Structural characterization and evaluation of interfacial properties of pea protein isolate-EGCG molecular complexes [J]. *Foods*, 2022, 11(18): 2895.
- [25] DING J, QI L B, ZHONG L M, et al. Conformation-activity mechanism of alcalase hydrolysis for reducing in vitro allergenicity of instant soy milk powder [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2024, 72(18): 10627-10639.
- [26] PI X W, LIU J F, SUN Y X, et al. Investigation of the differences in the effect of (-)-epigallocatechin gallate and proanthocyanidins on the functionality and allergenicity of soybean protein isolate [J]. *Food Chemistry: X*, 2023, 17: 100566.
- [27] 吴长玲,王冬梅,魏冬旭,等.风味酶控结合乳化修饰技术制备多肽脱苦豆乳(粉)工艺[J].中国食物与营养,2018,24(5):29-34.
- [28] VELAZQUEZ-DOMINGUEZ A, HIOLLE M, ABDALLAH M, et al. Transglutaminase cross-linking on dairy proteins: Functionalities, patents, and commercial uses [J]. *International Dairy Journal*, 2023, 143: 105688.
- [29] 赵思琪,张华娟,罗曜,等.红外辐射制备柠檬酸糯米淀粉酯工艺优化及功能特性[J].农业工程学报,2021,37(10): 261-268.
- [30] 胡晓利,布冠好.高压均质与酶法联合改性对大豆蛋白抗原性及结构的影响[J].河南工业大学学报(自然科学版),2018,39(6):29-35.
- [31] GAUCHE C, VIEIRA J T C, OGLIARI P J, et al. Crosslinking of milk whey proteins by transglutaminase [J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(7): 788-794.
- [32] KNIPPING K, BUELENS L, SIMONS P J, et al. An in vitro and in vivo translational research approach for the assessment of sensitization capacity and residual allergenicity of an extensive whey hydrolysate for cow's Milk-Allergic infants [J]. *Foods*, 2022, 11(14): 2005.
- [33] MILESSI T S, LPES L A, NOVELLI P K, et al. Improvement of functional properties of cow's milk peptides through partial proteins hydrolysis [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2022, 59(11): 4520-4529.