刘向军, 张雨婷, 王学东, 等. 不同蛋白酶酶解对小麦面筋蛋白酶解效果及结构的影响 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 54−62. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100314

LIU Xiangjun, ZHANG Yuting, WANG Xuedong, et al. Effect of Different Proteases on the Enzymatic Hydrolysis Efficiency and Structure of Wheat Gluten[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 54−62. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100314

· 研究与探讨 ·

不同蛋白酶酶解对小麦面筋蛋白酶解效果及结构的影响

刘向军[1], 张雨婷[2,3], 王学东[2,3,*], 吴　艳[2,3,*], 李　库[1], 胥　怀[1]

（1.安琪酵母股份有限公司, 酵母功能湖北省重点实验室, 湖北宜昌 443000;
2.武汉轻工大学, 农产品加工与转化湖北省重点实验室, 湖北武汉 430000;
3.武汉轻工大学, 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 湖北武汉 430000）

摘　要: 本文旨在研究木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶+TG 酶组合和木瓜蛋白酶+碱性蛋白酶组合酶解对面筋蛋白的酶解效果及对其结构的影响。研究以水解度、三氯乙酸氮溶指数（TCA-NSI）和分子量分布等为指标，判断酶解效果。利用傅里叶红外光谱、内源荧光光谱、紫外光谱等方法，测定了表面疏水性、游离巯基和蛋白质微观结构，系统表征了酶解产物的结构变化。结果表明，酶解处理显著提高了小麦面筋蛋白的水解度；表面疏水性和游离巯基含量的增加表明蛋白质三级结构发生显著改变；二级结构分析显示，小麦面筋蛋白中，β-折叠结构减少，无规则卷曲增加；对比酶解前后分子量分布结果表明，木瓜蛋白酶+碱性蛋白酶组合能够更有效地水解小麦醇溶蛋白；此外，微观结构变化也表明酶解处理显著改变了蛋白质分子的构象。因此，本研究为小麦面筋蛋白酶解后结构变化的研究提供了理论支持，并为开发高溶解度、高功能性的面筋蛋白产品提供了科学依据。

关键词: 小麦面筋蛋白, 酶法改性, 水解度, 分子量分布, 结构

中图分类号: TS210.1　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0054−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024100314　　本文网刊:

Effect of Different Proteases on the Enzymatic Hydrolysis Efficiency and Structure of Wheat Gluten

LIU Xiangjun[1], ZHANG Yuting[2,3], WANG Xuedong[2,3,*], WU Yan[2,3,*], LI Ku[1], XU Huai[1]

（1.The Hubei Provincial Key Laboratory of Yeast Function, Angel Yeast Co., Ltd., Yichang 443000, China;
2.Hubei Key Laboratory for Processing and Transformation of Agricultural Products, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430000, China;
3.Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil Ministry of Education, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430000, China）

Abstract: This study aimed to investigate the enzymatic hydrolysis effects of papain, alkaline protease, neutral protease, alkaline protease TG enzyme combination, and papain alkaline protease combination on gluten protein and their impact on its structure. The degree of hydrolysis, trichloroacetic acid nitrogen solubility index (TCA-NSI), and molecular weight distribution were used as evaluation indicators to the enzymatic hydrolysis. The surface hydrophobicity, free thiol groups, and protein microstructure were determined using Fourier transform infrared spectroscopy, intrinsic fluorescence spectroscopy, UV spectroscopy, and other methods, and the structural changes of enzymatic hydrolysis products were

收稿日期: 2024−10−28

基金项目: 校企合作项目; 武汉轻工大学校立项目（31271828）。

作者简介: 刘向军（1986−）, 男, 硕士, 研究方向: 植物蛋白开发与利用, E-mail: liuxjc@angelyeast.com。

*** 通信作者:** 王学东（1974−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 谷物食品的研究与开发, E-mail: xuedongwuhan@163.com。

吴艳（1989−）, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 谷物食品的研究与开发, E-mail: wuyan23@163.com。

systematically characterized. The results showed that enzymatic hydrolysis significantly increased the degree of hydrolysis of wheat gluten protein. The increase in surface hydrophobicity and free thiol content indicated significant changes in the protein's tertiary structure. Secondary structure analysis showed that in wheat gluten protein, the *β*-folding structure was transformed into irregular curls. The comparison of molecular weight distribution before and after enzymatic hydrolysis showed that the papain alkaline protease combination could more effectively hydrolyze wheat soluble protein. In addition, changes in the microstructure indicated that enzymatic hydrolysis altered the conformation of protein molecules. Therefore, this study provides theoretical support for the study of structural changes in wheat gluten after protein hydrolysis, and provides scientific basis for the development of high solubility and high functionality gluten protein products.

Key words: wheat gluten protein; enzymatic modification; degree of hydrolysis; molecular weight distribution; structure

小麦是世界上消费量第二大的粮食作物，也是全球产量第三大的作物，占全球谷物产量的 30%，仅次于玉米和水稻[1]。我国是小麦种植面积最大、总产量最多的国家，2023 年我国小麦总产量约为 1.34×10^8 吨[2]。小麦面粉中的蛋白质含量为 9%~14%[3]，根据溶解特性不同分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白[4]。醇溶蛋白和麦谷蛋白统称为小麦面筋蛋白[5]。麦谷蛋白是一种大分子聚合体，分子质量约为 40~300 kDa[6]。不同小麦品种的麦谷蛋白均由 17~20 种不同的多肽亚基组成，它们通过分子内和分子间的二硫键连成纤维状[7]。小麦面筋蛋白含有大量人体必需氨基酸[8]，具有低过敏性、较好的乳化稳定性和泡沫稳定性等特点[9]。然而由于面筋蛋白独特的结构及其氨基酸主要为疏水性氨基酸，降低了其在水中的溶解度，使得小麦蛋白的应用受到一定程度的限制[10]。

酶解技术的发展为提高面筋蛋白溶解性提供了一条有效途径。近年来，生物酶解法改性小麦蛋白已经成为小麦蛋白深加工研究领域中的热点之一[11]。魏芸锦等[12] 研究了分步酶解小麦面筋蛋白制备低苦味肽粉的工艺。董彩虹等[13] 对复合酶法制备小麦面筋蛋白咸味酶解液的工艺进行了优化研究。雷声等[14] 利用蛋白酶对小麦面筋蛋白进行可控酶解制备最适美拉德反应前体肽。从上述报道可以看出，目前对面筋蛋白的研究集中在酶解工艺优化及酶解产物功能性质方面，缺乏系统报道酶解对小麦面筋蛋白的溶解性及结构的影响。

本研究将对比木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶-TG 酶组合、木瓜蛋白酶-碱性蛋白酶组合酶解对面筋蛋白的酶解效果，并利用傅里叶红外光谱、内源荧光光谱、紫外光谱等技术，测定其表面疏水性、游离巯基及蛋白质微观结构的变化情况，旨在为改善小麦面筋蛋白的溶解性和功能特性提供科学依据，并为开发新型功能性食品原料奠定理论基础。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

小麦面筋蛋白　封丘县华丰粉业有限公司；AP-200A 碱性蛋白酶、NP-100a 中性蛋白酶、PA-2 木瓜蛋白酶、GLU100 谷氨酰胺转氨酶　食品级，安琪酵母股份有限公司；Page Ruler 预染蛋白 Marker　赛默飞世尔科技公司；SDS-PAGE 电泳凝胶配制试剂盒、SDS-PAGE 电泳 5×上样缓冲液　碧云天生物；SDS-PAGE 电泳缓冲液、考马斯亮蓝快速染色液、二硫苏糖醇　广州硕谱生物科技有限公司；十二烷基硫酸钠、邻苯二甲醛、丝氨酸、8-苯胺-1-萘磺酸、5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)　分析级，阿拉丁试剂有限公司；溴化钾　光谱级，阿拉丁试剂有限公司；十水四硼酸钠、三氯乙酸、盐酸、氢氧化钠、无水乙醇、三羟甲基氨基甲烷　分析级，国药集团化学试剂有限公司；Tricine-SDS-PAGE 2×上样缓冲液、Tricine-SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、超低分子量 Marker　北京索莱宝科技有限公司。

SHJ-6D 磁力搅拌水浴锅　常州金坛良友仪器有限公司；DYY-600c 蛋白电泳仪　北京东方瑞利电泳设备有限公司；Universal Hood Ⅲ凝胶成像仪　美国伯乐公司；ME104E/02 电子天平　梅特勒-托利多仪器有限公司；TGL-20bR 高速冷冻离心机　上海安亭科学仪器厂；EnSpire 多功能酶标仪、Frontier 傅里叶红外光谱　美国 PerkinElmer 仪器有限公司；LGJ-10C 真空冷冻干燥机　四环福瑞科仪科技发展有限公司；F4600 荧光分光光度计、SU8600 扫描电子显微镜　株式会社日立制作所。

1.2　实验方法

1.2.1　酶解蛋白样品的制备　选取木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶对小麦面筋蛋白进行单酶水解。经过预实验，底物浓度为 8%，选取碱性蛋白酶+TG 酶，木瓜蛋白酶+碱性蛋白酶两种双酶分步水解(其中碱性蛋白酶、TG 酶及木瓜蛋白酶加酶量如表 1 所示)，在最适条件下酶解小麦面筋蛋白。酶解实验过程参照本实验室任秋燕[15] 的方法进行。具体操作如下：称取小麦面筋蛋白和去离子水于 250 mL 的烧杯中，在磁力搅拌水浴锅内匀浆配制成相应浓度的悬浮液，待悬浮液中心温度升至蛋白酶作用最适温度后，用 1 mol/L NaOH/HCl 调节至最适 pH(±0.02)，加入蛋白酶在最适温度下反应。反应过程中不断搅拌并加入 1 mol/L NaOH/HCl 保证体系 pH 恒定。酶解完成后于 100 ℃ 水浴中加热 10 min 灭酶，冷却至室温后滴定至中性，8500 r/min 离心 20 min。上清液冷冻干燥保存待用。

表 1 蛋白酶最适酶解条件

Table 1 Optimal hydrolysis conditions for proteases

酶种类	最适温度(℃)	最适pH
木瓜蛋白酶	50	7
碱性蛋白酶	55	8
中性蛋白酶	50	7
TG酶	50	8

双酶分段水解实验操作如表 2 所示：第一段酶解反应结束后，100 ℃ 水浴中加热 10 min 灭酶，冷却后置于第二种酶的最适温度中预热 15 min，用 1 mol/L NaOH/HCl 调节至最适 pH 后加入第二种酶，后续操作同单酶酶解实验。

表 2 不同酶处理组

Table 2 Different enzyme treatment group

组别	酶水解	底物浓[S](%)	加酶量(U/g)	酶解时间(h)
1	木瓜蛋白酶	8	4000	3
2	中性蛋白酶	8	4000	3
3	碱性蛋白酶	8	4000	3
4	碱性蛋白酶+TG酶	8	4000+4000	3+3
5	木瓜蛋白酶+碱性蛋白酶	8	4000+4000	3+3

1.2.2 三氯乙酸氮溶指数(TCA-NSI)的测定 参照刘海梅等[16]的方法，配制 15% 的三氯乙酸溶液，与等体积的酶解液混合均匀静置 30 min。8000 r/min 离心 20 min。取上清液，采用 BCA 法测定其中蛋白质含量。利用公式(1)计算其 TCA-NSI：

$$\text{TCA}-\text{NSI}(\%)=\frac{\text{N}}{\text{N}_0}\times 100 \qquad \text{式（1）}$$

式中：N 为上清液中总氮含量，g；N_0 为酶解液中总氮含量，g。

1.2.3 蛋白质水解度的测定 使用 OPA(邻苯二甲醛)法测定酶解液的水解度[17]。

OPA 试剂：称取 7.62 g 十水四硼酸钠、0.2 g SDS，完全溶解于 150 mL 超纯水中，0.16 g 邻苯二甲醛完全溶解于 4 mL 无水乙醇中，转移至上述溶液中，最后加入 0.176 g DTT，超纯水定容至 200 mL。

丝氨酸标准溶液：称取 0.02 g 丝氨酸标准品，超纯水定容至 200 mL。

样品溶液：称取约 0.1 g 样品冻干粉(精确记录样品质量)，超纯水定容至 100 mL。

分别将 400 μL 超纯水、丝氨酸标准液、样品溶液与 3 mL OPA 试剂混合，避光反应 60 s，反应时间严格读秒，在 340 nm 处读取吸光度值。每个反应做 3 次平行。根据公式(2)~(4)计算样品水解度。

$$\text{SerineNH}_2=\frac{\text{样品OD}-\text{空白OD}}{\text{标品OD}-\text{空白OD}}\times\frac{0.9516\ \text{meqv}}{\text{L}}\times\frac{0.1\times 100}{\text{X}\times\text{P}}\text{L/protein} \qquad \text{式（2）}$$

式中：Serine NH_2 为 mmol serine NH_2/g 蛋白；X 为样品重量；P 为样品中的蛋白含量；L 为体积；0.1 为样品体积转换成 L 的系数。

h 的测定：

$$\text{h}=\left(\frac{\text{SerineNH}_2-\beta}{\alpha}\right)\text{meqv/g protein} \qquad \text{式（3）}$$

式中：α=1.00；β=0.40。

水解度(DH)的计算：

$$\text{DH}(\%)=\frac{\text{h}_1-\text{h}_0}{\text{h}_{\text{tot}}}\times 100 \qquad \text{式（4）}$$

式中：h_0 为水解反应前相对原始底物的水解度；h_1 为水解反应后相对原始底物的水解度；h_{tot} 为 8.30。

1.2.4 蛋白质分子量的测定 采用 SDS-PAGE 和 Tricine-SDS-PAGE 分析蛋白质分子量分布。

根据 Pi 等[18]的方法，使用 SDS-PAGE 测定酶解前后样品的分子量分布。按照试剂盒说明制备底物浓度为 12% 的分离胶和 5% 的浓缩胶。将样品溶液和 5×上样缓冲液以 1∶4 体积涡旋混匀，100 ℃ 煮沸 8 min，8000 r/min 离心 5 min 后取上清液上样。在电泳槽中加入适量电泳液，电泳初始电压设置为 80 V，运行 30 min 后调整为 120 V，直至溴酚蓝前沿接近凝胶底部时停止电泳。取下凝胶置于考马斯亮蓝染色液中染色 2 h，转入纯水中脱色，期间数次更换水，直至凝胶背景清晰透明。使用凝胶成像仪对染色后的凝胶进行拍照，通过与预染蛋白质标准品的分子量对比，确定酶解前后小麦面筋蛋白的分子量分布变化。

Tricine-SDS-PAGE 参考赵瑞芳[19]的方法进行。分离胶配制浓度为 16.5%，夹层胶配制浓度为 10%，浓缩胶配制浓度为 4%。将待测蛋白配制成 30 μg/μL 的溶液，取 20 μL 的样品溶液与等体积 2×Tricine-SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液混合并振荡 30 min，于 100 ℃ 下加热 8 min，涡旋混匀，冷却后以 8000 r/min 离心 60 s。将制备好的凝胶放入电泳槽中，拔掉梳子。内槽加入阴极缓冲液，外槽加入阳极缓冲液。将 Marker 与样品依次点入孔中。连通电泳仪电源，设置初始电压为 30 V，当样品到达分离胶上沿后，将电压调至 100 V，继续电泳直至溴酚蓝到达凝胶底部后关闭电源。电泳结束后，取下分离胶并放入固定液中固定 1 h，然后转移至考马斯亮蓝染色液染色 2 h。染色完成后进行脱色处理，脱色至背景完全干净后在凝胶成像系统进行结果分析。

1.2.5 蛋白质二级结构的测定 二级结构的测定参考 Rincón-aguirre 等的方法[20]，采用傅里叶红外光谱(FTIR)进行分析。准确称取 5 mg 样品粉末和 0.5 g 溴化钾研磨成粉末，放入模具置于压力机下压成半透明的均匀薄片，将样品片用夹片固定于红外光谱仪中扫描测定，以大气为扫描背景。扫描频率为 500~4000 cm^{-1}，以分辨率为 4 cm^{-1} 的频率扫描次数 64 次，每个样品进行 3 次平行实验。通过蛋白酰胺 I 带(1600~1700 cm^{-1})评估小麦面筋蛋白二级结构

相对含量的变化。用 Peakfit 分析样品的 α-螺旋(1650~1660 cm^{-1})、β-折叠(1618~1640 cm^{-1} 和 1670~1690 cm^{-1})、β-转角(1660~1670 cm^{-1} 和 1690~1700 cm^{-1})和无规则卷曲(1640~1650 cm^{-1})的相对含量。

1.2.6　紫外光谱分析　蛋白样品的紫外光谱也是反映蛋白三级结构变化的一种常用指标。将不同蛋白样品配制成浓度为 1 mg/mL 的溶液，测定 250~400 nm 波长段的吸收强度。

1.2.7　内源荧光光谱分析　采用荧光分光光度计分析不同处理的蛋白三级结构的变化。参考 Liu 等[21]的方法，用 65% 的乙醇将样品配制成浓度为 0.5 mg/mL 的样品溶液并置于光谱仪的样品槽中扫描，激发波长为 280 nm，发射波长为 300~500 nm，扫描速度为 1200 nm/min，反应时间为 0.5 s，PMT 电压为 500 V，激发和发射间隙波长为 5 nm。

1.2.8　表面疏水性(H_0)分析　参考 Yan 等[22]的方法，使用 ANS 作为荧光探针测定样品的表面疏水性。首先，使用磷酸盐缓冲液(PBS，0.01 mol/L，pH7.0)将蛋白冻干粉末配制为浓度范围为 0.1~0.5 mg/mL 的浓度梯度。再使用同样的 PBS 溶液制备浓度为 8 mmol/L 的 ANS 溶液。然后，将 20 μL ANS 溶液与 4 mL 待测样品溶液混匀，在 25 ℃ 下避光反应 25 min。最后，利用荧光光谱仪设定激发波长为 370 nm，发射波长为 470 nm，狭缝宽度为 5 nm，测定并记录待测溶液的相对荧光强度。荧光强度与蛋白质浓度曲线的初始斜率被记作 H_0。

1.2.9　游离巯基测定　采用 Ellman(DTNB)试剂法测定样品的游离巯基含量[23]。首先，将 3 mg 样品溶于 5 mL Tris-Gly-EDTA(10.42 g Tris，6.9 g 甘氨酸，1.2 g EDTA 定容至 1000 mL，调节 pH 为 8.0)缓冲液反应 30 min，再加入 40 μL Ellman 试剂，在室温 25 ℃ 下反应 30 min。最后，使用紫外分光光度计在 412 nm 处测定吸光值，使用 Tris-Gly-EDTA 缓冲液作为空白。根据公式(5)计算样品游离巯基(SH)的含量。

$$SH(\mu mol/g) = \frac{73.53 \times A_{412} \times D}{C} \qquad 式（5）$$

式中：A_{412} 为 412 nm 处的吸光值；D 为稀释系数；C 为蛋白样品的浓度(mg/mL)；73.53 为由 $10^6/(1.36\times10^4)$计算得出，1.36×10^4 为摩尔吸收率。

1.2.10　蛋白质微观结构的测定　将样品经过冷冻干燥后，使用双面碳带将样品粉末的薄层置于铜样品保持器上，并镀上 10 nm 厚的金以使样品导电。采用扫描电子显微镜在 15 kV 的加速电压放大 500 倍观察样品的微观结构。

1.3　数据处理

每个实验重复三次，实验数据以“平均值±标准差”表示，所得数据采用 Excel、Minitab 进行分析处理，显著性(P<0.05)检验方法为 Duncan 多重比较。使用 Origin 进行绘图。

2　结果与分析

2.1　水解度和 TCA-NSI

水解度是检测蛋白质水解效果的重要指标，酶解过程中，蛋白质被水解为较短的多肽或游离氨基酸，这些肽段和氨基酸的 N-末端均为 α-氨基。由图 1 可知，经过不同酶解处理的产物的水解度存在显著差异(P<0.05)，木瓜蛋白酶酶解水解度最低，碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶+碱性蛋白酶组合和碱性蛋白酶+TG 酶组合水解度较高。这是因为木瓜蛋白酶属于半胱氨酸蛋白酶，其作用位点相对单一，主要水解精氨酸、赖氨酸等碱性氨基酸的羧基端肽键。由于它能识别的肽键种类少，对蛋白质的切割不够全面，因此水解度低。而碱性蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶，作用位点更广泛。它能水解多种氨基酸(如丙氨酸、亮氨酸等)形成的肽键，对蛋白质的切割更充分，因此单独使用时水解度显著高于木瓜蛋白酶(P<0.05)。两种酶组合使用时，会通过“互补切割”进一步提升水解度，效果优于单一酶。

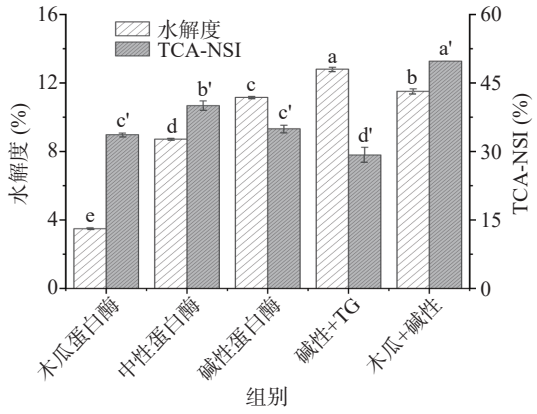


图 1　不同酶处理组的水解度和 TCA-NSI

Fig.1　Hydrolysis degree and TCA-NSI of samples at different enzymatic hydrolysis

注：图中不同小写字母表示组间差异显著(P<0.05)，图 7、图 8 同。

三氯乙酸(TCA)能够沉淀大分子蛋白质和较长的肽段，一般采用 10%~15% 的 TCA 处理水解物，可以沉淀大部分分子量大于 5 kDa 的多肽。因此 TCA 氮溶指数(TCA-NSI)可以用来表征水解产物中小分子肽的相对含量，小分子肽含量越高，蛋白质酶解情况越好。由图 1 结果可知，木瓜蛋白酶+碱性蛋白酶组合显示出最高的 TCA-NSI，达到 49.78%±0.02%，这说明木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的组合中的小分子多肽含量更高，这与其较高的水解度结果一致。

2.2　蛋白质的分子量分布

不同蛋白酶由于酶切位点不同，会产生不同组成和结构的水解产物。为了探究不同酶处理方案对小麦面筋蛋白分子量分布的影响，利用 SDS-PAGE 和 Tricine-SDS-PAGE 分析经过不同酶解方

案处理后的蛋白样品的分子量分布特征[24]。

通过不同酶解方案处理的蛋白样品的 SDS-PAGE 图谱如图 2 所示，可以看出，与未处理的小麦面筋蛋白相比，所有酶解样品中均不存在分子量大于 40 kDa 的蛋白质组分。然而，对于小于 40 kDa 的蛋白质组分，各组表现出差异。这说明经过木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶处理后，小麦面筋蛋白被裂解为小分子蛋白。但因为酶解程度的不同，木瓜蛋白酶酶解产物主要集中在 40 kDa 以下，中性蛋白酶酶解产物集中在 20 kDa 以下，碱性蛋白酶酶解产物集中在 15 kDa 以下，这与它们的水解度趋势一致。在这三组单酶处理样品中，均残留 35~40 kDa 的蛋白条带，这提示着在三种单酶处理组中，可能仍然存在着一定的 γ-醇溶蛋白（35~38 kDa）和低分子量谷蛋白（~40 kDa）[25]。碱性蛋白酶复合 TG 酶处理的样品由于 TG 酶的交联作用，小分子蛋白质重新聚合，使蛋白条带较碱性蛋白酶单酶处理有所加深，且仍然存在 35~40 kDa 的蛋白条带。而小麦面筋蛋白经过木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶双酶处理后条带几乎消失，仅在 10 kDa 附近有少量残留。35~40 kDa 的蛋白也被充分水解，这说明木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶组合能比其他酶解方案更有效地水解小麦醇溶蛋白。

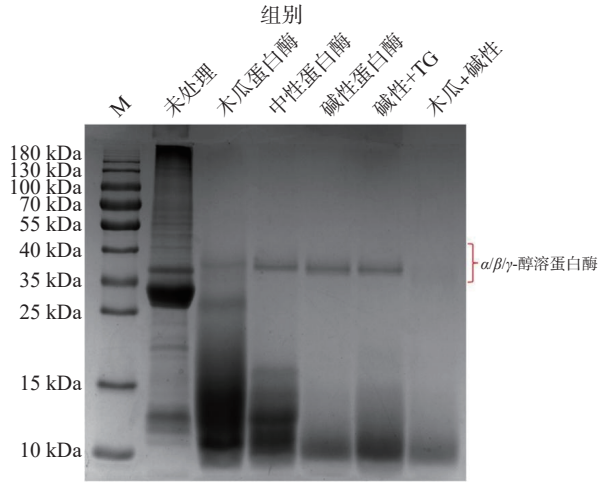


图 2 不同酶处理组酶解产物的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE profiles of hydrolysates obtained from different enzymatic hydrolysis schemes

Tricine-SDS-PAGE 利用 Tricine 代替了甘氨酸并使用 Tricine 缓冲体系，对于小分子蛋白质有更高的分辨率，常用来分析消化产物和酶解产物[26]。本文利用 Tricine-SDS-PAGE 进一步分析酶解产物在 30 kDa 以下的分布情况，如图 3 所示。木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶复合 TG 酶处理的样品在 31 kDa 以下存在明显条带，这说明在经过这些处理后的酶解产物中同工麦胚凝集素（~21 kDa）、抑制蛋白（~14 kDa）、氧硫还蛋白（~13.3 kDa）、非特异性脂转移蛋白酶（~9 kDa）、α-嘌呤硫蛋白（~12 kDa）等仍然未被降解[27]。经过碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶双酶处理的酶解产物只有 3.3 kDa 处有蛋白阴影，结合 SDS-PAGE 结果，木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶双酶处理已将小麦面筋蛋白绝大部分蛋白降解为 3.3 kDa 以下的小肽。

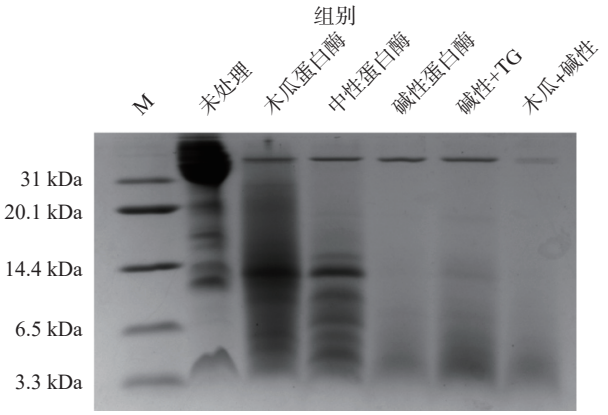


图 3 不同酶处理组酶解产物的 Tricine-SDS-PAGE 图谱

Fig.3 Tricine-SDS-PAGE profiles of hydrolysates obtained from different enzymatic hydrolysis schemes

2.3 蛋白质二级结构分析

蛋白质红外光谱由酰胺 Ⅰ带、酰胺 II 带、酰胺 III 带、酰胺Ⅳ、酰胺Ⅴ、酰胺 Ⅵ、酰胺Ⅶ、酰胺 A 带及酰胺 B 带组成，在 9 个特征吸收带中酰胺Ⅰ带（1600~1700 cm^{-1}）对蛋白质二级结构的研究最有意义[28]。为了得到不同处理方案对小麦面筋蛋白二级结构的影响，对红外光谱中酰胺 I 带进行去卷积和二

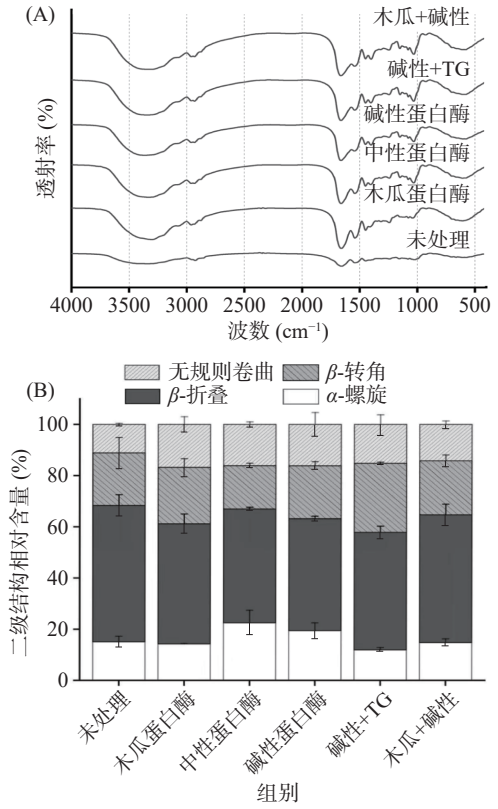


图 4 不同酶处理组酶解产物的 FTIR 图谱（A）和二级结构（B）

Fig.4 FTIR spectra (A) and secondary structure (B) of hydrolysates obtained from different enzymatic hydrolysis protocols

阶导数拟合分析。在蛋白质的二级结构中，α-螺旋和 β-折叠是组成蛋白质基本骨架的关键结构，具有较高的紧密度和稳定性[29]。通过计算不同处理条件下小麦面筋蛋白中 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规则卷曲等二级结构的相对含量，可以定量评估各处理方案对蛋白质构象的影响。经过不同处理的小麦面筋蛋白二级结构相对含量如图 4 所示。实验结果表明，未经处理的小麦面筋蛋白中 β-折叠相对含量最高。经酶解处理后，β-折叠相对含量呈现不同程度的下降，而无规则卷曲的比例则相应升高。这一结果说明酶解处理使小麦面筋蛋白二级结构发生了相互转化。这种转化意味着蛋白质分子的空间构象变得更加松散和无序。

2.4　紫外光谱分析

经过不同酶处理方案的样品紫外吸收光谱如图 5 所示，可知所有样品在 280 nm 处都有吸收峰。与未处理的小麦面筋蛋白相比，所有经过酶处理的样品在 280 nm 都出现了蓝移现象，这也证明酶解处理使蛋白质的构象改变，导致色氨酸发色团被置于极性较低、疏水性较强的微环境中[30]。此外，在 280 nm 附近出现的最大峰通常与蛋白质中酪氨酸和色氨酸残基的数量有关[31]。而其中未处理的小麦面筋蛋白吸光度值最低，这可能是由于小麦面筋蛋白在 PBS 中溶解度较差。

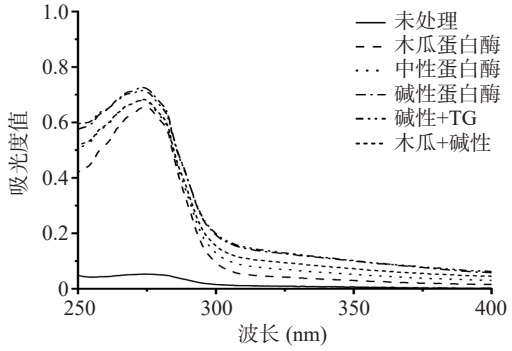


图 5　不同酶处理组酶解样品的紫外光谱

Fig.5　UV spectra of hydrolysates obtained from different enzymatic hydrolysis schemes

在经过不同酶解处理后，样品在 280 nm 处的吸光度值存在明显差异。木瓜蛋白酶处理组在 280 nm 处的吸光度值最低，碱性蛋白酶和经碱性蛋白酶和 TG 酶组合处理的吸光度值最高，这可能是由经过不同处理后蛋白质的结构不同导致的。由于碱性蛋白酶水解程度较高，对蛋白质结构的破坏能力更强，导致更多的芳香族基团暴露于溶剂中，故紫外吸收强度最高。由于谷氨酰胺转氨酶的交联作用，可能掩埋了部分发色基团，导致吸光度值下降。

2.5　内源荧光光谱分析

通过测定蛋白质的内源荧光可以反映蛋白质结构内的氨基酸微环境，有助于了解蛋白质的性质和三级结构的变化。

图 6 显示了不同酶解处理样品的荧光光谱，未处理的小麦面筋蛋白最大发射波长（λ_{max}）为 350.4 nm，经过木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、碱性蛋白酶和 TG 酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶双酶组处理后，样品的 λ_{max} 分别为 350.8、351.2、353.4、353.2、353.6 nm，均出现了不同程度的红移，这一结果表明，不同酶处理方案对蛋白构象造成了不同的影响。此外，荧光强度与发射荧光的基团暴露程度有关，因此可以反映蛋白质中生色团基团的变化[23]。其中未处理的小麦面筋蛋白在不同发射波长下的荧光强度与王淑敏[32] 的研究相似。一方面是由于小麦面筋蛋白的溶解度差，另一方面是因为具有荧光性的氨基酸被包裹在小麦面筋蛋白内部，从而显示出较低的荧光强度。经过酶解处理后的蛋白荧光值均显著增大，这是因为酶解处理影响了蛋白质的空间结构，使荧光发射基团暴露至亲水环境，导致氨基酸微环境极性增加。但不同酶解处理的样品荧光强度出现差异，这可能是因为不同蛋白酶的酶切作用位点不同导致酶解产物中肽段分布产生差异，受静电作用和疏水作用不同，从而在结构的再分配中出现差异，呈现出不同的荧光强度[23]。

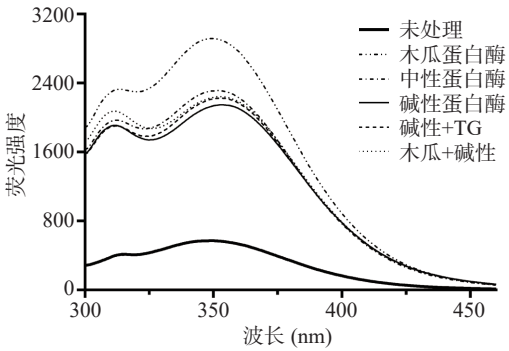


图 6　不同酶处理组酶解产物的荧光光谱

Fig.6　Fluorescence spectra of hydrolysates obtained from different enzymatic hydrolysis schemes

2.6　表面疏水性分析

ANS 荧光探针与蛋白质中暴露的疏水基团结合，通过测定荧光强度的变化可以表征蛋白质三级结构的改变。

由图 7 可知，经不同酶解处理后的小麦面筋蛋白的表面疏水性都有不同程度的增加，这可能是由于小麦面筋蛋白在酶解过程中蛋白质的三级结构被破坏，肽链展开，暴露更多的疏水性位点。在单酶处理组中，可以观察到表面疏水性与蛋白质水解程度呈相反的趋势，木瓜蛋白酶处理的样品 H_0 最大，碱性蛋白酶处理的样品 H_0 最小。这可能是由于疏水基团与亲水基团的暴露程度是导致蛋白质结构重排的重要因素，若蛋白质在重排过程中过度水解，疏水基团暴露过多，疏水相互作用增加而导致展开的肽链又聚集，此时测得的 H_0 会降低[33]。此外，在双酶处理组中，碱性蛋白酶和 TG 酶交联处理组呈现出较大的表

面疏水性，这可能归因于 TG 酶能够催化蛋白质形成共价键，促进蛋白质分子间或分子内发生共价交联，交联作用使更多的亲水基团被包埋在致密的网络结构中，从而使疏水相互作用增大[34]。木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶双酶处理组表现出了最低的表面疏水性，这与从单酶处理组中得到的规律不一致，可能是由于两种蛋白酶的互补作用，产生了更多小分子肽和游离氨基酸。虽然游离氨基酸分子由于具有疏水基团导致疏水性较高，但在水溶液环境中，它们的极性基团会与水分子发生强烈的亲和作用，使氨基酸分子在水溶液中的总体疏水性降低。此外，过度水解可能会破坏肽段间可能形成的疏水作用力，进一步降低疏水性[25]。

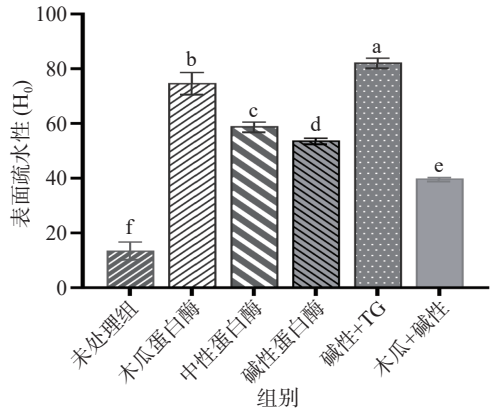


图 7 不同酶处理组酶解产物的表面疏水性

Fig.7 Surface hydrophobicity of hydrolysates obtained from different enzymatic hydrolysis schemes

2.7 游离巯基含量分析

小麦面筋蛋白中的二硫键是决定小麦面筋蛋白结构和功能特性的关键因素之一[27]。图 8 显示了小麦面筋蛋白经过不同酶解方案处理后游离巯基的变化情况。

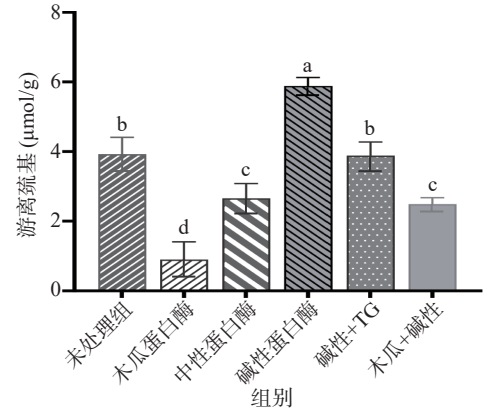


图 8 不同酶处理组酶解产物的游离巯基含量

Fig.8 Free thiol content of hydrolysates obtained from different enzymatic hydrolysis schemes

在单酶处理组中，碱性蛋白酶处理组游离巯基含量从未处理组的 3.92±0.32 μmol/g 上升到 5.88±0.20 μmol/g。薛腊梅[24] 也在试验中发现，经过碱性蛋白酶处理后游离巯基含量上升。这是由于蛋白质在酶解过程中肽键被水解，结构破坏导致被埋藏在结构内部的半胱氨酸残基暴露，侧链上的巯基数量增加，从而引起游离巯基含量上升。与之相反的是，经过木瓜蛋白酶和中性蛋白酶处理后，游离巯基含量反而下降。可以推测，在水解时木瓜蛋白酶可能更多切割了含巯基的肽键，导致巯基含量降低。中性蛋白酶处理组游离巯基含量下降的结果也可能与其特异性酶切位点有关。

在双酶分段处理的样品组中，与碱性蛋白酶单酶处理相比，经过 TG 酶交联后，游离巯基的含量下降，这是由于 TG 酶的交联作用，形成分子内和分子间的共价键，导致原本暴露的半胱氨酸被掩盖，使巯基不再暴露，故游离巯基含量下降[35]。而首先经过木瓜蛋白酶水解，然后经过碱性蛋白酶水解，碱性蛋白酶会在第一段酶解的基础上将蛋白质继续降解为更多更小的多肽片段和游离氨基酸，同时也会产生游离的半胱氨酸。在溶液中，游离的半胱氨酸容易与其他氨基酸结合形成胱氨酸或二硫键，从而进一步降低游离巯基的含量[36]。

2.8 表观形态和微观结构分析

图 9 和图 10 展示了经过不同酶解方案处理的

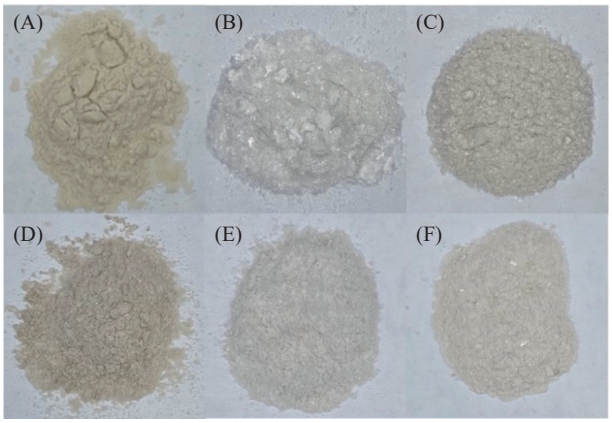


图 9 不同酶处理组酶解产物的图片

Fig.9 Visual comparison of hydrolysates obtained from different enzymatic hydrolysis schemes

注：A：未处理组；B：木瓜蛋白酶处理组；C：中性蛋白酶处理组；D：碱性蛋白酶处理组；E：碱性蛋白酶与 TG 酶交联处理组；F：木瓜蛋白酶与碱性蛋白酶处理组；图 10 同。

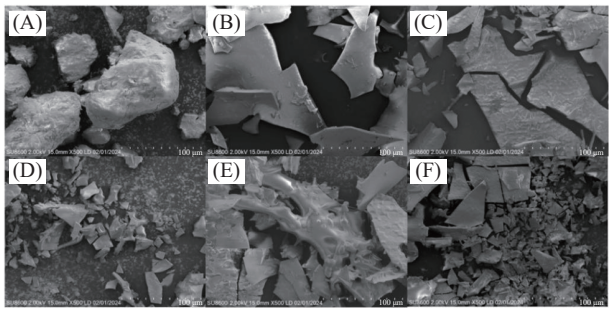


图 10 不同酶处理组酶解产物的微观图片

Fig.10 Microscopic images of hydrolysates obtained from different enzymatic hydrolysis schemes

小麦面筋蛋白经过冷冻干燥后的宏观和微观图片。从宏观形态可以看出，未处理的小麦面筋蛋白呈淡黄色粉末，质地细腻，吸湿性一般。通过扫描电镜观察，在 500 倍放大倍数下，可以观察到蛋白分子呈不规则碎石状，这可能是由于研磨时的机械力所导致。经木瓜蛋白酶酶解后，样品呈肉眼可见的白色片状，微观结构也显示蛋白质分子为具有锋利边缘的片状，体积较大。中性蛋白酶和碱性蛋白酶单酶处理后都呈现块状混合不规则片状的形态。其中，碱性蛋白酶组还存在深褐色团状聚集颗粒，且整体颜色更深，这可能与水解程度有关。

经过 TG 酶交联处理后，除了片状蛋白质分子以外，还出现了聚集状蛋白分子。TG 酶的交联作用促使了蛋白质发生聚集，改变了蛋白质的构象。而木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶双酶处理组的蛋白微观结构中，既存在破碎的大体积片状分子，也有小体积的蛋白质碎块。这可能是由于木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的协同作用，将蛋白质水解为更小的肽段或游离氨基酸。此外，在实验过程中，还观察到酶解后的样品出现不同程度的吸潮现象，并且这一现象与水解程度具有一定相关性，这是由于酶解后亲水基团的暴露增大了蛋白质的溶解性。

3　结论

酶改性法是改善小麦面筋蛋白结构和功能特性的有效方法。对不同酶解产物的结构进行比较，结果表明木瓜蛋白酶与碱性蛋白酶双酶水解组几乎将绝大部分蛋白降解为 3.3 kDa 以下的小肽，比其他酶解方案更有效地水解小麦醇溶蛋白；酶解处理后，小麦面筋蛋白主要的 β-折叠结构减少，无规则卷曲结构增加；紫外和荧光光谱显示不同酶解处理使蛋白质的三级结构发生不同程度的改变，可能发生构象表位的破坏；表面疏水性和游离巯基含量也证明酶解后蛋白质二硫键断裂，木瓜蛋白酶与碱性蛋白酶组合处理组含有更多小肽段和游离氨基酸；微观结构也显示酶解处理改变了蛋白质分子的微观结构。这些结果为小麦面筋蛋白的改性提供了新的依据，可为小麦蛋白的深加工利用提供理论参考。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] PANDEY M, SHRESTHA J, SUBEDI S, et al. Role of nutrients in wheat: A review[J]. Tropical Agrobiodiversity, 2020, 1(1): 18−23.

[2] 董连生. 2019—2023 年国审小麦品种产量相关性状的变化趋势分析[J]. 安徽农学通报, 2023, 29(20): 7−12. [DONG Liansheng. Analysis on the changing trend of yield-related traits of wheat varieties approved by the state from 2019 to 2023[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2023, 29(20): 7−12.]

[3] ISLAS-RUBIO A R, LABORIN-ESCALANTE F, VÁSQUEZ-LARA F, et al. Coconut flour (*Cocos nucifera* L.) as a partial replacement in wheat flour (*Triticum aestivum*)-based tortillas and its effect on dough rheology and tortilla quality[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2023, 78(2): 314−319.

[4] 王岸娜, 楚雯文, 吴立根. 光谱法研究小麦蛋白与直链淀粉的相互作用[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2022, 43(6): 80−86,94. [WANG Anna, CHU Wenwen, WU Ligen. Interaction between wheat protein and starch investigated by spectroscopy[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2022, 43(6): 80−86,94.]

[5] 李翠翠, 贾笑莉, 张丽, 等. 面制品加工过程中小麦面筋蛋白巯基、二硫键变化的研究进展[J]. 轻工学报, 2024, 39(6): 1−8,56. [LI Cuicui, JIA Xiaoli, ZHANG Li, et al. Research progress on the change of sulfhydryl group and disulphide bond in wheat gluten protein during processing of flour products[J]. Journal of Light Industry, 2024, 39(6): 1−8,56.]

[6] DAS M, DUODU S O, SANTRA S, et al. Gluten proteins: A comprehensive review[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2024, 62: 103437.

[7] WIESER H. Chemistry of gluten proteins[J]. Food Microbiology, 2007, 24(2): 115−119.

[8] 周伟, 赵泽龙, 张丽萍. 小麦低聚肽的结构及抗氧化能力分析[J]. 食品工业, 2017, 38(9): 196−200. [ZHOU Wei, ZHAO Zelong, ZHANG Liping. Structure and antioxidant capacity of wheat oligopeptide[J]. The Food Industry, 2017, 38(9): 196−200.]

[9] 任杰, 崔硕, 夏羽菡, 等. 小麦水解蛋白的结构表征及其体外稳定性研究[J]. 粮食与油脂, 2024, 37(6): 15−20. [REN Jie, CUI Shuo, XIA Yuhan, et al. Structural characterization and *in vitro* stability of wheat hydrolyzed protein[J]. Cereals & Oils, 2024, 37(6): 15−20.]

[10] 郑志强, 李宝林, 郝利民, 等. 不同蛋白酶对小麦蛋白酶解物抗氧化活性的影响[J]. 食品科学, 2017, 38(7): 161−166. [ZHENG Zhiqiang, LI Baolin, HAO Limin, et al. Effects of different proteases on antioxidant activities of wheat gluten hydrolysates[J]. Food Science, 2017, 38(7): 161−166.]

[11] ZHANG Ruixue, ZHANG Jiangtao, LIU Yan, et al. The effect of fermented wheat protein hydrolysate on the exercise performance in mice[J]. Journal of Functional Foods, 2022, 97: 105217.

[12] 魏芸锦, 刘伯业, 孙小瑞. 分步酶解小麦面筋蛋白制备低苦味肽粉的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(14): 298−307. [WEI Yunjin, LIU Boye, SUN Xiaorui. Study on the preparation of low bitter peptide powder by stepwise enzymatic hydrolysis of wheat gluten protein[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(14): 298−307.]

[13] 董彩虹, 温青玉, 李天齐, 等. 复合酶法制备小麦面筋蛋白咸味酶解液的工艺优化[J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 222−230. [DONG Caihong, WEN Qingyu, LI Tianqi, et al. Optimization of the technology for preparing salty wheat gluten protein hydrolysate by compound enzyme method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 222−230.]

[14] 雷声, 王凯, 段焰青, 等. 小麦面筋蛋白水解物及其肽美拉德反应中间体的水相制备[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 183−189, 220. [LEI Sheng, WANG Kai, DUAN Yanqing, et al. Preparation of wheat gluten protein hydrolysates and their aqueous intermediates for Maillard reaction[J]. Food & Machinery, 2020, 36(4): 183−189, 220.]

[15] 任秋燕. 酶解小麦面筋蛋白的工艺优化及功能特性研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2023. [REN Qiuyan. Optimization of process and functional properties of enzymatic digestion of wheat

gluten protein[D]. Wuhan: Wuhan Polytechnic University, 2023.]
[16] 刘海梅, 陈静, 安孝宇, 等. 牡蛎酶解工艺参数优化及其产物分析与评价[J]. 食品科学, 2017, 38(14): 240−244. [LIU Haimei, CHEN Jing, AN Xiaoyu, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of oysters and amino acid composition and nutritional quality of oyster hydrolysates[J]. Food Science, 2017, 38(14): 240−244.]
[17] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642−646.
[18] PI Xiaowen, FU Guiming, YANG Yili, et al. Changes in IgE binding capacity, structure, physicochemical properties of peanuts through fermentation with *Bacillus natto* and *Lactobacillus plantarum* along with autoclave pretreatment[J]. Food Chemistry, 2022, 392: 133208.
[19] 赵瑞芳. 转谷氨酰胺酶催化花生过敏原 Ara h 2 反应体系的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017. [ZHAO Ruifang. Study on transglutaminase treated Ara h 2 reaction system[D]. Nanchang: Nanchang University, 2017.]
[20] RINCÓN-AGUIRRE A, de DIOS FIGUEROA-CÁRDENAS J, RAMÍREZ-WONG B, et al. Nixtamalization of durum wheat and the effect on protein secondary structure, gliadins, dough, and breadmaking quality[J]. Journal of Cereal Science, 2022, 107: 103539.
[21] LIU Minnan, FAN Mingcong, QIAN Haifeng, et al. Effect of different enzymes on thermal and structural properties of gluten, gliadin, and glutenin in triticale whole-wheat dough[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 127384.
[22] YAN Shizhang, XU Jingwen, ZHANG Shuang, et al. Effects of flexibility and surface hydrophobicity on emulsifying properties: Ultrasound-treated soybean protein isolate[J]. LWT, 2021, 142: 110881.
[23] KANG Zhuangli, BAI Rong, LU Fei, et al. Effects of high pressure homogenization on the solubility, foaming, and gel properties of soy 11S globulin[J]. Food Hydrocolloids, 2022, 124: 107261.
[24] 薛腊梅. 不同处理方式对谷朊粉的物理化学性质和致敏性的影响[D]. 无锡: 江南大学, 2020. [XUE Lamei. Effects of different treatments on physical and chemical properties and allergenicity of gluten[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.]
[25] de SANTIS M A, GIULIANI M M, GIUZIO L, et al. Differences in gluten protein composition between old and modern durum wheat genotypes in relation to 20th century breeding in Italy[J]. European Journal of Agronomy, 2017, 87: 19−29.
[26] SCHÄGGER H, von JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166(2): 368−379.
[27] 王光正, 周洋, 卢勇莉, 等. 小麦过敏原脱敏技术研究进展[J]. 现代面粉工业, 2021, 35(3): 36−39. [WANG Guangzheng, ZHOU Yang, LU Yongli, et al. Research progress on desensitization technology of wheat allergens[J]. Modern Flour Milling Industry, 2021, 35(3): 36−39.]
[28] 高红艳, 许强, 杨志怀. FT-IR 在研究蛋白质二级结构中的应用[J]. 宝鸡文理学院学报(自然科学版), 2009, 29(3): 47−53. [GAO Hongyan, XU Qiang, YANG Zhihuai. Research on protein secondary structure by Fourier transformation infrared spectroscopy[J]. Journal of Baoji University of Arts and Sciences (Natural Science Edition), 2009, 29(3): 47−53.]
[29] XU Yixiang, GALANOPOULOS M, SISMOUR E, et al. Effect of enzymatic hydrolysis using endo- and exo-proteases on secondary structure, functional, and antioxidant properties of chickpea protein hydrolysates[J]. Journal of Food Measurement and Characterization, 2020, 14(1): 343−352.
[30] KRISHNAN S, SunilHIRAY K, VYAS S. A correlative multi-spectroscopy and docking study for the modeling of drug (luteolin and quercetin) binding to bovine serum albumin-A tool for the determination of binding characteristics to receptor proteins[J]. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2018, 52(3): 492−504.
[31] ZENG Shaokui, ZHANG Chaohua, LIN Hong, et al. Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Food Chemistry, 2009, 116(4): 879−883.
[32] 王淑敏. 脱酰胺对小麦面筋蛋白酶解敏感性及热诱导凝胶性质的影响[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018. [WANG Shumin. Effect of deamidation on the proteolysis susceptibility and heat-induced gel properties of wheat gluten[D]. Hefei: Hefei University of Technology, 2018.]
[33] 王宇飞. 小麦醇溶蛋白的分离、改性及其结构与致敏性的研究[D]. 太原: 中北大学, 2022. [WANG Y F. Study of isolation and modification of wheat gliadin and its structure and allergenicity [D]. Taiyuan: North University of China, 2022.]
[34] 李杨, 马召蕾, 郑丽, 等. 超声联合酶处理下 TG 酶交联大豆分离蛋白凝胶特性研究[J]. 农业机械学报, 2022, 53(4): 394−402. [LI Yang, MA Zhaolei, ZHENG Li, et al. Effect of ultrasonic combined with enzyme treatment on glutamine transaminase cross-linked soybean protein isolate gels[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2022, 53(4): 394−402.]
[35] 张爱琴, 齐凤敏, 赵爱萍, 等. 谷氨酰胺转氨酶改性核桃谷蛋白的结构表征分析[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(11): 38−44. [ZHANG Aiqin, QI Fengmin, ZHAO Aiping, et al. Structural characterization of walnut gluten protein modified by glutamine transaminase[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2019, 34(11): 38−44.]
[36] 张晴晴. 谷氨酰胺转氨酶对乳清蛋白的结构及功能特性影响研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古工业大学, 2021. [ZHANG Qingqing. Effect of glutamine transaminase on structure and functional properties of whey protein[D]. Hohhot: Inner Mongolia University of Tehchnology, 2021.]