

胰蛋白酶有限酶解米渣蛋白的机理及动力学模型研究

李湘^{1,2}, 彭地纬^{1,2}, 熊华^{1,2,*}, 赵强^{1,2}, 李薇^{1,2}

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2. 南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西 南昌 330047)

摘要: 运用实验研究结合数学推导的方法, 采用胰蛋白酶在温度 53℃、pH 7.6 条件下对酶解米渣蛋白的动力学机制进行研究。结果表明: 在反应过程中底物存在着促进反应进行和抑制酶活性的双重作用, 酶催化的水解速率随水解进程呈指数下降; 并由实验数据推导出描述胰蛋白酶催化水解米渣蛋白的动力学方程及胰蛋白酶的失活常数, 验证结果表明动力学模型与实验结果非常吻合。通过对酶与底物浓度之比、反应时间的调节可有效控制水解作用的程度, 从而为利用米渣酶法制备米蛋白肽的产业化实践提供指导。

关键词: 米渣; 胰蛋白酶; 有限酶解; 动力学模型

Mechanism and Kinetic Model for Limited Trypsin Digestion of Protein in Rice Dregs

LI Xiang^{1,2}, PENG Di-wei^{1,2}, XIONG Hua^{1,2,*}, ZHAO Qiang^{1,2}, LI Wei^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Mechanisms and kinetic models of enzymatic hydrolysis of protein in rice dregs by trypsin at pH 7.6 and 53 °C were investigated using the combined method of experimental analysis and mathematic deduction. Results indicated that the overall rate of hydrolysis decreased exponentially during the hydrolysis process due to dual functions of the substrate for accelerating and inhibiting enzymatic activity. Based on experimental data, a kinetic model equation was deduced to demonstrate trypsin hydrolysis of protein in rice dregs and inactivation constant of trypsin. Therefore, hydrolysis degree can be effectively controlled through the adjustment of trypsin/substrate ratio, and reaction time, which can provide guidance to peptide industrialization from rice dregs by means of enzymatic technology.

Key words: rice dregs; trypsin; limited-hydrolysis; kinetic model

中图分类号: TS201.25

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)21-0166-06

米渣, 作为大米制糖业的主要副产物, 其蛋白含量达 60% 以上, 保留了几乎全部的大米蛋白质, 是一种重要的米蛋白质资源。大米蛋白具有理想的氨基酸模式和低过敏性, 是婴幼儿、消化道疾病患者、乳糖过敏人群配方食品的最适蛋白质来源^[1-2], 但多年来仅作为下脚料低价出售给饲料厂, 资源浪费严重。米渣经胰

蛋白酶水解后其营养价值、功能性质均得到了不同程度的改善^[3-4], 对米渣蛋白进行酶解可用于生理活性肽的制备^[5]。但酶的活性与稳定性易受反应环境(温度、pH 值、金属离子和浓度、振荡、剪切等)、底物性质(纯度、粒度)、以及酶与底物浓度的影响。

对于大米蛋白, 熊善柏等^[6]以米渣为原料, 研究碱

收稿日期: 2009-06-30

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2006BAD27B00); 食品科学与技术国家重点实验室目标导向资助项目(SKLF-MB-200809);

食品科学与技术国家重点实验室自由探索资助项目(SKLF-TS-200818);

教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT0540)

作者简介: 李湘(1981—), 女, 博士研究生, 研究方向为粮食与油脂加工。E-mail: lixiang7783@126.com

* 通讯作者: 熊华(1957—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品微胶囊技术、保健食品及功能食品。

E-mail: huaxiong100@yahoo.com.cn

性蛋白酶、1398 中性蛋白酶和木瓜蛋白酶在不同起始 pH 值、加酶量和温度下水解大米蛋白的进程，建立大米蛋白酶水解动力学方程；李积华等^[7]对 Alcalase 2.4L FG 酶水解米渣蛋白的动力学特性进行了比较系统的探讨。本实验前期研究采用单一酶法比较了 Alcalase 蛋白酶、复合胰蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶的酶解效果，筛选出胰蛋白酶是米渣蛋白限制性水解的最适蛋白酶，且通过响应面法优化出其酶解工艺参数为：53℃、pH7.6、固液比为 0.17(m/V)、酶添加量 0.89‰、酶解 2.43h。

胰蛋白酶(trypsin, EC 3.4.21.4)，属丝氨酸蛋白酶家族的一种中性内切肽酶，来源于猪等动物胰脏，主要作用于蛋白质氨基酸链中的赖氨酸(Lys)残基和精氨酸(Arg)残基。胰蛋白酶因其来源广泛、简单易得、相对实惠的价格而日益成为一种广泛应用的工业酶，但有关胰蛋白酶对米渣蛋白进行有限水解的动力学特性研究目前尚未见报道。因此，本实验拟对胰蛋白酶在 53℃、pH 7.6 条件下对米渣蛋白质有限酶解的动力学特性进行研究，并结合数学模拟法推导其水解动力学模型，以期为准控制其水解过程而获得定向肽组成的酶解产物提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

米渣(蛋白质含量 63.5%) 江西省恒天实业有限公司。

胰蛋白酶(4000U/g) 无锡市酶制剂厂；其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

JB-3 型磁力搅拌器 上海雷磁新径仪器有限公司；PHS-3C 精密 pH 计 上海雷磁新径仪器有限公司；电子天平 瑞典 Mettler toledo 仪器公司。

1.3 水解度测定方法

采用 pH-stat 法^[8-9]测定反应过程中的水解度(x)。用蒸馏水配制底物溶液，在相应 pH 值和温度下平衡 15min，再按比例加入适量酶液。反应过程记录不同时刻为维持该 pH 值恒定而消耗的碱液量，以不加酶的底物溶液为空白。产物水解度定义为蛋白质中被水解肽键的比例，计算公式为：

$$x(\%) = \frac{BN}{aM_p h_{tot}} \times 100$$

式中：B 为消耗碱液的体积(ml)；N 为碱液的浓度(mol/L)；M_p 为底物中蛋白质质量(g)；h_{tot} 为单位质量蛋白质肽键当量数，米渣蛋白的 h_{tot} 为 7.40 meq/g^[10]；a 为氨基离解度，在具体 pH 值和温度下可由下式计算：

$$\frac{1}{a} = 1 + 10^{pK - pH}$$

式中：pH 值为反应起始阶段溶液的 pH 值，pK 为 α-NH₃⁺的平均解离常数，可通过亨德森-哈塞尔巴尔赫方程(Henderson-Hasselbalch equation)计算：

$$pK = pH - \lg \frac{[A^-]}{[HA]}$$

式中：pH 为反应体系中氢离子浓度指数；[HA] 为体系中以内盐(H₃N⁺-CHRCOO⁻)形式存在的氨基酸浓度；[A⁻] 为氨基酸内盐解离出来的共轭碱(H₂NCHRCOO⁻)浓度。

2 结果与分析

2.1 初始底物浓度对酶解反应的影响

以初始胰蛋白酶浓度为 0.15g/L，设定初始底物浓度分别为 120、150、165、180、210g/L，在恒定温度 53℃、溶液 pH7.6 条件下进行反应，记录不同酶解时间的碱液消耗量，所得水解度随时间变化的关系如图 1 所示。

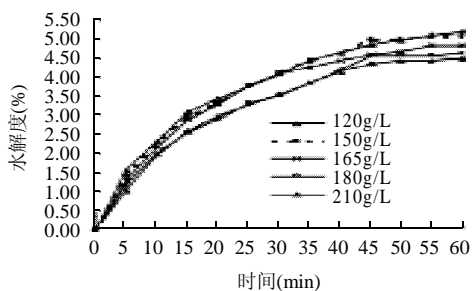


图1 初始底物浓度对水解度的影响

Fig.1 Effect of substrate concentration on hydrolysis degree

图 1 中不同初始底物浓度的水解进程曲线表明，初始底物浓度较低时体系的初始水解速度较快，在同一处理时间下体系水解度和水解速率均随初始底物浓度的增加而呈下降趋势，且当初始底物浓度为 180g/L 和 210g/L 时，其水解进程曲线相似，即体系中酶与底物的结合存在一个饱和状态，在该状态下底物浓度的继续增加无益于体系水解反应程度的加深。而对于同一初始底物浓度，体系水解速率随着水解时间的延长而下降，当反应进行到一定时间后水解速率变化减慢，而后趋于一极限值，这一极限值随初始底物浓度的增大而呈降低趋势。

2.2 初始酶浓度对酶解反应的影响

以初始底物浓度为 165g/L，设定初始胰蛋白酶浓度分别为 0.10、0.15、0.2、0.30g/L，在恒定 53℃、溶液 pH7.6 条件下反应，记录不同酶解时间下的碱液消耗量，所得水解度随时间变化的关系如图 2 所示。

由图 2 的水解曲线可知，对不同初始酶浓度，在同一处理时间下，体系水解度和水解速率均随初始酶浓度的增加而增强；但对于同一初始酶浓度，水解速率随

着水解时间的延长而下降,并趋向于一个极限值,其值随初始酶浓度的增加而提高。

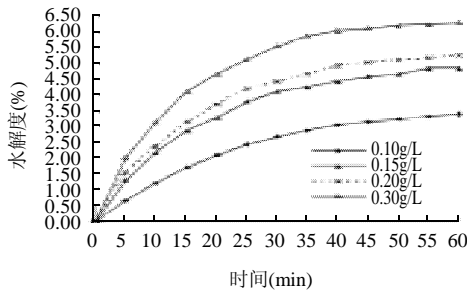


图2 初始酶浓度对水解度的影响

Fig.2 Effect of enzyme concentration on hydrolysis degree

2.3 酶解时间对酶解反应的影响

由图 1、2 可知,在不同的初始底物浓度、胰蛋白酶浓度下,水解度均随反应时间的延长而增强,并趋于一个稳定值;而水解速率于反应起始阶段增加较快,随后下降,25min 后水解速率的增加明显下降,45min 后水解速率的增加趋近于零。即体系水解速率随反应时间和水解度的增加而减小,这可能归因于:1)随酶解反应的进行,底物中可酶解肽键的浓度下降;2)产物浓度增加对正向酶解反应的抑制作用增强;3)随着反应过程酶变性失活现象可能加重。

2.4 酶解反应机理探讨

为了进一步研究体系水解度随反应进程下降的原因,取初始底物浓度为 165g/L,加入 0.15g/L 胰蛋白酶,于温度 53℃、pH7.6 的条件下水解,当反应进行到 25、45min 时分别向反应体系中增添 1/2 初始浓度的酶和 1/2 初始浓度的底物,所得水解度随时间变化的关系如图 3、4 所示。

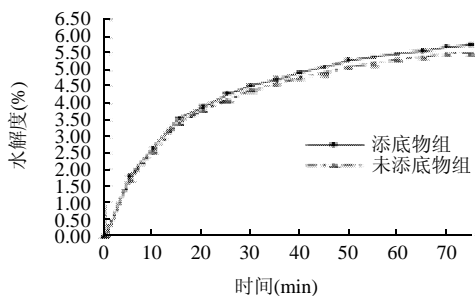


图3 水解过程中底物添加对水解度的影响

Fig.3 Effect of fresh substrate addition on hydrolysis degree

如果体系整体水解速率的下降是由反应过程中可酶解的肽键浓度下降引起的,那么当有新的底物加入时,体系水解速率将出现一个较快的增加趋势。但由图 3 可知,当新的底物添加到反应体系中后,体系在一个较

短时间的平衡后其水解速率并没有增加。因此,可确认随着反应进行,不断减少的可酶解肽键浓度不是引起体系整体水解速率下降的主要原因。

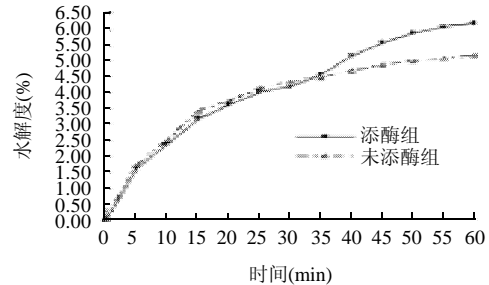


图4 水解过程中酶添加对水解度的影响

Fig.4 Effect of fresh enzyme addition on hydrolysis degree

如果反应中酶的变性失活是引起体系整体水解速率下降的原因,那么当体系中有效酶浓度增加时整体水解速率将增加,这在图 4 中得到了证实。在反应进行到 25min 时向体系中补加酶,经过一个较短时间缓冲后,体系水解速率在 35min 时出现有明显增加趋势,这表明反应中存在有酶失活现象,并且表明反应进行 25min 时体系中仍存在有较多的可酶解肽键。

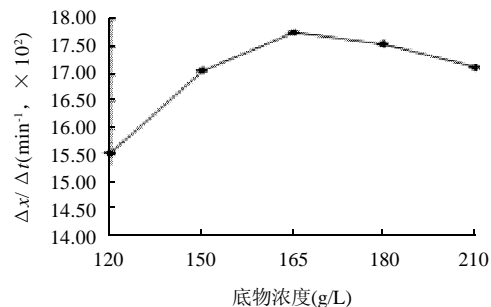


图5 $\Delta x/\Delta t$ 随底物浓度的变化

Fig.5 Effect of substrate concentration on initial reaction rate

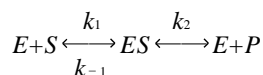
为检验体系中是否存在有酶活受抑制现象,本研究比较了同一初始酶浓度(0.15g/L)、不同初始底物浓度下体系水解度在水解反应初始阶段随时间的变化情况(图 5)。由图 5 可看出,体系水解速率并不是随着初始底物浓度的增加而呈线性增加趋势,而是随着初始底物浓度的增加达到峰值后下降,表明有限水解中底物同时存在着促进反应进行和抑制酶活性的双重作用,这一点在 Darby 等研究中得到了证实^[11]。米渣中精氨酸含量较丰富^[12],而胰蛋白酶对底物中精氨酸-赖氨酸残基的水解会产生一些可与酶结合的抑制肽^[13],抑制肽与酶的结合可调控酶的作用效率^[11]。因此,本实验中水解进程曲线随反应时间所表现出的非线性变化趋势可能是底物与

抑制肽对酶活性部位的竞争性结合所致。其机理推测是水解反应过程中，体系中可溶解抑制肽浓度增加并不断与酶的活性部位相结合，这就可能抑制底物降解后向体系中释放游离氨基酸的量，从而致使体系中游离氨基酸的净增量为零，即水解达动态平衡状态，采用 pH-stat 法所测得的水解度为零，因此体系整体反应速率较之反应初始阶段表现有明显的下降趋势。

综合以上可推知，对于米渣蛋白质的有限酶解，反应过程中所产生的抑制肽可能是引起酶变性失活的主要原因，且其失活程度与初始底物浓度有关，但其具体作用机理仍有待证实。

2.5 动力学模型的推导

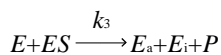
胰蛋白酶等内切肽酶限制性水解蛋白质的反应符合双底物水解机理^[14]，其过程为：



根据酶解反应公式，其反应速率是由不可逆反应阶段的速率来决定的。用 V 来表示反应速率， S_0 代表初始底物浓度， x 代表水解度，可得如下反应速率的导数方程式：

$$V=[S_0] \frac{dx}{dt} = k_2[ES] \quad (1)$$

在限制性酶解反应过程中，因底物和产物抑制等而导致胰蛋白酶钝化，其反应方程式为：



式中： E_a 表示具有活力的蛋白酶；而 E_i 代表被钝化的蛋白酶。用 e 表示总蛋白酶，则上述反应的动力学方程式表示为：

$$-\frac{de}{dt} = k_3[E][ES] \quad (2)$$

公式(1)比公式(2)，得

$$-S_0 \frac{dx}{de} = \frac{k_2}{k_3[E]} \quad (3)$$

蛋白酶在水解体系中存在游离状态 E 和复合物态 ES 两种形式，总蛋白酶为这两部分之和，则有：

$$e=[E]+[ES] \quad (4)$$

平衡阶段有：

$$k_1[E][S]=(k_{-1}+k_2)[ES]$$

即

$$[ES]=\frac{k_1[E][S]}{k_{-1}+k_2}=\frac{[E][S]}{k_m} \quad (5)$$

式中

$$k_m=\frac{k_{-1}+k_2}{k_1}$$

方程(5)代入(4)，设定 $[S]=[S_0]$ ，则：

$$[E]=\frac{k_me}{k_m+S_0} \quad (6)$$

k_m 代表酶促反应中底物与酶之间结合力的强弱， k_m 值大则其结合力弱， k_m 值小则底物与酶之间亲和力强。目前测得的酶制剂 k_m 值通常都较小^[15]，可设定 $k_m \ll S_0$ ，公式(6)简化为：

$$[E]=\frac{k_me}{S_0} \quad (7)$$

公式(7)代入公式(3)，则：

$$-\frac{dx}{de}=\frac{k_2}{k_3k_m} \times \frac{1}{e} \quad (8)$$

对公式(8)定积分，其中水解度的上、下限值分别为 x 、0，而总酶量上限值为 e ，下限值为 E_0 ，但由于底物及水解产物的抑制作用等将导致部分酶失活，从而其下限值调整为 $E_0 - C$ ，方程式简化为：

$$e=(E_0-C)\exp\left[-\frac{k_3k_m}{k_2}x\right] \quad (9)$$

整理公式(1)、(5)、(7)、(9)，则有：

$$V=k_2(E_0-C)\exp\left[-\frac{k_3k_m}{k_2}x\right] \quad (10)$$

方程式中值的大小与初始底物浓度 S_0 有关，即 S_0 越大，其值也越大，因此设定 $C=C_0S_0$ ，其中 C_0 为一常数，并代入方程式(1)、(10)则有：

$$\frac{dx}{dt}=k_2\left[\frac{E_0}{S_0}-C_0\right]\exp\left[-\frac{k_3k_m}{k_2}x\right] \quad (11)$$

设定

$$a=k_2\left[\frac{E_0}{S_0}-C_0\right]=k_2\frac{E_0}{S_0}-k_2C_0 \quad (12)$$

$$b=\frac{k_3k_m}{k_2} \quad (13)$$

则有：

$$\frac{dx}{dt}=a\exp(-bx) \quad (14)$$

对方程(14)积分, 水解度积分的上下限分别为 x 、 0 , 而水解时间的上下限分别为 t 、 0 , 则有:

$$x = -\frac{1}{b} \ln[1+abt] \quad (15)$$

因此, 蛋白质限制性酶解过程的动力学模型推导结果为:

$$V = aS_0 \exp[-bx] \quad (16)$$

$$x = -\frac{1}{b} \ln[1+abt]$$

式中, $a = k_2 \frac{e_0}{S_0} - k_2 C_0$, $b = \frac{k_3 k_m}{k_2}$

2.6 动力学模型参数的确定

利用 1stOpt 1.5 软件对图 1 和图 2 中各实验条件下的实验数据按方程 $x = -\frac{1}{b} \ln[1+abt]$ 进行非线性回归拟合, 求得 a 、 b 及 $a \times b$ 值列于表 1。

表 1 米渣蛋白的酶水解动力学参数值

Table 1 Kinetic parameters of enzymatic hydrolysis of rice dregs protein

S_0 (g/L)	E_0 (g/L)	E_0/S_0	a (min ⁻¹)	b	$a \times b$
120	0.15	0.001250	0.4935	0.5292	0.2612
150	0.15	0.001000	0.4401	0.4982	0.2193
180	0.15	0.000833	0.3459	0.5067	0.1753
210	0.15	0.000714	0.3570	0.5340	0.1906
165	0.1	0.000606	0.2024	0.5923	0.1199
165	0.15	0.000909	0.4256	0.5233	0.2227
165	0.2	0.001212	0.5404	0.5243	0.2833
165	0.3	0.001818	0.8580	0.4920	0.4221

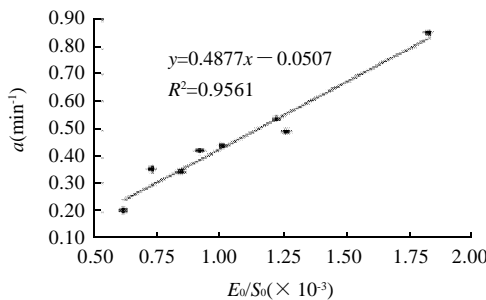


图 6 参数 a 随 E_0/S_0 的变化

Fig.6 Effect of E_0/S_0 value on parameter a

从表 1 结果可知, 动力学参数 a 随着 S_0 的增加而减小, 随着 E_0 的增大而增大。不同 S_0 和 E_0 条件下, 参数 b 的数值都相差小, 接近一个常数, 且在平均值 0.525 附近上下波动, 因此对于恒温水解反应, b 可看作是一个常数而取平均值。对 a 值与 E_0/S_0 值作图, 如

图 6 所示。

从图 6 所得线性关系式可知 a 与 E_0/S_0 值关系曲线所对应的方程为:

$$a = 487.75 \times E_0/S_0 - 0.0508 \quad (17)$$

把上述所求得的 a 与 b 值分别代入推导出的动力学模型, 则可得胰蛋白酶在 53℃, pH7.6 条件下水解米渣蛋白的动力学模型, 分别如下:

水解速率的动力学模型:

$$V = (487.75E_0 - 0.0508S_0) \exp(-0.525x) \quad (18)$$

水解度的动力学模型:

$$x = 1.905 \ln \left[1 + (256.07 \frac{E_0}{S_0} - 0.0267)t \right] \quad (19)$$

方程(18)表明, 水解速率 V 随着 E_0 的增加而上升, 但随着 S_0 和水解度 x 的上升而下降。水解度的增大, 相应地导致水解体系的底物中的可作用肽键浓度下降, 而引起水解反应的速率下降。并由此可得 53℃, pH7.6 条件下不同初始底物浓度下所对应的临界初始胰蛋白酶浓度为 $E_0 = \frac{0.0508}{487.75} S_0$, 不同初始酶浓度下所对应的临界初始底物浓度为 $S_0 = \frac{487.75}{0.0508} E_0$ 。当 $E_0 \leq \frac{0.0508}{487.75} S_0$ 时, 总水解速率变为负数, 水解反应不会发生。这一方面可能由于方程(18)对于较低的 E_0/S_0 值不适用; 另一方面可能由于底物或中间产物对酶反应存在不可逆抑制。同理, 当 $S_0 \geq \frac{487.75}{0.0508} E_0$ 时, 水解反应不会进行。

方程(19)表明, 在胰蛋白酶水解米渣蛋白的体系中, 水解度 x 与初始酶浓度 E_0 、初始底物浓度 S_0 和水解时间 t 之间存在一定关系: S_0 不变时, 水解度随着 E_0 的增加而提高; 反之, E_0 不变时, 水解度随着 S_0 的增加而降低。这与上面讨论的实验结果一致。另外, 通过对 E_0/S_0 的改变可在一定时间内获得所需水解度, 从而使米渣蛋白处于低度水解状态。

2.7 蛋白酶失活常数的确定

由方程式(2)、(5)、(7)可得:

$$-\frac{de}{dt} = k_3 k_m \frac{e^2}{S_0} = k_d \frac{e^2}{S_0}$$

$$k_d = k_3 k_m$$

k_d 即为水解过程中胰蛋白酶失活的动力学常数。

a 、 b 相乘得:

$$a \cdot b = \left[k_2 \frac{e_0}{S_0} - k_2 C_0 \right] \cdot \frac{k_3 k_m}{k_2} = k_d \left[\frac{E_0}{S_0} - C_0 \right]$$

因此, 运用 Excel 软件求得 $a \cdot b$ 值与 E_0/S_0 值之间的线性方程为 $y = 230.29x - 0.0033$ ($R^2 = 0.9597$), 于是得胰蛋白酶的失活常数 $k_d = 230.29 \text{ min}^{-1}$ 。

2.8 动力学模型的验证

图1中选择 $E_0=0.15\text{g/L}$ 、 S_0 分别为 120、150g/L，在溶液 pH7.6、温度为 53℃ 条件下对米渣蛋白进行水解，其实测值与模型预测值列于表2。同时，采用平均相对误差(E)对实测值与模型计算值之间的拟合程度进行评估，其计算公式为：

$$E(\%) = \frac{\sum \frac{|Y - Y^*|}{Y}}{n} \times 100$$

式中： Y 为实测值； Y^* 为计算值； n 为所考查的数据个数。

评估结果为，当 $E_0=0.15\text{g/L}$ 、 $S_0=120\text{g/L}$ 时，实测值与计算值之间的平均相对误差为 6.1%；当 $E_0=0.15\text{g/L}$ 、 $S_0=150\text{g/L}$ 时，实测值与计算值之间的平均相对误差为 3.5%；两体系所考查数据的总平均拟合误差为 4.8%。

表2 水解度动力学模型的验证
Table 2 Validation on kinetic model of limited hydrolysis

$E=0.15\text{g/L}, S=120\text{g/L}$			$E=0.15\text{g/L}, S=150\text{g/L}$		
$t(\text{min})$	实测值	模型计算值	$t(\text{min})$	实测值	模型计算值
5	1.555	1.72	5	1.422	1.455
10	2.333	2.609	10	2.275	2.271
15	3.11	3.213	15	2.95	2.84
20	3.443	3.671	20	3.306	3.278
25	3.776	4.039	25	3.75	3.633
30	4.11	4.348	30	4.105	3.933
35	4.443	4.614	35	4.461	4.192
40	4.665	4.847	40	4.638	4.419
45	4.887	5.055	45	4.994	4.623
50	4.998	5.242	50	4.994	4.807
55	5.109	5.413	55	5.083	4.974
60	5.22	5.569	60	5.083	5.128

3 结论

采用胰蛋白酶对米渣进行低度水解时，水解产物及过高的底物浓度对酶反应速率起抑制作用。在酶促反应最适温度、pH 值条件下，通过对酶与底物浓度之比、反应时间的控制可以实现有限水解。

根据酶动力学的基本理论，由实验数据得出温度 53℃、pH 7.6 下胰蛋白酶对米渣蛋白的水解速率动力学模型和水解度动力学模型，分别如下：

$$V=(187.75E_0 - 0.058S_0)\exp(-0.525x)$$

$$x=1.905\ln\left[1+(256.07\frac{E_0}{S_0} - 0.0267)t\right]$$

通过动力学方程，可推导可控酶解过程的最低临界初始酶浓度 $E_0 = \frac{0.0508}{487.75}S_0$ ，最大临界初始底物浓度 $S_0 = \frac{487.75}{0.0508}E_0$ 。通过动力学模型及相关实验数据的结果，得出可控酶解过程中胰蛋白酶失活的动力学常数 $k_a = 230.29\text{min}^{-1}$ 。与实验结果相比较，证实动力学模型与实验结果非常吻合，可用来指导和优化酶解反应实验。

参考文献：

- BURKS A W, HELM R M. Hypoallergenicity of rice protein[M]. Presented at the Annual Meeting of the American Association of Cereal Chemists, Nashville, Tennessee, 1994.
- CLEMENTE A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition[J]. Trends in Food Science and Technology, 2000, 11(7): 254-262.
- 陈升军, 熊华, 李庭, 等. 米渣蛋白酶解及酶解物功能性研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(5): 114-118.
- TANG S, HETTIARACHCHY N S, HORAX R, et al. Physicochemical properties and functionality of rice bran protein hydrolyzate prepared from heat-stabilized defatted rice bran with the aid of enzymes[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(1): 471-475.
- HE G Q, XUAN G D, RUAN H, et al. Optimization of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition by rice dregs hydrolysates using response surface methodology[J]. Journal of Zhejiang University Science: Life Science, 2005, 6B(6): 508-513.
- 熊善柏, 赵思明, 刘友明, 等. 大米蛋白的酶水解动力学研究[J]. 农业工程学报, 2003, 19(z1): 211-214.
- 李积华, 郑为完, 苏冰霞, 等. Alcalase 2.4L FG 酶解米渣蛋白动力学特性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(5): 190-194.
- ADLER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. London: El-sevier Applied Science Publishers, 1986: 132-142.
- DONG S, ZENG M, WANG D, et al. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)[J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1485-1493.
- 王章存, 姚惠源. 大米蛋白测定中蛋白系数的确定[J]. 食品工业科技, 2004, 25(1): 158-160.
- DARBY N J, SMYTH D G. Endopeptidases and prohormone processing [J]. Bioscience Reports, 1990, 10(1): 907-917.
- 陈升军, 熊华, 周侃, 等. 米蛋白肽制备工艺研究及产品营养成分分析[J]. 中国饲料, 2008(12): 36-40.
- VOLKERT M A, KLEIN B P. Protein dispersibility and emulsion characteristics of flour soy products[J]. Food Science, 1979, 44: 93-96.
- BALTI R, BARKIA A, BOUGATEF A, et al. A heat-stable trypsin from the hepatopancreas of the cuttlefish (*Sepia officinalis*): purification and characterisation[J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 146-154.
- 彭志英. 食品科学导论[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2002: 15.