

双酶酶解制备花生降血压肽的动力学研究

芦鑫^{1,2}, 孙强^{1,2}, 张丽霞^{1,2}, 宋国辉^{1,2}, 黄纪念^{1,2*}

(1. 河南省农业科学院 农副产品加工研究所, 河南 郑州 450002;

2. 河南省农产品生物活性物质工程技术研究中心, 河南 郑州 450002)

摘要: 为解析碱性蛋白酶 2709 和胰蛋白酶依次酶解花生蛋白制备降血压肽的动力学过程, 测定了不同底物浓度和加酶量条件下酶解液的水解度(DH), 并采用 $DH = A + B \times \ln(t + C)$ 拟合水解度随时间变化曲线, 然后结合双底物顺序反应机理, 推导动力学常数, 建立动力学模型。结果表明, 碱性蛋白酶 2709 和胰蛋白酶在 45 °C 酶解反应动力学模型为 $r = 109.1573 \times [E_0] \times \exp(-0.1580 \times DH)$ 和 $r' = (1.1912 \times [E'_0] + 0.06) \times \exp[-0.4852 \times (DH' - DH_1)]$; 碱性蛋白酶 2709 和胰蛋白酶的失活系数分别为 17.4527 min^{-1} 和 0.5984 min^{-1} 。碱性蛋白酶 2709 的酶解程度影响胰蛋白酶酶解, 碱性蛋白酶 2709 较胰蛋白酶更耐受花生蛋白体系。

关键词: 花生蛋白; 动力学模型; 酶解; 功能肽

中图分类号: TS210.9 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)08-0141-05

Research on Kinetics of Preparation of Antihypertensive Peptide from Peanut Protein by Two-step Enzymolysis

LU Xin^{1,2}, SUN Qiang^{1,2}, ZHANG Li-xia^{1,2}, SONG Guo-hui^{1,2}, HUANG Ji-nian^{1,2*}

(1. Institute of Agricultural Processing, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Engineering Research Centre of Bioactive Substances in Agricultural Products, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: To analyze the kinetic process of preparation of antihypertensive peptide from successively hydrolyzing peanut protein by alkali protease 2709 and trypsin, degree of hydrolysis(DH) of samples with various substrate concentrations and enzyme dosage was measured, the kinetic constant and equation were deduced according to the mechanism of bi-substrate sequential reaction and curves of DH versus time were fitted by $DH = A + B \times \ln(t + C)$. The results showed that kinetic models of alkali protease 2709 and trypsin at 45 °C were $r = 109.1573 \times [E_0] \times \exp(-0.1580 \times DH)$ and $r' = (1.1912 \times [E'_0] + 0.06) \times \exp[-0.4852 \times (DH' - DH_1)]$, respectively, and inactive constants were 17.4527 min^{-1} and 0.5984 min^{-1} , respectively. The DH of alkali protease 2709 would influence the enzymolysis of trypsin, and the alkali protease 2709 is more stable than trypsin under peanut protein system.

Key words: peanut protein; kinetic model; enzymolysis; functional peptide

我国是花生生产大国, 有丰富的花生资源^[1]。花生蛋白是优质的植物蛋白, 广泛用于肉制品、饮料、休闲食品等食品的加工生产^[2]。花生饼粕是花生油生产过程中的副产品, 其蛋白质含量在 50% 左右, 但国内主要将其用作饲料, 其蛋白质价值未得到

充分利用。因此, 开展花生饼粕蛋白的利用研究具有重要意义。

酶法酶解农产品中的蛋白质制备功能肽是农产品综合利用研究的热点。采用该方法可以生产具有降血压、抗氧化、免疫调节等功能的肽, 生产过程基

收稿日期: 2013-02-20

基金项目: 河南省省院科技合作项目(102106000035)

作者简介: 芦鑫(1981-), 男, 河南开封人, 助理研究员, 博士, 主要从事植物蛋白加工方面的研究。

E-mail: luxinvip@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 黄纪念(1971-), 男, 河南汝南人, 研究员, 博士, 主要从事农产品加工与天然活性成分提取方面的研究。

E-mail: hjinian@sina.com

本无污染,产品安全性高,附加值高,具有广阔的发展前景^[3-4]。目前,利用酶法酶解花生蛋白制备功能肽的研究已有报道,且发现花生肽具有较强的降血压、抗氧化作用^[5-6]。但对花生肽的制备研究主要集中在其生产工艺优化方面,关于酶解动力学的研究尚未见报道。鉴于此,根据本实验室前期研究结果^[7],以花生蛋白为底物,利用碱性蛋白酶 2709 和胰蛋白酶先后酶解花生蛋白制备 ACE(血管紧张素转换酶)抑制肽,并建立其动力学模型,以便为实际生产提供理论依据;并且底物浓度和反应速率的变化关系可为花生蛋白酶解反应器的开发提供数据指导。

1 材料和方法

1.1 材料

压榨花生饼粕(开封市包公食品有限公司),含蛋白质 54.85%、水分 6.53%、油脂 5.63%、灰分 4.90%;碱性蛋白酶 2709(酶活 220 000 U/g)、胰蛋白酶(酶活 20 000 U/g)购自郑州分子科贸有限公司;牛血清白蛋白、2,4,6-三硝基苯磺酸(TBNS)、考马斯亮蓝 G-250 购自美国 Sigma 公司;NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、NaOH 等购自国药集团化学试剂有限公司。

ZDDN-II 全自动凯氏定氮仪(浙江托普仪器有限公司)、Lyovac GT1 冷冻真空干燥机(德国 SRK 公司)、DL-5-B 离心机(上海安亭科学仪器厂)、TGL-16A 离心机(金坛市亿通电子有限公司)、XS205 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)、UV-2802 型紫外可见光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)、XW-80A 漩涡混合器(上海青浦沪西仪器厂)、DF-101S 型集热式磁力加热搅拌器(金坛市医疗仪器厂)。

1.2 方法

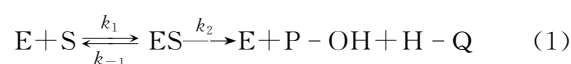
1.2.1 花生蛋白的制备 采用碱溶等电点沉淀法^[8]制备花生蛋白。

1.2.2 花生蛋白双酶酶解及水解度测定 在酶解温度 45℃、pH 值 10.50、酶解时间 150 min 的条件下,首先采用加酶量为 0.409 1 g/L 的碱性蛋白酶 2709 分别水解质量浓度为 20、40、60、80 g/L 的花生蛋白,采用 TBNS 法^[9]测定不同花生蛋白质量浓度下的水解度(DH);随后在花生蛋白质量浓度为 50 g/L 条件下分别采用 0.204 5、0.272 7、0.340 9、0.409 1、0.477 3 g/L 的碱性蛋白酶进行水解,测定不同加酶量下的水解度。

碱性蛋白酶 2709 酶解结束后,100℃灭酶

15 min,调整 pH 值为 8.50。在酶解温度 45℃、酶解时间 120 min 的条件下,采用 4.5 g/L 胰蛋白酶分别水解质量浓度为 20、40、60、80 g/L 的花生蛋白,测定不同花生蛋白质量浓度下的水解度;随后在花生蛋白质量浓度为 50 g/L 条件下分别采用 2.25、3.00、3.75、4.50、5.25 g/L 的胰蛋白酶进行水解,测定不同加酶量下的水解度。

1.2.3 碱性蛋白酶 2709 酶解花生蛋白动力学模型的构建 研究表明,蛋白酶酶解蛋白的反应符合双底物顺序反应机理^[10-12]。蛋白酶解过程由以下反应组成:



式中,E 为蛋白酶,S 为底物,ES 为中间产物,E_a 为具有酶活的蛋白酶,E_d 为失活的蛋白酶,P-OH 为羧基产物,H-Q 为氨基产物,k₁ 为生成中间产物的反应速率常数,k₋₁ 为中间产物分解的反应速率常数,k₂ 为中间产物分解为最终产物的反应速率常数,k_d 为蛋白酶失活反应速率常数。反应(1)表示蛋白被酶解的过程,其中在水溶液中,ES 分解是限速反应,且逆过程可忽略。反应(2)表示蛋白酶失活的反应过程。

在有限酶解前提下,碱性蛋白酶 2709 的反应速率为:

$$r = [S_0] \frac{d(DH)}{dt} = k_2 [ES] \quad (3)$$

式中,r 为碱性蛋白酶 2709 的酶解反应速率,[S₀] 为初始底物质量浓度(g/L),d(DH)/dt 为水解度对时间的导数,[ES] 为碱性蛋白酶 2709 酶解时中间产物质量浓度(g/L)。

碱性蛋白酶 2709 失活过程的动力学方程为:

$$-\frac{d[E_t]}{dt} = k_d [E][ES] \quad (4)$$

式中,[E] 为游离态碱性蛋白酶 2709 的质量浓度(g/L),d[E_t]/dt 为总碱性蛋白酶 2709 的质量浓度对时间的导数。

碱性蛋白酶 2709 质量浓度与水解度的关系式为:

$$\frac{d[E_0]}{[E_0]} = -\frac{k_d k_m}{k_2} d(DH) \quad (5)$$

式中,[E₀] 为碱性蛋白酶 2709 的初始蛋白酶质量浓度(g/L);k_m 为碱性蛋白酶 2709 的米氏常数,其中 k_m = (k₋₁ + k₂)/k₁;d[E₀] 为碱性蛋白酶 2709 的初始蛋白酶质量浓度导数。

对(5)式进行积分,水解度的上下限分别取 DH

和0,而总酶量的上下限为反应时间 t 时刻的 $[E]$ 和 $[E_0]$,积分简化后,有

$$[E] = [E_0] \exp\left(-\frac{k_d k_m}{k_2} \times DH\right) \quad (6)$$

将(6)式代入(3)式中,并令 $a = k_2 [E_0] / [S_0]$, $b = k_d k_m / k_2$,则

$$\frac{d(DH)}{dt} = a \times \exp(-b \times DH) \quad (7)$$

将(7)式代入(3)式中,则

$$r = [S_0] \frac{d(DH)}{dt} = [S_0] \times a \times \exp(-b \times DH) \quad (8)$$

当采用 $DH = A + B \times \ln(t + C)$ 拟合碱性蛋白酶2709的水解曲线时,则

$$\frac{d(DH)}{dt} = B \times \exp\left(\frac{A}{B}\right) \times \exp\left(-\frac{1}{B} \times DH\right) \quad (9)$$

因此对比(7)式和(9)式,推出 $a = B \times \exp(A/B)$, $b = 1/B$ 。

1.2.4 胰蛋白酶后续酶解花生蛋白动力学模型的构建 碱性蛋白酶水解150 min后,加热灭酶,调整pH值与温度,加入胰蛋白酶进行酶解。同理有胰蛋白酶质量浓度与水解度的关系式为:

$$\frac{d[E'_0]}{[E'_0]} = -\frac{k'_d k'_m}{k'_2} d(DH') \quad (10)$$

式中, $[E'_0]$ 为初始胰蛋白酶质量浓度(g/L), k'_2 为胰蛋白酶酶解时中间产物生成最终产物的反应速率常数, $d(DH')$ 为胰蛋白酶酶解蛋白的水解度的导数, k'_m 为胰蛋白酶的米氏常数, k'_d 为胰蛋白酶失活反应速率常数, $d[E'_0]$ 为胰蛋白酶的初始蛋白酶质量浓度导数。

前期碱性蛋白酶2709酶解产生的产物可能会削弱胰蛋白酶的活性。对(10)式进行定积分,总酶量的下限为 $[E'_0] - d$,其中 d 表示碱性蛋白酶2709酶解花生蛋白对胰蛋白酶后续酶解的影响,上限为 $[E']$,即胰蛋白酶质量浓度;而水解度的下限为 DH_1 ,即碱性蛋白酶2709酶解花生蛋白反应的最终水解度。

$$\int_{[E'_0]-d}^{[E']} \frac{d[E'_0]}{[E'_0]} = -\frac{k'_d k'_m}{k'_2} \int_{DH_1}^{DH'} d(DH') \quad (11)$$

积分简化后,代入(3)式整理,并且由于是有限酶解,底物远远过量,所以有 $[S_0] \approx [S']$,令

$$a' = \frac{k'_2 ([E'_0] - d)}{[S_0]}, b' = \frac{k'_d k'_m}{k'_2},$$

$$c' = \exp\left(\frac{k'_d k'_m DH_1}{k'_2}\right)$$

$$\text{则 } \frac{d(DH')}{dt} = a' \times \exp[-b' \times (DH' - DH_1)]$$

$$= a' \times c' \times \exp(-b' \times DH') \quad (12)$$

$$\text{则 } r' = [S_0] \frac{d(DH')}{dt} = [S_0] \times a' \times \exp[-b' \times (DH' - DH_1)] \quad (13)$$

1.2.5 蛋白酶失活系数的计算 底物抑制和产物抑制会导致蛋白酶在酶解过程中发生失活现象。因此,分析蛋白酶失活动力学可以更好地推动酶解反应进行,提高蛋白酶的酶解效果。根据方程(4)、 $[E] = k_m [E_0] / [S]$, $[ES] = [E][S] / k_m$,可以得出:

$$-\frac{d[E_t]}{dt} = k_d [E][ES] = k_d k_m [E_0] \frac{[E_0]}{[S_0]} \quad (14)$$

式中, $k_d k_m$ 是蛋白酶失活系数。对于碱性蛋白酶2709酶解时,由 $a = k_2 [E_0] / [S_0]$ 和 $b = k_d k_m / k_2$ 可知, $a \times b = k_d k_m [E_0] / [S_0]$ 。因此,以 $a \times b$ 为因变量, $[E_0] / [S_0]$ 为自变量进行线性回归,求出碱性蛋白酶2709的失活系数 $k_d k_m$ 。而对于胰蛋白酶酶解,此时 $a' = k'_2 ([E'_0] - d) / [S_0]$ 和 $b' = k'_d k'_m / k'_2$, $a' \times b' = k'_d k'_m [E'_0] / [S_0] - k'_d k'_m \times d / [S_0]$ 。同理,用 $a' \times b'$ 和 $[E'_0] / [S_0]$ 做线性回归,求出胰蛋白酶的失活系数 $k'_d k'_m$ 。

1.3 数据处理

采用SAS 9.1.3中nlin程序进行非线性拟合,拟合方法为Gauss-Newton。

2 结果与分析

2.1 碱性蛋白酶2709酶解的动力学参数

由图1可知,在相同加酶量条件下,花生蛋白质量浓度为20 g/L时,其水解度明显高于其他3组,这是由于该组的酶料比最高,提高了蛋白酶与花生蛋白作用位点发生碰撞的机会,从而提高反应速度。由于花生蛋白的作用位点有限,随着酶解反应的进行,可供反应的位点逐渐减少,酶解速度减慢,水解度增幅减少,直至平衡。

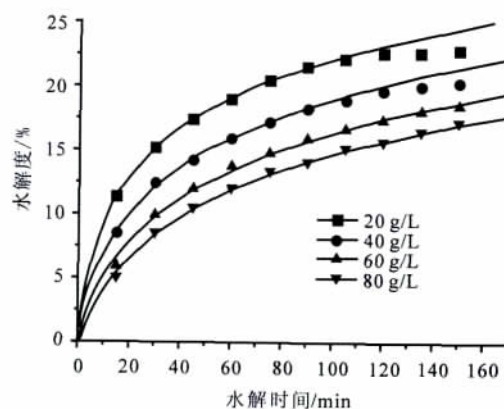


图1 不同花生蛋白质量浓度对碱性蛋白酶2709酶解花生蛋白的影响

如图 2 所示,在相同的花生蛋白质量浓度下,随着加酶量的增加,样品的水解度增加。这是由于伴随着加酶量的增加,催化花生蛋白水解的活性中心增加,从而提高蛋白水解反应的速度,使得单位时间

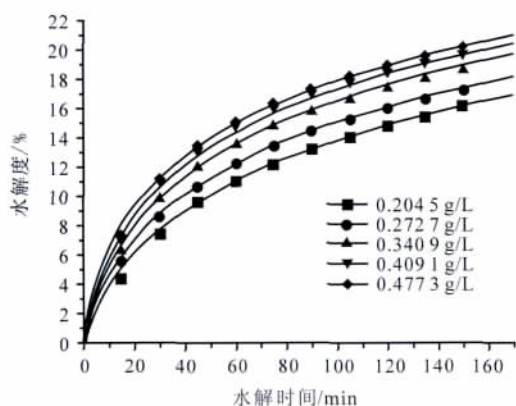


图 2 加酶量对碱性蛋白酶 2709 酶解花生蛋白的影响

表 1 碱性蛋白酶 2709 酶解花生蛋白的拟合曲线方程和参数

$[S_0]/$ (g/L)	$[E_0]/$ (g/L)	$[E_0]/$ $[S_0]$	回归方程	R^2	a/min^{-1}	b	$DH_1/\%$
20	0.409 1	0.020 4	$DH = -6.302 0 + 6.125 8 \ln(t + 3.013 0)$	0.990 7	2.189 6	0.163 2	22.79
40	0.409 1	0.010 2	$DH = -11.220 6 + 6.469 1 \ln(t + 6.651 9)$	0.991 3	1.141 7	0.154 6	20.28
60	0.409 1	0.006 8	$DH = -13.782 1 + 6.429 5 \ln(t + 8.592 9)$	0.996 4	0.753 8	0.155 5	18.52
80	0.409 1	0.005 1	$DH = -16.021 2 + 6.534 2 \ln(t + 11.682 3)$	0.995 8	0.562 8	0.153 0	17.24
50	0.204 5	0.004 1	$DH = -17.198 8 + 6.540 3 \ln(t + 14.796 0)$	0.995 3	0.471 6	0.152 9	16.18
50	0.272 7	0.005 4	$DH = -15.272 2 + 6.422 3 \ln(t + 12.096 6)$	0.997 0	0.595 6	0.155 7	17.34
50	0.340 9	0.006 8	$DH = -13.557 9 + 6.428 4 \ln(t + 8.245 3)$	0.996 2	0.780 1	0.155 6	18.61
50	0.409 1	0.008 2	$DH = -11.834 9 + 6.240 3 \ln(t + 6.625 6)$	0.993 6	0.936 6	0.160 2	19.72
50	0.477 3	0.009 5	$DH = -11.285 4 + 6.243 6 \ln(t + 6.859 5)$	0.995 9	1.024 3	0.160 2	20.18

2.2 胰蛋白酶酶解的动力学参数

由图 3 和图 4 可以看出,与碱性蛋白酶 2709 水解花生蛋白情况相似,高质量浓度花生蛋白和高加酶量有利于胰蛋白酶水解花生蛋白,但是由于胰蛋白酶的水解特异性,随着反应时间的延长,体系中能够参与水解的反应位点减少,水解速度减慢,水解度趋于平缓。

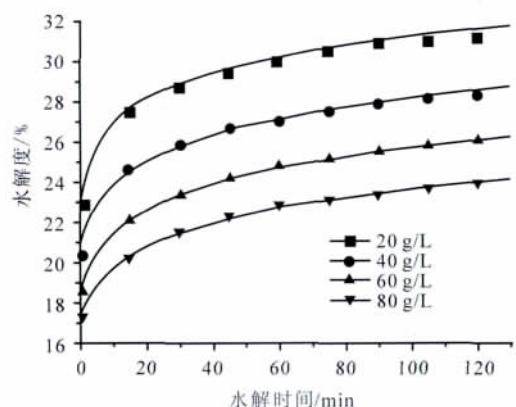


图 3 花生蛋白质量浓度对胰蛋白酶酶解花生蛋白的影响

内高加酶量作用的花生蛋白具有较高的水解度。

由表 1 可知,动力学参数 a 与花生蛋白质量浓度和加酶量有关,其随着花生蛋白质量浓度的增加而下降,随着加酶量增加而增加。根据 $a = k_2[E_0]/[S_0]$,可以通过 $[E_0]/[S_0]$ 和 a 作图进行线性拟合,得出回归方程: $a = 109.157 3[E_0]/[S_0]$, R^2 为 0.996 9,推出 k_2 为 $109.157 3 \text{ min}^{-1}$ 。动力学参数 b 基本不受花生蛋白质量浓度和加酶量的影响,在 $0.158 0 \pm 0.004 0$ 波动。因此在一个恒温反应条件下, b 可以认为是一个常数。将 a 、 b 代入(8)式得出碱性蛋白酶 2709 酶解花生蛋白的速率方程为: $r = 109.157 3 \times [E_0] \times \exp(-0.158 0 \times DH)$,分析碱性蛋白酶 2709 的速率方程可以看出,增加蛋白酶质量浓度,可以加速酶解反应;当水解度上升时,酶解速率下降。

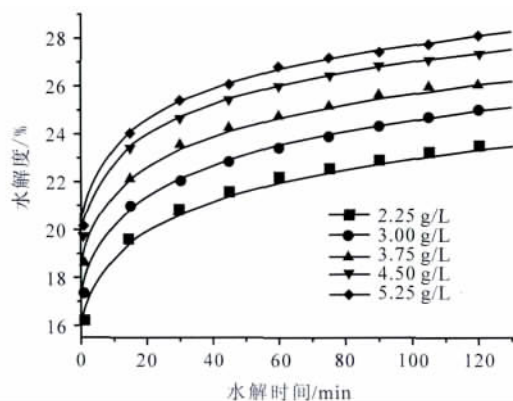


图 4 加酶量对胰蛋白酶酶解花生蛋白的影响

由表 2 可知,动力学参数 a' 与花生蛋白质量浓度和加酶量有关,也是随着花生蛋白质量浓度的增加而下降,随着加酶量增加而增加。根据 $a' = k'_2 \times [E_0]/[S_0] - k'_2 \times d/[S_0]$,可以通过 $[E_0]/[S_0]$ 和 a' 作图进行线性拟合,得出回归方程: $a' = 1.191 2 \times [E_0]/[S_0] + 0.06$, R^2 为 0.994,推出 k'_2 为 1.192 min^{-1} 。动力学参数 b' 也是个常数,在 $0.485 2 \pm 0.014 8$ 波动。将 a' 、 b' 代入(13)式得到胰蛋白酶酶解花生蛋白的

速率方程为:

$$r' = (1.1912 \times [E']_0 + 0.06) \times \exp[-0.4852(DH' - DH_1)]$$

分析胰蛋白酶的速率方程发现,胰蛋白酶的酶解速率除受胰蛋白酶质量浓度、水解度的影响外,还

受前阶段碱性蛋白酶 2709 酶解程度的影响。胰蛋白酶的 k'_2 远小于碱性蛋白酶 2709 的 k_2 ,除了 2 种蛋白酶自身特性差异以外,碱性蛋白酶 2709 前期酶解产生的某些产物对胰蛋白酶有抑制作用,从而导致 k'_2 降低。

表 2 胰蛋白酶酶解花生蛋白的拟合曲线方程和参数

$[S_0]/$ (g/L)	$[E']_0/$ (g/L)	$[E']_0/$ $[S_0]$	回归方程	R^2	a'/min^{-1}	b'	c'
20	4.50	0.225 0	$DH=21.9652+2.0107\ln(t+1.5240)$	0.991 8	0.330 0	0.497 3	83 647.03
40	4.50	0.112 5	$DH=18.3762+2.1232\ln(t+2.9464)$	0.994 5	0.192 1	0.471 0	14 067.47
60	4.50	0.075 0	$DH=16.0681+2.0837\ln(t+3.2414)$	0.997 1	0.148 0	0.479 9	7 244.77
80	4.50	0.056 2	$DH=14.5850+1.9531\ln(t+3.8656)$	0.996 8	0.131 5	0.512 0	6 815.76
50	2.25	0.045 0	$DH=13.3443+2.0661\ln(t+3.6532)$	0.993 2	0.122 7	0.484 0	2 517.90
50	3.00	0.060 0	$DH=14.4748+2.1732\ln(t+3.7733)$	0.997 6	0.123 1	0.460 2	2 919.06
50	3.75	0.075 0	$DH=16.1038+2.0622\ln(t+3.1417)$	0.993 4	0.143 8	0.484 9	8 302.76
50	4.50	0.090 0	$DH=17.5558+2.0344\ln(t+2.9742)$	0.998 3	0.164 3	0.486 2	14 591.22
50	5.25	0.105 0	$DH=18.1793+2.0589\ln(t+2.6374)$	0.996 7	0.183 8	0.485 7	18 058.11

2.3 蛋白酶失活系数

由图 5 可以看出,酶料比与 $a \times b$ 的回归关系为: $a \times b = 17.4527[E']_0/[S_0]$ 和 $a' \times b' = 0.5984[E']_0/[S_0] + 0.027$, R^2 分别为 0.998 5 和 0.983 4。碱性蛋白酶 2709 和胰蛋白酶的失活动力学系数为 17.4527 min^{-1} 和 0.5984 min^{-1} 。失活动力学系数越小,底物及产物抑制作用越强^[13]。由此可知,体系中底物及产物对碱性蛋白酶 2709 抑制能力较弱,而对胰蛋白酶的抑制能力较强。因此,为了提高胰蛋白酶酶解效果,有必要分析碱性蛋白酶 2709 酶解产物组成,分离出抑制性强的某些产物,以提高胰蛋白酶的酶解效率。

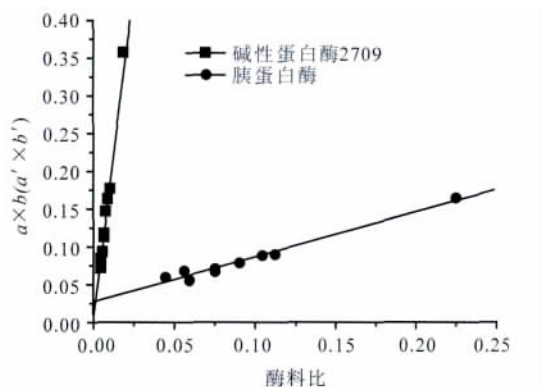


图 5 酶料比和动力学参数 $a \times b(a' \times b')$ 的回归关系

3 结论

研究结果表明,碱性蛋白酶 2709 和胰蛋白酶的酶动力学模型为: $r = 109.1573 \times [E_0] \times \exp(-0.1580 \times DH)$ 和 $r' = (1.1912 \times [E']_0 + 0.06) \times \exp[-0.4852 \times (DH' - DH_1)]$ 。由胰蛋白酶动力学模型可知碱性蛋白酶 2709 对花生蛋白的酶解程度

会影响后续胰蛋白酶的酶解过程。

此外,碱性蛋白酶 2709 和胰蛋白酶的失活系数分别为 17.4527 min^{-1} 和 0.5984 min^{-1} 。花生蛋白对碱性蛋白酶 2709 抑制较弱,对胰蛋白酶抑制较强,碱性蛋白酶 2709 较胰蛋白酶更耐受花生蛋白体系。

参考文献:

- [1] 张秀青,刘珉. 中国花生产业国际竞争力实证研究[J]. 河南农业科学,2008(11):42-46.
- [2] 董贝森. 花生蛋白粉的制取及在食品工业中的应用[J]. 中国油料作物学报,1998,20(3):85-89.
- [3] 张贵川,袁吕江. 食源性生物活性肽的研究进展[J]. 中国粮油学报,2009,24(9):157-162.
- [4] 马海乐,刘斌,李树君,等. 酶法制备大米抗氧化肽的蛋白酶筛选[J]. 农业机械学报,2010,41(11):119-123.
- [5] 彭维兵,何秋霞,刘可春,等. 花生肽对原发性高血压大鼠的降压作用[J]. 中国食物与营养,2012,18(8):71-73.
- [6] 陈贵堂,赵立艳,丛涛,等. Alcalase 蛋白酶水解花生蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 食品工业科技,2008(3):119-121,124.
- [7] 芦鑫,孙强,宋国辉,等. 固定化碱性蛋白酶水解花生蛋白制备 ACE 抑制肽[J]. 食品科技,2012,37(7):166-171.
- [8] Yu J M, Aahmedna M, Goktepe I. Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing[J]. Food Chemistry,2007,103(1):121-129.
- [9] Adler-Nissen J. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzene-sulfonic acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1979,27:1256-1262.
- [10] Márquez M C, Vázquez M A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis[J]. Process Biochemistry,1999,35:111-117.
- [11] 刘璘,叶峰,欧志敏. 蛋白质酶法有限水解过程反应机理和动力学特性[J]. 化工学报,2002,53(2):199-202.
- [12] 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.
- [13] 彭志英,陈中,龙彪,等. 酶解法制备鸡蛋蛋白肽的动力学研究[J]. 华南理工大学学报,2006,34(12):55-58.