

## 胰酶水解米渣制备寡肽工艺的优化

徐 敏, 杜先锋\*

(安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036)

**摘 要:** 以制备麦芽糖浆的副产物米渣为原料, 选取胰酶为改性用酶。在对加酶量、固液比、pH、温度的单因素试验基础上, 采用 4 因素 3 水平的响应面设计方法, 以水解度 (DH) 为评定指标, 并综合考虑限制性酶解程度与产品分子量分布之间的相关性, 得到了以寡肽为水解目标的最佳酶解工艺参数: 加酶量为底物的 1.6%, 固液比为 1:9, pH 值为 8.5, 温度为 55℃, 反应时间为 3.0 h。经脱色与喷雾干燥后, 水解产物的分子量分布基本上都处于 1 000 u 以下, 且以二肽、三肽为主。

**关键词:** 米渣; 寡肽; 酶改性; 响应面; 分子量分布

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0714-07

### Optimization of hydrolyzing rice residue for preparing oligopeptide by pancreatin

XU Min, DU Xian-feng

(School of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** Rice residue, a by-product from starch syrup industry, was hydrolyzed by using pancreatin with the objective of obtaining oligopeptide. Based on single factor tests, hydrolysis conditions were optimized by using a response surface methodology (RSM) on the degree of hydrolysis (DH) and investigating the relationship between DH and the molecular weight distributions. The optimum values for pancreatin concentration, substrate concentration, temperature, pH and hydrolysis time were found to be 1.6 g/100 g protein, 1:9 (w:v), 55℃, pH 8.5 and 3.0 h. The products made by spray-drying and decolorization with molecular weight (Mw) below 1 000 in the final peptides was over 95%, and most of the final peptides were dipeptide or tripeptide.

**Key words:** rice residue; oligopeptide; enzymatic modification; RSM; molecular weight distribution

米渣是利用早籼稻或碎米为原料生产淀粉糖的副产品, 其中大米蛋白含量高达 50%以上(干基)<sup>[1]</sup>, 是提取高纯度大米蛋白的优良原料。然而, 由于经历长时间的高温液化和淀粉酶水解, 大米蛋白二级结构发生改变, 分子内和分子间产生交联<sup>[2]</sup>, 美拉德反应 (Maillard) 使蛋白质与还原糖以 N-糖肽键发生结合<sup>[3]</sup>, 生成的深暗色色素使米渣在外观上呈暗黄色, 淀粉部分降解, 以极限糊精的形式与蛋白质胶合<sup>[4]</sup>, 因此, 米渣中大米蛋白与天然的大米蛋白相比, 溶解度大大降低并失去与之相关的某些功能性质, 限制了其在食品中的应用。

酶法改性是利用酶对蛋白质进行降解和修饰作用, 使其变成可溶性的肽或氨基酸而被抽提出来<sup>[5]</sup>,

改善变性大米蛋白的功能性质<sup>[6]</sup>。针对不同改性目标, 通过分析不同蛋白酶对米渣的酶解模式以及米渣酶解产物中肽分子的分布变化, 是确定改性用酶及酶解条件的关键。

寡肽是指肽链上氨基酸数目在 10 个以内的肽分子, 现代营养学研究发现, 蛋白质经消化道中酶作用后并不完全是以游离氨基酸的形式被吸收, 且机体对寡肽的吸收代谢速度比对游离氨基酸快。同时, 某些寡肽不仅具有营养功能, 而且具有重要的生理功能, 有些功能是原蛋白质和组成氨基酸所不具备的独特生理功能。例如, 调节免疫、抗菌、抗血栓形成和降血压等<sup>[7-9]</sup>。本研究以寡肽为改性目标, 通过选择与寡肽目标相适应的酶解模式, 确定

收稿日期: 2012-04-19

基金项目: 安徽省战略性新兴产业科技计划项目 (11010302147) 资助。

作者简介: 徐 敏, 女, 硕士研究生。E-mail: xumin\_cn@163.com

\* 通讯作者: 杜先锋, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: dxf@ahau.edu.cn

改性用酶, 同时, 通过对不同酶解产物的凝胶色谱分析, 探讨米渣的限制性酶解程度与分子量分布之间的内在关系, 以此确定米渣的适宜酶解工艺, 为米渣的开发利用提供理论和实践基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

米渣由合肥锦泰糖业有限公司提供; 中性蛋白酶 ( $1.2 \times 10^5 \text{ u} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 苏州维邦生物科技有限公司; 胰酶 ( $1.4 \times 10^5 \text{ u} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 碱性蛋白酶 ( $2.0 \times 10^5 \text{ u} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 广西庞博生物工程公司; Sephadex G-25 凝胶, Pharmacia 公司; 分子量分布分析中标准曲线绘制所用标准品均由 Sigma 公司提供。

### 1.2 仪器与设备

CR-φ100 板框压滤机, 河南省新乡市锦城环保

设备有限公司; OPD-8 喷雾干燥机, 上海大川原设备有限公司; Waters600 高效液相色谱仪 (配 2487 紫外检测器和 Empower 工作站 GPC 软件), 美国 Waters 公司; TSK-gel 2000SWXL (7.8 mm×300 mm) 色谱柱, 日本 TOSOH (东曹) 公司。

### 1.3 方 法

**1.3.1 酶解工艺** 米渣→预处理→加去离子水→调节 pH 值→加酶恒温水解→灭酶→离心得上清液

**1.3.2 改性用酶的选择** 用蒸馏水配置 10% 的米渣悬浊液, 置于恒温酶反应器中待酶解。选用的蛋白酶及各自酶解条件如表 1 所示。酶解时间为 3.0 h, 反应结束后立即置于 90℃ 水浴中灭酶 10 min, 冷却至室温后, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 收集上清液, 定容至 250 mL, 取一定量进行水解度和蛋白质回收率测定。

表 1 3 种酶的水解条件

Table 1 Conditions for hydrolysis using three proteases

酶的种类 Enzyme type	pH	温度/℃ Temperature	固液比 Ratio of solid to liquid	加酶量/ $\text{u} \cdot \text{g}^{-1}$ Enzyme dose
中性蛋白酶 Neutrase	7.5	50	1 : 10	1 400
碱性蛋白酶 Alcalase	9.0	50	1 : 10	1 400
胰酶 Pancreatin	8.0	50	1 : 10	1 400

**1.3.3 水解度 (DH) 的计算**<sup>[10]</sup> 蛋白质的水解度是指蛋白质水解反应过程中被裂开的肽键的百分数, 采用甲醛滴定法, 按公式计算:  $DH/\% = h/h_{tot} \times 100\%$ , 式中:  $h$  为蛋白质水解后每克蛋白中被裂解的肽键的量 ( $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 即为氨基氮含量;  $h_{tot}$  为每克原料蛋白中肽键的量 ( $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ ), 即为总氮含量。

氨基氮含量的测定采用甲醛滴定法 (GB/T5009.39-2003); 总氮含量的测定采用凯氏定氮法 (GB/T5009.5-2003)。

### 1.3.4 蛋白质回收率的测定

蛋白质回收率/ $\%$  =  $\frac{\text{酶解液中的总蛋白质含量}}{\text{酶解原料中的总蛋白含量}} \times 100\%$

式中: 蛋白质的含量测定采用凯氏定氮法, 蛋白质系数为 6.7<sup>[12]</sup>。

**1.3.5 单因素试验** 测定酶与底物比 E/S, 底物浓度 S, 反应 pH 值, 反应温度 T 对水解度的影响, 初步确定胰酶的适宜水解条件。

**1.3.6 米渣水解条件的响应面优化** 在单因素的试验所确定的适宜水解条件下, 采用四因素二次通用旋转设计, 以水解度为响应值, 通过考察上述 4 因素对水解程度的协同影响来确定酶的较佳反应条件。该设计采用 SAS 数据处理中的响应面分析。因素水平编码见表 2。

表 2 因素水平编码

Table 2 Encoding value of factors and levels

水平 Level	E/S/%	S	pH	T/℃
-2	0.0	1 : 2	7.0	40
-1	0.5	1 : 4	7.5	45
0	1.0	1 : 6	8.0	50
1	1.5	1 : 8	8.5	55
2	2.0	1 : 10	9.0	60

**1.3.7 分子量分布的测定** 凝胶色谱法。在 Sephadex G-25 (1.0×80 cm) 凝胶柱上以 0.02 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸-乙酸钠 (pH 为 4.0) 进行洗脱, 保持洗脱液的体积流量为 0.4 mL·min<sup>-1</sup>, 上样量 1.0 mL, 洗脱后在 280 nm 处用核酸蛋白质检测仪检测出光吸收值并由小型记录仪记录出洗脱曲线。以牛血清蛋白 (Mr 68 000)、杆菌肽 (Mr 1 422)、VB12 (1 300)、酪氨酸 (Mr 181) 为分子量参照物, 标准分子量的常用对数与保留时间之间的关系曲线为:  $\lg Mr = -0.052 2t + 5.360 3$ ,  $R^2 = 0.998 7$ , 其中,  $t$  为保留时间,  $Mr$  为相对分子质量。

HPLC 法。工作条件如下: 色谱柱: TSK gel G2000 SW×L (7.8×300 mm); 流动相: 乙腈: 水: TFA = 45:55:0.1; 检测波长: 220 nm; 柱温: 30℃; 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>; 上样量: 10 μL。标准分子量:

细胞色素 C(MW 12 500); 抑肽酶(MW 6 500); 杆菌肽(MW 1 450); 乙氨酰氨-乙氨酰氨-精氨酸(MW 451); 乙氨酰氨-乙氨酰氨-乙氨酸(MW 189)。各标样相对分子质量对数与各标样经 HPLC 的保留时间的关系曲线为  $\lg M_w = 7.34 - 0.24T$ ,  $R^2 = 0.9840$ , 其中,  $T$  为保留时间(min),  $M_w$  为重均分子量。

## 2 结果与分析

### 2.1 米渣水解酶的筛选

比较 3 种蛋白酶的水解情况, 以胰酶的水解效果最好, 如表 3 所示。

胰酶的最适 pH 值偏碱性, 大米蛋白含有 80%

的碱溶性蛋白<sup>[13]</sup>, 偏碱性的水解环境利于蛋白的溶出, 使酶与底物的接触机会大大增加。同时, 胰酶是从动物胰脏提取的粗制复合酶制剂, 除了含有胰蛋白酶外, 还含有胰凝乳蛋白酶, 弹性蛋白酶和羧肽酶, 它们的底物与特异性酶切位点如表 4 所示<sup>[14-17]</sup>。这种广泛的酶切模式易于获得肽链较短的寡肽产物。因此, 本试验选用胰酶为水解用酶, 并对其水解条件做进一步研究。

### 2.2 单因素试验

按照 1.3.2 所列胰酶水解条件, 以水解度为指标, 通过只改变一个因素, 来比较各因素较佳的酶解反应范围。

表 3 不同蛋白酶对米渣水解效果的比较

Table 3 Effects of hydrolysis using three proteases

酶的种类 Enzyme type	水解度/% DH	蛋白质回收率/% Protein recovery
中性蛋白酶 Neutrase	4.20	34.4
碱性蛋白酶 Alcalase	10.3	53.6
胰酶 Pancreatin	12.6	64.1

表 4 胰酶主要成分的作用底物和特异性酶切位点

Table 4 Substrates and the hydrolysis site of pancreatin

主要成分 Composition	编号 Number	底物 Substrate	特异性 (提供R1的氨基酸残基) Specificity (supply R1 amino acid residues)
胰蛋白酶 Trypsin	EC 3.4.21.4	蛋白质和多肽 Protein and peptide	Lys, Arg
胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin	EC 3.4.21.1	蛋白质和多肽 Protein and peptide	Tyr, Phe, Trp
弹性蛋白酶 Elastase	EC 3.4.4.7	弹性蛋白质和某些其它蛋白质 Elastic protein and other protein	Ala
羧肽酶 A Carboxypeptidase A	EC 3.4.17.1	蛋白质和多肽 Protein and peptide	切断C末端氨基酸

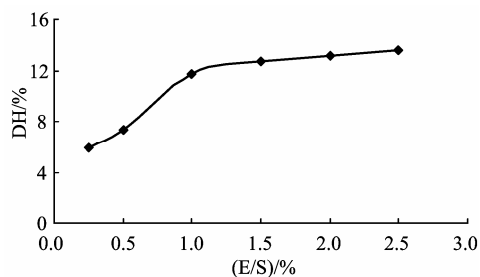


图 1 酶与底物比对水解度的影响

Figure 1 Effects of ratio of enzyme to substrate on DH

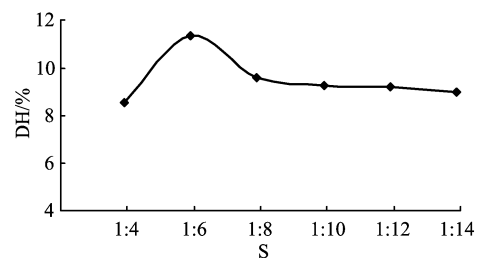


图 2 底物浓度对水解度的影响

Figure 2 Effects of substrate concentration on hydrolysis degree

**2.2.1 酶与底物比 E/S 对 DH 的影响** 由图 1 可知, E/S 在 0.25%~1% 之间时, 水解度上升趋势明显; 超过 1% 时, 水解度上升趋势平缓, 此时蛋白酶对底物的作用位点已大大减少, 因而再加大酶的用量所产生的作用也很小。

**2.2.2 底物浓度 S 对 DH 的影响** 由图 2 可知, S 对 DH 的影响呈现出先迅速上升, 后迅速下降并趋于平衡的趋势, 1:6 时达到最大值。固液比太大时, 酶

与底物不能充分接触, 导致反应不完全; 固液比太小时, 酶的浓度被稀释, 影响了酶解反应的进行。

**2.2.3 pH 值对 DH 的影响** 由图 3 可知, pH 值对 DH 的影响先上升后下降。米渣中的大米蛋白主要是碱溶性蛋白, 因此, pH 值的增加有利于大米蛋白的溶出。同时, 酶也是蛋白质, pH 值会影响其蛋白质空间结构, 从而影响酶的活性。

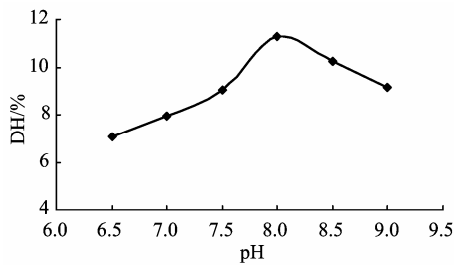


图 3 pH 值对水解度的影响

Figure 3 Effects of pH on hydrolysis degree

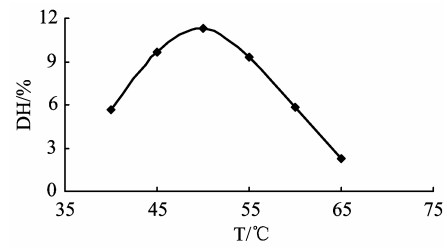


图 4 温度对水解度的影响

Figure 4 Effects of hydrolysis temperature on hydrolysis degree

**2.2.4 反应温度 T 对 DH 的影响** 由图 4 可知,温度对水解度的影响呈现出先增加后迅速减小的趋势。这是因为在一定范围内,温度升高,酶活性增加,酶解效率相应提高;而当温度超过酶的最适作用温度后,随着温度升高蛋白酶逐渐失活变性,酶解效率逐步下降。

**2.3 胰酶水解条件的优化**

由单因素试验结果,采用响应面分析中的二次通用旋转组合设计进行参数优化,用 SAS9.2 进行

数据分析。二次通用旋转组合设计实验安排及结果如表 5。

得到 E/S ( $X_1$ )、S ( $X_2$ )、pH ( $X_3$ )、T ( $X_4$ ) 的二次多项回归模型:

$$Y = -295.931 - 18.20214X_1 - 3.583512X_2 + 54.27286X_3 + 3.916845X_4 - 6.186429X_1^2 + 0.6075X_1X_2 + 2.63X_1X_3 - 0.206339X_2^2 + 0.637X_2X_3 - 3.531429X_3^2 - 0.035164X_4^2$$

表 5 响应面实验设计及结果

Table 5 RSM design and its results

编号 Code	$X_1$ (E/S)	$X_2$ (S)	$X_3$ (pH)	$X_4$ (T)	Y(DH/%)	编号 Code	$X_1$ (E/S)	$X_2$ (S)	$X_3$ (pH)	$X_4$ (T)	Y(DH/%)
1	1	1	1	1	6.30	17	2	0	0	0	0.28
2	1	1	1	-1	7.86	18	-2	0	0	0	9.61
3	1	1	-1	1	5.40	19	0	2	0	0	5.32
4	1	1	-1	-1	6.90	20	0	-2	0	0	10.34
5	1	-1	1	1	4.76	21	0	0	2	0	6.43
6	1	-1	1	-1	6.60	22	0	0	-2	0	8.77
7	1	-1	-1	1	6.70	23	0	0	0	2	6.09
8	1	-1	-1	-1	6.42	24	0	0	0	-2	9.14
9	-1	1	1	1	6.54	25	0	0	0	0	12.47
10	-1	1	1	-1	8.34	26	0	0	0	0	11.31
11	-1	1	-1	1	7.24	27	0	0	0	0	10.31
12	-1	1	-1	-1	9.56	28	0	0	0	0	11.45
13	-1	-1	1	1	5.60	29	0	0	0	0	12.34
14	-1	-1	1	-1	9.86	30	0	0	0	0	11.46
15	-1	-1	-1	1	10.21	31	0	0	0	0	11.52
16	-1	-1	-1	-1	13.75						

对模型进行方差分析,结果见表 6。模型的  $P < 0.0001$ ,表明回归模型极显著,故可用上述回归方程描述各因子与响应值之间的关系 ( $R^2 = 85.61\%$ )。失拟项  $P > 0.05$ ,不显著,说明该模型拟合程度良好,试验误差小,可以用此模型来分析和预测胰酶水解米渣的工艺结果。

经回归分析得出方程  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  的影响是高度显著的,且一次项二次项是显著的 ( $P < 0.001$ ),说明响应面分析所选的主效应都达到显著水平。其中,液固比和加酶量, pH 值和加酶量,加酶量和

温度之间的交互作用较显著,绘制响应面图见图 5。同时由  $F$  值和  $P$  值可以看出,得到的 E/S、S、pH 和 T 这 4 个因素对 DH 的影响程度为:  $E/S > T > S > pH$ 。

采用上述模型模拟出来的最佳工艺参数为:  $E/S = 1.5874\%$ ,  $S = 1:8.7403$ ,  $pH = 8.6075$ ,  $T = 54.2240^\circ C$ ,为便于实际操作,将优化的条件调整为:  $E/S = 1.6\%$ ,  $S = 1:9$ ,  $pH = 8.5$ ,  $T = 55^\circ C$ ,此条件下测得实际水解度为 11.33%,与预测值 11.55%相比,相对偏差约为 1.9%。

表 6 对 DH 模型的方差分析  
Table 6 Analysis of variance for the response of DH

方差来源 Source	自由度 DF	平方和 SS	均方和 MS	F值 F value	P值 P value
模型 Model	14	231.144 6	16.510 33	13.749 85	<0.000 1
$X_1$	1	62.791 35	62.791 35	52.292 82	<0.000 1
$X_2$	1	10.401 67	10.401 67	8.662 539	0.009 5
$X_3$	1	9.375	9.375	7.807 528	0.013 0
$X_4$	1	21.357 07	21.357 07	17.786 23	0.000 7
$X_1X_1$	1	68.400 84	68.400 84	56.964 42	<0.000 1
$X_1X_2$	1	5.904 3	5.904 3	4.917 618	0.041 4
$X_1X_3$	1	6.916 9	6.916 9	5.760 415	0.028 9
$X_1X_4$	1	3.330 625	3.330 625	2.773 754	0.115 3
$X_2X_2$	1	19.479 83	19.479 83	16.222 86	0.001 0
$X_2X_3$	1	6.502 5	6.502 5	5.415 301	0.033 4
$X_2X_4$	1	0.297 025	0.297 025	0.247 363	0.625 7
$X_3X_3$	1	22.288 57	22.288 57	18.561 99	0.000 5
$X_3X_4$	1	0.354 025	0.354 025	0.294 833	0.594 6
$X_4X_4$	1	22.099 63	22.099 63	18.404 64	0.000 6
一次项 Linear	4	103.925 1	25.981 27	21.637 28	<0.000 1
二次项 Quadratic	4	103.913 6	25.978 4	21.634 89	<0.000 1
交互项 Cross product	6	23.305 98	3.884 329	3.234 881	0.028 2
误差 Error	16	19.212 23	1.200 764		
失拟项 Lack of fit	10	16.127 54	1.612 754	3.136 957	0.087 4
纯误差 Pure error	6	3.084 686	0.514 114		
合计 Total	30	250.356 9			

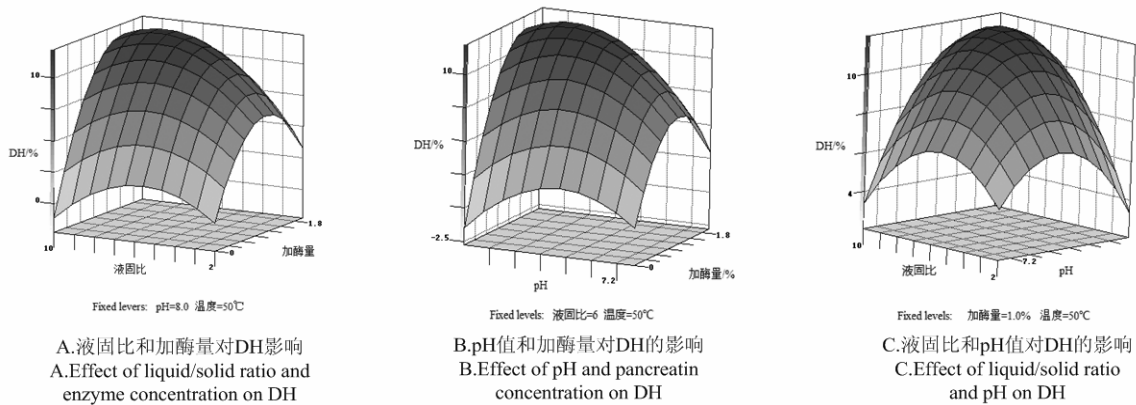


图 5 不同变量对水解度的响应面  
Figure 5 Response surface plots showing the effects of variables on DH

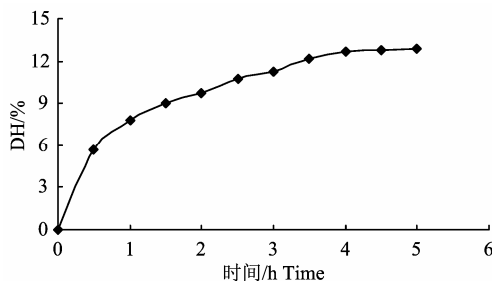


图 6 胰酶对米渣的水解进程曲线  
Figure 6 DH during different stages of enzymatic hydrolysis using pancreatin

### 2.4 水解时间的控制

**2.4.1 米渣的水解进程曲线** 在上述优化条件下, 考察时间对水解度的影响。从图 6 中可以看出, 随着酶解时间的延长, 水解度不断增大, 尤其在起初的 1.0 h 内增长较快, 此后逐渐减缓。酶解时间为 4.0 h 时, 水解度达到 12.75%, 进一步延长水解时间, 水解度逐渐趋于平缓。随着酶解的进行, 水解速率不断下降的主要原因可能在于: 1) 蛋白分子中能被酶水解的特异性肽键数目不断减少; 2) 酶在反应体系中逐渐失活; 3) 底物和水解产物之间的竞争

性抑制作用<sup>[18]</sup>。

**2.4.2 米渣限制性酶解程度与分子量分布** 对于米渣来说, 一部分酶解反应可能属于固液两相反应, 即不溶性的大米蛋白固相和可溶性蛋白酶液相之间的两相反应。某些不溶的蛋白虽然肽键被蛋白酶打断, 但蛋白质仍然没有溶出, 这样肽链末端氨基上可以解离的  $H^+$  不能进入溶液与甲醛结合并被碱滴

定, 导致 DH 偏低, 预测分子量偏离实际分子量。寡肽对分子量和分子量分布有特殊的要求, 了解不同时间下米渣的酶解程度对于水解产物分子量的控制是很有必要的。制取了反应时间分别为 1.0 h、2.0 h、3.0 h、4.0 h 的水解液 (水解度分别为 7.83%、9.78%、11.30%、12.68%), 进行凝胶层析 (SEC)。

表 7 不同水解度产物的分子量分布

Table 7 Molecular weight distribution of hydrolysates at various DH

DH/%	峰 1 Peak 1	峰 2 Peak 2	峰 3 Peak 3	峰 4 Peak 4	峰 5 Peak 5
7.83	18 369	4 570	2 818	1 230	347
9.78	16 289	3 631	2 380	1 089	257
11.30	1 148	562	100	/	/
12.68	794	389	73	/	/

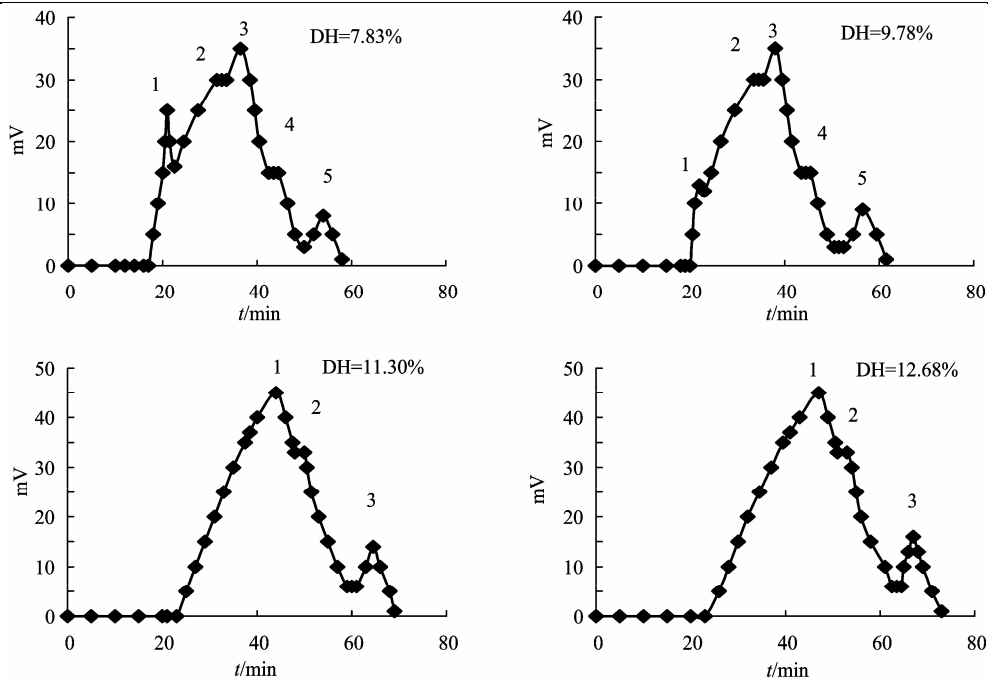


图 7 不同水解度产物的凝胶层析色谱

Figure 7 Size exclusion chromatography of hydrolysates at various DH

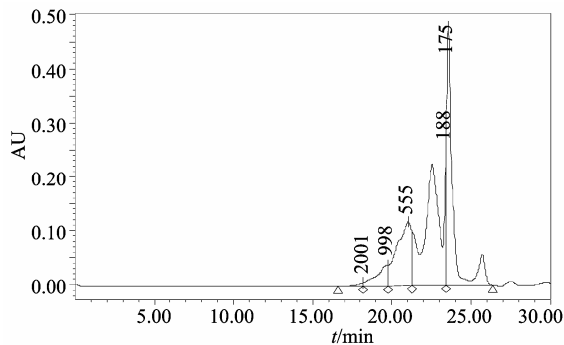


图 8 米渣水解物的体积排阻高效液相色谱图

Figure 8 High-performance size exclusion chromatography of rice residue hydrolysates

由图 7 和表 7 可知, 首先, 变性蛋白在很短的时间内被水解; 同时随着水解时间的延长, 产物的分子组成逐渐减小, 小分子肽的洗脱面积增大, 水解度达到 11.30% 时, 大多数水解产物已达到寡肽要求, 进一步水解能够得到分子量更小的酶解产物, 然而考虑到水解度过高, 苦味肽含量增高影响产品风味, 水解产物中氨基酸含量偏高, 最后确定水解时间为 3.0 h。

## 2.5 高效凝胶色谱法对米渣水解物的分析

按上述优化工艺, 对酶解液进行脱色处理与喷雾干燥, 并对米渣水解物进行高效凝胶色谱分析。由图 8 和表 8 可知: 米渣蛋白水解物是由一系列分

子质量不等的肽分子组成,其中分子质量在1 000 u以下的水解物含量大于95%,且以二肽、三肽为主。近年来的研究表明<sup>[19]</sup>,小肠的纹状缘上存在有二肽

和三肽的转运系统,蛋白质在人体内主要以二肽和三肽的形式被吸收,这说明在胰酶的作用下,米渣水解物有利于人体吸收。

表8 米渣水解物相对分子质量分布  
Table 8 Molecular weight distribution of rice residue hydrolysates

分子量范围 Molecular weight range	峰面积百分比/% Area ( $\lambda=220\text{ nm}$ )	数均分子量 $M_n$	重均分子量 $M_w$
>2 000	0.42	2 340	2 384
2 000~1 000	4.80	1 253	1 296
1 000~500	19.58	649	672
500~189	41.10	280	299
<189	34.11	/	/

### 3 结论

通过对比研究中性蛋白酶、碱性蛋白酶和胰酶对米渣的酶解效果,根据水解度和蛋白质回收率指标,综合考虑胰酶的广泛水解模式,选择胰酶为水解用酶。

在单因素的试验基础上,4因素3水平二次通用旋转组合设计试验,得出最佳水解工艺:加酶量为底物的1.6%,固液比为1:9,pH值为8.5,温度为55℃。所得回归模型拟合情况良好,达到设计要求。

按照优化工艺所制备的不同时间下的水解产物的凝胶色谱分析表明,3.0 h已达到水解要求,此时水解度为11.30%左右。经脱色与喷雾干燥后,产物符合寡肽要求,主要以二肽、三肽为主。

### 参考文献:

- [1] Frederick F S, Kim W D. Preparation and characterization of rice protein isolates [J]. *JAOCs*, 2000, 77(8): 885-889.
- [2] 刘骥. 淀粉糖副产品制备米渣浓缩蛋白及酶法增溶技术的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [3] 王章存, 刘卫东, 申瑞玲, 等. 大米蛋白水解机制研究—III酶水解对大米蛋白-糖结合特性的影响[J]. *中国粮油学报*, 2007, 22(6): 5-7; 11.
- [4] 王章存, 申瑞玲, 姚惠源. 大米分离蛋白的酶法提取及其性质[J]. *中国粮油学报*, 2004, 19(6): 4-7.
- [5] Radosavljevic M, Jane J, Johnson L A. Isolation of amaranth starch by diluted alkaline-protease treatment[J]. *Cereal Chemistry*, 1998, 75(2): 212-216.
- [6] Hou L X, Zhu Y Y, Li Q X. Characterization and preparation of broken rice proteins modified by proteases[J]. *Food Technol Biotechnol*, 2010, 48(1): 50-55.
- [7] Arai S, Kimura H. Comparative nutritional value for

amino acids, oligopeptides and soybean protein[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1987, 64(12): 1692-1696.

- [8] Webb K E, Matthews J J C, Dirienzo D B. Peptide Absorption: a review of current concepts and future perspectives[J]. *Journal of Animal Science*, 1992, 70(10): 3248-3257.
- [9] Boza J J, Moennoz D, Vuichoud J, et al. Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat[J]. *European Journal of Nutrition*, 2000, 39(6): 237-243.
- [10] 陈升军, 熊华, 李庭, 等. 米渣蛋白酶解及酶解物功能性质研究[J]. *食品发酵与工业*, 2008, 34(5): 114-118.
- [11] 孔祥珍, 周惠明, 钱海峰. 小麦面筋蛋白酶解物的制备及其功能性质研究[J]. *中国农业科学*, 2009, 39(3): 593-598.
- [12] 王章存, 姚惠源. 凯氏定氮法测定大米蛋白质时蛋白系数的确定[J]. *食品科学*, 2004, 25(1): 158-60.
- [13] Shih F F. An update on the processing of high-protein rice products[J]. *Nahrung Food*, 2003, 47(6): 420-424.
- [14] Adamson N J, Reynolds Eric C. Characterization of tryptic casein phosphopeptides prepared under industrially relevant conditions[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 45(3): 196-204.
- [15] Lemieux L, Amiot J. High-performance liquid chromatography of casein hydrolysates phosphorylated and dephosphorylated: I. Peptide mapping[J]. *Journal of Chromatography A*, 1990, 519(2): 299-321.
- [16] Reynolds E C, Cain C J, Webber E L, et al. Anticarcinogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rats[J]. *Journal of Dental Research*, 1995, 74(6): 1272-1279.
- [17] 王璋. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1990: 180-185.
- [18] 陈林. 物理预处理-蛋白酶控制水解联合改性对大豆分离蛋白功能特性的影响研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.
- [19] Zaloga G P, Siddiqui R A. Biologically active dietary peptides[J]. *Medicinal Chemistry*, 2004(4): 825-821.