

# 大米免疫活性肽水解用酶的筛选

## Study on enzyme screening of rice immune active peptide

王璐 陈月华 许宙文 李卜汉萍 程云辉

WANG Lu CHEN Yue-hua XU Zhou WEN li BU Han-ping CHENG Yun-hui

(长沙理工大学化学与生物工程学院, 湖南长沙 410114)

(College of Chemical and Biological Engineering, Changsha University of Science and Technology, Changsha, Hunan 410114, China)

**摘要:**研究 Neutrase、Acalase 2.4 L、Papain、Pepsin、Trypsin、Flavourzyme、Acid protease、Protamex 与 Bromelain 9 种蛋白酶水解大米蛋白的进程特性,考察 9 种蛋白酶水解物的免疫活性。结果表明,胰脏蛋白酶 Trypsin 可作为制备大米免疫活性肽的最适水解酶, Trypsin 酶解物对小鼠巨噬细胞 (RAW264.7) 的增值指数 (stimulating index, SI) 为 1.597 (1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 其酶解物中相对分子质量 < 1 000 的组分比例最高, 达到 74.11%。

**关键词:**大米蛋白; 免疫活性肽; 蛋白酶; 水解

**Abstract:** The hydrolysis processes of rice protein by had been studied 9 proteinases including Neutrase, Acalase 2.4 L, Papain, Pepsin, Trypsin, Flavourzyme, Acid protease, Protamex and Bromelain, and the immune activities of 9 protein hydrolysate had been considered. The results showed that Trypsin can be used as the optimum hydrolytic enzymes for the preparation of rice immune active peptide whose value-added index (stimulating index, SI) to mice macrophage (RAW264.7) is 1.597 (1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); the enzymatic hydrolysis had the highest percentage of components with relative molecular mass < 1 000, to 74.11%.

**Keywords:** rice protein; the immunizing peptide; protease; hydrolysis

中国稻谷产量占世界总产量的 1/3 以上,居世界前列,2014 年中国稻谷总产量为 2 亿 t 左右<sup>[1]</sup>。在稻米各加工领域,每年产生了大量的碎米、米糠和米渣等副产物,这些副产物中含有丰富的大米蛋白。大米蛋白是世界各地特别是亚洲地区消费者摄取植物蛋白的主要来源之一,是营养界所公认的优质植物蛋白,其氨基酸组成配比平衡合理,比较接近 WHO/FAO 推荐的理想模式,尤其是作为第一限制性氨基

酸的赖氨酸含量达到 4%,能够满足 2 到 5 岁儿童对氨基酸的需求,较大豆分离蛋白及酪蛋白更优,可与牛乳、鸡蛋、牛肉相媲美。且大米蛋白属于低抗原性蛋白,不会引起过敏反应,很适合作为生产婴幼儿食品的原料,充分开发利用大米蛋白意义重大。

全球性的老龄化现象已成为 21 世纪的重要问题,2000 年中国就已进入老龄化社会;从全国第六次人口普查数据来看,中国人口老龄化进程正在加快,65 岁以上人口占 8.87%,比 2000 年上升 1.91%<sup>[2]</sup>。随着年龄增长,人体各器官和基础代谢功能逐渐衰退,这些功能衰退到一定程度便会表现出机体综合免疫力低下;且肥胖症、睡眠时间或质量下降、吸烟与饮酒等不良生活习惯皆可能导致机体免疫力下降而引发各种疾病。因此,寻求适宜的免疫调节剂来提高人体免疫能力,成为了人类社会迫切的需求热点<sup>[3]</sup>。

利用米渣、碎米等大米加工副产物为原料,通过酶法制备大米免疫活性肽,不仅可为免疫力低下的人群和婴幼儿提供低过敏性的免疫调节剂,同时还有效提高大米加工副产物的附加值,具有重要的社会效益和较高的经济效益。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

金健黄花粉米;蛋白质含量约 7.15%,湖南金健米业股份有限公司;

小鼠巨噬细胞 (RAW264.7);赢润生物技术有限公司; Alcalase 2.4 L、Flavourzyme 500 MG、Neutrase 1.5 MG;诺维信公司;

木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、酸性蛋白酶、菠萝蛋白酶;中国 Bomei 公司;

复合蛋白酶;中国 KAYON 公司。

### 1.2 仪器与设备

台式 pH 计;DELTA320 型,江苏金坛市金城国胜实验

**基金项目:**“十二五”国家科技支撑计划(编号:2012BAD34B02);国家自然科学基金项目(编号:31171627)

**作者简介:**王璐(1989—),女,长沙理工大学在读硕士研究生。

E-mail: 1039519600@qq.com

**通讯作者:**程云辉

**收稿日期:**2015-03-05

仪器厂；

电动搅拌机:JJ-T型,江苏金坛市金城国胜实验仪器厂；

离心机:TDL-5-A型,上海安亭科学仪器厂；

循环水式真空泵:SHZ-D(Ⅲ)型,巩义市予华食品有限

公司；

旋转蒸发器:EV 311型,巩义市予华仪器有限责任公司；

恒温水浴锅:ZSXH-618型,上海智诚分析仪器制造有限

公司；

真空冷冻干燥机:FD-1型,北京博医康实验仪器有限

公司；

二氧化碳细胞培养箱:HH CP-01型,上海博讯医疗设备

厂；

灭菌锅:MLS-3750型,日本三洋有限公司；

超净工作台:SW-OJ-1FD型,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司；

酶标分析仪:DNM-9602型,北京普朗新技术有限公司。

### 1.3 试验方法

1.3.1 大米蛋白粉的制备方法 本课题组前期研究确定的碱法提取大米蛋白的工艺流程和条件为：

1 000 g 大米粉(过 120 目筛)→碱提(以液固比 10 : 1 (V : m)溶解于 10 L 0.05 mol/L NaOH 溶液)→室温下搅拌浸提 2 h→浸提液于 3 500 r/min 离心 30 min→酸沉(上清液调 pH 至 4.8)→3 500 r/min 离心 10 min→沉淀水洗 3 次→冷冻干燥→大米蛋白粉

1.3.2 大米蛋白酶解物制备方法 参考文献[4~8]确定制备大米蛋白酶解物的工艺流程和条件为：

5%(m/V)大米蛋白悬浮液→加热至各酶最适温度→加酸碱调整至各酶最适 pH→加酶(加酶量 3 000 U/g)→酶解 3 h→灭酶(15 min/ 80 ℃)→离心取上清液(3 500 r/min, 20 min)→真空浓缩→冷冻干燥→大米蛋白酶解物

9 种蛋白酶的酶解条件见表 1。

表 1 试验所选用蛋白酶的酶解条件

Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions of the tested proteases

酶种	最佳 pH	最佳温度/℃	底物浓度/%	加酶量/(U·g <sup>-1</sup> )	酶解时间/h
中性蛋白酶	7	45	5	3 000	3
碱性蛋白酶	8	55	5	3 000	3
风味蛋白酶	7	50	5	3 000	3
木瓜蛋白酶	7	55	5	3 000	3
胰蛋白酶	8	37	5	3 000	3
菠萝蛋白酶	7	55	5	3 000	3
胃蛋白酶	2	37	5	3 000	3
酸性蛋白酶	3	50	5	3 000	3
复合蛋白酶	7	50	5	3 000	3

### 1.4 分析方法

#### 1.4.1 基本成分分析方法

(1) 水分含量的测定:参考 GB 5009.3—2010 的直接干燥法；

(2) 灰分含量的测定:参考 GB 5009.4—2010 的干法灰化；

(3) 脂肪含量的测定:参考 GB/T 5512—2008 的索氏提取法；

(4) 蛋白含量的测定:参考 GB 5009.5—2010 中的凯氏定氮法。

1.4.2 蛋白酶活力的测定方法 参考 GB/T 23527—2009。

1.4.3 相对分子量测定方法 采用 HPLC 法<sup>[9]</sup>。

(1) 色谱条件为:色谱柱,TSKgel 2000 SWXL 300 × 7.8 mm;流动相,水/乙腈/三氟乙酸,55/45/0.1(V/V);检测波长,UV 220 nm;柱温,30 ℃;流速,0.5 mL/min。

(2) 样品制备:取样品 2 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,用微孔过滤膜(0.45 μm)过滤后供进样。

(3) 分子量校正曲线所用标准品:杆菌酶(MW1450);乙氨酸—乙氨酸—酪氨酸—精氨酸(MW451);细胞色素 C(MW12500);乙氨酸—乙氨酸—乙氨酸(MW189)。

1.4.4 小鼠巨噬细胞增殖试验方法 采用 MTT 法,取对数期的 RAW264.7 细胞,细胞浓度为 7 × 10<sup>5</sup> 个/mL,100 μL 接种于 96 孔板中,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 4 h 后,加入大米免疫活性肽,空白对照组加等量的无菌水,继续在培养箱中孵育 20 h;在终止孵育前 4 h 加入 20 μL MTT (5 mg/L);弃掉每孔中的液体,向孔中加入 150 μL 二甲基亚砜,避光条件下轻震 5 min<sup>[10]</sup>,在 492 nm 采用酶标仪检测吸光度(OD 值),并按式(1)计算 SI 值。

$$\text{细胞增殖指数 } SI = \frac{\text{试验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \quad (1)$$

#### 1.5 活性肽得率的测定方法

采用福林酚法测定蛋白质含量<sup>[11]</sup>,活性肽得率按式(2)计算:

$$\text{活性肽得率} = \frac{\text{大米蛋白酶解物蛋白质含量} \times \text{大米蛋白酶解物质量}}{\text{大米蛋白粉蛋白质含量} \times \text{大米蛋白粉质量}} \times 100\% \quad (2)$$

#### 1.6 数据处理

MTT 试验数据均为 3 个平行数据的均值,试验结果以平均值 ± 标准差表示。组间差异采用 Student's t-test 平均值的成对二样本分析,P < 0.05 时表示具有显著性差异,P < 0.01 时表示具有极显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大米和大米蛋白基本成分分析

对原料大米的基本成分及所提取的大米蛋白的基本成分进行了测定,结果见表 2,大米蛋白的蛋白质含量为 86.2%。

表 2 原料大米及大米蛋白的主要化学成分

Table 2 Main chemical compositions of the raw material of rice and rice protein %

成分	水分	蛋白质	脂肪	碳水化合物	灰分
原料大米	10.60	7.15	0.78	75.15	0.33
大米蛋白	5.82	86.20	0.39	6.97	0.62

## 2.2 9 种蛋白酶酶解物免疫活性分析

2.2.1 试验所用蛋白酶酶的测定 目前酶的来源主要有动物蛋白酶、植物蛋白酶和微生物蛋白酶,其中微生物蛋白酶的价格相对便宜。本研究选用胃蛋白酶、胰蛋白酶、菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶及碱性蛋白酶共 9 种蛋白酶对大米蛋白进行水解。胃蛋白酶和胰蛋白酶都是消化性蛋白酶且属于动物蛋白酶,胃蛋白酶的酶切位点是 Phe 和 Leu 等疏水性氨基酸,胰蛋白酶的酶切位点为赖氨酸(Lys)和精氨酸(Arg)等碱性氨基酸。菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶属于植物蛋白酶,菠萝蛋白酶的酶切位点为 Lys、Ala、Tyr、Gly,其中 Ala 和 Gly 是疏水性氨基酸而 Lys 为碱性氨基酸;木瓜蛋白酶的酶切位点是 Arg、Lys、Phe,其中 Arg 和 Lys 是碱性氨基酸而 Phe 是疏水性氨基酸。碱性蛋白酶、风味蛋白酶、酸性蛋白酶、中性蛋白酶和复合蛋白酶皆是微生物蛋白酶,碱性蛋白酶的酶切位点是 Ala、Leu、Val 等疏水性氨基酸;风味蛋白酶是一种能在中性或微酸性条件水解蛋白质的蛋白酶/肽酶的复合酶,主要为外切酶,可催化水解肽链末端的疏水性氨基酸;酸性蛋白酶具有广泛的特异性,可催化水解两端是 Phe、Trp 等疏水性氨基酸和碱性氨基酸 Arg 的肽键;中性蛋白酶可水解羧基端为 Tyr、Try 和 Phe 等芳香族疏水性氨基酸的肽链;复合蛋白酶兼具内切酶和外切酶活性,能比较彻底地酶解蛋白质<sup>[12-14]</sup>。张亚飞等<sup>[15]</sup>研究发现在目前已报道的免疫活性肽中大多含有疏水性及碱性氨基酸,上述 9 种酶的酶切位点大多集中在一些疏水性及碱性氨基酸上,因而本研究选择该 9 种蛋白酶作为待筛选酶种,以小鼠巨噬细胞增殖活性刺激指数(SI)为考察指标,拟从 9 种酶中确定制备大米免疫活性肽的最适水解酶,本研究参照 GB/T 23527—2009 测定的 9 种蛋白酶的酶活见表 3。

表 3 9 种试验所用蛋白酶的酶活

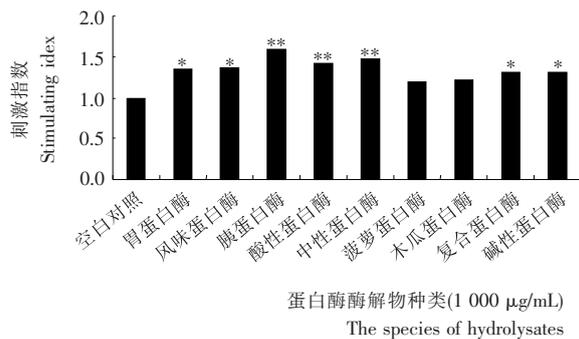
Table 3 The enzyme activity of 9 tested proteases

酶的种类	酶活/(U·g <sup>-1</sup> )	酶的种类	酶活/(U·g <sup>-1</sup> )
胃蛋白酶	68 252.4	菠萝蛋白酶	26 174.8
风味蛋白酶	1 141.7	木瓜蛋白酶	48 834.9
胰蛋白酶	28 317.2	复合蛋白酶	20 938.5
酸性蛋白酶	228 479.1	碱性蛋白酶	168 025.9
中性蛋白酶	39 061.5		

2.2.2 9 种蛋白酶酶解物免疫活性的分析 不同的酶具有不同的底物特异性和酶切位点,对同一种蛋白质进行水解所获得的酶解物的组成和结构将会不同,因酶解物的组成和结构不同其生物活性也将存在较大差异。本研究据表 1 的条件酶解大米蛋白,用所得酶解物采用 MTT 法进行小鼠巨噬细胞增值试验,结果见图 1 和表 4。由图 1 可知,9 种蛋白酶酶解物免疫活性的差异是较显著的,可能是因其酶切位点不同及特异性差异所致。与空白对照组相比,菠萝蛋白酶酶解物和木瓜蛋白酶酶解物对小鼠巨噬细胞增值无显著效果;胃蛋白酶酶解物、风味蛋白酶酶解物、复合蛋白酶酶解物和碱性蛋白酶酶解物对小鼠巨噬细胞增值效果显著( $P < 0.05$ );而促进小鼠巨噬细胞增值有极显著效果( $P < 0.01$ )的酶解物有胰蛋白酶酶解物、酸性蛋白酶酶解物和中性蛋白酶酶解物;由表 4 可知,有极显著效果的 3 种酶解物中胰蛋白酶酶解物对小鼠巨噬细胞增值的效果最强,其 SI 值为 1.597。胰蛋白酶的酶切位点为赖氨酸(Lys)和精氨酸(Arg),皆为带正电荷的碱性氨基酸。有研究<sup>[16]</sup>表明,免疫活性肽的免疫活性与其所带正电荷量呈正相关。采用该酶水解多种食物源蛋白均能获得不同活性的免疫活性肽,Takahashi M 等<sup>[17]</sup>采用胰蛋白酶酶解可溶性大米蛋白,酶解物分离纯化后获得免疫活性肽 Gly-Tyr-Pro-Met-Tyr-Pro-Leu-Pro-Arg,研究发现此九肽能提高白细胞吞噬功能;Hata 等<sup>[18]</sup>从牛  $\alpha_{S1}$ -酪蛋白的胰蛋白酶酶解物中分离鉴定出一种富含磷酸丝氨酸的多肽(对应于  $\alpha_{S1}$ -酪蛋白 59~79 氨基酸序列片段),它能够刺激体外培养的小鼠脾脏细胞和兔派伊尔结细胞的增殖和抗体的产生;Meisel 等<sup>[19]</sup>研究发现在牛酪蛋白的胰蛋白酶酶解物分离出的十二肽 Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe-Gly-Lys 能够刺激体外培养的小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬作用。

## 2.3 9 种蛋白酶酶解物分子量分布的分析

近年研究<sup>[20]</sup>发现 2~6 个氨基酸的短肽比蛋白质和游离氨基酸更容易被肠道吸收,特别是二肽和三肽的运转速度比转运等量的氨基酸混合物更快。可能的解释是这些小肽是由中性、碱性和酸性氨基酸组成,当小肽以完整形式被吸



\* 与空白组相比,  $P < 0.05$ ; \*\* 与空白组相比,  $P < 0.01$

图 1 9 种蛋白酶酶解物的 SI 值比较

Figure 1 The comparison of stimulating index of 9 hydrolysates

表4 9种蛋白酶酶解物的SI值

Table 4 The stimulating index of 9 hydrolysates

酶解物	SI	酶解物	SI
胃蛋白酶	1.342	菠萝蛋白酶	1.205
风味蛋白酶	1.369	木瓜蛋白酶	1.214
胰蛋白酶	1.597	复合蛋白酶	1.301
酸性蛋白酶	1.423	碱性蛋白酶	1.315
中性蛋白酶	1.471		

收时可能部分或完全避免了游离氨基酸转运中电荷的相互竞争<sup>[20]</sup>。通常认为蛋白酶解物的生理活性与其相对分子量及一级结构有着直接关系。本研究采用高效液相色谱测定了9种大米蛋白酶解物的分子量分布(见图2),由Waters M32 GPC软件计算的相对分子量范围的比例见表5。由表5可知,胃蛋白酶、酸性蛋白酶、菠萝蛋白酶的分子量主要分布在500~2 000,其所占比例大于75%;胰蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶及碱性蛋白酶的分子量分布主要分布在180~1 000,其所占比例在74%以上;风味蛋白酶、木瓜蛋白酶的分子量分布在180~2 000,其所占比例大于72%。说明胰蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶及碱性蛋白酶所制备的4

种酶解物中2~6个氨基酸组成的短肽比例较高。原料蛋白的一级结构和蛋白酶的酶切位点是影响酶解物分子量分布的主要因素<sup>[21]</sup>。胰蛋白酶的酶切位点为Arg和Lys,在大米蛋白氨基酸组成中所占比例为10.89%,其酶解物中相对分子量小于1 000所占比例为74.11%;碱性蛋白酶的酶切位点为Ala、Leu和Val,在大米蛋白氨基酸组成中所占比例为16.82%,其酶解物中相对分子量小于1 000所占比例为91.39%。胰蛋白酶是肽链内切酶,胰脏合成的是无活性的胰蛋白酶原,小肠内的肠肽酶会使胰蛋白酶原活化,活化的胰蛋白酶可选择地水解蛋白质中所有由Lys或Arg的羧基所构成的肽键<sup>[22]</sup>,进入小肠的蛋白质可被胰蛋白酶水解成肽或氨基酸而被人体吸收。选择胰蛋白酶作为目标酶种,一定程度上可模拟蛋白质在肠道的消化过程,且获得的肽段对消化酶具有较强的抗性<sup>[23]</sup>,在进入人体小肠后不会进一步被水解而直接被吸收。

2.4 不同蛋白酶酶解物肽得率的分析

活性肽得率也是活性肽制备需要考虑的重要因素。本研究比较了SI值较高的5种大米蛋白酶解物的活性肽得率,结果见图3。由图3可知,5种大米蛋白酶解物中,胃蛋白酶酶解物活性肽得率最高。与胃蛋白酶酶解物活性肽得率相比,风味蛋白酶和中性蛋白酶酶解物活性肽得率有极显

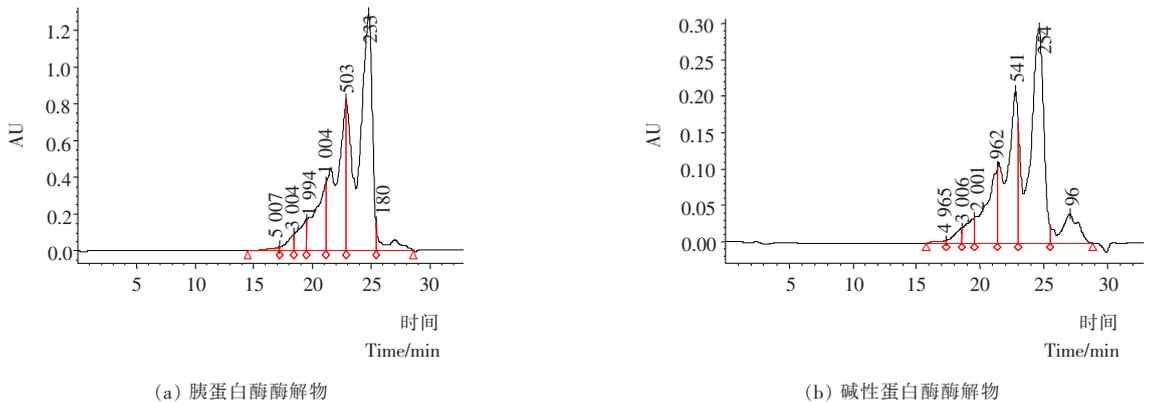


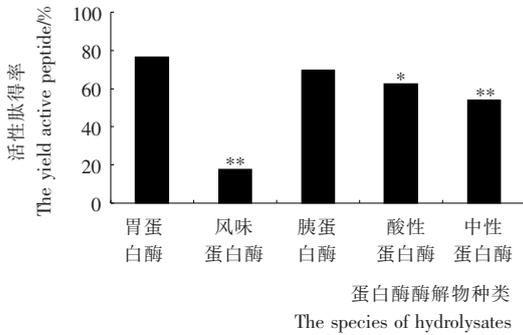
图2 蛋白酶解物的相对分子量分布

Figure 2 The molecular weight distribution of hydrolysate

表5 9种蛋白酶酶解物的分子量分布

Table 5 The molecular weight distribution of 9 hydrolysates

分子量范围	胃蛋白酶	风味蛋白酶	胰蛋白酶	酸性蛋白酶	中性蛋白酶	菠萝蛋白酶	木瓜蛋白酶	复合蛋白酶	碱性蛋白酶
>5 000	1.70	7.68	0.45	0.37	1.43	2.8	4.20	0.40	0.36
5 000~3 000	2.21	9.93	1.10	1.77	1.28	4.54	8.87	0.79	0.68
3 000~2 000	4.32	10.59	2.19	3.54	1.89	6.02	9.12	1.43	1.17
2 000~1 000	18.02	21.90	9.76	13.41	8.81	17.53	17.42	7.05	6.39
1 000~500	63.59	35.35	26.29	72.65	44.64	56.68	25.72	69.30	61.73
500~180	10.15	14.55	47.82	8.27	41.96	12.44	26.82	21.01	29.66



\* 与空白组相比,  $P < 0.05$ ; \*\* 与空白组相比,  $P < 0.01$

图 3 不同蛋白酶酶解物肽得率的比较

Figure 3 The comparison of yield of peptide from different hydrolysates

著差异( $P < 0.01$ ),酸性蛋白酶酶解物活性肽得率有显著差异( $P < 0.05$ );虽然胰蛋白酶酶解物活性肽得率没有胃蛋白酶酶解物高,但两者之间无显著性差异( $P > 0.01$ )。

### 2.5 制备大米免疫活性肽的最适酶种

兼顾考虑  $SI$  值、相对分子量分布和活性肽得率等因素,9 种蛋白酶酶解物中胰蛋白酶酶解物不仅  $SI$  值最高,达到 1.597(1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );相对分子量小于 1 000 组分所占比例 74.11%,说明胰蛋白酶酶解物中 2~6 个氨基酸组成的短肽比例较高;同时,其活性肽得率也达到 75.96%。因此,本研究认为胰蛋白酶可作为制备大米免疫活性肽的最适水解酶。

## 3 结论

通过考察 9 种蛋白酶酶解制备大米蛋白酶解物的  $SI$  值、相对分子量分布及活性肽得率,本研究认为胰蛋白酶是制备大米免疫活性肽的最适水解酶,其对小鼠巨噬细胞增值指数  $SI$ 、分子量小于 1 000 的组分所占比例及活性肽得率分别为 1.597(1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、74.11% 和 75.96%。

### 参考文献

- 刘笑然, 兰敦臣, 李越. 2014 年中国稻米产业研究[J]. 中国粮食经济, 2014, 8(12): 42~47.
- 冯慧阳. 基于第六次人口普查数据谈中国人口老龄化新变化[J]. 商业文化(上半月), 2011(8): 112.
- Duarte J, Vinderola G, Ritz B, et al. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation[J]. Immunobiology, 2006, 211(5): 341~350.
- Hou Hu, Fan Yan, Li Ba-fang, et al. Purification and identification of immunomodulating peptides from enzymatic hydrolysates of Alaska pollock frame[J]. Food Chemistry, 2012, 134(2): 821~828.
- Chen Jun-rong, Suetsuna K, Yamauchi F. Isolation and characterization of immunostimulative peptides from soybean[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1995, 6(6): 310~313.
- Kong Xiang-zhen, Guo Ming-ming, Hua Yu-fei, et al. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy pro-

- teins[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(18): 8 873~8 879.
- Kim E K, Kim Y S, Hwang J W, et al. Purification of a novel nitric oxide inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysates of *Mytilus coruscus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(6): 1 416~1 420.
- 黄文凯. 膜分离方法制备免疫活性大豆肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2007.
- 大连轻工业学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- Ting Feng-wu, Chiung Yuehhsu, Huei Sheng-huang, et al. Proteomic analysis of pycnogenol effects in RAW 264.7 macrophage reveals induction of cathepsin D expression and enhancement of phagocytosis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(24): 9 784~9 791.
- 赵亚华, 高向阳. 生物化学实验技术教程[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2000.
- 李慧静. 超高静压协同酶法降低专用大豆分离蛋白致敏性的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2013.
- 方海红, 方海红, 胡好远, 等. 微生物碱性蛋白酶的研究进展[J]. 微生物学通报, 2002, 29(2): 57~59.
- 王彦荣, 孟祥春, 任连彬, 等. 酸性蛋白酶生产与应用的研究[J]. 酿酒, 2003, 30(3): 16~18.
- 张亚飞. 小麦蛋白 Alcalase 水解物中免疫活性肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- Kong Xiang-zhen, Guo Ming-ming, Hua Yu-fei, et al. Enzymatic preparation of immunomodulating hydrolysates from soy proteins[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(18): 8 873~8 879.
- Takahashi M, Moriguchi S, Yoshikawa M, et al. Isolation and characterization of oryzatensin: a novel bioactive peptide with ileum-contracting and immunomodulating activities derived from rice albumin[J]. Biochemistry and Molecular Biology International, 1994, 33(6): 1 151~1 158.
- Hata I, Higashiyama S, Otani H. Identification of a phosphopeptide in bovine  $\alpha$ 1-casein digest as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures[J]. Journal of Dairy Research, 1998, 65(4): 569~578.
- Meisel H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications [J]. Livestock Production Science, 1997, 50(1): 125~138.
- Adibi SA. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption[J]. Journal of Clinical Investigation, 1971, 50(11): 2 266~2 275.
- 夏树华. 螺蛳中生物活性物质的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- Leiros H K S, Brandsdal B O, Andersen O A, et al. Trypsin specificity as elucidated by LIE calculations, X-ray structures, and association constant measurements[J]. Protein Science, 2004, 13(4): 1 056~1 070.
- 胡娟. 酶解鱼鳞明胶制备生物活性肽的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010.