

基于灰色关联分析法的大豆蛋白酶解工艺优化

Optimization on enzymatic hydrolysis process of soybean protein by grey correlation analysis

曲玲玲 郭长慧 刘丽洁 张娜

QU Ling-ling GUO Chang-hui LIU Li-jie ZHANG Na

(1. 哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 黑龙江省食品科学与工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076)

(1. College of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin, Heilongjiang 150076, China;

2. Key Laboratory of Food Science and Engineering of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150076, China)

摘要:为使灰色关联分析法在食品领域得到充分的应用,并为食品工业提供优质的豆蛋白资源。采用单因素试验考察不同酶解条件对大豆蛋白酶解的影响,并利用灰色关联分析法建立蛋白酶解过程模型。利用 Alcalase 碱性蛋白酶(4.4 万 U/g)对大豆低温豆粕进行酶解,制备大豆多肽。通过灰色关联分析法计算反应体系 pH 值、反应温度、反应时间、大豆脱脂豆粕添加量以及 Alcalase 碱性蛋白酶添加量的关联系数,得到各因素显著性大小为 pH 值 > 温度 > 底物浓度 > 加酶量 > 时间。经实验验证水解度与预测水解度基本一致,证明试验得出的结论可靠。其最佳工艺参数为:反应体系 pH 值 9.0,反应温度 55 °C,反应时间 3 h,大豆脱脂豆粕添加量 5% (m/V),Alcalase 碱性蛋白酶的添加量 1 500 U/g,该条件下水解度为 13.53%。

关键词:大豆蛋白;酶解;模型;灰色关联分析

Abstract: Single factor experiments were conducted to explore the influence of different effects on soybean protein enzymolysis. Based on this, the model of proteolytic digestion process was built according to the grey correlation analysis method to expand application of grey correlation analysis method in food field and provide quality soybean polypeptide resources for the food industry. Alcalase alkaline protease (4.4×10^4 U/g) was used to enzymatic hydrolysis soybean defatted soybean meal to prepare soybean peptides. The correlation coefficient of reaction pH, reaction temperature, reaction time, soybean

defatted soybean meal addition and Alcalase alkaline protease addition were calculated by grey correlation analysis method. Significant size of various factors: pH > temperature > concentration of substrate > addition of enzyme > reaction time. Degree of hydrolysis was basic consistent with degree of prediction hydrolysis by experimental verification. The experimental conclusion proves reliable. The optimum technological parameters were determined as follows: the reaction pH value was 9.0, the reaction temperature was 55 °C, the reaction time was 3h, the addition of defatted soybean meal was 5% (m/V), and the addition of Alcalase alkaline protease was 1 500 U/g. Under those conditions, degree of hydrolysis (DH) was 13.53%.

Keywords: soybean protein; enzymatic hydrolysis; model; grey correlation analysis

大豆蛋白经蛋白酶作用后,再经分离、精制等过程得到蛋白质水解产物,该水解产物由多种肽混合组成,其中还含有少量游离氨基酸、糖类和无机盐等成分^[1-3]。水解产物具有降血压、抗氧化、减肥及促进矿物质吸收等多种生理功能,使其在食品工业上具有广阔的开发应用前景^[4-6]。

中国对大豆多肽的研究起步较晚,基础和应用研究都很薄弱,尚处于初级开发应用阶段,具有极大市场潜力。本研究采用的豆粕是豆油加工的副产品,成本低廉,来源广泛。目前豆粕主要用作饲料,在食品方面应用极少,而且只限于酿造食品。脱脂豆粕中蛋白含量较高(45%~50%),氨基酸平衡,且较大豆分离蛋白和大豆浓缩蛋白价格便宜,因此利用豆粕加工大豆多肽有很高的开发和利用价值^[7,8]。

灰色关联分析是灰色系统理论的基础,实质上是关联系数的分析,目的是寻求系统中各因素间的主要关系、找出影响目标值的重要因素,从而掌握事物的主要特征,促进和引导系统迅速而有效地发展。自 1982 年邓聚龙教授^[9]创立灰色系统理论以来,灰色关联分析已成功应用于聚类、预测、决

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301602);黑龙江省应用技术与开发计划项目(编号:GC13B215);黑龙江省普通高等学校食品科学与工程重点实验室开放课题(编号:20121114194638483);哈尔滨商业大学研究生创新科研项目(编号:YJSCX2014-328HSD)

作者简介:曲玲玲(1991—),女,哈尔滨商业大学在读硕士研究生。E-mail:460512414@qq.com

通讯作者:张娜

收稿日期:2015-03-02

策、评估、模式识别、系统指标权重确定、建模精度检验及诊断等方面^[10-13]。在对复杂系统进行分析时,以往多采用统计分析或其它分析法,灰色关联分析法与之相比的优势在于:灰色关联分析是按发展趋势做分析,因此对样本量的多少没有过多的要求,也不需要典型的分布规律,而且计算量比较小,其结果与定性分析结果比较吻合。目前灰色关联分析在食品方面的应用较少,其不仅是优势分析的基础,还是进行科学决策的依据^[14]。

为了提高大豆蛋白资源的利用率,降低大豆肽的生产成本,提高大豆肽的水解度,获得具有高溶解度、低黏度等优良加工特性的大豆肽。黄雅燕等^[15]曾运用正交试验对碱性蛋白酶水解豆粕制备大豆多肽的工艺条件进行优化。本研究拟利用 Alcalase 碱性蛋白酶水解大豆脱脂豆粕,测定低温豆粕中的蛋白含量、水解度,选用灰色关联分析法对大豆蛋白酶解过程进行工艺优化,建立不同条件下水解制备大豆蛋白水解模型,以利用该模型在一定范围内预测大豆蛋白酶解程度。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大豆脱脂豆粕粉:哈高科大豆食品有限责任公司;
Alcalase(2.4LFG)酶:酶活 4.4 万 U/g,丹麦诺维信公司;
氢氧化钠、甲醛:分析纯,天津市大陆化学试剂厂;
盐酸:分析纯,西陇化工有限公司;
福林酚:分析纯,天津光复科技发展有限公司。

1.2 仪器与设备

电子天平:YB-10002 型,上海光正医疗仪器有限公司;
电子分析天平:e-10d 型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;
真空干燥箱:DZF-6020 型,上海一恒科学仪器有限公司;
电热恒温水浴锅:DK-98-IIA 型,天津泰斯特仪器有限公司;
分光光度计:722 型,上海佑科仪器仪表有限公司;
台式离心机:TDL80-2B 型,上海安亭科学仪器厂;
pH 计:PHS-3C 型,上海精密仪器有限公司;
万用电炉:DL-1 型,北京市永光明医疗仪器有限公司;
架盘天平:HC-TP11-5 型,上海精科天平。

1.3 方法

1.3.1 大豆蛋白的酶解 准确称取 Alcalase(2.4LFG)酶 0.340 9 g,用蒸馏水定容至 100 mL,准确吸取 1 mL,用蒸馏水定容至 100 mL。称取脱脂豆粕 10 g,加水配成 5%(m/V)的悬浊液,搅拌分散,用 1.0 mol/L HCl 调 pH 值为 4.5,45 ℃洗糖 60 min,再抽滤,取固体物质再次搅拌溶解配成 5%(m/V)的悬浊液,用 1.0 mol/L HCl 调 pH 值为 4.5,45 ℃洗糖 30 min,再抽滤,取固体物质再次搅拌溶解配成 5%(m/V)的悬浊液,反应过程中用 5% NaOH 溶液维持系统 pH 值恒定(±0.10),加酶 1 mL,升温至 55 ℃保温酶解

3 h,抽滤取上清液,再升温至 100 ℃保温灭酶 10 min,冷却后,抽滤,再将上清液浓缩干燥,得到大豆蛋白水解物。

1.3.2 酶活的测定 采用福林酚法^[16]。

1.3.3 大豆蛋白酶解的单因素试验

(1) pH 值对脱脂豆粕酶解的影响:固定时间为 3 h,温度为 55 ℃,加酶量为 1 500 U/g,底物浓度为 3%(m/V),分别在 pH 值为 8.0,8.5,9.0,9.5,10.0 的条件下,测定水解后上清液中的蛋白质含量和水解度。

(2) 温度对脱脂豆粕酶解的影响:固定时间为 3 h,pH 值为 9.0,加酶量为 1 500 U/g,底物浓度为 3%(m/V),分别在温度为 45,50,55,60,65 ℃的条件下,测定水解后上清液中的蛋白质含量和水解度。

(3) 时间对脱脂豆粕酶解的影响:固定温度为 55 ℃,pH 值为 9.0,加酶量为 1 500 U/g,底物浓度为 3%(m/V),分别在时间为 1,2,3,4,5 h 的条件下,测定水解后上清液中的蛋白质含量和水解度。

(4) 加酶量对脱脂豆粕酶解的影响:固定温度为 55 ℃,pH 值为 9.0,时间为 3 h,底物浓度为 3%(m/V),分别在加酶量为 500,1 000,1 500,2 000,2 500 U/g 的条件下,测定水解后上清液中的蛋白质含量和水解度。

(5) 底物浓度对脱脂豆粕酶解的影响:固定温度为 55 ℃,pH 值为 9.0,时间为 3 h,加酶量为 1 500 U/g,分别在底物浓度(m/V)为 3%,4%,5%,6%,7%的条件下,测定水解后上清液中的蛋白质含量和水解度。

1.3.4 制备工艺的优化 在单因素试验结果的基础上,选取温度、加酶量、pH 值、时间、底物浓度 5 个因素,利用 DPS 数据处理软件中“灰色系统方法关联度分析”程序进行试验方案设计,并对所得数据进行分析处理。

(1) 灰色关联分析原始数据变换:由于系统中各因素的量纲可能不同,数值的数量级也可能相差悬殊,很难直接进行比较。因此,本试验采取均值化变换,先分别求出各个序列的平均值,再用平均值去除对应序列中的各个原始数据,所得到的新数据列,即为均值化序列。其特点是量纲为一,其值大于 0,并且大部分近于 1,数列曲线互相相交。经过数据变换的母数列记为 $\{Y(t)\}$,子数列记为 $\{X_i(t)\}$ ^[17]。

(2) 关联系数分析:关联系数反映两个被比较序列在某一时刻的紧密程度,关联系数的范围为 $0 < L \leq 1$ 。经数据变换的母数列记为 $\{Y(t)\}$,子数列记为 $\{X_i(t)\}$,则在时刻 $t=k$ 时母序列 $\{Y(k)\}$ 与子序列 $\{X_i(k)\}$ 的关联系数 $L_{0i}(k)$,按式(1)计算:

$$L_{0i}(k) = \frac{\Delta_{\min} + \Delta_{\max}}{\Delta_{0i}(k) + \rho \Delta_{\max}} \quad (1)$$

式中:

$L_{0i}(k)$ ——关联系数;

$\Delta_{0i}(k)$ —— k 时刻两比较序列的绝对差,即 $\Delta_{0i}(k) = |Y(k) - X_i(t)|$;

$\Delta_{\min}$ ——所有比较序列各个时刻绝对差中的最小值;

$\Delta_{\max}$ ——所有比较序列各个时刻绝对差中的最大值;

ρ ——分辨系数,取 $\rho=0.5$ 。

1.3.5 多元回归分析 采用 SPSS 19.0 软件中“回归分析”程序分析底物浓度、加酶量、温度、pH 值、时间的回归方程。

1.3.6 蛋白质含量的测定 采用凯氏定氮法^[18]。

1.3.7 水解度的测定 采用甲醛滴定法^[19-21]。

2 结果与分析

2.1 大豆蛋白酶解单因素试验结果

2.1.1 pH 值对低温豆粕酶解的影响 由图 1 可知,随着 pH 值的增大,大豆蛋白水解度呈现先增加后趋于平缓的变化趋势。pH 值为 9.0 时,大豆蛋白水解度达到 13.31%。pH 值为 8.0~9.0 时处于酶的最适 pH,酶活力较大,随 pH 值增加水解度增加;超过 9.0 后,酶虽未变性,但 pH 会影响底物的游离状态,也会影响酶分子活性部位上有关基团的解离,进而影响酶与底物的结合与催化,使水解度变化趋于平缓^[22]。权衡水解度、环境条件和试剂用量对产率的影响,选择 9.0 作为最佳酶解环境的 pH 值。

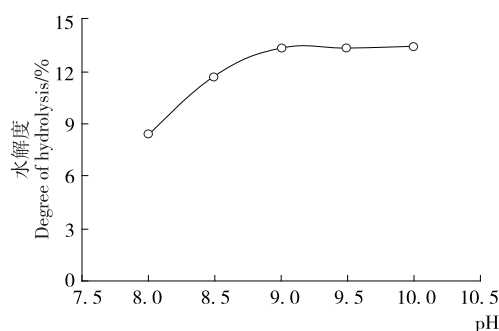


图 1 pH 值对水解度的影响

Figure 1 Effect of pH on the degree of hydrolysis

2.1.2 温度对低温豆粕酶解的影响 由图 2 可知,温度由 45 °C 增大到 55 °C 时,大豆蛋白水解度出现增长趋势;温度为 55 °C 时,大豆蛋白水解度达到 12.68%;超过 55 °C 之后,大豆蛋白水解度呈现降低的趋势。这是由于在低温阶段酶活力较小,酶水解速度较低,在适宜温度下,有利于蛋白结构的舒展,肽键更易与酶结合,酶水解速度加快,随着温度继续升高,酶蛋白变性失活,导致水解度下降^[23]。权衡水解度、环境条件以及试剂用量对产率的影响,选择 55 °C 作为最佳

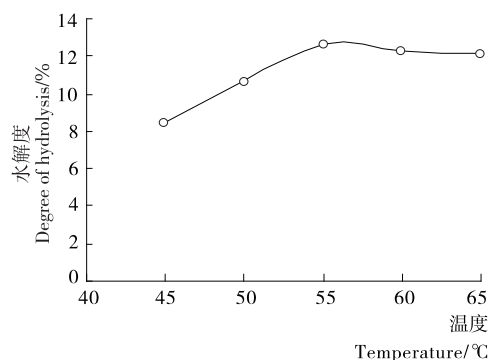


图 2 温度对水解度的影响

Figure 2 Effect of temperature on the degree of hydrolysis

酶解环境的温度。

2.1.3 时间对低温豆粕酶解的影响 由图 3 可知,随着时间的延长,大豆蛋白水解度呈现先增长后趋于平稳的变化趋势。时间为 3 h 时,大豆蛋白水解度达到 13.24%。原因主要是由于 Alcalase 蛋白酶酶解需要一定的反应时间,随着酶解反应的进行,酶与底物作用,水解程度不断加深,水解度也随之提高;在到达 3 h 时,底物浓度减少,反应位点逐渐被酶分子饱和,可与酶作用的肽键数量减少,并且产物浓度增加,其竞争性抑制增强,酶的活性逐渐降低,因此出现先增长后趋向平稳的变化过程^[24]。权衡水解度、环境条件以及试剂用量对产率的影响,选择 3 h 作为最佳酶解环境的时间。

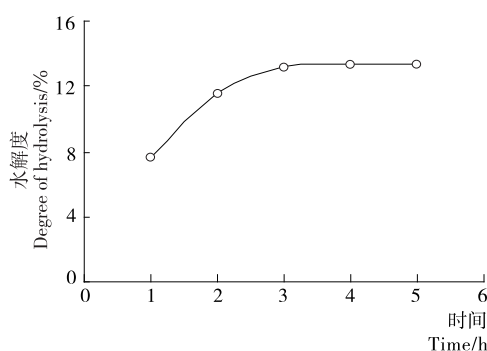


图 3 时间对水解度的影响

Figure 3 Effect of time on the degree of hydrolysis

2.1.4 加酶量对低温豆粕酶解的影响 由图 4 可知,加酶量由 500 U/g 增大到 2 000 U/g 时,大豆蛋白水解度逐渐增长;加酶量为 2 000 U/g 时,大豆蛋白水解度达到 14.61%,之后,大豆蛋白水解度呈略微降低的变化趋势。这是由于 Alcalase 蛋白酶酶解初期,酶浓度较低,底物过量,酶与底物完全结合,水解程度逐渐增大,水解度随之呈现上升趋势,在加酶量达到 2 000 U/g 时酶在底物表面的作用已达到饱和,酶分子与底物不能充分接触,而底物上可供酶切割的位点有限,多出的酶不能在底物上起作用^[25],因此水解度趋于平衡,有略微降低的趋势^[25]。因此,权衡产率、成本等相关因素,选择 2 000 U/g 作为最佳酶解环境的加酶量。

2.1.5 底物浓度对低温豆粕酶解的影响 由图 5 可知,随着

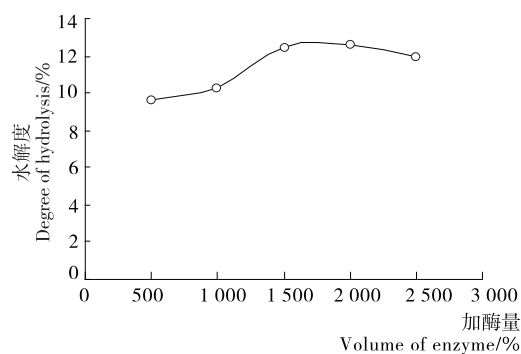


图 4 加酶量对水解度的影响

Figure 4 Effect of the enzyme added of the degree of hydrolysis

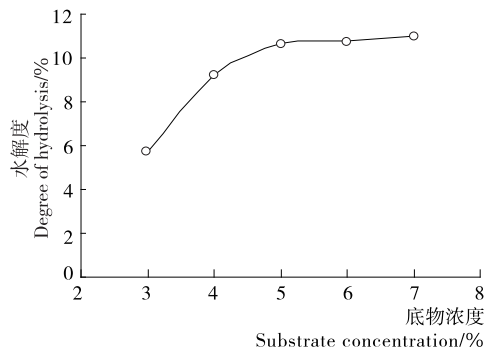


图 5 底物浓度对水解度的影响

Figure 5 Effect of substrate concentration on the degree of hydrolysis

底物浓度的增大,大豆蛋白水解度呈现先增长后逐渐趋于平稳的变化趋势。底物浓度为 5%(m/V)时,大豆蛋白水解度达到 10.66%。这是因为在一定的加酶量条件下,底物浓度的增加会导致酶解的效率增加,使得所有的酶都可以在同一时间作用于底物,导致水解度不断上升,当加酶量和底物相互平衡时达到酶解的最大效率,再增加底物浓度,酶解效率几乎不变,导致水解度基本保持不变的状态^[26]。权衡水解度、环境条件以及试剂用量对产率的影响,选择 5%(m/V)作为最佳酶解环境的底物浓度。

2.2 灰色关联分析

2.2.1 原始数据变换 利用 DPS 数据处理软件中“灰色系统方法关联度分析”程序,得到原始数据均值化结果见表 1。

2.2.2 关联系数分析 由原始数据均值化结果得到所有比较序列各个时刻绝对差中最小差值 Δmin 和最大差值 Δmax 分别为 0 和 0.481 65,利用 DPS 数据处理软件中“灰色系统方法关联度分析”程序计算反应体系中各因素的关联系数。根据不同因素的关联系数(表 2),排列出因素的显著性为:pH 值>温度>底物浓度>加酶量>时间,因此大豆多肽的制作工艺参数中,pH 值影响最显著,时间的影响最不显著。

2.3 多元回归分析

采用 SPSS 19.0 软件进行回归分析,以水解度为因变量,pH 值、温度、底物浓度、加酶量、时间为自变量建立多元线性回归方程^[27]。运用 SPSS 19.0 软件中“分析—回归—线性”程序,得到回归方程为:

$$Y = -32.041 + 2.372X_1 + 0.177X_2 + 1.335X_3 + 1.221X_4 + 0.001X_5$$
 (2)

根据回归方程(2),可以预测反应体系 pH 值为 8~10、温度为 45~65℃、时间为 1~5 h、底物浓度为 3%~7%(m/V)以及加酶量为 500~2 500 U/g 内的 Alcalase 碱性蛋白酶解大豆低温豆粕的水解度。

表 3 随机降解条件验证实验

Table 3 Random degrading conditions of validation experiments

样品	pH 值	温度/℃	时间/h	底物浓度/%	加酶量/(U·g ⁻¹)	预测水解度/%	实测水解度/%
1	8.5	47	3.5	4.0	800	6.79	7.01
2	9.5	53	2.5	5.0	1 100	10.42	10.32
3	8.0	59	4.5	4.5	1 400	10.28	10.15

表 1 原始数据均值化结果

Table 1 The average of the results of the original data

样品	X ₁ pH 值	X ₂ 温度/℃	X ₃ 时间/h	X ₄ 底物浓度/%	X ₅ 加酶量/(U·g ⁻¹)	Y 水解度/%
1	0.945 5	1.136 0	1.091 0	1.014 0	1.018 7	0.758 8
2	1.005 6	1.024 0	1.023 0	1.014 0	1.084 4	1.107 0
3	1.028 6	1.014 0	1.024 0	1.059 0	1.078 7	1.212 4
4	1.123 9	1.042 6	1.023 0	1.059 0	1.025 3	1.214 5
5	1.141 7	1.037 0	1.060 0	1.091 0	1.080 3	1.270 1
6	1.063 7	1.014 0	0.363 7	1.024 0	1.028 4	0.698 4
7	1.064 7	1.023 0	0.722 0	1.083 0	1.024 3	1.055 8
8	1.028 6	0.967 2	1.060 0	1.060 0	1.084 4	1.207 2
9	1.063 7	1.066 0	1.412 0	1.024 0	1.024 3	1.323 3
10	1.018 5	1.059 0	1.765 0	1.091 0	1.088 0	1.272 8
11	1.063 7	1.014 0	1.024 0	0.639 6	1.084 4	0.520 1
12	1.087 8	1.014 0	1.091 0	0.818 4	1.078 6	0.867 5
13	1.064 7	1.091 0	1.083 0	1.024 0	0.951 5	1.035 6
14	1.070 8	1.024 0	1.037 0	1.244 4	1.060 4	0.997 5
15	1.063 7	1.066 0	1.014 0	1.527 4	1.122 9	1.070 5
16	1.027 6	1.060 0	1.023 0	1.024 0	0.353 5	0.861 9
17	0.946 4	1.059 0	1.023 0	1.024 0	0.700 5	0.938 2
18	1.070 8	1.083 0	1.060 0	1.014 0	1.038 3	1.216 0
19	1.028 6	1.060 0	1.023 0	1.023 0	1.353 7	1.162 6
20	0.905 4	1.039 7	1.083 0	1.023 0	1.645 9	1.132 4
21	1.041 6	0.837 0	1.037 0	1.037 0	1.038 3	0.794 1
22	1.018 5	0.963 6	1.037 0	1.059 0	1.038 3	1.009 9
23	1.063 7	1.063 3	1.023 0	1.066 0	1.064 6	1.144 8
24	1.217 6	1.116 0	1.060 0	1.066 0	1.067 4	1.161 7
25	1.095 9	1.289 4	1.024 0	1.037 0	1.067 4	1.170 7

表 2 反应体系中各因素关联系数

Table 2 Correlation coefficient of various factors in the reaction system

X ₁ pH 值	X ₂ 温度/℃	X ₃ 时间/h	X ₄ 底物浓度/%	X ₅ 加酶量/(U·g ⁻¹)
0.732 2	0.688 2	0.654 7	0.665 0	0.655 0

2.4 验证实验

为了验证多元回归分析线性回归方程的可靠性,随机假设 3 组 Alcalase 碱性蛋白酶酶解大豆低温豆粕的反应条件,将方程预测的水解度和实测的水解度进行比较,结果见表 3。由表 3 可知,预测的水解度和实测的水解度数值基本接近,表明预测值与真实值之间有很好的拟合性,因此灰色关联分析方法得到的优化工艺参数准确可靠,具有实用性。

3 结论

本试验对 Alcalase 碱性蛋白酶酶解大豆蛋白过程进行优化,以水解度为指标,确定大豆多肽酶解的最佳工艺参数为:反应体系 pH 值 9.0,反应温度 55 ℃,反应时间 3 h,大豆脱脂豆粕添加量 5%(m/V),Alcalase 碱性蛋白酶的添加量 2 000 U/g,该条件下水解度为 13.53%。本试验使得大豆蛋白水解度得到了较大提高,下一步将对大豆蛋白水解产物的生理功能与水解度之间的关系进行更深入的研究。

参考文献

- Naoki Izawa, Tomoko Hanamizu, Toshiro Sone. Effects of fermentation conditions and soybean peptide supplementation on hyaluronic acid production by *Streptococcus thermophilus* strain YIT 2084 in milk[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, 10(4): 356~360.
- Huang Mei-gui, Zhang Xiao-ming, K Eric, et al. Inhibiting the color formation by gradient temperature-elevating Maillard reaction of soybean peptide-xylose system based on interaction of l-cysteine and Amadori compounds[J]. *Journal of Peptide Science*, 2012, 18(5): 342~349.
- Tokudome Yoshihiro. Effects of soybean peptide and collagen peptide on collagen synthesis in normal human dermal fibroblasts[J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2012, 63(6): 689~695.
- 兰欣怡, 张彬. 大豆多肽的研究进展[J]. *动物营养*, 2008(10): 19~22.
- 陶红丽, 朱志伟, 江津津. 大豆多肽生理活性研究进展[J]. *食品与机械*, 2007, 23(6): 133~136.
- Kamal Jangra, Sandeep Grover, Aman Aggarwal. Simultaneous optimization of material removal rate and surface roughness for WEDM of WC-Co composite using grey relational analysis along with Taguchi method[J]. *International Journal of Industrial Engineering Computations*, 2011, 2(3): 479~490.
- 王莉娟, 陶文沂. 脱脂豆粕制备高水解度大豆肽酶解条件的优化[J]. *食品与机械*, 2008, 24(1): 20~24.
- 张毅, 华欲飞, 孔祥珍, 等. Alcalase 酶解制备大豆肽工艺条件的优化[J]. *粮食与食品工业*, 2009, 16(6): 40~44.
- 邓聚龙. 灰色理论基础[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2002: 1~10.
- 周秀文. 灰色关联度的研究与应用[D]. 吉林: 吉林大学, 2011.
- 宋春宁, 杨瑞标. 蔗糖澄清工段糖浆色值影响因素的灰色关联分析[J]. *食品与机械*, 2013, 29(2): 28~31.
- Adeel H Suhail. Surface roughness identification using the grey relational analysis with multiple performance characteristics in turning operations[J]. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 2012, 37(4): 1 111~1 117.
- 王轩, 毕金峰, 刘璇, 等. 不同产地苹果脆片品质的灰色关联度分析[J]. *食品与机械*, 2012, 28(5): 51~54.
- 孙玉刚. 灰色关联分析及其应用的研究[D]. 南京: 南京航空航天大学, 2007.
- 黄雅燕, 王文平, 肖美添. 碱性蛋白酶水解豆粕制备大豆多肽[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*, 2013, 34(6): 674~677.
- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 23527—2009 蛋白酶制剂[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- Angeles Saavedra, Elena Arce, Jose Luis Miguez, et al. Potential effect of uncertainty on the GRG interpretation[J]. *Grey Systems: Theory and Application*, 2013, 3(2): 121~128.
- 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.5—2010 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- 徐勤, 葛向阳, 刘建峰. 甲醛法测大豆蛋白水解度的改进[J]. *饲料工业*, 2008, 29(5): 46~47.
- 胥彩云, 童军茂, 周晓宏. 酶水解法提高大豆蛋白水解度的研究[J]. *食品与机械*, 2010, 26(1): 9~11.
- 陈敏. 双酶复合法提取大豆蛋白的工艺研究[D]. 西安: 西安科技大学, 2009.
- 赵庆政. 用酶法从脱脂豆粕中提取蛋白的探讨[J]. *食品工业科技*, 1982(4): 53~56.
- 张玲华, 唐小俊, 张宝玲. 大豆多肽制备工艺的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2001(3): 37~39.
- 陈新, 陈庆森, 庞广昌. 不同变性方式对 Alcalase AF2.4L 酶解玉米蛋白水解度的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2005(2): 42~44.
- 马歌丽, 彭新榜, 卫军. 反应条件对酪蛋白水解度的影响[J]. *食品研究与开发*, 2007(1): 8~11.
- 张巧娥, 吴学荣, 马水鱼, 等. 奶牛产奶量与乳成分的多元回归分析[J]. *江西农业大学学报*, 2011, 33(1): 112~116.

(上接第 200 页)

- Li Jiang-tao, Zhang Jiu-liang, He Hui, et al. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013(51): 297~305.
- Yang Yan-jun, Tao Guan-jun, Liu Ping, et al. Peptide with angiotensin I-Converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(19): 7 891~7 895.
- Ma Zhi-li, Zhang Wen-jun, Yu Guo-cai, et al. The primary structure identification of a corn peptide facilitating alcohol metabolism by HPLC—MS/MS[J]. *Peptides*, 2012, 37(1): 138~143.
- Madhusudhan M C, Raghavarao K S M S, Sanjay Nene. Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from Baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 38(3): 414~420.
- 隋玉杰. 玉米肽的制备条件及其醒酒护肝机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006.