

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.04.031

电子束变性处理对大米蛋白酶解效率的影响

Effect of electron beam denaturation treatment on the enzymatic hydrolysis efficiency of rice protein

张新霞^{1,2} 陈正行^{1,2} 王莉^{1,2}ZHANG Xin-xia^{1,2} CHEN Zheng-xing^{1,2} WANG Li^{1,2}

(1. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122;

2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:利用电子束辐照(EBI)技术对大米蛋白进行变性处理,以水解度、多肽产率为评价指标,研究大米蛋白在不同酶作用下的酶解效果。研究发现,EBI变性处理能有效提高不同酶对大米蛋白的酶解效率,增加多肽产率,其中EBI辅助碱性蛋白酶水解效果最好,大米蛋白水解度提高(19.02±0.37)%,多肽产率提高(13.50±0.29)%。扫描电镜结果表明,EBI变性处理使大米蛋白表面结构完整性下降,颗粒化程度增加。二级结构中 α -螺旋含量由(18.38±0.31)%下降到(4.46±0.43)%,大米蛋白分子灵活性增加。紫外光谱和内源荧光光谱分析表明,EBI变性技术使大米蛋白分子空间构象展开,包埋在内部疏水区域的活性基团暴露,有利于酶解反应的进行。

关键词:大米蛋白;电子束变性处理;酶解效率;蛋白质高级结构

Abstract: In this study, electron beam irradiation (EBI) technology was used to modify rice protein. The enzymatic hydrolysis efficiency of modified rice protein under different enzymes was studied with hydrolysis degree and polypeptide yield as evaluation indexes. It was found that EBI denaturation treatment could effectively improve the enzymatic hydrolysis efficiency of rice protein and increase the polypeptide yield, among which EBI assisted alkaline protease hydrolysis had the best effect, the rice protein hydrolysis degree increased by (19.02±0.37)%, and the polypeptide yield increased by (13.50±0.29)%. The SEM analysis showed that EBI denaturation treatment decreased the

surface structure integrity of rice protein and increased the granulation degree. The content of α -helix decreased from (18.38±0.31)% to (4.46±0.43)%, indicating that the molecular flexibility of rice protein increased. The UV spectrum and endogenous fluorescence spectrum analysis showed that EBI denaturation technology expanded the spatial conformation of rice protein molecules, exposing more active groups embedded in the internal hydrophobic region. The structural changes of protein are beneficial to the enzymatic hydrolysis reaction.

Keywords: rice protein; electron beam denaturation processing; enzymatic hydrolysis efficiency; spatial structure of protein

大米蛋白是最接近 FAO/WHO 理想模式的植物蛋白,氨基酸组成配比合理,生物价高,过敏性低,是一种优质谷物蛋白^[1]。近年研究^[2-3]发现,大米蛋白具有重要保健功能,如抗糖尿病、抗胆固醇、抗癌变等。尽管大米蛋白的营养价值和保健价值已被认可,但低溶解性严重限制了其在工业中的应用。酶解改性可以较好地改善大米蛋白的溶解性,使水解产物具有各种生物活性^[4]。然而,大米蛋白分子结构紧密,具有高疏水性,对蛋白酶的水解作用有较强的抵抗力,现有资料^[5-8]显示,在适宜的酶解条件下,利用不同的蛋白酶水解大米蛋白,其水解度为 10%~20%,制约了大米蛋白酶解改性的实际效果,也导致利用酶法制备活性肽时产率较低。因此,寻求大米蛋白高效水解技术是大米蛋白酶法改性的关键。目前很多学者通过物理手段提高酶解效率,如超声波^[5,9]、微波^[10-11]、超高压^[12-13]和电子束辐照^[14-15]等。

电子束辐照(electron beam irradiation, EBI)是一种新型的冷处理改性技术,与其他物理手段相比,EBI 技术参数简单(只需控制处理剂量),易控制且操作简便,非常适合工业化应用。EBI 作用可使蛋白质表面微观结构和

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0401100);2015 年度粮食公益性行业科研专项(编号:201513004)

作者简介:张新霞,女,江南大学在读博士研究生。

通信作者:陈正行(1960—),男,江南大学教授,博导。

E-mail: zxchen2007@126.com

收稿日期:2018-12-16

空间构象发生改变。林松毅等^[14]发现 EBI 处理剂量为 3.24 kGy 时,玉米蛋白的表面完整性明显降低,紧密结构被打开。Lv 等^[16]研究了 EBI 变性处理对肌原纤维蛋白的影响,结果表明 1 kGy 处理剂量使 α -螺旋含量下降,但继续增加 EBI 处理剂量, α -螺旋含量增加。Zhao 等^[17]发现 EBI 处理剂量为 0~15 kGy 时,核桃蛋白的非结晶结构未发生变化,但其表面完整性下降,热稳定性增加。Wang 等^[18]利用 EBI 变性技术处理小麦胚芽蛋白,结果发现 EBI 变性处理能降低小麦胚芽蛋白的表面疏水性,并使其二级结构中的有序 α -螺旋结构向无规则卷曲转化。上述研究表明 EBI 变性处理能改变蛋白结构,但可能会对蛋白酶解产生影响。然而,目前关于 EBI 技术对蛋白酶解敏感性的报道较少^[14],而关于 EBI 变性处理改变蛋白质酶解效果的构效关系尚未见报道。

大米蛋白是植物蛋白中疏水性最强者,本研究拟以大米蛋白为例,研究新型 EBI 冷处理蛋白质变性技术,探索其提高酶解性能的作用机理,为植物蛋白的开发利用提供新途径和方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

大米蛋白:无锡金农生物科技有限公司;

碱性蛋白酶:13.8 万 U/g,诺维信(中国)生物技术有限公司;

中性蛋白酶:7.5 万 U/g,诺维信(中国)生物技术有限公司;

复合蛋白酶:12.5 万 U/g,诺维信(中国)生物技术有限公司;

胰蛋白酶:8.7 万 U/g,中国医药集团上海化学试剂公司;

其他试剂:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

电子加速器:5.0 MeV 型,无锡爱邦电子加速器公司;

氨基酸分析液相色谱仪:L-8800 型,日本 Hitachi 公司;

扫描电镜:TM-3030 型,日本 Hitachi 公司;

FTIR 光度计:Nicolet iS10 型,美国 ThermoFisher 公司;

荧光光度计:F-7000 型,日本 Hitachi 公司。

1.2 方法

1.2.1 EBI 变性处理大米蛋白 将大米蛋白粉装入自封袋(聚乙烯)中,使其铺平后厚度约为 1 cm。采用 5.0 MeV 电子加速器进行辐照,束流 2 mA,传送速率 6 m/min,辐照吸收剂量分别为 5,10,20,30,40 kGy,辐

照后的样品储存于-20 °C 备用。

1.2.2 大米蛋白酶解 选用 4 种蛋白酶进行水解,其各自最适酶解条件由商家提供,碱性蛋白酶(pH 8.5, 55 °C),中性蛋白酶(pH 7.0, 45 °C),复合蛋白酶(pH 7.0, 50 °C),胰蛋白酶(pH 8.0, 50 °C)。蛋白酶的最适添加量通过前期预试验确定。将大米蛋白配成 5 g/100 mL 悬液,在 4 种酶的最适酶解条件下搅拌 30 min,使其充分分散。然后加入蛋白酶进行水解 120 min。蛋白酶与大米蛋白的比例为 1:100(质量比)。通过加入 1 mol/L NaOH 溶液控制水解过程中溶液 pH。反应结束后,沸水浴中灭酶 10 min。将水解液 pH 调至中性后,10 000 r/min 离心 20 min。上清液冷冻干燥后储存于-20 °C 备用。水解过程中的水解度按式(1)计算:

$$DH = \frac{B \times M_b}{\alpha \times h_{tot} \times M_p} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

B ——消耗的氢氧化钠溶液的体积,mL;

M_b ——氢氧化钠溶液的浓度,mol/L;

α ——蛋白平均的解离程度, $1/\alpha = 1.01$;

M_p ——水解的蛋白质的质量,g;

h_{tot} ——蛋白质基质肽键总数(对于大米蛋白取 7.4 mmol/g)。

1.2.3 多肽产率测定 取步骤 1.2.2 中离心后上清液,与等体积 10 g/100 mL 三氯乙酸充分混合,4 °C 静置 30 min,8 000 r/min 离心 5 min,采用考马斯亮蓝法测定上清液中多肽含量。多肽产率为上清液中多肽的质量与原料蛋白中蛋白的量的比值。

1.2.4 电子扫描电镜 将蛋白样品置于导电胶表面,进行喷金处理。采用扫描电镜观察样品的微观结构。

1.2.5 傅里叶红外光谱(FTIR) 称取 2~3 mg 粉末样品与适量 KBr 混合并充分研磨,用压片机压成透明小块,采集 FTIR 图谱。采集参数为分辨率 2 cm^{-1} ,扫描范围 4 000~400 cm^{-1} ,扫描次数 32 次。利用 PeakFit 4.12 对 FTIR 图谱中酰胺 I 区(1 700~1 600 cm^{-1})进行解析,得到蛋白质 4 种二级结构含量。

1.2.6 紫外光谱 用 0.01 mol/L pH 8.0 磷酸缓冲液配制终浓度为 2.0 mg/mL 蛋白溶液。用紫外—可见分光光度计采集紫外光谱。采集参数为波长范围 200~400 nm,步长 2.0 nm,速度 60 nm/min,以磷酸缓冲液作空白。

1.2.7 内源荧光光谱 用 0.01 mol/L pH 8.0 磷酸缓冲液配制终浓度为 0.04 mg/mL 蛋白溶液,采集内源荧光光谱。采集参数为波长范围 300~500 nm,激发波长 280 nm,步长 2.5 nm,速度 10 nm/s,以磷酸缓冲液作空白。

1.2.8 数据分析 数据结构形式均为均值 \pm SD。采用 SPSS 对数据进行分析,采用 Duncan 多范围测试分析显

著性差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 EBI 变性处理对大米蛋白水解度的影响

由图 1 可知,EBI 处理组大米蛋白初始水解速率快, DH 值明显增加,碱性蛋白酶和复合蛋白酶水解过程中, DH 值随 EBI 处理剂量的升高快速增加。而中性蛋白酶和胰蛋白酶水解过程中,随着 EBI 处理剂量的增加, DH 值增长比较缓慢。EBI 处理剂量 30 kGy, 水解 120 min 时,不同蛋白酶对大米蛋白的水解度均达到最大值, DH 值分别增加 (19.02 ± 0.37)% (碱性蛋白酶), ($16.71 \pm$

0.48)% (复合蛋白酶), (11.44 ± 0.39)% (中性蛋白酶), (7.26 ± 0.50)% (胰蛋白酶)。在相同的 EBI 处理剂量下,不同种类的蛋白酶水解的大米蛋白的 DH 值增加程度不同,与蛋白酶的特异性有关。碱性蛋白酶和中性蛋白酶是非特异性内切酶,酶切位点广泛;复合蛋白酶含有内切蛋白酶和外切肽酶,作用位点较多;胰蛋白酶是特异性内切酶,只作用于 Lys 和 Arg 残基中的羧基端,酶切位点有限。当大米蛋白在 EBI 作用下结构发生改变时,作为底物,与具有广泛特异性的酶的相互作用效果比与限制性内切酶的作用效果要好。

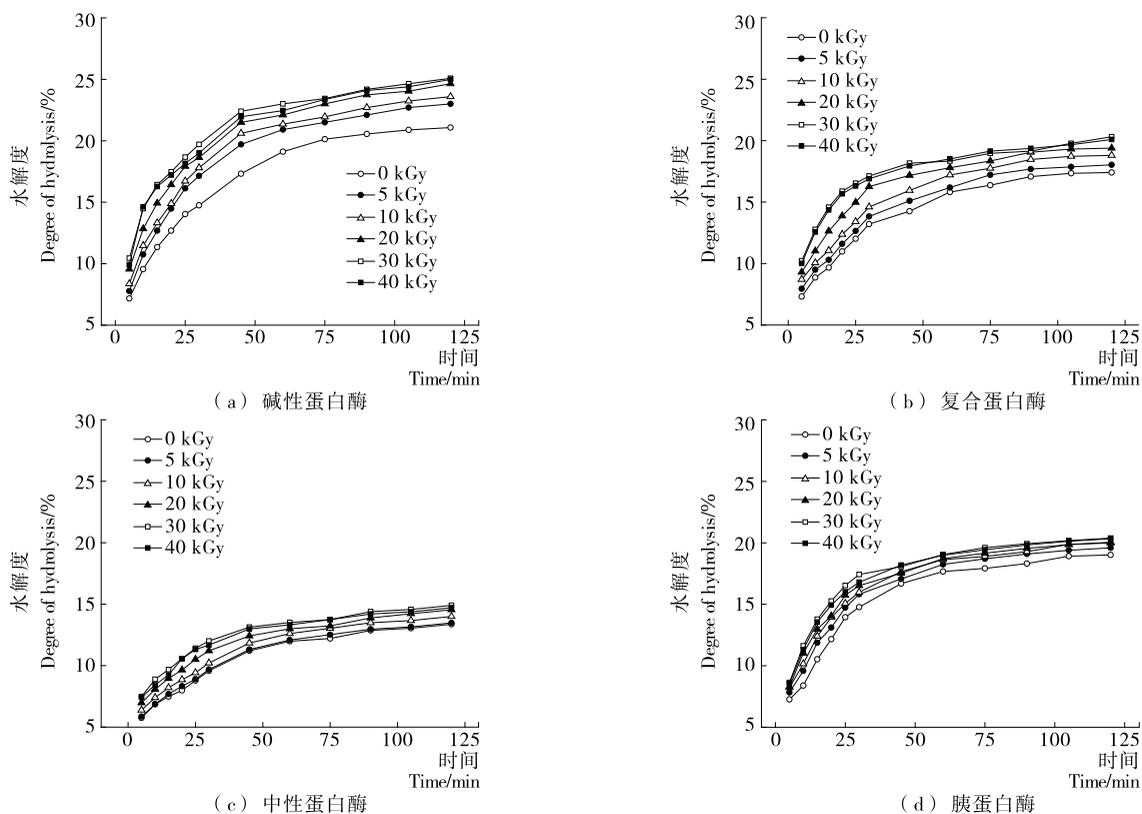


图 1 EBI 处理剂量和蛋白酶种类对大米蛋白酶解进程的影响

Figure 1 Effect of irradiation does and enzyme type on enzymatic hydrolysis of rice protein

2.2 EBI 变性处理对多肽产率的影响

由表 1 可知,采用碱性蛋白酶和复合蛋白酶对大米蛋白进行水解,变性处理剂量为 10~30 kGy 时,多肽产率随 EBI 变性处理剂量的增加而显著上升,变性处理剂量为 30 kGy 时,多肽产率分别增加 (13.5 ± 0.29)% 和 (8.19 ± 0.38)%,当变性处理剂量继续增加时,多肽产率无显著性变化。而采用中性蛋白酶和胰蛋白酶对大米蛋白进行水解,变性处理剂量为 5, 10 kGy 时,多肽产率增加效果不显著 ($P > 0.05$),当变性处理剂量为 30 kGy 时,大米蛋白多肽产率由 (53.62 ± 0.89)% (中性蛋白酶) 和 (64.16 ± 1.21)% (胰蛋白酶) 分别显著提高至 ($55.73 \pm$

1.05)% 和 (66.92 ± 1.12)%。

2.3 EBI 变性处理对大米蛋白表面形态的影响

由图 2 可知,大米蛋白的微观表面结构在 EBI 变性处理前后发生了明显的变化。未经 EBI 变性处理的大米蛋白为致密的球状结构,表面凹凸不平,存在细小的裂痕和孔隙,但整体完整性较好。经 EBI 变性处理的大米蛋白表面结构发生了明显的变化。当变性处理剂量增加至 30 kGy 时,大米蛋白微观表面完整性被破坏,大量小球形颗粒附着于大颗粒上,颗粒变的疏松。可能是 EBI 产生的能量使蛋白质分子间的氢键和范德华力发生断裂,破坏蛋白质分子间的交联。结果表明,随着 EBI 变性处理

表 1 EBI 变性处理剂量对不同酶水解产物多肽产率的影响[†]Table 1 Effect of irradiation does on peptide production of rice protein hydrolysates obtained by various enzyme ($n=3$) %

处理剂量/kGy	碱性蛋白酶	复合蛋白酶	中性蛋白酶	胰蛋白酶
0	69.41±1.57 ^a	61.18±1.11 ^a	53.62±0.89 ^a	64.16±1.21 ^a
5	73.31±1.71 ^b	62.87±0.95 ^{ab}	53.89±1.03 ^a	64.92±0.79 ^a
10	74.68±0.97 ^b	64.15±1.03 ^b	54.57±0.97 ^{ab}	65.83±1.08 ^{ab}
20	76.06±1.05 ^{bc}	65.32±1.01 ^{bc}	55.12±1.05 ^b	66.14±1.09 ^b
30	78.79±3.98 ^c	66.56±1.04 ^c	55.74±1.01 ^b	66.71±1.05 ^b
40	78.11±1.43 ^c	66.19±1.67 ^c	55.73±1.05 ^b	66.92±1.12 ^b

[†] 同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

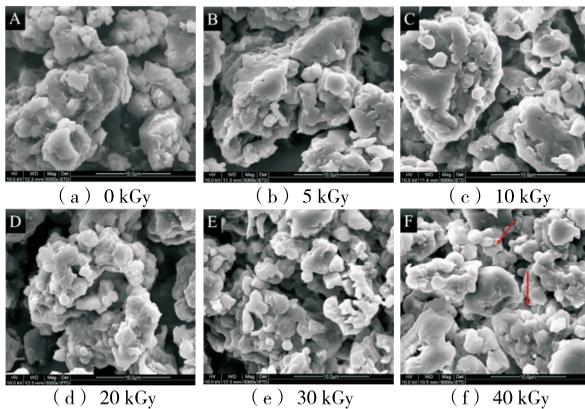


图 2 不同 EBI 变性处理剂量下大米蛋白扫描电子显微镜图

Figure 2 The SEM picture of rice protein pretreated with different irradiation

剂量的增加,大米蛋白致密的球状结构被打开,比表面积增加。由于表面的孔隙和小颗粒数量的增加,大米蛋白作为底物在酶解过程中与蛋白酶接触的表面积增加,使其更容易被水解。另外,孔隙结构也有利于蛋白酶进入底物颗粒内部,使肽键断裂,产生更多小分子肽^[19]。扫描电镜的结果可从宏观角度解释 EBI 变性处理提高大米蛋白水解度的原理。

2.4 EBI 变性处理对大米蛋白二级结构的影响

1 700~1 600 cm^{-1} 的 FTIR 图谱为蛋白质二级结构

的特征振动峰,通过软件对其结构进行解析(表 2)发现,大米蛋白的二级结构含量在 EBI 变性处理前后发生了明显的变化。当变性处理剂量为 5~30 kGy 时,EBI 变性处理组的大米蛋白的 α -螺旋结构含量随变性处理剂量增加显著下降,而 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲结构含量呈上升趋势。EBI 变性处理剂量为 30 kGy 时, α -螺旋结构含量降低了 75.73%,而 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲结构的含量分别增加了 16.63%,10.70%,24.77%。继续增加变性处理剂量,蛋白质二级结构含量变化不显著($P>0.05$)。在蛋白质的 4 种二级结构中, α -螺旋为致密的有序结构, β -折叠、 β -转角属于相对舒展的有序结构,而无规则卷曲则为无序结构^[16,20]。EBI 变性处理使大米蛋白中致密的 α -螺旋结构向相对舒展的 β 结构以及无序的无规则卷曲结构转化,说明 EBI 作用破坏了大米蛋白紧密的分子结构,使分子结构变动灵活疏松,更有利于蛋白质与酶接触,从而增强酶解效果。

2.5 紫外可见光光谱分析

由图 3(a)可知,EBI 作用后,大米蛋白的特征紫外吸收峰随变性处理剂量的增加呈先增强后减弱的趋势,但都远大于变性处理前的水平。说明 EBI 变性处理使大米蛋白分子展开,内部显色团外露,但当变性处理剂量增加到一定程度时,蛋白质分子出现重新聚集的趋势,导致吸收峰强度下降。200 nm 处的特征吸收峰由肽键贡献^[21], EBI 变性处理后,其吸收强度增加,表明大米蛋白经 EBI

表 2 蛋白二级结构百分含量[†]Table 2 Results of secondary structure analysis by FTIR ($n=3$) %

变性处理剂量/kGy	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
0	18.38±0.31 ^a	33.79±0.20 ^a	25.22±0.35 ^a	22.61±0.16 ^a
5	16.91±0.35 ^b	34.56±0.19 ^a	25.62±0.48 ^a	22.91±0.27 ^a
10	13.39±0.17 ^c	36.78±0.19 ^b	27.12±0.40 ^b	22.71±0.24 ^a
20	7.67±0.52 ^d	38.10±0.12 ^c	27.22±0.37 ^b	27.01±0.19 ^b
30	5.69±0.96 ^e	38.62±0.23 ^c	27.62±0.22 ^b	28.07±0.34 ^c
40	4.46±0.43 ^{ef}	39.41±0.23 ^{cd}	27.92±0.22 ^{bc}	28.21±0.34 ^c

[†] 同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

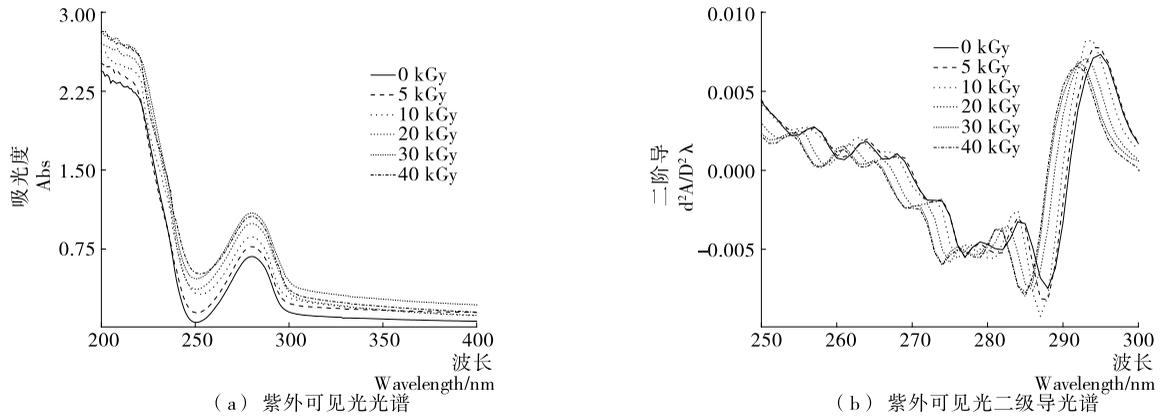


图 3 EBI 变性处理前后蛋白质的紫外可见光光谱分析
Figure 3 The UV spectra of protein with or without EBI treatment

变性处理后其肽键的空间结构发生改变,更多的肽键暴露到分子表面参与酶解反应。

由图 3(b)可知,当氨基酸残基所处的微环境疏水性下降时,其紫外吸收二阶导光谱特征峰向低波数迁移(蓝移)^[22]。270~282 nm 处吸收峰归属于苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸残基,其 λ_{max} 从 279 nm 蓝移至 276 nm (30 kGy);288 nm 处吸收峰由色氨酸和酪氨酸残基共同贡献,EBI 作用使其发生 3 nm 蓝移(30 kGy)。吸收峰的蓝移说明 EBI 变性处理后的大米蛋白分子展开,芳香族氨基酸残基所处的微环境更加亲水,与蛋白酶作用的空间位阻下降,从而使酶解效率提高。

2.6 内源荧光光谱分析

由图 4 可知,随着 EBI 变性处理剂量的增加,大米蛋白的最大吸收波长向长波长方向移动,在变性处理剂量为 30 kGy 时,红移程度最大(由 335 nm 红移至 347 nm)。红移程度越大,说明蛋白质空间构象的变化程度越大,蛋白质分子更加伸展^[23-24]。结合图 3(b)表明大米蛋白的空间构象发生变化,EBI 作用使蛋白质分子空间构象展开,内部疏水区的酶切位点暴露,参与酶解反应。

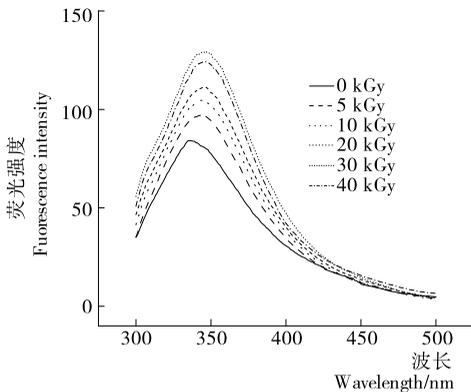


图 4 EBI 变性处理前后蛋白质的内源荧光光谱
Figure 4 The intrinsic fluorescence spectrum of protein with or without EBI treatment

3 结论

EBI 变性处理能有效提高大米蛋白的酶解效率和多肽产率。不同蛋白酶对 EBI 变性大米蛋白的水解度不同:碱性蛋白酶>复合蛋白酶>中性蛋白酶>胰蛋白酶,其中 EBI 辅助碱性蛋白酶水解效果最好,大米蛋白水解度提高(19.02±0.37)%,多肽产率提高(13.50±0.29)%。表面形态分析表明,EBI 变性处理使致密的大米蛋白颗粒变得疏松,颗粒化程度增加;此外,EBI 变性技术使蛋白质二级结构发生重组,致密的 α -螺旋结构向舒展的 β 结构和无序结构转化,使蛋白分子灵活性增加;紫外光谱和内源荧光光谱分析表明,EBI 变性技术使大米蛋白分子空间构象展开,暴露出更多包埋在内部疏水区域的活性基团。EBI 变性处理导致的大米蛋白结构的变化,既增加了蛋白质与酶接触的比表面积,又释放出更多的酶切位点,从而提高了酶解效率。目前,对动植物蛋白进行适度酶解是改善其溶解性、乳化性、起泡性以及抗氧化性等生理活性的重要手段。通过酶法改性能够提高蛋白资源的利用率,提升其资源价值。但随着水解程度的加深,蛋白酶解物的功能性质和生理活性不会无限增加,当水解度达到一定程度时,其功能性质和生理活性出现下降的趋势。本研究发现 EBI 变性处理能有效提高大米蛋白的酶解效率,提高多肽产率,因此,后续可对经过 EBI 变性处理的大米蛋白酶解物的功能性质和生理活性进行深入研究,以扩大大米蛋白的利用率。

参考文献

[1] HANSEN L P, HOSEK R, CALLAN M, et al. The development of high-protein rice flour for early childhood feeding[J]. Food Technology, 1981, 35(11): 38-42.
[2] YANG Lin, CHEN Jia-hou, XU Tong, et al. Rice protein extracted by different methods affects cholesterol metabolism in rats due to its lower digestibility[J]. International Journal

- of Molecular Sciences, 2011, 12(11): 7 594-7 608.
- [3] CHEN Ji-wang, LIU Shan-shan, YE Ran, et al. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4): 1 684-1 692.
- [4] ZHAO Qiang, XIONG Hua, SELOMULYA C, et al. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein; Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins[J]. Food Chemistry, 2012, 134(3): 1 360-1 367.
- [5] 李素云. 超声和超声协同碱预处理对大米蛋白酶解效果影响及过程模拟研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017: 31-32.
- [6] 李皖光, 汪桃花, 王新文, 等. 4种大米蛋白水解度测定方法比较[J]. 粮食科技与经济, 2017, 42(5): 35-37.
- [7] LI Su-yun, YANG Xue, ZHANG Yan-yan, et al. Effects of ultrasound and ultrasound assisted alkaline pretreatments on the enzymolysis and structural characteristics of rice protein[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2016, 31: 20-28.
- [8] ZHAO Qiang, SELOMULYA C, WANG Shen-qi, et al. Enhancing the oxidative stability of food emulsions with rice dreg protein hydrolysate[J]. Enhancing the oxidative stability of food emulsions with rice dreg protein hydrolysate, 2012, 48(2): 876-884.
- [9] ZHANG He-nan, MA Hai-le, LIU Wan, et al. Ultrasound enhanced production and antioxidant activity of polysaccharides from mycelial fermentation of *Phellinus igniarius*[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 113: 380-387.
- [10] CHENG Zhen-yu, SONG Hai-yan, YANG Ying-jie, et al. Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2015, 76: 161-168.
- [11] MORETTI M M D S, BOCCHINI-MARTINS D A, VIL-LENA M A, et al. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis[J]. Applied Energy, 2014, 122(6): 189-195.
- [12] JIN Shu-guang, ZAHNG Guang-ming, ZHANG Pan-yue, et al. High-pressure homogenization pretreatment of four different lignocellulosic biomass for enhancing enzymatic digestibility[J]. Bioresour Technol, 2015, 181(14): 270-274.
- [13] GARCIA-MORA P, PENAS E, FRIAS J, et al. High-pressure improves enzymatic proteolysis and the release of peptides with angiotensin I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities from lentil proteins[J]. Food Chemistry, 2015, 171: 224-232.
- [14] 林松毅, 王可, 刘静波. 电子束辐照技术提高玉米蛋白粉酶解效果[J]. 农业工程学报, 2014, 30(22): 300-308.
- [15] JIN Yan, LIANG Rong, LIU Jing-bo, et al. Effect of structure changes on hydrolysis degree, moisture state, and thermal denaturation of egg white protein treated by electron beam irradiation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2016, 77: 134-141.
- [16] LV Ming-chun, MEI Kai-lin, ZHANG Han, et al. Effects of electron beam irradiation on the biochemical properties and structure of myofibrillar protein from *Tegillarca granosa* meat[J]. Food Chemistry, 2018, 254: 64-69.
- [17] ZHAO Yue, SUN Na, LI Yong, et al. Effects of electron beam irradiation (EBI) on structure characteristics and thermal properties of walnut protein flour [J]. Food Research International, 2017, 100: 850-857.
- [18] WANG Li, LI Ting, SUN Dong-ling, et al. Effect of electron beam irradiation on the functional properties and antioxidant activity of wheat germ protein hydrolysate[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2018, DOI:10.1016/j.ifset.2018.09.003.
- [19] 孙旭. 挤压玉米蛋白粉酶法生物活性肽制备及特性[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013: 21-22.
- [20] JIN Jian, MA Hai-le, WANG Kai, et al. Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis and structural characteristics of corn gluten meal [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2015, 24: 55-64.
- [21] NIE Rui-yan, LIU Yue-jiao, LIU Zun-ying. The calcium-binding activity of fish scale protein hydrolysates [J]. Journal of Agricultural Chemistry & Environment, 2014, 3(1): 11-15.
- [22] LOPES D C F, DELVIVO F M, SILVESTRE M P C. Use of activated carbon for removing phenylalanine from reconstituted skim milk powder hydrolysates[J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(5): 447-453.
- [23] 赵伟. 高压脉冲电场在液态蛋杀菌中的应用及其对微生物和蛋白质的作用机制[D]. 无锡: 江南大学, 2009: 83-84.
- [24] 尹燕霞, 向本琼, 佟丽. 荧光光谱法在蛋白质研究中的应用[J]. 实验技术与管理, 2010, 27(2): 33-36.