

超声振荡改性玉米醇溶蛋白及高 *F* 值寡肽制备

李婷婷¹, 田亚平^{*1}, 周楠迪¹, 孙付保¹, 王志翠²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 纽绥笙特殊医用食品江苏有限公司, 江苏泰州 225300)

摘要: 玉米醇溶蛋白经 225 W 的超声振荡处理 90 min, 改善其结构特性, 解决 50 ℃ 加热会形成“粘弹性面团”的现象。通过扫描电镜、红外光谱、差示扫描量热技术, 清晰看到其微观表面形貌由片型初状转变为块型松散状, 变性峰显著减小, 酰胺 I 带 (1 700~1 600 cm⁻¹) 的吸收强度明显减弱。松散蛋白经 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶水解及超滤、纳滤膜过滤, 得到 *F* 值为 4.07 的粗肽, 其中相对分子质量小于 1 000 的占比 97.62%。 α -胰凝乳蛋白酶和羧肽酶 A 依次定向水解粗肽, 联合活性炭脱芳, 制备 *F* 值高达 41.87 的玉米寡肽, 其中苯丙氨酸和酪氨酸仅占总氨基酸的 0.73%, 相对分子质量 180~1 000 的占比 71.37%。

关键词: 玉米醇溶蛋白; 超声振荡; 酶解; 膜过滤; 脱芳; 高 *F* 值寡肽

中图分类号: Q 814.9 文章编号: 1673-1689(2020)11-0104-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.11.014

Modification of Zein by Ultrasound Oscillation and Preparation of Oligopeptides with a High Fischer's Ratio

LI Tingting¹, TIAN Yaping^{*1}, ZHOU Nandi¹, SUN Fubao¹, WANG Zhicui²

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Niu Suisheng Special Medical Food Jiangsu Co., Ltd, Taizhou 225300, China)

Abstract: Zein was treated by ultrasound oscillation at 225 W for 90 minutes to improve its structural characteristics and reduce the formation of viscoelastic gluten dough at 50 ℃. The treated zein was characterized by scanning electron microscopy, differential scanning calorimeter and Fourier transform infrared spectroscopy, respectively. The microscopic surface morphology of zein was clearly observed which changed from lamellar toughness to bulk looseness. Meanwhile, the denaturation peak and absorption intensity of amide I band (1 700~1 600 cm⁻¹) decreased significantly after ultrasound oscillation. Corn crude peptides with a Fisher's ratio of 4.07 were obtained after hydrolyzation by alkaline protease (Alcalase 2.4L), ultrafiltration and nanofiltration. The fraction with molecular weight less than 1 000 accounted for 97.62% in the crude peptides. Furthermore, the directed hydrolysis of corn crude peptides was performed by sequential using of α -chymotrypsin and carboxypeptidase A. Combined with the adsorption of aromatic amino acids by activated carbon, corn oligopeptides with a Fisher's ratio of 41.87 was prepared. The fraction with the

收稿日期: 2019-01-25

* 通信作者: 田亚平 (1964—), 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事生物活性物质方面的研究。E-mail: biochem@jiangnan.edu.cn

molecular weight of 180~1 000 was determined to be 71.37% in the oligopeptides, where the proportion of Phe and Tyr was only accounted for 0.73% within total amino acids.

Keywords: zein, ultrasound oscillation, enzymolysis, membrane filtration, adsorption of aromatic amino acids, high Fischer's ratio oligopeptides

玉米醇溶蛋白(Zein),其含量位居玉米蛋白首位,约占比60%^[1];其具有成膜、黏结、生物降解和抗氧化等特性,被用于制作保鲜、药物缓冲、活性包装材料^[2],但以其为原料酶法制备活性肽就需要解决其易形成“粘弹性面筋团”的现象^[3];其富含异亮氨酸、亮氨酸,缺乏色氨酸,是用于生产高F值寡肽的优质天然蛋白质^[4]。

高F值寡肽,其为一类混合物,相对分子质量为200~1 000;其组成独特,F值大于20,苯丙氨酸(Phe)和酪氨酸(Tyr)含量不超过2%^[5];其较氨基酸产品更易被生物体利用^[6-7]。其中,F值为支链氨基酸(BCAA)的摩尔数比芳香族氨基酸(AAA)的摩尔数^[8]。大量研究表明,高F值寡肽不仅可以缓解肝性脑病,还具有解醉酒^[9]、增强记忆^[10]、抗疲劳^[11]、抗氧化^[12]及抗衰老^[13]等功效。早在20世纪70年代,Yamashita等^[14]制得Phe含量低的肽,从此掀起了国内外对高F值寡肽的研究热潮。

本研究旨在借助超声协同振荡手段破坏蛋白质分子间作用力,使其紧致结构及聚集程度得到有效改善^[15-17],解决其在加热温度超过玻璃化转变温度(T_g)会聚成面团的现象^[18],易于蛋白酶作用^[16,19],为有效利用其天然优势且高效制备高F值玉米寡肽提供有利条件,进而推动高F值寡肽的商品化。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玉米醇溶蛋白:武汉远成共创科技有限公司;Alcalase 2.4 L碱性蛋白酶:诺维信(中国)生物技术有限公司;胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶:生工生物工程(上海)股份有限公司; α -胰凝乳蛋白酶:美国Amresco公司;羧肽酶A:美国Sigma公司;活性炭:宁夏天福盛园建设安装有限公司。

1.2 仪器设备

KX-85-2A数显恒温磁力搅拌器:金坛市科析仪器有限公司;超声振荡仪、真空冷冻干燥机:宁波

新芝生物科技股份有限公司;UF101超滤纳滤装置:上海弗立特实业有限公司;NEXUS傅里叶变换红外光谱:美国尼高力仪器公司;差示扫描量热仪(DSC 204F1):德国耐驰仪器制造有限公司;高速低温离心机、SU1510扫描电镜(SEM)、SU8220冷场发射扫描电镜(FESEM):日本日立HITACHI集团。

1.3 实验方法

1.3.1 玉米醇溶蛋白的预处理

1)各预处理方式对宏观形态的影响 配制50 g/L的悬浮液,pH调至9.5。分别采用50℃水浴、亚硫酸钠、吐温、聚乙二醇、皂素、丙三醇、十二烷基磺酸钠(SDS)、225 W超声振荡的方式进行90 min预处理,以50 g/L玉米醇溶蛋白悬浮液在高于玻璃化温度却不聚成团为指标,选择最佳预处理方式。

2)超声振荡对热稳定的影响 在张等^[20]的测定方法上稍有改良,固态样品的扫描范围为30~200℃;50 g/L悬浮液的扫描范围为20~80℃。 T_g 的计算参考卞^[21]的方法。

3)超声振荡对微观表面形貌的影响 取少量待测固态样品固定在样品台上,喷金镀膜处理,在高真空、5 kV的环境下,采用SEM在1 000、5 000倍下观察其微观表面形貌在超声处理前后的变化。

用体积分数70%乙醇配制2 mg/mL质量浓度的待测样品,取少量滴于硅片上,自然干后固定在样品台上,喷金镀膜处理后采用FESEM放大10 000倍,在高真空、3 kV的条件下观察其微观表面形貌在超声处理前后的变化。

4)超声振荡对结构的影响 参照董等^[22]的测定方法。

1.3.2 玉米粗肽的制备

1)蛋白酶的选择 将预处理后的玉米醇溶蛋白悬浮液分别调至各内切酶最适的反应温度、pH条件,均以 1×10^4 U/g的酶底比加入各内切酶且反应2 h。利用水解度(DH)、游离态BCAA和AAA含量作衡量参数,选择制备玉米粗肽(肽含量高且氮

基组成特殊)的最佳蛋白酶。

2)Alcalase 2.4 L 碱性蛋白酶水解条件的优化 将超声振荡后的悬浮液调至 50 ℃,pH 调至 8.0,分别以 1×10^4 、 2×10^4 、 3×10^4 、 4×10^4 、 5×10^4 U/g 的酶底比添加 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶,反应 4 h,通过控制 DH 和蛋白质质量浓度,对该酶的最佳酶底比和反应时间进行优化。

3) 酶解液的膜过滤 将酶解液加入超滤纳滤系统,选择操作压力为 0.25 MPa,经超滤(5 000)和纳滤(500)收集相对分子质量 500~5 000 的混合肽,冷冻干燥后进行氨基酸测定和相对分子质量分析。

1.3.3 高 F 值玉米寡肽的制备 将膜过滤得到的冻干粉配制成 50 g/L 的玉米粗肽溶液,温度维持在 40 ℃,pH 调至 8.0,按酶底比 2.0×10^4 U/g 加入 α -胰凝乳蛋白酶,水解 4 h;然后温度调至 37 ℃,pH 调至 7.0,按酶底比 40 U/g 加入羧肽酶 A,水解 2 h,然后进行 10 min 的 90 ℃酶失活处理;调 pH 至 2.5,按炭液比为 1:15 加入改性活性炭,调转速至 160 r/min,25 ℃处理 2 h,然后离心取上清液,经冷冻干燥后进行氨基酸和相对分子质量的测定。

1.3.4 水解度测定 采用甲醛滴定法,参照 Wang 等^[23]的测定方法。

1.3.5 蛋白质质量浓度测定 采用 BCA 法微量测定,按照 BCA 试剂盒的说明书进行标准曲线的制定及待测样品的多肽质量浓度测定。其中,反应温度为 37 ℃,反应时间为 30 min,检测波长为 562 nm。

1.3.6 多肽分布测定 参照齐等^[24]的测定方法进行待测样品的多肽相对分子质量分布测定。

1.3.7 氨基酸质量浓度测定 游离态氨基酸参照朱等^[25]的方法,总氨基酸参照尹等^[26]的方法。

1.3.8 产品得率计算 为保证工业转化的高质量运行,则对小试阶段的产品得率(Y)进行计算,公式如下:

$$Y = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%$$

式中,Y 为产品得率(%); m_1 为高 F 值玉米寡肽质量(g); m_2 为玉米醇溶蛋白质量(g)。

1.4 数据处理

实验中所有数据均进行 3 次平行测定,使用 SPSS 18.0 软件进行数据分析,以平均值 $\pm$ 标准误差表示结果,采用 Origin 8.5 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 玉米醇溶蛋白的预处理

2.1.1 各处理方式对宏观形态的影响 T_g 是非晶态高聚物的重要特征温度之一,是从玻璃态转变为高弹态的温度,是影响性能的主要因素^[27-29]。由 DSC 图谱可知,50 g/L 玉米醇溶蛋白悬浮液的 T_g 为 34.8 ℃(图 1(a));固态玉米醇溶蛋白的 T_g 为 107 ℃(图 1(b)),高于其 50 g/L 悬浮液的 T_g ,因为 T_g 与样品含水量呈负相关^[18,30];其 T_g 在超声振荡前后没有显著变化,而超声振荡后变性峰显著减弱(图 1(b)),可能因为超声协同振荡的空化与剪切作用削弱了蛋白质的聚集程度而使其变得分散^[31]。

作者发现 50 g/L 的玉米醇溶蛋白悬浮液在 50 ℃加热时会形成“粘弹性面筋团”(图 2(b)),因为其在温度高于 T_g 时,会失去其固有结构,通过蛋白质的重排形成粘弹性体系^[18]。该玉米醇溶蛋白悬浮液分别经亚硫酸钠、吐温、聚乙二醇、皂素、甘油、SDS 处理后,再经过 50 ℃加热仍会聚成“粘弹性面筋团”(图 2(b));但经超声振荡处理后,不仅解决了其在 50 ℃聚成团的难题(图 2(d)),且其冻干粉(图 2(c))较原玉米醇溶蛋白(图 2(a))显著松散,由颗粒状转变为粉末状。结合 DSC 图谱进行综合分析,则本研究选择超声振荡作为降低该蛋白质聚集程度的最佳处理方式。

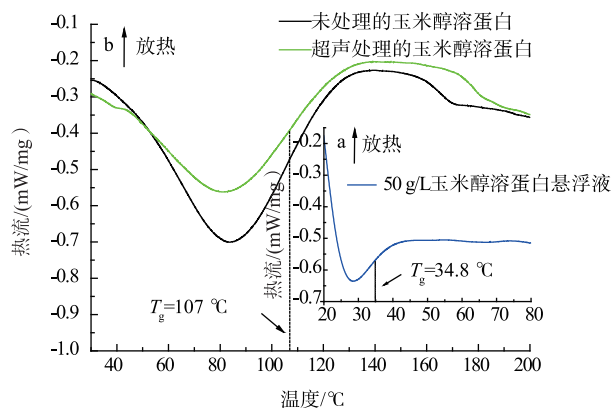


图 1 超声振荡前后玉米醇溶蛋白的 DSC 图谱

Fig. 1 DSC curves of zein before and after ultrasound oscillation pretreatment

2.1.2 超声振荡对微观表面形貌的影响 从 SEM 和 FESEM 中观察到:未经超声处理的玉米醇溶蛋白呈“海带”状,连接紧密,韧性强,表面光滑(图 3

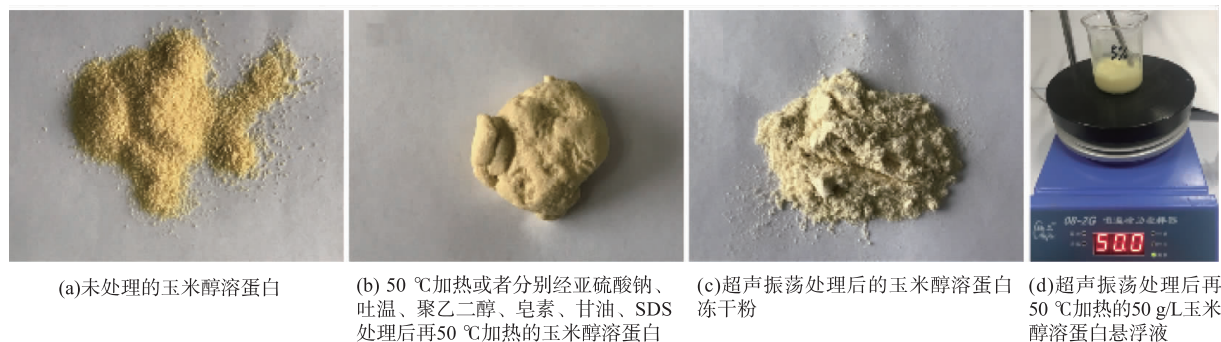


图2 不同预处理对玉米醇溶蛋白宏观形态的影响

Fig. 2 Effects of different pretreatments on macroscopic morphology of zein

(a)和3(b)),且蛋白质在70%乙醇中聚成球体,球的大小不等,球的顶端附有一层“薄膜”,球与球间连接紧密并盘旋成一团(图3(c)),这些聚集体也许就是其加热成团的结构基础;经超声振荡处理后,其微观表面形貌有显著变化,由整体片状型转变为块状堆积形态,由韧性变得松散,且表面出现了许多微小孔洞,增加了许多小突起(图3(d)和3(e)),且在70%乙醇溶液中分散较好,球直径显著变小,球大小较均一,球表面失去了“薄膜”而变得光滑,且球与球间失去了紧密的盘旋而呈线状(图3(f))。蛋白质松散度的提高为高效水解提供有利条件。超声振荡通过机械和空化作用、断裂作用于蛋白质分子间的范德华力和氢键,破坏蛋白质分子之间的交联^[15,17],这可能是玉米醇溶蛋白质的微观表面形貌经超声震荡后显著变化的根本原因,与DSC分析结果一致。

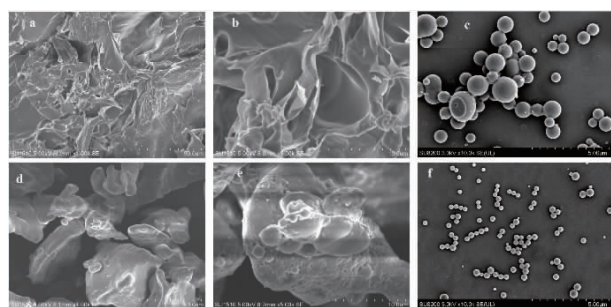


图3 超声振荡前后玉米醇溶蛋白的SEM图(a,b,d,e)和FESEM图(c,f)

Fig. 3 SEM (a,b,d,e) and FESEM (c,f) images of zein before and after ultrasound oscillation pretreatment

2.1.3 超声振荡对结构的影响 如图4(a)所示,超声处理前后的玉米醇溶蛋白在4 000~400 cm^{-1} 的FTIR中均出现特征吸收带,但强度存在差异。其中,

蛋白质的粘弹性和二级结构通常基于波数1 700~1 600 cm^{-1} 的FTIR分析(酰胺I带)^[32],其特征振动主要是C=O起作用,且1 610~1 640 cm^{-1} 是 β -折叠区域,1 640~1 650 cm^{-1} 是无规卷曲区域,1 650~1 658 cm^{-1} 是 α -螺旋区域,1 660~1 700 cm^{-1} 是 β -转角区域^[33]。如图4(b)所示,超声振荡前后的玉米醇溶蛋白在酰胺I带的吸收波形一致,但吸收强度在经超声振荡后明显减弱,这说明其二级结构经超声振荡后有很大程度的改变,但未被完全破坏。

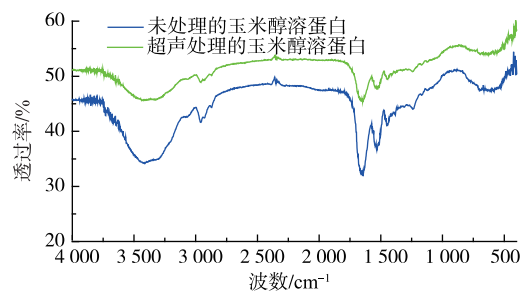
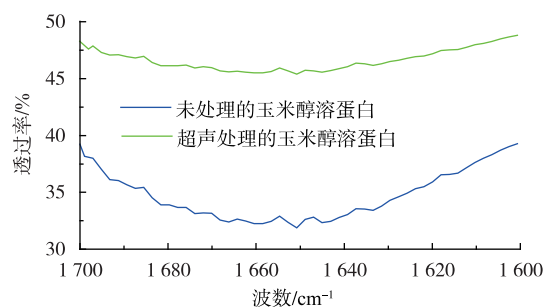
(a) 4000~400 cm^{-1} FTIR谱图(b) 酰胺I带(1700~1600 cm^{-1}) FTIR谱图

图4 超声振荡前后玉米醇溶蛋白的FTIR谱图

Fig. 4 FTIR spectra of zein before and after ultrasound oscillation pretreatment

2.2 玉米粗肽的制备

2.2.1 蛋白酶的选择 选择作用于AAA的蛋白酶、采用内外切酶协同水解是获得高F值寡肽的关

键。选用 5 种在 AAA 处有酶切位点的内切酶进行初步水解(表 1),在打开紧致结构的同时避免产生过多的游离氨基酸^[34]。如图 5(a)所示,DH 从大到小依次为:D、A、E、C、B。游离态氨基酸含量由多到少依次为:D、A、E、C、B(图 5(b)),与 DH 排序一致,D 水解物的游离态氨基酸为 1.86 mg/mL,其中,BCAA 为 0.87 mg/mL,AAA 为 0.37 mg/mL,均高于 A 水解物(1.03、0.34、0.26 mg/mL),但游离态 AAA/BCAA 为 0.42,低于 A 水解物(0.76),可能因为木瓜蛋白酶也具备外切酶的作用^[35]。结合玉米醇溶蛋白的特性及各内切酶的作用特点,该步选用 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶进行初步水解。

表 1 不同内切酶的作用位点

Table 1 Action sites of different endoproteases

编号	酶的名称	作用位点
A	Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶	水解由疏水性氨基酸羧基形成的肽键
B	胃蛋白酶	水解由 AAA 氨基或羧基形成的肽键和 Leu、Asp、Glu 羧基形成的肽键
C	α -胰凝乳蛋白酶	水解由 AAA、Leu 羧基形成的肽键
D	木瓜蛋白酶	优先水解由 Phe、Arg、Lys 羧基形成的肽键
E	中性蛋白酶	优先水解由 Phe、Leu 氨基形成的肽键

2.2.2 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶酶解条件的优化在 DH 和蛋白质质量浓度双指标的控制下,优化水解时间和酶添加量,以达到高水解度且肽含量高的目标。如图 6(a)所示,在其蛋白质质量浓度(50 g/L)恒定的条件下,随着酶添加量的增大,活性基团增加,反应增速,DH 增大,但蛋白质中可被酶作用的位点随反应的进行而减少,当反应 4 h 时,水解过程基本达到饱和状态,且以酶底比 4×10^4 U/g 水解 4 h 的水解度(18.6%)与以酶底比 5×10^4 U/g 水解 4 h 的水解度(19.66%)相近,而反应超过 3 h 后,蛋白质质量浓度迅速降低(图 6(b))。因此,选用 4×10^4 U/g 的酶底比对该松散蛋白质进行 3 h 的水解反应,以保证得到肽含量较高的玉米粗肽。

2.2.3 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶酶解液的超滤纳滤将得到的酶解液经超滤膜(5 000)和纳滤膜(500)过滤,得到的粗肽中相对分子质量小于 1 000 的约占 97.62%(图 7(a)和图 7(b))。其中,相对分子质量 500~1 000 的肽占 10.33%,180~500 的肽占 57.56%,小于 180 的物质占 29.73%(主要是二肽和

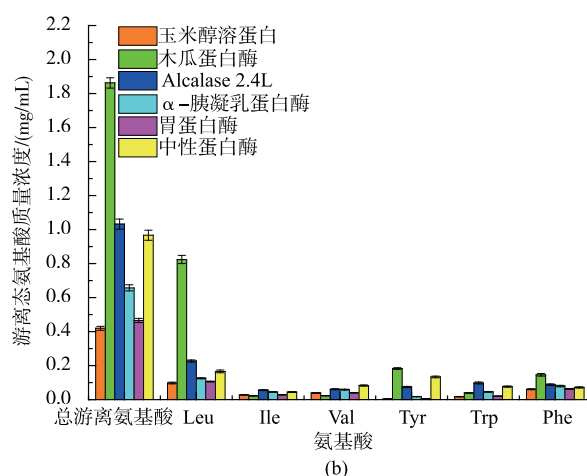
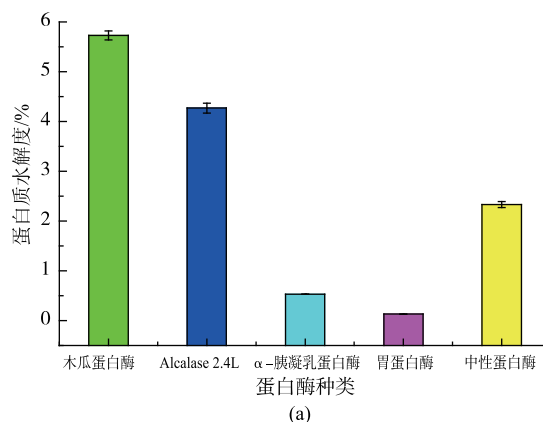


图 5 不同内切酶水解玉米醇溶蛋白的 DH 及游离态氨基酸质量浓度

Fig. 5 Degree of hydrolysis and free amino acids content of zein hydrolysed by different endoproteases

游离氨基酸),见图 7(b)。同时对此粗肽进行氨基酸组成分析,见表 2。总氨基酸质量分数为 80.047 3%,游离态氨基酸 8.924 9%且占比 11.15%,结合图 7(b)分析,18.58%的小于 180 的物质可能是二肽;另外,此肽混合物中 BCAA 质量分数为 20.818 7%,AAA 总量为 7.852 2%, F 值为 4.07,见表 2。可用于高 F 值玉米寡肽的制备,此 F 值高于何等^[36]水解大豆与玉米复配蛋白质制得的水解液的 F 值。另外,此粗肽混合物为短肽,便于 α -胰凝乳蛋白酶协同羧肽酶 A 进一步的定向且高效酶解^[37]。

2.3 高 F 值玉米寡肽的制备

按 1.3.3 所述方法制得高 F 值玉米寡肽混合物;以 1.3.8 所述公式算出此高 F 值玉米寡肽的得率为 34.66%,高于林^[38]制备高 F 值寡肽的得率,同时为后期工业化生产提供理论依据;以 1.3.7 所述

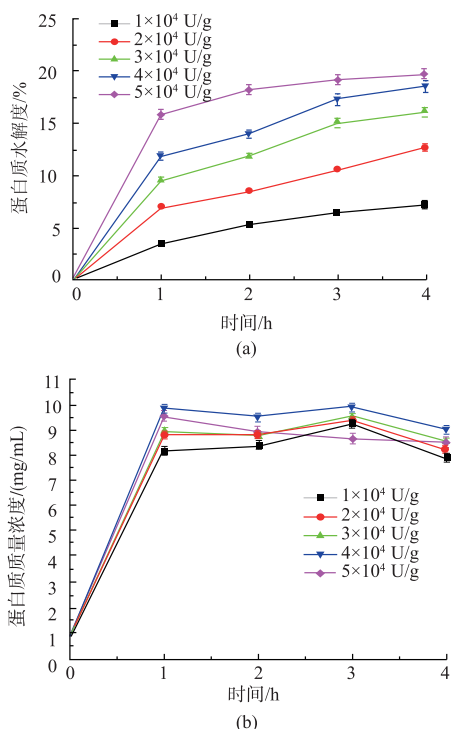


图 6 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶水解玉米醇溶蛋白的蛋白质水解度和蛋白质质量浓度

Fig. 6 Degree of hydrolysis and protein concentration of zein hydrolyzed by alkaline protease (Alcalase 2.4L)

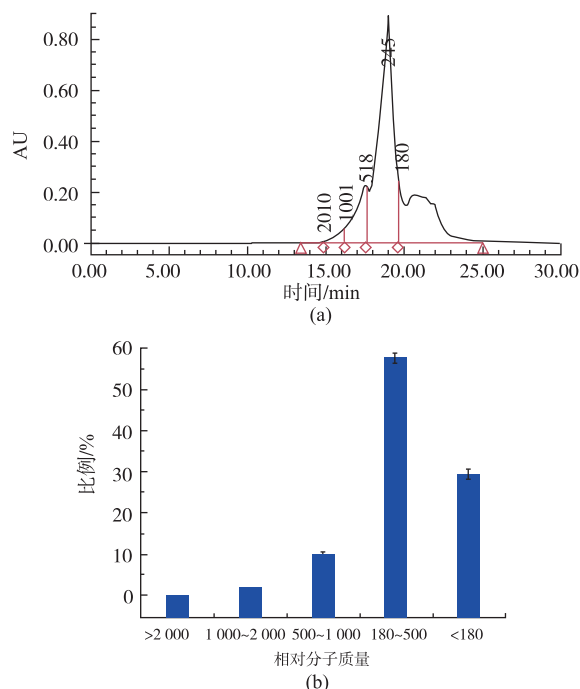


图 7 粗肽的相对分子质量分布和比例

Fig. 7 Molecular weight distribution and content of crude peptides

表 2 粗肽的氨基酸质量分数

Table 2 Amino acid content of crude peptides

%

氨基酸	游离	水解	氨基酸	游离	水解
Asp	0.057 4	5.021 4	Val	0.273 4	3.321 4
Glu	0.191 3	18.891 0	Met	0.455 0	1.292 3
Ser	0.025 3	3.924 7	Phe	0.775 5	5.023 8
His	0.354 5	0.932 4	Ile	0.215 9	3.690 2
Gly	0.406 8	1.498 7	Leu	2.016 8	13.807 1
Thr	0.105 7	2.515 8	Lys	0.111 9	0.344 8
Arg	0.390 4	1.082 8	Pro	0.205 8	9.576 0
Ala	0.469 7	5.945 7	BCAA	2.506 1	20.818 7
Tyr	1.143 6	2.828 4	AAA	1.919 1	7.852 2
Cys-s	0.123 1	0.351 0	总氨基酸	8.924 9	80.047 3
			<i>F</i> 值(nBCAA/nAAA)	4.07	

方法进行氨基酸质量分数测定,见表 3。此混合物中富含 BCAA、AAA,被活性炭大量吸附,由 7.852 2% 降至 0.42%,仅占氨基酸总量的 0.73%,且 *F* 值由玉米粗肽的 4.07 提高到 41.87,提高了 10.29 倍,高于使用这两种酶水解大米^[39]、蚂蚱^[40]、酪蛋白^[41]制备高 *F* 值寡肽的 *F* 值。这一结果表明:此粗肽是制备高 *F*

值寡肽的优质肽源,此双酶协同酶解能定向且高效释放 AAA,且 AAA 能被改性后的粉末活性炭高效除去。同时,以 1.3.6 所述方法进行多肽相对分子质量分布分析,见图 8。由图 8(a)可知,此混合物的相对分子质量主要集中于 1 000 以下,约占 97.68%,其中 180~1 000 的肽占比 71.37%(图 8(b)),此相

对分子质量范围的肽符合高 F 值寡肽的相对分子质量要求,且易被人体吸收利用。

表 3 高 F 值玉米寡肽的氨基酸质量分数

Table 3 Amino acid content of corn oligopeptides with a high Fischer's ratio

氨基酸种类	质量分数/%	氨基酸种类	质量分数/%
Asp	4.034 8	Val	3.050 7
Glu	11.095 7	Met	1.100 5
Ser	3.075 8	Phe	0.416 2
His	0.775 1	Ile	1.395 8
Gly	1.701 0	Leu	9.143 9
Thr	1.973 9	Lys	1.081 2
Arg	1.483 3	Pro	8.184 6
Ala	8.687 0	BCAA	13.590 4
Tyr	0.003 8	AAA	0.42
Cys-s	0.035 8	总氨基酸	57.24
F 值(nBCAA/nAAA)	41.87		

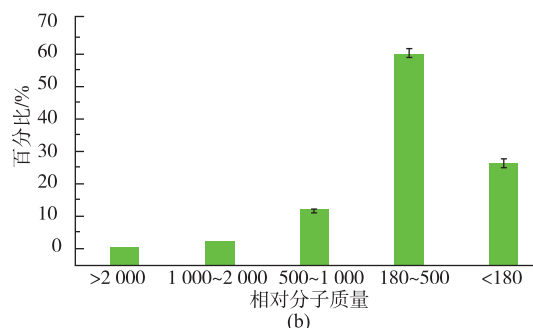
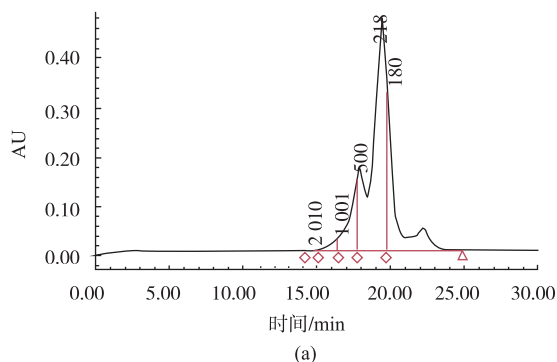


图 8 高 F 值玉米寡肽的相对分子质量分布和百分比

Fig. 8 Molecular weight distribution and content of crude oligopeptides with a high Fischer's ratio

3 结语

超声振荡使玉米醇溶蛋白的微观表面形貌由片型初状转变为块型松散状,蛋白球状体的聚集程度减弱且球直径变小,二级结构有一定程度的破坏等一系列的变化。结果说明超声振荡技术是通过改善玉米醇溶蛋白的结构特性而解决其加热温度高于 T_g 会形成“粘弹性面筋团”的现象。该蛋白质在结构松散状态下易被 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶作用,提高了酶解效率,并通过超滤纳滤膜分离、定向水解、活性炭脱芳香族氨基酸制得 F 值高达 41.87, Phe 和 Tyr 质量分数仅占氨基酸总量的 0.73%,相对分子质量 180~1 000 占比 71.37%的玉米寡肽。进一步研究的重点是通过动物实验和临床试验研究该高 F 值玉米寡肽是否有纠正低蛋白血症和预防早期肝损伤的功效,为来源于天然原料且具备特殊功效的高 F 值玉米寡肽的真正运用奠定基础。

参考文献:

- [1] 王晓杰,刘晓兰,丛万锁,等. 壳寡糖酶法糖基化修饰对玉米醇溶蛋白功能性质的影响[J]. 食品科学,2018,39(8):13-20.
- [2] 徐姗姗. 玉米醇溶蛋白研究进展[J]. 中国食品添加剂,2007(3):92-96.
- [3] 王晓杰,刘晓兰,丛万锁,等. 原料热处理对玉米醇溶蛋白结构性质和酶解效率的影响[J]. 现代食品科技,2015,31(11):170-176.
- [4] 蒋竹青,李萍,张明振,等. 玉米高 F 值寡肽的分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品与药品,2014,16(6):397-400.
- [5] OKITA M, WATANABE A, NAGASHIMA H. Nutritional treatment of liver cirrhosis by branched-chain amino acid-enriched nutrient mixture[J]. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 1985,31(3):291-303.
- [6] 张海欣,陈亮,金振涛,等. 普通玉米肽与高 F 值玉米肽抗氧化能力比较研究[J]. 食品科技,2015,40(7):177-180.
- [7] 刘静,李诚,胡迤萧,等. 酶解法制备牦牛骨胶原多肽及其加工性能评价[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(5):547-554.
- [8] 王鑫,侯威,赵磊,等. 不同分子特性玉米蛋白高 F 值活性肽的制备及其消化吸收的研究[J]. 食品工业科技,2019,40(1):58-65.
- [9] 黄程,杜帅,宋茹,等. 鲮鱼肉高 F 值寡肽液的生理活性研究[J]. 食品工业,2015,36(3):246-249.
- [10] 林松毅,许海丽,孟秀娟,等. 水迷宫评价蛋清高 F 值寡肽增强小鼠记忆功效的影响因素分析[J]. 食品科学,2011,32(3):

- 191-194.
- [11] 李润国, 庞文录. 酶解法制备花生粕高F值寡肽混合物及其缓解疲劳作用的研究[J]. 粮油食品科技, 2015, 23(1): 43-46.
- [12] UDENIGWE C C, ALUKO R E. Antioxidant and angiotensin converting enzyme-inhibitory properties of a flaxseed protein-derived high fischer ratio peptide mixture[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2010, 58(8): 4762-4768.
- [13] 王世巍, 刘静波, 王莹, 等. 蛋清高F值寡肽对受试小鼠皮肤中羟脯氨酸含量影响的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(11): 612-615.
- [14] YAMASHITA M, ARAI S, FUJIMAKI M. A low-phenylalanine, high-tyrosine plastein as an acceptable dietetic food method of preparation by use of enzymatic protein hydrolysis and resynthesis[J]. **Journal of Food Science**, 1976, 41(5): 1029-1032.
- [15] 杨柳, 覃小丽, 李依灿, 等. 超声处理对肾豆蛋白乳化活性和结构的影响[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(11): 117-123.
- [16] 任晓峰, 张熙, 侯婷, 等. 扫描超声波预处理对玉米醇溶蛋白酶解特性的影响[J]. 中国食品学报, 2018, 18(1): 128-136.
- [17] WANG Z B, LIN X M, LI P P, et al. Effects of low intensity ultrasound on cellulase pretreatment[J]. **Bioresource Technology**, 2012, 117: 222-227.
- [18] MEJIA C D, MAUER L J, HAMAKER B R. Similarities and differences in secondary structure of viscoelastic polymers of maize α -zein and wheat gluten proteins[J]. **Journal of Cereal Science**, 2007, 45(3): 353-359.
- [19] 王颖. 高F值寡肽的制备[D]. 天津: 天津科技大学, 2008.
- [20] 张雪莹, 郭超凡, 陶飞, 等. 不同热处理方式对玉米醇溶蛋白特性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(13): 112-118.
- [21] 卞正军. 橡胶材料多种测试玻璃化转变温度方法比较[J]. 世界橡胶工业, 2013, 40(8): 42-44.
- [22] 董艳娇, 张浩, 赵城彬, 等. 响应面法优化超声系统中玉米醇溶蛋白-葡聚糖糖基化及其性质分析[J]. 食品科学, 2018, 39(12): 247-253.
- [23] WANG K D, TIAN Y P, ZHOU N D, et al. Studies on fermentation optimization, stability and application of prolyl aminopeptidase from *Bacillus subtilis*[J]. **Process Biochemistry**, 2018, 74: 10-20.
- [24] 齐希光, 陆晓婷, 张晖, 等. 不同分子量黑籽瓜种子多肽抗氧化能力的研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(9): 74-80.
- [25] 朱强, 吴警涛, 田亚平. 亮氨酸氨肽酶的制备及在大米肽脱苦中的协同应用[J]. 食品工业科技, 2017, 38(19): 109-113.
- [26] 尹孝超, 钱海峰, 王立, 等. 米糠固态发酵工艺优化及其氨基酸变化[J]. 食品与机械, 2017, 33(3): 42-46, 65.
- [27] 赵凯, 李君, 刘宁, 等. 小麦淀粉老化动力学及玻璃化转变温度[J]. 食品科学, 2017, 38(23): 100-105.
- [28] 赵云波, 袁越锦, 王栋, 等. 渗透脱水对芒果解吸等温线和玻璃化转变温度的影响[J]. 食品工业, 2018, 39(4): 252-255.
- [29] RAHMAN M S. State diagram of foods: its potential use in food processing and product stability[J]. **Trends in Food Science and Technology**, 2006, 17(3): 129-141.
- [30] LAWTON J M. Viscoelasticity of zein-starch doughs[J]. **Cereal Chemistry**, 1992, 69(4): 351-355.
- [31] 孙建霞, 梅洲雄, 白卫滨, 等. 超声空化效应对食品品质影响研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(04): 337-342.
- [32] YE M P, ZHOU R, SHI Y R, et al. Effects of heating on the secondary structure of proteins in milk powders using mid-infrared spectroscopy[J]. **Journal of Dairy Science**, 2017, 100(1): 89-95.
- [33] WANG C, JIANG L Z, WEI D X, et al. Effect of secondary structure determined by FTIR spectra on surface hydrophobicity of soybean protein isolate[J]. **Procedia Engineering**, 2011, 15(1): 4819-4827.
- [34] 刘冬, 周丽珍, 李艳, 等. 玉米醇溶蛋白高水解度酶解制备短肽[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(1): 31-36.
- [35] MA Y, LI L, SUN D W. Preparation of high Fischer ratio oligopeptide by proteolysis of corn gluten meal[J]. **Czech Journal of Food Sciences**, 2008, 26(1): 38-47.
- [36] 何慧, 谢笔钧, 杨卓, 等. 大豆蛋白和玉米蛋白酶解肽及其活性研究[J]. 粮油食品科技, 2002, 10(1): 14-16.
- [37] PEDROCHE J, YUST M D M, LQARI H, et al. Production of *Brassica carinata* protein hydrolysates with a high Fischer's ratio using immobilized proteases[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006, 54(20): 7621-7627.
- [38] 林莉. 玉米蛋白酶解制备高F值低聚肽及应用研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2003.
- [39] JIANG W, YANG Y, TAO R Y, et al. Preparation of a novel chitosan-based biosorbent cross-linked with phenethylamine for adsorption of aromatic amino acids[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2017, 176: 236-245.
- [40] REN Y, YANG Y J, WU W J, et al. Identification and characterization of novel anticoagulant peptide with thrombolytic effect and nutrient oligopeptides with high branched chain amino acid from whitmania pigra protein[J]. **Amino Acids**, 2016, 48(11): 2657-2670.
- [41] PEDROCHE J, YUST M M, LQARI H, et al. Production and characterization of casein hydrolysates with a high amino acid fischer's ratio using immobilized proteases[J]. **International Dairy Journal**, 2004, 14(6): 527-533.