

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.02.011

颜小捷,刘幼娴,郑立浪,等. 胃蛋白酶和木瓜蛋白酶水解核桃蛋白工艺研究[J]. 广西植物, 2014, 34(2):183—188

Yan XJ, Liu YX, Zheng LL, et al. Study on preparation of walnut peptides from enzymatic hydrolysis of pepsin and papain[J]. *Guihaia*, 2014, 34(2):183—188

胃蛋白酶和木瓜蛋白酶水解核桃蛋白工艺研究

颜小捷¹, 刘幼娴^{1,2}, 郑立浪^{1,3}, 卢凤来¹, 李典鹏^{1*}

(1. 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西植物研究所, 广西 桂林 541006;

2. 广西中医药大学, 南宁 530001; 3. 广西师范大学, 广西 桂林 541004)

摘要: 以核桃粕为原料, 以水解度为考察指标, 研究胃蛋白酶和木瓜蛋白酶对核桃蛋白的水解作用。结果表明: 木瓜蛋白酶为酶解核桃蛋白最佳酶, 其最佳酶解条件为底物浓度 4%、酶质量分数 5%、酶解 pH 值为 7.0、酶解温度 50 °C、酶解时间 4 h; 在该条件下, 木瓜蛋白酶酶解核桃蛋白水解度可高于 25.76%。

关键词: 核桃蛋白; 胃蛋白酶; 木瓜蛋白酶; 水解度

中图分类号: Q946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)02-0183-06

Study on preparation of walnut peptides from enzymatic hydrolysis of pepsin and papain

YAN Xiao-Jie¹, LIU You-Xian^{1,2}, ZHENG Li-Lang^{1,3},LU Feng-Lai¹, LI Dian-Peng^{1*}(1. *Guangxi Key Laboratory of Functional Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany,**Guilin 541006, China; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;**3. College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)*

Abstract: Walnut peptides were obtained through pepsin or papain enzymolysis with walnut residue as raw materials and degree of hydrolysis as index. The results showed that papain was the optimum proteinase. The optimum hydrolytic conditions were as followed: substrate concentration was 4%, enzyme concentration was 5%, pH was 7, temperature was 50 °C and hydrolysis time was 4 h. Under these optimum conditions, the degree of hydrolysis can be higher than 25.76%.

Key words: walnut protein; epsin; papain; degree of hydrolysis

核桃(*Juglans regia*)为胡桃科胡桃属植物, 因其营养丰富, 有补肾强体、温肺定喘、润肠通便、强身健脑、驻颜延年等功效, 又称长寿果、万岁子、益智果、美容果(黄黎慧等, 2009; 李萍等, 2011)。现实中, 人们仅关注核桃油的营养价值, 忽略了对核桃饼粕的开发利用。核桃粕中蛋白质含量达 52%, 其中谷蛋白含量高达 70.11%, 而谷蛋白中疏水性氨基酸比例较高, 导致核桃蛋白溶解性较差, 大大限制了其

在食品工业中的利用(毛晓英, 2012; 丁晓雯等, 2005)。核桃蛋白中谷氨酸和精氨酸分别占氨基酸总量的 19.5%~20.4%和 15.4%~15.7%, 其中谷氨酸在人体内能促进 γ -氨基丁酸的生成, 降低血液氨基酸的含量, 促进脑细胞的呼吸; 赖氨酸与精氨酸的比值低至 0.16~0.19, 按该比值适当摄入可降低冠心病和动脉粥样硬化发生的概率(Kritchevsky, et al., 1982; Carroll, et al., 1975)。因此, 核桃粕的加

收稿日期: 2013-11-20 修回日期: 2014-03-07

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 11107010-3-10); 广西植物研究所基本业务费项目(2013001)。

作者简介: 颜小捷(1985-), 女, 广西玉林人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物资源开发与利用研究, (E-mail)xiaojie128@126.com。

*通讯作者: 李典鹏, 药学博士, 研究员, 主要从事天然药物和天然植物的化学研究, (E-mail)ldp@gxib.cn。

工利用和有效开发是延长核桃产业链的根本途径,而核桃粕蛋白的深加工将是核桃粕精深加工中最具潜力和最有前途的领域。

生产生物活性肽是蛋白质领域中新兴的朝阳产业,其系列产品是当前国内外食品界中较为热门的研究对象。至今,相关学者和企业多以乳制品、大豆、玉米等为原料研究和生产低分子肽,如市场上较为常见的有阿片肽、抗菌肽、抗癌肽、减肥肽、降糖肽、玉米肽等(豆康宁等,2007;王丽华等,2008;林燕等,2009);反之,以核桃粕为原料制备的低分子肽制品却较为罕见。现实中,要想得到核桃中特殊的活性水解肽类物质,须有足够的核桃水解产物作相关的药效学实验。本文主要以胃蛋白酶和木瓜蛋白酶为例,研究其水解核桃蛋白的最适条件。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

核桃饼粕(青岛十相自在食品有限公司);胃蛋白酶(郑州义多利化工产品有限公司);木瓜蛋白酶(南宁庞博生物工程有限公司);盐酸(西陇化工股份有限公司);氢氧化钠(西陇化工股份有限公司);磷酸氢二钾(广东汕头市西陇化工厂);磷酸二氢钾(广东汕头市西陇化工厂);甘氨酸(国药集团化学试剂有限公司);茆三酮(西陇化工股份有限公司)。

十两装高速中药粉碎机 LG-500A(浙江瑞安市百信药机器械厂);电子天平 XS225A-SCS(Precisa);HH-S 型水浴锅(郑州长城科工贸有限公司);KQ3200DE 型数控超声波清洗器(昆山市仪器有限公司);pH 计(深圳市柯迪达电子有限公司 CT-6023);T6 型新世纪紫外—可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

1.2 方法

1.2.1 核桃蛋白提取 核桃饼粕经粉碎过 40 目筛,核桃粉浸泡于去离子水中(1:9,w/v),用 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调 pH 值至 9.0,超声波浸提 1 h, $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min,取上清液加 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸调 pH 值至 4.5,蛋白质酸沉淀, $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min,沉淀水洗至中性,真空冷冻干燥,得核桃蛋白备用(丁晓雯等,2005)。

1.2.2 完全水解蛋白液的制备 精密称取核桃蛋白 50 mg,然后加入 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 50 mL,置沸水浴中冷凝回流水解 4 h,冷却,过滤,滤液真空浓缩至

1 mL 左右,加蒸馏水 9 mL,滴加 1 滴酚酞指示剂,用 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调至微红,定量转移至 25 mL 容量瓶中,用去离子水稀释至刻度,摇匀,离心,所得上清液备用(郭兴凤,2000;颜小捷等,2012)。

1.2.3 未酶解蛋白液的制备 称取核桃蛋白 5 g,浸泡于 50 mL 去离子水中,超声波浸提 10 min 后充分搅拌 30 min, $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min,取上清液备用。

1.2.4 标准曲线的制作 精密称取 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下干燥至恒重的甘氨酸 25 mg,置 25 mL 容量瓶中去离子水溶解并稀释至刻度,摇匀,得 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 储备液,移取 2 mL 上述储备液于 10 mL 容量瓶中定容至刻度,得 $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。分别吸取 0.45、0.5、0.55、0.6、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9 mL 对照品溶液于试管中,加去离子水至 2 mL,加 1 mL pH8.2 的磷酸缓冲液,加 1 mL 2% 的茆三酮显色剂,摇匀密封后置于沸水浴加热 15 min,然后冷水冷却,加入 5 mL 去离子水混匀,放置 15 min 后以去离子水管作为空白对照,570 nm 波长下测定吸光度(赵新淮等,1994),以甘氨酸含量为横坐标,以其吸光度为纵坐标,得甘氨酸含量测定标准曲线 $y=14.5x-1.1934(R^2=0.9933)$ 。

1.2.5 酶解核桃蛋白的单因素实验 称取一定质量的核桃蛋白,用 50 mL 蒸馏水配制成核桃蛋白水溶液,称重,超声 5 min 后置于沸水浴中加热 10 min 进行预处理,冷却后补重,调节反应温度(水浴保温)和 pH 分别为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 2,然后加入不同剂量胃蛋白酶,水解后在沸水浴条件下灭酶 10 min,冷却后 $4\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min,量取并记录上清液体积,上清液进行水解度的测定。固定其他条件,分别改变底物浓度、酶解 pH 值、酶解时间、酶解温度等单一条件,考察核桃蛋白水解度的变化情况。同理,调节反应温度(水浴保温)和 pH 分别为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 7,先考察不同剂量木瓜蛋白酶对核桃蛋白水解影响,后固定其他条件,分别改变底物浓度、酶解 pH 值、酶解时间、酶解温度等单一条件,考察核桃蛋白水解度的变化情况。

1.2.6 正交实验 酶质量分数、核桃蛋白底物浓度、酶解 pH 值、酶解温度和酶解时间对整个酶解反应体系均具有一定的影响。本实验根据单因素结果选取了核桃蛋白浓度、酶质量分数和酶解 pH 值 3 个因素,设计 $L_9(3^3)$ 正交实验优化胃蛋白酶酶解核桃

蛋白条件,实验设计见表 1。另选取核桃蛋白浓度、酶质量分数和酶解时间 3 个因素,设计 $L_9(3^3)$ 正交实验优化木瓜蛋白酶酶解核桃蛋白条件,实验设计见表 2。

表 1 胃蛋白酶正交实验因素水平表
Table 1 Multi-factor and multi-level orthogonal test on pepsin

水平 Level	因素 Factor		
	A 底物浓度 Concentration of substrate (%)	B 酶质量分数 Mass fraction of enzyme (%)	C 酶解 pH 值 pH of enzymatic hydrolysis
1	1	3	2
2	2	4	3
3	3	5	4

表 2 木瓜蛋白酶正交实验因素水平
Table 2 Multi-factor and multi-level orthogonal test on papain

水平 Level	因素 Factor		
	A 底物浓度 Concentration of substrate (%)	B 酶质量分数 Mass fraction of enzyme (%)	C 酶解时间 Enzymatic hydrolysis time
1	3	4	2
2	4	5	3
3	5	6	4

1.2.7 水解度的测定方法

$$DH = \frac{hs - ho}{ht - ho} \times 100$$

式中, DH 表示水解度, hs 代表每克核桃蛋白酶解后游离氨基酸浓度, ho 代表每克核桃蛋白未酶解的游离氨基酸浓度; ht 代表每克核桃蛋白用 $6\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸完全水解后总的游离氨基酸浓度(Pe-na *et al.*,2001)。

2 结果与分析

2.1 酶质量分数对酶解反应影响

酶与底物浓度比分别在 $0.5\% \sim 4\%$ 和 $1\% \sim 6\%$ 之间变化,以水解度作指标,胃蛋白酶及木瓜蛋白酶的酶质量分数变化对核桃蛋白酶解效果影响(图 1)。从图 1 可知,胃蛋白酶酶质量分数在 $0.5\% \sim 2\%$ 范围内,胃蛋白酶对核桃蛋白水解度变化不大;在 $2\% \sim 3\%$ 范围内,随酶质量分数的升高水解度快速增大;在 3% 时,取得最佳水解度为 3.85% ,酶质量分数进一步增大时水解度呈现波动趋势。木瓜蛋白酶酶质量分数在 $1\% \sim 6\%$ 范围内,对核桃蛋白水解度呈上升趋于平缓的趋势。综合考虑酶水解度及酶成本等因素,故选择胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶质量分数分别为 3% 和 5% 作为下一步实验参考。

2.2 底物浓度对酶解反应影响

以核桃蛋白为底物,其浓度分别在 $1\% \sim 8\%$ 和 $2\% \sim 12\%$ 之间变化,以水解度作指标,底物浓度变化对核桃蛋白酶解效果影响(图 2)。从图 2 可知,在一定范围内,胃蛋白酶和木瓜蛋白酶对核桃蛋白水解度均随底物浓度的升高呈先升后降的趋势,如胃蛋白酶在底物浓度不超过 2% 时,随着底物浓度增加,水解度逐渐增大;底物浓度超过 2% 后,水解度呈下降趋势;当核桃蛋白浓度为 2% 时,水解度最大为 7.93% 。木瓜蛋白酶在底物浓度不超过 4% 时,随着底物浓度增加,水解度逐渐增大;底物浓度超过 4% 后,水解度呈下降趋势;当核桃蛋白浓度为 4% 时,水解度最大为 31.69% 。

2.3 酶解 pH 值对酶解反应影响

pH 值分别在 $0.5 \sim 4$ 和 $4 \sim 9$ 之间变化,以水解度作指标,pH 变化对酶解效果影响(图 3)。从图 3 可知,pH 值为 3 是胃蛋白酶酶解反应较适宜 pH 值,其水解度为 7.44% ;pH 值为 7 是木瓜蛋白酶酶解反应较适宜 pH 值,其水解度为 25.27% 。

2.4 酶解温度对酶解反应影响

温度在 $30 \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $35 \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间变化,以水解度作指标,温度变化对酶解效果影响(图 4)。从图 4 可知, $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为胃蛋白酶酶解反应较适宜温度,其水解度为 2.67% ; $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为木瓜蛋白酶酶解反应较适宜温度,其水解度为 23.90% 。

2.5 酶解时间对酶解反应影响

以水解度作指标,酶解时间在 $1 \sim 6\text{ h}$ 之间变化对酶解效果影响(图 5)。从图 5 可知,在一定条件下,胃蛋白酶对核桃蛋白水解度随水解时间延长变化较小,而木瓜蛋白酶对核桃蛋白水解度随水解时间增加呈上升趋于平缓的趋势,当水解时间为 3 h ,其水解度达 17.40% ,若水解时间再增加,其水解度增加很缓慢。故选择胃蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解时间分别为 1 h 和 3 h 。

2.6 胃蛋白酶正交试验

由表 3 可见, $RA > RC > RB$,核桃蛋白浓度(A)、酶质量分数(B)和酶解 pH 值(C)三个因素对试验考察指标影响的主→次顺序是 ACB,即底物核桃蛋白浓度影响最大,酶解 pH 值次之,酶质量分数的影响最小。另 $kA1 \neq kA2 \neq kA3$,说明 A 因素的水平变动对试验结果有影响,同一因素中水平的 kA 值越大,该水平对试验指标的影响就越大,所以可断定 $A2$ 为 A 因素的优水平($kA2 > kA3 > kA1$)。

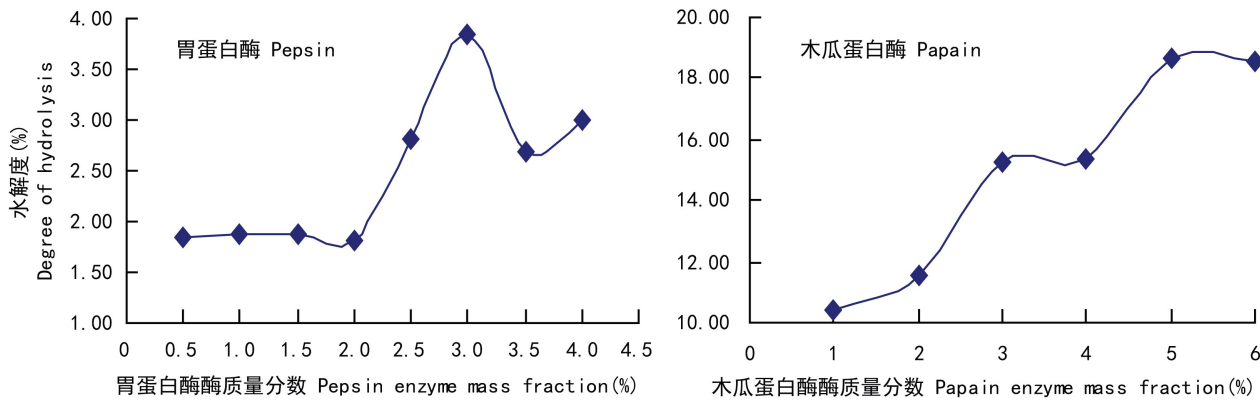


图 1 酶质量分数对核桃蛋白水解度的影响
Fig. 1 The influence of the enzyme mass fraction on walnut protein hydrolysis

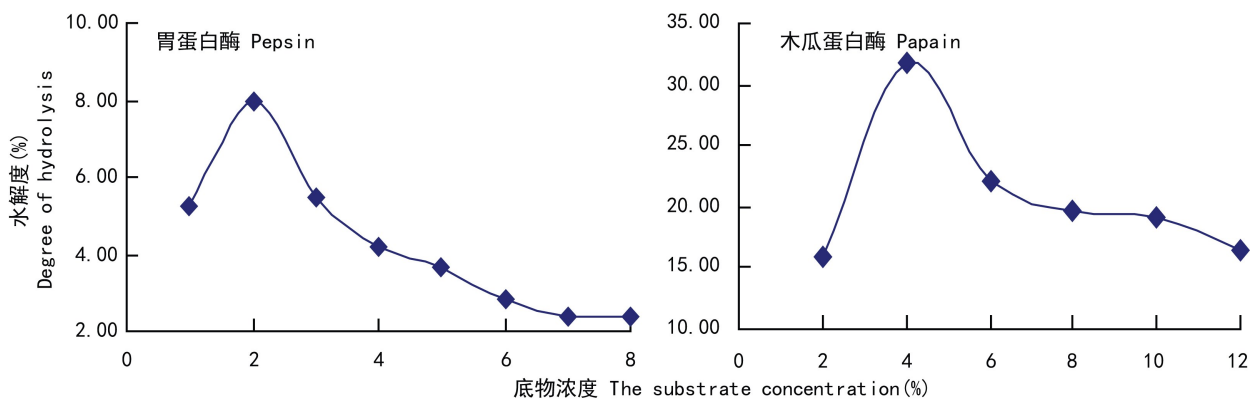


图 2 底物浓度对核桃蛋白水解度的影响
Fig. 2 The influence of substrate concentration on hydrolysis degree of walnut protein

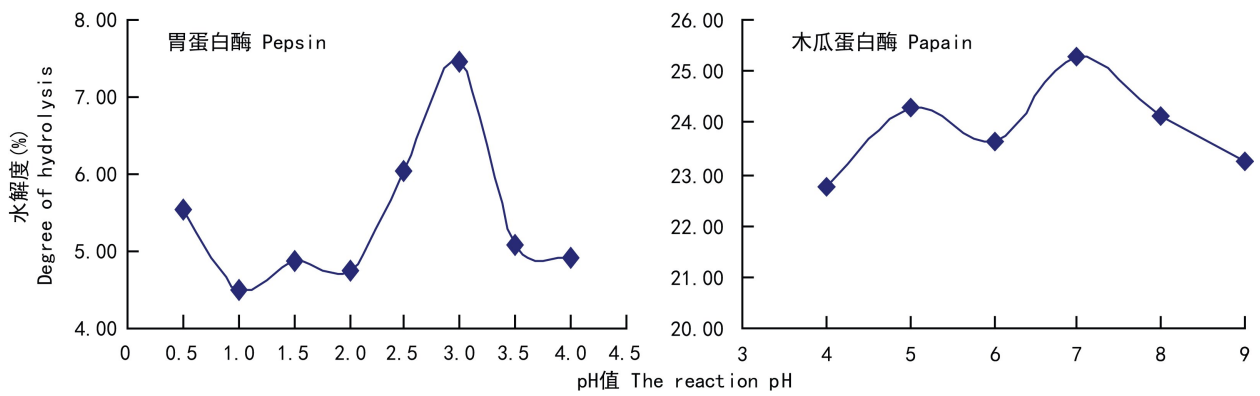


图 3 酶解 pH 值对核桃蛋白水解度的影响
Fig. 3 The effect of enzyme solution pH on hydrolysis degree of walnut protein

同理 B3 和 C2 分别为 B、C 两因素的优水平。故胃蛋白酶水解核桃蛋白的最佳工艺条件为：A2B3C2，即底物浓度为 2%，酶质量分数为 5%，酶解 pH 值为 3。

2.7 木瓜蛋白酶正交实验

由表 4 可见， $RA > RB > RC$ ，核桃蛋白浓度

(A)、酶质量分数(B)和酶解时间(C)三个因素对试验考察指标影响的主→次顺序是 ABC，即底物核桃蛋白浓度影响最大，酶质量分数次之，酶解时间的影响最小。 $kA1 \neq kA2 \neq kA3$ ，说明 A 因素的水平变动对试验结果有影响，同一因素中水平的 kA 值越

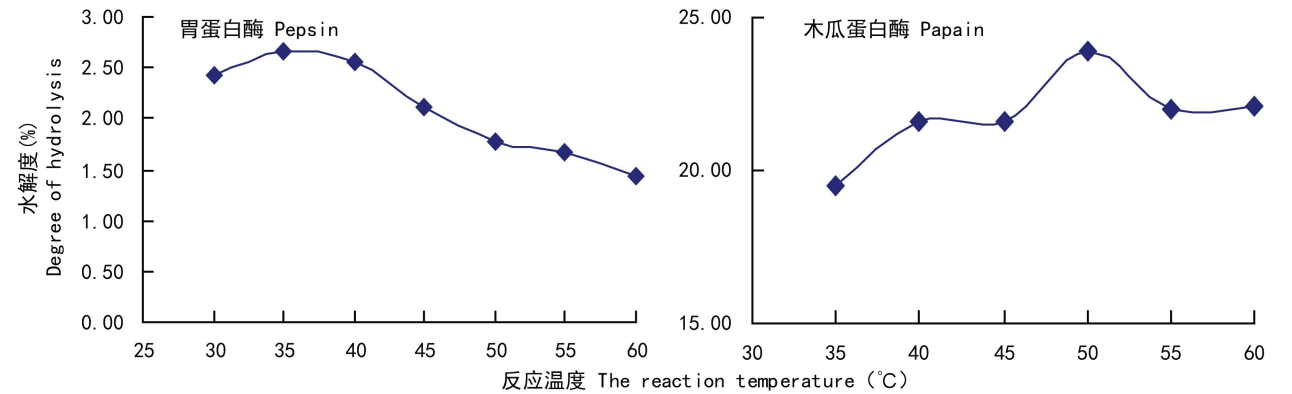


图 4 酶解温度对核桃蛋白水解度的影响

Fig. 4 The effection of enzyme solution temperature on the hydrolysis degree of walnut protein

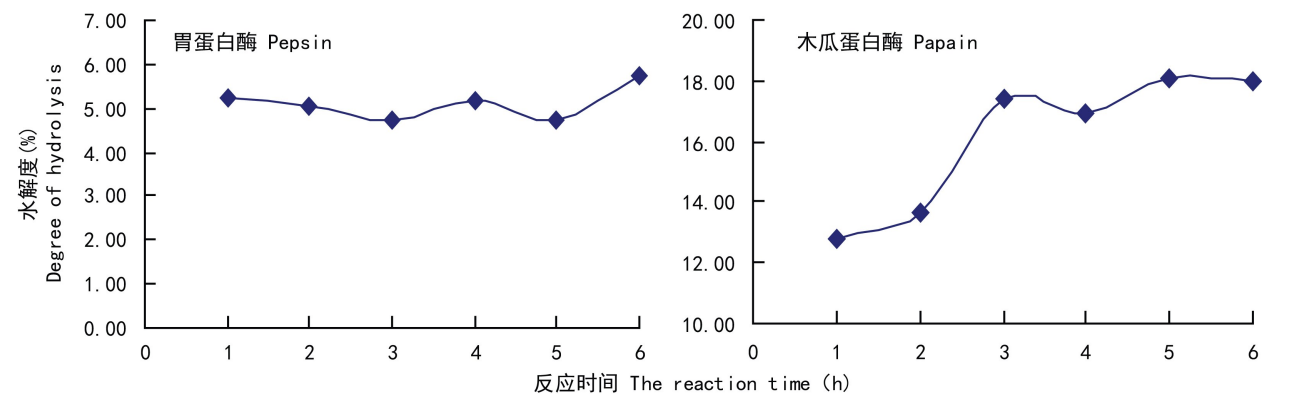


图 5 酶解时间对核桃蛋白水解度的影响

Fig. 5 The effect of enzyme solution time on the hydrolysis degree of walnut protein

表 3 胃蛋白酶正交实验结果与分析				
Table 3 The results and analysis of orthogonal test on pepsin				
编号 No.	A	B	C	水解度 Degree of hydrolysis (%)
1	1	1	1	5.37
2	1	2	2	5.12
3	1	3	3	5.00
4	2	1	3	9.24
5	2	2	1	8.50
6	2	3	2	8.99
7	3	1	2	6.05
8	3	2	3	6.28
9	3	3	1	6.90
k1	5.163	6.887	6.880	
k2	8.910	6.633	7.087	
k3	6.410	6.963	6.517	
R	3.747	0.330	0.570	

表 4 木瓜蛋白酶正交实验结果与分析				
Table 4 The results and analysis of orthogonal test on papain				
编号 No.	A	B	C	水解度 Degree of hydrolysis (%)
1	1	1	1	17.74
2	1	2	2	19.43
3	1	3	3	18.86
4	2	1	3	20.12
5	2	2	1	25.76
6	2	3	2	23.73
7	3	1	2	17.94
8	3	2	3	18.10
9	3	3	1	19.37
K1	18.677	18.600	19.857	
K2	23.203	21.097	19.640	
K3	18.470	20.653	20.853	
R	4.733	2.497	1.213	

大,该水平对试验指标的影响就越大,可断定 A2 为 A 因素的优水平(kA2>kA1>kA3)。同理 B2 和 C3 分别为 B、C 两因素的优水平。故木瓜蛋白酶酶解核桃蛋白的最佳工艺条件为 A2B2C3,即底物浓度为 4%,酶质量分数为 5%,酶解时间为 4 h。

3 结论与讨论

酶解蛋白释放出具某种生理功能的生物活性肽与蛋白质的水解程度密切相关,即与水解度有关(周

慧江等,2012)。目前报道测定蛋白质水解度的方法有 pH-slat 法、甲醛滴定法、三硝基苯磺酸法(TNBS)、茚三酮比色法等。其中,pH-slat 法在研究中仅适用于中性及碱性($\text{pH} > 7$)或 $\text{pH} < 3$ 的酸性溶液中进行的水解,并且需要特别的仪器对反应体系的 pH 值进行在线控制(徐英操等,2007);之所以测定核桃蛋白水解度时不宜采用甲醛滴定法,是因为核桃蛋白中富含脯氨酸(4.29%),易与甲醛反应生成不稳定化合物,导致测定的水解度值偏低(毛晓英,2012);TNBS 法是国外较为常用的测定蛋白水解度的方法,该法非常灵敏,且不受酶特异性影响,但由于所用试剂较为昂贵且反应中需要较长时间,不能实时反应水解过程的水解度(周慧江等,2012);由于用水合茚三酮显色法无法判断水解后的游离氨基是原样品中本来就含有的还是经水解产生的,且采用的是单一氨基酸做标准,而不同的氨基酸对茚三酮的呈色度不同,因此采用茚三酮比色法结果也有偏差。郭兴凤(2000)采用待水解蛋白质的完全水解液作为标准溶液,消除了由于蛋白质水解液中不同的氨基酸对反应试剂的响应不同所带来的误差,但我们试验中发现该完全水解液在中性条件下难于保存,标准曲线制作过程中难于保持稳定性及重复性,故选择甘氨酸作为标准,待水解原料的完全水解液中总的游离氨基酸浓度减去其未酶解的游离氨基酸浓度作为基准,虽然消除了原样品中含有的游离氨基酸对测定结果造成的误差,但不同的氨基酸对反应试剂的响应所带来的误差还有待进一步消除。

酶解方式对核桃蛋白酶解产物的水解度影响较大,在一定条件下,木瓜蛋白酶酶解产物的水解度显著高于胃蛋白酶酶解产物。而相关学者根据 AS.1398 中性蛋白酶等五种酶的最佳反应条件对核桃蛋白进行水解能力比较,结果表明水解能力大小顺序为 A.S.1398 中性蛋白酶 > 胃蛋白酶 > 2709 碱性蛋白酶 > 胰蛋白酶 > 木瓜蛋白酶(丁晓雯等,2005)。推其原因为酶的最佳反应条件并不一定是其水解核桃蛋白的最佳反应条件,水解蛋白质中各单因素对整个酶解反应体系均具有一定的影响,同一型号蛋白酶在水解不同蛋白中其最佳参数有所改变。本实验通过单因素及正交试验优化胃蛋白酶及木瓜蛋白酶水解核桃蛋白工艺参数,研究得出最优酶解工艺为木瓜蛋白酶为酶制剂,底物浓度为 4%,酶质量分数为 5%,酶解 pH 为 7、酶解温度为 50℃、酶解时间为 4 h,下一步将对水解后核桃多肽的药理药效

及其功能性食品的开发进行深入系统地研究。

参考文献:

- Carroll KK, Hamilton RMG. 1975. Effects of dietary protein and carbohydrate on plasm-cholesterol levels in relation to atherosclerosis[J]. *Food Sci*, **40**: 18—23
- Dou KN(豆康宁), Dong B(董彬), Wang YM(王银满). 2007. The biologic function and the application prospects of soybean protein active peptides(大豆蛋白活性肽的生物功能与应用前景)[J]. *Food Process*(粮食加工), **32**(2): 52—54
- Ding XW(丁晓雯), Zhang QZ(张庆祝), Qiao HO(乔海鸥). 2005. Study on optimum condition of enzymatic hydrolysis on walnut protein(核桃蛋白最佳酶解条件研究)[J]. *Cereals & Oils*(粮食与油脂), **10**(23): 23—25
- Guo XF(郭兴凤). 2000. Determination of hydrolysis degree of protein(蛋白质水解度的测定)[J]. *Chin Oil*(中国油脂), **25**(6): 176—178
- Huang LH(黄黎慧), Huang Q(黄群), Sun SG(孙术国), 等. 2009. Studies on the nutrition health protection function of walnut and its exploitations(核桃的营养保健功能与开发利用)[J]. *Food Sci*(食品科学), **4**: 48—50
- Kritchevsky D, Tepper SA, Czarnecki SK, et al. 1982. Atherogenicity of animal and vegetable protein. Influence of the lysine to arginine ratio[J]. *Atherosclerosis*, **41**: 429—431
- Li P(李萍), Lu JM(卢健鸣). 2011. Studies on the processing of walnut and its comprehensire utilization(核桃的加工及其综合利用)[J]. *Appl Promotion*(应用推广), **5**
- Lin Y(林燕), Chen JL(陈计峦), Wu JH(吴继红). 2009. Research advance on preparation of walnut peptide by enzymatic way(酶法制备核桃多肽研究进展)[J]. *Cereals & Oils*(粮食与油脂), **1**: 46—48
- Mao XY(毛晓英). 2012. Studies on the structure characterization and products modification of walnut protein(核桃蛋白质的结构表征及其制品的改性研究)[D]. *Jiangnan Univ*(江南大学)
- Pena EA Ramos, Xiong YL. 2001. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system[J]. *Dairy Sci*, **84**(12): 2 577—2 583
- Wang LH(王丽华), Huang MF(黄明发). 2008. Research advance on bioactive peptides from soybean protein(大豆源生物活性肽研究进展)[J]. *Cereals & Oils*(粮食与油脂), **1**: 42—45
- Xu YC(徐英操), Liu CH(刘春红). 2007. Introduction of method for determination of degree of hydrolysis of protein hydrolysates(蛋白质水解度测定方法综述)[J]. *Food Res & Devel*(食品研究与开发), **28**(7): 173—175
- Yan XJ(颜小捷), Lu FL(卢凤来), Chen HY(陈换莹), et al. 2012. Studies on isolation, purification, structural identification and its antitumor activity of polysaccharides from *Momordica grosvenori* swingle's root(罗汉果根多糖的分离纯化、结构鉴定及抗肿瘤活性研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), **32**(1): 138—142
- Zhao XH(赵新淮), Feng ZB(冯志彪). 1994. The detemination of protein hydrolysate hydrolyzed degree(蛋白质水解物水解度的测定)[J]. *Food Sci*(食品科学), **179**(11): 65—67
- Zhou HJ(周慧江), Zhu ZB(朱振宝), Yi JH(易建华). 2012. Various methods available for determination of hydrolyzed degree of walnut protein(核桃蛋白水解物水解度测定方法比较)[J]. *Cereals & Oils*(粮食与油脂), **2**: 28—30