酶法制备不同水解度高温豆粕水解产物的理化特性研究

黄利华[1]，张业辉[2]，黎海彬[1]
（1. 广州城市职业学院食品系，广东广州 510405）
（2. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所，广东广州 510610）

摘要：采用 Alcalase 酶和木瓜蛋白酶分别对高温大豆粕进行酶解，通过控制酶解反应得到水解度为 5%、10%和 15%的 6 种水解产物，研究两种酶对不同水解度的水解产物理化特性的影响。结果表明，Alcalase 酶和木瓜蛋白酶均可产生 6 种不同分子量范围的水解产物，但各部分比例具有显著差异（P<0.5），其平均分子量随水解度的增加逐渐减少，Alcalase 酶的水解产物中小于 2562 Da 小分子量肽所占比例更高。豆粕蛋白的疏水基团在酶解反应中发生暴露与断裂的数量差，导致其表面疏水性随水解度增加呈现先下降再上升的变化，即水解度为 10%的表面疏水性最低。zeta 电势的绝对值随水解度不断上升，分子间的斥力增大，相同水解度下两种酶对 zeta 电势的影响并不显著。此外，在 pH 值为 3、5、7 和 9 时，水解产物的溶解性随着水解度的增加而逐渐增高，乳化活性和乳化稳定性则逐渐降低。

关键词：水解产物；水解度；分子量；zeta 电势；理化性质
文章篇号：1673-9078(2014)6-196-201

Physicochemical Characteristics of High-temperature Soy Meal Hydrolysates with Different Degrees of Hydrolysis

HUANG Li-hua[1], ZHANG Ye-hui[2], LI Hai-bin[1]
(1.Department of Food, Guangzhou City Polytechnic, Guangzhou 510405, China)
(2.Sericulture & Agri-food Research Institute GAAS, Guangzhou 510610, China)

Abstract: High-temperature soybean meal was hydrolyzed by Alcalase and papain, respectively. Six kinds of hydrolysates were obtained with the degrees of hydrolysis (DH) of 5%, 10%, and 15%. Effects of Alcalase and papain on physicochemical properties of these different hydrolysates were evaluated. The results showed that Alcalase and papain were all produced six kinds of hydrolysates with different ranges of molecular weight. The proportions of hydrolysates from different enzymes had significant differences (P<0.5), and the average molecular weight of hydrolysates was gradually decreased with increasing the DH. Alcalase included more peptides that less than 2562 Da compared with papain at the same DH. The significant difference of amount between exposed and destruct of hydrophobic groups in enzymatic reactions resulted in surface hydrophobicity decreased firstly with the increasing DH and then increased. Therefore, the hydrolysates with DH of 10% had the minimum surface hydrophobicity than the others. The absolute values of zeta potential increased with increasing DH, and the intermolecular repulsion of molecules increased synchronously. The effect of Alcalase and papain on zeta potential had no significant difference at the same DH. Moreover, at pH 3, 5, 7 and 9, the solubility of the hydrolysates increased gradually with increasing DH, and the emulsifying activity index and emulsion stability index exhibited decreasing trends with increasing DH.

Key words: hydrolysate; degree of hydrolysis; molecular weight; zeta potential; physicochemical characteristics

大豆原产于我国，是重要的粮食和油料作物，也是世界上产量最大的食用和饲用植物蛋白资源[1]。大豆中的蛋白质含量高达 40%，在粮谷作物中位居首位，大豆食品也因其营养和健康的特点备受关注[2]。大豆蛋白属于全价蛋白，其赖氨酸的含量高的特点可搭配缺乏赖氨酸的谷类食品共同食用。在高温灭活抗营养因子后，其蛋白质功效比（PER）仅稍低于牛奶、鸡蛋等动物蛋白，但大豆蛋白的生产成本远低于这些动物性

收稿日期：2014-03-06
基金项目：国家自然科学基金资助项目（31301603）；国家星火计划项目（2013GA780107）；广州市教育局科研项目（2012A132）
作者简介：黄利华（1979-），女，硕士，讲师，主要从事食品生物化学研究
通讯作者：张业辉（1979-），男，博士，助理研究员，主要从事农副产品加工，蛋白质化学研究

蛋白，可作为一种廉价、健康的食品原料[3~4]。大豆蛋白可利用浸油后的高温豆粕制备，但其中的蛋白质发生严重热变性，导致其可溶性氮（NSI）下降，在食品加工应用中受到制约，而利用蛋白酶酶解豆粕制备易于消化吸收的小分子量蛋白肽，可解决高温豆粕的食品化利用难题。

大豆肽具有较强的吸水性、保水性和质构特性，作为一种优良的质构材料广泛应用于焙烤食品、香肠火腿食品、人造肉、发酵食品和蛋白饮料等高蛋白食品中，大豆肽在食品中具有调整硬度、保持水分和改善口感等作用[5~6]。另外，大豆肽还具有多种生物活性，在抗氧化性与抗疲劳性、降低高血压、抑制胆固醇、促进微量元素吸收、促进脂肪代谢等方面都显示出较好的功效，因此在保健性食品和药品中也有良好的应用前景[7~9]。目前高温豆粕主要用于制作饲料，较少用作食品原料。为了提高大豆蛋白资源的高值利用率，本研究从高温豆粕中采用酶法制备大豆蛋白肽，通过Alcalase酶和木瓜蛋白酶得到不同水解度的大豆肽，对其部分理化和功能性质进行分析，用以评价两种酶产生不同水解度的大豆肽对其应用性质的影响，为进一步开发利用大豆肽提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

高温豆粕粉，山东龙丰集团公司；Alcalase 酶，NovoNordisk公司；木瓜蛋白酶，Sigma分装；伴清蛋白（75 kDa）、牛血清蛋白（67 kDa）、溶菌酶（14300 Da）、维生素B12（1350 Da）和L-酪氨酸（181.19 Da），均为Sigma公司；其他试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

CR22 GIII冷冻离心机，日本HITACHI公司；EYEL 4冷冻干燥机，日本东京理化仪器株式会社；Zetasizer Nano ZS 2000粒度仪，英国Malvern公司；UV-1800紫外分光光度计，日本SHIMADZU公司；F-4500荧光分光光度计，日本HITACHI公司；PHS-3C精密pH计，上海雷磁仪器厂。

1.3 试验方法

1.3.1 大豆水解产物样品制备

将粉碎的高温豆粕粉通过80目筛，加入到水解反应器中，按适当比例加入适量蒸馏水，搅拌30 min。调节溶液至所需的pH和温度（Alcalase 酶 pH 8.0，50 ℃；木瓜蛋白酶pH 6.5，50 ℃）[10]。根据所用酶的活性，准确称量后加入到水解反应器，搅拌均匀。反应过程中及时加入1 mol/L的NaOH或HCl工作液维持系统pH恒定。根据pH-stat方法测定水解度，控制水解度在5.0±0.22%、10.0±0.37%和15.0±0.41%。反应到预定水解度后，即停止继续反应，迅速升温到90 ℃，灭酶活10 min。冷却后在4 ℃以10000 g离心20 min，上清液为大豆蛋白/肽的混合水解液。将不同水解度的大豆水解液在4 ℃透析24 h，约4~5次脱盐，将透析液冷冻干燥后低温贮藏待用。

1.3.2 分子量的分布

色谱条件如下：高效液相泵和1525紫外检测器组成的WATERS高效液相系统，采用TSK Gel2000SWXL（300 mm×7.18 mm，Tosoh，日本）作为分析柱，洗脱液为50 mmol/L磷酸缓冲溶液（pH 7.2，50 mmol/L NaCl），流速为0.5 mL/min，紫外检测器波长220 nm。洗脱液在10000 g离心15 min后，经过0.45 μm膜过滤。然后将10 μL的大豆肽样品溶液上柱，恒流洗脱。以伴清蛋白（75 kDa）、牛血清蛋白（67 kDa）、溶菌酶（14300 Da）、维生素B_{12}（1350 Da）和L-酪氨酸（181.19 Da）的洗脱时间绘制标准曲线。

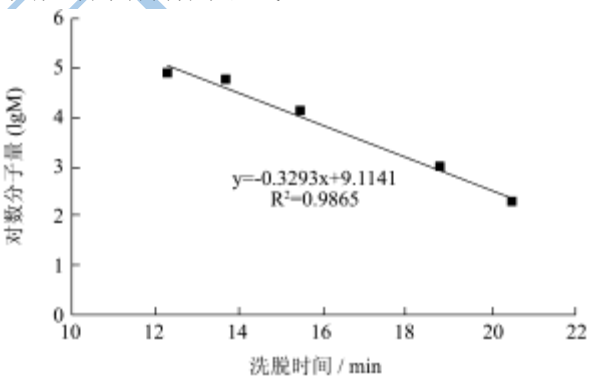


表1 标准品蛋白分子量与洗脱时间关系曲线

Fig.1 The curve of molecular weight of standard protein and elution time

1.3.3 表面疏水性

表面疏水性（H_0）的测定采用ANS荧光探针法。将待测蛋白样品溶于10 mmol/L磷酸缓冲液（pH 7.0）中，蛋白质浓度为1.5%（*m/V*）。向含4 mL磷酸缓冲液的塑料离心管中分别添加10、20、30、40和50 μL 1.5%的水解溶液，再添加40 μL 8 mmol/L的ANS工作液，振荡均匀，设置激发和发射波长为分别370 nm和470 nm，其狭缝宽均为5 nm。水解样品的荧光强度值与试剂空的白值的差值，即为相对荧光强度值。以水解样品的相对荧光强度值（y）和蛋白浓度（x）作图，其初始段斜率即为表面疏水性指数。

1.3.4 Zeta 电势的测量

大豆水解产物的zeta电位在测量前先将样品通过

0.45 μm 的膜，然后将样品的浓度调整为 0.1%，将样品液小心加入到带有电极的专用比色皿中。在 25 ℃条件下测量样品的 zeta 电位，每个样品重复 3 次，结果取平均值。

1.3.5 溶解性

精确称取 100 mg 大豆肽样品置于 10 mL 的去离子水中，室温下磁力搅拌 30 min，然后通过 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 工作液调节溶液的 pH 值分别为 3.0、5.0、7.0 和 9.0，再搅拌 30 min 后，转速 10000 g 离心（20 ℃，20 min）。采用福林酚法测定蛋白质含量，以牛血清白蛋白（BSA）为标准物做标准曲线。

$$溶解性=\frac{上清液蛋白质含量}{总蛋白含量}\times 100\%$$

1.3.6 乳化特性

取 4 根试管，分别加入 30 mL 0.1%（*m/V*）蛋白质溶液（调整 pH 值为 3.0、5.0、7.0 和 9.0）和 10 mL 大豆油，乳液经高速均质机（20000 r/min）处理 1 min。在第 0 min 和 10 min 分别用移液枪从试管底部取出 50 μL 乳液，加入到 5 mL 浓度为 0.1%（*m/V*）SDS 溶液中，于 500 nm 比色。乳化活性指数（EAI，m^2/g）和乳化稳定性指数（ESI，min）的计算如下：

$$EAI\,(m^2/g)=\frac{2\times 2.303\times 100\times A}{c\times 0.25\times 10000}$$

$$ESI\,(\min)=\frac{A_0}{A_0-A_{10}}\times 10$$

注：c 为蛋白浓度，g/mL；A_0、A_{10} 分别为 0 min 和 10 min 时的吸光度。

1.3.7 数据处理和分析

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行处理和分析。平均值和标准偏差由 3 个或以上的平行样品测量结果计算得到。

2 结果与讨论

2.1 不同水解度对大豆水解产物分子量分布的影响

不同的蛋白酶对底物有不同的特异性酶切位点，同一种底物蛋白经不同的蛋白酶作用，所得到水解产物的理化性质和生物活性可能具有较大差别。在 220 nm 条件下 Alcalase 酶和木瓜蛋白酶洗脱色谱图中可见 6 个主要的洗脱峰，但峰值面积具有明显差别（结果未显示）。通过图 1 的蛋白标准品曲线得到回归方程：lgM=9.1149-0.3293，其相关系数 R^2=0.9865。通过标准洗脱曲线回归方程来计算所分离大豆水解产物的分子量为 $M=10^{9.1149-0.3293}$，通过图谱与坐标轴围成区域的洗脱面积进行计算分析，得到水解产物相对应的分子量分别为：228 Da、517 Da、1276 Da、2562 Da、6436 Da 和 13200 Da。不同酶和水解度的大豆水解物的分子量分布见表 1。

表 1 Alcalase 酶和木瓜蛋白酶不同水解度的大豆肽分子量分布

Table 1 Distribution of molecular weight in the soy peptides with different DH prepared by Alcalase and papain

	分子量/Da					
	228	517	1276	2562	6436	13200
Alcalase（5%）	5.13±0.31^{a}	17.35±0.49^{c}	22.20±0.28^{d}	27.58±1.22^{b}	15.22±0.73^{a}	12.34±0.54^{b}
Alcalase（10%）	3.67±0.20^{c}	20.22±0.35^{b}	30.16±0.52^{a}	26.64±0.64^{b}	11.71±0.46^{b}	7.52±0.26^{c}
Alcalase（15%）	4.03±0.19^{b}	27.51±0.31^{a}	27.33±0.30^{b}	26.11±0.30^{b}	7.92±0.38^{d}	6.61±0.41^{d}
木瓜蛋白酶（5%）	3.33±0.28^{c}	13.86±0.25^{d}	17.96±0.37^{e}	34.57±0.73^{a}	15.63±0.45^{a}	14.55±0.60^{a}
木瓜蛋白酶（10%）	2.82±0.32^{cd}	19.06±0.55^{b}	24.66±0.29^{c}	33.63±0.39^{a}	12.34±0.29^{b}	7.22±0.33^{c}
木瓜蛋白酶（15%）	2.65±0.17^{d}	28.50±0.36^{a}	25.37±0.65^{c}	26.38±0.43^{b}	10.12±0.36^{c}	6.80±0.21^{cd}

注：表中字母表示显著性差异，（$p<0.05$）。

表 1 显示由 Alcalase 酶和木瓜蛋白酶都产生了不同分子量的大豆水解产物。不管是 Alcalase 酶还是木瓜蛋白酶处理的水解物，随着水解度的不断增加，分子量大于 13200 Da 和 6436 Da~13200 Da 的大豆水解产物所占比例逐渐减少，而小分子量的水解产物则不断增加。虽然这部分分子量较大的水解产物比例较低，但其与整个体系的界面特性等宏观性质密切相关。在 Alcalase 水解度 5%的水解产物中，2562 Da 至 6436 Da 之间的大豆肽所占比例最高，达到 27.5%，相同情况下木瓜蛋白酶 5%水解产物中 2562 Da 至 6436 Da 之间的大豆肽比例甚至高达 34.6%。在相同水解度的情况下，结果显示 Alcalase 酶中小于 2562 Da 的水解产物比例普遍大于木瓜蛋白酶的水解产物（$p<0.05$），说明 Alcalase 酶可产生更多的小分子肽。

2.2 不同水解度对大豆水解产物表面疏水性的影响

表面疏水性的强弱反映了大豆肽中疏水性基团的暴露情况，蛋白酶通过打断分子内次级键使疏水基团暴露。图 2 显示了不同水解产物的 ANS 荧光图谱，结果显示不同水解产物的表面疏水性之间具有显著性差异（P<0.5）。Alcalase 酶和木瓜蛋白酶的大豆水解产物随着水解度的不断增加，都显示了表面疏水性先下降，再上升的变化趋势。

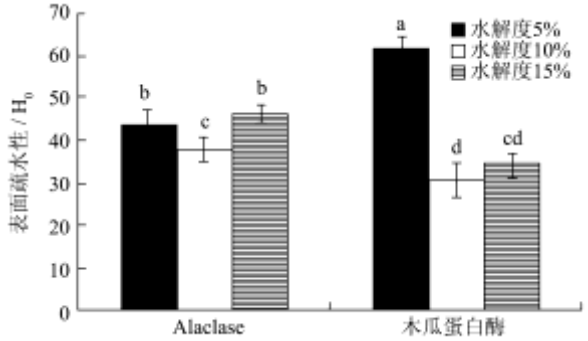


图2 Alcalase酶和木瓜蛋白酶对不同水解度的大豆水解产物表面疏水性的影响

Fig.2 Effects of hydrolysates with different DH prepared by Alcalase and papain on surface hydrophobicity

一般认为，底物蛋白在蛋白酶作用下分子内部结构变得松散，可发生去折叠反应，使分子内部的疏水氨基酸残基暴露出来，增加了水解产物的表面疏水性[11]。但试验结果却显示了水解度为 10%的水解产物表面疏水性低于 5%和 15%的水解产物，这个现象可能是在酶解过程初期，蛋白质表面疏水基团也被蛋白酶破坏，导致其表面疏水性指数出现暂时下降，随着水解度的不断增加，酶解作用破坏了蛋白的分子结构，将蛋白中的次级键断开，使得分子内部的疏水基团大量暴露出来，当暴露的疏水基团数量大于被破坏的疏水基团时，其表面疏水性也就升高[12]。

2.3 不同水解度对大豆水解产物 zeta 电势的影响

溶液的 zeta 电势可反映蛋白分子间力的平衡状态，展现蛋白分散体系的稳定性。图 5 显示不同水解度的大豆水解产物 zeta 电势值，在蛋白酶的作用下，蛋白质的结构变化导致其所带的电荷数的改变。在 pH 中性条件下，Alcalase 酶和木瓜蛋白酶的水解产物 zeta 电势为负值，其绝对值随着水解度的增加而不断增加，较高的 zeta 电势也意味着蛋白/肽分子之间的斥力增加。虽然 Alcalase 酶和木瓜蛋白酶在水解过程中可能产生的某些氨基酸残基和肽键的极性不同，但其水解产物的 zeta 电势值差异不显著（P>0.05）。蛋白体系的 zeta 电势也与溶液体系的溶解性和稳定性有关，zeta 电势的增加也意味着水解产物的分子之间的静电排斥力增强，这将有利于增强溶解性及其它溶解性相关的功能性质。

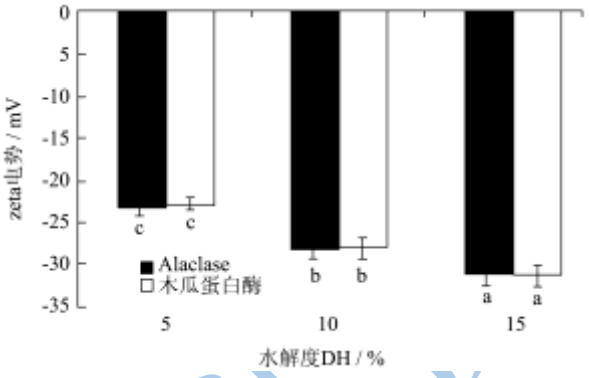


图 3 Alcalase 酶和木瓜蛋白酶对不同水解度的大豆水解产物 zeta 电势的影响

Fig.3 Effects of the hydrolysates with different DH prepared by Alcalase and papain on zeta potential

2.4 不同水解度对大豆水解产物溶解性的影响

图 4 显示不同水解度的大豆水解产物在不同 pH 溶液中溶解性-pH 曲线。大豆蛋白分别通过 Alcalase 酶和木瓜蛋白酶水解后，其溶解性与原蛋白相比明显增加，并且蛋白的水解度越高，其溶解性的值也越高。在相同水解度的情况下，Alcalase 酶水解大豆肽的溶解性要略高于木瓜蛋白酶。这或许是两种酶对大豆蛋白的解离程度不同，导致产生的氨基酸残基极性和疏水基团的暴露程度不同，从而影响水解产物的溶解性。另外，不同水解度的大豆水解产物之间的溶解性具有显著性差异（P<0.5），大分子蛋白分解为小分子肽使更多的疏水基团暴露，也利于提高整个蛋白体系的溶解性。不同的 pH 对大豆肽的溶解性影响较大，在等电点区域具有相对较低的溶解度，在碱性条件下溶解性明显升高。

较高水解度的大豆水解产物具有较低的平均分子量，蛋白水解为较小分子量的片段或短肽后，形成更多含有极性的残基，容易和水分子的氢键结合，从而展现出较高的溶解性[13]。不同水解度的大豆肽在接近蛋白等点 pH 情况下，分子间静电排斥力减弱，蛋白分子间通过疏水相互作用等次级作用力而聚集，蛋白/肽的溶解性下降。在碱性条件下，蛋白分子表面的负电荷堆积诱导蛋白分子伸展，暴露更多的疏水性基团，增加了彼此的排斥作用力，从而增加了溶解性。

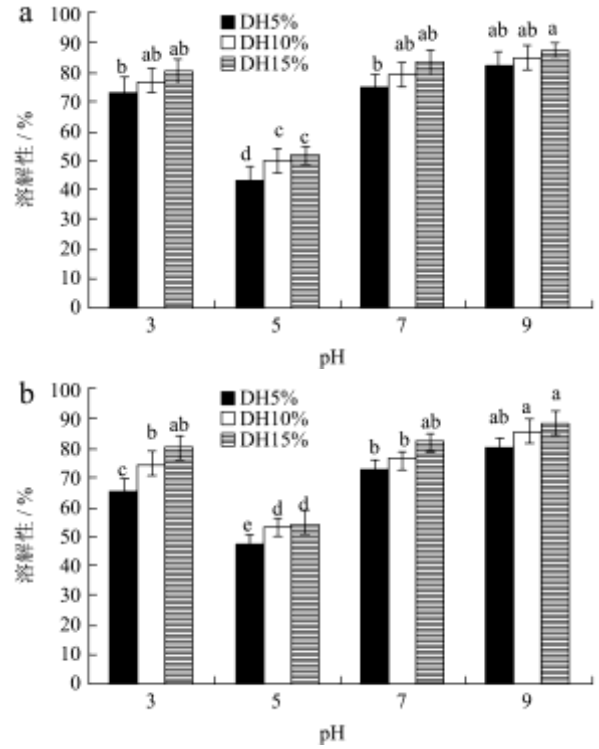


表4 Alcalase酶(a)和木瓜蛋白酶(b)对不同水解度的大豆水解产物溶解性的影响

Fig.4 Effects of the hydrolysates with different DH prepared by Alcalase (a) and papain (b) on solubility. Bars represent standard deviations from triplicate determinations

2.5 不同水解度对大豆水解产物乳化特性的影响

蛋白质的乳化特性包括乳化活性和乳化稳定性。表2显示不同水解度的大豆水解产物在不同pH溶液中乳化特性。一般来说，蛋白的溶解性、表面疏水性和表面电荷分布与其乳化性具有较强的相关性。大豆水解产物的乳化性随着水解度的增加而不断降低，酶解作用下肽链的断裂引起乳化性的大幅度降低。不同水解度之间的乳化性具有显著性差异（$P<0.5$），分子量较大的的水解产物对体系乳化性的影响更加显著。大豆水解产物的乳化活性指数和乳化稳定指数受 pH 的影响较大，这与不同pH下的溶解性不同有关。在蛋白质溶解性较低的情况下，溶解性是决定蛋白质乳化特性的主要因素；而在蛋白质溶解性较高的情况下，表面疏水性则成为主要因素。水解产物的乳化活性随水解度的增加而降低，可能是在初步酶解过程中，水解产物的疏水基团和端基（-NH_2和-COOH）的暴露使电荷数量明显增加，增强了油滴间的分散性，从而提高了水解体系的乳化活性和乳化稳定性。随着水解程度的增加，维持蛋白/肽结构的肽链、氢键、范德华力等断裂也越多，导致其在油水界面的相互作用力减小，油滴容易聚集，体系的乳化能力降低。

大豆水解产物的乳化稳定性大致和乳化活性具有相似的变化趋势，都是随着水解度的增加而降低。在水解过程中，当水解程度不断增加时，反应所形成的聚集物会阻碍油-水界面处粘弹性乳化薄膜的形成，增大了油滴聚集的几率，从而降低了体系的乳化稳定性[14]。

表 2 Alcalase 酶和木瓜蛋白酶对不同水解度的大豆水解产物乳化性的影响

Table 2 Effects of the hydrolysates with different DH prepared by Alcalase and papain on emulsifying activity index (EAI, m^2/g) and emulsion stability index (ESI, min)

pH	EAI/(m^2/g)				ESI/min			
	3	5	7	9	3	5	7	9
Alcalase(5%)	83.10±2.73^{a}	51.22±5.36^{a}	76.51±3.99^{a}	94.72±4.63^{a}	29.44±2.26^{a}	13.64±2.51^{ab}	25.81±1.67^{a}	23.12±3.30^{a}
Alcalase(10%)	36.33±1.51^{cd}	26.62±3.55^{bc}	37.85±2.62^{c}	44.17±3.08^{c}	16.72±1.79^{c}	11.90±1.16^{b}	20.53±1.07^{b}	17.72±2.11^{b}
Alcalase(15%)	32.05±2.27^{d}	25.71±1.35^{c}	34.19±2.93^{cd}	38.76±1.92^{d}	11.34±1.33^{d}	10.55±0.80^{bc}	18.31±1.37^{c}	14.13±1.35^{c}
木瓜蛋白酶(5%)	73.86±3.49^{b}	54.04±3.90^{a}	66.54±3.15^{b}	75.61±2.53^{b}	28.38±1.50^{a}	15.52±1.46^{a}	23.22±1.52^{a}	20.56±3.06^{ab}
木瓜蛋白酶(10%)	41.93±1.70^{c}	30.66±4.93^{b}	38.23±2.26^{c}	46.72±3.37^{c}	20.43±3.64^{b}	10.87±1.73^{bc}	17.36±1.03^{cd}	13.78±1.44^{c}
木瓜蛋白酶(15%)	33.52±2.32^{d}	23.22±3.57^{c}	33.70±1.83^{d}	40.32±2.61^{cd}	12.66±1.27^{d}	9.69±1.72^{c}	15.91±1.28^{d}	13.39±2.17^{c}

3 结论

Alcalase 酶和木瓜蛋白酶分别水解高温豆粕可产生不同分子量的水解产物，随着水解度的增加，水解产物平均分子量也逐渐减少，但 Alcalase 酶的水解产物分子量更小。水解度为 10%的水解产物的表面疏水性最低，水解产物 zeta 电势的绝对值随水解度不断上升，两种酶对 zeta 电势的影响不显著。随着水解度的增加，水解产物的溶解性增高，乳化活性和乳化稳定性降低。

参考文献

[1] 许晶,江连洲,李杨,等.酶水解高温豆粕制备高水解度大豆肽

的研究[J].食品与发酵工业,2009,35(4):98-102
XU Jing, JIANG Lian-zhou, LI Yang, et al. Study on preparation of high-DH soy peptides by enzymatic hydrolysis high-temperature soy bean meal [J]. Food and Fermentaion Industries, 2009, 35(4): 98-102

[2] Chen N N, Zhao M M, Sun W Z. Effect of protein oxidation on the in vitro digestibility of soy protein Isolate [J]. Food Chemistry, 2013, 141(3): 3224-3229

[3] Singh B P, Vij S, Hati S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean [J]. Peptides, 2014, 54: 171-179

[4] Nishinari K, Fanga Y, Guo S, et al. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification [J]. Food Hydrocolloids, 2014, 39: 301-318

[5] Tsou M J, Lin S B, Chao C H, et al. Enhancing the lipolysis-stimulating activity of soy protein using limited hydrolysis with flavourzyme and ultrafiltration [J]. Food Chemistry, 2012, 134(3): 1564-1570

[6] Kazunobu T, Tsutomu S, Keisuke T, et al. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis [J]. LWT, 2005, 38(3): 255-261

[7] 程天德,戴必胜,梁延省.富硒大豆低聚肽的抗氧化活性研究[J].现代食品科技,2013,29(2):277-280
CHENG Tian-de, DAI Bi-sheng, LIANG Yan-sheng. Study on antioxidation of se-riched soybean oligopeptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(2): 277-280

[8] Ranamukhaarachchi S, Meissner L, Moresoli C. Production of antioxidant soy protein hydrolysates by sequential ultrafiltration and nanofiltration [J]. Journal of Membrane Science. 2013, 429(15): 81-87

[9] Nakahara T, Yamaguchi H, Uchida R. Effect of temperature on the stability of various peptidases during peptide-enriched soy sauce fermentation [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2012, 113(3): 355-359

[10] Tsou M J, Kao F J, Lu H C, et al. Purification and identification of lipolysis-stimulating peptides derived from enzymatic hydrolysis of soy protein [J]. Food Chemistry, 2013, 138(2-3): 1454-1460

[11] Petruccelli S, Anon M. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy protein isolates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(10): 2170-2176

[12] Hua H, Wu J H, Eunice C Y, et al. Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2): 647-655

[13] Dong S, Zeng, M, Wang, D, et al. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) [J]. Food Chemistry, 2008, 107(4): 1485-1493

[14] Folkertsma B, Fox P F, Mcsweeney P L H. Accelerated ripening of cheddar cheese at elevated temperatures [J]. International Dairy Journal, 1996, 6(11-12): 1117-1134