酰化大米蛋白理化性质及胰蛋白酶酶解性质研究

李燕燕，王立，钱海峰，张晖，齐希光
（江南大学食品学院，江苏无锡 214122）

摘要：对酰化大米蛋白的溶解度、表面电荷情况及二级结构等理化特性进行初步探讨，同时研究了酰化大米蛋白胰蛋白酶酶解特性。结果表明，大米蛋白等电点随着酰化程度的增大，越来越向酸性方向迁移，由原来的 4.8 分别迁移到 4.4、3.8、3.3。酰化能够改善大米蛋白的溶解性，从 0.4 mg/mL 提高到了 0.7 mg/mL（中性 pH）。酰化能够明显增加蛋白质表面的净负电荷，酰化程度越大，净负电荷增加越多。酰化对大米蛋白的二级结构也有一定的影响，α-螺旋和无规卷曲含量基本不变，β-折叠含量下降，β-转角的含量上升。酰化可以提高大米蛋白胰蛋白酶酶解速率和消化率，相同底物浓度时动力学参数 a 随着酰化度的增大而增大。酶解物电泳表明，胰蛋白酶酶解 120 min 后，未改性大米蛋白酶解物在 20 kDa、16.9 kDa 和 14 kDa 处仍有清晰可见的条带，改性大米蛋白酶解物则这些条带几乎都完全消失。

关键词：大米蛋白；酰化；胰蛋白酶；理化性质

文章篇号：1673-9078(2015)2-81-86 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.2.015

Study on Physicochemical Properties and Trypsin Hydrolysis of Acetylated Rice Protein

LI Yan-yan, WANG Li, QIAN Hai-feng, ZHANG Hui, QI Xi-guang
(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The physicochemical properties of acetylated rice protein, including solubility, surface charge, and secondary structure, were explored; the enzymatic hydrolysis of acetylated rice protein by trypsin was also investigated. The results showed that the isoelectric point (pI) of acetylated rice protein was decreased with increasing degrees of acetylation. Acetylation improved the solubility of rice protein, as it was increased to 0.7 mg/mL from 0.4 mg/mL (neutral pH) upon acetylation. Acetylation significantly increased the net negative surface charge of the protein, and a higher degree of acetylation led to an increased net negative charge. Meanwhile, acetylation also had certain effects on the secondary structure of rice protein. The α-helix and random coil contents remained the same, while the β-sheet content decreased and β-corner content increased upon acetylation. Acetylation enhanced the enzymatic hydrolysis rate and digestibility of rice protein by trypsin. When the substrate concentration was the same, the kinetic parameter increased with increasing degree of acylation. The electrophoresis results of the enzymatic hydrolysates showed that after enzymatic hydrolysis by trypsin for 120 min, bands at 20 kDa, 16.9 kDa, and 14 kDa were still clearly visible for the unmodified rice protein, while the bands corresponding to the acetylated rice protein almost completely disappeared.

Key words: rice protein, acylation, trypsin, physicochemical properties

我国年产稻谷二亿吨左右，一般加工成大米供人们日常食用。稻谷加工过程中产生了大量的碎米，同时，我国每年有大量的陈米没有进行合理的开发利用。近年来已开发出较多关于稻米深加工的产品进入市场，如膨化米、米乳饮料、糙米茶、米粉以及添加米粉的烘焙类产品等。

收稿日期：2014-07-13

基金项目：国家“十二五”科技攻关项目（2012BAD37B08-3）；863 计划（2013AA102203-7）；国家科技支撑计划项目（2006BAD27B09；2006BAD04A12）

作者简介：李燕燕（1988-），女，在读研究生，研究方向：谷物与植物蛋白方向

通讯作者：钱海峰（1973-），男，副教授，研究方向：谷物与植物蛋白方向

大米蛋白的氨基酸组成比较合理，且具有低过敏性的特点，因此其产品开发受到国内外高度重视。大米蛋白可以加工成高蛋白粉、蛋白胨和蛋白发泡粉等，也可用于保健饮料、调味品、化妆品等产品中。但大米蛋白存在溶解性差，进而导致乳化性、起泡性等功能特性较弱[1~2]，影响了大米蛋白的进一步开发利用。目前，关于大米蛋白改性的研究也有很多，主要都集中于对大米蛋白功能性质的改善。

酰化改性是一种常见的蛋白改性方法，是指蛋白质分子中亲核基团(如氨基或羟基)与酰化试剂相互反应，从而导入新功能基团的过程。最为常见酰化剂为琥珀酸酐和乙酸酐。酰化后的蛋白分子多链肽伸展，

空间结构的改变,进而提高了蛋白分子的溶解性、持水性、吸油性、乳化性和起泡性等。酰化改性不仅能够改进蛋白质的功能性质，而且不损害产品质量和营养价值，并能减轻原料植物蛋白的色泽和不良气味。此外，酰化改性还具有反应条件温和、原料易得，精制方法简单等优点，显示出酰化植物蛋白作为新型功能蛋白质的优良特性和巨大发展潜力能够改善蛋白的溶解特性和功能特性。但是关于酰化大米蛋白的消化特性的研究报道较少。因此，本研究制备了不同改性程度的乙酰化大米蛋白，研究了酰化程度对理化性质的影响，并进一步研究了其体外消化性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

大米蛋白，江西金农米业集团提供。基本成分：蛋白质含量为92.3%（干基），水分，4.19%。乙酸酐，胰蛋白酶（438 U/mg）、氯化钠、氢氧化钠、浓盐酸、浓硫酸、SDS、正己烷等，分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

傅立叶红外光谱仪，美国赛默飞公司；Zeta 电位及纳米粒度分析仪，美国布鲁克海文仪器有限公司；分光光度计 722S，无锡科达智能仪器有限公司；酸度计 Delta 320，梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司；凝胶成像仪、消化炉、改良式微量凯氏定氮仪、水浴恒温振荡器、分光光度计、低速自动平衡离心机、冷冻干燥机、超低温冰箱。

1.2 方法

1.2.1 不同程度酰化大米蛋白制备

大米蛋白溶液(6%，*m/V*)在搅拌条件下，分次加入 0.01、0.03 和 0.3 g/g 大米蛋白的乙酸酐，常温下反应 2 h，反应过程中，用 l mol/L NaoH 调控反应体系 pH，使其保持在 7.5~8.5 之内。反应结束后，于去离子水中透析(4 ℃，24 h)，冷冻干燥的。

大米蛋白的酰化程度用茚三酮法测定[3]。具体为：取酰化改性后蛋白液 0.1 mL，加去离子水 0.9 mL，加茚三酮显色剂 l mL，混合液于 100℃水浴上加热 15 min 后取出静置 10 min，再加入 5 mL 40%的乙醇，570 nm 波长下测定溶液的吸光度，以吸光度表示游离氨基与茚三酮试剂的反应程度。吸光度值越大表示改性蛋白的酰化程度越低。

$$酰化度（\%）=\frac{未改性大米蛋白吸光度-改性大米蛋白吸光度}{未改性大米蛋白吸光度}\times 100$$

1.2.2 理化性质

溶解度：大米蛋白含量测定采用福林酚法[4]。取改性后蛋白质 0.1 g 溶于 10 mL 容量瓶，加不同 pH 磷酸盐缓冲液定容至刻度，磁力搅拌 30 min 后离心 3000 r/min 离心 30 min，上清液定容到 10 mL。取 1 mL 上清液，然后加入 5 mL 福林酚试剂甲混匀，30 ℃下放置 10 min。再加入 0.5 mL 福林酚试剂乙混匀，30 ℃放置 30 min，650 nm 处测光吸收值。同时做空白实验调整仪器零点及三次平行实验取平均值。以牛血清蛋白为标准曲线。

Zeta 电势测定:一定浓度蛋白溶于水（2 mg/mL），用 NaOH 或 HCl 调节至不同 pH，利用 Zetasizer nano ZS 进行电势电位测定[5]。

二级结构：傅里叶变换红外光谱仪 Nicolet iS10 通过对蛋白质酰胺吸收带的去卷积、二阶导数和拟合分析,观察到酰化蛋白质二级结构相对含量的变化。

1.2.3 酰化大米蛋白胰蛋白酶酶解特性

1.2.3.1 酰化大米蛋白胰蛋白酶消化率

分别称取一定量的酰化大米蛋白冻干粉分散于蒸馏水中，用 l mol/L NaOH 调整 pH 至 7.5，将其置于 37.5 ℃水浴中预热 10 min 后，将胰蛋白酶溶液液置于 37.5 ℃水浴中预热 10 min，按照酶:底物（*m/m*）=l:12 的量，加入新鲜配制的胰蛋白酶溶液，使最终蛋白浓度为 10 mg/mL。在 37.5 ℃条件下水浴震荡酶解 120 min。酶解完成后，煮沸 10 min 灭酶，加入等体积 10% TCA 沉淀蛋白并过滤，滤液进行凯氏定氮[6~8]。

$$TCA可溶性氮（\%）=\frac{滤液含氮量}{样品含氮量}\times 100$$

胰蛋白酶溶液：7 g KH_2PO_4，溶于 980 mL 去离子水，用 1 mol/L NaOH 调 pH 7.5 后定容到 1000 mL，用所得溶液配置浓度为 3.25 mg/mL 胰蛋白酶，现用现配。

1.2.3.2 酰化大米蛋白胰蛋白酶酶解动力学

胰蛋白酶酶解动力学采用 pH-stat 法[9]测定水解度-时间曲线，计算动力学参数。pH-stat 法：配置不同浓度蛋白溶液，用 NaOH 调 pH 7.5 后 37.5 ℃下平衡 30 min，再按比例加入适量胰蛋白酶溶液。反应过程记录不同时刻为维持 pH 值恒定而消耗的碱液量。产物水解度定义为蛋白质中被水解肽键的比例，计算公式为：

$$x(\%)=\frac{BN}{\alpha\ M_P h_{tot}}\times 100\cdot$$

式中：B 为消耗碱液的体积(mL)；N 为碱液的浓度(mol/L)；Mp 为底物中蛋白质质量(g)；htot 为单位质量蛋白质肽键当量数，米渣蛋白的 htot 为 7.72 mmol/g.α 为 α--氨基的解离度，$\alpha=10^{pH-pK}/(1+10^{pH-pK})$，其中 pH 是反应体系的 pH 值，

pK 是反应条件下 α-氨基酸解离常数(一般取 7.0 计算)。

1.2.4 大米蛋白及酶解物电泳

SDS-PAGE 根据 Laemmli(1970)报道的方法[10]，分离胶浓度为 12%，浓缩胶浓度为 4%。上样缓冲液中添加二流苏糖醇。蛋白酶解物采用 Tris-SDS-PAGE 电泳[11]。

1.2.5 数据分析

采用 Origin 8.6 软件进行数据统计分析和作图，用 spss 进行方程和显著性分析。

2 结果与分析

2.1 理化性质研究

2.1.1 酰化对大米蛋白溶解度的影响

酰化对大米蛋白溶解度的影响如图 1 所示。

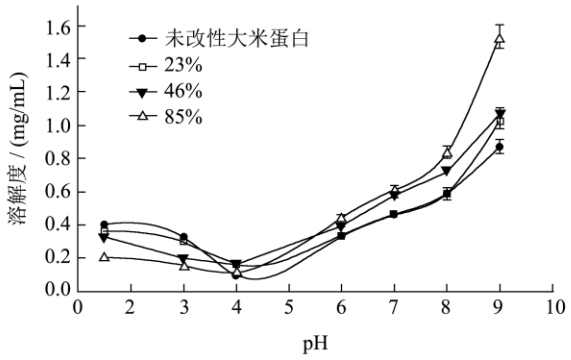


图 1 不同酰化改性大米蛋白的溶解度

Fig.1 Solubility of rice protein with varying degrees of acetylation

溶解度是蛋白质一个非常重要的功能性质。大米蛋白的主要成分为谷蛋白，属于碱溶性蛋白，在一般的食品体系中较难溶解。从图中可以看出，随着酰化程度的增加，大米蛋白的溶解度成规律性变化：在 pH 高于 pI 时，大米蛋白的溶解度随着酰化程度的增加而增加；当 pH 低于 pI 时，大米蛋白的溶解度随着酰化程度的增加略有降低。在已有植物蛋白（如大豆[12]、刀豆[13]、谷朊粉[14]、蚕豆蛋白[15]等）酰化研究报道时都得到了类似的结果，推测主要原因是蛋白质的溶解度取决于蛋白质分子间的静电排斥效应和疏水相互作用等次级相互作用力。中性的乙酰基取代了部分赖氨酸的正电荷，增加了蛋白质表面的净负电荷，因此等电点向酸性方向迁移。在 pH 高于 pI 区域内，蛋白质分子表面整体呈净负电荷，蛋白分子间有静电排斥效应。酰化增大增加了蛋白质表面的净负电荷，因此也增加了静电排斥效应蛋白，是蛋白质的溶解度增大。在 pH 低于 pI 区域内则相反，蛋白质表明呈净正电荷状态，酰化使静电荷减少，静电斥力降低，溶解度降低。

2.1.2 酰化对 Zeta 电势的影响

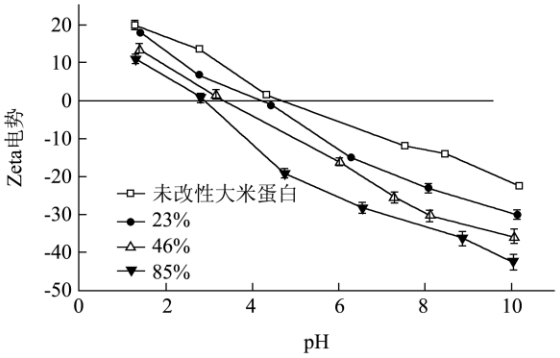


图 2 酰化大米蛋白 pH-Zeta 电位图

Fig.2 Zeta potential versus pH of rice protein with varying degrees of acetylation

从图 2 可以看出，相同 pH 下，随着酰化程度的增大，蛋白质表面净负电荷增大，说明酰基的引入改变了蛋白质表面的电荷情况。从图 1 中也可以看出，未改性大米蛋白的 pI 在 4.5~5，而 85%酰化大米蛋白 pI 大约为 3.3，明显低于未性大米蛋白，推测原因是酰化时中性的乙酰基代替了带有正电荷的氢离子[16]。蛋白质表面的净电荷情况会显著影响蛋白质的溶解度，一般来说，静电荷越多，蛋白质分子间静电排斥效应越大，蛋白质分子因疏水性作用力聚集的程度就会越小，蛋白质溶解度越大，尹寿伟[21]对芸豆蛋白的研究也发现了这一现象。

2.1.3 酰化大米蛋白二级结构

表 1 酰化大米蛋白二级结构

Table 1 Secondary structure of acetylated rice protein

	α-螺旋	β-折叠	β-转角	无规卷曲
未改性大米蛋白	0.0965	0.5271	0.2814	0.09463
23%	0.0966	0.5258	0.2826	0.09488
46%	0.1024	0.4929	0.3031	0.1015
85%	0.1110	0.4639	0.3197	0.1053

表 1 为利用 peakfit4.2 对大米蛋白红外光谱图的酰胺Ⅰ带（1700 cm^{-1}~1600 cm^{-1}）进行曲线拟合，得到酰化改性对大米蛋白二级结构的影响。从中可知，乙酰化后大米蛋白 α-螺旋和无规卷曲基本不变，β-折叠含量下降，β-转角的含量上升。α-螺旋是每个氨基酸残基(第 N 个)的羰基氧与多肽链 C 端方向的第 4 个残基(第 N+4 个)的酰胺氮形成的氢键。酰化形成了非主链酰胺键，对 α-螺旋产生了一定的影响，但总体来说影响不大。β-折叠是靠肽链链内或者链间氢键来维持的一种平行排列的空间结构，酰化时不会形成氢键的乙酰基代替了部分侧链上的能够形成氢键的 H，蛋白的空间排列改变，肽链的平行排列被打乱，β-折叠下

降，能够使肽链走向改变的β-转角增多，对芸豆蛋白和大米蛋白酰化改性，也得到了同样的结论[17~18]。

2.2 胰蛋白酶酶解酰化大米蛋白

表 2 胰蛋白酶消化酰化大米蛋白 TCA 可溶性氮含量

Table 2 TCA soluble nitrogen content of acetylated rice protein by trypsin deigestion

蛋白改性程度/%	0（未改性）	23	46	85
可溶性氮含量/%	45.42±0.05[a]	46.29±0.06[b]	48.79±0.04[c]	56.93±0.13[d]

注：表中小写字母表示相互之间有显著差异（p<0.05）。

从表 2 可以看出随着酰化程度的增大，在同样条件下酶解 TCA 可溶性氮越多，说明酰化改性有利于胰蛋白酶消化。

由 3a或 b 可看出大米蛋白和改性大米蛋白的酶解规律相似。低底物浓度时体系的初始水解速度较快，最终水解度也较高。水解速率和终水解度都随初始底物浓度的增加而呈下降趋势。初始底物浓度 18.75 g/L 和 25 g/L，有非常相近的水解进程曲线，说明此时体系中底物处于充足状态，继续增加底物浓度无益于反应。

比较图 3（a 和 b）中相同底物浓度反应进程曲线可知，在各底物浓度时酰化度 85%的大米蛋白酶解速率都大于未改性大米蛋白，且随着酰化程度的增加，这种趋势更加明显。酰化不仅提高初始酶解速率，还可以增加大米蛋白的最终水解度。如底物浓度同为 10 mg/mL 时，未改性大米蛋白最终水解度为 11%，85%酰化大米蛋白的最终水解度为 14%。其他改性程度大米蛋白也有相同的情况。

胰蛋白酶酶解酰化大米蛋白和未改性大米蛋白呈现相同的酶解规律，都符合双底物水解机理，利用 origin 软件对不同改性程度大米蛋白酶解 pH-stat 曲线按方程 DH= 1/b×ln[1+abt]进行非线性回归拟合，求得 a、b 值列于表 3。

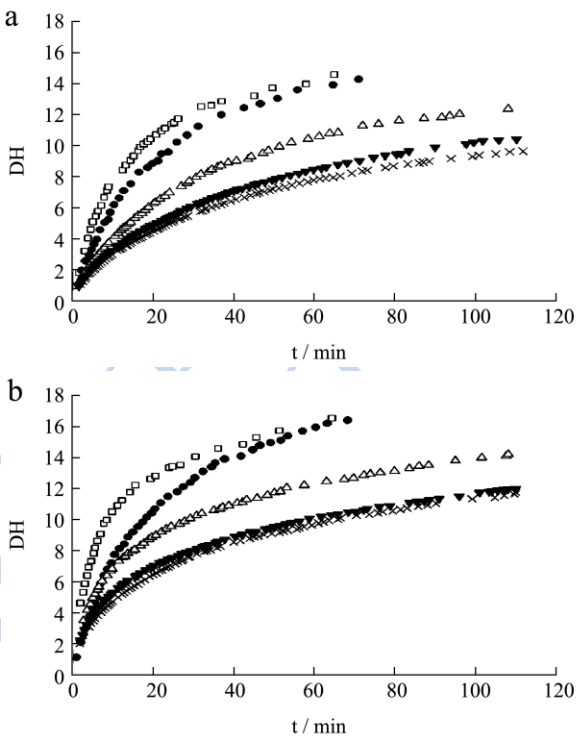


图 3 胰蛋白酶酶解不同底物浓度大米蛋白

Fig.3 Trypsin digested protein in substrate with different concentrations

注：A图为未改性大米蛋白，B图为85%酰化大米蛋白．底物浓度：□：3.125 mg/mL；●：6.25 mg/mL；Δ：10 mg/mL；▼：18.75 mg/mL；×：25 mg/mL。

表 3 不同酰化大米蛋白胰蛋白酶动力学参数 a、b

Table 3 Kinetic parameters a and b of trypsin digestion of acetylated rice protein with varying degrees of acetylation

底物浓度 /(mg/mL)	未改性大米蛋白		23%		46%		85%	
	a	b	a	b	a	b	a	b
3.125	2.130	0.230	2.610	0.223	3.273	0.239	5.332	0.269
6.25	1.032	0.230	1.295	0.248	3.031	0.276	4.138	0.301
10.00	0.665	0.239	1.190	0.270	1.394	0.272	2.382	0.310
18.75	0.5048	0.260	0.665	0.296	1.151	0.331	1.505	0.342
25.00	0.4515	0.279	0.533	0.278	0.652	0.275	1.134	0.322

从表 3 中可以看出，随着底物浓度的增加，动力学参数 a 变小，b 基本上为一个常数。在相同底物浓度时，酰化程度越大，动力学参数 a 越大。

表 2、表 3 以及图 3 可以充分说明酰化有利于胰蛋白酶酶解。推测原因可能有：⑴胰蛋白酶的作用位点为 Lys、Arg 羧基端参与形成的肽键键、酰胺键和酯键[19]，酰化作用发生的位点位 Lys 的侧链氨基，因此酰化可能会使更多的 Lys 参与形成的肽键暴露，即胰蛋白酶的作用位点暴露；⑵酰化增加了蛋白质表明的净负电荷（见图 2），有利于胰蛋白酶 S1 结合袋中 Asp

残基的负电荷与底物肽链中P1端的负电荷相匹配[20]；⑶胰蛋白酶作用环境 pH 为中性，在此条件下，酰化能够显著提高大米蛋白的溶解度。虽然酶既能够作用于溶于水的蛋白，又能够作用于不溶性蛋白。但是对于不溶于水的蛋白，酶只能吸附在其表面作用，水解速率远小于溶于水的蛋白。

2.3 酰化大米蛋白及酶解物电泳

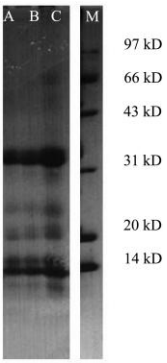


图 3 大米蛋白 SDS-PAGE 电泳.

Fig.3 SDS-PAGE profiles of rice proteins

注：A未改性大米蛋白，B 酰化度46%，C酰化度85%，M marker。

改性大米蛋白 SDS-PAGE 电泳（图 3）分析可看出，改性和未改性大米蛋白的主要条带出现 33 kD、22 kD、14 kD 等，说明酰化并没有明显增加蛋白质的分子量。原因为改性添加的乙酰基团只 28 Da，而大米蛋白分子量要远远大于此，这与对大豆和对小麦面筋蛋白等的研究一致。同时从图中可以看出，大米蛋白主要条带仍然为这些，但是小分子片段略微增加。另外，从图中也可以看出在改性程度较大时，少量蛋白发生了聚集现象，即改性程度在 85%时在 66 kD 处有不清晰的条带，但其他改性较低的程度没有见到此现象。

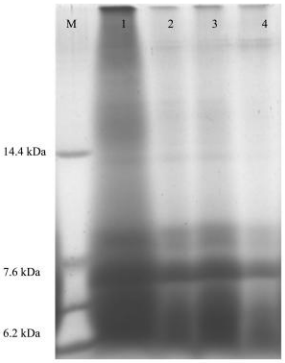


图 4 大米蛋白酶解液 Tris-SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 Tris-SDS-PAGE profiles of enzymatic hydrolysates

注：M为marker，1~4依次为未改性大米蛋白、酰化度23%大米蛋白、酰化度46%大米蛋白、酰化度85%大米蛋白被胰蛋白酶酶解120 min酶解物电泳条带。

比较胰蛋白酶酶解 120 min 条带可以发现，酰化度在 85%的大米蛋白大于 10 kDa 的分子片段几乎全部消失，而未改性大米蛋白在 20 kDa、16.9 kDa 和 14 kDa 处仍有清晰可见的条带。充分说明了酰化有利于大米蛋白胰蛋白酶酶解。

3 结论

3.1 酰化对大米蛋白的溶解度有一定的影响。在 pH＜pI 范围内，酰化会降低大米蛋白的溶解度，在 pH＞pI 条件下则会提高大米蛋白的溶解度。实验结果表明酰化可以改善大米蛋白胰蛋白酶酶解速率，提高胰蛋白酶酶解率。酶解物电泳表明，在被胰蛋白酶酶解 120 min 后，未改性大米蛋白在 20 kDa、16.9 kDa 和 14 kDa 处仍有清晰可见的条带，改性大米蛋白则这些条带明显变少或者几乎完全消失。对改性蛋白理化性质进行研究表明，蛋白质表面净负电荷增加，蛋白质二级结构也有一定变化。

3.2 蛋白质的结构特征是影响其消化特性的内部因素。消化酶对蛋白质的水解程度主要依靠作用位点的数量以及这些位点能否与蛋白酶良好的接触。本文在研究改性蛋白酶解情况的同时研究了改性对蛋白各种理化性质的影响，观察改性前后及不同改性程度大米蛋白分子结构的变化,期望为阐明蛋白质结构与酶解情况间的关系提供一些数据，酰化影响大米蛋白消化性机理仍需进一步研究。

参考文献

[1] 陈义勇,王伟,沈宗根,等.米糠可溶性蛋白提取工艺中各因素影响的研究[J].现代食品科技,2006,04:64-66,70
CHEN Yi-yong, WANG Wei, SHEN Zong-gen, et al. Research on effects of various factors among extraction of soluble protein from rice bran [J]. Modern Food Science and Technology, 2006,04:64-66, 70

[2] 王章存,聂卉,康延玲.酶法提取大米蛋白研究进展[J].现代食品科技,2006,03:255-258
WANG Zhang-cun, NIE Hui, KANG Yan-ling. Research progress of extraction of rice protein using enzyme [J]. Modern Food Science and Technology, 2006, 03: 255-258

[3] Krause J P. Comparison of the effect of acylation and phosphorylation on surface pressure, surface potential and foaming properties of protein isolates from rapeseed (Brassica napus) [J]. Industrial Crops and Products, 2002, 15(3): 221-228

[4] Lemos D, Lawrence A L, Siccardi A J. Prediction of apparent

protein digestibility of ingredients and diets by in vitro pH-stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei [J]. Aquaculture, 2009, 319: 407-416

[5] Ezquerra J.M, Garca-Carreno F.L., Carrillo O. In vitro digestibility of dietary protein sources for white shrimp (Penaeus vannamei) [J]. Aquaculture, 1998, 163: 123-136

[6] Vile R M, Lands L C, Chan HM, et al. High hydrostatic pressure enhances whey protein digestibility to generate whey peptides that improve glutathione status in CFTR-deficient lung epithelial cells [J]. Molecular Nutrition and Food Research, 2006, 50(11): 1013-1029

[7] 模拟胃肠液外源蛋白质消化稳定性试验方法,农业部869号公告2007
Simulation Protein Digestive Stability Using Exogenous Test Method the Agriculture Department Announcement No. 869 2007

[8] Liu Tong-Xun, MOU-Ming Zhao. Physical and chemical modification of SPI as a potential means to enhance small peptide contents and antioxidant activity found in hydrolysates [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11: 677-683

[9] D Lenmos, A L Lawrence, A J Siccardi. Prediction of apparent protein digestibility of ingredients and diets by in vitro pH-stat degree of protein hydrolysis with species-specific enzymes for juvenile Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei [J]. Aquaculture, 2009, 295: 89-98

[10] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680-685

[11] 翟祥超.乙酰化和羧基丙酰化大豆分离蛋白的制备与特性研究[D].天津:天津大学,2007
ZHAI Xiang-chao. Preparation and properties of acetylation and carboxyl propionyl isolated soybean protein [D]. Tianjin: Tianjin University, 2007

[12] Athanasia O. Matemu, Hisataka Kayahara, Hisashi Murasawa. Improved emulsifying properties of soy proteins by acylation with saturated fatty acids [J]. Food Chemistry, 2011, 124: 596-602

[13] Klaus Dieter Schwenke, Constanze Knopfe, Arndt Seifert. Acetylation of faba bean legumin: conformational changes and aggregation [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000, 81: 126-134

[14] 姜绍通,唐文婷,潘丽军.小麦面筋蛋白琥珀酰化修饰研究[J].食品科学,2005,12:40-44
JIANG Shao-tong, TANG Wen-ting, PAN Li-jun. Research of acylation wheat gluten protein [J]. Food Science, 2005(12): 40-44

[15] O S Lawala, K O Adebowaleba. The acylated protein derivatives of Canavalia ensiformis (jack bean):A study of functional characteristics [J]. LWT, 2006, 39: 918-929

[16] Shou-Wei Yin, Chuan-He Tang, Qi-Biao Wen, et al. The relationships between physicochemical properties and conformationalfeatures of succinylated and acetylated kidney bean (Phaseolus vulgaris L.) protein isolates [J]. Food Research International, 2010, 43

[17] 尹寿伟.芸豆蛋白的物化修饰及相关构效机理研究[D].华南理工大学,2009
YIN Chou-wei. Chemical modification of kidney bean protein and relationship between structure and effect [D]. South China University of Technology, 2009

[18] 王章存,刘卫东,申瑞玲,等.大米蛋白的酶水解机制研究-Ⅱ酶水解过程中蛋白质的组分变化[J].中国粮油学报,2007,04:5-8,13
WANG Zhang-cun, LIU Wei-dong, SHEN Rui-ling, et al. Hydrolysis mechanism of rice protein research-Ⅱ change of protein components in the process of hydrolysis [J]. Chinese Cereals and Oils Association, 2007(4): 5-8. 730-738

[19] Shou-Wei Yin, Ji-Cheng Chen .Physicochemical and structural characterisation of protein isolate, globulin and albumin from soapnut seeds (Sapindus mukorossi Gaertn) [J]. Food Chemistry, 2011, 128: 420-426

[20] 赵红辉.类黄酮与胰蛋白酶相互作用特性的研究[D].广州:华南理工大学,2012
ZHAO Hong-hui. Interaction between flavonoids and trypsin characteristics research [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012