

双酶法制备葵花籽肽的工艺研究

刘平伟, 刘会平, 陈苓

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 利用双酶法水解葵花籽分离蛋白(SPI)制备葵花蛋白肽, 探讨各因素对水解度(Degree of hydrolysis, DH)和肽含量的影响, 目的在于确定葵花蛋白肽制备的最佳酶解条件。结果表明: 最佳酶解条件为底物浓度 5.0×10^{-2} g/mL, 温度为 53.5°C , pH 8.5, 按照[E/S]为 1.0×10^{-2} g/g 加 Alcalase 2.4 L, 酶解 104 min, 调整 pH 为 7.5, 按照[E/S]为 0.44×10^{-2} g/g 添加 Flavourzyme 酶解 120 min。此工艺得到水解液中肽含量为 4.25 mg/mL, DH 为 30.97%, 与单酶法相比, 肽含量显著提高。

关键词: 双酶法; 葵花蛋白肽; 肽含量; 酶解条件

文章编号: 1673-9078(2013)4-829-834

Two-step Enzymatic Hydrolysis for Preparation of Peptides from Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Protein Isolates

LIU Ping-wei, LIU Hui-ping, CHEN Ling

(College of Food Engineering and Biology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Two-step enzymatic hydrolysis reactions were investigated to prepare peptides from sunflower protein isolates. In order to maximize content of peptides and optimal degree of hydrolysis (DH), crucial hydrolysis parameters were optimized. Results showed that the maximum content of peptides of 4.249 mg/mL was obtained under the following conditions in the first enzymatic step: Alcalase 2.4 L dosage 1.0×10^{-2} g/g, hydrolysis time 104 min, temperature 55°C , pH 8.5, and substrate concentration 5×10^{-2} g/mL. In the second enzymatic step, the optimum conditions were: Flavourzyme dosage 0.44×10^{-2} g/g, reaction time 120 min and pH 7.5. Under the optimum condition, the DH was 30.97%. In addition, much higher peptide contents than using single enzyme method was found when using this two-step enzymatic method.

Key words: double enzyme hydrolysis; sunflower protein isolates peptides; content of peptides; hydrolysis conditions

葵花籽是世界五大油料作物之一^[1], 葵花籽粕是葵花籽取油后的主要副产物, 营养丰富, 蛋白质含量为 40% (葵花籽粕干粉) 左右^[2], 与 FAO 规定的必需氨基酸相比, 除了赖氨酸外其它氨基酸含量都很高^[3-4], 另外, 葵花蛋白的结构组成与大豆蛋白的结构有很大的相似之处^[4], 说明葵花蛋白也可以作为功能性蛋白应用于食品工业。然而葵花籽粕通常被用作饲料, 没有得到很好的开发利用。葵花籽中多酚含量约为 2~4%^[5], 在中性和碱性条件下提取蛋白质时, 由于多酚氧化酶和氧气的作用, 它极易与蛋白质分子的极性基团、氨基、巯基和亚甲基等形成共价键而被氧化成醌严重影响蛋白质的质量^[6]。葵花蛋白肽的开发在一定程度上提高葵花籽蛋白的利用率。另外, 葵花籽蛋白肽还具有抗氧化作用^[7]、ACE 抑制作用^[8]、金属离子螯合作用^[9]等活性, 使其极具开发前景, 可以被广泛地应用于食品及相关领域。但是, 由于酶的专一性, 切割位点有限, 单一酶水解方法制备肽, 其产率

较低, 且功能性片段较少。本研究利用内切的 Alcalase 2.4 L 和外切的 Flavourzyme 1000 MG 双酶法制备葵花蛋白肽, 采用正交试验确定每种酶的最佳酶解条件后, 再探讨两种酶分步水解条件对其水解液水解度的影响, 并采用响应面法对其最佳拟合条件进行优化, 进而确定高肽产率的双酶法水解工艺条件, 从而为葵花蛋白肽更好地开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Alcalase 2.4 L (酶 I, 酶活为 27.6 万 U/g) 和 Flavourzyme 1000 MG (酶 II, 酶活力为 14.5 万 U/g) 均购自 Novozymes; 绿原酸和 Gly-Gly-Tyr-Arg 标准品购自 Sigma; 葵花籽粕购自内蒙古五原县广发农产品进出口有限责任公司。其它试剂均为分析纯。

电子恒温水浴锅, 河北黄骅市实验仪器厂; TDL-40B 型离心机: 上海安亭科学仪器厂; KDN-08A 微量凯氏定氮仪: 上海光谱仪器有限公司; JA2003 电子天平, 上海精科实业有限公司; SHZ-88 水浴, 恒温

收稿日期: 2012-11-09

通讯作者: 刘会平 (1964-), 男, 博士, 教授, 从事食品加工与保鲜的研究

振荡器, 江苏省金坛市医疗仪器厂; PHS-3C 型实验室 pH 计, 上海今迈仪器仪表有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 葵花籽分离蛋白的制备

葵花籽分离蛋白(SPI)的制备参照 Pickardt 等^[10]的方法。SPI 水分、灰分和蛋白含量分别按照 GB 5009.3-2010、GB 5009.4 2010、GB 5009.5-2010 进行测定, 多酚含量: 以绿原酸为标准品, 采用紫外分光光度法测定^[11-12]。葵花籽分离蛋白的各项指标为: 蛋白质含量(82.0±0.32)%、水分含量(7.13±0.82)%、灰分含量(4.19±0.03)%、多酚含量为(0.45±0.08)%。

1.2.2 水解度(DH)的测定

采用甲醛滴定法^[13]测定酶解产物中肽和氨基酸的含量, 以此反映 Alcalase 2.4 L 和 Flavourzyme 对葵花籽粕分离蛋白的酶解程度。

1.2.3 肽含量的测定

酶解物中多肽含量参照鲁伟等^[14]的测定方法。用 10% (m/v) 的三氯乙酸沉淀蛋白水解液中的大分子蛋白质, 经离心过滤后, 在上清液中加入双缩脲试剂, 于 540 nm 下测定其 OD 值, 继而在 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准曲线上查出样品中的多肽含量。

1.2.4 酶 I、酶 II 最佳酶解条件

对温度、pH、底物浓度[S]、酶与底物比[E/S]四个因素进行单因素试验, 分别考察其对 Alcalase 2.4L 和 Flavourzyme 对葵花籽分离蛋白水解作用的影响。基本操作: 精确称取葵花蛋白粉于锥形瓶中, 用蒸馏水 (m/v) 配成一定浓度的悬浮液, 放入水浴锅中, 预热至所需温度, 用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 调至所需 pH, 加入一定量的酶, 在恒温水浴振荡器中酶解 1 h。酶解过程中用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 维持 pH 恒定。水解结束后, 用 1 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 4.2, 将锥形瓶置于 80 °C 水浴锅中灭酶 20 min, 迅速冷却, 5000 g 离心 10 min, 取上清液测定 DH。

1.2.5 双酶拟合试验

双酶法制备葵花籽肽的工艺流程如下。

葵花籽分离蛋白粉→悬浮液、预热→调整酶解条件、加酶 I→酶解液 I→调整酶解条件、加酶 II→酶解液 II→灭酶→离心→上清液→冻干→检测。

基本操作同 1.2.4, 按照酶 I 最佳条件水解一定时间后, 调整酶解条件至酶 II 最佳水解条件, 共同酶解一定时间后灭酶、离心, 测定 DH 和肽含量。

2 结果与分析

2.1 酶 I、酶 II 单因素试验结果

研究了温度、pH、底物浓度[S]、酶与底物比[E/S]四个因素对 Alcalase 2.4L 和 Flavourzyme 水解葵花蛋白的影响, 结果分别见图 1 (a、b、c、d)、图 2 (a、b、c、d)。

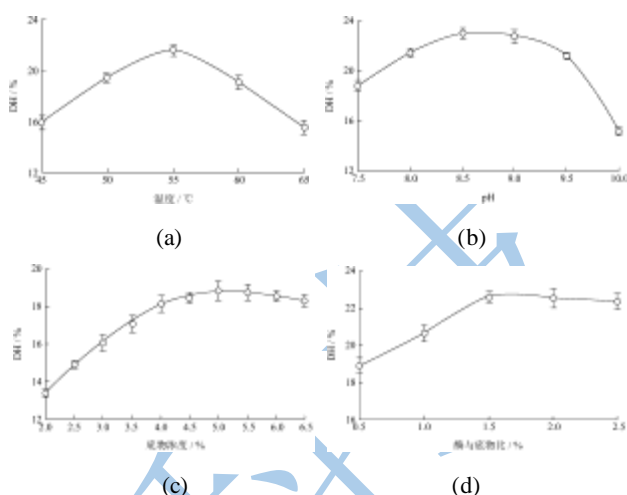


图 1 Alcalase 2.4L 单因素试验

Fig.1 Optimiztion of Alcalase

从图 1a 可以看到, Alcalase 2.4L 最适水解温度为 55 °C, 温度上升或下降, 对其酶解作用影响显著; 图 1b 可以看到, Alcalase 2.4 L 最佳 pH 为 8.5, 当 pH<8.5 时, DH 变化缓慢, 而当 pH>8.5 后, DH 随 pH 的增加下降明显。[S]对 Alcalase 2.4 L 酶解作用影响如图 1c, 当[S]<5.0×10⁻² g/mL 时, [S]的增加, DH 增加趋势明显, 反之趋于平缓; 图 1d 可以看到, [E/S]<1.5% 时, 水解液 DH 随着[E/S]的增大而增加, 但[E/S]>1.5% 时, 水解液 DH 趋于平缓, 考虑经济因素, 初选[E/S]为 1.5%。

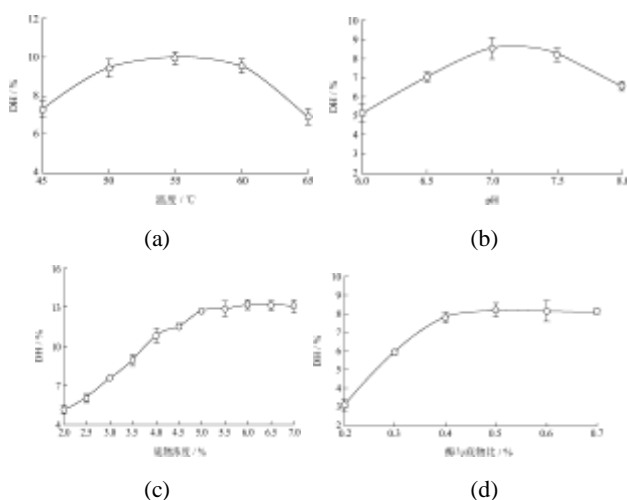


图 2 Flavourzyme 单因素试验

Fig. 2 One-factor experimental of flavourzyme

图 2 a 表明, 55 °C 时 Flavourzyme 作用效果最佳。温度较低时, 酶活力受到抑制, 温度高于 55 °C 时, 酶随温度上升, 渐渐失活; 图 2b 可以看出 pH 对

Flavourzyme 影响曲线近似于抛物线, pH=7.0 时, 水解液 DH 最大; [S]对 Flavourzyme 影响作用如图 2c, 当[S]=6.0×10⁻² g/mL 时, 水解液 DH 达到最大值, 随后几乎没有变化; 图 2d 表明[E/S]=0.5%时, 水解液 DH 趋于最大值, 而加酶量继续增大, 却不利于水解, 且成本增加, 因此确定[E/S]=0.5%。

2.2 酶 I、酶 II 正交试验结果分析

根据单因素结果, 选择温度、pH、底物质量浓度 (S)、酶与底物比 (E/S/g/g) 为试验因素, 以 DH 为指标设计试验, 对酶 I、酶 II 水解葵花蛋白制备葵花肽水解条件进行优化。正交试验设计如表 1、表 2。

表 1 Alcalase 2.4L 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal design for Alcalase 2.4

L hydrolysis optimization				
水平	A (温度/°C)	B (pH)	C [底物质量浓度 (10 ⁻² g/mL)]	D (E/S/%)
1	50	8.0	4.5	1.0
2	55	8.5	5.0	1.5
3	60	9.0	5.5	2.0

表 2 Flavourzyme 正交试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal array design for Flavourzyme hydrolysis optimization

水平	A (温度/°C)	B (pH)	C [底物质量浓度 (10 ⁻² g/mL)]	D (E/S/%)
1	50	7.0	5.5	0.3
2	55	7.5	6.0	0.4
3	60	8.0	6.5	0.5

表 3 Alcalase 2.4 L 正交试验结果表

Table 3 Orthogonal design and results for optimizing Alcalase

2.4 L-catalyzed hydrolysis of SPI					
试验号	A	B	C	D	DH/%
1	1	1	1	1	20.92
2	1	2	2	2	22.72
3	1	3	3	3	14.91
4	2	1	2	3	22.25
5	2	2	3	1	25.03
6	2	3	1	2	16.05
7	3	1	3	2	17.74
8	3	2	1	3	23.33
9	3	3	2	1	16.16
k ₁	19.517	20.303	20.100	20.703	
k ₂	21.110	23.693	20.377	18.837	
k ₃	19.077	15.707	19.227	20.163	
R	2.033	7.987	1.150	1.867	

酶 I 正交试验结果表如表 3, 可以看出: 影响

Alcalase 2.4L 水解作用的因素主次依次是 B>A>D>C, 理论最优组合为 A₂B₂C₂D₁, 试验中相似组为 A₂B₂C₃D₁。方差分析结果 (表 4) 可以看到 pH 对 Alcalase 2.4L 影响显著 (p<0.05)。按照理论组合进行验证试验, 结果显示理论组 DH 为 25.13, 大于相似组 DH, 因此确定 Alcalase 2.4L 最优酶解组合为 A₂B₂C₂D₁。

表 4 Alcalase 2.4L 正交试验结果方差分析表

Table 4 Analysis of Variance of the results of Alcalase 2.4L

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F0.05 临界值	显著性
温度/°C	6.867	2	3.176	19.000	
pH	96.406	2	44.592	19.000	*
底物浓度/%	2.162	2	1.000	19.000	
酶/底物/%	5.536	2	2.561	19.000	
误差	2.160	2			

Flavourzyme 正交试验结果和方差分析表如表 5、表 6, 因素主次为 B>A>D>C, 理论最优组合为 A₂B₃C₃D₃, 表 6 可知 pH 在 0.05 水平上对 Alcalase 2.4L 影响显著。按照理论组合进行验证试验, 试验结果 DH=15.12% 小于相似组的 15.20%, 所以选取相似组 A₂B₃C₁D₂ 为 Flavourzyme 的最优试验组合。

表 5 Flavourzyme 正交试验结果表

Table 5 Orthogonal design and results for optimizing

Flavourzyme-catalyzed hydrolysis of SPI					
试验号	A	B	C	D	DH/%
1	1	1	1	1	6.63
2	1	2	2	2	11.41
3	1	3	3	3	13.02
4	2	1	2	3	12.17
5	2	2	3	1	14.98
6	2	3	1	2	15.20
7	3	1	3	2	9.20
8	3	2	1	3	12.59
9	3	3	2	1	11.72
k ₁	10.353	9.333	11.473	11.110	
k ₂	14.117	12.993	11.767	11.937	
k ₃	11.170	13.313	12.400	12.593	
R	3.764	3.980	0.927	1.483	

根据以上单酶酶解结果可知, pH 对两种酶水解作用的影响都很显著 (p<0.05), 且两种酶最佳 pH 相差较大, 若采用双酶分步水解, 只有在两种酶最适 pH 条件下, 才能达到最佳酶解效果。因此, 要先按照一种酶的最佳作用条件水解一定时间后, 调整酶解条件, 再加另一种酶进行水解。以下实验在此基础上对双酶拟合实验条件进行了优化。

表 6 Flavourzyme 正交试验结果方差分析表

Table 6 Analysis of variance of the results of optimization test for Flavourzyme-catalyzed hydrolysis

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F0.05 临界值	显著性
温度/°C	23.512	2	17.468	19.000	
pH	29.338	2	21.796	19.000	*
底物浓度/%	1.346	2	1.000	19.000	
酶/底物/%	3.315	2	2.463	19.000	
误差	1.350	2			

2.3 酶 I、酶 II 添加顺序的确定

取温度 55 °C、[S]5.0×10⁻² g/mL (酶 I 最佳[S]) 为实验条件, 分别按照酶 I (酶 II) 最佳条件水解 1 h (2 h), 然后调整 pH 至酶 II (酶 I) 最佳 pH 水解 2 h (1 h), 灭酶、离心后取上清液分别测定其 DH 和肽含量。结果显示, 先加酶 I 后加酶 II DH 和肽含量分别为 30.97% 和 4.20 mg/mL, 明显优于先加酶 II 后加酶 I (DH 为 29.08%, 肽含量为 3.93 mg/mL), 这可能是因为酶 I 水解能力较强, 有较多的作用位点, 酶解一定时间后, 暴露出较多有益于酶 II 的作用位点, 得到了较好的酶解效果。所以确定酶解顺序为先加酶 II 后加酶 I。

2.4 酶 I、酶 II 添加顺序的确定

通过酶 I、酶 II 正交试验结果表 (表 3、表 5) 和方差分析表 (表 4、表 6) 可以看出: 底物浓度对酶 I、酶 II 水解作用影响最小。分别对[S] 5.0% (酶 I 最佳底物浓度) 和 6.0% (酶 II 最佳底物浓度) 先加酶 I 后加酶 II, 按照 2.2.5 的方法进行试验, 分别测定水解液的 DH 和肽含量。结果如表 7。

表 7 底物浓度对双酶水解影响结果

Table 7 Effect of substrate concentraion on DH and concentration of peptides

底物浓度/(g/mL)	水解度 DH/%	肽含量/(mg/mL)
5.0×10 ⁻²	30.85	4.19
6.0×10 ⁻²	30.83	4.03

上表可以看到: [S]分别为 5.0% 和 6.0% 时, DH 变化不明显, 但[S]为 5.0% 时, 肽含量却比 6.0% 时增加了 4.0%, 所以确定[S]为 5.0%。

2.5 双酶酶解时间的确定

按照上述确定的条件, 再分别确定酶 I、酶 II 的水解时间。酶 I 在 pH 为 8.5 时分别水解 1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h 时, 调整 pH 至 7.5, 加入酶 II 继续水解 1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h, 分别测定 DH 和肽含量的变化情况。结果如图 3。结合图 3a 和图 3b 可以看到酶 I 水解 1.5 h 后, 调整酶解条件, 加入酶 II 继续水解 2.0 h, 肽含量达到了最大值, 但随着

时间的延长, DH 的增加, 肽含量又缓慢下降。因此, 确定酶 I 水解时间为 1.5 h, 然后调整 pH, 加入酶 II 继续水解 2 h。这样在相同成本投入时, 可以提高肽的产率, 在实际生产应用中具有重要的意义。

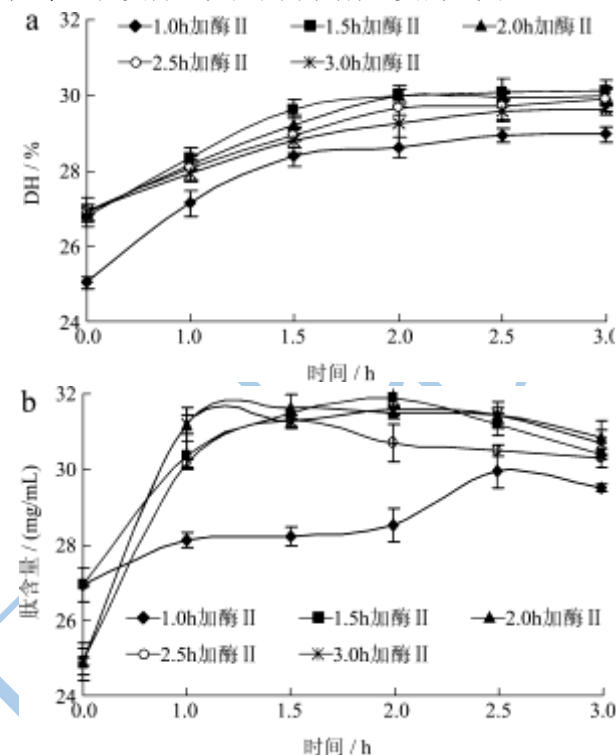


图 3 酶解时间对水解液 DH (a) 和肽含量 (b) 的影响 (n=3)

Fig.3 Combined effect of Alcalase 2.4 L and Flavourzyme hydrolysis time on DH (a) and concentration of peptides (b) of SPI (n=3)

2.6 双酶拟合后酶 II 添加量的确定

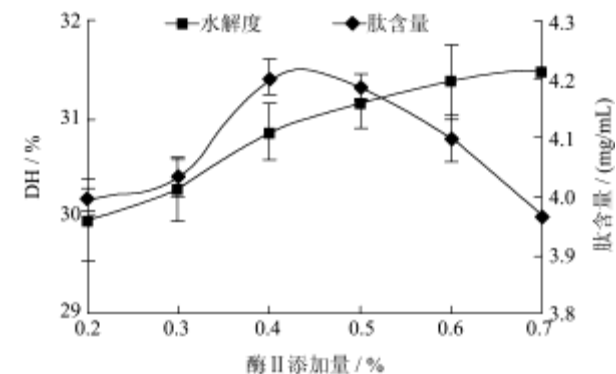


图 4 酶 II 与底物比对双酶水解效果的影响 (n=3)

Fig.4 Effect of ratio of Flavourzyme to substrate on DH of SPI

酶 I 水解一定时间以后, 底物蛋白发生了一定的边化, 因此需要对酶 II 的添加量进一步的研究。根据酶 II 正交试验结果设置试验点为 0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6%、0.7%, 按照 2.2.5 的方法进行试验, 分别测定水解液的 DH 和肽含量。结果如图 4。根据图 4, 综合考虑 DH 和肽含量, 确定酶 II 添加量为 0.4%。

2.7 响应曲面试验结果分析与条件优化

通过酶 I、酶 II 最优条件选择实验及双酶拟合实验发现, 酶解温度、酶 I 作用时间、酶 I 和酶 II 共同作用时间、酶 II 的添加量对酶解结果有较大的影响。以酶解温度 (A)、酶 I 作用时间 (B)、酶 I 和酶 II 共同作用时间 (C)、酶 II 的添加量 (D) 为试验因素, 以肽含量为试验指标, 根据 Box-Benheken 试验设计进行响应面实验, 试验设计及响应值结果如表 2 所示。Design Expert 8.0 软件分析肽含量回归模型的显著性。结果显示, 总回归 $F=14.50$, $P<0.01$, 说明总回归显著; 失拟项 $F=5.46$, $P=0.0581>0.05$, 说明总回归不显著, 说明该实验模型拟合较好, 可以应用于该反应的理论预测, 根据回归系数, 可得二次多项回归方程:

肽含量 = $-125.72060 + 4.30497A + 7.66272B + 0.55777C + 6.9008D - 0.10223AB + 0.0223AC - 0.10410AD - 0.036861A^2 - 0.86173B^2$ 。拟合方程中, A^2 项和 B^2 项的系数绝对值大于其余各二次项系数绝对值, 结合这两项系数的显著性分析结果, 说明酶解温度和酶 I 单独作用的时间对水解液中肽含量影响较大。

上述分析可知, 排除 pH 的影响, 温度和 Alcalase 2.4L 单独作用时间对肽含量有较为显著的影响。图 5 列出了它们与各因素间交互作用的响应曲面图。图 6a 中, 温度一定时, 随着酶 I 单独作用时间的延长, 肽含量增加趋势渐缓, 温度不同时, 肽含量取得最大值时的酶解时间变化较明显; 图 6b 中, 温度一定时, 双酶联合作用时间对肽含量的影响不显著, 与温度的交互作用不明显; 图 6c 中, 酶 I 作用时间一定时, 随着双酶联合作用时间的延长, 肽含量先增加后下降, 但双酶作用时间一定时, 随着酶 I 单独作用时间的变化, 肽含量也呈现先增加后下降的趋势; 图 6d 与图 6c 相似, 酶 II 添加量与酶 I 单独作用时间交互作用不显著。

预测最优组合: 温度 $53.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 酶 I 作用时间 105 min, 酶 I、酶 II 共同作用时间 125 min, 酶 II 添加量 0.444%, 此时肽含量为 4.25 mg/mL , DH 为 31.15%。在此条件下经经验证试验, 取温度 $53\text{ }^{\circ}\text{C}$, I 作用时间 105 min, 酶 I、酶 II 共同作用时间 125 min, 酶 II 添加量 0.444%, 发现肽含量为 4.26 mg/mL , DH 为 30.97%, 与理论预测值相差不显著。这一结果达到了预期, 提高了肽的产量, 一定程度上节约了成本, 对实践生产具有很大的帮助。

3 结论

酶的单一性使得单一酶对底物的切割位点有限, 致使底物蛋白水解不完全, 影响肽的的率。本实验选用内切酶与外切酶相结合的方法, 首先确定了两种酶单独水解时的最适条件, 再根据两种酶作用条件之间

的差异, 对两种酶进行拟合, 并通过相应面建立了温度、酶 I 作用时间、酶 I 和酶 II 共同作用时间、酶 II 添加量对肽含量的影响的二次回归模型, 对两酶拟合后的酶解条件进行优化, 得到双酶法制备葵花籽肽的最佳工艺。结合单酶实验结果和响应面优化模型确定双酶法制备葵花蛋白肽的最佳工艺条件为: 底物浓度 $5.0 \times 10^{-2}\text{ g/mL}$, 温度为 $53.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, Alcalase 2.4L 酶解 pH 为 8.5, 酶/蛋白为 $1.0 \times 10^{-2}\text{ g/g}$, 作用时间为 104 min; Flavourzyme 酶解 pH 为 7.5, 酶/蛋白为 $0.44 \times 10^{-2}\text{ g/g}$, 作用时间为 120 min。最佳水解条件下肽含量为 4.249 mg/mL , DH 为 30.97%。

表 8 响应曲面法优化酶解条件的试验结果

Table 8 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	A	B	C	D	肽含量/(mg/mL)	DH/%
1	55	1.0	2.5	0.4	3.49	26.92
2	60	1.5	2.0	0.5	2.55	21.68
3	50	1.0	2.0	0.4	2.76	22.12
4	55	1.0	2.0	0.3	3.86	27.76
5	60	2.0	2.0	0.4	2.77	22.81
6	60	1.5	1.5	0.4	2.59	22.06
7	55	1.5	2.0	0.4	4.20	30.97
8	55	1.0	1.5	0.4	3.98	28.83
9	60	1.5	2.5	0.4	2.61	21.16
10	55	1.5	2.0	0.4	4.28	30.03
11	55	1.5	2.0	0.4	4.18	29.99
12	55	2.0	2.5	0.4	3.95	31.12
13	55	2.0	2.0	0.3	3.97	29.87
14	60	1.5	2.0	0.3	3.27	24.19
15	55	1.5	1.5	0.5	3.87	28.37
16	55	1.5	1.5	0.3	3.67	27.27
17	50	2.0	2.0	0.4	3.70	25.15
18	55	1.5	2.5	0.5	4.20	30.97
19	55	1.5	2.0	0.4	4.02	31.02
20	55	1.5	2.5	0.3	3.99	31.09
21	50	1.5	2.0	0.5	3.71	27.92
22	60	1.0	2.0	0.4	2.85	21.81
23	50	1.5	2.5	0.4	3.44	26.01
24	55	2.0	2.0	0.5	3.83	31.15
25	55	1.5	2.0	0.4	4.20	29.98
26	55	2.0	1.5	0.4	3.98	27.71
27	55	1.0	2.0	0.5	3.79	28.17
28	50	1.5	1.5	0.4	3.64	25.97
29	50	1.5	2.0	0.3	3.39	24.09

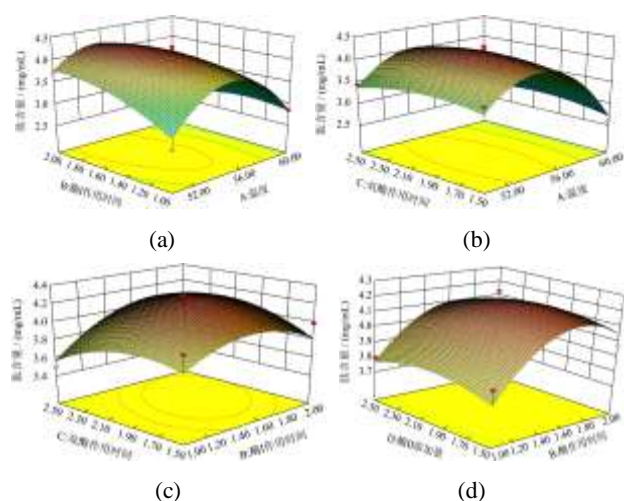


图5 各因素交互作用对肽含量影响的响应曲面图和等高线图
Fig.5 Response surface and contour plots for the factors on stimulation index

参考文献

[1] 彭喜洋,阮美娟.葵花籽酸性植物蛋白饮料的稳定性研究[J]. 现代食品科技,2011,27(2):196-198.

[2] Salgado P R, Drago S R, Molina Ortiz S E, et al. Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale[J]. LWT - Food Science and Technology, 2012,45(1):65-72

[3] Ordóñez C, Benítez C, González J L. Amino acid production from a sunflower wholemeal protein concentrate [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 4749-4754

[4] González-Pérez S J M V. Sunflower proteins overview of their physicochemical, structural and functional properties [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008(87): 2172-2191

[5] 冷玉娴.水酶法提取葵花籽油和葵花籽蛋白的回收[D].江南大学,2007

[6] Pablo R. Salgado S E M O. Sunflower Protein Concentrates and Isolates Prepared from Oil Cakes Have High Water Solubility and Antioxidant Capacity[J]. 2011(88): 351-360

[7] Jian Ren X Z X L. Purification and Characterization of Antioxidant Peptide from Sunflower Protein Hydrolysate[J]. Food Technol. Biotechnol,2010, 4(48): 519-523

[8] Megías C, Pedroche J, Yust M D M, et al. Purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from sunflower protein hydrolysates by reverse-phase chromatography following affinity purification[J]. LWT - Food Science and Technology, 2009, 42(1): 228-232

[9] Megías C, Pedroche J, Yust M M, et al. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin [J]. LWT - Food Science and Technology, 2008, 41(10): 1973-1977

[10] Pickardt C, Weisz G M, Eisner P, et al. Processing of low polyphenol protein isolates from residues of sunflower seed oil production[J]. Procedia Food Science, 2011, 1: 1417-1424

[11] Salgado P R, López-Caballero M E, Gómez-Guillén M C, et al. Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 29(2): 374-381

[12] 刘艳芳,马歌丽.薄层色谱-分光光度法测定葵花籽粕中的绿原酸[J].现代食品科技,2007,23(11):80-81

[13] 贾建.乳清蛋白酶解工艺参数优化及酶解产物功能特性的研究[D].黑龙江八一农垦大学,2008

[14] 鲁伟,任国谱,宋俊梅.蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J].食品科学,2005,7:169-171