

# 基于响应面法优化 $\alpha$ -淀粉酶 酶解鹰嘴豆淀粉工艺及建模的研究

高义霞, 王淑芳, 王丹丹, 王廷璞\*

(天水师范学院生物工程与技术学院, 甘肃天水 741001)

**摘要:**以葡萄糖值(DE)为考察指标,利用单因素实验和响应面法研究温度、pH及酶与底物比(E/S)对 $\alpha$ -淀粉酶酶解鹰嘴豆淀粉制糖的影响。应用Lineweaver-Burk和Wilkinson统计法分别求解米氏常数( $K_m$ )和最大反应速度( $V_m$ ),并建立相应的动力学模型。结果表明: $\alpha$ -淀粉酶酶解鹰嘴豆淀粉制糖的最佳参数为:pH 6.5,温度 55 °C及E/S = 0.12 U/mg,验证值为23.103%  $\pm$  0.454%。在30~50 °C范围内, $E_a$  = 18.977 kJ/mol,  $\Delta H$  = 19.624 kJ/mol。该研究为鹰嘴豆淀粉工业制糖提供理论依据。

**关键词:**鹰嘴豆, 酶解, 动力学, 响应面

## Study on the processing optimization and modelling of enzymolysis for Chickpea starch based on response surface method

GAO Yi-xia, WANG Shu-fang, WANG Dan-dan, WANG Ting-pu\*

(College of Bioengineering and Technology, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China)

**Abstract:** Using dextrose equivalent value (DE) as an index, the effect of temperature, pH and the ratio of enzyme to substrate concentration (E/S) on enzymolysis of chickpea starch with  $\alpha$ -amylase were explored based on single experiment and response surface method. The Michaelis constant ( $K_m$ ), Maximum velocity ( $V_m$ ) and corresponding kinetics modeling were also established by Lineweaver - Burk plotting and Wilkinson statistical method, respectively. The results indicated that the optimal parameters were pH 6.5, temperature 55 °C and E/S value 0.12 U/mg, and the verification value was 23.103%  $\pm$  0.454%.  $E_a$  and  $\Delta H$  were 18.977 kJ/mol and 19.624 kJ/mol in the temperature range of 30 °C to 50 °C, respectively. The study might provide a theory basis for industrial production of sugar from chickpea starch.

**Key words:** Chickpea; enzymolysis; kinetics; response surface method

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)15-0087-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.15.010

鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.), 又称桃豆、鸡豌豆等, 豆科鹰嘴豆属植物<sup>[1]</sup>, 淀粉含量高达40%~60%<sup>[2]</sup>, 具有降血糖、降血脂<sup>[3]</sup>和抗肿瘤<sup>[4]</sup>等活性。鹰嘴豆淀粉消化率低、酶解过程与淀粉浓度、pH、温度、酶类型及离子强度等有关, 常规米氏方程难以真实描述反应过程<sup>[5]</sup>, 而实际生产中, 须明确酶促反应条件及反应动力学特性, 以最大化发挥酶催化作用。随生淀粉酶等新型淀粉酶的出现, 直接选择淀粉颗粒作为底物进行水解成为一种趋势。

酶促反应动力学是研究酶促反应速度及其影响因素的学科, 在酶的结构、功能、作用机制、反应条件及代谢中作用等研究中, 具有重要的理论和实践意义。钟昔阳<sup>[6]</sup>利用 $\alpha$ -淀粉酶对小麦面粉进行了动力

学研究, 结果表明, Wilkinson法预测值与实测值基本吻合。张国权<sup>[7]</sup>利用真菌淀粉酶对荞麦淀粉进行了动力学研究, 并计算了最大反应速度( $V_{max}$ )和米氏常数( $K_m$ )。张丽华<sup>[8]</sup>利用响应面法优化莲藕淀粉酶解工艺, 得到最优的酶量、温度和时间。姜绍通<sup>[9]</sup>利用响应面法对芋头淀粉碱性蛋白酶酶解工艺参数进行优化, 获得最优的时间、温度、pH和酶量工艺参数。

本实验以温度、pH及酶与底物比(E/S)为因素, 通过响应面法优化 $\alpha$ -淀粉酶酶解鹰嘴豆淀粉制糖的最佳工艺, 同时对酶解动力学模型进行研究, 为鹰嘴豆淀粉工业制糖提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

收稿日期: 2014-10-21

作者简介: 高义霞(1982-), 女, 硕士研究生, 讲师, 从事食品化学研究, E-mail: egaoxy@yeah.net。

\* 通讯作者: 王廷璞(1965-), 男, 研究员, 从事食品化学研究, E-mail: 15293557513@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金(31360603)。

鹰嘴豆 淀粉含量为 87%,新疆天山奇豆生物科技有限责任公司;  $\alpha$ -淀粉酶(58.7 U/mg) Sigma 产品(Lot: STBB0510, 来自枯草芽孢杆菌); 酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、亚硫酸氢钠、苯酚、葡萄糖等试剂为国产分析纯 购自生工生物工程股份有限公司。

AL204 型电子天平 梅特勒-托利多仪器有限公司; TGL-20M 型高速台式冷冻离心机 湖南湘仪离心机仪器有限公司; PHS-3D 型 雷磁 pH 计: 上海精密科学有限公司; 722 型可见分光光度计 上海欣茂有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 鹰嘴豆淀粉的酶解 糖含量测定参考 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法<sup>[10]</sup>。称取鹰嘴豆淀粉 0.1 g, 加入 20 mL 0.05 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲液, 搅拌, 80 °C 糊化 5 min, 冷却至 50 °C, 按 E/S = 0.01 U/mg 加入  $\alpha$ -淀粉酶, 振荡混匀, 50 min 后迅速沸水灭活 5 min, 测定吸光度, 计算葡萄糖值(DE)。

DE (%) = 还原糖量(mg) × 100 / [87% × 淀粉量(mg)] 式(1)

$$v \{ \text{mg}/(\text{mL} \cdot \text{min}) \} = \frac{m}{V \cdot t} \quad \text{式(2)}$$

式中:  $v$  为反应速度(mg/(mL·min)),  $m/V$  为还原糖含量(mg/mL);  $t$  为反应时间(min)。

1.2.2 单因素实验 在温度 50 °C, pH6.0, E/S 0.04 U/mg 条件下, 考察时间分别为 5、10、20、30、40、50、70、90、110、140、170、200 min 时其对 DE 的影响; 在 pH6.0, E/S 0.04 U/mg, 时间 50 min 条件下, 考察温度分别为 30、40、50、60、70 °C 时其对 DE 的影响; 在温度 50 °C, E/S 0.04 U/mg, 时间 50 min 条件下, 考察 pH 分别为 4、5、6、7、8 时其对 DE 的影响; 在温度 50 °C, 时间 50 min, pH7.0 条件下, 考察 E/S 分别为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.16 U/mg 时其对 DE 的影响。

1.2.3 酶促反应动力学建模 Michaelis 和 Menten 根据快速平衡学说建立米氏方程, Briggs 和 Haldane 用稳态代替快速平衡态, 对米氏方程做了修正, 得到更合理的酶促反应动力学过程。推导过程简述如下<sup>[11]</sup>:



$$v = \frac{k_3 E_{\text{总}} [S]}{(k_2 + k_3)/k_1 + [S]} \quad \text{式(4)}$$

$$k_m = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1} \quad \text{式(5)}$$

$$v_m = k_3 E_{\text{总}} \quad \text{式(6)}$$

$$v = \frac{V_m [S]}{k_m + [S]} \quad \text{式(7)}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m [S]} \quad \text{式(8)}$$

式中,  $k_1$  为 ES 生成速度;  $k_2$ 、 $k_3$  分别为 ES 分解为 E + S 和 P + E 的速度;  $k_4$  为 E + P 生成 ES 的速度(反映初期忽略不计)。[S] 为底物浓度(mg/mL);  $E_{\text{总}}(\text{U/mL}) = [E] + [ES]$ 。利用(8)式求  $K_m$  和  $V_m$ <sup>[12]</sup>。

1.2.4 酶量对反应速度的影响 在反应时间 7 min、pH 7.0、底物浓度 20 mg/mL 条件下, 分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mL U/mL 酶, 测定酶量对反应速度的影响。

1.2.5 响应面法优化酶解工艺 参考李忠海等<sup>[13]</sup>, 以 pH、温度及 E/S 为因子, 各因子最优点为基准点, 确定适度步长, DE 为响应值, 利用 Design-Expert 8.06 软件设计 Box-Behnken 实验, 实验见表 1。在最优工艺条件 pH6.5, 温度 55 °C 及 E/S 0.12 U/mg 进行验证实验。

表 1 Box-Behnken 实验因素水平及编码

编码	X <sub>1</sub> pH	X <sub>2</sub> 温度(°C)	X <sub>3</sub> (E/S) (U/mg)
-1	6.5	45	0.08
0	7	50	0.1
1	7.5	55	0.12

## 1.3 数据处理

利用 Origin 7.5 软件(OriginLab 公司)作图, Design-Expert 8.06 软件(stat-ease 公司)进行响应面分析, 数据以平均值 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。相对标准偏差 RSD(%) = 标准偏差/平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线的制作

DNS 法测定糖含量的标准曲线方程为  $Y = 1.629X - 0.042$ ,  $r = 0.997$  (X 为葡萄糖质量, mg, Y 为吸光度, A)。

### 2.2 单因素实验

时间对 DE 的影响见图 1, 在 0~50 min 范围内, 随着时间的增加, DE 逐渐增大, 随后出现下降, 可能是复合糖生成速度逐渐接近、甚至超过淀粉水解速度, 即存在较弱的复合反应, 故 DE 的生成将趋于平稳<sup>[14]</sup>, 据此, 后续研究中时间选择 50 min。

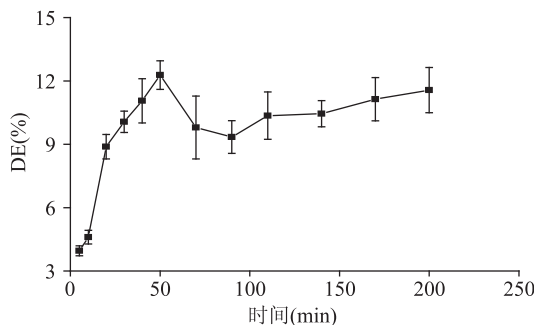


图 1 时间对 DE 的影响

Fig.1 Effect of time on DE

温度对 DE 的影响见图 2, 在 30~50 °C 范围内, 随温度升高, 酶与底物间碰撞次数增加, DE 增加, 50 °C 时达最大值, 为最适温度; 另一方面, 当温度增至 50 °C 以上时, 酶逐渐失活, DE 下降。

pH 对 DE 的影响见图 3, pH7.0 时, DE 达到最大值, 为最适 pH。pH 影响酶活性中心必需基团和底物的解离程度, 从而影响酶与底物的结合, 并最终影响 DE 的生成<sup>[15]</sup>。

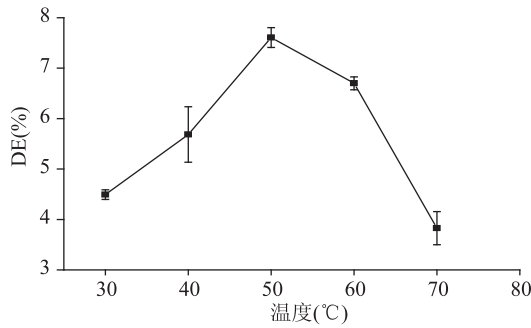


图2 温度对DE的影响

Fig.2 Effect of temperature on DE

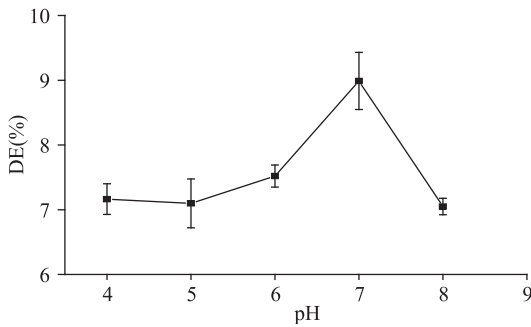


图3 pH对DE的影响

Fig.3 Effect of pH on DE

E/S对DE的影响见图4,随E/S的增加,酶解速度几乎呈线性增长,原因是反应初期底物过量,酶促反应速度与酶量成正比;随E/S的进一步增大,底物逐渐不足,反应速度趋于平稳<sup>[16]</sup>。因此E/S选择0.1 U/mg。

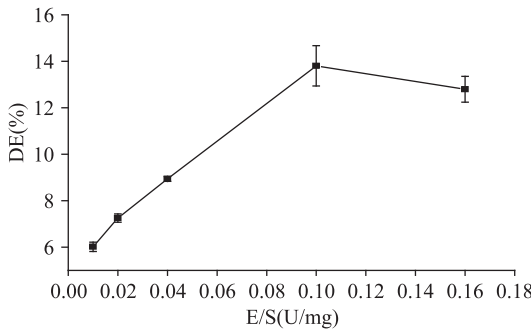


图4 E/S对DE的影响

Fig.4 Effect of E/S on DE

### 2.3 响应面分析

$$Y = -140.651 + 30.884X_1 + 2.233X_2 + 115.114X_3 - 0.367X_1X_2 - 50.268X_1X_3 + 3.439X_2X_3 - 0.821X_1^2 + 2.436X_2^2 - 610.919X_3^2$$

Box-Behnken结果及方差分析见表2和表3,方程具有显著性( $p = 0.0263$ ),表明模型显著。失拟项 $p = 0.213 > 0.05$ ,失拟不显著,回归模型与实际情况拟合较好。pH极显著,E/S影响显著,温度影响不显著。各因素影响大小依次为pH、E/S及温度。交互项影响均不显著。最优工艺为:pH 6.5,温度55 °C及E/S 0.12 U/mg。在此条件下进行验证,结果见表4。

表2 Box-Behnken 实验设计表及结果

Table 2 Box-Behnken design matrix and experimental results

实验号	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	DE(%)
1	1	0	-1	15.524
2	-1	1	0	20.540
3	0	0	0	19.433
4	1	1	0	15.242
5	0	1	-1	18.505
6	0	-1	-1	17.480
7	-1	0	1	22.851
8	-1	-1	0	19.814
9	0	0	0	18.671
10	0	-1	1	18.600
11	0	0	0	17.719
12	0	0	0	19.528
13	0	0	0	17.877
14	0	1	1	21.000
15	-1	0	-1	19.063
16	1	0	1	17.301
17	1	-1	0	18.190

表3 回归模型系数显著性检验及其方差分析

Table 3 Significance test of regression coefficient and its variance analysis

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	p
模型	48.02	9	5.34	4.73	0.0263
X <sub>1</sub>	32.04	1	32.04	28.41	0.0011
X <sub>2</sub>	0.18	1	0.18	0.16	0.7008
X <sub>3</sub>	10.53	1	10.53	9.34	0.0184
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	3.37	1	3.37	2.99	0.1273
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1.01	1	1.01	0.90	0.3754
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.47	1	0.47	0.42	0.5379
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	0.18	1	0.18	0.16	0.7036
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.000156	1	0.000156	0.000138	0.990900
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.25	1	0.25	0.22	0.6512
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	48.02	9	5.34	4.73	0.0263
残差	7.90	7	1.13		
失拟项	5.05	3	1.68	2.36	0.213
纯误差	2.85	4	0.71		
总变异					

表4 验证实验

Table 4 Verification testing

实验号	DE(%)		相对误差(%)
	预测值	真实值	
1	23.755	23.899	0.605
2	23.755	23.092	2.870
3	23.755	22.805	4.166
4	23.755	22.653	4.865
5	23.755	23.309	1.913
6	23.755	22.857	3.931

验证实验平均值为(23.103% ± 0.454%, n = 6), RSD = 1.964%,模型有效,可用于鹰嘴豆淀粉酶解参数的优化。酶解效率较低,其原因一方面由于α-淀粉酶首先作用于较容易水解的无定形区,随后残留的结晶区将部分地限制其水解<sup>[17]</sup>,另一方面与淀粉

分子中直链淀粉与支链淀粉的比例、颗粒大小、形状、结晶结构和结晶度等有关<sup>[18]</sup>。另外,鹰嘴豆中脂类化合物易与直链淀粉形成复合物,该复合物对淀粉颗粒的糊化、膨胀和溶解具有较强的抑制作用,对酶水解耐受性强<sup>[19]</sup>。

## 2.4 酶量对酶促反应速度的影响

酶量与反应速度的关系见图5,当底物过量时,酶促反应速度与酶量成正比。时间与反应速度的关系见图6,在0~7 min时间与反应速度线性较好,测定时间太短,反应速度误差较大,测定时间太长,则线性程度降低,综合考虑,确定酶促反应线性测定时间为7 min。

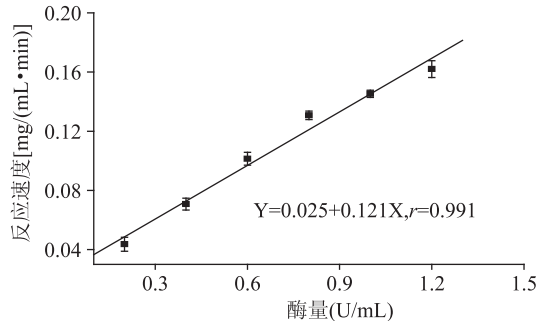


图5 酶量对酶促反应速度的影响

Fig.5 Effect of enzyme concentration on reaction velocity

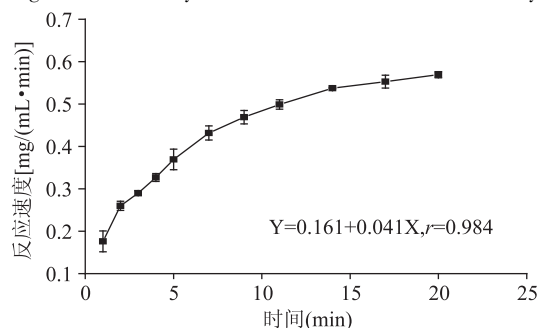


图6 反应时间的确定

Fig.6 Determination of reaction time

## 2.5 Lineweaver-Buck 法求解参数

V-S 曲线见图7,以1/V为纵坐标,1/S为横坐标,见图8,  $Y = 48.546X + 5.054$ ,  $r = 0.992$ 。计算得  $V_m = 0.198 \text{ mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ ,  $K_m = 9.605 \text{ mg}/\text{mL}$ 。

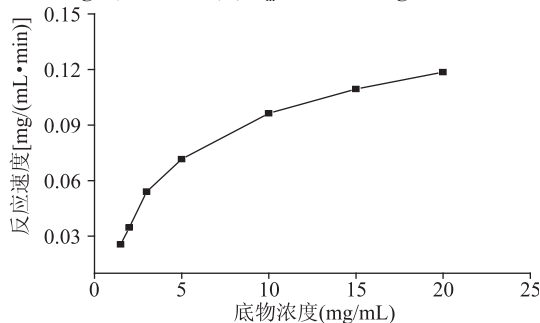


图7 反应速度与底物浓度的关系

Fig.7 Relationship of reaction velocity and substrate concentration

## 2.6 Wilkinson 统计法求解参数

2.6.1 最小二乘法求估算解 Wilkinson 统计法求

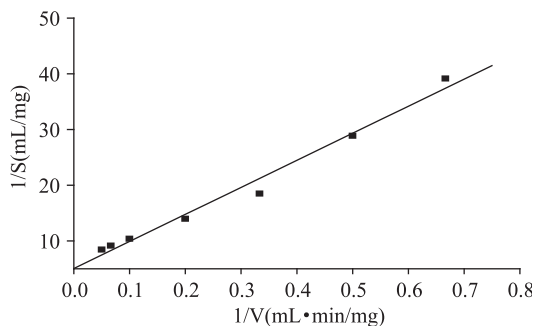


图8 双倒数作图

Table 8 Double-reciprocal plot

解,  $V_m = 0.155 \text{ mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ ,  $K_m = 6.043 \text{ mg}/\text{mL}$ , 式中  $V_m^0$  和  $K_m^0$  分别为最大反应速度和米氏常数估算值。

2.6.2 泰勒展开式求精校解 Wilkinson 法求得精确解为  $V_m = 0.132 \text{ mg}/\text{mL} \cdot \text{min}$ ,  $K_m = 5.736 \text{ mg}/\text{mL}$ 。

2.6.3 Lineweaver-Buck 法和 Wilkinson 统计法的比较 由表5可知, Lineweaver-Buck 法和 Wilkinson 统计法计算结果有一定的差别。当淀粉浓度较低时, Lineweaver-Buck 法<sup>[20]</sup>取倒数后误差较大, 偏离直线较远, 且  $[S]$  适合范围一般为在  $0.33 K_m \sim 2K_m$ , 因此影响  $K_m$  和  $V_m$  的准确性, 但该方法方便快捷, 计算量小<sup>[21]</sup>。Wilkinson 统计法结果可靠<sup>[22]</sup>。综合考虑各方面因素, 最终采用 Wilkinson 统计法计算结果, 最终得出  $V_m = 0.132 \text{ mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ ,  $K_m = 5.736 \text{ mg}/\text{mL}$ 。

表5 Lineweaver-Buck 法和 Wilkinson 统计法数据比较

Table 5 Comparison of  $V_m$  and  $K_m$  values calculated by the Lineweaver-Buck and Wilkinson methods

方法	$K_m$ (mg/mL)	$V_m$ {mg/(mL·min)}
Lineweaver-Buck 法	9.605	0.198
Wilkinson 统计法	5.736	0.132

## 2.7 $E_a$ 及 $\Delta H$ 计算

在  $30 \sim 50 \text{ }^\circ\text{C}$  范围内, 反应速度随温度的增加而增大, 以  $\ln v$  对  $1/T (\times 10^3)$  作图, 见图9, 呈直线关系, 用阿累尼乌斯 (Arrhenius) 方程拟合。

$$\ln K_3 = -\frac{E_a}{RT} + B \quad \text{式(9)}$$

式中:  $R$  为气体常数  $8.31 \text{ J}/(\text{mol} \cdot \text{K})$ ;  $E_a$  为活化能 ( $\text{kJ}/\text{mol}$ );  $B$  为积分常数。

$$K_3 = A \times \exp(-E_a/RT) \quad \text{式(10)}$$

式中,  $A$  为指前因子  $\{\text{mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})\}$ 。

以  $\ln V$  为纵坐标,  $1/T (\times 10^3)$  为横坐标,  $Y = 4.654 - 2.284X$ ,  $r = 0.97$ 。求得  $E_a = 18.977 \text{ kJ}/\text{mol}$ ,  $A = 104.962 \text{ mg}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ 。

$$\ln K_s = -\Delta H/RT + \ln C \quad \text{式(11)}$$

$K_3 \geq K_2$ ,  $K_s \approx K_m$ , 以不同温度下  $K_m$  与  $1/T$  回归, 见图10, 以  $\ln K_s$  为纵坐标,  $1/T (\times 10^3)$  为横坐标,  $Y = 7.078 - 1.76X$ ,  $r = 0.99$ 。求得  $\Delta H = 19.624 \text{ kJ}/\text{mol}$ 。

## 3 结论

本实验结合单因素实验和响应面法优化  $\alpha$ -淀粉酶解鹰嘴豆淀粉的工艺参数, 并对酶解动力学进行研

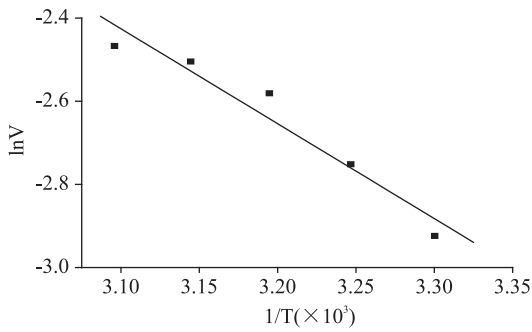


图9 lnv 与 1/T 的关系

Fig.9 Relationship between lnv and 1/T

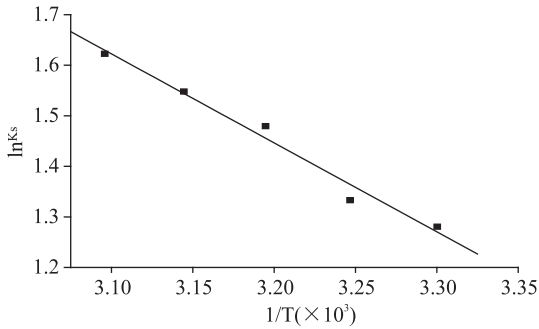


图10 lnKs 与 1/T 的关系

Table 10 Relationship between lnKs and 1/T

究。结果表明:酶解工艺为:pH 6.5,温度55℃和 E/S 0.12 U/mg。在此条件下,DE 验证值为 23.103% ± 0.454%, RSD = 1.964%。利用 Lineweaver - Burk 及 Wilkinson 统计法进行了数学回归,并分析比较后选择 Wilkinson 统计法,求解得动力学参数  $K_m = 5.736 \text{ mg/mL}$ ,  $V_m = 0.132 \text{ mg/(mL} \cdot \text{min)}$ 。在 30~50℃ 范围内,  $E_a = 18.977 \text{ kJ/mol}$ ,  $\Delta H = 19.624 \text{ kJ/mol}$ ,该模型推导过程中,各因子影响水解速度的数据拟合,方程相关性高,表明用米氏方程对  $\alpha$ -淀粉酶酶解鹰嘴豆淀粉的动力学过程进行描述和模拟式有效的。

参考文献

[1] Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. Affinity purification and characterization of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2011, 129(2): 485-490.  
 [2] Chavan J K, Kadam S S, Salunkhe D K. Biochemistry and technology of chickpea (Cicer arietinum L) seeds[J]. CRC Critical  
 (上接第 86 页)  
 ingredients[J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18: 81-89.  
 [10] 陈克复, 卢晓江, 金醇哲, 等. 食品流变学及其测量[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1989.  
 [11] 黄哲, 王锐. 明胶水溶液流变学行为的研究[J]. 明胶科学与技术, 2012, 32(2): 64-69.  
 [12] 刑本刚, 梁宏. FT-IR 在蛋白质二级结构研究中应用进展[J]. 广西大学学报: 自然科学版, 1997, 15(3): 45-49.  
 [13] 翁武银, 吴菲菲, 大迫一史, 等. 蛋白浓度对罗非鱼皮明胶高温干燥成膜的影响[J]. 农业机械学报, 45(7): 209-215.  
 [14] 涂宗财, 黄涛, 王辉, 等. 3 种淡水鱼鳞明胶成膜性的比较

Reviews in Food Science and Nutrition, 1986, 25: 107-132.  
 [3] 张金波, 苗昊翠, 王威, 等. 鹰嘴豆的应用价值及其研究与利用[J]. 作物杂志, 2011(1): 10-12.  
 [4] 高捷, 王华, 寇晓虹, 等. 鹰嘴豆肽抑制肿瘤作用和对免疫功能的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(3): 215-219.  
 [5] 黎金, 张国权, 罗勤贵. 荞麦蛋白的碱性蛋白酶酶解动力学研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(6): 41-46.  
 [6] 钟昔阳, 杨积东, 汤玉清, 等.  $\alpha$ -淀粉酶酶解小麦面粉动力学模型研究[J]. 食品科学, 2012, 33(7): 96-100.  
 [7] 张国权, 史一一, 魏益民, 等. 荞麦淀粉的真菌淀粉酶酶解动力学研究[J]. 农业工程学报, 2007, 23(5): 42-46.  
 [8] 张丽华, 韩永斌, 孙晶, 等. 响应面法优化莲藕淀粉的酶解工艺参数研究[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(10): 81-84.  
 [9] 姜绍通, 殷嘉忆, 王华林, 等. 响应面法优化酶法提取芋头淀粉工艺参数[J]. 食品科学, 2014, 35(6): 24-29.  
 [10] 张惟杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 杭州: 浙江大学出版社(第二版), 1999: 10-11.  
 [11] 任省涛, 程可可, 宋安东, 等. 蒸汽爆破玉米秸秆酶解动力学[J]. 生物工程学报, 2011, 27(4): 592-597.  
 [12] 袁勤生, 赵健. 酶与酶工程[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 2005.  
 [13] 李忠海, 刘建军, 钟海雁, 等. 响应面法优化甘薯淀粉酶解条件的研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(10): 64-69.  
 [14] 齐明, 房书, 沙同胜, 等. 葡萄糖收率-糖化反应的研究[J]. 牡丹江医学院学报, 1993, (S1): 29-31.  
 [15] 蔡丽华, 马美湖. 4 种常用蛋白酶对牛骨蛋白的酶解动力学研究[J]. 食品科学, 2010, 31(5): 150-154.  
 [16] 郑宝东. 食品酶学[M]. 南京: 东南大学出版社, 2006, 88.  
 [17] 二国二郎. 淀粉科学手册[M]. 王薇青等译. 北京: 中国轻工业出版社, 1990.  
 [18] 于轩, 李兆丰, 顾正彪, 等. 淀粉结构对其酶解性能影响的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(4): 137-140.  
 [19] Holm J, Björck I, Ostrowska S, et al. Digestibility of amylase-lipid complexes in-vitro and in-vivo[J]. Starch, 1983, 35(9): 294-297.  
 [20] Komolprasert V, Ofoli R. Starch hydrolysis kinetics of Bacillus licheniformis  $\alpha$ -amylase[J]. Journal Chem Tech Biotechnol, 1991, 51: 209-223.  
 [21] 赵燕, 涂勇刚, 郭建军, 等. 玉米淀粉的  $\beta$ -淀粉酶酶解动力学研究[J]. 食品科学, 2009, 30(17): 190-194.  
 [22] 钟穗生, 刘生玉, 张林香. 马铃薯淀粉糖化动力学的研究[J]. 中国粮油学报, 1998, 13(1): 21-25.  
 [J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(2): 151-154.  
 [15] Krimm S, Bandekar J. Vibrational analysis of peptides, polypeptides and proteins. V. Normal vibrations of  $\beta$ -turns[J]. Biopolymers, 1980, 19(1): 1-29.  
 [16] 李季衡, 李洋, 李国英. 戊二醛对胶原溶液热稳定性的影响[J]. 皮革科学与工程, 2009, 19(1): 14-17.  
 [17] (美) 舍伍德 (Sherwood, D.) 著; 范世藩译. 晶体、X 射线和蛋白质[M]. 北京: 科学出版社, 1985.  
 [18] 夏雨, 焦志华, 刘海英. 茶多酚对明胶的改性作用[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(10): 36-40.