



马铃薯产业与现代可持续农业

MALINGSHU CHANYE YU XIANDAI KECHIXU NONGYE

(2015)

屈冬玉 陈伊里◎主编

哈尔滨地图出版社

图书在版编目(CIP)数据

马铃薯产业与现代可持续农业 / 屈冬玉, 陈伊里主编. -- 哈尔滨: 哈尔滨地图出版社, 2015. 6
ISBN 978 - 7 - 5465 - 1218 - 1

I. ①马… II. ①屈… ②陈… III. ①马铃薯 - 产业发展 - 研究 - 中国 IV. ①F326. 11

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 149927 号

哈尔滨地图出版社出版发行

(地址: 哈尔滨市南岗区测绘路 32 号 邮政编码: 150086)

哈尔滨市石桥印务有限公司印刷

开本: 787 mm × 1 092 mm 1/16 印张: 28.5 字数: 658 千字

2015 年 6 月第 1 版 2015 年 6 月第 1 次印刷

ISBN 978 - 7 - 5465 - 1218 - 1

印数: 1 ~ 2 000 定价: 100.00 元

马铃薯产业与现代可持续农业

MALINGSHU CHANYE YU
XIANDAI KECHIXU NONGYE

(2015)

主 编 屈冬玉 陈伊里
副主编 吕文河 金黎平 谢开云
石 瑛 黄宇清 闫洪志

哈尔滨地图出版社

· 哈尔滨 ·

川北山区生态型马铃薯种质资源的保护和利用初探

..... 方 军, 罗仁革, 牟文平, 等(246)

不同生态区马铃薯品种(系)在中原二季作地区生产

评价..... 陈广侠, 董道峰, 刘 芳, 等(249)

中国马铃薯主栽品种块茎中蛋白质含量分析..... 王中平, 郭华春(257)

马铃薯晚疫病水平抗性材料的筛选与电镜观察..... 周 倩, 刘甜甜, 吴秋云, 等(262)

马铃薯新品种“中薯 18 号”选育 段绍光, 庞万福, 卞春松, 等(267)

马铃薯新品种“中薯 20 号”选育 段绍光, 庞万福, 卞春松, 等(269)

栽 培 生 理

全膜双垄沟一膜两年用不同播种密度对马铃薯生长及

产量的影响..... 杨祁峰, 折翰非, 熊春蓉, 等(273)

“中薯 18 号”不同种植密度对马铃薯块茎数量、大小

和产量的影响研究..... 庞万福, 卞春松, 金黎平, 等(279)

植物生长抑制剂 CCC、PP₃₃₃对马铃薯试管苗保存的研究

..... 刘俊秀, 李苗苗, 张剑峰, 等(282)

气候变化对重庆市马铃薯产量及虚拟水含量的影响

..... 牟新利, 刘 成, 张 露, 等(290)

马铃薯胰蛋白酶抑制剂活力的测定..... 曾凡逵, 康宪学, 刘 刚(294)

冬种马铃薯黑地膜覆盖栽培技术..... 唐洲萍, 何虎翼, 覃少军, 等(301)

湖南省冬闲田马铃薯防寒早熟栽培技术..... 王素华, 杨 丹, 王中美, 等(305)

电导率法配合 Logistic 方程确定马铃薯低温驯化前后

叶片的半致死温度..... 巩慧玲, 冯再平, 蒋继明(309)

黑龙江垦区马铃薯“四优一管”高产栽培技术 金光辉, 姜丽丽, 李玉成(314)

不同颜色地膜覆盖对广东省冬种马铃薯的影响..... 李小波, 安 康, 何 琴, 等(318)

马铃薯水培薯无土繁殖原原种技术..... 张远学, 黄大恩, 沈艳芬, 等(324)

呼伦贝尔市马铃薯生育期耗水与降水同步性分析..... 王贵平, 吕 森, 金 森, 等(327)

赤霉素诱导马铃薯二季种出芽效果及对春播性状与产

量的影响..... 徐 茜, 黎 华(332)

外源蔗糖供应对马铃薯块茎形成的影响..... 王迎男, 秦永林, 苏亚拉其其格, 等(339)

马铃薯地膜垄上微沟种植对商品性及产量的影响..... 任稳江, 任 亮(344)

黑麻土中“陇薯 7 号”脱毒一级种适宜施肥量和栽培

密度研究..... 谢奎忠, 罗爱花, 文国宏, 等(349)

马铃薯胰蛋白酶抑制剂活力的测定

曾凡逵¹, 康宪学², 刘刚^{1*}

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所/环境材料与生态化学研究发展中心, 甘肃 兰州 730000; 2. 甘肃薯界淀粉有限公司, 甘肃 定西 730510)

胰蛋白酶抑制剂在植物来源的食品中广泛存在, 特别是豆科植物的种子, 如四棱豆 (*Psophocarpus tetragonolobus*)、大豆 (*Glycine max*)、棉豆 (*Phaseolus lunatus*)、豇豆 (*Vigna unguiculata*)、印度黑绿豆 (Black gram)、鹰嘴豆 (Chick pea)、绿豆 (Mung bean)、木豆 (Pigeon pea)、刀豆 (*Canavalia*)、扁豆 (*Lens culinaris*)、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)、蚕豆 (*Vicia faba*) 等, 大麦 (*Hordeum vulgare*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、玉米 (Corn)、花生 (*Arachis hypogaea*)、米糠 (Rice bran) 中同样含有较多的胰蛋白酶抑制剂^[1]。

马铃薯中的蛋白酶抑制剂可以分成三类(不是按家族分)^[2,3]: 抑制剂 I, 为五聚体的丝氨酸蛋白酶抑制剂^[4]; 抑制剂 II, 为二聚体的丝氨酸蛋白酶抑制剂^[5,6]; 第三类抑制剂的分子量为 20 ~ 22 kDa, 这一类抑制剂又可以细分成四类, 分别为 Kunitz 型丝氨酸蛋白酶抑制剂^[7]、半胱氨酸蛋白酶抑制剂^[8,9]、天冬氨酸蛋白酶抑制剂^[10-12] 和羧肽酶抑制剂^[13,14]。上述不同类型的马铃薯蛋白酶抑制剂, 绝大部分对胰蛋白酶都具有抑制活力。

胰蛋白酶 (EC3. 4. 21. 4) 是一种典型的丝氨酸蛋白酶, 胰蛋白酶抑制剂活力测定的原理是通过抑制剂抑制胰蛋白酶活力的强弱来间接进行测定, 采用化学合成物质 $N\alpha$ -苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐 ($N\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride, BAPNA) 做底物, 该底物被胰蛋白酶水解以后会生成黄颜色的对硝基苯胺, 因此可以采用分光光度计测定, 检测波长为 410 nm^[1]。胰蛋白酶抑制剂的活力检测结果表达成被抑制的胰蛋白酶活力单位, 胰蛋白酶活力单位定义为在检测条件下吸光值每增加 0.01 即为一个活力单位。

大豆胰蛋白酶抑制剂的研究报道特别多, 金蓓和田少君^[15]对大豆胰蛋白酶抑制剂的研究进展进行了综述, 马铃薯蛋白酶抑制剂的研究鲜见报道^[16]。前期课题组对马铃薯蛋白酶抑制剂的分离进行了报道^[17,18], 阐述了蛋白酶抑制剂是导致马铃薯不能像甘薯一样适宜于生食的重要原因^[19], 还专门发表了一篇马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂活力的测定方法^[20], 本文作为姊妹篇详细阐述马铃薯胰蛋白酶抑制剂的活力测定方法。

作者简介: 曾凡逵(1980—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为马铃薯加工。

基金项目: 国家马铃薯产业技术体系专项(nycytx-15); 国家自然科学基金青年科学基金项目(31301532); 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目(科发人字[2013]165号)。

* **通信作者:** 刘刚, 男, 研究员, 博士, 研究方向为马铃薯加工, e-mail: gangliu@liep.cas.cn。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

$\text{Na}\alpha$ -苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐, 纯度 $\geq 98\%$, Sigma, 货号: B3133-250MG; 胰蛋白酶来源于牛胰腺 (Trypsin from bovine pancreas), Sigma, 货号: T8003-100MG; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型), 上海翊圣生物科技有限公司, 产品编号: 20201ES76。

1.2 仪器与设备

UV765 紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器; DNM-9602G 酶标分析仪, 上海普朗新技术有限公司; TDL-40B 型离心机, TGL-20B 型高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; 雷磁 PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; FA2004N 电子天平, 上海菁海仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 溶液配制

(1) 含 0.02 mol/L CaCl_2 的 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 值 8.2)。称取 6.05 g Tris 碱和 2.94 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶解到 900 mL 蒸馏水。用 HCl 将 pH 值调到 8.2 后, 添加蒸馏水补充体积到 1 L 。

(2) 底物溶液 (0.4 mg/mL)。将 40 mg BAPNA 溶解到 1 mL 二甲基亚砜, 然后用上一步配置好的 Tris-HCl 缓冲液稀释到 100 mL (Tris-HCl 缓冲液需要提前预热到 $37 \text{ }^\circ\text{C}$)。该底物溶液需要现配现用, 配置好以后置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用。为了避免 BAPNA 会发生沉降, 先将 BAPNA 溶解到二甲基亚砜 (置于冰箱中能够保存 1 个星期), 在使用前才将 BAPNA 的二甲基亚砜溶液用 Tris-HCl 溶液稀释。

(3) 0.001 mol/L HCl。取 0.09 mL 浓盐酸 (37% , w/v) 用蒸馏水稀释到 1 L 。

(4) 胰蛋白酶溶液 ($20 \text{ }\mu\text{g/mL}$)。将精确称量的 20 mg 胰蛋白酶溶解到 1 L 0.001 mol/L 的 HCl。该溶液在冰箱中放置 2~3 星期酶活不会降低。

1.3.2 蛋白酶抑制剂的提取

取一个马铃薯洗净去皮切成小块, 称 100 g 薯块, 用大约 100 mL 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液 (pH 值 7.6, 含 2 mmol/L 亚硫酸氢钠作为护色剂) 按物料比 1:1 进行打浆, 4 层纱布过滤后再用大约 100 mL 相同缓冲液冲洗滤渣。将滤液 8000 rpm 离心 30 min 分离淀粉, 上清液 (210 mL) 即为含马铃薯蛋白酶抑制剂的粗蛋白溶液。

1.3.3 蛋白含量测定

采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒用酶标仪 (96 孔板) 进行测定, 操作严格按照试剂盒说明书执行。

1.3.4 标准曲线制作

(1) 分别移取 $20 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 胰蛋白酶贮存液 1.0 、 1.5 、 2.0 、 2.5 和 3.0 mL 到 5 根不同的 15 mL 带盖塑料离心管, 再分别添加蒸馏水 3.0 、 2.5 、 2.0 、 1.5 和 1.0 mL 将体积补足到

4 mL。另取 5 根离心管按相同的比例添加胰蛋白酶贮存液和蒸馏水为空白对照。

(2) 将所有离心管放入 37 °C 恒温水浴中保温 10 min。在作为空白的 5 根离心管中分别添加 1 mL 30% 乙酸后再在所有 10 根离心管中分别添加 5 mL 预热到 37 °C 的 BAPNA 溶液。

(3) 将 10 根离心管中的样品用漩涡混匀器快速混匀后在 37 °C 条件下准确保持 10 min, 然后向 5 根没有添加乙酸的离心管中分别添加 1 mL 30% 乙酸终止反应。

(4) 将 10 根离心管用漩涡混匀器快速混匀后 4 000 rpm 离心 10 min, 以空白样品为对照测量对应样品在 410 nm 的吸光度。

(5) 一个胰蛋白酶的活力单位 (Trypsin unit, TU) 定义为在 37 °C 条件下, 10 mL 反应体系中酶解 10 min 后在 410 nm 的吸光值增加 0.01。

1.3.5 温度对胰蛋白酶抑制剂活力的影响

分别取稀释 20 倍的蛋白酶抑制剂样品溶液 0.5 mL 放入 8 根 15 mL 塑料离心管中(4 根离心管为空白对照组), 然后分别添加 1.5 mL 蒸馏水将体积补足到 2.0 mL, 在所有离心管中分别添加 2.0 mL 胰蛋白酶贮存液, 置于 37 °C 水浴中 10 min。另外取 4 根离心管用蒸馏水代替蛋白酶抑制剂用于分析不添加抑制剂情况下, 胰蛋白酶水解底物的情况。空白对照组添加 1.0 mL 30% 乙酸终止液, 然后在所有离心管中分别添加 5 mL BAPNA 溶液。分别取一根样品管、无抑制剂的管和一根空白管置于 23.7 °C (室温) 和 30、37、45 °C 恒温水浴中准确放置 10 min。样品组和无抑制剂组反应 10 min 后添加 1.0 mL 终止液。将所有离心管混匀后 4 000 rpm 离心 10 min, 以对应的空白样品为对照测量对应样品和无抑制剂体系在 410 nm 的吸光度, 以温度为横坐标 OD_{410} 为纵坐标绘图。

1.3.6 时间对胰蛋白酶抑制剂活力的影响

按照温度对胰蛋白酶抑制剂活力影响相同的方法, 分析反应时间对胰蛋白酶抑制剂活力的影响, 反应时间分别为 5、10、15 和 20 min。

1.3.7 蛋白酶抑制剂活力的测定

(1) 用移液器分别取 0.25、0.50 和 1.00 mL 蛋白酶抑制剂溶液(样品)到 15 mL 离心管中, 添加蒸馏水将体积补充到 2 mL, 另外取 3 根离心管按相同的比例添加样品和水作为空白对照, 实验需要另外做 2 个平行样。

(2) 空白管添加 1 mL 30% 乙酸, 然后在所有离心管中分别添加 2 mL 胰蛋白酶溶液, 将离心管 37 °C 保温 10 min。

(3) 每根离心管添加 5 mL 提前预热到 37 °C 的 BAPNA 溶液, 准确放置 10 min 后立即在样品管中添加 1 mL 30% 乙酸。

(4) 充分混匀后, 3 000 rpm 离心 10 min, 用空白对照做空白, 测定上清液在 410 nm 波长下的吸光值。

(5) 活力单位定义: 胰蛋白酶抑制剂的活力单位为被抑制的胰蛋白酶活力单位 (Trypsin-inhibiting units, TIUs)。

1.3.8 数据分析

采用 Origin 8 绘图和线性相关性分析。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

图1(左)为胰蛋白酶分解 $N\alpha$ -苯甲酰-DL-精氨酸-4-硝基苯胺盐酸盐生成对硝基苯胺黄色物质的全波长扫描图谱,从图中可以看出对硝基苯胺的最大吸收波长为390 nm,本实验采用410 nm作为检测波长,与文献^[1]一致。美国谷物化学学会(AACC71-10)标准方法采用的也是410 nm^[21,22],不采用最大吸收波长来进行检测的原因不太清楚,可能跟410 nm属于可见光、390 nm属于紫外光有关。采用410 nm和采用最大吸收波长对实验结果影响不大。反应体系中底物的添加量均为5 mL(2 mg),反应在37 °C下进行,10 min后,410 nm波长的吸光值随着酶的添加量增加而增加,说明胰蛋白酶水解底物生成对硝基苯胺的量相应增加。

根据胰蛋白酶活力单位的定义,吸光值乘以100即为胰蛋白酶活力单位。1.0、1.5、2.0、2.5和3.0 mL胰蛋白酶溶液所含的胰蛋白酶分别为20、30、40、50和60 μg ,以胰蛋白酶的量(μg)为横坐标,胰蛋白酶活力(TU)为纵坐标绘制标准曲线,如图1(右)所示,两者具有较好的线性相关性($R^2 = 0.9948$)。当体系中含有胰蛋白酶抑制剂的时候,部分胰蛋白酶的活力会被抑制,导致对硝基苯胺的生成量减少,测得的吸光值同样会降低,根据这一原理可以对蛋白酶抑制剂的活力进行测定。

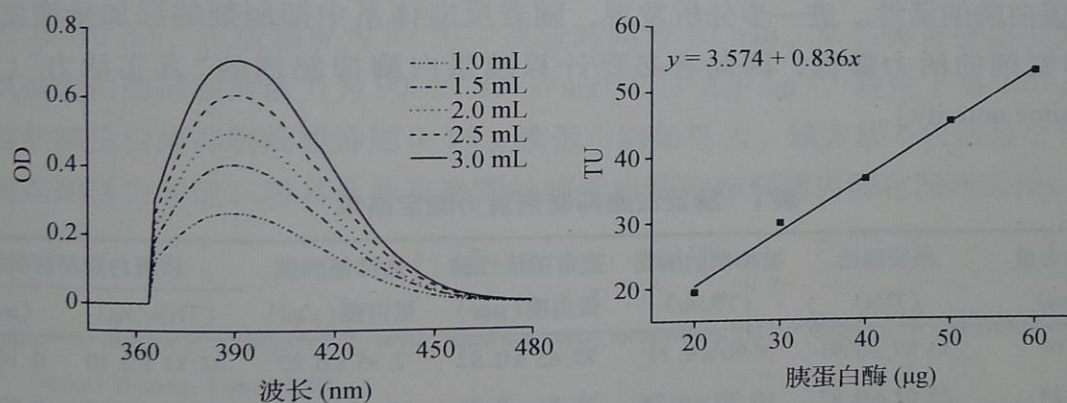


图1 胰蛋白酶抑制剂活力测定标准曲线

2.2 反应温度和时间对胰蛋白酶抑制剂活力的影响

反应温度和反应时间对胰蛋白酶抑制剂活力的影响如图2所示。随着反应温度升高(图2(a)),胰蛋白酶水解底物生成对硝基苯胺的量增加,有抑制剂和没有抑制剂的体系 OD_{410} 与反应温度均呈线性相关,考虑到胰蛋白酶抑制剂在制药行业中的应用,选择37 °C作为胰蛋白酶抑制剂活力测定温度最为合适。由图2(b)可知,不管反应体系中有无蛋白酶抑制剂存在,随着反应时间延长,胰蛋白酶水解底物生成对硝基苯胺的量都增加, OD_{410} 值与反应时间同样呈线性相关,没有抑制剂的体系 OD_{410} 值更高说明酶解生成产物更多。胰蛋白酶抑制剂的活力需要根据胰蛋白酶的活力来进行计算,反应时间不同,计算结

果不一样, 因此将反应时间统一定为 10 min。

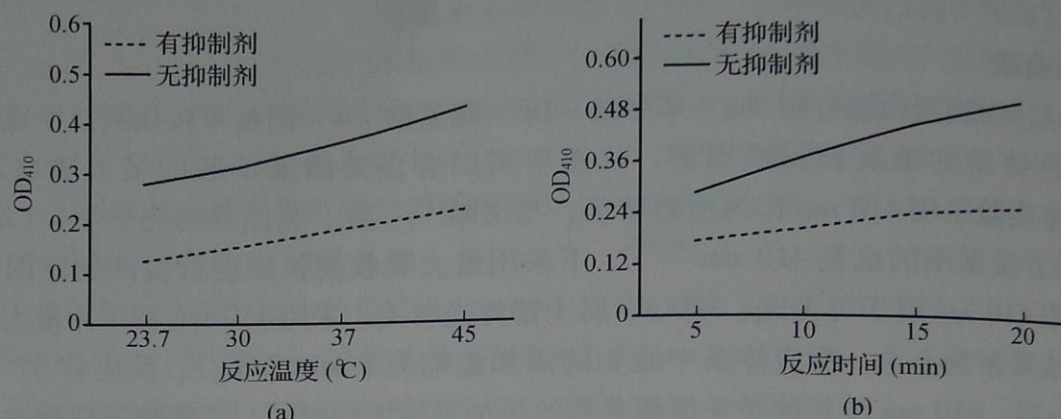


图 2 反应温度 (a) 和反应时间 (b) 对胰蛋白酶抑制剂活力的影响

2.3 样品测定结果

经测定, 马铃薯粗蛋白溶液的蛋白含量为 5.7 mg/mL, 添加稀释 20 倍以后的胰蛋白酶抑制剂溶液 0.25、0.50 和 1.00 mL 相当于添加的蛋白量为 0.07、0.14 和 0.28 mg (表 1 样品 1、2 和 3), 试验分别重复了 3 次, 结果以平均数 ± 标准差表示。从表 1 可以看出, 三个浓度梯度测得的马铃薯胰蛋白酶抑制剂的活力分别为 82.81 ± 2.10 、 75.51 ± 1.87 和 60.74 ± 1.22 TIUs/mg。按另外一种表达方式, 即每毫克蛋白分别能抑制 0.10、0.09 和 0.07 mg 胰蛋白酶的活性。进一步分析发现, 随着反应体系中抑制剂的添加量增加, 检测结果显示抑制剂的活力降低, 因此有必要计算胰蛋白酶抑制剂的“真实活力”(“True trypsin inhibitor activity”)。

表 1 胰蛋白酶抑制剂活力测定结果

样品	蛋白含量 (mg)	残留酶活 (TUa)	被抑制的酶活 (TIUsb)	残留的活性胰蛋白酶 (μ gc)	被抑制的胰蛋白酶 (μ gd)	胰蛋白酶抑制剂活力	
						(TIUs/mg)	(mg/mg)
1	0.07	30.87 ± 0.91	5.90 ± 0.11	32.65 ± 0.82	7.35 ± 0.27	82.81 ± 2.10	0.10 ± 0.00
2	0.14	26.01 ± 0.87	10.76 ± 0.28	26.84 ± 0.70	13.16 ± 0.38	75.51 ± 1.87	0.09 ± 0.00
3	0.28	19.46 ± 0.67	17.31 ± 0.42	19.00 ± 0.58	21.00 ± 0.56	60.74 ± 1.22	0.07 ± 0.00

注: ① 根据胰蛋白酶活力单位的定义, 残留酶活 = $OD_{410} \text{ nm} \times 100$; ② 2 mL 20 μ g/mL 胰蛋白酶的活力为 36.77 TU, 被抑制的酶活 = $36.77 - \text{残留酶活}$; ③ 根据标准曲线计算; ④ 蛋白含量 - 残留的活性胰蛋白酶。

胰蛋白酶抑制剂的“真实”活力计算方式如图 3 所示, 参照 Kakade 等^[23]测定大豆胰蛋白酶抑制剂活力的方法, 采用最小二乘法将 3 个测定结果进行线性拟合 (和标准曲线制作一致), 采用截距作为最终结果。按照这样的计算方法, 图 3 直线的截距为 0.11 mg/mg。按另外一种表达方式为 90.19 TIUs/mg 蛋白。AACC 和美国油脂化学家学会 (AOCS) 的标准方法不采用“真实”酶活, 但规定了测定过程中, 抑制剂要抑制不少于 40% 胰蛋白酶的活性, 同时又不能大于 60%。

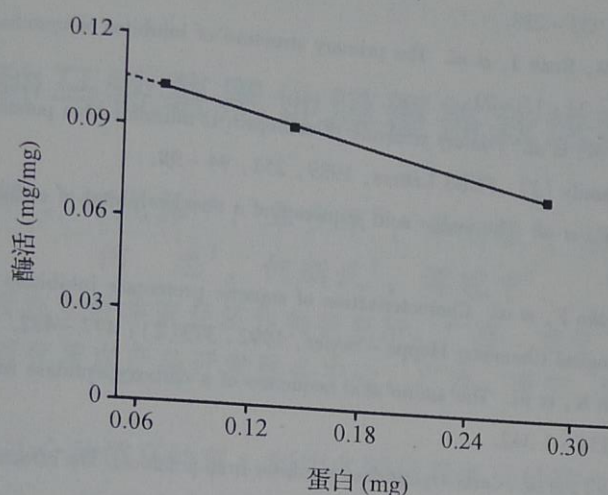


图3 马铃薯粗提物胰蛋白酶抑制剂的活力

通过进一步计算得出,本次实验所采用的100 g马铃薯块茎中所含有的胰蛋白酶抑制剂能抑制0.13 g胰蛋白酶的活力。这里阐述的分光光度法不仅适合于马铃薯胰蛋白酶抑制剂的活力测定,对其他所有来源的胰蛋白酶抑制剂活力测定同样适用。

3 结论

以BAPNA为底物采用分光光度法能有效测定马铃薯块茎中的胰蛋白酶抑制剂的活力,检测波长为410 nm,反应温度为37℃,反应时间为10 min。从马铃薯块茎中提取的粗蛋白溶液其胰蛋白酶抑制剂活力为90.19 TIUs/mg(0.11 mg/mg),理论上每100 g马铃薯块茎中所含的胰蛋白酶抑制剂能抑制0.13 g胰蛋白酶的活力。该方法不仅适合于马铃薯胰蛋白酶抑制剂的活力测定,对其他所有来源的胰蛋白酶抑制剂活力测定同样适用。

[参 考 文 献]

- [1] Harinder P S, Makkar P, Siddhura J U, et al. Plant secondary metabolites [M]//Walker J M. Methods in molecular biologyTM. Totowa: Humana Press, 2007.
- [2] Richardson M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors [M]. Methods in Plant Biochemistry, 1991: 259-305.
- [3] Pouvreau L. Properties of protease inhibitors from potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) [D]. Wageningen: Wageningen Unibersity, 2004.
- [4] Richardson M, Cossins L. Chymotrypsic inhibitor I from potatoes: the amino acid sequences of subunits B, C and D [J]. FEBS Letters, 1974, 45: 11-13.
- [5] Lee M C S, Scanlon M J, Craik D J, et al. A novel two-chain proteinase inhibitor generated by circularization of a multidomain precursor protein [J]. Nature Structural Biology, 1999(6): 526-530.
- [6] Beekwilder J, Schipper B, Bakker P, et al. Characterization of potato proteinase II reactive site mutants [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(7): 1 975-1 984.
- [7] Walsh T A, Twitchell W P. Two Kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers [J]. Plant Physiology, 1991, 97(1): 15-18.
- [8] Brzin J, Popovic T, Drobnic-Kosorok M, et al. Inhibitors of cysteine proteinases from potato [J]. Biological Chemistry

- Hoppe - Seyler, 1988, 369: 233 - 238.
- [9] Križaj I, Drobnič - Košorok M, Brzin J, *et al.* The primary structure of inhibitor of cysteine proteinases from potato [J]. FEBS Letters, 1993, 333(1 - 2): 15 - 20.
- [10] Mares M, Meloun B, Pavlik M, *et al.* Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family [J]. FEBS Letters, 1989, 251: 94 - 98.
- [11] Ritonja A, Križaj I, Meško P, *et al.* The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato [J]. FEBS Letters, 1990, 267, 13 - 15.
- [12] Štrukelj B, Pungerčar J, Meško P, *et al.* Characterization of aspartic proteinase inhibitors from potato at the gene, cDNA and protein levels [J]. Biological Chemistry Hoppe - Seyler, 1992, 373(2): 477 - 482.
- [13] Hass G M, Nau H, Biemann K, *et al.* The amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes [J]. Biochemistry, 1975, 14(6) 1 334 - 1 342.
- [14] Hass G M, Ako H, Grahn D T, *et al.* Carboxypeptidase inhibitor from potatoes. The effects of chemical modifications on inhibitory activity [J]. Biochemistry, 1976, 15(1): 93 - 100.
- [15] 金蓓, 田少君. 大豆胰蛋白酶抑制剂研究概况 [J]. 粮食与油脂, 2005(6): 3 - 6.
- [16] 李国明, 吴娜, 周明. 马铃薯汁水中粗蛋白及其蛋白酶抑制剂性质的初步研究 [J]. 中国食品添加剂, 2013(1): 56 - 61.
- [17] Zeng F K, Liu H, Ma P J, *et al.* Recovery of native protein from potato root water by expanded bed adsorption with amberlite Xad7hp [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2013, 18(5): 981 - 988.
- [18] 曾凡逵, 刘刚. 马铃薯蛋白的分离及氨基酸组成分析 [J]. 食品科学, 2014, 35(9): 53 - 56.
- [19] 曾凡逵, 周添红. 马铃薯能生食吗? [J]. 中国马铃薯, 2013, 27(6): 374 - 378.
- [20] 曾凡逵, 周添红, 康克归, 等. 马铃薯胰凝乳蛋白酶抑制剂活力的测定 [J]. 现代食品科技, 已接受.
- [21] Hamerstrand G E, Black L T, Glover J D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure [J]. Cereal Chemistry, 1981, 58(1): 42 - 45.
- [22] Liu K S, Markakis P. An improved colorimetric method for determining antitrypsin activity in soybean products [J]. Cereal Chemistry, 1989, 66(4): 415 - 422.
- [23] Kakade M L, Simons Nancy, Liener I E. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples [J]. Cereal chemistry, 1969, 46(5): 518 - 526.