

响应面法优化酶解鹿角冒渣制备抗氧化活性肽工艺

姜 薇¹, 殷涌光²

(1. 黄山学院旅游学院, 黄山 245041; 2. 吉林大学生物与农业工程学院, 长春 130022)

摘 要: 以游离氨基酸含量和抗氧化活性为试验指标, 分别采用 5 种蛋白酶酶解制备鹿角冒抗氧化多肽, 对鹿角冒渣为原料制备鹿角冒抗氧化活性肽的工艺进行了研究。结果表明, 碱性蛋白酶产物的游离氨基酸含量和抗氧化活性均较高, 因此水解用酶选择碱性蛋白酶。通过单因素和响应面回归试验对酶解工艺参数进行优化, 得出最佳酶解条件: 加酶量 6%、底物浓度 15%、pH8.5、温度 53℃、反应时间 4 h, 制备的鹿角冒渣抗氧化肽对 DPPH· 的清除率预测值为 74%, 验证试验所得实测平均值为(74.65±1.24)%, 实测结果与预测值符合良好。

关键词: 鹿角冒渣; 多肽; 抗氧化活性; 响应面法

中图分类号: TS251.92

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)04-0723-07

Preparation of antioxidant peptides from antler base residue through enzymatic hydrolysis

JIANG Wei¹, YIN Yongguang²

(1. College of Tourism, Huangshan University, Huangshan 245041;

2. College of Biological and Agricultural Engineering, Jilin University, Changchun 130022)

Abstract: This study aimed to prepare antioxidant peptides from antler base residue by enzymatic hydrolysis. Five proteases were used, and amino acid concentration and DPPH radical scavenging activity were evaluated. Results showed that the hydrolysate by alkaline protease possessed the strongest DPPH radical scavenging activity and amino acid concentration. The response surface regression experiment was carried out based on single factor tests, and the optimal parameters for enzymatic hydrolysis were: enzyme concentration, 6%; substrate concentration, 15%; hydrolysis temperature, 53℃; reaction time, 4 h; and pH value of 8.5. Under these conditions, the DPPH· scavenging activity of antler base peptides was 74%, and the actual average value was (74.65±1.24)% by verification tests. The measured result was in good agreement with forecast result.

Key words: antler base residue; poly peptides; antioxidant activity; response surface methodology

目前, 我国是世界上的鹿产业大国, 鹿角冒 (Antler base) 是梅花鹿 (*Cervus nippon*) 或马鹿 (*Cervus elaphus*) 鹿茸被锯掉后残留的基骨部分, 第 2 年新鹿茸长出便可自然脱落^[1-2], 其形状类似圆盘, 故命名为鹿角冒、鹿托盘或鹿角盘^[3]。鹿角冒作为中药材已有数千年, 用于治疗乳腺增生、乳腺炎、子宫肿瘤、恶性溃疡及儿童流行性腮腺炎等^[2,4], 具有安全食用性, 鹿角冒中的蛋白质是其药效的主要成分^[5], 约占总重 30% 以上。鹿角冒渣是鹿角冒经过提取水溶性蛋白或经高度白酒浸泡后的残渣, 其蛋白质含量占鹿角冒总蛋白质的 80% 以上, 主要

为胶原蛋白, 而鹿角冒渣一般都被扔掉, 造成资源浪费。

生物体可以产生适量的自由基以维持正常生理功能^[6], 但当机体内部系统紊乱或受到外界不利环境干扰时, 便会导致自由基产生异常, 从而引发很多疾病, 如糖尿病、动脉粥样硬化、神经紊乱和心血管疾病等^[7-8]。此外, 导致食品变质主要因素包括活性氧 (reactive oxygen species) 引起的氧化过程^[9]。为了预防由自由基氧化而引起的危害, 各种抗氧化剂及其性质引起了很多科学家的研究热潮。而化学合成的抗氧化剂具有很强的细胞毒性, 已被限制使

收稿日期: 2017-12-24

基金项目: 校级人才启动项目(2015xskq003), 烹饪科学四川高等学校重点实验室重点资助项目(PRKX2017Z02)和校级科研平台建设项目(kypt201811)共同资助。

作者简介: 姜 薇, 博士, 讲师, E-mail: jlu_jw@163.com

用在生物制品中^[6]。蛋白质经水解后会释放出能够有效螯合金属离子、抑制脂质过氧化物的发生、清除体内超量的自由基等作用,从而避免机体被氧化产生损伤^[10]。这类生物活性肽一般都具有分子质量小、易吸收和无副作用等优点。目前,抗氧化活性肽多采用生物酶解制备,而不同的蛋白酶具有不同的酶解条件,且对水解产物的水解程度和水解物的抗氧化活性产生很大的影响^[11-12]。

本研究以鹿角冒渣为原料,以水解度和 DPPH·清除活性为指标,在单因素试验的基础上,采用响应面试验优化鹿角冒渣抗氧化活性多肽的最佳酶解条件,为提高鹿角冒的综合利用价值提供一定的理论基础。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

鹿角冒:由吉林省中韩动物科学研究院提供。经 50%乙醇浸泡提取后的残渣,于 50℃干燥,粉碎, -20℃储存。

碱性蛋白酶 ($2.2 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)、胰蛋白酶 ($1.0 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)、中性蛋白酶 ($1.7 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)、木瓜蛋白酶 ($0.2 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$)、复合蛋白酶 ($2.4 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$) 购于上海宝曼生物有限公司;乙醇、NaOH、硫酸铜、酒石酸钾钠、水杨酸等均为分析纯。

D-37520 型高速冷冻离心机, Germany Osterode Kendro Laboratory; SHA-C 型恒温水浴振荡器,金坛市恒丰仪器厂; TU-1810 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;恒温水浴锅,江苏金坛市金城国盛试验仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 测定方法 (1) 水解度 (DH) 的测定方法。采用 pH-sata 法^[13]:氢氧化钠的摩尔浓度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 记为 N, 滴定消耗的体积 (L) 记为 V; 蛋白质中的肽键摩尔数取 7.8 g^{-1} ; 氨基酸解离度取 7.0。计算公式 (1):

$$DH(\%) = \frac{\text{水解肽键数}}{\text{总肽键数}} \times 100 = \frac{VN}{(7.0 \times M_p \times 7.8)} \times 100 \quad (1)$$

(2) DPPH·清除率的测定。采用紫外可见分光光度法测定样品在 517 nm 处的吸光值^[14], 取 2 份酶解液各 2 mL 分别置于 2 个试管中, 向其中 1 个试管中加入 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 溶液 2 mL 作为测试样 (吸光值记为 A_1), 另一个试管中加入 95%乙醇 2 mL 作为空白样 (吸光值记为 A_2), 以 95%乙醇 2 mL 和 $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DPPH 溶液 2 mL 混匀做参比 (吸光值记为 A_0), 用蒸馏水调零。计算公式 (2):

$$DPPH \cdot \text{清除率}(\%) = \left[1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0} \right] \times 100 \quad (2)$$

(3) O^{2-} ·清除率的测定。采用邻苯三酚自氧化法^[15], 用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液配制 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的邻苯三酚溶液, 取 25℃水浴保温 20 min 的 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH8.2 Tris-HCl 缓冲液 4.5 mL, 立即加入 2 mL 鹿角冒多肽溶液、3 mL 蒸馏水及 0.5 mL 25℃保温的邻苯三酚溶液, 迅速摇匀, 用紫外分光光度计检测 325 nm 处的吸光值, 反应 4.5 min 每隔 30 s 测 1 次。空白管用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 替换邻苯三酚溶液, 邻苯三酚自氧化速率记为 V_0 , 多肽溶液抑制邻苯三酚的自氧化速率记为 V_1 , 计算公式 (3):

$$\text{超氧阴离子清除率}(\%) = \left(1 - \frac{V_1}{V_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

(4) ·OH 清除率测定。采用水杨酸法^[16], 在试管中加入鹿角冒多肽溶液 0.5 mL、蒸馏水 3.5 mL、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeSO_4 溶液 0.5 mL、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水杨酸-乙醇溶液 0.5 mL、 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 溶液 0.5 mL, 摇匀, 室温反应 20 min (Fenton 反应), 用之外分光光度计测 510 nm 处吸光度 (A_1), 蒸馏水代替水杨酸的吸光度记为 A_2 , 蒸馏水代替酶解液的吸光度记为 A_3 。计算公式 (4):

$$\text{羟自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3} \right) \times 100 \quad (4)$$

(5) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)。称取一定量样品粉末溶解于 pH7.2 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液中, 离心, 取 20 μL 上清液与 5 μL $5 \times$ 样品缓冲溶液混合, 沸水浴 5 min, 取 10 μL 点样。其中浓缩胶为 5%, 分离胶为 7.5%^[17]。

1.2.2 鹿角冒渣抗氧化肽的制备 取一定量的鹿角冒渣粉碎并过 60 目筛, 加入一定量蒸馏水于 100℃水浴保温 10 min, 冷却至室温, 加蛋白酶量 $200 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 在各酶的最适条件下反应 6 h, 反应结束后 100℃水浴 15 min 灭酶, 流水冷却, $8500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上清。

1.2.3 单因素试验 采用 1.2.2 中的方法制备鹿角冒抗氧化肽, 提取条件为: 固定底物浓度为 10%, 加酶量 $200 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 考察碱性蛋白酶 (pH9, 50℃)、胰蛋白酶 (pH8, 40℃)、中性蛋白酶 (pH7, 50℃)、木瓜蛋白酶 (pH7, 55℃)、复合蛋白酶 (pH7, 50℃) 对水解液中游离氨基酸含量和 DPPH·清除率的影响; 选择碱性蛋白酶为水解用酶, 固定 pH8、加酶量 2%、温度 50℃、反应 240 min, 考察底物浓度 (5%、10%、15%、20% 和 25%) 对水解度和 DPPH·清除率的影响; 固定底物浓度 15%、加酶量 2%、酶

解温度 50℃、反应 240 min, 考察 pH 值 (7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0) 对水解度和 DPPH·清除率的影响; 固定 pH9、温度 50℃、底物浓度 15%、反应 240 min, 考察酶浓度 (0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、4.0%、6.0% 和 8.0%) 对水解度和 DPPH·清除率的影响; 固定 pH9、底物浓度 15%、加酶量 4%、反应 240 min, 考察温度 (45、50、55、60 和 65℃) 对水解度和 DPPH·清除率的影响; 固定 pH9、底物浓度 15%、加酶量 4%、温度 55℃, 考察反应时间 (1、2、4、6、24 h) 对水解度和 DPPH·清除率的影响。

1.2.4 响应面法优化酶解工艺 根据中心组合设计原理, 结合鹿角冒渣酶解单因素试验结果, 对酶与底物浓度 (enzyme/substrate, E/S)、温度和 pH 3 个因素进行优化, 以酶解液对 DPPH·清除率为响应值, 采用 3 因素 3 水平中心组合设计进行响应面分析。试验因素及水平见表 1。

表 1 响应面法优化酶解工艺各因素和水平的设计

Table 1 Coded settings of the process parameters for antlerbase protein hydrolysis

因素 Factor	水平 Level		
	-1	0	1
温度/℃ Temperature	50	55	60
E/S/%	2	4	6
pH	8	9	10

1.2.5 数据分析 每次试验数据均为 3 次重复试验的平均值, 采用 Origin8.0 软件作图, 并进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 酶种类的选择 从图 1 可以看出, 碱性蛋白酶水解液中氨基酸含量 ($1\ 212.4 \pm 20.3$) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 DPPH 自由基清除率 (66.67 ± 0.9) % 最高, 其次为复合蛋白酶、中性蛋白酶, 菠萝蛋白酶和胰蛋白酶水解产物的水解度和对 DPPH 自由基清除率均较低。每种酶都有其特异酶切位点, 相同的底物会被水解成不同的多肽链和游离氨基酸, 从而使水解产物具有不同的水解度和抗氧化活性^[18]。本研究选择碱性蛋白酶作为最优用酶。

2.1.2 底物浓度对酶解效果的影响 由图 2 可以看出, 在最初的 30 min 内, 酶解液水解度随鹿角冒渣浓度的增加而减小, 随着反应时间的延长, 水解度随底物浓度的增加先增加后减少, 这是因为底物浓度超过了碱性蛋白酶所能水解的量, 从而导致水解

度下降, 当底物浓度相对于碱性蛋白过低时, 底物的酶切位点被碱性蛋白酶全都剪切, 即使水解反应没有停止, 但不再有多余的氨基酸残基被切掉, 水解度也不再增加^[19]。因此, 底物浓度为 15% 的酶解效率最高。

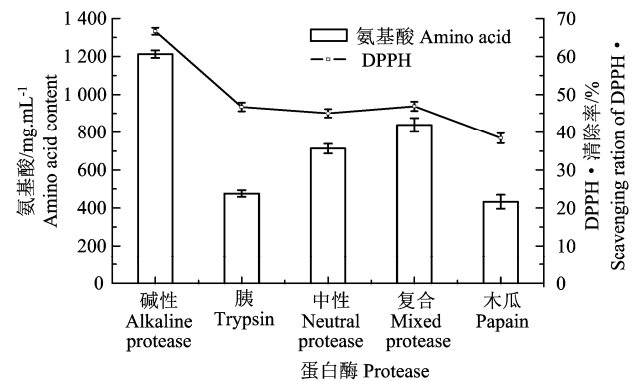


图 1 5 种蛋白酶对游离氨基酸浓度和 DPPH·清除率的影响
Figure 1 Effects of different protease on free amino acid concentration and scavenging ratio of DPPH·

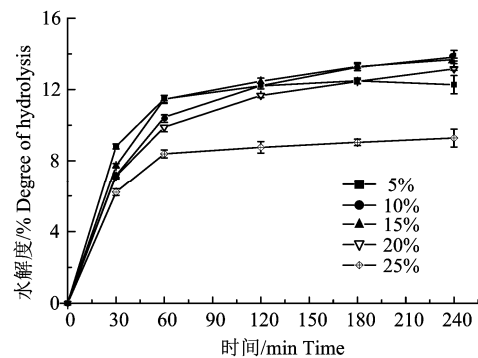


图 2 不同的底物浓度对鹿角冒水解度的影响

Figure 2 Effects of different substrate concentration on antler base degree of hydrolysis

2.1.3 pH 对酶解效果的影响 由图 3 可知, 酶解液水解度受反应体系 pH 值的影响较大, 碱性蛋白酶在偏中性的环境中酶活力较低, 在 pH 为 9.0 和 10.0 时碱性蛋白的活性最高, 其水解度也达到最大值。碱性蛋白酶的最适 pH 范围为 9.0~11.0, 在具体的反应过程中, 其最适 pH 也会因不同的底物而发生变化^[20]。但是 pH 值越大, 氢氧化钠的添加量就越多, 便会使反应液中的阳离子浓度增加, 本研究选择 pH9.0 为最优条件。

2.1.4 酶浓度对酶解效果的影响 由图 4 可以看出, 水解度随碱性蛋白酶浓度的增加逐渐上升, 但在加酶量为 4%~8% 的范围内水解度的变化不明显, 这可能是因为在碱性蛋白酶相对于底物酶解位点不足时, 随着酶浓度的逐渐增加, 底物的酶切位点被剪切的机率也随之增加, 水解度也随之增加;

但当碱性蛋白酶相对于底物酶解位点过多时,碱性蛋白酶浓度继续增加反而导致酶分子之间起到竞争性抑制作用,不仅降低了鹿角冒的水解度,还提高了试验的操作成本^[21]。从碱性蛋白酶的利用率考虑,本研究选择4%的加酶量。

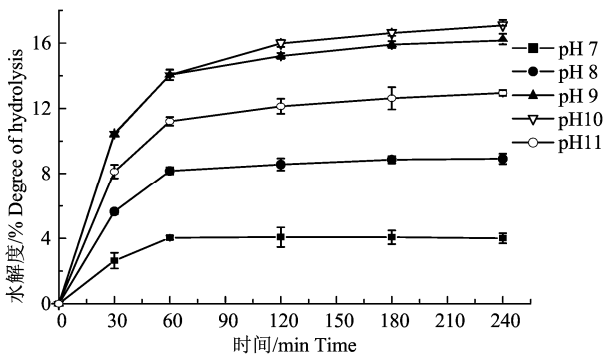


图3 不同的pH值对鹿角冒水解度的影响

Figure 3 Effects of different pH value on antler base degree of hydrolysis

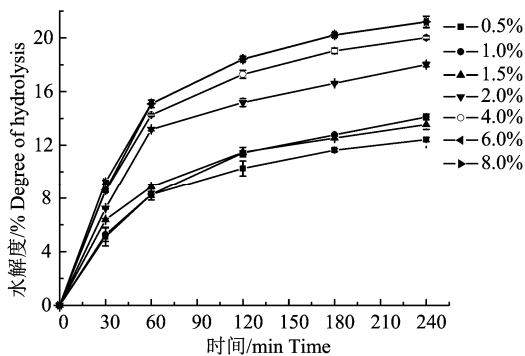


图4 碱性蛋白酶添加量对鹿角冒水解度的影响

Figure 4 Effects of alkaline protease concentration on antler base degree of hydrolysis

2.1.5 温度对酶解效果的影响 由图5可以看出,反应温度对鹿角冒水解度的影响较大,反应温度为65℃和45℃时的水解度最低。因为每一种酶都有其最适温度,反应温度低于其最适温度,酶没有被激活,反应速率较低;反应温度高于其最适温度,导致部分酶失去活性^[22]。本研究选择55℃为最优反应温度。

2.1.6 反应时间水解液抗氧化活性的影响 多肽的生物活性和多肽的分子量大小以及组成多肽的氨基酸种类有关^[23]。随着反应时间的延长,鹿角冒蛋白质中的酶解位点逐渐被碱性蛋白酶剪切,使水解液中的游离氨基酸增加,多肽的种类和分子量发生变化,进而导致水解液的抗氧化活性也发生变化。从图6中可以看出,鹿角冒水解液的抗氧化活性随反应时间的延长先增加后降低,在反应4h时的水解液对 $O_2^{\cdot-}$ 、DPPH·和·OH的清除率最高。

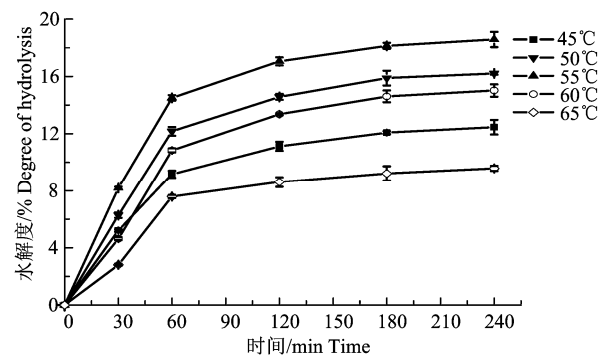


图5 不同的反应温度对鹿角冒水解度的影响

Figure 5 Effects of different reaction temperature on antler base degree of hydrolysis

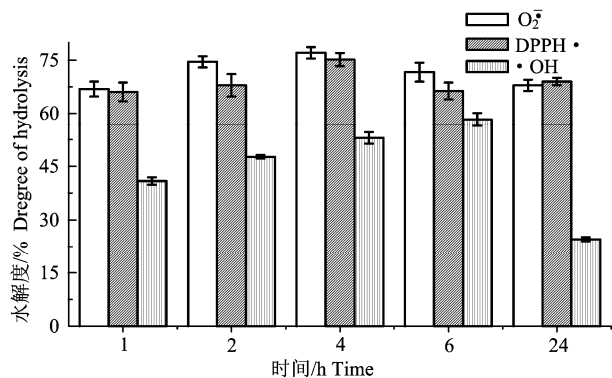


图6 不同的反应时间对水解液抗氧化活性的影响

Figure 6 Effects of reaction time on antioxidant activity of hydrolysate

表2 响应面法优化方案及试验结果

Table 2 Design and experimental results of RSM

序号 Number	E/S/%	温度/℃ Temperature	pH	DPPH·清除率/% Removal rate
1	0(4)	-1(50)	-1(8)	71.81
2	0(4)	-1(50)	1(9)	68.00
3	1(6)	0(55)	-1(8)	74.13
4	0(4)	0(55)	0(9)	74.13
5	-1(2)	-1(50)	0(9)	60.82
6	-1(2)	0(55)	-1(8)	60.82
7	0(4)	1(60)	-1(8)	73.49
8	1(6)	0(55)	1(10)	68.22
9	-1(2)	1(60)	0(9)	64.63
10	-1(2)	0(55)	1(10)	65.79
11	0(4)	0(55)	0(9)	72.23
12	0(4)	0(55)	0(9)	74.87
13	1(6)	1(60)	0(9)	71.81
14	0(4)	0(55)	0(9)	72.66
15	0(4)	1(60)	1(10)	68.11
16	0(4)	0(55)	0(9)	73.07
17	1(6)	-1(50)	0(9)	70.86

表 3 方差分析
Table 3 ANOVA

方差来源 Sources	平方和 SS	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 Significance
模型 Model	322.78	9	35.86	27.82	0.000 1	**
X_1	97.65	1	97.62	75.73	<0.000 1	**
X_2	11.17	1	11.17	8.67	0.021 6	*
X_3	1.02	1	1.02	0.79	0.402 3	
X_1X_2	5.88	1	5.88	4.56	0.070 0	*
X_1X_3	24.39	1	24.39	18.92	0.003 4	**
X_2X_3	4.88	1	4.88	3.78	0.092 9	
X_1^2	63.83	1	63.83	49.52	0.000 2	**
X_2^2	68.33	1	68.33	53.01	0.000 2	**
X_3^2	27.75	1	27.75	21.53	0.002 4	**
Lack of fit	7.01	3	2.34	4.64	0.086 2	Not significant

注: $P < 0.05$, 表示显著差异 “*”; $P < 0.01$, 表示极显著差异 “**”。

Note: “*” and “**” mean significant different at 0.01 and 0.05 level, respectively.

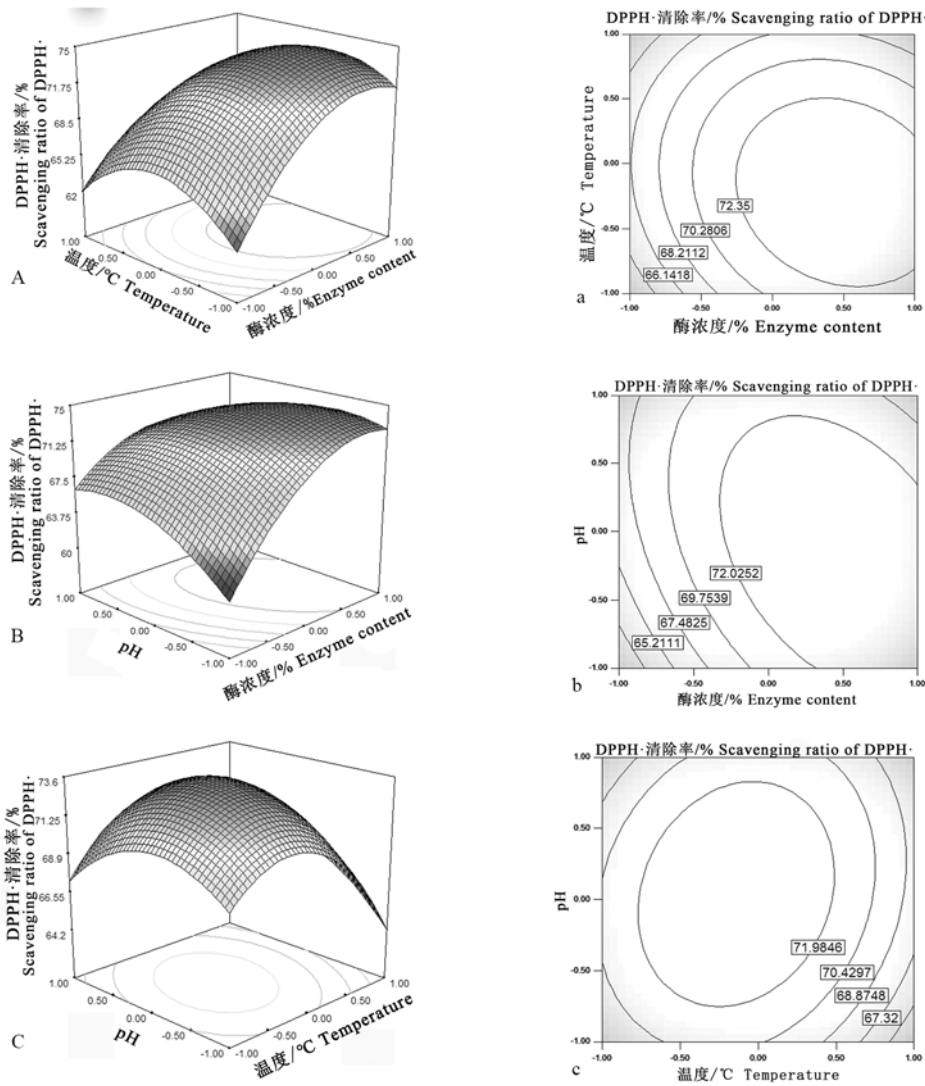


图 7 各因素交互作用对酶解液清除 DPPH·活性影响的响应面和等高线

Figure 7 Three-dimensional response surface and contour plots showing the interactive effects of antioxidant activity of peptide

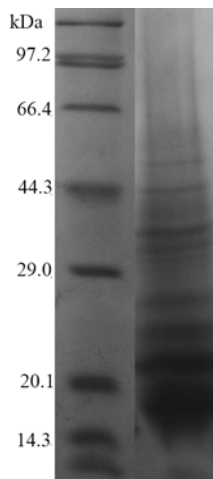


图 8 鹿角冒水解液 SDS-PAGE 电泳分析图谱

Figure 8 Pattern of SDS-PAGE analysis of antler base hydrolysate

2.2 多因素试验

2.2.1 模型建立与数据分析 响应面分析结果见表 2, 方差分析结果见表 3。

对表 3 中数据进行回归拟合, 去除不显著项后, 得到水解液对 DPPH· 的清除率和碱性蛋白酶浓度、pH 和温度的二次回归方程:

$$Y = 73.45 + 3.49X_1 - 1.18X_2 - 1.21X_1X_2 - 2.47X_1X_2 - 3.89X_1^2 - 4.03X_2^2 - 2.57X_3^2$$

从上述模型中可以得出碱性蛋白酶浓度和反应体系 pH 的增加能够提高水解液对 DPPH· 的清除率, 而反应温度的增加会降低水解液对 DPPH· 的清除率。酶浓度、pH 和温度的二次方均对 DPPH· 的清除率起负面影响, 即大幅度的提高酶浓度、pH 和温度的值对制备高抗氧化活性肽不利。

从表 3 中知, X_1 、 X_2 、 X_1X_2 、 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 和 X_3^2 因素对水解液清除 DPPH· 的能力影响显著, 相应面回归模型极显著 ($P=0.0001$), 模拟失拟项不显著 ($0.0862 > 0.05$), 即该模型拟合较好, 可以用该回归模型代替鹿角冒抗氧化活性肽的真实试验点进行分析。

2.2.2 响应面分析 由图 7 可知, 酶解液对 DPPH· 的清除率均随着水解温度和 pH 的增加先增大后减小, 即较高或较低的温度和 pH 都不利于高抗氧化活性多肽的制备。而在较低 pH 和温度条件下, 酶解液对 DPPH· 的清除率均随加酶量的增加而增加, 当反应体系的 pH 和温度较低时, 碱性蛋白酶的活性较低, 通过增加碱性蛋白酶的添加量可以提高酶的水解能力, 当反应体系的温度和 pH 值都较高时, 酶解液对 DPPH· 的清除率却表现出随加酶量的增加先上升后下降的趋势, 可能是在较高温度

和碱性条件导致碱性蛋白酶失活, 而失活的蛋白酶会使阻断底物与酶的接触, 降低反应速率。

根据所建二次方模型进行参数最佳化分析, 计算得出最佳参数为: 加酶量 6%、底物浓度 15%、pH8.5、温度 53℃、反应时间 4 h, 制备的鹿角冒渣抗氧化肽对 DPPH· 的清除率预测值为 74%, 将试验条件调整为最优工艺参数, 重复 3 次试验, 得到鹿角冒抗氧化多肽对 DPPH· 的清除率为 (74.65 ± 1.24) %, 实测结果与预测值符合良好, 进一步验证了鹿角冒抗氧化活性多肽回归模型的合适性。

2.3 鹿角冒抗氧化活性肽分子量分析

用 SDS-PAGE 电泳对碱性蛋白酶水解制备的鹿角冒抗氧化活性肽进行分子量测定, 结果 (图 8) 显示, 经过碱性蛋白酶酶解制备的鹿角冒抗氧化活性肽是一个连续分离的电泳条带, 其分子量主要分布在 14.3~29.0 kDa 之间, 符合胶原蛋白多肽的特征, 电泳条带清晰。

3 结论

通过比较不同蛋白酶对鹿角冒渣的酶解效果, 得出碱性蛋白酶产物的游离氨基酸含量和抗氧化活性均较高, 因此水解用酶选择碱性蛋白酶。通过单因素和响应面回归试验对酶解工艺参数进行优化, 得出最佳酶解条件: 加酶量 6%、底物浓度 15%、pH8.5、温度 53℃、反应时间 4 h, 制备的鹿角冒渣抗氧化肽对 DPPH· 的清除率预测值为 74%, 验证试验所得实测平均值为 (74.65 ± 1.24) %, 实测结果与预测值符合良好, 利用响应面法优化鹿角冒渣抗氧化肽的制备工艺条件是可行的。SDS-PAGE 电泳表明制备的抗氧化活性多肽的分子量主要分布在 14.3~29.0 kDa 之间, 符合胶原多肽的特征。

参考文献:

- [1] 张宝香, 金春爱, 赵延平. 鹿角盘的化学成分与开发利用[J]. 特种经济动植物, 2005, 8(12): 7.
- [2] 吴菲菲, 金礼吉, 李化强, 等. 鹿角盘天然活性成分和药理功能研究的新进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013(1): 23-25.
- [3] 张程程. 鹿角盘提取物抗炎作用的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2011.
- [4] 王莘, 姚艳飞. 鹿花盘蛋白对乳腺增生模型小鼠作用研究[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 295-297.
- [5] 黄萍, 赵雨, 牛放, 等. 鹿角托盘总蛋白的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(14): 7305-7307.
- [6] 李致瑜, 庄玮婧, 张宁宁, 等. Alcalase 蛋白酶酶解大黄鱼内脏制备抗氧化肽[J]. 中国食品学报, 2016, 16(8): 109-117.

- [7] MILIAUSKAS G, VAN BEEK T A, VENSKUTONIS P R, et al. Antioxidant activity of *Potentilla fruticosa*[J]. J Neurol Sci, 2004, 84(15): 1997-2009.
- [8] KAREL M, TANNENBAUM S R, WALLACE D H, et al. Autoxidation of methyl linoleate in freeze-dried model systems. III. effects of added amino acids[J]. J Sci Food Agr, 1966, 31(6): 892-896.
- [9] JUNG M Y, KIM S K, KIM S Y. Riboflavin-sensitized photooxidation of ascorbic acid: kinetics and amino acid effects[J]. Food Chem, 1995, 53(4): 397-403.
- [10] SJÖDIN B, WESTING Y H, APPLE F S. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise[J]. Sports Med, 1990, 10(4): 236-254.
- [11] SAITO K, JIN D H, OGAWA T, et al. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry[J]. J Agr Food Chem, 2003, 51(12): 3668-3674.
- [12] 谢正军. 苜蓿叶蛋白和酶法制备抗氧化肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
- [13] SAITO M, KUNISAKI N, URANO N, et al. Collagen as the major edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*)[J]. J Sci Food Agr, 2002, 67(4): 1319-1322.
- [14] LÓPEZ F, MEDINA F, PRODANOV M, et al. Oxidation of activated carbon: application to vinegar decolorization[J]. J Colloid Interf Sci, 2003, 257(2): 173-178.
- [15] 王若兰, 杨壮, 周菲. 中性酶从米糠中制取抗氧化性活性肽的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2008, 29(6): 1-4.
- [16] 刘闪, 刘培勇, 刘良忠, 等. 鲟鱼皮胶原蛋白肽酶解液脱色工艺的研究[J]. 食品工业, 2013, 34(9): 120-123.
- [17] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [18] 宋茹, 冯婷立, 谢超. 海产小杂鱼抗氧化肽制备工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(12): 29-33.
- [19] 张杨, 胡磊, 汪少芸, 等. 响应面优化酶解法制备蒲公英籽蛋白抗氧化肽工艺[J]. 食品工业科技, 2016(5): 258-262.
- [20] 麻成金, 黄伟, 黄群, 等. 复合酶法提取仿栗籽蛋白的工艺优化[J]. 食品科学, 2012, 33(20): 27-32.
- [21] 毛银, 朱科学, 张士康, 等. 响应面优化酶法制备茶叶蛋白抗氧化肽的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(7): 169-173.
- [22] 麻成金, 黄伟, 黄群, 等. 复合酶法提取仿栗籽蛋白的工艺优化[J]. 食品科学, 2012, 33(20): 7-32.
- [23] WU H C, CHEN H M, SHIAU C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*scomber austriasicus*) [J]. Food Res Int, 2003, 36(9): 949-957.