

椰肉蛋白酶解及其产物的抗氧化活性研究

金蓓^{1,2}, 黄梅芳¹, 何梓鹏¹, 沈淑钦¹

(1. 湛江师范学院化学科学与技术学院, 广东湛江 524048)

(2. 广东高校新材料工程技术开发中心, 广东湛江 524048)

摘要: 将新鲜椰肉粉碎脱脂, 利用碱溶酸沉法制备椰肉蛋白。用 Alcalase 碱性蛋白酶、Neutralse 中性蛋白酶、菠萝蛋白酶、Papain 木瓜蛋白酶酶解椰肉蛋白, 以 DPPH 自由基清除能力和水解度为指标对酶解过程进行分析, 筛选出最适合制备抗氧化酶解物的酶为 Alcalase 碱性蛋白酶。然后采用单因素及多指标正交实验设计优化 Alcalase 碱性蛋白酶酶解条件, 其中酶解温度和底物浓度对 DPPH 自由基清除率影响最大。优化后的制备参数为: 酶解温度 50 °C, pH 值 10.5, 加酶量 14000 U/g, 酶解时间 7 h, 底物浓度 2%, 该条件下水解液中蛋白含量为 15.8 mg/mL, 水解度和 DPPH 清除率分别为 29.16% 和 89.07%, 椰肉蛋白酶解物显示出较强的抗氧化活性, 接近同一浓度下谷胱甘肽的抗氧化能力, 比同浓度 Vc 的 DPPH 自由基清除率高 3.33 倍。

关键词: 椰肉蛋白; 酶解; 抗氧化活性

文章编号: 1673-9078(2013)8-1826-1831

Enzymatic Hydrolysis of Coconut Protein and Antioxidant Activity of the Hydrolysates

JIN Bei^{1,2}, HUANG Mei-fang¹, HE Zi-peng¹, SHEN Shu-qin¹

(1. School of Chemistry Science and Technology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang 524048, China)

(2. Development Center for New Materials Engineering & Technology, Zhanjiang 524048, China)

Abstract: Coconut was crushed and defatted, giving coconut powder. Coconut protein was obtained by alkaline extraction and acid precipitation from coconut powder. Then coconut protein was hydrolyzed by four proteases (Alcalase, Neutralse, bromelin, Papain), among which Alcalase showed to be the optimal in terms of degree of hydrolysis and DPPH-scavenging rate of hydrolysates. By single factor and multi-index orthogonal design, hydrolysis conditions were optimized using degree of hydrolysis and DPPH-scavenging rate as the evaluating indexes. Hydrolysis temperature and substrate concentration showed the highest influence on DPPH-scavenging activity. The optimal conditions were substrate concentration 2% (m/V), enzyme concentration 14000 U/g, pH 10.5, temperature 50 °C and hydrolyzing time 7 h. Under these conditions, the protein content of hydrolysates, the scavenging rate on DPPH and the degree of hydrolysis were 15.8 mg/mL, 89.07% and 29.16%, respectively. The antioxidant activity of coconut hydrolysates closed to that of the same concentration of glutathione, being 3.33 times higher than that of the same concentration of Vitamin C.

Key words: coconut protein; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity

椰子 (*Cocos nucifera* L.), 属于棕榈科椰肉属, 是热带地区典型的木本油料作物和食品能源作物, 也是粤西雷州半岛主要的作物之一。新鲜椰肉中含有 35.2% 脂肪、3.8% 蛋白质和 40% 水分, 以及少量 VB₁、VA、Vc、VE, 具有降血脂、降低胆固醇、抑制高血脂症等保健功能^[1-2]。尽管单个椰子果果肉的蛋白质含量比较低, 但椰果产量很大, 因此, 椰子果肉蛋白不失为一种重要的植物蛋白质资源。椰肉蛋白质中含有

收稿日期: 2013-04-06

基金项目: 湛江师范学院博士专项 (ZL0903); 国家级大学生创新训练项目 (201210579010)

作者简介: 金蓓 (1981-), 女, 博士, 讲师, 植物蛋白科学与工程

人体所需的 18 种氨基酸, 必需氨基酸种类齐全, 营养价值高, 并具备良好的功能特性, 其起泡性和乳化性要远高于大豆蛋白^[3]。然而在椰子加工中, 椰子蛋白主要是作为加工椰油等时的副产品, 要么做饲料, 要么被废弃, 很少进行深加工和再利用, 经济价值不高, 资源浪费严重。因此利用生物技术对椰肉进行深加工, 开发各种生物活性物质如活性肽等是提高其资源利用率和附加值的有效途径。目前关于椰肉蛋白的研究和开发, 侧重于椰肉蛋白的提取和功能特性的研究, 而对其生物活性的研究较少^[4]。目前仅有国内郑亚军等人发现椰肉中醇溶蛋白对 Fe²⁺ 具有很强的络合能力, 对 DPPH 有较强的清除能力, 有较好的抗氧化活性^[5],

但对酶解蛋白产物的理化特性尚未有研究报道。因此研究椰肉蛋白酶解特点及产物特性对椰肉的深度开发利用具有重要的意义。

本研究以椰肉为原料制备椰肉蛋白粉,分析不同蛋白酶酶解椰肉蛋白后水解度和抗氧化性能(清除DPPH·活性)的差异,探讨了不同酶解条件对酶解物水解度和抗氧化性的影响,为椰肉蛋白理化特性的改善以及椰肉的深度开发和利用提供理论支持和方法指导。

1 材料与方法

1.1 原料

椰子,购于湛江市赤坎区南华市场,其中椰肉水分含量46.36%,粗蛋白含量6.38%,脂肪含量53.10%。去壳、去皮、脱脂后干燥备用。Alcalase碱性蛋白酶(酶活为2.4A U/g)、Neutrase中性蛋白酶(酶活为1.5A U/g)、菠萝蛋白酶(酶活为 5×10^5 U/g)、Papain木瓜蛋白酶(酶活为 6×10^5 U/g)由江门拜奥生物科技有限公司提供。二苯基苦味酰基苯肼(DPPH)和谷胱甘肽和维生素C,购自上海品纯试剂有限公司。其他化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

722S可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;HH-4数显恒温水浴锅,常州澳华仪器有限公司;TGL-16C台式离心机,上海安亭科学仪器厂;04605电子天平,上海济成分析仪器有限公司;PHS-3C型pH计,上海精密科学仪器有限公司;78-2双向磁力加热搅拌器,常州澳华仪器有限公司;01049电子天平,上海继承分析仪器有限公司;BP281美的搅拌机,广东美的生活电器制造有限公司;TGJ-18型冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;KDN-2C型定氮仪,上海纤检仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 椰肉蛋白的制备

将脱脂椰肉粉碎→加入pH 8.0磷酸盐缓冲液(4℃水浴)→离心(5000 r/min, 10 min)→收集上清液→用0.1 mol/L的HCL调节上清液pH值为4.0→离心(5000 r/min, 10 min)→去离子水洗涤沉淀3次→冷冻干燥→椰肉蛋白

1.3.2 椰肉蛋白的酶解

称取一定量的椰肉蛋白→加入1:1(g/mL)的水→调节pH为到试验到所需的条件→加入一定量的蛋白酶→水浴恒温酶解→灭酶(90℃, 15 min)→冷却→离心(5000 r/min, 20 min)

→收集上清液

1.3.3 蛋白含量测定

采用凯氏定氮法,参照GB/T5009.5-85。

1.3.4 酶活测定

采用福林-酚法

1.3.5 水解度(DH)的测定^[6]

采用甲醛滴定法

$DH\% = \frac{\text{酶解液中氨基态氮含量}}{\text{酶解液中蛋白质含量}} \times 100\%$

1.3.6 酶解液对DPPH·自由基清除能力的测定^[7]

二苯基苦味酰基自由基(DPPH·自由基)是一种很稳定的自由基,在乙醇溶液中呈深紫色,在517 nm处有最大吸收峰,当有自由基清除剂存在时其颜色减退,退色程度与清除剂的清除能力及数量呈定量关系。用分光光度法进行定量分析可评价抗氧化物质的抗氧化能力。

将2.0 mL DPPH·溶液(0.1 mmol/L,溶于95%乙醇)置于试管中,加入2 mL酶解待测液,振荡摇匀,在黑暗室温放置30 min后,在517 nm处测定其吸光值(A_i),以2.0 mL 95%的乙醇加入2.0 mL蒸馏水调零,对照为2.0 mL DPPH·溶液加上2.0 mL 95%乙醇在测定波长的吸光值(A_c),2 mL酶解液和2 mL 95%乙醇混合后在测定波长的吸光值为A_j。

酶解液对DPPH·的清除能力用抑制率R表示:

$$R/\% = [1 - (A_i - A_j) / A_c] \times 100\%$$

1.3.7 统计分析

本研究所有实验数据重复测定三次,根据三次试验结果计算相应的标准偏差。结果以均值±标准偏差的形式表示。指标内部的均值比较采用最小显著差异法(least significant difference, LSD),取95%置信度(P<0.05)。

2 结果与讨论

2.1 酶的筛选

表1 不同蛋白酶的酶活力及实验条件

Table 1 Activities and hydrolysis conditions of different proteases

蛋白酶的 种类	pH 值	温度 /℃	酶解 时间/h	加酶量 (U/g)
Alcalase 碱性蛋白酶	10.0	45	5	8000
Neutrase 中性蛋白酶	7.0	45	5	8000
菠萝蛋白酶	7.0	55	5	8000
Papain 木瓜蛋白酶	7.0	55	5	8000

不同蛋白酶有着不同的特异酶切位点, 同一种底物蛋白用不同的蛋白酶酶解时, 所得到的酶解产物可能完全不同, 所获得抗氧化多肽的数量、活性就有较大不同, 因此, 蛋白酶的选择尤为重要。本研究综合考虑酶的来源、价格及水解能力, 选择四种不同蛋白酶(碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶)对相同浓度的椰肉蛋白, 在供选酶适宜条件(表1)下酶解, 然后测定特定酶解时间下(5 h)酶解产物的水解度和 DPPH· 的清除能力, 结果如图 1 所示。

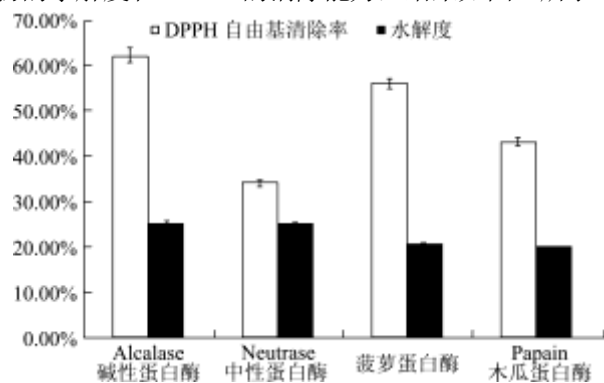


图1 不同蛋白酶的水解度及酶解液清除DPPH自由基能力的比较

Fig.1 Degree of hydrolysis of coconut protein by different proteases and DPPH radical scavenging rates of the hydrolysates

由图 1 可以看出, 不同蛋白酶酶解椰肉产物的水解度和抗氧化性有很大的差别。四种蛋白酶的水解能力大小次序为 Neutrase 中性蛋白酶>Alcalase 碱性蛋白酶>菠萝蛋白酶>Papain 木瓜蛋白酶。在一定范围内, 随着水解度的增加, 水解液中小分子片段越来越多, 因此, 可以通过控制水解度, 来获得具有生物活性的短肽。但若单纯追求高水解度指标, 必然会导致产生较多的游离氨基酸, 所以在检测椰肉蛋白酶解物水解度的同时, 也应检测酶解物的抗氧化活性。Alcalase 碱性蛋白酶的酶解产物清除 DPPH· 能力最强, 其次是菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶酶解产物, 而中性蛋白酶酶解产物清除 DPPH· 能力最弱。这可能是由于酶的特异性和酶切位点的专一性会影响酶解产物中小分子肽和氨基酸的组成和序列, 从而影响产物的抗氧化性。Alcalase 碱性蛋白酶是一种丝氨酸内肽酶, 酶切位点多, 可裂解蛋白中的 Glu、Met、Leu、Tyr、Lys 和 Gln 的羧端肽键^[8]。椰肉蛋白富含 Glu、Leu 和 Lys 等氨基酸, 同时还含有具有酚羟基结构的色氨酸(Trp)和酪氨酸(Tyr)等供氢体^[1], 这些供氢体能提供 H 质子使自由基还原, 终止了自由基连锁反应, 起到清除或抑制自由基的目的。因而通过比较这四种蛋白酶对椰肉蛋白酶解的效果和所得产物的抗氧化活性评价, 可以得出, Alcalase 碱性蛋白酶为酶解椰肉蛋白的最佳用酶, 可进一步优化椰肉蛋白水解作用以提高酶解物抗氧化能

力。这一结果进一步证实了王章存等人的研究^[9], 碱性蛋白酶较为适合水解植物蛋白。

2.2 碱性蛋白酶的水解工艺参数

2.2.1 反应时间对椰肉酶解物 DH 和 DPPH· 清除作用的影响

在底物浓度为 1%, pH 值为 10.0, 酶解温度 45 °C, 加酶量为 8000 U/g, 考察酶解时间对水解度和 DPPH· 清除率的影响, 结果见图 2。

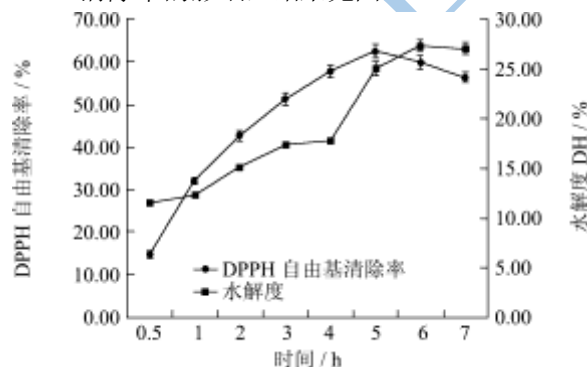


图 2 时间对水解度和 DPPH 自由基清除能力的影响

Fig.2 Effect of reaction time on the degree of hydrolysis of coconut protein and DPPH radical scavenging rates of its hydrolysates

由图 2 可知, 碱性蛋白酶酶解椰肉蛋白的水解度在 6h 内都随着时间的延长而不断增大; 之后水解度增幅趋于平缓, 这可能是由于随着时间的延长, 可以作用的底物也在减少, 蛋白酶的专一性可以水解的肽键也在逐渐的减少, 同时, 酶活力受到产物、pH 值和温度等的影响也逐渐下降, 造成水解度增加缓慢并趋于平衡。从图 2 也可发现, 酶解产物 DPPH· 清除能力的变化与水解度的变化相对应, 即在 5 h 以内, 酶解物的 DPPH· 清除作用随着水解时间的延长而增强, 其最大清除率为 62.51%, 之后酶解产物 DPPH· 清除能力反而略有减弱, 这可能是酶解时间过长, 水解过度, 产物中主要为小肽或氨基酸, 因而抗氧化活性也降低。这一结果表明适度酶解有利于提高产物的抗氧化性^[10]。

2.2.2 pH 值对椰肉酶解物 DH 和 DPPH· 清除作用的影响

在底物浓度为 1%, 酶解温度 45 °C, 加酶量为 8000 U/g, 酶解时间为 5 h, 考察酶解 pH 值对水解度和 DPPH· 清除率的影响, 结果见图 3。

如图 3 所示, 首先酶解物的水解度随着 pH 值的增加, 呈增长趋势, 但在 pH=10.5 时达到峰值, 随后又略有下降。而酶解物的 DPPH· 清除能力的变化趋势与水解度的变化趋势大致相同, 在 pH=10.5 时,

DPPH·清除率达到最大为66.31%。这可能是由于水解液的pH值是影响酶活力的非常重要的因素，pH值过高或太低都会使酶的空间构象发生改变，导致酶活性的降低^[11]。

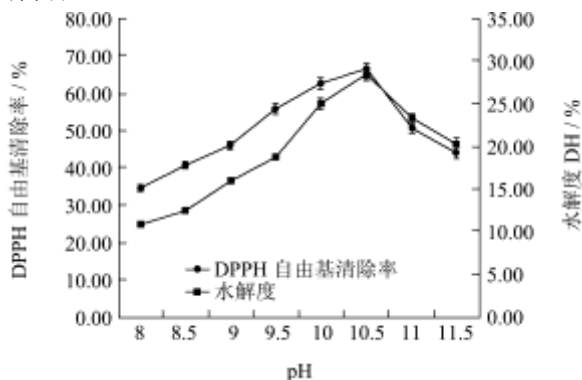


图3 pH值对水解度和DPPH自由基清除能力的影响

Fig.3 Effect of pH on the degree of hydrolysis of coconut protein and DPPH radical scavenging rates of its hydrolysates

2.2.3 温度对椰肉酶解物 DH 和 DPPH·清除作用的影响

在底物浓度为1%，加酶量为8000 U/g，酶解时间为5 h，pH值为10.5，考察酶解温度对水解度和DPPH·清除率的影响，结果见图4。

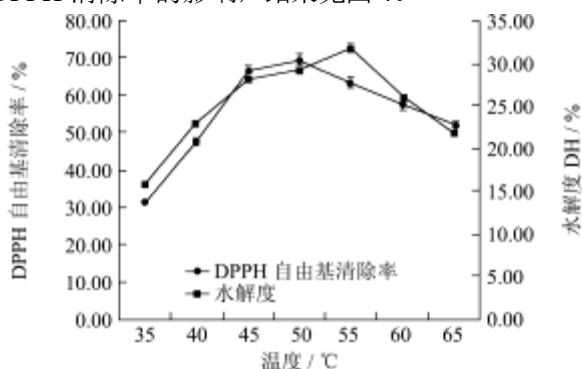


图4 温度对水解度和DPPH自由基清除能力的影响

Fig.4 Effect of temperature on the degree of hydrolysis of coconut protein and DPPH radical scavenging rates of its hydrolysates

如图4所示，温度对椰肉酶解物的水解度影响较大，首先水解度随着温度的升高而迅速增大，在55℃时达到峰值；之后随着温度的升高，水解度开始下降，这可能是由于在较低温度下酶反应速率较低，分子的动力学能量较低，酶与底物之间的相互碰撞次数较少；而在较高温度下，维持分子形状的作用力被破坏，酶分子逐渐发生变性，从而也导致水解度的降低^[11]。而酶解物的DPPH·清除能力随温度的变化也呈凸形的抛物线关系，而在温度达到50℃时，达到最大DPPH·清除率69.39%。

2.2.4 加酶量对椰肉酶解物 DH 和 DPPH·清除

作用的影响

在底物浓度为1%，酶解时间为5 h，pH值为10.5，酶解温度为50℃，考察加酶量对水解度和DPPH·清除率的影响，结果见图5。

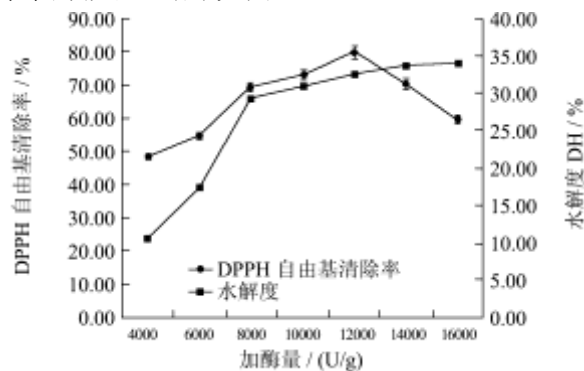


图5 加酶量对水解度和DPPH自由基清除能力的影响

Fig.5 Effect of the amount of enzyme on the degree of hydrolysis of coconut protein and DPPH radical scavenging rates of its hydrolysates

如图5所示，随着加酶量的增加，椰肉酶解物的水解度也随之增大，当加酶量超过8000 U/g时，水解曲线变得平缓，这可能是由于加酶量的过大使得单位时间内分子不与底物结合，造成水解度增加缓慢。而酶解物的DPPH·清除率则随着加酶量的增加先增大后减小，在加酶量为12000 U/g时，DPPH·清除率达到最大为79.68%。这说明了加酶量太大则会干扰酶解物的组成和活性^[12-13]，所以控制加酶量进行适度酶解，有利于提高产物的抗氧化性。

2.2.5 底物浓度对椰肉酶解物 DH 和 DPPH·清除作用的影响

在酶解时间为5 h，pH值为10.5，酶解温度为50℃，加酶量为12000 U/g，考察底物浓度对水解度和DPPH·清除率的影响，结果见图6。

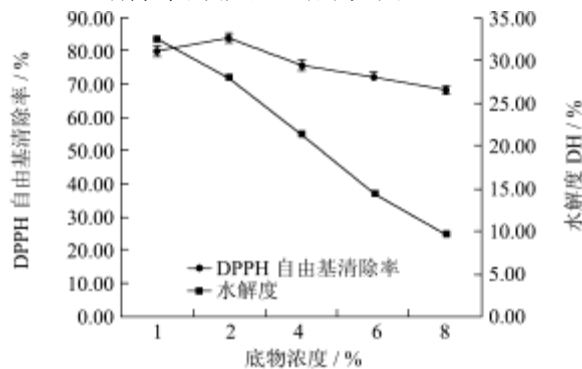


图6 底物浓度对水解度和DPPH自由基清除能力的影响

Fig.6 Effect of the content of substrate on the degree of hydrolysis of coconut protein and DPPH radical scavenging rates of its hydrolysates

如图6所示，随着底物浓度的增加，水解度逐渐

降低。这可能是由于当底物浓度为 1%时, 酶已经被底物所饱和, 随着底物浓度的增加导致溶液黏度加大, 流动性变差, 抑制了酶促反应各成分的扩散与运动, 限制了酶的催化作用。而 DPPH·清除率在底物浓度为 2%时, 达到最大为 83.81%, 这可能是因为当底物浓度相对较低时, 酶分子与椰肉蛋白结合速度较慢, 酶解产物的 DPPH·清除率较低, 随着底物浓度的增加, 酶分子与椰肉蛋白接触机会增多, 水解易于进行, 故酶解产物 DPPH·清除率增加, 但当底物浓度超过 2%, 随着底物浓度的继续增大, 底物分散困难, 较多的底物相互包埋, 且反应产物浓度过大抑制水解的继续进行, 反应难度加大, 所以导致椰肉蛋白酶解产物的 DPPH·清除率降低^[14]。

2.3 正交实验分析

从上述结果可以看出, 反应温度、pH 值、加酶量、反应时间和底物浓度是蛋白酶解的重要工艺参数。以酶解 pH 值、酶解温度、底物浓度、加酶量和酶解时间为实验因素, 采用 5 因素 4 水平正交实验设计 (见表 2), 以水解度和 DPPH·清除率为评价指标, 对椰肉酶解工艺参数进行优化, 其结果见表 3。

表 2 正交实验因素水平表

水平	因素				
	A (温度 /°C)	B (pH)	C [加酶量/(U/g)]	D (时间 /h)	E (底物浓度/%)
1	45	9.5	8000	4	1
2	50	10	10000	5	2
3	55	10.5	12000	6	3
4	50	11	14000	7	4

表 3. 椰肉蛋白酶解的正交实验结果与分析

因素	温度	pH	加酶量	时间	底物浓度	水解度 /%	DPPH·清除率/%
1	1	1	1	1	1	13.17	52.74
2	1	2	2	2	2	24.2	68.08
3	1	3	3	3	3	26.35	57.00
4	1	4	4	4	4	21.64	50.97
5	2	1	2	3	4	23.5	62.19
6	2	2	1	4	3	28.27	65.74
7	2	3	4	1	2	25.37	87.03
8	2	4	3	2	1	31.53	75.18
9	3	1	3	4	2	32.3	70.48
10	3	2	4	3	1	35.01	69.58
11	3	3	1	2	4	23.96	66.44

12	3	4	2	1	3	22.73	64.78
13	4	1	4	2	3	22.86	61.37
14	4	2	3	1	4	14.88	63.4
15	4	3	2	4	1	27.61	67.42
16	4	4	1	3	2	24.9	60.6
K ₁	21.340	22.957	22.575	19.037	26.830		
K ₂	27.168	25.590	24.510	25.637	26.693		
K ₃	28.500	25.823	26.265	27.440	25.053		
K ₄	22.563	25.200	26.220	27.455	20.995		
R	7.160	2.866	3.690	8.418	5.835		
k ₁	57.197	61.695	61.380	66.987	66.230		
k ₂	72.535	66.700	65.617	67.767	71.548		
k ₃	67.820	69.472	66.515	62.342	62.222		
k ₄	63.197	62.883	67.237	63.653	60.750		
r	15.338	7.777	5.857	5.425	10.798		

注: K 和 R 代表水解度; k 和 r 代表 DPPH·清除率。

2.4 验证实验

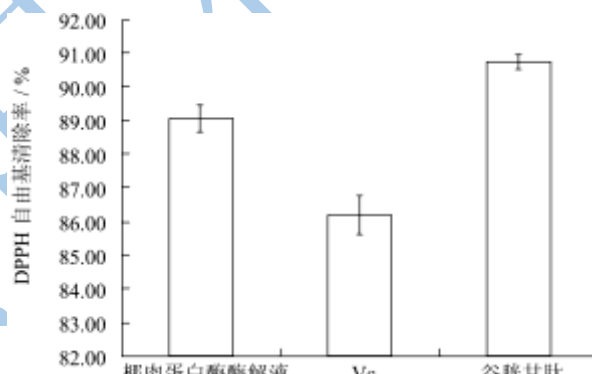


图 7 同一浓度下椰肉蛋白酶解物、Vc 和谷胱甘肽抗氧化能力的比较

Fig.7 Antioxidant capacities of coconut protein hydrolysates, ascorbic acid and glutathione at the same concentrations

通过正交实验确定了椰肉抗氧化酶解物的最佳制备工艺, 在该工艺条件下进行验证实验, 采用碱性蛋白酶酶解椰肉蛋白, 酶解后离心取上清液测其抗氧化活性和水解度, 三次平行实验。其中水解度为 29.16%, DPPH 自由基清除率 89.07%, 水解液中蛋白含量为 15.8 mg/mL, 抗氧化活性达到最佳, 由图 7 可以看出, 比同一浓度条件下的 Vc 的 DPPH 自由基清除率高 3.33 倍, 但比同质量浓度的谷胱甘肽的清除活性低 1.87 倍, 提示椰肉蛋白酶解物可作为氢供体终止自由基链式反应, 表明其具有作为天然抗氧化剂的应用潜力。

3 结论

本研究通过 Alcalase 碱性蛋白酶、Neutrase 中性蛋

白酶、菠萝蛋白酶、Papain 木瓜蛋白酶等 4 种蛋白酶对椰肉蛋白的水解,以水解度和 DPPH 清除率为指标,筛选 Alcalase 碱性蛋白酶为最适用酶,故进一步通过多指标正交设计对碱性蛋白酶的水解进行工艺参数优化,发现影响椰肉蛋白酶解物抗氧化性的主要因素是底物浓度和反应温度,同时得到最优酶解条件是酶解温度 50℃,pH 值 10.5,加酶量 14000 U/g,酶解时间 7 h,底物浓度 2%,在此条件下酶解物的水解度和对 DPPH 自由基清除率分别为 29.16% 和 89.07%。比同一浓度条件下的 Vc 的 DPPH 清除率高 3.33 倍,但比同质量浓度的谷胱甘肽的清除活性低 1.87 倍。说明椰肉蛋白酶解物具有较强的抗氧化活性,可作为抗氧化食品或保健品的基料。本研究为椰肉资源的合理、高效利用提供了一条新途径,并为椰肉多肽的工业化生产提供理论依据和工艺参数。此外,对椰肉蛋白酶解物的氨基酸组分分析和分子量分布测定将有助于进一步探讨其抗氧化机理。

参考文献

- [1] 张聪.椰子果的营养价值及其应用综述[J].四川烹饪高等专科学校学报,2011,1:26-28
Zhang C. Comprehensive review of the nutritious value and application of coconuts [J]. Journal of Sichuan Higher Institute of Cuisine, 2011, 1: 26-28
- [2] 康尔歌,赵晋府,孟旭.椰肉成分的测定及相关比较[J].广州食品工业科技,2002,18(4):48-49
Kang E G, Zhao J F, Meng X. Determination and comparison of components of coconut meat [J]. Guangzhou Food Science and Technology, 2002, 18(4): 48-49
- [3] Kwon K S, Bae D, Park K H, et al. Aqueous extraction and membrane techniques improve coconut protein concentrate functionality [J]. Journal of Food Science, 1996, 61(4): 753-756
- [4] Rasyid F, Manullang M, Hansen P M T. Isolation and characterization of coconut protein [J]. Food Hydrocolloids, 1992, 6(3):301-314
- [5] 郑亚军,李艳,赵松林,等.椰肉中醇溶蛋白抗氧化活性[J].热带作物学报,2009,30(7):1035-1038
Zheng Y J, Li Y, Zhao S L. et al. Antioxidant activities of coconut prolamine protein [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009, 30(7): 1035-1038
- [6] 赵新淮,冯志彪.蛋白质水解物水解度的测定[J].食品科学,1994,11:65-67.
Zhao X H, Feng Z B. The determination of the degree of hydrolysis of protein hydrolysates [J]. Food Science, 1994, 11: 65-67
- [7] Wu H C, Chen H M, Shiao C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*) [J]. Food Research International, 2003, 36: 949-957
- [8] Adamson N J, Reynolds E C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase [J]. Enzyme Microbial Technology, 1996, 19: 202-207
- [9] 王章存,姚惠源.大米蛋白质的酶法水解及其性质研究[J].中国粮油学报.2003,18(5):5-7
Wang Z C, Yao H Y. Enzymatic hydrolysis of rice protein and functional properties of the hydrolysates [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2003, 18(5): 5-7
- [10] 宋晓燕,高彦祥,袁芳.响应面法优化羊胎粉中抗氧化多肽制备工艺的研究[J].食品科技.2008,33(11):237-241
Song X Y, Gao Y X, Yuan F. Optimization of antioxidant peptide production from goat placenta powder using RSM [J]. Food Science and Technology, 2008, 33(11): 237-241
- [11] Shen Q, Guo R, Dai Z Y, et al. Investigation of Enzymatic Hydrolysis Conditions on the Properties of Protein Hydrolysate from Fish Muscle (*Collichthys niveatus*) and Evaluation of Its Functional Properties [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2012, 60: 5192-5198
- [12] You L J, Regenstein J M, Liu R H. Optimization of Hydrolysis Conditions for the Production of Antioxidant Peptides from Fish Gelatin Using Response Surface Methodology [J]. Journal of Food Science, 2010, 75(6): 582-587
- [13] 郭兴凤,吴欣欣,薛圆圆,等.碱性蛋白酶水解豌豆蛋白及其产物抗氧化活性研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2012,33(1):6-10
Guo X F, Wu X X, Xue Y Y, et al. Study on pea protein hydrolysis by using Alcalase and antioxidant activity of hydrolyzate thereof [J]. Journal of Henan University of Technology, 2012, 33(1): 6-10