

酶联合挤压豌豆蛋白肽的分离工艺

李慧, 王琪, 关健, 王鑫烁, 周泉城

(山东理工大学农业工程与食品科学学院, 山东淄博 255049)

摘要: 本文旨在应用响应曲面实验设计优化酶联合挤压豌豆蛋白酶解条件, 以期得到最优的抗氧化肽和准确的酶解预测模型, 并分离得到具有高自由基清除率的豌豆蛋白抗氧化肽。以含水量为 30% 的豌豆蛋白为原料, 以 O_2^- 清除率为评价指标, 利用响应曲面设计优化中性蛋白酶挤出物的酶解条件, 得出酶解最佳条件为: 加酶量 12.23%、温度 40.23 °C、pH 6.99、底物浓度 6.92%。在此条件下, O_2^- 清除率为 75.93%。采用透析和高效液相相结合的方法, 对酶解产物进行分离及分子量的确定。分离得到小于 1 ku、1~3.5 ku、3.5~7 ku 和大于 7 ku 的酶解液。经测定发现分子量小于 1 ku 的酶解液抗氧化活性最强, 达 78.31%, 其分子量集中在 200~800 u 左右, 为 2~8 肽。经验证, 所建模型预测准确可靠, 酶解产物抗氧化性高, 可为相关生产和工艺产品开发提供参考价值。透析可显著提高肽的自由基清除率。

关键词: 豌豆蛋白; 挤压; 中性蛋白酶; 酶解; 自由基清除率; 透析

文章编号: 1673-9078(2018)04-172-178

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.04.027

Separation Process of Pea Protein Peptide with Enzymolysis Combined Extrusion

LI Hui, WANG Qi, GUAN Jian, WANG Xin-shuo, ZHOU Quan-cheng

(School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo 255049, China)

Abstract: The purpose of this paper was to optimize the enzymolysis conditions of pea protein with enzyme combined extrusion by response surface methodology, so as to obtain the optimal antioxidant peptide with high free radicals scavenging capacity and an accurate enzymolysis prediction model. The enzymolysis conditions of neutral protease were optimized with the scavenging ratio of O_2^- as evaluation index and with water content of 30% pea protein as raw by response surface methodology. The optimal enzymolysis conditions were as follows: enzyme amount 12.23% (E/S), temperature 40.23 °C, pH 6.99, and substrate concentration 6.92% (g/mL). Under these conditions, the O_2^- scavenging rate was 75.93%. The separation and determination of molecular weight of enzymolysis products were studied by the combination of dialysis and HPLC. The enzymolysis liquids with molar weights <1 ku, 1~3.5 ku, 3.5~7 ku, and >7 ku were separated. The results showed that the antioxidant activity of enzymolysis liquid less than 1 ku was the strongest, reaching 78.31%. The molecular weight was concentrated in about 200 ~ 800 u as 2 ~ 8 peptide. It is confirmed that the prediction model is accurate and reliable, and hydrolysates has high antioxidant activity, which can provides the reference value for the development of related production and process products. Dialysis can significantly improve the free radical scavenging rate.

Key words: pea protein; extrusion; neutral protease; hydrolysis; free radical scavenging; dialysis

豌豆 (*Pisum sativum* Linn) 又名麦豌豆、寒豆、麦豆, 是重要的食用和饲用豆类作物, 是一种营养性食品^[1], 含有的各种矿物质对人体有极大的好处, 另外, 国际上现研究, 通过酶解所获得的豌豆蛋白肽具有一些活性功能^[2]。比如, Ndiaye 等^[3]人研究发现豌

收稿日期: 2017-11-18

基金项目: 山东省重点研究开发计划 (2017YYSP033); 山东省自然科学基金联合专项 (ZR2016BL03)

作者简介: 李慧 (1993-), 女, 在读硕士, 研究方向: 功能性食品加工及评价

通讯作者: 周泉城 (1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 功能性食品

豆酶解液具有抗氧化、降低炎症和免疫调节的作用。而 Huan Li 等人的研究则表明, 豌豆蛋白酶解后的产物为阳离子多肽, 该多肽可以有效调节 Ca MK II 的活性, 因而可以作为保健品被利用于心血管疾病的预防方面^[4]。Samson 等人则发现豌豆蛋白可以抑制 ACE 酶的活性, 从而起到降血压的作用。

利用挤压生产的食品营养丰富、风味独特、食用方便, 受到广大消费者的厚爱, 也逐渐成为食品加工的重要方式^[5]。挤压加工蛋白可使蛋白更易于酶解^[6,7]。在挤压过程中, 在温度、压力和剪切力的作用下, 使维持蛋白质结构的作用力减弱, 使其分子结构发生伸

展,由球状转为纤维状,并使分子间氢键、二硫键等化学键断裂^[8]。此外,挤压后的物料游离氨基的含量增加,使得挤出物的消化率升高,蛋白质的酶解速度加快^[9]。中性蛋白酶是指最适作用 pH 介于 6.0~7.5 之间的一类蛋白酶^[10],由枯草芽孢杆菌发酵提取而得,属于一种内切酶,可用于各种蛋白质水解处理^[11]。其中性 pH 范围内可迅速水解大分子蛋白质成肽类和部分游离氨基酸,有利于蛋白质的吸收和利用,且水解度高、风味佳,已广泛用于生产高级调味品和食品营养强化剂^[12,13]。它的催化反应快,安全无工业污染^[14],被广泛用于食品各个领域,具有很高的应用前景和研发价值。

本研究旨在以含水量为 30% 的豌豆蛋白为原料,采用酶联合挤压的方式对挤出物进行酶解,实验中以 O₂⁻ 自由基清除率作为抗氧化活性的评价指标,通过响应曲面实验设计优化利用中性蛋白酶酶解豌豆蛋白挤出物酶解条件并预测酶解产物自由基清除率模型,通过透析及高效液相相结合的方法进行分子的酶解产物的分离及分子量的测定。从而为豌豆蛋白酶联合挤出物的开发利用和加工拓宽思路、提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

中性蛋白酶,酶活力为 47362 u/g,济宁元素高科技生物科技有限公司;甲醛溶液等所用试剂均为分析纯;豌豆蛋白主要组成为水分 4.6±0.02%,蛋白质 73.2±0.23%、粗脂肪 0.22±0.01%、灰分 4.62±0.03%,购自烟台双塔食品股份有限公司。

单螺杆挤压机,山东理工大学农业工程与食品科学学院研制,螺杆转速:170 r/min,机筒温度:60 °C,膜孔孔径:12 mm; RE200 型旋转蒸发仪,雅马拓科技贸易(上海)有限公司; FD-C10N 型台式冷冻干燥机,冠森生物科技(上海)有限公司; Waters2695 高效液相色谱仪,杭州赛默科技有限公司。

1.2 加酶挤压操作

称取 2 kg 豌豆蛋白,向其中加入 2 g 中性蛋白酶,混匀,调整混合物含水率为 30%,过 80 目筛。挤压条件:机筒温度 60 °C、螺杆转速 170 r/min、模孔孔径 12 mm^[15]。将挤出物冷却、干燥、粉碎,装袋备用,记为酶解挤出物。

1.3 豌豆蛋白挤出物的酶解

称取一定质量的样品,加入一定质量的蛋白酶和

一定 pH 值的磷酸盐缓冲溶液,摇匀,置于恒温振荡水浴锅中,酶解 3 h,沸水浴灭酶 10 min。冷却后,将蛋白酶解液过滤,取滤液待测,记为酶解物^[16]。

1.4 豌豆蛋白水解度的测定

采用甲醛滴定法^[17]。水解度公式如下:

$$DH\% = \frac{M(V_1 - V_2)(1000/CwoV)}{(1/htot) \times 100}$$

其中, M 为 NaOH 溶液的浓度 (mol/L); Cwo 为所使用的豌豆蛋白质溶液的蛋白质量浓度 (g/L); V 为用于甲醛滴定的酶解液的体积数 (mL); htot 为每克原料蛋白质中肽键的毫摩尔数,豌豆蛋白为 7.55。

1.5 自由基清除活性响应曲面实验设计

查阅相关资料及文献可发现加酶量、温度、pH、底物浓度为影响酶解条件的四个显著因素,因此,选择此四个因素为实验因素。通过预实验研究大致确定实验因素的用量范围,采用单因素实验确定各因素的显著变化范围,进而确定最优水平,以自由基清除率为评判指标,运用 SAS 9.1 软件进行实验设计分析,得出最佳的酶解条件^[18]。实验因子及水平见表 1。

表 1 因素水平表

Fig.1 Factor level table of response surface methodology

| 水平 | A (加酶量)/% | B (温度)/°C | C (pH) | D (底物浓度)/% |
|----|-----------|-----------|--------|------------|
| -2 | 8 | 30 | 6.4 | 5 |
| -1 | 10 | 35 | 6.7 | 6 |
| 0 | 12 | 40 | 7.0 | 7 |
| 1 | 14 | 45 | 7.3 | 8 |
| 2 | 16 | 50 | 7.6 | 9 |

1.6 酶解产物自由基 O₂⁻ 清除率的测定

根据玄红专等人的方法^[19]。

1.7 透析袋分离豌豆蛋白抗氧化肽

采用 7、3.5、1 ku 的透析袋,对酶解液进行依次分离。预处理好的透析袋中加入约三分之二的酶解液,两端封好,放在蒸馏水中进行搅拌,每隔一段时间换一次水,直至透出液不再有颜色变化,将透出液用旋转蒸发仪浓缩,对浓缩液进行冷冻干燥,得到豌豆蛋白抗氧化肽粉。

1.8 豌豆蛋白抗氧化肽的抗氧化活性测定

对 1.7 中收集得到的分子量为小于 1 ku、1~3.5 ku、3.5~7 ku 和大于 7 ku 的豌豆蛋白抗氧化肽粉进行 O₂⁻ 清除率的测定。

1.9 豌豆蛋白酶解产物分子量分布的测定

用 Waters Protein-Pak 125A 300 mm×7.8 mm 色谱柱对经透析袋分离后得到的分子量小于 1 ku 的组分进行分子量分布的分析。流动相：乙腈/水/三氟乙酸，45/55/0.1 (V/V)，检测波长：220 nm 流速：0.5 mL/min 柱温：30 ℃。

1.10 数据分析

每个操作 3 次平行。利用 SAS 9.1 软件建立回归模型方程，对数据进行 ANOVA 分析，Duncan test 确定平均值差异。

2 结果与讨论

2.1 实验原料的确定

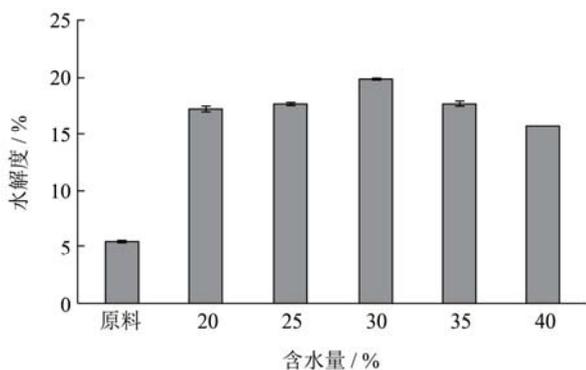


图 1 豌豆蛋白及酶联合挤压豌豆蛋白水解度

Fig.1 The degree of hydrolysis of pea protein and enzymolysis combined extrusion pea protein

对原豌豆蛋白和加入中性蛋白酶挤压不同含水率的豌豆蛋白的水解度进行测定比较，得出结果如图 1 所示。

由图 1 可知，豌豆蛋白经加酶挤压后水解度明显上升，且水解度随豌豆蛋白含水量的增加呈先升高后降低的趋势，当含水量为 30% 时，豌豆蛋白的水解度最大，因此本实验采用含水量为 30% 的挤压豌豆蛋白为原料。

2.2 响应面法优化酶解物 O₂⁻清除活性实验

查阅相关资料及文献，确定酶解时间 3 h，选取加酶量 (A)、温度 (B)、pH 值 (C)、底物浓度 (D) 为实验因素，利用单因素实验确定各因素的最显著用量范围，进而确定最优水平，并以酶解物的 O₂⁻自由基清除率为评判指标^[20]，设计 4 因素 5 水平共 26 个试验点的响应分析实验进行二次回归设计实验和分析。实验方案、实验条件及结果列于表 2 中。

表 2 响应面实验设计及结果

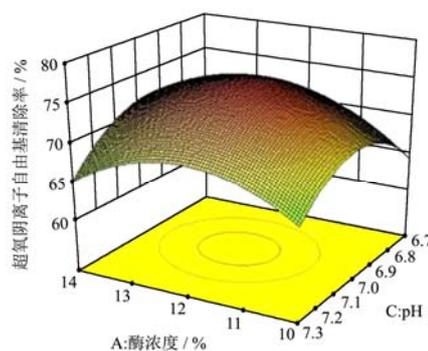
Table 2 The response surface experiment design and results

| A 加酶量/% | B 温度/℃ | C pH | D 底物浓度/% | O ₂ ⁻ 清除率/% |
|------------|-----------|---------|-------------|-----------------------------------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 53.02 |
| 1 | 1 | 1 | -1 | 62.94 |
| 1 | 1 | -1 | 1 | 58.33 |
| 1 | 1 | -1 | -1 | 67.71 |
| 1 | -1 | 1 | 1 | 52.85 |
| 1 | -1 | 1 | -1 | 56.07 |
| 1 | -1 | -1 | 1 | 54.54 |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 54.65 |
| -1 | 1 | 1 | 1 | 58.48 |
| -1 | 1 | 1 | -1 | 49.76 |
| -1 | 1 | -1 | 1 | 48.75 |
| -1 | 1 | -1 | -1 | 46.98 |
| -1 | -1 | 1 | 1 | 65.94 |
| -1 | -1 | 1 | -1 | 55.28 |
| -1 | -1 | -1 | 1 | 70.18 |
| -1 | -1 | -1 | -1 | 57.34 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 57.78 |
| -2 | 0 | 0 | 0 | 55.55 |
| 0 | 2 | 0 | 0 | 64.18 |
| 0 | -2 | 0 | 0 | 54.10 |
| 0 | 0 | 2 | 0 | 52.27 |
| 0 | 0 | -2 | 0 | 56.40 |
| 0 | 0 | 0 | 2 | 55.37 |
| 0 | 0 | 0 | -2 | 59.42 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 76.88 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 74.87 |

以 O₂⁻清除率为响应值，经回归拟合后，中性蛋白酶酶解豌豆蛋白的 O₂⁻清除率的回归方程为：

$$O_2^- \text{清除率} = -3567.79 + 36.19A + 8.05B + 835.67C + 98.51D + 0.43AB - 1.72AC - 1.77AD + 0.38BC - 0.36BD + 0.23CD - 1.19A^2 - 0.17B^2 - 59.52C^2 - 4.59D^2$$

中性蛋白酶酶解豌豆蛋白的 O₂⁻清除率回归方程方差分析表见表 3。



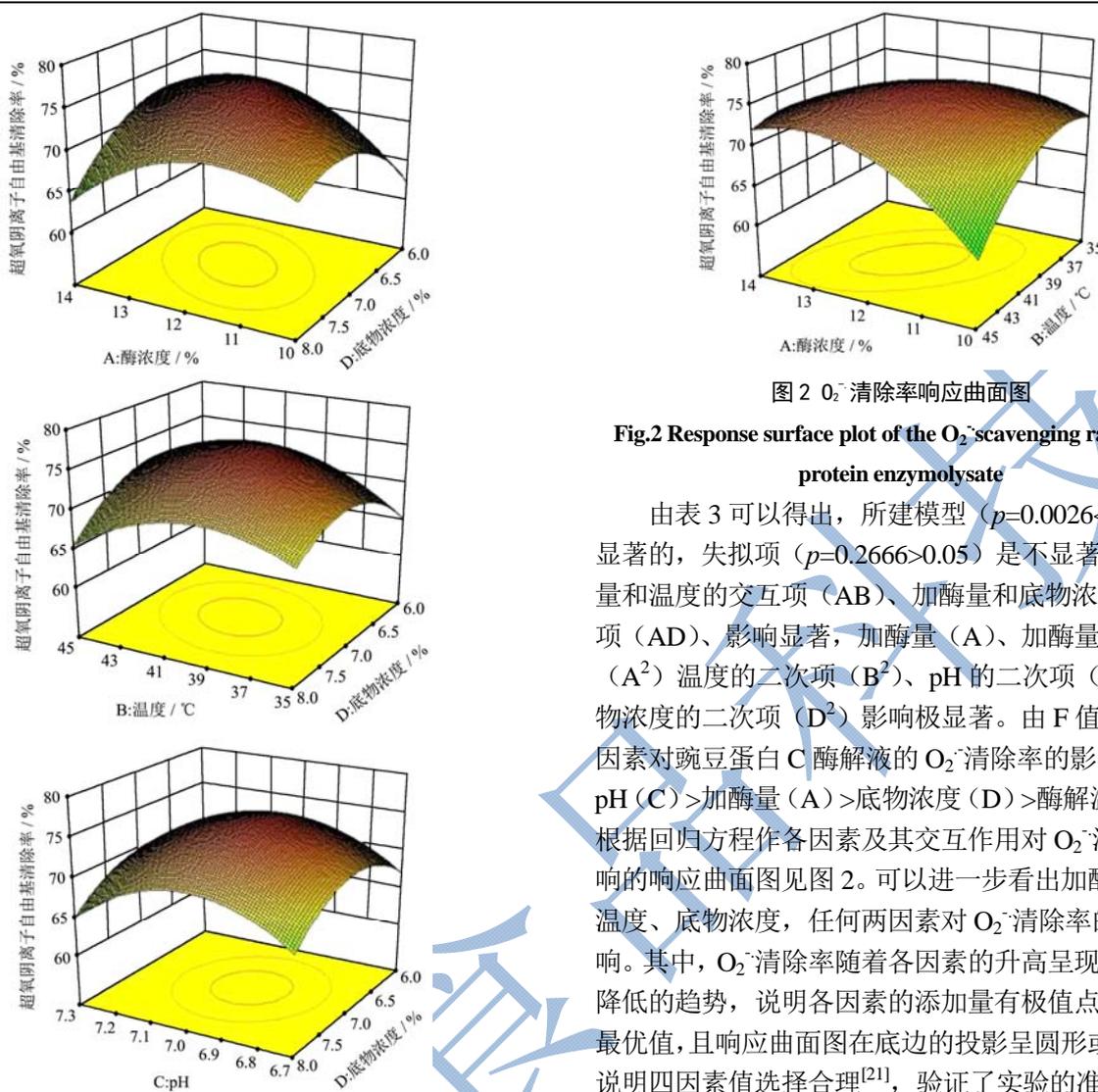


图 2 O₂^{·-}清除率响应曲面图

Fig.2 Response surface plot of the O₂^{·-} scavenging rate of pea protein enzymolysate

由表 3 可以得出, 所建模型 ($p=0.0026<0.05$) 是显著的, 失拟项 ($p=0.2666>0.05$) 是不显著的。加酶量和温度的交互项 (AB)、加酶量和底物浓度的交互项 (AD)、影响显著, 加酶量 (A)、加酶量的二次项 (A²) 温度的二次项 (B²)、pH 的二次项 (C²)、底物浓度的二次项 (D²) 影响极显著。由 F 值可知, 各因素对豌豆蛋白 C 酶解液的 O₂^{·-}清除率的影响次序: pH (C) > 加酶量 (A) > 底物浓度 (D) > 酶解温度 (B)。根据回归方程作各因素及其交互作用对 O₂^{·-}清除率影响的响应曲面图见图 2。可以进一步看出加酶量、pH、温度、底物浓度, 任何两因素对 O₂^{·-}清除率的交互影响。其中, O₂^{·-}清除率随着各因素的升高呈现先升高后降低的趋势, 说明各因素的添加量有极值点, 即存在最优值, 且响应曲面图在底边的投影呈圆形或椭圆形, 说明四因素值选择合理^[21], 验证了实验的准确性。

表 3 O₂^{·-}清除率的各因素方差分析

Table 3 Variance analysis of the O₂^{·-} scavenging rate of pea protein enzymolysate

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | Prob>F | 显著性 |
|----------------|---------|-----|--------|------------|--------|-----|
| | 1264.34 | 14 | 90.31 | 5.96 | 0.0026 | ** |
| A | 5.86 | 1 | 5.86 | 0.39 | 0.5467 | |
| B | 0.02 | 1 | 0.02 | 1.425E-003 | 0.9706 | |
| C | 6.41 | 1 | 6.41 | 0.42 | 0.5289 | |
| D | 0.44 | 1 | 0.44 | 0.029 | 0.8674 | |
| AB | 294.64 | 1 | 294.64 | 19.44 | 0.0010 | ** |
| AC | 17.14 | 1 | 17.14 | 1.13 | 0.3103 | |
| AD | 200.36 | 1 | 200.36 | 13.22 | 0.0039 | ** |
| BC | 5.06 | 1 | 5.06 | 0.33 | 0.5749 | |
| BD | 52.49 | 1 | 52.49 | 3.46 | 0.0896 | |
| CD | 0.08 | 1 | 0.08 | 5.174E-003 | 0.9439 | |
| A ² | 397.91 | 1 | 397.91 | 26.26 | 0.0003 | ** |
| B ² | 301.46 | 1 | 301.46 | 19.89 | 0.0010 | ** |
| C ² | 500.92 | 1 | 500.92 | 33.06 | 0.0001 | ** |

| | | | | | | |
|----------------|---------|----|--------|-------|--------|-----|
| 接上页 | | | | | | |
| D ² | 368.07 | 1 | 368.07 | 24.29 | 0.0005 | ** |
| 残差 | 166.68 | 11 | 15.15 | | | |
| 失拟项 | 164.66 | 10 | 16.47 | 8.15 | 0.2666 | 不显著 |
| 纯差 | 2.02 | 1 | 2.02 | | | |
| 总和 | 1431.02 | 25 | | | | |

注: *为显著 ($p < 0.05$), **为极显著 ($p < 0.01$)。

2.3 最佳自由基清除率条件

以 O₂⁻清除率为评价指标,对回归方程进行偏微分,在实验条件下进行调整,得出最佳酶解条件:加酶量 12.23%、温度 40.23 °C、pH 6.99、底物浓度 6.92%。在此条件下,得到 O₂⁻清除率为 75.93%。

经验证,在此条件下酶解液 O₂⁻清除率为 78.6±0.17%。方差分析无显著性差异。这说明该模型预测准确,可用于自由基 O₂⁻清除率抗氧化性预测及酶解条件筛选。

2.4 豌豆蛋白抗氧化肽的分离

对用透析袋分离得到的四个不同分子量的组分进行 O₂⁻清除测定,测定结果见表 4。

由表 4 可知,不同分子量的豌豆蛋白抗氧化肽均具有 O₂⁻的清除能力,其清除能力随分子量减小而增大。分子量小于 1 ku 的清除能力最强。这与文献报道一致^[22,23]。因此后续实验以分子量小于 1 ku 的组分为研究材料。

表 4 中性蛋白酶酶解豌豆蛋白酶解液的抗氧化活性

Table 4 Antioxidant activity of pea protein hydrolysate by neutral protease

| 分子量范围/ku | O ₂ ⁻ 清除率/% |
|----------|-----------------------------------|
| <1 | 78.31 |
| 1~3.5 | 31.53 |
| 3.5~7 | 18.42 |
| >7 | 10.34 |

2.5 豌豆蛋白酶解物小于 1 ku 组分的分子量

分析

2.5.1 分子量标准曲线

校正曲线: $Lg(MW)=7.382-0.248T$, $R^2=0.9994$, 见图 3。

2.5.2 分子量小于 1 ku 的酶解产物分子量分布图

酶解产物的分子量分布图见图 4。

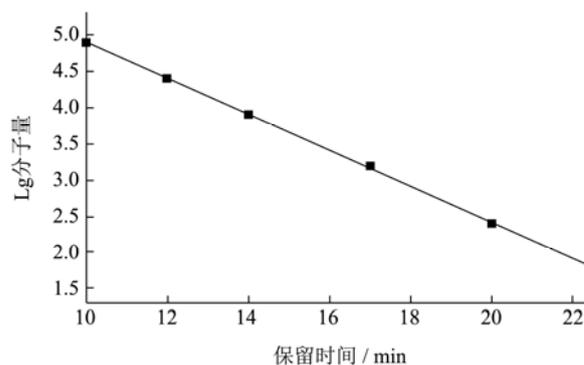


图 3 分子量校正曲线

Fig.3 Calibration curve of molecular weight

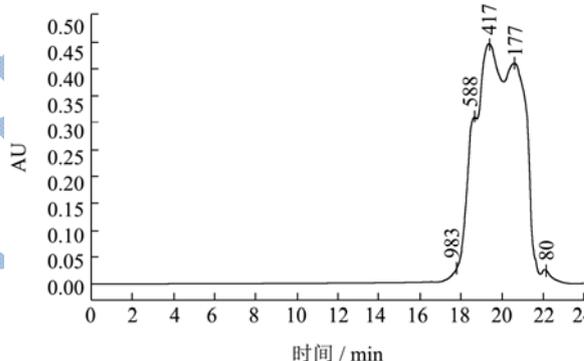


图 4 酶联合挤压豌豆蛋白酶解物分子量分布图

Fig.4 Molecular weight distribution of peptide products of pea protein treated by enzymolysis combined extrusion

刁静静等^[24]将豌豆蛋白的碱性蛋白酶酶解产物采用葡聚糖凝胶 G-25 进行分离,得到抗氧化活性相对较高的分子量集中在 470~640 u。由图 3、4 可知,经 1 ku 透析袋分离后的酶解液,分子量大多集中在 200~800 u 左右,说明酶解后得到的肽大多是 2~8 肽,这与刁静静等的研究大致相同。

3 结论

3.1 本研究以豌豆蛋白为原料,采用响应曲面法以 O₂⁻清除率为指标,优化中性蛋白酶酶解豌豆蛋白酶联合挤出物酶解条件,最终得出最佳酶解条件为:加酶量 12.23%、温度 40.23 °C、pH 6.99、底物浓度 6.92%。在此条件下, O₂⁻清除率为 75.93%。得到了豌豆蛋白酶联合挤出物中性蛋白酶酶解产物自由基清除预测模

型, 该模型预测准确可靠, 可用于生产预测和工艺开发。

3.2 对酶解液进行透析分离, 发现分子量小于 1 ku 的酶解液抗氧化活性最强, 达 78.31%, 其分子量集中在 200~800 u 左右, 为 2~8 肽。透析能显著提高肽的抗氧化活性, 得到的抗氧化活性肽具有良好的抗氧化性, 能清除体内自由基、减轻自由基对机体的损伤。

参考文献

- [1] Dahl W J, foster L M, Tyler R T. Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum*) [J]. *British Journal of Nutrition*, 2012, 108(S1): S3-S10
- [2] 朱国洪, 彭超英. 食品挤压技术研究新进展[J]. *食品与机械*, 2000, 26(4): 12-13
ZHU Guo-hong, PENG Chao-ying. New development of food extrusion technology [J]. *Food and Machinery*, 2000, 26(4): 12-13
- [3] 王东, 荣家萍, 唐自钟, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶的发酵条件[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(1): 143-151
WANG Dong, RONG Jia-ping, TANG Zi-zhong, et al. Response surface method optimization of fermentation conditions for *Bacillus subtilis* producing neutral protease [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(1): 143-151
- [4] 王凤青. 枯草芽孢杆菌发酵合成聚 γ -谷氨酸的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2011
WANG Feng-qing. Researched on *Bacillus subtilis* producing Poly γ -glutamic acid with fermentation [D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2011
- [5] Lothar R, Wolfgang F, Hans-Gert L, et al. Lateral extrusion in the eastern Alps. 2. structural analysis [J]. *Tectonics*, 1991, 10(2): 257-271
- [6] Quan-Cheng Zhou, Na Liu, Chuan-Xing Feng. Research on the Effect of Papain Co-extrusion on Pea Protein and Enzymolysis Antioxidant Peptides [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, 41(3): 10-11
- [7] 叶鸿剑, 肖志刚, 魏旭, 等. 豆渣粉低温加酶挤压技术研究[J]. *中国粮油学报*, 2011, 26(11): 99-105
YE Hong-jian, XIAO Zhi-gang, WEI-Xu, et al. Study on low temperature enzyme extrusion technology of soybean dregs powder [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oil Association*, 2011, 26(11): 99-105
- [8] Taponnier P, Peltzer G, Dain A Y L, et al. Propagating extrusion tectonics in Asia: New insights from simple experiments with plasticine [J]. *Geology*, 1982, 10(10): 611-621
- [9] 母应春, 解春芝, 杨夫光, 等. 加酶挤压碎米生产淀粉糖浆工艺优化[J]. *食品科技*, 2014, 39(7): 163-167
MU Ying-chun, XIE Chun-zhi, YANG Fu-guang, et al. Optimization of starch syrup production process by enzymatic extrusion broken rice [J]. *Food Science and Technology*, 2014, 39(7): 163-167
- [10] 许波. 中性蛋白酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的高效表达[D]. 昆明: 云南师范大学, 2004
XU Bo. Cloning and overexpression of gene encoding the neutral protease from *B. subtilis* in *Pichia pastoris* [D]. Kunming: College of Life Science Yunnan Normal University, 2004
- [11] 蒋小锋. 不同蛋白酶处理对马肉嫩度及其挥发性风味物质和超微结构的影响[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015
JIANG Xiao-feng. Effect of different protease treatment on tenderness, volatile flavor compounds and ultrastructure of horse meat [D]. Urumqi: Xinjiang University of Agriculture, 2015
- [12] 粟桂娇, 阎欲晓, 陈春宁. 双水相萃取分离米曲霉中性蛋白酶[J]. *食品科技*, 2012, 37(1): 9-13
SU Gui-jiao, YAN Yu-xiao, CHEN Chun-ning. The extraction and isolation of the neutral protease of *Aspergillus oryzae* using aqueous two-phase system [J]. *Food Science and Technology*, 2012, 37(1): 9-13
- [13] 李宁, 刘红芝, 刘丽, 等. 中性蛋白酶分步酶解花生分离蛋白制备花生短肽的研究[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(24): 5237-5247
LI Ning, LIU Hong-zhi, LIU Li, et al. Preparation of peanut protein isolated by neutral proteinase stepping hydrolysis [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(24): 5237-5247
- [14] Croall D E, Demartino G N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation [J]. *Physiological Reviews*, 1991, 71(3): 813-816
- [15] Ding Q B, Ainsworth P, Tucker G, et al. The effect of extrusion conditions on the physicochemical properties and sensory characteristics of rice-based expanded snacks [J]. *Journal of Food Engineering*, 2005, 66(3): 283-289
- [16] 夏明. 水解进程对乳蛋白酶解产物抗菌性能的影响研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2011
XIA Ming. The influence of hydrolytic proceeding on the antibacterial activity of the lactoprotein hydrolysate [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011
- [17] 李晓东, 牛治霞, 张柏林. 乳清蛋白水解物水解度 3 种测定方法的比较[J]. *中国乳品工业*, 2006, 34(10): 59-62

- LI Xiao-dong, NIU Zhi-xia, ZHANG Bo-lin. Various methods available for the determination of hydrolyzed degree of whey protein [J]. *China Dairy Industry*, 2006, 34(10): 59-62
- [18] 葛英亮,马艳秋.响应面法优化蓝莓澄清型果汁饮料工艺[J]. *食品科学*,2012,12(4):52-57
- GE Ying-liang, MA Yan-qiu. Formulation optimization for clarified blue berry juice by response surface methodology [J]. *Food Science*, 2012, 12(4): 52-57
- [19] 玄红专,桑青,麻建军.邻苯三酚自氧化法测定不同蜂产品抗氧化活性的研究[J]. *食品科技*,2008,33(4):137-139
- XUAN Hong-zhuan, SANG Qing, MA Jian-jun. Anti-oxidation study of different bee products measured by pyrogallol autoxidation method [J]. *Food Science and Technology*, 2008, 33(4): 137-139
- [20] 薛园园.豌豆蛋白的酶水解及其产物抗氧化性能研究[D]. 郑州:河南工业大学,2011
- XUE Yuan-yuan. Enzymatic hydrolysis of pea protein and antioxidative activity of the hydrolysates [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2011
- [21] Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, et al. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl [J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 1998, 62(6):1201-1204
- [22] Myers R H, Montgomery D C. Response surface methodology: process and product in optimization using designed experiments [J]. *Journal of Statistical Planning & Inference*, 2009, 59(3): 185-186
- [23] 张秋萍.豌豆分离蛋白酶解产生物活性肽的研究[D].无锡:江南大学,2013
- ZHANG Qiu-ping. Study on bioactive peptides prepared by enzymolysis of pea protein isolate [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2013
- [24] 刁静静,于伟,张丽萍.豌豆蛋白水解物的分离及其抗氧化活性的研究[J].*包装与食品机械*,2013,31(3):25-29
- DIAO Jing-jing, YU Wei, ZHANG Li-ping. Peptide fraction and activity of pea protein hydrolysates [J]. *Packaging and Food Machinery*, 2013, 31(3): 25-29