

Box-Benhnken 响应面优化 巴旦杏抗氧化肽的制备工艺

薛雨菲¹, 李芳², 程怡媚¹, 张瑞¹, 杨海燕¹, 孔令明¹

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

(2. 新疆轻工职业技术学院, 新疆乌鲁木齐 830021)

摘要: 本文研究了以巴旦杏粕蛋白为实验原料, 通过 Box-Benhnken 响应面优化巴旦杏粕蛋白抗氧化肽的酶法制备工艺。以酶解产物的水解度及 DPPH·清除率为评价标准从碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶中挑选最优水解酶, 考察酶的添加量、pH 值、酶解时间及酶解温度对酶解产物 DPPH·清除率的影响。在单因素试验基础上, 采用四因素三水平响应面法确定巴旦杏抗氧化肽酶法制备工艺。结果表明: 碱性蛋白酶较适合制备巴旦杏抗氧化肽, 其最佳酶解工艺条件为: 酶解时 pH 为 9.1, 酶添加量为 10000 U/g, 酶解温度为 58 ℃, 酶解时间为 4 h, 此时酶解物的 DPPH·清除率为 74.45%。该条件适于制备的巴旦杏抗氧化肽, 通过对巴旦杏抗氧化肽制备工艺的优化可为抗氧化肽的开发与应用提供理论借鉴。

关键词: 巴旦杏; 酶解; 抗氧化肽; 工艺

文章编号: 1673-9078(2019)12-208-215

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.027

Optimization of Preparation Technology of Antioxidant Peptide from Apricot by Box-benhnken Response Surface

XUE Yu-fei¹, LI Fang², CHENG Yi-mei¹, ZHANG Rui¹, YANG Hai-yan¹, KONG Ling-ming¹

(1. College of Food and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

(2. Xinjiang Light Industry Vocational and Technical College, Urumqi 830021, China)

Abstract: The preparation process of antioxidant peptides from almond meal protein was optimized. The optimal enzyme was selected from alkaline protease, neutral protease, trypsin, papain and protamex according to the hydrolysis degree and DPPH clearance rate of the hydrolysate. The effects of the amount of enzyme, pH, hydrolysis time and temperature on DPPH radical scavenging activity were investigated. On the basis of single factor test, four-factor and three-level response surface method was used to determine the preparation technology of antioxidant peptides from almond meal protein. The results showed that alkaline protease was suitable for the preparation of antioxidant peptides from almond meal protein. The optimum enzymatic hydrolysis conditions were as follows: pH 9.1, enzyme addition 10000 U/g, enzymatic hydrolysis temperature 58 ℃, enzymatic hydrolysis time 4 h, and DPPH radical scavenging activity of enzymatic hydrolysate was 74.45%. This condition was suitable for the preparation of antioxidant peptides from almond meal protein. The optimization of the preparation process of antioxidant peptides from almond meal protein can provide theoretical reference for the development and application of antioxidant peptides.

Key words: almond; enzymolysis; antioxidant peptide; technology

巴旦杏又名巴旦木、因形为扁长, 故叫扁桃, 新疆地区的巴旦杏资源相对比较丰富^[1]。巴旦杏中含有多种微量元素以及人体健康所需的必需氨基酸, 其仁

收稿日期: 2019-07-23

基金项目: 新疆维吾尔自治区重点研发计划项目 (2017B03020-1; 2017B01003)

作者简介: 薛雨菲 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与综合利用

通讯作者: 孔令明 (1976-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与综合利用

含有 55%~66%的优质油脂, 糖的含量在 10%左右, 粗蛋白含量为 26.3%^[2,3], 是一种优质的蛋白质资源。但由于蛋白质分子量大, 结构复杂, 摄入人体后不易被消化吸收, 从而影响了其生理功能及营养价值的有效发挥。有研究表明将蛋白质经蛋白酶水解为小肽和游离氨基酸后, 其吸收利用率就会大大增加^[4-6]。近年来有关植物蛋白质水解物的研究逐渐增多, 其功能特性受到广泛的关注, 构成蛋白质的几种肽已经被证实具有抗氧化活性, 而且人们对其抗氧化活性进行了广泛的研究。人的衰老及慢性疾病由于人体中自由基作

用于蛋白质导致蛋白质羰基的积聚,这种自由基可被一些具有抗氧化生物活性物质从人体内清除掉,因此具有抗氧化活性的生物肽可被认为是一种潜在的可以利用的外源性抗氧化物质,使用食源性抗氧化剂被认为是一种有效地促进人体健康的方式^[7,8]。如今市场推出的巴旦杏加工产品数量显著提升,如巴旦杏饮料、蛋白粉、油脂及多糖,但目前巴旦杏仅处于初加工状态,利用高新技术对巴旦杏蛋白水解肽的研究及其产品的开发和利用,可提高巴旦杏资源利用率,具有一定的经济效益。

本文以水解度及 DPPH·清除率为主要指标,从常用的五种蛋白酶:碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶中确定最优水解蛋白酶,考察了酶解条件包括 pH 值、酶解时间、酶添加量及酶解温度对酶解产物 DPPH·清除率的影响,并确定巴旦杏抗氧化肽最优制备条件。通过研究酶种类及 pH 值、酶解时间、酶添加量、温度等因素对制备抗氧化肽酶解条件的影响,为巴旦杏抗氧化肽的开发与应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

巴旦杏粕蛋白,实验室自制;碱性蛋白酶(20万 U/g)、中性蛋白酶(10万 U/g)、木瓜蛋白酶(80万 U/g)、复合蛋白酶(12万 U/g),上海源叶生物科技有限公司;胰蛋白酶(25万 N.F.U/g),赛国生物科技有限责任公司;1,1-二苯基-2-苦肼基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH·),美国 Sigma 公司;NaOH、HCl、无水乙醇(分析纯),国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

PHS-3C 型雷磁 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;TDSA-WS 型台式低速离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;FA1204B 型电子天平,上海仪天科学仪器有限公司;UV-7500 型紫外分光光度计,上海棱光技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 巴旦杏粕蛋白提取工艺

根据文献^[9],修改如下:首先对采购回的巴旦杏仁进行脱皮处理,榨油机初榨去除部分杂质,将所得产物利用正己烷脱脂得到巴旦杏粕,再将所得巴旦杏粕按水粕比 20:1 进行配置,利用提前配好的 1 mol/L 的 NaOH 将样液 pH 调至 10,超声处理 15 min,利用

台式离心机以 4000 r/min 离心 15 min,取上清液,用 1 mol/L 的 HCl 调 pH 至 5,离心 15 min,取出沉淀,经过冷冻干燥处理得到巴旦杏粕蛋白粉。

1.3.2 水解度 (DH) 的测定^[10,11]

通过水解后肽键断裂数比总肽键数来得出水解度。本实验采用 pH-Stat 法进行测定:以 0.5 mol/L 的 NaOH (标定)在整个水解过程中的消耗量来判定水解程度,记录 NaOH 的滴定量,根据下式计算水解度。

$$DH = \frac{B \times N_b}{\alpha \times M_p \times h_{tot}} \times 100\%$$

式中: B -记录 NaOH 溶液滴定量 (mL); N_b -0.5 mol/L NaOH 溶液浓度 (mol/L); M_p -水解的蛋白质质量 (g); h_{tot} -蛋白质肽键的总数 (mmol/g),巴旦杏蛋白取 $h_{tot}=7.58$; α -蛋白氨基酸的平均解离度,可用下式计算而得:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}}$$

式中: pH -酶解体系的 pH; pK - α -NH³⁺的解离常熟(通常取数值 7)。

1.3.3 DPPH·清除率测定

根据文献^[12],修改如下:将 2 mL 酶解液加入新配制的 0.2 mmol/L DPPH·溶液 2 mL,用力摇匀后在避光处静置 30 min,后在波长 517 nm 处测定吸光值。根据下式计算 DPPH·清除率。

$$\text{DPPH}\cdot\text{清除率} = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}) \times 100\%$$

式中: A_1 -样品组,为加蛋白酶解液及 DPPH·溶液时的吸光度; A_2 -空白组,为蛋白酶解液及 2 mL 无水乙醇溶液的吸光度; A_3 -对照组,为 2 mL DPPH·溶液及 2 mL 蒸馏水的吸光度。

1.3.4 蛋白酶的筛选

选用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶分别在表 1 中各自最适 pH、温度及底物浓度 5%、8000 U/g 条件下酶解 4 h^[13-15],以 DH 和 DPPH·清除率为指标筛选最适蛋白酶进行酶解。

表 1 蛋白酶最适酶解因素表

Table 1 Table of optimum enzymatic hydrolysis factors of protease

序号	酶种类	添加量	水解时间	水解温度	pH 值
1	碱性蛋白酶	8000 U/g	4	60	9
2	中性蛋白酶	8000 U/g	4	50	7
3	胰蛋白酶	8000 N.F.U/g	4	40	8
4	木瓜蛋白酶	8000 U/g	4	60	6
5	复合蛋白酶	8000 U/g	4	50	7

1.4 抗氧化肽制备单因素试验

选用筛选出的最适蛋白酶, 固定底物浓度 5%、以 DPPH·清除率为指标, 选择 pH 为 7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0; 酶添加量为 4000 U/g、6000 U/g、8000 U/g、10000 U/g 和 12000 U/g; 酶解温度为 40 °C、50 °C、60 °C、70 °C 和 80 °C; 酶解时间为 1、2、3、4 和 5 h, 进行单因素试验, 考察各因素对制备多肽的抗氧化活性的影响。每个样品做 3 组平行实验。

1.5 数据处理

每个样品处理均作 3 个平行, 采用 Origin Pro 软件进行制图及 Design Expert 软件和 Box-Behnken 中心组合试验方法设计响应面优化分析。

2 结果与分析

2.1 水解蛋白酶的筛选

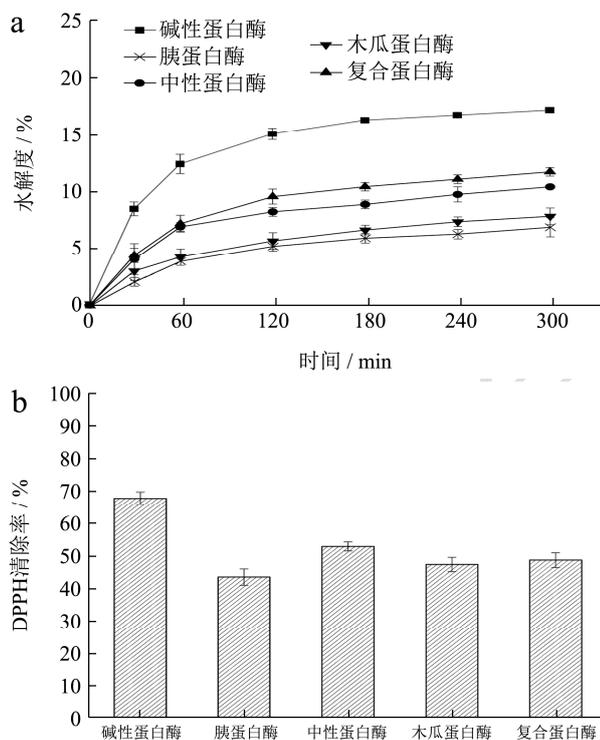


图 1 不同蛋白酶酶解对巴旦杏多肽水解度和 DPPH·清除率的影响

Fig.1 Effect of enzymatic hydrolysis of different protease on hydrolysis degree and DPPH clearance rate of apricot peptides

分别用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和复合蛋白酶在适宜的条件下水解巴旦杏粕蛋白, 测定蛋白酶解液的以水解度及 DPPH·清除率, 筛选出最优蛋白酶, 结果表明不同蛋白酶的酶解液水解度及 DPPH·清除率均不同, 见图 1。

由图 1a 可以看出不同的蛋白酶随着时间的变化水解度呈现逐渐增加的趋势, 在最初水解 1 h 内, 五

中蛋白酶水解度急剧上升, 后趋于平稳, 此现象符合酶解反应动力学^[16], 其中碱性蛋白酶水解度最高为 17.32%。由图 1b 可以看出不同蛋白酶的酶解产物抗氧化活性有明显的差异, 由于蛋白酶的专一性与特异性, 作用于蛋白的酶切位点不同, 酶解出的多肽氨基酸组成与肽链长度的不一导致多肽具有不同活性的差异^[17]。碱性蛋白酶与其它酶相比, 水解巴旦杏粕蛋白的酶解产物的 DPPH·清除率最高达 67.72%, 故选择碱性蛋白酶为制备巴旦杏抗氧化肽最适蛋白酶。

2.2 单因素试验分析

2.2.1 pH 值对酶解产物活性的影响

不同 pH 值对巴旦杏粕蛋白酶解肽 DPPH·清除率的影响如图 2 所示。

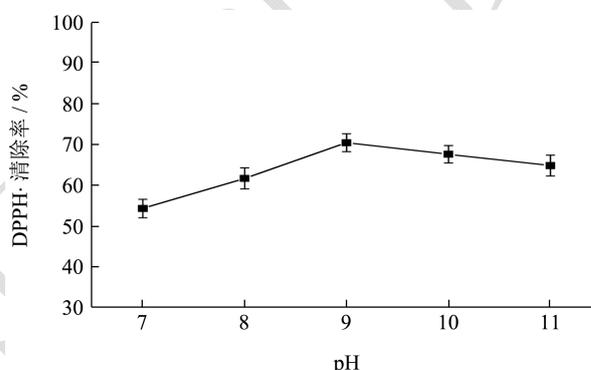


图 2 pH 值对巴旦杏粕蛋白酶解物 DPPH·清除率的影响

Fig.2 Effect of pH value on DPPH clearance of protease hydrolysate from Almond meal protein

由图 2 可知, 酶解 pH 值是影响蛋白酶催化活性的重要参数之一, 其过高或者过低都会影响酶解反应, 随着 pH 值得增加, 巴旦杏粕蛋白酶解物的 DPPH·清除率呈现先上升后降低的趋势, 这是由于酶的催化作用需在最适的 pH 值范围内才会具有最高的催化活性, 同时酶解反应速率也达到最高^[18]。在 pH 值为 9 时 DPPH·清除率达到最高为 70.26%。因此, 根据试验结果, 选择 pH 值为 8、9、10 三个水平进行响应面优化。

2.2.2 酶添加量对酶解产物活性的影响

不同酶的添加量对巴旦杏粕蛋白酶解肽 DPPH·清除率的影响如图 3 所示。

由图 3 可知, 巴旦杏粕蛋白酶解物 DPPH·清除率随着酶添加量的增加逐渐升高, 这是由于随着酶添加量的增加, 酶与底物的作用反应增强, 巴旦杏粕蛋白肽中的活性位点逐渐暴露, DPPH·清除率增大, 即抗氧化活性增强。当酶添加量达到 10000 U/g 时, DPPH·清除率最高为 72.35%, 后呈现下降的趋势, 由于当酶相对于底物的切点过多时, 过高的酶浓度导致酶分子之间的竞争抑制, 引起 DPPH·清除率的下降

[19]。同时考虑经济方面,确定酶添加量为 10000 U/g 时最佳。根据试验结果,选择酶添加量为 8000 U/g、10000 U/g、12000 U/g 三个水平进行响应面优化。

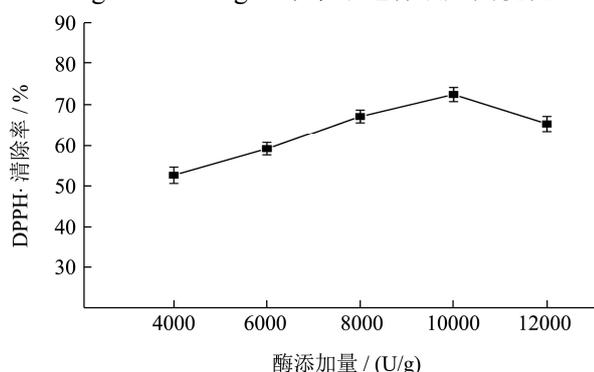


图3 酶添加量对巴旦杏粕蛋白酶解物 DPPH·清除率的影响
Fig.3 Effect of enzyme addition value on DPPH clearance of protease hydrolysate from Almond meal protein

2.2.3 温度对酶解产物活性的影响

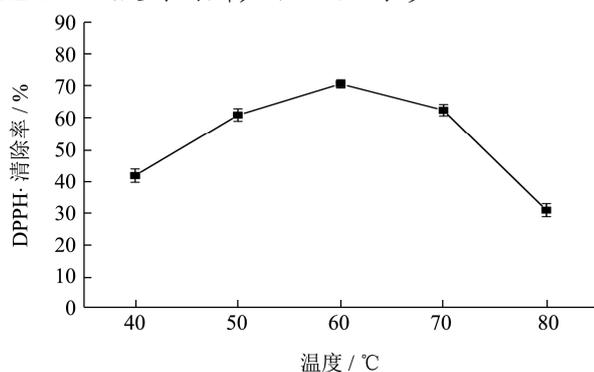


图4 温度对巴旦杏粕蛋白酶解物 DPPH·清除率的影响
Fig.4 Effect of temperature on DPPH clearance of protease hydrolysate from Almond meal protein

不同酶解温度对巴旦杏粕蛋白酶解肽 DPPH·清除率的影响如图 4 所示。由图 4 可知,酶对温度的变化敏感性较高,从而温度对巴旦杏粕蛋白酶解物的 DPPH·清除率的影响较大。在低于 60 °C 时, DPPH·清除率随着温度升高逐渐上升,分析由于在温度较低时,酶的催化活性未被激活,反应速率较低^[20]。随着温度逐渐升高,酶反应速度加快,酶解产物抗氧化活性在 60 °C 时达到最高,其 DPPH·清除率为 70.96%,当温度升高,酶的活性逐渐减弱,酶解产物的 DPPH·清除率下降。故 60 °C 为酶解蛋白制备抗氧化肽的最适酶解温度,根据试验结果,选择酶解温度为 50 °C、60 °C、70 °C 三个水平进行响应面优化。

2.2.4 时间对酶解产物活性的影响

不同酶解时间对巴旦杏粕蛋白酶解肽 DPPH·清除率的影响如图 5 所示。

由图 5 可知,随着酶解时间的延长,酶解物的 DPPH·清除率逐渐升高。在酶解时间 4 h 时, DPPH·清

除率最高达 68.70%。酶解时间达到 4 h 后,抗氧化活性降低,分析由于酶解时间的延长,具有抗氧化活性的肽段进一步受到碱性蛋白酶的影响。同时,适用于酶的专一性作用位点减少,导致酶解液的抗氧化活性降低。故考虑工艺耗时,选择酶解时间为 4 h 最佳,根据试验结果,选择酶解时间为 3 h、4 h、5 h 三个水平进行响应面优化。

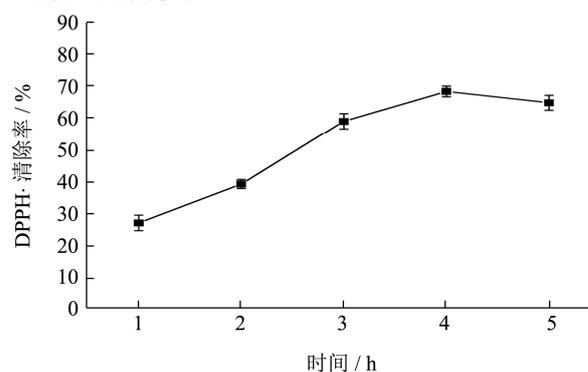


图5 时间对巴旦杏粕蛋白酶解物 DPPH·清除率的影响
Fig.5 Effect of time on DPPH clearance of protease hydrolysate from Almond meal protein

2.3 响应面实验结果分析

2.3.1 响应面四因素三水平设计方案及结果

在设计的单因素试验基础上,以酶解温度、酶解时间、pH 值、酶添加量为自变量, DPPH·清除率为响应值,设计四因素三水平的二次回归方程拟合自变量与 DPPH·清除率之间的函数关系,采用响应面分析方法优化提取工艺。见表 2。

表 2 响应面试验因素与水平表

Table 2 Response surface test factors and horizontal table

因素	水平		
	-1	0	1
A(pH 值)	8.0	9.0	10.0
B(酶添加量)	8000 U/g	10000 U/g	12000 U/g
C(酶解温度)	50 °C	60 °C	70 °C
D(酶解时间)	3 h	4 h	5 h

2.3.2 响应面模型建立

采用 Design-Expert V 8.0.6 软件对试验数据进行回归分析,得出的回归方程为: $Y=75.53+0.84A+0.64B-2.56C-0.06D-0.39AB-3.49AC+0.068AD+0.96BC+0.18BD-2.8CD-8.13A^2-9.84B^2-7.48C^2-7.39D^2$ 。

响应面结果见表 3。在回归方程中,各因素系数绝对值反映了对响应值的影响程度,各因素系数的正负性可以反映影响的方向。试验回归方程的二次项系数为负值,表明响应值具有极大值点,可进行优化分析,对所得回归方程做显著性检验与方差分析,结果

见表4。由表4可知,该模型的显著性检验 $p < 0.0001$,
 $R^2 = 0.9906$,说明该模型高度显著,方程可行性好,失
 拟项不显著($p = 0.9674$),说明了回归模型和实际试验

拟合充分,模型可行性和精确度高,可以用该模型对
 巴旦杏抗氧化肽的制备条件进行分析预测。

表3 根据 Design-expert 设计响应面试验方案及结果

Table 3 Design of response surface test scheme and results according to Design-expert

试验序号	A	B	C	D	DPPH·清除率%	试验序号	A	B	C	D	DPPH·清除率%
1	9	10000	50	5	66.45	16	9	12000	50	4	60.16
2	9	10000	60	4	73.35	17	8	10000	60	5	59.33
3	10	10000	70	4	55.18	18	8	10000	60	3	58.97
4	8	10000	50	4	57.72	19	9	8000	50	4	60.75
5	9	10000	60	4	76.22	20	9	8000	70	4	54.55
6	9	8000	60	5	57.15	21	10	10000	50	4	67.12
7	9	10000	70	5	54.73	22	9	10000	60	4	77.05
8	10	10000	60	5	61.38	23	10	8000	60	4	57.42
9	10	10000	60	3	60.75	24	9	10000	50	3	60.76
10	9	8000	60	3	58.46	25	10	12000	60	4	58.15
11	9	10000	60	4	75.87	26	9	10000	60	4	75.14
12	9	12000	60	5	58.52	27	8	8000	60	4	55.96
13	8	12000	60	4	58.26	28	9	12000	60	3	59.11
14	9	10000	70	3	60.23	29	8	10000	70	4	59.73
15	9	12000	70	4	57.8						

表4 响应面回归方程方差分析结果

Table 4 Results of variance analysis of response surface regression equation

方差	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性Y
模型	1322.52	14	94.47	104.97	<0.0001	***
A	8.38	1	8.38	9.32	0.0086	**
B	4.95	1	4.95	5.5	0.0342	*
C	78.75	1	78.75	87.5	<0.0001	***
D	0.043	1	0.043	0.048	0.8297	
AB	0.62	1	0.62	0.68	0.4218	
AC	48.65	1	48.65	54.06	<0.0001	***
AD	0.018	1	0.018	0.02	0.8889	
BC	3.69	1	3.69	4.1	0.0625	
BD	0.13	1	0.13	0.14	0.71	
CD	31.3	1	31.3	34.78	<0.0001	***
A ²	428.39	1	428.39	476.01	<0.0001	***
B ²	627.64	1	627.64	697.41	<0.0001	***
C ²	362.48	1	362.48	402.78	<0.0001	***
D ²	354.53	1	354.53	393.94	<0.0001	***
残差	12.6	14	0.9			
失拟性	4.79	10	0.48	0.25	0.9674	
纯误差	7.81	4	1.95			
总差	1335.12	28				

$R^2 = 0.9906$

注: ***差异极显著($p < 0.001$); **差异高度显著($p < 0.01$); *差异显著($p < 0.05$)。

2.3.3 响应面分析与优化

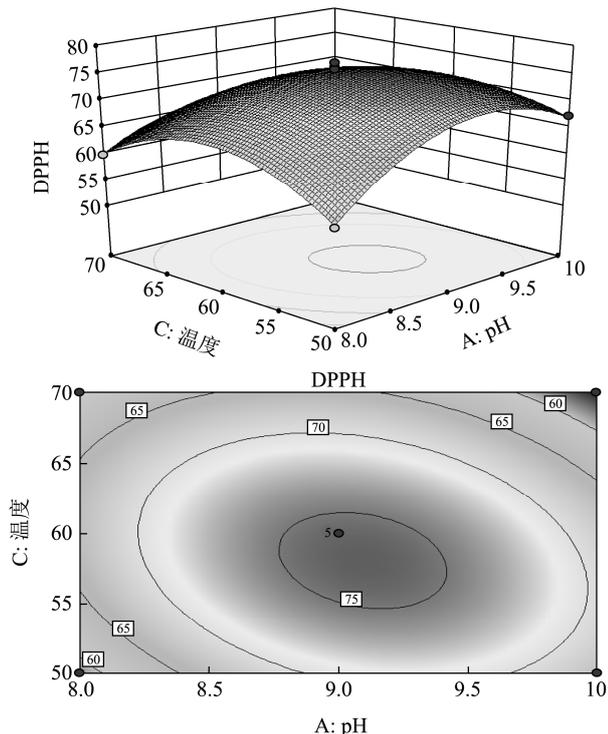


图 6 pH 和酶解温度对 DPPH · 清除率影响的响应面图

Fig.6 Response surface diagram of the effect of pH and enzymatic temperature on the clearance of DPPH

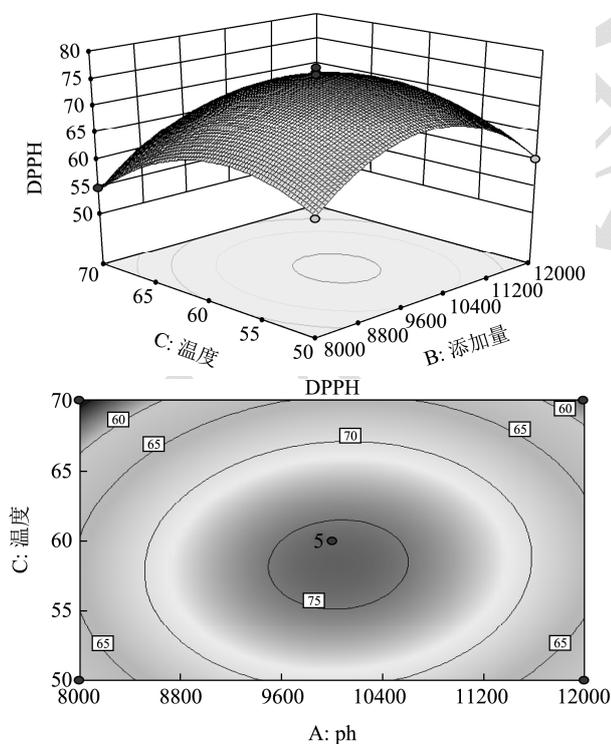


图 7 酶解温度和酶添加量对 DPPH · 清除率影响的响应面图

Fig.7 Response surface map of the effect of enzymatic temperature and enzymatic addition on the clearance of DPPH

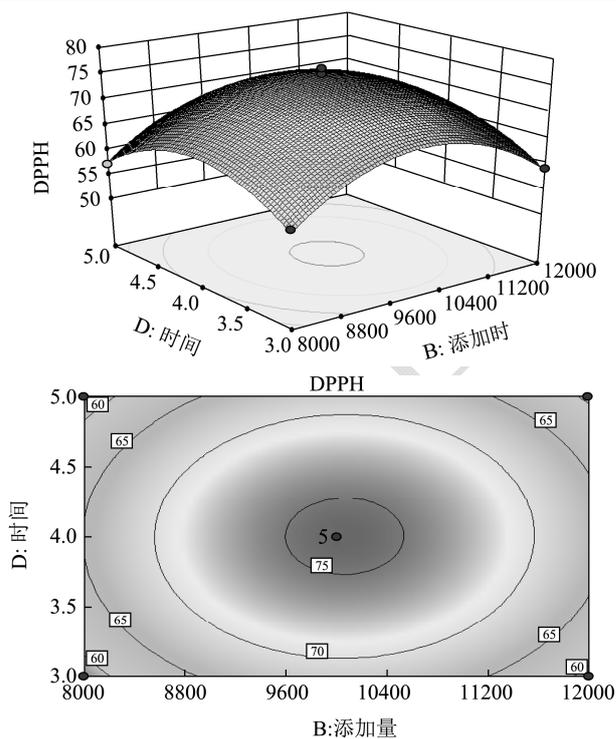


图 8 酶解时间和酶添加量对 DPPH · 清除率影响的响应面图

Fig.8 Response surface map of the effect of enzymatic hydrolysis time and enzymatic addition on the clearance of DPPH

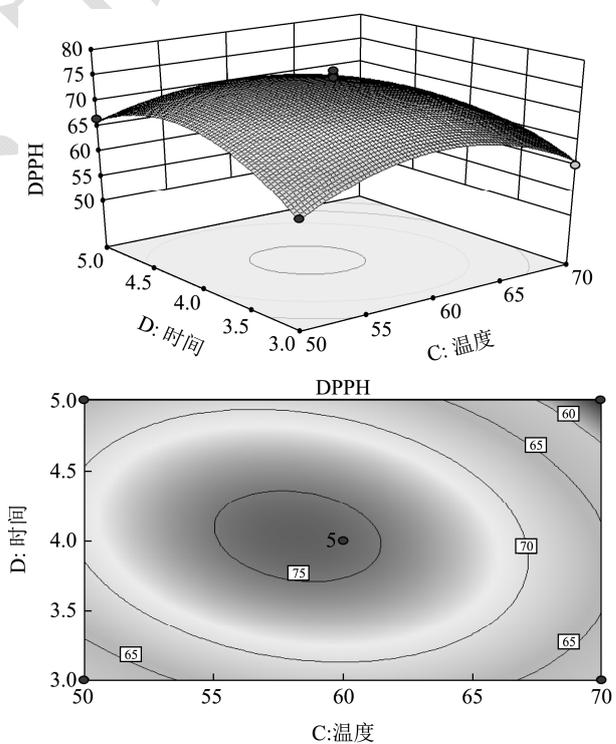


图 9 酶解时间和酶添温度对 DPPH · 清除率影响的响应面图

Fig.9 Response surface map of the effect of enzymatic hydrolysis time and enzymatic temperature on the clearance of DPPH

酶解 pH 值、酶添加量、酶解温度及酶解时间四个因素对响应值的影响显著性可用 F 值来评价, 由表 4 可知, $F(A)=9.32$, $F(B)=5.5$, $F(C)=87.5$, $F(D)=0.048$, 即各因素对巴旦杏粕蛋白酶解液的抗氧化活性影响顺序为酶解温度>pH 值>酶添加量>酶解时间, 其中酶解温度对巴旦杏粕蛋白酶解液的抗氧化活性影响为极显著, pH 值和酶添加量对巴旦杏粕蛋白酶解液的抗氧化活性影响为显著, 酶解时间影响不显著。下图 6~9 为影响巴旦杏粕蛋白酶解液的抗氧化活性的各个因素之间的相互交互作用图。

由图 6 和图 9 可知, 一次项 A(pH)因素差异高度显著、B(酶添加量)因素差异显著, 交互项 AC(pH 和酶解温度)、CD(酶解温度和酶解时间)和 4 个二次项的影响差异极显著, 可以看出, 各因素对 DPPH 清除率的影响不是一个简单的线性关系。所有因素都在调查范围内。响应面坡度越大, 响应值对不同条件的变化越敏感。反之, 坡度越平缓, 对响应值的影响越小。

2.3.4 最佳条件的确定及验证试验

该模型得到最优处理水平为酶解时 pH 为 9.09, 酶添加量为 10043.10 U/g, 酶解温度为 58.02 °C, 酶解时间为 4.03 h。在此条件利用碱性蛋白酶酶解巴旦杏粕蛋白制备抗氧化肽的 DPPH·清除率为 75.83%。考虑到实际操作上, 我们将实际试验条件调整为酶解时 pH 为 9.1, 酶添加量为 10000 U/g, 酶解温度为 58 °C, 酶解时间为 4 h, 在此条件下重复 3 次试验, 取平均值得到试验数据 DPPH·清除率为 74.45%, 与模型相符。

3 结论

通过筛选选择碱性蛋白酶制备巴旦杏抗氧化肽; 通过响应面结果可以得出酶法制备巴旦杏抗氧化肽的最佳条件为: 酶解时 pH 为 9.1, 酶添加量为 10000 U/g, 酶解温度为 58 °C, 酶解时间为 4 h, 此时酶解物的 DPPH·清除率为 74.45%。通过研究巴旦杏抗氧化肽制备工艺, 对功能性多肽的研究与开发起到一定的理论指导作用。

参考文献

- [1] 申烨华, 李聪, 张萍, 等. 扁桃研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 359-362
SHEN Ye-hua, LI Cong, ZHANG Ping, et al. Research progress in almond [J]. Food Science, 2007, 28(2): 359-362
- [2] Ling D. Inorganic elements in kernel of *Amygdalus communis* L. with ICP-OES method [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 23(6): 11-21
- [3] 孙蕾, 丁春瑞. 新疆巴旦木及巴旦木仁油营养成分分析[J].

中国油脂, 2018, 43(3): 87-89

- SUN Lei, DING Chun-rui. Nutritional components of *Amygdalus communis* L. And *Amygdalus communis* L. kernel oil in Xinjiang [J]. China Oils and Fats, 2018, 43(3): 87-89
- [4] 李慧, 王琪, 关键, 等. 酶联合挤压豌豆蛋白肽的分离工艺[J]. 现代食品科技, 2018, 34(4): 172-178
LI Hui, WANG Qi, GUAN Jian, et al. Separation process of pea protein peptide with enzymolysis combined extrusion [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(4): 172-178
- [5] Abadía-García L, Castaño-Tostado E, Ozimek L, et al. Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2016, 37: 84-90
- [6] Babini E, Tagliazucchi D, Martini S, et al. LC-ESI-QTOF-MS identification of novel antioxidant peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of vegetable proteins [J]. Food Chemistry, 2017, 228: 186-196
- [7] Kadam S U, Tiwari B K, Alvarez C, et al. Ultrasound for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides [J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 46(1): 60-67
- [8] 殷晓煌. 活性氧自由基与老年疾病代谢的关系[J]. 药物生物技术, 2013, 12(2): 183-185
YIN Xiao-huang. The relationship between reactive oxygen species and the metabolism of senile disease [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 2013, 12(2): 183-185
- [9] 孔令明, 李芳, 朱正兰, 等. 从巴旦杏粕中制备蛋白粉的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2009, 6: 118-120, 109
KONG Ling-ming, LI Fang, ZHU Zheng-lan, et al. Study on preparation technology of protein powder from *Amygdalus communis* L. nuts [J]. China Food Additives, 2009, 6: 118-120, 10
- [10] Mirquez MC, Ferandez V. pH-stat method to evaluate the heat inactivation of subtilisin inhibitor in legumes [J]. Chem Biochem Eng Q, 2002, 16 (1): 31-35
- [11] Adlernissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins [J]. Canadian Medical Association Journal, 1986, 172(8): 1783-1785
- [12] Chen Y X, Liu X Y, Xiao Z, et al. Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 91: 505-509
- [13] 芦鑫, 姜梦楠, 张丽霞, 等. 制备芝麻抗氧化肽的蛋白酶筛选[J]. 中国油脂, 2018, 43(11): 35-40
LU Xin, JIANG Meng-nan, ZHANG Li-xia, et al. Screening

- of protease for preparing antioxidant peptide from sesame protein [J]. *China Oils and Fats*, 2018, 43(11): 35-40
- [14] 赵泽龙.小麦低聚肽制备工艺的优化及性质与抗氧化能力测试[D].大庆:黑龙江八一农垦大学,2016
- ZHAO Ze-long. Optimization of preparation process of the wheat oligopeptides and analysis of the antioxidant ability [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2016
- [15] 申彩红.海参肽的酶法制备及其抗氧化、抗疲劳活性研究[D].泉州:华侨大学,2015
- SHEN Cai-hong. Study on the enzymatic preparation of sea cucumber peptide and its antioxidant and anti-fatigue activities [D]. Quanzhou: Huaqiao University, 2015
- [16] 叶健明,石宁蕙,周建中,等.鹰嘴豆蛋白酶解动力学研究[J]. *中国酿造*,2018,37(11):137-141
- YE Jian-ming, SHI Ning-hui, ZHOU Jian-zhong, et al. Kinetic model for enzymatic hydrolysis of chickpea protein [J]. *China Brewing*, 2018, 37(11): 137-141
- [17] 李清华,李君,胡耀丹,等.特种油料蛋白的功能特性及研究进展[J]. *食品研究与开发*,2013,34(18):116-118, 128
- LI Qing-hua, LI Jun, HU Yao-dan, et al. The research progress of protein from special oil materials [J]. *Food Research and Development*, 2013, 34(18): 116-118, 128
- [18] 李超楠,鹿保鑫,王长远.米蛋白抗氧化肽的制备及其结构分析[J].*中国食品添加剂*,2018,175(9):54-61
- LI Chao-nan, LU Bao-xin, WANG Chang-yuan. Preparation and structure analysis of rice protein antioxidant peptides [J]. *China Food Additives*, 2018, 175(9): 54-61
- [19] 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):169-172, 177
- MAO Yin, ZHU Ke-xue, ZHANG Shi-kang, et al. Optimization of preparing antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis of tea protein by response surface methodology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(7): 169-172, 177
- [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
- MA Cheng-jin, HUANG Wei, HUANG Qun, et al. Optimization of dual-enzymatic hydrolysis for protein extraction from *Sloanea hemsleyana* seeds [J]. *Food Science*, 2012, 33(20): 27-32

(上接第 281 页)

- [9] 潘虹.超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱法测定人体尿液中 14 种内源性甾体激素含量[J].*理化检验-化学分册*,2017,53(7): 832-837
- PAN Hong. UPLC-QTOF/MS determination of 14 endogenous steroids in human urine [J]. *Part B: Chemical Analysis*, 2017, 53(7): 832-837
- [10] 贺利民,黄显会,方炳虎,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定动物肌肉组织和鸡蛋中残留的 11 种甾体激素类药物[J].*色谱*,2008,26(6):714-719
- HE Li-min, HUANG Xian-hui, FANG Bing-hu, et al. Determination of eleven steroid hormones in animal muscle tissues and eggs using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2008, 26(6): 714-719
- [11] Bárbara S R, Darina L, Kateřina U, et al. Multiclass analytical method for the determination of natural/synthetic steroid hormones, phytoestrogens, and mycoestrogens in milk and yogurt [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017, 409(18): 4467-4477
- [12] Cui X L, Shao B, Zhao R, et al. Simultaneous determination of seventeen glucocorticoids residues in milk and eggs by ultra performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, 20(15): 2355-2364
- [13] Rayco G A, Zoraida S F, José J S R. Determination of steroid hormones in fish tissues by microwave-assisted extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2017, 237: 1012-1020
- [14] Li P P, Yan Z Y, Sun X M, et al. Determination of steroid hormone residues in fish tissues using gel permeation chromatography and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2018, 17(5): 1171-1177
- [15] 卢巧梅.水产品中多种雌激素残留的质谱分析方法研究[J].*分析测试技术与仪器*,2016,22(1):1-8
- LU Qiao-mei. Mass spectrometry analysis of diverse estrogens in aquatic products [J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2016, 22(1): 1-8