

固态发酵制备辣木叶活性肽及其抗氧化活性

康澳^{1,2}, 巩思佳^{1,3}, 陈可菁¹, 李子豪¹, 郑雪韵¹, 陈冰冰¹, 陈文浩², 曹庸¹, 苗建银^{1,2*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642) (2. 固态发酵资源利用四川省重点实验室, 四川宜宾 644000) (3. 中国农业大学动物科学技术学院, 北京 100193)

摘要: 为高效利用辣木叶中蛋白资源, 该研究采用固态发酵方式制备辣木叶活性肽。首先以酶活性和肽含量为指标从米曲霉、黑曲霉中筛选出最优菌种, 随后研究发酵时间、含水量、起始 pH 和接种量对肽含量的影响, 再结合响应面设计优化发酵工艺, 并对发酵制备辣木叶活性肽的抗氧化活性和氨基酸组成进行研究。研究发现, 最佳工艺条件为: 米曲霉为最优菌种, 发酵温度 30 °C, 发酵时间 72 h, 培养基含水量 52.39%, 接种量 14.71%, pH 为 5。在最优发酵条件下制备的辣木叶活性肽具有很好的 DPPH 自由基清除率 ($EC_{50}=1.0927$ mg/mL)、ABTS 自由基清除率 ($EC_{50}=0.059$ mg/mL) 和 Fe^{2+} 螯合率 ($EC_{50}=9.76$ mg/mL)。辣木叶活性肽中共检测出 17 种氨基酸, 谷氨酸 (Glutamic acid, Glu)、天冬氨酸 (Aspartic acid, Asp)、酪氨酸 (Tyrosine, Tyr)、组氨酸 (Histidine, His) 等具有抗氧化潜力的氨基酸的含量丰富。该研究为辣木叶的高值化利用和天然抗氧化功能食品的研发提供基础研究数据。

关键词: 米曲霉; 固态发酵; 辣木叶活性肽; 工艺优化; 抗氧化活性; 氨基酸组成

文章编号: 1673-9078(2022)06-105-115

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.6.0952

Solid State Fermentation Preparation of Bioactive Peptide from *Moringa Oleifera* Leaves and Its Antioxidant Activity

KANG Ao^{1,2}, GONG Sijia^{1,3}, CHEN Kejing¹, LI Zihao¹, ZHENG Xueyun¹, CHEN Bingbing¹, CHEN Wenhao², CAO Yong¹, MIAO Jianyin^{1,2*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China)

(2. Solid-state Fermentation Resource Utilization Key Laboratory of Sichuan Province, Yibin 644000, China)

(3. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: In order to make efficient use of protein resources in *Moringa oleifera* leaves, bioactive peptides from *Moringa oleifera* leaves were prepared by solid-state fermentation. Firstly, the optimal strains were selected from *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* with enzyme activity and peptide content as indexes. Then, the effects of fermentation time, water content, initial pH and inoculum amount on peptide content were studied. The fermentation process was optimized by response surface methodology. The antioxidant activity and amino acid composition of *Moringa oleifera* leaves bioactive peptides were studied. The results showed that the optimum conditions were as follows: *Aspergillus oryzae* was the best strain, fermentation temperature was 30 °C, fermentation time was 72 h, medium moisture content was 52.39%, inoculum volume was 14.71%, pH was 5. Under the optimal fermentation conditions, the *Moringa oleifera* leaves bioactive peptides had good DPPH free radical scavenging rate ($EC_{50}=1.0927$ mg/mL), ABTS free radical scavenging rate ($EC_{50}=0.059$ mg/mL) and Fe^{2+} chelating rate ($EC_{50}=9.76$ mg/mL). Seventeen kinds of amino acids were detected in the bioactive peptides of *Moringa oleifera* leaves, and the contents of acid amino acids (Glu

引文格式:

康澳, 巩思佳, 陈可菁, 等. 固态发酵制备辣木叶活性肽及其抗氧化活性[J]. 现代食品科技, 2022, 38(6): 105-115

KANG Ao, GONG Sijia, CHEN Kejing, et al. Solid state fermentation preparation of bioactive peptide from *Moringa Oleifera* leaves and its antioxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(6): 105-115

收稿日期: 2021-08-25

基金项目: 固态发酵资源利用四川省重点实验室开放基金项目资助 (2019GTY003); 广州市农村科技特派员项目 (GZKTP 201931)

作者简介: 康澳 (1999-), 男, 本科生, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: 279688726@qq.com; 共同第一作者: 巩思佳 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: 1965176512@qq.com

通讯作者: 苗建银 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: miao.jy8181@scau.edu.cn

and Asp) and hydrophobic amino acids (Tyr) with antioxidant function were abundant. The results provide basic research data for the high value utilization of *Moringa oleifera* leaves and the research and development of natural antioxidant food.

Key words: *Aspergillus oryzae*; solid state fermentation; bioactive peptides of *Moringa oleifera* leaves; process optimization; antioxidant activity; amino acid composition

辣木 (*Moringa Oleifera*) 是辣木科辣木属多年生热带落叶乔木, 在我国的种植面积已达 6000 hm²[1]。研究表明, 辣木叶干粉的粗蛋白含量达到 27.1%^[2], 辣木叶中的多糖、多酚等活性成分具有降血糖、抗氧化、降血压等多种保健功效^[3], 是优质的天然植物资源。当前, 国内的辣木叶除少量作为鲜食蔬菜外, 大部分被用作畜禽饲料或废弃物, 未被高效利用。

活性氧介导的氧化作用会与脂质、蛋白质反应而导致食品腐败变质, 产生不良异味, 因此, 抗氧化剂的开发对于食品的加工、保鲜尤为重要。抗氧化剂分为合成抗氧化剂和天然抗氧化剂。目前广泛应用的合成抗氧化剂如没食子酸丙酯、丁羟基茴香醚、二丁基羟基甲苯、特丁基对苯二酚的抗氧化效果显著, 但长期食用具有一定副作用^[4], 近年来人们更多地把目光投向了天然抗氧化剂的开发^[5,6]。抗氧化肽是一类天然生物活性肽, 一般由 5~16 个氨基酸残基组成, 可以通过肽键和羟基提供氢原子或电子来清除缺少氢离子或电子的自由基, 或者抑制某些促氧化酶、螯合参与催化自由基生成的过渡金属离子, 来抑制超氧化物和自由基形成^[7], 达到抗氧化的效果, 具有易吸收、稳定性好、保健效果好(降血压、抗衰老)、无免疫反应的优点^[8]。目前, 抗氧化肽的研究热点是制备工艺的优化、有效组分的分离纯化、抗氧化活性评价及在食品、医药、生物学等领域的应用。本文采用固态发酵法制备辣木叶活性肽, 利用筛选出的菌种研究发酵条件与发酵培养基中活性肽含量的相关性并优化出最佳制备工艺, 探讨辣木叶肽的抗氧化活性及其氨基酸组成, 以期达到安全性高, 生产条件温和, 可大规模生产辣木叶活性肽的目的, 为辣木叶的高值化利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

辣木叶干粉, 北部湾滨海富硒功能农业研究院; 米曲霉孢子粉 (AS 3.951), 上海佳民酿造食品有限公司; 黑曲霉孢子粉 (AS 3.324), 上海佳民酿造食品有限公司; 葡萄糖, 天津市福晨化学试剂厂; 三氯乙酸, 上海凌峰化学试剂有限公司; 酪蛋白, 上海生工生物工程技术有限公司; 无水碳酸钠, 天津市大茂化学试剂厂; 福林酚, 上海源叶生物科技有限公司; 磷

酸氢二钠, 天津市大茂化学试剂厂; 磷酸二氢钠, 广州化学试剂厂; L-酪氨酸, 上海伯奥生物科技有限公司; 硫酸铜, 天津市大茂化学试剂厂; 酒石酸钾钠, 天津市福晨化学试剂厂; 过硫酸钾, 天津市百世化工有限公司; 硫酸亚铁, 天津市福晨化学试剂厂; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH), 上海源叶生物科技有限公司; 2,2-气联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS), 广州市齐云生物技术有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。

pH 计, 上海佑科仪器有限公司; 电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; EnSpire™多功能酶标仪, PerkinElmer 公司; L530-cence 台式低速自动平衡离心机, 长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司; 天津泰斯特电热恒温培养箱 DH5000BII, 天津泰斯特仪器有限公司; 其林贝尔 Kylin-bell 微型振荡器 MH-2 型, 其林贝尔 Kylin-bell; 立式压力蒸汽灭菌器, 上海云泰仪器仪表有限公司; 苏州净化 SWCJ1G 型无菌操作工作台, 苏州净化工程有限公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; HZS-H 水浴振荡器, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 辣木叶活性肽制备工艺流程

发酵培养基→高压蒸汽灭菌→无菌接种→固态发酵→分析测定

1.2.2 固态发酵

1.2.2.1 固体培养基的配制

取 15 g 的辣木叶干粉、加入 1.5 g 葡萄糖、60 颗玻璃珠, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 冷却后待接种。

1.2.2.2 接种培养基

参考 Mazumdar^[9]的方法并稍作修改。无菌条件下加入一定量的孢子粉、用无菌水调节固体培养基的相对湿度, 并调至一定的起始 pH 值, 放入 30 °C 恒温培养箱中发酵一定时间后, 于 121 °C 灭酶 10 min。

1.2.3 酶活力测定

参照标准 QB/T 1803-1993 《工业酶制剂通用实验方法测定中性蛋白酶活力》^[10]。

以吸光值 (OD 值) 为纵坐标, 酪氨酸的浓度 (μg/mL) 为横坐标, 绘制标准曲线 (图 1), 得到回归方程 $y=0.009x+0.0223$, $R^2=0.9956$ 。

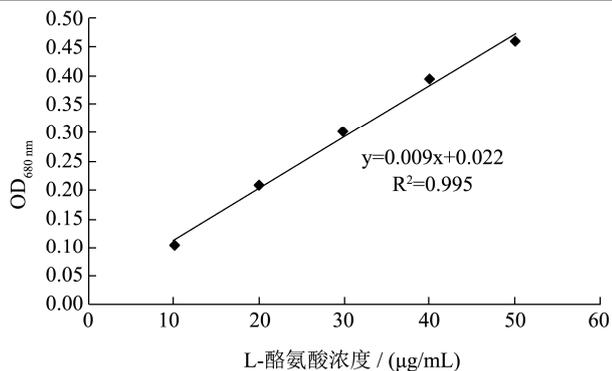


图1 L-酪氨酸浓度标准曲线

Fig.1 Standard curve of L-tyrosine concentration

1.2.4 活性肽的提取与测定

参考 Parvin^[11]的方法并稍作修改。将发酵结束的培养基中加入 100 mL 蒸馏水, 捣碎后于 25 °C、200 r/min 条件下水浴振荡 2 h, 4000 r/min 条件下离心 30 min, 上清液即为样品溶液。

取 2.5 mL 样品溶液, 加入 2.5 mL 的 10% 三氯乙酸水溶液, 混匀后静置 10 min, 在 4000 r/min 条件下离心 20 min 后, 将上清液全部转移到 50 mL 容量瓶中并用 5% 的三氯乙酸液定容。吸取 6.0 mL 溶液至试管, 加入双缩脲试剂 4.0 mL, 混合均匀后静置 10 min, 在 2000 r/min 条件下离心 10 min 后, 取上清液于 540 nm 处测定吸光度值。参考张红波等^[12]的研究方法, 以 OD_{540 nm} 表示辣木叶活性肽含量。

1.2.5 固态发酵菌种选择

无菌条件下加入 10% 的孢子粉、用无菌水调节辣木叶粉的湿度为 60%, 起始 pH 为 6.6 (黑曲霉 5.6), 放入 30 °C 培养箱中发酵 72 h, 发酵结束后于 121 °C 灭酶 10 min, 分析测定选出最优菌种。

1.2.6 固态发酵条件优化

1.2.6.1 单因素实验

以 OD_{540 nm} 为指标, 选择含水量、接种量、起始 pH 值、发酵时间四个因素进行单因素实验, 以确定固态发酵最佳工艺条件, 具体实验内容如下。

发酵时间: 无菌条件下加入 10% 的孢子粉、用无菌水调节辣木叶粉的湿度为 60%, 起始 pH 为 6.6, 放入 30 °C 培养箱中发酵 24、48、72、96、120 h, 发酵结束后于 121 °C 灭酶 10 min。

含水量: 无菌条件下加入 10% 的孢子粉、用无菌水调节辣木叶粉的湿度为 40%、50%、60%、70%、80%, 起始 pH 为 6.6, 放入 30 °C 培养箱中发酵 72 h, 发酵结束后于 121 °C 灭酶 10 min。

起始 pH 值: 无菌条件下加入 10% 的孢子粉、用无菌水调节辣木叶粉的湿度为 60%, 起始 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0, 放入 30 °C 培养箱中发酵 72 h, 发

酵结束后于 121 °C 灭酶 10 min。

接种量: 无菌条件下加入 3%、5%、8%、11%、14%、17% 的孢子粉, 用无菌水调节辣木叶粉的湿度为 60%, 起始 pH 为 6.6, 放入 30 °C 培养箱中发酵 72 h, 发酵结束后于 121 °C 灭酶 10 min。

1.2.6.2 响应面实验

根据单因素结果, 结合 Box-Behnken 中心组合设计原理, 以发酵时间、含水量、接种量为自变量, 以 OD_{540 nm} 为响应值, 设计三因素三水平共 17 个试验点的响应面实验。每组实验进行 3 个平行实验, 其中 5 个实验为零点, 用于估算误差, 12 个为析因点。

1.2.7 氨基酸组成分析

总氨基酸含量利用自动分析仪检测, 参照食品安全国家标准 GB 5009.124-2016 《食品中氨基酸的测定方法》^[13]。

1.2.8 活性肽体外抗氧化活性测定

1.2.8.1 DPPH 自由基清除能力

实验以 Asghar 等^[14]的实验作为基础, 并进行一定程度的变动: 用蒸馏水将辣木叶蛋白发酵物的冻干粉配制成 0.1、0.25、0.5、1、2 mg/mL 的样品液, 用 85% 的乙醇配制成 0.1 mmol/L DPPH 溶液; 样品组: 取 100 µL 不同浓度样液, 分别加入 100 µL DPPH 试剂, 充分混匀后于室温静置 30 min, 此过程要避免与光线直接接触。静置结束后用震荡仪震荡约 2 min 后, 用酶标仪检测吸光度 A₁, 检测波长为 517 nm; 空白组: 与样品组基本一致, 其中的 DPPH 试剂换用质量分数为 85% 的乙醇试剂即可, 用酶标仪检测吸光度 A₂; 对照组: 与样品组基本一致, 其中的样品换用蒸馏水即可, 用酶标仪检测吸光度 A₀; 每个样品进行三次平行试验, 将所得的三组数据求平均值用于结果计算:

$$\text{DPPH 自由基清除率} / \% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

A₁——样品组的吸光度值;

A₂——空白组的吸光度值;

A₀——对照组的吸光度值。

样品浓度设置为 0.1、0.25、0.5、1、2 mg/mL, 得出结果后, 根据结果显示的回归方程进行 EC₅₀ 值的计算。

1.2.8.2 ABTS 自由基清除能力

实验以 Olszowy-Tomczyk 等^[15]的实验作为基础, 并进行一定程度的变动: 将 ABTS 与过硫酸钾分别配制成浓度为 7 mmol/L 与 2.45 mmol/L 的溶液, 将两者充分混匀, 于室温下静置 12~16 h, 此过程注意避免与光线直接接触, 用蒸馏水稀释至样品于 734 nm 处

吸光值为 0.70 ± 0.02 , 得到工作液。样品组: $100 \mu\text{L}$ 浓度分别为 0.025 、 0.05 、 0.1 、 0.15 、 0.2 、 0.25 mg/mL 的样品液, 加入 $100 \mu\text{L}$ 工作液, 震荡 $1\sim 2 \text{ min}$ 混合均匀后于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 下放置 10 min , 用酶标仪在 734 nm 下测定吸光值 A_1 ; 空白组: 与样品组基本一致, 其中的 ABTS 换用 $100 \mu\text{L}$ 蒸馏水即可, 用酶标仪检测吸光度 A_2 ; 对照组: 与样品组基本一致, 其中的样品换用 $100 \mu\text{L}$ 蒸馏水即可, 用酶标仪检测吸光度 A_0 。每个样品进行三次平行试验, 将所得的三组数据求平均值用于结果计算:

$$\text{ABTS 自由基清除率} / \% = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_0} \right) \times 100\% \quad (2)$$

式中:

A_1 ——样品组的吸光度值;

A_2 ——空白组的吸光度值;

A_0 ——对照组的吸光度值。

样品浓度设置为 0.025 、 0.05 、 0.1 、 0.15 、 0.2 、 0.25 mg/mL , 得出结果后, 根据结果显示的回归方程进行 EC_{50} 值的计算。

1.2.8.3 螯合金属能力

实验以 Jim 等^[16]的实验作为基础, 并进行一定程度的变动: 用超纯水配制浓度为 2 mmol/L 的硫酸亚铁和 30% 的乙酸钠, 用冰乙酸调至乙酸钠 pH 为 5.0 后作为溶剂配制 5 mmol/L 的菲咯嗪溶液; 在 1 mL 最终浓度为 1.0 、 2.0 、 4.0 、 8.0 、 10.0 、 20.0 mg/mL 的样品中, 分别添加 0.05 mL 浓度为 2 mmol/L 的硫酸亚铁溶液以及 1.85 mL 超纯水并充分混匀, 静置 3 min 。然后在处理好的样液中添加 0.1 mL 浓度为 5 mmol/L 的菲咯嗪溶液, 混匀, 室温下静置 10 min ; 每个浓度的样品溶液中各取出 0.25 mL 加入到 96 孔板中, 在 562 nm 处测吸光值 A_1 。空白组 A_0 : 用 1 mL 超纯水代替样品, 其他条件相同; 每个样品进行三次平行试验, 将所得的三组数据求平均值用于结果计算:

$$\text{Fe}^{2+} \text{螯合率} / \% = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100\% \quad (3)$$

式中:

A_1 ——加入样品的吸光度;

A_0 ——空白组的吸光度。

样品浓度设置为 0.5 、 1.0 、 2.0 、 4.0 、 8.0 mg/mL , 得出结果后, 根据结果显示的回归方程进行 EC_{50} 值 (螯合 $50\% \text{ Fe}^{2+}$ 时的样品浓度) 的计算。分别测试浓度样品的 Fe^{2+} 螯合能力, 采用非线性回归计算其 EC_{50} 值。

1.3 数据处理

每个试验重复进行 3 次, 结果取平均值。采用 Microsoft Excel 2016 对数据进行整理, 并进行拟合和作图分析, 使用 Design-Expert V.8.0.6 进行响应面优化设计。

2 结果与分析

2.1 最优发酵菌种的确定

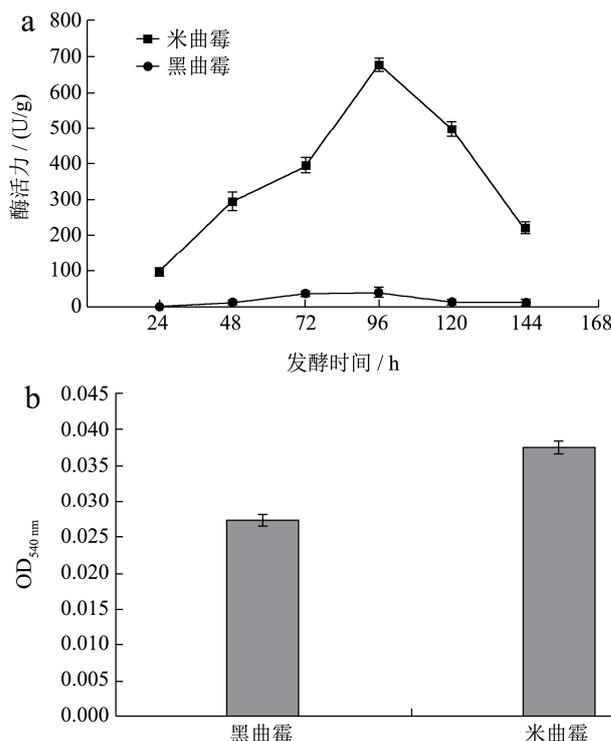


图 2 (a) 黑曲霉、米曲霉发酵过程中酶活力变化趋势图; (b) 黑曲霉、米曲霉发酵 96 h $\text{OD}_{540 \text{ nm}}$ 对比

Fig.2 Change trend of enzyme activity during fermentation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* (a); Comparison of $\text{OD}_{540 \text{ nm}}$ after 96 h fermentation between *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* (b)

由图 2a 可以看出, 米曲霉、黑曲霉在发酵过程中, 酶活力逐渐升高, 在发酵 96 h 时达到最大值, 之后逐渐下降, 且米曲霉的酶活力明显高于黑曲霉。发酵初始阶段, 菌体不断增殖, 产酶能力也不断增强, 酶活力随之升高, 当发酵至 96 h 左右时, 酶活力达到最高水平, 后期因菌体生长进入衰老期, 其产酶能力减弱, 菌体酶活力也就随之下降^[17]。米曲霉的主要产物是中性蛋白酶和碱性蛋白酶, 而黑曲霉的主要产物是酸性蛋白酶, 中性蛋白酶酶活处于较低水平^[17], 故而, 米曲霉的酶活力 (本实验所测为中性蛋白酶) 高于黑曲霉。由图 2b 可以看出, 在中性蛋白酶酶活力实验的基础上, 发酵 96 h 测定 $\text{OD}_{540 \text{ nm}}$, 结果显示, 米曲霉发酵培养基中的活性肽含量高于黑曲霉。相对黑曲霉,

米曲霉产中性蛋白酶能力较强，酶活力较高，因而选用米曲霉作为实验的发酵菌种。

2.2 单因素实验

以 $OD_{540\text{ nm}}$ 为指标，米曲霉为发酵菌种，研究不同因素（发酵时间、含水量、起始 pH、接种量）对于辣木叶活性肽含量的影响。

2.2.1 发酵时间

由图 3 可知，随着发酵的进行， $OD_{540\text{ nm}}$ 在 96 h 达到最高值，之后又呈现下降趋势，这一结果与发酵菌种筛选过程中的结果相符。因此，确定 96 h 为最优发酵时间。

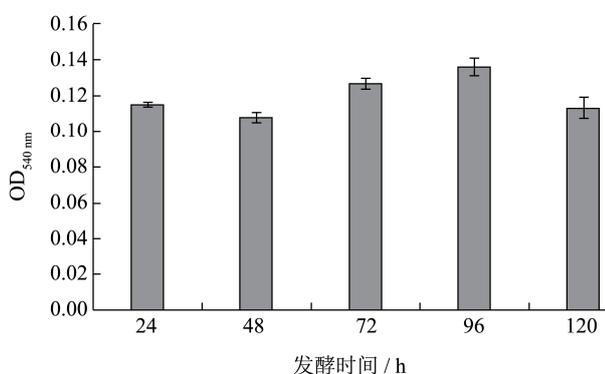


图 3 发酵时间对发酵制备的影响

Fig.3 Effect of fermentation time on fermentation preparation

2.2.2 含水量

从图 4 可以看出，当含水量为 50% 时， $OD_{540\text{ nm}}$ 最高。含水量低于或高于 50% 时， $OD_{540\text{ nm}}$ 呈现下降趋势。米曲霉是好氧微生物，在微生物生长发育、繁殖产酶时期均需要一定的水分参加生理反应，同时含水量还会影响培养基中各物质的溶解及酶解反应。当含水量较低时，可溶性营养物质的溶解不充分，不利于微生物生长、酶生产及酶水解过程；含水量过高时，会使固体培养基变为糊状，透气性差，不利于微生物的繁殖，甚至导致微生物的死亡，因此，最适发酵含水量应为 50%。

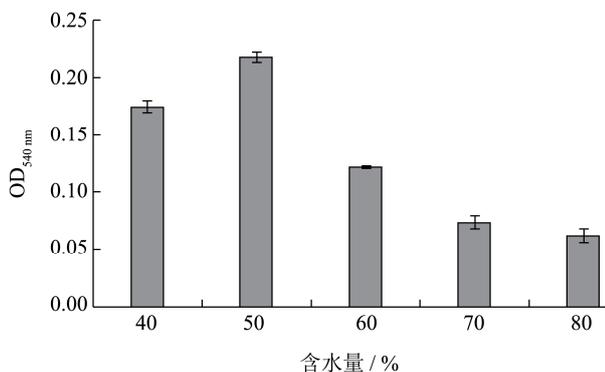


图 4 含水量对发酵制备的影响

Fig.4 Effect of water content on fermentation preparation

2.2.3 起始 pH

由图 5 所示，pH 为 5 时， $OD_{540\text{ nm}}$ 最高，当 pH 超过 5 后， $OD_{540\text{ nm}}$ 降低。每种菌都有其最适 pH 和耐受 pH 范围，pH 的变化可以影响细胞膜上的电荷，从而影响米曲霉对营养物质的吸收，进而影响米曲霉的新陈代谢，最终引起蛋白酶活力的改变。结果显示，pH 为 5 时，米曲霉生长旺盛，利于发酵，故而 $OD_{540\text{ nm}}$ 最高，即含量最高。

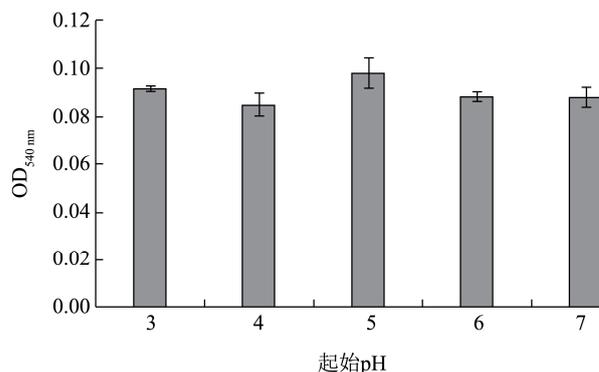


图 5 起始 pH 对发酵制备的影响

Fig.5 Effect of initial pH on fermentation preparation

2.2.4 接种量

由图 6 可知，在发酵过程中， $OD_{540\text{ nm}}$ 随接种量的增加呈现先增加后减少的趋势。接种量在较低水平时，随着接种量的增加，米曲霉在发酵过程中的生长繁殖速度加快，产酶量增加，但接种量过大，一定时期内菌种繁殖量过大导致氧气、营养等不足，反倒对酶的活性产生抑制作用，导致 $OD_{540\text{ nm}}$ 呈现下降的趋势^[18,19]。因此，选择 14% 作为最优接种量。

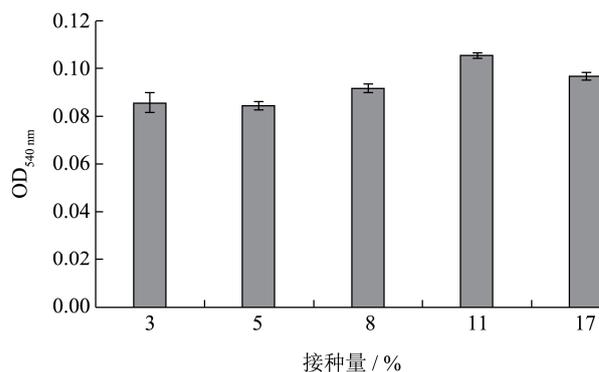


图 6 接种量对发酵制备的影响

Fig.6 Effect of inoculation amount on fermentation preparation

表 1 响应面试验因素水平表

Table 1 Response surface test factor level table

因素	水平		
	-1	0	1
A 培养基含水量/%	40	50	60
B 米曲霉接种量/%	11	14	17
C 发酵时间/h	72	96	120

表2 响应面设计方案及结果

Table 2 Response surface design scheme and results

试验号	A 培养基含水量/%	B 米曲霉接种量/%	C 发酵时间/h	Y OD _{540nm}
1	50.00	14.00	96.00	0.127
2	60.00	14.00	120.00	0.119
3	50.00	14.00	96.00	0.132
4	50.00	11.00	72.00	0.097
5	50.00	14.00	96.00	0.129
6	40.00	14.00	72.00	0.11
7	40.00	17.00	96.00	0.091
8	40.00	11.00	96.00	0.089
9	50.00	17.00	120.00	0.117
10	60.00	11.00	96.00	0.092
11	60.00	14.00	72.00	0.125
12	50.00	14.00	96.00	0.120
13	40.00	14.00	120.00	0.105
14	60.00	17.00	96.00	0.097
15	50.00	14.00	96.00	0.132
16	50.00	17.00	72.00	0.123
17	50.00	11.00	120.00	0.086

表3 回归模型的方差分析及显著性检验

Table 3 Analysis of variance and significance test of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	3.816×10 ⁻³	9	4.240×10 ⁻⁴	6.38	0.0116	*
A-培养基含水量	1.805×10 ⁻⁴	1	1.805×10 ⁻⁴	2.72	0.1433	
B-米曲霉接种量	5.120×10 ⁻⁴	1	5.120×10 ⁻⁴	7.71	0.0274	*
C-发酵时间	9.800×10 ⁻⁵	1	9.800×10 ⁻⁵	1.48	0.2639	
AB	2.550×10 ⁻⁶	1	2.250×10 ⁻⁶	0.034	0.8592	
AC	2.500×10 ⁻⁷	1	2.500×10 ⁻⁷	3.763×10 ⁻³	0.9528	
BC	6.250×10 ⁻⁶	1	6.250×10 ⁻⁶	0.094	0.7680	
A ²	7.532×10 ⁻⁴	1	7.532×10 ⁻⁴	11.34	0.0120	*
B ²	2.108×10 ⁻³	1	2.108×10 ⁻³	31.73	0.0008	***
C ²	6.579×10 ⁻⁸	1	6.579×10 ⁻⁸	9.904×10 ⁻⁴	0.9758	
残差	4.650×10 ⁻⁴	7	6.643×10 ⁻⁵	-	-	
失拟误差	3.670×10 ⁻⁴	3	1.223×10 ⁻⁴	4.99	0.0772	
纯误差	9.800×10 ⁻⁵	4	2.450×10 ⁻⁵	-	-	
总和	4.281×10 ⁻³	16	-	-	-	

注: ***为极显著 (p<0.001); **为较显著 (p<0.01); *为显著 (p<0.05); 不显著 (p>0.05); -表示无数据。

2.3 响应面优化

2.3.1 响应面因素水平设计与结果

在单因素实验的基础上, 根据 Design-Expert V.8.0.6 软件中 Box-Behnken 中心组合试验设计原理, 选取培养基含水量 (A)、米曲霉接种量 (B) 和发酵时间 (C) 作为变量, 以 OD_{540nm} (Y) 作为响应值进

行因素水平设计, 具体响应面试验因素水平设置见表 1, 各组试验设计结果见表 2。

2.3.2 响应面设计回归模型的建立及方差、可信度分析

利用 Design-Expert 8.0.6 对表 2 中的实验数据进行二次多元回归拟合, 得到二次多项回归方程: $Y=4.75 \times 10^{-3}A+8 \times 10^{-3}B-3.5 \times 10^{-3}C+7.5 \times 10^{-4}AB-2.5 \times 10^{-4}AC+$

$$1.25 \times 10^{-3}BC - 0.013A^2 - 0.022B^2 + 1.25 \times 10^{-4}C^2 + 0.13$$

进一步对拟合出的回归方程进行方差分析, 结果见表 3。此回归模型达到显著水平 ($p < 0.05$), 失拟项不显著 ($p > 0.05$), 建立的二次模型稳定^[19], 可用于推测相关发酵条件下的辣木叶活性肽含量。一次项 B ($p < 0.05$)、二次项 A² ($p < 0.05$) 和 B² ($p < 0.01$) 均达到显著水平。根据各影响因素的 F 值大小可知, 3 个因素各因素影响 OD_{540 nm} 的主次顺序为: B (米曲霉接种量) > A (培养基含水量) > C (发酵时间)。

2.3.3 响应曲面图分析

培养基含水量、米曲霉接种量、发酵时间三个因素间两两交互作用对 OD_{540 nm} 的影响见图 7。交互作用的强弱可由三维立体图平缓程度来反映, 响应面坡度越陡, 表明条件改变对响应值的影响越大^[20]。

由图 7 可以看到, 所有响应曲面图均呈向上突起状, BC 和 AB 交互作用的响应曲面图较 AC 更陡, 倾斜度更高, 因此米曲霉接种量 (B) 和发酵时间 (C)、培养基含水量 (A) 和米曲霉接种量 (B) 的交互作用明显, 与表 3 回归模型方差分析结果一致。

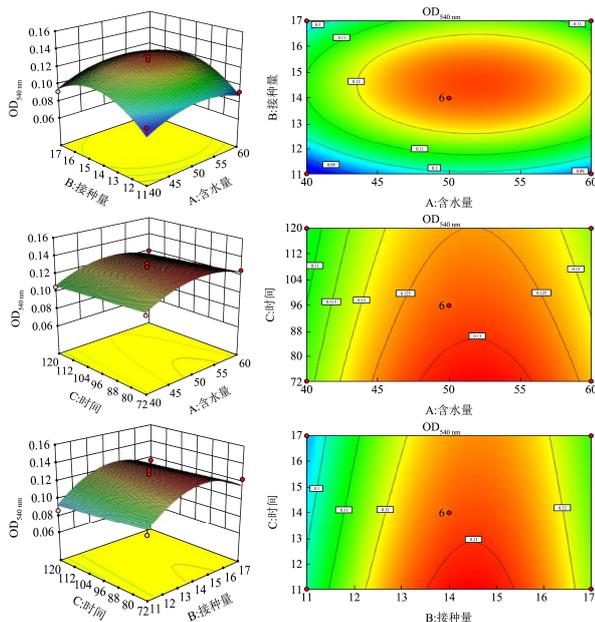


图 7 各因素交互作用对 OD_{540 nm} 影响的响应曲面图和等高线

Fig.7 Response surface diagram and contour of the interaction of various factors on OD_{540 nm}

2.3.4 最佳发酵工艺条件的验证试验

通过响应面实验模型预测, 培养基含水量 52.39%、米曲霉接种量 14.71%、发酵时间 72 h 时, OD_{540 nm} 达到极值点, 此时的 OD_{540 nm} 为 0.132。为验证响应面实验所建立模型的可行性, 在此工艺参数下进行 3 次固态发酵实验, 测得平均 OD_{540 nm} 为 0.130, 与预测值 0.132 相对误差 1.5%, 模型拟合度良好。

因此, 米曲霉固态发酵制备辣木叶活性肽的优化

工艺条件为: 培养基起始 pH 为 5、含水量 52.39%、米曲霉接种量 14.71%、发酵时间 72 h、发酵温度 30 ℃。

2.4 辣木叶活性肽抗氧化活性分析

2.4.1 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基是一种含有奇数个电子的稳定自由基, 其乙醇溶液呈深紫色, 在 517 nm 下有最大吸收值。当体系有抗氧化剂存在时, 两分子的 DPPH 自由基可与抗氧化物质结合, 形成一分子 DPPH 抗氧化物质复合物和一分子 DPPH 还原态分子, 此时在 517 nm 下的吸收值降低, 因此, 可用来评价物质的抗氧化活性^[21]。

不同浓度的辣木叶活性肽对 DPPH 自由基清除能力见图 8, 结果显示, 活性肽质量浓度在 0.1~1 mg/mL 时, DPPH 自由基清除率随着浓度增大而显著增大, 浓度为 1 mg/mL 时清除率可达到 91.45%。继续增加活性肽浓度, 自由基清除率增长趋于平稳。辣木叶活性肽对清除 DPPH 自由基的 EC₅₀ 为 0.42 mg/mL。李露等^[22]用碱性蛋白酶水解牦牛皮蛋白制备的抗氧化肽清除 DPPH 自由基的 EC₅₀ 为 2.884 mg/mL。Liang 等^[23]使用不同酶对辣木籽进行酶解并对得到的活性肽进行超滤, 得到抗氧化能力最强的活性肽 DPPH 自由基清除率的 EC₅₀ 为 4.0 mg/mL。与本实验相比, 发现采用米曲霉进行固态发酵得到的辣木叶活性肽对 DPPH 自由基的清除能力更强, 具有更高的抗氧化活性。

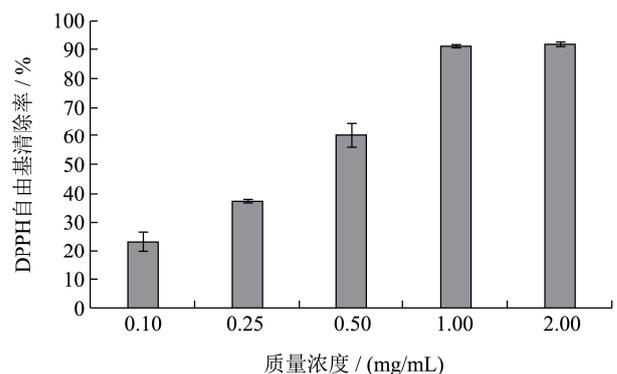


图 8 辣木叶活性肽在不同质量浓度下对 DPPH 自由基的清除率

Fig.8 DPPH free radical scavenging rate of *Moringa oleifera* leaves bioactive peptides at different mass concentrations

2.4.2 ABTS 自由基清除能力

ABTS 能与活性氧反应生成蓝绿色的 ABTS 自由基, 在 734 nm 有最大吸收峰。当体系中存在抗氧化物质时, 抗氧化物质能够与该呈色离子发生反应而使呈色离子的颜色变浅^[24], 734 nm 的吸收值相应减小, 因此, 可用于评价抗氧化反应的程度。

图 9 显示, 在质量浓度为 0.025~0.2 mg/mL 范围

内, ABTS 自由基清除率大小与辣木叶活性肽质量浓度呈现量效关系, 浓度上升至 0.2 mg/mL 时, 清除率高达 97.25%。继续增加辣木叶活性肽浓度, 对自由基清除率的影响很小, ABTS 自由基清除率的 EC₅₀ 为 0.059 mg/mL。贾蕾等^[25]采用酶解法制备碎米荠硒肽并测定其抗氧化能力, 结果显示其 ABTS 自由基清除率的 EC₅₀ 为 0.399 mg/mL。Wang 等^[26]发现最优酶解条件下酶解得到的棉籽肽的 ABTS 自由基清除率的 EC₅₀ 为 2.05±0.02 mg/mL。由此可见, 辣木叶活性肽在低浓度下对 ABTS 自由基有较强的清除效果。

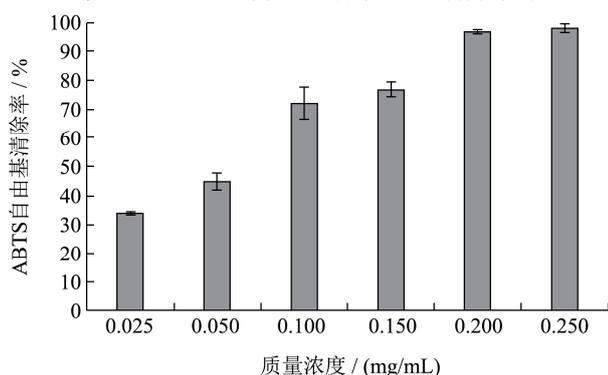


图9 辣木叶活性肽在不同质量浓度下对 ABTS 自由基的清除率

Fig.9 ABTS free radical scavenging rate of *Moringa oleifera* leaves bioactive peptide at different mass concentrations

2.4.3 螯合金属能力

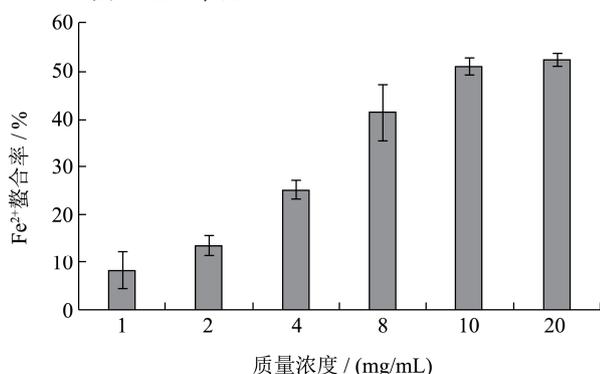


图10 辣木叶活性肽在不同质量浓度下对 Fe²⁺ 的螯合率

Fig.10 Fe²⁺ chelating rate of *Moringa oleifera* leaves bioactive peptide at different mass concentrations

以 Fe²⁺ 为代表的变价金属离子能加速氧自由基的产生, 从而加速食品中蛋白质、脂质的氧化。抗氧化剂清除氧自由基的能力有限, 若能同时通过螯合金属离子来减少氧自由基产生, 则能达到最佳的抗氧化效果^[27,28]。因此对辣木叶活性肽螯合 Fe²⁺ 的能力进行评估, 也能反映其抗氧化活性。菲啰啉作为一种发色螯合剂, 可强烈螯合 Fe²⁺ 形成一种稳定的红色配合物, 在 562 nm 处有较强的吸收能力。当可以与 Fe²⁺ 进行螯合的试剂与菲啰啉同时存在时, 该试剂与菲啰啉争夺 Fe²⁺ 使菲啰啉与 Fe²⁺ 形成的螯合物减少, 造成配合物

红色变浅, 因此可以通过测定在该波长处颜色减退来评估试剂与 Fe²⁺ 的螯合能力^[29]。

图 10 显示, 在质量浓度为 1~20 mg/mL 时, 样品浓度的大小与 Fe²⁺ 螯合率呈正相关关系, 当质量浓度达到 10 mg/mL 时, 螯合率达到 50.83%, 继续增加辣木叶活性肽的浓度, 螯合率趋于平稳, 其 EC₅₀=9.76 mg/mL。随着肽浓度的增加, 对 Fe²⁺ 的螯合能力增强, 这可能是因为活性肽浓度的增加使得肽与 Fe²⁺ 间相互接触的几率更大所致。明强强等^[30]使用黑曲霉固态发酵制备的花生活性肽分子量大于 10 ku 时 Fe²⁺ 螯合率的 EC₅₀=15.96 mg/mL, 毛晶等^[31]对松仁谷活性肽进行分离纯化与测序合成后, 得到的抗氧化肽在 1000 μmol/mL 时 Fe²⁺ 螯合率为 48.66%。与本实验对比发现, 辣木叶活性肽有较强的金属螯合能力。

2.5 氨基酸组成分析

在最优发酵条件下制备的辣木叶活性肽的氨基酸组成及含量如表 4 所示。

表 4 辣木叶活性肽氨基酸组成

Table 4 Amino acid composition of bioactive peptides from

Moringa oleifera leaves			
氨基酸种类	含量/%	总含量/%	
疏水氨基酸	丙氨酸 (Ala)	6.42	28.46
	缬氨酸 (Val)	5.21	
	异亮氨酸 (Ile)	3.25	
	亮氨酸 (Leu)	4.92	
	酪氨酸 (Tyr)	3.38	
	脯氨酸 (Pro)	5.27	
酸性氨基酸	天冬氨酸 (Asp)	11.21	30.31
	谷氨酸 (Glu)	19.10	
碱性氨基酸	精氨酸 (Arg)	2.61	13.64
	组氨酸 (His)	6.23	
	赖氨酸 (Lys)	4.80	
	苏氨酸 (Thr)	4.82	
其他氨基酸	丝氨酸 (Ser)	5.05	27.55
	甘氨酸 (Gly)	6.58	
	胱氨酸 (Cys)	5.51	
	蛋氨酸 (Met)	1.72	
	苯丙氨酸 (Phe)	3.87	

表 4 显示, 辣木叶活性肽共检出 17 种氨基酸, 与抗氧化活性相关的肽段氨基酸包括 Asp、Phe、Tyr、Glu、Lys、His、Pro、Cys 等^[7], 其中含量最高的氨基酸为 Glu (19.10%), 其次为 Asp (11.21%), 符合植物蛋白的组成^[32]。Kim 等^[33]对辣木叶干粉氨基酸组成进行了检测, 与我们发酵制备的辣木叶活性肽的氨

基酸组成对比分析发现,二者氨基酸组成相同,但不同氨基酸占总氨基酸的含量略有变化。发酵制备得到的辣木叶活性肽中, Glu 含量提高了 2.91%, His 含量提高了 3.85%; Asp、Tyr 的含量与发酵前相比略有减少,但总体变化不大。发酵前后氨基酸含量发生变化的原因可能是由于发酵过程并未将辣木叶蛋白完全转化为活性肽而导致氨基酸含量降低,也可能由于米曲霉自身产生了代谢物而导致部分氨基酸升高。辣木叶活性肽的抗氧化活性与氨基酸的组成有密切关系。酸性氨基酸(如 Glu 和 Asp)带负电,能和金属离子相互作用(如螯合作用),减少超氧阴离子及羟自由基的产生,从而抑制氧化链式反应^[7]。王颖颖等^[34]在使用不同蛋白酶对牡丹籽蛋白进行酶解后发现,酸性氨基酸含量高的水解产物,其抗氧化能力也更强。Yu 等^[35]分别合成了含有和缺失 Glu-Asp 序列的多肽并对比其抗氧化活性,确定了 Glu-Asp 的联合作用能提高多肽的抗氧化能力。本试验中,辣木叶活性肽中的 Asp 和 Glu 含量较高,起到了一定的抗氧化作用。芳香族氨基酸有质子供体的作用,能与自由基结合形成中间体,并通过中间体之间的共振维持稳定^[36],从而阻断或减慢自由基链式反应。曾剑华等^[32]研究也发现, Tyr 对 ABTS 阳离子自由基有较强的清除效果,抗氧化能力达到 186.29 mmol/kg。因此,辣木叶活性肽中的 Tyr (含量 3.38%) 对抗氧化性也起到了正向作用。碱性氨基酸中的 His 由于咪唑基的降解而使其具有自由基清除能力^[37],表明本试验中的 His (含量 6.23%) 也是辣木叶活性肽的抗氧化能力来源之一。另有研究证实,肽段中特定的氨基酸序列具有强抗氧化性。Asp、Glu 中的-COOH 是吸电子基团,与 Tyr 相邻时能使 Tyr 酚羟基上的氧电子云密度降低,促使质子释放,提高 Tyr 的供氢能力,从而增强肽段的自由基清除能力^[38];肽段的 N 端为疏水性氨基酸时,脂肪族侧链更利于抗氧化肽与活性氧结合^[39],增强其抗氧化活性,Chen 等^[40]、杨保军等^[41]也发现,大部分抗氧化肽在 N 端包含疏水性氨基酸(如 Val、Leu)。综合分析,辣木叶活性肽中的氨基酸组成及特征氨基酸序列结构是使得辣木叶具有强抗氧化活性的原因,后续研究将进一步对辣木叶活性肽的肽段组成和氨基酸序列进行深入分析。

3 结论

本实验利用米曲霉固态发酵法制备辣木叶活性肽,确定最佳发酵工艺为米曲霉作为最优菌种,发酵温度 30 °C,发酵时间 72 h,培养基含水量 52.39%,接种量 14.71%,pH 为 5。在最优工艺条件下得到的

辣木叶活性肽具有较好的抗氧化活性,且富含 17 种氨基酸,其中酸性氨基酸和疏水性氨基酸含量较高。本研究为辣木叶活性肽功能性产品的研发提供了一定的参考,有一定的理论指导意义。

参考文献

- [1] 郭刚军,胡小静,徐荣,等.干燥方式对辣木叶营养、功能成分及氨基酸组成的影响[J].食品科学,2018,39(11):39-45
GUO Gangjun, HU Xiaojing, XU Rong, et al. Effects of drying methods on nutrition, functional components and amino acid composition of spicy wood leaves [J]. Food Science, 2018, 39(11): 39-45
- [2] 郝东宇,席兴军,初侨,等.Box-Behnken响应面法优化辣木叶蛋白的超声提取工艺[J].分析仪器,2018,6:128-136
HAO Dongyu, XI Xingjun, CHU Qiao, et al. Optimization of ultrasonic extraction process of pungent leaf protein by box Behnken response surface methodology [J]. Analytical Instrumentation, 2018, 6: 128-136
- [3] El-hack M E A, Alagawany M, Elrys A S, et al. Effect of forage *Moringa Oleifera* L. (moringa) on animal health and nutrition and its beneficial applications in soil, plants and water purification [J]. Agriculture, 2018, 8(9): 1-22
- [4] M S Brewer. Natural Antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2011, 10(4)
- [5] Farhat U, Naveed I, Muhammad A, et al. DPPH, ABTS free radical scavenging, antibacterial and phytochemical evaluation of crude methanolic extract and subsequent fractions of *Chenopodium botrys* aerial parts [J]. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 30(3): 761-766
- [6] M S A, T E M, S M A, et al. Impact of cucumber pomace fortification on the nutritional, sensorial and technological quality of soft wheat flour-based noodles [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2021, 56(7): 3255-3268
- [7] 刘辉,童星.大豆水解蛋白中抗氧化肽的研究进展[J].中国调味品,2021,46(1):191-195
LIU Hui, TONG Xing. Research progress of antioxidant peptides in soybean hydrolyzed protein [J]. China Condiment, 2021, 46(1): 191-195
- [8] Weicai Zeng, Qun Sun, Wenhua Zhang, et al. Antioxidant activity *in vivo* and biological safety evaluation of a novel antioxidant peptide from bovine hair hydrolysates [J]. Process Biochemistry, 2017, 56: 193-198

- [9] Mazumdar A, Maumdar H. Bio-Processing of banana peel for alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid state fermentation [J]. The Clarion- International Multidisciplinary Journal, 2018, 7(1): 36
- [10] QB/T1803-1993,工业酶制剂通用试验方法[S]
QB/T1803-1993, General methods of determination for industrial enzymes [S]
- [11] Parvin R, Pande Sv, Venkitas Ta. On the colorimetric biuret method of protein determination [J]. Academic Press, 1965, 12(2): 219-229
- [12] 张红波,高艳平,周恩旭,等.响应面法对酶解法提取鲤鱼多肽工艺的优化[J].江苏农业科学,2017,45(3):151-154
ZHANG Hongbo, GAO Yanping, ZHOU Enxu, et al. Optimization of carp polypeptide extraction by enzymatic lysis by the response surface technique [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(3): 151-154
- [13] GB 5009.124-2016,食品安全国家标准,食品中氨基酸的测定[S]
GB 5009.124-2016, National Standards for Food Safety, Determination of Amino Acids in Foods [S]
- [14] Asghar M T, Yusof Y A, Mokhtar M N, et al. Coconut (*Cocos nucifera* L.) sap as a potential source of sugar: antioxidant and nutritional properties [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(4): 1777-1787
- [15] Olszowy-tomczyk M, Typek R. Monitoring the changes of 5-caffeoylquinic acid during its reaction with ABTS cation radicals by LC-MS [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2020, 43(15-16): 687-692
- [16] Jin D, Liu X, Zheng X, et al. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides [J]. Food Chemistry, 2016, 204: 427-436
- [17] 蔡佳.黑曲霉固态发酵玉米黄粉制备玉米肽[D].济南:山东轻工业学院, 2012
CAI Jia. Preparation of corn peptide from corn glutenmeal by *Aspergillus niger* solid-state fermentation: [D]. Jinan: Shandong Institute of light industry, 2012
- [18] Agarwal V, Kumar D, Varadwaj P, et al. Water activity and biomass estimation using digital image processing in solid-state fermentation [J]. Bioresource Technology, 2020, 308: 123277
- [19] 梁玉禧.米曲霉发酵对芝麻粕理化性质及抗氧化性的影响[D].南昌:南昌大学,2019
LIANG Yuxi. Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation on physicochemical properties and antioxidant activity of sesame meal: [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019
- [20] 时菲菲,陈毓,周晨,等.响应面法优化党参多糖提取工艺及抗氧化活性研究[J].畜牧与兽医,2021,53(1):54-60
SHI Feifei, CHEN Yu, ZHOU Chen, et al. Optimization of extracting polyphenols from *Codonopsis pilosula* by the response surface technique and their antioxidant activity [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(1): 54-60
- [21] M P V, N S F. Antioxidant activities from two varieties of pear peel extracts using DPPH and CUPRAC methods [J]. Journal of Physics: Conference Series, 2021, 1764(1): 012013
- [22] 李露,张普香,韩朋岑,等.酶法水解牦牛皮蛋白制备抗氧化肽工艺的优化[J].食品工业科技,2021,24:188-196
LI Lu, ZHANG Puxiang, HAN Pengcen, et al. Process of the preparation of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis of yak hide protein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 24: 188-196
- [23] Liang L, Wang C, Li S, et al. Nutritional compositions of Indian *Moringa oleifera* seed and antioxidant activity of its polypeptides [J]. Food Science & Nutrition, 2019, 7(5): 1754-1760
- [24] N K E, M K N. Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass [J]. Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic, 2002, 18(1): 39-48
- [25] 贾蕾,何慧,向极钎,等.碎米荠硒肽的制备及其体外抗氧化活性分析[J].食品工业科技,2022,6:205-212
JIA Lei, HE Hui, XIANG Jiqian, et al. Study on preparation and antioxidant activity of selenopeptide from *Cardamine ensliensis in vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 6: 205-212
- [26] Wang L, Ma M, Yu Z, et al. Preparation and identification of antioxidant peptides from cottonseed proteins [J]. Food chemistry, 2021, 352: 129399
- [27] 何琴.食品抗氧化剂在油脂中的应用[J].北京农业,2011,15: 13-14
HE Qin. Antioxidants in oils and fats in food applications [J]. Beijing Agriculture, 2011, 15: 13-14
- [28] 吕双双,李书国.植物源天然食品抗氧化剂及其应用的研究[J].粮油食品科技,2013,21(5):60-65
LYU Shuangshuang, LI Shuguo. Research on natural plant source food antioxidants and the application [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2013, 21(5): 60-65
- [29] Zarei M, Ghanbari R, Tajabadi N, et al. Generation, fractionation, and characterization of iron-chelating protein hydrolysate from palm kernel cake proteins [J]. Journal of

- Food Science, 2016, 81(2): C341-C347
- [30] 明强强,于丽娜,杨庆利,等.黑曲霉固态发酵制备花生蛋白肽及抗氧化活性研究[J].食品科技,2014,39(2):17-22
MING Qiangqiang, YU Lina, YANG Qingli, et al. Preparation of peanut protein peptide by solid state fermentation of *Aspergillus niger* and its antioxidant activity [J]. Food Science and Technology, 2014, 39(2): 17-22
- [31] 毛晶,王鹏,王祖浩,等.松仁谷蛋白抗氧化肽的分离纯化及一级结构鉴定[J].食品科学,2017,38(3):59-63
MAO Jing, WANG Peng, WANG Zuhao, et al. Isolation, purification and primary structure identification of antioxidant peptides from pine kernel glutenin [J]. Food Science, 2017, 38(3): 59-63
- [32] 曾剑华,刘琳琳,杨杨,等.大豆亲脂蛋白组分分析及体外抗氧化特性[J].食品科学,2020,41(14):58-65
ZENG Jianhua, LIU Linlin, YANG Yang, et al. Component analysis of soybean lipophilic protein and its antioxidant properties *in vitro* [J]. Food Science, 2020, 41(14): 58-65
- [33] Kim Y J, Kim H S. Screening *Moringa* species focused on development of locally available sustainable nutritional supplements [J]. Nutrition Research and Practice, 2019, 13(6): 529-534
- [34] 王颖颖,李迎秋.酶解牡丹籽蛋白抗氧化特性的研究[J].中国调味品,2020,45(12):159-164
WANG Yingying, LI Yingqiu. Study on antioxidant characteristics of enzymatic hydrolysis of tree peony seed protein [J]. China Condiment, 2020, 45(12): 159-164
- [35] Yu J, Hongfei Z, Bolin Z. The role of an acidic peptide in controlling the oxidation process of walnut oil [J]. Foods (Basel, Switzerland), 2019, 8(10): 8100499
- [36] Masomeh G, Keizo A, Salimeh M, et al. Identification of two novel antioxidant peptides from edible bird's nest (*Aerodramus fuciphagus*) protein hydrolysates [J]. Food & Function, 2017, 8(5): 2046-2052
- [37] A Michael Wade, Hugh N Tucker. Antioxidant characteristics of L-histidine 1[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 1998, 9(6): 308-315
- [38] 徐力,李相鲁,吴晓霞,等.一种新的玉米抗氧化肽的制备与结构表征[J].高等学校化学学报,2004,3:466-469
XU Li, LI Xianglu, WU Xiaoxia, et al. Preparation and structural characterization of a new corn anti-oxidative peptide [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2004, 3: 466-469
- [39] 叶勇,周春卡,唐小月,等.植物抗氧化肽制备和活性研究方法[J].广州化工,2021,49(3):4-7
YE Yong, ZHOU Chunka, TANG Xiaoyue, et al. Preparation and activity of plant antioxidant peptides [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2021, 49(3): 4-7
- [40] Chen H, Muramoto K, Yamauchi F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(3): 574-578
- [41] 杨保军,梁琪.干酪源生物活性肽的构效关系研究进展[J].食品与发酵工业,2021,47(16):288-293
YANG Baojun, LIANG Qi. Research progress on structure-activity relationship of bioactive peptides derived from cheese [J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(16): 288-293

(上接第 151 页)

- [15] 强志斌,陈寅生,郭华文,等.壳聚糖膜的制备及膜性能[J].东华大学学报(自然科学版),2007,33(2):212-215,220
QIANG Zhibin, CHEN Yinsheng, GUO Huawen, et al. Property of different molecular weight and degree of deacetylation chitosan membranes [J]. Journal of Donghua University (natural science), 2007, 33(2): 212-215, 220
- [16] 付海丽,张雯,张华,等.壳聚糖/有机锂皂石纳米复合材料的制备及抗菌性能研究[J].无机材料学报,2016,31(5):479-484
FU Haili, ZHANG Wen, ZHANG Hua, et al. Preparation and antibacterial activity of chitosan/organic laponite nanocomposites [J]. Journal of Inorganic Materials, 2016, 31(5): 479-484
- [17] 王朝,辛梅华,李明春,等.O-己酰化壳聚糖季铵盐的合成及其抗菌活性研究[J].功能材料,2013,44(15):2148-2151
WANG Chao, XIN Meihua, LI Mingchun, et al. Synthesis and antibacterial activity of o-hexylated chitosan quaternary ammonium salt [J]. Journal of Functional Materials, 2013, 44(15): 2148-2151
- [18] 龙德武,吴国忠,秦宗英,等.辐射法降解壳聚糖及其抑菌性能的研究[J].高分子材料科学与工程,2005,21(6):240-242
LONG Dewu, WU Guozhong, QIN Zongying, et al. Degradation of chitosan by radiation and its antibacterial properties [J]. Polymer Materials Science and Engineering, 2005, 21(6): 240-242
- [19] HE Guanghua, CHEN Xu, YIN Yihua, et al. Synthesis, characterization and antibacterial activity of salicyloyl chitosan [J]. Carbohydrate Polymers, 2011, 83(3): 1274-1278