

# 米曲霉固态发酵结合成曲水解法 制备大豆抗氧化肽的研究

王海燕<sup>1</sup>, 张凤兰<sup>1</sup>, 曹亚兰<sup>2</sup>, 丁宏<sup>1</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 利用米曲霉固态发酵制曲结合成曲水解制备大豆抗氧化肽。分别以豆粕和麸皮为氮源和碳源, 研究米曲霉制曲的原料碳氮比(C/N)、制曲培养时间、曲精接种量对成曲水解特性(成曲蛋白酶活、水解度、肽得率、蛋白质回收率)及其水解产物抗氧化活性(抗氧化能力指数 ORAC 值、DPPH 自由基清除率)的影响。在此基础上, 通过正交试验研究四因素(包括 pH、外源添加大豆分离蛋白、底物蛋白浓度和水解时间)对成曲水解产物抗氧化活性的影响, 以期筛选出水解产物抗氧化活性较高的大豆肽。结果表明: 制曲条件为: 麸皮/豆粕质量比为 1/5、培养时间 44 h、曲精接种量 0.05% (m/m); 成曲水解条件为: pH 7、底物蛋白浓度 8%、不添加外源蛋白、水解 4 h 时, 所得成曲的碱性蛋白酶活力可高达 3109.85 U/g, 曲水解产物的 ORAC 值可高达 2130.22  $\mu\text{mol Trolox equivalent/g peptide}$ , DPPH 的  $\text{IC}_{50}$  值为 0.29 mg/mL, 具有强抗氧化活性。

**关键词:** 米曲霉, 固态发酵, 大豆抗氧化肽, ORAC 值, DPPH 自由基清除率

文章编号: 1673-9078(2012)8-969-974

## Preparation of Soybean Antioxidant Peptides by *Aspergillus oryzae* Solid Fermentation Combined with Controllable Koji Hydrolysis

WANG Hai-yan<sup>1</sup>, ZHANG Feng-lan<sup>1</sup>, CAO Ya-lan<sup>2</sup>, DING Hong<sup>1</sup>

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

**Abstract:** Antioxidant peptides from soybean were prepared by solid fermentation with *Aspergillus oryzae* and combined with controllable koji hydrolysis. With defatted soybean as nitrogen source and wheat bran as carbon source for *Aspergillus oryzae*, the koji-making conditions were optimized and the protease activity of koji were evaluated. The degree of hydrolysis, peptide recovery and protein recovery were also analyzed. Then orthogonal test was applied to optimize preparation conditions. It was found that the optimum koji-making conditions were as follows: C/N ratio 1/5, culture time 44 h, and inoculum size 0.05%. The optimum hydrolysis conditions were as follows: pH 7, substrate protein concentration 8%, hydrolysis time 4 h and no additional protein needed. Under these conditions, the alkaline protease activity of koji was 3109.85 U/g and the obtained product showed strong antioxidant activity with high ORAC value (2130.22  $\mu\text{mol Trolox equivalent/g peptide}$ ) and DPPH scavenging activity ( $\text{IC}_{50}=0.29 \text{ mg/mL}$ ).

**Key words:** *Aspergillus oryzae*; solid fermentation; antioxidant peptides from soybean; ORAC value; DPPH radical scavenging activity

近年来, 生物活性肽清除自由基的作用越来越被认可<sup>[1]</sup>, 而食源性抗氧化肽因具有较强抗氧化活性和良好安全性, 在食品等领域已展现出极好的应用前景<sup>[2]</sup>。目前食源性生物活性肽的制备技术主要有蛋白可控酶解法、定向合成法、微生物发酵法以及直接提取分离纯化法等。合成法设备投资大、产品成本高, 当前其技术成熟度仅限于小分子寡肽的合成; 直接提取法只适合于细菌、真菌、动植物中存在的一些天然功能性肽, 但因其含量极微, 提取分离纯化成本高, 故难以

收稿日期: 2012-03-25

通讯作者: 丁宏 (1963-), 副主任药师, 主要从事药品食品的研究及监管工作

大规模推广; 酶降解法制备活性肽产品安全性高, 生产条件温和, 过程易控, 因此酶法降解蛋白质是获得食品级生物活性肽的常用方法。但由于酶解法可选择的蛋白酶仅限于少数几种商业化的蛋白酶, 因此蛋白酶法制备大豆肽受到一定局限性, 缺点在于蛋白利用率不高、肽得率较低<sup>[3-4]</sup>。近年来, 微生物发酵法广泛应用于大豆肽的生产制备, 主要利用发酵菌株所分泌的各种蛋白酶对蛋白质的相关位点切割获得不同的肽段, 可达到降低成本、提高利用率和产率目的。

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)是生产蛋白酶的优良菌种之一, 其生长过程中分泌蛋白酶的活性受其所利用

物料以及生产环境的影响<sup>[5]</sup>, 而大豆粕粉营养成分丰富, 除含有较高的碳氮源以外, 还有很多种类的其他营养成分, 有利于米曲霉利用<sup>[6]</sup>, 且豆粕粉价格低廉, 因此无论从原料成分还是成本价格的角度出发, 豆粕粉都是固态发酵制备大豆多肽的理想原料, 一方面, 豆粕粉养分充足, 可以作为米曲霉发酵的良好原料; 另一方面, 豆粕粉低廉的价格使生产多肽的成本大大降低。因此, 本文豆粕粉为米曲霉发酵的氮源, 以麸皮为碳源进行固态发酵, 探讨制曲条件 (C/N、培养时间、接种量等) 对成曲水解产物的水解特性和抗氧化性的影响, 并借助正交试验对发酵后成曲水解工艺条件进行优化, 以期制备高抗氧化活性的大豆肽。同时, 因前期研究发现挤压大豆分离蛋白可以提高其酶解敏感性<sup>[7]</sup>, 因此在发酵后成曲水解工艺中也对外源添加挤压/非挤压大豆分离蛋白进行了尝试。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

低温脱脂豆粕 (粗蛋白含量 43.77%、水分含量 10.23%), 由益海嘉里粮油 (中国) 有限公司提供; 大豆分离蛋白 (蛋白质含量 >90%), 购于山东万德福植物蛋白科技有限责任公司; 麸皮, 碳水化合物含量 61.4%; 曲精 (沪酿 3.042 孢子粉), 孢子发芽率 ≥80%, 孢子数 ≥100 亿/g (干基), 水分 ≤10%。

碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L FG (测定酶活,  $17.6 \times 10^4$  U/g) 由诺维信 (中国) 生物技术有限公司提供; 荧光物质 Sodium Fluorescein (3',6'-dihydroxyspiro [isobenzofuran-1 [3H], 9'[9H] - xanthen]-3-one, FL)、自由基产生剂 AAPH (2, 2'-azobis-2-amidinopropane-dihydrochloride)、抗氧化标准物质 Trolox (6-hydro-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)、DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhy-drazyl) 均购于 Sigma 公司; 其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

GL-21M 高速冷冻离心机, 长沙湘仪离心机仪器有限公司; THZ-82A 恒温振荡器, 常州澳华仪器有限公司; PHS-3C 精密 pH 计, 上海雷磁精密仪器厂; KDN-2C 型定氮仪, 上海纤检仪器有限公司; KDN-40 消化炉, 上海新嘉电子有限公司; Varioskan Flash 多功能酶标仪, 芬兰 Thermo Scientific 公司; JB200-D 型强力电动搅拌器, 上海标本模型厂; UV-2100 紫外可见分光光度计, 上海尤尼柯公司; Alpha1-4 LD plus 冷冻干燥机, 德国 Marin Christ 公司; EBC-LF 粉碎机, 北京德之杰公司; ZJP-A1230 霉菌培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司; LDZX-30KBS 立式压力蒸汽

灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; TM840 自动电位滴定仪, 上海摩达科学器材公司。

## 1.3 试验方法

### 1.3.1 碳氮比(C/N)对制曲过程的影响

将低温脱脂豆粕置于高压灭菌锅中干蒸, 后将麸皮:豆粕(m/m)分别按 1:3、1:4、1:5、1:6、1:7 复配, 各加 0.05% (以加水后麸皮与豆粕总重计) 的曲精制曲, 培养 44 h, 测定成曲蛋白酶活力, 并将成曲按底物蛋白含量 7% 加水, 置于 55 °C 水浴摇床中水解 4 h, 探讨制曲 C/N 对成曲水解产物的水解特性和抗氧化性的影响。

### 1.3.2 培养时间对制曲过程的影响

将低温脱脂豆粕置于高压灭菌锅中干蒸, 后将麸皮与豆粕按 1:5 复配, 加 0.05% (以加水后麸皮与豆粕总重计) 的曲精制曲, 分别在 36 h、40 h、42 h、44 h、46 h 测定成曲蛋白酶活力, 并将成曲按底物蛋白含量 7% 加水, 置于 55 °C 水浴摇床中水解 4 h, 探讨制曲培养时间对成曲水解产物的水解特性和抗氧化性的影响。

### 1.3.3 接种量对制曲过程的影响

将低温脱脂豆粕置于高压灭菌锅中干蒸, 后将麸皮与豆粕按 1:5 复配, 分别接入 0.03%、0.04%、0.05%、0.06%、0.07% 曲精, 培养 44 h, 测定成曲蛋白酶活力, 并将成曲按底物蛋白含量 7% 加水, 置于 55 °C 水浴摇床中水解 4 h, 探讨制曲接种量对成曲水解产物的水解特性和抗氧化性的影响。

### 1.3.4 制曲后水解条件的研究

表 1 正交试验分析因素与水平表

Table 1 Factors and levels of the orthogonal experiment

序号	A (pH)	B (底物蛋白浓度/%)	C (外加物)	D (水解时间/h)
1	7.0	6.0	挤压 SPI	4.0
2	8.0	6.0	/	2.0
3	9.0	6.0	SPI	3.0
4	7.0	8.0	挤压 SPI	2.0
5	8.0	8.0	/	3.0
6	9.0	8.0	SPI	4.0
7	7.0	10.0	挤压 SPI	3.0
8	8.0	10.0	/	4.0
9	9.0	10.0	SPI	2.0

注: “/” 表示无外源添加蛋白。

米曲霉固态发酵成熟后将曲粉碎, 按一定底物蛋白浓度称取成曲和蒸馏水, 置于摇床中。水解一定后于沸水浴中灭酶 10 min, 冷却至室温, 离心 (3000×g, 20 min), 取上清液即为曲水解液。利用正交试验探

讨此过程中 pH(A)、外源添加大豆分离蛋白(B)[非挤压 SPI 和挤压 SPI, 制备工艺参考曹亚兰等人<sup>[7]</sup>的研究方法]、底物蛋白浓度(C)和水解时间(D)对成曲水解产物抗氧化活性的影响, 以期筛选出水解产物抗氧化活性较高的发酵肽。以 A、B、C、D 为考察因素, 运用 SPSS 11.5 软件设计四因素三水平正交试验<sup>[8]</sup>(表 1)。

### 1.3.5 酶解特性测定方法

#### 1.3.5.1 蛋白质回收率的测定

蛋白质含量测定方法采用凯氏定氮法。

$$\text{蛋白质回收率}\% = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%$$

式中:  $N_1$ -酶解上清液总氮量, g;  $N_2$ -原料总氮量, g。

#### 1.3.5.2 肽得率的测定

氨态氮含量的测定方法采用甲醛滴定法<sup>[9]</sup>。分别用凯氏定氮法和甲醛滴定法测定上清液中的总氮含量和氨态氮含量, 则肽得率按下式进行计算:

$$\text{肽得率}\% = \frac{N_1 - N_2}{N_3} \times 100\%$$

式中:  $N_1$ -上清液总氮量, g;  $N_2$ -上清液总氨态氮量, g;  $N_3$ -原料总氮量, g。

#### 1.3.5.3 水解度 (DH) 的测定

$$\text{DH}\% = \frac{AN - AN_0}{N} \times 100\%$$

式中:  $AN$ -酶解液中游离氨态氮的量, g;  $AN_0$ -酶解前游离氨态氮量, g;  $N$ -原料总氮量, g。

#### 1.3.5.4 蛋白酶活力测定

酶活的测定参照 GB/T 23527-2009。蛋白酶活力以蛋白酶活力单位表示, 定义为 1 g 固体酶粉(或 1 mL 液体酶), 在一定温度和 pH 值条件下, 1 min 水解酪蛋白产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸, 即为 1 个酶活力单位, 以 U/g (U/mL) 表示。

### 1.3.6 抗氧化活性的测定方法

#### 1.3.6.1 ORAC 法

对米曲霉制曲的水解产物进行 ORAC 的测定, 参照 Blanca Hernandez-Ledesma 等人<sup>[10]</sup>的方法, 并作适当修改。在 96 孔荧光板各微孔中分别加入待测样品 20  $\mu\text{L}$ (将各酶解产物用 75 mmol/L 磷酸盐缓冲液做适当稀释, 每个样品待测液浓度为 0.08 mg/mL) 后添加 75 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液 20  $\mu\text{L}$  及 70 nmol/L FL 20  $\mu\text{L}$ , 在 37  $^{\circ}\text{C}$  下预置 15 min 后, 用多道移液器迅速在各孔中加入 12 mmol/L AAPH 140  $\mu\text{L}$  启动反应, 并将微孔板置于酶标仪中在 37  $^{\circ}\text{C}$  下以激发波长 485 nm, 发射波长 538 nm 进行连续测定, 每 2 min 测定一次各孔荧光强度, 测定时间设定在荧光衰减呈基线后为止, 即设为 2 h。

#### 1.3.6.2 DPPH 法

对米曲霉制曲的水解产物进行 DPPH 自由基清除率的测定, 参照李莹等人<sup>[11]</sup>的方法。测定 5 个浓度下的自由基清除率, 经线性回归后计算出自由基清除率为 50% 时的蛋白浓度, 即  $\text{IC}_{50}$  值。

#### 1.3.7 统计分析

除定量描述分析外, 所有试验均重复 3 次, 试验结果表述为平均值  $\pm$  标准偏差。方差分析采用 SPSS 软件 (SPSS 公司, 美国) 中的 One-Way ANOVA 进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 制曲条件的优化

成曲的制备需要控制适宜的制曲条件, 才能得到酶活较高的曲, 本研究以豆粕为氮源, 麸皮为碳源, 利用米曲霉进行制曲, 优化碳氮比 (C/N)、培养时间、接种量, 以期获得酶活较高的成曲和水解产物抗氧化活性较高的发酵肽。

#### 2.1.1 C/N 的确定

试验考察了 C/N 对成曲蛋白酶活力的影响, 同时研究 C/N 对成曲水解产物酶解特性及抗氧化活性的影响, 结果如图 1 (a-d) 所示。

由图 1a 可知成曲的酶活随着 C/N 减少而有所增加, 当 C/N 为 1/5 时, 中性、碱性酶活达到 3000 U/g 左右, 且随 C/N 进一步减小而有所波动。由图 1b 可知当 C/N 为 1/5 时, 成曲水解产物的蛋白质回收率与肽得率均为较高, 且此条件下成曲水解产物的 ORAC 值最大 (图 1c), 达到 2125.38  $\mu\text{mol}$  Trolox equivalent/g Peptide; 清除 DPPH 自由基的能力也最强 ( $\text{IC}_{50}$  值为 0.4382 mg/mL, 图 1d)。因此, 选择 C/N 为 1/5 进行后续试验。

#### 2.1.2 培养时间的确定

试验考察了培养时间对成曲蛋白酶活力以及成曲水解产物酶解特性、抗氧化活性的影响, 结果分别如图 2 (a-d) 所示。

由图 2a 可知成曲的酶活随着培养时间的增加而增加, 当培养时间为 44 h 时, 中性、碱性酶活达到 3000 U/g 左右, 当培养时间进一步延长时, 酶活变化不大。由图 2b 可知当培养时间为 44 h 时, 成曲水解产物的蛋白质回收率与肽得率均较高。制曲过程是米曲霉的生长与产酶过程, 随着培养时间的延长, 米曲霉要经过四个阶段, 即孢子发芽期、菌丝生长期、菌丝繁殖期、孢子着生期, 通常培养 24 h 后, 孢子逐渐成熟, 使曲料呈现淡黄色直至嫩黄绿色, 在孢子着生期米曲霉分泌的蛋白酶最为旺盛。由图 2c 知, 当培养时间为

44h 时, 成曲水解产物的 ORAC 值最大, 且该条件下成曲水解产物清除 DPPH 的能力相对较大 (图 2d)。因此, 选择培养时间为 44 h 进行后续试验。

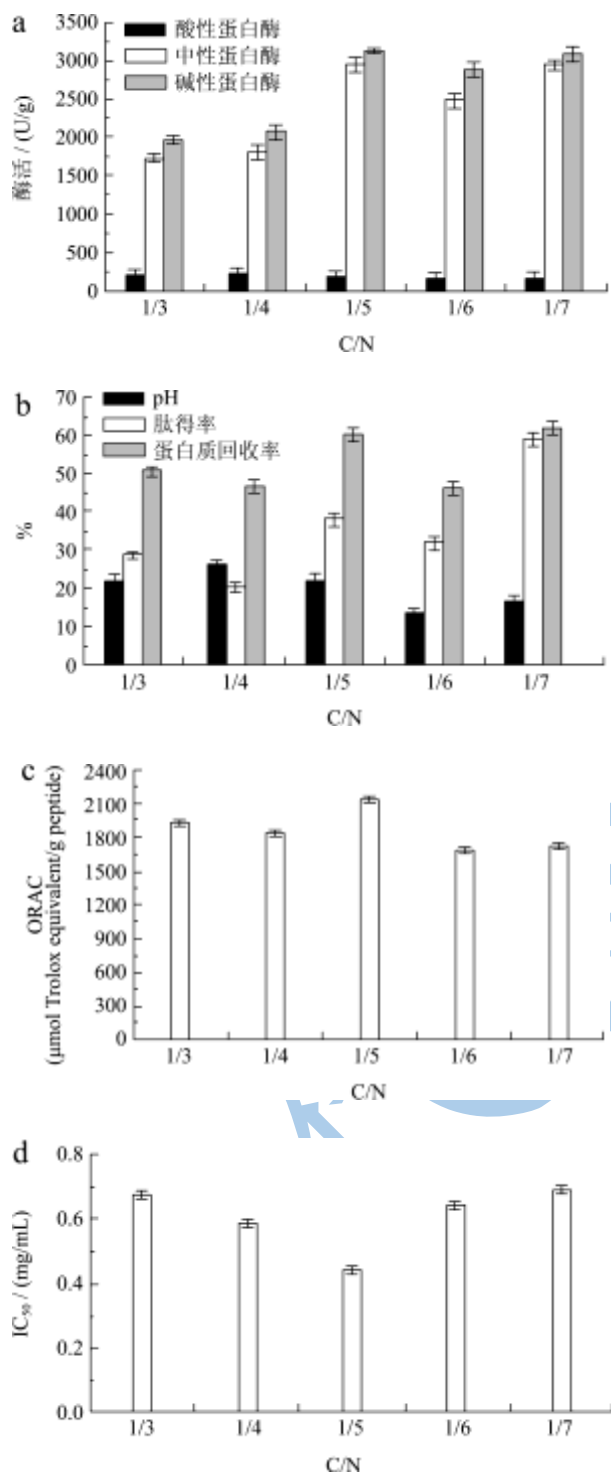


图 1 C/N 对成曲酶活、酶解特性及产物抗氧化活性的影响

Fig.1 Effect of C/N on protease activity of koji, hydrolysis characteristic and antioxidant activity of koji hydrolysates

注: a. C/N 对成曲蛋白酶活的影响; b. C/N 对成曲水解产物酶解特性的影响; c. C/N 对成曲水解产物 ORAC 值的影响; d. C/N 对成曲水解产物清除 DPPH 自由基能力的影响。

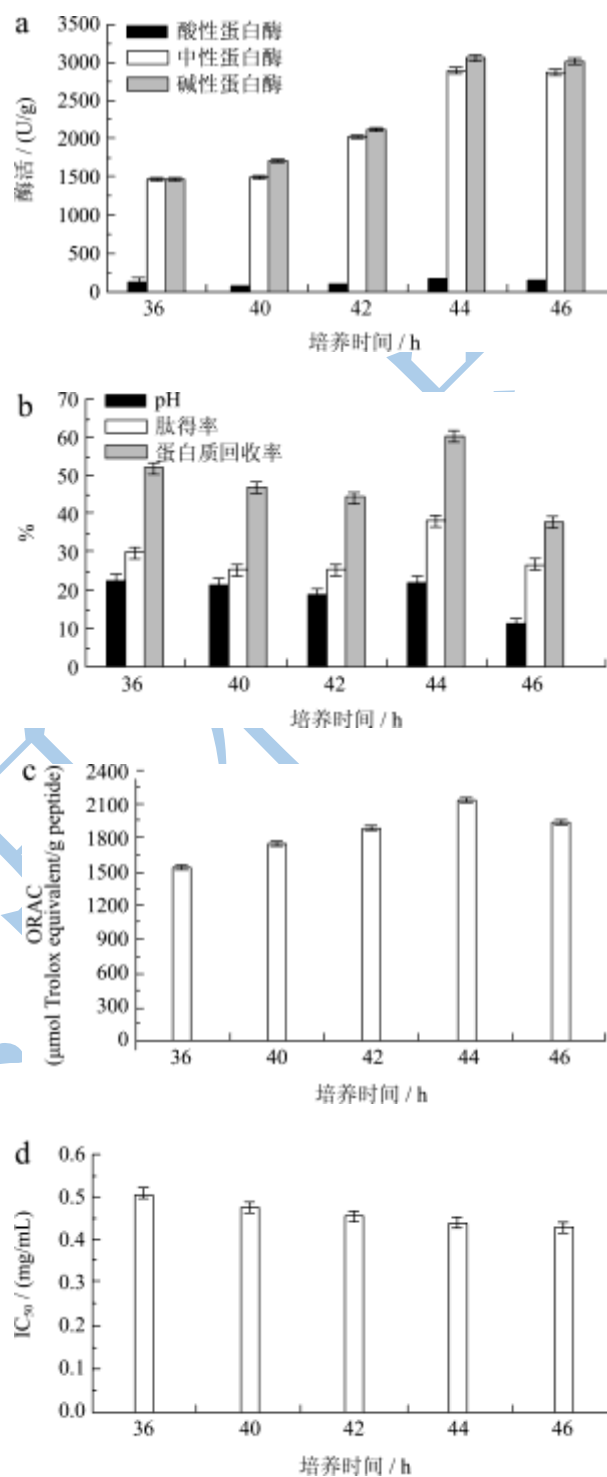


图 2 培养时间对成曲酶活、酶解特性及产物抗氧化活性的影响

Fig.2 Effect of incubation time on protease activity of koji a, hydrolysis characteristic and antioxidant activity of koji hydrolysates

注: a.培养时间对成曲蛋白酶活的影响; b. 培养时间对成曲水解产物酶解特性的影响; c. 培养时间对成曲水解产物 ORAC 值的影响; d. 培养时间对成曲水解产物清除 DPPH 自由基能力的影响。

### 2.1.3 接种量的确定

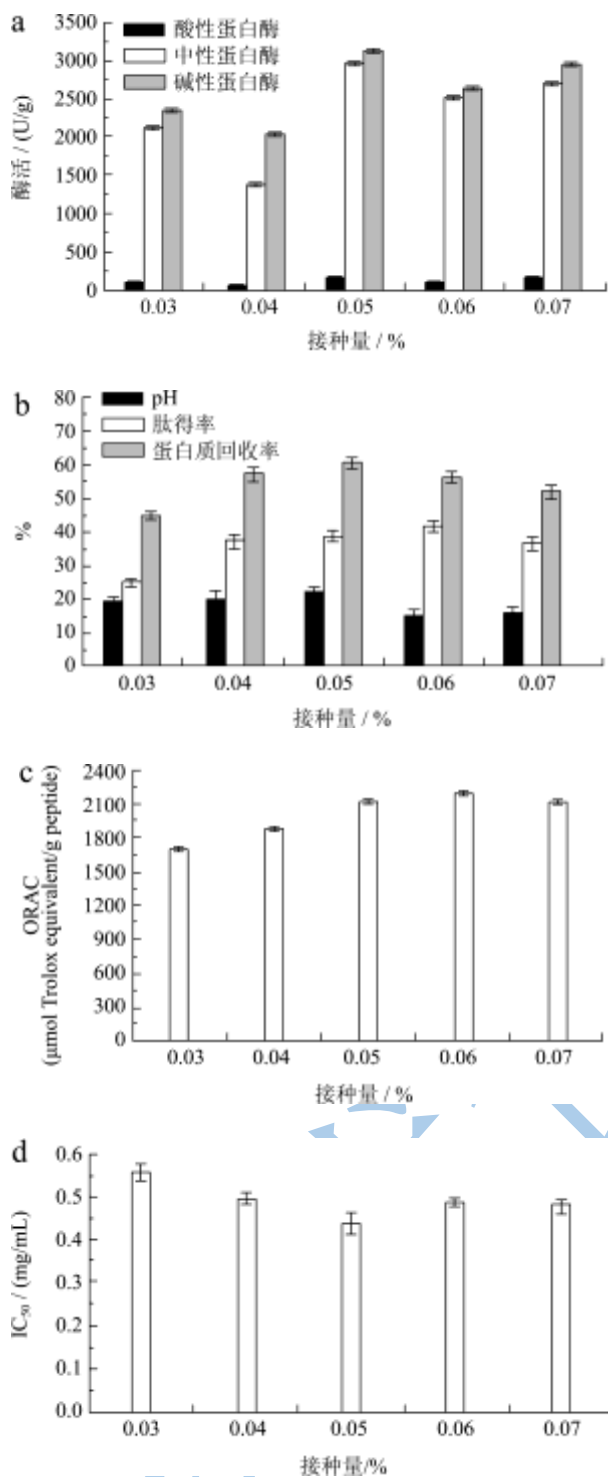


图3 接种量对成曲酶活、酶解特性及产物抗氧化活性的影响  
**Fig.3 Effect of inoculum size on protease activity of koji ,hydrolysis characteristic and antioxidant activity of koji hydrolysates**

注：a. 接种量对成曲蛋白酶活的影响；b. 接种量对成曲水解产物酶解特性的影响；c. 接种量对成曲水解产物 ORAC 值的影响；d.接种量对成曲水解产物清除 DPPH 自由基能力的影响。

试验考察了接种量对成曲蛋白酶活力以及成曲水解产物酶解特性、抗氧化活性的影响，结果分别如图3（a-d）所示。

由图3a可知，在一定的接种量范围内，成曲的酶活随接种量的增加而有所增加，当接种量为0.05%时，中性、碱性酶活达到3000 U/g左右，且此条件下成曲水解产物的蛋白质回收率与肽得率均较高，并具有较高ORAC值（图3c）及DPPH自由基清除率（图3d）。因此，选择接种量为0.05%。通过上述试验优化，最终得到制曲的最佳条件为：C/N为1/5、培养时间为44 h、米曲霉接种量为0.05%。

### 2.2 成曲水解正交试验结果分析

成曲水解正交试验样品的ORAC值及DPPH自由基清除能力如图4所示。

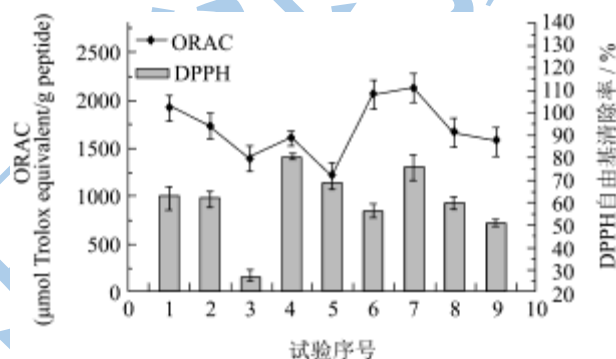


图4 正交试验样品抗氧化活性分析

**Fig.4 Antioxidant activity of koji hydrolysates for orthogonal test**

通过SPSS软件对各试验因素A、B、C、D进行极差分析结果来看（表2），对于ORAC值，试验因素组别范围内，各因素对水解产物ORAC值（极差项 $R_1$ ）影响程度的顺序为：C>A>D>B，即底物蛋白浓度是最主要的影响因素，而根据各因素各水平对应的平均值K，推断采用方案 $A_1B_3C_2D_3$ 可获得较高ORAC值的水解产物。对于DPPH自由基清除率，试验因素组别范围内，各因素对水解产物DPPH·清除率（极差项 $R_2$ ）影响程度的顺序为：A>B>C>D，即pH是最主要的影响因素。根据各因素各水平对应的平均值K，推断采用方案 $A_1B_2C_2D_1$ 可获得较高DPPH·清除率的水解产物。综上所述，两抗氧化指标中 $A_1C_2$ 均为最优条件，B因素对DPPH·清除率的影响程度较强，而对水解产物ORAC值的影响程度最弱，因此B选第二水平，即 $B_2$ ，D因素对水解产物ORAC值的影响程度次弱，而对DPPH·清除率的影响程度最弱，因此D选第三水平，即 $D_3$ 。于是得出最佳工艺组合为 $A_1B_2C_2D_3$ ，即成曲的水解条件为：pH为7，底物蛋白浓度为8%，不添加外加物，水解4h。

表 2 极差分析表

Table 2 Range analysis of antioxidant activity

因素	ORAC 值( $\mu\text{mol Trolox/g Peptide}$ )				DPPH·清除率/%			
	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	R <sub>1</sub>	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>	k <sub>3</sub>	R <sub>2</sub>
A	5648.98	4594.21	5026.42	351.59	220.05	190.34	133.97	28.69
B	5046.40	4866.02	5357.19	163.72	152.19	204.77	187.40	17.53
C	4711.44	5914.64	4643.52	423.71	183.10	194.13	167.13	9.00
D	4915.37	4723.77	5630.46	302.23	193.91	171.39	179.05	7.51

### 2.3 正交试验结果验证

按上述优化所得的制曲条件[麸皮/豆粕比1/5、培养时间44 h、曲精接种量为0.05% (*m/m*)] 以及成曲水解条件[pH 7、底物蛋白浓度8%、不添加外加物、水解4 h]，制备发酵大豆肽。测得该大豆肽的ORAC值为2130.22  $\mu\text{mol Trolox equivalent/g peptide}$ ，清除DPPH自由基的IC<sub>50</sub>值为0.29 mg/mL，与前期关于商业法制备所得大豆肽清除DPPH自由基的IC<sub>50</sub>值 (3.82 mg/mL) 相比<sup>[1]</sup>，发酵法所得的肽清除DPPH自由基的能力更强。

### 3 结论

高抗氧化活性大豆肽的最佳制曲条件为：麸皮/豆粕质量比为1/5、培养时间44 h、曲精接种量0.05% (*m/m*)，成曲的碱性蛋白酶活力可高达3109.85 U/g，曲水解产物的ORAC值可高达2125.38  $\mu\text{mol Trolox equivalent/g peptide}$ ，DPPH的IC<sub>50</sub>值为0.44 mg/mL，说明该条件下所制备的大豆肽具有强抗氧化活性。成曲水解条件为：pH 7、底物蛋白浓度为8%、不添加外加物、水解4 h时，曲水解产物的ORAC值可高达2130.22  $\mu\text{mol Trolox equivalent/g peptide}$ ，DPPH的IC<sub>50</sub>值为0.29 mg/mL，说明该条件下所制备的大豆肽具有非常好的抗氧化活性。本试验所制备的大豆肽比商业蛋白酶法制备的大豆肽具有更高的抗氧化能力。

### 参考文献

- [1] Sarmadi B H, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: A review [J]. Peptides, 2010, 31: 1949-1956
- [2] Elias R J, Kellerby S S, Decker E A. Antioxidant activity of proteins and peptides [J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2008, 48: 430-441
- [3] 付清泉,李天全,万昌秀.几类生物活性肽的研究进展[J]. 医学工程, 2002, 15(3): 227-230
- [4] 葛铁群.生物活性肽的研究进展[J].中国生化药物杂志, 2004,19(6):404-406
- [5] 昭焕霞.米曲霉LZF-5制曲工艺的研究[J]. 江苏调味副食品, 2008,25(2):15-18
- [6] 万琦.微生物法生产脱苦大豆功能性多肽的研究[D].南京:南京农业大学,2003
- [7] 曹亚兰,任娇艳,赵谋明.挤压预处理结合可控酶解制备抗氧化大豆肽的研究[J].食品工业科技,2011,6:222-225
- [8] 邓振伟,于萍,陈玲.SPSS软件在正交试验设计、结果分析中的应用[J].电脑学习,2009,5:15-17
- [9] 张水华.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2007
- [10] Hernandez-Ledesma B, Amigo L, Recio I, et al. ACE-Inhibitory and radical scavenging activity of peptides derived from  $\beta$ -Lactoglobulin f (19-25). interactions with ascorbic acid [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 3392-3397
- [11] 李莹,刘敏,崔春,等.酱油抗氧化能力评价及聚类分析[J].食品与发酵工业,2008,34(1):14-19