

# 新疆伊吾县野山杏多肽对衰老模型小鼠的抗氧化作用

蒋丽<sup>1</sup>, 卢悦<sup>2</sup>, 买迪娜木·阿布力米提<sup>2</sup>, 商雪珂<sup>2</sup>, 许贺志祥<sup>2</sup>, 杨晓君<sup>2,3\*</sup>

(1. 国药集团新疆新特药业有限公司, 新疆乌鲁木齐 830000)(2. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052)(3. 新疆果品采后科学与技术重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830052)

**摘要:** 采用酶解法提取新疆伊吾县野山杏多肽, 探究其对衰老模型小鼠的抗氧化作用。通过单因素实验, 考察酶底物比、料液比、提取时间、pH值和酶解温度对野山杏多肽水解度的影响, 结合正交试验, 优化野山杏多肽提取工艺; 以提取物为原料, D-半乳糖制备小鼠衰老模型, 分为空白对照组, 野山杏多肽低、中、高剂量组(50、75、100 mg/kg), 衰老模型组以及Vc阳性对照组, 连续灌胃饲养30 d, 测定血清、肝组织和脑组织匀浆中GSH-Px、SOD活力和MDA含量。酶解法提取野山杏多肽的最佳工艺: 酶底物比为4%, 酶解时间120 min, pH值为8, 酶解温度为65℃, 料液比为1:25, 多肽水解度为35.73%, 多肽得率为7.22%。与模型组相比, 多肽中、高剂量组均可显著提高小鼠血清、肝组织及脑组织中的T-SOD、GSH-Px活性( $p < 0.05$ ), 降低MDA的含量( $p < 0.05$ ); 其中高剂量组血清中T-SOD含量达到177.24 U/mL, MDA含量达到9.05 nmol/mL, GSH-Px达到261.59 U/mL, 与空白对照组结果相近。研究表明, 新疆伊吾县野山杏多肽对衰老模型小鼠具有良好的体内抗氧化作用。

**关键词:** 酶解法; 生物活性肽; 正交试验; 抗氧化

文章编号: 1673-9078(2022)02-46-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0505

## Antioxidant Effect of Peptides of Wild Apricot from Yiwu County in Xinjiang in Aging Mouse Model

JIANG Li<sup>1</sup>, LU Yue<sup>2</sup>, Maidenamu·Ablimiti<sup>2</sup>, SHANG Xueke<sup>2</sup>, XU Hezhixiang<sup>2</sup>, YANG Xiaojun<sup>2,3\*</sup>

(1. Sinopharm Xinjiang Xinte Pharmaceutical Co. Ltd., Urumqi 830000, China)

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

(3. Xinjiang Key Laboratory of Postharvest Science and Technology of Fruit, Urumqi 830052, China)

**Abstract:** In this study, enzymatic hydrolysis was used to extract the peptides in wild apricot from Yiwu County of Xinjiang, and its antioxidant effect was examined in aging mouse model. Through single factor experiments, the effects of enzyme-substrate ratio, material-to-liquid ratio, extraction time, pH and enzymatic hydrolysis temperature on hydrolysis degree were examined, and the extraction process for the wild apricot peptide was optimized through combining single factor and orthogonal experiments. Taking the extract as the raw material, D-galactose was used to establish an aging mouse model, and the mice were divided into the blank control group, the low-, medium-, and high-dose wild apricot peptide groups (50, 75 or 100 mg/kg), the aging model group and the Vc positive control group. After 30 days of continuous intragastric administration, the GSH-Px activity, SOD activity and MDA content in the serum, liver tissue and brain tissue homogenates were determined. The optimal conditions for extracting wild apricot peptides by enzymatic hydrolysis were as follows: enzyme-substrate ratio, 4%; enzymolysis time, 120 min; pH, 8; enzymolysis temperature, 65℃; material-liquid ratio, 1:25. The hydrolysis

引文格式:

蒋丽, 卢悦, 买迪娜木·阿布力米提, 等. 新疆伊吾县野山杏多肽对衰老模型小鼠的抗氧化作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(2): 46-55, +11

JIANG Li, LU Yue, Maidenamu·Ablimiti, et al. Antioxidant effect of peptides of wild apricot from Yiwu county in xinjiang in aging mouse model [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 46-55, +11

收稿日期: 2021-05-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31460393)

作者简介: 蒋丽(1973-), 女, 中级药师, 研究方向: 药学, E-mail: 1282465050@qq.com

通讯作者: 杨晓君(1971-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 新疆特色天然产物, E-mail: xjxiaojun@163.com

degree and peptide yield were 35.73 % and 7.22%, respectively. Compared with the model group, the medium-dose and high-dose peptide groups could significantly increase the activities of T-SOD and GSH-Px in mouse serum, liver tissue and brain tissue ( $p < 0.05$ ), and reduce the content of MDA ( $p < 0.05$ ). Among which, the serum contents of serum T-SOD, MDA and GSH-Px were 177.24 U/mL, 9.05 nmol/mL and 261.59 U/mL. Respectively, in high dose groups, were similar to those of the blank control group. The results showed that the peptides from the wild apricot in Yiwu County of Xinjiang exhibited good anti-oxidant effects in the aging mouse model.

**Key words:** enzymatic hydrolysis; bioactive active peptides; orthogonal test; antioxidant

山杏仁 (*Semen armeniacae Amanrum*) 又名苦杏仁, 是蔷薇科杏属植物, 广泛分布在全球各地, 在我国主要产于辽宁、内蒙古、陕西、甘肃、新疆等干旱和半干旱地区, 资源丰富<sup>[1,2]</sup>。野山杏在新疆的伊犁和哈密地区分布广泛, 且因山杏树耐寒、耐旱、耐贫瘠且适应性强, 具有良好的防风固沙作用, 加之国家政策的大力支持, 使得山杏树在新疆的栽培面积不断扩大。杏仁是我国传统中药, 不仅具有治风寒、定喘润肺、止咳祛痰等药效作用<sup>[3]</sup>, 还具有丰富的营养价值, 是一种药食兼用的材料, 杏仁中含有油脂、蛋白质、糖类、粗纤维以及维生素 E 等多种维生素。

目前我国对山杏的研究主要集中在果肉以及杏仁油上, 随着杏仁油加工产业的发展, 产生了大量杏仁粕, 杏仁粕中含有约 34% 的果仁粗蛋白<sup>[4]</sup>, 伊吾县野山杏中杏仁粕蛋白可达 47.8%, 而杏仁粕仅作为动物饲料处理, 造成资源的浪费, 因此开发利用新疆野山杏特色资源具有十分重要的意义<sup>[5-7]</sup>。

近年来, 食物蛋白质酶解物中的水解产物被称为食源性生物活性肽, 生物活性肽 (Bioactive peptides) 是一种特殊的蛋白质片段, 与蛋白质相比, 生物活性肽不仅易于吸收, 而且具有广泛的生物活性<sup>[8,9]</sup>, 例如: 提高抗氧化性、降血压、降血脂、抗血栓、抑菌、免疫调节等作用受到广泛关注<sup>[10-12]</sup>。其中抗氧化肽是重要的生物活性肽之一, 按来源可分为天然抗氧化肽、蛋白降解抗氧化肽和人工合成抗氧化肽三种, 其中以蛋白降解多肽为主, 主要从动植物中提取蛋白而得。研究表明, 抗氧化肽可以预防与癌症和动脉粥样硬化等众多退行性疾病相关的氧化应激<sup>[13]</sup>。与其他制备方法相比, 酶解法因价格低廉、操作简单、反应温和, 可保护产物蛋白质营养价值等优点广泛使用<sup>[14]</sup>。

本研究以野山杏仁作为原料, 在磁力搅拌方式下采用酶解法从杏仁中提取杏仁多肽, 确定最佳提取条件, 通过单因素实验与正交实验确定木瓜蛋白酶酶解的最优工艺指标, 同时针对野山杏多肽的体内抗氧化活性进行研究, 探讨伊吾县野山杏多肽的体内抗氧化作用, 为伊吾县野山杏多肽的生物活性机制研究提供一定的理论基础。

## 1 试验材料

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 原料

新疆伊吾县野山杏仁, 由新疆伊吾天苇生物科技公司提供。

#### 1.1.2 仪器设备和试剂

##### 1.1.2.1 主要试剂

盐酸 (分析纯), 南京建成生物工程研究所; 氨基酸水解分析标准样品, 德国塞卡姆 Sykam; 三羟甲基氨基甲烷 (分析纯), Genthold; 甲醛溶液 (分析纯), 天津市致远化学试剂有限公司; 氢氧化钠 (分析纯), 天津市致远化学试剂有限公司; 双蒸水 (自制); 丙二醛 (MDA) 测试盒, 南京建成生物试剂研究所; 总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 测试盒, 南京建成生物试剂研究所; 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 测试盒, 南京建成生物试剂研究所; 抗坏血酸, 天津市致远化学试剂有限公司; 木瓜蛋白酶, 北京奥博星生物有限公司。

##### 1.1.2.2 主要仪器

XMT-DA 数显恒温水浴锅, 余姚市亚星仪器仪表有限公司; 80-2 离心沉淀器, 金坛市医疗仪器厂; PHS-2C 型精密酸度计, 上海大普仪器有限公司; 85-2 控温磁力搅拌器, 江苏金怡仪器科技有限公司; S-433D 全自动氨基酸分析仪, 德国塞卡姆 Sykam; X-Mark 酶标仪, 伯乐生命医学产品上海有限公司; Neofuge 13R 台式高速冷冻离心机, 力康生物科技有限控股公司; XHF-DY 高速分散器, 宁波新芝生物科技股份有限公司; LGJ-10 型冷冻干燥机, 北京松源华兴科技发展有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 野山杏多肽的提取工艺优化

#### 1.2.1.1 野山杏处理方法

野山杏仁置于烧杯中, 在 60 °C 的水浴中浸泡 10~20 min, 即可去皮, 外皮自然阴干保存, 去皮后的

杏仁于 60 °C 干燥箱烘干 2~4 h, 将烘干的野山杏仁粉碎过 60 目筛, 经正己烷回流 2 h 后取沉淀, 为杏仁粕, 将脱油后的杏仁粕于 45 °C 鼓风干燥 2 h, 粉碎过 80 目筛, 即为酶解粕原料。

### 1.2.1.2 粗蛋白检测标准曲线的绘制

氨氮标准储备溶液(以氮计)(1.0 g/L): 称取 105 °C 干燥 2 h 的硫酸铵 0.4720 g, 加水溶解后转入 100 mL 容量瓶中, 并稀释至刻度, 混匀, 此溶液每毫升相当于 1.0 mg 氮。

氨氮标准使用溶液(0.1 g/L): 用移液管吸取 10.00 mL 氨氮标准储备液于 100 mL 容量瓶内, 加水定容至刻度, 混匀, 此溶液每毫升相当于 0.1 mg 氮。

粗蛋白按 GB 5009.5-2016 分光光度法测定<sup>[15]</sup>, 吸取 0.00、0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 氨氮标准使用溶液, 分别置于 10 mL 比色管中, 加 4.0 mL 乙酸钠-乙酸缓冲溶液及 4.0 mL 显色剂, 加水稀释至刻度, 混匀。置于 100 °C 水浴中加热 15 min。取出用水冷却至室温后, 移入 1 cm 比色杯内, 以零管为参比, 波长 400 nm 处测量吸光度值, 根据标准各点吸光度值绘制标准曲线并计算线性回归方程。

以氨氮标准液浓度 C (mg/mL) 为横坐标, 吸光度值 A 为纵坐标, 线性拟合, 线性回归方程为:  $A=0.9899C-0.0567$  ( $r=0.9980$ ), 在 0.00~1.00 mg/mL 范围内呈良好的线性关系, 故可以用此方法来快速检测提取溶液中蛋白质的含量。粗蛋白检测标准曲线见图 1。

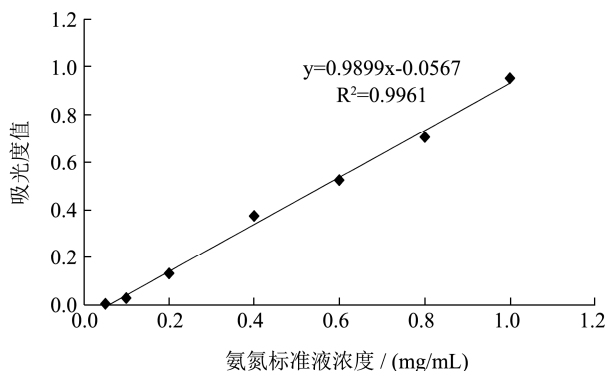


图 1 粗蛋白检测标准曲线

Fig.1 Crude protein detection standard curve

### 1.2.1.3 木瓜蛋白酶水解条件的单因素试验设计

经前期试验证明, 野山杏多肽在磁力搅拌酶解方式下利用木瓜蛋白酶水解度最高, 多肽水解度为: 35.02%<sup>[16]</sup>。因此在磁力搅拌酶解方式下考察酶底物比、料液比、酶解时间、pH 值和酶解温度对野山杏多肽水解度的影响。

(1) 酶底物比对野山杏多肽水解度的影响

设定酶底物比分别为 1%、2%、3%、4%、5%,

料液比 1:20, pH 为 7.0, 反应温度为 60 °C 条件下, 酶解 120 min。

(2) 料液比对野山杏多肽水解度的影响

根据(1)筛选出的酶底物比, 料液比分别为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30, pH 为 7.0, 反应温度为 60 °C 条件下, 酶解 120 min。

(3) 酶解时间对野山杏多肽水解度的影响

根据 1 筛选出的酶底物比, (2) 筛选出的料液比, pH 为 7.0, 反应温度为 60 °C 条件下, 将酶解时间分别设定为 30、60、120、180、240 min。

(4) pH 值对野山杏多肽水解度的影响

根据(1)筛选出的酶底物比, (2) 筛选出的料液比(3)筛选出的酶解时间, 设定 pH 值为 4、5、6、7、8, 反应温度为 60 °C 条件下进行酶解。

(5) 酶解温度对野山杏多肽水解度的影响

根据(1)筛选出的酶底物比, (2) 筛选出的料液比, (3) 筛选出的酶解时间, (4) 筛选出的 pH 值, 设定反应温度分别为 50、55、60、65、70 °C 条件下进行酶解。

### 1.2.1.4 木瓜蛋白酶水解条件的优化试验

在单因素试验的基础上, 选取酶底物比、时间、pH 值和酶解温度为试验因素, 以多肽水解度为试验指标, 进行四因素三水平的正交试验。

### 1.2.1.5 野山杏仁粕水解度(DH)的测定

利用甲醛滴定法测定酶解液中的氨基酸<sup>[17]</sup>。原理: 甲醛与氨基酸中的氨基作用, 可消除其碱性, 使羟基显示出酸性, 用氢氧化钠标准溶液滴定, 以酸度计指示终点, 即可对氨基酸进行定量<sup>[18]</sup>。

吸取 5 mL 上清液, 置于 200 mL 烧杯中, 加入 45 mL 蒸馏水, 用 0.05 mol/L NaOH 标准溶液滴定至 pH 为 8.2, 记录使用 NaOH 标准溶液的体积; 再加入 10 mL 甲醛溶液并混匀, 继续用 NaOH 标准溶液滴定至 pH 为 9.2, 记录使用体积, 同时做空白试验。

(1) 氨基酸态氮计算公式<sup>[19]</sup>

$$\text{氨基酸态氮(以氮计)} = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 0.014}{m \times \left(\frac{V_3}{100}\right)} \times 100\% \quad (1)$$

(2) 总氮量测定计算公式

采用凯氏定氮法<sup>[20]</sup>测定:

$$\text{蛋白质}/\% = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 0.014}{m \times \frac{10}{100}} \times F \times 100\% \quad (2)$$

(3) 水解度公式<sup>[21]</sup>

$$\text{水解度}/\% = \frac{\text{样品中的氨基氮含量}}{\text{样品中的总氮}} \times 100\% \quad (3)$$

表1 各组给药剂量

Table 1 Dosage of each group

组别	给药体积/(mL/d)	D-半乳糖/g	野山杏多肽/g	羧甲基纤维素/g	Vc/g	蒸馏水/mL
阳性对照组	0.5	0.003	-	-	0.015	加至 0.5
空白对照组	0.5	-	-	-	-	加至 0.5
模型组	0.5	0.003	-	-	-	加至 0.5
低剂量组	0.5	0.003	0.001	0.0035	-	加至 0.5
中剂量组	0.5	0.003	0.0015	0.0035	-	加至 0.5
高剂量组	0.5	0.003	0.002	0.0035	-	加至 0.5

注:小鼠体重按 20 g 计算,小鼠称重后按相应比例给药。

### 1.2.1.6 野山杏多肽得率计算

$$\text{野山杏多肽得率}/\% = \frac{\text{野山杏多肽质量}}{\text{野山杏原料质量}} \times 100\% \quad (4)$$

## 1.2.2 野山杏多肽对衰老模型小鼠的抗氧化作用

### 1.2.2.1 试验原料的制备

野山杏多肽为 1.2.1.3 中优化试验后木瓜蛋白酶磁力加热搅拌所得野山杏仁酶解液,经过冷冻干燥得野山杏多肽粉,低温保存备用。

### 1.2.2.2 试验动物及饲料

健康昆明种 S 级小鼠,雄性,体重 18±4 g,由新疆医科大学实验动物中心提供(动物生产许可证号:SCXK[新]2017-0004)。灭菌全价颗粒饲料,由新疆医科大学实验动物中心提供。

### 1.2.2.3 分组与造模

选取健康的雄性小鼠 72 只,适应性喂养 7 d,随机分为六组,每组 12 只。选取五组小鼠以 D-半乳糖 100 mg/kg·bw·d 颈后皮下注射,每天一次,连续 30 d,制备衰老模型。五组分别为:野山杏多肽低剂量组(后文简称低剂量组)、野山杏多肽中剂量组(后文简称中剂量组)、野山杏多肽高剂量组(后文简称高剂量组)、衰老模型组(后文简称模型组)、Vc 阳性对照组(后文简称阳性对照组),另取一组为空白对照组。同时进行野山杏多肽按低、中、高剂量每天一次灌胃给药,阳性对照组灌胃给予 Vc,空白对照组和模型组用等剂量生理盐水代替。持续喂养 30 d,试验过程中小鼠每周称取体重 1 次调整给予剂量,自由进食,进水。末次给药后禁食 24 h,不禁水,处死前称量体重。

### 1.2.2.4 剂量设计

在体外抗氧化的基础上,以体外抗氧化清除自由基能力最佳剂量结合文献资料,设置高、中、低剂量进行体内抗氧化预实验,根据预实验结果确定的实验剂量分别为 50、75、100 mg/kg,详见表 1 所示。

### 1.2.2.5 样品制备

各组小鼠眼眶取血,4℃条件下 3000 r/min 离心 15 min,取上清(即血清)备用。小鼠取血后脱臼处

死,快速取出肝组织及脑组织,0℃~2℃生理盐水洗去淤血。精密称取肝组织 0.5 g,加入 0℃生理盐水 4.5 mL,迅速研磨制成组织匀浆,4℃条件下 4000 r/min 离心 10 min,取上清,备用。

## 1.2.3 MDA、T-SOD 及 GSH-Px 含量测定

### 1.2.3.1 脑组织、肝组织蛋白测定<sup>[22]</sup>

取脑组织、肝组织匀浆上清用生理盐水稀释,取样 50 μL 测定。混匀,将配置好的溶液静置 10 min,于 595 nm 波长,1 cm 光径,蒸馏水调零,测定各管吸光度值。计算方法见公式(5)。

### 1.2.3.2 MDA 含量测定<sup>[23]</sup>

(1) 小鼠血清 MDA 测定:直接取血清 0.05 mL 进行测定。将配置好的混匀,塑料薄膜封口,刺一小孔,95℃水浴 40 min,取出后流水冷却,3500 r/min,离心 10 min,取上清,于 532 nm 处,1 cm 光径 4 mm 内径,蒸馏水调零,测各管吸光度值。计算方法见公式(6)。

(2) 小鼠肝组织、脑组织 MDA 测定:取上清组织匀浆待测,将配置好的试剂旋涡混匀器混匀,用保鲜薄膜封口,刺一小孔,沸水浴 40 min,取出后流水冷却,然后 3500 r/min,离心 10 min,取上清,于 532 nm 处,1 cm 光径 4 mm 内径,蒸馏水调零,测各管吸光度值。计算方法为见公式(7)。

### 1.2.3.3 T-SOD 含量测定<sup>[24]</sup>

(1) 小鼠血清 T-SOD 测定:将小鼠血清稀释 2 倍,取 50 μL 测定。将溶液混匀,室温静置 10 min,550 nm,1 cm 光径,蒸馏水调零,测各管吸光度值。计算方法见公式(8)。

(2) 小鼠肝组织、脑组织 T-SOD 测定:取脑组织、肝组织匀浆上清用生理盐水稀释,取样 50 μL 测定。将试剂混匀,室温放置 10 min,于波长 550 nm 处,1 cm 光径比色杯,蒸馏水调零,比色。计算方法见公式(9)。

### 1.2.3.4 GSH-Px 含量测定<sup>[25]</sup>

(1) 小鼠血清 GSH-Px 测定:将小鼠血清 2 倍稀

释, 取 100  $\mu\text{L}$  测定。将各试剂与待测样品混匀, 4000 r/min, 离心 10 min, 取酶促反应上清液 1 mL, 将试剂与待测样品溶混匀, 15 min 后, 412 nm 处, 1 cm 光径比色杯, 蒸馏水调零, 测各管吸光度值。计算方

法见公式 (10)。

(2) 小鼠肝组织、脑组织 GSH-Px 测定: 取脑组织、肝组织匀浆上清液 200  $\mu\text{L}$  测定。操作同小鼠血清 GSH-Px 测定。计算方法见公式 (11)。

$$\text{待测匀浆蛋白浓度}(\text{mg prot} / \text{mL}) = \frac{\text{测定管OD值} - \text{空白管OD值}}{\text{标准管OD值} - \text{空白管OD值}} \times \text{蛋白标准浓度}(0.563 \text{ mg prot} / \text{mL}) \times \text{待测样本稀释倍数} \quad (5)$$

$$\text{MDA含量}(\text{nmol} / \text{mL}) = \frac{\text{测定OD值} - \text{空白OD值}}{\text{标准OD值} - \text{空白OD值}} \times \text{标准品浓度}(10 \text{ nmol} / \text{mL}) \quad (6)$$

$$\text{组织中MDA含量}(\text{nmol} / \text{mg prot}) = \frac{\text{测定管吸光度} - \text{空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{空白管吸光度}} \times \frac{\text{标准品浓度}(10 \text{ nmol} / \text{mL})}{10\% \text{ 蛋白含量}(\text{mg prot} / \text{mL})} \quad (7)$$

$$\text{总SOD活力}(\text{U} / \text{mL}) = \frac{\text{对照管OD值} - \text{测定管OD值}}{\text{对照管OD值}} \div 50\% \times \text{反应体系稀释倍数} \left(\frac{3.35}{0.05}\right) \times \text{样本测定前稀释倍数} \quad (8)$$

$$\text{总SOD活力}(\text{U} / \text{mg prot}) = \frac{\text{对照OD值} - \text{测定OD值}}{\text{对照OD值}} \div 50\% \times \frac{\text{反应液总体积}(\text{mL})}{\text{取样量}(\text{mL})} \div \text{待测样本蛋白浓度}(\text{mg prot} / \text{mL}) \quad (9)$$

$$\text{GSH-Px活力} = \frac{\text{非酶管OD值} - \text{酶管OD值}}{\text{标准管OD值} - \text{空白管OD值}} \times \text{标准管浓度}(20 \mu\text{mol} / \text{L}) \times \text{稀释倍数}(6^*) \times \text{样本测试前稀释倍数} \quad (10)$$

$$\text{组织GSH-Px酶活力} = \frac{\text{对照管OD值} - \text{测定管OD值}}{\text{标准管OD值} - \text{空白管OD值}} \times \text{标准管浓度}(20 \mu\text{mol} / \text{L}) \times \text{稀释倍数}(5^*) \div \text{反应时间} \times (\text{待测匀浆蛋白浓度} \times \text{取样量}) \quad (11)$$

### 1.2.4 数据处理

采用 Origin Pro 2018 软件进行图形绘制, SPSS 24.0 版统计软件进行统计学分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶解法提取野山杏多肽的单因素试验

#### 2.1.1 酶底物比对野山杏多肽水解度的影响

当酶底物比分别为 1%、2%、3%、4%、5%, 料液比 1:20, pH 为 7.0, 60  $^{\circ}\text{C}$  酶解 120 min 时, 水解度见图 2。

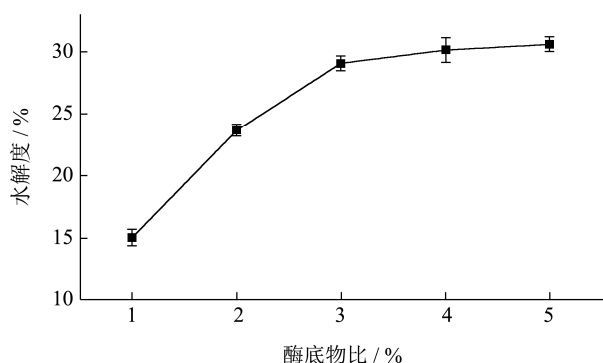


图 2 酶底物比对野山杏多肽水解度的影响

Fig.2 Effect of enzyme substrate ratio on degree of hydrolysis of polypeptide in wild almond

由图 2 可知, 水解度随酶底物比的增加而上升, 酶底物比为 3% 时野山杏仁水解度为 29.23%; 当酶底物比大于 3% 时, 水解度趋于平稳, 根据酶动力学原

理, 酶的用量过少不利于水解, 过多不仅水解效果差, 还会造成一定程度上的资源浪费<sup>[26]</sup>。因此, 综合考虑选择酶底物比 3% 作为野山杏多肽水解度最适酶底物比。

#### 2.1.2 料液比对野山杏多肽水解度的影响

当酶底物比为 3%, 料液比分别为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30, pH 为 7.0, 60  $^{\circ}\text{C}$  酶解 120 min 时, 水解度见图 3。

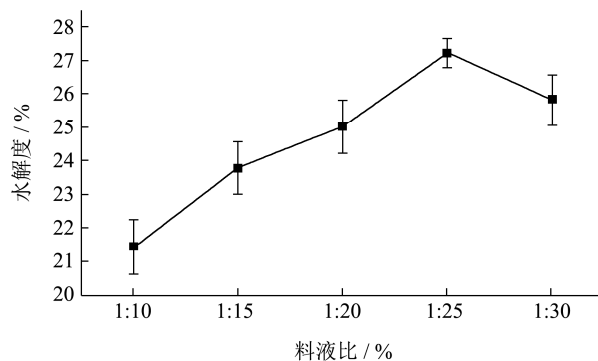


图 3 料液比对野山杏多肽水解度的影响

Fig.3 Effect of material and liquid ratio on the degree of hydrolysis of wild almond polypeptide

由图 3 可知, 料液比对于水解度影响不大, 野山杏多肽水解度在料液比为 1:10 时最低为 21.66%, 料液比 1:25 时水解度最大为 27.07%, 因此料液比为 1:25 时为最适料液比。

#### 2.1.3 酶解时间对野山杏多肽水解度的影响

当酶底物比为 3%, 料液比为 1:25, pH 为 7.0,

60 °C 酶解 30、60、120、180、240 min 时, 水解度见图 4。

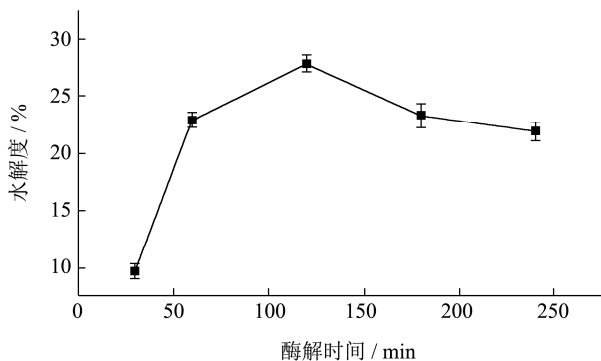


图 4 酶解时间对野山杏多肽水解度的影响

Fig.4 The effect of enzymolysis time on the degree of hydrolysis of wild almond polypeptide

由图 4 可知, 酶解时间对野山杏多肽水解度影响较大。酶解 120 min 时水解度最大为 27.07%。水解时间 180 min 和 240 min 时, 水解度降低。因此, 水解时间不宜过长, 以 120 min 为中间点, 取 60、120、180 min 做正交试验条件。

### 2.1.4 pH 对野山杏多肽水解度的影响

当酶底物比为 3%, 料液比为 1:25, 60 °C 酶解 120 min 时, 设定 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 酶解, 水解度见图 5。

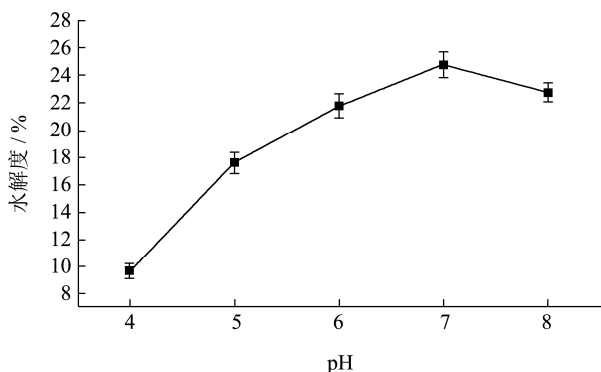


图 5 pH 对野山杏多肽水解度的影响

Fig.5 The effect of pH on the degree of hydrolysis of wild almond polypeptide

由图 5 可以看出, 当 pH 值为 4.0 时, 溶液呈酸性, 野山杏多肽水解度为 10.83%, 为最低, 可以看出酶解溶液呈酸性可抑制酶解, 木瓜蛋白酶在酸性条件下可部分失活, 酶解能力下降。当 pH 值为 7.0 时, 为木瓜蛋白酶的酶解最适 pH, 水解度为 25.99%。因此, 正交试验选取 pH 为 6.0、7.0、8.0 三个梯度。

### 2.1.5 酶解温度对野山杏多肽水解度的影响

当酶底物比为 3%, 料液比为 1:25, pH 为 7.0, 酶解 120 min 时, 不同温度 50、55、60、65、70 °C 条件下, 水解度见图 6。

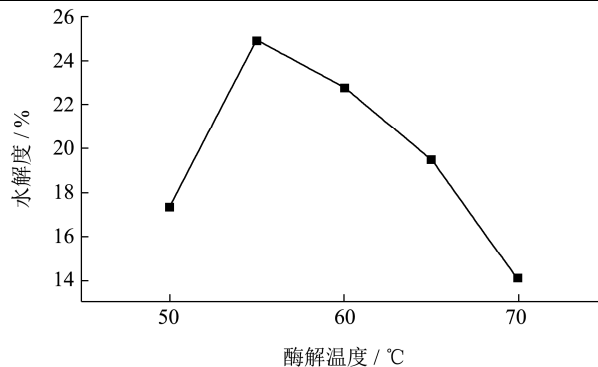


图 6 酶解温度对野山杏多肽水解度的影响

Fig.6 The effect of enzymolysis temperature on the degree of hydrolysis of wild almond polypeptide

由图 6 可以看出, 55 °C 时野山杏多肽水解度亦最大, 为 24.90%。随着温度的升高, 水解度下降, 说明温度越高, 酶解能力越弱。由于温度过高会使木瓜蛋白酶失活, 酶解能力下降。由于木瓜蛋白酶在水解过程中, 最适 pH 值温度在 55 °C~65 °C 之间<sup>[27]</sup>, 因此选用 55、60、65 °C 为正交试验条件。

## 2.2 正交试验结果与分析

表 2 正交试验因素和水平设计表

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	A 酶底物比/%	B 时间/min	C pH 值	D 温度/°C
1	3	60	6	55
2	4	120	7	60
3	5	180	8	65

在单因素试验结果与分析的基础上, 对影响野山杏多肽水解度的四个因素进行  $L_9(3^4)$  正交试验设计, 试验因素水平表见表 2, 正交试验结果见表 3, 方差分析见表 4。

从表 2~表 4 正交试验结果可以看出, 以野山杏多肽水解度为评价指标, 各个因素影响极差 R 大小的主次顺序依次为: C>D>B>A, 即温度>pH 值>酶解时间>酶底物比。因此, 野山杏多肽提取最佳工艺组合为  $A_2B_2C_3D_3$ , 即酶底物比为 4%, 酶解时间 120 min, pH 值为 8.0, 酶解温度为 65 °C。

从方差分析表 4 可以看出, pH 值、酶解时间、酶解温度对野山杏多肽水解度影响差异极其显著 ( $p<0.001$ ), 酶底物比对野山杏多肽水解度影响差异不显著 ( $p>0.05$ )。

综上所述, 酶解法提取野山杏多肽的最佳工艺为酶底物比为 4%, 酶解时间 120 min, pH 值为 8, 酶解温度为 65 °C。

表3 正交试验结果

Table 3 The result and analysis of orthogonal experiment

试验号	因素				水解度/%
	A	B	C	D	
1	3	2	3	1	33.15
2	3	3	1	2	25.56
3	2	1	3	2	27.06
4	2	3	2	1	25.41
5	2	2	1	3	35.02
6	1	3	3	3	31.45
7	1	1	1	1	26.45
8	3	1	2	3	26.95
9	1	2	2	2	25.79
I	83.69	80.46	87.03	85.01	
II	87.49	93.96	78.15	78.41	
III	85.66	82.42	91.66	93.42	
K1	27.90	26.82	30.34	28.34	
K2	29.16	31.32	26.05	26.14	
K3	28.55	27.47	30.55	31.14	
R	1.26	4.50	6.29	5.00	

表4 方差分析结果

Table 4 Results of analysis of variance

变异来源	自由度	偏平方和	均方	F值	显著性
A	2	7.20	3.599	2.21	
B	2	106.59	53.29	32.75	***
C	2	94.21	47.11	28.94	***
D	2	113.25	56.63	34.79	***
误差	2	29.30			
总变异	8	350.55			

### 2.3 验证试验

称取 10 g 野山杏仁粕放置于 500 mL 烧杯中, 按 1:25 料液比加入 250 mL 去离子水, 以酶底物比为 4% 加入木瓜蛋白酶, pH 值为 8, 65 °C 水浴酶解 120 min 后, 离心, 分离上清液, 测定多肽水解度。该试验过

表6 野山杏多肽对小鼠血清 T-SOD、GSH-Px 活性以及 MDA 含量的影响

Table 6 Effects of Noama Kyoto polypeptide on T-SOD, GSH-Px activity and MDA content in serum of mice ( $\bar{X}\pm SD$ , n=10)

组别	T-SOD/(U/mL)	MDA/(nmol/mL)	GSH-Px/(U/mL)
空白对照组	178.61±11.05	8.30±1.71	271.25±48.26
模型组	158.65±15.22▲▲▲	11.67±0.74▲▲▲	223.14±40.94▲▲
阳性对照组	176.10±9.11***	9.33±1.18***	269.53±28.68**
低剂量组	168.35±7.53*	9.87±0.67**	271.99±33.50**
中剂量组	170.88±3.57**	9.79±1.40**	275.41±32.26**
高剂量组	177.24±10.25***	9.05±1.30***	261.59±31.07*

注: 与空白对照组相比, ▲ $p<0.05$ 、▲▲ $p<0.01$ 、▲▲▲ $p<0.001$ , 与模型组相比, \* $p<0.05$ 、\*\* $p<0.01$ 、\*\*\* $p<0.001$ 。

程平行进行三组。

通过验证试验可以得知: 在此工艺条件下野山杏多肽水解度为 35.73%, 多肽液经过酸沉、洗脱、冷冻干燥, 得白色粉末, 得率为 7.22%。

酶解法通常采用一种或多种蛋白酶, 王琳等人<sup>[28]</sup>以杏仁粕为原料, 通过脱脂和提取蛋白处理后, 以木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶作为复合酶解制备杏仁肽, 以水解度为指标, 最终杏仁蛋白水解度为 23.60%; 赵换霞等<sup>[29]</sup>通过响应面分析法研究并优化了扁杏仁抗氧化肽的酶解制备工艺, 同时研究其体外抗氧化活性, 以碱性蛋白酶-风味蛋白酶的复合酶制备的扁杏仁抗氧化活性肽水解度为 20.87%, 本试验多肽水解度为 35.73%, 与上述文献进行比较, 分别高出 12.13%和 14.86%, 由此可见本试验优化后的多肽提取工艺较优于对方。

### 2.4 野山杏多肽对衰老模型小鼠的抗氧化作用

#### 2.4.1 试验前后小鼠的体重变化

试验数据以 ( $\bar{X}\pm SD$ ) 表示, 采用 SPSS 24.0 统计软件分析试验数据。

表5 试验中总体动物体重变化

Table 5 The overall animal body weight change in the experiment ( $\bar{X}\pm SD$ , n=12)

组别	例数	试验前/g	试验后/g
空白对照组	12	23.51±2.19	24.14±3.33
模型组	12	23.10±2.22	22.97±3.11
阳性对照组	12	24.21±0.91	24.47±2.96
低剂量组	12	25.05±1.98	26.71±2.04
中剂量组	12	23.63±2.04	24.47±2.19
高剂量组	12	23.79±2.05	24.98±2.27

通过表 5 可以看出, 各组小鼠试验前后体重差别不明显 ( $p>0.05$ ), 各组间试验小鼠体重无显著差异 ( $p>0.05$ )。模型组小鼠注射 D-半乳糖, 30 d 后体重略有下降, 其余各组小鼠体重稍微增加。

表7 野山杏多肽对小鼠肝组织 T-SOD、GSH-Px 活性以及 MDA 含量的影响

Table 7 Effects of apricot kernel polypeptide on T-SOD, GSH-Px activity and MDA content in liver tissues of mice ( $\bar{X} \pm SD$ , n=10)

组别	T-SOD/(U/mL)	MDA/(nmol/mL)	GSH-Px/(U/mL)
空白对照组	369.37±32.93	0.75±0.18	53.05±4.43
模型组	280.22±49.23▲▲▲	1.08±0.11▲▲▲	42.01±8.11▲▲
阳性对照组	347.69±35.02**	0.82±0.96***	51.60±8.47**
低剂量组	336.86±61.38*	0.89±0.13*	49.04±7.01*
中剂量组	340.21±58.57**	0.89±0.27*	53.56±10.45***
高剂量组	360.32±46.77***	0.83±0.16***	51.50±4.77**

注: 模型组与空白对照组相比, ▲ $p < 0.05$ 、▲▲ $p < 0.01$ 、▲▲▲ $p < 0.001$ , 与模型组相比, \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 。

表8 野山杏多肽对小鼠脑组织 T-SOD、GSH-Px 活性以及 MDA 含量的影响

Table 8 Effect of Noama Kyoto polypeptide on T-SOD, GSH-Px activity and MDA content in the brain of mice ( $\bar{X} \pm SD$ , n=10)

组别	T-SOD/(U/mL)	MDA/(nmol/mL)	GSH-Px/(U/mL)
空白对照组	166.21±21.75	1.81±0.24	25.69±3.73
模型组	131.73±25.80▲▲▲	2.49±0.49▲▲	15.43±3.96▲▲▲
阳性对照组	157.69±23.67**	1.86±0.29**	22.22±4.19***
低剂量组	144.30±12.22	2.23±0.84	19.51±4.59*
中剂量组	157.65±10.41**	1.98±0.56*	20.09±2.56**
高剂量组	156.04±12.80**	1.84±0.36**	20.51±2.82**

注: 模型组与空白对照组相比, ▲ $p < 0.05$ 、▲▲ $p < 0.01$ 、▲▲▲ $p < 0.001$ , 与模型组相比, \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 、\*\*\* $p < 0.001$ 。

#### 2.4.2 野山杏多肽对小鼠血清 T-SOD、GSH-Px 活性以及 MDA 含量的影响

试验数据以 ( $\bar{X} \pm SD$ ) 表示, 采用 SPSS 24.0 统计软件分析, 组间比较方差分析和  $t$  检验。试验结果见表 6。

由表 6 可知, 与空白对照组比, 模型组小鼠血清 T-SOD、GSH-Px 活性极显著下降 ( $p < 0.001$ 、 $p < 0.01$ ), MDA 含量极显著升高 ( $p < 0.001$ ), 表明衰老模型小鼠造模成功。

MDA 是体内含氧自由基与细胞膜表面脂质过氧化反应的产物, 其含量反映体内脂质氧化损伤程度<sup>[30]</sup>。GSH-Px 可以催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 过氧化氢反应生成对机体无害的水和氧化型谷胱甘肽, 从而保护细胞免受氧化胁迫和细胞损伤<sup>[31]</sup>。SOD 几乎存在于所有生物细胞中, 能够催化超氧化物转化, T-SOD 活力的高低代表着机体清除氧自由基的能力大小<sup>[32]</sup>。

与模型组比, 阳性对照组及低、中、高剂量组小鼠血清中 T-SOD、GSH-Px 活性显著升高 ( $p < 0.01$  或  $p < 0.05$  或  $p < 0.001$ ), MDA 活性均极显著降低 ( $p < 0.001$  或  $p < 0.01$ )。其中低剂量组 GSH-Px 活性达到 271.99 U/mL, 高剂量组 T-SOD 活力达到 177.24 U/mL, 与空白对照组结果相近; 低、中、高剂量组小鼠 T-SOD 活性随着野山杏多肽给药量的增加而增加, 具有剂量依赖性。说明不同剂量的野山杏多肽均能对小鼠血清中的 MDA 含量值以及 T-SOD、GSH-Px 活力产生显著

影响。

#### 2.4.3 野山杏多肽对小鼠肝组织 T-SOD、GSH-Px 活性、以及 MDA 含量的影响

试验数据以 ( $\bar{X} \pm SD$ ) 表示, 采用 SPSS 24.0 统计软件分析, 组间比较才有方差分析和  $t$  检验。试验结果见表 7。

由表 7 可知, 与空白对照组比, 模型组小鼠肝组织 T-SOD、GSH-Px 活力极显著下降 ( $p < 0.001$  或  $p < 0.01$ ), MDA 含量极显著升高 ( $p < 0.001$ ); 与模型组相比, 阳性对照组及各剂量组 MDA 含量不同程度的降低 ( $p < 0.05$  或  $p < 0.001$ ), T-SOD、GSH-Px 活性均有不同程度的增加 ( $p < 0.01$  或  $p < 0.05$  或  $p < 0.001$ ), 其中 T-SOD 活性随着野山杏多肽剂量的增加而增加, 具有剂量依赖性。说明不同剂量的野山杏多肽均能对小鼠肝组织中的 T-SOD、GSH-Px 活性、以及 MDA 含量值产生影响。

#### 2.4.4 野山杏多肽对小鼠脑组织 T-SOD、GSH-Px 活性以及 MDA 含量的影响

试验结果以 ( $\bar{X} \pm SD$ ) 表示, 采用 SPSS 24.0 统计软件分析试验数据, 数据如表 8 所示。

由表 8 可知, 与模型组相比, 中、高剂量组均可显著提高衰老小鼠脑组织中 T-SOD、GSH-Px 活性 ( $p < 0.01$ ), 降低 MDA 含量 ( $p < 0.05$  或  $p < 0.01$ ), 其中高剂量组 MDA 含量为 1.84 nmol/mL, 与空白对照组脑组织中 MDA 含量接近, 表明当野山杏多肽给



药剂量为 100 mg/kg, 给药周期 30 d 后, 可使衰老模型小鼠脑组织中 MDA 含量显著降低并基本恢复至造模前水平。与低剂量组相比, 中、高剂量组 T-SOD 及 MDA 数据差异较大, 中高剂量组明显好于小剂量组, 且数据更接近于阳性对照组。综上, 中、高剂量组野山杏多肽均能对小鼠肝组织中的 T-SOD、GSH-Px 活性以及 MDA 含量值产生显著影响。

综上所述, 本试验通过野山杏多肽各剂量组研究其对衰老模型小鼠的体内抗氧化作用, 与模型组相比, 各剂量组可以不同程度地增加小鼠体内 GSH-Px 及 T-SOD 活力, 降低 MDA 含量, 其中以中、高剂量组效果较为明显, 具有统计学意义。但野山杏多肽的不同剂量组的各项数据并未呈现出完全一致的变化趋势, 可能是由于机体存在不同的抗氧化调节机制而导致的, 其他研究也表明 SOD 和 GSH-Px 在某些状态下呈现出一定范围内的动态变化, 而非绝对的同时增加, 即当其中一种机制被激活时, 另一种会呈现出有所抑制的状态<sup>[33]</sup>。

### 3 结论

本试验通过研究得到酶解法提取野山杏多肽的最佳工艺: 酶底物比为 4%, 酶解时间 120 min, pH 值为 8, 酶解温度为 65 ℃。并进行验证试验, 得知: 在此工艺条件下野山杏多肽水解度为 35.73%, 多肽液经过酸沉、洗脱、冷冻干燥, 得白色粉末, 得率为 7.22%。通过上述工艺得到的野山杏多肽给予 D-半乳糖诱导的小鼠衰老模型, 发现中、高剂量的野山杏多肽皆能提高衰老小鼠血清、肝组织以及脑组织匀浆中的 T-SOD、GSH-Px 活性, 同时降低 MDA 含量, 抑制血清及组织中的脂质过氧化。综上所述, 本试验优化后提取的野山杏多肽对衰老小鼠具有良好的体内抗氧化作用。

### 参考文献

- [1] 焦中高, 吕真真, 刘杰超, 等. 苦杏仁去皮热风干燥适宜温度提高油脂品质[J]. 农业工程学报, 2016, 32(4): 262-268  
JIAO Zhonggao, LYU Zhenzhen, LIU Jiechao, et al. Suitable hot air drying temperature improving quality of apricot kernel oil [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2016, 32(4): 262-268
- [2] 郝文杰, 黎刚刚, 周亚琼, 等. Box-Behnken 优化醇酶法提取野山杏仁油工艺及脂肪酸分析[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(1): 108-111, 114  
HAO Wenjie, LI Ganggang, ZHOU Yaqiong, et al. Optimization of enzymatic extraction of almond oil by Box-Behnken method and analysis of fatty acids [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(1): 108-111, 114
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 201-202  
National Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. One [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 201-202
- [4] Wen X, Feng J, Joe M, et al. Transglutaminase induced gels using bitter apricot kernel protein: chemical, textural and release properties [J]. Food Bioscience, 2018, 26: 15-22
- [5] 张杰, 张海珊, 田丝雨, 等. 新疆伊吾县野山杏叶的品质检测与分析[J]. 华西药学杂志, 2018, 33(4): 413-416  
ZHANG Jie, ZHANG Haishan, TIAN Siyu, et al. Quality detection and analysis of wild *Prunus sibirica* leaves in Xinjiang Yiwu county [J]. West China Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 33(4): 413-416
- [6] 阿依姑丽·艾合麦提, 王妙颖, 彭祺菲, 等. 野山杏果肉总有机酸对高脂血症大鼠血脂及相关基因表达的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(21): 171-176  
AHMAT Aygul, WANG Miaoying, PENG Zhenfei, et al. Effect of total organic acid from wild apricot on blood lipid and the expression of related genes in hyperlipidemic rats [J]. Food Science, 2018, 39(21): 171-176
- [7] 阿依姑丽·艾合麦提, 李珊, 英提扎尔·艾孜木江, 等. 野山杏果肉总有机酸体外抑制脂质过氧化活性研究[J]. 西北药学杂志, 2017, 32(4): 426-430  
AHMAT Aygul, LI Shan, AZIMJIAN Entizar, et al. Study on the activity of anti-lipoperoxidation *in vitro* of total organic acids from wild apricot [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2017, 32(4): 426-430
- [8] 朱秀清, 李美莹, 孙冰玉, 等. 复合酶分步水解法制备汉麻多肽及其抗氧化特性研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 161-169  
ZHU Xiuqing, LI Meiyang, SUN Bingyu, et al. Preparation of polypeptides from hemp by two-step enzymatic hydrolysis with complex enzymes and its antioxidant properties [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 161-169
- [9] 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 methods and activities of plant antioxidant peptides [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2021, 49(3): 4-7
- [10] Boachie R, Yao S Y, Udenigwe C C. Molecular mechanisms

- of cholesterol-lowering peptides derived from food proteins [J]. *Current Opinion in Food Science*, 2018, 20: 58-63
- [11] Tanzadehpanah H, Asoodeh A, Saidijam M, et al. Improving efficiency of an angiotensin converting enzyme inhibitory peptide as multifunctional peptides [J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2018, 36(14)
- [12] Qin X Y, Zhang J T, Li G M, et al. Structure and composition of a potential antioxidant obtained from the chelation of pea oligopeptide and sodium selenite [J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 64: 103619
- [13] 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
- [14] 张乃云.杏仁多肽的制备、分离及其抗氧化活性研究[D].晋中:山西农业大学,2014  
ZHANG Naiyun. Study on preparation, separation and antioxidant activity of almond peptides [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2014
- [15] GB 5009.5-2016 分光光度法-文后参考文献著录规则[S]  
GB 5009.5-2016. Spectrophotometric Method-Rules of Bibliography at the End of the Paper [S]
- [16] 田丝雨,杨晓君,何笑娜,等.伊吾县野山杏多肽的提取及其抗氧化活性的研究[J].*中国食品添加剂*,2018,170(4):74-79  
TIAN Siyu, YANG Xiaojun, HE Xiaona, et al. Study on the extraction and antioxidant activity of polypeptide from wild almond in Yiwu county [J]. *China Food Additives*, 2018, 170(4): 74-79
- [17] 何晓兰,许庆忠,王筑婷,等.消化道酶连续水解制备苦荞球蛋白多肽及其抗氧化活性研究[J].*食品科技*,2016,41(8):70-75  
HE Xiaolan, XU Qingzhong, WANG Zhuting, et al. Preparation of Tartary buckwheat globulin peptides by digestive protease hydrolysis sequentially and its antioxidant activity [J]. *Food Science and Technology*, 2016, 41(8): 70-75
- [18] 周燕芳.超声波处理对蓝圆鲱鱼蛋白酶解效果的影响[J].*天津农业科学*,2017,23(1):23-27  
ZHOU Yanfang. Effect of ultrasonic wave on the effect of *Decapterus maruadsi* fish protease hydrolysis [J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2017, 23(1): 23-27
- [19] 高士昌,李文军.自检酱油中氨基酸态氮含量认定可信准确度的研讨[J].*中国调味品*,2009,34(10):99-100  
GAO Shichang, LI Wenjun. Research on the reliability and accuracy of the determination of amino acid nitrogen content in soy sauce by self-test [J]. *China Condiment*, 2009, 34(10): 99-100
- [20] 李志强.生气化学与组织学[M].北京:中国轻工业出版社,2010  
LI Zhiqiang. *Gas Chemistry and Histology* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2010
- [21] 余勃,陆兆新.微生物发酵法产大豆多肽液水解度的测定[J].*食品科学*,2005,26(4):104-107  
YU Bo, LU Zhaoxin. Determination of degree of hydrolysis of soybean peptides produced by microorganism fermentation [J]. *Food Science*, 2005, 26(4): 104-107
- [22] 李岭.RABV 感染小鼠脑组织蛋白质组学分析及自噬与RABV 复制关系研究[D].长春:吉林大学,2017  
LI Ling. Proteomics analysis of RABV-infected mouse brain and therole of autophagy in RABV replication [D]. Changchun: Jilin University, 2017
- [23] 张秋萍,吴霞红,郑剑恒,等.生物样本中丙二醛测定方法的研究进展[J].*理化检验(化学分册)*,2016,52(8):979-985  
ZHANG Qiuping, WU Xiahong, ZHENG Jianheng, et al. Progress of researches on methods for determination of malondialdehyde in biological samples [J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2016, 52(8): 979-985
- [24] 刘军杰,黄忠仕,曾庆春,等.壮精合剂对初老大鼠血清、肝、脑、卵巢中 T-SOD、GSH-Px 活性及 MDA 含量的影响[J].*右江民族医学院学报*,2014,36(1):4-6  
LIU Junjie, HUANG Zhongshi, ZENG Qingchun, et al. Effects of Zhuangjing Mixture (Chinese hebal medicine) on the activities of T-SOD and GSH-Px, the contents of MDA content in the serum, liver, brain and ovary of initial aging rats [J]. *Journal of Youjiang Medical College for Nationalities*, 2014, 36(1): 4-6
- [25] 张光超,王晓松,马泽芳,等.不同生理时期梅花鹿血液 GSH-Px 含量测定及其纯化[J].*畜牧兽医学报*,2012,43(1):138-144  
ZHANG Guangchao, WANG Xiaosong, MA Zefang, et al. Measurement and purification of GSH-Px in different physiological period of Sika deer blood [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(1): 138-144
- [26] 徐杨林,严宏孟,高蕾,等.苦杏仁醇溶蛋白酶解抗氧化肽的制备工艺优化[J].*现代食品科技*,2021,6:201-210,192  
XU Yanglin, YAN Hongmeng, GAO Lei, et al. Optimization of preparation process of antioxidant peptides from amygdala proteolysis [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2021, 6: 201-210, 192

