

大豆分离蛋白重组蛋白酶水解肽对小鼠免疫功能及抗氧化能力的影响

曾松荣, 庞彦韬, 柯野*, 何璐娜, 刘玉萍

(韶关学院 英东生物与农业学院, 广东 韶关 512005)

摘要: 为了研究重组酱油曲霉碱性蛋白酶(rAp)水解大豆分离蛋白获得的大豆肽对小鼠免疫功能及抗氧化能力的影响,将诱导表达后分离纯化的 rAp 对大豆分离蛋白进行水解,然后将水解液灌胃小白鼠,测定其水解液对小鼠免疫器官指数、小鼠血清溶菌酶活性和小鼠血清抗菌活力等对小鼠免疫功能的影响;通过测定谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和过氧化氢酶(CAT)的活性以及丙二醛(MDA)浓度等,进一步检测对小鼠血液中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)浓度的影响。结果表明,大豆肽对小鼠免疫器官指数没有显著影响,但可显著提高小鼠血清溶菌酶活性和小鼠血清抗菌活力;对小鼠血清中的 GSH-PX 的活力影响不显著,但能显著提高血清中的 CAT 活力和显著降低 MDA 浓度。由此可见,rAp 水解大豆分离蛋白获得的大豆活性肽在一定程度上能增强小鼠机体的免疫功能和抗氧化活性,在保健品行业为大豆的高值化利用提供了实验依据。

关键词: 酱油曲霉碱性蛋白酶;大豆分离蛋白;大豆肽;免疫功能;抗氧化

中图分类号:TS 214.2 文章编号:1673-1689(2021)07-0097-06 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.07.012

Effects of Soybean Peptides from Soybean Protein Isolate Hydrolyzed by Recombinant *Aspergillus sojae* Alkaline Protease on Immune Function and Antioxidation in Mice

ZENG Songrong, PANG Yantao, KE Ye*, HE Luna, LIU Yuping

(Henry Fok School of Biology and Agriculture, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China)

Abstract: The effects of soybean peptides from soybean protein isolate (SPI) hydrolyzed by the recombinant *Aspergillus sojae* alkaline protease (rAp) on immunity function and antioxidation in mice was explored. Soybean protein isolate (SPI) was hydrolyzed by induced expression of purified rAp, and then the hydrolysate was administered to mice. The effects of its hydrolysate on immune organ index, serum lysozyme activity and serum anti-bacterial activity of mice were determined. The antioxidant activity of GSH-PX and CAT, and the content of MDA in mice were measured based on the anti-oxidation test carried out in mice. Furthermore, the effect of soybean peptides on the activity of GSH-PX, CAT and the content of MDA in mice blood were determined. The results indicated that

收稿日期: 2019-04-17

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2018A0303130108);广东省韶关市科技计划项目(2018sn087)。

作者简介: 曾松荣(1964—),男,博士,教授,主要从事微生物学和生物工程方面的研究。E-mail: zengsr@hotmail.com

* 通信作者: 柯野(1977—),男,博士,副教授,主要从事微生物学和生物工程方面的研究。E-mail: keye518@126.com

soybean peptide had no significant effect on immune organ index of mice, but it had significant improvement on serum lysozyme activity and serum anti-bacterial activity of mice. It had no significant effect on serum GSH-PX activity of mice, however, CAT activity and MDA content in serum were significantly increased. In conclusion, the soy peptides hydrolyzed by rAp could enhance the immune function and antioxidant activity of mice, providing experimental basis for high value utilization of soybean in health food industry.

Keywords: *Aspergillus sojae* alkaline protease, soybean protein isolate, soybean peptides, immune function, antioxidation

大豆肽通常是以大豆分离蛋白(soybean protein isolate, SPI)为原料,在最适温度和 pH 下进行蛋白酶反应后所获得的小分子肽类经加工精制生产出的活性短肽类产品。如果将大豆分离蛋白(SPI)直接应用于食品工业中,制造出来的产品就不易被吸收。因此,先将其水解为短肽,再应用于食品的生产中,这样的产品不仅有利于消化吸收,而且还可以使大豆肽的生物学功能得以充分发挥,提高其附加值。酶水解法是目前生产大豆肽的主要方法,随着大量蛋白酶在活性肽制备中的应用,微生物蛋白酶水解催化效率更高,且价格便宜,其中真菌来源的蛋白酶具备 pH 适应性广、底物选择性大等优点,因此也非常适用于大豆肽的生产^[1-2]。

酱油曲霉(*Aspergillus sojae*)可以产生多种运送到胞外的蛋白酶,其中某些胞外蛋白酶可以水解植物蛋白,这些蛋白酶大多为中性和碱性,日本的 Hayashi 等对其性质做了研究,发现酱油曲霉蛋白酶具有典型的肽链内切酶特性,一般在消化蛋白质时切断肽链的 8%~15%就终止反应^[3]。在国内,酱油曲霉已被广泛用于生产传统豆类发酵食品,对酱油曲霉的研究主要集中在其蛋白酶学性质方面,而利用其重组蛋白酶法制备大豆肽鲜见报道。

作者所在实验室前期已构建好的酱油曲霉重组碱性蛋白酶毕赤酵母(*Pichia pastoris*)工程菌株来表达酱油曲霉重组碱性蛋白酶(rAp),以大豆分离蛋白(SPI)为底物经酶解后得到大豆分离蛋白重组蛋白酶水解肽(以下简称大豆肽),然后探讨这些大豆肽对小鼠免疫功能及抗氧化能力的影响,为大豆的高值化利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 小鼠、饲料与菌株来源 实验动物小鼠(*Mus*

musculus): 购自广州中医药大学实验动物中心;饲养小鼠的普通饲料:购自沈阳市于洪区前民动物实验饲料厂;酱油曲霉重组碱性蛋白酶(rAp)毕赤酵母工程菌株:韶关学院英东生物与农业学院微生物学实验室构建, -80 °C 冰箱保藏。

1.1.2 培养基

1) BMGY 液体培养基:蛋白胨 2 g/dL, 酵母粉 1 g/dL, 甘油体积分数 1%, 采用 0.1 mol/L 的 pH 6.0 磷酸盐缓冲液配制。

2) BMMY 液体培养基:蛋白胨 2 g/dL, 酵母粉 1 g/dL, 甲醇体积分数 1%, 采用 0.1 mol/L 的 pH 6.0 磷酸盐缓冲液配制。

1.1.3 生化与化学试剂 测定谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)和丙二醛(MDA)的试剂盒:购自南京建成科技有限公司;镍柱亲和层析预装柱和 Sephadex G-75 层析柱:购自 BIO-RAD 公司;大豆分离蛋白(SPI):购自上海蓝平实业有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 重组碱性蛋白酶(rAp)的诱导表达及纯化 将保藏于-80 °C 冰箱的酱油曲霉重组碱性蛋白酶毕赤酵母(*Pichia pastoris*)工程菌株活化后,接种于 BMGY 液体培养基中。180 r/min, 28 °C 摇瓶振荡恒温培养 24 h 后,将菌液无菌离心、洗涤,取其菌体重悬于 BMMY 诱导培养基中,30 °C 继续摇瓶培养,每隔 24 h 添加 BMMY 培养基体积分数 1% 的甲醇对工程菌株进行诱导,诱导 7 d 后离心收集发酵液,采用 Folin 酚法测定发酵液中 rAp 的酶活^[4]。酶活单位的定义为:在 40 °C 下,每分钟水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为 1 个酶活力单位。

在发酵液中添加固体硫酸铵 80 g/dL, 4 °C 放置过夜后, 8 000 r/min 离心 10 min, 收集蛋白质沉淀,采用蒸馏水溶解蛋白质沉淀后,利用镍柱亲和层析

对rAp进行分离纯化,采用不同浓度的洗脱液进行洗脱,收集含有100 mmol/L咪唑的洗脱液,对洗脱液超滤浓缩后,利用Sephadex G-75层析柱进行层析,收集洗脱液,超滤浓缩,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)初步鉴定rAp,蛋白质印迹(Western blotting)做进一步鉴定,保存酶液备用。

1.2.2 利用rAp制备大豆肽 用0.01 mol/L Gly-NaOH缓冲液(pH 10)配置质量浓度为7.0 g/dL的大豆分离蛋白(SPI)溶液,在95℃以上的水浴中处理15 min,冷却后调至pH 10,按酶/底物比为3 000 U/g添加纯化的rAp后,在40℃保温水解1 h,水解期间不定时搅拌,水解完成后将含有大豆肽的酶解液pH值调为7.2^[5-6]。

1.2.3 大豆分离蛋白(SPI)的酶解情况鉴定试验

1)大豆肽的分离:将上述大豆分离蛋白(SPI)的rAp水解液调至pH 4.2进行等电点沉淀,于12 000 r/min离心15 min,取上清液,再经抽滤装置进行抽滤,得到澄清的水解液,即为重组蛋白酶水解产物大豆肽溶液。

2)大豆分离蛋白酶解情况初步鉴定:制备质量浓度为5 g/dL的浓缩胶,12 g/dL的分离胶,再经SDS-PAGE凝胶电泳、染色、脱色和观察,拍照记录结果。

1.2.4 对实验小鼠的处理及饲养 选取合格小鼠40只,随机分为两组(实验组、对照组),每组20只。对每只小白鼠进行打耳标编号标记,称量体重并一一对应编号记录,体质量记为 W_0 。其中实验组参照小鼠体质量以2 mg/g的剂量灌胃由rAp酶解得到的大豆分离蛋白(SPI)水解液;对照组直接灌胃等剂量的由未加酶水解液制备得到的大豆分离蛋白水溶液。在每天同一时间灌胃一次,连续灌胃30 d后对其禁食24 h,然后对小鼠采用眼球采血法收集血液,置于已编号的离心管中用于小鼠血清的制备。采用颈椎脱臼法处死小鼠,随后进行实验组和对照组对小鼠免疫功能和抗氧化能力的研究。

1.2.5 大豆肽对小鼠免疫功能的影响

1)小鼠免疫器官指数的测定:将供试小鼠眼球取血前称体质量,取血后颈椎脱臼法处死,取出胸腺和脾脏等免疫器官,滤纸吸干水分后分别称质量,计算免疫器官指数^[7-8]。

免疫器官指数=脏器质量(mg)/体质量(g)。

2)小鼠血清溶菌酶活性的测定:受试小鼠连续灌胃30 d,末次灌胃结束后24 h采用摘除眼球采血法取血,于4℃、2 000 r/min离心15 min,取上清液作为待测血清备用。

采用牛肉膏蛋白胨琼脂双层平板法培养金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),采用上层混菌法,待上层培养基凝固后,在上层平板打孔,将200 μ L小鼠血清点样于琼脂平板的小孔中,每组中每个小鼠血清点样3个孔,置37℃培养24 h,测定溶菌圈的直径^[9]。

3)小鼠血清抗菌活力的测定:以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为受试菌株,用生理盐水缓冲液配制成一定浓度的菌悬液($OD_{600}=0.282$)。取5 mL菌悬液与100 μ L的上述血清混匀,于600 nm处测定光密度值 A_1 ^[9];然后置于37℃培养30 min,再于600 nm处测定光密度值 A_2 。

血清抗菌活力 $=(A_1-A_2)/A_1$ 。

1.2.6 大豆肽对小鼠抗氧化性的影响 受试小鼠连续灌胃30 d后处死,分离血清,按照各试剂盒说明书的操作方法检测小鼠血清中过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、丙二醛(MDA)的水平^[10-11]。

2 结果与分析

2.1 rAp的诱导表达纯化结果

通过对rAp工程菌株的培养和添加甲醇诱导表达,采用Folin-酚法测定发酵液中蛋白酶的酶活,然后对发酵液中蛋白质进行盐析、亲和层析和分子筛层析后,SDS-PAGE电泳获得较为单一的蛋白质条带,见图1。该蛋白质条带与rAp的基因序列推导的蛋白质相对分子质量35 000基本一致。Western blotting分析结果显示,该纯化的目的蛋白质条带可以被His标签抗体识别,大小为35 000左右,见图2。试验结果表明,rAp被工程菌株成功诱导表达,并且通过纯化鉴定后获得了目的重组蛋白酶rAp。

2.2 rAp水解大豆分离蛋白质的结果

对大豆分离蛋白(SPI)进行95℃以上预处理后,利用rAp对其在40℃酶解1 h,进一步将酶解液离心去掉沉淀,进行SDS-PAGE电泳,见图3。

由图3可知,大豆分离蛋白中35 000以上的大分子蛋白质基本都被rAp水解,并且被水解后的大豆分离蛋白中相对分子质量大于18 400以上具有

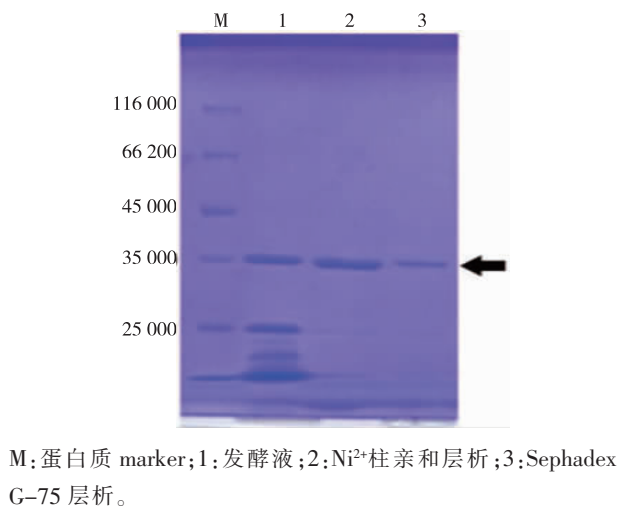


图 1 rAp 的纯化 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 1 SDS-PAGE of the purified rAp

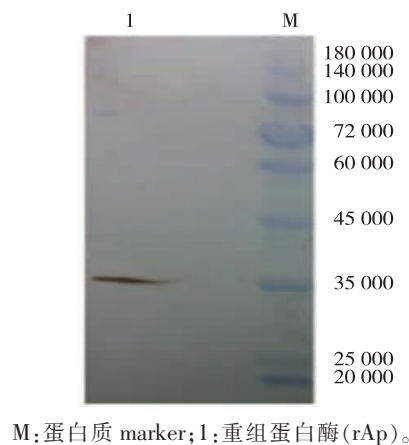


图 2 rAp 的 Western blotting 鉴定
Fig. 2 Western blotting analysis of the rAp

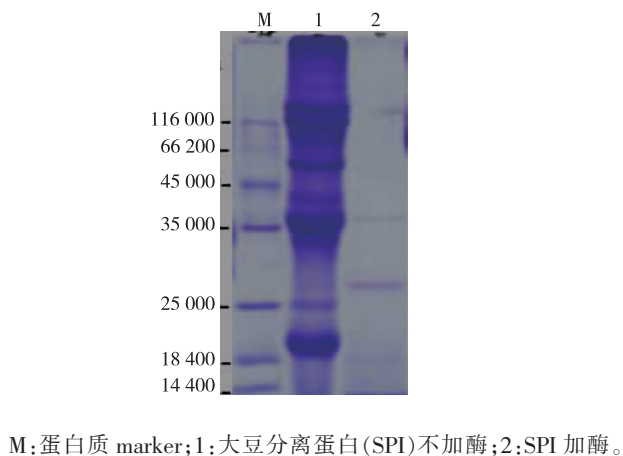


图 3 rAp 对大豆分离蛋白的水解产物的电泳图
Fig. 3 SDS-PAGE of soybean peptides from soybean protein isolate hydrolyzed by rAp

明显条带的蛋白质仅有 3 条,这表明大豆分离蛋白被 rAp 水解成小分子蛋白质,并且多数可能被水解为小肽。

2.3 大豆肽对小鼠免疫功能的影响结果

2.3.1 大豆肽对小鼠免疫器官指数的影响 大豆肽对小鼠体内免疫器官指数的影响见表 1。

表 1 大豆肽对小鼠免疫器官指数的影响

Table 1 Effect of soybean peptides on the immune organ indices in mice

处理	(胸腺质量/体质量)/%	(脾脏质量/体质量)/%
大豆肽	0.163 9±0.011 1	0.468 2±0.034 1
大豆分离蛋白(SPI)	0.162 7±0.012 3	0.440 2±0.033 0

由表 1 可知,大豆肽对小鼠胸腺和脾脏指数分别为 0.1639 %、0.4682 %;与大豆分离蛋白(SPI)相比,未有显著差异,这表明大豆肽对小鼠整体的免疫器官没有明显影响。

2.3.2 大豆肽对小鼠血清溶菌酶活性的影响 以金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)作为受试菌株,大豆肽对小鼠血清溶菌酶活性试验结果见图 4。

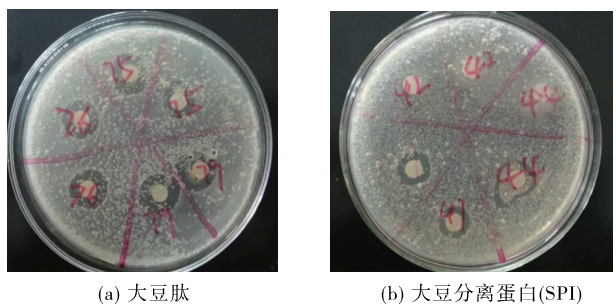


图 4 小鼠血清溶菌酶活性试验
Fig. 4 Serum lysozyme activities in mice

测量溶菌酶对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的抑菌菌直径见表 2。

表 2 大豆肽对小鼠血清溶菌酶活性的影响

Table 2 Effect of soybean peptides on the serum lysozyme activity in mice

处理	滤纸片直径/cm	抑菌圈平均直径/cm
大豆肽	0.80	1.40
大豆分离蛋白(SPI)	0.80	0.85

由表 2 可知,在相同的滤纸片直径下,灌胃由 rAp 水解的大豆肽的小鼠血清具有明显的抑菌作用,且抑菌圈直径达到了 1.4 cm。由此可知,大豆肽

有显著提高小鼠血清溶菌酶活性的作用。

2.3.3 大豆肽对小鼠血清抗菌活力的影响 以大肠杆菌(*E. coli*)作为受试菌株,大豆肽对小鼠血清的抗菌活力影响见表3。

表3 大豆肽对小鼠血清抗菌活力影响

Table 3 Effect of soybean peptides on the serum antibacterial activity in mice

处理	小鼠血清抗菌活力/%
大豆肽	28.58±1.00*
大豆分离蛋白(SPI)	10.16±0.68

注:*与大豆分离蛋白(SPI)比较, $P<0.05$ 。

由表3可知,大豆肽的小鼠血清的抗菌能力达到28.58%,显著高于大豆分离蛋白(SPI)10.16%,表明大豆肽有显著提高小鼠血清抗菌活力的作用。

2.4 大豆肽体内抗氧化试验结果

以大豆分离蛋白(SPI)做对照,大豆肽灌胃30 d后检测小鼠血清中过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活性以及丙二醛(MDA)水平,结果见表4。

表4 各组小鼠血清中GSH-PX、CAT、MDA测定结果

Table 4 Activities of GSH-PX, CAT and the contents of MDA in different mice serum

组别	GSH-PX 活性/ (U/mL)	CAT 活性/ (U/mL)	MDA 浓度/ (nmol/mL)
大豆肽	243.78±6.28	36.16±0.90*	17.68±0.45*
大豆分离蛋白(SPI)	238.92±16.17	14.89±0.99	21.52±1.47

注:*与大豆分离蛋白(SPI)比较, $P<0.05$ 。

由表4可以看出,与大豆分离蛋白(SPI)对照组相比,谷胱甘肽过氧化物酶GSH-PX活性没有显著变化,而CAT活性显著提高,MDA浓度显著降低。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)作为细胞内酶保护系统的主要成分之一,它和超氧化物歧化酶、过氧化氢酶一起能去除超氧阴离子自由基和 H_2O_2 ,还原氢过氧化物,以减轻和阻断脂质过氧化作用,保护细胞免受过氧化损伤^[12]。但实验组和对照组在增强小鼠血清中GSH-Px活力方面无明显改变。

细胞内氢氧自由基($OH^{\cdot}$)经过一系列反应,对细胞有极强的破坏性,而这种氢氧自由基($OH^{\cdot}$)能被过氧化氢酶分解,保证机体细胞内环境的稳定和细胞的正常生活。CAT值越高,分解过氧化氢能力越强,机体的抗氧化能力就越高。实验组小鼠血清CAT值较高,表明大豆肽可以提高小鼠体内的CAT

值,从而增强小鼠的体内抗氧化性。

体内MDA浓度反映机体细胞受自由基攻击的严重程度,MDA浓度越高,受自由基攻击越严重^[13-14]。实验组小鼠体内MDA浓度较少,说明该组小鼠体内细胞受自由基攻击最少,其体内的抗氧化性较高。

3 讨论

酶的选择和酶解条件是大豆肽制备的关键,目前商业用酶主要是微生物酶(酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶及复合酶)、植物蛋白酶及少量的动物蛋白酶。通过这些特异性蛋白酶的作用,可以形成大小不等的多种活性肽。已经证明,不同的大豆活性肽具有抗高血压、抗氧化、抗癌、降血脂、减肥、抗病毒及抑菌等生理保健功能^[15]。Stephen等利用大豆肽对大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)和白色念珠菌(*Candida albicans*)等进行抗菌活性实验,结果表明,从大豆中提取的活性肽(PGTAVFK)能够显著抑制这些病原微生物的生长,推测大豆肽抗菌活性可能与大豆肽中氨基酸带电性及疏水性有关,从而表现出抑菌性^[16],该结果与本研究的抑菌结果基本一致。

对具有抗氧化活性的多肽而言,其氨基酸序列和结构对其抗氧化功能起着基础性的作用。有研究表明,其抗氧化性与氨基酸组成如酪氨酸残基或者氢键网络性具有直接相关性,但其抗氧化机制仍不是十分清楚^[17]。对于大豆肽的抗氧化性,也与其氨基酸组成和序列密切相关,如富含色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸等残基的大豆肽具有较强的抗氧化性^[18-19]。作者利用rAp制备的大豆肽,由于重组蛋白酶对底物P1位点具有苯丙氨酸类疏水性的氨基酸残基底物具有偏好性^[20],表明本研究获得的大豆肽的序列中富含苯丙氨酸,这可能是其具有较强抗氧化性的原因之一。在本研究中,大豆肽提高了小鼠血清的抗氧化性和抗菌性,这可能是由于大豆肽这些小分子肽类不需进一步降解就可直接被机体吸收进入血清,提高了血清的抗氧化性和抗菌能力^[21-22],但其具体的机理还有待于进一步研究。

4 结语

作者对酱油曲霉重组碱性蛋白酶(rAp)毕赤酵母工程菌株进行了活化、摇瓶诱导表达和分离纯

化。通过 SDS-PAGE 电泳进行初步鉴定,在 35 000 位置获得单一的蛋白质条带,与预期的重组 rAp 相对分子质量大小一致,表明酱油曲霉重组碱性蛋白酶(rAp)已成功得到表达和纯化鉴定。

利用上述已分离纯化的酱油曲霉重组碱性蛋白酶(rAp)水解大豆分离蛋白制备大豆肽,将大豆肽灌胃小鼠,然后探究这些大豆肽对小鼠免疫功能及抗氧化能力的影响。在大豆肽对小鼠免疫功能的影响方面,尽管由重组酱油曲霉蛋白酶(rAp)水解大豆分离蛋白所得到的大豆肽与大豆分离蛋白(SPI)对照组相比,对小鼠免疫器官指数没有明显影响,但显著提高了血清抗菌能力和血清溶菌酶活

性,表明大豆肽对小鼠有显著的免疫增强活性;在大豆肽的体内抗氧化验证试验方面,重组酱油曲霉蛋白酶(rAp)水解大豆分离蛋白所得到的大豆肽与大豆分离蛋白(SPI)对照组相比,尽管二者在 GSH-Px 活性影响方面无明显差别,但实验中的大豆肽可使 CAT 的活性显著提高、MDA 浓度显著降低,表明大豆肽与对照组相比可显著提高小鼠的抗氧化性。综上所述,酱油曲霉重组碱性蛋白酶(rAp)水解大豆分离蛋白获得的大豆活性肽能在较大程度上增强小鼠机体的免疫功能和抗氧化活性,这些生理活性在营养、化妆品和医药领域的应用前景广阔。

参考文献:

- [1] 游子娟,钟丽芬,黄伟谦,等. 重组米曲霉中性蛋白酶(rNpI)水解大豆蛋白苦味及其抗氧化性研究[J]. 广东农业科学, 2015,42(10):84-88.
- [2] 雷鸣,李志忠. 大豆多肽制备中蛋白酶的选择[J]. 甘肃农业大学学报,2006,41(5):122-126.
- [3] 杨俊豪,陈宝英,吴培群,等. 酱油曲霉蛋白酶活力的提高[J]. 工业微生物,1994,24(1):1-6.
- [4] 柯野,陈丹,李家洲,等. 米曲霉碱性蛋白酶基因的克隆表达及水解特性[J]. 华南理工大学学报(自然科学版),2012,40(8):88-94.
- [5] 曹亚兰. 大豆抗氧化肽的制备,分离纯化及结构鉴定[D]. 广州:华南理工大学,2012.
- [6] ZHENG L, SU G, REN J, et al. Isolation and characterization of an oxygen radical absorbance activity peptide from defatted peanut meal hydrolysate and its antioxidant properties[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(21):5431-5437.
- [7] 陈红伟,钟文杰,吴俊伟,等. 兔抗菌组蛋白对小白鼠生长和细胞免疫功能的影响[J]. 中国兽医学报,2014,34(5):798-803.
- [8] 曾献春,刘金宝,江岩. 番茄、胡萝卜混合汁乳酸菌发酵液对小鼠免疫功能的影响[J]. 解放军预防医学杂志,2005,23(4):248-251.
- [9] 邓超,邹敏辰. 茶树菇多糖对小鼠免疫功能影响的研究[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2007,2(1):42-44.
- [10] 许惠仙,汪霞,金延华,等. 大豆异黄酮和皂甙对肝癌前病变大鼠血清标志酶及抗氧化活性的影响[J]. 大豆科学,2012,31(1):124-126.
- [11] 尹学哲,金明,金延华,等. 大豆异黄酮和皂甙对扑热息痛诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(12):1266-1269.
- [12] 王江宏,刘艳,桑敏,等. 硒对紫球藻抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 热带海洋学报,2011,30(3):94-98.
- [13] 王莉娟,陶文沂. 大豆肽体外抗氧化活性研究[J]. 生物加工过程,2008,6(4):69-73.
- [14] GUTTERIDGE JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage[J]. *Clinical Chemistry*, 1995, 41(2):1819-1828.
- [15] 王立博,陈复生. 大豆活性肽生理保健功能研究进展[J]. 食品与机械,2016,32(2):198-201.
- [16] STEPHEN MCCLEAN, LOUISE B BEG, ROBERT W WELCH. Antimicrobial activity of antihypertensive food-derived peptides and selected alanine analogues[J]. *Food Chemistry*, 2014, 146:443-447.
- [17] WU R B, HUANG J F, HUAN R, et al. New insights into the structure-activity relationships of antioxidative peptide PMRGGGGYHYH[J]. *Food Chemistry*, 2020, 337:127678.
- [18] BEERMANN C, EULER M, HERZBERG J, et al. Antioxidative capacity of enzymatically released peptides from soybean protein isolate[J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 229(4):637-644.
- [19] 戴媛,冷进松. 大豆多肽的功能性质及应用前景[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2019,40(2):132-139.
- [20] WAN M Y, WANG H Y, ZHANG Y Z, et al. Substrate specificity and thermostability of the dehairing alkaline protease from *Bacillus pumilus*[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2009, 159(2):394-403.
- [21] JIE Y, ZHAO H, SUN X, et al. Isolation of antioxidative peptide from the protein hydrolysate of *Caragana ambigua* seeds and its mechanism for retarding lipid auto-oxidation[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2019, 99(6):3078-3085.
- [22] YUAN B, REN J, ZHAO M et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with pepsin and high-pressure homogenization on the functional properties of soybean protein isolate[J]. *LWT – Food Science and Technology*, 2012, 46(2):453-459.