

干酪乳杆菌胞壁蛋白酶的分离及水解酪蛋白产物特性

吴 振¹, 潘道东^{1,2,*}, 严 丽¹

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211;

2. 南京师范大学 国家乳品加工技术研发分中心, 江苏 南京 210097)

摘 要: 通过 DEAE-Sephadex A-25 和 Sephadex G-100 对干酪乳杆菌胞壁蛋白酶粗提物进行分离纯化, 分离到酶比活力为 12.50U/mg 的 CEP-1 与 16.67U/mg 的 CEP-2 两种胞壁蛋白酶。CEP-1 提纯倍数达到 50, 回收率为 33.61%; CEP-2 提纯倍数为 66.68, 回收率 55.17%。对不同时间和底物浓度下 CEP-1 与 CEP-2 的 α -酪蛋白和 β -酪蛋白水解特性进行研究。结果显示, 酪蛋白水解产物有显著的抗 ACE 与抗氧化活性, 产生最高 ACE 抑制活性的水解条件为: CEP-2 水解 α -酪蛋白, 时间 6h, 酶与底物质量比 1:10, 此时 ACE 抑制活性为 84.66%; 在酶与底物质量比 1:40, 水解时间 4h 条件下, CEP-2 水解 β -酪蛋白产生最佳的 O_2^- 清除能力, 其 IC_{50} 为 0.2138mg/mL。

关键词: 胞壁蛋白酶; 酪蛋白水解物; 抗 ACE 抑制活性; 抗氧化活性

Purification of Cell-envelop Proteinases from *Lactobacillus casei* and Biological Activity of Casein Hydrolysates Prepared with Them

WU Zhen¹, PAN Dao-dong^{1,2,*}, YAN Li¹

(1. College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Branch of National Dairy Processing Technology Developing Center, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: Crude cell-envelop proteinase extracted from *Lactobacillus casei* cells was purified/fractionated by DEAE-Sephadex A-25 and subsequent Sephadex G-100 column chromatographies. Two cell-envelop proteinase fractions, named as CEP-1 and CEP-2, were obtained, of which the activity was 12.50 U/mg and 16.67 U/mg, the purification folds 50 and 66.68, and the recoveries 33.61% and 55.17%, respectively. The hydrolysis characteristics of CEP-1 and CEP-2 on α -casein and β -casein under different conditions of hydrolysis time and substrate concentration were assessed in terms of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and superoxide anion radical scavenging activity of hydrolysates. Both CEP fractions resulted in casein hydrolysates with obvious ACE inhibitory activity and superoxide anion radical scavenging activity. Maximum ACE inhibitory activity was achieved after 6 h hydrolysis of α -casein at an enzyme/substrate ratio of 1:10 by CEP-2, reaching 84.66%. The β -casein hydrolysate obtained after 4 h of hydrolysis with an enzyme/substrate ratio of 1:40 revealed the best superoxide anion radical scavenging activity with a 0.2138 mg/mL IC_{50} .

Key words: cell-envelop proteinase (CEP); casein hydrolysate; ACE-inhibitory activity; antioxidant activity

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0188-05

乳酸菌胞壁蛋白酶(cell-envelop proteinase, CEP)属于蛋白水解酶^[1], 它能把乳蛋白水解成一系列的短肽, 这些肽类释放到培养液中或再由寡肽转移系统(Opp)^[2], 二肽和三肽转运系统(DtpP 和 DtpT)运输至细胞内, 再由

胞内肽酶(包括肽链内切酶、氨肽酶、pro- 特异性肽酶等)进一步将短肽水解为氨基酸或更小的肽类。而这些肽类对血管紧张素转移酶(ACE)具有抑制作用, 从而达到降血压的效果^[3]。同时, 在对不同分子质量的酪蛋白

收稿日期: 2011-03-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972130); 江苏省自然科学基金项目(BK2009403);

国家农业科技成果转化资金项目(2009GB2C220412); 浙江省重大科技专项重点农业项目(2010C12015)

作者简介: 吴振(1985—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: wuzhen201@yahoo.com.cn

* 通信作者: 潘道东(1964—), 男, 教授, 博士, 研究方向为乳品科学。E-mail: daodongpan@163.com

肽研究报道中,发现分子质量<1kD肽的最高DPPH自由基清除率为90.94%,抗氧化效果显著^[4]。在对动物蛋白酶法制备抗氧化多肽的研究中,主要采用的是木瓜蛋白酶与胰蛋白酶等^[5],未见到采用乳酸菌胞壁蛋白酶水解酪蛋白产生肽相关特性的研究进展。在乳杆菌胞壁蛋白酶分离纯化的研究方面,相关文献报道很少,国内曾有学者研究过乳酸乳球菌胞壁蛋白酶的分离纯化^[6],国外研究较多的也是直接对微生物胞壁蛋白酶粗提物进行相关特性分析,如Shin等^[7]曾对*Lactobacillus casei* ssp. *casei* LLG进行分离纯化,但未对酶解后的酪蛋白水解产物做相关功能性分析研究。

本实验主要通过对CEP进行分离纯化,同时用纯化后的CEP水解酪蛋白,进而研究酪蛋白水解物的(ACE)活性和清除 $O_2^{\cdot-}$ 的抗氧化活性,以对发酵乳的功能特性研究提供必要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

干酪乳杆菌由宁波大学曹光彪科技楼畜产品加工研究室分离,壁蛋白粗酶采用 Ca^{2+} -free法从干酪乳杆菌分离得到。

三羟甲基甘氨酸(分析纯)、十二烷基硫酸钠(电泳级)、邻苯三酚(分析纯) 阿拉丁试剂(上海)有限公司; Hippuryl-l-histidyl-l-leucine (HHL)、Angiotensin- I converting enzyme (ACE)、 α -酪蛋白、 β -酪蛋白 美国Sigma公司; 合成多肽MeOsuc-Arg-Pro-Tyr-pNA (MS-Arg) 日本和光纯药工业株式会社; DEAE Sephadex™ A-25 通用电气(中国)医疗集团; Sephadex G-100 上海博蕴生物有限公司。

1.2 仪器与设备

H-2050R 高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司; LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器 上海申安医疗器械厂; FE20PH计 梅特勒-托利多仪器有限公司; UV-4802 紫外-可见分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司; DKS-26 电热恒温水浴锅 宁波江南仪器有限公司; FD-1D-80 真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司; 垂直电泳仪 北京市六一仪器厂。

1.3 方法

1.3.1 DEAE-Sephadex A-25 层析^[8]

称适量DEAE-Sephadex A-25粉末,预处理完后装柱(26mm×50mm),用50mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH7.0)充分平衡,上样量为5mL(CEP含量为100mg/mL),流速为1mL/min,采用50mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH7.0)与0~1mol/L NaCl洗脱液进行线性梯度洗脱,收集280nm波长处的洗脱峰。

1.3.2 Sephadex G-100 凝胶层析

采用Sephadex G-100凝胶柱对DEAE-Sephadex A-25层析分离得到的胞壁蛋白酶进行再次纯化,过柱前,先用50mmol/L Tris-HCl缓冲液(pH8.3)充分平衡柱体,上样量为1mL(CEP含量为1mg),流速为1mL/min,收集280nm波长处的洗脱峰。

1.3.3 超滤方法

采用装有Ultracel-10超滤膜的Millipore Amicon Ultra-4超滤离心管(截留分子质量10kD)过滤Sephadex G-100凝胶层析后的蛋白酶样品,除去其中的盐分。超滤条件:装样5mL,4℃、3000×g离心30min。将分子质量大于10kD的浓缩液冷冻干燥处理备用。

1.3.4 酶活力测定^[9]

取0.05mL底物MeOsuc-Arg-Pro-Tyr-pNA (MS-Arg) (16.4mmol/L),酶液(20mg纯化冻干酶粉溶于1mL蒸馏水中)0.1mL,2.85mL Tris-HCl缓冲液(50mmol/L, pH7.0)混合,在37℃条件下保温60min。之后在410nm波长处测定吸光度。以蒸馏水代替酶液同样条件操作作为空白对照。酶活力单位定义为:37℃时,每分钟生成1μmol对硝基苯氨($\xi_{410nm} = 8800L/(mol \cdot cm)$)为一个酶活力单位。

1.3.5 电泳方法

采用Tris-Tricine缓冲液系统中的蛋白多肽分离电泳方法对DEAE-Sephadex A-25层析所得到的不同组分蛋白酶进行电泳分析^[10]。电泳条件:先在30V恒压下电泳1h,接着在150V恒压下电泳1.5~2h。用散热器将电泳缓冲液槽的温度维持在室温水平。然后进行染色成像^[11]。

1.3.6 酪蛋白水解方法

取150μL 20mg/mL酪蛋白溶液^[12](用50mmol/L Tris-HCl, pH7.5完全溶解)加入150μL CEP溶液(1mg/mL,用50mmol/L Tris-HCl, pH7.5完全溶解),在37℃分别水解4、6、8h,然后再加入12.5μL体积分数25%三氟乙酸(TFA,最终体积分数1%),停止反应^[13]。将水解液放入-41℃冰箱里保存,用以测定ACE抑制活性。

1.3.7 ACE抑制活性测定

采用Cushman等^[14]的方法做适当改进。用含有0.3mol/L NaCl的0.1mol/L硼酸盐缓冲液(pH8.3)将Hip-His-Leu配成5.0mmol/L的溶液。在10mL试管中加入200μL的5.0mmol/L Hip-His-Leu溶液和80μL样品(1.3.6节中的水解产物),于37℃条件下保温3min后,再加入20μL ACE溶液(溶解于蒸馏水中,酶活力为0.1U/mL),混匀后在37℃条件下保温30min,加入250μL的1.0mol/L盐酸溶液以终止反应,加入1.7mL醋酸乙酯,经15s振荡混匀后,静置5min,用移液管吸取1.0mL醋酸乙酯层,100℃恒温加热板上烘干,加入2.0mL蒸馏水,混匀后在228nm波长处测定吸光度。

$$\text{ACE抑制率}/\% = \frac{A_1 - A}{A_1} \times 100 \quad (1)$$

式中: A 为添加 ACE 抑制肽时, ACE 和 Hip-His-Leu 反应的吸光度; A_1 为不添加 ACE 抑制肽时, ACE 和 Hip-His-Leu 反应的吸光度。

1.3.8 $O_2^{\cdot-}$ 的清除能力测定

将 CEP-2 水解的酪蛋白多肽配制成 0.004688、0.009375、0.01875、0.0375、0.075、0.15mg/mL 溶液^[15]。取 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.2) 4.5mL, 置 25℃ 水浴中保温 20min, 分别加入 1mL 多肽液和 0.4mL 25mmol/L 邻苯三酚溶液, 混匀后于 25℃ 水浴中反应 5min, 加入 1mL 8mmol/L HCl 终止反应, 于 299nm 波长处测定吸光度(A_x), 空白对照组用蒸馏水^[16-17]。

$$\text{清除率}/\% = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_0 为空白对照液吸光度; A_x 为样品溶液吸光度。

2 结果与分析

2.1 粗蛋白的提纯

采用离子交换层析分离技术, 将从 *L.casei* 中提取的 CEP 进行提纯分离, 以获得相对较纯的 CEP, 同时作电泳验证和酶活力测定。

2.1.1 DEAE-Sephadex A-25 离子交换柱层析

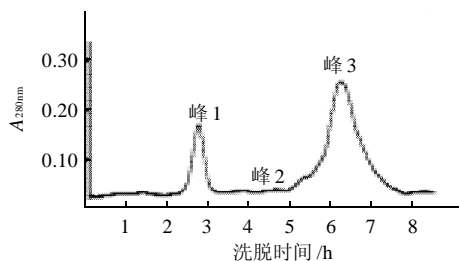
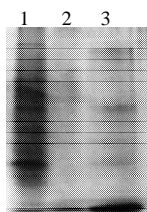


图1 粗酶经 DEAE Sephadex A-25 离子交换柱洗脱曲线
Fig.1 Elution curve of crude CEP on DEAE Sephadex A-25 column

由图 1 可知, 经过硫酸铵盐析后的粗酶液经过 DEAE-Sephadex A-25 分离后有 3 个峰, 峰 2 在 280nm 波长处的吸光度很低, 仅有 0.06, 峰 1 的吸光度为 0.17, 峰 3 的吸光度为 0.26。

2.1.2 活性胶 CEP 分离效果验证



1. DEAE-Sephadex A-25 分离后峰 1 组分; 2. DEAE-Sephadex A-25 分离后峰 2 组分; 3. DEAE-Sephadex A-25 分离后峰 3 组分。

图2 CEP 组分的活性胶电泳图
Fig.2 Native PAGE of three CEP fractions

离子交换层析分离后各组分的电泳图如图 2 所示, 可以看出, 峰 1 和峰 3 的组分中出现了颜色很深的条带, 峰 2 的电泳条带很淡。各组分的酶活力及酶比活力如表 1 所示。可以看出, 峰 1、3 组分的酶比活力较高。所以选择酶活力相对较高的峰 1、3 组分进行下一步分离纯化。

表1 DEAE Sephadex A-25 离子交换层析后 CEP 各组分的酶活性
Table 1 ACE inhibitory activity of three CEP fractions

组分	峰 1	峰 2	峰 3
A_{410nm}	0.005	0.002	0.008
酶比活力/(U/mg)	10.42	4.17	16.67

2.1.3 Sephadex G-100 凝胶层析

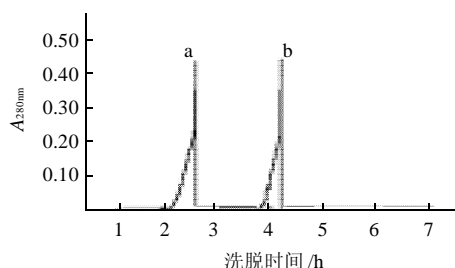


图3 峰3经 Sephadex G-100 凝胶层析柱洗脱曲线
Fig.3 Elution curve of CEP 3 on Sephadex G-100 column

根据酶活力的高低与电泳结果, 对经过 DEAE-A-25 分离得到的峰 3 成分进行凝胶层析, 由图 3 可知, 峰 3 成分中存在两种 CEP 成分, 分别命名为 CEP-1(峰 a)与 CEP-2(峰 b), 测定其酶比活力分别为 12.50U/mg (CEP-1) 和 16.67U/mg(CEP-2), 结果见表 2。

表2 干酪乳杆菌胞壁蛋白酶的纯化过程
Table 2 Summary of separation and purification procedures of CEP from *Lactobacillus casei* cells

纯化步骤	蛋白 含量/mg	酶活 力/U	酶比活 力/(U/mg)	回收 率/%	提纯 倍数	
粗酶	250	62.5	0.25	100	1	
DEAE-Sephadex A-25	峰 1	1.2	12.54	10.42	20.06	41.68
	峰 2	0.42	1.75	4.17	2.8	16.68
	峰 3	2.9	48.34	16.67	77.34	66.68
Sephadex G-100	CEP-1	1.3	16.25	12.50	33.61	50
	CEP-2	1.6	26.67	16.67	55.17	66.68

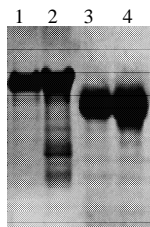
2.1.4 超滤脱盐

根据电泳分析结果, 可见组分的蛋白纯度是比较高的, 采用 10kD 的超滤离心管进行脱盐处理, 然后进行冷冻干燥, 得到脱盐后的纯品 CEP, 放入 -41℃ 的冰箱里保藏。

2.2 水解酪蛋白产物相关特性研究

对得到的 CEP 酶进行相关特性方面的分析, 包括水解酪蛋白特性及水解酪蛋白后得到的多肽的功能性分析, 如抗 ACE 活性及抗氧化性。

2.2.1 不同 CEP 对 α -酪蛋白和 β -酪蛋白水解特性的影响



1. CEP-1 水解 α -酪蛋白的水解产物; 2. CEP-2 水解 α -酪蛋白的水解产物; 3. CEP-1 水解 β -酪蛋白的水解产物; 4. CEP-2 水解 β -酪蛋白的水解产物。

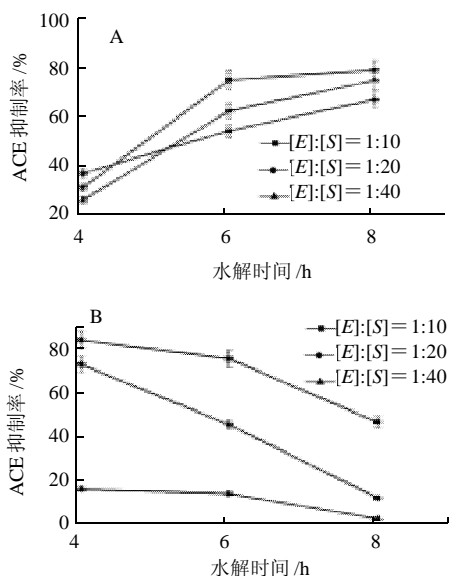
图4 不同 CEP 组分水解 α -酪蛋白和 β -酪蛋白的电泳分析

Fig.4 Tricine PAGE of α -casein hydrolysates and β -casein hydrolysates prepared with CEP-1 and CEP-2

在 CEP 对酪蛋白的水解特性研究中, 采取了蛋白多肽电泳分离的 Tricine 胶电泳方法。图 4 为不同 CEP 组分水解 α -酪蛋白和 β -酪蛋白 8h 的水解液电泳分析。由图 4 可知, CEP-2 对 α -酪蛋白和 β -酪蛋白的水解度较高, 其中条带粗、颜色较深的为未被 CEP 水解的酪蛋白。

2.2.2 酪蛋白水解肽的抗 ACE 活性研究

根据上述的水解条件, 同时结合酶与底物比这个因素, 在水解多肽的抗 ACE 活性研究中, 主要从酶种类、酶与底物比、水解时间 3 个因素进行分析。

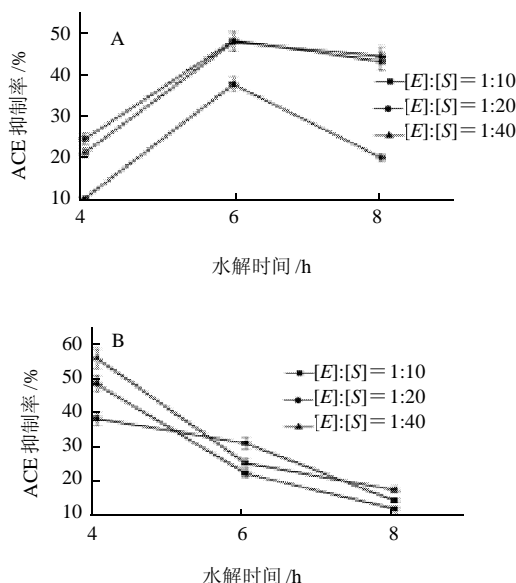


A. CEP-1 水解 α -酪蛋白; B. CEP-2 水解 α -酪蛋白。

图5 不同条件下 α -酪蛋白水解产物的抗 ACE 活性

Fig.5 Effect of enzyme/substrate ratio on ACE inhibitory rate of α -casein hydrolysates as a function of hydrolysis time

由图 5 可知, 在水解 α -酪蛋白获得抗 ACE 肽的能力上, CEP-1 水解 α -酪蛋白在 6~8h 内可以获得较好的效果, 而 CEP-2 水解 α -酪蛋白在 4~6h 内得到的结果较为显著; 同时发现, 酶与底物质量比为 1:10 时, α -酪蛋白的水解产物有较高的 ACE 抑制活性, 1:20 次之, 1:40 最差。对比 α -酪蛋白水解产物的 ACE 抑制活性, 最高的抑制活性条件为采用 CEP-1 酶解 6h, 酶与底物质量比为 1:10 时, ACE 抑制活性为 84.66%。



A. CEP-1 水解 β -酪蛋白; B. CEP-2 水解 β -酪蛋白。

图6 不同条件下 β -酪蛋白水解产物的抗 ACE 活性

Fig.6 Effect of enzyme/substrate ratio on ACE inhibitory rate of β -casein hydrolysates as a function of hydrolysis time

由图 6 可知, CEP 在水解 β -酪蛋白获得抗 ACE 肽的能力上, 类似于 α -酪蛋白, CEP-1 为 6~8h, CEP-2 为 4~6h; 在底物质量浓度水平上, 发现当酶与底物质量比为 1:40 时, 得到的水解肽有较高的抑制活性。比较图 5 和图 6, 当采用 CEP-2 水解 β -酪蛋白, 水解 4h, 酶与底物质量比为 1:40 时, 测定 ACE 抑制活性为 56.66%。

同时对比图 5 与图 6 中 4 条曲线发现 CEP-2 水解 α -酪蛋白可以得到很高的 ACE 抑制活性, 最高可达 84.66%。

2.2.3 酪蛋白水解肽的 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力

根据不同酪蛋白水解物在不同条件的 ACE 抑制活性, 采用 CEP-2 酶对酪蛋白进行水解, 并测定水解产物的 $O_2^{\cdot-}$ 清除能力。具体水解条件如下: α -酪蛋白的酶与底物质量比为 1:10, 水解时间 6h; β -酪蛋白的酶与底物质量比为 1:40, 水解时间为 4h。

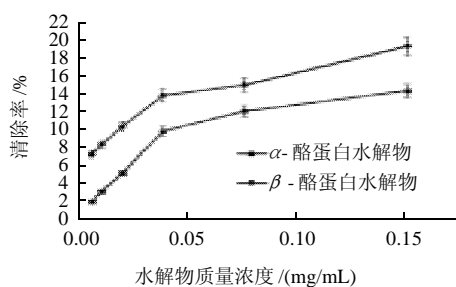


图7 α -和 β -酪蛋白水解物质量浓度对 $O_2^{\cdot -}$ 清除率的影响
Fig.7 Dose-dependent superoxide anion radical scavenging effects of α -casein hydrolysate and β -casein hydrolysate prepared with CEP-2

由图7可知, $O_2^{\cdot -}$ 的清除能力随酪蛋白水解液质量浓度的增加而增加, 并且在0.004688~0.0375mg/mL的质量浓度范围内, 水解产物的质量浓度与 $O_2^{\cdot -}$ 清除率呈良好的线性关系。通过计算得知, α -酪蛋白水解产物清除 $O_2^{\cdot -}$ 的 IC_{50} 为0.2017mg/mL, β -酪蛋白水解产物清除 $O_2^{\cdot -}$ 的 IC_{50} 为0.2138mg/mL。最佳的 $O_2^{\cdot -}$ 清除率来自 β -酪蛋白水解产物, 清除率为19.65%。

3 结 论

3.1 通过DEAE-Sephadex A-25和Sephadex G-100分离, 得到了CEP-1与CEP-2两种胞壁蛋白酶, 其酶活力分别为12.50U/mg和16.67U/mg。且CEP-1提纯倍数达到50, 回收率为33.61%; CEP-2提纯倍数为66.68, 回收率55.17%。

3.2 在CEP水解酪蛋白实验中, 得到了CEP水解酪蛋白的最佳水解条件, α -酪蛋白水解产物的ACE抑制活性为84.66%; β -酪蛋白水解产物的ACE抑制活性为56.66%。

3.3 α -酪蛋白水解产物清除 $O_2^{\cdot -}$ 的 IC_{50} 为0.2017mg/mL, β -酪蛋白水解产物清除 $O_2^{\cdot -}$ 的 IC_{50} 为0.2138mg/mL。最佳的 $O_2^{\cdot -}$ 清除率来自 β -酪蛋白水解产物, 清除率为19.65%。

3.4 今后对于酪蛋白源ACE与抗氧化肽的研究, 可以利用2D胶电泳, 做蛋白组学研究, 也可以通过高效液相色谱分离来分析相关活性肽, 并进一步做肽分子特性等相关研究工作。

参考文献:

- [1] TAKANO T. Milk derived peptides and hypertension reduction[J]. International Dairy Journal, 1998, 8(5/6): 375-381.
- [2] MARUGG J, van KRANENBURG R, LAVERMAN P, et al. Identical transcriptional control of the divergently transcribed *prtP* and *prtM* genes that are required for proteinase production in *Lactococcus lactis* SK11[J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(6): 1525-1531.
- [3] 吴正钧, 叶锦, 郭本恒. 乳酸菌的抗高血压作用[J]. 乳业科学与技术, 2004(1): 1-8.
- [4] 潘超, 王鹏, 朱斌. 酶解动物蛋白制备抗氧化多肽研究进展[J]. 肉类工业, 2010(4): 27-29.
- [5] 陈东平, 牟光庆. 不同分子量酪蛋白肽对自由基清除作用研究[J]. 中国酿造, 2010(4): 33-35.
- [6] 郭宇星, 潘道东. 乳酸乳球菌细胞壁蛋白酶的分离纯化[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 388-391.
- [7] SHIN J Y, JEON W M, KIM G B, et al. Purification and characterization of intracellular proteinase from *Lactobacillus casei* ssp. *casei* LLG[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87(12): 4097-4103.
- [8] 胡铁红, 郭建林, 徐存拴. 离子交换层析初步分离大鼠肝蛋白水解酶、ADAMs、ACP、AKP和PCNA[J]. 动物学报, 2001, 47(增刊1): 217-222.
- [9] FERNÁNDEZ DE PALENCIA P, PELÁEZ C, MARTÍN-HERNÁNDEZ M C. Specificity of the bound and free forms of the cell envelope proteinase of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL 731 towards the α -casein-(1-23)-fragment[J]. Letters in Applied Microbiology, 1997, 25(6): 388-392.
- [10] COLIGAN J E, DUNN B M, PLOEGH H L, et al. 精编蛋白质科学实验指南[M]. 李慎涛, 译. 北京: 科学出版社, 2007: 297-299.
- [11] HÉBERT E M, RAYA R R, GIORI G S. Characterisation of a cell-envelope proteinase from *Lactobacillus helveticus*[J]. Biotechnology Letters, 1999, 21(9): 831-834.
- [12] TSAKALIDOU E, ANASTASIOU R, VANDENBERGHE I, et al. Cell-wall-bound proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ACA-DC178: characterization and specificity for β -casein[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(5): 2035-2040.
- [13] HÉBERT E M, MAMONE G, PICARIELLO G, et al. Characterization of the pattern of α - and β -casein breakdown and release of a bioactive peptide by a cell envelope proteinase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CRL 581[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(12): 3682-3689.
- [14] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20(7): 1637-1648.
- [15] 欧晓峰, 张建新, 郭倩, 等. 复合酶法水解大麦虫蛋白制备酸性多肽及其抗氧化活性[J]. 西北农业学报, 2010, 19(2): 189-193.
- [16] 周婷婷, 李燕, 宋斐. 抗氧化大豆多肽制备的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(3): 281-284.
- [17] 罗文锋, 吴新良, 郭勇. 酶解对乌骨鸡多肽抗氧化活性影响的研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(4): 180-182.