

蚕蛹抗氧化肽的制备及其体外抗氧化活性评价

卢楠, 廖鲜艳, 翁新楚, 宋红生
(上海大学 生命科学院, 上海 200444)

摘要: 为更客观地评价蚕蛹抗氧化肽的抗氧化能力, 以人工胃肠模拟液对不同蛋白酶酶解物的抗氧化能力进行评价, 优选获得最佳的制备用酶——碱性蛋白酶. 在此基础上, 以蚕蛹抗氧化肽总还原能力为指标, 利用响应曲面法(response surface method, RSM)优化碱性蛋白酶制备蚕蛹抗氧化肽的最佳酶解工艺. 结果表明: 碱性蛋白酶的最佳酶解条件为 pH=8.30, 加酶量为 15.34 μL (1 902 U), 温度为 50.47 $^{\circ}\text{C}$, 时间为 2.45 h; 在此条件下优化预测得到的 2 mg 蚕蛹蛋白/mL 酶解液的总还原能力为 0.434, 蚕蛹抗氧化肽对 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH \cdot 自由基的半数清除率 IC_{50} 分别为 4.51 与 4.24 mg/mL.

关键词: 响应曲面法; 蚕蛹蛋白; 酶解; 抗氧化肽

中图分类号: TS 201.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-2861(2013)02-0215-06

Preparation of Antioxidant Peptides from Silkworm Pupae Protein and Evaluation of Activities *in vitro*

LU Nan, LIAO Xian-yan, WENG Xin-chu, SONG Hong-sheng
(School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: Alkaline protease was chosen by the effect of gastrointestinal fluid simulation which was used to predict the activity *in vivo* of silkworm pupae protein. Response surface method (RSM) was employed to optimum the optimal alkaline protease enzymolysis procedure of silkworm pupae protein for antioxidant peptides with high reducing power. Antioxidant activity of enzymolysates was assessed with reducing power and scavenging effects against $\cdot\text{OH}$ and DPPH \cdot radicals. Results show that the optimum conditions are as follows: pH at 8.30, quantity of alkaline protease at 15.34 μL (1 902 U), temperature at 50.47 $^{\circ}\text{C}$ and time at 2.45 h. Under the optimum conditions, the predicted total reducing power of 2.0 mg silkworm pupae protein/mL enzymolysates was 0.434. On the basis of the optimum conditions of the enzymolysates, the half-scavenging concentration IC_{50} values of $\cdot\text{OH}$ and DPPH \cdot radicals were 4.51 and 4.24 mg/mL respectively.

Key words: response surface method (RSM); silkworm pupae protein; enzymolysis; antioxidant peptides

我国鲜蚕蛹年产量可达 50 万 t, 占世界总茧量的 70%, 烘干后可得干蚕蛹 12 万 t^[1]. 一直以来, 蚕蛹的加工利用率极低, 除少数经烘干粉碎作为营养添加剂外, 多数用作饲料甚至肥料, 还有很多被废弃, 造成资源的巨大浪费. 据分析, 蚕蛹的蛋白含量高, 氨基酸种类齐全, 缂丝后干蚕蛹中的水分占总质量的 11.28%, 粗脂肪、粗蛋白各占其干重的 20.77% 和 70.69%, 14 种氨基酸的总含量为 59.68 mg/100 g, 8 种必需氨基酸的含量占蚕蛹所含氨基酸总量的 49.65%, 必需氨基

酸与非必需氨基酸含量的比值为 0.99^[2]. 可见, 蚕蛹是一种优良的活性肽源.

生物活性肽是近年来研究的热点. 已有研究发现, 植物蛋白、动物蛋白以及微生物蛋白中能水解分离出血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制肽^[3]、抗菌肽^[4]以及抗氧化肽^[5]等生物活性肽. 杨安树等^[6]酶解蚕蛹得到了免疫活性肽, 吴琼英等^[7]、贾俊强等^[8]酶解蚕蛹得到了 ACE 抑制肽. 闵建华^[9]、粟晖等^[10]、朱新鹏^[11]以水解度(degree of

收稿日期: 2012-02-20

基金项目: 上海市教委重点学科建设资助项目(J50108); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金资助项目(SHU09063)

通信作者: 廖鲜艳(1975—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品营养与功能. E-mail: zbwxy1@gmail.com

hydrolysis, DH)为指标,肖燕平等^[12]、李高扬等^[13]、赵钟兴等^[14]以 DPPH·自由基清除能力为指标,分别研究了蚕蛹蛋白酶解制备抗氧化肽的最优条件.但这些研究都存在一些问题,如没有考虑到活性肽在胃肠中的稳定性,水解度不能直接反应抗氧化效果, DPPH·自由基清除能力测定过程中所用的乙醇易使活性肽变性,导致测定结果可能存在偏差等.本研究对在人工胃肠模拟液中不同酶的酶解产物的抗氧化能力进行了评价,优选获得了最佳的制备用酶——碱性蛋白酶,以总还原能力为指标直观评价了抗氧化肽的抗氧化效果;采用 RSM 分析得出了碱性蛋白酶的最佳酶解条件;以谷胱甘肽(glutathione, GSH)、维生素 C(vitamin C, VC)为阳性对照,对蚕蛹抗氧化肽进行了体外抗氧化评价,以期为工业生产抗氧化肽提供实验依据,也为蚕蛹资源的回收利用提供思路.

1 材料与方 法

1.1 实验试剂与材料

碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L FG (根据 SB/T 10317—1999,测得酶的活性为 124 000 U/mL)购自诺维信(中国)投资有限公司;干蚕蛹由安徽省霍山县丝绸厂提供;2,2-二苯基苦基苯肼(DPPH)购自美国Sigma公司;谷胱甘肽(GSH)购自沃凯有限公司;其他试剂均为分析纯,购自国药集团上海化学试剂公司.

1.2 实验方法

1.2.1 蚕蛹蛋白粉的制备工艺

干蚕蛹油脂含量约为 30%^[15],蚕蛹蛋白的水解度与蚕蛹油脂的残留量成负相关.为避免油脂影响蚕蛹蛋白的水解,本研究采用二步索氏脱脂法制备蚕蛹蛋白,具体步骤如下:干蚕蛹去杂→清洗→烘干→使用石油醚(60~90 °C)第一次脱脂 12 h,残油率为 10.61%→挥发→粉碎→过筛→使用正己烷(72 °C)第二次脱脂 12 h,残油率为 2.69%→乙醇水洗→挥发烘干→得到浅褐色基本无腥味的蚕蛹蛋白粉.

1.2.2 蚕蛹蛋白的酶解过程

称取 0.5 g 蚕蛹蛋白粉,用 10 mL 磷酸盐缓冲液溶解,热处理(80 °C, 15 min)后冷却,加蛋白酶,放入恒温振荡器(100 r/min)中酶解.酶解一定时间后灭活(100 °C, 10 min),倒入 10 mL 离心管中离心(3 000 r/min) 20 min 后,上清液稀释定容至 25 mL,即制得浓度为 2 mg 蚕蛹蛋白/mL 酶解液的待测样品.

1.2.3 蚕蛹抗氧化肽制备的单因素实验

在单因素实验前,对木瓜蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶进行了筛选.4 种蚕蛹抗氧化肽冷冻干燥后,经 5 mL 人工胃液(量取稀 HCL

16.4 mL,加水约 800 mL,加胃蛋白酶 10 g,摇匀后加水稀释至 1 000 mL) 37 °C 保温 10 min 处理,冷冻干燥,再经 5 mL 人工肠液(KH₂PO₃ 6.8 g 加水 500 mL 溶解,用 0.4% NaOH 溶液调节 pH 值至 6.8,另取胰蛋白酶 10 g 加适量水溶解,将两种溶液混合后加水稀释至 1 000 mL) 37 °C 保温 10 min 后,冷冻干燥,比较其总还原能力.结果发现,碱性蛋白酶结合人工胃肠液处理,其总还原能力最佳.因此,后续实验中选用碱性蛋白酶对蚕蛹蛋白进行酶解,以获得抗氧化肽.

以总还原能力为指标评价酶解工艺,分别研究了 pH 值、酶解温度、加酶量、酶解时间对酶解制备蚕蛹抗氧化肽工艺的影响.

1.2.4 蚕蛹抗氧化肽制备的 RSM 分析

在单因素实验的基础上,以总还原能力为响应值,设计 4 因素 3 水平共 29 个实验点的 RSM 分析实验,对工艺条件进行了进一步的优化,实验安排如表 1 所示.实验重复次数为 3 次,采用 Design Expert 7 对实验数据进行方差分析和显著检验分析.

表 1 RSM 实验设计因素及水平

Table 1 Factors and levels of RSM experimental design

因素	水平		
	-1	0	1
pH	7	8	9
加酶量/ μ L	5	15	25
酶解温度 t / $^{\circ}$ C	45	50	55
酶解时间/h	1	2	3

1.2.5 体外抗氧化活性测定

1.2.5.1 总还原能力测定

取 0.5 mL 不同浓度待测样品与 2.5 mL 磷酸盐缓冲液、2.5 mL K₃Fe(CN)₆ 溶液充分混合,于 50 °C 水浴中保温 20 min.快速冷却,加入 2.5 mL 三氯乙酸溶液,迅速混匀,4 000 r/min 离心 10 min.取 2.5 mL 上清液与 2.5 mL 蒸馏水、0.5 mL FeCl₃ 溶液混合反应 10 min 后,于 700 nm 处测定其吸光度值^[16],空白对照为蒸馏水,阳性对照为 GSH, VC.吸光度值越高,说明所测定样品的还原力越强.

1.2.5.2 对·OH 自由基清除作用的测定

在 5 mL 试管中依次加入 6 mmol/L 硫酸亚铁溶液 1 mL、不同浓度的蚕蛹抗氧化肽溶液 1 mL、6 mmol/L 双氧水溶液 1 mL,摇匀后静置 10 min,再加入 6 mmol/L 水杨酸溶液 1 mL,摇匀后静置 30 min,于 510 nm 处测定其吸光度值 A_{510} ^[17](以 GSH, VC 为阳性对照).因此,·OH 自由基清除率的具体计算公

式为

$$\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_s - A_x}{A_0}\right) \times 100\%,$$

式中, A_0 为不加样品液的吸光度值, A_s 为加入样品溶液反应后的吸光度值, A_x 为不加水杨酸溶液的吸光度值。

1.2.5.3 DPPH·自由基清除能力的测定

取不同浓度的蚕蛹抗氧化肽样品 0.1 mL, 加入 1×10^{-4} mol/L DPPH·无水乙醇溶液 2.8 mL, 混匀后在室温下避光反应 0.5 h, 于 517 nm 处测定吸光度值 A_m 。空白组以等体积无水乙醇溶液代替 DPPH·溶液, 测得吸光度值 A_n 。对照组以等体积蒸馏水代替样品溶液, 测得吸光度值 A_0 。该测定试验以等体积蒸馏水和无水乙醇混合液空白调零^[18], 以 GSH, VC 为阳性对照。因此, DPPH·自由基清除率的计算公式为

$$\text{清除率}/\% = \left(1 - \frac{A_m - A_n}{A_0}\right) \times 100\%.$$

2 结果与分析

2.1 单因素实验分析

单因素实验的结果如图 1 所示。由图 1(a) 可见, 在酶解温度为 50 °C, 酶用量为 30 μL, 酶解时间为 3 h 的条件下, 当 pH < 8 时, 蚕蛹抗氧化肽的总还原力随着 pH 值的增大而增大; 当 pH = 8 时, 蚕蛹抗氧化肽的总还原力达到最大, 之后随着 pH 值的增大而有所

降低。由图 1(b) 可见, 在酶用量为 30 μL, pH 值为 8, 酶解时间为 3 h 的条件下, 酶解的最适温度为 50 °C; 超过 55 °C 时, 总还原能力迅速下降, 这可能是因为酶解温度超过了酶的最适温度范围, 而造成酶的活性下降。由图 1(c) 可见, 在 pH 值为 8, 酶解温度为 50 °C, 酶解时间为 3 h 的条件下, 总还原能力随着加酶量的增加而增大。当加酶量比较少时, 总还原能力随酶量的增加而较快上升; 当加酶量达到 15 μL 时, 随着酶量的增加, 总还原力有所增大, 但是也相应增加了成本。由图 1(d) 可见, 在 pH 值为 8, 酶解温度为 50 °C, 酶用量为 15 μL 的条件下, 总还原能力随酶解时间的延长逐渐增大, 其中在 2 h 内上升较快, 2 h 后随着酶解时间的延长略有下降。

2.2 酶解工艺条件的优化

采用 RSM 分析, 对 pH 值、酶解温度、加酶量和酶解时间 4 因素 3 水平的实验结果如表 2 所示。

应用 Design Expert 7 统计分析软件对 29 个实验点的响应面进行回归分析, 得到如下总还原能力的二次多元回归方程 (模型):

$$\begin{aligned} \text{OD}_{700} = & 0.4232 + 0.006X_1 + 0.001667X_2 + \\ & 0.001667X_3 + 0.0035X_4 + 0.0005X_1X_2 + 0.002X_1X_3 + \\ & 0.007X_1X_4 - 0.007X_1X_4 - 0.002X_2X_3 - 0.0005X_3X_4 - \\ & 0.01518X_1^2 - 0.00943X_2^2 - 0.01043X_3^2 - 0.00618X_4^2, \end{aligned}$$

式中, X_1 为 pH 值, X_2 为加酶量, X_3 为酶解温度, X_4 为酶解时间。

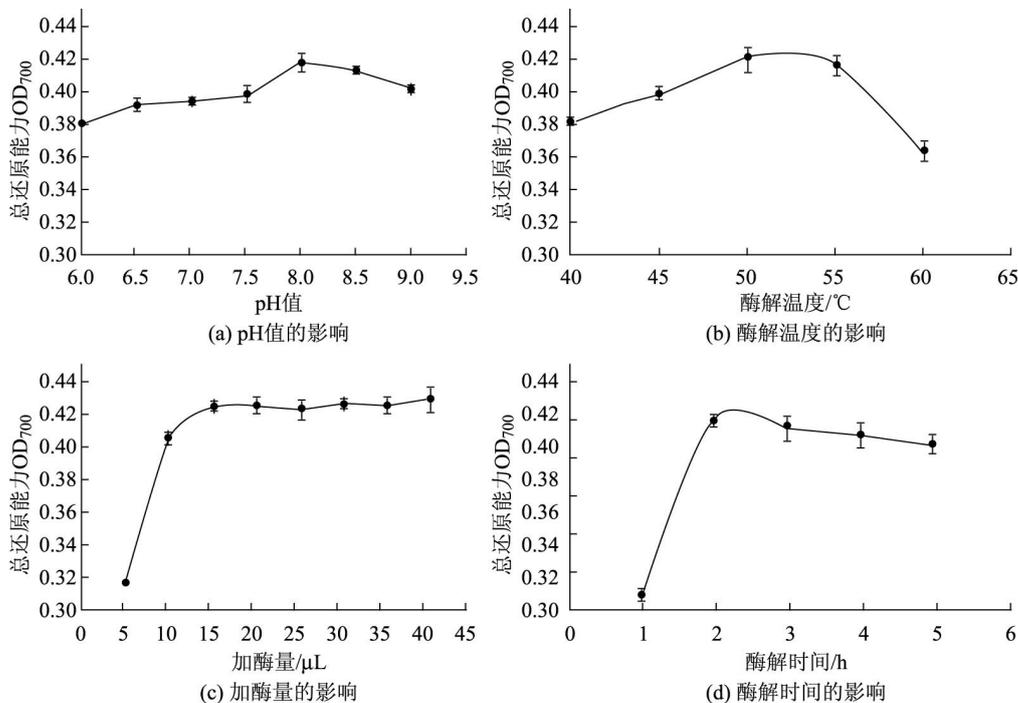


图 1 单因素对蚕蛹抗氧化肽总还原能力的影响

Fig. 1 Effect of single factor on reducing power of silkworm pupae peptides

对该模型进行方差分析, 结果如表 3 所示. 可以看出, $P_{\text{模型}} < 0.000 1$ 表明模型极显著, $P_{\text{失拟}}$ 为 $0.075 8 > 0.05$ 表明模型失拟度不显著. 由回归方程系数显著性检验可知, 一次项 A 与 D 显著, 二次项 A^2 , B^2 , C^2 , D^2 均显著, 交互项 AD 显著. 各因素对总还原能力的

影响顺序依次为 $\text{pH值} > \text{时间} > \text{温度} = \text{加酶量}$. 模型的绝对系数 $R^2 = 0.956 5$, 说明该模型能解释 95.65% 响应值的变化. 因此, 该模型拟合程度良好, 实验误差较小, 可以用此模型对碱性蛋白酶制备的蚕蛹抗氧化肽的总还原能力进行分析和预测. 这与贾俊强等^[8]

表 2 实验设计及结果

Table 2 Experimental design and results

实验号	pH 值	加酶量/ μL	酶解温度/ $^{\circ}\text{C}$	酶解时间/h	OD ₇₀₀	实验号	pH 值	加酶量/ μL	酶解温度/ $^{\circ}\text{C}$	酶解时间/h	OD ₇₀₀
1	8	25	50	1	0.408±0.10	16	8	25	50	3	0.411±0.02
2	8	25	55	2	0.403±0.03	17	9	15	55	2	0.410±0.06
3	8	15	55	1	0.405±0.09	18	8	5	55	2	0.402±0.05
4	9	5	50	2	0.406±0.11	19	8	15	50	2	0.423±0.03
5	8	25	45	2	0.407±0.03	20	9	15	50	3	0.417±0.04
6	9	15	45	2	0.397±0.04	21	8	15	45	3	0.412±0.01
7	7	15	55	2	0.395±0.02	22	7	15	50	1	0.397±0.07
8	7	25	50	2	0.393±0.04	23	8	15	50	2	0.426±0.03
9	7	15	50	3	0.391±0.11	24	8	5	50	3	0.412±0.05
10	8	5	50	1	0.401±0.03	25	9	15	50	1	0.395±0.06
11	8	15	50	2	0.422±0.04	26	8	15	55	3	0.410±0.08
12	9	25	50	2	0.407±0.07	27	8	15	50	2	0.423±0.03
13	8	5	45	2	0.394±0.07	28	8	15	50	2	0.422±0.04
14	8	15	45	1	0.405±0.11	29	7	5	50	2	0.394±0.02
15	7	15	45	2	0.390±0.04						

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 比值	P 值	显著性
模型	30.03E-4	14	2.14E-4	22.005 240	< 0.000 1	显著
A(pH)	4.32E-4	1	4.32E-4	44.318 510	< 0.000 1	显著
B(加酶量)	3.33E-5	1	3.33E-5	3.419 638	0.085 6	不显著
C(酶解温度)	3.33E-5	1	3.33E-5	3.419 638	0.085 6	不显著
D(酶解时间)	1.47E-4	1	1.47E-4	15.080 610	0.001 7	显著
AB	1.00E-6	1	1.00E-6	0.102 589	0.753 5	不显著
AC	1.60E-5	1	1.60E-5	1.641 426	0.220 9	不显著
AD	1.96E-4	1	1.96E-4	20.107 470	0.000 5	显著
BC	3.60E-5	1	3.60E-5	3.693 210	0.075 2	不显著
BD	1.60E-5	1	1.60E-5	1.641 426	0.220 9	不显著
CD	1.00E-6	1	1.00E-6	0.102 589	0.753 5	不显著
A ²	14.95E-4	1	14.95E-4	153.407 000	< 0.000 1	显著
B ²	5.77E-4	1	5.77E-4	59.216 310	< 0.000 1	显著
C ²	7.06E-4	1	7.06E-4	72.436 450	< 0.000 1	显著
D ²	2.48E-4	1	2.48E-4	25.442 300	0.000 2	显著
残差	1.36E-4	14	9.75E-6	—	—	—
失拟	1.26E-4	10	1.26E-5	4.654 321	0.075 8	不显著
误差	1.08E-5	4	2.70E-6	—	—	—
总和	31.39E-4	28	—	—	—	—
模型的绝对系数 R^2				0.956 500		
模型的调整绝对系数 $\text{Adj-}R^2$				0.913 100		

采用 RSM 分析酶解蚕蛹蛋白制备 ACE 抑制肽的模型相似, 各因素对制备 ACE 抑制肽的活性影响程度由大到小依次为 pH 值>酶解温度>加酶量. 因此, 蚕蛹酶解得到的多肽的抗氧化效果与 ACE 的抑制效果有正相关性.

为了进一步验证最佳点的值, 对回归方程取一阶偏导等于 0, 得到最优酶解条件如下: pH=8.30, 加酶量为 15.34 μL , 温度为 50.47 $^{\circ}\text{C}$, 时间为 2.45 h. 在此条件下, 预测得到的酶解产物的总还原能力最高为 0.434, 蚕蛹抗氧化肽的得率为 64.46%.

为了确保在以上几组实验基础上所建立的回归模型的准确性, 对不同条件进行了预测, 并与实验数据进行了比较, 结果如表 4 所示. 可见, 实验值和预测值的相对偏差小于 5%, 证明该模型有效, 可以用于预测蚕蛹抗氧化肽的总还原能力.

表 4 响应面二次回归模型验证实验

Table 4 Validation of response surface quadratic model

实验号	pH 值	加酶量/ μL	酶解温度/ $^{\circ}\text{C}$	酶解时间/h	OD ₇₀₀	
					预测值	实验值
1	8.0	15	50	2.5	0.423 4	0.422
2	8.5	15	50	2.5	0.424 4	0.426
3	8.5	20	50	2.5	0.422 5	0.423

2.3 体外抗氧化活性测定

当蚕蛹抗氧化肽浓度为 1.0~3.0 mg/mL、阳性对照 GSH 和 VC 的浓度分别为 0.1~0.9, 0.02~0.10 mg/mL 时, 总还原能力(吸光度从 0~1.0)与这三者呈良好线性关系. 比较总还原能力强弱时发现: VC>GSH> 蚕蛹抗氧化肽.

蚕蛹抗氧化肽对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率在 1~10 mg/mL 蚕蛹抗氧化肽浓度范围内, 且随着浓度的增加而升高, 其半数清除率 IC_{50} 为 4.51 mg/mL. 阳性对照 GSH 在 1~5 mg/mL 浓度范围内与 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除率呈良好线性关系, IC_{50} 为 2.53 mg/mL. VC 在 0.1~1.0 mg/mL 浓度范围内与 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除率呈良好线性关系, IC_{50} 为 0.50 mg/mL (见表 5). 比较 $\cdot\text{OH}$ 自由基清除能力发现: VC>GSH> 蚕蛹抗氧化肽. 这与文献 [9] 报道的碱性蛋白酶酶解制备的蚕蛹抗氧化肽的半数清除率相同.

DPPH \cdot 自由基清除率在 3~9 mg/mL 蚕蛹抗氧化肽浓度范围内呈良好线性关系, 其 IC_{50} 为 4.24 mg/mL. 阳性对照 GSH 对 DPPH \cdot 自由基的 IC_{50} 为 4.65 mg/mL, VC 的 IC_{50} 为 0.03 mg/mL (见表 5). 比较 DPPH \cdot 自由基清除能力发现: VC> 蚕蛹抗氧化肽 >GSH.

表 5 蚕蛹抗氧化肽对 $\cdot\text{OH}$ 和 DPPH \cdot 自由基的半数清除率

Table 5 IC_{50} values of $\cdot\text{OH}$ and DPPH \cdot free radicals scavenging activity of silkworm pupae peptides $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

	IC_{50}		
	蚕蛹抗氧化肽	GSH	VC
$\cdot\text{OH}$ 自由基	4.51	2.53	0.50
DPPH \cdot 自由基	4.24	4.65	0.03

3 结束语

对蚕蛹蛋白用碱性蛋白酶酶解制备蚕蛹抗氧化肽的影响因子: pH 值、温度、加酶量、酶解时间进行了 4 因素 3 水平的 RSM 分析实验. 实验结果表明: 各因素对总还原能力的影响顺序依次为 pH> 水解时间> 温度=加酶量; 最适水解条件为 pH=8.30, 加酶量为 15.34 μL , 温度为 50.47 $^{\circ}\text{C}$, 时间为 2.45 h; 在此条件下预测得到的 2 mg 蚕蛹蛋白/mL 酶解液的总还原能力为 0.434. 体外抗氧化活性实验结果表明: 蚕蛹抗氧化肽在 0.5~3.0 mg/mL 范围内的总还原能力随着浓度的增加而增强(吸光度从 0~1.0); 蚕蛹抗氧化肽对 $\cdot\text{OH}$ 自由基的清除率在 1~10 mg/mL 浓度范围内随着浓度的增加而升高, 半数清除率 IC_{50} 为 4.51 mg/mL; DPPH \cdot 自由基清除能力在 3~9 mg/mL 范围内呈良好线性关系, IC_{50} 为 4.24 mg/mL, 具有一定的量效关系.

参考文献:

- [1] 杨乐武, 王增国. 蚕蛹的几种开发利用方法 [J]. 养殖技术顾问, 2010(10): 208.
- [2] 王彦平, 刘洁, 吴予明, 等. 蚕蛹的营养成分分析 [J]. 郑州大学学报: 医学版, 2009, 44(3): 638-641.
- [3] CHEN J W, WANG Y M, ZHONG Q X, et al. Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein [J]. Peptides, 2012, 33(1): 52-58.
- [4] WANG H, RAN R, YU H N, et al. Identification and characterization of antimicrobial peptides from skin of *Amolops ricketti* (Anura: Ranidae) [J]. Peptides, 2012, 33(1): 27-34.
- [5] ZHANG T, LI Y H, MIAO M, et al. Purification and characterisation of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2011, 128(1): 28-33.

- [6] 杨安树, 陈红兵, 郑功源, 等. 酶法水解蚕蛹蛋白制备免疫活性肽工艺的研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(1): 225-227.
- [7] 吴琼英, 徐金玲, 贾俊强, 等. 蚕蛹不同溶解性蛋白的营养学评价及酶解物对血管紧张素转换酶的抑制活性 [J]. 蚕业科学, 2011, 37(2): 352-357.
- [8] 贾俊强, 徐金玲, 吴琼英, 等. 酶解蚕蛹蛋白制备血管紧张素转换酶抑制肽的工艺优化 [J]. 蚕业科学, 2011, 37(5): 872-877.
- [9] 闵建华, 李建科, 陈婷. 蚕蛹多肽的制备工艺及其体外抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2009, 30(14): 123-126.
- [10] 粟晖, 李军生, 刘柳, 等. 蚕蛹蛋白的水解工艺研究 [J]. 粮油加工, 2008(11): 116-118.
- [11] 朱新鹏. 碱性蛋白酶水解蚕蛹蛋白质工艺的研究 [J]. 保鲜与加工, 2011, 11(4): 19-22.
- [12] 肖燕平, 黄培霞, 董焯平, 等. 蚕蛹蛋白抗氧化肽的制备及其纯化 [J]. 农产品加工, 2011(3): 11-30.
- [13] 李高扬, 崔堂兵, 陈亮. 蚕蛹蛋白酶解制备抗氧化肽的初步研究 [J]. 现代食品科技, 2011, 27(7): 810-814.
- [14] 赵钟兴, 廖丹葵, 孙建华, 等. 蚕蛹蛋白酶解产物体外抗氧化和降血压活性筛选及响应面工艺优化 [J]. 食品科学, 2011, 32(23): 186-191.
- [15] 沈芸, 翁新楚, 宋红生, 等. 凹凸棒土对蚕蛹油的脱色 [J]. 上海大学学报: 自然科学版, 2011, 17(5): 687-690.
- [16] 曹炜, 卢珂, 陈卫军, 等. 不同种类蜂蜜抗氧化活性的研究 [J]. 食品科学, 2006, 25(8): 352-355.
- [17] 阎欲晓, 栗桂娇. 文蛤肉酶解液清除自由基能力的研究 [J]. 食品工业科技, 2004, 25(10): 59-61.
- [18] COTELLE N, BEMIER J L, CATTEAU J P, et al. Antioxidant properties of hydroxyl flavones [J]. Free Radical Biology Medicine, 1996, 20(1): 35-43.

(上接第 164 页)

- [11] WANG H. Extinction of P-S-D branching processes in random environments [J]. Appl Prob, 1999, 36(1): 146-154.
- [12] WANG H X, FANG D. Asymptotic behaviour for P-S-D branching processes in Markovian random environments [J]. Appl Prob, 1999, 36(2): 611-619.
- [13] WANG H X, ZHAO F, LU J Y. A note on asymptotic behavior of Galton-Watson branching processes in random environments [J]. Journal of Shanghai University: English Edition, 2006, 10(2): 95-99.
- [14] 劳斯 S M. 随机过程 [M]. 何声武, 等译. 北京: 中国统计出版社, 1997: 41-43.