

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2015.02.006

Alcalase 和 Flavourzyme 协同修饰玉米蛋白 制备抗氧化活性蛋白水解物

Preparation of corn gluten hydrolysate with anti-oxidative activity by
synergistic action of Alcalase and Flavourzyme

金杜欣^{1,2} 刘晓兰^{1,2} 郑喜群^{1,2}

JIN Du-xin^{1,2} LIU Xiao-lan^{1,2} ZHENG Xi-qun^{1,2}

(1. 齐齐哈尔大学, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 农产品加工黑龙江省普通高校重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

(1. Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China; 2. Key Laboratory of Processing
Agricultural Products of Heilongjiang Province Qiqihar, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

摘要:采用 Alcalase 和 Flavourzyme 对高底物浓度玉米蛋白单酶水解条件进行优化,并研究双酶协同水解玉米蛋白制备抗氧化活性蛋白水解物的工艺。结果表明:Alcalase 的适宜水解条件为酶解温度 50 ℃, pH 7.7, 加酶量 2% (V/m), 反应时间 75 min, 该条件下玉米蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力分别为 74.34% 和 0.984; Flavourzyme 适宜水解条件为酶解温度 53 ℃, pH 6.4, 加酶量 5% (m/m), 反应时间 50 min, 该条件下玉米蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力分别为 70.55% 和 0.715。双酶协同水解过程中 Alcalase+Flavourzyme 较 Flavourzyme+Alcalase 所得玉米蛋白水解物的抗氧化活性高, 在 110 min 时 Alcalase + Flavourzyme 水解所得玉米蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率与还原力达到整个水解过程中的最高值, 分别为 91.32% 和 1.341。

关键词:玉米蛋白; 蛋白酶; 抗氧化肽; DPPH 自由基清除率; 还原力

Abstract: Corn protein hydrolysates of high concentration were prepared by optimizing the hydrolyzing conditions of alcalase and flavourzyme respectively. Both of which were applied synergistically to hydrolyze corn gluten to obtain antioxidative corn protein hydrolysates. The results showed that the optimal hydrolysis by Alcalase was obtained at 50 ℃, pH 7.7 and E/S of 2% (V/m) for reaction time of 75 minutes, and under the optimized conditions, DPPH radical

scavenging activity and reducing power of the hydrolysate were 74.34% and 0.984 respectively; the optimal hydrolysis by Flavourzyme was reacted at 53 ℃, pH 6.4 and E/S of 5% (m/m) for reaction time of 50 minutes, and under the optimized condition, DPPH radical scavenging activity and reducing power of the hydrolysate were 70.55% and 0.715 respectively. During the process of dual-enzyme hydrolyzing corn gluten, antioxidant activities of corn protein hydrolysate that catalyzed by Alcalase + Flavourzyme were higher than that by Flavourzyme + Alcalase. At 110 min, DPPH radical scavenging value and reducing power of corn protein hydrolysate that catalyzed by Alcalase + Flavourzyme reached the highest in the whole reaction process, which were 91.32% and 1.341 respectively.

Keywords: corn gluten; enzyme; antioxidant peptide; DPPH radical scavenging activity; reducing power

玉米蛋白粉是玉米湿磨法生产淀粉过程中的副产物, 具有价格低廉的优点, 但由于水溶性差而限制了其在食品工业的应用范围。用蛋白酶对玉米蛋白粉进行改性获得的玉米蛋白水解物, 不仅易消化吸收, 还具有多种生物学功能^[1-5]。酶法水解蛋白条件温和、副产物少, 并且能保留水解物的营养价值^[6]。据已有的研究^[7,8]表明, 从蛋白质水解效果和水解物抗氧化活性角度考虑, 双酶协同水解法比单酶水解法效果要好。

蛋白水解物的功能活性与其肽链端基的氨基酸残基种类、肽链分子量大小、肽链氨基酸序列与组成等多种因素有关^[9], 直接以蛋白水解物的功能活性为指标来确定蛋白的水解条件, 更有利于制备功能活性高的蛋白水解物并开阔其应用领域。DPPH 自由基清除率是根据自由基清除剂与 DPPH 自由基中的单电子配对而使其在 517 nm 处的紫外吸收

基金项目: 黑龙江省应用技术与开发重大项目 (编号: 2013G0880); 齐齐哈尔市科技局项目 (编号: GYGG-201208)

作者简介: 金杜欣 (1989—), 女, 齐齐哈尔大学在读硕士研究生。
E-mail: gogoxiaobai89@126.com

通讯作者: 郑喜群

收稿日期: 2014-12-15

减弱而测定的,DPPH 自由基清除率的大小与自由基清除剂的供电子数成正相关,因而可作为筛选抗氧化剂的指标^[10]。DPPH 自由基清除率的测定方法操作简单、重复性良好,是目前广泛使用的评价被测物抗氧化活性高低的指标。而还原力是评价样品供电子能力大小的重要指标,样品供电子能力越强,还原力越大。

已有研究^[6,11]表明,玉米蛋白水解物具有一定的抗氧化活性,如何将玉米蛋白的这一功能活性最大限度地释放出来是其在食品工业广泛应用的关键前提。本试验拟以玉米蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力为评价指标来确定 Alcalase 和 Flavourzyme 的单酶适宜水解条件,然后采用双酶协同水解玉米蛋白的方法来制备其水解物,为玉米蛋白在食品工业的广泛应用提供有力的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米蛋白粉:中粮生化能源(龙江)有限公司;
碱性蛋白酶 Alcalase (2.4L)、风味蛋白酶 Flavourzyme:食品级,酶活分别为 2.04×10^5 U/mL, 1.35×10^4 U/g,丹麦 NovoNordisk 公司;
DPPH:纯度 95%,美国 Sigma 公司。

1.2 主要仪器

电热恒温水浴锅:HH. S21-1 型,上海跃进医疗器械厂;
pH-计:PB-10 型,上海精密科学仪器有限公司;
台式离心机:TCL-16G 型,上海安亭科学仪器厂;
紫外可见分光光度计:TU1810 型,北京普析通用仪器有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 玉米黄粉的预处理 采用本课题组^[12]提出的先挤压膨化再去淀粉的方式对玉米蛋白进行预处理。

1.3.2 玉米蛋白的单酶水解 称取一定量预处理后的玉米蛋白粉溶于蒸馏水配置成玉米蛋白水溶液,放置于磁力加热搅拌器中,在一定温度和 pH 条件下,加入相应的蛋白酶,进行酶解反应,酶解过程中通过滴加 NaOH 保持反应体系 pH 不变,酶解结束后,酶解液于 100℃下灭酶 5 min,并于 4 000 r/min 离心 10 min。测定上清液的 DPPH 自由基清除率、还原力以及可溶性蛋白含量。

(1) Alcalase 水解条件优化:参照本课题组^[13]前期的研究结果,采用 10%(*m/V*)的底物浓度,以温度 60℃、pH 8.5、加酶量 3%(*V/m*)和反应时间 2 h 为初始酶解条件,考察温度、pH、加酶量和时间对玉米蛋白水解物 DPPH 自由基清除率和还原力的影响。为了进一步确定 Alcalase 水解玉米蛋白制备抗氧化蛋白水解物的最佳条件,在单因素试验的基础上缩小各因素的变化水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,确定 Alcalase 水解玉米蛋白制备抗氧化蛋白水解物的适宜条件。

(2) Flavourzyme 水解条件优化:采用 10%(*m/V*)底物浓度,以温度 50℃、pH 6.0、加酶量 5%和反应时间 60 min

为初始酶解条件,考察温度、pH、加酶量和时间对玉米蛋白水解物 DPPH 自由基清除率和还原力的影响。在单因素试验的基础上缩小各因素的变化水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,确定 Flavourzyme 水解玉米蛋白制备抗氧化蛋白水解物的适宜条件。

1.3.3 玉米蛋白的双酶水解 第一种酶在其适宜水解条件下水解玉米蛋白,然后将温度、pH 调至第二种酶的适宜反应条件,加入第二种酶,每隔一定时间取样,测定玉米蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力的变化,从而选出最适的反应组合及最适的反应时间点。

1.3.4 可溶性蛋白含量的测定 采用 Folin-酚法^[14]。

1.3.5 抗氧化活性的测定

- (1) DPPH 自由基清除率的测定:参照文献[15]。
- (2) 还原力的测定:参照文献[16]。

2 结果与讨论

2.1 Alcalase 水解玉米蛋白的条件

2.1.1 Alcalase 水解玉米蛋白的单因素试验 影响玉米蛋白酶解效果的因素主要有底物浓度、温度、pH、加酶量和酶解反应时间。高底物浓度能够提高设备容积效率并增加产物浓度,同时可有效地减少蛋白水解物生产过程中水分的去除量,从而降低生产成本。

由图 1 可知,在 45~50℃时,玉米蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力都随温度的升高而增加,50℃时,DPPH 自由基清除率达到 33.30%,还原力为 0.948;之后随着温度的继续升高,酶蛋白变性,导致催化速率大幅下降,DPPH 自由基清除率和还原力都呈降低趋势(图 1(a)),选择 50℃作为 Alcalase 水解玉米蛋白制备抗氧化活性蛋白水解物的适宜温度;pH 对酶活力的影响表现在过酸或过碱都会造成酶本身空间结构的破坏,从而造成酶活力的下降,pH 在 7.5~8.0 时,蛋白水解物 DPPH 自由基清除率和还原力都呈现上升趋势,pH 为 8 时,水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力达到最高值(60.53%和 0.962),当 pH>8 时,水解物抗氧化活性呈现降低趋势(图 1(b));加酶量在 0.5%~2.0%时,蛋白水解物 DPPH 自由基清除率和还原力都随加酶量的增加而增加,加酶量为 2%时,蛋白酶解物 DPPH 自由基清除率为 73.45%,还原力为 0.976,加酶量在 2%~3%时呈现下降趋势(图 1(c)),确定 Alcalase 水解玉米蛋白的适宜加酶量为 2%;反应时间在 30~60 min 时,蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力都增大,60 min 时,其 DPPH 自由基清除率为 73.46%,还原力为 0.981,但是 60 min 后,其抗氧化活性均呈下降趋势(图 1(d)),原因可能是蛋白酶继续酶解 60 min 得到的玉米肽,有活性部位的端基氨基酸被切断,活性肽链长度缩短,氨基酸组成发生了改变,从而使得水解液的 DPPH 自由基清除率明显降低。

2.1.2 Alcalase 水解玉米蛋白的正交试验 Alcalase 正交试验因素水平和结果分别见表 1、2,方差分析见表 3、4。

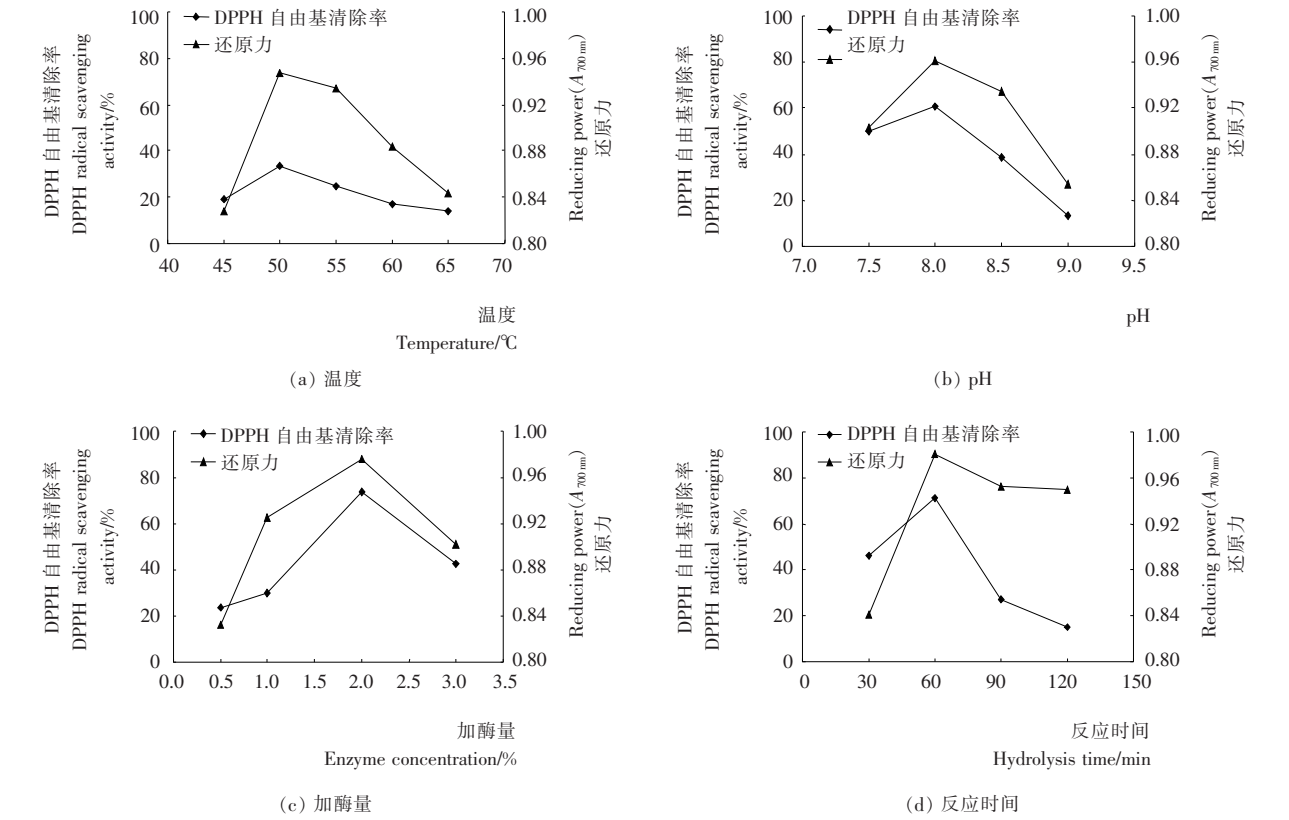


图 1 温度、pH、加酶量和反应时间对 Alcalase 水解玉米蛋白水解物 DPPH 自由基清除率及还原力的影响
Figure 1 Effects of temperature, pH, Alcalase concentration and hydrolysis time on DPPH radical scavenging activity and reducing power of corn hydrolysate by Alcalase

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal test

水平	A 酶解温度/℃	B pH	C 加酶量/%	D 时间/min
1	47	7.7	1.5	45
2	50	8.0	2.0	60
3	53	8.3	2.5	75

由表 2 可知,影响 Alcalase 水解玉米蛋白水解物 DPPH 自由基清除率的因素主次顺序为: C>B>A>D,影响蛋白水解物还原力的因素主次顺序为: A>C>B>D,在本研究中,由于时间对蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率及还原力影响因素均最小,综合考虑各方面因素,选择最佳组合为 A₂B₁C₂D₃,即酶解温度 50 ℃、pH 7.7、加酶量 2%(V/m)和反应时间 75 min。在此组合水解条件下,玉米蛋白水解液的 DPPH 自由基清除率为 74.34%,还原力为 0.984,可溶性蛋白含量为 43.28 mg/mL。由表 3、4 可知,温度、pH、加酶量对水解物 DPPH 自由基清除率及还原力均具有显著性影响,反应时间对水解物还原力具有显著性影响。

2.2 Flavourzyme 水解玉米蛋白的条件

2.2.1 Flavourzyme 水解玉米蛋白的单因素试验

由图 2 可知,在 45~50 ℃时,蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力都随温度的升高而增加,50 ℃时,DPPH 自由基清除率为 67.11%,还原力 0.669;之后随温度继续升高,DPPH 自由基清除率和还原力都呈降低趋势(图 2(a)),选择 50 ℃作为 Flavourzyme 水解玉米蛋白的适宜温度;pH 为 6 时,Flavourzyme 水解玉米蛋白所得玉米蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力为最高,分别为 71.44%和 0.695,当 pH>6 时,DPPH 自由基清除率和还原力都呈现降低趋势(图 2(b)),选择 pH 6.0 为 Flavourzyme 水解玉米蛋白的适宜 pH;加酶量在 1%~5%时,蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力都随加酶量的增加而增大,加酶量为 5%时,蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率为 69.20%,还原力为 0.701,加酶量继续增加时,水解物抗氧化活性下降(图 2(c)),确定 Flavourzyme 水解玉米蛋白的适宜加酶量为 5%;反应时间从 15 min 变为 60 min 时,DPPH 自由基清除率和还原力有平缓上升趋势,60 min 时,玉米蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率为 69.22%,还原力为 0.711。但是 60 min 后,还原力略微下降,DPPH 自由基清除率呈现明显下降趋势(图 2(d))。综上试验结果,Flavourzyme 水解玉米蛋白制备抗氧化活性蛋白水解物的适宜条件为:酶解温度 50 ℃,pH 6.0,加酶量 5%,时间 60 min。

表 2 Alcalase 水解玉米蛋白的正交试验设计及结果

Table 2 Design and results of orthogonal test for optimizing the hydrolysis condition of corn gluten meal by Alcalase ($n=2$)

试验号	A	B	C	D	DPPH 自由基清除率/%		还原力($A_{700\text{ nm}}$)	
					Y_1	Y_2	y_1	y_2
1	1	1	1	1	62.14	61.80	0.944	0.943
2	1	2	2	2	63.49	61.47	0.956	0.959
3	1	3	3	3	60.96	63.65	0.951	0.951
4	2	1	2	3	76.44	72.24	0.987	0.981
5	2	2	3	1	61.92	68.13	0.963	0.969
6	2	3	1	2	63.94	64.56	0.959	0.958
7	3	1	3	2	65.49	73.11	0.977	0.971
8	3	2	1	3	61.29	65.18	0.941	0.939
9	3	3	2	1	65.65	66.42	0.953	0.952
DPPH 自由基清除率	k_1	62.253	68.537	61.807	64.347			
	k_2	66.527	63.583	67.620	63.997			
	k_3	66.193	62.853	65.547	66.630			
	R_1	4.274	5.684	5.813	2.633			
还原力	k_1	0.951	0.967	0.947	0.954			
	k_2	0.970	0.955	0.965	0.963			
	k_3	0.955	0.954	0.964	0.958			
	R_2	0.019	0.013	0.018	0.009			

表 3 DPPH 自由基清除率的方差分析表[†]

Table 3 Analysis of variance table of DPPH radical scavenging activity

方差来源	自由度	偏差平方和	均方差	F 值	显著性
A	2	99.845 7	49.922 9	6.885 7	* *
B	2	87.568 8	43.784 4	6.039 0	*
C	2	59.953 6	29.976 8	4.134 6	*
D	2	15.721 1	7.860 6	1.084 2	
误差	9	70.905 0	7.878 3		
总和	17	333.994 2			

† * * 表示差异极显著, * 表示差异显著。

2.2.2 Flavourzyme 水解玉米蛋白的正交试验 Flavourzyme 正交试验因素水平和结果分别见表 5、6, 方差分析见表 7、8。

由表 6 可知, 影响 Flavourzyme 水解玉米蛋白水解物 DPPH 自由基清除率的因素主次顺序为 A>B>C>D, 影响 Flavourzyme 水解玉米蛋白水解物还原力的因素主次顺序为 B>A=C=D, 由于 DPPH 自由基清除率中加酶量和时间是次要影响因素, 还原力中加酶量、温度和时间为次要影响因素, 综合考虑各方面因素, 尤其是经济成本, 选择最佳组合为 A₃B₃C₂D₁。此组合的 DPPH 自由基清除率为 70.55%, 还

表 4 还原力的方差分析表[†]

Table 4 Analysis of variance table of reducing power

方差来源	自由度	偏差平方和	均方差	F 值	显著性
A	2	0.001 1	0.000 6	83.330 6	* *
B	2	0.000 7	0.000 3	48.491 9	* *
C	2	0.001 1	0.000 6	82.483 9	* *
D	2	0.000 3	0.000 1	19.000 0	* *
误差	9	0.000 1	0		
总和	17	0.003 3			

† * * 表示差异极显著, * 表示差异显著。

表 5 L₉(3⁴) 正交试验因素水平表

Table 5 Factors and levels of L₉(3⁴) orthogonal test

水平	A 酶解温度/℃	B pH	C 加酶量/%	D 时间/min
1	47	5.6	4	50
2	50	6.0	5	60
3	53	6.4	6	70

原力为 0.715, 可溶性蛋白含量为 10.34 mg/mL。由表 7、8 可知, 温度、pH、加酶量以及时间对 DPPH 自由基清除率和

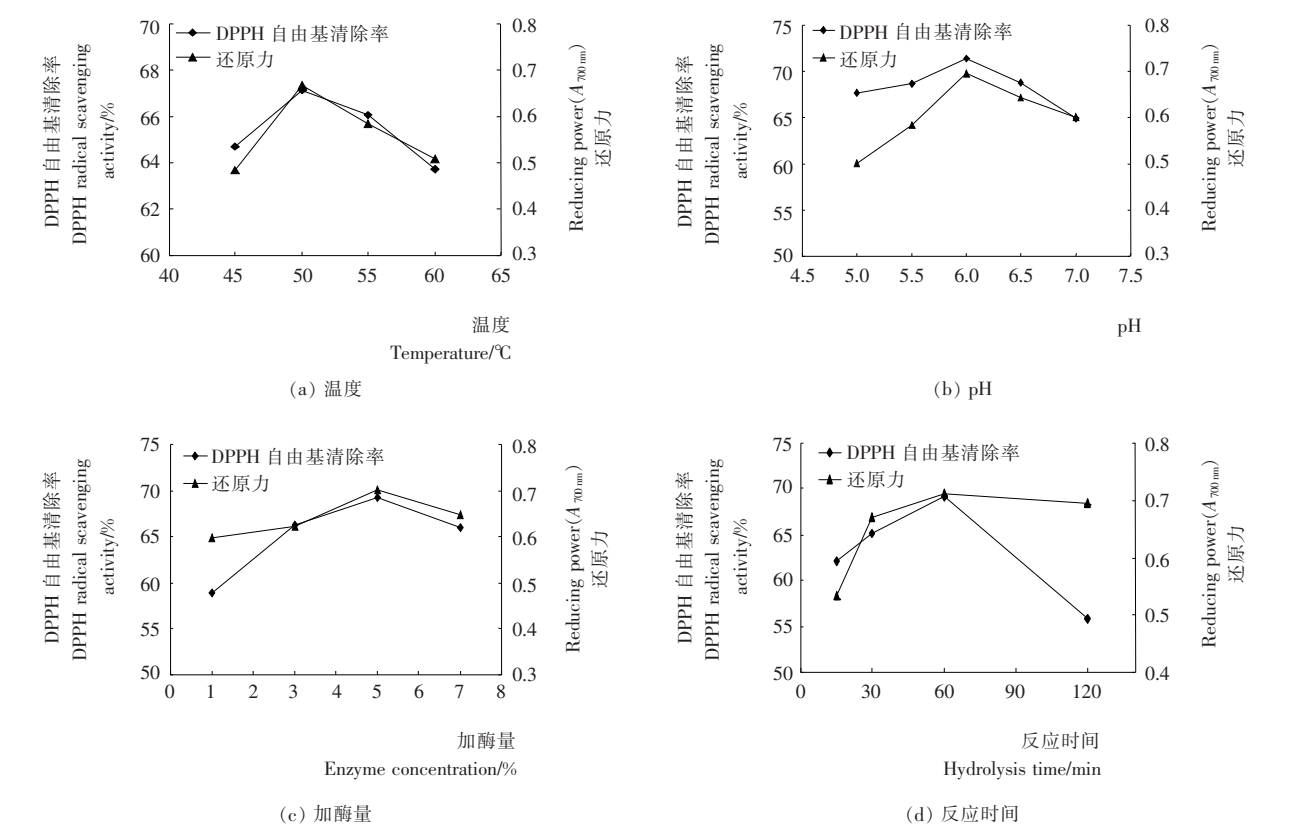


图 2 温度、pH、加酶量和反应时间对 Flavourzyme 水解玉米蛋白水解物 DPPH 自由基清除率及还原力的影响
Figure 2 Effects of temperature, pH, enzyme concentration and hydrolysis time on DPPH radical scavenging activity and reducing power of corn hydrolysate by Flavourzyme

表 6 Flavourzyme 水解玉米蛋白的正交试验设计及结果

Table 6 Design and results of orthogonal test for optimizing the hydrolysis condition of corn gluten meal by Flavourzyme ($n=2$)

试验号	A	B	C	D	DPPH 自由基清除率/%		还原力($A_{700\text{nm}}$)	
					Y_1	Y_2	y_1	y_2
1	1	1	1	1	67.92	67.59	0.687	0.691
2	1	2	2	2	67.26	67.76	0.684	0.683
3	1	3	3	3	69.42	68.76	0.702	0.699
4	2	1	2	3	66.93	66.76	0.678	0.673
5	2	2	3	1	70.42	69.75	0.712	0.710
6	2	3	1	2	69.74	69.09	0.703	0.707
7	3	1	3	2	69.74	70.23	0.709	0.700
8	3	2	1	3	68.93	68.11	0.699	0.693
9	3	3	2	1	71.04	70.07	0.715	0.714
DPPH 自由基清除率	k_1	68.120	68.193	68.563	69.463			
	k_2	68.777	68.703	68.300	68.967			
	k_3	69.683	69.683	69.717	68.150			
	R_1	1.563	1.490	1.417	1.313			
	k_1	0.691	0.690	0.697	0.705			
还原力	k_2	0.697	0.697	0.691	0.698			
	k_3	0.705	0.707	0.705	0.691			
	R_2	0.014	0.017	0.014	0.014			

表 7 DPPH 自由基清除率的方差分析表[†]

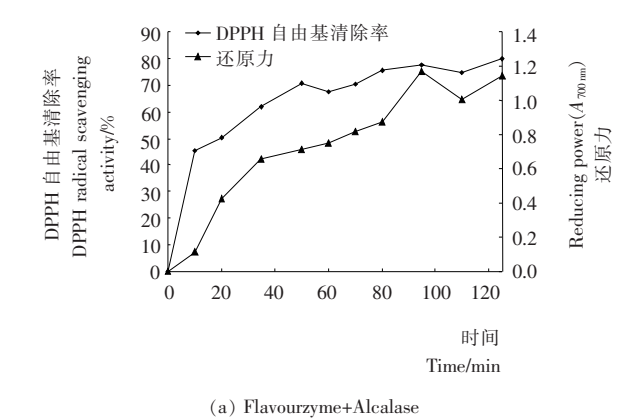
Table 7 Analysis of variance table of DPPH radical scavenging activity					
方差来源	自由度	偏差平方和	均方差	F 值	显著性
A	2	7.708 8	3.854 4	20.402 1	* *
B	2	6.957 9	3.478 9	18.414 7	* *
C	2	7.029 6	3.514 8	18.604 6	* *
D	2	5.243 9	2.621 9	13.878 4	* *
误差	9	1.700 3	0.188 9		
总和	17	28.640 5			

† * * 表示差异极显著,* 表示差异显著。

表 8 还原力的方差分析表[†]

Table 8 Analysis of variance table of reducing power					
方差来源	自由度	偏差平方和	均方差	F 值	显著性
A	2	0.000 6	0.000 3	28.132 3	* *
B	2	0.000 9	0.000 4	41.624 3	* *
C	2	0.000 6	0.000 3	29.148 1	* *
D	2	0.000 6	0.000 3	28.672 0	* *
误差	9	0.000 1	0		
总和	17	0.002 8			

† * * 表示差异极显著,* 表示差异显著。



还原力均具有极显著性影响。

2.3 Alcalase 和 Flavourzyme 协同水解玉米蛋白条件

Alcalase 是一种内切肽酶,而 Flavourzyme 是一种偏向外切同时兼具内切活性的蛋白酶。双酶协同水解玉米蛋白可增加蛋白酶的作用位点,提高玉米蛋白的水解度^[8],有利于提高原料的利用率和多肽的转化率。同时双酶对玉米蛋白的水解比单酶更加充分,使更多小分子多肽游离释放出来^[17,18],而具有活性的多肽主要集中在小分子多肽中^[19]。

本试验在 Alcalase 和 Flavourzyme 分别水解玉米蛋白的适宜条件基础上,采用双酶协同水解玉米蛋白的方法制备抗氧化活性更高的蛋白水解物,试验结果见图 3。

由图 3 可知,双酶协同水解玉米蛋白与单酶水解的情况相比,蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力均有提高,Flavourzyme+Alcalase 水解玉米蛋白所得水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力呈现整体上升趋势,但上升趋势平缓。Alcalase+Flavourzyme 所得玉米蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力较 Flavourzyme+Alcalase 水解所得玉米蛋白水解物要高,在 110 min 时分别达到最高值,为 91.32%和 1.341,Alcalase+Flavourzyme 水解玉米蛋白所得蛋白水解物的可溶性蛋白含量为 50.96 mg/mL,Flavourzyme+Alcalase 水解玉米蛋白所得蛋白水解物的可溶性蛋白含量为 51.86 mg/mL,可见玉米蛋白水解物的抗氧化活性并非与可溶性蛋白含量成正相关。Alcalase 是内切蛋白酶,其对疏水性肽键具有优先水解作用,因此可水解出具有

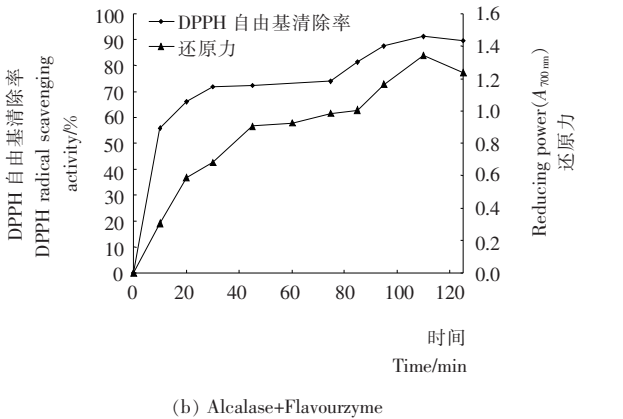


图 3 双酶不同加入顺序对玉米蛋白水解物抗氧化活性的影响

Figure 3 Effects of different enzyme catalyzing order on corn protein hydrolysates

疏水性氨基酸末端的肽段;Flavourzyme 具有外切蛋白酶活性,加入 Flavourzyme 后,玉米蛋白在其作用下继续水解,致使肽键更加充分断裂,从而使得肽链暴露出带电荷、极性的氨基酸基团,使玉米蛋白水解物传递 H⁺ 的能力加强^[20],故 DPPH 自由基清除率和还原力增强。

3 结论

以 DPPH 自由基清除率和还原力为检测指标,对 Alcalase 和 Flavourzyme 分别与协同水解玉米蛋白的条件进行了

研究。Alcalase 水解玉米蛋白的最适水解条件为:酶解温度 50 ℃,pH 7.7,加酶量 2%(V/m),时间 75 min,此时,玉米蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率为 74.34%,还原力为 0.984,可溶性蛋白含量为 43.28 mg/mL。Flavourzyme 水解玉米蛋白的最适水解条件为:酶解温度 53 ℃,pH 6.4,加酶量 5%(m/m),时间 50 min,此时玉米蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率为 70.55%,还原力为 0.715,可溶性蛋白含量为 10.34 mg/mL。Alcalase 和 Flavourzyme 协同水解

比单酶水解玉米蛋白所得水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力要高,采用 Alcalase+Flavourzyme 水解玉米蛋白所得水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力较 Flavourzyme+Alcalase 要高,其中在 110 min 时,Alcalase+Flavourzyme 所得玉米蛋白水解物的 DPPH 自由基清除率和还原力最高,分别为 91.32%和 1.341。

参考文献

1 杨双,郑喜群,刘晓兰,等. 水解时间对玉米蛋白粉酶解物抗氧化活性的影响[J]. 食品与机械,2014,30(3):154~158.

2 王层飞,李忠海,袭吉军,等. 生物活性肽的保健功能及其在食品工业中的应用研究[J]. 食品与机械,2008,24(3):128~131.

3 王俊彤,郑喜群,刘晓兰. 酶解玉米黄粉制备降血压肽的研究[J]. 食品与机械,2013,29(3):212~215.

4 郭庆启,张乃珣,王群,等. 玉米蛋白酶解工艺的优化及酶解液对乙醇脱氢酶活性的影响[J]. 食品科学,2013,34(13):170~174.

5 Zhang Gui-xiang, Sun Na-xin, Zheng Ming-yang, et al. Preparation of high F-value oligopeptides from corn gluten meal and its anti-fatigue functions[J]. Biomedical Engineering and Biotechnology, 2012(1): 429~432.

6 郑喜群. 玉米黄粉的酶解工艺与抗氧化活性肽的制备[D]. 北京: 中国农业大学,2006.

7 陈星,李晓磊,吴琼. 不同蛋白酶酶解产物活性大豆肽分子量分布状态的研究[J]. 西南大学学报(自然科学版),2010,32(7):1~7.

8 Lee J, Koo N, Min D B. Reactive oxygen species aging and antioxidative nutraceuticals[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2004, 3(1): 21~33.

9 吴建中. 大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学,2003.

10 Hide Yukil, Kaharat. Superoxide and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical-scavenging activities of soyasaponin related to

gallic acid[J]. Biosci. Biotechnol Biochem., 2001, 65(10): 2162~2165.

11 Zhou Ke-quan, Sun Shi, Canning C. Production and functional characterization of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration[J]. Food Chemistry, 2012, 135(3): 1192~1197.

12 Zheng Xi-qun, Li Li-te, Liu Xiao-lan, et al. Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten[J]. Appl Micro Biol Biotechnol, 2006(73): 763~770.

13 宋占兰,郑喜群,刘晓兰. Alcalase 酶解高底物浓度玉米蛋白工艺优化[J]. 食品与机械,2011,27(6):226~231.

14 陈毓莹,马静芳,文建雷,等. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 科学出版社,2002.

15 Mina Memarpoor-Yazdi, Hanie Mahaki, Hadi Zare-Zardini. Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from Zizyphus jujube fruits[J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(1): 62~70.

16 荣建华,李小定,谢笔钧. 大豆肽体外抗氧化效果的研究[J]. 食品科学,2002,23(11):118~120.

17 Zhang Yu-feng, Duan Xiu, Zhuang Yong-liang. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (Oreochromis niloticus) skin gelatin[J]. Peptides, 2012(38): 13~21.

18 Li Xiu-xia, Han Lu-jia, Chen Long-jian. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2008, 88(9): 1660~1666.

19 陈星,李晓磊,吴琼. 不同蛋白酶酶解产物活性大豆肽分子量分布状态的研究[J]. 西南大学学报(自然科学版),2010,32(7):1~7.

20 王晓杰,郑喜群,胡立玉. 双酶分布水解时间对玉米肽功能性质的影响[J]. 食品工业科技,2013,34(8):223~227.

(上接第 24 页)

3 Dietrich Hoffmann, Ilse Hoffmann, Karam El-Bayoumy. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to ernst l. wynder[J]. Chemical Research in Toxicology, 2001, 14(7): 767~790.

4 Cheryl A Oncken, Mark D Litt, Lynn D McLaughlin, et al. Nicotine concentrations with electronic cigarette use: effects of sex and flavor[J]. Nicotine and Tobacco Research, 2015, 17(4): 473~478.

5 Barbara Davis, Michael Dang, Jisoo Kim, et al. Nicotine concentrations in electronic cigarette refill and do-it-yourself fluids[J]. Nicotine and Tobacco Research, 2015, 17(2): 134~141.

6 Christine L Megerdichian, Vaughan W Rees, Geoffrey Ferris Wayne, et al. Internal tobacco industry research on olfactory and trigeminal nerve response to nicotine and other smoke components[J]. Nicotine and Tobacco Research, 2007, 9(11):

1119~1129.

7 Fiammetta Cosci, Kenneth Abrams, Koen R J Schruers, et al. Effect of Nicotine on 35% CO₂-Induced anxiety: a study in healthy volunteers[J]. Nicotine and Tobacco Research, 2006, 8(4): 511~517.

8 Tara Parker-Pope. "Safer" cigarettes: a history[EB/OL]. (2001-10-02)[2015-01-30]. <http://www.pbs.org/wgbh/nova/body/safer-cigarettes-history.html>.

9 Richard R Baker, Louise J Bishop. The pyrolysis of tobacco ingredients[J]. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis, 2004, 71(1): 223~311.

10 罗昌荣,谢焰,印黔黔. 葡萄糖、果糖和蔗糖/脯氨酸的共裂解行为研究[J]. 烟草科技,2014(2):61~69.

11 David G Gilbert, Chihiro Sugai, Zuo Yan-tao, et al. Effects of nicotine on brain responses to emotional pictures[J]. Nicotine and Tobacco Research, 2004, 6(6): 985~996.