

超声辅助麦胚蛋白提取、酶解工艺优化及抗氧化性研究

杨盛茹¹, 张秋双², 侯银臣^{1*}, 王雪莉¹, 回传胤¹, 李怡¹, 韩檀楚¹, 路梦醒¹

1. 河南牧业经济学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450046

2. 河南省兽药饲料监察所, 河南 郑州 450001

摘要: 为了确定超声波辅助碱提麦胚蛋白工艺以及麦胚蛋白酶解最佳条件, 分析其结构及抗氧化活性, 以脱脂麦胚为原料, 应用超声波辅助碱提法, 以麦胚蛋白提取率为指标, 研究超声温度、时间、频率对麦胚蛋白提取率的影响, 以水解度为指标通过响应面法优化麦胚蛋白酶解工艺参数, 并对其电位、结构及体外抗氧化活性进行了测定。研究表明: 超声辅助碱法提取麦胚蛋白条件为超声温度 40 ℃、时间 20 min、频率 40 kHz, 麦胚蛋白提取率可达 68.42%; 麦胚蛋白酶解最佳工艺参数为酶解时间 2 h、pH 8.4、温度 51 ℃、加酶量 7 000 U/g、水解度为 41.73%; Zeta-电位分析表明麦胚蛋白酶解前后电位均为负值且绝对值显著性变化, 紫外光谱、红外光谱结构分析发现麦胚蛋白在酶解后特征吸收峰红移, 内部结构和疏水区发生改变; 酶解物对 DPPH 自由基、羟基自由基、ABTS⁺ 自由基清除能力的 IC₅₀ 分别为 0.058 1、0.108 5、0.104 1 mg/mL, 对 Fe³⁺ 还原力在 0.16 mg/mL 时达到最大值 0.69(吸光度)。麦胚蛋白酶解物具有一定的体外抗氧化性, 本研究为麦胚资源进一步开发利用提供了依据。

关键词: 麦胚蛋白; 超声辅助; 酶解; 抗氧化性

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-2383(2023)06-0018-08

DOI: 10.16433/j.1673-2383.2023.06.003

Study on optimization of ultrasound-assisted extraction of wheat germ protein and enzymatic hydrolysis process and antioxidant properties

YANG Shengru¹, ZHANG Qiushuang², HOU Yinchen^{1*}, WANG Xueli¹, HUI Chuanyin¹, LI Yi¹, HAN Tanchu¹, LU Mengxing¹

1. College of Food and Biological Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China

2. Henan Province Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Zhengzhou 450001, China

Abstract: This study was aimed to determine the optimal conditions of ultrasonic-assisted alkaline extraction of wheat germ protein and enzymatic hydrolysis of wheat germ protein, and analyze their structure and antioxidant activity. Defatted wheat germ was used as raw material, and ultrasonic-assisted alkaline extraction was applied to study the effects of ultrasonic temperature, time, and frequency on the extraction rate of wheat germ protein with the extraction rate of wheat germ protein as an indicator; the enzymatic process parameters of wheat germ protein were optimized by response surface methodology with the degree of hydrolysis as an indicator; and the potentials, structures, and antioxidant activities were determined *in vitro*. The optimized conditions of ultrasound-assisted alkaline extraction of wheat germ protein were as follows: ultrasonic temperature 40 ℃, time 20 min, frequency 40 kHz, and the extraction rate of wheat germ protein

收稿日期: 2023-04-17

基金项目: 河南省科技攻关项目(212102110313)

作者简介: 杨盛茹(1988—), 女, 河南商丘人, 博士研究生, 讲师, 主要研究方向为天然活性产物。

* 通信作者: 侯银臣, 博士, 讲师, E-mail: 307219505@qq.com。

could reach 68.42%; The optimum technological conditions of wheat germ protein hydrolysis were as follows: enzymatic hydrolysis time 2 h, pH 8.4, temperature 51 °C, enzyme addition 7 000 U/g, the degree of hydrolysis reached 41.73%. Zeta-potential analysis showed that the potentials before and after hydrolysis were both negative and the absolute value changed significantly. The structural analysis of UV and IR spectra revealed that the characteristic absorption peaks of wheat germ protein were red-shifted and the internal structure and hydrophobic region were changed after enzymatic hydrolysis. The IC_{50} of the enzymatic hydrolysates of wheat germ protein for the scavenging ability of DPPH radicals, hydroxyl radicals and $ABTS^+$ radicals were 0.0581 mg/mL, 0.108 5 mg/mL and 0.104 1 mg/mL, respectively, the reducing power for Fe^{3+} reached a maximum value of 0.69 at 0.16 mg/mL. The enzymatic hydrolysates of wheat germ protein showed certain antioxidant properties *in vitro*, which provided a basis for further exploitation of wheat germ resources.

Key words: wheat germ protein; ultrasound-assisted; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity

小麦是我国第三大粮食作物,2022年产量为13 772.3万t,约占世界总产量18%,居世界第一^[1]。麦胚约占整个小麦籽粒质量的3%,其蛋白质含量约占麦胚的30%,具有较高营养价值。目前麦胚资源尤其是麦胚蛋白利用不足,主要用作饲料,附加值较低,造成极大浪费^[2]。

生物活性肽是指对生物机体的生命活动有益或具有生理作用的一类独特的蛋白质片段,由2~20个氨基酸以不同的排列方式组成。1950年Mellande提出食物来源生物活性肽,此后从各种底物中提取、分离纯化并分析其生理作用的研究广泛进行^[3]。生物活性肽活性与氨基酸组成和序列相关^[4],具有抗氧化、降血糖、降血压等作用^[5]。制备生物活性肽采用的方法有化学水解法、酶解法、发酵法等^[6],酶解法由于具有过程容易控制、条件温和、设备简单、安全性高等特点已得到普遍认可。如曾祺等^[7]用碱性蛋白酶酶解脱脂麦胚蛋白2h,优化酶解工艺条件后麦胚蛋白水解度为33.64%。

超声处理作为强化过程手段,其较强的空化效应^[8]、热效应、机械效应^[9]对原料组织、结构、功能等产生一定的影响,应用受到广泛关注。如Jiang等^[10]使用超声预处理提取三叶木通蛋白,蛋白纯度达到52.78g/100g,提取率提高了19.38%,同时蛋白的持油能力和乳化性均有提高。Li等^[11]使用超声辅助提取啤酒糟中的蛋白质,蛋白质提取率提高到86.16%,持水性、持油性、乳化性和起泡性均有所提高。而当前关于使用超声辅助提取麦胚蛋白的研究有待深入展开。

本研究以来源丰富的农产品加工副产

物——小麦胚芽为研究对象,超声辅助碱法提取麦胚蛋白后用碱性蛋白酶水解,通过单因素、响应面法优化确定麦胚蛋白酶解工艺最佳参数,通过紫外光谱、红外光谱对其结构初步表征,并探讨其抗氧化性,为小麦胚芽开发应用奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

脱脂小麦胚粉:河南省鲲鹏华生物技术有限公司;干酪素:生物试剂,北京奥博星生物技术有限公司;碱性蛋白酶:200 U/mg,上海源叶生物技术有限公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-1900PC 双光束紫外可见分光光度计:上海美析仪器有限公司;JS94K2M Zeta 电位仪:北京商德通科技有限公司;WKS900/3S 超声波反应器:江苏江大五棵松生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 脱脂麦胚基本成分测定

水分测定:GB 5009.3—2010;脂肪测定:GB 5009.6—2016;蛋白质测定:GB 5009.5—2016;灰分测定:GB/T 5505—2008。

1.3.2 超声辅助碱法提取麦胚蛋白工艺优化

参照曾祺等^[7]使用的方法并稍做调整,将脱脂麦胚粉过筛(100目),按照料液比1:10(g/mL)加入蒸馏水混合搅拌均匀,调pH至12.0,用分散器搅拌2min,静置后分别在不同的超声温度、时间、频率下处理,以4 000 r/min离心20min,取上清液,研究麦胚蛋白提取率变化情况。

1.3.3 麦胚蛋白提取率测定

蛋白质含量测定采用双缩脲法^[12]。

$$Y_1 = \frac{m_1}{m_2} \times 100\%,$$

式中: Y_1 为蛋白提取率,%; m_1 为上清液中蛋白质质量,mg; m_2 为脱脂麦胚粉蛋白质量,mg。

1.3.4 麦胚蛋白酶解工艺研究

取上述上清液,调pH至4.0,4 000 r/min离心20 min,冻干。取麦胚蛋白用去离子水配制成质量分数为3%的溶液置于水浴锅中,分别设定不同温度,预热15 min,调节不同pH,分别设置不同加酶量[E/S]加入碱性蛋白酶,水解不同时间后沸水浴10 min,4 000 r/min离心20 min,取上清液测定水解度。根据单因素试验结果,使用Design Expert软件设计响应面试验。

1.3.5 水解度测定

水解度通常被用作蛋白质水解的监测因子,采用甲醛滴定法测样品中氨基氮含量^[13]。

$$Y_2 = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%,$$

式中: Y_2 为水解度,%; N_1 为水解后生成的氨基氮质量,mg; N_2 为待测样品中氮的质量,mg。

1.3.6 Zeta-电位测定

参照王耀松等^[14]使用的方法测定。

1.3.7 结构分析

1.3.7.1 紫外光谱分析

用0.01 mol/L PBS(pH 7.0)配制样品,其质量浓度为1.0 mg/mL,200~800 nm扫描,分辨率1 nm。

1.3.7.2 红外光谱分析

称取3 mg样品,与100 mg干燥的KBr在红外灯下研磨均匀后装入压片模具,用红外光谱仪进行红外扫描。

1.3.8 麦胚蛋白酶解物抗氧化性分析

DPPH自由基清除能力的测定参照 Homay-

ouni-Tabrizi等^[15]使用的方法,羟基自由基清除能力的测定参照 Ren等^[16]使用的方法,ABTS⁺自由基清除能力的测定参照 Yuan等^[17]使用的方法,总还原能力的测定参照马雪洁等^[18]使用的方法。

1.4 数据处理与分析

运用 Origin 2018、Design Expert 8.0、IBM SPSS Statistics 26 作图及统计分析,其中 $P < 0.01$ 表示差异极显著, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 脱脂麦胚基本成分

脱脂麦胚基本成分见表1。

表1 脱脂麦胚基本成分

Table 1 Basic ingredients of defatted wheat germ

成分	水分	蛋白质(干基)	脂肪	灰分
含量/%	8.30±0.34	30.30±0.32	1.10±0.08	2.08±0.09

2.2 提取麦胚蛋白试验结果与分析

2.2.1 超声温度对麦胚蛋白提取率的影响

由图1(a)可知,在超声作用下,温度逐渐升高使蛋白质结构疏松,溶解液中蛋白质含量增加;但继续升高温度,蛋白质疏水基团暴露,疏基相互结合形成二硫键,蛋白质分子聚集使溶解度下降从而影响了其提取^[19]。故确定超声温度为40℃。

2.2.2 超声时间对麦胚蛋白提取率的影响

由图1(b)可知,随提取时间延长,蛋白质溶出趋于饱和,同时在超声处理过程中产生一定热量,温度升高导致麦胚蛋白结构改变从而影响了其提取^[20]。故确定超声时间为20 min。

2.2.3 超声频率对麦胚蛋白提取率的影响

超声频率是影响空化效应的重要参数,频率合适可有效增加蛋白质提取率^[21]。由图1(c)可知,40 kHz下麦胚蛋白提取率最高(68.42%),说

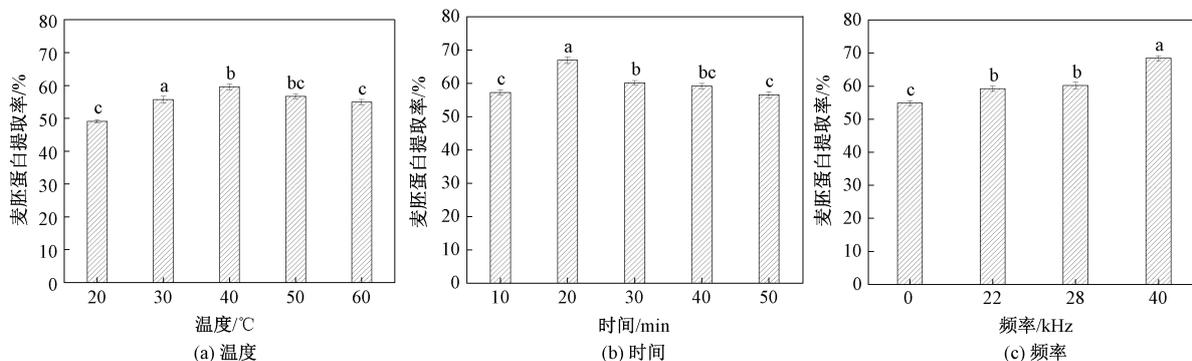


图1 温度、时间、频率对麦胚蛋白提取率的影响

Fig. 1 Effects of temperature, time and frequency on the extraction rate of wheat germ protein

明此超声频率对麦胚原料具有特异性,是麦胚蛋白提取的有效频率。故确定超声频率为 40 kHz。

2.3 酶解麦胚蛋白单因素试验结果与分析

2.3.1 酶解时间对麦胚蛋白酶解的影响

由图 2(a)可知,随着酶解时间增加,水解度先逐步增大后下降,这可能是因为初始阶段蛋白浓度高,底物与酶结合程度高,而随着时间延长酶与底物接触率变低、酶切位点少导致水解度逐渐变缓。

2.3.2 加酶量对麦胚蛋白酶解的影响

由图 2(b)可知,随着加酶量增加,水解度先增大后降低,可能是因为酶增多增加了接触概率,但

当酶量增到一定程度时,底物逐渐减少,产物逐步增加,可能对酶促反应有一定的抑制作用。

2.3.3 pH 值对麦胚蛋白酶解的影响

由图 2(c)可知,随着 pH 值增大,水解度先增加后降低,可能是因为 pH 值影响酶和底物解离状态,pH 值过低或过高均会影响酶空间结构及稳定性,从而影响酶活力,导致酶解反应不完全。

2.3.4 酶解温度对麦胚蛋白酶解的影响

由图 2(d)可知,随着温度升高,水解度先升高后降低,可能是随着温度逐渐升高,分子运动速度加快,底物与酶接触概率增大,当超过一定温度时酶活力不断下降,催化效率逐渐降低。

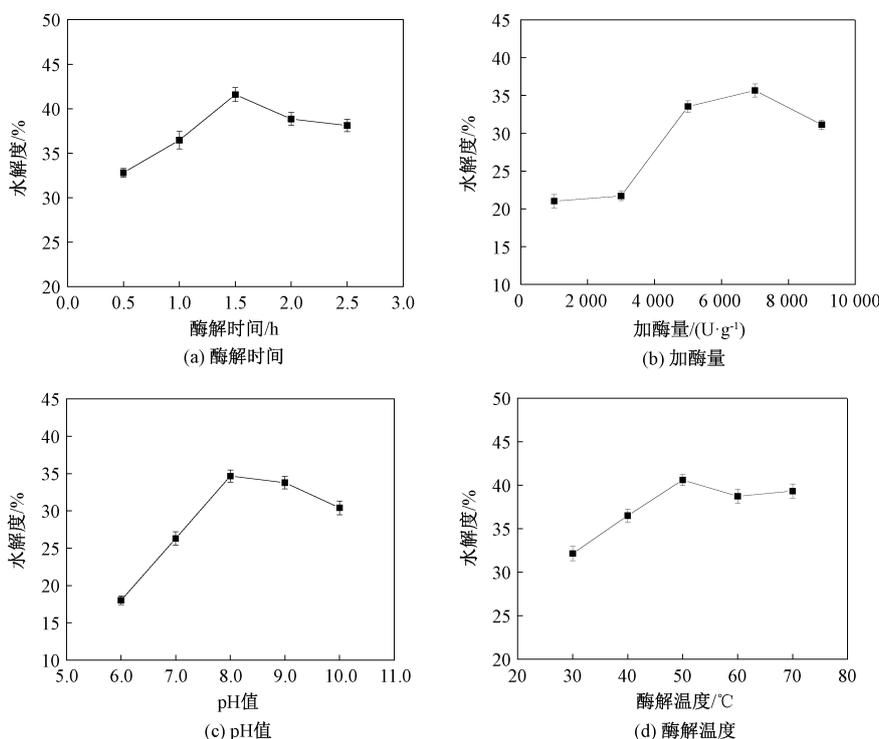


图 2 酶解时间、加酶量、pH 值、酶解温度对麦胚蛋白酶解的影响

Fig. 2 Effects of enzymatic hydrolysis time, enzyme addition, pH and temperature on the enzymatic hydrolysis of wheat germ protein

2.4 酶解麦胚蛋白响应面试验设计及结果

2.4.1 麦胚蛋白酶解回归模型分析

在上述单因素试验的基础上,选择酶解时间、温度、pH 值为自变量,响应面软件设计的因素与水平如表 2 所示,试验结果及方差分析分别如表 3、表 4 所示。

通过响应面软件统计分析,得到回归模型如下:

$$\text{麦胚蛋白水解度} = 41.29 + 1.17A - 0.31B + 1.98C - 3.21AB - 0.38AC - 0.23BC - 1.28A^2 - 3.05B^2 - 6.68C^2.$$

表 2 试验因素与水平

Table 2 Experimental levels and factors

因素	水平		
	-1	0	1
A 酶解时间/h	1	1.5	2
B pH 值	7	8	9
C 酶解温度/°C	40	50	60

从表 4 可知,回归模型 $P < 0.0001$,模型极显著;失拟项 $P = 0.3699 > 0.05$,误差在可控范围; $R^2 = 0.978$,相关性好,因素对麦胚蛋白水解影响顺序为酶解温度>酶解时间>pH 值。

表 3 响应面试验结果

Table 3 Response surface experiment results

编号	A	B	C	麦胚蛋白水解度/%
1	0	1	1	33.42
2	0	1	-1	28.66
3	-1	0	1	34.04
4	0	0	0	42.06
5	0	-1	1	34.91
6	-1	1	0	38.71
7	0	0	0	41.54
8	0	0	0	42.07
9	1	1	0	34.98
10	0	0	0	39.79
11	-1	0	-1	30.59
12	0	0	0	40.98
13	1	-1	0	41.62
14	-1	-1	0	32.52
15	1	0	-1	33.36
16	0	-1	-1	29.23
17	1	0	1	35.30

响应曲面坡度越陡、倾斜度越高,交互效应越显著。由图 3 可知,酶解时间和 pH 值交互作用响应曲面倾斜度高,对麦胚蛋白水解度影响显著。三因素间交互效应对麦胚蛋白水解度影响顺序为 $AB>AC>BC$,与表 4 中方差分析一致。

2.4.2 最佳酶解工艺参数验证

响应面分析得出麦胚蛋白酶解最佳工艺为酶解时间 2 h、pH 8.42、酶解温度 51.3 °C,预测水解度为 42.31%。根据试验实际确定酶解时间 2 h、pH 8.4、酶解温度 51 °C,3 组验证试验得到水解度为 41.73%,接近预测值,回归模型拟合性好。

2.5 Zeta-电位分析

Zeta-电位表征溶液中分子间静电相互作用,大小与氨基酸残基分布、带电基团相关。如图 4 所示,麦胚蛋白水解前后 Zeta-电位均为负值,表明其分子表面带有大量负电荷,水解后 Zeta-电位绝对值显著高于水解前($P<0.05$),可能是由于酶解作用释放出带负电荷氨基酸较多所致。

表 4 回归模型方差分析
Table 4 Analysis of variance in response surface test

方差来源	平方和	df	均方和	F	P	显著性
回归模型	336.09	9	37.34	35.58	<0.000 1	**
A	11.05	1	11.05	10.52	0.014 2	*
B	0.79	1	0.79	0.75	0.415 1	
C	31.32	1	31.32	29.85	0.000 9	**
AB	41.15	1	41.15	39.21	0.000 4	**
AC	0.57	1	0.57	0.54	0.485 1	
BC	0.21	1	0.21	0.20	0.667 0	
A ²	6.91	1	6.91	6.59	0.037 2	*
B ²	39.14	1	39.14	37.30	0.000 5	**
C ²	188.11	1	188.11	179.25	<0.000 1	**
残差	7.35	7	1.05			
失拟项	3.74	3	1.25	1.38	0.369 9	
误差项	3.61	4	0.9			
总计	343.44	16				

$R^2=0.978;R_{Adj}^2=0.9511;R_{Pred}^2=0.8095$

注: * 表示差异显著($P<0.05$); ** 表示差异极显著($P<0.01$)。

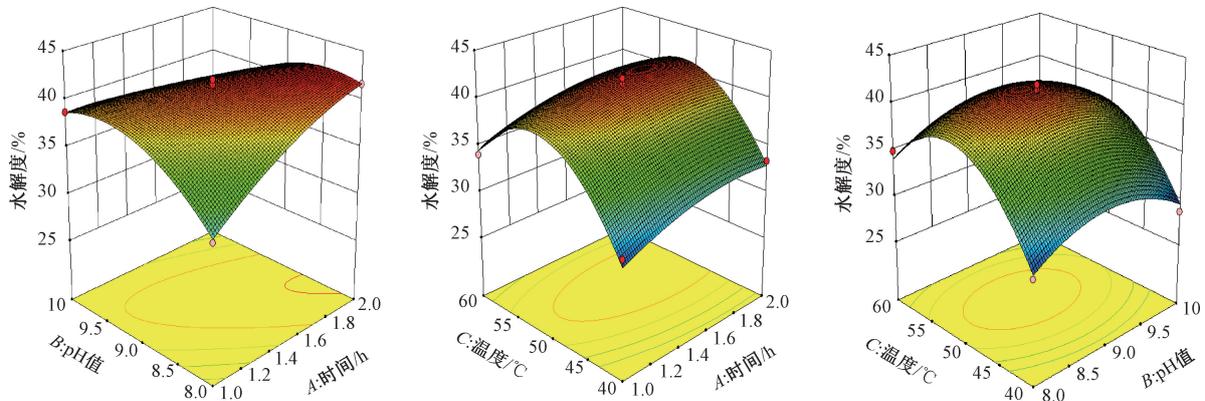


图 3 酶解时间、pH 值、酶解温度的交互作用对麦胚蛋白酶解影响的响应面

Fig. 3 Response surface of the interaction between enzymatic hydrolysis time, pH value and temperature on the enzymatic hydrolysis of wheat germ protein

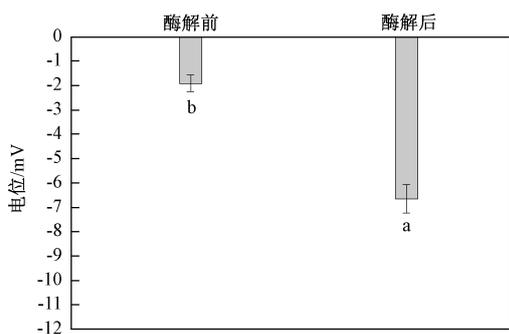


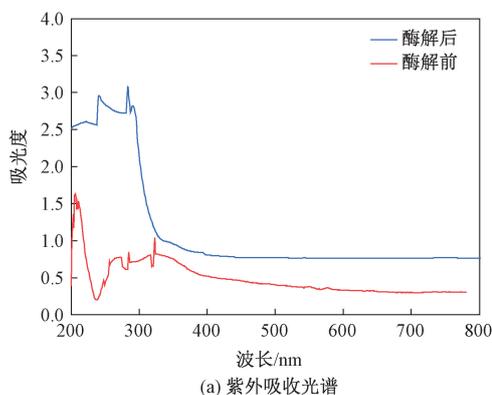
图 4 麦胚蛋白酶解前后 Zeta-电位

Fig. 4 Zeta-potential of wheat germ protein before and after enzymatic hydrolysis

2.6 结构分析

2.6.1 紫外光谱分析

由图 5(a)可知,酶解前后麦胚蛋白紫外光谱的峰形、峰强度存在明显差别。酶解前在 208 nm

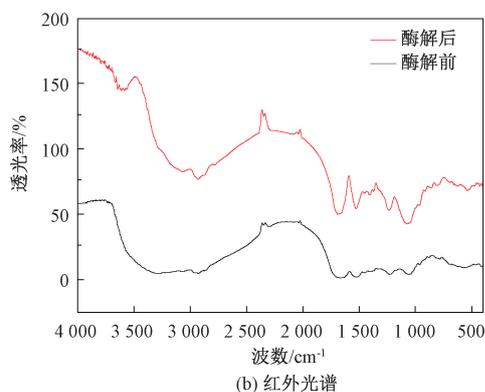


(a) 紫外吸收光谱

附近存在强吸收峰,是肽键中 C=O 发生 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁所致,280 nm 附近吸收带与芳香氨基酸残基有关。酶解后吸收峰红移是因为水解肽键断裂,芳香族生色团暴露改变其构象。

2.6.2 红外光谱分析

如图 5(b)所示,酶解物在 3400 cm^{-1} 附近出现吸收峰,其分子聚合物中有大量氢键,在 2900 cm^{-1} 附近吸收峰与 CH_2 不对称伸展相关,在 2779 cm^{-1} 处有吸收峰表明脂肪链组成发生改变, 2900 cm^{-1} 附近有吸收峰表明酶解物中存在饱和碳 C—H 伸缩振动。酶解物酰胺 I 带 ($1700 \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$) 信号较强,这与 C=O 和肽键的 C—N 伸缩振动相关,其峰型与蛋白二级结构有关^[22]。这些表明麦胚蛋白酶解后其内部结构和疏水区发生了改变。



(b) 红外光谱

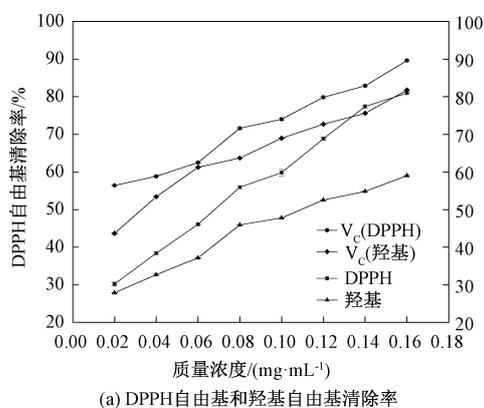
图 5 麦胚蛋白酶解前后紫外吸收光谱和红外光谱

Fig. 5 UV absorption and FTIR spectra of wheat germ protein before and after enzymatic hydrolysis

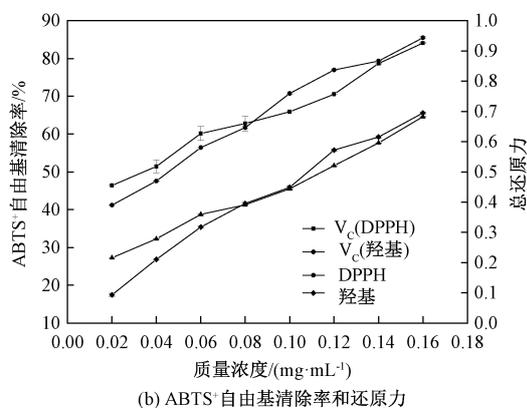
2.7 麦胚蛋白酶解物抗氧化性

如图 6 所示,酶解物对 DPPH·清除能力与质

量浓度基本呈线性关系,清除率最高在 78% 左右, IC_{50} 为 0.0581 mg/mL ;对羟基自由基清除率



(a) DPPH 自由基和羟基自由基清除率



(b) ABTS⁺ 自由基清除率和还原力

图 6 麦胚蛋白酶解物的 DPPH 自由基、羟基自由基、 ABTS^+ 清除能力以及还原力Fig. 6 DPPH free radical, hydroxyl radical, and ABTS^+ scavenging capacity and reduction capacity of enzymatic hydrolysates of wheat germ protein

呈剂量效应关系,最大清除率为 59.09%, IC_{50} 为 0.108 5 mg/mL;对 ABTS⁺ 自由基清除曲线基本呈线性,清除率最高为 61.21%, IC_{50} 为 0.104 1 mg/mL;还原力对应吸光度逐渐增大,呈正相关性,在 0.16 mg/mL 时达到最大值 0.69。相比于齐慧丽等^[23]用复合酶法制备麦胚蛋白活性肽,其水解度、DPPH·清除率和还原力分别为 34.09%、64.78%和 0.578,本试验结果稍高,可能是因为麦胚蛋白经超声处理后酶解,氨基酸结构序列发生改变,肽抗氧化性与氨基酸序列有很大关系,同时也和水解过程中所使用的酶和样品蛋白质质量浓度有关。

3 结论

通过优化得到超声辅助碱法提取麦胚蛋白条件为超声温度 40 ℃、时间 20 min、超声频率 40 kHz,此时麦胚蛋白提取率可达 68.42%。通过单因素试验、响应面试验优化,确定麦胚蛋白酶解最佳工艺条件为酶解时间 2 h、pH 8.4、酶解温度 51 ℃、加酶量 7 000 U/g,此时麦胚蛋白水解度为 41.73%。紫外光谱、红外光谱结构分析发现麦胚蛋白在酶解后特征吸收峰红移,内部结构和疏水区发生改变。麦胚蛋白酶解物表现出一定的体外抗氧化性,其对 DPPH 自由基、羟基自由基、ABTS⁺ 自由基清除能力的 IC_{50} 分别为 0.058 1、0.108 5、0.104 1 mg/mL,还原力在 0.16 mg/mL 时达到最大值 0.69(吸光度)。

参考文献:

- [1] 国家统计局关于 2022 年粮食产量数据的公告 [J]. 粮食加工, 2023, 48(1): 76.
- [2] TIAN S Q, DU K, YAN F, et al. Microwave-assisted enzymatic hydrolysis of wheat germ albumin to prepare polypeptides and influence on physical and chemical properties [J]. Food chemistry, 2022, 374: 131707.
- [3] SOSALAGERE C, ADESEGUN KEHINDE B, SHARMA P. Isolation and functionalities of bioactive peptides from fruits and vegetables: a reviews [J]. Food chemistry, 2022, 366: 130494.
- [4] MOUSAVI B, AZIZI M H, ABBASI S. Antidiabetic bio-peptides of soft and hard wheat glutens [J]. Food chemistry: molecular sciences, 2022, 4: 100104.
- [5] AONDONA M M, IKYA J K, UKEYIMA M T, et al. *In vitro* antioxidant and antihypertensive properties of sesame seed enzymatic protein hydrolysate and ultrafiltration peptide fractions [J]. Journal of food biochemistry, 2021, 45(1): e13587.
- [6] WANG L, LI T, SUN D L, et al. Effect of electron beam irradiation on the functional properties and antioxidant activity of wheat germ protein hydrolysates [J]. Innovative food science & emerging technologies, 2019, 54: 192-199.
- [7] 曾祺, 郑安娜, 张志国. 麦胚蛋白的提取及其酶解制备多肽工艺参数优化 [J]. 粮食与油脂, 2019, 32(6): 20-24.
- [8] RESENDIZ-VAZQUEZ J A, URÍAS-SILVAS J E, ARM J, et al. Effect of ultrasound-assisted enzymolysis on jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed proteins: structural characteristics, technofunctional properties and the correlation to enzymolysis [J]. Journal of food processing and technology, 2019, 10: 1-11.
- [9] FERNANDES F A N, LINHARES F E, RODRIGUES S. Ultrasound as pre-treatment for drying of pineapple [J]. Ultrasonics sonochemistry, 2008, 15(6): 1049-1054.
- [10] JIANG Y L, ZHOU X F, ZHENG Y N, et al. Impact of ultrasonication/shear emulsifying/microwave-assisted enzymatic extraction on rheological, structural, and functional properties of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. seed protein isolates [J]. Food hydrocolloids, 2021, 112: 106355.
- [11] LI W Y, YANG H R, TEODORA E C, et al. Modification of structural and functional characteristics of brewer's spent grain protein by ultrasound assisted extraction [J]. LWT - food science and technology, 2021, 139:110-119.
- [12] SAPAN C V, LUNDBLAD R L, PRICE N C. Colorimetric protein assay techniques [J]. Biotechnology and applied biochemis-

- try, 1999, 29(2): 99-108.
- [13] UMEGO E C, HE R H, REN W B, et al. Ultrasonic-assisted enzymolysis: principle and applications [J]. *Process biochemistry*, 2021, 100: 59-68.
- [14] 王耀松, 马天怡, 胡荣蓉, 等. L-组氨酸修饰乳清蛋白结构及其热诱导凝胶特性 [J]. *食品科学*, 2021, 42(6): 16-23.
- [15] HOMAYOUNI-TABRIZI M, ASOODEH A, SOLTANI M. Cytotoxic and antioxidant capacity of camel milk peptides: effects of isolated peptide on superoxide dismutase and catalase gene expression [J]. *Journal of food and drug analysis*, 2017, 25(3): 567-575.
- [16] REN Y, WU H, LI X F, et al. A two-step, one-pot enzymatic method for preparation of duck egg white protein hydrolysates with high antioxidant activity [J]. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2014, 172(3): 1227-1240.
- [17] YUAN B, YANG X Q, KOU M, et al. Selenylation of polysaccharide from the sweet potato and evaluation of antioxidant, antitumor, and antidiabetic activities [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2017, 65(3): 605-617.
- [18] 马雪洁, 程路峰, 杨淑梅, 等. 异叶青兰总黄酮的含量测定及体外抗氧化活性研究 [J]. *中南药学*, 2021, 19(6): 1130-1133.
- [19] 赵新淮, 徐红华, 姜毓君. 食品蛋白质: 结构、性质与功能 [M]. 北京: 科学出版社, 2009: 440-441.
- [20] DING Y H, MA H L, WANG K, et al. Ultrasound frequency effect on soybean protein: acoustic field simulation, extraction rate and structure [J]. *LWT-food science and technology*, 2021, 145: 111320.
- [21] YANG X, LI Y L, LI S Y, et al. Effects of ultrasound-assisted α -amylase degradation treatment with multiple modes on the extraction of rice protein [J]. *Ultrasonics sonochemistry*, 2018, 40: 890-899.
- [22] MORAND M, GUYOMARC'H F, PEZENEC S, et al. On how κ -casein affects the interactions between the heat-induced whey protein/ κ -casein complexes and the casein micelles during the acid gelation of skim milk [J]. *International dairy journal*, 2011, 21(9): 670-678.
- [23] 齐慧丽, 李书国. 小麦胚芽蛋白活性肽的酶法制备及抗氧化活性的研究 [J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(11): 41-45, 59.

(责任编辑 金铁成)