

玉米醇溶蛋白肽的超滤膜分级及产物的体外生物活性

丛万锁¹, 王晓杰²

(1. 齐齐哈尔大学 研究生部, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 齐齐哈尔大学 食品与生物工程学院, 黑龙江省玉米深加工理论与技术重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:为探究分子质量对玉米醇溶蛋白肽体外生物活性的影响,以玉米醇溶蛋白为原料,采用碱性蛋白酶 Alcalase 酶解制备玉米醇溶蛋白肽,采用截留分子质量为 5.3 ku 和 1 ku 的超滤膜对玉米醇溶蛋白肽进行顺次分级分离,获得分子质量大于 5 ku、3~5 ku、1~3 ku 和小于 1 ku 4 个组分,通过测定各组分的抗氧化活性和乙醇脱氢酶激活活性,表征超滤膜分级对玉米醇溶蛋白肽体外生物活性的影响。结果表明:用碱性蛋白酶 Alcalase 酶解玉米醇溶蛋白 2 h 时,清除 DPPH 自由基的玉米醇溶蛋白肽组分分子质量分布在 1~5 ku 范围内;螯合亚铁离子、清除羟自由基和激活乙醇脱氢酶的玉米醇溶蛋白肽组分的分子质量集中在小于 1 ku;而玉米醇溶蛋白肽的超氧阴离子自由基清除活性和还原力受其分子质量大小影响较小。综上,分子质量对玉米醇溶蛋白肽的生物活性影响较大,可以选用超滤膜对玉米醇溶蛋白肽活性组分进行分级和富集。

关键词:玉米醇溶蛋白;玉米醇溶蛋白肽;超滤分级;分子质量;抗氧化活性

中图分类号:TQ936; TQ028.8 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2022)12-0070-06

Ultrafiltration membrane classification of zein peptide and the in vitro biological activities of the product

CONG Wansuo¹, WANG Xiaojie²

(1. Graduate Faculty of Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China; 2. Heilongjiang Key Laboratory of Corn Deep Processing Theory and Technology, College of Food and Biological Engineering, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to study the effect of molecular weight on the in vitro biological activities of zein peptide, zein was hydrolyzed by alkaline protease Alcalase to prepare zein peptide, and then the zein peptide was fractionated sequentially using ultrafiltration membranes with molecular weight cut-off 5.3 ku and 1 ku, and four components with molecular weight more than 5 ku, 3-5 ku, 1-3 ku and less than 1 ku were obtained. The effect of molecular weight on the biological activities of zein peptide was characterized by measuring the antioxidant and alcohol dehydrogenase activation activities of each molecular weight component. The results showed that when zein was hydrolyzed with alkaline protease Alcalase for 2 h, the molecular weight of the zein peptide that had the ability to scavenge DPPH free radicals was in the range of 1-5 ku. The molecular weight of the zein peptide with the ability to chelate ferrous ions, scavenge hydroxyl free radicals and activate alcohol dehydrogenase was concentrated less than 1 ku. However, the superoxide anion radical scavenging activity and reducing power of zein peptide were less affected by the molecular weight. In conclusion, the biological activities of zein peptide were greatly

收稿日期:2021-09-28;修回日期:2022-07-22

基金项目:黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2020C111);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费青年创新人才科研项目(135509228)

作者简介:丛万锁(1980),男,工程师,硕士,研究方向为生物信息学(E-mail) congwansuo@126.com。

affected by the molecular weight, and ultrafiltration membranes could be used to fractionate and concentrate the active components of zein peptide.

Key words: zein; zein peptide; ultrafiltration classification; molecular weight; antioxidant activity

玉米醇溶蛋白肽是以玉米醇溶蛋白为原料,经蛋白酶水解或微生物发酵后获得的小分子质量多肽^[1]。与玉米醇溶蛋白相比,玉米醇溶蛋白肽具有分子质量小、易于吸收等特性,可以减轻胃肠道负担,进而改善胃肠功能障碍。同时,玉米醇溶蛋白肽的结构多样性使其在抗氧化活性方面效果显著,如清除自由基、螯合金属离子、抑制亚油酸自氧化等^[2-3];在H₂O₂诱导的氧化应激条件下,玉米醇溶蛋白肽通过清除人肝肿瘤细胞HepG2和JHH7细胞内的活性氧簇(ROS),提高细胞内源抗氧化酶活性及总谷胱甘肽的含量,从而对氧化损伤的肝细胞产生保护作用^[4-6];Jiang等^[7]用D-半乳糖构建了衰老大鼠模型,发现250 mg/kg剂量的玉米醇溶蛋白肽(分子质量小于10 ku)能够提高大鼠体内的超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性,降低脂质过氧化产物丙二醛浓度,表明玉米醇溶蛋白肽具有良好的体内抗氧化能力。因此,可以将玉米醇溶蛋白肽用作食品、宠物食品和饲料系统中的天然抗氧化剂^[8]。

玉米醇溶蛋白肽的分子质量大小与其抗氧化效果直接相关^[9],但大多数功能性活性肽存在于复杂的基质混合物中,且该混合物含有大量不同大小、构象和净电荷的水解蛋白质组分^[10],因此有必要在工业规模上分离和浓缩特定肽,并明确玉米醇溶蛋白肽的分子质量大小与其生物活性之间的关系,为玉米醇溶蛋白肽的制备和富集指明方向。超滤是一种膜过滤法,其借助压力或浓度梯度使样品通过半透膜进行分离,这种分离方法已在实验室研究和工业生产中广泛应用于从粗蛋白水解物中纯化和浓缩低分子质量活性肽^[11]。

本研究以玉米醇溶蛋白为原料,采用碱性蛋白酶Alcalase酶解制备玉米醇溶蛋白肽,采用截留分子质量为5、3 ku和1 ku的超滤膜对玉米醇溶蛋白肽进行顺次分级分离,获得分子质量大于5 ku、3~5 ku、1~3 ku和小于1 ku 4个组分,通过测定各组分的抗氧化活性和乙醇脱氢酶激活活性,表征分子质量对玉米醇溶蛋白肽抗氧化活性和乙醇脱氢酶激活活性的影响,以期对玉米蛋白源活性肽产品的生产与开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

硫代巴比妥酸、菲洛嗪,上海生工生物工程有限公司;碱性蛋白酶Alcalase,酶活力 6.28×10^5 U/mL,丹麦诺维信公司;DPPH自由基、2-脱氧-D-核糖、玉米醇溶蛋白(蛋白质含量95%),Sigma公司;

乙醇脱氢酶、氧化型辅酶I(NAD⁺),上海宝曼生物科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

DF-I集热式磁力加热搅拌器;SHZ-A恒温水浴振荡器;TU1901紫外可见分光光度计;PB-10 pH计;NDA701杜马斯定氮仪,意大利VELP公司;LD-53真空冷冻干燥机,美国Millrock公司;AKTAFWXS膜过滤系统,美国GE公司;中空纤维膜(5 000、3 000 NMWC和1 000 NMWC),美国GE公司。

1.2 实验方法

1.2.1 玉米醇溶蛋白肽的制备

将玉米醇溶蛋白用蒸馏水配成底物质量浓度为50 mg/mL的悬浮液,按酶与底物的质量比为3:100加入碱性蛋白酶Alcalase,在初始pH 8.5、温度60℃条件下酶解2 h。在酶解过程中,不断加入1.0 mol/L NaOH使pH保持在8.5。酶解结束后,将反应液放入沸水浴中灭酶15 min,冷却至室温后将pH调至7.0,以4 000 r/min离心10 min,收集上清液(玉米醇溶蛋白肽溶液)备用。

1.2.2 玉米醇溶蛋白肽的超滤分级

将一定体积的玉米醇溶蛋白肽溶液注入超滤分离装置的储槽中,通过泵提供动力,样品溶液经微滤后进入截留分子质量为5 ku的超滤膜中,样品溶液中分子质量小于5 ku的小分子物质经中空纤维膜的内壁渗透出来成为渗透液,分子质量大于5 ku的大分子物质得以保留并得到浓缩,返回到储槽中,如此反复循环,收集分子质量大于5 ku和小于5 ku的组分。将分子质量小于5 ku的渗透液再顺次通过3 ku和1 ku的超滤膜。共获得分子质量大于5 ku、3~5 ku、1~3 ku和小于1 ku 4个组分。

1.2.3 蛋白质含量的测定

采用Folin-酚法^[12]测定蛋白质含量。

1.2.4 抗氧化活性的测定

参照Wang等^[9]的方法进行测定。以未超滤的玉米醇溶蛋白肽为对照,用蒸馏水将各超滤组分稀释为质量浓度分别为0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL溶液,用于测定DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基清除能力,亚铁离子螯合能力和还原力。

1.2.5 乙醇脱氢酶激活活性的测定

采用瓦勒-霍赫法进行测定^[13],略有修改。按表1加入各种相应反应液到10 mL带盖离心管中,振荡混合均匀后放入25℃水浴锅中,盖盖水浴5 min后立即加入0.1 mL 0.25 U/mL乙醇脱氢酶,摇匀后于340 nm处进行时间扫描,反应时间5 min,取

反应最初的线性部分作图,斜率记为 K_p 。对于对照组,用 0.2 mL 蒸馏水代替样品,斜率记为 K_c 。对于空白组,以 0.8 mL 蒸馏水代替对照组的 11.5% 乙醇溶液。按公式(1)计算待测样品的乙醇脱氢酶激活率,记为 y 。

表 1 乙醇脱氢酶激活活性测定时的加样量 mL

组别	样液	pH 8.8 焦磷酸钠	NAD ⁺	11.5% 乙醇	H ₂ O
空白组	-	3	2	-	1
对照组	-	3	2	1	0.2
样品组	0.2	3	2	1	-

$$y = \frac{K_p - K_c}{K_c} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.6 数据统计与分析

除超滤膜分级实验外,其他实验均平行 3 次,结果用“平均值 ± 标准差”表示。实验数据采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 19.0 进行单因素方差分析,采用 LSD 法进行组间多重比较, $p < 0.05$ 为差异显著性水平。

2 结果与讨论

2.1 超滤膜分级对玉米醇溶蛋白肽蛋白质回收率的影响

4 个超滤组分的蛋白质回收率结果如表 2 所示。由表 2 可知,玉米醇溶蛋白经碱性蛋白酶 Alcalase 酶解 2 h 的水解液,经 3 种超滤膜顺次分级分离后,蛋白质的总回收率为 78.25%,其中分子质量小于 3 ku 的组分为 54.31%,而分子质量大于 5 ku 的组分仅为 7.96%,说明在碱性蛋白酶 Alcalase 的作用下,玉米醇溶蛋白的酶解产物主要由分子质量小于 3 ku 的组分构成。

表 2 超滤膜分级后玉米醇溶蛋白肽的蛋白质回收率

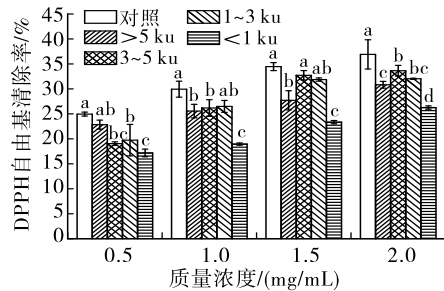
组分	体积/mL	蛋白质含量/ (mg/mL)	蛋白质总量/ mg	回收率/%
超滤前	760	25.45	19 342	-
>5 ku	42	36.67	1 540	7.96
3~5 ku	100	30.91	3 091	15.98
1~3 ku	300	21.82	6 546	33.84
<1 ku	198	20.00	3 960	20.47

2.2 超滤膜分级对玉米醇溶蛋白肽抗氧化活性的影响

2.2.1 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基是一种含有一个单电子、较稳定的含氮自由基,当其遇到质子供体时,例如抗氧化活性肽,可以转移一个电子将 DPPH 自由基还原成稳定的抗磁性分子^[14],同时, DPPH 自由基的抑制实

验具有很高的重现性^[15]。因此, DPPH 自由基通常用于评价食品成分的氮自由基清除能力。在不同质量浓度下,研究分子质量对玉米醇溶蛋白肽 DPPH 自由基清除能力的影响,结果如图 1 所示。



注:同一质量浓度下不同小写字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。下同

图 1 超滤膜分级对玉米醇溶蛋白肽 DPPH 自由基清除率的影响

由图 1 可见,与对照组相比,玉米醇溶蛋白肽经超滤膜分级后,各分子质量组分对 DPPH 自由基的清除能力有不同程度的降低,但均随着其质量浓度的增加而增大。在质量浓度为 0.5 ~ 1.0 mg/mL 时,分子质量大于 5 ku 组分对 DPPH 自由基的清除能力与分子质量 3~5 ku 和 1~3 ku 组分相比差异不显著 ($p > 0.05$),但显著高于分子质量小于 1 ku 组分 ($p < 0.05$);在质量浓度为 1.5 ~ 2.0 mg/mL 时,分子质量大于 5 ku 组分对 DPPH 自由基的清除能力显著低于分子质量 3~5 ku 组分 ($p < 0.05$),而与分子质量 1~3 ku 组分差异不显著 ($p > 0.05$),说明经过超滤膜分级后,具有较强 DPPH 自由基清除能力的组分主要集中在分子质量 1~5 ku 范围内。

Bamdad 等^[16]研究了大麦醇溶蛋白酶解产物的抗氧化活性,发现中等大小的肽可能在抗氧化活性中起重要作用。Suwal 等^[17]发现 DPPH 清除能力与肽组分的疏水性呈正相关。Xia 等^[18]发现大分子质量肽比小分子质量肽具有更好的 DPPH 自由基清除能力。齐希光等^[19]研究了不同分子质量黑籽瓜种子多肽的抗氧化能力,发现高分子质量多肽具有较多电子致密的侧链基团和较高的疏水性,更易于与 DPPH 自由基结合。在本研究中,分子质量为 1~5 ku 的组分可能具有扩散性和疏水性的最佳平衡,有利于玉米醇溶蛋白肽与 DPPH 自由基结合并将其清除。分子质量大于 5 ku 的组分,主要由大分子质量肽段组成,其较低的反应扩散率可能会限制 DPPH 自由基的清除,而分子质量小于 1 ku 的组分由于其亲水性的积累,不利于与脂溶性 DPPH 自由基结合,

导致 DPPH 自由基清除能力较低。

2.2.2 亚铁离子螯合能力

亚铁离子是过渡态金属离子中最强大的助氧化剂,具有通过 Fenton 反应或 Haber-Weiss 反应产生羟自由基的能力^[20]。因此,具有亚铁离子螯合能力就能抑制羟自由基的产生,进而延迟氧化反应。在不同质量浓度下,研究分子质量对玉米醇溶蛋白肽亚铁离子螯合能力的影响,结果如图 2 所示。

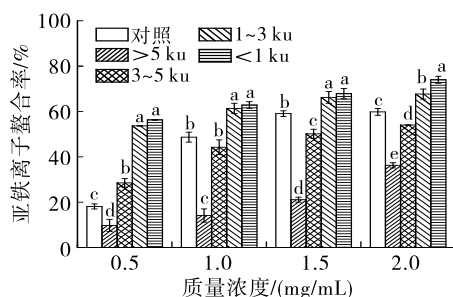


图 2 超滤膜分级对玉米醇溶蛋白肽亚铁离子螯合率的影响

由图 2 可见,玉米醇溶蛋白肽经超滤膜分级后,随着超滤组分分子质量的减小,其对亚铁离子的螯合能力逐渐增大,且螯合能力随着其质量浓度的增加而增大。4 个分级组分中,分子质量小于 1 ku 组分具有最强的亚铁离子螯合能力,且显著高于对照组($p < 0.05$)。杨玉蓉等^[21]研究了不同分子质量桃仁多肽螯合亚铁离子的能力,也发现分子质量越小而螯合率越高的现象,与本实验结果一致。Saiga 等^[22]发现酸性残基(Asp 和 Glu)和碱性残基(His, Lys 和 Arg)由于其电子电荷特性,其侧链中的羧基和氨基在肽的 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 螯合能力中起着至关重要的作用。与分子质量大的组分相比,分子质量小于 1 ku 的玉米醇溶蛋白肽组分中可能具有更多的亚铁离子结合位点,如 Asp、Glu、His 和 Arg 等,故其亚铁离子螯合能力最强,这与 Jaiswal 等^[23]实验结果一致。

2.2.3 还原力

在不同质量浓度下,研究分子质量对玉米醇溶蛋白肽还原力的影响,结果如图 3 所示。

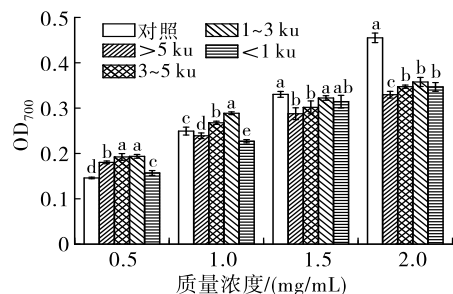


图 3 超滤膜分级对玉米醇溶蛋白肽还原力的影响

由图 3 可见:在质量浓度为 0.5 ~ 1.0 mg/mL

时,经超滤膜分级后,分子质量 3 ~ 5 ku、1 ~ 3 ku 组分的还原力与对照组相比显著增加($p < 0.05$);在质量浓度为 1.5 mg/mL 时,分子质量 1 ~ 3 ku 和小于 1 ku 组分的还原力与对照组相比差异不显著($p > 0.05$);在质量浓度为 2.0 mg/mL 时,分子质量 3 ~ 5 ku、1 ~ 3 ku 和小于 1 ku 3 个组分间的还原力差异不显著($p > 0.05$)。丁顺杰等^[24]研究了超滤分级前后酶解缬丝蚕蛹蛋白各组分的还原力,发现达到一定质量浓度后还原力不再增大的现象,与本实验结果一致。综上,在玉米醇溶蛋白肽的不同分子质量组分中,发挥还原能力的组分主要集中在分子质量 1 ~ 3 ku 范围内。

2.2.4 羟自由基清除能力

羟自由基在活性氧簇(ROS)中具有最强的氧化能力,可以在金属离子(例如 Cu^{2+} 或 Fe^{2+})存在下由超氧阴离子和过氧化氢形成。羟自由基可以与蛋白质、脂质和核酸发生反应。因此,羟自由基清除能力是衡量抗氧化剂性能的常用指标。在不同质量浓度下,研究分子质量对玉米醇溶蛋白肽羟自由基清除能力的影响,结果如图 4 所示。

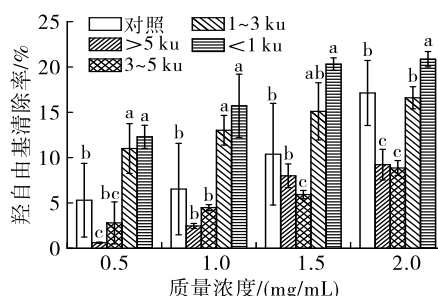


图 4 超滤膜分级对玉米醇溶蛋白肽羟自由基清除率的影响

由图 4 可见,在实验质量浓度范围内,分子质量小于 1 ku 组分的羟自由基清除率与对照组相比显著增加($p < 0.05$),表明经超滤膜过滤可富集具有清除羟自由基能力的玉米醇溶蛋白肽。在质量浓度为 2.0 mg/mL 时,分子质量小于 1 ku 组分的羟自由基清除率最大,为 20.86%。随着分子质量的降低,玉米醇溶蛋白肽对羟自由基的清除能力总体上逐渐增强,可能的原因有以下两方面:一是小分子质量玉米醇溶蛋白肽可以作为氢供体与羟自由基反应,阻止了自由基链式反应,杨佳洪^[25]研究鲍内脏抗氧化肽时也发现小分子肽段由于空间位阻小,更易与自由基接触,发挥其抗氧化活性;二是结合 2.2.2 的实验结果,小分子质量玉米醇溶蛋白肽作为金属离子螯合剂可以与过渡金属离子如 Fe^{2+} 发生螯合作用,破坏 Fenton 反应或者 Haber-Weiss 反

应,从而抑制羟自由基的产生。

目前,关于分子质量对活性肽清除羟自由基能力的影响有不同的报道。分子质量在 30 ~ 50 ku 之间的大豆蛋白水解物显示出最高的羟自由基清除能力(69.75%),而鹰嘴豆蛋白 Alcalase 水解物中分子质量最低的肽组分显示出最高的羟自由基清除活性(1.5 mg/mL 时为 81%)^[26]。这些差异可以通过底物、蛋白酶类型以及酶与底物比例的不同来解释,这些因素都会直接影响底物的水解程度,进而影响水解产物的氨基酸组成和序列^[26]。因此,在利用玉米醇溶蛋白制备抗氧化活性肽时,应考虑蛋白酶的选择及使用剂量,才能使抗氧化活性肽的活性集中在小分子质量范围内。

2.2.5 超氧阴离子自由基清除能力

超氧阴离子自由基是 ROS 的主要成分,在细胞凋亡、增殖和分化中起着重要的生理作用^[20]。同时,超氧阴离子自由基是高反应活性物质(例如羟自由基)的潜在前体。因此,清除超氧阴离子自由基非常重要。在不同质量浓度下,研究分子质量对玉米醇溶蛋白肽超氧阴离子自由基清除率的影响,结果如图 5 所示。

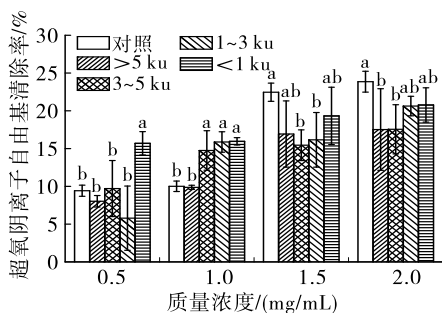


图 5 超滤膜分级对玉米醇溶蛋白肽超氧阴离子自由基清除率的影响

由图 5 可见:在质量浓度为 0.5 ~ 1.0 mg/mL 时,分子质量小于 1 ku 组分的超氧阴离子自由基清除率与对照组相比显著增加($p < 0.05$);在质量浓度为 1.5 ~ 2.0 mg/mL 时,分子质量小于 1 ku 组分的超氧阴离子自由基清除率与对照组相比差异不显著($p > 0.05$);在质量浓度为 2.0 mg/mL 时,4 个分子质量组分间的超氧阴离子自由基清除率差异不显著($p > 0.05$),说明玉米醇溶蛋白肽清除超氧阴离子的能力与其分子质量之间没有太大关系,这与付学军等^[27]的研究结果一致。

2.3 超滤膜分级对玉米醇溶蛋白肽乙醇脱氢酶激活活性的影响

在肝脏中,大部分酒精通过乙醇脱氢酶途径代谢。乙醇脱氢酶途径包括乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶

两种酶,血液中酒精的去除率通常取决于乙醇脱氢酶活性。在不同质量浓度下,研究分子质量对玉米醇溶蛋白肽乙醇脱氢酶激活率的影响,结果如图 6 所示。

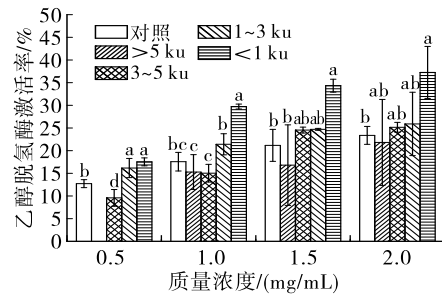


图 6 超滤膜分级对玉米醇溶蛋白肽乙醇脱氢酶激活率的影响

由图 6 可见,除 0.5 mg/mL 质量浓度外,分子质量大于 5 ku、3 ~ 5 ku 和 1 ~ 3 ku 3 个组分的乙醇脱氢酶激活率与对照组间差异均不显著($p > 0.05$),而分子质量小于 1 ku 组分的乙醇脱氢酶激活率与对照组相比显著增加($p < 0.05$),说明经超滤膜分离可对具有乙醇脱氢酶激活活性的玉米醇溶蛋白肽起到富集效果。在质量浓度为 2.0 mg/mL 时,分子质量小于 1 ku 组分的乙醇脱氢酶激活率最高,为 37.92%。小分子质量组分的乙醇脱氢酶激活率最高,可能的原因有以下两方面:一是分子质量小于 1 ku 组分中含有高比例的丙氨酸(Ala)和亮氨酸(Leu),能够稳定反应体系中的 NAD^+ ,从而增强了乙醇脱氢酶的活性,提高了乙醇脱氢酶激活率;二是与大分子质量组分相比,分子质量小于 1 ku 组分相对于乙醇脱氢酶的空间位阻相对较低,可以稳定乙醇脱氢酶活性。Xiao 等^[28]研究了鸡肉水解物对乙醇脱氢酶稳定性的影响,发现肽分子的低空间位阻可以稳定乙醇脱氢酶活性,与本实验结果一致。

3 结论

玉米醇溶蛋白经碱性蛋白酶 Alcalase 酶解 2 h 时,水解产物经过截留分子质量为 5、3 ku 和 1 ku 的超滤膜进行顺次分级分离后,研究不同分子质量组分的抗氧化活性和乙醇脱氢酶激活活性,发现玉米醇溶蛋白肽的生物活性与其分子质量大小有关,玉米醇溶蛋白肽的抗氧化活性和乙醇脱氢酶激活活性主要集中在分子质量小于 1 ku 组分中,且呈剂量依赖性。因此,在制备玉米醇溶蛋白肽时,可以选用超滤膜对活性组分进行分级和富集。

参考文献:

- [1] 王晓杰,曲悦,刘晓兰,等. 玉米肽的纳滤脱盐工艺及脱盐产物抗氧化活性[J]. 食品科学, 2021, 42(5):

- 39–45.
- [2] WANG L Y, DING L, WANG Y, et al. Isolation and characterisation of in vitro and cellular free radical scavenging peptides from corn peptide fractions [J]. *Molecules*, 2015, 20(2): 3221–3237.
- [3] SHEN Y T, HU R J, LI Y H. Antioxidant and emulsifying activities of corn gluten meal hydrolysates in oil-in-water emulsions[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2020, 97(2): 175–185.
- [4] WANG L Y, DING L, YU Z P, et al. Intracellular ROS scavenging and antioxidant enzyme regulating capacities of corn gluten meal-derived antioxidant peptides in HepG2 cells[J]. *Food Res Int*, 2016, 90: 33–41.
- [5] WANG L Y, DING L, XUE C M, et al. Corn gluten hydrolysate regulates the expressions of antioxidant defense and ROS metabolism relevant genes in H₂O₂-induced HepG2 cells[J]. *J Funct Foods*, 2018, 42: 362–370.
- [6] LIU W Y, FANG L, FENG X W, et al. In vitro antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of peptides derived from corn gluten meal[J]. *Eur Food Res Technol*, 2020, 246(10): 2017–2027.
- [7] JIANG X, CUI Z Q, WANG L H, et al. Production of bioactive peptides from corn gluten meal by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* MTCC5480 and evaluation of its antioxidant capacity in vivo[J/OL]. *LWT – Food Sci Tech*, 2020, 131: 109767 [2021-09-28]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109767>.
- [8] HU R J, DUNMIRE K M, TRUELOCK C N, et al. Antioxidant performances of corn gluten meal and DDGS protein hydrolysates in food, pet food, and feed systems [J/OL]. *J Agric Food Res*, 2020, 2: 100030 [2021-09-28]. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2020.100030>.
- [9] WANG X J, ZHENG X Q, KOPPARAPU N K, et al. Purification and evaluation of a novel antioxidant peptide from corn protein hydrolysate[J]. *Process Biochem*, 2014, 49(9): 1562–1569.
- [10] CHEN L H, LI D N, ZHU C C, et al. Characterisation of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of golden melon seeds protein[J]. *Int J Food Sci Tech*, 2021, 56(11): 5904–5912.
- [11] PAN X, ZHAO Y Q, HU F Y, et al. Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage[J]. *J Funct Foods*, 2016, 25: 220–230.
- [12] LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 264–275.
- [13] VALLEE B L, HOCH F L. Zinc: a component of yeast alcohol dehydrogenase[J]. *P Natl Acad Sci USA*, 1955, 41(6): 327–328.
- [14] COTELLE N, BERNIER J L, CATTEAU J P, et al. Antioxidant properties of hydroxy-flavones [J]. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20: 35–43.
- [15] WANG K, WANG Y, LIN S Y, et al. Analysis of DPPH inhibition and structure change of corn peptides treated by pulsed electric field technology [J]. *J Food Sci Tech*, 2015, 52(7): 4342–4350.
- [16] BAMDAD F, WU J, CHEN L. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein[J]. *J Cereal Sci*, 2011, 54(1): 20–28.
- [17] SUWAL S, KETNAWA S, LICEAGA A M, et al. Electro-membrane fractionation of antioxidant peptides from protein hydrolysates of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) byproducts[J]. *Innov Food Sci Emerg*, 2018, 45: 122–131.
- [18] XIA Y, BAMDAD F, GÄNZLE M, et al. Fractionation and characterization of antioxidant peptides derived from barley glutelin by enzymatic hydrolysis[J]. *Food Chem*, 2012, 134(3): 1509–1518.
- [19] 齐希光, 陆晓婷, 张晖, 等. 不同分子量黑籽瓜种子多肽抗氧化能力的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(9): 74–80.
- [20] LIU H, COLAVITTI R, ROVIRA I I, et al. Redox-dependent transcriptional regulation[J]. *Circ Res*, 2005, 97(10): 967–974.
- [21] 杨玉蓉, 李安平, 钟政昌, 等. 桃仁多肽螯合亚铁的结构表征及体外模拟消化[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(2): 61–69.
- [22] SAIGA A I, TANABE S, NISHIMURA T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(12): 3661–3667.
- [23] JAISWAL A, BAJAJ R, MANN B, et al. Iron(II)-chelating activity of buffalo α S-casein hydrolysed by corolase PP, alcalase and flavourzyme[J]. *J Food Sci Tech*, 2014, 52(6): 3911–3918.
- [24] 丁顺杰, 罗金凤, 丁晓雯, 等. 酶解缫丝蚕蛹蛋白抗氧化肽的分离与稳定性研究[J]. *食品科学*, 2015, 36(3): 35–40.
- [25] 杨佳洪. 鲍内脏抗氧化肽分离纯化和构效关系研究[D]. 福建 厦门:集美大学, 2017.
- [26] ZHUANG H, TANG N, YUAN Y. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal [J]. *J Funct Foods*, 2013, 5(4): 1810–1821.
- [27] 付学军, 金海珠. 海参肽的抗氧化活性与分子量的相关性研究[J]. *食品科技*, 2013, 38(7): 63–66.
- [28] XIAO C Q, ZHAO M M, ZHOU F B, et al. Isolation and identification of alcohol dehydrogenase stabilizing peptides from Alcalase digested chicken breast hydrolysates[J/OL]. *J Funct Foods*, 2019, 64: 103617 [2021-09-27]. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103617>.