

双酶制备花生肽及其对 NO· 的清除能力

王 越, 章绍兵, 张晓瑞, 王冰奕

(河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450052)

摘要:为对花生免疫活性肽的制备提供基础,采用蛋白酶水解花生蛋白制备花生肽,以花生蛋白水解度和 NO· 清除率为指标,优化酶种类组合及水解条件。结果表明:先采用 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶在花生蛋白质量浓度 5 g/100 mL、超声功率 400 W、超声时间 5 min、pH 8.0、加酶量 7 400 U/g、水解温度 55 °C 条件下水解 3 h,再加入 2 480 U/g 的中性蛋白酶,在 pH 7.0、水解温度 40 °C 条件下继续水解 30 min,花生蛋白水解度可达到 24.73%,花生肽 NO· 清除率的 IC₅₀ 为 1.88 mg/mL (显著低于商品大豆肽的 3.51 mg/mL 和商品酪蛋白肽的 11.71 mg/mL);水解度在 7.8% ~ 39.1% 范围内与 NO· 清除率有极显著线性关系,水解度超过 22.6% 时,与 NO· 清除率无显著线性关系。较高的水解度是花生肽拥有良好 NO· 清除能力的必要条件,但并非水解度越高越好。

关键词:花生肽;酶解;水解度;NO· 清除率

中图分类号:TS201.2;TQ936.1 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)01-0014-06

Preparation of peanut peptide by double enzymes hydrolysis and its ability to scavenge NO·

WANG Yue, ZHANG Shaobing, ZHANG Xiaorui, WANG Bingyi

(College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: In order to provide a basis for the preparation of peanut immune active peptide, the peanut peptide was prepared by hydrolyzing peanut protein with protease, and the combination of enzyme species and hydrolysis conditions were optimized with the degree of hydrolysis of peanut protein and NO· scavenging rate as indicators. The results showed that the peanut protein was first hydrolyzed for 3 h with Alcalase 2.4L alkaline protease under the conditions of mass concentration of peanut protein 5 g/100 mL, ultrasonic power 400 W, ultrasonic time 5 min, pH 8.0, enzyme dosage 7 400 U/g, and hydrolysis temperature 55 °C, then 2 480 U/g neutral protease was added to hydrolyze for 30 min under the conditions of pH 7.0 and hydrolysis temperature 40 °C, the degree of hydrolysis of peanut protein could reach 24.73%, and the IC₅₀ of NO· scavenging rate of peanut peptide was 1.88 mg/mL (significantly lower than commercial soybean peptide 3.51 mg/mL and commercial casein peptide 11.71 mg/mL). The degree of hydrolysis in the range of 7.8% - 39.1% had a very significant linear correlation with NO· scavenging rate. When the degree of hydrolysis was over 22.6%, there was no significant linear correlation between the degree of hydrolysis and NO· scavenging rate. Higher degree of hydrolysis is the necessary condition for peanut peptide to have good NO· scavenging ability, but the higher degree of hydrolysis is not the better.

Key words: peanut peptide; enzymatic hydrolysis; degree of hydrolysis; NO· scavenging rate

花生蛋白主要由花生球蛋白和伴花生球蛋白组

成,其氨基酸种类和含量丰富^[1]。研究发现,蛋白质经水解制得的肽生物活性好,其吸收率比氨基酸高,且比氨基酸更易、更快通过小肠黏膜被人体吸收利用^[2]。花生肽具有抗氧化^[3]、降血压^[4]、抗菌^[5]、免疫调节^[6-7]等多种生理活性。然而,目前在对花生肽免疫调节功能的研究中,因动物实验周期长、操

收稿日期:2021-09-09;修回日期:2022-07-29

作者简介:王 越(1996),男,硕士研究生,研究方向为食品生物技术(E-mail)776409592@qq.com。

通信作者:章绍兵,教授(E-mail)shaobingzhang@126.com。

作复杂,一般在实验过程中只是改变了某种花生肽的灌胃剂量,并未对不同来源、不同水解度花生肽的免疫活性进行研究,对花生肽免疫活性的研究仍不够系统和全面。

一氧化氮(NO)在炎症的发病机制中起着关键作用,是包括免疫、神经和心血管组织在内的许多生物系统中的效应分子,是参与宿主免疫防御系统的关键信号生物分子^[8]。当NO过量时,会发生氧化形成更多的活性氮,导致附近组织中细胞的凋亡,并破坏组织的稳态^[9],所以能够抑制NO·的物质均具有提高人体免疫力的潜力。Hirai等^[10]从小麦面筋中提取的多聚焦谷氨酰亮氨酸(Pyro-Glu-Leu)可以抑制脂多糖(LPS)诱导的NO、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-6(IL-6)的产生,具有抑制炎症的免疫调节作用。Saisavoey等^[11]用4种不同的蛋白酶水解鲑鱼骨蛋白得到的水解产物都表现出了较高的NO·清除活性。目前尚未见到关于花生肽NO·清除活性的研究报道。

本实验采用不同商品蛋白酶水解花生蛋白,以花生蛋白水解度和NO·清除率为指标,优化花生蛋白的酶解工艺参数,旨在为花生免疫活性肽的制备提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

花生,市售;Alcalase 2.4L碱性蛋白酶(1.85×10^5 U/mL),丹麦诺维信有限公司;2709碱性蛋白酶(1.77×10^5 U/g),北京索莱宝科技有限公司;胰蛋白酶(1.19×10^5 U/g),上海麦克林生化科技有限公司;中性蛋白酶(6.2×10^4 U/g)、木瓜蛋白酶(1.4×10^4 U/g)、风味蛋白酶(9.57×10^4 U/g),上海源叶生物科技有限公司;硝普钠(SNP)、磺胺、N-(1-萘基)乙二胺盐酸盐(NED),天津市科密欧化学试剂有限公司;大豆肽和酪蛋白肽,西安朗德生物科技有限公司;其他均为国产分析纯试剂。

PHS-3C型pH计,IGJ-10C型冷冻干燥机, TG1850-WS型高速离心机,HH-2J数显恒温水浴锅, GL-20G-II型冷冻离心机, P9型分光光度计, Scientz-III型超声波细胞粉碎机。

1.2 实验方法

1.2.1 花生蛋白的制备

参照文献^[12]采用碱溶酸沉法制备花生蛋白。将花生制浆,取一定量的花生浆,按照料液比1:6加蒸馏水充分溶解,调节pH至10.0后,在50℃、150 r/min的恒温水浴振荡器中振荡30 min,然后在4 000 r/min下离心15 min,取上清液并调节pH至

4.5,沉淀蛋白质,取沉淀并用蒸馏水洗涤2次后,于4 000 r/min下离心10 min,取沉淀,冷冻干燥,粉碎,得花生蛋白粉。

1.2.2 花生肽的酶法制备

将花生蛋白粉配制成一定质量浓度的溶液,用400 W的超声波预处理一定时间,然后用0.5 mol/L NaOH溶液调节pH,加入蛋白酶,在一定温度下水解一定时间。反应过程中不断搅拌,并保持体系pH恒定。对于单酶水解,水解完成后,立即将水解液于90℃恒温水浴锅中灭酶15 min,立即冷却,在4℃、10 000 r/min下离心15 min,取上清液,过滤,冷冻干燥,粉碎,得到花生肽粉。而对于双酶水解,则在单酶水解完成后,调节溶液pH,加入另外一种蛋白酶,在适宜的温度下水解一定时间,然后按照单酶水解的操作经灭酶、离心、冷冻干燥等得到花生肽粉。

1.2.3 水解度的测定

单酶水解制备花生肽的水解度采用pH-Stat法测定,具体见文献^[13]。双酶水解制备花生肽的水解度采用甲醛滴定法,具体参考周慧江等^[14]的方法并稍作修改:取灭酶后的水解液5.0 mL于烧杯中,加入60 mL去CO₂的水,置于磁力搅拌器上,调节体系pH至8.2,加入20 mL中性甲醛溶液,再加入0.1 mol/L NaOH标准溶液使体系pH达到9.2,记录消耗的NaOH标准溶液体积。同时取相同质量浓度的未水解蛋白质溶液5.0 mL,按上述方法做空白实验,记录消耗的NaOH标准溶液体积。水解度(D_H)按式(1)计算。

$$D_H = C \times (V - V_0) \times 0.014 / N \times 100\% \quad (1)$$

式中: C 为NaOH标准溶液浓度, mol/L; V 为水解液消耗NaOH标准溶液体积, mL; V_0 为空白实验消耗NaOH标准溶液体积, mL; 0.014为氮毫克当量; N 为底物样品总氮含量(凯氏定氮法测定), g。

1.2.4 NO·清除率的测定

参考霍彦雄^[15]、Sangtanoo^[16]的方法并稍加改动。配制一定质量浓度的花生肽溶液,取100 μ L,加入100 μ L 0.1 mol/L硝普钠溶液,混匀,在室温下反应150 min。加入2 mL酸性磺胺溶液(0.33 g磺胺溶于100 mL体积分数为5%的磷酸溶液中),在室温下反应5 min后,再加入2 mL 12.5 mmol/L的NED溶液,立即在540 nm处测定吸光值。按下式计算NO·清除率(Y)。

$$Y = [A_3 - (A_2 - A_1)] / A_3 \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_3 为不加花生肽溶液的吸光值; A_2 为加花

生肽溶液的吸光值; A_1 为以去离子水代替花生肽溶液的吸光值。

1.2.5 常规指标分析

蛋白质含量按照 GB 5009.5—2016 中的凯氏定氮法测定,水分含量按照 GB 5009.3—2016 中的直接干燥法测定,蛋白酶活力按照 GB/T 23527—2009 中的福林法测定。

1.2.6 数据分析

所有实验至少重复两次,结果以“平均值 \pm 标准差”表示,采用 SPSS 软件对数据进行 Duncan 方差分析($p < 0.05$ 为显著水平),采用 Origin 软件作图。

2 结果与分析

2.1 单酶水解花生蛋白工艺条件的优化

2.1.1 酶种类的筛选

采用 6 种商品蛋白酶,按照 1.2.2 的方法,在花生蛋白质量浓度 5 g/100 mL、未超声预处理、加酶量 5% (除 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶为 3% 外)、水解时间 3 h,以及各酶最适温度和 pH (见表 1) 条件下,考察不同蛋白酶对花生蛋白水解度和 NO \cdot 清除率的影响,结果分别见图 1 和图 2。

表 1 不同蛋白酶作用条件

酶种类	pH	温度/ $^{\circ}$ C
2709 碱性蛋白酶	8.5	50
Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶	8.0	55
胰蛋白酶	8.5	50
中性蛋白酶	7.0	40
风味蛋白酶	7.0	50
木瓜蛋白酶	7.5	60

注:表中数据根据文献[17]整理

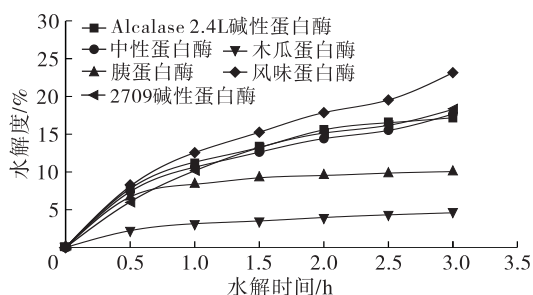
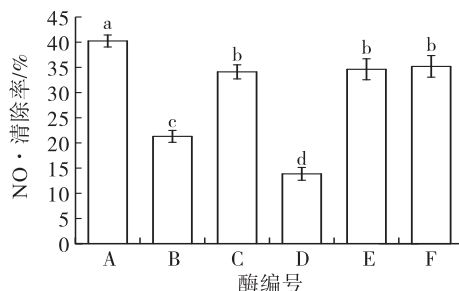


图 1 不同蛋白酶对花生蛋白水解度的影响

由图 1 可知,对于不同蛋白酶,前 1 h 水解度均迅速增大,而后逐渐趋于平缓。在 6 种蛋白酶中,风味蛋白酶的水解度最高,在水解 3 h 时水解度达到 23.15%,其次是 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶、2709 碱性蛋白酶和中性蛋白酶,在水解 3 h 时三者水解度均在 17% 左右,而胰蛋白酶和木瓜蛋白酶水解花生蛋白的能力较差,在水解 3 h 时水解度均在 10% 以下。



注:A. Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶;B. 胰蛋白酶;C. 风味蛋白酶;D. 木瓜蛋白酶;E. 中性蛋白酶;F. 2709 碱性蛋白酶。NO \cdot 清除率为样品质量浓度 5 mg/mL 时的测定值。不同字母表示差异显著($p < 0.05$),下同

图 2 不同蛋白酶对 NO \cdot 清除率的影响

由图 2 可知,使用不同的蛋白酶水解花生蛋白 3 h 制备的花生肽对 NO \cdot 的清除效果不同,其中:Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶制备的花生肽对 NO \cdot 的清除效果最好,清除率达到 40.24%;其次是 2709 碱性蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶,这 3 种酶制备的花生肽对 NO \cdot 的清除率没有显著差异,均在 34% 左右;胰蛋白酶和木瓜蛋白酶制备的花生肽对 NO \cdot 的清除效果最差,清除率在 25% 以下。另外,5 种蛋白酶水解花生蛋白制备的花生肽对 NO \cdot 的清除效果均高于未水解的花生蛋白(NO \cdot 清除率 7.15%)。

综合花生蛋白水解度和 NO \cdot 清除率,选择 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶作为花生蛋白的水解酶。

2.1.2 加酶量对花生蛋白水解度和 NO \cdot 清除率的影响

在花生蛋白质量浓度 5 g/100 mL、未超声预处理、pH 8.0、水解温度 55 $^{\circ}$ C、水解时间 3 h 的条件下,考察 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶加酶量对花生蛋白水解度和 NO \cdot 清除率的影响,结果见图 3。

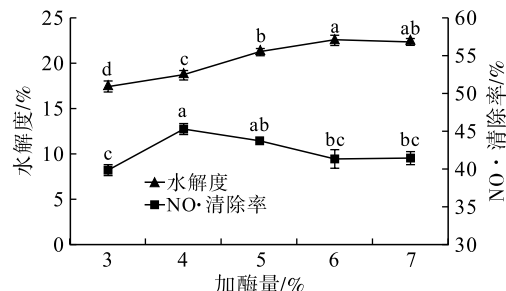


图 3 加酶量对花生蛋白水解度及 NO \cdot 清除率的影响

由图 3 可见:随着加酶量的不断增大,花生蛋白的水解度逐渐上升,在加酶量为 6% (即 11 100 U/g) 时水解度达到最大值;而 NO \cdot 清除率随着加酶量的增加呈先上升后下降的趋势,在加酶量为 4% (即 7 400 U/g) 时 NO \cdot 清除率达到最大(45.28%),此

时水解度为 18.74%。结果说明并不是花生蛋白水解度越高,对 NO· 的清除能力越强。水解过度可能会导致原来具有活性的花生肽丧失活性(活性序列被破坏)。因此,选择加酶量为 4% (即 7 400 U/g)。

2.1.3 花生蛋白质量浓度对花生蛋白水解度和 NO· 清除率的影响

在未超声预处理、pH 8.0、加酶量 3%、水解温度 55℃、水解时间 3 h 的条件下,考察花生蛋白质量浓度对花生蛋白水解度和 NO· 清除率的影响,结果见图 4。

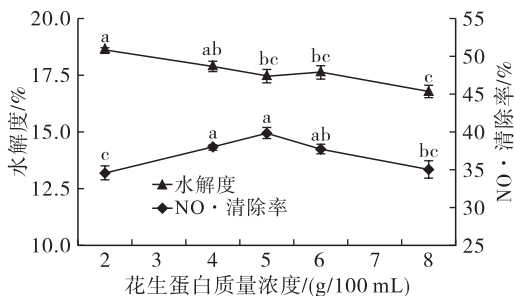


图 4 花生蛋白质量浓度对花生蛋白水解度及 NO· 清除率的影响

由图 4 可见:花生蛋白质量浓度在 2~8 g/100 mL 范围内,随着花生蛋白质量浓度的增大,水解度呈现不断降低的趋势,NO· 清除率呈先增大后降低的趋势,在花生蛋白质量浓度为 5 g/100 mL 时 NO· 清除率最大,为 39.86%,此时水解度为 17.46%。水解度持续降低的原因是体系浓度的增加导致底物溶解性和流动性降低,不利于蛋白酶和底物的接触,进而抑制了水解的进程^[18]。花生蛋白质量浓度在 2~5 g/100 mL 时,尽管水解度下降,但花生肽中具有 NO· 清除活性的组分含量在不断增加,从而使 NO· 清除率不断上升,而当花生蛋白质量浓度超过 5 g/100 mL 后,底物浓度的不断增大导致其水解不彻底,从而使 NO· 清除率下降。因此,选择花生蛋白质量浓度为 5 g/100 mL。

2.1.4 水解时间对花生蛋白水解度及 NO· 清除率的影响

在花生蛋白质量浓度 5 g/100 mL、未超声预处理、pH 8.0、加酶量 3%、水解温度 55℃ 的条件下,考察水解时间对花生蛋白水解度和 NO· 清除率的影响,结果见图 5。

由图 5 可见,在前 60 min 水解反应较为迅速,花生蛋白水解度和 NO· 清除率都呈快速上升趋势,此后上升幅度逐渐减小,在水解 3 h 后花生蛋白水解度和 NO· 清除率都不再有明显的增加。因此,选择水解时间为 3 h。

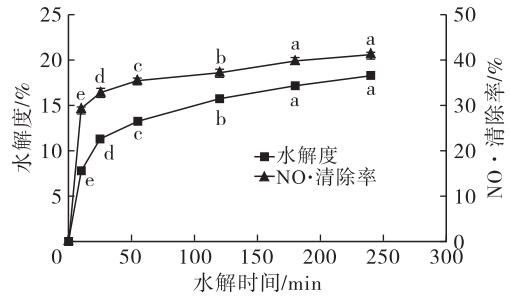


图 5 水解时间对花生蛋白水解度及 NO· 清除率的影响

2.1.5 超声时间对花生蛋白水解度及 NO· 清除率的影响

在花生蛋白质量浓度 5 g/100 mL、pH 8.0、加酶量 5%、水解温度 55℃、水解时间 3 h 的条件下,考察超声时间对花生蛋白水解度和 NO· 清除率的影响,结果见图 6。

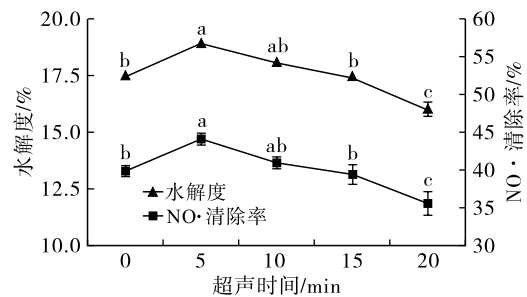


图 6 超声时间对花生蛋白水解度和 NO· 清除率的影响

由图 6 可见,随着超声时间的延长,花生蛋白水解度和 NO· 清除率均先增大后减小,在超声时间为 5 min 时二者都达到了最大值。这是因为适度对花生蛋白进行超声处理可以促进蛋白质分子展开,使酶的结合位点增多,进而促进水解^[19],而过度的超声处理也可能使蛋白质分子发生聚集,不利于水解。因此,选择超声时间为 5 min。

综上,确定 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶水解花生蛋白的优化工艺条件为花生蛋白质量浓度 5 g/100 mL、超声时间 5 min、pH 8.0、加酶量 4%、水解温度 55℃、水解时间 3 h。

2.2 双酶分步水解花生蛋白工艺条件的优化

2.2.1 酶种类的筛选

在 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶(A)优化的条件下对花生蛋白进行水解后,再分别使用中性蛋白酶(B)、风味蛋白酶(C)、胰蛋白酶(D)和木瓜蛋白酶(E)在加酶量 5% 以及各酶最适温度和 pH (见表 1) 条件下水解 1.5 h,考察不同酶组合对花生蛋白水解度和 NO· 清除率的影响,结果见图 7。

由图 7 可见,与单一 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶水解相比,风味蛋白酶、中性蛋白酶和胰蛋白酶的二

次水解显著提高了水解度,而木瓜蛋白酶二次水解不能进一步提高水解度。此外,中性蛋白酶的二次水解显著提高了 NO·清除率,胰蛋白酶对其没有显著影响,而风味蛋白酶和木瓜蛋白酶二次水解后反而降低了 NO·清除率,这可能是由于二次水解将一些原本具有 NO·清除活性的肽段切断。因此,选择 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶 + 中性蛋白酶组合进行后续的研究。

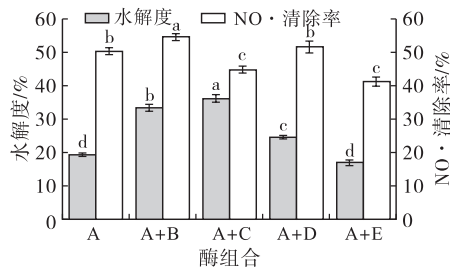


图7 双酶分步水解对花生蛋白水解度和 NO·清除率的影响

2.2.2 中性蛋白酶加酶量对花生蛋白水解度和 NO·清除率的影响

在 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶优化的条件下对花生蛋白进行水解后,采用中性蛋白酶在 pH 7.0、水解温度 40℃、水解时间 1.5 h 条件下进行二次水解,考察中性蛋白酶加酶量对花生蛋白水解度和 NO·清除率的影响,结果见图 8。

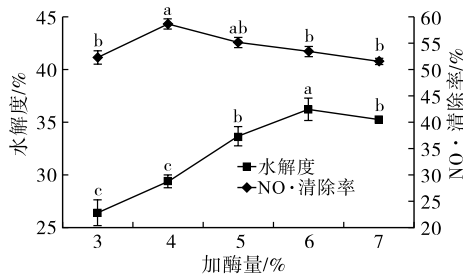


图8 中性蛋白酶加酶量对花生蛋白水解度和 NO·清除率的影响

由图 8 可见,随着中性蛋白酶加酶量的增加,水解度和 NO·清除率均先增大后降低,水解度在加酶量为 6% 时最大,为 35.23%,而 NO·清除率在加酶量为 4% 时最大,为 58.65%。加酶量在 4% ~ 6% 时,随加酶量增加水解度增大而 NO·清除率降低的原因可能是,随着加酶量的不断增大,已生成的具有活性的多肽被进一步水解,形成不具有 NO·清除活性的更小肽段或游离氨基酸。因此,选择加酶量为 4% (2 480 U/g)。

2.2.3 二次水解时间对花生蛋白水解度和 NO·清除率的影响

在 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶优化的条件下对

花生蛋白进行水解后,采用中性蛋白酶在加酶量 4%、pH 7.0、水解温度 40℃ 条件下进行二次水解,考察二次水解时间对花生蛋白水解度和 NO·清除率的影响,结果见图 9。

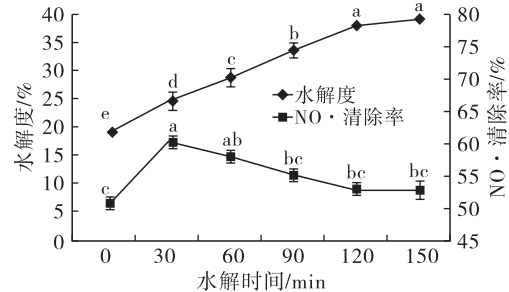


图9 二次水解时间对花生蛋白水解度和 NO·清除率的影响

由图 9 可见:随着二次水解时间的延长,水解度逐渐增大,直至 120 min 时趋于稳定,达到 39.13%; NO·清除率在二次水解时间为 30 min 时最大,为 60.23%,之后随着水解时间的延长 NO·清除率呈逐渐下降趋势。因此,选择二次水解时间为 30 min。

2.3 花生蛋白水解度与 NO·清除率的相关性分析

根据以上 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶以及 Alcalase 2.4L 碱性蛋白酶 + 中性蛋白酶对花生蛋白的水解实验数据,以水解度为横坐标,NO·清除率为纵坐标绘图,并进行相关性分析,结果见图 10。

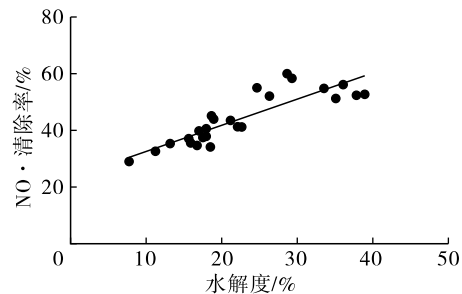


图10 花生蛋白水解度与 NO·清除率的相关性分析

对图 10 的数据进行拟合可知:花生蛋白的水解度在 7.8% ~ 39.1% 范围内与 NO·清除率之间有着极显著的线性关系 ($r = 0.8804, p < 0.0001; n = 30$);当花生蛋白的水解度在 7.8% ~ 22.6% 时,与 NO·清除率之间也呈极显著正相关 ($r = 0.8037, p < 0.0001; n = 20$);当花生蛋白的水解度超过 22.6% 时,与 NO·清除率之间没有显著的线性关系 ($r = -0.3833, p = 0.2742; n = 10$)。实验结果表明较高的水解度是花生蛋白拥有良好 NO·清除能力的必要条件,但并非水解度越高越好,在达到一定水解程度后蛋白肽序列可能是决定 NO·清除能力的主要因素。

2.4 3种蛋白肽对NO·清除能力的比较

按照上述研究,采用双酶水解法制备花生肽,测定其蛋白质含量、水分含量、水解度和NO·清除率,并与商品大豆肽和商品酪蛋白肽相比,结果分别见表2和图11。

表2 不同蛋白肽的蛋白质含量、水分含量和水解度 %

肽种类	蛋白质含量	水分含量	水解度
自制花生肽	66.41 ± 0.55	6.43 ± 0.53	24.73 ± 1.72
商品大豆肽	90.96 ± 0.17	3.94 ± 0.25	20.51 ± 1.53
商品酪蛋白肽	87.66 ± 0.08	4.75 ± 0.31	9.57 ± 0.95

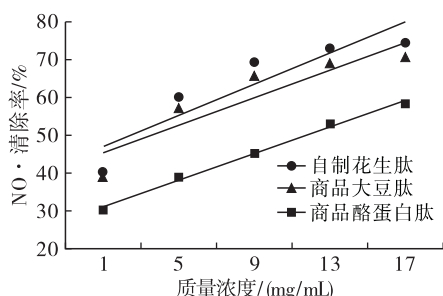


图11 不同蛋白肽的NO·清除率的拟合曲线

由表2可知,与商品大豆肽和商品酪蛋白肽相比,自制花生肽的蛋白质含量较低,主要原因是花生肽未经过纯化处理,其中含有较多的可溶性糖和无机盐(水解过程中引入了不少碱液),但自制花生肽的水解度显著高于两种商品肽。

由图11可知,自制花生肽、商品大豆肽和商品酪蛋白肽对NO·的清除能力均随其质量浓度的升高而逐渐增加,在相同质量浓度时,自制花生肽对NO·的清除能力最强,商品大豆肽次之。经计算,自制花生肽、商品大豆肽和商品酪蛋白肽清除NO·的 IC_{50} 分别是1.88、3.51 mg/mL和11.71 mg/mL。尽管自制花生肽清除NO·的 IC_{50} 较低,但与抗坏血酸(IC_{50} 为0.154 mg/mL,实测值)相比仍有较大的差距,后期将对其进行分离纯化,以获得更好的免疫活性。

3 结论

以花生蛋白水解度和NO·清除率为指标,通过单酶筛选和双酶组合实验,选用了Alcalase 2.4L碱性蛋白酶和中性蛋白酶对花生蛋白进行水解,得到的花生肽NO·清除率最高可达到60.23%(花生肽质量浓度5 mg/mL),此时花生蛋白水解度为24.73%。较高的水解度是花生蛋白拥有良好NO·清除能力的必要条件,但在充分水解后(如水解度超过22.6%)肽序列可能是决定NO·清除能力的主要因素。与商品大豆肽和商品酪蛋白肽相比,本文制备的花生肽虽然纯度较低,但免疫活性较高,NO·清除率的 IC_{50} 为1.88 mg/mL。

参考文献:

[1] ZHAO G, LIU Y, ZHAO M, et al. Enzymatic hydrolysis and

their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate[J]. Food Chem, 2011, 127: 1438 - 1443.

[2] 王晓坤,侯利霞,王金水,等.花生肽的提取纯化及生物活性研究进展[J].农业机械,2011(8):54 - 57.

[3] JI N, SUN C, ZHAO Y, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from peanut protein isolate hydrolysates using UHR - Q - TOF mass spectrometer[J]. Food Chem, 2014, 161(3): 148 - 154.

[4] 刘冬,周丽珍,李艳,等.酶法水解花生蛋白制备短肽及其降血压活性试验[J].中国油脂,2015,40(5):18 - 23.

[5] YE X Y, NG T B. Hypogin, a novel antifungal peptide from peanuts with sequence similarity to peanut allergen[J]. Eur J Allergy Clin Immunol, 2010, 57(4): 330 - 336.

[6] 刘丽娜,何东平,张声华,等.花生多肽对小鼠免疫功能影响的研究[J].中国粮油学报,2011,26(1):79 - 82.

[7] 李立,王勇,王亚东,等.花生蛋白多肽对小鼠免疫功能的影响[J].中国医药指南,2013,11(36):324 - 325.

[8] COLEMAN J W. Nitric oxide in immunity and inflammation [J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1(8): 1397 - 1406.

[9] FORSTERMANN U, SESSA W C. Nitric oxide synthases: regulation and function [J]. Eur Heart J, 2012, 33(7): 829 - 837.

[10] HIRAI S, HORII S, MATSUZAKI Y, et al. Anti-inflammatory effect of pyroglutamyl - leucine on lipopolysaccharide - stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. Life Sci, 2014, 117(1): 1 - 6.

[11] SAISAVOEY T, SANGTANOO P, REAMTONG O, et al. Free radical scavenging and anti-inflammatory potential of a protein hydrolysate derived from salmon bones on RAW 264.7 macrophage cells [J]. J Sci Food Agric, 2019, 99(11): 5112 - 5121.

[12] 蒋雨珊.花生和大豆蛋白乳液及凝胶的制备与性质研究[D].郑州:河南工业大学,2021.

[13] CHAVAN U D, MCKENZIE D B, SHAHIDI F. Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) [J]. Food Chem, 2001, 74(2): 177 - 187.

[14] 周慧江,朱振宝,易建华.核桃蛋白水解物水解度测定方法比较[J].粮食与油脂,2012(2):28 - 30.

[15] 霍彦雄,任亚梅,袁春龙,等.根皮苷豆蔻酸酯的抗氧化活性[J].食品科学,2017,38(9):119 - 125.

[16] SANGTANOO P, SRIMONGKOL P, SAISAVOEY T, et al. Anti-inflammatory action of two novel peptides derived from peanut worms (*Sipunculus nudus*) in lipopolysaccharide - induced RAW264.7 macrophages [J]. Food Funct, 2020, 11: 552 - 560.

[17] 陈贵堂,赵立艳,丛涛,等. Alcalase蛋白酶水解花生蛋白制备抗氧化肽的研究[J].食品工业科技,2008(3):119 - 121.

[18] 黄薇,宋永康,余华,等.酶法制备玉米抗氧化肽[J].中国食品学报,2014,14(8):69 - 76.

[19] 许均华,李高阳.花生分离蛋白酶解超声前处理条件的优化[J].中国油脂,2011,36(12):33 - 37.