

亚麻籽降胆固醇活性肽的酶解 工艺优化及分级制备

包小兰¹, 刘晓静¹, 郑睿¹, 李雪馨¹, 朝鲁巴根²

(1. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古国际蒙医医院, 呼和浩特 010065)

摘要:以亚麻籽分离蛋白为原料, 利用酶解工艺制备降胆固醇活性肽。对蛋白酶进行了筛选, 并通过单因素实验和正交实验确定最优酶解工艺, 采用超滤分离技术得到具有较高降胆固醇活性的亚麻籽肽, 并对超滤前后亚麻籽肽的氨基酸组成及降胆固醇活性进行了研究。结果表明: 最佳酶解工艺条件为采用 Protease M 进行酶解、加酶量 1.5%、底物质量分数 2.0%、酶解温度 50℃、酶解时间 3 h, 在此条件下亚麻籽肽的降胆固醇活性最强, 胆固醇胶束溶解度抑制率达 53.19%; 超滤后相对分子质量小于 1 kDa 的多肽组分降胆固醇活性最强, 胆固醇胶束溶解度抑制率达 72.39%, 较超滤前提高了 19.20 个百分点。氨基酸分析结果表明, 超滤后相对分子质量小于 1 kDa 的多肽组分的总疏水性氨基酸含量明显高于超滤前, 提高了 15.97 个百分点, 而且多肽组分中赖氨酸/精氨酸的比值低于超滤前, 这可能是其降胆固醇活性强于超滤前的主要原因。

关键词: 亚麻籽; 酶解; 亚麻籽肽; 降胆固醇; 超滤; 氨基酸

中图分类号: TQ936.2; Q517 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)06-0030-06

Optimization of enzymatic hydrolysis and fractionation preparation of flaxseed peptides with cholesterol – lowering activity

BAO Xiaolan¹, LIU Xiaojing¹, ZHENG Rui¹,
LI Xuexin¹, ZHAOLU Bagen²

(1. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;

2. Inner Mongolia International Mongolian Medical Hospital, Hohhot 010065, China)

Abstract: The flaxseed protein isolate was used as raw material to prepare flaxseed peptides with cholesterol – lowering activity by enzymatic hydrolysis process. The protease was screened, and the optimal enzymatic hydrolysis process was optimized by single factor experiment and orthogonal experiment. After enzymatic hydrolysis, bioactive peptides with higher cholesterol – lowering activity were obtained by ultrafiltration separation technology, and the amino acid composition and cholesterol – lowering activity of flaxseed peptides before and after ultrafiltration were studied. The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis conditions were obtained as follows: Protease M used for hydrolysis, dosage of enzyme 1.5%, mass fraction of substrate 2.0%, enzymatic hydrolysis temperature 50℃, and enzymatic hydrolysis time 3 h. Under these conditions, the inhibition rate of cholesterol micellar solubility reached 53.19%. The fraction with the relative molecular weight less than 1 kDa had the highest cholesterol – lowering activity, and its inhibition rate of cholesterol micellar solubility was 72.39%, which was 19.20 percentage points higher than that before ultrafiltration. The amino acid compositions results showed that the total hydrophobic amino acid content with the relative molecular weight less than 1 kDa was significantly higher than that before ultrafiltration, with an increase of 15.97 percentage points, and the ratio of lysine to arginine was lower than that before ultrafiltration,

收稿日期: 2020-01-10; 修回日期: 2020-03-28

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金(31860423)

作者简介: 包小兰(1969), 女, 副教授, 硕士生导师, 博士, 研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程(E-mail) xlb06@163.com。

bic amino acid content with the relative molecular weight less than 1 kDa was significantly higher than that before ultrafiltration, with an increase of 15.97 percentage points, and the ratio of lysine to arginine was lower than that before ultrafiltration,

which might be the main reason for its higher cholesterol - lowering activity than before ultrafiltration.

Key words: flaxseed; enzymatic hydrolysis; flaxseed peptide; cholesterol - lowering; ultrafiltration; amino acid

高胆固醇血症是造成冠心病等心血管疾病的主要危险因素^[1]。近年来,随着我国经济的发展,居民饮食结构发生了很大的变化,饮食结构的不平衡以及运动的缺乏导致高胆固醇血症的发病率逐年升高,且越来越趋于低龄化^[2]。目前,市场上常见的降脂类药物为他汀类、贝特类和烟酸类等,这些药物虽然能够有效降低人体总胆固醇含量,但存在一些副作用^[3-4]。因此,寻找并开发更为安全、效果持久的具有降胆固醇活性的食物成分成为研究热点^[5]。

亚麻籽主产于美洲和亚洲,适宜生长在寒冷地区^[6]。我国的内蒙古和新疆维吾尔自治区、甘肃、云南、宁夏和青海等高纬度地区都有亚麻籽的生产种植基地。亚麻籽除了富含油脂、蛋白质、膳食纤维等多种营养成分^[7-8],还含有多种生物活性物质,具有很高的营养价值。目前,我国的亚麻籽更多用于直接压榨制备亚麻籽油,而对于榨油后的亚麻籽饼的深加工利用较少。榨油后的亚麻籽饼中还含有30%~40%的蛋白质,未得到有效利用,造成了巨大的资源浪费^[9-11]。因此,对亚麻籽饼进行充分的开发利用有着深远的影响。

本实验室前期已对亚麻籽蛋白的提取方式进行了探讨,并对其生物活性进行了研究,发现亚麻籽分离蛋白具有一定的降胆固醇活性,但其具体的作用成分还未得到充分验证。因此,本文以亚麻籽分离蛋白为原料,研究了不同蛋白酶对其的水解程度,以降胆固醇活性为评价指标优化酶解工艺,并对酶解物进行超滤分离,对比其氨基酸组成,研究超滤前后亚麻籽肽的降胆固醇效果,为亚麻籽饼的深加工利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

低温压榨亚麻籽饼(粗蛋白质含量40%),内蒙古丰吉妙农业产品科技开发有限公司;Protease M(51.5 AU/g),日本天野酶制剂株式会社;碱性蛋白酶(Alcalase,10 000 U/g),诺维信(中国)生物技术有限公司;木瓜蛋白酶(Papain,12 000 U/g),北京中生瑞泰科技有限公司;胰蛋白酶(Trypsin,6 000 U/g)、牛磺胆酸钠、胆固醇,美国Sigma公司;氢氧化钠、盐酸、氯化钠、磷酸氢二钠等均为分析纯,国药

集团化学试剂有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

HJ-6 电热恒温水浴锅,上海福玛实验设备有限公司;PHSJ-4A 酸度计,上海雷磁仪器电科学仪器股份有限公司;TDL-5-A 离心机,上海安亭科学仪器厂;HJ-1 磁力搅拌器,江苏金坛荣华仪器有限公司;TAS-986 紫外分光光度计,北京普析通用仪器公司;LGJ-25C 冻干机,北京四环科技有限公司;BCD-223MTX 新飞冷藏冷冻冰箱,河南新飞电器有限公司;Millipore8200 超滤杯,美国 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 亚麻籽分离蛋白的制备

参照郑睿^[12]的方法制备亚麻籽分离蛋白。将低温压榨亚麻籽饼粉碎、脱脂处理。称取20 g 低温脱脂亚麻籽粉,按料液比1:35 加入去离子水,50℃ 下恒温提取2 h,离心(4 000 r/min,15 min)去除沉淀物,调节pH至4.4,静置1 h后离心去除上清液,使用少量去离子水洗涤沉淀2次,调节pH 7.0,冻干得亚麻籽分离蛋白。

1.2.2 亚麻籽降胆固醇活性肽的制备

称取一定量亚麻籽分离蛋白,以去离子水配制成一定质量分数的亚麻籽蛋白溶液,调节pH,加入蛋白酶,搅拌均匀,置于一定温度水浴锅中恒温酶解一定时间,酶解结束后90℃ 灭酶15 min,4 000 r/min 下离心15 min,所得上清液即为亚麻籽分离蛋白酶解液,冷冻干燥备用。

1.2.3 水解度的测定

采用pH-stat法测定酶解物的水解度^[13-14]。

1.2.4 胆固醇胶束溶解度抑制率的测定

采用刘丽媛等^[15]的方法并加以改进。

胆固醇标准溶液曲线的绘制^[16]:配制胆固醇标准使用液,吸取0~8 mL 分别置于25 mL 具塞试管中。将各具塞试管用冰醋酸定容至8 mL,加入4 mL 铁矾显色剂,振荡均匀,静置30 min,采用紫外分光光度计于560 nm 波长处测定OD值,并绘制标准曲线,得到标准曲线方程: $Y=0.0143x+0.0419$, $R^2=0.9909$ (x 为胆固醇质量浓度,mg/L; Y 为OD值)。

称取5 mg 亚麻籽分离蛋白酶解物,溶解在1 mL 胶束溶液(10 mmol/L 牛磺胆酸钠,0.4 mmol/L 胆固醇,1 mmol/L 油酸,132 mmol/L NaCl,15 mmol/L 磷

酸钠缓冲液(pH 7.4))中。对胶束溶液采用超声波降解法(超声波均质器)处理,37℃恒温振荡培养箱中培养24 h,用超高速离心机15 000 r/min下离心60 min。收集上清液,采用紫外分光光度计于560 nm波长处测定OD值,按标准曲线方程计算胆固醇质量浓度。以不加亚麻籽蛋白酶解物的溶液为空白,根据下式计算胆固醇胶束溶解度抑制率。

胆固醇胶束溶解度抑制率 = $(S_0 - S_1) / S_0 \times 100\%$

式中: S_0 为空白溶液胆固醇的质量浓度,mg/L; S_1 为样品溶液胆固醇的质量浓度,mg/L。

1.2.5 亚麻籽降胆固醇活性肽的超滤分离

采用截留相对分子质量为10、5、3、1 kDa的超滤膜将亚麻籽分离蛋白酶解液分为5个组分(≥ 10 kDa, 5~10 kDa, 3~5 kDa, 1~3 kDa, <1 kDa),收集各组分,冻干,测定各组分的胆固醇胶束溶解度抑制率。

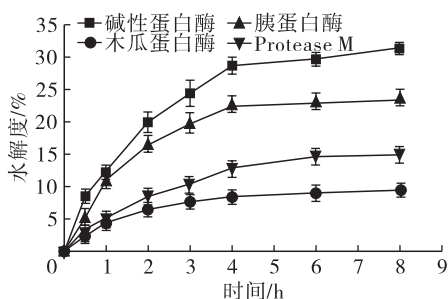
1.2.6 亚麻籽肽氨基酸组成分析

称取0.5 g亚麻籽肽粉于水解管中,加入10 mL浓度为6 mol/L的HCl溶液,于真空状态下迅速封管,110℃下水解24 h,用少量去离子水将水解物转入到25 mL容量瓶中,定容。取5 mL过滤后的水解液进行真空干燥,加入2 mL柠檬酸钠缓冲液(pH 2.2)对其进行溶解,振荡混匀后过0.22 μm 滤膜,转移至进样瓶。采用氨基酸自动分析仪对亚麻籽肽的氨基酸组成进行测定。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶的筛选

在加酶量1% (以底物质量计)、底物质量分数2.0%,各酶的最适条件下对亚麻籽分离蛋白进行酶解,不同蛋白酶酶解亚麻籽分离蛋白的水解度见图1。



注:碱性蛋白酶最适温度为55℃,最适pH为8.0;木瓜蛋白酶最适温度为50℃,最适pH为7.4;胰蛋白酶最适温度为37℃,最适pH为8.0;Protease M最适温度为50℃,最适pH为3.0。

图1 不同蛋白酶酶解亚麻籽分离蛋白的水解度

由图1可知,4种蛋白酶的水解趋势较为接近,

即在酶解初期,亚麻籽分离蛋白的水解度随时间延长而逐渐增大,继续延长时间水解度逐渐趋于稳定,最后酶解停止。木瓜蛋白酶在酶解3 h时接近最大酶解程度,水解度达7.7%;Protease M在酶解6 h时酶解接近停止,水解度达14.6%;碱性蛋白酶酶解程度最大,酶解4 h时,水解度为木瓜蛋白酶的3倍左右,为Protease M的2倍左右,酶解6 h时,酶解接近停止,水解度达29.66%。不同蛋白酶对同种底物的酶解程度存在较大差异,相同时间蛋白酶的水解度排序为碱性蛋白酶>胰蛋白酶>Protease M>木瓜蛋白酶。

在最适条件下,对4种蛋白酶酶解亚麻籽分离蛋白得到的酶解物进行降胆固醇活性检测,结果见图2。

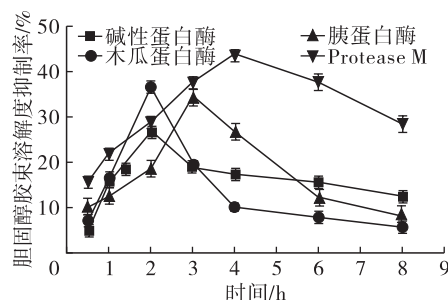


图2 不同酶酶解后酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率

由图2可知,Protease M在酶解4 h时的酶解物胆固醇胶束溶解度抑制率最高,达43.71%,明显高于其他3种酶的酶解物($p < 0.05$),木瓜蛋白酶在酶解2 h时的抑制率最高,达36.25%。Protease M在酶解4 h后对胆固醇胶束溶解度的抑制程度明显高于其他酶,因此选择Protease M进行酶解较为理想。

2.2 Protease M酶解亚麻籽分离蛋白单因素实验

2.2.1 加酶量的确定

固定底物质量分数为2.0%,酶解温度为50℃,酶解pH为3.0,添加0.5%~2.5%的Protease M酶解4 h,测定不同加酶量下酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率,结果见图3。

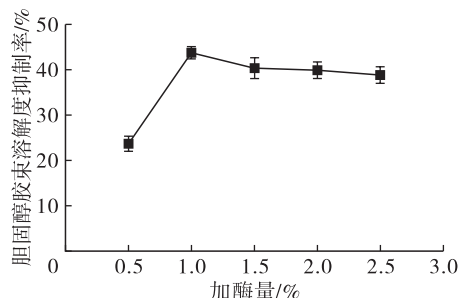


图3 加酶量对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

由图3可以看出:当固定底物质量分数后,加酶量发生变化时,胆固醇胶束溶解度抑制率随之改变,当加酶量在0.5%~1.0%时,随加酶量的增大,亚麻籽分离蛋白逐渐酶解充分,生成具有降胆固醇活性的多肽,抑制率呈现上升状态;当加酶量达到1.0%时,亚麻籽分离蛋白酶解物的降胆固醇活性达到最强,抑制率为43.71%;当加酶量继续增加时,大分子多肽被水解为小分子肽段或氨基酸,降胆固醇活性肽减少,抑制率下降。因此,最适加酶量确定为1.0%。

2.2.2 底物质量分数的确定

固定酶解温度为50℃,酶解pH为3.0,加酶量为1.0%,改变底物质量分数为0.5%~4.0%,酶解4h,测定不同底物质量分数下酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率,结果如图4所示。

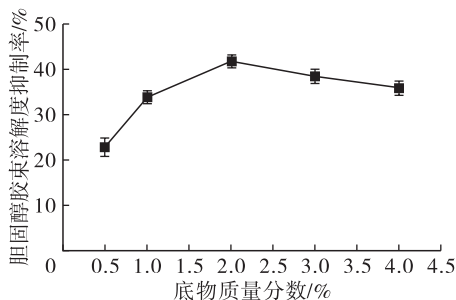


图4 底物质量分数对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

由图4可以看出,当底物质量分数在0.5%~2.0%时,随底物质量分数的增加,胆固醇胶束溶解度抑制率呈现较为明显的上升趋势。底物质量分数为2.0%时,亚麻籽分离蛋白酶解物的降胆固醇活性最强,抑制率达41.75%。当底物质量分数继续增加时,抑制率开始下降。这可能是由于底物质量分数过高时,没有足够的蛋白酶与其反应生成大量具有降胆固醇活性的肽^[17],同时由于浓度增大,溶液黏稠度上升,酶与底物作用面积变小,酶解效率降低,抑制率下降^[18]。在此反应体系中,底物质量分数过高或过低都不利于亚麻籽蛋白活性肽的制备。因此,最适底物质量分数确定为2.0%。

2.2.3 酶解温度的确定

固定底物质量分数为2.0%,酶解pH为3.0,加酶量为1.0%,控制酶解温度为30~70℃,酶解4h,测定不同酶解温度下酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率,结果如图5所示。

由图5可知,当酶解温度在30~50℃时,随酶解温度的升高,胆固醇胶束溶解度抑制率呈现上升趋势。酶解温度为50℃时,达到蛋白酶的最适酶解温度,亚麻籽分离蛋白酶解物的降胆固醇活性最强,

抑制率为46.75%。当酶解温度继续升高时,蛋白酶活力受到影响,蛋白的水解程度降低,活性肽的含量减少,酶解物的降胆固醇活性开始下降。因此,最适酶解温度确定为50℃。

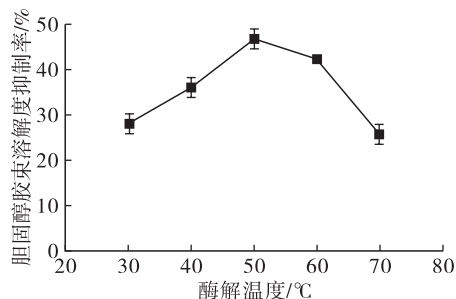


图5 酶解温度对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

2.2.4 酶解时间的确定

固定底物质量分数为2.0%,酶解pH为3.0,加酶量为1.0%,酶解温度为50℃,分别酶解1、2、3、4、5、6h,测定不同酶解时间下酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率,结果如图6所示。

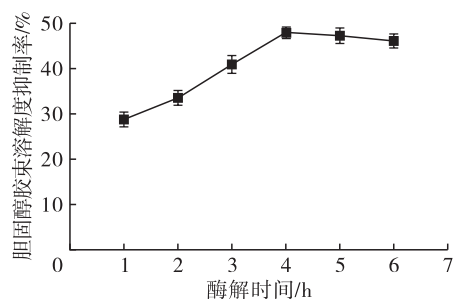


图6 酶解时间对胆固醇胶束溶解度抑制率的影响

由图6可知,当酶解时间在1~4h时,随着酶解时间的延长,胆固醇胶束溶解度抑制率呈现上升趋势。酶解时间为4h时,亚麻籽分离蛋白酶解物的降胆固醇活性最强,抑制率为47.98%。继续延长酶解时间,抑制率呈现缓慢下降的趋势。有研究表明,蛋白的水解过程中在酶的作用下蛋白质长链被打开,形成长度不同的小分子肽段^[19]。亚麻籽分离蛋白酶解物的降胆固醇活性可能与蛋白质经酶解后暴露出来的某些氨基酸残基有关。因此,最适酶解时间确定为4h。

2.3 Protease M酶解亚麻籽分离蛋白正交实验

在单因素实验的基础上,固定酶解pH3.0,选择加酶量(A)、底物质量分数(B)、酶解温度(C)、酶解时间(D)为考察因素,各取3个水平,以胆固醇胶束溶解度抑制率为指标,利用 $L_9(3^4)$ 正交表设计正交实验,对酶解亚麻籽分离蛋白制备降胆固醇活性肽的工艺进行优化。正交实验因素水平见表1,正交实验设计及结果见表2。

表1 正交实验因素水平

水平	A 加酶量/%	B 底物质量分数/%	C 酶解温度/℃	D 酶解时间/h
1	0.5	1.0	40	3
2	1.0	2.0	50	4
3	1.5	3.0	60	5

表2 正交实验设计及结果

实验号	A	B	C	D	胆固醇胶束溶解度抑制率/%
1	1	1	1	1	32.19
2	1	2	2	2	37.25
3	1	3	3	3	34.93
4	2	1	2	3	39.91
5	2	2	3	1	45.78
6	2	3	1	2	42.98
7	3	1	3	2	45.12
8	3	2	1	3	50.23
9	3	3	2	1	52.87
K_1	104.37	117.22	125.40	130.84	
K_2	128.67	133.26	130.03	125.35	
K_3	148.22	130.78	125.83	125.07	
R	43.85	16.04	4.63	5.77	

由表2可知,各因素对酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率的影响大小依次为 $A > B > D > C$,即加酶量 > 底物质量分数 > 酶解时间 > 酶解温度。最优水平组合为 $A_3B_2C_2D_1$,即加酶量1.5%,底物质量分数2.0%,酶解温度50℃,酶解时间3h。在最优酶解条件下进行验证实验,胆固醇胶束溶解度抑制率达到53.19%。

2.4 亚麻籽降胆固醇活性肽的超滤分离

采用截留相对分子质量为10、5、3、1 kDa的超滤膜对亚麻籽分离蛋白酶解液进行分离,对各组分的得率和降胆固醇活性进行评价,结果见表3。

表3 亚麻籽分离蛋白酶解液超滤后各组分的得率与胆固醇胶束溶解度抑制率

组分	相对分子质量/kDa	得率/%	胆固醇胶束溶解度抑制率/%
Y_1	≥ 10	22.1	50.95
Y_2	5~10	9.4	35.12
Y_3	3~5	28.9	27.07
Y_4	1~3	15.8	45.08
Y_5	<1	20.5	72.39

由表3可知:亚麻籽分离蛋白酶解液经超滤分离后, Y_3 组分(相对分子质量范围为3~5 kDa)得率最高,为28.9%,但该组分的降胆固醇活性较弱,胆固醇胶束溶解度抑制率仅为27.07%; Y_5 组分

(相对分子质量范围为1 kDa以下)降胆固醇活性最强,胆固醇胶束溶解度抑制率高达72.39%,且该组分的得率达到20.5%。张宇等^[20]采用超滤技术纯化了乳清蛋白肽,比较了超滤前后水解溶液的降胆固醇活性,表明超滤分离技术可以有效分离小分子肽,得到胆固醇胶束溶解度抑制率较高的组分。

2.5 超滤前后亚麻籽肽的氨基酸组成

采用氨基酸自动分析仪对超滤前酶解物和超滤后小于1 kDa多肽组分的氨基酸组成进行分析,结果见表4。

表4 超滤前后亚麻籽肽的氨基酸组成及含量 %

氨基酸	超滤前	超滤后
疏水性氨基酸(非极性)		
丙氨酸(Ala)	2.53	5.53
缬氨酸(Val)	2.79	5.58
蛋氨酸(Met)	0.63	1.40
异亮氨酸(Ile)	2.18	5.06
亮氨酸(Leu)	2.94	5.07
苯丙氨酸(Phe)	2.61	4.87
脯氨酸(Pro)	2.21	4.35
总疏水性氨基酸	15.89	31.86
中性(无电荷)氨基酸(极性)		
苏氨酸(Thr)	1.83	3.11
丝氨酸(Ser)	2.34	2.16
甘氨酸(Gly)	2.46	5.26
酪氨酸(Tyr)	1.19	3.64
半胱氨酸(Cys)	0.20	2.92
总中性氨基酸	8.02	17.09
酸性(带负电)氨基酸(极性)		
天冬氨酸(Asp)	6.74	6.60
谷氨酸(Glu)	8.12	13.45
总酸性氨基酸	14.86	20.05
碱性(带正电)氨基酸(极性)		
赖氨酸(Lys)	2.19	2.17
精氨酸(Arg)	6.76	12.89
组氨酸(His)	2.51	2.51
总碱性氨基酸	11.46	17.57
总必需氨基酸	15.17	27.26

由表4可知,超滤后亚麻籽肽中各疏水性氨基酸的含量均有所提高,总疏水性氨基酸含量由15.89%提升到31.86%,提高了15.97个百分点。国内外研究表明,肽的降胆固醇活性与其含有的疏水区有一定的相关性^[21]。本研究中超滤后相对分子质量小于1 kDa的多肽组分的疏水性氨基酸苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸的含量分别达到了4.87%、5.07%、5.06%、5.58%,均明显高于超滤前。许多文献研究认为降胆固醇活性较强的多肽蛋

氨酸/甘氨酸和赖氨酸/精氨酸的比值较小^[22]。本实验中超滤前后亚麻籽肽蛋氨酸/甘氨酸与赖氨酸/精氨酸的比值分别为0.26、0.32和0.27、0.17,超滤后相对分子质量小于1 kDa的多肽组分的赖氨酸/精氨酸的比值明显低于超滤前。

3 结论

本实验通过蛋白酶酶解亚麻籽分离蛋白,制备降胆固醇活性肽。对蛋白酶进行了筛选,以体外胆固醇胶束溶解度抑制率为指标,通过单因素实验和正交实验优化酶解工艺。结果表明,最佳酶解工艺条件为采用Protease M进行酶解、加酶量1.5%、底物质量分数2.0%、酶解温度50℃、酶解时间3 h,在此条件下酶解物的胆固醇胶束溶解度抑制率为53.19%。对最优工艺下得到的酶解液进行超滤纯化,测定超滤后不同组分的胆固醇胶束溶解度抑制率,可知相对分子质量范围小于1 kDa的多肽组分降胆固醇活性最强,胆固醇胶束溶解度抑制率达72.39%。氨基酸组成分析表明,相对分子质量小于1 kDa的多肽组分总疏水性氨基酸含量明显高于超滤前,赖氨酸/精氨酸的比值也明显低于超滤前。

参考文献:

- [1] ZHANG C, ZHANG R, LI Y M, et al. Cholesterol-lowering activity of Tartary buckwheat protein [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(9):1900-1906.
- [2] 高文鸽, 张泽生, 李雨蒙, 等. 匙羹藤酸调节仓鼠血脂机理的研究[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(1):315-320, 360.
- [3] 赵士魁, 周伟澄. 降血脂药物研究进展[J]. *中国医药工业杂志*, 2009, 40(7):536-542.
- [4] 杨宝瑜, 高天琦, 李洋, 等. 细胞胆固醇的生理功能及其代谢异常相关疾病的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2017(12):1642-1650.
- [5] 邵素娟, 丁方莉, 刘迪迪, 等. 食物蛋白源降血脂肽的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018(1):323-326.
- [6] 赵胜男. 亚麻饼粕营养挂面及冲调粉的研制[D]. 天津:天津科技大学, 2017.
- [7] 李赫, 张文敏, 应知伟, 等. 亚麻籽蛋白及其活性肽的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(6):330-335.
- [8] 禹晓, 黄沙沙, 程晨, 等. 不同品种亚麻籽组成及抗氧化特性分析[J]. *中国油料作物学报*, 2018, 40(6):147-156.
- [9] 蔡雯雯, 李铎. 亚麻籽饼粕营养成分分析[C]//中国食品科学技术学会第十一届年会论文集. 北京:中国食品科学技术学会, 2014:31.
- [10] SILVA F G D E, HERNÁNDEZ-LEDESMA B, AMIGO L, et al. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by alcalase hydrolysis: antioxidant activity [J]. *LWT - Food Sci Technol*, 2017, 76:140-146.
- [11] 陈丽娜, 温宇旗, 韩国庆, 等. 生物活性肽制备工艺的研究进展[J]. *农产品加工*, 2018(9):63-68.
- [12] 郑睿. 降胆固醇亚麻籽蛋白酶解肽的制备及结构表征[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2016.
- [13] 高婕. 具有降胆固醇活性的亚麻籽肽的制备及其对大鼠降胆固醇作用的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2018.
- [14] 蓝建京. 酶法制取丝素降胆固醇肽的工艺研究[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(21):13119-13121.
- [15] 刘丽媛, 彭晨, 肖萍, 等. 鲫鱼蛋白酶解制取鱼露及其降胆固醇活性研究[J]. *中国食品添加剂*, 2012(Z1):154-158.
- [16] 丁卓平, 王明华, 刘振华, 等. 食品中胆固醇含量测定方法的研究与比较[J]. *食品科学*, 2004, 25(1):130-135.
- [17] 殷金莲, 靳毓. 酶解法制备榛子粕ACE抑制肽工艺研究[J]. *中国油脂*, 2020, 45(1):68-72.
- [18] 田地, 任健. 黑豆抗氧化肽的酶解条件优化及分级制备[J]. *中国油脂*, 2019, 44(7):64-67.
- [19] NAGAOKA S, FUTAMURA Y, MIWA K, et al. Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk β -lactoglobulin [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281:11-17.
- [20] 张宇, 李晓东, 刘璐, 等. 乳清蛋白降胆固醇肽的制备及活性研究[J]. *食品科技*, 2019, 44(3):14-20.
- [21] 赵谋明, 任娇艳. 食源性生物活性肽结构特征与生理活性的研究现状与趋势[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(9):69-81.
- [22] 刘恩岐. 黑豆蛋白酶解产物的生物活性研究与结构表征[D]. 陕西 杨凌:西北农林科技大学, 2013.