

利用油料籽粕酶法制备多肽工艺及其抗氧化活性研究进展

唐天悦^{1,2}, 周海玥¹, 姜婧¹, 宋立华^{1,*}

(1.上海交通大学 农业与生物学院, 陆伯勋食品安全研究中心, 上海 200240;

2.雀巢研发中心上海有限公司, 上海 201812)

摘要:油料籽粕经过酶水解可制备具有生物活性的多肽, 其中部分多肽具有抗氧化活性。籽粕原料来源及水解工艺不同, 活性肽的抗氧化活性也有所差别。本篇综述介绍目前国内外利用花生、大豆和油菜籽等主要油料籽粕原料酶解制备抗氧化活性肽的工艺方法及其抗氧化活性。

关键词:油料籽粕, 酶解工艺, 生物活性肽, 抗氧化活性

Research progress in enzymic preparation of oil crop meal peptides and its antioxidant activity

TANG Tian-yue^{1,2}, ZHOU Hai-yue¹, JIANG Jing¹, SONG Li-hua^{1,*}

(1. Bor S. Luh Food Safety Research Center, School of Agriculture & Biology,

Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

2. The nestle research center in Shanghai co., LTD, Shanghai 201812, China)

Abstract: Bioactive peptides from de-fatted oil crops meal can be prepared using enzyme hydrolysis, and some of them has anti-oxidative activity. These peptides obtained under different hydrolysis condition and from different categories of oil crop meal have been shown to possess different radical scavenging and lipid oxidation inhibition abilities. Our present review summarized the enzymatic process and antioxidant activities of peptides from oil crops meal as peanut, soybean and rapeseed.

Key words: oil crop meals; enzymatic hydrolysis; bioactive peptides; antioxidant activity

中图分类号: TS201.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)17-0390-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.17.069

根据联合国粮农组织 (UNFAO) 的调查数据, 2014~2015 年度油籽的总产量约 5.4 亿 t, 榨油之后的副产物油粕粉和油粕饼的利用率 (利用量与供应量之比) 为 82.5%^[1], 目前, 油料作物榨油后的副产物——籽粕, 如花生粕、玉米渣和大豆粕等, 炼油之后一般都被丢弃或用作廉价的动物饲料。事实上, 常见油料籽粕中含有至少 35% 以上的蛋白质 (如表 1 所示), 且氨基酸组成平衡^[2], 是重要的植物蛋白资源。Hwang JY 等^[3]的研究表明, 利用酶水解花生粕后获得的多肽较籽粕蛋白在抑制亚麻酸过氧化作用中具有更强的抗氧化活性; 更为重要的是, 与其他抗氧化食品添加剂相比, 籽粕活性多肽在 pH 为 2~12、温度为 30~80 °C 的范围内, 均显示出较好的溶解性和活性^[4]。因此, 利用现代生物技术对这些籽粕中的蛋白质进行综合开发利用, 生产活性多肽, 不仅可减

少浪费, 还可开发出具有高附加值的生物活性物质。

表 1 我国 2012 年油料作物产量、籽粕产出量 * 以及蛋白质含量

Table 1 The yield of oil crops, oil crops meal and protein content of oil crops meal in China

	2012 产量 (万 t)	2012 年籽粕 产出量 (万 t)	籽粕中蛋白质 含量 (%)
花生	1669	751	49.4 ^[11]
大豆 **	1301	781	48.0 ^[12]
油菜籽	1401	448	35.0~45.0 ^[13]

注: * 中国国家统计局年鉴 2013 <http://www.stats.gov.cn/tjsj/ndsj/2013/indexch.htm>; ** 2012 年我国大豆的进口数量为 5838 万 t。

目前, 利用动、植物来源的蛋白质制备活性肽的

收稿日期: 2016-01-27

作者简介: 唐天悦 (1986-), 女, 在读农业推广硕士研究生, 研究方向: 食品营养, E-mail: 397728089@qq.com。

* 通讯作者: 宋立华 (1970-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品加工与营养, E-mail: lihua0529@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金 (30972460)。

表2 部分油料籽粕蛋白的最佳水解条件

Table 2 Optimum hydrolysis conditions for some of the oil crops meal

	pH		温度		底物质量分数(%)		酶添加量(U/g 蛋白)	
	碱性蛋白酶	中性蛋白酶	碱性蛋白酶	中性蛋白酶	碱性蛋白酶	中性蛋白酶	碱性蛋白酶	中性蛋白酶
花生粕 ^[22]	8.0	6.7	55	50	8.0	6.5	2061	6500
大豆粕 ^[23]	9.0	7.5	60	45	5.0	5.0	5000	6000
油菜籽粕 ^[24]	10.0	7.0	55	55	2.0	4.0	5430	3000

方法有酶水解及生物发酵等方法^[5]。其中,因为酶法具有较好的专一性,故而在实际生产中得到广泛应用。在活性肽的酶解制备工艺中,蛋白质来源、氨基酸序列、工艺条件不同,最终获得的籽粕活性多肽的活性也有所不同。此外,研究表明有些活性多肽对心血管系统、消化系统、免疫系统和神经系统等发挥有益作用^[6],其中,具有抗氧化活性的多肽通过抑制羟基自由基、超氧阴离子等自由基的活动,减轻脂质过氧化反应,从而发挥延缓衰老、抗肿瘤及减轻心血管疾病等作用^[7]。近年来,抗氧化活性肽的制备工艺及其生物学活性的研究一直受到关注。本文主要综合论述以花生粕、大豆粕和油菜籽粕为原料,利用酶法制备活性多肽工艺方法及其抗氧化生物活性研究进展。

1 籽粕活性多肽的酶法制备工艺

目前,利用籽粕制备活性多肽的方法主要有直接提取、生物发酵和酶水解等^[5]。由于蛋白质结构、分子量以及氨基酸序列不同,所采取的制备工艺也有所不同。其中,直接提取的活性多肽一般天然存在于植物中,如银杏种子、芹菜和山药块茎等,其多肽分子量在30 ku以下,可用离子交换或者排阻色谱法进行提取纯化^[8-10];利用微生物发酵肉酱、大豆和牛奶也可以获得活性多肽^[11-13];大麻籽活性多肽则是利用胃蛋白酶和胰蛋白酶经体外水解后,再利用超滤分离获得不同分子量的活性多肽^[14],在上述各种工艺中酶水解法应用较多。

1.1 酶水解法工艺流程

利用酶法从籽粕中提取制备活性多肽的一般工艺为:籽粕粉碎过筛→提取蛋白→80~100℃热水浴处理→调节pH→酶水解→高温灭酶→分离纯化或超滤→浓缩→冷冻干燥→多肽→检测多肽的生物学活性^[15-17]。在制备活性多肽的工艺中,前处理中通过加热煮沸籽粕,可破坏蛋白质紧密的球状空间结构,有利于蛋白酶与蛋白结合位点的接触,从而加快酶解速度^[17]。

1.2 酶的选择

目前,利用籽粕水解制备活性肽的酶制剂主要有:碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶等^[15,18-19],其中碱性蛋白酶和中性蛋白酶最为常用。在蛋白酶推荐的最适宜作用条件下,碱性蛋白酶酶解花生粕、大豆粕和油菜籽粕后水解产物的抗氧化活性最高^[15,18-19]。这可能是与蛋白酶的作用位点密切相关,如有研究表明碱性蛋白酶的水解氨基酸残基位点为谷氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、酪氨酸、赖氨酸及谷氨酰胺的羧端肽键;而中性蛋白酶仅水解羧基端为酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸等芳香族疏水性氨基酸的肽键^[20]。因此,利用植物

蛋白水解制备活性肽时,选用碱性蛋白酶可能更合适,因为其对羧端疏水性氨基酸具有较强的专一性,表现为经碱性蛋白酶水解后,能获得较多分子量小于10 ku的肽,由于水解相对彻底,获得的肽链短,游离氨基酸残基较多,故抗氧化能力较强^[21]。

1.3 水解条件的选择

在水解条件方面(包括pH、水解温度、底物的量、酶制剂添加量),中性和碱性蛋白酶水解各类籽粕的最佳水解条件如表2所示,从表中数据可看出,作用底物不同,两种蛋白酶的最佳水解条件有所不同:与中性蛋白酶相比,总体上碱性蛋白酶的作用温度偏高;其次,同样来源的植物蛋白,经碱性蛋白酶处理的水解度高于中性蛋白酶^[22-24],碱性蛋白酶处理后花生粕、大豆粕以及油菜籽粕的水解度在14%~25%。而中性蛋白酶水解之后的籽粕的水解度仅为5%~15%^[22-24];此外,在水解时间方面,研究表明水解2 h之后,籽粕溶液水解度的上升趋于缓和,3 h之后水解几乎不再进行^[21]。

因此,在酶解制备活性多肽的实际生产工艺中,可根据所需多肽分子量等要求,合理选择酶制剂和酶解时间,以简化生产工艺,降低生产成本^[25]。

2 籽粕活性多肽的抗氧化活性

2.1 多肽抗氧化活性的影响因素

多肽具有多种活性,其中抗氧化活性是多肽的生物学活性之一。已有部分结果证明分子量在13 ku之内的多肽具有较好的抗氧化活性^[26];此外,Pihlanto-Leppälä^[27]指出,肽链末端氨基酸种类会影响肽的生物学活性,一般地,甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、脯氨酸、组氨酸、缬氨酸、亮氨酸、赖氨酸和苯丙氨酸被认为是抗氧化氨基酸^[28]。Garcia^[5]和Sila等人^[29]分别比较了上百种植物蛋白和数十种鱼类蛋白水解后的肽链结构及其抗氧化活性,结果表明具有含有上述抗氧化氨基酸残基的肽链具有较高的抗氧化活性。然而,另有研究表明,尽管多肽链具有相同种类的氨基酸,其抗氧化活性却不尽相同,如有研究对猪脑蛋白在不同条件下进行酶解处理后得到不同的多肽,测得这些多肽的各氨基酸比例相同,但这些多肽在相同浓度下,抗氧化活性却具有显著差异,研究推测这可能是由于多肽链的分子量及亲水性有所不同所致,但该研究只给出了肽链氨基酸比例和肽链大小分布,并未提及肽链的亲水情况及肽链结构式^[28];另外,Je^[30]和Kim等人^[31]证明有些不含上述氨基酸残基的多肽链,亦有较好的抗氧化活性。上述研究结果提示氨基酸残基的种类对多肽抗氧化活性的影响尚有待于进一步研究。

值得注意的是,除了多肽中抗氧化氨基酸残基的种类,这些氨基酸残基的位置也会导致其抗氧化活性的变化,Chen^[32]研究了28种多肽的抗氧化活性,结果表明在肽链C末端缺失组氨酸会降低抗氧化活性,如果N末端缺失亮氨酸却对抗氧化活性无影响,这进一步提示抗氧化氨基酸残基在C端还是N端对多肽的抗氧化活性亦有影响。某些以二肽形式结合的氨基酸,比他们单独存在时要表现出更强的抗氧化活性^[33-34]。此外,多肽的某些结构构象也会降低多肽的抗氧化活性,比如,将多肽链中第二个L-组氨酸换成了D-组氨酸,其抗氧化活性则会下降60%^[35-36]。由此可见,多肽的抗氧化活性与其分子量、氨基酸残基种类、残基位置以及构象等有关。

2.2 籽粕活性多肽的体外抗氧化活性

籽粕活性多肽的体外抗氧化活性主要体现在对羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)的清除、对油脂过氧化以及对动物组织脂质过氧化的抑制作用。

表3所示为籽粕活性多肽发挥体外抗氧化活性的作用浓度及作用效果。研究表明,籽粕活性多肽的体外抗氧化活性与其浓度虽呈正相关,但随着浓度的增加,籽粕活性多肽对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率和对 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的抑制率并未呈较大幅度增长(表3);油菜籽肽浓度提高20倍(从0.5 mg/mL增加到10 mg/mL),但对 $\cdot\text{OH}$ 的清除率仅提高了2.7倍;对超氧阴离子的清除率则仅为1.8倍^[19]。Yang B等^[37]的研究发现,无论抗氧化多肽的浓度高低,其抗氧化氨基酸残基含量越高,抗氧化能力越强,抗氧化氨基酸占总氨基酸的比例对多肽的抗氧化能力无显著影响,氨基酸顺序和分子量对其抗氧化能力的影响更为显著。

表3 不同浓度籽粕活性多肽的体外抗氧化活性

Table 3 Vitro antioxidant activities at different concentration

项目	多肽浓度 (mg/mL)	$\cdot\text{OH}$ 清除率 (%)	$\text{O}_2^{\cdot-}$ 抑制率 (%)
花生粕活性多肽 ^[15]	2.5	80.0	无数据
	10.0	无数据	55.0
大豆粕活性多肽 ^[18]	2.0	21.5	11.3
	10.0	62.2	30.2
油菜籽粕活性多肽 ^[19]	0.5	17.1	32.2
	10.0	46.1	58.3

多肽体外抗氧化能力还可通过检测红细胞的溶血率和丙二醛(MDA)抑制率等方法进行评估。研究显示,油料籽粕活性多肽可在红细胞受到氧化物(例如:过氧化氢)攻击时,利用其自身的抗氧化性,使红细胞的细胞膜免受氧化损伤而减少细胞膜的破裂

表4 籽粕活性多肽对大鼠血红细胞及肝细胞的体外抗氧化作用

Table 4 Anti-oxidation capability *in vitro*; Mouse red cell and liver cell

项目	多肽浓度 (mg/mL)	红细胞 H_2O_2 所致溶血率 (%)	肝匀浆 MDA 抑制率 (%)
对照组 ^[15,18,38]	0.0	100	0
花生粕活性多肽 ^[15]	20.0	28.7	83.2
大豆粕活性多肽 ^[18]	30.0	28.2	76.4
油菜籽粕活性多肽 ^[38]	2.0	33.9	57.5

(表现为红细胞溶血率的降低)^[15];薛照辉^[38]的研究表明,油菜籽粕活性多肽可通过抑制肝细胞中脂质过氧化反应,抑制脂质过氧化反应终产物MDA的生成(表4)。

在多肽的抗氧化活性评价方面,也有人将籽粕活性多肽加入食用油脂中以替代常规抗氧化剂,观察其对油脂氧化的抑制作用。王建化等人^[22]在猪板油里添加花生肽,通过检测油脂的过氧化值观察花生肽(5%)的抗氧化效果,结果表明猪板油在70℃下保存12d,其过氧化值(POV)较对照组降低五倍,抗氧化效果与3%维生素E的抗氧化效果相当;Hwang JY等人^[39]的结果表明:1.0 mg/mL花生籽粕活性多肽与0.02 mg/mL BHA具有相同的抗氧化能力,提示花生籽粕来源的多肽具有一定的抗氧化活性。另有研究表明大豆籽粕多肽浓度小于0.1%时,其在大豆油和菜籽油中的抗氧化活性显著低于叔丁基对苯二酚(0.02%),随着大豆籽粕多肽使用量的增加,其抗氧化作用增强;但添加量加倍后,油脂过氧化值(POV)值未见进一步明显降低。即使在大豆油和菜籽油中添加0.1%的大豆籽粕多肽,其对POV值的影响仅相当于0.04%茶多酚的2倍^[18]。

上述研究结果表明,多肽的抗氧化活性与其原料来源密切相关,即来源不同,其发挥抗氧化活性的有效浓度有所不同;抗氧化活性的评估方法不同,其表现也不尽相同。另外,籽粕来源的活性多肽,虽然在清除氧自由基和延缓脂质过氧化等方面都有一定效果,但作为抗氧化剂应用于食用油中尚有一定的局限性,根据现有研究结果,将籽粕多肽作为抗氧化剂应用植物油,不但添加量较高,抗氧化效果有限,而且不同来源的籽粕活性多肽对不同植物油的抗氧化效果也还需要更多的实验数据进一步评估。

2.3 籽粕活性多肽的体内抗氧化活性

为进一步研究籽粕多肽的体内抗氧化活性,有研究利用D-半乳糖建立衰老大鼠模型,并灌胃给予大鼠花生籽粕多肽(500 mg/kg·体重),连续喂养50d后,可以使大鼠血清和脑组织中的SOD活性显著增加,其中,大鼠脑组织SOD活性较衰老模型组增加14.5%,血清SOD活性增加7.7%^[40]。给大鼠每日灌胃给予400 mg/kg·体重大豆籽粕多肽,45d之后,其肝组织的SOD活性量较模型组增加15.2%^[18]。

另有体内研究结果表明,D-半乳糖所致衰老组大鼠脑组织CAT活性较正常组大鼠降低50%,而每日灌胃给予剂量为400 mg/kg·体重大豆籽粕多肽,连续喂养45d后,大鼠脑组织的CAT活性较衰老模型组高41.6%^[18];且大豆籽粕多肽干预剂量低

于 400 mg/kg·体重时,随多肽剂量的增加脑及肝组织中 CAT 活性显著增加;但当大豆籽粕多肽的干预剂量超过 400 mg/kg·体重之后, CAT 活性未见明显增强^[18]。

在对脂质过氧化物的作用方面, D-半乳糖致衰老大鼠脑组织 MDA 水平较正常组大鼠升高 29.4%,而在大豆籽粕多肽干预组(400 mg/kg·体重, 45 d) MDA 水平较衰老模型组降低 10.3%,肝组织的 MDA 则降低 16.8%^[18]。利用花生籽粕多肽(500 mg/kg·体重)对同类衰老大鼠进行干预 50 d 后,大鼠血清 MDA 含量可较衰老模型降低 39.5%^[40]

上述研究表明,花生和豆籽粕多肽对衰老大鼠的脑、肝脏和机体均表现出一定的抗氧化活性,但与花生和豆籽粕多肽相比较而言,菜籽多肽的体内抗氧化效果并不是非常显著^[41],可见多肽在体内的抗氧化活性与其制备的原料来源、种类及作用剂量密切相关。

3 展望

多肽的抗氧化活性与其分子量、氨基酸残基种类和位置等有关。对于特定的植物蛋白源,由于其氨基酸序列不可改变,可通过选择合适的酶切位点和反应条件,获得具有特定氨基酸残基和分子量的多肽,从而使其具有较强抗氧化活性。籽粕活性多肽的体外抗氧化活性主要体现在对·OH、O₂⁻的清除、及其对油脂过氧化和动物组织脂质过氧化的抑制作用。但目前活性多肽体内抗氧化活性的相关研究较少,尚需要广泛深入研究不同来源活性多肽在不同条件下(如:不同病理条件下)其在体内发挥抗氧化活性的作用效果及剂量;抗氧化活性肽在体外虽表现出一定的抗氧化活性,但其作为抗氧化剂可应用的食物范围(即不同种类的食物)及其应用效果如何也需要进一步实验研究。

参考文献

[1] 粮食展望 市场综述. 联合国粮食及农业组织(粮农组织) [R]. ISSN 2227-4669, 2014(10):8

[2] 王楠,冯志彪.两种油料蛋白制备及其功能性研究[J].中国油脂,2012,03:18-22.

[3] Hwang JY, Shyu YS, Wang YT, et al. Antioxidative properties of protein hydrolysate from defatted peanut kernels treated with esperase [J]. LWT - Food Science and Technology, 2010, 43: 285-290.

[4] Tang L, Sun J, Zhang H, et al. Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of peanut protein hydrolysate [J]. National Institutes of Health, 2012, 7(5), PMC3365052 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365052/>

[5] Garcia MC, Puchalska P, Esteve C, et al. Vegetable Foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities [J]. Talanta, 2013, 106:328-349.

[6] Murray BA, FitzGerald RJ. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: biochemistry, bioactivity and production [J]. Curr Pharma Design, 2007, 13:

773-791.

[7] Zhou CS, Hu JL, Ma HL, et al. Antioxidant peptides from corn gluten meal: Orthogonal design evaluation [J]. Food Chemistry, 2015, 187:270-278.

[8] Huang W, Deng Q, Xie B, et al. Purification and characterization of an antioxidant protein from Ginkgo biloba seeds [J]. Food Research International, 2010, 43(1):86-94.

[9] Boonmee A, Srisomsap C, Karnchanat A, et al. An antioxidant protein in Curcuma comosa Roxb. Rhizomes [J]. Food Chemistry, 2011, 124(2):476-480.

[10] Hou WC, Lee MH, Chen HJ, et al. Antioxidant Activities of Dioscorin, the Storage Protein of Yam Tubers [J]. Agriculture Food Chemistry, 2001, 49(10):4956-4960.

[11] Ohata M, Uchida S, Zhou LX, et al. Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide [J]. Food Chemistry, 2016, 194:1034-1039.

[12] Xu L, Du B, Xu BJ. A systematic, comparative study on the beneficial health components and antioxidant activities of commercially fermented soy products marketed in China [J]. Food Chemistry, 2015, 174:202-213.

[13] Solieri L, Rutella GS, Tagliacozzi D. Impact of non-starter lactobacilli on release of peptides with angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities during bovine milk fermentation [J]. Food Microbiology, 2015, 51:108-116.

[14] He R, Girgih AT, Rozoy E, et al. Selective separation and concentration of antihypertensive peptides from rapeseed protein hydrolysate by electro dialysis with ultrafiltration membranes [J]. Food Chemistry, 2016, 197:1008-1014.

[15] 刘丽娜.不同水解度花生多肽的制备及其生物活性研究[D].武汉:华中农业大学,2009.

[16] 陈丽花,王跃,朱锦爵.大豆蛋白抗氧化活性肽的制备工艺研究[J].食品工业,2011,3:31-34.

[17] 王微星,陈剑兵,杨颖,等.不同预处理方法对菜籽蛋白酶解效果的影响[J].浙江农业学报,2012,24(5):909-913.

[18] 王莉娟.大豆肽的制备及其体外抗氧化活性研究[D].无锡:江南大学,2008.

[19] 聂慎德.菜籽肽制备及其抗氧化活性的研究[D].合肥:合肥工业大学,2009.

[20] 王洪涛.海参肽的酶法制备工艺及抗疲劳活性研究[D].烟台:烟台大学,2007.

[21] He R, Girgih AT, Malomo SA, et al. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5: 219-227.

[22] 王建化,熊柳,孙高飞,等.花生抗氧化活性肽制取工艺研究[J].中国油脂,2008,33(6):15-18.

[23] 张强.酶解豆粕蛋白制备 ACE 抑制肽的研究[D].天津:天津商业大学,2012.

[24] 卢晓会.菜籽肽的制备、分离纯化及其抗氧化活性研究[D].扬州:扬州大学,2012.

[25] 张毅.酶法制备大豆肽工艺条件的研究[D].无锡:江南大学,2009.

[26] Samaranayaka, AGP, Li C. Food - derived peptidic

antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications [J]. *Journal of Functional Foods*, 2011, 3: 229–254.

[27] Pihlanto-Leppälä A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2000, 11: 347–56.

[28] Zou Y, Wang W, Li Q, et al. Physicochemical, functional properties and antioxidant activities of porcine cerebral hydrolysate peptides produced by ultrasound processing [J]. *Process Biochemistry*, 2015: 431–443.

[29] Sila A, Bougateg A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review [J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 21: 10–26.

[30] Je JY, Qian ZJ, Byun HG, et al. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis [J]. *Process Biochemistry*, 2007, 42: 840–846.

[31] Kim S, Je J, Kim S. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007, 18: 31–38.

[32] Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, et al. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44: 2619–2623.

[33] Chi C F, Wang B, Hu F, et al. Purification and identification

of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin [J]. *Food Research International*, 2015, 73(a): 124–139.

[34] Saito K, Jin DH, Ogawa T, et al. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 3668–3674.

[35] Nagasawa T, Yonekura T, Nishizawa N, et al. *In vitro* and *in vivo* inhibition of muscle lipid and protein oxidation by carnosine [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2001, 225: 29–34.

[36] Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: A review [J]. *Peptides*, 2010, 31: 1949–1956.

[37] Yang B, Yang HS, Li J, et al. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees [J]. *Food Chemistry*, 2011, 124: 551–555.

[38] 薛照辉. 菜籽肽的制备及其生物活性的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.

[39] Hwang JY, Shyu YS, Chang HM. Antioxidative activity of roasted and defatted peanut kernels [J]. *Food Research International*, 2001, 34: 639–647.

[40] 陈贵堂, 赵立艳, 李博, 等. 花生肽对衰老模型大鼠血清和心、脑组织抗氧化效果的影响 [J]. *中国粮油学报*, 2012, 27(1): 34–38.

[41] 金晶. 菜籽蛋白酶解及产物抗氧化活性的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.

(上接第 389 页)

923–940.

[37] Labat E, Morel M H, Rouau X. Effects of Laccase and Ferulic Acid on Wheat Flour Doughs 1 [J]. *Cereal Chemistry*, 2000, 77(6): 823–828.

[38] Selinheimo E, Kruus K, Buchert J, et al. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs [J]. *Journal of Cereal Science*, 2006, 43(2): 152–159.

[39] Cura D E, Lantto R, Lille M, et al. Laccase-aided protein modification: effects on the structural properties of acidified sodium caseinate gels [J]. *International Dairy Journal*, 2009, 19(12): 737–745.

[40] Brinch D S, Pedersen P B. Toxicological studies on Laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae* [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2002, 35(3): 296–307.

[41] Marques de Souza C G, Peralta R M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2003, 43(4): 278–286.

[42] Montoya S, Orrego C E, Levin L. Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake) [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1533–1541.

[43] Munk L, Sitarz A K, Kalyani D C, et al. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(1): 13–24.

[44] Baldrian P. Fungal laccases—occurrence and properties [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30(2): 215–242.

[45] Vianello F, Cambria A, Ragusa S, et al. A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as biorecognition element [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20(2): 315–321.

[46] Leite O D, Lupetti K O, Fatibello-Filho O, et al. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase-peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines [J]. *Talanta*, 2003, 59(5): 889–896.

[47] Gomes S, Rebelo M J F. A new laccase biosensor for polyphenols determination [J]. *Sensors*, 2003, 3(6): 166–175.

[48] Gil D M A, Rebelo M J F. Evaluating the antioxidant capacity of wines: a laccase-based biosensor approach [J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 231(2): 303–308.

[49] Tortolini C, Di Fusco M, Frasconi M, et al. Laccase-polyazetidine prepolymer-MWCNT integrated system: Biochemical properties and application to analytical determinations in real samples [J]. *Microchemical Journal*, 2010, 96(2): 301–307.

[50] Mann J, Markham J L, Peiris P, et al. Use of olive mill wastewater as a suitable substrate for the production of laccase by *Cerrenaconsors* [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2015, 99: 138–145.

[51] Struch M, Linke D, Mookoonlall A, et al. Laccase-catalysed cross-linking of a yoghurt-like model system made from skimmed milk with added food-grade mediators [J]. *International Dairy Journal*, 2015, 49: 89–94.