

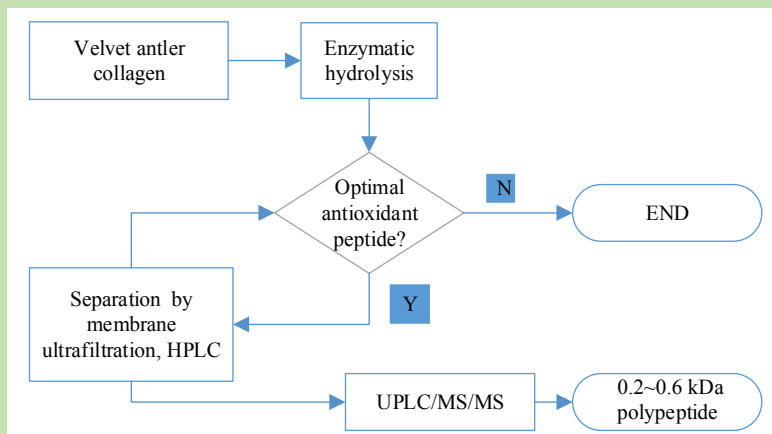
Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for antioxidant peptide preparation from velvet antler collagen by response surface methodology

Yaru LAN¹, Shuo HUANG¹, Fei ZHAO², Hongyu WU¹, Yongxue GUO^{1*}

1. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning 110016, China

2. Liaoning Inspection, Examination & Certification Centre, Shenyang, Liaoning 110015, China

Abstract: It is believed that the velvet antler head has the best health benefits in traditional Chinese medicine. But its output is small, and the price is high. The first section of velvet antler is used frequently, and its protein/peptide content is highest among all sections. The polypeptide molecular weight is about 5 kDa. In this work, in order to make full use of the velvet antler resources, the water extract of the middle and low sections collagen of velvet antler was used as an enzymatic substrate to prepare an antioxidant peptide



using papain. Enzymatic hydrolysis conditions (time, enzyme addition ratio, pH and temperature) were optimized by response surface methodology (RSM). The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH·) radical-scavenging activity rate was used as an index. The target antioxidant peptide (molecular weight less than 5 kDa) obtained by separation through an ultrafiltration membrane was further separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography. And 10 components, S1~S10, were obtained respectively and the components were lyophilized. Component S3 was further subjected by reversed-phase ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) on-line electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) for molecular weight determination. The polypeptide with the highest antioxidant activity was fractionated by ultrafiltration membranes of molecular weight cut off of 50, 10 and 5 kDa respectively. The results showed that the optimal experimental conditions were time of 56 min, enzyme addition of 1.40wt%, pH of 5.60, temperature of 60 °C, DPPH· radical-scavenging activity rate was 83.09%. The molecular weight of polypeptide was 0.2~0.6 kDa. The resulting small molecule peptide has similar health benefits as the head section, is more easily absorbed by the body, and is easier to further process and store.

Key words: *Cervi cornu pantotrichum*; antioxidant activity; enzymatic hydrolysis; response surface methodology; ultra-high performance liquid chromatography–mass spectrometry

收稿: 2019-04-18, 修回: 2019-05-20, 网络发表: 2019-06-05, Received: 2019-04-18, Revised: 2019-05-20, Published online: 2019-06-05

作者简介: 兰亚茹(1993-), 女, 山西省临汾市人, 硕士研究生, 生物化工专业, Tel: 18741423426, E-mail: laarrb@126.com; 郭永学, 通讯联系人, Tel: 18740046538, E-mail: yongxueguo@163.com.

引用格式: 兰亚茹, 黄硕, 赵飞, 等. 响应面法优化鹿茸胶原蛋白制备抗氧化肽的水解条件. 过程工程学报, 2020, 20(1): 91-98.

Lan Y R, Huang S, Zhao F, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for antioxidant peptide preparation from velvet antler collagen by response surface methodology (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2020, 20(1): 91-98, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.219174.

响应面法优化鹿茸胶原蛋白制备抗氧化肽的水解条件

兰亚茹¹, 黄硕¹, 赵飞², 吴宏宇¹, 郭永学^{1*}

1. 沈阳药科大学制药工程学院, 辽宁 沈阳 110016

2. 辽宁省检验检测认证中心, 辽宁 沈阳 110015

摘要:以鹿茸中下段胶原蛋白为酶解底物,用木瓜蛋白酶酶解制备小分子抗氧化肽,以清除 1,1-二苯基-2-苦基肼基(DPPH·)自由基的能力为指标,采用响应面法优化酶水解条件。结果表明,最优实验条件为时间 56 min,酶添加量 1.40wt%, pH=5.60, 温度 60℃。该条件下所得抗氧化肽对 DPPH·自由基的清除率为 83.09%。用超滤膜、半制备色谱柱和超高效液相色谱-质谱联用仪分级分离获得分子量 0.2~0.6 kDa 的具有最高抗氧化活性的多肽,其具有与头段类似的保健功效,更易被人体吸收,且易进一步加工和储存。

关键词:鹿茸; 抗氧化性; 酶水解法; 响应面法; 超高效液相色谱-质谱联用仪

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2020)01-0091-08

1 前言

我国临床使用鹿茸(*Cervi cornu pantotrichum*)有悠久的历史,它是现存最早的本草专著《神农本草经》中记载的 67 种动物药之一,被列为中品,有治病补虚兼而有之的功效^[1,2]。现代研究表明,鹿茸具有调节免疫系统、提高免疫机能、抗炎、促进组织伤后愈合、抗癌等功效^[3-6]。鹿茸所含的抗氧化肽可延缓衰老、提高记忆力、提高竞技能力,且没有副作用^[7-9]。鹿茸作为一种饮食补品,具有极大的保健潜力,不仅可以恢复体力,还能提高精力、增强体质、保护身体。

我国东北鹿资源丰富,但目前粗犷式的生产和加工方式无益于充分利用。鹿茸制品来自整支鹿角,包括鹿角中的骨质、软骨、血液、神经和结缔组织(图 1)。中医认为鹿茸头上段(蜡片)的保健功效最好,现代研究也侧

重于头上段,对胶原含量最多的中下段研究较少^[10,11]。体外和动物研究证明,多肽和蛋白质是鹿茸中重要的生物活性成分^[12],胶原蛋白不具有抗氧化功效^[8],但可在蛋白酶水解后产生具有抗氧化活性的肽^[7]。与蛋白质相比,肽作为营养补充剂不仅可被快速轻松地吸收,还可促进氨基酸、蛋白质和葡萄糖吸收利用。

为使整支鹿茸都得到有效利用,本研究采用优化酶解法对鹿茸中下段胶原蛋白进行酶解以获得小分子抗氧化肽。木瓜蛋白酶常用于制备抗氧化肽^[13],用木瓜蛋白酶酶解鹿茸中下段的胶原蛋白,测定其体外抗氧化活性,优化制备抗氧化肽的工艺。采用响应曲面法(Response Surface Methodology, RSM)优化酶解操作参数,再用超滤膜和半制备色谱柱对最佳抗氧化肽进行分离和纯化,最后用超高效液相色谱-质谱联用仪(UPLC/MS/MS)获取抗氧化肽的分子量。

2 实验

2.1 材料与试剂

新西兰马鹿鹿茸由西丰日日升参茸土特产品有限公司提供。木瓜蛋白酶(酶活力 ≥ 6000 U/mg)和 1,1-二苯基-2-苦基肼基(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH·)由国药集团化学试剂有限公司提供,实验用水为超纯水,其它试剂为市售分析纯。

2.2 实验设备与分析仪器

RW20 D S025 digital 搅拌桨[艾卡(广州)仪器设备有限公司], YP20002 电子天平(上海衡际科学仪器有限公司), DFY-5/40 低温恒温反应浴(西安安泰仪器科技有

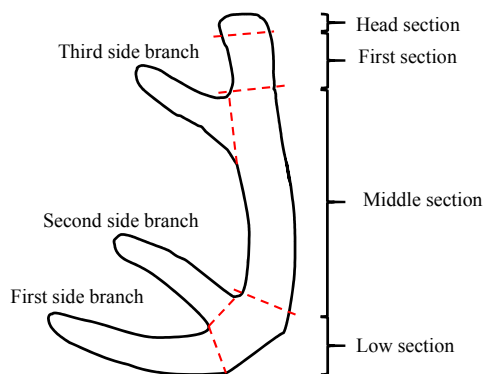


图 1 新西兰马鹿鹿茸药材(马鹿茸三岔)示意图

Fig.1 Schematic diagram of New Zealand red deer (*cervus elaphus*) velvet antler (trident)

限公司), DL-1 电子万用炉(北京市永光明医疗仪器有限公司), 200 mL 夹套反应器(天津市友丰技术玻璃有限公司), PB-10 酸度计[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], MS204TS/00 万分之一电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司], R1001-VN 旋转蒸发器(郑州长城科工贸有限公司), YB-FD-20 真空冷冻干燥机(上海亿倍实业有限公司), U-5100 紫外-可见分光光度计[日立(中国)有限公司], P230 高效液相色谱仪(HPLC, 大连依利特分析仪器有限公司), Waters ACQUITY H-Class_XEVO-TQD 超高效液相色谱-质谱联用仪[UPLC/MS, 沃特世科技(上海)有限公司]。

2.3 实验方法

2.3.1 鹿茸胶原蛋白的制备

按文献[14]方法, 称取 100 g 鹿茸, 每次加入 300 mL 超纯水(料液比为 1:3 g/mL), 回流提取 4 h, 共提取 5 次。趁热过滤(冷却后胶原蛋白黏度迅速增加成果冻状, 不利于固液分离)。将滤液合并浓缩, 冷冻干燥成粉末备用。用干重法测定粗蛋白含量, 用考马斯亮蓝 G-250 法^[15]测得胶原的蛋白质含量为 20.6wt%。

2.3.2 鹿茸胶原蛋白酶解方法

将 10 g 鹿茸胶原蛋白粉用 200 mL 超纯水溶解(pH=6.18), 搅拌转速为 300 r/min, 将溶液预热至所需温度, 用 4 mol/L HCl 或 NaOH 调节反应体系 pH, 按比例加入恒温保温的木瓜蛋白酶, 开始计时。反应过程中补充 0.5 mol/L NaOH 维持体系的 pH 值。反应结束后, 将酶解液在沸水浴中加热 15 min 使蛋白酶失活。用 0.45 μ m 滤膜将水解液过滤 3 遍, 清液为鹿茸肽粗提液, 冷冻干燥成粉末备用。所有酶解产物平行制备 3 份。

2.3.3 酶解产物清除 DPPH·自由基能力测定

采用文献[16]的方法, 对溶液溶剂稍作修改, 测定酶解产物清除 DPPH·自由基的能力。将 2 mL 0.1 mmol/L DPPH·溶液(DPPH·粉末溶于无水乙醇中)置于离心管中, 加入 10 mg/mL 酶解液(样品冻干粉溶于超纯水)2 mL, 旋涡混匀, 在 25 $^{\circ}$ C 的恒温水浴槽中避光反应 30 min, 测定 517 nm 处的吸光度 A_{517} ; 以 2 mL 无水乙醇加入 2 mL 超纯水作为参比溶液, 对照组为 2 mL DPPH·溶液加入 2 mL 超纯水, 测定 517 nm 处的吸光度 A_0 ; 2 mL 酶解液和 2 mL 无水乙醇混合后在 517 nm 处的吸光度为 A 。酶解产物清除 DPPH·自由基的能力用 DPPH(%)表示:

$$\text{DPPH}(\%) = [(A_0 - A_{517}) / A_0] \times 100\%$$

2.3.4 RSM 优化酶解实验

用 JMP[®]13.2.0 软件进行实验设计、数据分析和模

型构建。采用具有 4 个变量的 Box-Wilson 中心复合设计(CCD)确定响应模式, 建立模型。4 个变量分别为时间(X_1)、酶添加率(X_2)和 pH(X_3)、水解温度(X_4), 每个变量取 3 个水平, 因变量 Y 是清除 DPPH·自由基的能力。表 1 为 CCD 设计的因子和水平, 有 16 个因子点、8 个轴向点和 6 个中心点, 共 30 组实验。响应值(Y)方程为

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} X_i X_j$$

其中, b_0 为截距, b_i , b_{ii} 和 b_{ij} 分别为线性、二次项和交互项的系数。绘制模型预测值的响应 3D 图, 模型的拟合质量由系数 R^2 确定, 用 F 检验检查其统计显著性。

表 1 中心复合设计的因子及水平

Table 1 Factors and levels in central composite design

Level	Factor			
	Time, X_1 /min	Enzyme addition, X_2 /%	pH, X_3	Temperature, X_4 / $^{\circ}$ C
-2	40	0.2	5.0	50
-1	50	0.6	5.5	55
0	60	1	6	60
+1	70	1.4	6.5	65
+2	80	1.8	7.0	70

2.3.5 膜超滤法分离纯化鹿茸抗氧化肽

将鹿茸抗氧化肽(Antioxidant peptide, CAP)冻干粉溶于超纯水中, 配成浓度 50 mg/mL 的溶液。用截留分子量分别为 50, 10 和 5 kDa 的超滤膜对 CAP 溶液分级分离, 控制蠕动泵转速为 100 r/min, 超滤膜出口压力为 200 kPa。收集不同分子量(M_w)的组分: CAP-I ($M_w > 50$ kDa), CAP-II ($M_w = 10 \sim 50$ kDa), CAP-III ($M_w = 5 \sim 10$ kDa) 和 CAP-IV ($M_w < 5$ kDa), 将各组分冻干后配成 5 mg/mL 的溶液, 测定其清除 DPPH·自由基的能力。

2.3.6 反相高效液相色谱法分离纯化

超滤膜分离所得的最优抗氧化肽段进一步采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分离, 半制备型色谱柱为 SinoChrom ODP-BP ($\phi 10 \mu$ m, 20.0 mm \times 250 mm), 得到 10 个组分 S1~S10。通过测量各组分清除 DPPH·自由基的能力获得清除能力最高的组分, 进一步用超高效液相色谱(UPLC)在线连接的电喷雾离子质谱(ESI-MS)测定其分子量。

3 结果与讨论

3.1 模型拟合

鹿茸中下段胶原蛋白酶解制备抗氧化肽实验设计方案和结果见表 2。各因素与清除 DPPH·自由基能力关

系的多元二次回归方程如下:

$$\begin{aligned} Y(\%) = & -672.00 + 0.86X_1 + 3.21X_2 + 210.61X_3 + 4.44X_4 - \\ & 0.072X_1X_2 - 8.38 \times 10^{-3}X_1X_3 + 2.39 \times 10^{-3}X_1X_4 - \\ & 0.08X_2X_3 + 0.13X_2X_4 - 0.41X_3X_4 - 7.66 \times 10^{-3}X_1^2 + \\ & 0.65X_2^2 - 16.53X_3^2 - 0.02X_4^2 \end{aligned}$$

由表 3 可知, 该二次模型达到极显著水平 ($P=0.0001<0.01$), 且失拟项 $P=0.8389>0.05$, 方程拟合较好, 实验误差小, 可用于分析和预测木瓜蛋白酶酶解鹿茸中下段胶原蛋白制备抗氧化肽的工艺。

相关系数 $R^2 \approx 1$ 时模型可以很好地拟合实际数据。鹿茸中下段胶原蛋白酶解所制抗氧化肽清除 DPPH·自由基能力模型的方差分析结果(ANOVA)的 $R^2=0.9684$, 表明模型可很好地预测实际系统的行为。一次项酶添加率(X_2)和 pH 值(X_3)、二次项 X_3^2 对 DPPH·清除率有极显著影响, 各因素对清除 DPPH·自由基能力的影响不只局

限于线性关系。通过 JMP®13.2.0 软件求解方程, 得出用木瓜蛋白酶酶解胶原蛋白获取抗氧化肽的最佳条件为: 酶解时间 55.69 min, 酶添加量 1.40wt%, pH=5.62, 酶解温度 59.26 ℃, 此条件下模型预测的抗氧化肽对 DPPH·自由基的清除率为 83.88%。按照实际情况将此条件修正为酶解时间 56 min, 酶添加量 1.40wt%, pH=5.60, 酶解温度 60 ℃, 测定的该条件下 DPPH·自由基的清除率最大为 83.09%, 与预测值基本一致, 且在 95%置信区间内, 表明该优选工艺可靠。

4 个变量对所制抗氧化肽清除 DPPH·自由基能力的影响见图 2。从图可见, 随酶添加率、pH 值和温度变化, 酶解时间与抗氧化肽对 DPPH·自由基的清除率均呈正态分布趋势, 且在 1 h 时达到最高响应值。图 2(a), 2(d), 2(e)表明, 酶添加率与 DPPH·自由基清除率呈正相关性, 且极显著($P<0.01$)。图 2(b), 2(d), 2(f)表明, pH≤6 时, 所制抗氧化肽清除 DPPH·自由基的能力随 pH 值增加而

表 2 响应面法实验设计和结果
Table 2 Experimental design used response surface methodology and the results

Run	Level				Radical-scavenging activity rate of
	Time, X_1	Enzyme addition, X_2	pH, X_3	Temperature, X_4	DPPH·, Y/%
1	-1	-1	+1	+1	60.12
2	-1	+1	+1	+1	68.51
3	0	0	0	0	76.21
4	+1	-1	-1	+1	76.07
5	0	0	+2	0	47.10
6	-1	-1	-1	+1	74.85
7	+1	-1	-1	-1	76.96
8	0	0	0	0	83.78
9	+1	-1	+1	+1	63.67
10	0	-2	0	0	73.01
11	-2	0	0	0	78.53
12	0	0	0	0	75.46
13	+2	0	0	0	71.98
14	0	0	0	0	80.91
15	+1	-1	+1	-1	64.01
16	0	0	0	+2	71.98
17	0	+2	0	0	84.46
18	-1	-1	-1	-1	74.10
19	0	0	0	-2	80.50
20	-1	+1	-1	-1	81.12
21	0	0	-2	0	76.48
22	-1	-1	+1	-1	66.87
23	-1	+1	-1	+1	83.09
24	+1	+1	+1	+1	68.17
25	0	0	0	0	76.76
26	+1	+1	-1	+1	82.07
27	+1	+1	-1	-1	80.85
28	-1	+1	+1	-1	70.55
29	+1	+1	+1	-1	72.32
30	0	0	0	0	75.60

表 3 响应面测试方差分析结果
Table 3 Analysis results of response surface test variance

Source	Sum of squares	df	Mean square	F-value	Prob<F
Model	1742.067	14	124.4334	15.96004	<0.0001 ¹⁾
X_1	2.788003	1	2.788003	0.357594	0.5588
X_2	221.6645	1	221.6645	28.43108	<0.0001 ¹⁾
X_3	983.6404	1	983.6404	126.1634	<0.0001 ¹⁾
X_4	30.97763	1	30.97763	3.973245	0.0647
X_1X_2	1.342875	1	1.342875	0.17224	0.6840
X_1X_3	0.029041	1	0.029041	0.003725	0.9521
X_1X_4	0.227691	1	0.227691	0.029204	0.8666
X_2X_3	0.004646	1	0.004646	0.000596	0.9808
X_2X_4	1.116361	1	1.116361	0.143186	0.7104
X_3X_4	16.72794	1	16.72794	2.145554	0.1636
X_1^2	16.07078	1	16.07078	2.061267	0.1716
X_2^2	0.294787	1	0.294787	0.03781	0.8484
X_3^2	468.1099	1	468.1099	60.04059	<0.0001 ¹⁾
X_4^2	7.369628	1	7.369628	0.945241	0.3464
Residual	116.9483	15	7.796557		
Lack of fit	58.19617	10	5.819617	0.495268	0.8389
Pure error	58.75218	5	11.75044		
R^2	0.9684				
Adjust R^2	0.8784				

Note: 1) Super significant difference.

缓慢增加，pH>6 时，所制抗氧化肽清除 DPPH·自由基的能力随 pH 值增加而急速降低，与木瓜蛋白酶的最适 pH 值为 4.8~6.2 相符。图 2(c), 2(e), 2(f)表明，温度与所制抗氧化肽清除 DPPH·自由基能力也成正态分布趋势，且其影响大于酶解时间。综上所述，4 个变量对所制抗氧化肽清除 DPPH·自由基能力影响的重要性为 pH 值>酶添加率>温度>酶解时间。

3.2 超滤法分离纯化鹿茸抗氧化肽

采用响应面法获得的最佳条件制备抗氧化多肽，用不同截留分子量的超滤膜分离，得到 4 种分子量(M_w)的组分，分别为 CAP-I (M_w >50 kDa), CAP-II (M_w =10~50 kDa), CAP-III (M_w =5~10 kDa)和 CAP-IV(M_w <5 kDa)，将各组分冻干后配成 5 mg/mL 的溶液，测定其清除 DPPH·自由基的能力，各组分的含量及其抗氧化活性如表 4 所示。鹿茸胶原抗氧化多肽组成中有 93.5%的肽段截留分子量小于 5 kDa，可见鹿茸抗氧化多肽主要是由小分子量肽段组成。本实验将鹿茸中下段大分子胶原蛋白酶解成了与头上段 M_w <5 kDa 成分类似的多肽，且组分 CAP-IV (M_w <5 kDa)清除 DPPH·自由基的能力比其它 3 种组分强，清除率达到 66.96%，与分子量小的肽组分比分子量上万的组分抗氧化活性更强的结果^[17]相符。Puchalska 等^[16]发现用超滤法分离大豆婴儿配方奶粉，

分子量 5~10 kDa 提取物的抗氧化能力远高于单级分离组分，Ghiselli 等^[18]描述了这种协同效应。

3.3 反相半制备液相色谱柱分离纯化CAP-IV

将超滤法分离的组分 CAP-IV 收集冻干后进行反相半制备液相色谱柱分离，根据保留时间，得到 S1~S10 共 10 个组分，如图 3 所示。将各组分冻干后配成 1 mg/mL 的溶液，测定其清除 DPPH·自由基的能力，如表 5 所示。

由此可知，组分 S3 清除 DPPH·自由基的能力最高，达 54.25%。用超高效液相色谱在线连接的电喷雾离子质谱(ESI-MS)测定 S3 的分子量，图 4 为其总离子流色谱图(TIC)，以总离子流强度对时间作图，最高响应值的保留时间为 15.60 min。此响应值下的质谱如图 5 所示，其分子量为 0.2~0.6 kDa。

前期实验中，500 mg/mL 胶原蛋白粉末对 DPPH·自由基的清除率为 16.71%，响应面优化的酶解方法极大提高了其抗氧化性，10 mg/mL 酶解产物对 DPPH·自由基的清除率大于 80%，抗氧化能力显著增加。超滤膜和反相 HPLC 分离纯化所得成分清除 DPPH·自由基的能力比混合酶解产物增加了 6 倍，与文献[7,8]结果相符。实验结果表明，通过木瓜蛋白酶酶水解法可制备鹿茸小分子胶原蛋白肽，并可进一步获得抗氧化肽，该方法是获得生物活性肽的实用方法。

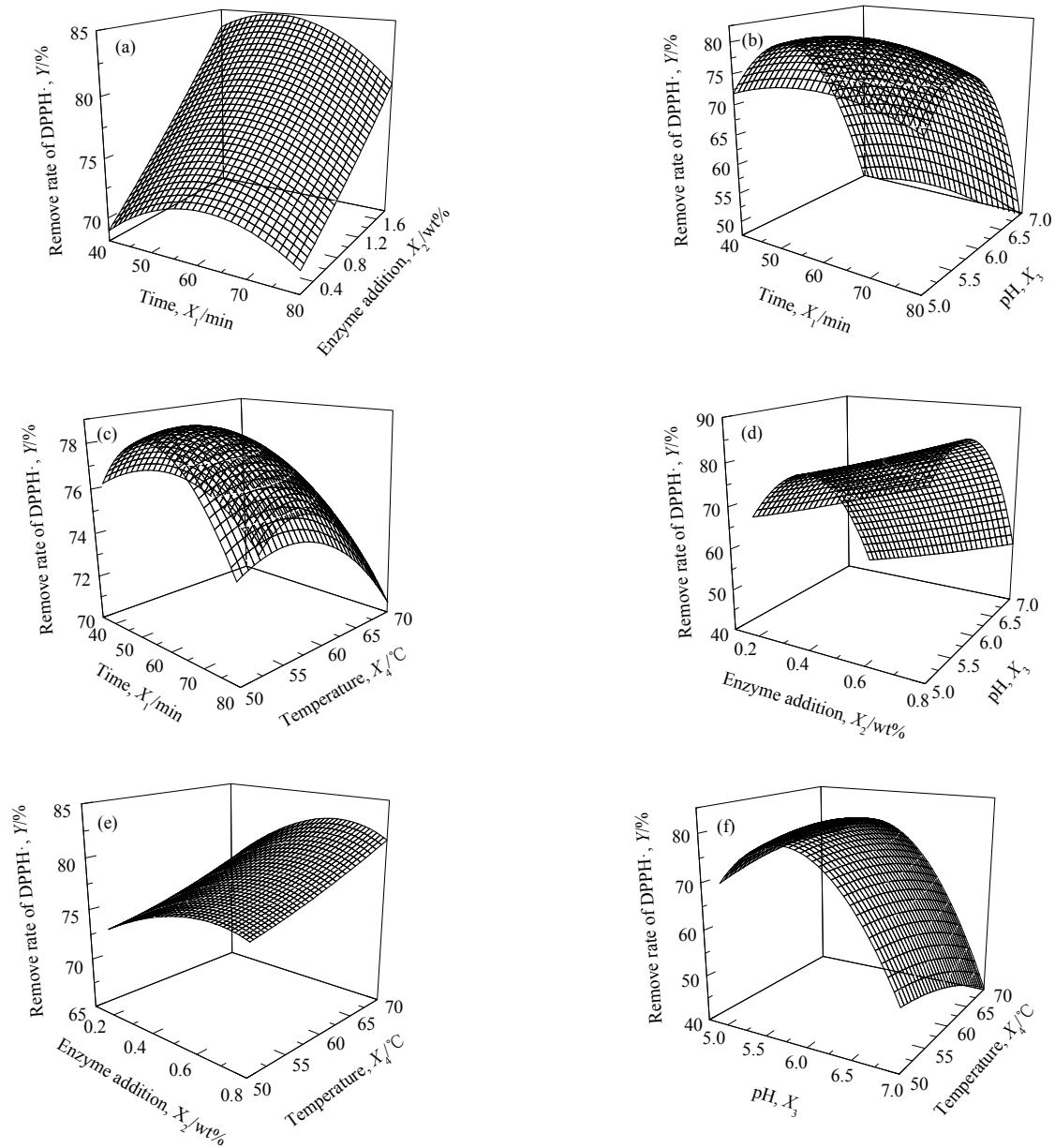


图 2 各因素相互作用对所制抗氧化肽清除 DPPH·自由基能力的影响
Fig.2 Effects of factors of preparation polypeptide on their radical-scavenging activity of DPPH·

表 4 鹿茸蛋白水解物的超滤分离产物及其抗氧化活性
Table 4 Ultrafiltration separation products of antler protein hydrolysate and their antioxidant activities

Product	Molecular weight, M_w /kDa	Content /wt%	Radical-scavenging activity rate of DPPH·, Y/%
VAP-I	>50	0.5	27.72
VAP-II	10~50	1	42.73
VAP-III	5~10	5	34.01
VAP-IV	<5	93.5	66.96

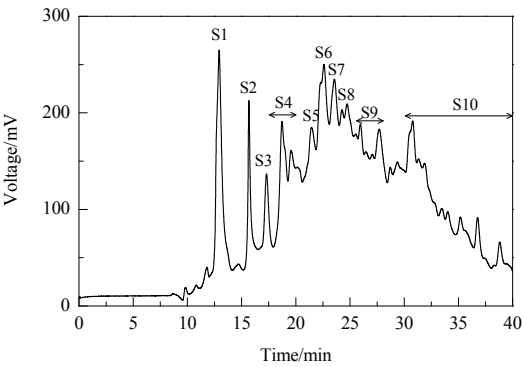


图 3 组分 CAP-IV 的反相半制备液相色谱
Fig.3 RP-HPLC of component CAP-IV

表 5 反相高效液相色谱分离 CAP-IV 所得组分清除 DPPH·自由基的活性

Table 5 Radical-scavenging activity rate of component separation from CAP-IV by RP-HPLC to remove DPPH·

Component	Content/wt%	Radical-scavenging activity rate of DPPH·, Y/%
S1	12.1	35.72
S2	3.1	42.13
S3	8.9	54.25
S4	27.8	34.41
S5	13.9	34.65
S6	5.2	44.37
S7	2.6	28.81
S8	14.2	34.18
S9	8.4	46.06
S10	3.7	18.42

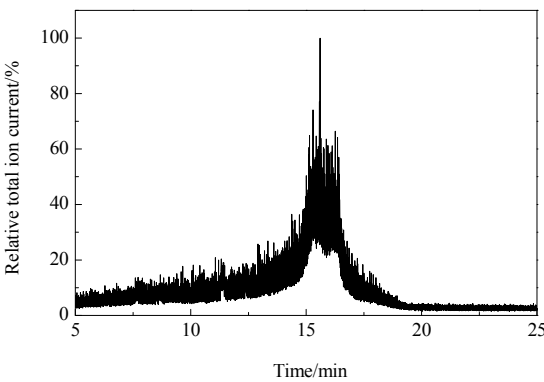


图 4 组分 S3 的总离子流色谱

Fig.4 UPLC-MS-TIC spectrum of component S3

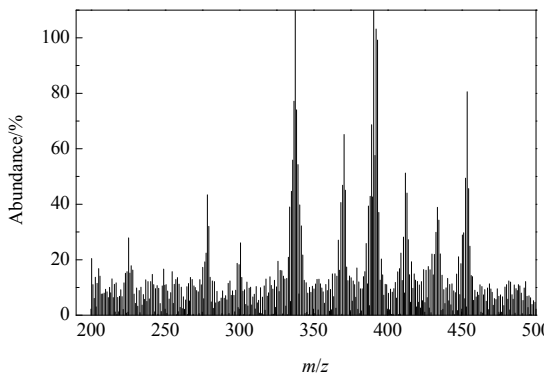


图 5 TIC 保留时间为 15.60 min 的主峰的质谱

Fig.5 MS spectrum of the main peak detection time of 15.60 min

4 结 论

以木瓜蛋白酶酶解鹿茸中下段胶原蛋白制备抗氧化肽，通过 CCD 响应面法优化酶解条件，对酶解多肽进行分离与分析，得到如下结论：

(1) 木瓜蛋白酶酶解鹿茸胶原蛋白的优化工艺条件

为：酶解时间 56 min，酶添加率 1.40wt%，pH=5.60，温度 60 ℃。该条件下所得抗氧化肽浓度为 10 mg/mL 时，清除 DPPH·自由基的能力为 83.09%。

(2) 截留分子量在 5 kDa 以下的多肽具有较高的清除 DPPH·自由基的能力，所得抗氧化肽在浓度为 5 mg/mL 时，清除 DPPH·自由基的能力为 66.96%。分子量 0.2~0.6 kDa 的小肽组合物的体外抗氧化活性最强，浓度为 1 mg/mL 时清除 DPPH·自由基的能力最强为 54.25%。

参考文献

[1] Wu F F, Li H Q, Jin L J, et al. Deer antler base as a traditional Chinese medicine: a review of its traditional uses, chemistry and pharmacology [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 145(2): 403–415.

[2] 高学敏. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002: 4.

[3] Zong Y, Wang Y, Li H, et al. Simultaneous quantification and splenocyte-proliferating activities of nucleosides and bases in *Cervi cornu pantotrichum* [J]. Pharmacognosy Magazine, 2014, 10(40): 391–397.

[4] Zhao L, Wang X, Zhang X L, et al. Purification and identification of anti-inflammatory peptides derived from simulated gastrointestinal digests of velvet antler protein (*Cervus elaphus linnaeus*) [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2016, 24(2): 376–384.

[5] Zha E H, Gao S Y, Pi Y Z, et al. Wound healing by a 3.2 kDa recombinant polypeptide from velvet antler of *Cervus nippon temminck* [J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(4): 789–793.

[6] Yang H H, Wang L L, Sun H, et al. Anticancer activity *in vitro* and biological safety evaluation *in vivo* of Sika deer antler protein [J]. Journal of Food Biochemistry, 2017, 41(6): e12421.

[7] Zhao L, Luo Y C, Wang C T, et al. Antioxidant activity of protein hydrolysates from aqueous extract of velvet antler (*Cervus elaphus*) as influenced by molecular weight and enzymes [J]. Natural Product Communications, 2011, 6(11): 1683–1688.

[8] Zhao L, Pei R S, Ji B P, et al. Antioxidant activity of aqueous extract fractions of velvet antler (*Cervus elaphus linnaeus*) [J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2010, 18(5): 319–327.

[9] Zhou R, Li S F. *In vitro* antioxidant analysis and characterisation of antler velvet extract [J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1321–1327.

[10] Jeon B T, Kim M H, Lee S M, et al. Effects of dietary protein level on dry matter intake, and production and chemical composition of velvet antler in spotted deer fed forest by-product silage [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2006, 19(12): 1737–1741.

[11] Jeon B, Kim S, Lee S, et al. Effect of antler growth period on the chemical composition of velvet antler in sika deer (*Cervus nippon*) [J]. Mammalian Biology, 2009, 74(5): 374–380.

[12] Lee S H, Yang H W, Ding Y, et al. Anti-inflammatory effects of enzymatic hydrolysates of velvet antler in raw 264.7 cells *in vitro* and Zebrafish model [J]. Excli Journal, 2015, 14: 1122–1132.

[13] 游丽君. 泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳、抗癌功效研究 [D]. 广州: 华南理工大学, 2010: 74.

You L J. Study on the purification of antioxidant peptide from loach protein and its antifatigue and anticancer activities [D]. Guangzhou:

- South China University of Technology, 2010: 74.
- [14] 李银清. 梅花鹿鹿茸胶原酶解物的制备及活性研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2010: 39.
- [15] 柯林根 J E. 精编蛋白质科学实验指南 [M]. 李慎涛, 译. 北京: 科学出版社, 2007: 60.
- Coligan J E. Short protocols in protein science [M]. Li S T, trans. Beijing: Science Press, 2007: 60.
- [16] Puchalska P, Marina M L, García M C. Isolation and identification of antioxidant peptides from commercial soybean-based infant formulas [J]. Food Chemistry, 2014, 148: 147–154.
- [17] 刘丹. 大豆抗氧化活性肽的生物制备技术及稳定性研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014: 51.
- Liu D. The research on biological preparation technology and stability of antioxidant peptide from soybean [D]. Changchun: Jilin University, 2014: 51.
- [18] Ghiselli A, Serafini M, Natella F, et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2000, 29(11): 1106–1114.