

功能栗仁的酶法制备及功能评价

田金强^{1,2}, 兰彦平¹, 王春艳², 王强², 周连第^{1,*}

(1.北京市农林科学院农业综合发展研究所, 北京 100097; 2.中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100093)

摘要:对完整形态的板栗仁进行酶解,使之含有功能性短肽,以强化或者赋予其保健功能,拟开发出具有降血压和抗氧化活性的功能栗仁产品。主要对功能栗仁制备的关键技术进行研究,包括蛋白酶的选择、酶解条件的优化、酶解后栗仁的功能评价等。结果表明:采用木瓜蛋白酶酶解可得到较高的短肽得率和水解度;木瓜蛋白酶与 α -淀粉酶复合可提高短肽得率;木瓜蛋白酶和其他蛋白酶复合可提高水解度,其中与Flowryme复合水解度提高最为明显;蛋白酶用量过低或过高均不利于酶解反应进行; α -淀粉酶(Liquozyme Supra)的适宜用量为0.35g/100mL蛋白酶液,木瓜蛋白酶和Flowryme适宜的配比为2:1(m/m),蛋白酶的适宜用量为8000U/g,当酶解温度55℃、酶解时间15h时,短肽得率为43.62%、水解度为26.27%;板栗水解物具有较好的ACE(血管紧张素转化酶)抑制和抗氧化活性,ACE抑制的IC₅₀为4.70mg/mL,亚油酸氧化抑制的IC₅₀值为4.26mg/mL,清除超氧阴离子自由基、羟自由基和DPPH自由基的IC₅₀值分别为2.77、7.78、4.30mg/mL。

关键词:板栗仁;功能食品;短肽;ACE抑制;抗氧化

Enzymatic Preparation and Biological Activities of Functional Chinese Chestnut Kernel Products

TIAN Jin-qiang^{1,2}, LAN Yan-ping¹, WANG Chun-yan², WANG Qiang², ZHOU Lian-di^{1,*}

(1. Institute of Agricultural Integrated Development, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China
2. Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract: Intact Chinese chestnut kernels were enzymatically hydrolyzed to develop functional products with antihypertensive and antioxidant activities. Enzyme screening was investigated for different purposes. Papain could result in higher short-chain peptide yield and degree of hydrolysis (DH) than other five proteases investigated. A higher short-chain peptide yield was obtained by papain + α -amylase than papain + pullulanase and papain alone. Compared with papain alone, the combination of papain and each of the other five proteases increased the DH of Chinese chestnut kernels, especially in combination with Flowryme. Improper protease amount was unfavorable for the hydrolysis of Chinese chestnut kernels. The appropriate amount of α -amylase was 0.35 g/100 mL hydrolysate. The appropriate ratio of papain to Flowryme was 2:1 (m/m). The DH of Chinese chestnut kernels was 26.27% and the short-chain peptide yield was 43.62% under the following hydrolysis conditions: protease amount of 8000 U/g protein, hydrolysis temperature of 55 °C and hydrolysis time of 15 h. The resultant hydrolysate exhibited excellent ACE inhibitory activity with an IC₅₀ of 4.70 mg/mL and antioxidant activity. The IC₅₀ values for inhibiting linoleic acid oxidation and scavenging superoxide anion, hydroxyl, DPPH free radicals were 4.26, 2.77, 7.78 mg/mL and 4.30 mg/mL, respectively.

Key words: chestnut kernel; functional food; peptide; ACE inhibition; antioxidation

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)16-0146-06

板栗原产于我国,已有3000多年的栽培历史,素有“木本粮食”、“铁杆庄稼”、“干果之王”等美誉^[1]。近十年来,我国板栗生产发展迅猛。2000年我国板栗年产量为59.8万t,2003年达71.5万t,到2007年已有25个省市栽培,面积达到2000万亩(约130万公

顷),产量突破120万t,占世界总产量的70%,面积及产量均居世界之首^[2]。板栗富有营养、保健和医疗功能,含有40%~60%淀粉、5%~10%蛋白质以及少量脂肪、胡萝卜素、酚类物质、多种维生素如VC、VA、VB和矿物元素等^[3-4]。中外医学认为板栗味甘、性温,

收稿日期: 2011-03-01

作者简介: 田金强(1971—),男,副教授,博士,研究方向为食品生物技术。E-mail: tianjinqiang1971@163.com

*通信作者: 周连第(1963—),男,研究员,博士,研究方向为农艺经济和农业发展。E-mail: liandizhou@126.com

有补肾健脾、强身壮骨、益胃平肝和防止心血管疾病等保健医疗功能^[5-6]。

食品功能化是食品加工的发展方向之一。板栗当中含有5%~10%的蛋白质,在保持板栗仁完整形态的前提下,采用蛋白酶将以上蛋白质水解为具有生物活性的短肽,以强化或者赋予板栗某些保健功能,开发出功能栗仁产品,无疑是一条板栗精深加工的新思路。国内功能食品的产品形态多是药剂形态,如胶囊、片剂、口服液,忽视了其食品属性。功能食品的发展方向趋向于以食品作为载体,而非以药剂的形式出现。功能栗仁以完整的板栗仁作为载体、强化或赋予其某些保健功能,既迎合功能食品的发展方向,也符合人们对板栗的消费习惯(我国习惯板栗整粒食用),同时无需进行功能因子的分离提纯,加工成本大大降低。本实验主要对功能栗仁制备的关键技术进行研究,包括蛋白酶的选择、酶解条件的优化和酶解后栗仁的功能活性等。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

燕红板栗产于北京怀柔区;纯净水 杭州哇哈哈集团。

Alalase 蛋白酶($6.119 \times 10^5 \text{U/mL}$)、Protamex 蛋白酶($2.159 \times 10^5 \text{U/g}$)、Neutrased 蛋白酶($3.6168 \times 10^5 \text{U/mL}$)、Flowryme 蛋白酶($5.477 \times 10^4 \text{U/g}$)、N120p 蛋白酶($2.775 \times 10^5 \text{U/g}$)、木瓜蛋白酶($4.342 \times 10^4 \text{U/g}$)、Liquozyme Supra α -淀粉酶(90KNU/g)、切枝淀粉酶(400PUN/mL) 丹麦诺维信公司;福林-酚试剂、二苯代苦味酰自由基(DPPH)、血管紧张素转化酶(angiotension-converting enzyme, ACE)、马尿酸组胺酰亮氨酸(HHL) 美国 Sigma 公司;邻苯三酚、水杨酸、TBHQ 北京化学试剂公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

LGJ-25 型冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂有限公司;HZC-250 恒温振荡培养箱 太仓市实验设备厂;TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限公司;高效液相色谱仪、2695 色谱工作站(四元泵、柱温箱、自动进样器、在线脱气机)、2998 二极管阵列检测器 美国 Waters 公司。

1.3 功能栗仁制备的工艺流程及操作要点

工艺流程:板栗→剥壳去衣→干制→浸渍酶液→沥干→培养→装袋→灭酶及杀菌→产品。

操作要点:将新鲜的板栗在沸水中加热2min,趁热手工剥壳去衣之后,浸入护色液中浸泡30min,护色液成分为0.01%茶多酚+0.2%柠檬酸+0.1%EDTA+2%NaCl+2%无水乙醇^[7],以达到防褐变并破坏栗仁表面致密层的目的,之后进行冷冻干燥。将干燥后的栗仁浸入酶液中浸渍2h使干栗仁复水,取出沥干,然后在

适宜的温度下培养。装入耐高温铝箔袋,封口,121℃处理15min进行灭酶及杀菌。

1.4 酶解条件的确定

1.4.1 蛋白酶的选择

分别选用 Alalase、Protamex、Flowryme、N120p、Neutrased 和木瓜蛋白酶,控制栗仁蛋白水解时的酶用量为6000U/g,具体操作方法:配制一定酶含量的酶液(干栗仁浸入酶液中浸渍2h后复水,可吸收干栗仁等量的酶液,由此可计算所配制酶液的酶含量),将干栗仁在酶液中浸渍2h,取出沥干后恒温培养5h,6种蛋白酶培养温度依次为55、50、50、55、50、55℃,测定短肽得率(trichloroacetic acid-nitrogen solution index, TCA-NSI)与水解度(degree of hydrolysis, DH)。

1.4.2 提高短肽得率方法的研究(蛋白酶与淀粉酶的复合处理)

按蛋白加酶量为6000U/g配制木瓜蛋白酶液,将酶液分成两份,分别添加 α -淀粉酶和切枝淀粉酶,添加量为0.25g/100mL酶液。将干栗仁浸入酶液中浸渍2h复水,取出沥干后55℃恒温培养15h,测定短肽得率和水解度。

1.4.3 提高水解度方法的研究(复合蛋白酶处理)

木瓜蛋白酶以1:1的质量比分别复合 Alalase、Protamex、Neutrased、Flowryme 和 N120p 蛋白酶,均按6000U/g的蛋白加酶量配制复合酶液,干栗仁在此酶液中浸渍2h后沥干,55℃恒温培养5h之后,测定短肽得率和水解度。

1.4.4 蛋白酶用量的确定

按2000、4000、6000、8000、10000、12000、14000、16000U/g的蛋白加酶量配制不同浓度的木瓜蛋白酶和 Flowryme 蛋白酶混合液(2:1, m/m),分别加入0.35g/100mL酶液的 α -淀粉酶,将干栗仁浸入酶液中浸渍2h复水,取出沥干后55℃培养15h,测定短肽得率及水解度。

1.5 栗仁功能活性的测定

1.5.1 ACE抑制活性的测定

1.5.1.1 色谱条件

色谱柱:SunFire™ C₁₈分析型色谱柱(4.6mm × 250mm, 5 μ m);检测波长:228nm;流速:0.4mL/min;流动相A为纯净水(含0.05%三氟乙酸),流动相B为色谱乙腈(含0.05%三氟乙酸);进样量:20 μ L,自动进样;柱温30℃。

1.5.1.2 试剂与供试品溶液的制备

ACE溶液:将1U ACE溶于2mL 0.1mol/L 硼酸缓冲液(pH8.3, 含0.4mol/L NaCl)中即得;HHL溶液:取HHL

适量,以 0.1mol/L 硼酸缓冲液(pH 8.3, 含 0.4mol/L NaCl)溶解配成 5mmol/L HHL 溶液; 马尿酸标准液的制备: 取马尿酸标准品适量,用 0.1mol/L 硼酸缓冲液(pH8.3, 含 0.4mol/L NaCl)配制成不同浓度的马尿酸标准液; 栗仁水解样品的制备: 将培养后的栗仁研磨粉碎,加入适量去离子水和玻璃珠,50℃、140r/min 摇床振荡 1h,之后 4000r/min 离心 10min,取上清液冷冻干燥即得到栗仁短肽粗品,取一定量的栗仁短肽,用 0.1mol/L 硼酸缓冲液(pH8.3, 含 0.4mol/L NaCl)溶解混匀,配制成不同浓度的溶液,4℃ 保存备用; HPLC 分析: 取不同浓度的栗仁短肽样品 15μL,加入 15μL 的 ACE 溶液,在 37℃ 水浴保温 3min 后加入 50μL HHL 溶液开始反应,在 37℃ 条件下反应 30min 后加入 100μL 1.0mol/L HCl 溶液终止反应,同时用 15μL pH8.3 硼酸缓冲液替代栗仁短肽样品溶液,作为空白对照组。反应液经 0.45μm 滤膜过滤后用于 HPLC 分析。

1.5.1.3 ACE 抑制率的计算

$$\text{ACE 抑制率} / \% = \frac{a-b}{a} \times 100$$

式中: a 为空白组马尿酸的峰面积; b 为样品组马尿酸的峰面积。

1.5.2 抗氧化活性的测定

对超氧阴离子自由基、羟自由基和 DPPH 自由基的清除活性的测定参照文献[8]; 亚油酸氧化抑制力的测定参照文献[9]。

1.6 分析方法

还原糖的测定: 参照 GB/T 5009.7—2008《食品中还原糖的测定》; 短肽得率的测定: 参照三氯乙酸(TCA)可溶性氮法^[10]; 水解度的测定: 参照邻苯二甲醛法(OPA)^[11]。

2 结果与分析

2.1 酶解条件的确定

2.1.1 蛋白酶的选择

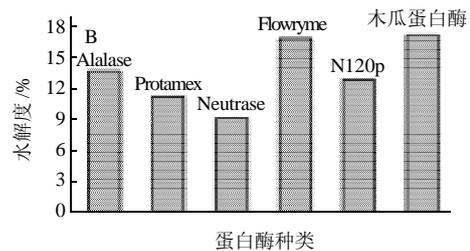
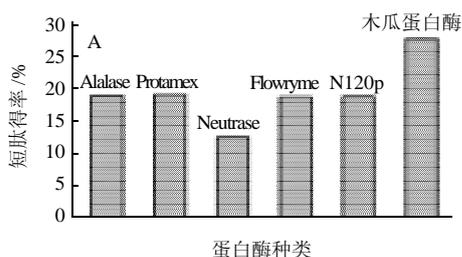


图1 不同蛋白酶作用下的短肽得率(A)和水解度(B)测定结果
Fig.1 Effect of protease type on short-chain peptide yield (A) and DH (B)

由图 1A 可知,选用木瓜蛋白酶短肽得率最高,可达到 28.23%,使用 Neutrased 蛋白酶得率最低,仅为 12.85%,其他 4 种蛋白酶差异不大,均在 19% 左右,短肽得率从高到低的顺序依次为木瓜蛋白酶、Protamex、N120p、Alalase、Flowryme、Neutrased。由图 1B 可知,选用木瓜蛋白酶水解度最高,为 17.39%,6 种蛋白酶水解度由高到低的顺序为木瓜蛋白酶、Flowryme、Alalase、N120p、Protamex、Neutrased。综合考虑短肽得率和水解度两个因素,确定木瓜蛋白酶为较适宜的蛋白酶。

2.1.2 提高短肽得率的方法

功能栗仁制备中存在短肽得率相对较低的问题,原因是酶和底物在固态的栗仁中扩散比较困难。采用蛋白酶与淀粉酶共同作用,结果如表 1 所示。

表 1 蛋白酶-淀粉酶复合后短肽得率

Table 1 Effect of papain alone and in combination with α -amylase or pullulanase on short-chain peptide yield

组别	木瓜蛋白酶用量/(U/g)	α -淀粉酶用量/(g/100mL)	切枝淀粉酶用量/(g/100mL)	短肽得率 / %
实验组	1	6000	0.25	40.5
	2	6000	0	31.1
对照组	6000	0	0	37.3

由表 1 可知, α -淀粉酶能促进蛋白酶解反应,提高短肽得率,较对照提高约 3%,而切枝淀粉酶则有抑制作用,较对照降低约 6%。 α -淀粉酶之所以对短肽得率有促进作用,是因为 α -淀粉酶能水解淀粉 α -1,4 糖苷键,将大分子淀粉水解成分子质量较小的糊精,一定程度上消除了扩散限制。而切枝淀粉酶将支链淀粉水解为直链淀粉,使栗仁中淀粉的结晶化和凝胶化趋势增强^[12],不利于体系中的蛋白酶与底物的充分接触,因此对酶解反应有抑制作用。

相同操作条件下添加不同量的 α -淀粉酶,栗仁中还原糖含量和短肽得率如图 2 所示。从图 2 可看出,当 α -淀粉酶的添加量为 0.35g/100mL 酶液时,还原糖含量最高,达到 14.53g/100g,意味着 α -淀粉酶对板栗

淀粉的水解程度达到最大,同时短肽得率亦达到最高,为49.95%。

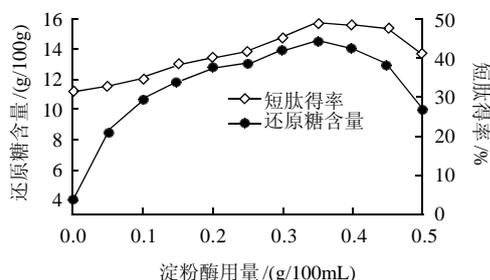


图2 不同 α -淀粉酶用量的还原糖含量和短肽得率

Fig.2 Effect of α -amylase amount on reducing sugar content and short-chain peptide yield

因此,功能栗仁的制备,应使淀粉适度水解后再进行蛋白酶解。换一个角度,这也是防止板栗制品“淀粉返生”的必要措施^[13-14]。在实际生产中,可利用板栗内源 α -淀粉酶的作用使淀粉适度水解,即新鲜板栗冷藏1~2月后再加工^[15]。

2.1.3 提高水解度的方法

通常,具有较好降压活性的肽类分子质量在5000D以下^[16],较好抗氧化活性的肽类为2500~3000D,甚至更低^[17-18]。因此一定范围内水解度越高越好。采用木瓜蛋白酶与其他蛋白酶共同作用,水解度测定结果如表2所示。

表2 木瓜蛋白酶与其他蛋白酶复合的水解度和短肽得率

Table 2 Effect of papain alone and in combination with other five proteases on short-chain peptide yield and DH

蛋白酶种类	水解度/%	短肽得率/%
木瓜蛋白酶+Alalase	22.55	22.50
木瓜蛋白酶+Protamex	18.93	23.48
木瓜蛋白酶+Neutraxe	16.50	21.07
木瓜蛋白酶+Flowryme	25.11	17.50
木瓜蛋白酶+N120p	17.98	23.98
木瓜蛋白酶(对照组)	17.39	25.82

由表2可知,木瓜蛋白酶与其他蛋白酶复合可提高水解度。尤其是与Flowryme复合,水解度达到25.11%,明显高于单独使用木瓜蛋白酶时的17.39%。除与Neutraxe复合的水解度低于单独使用木瓜蛋白酶外,与其他酶复合水解度均有提高。这是由于不同蛋白酶的酶切位点不同,不同的蛋白酶水解不同肽键,效果相互叠加。复合酶作用下水解度由高到低依次为:木瓜蛋白酶+Flowryme > 木瓜蛋白酶+Alalase > 木瓜蛋白酶+Protamex > 木瓜蛋白酶+N120p > 木瓜蛋白酶 > 木瓜蛋白酶+Neutraxe。不难推知,Flowryme的酶切位点与木瓜蛋白酶差异较大,致使水解度提高最为明显。而

与Neutraxe复合水解度低于木瓜蛋白酶,可能是因为水解能力较弱的Neutraxe对木瓜蛋白酶存在竞争性抑制作用的缘故。但木瓜蛋白酶与其他蛋白酶共同作用时,短肽得率均低于木瓜蛋白酶的单一酶(表2)。

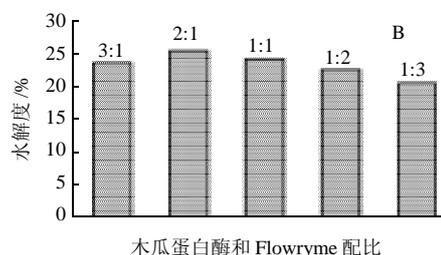
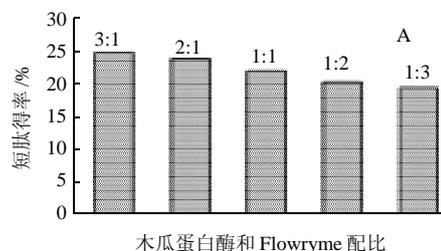


图3 不同木瓜蛋白酶与Flowryme配比的短肽得率(A)和水解度(B)

Fig.3 Effect of papain-to-Flowryme ratio on short-chain peptide yield (A) and DH (B)

相同操作条件下,控制木瓜蛋白酶与Flowryme的不同配比,短肽得率和水解度的变化结果如图3所示。可以看出,随着木瓜蛋白酶所占比例的降低,短肽得率一直呈下降趋势,但水解度呈现先增加后降低的趋势,木瓜蛋白酶与Flowryme配比在2:1时水解度达到最大值,低于或高于该配比水解度均有降低。综合考虑短肽得率和水解度,确定木瓜蛋白酶与Flowryme适宜的配比为2:1。

2.1.4 蛋白酶用量的确定

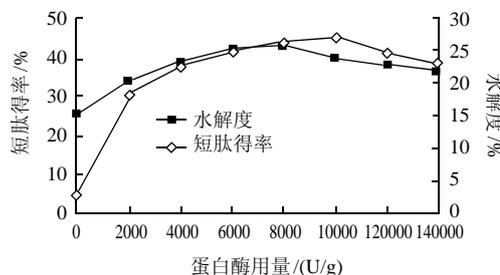


图4 不同蛋白酶用量时的短肽得率和水解度

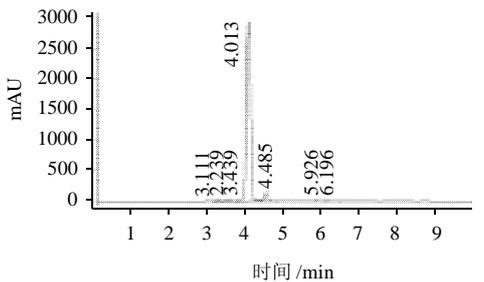
Fig.4 Effect of protease dosage on short-chain peptide yield and DH

由图4可知,短肽得率随着蛋白酶用量的增加而增加,当蛋白酶用量达到10000U/g时,短肽得率达到最高值为45.20%。酶用量继续增加短肽得率反而下降,这

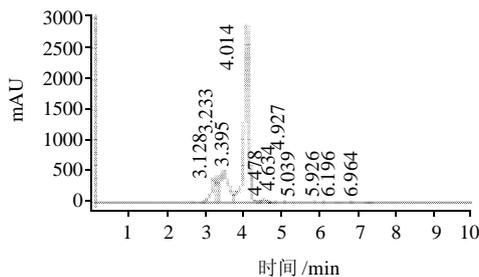
是由于尽管加酶量相对增加,但能够发生反应的有效酶量却保持不变,即所谓的“酶饱和”现象,过多的酶可抑制酶和底物的扩散。水解度随酶用量的变化亦呈相似趋势,当蛋白酶用量为8000U/g时水解度最高为26.27%。综合考虑短肽得率和水解度,确定蛋白酶的适宜用量为8000U/g,此时短肽得率为43.62%、水解度为26.27%。

2.2 功能活性的测定

2.2.1 ACE抑制活性的测定



A.未加入抑制剂的标准对照反应液



B.加入栗仁短肽样品的反应液

图5 HHL与ACE反应后的色谱分析图

Fig.5 HPLC chromatograms of reaction products between HHL and ACE without inhibition or in the attendance of short-chain peptides derived from Chinese chestnut kernels

对比图5A与5B可知,板栗短肽粗品具有较好的ACE抑制活性(马尿酸的出峰时间在4.485min处)。其活性随着肽质量浓度的增加呈线性增加趋势,ACE抑制的 IC_{50} 为4.70mg/mL(图6)。

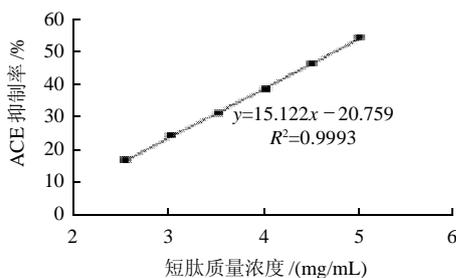


图6 不同质量浓度栗仁短肽的ACE抑制活性

Fig.6 Linear concentration dependence of ACE inhibitory activity of short-chain peptides derived from Chinese chestnut kernels

2.2.2 抗氧化活性的测定

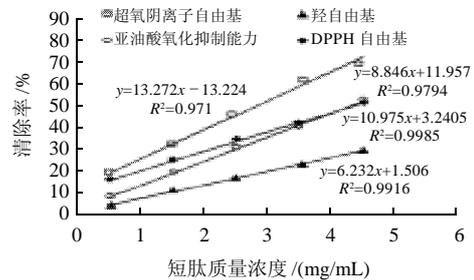


图7 不同质量浓度栗仁短肽的自由基清除和抗氧化活性效果
Fig.7 Linear concentration dependence of radical scavenging and antioxidant activities of short-chain peptides derived from Chinese chestnut kernels

由图7可知,栗仁短肽粗品具有较强的超氧阴离子自由基、羟自由基、DPPH自由基清除活性以及亚油酸氧化抑制活性,并且随着质量浓度增加,其清除或抗氧化作用增强。栗仁短肽清除以上3种自由基的 IC_{50} 值分别为2.77、7.78、4.30mg/mL,亚油酸氧化抑制的 IC_{50} 值为4.26mg/mL。

3 讨论

蛋白酶酶解制备的功能栗仁制品,外观呈褐色、质地肉糯、栗香浓郁、香甜中带有一点苦味,这是由于含有疏水性肽(苦味肽)的缘故,因此蛋白酶对栗仁风味的影响较小。如前所述, α -淀粉酶能提高短肽得率、防止制品的“淀粉返生”。但 α -淀粉酶处理使栗仁稍微带有酶本身不愉快的臭味,因此在实际生产中最好利用内源 α -淀粉酶的作用,即新鲜板栗冷藏1~2月后再加工。

蛋白酶均匀渗入栗仁组织内是制备功能栗仁的关键,本实验采用栗仁干制后浸渍酶液的方法取得了较好的渗入效果。而栗仁的干制,包括热风干燥、冷冻干燥等均为生产中成熟的技术,因此本实验的工艺产业化没有困难。此外,栗仁漂烫后浸入酶液也可以使蛋白酶均匀渗入,若采用此工艺可降低生产成本。

本研究表明,采用木瓜蛋白酶和Flowryme复合对完整形态的板栗仁进行酶解,可赋予板栗仁ACE抑制、抗氧化和自由基清除活性,这为开发具有降血压、抗氧化活性的功能栗仁产品奠定了基础。下一步研究将对酶解工艺及其参数进一步优化,并借鉴软包装栗仁罐头的加工工艺,开发出香味形俱佳的功能栗仁产品。

参考文献:

- [1] 曹家树,秦岭.园艺植物种质资源学[M].北京:中国林业出版社,2005:150-151.

- [2] 姚望. 中国板栗出口国际竞争力比较分析[J]. 市场周刊: 理论研究, 2009(6): 130-131.
- [3] 龙志敏, 吴立军, 江冰娅, 等. 板栗种仁的化学成分(III)[J]. 沈阳药科大学学报, 2008, 25(11): 883-891.
- [4] De-VASCONCELOS MARIA C B M, BENNETT R N, ROSA E A, et al. Primary and secondary metabolite composition of kernels from three cultivars of portuguese chestnut (*Castanea sativa* Mill.) at different stages of industrial transformation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(9): 3508-3516.
- [5] 高海生, 常学东, 蔡金星, 等. 我国板栗加工产业的现状与发展趋势[J]. 中国食品学报, 2006, 6(1): 429-435.
- [6] JOAO C M, SUSANA C, ISABEL C F R, et al. Nutritional, fatty acid and triacylglycerol profiles of *Castanea sativa* Mill. cultivars: a compositional and chemometric approach[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(7): 2836-2842.
- [7] 张会坡. 板栗真空冷冻干燥工艺研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2005.
- [8] NIRANJAN R, ERESHA M, WON K J, et al. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties[J]. Food Research International, 2005, 38(2): 175-182.
- [9] JAE Y J, SOO Y K, SE K K, et al. Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes[J]. European Food Research and Technology, 2005, 221(1/2): 157-162.
- [10] JANG A, LEE M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates[J]. Meat Science, 2005, 69(4): 653-661.
- [11] NIELSEN P M, PETERSEN D, DAMBMANN C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001, 66(5): 642-646.
- [12] 王璋, 许时婴, 汤坚. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 65-71.
- [13] 周礼娟, 芮汉明. 低糖板栗果脯加工中 α -淀粉酶作用效果研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(9): 101-103.
- [14] LÓPEZ C, TORRADO A, GUERRA N P, et al. Optimization of solid-state enzymatic hydrolysis of chestnut using mixtures of α -amylase and glucoamylase[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(4): 989-995.
- [15] JERMINI M, CONEDERA M, SIEBER T N, et al. Influence of fruit treatments on perishability during cold storage of sweet chestnuts[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006, 86(6): 877-885.
- [16] ROBERTM C, RAZANAME A, MUTTER M, et al. Identification of angiotensin. I. Converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(23): 6923-6931.
- [17] WU H, CHEN H, SHIAU C Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*)[J]. Food Research International, 2003, 36(9/10): 949-957.
- [18] YAMAGUCHIN N, YOKOO Y, FUJIMAKI M. Oxidative stability of dried model food consisted of soybean protein hydrolyzate and lard[J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gkkaishi, 1980, 27(4): 51-55.