

酪蛋白水解物的酶法修饰优化与抗氧化活性改善*

吴丹 李铁晶 赵新淮

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030)

【摘要】 利用木瓜蛋白酶对酪蛋白水解,并对所得到的水解物进行类蛋白反应修饰,制备高活性抗氧化肽。以水解物的游离氨基含量变化为响应值,利用响应面分析法对类蛋白反应条件进行优化,得到适宜条件为:酶添加量为 500 U/g,温度 30℃,底物质量分数 50%,反应时间 5.6 h。毛细管电泳分析确认,水解物经类蛋白反应修饰后肽分子组成发生变化。抗氧化活性分析结果表明,所制备的 3 个修饰产物对 3 种自由基的清除能力显著提高。

关键词: 酪蛋白水解物 抗氧化活性 类蛋白反应 响应面分析

中图分类号: TS201.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2010)01-0139-07

Enzymatic Modification of Casein Hydrolysates by Plastein Reaction and Improvement in Antioxidant Activity

Wu Dan Li Tiejing Zhao Xinhuai

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract

Casein hydrolysates were prepared by hydrolysis of casein with papain, and then modified by papain-catalyzed plastein reaction to prepare antioxidant peptides with higher activity. Response surface analysis was conducted to optimize the conditions of plastein reaction with the variations of free amino groups in reaction mixture used as index. The optimal conditions obtained were that enzyme addition level was 500 U/g, temperature was 30℃, concentration of hydrolysates was 50% and reaction time was 5.6 h. The analysis results from capillary electrophoresis confirmed that the peptide compositions of modified products were different from that of casein hydrolysates. The antioxidant activities of three modified products were also analyzed, which indicated that their scavenging activities for three free radicals were enhanced obviously.

Key words Casein hydrolysates, Antioxidant activity, Plastein reaction, Response surface analysis

引言

蛋白质的酶水解修饰,可以改善蛋白质的某些性质。徐红华等^[1]利用 3 种蛋白酶复合对大豆分离蛋白乳化性进行改善,并确定其最佳水解条件,陈洁等^[2]利用中性蛋白酶对葵花浓缩蛋白进行酶水解改性,改善其溶解性、吸油性、乳化性等功能性。蛋白质的酶水解还可以制备具有抗氧化活性的产物——抗氧化肽。国内李艳红等^[3]利用碱性蛋白

酶水解鹰嘴豆蛋白制备抗氧化肽,胡文琴等^[4]以羟基自由基清除率为衡量指标,通过正交试验确定 3 种蛋白酶水解酪蛋白的最佳条件。国外 Kitts D D^[5]对酪蛋白磷酸肽进行抗氧化活性的测定并进行比较,Hernández-Ledesma B 等^[6]则对发酵乳中抗氧化肽以及降血压肽进行研究,采用 RP-HPLC 收集大量活性肽并采用串联质谱进行测序,研究了结构与活性的关系,Raval 等^[7-8]通过对脂肪氧合酶抑制作用的评价,比较了酪蛋白和酪蛋白水解物的抗氧化活

性。然而,已经发表的研究大多集中于蛋白质的酶解过程,主要是通过优化酶解条件和参数来制备高活性的抗氧化肽,并没有更多地考虑通过其他的技术手段来提高蛋白水解物的抗氧化活性。

类蛋白反应可以看成是在蛋白酶存在下蛋白质水解反应的逆反应^[9],其结果相当于肽分子合成蛋白的反应,目前对类蛋白反应的研究较少。国内曾利用其对水解明胶进行改性^[10],国外 Williams 等将此反应应用于真菌蛋白,优化了反应条件并对修饰后真菌蛋白的性质进行研究^[11-12]。本文尝试两步法制备酪蛋白抗氧化肽,首先利用木瓜蛋白酶制备蛋白水解物,并利用木瓜蛋白酶对水解物进行类蛋白反应修饰;利用响应面分析法优化酪蛋白水解物的类蛋白反应条件,采用毛细管电泳技术对产物的组成变化进行确认,同时对产物抗氧化活性进行分析评价,确认类蛋白反应对酪蛋白水解物抗氧化活性的影响,以探讨利用类蛋白反应作为一个新手段改善酪蛋白水解物生物活性的可能性。

1 材料与方 法

酪蛋白(蛋白质含量 95.7%,上海山浦化工有限公司),木瓜蛋白酶(上海国药集团化学试剂有限公司,酶活 17 800 U/g),1,1-二苯基-2-苦基肼(DPPH)(美国 Sigma 公司),Trolox(美国 Sigma 公司)。其他所有试剂为分析纯,所用的水为去离子水。

主要仪器设备包括毛细管电泳仪(PACE-MDQ 型,美国 Beckman 公司);石英毛细管(60 cm × 50 μm i. d.,窗口位于 50 cm 处);紫外可见分光光度计(UV-2401PC 型,日本岛津公司);分析天平(AL204 型,梅特勒-托利多仪器中国有限公司);全自动凯氏定氮仪(Kjeltec TM 2300 型,瑞士 Foss 公司);真空冷冻干燥机(LGJ-1 型,上海医用分析仪器厂);精密 pH 计(DELTA 320 型,梅特勒-托利多中国有限公司);微型漩涡混合器(H-1 型,上海精科实业有限公司);远红外恒温干燥箱(YH-4BS 型,天津市中环实验电炉有限公司);电热恒温水浴锅(DK-98-1 型,天津市泰斯特仪器有限公司)。

2 方 法

2.1 酪蛋白的酶水解

用蒸馏水配制质量分数为 5% 的酪蛋白溶液,调节 pH 值至 6.5,按 500 U/g 的加酶量添加木瓜蛋白酶,然后在 45℃ 恒温水浴中进行酶解;酶解作用进行 2 h 后,调节 pH 值至 4.6 等电点沉淀,100℃ 加热处理 20 min 使酶灭活,然后 5 000 r/min 离心

20 min,测定其蛋白质含量和游离氨基含量,计算其水解度。水解物冷冻干燥,保存于 -20℃ 冰箱中备用。

2.2 酪蛋白水解物的类蛋白反应优化

根据中心组合试验设计原理,在木瓜蛋白酶添加量为 500 U/g 的条件下,研究温度、底物质量分数、反应时间对类蛋白反应修饰的影响。以反应前后游离氨基含量变化(反应前游离氨基含量减去反应后游离氨基含量)为响应值,采用三因素五水平响应面分析方法优化反应条件,其因素水平编码如表 1 所示。

表 1 响应面分析的因素水平编码

Tab.1 Factors and coding levels of response surface analysis

| 编码 | 因素 | | |
|--------|-------------------------|-----------------|---------------------|
| | 温度 $x_1/^\circ\text{C}$ | 底物质量分数 $x_2/\%$ | 反应时间 x_3/h |
| -1.682 | 13.2 | 29.8 | 1.3 |
| -1 | 20.0 | 38.0 | 3.0 |
| 0 | 30.0 | 50.0 | 5.5 |
| 1 | 40.0 | 62.0 | 8.0 |
| 1.682 | 46.8 | 70.2 | 9.7 |

2.3 酪蛋白水解物的相关分析

2.3.1 蛋白质含量、蛋白质水解度及酶活力测定

(1) 蛋白质含量参照凯氏定氮法^[13]。

(2) 游离氨基含量与蛋白质水解度测定参照 OPA 法^[14]。

水解度计算公式^[15]为

$$D_H = \frac{F_1 - F_0}{f_N N_1} \times 100\%$$

式中 F_0 ——酪蛋白游离氨基含量,取 0.44 mmol/g

F_1 ——酪蛋白水解物游离氨基含量,mmol/g

f_N ——酪蛋白的蛋白质换算系数,取 6.38

N_1 ——酪蛋白水解物的氮含量,mg/mL

h_{tot} ——酪蛋白的肽键含量,取 8.2 mmol/g

(3) 酶活力测定参照福林酚法^[16]。

2.3.2 抗氧化活性分析

(1) 清除 DPPH 自由基活性

参考文献[17],无水乙醇溶解 DPPH,最终浓度为 20 μmol/L。取 1 mL DPPH 乙醇溶液与 2 mL 已稀释适当倍数的待测样品溶液混合,室温暗处反应 30 min,测定其在 517 nm 处的吸光度,同时利用无水乙醇进行空白试验,平行试验 3 次。采用系列 Trolox 溶液(1~5 μg/mL)代替样品溶液,测定后绘制标准曲线,用于计算样品半数清除浓度。DPPH 自由基清除率计算公式为

$$S_{AD} = \frac{A_{D0} - A_{D1}}{A_{D0}} \times 100\%$$

式中 A_{D0} ——空白样在波长 517 nm 处的吸光度

A_{D1} ——样品在波长 517 nm 处的吸光度

(2) 清除·OH 活性

参照文献 [18], 将 0.2 mL 的 $\text{FeSO}_4 - \text{EDTA}$ (10 mmol/L) 溶液与 0.2 mL α -脱氧核糖 (10 mmol/L) 混合, 加入一定量的样品溶液, 并用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 值 7.4) 定容到 1.8 mL, 再加入 0.2 mL H_2O_2 (10 mmol/L), 混匀后于 37℃ 水浴中恒温保持 30 min, 然后加质量分数为 2.8% 三氯乙酸 1.00 mL、1.0% 硫代巴比妥酸 1.00 mL, 混匀后于沸水浴中加热 10 min; 冷水冷却后在波长 532 nm 处测吸光度, 平行试验 3 次, 计算样品半数清除浓度。·OH 清除率计算公式为

$$S_{AH} = \left(1 - \frac{A_{HS} - A_{H0}}{A_{HC} - A_{H0}} \right) \times 100\%$$

式中 A_{HS} ——样品溶液操作处理后在波长 532 nm 处的吸光度

A_{HC} ——不加样品溶液, 相同操作处理后在波长 532 nm 处的吸光度

A_{H0} ——不加样品溶液且不在 37℃ 水浴中反应, 其他相同操作处理后在 532 nm 处的吸光度

(3) 清除 $\text{ABTS} \cdot ^+$ 活性

参照文献 [19], 将 7 mmol/L $\text{ABTS} \cdot ^+$ (水溶液) 与终浓度为 2.45 mmol/L 的过硫酸钾混合, 室温下混合液放置 12~16 h。然后用无水乙醇稀释该溶液, 使其 30℃ 下波长 734 nm 处的吸光度达到 0.70 ± 0.02。

取该溶液 1 mL 与 10 μL 适当稀释的待测样品溶液混合, 30℃ 下分别在 1、4、6 min 时测定吸光度, 进行空白试验, 平行试验 3 次。采用系列 Trolox 溶液 (0~4.5 $\mu\text{mol}/\text{mL}$) 代替样品溶液, 测定后绘制标准曲线, 用于计算样品半数清除浓度。 $\text{ABTS} \cdot ^+$ 清除率计算公式为

$$S_{AA} = \frac{A_{A0} - A_{A1}}{A_{A0}} \times 100\%$$

式中 A_{A0} ——空白样在波长 734 nm 处的吸光度

A_{A1} ——待测样在波长 734 nm 处的吸光度

2.3.3 毛细管电泳分析

配制样品溶液、分离缓冲液及电泳试剂。本研究所有分析样品的浓度均为 2 mg/mL, 溶液于毛细管上样瓶中上机测定^[20]。

在 Beckman P/ACE MDQ 毛细管电泳系统进行测定, 毛细管为裸管 (60 cm × 50 μm i. d.), 分离温

度为 20℃, 分离电压为 17 kV, 样品紫外检测波长 200 nm。测定前依次用水、0.1 mol/L HCl、水、电泳缓冲溶液冲洗毛细管, 时间分别为 10、10、10 和 7 min。然后 24.1 kPa 压力下进样, 进样量 5 μL , 进样时间为 3 s。最后, 用分离缓冲液分离 60 min。利用 P/ACE MDQ 中的 32Karat 软件处理分析毛细管电泳谱图。

2.4 数据的统计分析

采用 Design Expert 7.0 软件中 RS (response surface) 程序进行分析, 用 Model Graphs 程序作响应曲面图和等高线图, 用 Excel 2003 软件进行规划分析得到最优条件。

3 结果与分析

3.1 酪蛋白水解物的制备

酪蛋白进行木瓜蛋白酶水解时, 水解产物含有大小不等的肽分子。为了得到抗氧化活性较好的酪蛋白水解物, 需要控制酪蛋白的酶水解条件。根据其他研究者的研究结果^[4], 采用一个较适宜的水解条件, 即酶添加量为 500 U/g、pH 值 6.5、温度 45℃、酪蛋白质量分数 5%。在此水解条件下, 对不同水解时间 (1~5 h) 得到的酪蛋白水解物进行抗氧化活性比较, 发现酪蛋白水解处理 2 h 时, 获得对 DPPH 自由基和 $\text{ABTS} \cdot ^+$ 清除能力最高的水解物, 其清除 DPPH 自由基活性的 Trolox 等价抗氧化能力值为 (10.45 ± 0.64) mmol/g, 半数清除浓度 (1 854.46 ± 109.54) $\mu\text{g}/\text{mL}$; 其清除 $\text{ABTS} \cdot ^+$ 活性的 Trolox 等价抗氧化能力值为 (8.33 ± 1.14) $\mu\text{mol}/\text{g}$, 半数清除浓度为 (965.52 ± 56.77) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因此, 制备水解处理 2 h 的酪蛋白水解物 (其水解度为 10%) 作为下一步进行类蛋白反应修饰的底物。

3.2 类蛋白反应条件的响应面分析法优化

3.2.1 类蛋白反应回归方程的建立与分析

按照中心组合设计的统计学要求, 进行 20 组试验, 温度、底物质量分数和反应时间分别为自变量 X_1 、 X_2 和 X_3 , 以水解物类蛋白反应修饰后的游离氨基含量变化为响应值 Y , 试验结果如表 2 所示。

利用 Design-Expert 软件对表 2 试验数据进行二次多项回归拟合, 获得类蛋白反应修饰前后的游离氨基含量变化量与温度、底物质量分数和反应时间关系的二次多项式回归方程为

$$Y = -661.11466 + 12.90736X_1 + 16.16788X_2 + 49.11057X_3 + 0.091969X_1X_2 + 0.41895X_1X_3 - 0.18471X_2X_3 - 0.32692X_1^2 - 0.17759X_2^2 - 4.71988X_3^2$$

表 2 中心组合设计表及试验结果

Tab.2 Central composite design matrix and results

| 试验序号 | X_1 | X_2 | X_3 | $Y/\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ |
|------|--------|--------|--------|-------------------------------------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | 10.87 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | -31.91 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | -16.23 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 7.07 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | -6.79 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 14.26 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -34.12 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 9.15 |
| 9 | -1.682 | 0 | 0 | -9.80 |
| 10 | 1.682 | 0 | 0 | -20.64 |
| 11 | 0 | -1.682 | 0 | -8.60 |
| 12 | 0 | 1.682 | 0 | 18.43 |
| 13 | 0 | 0 | -1.682 | -7.74 |
| 14 | 0 | 0 | 1.682 | -4.64 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 78.95 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 81.01 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 80.50 |
| 18 | 0 | 0 | 0 | 80.50 |
| 19 | 0 | 0 | 0 | 79.98 |
| 20 | 0 | 0 | 0 | 79.46 |

方差分析结果见表 3。分析结果表明所得模型显著 ($P < 0.000 1$), 模型的校正确定系数 $R^2_{\text{Adj}} = 0.947 8$, 表明模型能很好的反映出类蛋白反应过程中游离氨基含量变化, 与实际情况拟合较好, 可用于类蛋白反应修饰实际情况预测。

表 3 回归方程方差分析

Tab.3 ANOVA for the quadratic polynomial

regression model

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 |
|------|-----------|-----------------|------------------------------|--------|----------|
| 模型 | 33 495.96 | 9 | 3 721.77 | 39.30 | <0.000 1 |
| 失拟项 | 944.10 | 5 | 188.82 | 326.91 | <0.000 1 |
| 纯误差 | 2.89 | 5 | 0.58 | | |
| 所有项 | 34 442.96 | 19 | | | |
| | | $R^2 = 0.972 5$ | $R^2_{\text{Adj}} = 0.947 8$ | | |

Design Expert 7.0 软件分析表明, 影响响应值的各因素主次顺序为反应时间、底物质量分数、温度。

3.2.2 类蛋白反应最优水平确定

用 Design Expert 7.0 软件中 Model Graphs 程序所作的响应面曲面图及其等高线, 结果如图 1~3。

底物质量分数和温度对酪蛋白水解物类蛋白反应修饰后游离氨基含量变化量的响应面及等高线图如图 1 所示。随着底物质量分数和温度的增加, 游

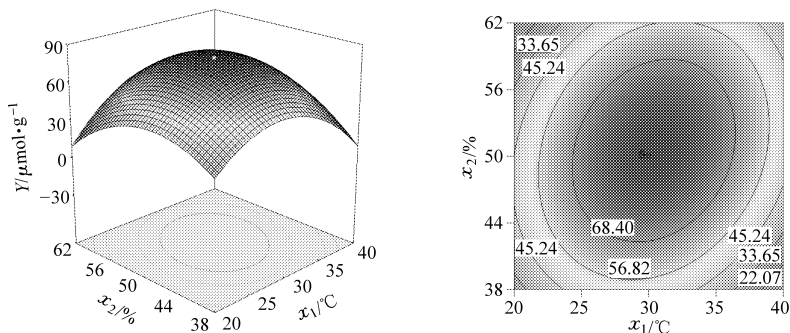


图 1 底物质量分数和温度对酪蛋白水解物类蛋白反应中游离氨基含量变化的响应面和等高线图 ($X_3 = 0$)

Fig.1 Response surface and contour lines of substrate concentration and temperature on the variations of free amino group of casein hydrolysates by plastein reaction ($X_3 = 0$)

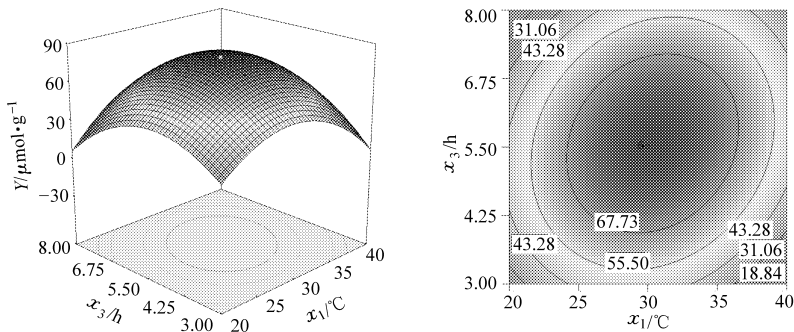


图 2 反应时间和温度对酪蛋白水解物类蛋白反应中游离氨基含量变化量的响应面和等高线图 ($X_2 = 0$)

Fig.2 Response surface and contour lines of reaction time and temperature on the variations of free amino group of casein hydrolysates by plastein reaction ($X_2 = 0$)

离氨基含量变化量逐渐增加,这意味着肽分子之间相互反应合成新的肽分子;然后,游离氨基含量变化量逐渐降低,意味着肽分子之间合成反应趋势降低,水解反应趋势增加。从等高线图看出,一定底物质量分数下、28~34℃时游离氨基变化量较大。

反应时间和温度对酪蛋白水解物类蛋白反应修饰后游离氨基含量变化量的响应面及等高线图如图2所示。随着反应时间和温度的增加,游离氨基含量变化量逐渐增加,反应时间为5.6 h时,此变化量达到最大,之后逐渐降低。从等高线图看出,反应

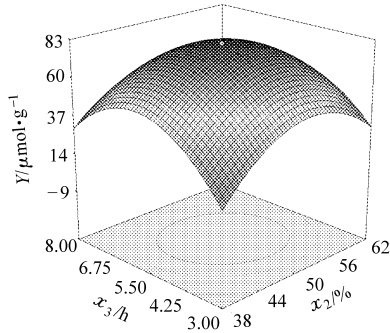


图3 反应时间和底物质量分数对酪蛋白水解物类蛋白反应游离氨基含量变化量的响应面及等高线图($X_1 = 0$)

Fig. 3 Response surface and contour lines of reaction time and substrate concentration on the variations of free amino group of casein hydrolysates by plastein reaction($X_1 = 0$)

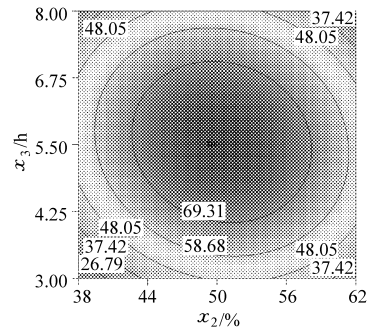
通过上述分析,得到酪蛋白水解物类蛋白反应修饰的优化条件为反应温度30℃、底物质量分数50%、反应时间5.6 h。将此参数代入二次回归模型,得出水解物类蛋白反应修饰后的游离氨基含量变化量的最大理论值为80.01 $\mu\text{mol/g}$ 。试验设计中的中心点与优化反应条件很接近(仅反应时间相差0.1 h),中心点反应条件下的实际游离氨基含量变化量为80.06 $\mu\text{mol/g}$ (6次平均值),与理论值基本无区别。这表明所得出的回归方程可以很好地反映温度、底物质量分数和时间与类蛋白反应中游离氨基含量的变化关系,可用于预测类蛋白反应修饰进行的程度。在Williams等的研究中^[11-12],用胃蛋白酶与其他蛋白酶(包括胰蛋白酶,胰凝乳蛋白酶和木瓜蛋白酶等)进行类蛋白反应,反应底物选择真菌蛋白多肽;通过比较发现胃蛋白酶优于其他蛋白酶;研究表明多肽浓度在11%~43%之间,类蛋白反应产物的产率增加;当反应时间为4~5 h、温度65℃时,类蛋白反应产物的产率达到最大值。本研究结果与其相比,类蛋白反应底物、酶等存在根本性差别,所以不存在可比性,但是反应时间基本相同。

3.3 毛细管电泳分析

毛细管电泳技术常用于分析蛋白质或肽分子的组成,方法准确、灵敏度高、可靠。为了研究类蛋白反应对酪蛋白水解物组成的影响,选择修饰反应过程中游离氨基变化量均大于零的类蛋白修饰产物

时间为4.5~6.5 h、温度为28~34℃时,类蛋白反应修饰后游离氨基含量变化量较大。

底物质量分数和反应时间对酪蛋白水解物类蛋白反应修饰后游离氨基含量变化量的响应面及等高线图如图3所示。随着反应时间的增加,游离氨基含量变化量增加,达到一定程度后呈现下降趋势。从等高线图看出,底物质量分数为50%时游离氨基含量变化量最大,可能是由于类蛋白反应修饰达到一定程度后,底物质量分数的变化对游离氨基含量变化量的影响不明显。



(此可以保证它们发生了类蛋白反应合成新肽)为分析对象,所选择的两个反应产物的游离氨基含量变化量分别为7 $\mu\text{mol/g}$ 、81 $\mu\text{mol/g}$,这样可以保证它们典型性的代表类蛋白反应修饰程度不同的修饰产物。以酪蛋白水解物(水解处理2 h)为对照,分析、比较两种修饰产物的肽分子组成,经过P/ACE MDQ 32Karat软件处理后的分析结果如图4所示。图中1为酪蛋白水解物,2为类蛋白反应修饰产物1(游离氨基含量变化量为7 $\mu\text{mol/g}$),3为类蛋白反应修饰产物2(游离氨基含量变化量为81 $\mu\text{mol/g}$)。

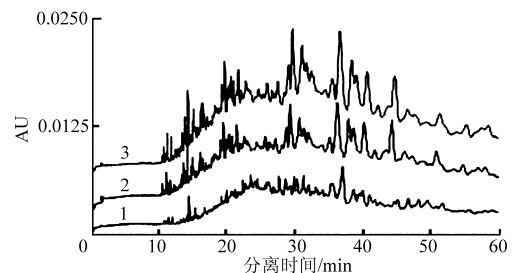


图4 毛细管电泳分析酪蛋白水解物类蛋白反应修饰前后肽分子组成变化情况

Fig. 4 Capillary electrophoresis analysis of casein hydrolysates and two plastein products

图4显示,与酪蛋白水解物相比,两个类蛋白反应修饰产物的肽分子组成情况发生明显变化(见分离时间在14~50 min之间的吸收峰的变化情况)。在分离时间为0~20 min之间,肽分子吸收峰的变

化较小,而在分离时间为 20 min 附近、28 ~ 32 min 之间以及 37 ~ 44 min 之间,肽分子吸收峰变化很明显,尤其在 37 ~ 45 min 之间出现若干吸收强度强的新峰;而在分离时间为 24 min、34 min 附近肽分子吸收峰减少。这些结果表明,酪蛋白水解物类蛋白反应修饰后,确实生成一些新的肽分子,同时还伴随有一些肽分子数量增加、一些肽分子数量减少,导致类

蛋白反应修饰产物的肽分子组成明显的不同于原料酪蛋白水解物,从而可能导致其某些性质发生变化。

3.4 类蛋白反应修饰抗氧化活性变化

对酪蛋白水解物、制备出的 3 个类蛋白修饰产物的抗氧化活性进行分析,选用了大多数研究中常用的 DPPH 自由基、·OH 和 ABTS·⁺ 的清除活性评价方法,得到表 4 中所列结果。

表 4 酪蛋白水解物以及修饰产物的清除自由基活性

Tab. 4 Scavenging activities of casein hydrolysates and three plastein products

| 分析样品 | 游离氨基含量 变化量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ | 清除 DPPH 自由基活性 | | 清除·OH 活性 | 清除 ABTS· ⁺ 活性 | |
|--------|--|---|--|--|---|--|
| | | Trolox 等价抗氧化 能力/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$ | 半数清除浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 半数清除浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | Trolox 等价抗氧化 能力/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ | 半数清除浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
| 酪蛋白水解物 | 0 | 10.45 ± 0.64 | 1 854.46 ± 109.54 | 115.67 ± 0.33 | 8.33 ± 1.14 | 965.52 ± 56.77 |
| 修饰产物 1 | 7 | 76.50 ± 0.30 | 253.29 ± 0.98 | 87.91 ± 9.50 | 16.37 ± 1.97 | 491.23 ± 24.58 |
| 修饰产物 2 | 81 | 90.31 ± 1.42 | 214.57 ± 3.36 | 111.80 ± 0.18 | 15.23 ± 1.09 | 528.30 ± 15.94 |
| 修饰产物 3 | 79 | 86.58 ± 0.57 | 223.81 ± 1.748 | 94.80 ± 0.41 | 15.51 ± 0.12 | 518.52 ± 1.60 |

从数据结果中可以看出,酪蛋白水解物的类蛋白反应修饰,有效地提高了 3 个修饰产物的抗氧化活性,修饰产物的半数清除浓度均小于酪蛋白水解物的半数清除浓度,表明 3 个产物对 DPPH 自由基、·OH 和 ABTS·⁺ 的清除活性有较大幅度的改善。虽然类蛋白反应修饰酪蛋白水解物的程度(游离氨基含量的减少程度)与抗氧化活性增加之间的不明显关系,但是整体结果仍然表明,酪蛋白水解物的类蛋白反应修饰是提高其活性的有效的技术手段。但对于其他蛋白质水解物是否存在类似的结果,以及蛋白酶的不同是否有影响作用,有待于今后的相关研究结果确定。

解度约为 10% 酪蛋白水解物。通过响应面分析法,对水解物的木瓜蛋白酶催化类蛋白反应条件进行研究,得到适宜的反应条件为:反应温度为 30℃、底物质量分数为 50%、反应时间为 5.6 h,各因素主次顺序为反应时间、底物质量分数、温度。

(2) 采用毛细管电泳技术对酪蛋白水解物、水解物的类蛋白反应修饰产物进行分析,发现修饰后产物的肽分子组成情况发生变化,证明类蛋白反应对酪蛋白水解物的组成产生了影响。

(3) 通过评价酪蛋白水解物、水解物的类蛋白反应修饰产物的抗氧化活性,结果表明类蛋白反应修饰产物对 DPPH 自由基、·OH 和 ABTS·⁺ 的清除能力明显提高。

4 结论

(1) 利用木瓜蛋白酶对酪蛋白酶水解,得到水

参 考 文 献

- 徐红华,刘欣,温其标. 复合酶法改善大豆分离蛋白乳化性的试验[J]. 农业机械学报, 2008, 39(2): 102 ~ 106.
Xu Honghua, Liu Xin, Wen Qibiao. Optimum technology of improvement emulsifying properties of soybean protein isolate by multiple enzymes [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2008, 39(2): 102 ~ 106. (in Chinese)
- 陈洁,刘国琴,裘爱泳,等. 葵花浓缩蛋白的酶法改性研究[J]. 农业机械学报, 2008, 39(5): 86 ~ 90, 69.
Chen Jie, Liu Guoqin, Qiu Aiyong, et al. Enzymatic modification of concentrated sunflower proteins [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2008, 39(5): 86 ~ 90, 69. (in Chinese)
- 李艳红,刘坚,张涛,等. 酶解鹰嘴豆蛋白制备抗氧化肽工艺优化研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(1): 268 ~ 273.
Li Yanhong, Liu Jian, Zhang Tao, et al. Enzymolysis technology optimization for production of antioxidant peptides from chickpea protein [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2008, 24(1): 268 ~ 273. (in Chinese)
- 胡文琴,王恬,霍永久,等. 酪蛋白酶解物体外抗氧化作用的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(4): 158 ~ 162.
Hu Wenqin, Wang Tian, Huo Yongjiu, et al. Study on antioxidant activities of hydrolysed casein in vitro [J]. Food Science,

- 2004, 25(4): 158 ~ 162. (in Chinese)
- 5 Kitts D D. Antioxidant properties of casein phosphopeptides[J]. Trends in Food Science & Technology, 2005, 16(12): 549 ~ 556.
 - 6 Hernández-Ledesma B, Miralles B, Amigo L, et al. Identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptides in fermented milk[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(6): 1 041 ~ 1 048.
 - 7 Raval S G, Boeriu C G, Wichers H J. Casein and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(1): 295 ~ 302.
 - 8 Raval S G, Boeriu C G, Wichers H J. Casein and casein hydrolysates. 1. Lipoxygenase inhibitory properties[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49(1): 287 ~ 294.
 - 9 Hardolph W, Henry B. The enzymatic synthesis of protein. I. The synthesizing action of pepsin[J]. Journal of Biological Chemistry, 1924, 62(1): 15 ~ 29.
 - 10 安广杰, 王璋. 类蛋白反应改性水解明胶的原理[J]. 食品与生物技术学报, 2006, 25(1): 92 ~ 95, 119.
 - 11 Williams R J, Brownsell V L, Andrews A T. Application of the plastein reaction to mycoprotein: I. Plastein synthesis[J]. Food Chemistry, 2001, 72(3): 329 ~ 335.
 - 12 Brownsell V L, Williams R J, Andrews A T. Application of the plastein reaction to mycoprotein: II. Plastein properties [J]. Food Chemistry, 2001, 72(3): 337 ~ 346.
 - 13 GB/T 5009.5—2003, 食品中蛋白质的测定[S].
 - 14 Hernández M J, Domingo E B, Camañas R M, et al. Evaluation of the proteolysis degree with o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine reagent[J]. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1990, 338(1): 62 ~ 65.
 - 15 赵新淮, 冯志彪. 大豆蛋白水解物水解度测定的研究[J]. 东北农业大学学报, 1995, 26(2): 178 ~ 181.
Zhao Xinhuai, Feng Zhibiao. A study on the determination of the degree of hydrolysis in soy protein hydrolysates[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 1995, 26(2): 178 ~ 181. (in Chinese)
 - 16 SB/T 10317—1999 蛋白酶活力测定[S].
 - 17 Nsimba R Y, Kikuzaki H, Konishi Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds[J]. Food Chemistry, 2008, 106(2): 760 ~ 766.
 - 18 Chung Shin-Kyo, Osawa Toshihiko, Kawakishi Shunro. Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*)[J]. Bioscience, Biotechnology & Biochemistry, 1997, 61(1): 118 ~ 123.
 - 19 Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biology and Medicine, 1999, 26(9 ~ 10): 1 231 ~ 1 237.
 - 20 Otte J, Shalabya M S, Zakoraa M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk protein hydrolysates: effect of substrate, enzyme and time of hydrolysis[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(5): 488 ~ 503.