

山羊乳酪蛋白酶解物制备及体外抗氧化活性研究

李志成¹, 蒋爱民^{2,*}, 熊清权¹, 童伟¹, 郑晓莹¹

(1.西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2.华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)

摘要:以自由基清除能力、金属离子螯合能力和抗脂质过氧化能力为指标,采用均匀试验研究山羊乳酪蛋白酶解物的制备及其体外抗氧化活性,并且比较自由基清除能力的方法。结果表明:山羊乳酪蛋白适宜的酶解工艺为在60g/kg的底物浓度下,中性蛋白酶和碱性蛋白酶的添加量分别为4000U/g和250U/g,45℃、pH7.5条件下酶解24h。山羊乳酪蛋白经酶解后其体外抗氧化活性显著增强。山羊乳酪蛋白酶解物·OH清除率的EC₅₀值是其蛋白的3.59倍,ABTS⁺·的清除能力是其蛋白的158.72倍,螯合Fe²⁺的能力是其蛋白的5.44倍;在亚油酸体系中抗脂质过氧化能力强于TBHQ,与VE相当。清除·OH、DPPH自由基、O₂⁻·和ABTS⁺·的方法不能相互替代。

关键词:山羊乳酪蛋白酶解物;制备;抗氧化;半效应质量浓度(EC₅₀)

Enzymatic Preparation and Antioxidative Activity of Goat's Milk Casein Hydrolysates *in vitro*

LI Zhi-cheng¹, JIANG Ai-min^{2,*}, XIONG Qing-quan¹, TONG Wei¹, ZHENG Xiao-ying¹

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Our previously reported work has shown that one-step enzymatic hydrolysis with neutral and alkaline proteases allows the preparation of highly antioxidant goat's milk casein hydrolysates. In this study, hydrolysis conditions for the preparation of goat's milk casein hydrolysates by the method were optimized using uniform design based on radical scavenging activities against hydroxyl and DPPH free radicals. The results showed that hydrolysis for 24 h at 45 °C, pH 7.5 and 60 g/kg substrate concentration with 4000 U/g neutral protease and 250 U/g alkaline protease proved optimal. The EC₅₀ concentrations of the obtained hydrolysate for scavenging hydroxyl and ABTS⁺· and chelating Fe²⁺ were 3.59, 158.72 times and 5.44 times higher than those of goat's milk casein, respectively. Moreover, this hydrolysate revealed stronger inhibitory effect on lipid peroxidation in linoleic acid model system and was equivalent to VE. The scavenging activities against hydroxyl, DPPH, superoxide anion and ABTS⁺ could not replace each other.

Key words: goat's milk casein hydrolysates; preparation; antioxidant activity; EC₅₀

中图分类号: TS252.1; TS252.41

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0082-05

与牛乳相比,山羊乳的蛋白质和脂肪特性等更接近人乳,更适合各类人群饮用^[1]。生物活性肽具有活性多样性和功能多样性,是近年来的研究热点^[2-3]。牛乳酪蛋白来源的活性肽研究较多^[4-5],山羊乳酪蛋白(goat's milk casein, GMC)和牛乳酪蛋白相比除各酪蛋白组分含量不同外^[1,6],组成牛羊乳各酪蛋白组分的氨基酸序列和长度也不同^[7-8],具有本质的区别。Lee等^[9]和Hernández-Ledesma等^[10]研究了山羊乳酪蛋白来源的ACE抑制肽,并获得了ACE抑制肽段的序列,但山羊乳酪蛋白来源的抗氧化肽鲜见报道。本研究在前期实验基础上,选用中性蛋白酶和碱性蛋白酶复合酶对山羊乳酪蛋白进行酶解,

研究山羊乳酪蛋白的酶解工艺,及山羊乳酪蛋白酶解物(goat's milk casein hydrolysates, GMCH)的体外抗氧化活性,同时比较4种自由基清除率测定方法的相关性,为探明山羊乳酪蛋白酶解物的抗氧化作用提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

山羊乳酪蛋白:西农萨能奶山羊所产鲜山羊奶,离心脱脂,用2mol/L盐酸调节pH4.4,沉淀出酪蛋白,再用0.05mol/L、pH4.4的醋酸-醋酸钠缓冲液洗涤两次,离心沉淀物即为酪蛋白粗品,经测定其蛋白质含量为18.34%。

收稿日期:2011-02-10

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD12B07);陕西省科技厅农业科技攻关项目(2011K01-04)

作者简介:李志成(1966—),男,副教授,博士,研究方向为乳肉蛋贮藏与加工。E-mail: lzc20000@163.com

*通信作者:蒋爱民(1957—),男,教授,博士,研究方向为畜禽产品加工与质量安全控制。E-mail: jiangaimin20000@163.com

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、亚油酸、还原型谷胱甘肽(GSH)、 α -脱氧核糖 美国 Sigma 公司; ABTS 英国 Better 公司; 中性蛋白酶(50000U/mg)、碱性蛋白酶(10000U/g) 日本 Amano Enzyme 公司; 亚铁啉 德国 Ruibio 公司; 过硫酸钾、硫氰酸铵、邻苯三酚、过氧化氢、无水乙醇、三氯乙酸(TCA)、硫代巴比妥酸(TBA)、乙二胺四乙酸(EDTA)等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-1700 双光束紫外分光光度计 日本岛津公司; HH-S6-2 型恒温水浴锅 上海仪器仪表有限公司; PK121R 型冷冻离心机 SIM 国际有限公司; 2300 型全自动凯氏定氮仪 瑞典 FOSS 公司; PB-10 pH 计 德国 Sartorius 公司。

1.3 方法

1.3.1 山羊乳酪蛋白酶解物的制备

称取一定质量的酪蛋白粗品置于三口瓶中, 用 0.1mol/L 氢氧化钠溶液助溶, 用蒸馏水定容, 得到 60g/kg 的山羊乳酪蛋白溶液, 加入蛋白酶, 在规定条件下酶解一定时间。酶解过程用 2mol/L 的 NaOH 溶液调整酶解液的 pH 值为 7.5 \pm 0.2。酶解结束后 95 $^{\circ}$ C 灭酶 10min, 冷却到室温, 10000r/min 离心 15min 去除酶及未被酶解的蛋白质等大分子物质, 进行测定。

1.3.2 山羊乳酪蛋白酶解工艺优化

前期研究^[1]发现, 山羊乳酪蛋白的中性蛋白酶和碱性蛋白酶复酶酶解物的抗氧化活性较高, 采用均匀试验确定山羊乳酪蛋白的最佳酶解工艺条件, 中性蛋白酶的加酶量为 0、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000U/g 9 个水平, 碱性蛋白酶的加酶量为 0、50、100、150、200、250、300、350、400U/g 9 个水平, 酶解温度设 40、45、50 $^{\circ}$ C 3 个水平, 酶解时间设 3、6、9、12、18、24、30、36、48h 9 个水平, 同时测定酶解物的 \cdot OH 和 DPPH 自由基。并测定 GMC 优化酶解工艺所得酶解物的 \cdot OH、DPPH 自由基、 O_2^- 和 ABTS $^+$ 清除能力, 抗脂质过氧化能力以及金属离子的螯合能力。

1.3.3 活性肽含量和 EC₅₀ 值的测定

参照文献^[11]的方法, 以 GSH 为标样进行测定。回归方程为 $y = 0.0666x - 0.0006$, $R^2 = 0.9939$, 其中 y 为活性肽的含量, x 为 540nm 波长处的吸光度。活性肽含量在 0~1.0mg/mL 之间的线性关系良好。

取一定质量浓度的样品, 倍半或按比例稀释 5~7 个稀释度, 计算活性肽含量, 同时测定各稀释样品的效应值, 然后按照西北农林科技大学 IC₅₀(EC₅₀) 计算软件计算其 EC₅₀ 值。

1.3.4 \cdot OH 和 O_2^- 清除率的测定

\cdot OH 清除率参照文献^[12]的方法测定; O_2^- 清除率参照文献^[13]的方法测定。

1.3.5 DPPH 自由基清除率的测定

参照文献^[14]的方法测定。

1.3.6 ABTS $^+$ 清除率的测定

参照文献^[15]的方法测定, 有改动。用无水乙醇稀释 ABTS 原液制成 ABTS $^+$ 工作液, 分别取 ABTS $^+$ 工作液 2mL + 样品液 1mL(A_s), ABTS $^+$ 工作液 2mL + 无水乙醇 1mL(A_c), 均匀振荡 10s, 30 $^{\circ}$ C 水浴反应 6min, 在 734nm 波长处测定吸光度, 按式(1)计算 ABTS $^+$ 清除率。

$$\text{ABTS}^+ \text{清除率} / \% = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100$$

1.3.7 GMCH 抗脂质过氧化能力的测定

采用硫氰酸盐法, 以 2mmol/L 的 TBHQ、VC 和 VE 作阳性对照, 以磷酸钠缓冲液和亚油酸乙醇混合液为空白对照, 参考文献^[12,16]的方法测定。

1.3.8 GMCH 金属螯合能力的测定

参考文献^[17]的方法测定。

1.3.9 数据处理

实验均做 3 个平行样, 采用 SPSS13.0 和 DPS7.55 软件进行数据处理, 结果用平均值 \pm 标准差表示, 必要时按照 Duncan's 新复极差法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 山羊乳酪蛋白复酶酶解工艺优化

单酶的酶切位点较单一, 选择合适的复酶能最大限度地使抗氧化活性基团得以暴露, 进而表现出较强的抗氧化活性。山羊乳酪蛋白的中性蛋白酶和碱性蛋白酶各处理及复酶酶解物的自由基清除率均较高(表 1)。对表 1 的数据进行二次多项式逐步回归, 得到 \cdot OH 为响应值的回归方程: $Y_1 = -56.25 + 4.649X_3 + 0.00001014X_2^2 - 0.03566X_3^2 + 0.0003482X_4^2 + 0.00001082X_1X_3 - 0.0002540X_2X_4$ 。

各因素对 Y_1 的相关系数 $R = 0.99997$, 总 $F = 2376.93$, $P = 0.0158 < 0.05$, 差异显著。选择对 Y_1 偏相关系数高($R > 0.98$)、差异显著或极显著的交互项 X_1X_3 ($P = 0.0055$)和 X_2X_4 ($P = 0.0178$)做图, 结果见图 1。可见, 随着温度和中性蛋白酶添加量的增加, GMCH 的 \cdot OH 清除率逐渐增大; 随着酶解时间的延长, GMCH 的 \cdot OH 清除率逐渐增大; 随着碱性蛋白酶添加量的增加, GMCH 的 \cdot OH 清除率有减小的趋势。 \cdot OH 清除率最高时各因素最优组合是中性蛋白酶和碱性蛋白酶的添加量分别为 3964.031U/g 和 1.034U/g, 在 50 $^{\circ}$ C 酶解 47.769h, 此时 GMCH 的 \cdot OH 清除率为 89.886%。

表 1 中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解 GMC 均匀试验结果

Table 1 Uniform design and results for optimizing the preparation of goat's milk casein hydrolysates based on radical scavenging activities against hydroxyl and DPPH free radicals

| 试验号 | X ₁ 中性蛋白酶添加量/(U/g) | X ₂ 碱性蛋白酶添加量/(U/g) | X ₃ 温度/℃ | X ₄ 时间/h | Y ₁ ·OH 清除率/% | Y ₂ DPPH 自由基清除率/% |
|-----|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|------------------------------|
| 1 | 3000 | 0 | 45 | 12 | 82.220 ± 1.908 | 55.724 ± 1.364 |
| 2 | 0 | 300 | 45 | 18 | 80.399 ± 2.592 | 67.892 ± 2.048 |
| 3 | 2500 | 400 | 50 | 36 | 86.817 ± 3.045 | 59.709 ± 1.501 |
| 4 | 4500 | 350 | 40 | 9 | 74.964 ± 2.154 | 71.044 ± 2.610 |
| 5 | 3500 | 250 | 40 | 3 | 74.762 ± 2.912 | 72.660 ± 3.362 |
| 6 | 5000 | 200 | 45 | 24 | 82.567 ± 1.830 | 62.061 ± 2.286 |
| 7 | 1500 | 100 | 40 | 6 | 73.200 ± 1.357 | 51.102 ± 1.813 |
| 8 | 2000 | 150 | 50 | 30 | 87.511 ± 3.819 | 69.345 ± 1.275 |
| 9 | 4000 | 50 | 50 | 48 | 89.419 ± 2.392 | 51.707 ± 2.503 |

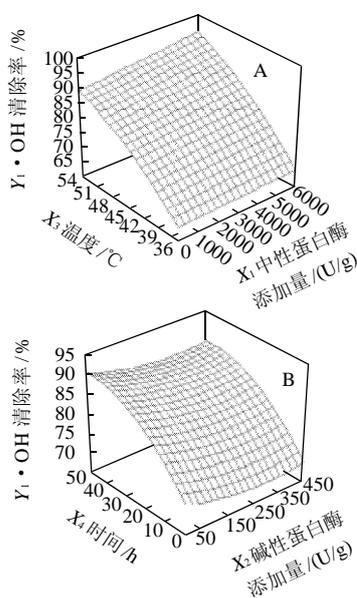
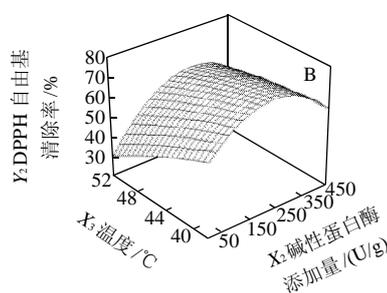
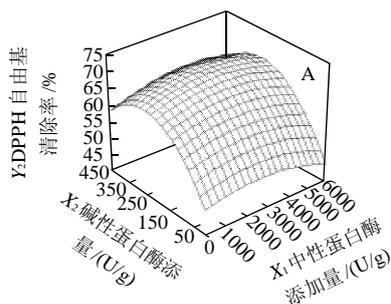


图 1 两因素交互作用对 GMC 酶解物·OH 清除率的影响

Fig.1 Response surface plots showed the interactive effect of hydrolysis conditions on hydroxyl radical scavenging activity of goat's milk casein hydrolysates

同时检测了均匀试验各因素对酶解物 DPPH 自由基清除率的影响, 得到方程: $Y_2 = 97.82 - 0.1053X_2 - 0.0003365X_2^2 - 0.02634X_3^2 + 0.000001990X_1X_2 + 0.006615X_2X_3 - 0.0007355X_2X_4$ 。

图 2 两因素交互作用对 GMC 酶解物 DPPH 自由基清除率的影响
Fig.2 Response surface plots showed the interactive effect of hydrolysis conditions on DPPH radical scavenging activity of goat's milk casein hydrolysates

各因素对 Y₂ 的相关系数 $R = 1.0000$, 总 $F = 28653$, $P = 0.0045 < 0.01$, 差异极显著。取对 Y₂ 偏相关系数高 ($R > 0.999$)、差异极显著的交互项 X_1X_2 ($P = 0.00164$) 和 X_2X_3 ($P = 0.00007$) 做图 (图 2)。图 2A 表明, 中性蛋白酶和碱性蛋白酶的添加量对 GMCH 的 DPPH 自由基清除率具有显著影响, 随着二者添加量的增加, DPPH 自由基清除率变化趋势呈开口向下的抛物线。由图 2B 可以看出, 随着酶解温度的减小, GMCH 的 DPPH 自由基清除率逐渐增加, 40℃ 时最高, 碱性蛋白酶的添加量对 GMC 酶解物的 DPPH 自由基清除率的影响也呈开口向下的抛物线, 在 300~350U/g 处有最大值。DPPH 自由基清除率最高时各因素的组合是中性蛋白酶和碱性蛋白酶的添加量分别为 4999.998U/g 和 248.885U/g, 在 40℃ 酶解 3.000h。此时 GMCH 的 DPPH 自由基清除率为 76.455%。

因山羊乳酪蛋白酶解物的·OH 和 DPPH 自由基清除率最高时的各因素取值不一致, 结合参考文献[16]的方法, 将所得的最优条件(取整数)和均匀试验中效应值较高的两个组再进行一次验证实验, 因 DPPH 自由基体内产生的自由基, 以·OH 清除率为评价标准。

表2 山羊乳酪蛋白复酶酶解工艺优化验证实验
Table 2 Results of verification experiments carried out under optimized hydrolysis conditions

| 样品号 | 中性蛋白酶添加量/(U/g) | 碱性蛋白酶添加量/(U/g) | 温度/℃ | 时间/h | ·OH清除率/% |
|-----|----------------|----------------|------|------|---------------------------------|
| 1 | 4000 | 0 | 50 | 48 | 72.623 ± 2.212 ^{dD} |
| 2 | 4000 | 50 | 50 | 48 | 84.162 ± 3.054 ^{bcABC} |
| 3 | 5000 | 250 | 40 | 3 | 82.544 ± 1.932 ^{bcBC} |
| 4 | 3500 | 250 | 40 | 3 | 79.576 ± 3.418 ^{cC} |
| 5 | 4000 | 250 | 50 | 24 | 87.014 ± 2.503 ^{abAB} |
| 6 | 4000 | 250 | 45 | 24 | 89.502 ± 2.335 ^{aA} |
| 7 | 4000 | 250 | 45 | 48 | 85.479 ± 2.396 ^{abABC} |

注: a~d 不同肩标小写字母表示在 0.05 水平上差异显著, A~D 不同肩标大写字母表示在 0.01 水平上差异显著。

由表 2 可知, 样品 1 和样品 2 比较, ·OH 清除率差异极显著($P < 0.01$), 说明碱性蛋白酶加入比不加效果好。样品 3 和样品 4 比较, 表明中性蛋白酶加酶量 5000U/g 好于 3500U/g 的效果, 但差异不显著($P > 0.05$)。样品 5 和样品 6 比较说明酶解温度 45℃ 好于 50℃, 但差异不显著($P > 0.05$)。样品 4 与样品 6 和样品 7 比较, 表明延长酶解时间效果显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 但酶解 24h 与 48h 差异不显著($P > 0.05$), 48h 比 24h 还有降低趋势。综合以上分析山羊乳酪蛋白酶解的最优工艺为在 60g/kg 的底物浓度下, 中性蛋白酶和碱性蛋白酶的添加量分别为 4000U/g 和 250U/g, 45℃ 酶解 24h。

2.2 山羊乳酪蛋白及其酶解物抗氧化性的比较

因不同物质的抗氧化活性多用 EC_{50} 来表示, 山羊乳酪蛋白酶解物对 ·OH、DPPH 自由基、 $O_2^-·$ 和 $ABTS^+·$ 的清除率用 EC_{50} 值表示, 结果见表 3。山羊乳酪蛋白具有一定的 ·OH 和 $ABTS^+·$ 清除能力, DPPH 自由基和 $O_2^-·$ 清除能力很微弱, 其 EC_{50} 测不出。山羊乳酪蛋白经酶解后, 抗氧化活性明显增加, $O_2^-·$ 和 DPPH 自由基清除能力的 EC_{50} 由测不出, 至分别增加到 223.77 $\mu\text{g/mL}$ 和 244.27 $\mu\text{g/mL}$, 虽然远小于相应的 VC, 但与 GMC 比较, 抗氧化性增加已非常明显; 与 GMC 组比较, 酶解物 ·OH 清除率的 EC_{50} 是 GMC 组的 3.59 倍, $ABTS^+·$ 的清除能力则是 GMC 组的 158.7 倍, $ABTS^+·$ 的清除能力是 VC 的 11.0 倍。

表3 山羊乳酪蛋白及其酶解物抗氧化性的 EC_{50} 值
Table 3 Comparisons of scavenging activities of goat's milk casein and its hydrolysate as well as VC against 4 types of free radicals

| 指标 | GMC 组 | GMCH 组 | VC 组 |
|-----------|------------------|------------------|-----------------|
| ·OH | 292.008 ± 12.169 | 81.400 ± 2.462 | — |
| $O_2^-·$ | — | 223.766 ± 10.863 | 139.407 ± 6.440 |
| DPPH 自由基 | — | 244.275 ± 11.535 | 6.033 ± 0.229 |
| $ABTS^+·$ | 71.251 ± 2.747 | 0.449 ± 0.027 | 4.947 ± 0.183 |

注: —. 未检测出。

2.3 GMCH 的抗脂质过氧化作用

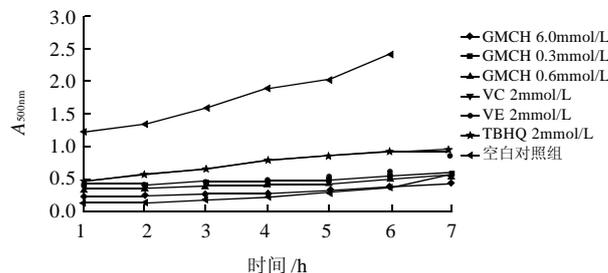


图3 GMCH 对脂质过氧化的抑制作用
Fig.3 Inhibitory effect of goat's milk casein hydrolysate on lipid peroxidation

亚油酸体系是用来测定脂质抗氧化作用最常用的体系。在亚油酸氧化过程中会产生过氧化物, 氧化 Fe^{2+} 为 Fe^{3+} , Fe^{3+} 与 SCN^- 形成络合物, 于波长 500nm 处有最大吸光度。因此, 吸光度越大, 表明亚油酸的过氧化程度越高。由图 3 可知, 加入 GMCH 组的吸光度远小于空白对照组而基本大于 2mmol/L 的 VC, 表明 GMCH 能抑制亚油酸过氧化, 且随着 GMCH 浓度的增大(0.3~6mmol/L), GMCH 对亚油酸过氧化的抑制作用越强, 但基本弱于 2mmol/L VC 的抗脂质过氧化作用。0.6mmol/L GMCH 与 2mmol/L VE 的吸光度相当, 且均小于 2mmol/L 的抗氧化剂 TBHQ 的吸光度, 表明亚油酸体系中 GMCH 的抗脂质过氧化能力强于 TBHQ, 与 VE 相当, 比 VC 稍弱。反应到 168h 时, GMCH 抗脂质过氧化能力的稳定性均强于 VE 和 VC, 提示 GMCH 可以用于食品中做天然抗氧化剂使用。

2.4 GMCH 螯合金属离子的能力

生物体内的许多氧化过程都是在过渡金属离子的参与下进行的, 如 Fe^{2+} 能催化巯基化合物的自氧化, 促使 $O_2^-·$ 、 H_2O_2 和 ·OH 的生成, 进而产生脂质过氧化产物丙二醛等毒性物质^[18-19]。螯合金属离子能力大小是评价样品抗氧化性能常用的方法。螯合能力愈大, 被评价样品潜在的抗氧化性就愈强。EDTA、GMC 和 GMCH 螯合 Fe^{2+} 的 EC_{50} 分别为 10.056、262.174 $\mu\text{g/mL}$ 和 48.184 $\mu\text{g/mL}$, 山羊乳酪蛋白酶解物的 EC_{50} 值虽然高于螯合剂 EDTA, 却是山羊乳酪蛋白的 5.44 倍, 即山羊乳酪蛋白经酶解后, 其抗氧化潜力是山羊乳酪蛋白的 5.44 倍。

3 结论与讨论

山羊乳酪蛋白适宜的酶解工艺: 在 60g/kg 的底物浓度条件下, 中性蛋白酶和碱性蛋白酶的加酶量分别为 4000U/g 和 250U/g, 于 45℃、pH7.5 条件下酶解 24h。山羊乳酪蛋白经酶解后其体外抗氧化活性显著增强。与

山羊乳酪蛋白相比,其酶解物 $\cdot\text{OH}$ 清除率的 EC_{50} 值是山羊乳酪蛋白的3.59倍,ABTS $^{+}\cdot$ 的清除能力则是原来的158.72倍,螯合 Fe^{2+} 的能力是原来的5.44倍;在亚油酸体系中抗脂质过氧化能力强于TBHQ,与VE相当。

脱氧核糖法测定 $\cdot\text{OH}$ 的方法虽然较复杂,但测定结果较邻二氮菲法等稳定、重现性好(数据未显示),是比较常用的方法。VC清除 $\cdot\text{OH}$ 的 EC_{50} 报道值从0.009~8.99mg/mL不等^[20-24],但本研究采用脱氧核糖法未测出,原因有待进一步探讨。

DPPH自由基和ABTS $^{+}\cdot$ 是广泛用于定量测定生物试样、酚类物质和食品的抗氧化能力的两种人工合成的自由基。但DPPH自由基比ABTS $^{+}\cdot$ 对供氢体反应的选择性强。例如,DPPH自由基不能与只含有一个 $-\text{OH}$ 的芳香酸反应,也不能与 β 环上没有 $-\text{OH}$ 的类黄酮反应,而ABTS $^{+}\cdot$ 可与任何羟基化的芳香族化合物反应^[25-26],所以,ABTS $^{+}\cdot$ 抗氧化性 EC_{50} 值比DPPH自由基的 EC_{50} 值高。

不同物质对某一自由基的清除能力是不同的。因清除自由基的原理不同,同一物质清除 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH自由基、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和ABTS $^{+}\cdot$ 的能力也不同,用不同方法测得同一物质的抗氧化活性的数据相关性也较差,这与参考文献[27]的研究结果一致,因此体外清除 $\cdot\text{OH}$ 、DPPH自由基、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和ABTS $^{+}\cdot$ 等自由基的方法不能相互替代。

另外,检测过程中多次发现同一酶解物95℃水浴杀菌15min后密封放入2~8℃环境中一段时间后 $\cdot\text{OH}$ 清除率明显增加,如某酶解物放置6d,其 $\cdot\text{OH}$ 清除率由放置前的76.122%增加到82.540%($P < 0.05$),其原因有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 李志成, 蒋爱民, 岳田利, 等. 羊乳酪蛋白酶解工艺及其抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 252-257.
- [2] HOGAN S, ZHANG Lei, LI Jianrong, et al. Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef[J]. Food Chemistry, 2009, 117(3): 438-443.
- [3] 王嘉榕, 滕达, 田子罡, 等. 功能性抗氧化肽制备与机制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(2): 371-375.
- [4] OH J, LEE Y S. Hypolipidemic effects of peptide fractions of casein on serum lipids in rats fed normal or high fat diet[J]. J Korean Soc Food Sci Nutr, 2002, 31(2): 263-270.
- [5] 刘志东, 郭本恒, 曲映红, 等. 酪蛋白酶解物的抗氧化活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(1): 19-23.
- [6] TOMOTAKE H, OKUYAMA R, KATAGIRI M, et al. Comparison between Holstein cow's milk and Japanese-Saenen goat's milk in fatty acid composition, lipid digestibility and protein profile[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2006, 70(11): 2771-2774.
- [7] PARK Y W, JUAREZ M, RAMOS M, et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk[J]. Small Ruminant Research, 2007, 68(1/2): 88-113.
- [8] NCBI. Entrez, the Life Sciences Search Engine[DB/OL]. (1998-11-13) [2011-01-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/?term=casein>.
- [9] LEE K J, KIM S B, RYU J S, et al. Separation and purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from goat's milk casein hydrolysates[J]. Asian-Aust J Anim Sci, 2005, 18(5): 741-746.
- [10] HERNÁNDEZ-LEDESMA B, RECIO I, RAMOS M, et al. Preparation of ovine and caprine β -lactoglobulin hydrolysates with ACE-inhibitory activity. Identification of active peptides from caprine β -lactoglobulin hydrolysed with thermolysin[J]. Int Dairy J, 2002, 12(10): 805-812.
- [11] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 169-171.
- [12] ZHU Kexue, ZHOU Huiming, QIAN Haifeng. Antioxidative and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(6): 1296-1302.
- [13] 钱晓婕, 陈舜胜, 付杰. 坛紫菜中藻胆蛋白的提取及其抗氧化活性研究[J]. 中国海洋药物杂志, 2008, 27(2): 42-45.
- [14] GUO Hang, KOUZUMA Y, YONEKURA M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein[J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 238-245.
- [15] AEWSIRI T, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin modified by oxidised phenolic compounds[J]. Food Chemistry, 2009, 117(1): 160-168.
- [16] PENG Xinyan, XIONG Youling, KONG Baohua. Antioxidative activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance[J]. Food Chemistry, 2009, 113(1): 196-201.
- [17] LI Bo, CHEN Feng, WANG Xi, et al. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2007, 102(4): 1135-1143.
- [18] BRAUGHLER J M, CHASE R L, PREGENZER J F. Oxidation of ferrous ion during peroxidation of various lipid substances[J]. Biochem Biophys Acta, 1987, 921: 457-467.
- [19] HALLIWELL B. The wanderings of a free radical[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 46(5): 531-542.
- [20] 张京芳, 王冬梅, 周丽, 等. 香椿叶抗氧化物提取工艺优化与抗氧化活性分析[J]. 农业机械学报, 2007, 38(8): 97-100; 108.
- [21] 徐向荣, 王文华, 李华斌. 比色法测定Fenton反应产生的羟自由基及其应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(1): 67-69.
- [22] 宋永相, 孙谧, 王海英, 等. 海洋酶法利用海产品下脚料制取活性胶原肽的研究[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(2): 28-33.
- [23] 刘英, 王之盛, 周安国, 等. 橙皮苷和绿原酸的体内外抗氧化效应研究[J]. 食品科学, 2009, 30(23): 196-199.
- [24] KIM E K, LEE S J, JEON B T, et al. Purification and characterisation of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein [J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1365-1370.
- [25] YOKOZAWA T, CHEN Cuiping, DONG E, et al. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical[J]. Biochem Pharmacol, 1998, 56(2): 213-222.
- [26] NANJO F, MORI M, GOTO K, et al. Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63: 1621-1623.
- [27] 王会, 郭立, 谢文磊. 抗氧化剂抗氧化活性的测定方法(二)[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(4): 98-102.