

牛乳酪蛋白抗氧化乳基料的制备及其分离纯化

童 伟, 李志成*, 熊清权, 郑晓莹, 苏晋文, 任 娇
(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 为制备具有低过敏性和抗氧化作用的牛乳酪蛋白活性肽乳基料, 以水解度和 $\cdot\text{OH}$ 清除率为指标, 先后采用大孔吸附树脂和凝胶过滤色谱分离、纯化酪蛋白酶解物。结果表明: 胰蛋白酶和中性蛋白酶组合酶解牛乳蛋白6h, 其产物具有较高的水解度(36.80%)和较好的抗氧化活性, $\cdot\text{OH}$ 清除率的半抑制浓度(IC_{50})值为3.12mg/mL; 酶解物通过LS106大孔吸附树脂分离、纯化后, 体积分数为75%的乙醇洗脱液具有较高的抗氧化活性, 其 $\cdot\text{OH}$ 清除率的 IC_{50} 值为0.14mg/mL; 体积分数75%的乙醇洗脱组分经凝胶过滤色谱分离、纯化后, 得到4个不同相对分子质量肽段, 其中抗氧化活性较强肽段的相对分子质量为355.38~854.89, 其 $\cdot\text{OH}$ 清除率的 IC_{50} 值为0.09219mg/mL, 与酶解物相比其抗氧化活性扩大33.84倍; 相对分子质量小于3238.05的多肽占纯化后多肽总量的60.32%, 30.09%多肽是由2~8个氨基酸组成的寡肽。牛乳酪蛋白经复合酶酶解后其抗氧化活性明显提高, 过敏性明显降低, 喷雾干燥后可以直接制备乳基料。

关键词: 牛乳酪蛋白酶解物; 乳基料; 分离、纯化; 抗氧化性; 过敏性

Preparation, Isolation and Purification of Dairy Ingredients with Antioxidant Activity from Milk Casein

TONG Wei, LI Zhi-cheng*, XIONG Qing-quan, ZHENG Xiao-ying, SU Jin-wen, REN Jiao
(College of Food Science and Engineering, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The dairy ingredients with low allergenic reaction and antioxidant activity were prepared from milk casein. The optimal preparation process parameters were explored to achieve the strong hydroxyl radical scavenging activity. Milk casein hydrolysates (MCH) were isolated and purified by macroporous adsorption resin and gel filtration chromatography. The results indicated that: (1) MCH obtained from hydrolysis by trypsin and neutral protease for 6 h had higher degree of hydrolysis (36.80%) and better antioxidant activity. IC_{50} of MCH for scavenging hydroxyl free radicals 3.12 mg/mL. (2) The elution fraction from 75% ethanol purified by macroporous adsorption resin had higher antioxidant activity with IC_{50} of 0.14 mg/mL. (3) The elution fraction from 75% ethanol by gel filtration chromatography with molecular weight in the range of 355.38–854.89 D had higher antioxidant activity with IC_{50} of 0.09219 mg/mL, which revealed a 33.84-fold increase compared with MCH. The contents of peptides with molecular weight less than 3238.05 D were accounted for 60.32% of total purified peptides, and 30.09% peptides were oligopeptides with 2–8 amino acid residues. This preparation process not only increased antioxidant activity, but also reduced anaphylaxis of dairy ingredients from milk casein. In addition, the spray drying was also better for the preparation of dairy ingredients.

Key words: milk casein hydrolysate; dairy ingredient; isolation and purification; antioxidant activity; anaphylaxis

中图分类号: TS252.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)06-0033-04

牛乳是婴幼儿配方奶粉的主要原料, 但牛乳蛋白质中80%左右是酪蛋白, 酪蛋白中的 α_s -酪蛋白可引起婴儿消化不良、过敏等症状^[1]。Wroblewska等研究表明相对分子质量在2600以上的水解肽段能引起阳性皮肤反应, 相对分子质量低于1400肽段则不会引起过敏反应^[2]。蛋白酶可以打断酪蛋白多肽链间的肽键, 生成一些具有重要生

理功能的多肽^[3], 这不仅可以降低酪蛋白的过敏性, 还可提高酶解物的抗氧化活性。

乳基料是以全乳或乳的部分成分为原料加工而成的可用作乳品及其他食品加工配料的配料型产品^[4]。纵观国外乳业的发展, 已将以乳为原料, 经过分离、转化、酶解等手段开发而成的乳基料等深加工产品作为一项核心

收稿日期: 2011-11-04

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

陕西省科技统筹创新工程计划项目(2011KTCL02-11); 西北农林科技大学基本科研业务费专项(QN2011070)

作者简介: 童伟(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为乳品加工。E-mail: tongwei.330@163.com

*通信作者: 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

业务, 而我国乳业的发展主要集中在终端消费品上。开发乳基料加工技术不但是我国乳业技术和产业结构提升的重要途径, 而且可以满足国内市场的需要并替代部分进口, 对我国乳业及食品行业发展极为有利。

本实验从中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶4种蛋白酶中选出2种蛋白酶, 复合酶酶解牛乳酪蛋白, 并将酶解物通过大孔吸附树脂和凝胶过滤色谱分离、纯化, 研究其前后抗氧化活性的变化, 旨在降低牛乳酪蛋白的过敏性, 提高酶解物的抗氧化活性, 为今后制备低过敏性和具有抗氧化作用的牛乳酪蛋白活性肽乳基料提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

LS106大孔吸附树脂(比表面积1200~1600m²/g) 西安蓝深公司; 中性蛋白酶、Nisin(乳链球菌素) 英国BDH公司; 2-脱氧-D-核糖、牛胰岛素、VB₁₂ 美国Sigma公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

TGL-16G高速台式离心机、HH-S6型恒温水浴锅 上海安亭科学仪器厂; UV-1700双光束紫外分光光度计 日本岛津公司; SB-5200T超声波清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司; JA3003电子天平、PB-10pH计 德国赛多利斯股份公司上海分公司; RE-52A旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; AKTA蛋白层析系统 瑞典Amersham Biosciences公司; J-10D冷冻干燥机 韩国LG公司。

1.3 方法

1.3.1 酪蛋白酶解工艺

1.3.1.1 酪蛋白的制备

取所需量新鲜牛乳200目筛过滤除杂质, 离心脱脂, 用2mol/L盐酸溶液调pH值至4.6, 蛋白出现絮状, 静止30min后离心, 去除上清液, 沉淀用50mmol/mL pH4.6的醋酸钠-醋酸缓冲液洗涤、离心2次后所得沉淀物即为酪蛋白粗品。

1.3.1.2 酪蛋白酶解物的制备

称取适量酪蛋白于三角瓶中, 用0.1mol/L NaOH溶液助溶后, 加水定容到刻度, 置于恒温水浴锅中, 待调节pH值及温度至最适后加入蛋白酶, 水解过程中滴加2mol/L NaOH溶液, 保持pH值恒定。酶解结束后沸水浴中加热灭酶10 min。冷却后离心, 取上清液, 留待相关指标测定。

1.3.2 酶种类和酶解时间的选择

根据预试验和相关资料^[5-8], 选用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶4种蛋白酶, 分别在其最优条件下酶解牛乳酪蛋白1h, 检测酶解物的水解度和·OH

清除率, 选用抗氧化活性较好的2种蛋白酶作为复合酶, 酶解酪蛋白1~7h, 以确定适宜的酶解时间。

1.3.3 蛋白含量的测定

采用考马斯亮蓝法^[9]。

1.3.4 酶活的测定

参考张寒俊等^[10]的方法。

1.3.5 酶解物水解度(degree of hydrolysis, DH)的测定

采用甲醛滴定法^[11]。

1.3.6 酶解产物·OH清除率的测定

采用 α -脱氧核糖法^[12]。

1.3.7 多肽含量的测定

取2.0mL样品溶液, 加入2.0mL 质量分数为10%的三氯乙酸(TCA)溶液, 混合均匀后静置, 离心, 吸取上清液0.5mL转移到10mL容量瓶中, 并用质量分数5%的TCA定容至刻度, 充分摇匀。取3.0mL溶液溶于另一试管中, 加入双缩脲试剂2.0mL, 混合均匀后静置, 离心, 于波长540nm处测定OD值(未加样品的为对照管), 对照还原型谷胱甘肽(GSH)标准曲线和回归方程 $y=0.1011x+0.0005$, $R^2=0.9987$, 乘以稀释倍数即可求得样品中的多肽质量浓度(mg/mL)。

1.3.8 大孔吸附树脂分离、纯化酪蛋白抗氧化肽

称取经处理过的适量LS106湿树脂于250mL锥形瓶中, 加等体积的酪蛋白酶解物, 25℃恒温摇床中振荡(转速为160r/min)12h, 充分吸附后, 检测 $A_{220nm} \leq 0.05$ 。之后依次用体积分数25%、50%、75%和100%的乙醇溶液对大孔吸附树脂吸附的酪蛋白多肽进行洗脱, 洗脱速率为1mL/min, 分别收集各组分, 旋转蒸发掉乙醇后测酪蛋白肽的回收率和各组分的·OH清除率^[13]。

$$\text{回收率}/\% = \frac{\text{各洗脱液多肽质量之和}}{\text{吸附前酶解液多肽质量}} \times 100$$

1.3.9 凝胶过滤色谱分离酪蛋白抗氧化肽

选用溶菌酶(14400)、牛胰岛素(5733)、Nisin(3348)、VB₁₂(1355)和L-酪氨酸(181.19)为标样, 以出峰体积为纵坐标, 相对分子质量的对数值为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $y=-4.81871gx+31.393$, $R^2=0.9982$ 。

凝胶柱: SuperdexTM peptide 10/300 GL, 先后用超纯水和50mmol/L pH4.6的醋酸-醋酸钠缓冲溶液平衡后上样。流速0.8mL/min, 检测波长220nm, 上样量500 μ L, 用记录仪检测出峰情况, 分别收集各组分, 冷冻干燥后备用。

1.4 数据处理

采用DPS7.55进行统计分析, 结果以“平均值 \pm 标准偏差”($\bar{x} \pm s$)的形式表示。每组实验重复3次, 必要时采用Duncan新复极差法进行方差分析。半抑制浓度IC₅₀值采用西北农林科技大学IC₅₀(EC₅₀)计算软件获得。

2 结果与分析

2.1 复合酶种类的确立

表1 蛋白酶种类对牛乳酪蛋白酶解物·OH清除率的影响($n=3$)

Table 1 Effect of protease type on hydroxyl radical scavenging rate of MCH ($n=3$)				
酶种类	胰蛋白酶	中性蛋白酶	糜蛋白酶	碱性蛋白酶
DH/%	15.25±0.35 ^a	7.70±0.01 ^b	6.83±0.04 ^c	6.99±0.02 ^c
·OH清除率/%	69.11±0.6 ^a	60.35±1.3 ^b	60.89±0.5 ^b	54.93±0.8 ^c

注：不同字母a~c表示组内差异显著($P<0.05$)。

由表1可以看出,4种酶对酪蛋白都有较好的酶解效果,酶解1h后,胰蛋白酶和中性蛋白酶的水解度较高,分别达到了(15.25±0.35)%和(7.70±0.01)%,其中糜蛋白酶和碱性蛋白酶对牛乳酪蛋白的水解度差异不显著($P>0.05$);胰蛋白酶和糜蛋白酶酶解物的·OH清除率较高,分别为(69.11±0.6)%和(60.89±0.5)%。由于中性蛋白酶与糜蛋白酶·OH清除率并无显著性差异($P>0.05$),而且中性蛋白酶来源方便、成本低,因此,最终确定采用胰蛋白酶和中性蛋白酶复合酶酶解牛乳酪蛋白。

2.2 酶解时间对水解度和抗氧化活性的影响

选用胰蛋白酶和中性蛋白酶复合酶,在pH7.0、55℃、酪蛋白质量分数6%的条件下酶解,胰蛋白酶和中性蛋白酶加酶量分别为2500U/g和3000U/g,研究酶解时间对水解度和抗氧化活性的影响(图1)。

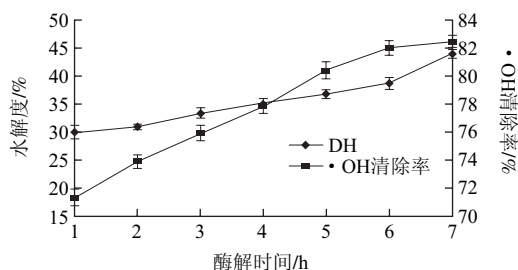


图1 牛乳酪蛋白酶解物水解度和·OH清除率的关系

Fig.1 Relationship between DH and hydroxyl radical scavenging rate of MCH

由图1可以看出,牛乳酪蛋白酶解物·OH清除率在前6h内增加的较快,随后趋于平缓;虽然水解度在1~7h内都有较快增加,但·OH清除率在水解6h后增长趋缓,因此复合酶的酶解时间定为6h,这也证明了水解度和抗氧化值之间不存在线性关系,只有在特定的水解度时抗氧化能力才最强^[14]。

2.3 大孔吸附树脂对酪蛋白酶解物的分离

多肽的生理活性与其分子中疏水性氨基酸残基所占的比例及多肽链两端氨基酸的种类有很大的关系^[15-16],不同体积分数乙醇溶液的极性不同,它们与不同疏水性肽段的亲和力不同,采用不同体积分数的乙醇溶液进行梯

度洗脱就可以得到具有不同活性的抗氧化肽,表2为大孔吸附树脂分离组分的回收率和·OH清除率的IC₅₀值。

表2 牛乳酪蛋白酶解物乙醇洗脱组分的回收率和·OH清除率的IC₅₀值

Table 2 Recovery rates and IC ₅₀ of ethanol elution fractions from MCH					
洗脱液	25%乙醇溶液	50%乙醇溶液	75%乙醇溶液	100%乙醇	原液
回收率/%	75.39	15.88	3.3	0.82	/
IC ₅₀ /(mg/mL)	3.83	1.65	0.14	0.57	3.12

由表2可知,乙醇溶液体积分数在25%和50%处洗出了91.27%酪蛋白肽;而在75%和100%乙醇溶液体积分数处酪蛋白肽含量合计为4.12%,酪蛋白肽总的回收率为95.39%;不同体积分数乙醇洗脱组分的抗氧化性也有很大的差别,其中25%乙醇洗脱液组分的·OH清除率的IC₅₀值最大,为3.83mg/mL,而其他三组分的·OH清除率的IC₅₀值均低于酶解物的3.12mg/mL,其中75%乙醇洗脱组分的·OH清除率的IC₅₀值(0.14mg/mL)最低,说明该组分的抗氧化效果最好,因此对75%乙醇洗脱组分进行进一步分离、纯化。

2.4 酪蛋白活性肽凝胶过滤色谱分离、纯化

采用凝胶色谱对75%乙醇洗脱组分进行进一步的分离、纯化和检测,结果见表3和图2。

表3 牛乳酪蛋白肽凝胶过滤分离组分及其抗氧化活性值

Table 3 Components and their antioxidant activity of milk casein peptides purified by gel filtration chromatography

分离峰名称	平均氨基酸残基数/个	峰面积/(mL·mAU)	分离组分相对含量/%	·OH清除率的IC ₅₀ /(mg/mL)	相对分子质量
峰1	26.98~43.43	229.32	39.68	0.1289	3238.05~5211.68
峰2	7.12~26.98	174.70	30.23	0.1037	854.89~3238.05
峰3	4.34~7.12	14.01	2.42	0.0875	521.34~854.89
峰4	2.96~4.34	159.92	27.67	0.0926	355.38~521.34

注：酶解物·OH清除率的IC₅₀值为3.12mg/mL。

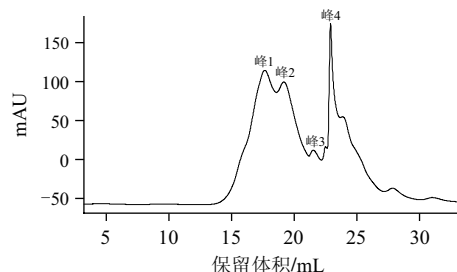


图2 牛乳酪蛋白肽凝胶过滤分离图谱

Fig.2 The purification profile of milk casein peptides by gel filtration chromatography

由图2可以看出,几个主要组分峰的分离效果较为理想,但峰4之后含量甚微,没有实际收集意义,因此,试验只对前4个峰进行检测。由表3可知,峰1含量最大,占总量的39.68%,其相对分子质量为3238.05~5211.68,相对分子质量小于3238.05的多肽占纯化后多肽总量的60.32%,峰3和峰4合计占总量的30.09%,是由2~8个氨基酸组成的寡肽,其·OH清除率的IC₅₀值为0.09219mg/mL,

对应的相对分子质量为355.38~854.89。4个峰的抗氧化效果与酶解物相比均有较大幅度的增加,其中峰3和峰4合并的抗氧化活性比牛乳酪蛋白酶解物扩大33.84倍。牛乳酪蛋白过敏源的相对分子质量为20000~30000^[17],但酶解产物中相对分子质量小于5000的小片段与总的酶解产物相比其过敏性明显降低^[18],而相对分子质量低于1400的肽段不会引起过敏反应^[2];也有研究表明相对分子质量大于200而小于10000的牛乳酪蛋白酶解物,其过敏性明显降低^[19-20]。由此可知牛乳酪蛋白通过复合酶酶水解后,峰1和峰2的过敏性明显降低,而峰3和峰4已经没有过敏性。说明牛乳酪蛋白经复合酶酶解后其抗氧化活性明显提高,而过敏性明显降低,喷雾干燥后直接可以制备不同过敏性和抗氧化性级别的乳基料。

3 结 论

3.1 由胰蛋白酶和中性蛋白酶组成的复合蛋白酶,酶解牛乳酪蛋白6h,其酶解物具有较高的水解度和较好的抗氧化活性。

3.2 牛乳酪蛋白酶解物通过大孔吸附树脂洗脱得到4个组分,其中体积分数75%的乙醇洗脱组分的·OH清除效果较好,其IC₅₀值为0.14mg/mL;将乙醇溶液体积分数75%的洗脱组分通过凝胶过滤色谱分离,得到4个不同相对分子质量组分,4个峰的抗氧化效果与酶解物相比均有较大幅度的增加,其中,峰3和峰4合并的·OH清除率的IC₅₀值最低为0.09219mg/mL,其抗氧化活性扩大33.84倍,对应的相对分子质量为355.38~854.89。

3.3 75%的牛乳酪蛋白酶解物洗脱组分经分离、纯化,相对分子质量小于3238.05的多肽占纯化后多肽总量的60.32%,30.09%多肽是由2~8个氨基酸组成的寡肽。牛乳酪蛋白经复合酶酶解后其抗氧化活性明显提高,过敏性明显降低,喷雾干燥后直接可以制备不同过敏性和抗氧化性级别乳基料。

参考文献:

- [1] 许建香. 水解牛乳蛋白技术及其产物的功能特性[J]. 中国乳品工业, 2005, 3(35): 42-45.
- [2] WROBLEWSKA B, KARAMC M, AMAROWICZ R. Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39(8): 839-850.
- [3] 李培骏, 袁永俊, 胡婷, 等. 胰蛋白酶水解酪蛋白进程研究[J]. 西华大学学报, 2006, 25(3): 55-57.
- [4] RAMESH C. Dairy Ingredients for food processing[M]. WILEY-BLACKWELL, USA, 2011: 1.
- [5] 张虎刚, 张志翔, 万端极. 酪蛋白酶解制活性肽的工艺条件[J]. 食品研究与开发, 2010, 11(11): 201-203.
- [6] 徐微, 赵新淮. 酪蛋白水解物的中性蛋白酶修饰及其ACE抑制活性[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(5): 17-21.
- [7] 孙浩, 蔡兴旺. 碱性蛋白酶对酪蛋白水解的最适宜条件[J]. 大连轻工业学院报, 2003, 22(1): 25-26.
- [8] 李志成, 蒋爱民, 熊清权, 等. 山羊乳酪蛋白酶解物制备及体外抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 82-86.
- [9] MARION M, BRADFORD. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [10] 张寒俊, 刘大川, 杨国燕. 紫外光谱法定量测定不同种蛋白酶活力的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2004(9): 44-45.
- [11] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, 15(11): 65-67.
- [12] 王海宽, 赵新淮, 姜岩. 甘草有效成分分离及其对自由基的清除能力[J]. 食品机械, 2000(4): 23-24.
- [13] 钟芳, 张晓梅, 马建国. 大豆肽的大孔吸附树脂以及凝胶过滤色谱分离[J]. 食品与机械, 2006, 22(4): 25-28.
- [14] 沈滢, 卢蓉蓉, 陈卫, 等. 乳清蛋白抗氧化肽的制备及酶解产物特性[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(7): 68-73.
- [15] CHEUNG H, WANG F, ONDETTI M, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme importance of the COOH-terminal dipeptides sequence[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1980, 255(2): 401-407.
- [16] WU Jianping, DING Xiaolin. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides[J]. Food Research International, 2002, 35(4): 367-375.
- [17] 王秀娟, 郑磊, 詹冬玲. 牛乳中主要过敏原组分的分离纯化[J]. 食品工程, 2010(7): 148-151.
- [18] ENA J M, van BERESTEIN E C H. Whey protein antigenicity reduction by fungal proteinases and a pepsin/pancreatic combination[J]. Journal of Food Science, 1995, 60(1): 104-116.
- [19] VANHE M, ESCALONA M, DE SWERT LF A. Allergenic and antigenic activity of peptide fragments in a whey hydrolysate formula[J]. Clinical and Experimental Allergy, 1998, 28(9): 1131-1137.
- [20] WRÓBLEWSKA B, KARAMC M, AMAROWICA R, et al. Immunoreactive properties of peptide fractions of cow whey milk proteins after enzymatic hydrolysis[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2004, 39(8): 839-850.