

干酪乳清酶解产物抗氧化肽的分离和纯化

霍建新¹, 原慧艳¹, 王 燕¹, 王 演¹, 白彩艳¹, 赵文博^{2,*}

(1.晋中学院, 山西 晋中 030600; 2.天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘 要:干酪乳清Alcalase 2.4L酶解的最优条件, 即酶解时间为2 h、pH 9.5、酶与底物比为4%、酶解温度为50 ℃。利用超滤、葡聚糖凝胶层析和三羟甲基氨基甘氨酸-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, tricine SDS-PAGE)等方法从干酪乳清中提取抗氧化性蛋白肽。分别考察操作压力、料液温度、料液pH值、操作时间对超滤膜通量的影响。乳清酶解物超滤的最佳条件为: 压力0.25 MPa、温度30 ℃、时间120 min、初始pH 9.0。分子质量4 000~6 000 D肽的水解液脂质过氧化抑制率最高, 达到47.28%。利用Sephadex G-50型葡聚糖凝胶进行纯化, 将分离的组分进行Tricine-SDS-PAGE分析和脂质过氧化抑制率的测定。第34管洗脱液的脂质过氧化抑制率最高, 分子质量范围为4 000~4 100 D。

关键词:干酪乳清; 超滤; 碱性蛋白酶; 抗氧化肽

Isolation and Purification of Antioxidant Peptide from Cheese Whey Hydrolysates Produced with Alkaline Protease

HUO Jianxin¹, YUAN Huiyan¹, WANG Yan¹, WANG Yan¹, BAI Caiyan¹, ZHAO Wenbo^{2,*}

(1. Jinzhong University, Jinzhong 030600, China; 2. School of Food Engineering and Biological Technology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Cheese whey hydrolysates were obtained by enzymatic hydrolysis with an alkaline protease “alcalase” for 2 h at 50 ℃ and an initial pH of 9.5 with an $[E]/[S]$ ratio of 4%. The antioxidant peptide was purified from cheese whey hydrolysates by ultrafiltration, polydextran gel chromatography and tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis (tricine SDS-PAGE). The optimal operating pressure, hydrolysate temperature and pH and ultrafiltration time for the improved ultrafiltration membrane flux were found to be 0.25 MPa, 30 ℃, 9.0 and 120 min, respectively. The peptide with molecular weights ranging from 4 000 to 6 000 D had the highest inhibitory activity on lipid peroxidation, with an inhibitory rate of approximately 47.28%. After purification with Sephadex G-50, the separated fractions were determined by tricine SDS-PAGE and lipid peroxidation inhibition, respectively. Fraction 34 with molecular weight distribution ranging from 4 000 to 4 100 D had the highest inhibitory activity on lipid peroxidation.

Key words: cheese whey; ultrafiltration; Alcalase 2.4L; antioxidant peptide

中图分类号: TS252.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2015) 13-0172-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201513032

乳清是干酪加工过程中排出的液体副产品, 廉价易得。乳清蛋白通过酶解等方式释放生物活性肽, 尤其是抗氧化活性肽, 可有效预防癌症、老化、动脉硬化等疾病^[1]。Peña-Ramos等^[2]研究认为乳清蛋白酶解物可以抑制脂质过氧化。刘志东等^[3]研究发现乳清蛋白的抗氧化活性机理是提供的氢原子还原氧自由基以及脂类的自动氧化被半胱氨酸分解产生的巯基基团抑制。

目前国内外有关乳清蛋白酶解物的研究主要集中在其抗氧化活性及具有抗氧化活性的肽类物质的提取方面^[3-4]。关于优化乳清酶解工艺, 分离纯化抗氧化肽^[5-9], 并确定肽的分子质量范围研究甚少。

本研究通过单因素试验和正交试验研究干酪乳清Alcalase 2.4L酶解的最优条件, 利用超滤、葡聚糖凝胶层析等技术, 进行脂质过氧化抑制率测定, 从干酪乳清水解产物提取抗氧化性肽。采用分离小分子肽的三羟甲基氨基甘氨酸-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, tricine-SDS-PAGE)方法确定肽的分子质量, 制备抗氧化肽产品, 不仅减少环境污染, 也可带来经济效益。

收稿日期: 2014-09-20

基金项目: 山西省高等学校科技创新项目(2010127)

作者简介: 霍建新(1972—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为食品科学。E-mail: hjx1126@126.com

*通信作者: 赵文博(1984—), 女, 工程师, 硕士, 研究方向为食品科学。E-mail: zhaowenbo1984140@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜干酪乳清, 天津科技大学干酪科学与工程研究室提供。

Alcalase 2.4L碱性蛋白酶(酶活力87 170 U/g) 北京诺和诺德生物制剂有限公司; Tris 美国Sigma公司; 卵磷脂 天津市英博生化试剂有限公司; G-50葡聚糖凝胶 美国Pharacia公司; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

RE-52AA旋转蒸发器 上海亚荣生化仪器厂; BS-100型部分收集器 上海沪西分析仪器厂; 层析柱($\phi 16\text{ cm} \times 40\text{ cm}$) 北京来亨科贸公司; 5804R型高速低温冷冻离心机 德国Eppendorf公司; 752紫外-可见分光光度计 天津市普瑞斯仪器有限公司; DYY-6C型电泳仪 北京市六一仪器厂; 超滤装置(超滤膜截留分子质量分别为2 000、4 000、6 000 D) 上海斯纳普膜分离科技有限公司; 真空冷冻干燥机 美国Thermo Electron公司。

1.3 方法

1.3.1 干酪乳清的前处理

1.3.1.1 乳清的脱脂

乳清在离心力为 $8\,000 \times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下离心20 min, 去除上层的脂肪待用。

1.3.1.2 乳清浓缩

乳清经双层纱布过滤, 除去大块固形物, 在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下用旋转蒸发器浓缩乳清, 当旋出乳清的体积为原乳清体积的约2/3停止。然后将乳清进行过滤、离心, 用2 000 D的超滤膜进行超滤, 将截留液收集。

1.3.2 乳清酶解液的制备

新鲜乳清浓缩液, 通过酶解温度、酶解时间、酶与底物比($[E]/[S]$)、pH值为考察因素进行单因素试验, 以水解度作为优化指标。固定酶解温度 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 8.5, 酶与底物比为4%, 考察酶解时间对水解度的影响, 得到最佳酶解时间。固定pH 8.5, 酶与底物比为4%, 最佳酶解时间, 考察酶解温度对水解度的影响, 得到最佳酶解温度。固定最佳酶解温度, 酶与底物比为4%, 最佳酶解时间, 考察pH值对水解度的影响, 得到最佳pH值。固定最佳酶解温度、pH值、酶解时间, 考察不同酶与底物比对水解度的影响, 得到最佳酶与底物比。在单因素试验的基础上进行正交试验, 得到最佳酶解条件。调节溶液pH值、温度、Alcalase 2.4L酶与底物比, 启动水解反应。反应过程中用1 mol/L的NaOH调节反应液使pH值保持恒定。酶解一定时间后, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 维持15 min进行酶灭活。蛋白质水解度的测定用pH-Stat法^[10]。

1.3.3 乳清肽的超滤分离

乳清酶解液通过截留分子质量为6 000 D的超滤膜, 收集透过液, 将其通过截留分子质量为4 000 D的超滤膜, 收集各个分子质量段的乳清酶解液。固定料液温度 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 9.0, 120 min为一个运行周期, 测定不同操作压力(0.1、0.15、0.2、0.25、0.3 MPa)的膜通量, 得到最佳操作压力; 固定最佳操作压力, pH 9.0, 120 min为一个运行周期, 测定不同料液温度(15、20、25、30、35、 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$)的膜通量, 得到最佳料液温度; 固定最佳料液温度和操作压力, pH 9.0, 测定不同操作时间(20、40、60、80、100、120、140、160、180 min)的膜通量, 得到最佳的运行周期; 固定最佳料液温度、操作压力、一个运行周期的值, 测定pH值(7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10)的膜通量, 确定最佳pH值。膜通量由公式(1)计算可得^[11]。

$$J = \frac{V}{S \times t} \quad (1)$$

式中: J 为膜通量($\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$); V 为透过液的体积/L; S 为超滤膜的有效面积/ m^2 ; t 为超滤所消耗的时间/h。

1.3.4 抗脂质过氧化活性的测定^[12-13]

酶解液离心、超滤, 选取未进行超滤的乳清酶解液、分子质量大于6 000 D酶解液、分子质量在4 000~6 000 D之间酶解液以及分子质量低于4 000 D酶解液。超滤液在 $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下冷冻干燥24 h, 冷阱温度 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 真空度为50 kPa。测定其抗脂质过氧化活性。

依次加入1 mL卵磷脂溶液、1 mL 400 mmol/L FeCl_3 溶液、1 mL样品于10 mL试管。然后将1 mL 400 mmol/L抗坏血酸加入。将其混匀后避光, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱1 h, 接着加入三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)-硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)-HCl混合溶液2 mL, 置于 $90\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴箱15 min, 取出后将其快速冷却, $2\,000 \times g$ 离心10 min, 取上清液在535 nm波长处测定吸光度(A)。在空白管中加入1 mL重蒸水, 代替样品, 按上述操作方法, 测定吸光度(A_0)。脂质过氧化抑制率计算公式如下。

$$\text{脂质过氧化抑制率}/\% = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \quad (2)$$

1.3.5 乳清中抗氧化肽的粗提

取抗氧化性活力高的分子质量段的超滤液, 使用葡聚糖凝胶层析技术对目标产物进行粗提。选用Sephadex G-50, 蛋白分离范围1 500~30 000 D。煮沸葡聚糖凝胶, 用pH 7.0, 0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液反复冲洗, 使上层溶液干净透明, 装柱。上样1 mL经超滤处理的酶解液, 经磷酸盐缓冲液洗脱后, 流速为0.6 mL/min, 洗脱液为蒸馏水, 每管收集时间为5 min, 收集的样品于280 nm波长处测定吸光度。

1.3.6 三羟甲基氨基甘氨酸-十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, tricine-SDS-PAGE)

Tricine-SDS-PAGE的分离胶采用4 mL 5C凝胶储存液、4 mL凝胶缓冲液 (3×)、4.32 mL尿素配成, 临用前加入质量分数为10%的过硫酸铵溶液60 μL和四甲基乙二胺 (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine, TEMED) 6 μL^[14-16]。浓缩胶用凝胶缓冲液 (3×) 1.86 mL、3C凝胶储存液0.6 mL和2.54 mL去离子水配成, 临用前加入质量分数为10%过硫酸铵溶液50 μL和TEMED 5 μL。正极缓冲液 (5×): 取Tris 60.57 g, HCl调pH 8.9, 用去离子水定容到250 mL; 负极缓冲液 (10×): 取Tricine 8.958 g, Tris 6.055 g, SDS 0.5 g, 加入去离子水, 定容至50 mL。整块分离胶浸没在考马斯亮蓝R250溶液 (0.25%) 中, 染色3 h。取出并用水漂洗3次后, 加入脱色液, 脱色液根据脱色情况更换, 脱去凝胶蓝色背景, 直至蛋白质色带清晰显现^[17-18]。

1.3.7 抗氧化肽制备

样品经纯化后, 再经浓缩, 冷冻干燥, 即为抗氧化肽样品。

2 结果与分析

2.1 Alcalase 2.4L蛋白酶酶解干酪乳清条件的确定

2.1.1 酶解时间对酶解液水解度的影响

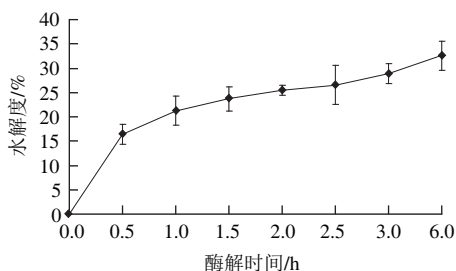


图1 酶解时间对干酪乳清酶解液水解度的影响

Fig.1 Effect of hydrolysis time on the degree of hydrolysis

由图1可知, 0.5 h内水解度增加较快, 1~3 h时水解度增加缓慢, 3~6 h后水解度呈平缓增加。这主要是因为酶解主要是断开肽键, 最初肽键数目多, 随着时间的延长, 肽键数减少, 水解度的增加且趋于平缓。从节约时间和能源考虑, 乳清最佳酶解时间3.0 h。

2.1.2 酶解温度对乳清酶解液水解度的影响

由图2可知, 水解度随酶解温度的升高先增大后减小, 温度在45~55 ℃时范围内, 水解度快速增加, 当温度增加到60 ℃时, 水解度最大, 为25.8%, 超过60 ℃水解度反而下降。由于60 ℃会发生美拉德反应, 使酶解产

物的颜色变深, 所以最佳温度为55~60 ℃。这与刘利军等^[19]的研究结果一致。

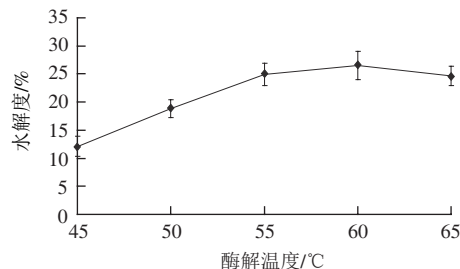


图2 酶解温度对干酪乳清酶解液水解度的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis temperature on the degree of hydrolysis

2.1.3 酶解pH值对水解度的影响

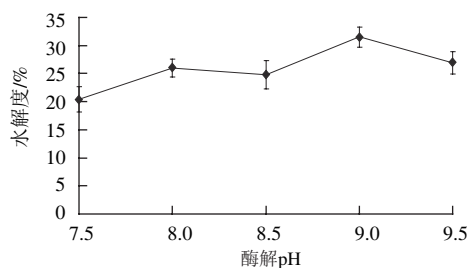


图3 酶解pH值对干酪乳清酶解液水解度的影响

Fig.3 Effect of initial pH on the degree of hydrolysis

由图3可知, pH 8.5时, 水解度较低; pH 9.0时, 水解度最大, 故选择pH 9.0时为最适条件。

2.1.4 酶与底物比 ([E]/[S]) 对水解度的影响

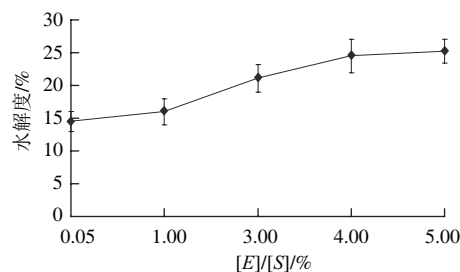


图4 [E]/[S]对干酪乳清酶解液水解度的影响

Fig.4 Effect of [E]/[S] ratio on the degree of hydrolysis

由图4可知, [E]/[S]在0.05%~5%时, 水解度随着[E]/[S]的增加而增加, [E]/[S]高于4%后, 水解度的增加趋于平缓。从经济因素考虑, 选择[E]/[S]为4%~5%为最适值。这与刘利军等^[19]的研究结果一致。

2.1.5 正交试验对干酪乳清酶解条件优化

在单因素试验的基础上, 得到乳清酶解条件, 以酶解温度、酶解pH值、[E]/[S]、酶解时间为考察因素, 并以水解度作为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行正交试验。试验设计及结果见表1。

表1 干酪乳清酶解条件正交试验设计及结果

Table 1 Results of orthogonal array design for the hydrolysis of cheese whey

试验号	A酶解温度/℃	B酶解时间/h	C [E]/[S]/%	D酶解pH	水解度/%
1	1 (50)	1 (2)	1 (3)	1 (8.5)	21.91
2	1	2 (3)	2 (4)	2 (9.0)	20.20
3	1	3 (4)	3 (5)	3 (9.5)	18.83
4	2 (55)	1	2	3	23.32
5	2	2	3	1	14.67
6	2	3	1	2	13.69
7	3 (60)	1	3	2	15.80
8	3	2	1	3	11.38
9	3	3	2	1	16.54
K_1	60.94	61.03	46.98	53.12	
K_2	51.68	46.25	60.06	49.69	
K_3	43.72	49.06	49.30	53.53	
k_1	20.31	20.34	15.66	17.37	
k_2	17.33	15.42	20.02	16.56	
k_3	14.54	16.32	16.43	17.79	
R	5.77	4.92	4.86	1.23	

由表1中极差分析可知,各因素对水解度的影响顺序依次为 $A>B>C>D$;极差分析中得到的最佳酶解条件为 $A_1B_1C_2D_3$ 。该条件下的干酪乳清水解度为25.42%。这与彭新颜等^[20]的研究结果相符。

各因素对水解度影响的方差分析结果如表2所示,四因素的 F 值均小于 $F_{0.05}$,说明各因素对干酪乳清水解度影响均不显著。

表2 正交试验方差分析表

Table 2 ANOVA of experimental results from orthogonal array

方差来源	均方和	自由度	F 值	$F_{0.05}$	显著性
酶解温度	24.76	2	16.73	19	不显著
酶解时间	20.53	2	13.87	19	不显著
[E]/[S]	16.23	2	10.97	19	不显著
酶解pH	1.48	2	1		不显著
总和	63.00	8			

2.2 干酪乳清酶解产物超滤操作条件的确定

2.2.1 压力对超滤膜膜通量的影响

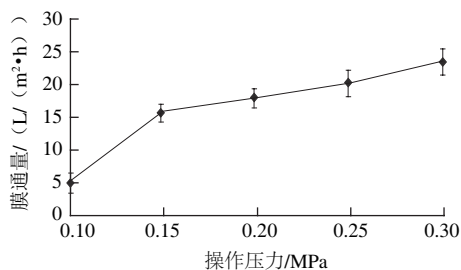


图5 操作压力对超滤膜膜通量的影响

Fig.5 Effect of operating pressure on ultrafiltration membrane flux

由图5可知,在超滤开始阶段,随着操作压力的增加,膜两侧压力差也增加,导致膜通量快速升高。操作压力的继续增加,膜通量增加幅度变小。考虑到本实验用膜的性质,压力控制在0.25 MPa。

2.2.2 料液温度对超滤膜膜通量的影响

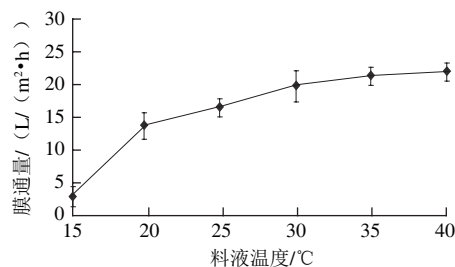


图6 料液温度对超滤膜膜通量的影响

Fig.6 Effect of hydrolysate temperature on ultrafiltration membrane flux

由图6可知,当料液温度升高,膜通量也随之增加。温度升高时,部分热敏性蛋白和风味蛋白变性;还会使滤膜老化,消耗能量,滋生微生物。所以从超滤速率、膜材料的特性等方面考虑,最佳料液温度为30 °C。

2.2.3 操作时间对超滤膜膜通量的影响

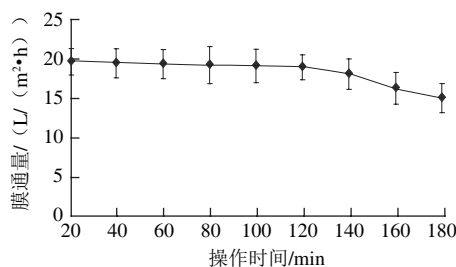


图7 操作时间对超滤膜膜通量的影响

Fig.7 Effect of ultrafiltration time on membrane flux

由图7可知,膜通量随着超滤时间的延长而平缓下降趋势,并呈稳定趋势;120 min以后,超滤膜表面上聚集大量大分子蛋白质和水解液的组分,阻碍了小分子肽的通过,膜的截留率增加,膜通量降低。为了高效超滤及清洗工作的顺利进行,超滤膜应该以120 min为一个运行周期。

2.2.4 料液pH值对超滤膜膜通量的影响

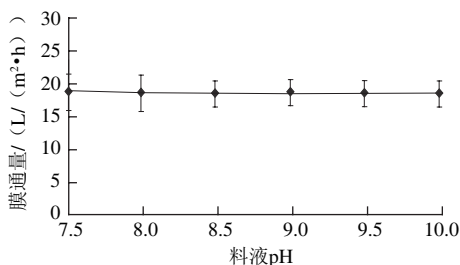


图8 料液pH值对超滤膜膜通量的影响

Fig.8 Effect of hydrolysate pH on ultrafiltration membrane flux

由图8可知,膜通量随着料液pH值的增加变化很小,即膜通量受料液的pH值影响不大;考虑到最终产品风味,选用料液的初始pH 9.0。

2.3 不同分子质量范围多肽的脂质过氧化抑制率

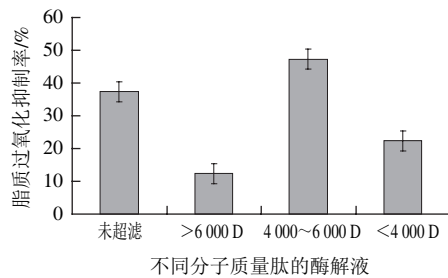


图9 不同分子质量多肽的脂质过氧化抑制率

Fig.9 Inhibitory rates of peptides with various molecular weights on lipid peroxidation

由图9可知, 分子质量大于6 000 D的酶解液的脂质过氧化抑制率最低, 为12.35%。而分子质量在4 000~6 000 D范围的酶解液脂质过氧化抑制率最高, 达到47.28%, 高于未经过超滤的酶解液脂质过氧化抑制率。乳清酶解液的抑制脂质过氧化的能力与多肽类型、不同游离氨基酸的比例有关。通过碱性蛋白酶酶解产生分子质量范围不同, 氨基酸序列的不同两性的、结构可变的短肽, 容易分散在油-水界面中, 借助磷脂膜的作用而松散分布脂肪氧化体系中^[20]。

2.4 乳清水解产物G-50凝胶分离

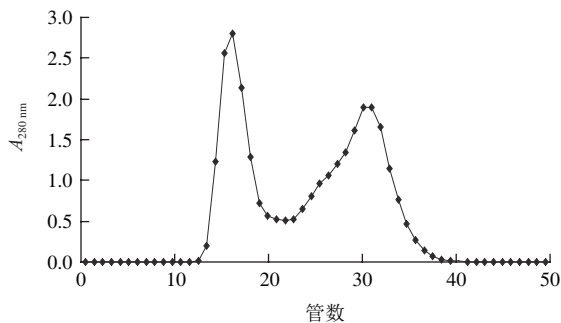


图10 Sephadex G-50凝胶层析纯化干酪乳清酶解液

Fig.10 Elution profile of hydrolysates by Sephadex G-50

由图10可知, 分子质量在4 000~6 000 D范围的乳清蛋白肽酶解液通过Sephadex G-50后, 有2个峰, 紫外检测峰对应的管号分别为第17、34管, 说明复合产物中主要含有2种物质。

取紫外检测峰的第17、34管洗脱液分别进行抗脂质过氧化抑制率的测定(图11)和Tricine-SDS-PAGE分析(图12)。由图11可知, 第34管洗脱液的抗脂质过氧化抑制率高达40.05%, 高于第17管洗脱液的抗脂质过氧化抑制率。由图12可知, 乳清酶解过程使得 α -乳白蛋白、 β -乳球蛋白分解, 小分子肽增加。葡聚糖凝胶具有分子筛作用, 酶解液的蛋白肽将按分子质量大小, 逐步洗脱而分离^[15], 第17管(泳道1)的分子质量大于第34管

(泳道2)酶解液的分子质量。因此, 第34管酶解液抗氧化性较高, 分子质量在4 000~4 100 D之间。干酪乳清Alcalase 2.4L酶解液中抗氧化活性肽最终选择第32、33、34、35、36管洗脱液作为乳清抗氧化肽收集对象。

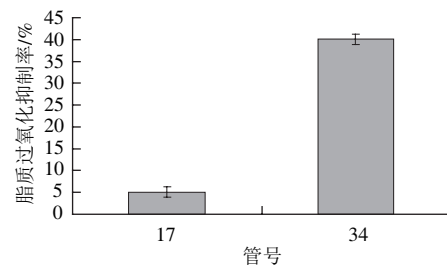


图11 Sephadex G-50凝胶层析纯化第17和34管洗脱液的脂质过氧化抑制率

Fig.11 Inhibitory rates of fractions 17 and 34 from Sephadex G-50 column chromatography on lipid peroxidation

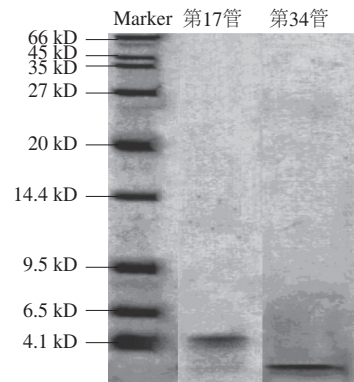


图12 Sephadex G-50凝胶层析纯化产物Tricine-SDS-PAGE图

Fig.12 Tricine-SDS-PAGE gel electrophoresis of separated hydrolysates by Sephadex G-50 column chromatography

3 结论

利用超滤从干酪乳清Alcalase 2.4L酶解液中提取抗氧化性蛋白肽。通过三因素三水平正交试验得到干酪乳清Alcalase 2.4L酶解的最优条件, 即酶解时间为2 h、pH 9.5、 $[E]/[S]$ 为4%、酶解温度为50℃。该条件下的干酪乳清水解度为25.42%。

乳清酶解物超滤的最佳条件为: 压力0.25 MPa, 温度为30℃, 时间120 min, 初始pH 9.0。分子质量范围在4 000~6 000 D范围内的肽酶解液脂质过氧化抑制率最高, 达到47.28%。将分子质量4 000~6 000 D肽的酶解液, 采用Sephadex G-50型葡聚糖凝胶进行纯化, 将分离的组分进行Tricine-SDS-PAGE分析和脂质过氧化抑制率的测定, 第34管洗脱液的抗氧化性最高, 分子质量范围为4 000~4 100 D。将其样品冷冻干燥制的固体粉末为抗氧化肽样品。

参考文献:

- [1] 于长青, 赵学明, 姚琨. 高产蛋白酶芽孢杆菌的选育及其在大豆活性肽制备中的应用[J]. 中国农业大学学报, 2005, 10(1): 34-37.
- [2] PEÑA-RAMOS E A, XIONG Y L. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system[J]. Journal of Dairy Science, 84(12): 2577-2583.
- [3] 刘志东, 郭本恒, 王荫榆, 等. 乳源抗氧化肽的研究进展[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 282-287.
- [4] SAIDE J A O, GILLILAND S E. Antioxidative activity of lactobacilli measured by oxygen radical absorbance capacity[J]. Journal of Dairy Science, 88: 1352-1357.
- [5] 陈泽宪, 徐辉碧. 蛋白质水解阶段对氨基酸组成分析的影响[J]. 分析科学学报, 2002, 18(1): 80-85.
- [6] SCHAGGER H, VONJAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 166: 368-379.
- [7] 曹佐武. 小分子肽的Tricine-SDS-PAGE分离方法[J]. 生物学通报, 2003, 38(3): 55-56.
- [8] SCHAGGER H. Tricine-SDS-PAGE[J]. Nature Protocols, 2006, 1(1): 16-22.
- [9] BINSAN W, BENJAKUL S, VISESSANGUAN W, et al. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)[J]. Food Chemistry, 2008, 106(1): 185-193.
- [10] 包怡红. 乳清蛋白的酶解及其性质研究[J]. 食品科学, 2003, 24(9): 63-65.
- [11] MEISEL H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk protein[J]. Biopolymer, 1997, 43(2): 119-128.
- [12] YI O, MEYER A S, FRANKEL E N. Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1997, 74(10): 1301-1306.
- [13] SMIRNOFF N, CUMBES Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.
- [14] 赵永芳. 生物化学原理及其技术应用[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1995: 125.
- [15] 赵文博. 干酪乳清水解产物的抗氧化活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2010: 25.
- [16] 赵利, 李雁群, 余世望. 试论食品工业中蛋白质酶水解物生产[J]. 食品研究与开发, 1997, 18(4): 8-10.
- [17] PROVANSAL M M, CUQ J L, CHEFTEL J C. Chemical and nutritional modifications of sunflower proteins due to alkaline processing. Formation of amino acid cross-link and isomerization of lysine residues[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1975, 23(5): 938-943.
- [18] FITZGERALD R J, MILK M H. Protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme[J]. The British Journal of Nutrition, 2000, 84(Suppl 1): 33-37.
- [19] 刘利军, 赵征. 酶法水解乳清蛋白过程的优化[J]. 天津科技大学学报, 2005, 20(3): 9-11.
- [20] 彭新颜, 孔保华, 熊幼翎. 乳清蛋白水解物抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 167-176.