

# 牦牛乳酪蛋白酶解产物清除 DPPH 自由基活性分析

毛学英, 吴思嘉, 范金波, 徐世平, 王晶, 谷俊男, 任发政

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 教育部-北京市功能乳品重点实验室, 北京 100083)

**摘要:** 以牦牛 (*Bos grunniens*) 乳酪蛋白为原料, 用胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶制备酪蛋白酶解产物, 分别测定其 DPPH 自由基清除活力, 发现碱性蛋白酶酶解产物的清除活力显著高于其他酶解产物 ( $p < 0.05$ )。测定不同水解时间点酪蛋白酶解产物的 DPPH 自由基清除活力, 发现第 7 h 酶解产物的清除活力显著高于其它水解时间点的样品 ( $p < 0.05$ )。还分析了碱性蛋白酶 7 h 酶解产物的理化指标, 发现其水解度、三氯乙酸氮溶解指数和蛋白质回收率均较高, 表明此时大部分酪蛋白已降解, 且酶解产物中短肽段的含量较高, 用碱性蛋白酶制备具有 DPPH 自由基清除能力的酪蛋白酶解产物时得率较高, 而其氨基酸含量相对较低, 适宜作为保健食品功能性基料。

**关键词:** 牦牛乳; 酪蛋白; 酶解产物; DPPH 自由基清除活性

中图分类号: TS201.4; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)07-0624-04

## Scavenging Activity of Enzymatic Hydrolysate of Yak Casein on DPPH Radical

MAO Xue-ying, WU Si-jia, FAN Jin-bo, XU Shi-ping, WANG Jing, GU Jun-nan, REN Fa-zheng

(Key Lab of Functional Dairy, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** The DPPH radical scavenging activity of enzymatic hydrolysate of yak casein by different enzymes was studied. It was found that hydrolysates catalyzed by Alcalase showed the highest scavenging effect ( $p < 0.05$ ). Its scavenging effect varied with the hydrolysis time. When the hydrolysis time was 7 h, the obtained hydrolysate had the highest antioxidation property ( $p < 0.05$ ). Besides, the hydrolysis degree, TCA-soluble nitrogen index, short chain peptide content and protein recovery rate of casein hydrolysate by Alcalase for 7 h were very high, indicating a degradation of the most yak casein. In addition, the amino acid content of this hydrolysate was much lower than 15%.

**Key words:** yak (*Bos grunniens*) milk; casein; enzymatic hydrolysate; DPPH scavenging activity

生物体过量的自由基会引起蛋白质氧化、DNA 损伤和脂类过氧化<sup>[1]</sup>, 导致衰老、肿瘤、心脑血管疾病等<sup>[2]</sup>。因此, 寻找阻断自由基反应的高效安全抗氧化剂显得尤为重要。目前, 食品中多添加化学合成抗氧化剂 BHA、BHT 等, 其具有致畸、致癌等毒副作用<sup>[3]</sup>。因此, 非常有必要从天然化合物中寻找更加安全的抗氧化剂。肽类抗氧化剂在体内可以消化吸收、兼具营养和保健特性、作用温和、没有毒副作用, 因此肽类抗氧化剂的研发十分必要。

许多蛋白酶解产物中均含有抗氧化活性组分。蛋白质高级结构不利于活性位点与自由基的接触, 经酶解作用释放出具有抗氧化活性的小分子肽和游离氨基

收稿日期: 2008-03-13

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2008AA10Z320); 国家科技支撑计划 (2006BAD04A06); 中国农业大学青年启动基金 (2006020)

作者简介: 毛学英 (1970-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为功能性乳制品

酸<sup>[4]</sup>。大豆蛋白水解产物可以抑制亚油酸氧化<sup>[5]</sup>, 抗氧化能力取决于其氨基酸组成和序列<sup>[6]</sup>。随着水解时间的延长, 鲑鱼蛋白酶解产物清除 DPPH 自由基的能力提高<sup>[7]</sup>。酪蛋白胰蛋白酶酶解产物通过抑制脂肪氧合酶和过氧化自由基的活性抑制亚油酸氧化<sup>[8,9]</sup>。邱隽等 (2002) 报道乳蛋白活性肽可以延长果蝇寿命、降低大鼠血清丙二醛 (MDA) 含量、延缓衰老<sup>[10]</sup>。本研究旨在解析酪蛋白酶解产物水解度与酶解产物清除 DPPH 自由基活性的关系, 确定适宜的水解时间, 并对活性酶解产物的理化特性进行分析, 旨在为乳蛋白抗氧化保健品的研发提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验材料与仪器

牦牛 (*Bos grunniens*) 乳酪蛋白 (兰州同健生物科技股份有限公司), 胃蛋白酶 (EC.3.4.23.1, 比活力

为 1:10000, Sigma); 胰蛋白酶 (EC.3.4.21.4, 比活力为 1:250, Gibco-BRL, 活力为 2~4 U/mg, Sigma); 木瓜蛋白酶 (EC.3.4.22.21, 活力为 6000 U/mg, 德国进口分装); 碱性蛋白酶 (3500 U/mg) 和风味蛋白酶 (5000 U/mg) 均为 Novozymes 公司生产; DPPH (购自 Sigma 公司)。

恒温箱 (天津市中环实验电炉公司); FD-1 冷冻干燥机 (北京博医康技术公司); 79-3 型磁力恒温搅拌器 (上海市上海县曹行无线电元件厂); PH S-3C 型酸度计 (上海虹益仪器厂) Ultrospec 3000 型 UV/Visible 分光光度计 (Pharmacia-Biotech); 电子恒温水浴箱 (北京医疗设备厂); 万分之一电子天平 (岛津)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 酪蛋白酶解产物的制备

用胃蛋白酶 (pepsin)、胰蛋白酶 (trypsin)、碱性蛋白酶 (alcalase)、风味蛋白酶 (flavorzyme) 和木瓜蛋白酶 (papain), 按照表 1 所列条件分别酶解酪蛋白, 制备酪蛋白酶解产物。

表 1 蛋白酶水解的反应条件

Table 1 Reaction conditions of the enzymatic hydrolysis of yakcasein

蛋白酶	温度/°C	pH	酶/底物比/(U/g 酪蛋白)
胰蛋白酶	40	7.5	5000
碱性蛋白酶	60	8.0	2800
胃蛋白酶	37	2.0	12500
木瓜蛋白酶	65	7.0	1800
风味蛋白酶	45	6.5	600

#### 1.2.2 DPPH 自由基的清除能力<sup>[11]</sup>

将 1.5 mL 质量浓度为 2.5 mg/mL 酪蛋白酶解产物溶液与等量的 DPPH (2×10<sup>-4</sup> mol/L, 乙醇溶解) 溶液均匀的混合, 室温下避光静置 30 min 在 517 nm 下测定 OD 值。DPPH 自由基清除率用下式计算:

$$DPPH \text{ 自由基清除率 } (\%) = \frac{A_0 - A_e}{A_0} \times 100\%$$

其中 A<sub>0</sub> 为没有肽段的反应管的 OD 值, A<sub>e</sub> 是含有肽段的反应管的 OD 值。

#### 1.2.3 水解度的测定

水解度 (DH) 等于断裂肽键的数目与总肽键数目之比<sup>[12]</sup>, 计算公式为:

$$DH (\%) = V_{NaOH} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{N_{NaOH}}{M_p} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

式中, V<sub>NaOH</sub> 为水解过程中用去的 NaOH (mL); M<sub>p</sub> 为水解底物的总蛋白质含量 (g); N<sub>NaOH</sub> 为 NaOH 的摩尔浓度; h<sub>tot</sub> 为每克蛋白质中肽键的克当量; α 为 α-氨基的解离度。

#### 1.2.4 氨基氮含量的测定<sup>[13]</sup>

采用甲醛滴定法, 即取 10 mL 酶解液, 加入 30 mL 蒸馏水, 搅拌均匀, 用 0.1 M 的 NaOH 调节 pH 至 8.2, 加入 20 mL 中性甲醛, 然后用 0.1 M NaOH 调节 pH 至 9.2, 记录所用 NaOH 溶液的体积。每个样品设 3 次重复。

$$\text{氨基酸含量} (mg \cdot mL^{-1}) = \frac{N_{NaOH} \times (V_1 - V_0) \times 14.008}{V}$$

式中, V 为酶解液体积 (mL); V<sub>1</sub> 为样品滴定所用 NaOH 的体积 (mL); V<sub>0</sub> 为空白滴定所用 NaOH 的体积 (mL); N<sub>NaOH</sub> 为 NaOH 的摩尔浓度。

#### 1.2.5 三氯乙酸氮溶解指数 (TCA-NSI) 的测定<sup>[14]</sup>

取 10 mL 酶解液于小烧杯中, 加入 10 mL 三氯乙酸 (TCA), 放置 30 min, 于 4000 r/min 下离心 10 min, 取上清液用凯氏定氮法测定可溶性氮含量, 计算酶解产物的三氯乙酸氮溶解指数。

$$TCA-NSI (\%) = \frac{TCA \text{ 可溶性氮 } (g)}{\text{加入 TCA 前蛋白水解物中的总氮量 } (g)} \times 100$$

#### 1.2.6 蛋白回收率 (NR) 的测定<sup>[15]</sup>

调节酶解液至 pH4.6, 沉淀未被分解的蛋白质, 未被沉淀的部分即为酸溶性多肽。计量酶解离心后上清液的总体积, 取 5 mL 蛋白酶解液, 用凯氏定氮法测出上清液中的蛋白质含量, 即可以计算出蛋白质回收率, 又称为酸溶性多肽得率。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同蛋白酶酶解产物的 DPPH 自由基清除活性的比较

测定酪蛋白的胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解产物清除 DPPH 自由基的活力, 结果如图 1 所示。

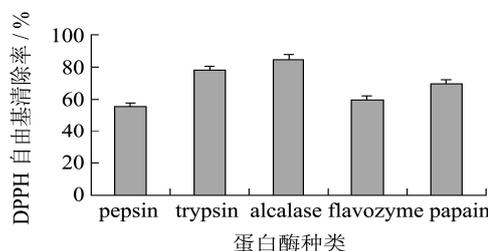


图 1 牦牛乳酪蛋白酶解产物的 DPPH 自由基清除活性

Fig.1 Effect of the enzymes on the DPPH radicals scavenging activity of casein hydrolysates

图 1 显示酪蛋白的碱性蛋白酶酶解产物的 DPPH 自由基清除活性最强, 显著高于其胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶酶解产物 (p<0.05)。因此, 选用碱性蛋白酶 (Alcalase) 作为本研究中水解

酪蛋白制备抗氧化肽的蛋白酶。

### 2.2 不同水解时间点样品的 DPPH 自由基清除活性

用 Alcalase 水解牦牛乳酪蛋白，并于水解反应的不同时间点取样，测定不同水解时间点样品的 DPPH 自由基清除活性，测定结果如图 2 所示。

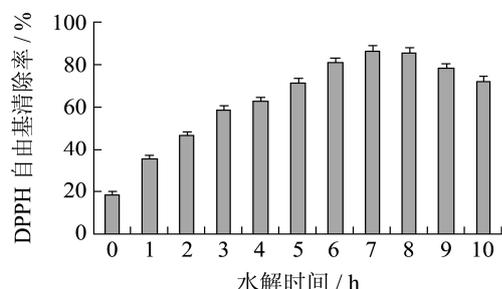


图 2 酪蛋白不同时间碱性蛋白酶解产物的 DPPH 自由基清除率

**Fig.2 Effect of the reaction time on the DPPH radicals scavenging activity of casein hydrolysates by alcalase**

图 2 显示酪蛋白本身所具有的 DPPH 清除活性很低，随着酶解时间的延长，酶解产物的 DPPH 自由基清除活性逐渐升高，当水解时间为 7 h 时，所得酶解产物对 DPPH 自由基清除活性最强，显著高于其它酶解产物的活性 ( $p < 0.05$ )。

### 2.3 活性酶解产物特性分析

以上结果表明用碱性蛋白酶酶解酪蛋白 7 h 获得的酶解产物的 DPPH 自由基清除活性最高，分析其水解度、氨基氮含量、三氯乙酸氮溶解指数和蛋白质回收率，测定结果如表 2 所示。

表 2 酪蛋白碱性蛋白酶 7 h 酶解产物的特性

**Table 2 Characteristics of casein hydrolysates catalyzed by alcalase for 7 hours**

水解度/%	氨基氮含量/%	三氯乙酸氮溶解指数/%	蛋白质回收率/%
21.56±0.24	4.19±0.009	84.11±0.56	83.37±0.55

表 2 显示用碱性蛋白酶酶解酪蛋白 7 h 时获得的酶解产物的水解度、三氯乙酸氮溶解指数和蛋白质回收率均较高，表明酶解 7 h 时大部分酪蛋白已降解，且酶解产物中短肽段的含量较高，用碱性蛋白酶制备酪蛋白 DPPH 自由基清除产物时得率较高。酶解产物的氨基氮含量为 (4.19±0.009) %，表明蛋白水解物中游离氨基酸的相对含量较低，适宜作为保健食品功能性基料。

## 3 结论

(1) 牦牛乳酪蛋白碱性蛋白酶酶解产物的 DPPH 自由基清除活力显著其胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶酶解产物 ( $p < 0.05$ )。

(2) 不同水解时间点酪蛋白酶解产物的 DPPH 自由基清除活力不同，水解 7 h 获得的酶解产物的清除活力显著高于其它水解时间点的样品 ( $p < 0.05$ )。

(3) 水解 7 h 获得的碱性蛋白酶酶解产物的水解度、三氯乙酸氮溶解指数和蛋白质回收率均较高，表明此时大部分酪蛋白已降解，且酶解产物中短肽段的含量较高，而其氨基氮含量相对较低，适宜作为保健食品功能性基料。

## 参考文献

- [1] Landommenica A. R., Dizdaroglu M., Halliwell, B. The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide [J]. Free Radical Biol. Med., 1997,23(3):426
- [2] Bethesda. Antioxidant nutrients and chronic disease: Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research [J]. The Journal of Nutrition, 2003, 133 (3):93
- [3] Hettiarachchy N., Glenn K., Gnanasambandam R. Natural antioxidant extract from fenugreek Trigonella foenumgraecum for ground beef patties [J]. J. Food Sci., 1996, 61(3):516
- [4] 陈美珍,余杰,郭慧敏.大豆分离蛋白酶解物清除羟自由基作用的研究 [J].食品科学, 2002, 23(1):43-47
- [5] Chen H., Muramoto K., Yamaguchi, F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995,43(3): 574-578
- [6] Chen H., Muramoto K., Yamaguchi F., Fujimoto K., & Nokihara K., Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(1): 49-53
- [7] Wu H. C., Chenb H. M., Shiaua 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(1): 949-957

(下转第 634 页)