

胞壁蛋白酶 (CEP) 酶解对酪蛋白结构及功能特性的影响

任晓芬, 潘道东, 曾小群, 曹锦轩, 孙杨赢

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

摘要: 通过纳米粒度分析、傅立叶红外光谱 (FT-IR)、乳化性、乳化稳定性、蛋白溶解性、抗氧化性及 ACE 抑制率的测定, 分析探讨酪蛋白及其不同水解度 (DH 2.4%、4.5%、7.1%、8.3%) 的嗜酸乳杆菌胞壁蛋白酶 (CEP) 酶解产物的结构及功能特性。FTIR 分析表明 CEP 酶解改变了酪蛋白各种构象所占的比例, 酪蛋白二级结构发生了不同程度的变化; 纳米粒度分析表明酪蛋白颗粒大小随水解的加深先减小后增大, 其水解物颗粒在 DH 4.5% 时最小, 乳化稳定性最大; 酪蛋白的乳化性随水解的加深先增大后减小, DH 7.1% 时增至最大, 与其溶解性的变化趋势一致; 此外酪蛋白的酶解物具有一定的 ACE 抑制活性及抗氧化性, 且 DPPH 清除能力在一定范围内随水解度及浓度的增大而增大, 当 DH 为 8.3%, 浓度为 5 mg/mL 时, DPPH 清除能力增大至 35.00%。因此 CEP 酶解可有效改善酪蛋白的结构及功能特性, 为乳源性功能多肽的开发提供理论依据。

关键词: 酪蛋白; 胞壁蛋白酶; 水解; 结构特性; 功能特性

文章编号: 1673-9078(2013)11-2643-2648

Effects of Enzymatic Hydrolysis with Cell Wall Proteinase (CEP) on Structural and Functional Properties of Casein

REN Xiao-fen, PAN Dao-dong, ZENG Xiao-qun, CAO Jin-xuan, SUN Yang-ying

(College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The structural characteristics of casein hydrolyzed by cell wall proteinase (CEP) from *Lactobacillus acidophilus* were analyzed by granularity and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The effects of different degree of hydrolysis (DH 2.4%, 4.5%, 7.1% and 8.3%) on functional properties of casein were determined by emulsibility, emulsion stability, solubility, antioxidant activity and ACE inhibitory activity. The results of FT-IR spectra indicated remarkable changes in the chemical compositions and macromolecular conformation of casein after hydrolysis. The secondary structure of casein was changed with the enzymatic treatment. The nanoparticle size analysis showed that the casein particles decreased during the initial hydrolysis time (DH<4.5%), but increased for further hydrolysis, which resulted in the highest emulsion stability under DH 4.5%. The emulsibility and solubility of casein first increased and reached the highest when DH was 7.1%, and then decreased with the further hydrolysis. In addition, the casein hydrolysates had certain ACE inhibitory activity and antioxidant properties, and the DPPH removal capacity within a certain range increased as DH and concentration increased. The highest DPPH removal capacity was 35.00% with DH 8.3% and hydrolysates concentration of 5 mg/mL. Therefore, the enzymatic hydrolysis with CEP can effectively improve the structural and functional properties of casein. This research will provide useful theoretical basis for the production of ACE inhibitory peptides derived from casein.

Key words: casein; cell wall proteinase; hydrolysis; structural properties; functional properties

酪蛋白作为乳蛋白中的一大类, 含有人体所必需的 8 种氨基酸, 是一种全价蛋白质。目前已从酪蛋白中分离出了多种生物活性多肽, 这些多肽具有调节胃

收稿日期: 2013-07-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (41276121); 宁波市创新团队 (2012B82017); 宁波市重大攻关 (2011C11017)

作者简介: 任晓芬(1987-), 女, 研究生, 研究方向为乳品科学

通讯作者: 潘道东(1964-), 男, 教授, 研究方向为乳品科学

肠道、降血压、降血脂、抗氧化、抗肿瘤及增强机体免疫等生物活性功能。细胞壁蛋白酶 (Cell-envelope Proteinase, CEP) 作为乳酸菌蛋白水解系统中一种重要的酶, 遇到乳蛋白时^[1], 首先将其水解为一系列短肽, 降解后的短肽再由寡肽转移系统 (Opp)、二肽和三肽转运系统 (DtpP 和 DtpT) 运输到细胞内, 最后由胞内肽酶 (包括氨肽酶、肽链内切酶、pro-特异性肽酶等) 进一步水解成具有降血压作用的 ACE 抑

制肽。如 Jiang Z M^[2]等从 κ -酪蛋白水解产物中分离纯化出氨基酸序列分别为 Arg-Tyr-Pro-Ser-Tyr-Gly (κ -casein; f25-30)和 Asp-Glu-Arg-Phe (κ -casein; f15-18)的两种 ACE 抑制肽。又如闭秋华等^[3]利用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶分别水解水牛奶酪蛋白制备抗氧化活性肽。但对于嗜酸乳杆菌胞壁蛋白酶水解酪蛋白产物的抗氧化性鲜见报道。本文将利用嗜酸乳杆菌的提取物胞壁蛋白酶 (CEP) 水解酪蛋白, 以产生具有 ACE 抑制活性及抗氧化性的食源性多肽。

用于研究蛋白质分子构象的方法很多, 如傅里叶红外光谱法、圆二色谱法、激光拉曼光谱法和核磁共振光谱等, 但它们各有优缺点。前三种方法主要用于确定蛋白质二级结构的类型及相对含量, 而核磁共振主要用于对蛋白质二级结构进行准确定位。傅里叶红外光谱法主要用于检测因分子振动产生的偶极矩变化, 所有氨基酸残基都可以作为发色团, 且对于微弱结构的变化具有独特的敏感性; 圆二色谱法只能用于分析很窄范围内的澄清溶液, 且必须保证蛋白质浓度是准确的, 且 CD 仪器必须经过精确的校正, 才能得到准确可靠的二级结构信息; 拉曼光谱是检测非极性基团很好的探针, 对分子的形态及极化度的变化较为敏感, 但排除不了蛋白质溶液中的水产生的严重背景干扰。而运用核磁共振光谱对蛋白质二级结构进行分析, 必须保证蛋白质在溶液中稳定、不聚合、不降解^[4]。目前对于乳酸菌胞壁蛋白酶水解酪蛋白的结构及功能特征尚未见报道, 因此本实验将利用粒度分析、FTIR、ACE 抑制率、抗氧化性、乳化性、乳化稳定性及溶解性的变化等手段研究嗜酸乳杆菌 CEP 酶解对酪蛋白粒径、结构及功能特性的影响, 为酪蛋白的酶解提供理论依据, 以更好地应用于乳源性功能多肽的开发。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

嗜酸乳杆菌, 实验室筛选保藏菌株; 酪蛋白、马尿酸-组氨酸-亮氨酸 (Hippuryl-L-histidyl-L-leucine, HHL)、血管紧张素转化酶 (ACE)、1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), Sigma 公司。

1.2 仪器与设备

Nicolet-6700 傅立叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo 公司; Nano ZS 型 Zeta 电位分析仪, 英国 Malvern 公司; 冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有

限公司; UV-4802 型双光束紫外可见分光光度计, 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司; DB-2 型电热板, 常州国华电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 嗜酸乳杆菌胞壁蛋白酶的提取

嗜酸乳杆菌菌体采用50%甘油保藏 (置于-40℃), 将冷藏的菌液连续活化三代。按照3%的接种量至新配制的MRS培养基中, 37℃下扩大培养至菌体生长对数期16h后取出, 于4500 r/min、4℃离心20 min, 收集菌体沉淀。用含有Ca²⁺ (30 mmol/L) 的 Tris-HCl (50 mmol/L, pH 7.8) 缓冲液洗涤菌体, 再次于4500 r/min、4℃离心20 min, 弃上清液, 重复洗涤三次, 收集菌体冷冻干燥后以备。取菌体2 g, 用裂解液 (1 mg/mL 溶菌酶、0.5% Tritonx-100、2 mmol/L EDTA-Na₂、100 mmol/L NaCl、50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5) 40 mL 悬浮菌体, 37℃下保温3 h, 离心 (4500 r/min, 20 min, 4℃), 上清液即为粗酶液。通过聚乙二醇-20000浓缩, DEAE-Sephadex A-25和Sephadex G-100两步层析对粗酶液进行分离纯化, 纯化后蛋白酶SDS-PAGE电泳检测为单体结构, 分子量约为45 ku。

1.3.2 酪蛋白的水解及水解度的测定

用 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲液将酪蛋白配制成 2 mg/mL 的溶液, 取 200 μ L 作为酶解底物, 加入胞壁蛋白酶 (2 mg/mL) 液 40 μ L, 置于恒温水浴振荡器中进行水解, 不断加入 0.1 mol/L NaOH 溶液, 保持 pH 值恒定, 记录所消耗的 NaOH 量, 用于计算水解度。到规定时间后将反应体系加热 (100℃, 5 min) 灭酶, 离心 (4500 r/min, 20 min, 4℃), 收集上清液, 测定其 ACE 抑制率。

酪蛋白水解度测定采用 pH-Stat 法^[5]并做适当调整, 按下式计算酪蛋白水解度:

$$DH/\% = B (Mb) (1/\alpha) (1/Mp) (1/h\text{-tot}) \times 100$$

注: B 为消耗的 NaOH 体积 (mL); Mb 为 NaOH 的浓度 (mol/L); Mp 为蛋白质的质量 (g); h-tot 为每克原料蛋白质中肽键的毫摩尔数, 对于酪蛋白, 该值取 8.2 meq/g, 1/ α 为 2.26。

1.3.3 乳化性及其稳定性测定

蛋白乳化特性的测定采用 Pearce 描述的方法并做适当调整^[5]。取 10 mL 浓度为 1 mg/mL 的待测样品溶液, 加入 3 mL 大豆色拉油, 在室温下以 8000 r/min 高速剪切 5 min, 制成乳状液。立即用微量进样器准确量取容器底部乳状液 100 μ L, 以 0.1% 的 SDS 将其稀释 100 倍, 充分混匀, 500 nm 下吸光值记为 A₀, 以 SDS 溶液作为空白对照。

乳化性 (EA) 用乳化活性指数 (EAI) 表示:

$$EAI = 2 \times T \times \frac{A_0 \times \text{稀释倍数}}{C \times \phi \times 10000}$$

注: T值为2.303; A_0 为均质后迅速被稀释的乳化液吸光值; C为乳化液形成之前蛋白质水溶液中的蛋白质量浓度(g/mL); ϕ 为乳化液中油相所占的体积分数。

乳化稳定性 (ES) 用乳化稳定指数 (ESI) 表示:

$$ESI = \frac{A_0 \times \Delta T}{\Delta A}$$

注: A_0 为0时刻的吸光值; ΔT 为时间差, min; ΔA 为 ΔT 内的吸光值差。

1.3.4 粒度分析

取酪蛋白的水解液 10 mL, 边搅拌边加入 3 mL 食用油, 然后在 10000 r/min 下高速剪切乳化 2 min, 制成乳状液^[6]。利用 Nano ZS 型 Zeta 电位分析仪测定不同水解度的酪蛋白酶解物乳状液的粒度分布, 并分别记录样品乳状液的粒度随时间的变化情况。

1.3.5 傅立叶变换红外光谱分析

准确称取一定量冷冻干燥后的样品, 加入适量溴化钾, 研磨成均匀的粉末, 并压成薄片, 用 Nicolet-6700 傅立叶红外光谱仪 (4000~500 cm^{-1}) 测定酪蛋白及不同水解度的酶解产物的红外光谱图。光谱分辨率为 0.09 cm^{-1} 。

1.3.6 溶解性的测定

采用 Bradford 法测定溶解性。制备质量浓度为 5 mg/mL 的蛋白溶液, 测定总蛋白含量。经 4000 r/min 离心 30 min, 沉淀不溶性蛋白, 并测定上清液中酪蛋白含量, 计算上清液中酪蛋白占总蛋白含量的百分数, 衡量其溶解性, 计算公式如下:

$$\text{溶解性}/\% = (\text{上清液蛋白总量}/\text{总蛋白含量}) \times 100$$

1.3.7 抗氧化性测定

取 2.0 mL DPPH (6.5 $\times 10^{-5}$ mol/L) 溶液, 加入体积分数为 50% 的乙醇, 总体积为 4.0 mL, 充分混匀 20 min, 移至 1 cm 的比色皿中, 测定 517 nm 处的吸光度值, 记为 A_0 ; 取 2.0 mL DPPH 溶液 (6.5 $\times 10^{-5}$ mol/L), 加入待测试样溶液, 总体积为 4.0 mL, 测定 517 nm 处的吸光值记为 A_g ; 取 2.5 mL 体积分数为 50% 的乙醇, 加入待测试样溶液, 总体积为 4.0 mL, 同样吸光度下值记为 A_r ^[7], 计算 DPPH 自由基清除率, 公式如下:

$$\text{清除率}/\% = \left(\frac{A_g - A_r}{A_0} \right) \times 100$$

1.3.8 ACE 抑制活性测定

将 Hip-His-Leu 用含 0.3 mol/L NaCl 的硼酸盐缓冲液 (0.1 mol/L, pH 8.3) 配成 6.7 mmol/L 的溶液。取配好

的 200 μL Hip-His-Leu (6.7 mmol/L) 溶液, 加入 100 μL 的样品 (即胞壁蛋白酶水解酪蛋白的产物), 充分混合后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 3 min。再加入 ACE (0.1 U/mL) 溶液 20 μL , 振荡混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温 30 min。加入盐酸 (1.0 mol/L) 溶液 250 μL 以终止反应, 然后加入醋酸乙酯 1.7 mL, 经 15 s 振荡混匀, 吸取 1.0 mL 的有机层于小烧杯中, 置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温加热板上蒸干。将残渣重新溶于 1 mL 去离子水中, 测定 228 nm 波长处的吸光度值^[8]。

$$\text{ACE抑制率}/\% = \frac{B - A}{B} \times 100$$

注: A为含样品时, ACE和底物H-H-L反应的吸光值; B为用蒸馏水代替样品时, ACE和底物H-H-L反应的吸光值, 即对照组。

1.4 数据分析

采用 Origin 9.0 及 SPSS 16.0 软件对所获得的数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 乳化性及稳定性测定

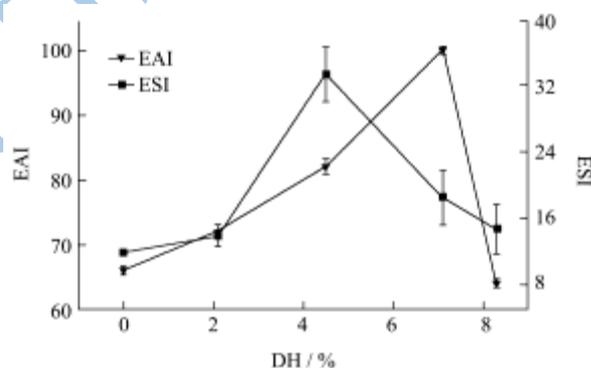


图1 水解度对 CEP 酶解酪蛋白乳化性及稳定性的影响

Fig.1 Effect of DH on EA and K of casein hydrolysates by CEP

蛋白质的乳化特性可用乳化活性指数 (EAI) 和乳化稳定性指数 (ESI) 来表征。样品的 EAI 和 ESI 与水解度的关系如图 1 所示, 从图中可以看出, 随着 DH 的增高, EAI 先增大后减小。这主要是由于多肽数量随水解的加深而逐渐增加, 同时疏水性氨基酸的侧链外露, 静电荷数增加, 因此蛋白质的乳化性在一定程度上随水解度的增大而增强; 但是当端基的数目增加到一定程度 (DH>7.1%), 静电荷数继续增加, 亲水性随之增大, 但亲油能力下降^[9], 因此其乳化性降低。

由图 1 还可看出, 随 DH 的增加, 蛋白质乳状液稳定性先增大后减小。这是由于随水解的加深, 蛋白

质分子的体积减小, 疏水基团逐渐外露, 使得液珠中蛋白分子与油滴的吸引力增强, 因此在 DH<4.5%下, 乳状液的稳定性逐渐增大; 随水解度的继续增加 (DH 为 4.5~8.3%), 分子中疏水区域的结构逐渐被破坏, 使其在整个分子中所占的比例相对减小, 导致乳状液稳定性减小。这可能是由于经胞壁蛋白酶水解后, 酪蛋白的肽链长度变短, 亲水基团增加, 在油水界面上吸附的蛋白质减少, 使得界面膜厚度减小、强度下降, 因此酪蛋白的乳化稳定性减小^[10]。但酶解产物的乳化稳定性明显高于未经水解的酪蛋白, 这可能是由于水解作用使得分子体积减小, 离子化基团数量增加, 在形成乳状液中液珠间的排斥作用大于其间吸引作用, 因此液珠不易聚结。

2.2 粒度分析

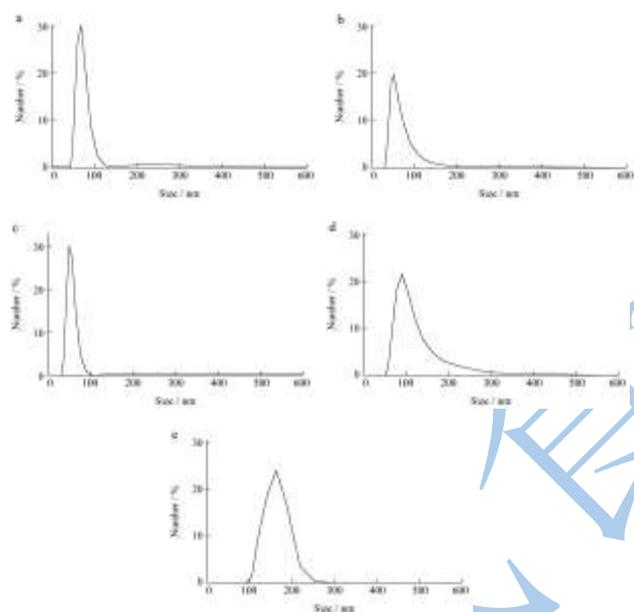


图2 水解度对 CEP 酶解酪蛋白乳状液粒度分布的影响

Fig.2 Effect of DH on particle size distribution of casein hydrolysates emulsion by CEP

注: a: raw β-CN, b: DH 2.4%, c: DH 4.5%, d: DH 7.1%, e: DH 8.3%。

乳状液中的滴珠大小并不是完全均匀的, 而是各种大小都有, 并呈现一定的分布趋势, 因此常用分布曲线来反映乳状液液珠大小的分布情况。分布曲线是将各种尺寸范围内的颗粒数目 dn/dx 在总体颗粒 (N) 中所占的分数作纵坐标, 液珠直径作横坐标, 依据实验测得的颗粒大小分布作图得到的。图 2 为不同水解度的酪蛋白 CEP 酶解物乳状液的粒径分布状况图。从图 2 可以看出, 酶解物乳状液颗粒粒径先减小后增大, 这可能是由于随着 DH 的增加 (DH<4.5%), 酪蛋白被酶解成小分子多肽, 因此其粒径减小; 继续增加 DH

(4.5~8.3%), 酪蛋白水解后的乳状液发生了絮凝和聚结^[11], 使得原来小液珠的液膜被破坏, 形成了体积较大而界面积较小的大液珠, 导致酶解物乳状液粒径增大, 同时乳液的破坏 (油水分离) 及液珠数目的减少又导致了酶解物乳状液稳定性的下降, 这与 2.1 中的结果一致。

2.3 红外光谱分析

对于红外光谱, 由于其用量少, 不受蛋白分子大小、荧光和光散射等影响, 使其成为目前分析蛋白质和多肽二级结构最常见、应用范围最广的方法。蛋白质和多肽在红外区域主要表现为 9 个特征基团频率, 其中酰胺谱带 I ($1600\sim1700\text{cm}^{-1}$) 最常用于分析二级结构, 其特征振动频率取决于 C=O 和 N-H 的氢键性质变化^[12], 由此可推断出蛋白质或多肽二级结构 (α -螺旋、 β -折叠、无规则卷曲及回转结构) 的变化。当酪蛋白被胞壁蛋白酶酶解后, 通过红外光谱观察其 C=O、O-H、N-H 等特征基团伸缩峰的变化, 从而对酪蛋白酶解物的二级结构进行分析鉴定。

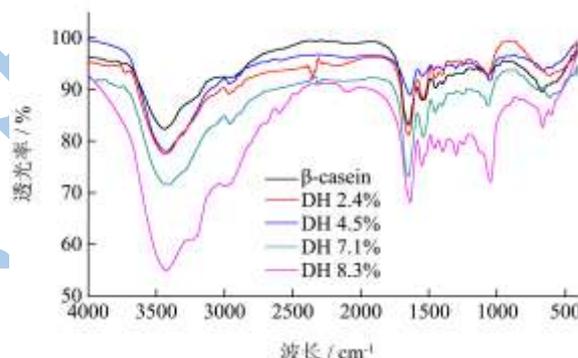


图3 酪蛋白及其水解物的红外光谱图

Fig.3 FTIR spectra of raw casein and its hydrolysates

不同水解度的牛奶酪蛋白水解物的红外光谱图如图 3 所示。图 3 表明酶解在一定程度上改变了峰的位置、强度和面积, 但是并没有出现新的化学基团, 即酶解改变了蛋白各种构象所占的比例, 蛋白二级结构发生了不同程度的变化。如图所示, 在 $3200\sim3500\text{cm}^{-1}$ 范围内, 牛奶酪蛋白及其水解样品的特征吸收峰随水解的进行逐渐变宽和变强, 这主要归因于水解过程中 N-H 和 O-H 键的伸缩振动。在 $1200\sim1700\text{cm}^{-1}$ 的范围内, 牛奶酪蛋白的水解物有较强的吸收带, 表明了水解过程中酰胺基团的结构发生了变化。常用于蛋白二级结构分析的酰胺谱带 I, 位于 1650cm^{-1} 处, 其振动频率取决于 C=O 伸缩振动。随着水解度的增加, 酰胺 I 带吸收峰的强度逐渐增强。酰胺谱带 II, 位于 1540cm^{-1} 处, 其振动频率取决于 N-H 键的弯曲。随水解程度的增加, 酰胺谱带 II 吸收峰逐渐增强, 这主要归因

于水解产生较多的酰胺基团^[13]。同时蛋白质在 1650 cm^{-1} 处的吸收逐渐增强也表明 α -螺旋结构逐渐增加。以上分析表明随水解程度的变化,酪蛋白分子间相互作用力及分子间化学键都随之变化,因此酪蛋白的空间结构发生改变。

2.4 溶解性分析

作为食品原料的蛋白质其水溶性与其乳化性直接相关。酪蛋白溶解性随水解度变化的关系如图 4 所示。

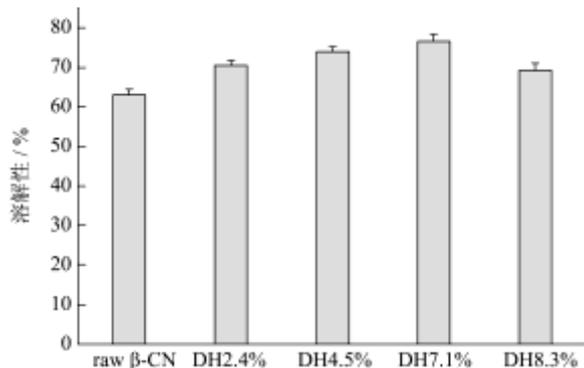


图 4 水解度对 CEP 酶解酪蛋白溶解性的影响

Fig.4 Effect of DH on solubility of casein hydrolysates by CEP

由图 4 可以看出,在 DH 2.4~8.3% 范围内,随着水解度的增加,酪蛋白溶解性先增大后减小,与其乳化性的变化趋势一致。这可能是由于随着水解的加深,蛋白质空间结构变得松散,其分子出现一定程度的解离和伸展,更多的极性基团被暴露出来,因此蛋白溶解性增大。但是当水解到一定程度后,肽键的特定结构遭破坏,使得原来埋藏在球状分子内的许多疏水基团外露,酪蛋白中大部分的疏水结构和小部分的亲水结构也被暴露出来,表面疏水结构的增多使得蛋白质之间的结合机会增多,而酪蛋白与水分子之间的结合减少^[14],即蛋白质的水化作用减小,因此其溶解性相应变小。

2.5 抗氧化性测定

图 5 给出了不同水解程度的酪蛋白 CEP 酶解物对 DPPH 自由基的清除情况。由图 5 可知,不同水解程度的酪蛋白 CEP 酶解物对 DPPH 自由基均有一定的清除作用,在 DH 2.4~8.3% 范围内,清除率随水解度的增加而增大,且清除率随浓度的增大而增大。若样品具有 DPPH 自由基清除能力,则表明样品也具有降低超氧阴离子自由基、羟基自由基以及终止脂质过氧化链反应等抗氧化性^[7]。因此可以通过样品的 DPPH 自由基清除能力反映样品的抗氧化能力。所以在一定的水解度范围内,酪蛋白 CEP 酶解物的抗氧化性将随水解度的增大而显著增大 ($P < 0.05$),且对于同一水解度

的酶解物来说,其抗氧化性将随浓度的增大而显著增大 ($P < 0.05$)。刘志东等^[7]利用木瓜蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶和胰凝乳蛋白酶分别水解酪蛋白时得到相似的结论,在 0~10 mg/mL 的浓度范围内,酪蛋白的四种酶解物 DPPH 清除能力均随浓度的增大而增大,但四种酶解物的清除能力各不相同,这也说明胞壁蛋白酶对于酪蛋白水解产物的功能性具有关键作用。

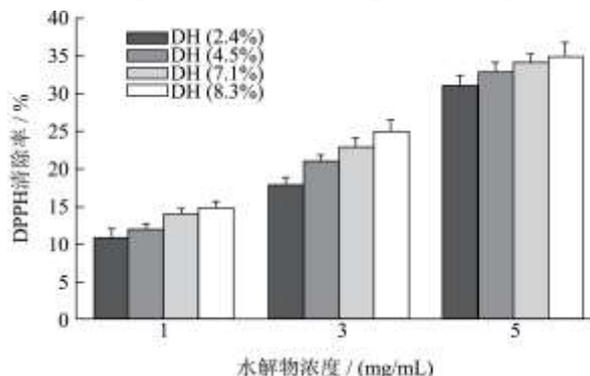


图 5 酪蛋白不同水解度的 CEP 酶解产物 DPPH 自由基清除率

Fig.5 Effect of DH on the DPPH radicals scavenging activity of casein hydrolysates by CEP

2.6 水解度及 ACE 抑制活性测定

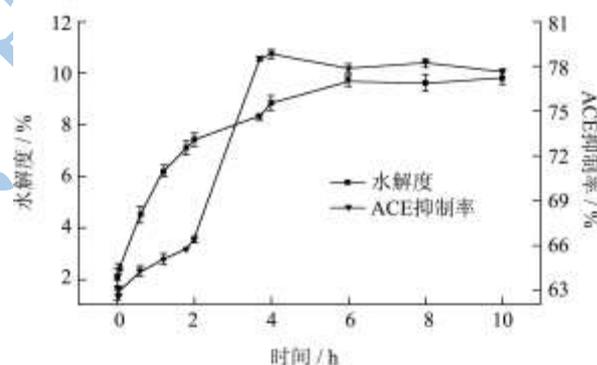


图 6 水解时间对水解度和 ACE 抑制活性的影响

Fig.6 Effect of hydrolysis time on DH and ACE inhibitory activity

图 6 为水解度和 ACE 抑制率随水解时间的变化曲线。从图 6 看出,在胞壁蛋白酶水解酪蛋白开始的 4 h 内,水解度和 ACE 抑制率均显著上升。这主要是因为酶作用的肽键数目在最初水解时最多,随着水解的加深,肽键逐渐被断开,酶解底物中的肽键数逐渐减少,因此水解度的增加趋势减缓,在 4 h 时 ACE 抑制率达到最大,但水解度并未达到最大。由此说明 ACE 抑制肽的产生和水解度并无直接关系。乳酸菌在发酵过程中分泌产生的胞壁蛋白酶能水解酪蛋白,产生对血管紧张素转移酶 (ACE) 具有抑制作用的多肽。Stressler^[15]等进行了类似的实验,用乳酸菌肽酶分别水解 β -酪蛋白,发现可产生十二种具有 ACE 抑制率的

活性多肽,但其 ACE 抑制率各不相同,这可能是由于不同的蛋白酶对酪蛋白的酶解方式不同,导致其水解产物具有不同的功能活性。由此可说明胞壁蛋白酶在酪蛋白的酶解过程中起决定作用。

3 结论

3.1 通过乳化性、乳化稳定性、蛋白溶解性、抗氧化性及 ACE 抑制率的测定,分析了水解度对酪蛋白及其水解物功能特性的影响。实验数据表明牛奶酪蛋白的酶解物还具有一定的 ACE 抑制活性及抗氧化性,且 DPPH 清除能力在一定范围内随水解度的增大而增大,随浓度的增大而增大,反映出其抗氧化能力的变化趋势;酪蛋白的乳化性随水解的加深先增大后减小,与其溶解性的变化趋势一致。

3.2 利用纳米粒度、傅立叶红外光谱 (FT-IR) 分析探讨了酪蛋白及其不同水解度的胞壁蛋白酶酶解产物的结构特征。其中纳米粒度分析表明酪蛋白颗粒随水解的加深先减小后增大,与其乳化稳定性的变化趋势一致;红外光谱表明嗜酸乳杆菌胞壁蛋白酶的限制性酶解改变了酪蛋白各种构象所占的比例,酪蛋白二级结构发生了不同程度的变化。

3.3 通过以上分析得出嗜酸乳杆菌胞壁蛋白酶酶解能有效改善牛奶酪蛋白的结构及功能特性,对于缓解乳糖不耐症、调节人体肠胃健康、降血压、抗氧化等具有一定的作用,为下一步乳源性功能多肽的开发提供理论依据,更好地应用于功能性食品产业。

参考文献

- [1] Sadat-Mekmene L, Genay M, Atlan D, et al. Original features of cell-envelope proteinases of *Lactobacillus helveticus*. A review [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 146: 1-13
- [2] Jiang Z M, Tian B, Huo G C, et al. Production, analysis and in vivo evaluation of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from bovine casein [J]. *Food Chemistry*, 2010, 123: 779-786
- [3] 闭秋华, 宫霞, 白文娟, 等. 酶解水牛奶酪蛋白制备抗氧化活性肽工艺的研究 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(12): 309-313
- [4] Bi Q H, Gong X, Bai W J, et al. Study on preparation of antioxidant peptides derived from buffalo casein by enzyme hydrolysis technology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(12): 309-313
- [5] 单媛媛, 马美湖, 黄茜, 等. 红外光谱法研究温度变化对卵粘蛋白构象的影响 [J]. *高等学校化学学报*, 2012, 33(9): 1950-1956
- [6] Shan Y Y, Ma M H, Huang X, et al. Infrared Spectroscopy Analysis of Structural Changes of Ovornucien as Induced by Temperature [J]. *Chemical Journal Of Chinese Universities*, 2012, 33(9): 1950-1956
- [7] Zhao G L, Liu Y, Zhao M M, et al. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127: 1438-1443
- [8] 吴姣, 郑为完, 赵伟学, 等. 有限酶解米渣蛋白的乳化功能特性表征 [J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(10): 23-26
- [9] Wu J, Zheng W W, Zhao W X, et al. Emulsification Characteristics of Rice Residues Protein with Limited Enzymatic Hydrolyzed [J]. *Food And Fermentation Industries*, 2007, 33(10): 23-26
- [10] 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: 19-23
- [11] Liu Z D, Guo B H, Qu Y H, et al. Antioxidant Activity of Hydrolysates of Casein [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2008, 20: 19-23
- [12] Sheih I C, Fang T J, Wub T K. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste [J]. *Food Chemistry*, 2009, 115: 279-284
- [13] 管军军, 裘爱冰, 周瑞宝. 提高大豆分离蛋白乳化性及乳化稳定性的研究 [J]. *中国油脂*, 2003, 28(11): 38-42
- [14] Guan J J, Qiu A Y, Zhou R B. Improvement of Emulsifying and Emulsion-stabilizing Properties of Soybean Protein Isolate [J]. *China Oils And Fats*, 2003, 28(11): 38-42
- [15] 郑喜群, 刘文丽, 刘晓兰, 等. 酶解条件对玉米浸泡水蛋白水解液物性的影响 [J]. *食品工业科技*, 2010, 31(7): 128-131
- [16] Zheng X Q, Liu W L, Liu X L, et al. Effect of hydrolysis conditions on functional properties of com steep water protein hydrolysates [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(7): 128-131
- [17] 卢蓉蓉, 李玉美, 高乾, 等. 以乳清蛋白为基质的脂肪替代品的微粒化研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(9): 39-42
- [18] Lu R R, Li Y M, Gao Q, et al. Microparticulation of Fat Replacers Based on Whey Protein [J]. *Food And Fermentation Industries*, 2006, 32(9): 39-42
- [19] Wang C, Jiang L, Wei D, et al. Effect of Secondary Structure determined by FTIR Spectra on Surface Hydrophobicity of Soybean Protein Isolate [J]. *Engineering*, 2011, 15: 4819-4827
- [20] Eslahi N, Dadashian F, Nejad N H. Optimization of enzymatic hydrolysis of wool fibers for nanoparticles production using response surface methodology [J]. *Advanced Powder Technology*, 2013, 24: 416-426
- [21] 胡志和, 关玉霞. 超高压处理对乳酪蛋白加工特性的影响 [J].

乳业科学与技术,2012,35(6):9-13

Hu Z H, Guan Y X. Effect of Ultra High Pressure Treatment on Processing Properties of Casein [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2012, 35(6): 9-13

[15] Stressler T, Eisele T, Fischer L. Simultaneous monitoring of twelve angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides during enzymatic β -casein hydrolysis using Lactobacillus peptidases [J]. International Dairy Journal, 2013, 30: 96-102

