

酪蛋白水解物的类蛋白反应修饰产物的分离纯化及其抗氧化活性研究

戚莉佳¹, 庞佳楠¹, 马春敏¹, 陈芳芳¹, 李铁晶²

(1. 东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150030)(2. 辽宁大学轻工学院, 辽宁沈阳 110000)

摘要: 本文采用木瓜蛋白酶在 pH 6.5 的条件下对酪蛋白进行水解 2 h, 水解产物测得 DPPH 35.89%±0.13%, 超氧阴离子清除能力为 21.39%±0.33%, 还原能力为 53.00%±2.00%。分别导入 Tyr、Phe 和 Try 对水解产物进行修饰, 结果表明类蛋白反应时间为 6 h 时, 三种产物的抗氧化性最高, 其中 Try 修饰产物抗氧化性最好, 测得 DPPH、超氧阴离子清除能力、还原能力分别 46.84%±1.16%、34.10%±0.32%、70.00%±2% ($p<0.05$)。随后, 将 Try 修饰下的产物进行分离纯化, 使用装有 G-15 葡聚糖凝胶的色谱柱, 水为洗脱液, 上样浓度为 20 mg/mL, 流速为 0.5 mL/min, 洗脱效果最佳, 得到三个峰, 分别测定其抗氧化性, 结果表明峰二的抗氧化性最好, 测得 DPPH、超氧阴离子清除能力、还原能力分别为 58.46%±0.57%、38.42%±0.47%和 80.00%±0.02% ($p<0.05$)。将峰二产物通过液相色谱进一步分离鉴定, 得到单一峰, 证明蛋白纯化下的产物纯度较高。最后, 得到了高纯度的抗氧化肽。

关键词: 抗氧化活性; 酪蛋白水解; 类蛋白反应; 分离纯化

文章编号: 1673-9078(2017)5-91-96

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.015

Separation and Purification of Modified Casein Hydrolysates Using Plastein Reaction and Their Antioxidant Activities

QI Li-jia¹, PANG Jia-nan¹, MA Chun-min¹, CHEN Fang-fang¹, LI Tie-jing²

(1. Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

(2. College of Light Industry, Liaoning University, Shenyang 110000, China)

Abstract: Casein was hydrolyzed with papain at pH 6.5 for two hours, and the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging capacity, superoxide anion scavenging capacity, and reducing power of the hydrolysis product (CH) were measured and found to be 35.89%±0.13%, 21.39%±0.33%, and 53.00%±2.00%, respectively. Subsequently, phenylalanine (PHE), tyrosine (TYR), and tryptophan (TRY) were used to modify the casein hydrolysate, respectively. The results showed that the antioxidant activities of the three products (CHPHE, CHTYR, and CHTRY) were highest when the plastein reaction time was six hours. Among them, the highest antioxidant activity was found in CHTRY, whose DPPH radical scavenging capacity, superoxide anion scavenging capacity, and reducing power were 46.84%±1.16%, 34.10%±0.32%, and 70.00%±2%, respectively ($p<0.05$). CHTRY was separated and purified using a Sephadex G-15 column, and the optimal elution result was obtained when deionized water was used as the elution solution, the concentration of loaded sample was 20 mg/mL, and the flow rate was 0.5 mL/min. Three peaks (P1, P2, and P3) were obtained, and their antioxidant activities were determined. The results showed that P2 had the highest antioxidant activity and its DPPH radical scavenging capacity, superoxide anion scavenging capacity, and reducing power were 58.46%±0.57%, 38.42%±0.47%, and 80.00%±0.02% ($p<0.05$), respectively. The P2 product was further separated and identified by liquid chromatography, and a single peak was obtained, confirming a relatively high purity of the product. Finally, antioxidant peptides with a high purity were obtained.

Key words: antioxidant activity; hydrolysis of casein; plastein reaction; separation and purification

人体代谢或外界环境接触过程中, 会在人体内产

收稿日期: 2016-09-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201337)

作者简介: 戚莉佳 (1991-) 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程

通讯作者: 李铁晶 (1973-) 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品化学

与营养

生大量的自由基, 这些自由基攻击生物大分子, 如蛋白质、不饱和脂肪酸和核酸, 相应地导致细胞或组织氧化损伤甚至导致基因突变。人体内的过量自由基会引起氧化应激, 从而破坏体内的氧化还原平衡, 引起多种慢性病, 包括动脉硬化、心血管疾病在内的疾病, 神经退行性疾病、癌症和衰老等^[1]。因此, 自由基已

成为影响人类健康的罪魁祸首。为了清除多余自由基,在人体内保持平衡稳态,以及完成疾病的预防和治疗,饮食中抗氧化剂的摄入是必要的。目前,食品加工中主要应用人工合成的抗氧化剂有丁基羟基甲苯(BHT)、丁基羟基茴香醚(BHA)、叔丁基对苯二酚(TBHQ)等,但合成抗氧化剂是具有一定潜在健康危害^[2]。因此,天然的抗氧化剂成为第一选择,对天然抗氧化剂进行适当修饰提纯,得到高抗氧化活性的产物,从而应用于食品中。

类蛋白反应是1902年在蛋白水解液中添加凝乳酶导致沉淀产生发现的。蛋白酶不仅能催化蛋白质水解产生分子质量比初始底物低的水解产物,而且高质量浓度的蛋白质水解产物和蛋白酶相互作用还能形成不溶于水的产物和凝胶型的产物,形成具体需要3步:1)在酶的最适pH值下水解低质量浓度蛋白得到适当水解度的水解产物;2)将水解产物浓缩;3)加入与水解过程相同的酶或不同的酶,在高浓度(30~50)×10⁻²g/mL底物下进行反应^[3,4]。赵新淮等人利用类蛋白反应修饰酪蛋白水解产物从而提高抗氧化活性^[5]。

近些年来,通过蛋白水解作用来源抗氧化肽研究较多,Y. Ren等研究鸡蛋蛋白水解物的抗氧化活性很高^[6]。Wang B.等人通过蛋白水解分离纯化等处理手段得到了高纯度新型抗氧化肽^[7]。Wiriaphan C.等人通过蛋白质水解作用得到了高活性抗氧化肽^[8]。牛乳中酪蛋白含量80%以上,酪蛋白经过生物酶水解可以促进消化、内分泌、免疫、神经和营养等生物过程发生应答反应。此外,酪蛋白水解物中的活性肽具有降压、催眠、矿物结合、抗血栓、抗菌、免疫调节和抗氧化活性等作用^[9-11]。

本文采用木瓜蛋白酶水解酪蛋白,利用类蛋白反应,分离纯化等处理方法提高抗氧化肽的抗氧化性,得到的高活性的抗氧化肽对食品生产加工具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要实验试剂

酪蛋白,北京奥博星生物技术有限公司;木瓜蛋白酶,诺维信公司提供;L-苯丙氨酸甲醋酸盐、L-酪氨酸甲醋酸盐、L-色氨酸甲醋酸盐,阿拉丁试剂股份有限公司提供;Sephadex G-15 Medium, Biotopped,北京博奥拓达科技有限公司提供;超纯水,娃哈哈公司提供;乙腈,甲醇,天津市博迪化工有限公司;TFA,天津市博迪化工有限公司;DPPH, Sigma

公司;邻苯三酚,天津市博迪化工有限公司;铁氰化钾,天津市博迪化工有限公司;其它的试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

DELTA 320型pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司提供;LG-21M高速冷冻离心机,上海市离心机械研究所提供;LGJ-1型冷冻干燥机,老日光冷冻工业股份有限公司提供;Model 680酶标仪,美国BIO-RAD公司提供;UV-2401PC紫外可见分光光度计,日本岛津公司提供;蛋白纯化仪、1.0×70cm层析柱,上海华美实验仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 酪蛋白的水解

制备浓度为5%的酪蛋白溶液作为水解底物,水解前将pH调至6.5,加入木瓜蛋白酶水解2h,水解结束调节水解液pH至4.6,灭酶。收集上清液进行-20℃预冻处理,再使用冻干机进行冷冻干燥,收集样品,测定抗氧化活性,样品-20℃保存备用。

1.2.2 类蛋白修饰产物的制备

李亚云等人已有的类蛋白反应条件下略有改动^[3],以50%酪蛋白水解物作为反应底物,酪氨酸、苯丙氨酸或色氨酸添加与水解物游离氨基比都为0.74mol/mol,30℃条件下分别反应5h、6h和7h。-20℃预冻处理,再使用冻干机进行冷冻干燥,收集样品,测定抗氧化活性,综合比较抗氧化活性较高的类蛋白反应产物进行大量制样,制备样品-20℃保存备用。

1.2.3 游离氨基的测定

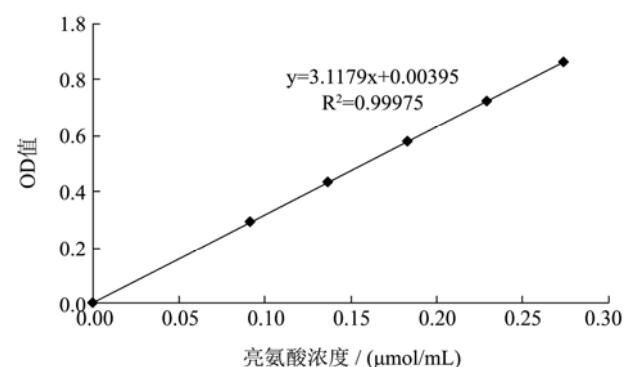


图1 亮氨酸标准曲线

Fig.1 Leucine standard curve

邻苯二甲醛法(OPA)^[12],OPA浓度为80mg/mL,2g十二烷基磺酸钠(SDS),pH9.5硼酸缓冲液(0.4mol/L)。取出OPA溶液1mL加入到SDS溶液中,再加入20μL的β-巯基乙醇,用硼酸缓冲液定容至100mL。亮氨酸标准溶液配成不同浓度溶液(0、12、18、24、30、36μg/mL)。取3mL标准液与3mLOPA试

剂混合, 反应 5 min, 340 nm 测定吸光值。标准曲线通过亮氨酸标准液的浓度与 340 nm 处所得的吸光值的关系绘制 (如表 1)。

表 1 不同浓度亮氨酸溶液的配制

Table 1 Preparation of different concentrations of leucine solutions

试剂	容量瓶编号					
	1	2	3	4	5	6
蒸馏水/mL	100	98	97	96	95	94
600 μg/mL 亮氨酸/mL	0	2	3	4	5	6
亮氨酸终浓度/(μg/mL)	0	12	18	24	30	36

将样品溶液稀释一定倍数后, 按上述方法测其吸光值, 根据所得标准曲线计算样品溶液中的游离氨基酸含量。

1.2.4 葡聚糖凝胶色谱分离

将抗氧化活性最高的类蛋白反应产物配制成 20 mg/mL 的溶液, 溶液过水系滤膜 (0.45 μm) 进样到已平衡好的 G-15 葡聚糖凝胶色谱柱中 (1.0×70 cm), 上样量 1 mL, 检测波长为 280 nm, 超纯水作为洗脱液, 以流速 0.5 mL/min 进行洗脱。收集各个峰所得的纯化产物。将所收集的产物分别进行抗氧化活性测定 (DPPH、超氧阴离子清除能力和还原能力), 综合分析比较各个组分的抗氧化活性, 将抗氧化活性最高的峰进行大量制样, 冻干保存, 进行后续实验。

1.2.5 液相色谱 (HPLC) 检测

将纯化后的抗氧化肽 (分离纯化后的类蛋白反应产物) 配制成浓度为 10 mg/mL 的溶液, 配制好的溶液过水系滤膜 (0.45 μm) 再进样到平衡好的色谱级 C18 色谱柱中, 进样量 10 μL, 0.1% TFA (20%) 与分析级乙腈 (80%) 为洗脱液, 检测流速为 0.5 mL/min。上述液相条件不变, 将流动相乙腈换成流动相甲醇作为洗脱液, 对抗氧化肽进行分析检测其纯度。

1.2.6 抗氧化性的测定

1.2.6.1 DPPH 自由基清除力

DPPH 自由基清除能力的测定是根据 Fukumoto 和 Mazza 的方法^[13], 将配置好的待测溶液 (1 mg/mL) 4 mL 与 200 μmol/L 的 DPPH 溶液 1 mL 混合, 避光下反应 30 min, 反应结束后与 517 nm 处检测吸光值, 以无水乙醇作为空白对照。计算公式:

$$\text{DPPH 自由基清除率 (\%)} = \left[\frac{A_{517\text{空白}} - A_{517\text{样品}}}{A_{517\text{空白}}} \right] \times 100$$

1.2.6.2 超氧阴离子清除能力

$$\text{超氧阴离子清除活性 (\%)} = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_1}{\Delta A_0} \times 100$$

配置 10 mmol/L 邻苯三酚溶液, 样品稀释后, 取

1 mL 与 50 mmol/L 三羟甲基甲烷-盐酸缓冲液 (pH 8.2) 1.8 mL 混合。25 °C 恒温反应 10 min, 加入 0.1 mL 邻苯三酚溶液。于 320 nm 处测定吸光值, 测定时每 0.5 min 读数一次, 到 4 min 为止。所得数值绘成吸收率曲线, 下式中 ΔA_1 : 曲线斜率, ΔA_0 : 1 mL 去离子水为空白样值。

1.2.6.3 还原能力

磷酸钠缓冲液 (pH 6.6), 1% 的铁氰化钾溶液, 样品浓度为 2 mg/mL, 上述溶液各取 2 mL, 恒温水浴 (50 °C) 反应 30 min, 反应后冷却至室温, 再加入 2 mL、10% 的三氯乙酸, 放入离心机内, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 mL 加入 2 mL 蒸馏水、0.4 mL、0.1% 氯化铁后混合均匀, 反应 10 min, 于 700 nm 处测定吸光度。所测吸光值越大, 表明样品还原能力越强^[14]。

1.3 数据统计分析

采用 Excel 2003 软件进行实验数据处理, 以平均值±标准差形式表示。利用 SPSS17.0 软件单因素方差分析及 Duncan 多重比较分析, $p < 0.05$ 认为差异明显。

2 结果与讨论

2.1 类蛋白反应产物的抗氧化活性的测定

酪蛋白经过木瓜蛋白酶水解的产物一般为分子量较小的多肽, 以反应体系游离氨基减少量判定类蛋白反应的发生。分别探究三种修饰产物 (修饰产物 1: 苯丙氨酸修饰产物; 修饰产物 2: 酪氨酸修饰产物; 修饰产物 3: 色氨酸修饰产物) 在 5 h, 6 h 和 7 h 游离氨基酸减少量以及各个修饰产物的抗氧化活性, 如表 2 (反应时间为 5 h), 如表 3 (反应时间为 6 h), 如表 4 (反应时间为 7 h)。

由表 2 可以看出, 在反应时间为 5 h 时, 修饰产物 1 与修饰产物 2 的抗氧化活性相当, 没有显著性差异 ($p > 0.05$), 但都低于修饰产物 3 的抗氧化活性 ($p < 0.05$)。由表 3 可以得出抗氧化活性: 修饰产物 3 > 修饰产物 2 > 修饰产物 1。由表 2、表 3 和表 4 综合可以看出在反应时间为 5 h、6 h 和 7 h 时类蛋白反应修饰产物的抗氧化活性比水解产物抗氧化活性有显著性提高 ($p < 0.05$), 且修饰产物 3 > 修饰产物 2 > 修饰产物 1。5 h~6 h, 随着反应时间变化, 修饰产物 3、修饰产物 2 和修饰产物 1 的抗氧化活性均有不同程度的提升, 7 h 时修饰产物 3、修饰产物 2 和修饰产物 1 抗氧化活性趋于稳定或略有降低。同时, 从游离氨基的减少量上来看, 游离氨基的减少量越多, 产物的抗氧

化性越高。综合表 2、表 3 和表 4 进行分析抗氧化活
性进行分析, 6 h 的修饰产物 3 分别比 5 h 和 7 h 修饰

产物 3 的抗氧化活性有显著性提高 ($p < 0.05$), 即选用
6 h 修饰产物 3 为分离纯化步骤的原料。

表 2 类蛋白反应 5 h 的抗氧化活性

Table 2 Antioxidant activity of the products after the plastein reaction proceeded for five hours

	游离氨基减少量/($\mu\text{mol/g}$)	DPPH 清除活性/%	超氧阴离子清除活性/%	还原能力
酪蛋白水解物	0	35.89 \pm 0.13 ^a	21.39 \pm 0.33 ^a	0.53 \pm 0.02 ^a
修饰产物 1	221.52 \pm 7.18	37.58 \pm 0.60 ^{ab}	24.61 \pm 0.87 ^b	0.57 \pm 0.02 ^{ab}
修饰产物 2	240.12 \pm 8.22	38.82 \pm 0.14 ^b	24.61 \pm 0.23 ^b	0.55 \pm 0.01 ^{ab}
修饰产物 3	305.12 \pm 10.86	44.24 \pm 0.35 ^c	25.13 \pm 0.49 ^b	0.56 \pm 0.02 ^b

表 3 类蛋白反应 6 h 的抗氧化活性

Table 3 Antioxidant activity of the products after the plastein reaction proceeded for six hours

	游离氨基减少量/($\mu\text{mol/g}$)	DPPH 清除活性/%	超氧阴离子清除活性/%	还原能力
酪蛋白水解物	0	35.89 \pm 0.13 ^a	21.39 \pm 0.33 ^a	0.53 \pm 0.02 ^a
修饰产物 1	227.72 \pm 8.12	38.71 \pm 0.23 ^b	28.32 \pm 0.23 ^b	0.58 \pm 0.01 ^b
修饰产物 2	242.33 \pm 10.32	39.01 \pm 0.34 ^b	33.53 \pm 0.09 ^b	0.62 \pm 0.01 ^b
修饰产物 3	321.12 \pm 10.42	46.84 \pm 1.16 ^c	34.10 \pm 0.32 ^c	0.70 \pm 0.02 ^b

表 4 类蛋白反应 7 h 的抗氧化活性

Table 4 Antioxidant activity of the products after the plastein reaction proceeded for seven hours

	游离氨基减少量/($\mu\text{mol/g}$)	DPPH 清除活性/%	超氧阴离子清除活性/%	还原能力
酪蛋白水解物	0	35.89 \pm 0.23 ^a	21.39 \pm 0.33 ^a	0.53 \pm 0.02 ^a
修饰产物 1	227.52 \pm 9.32	38.71 \pm 0.96 ^b	27.77 \pm 0.74 ^b	0.54 \pm 0.01 ^a
修饰产物 2	240.12 \pm 12.32	38.80 \pm 0.70 ^b	29.66 \pm 0.89 ^c	0.62 \pm 0.02 ^b
修饰产物 3	310.32 \pm 10.42	44.13 \pm 0.64 ^c	33.10 \pm 0.33 ^d	0.64 \pm 0.01 ^b

注: 采用 Duncan's multiple range test 方法分析。同一列不同字母表示组间分析结果差异性显著 ($p < 0.05$)。实验结果表示为平均值 \pm 标准偏差。测定 DPPH 自由基清除能力和超氧阴离子清除活性样品蛋白质含量为 1 mg/mL, 测定还原能力时样品蛋白质含量分别为 5 mg/mL。

2.2 修饰产物的分离纯化

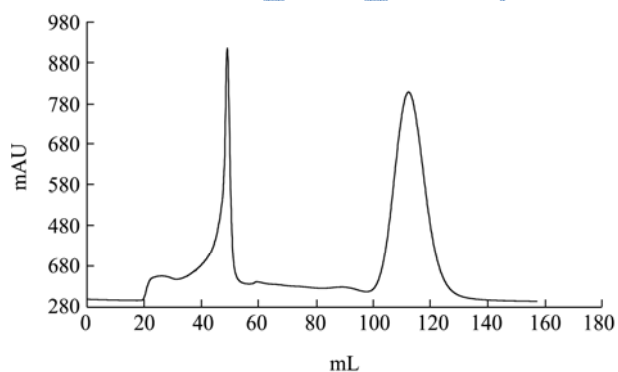


图 2 色氨酸修饰产物蛋白纯化图

Fig.2 Purification of CHTRY

注: 从左到右依次为 P1、P2 和 P3。

在 280 nm 波长下进行检测, 上样浓度为 20 mg/mL, 以超纯水作为洗脱液, 流速为 0.5 mL/min 的条件下, 得出的抗氧化肽分离纯化如图 2 所示, 一共收集三个峰, 分别为 P1、P2 和 P3。

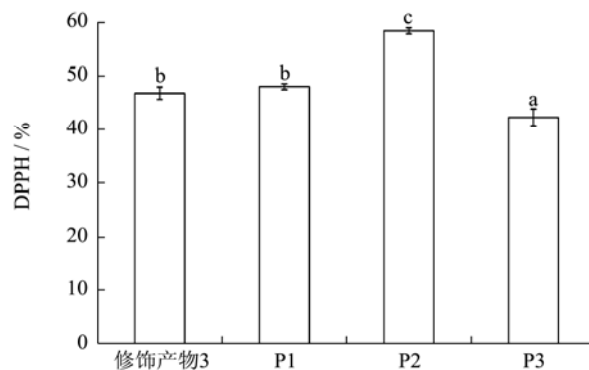


图 3 DPPH 自由基清除能力

Fig.3 DPPH free radical scavenging ability

经过分离纯化处理后所得产物抗氧化活性 (DPPH 自由基清除力如图 3; 超氧阴离子清除能力如图 4; 还原能力如图 5 所示), 由图 3、4 和 5 分别可以看出 P2 产物的 DPPH 自由基清除能力、超氧阴离子清除能力、还原能力与修饰产物 3 的 DPPH 自由基清除能力、超氧阴离子清除能力、还原能力相比有显著性提高 ($p < 0.05$); 而 P1 产物的抗氧化活性与修饰产物 3 的抗氧化活性相当, 没有明显升高或降低

($p>0.05$); P3 产物的抗氧化活性相比于修饰产物 3 有显著性降低 ($p<0.05$)。

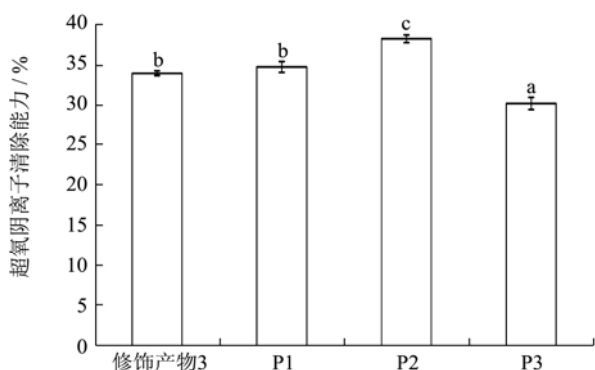


图 4 超氧阴离子清除能力

Fig.4 Superoxide anion scavenging capacity

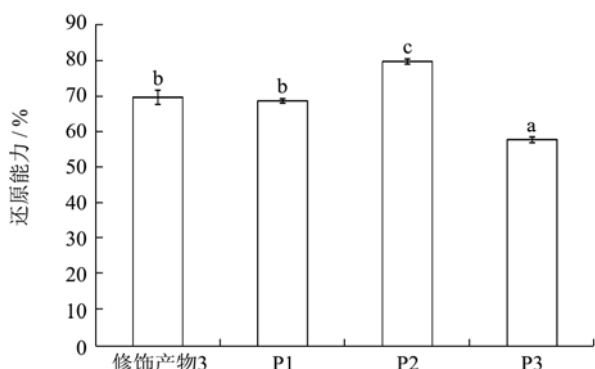


图 5 还原能力

Fig.5 Reducing power

2.3 HPLC 分析

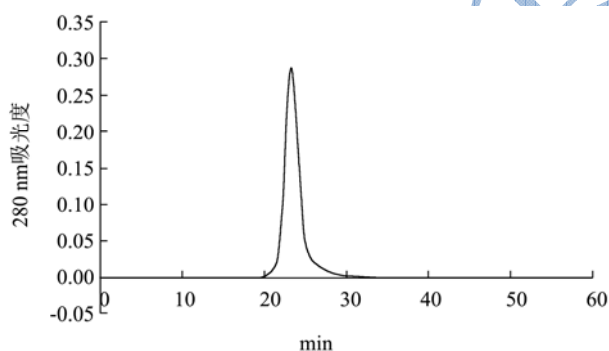


图 6 乙腈为流动相的 HPLC 图谱

Fig.6 HPLC chromatogram with acetonitrile as mobile phase

根据 1.2.5 方法使用 C18 色谱柱(可分离多种化合物)在 280 nm 波长下进行液相监测分析。如图 6 所示,由乙腈和 TFA 作为流动相分析得到的色谱图,由检测图可以看出,乙腈(80%)和 TFA(0.1%, 20%)作为流动相,对分离纯化所得的 P2 产物进行鉴定,所得抗氧化肽纯度较高。如图 7 所示,以甲醇和 TFA(0.1%, 20%)作为流动相检测分离纯化所得的 P2 产物也得到单一峰,可以说明抗氧化肽纯度较高。综合通过使用

两种流动相 HPLC 分析检测结果图,当流动相不同时,分析检测结果都为单一峰,可以说明,分离纯化后所得到的 P2 产物的纯度较高。

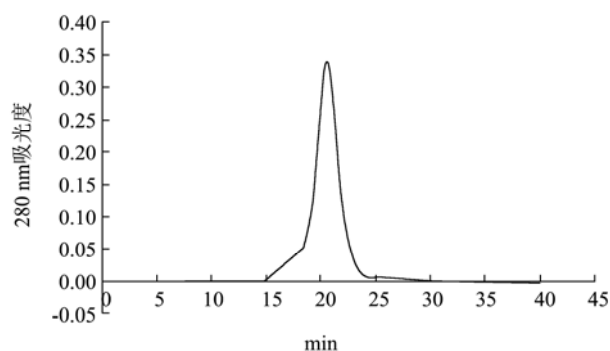


图 7 甲醇为流动相的 HPLC 图谱

Fig.7 HPLC chromatogram with methanol as mobile phase

3 结论

本研究考察了类蛋白反应产物经过分离纯化过程其抗氧化能力得到了提高。通过 DPPH 自由基清除力、超氧阴离子清除能力、还原能力等相关指标的测定,确定了三种氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸)类蛋白修饰产物的抗氧化活性。其中,色氨酸修饰产物的抗氧化活性相对较高。我们通过利用蛋白纯化仪对色氨酸修饰产物进行分离纯化、收集产物、抗氧化活性测定等最终确定了 P2 所得产物抗氧化活性最高,并且利用 HPLC(两类不同流动相条件下)对 P2 产物进行了进一步检测,最终得到单一峰,检测结果证明所得抗氧化肽纯度较高。本研究通过类蛋白及分离纯化等方法制得了纯度较高的抗氧化肽,为食品级高纯度抗氧化肽的制备提供了新的方法,为研制功能性食品提供了新的原料。

参考文献

- [1] Bougateg A, Nedjar-Arroume N, Laïla M, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella Aurita*) by-products proteins [J]. Food Chemistry, 2010, 118(3): 559-565
- [2] Samaranyka A G P, Li-Chan E C. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production assessment, and potential applications [J]. Journal of Functional Foods, 2011, 220(3): 229-254
- [3] LI Ya-yun, ZHAO Xin-huai. Enzymatic modification of casein hydrolysate and changes of ace inhibitory activity [J]. Food and Fermentation Industry, 2009, 35(5): 35-39
- [4] ZHAO X H, LI Y Y. An approach to improve ace inhibitory

- activity of casein hydrolysates with pepsin reaction catalyzed by alcalase [J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 229(5): 795-805
- [5] WU Dan, LI Tie-jing, ZHAO Xin-huai. Optimization of enzymatic modification of casein hydrolysate and improvement of antioxidant activity [J]. *Chinese Journal of Agricultural Machinery*, 2010, 41(1): 139-145
- [6] Y Ren H, WU X F, Li A. Two-step, one-pot enzymatic method for preparation of duck egg white protein hydrolysates with high antioxidant activity [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, 172(3): 1227-1240
- [7] WANG B, GONG Y D, Li Z R, et al. Isolation and characterisation of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smoothhound (*Mustelus Griseus*) muscle [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 196(6): 176-185
- [8] Wiriyaphan C, Chitsomboon B, Yongsawadigul J. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts [J]. *Food Chemistry*, 2014, 132(6): 104-111
- [9] WANG Q K, Li W, HE Y H, et al. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea alienwhanensis*) [J]. *Food Chemistry*, 2014, 145(15): 991-996
- [10] Guinane C M, Kent R M, Norberg S, et al. Generation of the antimicrobial peptide caseicin a from casein by hydrolysis with the rmo lysinenzymes [J]. *International Dairy Journal*, 2015, 49(10): 1-7
- [11] J Malinowski, M Klempt, I Clawin-Rädecker, et al. Identification of a NF κ B inhibitory peptide from tryptic β -casein hydrolysate [J]. *Food Chemistry*, 2015, 165(15): 129-133
- [12] Wong P Y Y, Kitts D D. Chemistry of buttermilk solid antioxidant activity [J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(3): 1541-1547
- [13] Spellman D, Mce Voy E, O'Cuinn G, et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis [J]. *International Dairy Journal*, 2003, 13(6): 447-453
- [14] Fukumoto L R, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(10): 3597-3604