

山羊乳酪蛋白酶解工艺研究

李志成^{1,2}, 蒋爱民¹, 岳田利², 栾广忠², 郭善广¹

(1 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642; 2 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 【目的】确定山羊乳酪蛋白的酶解工艺, 为制备山羊乳酪蛋白活性肽奠定基础。【方法】选用中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶, 采用对比和正交试验方法, 研究山羊乳酪蛋白单酶和复合酶的酶解工艺, 测定山羊乳酪蛋白的总肽键物质的量, 优选山羊乳酪蛋白的酶解工艺参数。【结果】山羊乳酪蛋白的总肽键物质的量为 8.537 9 mmol/g。单酶中, 胰蛋白酶和中性蛋白酶对山羊乳酪蛋白的水解度均较大, 木瓜蛋白酶次之, 碱性蛋白酶最小; 胰蛋白酶对山羊乳酪蛋白的水解度最高, 为 14.67%, 其适宜的酶解工艺为: 加酶量 2 500 U/g, pH 7.5, 50 °C 下酶解 2 h。复合蛋白酶中, 中性蛋白酶和胰蛋白酶复合及中性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶 3 酶复合时的水解度均较大, 2 种复合酶的水解度、平均肽链长度和平均相对分子量分别为 17.34%, 21.16%; 5.77, 4.73 和 692, 567。【结论】在最佳酶解工艺条件下, 单酶中, 胰蛋白酶和中性蛋白酶对山羊乳酪蛋白水解度均较大, 复合酶中, 中性蛋白酶、胰蛋白酶复合及中性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶 3 酶复合时的水解度均较大。

【关键词】 山羊乳酪蛋白; 酶解工艺; 蛋白酶; 工艺参数优化; 氨基酸氮含量

【中图分类号】 TS252.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)11-0062-07

Study on enzymolysis technology of goat's milk casein

LI Zhi-cheng^{1,2}, JIANG Ai-min¹, YUE Tian-li², LUAN Guang-zhong², GUO Shan-guang¹

(1 College of Food Science, South China Agriculture University, Guangzhou, Guangdong 510642, China;

2 College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】Enzymolysis technology of goat's milk casein(GMC) was studied in order to provide a theoretical foundation for the preparation of peptides derived from GMC. 【Method】GMC was hydrolyzed with its single and complex enzyme, single enzyme including neutral protease(N), trypsin(T), papain(P) and alkaline protease(A), and the content of amino nitrogen and total peptide bond amount of substance and degree of hydrolysis of GMC were determined to optimize enzymolysis technology parameter for GMC. 【Result】The total peptide bond amount of substance of GMC was 8.537 9 mmol/g. The degree of hydrolysis of trypsin and neutral protease for GMC was higher than that of papain, and that of alkaline protease was the lowest among single enzymes. The optimum enzymolysis technology of trypsin for GMC was hydrolyzed for two hours at 50 °C, enzyme dosage 2 500 U/g and pH 7.5. The degree of hydrolysis of complex enzyme consisting of neutral protease, trypsin and papain was higher than that of the complex enzyme consisting of neutral protease and trypsin among complex enzyme. And its degree of hydrolysis, average peptide chain length and their average relative molecular mass was 17.34%, 21.16%; 5.77, 4.73 and 692, 567 respectively. 【Conclusion】Under optimum enzymolysis conditions, the degree of hydrolysis of trypsin and neutral protease for GMC was higher than other protease among single enzymes, and the complex en-

* [收稿日期] 2009-03-03

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD04A11); 西北农林科技大学科研专项(07ZR005)

[作者简介] 李志成(1966—), 男, 陕西长武人, 副教授, 在读博士, 硕士生导师, 主要从事乳肉蛋加工研究。

E-mail: lzc20000@163.com

[通信作者] 蒋爱民(1957—), 男, 甘肃武威人, 教授, 博士生导师, 主要从事畜禽产品加工与质量安全控制研究。

E-mail: jiangqimin20000@163.com

zymes consisting of neutral protease, trypsin and papain, and consisting of neutral protease and trypsin were higher than that of other complex enzyme.

Key words: goat's milk casein(GMC); enzymolysis technology; protease; optimization of technology parameter; content of amino nitrogen

与牛奶相比,羊奶更接近人奶,也更适合各类人群饮用。因为羊奶的脂肪球体积是牛奶的 1/3,且中短链脂肪酸含量较高,更容易被人体消化吸收;羊奶中酪蛋白与乳清蛋白的比例(75:25)比牛奶(80:20)更接近人奶(60:40),羊奶蛋白凝块细而软,含有很少或不含 α_{s1} 酪蛋白,几乎无过敏风险,利于人体消化吸收;羊奶的矿物质和维生素含量大都高于牛奶,且富含上皮因子(EGF)等多种活性因子^[1-3]。但目前对羊奶及羊奶产品的研究开发却明显滞后于牛奶。

生物活性肽具有调节胃肠运动及免疫系统、抗高血压、抗菌、抗血栓、抗病毒、抗癌、抗氧化和促进矿物元素吸收等多种功能,是近年来研究的热点之一^[4-6]。研究发现很多生物活性肽的氨基酸序列与蛋白质活性部位相同^[7-8]。由此推测在营养蛋白的多肽链内部可能普遍存在着功能区,选择适当的蛋白酶水解这些多肽,将其释放出来,还原其功能特性,有可能制备多种生物活性肽。山羊乳酪蛋白(Goat's milk casein, GMC)和牛乳酪蛋白有本质的不同^[1]。目前,对牛乳酪蛋白来源的活性肽研究较多^[9-12],但对山羊乳酪蛋白来源的酪蛋白酶解及其活性肽研究比较鲜见。Trujillo 等^[13]、Vairo 等^[14]和 Sandra 等^[15]分别用小牛凝乳蛋白酶和来自植物的蛋白酶研究了山羊乳酪蛋白的蛋白质组分,表明山羊乳酪蛋白中 α_{s1} 含量很少。Lee 等^[16]利用胰蛋白酶、中性蛋白酶、蛋白酶 S 等单酶对山羊乳酪蛋白进行酶解,表明胰蛋白酶和蛋白酶 S 的水解度较大,但对羊乳酪蛋白系统的酶解工艺未见报道。本试验选用在接近中性条件下常用的胰蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶等 4 种蛋白酶,对山羊乳酪蛋白进行单酶和复合酶酶解,并用正交试验对山羊乳酪蛋白的酶解工艺进行优选,以期对山羊乳酪蛋白活性肽产品的研究与开发提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

鲜山羊乳,由西北农林科技大学畜牧场提供,为西农-萨能奶山羊所产 4 h 以内的鲜山羊乳。

生化试剂中性蛋白酶(简称为“N”,酶活 500 U/mg, pH 7.0, 适宜温度 45 ℃)、胰蛋白酶(简称为“T”,酶活 250 U/mg, pH 8.0, 适宜温度 50 ℃)、木瓜蛋白酶(简称为“P”,酶活 2 000 U/mg, pH 6.5, 适宜温度 50 ℃)和碱性蛋白酶(简称为“A”,酶活 10 000 U/g, pH 8.5, 适宜温度 45 ℃),均为日本 Amano Enzyme 公司产品。

盐酸、氢氧化钠、甲醛、醋酸、醋酸钠、浓硫酸等均均为分析纯,西安三浦精细化工厂产品。

1.2 主要仪器与amp;设备

瑞典 2300 全自动凯氏定氮仪,瑞典 FOSS 公司;PK121R 型冷冻离心机, SIM international CO. LTD; TGL-16G 高速台式离心机,上海安亭公司;PB-10 pH 计,德国 Sartorius 公司;DH 型恒温水浴锅,北京科伟永兴仪器有限公司;UV-1700 双光束紫外分光光度计,日本岛津公司。

1.3 试验方法

1.3.1 山羊乳酪蛋白的制备 取所需量的鲜山羊乳用 6 层纱布过滤除杂。4 ℃、5 000 r/min 离心 10 min 脱脂。用 2 mol/L HCl 溶液调节 pH 值为 4.6, 静止 30 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀用 pH 4.6 的醋酸-醋酸钠缓冲液洗涤 2 次, 3 000 r/min 离心 5 min, 所得沉淀物即为酪蛋白粗品, 经测定其蛋白含量为 183.40 g/kg。

1.3.2 山羊乳酪蛋白酶解液的制备 称取一定质量的酪蛋白粗品置于烧杯中,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液助溶,用蒸馏水定容至 500 mL,调节 pH 值,加入蛋白酶,酶解规定时间后,于 95 ℃灭酶 10 min,冷却,10 000 r/min 离心 15 min,去除酶及未被酶解的蛋白质等大分子物质备用。

1.3.3 山羊乳酪蛋白酶解工艺研究 (1)酶用量的确定。按照所选 4 种蛋白酶的给定温度、pH 值和 40 g/kg 的底物浓度,按 50, 100, 200, 300 和 400 U/g 加入碱性蛋白酶,按 500, 1 000, 2 000, 3 000, 4 000, 5 000 和 6 000 U/g 加入所选其他 3 种蛋白酶,酶解 2 h,以酶解液中氨基态氮含量为指标,确定各种蛋白酶的适宜用量。

(2)底物浓度的确定。根据 1.3.3 (1)试验结果,选用适宜酶用量,其他条件不变(下同),在底物

浓度分别为 40, 60, 80, 100 和 120 g/kg 时进行酶解, 以酶解液中氨基态氮含量为指标, 确定适宜的底物浓度。

(3) pH 值的确定。选用适宜的酶用量和底物浓度, 分别在 pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 和 9.5 的条件下进行酶解, 其中碱性蛋白酶在 pH 5.5~9.5 条件下进行酶解, 其他 3 种蛋白酶在 pH 4.5~8.5 条件下进行酶解, 以酶解液中氨基态氮含量为指标, 确定各种酶适宜的 pH 值。

(4) 酶解温度的确定。选用适宜的酶用量、pH 值和底物浓度, 分别在 35, 40, 45, 50, 55, 60 和 65 °C 条件下酶解 2 h, 其中木瓜蛋白酶在 45~65 °C 条件下进行酶解, 其他 3 种蛋白酶在 35~55 °C 条件下进行酶解, 以酶解液中氨基态氮含量为指标, 确定各酶适宜的酶解温度。

(5) 酶解时间的确定。选用适宜的酶用量、pH 值、底物浓度和酶解温度, 分别酶解 30, 60, 90, 120, 150, 180 min, 其中胰蛋白酶在 61~180 min 条件下进行酶解, 其他 3 种蛋白酶在 30~150 min 条件下进行酶解, 以酶解液中氨基态氮含量为指标, 确定适宜的酶解时间。

(6) 单酶酶解条件的优化。以 80 g/kg 羊奶酪蛋白水溶液为底物, 以酶用量、酶解温度、pH 值、酶解时间为主要因素, 各自选择 3 个水平, 采用 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验, 酶解过程中以酶解液的氨基态氮含量为指标, 确定各蛋白酶酶解山羊乳酪蛋白的最优工艺条件。

(7) 复合酶的水解试验。按照正交试验的优化结果先进行第一种酶的水解, 然后灭酶; 再在第二、三种酶的最优水平下酶解, 进行复合酶的水解试验。

1.3.4 水解度的测定 精确称取 6.000 0 g 1.3.1 所得的酪蛋白粗品, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液助溶, 加入蒸馏水定至 100 mL, 用甲醛滴定法(pH 计法)^[17]测定其本身含有的游离氨基态氮物质的量。同时按照国家标准^[18]将山羊乳酪蛋白抽真空, 充氮气 2 次后再抽真空充氮气, 110 °C 水解 22 h, 测定其总氨基态氮物质的量^[19]。

设原料本身含有的游离氨基态氮物质的量或总氨基态氮物质的量为 ρ_i (mmol/g), 则:

$$\rho_i = C(V_1 - V_2) \times \text{稀释倍数} \times 1\,000/W. \quad (1)$$

式中: C 为标准碱液的浓度 (mol/L), 本试验中 C 为 0.044 7 mol/L; V_1 为样品消耗的标准碱液体积 (mL); V_2 为空白消耗的标准碱液体积 (mL); W 为酪蛋白的质量 (g)。

水解度 (DH) 的计算公式^[20]为:

$$DH/\% = \frac{\text{每克羊乳酪蛋白被水解肽键的物质的量}}{\text{每克羊乳酪蛋白总肽键的物质的量}} \times 100\% = \frac{B-C}{A-C} \times 100\%. \quad (2)$$

式中: A 为原料中总氨基态氮物质的量; B 为酶解液中氨基态氮物质的量; C 为水解前原料本身含有的氨基态氮物质的量。

由水解度 (DH) 可得平均肽链长度 (APCL) 及肽段平均相对分子量 (M_r) 的计算公式为:

$$APCL = 1/DH, \quad (3)$$

$$M_r = \text{平均肽链长度} \times 120. \quad (4)$$

1.3.5 蛋白质含量的测定 参考文献^[21]的方法进行前处理后, 采用全自动凯氏定氮仪进行测定。

2 结果与分析

2.1 山羊乳酪蛋白及其水解液物质的量的测定

经测定, 山羊乳酪蛋白水解前游离氨基态氮物质的量为 0.580 9 mmol/g (牛乳为 0.45 mmol/g^[12]), 原料中总氨基态氮物质的量为 9.118 8 mmol/g, 总肽键物质的量为 8.537 9 mmol/g。

2.2 酶用量对山羊乳酪蛋白酶解液氨基态氮含量的影响

由图 1 可知, 4 种蛋白酶中, 胰蛋白酶和中性蛋白酶的氨基态氮含量均较高, 木瓜蛋白酶次之, 碱性蛋白酶最低。除碱性蛋白酶的氨基态氮含量随酶用量的变化不明显外, 其余 3 种酶氨基态氮含量随着酶用量的增加呈先增加后趋于稳定的趋势。中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶酶解山羊乳酪蛋白适宜的酶用量分别是 4 000, 3 000, 4 000 和 200 U/g。

2.3 底物浓度对山羊乳酪蛋白酶解液氨基态氮含量的影响

由图 2 可知, 胰蛋白酶和碱性蛋白酶酶解时, 随着底物浓度的增加, 其氨基态氮含量几乎均呈直线上升趋势, 但胰蛋白酶的变化较碱性蛋白酶明显; 在所选底物浓度范围内, 中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的氨基态氮含量均呈先上升后降低的趋势, 符合米氏方程 (Michaelis-Menten equation), 其适宜的底物浓度为 80 g/kg。碱性蛋白酶和胰蛋白酶适宜的底物浓度大于 120 g/kg, 但考虑到酶解产物的黏度及后续处理, 如分离、冻干和活性测定等的可比性, 底物浓度均取 80 g/kg。

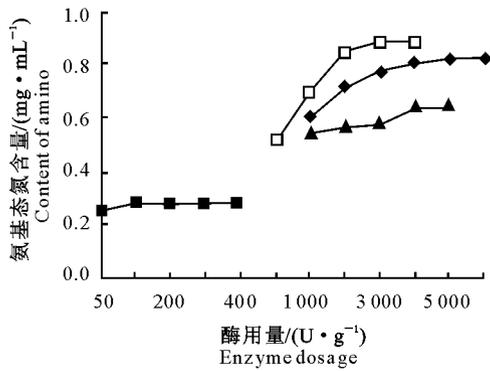


图 1 酶用量对 GMC 酶解液氨基态氮含量的影响

—◆—, 中性蛋白酶; —■—, 碱性蛋白酶;
—▲—, 木瓜蛋白酶; —□—, 胰蛋白酶

Fig. 1 Effect of enzyme dosage on content of amino nitrogen of hydrolysates derived from GMC

—◆—, Neutral protease; —■—, Alkaline protease;
—▲—, Papain; —□—, Trypsin

2.4 pH 值对山羊乳酪蛋白酶解液氨基态氮含量的影响

溶液的 pH 值会影响酶蛋白的构象和酶分子氨基酸侧链基团及底物分子的解离状态, 从而影响酶活及底物的溶解性。由图 3 可知, 中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的氨基态氮含量均呈先增加后降低的变化趋势, 4 种酶酶解山羊乳酪蛋白适宜的 pH 值分别为 7.5(N), 7.5(T), 6.5(P) 和 8.5(A)。

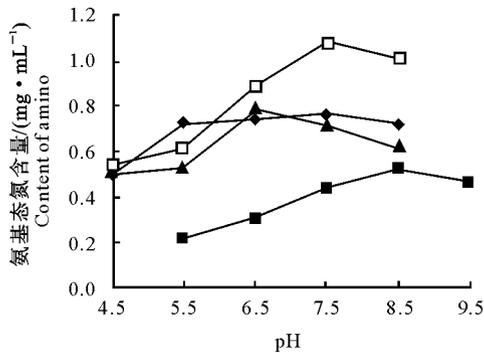


图 3 pH 对 GMC 酶解液氨基态氮含量的影响

—◆—, 中性蛋白酶; —■—, 碱性蛋白酶;
—▲—, 木瓜蛋白酶; —□—, 胰蛋白酶

Fig. 3 Effect of pH on content of amino nitrogen of hydrolysates derived from GMC

—◆—, Neutral protease; —■—, Alkaline protease;
—▲—, Papain; —□—, Trypsin

2.6 酶解时间对山羊乳酪蛋白酶解液氨基态氮含量的影响

由图 5 可以看出, 酶解初期, 酶量充足, 底物可断裂的肽键较多, 因此山羊乳酪蛋白酶解液中氨基态氮含量上升较快; 酶解 120 min 后, 酶解液中氨基

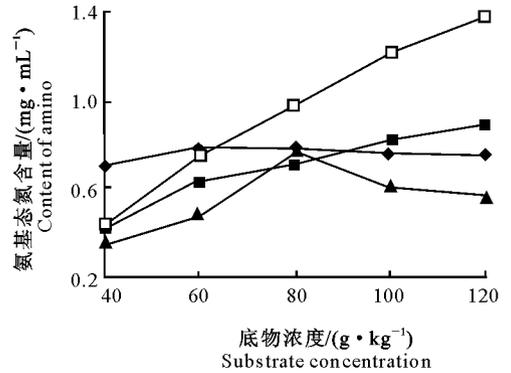


图 2 底物浓度对 GMC 酶解液氨基态氮含量的影响

—◆—, 中性蛋白酶; —■—, 碱性蛋白酶;
—▲—, 木瓜蛋白酶; —□—, 胰蛋白酶

Fig. 2 Effect of substrate concentration on content of amino nitrogen of hydrolysates derived from GMC

—◆—, Neutral protease; —■—, Alkaline protease;
—▲—, Papain; —□—, Trypsin

2.5 酶解温度对山羊乳酪蛋白酶解液氨基态氮含量的影响

温度能增加反应速度, 但也会使酶因热变性而失活。由图 4 可见, 不同的蛋白酶对温度的反应不同, 中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶酶解山羊乳酪蛋白的适宜温度分别为 50, 45, 60 和 45 °C。

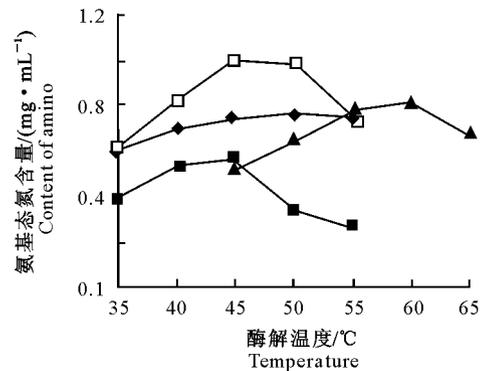


图 4 酶解温度对 GMC 酶解液氨基态氮含量的影响

—◆—, 中性蛋白酶; —■—, 碱性蛋白酶;
—▲—, 木瓜蛋白酶; —□—, 胰蛋白酶

Fig. 4 Effect of temperature on content of amino nitrogen of hydrolysates derived from GMC

—◆—, Neutral protease; —■—, Alkaline protease;
—▲—, Papain; —□—, Trypsin

态氮的含量增加趋缓, 且随着水解时间的延长, 氨基态氮含量增加不明显。因此, 中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶酶解山羊乳酪蛋白的适宜时间均为 2 h。

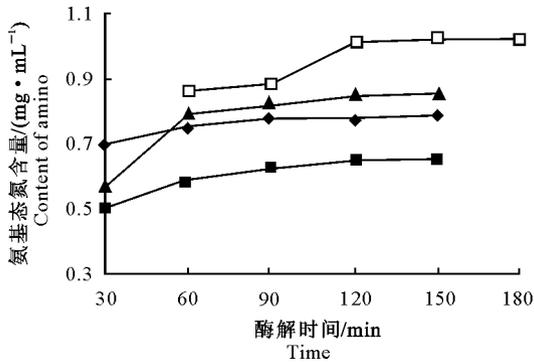


图 5 酶解时间对 GMC 酶解液氨基态氮含量的影响

—◆—, 中性蛋白酶; —■—, 碱性蛋白酶;
—▲—, 木瓜蛋白酶; —□—, 胰蛋白酶

Fig. 5 Effect of time on content of amino nitrogen of hydrolysates derived from GMC

—◆—, Neutral protease; —■—, Alkaline protease;
—▲—, Papain; —□—, Trypsin

2.7 山羊乳酪蛋白单酶酶解条件的优化

中性蛋白酶水解山羊乳酪蛋白的正交试验和极差分析结果见表 1。由表 1 的 R 值可知, B 和 D 因

素的极差较大, 即 pH 和酶解时间对山羊乳酪蛋白酶解液中氨基态氮含量的影响较大; 其次为 A 因素, 即酶解温度; 而 C 因素, 即酶用量的影响最小。

以酶用量为误差项, 对表 1 进行方差分析, 结果表明, pH、酶解时间和温度与酶用量相比差异显著 ($P < 0.05$), 中性蛋白酶水解山羊乳酪蛋白的最优工艺组合为 $A_2B_1C_3D_3$, 即酶解温度为 $50\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7.0, 酶用量 $4\ 000\ \text{U/g}$, 酶解时间 150 min。但该组合未在试验设计中, 因此取 4 号试验组合与 $A_2B_1C_3D_3$ 做验证试验, 结果表明, 二者酶解液中氨基态氮含量分别为 1.269 和 1.293 mg/mL, 说明 $A_2B_1C_3D_3$ 组合为中性蛋白酶水解山羊乳酪蛋白的最优工艺组合。经计算其水解度为 13.70%, 酶解液中平均肽链长度为 7.30, 平均相对分子量为 876。

同理可得到碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶的优化组合, 其验证试验结果如表 2 所示。由表 2 可知, 4 种单酶中, 中性蛋白酶和胰蛋白酶水解度较大, 木瓜蛋白酶次之, 碱性蛋白酶最小。

表 1 中性蛋白酶酶解山羊乳酪蛋白的正交试验结果与分析

Table 1 Result and analysis of orthogonal test of neutral protease for GMC

试验号 No.	A 酶解温度/ $^\circ\text{C}$ Temperature	B pH	C 酶用量/ $(\text{U} \cdot \text{g}^{-1})$ Enzyme dosage	D 酶解时间/min Time	氨基态氮含量/ $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ Content of amino nitrogen
1	1(45)	1(7.0)	1(3 000)	1(90)	0.700
2	1	2(7.5)	2(3 500)	2(120)	0.806
3	1	3(8.0)	3(4 000)	3(150)	0.740
4	2(50)	1	2	3	1.263
5	2	2	3	1	0.893
6	2	3	1	2	0.837
7	3(55)	1	3	2	1.160
8	3	2	1	3	1.126
9	3	3	2	1	0.686
K_1	2.246	3.123	2.663	2.279	8.311
K_2	2.993	2.825	2.755	2.803	
K_3	2.972	2.263	2.793	3.129	
k_1	0.748 7	1.041 0	0.887 7	0.759 7	
k_2	0.997 7	0.941 7	0.918 3	0.934 3	
k_3	0.990 7	0.754 3	0.931 0	1.043 0	
R	0.249 0	0.286 7	0.043 3	0.283 3	

表 2 4 种蛋白酶酶解山羊乳酪蛋白的酶解工艺优化及验证

Table 2 Optimization and verification of enzymolysis technology of four proteases for GMC

酶名称 Name of enzyme	优化工艺组合 Optimal technology combination				氨基态氮 含量/ $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$ Content of amino nitrogen	水解度/% Degree of hydrolysis	平均肽链长度 Average peptide length	平均相对分子量 Average relative molecular weight
	酶解温度/ $^\circ\text{C}$ Temperature	pH	酶用量/ $(\text{U} \cdot \text{g}^{-1})$ Enzyme dosage	酶解时间/min Time				
N	50	7.0	4 000	150	1.293 0	13.70	7.30	876
T	50	7.5	2 500	120	1.384 2	14.67	6.82	818
P	60	6.5	4 000	150	0.898 0	9.49	10.53	1 264
A	45	8.5	300	120	0.630 7	6.65	15.04	1 805

2.8 复合酶对山羊乳酪蛋白的水解

酶有很好的特异性,故单一酶的水解程度有限。为了考察中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶复合作用对山羊乳酪蛋白的酶解效果,将所选 4 种蛋白酶两两或 3 种酶复合对山羊乳酪蛋白进行水解,结果见图 6。由图 6 可知,复合酶水解时,山羊乳酪蛋白酶解液中氨基态氮含量较相应单一酶基本上有较大提高,尤其是中性蛋白酶和胰蛋白酶复合以及中性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶 3 种酶复合,其酶解液中氨基态氮含量分别达到 1.635 和 1.993 mg/mL。这 2 种复合酶的水解度、平均肽链长度和平均相对分子量分别为 17.34%, 21.16%; 5.77, 4.73 和 692,567。

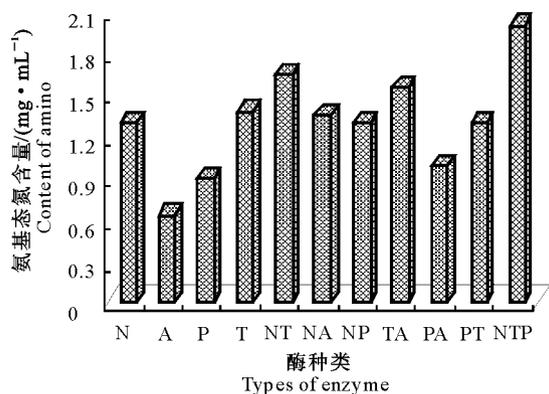


图 6 4 种蛋白酶及其组合对 GMC 酶解液氨基态氮含量的影响

Fig. 6 Effect of four proteases and their combinations on content of amino nitrogen of hydrolysates derived from GMC

3 讨论与结论

1) 不同蛋白酶对蛋白质的酶切位点不同。所选 4 种蛋白酶均为内肽酶,即将蛋白质酶解为肽、肽和肽。胰蛋白酶主要酶切由赖氨酸和精氨酸形成的肽键羧基端;木瓜蛋白酶主要作用于精氨酸、赖氨酸、苯丙氨酸的羧基端;碱性蛋白酶主要作用于缬氨酸、脯氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等疏水氨基酸的羧基端;中性蛋白酶的酶切位点较宽,水解亮氨酸和苯丙氨酸的氨基端及其他肽键^[22]。但单一蛋白酶的水解程度有限,蛋白酶复合后才能发挥其酶切互补作用从而提高水解度。水解度越大,说明蛋白质被酶切割的程度越大,酶切后肽链越短,平均相对分子量就越小。由于活性肽的功能与肽链的结构和平均相对分子量大小有关,通过酶解,测定酶解液中的氨基态氮含量,可以计算出水解度、平均肽链长度和平均相对分子量。Guo 等^[23]、Gómez-Estaca 等^[24]和 Zhu

等^[25]研究表明,抗氧化肽由 2~16 个氨基酸残基组成,相对分子量在 2 000 以下,而抗菌肽的相对分子量为 2 000~8 000^[26]。根据目标肽段的结构和分子量大小,选择合适的蛋白酶,调整酶解工艺参数,控制水解度就可以获得所需要的肽段。

2) 山羊乳酪蛋白的总肽键物质的量为 8.537 9 mmol/g,该数值高于牛乳物质的量 8.2 mmol/g^[17],原因可能是山羊乳酪蛋白本身游离氨基态氮物质的量较高等特性所决定的。总肽键物质的量测定为山羊乳酪蛋白水解度的计算带来极大方便。

3) 单酶中,中性蛋白酶和胰蛋白酶对山羊乳酪蛋白的水解度均较大,木瓜蛋白酶次之,碱性蛋白酶最小。胰蛋白酶的水解度较高,这与 Lee 等^[16]报道的趋势相同,但与其关于中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的报道相差较大。这可能与所选用酶的活性、用量及温度等不同有关。本试验结果表明,胰蛋白酶对山羊乳酪蛋白的水解度最高,其适宜的酶解工艺为酶用量 2 500 U/g, pH 7.5, 50 °C 下酶解 2 h,在此条件下水解度、平均肽链长度和平均相对分子量分别为 14.67%, 6.82 和 818。

4) 复合蛋白酶中,中性蛋白酶和胰蛋白酶复合及中性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶 3 种酶复合时的水解度均较大。这 2 种复合酶的水解度、平均肽链长度和平均相对分子量分别为 17.34%, 21.16%; 5.77, 4.73 和 692,567。实际应用时要根据目标活性肽的结构和分子量大小,选择合适的蛋白酶及其组合,并适当增加或减少酶解时间,以获得所需要的活性肽。

[参考文献]

- [1] 金世琳. 关于山羊奶的加工工艺若干问题:第三部分 [J]. 中国乳品工业, 1993, 21(4): 154-158.
Jin S L. Some problems for the processing technology of goat's milk; part three [J]. China Dairy Industry, 1993, 21(4): 154-158. (in Chinese)
- [2] Alferez M J M, Lopez-Aliaga I, Nestares T, et al. Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced ferroperenic anaemia in comparison with cow milk [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(7): 813-821.
- [3] Kondyli E, Katsiari M C, Voutsinas L P. Amino acid composition and nutritional value of goat milk from the indigenous Greek breed [J]. Milchwissenschaft, 2007, 62(2): 164-166.
- [4] 王秋韞, 庞广昌, 陈庆森. 免疫活性肽的研究进展与展望 [J]. 食品科学, 2002, 23(7): 136-139.
Wang Q Y, Pang G C, Chen Q S. Studies on the progress of the immunopeptide and its prospective [J]. Food Science, 2002, 23(7): 136-139. (in Chinese)

- [5] 陈贵堂,赵 霖.食物源生物活性肽及其营养生理价值 [J]. 中国临床营养杂志,2005,13(5):312-315.
Chen G T,Zhao L. Nutrition physiology of dietary bioactive peptides [J]. Chinese Journal of Clinical Nutrition, 2005, 13 (5):312-315. (in Chinese)
- [6] Yamamoto N,Ejiri M,Mizuno S. Biogenic peptides and their potential use [J]. Curr Pharma Design,2003,9(16):1345-1355.
- [7] Lahov E,Regelson W. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substance from milk: cascadin, isracidin peptide [J]. Food Chem Toxic,1996,34(1):131-145.
- [8] 王志超,安玉会.生物活性肽的研究进展 [J]. 河南医学研究,2004,13(4):353-356.
Wang Z C, An Y H. Research progress of biopeptides [J]. Henan Medical Research,2004,13(4):353-356. (in Chinese)
- [9] Oh J,Lee Y S. Hypolipidemic effects of peptide fractions of casein on serum lipids in rats fed normal or high fat diet [J]. J Korean Soc Food Sci Nutr,2002,31(2):263-270.
- [10] 王 政.酪蛋白酶促水解及其酶解物性质研究 [D]. 郑州:河南农业大学,2005.
Wang Z. Study on the enzymatic hydrolysis and properties of the enzymatic hydrolysate of casein [D]. Zhengzhou: Henan Agriculture University,2005. (in Chinese)
- [11] 董文斌,杨兆艳,胡献丽,等.动物蛋白生物活性肽的研究进展 [J]. 食品研究与开发,2004,25(5):66-69.
Dong W B, Yang Z Y, Hu X L, et al. Research advances of bioactive peptides derived from animal protein [J]. Food Research and Development,2004,25(5):66-69. (in Chinese)
- [12] Eriksen E K,Vegarud G E,Langsrud T, et al. Effect of milk proteins and their hydrolysates on *in vitro* immune responses [J]. Small Ruminant Research,2008,79(1):29-37.
- [13] Trujillo A J,Guamis B,Carretero C. Proteolysis of goat casein by calf rennet [J]. Int Dairy Journal,1997(7):579-588.
- [14] Vairo C S,Vairo C S,Claver,N P, et al. Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from silybum marianum flowers; Its action on bovine caseinate [J]. Journal of Dairy Research,2005,72:271-275.
- [15] Sandra V C, Sofia V S, Cecilia C. Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins brought about by aspartic peptidases from Silybum marianum flowers [J]. Food Chemistry, 2008, 106 (3):997-1003.
- [16] Lee K J, Kim S B, Ryu J S, et al. Separation and purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from goat's milk casein hydrolysates [J]. Asian-Aust J Anim Sci,2005,18(5):741-746.
- [17] 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.
Zhao X H, Feng Z B. Determination of degree of hydrolysis of protein hydrolysates [J]. Food Science,1994,15(11):65-67. (in Chinese)
- [18] 贾健斌,赵熙和.中华人民共和国国家标准 GB/T 5009.124—2003 食品中氨基酸的测定 [S]. 北京:中国标准出版社,2003.
Jia J B, Zhao X H. National standard of the People's Republic of China GB/T 5009.124—2003, Determination of amino acids in foods [S]. Beijing: China Standard Press, 2003. (in Chinese)
- [19] 余 勃,陆兆新.微生物发酵法产大豆多肽液水解度的测定 [J]. 食品科学,2005,26(4):104-107.
Yu B, Lu Z X. Determination of degree of hydrolysis of soybean peptides produced by microorganism fermentation [J]. Food Science,2005,26(4):104-107. (in Chinese)
- [20] Pena-Ramos E A, Xiong Y L. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system [J]. J Dairy Sci, 2001,84(12):2577-2583.
- [21] 张文德,李信荣,尹 璐,等.中华人民共和国国家标准 GB/T 5009.5—2003 食品中蛋白质的测定 [S]. 北京:中国标准出版社,2003.
Zhang W D, Li X R, Yin L, et al. National standard of the People's Republic of China GB/T 5009.5—2003, Determination of protein in foods [S]. Beijing: China Standard Press, 2003. (in Chinese)
- [22] 刘 欣.食品酶学 [M]. 北京:中国轻工业出版社,2007:51-64.
Liu X. Food enzymology [M]. Beijing: China Light Industry Press,2007:51-64. (in Chinese)
- [23] Guo H, Kouzuma Y, Yonekura M. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein [J]. Food Chemistry,2009,113:238-245.
- [24] Gómez-Estaca J, Giménez B, Montero P, et al. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin [J]. Journal of Food Engineering,2009,92(1):78-85.
- [25] Zhu K, Kanu P J, Claver I P, et al. Antioxidative properties and inhibition of soybean lipoxygenase activity of three kinds of cereal polypeptides [J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136:717-742.
- [26] 李海琴,李兴民.乳源抗菌肽的研究进展与展望 [J]. 食品科技,2005(5):32-35.
Li H Q, Li X M. Progresses and prospects of the research on milk-derived antimicrobial peptides [J]. Food Science and Technology,2005(5):32-35. (in Chinese)