

苯丙氨酸添加下酪蛋白类蛋白 反应修饰物的抗氧化性质

岳楠, 赵新淮*

(乳品科学教育部重点实验室, 东北农业大学, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:采用木瓜蛋白酶水解酪蛋白制备水解度为9.6%、DPPH·清除率为38.7%的水解物, 添加苯丙氨酸于水解物并利用响应面法优化木瓜蛋白酶催化的类蛋白反应条件。在反应时间固定为5h下得到适宜的条件为: 温度30℃、底物浓度50%(w/v)、酶添加量3kU/g蛋白质、氨基酸添加量0.74mol/mol水解物游离氨基。此条件下分别制备出5个修饰产物, 以不添加苯丙氨酸的修饰产物或水解物和苯丙氨酸混合物为对照, 评价它们的抗氧化活性。结果表明, 与酪蛋白水解物或混合物或不添加苯丙氨酸的修饰产物相比, 添加苯丙氨酸的修饰产物的DPPH·清除能力、还原能力和·OH清除能力显著提高; 但是抗氧化性质与所采用的氨基酸添加量、反应时间之间的关系不显著。

关键词:酪蛋白水解物, 苯丙氨酸, 木瓜蛋白酶, 类蛋白反应, 抗氧化活性

In vitro antioxidant activity of the casein hydrolysates modified by plastein reaction in the presence of phenylalanine

YUE Nan, ZHAO Xin-huai*

(Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Papain was used to hydrolyze casein to prepare casein hydrolysates with a degree of hydrolysis of 9.6% and a scavenging activity on DPPH· radical of 38.7%. Phenylalanine was added into the hydrolysates to carry out a plastein reaction catalyzed by papain. When reaction time was fixed at 5h, response surface method was used to optimize plastein reaction conditions, which were selected as follows: reaction temperature 30℃, substrate concentration of 50% (w/v), enzyme addition 3kU/g proteins, phenylalanine addition 0.74mol/mol free amino groups of the hydrolysates. Five modified casein hydrolysates were thus prepared and evaluated for their antioxidant properties, with the original casein hydrolysates, mixture of casein hydrolysates and phenylalanine, modified casein hydrolysates without phenylalanine addition as controls. The evaluation results showed that the modified casein hydrolysates had better antioxidant properties including scavenging activity on DPPH· radical or hydroxyl radical and reducing powder, compared to these controls. It was also found that the improved antioxidant properties of the modified casein hydrolysates were not related to the reaction time and phenylalanine addition applied in the preparation.

Key words: casein hydrolysates; phenylalanine; papain; plastein reaction; antioxidant activity

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)10-0099-05

对自由基的研究是生命科学中的重点领域, 研究发现机体的疾病和衰老等与自由基之间存在内在关系^[1-3]。蛋白质酶水解得到的抗氧化活性肽, 能有效地清除活性氧自由基^[4-5], 具有潜在的生理调节作用, 保护细胞和线粒体的正常结构和功能^[6]。因此, 抗氧化肽的研究成为当前的研究热点。类蛋白反应通常是指在一定条件下, 通过蛋白酶的催化作用将高浓

度的蛋白质水解物与蛋白酶一起加热处理, 生成一种类似高分子蛋白质物质的反应。通过类蛋白反应合成的类似蛋白质的物质, 可提高蛋白质的营养功能和加工特性, 提高蛋白产品的附加值, 满足食品工业对蛋白质的功能特性和营养价值日益提高的要求^[7-9]。已有研究表明, 蛋白质水解物的类蛋白反应可以提高其抗氧化性质^[10-11]; 酪氨酸的添加也可以改善酪蛋白类蛋白反应修饰产物的抗氧化性质^[12]。为此, 本研究通过木瓜蛋白酶水解酪蛋白制备出酪蛋白水解物, 然后添加苯丙氨酸并利用木瓜蛋白酶对水解物进行类蛋白反应修饰, 考察修饰产物的抗氧化性质变化, 揭示氨基酸添加对酪蛋白类蛋白修饰产物的

收稿日期: 2011-07-18 * 通讯联系人

作者简介: 岳楠(1986-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品科学。

基金项目: 国家自然科学基金(30972132); 黑龙江省高等学校科技创新团队建设计划项目(2010td11)。

抗氧化活性影响。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

酪蛋白 蛋白质含量86.1%,北京奥博星生物技术有限公司;木瓜蛋白酶 国药集团化学试剂有限公司,酶活力 $2.25 \times 10^4 \text{ U/g}$;1,1-二苯基-2-苦基苯肼(DPPH) Sigma公司;铁氰化钾 天津市博迪化工有限公司;苯丙氨酸甲酯盐酸盐、酪氨酸甲酯盐酸盐、 α -脱氧核糖 阿拉丁试剂股份有限公司;其他所有试剂 均为分析纯。

UV-2401PC型紫外可见分光光度计 日本岛津公司;AL204型分析天平、DELTA 320型精密pH计 梅特勒-托利多仪器中国有限公司;LGJ-1型真空冷冻干燥机 上海医用分析仪器厂;HZQ-F160型全温振荡培养箱 哈尔滨东联电子技术开发有限公司;DK-98-1型电热恒温水浴锅 天津市泰斯特仪器有限公司;LG-21M高速冷冻离心机 上海市离心机械研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 酪蛋白水解物的制备 配制浓度为5% (w/v)的酪蛋白溶液,调节pH至6.5,加入木瓜蛋白酶 1500 U/g 蛋白质, 45°C 恒温水浴中水解1~5h;水解结束时调节pH至4.6, 100°C 加热20min,然后 5000 r/min 离心20min,收集上清液。分别测定各上清液的蛋白质含量和游离氨基含量,计算其水解度与蛋白质收率;然后测定上清液对DPPH·自由基的清除能力。综合分析确定水解物的适宜制备条件,大批制备后真空冷冻干燥,于 -20°C 保藏。

1.2.2 酪蛋白水解物的类蛋白反应条件优化 采用中心组合实验,固定反应时间5h,通过测定反应体系的游离氨基含量减少量变化(底物游离氨基含量减去修饰产物游离氨基含量),利用响应面法对温度、底物浓度、酶添加量、氨基酸添加比例4个因素进行优化,其因素水平编码见表1,以选择适宜的修饰反应条件。反应结束后,修饰产物在沸水浴灭酶15min,冷却后测定游离氨基含量。

表1 响应面分析的因素水平编码表

因素	水平				
	-1.682	-1	0	+1	+1.682
X_1 反应温度($^\circ\text{C}$)	13.2	20	30	40	46.8
X_2 底物浓度(% w/w)	23.2	30	40	50	56.8
X_3 酶添加量(U/g 蛋白质)	318	1000	2000	3000	3682
X_4 氨基酸添加量 (mol/mol水解物游离氨基)	0.06	0.20	0.40	0.60	0.74

1.2.3 测定方法

1.2.3.1 蛋白质含量、水解度及蛋白酶活力的测定

a. 蛋白质含量测定:凯氏定氮法^[13]。

b. 游离氨基含量及酪蛋白水解度(DH)测定:邻苯二甲醛(OPA)法^[14-15]。

OPA试剂:称取2.00g十二烷基磺酸钠(SDS),加入30mL 0.4mol/L的硼酸缓冲溶液(pH9.5),水浴加热使其完全溶解,冷却至室温后再加入1mL 80mg/mL的OPA乙醇溶液和200 μL β -巯基乙醇,并用硼酸缓

冲溶液定容至100mL。

游离氨基含量测定:将亮氨酸配制成不同浓度的标准溶液(0~30 $\mu\text{g/mL}$),取3mL标准溶液与同体积的OPA试剂混合并开始计时,5min后在分光光度计上340nm波长下测定。以吸光值为横坐标,亮氨酸浓度为纵坐标绘制标准曲线。按照标准曲线制作步骤,测定分析样品的吸光值,并根据标准曲线回归方程计算其游离氨基含量。水解度的计算^[16]如下,其中0.6mol/g为酪蛋白的游离氨基含量。

$$\text{DH}(\%) = \left[\frac{\text{水解物游离氨基含量}(\mu\text{mol/mL})}{6.38 \times \text{水解物氮含量}(\text{mg/mL})} - 0.6 \right] \times 100\%$$

c. 蛋白酶活力测定:福林酚法^[17]。

d. 蛋白质收率(%):酪蛋白的蛋白质质量与酪蛋白水解物的蛋白质质量的比值。

1.2.3.2 DPPH·自由基清除活性^[18] 称取DPPH粉末0.0079g,用无水乙醇溶解,定容至100mL,配制成20 $\mu\text{mol/L}$ 的DPPH乙醇溶液,放置于棕色瓶中,暗处保存。将样品溶液适当稀释,使分析时其吸光值在0.7以下。吸取1mL DPPH乙醇溶液与2.00mL 1mg/mL的样品溶液在具塞试管中混合,室温下暗处放置30min后,测定其在517nm处的吸光值,同时利用无水乙醇进行空白实验。DPPH自由基清除率的计算方法如下:

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

式中: $A_{517\text{空白}}$ 为空白样在517nm处的吸光值, $A_{517\text{样品}}$ 为分析样在517nm处的吸光值。

1.2.3.3 还原能力^[19] 取2mL 0.2mol/L磷酸钠缓冲液(pH6.6)与2mL 1%铁氰化钾溶液混合,加入2mL样品,使样品终浓度为2mg/mL, 50°C 保温30min,冷却并加入2mL 10%的三氯乙酸;取2mL上清液加入2mL蒸馏水和0.4mL 0.1%氯化铁,混合均匀;反应10min后在700nm测定吸光度。吸光值越大,说明样品还原能力越强。

1.2.3.4 羟自由基清除能力^[20] 取0.20mL FeSO_4 -EDTA混合液(10mmol/L)于试管中,加入0.50mL的脱氧核糖溶液(10mmol/L)、0.90mL磷酸缓冲液(pH 7.4, 0.1mol/L)、0.20mL的样品溶液、0.20mL H_2O_2 (10mmol/L),混合后置于 37°C 恒温水浴中反应1h,然后加入2.8% (w/w)三氯乙酸溶液1.00mL、1.0% (w/w) 硫代巴比妥酸溶液1.00mL,混匀后沸水浴反应15min,冷却后在532nm处测吸光度 A_1 。测定空白样时,不加样品同上操作处理,吸光值为 A_0 。羟自由基清除能力(SA)如下式表示:

$$\text{SA}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

1.3 数据的统计分析

采用Excel 2003软件,SPSS 13.0软件和Design Expert 7.0软件对数据进行处理、绘图、统计分析。

2 结果与讨论

2.1 酪蛋白水解物的制备

采用木瓜蛋白酶、添加量为1.5kU/g、温度 45°C ,

对酪蛋白进行水解。水解时间为1~5h时,酪蛋白水解物水解度、DPPH·清除率如图1所示,蛋白质收率则分别为79.9%、80.8%、81.7%、82.3%、82.9%。

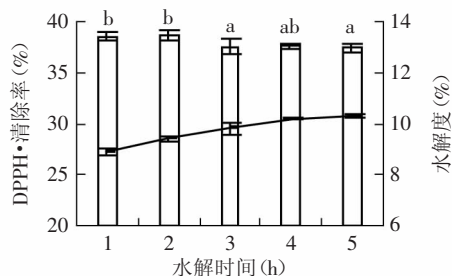


图1 水解时间对酪蛋白水解物水解度、DPPH·清除率的影响
注:折线图为水解度,柱状图为DPPH·清除率(浓度1mg/mL)。

在反应时间2h时,水解物的DPPH·清除活性较好,并且蛋白质回收率也较高,所以水解物的反应时间选择2h,制备样品进行下一步研究。所制备的酪蛋白水解物在样品蛋白质浓度1mg/mL时,对DPPH·清除率为38.7%、水解度为9.6%。有研究对比了五种蛋白酶水解牛酪蛋白水解后得到水解物的抗氧化性,结果发现这些水解物在浓度为2.5mg/mL时,对DPPH·自由基的清除率均不高于80%^[21]。另外,在Ali^[22]等人的研究中利用胃蛋白酶水解的肌肉蛋白质,得到的水解物浓度为1mg/mL时,其DPPH·清除率不超过40%。因此,从这些结果可以看出,本研究选择的酪蛋白水解物具有较强的抗氧化活性,可作为下一步研究的原料。

2.2 酪蛋白水解物的类蛋白反应条件优化

固定反应时间为5h,采用四因素五水平响应面方法(共30组实验),以反应体系游离氨基减少量为响应值Y,利用Design-Expert软件进行二次多项回归拟合,获得游离氨基减少量(Y)与温度(X_1)、底物浓度(X_2)、酶添加量(X_3)、氨基酸添加比例(X_4)关系的二次多项式回归方程为:

$$Y = -474.55506 + 22.60965X_1 - 0.4573X_2 + 0.14361X_3 - 95.2216X_4 - 0.11187X_1X_2 - 5.94719 \times 10^{-4}X_1X_3 + 6.35172X_1X_4 - 2.45531 \times 10^{-4}X_2X_3 + 8.80141X_2X_4 + 0.039345X_3X_4 - 0.31591X_1^2 + 0.078907X_2^2 - 2.22423 \times 10^{-5}X_3^2 - 247.64259X_4^2$$

软件分析结果表明,所得模型显著($P < 0.0001$),模型的校正确定系数 $R^2_{adj} = 0.9053$,表明模型能很好地反映出类蛋白反应过程中游离氨基含量变化。图2为应用Design Expert 7.0所作的响应面曲面图,可以得到以下结论:a. 随着底物浓度和温度的提高,反应体系游离氨基减少量逐渐提高,在温度和底物浓度分别达到30℃和50%时,体系中的游离氨基减少量达到最大,随后逐渐降低;b. 随着酶添加量的增加,反应体系中的游离氨基减少量逐渐增加,当酶添加量达到3kU/g蛋白质时,体系中的游离氨基减少量达到较大值;c. 随着苯丙氨酸的添加量逐渐增加,反应体系中游离氨基减少量逐渐增加,苯丙氨酸添加量为0.74mol/mol水解物游离氨基时,体系中游离氨基减少量也最大。综合分析,得到苯丙氨酸存在条件下酪蛋白水解物的适宜类蛋白反应条件为:在反应时间为5h时,温度30℃、底物浓度50%、酶添加量3kU/g蛋白质、氨基酸添加量0.74mol/mol水解物游离氨基。

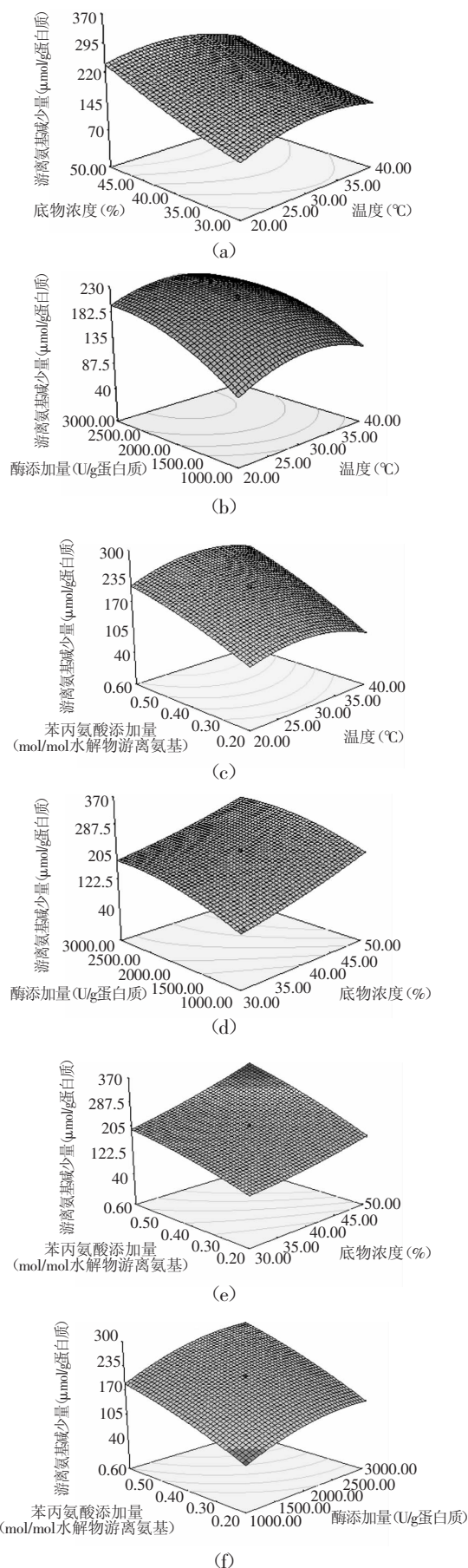


图2 酪蛋白水解物类蛋白反应修饰时
各因素对游离氨基减少量的影响

表2 类蛋白反应修饰对酪蛋白水解物抗氧化活性的影响

样品	苯丙氨酸添加量(mol/mol)	时间(h)	游离氨基减少量($\mu\text{mol/g}$)	DPPH·清除能力(%)	还原能力	·OH清除率(%)
水解物	—	—	—	38.7 $\pm$ 0.5 ab	0.497 $\pm$ 0.002 a	17.2 $\pm$ 0.2 a
混合物1	0.25	—	—	37.8 $\pm$ 0.4 a	0.506 $\pm$ 0.002 ab	18.7 $\pm$ 0.2 a
混合物2	0.74	—	—	39.7 $\pm$ 0.4 b	0.521 $\pm$ 0.004 bc	20.8 $\pm$ 0.1 bc
修饰产物1	—	5	103.71 $\pm$ 6.08	42.6 $\pm$ 1.2 c	0.564 $\pm$ 0.008 d	21.6 $\pm$ 0.3 c
修饰产物2	0.74	1	328.36 $\pm$ 39.14	49.3 $\pm$ 0.2 f	0.634 $\pm$ 0.008 g	22.3 $\pm$ 1.9 cd
修饰产物3	0.74	5	450.03 $\pm$ 12.35	47.7 $\pm$ 0.6 e	0.620 $\pm$ 0.002 efg	21.3 $\pm$ 2.2 c
修饰产物4	0.74	7	621.72 $\pm$ 5.57	46.2 $\pm$ 0.1 de	0.629 $\pm$ 0.009 fg	21.4 $\pm$ 0.6 c
修饰产物5	0.25	5	155.73 $\pm$ 26.86	45.7 $\pm$ 0.7 d	0.619 $\pm$ 0.013 efg	21.3 $\pm$ 0.1 c
修饰产物6	0.25	7	174.17 $\pm$ 11.00	47.0 $\pm$ 1.9 de	0.621 $\pm$ 0.012 efg	21.2 $\pm$ 2.1 c

注:测定DPPH·清除能力、还原能力、·OH清除率时样品蛋白质含量分别为1、6、9mg/mL。

2.3 修饰产物的抗氧化活性变化

在上述优化条件下对酪蛋白水解物进行类蛋白反应修饰,并分别变化反应时间、苯丙氨酸添加量,制备出5个不同程度的修饰产物(修饰产物2~6),测定其游离氨基减少量及三个抗氧化性质。对照样则为酪蛋白水解物、水解物与苯丙氨酸的混合物(混合物1~2)和未添加苯丙氨酸进行类蛋白修饰反应的修饰产物1。最终的抗氧化性质评价结果如表2。

总体上看,可以发现:a. 酪蛋白水解物中直接混入较高水平(例如0.74mol/mol)的苯丙氨酸,可以一定程度提高混合物的抗氧化性;b. 酪蛋白修饰产物1~6均显示出比水解物、混合物更好的抗氧化性质,说明是类蛋白反应修饰改善了酪蛋白水解物的抗氧化性质;c. 添加苯丙氨酸时进行类蛋白反应修饰,酪蛋白修饰产物的抗氧化活性更好,因为修饰产物2~6的抗氧化性质(例如DPPH·清除能力、还原能力)一般均好于修饰产物1;d. 在添加相同水平苯丙氨酸时,反应时间对修饰产物的抗氧化性质的影响不大,因为修饰产物2、3、4之间以及修饰产物5、6之间的整体差异不大;e. 苯丙氨酸添加量的高低,对修饰产物2~6抗氧化活性的影响也不显著;f. 在酪蛋白水解物类蛋白反应中加入苯丙氨酸,可以提高酪蛋白水解物的抗氧化性质,但修饰产物的游离氨基减少量与抗氧化活性提高,也不存在明显的相关性。

在Anusha^[23]关于鲑鱼蛋白质水解物抗氧化活性的研究中,其样品在浓度为3mg/mL时DPPH·最大清除率为61.3%,在测定还原能力时样品终浓度为3mg/mL(相当于蛋白质浓度9mg/mL),还原能力不超过0.603,不难看出,本研究制备的修饰产物具有较高的DPPH·清除率及还原能力。另外,木瓜蛋白酶参与下的酪蛋白水解物样品浓度为26.80mg/mL,其羟自由基清除率为71.28%^[24],此结果与我们的研究结果相似。

3 结论

3.1 利用木瓜蛋白酶水解酪蛋白,通过水解度、蛋白回收率、DPPH·清除率等方面评价,选择反应时间为2h的水解产物为类蛋白反应的底物,此水解物的水解度为9.6%、DPPH·清除率为38.7%。

3.2 通过响应面分析法,苯丙氨酸存在下木瓜蛋白酶催化酪蛋白水解物类蛋白反应的适宜条件为:反应时间固定为5h,反应温度30℃、底物浓度50%(w/w)、酶添加量3kU/g蛋白质、氨基酸添加量0.74mol/mol水解

物游离氨基。

3.3 不添加氨基酸的类蛋白反应可以改善酪蛋白水解物的DPPH·清除能力、还原能力、·OH清除率,而添加苯丙氨酸的类蛋白修饰产物能够进一步提高酪蛋白水解物的这些抗氧化性质,并且在添加苯丙氨酸后修饰产物的抗氧化性质与氨基酸添加量、反应时间之间的关系不明显。

参考文献

- [1] Kehrer J P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease [J]. Critical Reviews in Toxicology, 1993, 23 (1): 21-48.
- [2] Marnett L J. Oxyradicals and DNA damage [J]. Carcinogenesis, 2000, 21 (3): 361-370.
- [3] Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease [J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2000, 71 (2): 621-629.
- [4] Bishov S J, Heniek A S. Antioxidant effect of protein hydrolysates in a freeze-dried model system [J]. Food Science, 1972, 37 (6): 873-875.
- [5] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51 (12): 3661-3667.
- [6] Pihlanto-Leppala A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides [J]. Trends in Food Science and Technology, 2001, 11 (9-10): 347-356.
- [7] Hardolph W, Henry B. The enzymatic synthesis of protein. I. The synthesizing action of pepsin [J]. Journal of Biological Chemistry, 1924, 62 (1): 15-29.
- [8] Michiko, Yamashita, et al. Plastein reaction as a method for enhancing the sulfur-containing amino acid level of soybean protein [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1971, 19 (6): 1151-1154.
- [9] Zhao X H, Li Y Y. An approach to improve ACE inhibitory activity of casein hydrolysates with Plastein reaction catalyzed by Alcalase [J]. European Food Research and Technology, 2009, 229 (5): 795-805.
- [10] Ono S, Kasai D, Sugano T, et al. Production of water soluble antioxidative plastein from Squid Hepatopancreas [J]. Journal of Oleo Science, 2004, 53 (5): 267-273.
- [11] 吴丹, 李铁晶, 赵新淮. 酪蛋白水解物的酶法修饰优化与抗氧化活性改善[J]. 农业机械学报, 2010, 41 (1): 139-145.

(下转第106页)

白-淀粉RDS和SDS片段虽然也有增加,但增幅较小,尤其蛋白质含量在4.65%的蛋白-淀粉最为明显,其RS含量依然达90%以上。这是因为经过糊化后,淀粉颗粒被破坏,淀粉酶更容易与淀粉分子结合,发生酶解反应,因此,糊化后淀粉的消化性变高,RS含量降低。但是在蛋白-淀粉中,由于胶原蛋白和淀粉之间的作用力较强,蛋白质又主要处于淀粉颗粒表面,使淀粉颗粒在糊化过程中不易破坏,而且对淀粉酶与淀粉的结合有位阻作用,所以随着蛋白质含量增大,即使糊化后,蛋白-淀粉中RS含量依然比较高。

表4 淀粉样品体外模拟消化的营养片段分类(%)

淀粉种类	颗粒			糊化后		
	RDS	SDS	RS	RDS	SDS	RS
木薯原淀粉	4.37	10.98	84.65	13.77	46.47	39.76
pro=0.65%	4.43	9.73	85.84	12.06	46.39	41.55
pro=0.85%	4.07	9.60	86.33	11.60	43.32	45.08
pro=1.45%	4.13	9.55	86.33	9.91	34.68	55.41
pro=3.39%	2.03	3.27	94.70	7.19	30.26	62.55
pro=4.65%	1.67	2.39	95.94	3.86	5.68	90.47

3 结论

3.1 蛋白-淀粉在水中非常容易沉降,糊化后大部分淀粉仍保持颗粒态,没有被破坏;随着蛋白含量的增加,蛋白-淀粉的粘度比原淀粉显著降低,起糊早;改性后的淀粉,其溶胀能力在各温度下均低于原淀粉。

3.2 通过将Jenkin提出的In-Vitro模型进行改进,测定淀粉样品的消化性能。木薯淀粉经过蛋白的改性改变了淀粉的结构和组成,从而对淀粉的消化性能也产生了影响。颗粒态的淀粉样品在蛋白质含量低时比原淀粉的消化速率略低或者说相差不大,但随着蛋白质含量的增加,样品的消化速率显著降低。经过糊化后淀粉样品的消化速率均有所增加,但是仍

随着蛋白质含量的增加而逐渐降低并低于原淀粉的。淀粉的酶解符合一级反应动力学方程,瞬时消化速率的对数 $\ln V = -Kt + C$,通过对其分析,进一步说明蛋白质对淀粉的改性使其消化性能降低。

3.3 通过对不同淀粉样品的颗粒态和糊化后的RDS、SDS和RS营养片段的分析,糊化后的RDS和SDS均有所增加,RS均减少。

参考文献

- [1] 琚长霄,黄立新,许世枫,等.木薯淀粉与胶原蛋白作用物的结构形态研究[J].食品工业科技,2011(8):168-171.
- [2] R J 惠斯特勒, J N 贝米勒, E F 斯卡帕尔.淀粉的化学与工艺学[M].王维文,闵大诤,杨家顺,等译校.北京:中国食品出版社,1987:230-32,350-362.
- [3] 张力田.变性淀粉[M].广州:华南理工大学出版社,1992:1-8.
- [4] 张元超,李伟雄,黄立新.赤小豆淀粉性质的研究[J].食品科学,2006,27(3):44-47.
- [5] Englyst H N, Kingman S M, Cummings J H. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions[J]. European Journal of Clinical Nutrition, 1992(46):S33-S50.
- [6] 张二娟,何小维.湿热处理蜡质玉米淀粉消化性研究[J].粮食与油脂,2009(6):20-22.
- [7] Wen Q B, Lorenz K J, Martin D J, et al. Carbohydrate digestibility and resistant starch of steamed bread [J]. Starch, 1996, 48:180-185.
- [8] Go n-i I, Garcia-Alonso A, and Saura-Calixto F. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index [J]. Nutrition Research, 1997, 17(3):427-437.
- [9] 林伟峰,赵谋明,彭志英,等.海洋鱼蛋白可控酶解动力学模型的研究[J].食品与机械,2005,21(3):10-13.
- [10] 张佳程,师进生.食品物理化学[M].北京:中国轻工业出版社,2007:50-54.

(上接第102页)

- [12] 吴丹,赵新淮.酪氨酸存在下酪蛋白水解物的Plastein反应修饰与抗氧化活性影响[J].食品与发酵工业,2009,35(12):28-33.
- [13] GB/T 5009.5-2003.食品中蛋白质的测定[S].北京:中国标准出版社,1992.
- [14] Mahmoud M, Malone W, Cordle C. Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties [J]. Journal of Food Science, 1992, 57(5): 1223-1229.
- [15] Spellman D, McEvoy 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.
- [16] 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.
- [17] SB/T 10317-1999.蛋白酶活力测定[S].北京:中国标准出版社,1988.
- [18] Nsimba R Y, Kikuzaki H, Konishi Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of Chenopodium quinoa and Amaranthus spp. seeds [J]. Food Chemistry, 2008, 106(2):760-766.
- [19] Oyaizu M. Antioxidative activities of browning products of

- glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography [J]. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 1988, 35(11): 771-775.
- [20] Chung S K, Osawa T, Kawakishi S. Hydroxyl radical scavenging effects of species and scavengers from brown mustard (Brassica nigra) [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61(1): 118-123.
- [21] 毛学英,吴思嘉,范金波,等.牦牛乳酪蛋白酶解产物清除DPPH·自由基活性分析[J].现代食品科技,2007,24(7):624-626.
- [22] Ali B, Mohamed H, Rafik B, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (Mustelus mustelus) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases [J]. Food Chemistry, 2009, 114(4): 1198-1205.
- [23] Samaranayakaa A G P, Chan E C Y L. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (Merluccius productus) [J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 768-776.
- [24] 胡文琴,王恬,霍永久,等.酪蛋白酶解物体外抗氧化作用的研究[J].食品科学,2004,25(4):158-162.