

# 牛初乳及其酵素水解物之抗氧化性與其蛋白質組成之相關性研究

江淑華、張基郁；謝淳仁

E-mail: 9512338@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究以不同泌乳期(第1~7天)之牛初乳脫脂全乳、酪蛋白與乳清作為材料，進行三者之抗氧化性分析，並探討牛初乳蛋白質組成與抗氧化性之相關性。接著採用具有內、外切作用之flavourzyme(由Aspergillus oryzae製得)以反應曲面法探討牛初乳酪蛋白與乳清之水解條件對其水解物抗氧化性之影響，並且進一步分析水解物之組成對其抗氧化性的相關性，再以模擬腸胃消化試驗，探討水解物經消化後之抗氧化活性。另外，使用特定胺基酸(His、Pro、His+Pro)、特定酵素(Flavourzyme, FL)添加於水解物中於不同pH(5.5、7.5和9.5)下進行普拉斯丁合成反應，分析普拉斯丁產物之抗氧化性，並以模擬腸胃消化試驗，探討普拉斯丁反應產物經消化後之抗氧化性。研究結果顯示：1.脫脂全乳、酪蛋白與乳清之抗氧化性分析結果分別為：還原力大小為脫脂全乳 > 乳清蛋白 > 酪蛋白；亞鐵離子螯合能力為脫脂全乳 > 乳清蛋白 > 酪蛋白；DPPH自由基清除能力為脫脂全乳 > 乳清蛋白 > 酪蛋白；超氧陰離子清除能力為脫脂全乳 > 酪蛋白 > 乳清蛋白。以第1、2天之乳清之亞鐵離子螯合能力明顯較強；以第2~4天之乳清和第2天之酪蛋白具有較高的DPPH自由基清除能力，在濃度為20 mg/mL時，其清除能力皆高於60%；酪蛋白之抑制脂質氧化能力高於乳清，於8小時內其抑制效果與BHA及 $\alpha$ -生育醇相當。2.在蛋白質組成與抗氧化性之相關性方面，將酪蛋白與乳清之膠體過濾層析圖上的尖峰各分成四個尖峰群。酪蛋白之第I尖峰群(Casein I, lactoferrin)與還原力、DPPH自由基清除能力呈現極顯著正相關。乳清之各尖峰群與亞鐵離子螯合能力均呈現極顯著正相關，乳清之第IV尖峰群(Whey IV,  $\beta$ -lactoglobulin和 $\beta$ -lactalbumin)與DPPH自由基清除能力呈現顯著正相關。3.酪蛋白與乳清水解所得之水解物在1 mg/mL下均較未水解者有較高之亞鐵離子螯合能力，還原力與DPPH自由基清除能力則較未水解者差。脊行最大值之分析結果顯示，酪蛋白與乳清分別於水解時間23.28和21.51 h、溫度36.77和41.65 °C及E/S 2.26 %和1.35 %時，得到最大水解率24.87和23.45 %。酪蛋白與乳清以脊行分析法得到之最大水解率之條件進行實際水解試驗所得之水解物，其DPPH自由基清除能力之表現比脊行分析法推估者高，而還原力與亞鐵離子螯合能力之表現則比脊行分析法推估者低，此點顯示高水解率之水解物其DPPH自由基清除能力較高，但還原力與亞鐵離子螯合能力則否。4.在牛初乳蛋白質水解物方面，以中性胺基酸含量較高，其次為鹼性和芳香族胺基酸，而酸性胺基酸和環狀的亞胺酸則含量較低，且酪蛋白水解物與乳清水解物均含有高量的Leu和Lys。在胺基酸組成與抗氧化性之相關性分析方面，中性胺基酸的含量增加，其還原力和超氧陰離子清除能力有降低之趨勢。5.以flavourzyme催化由酪蛋白水解物和乳清水解物合成所得之普拉斯丁產物，其抗氧化性較酪蛋白水解物和乳清水解物高。與未水解之酪蛋白或乳清及其水解物做比較，在濃度為1 mg/mL時，普拉斯丁合成產物於還原力及亞鐵離子螯合能力方面均有提高之趨勢，而DPPH自由基清除能力則較不明顯。6.在模擬腸胃消化試驗方面，脫脂全乳、未水解的乳清、酪蛋白水解物與乳清水解物之還原力經腸胃消化後均有提高之趨勢，而亞鐵離子螯合能力和DPPH自由基清除能力則均呈現下降之趨勢。

關鍵詞：牛初乳；酪蛋白；乳清；抗氧化性；酵素水解；普拉斯丁反應

## 目錄

封面內頁 簽名頁 授權書 中文摘要 英文摘要 誌謝

目錄

圖目錄 表目錄 第一章 緒論 第二章 文獻回顧 2.1 牛初乳 2.2 牛初乳蛋白的研究與應用 2.3 酵素水解 2.4 蛋白質水解物在食品上之應用 2.5 乳蛋白及其水解物之機能性 2.6 自由基、老化與抗氧化物質 2.7 反應曲面法 2.8 膜過濾(membrane filtration) 2.9 普拉斯丁(plastein)及普拉斯丁反應(plastein reaction) 參考文獻 第三章 牛初乳脫脂全乳、酪蛋白與乳清之抗氧化性 3.1 摘要 3.2 前言 3.3 材料與方法 3.4 結果與討論 結論 參考文獻 第四章 牛初乳之蛋白質組成與抗氧化性之相關性 4.1 摘要 4.2 前言 4.3 材料與方法 4.4 結果與討論 結論 參考文獻 第五章 以反應曲面法探討牛初乳酪蛋白與乳清之水解條件 對其水解物抗氧化性之影響 5.1 摘要 5.2 前言 5.3 材料與方法 5.4 結果與討論 結論 參考文獻 第六章 牛初乳蛋白質水解物之組成與其抗氧化性之相關性 6.1 摘要 6.2 前言 6.3 材料與方法 6.4 結果與討論 結論 參考文獻 第七章 利用牛初乳蛋白質水解物以酵素法合成具抗氧化性之胜? 7.1 摘要 7.2 前言 7.3 材料與方法 7.4 結果與討論 結論 參考文獻 第八章 以腸胃酵素水解牛初乳蛋白所得消化液之抗氧化性 8.1 摘要 8.2 前言 8.3 材料與方法 8.4 結果與討論 結論 參考文獻 第九章 總結 圖2.1 牛乳成分的由來 圖2.2 牛乳的成分 圖2.3 強化鐵含量之牛乳(100克鐵/公升), pH 6.7-4.0上清液與沉澱物之電泳圖 圖2.4 添加0.75%乳清分離物之牛乳乳化物水相之電泳圖(樣品經80 °C加熱不同時間處理) 圖2.5 一般實驗室之典型酵素水解反應系統模式圖 圖2.6 哺乳細胞中, 氧、氮自由基及其他活性物質生成途徑 圖2.7 氧化蛋白累積與過氧化物和抗氧化物之平衡關係 圖2.8 細胞內抗氧化物之防禦系統 圖2.9 反應曲面進行步驟流程圖 圖2.10 普拉斯丁反應 圖3.1 以0.1 M磷酸緩衝溶液(pH=7.0)萃取所得之七天期不同牛初乳酪蛋白之SDS-PAGE電泳圖 圖3.2 以0.05 M磷酸緩衝溶液(pH=7.0)萃取

所得之七天期不同牛初乳乳清蛋白之SDS-PAGE電泳圖 圖3.3 乳牛分娩後7天之脫脂全乳、酪蛋白與乳清溶液與 BHA、-生育醇之還原力比較 圖3.4 乳牛分娩後7天之脫脂全乳、酪蛋白與乳清溶液與 EDTA之亞鐵離子螯合能力比較 圖3.5 乳牛分娩後7天之脫脂全乳、酪蛋白與乳清溶液與 BHA、-生育醇之DPPH自由基清除能力比較 圖3.6 乳牛分娩後7天之酪蛋白與乳清溶液與BHA、-生育醇之抗過氧化性(以硫氰酸鐵法測得)比較 圖4.1 乳牛分娩後7天之酪蛋白之Sephacryl S-200膠體過濾層析圖 圖4.2 乳牛分娩後7天之酪蛋白之Sephacryl S-200膠體過濾層析圖 圖5.1 分別以alcalase及flavourzyme進行初步酵素水解牛初乳酪蛋白與乳清所得之水解率 圖5.2 酵素flavourzyme水解酪蛋白(A~C)與乳清(D~F)反應之 酵素基質比(E/S)保持不變獲得反應時間、反應溫度之間與水解率變化的輪廓圖 圖5.3 在不同酵素基質比(E/S)條件下以flavourzyme水解酪蛋白(A~C)與乳清(D~F)所得之反應時間、反應溫度之間與還原力變化的輪廓圖 圖5.4 在不同酵素基質比(E/S)條件下以flavourzyme水解酪蛋白(A~C)與乳清(D~F)所得之反應時間、反應溫度之間與亞鐵離子螯合能力變化的輪廓圖 圖5.5 在不同酵素基質比(E/S)條件下以flavourzyme水解酪蛋白(A~C)與乳清(D~F)所得之反應時間、反應溫度之間與DPPH自由基清除能力變化的輪廓圖 圖6.1 牛初乳酪蛋白水解物之Sephadex G-25膠體過濾層析圖 圖6.2 牛初乳乳清水解物之Sephadex G-25膠體過濾層析圖 圖6.3 酪蛋白水解物及其不同分子量超過濾劃分物之胺基酸含量 圖6.4 乳清水解物及其不同分子量超過濾劃分物之胺基酸含量 圖7.1 酪蛋白水解物於不同反應時間及不同pH下添加histidine、proline及histidine+proline並以flavourzyme進行普拉斯丁反應所得產物之還原力 圖7.2 乳清水解物於不同反應時間及不同pH下添加histidine、proline及histidine+proline並以flavourzyme進行普拉斯丁反應所得產物之還原力 圖7.3 酪蛋白水解物於不同反應時間及不同pH下添加histidine、proline及histidine+proline並以flavourzyme進行普拉斯丁反應所得產物之亞鐵離子螯合能力 圖7.4 乳清水解物於不同反應時間及不同pH下添加histidine、proline及histidine+proline並以flavourzyme進行普拉斯丁反應所得產物之亞鐵離子螯合能力 圖7.5 酪蛋白水解物於不同反應時間及不同pH下添加histidine、proline及histidine+proline並以flavourzyme進行普拉斯丁反應所得產物之DPPH自由基清除能力 圖7.6 乳清水解物於不同反應時間及不同pH下添加histidine、proline及histidine+proline並以flavourzyme進行普拉斯丁反應所得產物之DPPH自由基清除能力 表2.1 牛乳與人乳之主要蛋白質含量(%) 表2.2 牛乳蛋白質之胺基酸組成 表2.3 各種運輸鐵蛋白質 表2.4 應用於食品蛋白質水解之蛋白? 表2.4(續) 表2.5 已商業化之蛋白? 表2.6 乳蛋白中的機能性胜? 表3.1 牛初乳之基本組成 表3.2 牛初乳酪蛋白與乳清之收率(%) 表3.3 牛初乳酪蛋白和乳清之蛋白質含量 表3.4 不同牛初乳酪蛋白與乳清溶液之超氧陰離子清除能力 表4.1 以Sephacryl S-200膠體過濾層析法分析不同泌乳期牛初乳酪蛋白所得之各尖峰群面積百分比 表4.2 以Sephacryl S-200膠體過濾層析法分析不同泌乳期牛初乳乳清所得之各尖峰群面積百分比 表4.3 以Sephacryl S-200膠體過濾層析法分析不同泌乳期牛初乳酪蛋白所得之各尖峰群之蛋白質含量(%) 表4.4 以Sephacryl S-200膠體過濾層析法分析不同泌乳期牛初乳乳清所得之各尖峰群之蛋白質含量(%) 表4.5 牛初乳酪蛋白與乳清在濃度為20 mg/mL時之抗氧化性 表4.6 牛初乳之酪蛋白各蛋白質群含量與其抗氧化性分析之相關係數 表4.7 牛初乳之乳清各蛋白質群含量與其抗氧化性分析之相關係數 表5.1 酪蛋白與乳清酵素水解之反應曲面水解變數與實驗設計 階層 表5.2 以反應曲面法分析flavourzyme水解酪蛋白與乳清水解率及抗氧化性之三階層三變數部分因子實驗設計與實驗值 表5.3 以flavourzyme水解酪蛋白與乳清所得之水解率與抗氧化性分析值之二次多項迴歸相關係數與R平方值(R<sup>2</sup>) 表5.4 反應時間、溫度以及酵素/基質比對以flavourzyme水解酪蛋白與乳清所得之水解率與抗氧化性分析值之反應性 狀變異數分析 表5.5 利用脊行分析評估以flavourzyme水解酪蛋白與乳清所得水解物之水解率及抗氧化性之最大值 表6.1 以超過濾法進行酪蛋白水解物與乳清水解物之不同分子量劃分所得各劃分物之收率 表6.2 以超過濾法進行酪蛋白水解物之不同分子量劃分所得各劃分物之抗氧化性 表6.3 以超過濾法進行乳清水解物之不同分子量劃分所得各劃分物之抗氧化性 表6.4 牛初乳酪蛋白水解物、乳清水解物及以超過濾法所得各劃分物之胺基酸含量 表8.1 牛初乳脫脂全乳、酪蛋白及其水解物、乳清及其水解物 經腸胃道酵素消化前後之抗氧化性 表8.2 酪蛋白水解物和乳清水解物之普拉斯丁合成產物 經腸胃道酵素消化前後抗氧化性分析

## 參考文獻

1. 王哲齡。1977。酪蛋白普拉斯丁性質之研究。國立台灣大學畜牧學系碩士論文，台北。
2. 行政院農業委員會。2000。八十九年農業統計年報。p. 136-137。
3. 佑生開發股份有限公司。1995。乳鐵蛋白--天然的保護性蛋白。畜牧半月刊，54(7): 89-92。
4. 李怡萱。2002。衍自牛乳中血管收縮素轉化?抑制物活性之探討。國立中興大學畜產學系碩士論文，台中。
5. 吳則雄。1980。認識牛的初乳。乳業，98/99: 9-14。
6. 吳柏宏。2004。科學與技術自由基、老化與抗氧化配方。食品工業，36: 45-51。
7. 林玫欣。1999。鯖魚肉與內臟水解物之抗氧化性研究。國立台灣海洋大學食品科學系碩士論文，基隆。
8. 林淑媛。1986。利用普拉斯丁反應製備治療苯酮尿症的配方奶粉。國立中興大學食品科技系碩士論文，台中。
9. 皇輝貿易有限公司。2003。初乳之研究報告。畜牧半月刊，69(8): 29-34。
10. 張為惠。1980。應用普拉斯丁反應於植物及微生物蛋白質之高度利用。食品工業，8: 10-12。
11. 陳昭誠、杜艷櫻、張鴻民。1999。牛乳IgG之酵素水解物性質。食品科學，26: 496-506。
12. 陳建中、劉春妙、蔣丙煌。1994。以共沉澱及超過濾膜濾洗方法分離全牛乳蛋白質及功能性測定。食品科學，21: 459-469。
13. 楊正護。1983。剩餘初乳利用性之研究。國立中興大學畜牧研究所碩士論文，台中。
14. 楊詠翔。1999。食品中抗高血壓胜?的發展現況。食品工業，31: 9-18。
15. 鄭名凡。1999。蛋白質水解物的功能與應用。食品資訊，160: 49-54。
16. 劉新裕、王昭月、張同吳、林義恭、陳淑芬、朱良戩、王順成。1999。山藥之品種特性、生產潛力、物化性質與抗氧化研究。中華農業研究，48: 1-22。
17. 劉毓蕙。2004。水解蛋白的特性及應用。食品工業，36: 19-24。
18. 賴滋漢、金安兒。1991。食品加工學製品篇。p. 181-196。
19. 賴祥玲。2004。乳蛋白中的機能胜?。食品工業，36: 37-44。
20. 盧建宇、陳全木、林慶文。2003。乳鐵蛋白

素之抗菌表現及其應用。食品工業, 35: 61-65. 21. 蘇家愷。1994。自牛初乳中分離免疫球蛋白與乳鐵蛋白。國立台灣大學食品科技研究所博士論文, 台北。 22. 饒家麟、柯文慶。2001。鮪魚蒸煮液蛋白質水解物之抗氧化特性。台灣農業化學與食品科學, 39: 363-369. 23. Adler-Nissen, J. 1986. Some fundamental aspects of food protein hydrolysis. In "Enzymatic Hydrolysis of Food Protein". pp. 20-21. Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York, USA. 24. Al-Mashikhi, S. A. and Nakai, S. 1987. Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey protein by gel filtration techniques. *J. Dairy Sci.* 70: 2486-2492. 25. Arai, S., Yamashita, M. and Fujimaki, M. 1986. Plastein reaction and its application. *Cereal Foods World* 20: 107-112. 26. Aso, K., Yamashita, M. and Arai, S. 1974. Hydrophobic force as a main factor contributing to plastein chain assembly. *J. Biochem.* 76: 341-347. 27. Blosi, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200. 28. Bouhallab, S., Molle, D. and Leonil, J. 1992. Tryptic hydrolysis of caseinomacropeptide in membrane reactor: preparation of bioactive peptides. *Biotechnol. Lett.* 14: 805-810. 29. Bowman, L. and Geiger, E. 1984. Optimization of fermentation conditions of alcohol production. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1492-1497. 30. Box, G. E. P. and Wilson, K. B. 1951. On the experimental attainment optimum conditions. *J. Roy. Statist. Soc. B13*: 1-45. 31. Brun, J. M. and Dalgleish, D. G. 1999. Some effects of heat on the competitive adsorption of caseins and whey proteins in oil-in-water emulsions. *Int. Dairy J.* 9: 323-327. 32. Brunner, J. R. 1981. Cow milk proteins: Twenty-five years of progress. *J. Dairy Sci.* 64: 1038-1054. 33. Brownsell, V. L., Williams, R. J. H. and Andrews, A. T. 2001. Application of the plastein reaction to mycoprotein: Plastein properties. *Food Chem.* 72: 337-346. 34. Cervato, G., Cazzola, R. and Cestaro, B. 1999. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50: 291-296. 35. Cheynier, V., Feinberg, M., Chararas, C. and Ducauze, C. 1983. Application of response surface methodology to evaluation of bioconversion experimental conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 634-639. 36. Chiang, W. D., Shih, C. J. and Chu, Y. H. 1999. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. *Food Chem.* 65: 189-194. 37. Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 11: 254-262. 38. Clemente, A. and Chambers, S. J. 2000. Development and production of hypoallergenic protein hydrolysates for use in infant formulas. *Food Allergy Intoler.* 1: 175-190. 39. Darkwa, J., Mundoma, C. and Simoyi, R. H. 1988. Antioxidant chemistry: reactivity and oxidation of dl-cysteine by some common oxidants. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 94: 1971-1978. 40. Donnelly, J. L., Decker, E. A. and McClements, D. J. 1998. Iron-catalyzed oxidation of menhaden oil as affected by emulsifiers. *J. Food Sci.* 63: 997-1000. 41. Fagbenro, O. and Jauncery, K. 1993. Chemical and nutritional quality of raw, cooked and salted fish silage. *Food Chem.* 48: 331-335. 42. Fang, Y. Z., Yang, S. and Wu, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutri.* 18: 872-879. 43. Fox, P. F. and Mulvihill, D. M. 1993. Developments in milk protein processing. *Food Sci. Tech. Today.* 7: 152-161. 44. Galas, E., Bielecki, S., Antezak, T., Weiczorek, A. and Blaszyk. 1981. Optimization of cultivation medium composition for lytic enzyme biosynthesis. In Moo-Young, M., Vezina, C. and Singh, K. (Eds) *Advances in Biotechnology-Proceedings 6th International Fermentation Symposium, Vol.3*, Pergamon Press, Canada. p. 301-306. 45. Gildberg, A. 1993. Enzymatic processing of marine raw materials. *Process Biochem.* 28: 1-15. 46. Gildberg, A., Hermes, J. E. and Orejana, F. M. 1984. Acceleration of autolysis during fish sauce fermentation by adding acid and reducing the salt content. *J. Sci. Food Agric.* 35: 1363-1369. 47. Gill, H. S. and Cross, M. L. 2000. Anticancer properties of bovine milk. *Br. J. Nutri.* 84: S161-S166. 48. Gill, H. S., Doull, F., Rutherford, K. J. and Cross, M. L. 2000. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br. J. Nutri.* 84: S111-S117. 49. Green, M., Scott, K. J., Anderson, M., Griffin, M. C. and Glover, F. A. 1984. Chemical characterization of milk concentrated by ultrafiltration. *J. Dairy Res.* 51: 267-278. 50. Gurr, M. I. 1981. Review of the progress of dairy science: Human and artificial milks for infant feeding. *J. Dairy Res.* 48: 519-554. 51. Halliwell, B. and Gutteridge, J. 1998. Free radicals in biology and medicine. pp. 316-319. Oxford university press, London, UK. 52. Hekmat, S. and McMahon, D. J. 1998. Distribution of iron between caseins and whey proteins in acidified milk. *Lebensm-wiss. u. -Technol.* 31: 632-638. 53. Himmelblau, D. M. 1970. Process analysis by statistical methods. John Wiley and Sons, New York. 230-292. 54. Hooijdonk, A. C. M. van, Kussendrager, K. D. and Steijns, J. M. 2000. In vivo antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Br. J. Nutri.* 84: S127-S134. 55. Ishigawa, Y. 1992. Development of new types of antioxidants from microbial origin. *J. Jpn. Oil Chem. Soc.* 41: 762-771. 56. Jeon, S. M., Bok, S. H., Jang, M. K., Lee, M. K., Nam, K. T., Park, Y. B., Rhee, S. J. and Choi, M. S. 2001. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sci.* 69: 2855-2866. 57. Kayser, H. and Meisel, H. 1996. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptide derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* 383: 18-20. 58. Kosikowski, F. V. 1983. Low sodium cheddar cheese through whole milk retentate supplementation. *J. Dairy Sci.* 66: 2494-2500. 59. Kuo, K. P. and Cheryan, M. 1983. Ultrafiltration of acid whey in a spiral wound unit: effect of operating parameters on membrane fouling. *J. Food Sci.* 48: 1113-1118. 60. Lahl, W. J. and Braun, S. T. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* 48: 68-71. 61. Lee, Y. S., Noguchi, T. and Naito, H. 1980. Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet. *Br. J. Nutri.* 43: 457-467. 62. Lindsay, D. G. and Astley, S. B. 2002. European research on the functional effects of dietary antioxidants-eurofeda. *Mol. aspects med.* 23: 1-38. 63. Lindmark-Mansson, H. and Akesson, B. 2000. Antioxidative factors in milk. *Br. J. Nutri.* 84: S103-S110. 64. Loukas, S., Varoucha, D., Zioudrou, C., Streaty, R. A. and Klee, W. A. 1983. Opioid activities and structures of  $\beta$ -casein-derived exorphins. *Biochem.* 22: 4567-4573. 65. Lu, L. C., Chen, Y. W. and Chou, C. C. 2003. Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. *J. Food Drug Anal.* 11: 277-282. 66. Mackie, I. M. 1982. Fish protein hydrolysates. *Process Biochem.* 31: 26-31. 67. Maddox, I. S. and Richert, S. H. 1977. Use of response surface methodology for the rapid optimization of microbiological media. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 17-204. 68. Manley, C. H. and Ahmed, S. 1995. The development of process flavors. *Trends Food Sci. Tech.* 6: 46-51. 69. Maruyama, S. and Suzuki, H. 1982. A peptide inhibitor of angiotensin I-converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* 46: 1393-1394. 70. Maruyama, S., Nakagomi, K., Tomozuka, N. and Suzuki, H. 1985. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor

derived from an enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 49: 1405-1409. 71. McIntosh, H., Royle, J., Leu, K. Le, Regester, O., Johnson, A., Grinsted, L., Kenward, S and Smithers, W. 1998. Whey protein as functional food ingredients. *Int. Dairy J.* 8: 425-434. 72. Meisel, H. and Schlimme, E. 1996. Bioactivity peptides derived from milk proteins: Ingredients for functional foods? *Kieler Milchw. Forsch.* 48: 343-357. 73. Meisel, H. 1997. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins. *Biopoly.* 43: 119-128. 74. Meisel, H. 1998. Overview on milk protein-derived peptides. *Int. Dairy J.* 8: 363-373. 75. Migliore-Samour, D., Floch, F. and Jolles, P. 1989. Biologically active casein peptide implicated in immunomodulation. *J. Dairy Res.* 56: 357-362. 76. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H. and Maruyama, S. 1991. Structures and activity of Angiotensin I – converting enzyme inhibitors in an  $\alpha$ -Zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem.* 55: 1313-1318. 77. Moresi, M., Colicchio, A. and Sansovini, F. 1980. Optimization of whey fermentation in a jar fermenter. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9: 173-183. 78. Mullally, M. M., Meisel, H. and Fitzgerald, R. J. 1996. Synthetic peptides corresponding to  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin sequences with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Bio. Chem. Hoppe Seyler.* 377: 259-260. 79. Orejana, F. M. and Liston, J., 1982. Agents of proteolysis and its inhibition in Patis (fish sauce) fermentation. *J. Food Sci.* 47: 198-203. 80. Oshima, G., Shimabukuro, H. and Nagasawa, K. 1979. *Biochim. Biophys. Acta.* 566: 128-137. 81. Paulson, D. J., Wilson, R. L. and Spatz, D. 1984. Cross-flow membrane technology and its application. *Food Tech.* 38: 77-91. 82. Pena-Ramos, E. A. and Xiong, Y. L. 2001. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. *J. Dairy Sci.* 84: 2577-2583. 83. Quagila, G. B. and Orban, E. 1987. Enzymic solubilisation of sardin (*Sardina pilchardus*) by commercial protease. *J. Sci. Food Agric.* 38: 263-269. 84. Raynaud, M. 1959. Bifidus growth promoting of human casein. *Sem. Hop. Paris.* 35: 240-245. 85. Rebeca, B. D., Pena-Vera, M. T. and Diaz-castaneda, M. 1991. Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases, yield and nutritional value. *J. Food Sci.* 56: 309-314. 86. Rival, S. G., Boeriu, C. G. and Wicher, H. J. 2001. Casein and casein hydrolysates. II. antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 49: 295-302. 87. Sasaki, A., McClements, D. J. and Decker, E. A. 2000. Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *J. Food Sci.* 65: 1325-1329. 88. Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N. and Juneja, L. R. 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chem.* 86: 99-103. 89. Sasaki, A., McClements, D. J. and Decker, E. A. 2000. Antioxidant activity of whey in a salmon oil emulsion. *J. Food Sci.* 65: 1325-1329. 90. Satue-Gracia, M. T., Frankel, E. N., Nagendra-Rangavajhala and German, J. B. 2000. Lactoferrin in infant formulas: effect on oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4984-4990. 91. Shih, F. F. 1992. Modification of food protein by non-enzymatic methods. In: *Biochemistry of Food Protein* (B. J. F., Hudson ed.), Ch. 7., Elsevier Applied Science Publishers, London, England. 92. Suetsuna, K., Ukeda, H. and Ochi, H. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J. Nutr. Biochem.* 11: 128-131. 93. Stadtman, E. R. 2002. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radical Bio. Med.* 33: 597-604. 94. Tanimoto, S., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M. 1975. Salt effect on plastein formation by  $\alpha$ -chymotrypsin. *Agr. Biol. Chem.* 39: 1207-1210. 95. Tong, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J. and Decker, E. A. 2000. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1473-1478. 96. Tsai, S. J., Yamashita, M., Arai, S. and Fujimaki, M. 1974. Polyacrylamide gel electrophoresis of plasteins. *Agr. Biol. Chem.* 38: 641-644. 97. Van Beresteijn, E. C., Peeters, R. A., Kaper, J., Meijer, R., Robben, A. and Schmidt, D. 1994. Molecular mass distribution, immunological properties and nutritive value of whey protein hydrolysates. *J. Food Prot.* 57: 619-625. 98. Varnam, H. and Sutherland, P. 1994. *Milk and milk products.* Chapman & Hall, London. 99. Walsh, G. 2002. *Proteins biochemistry and biotechnology.* John Wiley & Sons Ltd, England. 100. Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., Barclay, L. R. C. and Locke, S. J. 1987. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate, and proteins to the total peroxy radical trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochem. Biophys. Acta.* 924: 408-419. 101. Williams, R. J. H., Brownsell, V. L. A. and Andrews, T. 2001. Application of the plastein reaction to mycoprotein: I. Plastein synthesis. *Food Chem.* 72: 329-335. 102. Woodward, D. R. 1976. The chemistry of mammalian caseins: A review. *Dairy Sci. Abstr.* 38: 137-150. 103. Wu, H. C., Chen, H. M. and Shiao, C. Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.* 36: 949-957. 104. Yamamoto, S., Toida, I. and Iwai, K. 1980. Re-examination of the spectrophotometric assay for serum angiotensin-converting enzyme, *Nippon Kyobu Shippei Kaishi* 18: 297-303. 105. Yamashita, M., Arai, S., Matsuyama, J., Gonda, M., Kato, H. and Fujimaki, M. 1970. Enzymatic modification of proteins in foodstuffs. III. Phenomenal survey on  $\alpha$ -chymotryptic plastein synthesis from peptic hydrolyzate of soy protein. *Agr. Biol. Chem.* 34: 1484-1491. 106. Yamashita, M., Arai, A., Tsai, S. J., Kato, H. and Fujimaki, M. 1971. Enzymatic modification of proteins in foodstuffs. V. Plastein yields and their pH dependence. *Agr. Biol. Chem.* 35: 86-91. 107. Yamashita, M., Arai, S., Aso, K. and Fujimaki, M. 1972. Location and state of methionine residues in papain-synthesized plastein from a mixture of soybean protein hydrolyzate and L-methionine ethyl ester. *Agr. Biol. Chem.* 36: 1353-1360. 108. Zertuche, L. and Zall, R. R. 1985. Optimizing alcohol production from whey using computer technology. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 547-554.