

核桃蛋白肽脱苦及其对ACE抑制活性的影响

裴晓惠^{1,2}, 张佳程¹, 齐建勋², 吴春林², 陈永浩^{2,*}, 郝艳宾^{2,*}

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109;

2. 北京市农林科学院, 林业果树研究所, 北京 100093)

摘要:以核桃蛋白粕为原料采用碱溶酸沉法从中提取蛋白,用中性蛋白酶对其进行酶解,制备核桃蛋白肽,采用活性炭和 β -环状糊精对核桃肽进行脱苦,比较两者脱苦效果以及脱苦对核桃蛋白肽ACE抑制率的影响。研究表明,活性炭脱苦时其影响因素排序为:活性炭用量>处理时间>pH,当活性炭用量为50%,处理时间为100min,pH=8时,核桃蛋白肽苦味值最低,但其氮损失率较大;当活性炭用量为40%,处理时间为80min,pH=7时氮损失量最低,苦味值为2,对ACE抑制活性影响较大,损失15.81%。 β -环状糊精脱苦最佳条件为 β -环状糊精添加量为22%,处理时间为30min,苦味值为2,对ACE抑制活性影响最小,仅降低了0.12%。 β -环状糊精处理是既能保存核桃蛋白肽ACE抑制活性,又能起到较好脱苦效果的脱苦处理方法。

关键词:脱苦,活性炭, β -环状糊精,ACE抑制活性

Debittering of walnut peptide and the effect of ACE inhibitory activity

PEI Xiao-hui^{1,2}, ZHANG Jia-cheng¹, QI Jian-xun², WU Chun-lin², CHEN Yong-hao^{2,*}, HAO Yan-bin^{2,*}

(1. School of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China;

2. Institute of Forestry & Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science, Beijing 100093, China)

Abstract: Protein was extracted from walnut residue and it was hydrolyzed by neutral protease. The determination of bitterness value was carried out to compare with the debittering effect for walnut peptides by using active carbon and β -cyclodextrin, and meanwhile to investigate their influences on the antihypertensive activity of walnut peptide, to choose a better way to debitterize. The result showed that the order of the influencing factors on debitterize: the amount of active carbon > processing time > pH. When the amount of active carbon was 50%, processing time was 100min, pH value was 8, the bitterness value of the peptide was lowest, while the nitrogen loss rate was larger. When the amount of active carbon got 40%, processing time was 80min, pH value was 7, its minimum nitrogen loss rate was obtained, bitterness value of 2, and the loss of antihypertensive activity was 15.81%. The optimum condition to debitterize using β -cyclodextrin: the amount was 22%, processing time was 30min. Under these conditions, the bitterness value could reduce to 2, the antihypertensive activity could hardly be affected. It was concluded that using β -cyclodextrin to debitterize was better than active carbon treatment.

Key words: debitterize; active carbon; β -cyclodextrin; ACE inhibitory activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)20-0236-04

核桃营养丰富,核桃脂肪富含不饱和脂肪酸,且不含胆固醇^[1]。核桃蛋白富含的18种氨基酸,8种人体必需氨基酸齐全,是一种优质的蛋白来源^[2]。采用酶法将核桃蛋白水解后的酶解产物还具有降血压和抗

氧化等生理作用^[3],但经酶解后蛋白的疏水性氨基酸暴露引起苦味却限制了其在食品当中的应用^[4]。因此要想扩大其应用范围,就要对其苦味进行控制。目前常用的去除蛋白肽苦味的方法有3种:选择性分离、酶脱苦法、掩盖法。选择性分离法脱苦主要是采用活性炭等吸附疏水氨基酸的同时亦可脱色,一举两得。但是会造成必需氨基酸的严重损失,使得氮元素含量降低,从而降低蛋白水解产物的营养价值^[5]。酶法

收稿日期: 2012-03-31 * 通讯联系人

作者简介: 裴晓惠(1987-),女,硕士,研究方向:功能活性成分研究。

system[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39(7): 1298-1303.

[21] 邓任任,夏林波. 响应面法优化芫花总黄酮的提取工艺[J]. 中国食品添加剂, 2012(2): 70-76.

[22] 陈莉,屠康,王海,等. 采用响应面法对采后红富士苹果热处理条件的优化[J]. 农业工程学报, 2006, 22(2): 159-163.

脱苦不会降低蛋白多肽的营养价值,但此方法将苦味肽进一步水解,改变苦味短肽分子结构,从而影响其功能性^[4],且成本较高,不适合工业化生产。掩盖法脱苦是采用一些能掩盖蛋白质水解液苦味的物质使蛋白酶解物苦味减轻^[5],不会影响蛋白肽功能性且易操作,但需要加入足够量掩盖剂才能够掩盖住肽的苦味,还可能会产生异味。本文主要采用活性炭吸附和 β -环糊精掩盖的方法脱除核桃蛋白多肽中的苦味,比较两种方法对核桃多肽的苦味脱除效果及其对核桃多肽降血压活性的影响,从中选择一种较为合适的脱苦方法应用于生产食品用核桃多肽,可提高食品的营养价值和功能性,满足人们日益增长的健康需求。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

核桃蛋白粉 实验室采用碱溶酸沉法从核桃蛋白粕中提取制得;中性蛋白酶 生化试剂,北京奥博星生物技术有限责任公司;活性炭 分析纯,天津市福晨化学试剂厂; β -环状糊精 生化试剂,北京双旋微生物培养基制品厂;血管紧张素转化酶(ACE)、马尿酸组胺酰亮氨酸(Hippuryl-His-Leuacetate salt, HHL) 美国Sigma公司。

PHS-3C型数字酸度计 上海鹏顺科学仪器有限公司;HW·SY型电热恒温水浴锅 北京市长风仪器仪表有限公司;KDY-9830型凯氏定氮仪 北京市通润源机电技术有限责任公司;UV-2102PC型紫外可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 核桃蛋白肽粉的制备^[6] 配制5%(质量分数)的核桃蛋白溶液,搅匀,放入90℃水浴锅中加热15min,使蛋白变性,调节pH至7.5,加入3%(占底物百分数)的中性蛋白酶,将反应液置于40℃恒温水浴锅中。在反应过程中,用NaOH溶液不断滴定,使反应液保持pH=7.5。酶解5h后取样,并将反应液放入100℃水浴锅中10min,灭酶。冷却后调pH=4.5,在3200r/min离心5min,取上清液,调pH=7.0,最后将上清液冷冻干燥后备用。

1.2.2 苦味、酸味的评价方法 苦味的评价方法采用感官评定法^[7],配制20%、40%、60%、80%、100%的未脱苦的活性肽溶液,将其苦味值分别定义为1-无苦味,2-略有苦味,3-苦味较弱,4-苦味一般,5-苦味较重。根据此评分标准,将脱苦的活性肽溶液提供给10名品尝者品尝,并与标准未脱苦的核桃肽溶液比较进行评分,最后得出平均值来表示苦味程度。酸味的评价方法^[8]:0-无酸味,1-略有酸味,2-酸味较弱,3-酸味一般,4-酸味较重,5-酸味极重。

1.2.3 苦味的去除

1.2.3.1 活性炭脱苦单因素实验 在使用活性炭前,先置于120℃的烘箱中活化4h以上。

a.活性炭用量和时间对活性炭脱苦的影响:分别称取5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%(按占溶液中核桃多肽百分量计)活性炭于pH=7,浓度1%核桃肽溶液中,40℃水浴,每隔20min取

50mL,取5次,采用感官评价法评价其苦味。

b.pH对活性炭脱苦的影响:分别量取50mL浓度1%核桃多肽溶液于8个100mL烧杯中,调其pH为3、4、5、6、7、8、9、10,再称取40%的活性炭于8个烧杯中,40℃水浴80min,取出,采用感官评价法评价其苦味。

1.2.3.2 活性炭脱苦正交实验 考虑到各因素间可能的相互依赖和相互制约,会对活性炭脱苦造成一定的影响,为得到理想的脱苦效果,通过正交实验确定各参数的最佳组合。实验以 $L_9(3^3)$ 正交表设计,3个因素分别为单因素实验中所研究的活性炭用量、处理时间、pH,水平设计以单因素实验的结果为基础,见表1。

表1 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal tests

水平	因素		
	A pH	B 处理时间(min)	C 活性炭用量(%)
1	6	60	40
2	7	80	45
3	8	100	50

1.2.3.3 β -环状糊精脱苦 分别将2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%的 β -环状糊精(按占溶液中核桃多肽百分量计)溶于1%的核桃多肽溶液中,置于40℃水浴中,每隔10min取出50mL,取8次,采用感官评价法评价其苦味。

1.2.4 氮含量的测定 采用全自动凯氏定氮仪测定氮含量,氮损失率按下式计算。

氮损失率(%)=[(核桃肽原液含氮量-活性炭处理样液含氮量)/核桃多肽原液含氮量] \times 100

1.2.5 降血压活性的测定 采用ACE抑制率的体外检测方法^[9]。

2 结果与讨论

未脱苦的核桃多肽原液的苦味值为5,分别采用活性炭吸附和 β -环状糊精掩盖2种方法进行脱苦实验。

2.1 活性炭脱苦

2.1.1 活性炭添加量对活性炭脱苦的影响 由图1可知,活性炭吸附能力饱和之前,活性炭添加量越大,核桃蛋白酶解物苦味值就越低。在添加量为35%时,苦味值为2,明显降低。这就表明,活性炭对核桃蛋白肽有明显脱苦效果。在添加量达50%时,苦味值降为1,基本无苦味。考虑到活性炭吸附核桃多肽中

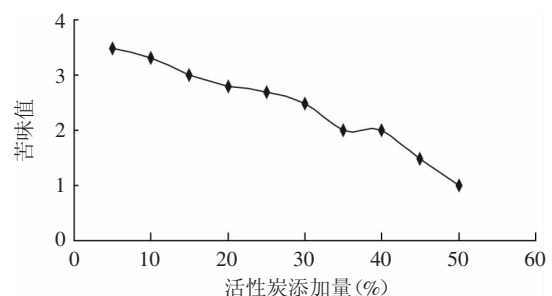


图1 活性炭添加量对活性炭脱苦的影响

Fig.1 Effect of the amount of active carbon on debitterize

疏水性基团使得苦味降低同时营养价值也会大幅度下降,因此活性炭添加量不宜过多。

2.1.2 脱苦时间对活性炭脱苦的影响 由图2可见,活性炭脱苦时间越长,核桃蛋白肽苦味就越弱。吸附40min后,苦味值变化不明显,下降趋势减缓,说明此时活性炭吸附能力几乎饱和。

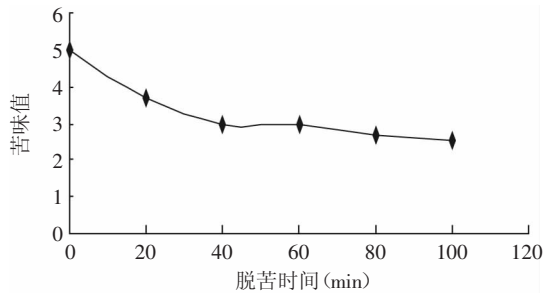


图2 脱苦时间对活性炭脱苦的影响

Fig.2 Effect of the processing time of active carbon on debitterize

2.1.3 pH对活性炭脱苦的影响 酶解反应体系的pH对活性炭脱苦效果也有一定的影响,pH较低时,由于酸的加入,掩盖了苦味的同时带来了明显酸味,同样不能被人群所接受,pH较高时,由于引入大量钠离子,咸味增加。由图3可知,pH在3~5之间时,酶解物苦味值最低为1,基本感受不到苦味,但在此范围内,由于柠檬酸而引起的酸味明显,均在2以上,不能被正常人群所接受。pH在6~9之间时,酸味降低,pH=8时苦味值最低。pH=9时由于钠离子浓度的增加,咸味增加,影响核桃蛋白肽的口感。因此pH=8时活性炭脱苦效果最佳,在此条件下无酸味,苦味值也低于2。

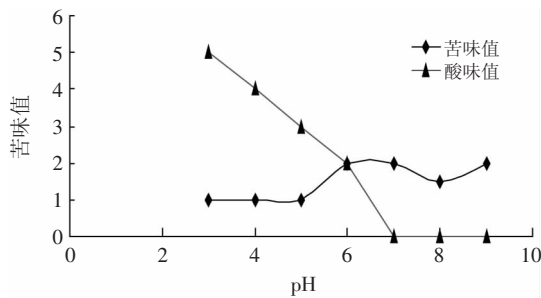


图3 pH对活性炭脱苦的影响

Fig.3 Effect of the pH on debitterize

2.1.4 活性炭脱苦正交实验 活性炭吸附脱除蛋白水解物中苦味的同时还具有脱色脱臭的效果,可谓一举多得,但此方法有一最大的缺点就是活性炭脱苦同时吸附了疏水性氨基酸与疏水性短肽,使得苦味消失的同时营养价值下降^[10]。从表2极差值可知,对活性炭脱苦及氮损失量影响因素的排序为:C(活性炭用量)>B(处理时间)>A(pH)。由此可见,活性炭用量不但对苦味影响最大,对氮损失量影响也最大,即活性炭用量越大,酶解物苦味值就越低,氮损失量也越大。损失的这部分氮就来自于被吸附的疏水性氨基酸和短肽。由表2可知,活性炭脱苦使得苦味最低的最佳组合为:活性炭用量为50%,脱苦时间为100min,pH=8,此条件下苦味可低于正交实验中的

最低苦味值1,基本无苦味。但由于活性炭用量对氮损失量影响也最大,因此此条件不可选。当活性炭用量为40%,脱苦时间为80min,pH=7时氮损失量最低,低于正交实验中氮损失率最低值2.790%,经验证,此条件下,苦味值为2,略有苦味,氮损失率为2.610%。因此活性炭脱苦最佳组合为活性炭用量为40%,脱苦时间为80min,pH为7。

表2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal tests

实验号	A	B	C	氮损失量(%)	苦味值
1	1	1	1	4.970	2.5
2	1	2	2	6.320	2
3	1	3	3	10.400	1
4	2	1	2	8.420	2
5	2	2	3	7.660	1.5
6	2	3	1	2.790	2
7	3	1	3	8.840	1.5
8	3	2	1	4.760	2
9	3	3	2	7.080	1.5
k ₁		0.072	0.074	0.042	
k ₂		0.063	0.062	0.073	
k ₃		0.069	0.068	0.090	
R		0.009	0.012	0.048	
k ₁ '		1.833	2.000	2.167	
k ₂ '		1.833	1.833	1.833	
k ₃ '		1.667	1.667	1.333	
R		0.166	0.333	0.833	

2.2 β-环状糊精脱苦

2.2.1 β-环状糊精的包埋时间对脱苦的影响 由于在室温下,β-环状糊精溶解度较低为1.85%。随温度升高其溶解度增大,但是脱苦采用的温度过高也有可能影响核桃蛋白酶解物的性质,因此包埋温度选为40℃,由图4可知,在30min内,β-环状糊精添加量越大,苦味值降低的速度就越快。包埋30min后不论β-环状糊精添加量多少,苦味值变化均不明显,说明β-环状糊精在包埋30min后几乎可以达到饱和,因此选定最佳包埋时间为30min。

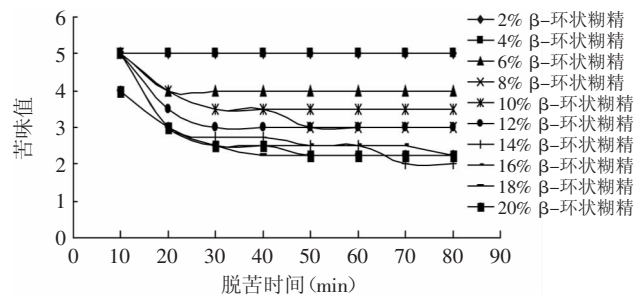


图4 β-环状糊精包埋时间对脱苦的影响

Fig.4 Effect of the processing time of β-cyclodextrin on debitterize

2.2.2 β-环状糊精的添加量对脱苦的影响 图5说明了在一定量范围内随着环状糊精的添加量增加,酶解物苦味值下降,但当添加量达到24%时,苦味基本无变化。由图5可见,β-环状糊精添加量过多对苦味几乎无影响,但是由于β-环状糊精溶解后黏稠,使

表3 脱苦对核桃蛋白酶解物降血压活性的影响
Table 3 Effect of debitterize on the ACE inhibitory activity

β-环状糊精或活性炭添加量(%)	脱苦时间(min)	pH	苦味值	ACE抑制率(%)	ACE抑制率降低百分率(%)
0	0	7	5	72.04	0
活性炭用量40	80	7	2	60.65±1.09	15.81
β-环状糊精22	30	7	2	71.96±1.09	0.12
β-环状糊精24	30	7	1.5	69.35±0.65	3.74
β-环状糊精26	30	7	1.5	60.00±5.65	16.71

得核桃多肽液感官品质下降,产生异味,因此β-环状糊精添加量不宜过多。

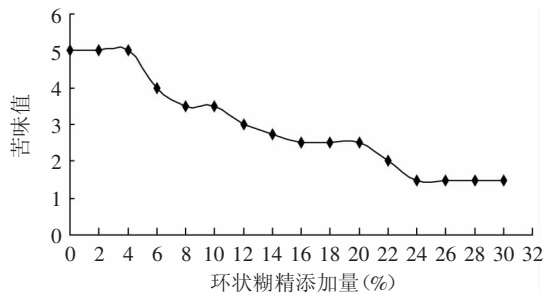


图5 β-环状糊精添加量对脱苦的影响

Fig.5 Effect of the amount of β-cyclodextrin on debitterize

2.3 脱苦对核桃蛋白酶解物降血压活性的影响

由以上实验结果筛选出几种脱苦效果的较佳实验组合,来考察脱苦对核桃蛋白酶解物降血压活性的影响。活性炭的脱苦效果要综合考虑苦味降低程度和氮损失量两个因素,得出最佳的组合为活性炭用量40%,脱苦时间80min, pH=7,苦味值为2,苦味不明显,氮损失率低于2.790%。β-环状糊精脱苦在其添加量达22%以上时,苦味值降低至2以下,苦味不明显。因此选择这几种实验组合来考察脱苦对核桃蛋白酶解物降血压活性的影响,结果如表3所示。

由表3可知,活性炭脱苦对ACE抑制率影响较大,明显降低其抑制率,可见活性炭虽有好的脱苦效果,但其使酶解物营养价值降低的同时,又会降低酶解物降血压的活性,因此不可取。β-环状糊精脱苦对ACE抑制率也有一定影响,但影响较小,β-环状糊精添加量越大,ACE抑制率越低。当β-环状糊精添加量为22%时,包埋30min,核桃蛋白酶解物苦味值降为2,ACE抑制率降低最少,为0.12%,当β-环状糊精添加量为24%时苦味值达最低值1.5,ACE抑制率降低3.74%,也是可取的。β-环状糊精添加量增加到26%时,ACE抑制率降低较多,这可能是由于β-环状糊精是中空状,可以与大小、性质合适的小分子形成包合物。β-环状糊精添加量多,分子与分子之间竞争,形成了更为稳定的包合物,使得具有苦味的疏水性小分子肽更不易脱离。另外,β-环状糊精由于其本身不会改变生物多肽的活性,脱苦之后又不用将其去除,而且还具有圆润柔滑的口感,因此选用β-环状糊精脱苦较好。

3 结论

本文采用了活性炭吸附和β-环状糊精掩盖两种脱苦方法脱除核桃蛋白酶解物的苦味。活性炭脱苦,

当活性炭用量为50%,脱苦时间为100min, pH=8时可使苦味值小于1,效果虽好,但用其脱苦氮损失率较大,造成了酶解物营养价值的大幅度降低,活性炭用量为40%,脱苦时间为80min, pH=7时氮损失率最低,为2.610%,苦味值也不高为2,但在此条件下,酶解物的降血压活性大大降低,故核桃蛋白酶解物不宜采用活性炭脱苦。而采用β-环状糊精脱苦,效果虽不及活性炭,但当其添加量达24%以上时苦味值可低至1.5,基本无苦味,对酶解物的降血压活性影响也较小。实验结果显示,当β-环状糊精的添加量为22%时苦味值为2,降血压活性仅降低0.12%,当β-环状糊精添加量为24%时苦味值降至1.5,降血压活性降低3.74%。β-环状糊精不但价格低廉易得,具有圆润柔滑的口感,且不会影响核桃蛋白酶解物的营养价值。由此可见,β-环状糊精脱苦是核桃蛋白酶解物进行脱苦的最佳途径。

参考文献

- [1] 李敏,刘媛,孙翠,等. 核桃营养价值研究进展[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(6): 166.
- [2] 黄黎慧,黄群,孙木国,等. 核桃的营养保健功能与开发利用[J]. 粮食科技与经济, 2009(4): 48.
- [3] Chen J, Suetsuna K, Yamauchi F. Isolation and characterization of immunostimulative peptides from soybean[J]. Journal of Nutrition Biochemistry, 1995(6): 310-313.
- [4] 马铁铮,王强,周素梅. 蛋白短肽苦味成因与脱苦技术研究进展[J]. 中国粮油学报, 2008, 23(6): 220-224.
- [5] 冯虹霞,陆兆新,尤华. 苦味肽的形成及脱苦方法的研究[J]. 食品科学, 2002, 23(5): 152-153.
- [6] 许慧娇,郝艳宾,齐建勋,等. 核桃蛋白酶解物体外抗氧化及降血压活性研究[J]. 农产品加工·创新版, 2009(10): 39.
- [7] 隋玉杰,何慧,王进,等. 玉米醒酒肽的脱苦及其对活性的影响[J]. 中国粮油学报, 2007, 22(5): 45.
- [8] 蒲云健,梁歧. 大豆寡肽脱苦技术的研究[J]. 粮油加工, 2004(1): 46-47.
- [9] Cushman D W, Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the Angiotensin Converting Enzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20: 1637-1648.
- [10] Uri Cogan, Michael Moshe, Shoshana Mokady. Debittering and Nutritional Upgrading of Enzymic Casein Hydrolysates[J]. J Sci Food Agric, 1981, 32: 459-466.
- [11] 淡家林. 环状糊精的应用[J]. 微生物学通报, 1986(4): 162.
- [12] 唐传核,彭志英. 大豆蛋白水解物的苦肽以及脱除方法进展[J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 170.