

# 牦牛乳酪蛋白肽制备及乙酰化脱苦

纪银莉<sup>1</sup>,高维东<sup>2</sup>,宋礼<sup>1</sup>,何潇<sup>1</sup>,丁建明<sup>2</sup>,谢小冬<sup>3,\*</sup>

(1.甘肃华羚生物技术研究中心,甘肃兰州 730000;

2.甘肃省干酪素工程技术研究中心,甘肃兰州 730000;

3.兰州大学基础医学院,甘肃兰州 730000)

**摘要:**采用碱性蛋白酶对牦牛乳酪蛋白进行水解,得到牦牛乳酪蛋白肽。以醋酸酐为酰化试剂,利用结构修饰的方法对牦牛乳酪蛋白肽进行脱苦研究,探讨醋酸酐添加量、pH对牦牛乳酪蛋白肽酰化度及苦味的影响。结果显示,碱性蛋白酶最佳水解条件为:温度55℃,pH7.0,酶添加量1.25%,反应3h。维持酰化反应pH7以上,产物乙酰化程度最高,醋酸酐的添加量与脱苦效果呈正比,当醋酸酐添加量为40%时,牦牛乳酪蛋白肽酰化产物的苦味基本消失。

**关键词:**酪蛋白肽,醋酸酐,脱苦

## Preparation and acetylated debittering of yak milk casein peptides

Ji Yin-li<sup>1</sup>, GAO Wei-dong<sup>2</sup>, SONG Li<sup>1</sup>, HE Xiao<sup>1</sup>, DING Jian-ming<sup>2</sup>, XIE Xiao-dong<sup>3,\*</sup>

(1.Gansu Hua Ling Biotechnology Research Center, Lanzhou 730000, China;

2.Gansu Casein Engineering and Technology Research Center, Lanzhou 730000, China;

3.School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:**Preparation of yak milk casein peptides by hydrolysis of yak milk casein with alkaline protease was studied. Yak milk casein peptides was modified to carry out on the debittering research by the acetic anhydride of structural modification. The influence of the adding amount of acetic anhydride and pH on the degree of Yak milk casein peptides acetylation and bitterness was discussed. The result showed that: the enzyme dosage of substrate 1.25%, pH7.0, 55℃, 3h had the optimum hydrolysis conditions. Maintaining acylation reaction pH above 7, the degree of acetylation were the highest, the acetic anhydride adding amount proportional to the effects of debittering. When acetic anhydride dosage was 40%, the bitterness of yak milk casein peptide acylation product would be disappeared.

**Key words:** casein peptide; acetic anhydride; debittering

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)06-0302-04

蛋白质作为人体必需的营养成分,在人体内主要以氨基酸和多肽的形式被人体所吸收、利用,其中大量的多肽又因兼具营养价值和功能特性,在提高蛋白质的利用率和功能性方面受到了食品行业的广泛关注。蛋白质水解会产生一系列分子量在6000u以下,含有疏水性氨基酸的多肽,这类多肽带有不同程度的苦味<sup>[1]</sup>,严重影响了其在食品领域中的应用<sup>[2-3]</sup>,这就需要对其进行脱苦研究,改善它的风味,提高它在食品行业的应用性能<sup>[4]</sup>。多肽中疏水性氨基酸置于C端或侧链基团较大的疏水性氨基酸残基靠近C端,而亲水性氨基酸置于N端是多肽产生苦味的重要原因之一<sup>[5-6]</sup>。根据苦味产生的机理,目前对多肽的脱苦方法主要有物理脱苦<sup>[7-8]</sup>、酶法脱苦<sup>[9-10]</sup>、微生物脱苦<sup>[11-12]</sup>等多种方法。所有这些方法通过改变或直接切除肽的苦味结构来实现脱苦的目的。然而,在很多情况下,苦素因其在营养或药物治疗中

的重要作用而不得不保存下来。根据这一原理,可以通过对多肽进行化学修饰<sup>[13-14]</sup>,改变多肽结构来达到对多肽脱苦的目的。本实验将牦牛乳酪蛋白酶解,得到牦牛乳酪蛋白肽,然后利用醋酸酐将多肽中的氨基乙酰化(图1),对多肽进行结构修饰。探讨了醋酸酐添加量、pH对牦牛乳酪蛋白肽酰化度和苦味的影响。

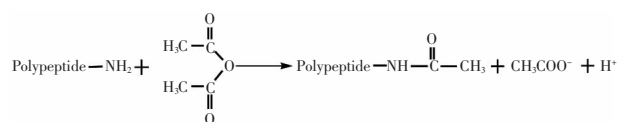


图1 醋酸酐与多肽中氨基反应

Fig.1 Reaction of acetic anhydrides with the amino group of polypeptide

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

牦牛乳酪蛋白 甘肃华羚酪蛋白股份有限公司,食品级,蛋白含量92%;碱性蛋白酶 诺维信(中国)生物技术有限公司;醋酸酐 天津光复精细化工

收稿日期:2012-08-17 \* 通讯联系人

作者简介:纪银莉(1981-),女,中级工程师,研究方向:食品科学。

有限公司,分析纯;其他试剂 均为分析纯。

DD-5M低速离心机 湘仪离心机仪器有限公司;SD1500喷雾干燥机 上海沃迪科技有限公司;RE52-99旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;UV2450紫外分光光度计 日本岛津。

### 1.2 实验方法

1.2.1 牦牛乳酪蛋白肽的制备 称取一定量牦牛乳酪蛋白加水配制成5% (w/v) 的酪蛋白溶液,在一定的pH、温度、加酶量、反应时间下水解,不断搅拌,用1mol/L氢氧化钠保持反应体系为固定pH,水解结束后在80℃灭酶反应15min,冷却至室温,调节pH至4.6,4000g离心,除去沉淀,回调pH为5.5,喷雾干燥。

1.2.1.1 碱性蛋白酶制备牦牛乳酪蛋白肽最优条件研究 在前期单因素实验的基础上,选取pH、温度、酶用量、反应时间为因素,以牦牛乳酪蛋白水解度为指标,设计四因素三水平正交实验。以确定牦牛乳酪蛋白最佳水解工艺,正交实验因素水平设计如表1所示。

表1 正交实验因素水平设计

Table 1 Factors and levels in orthogonal design

水平	因素			
	A pH	B 温度(℃)	C 加酶量(%)	D 时间(h)
1	6.5	45	0.75	2
2	7.0	50	1	3
3	7.5	55	1.25	4

1.2.2 牦牛乳酪蛋白肽乙酰化 称取一定量的牦牛乳酪蛋白肽加水配制成10% (w/v) 的肽溶液,在冰浴条件下分次加入醋酸酐/牦牛乳酪蛋白肽 (v/w) 比为0.5:5、1:5、2:5、3:5、4:5、1:1的醋酸酐,维持pH7.5的条件下搅拌反应,醋酸酐添加完毕,待pH稳定后结束反应。加水稀释乙酰化的牦牛乳酪蛋白肽溶液,旋转蒸发,喷雾干燥。

1.2.3 水解度(DH)的测定<sup>[15]</sup> 取牦牛乳酪蛋白酶水解液10mL,去二氧化碳蒸馏水30mL于小烧杯中,调节pH到8.2,再加入10mL中性甲醛,反应1min后,用标准氢氧化钠滴定至pH9.2,记录初点值和终点值,未加酶水解的酪蛋白溶液为空白。水解度计算公式见式(1):

$$DH(\%) = \frac{M(V-V_0)}{C_{wo}V_1X} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式中:DH—牦牛乳酪蛋白的水解度(%);M为氢氧化钠溶液的浓度(mol/L);V—牦牛乳酪蛋白酶水解液滴定时消耗的氢氧化钠溶液的体积(mL);V<sub>0</sub>—空白液滴定时消耗的氢氧化钠溶液的体积(mL);C<sub>wo</sub>、V<sub>1</sub>—所取酪蛋白溶液的浓度(mol/L)、体积(mL);X—酪蛋白样品中蛋白质含量,通过蛋白质测定方法,测得为0.909。

1.2.4 酰化度测定 茚三酮比色法<sup>[16-18]</sup>:取浓度为10% (w/v) 的酰基化酪蛋白肽溶液1mL,加入2% (w/v) 茚三酮溶液1mL,混合液于100℃水浴上加热5min,迅速冷却至25℃,加入5mL蒸馏水,在580nm波长下,测定溶液的吸光度,以2% (w/v) 茚三酮溶液为参比液。吸光度表示游离氨基与茚三酮试剂的反应程度,吸

光度越大表示改性蛋白的酰化程度越低,酰化程度的计算公式见式(2):

$$\text{酰化程度}(\%) = (\text{肽溶液吸光度} - \text{酰化后肽溶液吸光度}) / \text{肽溶液吸光度} \times 100 \quad \text{式(2)}$$

1.2.5 苦味评价方法<sup>[9]</sup> 将乳蛋白肽粉溶液苦味定义为10分,取20mL水解液10份,分别加入10、20、30、40、50、60、70、80、90、100mL的蒸馏水,搅拌均匀,将其苦味值分别定义为9、8、7、6、5、4、3、2、1、0。将样品按照1g/30mL的浓度配成溶液,抽取10人(均为不吸烟者)品尝,感官评价品评出苦味等级,判断苦味值为0~10。分为极苦(+++,苦味值≥7)、苦(++ ,苦味值5~6)、微苦(+ ,苦味值4~5)、基本无苦(- ,苦味值≤3)。

## 2 结果与分析

### 2.1 牦牛乳酪蛋白酶解研究

L<sub>9</sub>(4<sup>3</sup>)的正交实验结果及分析见表2。对于水解度而言,最优水平组合是A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>,即pH7.0、温度为55℃、加酶量为酶/底物(w/w)比为1.25%、水解时间为3h,在该条件下,经验证实验表明,牦牛乳酪蛋白的水解度为6.85%。

由极差R可知,4个因素对牦牛乳酪蛋白水解度影响的显著性顺序为:加酶量>pH>水解温度>水解时间,加酶量对牦牛乳酪蛋白水解度的影响大,可以认为其在整个过程中起决定作用。

表2 L<sub>9</sub>(4<sup>3</sup>)正交实验结果及分析表

Table 2 Results and analysis of orthogonal array design experiments

实验号	A	B	C	D	水解度(%)
1	1	1	1	1	5.03
2	1	2	2	2	5.97
3	1	3	3	3	6.23
4	2	3	2	3	6.13
5	2	1	3	1	6.53
6	2	2	1	2	5.52
7	3	1	3	2	6.41
8	3	2	1	3	5.33
9	3	3	2	1	6.03
k <sub>1</sub>	5.683	5.857	5.293	5.863	
k <sub>2</sub>	6.060	5.883	5.983	5.907	
k <sub>3</sub>	5.923	5.927	6.390	5.897	
R	0.377	0.070	1.097	0.044	

### 2.2 牦牛乳酪蛋白肽乙酰化改性研究

在确定牦牛乳酪蛋白酶水解条件后,就牦牛乳酪蛋白肽粉乙酰化改性进行研究,探讨牦牛乳酪蛋白肽粉乙酰化程度与牦牛乳酪蛋白肽粉溶液苦味的关系。

2.2.1 醋酸酐添加量与酰化度关系 由表3可知,选取水解度为6.85%的牦牛乳酪蛋白肽粉利用醋酸酐进行酰化,维持反应pH8,冰水浴的条件下,改变醋酸酐添加量,并保持各个反应中醋酸酐不同的添加次数下每次醋酸酐的添加量都一致,得到的牦牛乳酪蛋白肽粉的酰化度随醋酸酐添加量的增加而逐渐

增大。

表3 牦牛乳酪蛋白肽粉乙酰化

Table 3 Acetylation of Yak milk casein peptides powder

醋酸酐/底物	醋酸酐添加次数	酰化度(%)
0.5:5	2	12
1:5	4	30
2:5	8	62
3:5	12	78
4:5	16	86
1:1	20	89

由图2可知,牦牛乳酪蛋白肽粉的酰化度随醋酸酐的添加量的增大而逐渐增大,醋酸酐添加量为60%时,牦牛乳酪蛋白肽粉的酰化度逐渐放缓。这说明,随着酰化的不断进行,肽链上的氨基不断被酰化减少,肽链的疏水性增强,降低了酰化反应速率。

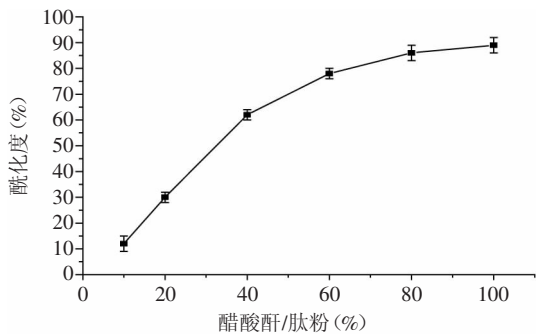


图2 牦牛乳酪蛋白肽粉酰化曲线

Fig.2 Acylation curve of Yak milk casein peptides powder

2.2.2 pH对醋酸酐酰化的影响 按照表3的条件进行反应,在醋酸酐添加量相同的情况下,不维持pH的牦牛乳酪蛋白肽粉的酰化度小于维持pH的牦牛乳酪蛋白肽粉的酰化度。这说明,水解度为6.85的牦牛乳酪蛋白肽粉中还存在未被水解破坏的蛋白质二级或三级结构,部分氨基被包含在蛋白质结构内部,降低了酰化的反应性。当维持pH>7的弱碱性条件下,酪蛋白有较好的溶解性,促进了醋酸酐与未被酶水解破坏的蛋白质结构内部氨基的作用,酰化度随之也增大;而不维持pH的反应由于醋酸酐与氨基作用产生乙酸提高了溶液的酸性,蛋白质在酸性条件下溶解性较差,导致未被酶水解破坏的蛋白质

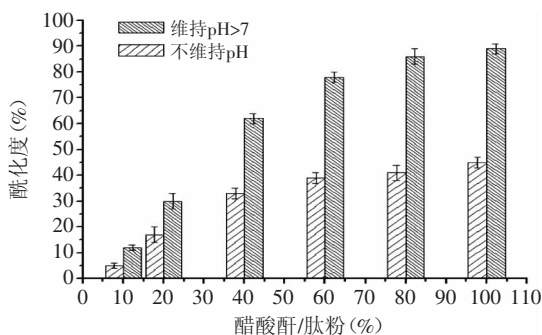


图3 pH对牦牛乳酪蛋白肽酰化度的影响

Fig.3 The influence of pH on the degree of Yak milk casein peptides acetylation

结构内部氨基无法充分与醋酸酐作用,酰化度随之降低。

2.2.3 酰化度对牦牛乳酪蛋白肽苦味的影响 将酰化前和酰化后不同酰化度的牦牛乳酪蛋白肽按照1g/30mL的浓度配成溶液,随机抽取十人进行品尝。由表4可知,当醋酸酐添加量达到40%时,酰化产物的苦味基本消失,达到了脱苦效果。在醋酸酐添加量相同的情况下,维持pH>7与不维持pH造成酰化产物的酰化度不同,但对酶解液苦味影响不大。这说明牦牛乳酪蛋白酶水解液苦味主要是由游离的肽链上的氨基引起的,而仍存在于未被酶水解破坏的蛋白质结构内部氨基则对苦味的贡献不大。

表4 酰化度与苦味的关系

Table 4 Relationship of acylation degree and bitterness

醋酸酐用量 (%)	酰化度 (%)		苦味	
	维持pH>7	不维持pH	维持pH>7	不维持pH
0	0	0	+++	+++
10	12	5	++	++
20	30	17	+	+
40	62	33	-	-
60	78	39	-	-
80	86	41	-	-
100	89	45	-	-

### 3 结论

碱性蛋白酶水解牦牛乳酪蛋白的最佳水解条件为,温度55℃,pH7.0,酶添加量1.25%,反应3h。用醋酸酐对水解产物进行脱苦,反应pH对乙酰化影响最大,维持乙酰化反应pH7以上时,水解产物乙酰化程度最高。醋酸酐的添加量与脱苦效果有正相关性,随着醋酸酐的添加量增大,水解产物的苦味逐渐变小,当醋酸酐添加量为40%时,牦牛乳酪蛋白肽酰化产物的苦味基本消失。

### 参考文献

- [1] IZAWA K, AMINO Y, KOHMURA M, *et al.* Human environment interactions: taste[M]. Oxford: Elsevier, 2010: 631-671.
- [2] 姜曼, 宋俊梅. 大豆肽的营养价值及脱苦方法的研究进展[J]. 粮食科技与经济, 2009(4): 38-40.
- [3] 陶红, 梁歧, 赵谋明. 双酶法水解对大豆寡肽苦味的影响[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2006, 34(8): 121-125.
- [4] SAHA B C, HAYASH K. Debitting of protein hydrolyzates[J]. Biotechnology Advances, 2001, 19: 355-370.
- [5] KIM H O, EUNICE C Y, LI Chan. Quantitative structure: activity relationship study of bitter peptides[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 2006, 54(26): 10102-10111.
- [6] 张海秀, 王锡昌, 刘源. 食品中的呈味肽及其呈味机理研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(7): 320-326.
- [7] SZEJTLI J, SZENTE L. Elimination of bitter disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2005, 61: 115-125.
- [8] FAVARO-TRINDAD C S, SANTANA A, QUINTERO M, *et al.*

(下转第308页)



高,同时酶解产物中小肽的比重高,而游离氨基酸的比重低。在本实验的最佳酶解条件下,可以使底物中小肽占总蛋白质的比重从7.11%升高至39.68%。

### 3 结论

木瓜蛋白酶是一种高效蛋白水解酶,用于酶解小桐子仁粕可以获得较高产量的酶解产物——小肽。通过单因素和正交实验,得到最佳酶解工艺条件为:加酶量180U/g,酶解时间36h,料液比1:3,pH5.5,酶解温度50℃,在此条件下酶解产物中的小肽含量可达217.42mg/g。同时,木瓜蛋白酶还具有酯酶的活性,对动植物中的酯、酰胺等也有较强的水解能力,这对促进小桐子仁粕中主要毒素佛波醇酯的水解,减少水解产物中残留毒性物质具有积极作用<sup>[15-16]</sup>。该工艺绿色环保,操作简单且成本较低,可以利用小桐子仁粕直接生产出小肽饲料,提高蛋白质的利用效率,这对于小桐子资源的综合利用以及缓解我国蛋白质饲料短缺具有重要的应用价值。

### 参考文献

- [1] 吴远根,彭湘屏,张晓娟,等.产阮假丝酵母固态发酵麻疯树饼粕产菌体蛋白的研究[J].食品工业科技,2009,30(2):161-164.
- [2] 张伶俐,苏勇,Makkar H,等.体外评估一种新型蛋白原料——麻疯树脱毒浓缩蛋白的营养价值[J].畜牧与兽医,2010,42(9):57-59.
- [3] Aregheore EM, Becker K, Makkar HPS. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats [J]. South Pacific Journal of Natural Science, 2003, 21(1): 50-56.
- [4] 马博,兰翠玲,李力.麻疯树籽饼粕饲用品质改良及深加工技术研究进展[J].中国油脂,2011,36(5):26-30.
- [5] Aderibigbe AO, Johnson COLE, Makkar HPS, et al. Chemical composition and effect of heat on organic matter- and nitrogen-degradability and some antinutritional components of *Jatropha meal*[J]. Animal Feed Science Technology, 1997, 67: 223-243.
- [6] Makkar HPS, Martínez-Herrera J, Becker K. Variation in seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil, protein and phorbol esters in toxic and non-toxic genotypes of *Jatropha curcas*[J]. J Plant Sci, 2008, 3(3): 260-265.
- [7] Kumar V, Makkar HPS, Amselgruber W, et al. Physiological, haematological and histopathological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings fed with differently detoxified *Jatropha curcas* kernel meal [J]. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48(8-9): 2063-2072.
- [8] 张春强,刁其玉,屠焰,等.麻疯树籽实的毒性原理及其脱毒处理方法[J].饲料博览,2009(5):29-31.
- [9] 郭玉东,张洋,张均国.小肽饲料营养价值及评价方法[J].饲料工业,2007,28(7):13-16.
- [10] 袁书林,陈海燕,杨明君,等.小肽营养研究进展[J].粮食与饲料工业,2002(8):37-39.
- [11] Martínez-Herrera J, Siddhuraju P, Francis G, et al. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico [J]. Food Chemistry, 2006, 96(1): 80-89.
- [12] 中国轻工业联合会. QB/T 2879-2007 海洋鱼低聚肽粉[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [13] 中华人民共和国农业部. GB/T 6432-1994 饲料中粗蛋白测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1994.
- [14] 中华人民共和国农业部. GB/T 6435-1986 饲料水分的测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 1986.
- [15] 冯定远,陈芳艳.木瓜蛋白酶的酶学特性及其在饲料工业中的应用[J].饲料工业,2011,32(20):1-5.
- [16] 凌兴汉,吴显荣.木瓜蛋白酶与番木瓜栽培[M].北京:中国农业出版社,1998:106-108.
- [17] 粮食与油脂,1999(3):24-25.
- [14] 王飞镛,崔英德,周智鹏.天然大豆蛋白的功能性及其化学改性策略[J].功能材料(增刊),2004,35:2328-2331.
- [15] 钱芳,王凤翼,邓岩.胃蛋白酶解大豆蛋白苦味肽的粗分离[J].中国乳品工业,2002,30(2):20-23.
- [16] 宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998:119-124.
- [17] FRANZEN K L, KINSELLA J E. Functional properties of succinylated and acetylated soy protein[J]. J Agric Food Chem, 1976, 24(4): 788-795.
- [18] PAIK W K, KIM S. Effect of methylation on susceptibility of protein to proteolytic enzymes[J]. Biochemistry, 1972, 11(14): 2589-2593.
- [19] 裘迪仙,周涛,戴志远,等.鲑鱼蛋白液脱苦脱腥的研究[J].北京水产,2002(6):46-48.

(上接第304页)

al. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate[J]. Food Hydrocolloids, 2010, 24: 336-340.

[9] FITZGERALD R J, O'CUINN G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates[J]. Biotechnology Advances, 2006, 24: 234-237.

[10] 潘进权.毛霉亮氨酸氨肽酶的纯化及性质研究[J].食品科学,2012,33(7):163-167.

[11] NISHIWAKI T, YOSHIMIZU S, FURUTA M, et al. Debittering of Enzymatic Hydrolysates Using an Aminopeptidase from the Edible Basidiomycete *Gibberula frondosa*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 93(1): 60-63.

[12] SPELLMAN D, O'CUINN G, FITZGERALD R J. Bitterness in *Bacillus* proteinase hydrolysates of whey proteins[J]. Food Chemistry, 2009, 114: 440-446.

[13] 孙冀平,李艳娜,沈蓓英.掩盖—脱苦的实用新方法研究