

加工工艺对荞麦蛋白热性质和体外模拟消化过程的影响

米宏伟¹, 郑宗坤¹, 唐传核², 杨晓泉²

(1. 深圳大学化学与化工学院, 广东 深圳

518060 2. 华南理工大学蛋白工程研究中心, 广东 广州

510640)

摘 要: 本实验研究了加工工艺对荞麦蛋白(BWP)的热性质和体外模拟消化过程的影响。荞麦蛋白有两个变性温度, 在80℃和102℃附近, 分别对应8S和13S球蛋白的变性。脂肪的存在对荞麦蛋白的变性温度影响不大, 但会降低其热焓。在模拟的胃蛋白酶消化过程中, BWP的氮释放量较大豆分离蛋白(SPI)先高后低; 而在胰蛋白酶消化过程中, BWP的氮释放量较SPI高。这与其蛋白组成以及SPI中存在活性较高的胰蛋白酶抑制剂有关。荞麦蛋白的球蛋白(13S和8S)易被降解(胃蛋白酶消化阶段), 而2S清蛋白的降解主要集中在胰蛋白酶消化阶段。经脱脂处理、超声协助提取的荞麦蛋白(DFU-BWP)和搅拌提取的荞麦蛋白(FM-BWP)的氮释放量在整个胃蛋白酶消化过程中类似, 均明显高于超声提取的荞麦蛋白(FU-BWP) ($p < 0.05$), 说明胃蛋白酶对BWP的降解过程与其脂肪含量以及加工工艺有关。

关键词: 荞麦蛋白(BWP); 热变性; 体外消化; 加工工艺

Thermal Properties and *in vitro* Digestibility of Buckwheat Protein Products: Processing Effects Study

MI Hong-wei¹, ZHENG Zong-kun¹, TANG Chuan-he², YANG Xiao-quan²

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

2. Research Center of Food Protein Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The effect of processing on thermal properties and *in vitro* digestibility of buckwheat protein (BWP) products were investigated. All the BWP samples exhibited two observable endothermic peaks with similar peak temperature (T_d) values with the major peak at about 102 °C and the minor one at near 80 °C. The two transition peaks observed may be attributed to 13S globulin with the T_d near 102 °C and 8S globulins with the T_d near 80 °C respectively. The presence of high level of lipid (e. g. 17.8% in the FU-BWP) significantly decreases the enthalpy changes (ΔH) ($p < 0.05$), and in some extent increases the $\Delta T_{1/2}$ ($p < 0.1$) so as to suggest a decline of the extent of ordered structure. In simulated gastric fluid, the digestion pattern of BWP was

收稿日期: 2006-10-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20306008)

作者简介: 米宏伟(1982-), 女, 硕士, 主要从事蛋白质化学与工程方面的研究。

Trestatins ($ID_{50} = 2.1 \times 10^{-5} \sim 5.4 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 在数量级上相同, 说明其对哺乳动物胰 α -淀粉酶具有较强的抑制作用。WBA I 淀粉酶抑制剂属于糖蛋白, 但其较一般的蛋白质稳定, 对温度、pH 都具有较高的稳定性, 具有较大的实用价值。

参考文献:

[1] LEE S C, WHITAKER J R. The molecular weight of α -amylase inhibitor from white bean cv 858B (*Phaseolus vulgaris* L) is 56 kDa, not 20 kDa[J]. Journal of Food Biochemistry, 2000, 24: 55-67.

[2] COLOWICK S P, KAPLAN N O. Methods in enzymology[M]. New York: Academic Press, 1955: 149-158.

[3] YOSHIKAWA H, KOTARU M, TANAKA C, et al. Purification and some properties of an α -amylase inhibition from tora bean (*Phaseolus vulgaris*) [J]. Home Econ Jpn, 1999, 50(3): 243-249.

[4] 刘绮英, 刘华珍, 江宏雷. 微生物产生的淀粉酶抑制剂研究 III 淀粉酶抑制剂抑制动力学研究[J]. 中国抗生素杂志, 1994, 19(1): 17-20.

[5] 江宏磊, 张慧, 郑卫, 等. 弹性蛋白酶抑制剂 Fw99468 抑制动力学的研究[J]. 海峡药学, 2005, 17(6): 168-170.

[6] 李宪瑾. 海藻中 α -葡萄糖苷酶抑制剂的分离鉴定及活性机理的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2001.

evidently different from that of SPI. In the pepsin digestion, the %N release of BWP increased more quickly than SPI at the beginning, but more slowly than SPI after 30 min. However, the %N release of BWP increases much faster than that of SPI in the trypsin-digested stage. This is because of different components of them and the presence of high activity of trypsin inhibitors in SPI. Most of the protein constituents of BWP globulins (including 13 S and 8 S globulins) are rapidly and completely hydrolyzed by pepsin within 1 min to form the protein hydrolysate products (with MW lower than 20 kDa), when 2 S albumins are almost intact during the whole pepsin digestion but hydrolyzed totally in the trypsin digestion. BWP with low lipid content shows high %N release in comparison with those with high lipid content ($p < 0.05$). These results suggested that the digestibility of BWP can be associated with its lipid contents, which are affected by processing.

Key words buckwheat protein (BWP); thermal denaturation; *in vitro* digestibility; processing

中图分类号: TS201.2; R151.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0032-05

荞麦蛋白具有较广泛的生物活性和良好的功能性质, 有利于将其应用于食品配方和加工中。国外研究^[1-2]显示, 荞麦蛋白良好的降胆固醇功效是由于其具有较低的消化率所致; 同时, 荞麦蛋白的低消化率也可能是其引起过敏的主要原因之一。因此, 有必要对 BWP 在消化道环境下的消化行为, 及加工工艺热变性等对 BWP 消化过程的影响进行研究。

本实验不仅要研究加工工艺对荞麦蛋白热性质的影响, 而且, 通过模拟人体胃部消化环境的模型, 分析荞麦蛋白产品(BWP)的消化情形。并且探讨加工工艺(如超声处理、脂肪含量等)对 BWP 消化过程的影响。此外, 还比较 BWP 和 SPI 的消化过程。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

荞麦: 原产地河南。

大豆分离蛋白(SPI)(蛋白含量87.38%, N×6.25) 实验室制; Tris Genview 公司分装; 胃蛋白酶(效价 1:10000) Sigma 公司分装; 胰蛋白酶(效价 1:250) Genview 公司分装; 低分子质量(24~97kD)标准蛋白 北京鼎国生物技术有限责任公司; 其他化学试剂均为分析级或生化级。

1.2 仪器与设备

自动凯氏定氮仪 瑞士 Büchi 公司; 探头式超声仪 NP-S-15-500 广州市新栋力超声电子有限公司; 高速冷冻离心机 CR22G 日本 HITACHI Koki 公司; ALPHA1-4 冷冻干燥机 博励行仪器有限公司; DYCZ-24D 电泳仪 北京市六一仪器厂; TA Q100 差示扫描量热仪 美国 TA 仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 基本指标测定

蛋白质含量测定: 参照 GB5009.5-85; 粗脂肪含量测定: 参照 GB5009.6-85; 水分含量测定: 参照 GB5009.3-85; 灰分含量测定: 参照 GB5009.4-85。

1.3.2 荞麦蛋白(BWP)的制备工艺

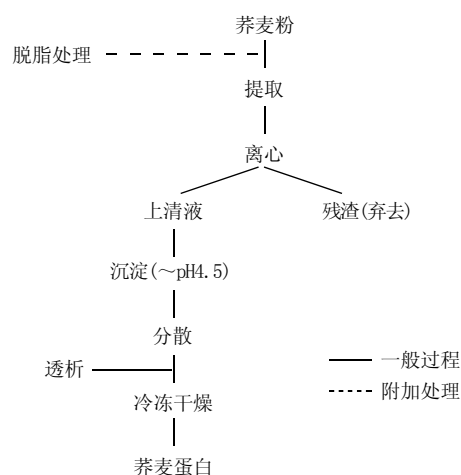


图1 荞麦蛋白产品(BWP)的制备工艺

Fig.1 Production process of buckwheat protein products (BWP)

1.3.3 热分析

精确称取 2.3~2.5mg 样品(含 1.5~2.0mg 蛋白), 置于干净铝盒中, 加入 10μl 的 0.05mol/L 的磷酸缓冲液。待充分溶解后, 将铝盒密封。升温速度为 5℃/min, 温度扫描范围为 20~140℃, 以空盒作为参比。

1.3.4 SDS-PAGE 电泳

参照 Laemmli^[3]的方法。

1.3.5 体外消化

BWP 和 SPI 的体外消化实验根据 Fu T J 等^[4]和 Nunes A 等^[5]报道的体外消化模型进行, 具体操作步骤如下: 一定量的 BWP 和 SPI 悬浮于 pH1.5 的 HCl 溶液形成 1%(W/V) 的溶液, 置于 37℃ 水浴预热处理 3~5min; 然后, 加入一定量的胃蛋白酶(酶与底物质量比为 1:100), 分别在不同消化时间(0、1、5、10、20、30、60 和 120min) 取样分析, 所取的样品用 1.0mol/L NaOH 调节至 pH7.0 以中止消化反应。之后, 在所得的消化液中, 加入一定量的胰蛋白酶(酶与底物质量比为 1:20), 再消化 1、

5、10、20、30、60 和 120 min, 之后取样分析。

1.3.6 氮释放量(%)的测定(TCA-NSI 法)^[6-7]

10ml 10% TCA 加入到 10ml 的不同消化液中, 于 $8000 \times g$ 离心 30min 后, 倒出上清液。沉淀部分再用 10ml 的 10% TCA 洗涤, 并于同样条件下离心, 得到 TCA 不溶组分。蛋白质总氮和 TCA 不溶性氮含量采用凯氏定氮法测得。消化过程氮释放量(%) 由下式计算而得:

$$\text{氮释放量}(\%) = \frac{N_0 - N_t}{N_{\text{tot}}} \times 100$$

式中, N_t 为消化 t 分钟时的 TCA 不溶性氮(mg); N_0 为样品中的 TCA 不溶性氮(mg); N_{tot} 为样品的总氮量(mg)。

1.3.7 数据分析

所有实验数据都用“平均值±标准偏差”表示。不同实验组数据间差异范围取 $p < 0.05$ 或 $p < 0.1$ 。

2 结果与分析

2.1 荞麦蛋白产品(BWP)基本成分分析

荞麦蛋白的化学组成见表 1。超声协助提取荞麦蛋白(FU-BWP)的蛋白含量明显低于机械搅拌提取荞麦蛋白(FM-BWP) ($p < 0.05$), 但脱脂、超声协助提取荞麦蛋白(DFU-BWP)的蛋白含量明显提高, 甚至高于 FM-BWP。FU-BWP 的脂肪含量是 FM-BWP 的 3 倍之多。从表 1 可知, BWP 的蛋白含量与脂类含量呈负相关, 这可能是荞麦中的蛋白质和脂类具有某种亲和作用的缘故^[8]。

2.2 热分析

表 2 列出了各种荞麦蛋白样品变性起始温度(T_m)、峰值温度(T_d)、主吸热峰半峰高($\Delta T_{1/2}$)和热焓(ΔH)。在同样的介质和加热条件下, 各种 BWP 的变性温度(T_m 和 T_d) 没有显著差异, 说明: 在特定介质中, BWP 的热变性不受加工工艺的影响。然而, FU-BWP 的热焓明显低于 FM-BWP 和 DFU-BWP ($p < 0.05$), 说明脂肪的存在会降低 BWP 的热焓。另外, $\Delta T_{1/2}$ 的增加 ($p < 0.1$) (FU-BWP 的峰型较 FM-BWP 和 DFU-BWP 平缓, 见图 2), 进一步说明脂肪的存在抑制了 BWP 的变性。

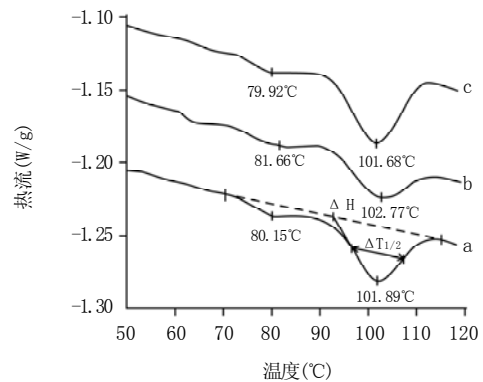
由 DSC 曲线(图 2) 知, 各种荞麦蛋白样品在 80℃ 和 102℃ 附近各有一个吸热峰, 说明荞麦蛋白有两个热变

表 2 不同荞麦蛋白样品(BWP)的 DSC 分析结果

Table 2 DSC analysis results of various BWPs

样品	T_m (°C)	T_d (°C)	ΔH (J/g pro)	$\Delta T_{1/2}$ (°C)
FM-BWP	92.4 ± 1.21^1	1101.7 ± 0.17^a	7.8 ± 0.44^a	9.8 ± 1.00^{ab}
FU-BWP	93.1 ± 0.34^a	102.6 ± 0.63^a	5.9 ± 0.30^b	11.2 ± 0.08^a
DFU-BWP	92.8 ± 0.74^a	102.0 ± 0.45^a	8.7 ± 0.47^a	10.3 ± 0.87^{ab}

注: ¹ 三组平行实验的平均值和标准偏差; ² 两个吸热峰的联合热焓; ^{a, b} 表示同一列数值间有显著性差异 ($p < 0.05$); ^{a, ab} 表示同一列数值间有显著性差异 ($p < 0.1$)。



a. FM-BWP; b. FU-BWP; c. DFU-BWP。

图 2 荞麦蛋白样品(BWP)DSC 曲线
Fig.2 Typical DSC thermograms of various BWPs

性温度。分别对应的 8S 和 13S 球蛋白的变性 SDS-PAGE 图谱见图 3 A。

2.3 BWP 和 SPI 体外消化

在模拟的人体胃部消化环境中, 我们通过 SDS-PAGE 和氮释放量研究并比较了 BWP 和 SPI 对胃蛋白酶和胰蛋白酶的易感性(图 3、4)。由于 BWP 和 SPI 的蛋白组成不同, 使得它们的消化模式有所区别。BWP 主要是由 13S、8S 球蛋白和 2S 清蛋白构成^[9]; 而 SPI 的主要组分为大豆球蛋白(glycinin)和 β -伴大豆球蛋白(β -conglycinin), 大豆球蛋白又由不同的酸性亚基(A1-4)和碱性亚基(B)组成, 而 β -伴大豆球蛋白主要由 α -、 α' -及 β -亚基组成。BWP 球蛋白中大部分组成(包括 13S 和 8S 球蛋白)被胃蛋白酶快速、完全地降解, 形成分子量小于 20kD 的蛋白水解产物(1min 之内), 而在整个胃蛋白酶消化过程中 2S 清蛋白几乎保持完整(图 3A, 1~8 道)。对于 SPI 而言, 大豆球蛋白组分几乎在加入胃蛋白酶 1min 之内被完全降解, 接下来 β -伴大豆球蛋白的 α -亚

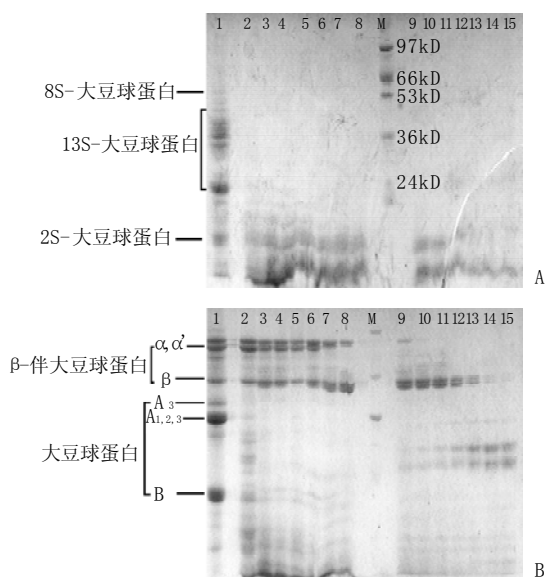
表 1 不同荞麦蛋白产品(BWP)基本成分分析
Table 1 Compositions of various BWPs produced by different processings

样品	基本成分(湿基±SD ¹ , %, W/W)			
	蛋白 ²	脂肪	水分	灰分
搅拌提取 FM-BWP	81.40 ± 0.25^b	6.54 ± 0.20^b	4.48 ± 0.12^b	0.95 ± 0.06^a
超声提取 FU-BWP	66.06 ± 0.37^c	17.82 ± 0.23^a	3.92 ± 0.14^c	0.83 ± 0.15^a
脱脂超声 DFU-BWP	82.26 ± 0.33^a	2.49 ± 0.21^c	5.07 ± 0.01^a	0.82 ± 0.10^a

注: ¹ 两组平行实验的平均值和标准偏差; ² $N \times 6.25$; ^{a, b, c} 不同字母表示同一列数值间有显著性差异 ($p < 0.05$)。

基较易被消化,但 α' -及 β -亚基几乎不被胃蛋白酶消化(图3B,1~8道)。胃蛋白酶消化过程中的氮释放量也反映了此结果(图4)。BWP的胃蛋白酶降解产物呈线性增加(0~10min),而SPI的胃蛋白酶降解产物的线性增加范围为0~20min。加入胃蛋白酶30min之内,BWP较SPI降解得快(图4)。消化30min后,BWP氮释放量的增加趋势逐渐减弱,60min后几乎保持不变。然而,SPI的氮释放量在30min后仍保持快速增长,并于45min左右超过了BWP。

中止胃蛋白酶消化过程(调至pH7.0)后加入胰蛋白



1道为FM-BWP(A)或SPI(B)的谱带;2~8道分别为FM-BWP'(A)或SPI(B)经胃蛋白酶消化1、5、10、20、30、60和120min后的谱带;9~15道分别为FM-BWP'(A)或SPI(B)经胰蛋白酶继续消化1、5、10、20、30、60和120min后的谱带;M道电泳带为标准蛋白,分子质量分别为97、66、53、36和24kD。

图3 FM-BWP(A)和SPI(B)的体外消化过程的SDS-PAGE分析
Fig.3 Typical SDS-PAGE patterns of FM-BWP(A) and SPI(B) digested by pepsin and trypsin for various time

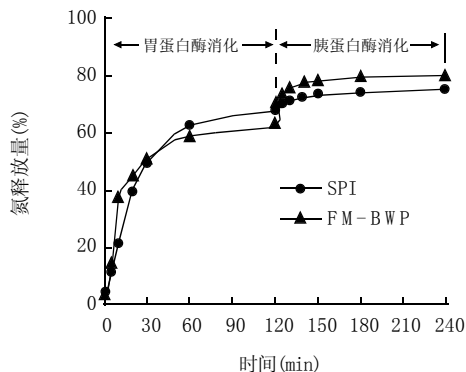


图4 FM-BWP'和SPI的氮释放量随胃蛋白酶/胰蛋白酶消化时间的变化

Fig.4 Nitrogen release of FM-BWP' and SPI digested by pepsin and trypsin as function of time

酶,BWP和SPI的氮释放量增加趋势与胃蛋白酶消化过程类似(图4)。BWP氮释放量较SPI增加更快。BWP的2S清蛋白被胰蛋白酶降解(图3A,9~15道),也可以通过氮释放量的增加来反映(图4)。 β -伴大豆球蛋白的 α' -及 β -亚基聚合成分子量为20kD左右的多肽(图3B,9~15道),与氮释放量的缓慢增加(相对于BWP)保持一致(图4)。BWP和SPI的胰蛋白酶消化过程的不同可能是由豆类中高活性的胰蛋白酶抑制剂引起的^[10]。

2.4 加工工艺对BWP体外消化的影响

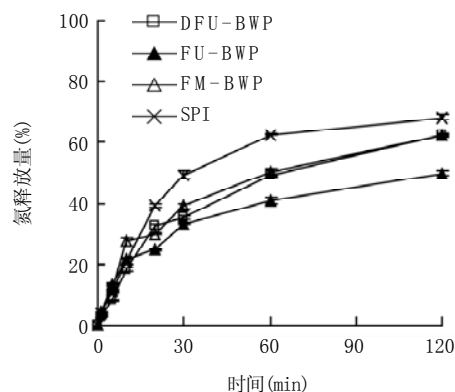


图5 BWP和SPI的氮释放量随胃蛋白酶消化时间的变化

Fig.5 Pepsin-digested curves of various kinds of BWP as function of digestive time

所有BWP的胃蛋白酶降解产物呈线性增加(0~10min),之后增加趋势逐渐减缓(图5)。由图5知,消化开始至10min,BWP较SPI降解快;20min以后,SPI的氮释放量明显高于各种BWP($p < 0.05$)。DFU-BWP和FM-BWP的氮释放量在整个胃蛋白酶消化过程中类似,均明显高于FU-BWP($p < 0.05$)。这可能是BWP中的极性脂质在一定程度上抑制了荞麦蛋白的热变性,进而影响了上荞麦蛋白的消化(表1、2和图2)。结果表明,BWP的胃蛋白酶消化过程与其脂类含量以及加工工艺相关。

3 结论

3.1 荞麦蛋白有两个变性温度,在80℃和102℃附近,分别对应8S和13S球蛋白的变性。脂肪的存在对荞麦蛋白的变性温度影响不大,但会降低其热焯。

3.2 荞麦蛋白的球蛋白(13S和8S)易被降解(胃蛋白酶消化阶段),而2S清蛋白的消化主要集中在胰蛋白酶消化阶段。胃蛋白酶消化过程中,BWP的降解速率较SPI先高后低;而在胰蛋白酶消化过程中,BWP的降解速率较SPI高。这与其蛋白组成以及SPI中存在活性较高的胰蛋白酶抑制剂有关。胃蛋白酶对BWP的降解过程与其脂肪含量以及加工工艺有关。

琯溪蜜柚果皮提取物抑制亚硝化反应的研究

黄高凌, 翁聪泽, 倪 辉, 肖安风, 蔡慧农*

(集美大学生物工程学院, 厦门市食品生物工程技术研究中心, 福建 厦门 361021)

摘 要: 本实验以乙醇、丙酮和水作为提取剂, 对柚皮中的活性物质进行提取, 通过正交试验确定出最佳提取条件; 在模拟人体胃液环境条件下, 采用比色法和紫外光解法分别测定了柚皮提取液对亚硝酸根的清除作用和对亚硝酸合成的阻断作用。结果表明, 以乙醇为提取剂的最佳提取条件为: 90% 乙醇、60℃ 水浴冷凝回流, 提取时间 1h; 提取液对亚硝酸胺、亚硝酸钠的最大阻断率和清除率分别为 95.5% 和 91.8%。同时比较了柚皮提取物阻断亚硝酸胺合成及消除亚硝酸钠的效果。

关键词: 亚硝酸胺; 亚硝酸盐; 柚皮提取物; 抑制

Study on Inhibition of Extract from Guaixi Pomelo Peel to Nitrosation

HUANG Gao-ling, WENG Cong-ze, NI Hui, XIAO An-feng, CAI Hui-nong*

(School of Bio-engineering, Jimei University, Food Bio-engineering Research Center of Xiamen, Xiamen 361021, China)

Abstract: The active substance from Guaixi pomelo peel was extracted through different solvents such as ethanol, acetone and distilled water. The optimum extraction conditions were obtained by the orthogonal test: 90% ethanol in 60℃ water bath condenser extracting 1 hour. The maximum inhibition capability of the extract to nitrosamine ethylamine and scavenging sodium nitrite capability were 95.5% and 91.8%, respectively, and the inhibition capability of the extract to nitrosamine ethylamine and scavenging sodium nitrite capability were compared.

Key words nitrosation; sodium nitrite; shaddock peel extract; inhibition

中图分类号: S666.3 Q621.2554

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0036-04

收稿日期: 2007-09-30

*通讯作者

基金项目: 福建省自然科学基金项目(B0610030); 厦门市科技计划项目(3502Z20063016)

作者简介: 黄高凌(1966-), 女, 副教授, 研究方向为食品化学。

参考文献:

- [1] KAYASHITA J, SHIMAOKA I, NAKAJOH M, et al. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility[J]. *Nutrition*, 1997, 127: 1395-1400.
- [2] TOMOTAKE H, SHIMAOKA I, KAYASHITA J, et al. A buckwheat protein products suppresses gallstone formation and plasma cholesterol more strongly than soy protein isolate in hamsters[J]. *Nutrition*, 2000, 130(7): 1670-1674.
- [3] LAMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227: 680-685.
- [4] FU T J, ABBOT U R, HATZOS C. Digestibility of food allergens and nonallergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid—a comparative study[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 7154-7160.
- [5] NUNES A, CORREIA I, BARROS A, et al. Sequential *in vitro* pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 2052-2058.
- [6] IWAMI K, SAKAKIBARA K, IBUKI F. Involvement of post-digestion 'hydrophobic' peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1986, 50: 1217-1222.
- [7] GE S J, BAI H, YUAN H S, et al. Continuous production of high degree casein hydrolysates by immobilized proteases in column reactor[J]. *Journal of Biotechnology*, 1996, 50: 161-170.
- [8] ZHENG G H, SOSULSKI F W, TYLER R T. Wet-milling, composition and functional properties of starch and protein isolated from buckwheat groats[J]. *Food Research International*, 1998, 30: 493-502.
- [9] FUJINO K, FUNATSUKI H, INADA M, et al. Expression, cloning, and immunological analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seed storage proteins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 1825-1829.
- [10] MARQUEZ M C, FERNANDEZ V, ALONSO R. Effect of dry heat on the *in vitro* digestibility and trypsin inhibitor activity of chickpea flour[J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 1998, 33: 527-532.