

苦荞多肽营养饮料的研究

周小理¹, 李红敏^{1,2}, 周一鸣³, 汪雪平¹, 刘翔海¹

(1.上海应用技术学院生物与食品工程系, 上海 200233; 2.上海水产大学食品学院, 上海 200090;
3.陕西师范大学食品工程系, 陕西 西安 710062)

摘 要: 本试验以苦荞麦为原料, 采用酶解工艺将碱法浸提得到的苦荞复合蛋白水解为多肽液。并以酶解后多肽浓度和水解度为指标, 确定出制备苦荞多肽液的最佳工艺条件。试验表明: 通过先后加入 Flavourzyme 复合风味蛋白酶与 Alcalase Food Grade 水解蛋白酶对苦荞复合蛋白进行混合阶段水解的效果最好; 并采用单因素及正交试验确定出苦荞多肽营养饮料的最佳配方。

关键词: 苦荞多肽; 混合阶段酶解; 营养饮料

Research on Nutrient Beverage with Tartary Buckwheat Peptide

ZHOU Xiao-li¹, LI Hong-min^{1,2}, ZHOU Yi-ming³, WANG Xue-ping¹, LIU Xiang-hai¹

(1.Department of Biology and Food Engineering Shanghai Institute of Technology, Shanghai 200235, China;
2.College of Food, Shanghai Fishery University, Shanghai 200090, China;
3.Department of Food Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract : The Beverage was made with a material of tartary buckwheat. Extracted by the alkali process of generation, a buckwheat protein was hydrolyzed into the polypeptide solution with enzymolysis technology. A optimal processing condition for preparation of tartary buckwheat polypeptide solution was set down according to a target of polypeptide concentration and degree of hydrolysis. Showed as the result, a best effect can be acquired by processing a combined multi-stage hydrolysis, added the Flavourzyme multiple flavor protease and Alcalase Food Grade hydrolysis protease. The optimum recipe of tartary buckwheat nutrient beverage was developed from single factor experiment and orthogonal experiment.

收稿日期: 2005-09-18

基金项目: 上海市高等学校科学技术发展基金项目(03HK10); 上海市重点学科建设项目(P1501)

作者简介: 周小理(1957-), 女, 教授, 研究方向为食品资源的研究与开发。

-
- and the modulation of xenobiotic metabolizing enzymes in rats and mice[J]. Carcinogenesis, 1993, (14): 1167-1173.
- [4] Morse M A, Zu H, Galati A J, et al. Dose-related inhibition by dietaryphenethyl isothiocyanate of esophageal tumorigenesis and DNA methylation induced by N-nitrosomethylbenzylaminein rats[J]. Cancer Lett, 1993, (72): 103-110.
- [5] Nakata S, Sato J, Yamanaka H. Correlation analysis between bladder cancer and cigarette smoking in various countries[J]. Tohoku J Exp Med, 1996, 178: 169-176.
- [6] Musk S R R, Smith T K, Johnson I T. On the cytotoxicity and genotoxicity of allyl and phenethyl isothiocyanates and their parent glucosinolates sinigrin and gluconasturtiin[J]. Mutat Res, 1995, 348: 19-23.
- [7] Cejpek K, Urban J, Velisek J, et al. Effect of sulphite treatment on allyl isothiocyanate in mustard paste[J]. Food Chemistry, 1998, 62: 53-57.
- [8] 姜子涛, 李荣. 快速测定芥末油中异硫氰酸酯的含量[J]. 中国调味品, 1992, (8): 29-30.
- [9] Etoh H, Jian-Sheng Wu, Yagi A, et al. Stabilization of isothiocyanates in wasabi and horse radish by high pressure treatment and addition of proteins[J]. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology, 1994, 41(8): 531-535.
- [10] 童林荟. 环糊精化学 - 基础与应用[M]. 科学出版社, 2001. 3.

Key words: Tartary buckwheat polypeptide; combined multi-stage enzymolysis; nutrient beverage

中图分类号: TS275.4

文献标识码: B

文章编号: 1002-6630(2005)11-0128-05

荞麦属于蓼科荞麦属, 分为普通荞麦(甜荞)和鞑靼荞麦(苦荞)两个栽培种。中国荞麦的种植面积已达 100×10^4 亩, 产量为 105×10^4 t, 其中苦荞种植面积和产量均居世界第一位。近几年来, 荞麦的营养价值已引起了我国和世界各国如美国、加拿大、日本、瑞典、韩国等国家食品营养及医学界的关注。与其他禾谷类粮食相比, 荞麦中含有以黄酮类化合物为主要成分的荞麦多酚, 如芦丁、槲皮素、儿茶素等, 含有多种维生素和矿物质元素。特别是荞麦中蛋白质的结构组成及含量, 使其具有独特的营养和保健功能。国际植物遗传资源研究所已将荞麦归到“未被充分利用的作物”之列, 专家预言荞麦特别是苦荞是本世纪人类的重要食物资源。

近年来, 生物活性肽(bio-active peptides)的结构和功能研究再现高潮, 生物活性肽的开发应用也成为当前生物工程领域的热门课题。肽所具有的极强活性和多样性, 不仅能提供人体生长发育所需的营养物质, 而且具有特殊的生物学功能, 如大豆蛋白制备的大豆多肽, 具有降脂、减肥、提高运动能力的功能, 鸡卵清蛋白制备的白蛋白多肽具有提高免疫、促进消化的功能, 酪蛋白磷酸肽(CPP), 具有促钙吸收, 抗骨质疏松的功能, 以及胶原多肽是皮肤抗皱保湿的首选等。

现代生物代谢试验还发现, 蛋白质并非必须通过消化道中的多种蛋白酶水解后, 最终以氨基酸的形态才能被人体吸收, 而是大部分在多肽形态时就能被直接吸收, 并且其吸收率比氨基酸更快, 同时短肽具有低抗原性, 不会引起食后过敏。

作为食品材料, 肽与蛋白质相比, 还具有许多适合食品加工的优越性。以大豆多肽为例, 其粘度、溶解性以及抗凝胶形成性等均优于大豆蛋白。如大豆多肽溶液在浓度高达 65% 时尚具有良好的流动性, 即使在大豆蛋白的等电点 pH4.3 附近, 仍能保持溶解状态^[1]。

研究还表明, 苦荞麦蛋白与大豆蛋白有其相似性, 本文以苦荞蛋白的水解为切入点, 采用生物酶加工技术, 将荞麦蛋白转变为小分子的肽类和氨基酸, 并将其开发为苦荞多肽营养饮料。为荞麦的深加工研究和开发我国荞麦特色资源具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苦荞麦: 山西产黑丰 1 号; Flavourzyme 复合风味蛋白酶(酶活力 500LAPU/g)、Neutrase 中性蛋白酶(酶活力 0.8AU/g)、Alcalase Food Grade 水解蛋白酶(酶活力

2.4AU/g), 均为 NOVO 公司产。

1.2 试验仪器与设备

101-2B 型干燥箱 上海市实验仪器总厂; SHZ-B 型水浴恒温振荡器 宁波市机电工业研究设计院; LXJ-II 型离心沉淀机 上海医用分析仪器厂; TL-18 型冷冻离心机 上海离心机研究所; PHS-25 型 PH 计 上海精密科学仪器有限公司; 精密电子天平 梅特勒—托利多仪器有限公司; H.H.S11-2 电热恒温水浴锅 上海医疗器械五厂; 754 型分光光度计 上海菁华科技仪器有限公司; KDN-04A 型定氮仪 上海新嘉电子有限公司; WK-2000 型微波快速消解系统 上海屹尧分析仪器有限公司; 粉碎机 江苏金坛市环宇科学仪器厂; Fiuko 高效分散乳化机 上海弗鲁克流体机械制造有限公司; YX-280B 型立式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司医疗设备厂; 旋转蒸发器 上海申顺生物科技有限公司。

1.3 工艺流程

苦荞麦→粉碎→筛分→芯粉层→提取荞麦复合蛋白→加酶水解→灭酶→活性炭处理→过滤→离子交换树脂处理→真空浓缩→荞麦多肽浓缩物
苹果酸, 蜂蜜, 复合稳定剂→溶解→配料
↓
均质→调香→灌封→灭菌→成品

1.4 试验方法

1.4.1 苦荞复合蛋白提取工艺参数的确定

称取一定量的苦荞麦种子采用粉碎机进行粉碎, 经 80 目筛分得到所需细度的苦荞麦芯粉。分别以固液比 1:3、1:6、1:9、1:12 加入蒸馏水搅拌混匀; 并加入一定量的 0.1mol/L NaOH 溶液, 将试样 pH 值调整至 8、9、10、11; 然后浸提 0.5、1.0、1.5、2.0h。通过正交试验得出最佳浸提时间、浸提固液比、浸提 pH 值等最佳浸提条件, 以提高苦荞麦复合蛋白物的浸提得率。

将浸提液置于离心机 3800r/min, 10min 离心分离, 收集其上清液。加入 0.1mol/L HCl, 以调整 pH 值到 4.5, 再次置于离心机 3800r/min, 10min 进行二次离心分离。离心分离所得沉淀物即苦荞麦复合蛋白物。

1.4.2 苦荞麦复合蛋白水解工艺参数的确定

1.4.2.1 各种蛋白酶最佳酶解条件的确定

酶可以将蛋白质结构改性, 并将其功能性质改变, 其中水解作用对食品蛋白质的改性最为广泛。为筛选出一种适宜于苦荞麦蛋白水解的酶, 本实验对 Flavourzyme 复合风味蛋白酶、Neutrase 中性蛋白酶、Alcalase Food Grade 水解蛋白酶水解苦荞麦蛋白后多肽

含量的多寡进行比较。

实验称取一定量的苦荞麦复合蛋白物, 加入适量的水配制成为5%的苦荞麦复合蛋白溶液, 调节温度、pH值至反应温度和反应pH值, 分别加入三种蛋白酶。在水浴恒温振荡器中进行酶解, 同时每隔30min通过滴加0.1mol/L NaOH溶液以保持反应体系pH值的恒定。酶解结束后, 将苦荞麦复合蛋白酶解液加热升温至85℃, 保温10min, 使其酶活力丧失。然后经冷冻离心机在4000r/min, 5℃离心10min, 除去未水解的蛋白和其他非溶性物质, 收集上清液并于真空浓缩器中浓缩至一定浓度后待用。通过测定苦荞麦复合蛋白酶解液中荞麦肽的含量及水解度的计算, 以确定出适于苦荞蛋白水解多肽的酶。

1.4.2.2 混合酶与单一酶酶解效果的对比

蛋白酶按其水解蛋白质的方式可以分为内肽酶和外肽酶。内肽酶作用于蛋白质分子内部肽键, 生成小分子肽段。实验所采用的Neutrase中性蛋白酶、Alcalase Food Grade水解蛋白酶均为内肽酶, 而Flavourzyme复合风味蛋白酶是由内肽酶和外肽酶复合而成的蛋白酶。这三种蛋白酶断裂氨基酸的位点随其专一性而有所不同, 实验力图通过两种酶的混合, 即采用Flavourzyme复合风味蛋白酶与Alcalase Food Grade水解蛋白酶的混合, 以增加苦荞麦复合蛋白酶解液中荞麦肽的含量和提高水解度。

此外由于内肽酶水解时, 主要断裂疏水氨基酸的C端, 会形成易产生苦味的含有疏水氨基酸终端的短肽链, 而Flavourzyme复合风味蛋白酶由于其中含有一部分可作用于蛋白质或多肽分子氨基或羧基末端肽键的外肽酶, 它能进一步将产生的苦味肽降解, 而减缓苦味^[2]。因此实验也力图通过两种酶的混合以改善苦荞麦复合蛋白酶解液的口感。

试验中样品1采用Flavourzyme复合风味蛋白酶与Alcalase Food Grade水解蛋白酶混合阶段酶解。具体操作如下: 先添加Alcalase Food Grade水解蛋白酶, 水解3h后于85℃灭酶5min后再添加Flavourzyme复合风味蛋白酶, 水解3h。酶解条件均为各个单酶酶解时的最佳条件。样品2采用Flavourzyme复合风味蛋白酶单酶酶解, 酶解条件为水解6h后于85℃灭酶5min。

1.4.2.3 混合酶添加顺序对酶解效果的影响

两种酶的添加顺序可能会影响酶解液中多肽含量的增加和水解度的提高。试验通过对比Flavourzyme复合风味蛋白酶与Alcalase Food Grade水解蛋白酶添加顺序先后所得到的水解液中多肽浓度、氨基酸浓度等来确定酶解效果。

试验中序号1表示先采用Alcalase Food Grade水解蛋白酶再用Flavourzyme复合风味蛋白酶混合阶段酶解的

效果。具体操作同1.4.2.2。序号2表示先采用Flavourzyme复合风味蛋白酶再用Alcalase Food Grade水解蛋白酶酶解效果。酶解条件和序号1相同。

1.4.3 苦荞多肽营养饮料的配方优选

1.4.3.1 苦荞多肽营养饮料配方的单因素试验

苦荞多肽营养饮料的风味受多种因素影响。本实验分别对影响苦荞多肽营养饮料风味较大的荞麦多肽浓缩物、苹果酸、蜂蜜三个主要因素的添加量进行单因素试验, 以找出各因素水平范围。

1.4.3.2 苦荞多肽营养饮料配方的正交试验

为获得较佳风味的苦荞多肽营养饮料的配方, 实验采用L₉(3³)正交试验设计, 以感官鉴评作为评分标准, 选25人进行打分, 满分为10分。

1.4.4 总蛋白质测定 微量凯氏定氮法。

1.4.5 游离氨基酸含量的测定 GB/T14965规定的方法。

1.4.6 荞麦肽含量的测定 参照Q/TDQ001-2005大豆肽粉标准。

荞麦肽的含量 = 酸溶蛋白质测定值 - 游离氨基酸测定值

高分子蛋白质在酸性条件下易被沉淀, 较低分子量的蛋白质水解物即酸溶蛋白质, 可溶于酸性溶液(其中包含肽及游离氨基酸)。样品经酸化后, 滤液中的酸溶蛋白质含量减去游离氨基酸含量即为肽的含量。

其中酸溶蛋白质含量的测定方法为:

称取2.00g样品, 加入10ml 15%TCA(三氯乙酸)溶液, 混合均匀, 静置5min。将溶液定量转移, 在4000r/min下离心10min后, 取全部上清液, 按照1.4.4规定的方法测定上清液中的可溶性蛋白。

1.4.7 多肽浓度的测定^[3]

利用10%的TCA(三氯乙酸)沉淀样品水解液中的大分子蛋白质, 经离心过滤后, 在上清液中加入双缩脲试剂, 于540nm测定其OD值, 继而在Gly-Gly-Tyr-Arg四肽标准曲线上查出样品中的多肽含量。

1.4.8 水解度的测定

DH亦即原料蛋白质中水解为多肽的百分数, 表示蛋白质被酶催化水解的程度。而蛋白质的酶解过程关键是蛋白质水解程度的控制。

$$DH = \frac{\text{水解后上清液中总氮量(mg)}}{\text{荞麦复合蛋白中总氮量(mg)}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 苦荞复合蛋白提取工艺参数的确定

经 $L_{16}(4^3)$ 正交试验得出: 苦荞复合蛋白提取工艺参数中对荞麦蛋白浸提得率结果的影响次序为 $B > A > C$, 其最佳条件为 $A_3B_2C_2$ 即固液比 1:9, pH9, 浸提时间 1.0h。且在最佳条件下通过验证试验, 荞麦蛋白浸提得率可达到 41.96%。见表 1。

表 1 苦荞复合蛋白提取工艺正交试验表				
Table 1 Orthogonal experiment results of buckwheat protein extraction				
实验号	A 固液比	B pH	C 浸提时间(h)	荞麦蛋白 浸提得率(%)
1	1(1:3)	1(8)	1(0.5)	29.02
2	1	2(9)	2(1.0)	38.14
3	1	3(10)	3(1.5)	31.98
4	1	4(11)	4(2.0)	22.11
5	2(1:6)	1	2	36.88
6	2	2	1	39.12
7	2	3	4	29.78
8	2	4	3	28.22
9	3(1:9)	1	3	36.89
10	3	2	4	41.40
11	3	3	1	39.54
12	3	4	2	27.71
13	4(1:12)	1	4	38.10
14	4	2	3	39.02
15	4	3	2	38.77
16	4	4	1	27.14
K_1	121.25	140.89	134.4	
K_2	154.24	155.5	148.78	
K_3	161.09	140.07	136.11	
K_4	143.28	105.69	131.39	
k_1	30.31	35.22	33.6	
k_2	38.56	38.88	37.20	
k_3	40.27	35.02	34.03	
k_4	35.82	26.42	32.85	
R	9.96	12.46	4.35	
Q	A_3	B_2	C_2	

注: R: 极差; Q: 每一因素的最优水平。

2.2 苦荞复合蛋白水解工艺参数的确定

2.2.1 各种蛋白酶最佳酶解条件的确定

表 2 各种蛋白酶水解效果的对比					
Table 2 The comparison of hydrolysis effect of various enzymes					
酶种类	酶解条件				水解度
	pH	温度 (°C)	[E]/[S] (%)	酶解液中荞麦 肽的浓度(mg/ml)	
复合风味蛋白酶	7.5	47.5	4.5	8.19	39.24
中性蛋白酶	7.5	50	11.2	5.99	30.22
水解蛋白酶	8	60	3.3	6.81	33.60

由表 2 得知, 三种蛋白酶水解苦荞麦蛋白的效果有所不同, 其中 Flavourzyme 复合风味蛋白酶的效果最好, Alcalase Food Grade 水解蛋白酶次之。

2.2.2 单酶与混合酶水解效果的对比

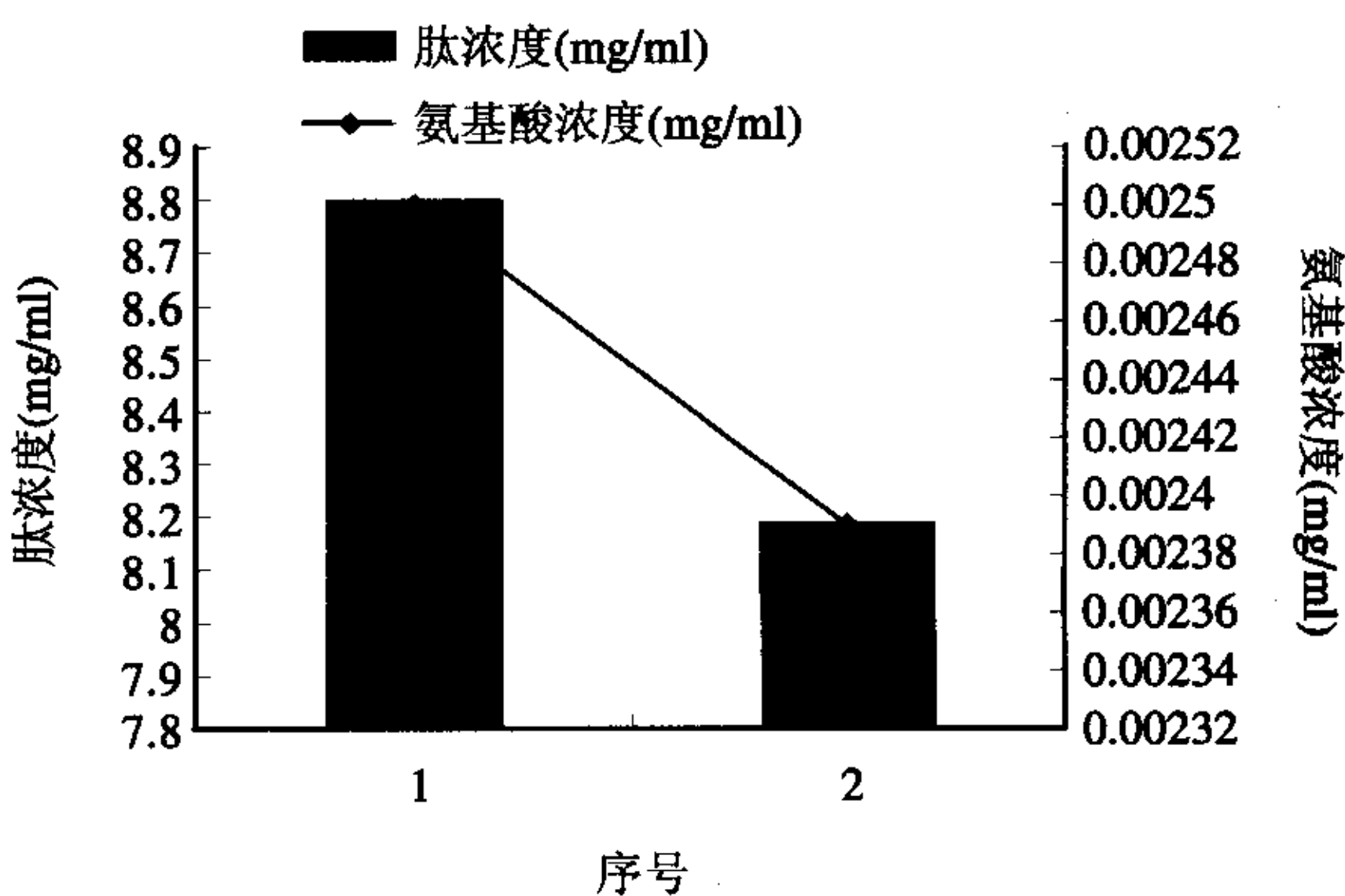


图 1 混合酶与单酶水解效果比较
Fig.1 Comparison of hydrolysis effect of single enzyme and combined enzymes

从图 1 可以看出在相同酶解条件下, 混合酶较单酶水解效果明显提高。其肽含量每百毫升增加了 61mg, 氨基酸浓度也有所提高, 水解度也得到提高。总之, 混合酶将荞麦复合蛋白水解成肽的能力明显优于单一酶。

2.2.3 混合酶添加顺序不同水解效果的对比

从图 2 可知: 两种酶的添加顺序直接影响酶解液中多肽含量的增加和水解度的提高。先添加 Flavourzyme 复合风味蛋白酶的效果更好, 其肽含量每百毫升可增加 40mg, 氨基酸浓度也有所提高, 水解度也得到总体提高。

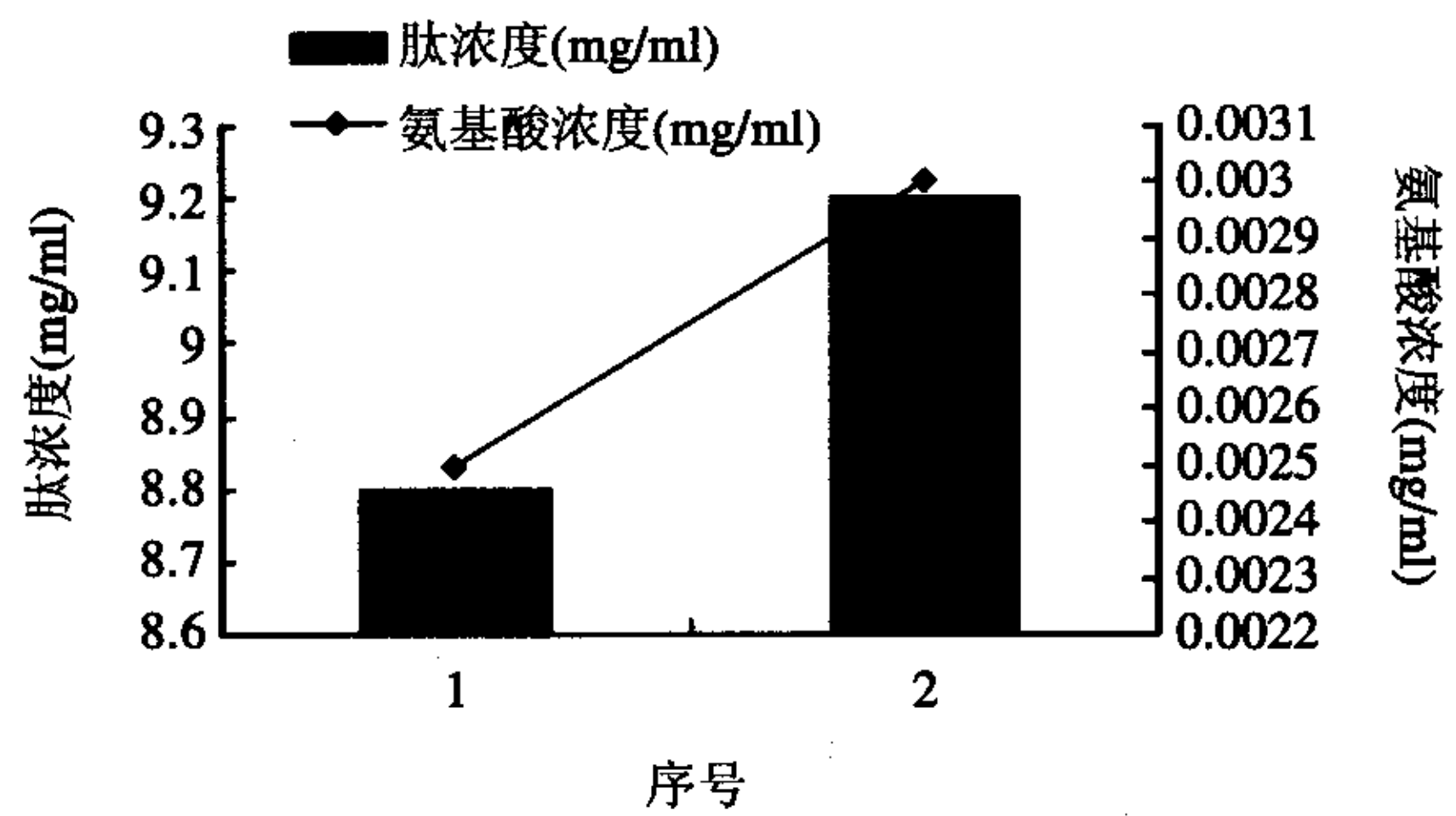


图 2 混合酶中单酶的添加顺序不同对水解效果的影响
Fig.2 The effect of different additive order of single enzyme in combined enzymes on hydrolysis

2.3 苦荞多肽营养饮料的配方优选

2.3.1 苦荞多肽营养饮料配方的单因素试验

2.3.1.1 添加苹果酸量对荞麦营养饮料风味的影响

在蜂蜜为 6.0%、荞麦多肽浓缩物为 2.00%, 分别添加 0.10%、0.12%、0.14%、0.16%、0.18% 的苹果酸, 试验结果见表 3。

由试验可得出添加 0.14% 的苹果酸, 酸度比较柔和, 爽口, 回味绵长。

2.3.1.2 添加荞麦多肽浓缩物量对荞麦营养饮料风味的影响

表3 苹果酸添加量对饮料风味的影响

Table 3 Effect of malic acid on flavor of tartary buckwheat peptides nutrient drink

添加量(%)	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18
感官得分	7.46	8.78	9.54	8.88	7.36

在蜂蜜为6.0%，苹果酸0.14%，分别添加1.25%、1.50%、1.75%、2.00%、2.25%的荞麦多肽浓缩物，试验结果见表4。

表4 荞麦多肽浓缩物添加量对饮料风味的影响

Table 4 Effect of buckwheat peptide condensate on flavor of tartary buckwheat peptides nutrient drink

添加量(%)	1.25	1.50	1.75	2.00	2.25
感官得分	7.19	8.21	8.98	8.35	7.23

由试验可得出添加1.75%的荞麦多肽浓缩物，甜度比较适口，口味纯正。

2.3.1.3 添加蜂蜜量对荞麦营养饮料风味的影响

在荞麦多肽浓缩物为1.75%，苹果酸0.14%，分别添加5.0%、6.0%、7.0%、8.0%、9.0%的蜂蜜，试验结果见表5。

表5 蜂蜜添加量对饮料风味的影响

Table 5 Effect of honey on flavor of tartary buckwheat peptides nutrient drink

添加量(%)	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
感官得分	7.5	9.0	8.5	7.5	7.4

由试验可得出添加6.0%的蜂蜜，甜度比较适口，口感润滑、柔和。

2.3.2 苦荞多肽营养饮料最佳配方正交试验

表6 苦荞多肽营养饮料感官评价标准

Table 6 The standard of appraisal of quality to tartary buckwheat peptides nutrient drink

感官指标	分值		
	10~9分	8~7分	6~5分
色泽	外观均一呈黄色，清亮均匀	色泽较淡，清亮度稍差	色泽暗淡，清亮度差
滋味气味	酸甜适口，无苦味，无异味。	酸甜不适，微甜或微酸，稍有苦味	苦味较明显，过甜或过酸
口感	口感纯正协调	口感较协调	口感不够协调

依据正交试验可知 $B > C = A$ ，最佳组合为 $A_2B_2C_1$ ，即苹果酸用量为0.14%，荞麦多肽浓缩物用量为1.75%，蜂蜜用量为6.0%时产品的风味及口感最佳。

3 结 论

表7 苦荞多肽营养饮料的最佳配方正交试验表

Table 7 Orthogonal experiment design and results of tartary buckwheat peptides nutrient drink

试验号	因素			得分
	A 苹果酸(%)	B 荞麦多肽浓缩物(%)	C 蜂蜜(%)	
1	1(0.12)	1(1.25)	1(6.0)	8.5
2	2(0.14)	2(1.75)	2(7.0)	9.2
3	3(0.16)	3(2.00)	3(8.0)	8.3
4	3	2	1	9.3
5	1	3	2	8.6
6	2	1	3	8.9
7	2	3	1	8.7
8	3	1	2	8.2
9	1	2	3	9.1
K_1	26.2	25.6	26.6	
K_2	26.8	27.6	26.0	
K_3	25.8	25.6	26.3	
k_1	8.73	8.53	8.87	
k_2	8.93	9.20	8.67	
k_3	8.60	8.53	8.77	
极差 R	0.33	0.67	0.33	
优水平	A_2	B_2	C_1	

3.1 经 $L_{16}(4^3)$ 正交实验得出：苦荞复合蛋白提取工艺参数中对荞麦蛋白浸提得率结果的影响次序为 $B > A > C$ ，其最佳条件为 $A_3B_2C_2$ 即固液比1:9，pH9，浸提时间1.0h。

3.2 通过对 Neutrase 中性蛋白酶、Alcalase Food Grade 水解蛋白酶和 Flavourzyme 复合风味蛋白酶中水解苦荞复合蛋白效果的比较，得出 Flavourzyme 复合风味蛋白酶酶解效果最佳。特别是采用 Flavourzyme 复合风味蛋白酶和 Alcalase Food Grade 水解蛋白酶组成的混合酶将荞麦复合蛋白水解成肽的能力比单一酶效果好。且混合酶按先 Flavourzyme 复合风味蛋白酶后 Alcalase Food Grade 水解蛋白酶的顺序添加酶解效果更好。

3.3 经单因素试验和 $L_9(3^3)$ 正交试验得出苦荞多肽营养饮料的最佳配方为荞麦多肽浓缩物用量为1.75%、苹果酸用量为0.14%，蜂蜜用量为6.0%时产品的风味及口感最佳。

参考文献：

- [1] 唐传核, 彭志英. 功能性食品基料蛋白质及多肽类开发现状[J]. 粮油与油脂, 2001, (1): 39-41.
- [2] 钱方, 邓岩, 等. 蛋白酶及其大豆蛋白水解物苦味的研究[J]. 大连轻工业学院学报, 2000, 19(3): 182-186.
- [3] 鲁伟, 任国谱, 宋俊梅. 蛋白水解中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学, 2005, 26(7): 169-171.