

# 大豆分离蛋白对大豆肽纳米颗粒 Pickering 乳液性能的影响

王 丹<sup>1</sup>, 代养勇<sup>1</sup>, 赵路苹<sup>1</sup>, 刘海燕<sup>2</sup>, 丁秀臻<sup>1</sup>

(1. 山东农业大学 食品科学与工程学院, 山东省高校食品加工技术与质量控制重点实验室, 山东省粮食加工技术工程技术研究中心, 山东 泰安 271018; 2. 青岛明月海藻生物健康科技集团有限公司, 山东 青岛 266400)

**摘要:**为提高大豆肽纳米颗粒(SPN) Pickering 乳液稳定性,以大豆肽聚集体为原料,采用超声法制备 SPN,对超声时间进行了优化;在 SPN 体系中引入大豆分离蛋白(SPI)构建复合乳化剂,研究不同乳化剂质量浓度下 SPI 对 SPN 界面活性和乳化稳定性的影响。结果表明:选取超声时间 10 min 制备 SPN;随着乳化剂质量浓度的增大,乳液粒径逐渐减小,当乳化剂质量浓度较低(5 mg/mL)时,乳液出现桥联,乳化剂质量浓度过高(30 mg/mL)时则出现絮凝;界面蛋白吸附率随着乳化剂质量浓度的增加呈现先升高后降低的趋势。在相同乳化剂质量浓度下,添加 SPI 的 SPN 乳液(SPI-SPN 乳液)的粒径分布峰左移,其粒径、界面蛋白吸附率显著小于 SPN 乳液的;在储存过程中,SPN 乳液粒径逐渐增大,SPI-SPN 乳液粒径没有显著变化;SPI-SPN 乳液的乳析指数小于相同乳化剂质量浓度的 SPN 乳液,当乳化剂质量浓度为 30 mg/mL 时,储存 15 d SPI-SPN 乳液未出现分层现象。综上,SPI 可以提高 SPN 的界面活性和 SPN 乳液储存过程中的絮凝稳定性和分层稳定性。

**关键词:**大豆肽纳米颗粒;乳液;大豆分离蛋白;储存稳定性

中图分类号:Q51;TS201.2

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2024)03-0094-08

## Effects of soy protein isolate on the properties of Pickering emulsions stabilized by soy peptide nanoparticles

WANG Dan<sup>1</sup>, DAI Yangyong<sup>1</sup>, ZHAO Luping<sup>1</sup>, LIU Haiyan<sup>2</sup>, DING Xiuzhen<sup>1</sup>

(1. Engineering and Technology Center for Grain Processing of Shandong Province, Key Laboratory of Food Processing Technology and Quality Control in Shandong Province, College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China; 2. Qingdao Bright Moon Seaweed Bio-Health Technology Group Co., Ltd., Qingdao 266400, Shandong, China)

**Abstract:** In order to improve the stability of the Pickering emulsion of soy peptide nanoparticles (SPN), soy peptide aggregates were used as raw materials to prepare SPN by ultrasonic method, and the ultrasonic time was optimized. And then soy protein isolate (SPI) was introduced into the SPN system to construct a new composite emulsifier. The effects of SPI on the interface activity and emulsification stability of SPN under different emulsifier mass concentrations were studied. The results showed that SPN was prepared under the condition of ultrasonic time 10 min. With the increase of emulsifier mass concentration, the particle size of the emulsion decreased gradually. When the emulsifier mass concentration was low (5 mg/mL), the emulsion bridged, while when the emulsifier mass concentration was high (30 mg/mL), the emulsion flocculated. The adsorption rate of interfacial protein increased

chiefly and then decreased with emulsifier mass concentration increasing. Under the same emulsifier mass concentration, the particle size distribution peak of the SPN emulsion with SPI (SPI-SPN emulsion) was shifted to the left, and the particle size and adsorption rate of interfacial

收稿日期:2023-01-12;修回日期:2023-11-30

基金项目:国家自然科学基金(31901637,31872889);山东省高等学校科技计划项目(J18KA171)

作者简介:王 丹(1998),女,硕士研究生,研究方向为粮食、油脂与蛋白工程(E-mail) wang0921992022@163.com。

通信作者:丁秀臻,讲师,博士(E-mail) xzd@sdau.edu.cn。

protein were significantly smaller than the SPN emulsion. The particle size of the SPN emulsion gradually increased during storage, while the particle size of the SPI – SPN emulsion did not change significantly. The creaming index of SPI – SPN emulsion was smaller than that of SPN emulsion with the same emulsifier mass concentration. The SPI – SPN emulsion did not appear to cream after 15 d of storage when the emulsifier mass concentration was 30 mg/mL. In conclusion, SPI can improve the interfacial activity of SPN and the stability of flocculation and stratification of SPN emulsion during the storage.

**Key words:** soy peptide nanoparticles; emulsion; soy protein isolate; storage stability

大豆蛋白因成本低、营养价值高、功能性质好等特点,被广泛应用于食品加工。酶解技术制备的大豆肽具有良好的生物活性<sup>[1-2]</sup>,使得大豆蛋白在食品、药品以及化妆品领域的应用进一步拓宽。然而,酶解过程中会不可避免地产生不溶性肽聚集体,这些聚集体通常被丢弃或用于动物饲料,极大降低了大豆蛋白的利用率。近年来,植物蛋白颗粒稳定的 Pickering 乳液因具有良好的抗聚结稳定性受到广泛关注<sup>[3-4]</sup>。以往的研究发现,利用超声技术可诱导不溶性肽聚集体发生自组装,成功制备出大豆肽纳米颗粒(SPN),该颗粒可作为 Pickering 乳液的乳化剂<sup>[5]</sup>,然而 SPN 乳液的分层稳定性较差。

研究表明,由于短时间内蛋白质吸附性能的差异<sup>[6]</sup>,两种蛋白质复合物的乳化性优于任何一种单独的蛋白质<sup>[7]</sup>。大豆分离蛋白(SPI)是一种优质的天然表面活性剂,可以吸附在油水界面,降低表面张力,使油滴稳定存在于连续相中<sup>[8]</sup>。与颗粒乳化剂不同的是,SPI 具有弹性结构,吸附在油水界面后会发生结构重排<sup>[9-10]</sup>。此外,可溶性的 SPI 比不溶性颗粒乳化剂运动更自由,可以更快地迁移到油水界面。因此,将 SPI 和 SPN 复配构建复合乳化剂,有望改善 SPN 的乳化性能,但目前未见对 SPI – SPN 复合物乳化性能的研究。

本研究利用超声诱导技术制备 SPN 分散液,并将其与 SPI 分散液复配构建复合乳化剂,考察不同乳化剂质量浓度(5、10、15、20、25、30 mg/mL)下的 SPI 对 SPN 乳液显微结构、粒径、界面微观结构、界面蛋白吸附率、絮凝稳定性以及分层稳定性的影响,以期为提高 SPN 的乳化性能提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

低温脱脂豆粕,购于山东万得福生物科技有限公司;大豆油,购于当地农贸市场;碱性蛋白酶(酶活为 2.4 AU/g),购于北京诺维信生物科技有限公

司。所有试验试剂均为分析纯或以上等级。

#### 1.1.2 仪器与设备

FDU – 2110 冷冻干燥机,日本东京理化器械株式会社;FS – 300N 超声波处理器,上海生析超声仪器有限公司;Zetasizer – Nano – ZS 激光纳米粒度分析仪,英国马尔文仪器有限公司;HL3100 激光粒度仪,北京海鑫瑞科技有限公司;UV – 5100B 紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司;T25 高速分散机,德国 IKA 公司;IX73 荧光倒置显微镜,日本奥林巴斯株式会社;LSM 880 激光共聚焦显微镜,德国蔡司公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 SPI 和 SPN 的制备

根据 Sui 等<sup>[11]</sup>的方法略加改动制备 SPI。将低温脱脂豆粕粉碎 30 s,与去离子水按照质量体积比 1:10 混合,调节 pH 为 7.0 后搅拌 1 h。在 4 000 r/min 下离心 20 min,取上清液,调节 pH 为 4.5,在 4 000 r/min 下离心 15 min。将离心获得的沉淀物洗涤两次,加水调 pH 为 7.0 复溶。最后在 4 000 r/min 离心 20 min 取上清,冷冻干燥获得 SPI。采用凯氏定氮法测得 SPI 的蛋白质含量为 97.10%。

称取 40 g SPI,加入 800 mL 去离子水溶解,室温搅拌 2 h 后 4℃ 水化过夜。将 SPI 溶液在 100℃ 水浴加热 5 min,室温冷却到 50℃ 后调节 pH 为 8.0,按照酶底比 1:100 加入碱性蛋白酶,在 50℃ 下酶解 6 h。酶解结束后于 100℃ 水浴 5 min,使碱性蛋白酶失活。冷却至室温,调 pH 为 7.0,在 4 000 r/min 下离心 15 min 取沉淀,水洗后重新分散,冷冻干燥后得到大豆肽聚集体(SPA)。经测定 SPA 的得率为 19.50%,采用 Tricine – SDS – PAGE 测定 SPA 的分子质量在 15.0 kDa 以下。

称取 0.4 g SPA,加入 10 mL 去离子水,搅拌 2 h 后 4℃ 水化过夜,调节 pH 为 7.0。将 SPA 分散液进行探头式超声处理,探头直径为 8 mm,超声功率为 285 W,输出频率为 20 kHz。在超声时间为 0、5、10、

15、20 min 时取样并在 8 000 r/min 下离心 10 min 去除沉淀,上清液为 SPN 分散液,用于后续试验。整个超声过程中,冰浴控制样品温度在 25 ℃ 以下。

### 1.2.2 SPN 的粒径、多分散系数和 Zeta 电位的测定

用 20 mmol/L pH 为 7.0 的 PBS 缓冲液将所有样品均稀释 40 倍,采用动态光散射技术(DLS)对 SPN 的粒径、多分散系数(PDI)和 Zeta 电位进行测定。20 mmol/L PBS 缓冲液的折射率为 1.331,蛋白质的折射率为 1.450,吸收率为 0.001。所有测定均在 25 ℃ 下进行,每个样品至少测定 3 次。

### 1.2.3 乳液的制备

首先,称取 0.4 g SPI 粉末,加入 10 mL 去离子水溶解,得到 SPI 分散液。将 SPI 分散液和 SPN 分散液按体积比 1:10 混合,制备 SPI-SPN 分散液。然后,将 SPN 分散液和 SPI-SPN 分散液稀释到质量浓度分别为 5、10、15、20、25、30 mg/mL。最后,在分散液中加入油相比比例为 0.2 的大豆油,用高速分散机在 15 000 r/min 下分散 2 min,得到乳液,4 ℃ 保存备用。

### 1.2.4 乳液显微结构的测定

在载玻片上滴 10 μL 新鲜制备的乳液,然后盖上盖玻片。用荧光倒置显微镜 40 × 物镜直接观察,并拍照。

### 1.2.5 乳液粒度及粒径分布的测定

将新鲜制备的乳液样品直接注入激光粒度仪,以纯水作为分散剂,当遮蔽率达到 15% 时停止加样,开始粒径及粒径分布分析。颗粒的折射率为 1.467,吸收率为 0.001,分散剂的折射率为 1.330,乳液的粒度用体积平均粒径( $D_{4,3}$ )表示,乳液液滴的分散性( $S$ )<sup>[12]</sup>按公式(1)计算。

$$S = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (1)$$

式中: $D_{90}$ 、 $D_{50}$ 和 $D_{10}$ 分别为粒径分布分别达到 90%、50%和 10% 所对应的粒径。

### 1.2.6 乳液界面微观结构的测定

采用激光共聚焦显微镜(CLSM)观察乳液的界面微观结构,染色方法参照 Feng 等<sup>[13]</sup>的方法并略作修改。取 1 mL 新鲜制备的乳液用 40 μL 染色液(0.1% 尼罗红和 0.1% 尼罗蓝混合后,用 1,2-丙二醇溶解)避光染色。取 10 μL 染色后的样品滴在载玻片中央,并小心盖上盖玻片,不要产生气泡,采用 Ar/K 和 He/Ne 双通道激光模式在 488 nm 和 633 nm 的激发波长下进行 CLSM 观察,分辨率为 1 024 × 1 024,将蛋白质信号设为绿色,油相信号设

为红色。用 40 × 油镜进行观察,尽可能采集图像。

### 1.2.7 乳液界面蛋白吸附率的测定

固体颗粒在稳定乳液的过程中,一部分吸附在油水界面,另一部分则是分散在连续相中。乳液界面蛋白吸附率参照 Kim 等<sup>[14]</sup>的方法测定。取 4 mL 乳液在 13 000 ×  $g$  下离心 30 min,用针管吸取下层清液并过 0.22 μm 水系滤膜。以牛血清白蛋白(BSA)为标准,用考马斯亮蓝法<sup>[15]</sup>测定乳化前(乳化剂分散液)连续相的浓度( $C_i$ )和乳化后(乳液)连续相的浓度( $C_s$ )。乳液界面蛋白吸附率( $A$ )按照公式(2)计算。

$$A = \frac{C_i - C_s}{C_i} \times 100\% \quad (2)$$

### 1.2.8 乳液絮凝稳定性的测定

将新鲜制备的乳液在室温下储存 15 d,通过测定 0、7、15 d 时的  $D_{4,3}$ 来评估乳液的絮凝稳定性。

### 1.2.9 乳液分层稳定性的测定

参照 Yang 等<sup>[16]</sup>的方法并略加修改,取 10 mL 新鲜制备的乳液装入平底具塞玻璃比色管中,然后在室温下储存 15 d,记录在室温储藏过程中下层清液的高度( $H_s$ )和乳液总高度( $H_t$ )。乳析指数( $C$ )按公式(3)计算。

$$C = H_s/H_t \times 100\% \quad (3)$$

### 1.2.10 数据处理

试验数据均以 3 次平行测量的“平均值 ± 标准差”表示,采用 Excel 和 Origin 2016 进行数据处理,采用 SPSS 16.0 软件对样品均值之间进行 ANOVA 显著性分析( $p < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 SPN 制备条件的优化

高强度的超声可以打断蛋白质的非共价作用,使大分子聚集体降解成小尺寸的粒子<sup>[17]</sup>。本文研究了超声时间对 SPN 粒径、PDI 及 Zeta 电位的影响,结果如图 1 所示。由图 1 可知,随着超声时间的延长,SPN 的粒径和 PDI 逐渐降低,在超声处理 10 min 后粒径为 103.7 nm, PDI 为 0.252,这是因为超声波可以通过空化作用打断肽聚集体内部的作用力,使其最大程度地游离和分解<sup>[18]</sup>,使肽聚集体粒径变得更加均一。但随着超声时间的进一步延长,粒径和 PDI 变化不显著。由图 1 还可知,Zeta 电位的绝对值随着超声时间的延长呈现下降的趋势,未经超声处理的 SPA 分散液的 Zeta 电位的绝对值为 19.02 mV,超声处理 10 min 后 Zeta 电位的绝对值降低到 17.68 mV,可能是聚集体的解聚暴露了内部带正电的基团,中和了体系的负电荷。随着超声时间

的进一步延长,Zeta 电位变化不显著。另观察 SPA 分散液和 SPN 分散液外观发现,SPA 分散液浑浊,PDI 较大(0.83),在水中的分散性较差,但经过超声

处理 10 min 后所制备的 SPN 粒径减小,呈现澄清透明的状态。因此,选取超声时间 10 min 制备 SPN,进行后续试验。

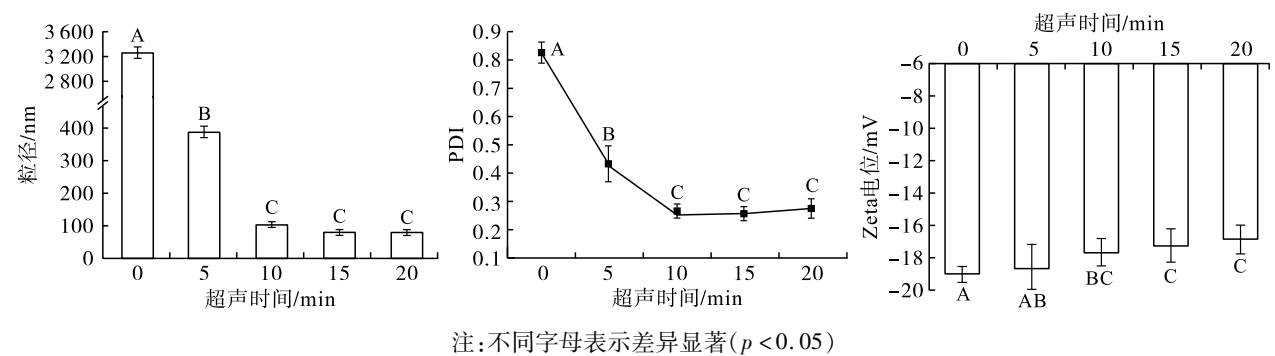


图1 超声时间对 SPN 粒径、PDI 及 Zeta 电位的影响

2.2 乳液的显微结构

SPN 乳液和 SPI – SPN 乳液的显微结构如图 2 所示。由图 2 可知,SPN 乳液和 SPI – SPN 乳液液滴从外观上均呈现典型的圆形,随着乳化剂质量浓度的升高,乳液粒径逐渐减小。这是因为蛋白质颗粒浓度越高,稳定的乳液的界面面积越大<sup>[16]</sup>,均质过程中蛋白质颗粒的吸附阻碍了油滴的聚合,所以乳液粒径随着乳化剂浓度的升高而减小,类似的现象也出现在纤维素颗粒<sup>[19]</sup>稳定的 Pickering 乳液中。当乳化剂质量浓度足够低时(5 mg/mL),乳液液滴

出现了桥联现象<sup>[20]</sup>,即一个蛋白质界面稳定两个液滴(箭头所指)。当乳化剂质量浓度高于 25 mg/mL 时,乳液的粒径变化不大,这可能是因为油滴表面的蛋白质含量达到饱和,也可能是乳化剂质量浓度过高使乳液液滴发生絮凝(圆圈所指)所致。在相同乳化剂质量浓度下,相对于 SPN 乳液,SPI – SPN 乳液的液滴粒径更小,说明 SPI 能够提高 SPN 的乳化活性。此外,SPI 吸附到油水界面上会发生亚基解离和结构重排,也有助于液滴的稳定,阻止油滴的聚结<sup>[10]</sup>。

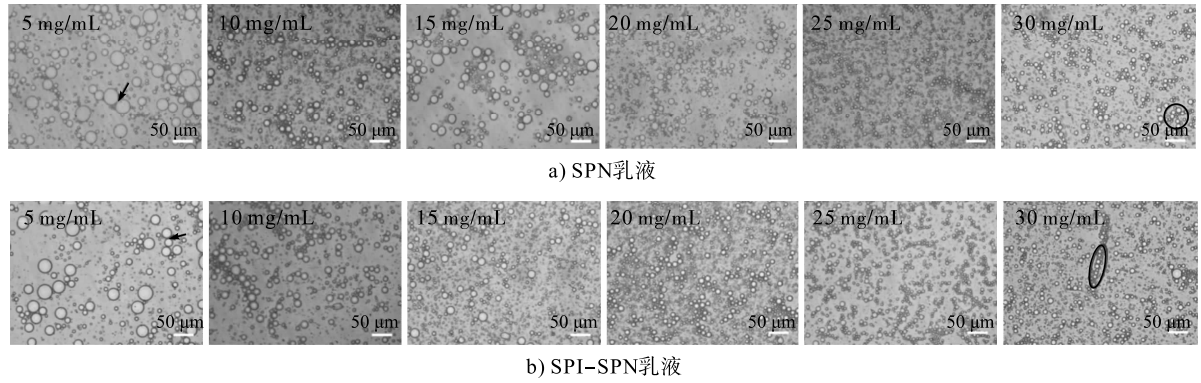
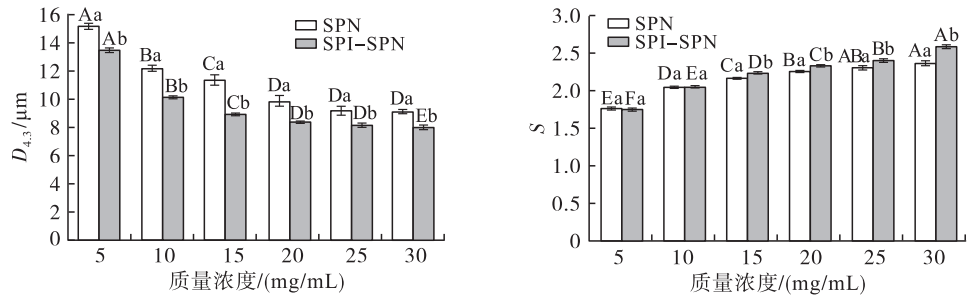


图2 SPN 乳液和 SPI – SPN 乳液的显微结构

2.3 乳液的粒度及粒径分布

为了更加直观地描述乳液液滴大小,对乳液的

粒度及粒径分布进行测定,结果如图 3 所示。



注:不同大写字母表示同一乳化剂不同质量浓度样品间差异显著( $p < 0.05$ );不同小写字母表示不同乳化剂相同质量浓度样品间差异显著( $p < 0.05$ )。下同

图3 SPN 乳液和 SPI – SPN 乳液平均粒径及分散性

由图3可知,乳液的 $D_{4,3}$ 随乳化剂质量浓度的升高而降低,当乳化剂质量浓度大于25 mg/mL后,继续增大乳化剂质量浓度,乳液的粒径变化总体不显著,这与显微镜观察结果一致。在相同乳化剂质量浓度下,SPI-SPN乳液的 $D_{4,3}$ 显著低于SPN乳液。蛋白质的乳化能力可以通过形成乳液液滴的大小来反映,粒径越小说明乳化能力越强<sup>[21]</sup>,由此可见SPI可以提高SPN的乳化能力。随着乳化剂质量浓度的升高,乳液液滴的分散性逐渐升高,SPI-SPN乳液的分散性比SPN乳液大,与粒径大小变化呈相反趋势,这种趋势同样在Tian<sup>[22]</sup>、Saeidy<sup>[23]</sup>等的研究中出现。

不同乳化剂质量浓度下的SPN乳液和SPI-SPN乳液的粒径分布如图4所示。由图4可知,所有乳液的粒径均呈双峰分布,随着乳化剂质量浓度

的增大,SPN乳液的粒径分布范围从0.39~52.15  $\mu\text{m}$  缩小至0.39~36.30  $\mu\text{m}$ ,SPI-SPN乳液的粒径分布范围从0.39~43.51  $\mu\text{m}$  缩小至0.33~30.29  $\mu\text{m}$ ,说明SPI的添加降低了SPN乳液的粒径分布范围,这与显微结构(图2)和 $D_{4,3}$ (图3)结果基本一致。随着乳化剂质量浓度升高,粒径分布曲线逐渐左移,并且大尺寸峰的体积逐渐降低,小尺寸峰的体积逐渐增高,两个峰之间的高度差距逐渐降低,同样说明增大乳化剂质量浓度可以降低乳液的粒径,相似的粒径分布峰的变化规律出现在不同质量浓度的大豆蛋白纳米颗粒<sup>[21]</sup>乳液中。特别地,当乳化剂质量浓度从25 mg/mL增加到30 mg/mL时,粒径稍小的峰重合或者增高不明显,并且当乳化剂质量浓度为30 mg/mL时,粒径稍大的峰的峰顶相对平缓。

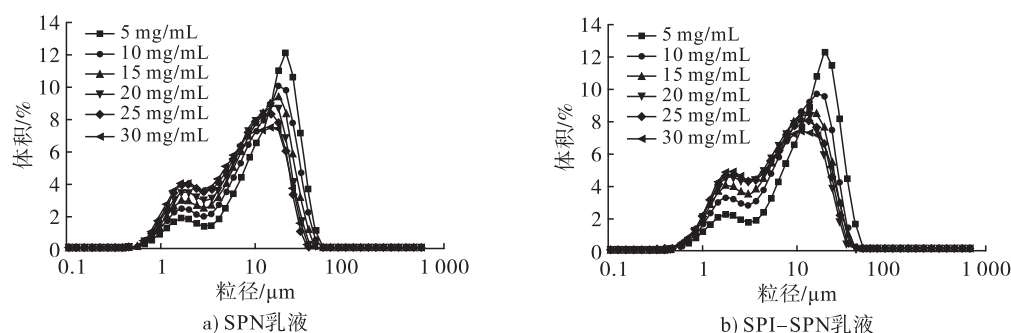


图4 SPN乳液和SPI-SPN乳液粒径分布

## 2.4 乳液的界面微观结构

用CLSM分析不同乳化剂质量浓度下的SPN

乳液和SPI-SPN乳液的界面微观结构,结果如图5所示。

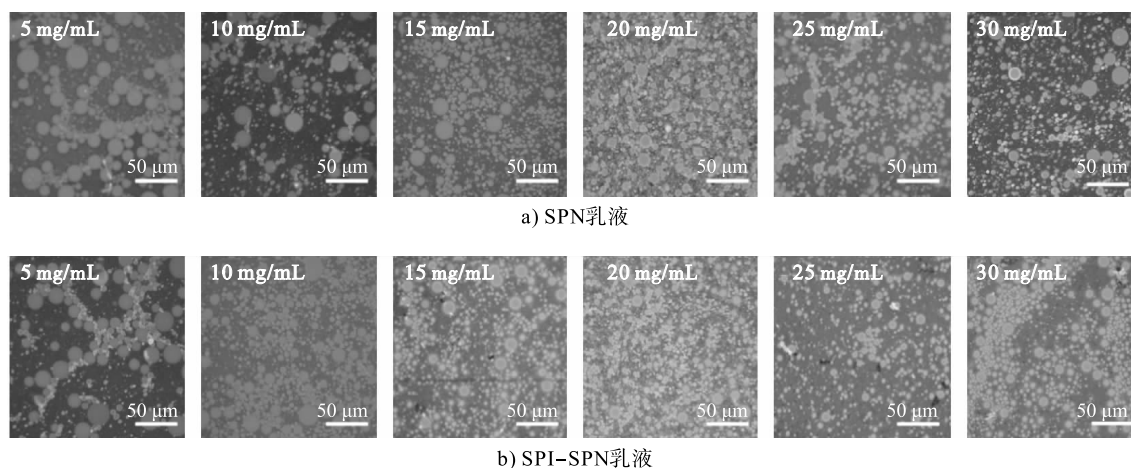


图5 SPN乳液和SPI-SPN乳液界面微观结构

由图5可知,所有乳液液滴呈典型的圆形,与显微结构(图2)结果一致,液滴内部都为红色,外部被绿色包被,表明SPN和SPI吸附在油滴表面,形成了乳液的空间屏障,阻止液滴絮凝和聚结<sup>[9]</sup>,成功制备了水包油型Pickering乳液。随着乳化剂质量浓度的增大,乳液液滴尺寸逐渐减小,在相同

乳化剂质量浓度下,SPI-SPN乳液的粒径小于SPN乳液,这与光学显微镜、粒径分布和 $D_{4,3}$ 结果一致。

## 2.5 乳液的界面蛋白吸附率

SPN、SPI-SPN乳液的界面蛋白吸附率随乳化剂质量浓度的变化趋势如图6所示。

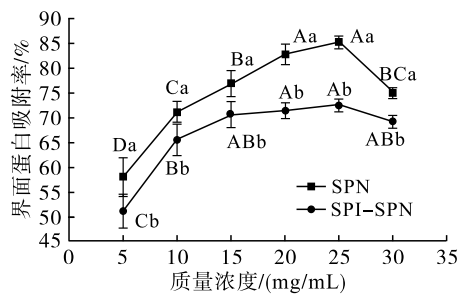


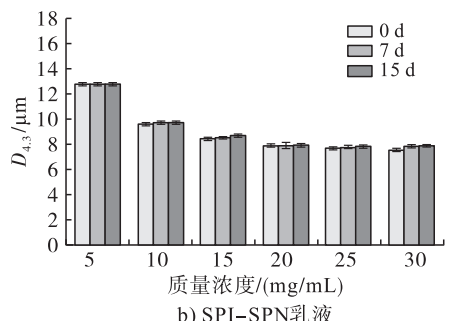
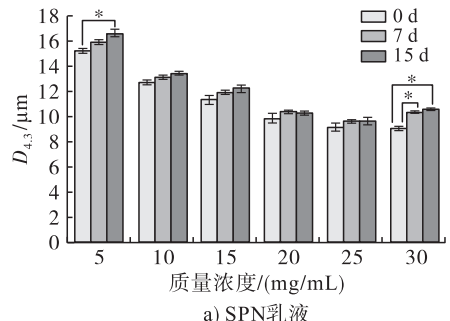
图 6 SPN 乳液和 SPI-SPN 乳液界面蛋白吸附率

由图 6 可知,在相同乳化剂质量浓度下,SPI-SPN 乳液的界面蛋白吸附率均比 SPN 乳液的低,说明其稳定相同的油水界面所需的乳化剂较少,进一步证明了 SPI 可以提高 SPN 的乳化性能。随着乳化剂质量浓度的升高,乳液的界面蛋白吸附率都呈现先增加后降低的趋势。以 SPI-SPN 乳液为例,随着乳化剂质量浓度从 5 mg/mL 增加到 25 mg/mL,界面蛋白吸附率从 51.28% 增加到 72.83%,说明乳化剂质量浓度越高,有更多的蛋白质吸附在油滴表面,参与界面膜的形成与稳定。类似的现象在大豆蛋白纳米颗粒<sup>[21]</sup>和大豆球蛋白颗粒<sup>[24]</sup>稳定的乳液中也被观察到。然而,当 SPI-SPN 的质量浓度为 30 mg/mL 时,界面蛋白吸附率降低至 69.50%,这可能是因为界面上的蛋白质达到饱和状态<sup>[25]</sup>,增大

乳化剂质量浓度会有更多的蛋白质残留在连续相中。当界面蛋白未达到饱和时,增大乳化剂浓度会导致乳液粒径降低,相反会使乳液液滴粒径不变,这与乳化剂质量浓度对乳液粒径(图 2)影响的变化趋势一致。

2.6 乳液的絮凝稳定性

利用乳液液滴在储存期间粒径的变化来评价乳液的絮凝稳定性,结果如图 7 所示。由图 7 可知,在室温(25℃)下储存 15 d 后,不同乳化剂质量浓度的 SPN 乳液粒径均有不同程度的增加,其在低乳化剂质量浓度(5 mg/mL)和高乳化剂质量浓度(30 mg/mL)下粒径增加程度最大,储存 15 d 后粒径分别增加了 8.98%、16.32%,而 SPI-SPN 乳液的粒径在储存期间没有显著变化,说明 SPI 提高了 SPN 乳液的絮凝稳定性。SPN 和 SPI-SPN 具有大分子蛋白质的界面性质,能够吸附在油水界面降低界面张力,并且形成具有黏弹性的界面膜,阻止油滴之间的聚结<sup>[26-27]</sup>。界面上的 SPI 具有柔性结构,伸到连续相中的肽链可以增大液滴之间的空间位阻,减少液滴之间的碰撞概率,因此 SPI-SPN 乳液具有很强的絮凝稳定性。



注: \* 表示存在显著性差异( $p < 0.05$ )

图 7 储存过程中 SPN 乳液和 SPI-SPN 乳液的粒径

2.7 乳液的分层稳定性

乳液中的水相密度大于油相,由于油相分子的运动,油滴上移,出现分层现象<sup>[28]</sup>。不同乳化剂质

量浓度下的 SPN 乳液和 SPI-SPN 乳液在储存过程中乳析指数的变化如图 8 所示。

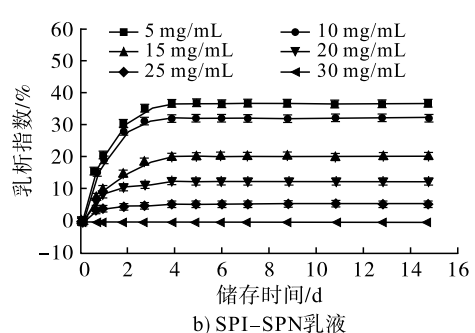
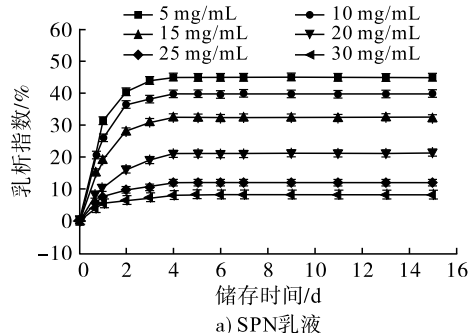


图 8 储存过程中 SPN 乳液和 SPI-SPN 乳液乳析指数

由图8可知,所有乳液的乳析指数在储存1 d时迅速增加,4 d后基本不再发生变化,这表明乳液液滴上浮主要发生在储存的初期。随着乳化剂质量浓度的升高,乳液的乳析指数逐渐降低,可能因为随着乳化剂质量浓度的增大,乳液粒径逐渐减小,并且乳液有更高的黏度<sup>[29]</sup>阻碍了乳化层的上浮,分层稳定性增强。类似地,Liu等<sup>[30]</sup>发现当鱼糜颗粒质量分数从1%增加到4%时,乳化层的占比增大,乳析指数逐渐降低。SPI-SPN乳液在任意乳化剂浓度下的乳析指数均低于SPN乳液,并且当SPI-SPN质量浓度为30 mg/mL时,乳液没有分层,说明SPI的添加提高了SPN乳液的分层稳定性,这可能与加入SPI后乳液粒径变小有关,因为粒径越小或者粒径分布越窄的乳液在长期储存过程中更稳定<sup>[31-32]</sup>;另一方面,吸附在界面上及连续相中的SPI增大了液滴之间的空间位阻,使液滴之间接触的概率降低,从而提高了乳液的分层稳定性。

### 3 结 论

固定油相比比例为0.2,改变乳化剂质量浓度(5、10、15、20、25、30 mg/mL),研究SPI对SPN乳液粒径、界面微观结构、界面蛋白吸附率以及储存稳定性的影响。结果表明,随着乳化剂质量浓度的增大,乳液液滴粒径逐渐减小,当乳化剂质量浓度较低(5 mg/mL)时,乳液出现桥联,乳化剂质量浓度过高(30 mg/mL)则出现絮凝。界面蛋白吸附率随着乳化剂质量浓度的增加呈现出先升高后降低的趋势。与SPN乳液相比,SPI-SPN乳液的粒径和界面蛋白吸附率显著降低,这表明SPI提高了SPN的乳化性能。更为重要的是,SPI的加入显著降低了乳液储存期间的絮凝程度,提高了乳液分层稳定性,尤其是当乳化剂质量浓度为30 mg/mL时,乳液没有出现分层现象。研究结果说明SPI对于提高SPN稳定的Pickering乳液的储存稳定性具有重要作用。本研究为SPN在稳定的食品、药品和化妆品乳液体系中的应用提供了重要数据支撑。

### 参考文献:

- [1] ZHANG Y, SUN W, ZHAO M, et al. Improvement of the ACE-inhibitory and DPPH radical scavenging activities of soya protein hydrolysates through pepsin pretreatment[J]. Int J Food Sci Technol, 2015, 50(10): 2175-2182.
- [2] WANG R, ZHAO H, PAN X, et al. Preparation of bioactive peptides with antidiabetic, antihypertensive, and antioxidant activities and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory peptides from soy protein[J]. Food Sci Nutr, 2019, 7(5): 1848-1856.
- [3] YAN X, MA C, CUI F, et al. Protein-stabilized Pickering emulsions: Formation, stability, properties, and applications in foods[J]. Trends Food Sci Technol, 2020, 103: 293-303.
- [4] SHI A, FENG X, WANG Q, et al. Pickering and high internal phase Pickering emulsions stabilized by protein-based particles: A review of synthesis, application and prospective[J/OL]. Food Hydrocoll, 2020, 109: 106117 [2023-01-12]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106117>.
- [5] ZHANG Y, ZHOU F, ZHAO M, et al. Soy peptide nanoparticles by ultrasound-induced self-assembly of large peptide aggregates and their role on emulsion stability[J]. Food Hydrocoll, 2018, 74: 62-71.
- [6] RODRÍGUEZ NIÑO M R, SÁNCHEZ C C, RUÍZ-HENESTOSA V P, et al. Milk and soy protein films at the air-water interface[J]. Food Hydrocoll, 2005, 19(3): 417-428.
- [7] ZHANG X, QI B, XIE F, et al. Emulsion stability and dilatational rheological properties of soy/whey protein isolate complexes at the oil-water interface: Influence of pH[J/OL]. Food Hydrocoll, 2021, 113: 106391 [2023-01-12]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106391>.
- [8] IMURA T, NAKAYAMA M, TAIRA T, et al. Interfacial and emulsifying properties of soybean peptides with different degrees of hydrolysis[J]. J Oleo Sci, 2015, 64(2): 183-189.
- [9] WANG Y, FAN B, TONG L T, et al. High internal phase emulsions stabilized solely by soy protein isolate[J/OL]. J Food Eng, 2022, 318: 110905 [2023-01-12]. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110905>.
- [10] XU Y T, LIU T X, TANG C H. Novel Pickering high internal phase emulsion gels stabilized solely by soy  $\beta$ -conglycinin[J]. Food Hydrocoll, 2019, 88: 21-30.
- [11] SUI X, BI S, QI B, et al. Impact of ultrasonic treatment on an emulsion system stabilized with soybean protein isolate and lecithin: Its emulsifying property and emulsion stability[J]. Food Hydrocoll, 2017, 63: 727-734.
- [12] GALVÃO A M M T, VÉLEZ-ERAZO E M, KARATAY G G B, et al. High internal phase emulsions stabilized by the lentil protein isolate (*Lens culinaris*) [J/OL]. Colloid Surf A, 2022, 653: 129993 [2023-01-12]. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129993>.
- [13] FENG X, DAI H, MA L, et al. Properties of Pickering emulsion stabilized by food-grade gelatin nanoparticles: Influence of the nanoparticles concentration [J/OL]. Colloid Surf B, 2020, 196: 111294 [2023-01-12]. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111294>.

- [14] KIM W, WANG Y, SELOMULYA C. Impact of sodium alginate on binary whey/pea protein – stabilised emulsions [J/OL]. *J Food Eng*, 2022, 321: 110978[2023 – 01 – 12]. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.110978>.
- [15] SEDMAK J J, GROSSBERG S E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250[J]. *Anal Biochem*, 1977, 79(1/2): 544 – 552.
- [16] YANG H, SU Z, MENG X, et al. Fabrication and characterization of Pickering emulsion stabilized by soy protein isolate – chitosan nanoparticles [J/OL]. *Carbohydr Polym*, 2020, 247: 116712[2023 – 01 – 12]. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116712>.
- [17] DALVI S V, DAVE R N. Controlling particle size of a poorly water – soluble drug using ultrasound and stabilizers in antisolvent precipitation[J]. *Ind Eng Chem Res*, 2009, 48(16): 7581 – 7593.
- [18] CAO H, SUN R, SHI J, et al. Effect of ultrasonic on the structure and quality characteristics of quinoa protein oxidation aggregates[J/OL]. *Ultrason Sonochem*, 2021, 77: 105685 [2023 – 01 – 12]. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105685>.
- [19] 牛付阁, 韩备竞, 寇梦璇, 等. 纳米纤维素颗粒稳定的 Pickering 乳液的性能研究[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(6): 166 – 172.
- [20] 邢琳琳, 朱力杰. 大豆分离蛋白 – 多糖体系对甜菊糖苷苦味的抑制作用及复合乳液稳定性研究[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(9): 153 – 162.
- [21] LIU F, TANG C H. Emulsifying properties of soy protein nanoparticles: Influence of the protein concentration and/or emulsification process[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(12): 2644 – 2654.
- [22] TIAN H, XIANG D, LI C. Tea polyphenols encapsulated in W/O/W emulsions with xanthan gum – locust bean gum mixture: Evaluation of their stability and protection [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 175: 40 – 48.
- [23] SAEIDY S, NASIRPOUR A, DJELVEH G, et al. Emulsion properties of Asafoetida gum: Effect of oil concentration on stability and rheological properties [J]. *Colloid Surf A*, 2019, 560: 114 – 121.
- [24] LIU F, TANG C H. Soy glycinin as food – grade Pickering stabilizers; Part. III. Fabrication of gel – like emulsions and their potential as sustained – release delivery systems for  $\beta$  – carotene [J]. *Food Hydrocoll*, 2016, 56: 434 – 444.
- [25] 卢菊慧, 钟芳, 陈茂深. 影响豌豆蛋白乳化特性的分子机制[J]. *食品与机械*, 2018, 34(1): 7 – 12.
- [26] 张远红. 大豆肽基纳米颗粒的制备、界面行为及功能性输送的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- [27] DICKINSON E. Hydrocolloids acting as emulsifying agents: How do they do it? [J]. *Food Hydrocoll*, 2018, 78: 2 – 14.
- [28] 蔡惠钿, 张逸, 蔡清晖. 氧化茶多酚对水包油型乳液物理稳定性的影响[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(1): 27 – 30.
- [29] NOR HAYATI I, HUI C H, ISHAK W R W, et al. Effect of black seed oil, honey, whey protein concentrate and their interaction on antioxidant activity, elastic modulus and creaming index of O/W emulsions [J]. *J Dispers Sci Technol*, 2020, 41(13): 1925 – 1936.
- [30] LIU C, FAN L, YANG Y, et al. Characterization of surimi particles stabilized novel Pickering emulsions: Effect of particles concentration, pH and NaCl levels [J/OL]. *Food Hydrocoll*, 2021, 117: 106731[2023 – 01 – 12]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106731>.
- [31] LOI C C, EYRES G T, BIRCH E J. Effect of milk protein composition on physicochemical properties, creaming stability and volatile profile of a protein – stabilised oil – in – water emulsion [J]. *Food Res Int*, 2019, 120: 83 – 91.
- [32] GHAEDI N, HOSSEINI E. Physical and oxidative stability of emulsions treated with bitter almond gum – soy protein isolate Maillard conjugates [J/OL]. *LWT – Food Sci Technol*, 2021, 152: 112352 [2023 – 01 – 12]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112352>.

# 活性炭与树脂对芝麻 ACE 抑制肽脱苦的工艺优化及其性能比较

芦鑫<sup>1,2</sup>, 游静<sup>1,2</sup>, 金璐<sup>1,2</sup>, 宋国辉<sup>1,2</sup>, 孙强<sup>1,2</sup>, 黄纪念<sup>1,2,3</sup>

(1. 河南省农业科学院 农副产品加工研究中心, 郑州 450002; 2. 河南省农产品生物活性物质工程技术研究中心, 郑州 450002; 3. 农业部油料加工重点实验室, 武汉 430062)

**摘要:**为改善芝麻 ACE 抑制肽的味道, 分别采用活性炭与树脂对芝麻 ACE 抑制肽进行脱苦, 以脱苦率、多肽损失率为评价指标, 采用单因素实验和正交实验对两种脱苦工艺条件进行优化, 并比较两种脱苦方法对芝麻 ACE 抑制肽味觉特性、活性及氨基酸组成的影响, 以确定最适宜的脱苦方法。结果表明: 两种方法均能使芝麻 ACE 抑制肽液苦味降至无法察觉, 活性炭脱苦最佳工艺条件为活性炭 2 号添加量 6%、芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度 10 g/100 mL、吸附温度 55 ℃、吸附时间 15 min, 在此条件下脱苦率与多肽损失率分别为  $(96.46 \pm 0.57)\%$  和  $(29.02 \pm 0.19)\%$  (电子舌测定苦味为  $-0.61 \pm 0.02$ ); AB-8 大孔吸附树脂脱苦最佳工艺条件为树脂添加量 12.5%、pH 7、吸附温度 35 ℃、吸附时间 15 min、芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度 10 g/100 mL, 在此条件下脱苦率与多肽损失率分别为  $(95.21 \pm 0.93)\%$  和  $(12.11 \pm 0.19)\%$  (苦味为  $-0.03 \pm 0.08$ ); AB-8 大孔吸附树脂脱苦的芝麻 ACE 抑制肽活性显著强于活性炭脱苦的, 这与不同脱苦方法引起的多肽组成差异有关。综合考虑, AB-8 大孔吸附树脂可以更好地降低芝麻 ACE 抑制肽中苦味氨基酸含量, 适合用于芝麻 ACE 抑制肽的脱苦。

**关键词:** 芝麻; ACE 抑制肽; 多肽脱苦; 树脂脱苦; 活性炭脱苦; 吸附脱苦

中图分类号: TS229; TS201.2 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2024)03-0102-09

## Optimization of debittering of sesame ACE inhibitory peptide by activated carbon and resin and their performance comparison

LU Xin<sup>1,2</sup>, YOU Jing<sup>1,2</sup>, JIN Lu<sup>1,2</sup>, SONG Guohui<sup>1,2</sup>,  
SUN Qiang<sup>1,2</sup>, HUANG Jinian<sup>1,2,3</sup>

(1. Research Center of Agricultural and Sideline Products Processing, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Engineering Research Centre of Bioactive Substances in Agricultural Products, Zhengzhou 450002, China; 3. Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

**Abstract:** To improve the taste of sesame ACE inhibitory peptide, activated carbon and resin were used to eliminate the bitterness of sesame ACE inhibitory peptide, and the debittering rate and peptide loss rate were taken as the evaluation indexes, single factor experiment and orthogonal experiment were used to optimize the two debittering process conditions. The suitable debittering method was obtained based on

the comparison in taste characterization, sesame ACE inhibitory peptide activity, and amino acid composition between the two debittering methods. The results showed that both methods could reduce the bitterness of sesame ACE inhibitory peptide to imperceptible. The optimal debittering conditions of activated carbon were as follows:

收稿日期: 2022-10-28; 修回日期: 2023-10-12

基金项目: 河南省科技攻关项目(222102110037); 河南省科技攻关项目(212102110076); 国家特色油料产业技术体系(CARS-14)

作者简介: 芦鑫(1981), 男, 助理研究员, 博士, 研究方向为油脂加工(E-mail) xinlu1981@foxmail.com。

通信作者: 黄纪念, 研究员, 博士(E-mail) hjinian@sina.com。

addition of activated carbon No. 2 6%, sesame ACE inhibitory peptide solution mass concentration 10 g/100 mL, absorption temperature 55 °C, absorption time 15 min. Under the optimal conditions, the debittering rate and peptide loss rate were  $(96.46 \pm 0.57)\%$  and  $(29.02 \pm 0.19)\%$  (bitterness detected by electronic tongue was  $-0.61 \pm 0.02$ ). While the debittering rate and peptide loss rate of AB-8 macroporous resin reached  $(95.21 \pm 0.93)\%$  and  $(12.11 \pm 0.19)\%$  (the bitterness was  $-0.03 \pm 0.08$ ) under the optimal conditions of AB-8 macroporous resin dosage 12.5%, sesame ACE inhibitory peptide solution mass concentration 10 g/100 mL, pH 7, absorption temperature 35 °C and absorption time 15 min. The activity of ACE inhibitory peptide debittered by AB-8 macroporous resin was significantly stronger than that debittered by activated carbon, which was related to the difference in peptide composition caused by the debittering methods. Overall, AB-8 macroporous resin adsorption can better reduce the contents of bitter amino acids, and is suitable for sesame ACE inhibitory peptide debittering.

**Key words:** sesame; ACE inhibitory peptide; peptide debittering; resin debittering; activated carbon debittering; adsorption debittering

我国是高血压高发国家之一,成人患病率达到23.2%<sup>[1]</sup>,预防与治疗高血压疾病成为我国亟待解决的公共卫生问题。食源性ACE抑制肽被认为是辅助防控高血压的有效成分<sup>[2]</sup>。研究表明,芝麻蛋白酶解物中含有ACE抑制肽<sup>[3]</sup>。然而,芝麻ACE抑制肽具有苦味,这会削弱消费者的购买意愿。为了改善芝麻ACE抑制肽的味道,需要对其进行脱苦处理。

目前,脱苦方法有物理法与生物法<sup>[4-5]</sup>,其中物理法包括吸附、离子交换与包埋<sup>[6-7]</sup>,生物法分为酶法修饰与生物发酵<sup>[8]</sup>。活性炭与树脂吸附脱苦法是食品脱苦的常用方法,具有操作简单、时间短、成本低、可重复利用、易于工业化等优点<sup>[5,9]</sup>。虽然采用活性炭与树脂脱苦已经在食品工业中得到广泛应用,但上述两种方法应用于芝麻ACE抑制肽脱苦鲜有报道,且不涉及脱苦处理对ACE抑制肽活性的影响。因此,有必要开展活性炭与树脂对芝麻ACE抑制肽脱苦的研究。

本文以芝麻ACE抑制肽液为研究对象,分别采用活性炭与树脂对其进行脱苦,采用单因素实验和正交实验对两种脱苦工艺条件进行优化,并比较两种脱苦方法的ACE抑制肽多肽损失率、活性、味觉差异及氨基酸组成,为芝麻ACE抑制肽脱苦方法的选择及工业化生产提供理论基础与数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

芝麻ACE抑制肽液冻干粉,参照文献[3],采用碱性蛋白酶与风味蛋白酶先后水解芝麻蛋白,再经浓缩、冻干后得到。

活性炭1号(木质)、活性炭2号(木质与椰壳

混合物)、活性炭3号(椰壳),郑州科林净水材料有限公司;D001强酸阳离子交换树脂、D201强碱阴离子交换树脂、D301弱碱阴离子交换树脂、D113弱酸阳离子交换树脂、AB-8大孔吸附树脂(弱极性)、D3520大孔吸附树脂(非极性),天津允开树脂科技公司;S-8大孔吸附树脂(极性),广州伟伯科技有限公司;盐酸奎宁,分析纯,西安玉宁生物科技有限公司;其他试剂,分析纯,国药集团有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

DELTA 320型pH计,上海梅特勒-托利多仪器有限公司;ZW-A振荡器,常州博远实验分析仪器有限公司;Rotanta460R离心机,德国Hettich科学仪器公司;K1100全自动凯氏定氮仪,海能未来技术集团股份有限公司;DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器,巩义市予华仪器有限责任公司;TS-500Z电子舌,日本Insent公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 芝麻ACE抑制肽的活性炭脱苦

取芝麻ACE抑制肽液冻干粉,加入蒸馏水配成一定质量浓度的溶液后,加入一定量的活性炭,于一定温度水浴搅拌脱苦一定时间后,10 000 r/min离心15 min,取上清液进行脱苦率与多肽损失率测定。

#### 1.2.2 芝麻ACE抑制肽的树脂脱苦

取芝麻ACE抑制肽液冻干粉,加入蒸馏水配成10 g/100 mL溶液后,调节pH,加入一定量的树脂,在一定温度、120 r/min下振荡吸附一定时间后,过0.075 mm(200目)筛,取滤液进行脱苦率与多肽损失率测定。

#### 1.2.3 脱苦率评价

参考谷宇等<sup>[10]</sup>的方法,以盐酸奎宁为苦味基准

物,称取 0.1 g 盐酸奎宁于 100 mL 体积分数为 95% 的乙醇中,混合均匀,取 10 mL 混合溶液于 100 mL 蒸馏水中,配成  $1 \times 10^{-4}$  g/mL 盐酸奎宁溶液,再分别稀释得到质量浓度为  $9 \times 10^{-5}$ 、 $8 \times 10^{-5}$ 、 $7 \times 10^{-5}$ 、 $6 \times 10^{-5}$ 、 $5 \times 10^{-5}$ 、 $4 \times 10^{-5}$ 、 $3 \times 10^{-5}$ 、 $2 \times 10^{-5}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  g/mL 的盐酸奎宁溶液,分装于不同瓶子中,随机抽取 5 瓶,安排实验室人员对上述溶液进行排序,选拔出能正确排序的人员,而后安排三点实验,从能正确区分的人员中抽出 5 人,参加芝麻 ACE 抑制肽液的苦味评价。

将上述盐酸奎宁溶液(包括  $1 \times 10^{-4}$  g/mL)质量浓度从低到高依次设定为苦味值 1~10 分,以盐酸奎宁的苦味值为参比,对芝麻 ACE 抑制肽液的苦味进行评分,确定苦味值。按照公式(1)计算脱苦率( $Y$ )。

$$Y = (1 - \frac{D_d}{D_o}) \times 100\% \quad (1)$$

式中: $D_d$ 为芝麻 ACE 抑制肽液脱苦后的苦味值; $D_o$ 为未脱苦芝麻 ACE 抑制肽液苦味值。

#### 1.2.4 多肽损失率测定

将 1 mL 芝麻 ACE 抑制肽液和 2 mL 10 g/mL 的三氯乙酸溶液混合均匀,8 000 r/min 离心 20 min,取上清液并用凯氏定氮法测定多肽含量。按公式(2)计算多肽损失率( $X$ )。

$$X = (1 - \frac{P_d}{P_o}) \times 100\% \quad (2)$$

式中: $P_d$ 为脱苦后芝麻 ACE 抑制肽液中的多肽质量,g; $P_o$ 为未脱苦芝麻 ACE 抑制肽液中的多肽质量,g。

#### 1.2.5 电子舌鉴定芝麻 ACE 抑制肽液味觉特征

采用 TS-500Z 电子舌测定芝麻 ACE 抑制肽液的酸、甜、苦、咸、鲜、涩味等味觉特征。测试中,参比溶液为 30 mmol/L 氯化钾溶液(含 0.3 mmol/L 酒石酸),视其为无味。基本味觉值是传感器在样品中电压( $V_s$ )与其在参比溶液中电压( $V_r$ )的差值,回味值是将传感器简单清洗后,再次测定在参比溶液中电压与  $V_r$  的差值,其反映某种味觉的持续性。味觉指标数值越大,反映样品与参比溶液差异越大,数值正负则反映样品与参比溶液的强弱。

#### 1.2.6 芝麻 ACE 抑制肽活性测定

参照 Wang 等<sup>[11]</sup>的方法测定芝麻 ACE 抑制肽活性。

#### 1.2.7 芝麻 ACE 抑制肽氨基酸组成测定

参考贾聪等<sup>[3]</sup>的方法测定芝麻 ACE 抑制肽氨基酸组成。

#### 1.2.8 数据分析

无特殊说明,实验测定 3 次平行。采用 SAS9.2 进行单因素实验与正交实验方差分析,其中  $p < 0.05$  为显著, $p < 0.01$  为极显著。使用 OriginPro 2022 作图,图表中同一指标不同字母的数据代表差异显著。

### 2 结果与讨论

#### 2.1 活性炭对芝麻 ACE 抑制肽脱苦的工艺优化

##### 2.1.1 活性炭类型对脱苦的影响

在芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度 10 g/100 mL、活性炭添加量 1% (以溶液体积计算)、吸附温度 30 ℃、吸附时间 15 min 条件下,考察不同类型活性炭对芝麻 ACE 抑制肽的脱苦效果,结果见图 1。

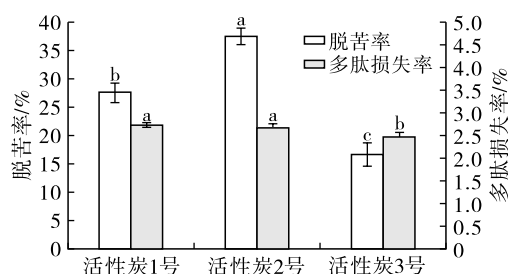


图1 不同类型活性炭对芝麻 ACE 抑制肽的脱苦效果

由图 1 可知,3 种类型活性炭脱苦能力依次为活性炭 2 号>活性炭 1 号>活性炭 3 号。3 种活性炭脱苦差异与活性炭材质、结构有关<sup>[12]</sup>。活性炭 3 号的多肽损失率显著低于活性炭 1 号和活性炭 2 号的,这可能与活性炭材质的组成成分存在差异,从而影响吸附性能有关<sup>[13]</sup>。综合脱苦效果与多肽损失情况,采用活性炭 2 号进行后续研究。

##### 2.1.2 活性炭脱苦单因素实验

活性炭吸附物质分为 3 个阶段:第一阶段吸附物从液相界膜扩散至活性炭表面,即膜扩散阶段;第二阶段吸附物从活性炭表面向颗粒内部扩散,为颗粒内扩散阶段;第三阶段吸附物的吸附与解吸达到平衡阶段<sup>[14]</sup>。吸附温度、活性炭添加量、吸附时间、芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度对脱苦率与多肽损失率的影响如图 2 所示。

由图 2a 可知,随着吸附温度的升高,脱苦率逐渐上升,当吸附温度超过 55 ℃后,脱苦率有所下降。温度升高会加强膜扩散与颗粒内扩散速度,促进活性炭吸附苦味肽分子,有利于降低苦味,但温度过高,苦味肽分子运动速度过快,难以被吸附,削弱脱苦效果。随着吸附温度升高,多肽损失率逐渐增加,当吸附温度达到 55 ℃后,多肽损失率基本保持稳定。综合脱苦效果与多肽损失情况,吸附温度选择 55 ℃。

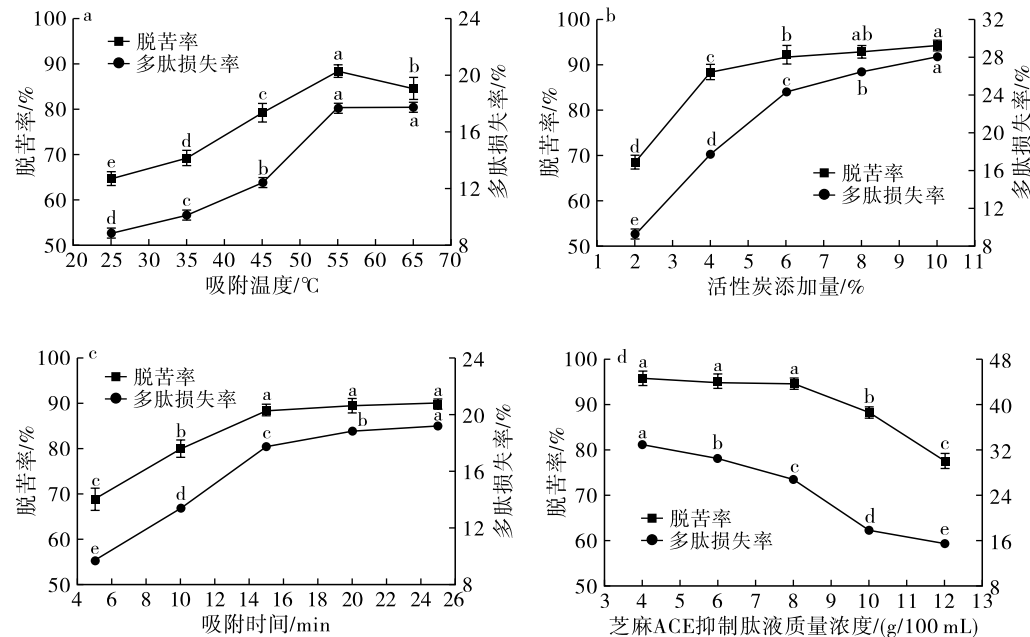
由图 2b 可知,随着活性炭添加量的增加,脱苦率

逐渐增加,当活性炭添加量超过 6% 后,脱苦率逐渐稳定,而多肽损失率随着活性炭添加量增加而不断升高。活性炭吸附的专一性较差,当活性炭对苦味肽吸附平衡后,继续添加活性炭会增加其对其他多肽的吸附,从而造成多肽损失率上升。因此,活性炭添加量以 6% 为宜。前人采用活性炭对不同蛋白水解液脱苦时,活性炭添加量差异大,如大豆肽脱苦的活性炭添加量为 1%<sup>[15]</sup>,核桃肽脱苦的活性炭添加量为 50%<sup>[6]</sup>。造成上述明显差异的原因可能是:①活性炭品种不同,吸附性能差异显著<sup>[16]</sup>;②原料蛋白的氨基酸组成与水解程度差异,其苦味值差异大<sup>[17]</sup>。

由图 2c 可知,随着吸附时间的延长,脱苦率与多肽损失率逐渐增加,当吸附时间超过 15 min 后,脱苦率无显著变化,而多肽损失率仍小幅增长。这

表明活性炭-芝麻 ACE 抑制肽体系中,活性炭吸附平衡基本在 15 min 左右完成,继续延长吸附时间会增加多肽损失率。因此,吸附时间控制在 15 min。

由图 2d 可知,芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度从 4 g/100 mL 增加到 8 g/100 mL 时,脱苦率下降但无显著差异,当芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度超过 8 g/100 mL 时,脱苦率显著下降。随着芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度的增加,多肽损失率显著下降。当芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度较低时,活性炭吸附容量剩余,除彻底吸附苦味肽外,还能充分吸附其他多肽,造成高脱苦率与高多肽损失率;当芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度过高时,活性炭吸附容量饱和,造成苦味肽残留,导致脱苦率下降。综合考虑,芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度控制在 8 g/100 mL 为宜。



注:固定条件为活性炭添加量 4%、吸附时间 15 min、芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度 10 g/100 mL、吸附温度 55 ℃,考察其中一个因素时,其他因素条件固定

图 2 活性炭吸附条件对芝麻 ACE 抑制肽脱苦的影响

2.1.3 活性炭脱苦正交实验

根据单因素实验结果,以脱苦率与多肽损失率为评价指标,固定吸附时间 15 min,选取吸附温度(A)、活性炭添加量(B)、芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度(C)为考察因素进行正交实验。活性炭脱苦正交实验设计及结果见表 1,正交实验方差分析见表 2。

由表 1、表 2 可看出:脱苦率的正交实验模型显著并且  $R^2$  接近 1,该模型可以客观反映吸附温度、活性炭添加量、芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度对脱苦率的影响并准确预测脱苦率变化;吸附温度与活性炭添加量是脱苦率的显著影响因素,且吸附温度的影响强于活性炭添加量,而芝麻 ACE 抑制肽液质量浓

度为非显著影响因素。脱苦率最佳因素水平组合为  $A_2B_3C_1$ ,极差分析结果显示活性炭添加量 6% 与 7% 对应的脱苦率无显著差异。因此,为节约活性炭添加量与增加处理量,脱苦率的最优因素水平组合选择  $A_2B_2C_3$ 。

由表 1、表 2 还可看出:多肽损失率的正交模型显著,且  $R^2 = 99.49\%$ ,说明该模型能客观揭示考察各因素对多肽损失率的影响;3 个因素影响主次顺序为活性炭添加量(B) > 吸附温度(A) > 芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度(C),其中活性炭添加量与吸附温度对多肽损失率的影响显著,芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度对多肽损失率的影响不显著。最低多

肽损失率对应的因素水平组合为 A<sub>1</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>。综合脱苦率与多肽损失率,确定最佳因素水平组合为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>,即吸附温度 55 ℃,活性炭添加量 6%,芝麻 ACE 抑制肽液质量浓度 10 g/100 mL,在此条件下进行验证实验,脱苦率与多肽损失率分别为 (96.46 ± 0.57)% 和 (29.02 ± 0.19)%。

表 1 活性炭脱苦正交实验设计及结果

| 实验号            | A                  | B                  | C              | 脱苦率/% | 多肽损失率/% |
|----------------|--------------------|--------------------|----------------|-------|---------|
| 1              | 1(50 ℃)            | 1(5%)              | 1(6 g/100 mL)  | 90.00 | 22.12   |
| 2              | 1                  | 2(6%)              | 3(10 g/100 mL) | 92.08 | 27.04   |
| 3              | 1                  | 3(7%)              | 2(8 g/100 mL)  | 93.33 | 29.63   |
| 4              | 2(55 ℃)            | 1                  | 2              | 94.17 | 24.98   |
| 5              | 2                  | 2                  | 1              | 96.67 | 29.11   |
| 6              | 2                  | 3                  | 3              | 96.88 | 30.98   |
| 7              | 3(60 ℃)            | 1                  | 3              | 92.50 | 24.20   |
| 8              | 3                  | 2                  | 2              | 94.17 | 29.36   |
| 9              | 3                  | 3                  | 1              | 96.04 | 32.05   |
| 脱苦率            |                    |                    |                |       |         |
| k <sub>1</sub> | 91.81 <sup>c</sup> | 92.22 <sup>b</sup> | 94.24          |       |         |
| k <sub>2</sub> | 95.90 <sup>a</sup> | 94.31 <sup>a</sup> | 93.89          |       |         |
| k <sub>3</sub> | 94.24 <sup>b</sup> | 95.42 <sup>a</sup> | 93.82          |       |         |
| R              | 4.10               | 3.19               | 0.42           |       |         |
| 多肽损失率          |                    |                    |                |       |         |
| k <sub>1</sub> | 26.26 <sup>b</sup> | 23.77 <sup>c</sup> | 27.76          |       |         |
| k <sub>2</sub> | 28.36 <sup>a</sup> | 28.50 <sup>b</sup> | 27.99          |       |         |
| k <sub>3</sub> | 28.54 <sup>a</sup> | 30.89 <sup>a</sup> | 27.41          |       |         |
| R              | 2.27               | 7.12               | 0.58           |       |         |

表 2 活性炭脱苦正交实验方差分析

| 项目    | 自由度 | 方差和   | 均方差   | F      | p                       |
|-------|-----|-------|-------|--------|-------------------------|
| 脱苦率   |     |       |       |        |                         |
| 模型    | 6   | 41.62 | 6.94  | 33.89  | 2.89 × 10 <sup>-2</sup> |
| A     | 2   | 25.55 | 12.77 | 62.41  | 1.58 × 10 <sup>-2</sup> |
| B     | 2   | 15.77 | 7.88  | 38.52  | 2.53 × 10 <sup>-2</sup> |
| C     | 2   | 0.30  | 0.15  | 0.73   | 0.58                    |
| 误差    | 2   | 0.41  |       |        |                         |
| 多肽损失率 |     |       |       |        |                         |
| 模型    | 6   | 88.91 | 14.82 | 65.07  | 1.52 × 10 <sup>-2</sup> |
| A     | 2   | 9.58  | 4.79  | 21.04  | 4.54 × 10 <sup>-2</sup> |
| B     | 2   | 78.81 | 39.40 | 173.02 | 5.70 × 10 <sup>-3</sup> |
| C     | 2   | 0.52  | 0.26  | 1.14   | 0.47                    |
| 误差    | 2   | 0.46  |       |        |                         |

注:脱苦率与多肽损失率的正交模型 R<sup>2</sup> 分别为 99.02% 和 99.49%

2.2 树脂对芝麻 ACE 抑制肽脱苦的工艺优化

2.2.1 树脂类型对脱苦的影响

在树脂添加量 10% (以溶液体积计算)、吸附温度 35 ℃、吸附时间 15 min 条件下,考察不同类型树脂对芝麻 ACE 抑制肽的脱苦效果,结果见图 3。

由图 3 可知,AB-8 大孔吸附树脂具有最佳的脱苦效果,且多肽损失率较低,这与树脂极性与苦味

肽极性有关。研究表明:苦味肽分子多含有疏水性氨基酸残基,其中对苦味贡献较大的疏水氨基酸有脯氨酸(Pro)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、苯丙氨酸(Phe)与色氨酸(Trp)<sup>[17-18]</sup>,另外,特定位置上的极性氨基酸能增强苦味,如碱性氨基酸残基在 N 端<sup>[17, 19-20]</sup>,此外,极性氨基酸残基的存在也有利于提高多肽的水溶性。故苦味肽呈现弱极性,有利于与弱极性 AB-8 发生吸附,从而实现脱苦<sup>[21]</sup>。综合脱苦效果与多肽损失情况,选择 AB-8 大孔吸附树脂进行后续脱苦研究。

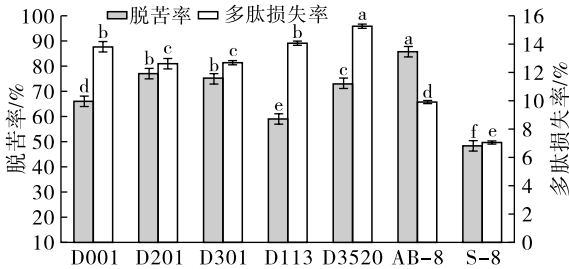


图 3 树脂类型对芝麻 ACE 抑制肽脱苦的影响

2.2.2 树脂脱苦单因素实验

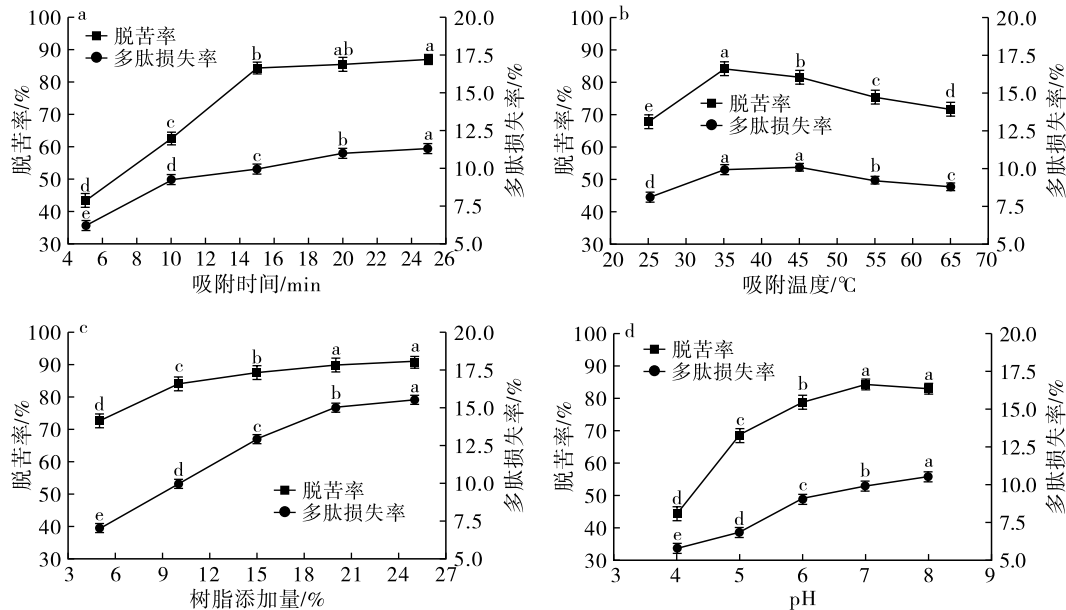
大孔树脂吸附条件对芝麻 ACE 抑制肽脱苦的影响见图 4。由图 4a 可知:随着吸附时间的延长,脱苦率显著增加,但吸附时间超过 15 min 后,脱苦率增加放缓;多肽损失率随着吸附时间的延长呈现显著增加趋势。上述变化表明,AB-8 大孔吸附树脂吸附苦味肽基本在 15 min 左右达到平衡。综合考虑,吸附时间以 15 min 为宜。另外,相较于活性炭吸附,由于树脂吸附具有专一性,故吸附其他多肽较少,多肽损失率较低。

由图 4b 可知,在 25 ~ 65 ℃ 范围内,脱苦率和多肽损失率均呈现先升高后降低的趋势,在 35 ℃ 时脱苦率达到最大值,为 (84.17 ± 1.14)%,而高多肽损失率出现在 45 ℃。类似现象在大孔树脂脱苦菊粉中也有报道<sup>[22]</sup>。推测是温度升高加速了多肽在大孔树脂表面与内部运动速度,促进了大孔树脂对多肽的吸附作用,提升了脱苦效果;但温度过高,削弱非共价相互作用,使部分多肽解吸,导致脱苦率与多肽损失率下降。综合考虑,吸附温度选择 35 ℃ 为宜。

由图 4c 可知,随着树脂添加量的增加,脱苦率显著增加,当树脂添加量超过 15% 后,脱苦率增加放缓,而多肽损失率在 5% ~ 25% 的树脂添加量范围内呈现上升趋势。大孔树脂脱苦柚汁也有类似现象<sup>[23]</sup>。芝麻 ACE 抑制肽中苦味肽的含量一定,当树脂吸附苦味肽达到平衡后,脱苦率基本保持不变,而多余树脂会继续吸附其他多肽,增加多肽损失率。综合考虑,树脂添加量控制在 15% 以内。

由图 4d 可知,随着 pH 从 4 增加到 8,脱苦率呈现快速增加到逐渐平稳的趋势,多肽损失率呈现逐渐增加趋势。大孔树脂吸附物质通过范德华引力、氢键等非共价键实现<sup>[21, 24]</sup>,多肽具有两性解离性,

伴随着 pH 变化,其带电极性与强度会发生变化,这会影响与树脂吸附效果,从而造成脱苦率与多肽损失率发生变化。结合脱苦效果与多肽损失率,pH 7 较为适宜。



注:固定条件为树脂添加量 10%、吸附时间 15 min、pH 7、吸附温度 35 ℃,考察其中一个因素时,其他因素条件固定

图 4 树脂吸附条件对芝麻 ACE 抑制肽脱苦的影响

2.2.3 树脂脱苦正交实验

在单因素实验的基础上,选定 AB-8 大孔吸附树脂,固定芝麻 ACE 抑制肽液 pH 为 7,以吸附时间(A)、吸附温度(B)和树脂添加量(C)为影响因素,开展正交实验。AB-8 大孔吸附树脂脱苦正交实验设计及结果见表 3,正交实验方差分析见表 4。

表 3 AB-8 大孔吸附树脂脱苦正交实验设计及结果

| 实验号   | A                  | B                   | C                  | 脱苦率/% | 多肽损失率/% |
|-------|--------------------|---------------------|--------------------|-------|---------|
| 1     | 1(12 min)          | 1(30 ℃)             | 1(12.5%)           | 81.25 | 10.88   |
| 2     | 1                  | 2(35 ℃)             | 2(15.0%)           | 87.92 | 12.25   |
| 3     | 1                  | 3(40 ℃)             | 3(17.5%)           | 84.58 | 13.58   |
| 4     | 2(15 min)          | 1                   | 2                  | 90.83 | 13.47   |
| 5     | 2                  | 2                   | 3                  | 95.42 | 14.11   |
| 6     | 2                  | 3                   | 1                  | 94.17 | 11.75   |
| 7     | 3(18 min)          | 1                   | 3                  | 92.08 | 15.23   |
| 8     | 3                  | 2                   | 1                  | 95.83 | 12.22   |
| 9     | 3                  | 3                   | 2                  | 95.00 | 14.88   |
| 脱苦率   |                    |                     |                    |       |         |
| $k_1$ | 84.58 <sup>b</sup> | 88.06 <sup>b</sup>  | 90.42              |       |         |
| $k_2$ | 93.47 <sup>a</sup> | 93.06 <sup>a</sup>  | 91.25              |       |         |
| $k_3$ | 94.31 <sup>a</sup> | 91.25 <sup>ab</sup> | 90.69              |       |         |
| R     | 9.72               | 5.00                | 0.83               |       |         |
| 多肽损失率 |                    |                     |                    |       |         |
| $k_1$ | 12.24 <sup>c</sup> | 13.19               | 11.62 <sup>c</sup> |       |         |
| $k_2$ | 13.11 <sup>b</sup> | 12.86               | 13.53 <sup>b</sup> |       |         |
| $k_3$ | 14.11 <sup>a</sup> | 13.40               | 14.30 <sup>a</sup> |       |         |
| R     | 1.87               | 0.54                | 2.69               |       |         |

表 4 AB-8 大孔吸附树脂脱苦正交实验方差分析

| 项目    | 自由度 | 方差和    | 均方差   | F      | p                     |
|-------|-----|--------|-------|--------|-----------------------|
| 脱苦率   |     |        |       |        |                       |
| 模型    | 6   | 213.80 | 35.63 | 42.70  | $2.31 \times 10^{-2}$ |
| A     | 2   | 174.20 | 87.10 | 104.38 | $8.50 \times 10^{-3}$ |
| B     | 2   | 38.52  | 19.26 | 23.08  | $4.15 \times 10^{-2}$ |
| C     | 2   | 1.08   | 0.54  | 0.65   | 0.61                  |
| 误差    | 2   | 1.67   |       |        |                       |
| 多肽损失率 |     |        |       |        |                       |
| 模型    | 6   | 17.23  | 2.87  | 67.03  | $1.48 \times 10^{-2}$ |
| A     | 2   | 5.27   | 2.64  | 61.53  | $1.60 \times 10^{-2}$ |
| B     | 2   | 0.45   | 0.22  | 5.26   | 0.16                  |
| C     | 2   | 11.51  | 5.75  | 134.30 | $7.40 \times 10^{-3}$ |
| 误差    | 2   | 0.08   |       |        |                       |

注:脱苦率模型与多肽损失率模型的  $R^2$  分别为 99.22% 和 99.50%

由表 3 和表 4 可知,AB-8 大孔吸附树脂对芝麻 ACE 抑制肽脱苦的正交模型显著,可以客观真实反映吸附时间、吸附温度、树脂添加量对脱苦率与多肽损失率的影响规律。3 个因素对脱苦率的影响强弱顺序为吸附时间>吸附温度>树脂添加量,吸附时间和吸附温度影响显著,而树脂添加量影响不显著,最佳因素水平组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>,吸附时间的极差分析结果表明 15 min 和 18 min 的脱苦率无显著差异,考虑缩短吸附时间与减少树脂用量,脱苦率的最佳因素水平组合是 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>1</sub>。3 个因素对多肽损失