

# 花生品种对水媒法提取分离蛋白质与脂质 及内源性蛋白酶活性的影响

范俊燕, 张彩猛, 孔祥珍, 李兴飞, 华欲飞, 陈业明

(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

**摘要:**为筛选适合水媒法加工的花生品种,降低花生蛋白的致敏性,收集了5个花生品种,首先比较了其脂质和蛋白质含量,然后采用水媒法提取分离蛋白质与脂质,考察了花生品种对脂质和蛋白质的提取率及脂质和蛋白质的分离效果的影响,最后比较了不同品种花生的内源性蛋白酶(内肽酶和外肽酶)活性。结果表明:脂质(46.95%~51.35%)和蛋白质(24.66%~29.68%)含量在花生品种间存在差异;花生品种对于蛋白质提取率(91.86%~97.77%)的影响显著,而对于脂质提取率(98%左右)的影响不大;不同品种花生浆中蛋白质和脂质的离心分离效果不同,蛋白质在蛋白液中的分布比例为85.32%~97.34%,脂质在乳状液中的分布比例为68.75%~81.24%,白沙308的分离效果最好;内源性蛋白酶活性(pH 3~5)在花生品种间存在差异,但是各品种的内肽酶均在pH 3时表现出最强活性,可有效水解花生致敏蛋白Ara h 1;各品种花生的外肽酶活性均随pH的增加而增加,在pH 5时,四粒红最高;对于内肽酶和外肽酶的协同活性,花育在pH 3时最强,而其他4个品种在pH 5时最强。综上,白沙308可作为花生水媒法加工的参考品种,而四粒红的内源性蛋白酶活性最强。

**关键词:**花生品种;蛋白质;脂质;提取分离;内源性蛋白酶;游离氨基酸

**中图分类号:**TS201.2;O629.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2023)01-0020-07

## Effects of peanut variety on extraction and separation of protein and lipid by aqueous extraction processing and activity of endogenous protease

FAN Junyan, ZHANG Caimeng, KONG Xiangzhen, LI Xingfei,  
HUA Yufei, CHEN Yeming

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** In order to screen peanut varieties suitable for aqueous extraction processing and reduce the allergenicity of peanut protein, five peanut varieties were collected for study. Firstly, their lipid and protein contents were compared, and the protein and lipid was extracted and separated by aqueous extraction processing. Then, the effects of peanut variety on extraction rates of lipid and protein, and separation efficiency of lipid and protein were investigated. Finally, the activities of endogenous proteases (endopeptidases and exopeptidases) of different peanut varieties were compared. The results showed that the lipid (46.95% - 51.35%) and protein (24.66% - 29.68%) contents were different among peanut

varieties. The protein extraction rate (91.86% - 97.77%) was obviously affected by varieties, while the lipid extraction rate (about 98%) was not. The effects of centrifugal separation of protein and lipid in different varieties of peanut milk were different. The distribution proportion of protein in protein liquid was 85.32% - 97.34%, whereas the distribution proportion of lipid in emulsion was

收稿日期:2021-08-26;修回日期:2022-07-16

基金项目:江苏省林业科技创新与推广项目(LYKJ-句容[2020]01)

作者简介:范俊燕(1995),女,在读硕士,研究方向为油脂与植物蛋白(E-mail)fanjunyan0615@163.com。

通信作者:陈业明,副教授,博士(E-mail)chenyeming@jiangnan.edu.cn。

68.75%–81.24%。Baisha 308 was the best for the centrifugal separation of lipid and proteins. Endogenous protease activity in the range of pH 3–5 was different among peanut varieties, but the endopeptidases in all varieties showed the highest activity at pH 3, which could effectively hydrolyze the allergen protein Ara h 1. The activity of exopeptidases in all varieties enhanced with the increase of pH. At pH 5, Silihong exerted the highest exopeptidase activity. Huayu showed the highest synergistic activity of endopeptidases and exopeptidases at pH 3, while the other four varieties were the highest at pH 5. In conclusion, Baisha 308 can be used as a reference variety for peanut aqueous extraction processing, and the endogenous protease activity of Silihong is the strongest.

**Key words:** peanut variety; protein; lipid; extraction and separation; endogenous proteases; free amino acid

花生是我国主要的油料作物<sup>[1]</sup>,国家统计局数据显示,2020年我国花生种植面积达到473万hm<sup>2</sup>,产量达到1799万t,由于品种差异,其脂质含量在42%~56%之间,显著高于大豆、油菜籽和棉籽等大宗油料,蛋白质含量则在22%~30%之间<sup>[2-4]</sup>。花生的水媒法加工工艺指采用机械作用破碎花生,利用水对脂质和蛋白质等物质进行提取,然后利用油水密度的差异,通过离心将脂质部分(主要以油体形式存在)与蛋白质部分分离,再经后续加工得到油体和蛋白质产品<sup>[5-8]</sup>。油体是天然的水包油型乳状物,有效保留了油料中的功能性小分子成分(如磷脂、植物甾醇和维生素E),可以在食品(如色拉酱、蛋黄酱、冰淇淋和奶油)、药物(如药物的载体)和化妆品(如替代矿物油)等领域进行应用<sup>[9-13]</sup>。

花生蛋白具有很强的致敏性,Ara h 1、Ara h 2和Ara h 3为主要致敏原<sup>[14]</sup>,降低致敏性对花生的安全食用至关重要<sup>[15]</sup>。目前,酶解是降低花生蛋白致敏性最有效的方法之一,一般使用商业蛋白酶<sup>[16-18]</sup>,这在一定程度上会增加生产成本。因此,探索更加经济、绿色的酶解工艺,有利于花生相关产业的发展。Wilson等<sup>[19]</sup>研究发现花生发芽2d后,一种内源性天冬氨酸蛋白酶可水解Ara h 1和Ara h 3。张宏声<sup>[20]</sup>研究发现水媒法获得的花生蛋白液中含有内源性蛋白酶(包括内肽酶和外肽酶),在一定条件下可有效水解Ara h 1,并且在内源性蛋白酶的作用下,大分子蛋白质也会被水解,产生易于人体吸收的小肽与游离氨基酸等。因此,利用内源性蛋白酶对植物蛋白进行加工是一种更加绿色、经济的方法,合理利用植物内源性蛋白酶,会带来较高的经济价值和社会效益。

花生品种对水媒法提取分离脂质和蛋白质及内源性蛋白酶活性的影响鲜见报道。因此,本文选择5个花生品种,主要考察了不同品种花生在水媒法

加工过程中蛋白质与脂质的提取和分离情况,及其内源性蛋白酶活性的差别,以期水媒法加工花生品种的选择提供参考,为内源性蛋白酶在花生蛋白加工改性方面的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

5个花生种质资源,具体信息见表1。氯仿、石油醚、浓盐酸、三羧基氨基甲烷(Tris)、二巯苏糖醇(DTT)、甲醇、甘油、十二烷基硫酸钠(SDS)、硫酸钾、硼酸、五水硫酸铜、浓硫酸、三氯乙酸(TCA)、5-磺基水杨酸,国药集团化学试剂有限公司。

MJ-60BE01B打浆机,美的电器有限公司;Himac CR21G II型冷冻离心机,日本日立公司;K9840半自动凯氏定氮仪,济南海能仪器股份有限公司;MODEL BE-210型垂直电泳仪,日本Bio-Craft公司;凝胶成像仪,美国Bio-Rad公司;Agilent 1100型全自动氨基酸分析仪,美国安捷伦公司。

表1 实验花生资源信息

品种	来源地
花育	山东省菏泽市
白沙308	辽宁省铁岭市
四粒红	辽宁省铁岭市
富硒黑花生	山东省青岛市
罗汉果	河南省南阳市

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 水媒法提取分离蛋白质与脂质

参考张宏声<sup>[20]</sup>的方法并作一定的修改。称取100g花生仁,加入900g去离子水,置于冰箱(4℃)浸泡18h。手工去红衣后,去离子水清洗3次。去红衣花生仁中加入去离子水至花生仁干质量的6倍,15000r/min下打浆2min,4层纱布过滤,得到滤液。继续向残留的滤渣中加入4倍花生仁干质量的去离子水,打浆2min后过滤,合并滤液,即得

花生浆。花生浆通过离心(4℃, 4 000 r/min, 15 min)分成上浮层(乳状液)、中间层清液(蛋白液)和下层沉淀。

### 1.2.2 不同 pH 下花生内源性蛋白酶水解花生蛋白

张宏声<sup>[20]</sup>发现花生内源性蛋白酶在 pH 3~5、50℃下具有较显著的水解活性。基于此,在该条件下系统考察花生品种对内源性蛋白酶活性的影响。由于花生蛋白主要分布在离心分离所得的蛋白液中,因此以蛋白液为研究对象。

将 1.2.1 得到的蛋白液分为 3 等份,用体积分数 85% 磷酸溶液将其 pH 分别调至 5、4、3,并于 50℃水浴水解 6 h,冷却至室温,作为后续 Tricine-SDS-PAGE 分析、TCA-NSI 测定、游离氨基酸测定的样品。

### 1.2.3 蛋白质含量、脂质含量与水分含量的测定

水分含量的测定参考 GB 5009.3—2016 中的直接干燥法;蛋白质含量的测定参考 GB 5009.5—2016 中的凯氏定氮法。

脂质含量的测定:参考 Phillips 等<sup>[21]</sup>的氯仿-甲醇法并作一定的修改。称取 5 g 左右的样品(花生仁样品需粉碎),加入 60 mL 氯仿-甲醇混合溶液(体积比 2:1),在蓝盖瓶中装好并用保鲜膜包裹密封,置于 60℃水浴锅中提取 2.5 h。提取完成后使用砂芯漏斗抽滤得到脂质提取液,置于 70℃水浴锅中加热,使有机试剂挥发,至浓稠状,冷却。加入 25 mL 石油醚(沸程 30~60℃)和 15 g 无水硫酸钠,振荡 10 min,将醚层转移至离心管中离心(3 000 r/min, 5 min)。取离心后的醚层放入烘干至恒重的铝盒内,50℃蒸发去除石油醚后置于 105℃烘箱烘至恒重,平行测定 3 次。脂质含量( $y$ )按下式计算。

$$y = (m_1 - m_0) / m \times 100\% \quad (1)$$

式中: $m_1$ 为烘干后铝盒与脂质总质量; $m_0$ 为铝盒质量; $m$ 为样品质量。

### 1.2.4 Tricine-SDS-PAGE 分析

将 1.2.2 所得样品的蛋白质质量浓度调节为 2 mg/mL,取 500  $\mu$ L 样品加入等体积电泳样品溶解液,再加入 1% 的溴酚蓝指示剂及 2% DTT 搅匀,沸水浴中处理 3~5 min,冷却至室温即可上样。

Tricine-SDS-PAGE 分析参考 Schagger<sup>[22]</sup>的方法。浓缩胶质量浓度为 4 g/100 mL,分离胶质量浓度为 16 g/100 mL,上样量为 10  $\mu$ L。样品在进入浓缩胶之前电压为 30 V,进入分离胶后电压调为 100 V。电泳指示剂距分离胶前沿 0.5 cm 时关闭电

泳仪,进行固定、染色、脱色。用凝胶成像仪拍照。

### 1.2.5 游离氨基酸含量的测定

样品处理:取 5 mL 待测样品,加入 5 mL 质量浓度为 10 g/100 mL 5-磺基水杨酸溶液,搅拌 10 min,4℃下静置 4 h 以上,离心(10 000 r/min, 10 min),取上清过 0.22  $\mu$ m 滤膜备用。

采用氨基酸分析仪测定游离氨基酸含量。测定条件:Agilent Hypersil ODS 柱(250 mm  $\times$  4.0 mm  $\times$  5  $\mu$ m),流动相 A 为乙酸钠-三乙胺-四氢呋喃缓冲液(pH 7.2),流动相 B 为乙酸钠-甲醇-乙腈缓冲液(pH 7.2),流速 1.0 mL/min,柱温 40℃,检测波长 338 nm(脯氨酸检测波长 262 nm),梯度洗脱,外标法定量。

### 1.2.6 三氯乙酸-可溶性氮含量(TCA-NSI)的测定

参考裴昊铭<sup>[23]</sup>的方法并作一定的修改。取 10 mL 待测样品,加入 10 mL 质量分数 30% TCA 溶液,使体系中 TCA 的最终质量分数为 15%,搅拌 10 min 后室温静置 1 h,离心(8 000 r/min, 15 min)取上清液,凯氏定氮法测定上清液中的蛋白质含量。以上清液中氮含量与样品的氮含量比值计算 TCA-NSI。

### 1.2.7 数据分析

实验数据测定 3 次,使用 Excel 2016 处理数据,求平均值,使用 Origin 8.5 拟合曲线和绘图。利用 SPSS 统计分析软件对数据进行显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 花生品种对蛋白质和脂质提取和分离的影响

#### 2.1.1 不同品种花生的基本成分(见表 2)

品种	蛋白质	脂质	水分
花育	28.18	48.68	7.46
白沙 308	27.44	51.35	8.37
四粒红	29.68	46.95	6.02
富硒黑花生	24.66	47.49	6.80
罗汉果	28.63	49.96	7.73

由表 2 可知,花生蛋白质含量在 24.66%~29.68% 之间,四粒红最高,富硒黑花生最低。脂质含量以白沙 308 最高(51.35%),其次是罗汉果和花育(分别为 49.96%、48.68%),脂质含量较低的是富硒黑花生和四粒红(分别为 47.49%、46.95%)。

#### 2.1.2 不同品种花生浆中蛋白质和脂质的提取率

不同品种花生浆中的蛋白质含量、脂质含量、蛋白质提取率和脂质提取率见表 3。

表3 不同品种花生浆中蛋白质、脂质含量及蛋白质、脂质提取率

品种	蛋白质含量	脂质含量	蛋白质提取率	脂质提取率
花育	2.50 ± 0.03 <sup>b</sup>	4.61 ± 0.02 <sup>c</sup>	91.86 ± 1.28 <sup>a</sup>	98.02 ± 0.53 <sup>ab</sup>
白沙308	2.53 ± 0.06 <sup>b</sup>	4.78 ± 0.02 <sup>c</sup>	96.18 ± 1.08 <sup>bc</sup>	98.10 ± 0.41 <sup>ab</sup>
四粒红	2.74 ± 0.03 <sup>d</sup>	4.47 ± 0.02 <sup>a</sup>	94.74 ± 0.99 <sup>b</sup>	97.77 ± 0.52 <sup>a</sup>
富硒黑花生	2.26 ± 0.00 <sup>a</sup>	4.53 ± 0.00 <sup>b</sup>	94.79 ± 0.02 <sup>b</sup>	98.74 ± 0.01 <sup>b</sup>
罗汉果	2.67 ± 0.03 <sup>c</sup>	4.68 ± 0.02 <sup>d</sup>	97.77 ± 0.42 <sup>c</sup>	98.24 ± 0.51 <sup>ab</sup>

注:同列中字母不同表示存在显著性差异( $p < 0.05$ )

不同品种花生打浆后,绝大多数的蛋白质与脂质都提取至浆液中。由表3可知,罗汉果的蛋白质提取率(97.77%)与白沙308的(96.18%)差异不显著,但显著高于其他品种花生的,花育的蛋白质提取率(91.86%)则显著低于其他品种花生的,四粒红和富硒黑花生的蛋白质提取率居中,分别为94.74%和94.79%,差异不显著( $p < 0.05$ )。不同品种花生的脂质提取率总体无显著差异,均为98%左右。综合来看,罗汉果、白沙308的蛋白质与脂质提取率均处于较高水平。水媒法加工技术是利用机

械作用破碎种子,利用水对蛋白质和脂质等物质进行提取,因此在花生的实际水媒法加工生产中,应选择如罗汉果、白沙308等具有高蛋白质与脂质提取率的品种。根据加工目的的不同选择高蛋白质提取率或高脂质提取率的品种对加工过程具有重要的意义。

### 2.1.3 不同品种花生浆中蛋白质和脂质的分离效果

花生浆离心后蛋白质和脂质在乳状液、蛋白液和沉淀中的分布比例如表4所示。

表4 花生浆离心后蛋白质和脂质在乳状液、蛋白液和沉淀中的分布比例

成分	项目	花育	白沙308	四粒红	富硒黑花生	罗汉果
蛋白液	质量分布	92.95 ± 0.02 <sup>c</sup>	91.52 ± 0.03 <sup>a</sup>	93.75 ± 0.02 <sup>c</sup>	93.10 ± 0.01 <sup>d</sup>	92.38 ± 0.02 <sup>b</sup>
	蛋白质含量	2.33 ± 0.00 <sup>a</sup>	2.63 ± 0.01 <sup>c</sup>	2.63 ± 0.01 <sup>c</sup>	2.36 ± 0.03 <sup>b</sup>	2.70 ± 0.01 <sup>d</sup>
	脂质含量	1.18 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.66 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.00 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.20 <sup>a</sup>
	蛋白质分布	85.32 ± 0.00 <sup>a</sup>	95.18 ± 0.36 <sup>d</sup>	90.08 ± 0.26 <sup>b</sup>	97.34 ± 1.03 <sup>e</sup>	92.41 ± 0.24 <sup>c</sup>
	脂质分布	29.42 ± 1.56 <sup>d</sup>	15.25 ± 0.24 <sup>a</sup>	16.85 ± 0.05 <sup>b</sup>	25.82 ± 0.49 <sup>c</sup>	14.85 ± 0.46 <sup>a</sup>
乳状液	质量分布	4.58 ± 0.02 <sup>b</sup>	5.00 ± 0.06 <sup>c</sup>	4.50 ± 0.04 <sup>a</sup>	4.62 ± 0.02 <sup>b</sup>	5.45 ± 0.01 <sup>d</sup>
	蛋白质含量	1.30 ± 0.03 <sup>c</sup>	1.06 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.03 <sup>ab</sup>	1.33 ± 0.06 <sup>d</sup>	1.19 ± 0.04 <sup>b</sup>
	脂质含量	55.90 ± 1.57 <sup>a</sup>	63.52 ± 0.30 <sup>d</sup>	64.38 ± 0.49 <sup>d</sup>	58.87 ± 0.15 <sup>b</sup>	60.66 ± 0.10 <sup>c</sup>
	蛋白质分布	2.38 ± 0.06 <sup>c</sup>	2.09 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.85 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.85 ± 0.11 <sup>d</sup>	2.40 ± 0.08 <sup>c</sup>
	脂质分布	68.75 ± 1.93 <sup>a</sup>	81.24 ± 0.38 <sup>d</sup>	78.52 ± 0.60 <sup>c</sup>	71.26 ± 0.18 <sup>b</sup>	80.82 ± 0.13 <sup>d</sup>
沉淀	质量分布	1.26 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.75 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.04 <sup>d</sup>	1.30 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.88 ± 0.02 <sup>b</sup>
	蛋白质含量	20.46 ± 0.02 <sup>c</sup>	8.92 ± 0.11 <sup>c</sup>	15.10 ± 0.46 <sup>d</sup>	1.85 ± 0.02 <sup>a</sup>	3.25 ± 0.04 <sup>b</sup>
	脂质含量	1.84 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.26 ± 0.14 <sup>a</sup>	2.48 ± 0.10 <sup>d</sup>	1.95 ± 0.12 <sup>bc</sup>	2.08 ± 0.06 <sup>c</sup>
	蛋白质分布	10.32 ± 0.01 <sup>d</sup>	2.64 ± 0.03 <sup>b</sup>	7.92 ± 0.24 <sup>c</sup>	1.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.05 ± 0.01 <sup>a</sup>
	脂质分布	0.62 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.21 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.04 <sup>d</sup>	0.66 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.45 ± 0.01 <sup>b</sup>

注:同行中字母不同表示存在显著性差异( $p < 0.05$ )

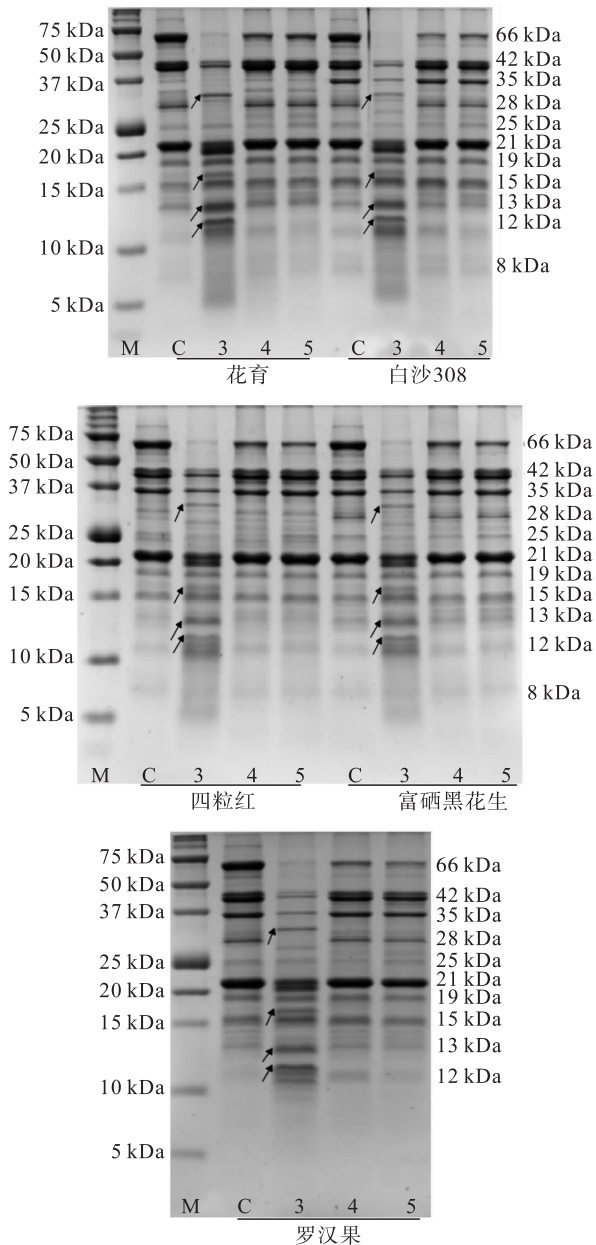
由表4可知,花生浆离心后得到乳状液、蛋白液和沉淀,分别占花生浆质量的4.50%~5.45%、91.52%~93.75%和0.75%~1.44%,不同品种花生浆离心后所得3部分的质量分布均有显著差异。离心分离后85.32%~97.34%的蛋白质进入到蛋白液,68.75%~81.24%的脂质进入乳状液,同时有1.05%~10.32%的蛋白质和0.21%~0.97%的脂质进入到沉淀。其中,富硒黑花生的浆液中有97.34%的蛋白质富集到蛋白液中,富集效果最好,其次是白沙308(95.18%)。白沙308的浆液中有81.24%的脂

质富集到乳状液中,富集效果最好。综合来看,白沙308的蛋白质与脂质分离效果最好。同理,在加工选择花生时,最好选择蛋白质和脂质离心分离效果好的品种,如白沙308。

## 2.2 花生品种对内源性蛋白酶活性的影响

### 2.2.1 pH对花生蛋白液中内源性内肽酶活性的影响

通过Tricine-SDS-PAGE胶上蛋白条带的强度降低程度对内源性内肽酶的活性进行表征,结果如图1所示。



注: M. 蛋白标准品; C. 未处理花生蛋白液; 3~5 分别为相应 pH 下 50℃ 水解 6 h 的花生蛋白溶液

图 1 不同 pH 条件下花生蛋白液中内源性内肽酶的活性

由图 1 可知,花生蛋白的主要条带为 Ara h 1 (66 kDa)、Arachin-A (42 kDa 与 35 kDa)、Arachin-B (21 kDa) 以及少量的 28 kDa。而个别花生品种会存在某种条带的缺失,如花育的 35 kDa 缺失,四粒红的 28 kDa 缺失。杜寅<sup>[24]</sup>发现双纪 2 号、粤油 14 号、闽花 9 号等 35 个花生品种的 35.5 kDa 缺失。Shokarii 等<sup>[25]</sup>也报道花生的一些品种缺少 36.5 kDa。由于研究时实验条件的差异,可认为它们(35.5 kDa 和 36.5 kDa)与本文的 35 kDa 为同一种蛋白,与本实验结果相印证。在 pH 3~5 范围内,不同品种花生蛋白的 Ara h 1 均发生明显的水解,尤其是在 pH 3 时。Wilson 等<sup>[19]</sup>发现花生中内源性天

冬氨酸内肽酶可有效水解 Ara h 1,并在 pH 2.6~3 时水解活性最强,与本研究相符。花生球蛋白的酸性肽链(42 kDa 和 35 kDa)和碱性肽链(21 kDa)同样也在 pH 3 时水解最多,而在 pH 4 与 pH 5 时水解不明显。在 pH 3 时,出现了新条带和强度增强的条带(箭头标注),是花生蛋白水解形成的多肽产物,分子质量分别为 30、17、13 kDa 和 12 kDa。张宏声<sup>[20]</sup>发现内肽酶在 pH 3 时水解活性最强,与本研究结果一致。上述结果表明不同品种花生的内肽酶活性均在 pH 3 时最强,并且可有效水解致敏蛋白 Ara h 1。

### 2.2.2 pH 对不同品种花生蛋白液中内源性外肽酶活性的影响

外肽酶包括羧肽酶和氨肽酶,它们的水解产物为游离氨基酸,因此可通过测定游离氨基酸的含量来表征外肽酶在 pH 3~5 范围内的水解活性。不同 pH 下花生蛋白液中游离氨基酸的含量见表 5。

表 5 不同 pH 下花生蛋白液中

品种	游离氨基酸的含量				mg/L
	未水解	pH 3	pH 4	pH 5	
花育	239.04	277.80	315.96	415.74	
白沙 308	227.85	269.39	315.90	414.35	
四粒红	304.27	349.63	413.17	569.10	
富硒黑花生	281.14	297.83	361.22	494.49	
罗汉果	214.26	291.48	316.15	427.01	

由表 5 可知,不同品种花生蛋白液未经水解时游离氨基酸含量存在明显差异。经过水解之后,所有品种蛋白液的游离氨基酸含量都随 pH 的增加而逐渐升高。其中,四粒红的游离氨基酸含量在未水解及 pH 3~5 条件下均处于最高,并且 pH 4~5 时相较于未水解时增加量最大,说明四粒红的外肽酶的活性最高。张宏声<sup>[20]</sup>报道花生蛋白液中的总游离氨基酸含量随水解 pH 的增加而增加,与本研究结果相符。

对游离氨基酸在花生蛋白液总蛋白中的占比进行计算,结果如表 6 所示。

表 6 不同 pH 下游离氨基酸在花生蛋白液

品种	总蛋白中的占比				%
	未水解	pH 3	pH 4	pH 5	
花育	0.96	1.12	1.27	1.68	
白沙 308	0.90	1.06	1.25	1.64	
四粒红	1.39	1.60	1.89	2.60	
富硒黑花生	1.27	1.35	1.63	2.24	
罗汉果	0.81	1.11	1.20	1.62	

由表 6 可知,5 种花生蛋白液未经水解时游离

氨基酸仅为总蛋白的0.81%~1.39%,经过内源性外肽酶的水解,游离氨基酸在花生蛋白液总蛋白中的占比有一定程度的上升,在pH 5时为1.62%~2.60%。

### 2.2.3 pH对不同品种花生蛋白液中内肽酶和外肽酶协同活性的影响

利用TCA-NSI的增加对内肽酶和外肽酶的协同活性进行表征,结果见表7。

表7 不同pH下花生蛋白液的TCA-NSI

品种	未水解	pH 3	pH 4	pH 5
花育	3.86 ± 0.01 <sup>b</sup>	9.33 ± 0.55 <sup>c</sup>	8.32 ± 0.23 <sup>c</sup>	8.66 ± 0.11 <sup>b</sup>
白沙308	3.07 ± 0.11 <sup>a</sup>	8.26 ± 0.18 <sup>b</sup>	7.63 ± 0.39 <sup>b</sup>	8.39 ± 0.26 <sup>b</sup>
四粒红	4.19 ± 0.15 <sup>c</sup>	9.89 ± 0.10 <sup>d</sup>	9.53 ± 0.04 <sup>d</sup>	11.20 ± 0.01 <sup>d</sup>
富硒黑花生	4.45 ± 0.00 <sup>c</sup>	9.39 ± 0.13 <sup>c</sup>	8.55 ± 0.20 <sup>c</sup>	10.19 ± 0.11 <sup>c</sup>
罗汉果	3.08 ± 0.05 <sup>a</sup>	7.01 ± 0.11 <sup>a</sup>	6.94 ± 0.07 <sup>a</sup>	7.36 ± 0.17 <sup>a</sup>

注:同列中字母不同表示存在显著性差异( $p < 0.05$ )

由表7可知,5个品种花生蛋白液未经内源性蛋白酶水解时,TCA-NSI为3.07%~4.45%。经过内源性蛋白酶在不同pH下水解后,TCA-NSI有不同程度的增加。对于不同品种来说,四粒红的TCA-NSI在pH 3~5时均处于最高,而罗汉果的TCA-NSI在pH 3~5时均处于最低,说明四粒红的内肽酶和外肽酶协同活性最强。对于单个花生品种来说,花育在pH 3时TCA-NSI最高,而其他4个品种均在pH 5时TCA-NSI最高,说明花育的内肽酶和外肽酶协同活性在pH 3时最强,而其他4个品种的则在pH 5时最强。

结合表6计算可知,未经水解的花生蛋白液其TCA-NSI有24.87%~33.17%由游离氨基酸所贡献。经过水解的花生蛋白液虽然游离氨基酸含量增加,但贡献率有所下降,这是由于水解生成的小肽占比较大;并且在pH 3~5范围内,贡献率随pH的升高而增加,最高可达23.21%(pH 5,四粒红),进一步支持了2.2.2中四粒红的外肽酶活性最高这一结论。

### 3 结论

5个品种花生的蛋白质(24.66%~29.68%)和脂质(46.95%~51.35%)含量存在差异。经水媒法加工后花生浆液的蛋白质提取率存在显著差异,罗汉果(97.77%)和白沙308(96.18%)最佳,其次是富硒黑花生(94.79%)和四粒红(94.74%),花育(91.86%)最低;而花生品种对于脂质提取率影响很小,集中在98%左右。不同品种花生浆经过离心后,蛋白质和脂质的离心分离效果不同,蛋白质在蛋白液中的分布比例为85.32%~97.34%,脂质在乳状液中的分布比例为68.75%~81.24%,白沙308的分离效果最好。对于内源性蛋白酶在pH 3~5范围内的活性:花生品种间的内源性蛋白酶活性存在差异;各品种的内肽酶活性都在pH 3时最强,可有

效水解致敏蛋白Ara h 1;各品种的外肽酶活性都随pH的增加而增加,在pH 5时,四粒红最高;对于内肽酶和外肽酶的协同活性,花育在pH 3时最强,而其他4个品种在pH 5时最强。综上,白沙308可作为花生水媒法加工的参考品种,而四粒红的内源性蛋白酶活性最强。

### 参考文献:

- [1] ZHAO X Y, CHEN J, DU F L. Potential use of peanut by-products in food processing: a review[J]. J Food Sci Tech, 2012, 49(5): 521-529.
- [2] 张驰. 多酚与花生蛋白相互作用及其对花生蛋白致敏性的影响[D]. 重庆:西南大学,2021.
- [3] 童芳. 花生酸奶的制备、营养成分及品质研究[D]. 重庆:西南大学,2020.
- [4] 尤梦圆, 苏宇辰, 王凤香, 等. 滤袋法测定油料及粕含油量的研究[J]. 中国油脂, 2016, 41(10): 106-108.
- [5] ZHANG S B, LU Q Y. Characterizing the structural and surface properties of proteins isolated before and after enzymatic demulsification of the aqueous extract emulsion of peanut seeds[J]. Food Hydrocolloid, 2015, 47: 51-60.
- [6] SUBRAHMANYAN V, BHATIA D S, KALBAG S S, et al. Integrated processing of peanut for the separation of major constituents[J]. J Am Oil Chem Soc, 1959, 36(2): 66-70.
- [7] JIANG L H, HUA D, ZANGEL Z, et al. Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates[J]. Food Bioprod Process, 2010, 88(2/3): 233-238.
- [8] 刘静, 胡经纬, 周裔彬. 植物油体的提取及其乳化体系研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 422-429.
- [9] 陈雅静, 赵路苹, 华欲飞, 等. 植物种子油体的提取及其性质的初步研究[J]. 中国粮油学报, 2017, 32(5): 62-67.
- [10] 姚正颖, 张卫明, 孙力军. 植物油体在生物技术中的应用研究进展[J]. 生物技术进展, 2014(5): 318-324.
- [11] DECKERS H M, ROOIJEN G V, BOOTHE J, et al. Oil body based personal care products: US6183762[P]. 2001-02-06.

(下转第36页)

质,其中含量最多的是甘油三酯(15.76  $\mu\text{mol/g}$ ),种类高达39种,鞘磷脂次之,含量为96.58  $\text{nmol/g}$ 。羊骨油中共检出20种脂肪酸,鉴定出11种,其中:MUFA含量达到72.34%,以油酸(64.60%)为主;SFA含量为11.51%,以硬脂酸(6.75%)为主;仅检测到亚油酸一种PUFA,含量为7.56%。

#### 参考文献:

- [1] 熊学振,杨春. 2020年牛羊产业发展状况、未来趋势及对策建议[J]. 产业透视,2021,57(4):232-236,240.
- [2] 杨巍,成晓瑜,陈文华,等. 畜禽骨深加工技术与应用现状[J]. 肉类研究,2009(11):75-79.
- [3] 李桂星. 羊骨素及其衍生化产品提取制备工艺研究[D]. 北京:北京林业大学,2012.
- [4] 帕尔哈提·柔孜,杨晓君,木合布力·阿布力孜,等. 4种动物骨骼的化学成分与生物活性研究进展[J]. 现代食品科技,2020,36(5):337-346.
- [5] 范丽森,孙亚军,赵伟. 畜禽骨加工及其余料利用工艺的研究进展[J]. 工艺技术,2019(20):110-112.
- [6] 徐锡春. 畜骨在食品开发中的发展前景[J]. 肉类研究,1999(2):50-51.
- [7] 李婉君. 畜禽骨副产物高值化加工关键技术与装备:中国农业科学院农产品加工所张春晖研究员专访[J]. 肉类研究,2018,32(4):12-18.
- [8] 刘金凯,高远,王振宇,等. 氧化羊骨油脂脂肪酸组成及挥发性风味物质分析[J]. 现代食品科技,2014,30(11):240-245,169.
- [9] FOLCH J. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues[J]. J Bid Chem,1957,226(1):497-509.
- [10] BLIGH E G, DYER W J. A rapid method of total lipid extraction and purification[J]. Can J Biochem Physiol, 1959, 37(8):917-938.
- [11] YANG K, CHENG H, GROSS R W, et al. Automated lipid identification and quantification by multidimensional mass spectrometry - based shotgun lipidomics[J]. Anal Chem, 2009, 81(11):4356-4368.
- [12] DEVI B P, GANGADHAR K N, PRASAD R, et al. Nutritionally enriched 1,3 - diacylglycerol - rich oil: low calorie fat with hypolipidemic effects in rats[J]. Food Chem, 2018, 248: 210-216.
- [13] 吕冰洁,杨阳,张建初. 鞘磷脂代谢物与肺癌关系的研究进展[J]. 华中科技大学学报(医学版),2014,43(5):603-605.
- [14] 罗鑫,孙万成,罗毅皓. 食品中鞘磷脂的检测及功能研究进展[J]. 食品研究与开发,2020,41(15):211-218.
- [15] 黄瑾,王鑫,吴海虹,等. 卵磷脂的提取、鉴定与应用的研究进展[J]. 食品工业科技,2020,41(24):338-343,353.
- [16] 吴洪号,张慧,贾佳,等. 功能性多不饱和脂肪酸的生理功能及应用研究进展[J]. 中国食品添加剂,2021,32(8):134-140.
- [17] 王子豪,孟鑫. 沙棘果油中油酸的富集及对高脂小鼠的代谢影响[J]. 食品科技,2021,46(9):161-168.
- [18] 刘丽娜,缪锦来,郑洲. 共轭亚油酸的生理功能综述[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(8):2552-2557.
- [19] WILSON K A, TAN - WILSON A. Proteolysis of the peanut allergen Ara h 1 by an endogenous aspartic protease[J]. Plant Physiol Bioch,2015,96:301-310.
- [20] 张宏声. 花生内源性蛋白酶系的鉴定、水解条件及其在蛋白加工方面的应用[D]. 江苏 无锡:江南大学,2020.
- [21] PHILLIPS K M, TARRAGO - TRANI M T, GROVE T M, et al. Simplified gravimetric determination of total fat in food composites after chloroform - methanol extraction[J]. J Am Oil Chem Soc,1997,74(2):137-142.
- [22] SCHAGGER H. Tricine - SDS - PAGE[J]. Nat Protoc, 2006,1:16-22.
- [23] 裴昊铭. 核桃内源性蛋白酶的组成、水解蛋白条件及其在核桃加工中的运用[D]. 江苏 无锡:江南大学,2021.
- [24] 杜寅. 花生蛋白主要组分的制备及凝胶特性研究[D]. 北京:中国农业科学院,2012.
- [25] SHOKARII E H, ESEN A, MOZINGO R W. Immunological characterization of a 36 kD polypeptide in peanuts (*Arachis hypogaea* L.)[J]. Peanut Sci,1991,18(1):11-15.

(上接第25页)

- [12] CHIANG C J, CHEN H C, KUO H F, et al. A simple and effective method to prepare immobilized enzymes using artificial oil bodies[J]. Enzyme Microb Tech, 2006, 39(5):1152-1158.
- [13] 武艺. 油茶种子油体及油体蛋白加工稳定性的研究[D]. 武汉:武汉轻工大学,2020.
- [14] 蒋圣娟,周正义,孙玉军,等. 花生致敏蛋白 Ara h 1、2、3的研究进展[J]. 生物医学工程学杂志,2010(6):211-215.
- [15] 王烁,孙晓东,钮冰,等. 不同加工方式对花生致敏性的影响[J]. 食品科技,2020,45(4):49-55.
- [16] 张英. 热加工鲜花生的蛋白致敏性变化评估研究[D]. 南昌:南昌大学,2019.
- [17] 周红菲,吴志华,张英,等. 质谱法分析烘焙对花生过敏原 Ara h 1 潜在致敏性的影响[J]. 食品科学,2021,42(3):1-6.
- [18] YU J, MIKISHVILI N. Effectiveness of different proteases in reducing allergen content and IgE - binding of raw peanuts [J/OL]. Food Chem, 2019, 307:125565 [2021-08-26].

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125565>.