



采用模糊综合评价法比较 黑豆多肽的脱苦工艺

王常青¹,任海伟²,王海凤¹,刘佳璐¹,吕鹏¹

(¹山西大学生命科学与技术学院,山西太原 030006;

²兰州理工大学生命科学与工程学院,甘肃兰州 730050)

摘要:采用模糊数学综合评判法,分析比较了 β -环糊精包埋脱苦和枯草杆菌氨肽酶水解脱苦等对黑豆多肽苦味值的影响,确定最佳脱苦工艺条件。结果表明,枯草杆菌氨肽酶的脱苦效果优于 β -环糊精,枯草杆菌氨肽酶脱苦的最佳工艺条件为:加酶量 1500LAPU、pH8.5、温度 50℃、时间 4h。

关键词:黑豆多肽,脱苦,模糊综合评价,枯草杆菌氨肽酶

Comparative study on debittering technology of black soybean peptides by fuzzy comprehensive evaluation

WANG Chang-qing¹, REN Hai-wei², WANG Han-feng¹, LIU Jia-lu¹, LV Peng¹

(¹Institute of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

²College of Life Science and Engineering Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Fuzzy mathematics comprehensive evaluation method was applied to compare the debittering effects on black soybean peptides by using an ino-peptidase and β -cycloextrin. The results indicated that the debittering effects of an ino-peptidase were better than that of β -cycloextrin without the function and nitrogen base. The optimum conditions of debittering were: hydrolyzing temperature 50℃, enzyme dosage 1500LAPU, pH 8.5, total hydrolysis time 4h.

Key words: black soybean peptides; debittering; fuzzy comprehensive evaluation; ino-peptidase

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)01-0294-04

黑豆 (black soybean) 是黑色种皮的大豆, 别名乌豆, 是豆科 (Leguminosae) 大豆属植物大豆 [*Glycine max* (L.) Merr.] 的种子, 其营养和药用价值极高。近年来, 关于植物蛋白源活性肽的研究日趋深入, 本课题组对山西腰型小黑豆蛋白和多肽的特性及其功能进行了一系列研究^[1-2], 发现小分子黑豆多肽具有明显的清除自由基能力, 对 D-半乳糖诱导小鼠具有抗衰老、抗氧化作用。由于小黑豆蛋白经酶解后导致原来处于分子内部的疏水性氨基酸暴露 (如 Lys, Val, Leu, Pro, Phe, Tyr, Ile, Trp), 致使小黑豆多肽呈现出一定的苦味, 这种不良风味使其无法满足口感和嗜好性的要求, 限制了其在功能食品和化妆品领

域的应用, 因此多肽的脱苦技术和苦味评价方法至关重要^[3]。鉴此, 本文利用模糊数学综合评判法分析比较了枯草芽孢杆菌氨肽酶酶法脱苦与 β -环糊精掩盖法的脱苦效果, 以期选择小黑豆多肽脱苦的最佳工艺。目前还没有关于将模糊综合评判法应用于多肽风味评价分析的报道。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小黑豆分离蛋白 蛋白含量 96.58%, 实验室自制^[2]; 碱性蛋白酶 广西庞博生物工程有限公司; 霉菌中性蛋白酶 山西大学生物工程系; 枯草芽孢杆菌氨肽酶 上海伯奥生物科技有限公司; β -环糊精 西安宏昌药业有限责任公司。

生物反应罐 江苏东方生物工程设备有限公司; TDL-5 高速离心机 上海安亭科学仪器厂; Orion 818 pH 计 美国奥立龙公司。

收稿日期: 2009-02-20

作者简介: 王常青 (1956-), 男, 教授, 主要从事食品科学研究。

基金项目: 太原市大学生创业创新计划项目 (07010737)。

发展动态 [J] 贵州农业科学, 2007, 35(2): 143-146.

[4] 徐志红, 李磊, 武法文, 等. 环糊精对黄酮的包合作用及其在银杏黄酮提取中的应用 [J] 精细化工, 2005, 22(10):

762-765.

[5] 马小明. 食品工业中的微胶囊技术 [M] 北京: 学苑出版社, 2001: 29-33.

1.2 实验方法

1.2.1 小黑豆多肽的制备 将浓度为 8% (w/v) 的黑豆分离蛋白溶液充分混匀, 95℃ 预热 15min 后快速冷却。先加碱性蛋白酶, 在 50℃, pH9.0 条件下酶解 4h 然后再加霉菌中性蛋白酶, 在 50℃, pH7.0 条件下继续水解 4h 加酶量均为 4000u/g。酶解过程中用 1mol/L 的 HCl 维持 pH 恒定。酶解结束后沸水浴 10min 以钝化酶, 冷却后调 pH 至 4.3, 4000r/min 离心 15min 即得小黑豆多肽溶液, 备用。

1.2.2 氨肽酶活力测定

1.2.2.1 酶活力定义 在 40℃、pH8.0 条件下, 每分钟水解 1μg LAN 所需的酶量定义为一个酶活力单位 (LAPU)。

1.2.2.2 测定方法 以 LAN (L-leucine-4-nitroanilide) 为底物测定。取氨肽酶样品 1g 加 10mL 1% 的食盐水, 研碎过滤稀释数倍, 取 0.4mL 加入 6mL pH8.0 Tris-HCl 缓冲液中, 40℃ 水浴 5min 加 0.4mL 26mmol/L 的 LAN 乙醇溶液 (对照加蒸馏水), 准确反应 10min 立即放入冰浴中, 5min 后于 405nm 比色^[4]。

1.2.3 β-环糊精包埋脱苦 黑豆多肽溶液分别加入 0.25%、0.5%、0.75%、1.0%、1.25%、1.5% 的 β-环糊精, 40℃ 包埋脱苦 30min。以苦味值为指标, 采用模糊综合评价法评价多肽风味。

1.2.4 枯草芽孢杆菌氨肽酶水解脱苦 以氨基态氮含量和苦味值 (滋味) 为指标, 考察氨肽酶添加量 (500、1000、1500、2000 LAPU)、温度 (40、45、50、55℃)、pH (7.5、8.0、8.5、9.0) 和时间 (1、2、3、4、5、6h) 对黑豆多肽脱苦效果的影响。氨基氮的测定采用甲醛电位滴定法^[5]。

1.3 黑豆多肽苦味的模糊综合评价法

评价小组由 10 名经过专业培训的人员组成。

1.3.1 评定论域的确定 评定论域的确定即被评黑豆多肽的指标集合。记为 U, $U = \{u_1, u_2\} = \{\text{滋味}, \text{气味}\}$ 。黑豆多肽的气味根据特有芳香程度及有无异味进行评分; 滋味 (苦味值) 以硫酸奎宁溶液做参照, 苦味评分等级见表 1。

表 1 硫酸奎宁溶液浓度-苦味分值

浓度 (mg/L)	8	12	16	20	24
苦味值 (分值)	1	2	3	4	5
苦味描述	优	良	中等	较差	差

1.3.2 评语论域的确定 评语论域的确定即黑豆多肽所属级别的集合记为 C, $C = \{c_1, c_2, c_3, c_4, c_5\} = \{\text{优、良、中等、较差、差}\}$ 。

1.3.3 指标权重的集合 被评黑豆多肽指标权重的集合记为 X, $X = \{x_1, x_2\} = \{0.75, 0.25\}$, 即黑豆多肽滋味和气味占总体感官质量的比重分别为 0.75 和 0.25。

从 U 到 C 的一个模糊映射 R, 则有最终感官指标的结果 Y 是模糊向量 X (权集) 和模糊关系矩阵 R 的合成, 即 $Y = X \cdot R$ 。

2 结果与分析

2.1 β-环糊精脱苦的研究

β-环糊精脱苦后, 经专业人员对滋气味进行感官评定确定分值 (表略), 并将分值除以评定人员总数 (10 人), 得到 6 组模糊矩阵 $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$, 分别对应 0.25%、0.5%、0.75%、1.0%、1.25% 和 1.5% 的 β-环糊精添加量, 采用模糊综合评判法进行分析, 选出感官评定最好的 β-环糊精添加量。矩阵如下:

$$R_1 = (r_{ij})_{2 \times 5} = \begin{vmatrix} 0 & 0 & 0.3 & 0.3 & 0.4 \\ 0.3 & 0.5 & 0.2 & 0 & 0 \end{vmatrix};$$

$$R_2 = (r_{ij})_{2 \times 5} = \begin{vmatrix} 0 & 0.2 & 0.2 & 0.3 & 0.3 \\ 0.3 & 0.4 & 0.2 & 0.1 & 0 \end{vmatrix};$$

$$R_3 = (r_{ij})_{2 \times 5} = \begin{vmatrix} 0 & 0.3 & 0.3 & 0.2 & 0.2 \\ 0.2 & 0.3 & 0.2 & 0.2 & 0.1 \end{vmatrix};$$

$$R_4 = (r_{ij})_{2 \times 5} = \begin{vmatrix} 0.1 & 0.3 & 0.3 & 0.2 & 0.1 \\ 0.1 & 0.3 & 0.3 & 0.2 & 0.1 \end{vmatrix};$$

$$R_5 = (r_{ij})_{2 \times 5} = \begin{vmatrix} 0.2 & 0.3 & 0.4 & 0.1 & 0 \\ 0.1 & 0.2 & 0.4 & 0.2 & 0.1 \end{vmatrix};$$

$$R_6 = (r_{ij})_{2 \times 5} = \begin{vmatrix} 0.3 & 0.2 & 0.5 & 0 & 0 \\ 0 & 0.2 & 0.4 & 0.2 & 0.2 \end{vmatrix}$$

其中: r_{ij} 为多肽样品中第 i 个因素对第 j 类评价的隶属度。

根据模糊综合评判数学原理, 可得黑豆多肽感官质量综合评判的结果向量如下:

$$Y = X \cdot R = (x_1, x_2) \times \begin{vmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} & r_{14} & r_{15} \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} & r_{24} & r_{25} \end{vmatrix} =$$

$(y_1, y_2, y_3, y_4, y_5)$, 式中 $Y_i = \sum_{j=1}^m X_j r_{ij}$ 。

添加量为 0.25% 的 β-环糊精脱苦后为多肽样品 1 号, 感官质量综合评判结果向量如下:

$$Y_1 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.8, 0.2) \times \begin{vmatrix} 0 & 0 & 0.3 & 0.3 & 0.4 \\ 0.3 & 0.5 & 0.2 & 0 & 0 \end{vmatrix};$$

其中 $y_1 = (0.8 \wedge 0) \vee (0.2 \wedge 0.3) = 0 \vee 0.2 = 0.2$; 同理得 y_2, y_3, y_4, y_5 分别为 0.2, 0.2, 0.3, 0.4, 即 $Y_1 = (0.2, 0.2, 0.2, 0.3, 0.4)$ 。

同理, 其余 5 个多肽样品的感官评判向量分别为:

$$Y_2 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.2, 0.2, 0.2, 0.3, 0.3);$$

$$Y_3 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.2, 0.3, 0.3, 0.2, 0.2);$$

$$Y_4 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.1, 0.3, 0.3, 0.2, 0.1);$$

$$Y_5 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.2, 0.3, 0.4, 0.2, 0.1);$$

$$Y_6 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.3, 0.2, 0.5, 0.2, 0.2)。$$

归一化后得:

$Y_1 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.15, 0.15, 0.15, 0.25, 0.3)$, 峰值 0.3; $Y_2 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.17, 0.17, 0.17, 0.25, 0.25)$, 峰值 0.25; $Y_3 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.17, 0.25, 0.25, 0.17, 0.17)$, 峰值 0.25; $Y_4 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.1, 0.3, 0.3, 0.2, 0.1)$, 峰值 0.3; $Y_5 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.17, 0.25, 0.35, 0.17, 0.08)$, 峰值 0.35; $Y_6 = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.21, 0.14, 0.36, 0.14, 0.14)$, 峰值 0.36。

β-环糊精处理后 6 个样品的感官质量评定峰值 $Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5, Y_6$ 分别为 0.3、0.25、0.25、0.3、0.35 和 0.36, 故其排名顺序为样品 6 > 样品 5 > 样品 4 =

样品 1 > 样品 2 = 样品 3。由模糊关系曲线 (图 1) 分析可得, 样品 1 和样品 4 尽管峰值一样, 但样品 4 的评定峰值向着良—中等范围重心偏移, 故样品 4 优于样品 1。同理样品 3 优于样品 2。因此, 由峰值和模糊关系曲线综合判断各样品的优劣次序为: 样品 6 > 样品 5 > 样品 4 > 样品 1 > 样品 3 > 样品 2, 对应 β -环糊精加入量为 1.5% 为宜, 在此条件下脱苦后的黑豆多肽风味评价最好。

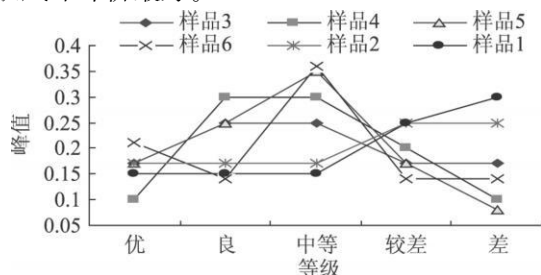


图 1 参评样品的模糊关系曲线

2.2 枯草杆菌氨肽酶脱苦的研究

2.2.1 氨肽酶添加量对氨基酸态氮含量的影响 由图 2 可知, 水解液中游离氨基酸的含量随加酶量的增加和时间的延长呈明显上升趋势, 4h 后氨基酸态氮含量增加缓慢; 故推断氨肽酶主要作用于已被水解的肽段, 苦味多肽被氨肽酶水解成分子量很小的短肽或氨基酸, 使得游离氨基酸含量增加。

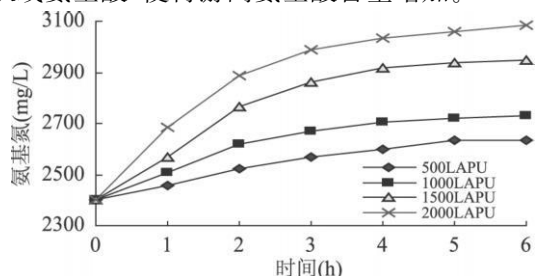


图 2 氨肽酶水解后氨基酸含量的变化

2.2.2 氨肽酶添加量对苦味值的影响 由图 3 可知, 随着时间的延长, 水解液的苦味值变小; 并且加酶量越大苦味值降低越快, 因为加酶量的增加使得水解度增大, 越来越多的疏水性氨基酸处于肽链末端或被水解成游离氨基酸, 导致苦味值降低。加酶量为 1500LAPU 和 2000LAPU 时的苦味值相近, 考虑到工业实际生产的成本, 确定加酶量为 1500LAPU, 反应时间 4h。

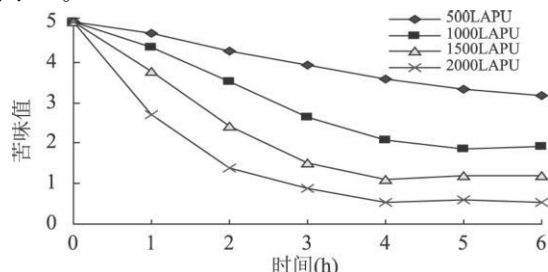


图 3 酶添加量对氨肽酶脱苦的影响

2.2.3 pH 对苦味值的影响 由图 4 可知, pH 对氨肽酶的脱苦效果影响不大, pH 8.5 时水解液的苦味值在 4h 内便可以降到 1.15, 说明 pH 8.5 时氨肽酶活力最强, 这与文献报道 [6] 的枯草芽孢杆菌氨肽酶 (最适

pH 8.4) 基本一致, 说明该酶可能是一种碱性氨肽酶。故选择 pH 8.5 为氨肽酶的最适条件。

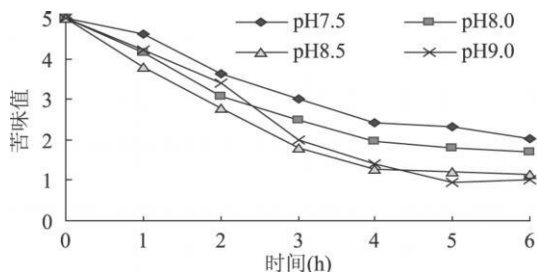


图 4 pH 对氨肽酶脱苦的影响

2.2.4 温度对苦味值的影响 在 pH 8.5 条件下, 加入 1500LAPU 氨肽酶, 分别在 40、45、50、55℃ 下进行酶解反应, 分析苦味值变化, 结果见图 5。由图可知, 随着温度的升高, 多肽苦味值降低的速度加快, 但 50℃ 时多肽的苦味值最低, 这可能是因为氨肽酶对热敏感, 温度太高会影响酶活性的稳定, 故确定温度为 50℃。

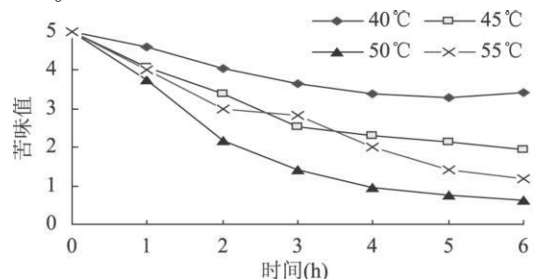


图 5 温度对氨肽酶脱苦的影响

2.2.5 氨肽酶脱苦后的黑豆多肽感官评价 黑豆多肽在上述实验确定的最适条件 (加酶量 1500LAPU、pH 8.5、50℃、4h) 下脱苦后, 经 10 名评定人员对滋味进行感官评定确定分值, 并将分值除以评定人员总数 (10 人), 得到模糊矩阵如下:

$$R = (r_{ij})_{2 \times 5} = \begin{bmatrix} 0.4 & 0.3 & 0.2 & 0.1 & 0 \\ 0.4 & 0.4 & 0.3 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

采用模糊综合评判原理, 可得氨肽酶脱苦后的感官质量综合评判结果向量如下:

$$Y = X \cdot R = (x_1, x_2) \times \begin{bmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} & r_{14} & r_{15} \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} & r_{24} & r_{25} \end{bmatrix} \\ = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5);$$

$$Y = (y_1, y_2, y_3, y_4, y_5) = (0.8, 0.2) \\ \times \begin{bmatrix} 0.4 & 0.3 & 0.2 & 0.1 & 0 \\ 0.4 & 0.4 & 0.3 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

其中 $y_1 = (0.8 \wedge 0.4) \vee (0.2 \wedge 0.4) = 0.4 \vee 0.2 = 0.4$; 同理得 y_2, y_3, y_4, y_5 分别为 0.3, 0.2, 0.1, 0, 即 $Y_1 = (0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0)$ 。归一化后得: $Y_1 = (0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0)$, 峰值 0.4 (> 0.36)。

枯草杆菌氨肽酶脱苦后, 经模糊综合评判发现其峰值为 0.4 大于 β -环糊精脱苦的峰值 0.36, 说明采用氨肽酶法脱苦后的黑豆多肽口感得到改善, 苦味基本消失, 香气保留完整。

3 结论

采用模糊综合评判法比较黑豆多肽的脱苦效果, 发现枯草杆菌氨肽酶法脱苦结果优于 β -环糊

精,最佳酶法脱苦条件为:加酶量 1500LAPU、pH8.5、温度 50℃、时间 4h; 枯草杆菌氨肽酶酶法脱苦不仅效率高、条件温和,而且水解过程易控制,容易实现工业化操作,故确定采用枯草杆菌氨肽酶酶法脱苦的方法来改善黑豆多肽的风味和口感。

参考文献

[1] 李清云,王常青. 小黑豆分离蛋白的制取与分析[J] 农产品加工, 2007(2): 65-67.
 [2] 王常青,任海伟. 小黑豆多肽加工工艺的研究[J] 食品科学, 2008, 29(5): 231-233.

[3] Perez-ortondo F J. Food quality certification: an approach for the development of accredited sensory evaluation methods[J]. Food Quality and Preference 2007, 18: 425-439.
 [4] 魏亚娟,田亚平,须瑛敏. 枯草芽孢杆菌脱苦氨肽酶在水解大豆分离蛋白中的应用研究[J] 食品工业科技, 2008, 29(04): 149-151.
 [5] 侯曼玲. 食品分析[M]北京:化学工业出版社, 2004: 128-129.
 [6] 吴庆勋,谷海先,赵光鳌. N⁺注入诱变选育氨肽酶高产菌株及发酵条件初步优化[J] 食品与发酵工业, 2006, 29(1): 15-18.

(上接第 172 页)

大,抗氧化性越高,其随浓度变化趋势如图 6 所示。

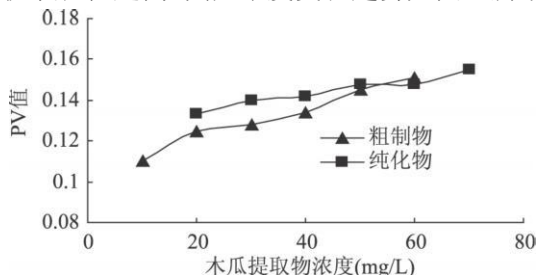


图 6 木瓜提取物的抗食用油脂氧化性

图 6 显示,木瓜提取物抗油脂氧化能力随着提取物浓度的增加而增加,但是增加不明显,同时木瓜纯化物的抗油脂氧化能力略高于粗制物。

2.7 对羟基自由基引发 DNA 氧化损伤的抑制作用

木瓜提取物对羟基自由基引发 DNA 氧化损伤的抑制效果如图 7 所示。

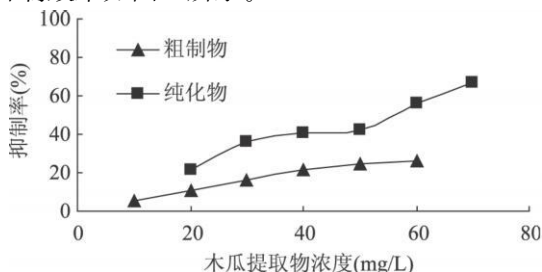


图 7 提取物对 DNA 损伤的抑制率

由图 7 可看出,纯化物与粗制物都具有抑制 DNA 损伤的能力,抑制能力与提取物的浓度呈正相关,但木瓜纯化物对 DNA 损伤抑制率是粗制物的一倍以上,说明提纯相对增加了可抑制 DNA 损伤的有效物质浓度。

综合以上实验结果,经提纯的木瓜纯化物的清除超氧阴离子、清除 DPPH·、还原能力、抗油脂氧化和抑制 DNA 氧化损伤的抗氧化能力高于粗制物,但同时看到木瓜纯化物的清除羟基自由基与抗脂质过氧化能力低于粗制物,尤其是其抗脂质过氧化的能力损失近半。说明提纯过程中虽然一些抗氧化物质的有效浓度增大,但同时也使得少量某些抗氧化物质在纯化过程中出现损失,纯化对抗氧化能力有影响。

3 结论

通过测定木瓜纯化物与粗制物的抗氧化指标,结果表明:木瓜纯化与粗制物对超氧阴离子自由基、羟基自由基和 DPPH 自由基抑制清除和食用油脂抗氧化能力差异较小;木瓜纯化物的抗 DNA 氧化损伤的抑制和还原力明显高于粗制物;粗制物在清除羟基自由基与抗脂质过氧化能力高于纯化物,说明纯化过程导致其中某些抗氧化物质损失。

参考文献

[1] 黄国伟,常红,任大林,等. 木瓜粉对体外缺氧损伤神经细胞抗氧化能力及凋亡的影响[J] 营养学报, 2003, 25(4): 392-396.
 [2] 周晓丽,邵震,李婷婷,等. 木瓜黄酮的提取及抗氧化性研究[J] 食品工业科技, 2007, 28(8): 170-172.
 [3] 刘朝霞,胡士德,邹坤,等. 资木瓜乙醇提取物的体外抗氧化活性研究[J] 三峡大学学报:自然科学版, 2008, 30(4): 72-75.
 [4] 周巧霞,张经硕,顾明,等. 测定山楂及提取物总三萜酸的含量[J] 中国野生植物资源, 2004, 23(5): 43-44.
 [5] 潘循哲. 大气环境中 OH 自由基测定[J] 上海环境学, 1999, 18(2): 59-61.
 [6] 唐春红,项昭保. 木瓜中齐墩果酸的提取分离及含量测定[J] 中国野生植物资源, 1999, 20(2): 48-50.
 [7] 陈卫军,曹炜. 麦胚提取物的抗氧化性研究[J] 食品科学, 2004, 25(10): 294-300.
 [8] Shu-Yao Tsa, Shih-Jeng Huang, Jeng-Leun Mau. Anti-oxidant properties of hot water extracts from *Agrocybe cylindracea* [J] Food Chemistry, 2006, 98(6): 670-677.
 [9] 朱振宝,田宾,易建华. 金银花不同提取物的油脂抗氧化效果研究[J] 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 69-72.
 [10] Gow Chin Yen, Chen Hui Yin. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antinutagenicity[J] Agric & Food Chem, 1995, 43(1): 27-32.
 [11] 张赞彬,龚钢明,戴妙妙. 甘薯多酚粗提取液的抗氧化活性研究[J] 中国粮油学报, 2007, 22(5): 76-79.
 [12] 曹炜,陈卫军,郑晓晖,等. 一种评价天然抗氧化剂对羟自由基致 DNA 损伤保护作用的改进方法[J] 营养学报, 2008, 30(1): 74-77.