

核桃乳酶解工艺及稳定性研究

姚奎章, 齐兵, 路敏, 夏君霞, 赵慧博, 李喜层

(河北养元智汇饮品股份有限公司, 河北衡水 053000)

摘要: 采用胰蛋白酶对未脱脂的核桃浆液进行酶解, 并利用 Turbiscan 稳定性分析仪对酶解核桃乳的稳定性进行了考察。通过单因素与正交试验优化得到最佳的酶解工艺条件为: 核桃浆液浓度 9% (*m/m*)、胰蛋白酶添加量 0.4% (*m/m*)、反应初始 pH 9.0、酶解温度 55 °C、酶解时间 1 h, 在此条件下, 蛋白水解度为 13.67%±0.41%。在此基础上, 利用 Turbiscan 稳定性分析仪考察了水解度分别为 13.70%、10.20%、7.01%的酶解核桃乳样品与常规工艺样品的稳定性差异。对比背散射光谱图得出, 通过酶解工艺产品底部析水层高度由 0~10 mm 减小至 0~5 mm。由底部稳定性动力学指数曲线得到, 酶解核桃乳样品稳定性动力学指数均小于对照样品, 且水解度较大样品 (13.70%) 的稳定性指数更小。与常规工艺相比较, 酶解核桃乳产品底部 TSI 曲线均无明显拐点, 说明其底部浓度和颗粒粒径的变化幅度小且平缓, 稳定性更好。

关键词: 核桃乳; 酶解; 稳定性

文章编号: 1673-9078(2016)8-259-264

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.039

Study on Enzymatic Hydrolysis Process and Stability of Walnut Milk

YAO Kui-zhang, QI Bing, LU Min, XIA Jun-xia, ZHAO Hui-bo, LI Xi-ceng

(Hebei Yangyuan Zhihui Co., Ltd., Hengshui 053000, China)

Abstract: Walnut milk was hydrolyzed by trypsin, and the stability of the enzymatic prepared walnut milk was studied. The most optimal conditions for enzymatic hydrolysis were as follows: walnut slurry concentration 9% (*m/m*), trypsin amount 0.4% (*m/m*), pH 9.0, reaction time 1h and temperature 55 °C. Under these conditions, the degree of hydrolysis (DH) reached 13.67 ± 0.41%. The stability of three hydrolysates with DH of 13.70%, 10.20% and 7.01% compared to the non-hydrolytic process were investigated by Turbiscan. Back scattering curve showed that the height of water separating layer from bottom was reduced from 0~10 mm to 0~5 mm by using the technique of enzymatic hydrolysis. The bottom stability indices of the hydrolysates were lower than the non-hydrolytic sample, and the higher the DH, the lower the stability index. Compared with the non-hydrolytic process, the stability index curves of the hydrolytic process samples were smoother with unobvious inflection points. All the results indicated that the stability of the enzymatic hydrolysis process was better than the non-hydrolytic process.

Key words: walnut milk; enzymatic hydrolysis; stability

核桃仁中含有丰富的脂肪酸、蛋白质、维生素和矿物质等营养成分, 其中蛋白质含量 15%左右, 脂肪含量 60%左右。核桃蛋白质主要由谷蛋白、球蛋白、清蛋白和醇溶蛋白四种蛋白质组成, 它们分别占核桃蛋白总量的 70.11%、17.57%、6.81%和 5.33%。核桃仁中脂肪酸的主要成分是不饱和脂肪酸, 约总量的 90%, 且富含人体必需脂肪酸亚麻酸, 是优质的天然“脑黄金”^[1]。

核桃乳饮料是以核桃仁、纯净水为主要原料加工制得料的乳状液, 其体系以水为分散介质, 蛋白、脂肪为主要分散相, 具有热力学不稳定性。核桃乳体系中蛋白、脂肪是影响体系稳定性的主要因素, 其中蛋

收稿日期: 2016-04-20

基金项目: 河北省重点研发计划农业关键共性技术攻关专项 (3020111)

作者简介: 姚奎章 (1965-), 男, 高级工程师, 主要从事植物蛋白饮料的研究与开发

白质大分子不断聚集, 最终沉淀影响产品稳定性。常规核桃乳生产工艺通常是通过均质等条件, 并调配不同的稳定体系来改善产品的沉淀问题, 但是效果不明显。

蛋白酶是能够水解蛋白质的一类酶, 可以破坏植物细胞壁及细胞内的蛋白质, 利用蛋白酶对肽键的水解作用可以将大分子的蛋白质切断, 形成小分子的氨基酸和多肽等物质^[2,3]。目前, 国内学者对于核桃蛋白的酶解工艺研究, 偏重于先将核桃仁脱油脂再进行蛋白酶水解工艺的研究^[4], 操作步骤繁琐且造成了对核桃仁资源的浪费。核桃仁磨浆后的浆液直接进行酶解, 酶解工序相对简单易行, 且能够实现较高水解度^[5]。同时, 将酶解液制作成核桃乳产品实现了核桃仁营养物质的完全利用。

本文在核桃乳的加工过程中, 利用胰蛋白酶的水解作用直接对核桃浆液进行酶解反应, 并优化得到最

适酶解工艺条件。通过酶解技术将核桃浆液中大分子蛋白质水解为小分子的多肽、氨基酸,并将酶解后的核桃浆液加工制得核桃乳产品,有效地控制产品底部地析水、沉淀问题,进而极大提高了核桃乳产品的稳定性。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

核桃仁,河北养元智汇饮品股份有限公司;胰蛋白酶,诺维信(中国)有限公司,食品级;复配乳化增稠剂,丹尼斯克(中国)投资有限公司;白砂糖,广西大新县雷平永鑫糖业有限公司;氢氧化钠,天津坤鹏化工有限公司,分析纯;食品添加剂碳酸钠,唐山三友化工股份有限公司。

1.2 仪器与设备

METTLER TOLEDO 型 pH 计,梅特勒-托利仪器有限公司;HENC 实验室搅-HW30,上海恒川机械设备有限公司;电热恒温水浴槽,上海沃迪自动化装备股份有限公司;AL204/01 电子分子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;Turbiscan LAB (Formulation) 全方位稳定分析仪,北京朗迪森科技有限公司;JMS-80A 胶体磨,廊坊市惠友机械有限公司;GYB60-6S 高压均质机,上海市东华高压均质机厂;XT-FGJ100S 型手动封盖机,广州市喜泰包装设备有限公司;LDZM-60KCS 立式压力蒸汽灭菌器,上海市申安医疗器械厂;SG400 型实验室乳化机,上海尚贵流体设备有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 酶解核桃乳制备

辅料:核桃仁→去皮→磨浆→调节 pH→酶解→85 °C 灭酶→定容→均质→封盖→杀菌→成品

1.3.2 核桃浆液酶解工艺优化实验

1.3.2.1 单因素实验

核桃浆液浓度(6%、8%、10%、12%、14%)(m/m)、加酶量(0.1‰、0.3‰、0.5‰、0.7‰、0.9‰)(m/m)、酶解温度(30、40、50、60 °C)、初始 pH(7.0、8.0、9.0、10.0)和酶解时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 h)为单因素,其他条件一定的前提下,进行单因素水平的预实验。

1.3.2.2 正交试验

在单因素试验的基础上,以核桃浆液浓度(A)、加酶量(B)、酶解温度(C)、和初始 pH(D)为研

究对象,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验来研究不同条件下的酶解效果,并做平行试验。以水解度为指标,因素水平表如表 1 所示。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	A 浆液浓度 /%	B 加酶量 /%	C 酶解温度 /°C	D 初始 pH
1	9	0.4	45	8.0
2	10	0.5	50	8.5
3	11	0.6	55	9.0

1.3.3 水解度的测定

准确称取一定质量酶解后的核桃浆液,测定其 pH 值,用一定浓度的 NaOH 溶液将反应体系的 pH 调到酶解初始的 pH 值,记录下所消耗的碱液用量,计算核桃蛋白的水解度按照以下公式计算^[6]:

$$DH/\% = \frac{V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}}}{M_s \times H_{\text{tot}}} \times 100$$

式中: V_{NaOH} 为碱液的体积, mL; C_{NaOH} 为碱液的浓度, mol/mL; α 为氨基的解离度; M_s 为底物中蛋白质的总质量, g; H_{tot} 为底物蛋白质中肽键的总数(取 8.0), mmol/g。

1.3.4 核桃乳的稳定性

采用 Turbiscan 稳定性分析仪对核桃乳的稳定性进行分析。通过检测样品的透射光和背散射光的光强值变化,反映样品的稳定性。主要仪凭借垂直扫描工作原理,能在不稳定现象发生的初期定性定量的分析出体系不稳定性发生的机理和速度,给出相厚度(沉淀层、浮油层、澄清层)随时间变化关系曲线,粒子的迁移速度(沉淀或絮凝)及粒子平均粒径随时间的变化关系曲线。

将待测样品放入测量池,装液量为 20 mL,选取背散射光对样品进行分析,通过扫描模式进行测量,探头从样品池的底部到样品池的顶部每隔 40 μm 测量一次,完成样品池从底部到顶部的测量称为 1 次扫描。设定样品扫描时间为 23 h,扫描间隔为 1 h,测试温度恒定为 25 °C,扫描曲线第一次为蓝色,最后一次为红色^[7]。

2 结果与讨论

2.1 单因素实验结果与讨论

2.1.1 核桃浆液浓度对酶解效果的影响

核桃浆液浓度对水解度的影响如图 1 所示,浆液浓度为 10% 时,蛋白水解度最大。之后,继续增大浆液浓度,酶解效果变差,这是由于核桃中富含脂肪、

纤维等物质,随着浆液浓度的增加,这些物质会降低底物蛋白质的溶解度,并限制了底物蛋白质与蛋白酶的充分接触,进而影响酶解效果,因此最适底物浓度为10%。

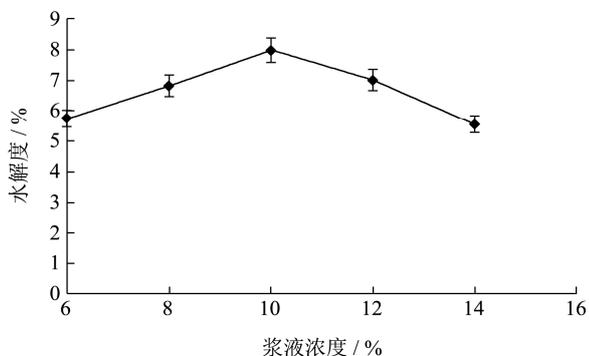


图1 浆液浓度对水解度的影响

Fig.1 Effect of seriflux concentration on degree of hydrolysis

2.1.2 加酶量对酶解效果的影响

加酶量对水解度的影响如图2所示,核桃蛋白水解度随加酶量增加而提高,当加酶量达到0.5‰之后蛋白酶用量再增加,水解度增加很缓慢,这是由于底物蛋白质浓度一定时,加酶量过高,部分蛋白酶无法与底物相互作用,因而水解度不再增大。同时,增大加酶量会提高生产成本,综合考虑经济因素,选择0.5‰为最适加酶量。

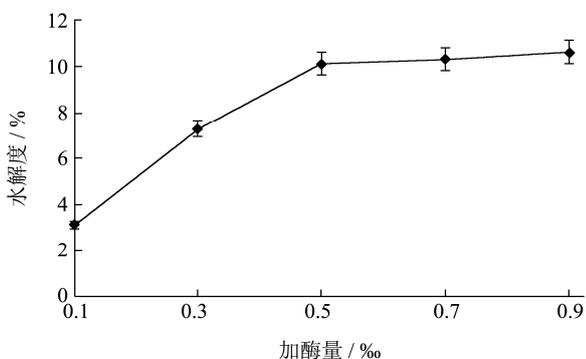


图2 加酶量对水解度的影响

Fig.2 Effect of enzyme amount on degree of hydrolysis

2.1.3 酶解温度对酶解效果的影响

酶解温度对水解度的影响如图3所示,酶解反应过程温度低于50℃时,水解度随着温度升高而提高,温度较低时,蛋白酶的催化活性较低,提升温度,蛋白酶的催化活性提高,另一方面,温度的提高有利于核桃蛋白质的溶解度提升。当温度超过50℃后,水解度明显下降,主要是由于温度过高会导致蛋白酶的变性失活,因此,酶解温度最适为50℃。

2.1.4 初始pH对酶解效果的影响

初始pH对水解度的影响如图4所示,从图中可以看出,在pH9.0时,水解度最大,说明调节浆液的

初始值为pH9.0时,整个酶解过程中酶解效果最好,pH主要通过影响酶活力进而影响酶解反应,过酸或者过碱的环境都会影响蛋白酶的活性进而影响酶解效果^[8],因此选择最适初始pH为9.0。

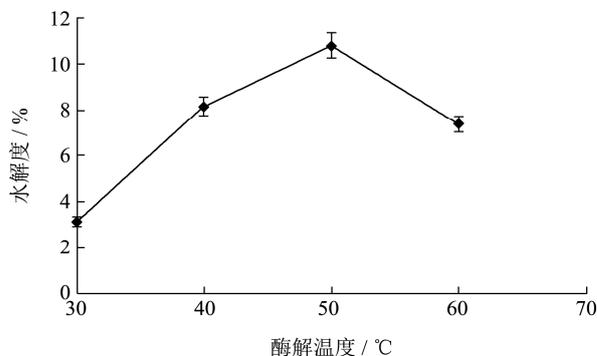


图3 酶解温度对水解度的影响

Fig.3 Effect of temperature on degree of hydrolysis

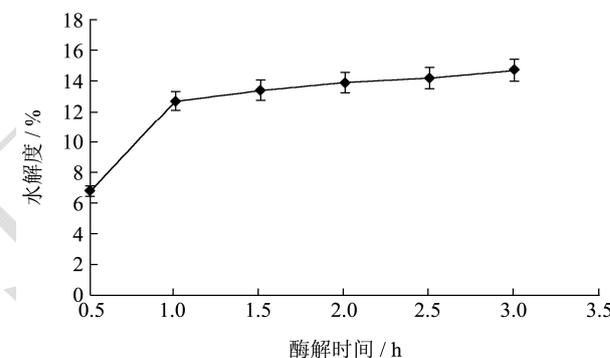


图4 初始pH对水解度的影响

Fig.4 Effect of pH on degree of hydrolysis

2.1.5 酶解时间对酶解效果的影响

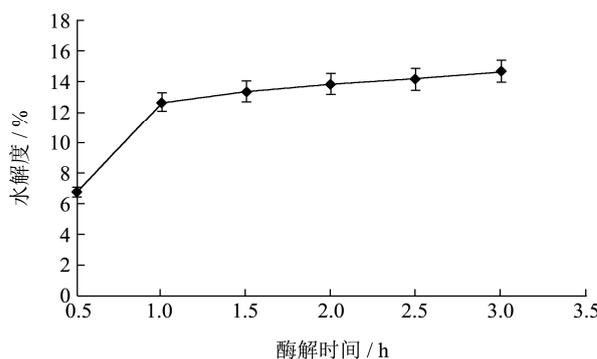


图5 酶解时间对水解度的影响

Fig.5 Effect of time on degree of hydrolysis

酶解时间对水解度的影响如图5所示,从图中可以看出反应时间越长,蛋白的水解度越高,但1h之后,水解度增加幅度变缓,且考虑酶解时间对生产周期和能耗的影响,选择控制酶解时间为1h。

2.2 核桃浆液酶解工艺的优化

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Design and result of orthogonal experiment

实验号	A	B	C	D	水解/%
1	1	1	1	1	7.01
2	1	2	2	2	10.55
3	1	3	3	3	13.70
4	2	1	2	3	10.20
5	2	2	3	1	8.93
6	2	3	1	2	7.05
7	3	1	3	2	11.02
8	3	2	1	3	9.45
9	3	3	2	1	8.99
\bar{K}_1	10.420	9.410	7.837	8.310	
\bar{K}_2	8.727	9.643	9.913	9.540	
\bar{K}_3	9.820	9.913	11.217	11.117	
R	1.693	0.503	3.380	2.807	

表 3 正交试验的方差分析表

Table 3 Variance analysis of orthogonal experiment

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
A	4.423	2	11.609	
B	0.381	2	1.000	
C	17.436	2	45.764	*
D	11.876	2	31.171	*
误差	0.38	2		

注：“*”表示差异显著 ($p < 0.05$)。

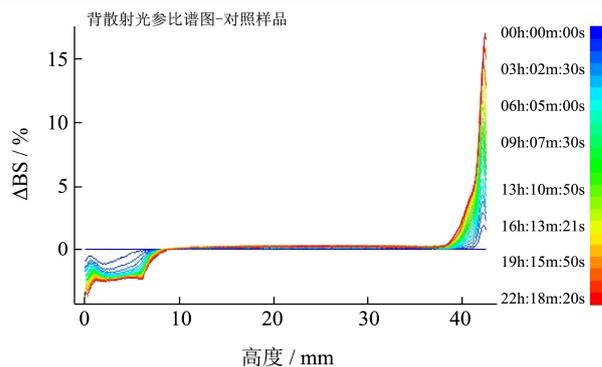
由正交试验结果与方差分析表可知，四个因素对酶解效果的影响大小依次为 $C > D > A > B$ ，即酶解温度 $>$ 初始 pH $>$ 浆液浓度 $>$ 加酶量。由 F 值判断可以，C、D 为显著性影响因素，A、B 为次要影响因素。选取出最佳水平酶解温度 55℃，初始 pH 9.0，加酶量与浆液浓度为次要影响因素，从时间操作与经济因素考虑，选择浆液浓度 9%，加酶量 0.4%，最终确定最优水平组合为 $A_1B_1C_3D_3$ ，在此条件下，水解度为 13.67% \pm 0.41%。

2.3 核桃乳产品稳定性分析

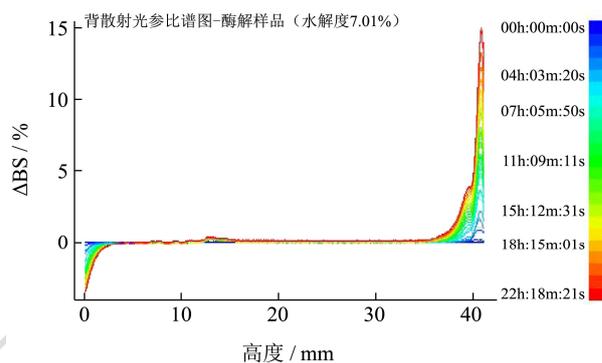
将酶解工艺制得的核桃乳样品（水解度分别为 13.70%、10.20%、7.01%）与正常工艺制得的对照样品在相同条件下放置一段时间后，利用 Turbiscan 稳定性分析仪进行快速检测。

2.3.1 背散射光谱图分析

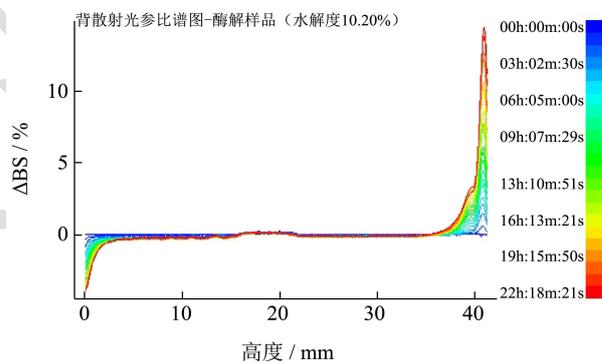
根据扫描曲线给出的扫描时间与背散射光随样品高度的变化关系，以样品初始值为对照，样品与之的差值（变化率， ΔBS ）可以反映体系的变化。



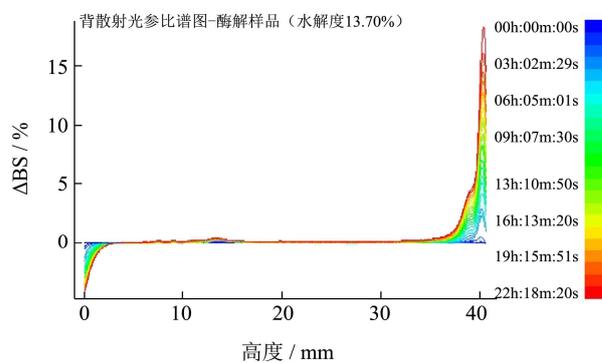
(a) 常规工艺核桃乳



(b) 酶解工艺核桃乳（水解度 7.01%）



(c) 酶解工艺核桃乳（水解度 10.20%）



(d) 酶解工艺核桃乳（水解度 13.70%）

图 6 样品背散射光光强值与样品池高度的关系图谱

Fig.6 Scheme of relationship between back scattering light intensity and pool height

背散射光的强度随着体系浓度的增加而增强^[9]，

从背散射光谱图(图6)可以看出,对照样品底部0~10 mm处, Δ BS 值由0%减少至-4%,而三个酶解样品,底部0~5 mm处, Δ BS 值由0%减少至-4%,说明对照样品底部析水层高度大于酶解样品,三个不同水解度酶解样品的差别不明显。由于大分子的蛋白质沉淀与脂肪上浮是造成核桃乳底部析水的主要原因,因而由背散射光谱图可以看出,通过酶解工艺的核桃乳产品,减小了底部析水层高度,实现了对底部大分子蛋白沉淀与脂肪上浮的控制,改善了产品的稳定性。

2.3.2 稳定性指数曲线分析

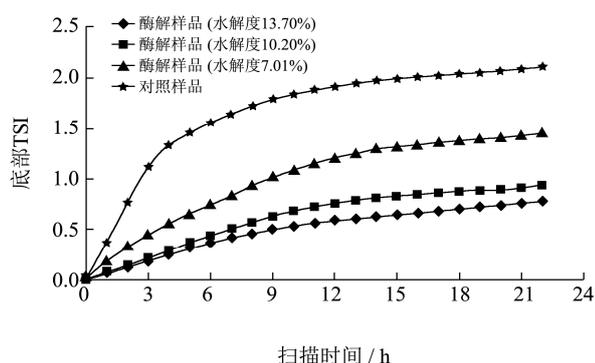


图7 底部稳定指数曲线

Fig.7 Bottom stability index curves

通过 Turbiscan 仪器的稳定性参数计算软件 Easy Soft 可以计算得出各样品的稳定性动力学指数。底部稳定性动力学指数(TSI)曲线反映样品底部在整个扫描时间内浓度和颗粒粒径的变化幅度的综合情况,TSI 变化幅度越大,稳定性动力学指数越大,说明体系越不稳定。由底部稳定性指数曲线(图7)可知,相同扫描时间点,三个不同水解度的酶解样品稳定性动力学指数均小于对照样品,进一步分析 TSI 曲线可看出,对照样品 TSI 曲线扫描 4 h 位置出现明显拐点,说明前 4 h 产品浓度和颗粒粒径的变化幅度大,而三个不同水解度酶解核桃乳样品底部 TSI 曲线均无明显拐点,证明酶解核桃乳样品的底部浓度和颗粒粒径的变化幅度小且平缓,进而证明通过酶解后核桃乳产品稳定性得到提高。对比三个不同水解度样品可看出,水解度较大样品(13.70%)的稳定性指数更小,说明其稳定性更好。综合分析后推断,通过蛋白酶水解作用将大分子核桃蛋白水解成小分子氨基酸、多肽物质,底部不容易形成沉淀分层,进而析水层不明显^[10]。另一方面,是由于蛋白分子量变小,分子结构部分展开,内部疏水基团暴露,其乳化性能提高^[11,12],进一步控制了脂肪的上浮,进而提高了核桃乳产品的稳定性。

3 结论

3.1 为了解决核桃乳稳定性、提高其生物利用度的问

题,采用胰蛋白酶对未经脱脂的核桃浆进行了酶解,获得了胰蛋白酶水解核桃乳浆液的最优条件为:浆液浓度 9%(m/m)、加酶量 0.4‰(m/m)、酶解温度 55 ℃、酶解初始 pH 9.0,酶解时间 1 h,此条件下核桃蛋白水解度最大为 13.67%±0.41%。

3.2 将水解后浆液按照核桃乳加工工艺制得了核桃乳产品,利用 Turbiscan 稳定性分析仪考察三个不同水解度(水解度分别为 13.70%、10.20%、7.01%)的酶解核桃乳样品与常规工艺样品的稳定性。对比背散射光谱图得到,通过酶解工艺实现了将产品底部析水层高度由 0~10 mm 减小至 0~5 mm。由 Turbiscan Easy Soft 软件计算各样品的底部稳定性指数曲线得到,三个不同水解度的酶解样品稳定性动力学指数均小于对照样品,水解度较大样品(13.70%)的稳定性指数更小。酶解核桃乳产品底部 TSI 曲线无明显拐点,说明酶解核桃乳样品的底部浓度和颗粒粒径的变化幅度小且平缓,稳定性好。但稳定性与水解程度之间的关系有待进一步研究。

参考文献

- [1] 李敏,刘媛,孙翠,等.核桃营养价值研究进展[J].中国粮油学报,2009,24(6):166-170
LI Min, LIU Yuan, SUN Cui, et al. Research advance about nutrients and medicinal value of walnut [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(6): 166-170
- [2] Zambrowicz A, Eckert E, Pokora M, et al. Biological logical activity of egg-yolk protein by-product hydrolysates obtained with the use of non-commercial plant protease [J]. Italian Journal of Food Science, 2015, 27(4): 450-458
- [3] 赵谋明,徐巨才,刘雷,等.不同 HLB 值的表面活性剂对核桃仁酶解特性的影响[J].现代食品科技,2016,32(7):109-114
ZHAO Mou-ming, XU Ju-cai, LIU Lei, et al. Effect of HLB value of surfactant on enzymatic hydrolysis characteristics of walnut kernel [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(7): 109-114
- [4] 康俊杰,陈树俊,赵瑞欢,等.核桃粕组成测定及抗氧化多肽工艺优化的研究[J].农产品加工,2014,1:31-34
KANG Jun-jie, CHEN Shu-jun, ZHAO Rui-huan, et al. Determination of the composition of walnut meal and enzymatic hydrolysis process optimization [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2014, 1: 31-34
- [5] 赵谋明,陈卉平,任娇艳.核桃粕、核桃仁酶解物抗氧化活性的研究[J].现代食品科技,2013,29(10):2335-2339
ZHAO Mou-ming, CHEN Hui-ping, REN Jiao-yan. The antioxidant activities of walnut protein and its enzymolysis

- product [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(10): 2335-2339
- [6] 袁斌,吕桂善,刘小玲.蛋白质水解度的简易测定方法[J].*广西农业生物科学*,2002,21(2):113-115
YUAN Bin, LV Gui-shan, LIU Xiao-ling. The simple method of determining for the degree of hydrolysis of proteins [J]. *Journal of Guangxi Agric. and Biol. Science*, 2002, 21(2): 113-115
- [7] 吕长鑫,李萌萌,徐晓明,等.利用 Turbiscan 稳定性分析仪检测紫苏酸性乳饮料乳化稳定性[J].*中国食品学报*,2014, 14(4):239-245
LV Chang-xin, LI Meng-meng, XU Xiao-ming, et al. Application of turbiscan for analysis on stability and emulsibility of purple perilla acid milk beverage [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2014, 14(4): 239-245
- [8] Butre C I, Sforza S, Wierenga P A, et al. Determination of the influence of the pH of hydrolysis on enzyme selectivity of *Bacillus licheniformis* protease towards whey protein isolate [J]. *International Dairy Journal*, 2015, 44(2): 283-302
- [9] Mengual O, Meunier G, Cayre I, et al. Turbiscan ma 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis [J]. *Talanta*, 1999, 50(2): 445-456
- [10] Mune M A M. Influence of degree of hydrolysis on the functional properties of cowpea protein hydrolysates [J]. *Journal of Food Processing & Preservation*, 2015, 39(6): 518-519
- [11] He S, Franco C, Zhang W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP) [J]. *Food Research International*, 2013, 50(1): 289-297
- [12] 于泓鹏,陈运生,吴克刚,等.罗非鱼酶解多肽的乳化性及乳化稳定性研究[J].*中国食品添加剂*,2015,2:94-100
YU Hong-peng, CHEN Yun-sheng, WU Ke-gang, et al. Emulsifying activity and emulsifying stability of enzymatic polypeptide from *Tilapia* [J]. *China Food Additives*, 2015, 2: 94-100