



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107058438 B

(45) 授权公告日 2021. 03. 30

(21) 申请号 201710345115.8

C07K 1/36 (2006.01)

(22) 申请日 2017.05.16

C07K 1/30 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107058438 A

(56) 对比文件

CN 106282282 A, 2017.01.04

(43) 申请公布日 2017.08.18

刘华勇. 水酶法同时提取辣木籽油和抗氧化肽的研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 工程科技I辑》.2017,

(73) 专利权人 华南理工大学

地址 510640 广东省广州市天河区五山路 381号

审查员 苏存生

(72) 发明人 林恋竹 朱启源 赵谋明 苏国万 刘雪梅

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 何淑珍

(51) Int. Cl.

C12P 21/06 (2006.01)

权利要求书2页 说明书6页

(54) 发明名称

一种从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法。通过高温蒸煮、高压均质、碱法提取的前处理方法,联合蛋白酶酶解、离心去油、分级醇沉、大孔树脂富集处理方法,实现控制酶解,提高了原料利用率,释放抗氧化肽,高效富集抗氧化性较强的组分,最大程度地提取辣木籽蛋白肽。本发明工艺操作简单、生产成本低、无污染,所得辣木籽蛋白肽中,抗氧化肽蛋白含量>90%,水分含量<8%,ORAC值>1450 μmol Trolox equiv/g,所得辣木籽蛋白肽可用于药品、保健品和食品中。

1. 从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 高温蒸煮:将新鲜辣木籽烘干后去壳粉碎,过60目筛,在100℃条件下高温蒸煮辣木籽粉30min;

(2) 高压均质:取经高温蒸煮后的辣木籽粉,按照料液比1:6 g/mL加入去离子水,以8000rpm的速率剪切10分钟,过胶体磨2次,得辣木籽匀浆液,20 MPa高压均质2次;

(3) 碱法提取:在辣木籽粉匀浆液中加入氢氧化钠,调节pH值至7.0,在温度为40℃的条件下,提取40 min,冷却至室温,得混悬液;

(4) 酶解:调节混悬液pH值至7.0,加入质量为辣木籽质量1%的蛋白酶,在50℃的条件下酶解18小时,90℃灭酶30 min,8000 g离心20min;分离,去除上层油脂,所得上清液为富含辣木籽蛋白肽的酶解液;所述蛋白酶由质量比为2:3的胰酶和NS37071蛋白酶的组成;

(5) 分级醇沉:真空浓缩辣木籽酶解液至固形物含量30%,加入预冷至4℃的无水乙醇,使得体系中乙醇质量百分比含量达到10%,200 r/min室温匀速搅拌4h后,4000 g离心20 min,得到上清液;将上清液浓缩至固形物含量30%,加入预冷至4℃的无水乙醇,使得体系中乙醇质量百分比含量达到40%,200 r/min室温匀速搅拌4h后,4000g离心20 min,得到沉淀;加入沉淀湿重8倍的去离子水,溶解后,真空浓缩,冷冻干燥,得到粉末;

(6) 大孔树脂富集:将粉末溶于水中,浓度为100 mg/mL,过安伯莱特XAD-16大孔树脂柱,采用0-60 vol%乙醇溶液进行8个柱体积梯度洗脱,流速为2mL/min,具体为:1-5个柱体积采用100 vol % 水、0 vol % 乙醇洗脱;6-7个柱体积采用50 vol % 水、50 vol % 乙醇洗脱;7-8 个柱体积采用40 vol % 水、60 vol % 乙醇洗脱;收集60%体积比的乙醇洗脱液,冷冻干燥,得具有强抗氧化活性的辣木籽蛋白肽1;

所得蛋白肽1中,蛋白质含量为92%,水分含量为7%,ORAC值为1455 $\mu\text{mol Trolox equiv/g}$ 。

2. 从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 高温蒸煮:将新鲜辣木籽烘干后去壳粉碎,过60目筛,在105℃条件下高温蒸煮辣木籽粉40min;

(2) 高压均质:取经高温蒸煮后的辣木籽粉,按照料液比1:7 g/mL加入去离子水,以9000rpm的速率剪切15分钟,过胶体磨3次,得辣木籽匀浆液,30 MPa高压均质3次;

(3) 碱法提取:在辣木籽粉匀浆液中加入氢氧化钠,调节pH值至8.0,在温度为50℃的条件下,提取50 min,冷却至室温,得混悬液;

(4) 酶解:调节混悬液pH值至7.5,加入质量为辣木籽质量2%的蛋白酶,在53℃的条件下酶解21小时,93℃灭酶40 min,9000g离心25min,分离,去除上层油脂,所得上清液为富含辣木籽蛋白肽的酶解液;所述蛋白酶由质量比为1:1胰酶和NS37071蛋白酶组成;

(5) 分级醇沉:真空浓缩辣木籽酶解液至固形物含量35%,加入预冷至6℃的无水乙醇,使得体系中乙醇质量百分比含量达到15%,300 r/min室温匀速搅拌5h后,5000g离心25min,得到上清液;将上清液浓缩至固形物含量35%,加入预冷至6℃的无水乙醇,使得体系中乙醇质量百分比含量达到50%,300 r/min室温匀速搅拌5h后,5000g离心25min,得到沉淀;加入沉淀湿重9倍的去离子水,溶解后,真空浓缩,冷冻干燥,得到粉末;

(6) 大孔树脂富集:将粉末溶于水中,浓度为150 mg/mL,过安伯莱特XAD-16大孔树脂柱,采用0-60 vol%乙醇溶液进行8个柱体积梯度洗脱,流速为2mL/min,具体为:1-3个柱体

积采用100 vol %水洗脱;4-6 个柱体积采用75 vol %水、25 vol %乙醇洗脱;6-7个柱体积采用45 vol %水、55 vol % 乙醇洗脱;7-8 个柱体积采用40 vol % 水、60 vol % 乙醇洗脱;收集60%体积比的乙醇洗脱液,冷冻干燥,得具有强抗氧化活性的辣木籽蛋白肽2;

所得蛋白肽2中,蛋白质含量为91%,水分含量为7%,ORAC值为1500 $\mu\text{mol Trolox equiv/g}$ 。

3.从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1)高温蒸煮:将新鲜辣木籽烘干后去壳粉碎,过60目筛,在110℃条件下高温蒸煮辣木籽粉50min;

(2)高压均质:取经高温蒸煮后的辣木籽粉,按照料液比1:8 g/mL加入去离子水,以10000rpm的速率剪切20分钟,过胶体磨2次,得辣木籽匀浆液,40 MPa高压均质2次;

(3)碱法提取:在辣木籽粉匀浆液中加入氢氧化钠,调节pH值至9.0,在温度为60℃的条件下,提取60 min,冷却至室温,得混悬液;

(4)酶解:调节混悬液pH值至8.0,加入质量为辣木籽质量3%的蛋白酶,在56℃的条件下酶解24小时,96℃灭酶50 min,10000 g离心30min,分离,去除上层油脂,所得上清液为富含辣木籽蛋白肽的酶解液;所述蛋白酶由质量比为3:2的胰酶和NS37071蛋白酶组成;

(5)分级醇沉:真空浓缩辣木籽酶解液至固形物含量40%,加入预冷至8℃的无水乙醇,使得体系中乙醇质量百分比含量达到20%,400 r/min室温匀速搅拌6h后,6000 g离心30 min,得到上清液;将上清液浓缩至固形物含量40%,加入预冷至8℃的无水乙醇,使得体系中乙醇质量百分比含量达到60%,400 r/min室温匀速搅拌6h后,6000 g离心30 min,得到沉淀;加入沉淀湿重10倍的去离子水,溶解后,真空浓缩,冷冻干燥,得到粉末;

(6)大孔树脂富集:将粉末溶于水中,浓度为200 mg/mL,过安伯莱特XAD-16大孔树脂柱,采用0-60 vol%乙醇溶液进行8个柱体积梯度洗脱,具体为:1-3个柱体积采用100 vol %水洗脱;4-6 个柱体积采用50 vol %水、50 vol % 乙醇洗脱; 7-8 个柱体积采用40 vol %水、60 vol % 乙醇洗脱;

收集60%体积比乙醇洗脱液,冷冻干燥,得具有强抗氧化活性的辣木籽蛋白肽3;所得蛋白肽3中,蛋白质含量为93%,水分含量为6%,ORAC值为1550 $\mu\text{mol Trolox equiv/g}$ 。

一种从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法

技术领域

[0001] 本发明属于辣木籽深加工领域,具体涉及一种从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法。

背景技术

[0002] 人的每个细胞每天大约可受到自由基 10^3-10^4 次的攻击。而当体内的氧化增强系统与抗氧化系统之间的平衡向氧化增强方向变化时,就会造成氧化胁迫(亦称氧化应激)。当细胞处于氧化应激态时,自由基会与机体内脂类、糖类、蛋白质、DNA等,发生各种氧化反应,引起变性、交联、断裂等氧化伤害。在正常情况下,人体具有多层次的抗氧化防御系统,严格控制着体内自由基的氧化效应,以维持体内环境的相对稳定。抗氧化防御系统由两类物质构成:一类是能捕获自由基的酶系,如谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等;另一类是具还原能力的抗氧化物质,如维生素E、维生素C及其他抗氧化物质等。这些物质摄入不足,就会使机体捕获自由基的能力下降,从而导致自由基在体内的堆积,造成机体在分子水平、细胞水平及组织器官水平的各种损伤,加速机体的衰老、疲劳并诱发阿尔茨海默氏症,老龄化进程,白内障,急性肝毒性,心血管疾病,动脉硬化,肾炎,糖尿病,风湿病,炎症过程,DNA损伤所致癌变等。

[0003] 肽类物质是众多研究者公认的安全性较高的一类抗氧化剂。肽的抗氧化活性与其氨基酸的组成及排列顺序、疏水性、空间体积大小及酸碱性等有关:(1)肽的抗氧化活性主要是由于其序列中Tyr、Trp、Cys或Met等具有供质子或供电子能力的氨基酸残基存在;(2)肽序列中的疏水性氨基酸如Leu、Pro、Phe及Val对肽的抗氧化活性具有重要贡献;(3)肽序列中的酸性氨基酸残基对肽的抗氧化活性起到关键作用。

[0004] 辣木,是辣木科辣木属的植物,原产于印度北部的喜马拉雅山地区,广泛种植在亚洲和非洲热带和亚热带地区,辣木共有14个种,印度传统辣木(*Moringa oleifera* Lam.)生长快,分布广,是栽培面积最大、研究最多的辣木种。我国对辣木的引种种植和开发研究主要集中在云南、广西、广东、福建、贵州、台湾等省份。2012年,辣木叶被国家卫生和计划生育委员会批准作为新资源食品。辣木全身都是宝,其叶片、花朵、种子及嫩芽、嫩茎、根等均可食用,是药食同源的植物。印度和非洲国家常用辣木来治疗高血压、糖尿病、心血管疾病、风湿、关节炎等高发疾病。辣木籽中含有丰富的油脂以及蛋白质,是优质的蛋白质来源。辣木籽蛋白含有较丰富的供质子或供电子能力的氨基酸包括:Tyr、Met、Cys;较丰富的疏水性氨基酸包括:Leu、Pro、Phe及Val;以及丰富的酸性氨基酸:Glu。因此,采用酶法可以制备得到具有强抗氧化活性的辣木籽肽。辣木籽肽可作为高效的抗氧化剂用于食品工业,具有较强的社会与经济效益。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法。该方法通过高温蒸煮、高压均质、碱法提取的前处理方法,通过蛋白酶酶解、离心去油、分级醇沉、大孔树

脂富集处理方法,提取得到辣木籽蛋白肽。

[0006] 本发明方法得到的辣木籽蛋白肽中,蛋白质含量>90%,水分含量<8%,ORAC值>1450 $\mu\text{mol Trolox equiv/g}$ 。

[0007] 本发明的目的通过如下技术方案实现。

[0008] 一种从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法,采用高温蒸煮、高压均质、碱法提取、酶解、分级醇沉、大孔树脂富集联合处理,具体包括如下步骤:

[0009] (1) 高温蒸煮:将新鲜辣木籽烘干后去壳、粉碎,过筛,得到的辣木籽粉进行高温蒸煮;

[0010] (2) 高压均质:取经高温蒸煮后的辣木籽粉,加入去离子水,高速剪切后过胶体磨,再进行高压均质,得到辣木籽匀浆液;

[0011] (3) 减法提取:在辣木籽粉匀浆液中加入氢氧化钠,调节pH值,加热提取后,冷却至室温,得到混悬液;

[0012] (4) 酶解:调节混悬液的pH值,加入蛋白酶进行酶解后,灭酶,离心分离,去除上层油脂,取上清液;

[0013] (5) 分级醇沉:将步骤(4)得到的上清液进行初步真空浓缩后,加入预冷后的无水乙醇,匀速搅拌后,离心,得到上清液A;将上清液A再次真空浓缩后,加入预冷后的无水乙醇,匀速搅拌,离心,在得到的沉淀物中加入去离子水溶解后,真空浓缩,冷冻干燥,得到粉末;

[0014] (6) 大孔树脂富集:将步骤(5)得到的粉末溶于水中,过大孔树脂柱,采用乙醇溶液梯度洗脱,收集洗脱液,冷冻干燥,得到辣木籽蛋白肽。

[0015] 进一步地,步骤(1)中,所述过筛是过60目筛。

[0016] 进一步地,步骤(1)中,所述高温蒸煮是在100~120℃的条件下蒸煮30~50 min。

[0017] 进一步地,步骤(2)中,高温蒸煮后的辣木籽粉与去离子水的料液比为1:6~8 g/mL。

[0018] 进一步地,步骤(2)中,所述高速剪切是在8000~10000 rpm的速率剪切10~20分钟。

[0019] 进一步地,步骤(2)中,所述过胶体磨的次数为2~3次。

[0020] 进一步地,步骤(2)中,所述高压均质的压力为20~40 MPa。

[0021] 进一步地,步骤(2)中,所述过高压均质的次数为2~3次。

[0022] 进一步地,步骤(3)中,所述调节pH值是调节值pH值为7.0~9.0。

[0023] 进一步地,步骤(3)中,所述加热提取是在40~60℃的条件下提取40~60min。

[0024] 进一步地,步骤(4)中,调节混悬液的pH值至7.0~8.0。

[0025] 进一步地,步骤(4)中,所述蛋白酶的加入量为辣木籽质量的1~3%。

[0026] 进一步地,步骤(4)中,所述蛋白酶为胰酶和碱性蛋白酶,胰酶的加入量占总酶量的40~60%,碱性蛋白酶的加入量占总酶量的40~60%。

[0027] 更进一步地,步骤(4)中,所述碱性蛋白酶包括型号为NS37071的蛋白酶。

[0028] 进一步地,步骤(4)中,所述酶解是在50~56℃的条件下酶解18~24小时。

[0029] 进一步地,步骤(4)中,所述灭酶是在90~96℃灭酶30~50 min。

[0030] 进一步地,步骤(4)中,所述离心分离是8000~10000g离心20~30min。

[0031] 进一步地,步骤(5)中,所述初步真空浓缩和再次真空浓缩均为浓缩至固形物含量

为30~40%。

[0032] 进一步地,步骤(5)中,所述预冷的无水乙醇为预冷至4~8℃的无水乙醇。

[0033] 进一步地,步骤(5)中,步骤(4)得到的上清液浓缩后,预冷的无水乙醇的加入量为使体系中乙醇含量达到10~20wt%。

[0034] 进一步地,步骤(5)中,所述匀速搅拌均为室温下200~400 r/min转速搅拌4~6h。

[0035] 进一步地,步骤(5)中,所述离心均为4000~6000g离心20~30min。

[0036] 进一步地,步骤(5)中,上清液A浓缩后,预冷的无水乙醇的加入量为使体系中乙醇含量达到40~60wt%。

[0037] 进一步地,步骤(5)中,沉淀物中加入去离子水的量为沉淀物湿重的8~10倍。

[0038] 进一步地,步骤(6)中,所述粉末溶于水后的浓度为100~200 mg/mL。

[0039] 进一步地,步骤(6)中,所述大孔树脂为安伯莱特XAD-16大孔树脂。

[0040] 进一步地,步骤(6)中,所述梯度洗脱为采用0~60 vol%乙醇溶液梯度洗脱,具体为:1~3个柱体积采用100vol%水洗脱,4~6个柱体积采用100~50 vol%水、0~50 vol%乙醇洗脱,6~7个柱体积采用50~40 vol%水、50~60 vol%乙醇洗脱,7~8个柱体积采用40 vol%水、60 vol%乙醇洗脱,收集60 vol%乙醇洗脱液。

[0041] 进一步地,提取得到的辣木籽蛋白肽中,蛋白质含量>90%,水分含量<8%,且具有强抗氧化性,ORAC值>1450 $\mu\text{mol Trolox equiv/g}$ 。

[0042] 提取得到的辣木籽蛋白肽可用于药品、保健品和食品中。

[0043] 与现有技术相比,本发明具有如下优点和有益效果:

[0044] (1)本发明方法通过高温蒸煮、高压均质、碱法提取的前处理方法,联合蛋白酶酶解、离心去油处理方法,实现控制酶解,提高了原料利用率,释放抗氧化肽,最大程度地提取辣木籽蛋白肽;

[0045] (2)本发明方法采用分级醇沉、大孔树脂富集处理方法去除抗氧化性较弱的组分,高效富集抗氧化性较强的组分;

[0046] (3)本发明工艺操作简单、生产成本低、无污染,所得辣木籽蛋白肽中,抗氧化肽蛋白含量>90%,水分含量<8%,ORAC值>1450 $\mu\text{mol Trolox equiv/g}$,可用于药品、保健品和食品中。

具体实施方式

[0047] 本发明用下列实施例来进一步说明本发明,但本发明的保护范围并不限于下列实施例。

[0048] 以下实施例中,氧自由基吸收能力(Oxygen Radical Absorbance Capacity, ORAC)测定方法如下:

[0049] 在96孔荧光板各微孔中分别加入20 μL 待测样品(将各酶解产物用75 mmol/L磷酸盐缓冲液做适当稀释,每个样品待测液浓度为0.05 mg/mL),然后添加60 μL 70 nmol / L 荧光素,在37℃下预置15 min后,用多道移液器迅速在各孔中加入120 μL 40 mmol/L AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride) 启动反应,并将微孔板置于酶标仪中在37℃下以激发波长485 nm,发射波长538 nm进行连续测定,每1 min 测定1次各孔荧光强度,测定时间设定在荧光衰减呈基线后为止,样品的ORAC值越高则其抗氧化能力

越强。

[0050] 实施例1

[0051] 从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法,包括以下步骤:

[0052] (1) 高温蒸煮:将新鲜辣木籽烘干后去壳粉碎,过60目筛,在100℃条件下高温蒸煮辣木籽粉30min;

[0053] (2) 高压均质:取经高温蒸煮后的辣木籽粉,按照料液比1:6 g/mL加入去离子水,以8000rpm的速率剪切10分钟,过胶体磨2次,得辣木籽匀浆液,20 MPa高压均质2次;

[0054] (3) 碱法提取:在辣木籽粉匀浆液中加入氢氧化钠,调节pH值至7.0,在温度为40℃的条件下,提取40 min,冷却至室温,得混悬液;

[0055] (4) 酶解:调节混悬液pH值至7.0,加入质量为辣木籽质量1%的蛋白酶(胰酶和NS37071蛋白酶的质量比为2:3),在50℃的条件下酶解18小时,90℃灭酶30 min,8000 g离心20min;分离,去除上层油脂,所得上清液为富含辣木籽蛋白肽的酶解液;

[0056] (5) 分级醇沉:真空浓缩辣木籽酶解液至固形物含量30%,加入预冷至4℃的无水乙醇,使得体系中乙醇含量达到10%(按质量计),200 r/min室温匀速搅拌4h后,4000 g离心20 min,得到上清液;将上清液浓缩至固形物含量30%,加入预冷至4℃的无水乙醇,使得体系中乙醇含量达到40%(按质量计),200 r/min室温匀速搅拌4h后,4000g离心20 min,得到沉淀;加入沉淀湿重8倍的去离子水,溶解后,真空浓缩,冷冻干燥,得到粉末;

[0057] (6) 大孔树脂富集:将粉末溶于水中,浓度为100 mg/mL,过安伯莱特XAD-16大孔树脂柱,采用0-60 vol%乙醇溶液进行8个柱体积梯度洗脱,流速为2mL/min,具体为:1-5个柱体积采用100 vol % 水、0 vol % 乙醇洗脱;6-7个柱体积采用50 vol %水、50 vol % 乙醇洗脱;7-8 个柱体积采用40 vol % 水、60 vol % 乙醇洗脱;收集60%(v/v)乙醇洗脱液,冷冻干燥,得具有强抗氧化活性的辣木籽蛋白肽1。

[0058] 所得蛋白肽1中,蛋白质含量为92%,水分含量为7%,ORAC值为1455 $\mu\text{mol Trolox equiv/g}$ 。

[0059] 实施例2

[0060] 从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法,包括以下步骤:

[0061] (1) 高温蒸煮:将新鲜辣木籽烘干后去壳粉碎,过60目筛,在105℃条件下高温蒸煮辣木籽粉40min;

[0062] (2) 高压均质:取经高温蒸煮后的辣木籽粉,按照料液比1:7 g/mL加入去离子水,以9000rpm的速率剪切15分钟,过胶体磨3次,得辣木籽匀浆液,30 MPa高压均质3次;

[0063] (3) 碱法提取:在辣木籽粉匀浆液中加入氢氧化钠,调节pH值至8.0,在温度为50℃的条件下,提取50 min,冷却至室温,得混悬液;

[0064] (4) 酶解:调节混悬液pH值至7.5,加入质量为辣木籽质量2%的蛋白酶(胰酶和NS37071蛋白酶的质量比为1:1),在53℃的条件下酶解21小时,93℃灭酶40 min,9000g离心25min,分离,去除上层油脂,所得上清液为富含辣木籽蛋白肽的酶解液;

[0065] (5) 分级醇沉:真空浓缩辣木籽酶解液至固形物含量35%,加入预冷至6℃的无水乙醇,使得体系中乙醇含量达到15%(按质量计),300 r/min室温匀速搅拌5h后,5000g离心25min,得到上清液;将上清液浓缩至固形物含量35%,加入预冷至6℃的无水乙醇,使得体系中乙醇含量达到50%(按质量计),300 r/min室温匀速搅拌5h后,5000g离心25min,得到沉

淀;加入沉淀湿重9倍的去离子水,溶解后,真空浓缩,冷冻干燥,得到粉末;

[0066] (6)大孔树脂富集:将粉末溶于水中,浓度为150 mg/mL,过安伯莱特XAD-16大孔树脂柱,采用0-60 vol%乙醇溶液进行8个柱体积梯度洗脱,流速为2mL/min,具体为:1-3个柱体积采用100 vol %水洗脱;4-6 个柱体积采用75 vol %水、25 vol %乙醇洗脱;6-7个柱体积采用45 vol %水、55 vol % 乙醇洗脱;7-8 个柱体积采用40 vol % 水、60 vol % 乙醇洗脱;收集60%(v/v)乙醇洗脱液,冷冻干燥,得具有强抗氧化活性的辣木籽蛋白肽2。

[0067] 所得蛋白肽2中,蛋白质含量为91%,水分含量为7%,ORAC值为1500 $\mu\text{mol Trolox equiv/g}$ 。

[0068] 实施例3

[0069] 从辣木籽中提取强抗氧化蛋白肽的方法,包括以下步骤:

[0070] (1)高温蒸煮:将新鲜辣木籽烘干后去壳粉碎,过60目筛,在110℃条件下高温蒸煮辣木籽粉50min;

[0071] (2)高压均质:取经高温蒸煮后的辣木籽粉,按照料液比1:8 g/mL加入去离子水,以10000rpm的速率剪切20分钟,过胶体磨2次,得辣木籽匀浆液,40 MPa高压均质2次;

[0072] (3)碱法提取:在辣木籽粉匀浆液中加入氢氧化钠,调节pH值至9.0,在温度为60℃的条件下,提取60 min,冷却至室温,得混悬液;

[0073] (4)酶解:调节混悬液pH值至8.0,加入质量为辣木籽质量3%的蛋白酶(胰酶和NS37071蛋白酶的质量比为3:2),在56℃的条件下酶解24小时,96℃灭酶50 min,10000 g离心30min,分离,去除上层油脂,所得上清液为富含辣木籽蛋白肽的酶解液;

[0074] (5)分级醇沉:真空浓缩辣木籽酶解液至固形物含量40%,加入预冷至8℃的无水乙醇,使得体系中乙醇含量达到20%(按质量计),400 r/min室温匀速搅拌6h后,6000 g离心30 min,得到上清液;将上清液浓缩至固形物含量40%,加入预冷至8℃的无水乙醇,使得体系中乙醇含量达到60%(按质量计),400 r/min室温匀速搅拌6h后,6000 g离心30 min,得到沉淀;加入沉淀湿重10倍的去离子水,溶解后,真空浓缩,冷冻干燥,得到粉末;

[0075] (6)大孔树脂富集:将粉末溶于水中,浓度为200 mg/mL,过安伯莱特XAD-16大孔树脂柱,采用0-60 vol%乙醇溶液进行8个柱体积梯度洗脱,具体为:1-3个柱体积采用100 vol %水洗脱;4-6 个柱体积采用50 vol %水、50 vol % 乙醇洗脱;7-8 个柱体积采用40 vol % 水、60 vol % 乙醇洗脱。收集60%(v/v)乙醇洗脱液,冷冻干燥,得具有强抗氧化活性的辣木籽蛋白肽3。

[0076] 所得蛋白肽3中,蛋白质含量为93%,水分含量为6%,ORAC值为1550 $\mu\text{mol Trolox equiv/g}$ 。

[0077] 对比例1

[0078] 从辣木籽中提取辣木籽蛋白肽的方法,包括以下步骤:

[0079] (1)高温蒸煮:将新鲜辣木籽烘干后去壳粉碎,过60目筛,在110℃条件下高温蒸煮辣木籽粉50min;

[0080] (2)高压均质:取经高温蒸煮后的辣木籽粉,按照料液比1:8 g/mL加入去离子水,以10000rpm的速率剪切20分钟,过胶体磨2次,得辣木籽匀浆液,40 MPa高压均质2次;

[0081] (3)碱法提取:在辣木籽粉匀浆液中加入氢氧化钠,调节pH值至9.0,在温度为60℃的条件下,提取60 min,冷却至室温,得混悬液;

[0082] (4) 酶解: 调节混悬液pH值至8.0, 加入质量为辣木籽质量3%的蛋白酶(胰酶和NS37071蛋白酶的质量比为3:2), 在55℃的条件下酶解24小时, 95℃灭酶50 min, 8000 g离心30min, 分离, 去除上层油脂, 所得上清液为富含辣木籽蛋白肽的酶解液;

[0083] (5) 分级醇沉: 真空浓缩辣木籽酶解液至固形物含量40%, 加入预冷至4℃的无水乙醇, 使得体系中乙醇含量达到20% (按质量计), 400 r/min室温匀速搅拌4h后, 4000 g离心20 min, 得到上清液; 将上清液浓缩至固形物含量40%, 加入预冷至4℃的无水乙醇, 使得体系中乙醇含量达到60% (按质量计), 400 r/min室温匀速搅拌4h后, 4000 g离心20 min, 得到沉淀; 加入沉淀湿重10倍的去离子水, 溶解后, 真空浓缩, 冷冻干燥, 得到辣木籽蛋白肽4。

[0084] 所得蛋白肽4中, 蛋白质含量为68%, 水分含量为7%, ORAC值为540 $\mu\text{mol Trolox equiv/g}$ 。

[0085] 由实施例1~3和对比例1可知, 实施例与对比例最大区别在于: 实施例使用了大孔树脂富集技术, 通过实施例1~3制备的辣木籽肽蛋白含量高、抗氧化能力强, 辣木籽肽蛋白含量以及ORAC值分别对比例的1.35倍和2.70~2.87倍。

[0086] 本发明通过高温蒸煮、高压均质、碱法提取、酶解、分级醇沉、大孔树脂富集去杂联合处理, 可获得蛋白含量高、抗氧化活性强的辣木籽肽, 可广泛应用于食品领域中。