

低苯丙氨酸花生肽混合物的制备

Preparation of low phenylalanine peptides mixture from peanut protein

李志刚¹ 光翠娥^{1,2} 于建平²

LI Zhi-gang¹ GUANG Cui-e^{1,2} GAN Jian-ping²

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 黄冈师范学院经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室 & 大别山特色资源开发湖北省协同创新中心, 湖北 黄冈 438000)

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;
2. Hubei Key Laboratory of Economic Forest Germplasm Improvement and Resources Comprehensive Utilization & Hubei Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation of Dabie Mountains, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000, China)

摘要:为了制备适合开发低苯丙氨酸特膳食品的原料,花生蛋白经碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L 及木瓜蛋白酶降解后,通过单因素及正交试验分别确定了风味蛋白酶 Flavourzyme 水解及活性炭吸附工艺。结果显示,在 50 ℃, pH 6.5 及添加 3 500 U/g 风味蛋白酶水解 5 h, 水解所得游离苯丙氨酸可达 28.65 mg/100 mL。添加 7 g/100 g 活性炭, 于 35 ℃、pH 3.0 条件下吸附 2.5 h, 苯丙氨酸去除率可达 98.64%。经氨基酸及分子量分析显示, 产物中苯丙氨酸含量大幅下降(0.61 mg/100 mL), 主要为 600 Da 以下的寡肽和游离氨基酸, 适合将来为苯丙酮尿症患者制备特殊医学配方食品。

关键词:花生蛋白; Flavourzyme; 活性炭; 苯丙酮尿症; 低苯丙氨酸肽混合物

Abstract: In order to prepare original material for developing low phenylalanine special food, the peanut protein was degraded by Alcalase 2.4L and papain, the hydrolysis by Flavourzyme and the removal of phenylalanine by activated carbon were determined by signal and orthogonal tests separately. The optimal parameters were found to be hydrolysis temperature 50 ℃, pH 6.5, enzyme/substrate 3 500 U/g and time 5 h, which resulted in a content of free phenylalanine of 28.65 mg/100 mL in hydrolysates. The removal of phenylalanine with 7 g/100 g activated carbon powder was conducted at 35 ℃, pH 3.0 for 2.5 h and the removal rate of phenylalanine could reach 98.64% under these parameters. The amino acids and molecular

weight analysis showed a significant decrease for the content of phenylalanine (0.61 mg/100 mL) and the molecular weight was below 600 Da, mainly including oligopeptides and free amino acids. The resulting product could be used to prepare special medical formula foods in the future.

Keywords: peanut protein; Flavourzyme; activated carbon; phenylketonuria; low phenylalanine peptides mixture

苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)是一种由苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)代谢过程中的辅酶四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH₄)缺乏或苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)活性丧失或合成不足,导致 Phe 无法被正常代谢^[1]的常见隐性遗传氨基酸代谢症。现阶段推荐通过饮食管理达到治疗的目的,即控制患者每日饮食摄入的 Phe^[2-3]。在采取普通严格低蛋白饮食时,患者可能会出现如不饱和脂肪酸、维生素及矿物质等营养素缺乏症^[4-6],因此推荐食用低苯丙氨酸特殊医学配方食品补充患者每日所需蛋白质、维生素及矿物质等营养素。目前,此类特膳食品主要为低/无苯丙氨酸游离氨基酸配方食品^[7-8]。但此类特膳食品适口性差,存在由于摄入过多游离氨基酸而致腹泻的风险^[8]。通过蛋白酶水解天然蛋白,分离 Phe 后所得低苯丙氨酸肽混合物可用于为 PKU 患者制备特殊医学配方食品^[9]。

目前,制备低苯丙氨酸肽混合物的原料主要以乳清蛋白^[10-12]和酪蛋白^[7,13]等动物性蛋白为主,而对植物蛋白的开发利用主要以不含过敏源的玉米蛋白^[14]、小麦蛋白^[15]及大米蛋白^[16]为原料。由于花生蛋白含有大分子过敏性蛋白^[9]限制了对它的开发利用,针对这一现状,本研究通过多酶分步深度降解花生蛋白,再利用活性炭吸附分离 Phe 制备不含过敏性蛋白的低苯丙氨酸肽混合物,一方面为花生蛋白

基金项目:经济林木种质改良与资源综合利用湖北省重点实验室 & 大别山特色资源开发湖北省协同创新中心联合开放基金项目(编号:2017AW01);国家自然科学基金项目(编号:31201289)

作者简介:李志刚,男,江南大学在读硕士研究生。

通信作者:光翠娥(1976—),女,江南大学副教授,博士。

E-mail:guang1226@hotmail.com

收稿日期:2017-08-03

的应用提供新方向,另一方面为将来制备适合 PKU 患者食用的特殊医学配方食品提供更多的原料选择。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与amp;仪器

1.1.1 材料与amp;试剂

花生蛋白:粗蛋白含量 73.69%,陕西森弗天然制品有限公司;

Alcalase2.4L:食品级,19 8761 U/mL,诺维信(中国)投资有限公司;

Flavourzyme:食品级,38 810 U/mL,诺维信(中国)投资有限公司;

木瓜蛋白酶:食品级,169 704 U/g,广西庞博生物工程有限公司;

三氯乙酸、氢氧化钠、浓盐酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠等:分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司;

粉末活性炭:食品级,200 目,椰壳制,江苏森森碳业有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

电子天平:EL204 型,PL20002 型,梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;

pH 计:FE-20 型,梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司;

紫外可见光分光光度计:UV-1600 型,上海美普达仪器有限公司;

电热恒温水槽:DK-8D 型,上海精宏实业有限公司;

氨基酸专用高效液相色谱仪:Agilent1100 型,美国安捷伦科技有限公司;

高效液相色谱仪:Waters600 型,美国沃特世有限公司。

1.2 方法

1.2.1 游离 Phe 含量测定及氨基酸组成分析 采用 OPA 柱前衍生高效液相色谱—紫外检测法。

(1) 色谱条件:色谱柱:Agilent Hypersil ODS 柱(5 μm , 4.0 mm $\times$ 250 mm);梯度洗脱程序:0 min,8%;17 min,50% B;24.0 min,0% B;流动相 A(pH=7.2):27.6 mmol/L 醋酸钠—三乙胺—四氢呋喃(体积比为 500:0.11:2.5);流动相 B(pH=7.2):80.9 mmol/L 醋酸钠—甲醇—乙腈(体积比为 1:2:2);流动相流速 1.0 mL/min;柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;紫外检测波长:330 nm,脯氨酸于 263 nm 处检测。

(2) 游离 Phe 含量测定样品处理:取一定量酶水解样品,用 10 g/100 g 三氯乙酸等体积稀释,静置 1 h,经双层滤纸过滤后取 1 mL 滤液于离心管内,15 000 r/min 离心 20 min,取 400 μL 上清液于液相小瓶,待测。

(3) 氨基酸组成分析样品处理:取 1 mL 样品于水解管内,依次添加 12 mol/L HCl 1 mL 和 6 mol/L HCl 6 mL,充氮封管,置于 120 $^{\circ}\text{C}$ 鼓风干燥箱内水解 22 h。水解完成后冷却至室温,添加 10 mol/L NaOH 4.8 mL 中和盐酸,转移至 25 mL 容量瓶内用去离子水定容,0.45 μm 水系微滤膜过滤,取 1 mL 滤液于离心管内,于 15 000 r/min 离心 10 min,取

400 μL 上清液于液相小瓶,待测。

1.2.2 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 单因素试验

配制 4 g/100 g 花生蛋白溶液,于 90 $^{\circ}\text{C}$ 热处理 20 min。热处理完成后冷却至 60 $^{\circ}\text{C}$,调节溶液 pH 至 8.0,添加 35 $\mu\text{L/g}$ Alcalase2.4L 水解 110 min。水解完成后沸水浴灭酶 10 min,冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$,调节 pH 至 7.0,添加 5 000 U/g 木瓜蛋白酶水解 3 h。水解完成后沸水浴灭酶,冷却至室温后 6 000 r/min 离心 10 min,取上清液用于 Flavourzyme 再水解。

(1) 温度对 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的影响:取等量水解液 5 份分别预热至 40,45,50,55,60 $^{\circ}\text{C}$,调节 pH 至 7.0,均添加 2 500 U/g Flavourzyme 水解 2.0 h。水解完成后沸水浴灭酶 10 min,待冷却至室温后测定游离 Phe 含量。

(2) pH 对 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的影响:取等量水解液 5 份预热至 50 $^{\circ}\text{C}$,调节 pH 至 5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,添加 2 500 U/g Flavourzyme 水解 2.0 h。水解完成后沸水浴灭酶 10 min,待冷却至室温后测定游离 Phe 含量。

(3) 酶浓度对 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的影响:取等量水解液 6 份预热至 50 $^{\circ}\text{C}$,调节 pH 至 6.5,分别添加 1 500,2 000,2 500,3 000,3 500,4 000 U/g Flavourzyme 水解 2.0 h。水解完成后沸水浴灭酶 10 min,待冷却至室温后测定游离 Phe 含量。

(4) 水解时间对 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的影响:取等量水解液 6 份,调节 pH 至 6.5,均添加 3 000 U/g Flavourzyme,分别水解 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0 h。水解完成后沸水浴灭酶 10 min,待冷却至室温后测定游离 Phe 含量。

1.2.3 Flavourzyme 水解正交试验 在单因素试验的基础上,固定水解时间为 5 h,选择温度、pH 及酶浓度为正交试验因子,以水解所得游离 Phe 为指标,设计三因素三水平正交试验。

1.2.4 活性炭吸附分离 Phe 活性炭是一种有极大比表面的多孔疏水性极性吸附剂,能够特异性地吸附芳香族氨基酸。Phe 在 260 nm 处有最强紫外吸收峰^[17-18],而非芳香族氨基酸在 210~220 nm 处有紫外吸收峰,因此,以吸附前后 OD_{260} 的变化计算去除率,以 OD_{220}/OD_{260} 衡量活性炭吸附效果^[19]。

(1) pH 对吸附效果的影响:取水解液 5 份预热至 35 $^{\circ}\text{C}$,分别调节 pH 至 2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,均添加 5 g/100 g 粉末活性炭,静态吸附 2.0 h。吸附完成后过滤,滤液稀释 10,20 倍后分别测定 OD_{260} 、 OD_{220} ,计算去除率及 OD_{220}/OD_{260} 。

(2) 温度对吸附效果的影响:取水解液 5 份分别预热至 25,30,35,40,45 $^{\circ}\text{C}$,均调整 pH 至 3.5,添加 5 g/100 g 粉末活性炭,静态吸附 2.0 h。吸附完成后过滤,滤液稀释 10,20 倍后分别测定 OD_{260} 、 OD_{220} ,计算去除率及 OD_{220}/OD_{260} 。

(3) 活性炭用量对吸附效果的影响:取水解液 4 份预热

至 35 ℃,调整 pH 至 3.5,分别添加 3,5,7,9 g/100 g 粉末活性炭,静态吸附 2.0 h。吸附完成后过滤,滤液稀释 10,20 倍后分别测定 OD_{260} 、 OD_{220} ,计算去除率及 OD_{220}/OD_{260} 。

(4) 时间对吸附效果的影响:取水解液 5 份预热至 35 ℃,均调整 pH 至 3.5,添加 7 g/100 g 粉末活性炭,分别静态吸附 0.5,1.0,1.5,2.0,2.5,3.0 h。吸附完成后过滤,滤液稀释 10,20 倍后分别测定 OD_{260} 、 OD_{220} ,计算去除率及 OD_{220}/OD_{260} 。

1.2.5 活性炭吸附正交试验 在单因素试验的基础上,固定吸附时间为 2.5 h,选择 OD_{220}/OD_{260} 为指标,以温度、pH 及活性炭用量为正交试验因子,设计三因素三水平正交试验。

1.2.6 分子量分布分析

(1) 色谱条件:色谱柱:TSK gel 2000 SWXL (7.8 mm×300 mm);紫外检测器检测波长:330 nm;流动相:乙腈—水—三氟乙酸(体积比为 40:60:0.05);流速:0.5 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL;混合标准品:细胞色素 C (MW12500)、杆菌酶(MW1450)、乙氨酸—酪氨酸—精氨酸(MW451)、乙氨酸—乙氨酸—乙氨酸(MW189)。

(2) 样品处理:样品经 0.45 μm 水系微滤膜过滤。

1.2.7 数据处理 试验重复 3 次,采用 Origin 9.0 及 SPSS 20 进行数据处理与分析。

2 结果与分析

2.1 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe

2.1.1 温度对 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的影响 温度对蛋白酶的水解反应有两方面的影响:① 通过影响分子热运动而影响水解速率;② 影响蛋白酶的活性^{[20]202}。由图 1 可知,随温度的上升,分子热运动加强,水解速率增快,游离 Phe 含量随之上升。当温度升至 50 ℃时,所得游离 Phe 含量达到了最高。当温度超过 50 ℃后,游离 Phe 含量下降,可能是高温致使蛋白酶变性导致活性下降。因此,Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的最适温度在 50 ℃左右。

2.1.2 pH 对 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的影响 pH 通过影响蛋白酶氨基酸侧链基团的解离状态,改变空间构型,从而对酶的活性造成影响^{[20]202-203}。由图 2 可知,在选定的 pH 下,随着 pH 的上升,水解活性增强,游离 Phe

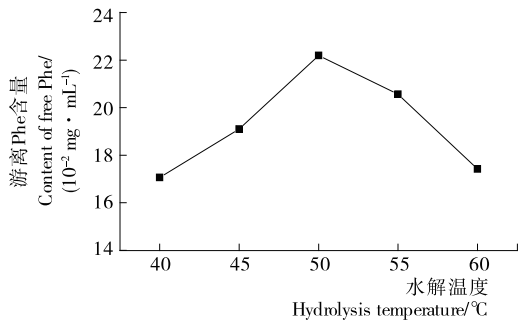


图 1 水解温度对游离 Phe 含量的影响

Figure 1 Effect of hydrolysis temperature on the content of free Phe

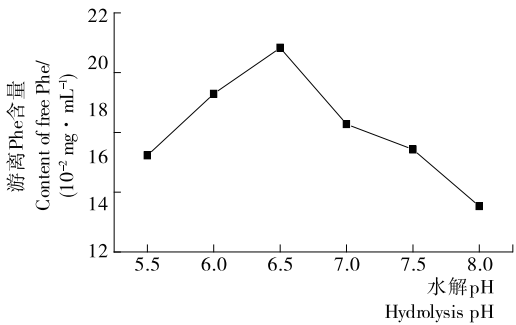


图 2 水解 pH 对游离 Phe 含量的影响

Figure 2 Effect of hydrolysis pH on the content of free Phe

含量也随之上升。当 pH 升至 6.5 时游离 Phe 含量达到了最高,继续升高 pH,其含量随之下降,可能是过高的 pH 导致酶的空间构型发生变化,活性下降。因此,Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的最适 pH 在 6.5 左右。

2.1.3 酶浓度对 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的影响 蛋白酶催化水解反应时,当底物浓度一定时,酶浓度的上升能加速水解过程^{[20]205}。由图 3 可知,随着酶浓度的上升,游离 Phe 含量随之上升。当浓度升至 3 000 U/g 时,游离 Phe 含量增幅减缓,因此选择 3 000 U/g 为 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的最适酶浓度。

2.1.4 水解时间对 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的影响 当其他水解条件一定时,水解时间同产物成正比^{[20]209-210}。由图 4 可知,随着水解时间的增加,游离 Phe 含

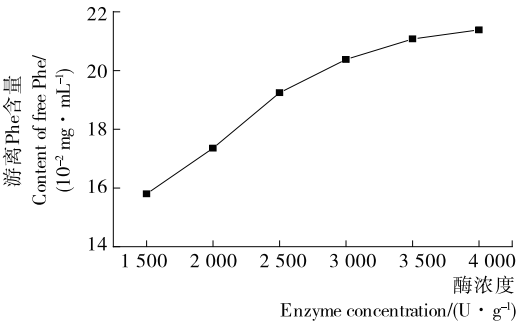


图 3 酶浓度对游离 Phe 的影响

Figure 3 Effect of enzyme concentration on the content of free Phe

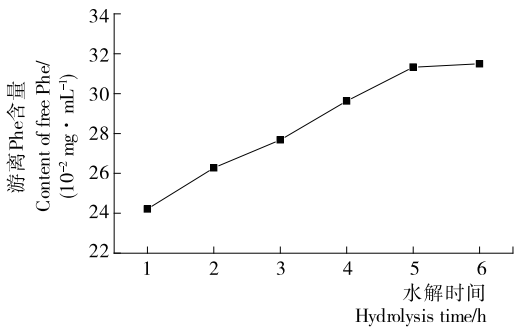


图 4 水解时间对游离 Phe 含量的影响

Figure 4 Effect of hydrolysis time on the content of free Phe

量随之上升,但水解 5 h 后所得游离 Phe 趋于稳定。这是由于蛋白酶的水解作用具有位点特异性,随着水解程度的加深,可供酶水解的位点逐渐减少,水解产物趋于平衡^[21]。因此水解时间为 5 h 为宜,后续试验固定水解时间为 5 h。

2.2 Flavourzyme 水解正交试验

正交试验设计及结果见表 1、2。

表 1 水解正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test for hydrolysis

水平	A 温度/℃	B pH	C 酶浓度/(U · g ⁻¹)
1	45	6.0	2 500
2	50	6.5	3 000
3	55	7.0	3 500

表 2 水解正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test for hydrolysis

试验序号	A	B	C	游离 Phe 含量/ (10 ⁻² mg · mL ⁻¹)
1	1	1	1	25.21
2	1	2	2	27.47
3	1	3	3	27.38
4	2	1	2	28.16
5	2	2	3	28.42
6	2	3	1	24.50
7	3	1	3	26.55
8	3	2	1	26.14
9	3	3	2	21.71

<i>k</i> ₁	26.68	26.64	25.28	
<i>k</i> ₂	27.03	27.34	25.78	
<i>k</i> ₃	24.80	24.53	27.45	
极差 <i>R</i>	2.23	2.81	2.17	

由表 2 可知,影响 Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的因素主次为 $R_B>R_A>R_C$,最佳水解工艺为 50 ℃,酶浓度 3 500 U/g,pH 6.5,水解 5 h。经次重复实验验证,在此工艺条件下水解所得游离 Phe 可达 28.65 mg/100 mL。

2.3 活性炭分离 Phe

2.3.1 温度对吸附效果的影响 由图 5 可知,温度的上升有利于 Phe 的吸附。超过 35 ℃时,Phe 去除率下降,活性炭对其他氨基酸的吸附增加导致吸收示差下降。因此,活性炭吸附 Phe 的合适温度在 35 ℃左右。

2.3.2 pH 对吸附效果的影响 pH 一方面影响氨基酸在体系中的存在形式,另一方面通过影响活性炭分子表面的带电情况而改变吸附能力^[22-23]。由图 6 可知,pH 的上升有利于 Phe 的去除,pH 超过 3.0 时,活性炭对 Phe 的吸附能力下降,对其他氨基酸的吸附能力增加导致吸收示差下降。因此,活性炭吸附去除 Phe 的最适 pH 在 3.0 左右。

2.3.3 活性炭用量对吸附效果的影响 由图 7 可知,随着活性炭用量的增加 Phe 去除率及吸收示差均出现上升现象。

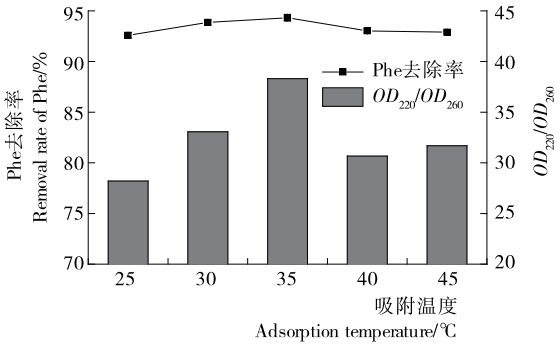


图 5 吸附温度对 OD_{220}/OD_{260} 及 Phe 吸附率的影响
Figure 5 Effect of adsorption temperature on the value of OD_{220}/OD_{260} and the removal rate of Phe

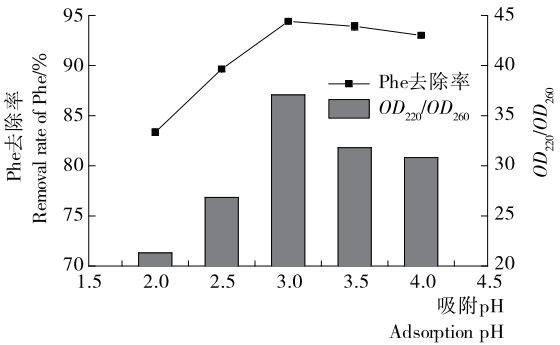


图 6 吸附 pH 对 OD_{220}/OD_{260} 及 Phe 去除率的影响
Figure 6 Effect of adsorption pH on the value of OD_{220}/OD_{260} and the removal rate of Phe

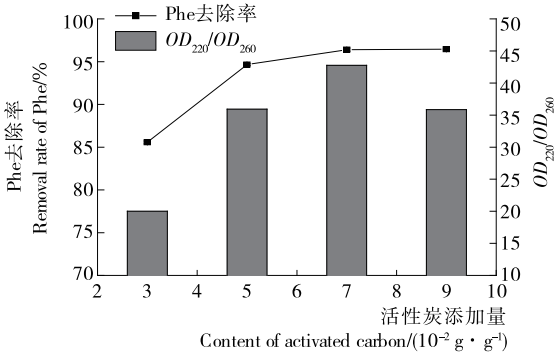


图 7 活性炭添加量对 OD_{220}/OD_{260} 及 Phe 去除率的影响
Figure 7 Effect of the content of activated carbon on the value of OD_{220}/OD_{260} and the removal rate of Phe

当添加量增至 7 g/100 g 时,Phe 去除率趋于平缓,继续增加用量对 Phe 去除率的贡献有限,吸收示差的下降说明活性炭对其他氨基酸的吸附逐渐增强。因此,活性炭适宜添加量在 7 g/100 g 左右。

2.3.4 吸附时间对吸附效果的影响 在活性炭吸附过程中,其不仅特异地吸附 Phe,对非芳香族氨基酸也有一定的吸附能力^[22-23]。由图 8 可知,吸附时间的延长有利于 Phe 的去除,但长时间的吸附会导致其他氨基酸大量损失,从而导致吸收示差大幅下降。因此,活性炭吸附 Phe 的时间应在 2.5 h 左右为宜,后续正交试验固定水解时间为 2.5 h。

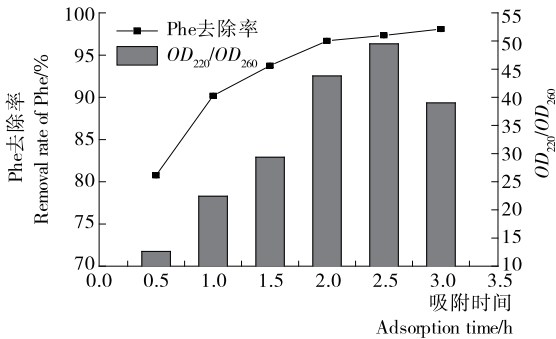


图 8 吸附时间对 OD_{220}/OD_{260} 及 Phe 去除率的影响
Figure 8 Effect of adsorption time on the value of OD_{220}/OD_{260} and the removal rate of Phe

2.4 活性炭吸附正交试验

吸附正交试验设计及结果见表 3、4。

表 3 吸附正交试验因素水平表

Table 3 Factors and levels of orthogonal tests for adsorption

水平	A 温度/℃	B pH	C 活性炭用量/ (10 ⁻² g · g ⁻¹)
1	30	2.5	5
2	35	3.0	7
3	40	3.5	9

表 4 吸附正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal test for adsorption

试验序号	A	B	C	OD_{220}/OD_{260}
1	1	1	1	45.47
2	1	2	2	48.33
3	1	3	3	46.80
4	2	1	2	46.27
5	2	2	3	49.87
6	2	3	1	45.29
7	3	1	3	43.32
8	3	2	1	46.19
9	3	3	2	45.47
k_1	46.69	45.02	45.65	
k_2	47.14	48.13	46.69	
k_3	44.99	45.85	46.66	
极差 R	2.15	3.11	1.04	

由表 4 可知,影响活性炭吸附效果的主次因素为 $R_B > R_A > R_C$,最佳工艺为吸附温度 35 ℃,pH 3.0,活性炭用量 7 g/100 g。经 3 次平行实验验证,在此工艺条件下吸附 2.5 h, OD_{220}/OD_{260} 可达 49.95,Phe 去除率达到 98.64%。

2.5 氨基酸组成分析

花生蛋白经蛋白酶水解及活性炭吸附处理后,所得产物氨基酸组成见表 5,氨基酸图谱见图 9。由表 5 可知,经活性炭吸附后 Phe 仅占 17 种总氨基酸含量的 0.09%,符合 GB

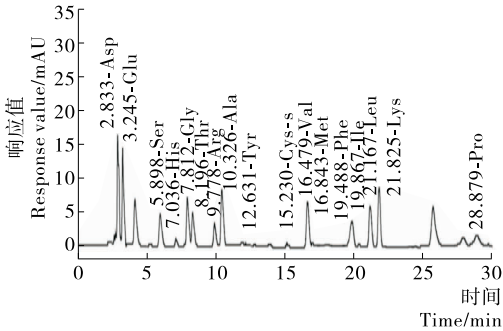


图 9 低苯丙氨酸肽混合物氨基酸图谱
Figure 9 Amino acid spectrum of low phenylalanine peptides mixture

表 5 低苯丙氨酸肽混合物氨基酸组成[†]

Table 5 Amino acid composition of low phenylalanine peptides mixture

氨基酸	含量/(10 ⁻² mg · mL ⁻¹)
Asp(天冬氨酸)	121.27
Glu(谷氨酸)	113.64
Ser(丝氨酸)	39.48
His(组氨酸)	15.15
Gly(甘氨酸)	35.78
Thr(苏氨酸)	35.05
Arg(精氨酸)	40.97
Tyr(酪氨酸)	0.71
Cys-s(半胱氨酸)	1.29
Val(缬氨酸)	57.98
Met(蛋氨酸)	6.59
Pro(脯氨酸)	30.18
Phe(苯丙氨酸)	0.61
Leu(亮氨酸)	59.29
Ile(异亮氨酸)	36.67
Lys(赖氨酸)	49.79
Trp(色氨酸)	—
Ala(精氨酸)	40.97

[†] “—”表示未检测。

29922—2013 中关于 PKU 患者专用特膳食品中 Phe 含量不得高于 1.5 mg/g 蛋白等同物的要求,因此,通过本工艺获得的低苯丙氨酸肽混合物适合将来为 PKU 患者制备特膳食品。

2.6 分子量分布分析

花生蛋白虽然是一种具有较高营养价值的植物蛋白,但由于含有分子量在 10~70 kDa 的过敏性蛋白^[24],限制了其在食品行业的应用。由图 10 可知,经蛋白酶水解及活性炭吸附,产物分子量主要为 600 Da 以下的低聚肽和游离氨基酸,过敏性蛋白被去除。人体对蛋白质的吸收主要以低聚肽的形式为主^[25],因此,通过本工艺获得的低苯丙氨酸肽混合物是一种不含过敏蛋白的可用于制备低苯丙氨酸特殊医学配方食品的原料。

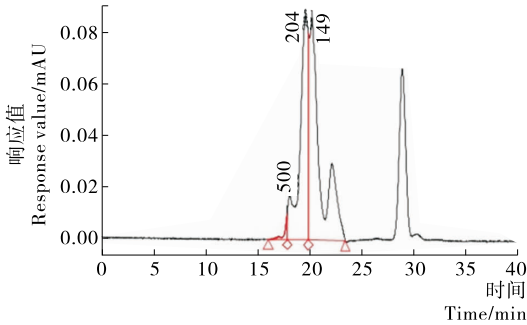


图 10 低苯丙氨酸肽混合物分子量分布图谱
Figure 10 Molecular weight chromatogram of low phenylalanine peptides mixture

3 结论

通过试验发现,Flavourzyme 水解花生蛋白释放游离 Phe 的最佳工艺条件为:温度 50 ℃,pH 6.5,酶添加量为 3 500 U/g,水解 5 h,在此工艺条件下游离 Phe 含量可达 28.65 mg/100 mL。所得水解液添加 7 g/100 g 活性炭,于 35 ℃,pH 3.0,吸附 2.5 h,Phe 去除率可达 98.64%, OD_{220}/OD_{260} 达到 49.95。所得产物中 Phe 仅占总氨基酸的 0.09%,且主要为 600 Da 以下的低聚肽及游离氨基酸,不含过敏性蛋白,完全满足 GB 29922—2013 中,关于 PKU 患者特膳食品中 Phe 限量(≤ 0.15 mg/g 蛋白质等同物)的要求,适合将来为此类患者制备不同品类的特膳食品。

参考文献

[1] CLEARY M A. Phenylketonuria[J]. *Pediatrics & Child Health*, 2011, 21(2): 61-64.

[2] 侯岚,高媛,宋利. 苯丙酮尿症的研究进展[J]. *中国实用医药*, 2007, 2(24): 116-118.

[3] STRISCIUGLIO P, CONCOLINO D. New strategies for the treatment of phenylketonuria (PKU)[J]. *Metabolites*, 2014, 4(4): 1 007-1 017.

[4] ZANNINI E, KINGSTON W, ARENDT E K, et al. Technological challenges and strategies for developing low-protein/protein-free cereal foods for specific dietary management[J]. *Food Research International*, 2013, 54(1): 935-950.

[5] FEILLET F, AGOSTONI C. Nutritional issues in treating phenylketonuria[J]. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2010, 33(6): 659-664.

[6] GIOVANNINI M, VERDUCI E, SALVATICI E, et al. Phenylketonuria: nutritional advances and challenges[J]. *Nutrition & Metabolism*, 2012, 9(1): 1-7.

[7] 吴乐斌,刘汉民,胡晨旭,等. 一种用于苯丙酮尿症儿童的配方粉及其制备方法: 中国, CN10298604.9[P]. 2014-06-26.

[8] 周志伟,张嘉芷,许永红,等. 低苯丙肽配方食品的研制[J]. *食品工业科技*, 1999(S1): 96-100.

[9] 盛晓静,王强,石爱民,等. 制备低苯丙氨酸特膳食品的研究进展[J]. *食品科学*, 2016, 37(21): 285-290.

[10] CÉLIAMA G, GILSONA P, CHARLESDF J, et al. Producing a phenylalanine-free pool of peptides after tailored enzymatic

hydrolyses of cheese whey[J]. *Journal of Food Engineering*, 2009, 91(1): 109-117.

[11] LARA G M, IZUMI M, GREENE L J, et al. Preparation and scaling up of a low phenylalanine enzymatic hydrolysate of bovine whey proteins[J]. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, 41(4): 459-466.

[12] LOPES D C F, DELVIVO F M, JANUARIO J N, et al. Phenylalanine removal from whey hydrolysates[J]. *Journal of Food Technology*, 2013(2): 191-197.

[13] VASCONCELLOS A M, OLIVEIRA C P, GRASSIANO D M, et al. Adsorption of phenylalanine from casein hydrolysates[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 1992, 37(1): 69-80.

[14] CAPOBIANGO M, LOPES D C F, CARREIRA R L, et al. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2007, 3(6): 1-19.

[15] CARREIRA R L, SILVA M R, STARLING A L P, et al. Association of two enzymes for obtaining low phenylalanine protein hydrolysates from wheat flour[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2008, 4(7): 99-107.

[16] SILVESTRE M P C, VIEIRA C R, SILVA M R, et al. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolyzing rice proteins aiming at phenylalanine removal[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2009, 5(1): 64-67.

[17] 董欣,王丽燕. 氨基酸紫外光谱的再测定[J]. *德州学院院报*, 2015(2): 44-46.

[18] 陈瑞锋,陈璐,陈延登. 用活性炭分离纯化苯丙氨酸与酪氨酸的研究[J]. *浙江工业大学学报*, 2006, 34(4): 373-376.

[19] 王梅,谷文英,沈蓓英. 活性炭色谱法分离制备高 F 值寡肽混合物[J]. *食品与生物技术学报*, 1998, 17(4): 41-45.

[20] 王璋,许时婴,汤坚. *食品化学*[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.

[21] 胡学智,王俊. 蛋白酶生产和应用的进展[J]. *工业微生物*, 2008, 38(4): 49-61.

[22] 赵振国,金明钟. 氨基酸在固/水界面的吸附作用[J]. *离子交换与吸附*, 2001, 17(5): 289-295.

[23] 高强,徐耀,吴东,等. 氨基酸在固体表面的吸附[J]. *化学进展*, 2007, 19(6): 1 016-1 025.

[24] 丛艳君,程永强,薛文通. 花生致敏蛋白的研究进展[J]. *食品科学*, 2005, 26(S1): 176-178.

[25] 程云辉,文新华. 生物活性肽制备的研究进展[J]. *食品与机械*, 2001(4): 4-5.