

高温瞬时  $\alpha$  化大米蛋白质酶促水解性能的测定朱益波<sup>1</sup>, 张建华<sup>2</sup>

1(常熟理工学院生物与食品工程系, 江苏常熟, 215500) 2(江南大学生物工程学院, 江苏无锡, 214036)

**摘要** 经单因素和正交实验优化, 高温瞬时  $\alpha$  化大米的蛋白质酶促水解条件为: pH3.0, 温度 30℃, 液固质量比为 15, 水解时间 3 h, 加酶量为 2.0 SAPU/g(米粉)。在该水解条件下测定不同处理条件下大米的酶促水解  $\alpha$  氨基氮含量, 揭示了其在高温瞬时  $\alpha$  化过程中的变化规律, 在一定程度上可用于指导生产。

**关键词**  $\alpha$ -氨基氮, 高温瞬时  $\alpha$  化, 酶促水解

高温瞬时  $\alpha$  化是一种全新的使原料淀粉糊化的方法。该技术中, 采用高温空气替代水蒸汽, 在高温、瞬时及流化的条件下处理原料大米, 具有彻底解决废水污染、节能环保、缩短传统酿造业生产周期以及产品易于保存等优点, 是食用酒酿制工业中一项具有相当发展潜力的技术<sup>[1,2]</sup>。已有研究表明, 大米中的蛋白质是成品酒中氨基氮的重要来源之一<sup>[3,4]</sup>, 氨基酸也是大米酿造酒中重要的风味物质, 不同的氨基酸呈现不同的味道, 它分解生成的高级醇与黄酒中的有机酸酯化后生成的多种酯类物质是构成酒体香味的重要组成部分; 此外, 由于氨基酸与空气中的氧气接触发生褐变, 与酒液中糖类的羰基结合生成类黑精(或称氨基糖), 都是使酒体色度加深的重要原因<sup>[5]</sup>; 另外, 过多的氨基酸带入酒体中容易引起浑浊, 影响货架寿命。而在高温瞬时  $\alpha$  化处理大米过程中, 蛋白质因发生美拉德反应、氨基残基脱水、脱氨、交联变性等作用而使蛋白质的酶促水解性能大幅下降, 所以在采用高温瞬时  $\alpha$  化技术处理大米时, 其处理后大米中蛋白质的酶促水解性能被认为是评价  $\alpha$  化大米的重要质量指标, 因此对其测定方法进行探讨很有必要。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新鲜糯米(市售); 酸性蛋白酶 GC106(无锡杰能科酶制剂厂), 酶活力 1 000 SAPU/g(注: 1SAPU 是指在特定分析条件下, 每分钟从酪素释放 1  $\mu$ mol 酪氨酸所需的酶量); 标准 NaOH 溶液; 0.2mol/L pH3.0、pH4.0、pH5.0 柠檬酸钠缓冲溶液; 中性甲醛溶液; 36%~38%(无缩合沉淀); 去 CO<sub>2</sub> 水, 按 GB/T603 制备。

第一作者: 硕士, 讲师。

收稿日期: 2007-01-08, 改回日期: 2007-06-01

精密酸度计, 梅特勒托利多仪器公司; TDL-40B 离心机, 上海安亭科学仪器厂; MA40 水分天平, Sartorius; 中试高温瞬时  $\alpha$  化处理机, 江南大学科技园百泰酒业有限公司提供。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 大米的预处理

30℃喷雾增湿, 保温 5 min 后冷风吹干表面水分, 经处理后原料大米的干基含水量在 30%左右。

#### 1.2.2 大米水分含量的测定

将大米粉碎, 过 100 目筛, 立即称取约 20 g 于 MA40 水分天平上测定含水量。

#### 1.2.3 氨基氮含量的测定

甲醛滴定法, 取新鲜水解液 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 10 mL, 加入 10 mL 中性甲醛, 以 0.01 mol/L NaOH 标准溶液滴定待测水解液, 采用精密酸度计指示滴定终点(终点 pH 为 9.20), 记录碱液的消耗量, 扣除空白后计算出氨基氮含量。

#### 1.2.4 $\alpha$ 化大米的水解步骤

准确称取 15.00 g 粉碎过筛后的高温瞬时  $\alpha$  化大米粉(事先测定好水分含量)转入 500 mL 三角瓶, 加入适量柠檬酸钠缓冲溶液搅拌均匀, 然后加入适量酸性蛋白酶 GC106, 混合均匀后保鲜膜封住瓶口, 于 30℃水浴振荡水解, 水解液过滤备用。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶水解条件的确立

#### 2.1.1 水解液液固质量比对蛋白质水解程度的影响

水解条件为: pH3.0, 温度 30℃, 水解 3 h, 加酶量为 2.0SAPU/g 米粉, 选择蒸馏水与  $\alpha$  化大米粉的质量比分别为 5、10、15、20 共 4 个水平分别进行水解测定。液固质量比对水解程度的影响如图 1 所示。因净耗碱量与氨基氮含量成正线性相关, 故图 1 中以净耗碱量代替水解程度。从图 1 可以看到, 耗碱量随

液固比的升高有所变化,表现出先增高后降低的趋势。其原因可能为:液固质量比是影响蛋白质水解的重要因素,因为液固比的不同会影响水解液的黏度以及酶与底物接触的几率。液固质量比过高,则水解液中酶与底物的结合机率降低;过低则水解液粘度较大,不利于传质从而不利于酶的水解。适当增大液固质量比,降低了体系的粘度,可以加快传质进程,有助于酶的水解作用,而当液固质量比达到 20 时,则因加水量的过多而大大降低了酶与蛋白质互相作用的机率,导致水解程度较低。由液固质量比在 15 时,水解所表现出的水解程度最高,故选取水解液的液固质量比为 15。

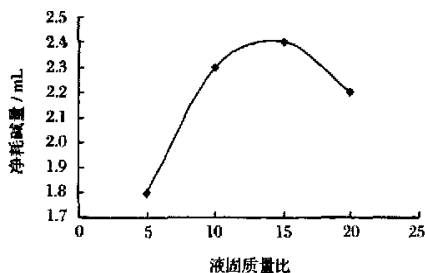


图1 不同液固质量比对水解程度的影响

### 2.1.2 水解时间对蛋白质水解程度的影响

水解条件为: pH 3.0, 温度 30℃, 加酶量为 2.0 SAPU/g(米粉), 液固质量比为 15。从第 60 min 开始每隔 30 min 取水样离心测定氨基酸含量。结果见图 2。

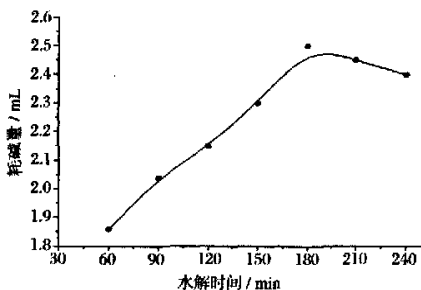


图2 水解时间对蛋白质水解程度的影响

由图 2 可知,蛋白质水解程度随水解时间的增加而增加,到 180 min 左右,水解程度达到最高,随后开始稍有下降。在理论上,酶的水解时间越长,蛋白质的水解程度越高,但是在水解 3 h 后水解程度却开始表现出下降,其原因可能是随着水解时间的延长,水解液中淀粉颗粒充分溶胀,使得水解液的黏度越来越大,传质越来越慢而使得水解难以进行下去,同时水

解产生的游离氨基酸吸附在淀粉颗粒上而表现出游离氨基酸含量的减少<sup>[6]</sup>。另外,在较长时间的水解过程中,酶活性的下降可能也是其原因之一。综上所述,选择水解时间 180 min 后进行游离氨基酸的测定较为合适。

### 2.1.3 加酶量对蛋白质水解程度的影响

水解条件为: pH 3.0, 温度 30℃, 液固质量比为 15, 水解 3 h, 加酶量分别改变为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 SAPU/g(米粉)进行水解测定。结果见图 3。

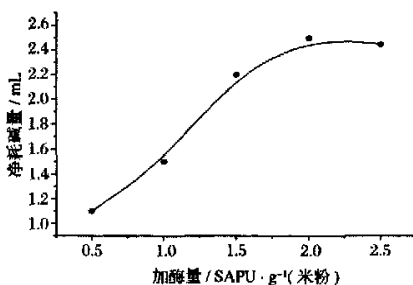


图3 不同加酶量对蛋白质水解程度的影响

由图 3 可知,在加酶量较低时,蛋白质水解程度随着加酶量的增加而提高,当加酶量提高到 2.0 SAPU/g(米粉)后,再继续增加加酶量,对于提高蛋白质的水解程度没有明显的增强作用。这可能是由于酶量的增加加强了酶与底物的结合,由此可引起单位时间内氨基酸含量的升高,但当加酶量增大到一定数值时,蛋白质分子与酶的结合达到平衡,加酶量不再是提高蛋白质水解速率的限制性因素,所以水解速率的增加随着加酶量的增大变得平缓。当酶用量在 2.0 SAPU/g(米粉)时,相同的水解条件下产生的游离氨基酸含量最高,所以选择蛋白质水解的加酶量为 2.0 SAPU/g(米粉)。

### 2.1.4 蛋白质水解条件的正交实验优化

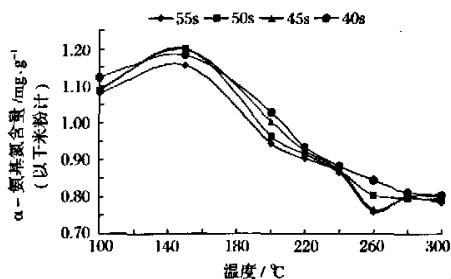
在初步确定水解时间、加酶量的条件下,根据酸性蛋白酶 GC106 的特性,设计了正交实验(L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>))进一步优化水解条件。正交实验结果见表 1。由结果可知,R 值的大小分别为 A>D>B>C。说明水解温度影响最大,其次是加酶量和时间,pH 的影响较小,因为其本身为酸性蛋白酶,且稳定 pH 范围为 3.0~5.0。最佳的水解条件为 A<sub>1</sub>B<sub>3</sub>C<sub>1</sub>D<sub>3</sub>,在正交试验中并无此条件,需做补充实验加以验证,验证结果为净耗碱量 2.60 mL。综上所述,最后确定水解条件为: pH 3.0, 温度 30℃, 液固质量比为 15, 水解时间 3 h, 加酶量为 2.0 SAPU/g(米粉)。

表1 正交实验结果及分析

实验号	温度/℃ (A)	时间/h (B)	pH (C)	加酶量/SAPU·g <sup>-1</sup> (米粉) (D)	净耗碱量/mL
1	A(1) 30	B(1) 1	C(1) 3.0	D(1) 1.0	1.85
2	30	B(2) 2	C(2) 4.0	D(2) 1.5	2.00
3	30	B(3) 3	C(3) 5.0	D(3) 2.0	2.45
4	A(2) 40	1	4.0	2.0	1.75
5	40	2	5.0	1.0	1.70
6	40	3	3.0	1.5	2.15
7	A(3) 50	1	5.0	1.5	1.05
8	50	2	3.0	2.0	1.60
9	50	3	4.0	1.0	1.05
K <sub>1</sub>	6.30	4.65	5.60	4.60	
K <sub>2</sub>	5.60	5.30	4.80	5.20	
K <sub>3</sub>	3.70	5.65	5.20	5.80	
R	2.60	1.00	0.80	1.20	

## 2.2 高温瞬时 $\alpha$ 化处理大米过程对蛋白质酶促水解的影响

对于不同高温瞬时 $\alpha$ 化条件(不同温度和不同 $\alpha$ 化时间)下处理的大米按上述方法进行了酶促水解,并测定了水解产生的 $\alpha$ -氨基氮的含量,结果如图4所示。

图4 不同 $\alpha$ 化处理条件下大米的酶促水解氨基氮含量

从图4可以看到, $\alpha$ 化大米水解液中的 $\alpha$ 氨基氮含量一开始随着 $\alpha$ 化温度的升高而上升,但当 $\alpha$ 化温度超过150℃, $\alpha$ 化大米水解液中氨基氮含量开始下降。其原因可能是由于在温度开始升高到150℃的过程中,蛋白质的分子振动加剧,氢键被打破,蛋白质折叠被打开,使得其有利于蛋白酶的水解,从而显示出水解液中氨基氮含量的升高。在这个过程中同时发生的蛋白质的非酶促脱氮以及复杂的美拉德反应使得蛋白质之间发生交联使其酶解性能下降。当温度继续升高到280℃左右,由于美拉德反应的加剧以及蛋白质的过度变性,使得蛋白质的酶水解性能持续降低,在这个过程中蛋白质之间氨基酸残基脱水、脱氮等反应使得蛋白质分子发生交联点增多,酶的作用点减少或丧失,可溶性降低,酶解性能下降<sup>[7,8]</sup>,从而显示出水解液中的氨基氮含量持续减少。另外,可以

看到,在同一温度下, $\alpha$ 化时间较长的氨基氮含量相对较低。由图4可以看出,温度高于260℃,氨基氮含量达到一个比较稳定的状态。

## 3 结论

(1)高温瞬时 $\alpha$ 化大米蛋白质的酶促水解条件单因素的试验表明,最佳液固质量比为15;最佳的水解时间为3 h;最佳的加酶量为2.0SAPU/g(米粉)。

(2)经正交实验优化,并经验证实验优化后的水解条件为:pH 3.0,温度30℃,液固质量比为15,水解时间3 h,加酶量为2.0SAPU/g(米粉)。该水解条件能够较好地反映出大米经高温瞬时 $\alpha$ 化处理后蛋白质酶促水解的变化情况,为高温瞬时 $\alpha$ 化处理大米的重要指标——可酶促水解氨基氮含量的测定提供了可靠的方法。

(3)高温瞬时 $\alpha$ 化处理大米使大米中蛋白质的酶促水解性能发生剧烈改变,随着处理温度的升高,其变化也越为明显,总体表现出水解性能的下降,并且在同一处理温度下,处理时间长变化也越为明显。

(4)由大米经高温瞬时 $\alpha$ 化后蛋白质酶解性能变化的规律有助于指导生产,可根据产品的需要生产出不同质量的 $\alpha$ 化大米。

## 参考文献

- 1 贝沼禎介. 焙炒技術の清酒製造への応用[C]. '97 国际酒文化研讨论文集. 上海: 学林出版社, 1998. 39~43
- 2 朱益波, 张建华, 史仲平, 等. 人工神经网络结合遗传算法在焙炒大米过程中的应用[J]. 食品与生物技术, 2004, 23(3): 51~56
- 3 王树英, 徐 岩. 中国黄酒与日本清酒氨基酸成分和成因

- 研究与分析[J]. 酿酒, 1997, (6): 10~11
- 4 陈靖显. 论黄酒中氨基酸态氮含量的相关因素[J]. 食品与发酵工业, 1992, 18(2): 83~88
- 5 周建弟. 浅谈黄酒中的氨基酸及其含量的控制[J]. 酿酒科技, 2002, (4): 73~73
- 6 姚菁华, 肖雷. 谷氨酸菌体蛋白的酶解实验研究[J]. 淮海工学院学报, 2002, (4): 52~55
- 7 McKee T, McKee J R. Biochemistry An Introduction(第2版)[M]. 北京, McGraw-Hill, 1999, 93~106
- 8 Ramanakoppa H Nagaraj. Protein cross-linking by the millard reaction. [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1996 (32): 19 338~19 345

## The Measurement of Enzymatic Hydrolyze $\alpha$ -amino Nitrogen Content of Heat Blast Rice

Zhu Yibo<sup>1</sup>, Zhang Jianhua<sup>2</sup>

1(Departemtn of Food and Biotkechnology, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

2(College of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT** The research shows that the optimization result of enzymatic hydrolyze protein in heat blast rice is: pH value 3.0, 30℃, quality ratio of liquid to rice powder 15, 3-hour hyclrolyzation and 2.0SAPU /g rice powder. The paper also shows the trend line of enzymatic hydrolyze  $\alpha$ -amino nitrogen content during the process of heat blast.

**Key words**  $\alpha$ -amino nitrogen, heat blast process, enzymatic hydrolyze,

市场动态

### 婴幼儿奶粉市场凸显马太效应

法国达能集团发布公告称,欲以每股55欧元的价格收购欧洲最大婴儿食品生产商荷兰纽密科 Numico 公司,此番收购意味着达能将重返中国奶粉市场。业内资深人士表示,就日益成熟的国内婴幼儿奶粉市场而言,现在就判断达能前景甚好尚为时过早,但此举会对整个市场格局产生冲击是不争事实,比较明显的结果将是市场的马太效应在婴幼儿奶粉领域愈发凸显,高端婴幼儿奶粉市场尤其如此,具备三大核心竞争力而牢牢占据高端市场的美赞臣、雀巢、雅培等企业将强者愈强、大者恒大。

从2006年下半年开始,“配方升级”和“涨价”就成为婴幼儿奶粉的热点关键词,而涨价实际上也是配方升级导致的市场效应。婴幼儿奶粉市场的竞争早已不是简单的价格竞争,技术竞争将是行业的主要竞争方向之一,其中配方始终是最具竞争力的元素。比如2006年,美赞臣升级的A+系列奶粉、雀巢的能恩金盾,包括伊利、三鹿等系列产品都宣称含有DHA、ARA、胆碱等促进婴幼儿脑部发育的营养元素。众商家的“脑部营养”配方升级战成为奶粉行业去年年底最热门的话题。品牌营销专家劳兵表示,纵观我国婴幼儿奶粉市场的竞争态势,产品的销售不仅需要品牌、价格、渠道、服务等方面的支撑,还要有创新技术做后盾。奶粉企业大打升级概念牌,一方面是市场需求所致,但更大程度上是企业出于抢占市场、赢得市场口碑的战略考虑。现阶段,国际品牌正是不断改造、调整配方,使其更接近母乳,牢牢掌控着高端市场的风向标。

在以品牌、价值、创新为核心的综合竞争时代,企业向消费者销售的不仅仅只是物理概念上的商品,更须传递企业品牌的特有文化,让消费者认可品牌价值,从而再次拉动市场发展。就我国目前中外企业对垒的婴幼儿奶粉市场而言,国内企业与外企最大差异在于品牌建设方面,洋品牌更侧重品牌营销的实施。他们纷纷打出社会公益牌进行品牌建设,例如“母婴平安120活动”、援助艾滋病治疗事业等都是洋品牌品牌建设的佳作。通过开展一系列的品牌建设活动,洋品牌成功的提升了品牌美誉度,让消费者从品牌认识到文化价值认可的高度,由此带来的经济效益也让众洋品牌尝到甜头。品牌建设是国内婴幼儿企业的软肋之一,也是最需借鉴的地方。

2006年调查数据显示,在美国,前三甲的美赞臣、雅培、雀巢公司占据市场份额高达97.1%。究其原因,除了上述因素外,用户忠诚度是造就几大品牌战绩辉煌的要因。知名市场调查机构AC尼尔森曾对京、沪、粤3地医务人员进行一次奶粉品牌认知认可与推荐度的调查,8成以上被访者都选择洋品牌奶粉。更直接的说,相当一部分消费者会选择有品质保证、服务到位的大品牌产品来进行消费。这便可以说明为何婴幼儿奶粉高端市场一直被这些洋品牌牢牢占据,而目前上位的洋品牌也是具备相当实力的知名企业。