

# 有限酶解米渣蛋白的乳化功能特性表征\*

吴 姣, 郑为完, 赵伟学, 任东东

(南昌大学食品科学教育部重点实验室, 江西南昌, 330047)

**摘 要** 讨论了米渣蛋白经碱性内切蛋白酶 Alcalase 2.4L FG 水解后, 水解度(DH)分别为 3、4、5、6、10 的有限酶解米渣蛋白的乳化活性、乳化稳定性、溶解性、表面张力、粘度、样品乳状液粒度分布等特性, 并与米渣蛋白、大米分离蛋白、国外进口酪氨酸钠进行比较。结果表明, 有限酶解米渣蛋白的乳化功能特性大大优于大米分离蛋白和米渣蛋白, 并且得到有限酶解米渣蛋白(DH=4)的乳化性比国外进口的酪氨酸钠佳, 但乳化稳定性次于酪氨酸钠。综合结果表明, DH=4 的有限酶解米渣蛋白的乳化功能特性很好。

**关键词** 米渣蛋白, 有限酶解, 乳化功能

蛋白质具有趋向聚集于空气和水的界面的特性, 特别适合稳定泡沫和其它乳化液<sup>[1]</sup>。通过蛋白改性提高乳化性能的方法主要是根据蛋白本身结构特点而定, 其有效方法主要有基因工程、化学改性和酶改性等。通过基因工程或选择性的酶和化学水解途径可以使合适的、较短伸展结构的蛋白成为效果好的乳化剂。基因工程改性蛋白提高乳化性工艺在技术及成本等方面目前还存在很多不足, 因此未能产业化, 现在应用得比较多的是化学改性和酶法改性。化学改性具有成本低、速度快的优点, 但具有过程难以控制、工业污染严重等缺点, 相对这 2 点缺陷, 酶法则具有明显优势, 因此得到广泛应用。目前国内应用酶法改性增强蛋白乳化性能的报道已有不少<sup>[2-4]</sup>, 大部分研究认为, 酶法水解提高蛋白乳化特性的关键是要控制酶水解的水解度, 水解度过高, 会导致蛋白肽分子量过低, 并几乎完全亲水而蛋白质的乳化性能降低; 水解度过低, 蛋白的溶解性不好, 导致蛋白质分子不能完全展开, 乳化性不佳所以经过适度水解(有限水解)能提高蛋白质的乳化功能性质。

实验中用碱性内切蛋白酶 Alcalase 2.4L FG 对米渣蛋白进行适度水解, 控制水解度(DH)范围在 3~10, 得到不同 DH 的有限酶解米渣蛋白, 分别对不同 DH 的产物的乳化活性、乳化稳定性、溶解性、表面张力、粘度、样品乳状液粒度分布等特性进行表征分析, 渴望得到一种乳化功能性高的有限酶解米渣蛋白。

## 1 实验部分

### 1.1 主要试剂

第一作者: 硕士研究生。

\* 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(批准号: IRT0540)

收稿日期: 2007-05-16, 改回日期: 2007-07-24

米渣蛋白(营养成分见表 1), 江西维尔宝食品生物有限公司提供; 大米分离蛋白(营养成分见表 1), 江苏宝宝集团公司提供; 碱性内切酶(Alcalase 2.4L FG 活力: 2.4AU/mL), Novozymes 公司; 酪氨酸钠, 德国进口; 0.1% 十二烷基磺酸钠(SDS)溶液。

表 1 米渣蛋白、大米分离蛋白营养成分含量

样品	水分 /%	灰分 /%	碳水化合物 /%	蛋白质 /%	脂肪 /%
米渣蛋白	4.5	3.7	24.9	64	2.3
大米分离蛋白	2.1	2.6	10.8	83	1.2

### 1.2 主要仪器

8500 型紫外可见分光光度计, 上海天美公司; FSH-II 高速电动匀浆器, 江苏金坛市环宇; DST-60 表面张力分析, 韩国 SEO 公司; Nicomp 380/ZLS 激光纳米粒度测定仪, 美国 PSS 公司; DV-III UL-TF 数字流变仪, 美国 Brookfield 公司, 恒温水浴锅; 电子分析天平。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 米渣有限水解产物的制备

米渣(干基)→加水调浆→调 pH 值到 8.3→加适量 Alcalase 2.4L FG 酶水解(在线滴加 NaOH)→灭酶→离心→取上清液→喷雾干燥→有限酶解米渣蛋白粉(备用)。

根据 pH-stat 法水解过程, 通过控制酶解过程 NaOH 的加入量, 即可控制该过程的水解度, 分别称取 5 份新鲜米渣, 控制 NaOH 的加入量分别为 0、9、18、27、63 mL, 测得水解液的水解度分别是 3、4、5、6、10。

#### 1.3.2 pH-stat 法水解过程

用蒸馏水配制底物溶液, 在相应 pH 值和温度下平衡 15 min, 再按比例加入适量酶液。反应过程维持 pH 值恒定, 记录不同 t 时刻为维持该 pH 值恒定

而消耗的碱液量,以不加酶的底物为空白。产物水解度  $DH$  定义为蛋白质中被水解的肽键的比例,由式(1)计算<sup>[8]</sup>。

$$DH/\% = \frac{e}{a \times m_p \times h_i} \times 100 \quad (1)$$

式中: $e$  为所消耗的碱液的当量数; $m_p$  为底物中蛋白质质量,  $g$ ;  $h_i$  为单位质量蛋白质肽键当量数,米渣蛋白的  $h_i$  为  $7.40 \text{ meq/g}$ ;  $a$  为  $\alpha\text{-NH}_3^+$  的平均解离度,可由式(2)计算:

$$a = [10^{(\text{pH}-\text{pK})}]/[1+10^{(\text{pH}-\text{pK})}] \quad (2)$$

其中  $\text{pK}$  为  $\alpha\text{-NH}_3^+$  的平均  $\text{pK}$ , 计  $7.0$ ;  $\text{pH}$  为反应起始的  $\text{pH}$ 。

### 1.3.3 水解液乳化性及其稳定性测定

采用浊度法<sup>[8]</sup>,并做适当调整。取固形物含量为  $2\%$  的样品水溶液  $10 \text{ mL}$ , 搅拌的同时加入  $3 \text{ mL}$  食用油, 然后  $10\,000 \text{ r/min}$  下高速剪切乳化  $2 \text{ min}$ , 制成乳状液。立即用微量进样器准确量取容器底部乳状液  $50 \mu\text{L}$ , 以  $25 \text{ mL } 0.1\%$   $\text{SDS}$  溶液稀释, 充分混匀, 于  $500 \text{ nm}$  波长处测定吸光值 ( $A_{\text{OD}}$ ), 其中空白为以  $25 \text{ mL } 0.1\%$   $\text{SDS}$  溶液稀释的  $50 \mu\text{L}$  水解液。以乳化性指数表示乳化性,  $5 \text{ min}$  后再次测定其吸光值 ( $A'_{\text{OD}}$ ), 并计算乳化稳定性。每个数据测定  $3$  次取平均值。

$$\text{乳化性指数}(EAI) = A_{\text{OD}} \times 100$$

$$\text{乳化稳定性指数}(ESI) = A'_{\text{OD}}/A_{\text{OD}} \times t$$

其中  $t$  为前后  $2$  次测定吸光值所间隔的时间 ( $5 \text{ min}$ )。

### 1.3.4 溶解性的测定

取固形物含量为  $2\%$  的样品水溶液  $20 \text{ mL}$ ,  $100^\circ\text{C}$  加热  $30 \text{ min}$  充分溶解后, 在  $3\,000 \text{ r/min}$  下离心分离  $30 \text{ min}$ 。将上清液倾出,  $105^\circ\text{C}$  烘干称重计算其溶解性。每个数据测定  $3$  次取平均值。公式如下:

$$\text{溶解性}/\% = \frac{\text{上清液烘干后质量}}{\text{原料质量}} \times 100$$

### 1.3.5 米渣酶法水解产物的其它乳化功能特性测定

表 2 样品乳化功能特性的测定

编号	样品	乳化性(EAI)	乳化稳定性(ESI)	溶解性/%	表面张力/ $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$	粘度/ $\text{cp}$
1	有限酶解米渣蛋白( $DH=3$ )	$33.21 \pm 0.0238$	$138.3 \pm 8.3$	$83.80 \pm 0.8$	$29.982 \pm 0.011$	$1.38 \pm 0.03$
2	有限酶解米渣蛋白( $DH=4$ )	$37.74 \pm 0.0117$	$145.7 \pm 11.9$	$83.84 \pm 0.7$	$29.5814 \pm 0.010$	$1.38 \pm 0.01$
3	有限酶解米渣蛋白( $DH=5$ )	$35.93 \pm 0.0213$	$119.0 \pm 7.1$	$86.29 \pm 1.3$	$30.0922 \pm 0.023$	$1.38 \pm 0.03$
4	有限酶解米渣蛋白( $DH=6$ )	$34.22 \pm 0.0093$	$85.6 \pm 3.3$	$89.08 \pm 0.9$	$33.9244 \pm 0.009$	$1.38 \pm 0.01$
5	有限酶解米渣蛋白( $DH=10$ )	$27.59 \pm 0.0158$	$76.2 \pm 5.5$	$89.24 \pm 1.8$	$34.5727 \pm 0.006$	$1.15 \pm 0.09$
6	米渣蛋白	$12.81 \pm 0.0140$	$56.1 \pm 8.0$	$7.05 \pm 0.5$	$45.5586 \pm 0.120$	$1.15 \pm 0.05$
7	大米分离蛋白	$9.55 \pm 0.0052$	$20.1 \pm 1.2$	$10.37 \pm 2.1$	$50.6951 \pm 0.015$	$1.15 \pm 0.07$
8	酪氨酸钠	$26.95 \pm 0.0200$	$157.6 \pm 3.7$	$86.08 \pm 0.6$	$49.3325 \pm 0.008$	$3.45 \pm 0.02$

注:水的表面张力为  $54.1492 \text{ mN/m}$ 。

取固形物含量为  $2\%$  的样品水溶液  $20 \text{ mL}$ , 对其进行表面张力、粘度及样品乳状液粒度特性表征, 每个数据测定  $3$  次取平均值。

### 1.3.5.1 表面张力的测定

每种液体都有一定的表面张力, 当向水中加入乳化剂后, 其表面张力会明显下降。这是因为水中加入乳化剂后, 乳化剂的亲水基团溶于水, 而亲油基团被水推开而指向空气, 部分或全部水面被定向排列的亲油基团覆盖, 将水-空气界面变成了亲油基团-空气界面。由于油的表面张力小于水, 故乳化剂水溶液表面张力小于水的表面张力。随着乳化剂种类不同及用量不同, 其降低水的表面张力的程度也不同。表面张力越小, 乳化性越好。

采用脱环法, 利用  $\text{DST-60}$  表面张力分析仪进行测定,  $T=20^\circ\text{C}$ ,  $C=0.618 \text{ g/cm}$ ,  $R/r=54.285 \text{ 7}$ 。

### 1.3.5.2 粘度测定

乳状液分散介质的粘度对乳状液的稳定性有一定影响, 一般地, 分散介质的粘度越大, 则分散相液珠运动速度越慢, 有利于乳状液的稳定性。

利用  $\text{BROOKFIELD DV-III}$  数字流变仪进行测定,  $T=25^\circ\text{C}$ ,  $v=10 \text{ s}^{-1}$ , 转子型号  $\text{cp40}$ 。

### 1.3.5.3 粒度分布的测定

取固形物含量为  $2\%$  的样品水溶液  $10 \text{ mL}$ , 一边搅拌一边加入  $3 \text{ mL}$  食用油, 然后在  $10\,000 \text{ r/min}$  下高速剪切乳化  $2 \text{ min}$ , 制成乳状液。利用  $\text{Nicomp 380/ZLS}$  激光纳米粒度测定仪测定各组乳状液的粒度分布, 并分别记录乳状液的粒度随时间变化情况。

## 2 结果与讨论

### 2.1 乳化功能特性的测定

$DH$  分别为  $3, 4, 5, 6, 10$  的有限酶解米渣蛋白以及未经水解的米渣蛋白、大米分离蛋白、酪氨酸钠的乳化性、乳化稳定性、溶解性、表面张力、粘度进行测定, 每个数据测定  $3$  次取平均值, 测定结果如表 2。

通过 SPSS 软件对  $DH$  分别为 3、4、5、6、10 的有限酶解米渣蛋白的乳化性、乳化稳定性、溶解性、表面张力、粘度进行单因素方差分析,结果如表 3。

表 3 方差分析

项 目	平方和	自由度	均方	F 值	P
乳化性	组间 177.641	4	44.410	6 486.398	<0.000 1
	组内 0.068	10	0.007		
乳 化	组间 11 560.588	4	2 890.147	112 021.197	<0.000 1
	组内 0.258	10	0.026		
稳定性	组间 86.906	4	21.726	3 034.419	<0.000 1
	组内 0.072	10	0.007		
表面张力	组间 46.633	4	11.658	8.692	0.003
	组内 13.412	10	1.341		
粘 度	组间 0.092	4	0.023	2.167	0.147
	组内 0.106	10	0.011		

表 3 数据表明,对于不同水解度的有限酶解米渣蛋白的 5 项乳化功能特性测定的结果,只有粘度的  $P$  值大于 0.05,说明不同  $DH$  的有限酶解米渣蛋白对于粘度的测定在  $P=0.05$  水平上没有显著性差异;其它 4 项都有极显著差异。并且通过对乳化性、

乳化稳定性、溶解性、表面张力的直观分析可以看出  $DH=4$  的有限酶解米渣蛋白的乳化功能特性最佳。

将乳化功能特性最佳的  $DH=4$  的有限酶解米渣蛋白与米渣蛋白、大米分离蛋白和酪氨酸钠进行直观分析和方差分析,结果显示  $DH=4$  的有限酶解米渣蛋白的五项乳化功能特性指标大大优于大米分离蛋白和米渣蛋白, $P$  值均小于 0.01,有极显著差异;与酪氨酸钠相比, $P$  值均小于 0.01,有极显著差异,直观分析乳化性、表面张力更优,但乳化稳定性和溶解性不及酪氨酸钠佳。

## 2.2 粒度分布表征

乳状液中的滴珠大小并不是完全均匀的,而是各种大小都有,并有一定分布的,人们常用分布曲线反映乳状液液珠大小分布的情况。分布曲线是根据实验测得的颗粒大小分布将各种尺寸范围内颗粒数目  $dn/dx$  在总体颗粒( $N$ )中所占有分数(作纵坐标)对液珠直径(横坐标)作图得到的<sup>[6,7]</sup>。

表 4 各样品乳状液的粒度分布

	$DH=3$	$DH=4$	$DH=5$	$DH=6$	$DH=10$	米渣蛋白	大米分离蛋白	酪氨酸钠
颗粒平均粒径/nm	240.6	190.8	234.9	289.9	292.2	1477.0	547.5	545.3
25%颗粒的粒径分布	<78.9	<92.1	<78.5	<113.4	<254.5	<298.1	<207.5	<296.7
50%颗粒的粒径分布	<149.8	<148.5	<148.0	<201.2	<287.4	<597.7	<372.9	<540.2
75%颗粒的粒径分布	<294.1	<239.7	<287.8	<360.8	<324.4	<1602.8	<679.5	<683.3
90%颗粒的粒径分布	<543.2	<369.0	<526.6	<611.5	<361.9	<4 222.0	<1 169.3	<994.9
99%颗粒的粒径分布	<1 453.1	<773.1	<1 396.2	<1 483.0	<436.8	<12 268	<2 892.2	<1 898.3

注: $DH=3$  表示  $DH=3$  的有限酶解米渣蛋白,依次类推。

从表 4 可看出,米渣蛋白乳状液的粒度分布较差,且平均粒度大,经有限酶解之后,所有有限酶解米渣蛋白的乳状液颗粒粒径明显减小, $DH=10$  的有限酶解米渣蛋白乳状液的粒度分布非常集中,这也可以看出深度水解后绝大多数的蛋白大分子物质都被水解, $DH=4$  的有限酶解米渣蛋白的乳状液的平均粒度最小( $D=190.8\text{nm}$ ),比米渣、大米分离蛋白乳状液、酪氨酸钠乳状液的平均粒径都要小。且上述各样中只有有限酶解米渣蛋白( $DH=4$ )乳状液和酪氨酸钠乳状液粒径分布成正态的高斯分布(如图 1 和图 2)。这是由于乳状液液珠的粒径会影响乳状液液滴上浮或沉降的速度,粒径越小者则速度会越慢,所以从粒径的分布又再次可以证明有限酶解后的米渣蛋白的乳化稳定性明显得以改善,且有限酶解米渣蛋白( $DH=4$ )乳状液稳定性佳。

由于乳状液是不稳定的体系,它的液珠大小分布是随时间不断变化的。通过液珠大小分布随时间变

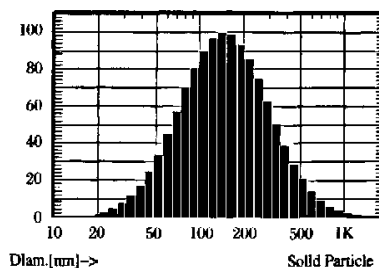


图 1 有限酶解米渣蛋白( $DH=4$ )乳状液粒度分布的关系可以衡量乳状液的稳定性。酪氨酸钠和有限酶解米渣蛋白( $DH=4$ )的乳状液在 6 h 内的平均粒径的变化如图 3 所示。

由图 3 可知,酪氨酸钠乳状液的平均粒径随时间基本不发生变化,而有限酶解米渣蛋白( $DH=4$ )乳状液的平均粒径会随着时间增加而增大,这可能是由于有限酶解米渣蛋白乳状液发生了絮凝和聚结,原来小液珠的液膜被破坏,形成体积较大而界面面积较小

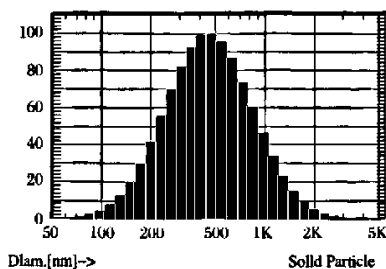


图2 酪氨酸钠乳状液粒度分布

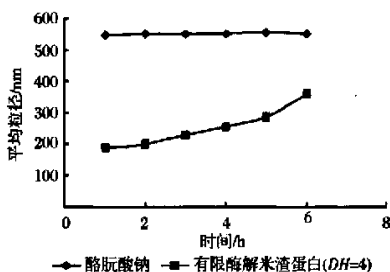


图3 平均粒径随时间的变化

的大液珠,这样就导致液珠数目减少和乳液的破坏(油水分离),从而降低了乳状液的稳定性。综合表明,酪氨酸钠的乳化稳定性要比有限酶解米渣蛋白( $DH=4$ )更佳,但乳化性不如  $DH=4$  的有限酶解米渣蛋白。

### 3 结论

采用酶法有限水解,可以很好地增加米渣蛋白的水溶性,这在一定程度上表明通过酶法有限水解改善米渣蛋白功能特性是可行的。通过米渣蛋白有限水解产物乳化功能表征研究结果表明,有限酶解米渣蛋白( $DH=4$ )具有很好的乳化功能性质,这将给米渣“变废为宝”的再次利用提供理论依据。

### 参考文献

- 1 王 璋,许时婴,汤 坚. 食品化学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999. 123~190
- 2 金世合,陈正行,周素梅. 酶解米糠蛋白的功能性质[J]. 食品工业科技,2004,(3):56~58
- 3 玄国东,何国庆,熊皓平,等. 大米蛋白酶法改性及酶解物功能特性研究[J]. 中国粮油学报,2005,20(3):1~4
- 4 刘 粼. 酶法有限水解对大豆分离蛋白乳化性能的影响[J]. 中国粮油学报,2000,15(1):26~29
- 5 Surowka K, Zmudzinski D, Fik M, et al. New protein preparations from soy flour obtained by limited enzymic hydrolysis of extrudates[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2004, 5: 225~234
- 6 梁治齐,李金华编. 功能性乳化剂与乳状液[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000
- 7 张 峻,齐 巍,韩志慧等编著. 食品微胶囊、超微粉碎加工技术[M]. 北京:化学工业出版社,2000
- 8 刘 粼,叶 峰,欧志敏. 蛋白质酶法有限水解过程反应机理和动力学特性[J]. 化工学报,2002,53(2):199~202

## Emulsification Characteristics of Rice Residues Protein with Limited Enzymatic Hydrolyzed

Wu Jiao, Zheng Weiwan, Zhao Weixue, Ren Dongdong

(The Key Laboratory of Food Science, Nanchang University, Ministry of Education, Nanchang 330047, China)

**ABSTRACT** Emulsification characteristics such as emulsification, emulsification stabilities, dissolution characters, surface tension, consideration and granularity gaussian distribution was studied with the Rice Residues Protein  $DH$  3,4,5,6,10, which was limited enzymatic hydrolyzed by Alcalase 2.4L FG. It can be easily seen from the investigation result that rice residues protein with limited enzymatic hydrolyzed had much better emulsification characteristics than Rice Residues Protein and rice separated protein. And the emulsification activity of the rice residues protein  $DH$  4 was better than that of sodium casein, but the emulsification stability was worse than it. In a word, rice residues protein  $DH$  4 possesses strong emulsification characteristic.

**Key words** rice residues protein, limited enzymatic hydrolysis, emulsification characteristics