

中性蛋白酶与超声波结合分离稻米淀粉及其黏滞性研究

谢新华^{1,2}, 李晓方², 肖 昕²

(1. 河南农业大学 食品科学技术学院, 河南 郑州 450002; 2. 广东省农业科学院 水稻研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 用中性蛋白酶与超声波结合提取稻米淀粉, 并用快速黏度分析仪测定稻米淀粉的黏滞性。结果显示, 用中性蛋白酶提取稻米淀粉时, 稻米淀粉的提取率为 62.3%~73.8%, 淀粉中蛋白质含量为 3.74%~4.88%; 蛋白酶与超声波结合时稻米淀粉的提取率为 72.1%~77.2%, 蛋白质含量为 0.68%~1.30%, 破损淀粉含量显著降低, 两者结合的最佳条件是酶先作用 3h, 再 50% 超声波作用 40min。中性蛋白酶与超声波结合处理所得淀粉的黏滞谱中, 峰值黏度、消减值和最终黏度都比单独酶解所得淀粉的高, 而崩解值降低; 与碱处理淀粉比, 也是峰值黏度、消减值和最终黏度升高, 崩解值降低, 这说明超声波作用没有破坏淀粉性质。中性蛋白酶与超声波结合是提取稻米淀粉的有效方法。

关键词: 稻米淀粉; 中性蛋白酶; 超声波; 黏滞性

中图分类号: S511 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2009)07-0050-04

Rice Starch Isolation by Neutral Protease and High-intensity Ultrasound

XIE Xin-hua^{1,2}, LI Xiao-fang², XIAO Xin²

(1. College of Food Science & Technology, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Rice Research Institute of Guangdong Academy of Agriculture Science, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The neutral protease and high-intensity ultrasound were combinedly used to isolate the rice starch, which viscosity was analyzed by Rapid Visco Analyzer (RVA). The results showed that the starch yield was 62.3%—73.8% with 3.74%—4.88% residual protein content by neutral protease alone, and 72.1%—77.2% with 0.68%—1.30% residual protein content by the combination of neutral protease and high-intensity ultrasound. Damaged starch content greatly decreased after sonication. The preferred combination was neutral protease digestion for 3 h followed by sonication at 50% amplitude for 40 min. The protease peak viscosity, setback viscosity and final viscosity of rice starch increased and breakdown viscosity of rice starch decreased after the combinations, which were the same to the alkaline treatment. This indicated that the high-intensity ultrasound produced no damage to starch properties. The combination of neutral protease and high intensity ultrasound was an effective technique for isolation of rice starch.

Key words: Rice starch; Neutral protease; High-intensity ultrasound; Viscosity

稻米淀粉以其独特的物理化学性质而广泛应用于食品、药品和化妆品等^[1], 与玉米和小麦淀粉相比稻米淀粉的分离较难^[2], 要获得高纯度的稻米淀粉。常用的方法有碱浸泡、表面活性剂和酶法等^[3~5], 但

是碱浸泡和表面活性剂都会造成环境污染^[6], 而酶需要的时间较长, 酶解过程中的温度也适合微生物生长^[7]。为了缩短酶解时间, 本研究利用超声波与中性蛋白酶结合来提取稻米淀粉, 并用快速黏度分

收稿日期: 2008-11-09

基金项目: 广东省自然科学基金重点资助项目(06200585); 河南农业大学博士基金(30300111)

作者简介: 谢新华(1976-), 男, 河南漯河人, 讲师, 博士, 主要从事谷物化学研究与教学。

析仪来测定稻米淀粉的黏滞性, 报道如下。

1 材料和方法

1.1 试材及仪器

籼米由广东省农科院水稻研究所提供。BUCHI—309 凯氏定氮仪(德国 BUCHI 公司), LGJ—18 型真空冷冻干燥机(上海离心机械研究所), SUPER—3 型快速黏度测定仪(澳大利亚 Newport Scientific 仪器公司), Cole—parmer500 超声波细胞破碎仪(美国 Cole—parmer 公司), W X G—4 圆盘旋光仪(上海华岩仪器设备有限公司)。牛血清白蛋白(上海伯奥生物有限公司), 中性蛋白酶 Neutrase1 (Novozymes 公司, 酶活力 1.5 AU/g), α—淀粉酶 Novozymes 公司(酶活力 10000 FAU/g)。

1.2 测定方法

凯氏定氮法测定蛋白质含量; 旋光法测定淀粉含量; 破损淀粉测定按 AACC76—30A; 用 RVA3D 测定淀粉黏滞特性, 并用配套软件分析。测定按 AACC 规程(1995 61—02)要求, 即含水率在 14 0%时, 样品量 3.00g, 蒸馏水 25.00mL^[8]。特征值用 RVU 作单位。以氢氧化钠处理稻米淀粉为对照, 蛋白酶和超声波提取稻米淀粉的处理见表 1、2。

2 结果与分析

表 1 显示, 仅用中性蛋白酶酶解米粉不能有效的将蛋白质降解。随着蛋白酶浓度的增加米粉中蛋白质含量降低, 淀粉提取率升高; 酶解时间的延长也有同样的效果, 所得淀粉中破损淀粉的含量基本一致, 与碱提取的淀粉相比破损淀粉含量有所下降。但所得米粉中蛋白质含量依然很高, 蛋白质含量在 3.79%~4.96%, 而淀粉得率在 62.3%~73.7%。这是因为稻米中的蛋白质主要是碱溶性蛋白, 在中性条件下蛋白质不能溶胀, 不利于蛋白酶的水解。

为了提高提取效果, 采用蛋白酶与超声波结合来辅助提取淀粉。在酶解前、酶解过程中、酶解后 3 个阶段分别用超声波作用米粉酶解液。超声波作用条件: 脉冲; 辐射输出控制: 25%、50%、75%。探针进入液体 3/4 深度, 酶解时采用最佳酶解条件(pH 在 6~7, 温度 50℃)。试验表明(表 2), 先进行酶解再进行超声波, 作用效果优于先超声波再酶解以及在酶解过程中作用的效果。因为在超声波作用条件下, 能量的输入不足以破坏淀粉和蛋白质的结合, 先进行蛋白酶水解可以部分破坏蛋白质和淀粉相互结合的结构, 这时蛋白酶只是水解淀粉表面结合的蛋

白, 而后续的超声波作用可以进一步破坏蛋白质和淀粉的非共价键, 使蛋白酶进一步水解蛋白, 提高淀粉和蛋白质分离。先超声波作用时, 超声波形成的气穴不足以打破淀粉包围蛋白质的结构, 故效果没有先水解后超声波作用的好。在酶解过程中的超声波作用效果比先超声波作用的好, 而比酶解后超声波差, 这可能是由于超声波在作用米粉的同时也影响了蛋白酶, 使其活性有所下降。增加超声波辐射量也同样能有效的去除蛋白质, 同时由于辐射强度增加, 淀粉破损度也增加。延长超声波作用时间淀粉提取率升高, 同样也使淀粉破损度增加。若单采用超声波来分离稻米中的蛋白质和淀粉, 分离效果不明显, 淀粉损失大。

表 1 不同处理条件下的淀粉得率、蛋白质含量和破损淀粉含量

处理	淀粉提取率 (%)	蛋白质含量 (%)	破损淀粉 (%)
NaOH 提取	74.0a	0.56c	2.60a
0.4%蛋白酶/2h	62.3b	4.96a	2.56a
0.6%蛋白酶/2h	63.1b	4.88a	2.23b
0.8%蛋白酶/2h	68.9b	4.81a	2.12b
0.4%蛋白酶/4h	65.2b	4.01a	2.21b
0.6%蛋白酶/4h	70.2a	3.94ab	2.36b
0.8%蛋白酶/4h	72.8a	3.82b	2.23b
0.4%蛋白酶/6h	66.4b	3.79b	2.45a
0.6%蛋白酶/6h	71.5a	3.74b	2.02b
0.8%蛋白酶/6h	73.7a	3.75b	2.24b

注: 同列不同字母表示差异显著(P<0.05)。下同

蛋白酶与超声波结合处理米粉悬浮液, 所得淀粉中蛋白质含量显著降低, 淀粉得率也显著增加, 与碱处理所得淀粉相比, 蛋白质含量基本达到同等水平, 淀粉得率有所提高, 淀粉破损程度下降。最后确定 0.8%中性蛋白酶先作用 3h 后, 超生波作用 40min 效果为最佳。

中性蛋白酶处理得到的淀粉与碱处理淀粉的黏滞性相比, 酶处理得到淀粉的峰值黏度和最终黏度比碱处理得到的淀粉高, 而消减值小, 崩解值差别不大。黏滞性差别的原因可能是碱处理后的淀粉中破损淀粉含量高, 以及碱处理时引入的盐造成的, 酶处理后淀粉中蛋白质残留多也是一个因素。相同酶浓度不同处理时间得到的淀粉的黏滞性差别不显著, 不同酶浓度以及相同处理时间所得淀粉之间的黏滞性, 随着酶解时间的延长淀粉的黏滞性有增加的趨勢(表 3)。

表 2 超声波和 0.8%中性蛋白酶共同作用下淀粉得率、蛋白质含量和破损淀粉含量

处理	淀粉提取率(%)	蛋白质含量(%)	破损淀粉(%)
NaOH 处理	74.0c	0.56c	2.60a
25%超声 20min 后酶解 3h	72.1d	1.30a	2.15c
25%超声 40min 后酶解 3h	73.5bc	1.28a	2.21bc
50%超声 20min 后酶解 3h	73.8bc	1.14a	2.34b
50%超声 40min 后酶解 3h	75.2b	1.12a	2.41b
75%超声 20min 后酶解 3h	75.1b	1.15a	2.45ab
75%超声 40min 后酶解 3h	76.5a	1.05a	2.55a
酶解 3h 过程中 25%超声 20min	73.6bc	0.96b	2.11c
酶解 3h 过程中 25%超声 40min	75.3b	0.98ab	2.19c
酶解 3h 过程中 50%超声 20min	76.4a	0.99ab	2.25bc
酶解 3h 过程中 50%超声 40min	77.9a	0.91b	2.31b
酶解 3h 过程中 75%超声 20min	76.1a	0.82b	1.40b
酶解 3h 过程中 75%超声 40min	77.2a	0.81b	1.51a
酶解 3h 后 25%超声 20min	74.4bc	0.76b	1.09c
酶解 3h 后 25%超声 40min	75.2b	0.77b	1.10c
酶解 3h 后 50%超声 20min	75.0b	0.71bc	1.26bc
酶解 3h 后 50%超声 40min	76.8b	0.69c	1.31b
酶解 3h 后 75%超声 20min	76.4a	0.68c	1.47ab
酶解 3h 后 75%超声 40min	77.2a	0.70bc	1.53a

表 3 中性蛋白酶处理淀粉的黏滞性

处理	峰值黏度(RVU)	崩解值(RVU)	消减值(RVU)	最终黏度(RVU)
NaOH 提取	205d	85b	34a	239c
0.04%蛋白酶/ 2h	221c	87b	23b	244bc
0.06%蛋白酶/ 2h	220c	80b	19bc	239c
0.08%蛋白酶/ 2h	230b	82b	16c	246bc
0.04%蛋白酶/ 4h	220c	89ab	34a	254b
0.06%蛋白酶/ 4h	233b	89ab	17c	250b
0.08%蛋白酶/ 4h	232b	92a	31a	253b
0.04%蛋白酶/ 6h	231b	89ab	22bc	253b
0.06%蛋白酶/ 6h	242a	98a	24b	266a
0.08%蛋白酶/ 6h	230b	98a	26b	256b

中性蛋白酶与超声波结合处理所得淀粉的黏滞谱中，峰值黏度、消减值和最终黏度都比单独酶解所得淀粉的高，而崩解值降低；与碱处理淀粉比，也是峰值黏度、消减值和最终黏度升高，崩解值降

低。在酶解的不同阶段用超声波作用米粉，所得淀粉的黏滞性没有显著差别（表 4），这说明超声波没有影响淀粉的黏滞性，因而也就没有改变淀粉的性质。

表 4 中性蛋白酶和超声波结合处理淀粉的黏滞性

处理	峰值黏度(RVU)	崩解值(RVU)	消减值(RVU)	最终黏度(RVU)
NaOH 处理	205d	85a	34d	239d
25%超声 20min 后酶解 3h	255b	81ab	58ab	313a
25%超声 40min 后酶解 3h	252b	70bc	63a	315a
50%超声 20min 后酶解 3h	251b	82ab	61a	312a
50%超声 40min 后酶解 3h	249bc	84a	48bc	297b
75%超声 20min 后酶解 3h	267a	89a	22e	289bc
75%超声 40min 后酶解 3h	249bc	72b	49bc	298b
酶解 3h 过程中 25%超声 20min	247c	78b	34d	271c
酶解 3h 过程中 25%超声 40min	248c	78b	39cd	287bc
酶解 3h 过程中 50%超声 20min	249bc	77b	34d	283c
酶解 3h 过程中 50%超声 40min	251b	80ab	37d	288bc

续表 4 中性蛋白酶和超声波结合处理淀粉的黏滞性

处理	峰值黏度(RVU)	崩解值(RVU)	消减值(RVU)	最终黏度(RVU)
酶解 3h 过程中 75%超声 20min	248bc	85a	67a	315a
酶解 3h 过程中 75%超声 40min	249bc	69bc	64a	313a
酶解 3h 后 25%超声 20min	240c	67c	64a	304ab
酶解 3h 后 25%超声 40min	239c	64c	53b	292bc
酶解 3h 后 50%超声 20min	245bc	81ab	53b	298b
酶解 3h 后 50%超声 40min	241c	78b	45c	286bc
酶解 3h 后 75%超声 20min	258b	71bc	50bc	308a
酶解 3h 后 75%超声 40min	240c	69bc	54b	294b

4 结论

在中性条件下蛋白质难以溶解, 仅用中性蛋白酶来降解蛋白质的效果较差, 结合超声波处理效果很好。试验结果表明用蛋白酶与超声波结合来降解蛋白质是可行的, 最佳条件是先用中性蛋白酶酶解 3h 后超声波作用 40min, 得到的淀粉基本与碱性蛋白酶酶解 12h 的结果相同, 这不仅缩短了蛋白酶降解蛋白质的时间, 还减少了污染。用黏度仪测定酶解蛋白和中性蛋白酶与超声波结合所得淀粉的黏滞性, 相比酶与超声波结合分离稻米淀粉的峰值黏度升高、崩解值降低、消减值增大、最终黏度升高, 这与碱分离的比较结果是一致的, 由此说明, 超声波作用没有破坏淀粉的结构和性质, 这种分离稻米淀粉的方法是有效的。

参考文献:

[1] 于泓鹏, 徐丽, 高群玉, 等. 大米淀粉的制备及其综合利用研究进展[J] . 粮食与饲料工业, 2004(4): 21— 22

[2] Bcchtel D B, Pomeranz Y. Ultrastructrue of the mature ungerminated rice (*Oryza Sativa*) caryopsis. the starchy endosperm[J] . American Journal of Botany, 1978, 65: 684— 690

[3] Yamamoto K, Sumie S, Toshio O. Properties of rice starch prepared by alkali method with various conditions[J] . Denpun Kagaku, 1973, 20: 99— 102

[4] Wang L, Wang Y. Comparison of protease digestion at neutral pH with alkaline steeping method for rice starch isolation[J] . Cereal Chemistry, 2001, 78: 690— 692

[5] Lumdubwong N, Seib P A. Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wet milled rice flour [J] . Journal of Cereal Science, 2000, 31: 63— 74

[6] Han X Z, Hamaker B R, Partial leaching of granule-associated proteins from rice starch during alkaline extraction and subsequent gelatinization [J] . Starch/ Staerke, 2002, 54: 454— 460

[7] N. Lumdubwong P A Seib. Rice starch isolation by alkaline protease digestion of wet-milled rice flour[J] . Journal of Cereal Science, 2000, 31: 63— 74

(上接第 49 页) 左右, 需浇 3~4 次水, 而在豫中补灌区的多数地区多数年份, 实际浇水要少于这个水平。这可能是一方面近年来随着生产条件的改善, 小麦无论是苗期或成株期长势都优于过去, 因而株间蒸发减少; 另一方面连年秸秆还田, 土壤有机质增加迅速, 土壤理化特性得到改善, 保水保肥能力提高。

本研究通过逐步回归建立的最优回归方程均达极显著水平, 其多元决定系数都在 0. 9643 以上, 既可用于研究影响小麦生长发育的关键因子及其时

段, 且随着中长期天气预报水平的提高, 也可用于产量预测。

参考文献:

[1] 河南省小麦高稳优低研究推广协作组. 小麦生态和生产技术[M] . 郑州: 河南科学技术出版社, 1986.

[2] 董中强. 河南农业气候[M] . 郑州: 河南科学技术出版社, 1991.

[3] 崔党群. 生物统计学[M] . 北京: 中国科学技术出版社, 1994.