

# 底物浓度对碱性蛋白酶水解面筋流变特性的影响

张少敏<sup>1</sup>, 刘慧燕<sup>1</sup>, 沈会平<sup>1</sup>, 钱杨鹏<sup>2</sup>, 董可明<sup>3</sup>

(1. 广东环境保护工程职业学院食品工程系, 广东佛山 528216)

(2. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640) (3. 广东巍微生物科技有限公司, 广东广州 511400)

**摘要:** 本文较系统地研究了 Alcalase 碱性蛋白酶催化不同浓度小麦面筋蛋白水解过程中酶解产物的表现现象、表观粘度、剪切应力和流变特性。研究表明: 酶解体系中小麦面筋的浓度越高, pH 值下降幅度越少, 在反应刚开始的 6 h 内是 pH 值变化最明显的区间, 固形物浓度越高的样品, 越早进入变化平稳的阶段。随着固形物浓度的提升和酶解时间的延长, 酶解液的水分活度有下降的趋势, 且固形物浓度越大, 水分活度下降幅度越大, 下降速度越快。在整个反应过程中, 各固形物浓度酶解物的表观粘度和剪切应力均会随着酶解时间的延长而不断下降; 固形物浓度越大下降趋势越明显, 且不同固形物浓度酶解液的表观粘度和剪切应力的大小始终保持 40%>32%>24%>16%>8%。此外, 研究发现 Ostwald-dewaele 模型可以很好的拟合碱性蛋白酶催化不同固形物浓度小麦面筋蛋白酶解液的流变特性。

**关键词:** 小麦面筋蛋白; 固形物浓度; 流变特性

文章编号: 1673-9078(2017)8-243-247

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.035

## Effects of Solid Concentration on the Rheological Properties of Wheat Gluten Hydrolysate Obtained Using Alkaline Protease

ZHANG Shao-min<sup>1</sup>, LIU Hui-yan<sup>1</sup>, SHEN Hui-ping<sup>1</sup>, QIAN Yang-peng<sup>2</sup>, DONG Ke-ming<sup>3</sup>

(1. Department of Food Engineering, Guangdong Polytechnic of Environmental Protection Engineering, Foshan 528216, China) (2. College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(3. Guangdong WeiWei Biotechnology Limited Corporation, Guangzhou 511400, China)

**Abstract:** The apparent viscosity, shear stress, and rheological properties of wheat gluten hydrolysates obtained from the hydrolysis of wheat glutes of different concentrations by an alkaline protease, Alcalase, were investigated. The results showed that a higher concentration of wheat gluten in the hydrolysis system resulted in a smaller decrease in pH value. The first six hours of the reaction showed the most significant change in pH, and samples with a higher solid concentration achieved a steady-state change earlier. With increasing solid concentration and hydrolysis time, the water activity of the wheat hydrolysates showed a downward trend. In addition, a higher solid concentration led to a higher magnitude of reduction in water activity and a faster reduction rate. During the whole hydrolysis process, the viscosity and shear stress of the hydrolysates at different solid concentrations dropped constantly as the hydrolysis time was increased; a higher solid concentration led to a more apparent declining trend, and the viscosity and shear stress values of wheat gluten hydrolysates at different solid concentrations were always in the order of 40%>32%>24%>16%>8%. In addition, it was found that the Ostwald-de Waele model could be used to fit the rheological properties of wheat gluten hydrolysates obtained from the hydrolysis of wheat glutes of different concentrations by an alkaline protease.

**Key words:** wheat gluten; solid concentration; rheological properties

谷朊粉, 又名小麦面筋蛋白, 是加工制作小麦粉时所产生的主要副产品, 是一种天然的谷物蛋白质<sup>[1]</sup>。小麦面筋蛋白中含有大量的谷氨酸 (大部分以酰胺形式存在), 脯氨酸和其他非极性氨基酸, 导致在水中分散性差, 限制了其在各个领域的应用<sup>[2,3]</sup>。由于酶法改

收稿日期: 2016-12-20

基金项目: 广州市科技计划项目 (201604020067); 广东环境保护工程职业学院院长基金项目 (KY201401003)

作者简介: 张少敏 (1987-), 女, 讲师, 研究方向: 食品生物技术

性具有效率高、易控制、专一性强、不产生有毒有害物质、不损害原料中的其他营养成分等优点, 现在已越来越多的应用于蛋白质的改性研究中<sup>[5-7]</sup>。在实际应用中, 蛋白质的酶法水解改性比非水解改性具有更大的意义。高固形物浓度酶解反应具有节水、投资少、设备尺寸小、利用率高、终产物浓度高、废水产量少、简化工艺和能够提高等优点。现已成为研究热点之一<sup>[8,9]</sup>。目前工业化的面筋蛋白酶解体系中小麦面筋蛋白的常规浓度一般控制在 10~20% 的狭小范围。然而,

近年来蛋白质“常浓”酶解技术的缺点日益突出,如单位设备的生产效率低、浓缩能耗高、水消耗量大和人工成本高等。高浓度底物酶解或高浓酶解技术是针对“常浓”酶解技术不足而提出的新技术,属于绿色生产技术。相对于“常浓”体系而言,高底物浓度酶解具有许多优点:(1)显著提高了生产设备利用率,提升了单位设备的产能;(2)单位产品产生废水更少,废水治理成本低;(3)酶解产物的浓缩、干燥所耗能量更低<sup>[10,11]</sup>。

随着底物蛋白浓度的提高,酶解体系传热、传质和传动特性发生显著变化,因此阐明高浓酶解体系的流变特性具有重要意义。本文以小麦面筋蛋白为原料,系统研究了不同底物浓度对碱性蛋白酶水解面筋蛋白酶解产物流变特性的影响,以期对小麦面筋蛋白高浓酶解的产业化奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料、试剂与仪器

原料及试剂:小麦面筋蛋白、Alcalase 碱性蛋白酶均为食品级,安徽碧绿春生物科技有限公司;浓盐酸、浓硫酸、氢氧化钠、苯酚、石油醚(30-60)、溴甲酚绿、甲基红、硫酸钾、硒粉、硼酸、BSA 牛血清蛋白、硫酸铜和葡萄糖等添加剂均为分析纯;Sephadex LH20,瑞典 Pharmacia 公司。

仪器:SHA-C 水浴恒温振荡器,江苏省金坛市恒农仪器厂;101A-2 数显电热鼓风干燥箱,上海浦东跃欣科学仪器厂;KDN-103F 微量凯式定氮仪,上海纤检仪器有限公司;HYP-308 八孔消化炉,上海纤检仪器有限公司;GL-21M 高速冷冻离心机,湘仪离心机仪器有限公司;PHS-3E 数显 pH 计,上海精密科学仪器有限公司;UV-2100 紫外可见分光光度计,上海优尼科仪器有限公司;Haaka MARS III 流变仪,德国 Thermo Fisher 公司;EL204 精密电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;AquaLab Series 4Te 水分活度仪,美国 Decagon 公司;SZC-C 脂肪测定仪,上海纤检仪器有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 小麦面筋蛋白酶解物的制备

将小麦面筋蛋白按 8:92、16:84、24:76、32:68 和 40:60 (*m/m*) 溶于预先调好的碱溶液中,置于恒温水浴锅中振荡预热,待温度达到 50 °C 和 pH 达到 8.0,添加 0.2% 的碱性蛋白酶酶,水浴振荡,将振荡速率控制在 100~120 r/min,恒温酶解。在 6 h、12 h、18 h、

24 h、30 h 和 36 h 分别取样,然后置于沸水浴中灭酶 15 min,再将酶解物置于 -18 °C 冷柜中冷冻保存备用。

#### 1.2.2 小麦面筋蛋白基本成分的测定

蛋白含量的测定:参照 GB/T 5511-1985,小麦面筋蛋白的换算系数为 5.7。水分含量的测定:参照 GB/T 5009.3-1985,采用 105 °C 恒重法测定原料面筋蛋白中的水分含量。粗脂肪含量的测定:参照 GB/T 5490-1985,采用索氏抽提法测定小麦面筋蛋白的脂肪含量。灰分的测定:参照 GB/T 5009.4-1985。多糖含量的测定:采用苯酚-硫酸法测定原料中多糖含量<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.3 pH 的测定

将冷冻保存的样品取出,置于 20 °C 恒温摇床中水浴解冻,待完全溶解后,摇匀,使用 pH 计进行测量。

#### 1.2.4 水分活度的测定

将冷冻保存的样品置于室温条件下解冻,均匀铺满测量皿容器底部,使用水分活度仪进行测定,待数值稳定后取值。

#### 1.2.5 流变特性的测定

参考龙肇<sup>[13]</sup>的方法,略有改动,准确移取 1 mL 样品于流变仪平台上,使用转子的型号为 P35Til Polished,设定测试参数分别为:测量温度为 25±1 °C,板间距为 1 mm,剪切速率于 120 s 内由 0 升至 60 s<sup>-1</sup>,线性选取 80 个参考点考察粘度和剪切应力与剪切速率变化的关系。

使用软件 Rheowin Data Manager software Version 4.30 对表观粘度,剪切应力和剪切速率间的曲线进行分析,Ostwald-de waele 模型能够很好拟合。

$$\eta = K \times \dot{\gamma}^{n-1}$$

$$\tau = K \times \dot{\gamma}^n$$

模型中, $\eta$  为表观粘度; $\tau$  为剪切应力;K 为稠度系数; $\dot{\gamma}$  为剪切速率;n 为流动指数。

#### 1.2.6 数据处理

所有试验结果均为三个平行样的测定结果,结果表示为平均值±标准偏差,使用 SPSS 21.0 和 Excel 2007 软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦面筋蛋白的基本组成

小麦面筋蛋白是加工小麦淀粉时留下的副产品,受限于加工方法等客观条件,出品的小麦面筋蛋白一般还含有其他的成分。本实验小麦面筋中粗蛋白含量为(80.21±1.21)%,多糖含量为(6.13±0.25)%,粗脂肪含量为(1.92±0.32)%,灰分含量为(2.2±0.43)%。本文各固形物浓度条件下的酶解体系如表 1 所示。

表1 样品信息

Table 1 Sample information

固形物浓度/%	面筋蛋白/%	水分/%	油脂/%	多糖/%	灰分/%
8	6.43	92.75	0.11	0.59	0.12
16	12.85	85.50	0.23	1.18	0.24
24	19.28	78.25	0.34	1.77	0.36
32	25.71	71.00	0.46	2.36	0.47
40	32.14	63.75	0.57	2.95	0.59

## 2.2 不同固形物浓度对酶解过程中 pH 和水分活度的影响

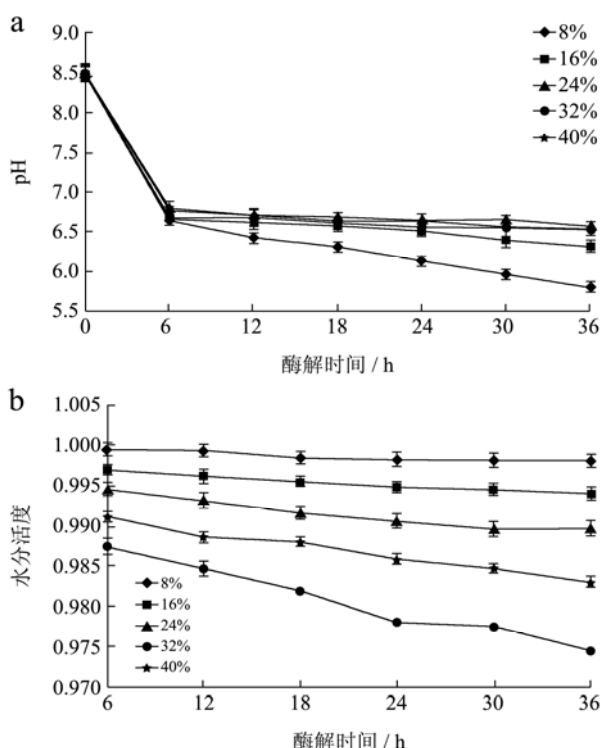


图1 碱性酶酶解体系在酶解过程中 pH(a)和水分活度(b)的变化

Fig.1 Changes in pH (a) and water activity (b) during Alcalase hydrolysis

不同固形物浓度对酶解过程 pH 的影响如图 1a 所示, pH 在酶解初期下降剧烈, 之后 pH 下降趋势放缓。五种固形物浓度条件下的碱性酶酶解物均在反应初的 6 h 内下降到 6.6~6.8 的范围内, 无显著性差异。到酶解反应中后期, 不同固形物浓度条件下的酶解体系开始呈现出不同的趋势, 8%和 16%两个中低固形物浓度的酶解样品 pH 值依然呈现明显的下降趋势, 其中 8%固形物浓度的样品 pH 下降最为明显, 反应 36 h 时, 酶解液的 pH 值到达 5.8。而 24%、32%和 40%三个固形物浓度体系的 pH 值在酶解反应 6 h 后趋于稳定, pH 的变化范围均不超过 0.3。在整个酶解反应过程中, 不

同固形物浓度酶解液的 pH 值的大小始终保持为 40%~32%~24%>16%>8%。当固形物浓度达到 24%或更高时, 酶解体系在整个酶解反应过程中 pH 值变化较小, 这可能是由于蛋白质和多肽具有较强缓冲能力。

不同固形物浓度酶解液在酶解反应过程水分活度的变化如图 1b 所示。水分活度指的是水分在酶解体系中存在状态以及和蛋白质, 多肽等亲水物质的结合程度<sup>[14]</sup>。在酶解反应初始阶段, 不同固形物浓度酶解体系的水分活度相差较小, 如 8%的样品和 40%的样品水分活度差距仅有 0.012, 但随着酶解反应的进行, 固形物浓度越高的样品, 水分活度下降越快, 其中, 固形物浓度为 40%的样品下降趋势最为明显, 水分活度从 0.9874 降至 0.9746, 下降幅度超过 1.3%, 下降速率是固形物浓度为 8%的样品的 9 倍以上。在整个酶解反应过程中水分活度的大小始终保持 40%>32%>24%>16%>8%。

小麦面筋蛋白水溶性较差, 大部分不溶于水。在整个酶解反应过程中, 水分活度的降低可能是由于随着反应的进行, 小麦面筋蛋白分子在蛋白酶的催化不断降解形成的可溶性的多肽、寡肽和氨基酸等小分子物质进入酶解体系中, 导致酶解体系的水分活度降低。固形物浓度越高的酶解体系, 水分活度越低可能是因为本身体系中含有的水较少, 另一方面, 大量溶出的多肽、寡肽和氨基酸等小分子物质更多导致水分活度下降更为明显。

## 2.3 不同固形物浓度对酶解体系表观现象的影响

图 2 为不同固形物浓度在酶解过程中对酶解液表观现象的影响。在图 2 中, I、II 和 III 分别为固形物浓度为 16%, 24%和 32%的样品在反应 6 h、12 h、18 h、24 h、30 h 和 36 h 时溶液静置后的表观现象 (固形物浓度 8%与 16%的样品, 40%与 32%的样品的表观现象相似, 故并未列出); IV, V 和 VI 为各固形物浓度在 6 h、24 h 和 36 h 时溶液静置后的表观现象。由图 2-I、2-II 和 2-III 可知, 16%的样品在静置后分层现象

明显,且上层液浑浊度和颜色逐渐加深,24%的样品仅有轻微的分层,32%的样品已经未出现明显分层现象,其中,24%的样品在反应18 h至30 h的区间内,酶解液下层出现絮状物质,在其他的样品中却未出现这种现象。由图2-IV、2-V和2-VI可知,随着酶解体系固形物浓度的提高,酶解液上层清液的比例不断减少,直至不再出现分层。酶解反应时间对酶解液上层清液的比例无明显影响。

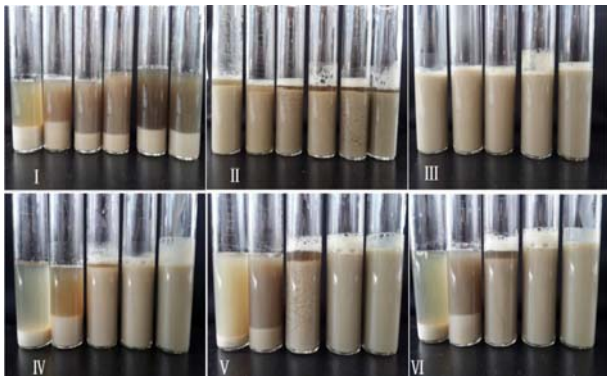


图2 碱性酶酶解体系在酶解过程中表现现象的变化

Fig.2 Changes in appearance during Alcalase hydrolysis

### 2.4 不同固形物浓度对表观粘度和剪切应力的影响

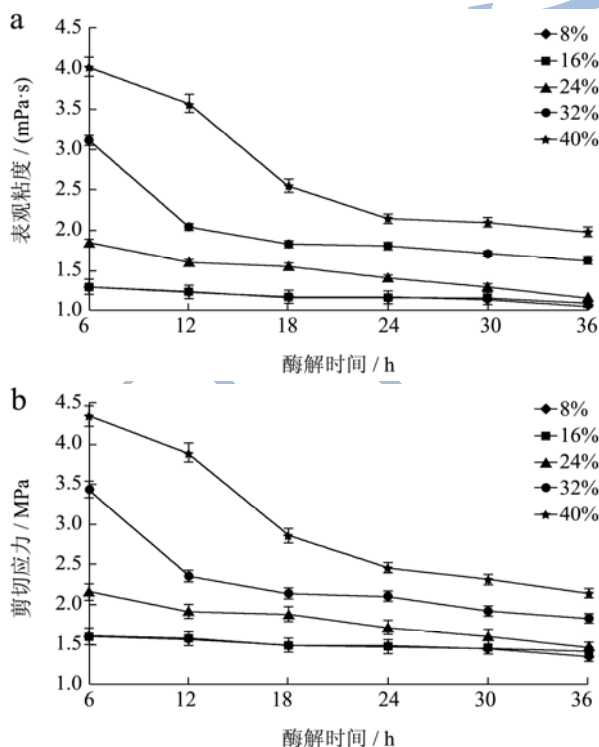


图3 碱性酶酶解体系酶解过程中表观粘度(a)和剪切应力(b)的变化

Fig.3 Changes in apparent viscosity and shear stress during Alcalase hydrolysis

高固形物浓度条件下,自由水含量低,导致整个酶解体系粘度和剪切应力上升,易造成搅拌困难,这样不利于酶和底物的结合,酶的转移,酶解产物的扩散,造成传质困难,同时搅拌困难又会导致酶解体系分布不均,受热不匀,热量分布不平衡,造成传热困难<sup>[16]</sup>。本实验中,以10为底数对剪切速率为 $2\text{ s}^{-1}$ 时的粘度和剪切应力求对数,以该值为Y轴建立坐标系,所得不同固形物浓度在酶解过程粘度和剪切应力的变化如图3a和3b所示。

在碱性酶酶解体系中,随着反应时间的延长,各固形物浓度的样品的表观粘度均呈现逐渐下降的趋势,剪切应力的结果同表观粘度的结果相似。在整个酶解反应过程中,面筋蛋白酶解体系中各固形物浓度的表观粘度和剪切应力的大小始终保持 $40\% > 32\% > 24\% > 16\% > 8\%$ 。其中,固形物含量较低的8%和16%两组样品的指标非常接近。

固形物含量8%酶解体系的粘度和剪切应力分别从 $20.01\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 和 $40.03\text{ mPa}$ 下降到 $11.15\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 和 $22.5\text{ mPa}$ ,分别下降了38%和37%,而40%酶解体系粘度和剪切应力则分别从 $10440\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 和 $20890\text{ mPa}$ 下降到 $95.24\text{ mPa}\cdot\text{s}$ 和 $137.4\text{ mPa}$ ,两组数值下降超过99%。

### 2.5 不同固形物浓度对酶解体系流变特性的影响

非牛顿流体是指剪应力与剪切应变率之间不是线性关系的流体,其剪应力与剪应变率之间的关系可通过幂律函数来表示,即Ostwald-de waele模型。

$$\tau = K \left( \frac{dv}{dr} \right)^n = K \left( \frac{d\gamma}{dt} \right)^n = K\gamma^n$$

式中, K为稠度系数, n为流动指数。

固形物浓度对碱性酶酶解体系 Ostwald-de waele模型各参数的影响如表2所示。

由表2可知样品的流动指数n均小于1,说明酶解体系是非牛顿流体中的假塑性流体,具有剪切变稀的性质。伴随固形物浓度的提升和酶解时间的延长流动指数n均呈不断下降的趋势,这说明提升固形物浓度和酶解反应时间能够使剪切变稀特征更加明显。稠度系数(K)是表征样品粘稠度的指标,由表2可知,当固形物浓度提升,稠度系数也在上涨,说明样品的粘稠度随着固形物浓度的提升而增加,当酶解时间增长时,酶解液的稠度系数则发生下降,这个实验结果同上一节的实验结果相似。相关性系数 $R^2 > 0.9$ ,说明Ostwald-de waele模型可以很好的拟合碱性酶酶解面筋蛋白体系。

表2 固形物浓度对碱性酶酶解体系 Ostwald-de waele 模型各参数的影响

Table 2 Effects of solid concentration on Ostwald de Waele model parameters in the Alcalase hydrolysis system

固形物浓度	8%	16%	24%	32%	40%	
n (无量纲)	6 h	0.765	0.745	0.598	0.538	0.475
	12 h	0.764	0.734	0.536	0.516	0.436
	18 h	0.743	0.679	0.506	0.472	0.378
	24 h	0.699	0.589	0.408	0.354	0.319
	30 h	0.684	0.496	0.359	0.292	0.212
	36 h	0.639	0.394	0.340	0.238	0.155
K/(Pa·sn)	6 h	0.013	0.074	0.094	3.93	10.5
	12 h	0.013	0.054	0.087	0.970	5.62
	18 h	0.011	0.033	0.076	0.507	1.95
	24 h	0.010	0.013	0.050	0.075	1.17
	30 h	0.009	0.013	0.033	0.055	0.228
	36 h	0.008	0.009	0.023	0.027	0.135
R <sup>2</sup>	6 h	0.906	0.994	0.999	0.999	0.979
	12 h	0.930	0.996	0.999	0.999	0.998
	18 h	0.947	0.980	0.999	0.998	0.974
	24 h	0.963	0.988	0.995	0.990	0.999
	30 h	0.960	0.992	0.999	0.999	0.999
	36 h	0.972	0.991	0.995	0.999	0.997

### 3 结论

3.1 不同固形物浓度条件下的面筋蛋白酶解物水分活度的变化规律有显著区别。随着固形物浓度的提升和酶解时间的延长,酶解液的水分活度有下降的趋势,且固形物浓度越大,水分活度下降幅度越大,下降速度越快。

3.2 在整个反应过程中,各固形物浓度酶解物的表现粘度和剪切应力均会随着酶解时间的延长而不断下降,固形物浓度越大下降趋势越明显。

3.3 Ostwald-dewaele 模型可以很好拟合碱性蛋白酶催化不同固形物浓度小麦面筋蛋白酶解液流变特性。

### 参考文献

[1] 柏菁.中国小麦市场整合研究[D].南京:南京农业大学,2012  
BO Qing. Integration study on China's wheat market based on empirical reserch of spot price from 2009 to 2011 [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012

[2] 国家粮食局.2014 年中国粮食发展报告[M].北京:经济管理出版社,2015  
State Administration of Grain. China grain development report, 2014 [M]. Beijing: Economy & Management Publishing House, 2015

[3] 魏本军.谷朊粉在面包专用粉中应用概述[J].粮食与油脂,2002,6:7-8

WEI Ben-jun. Application of wheat gluten in wheat bread powder [J]. Gereals & Oils, 2002, 6: 7-8

[4] 赵京岚,李斯深,范玉顶,等.小麦品种蛋白质性状与中国干面条品质关系的研究[J].西北植物学报,2005,25(1):144-149  
ZHAO Jing-lan, LI Si-shen, FAN Yu-ding, et al. Study on relationship between protein quality of wheat andmaking quality of Chinese dry noodle [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(1): 144-149

[5] Rizzello C G, Curiel J A, Nionelli L, et al. Use of fungal protease and selected sourdough lactic acid bacteria for making wheat bread with an intermediate content of gluten [J]. Food Microbiology, 2014, 37(2): 59-68

[6] M'hir S, Rizzello C G, Di Cagno R, et al. Use of selected enterococci and Rhizopus oryzae proteases to hydrolyse wheat proteins responsible for celiac disease [J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(2): 421-431

[7] CUI Chun, HU Qing-ling, REN Jiao-yan, et al. The effect of lactic acid bacteria fermentation on the antioxidant activity of wheat gluten pancreatin hydrolysates [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2014, 49(4): 1048-1054

- [8] Kristensen J B, Felby C, Jørgensen H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2(1): 11
- [9] CUI Chun, QIAN Yang-peng, SUN Wei-zheng, et al. Effects of high solid concentration on the efficacy of enzymatic hydrolysis of yeast cells and the taste characteristics of the resulting hydrolysates [J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2016, 51(5): 1298- 1304
- [10] Hardt N A, Goot A J V D, Boom R M. Influence of high solid concentrations on enzymatic wheat gluten hydrolysis and resulting functional properties [J]. *Journal of Cereal Science*, 2013, 57(3): 531-536
- [11] Hardt N A, Janssen A E M, Boom R M, et al. Factors impeding enzymatic wheat gluten hydrolysis at high solid concentrations [J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 2014, 111(7): 1304-1312
- [12] 食品分析[M].北京:中国轻工业出版社, 1994  
Food analysis [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1994
- [13] 龙肇.蛋白质/多糖交互作用对高乳脂乳浊液稳定性的影响及作用机理研究[D].广州:华南理工大学,2014  
LONG Zhao. Effect of protein-polysaccharide interactions on the stability of concentrated emulsions and its mechanism [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2014
- [14] 卞科.水分活度与食品储藏稳定性的关系[J].郑州粮食学院学报,1997,18(4):41-47  
BIAN Ke. The relationship between stability of food storage and water activity [J]. *Journal of Zhengzhou Grain College*, 1997, 18(4): 41-47
- [15] Horiuchi T, Fukushima D, Sugimoto H. Studies on enzyme modified proteins as foaming agents: effect of structure on foam stability [J]. *Food Chemistry*, 1978, 3: 35-42
- [16] Mimouni B, Raymond J, Merle-Desnoyers A M, et al. Combined acid deamidation and enzymic hydrolysis for improvement of functional properties of wheat gluten [J]. *Journal of Cereal Science*, 1994, 20(2): 153-165