

高固形物浓度对酵母酶解及其产物抗氧化性的影响

崔春, 王海萍, 钱杨鹏, 赵谋明, 孙为正

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 高固形物浓度的酶解是近年来国际食品探究的热点之一。本文利用木瓜蛋白酶水解不同固形物浓度的活性面包酵母, 并对酶解液的氨氮、总氮、可溶固形物含量、还原糖、总糖、渗透压、抗氧化活性以及褐变程度进行了检测, 探究高固形物浓度对酵母酶解及其产物抗氧化性的影响。结果表明, 随着固形物浓度的提高, 酵母酶解液中的氨氮、总氮, 可溶性固形物含量、还原糖、总糖、渗透压随之提高, 提高固形物浓度有利于提高酵母酶解效率。通过对酵母酶解液抗氧化活性的测定发现, 固形物浓度为 30% 时, 酶解液具有较高的 DPPH 和羟自由基清除活性, 酶解 13 h 时, 其 IC_{50} 值分别为 0.83 ± 0.09 mg/mL 和 21.53 ± 1.18 mg/mL; 酶解 21 h 时, 其 IC_{50} 值分别为 1.01 ± 0.13 mg/mL 和 23.17 ± 1.33 mg/mL。在高浓度固形物酶解液中, 适当添加 SDS 有助于降低其褐变程度。

关键词: 酵母; 酶解; 高固形物; 抗氧化性

文章编号: 1673-9078(2014)9-161-165

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.09.027

Effect of High Solid Content on Enzymolysis by Yeasts and Antioxidant Activity of the Products

CUI Chun, WANG Hai-ping, QIAN Yang-peng, ZHAO Mou-ming, SUN Wei-zheng

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Enzymolysis with high solid content (HSC) is one of the current hotspots in food research worldwide. In this study, active yeasts from bread containing different levels of solid content were hydrolyzed using papain. The levels of ammonia nitrogen, total nitrogen, soluble solids, reducing sugar, and total sugar, as well as osmotic pressure, antioxidant activity, and extent of browning of the enzymatic hydrolysate were measured to determine the effect of HSC on enzymolysis and the antioxidant activity of yeast enzymolysis products. The results showed that the levels of ammonia nitrogen, total nitrogen, soluble solids, reducing sugar, total sugar, and osmotic pressure increased with increasing solid content, suggesting that increasing solid content could promote the efficiency of yeast enzymolysis. Antioxidant activity measurement demonstrated that when the solid content was 30%, the enzymolysis hydrolysate had a relatively high diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl radical scavenging activity, with half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.83 ± 0.09 mg/mL and 21.53 ± 1.18 mg/mL, respectively, after 13 hours of enzymolysis; whereas the IC_{50} reached 1.01 ± 0.13 mg/ml and 23.17 ± 1.33 mg/mL, respectively, after 21 hours of enzymolysis. The addition of an appropriate amount of SDS could decrease the degree of browning of yeast.

Key words: yeast; enzymolysis; high solid content; antioxidant activity

底物浓度是影响蛋白质酶解反应的重要参数, 对蛋白质的酶解效率及酶解产物的理化性质有着重要影响。底物浓度过高, 蛋白质的酶解产物和蛋白酶的有效扩散受到抑制, 且蛋白酶更易受到酶解产物的抑制, 蛋白质酶解效率降低, 酶解产物的功能特性也随之下降。此外, 蛋白质是典型的大分子化合物, 蛋白质溶液的黏度随溶液中蛋白质浓度的增加而增加, 体系水分活度降低, 从而影响其反应速度, 上述因素限制了高蛋白浓度在酶解中的应用^[1]。

收稿日期: 2014-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31201416); 中央高校基本科研业务费 (2014ZZ0053); 国家十二五科技计划项目 (2011BAD23B01)

作者简介: 崔春 (1978-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品生物技术

近年来, 高固形物浓度的酶解逐渐成为国际食品研究的热点。Krause 等^[2]研究发现 β -酪蛋白浓度为 50% (以干物质计) 时强烈抑制了凝乳酶对其的水解, 这主要是由于酶与底物对自由水的竞争造成的。Ruan^[3]和 Butre^[4]分别对固形物浓度最高为 35% 和 30% 的卵清蛋白和乳清分离蛋白进行水解, 均发现固形物浓度越高, 水解效率越低。Hardt 等^[5]探究了高固形物浓度对小麦面筋蛋白水解以及功能特性的影响, 结果发现固形物浓度为 10%~60% 时水解度变化范围为 3.2%~10.2%, 小麦面筋蛋白的水解速率随着固形物浓度的提高而受到影响。然而, 高固形物浓度酶解具有独特的优势, 主要表现在设备利用率高、反应加热冷却以及产物浓缩干燥所耗能量少, 同时高固形物酶解

所需水更少,产生较少的废水,从而降低废水治理成本^[6],具有很高的经济效益。

酵母抽提物(Yeast Extract),是以食品用酵母为主要原料,在酵母自身的酶或外加食品级酶的作用下,酶解自溶(可再经分离提取)后得到的产品,并富含氨基酸、多肽、核苷酸等酵母细胞中的可溶性成分。酵母抽提物是一种天然调味料,具有纯天然、营养丰富、味道鲜美、香味醇厚的优点,既可以作为天然的调味料添加到酱油、酱料、鸡精粉、糕点、膨化食品等中,改善食品风味,提高产品质量,也可以作为美拉德反应制备肉味香精的优质氨基酸源。传统酵母酶解时其固形物浓度一般在12%~15%,虽然方便搅拌,对设备要求也比较低,但是容易造成资源能源的浪费。本文通过分析不同固形物浓度下酵母酶解液酶解效率、抗氧化活性、褐变程度的变化,研究固形物浓度对酵母酶解及抗氧化性的影响,旨在为高效节能生产酵母抽提物提供理论依据和方法指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

半干酵母:安琪酵母股份有限公司,水分含量为20%,蛋白质含量为38.06%。

木瓜蛋白酶:广州市华琪生物科技有限公司(最适温度60~65℃,最适pH为5~7)。

1.1.2 仪器设备

THZ-82AX型恒温水浴振荡器,常州澳华仪器有限公司;GL-21M型高速冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;KDN-103F型凯氏定氮仪,上海纤检仪器有限公司;JB-1型磁力搅拌器,上海雷磁新泾仪器有限公司;AquaLab型水分活度仪;UV-2100型分光光度计,广州广一科学仪器等。

1.1.3 主要试剂

NaCl、NaOH、DPPH、EDTA、乙醇、浓硫酸、邻二氮菲、硫酸亚铁等,所用试剂均为分析纯;水为去离子水。

1.2 实验方法

酵母酶解液制备工艺流程:半干酵母→加0.5%木瓜蛋白酶(以酵母干物质计)+2g NaCl→加水调成一定浓度的酵母悬浮液或者泥浆→55℃分别振荡3、5、8、13、21、34、48h→灭酶(100℃ 20min)→离心分离(8000 r/min 20min)→过滤取上清液

1.3 分析方法

总氮的测定:凯氏定氮法,参考GB 5009.5-2010食品中蛋白质的测定。

氨基酸态氮的测定:甲醛滴定法,参考GB/T 5009.39-2003酱油卫生标准的分析方法。

可溶性固形物的测定:手持折射仪法。

抗氧化性的测定:DPPH自由基清除法^[7],羟自由基清除法^[8]。

褐变程度的测定:将酶解液稀释一定倍数,在紫外分光光度计420nm条件下测定吸光值。

1.4 数据分析

文中试验重复3次,采用Microsoft Excel 2007和SPSS 11.5对数据进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 不同固形物浓度对酵母水解效率的影响

固形物浓度对酵母细胞在体系中的分散程度和运动速度有着重要的作用,因此其总氮、氨氮、水解度、还原糖、总糖等理化特性也受到相应的影响。由表1可知,同一固形物浓度下,随着酶解时间的延长,酵母酶解液中氨氮、总氮、可溶性固形物含量、还原糖、总糖浓度均呈上升的趋势。这可能与随着水解作用的进行,大分子物质不断降解,并通过扩散作用从酵母细胞中释放出来有关^[9]。同一水解时间下,酵母酶解液的氨氮、总氮、可溶性固形物、还原糖、总糖浓度随酶解液固形物浓度的增加显著提高。酶解时间为21h时,10%固形物浓度的水解液中氨氮、总氮、可溶性固形物、还原糖、总糖浓度分别为0.19±0.02%、0.45±0.04%、7.4±0.04%、0.26±0.07%和1.05±0.07%,而在30%固形物浓度的水解液达到0.87±0.01%、2.03±0.04%、25.8±0.05%、2.36±0.54%和3.29±0.11%,其中氨氮含量提高4.58倍;总氮含量提高了4.51倍;可溶性固形物含量提高了3.84倍。酶解时间为21h时,10%~40%固形物酶解液的水解度分别为42.79±0.48%、42.80±2.29%、42.94±0.84%和42.38±0.22%,差别不大。这表明提高酶解液的固形物含量有助于酶解产物的释放,但对蛋白质的水解度无太大影响。

此外,提高酶解液中酵母细胞的浓度,酶解产物的渗透压也随之提高(图1)。酶解液渗透压的提高,对抑制酶解液中微生物的生长、酶解液的保存是有利的。

表 1 不同固形物浓度对酵母水解效率的影响

Table 1 The influence of different solid concentrations on yeast hydrolysis efficiency

序号	固形物浓度	水解时间/h	氮氮/%	总氮/%	水解度/%	可溶性固形物含量/%	还原糖/%	总糖/%
1	10%	3	0.07±0.01	0.18±0.01	37.89±0.64	5.0±0.02	0.02±0.01	0.66±0.05
2	10%	5	0.07±0.01	0.20±0.01	38.00±0.49	5.4±0.01	0.08±0.01	0.82±0.04
3	10%	8	0.10±0.03	0.25±0.02	42.11±0.36	5.9±0.02	0.19±0.02	0.80±0.31
4	10%	13	0.15±0.02	0.36±0.02	40.69±1.34	6.4±0.01	0.09±0.00	0.69±0.09
5	10%	21	0.19±0.02	0.45±0.04	42.79±0.48	7.4±0.04	0.26±0.07	1.05±0.07
6	20%	3	0.13±0.01	0.42±0.01	31.88±0.08	10.5±0.01	0.09±0.01	1.21±0.10
7	20%	5	0.17±0.03	0.49±0.02	34.95±0.51	11.1±0.02	0.35±0.06	1.13±0.04
8	20%	8	0.24±0.03	0.64±0.03	37.84±0.64	12.9±0.07	1.73±0.24	1.76±0.07
9	20%	13	0.37±0.04	0.93±0.04	40.40±2.04	14.7±0.04	2.13±0.19	2.87±0.23
10	20%	21	0.46±0.02	1.08±0.03	42.80±2.29	15.2±0.04	2.22±0.27	3.09±0.21
11	30%	3	0.31±0.02	0.93±0.01	33.61±1.19	19.6±0.05	0.28±0.16	0.70±0.07
12	30%	5	0.39±0.01	1.01±0.05	38.51±1.02	17.9±0.03	0.78±0.21	0.88±0.13
13	30%	8	0.64±0.04	1.43±0.04	45.05±0.46	24.5±0.04	1.45±0.16	1.97±0.32
14	30%	13	0.68±0.03	1.78±0.05	38.28±1.17	23.7±0.01	2.00±0.18	3.51±0.26
15	30%	21	0.87±0.01	2.03±0.04	42.94±0.84	25.8±0.05	2.36±0.54	3.29±0.11
16	30%	34	1.10±0.02	2.12±0.03	51.91±0.63	27.3±0.04	4.48±0.35	4.64±0.45
17	40%	13	1.10±0.04	2.64±0.03	41.78±1.89	33.8±0.08	4.11±0.44	4.87±0.14
18	40%	21	1.27±0.02	2.99±0.02	42.38±0.22	34.2±0.02	4.20±0.16	4.75±0.41
19	40%	34	1.53±0.04	3.10±0.05	49.36±0.52	36.0±0.06	3.78±0.85	4.25±0.14
20	40%	48	1.55±0.06	3.26±0.01	47.65±0.29	37.0±0.07	4.20±0.08	4.66±0.22

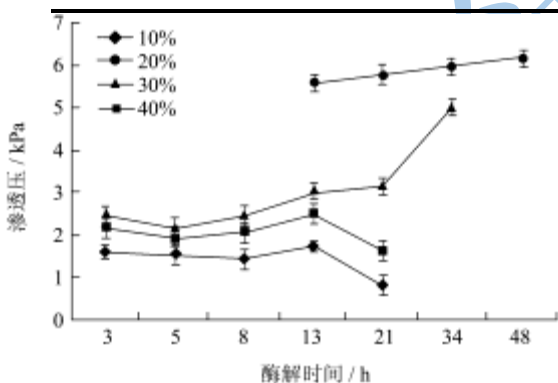


图 1 固形物浓度对酵母酶解液渗透压的影响

Fig.1 Influence of the solid concentrations on the osmotic pressure of yeast extract

2.2 不同固形物浓度对酵母酶解液抗氧化性的影响

酵母酶解产物中含有大量具有抗氧化活性的抗氧化肽，如还原型谷胱甘肽等^[10]。除此之外，酵母酶解液中含有丰富的还原糖和游离氨基酸，在酶解及灭酶过程中发生美拉德反应，美拉德反应的某些中间产物及最终产物都有一定的抗氧化作用^[11]。IC₅₀即自由基

清除率达 50%时酶解液蛋白浓度，IC₅₀越小，则酶解液的抗氧化能力越强。分别测定了不同固形物浓度的酵母酶解 13 h 和 21 h 的 DPPH 自由基和羟自由基的清除活性，探究不同固形物浓度对酵母酶解液抗氧化性的影响。

2.2.1 DPPH 自由基清除活性

对酶解 13 h、21 h 的酵母酶解液的 DPPH 自由基清除活性进行测定，并以还原型谷胱甘肽 (GSH) 作为阳性对照，结果见图 2。从图中可以看出，酶解 21 h 时，尽管不同固形物浓度酵母酶解液的水解度接近，但其 DPPH 自由基清除活性显著不同。浓度从 10% 到 30% 的酵母酶解液的 DPPH 自由基清除活性随酶解液固形物浓度提高逐渐增强，并在固形物浓度为 30% 时达到最大值；而进一步提高酶解液固形物浓度到 40%，DPPH 自由基清除活性下降。从图 2 还可以看出，酶解 13 h 和 21 h 时酵母酶解液具有不同的 DPPH 自由基清除活性，酶解 13 h 自由基清除活性高于 21 h，固形物浓度为 30% 的酵母酶解 13 h 的酶解液具有最高的 DPPH 自由基清除活性，其 IC₅₀ 为 0.83±0.09 mg/mL，酶解 21 h 其 IC₅₀ 为 1.01±0.13 mg/mL，GSH 的 IC₅₀ 为 0.36±0.11 mg/mL。

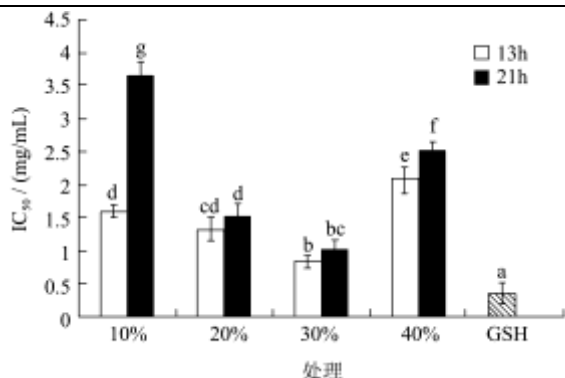


图2 固形物浓度对酵母酶解液 DPPH 自由基清除活性的影响

Fig.2 Influence of the solid concentrations of yeast extract on the DPPH radical scavenging

2.2.2 羟自由基清除活性

机体在生命活动过程中不可避免的产生自由基,过多的自由基会破坏机体组织^[2]。据报道,羟自由基是生物体内活性最强的自由基之一,几乎可与生物体内所有物质产生作用,从而破坏其原有功能^[3]。图3为不同固形物浓度酵母酶解13h和21h时酶解液对羟自由基清除作用的试验结果。

由图3可知,20%固形物浓度下羟自由基清除活性最大,酶解13h和21h IC₅₀分别为12.12±0.87 mg/mL和9.37±0.77 mg/mL。固形物浓度提高,其清除活性受到了抑制,固形物浓度为30%和40%酶解13h IC₅₀值分别为21.53±1.18 mg/mL,19.22±0.91 mg/mL;21h为23.17±1.33 mg/mL,25.06±1.05 mg/mL,阳性对照GSH IC₅₀值为4.55±0.77 mg/mL。固形物浓度为10%、30%、40%时,酶解13h较21h有较好的羟自由基清除活性。

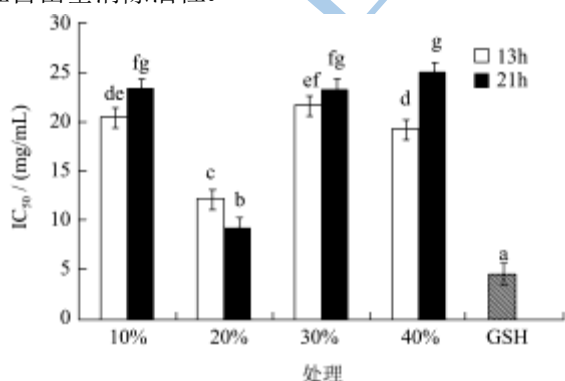


图3 固形物浓度对酵母酶解液羟自由基清除活性的影响

Fig.3 Influence of the solid concentrations of yeast extract on the hydroxyl radical scavenging

2.2.3 不同固形物浓度对酵母酶解液褐变程度的影响

随着酶解时间的延长,固形物浓度的提高,酵母酶解液的颜色不断加深,这是酵母在酶解过程中酶解液中的还原糖与氨基酸、肽及蛋白质进行美拉德反应

造成的。而美拉德反应产物与酶解液抗氧化性密切相关。褐变强度(A_{420nm})常作为美拉德反应进入最终阶段的一个重要指标,它表示美拉德反应进入最终阶段的程度。将10%、20%、30%和40%酶解13h的酵母酶解液分别稀释适当的倍数到相同浓度后,添加1% SDS和未添加SDS的酶解液在420nm下测定吸光值,作为Maillard反应最后阶段产物(褐变强度)的指标。如图4显示了酶解13h时不同固形物浓度酵母酶解液稀释液的褐变强度(A_{420nm})。

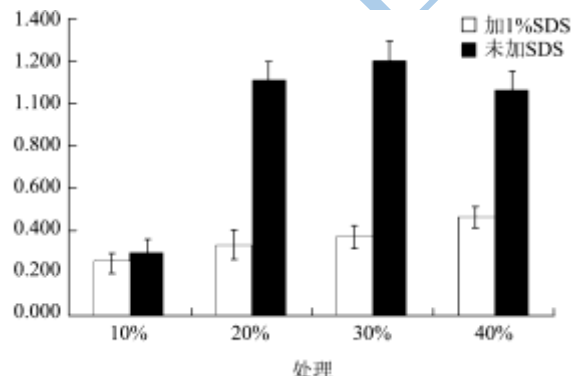


图4 固形物浓度对酵母酶解液褐变程度的影响

Fig.4 Influence of the solid concentrations of yeast extract on the enzymatic browning

SDS是一种有效蛋白质变性剂和助溶性试剂,它可断裂蛋白质、多肽分子内和分子间的氢键,破坏蛋白质或多肽聚集体的二级和三级结构^[4]。大量文献报道,多肽聚集体添加SDS后,溶液变澄清,吸光值降低。由图4可见,在未添加SDS的情况下,当固形物浓度为20%及以上时,酵母酶解液的褐变程度相比10%浓度的有大幅度提高,而浓度为20%~40%之间的酵母酶解液褐变强度差别不大。这可能与高固形物浓度下酶解制备的酶解液多肽易发生聚集导致酶解液浑浊有关。添加了SDS显著抑制了浓度为20%及以上酵母水解液的褐变,其中20%、30%、40%浓度的酵母水解液的褐变强度仅分别为未添加SDS的29.86%、31.05%、43.78%。

3 结论

固形物浓度对酵母酶解效率、酶解产物化学组成及抗氧化活性均有显著的影响。随着固形物浓度的提高,酵母酶解液中氨氮、总氮、可溶固形物含量、还原糖、总糖也随之提高。固形物浓度为30%时,酵母酶解效率最高,水解34h时水解度达到51.91±0.63%。此外,固形物浓度提高,渗透压逐渐上升,加快了酵母细胞的破碎,同时抑制了酶解液中微生物的生长。当固形物浓度为30%时,酵母酶解液的抗氧化性较高,水解13h DPPH的IC₅₀为0.828±0.09 mg/mL。在高浓

度固形物酶解液中,适当添加 SDS 有助于降低其褐变强度。以上研究结果将为高品质酵母抽提物的工业化生产提供一定的理论指导。

参考文献

- [1] 宋占兰.玉米蛋白的生物法水解及产物的性质研究[D].齐齐哈尔市:齐齐哈尔大学,2012
SONG Zhan-lan. Biological hydrolysis of corn gluten and the characteristics of products [D]. Qiqihar: Qiqihar University, 2012
- [2] Krause W, Partzsch M, Koch J. Chymosin catalysed hydrolysis of isolated β -casein in diluted solution and in systems with reduced water content [J]. *Milchwissenschaft*, 1999, 54: 569-573
- [3] Ruan C, Chi Y, Zhang R. Kinetics of hydrolysis of egg white protein by pepsin [J]. *Czech Journal of Food Sciences*, 2010, 28(5): 355-363
- [4] Butré C, Wierenga P, Gruppen H. Effects of ionic strength on the enzymatic hydrolysis of diluted and concentrated whey protein isolate [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(22): 5644-5651
- [5] Hardt N A, van der Goot A J, 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
- [6] Kristensen J B, Felby C, Henning Jorgensen H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocelluloses [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2: 1-10
- [7] Cui C, Zhang S M, You L J, et al. Antioxidant capacity of anthocyanins from *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait) and identification of the major anthocyanins [J]. *Food Chemistry*, 2013, 139: 1-8
- [8] Cervantes MI, Balderas PMD, Gutierrez-Banos JD, et al. Comparison of antioxidant activity of hydroethanolic fresh and aged garlic extracts and their effects on cerebral ischemia [J]. *Food Chemistry*, 2013, 140: 343-352
- [9] 陈军.从啤酒废酵母制备酵母抽提物的工艺研究[J].广西轻工业,2011,4:46-47,62
CHEN Jun. Preparation of yeast extract with spent brewer's yeast [J]. *Guangxi Journal of Light Industry*, 2011, 4: 46-47, 62
- [10] 郭永,庞宏建.酵母抽提物的研究进展[J].中国调味品,2010, 35(12):24-27
GUO Yong, PANG Hong-jian. Research progress of yeast extract [J]. *China Condiment*, 2010, 35(12): 24-27
- [11] 张余,骆会婷.食品类黑精的研究进展[J].中国食品添加剂,2005,3:11-13,32
ZHANG Cuan, LUO Hui-ting. Advancement of the study on the food melanoidins [J]. *China Food Additives*, 2005(3): 11-13, 32
- [12] Wang J S, Zhao M M, Zhao Q Z, et al. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems [J]. *Food Chemistry*, 2007, 101(4): 1658-1663
- [13] Castro L, Freeman B. Reactive oxygen species in human health and disease [J]. *Nutrition*, 2001, 17(2): 161-165
- [14] 赵郁,刘新宇,杨宇虹.十二烷基硫酸钠与十二烷基磺酸钠[J].生命的化学,2004,24(3):277-278
ZHAO Yu, LIU Xin-yu, YANG Yu-hong. Sodium dodecyl sulfate and sodium dodecyl sulfonate [J]. *Chemistry of Life*, 2004, 24(3): 277-278