

鲜食糯玉米酶法制汁工艺优化

林美娟^{1,2,3}, 宋江峰^{2,3}, 李大婧^{2,3}, 刘春泉^{2,3,*}, 金邦荃¹

(1.南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097; 2.江苏省农业科学院农产品加工研究所, 江苏 南京 210014;
3.国家农业科技华东(江苏)创新中心 农产品加工工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

摘 要:以“江南花糯”鲜食玉米为原料,在单因素试验基础上,确定中温 α -淀粉酶添加量、中性蛋白酶添加量和中性蛋白酶酶解时间3个因素的取值范围,并应用Box-Behnken设计原理和响应曲面分析法对鲜食糯玉米汁酶解工艺条件进行优化。结果表明:中温 α -淀粉酶添加量、中性蛋白酶添加量和中性蛋白酶酶解时间均对糯玉米浆液悬浮稳定性有显著影响($P < 0.05$);在中温 α -淀粉酶添加量7.5U/g、中性蛋白酶添加量83U/g、中性蛋白酶酶解时间43min最佳作用条件下,鲜食糯玉米汁悬浮稳定性得到最大程度的改善与提高($OD_{660} = 1.832$),回归模型的相对误差小于0.5%,与实测值拟合较好。

关键词:糯玉米汁;酶解;悬浮稳定性;响应面

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Parameters for Preparation of Fresh Wax Corn Juice

LIN Mei-juan^{1,2,3}, SONG Jiang-feng^{2,3}, LI Da-jing^{2,3}, LIU Chun-quan^{2,3,*}, JIN Bang-quan¹

(1. Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China; 2. Institute of Farm Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Engineering Research Center for Agricultural Products Processing, National Agricultural Science and Technology Innovation Center in East China, Nanjing 210014, China)

Abstract: The goal of this study was to develop an optimum hydrolysis process for preparing corn juice from fresh wax corn cultivar “Jiangnanhuanuo”. A series of single factor experiments were carried out to address the effects of mid-temperature α -amylase dosage, neutral protease dosage and neutral protease hydrolysis time on suspension stability. Box-Behnken design coupled with response surface methodology (RSM) was employed to optimize hydrolysis conditions of fresh wax corn juice. The result showed that its suspension stability was significantly influenced by mid-temperature α -amylase dosage, neutral protease dosage as well as neutral protease hydrolysis time. The optimal hydrolysis conditions were achieved as follows: mid-temperature α -amylase dosage 7.5 U/g, neutral protease dosage 83 U/g and neutral protease hydrolysis time 43 min. Under these conditions, the suspension stability of fresh wax corn juice was improved to the greatest extent ($OD_{660} = 1.832$, presenting a relative error less than 0.5% when compared with the predicted counterpart).

Key words: wax corn juice; enzyme hydrolysis; suspension stability; response surface methodology (RSM)

中图分类号: TS255.44

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0036-05

鲜食期糯玉米籽粒中淀粉和蛋白质总含量占干质量的50%以上,这些大分子物质分散在水介质中制得的浆液属于悬浮液水溶胶,是典型的热力学不稳定体系^[1-2]。单纯采用压榨等传统工艺制取汁液的方法因出汁率低,导致生产成本过高而不可取;仅用打浆均质的方法生产的糯玉米汁,因产品中的淀粉和蛋白质等物质在杀菌过程中容易絮凝沉淀,影响产品质量^[3]。国内制取玉米汁

多采用单一酶法进行水解,水解不完全导致稳定性仍然较差^[4-5]。本实验拟利用中温 α -淀粉酶和中性蛋白酶双酶酶解制备糯玉米汁,并采用响应面设计法对酶解工艺进行优化,分析不同酶解条件对鲜食糯玉米汁悬浮稳定性的影响规律,建立相应的数学模型,以期工业化大规模生产高品质的糯玉米汁提供理论依据,对鲜食玉米的综合利用提供新的途径。

收稿日期: 2011-02-25

基金项目: 江苏四青作物精深加工及品质提升关键技术与装备研究项目(CX(11)2067)

作者简介: 林美娟(1987—),女,硕士,研究方向为农产品精深加工。E-mail: lmjlf@163.com

* 通信作者: 刘春泉(1959—),男,研究员,硕士,研究方向为农产品精深加工及产业化开发。

E-mail: liuchunquan2009@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲜食糯玉米品种为“江南花糯”，采摘于江苏省农业科学院六合动物科学基地；中温 α -淀粉酶(酶活力为 $0.2 \times 10^4 \text{U/mL}$)、中性蛋白酶(酶活力为 $5 \times 10^4 \text{U/g}$) 山东杰诺生物科技有限公司；其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

JJ-2B 组织捣碎机、HH-8 数显恒温水浴锅 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司；JMS-50(C)分体式变速胶体磨 廊坊市廊通机械有限公司；TU-1810 紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器制造有限责任公司；PB-10 pH 计 北京赛多利斯科学仪器有限公司；脂肪测定仪 上海新嘉电子有限公司。

1.3 方法

1.3.1 鲜食糯玉米酶法制汁工艺流程及操作要点

工艺流程：鲜食糯玉米粒→清洗沥干→打浆→胶体磨→糊化→酶解→灭酶→过滤→糯玉米汁。

操作要点：取一定量“江南花糯”鲜食玉米籽粒，清洗后沥干，按料液比 1:4(m/V)的比例打浆，过完胶体磨后置于 85℃ 恒温水浴中糊化 20min，待温度降低至 65℃ 时，在自然 pH 值状态下，加入一定量的中温 α -淀粉酶作用一段时间，然后降温至 45℃，加入一定量的中性蛋白酶水解一定时间结束后，升温至 85℃ 以上，保持 20min 灭酶，冷却后 80 目过滤，即得到糯玉米汁。

1.3.2 主要指标测定

水分含量：参照 GB/T 5009.3—2003《食品中水分的测定》；还原糖与总糖含量：参考赵凯^[6]、尹建雄^[7]等的 3,5-二硝基水杨酸比色法测定；总蛋白质含量：参照 GB 5009.5—2003《食品中蛋白质的测定》脂肪含量：参照 GB/T 5009.6—2003《食品中脂肪的测定》淀粉含量：参照双波长分光光度法^[8]；悬浮稳定性：采用分光光度计法^[9]，取 10mL 糯玉米汁(彻底振荡)样品于 4200 × g 离心 20min，以蒸馏水作参比，测定所得上清液在 660nm 处的光密度值，其值 OD₆₆₀ 的大小表示悬浮稳定性的好坏。

1.3.3 鲜食糯玉米汁酶解单因素试验

表 1 鲜食糯玉米汁酶解单因素试验因素与水平
Table 1 One-factor-at-a-time experiment protocols

水平	中温 α -淀粉酶 酶添加量/(U/g)	中温 α -淀粉酶 酶解时间/min	中性蛋白酶 添加量/(U/g)	中性蛋白酶 作用时间/min
1	2	10	20	10
2	4	20	40	20
3	6	30	60	30
4	8	40	80	40
5	10	50	100	50
6	12	60	120	60

主要考察中温 α -淀粉酶和中性蛋白酶两种酶的酶添加量及其酶解作用时间对糯玉米汁悬浮稳定性的影响，单因素试验因素及水平见表 1。

1.3.4 鲜食糯玉米汁酶法制汁工艺条件的优化

根据前期单因素试验结果，选取中温 α -淀粉酶添加量(A)、中性蛋白酶添加量(B)和中性蛋白酶反应时间(C)为因素鲜食糯玉米汁悬浮稳定性 OD₆₆₀ 为响应指标(Y)，根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理，设计三因素三水平响应面分析试验，建立二次多项式回归模型^[10]，试验因素水平与编码见表 2。

表 2 鲜食糯玉米汁酶法制汁工艺优化试验因素水平编码表
Table 2 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters tested in response surface analysis

水平	A 中温 α -淀粉酶 酶添加量/(U/g)	B 中性蛋白酶 添加量/(U/g)	C 中性蛋白酶 作用时间/min
-1	6.6	64	27
0	7.6	81	42
1	8.6	98	57

1.3.5 数据分析

响应面分析试验数据采用 Design-Expert 8.0.4 Trial 软件中的 Response Surface 程序进行分析，应用 Model Graph 程序作响应曲面分析。

2 结果与分析

2.1 鲜食糯玉米主要营养成分及含量分析

表 3 “江南花糯”鲜食玉米主要营养成分及含量
Table 3 Main nutritional ingredients and contents in fresh wax corn cultivar “Jiangnanhuanuo”

指标	水分	总糖	还原糖	总蛋白	脂肪	支链淀粉	总淀粉
含量/%	52.97	14.62	0.71	5.26	4.9	16.85	18.87

由表 3 可知，“江南花糯”鲜食玉米有较高的营养价值，其淀粉含量占鲜食糯玉米籽粒干质量的 40% 以上，粗蛋白质含量约占 11.2%，它们的组成决定了鲜食糯玉米汁的加工方法与普通玉米加工的差异。

2.2 单因素试验

2.2.1 中温 α -淀粉酶添加量对糯玉米汁悬浮稳定性的影响

随着中温 α -淀粉酶添加量的增大，悬浮稳定性 OD₆₆₀ 值逐渐下降(图 1)，这是由于淀粉颗粒在酶的作用下发生水解，形成可溶性小分子物质。在酶解初期酶浓度较低，水解不完全；当酶浓度大于底物浓度时，酶不再作用。

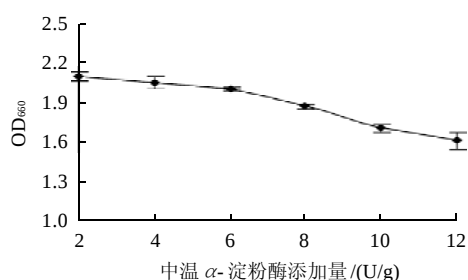


图1 中温 α-淀粉酶添加量对玉米汁悬浮稳定性的影响

Fig.1 Effect of mid-temperature α-amylase dosage on the suspension stability of fresh wax corn juice

2.2.2 中温 α-淀粉酶酶解时间对糯玉米汁悬浮稳定性的影响

酶解时间是影响酶解效果的一个重要因素,随着酶解时间的延长,糯玉米汁悬浮稳定性呈下降趋势(图2),在30min后趋于平缓。由于糯玉米浆营养丰富,长时间作用会造成风味和感官的变化。综合考虑,中温 α-淀粉酶酶解时间在30min。

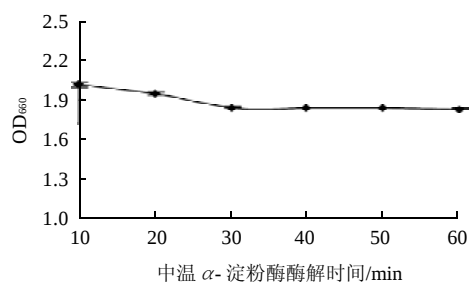


图2 中温 α-淀粉酶酶解时间对玉米汁悬浮稳定性的影响

Fig.2 Effect of mid-temperature α-amylase hydrolysis time on the suspension stability of fresh wax corn juice

2.2.3 中性蛋白酶添加量对糯玉米汁悬浮稳定性的影响

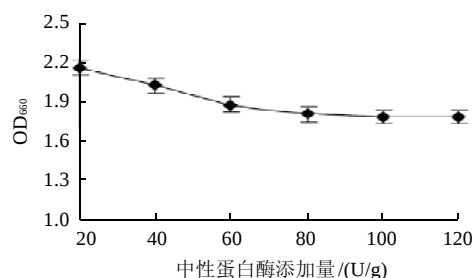


图3 中性蛋白酶添加量对玉米汁悬浮稳定性的影响

Fig.3 Effect of neutral protease dosage on the suspension stability of fresh wax corn juice

中性蛋白酶可降低糯玉米汁悬浮稳定性,由图3可知,中性蛋白酶在低添加量范围内,悬浮稳定性随着

酶量增加下降较快,当添加量大于80U/g时趋于稳定。这主要是由于蛋白酶将蛋白质等大分子物质分解为氨基酸等小分子颗粒,随着添加量的增加,水解趋于平衡。此时大颗粒物质经离心除去后,稳定性变化减小。

2.2.4 中性蛋白酶酶解时间对糯玉米汁悬浮稳定性的影响

酶解时间对玉米汁悬浮稳定性的影响较大,随着酶解时间的延长,悬浮稳定性不断升高(图4),当酶解时间大于40min后,变化趋于平缓,说明此时水解程度较完全。

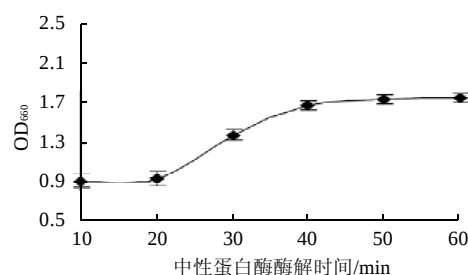


图4 中性蛋白酶酶解时间对玉米汁悬浮稳定性的影响

Fig.4 Effect of neutral protease hydrolysis time on the suspension stability of fresh wax corn juice

2.3 响应面法优化酶解制备糯玉米汁工艺条件

2.3.1 模型建立及显著性检验

表4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Box-Behnken experimental design and results

试验号	A	B	C	OD ₆₆₀	
				实测值	预测值
1	-1	-1	0	1.57	1.57
2	1	-1	0	1.41	1.39
3	-1	1	0	1.46	1.49
4	1	1	0	1.62	1.62
5	-1	0	-1	1.28	1.26
6	1	0	-1	1.36	1.36
7	-1	0	1	1.50	1.49
8	1	0	1	1.31	1.34
9	0	-1	-1	1.22	1.24
10	0	1	-1	1.32	1.31
11	0	-1	1	1.33	1.34
12	0	1	1	1.45	1.43
13	0	0	0	1.81	1.83
14	0	0	0	1.82	1.83
15	0	0	0	1.87	1.83
16	0	0	0	1.85	1.83
17	0	0	0	1.82	1.83

按照 Box-Behnken 试验设计的统计学要求,试验共设17个试验点,其中12个分析因子,5个零点以估计

试验误差^[11], 各试验点以随机顺序进行, 重复实验 3 次, 结果取平均值。利用 Design Expert 软件对 17 组试验数据(表 4)进行多元回归拟合分析, 获得鲜食糯玉米汁悬浮稳定性 OD₆₆₀ 值(Y)对编码自变量中温 α -淀粉酶添加量(A)、中性蛋白酶添加量(B)和中性蛋白酶作用时间(C)的二次多项回归方程:

$$Y = 1.83 - 0.014A + 0.04B + 0.052C + 0.078AB - 0.065AC + 0.0055BC - 0.14A^2 - 0.17B^2 - 0.33C^2 \quad (1)$$

为了检验方程的有效性, 对糯玉米汁酶解的数学模型进行方差分析, 并对各因素的偏回归系数进行检验, 结果见表 5。由表 5 可知, 本实验所选用的二次多项模型差异极显著($P_{\text{模型}} < 0.0001$), 方程失拟项不显著($P = 0.2336$), 说明各因素和响应值之间的关系可以用该模型来函数化。相关系数 $R^2 = 0.9922$, 表明悬浮稳定性 OD₆₆₀ 的实测值与预测值之间具有较好的拟合度。其校正决定系数 $R^2_{\text{Adj}} = 0.9821$, 表明有 98.21% 的悬浮稳定性 OD₆₆₀ 的总变异可以由此模型进行解释, 试验误差小, 因此所得到的回归方程能较好地用于对糯玉米汁酶解工艺的分析 and 预测。

表 5 糯玉米汁悬浮稳定性 OD₆₆₀ 回归模型方差分析

Table 5 Variance analysis for the developed regression model for optimization of the suspension stability of fresh wax corn juice

变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.81	9	0.09	98.34	< 0.0001	**
A	0.00157	1	0.00157	1.72	0.2316	
B	0.013	1	0.013	13.86	0.0074	*
C	0.022	1	0.022	23.78	0.0018	*
A ²	0.025	1	0.025	26.91	0.0013	*
B ²	0.017	1	0.017	18.35	0.0036	*
C ²	0.00012	1	0.00012	0.13	0.7267	
AB	0.083	1	0.083	90.62	< 0.0001	**
AC	0.13	1	0.13	140.82	< 0.0001	**
BC	0.46	1	0.46	498.61	< 0.0001	**
残差	0.00640	7	0.00091			
失拟项	0.00397	3	0.00132	2.18	0.2336	
误差项	0.00243	4	0.00061			
总和	0.82	16			$R^2 = 0.9922$ $R^2_{\text{adj}} = 0.9821$	

注: **. $P < 0.0001$, 差异极显著; *. $P < 0.05$, 差异显著。

从 3 个因素对悬浮稳定性 OD₆₆₀ 的影响来看, 回归方程的一次项 B($P = 0.0074$)和 C($P = 0.0018$)的偏回归系数显著, 说明中性蛋白酶的添加量和作用时间对悬浮稳定性的线性效应显著, 且影响顺序为 $C > B$, A($P = 0.2316$)不显著; 二次项 A²($P = 0.0013$)和 B²($P = 0.0036$)对悬浮稳定性 OD₆₆₀ 的曲面效应极显著, 而 C²($P = 0.7267$)不显著; 交互项 AB、AC 和 BC 的交互作用极显著($P < 0.0001$)。

2.3.2 鲜食糯玉米汁悬浮稳定性的响应面分析

对表 4 数据进行二次多元回归拟合得到图 5, 该图

可以直观反映出酶解条件对糯玉米汁悬浮稳定性的影响。根据二次模型所做的响应曲面可评价试验因素对鲜食糯玉米汁悬浮稳定性的两两交互作用, 以及确定各因素的最佳水平范围。如果一个响应曲面坡度相对平缓, 表明糯玉米汁悬浮稳定性可以忍受处理条件的变异, 此时对响应值影响小。相反, 如果一个响应曲面坡度非常陡峭, 则表明响应值对于处理条件的改变非常敏感^[12]。

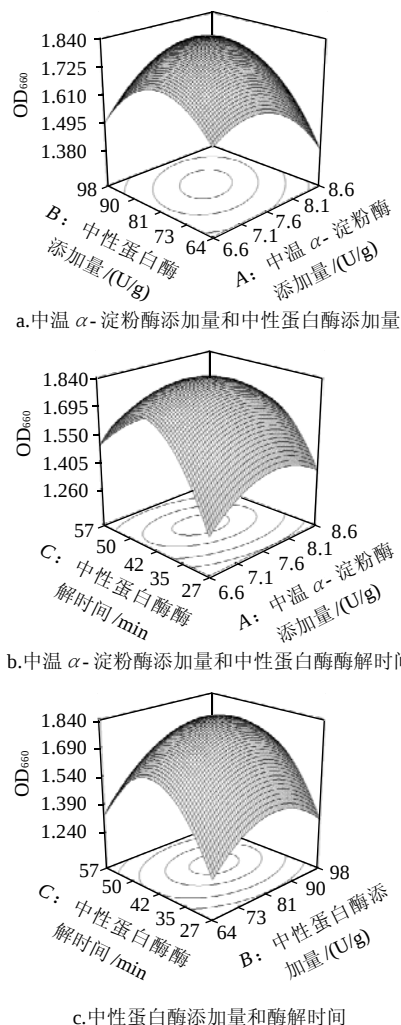


图 5 玉米汁悬浮稳定性与两两因素交互作用的响应面图
Fig.5 Response surface plots showing the interactive effects of various hydrolysis parameters on the suspension stability of fresh wax corn juice

在玉米汁的加工过程中, 由于会产生部分不溶于水的物质, 主要包括一些淀粉、蛋白质等大分子物质, 添加 α -淀粉酶既能作用于直链淀粉, 亦能作用于支链淀粉, 无差别地切断 α -1,4-链, 可将玉米淀粉水解为麦芽糖、葡萄糖和糊精等小分子物质^[13-14]; 而中性蛋白酶属于金属蛋白酶, 是外切酶, 它的水解部位是亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸等疏水性大分子氨基酸的氨基,

能将蛋白质水解成小分子肽类和氨基酸^[15], 因此两种酶的添加能提高糯玉米浆液的溶解性, 降低黏度, 同时还能提高其生物活性, 易为人体消化和吸收。

比较响应面三维图可知, 在所选取的范围内均存在极值, 即响应面最高点。由图 5a 可以看出, 当中性蛋白酶作用时间为 42min, 固定中温 α -淀粉酶添加量时, 随着中性蛋白酶添加量的增加, 玉米汁 OD₆₆₀ 不断提高, 当达到 81U/g 后, OD₆₆₀ 逐渐下降; 当中性蛋白酶添加量恒定, 中温 α -淀粉酶添加量在 7.1~8.0U/g 范围内, 玉米汁 OD₆₆₀ 逐渐提高, 达到极大值后逐渐下降。由图 5b、5c 可以看出, 当中温 α -淀粉酶和中性蛋白酶添加量固定不变时, 玉米汁 OD₆₆₀ 随着中性蛋白酶酶解时间的延长呈先升后降的趋势。在一定范围内, 当各试验因素编码接近 0 时, 玉米汁 OD₆₆₀ 较高。

2.3.3 酶解条件的优化及模型验证

综合考虑, 在试验所设定的参数范围内, 获得较高的悬浮稳定性的酶解工艺条件为中温 α -淀粉酶添加量 7.54U/g、中性蛋白酶添加量 82.93U/g、酶解时间 43.23min, 由此获得的糯玉米汁的理论悬浮稳定性 OD₆₆₀ 值为 1.838。为了验证响应曲面法所得结果的可靠性, 在获得的最佳酶解工艺条件的基础上, 为便于实验进行, 将糯玉米浆酶解效果的验证实验工艺条件修正为中温 α -淀粉酶添加量 7.5U/g、中性蛋白酶添加量 83U/g、酶解时间 43min, 重复实验 3 次, 实际测得的平均值为 1.832, 与理论预测值相比, 其相对误差在 0.5% 以内。说明基于响应曲面法所得的优化酶解工艺参数准确可靠, 与实际情况拟合很好, 具有一定的实践指导意义。

3 结 论

通过单因素试验和 Box-Behnken 响应面试验, 探讨了影响酶法制备鲜食糯玉米汁悬浮稳定性的关键因素及其相互作用, 建立了鲜食糯玉米汁悬浮稳定性 OD₆₆₀ 与淀粉酶添加量、蛋白酶添加量以及酶解时间之间关系的数学回归模型, 确定了最佳酶解工艺条件为中温 α -淀粉酶添加量 7.5U/g、中性蛋白酶添加量 83U/g、酶解时间 43min。在此条件下, 鲜食糯玉米汁悬浮稳定性得到较大程度的改善与提高。

回归分析和验证实验表明, 响应曲面法能够较好地鲜食糯玉米浆酶解条件进行分析和参数优化, 所得酶解工艺条件具有可行性。

将本研究确定的双酶水解条件应用到糯玉米汁饮料加工过程中, 不仅解决了高淀粉糯玉米制备浊汁饮料悬浮稳定性差难题, 而且所获得的糯玉米汁饮品营养价值高、口感爽口、香味浓郁。

参考文献:

- [1] 岳春. 玉米饮料稳定性的探讨[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 368-370.
- [2] ILAN S, TATIANA Y, UZI M. Involvement of proteins in cloud instability of Shamouti orange juice[J]. Journal of Food Chemistry, 1999, 47(7): 2623-2631.
- [3] 董文明, 袁唯, 王伟, 等. 甜玉米饮料加工技术[J]. 食品与机械, 2004, 20(4): 41-43.
- [4] 贾巍, 邓雨艳, 曾凡坤. 糯玉米饮料工艺及配方研究[J]. 试验报告与理论研究, 2007, 10(5): 18-20.
- [5] 孙祖莉, 郭明恩, 刘玉田, 等. 酶法液化糯玉米 5 号玉米制备仿乳玉米汁工艺研究[J]. 食品科技, 2005, 30(8): 58-60.
- [6] 赵凯, 许鹏举, 谷广烨. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534-536.
- [7] 尹建雄, 卢红, 谢强, 等. 3,5-二硝基水杨酸比色法快速测定烟草水溶性总糖、还原糖及淀粉的探讨[J]. 云南农业大学学报, 2007, 22(6): 829-833.
- [8] 林美娟, 宋江峰, 李大婧, 等. 用双波长分光光度法测定鲜食玉米中直链淀粉和支链淀粉含量[J]. 江西农业学报, 2010, 22(12): 117-119.
- [9] SIMS C A, BALABAN M O, MATTHEWS R F. Optimization of carrot juice color and cloud stability[J]. Journal of Food Science, 1993, 58(5): 1129-1131.
- [10] ZHANG Hui, WANG Zhang, XU Shiying. Optimization of processing parameters for cloudy ginkgo juice[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 80(4): 1226-1232.
- [11] 张瑶, 蒲彪, 刘云, 等. 枇杷果浆酶解工艺的响应面法优化[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 106-110.
- [12] 宋江峰, 李大婧, 刘春泉. 响应曲面法优选人工蛹虫草多糖微波提取工艺[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(5): 1143-1150.
- [13] 郝晓敏, 王遂, 崔凌飞. α -淀粉酶水解玉米淀粉的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(2): 141-143.
- [14] ASGHER M, JAVAID ASAD M, RAHMAN S U, et al. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 79(3): 950-955.
- [15] GU Zhengrong, GLATZ C E. Aqueous two-phase extraction for protein recovery from corn extracts[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 845(1): 38-50.