

随机质心衍射优化酶法去除客家娘酒中氨基甲酸乙酯工艺

沈 棚¹, 黄敏欣¹, 白卫东^{1,2,*}, 钱 敏¹, 朱 豪¹

(1.仲恺农业工程学院轻工食品学院, 广东 广州 510225; 2.华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642)

摘 要:通过随机质心衍射程序中的随机搜索, 图心搜索及优化映射设计试验确定客家娘酒中尿素去除的最佳工艺: 温度20.70℃、pH4.26、加酶量48.06mg/L、酶解时间50h、酶解2次。在此工艺条件下酶解处理过的客家娘酒中尿素含量降低为 (2.134 ± 0.024) mg/L。测得储藏1年后的该客家娘酒中氨基甲酸乙酯含量为 (25.632 ± 0.017) μg/kg, 与没有经过酶解的客家娘酒相比减少了88.5%。有效地降低客家娘酒中氨基甲酸乙酯的含量, 提高了饮用的安全性。

关键词:随机质心衍射; 酶解; 客家娘酒; 氨基甲酸乙酯

Optimization of Enzymatic Removal of Urethane from Hakka Mother Wine Using Random Centroid Optimization Methodology

SHEN Peng¹, HUANG Min-xin¹, BAI Wei-dong^{1,2,*}, QIAN Min¹, ZHU Hao¹

(1. College of Light Industry and Food, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;

2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The enzymatic removal of urethane from Hakka mother wine with acid urease was optimized by using random-centroid optimization through random search, centroid search and optimal mapping of the random centroid diffraction procedure. The optimal enzymatic hydrolysis conditions were found to be hydrolysis at 20.70 °C, initial pH 4.26 for 50 h with an enzyme of 48.06 mg/L repeated twice. The urea content in Hakka mother wine after the enzymatic treatment was decreased to (2.134 ± 0.024) mg/L. The urethane content in Hakka mother liquor after one-year storage was measured to be (25.632 ± 0.017) μg/kg, which showed an 88.5% reduction compared to that without enzymatic treatment. Therefore, the urethane content in Hakka mother wine can be reduced effectively by the optimized enzymatic treatment and the consumption safety is improved greatly.

Key words: random-centroid optimization; enzymatic hydrolysis; Hakka mother wine; urethane

中图分类号: TS261.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)22-0040-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201322008

广东客家娘酒又称客家黄酒, 是岭南一带客家民间传统发酵型黄酒。客家娘酒作为发酵类饮品, 其中存在的氨基甲酸乙酯是危害人类健康不可忽视的因素。氨基甲酸乙酯(ethyl carbamate, EC)是一种多位点致癌物, 可导致肺癌、淋巴瘤、肝癌和皮肤癌等多种疾病^[1-3]。国际癌症研究所把EC对人类的致癌毒性归为2A群。

尿素是EC一种重要的前体物质。黄酒中90% EC是由乙醇和尿素反应生成。在客家娘酒的酿造中, 尿素除小部分是原料直接带入外, 其余绝大部分来源于酵母代谢过程中L-精氨酸在精氨酸酶的作用下代谢而成^[4-5]。添加酸性脲酶可以使尿素分解为氨和二氧化碳^[6]。在客家娘酒压榨后勾兑澄清过程中添加脲酶进行处理, 再利用煎

酒时高温(90~92℃)破坏脲酶的残余活力。这样在不影响客家娘酒正常的生产工艺条件下, 降低成品酒中尿素含量。

目前正交试验和响应面试验设计普遍应用于优化试验, 但是正交和响应面试验都是依靠单因素试验寻找优化的中心点, 试验量大, 操作繁琐。Dou和Nakai发明的随机质心衍射优化(random-centroid optimization, RCO)是一种简单、方便、有效的试验设计方法^[7-8]。它可以在较少操作次数下完成试验的优化^[9]。RCO程序包括随机搜索、图心搜索和优化映射试验设计, 可以在一个周期内完成目标值和最优因素水平值的优化。在国外它成功应用于定点诱变, 溶菌酶葡聚糖制备条件和食品配方实验

收稿日期: 2012-10-29

基金项目: 2011年国家星火计划项目(2011GA780013); 2011年广东省科技计划项目(2011B090400452)

作者简介: 沈棚(1987—), 男, 硕士研究生, 研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail: shenpeng19870501@163.com

*通信作者: 白卫东(1967—), 男, 教授, 硕士, 研究方向为食品化学。E-mail: whitebai2002@yahoo.com.cn

优化^[10-11]。本实验将其应用于客家娘酒酿造工艺的优化,旨在降低由发酵代谢产物产生的安全隐患。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

客家娘酒(尿素含量为34.25mg/L)由仲恺农业工程学院食品化学实验室酿造;酸性脲酶(活力200U/g) 上海宝丰生化有限公司;乙腈(色谱纯) 广州自力色谱科仪有限公司;二氯甲烷(分析纯) 成都市科龙化工试剂厂;氨基甲酸乙酯标准品 阿拉丁试剂网;氨基甲酸丙酯标准品(纯度≥98.5%) 德国Dr. Ehrenstorfer公司;尿素(分析纯) 天津市福晨化学试剂厂;乙醇(分析纯) 天津市富宇精细化工有限公司。

1.2 仪器与设备

1100高效液相色谱仪、6890GC-5973MS气相色谱-质谱联用仪、DB-200色谱柱(30m×0.250mm, 0.25μm) 美国安捷伦科技公司;氨基酸分析柱(200mm×4.6mm, 5μm) Grace Davison Discovery Sciences; KL512型氮吹仪 北京康林科技有限公司; Chem Elut 50mL固相萃取柱 美国瓦里安有限公司; RE-52C 旋转蒸发器 巩义市予华仪器有限责任公司。

1.3 方法

1.3.1 尿素的检测^[12-13]

1.3.1.1 液相色谱条件

色谱柱: (200mm×4.6mm, 5μm)氨基酸分析柱; 流动相: 乙腈:水=95:5(V/V); 流速: 1mL/min; DAD检测波长: 203nm; 柱温: 40℃; 进样量: 10μL。

1.3.1.2 样品前处理

取5mL酶解过后的客家娘酒样品于小试管中, 经过0.45μm过滤头过滤, 将滤液转移至2mL样品瓶中用HPLC进行定量分析。

1.3.2 氨基甲酸乙酯的检测^[14-16]

1.3.2.1 样品前处理

称取3.00g酶解过后储藏1年的客家娘酒样品于100mL的烧杯中, 加入1.00mL氨基甲酸丙酯(nPC)内标使用液, 再加蒸馏水至总质量为40g, 混合均匀成测试液。将测试液移到萃取柱上, 再用10mL水冲洗烧杯, 然后将洗液转移进萃取柱, 让液体在柱子上吸附10min。再用150mL二氯甲烷分3次洗涤。用250mL的单口鸡心瓶收集洗脱液。用旋转蒸发仪在30℃水浴将洗脱液蒸发浓缩至2~3mL。用吸管把浓缩液转移到5mL的有刻度的收集管中, 用2mL二氯甲烷洗涤鸡心瓶, 把洗涤液并入收集管中。在温和的N₂吹扫下浓缩提取液至1mL, 将浓缩液转移至进样瓶中进GC-MS定量分析。

1.3.2.2 气相色谱条件

色谱柱: DB-200石英毛细柱(30m×0.250mm, 0.25μm); 进样口温度180℃; 载气: 氦气; 初始流速0.92mL/min; 进样量: 1μL, 不分流; 升温程序: 初始温度40℃保持0.75min, 以10℃/min升到60℃, 接着以3℃/min升到105℃, 再以1℃/min升到121℃, 然后以3℃/min升到127℃, 最后以30℃/min升温到220℃并保持4.00min。

1.3.2.3 质谱条件

电子电离(electron ionization, EI)离子源温度220℃; 接口温度220℃; 溶剂延迟9.5min; 微扫描宽度Ou; 检测器电压0(相对于调谐电压); SIM模式: 氨基甲酸乙酯(EC)定量离子为 m/z 62, 参考离子为 m/z 89、61; 氨基甲酸丙酯(nPC)定量离子为 m/z 62, 参考离子为 m/z 74、59。

1.3.3 随机质心衍射过程

在温度5~25℃、pH3~5、加酶量5~50mg/L、酶解时间24~72h范围内, 随着温度、pH值、加酶量及时间的提高酸性脲酶去除尿素的效果都会增强。由于时间的延长, 酶的催化活力将会下降, 所以酶解一次很难完全去除黄酒中的尿素^[6,17]。利用随机质心衍射软件进行试验设计, 将5个因素不同范围值输入到随机质心衍射程序中。其中包括温度(5~40℃)、pH(3~5)、加酶量(5~50mg/L)、酶解时间(24~96h), 酶解次数(1~3)^[18]。对于设计的因素值随机搜索提出10组试验, 每组实验重复3次, 然后对提出的每组实验进行尿素的检测。在10组试验之后, 对试验数据进行分析, 将获得的结果输入到随机质心衍射程序中进行图心搜索设计。软件对设计的因素将会提出新的4组试验, 每组试验重复3次, 然后将检测的结果再次输入到随机质心衍射程序中。最后对于检测到尿素含量最低值设计的因素的条件将会在优化映射中呈现。

1.4 数据分析

所有的样品进行3次平行试验, 并计算标准差。采用SPSS 19.0软件对每次设计的组内试验结果进行单因素方差分析, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 随机搜索设计及其结果

随机质心衍射是以选择的5个因素经验值范围为基础进行随机搜索的。在优化的过程中设计了10水平的试验(表1), 对不同条件下酶解试验进行尿素含量的检测, 结果如表2所示。

表1 随机搜索试验设计

Table 1 Random search experimental design

序号	温度/℃	pH	加酶量/(mg/L)	时间/h	酶解次数
1	13.45(13.5)	4.47	11.83	82.61(83)	2.24(2)
2	39.24(39.3)	4.01	28.06	61.85(62)	1.20(1)
3	22.56(22.6)	3.91	45.48	52.14(52)	1.79(2)
4	37.60(37.6)	3.67	17.12	62.14(62)	1.50(2)
5	11.06(11.1)	4.38	12.2	32.15(32)	2.89(3)
6	20.69(20.7)	4.26	48.06	50.12(50)	2.20(2)
7	8.21(8.2)	3.14	30.46	49.06(49)	2.29(2)
8	19.94(19.9)	3.98	38.27	71.37(71)	1.08(1)
9	10.45(10.5)	4.93	38.75	76.46(76)	2.17(2)
10	13.21(13.2)	3.15	37.31	80.3(80)	2.35(2)

注：序号代表不同的因素值试验组合，表中的因素值是通过随机质心衍射程序设计的。括号中的值是进行四舍五入处理后的值，在试验过程中按照这些值进行操作的。

表2 随机搜索设计试验结果

Table 2 Results of random search experimental design

序号	1	2	3	4	5
尿素含量/(mg/L)	6.862±0.013 ^b	7.653±0.009 ^a	3.172±0.021 ⁱ	6.486±0.005 ^c	5.841±0.018 ^f
序号	6	7	8	9	10
尿素含量/(mg/L)	2.134±0.024 ^j	5.736±0.031 ^l	6.421±0.015 ^d	4.863±0.007 ^e	4.627±0.027 ^h

注：序号代表在不同条件下酶解后黄酒样品。结果表示为平均值±标准差。字母a~j代表不同序号组结果差异显著(P<0.05)。

2.2 图心搜索试验设计及结果

将随机搜索设计检测的值输入到程序中进行图心优化搜索。在完成图心优化搜索之后，出现新的四组因素水平值的试验设计(表3)。图心搜索试验结果如表4所示。

表3 图心搜索试验设计

Table 3 Centroid search experimental design

序号	温度/℃	pH	加酶量/(mg/L)	时间/h	酶解次数
1	15.02(15.0)	3.88	40.01	61.62(62)	2.16(2)
2	15.59(15.6)	4.13	36.36	58.23(58)	2.28(2)
3	15.15(15.2)	3.77	34.70	52.75(53)	2.30(2)
4	14.59(14.6)	4.12	34.99	51.99(52)	2.27(2)

注：序号代表不同的因素值试验组合，表中的因素值是通过随机质心衍射程序设计的。括号中的值是进行四舍五入处理后的值，在试验过程中按照这些值进行操作的。

表4 图心设计试验结果

Table 4 Results of centroid search experimental design

序号	1	2	3	4
尿素含量/(mg/L)	3.236±0.007 ^d	3.451±0.010 ^c	3.673±0.004 ^a	3.638±0.011 ^b

注：序号代表在不同条件下酶解后客家娘酒中尿素的含量。字母a~d代表不同序号组之间差异显著(P<0.05)。

2.3 优化映射试验结果

最终的优化映射为酶解工艺提供了一组最优组合。最优酶解条件下5个因素的最优水平值如图1中X轴箭头所示。图中加酶量、pH值、酶解次数等因素朝着最优值呈现更多的趋势线，而其他因素的映射表现出较少的趋势线与未定义方向。结果表明，加酶量、pH值、酶解次数是影响酶解效果的重要因素。由于客家娘酒中存在某

些钝化酸性脲酶酶活性的因素，随着处理时间的延长，酶的活性在这些影响因素的作用下不断下降，当处理后的50h后尿素分解率基本趋于平衡。客家娘酒中的pH值在3.5~5之间，在这个范围内随着pH值增加，酶解效果也越好，当pH值在4.26以上时酶解效果增加幅度明显减少。当温度在5~20.7℃范围内，酶解效果明显增加，再提高温度，酶解效果增幅不明显。当温度过高时，会影响酸性脲酶的活性，同时也会加速尿素与乙醇的反应生成氨基甲酸乙酯。在加酶量及酶解次数增加会提高酶解效果，综合考虑成本和酶解效果问题，选择酶解2次，加酶量48.06mg/L，最佳酶解条件参数及最优值见表5。

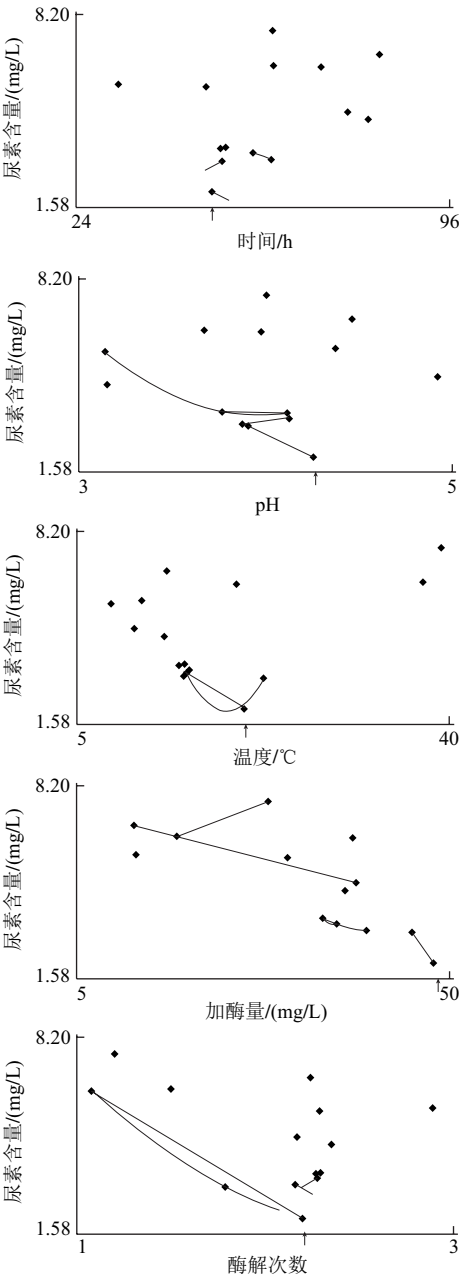


图1 优化尿素酶解目标的映射

Fig.1 Optimal target mapping for enzymatic hydrolysis of urea

表5 最佳酶解条件参数及最优值
Table 5 Optimal parameters of enzymatic hydrolysis and corresponding urea content

温度/℃	pH	加酶量/(mg/L)	时间/h	酶解次数	尿素含量/(mg/L)
20.69(20.70)	4.26	48.06	50.12(50)	2.2(2)	2.134±0.024

2.4 最优酶解条件下尿素检测结果

在温度20.70℃、pH4.26、加酶量48.06mg/L、酶解时间50h、酶解2次的最优条件下对客家娘酒样品进行处理,尿素的出峰时间为7.896min,处理后尿素的检测结果为(2.134±0.024)mg/L,为原酒样中的6.23%。说明在最佳条件下可以有效的去除客家娘酒中尿素的含量,检测液相图如图2所示。

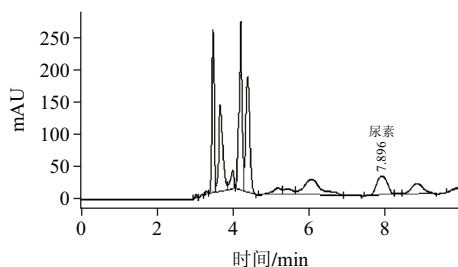


图2 尿素检测的液相图
Fig.2 HPLC profile of urea

2.5 氨基甲酸乙酯检测结果

对温度20.70℃、pH4.26、加酶量48.06mg/L、酶解时间50h、酶解2次的条件下进行酶解处理后储藏1年的样品进行氨基甲酸乙酯检测。氨基甲酸乙酯出峰时间为24.82min,氨基甲酸丙酯出峰时间为28.89min,检测到储藏后的处理过的客家娘酒氨基甲酸乙酯含量为(25.632±0.017)μg/kg,与没有经过酶解的客家娘酒相比减少了88.5%,结果见图3。

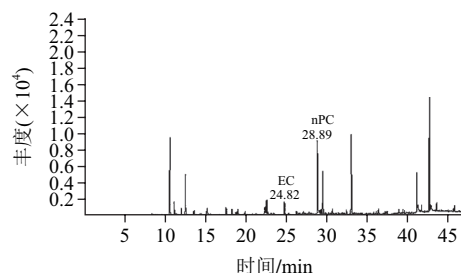


图3 客家娘酒样品总离子图

Fig.3 Total ion current chromatograph of Hakka mother wine sample

3 结论

通过随机质心衍射优化确定客家娘酒中尿素去除的最佳工艺: 温度20.70℃、pH4.26、加酶量48.06mg/L、酶解

时间50h, 酶解2次。在此工艺下客家娘酒中尿素含量能降低为(2.134±0.024)mg/L, 经过酶解的客家娘酒储藏1年后氨基甲酸乙酯含量为(25.632±0.017)μg/kg, 明显低于世界卫生组织规定的日本清酒中EC限量标准(100μg/kg), 有效地降低客家娘酒中氨基甲酸乙酯含量。

参考文献:

- [1] SAKANO K, OIKAWA S, HIRAKU Y, et al. Metabolism of carcinogenic urethane to nitric oxide is involved in oxidative DNA damage[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2002, 33(5): 703-714.
- [2] MILLER Y E, DWYER-NIELD L D, KEITH R L, et al. Induction of a high incidence of lung tumors in C57BL/6 mice with multiple ethyl carbamate injection[J]. Cancer Letters, 2003, 198(2): 139-144.
- [3] TOMISAWA M, SUEMIZU H, OHNISHI Y, et al. Mutation analysis of vinyl carbamate or urethane induced lung tumors in rasH2 transgenic mice[J]. Toxicology Letters, 2003, 142(2): 111-117.
- [4] 顾国贤. 酿造酒工艺学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 471-478.
- [5] LIU S Q, PRITCHARD G G, HARDMAN M J, et al. Arginine catabolism in wine lactic acid bacteria: is it via the arginine deiminase pathway or the arginase-urease pathway[J]. Journal of Applied Microbiology, 1996, 81(5): 486-492.
- [6] 周建弟, 丁关海, 郑志强. 酸性脲酶分解黄酒中尿素特性的研究[J]. 中国酿造, 2006(11): 45-46.
- [7] NAKAI S, ARTEAGA G E, LI-CHAN E C Y. Computer-aided techniques for quantitative structure activity relationships study of food proteins[M]. New York: Hettiarachchy N S, 2007: 121-145.
- [8] NAKAI S, DOU J, VICTOR L K, et al. Optimization of site-directed mutagenesis. 1. new random-centroid optimization program for windows useful in research and development[J]. Journal of Agricultural Food Chemistry, 1998, 46(4): 1642-1654.
- [9] AHMAD S, YAGHMAEE P, DURANCE T. Optimization of dehydration of lactobacillus salivarius using radiant energy vacuum[J]. Food and Bioprocess Technology, 2012, 5(3): 1019-1027.
- [10] NAKAMURA K, HATANO S, MATSUOKA A, et al. Optimum condition of high pressure treatment for the preparation of lysozyme-dextran complex found by random-centroid optimization[J]. Food Science and Technology Research, 2001, 7(1): 84-87.
- [11] SAITO M, NAKAI S. Application of computer-aided optimization technique for food science[J]. Kagaku to Seibutsu, 1998, 36: 12-14.
- [12] 王晓娟, 傅力, 李建飞. 高效液相色谱测定黄酒中尿素的含量[J]. 食品工业科技, 2009, 30(5): 318-319.
- [13] 陆永梅, 董明盛, 吕欣, 等. 高效液相色谱法测定黄酒中生物胺的含量[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 196-199.
- [14] 巫景铭, 洪瑞泽. SPE结合GC/MS 测定黄酒中氨基甲酸乙酯[J]. 酿酒, 2010, 37(6): 67-70.
- [15] 谭文渊, 袁东, 付大友, 等. 气相色谱-质谱联用测定白酒中的氨基甲酸酯和氨基甲酸乙酯[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 305-307.
- [16] 钟其顶, 姚亮, 熊正河. 采用 GC/MS和 HPLC-FLD 2种方法测定黄酒中的EC含量[J]. 食品发酵工业, 33(3): 115-119.
- [17] 陆健, 曹钰. 葡萄酒中氨基甲酸乙酯的研究[J]. 食品发酵工业, 1996(3): 79-82.
- [18] WU Xia, YU Xiong, JING Hao. Optimization of phenolic anti-oxidant extraction from Wuweiz (*Schisandra chinensis*) pulp using random-centroid optimization methodology[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12: 6255-6266.