

不同发酵条件对糙米酵素中活性成分的影响

李 飞, 隋 新*, 苏 红, 代娇阳, 刘 佳, 张国峰

(吉林化工学院 生物与食品工程学院, 吉林 吉林 132022)

摘 要: 发芽糙米酵素是以发芽糙米为主要原料, 经酵母发酵制成的功能性食品。发芽糙米酵素中含 γ -氨基丁酸、谷胱甘肽、 γ -谷维醇等多种生理功能活性成分。本试验研究了蜂蜜添加量、酵母活化液添加量、发酵时间和发酵温度等因素对产品中谷胱甘肽、 γ -氨基丁酸与淀粉酶活力的影响, 并以 γ -氨基丁酸含量为评价指标, 通过Plackett-Burman试验设计方法对其生产工艺进一步优化。结果表明: 当蜂蜜添加量为8%, 发酵温度为30℃, 时间为3.9 h, 酵母活化液添加量为13%时, γ -氨基丁酸的含量最高为0.80 mg/mL。

关键词: 发芽糙米酵素; 谷胱甘肽; γ -氨基丁酸; 淀粉酶活力

中图分类号: TS210.5

文章编号: 0254-5071 (2016) 11-0162-05

doi:10.11882/j.issn.0254-5071.2016.11.034

Effect of different fermentation conditions on the active ingredients in the brown rice leaven

LI Fei, SUI Xin*, SU Hong, DAI Jiaoyang, LIU Jia, ZHANG Guofeng

(College of Biological and Food Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China)

Abstract: Germinated brown rice leaven is fermented by yeast with germinated brown rice. It contains lots of active ingredients such as γ -amino butyric acid (GABA), glutathione, γ -oryzanol and so on. The effect of honey addition, yeast active fluid addition, fermentation time and temperature on glutathione, GABA and amylase activity was studied. Using GABA content as evaluation index, the process was optimized by response surface methodology. The results indicated that when honey addition was 8%, fermentation temperature was 30℃, time was 3.9 h, and yeast active fluid addition was 13%, the GABA content was the highest of 0.80 mg/ml.

Key words: brown rice leaven; glutathione; γ -amino butyric acid; amylase activity

发芽糙米酵素是以发芽糙米为主要原料, 添加蜂蜜和水等辅料进行调配, 经酵母发酵制成的具有特殊保健功能的发酵类食品^[1]。在发酵过程中酵母菌利用调配的营养物质产生出多种复合酶类, 其营养价值远远超过了发芽糙米本身^[2]。发芽糙米酵素中富含 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)、谷胱甘肽、 γ -谷维醇等多种生理功能活性成分和 β -胡萝卜素、核黄素、VE、B族维生素以及各种分解酵素、膳食纤维、锌、钙、铁等成分^[3]。通过这些成分的共同作用能帮助机体营养素迅速吸收、促进新陈代谢、并能活化细胞、调节生理平衡、减少各种疾病的发生、提高机体免疫力, 从而可以达到增强人体健康的目的^[4-6]。

发芽糙米酵素不仅可以直接食用, 也可以作为产品改良剂或添加剂应用于食品生产加工过程中。目前, 其产地主要集中在日本和我国台湾地区, 并已研究开发出品种多样的糙米酵素食品, 而我国大陆地区的相关产品目前还处于起步阶段。因此, 研究发芽糙米酵素的相关工艺、发酵前后营养成分的变化及各种糙米酵素产品的开发就成为研究热点。本研究测定在不同发酵条件下发芽糙米酵素中谷胱

甘肽、 γ -氨基丁酸、淀粉酶三种成分的含量的变化, 并在此基础上对发芽糙米酵素的生产工艺进行了优化, 旨在为今后的发芽糙米酵素产品开发提供一定的依据, 为进一步推动粮食深加工产业的发展, 满足消费者的需求提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

糙米: 黑龙江省宁安市万佳米业有限公司; 蜂蜜(百花椴树蜜): 市售; 活性干酵母: 安琪酵母股份有限公司。

四硼酸钠、苯酚、次氯酸钠、乙醇(分析纯)、GABA标准品、三氯丁酸、乙二胺四乙酸二钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、二硝基苯甲酸标准品、谷胱甘肽(glutathione, GSH)标准品、3,5-二硝基水杨酸、丙三醇、葡萄糖标准品、可溶性淀粉: 国药集团化学试剂有限公司; 蒸馏水(以下所用水均为蒸馏水)。

1.2 仪器与设备

DH-250恒温培养箱: 北京中兴伟业有限公司; WGLL-65BE鼓风干燥箱、DK98电热恒温水浴锅: 天津泰斯特仪器有限公司; DFY-1000高速粉碎机: 上海德洋意那邦仪器有

收稿日期: 2016-05-26

基金项目: 2016年度吉林省“大学生创新创业训练计划”项目

作者简介: 李 飞(1982-), 女, 讲师, 博士, 研究方向为农产品加工与贮藏。

*通讯作者: 隋 新(1972-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为农产品加工与贮藏。

限公司;DDL-5M高速离心机:湖南沪康离心机有限公司;
T3紫外分光光度计:北京普析通用仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 发芽酵素生产工艺流程

糙米 → 发芽糙米 → 干燥 → 粉碎 → 调配 → 搅拌 → 发酵 → 干燥 → 粉碎 → 成品酵素
 蜂蜜 ↓ 酵母活化液 ↓

1.3.2 单因素试验^[7-9]

1) 蜂蜜添加量对各种活性成分的影响:取10 g发芽糙米粉分别于100 mL水中,分别添加2%、4%、6%、8%、10%、12%的蜂蜜,14%的酵母活化液,于培养皿中搅拌均匀,置于恒温培养箱中32℃,发酵2 h,然后于鼓风干燥机中干燥,粉碎后得到成品。测定谷胱甘肽、 γ -氨基丁酸、淀粉酶活力三种活性成分含量。

2) 酵母活化液添加量对各种活性成分的影响:取10 g发芽糙米粉分别于100 mL水中,分别添加6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%的酵母活化液(取活性干酵母与40℃温水,以1:15的比例活化20 min),其他操作同上,得出酵母活化液最佳添加量。

3) 发酵时间对各种活性成分的影响:分别置于恒温培养箱中32℃,发酵1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h,其他操作同上,得出最佳发酵时间。

4) 发酵温度对各种活性成分的影响:取发芽糙米粉于6个培养皿中,分别置于28℃、30℃、32℃、34℃、36℃、38℃条件下,得出最佳发酵温度。

1.3.3 测定方法

(1) γ -氨基丁酸含量的测定^[10-11]

标准曲线的制作:分别取1 mg/mL标准GABA溶液0、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL于6个试管中,加水补足至1.0 mL,加1 mL四硼酸钠缓冲溶液,1 mL重熏苯酚,7.5%的次氯酸钠溶液5 mL,沸水浴10 min,冰浴5 min,然后加入体积分数60%乙醇2 mL,用分光光度计于波长640 nm处测定吸光度值,绘制标准曲线。

样品的测定:取一定量的成品酵素加入体积分数60%乙醇(料液比为1:5(g:mL)),70℃水浴中回流提取2 h,取离心后上清液备用,取上清液1 mL,按照标准曲线的步骤操作,根据样品吸光度值计算样品中GABA含量。

(2) 谷胱甘肽含量的测定

按照参考文献[12]中的方法,测定样品中的GSH的含量。

(3) 淀粉酶活力的测定^[13-14]

葡萄糖标准曲线的制作:分别取2 mg/mL葡萄糖标准溶液0、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1.0 mL、1.2 mL、1.4 mL、1.6 mL、1.8 mL、2.0 mL于25 mL比色管,加水至2 mL,再加入3,5-二硝基水杨酸溶液3 mL,沸水显色5 min,流水迅速冷却后用水定容至25 mL,摇匀,在波长540 nm处测

定吸光度值。以葡萄糖量(mg)为横坐标,以吸光度值为纵坐标,绘制葡萄糖标准曲线。

样品的测定:称取2.5 g过100目的糙米酵素粉,加蒸馏水25 mL,在室温下(25℃)放置提取30 min,每隔5 min搅动1次,使其充分提取。然后3 000 r/min离心10 min,将上清液倒入50 mL容量瓶中,加蒸馏水定容至刻度,摇匀,即为淀粉酶原液。吸取上述淀粉酶原液5 mL,放入50 mL容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,摇匀,即为淀粉酶稀释液。

取3支干净的试管,编号,各加入1 mL淀粉酶稀释液,1号试管中加入3,5-二硝基水杨酸溶液2 mL,将各试管置于40℃恒温水浴中保温10 min,各加入1%淀粉溶液1 mL,在40℃恒温水浴中保温5 min,在2、3号试管中分别加入2 mL的3,5-二硝基水杨酸溶液,按标准曲线方法测吸光度值,计算2、3号试管吸光度平均值与1号试管吸光度值之差,在标准曲线上查出相应葡萄糖量(mg)。进而计算出样品的淀粉酶活力(U/g)(40℃时,5 min内水解单位质量淀粉(1%的淀粉溶液)释放1 mg葡萄糖所需酶量为1 U/g)^[15]。

1.3.4 响应面设计

综合单因素试验结果,选取发酵温度、酵母活化液添加量、发酵时间3个因素为评价因素,以 γ -氨基丁酸含量为响应值,在单因素试验基础上采用3因素3水平的响应面分析方法,优化糙米的发酵条件。

表1 响应面设计因素与水平
Table 1 Factors and levels of response surface experiment

因素	-1	0	1
A酵母活化液添加量/%	12	14	16
B发酵时间/h	3	4	5
C发酵温度/℃	28	30	32

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果的确定

2.1.1 蜂蜜添加量的确定

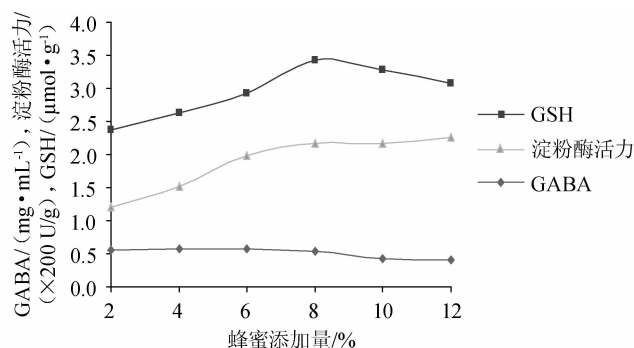


图1 蜂蜜添加量对各成分的影响

Fig. 1 Effect of honey addition on each ingredient

蜂蜜添加量对 γ -氨基丁酸含量、谷胱甘肽含量、淀粉酶活力的影响见图1。由图1可知,蜂蜜添加量对三种活性成分含量的影响并不是很大,谷胱甘肽含量和淀粉酶活

力随着蜂蜜添加量升高而升高,谷胱甘肽含量在蜂蜜添加量8%处达到较高水平, γ -氨基丁酸含量一开始处于稳定水平,在8%之后随着蜂蜜添加量的增加,GABA含量有缓慢下降的趋势,因此选择蜂蜜添加量为8%为最佳。

2.1.2 酵母活化液添加量的确定

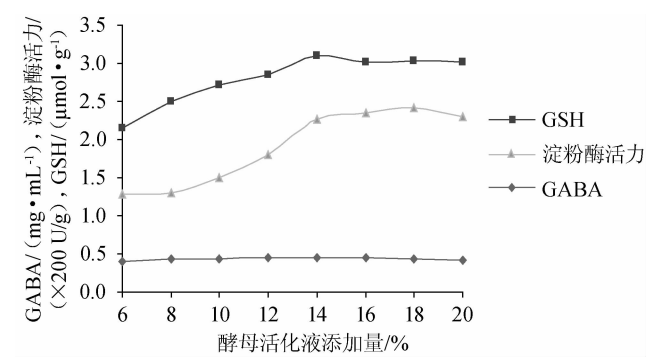


图2 酵母活化液添加量对各成分的影响

Fig. 2 Effect of yeast active fluid addition on each ingredient

酵母活化液添加量对 γ -氨基丁酸含量、谷胱甘肽含量、淀粉酶活力的影响见图2。由图2可以得出,随着酵母活化液添加量的增加,GSH以及淀粉酶活力均呈上升的趋势,GABA含量相对稳定,添加量超过14%后,GABA和GSH含量变化平缓,而淀粉酶活力下降。因此本试验选取酵母活化液添加量为14%。

2.1.3 发酵时间的确定

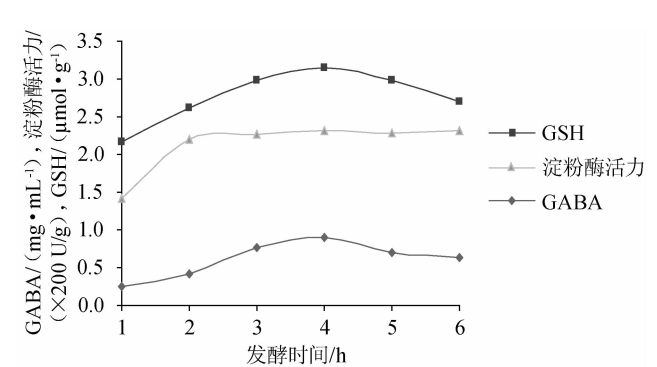


图3 发酵时间对各成分的影响

Fig. 3 Effect of fermentation time on each ingredient

发酵时间对GSH、淀粉酶活力和GABA含量的影响见图3。由图3可知,当发酵时间从1 h增加至2 h时,淀粉酶活力迅速增加,之后随着时间延长,淀粉酶活力基本上保持不变,而GABA和GSH的含量均在4 h的时候达到最大值,4 h后随着时间的增加出现下降的趋势,故最佳发酵时间选择为4 h。

2.1.4 发酵温度的确定

发酵温度对各成分的影响见图4。由图4可知,淀粉酶活力在30 ℃时达到最大值,之后随着温度的升高而下降,GABA含量是在32 ℃时达到最高点,随后随着温度的升高

而渐近下降,而GSH含量起初则随着温度升高而出现上升的现象,在30 ℃达到最大值后开始下降,32 ℃开始一直处于较平稳的含量,综合考虑,发酵温度取30 ℃为最佳。

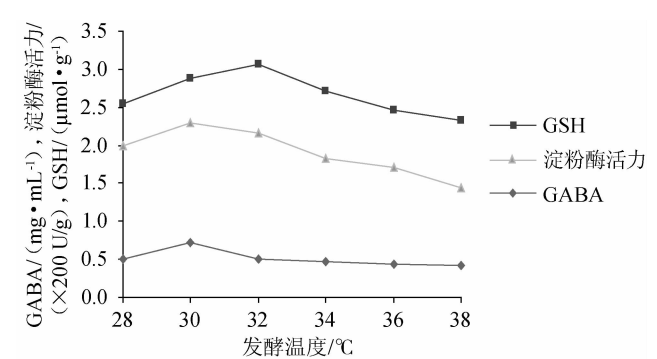


图4 发酵温度对各成分的影响

Fig. 4 Effect of fermentation temperature on each ingredient

2.2 响应面法优化工艺条件的结果

按照表1的响应面设计方案进行响应面试验,结果如表2所示,方差分析结果见表3。

试验号	A发酵温度/℃	B发酵时间/h	C酵母活化液/%	γ -氨基丁酸/(mg·mL ⁻¹)
1	30.00	4.00	14.00	0.76
2	32.00	4.00	12.00	0.55
3	32.00	4.00	16.00	0.53
4	28.00	4.00	12.00	0.69
5	30.00	3.00	12.00	0.73
6	30.00	4.00	14.00	0.77
7	28.00	5.00	14.00	0.50
8	28.00	4.00	16.00	0.50
9	30.00	5.00	16.00	0.57
10	30.00	5.00	12.00	0.66
11	30.00	4.00	14.00	0.80
12	30.00	4.00	14.00	0.85
13	32.00	3.00	14.00	0.48
14	28.00	3.00	14.00	0.47
15	32.00	5.00	14.00	0.47
16	30.00	4.00	14.00	0.88
17	30.00	3.00	16.00	0.62

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	Prob> F
模型	0.31	9	0.034	16.59	0.000 6
A	0.001 953	1	0.001 953	0.95	0.361 8
B	0.001 513	1	0.001 513	0.74	0.419 0
C	0.020	1	0.020	9.80	0.016 6

续表

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	Prob>F
AB	1.103E-004	1	1.103E-004	0.054	0.823 3
AC	0.007 744	1	0.007 744	3.77	0.093 2
BC	2.723E-004	1	2.723E-004	0.13	0.726 4
A ²	0.18	1	0.18	86.78	<0.000 1
B ²	0.070	1	0.070	34.09	0.000 6
C ²	0.006 454	1	0.006 454	3.15	0.119 4
残差	0.014	7	0.002 052		
失拟性	0.003 477	3	0.001 159	0.43	0.745 5
纯误差	0.011	4	0.002 722		
总差	0.32	16			
R ²	0.955 2				
R _{Adj} ²	0.897 6				
R _{Pred} ²	0.773 5				
C.V %	7.12				
信噪比	16.413				

注: $p < 0.05$ 为显著相关, $p < 0.01$ 为极显著相关。

由于各因素对以 γ -氨基丁酸含量的影响不是简单的线性关系,为了更明确各因素对响应值的影响,采用Plackett-

Burman试验设计方法对试验数据进行分析,得到模型的多元回归方程为:

$$R = 0.81 - 0.016A - 0.014B - 0.050C - 0.00525AB + 0.044AC + 0.008253BC - 0.21A^2 - 0.13B^2 - 0.039C^2$$

由方程的显著性分析可知,模型的 F 值为16.59,相应的概率 $P=0.000 6$,由方程显著性检验可知,该方程的模型达到了极显著($P < 0.01$)。由失拟性分析可知, $F_2=0.43$,相应的概率 $P=0.745 5$ ($P < 0.05$),失拟性分析表明该方程无失拟性因素存在,回归模型与实际值能较好的拟合。模型的变异系数为7.12,说明模型数据准确度较好,具有一定的可靠性;信噪比 $16.413 > 4$,表明模型可以用于实际预测。

各因素的 F 值可以反映出各因素对实验指标的重要性, F 值越大,表明对试验指标的影响越大,即重要性越大。从 F 值分析可知, A 、 B 、 C 的 F 值分别0.95、0.74、9.80,各因素影响程度从大到小依次为 $C > A > B$,即酵母活化液添加量 $>$ 发酵时间 $>$ 发酵温度。

2.3 响应面结果分析

图5为因素交互作用的响应面和等高线图,从图中可知3个响应曲面均开口向下,说明响应值存在极大值。发酵温度和活化液添加量的交互作用对GABA含量的影响更大。

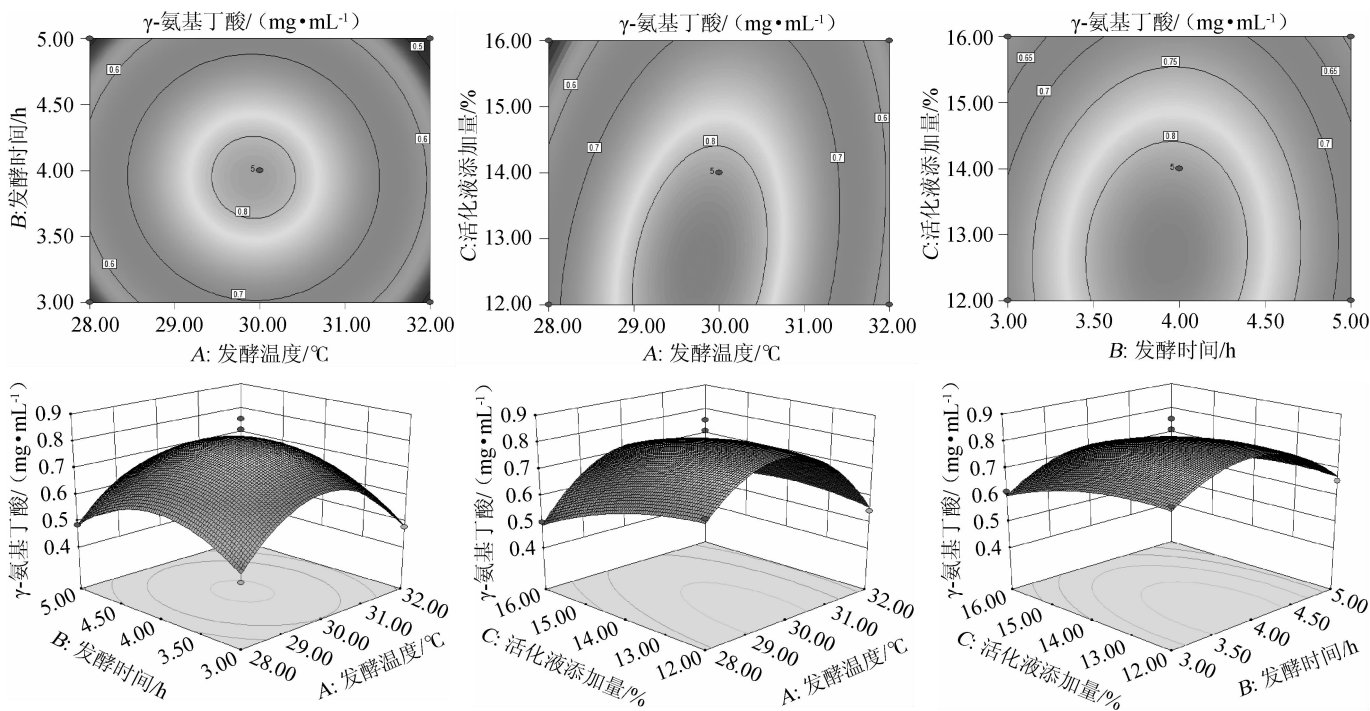


图5 发酵温度、发酵时间、活化液添加量交互作用对GABA含量影响的响应面和等高线

Fig. 5 Response surface plots and contour line of effects of interaction between fermentation temperature, time and active fluids on GABA content

2.4 最佳工艺验证

通过模型分析可知,当蜂蜜添加量为8%,发酵温度为 29.77°C ,时间为 3.93 h ,酵母活化液添加量为 12.58% 时, γ -氨基丁酸的预测含量为 0.83 mg/mL 。为了检验试验结果

与理论情况是否一致,并考虑更当好的应用于实际生产,在发酵温度 30°C ,发酵时间 3.9 h ,酵母活化液添加量为 13% 条件下进行3次平行试验,得 γ -氨基丁酸实际含量为 0.80 mg/mL ,验证值与预测结果接近,说明采用响应面法优化得到的

发酵条件可靠。

3 结论

本试验研究了酵母活化液添加量、发酵温度和发酵时间等因素对发芽糙米酵素在发酵过程中 γ -氨基丁酸含量、谷胱甘肽含量和淀粉酶活力大小的影响。试验证明发酵时间对谷胱甘肽含量的影响最为显著,酵母活化液添加量对淀粉酶活力的影响显著,酵母活化液添加量对 γ -氨基丁酸含量的影响最为显著。为了更好的应用于实际,采用发酵温度30℃,发酵时间3.9 h,酵母活化液添加量为13%条件下进行验证试验,得 γ -氨基丁酸实际含量0.80 mg/mL,与验证值预测结果(0.83 mg/mL)基本吻合,说明采用响应面法优化得到的发酵条件可靠。

参考文献:

- [1] 丁俊肖,刘 贞,赵思明. 糙米发芽过程中内源酶活力及主要成分的变化[J]. 食品科学, 2011, 32(11): 29-32.
- [2] KIM D J, OH S K, YOON M R, et al. The change in biological activities of brown rice and germinated brown rice[J]. *J Soc Food Sci Nutr*, 2011, 40(6): 781-789.
- [3] 李向红,刘永乐,俞 健,等. 精白保胚米发芽过程中淀粉酶及相关营养成分的变化[J]. 食品科学, 2013, 34(3): 37-40.
- [4] ESA N M, KADIR K K A, AMOM Z, et al. Antioxidant activity of white rice, brown rice and germinated brown rice (*in vivo* and *in vitro*) and the effects on lipid peroxidation and liver enzymes in hyperlipidemia rabbits [J]. *Food Chem*, 2013, 141(2): 1306-1312.
- [5] 樊秀花,王步江,张爱琳. 发酵糙米的加工工艺[J]. 食品研究与开发, 2012(4): 120-122.
- [6] 袁周率,易兴建,许静雅,等. 糙米酵素发酵工艺的研究[J]. 农产品加工, 2013(11): 26-31.
- [7] 牛广财,朱 丹,左 锋,等. 糙米酵素发酵工艺的中试研究[J]. 中国酿造, 2014, 33(6): 96-98.
- [8] 金明晓. 糙米酵素最佳工艺条件研究[J]. 现代商贸工业, 2013(9): 189-190.
- [9] 杨慧萍,李常钰,王超超,等. 响应面法优化糙米发芽工艺条件研究[J]. 粮食与饲料工业, 2011(4): 1-5.
- [10] 孙 波,梁海文,迟玉杰,等. 比色法快速测定酶转化反应中 γ -氨基丁酸含量的研究[J]. 食品科技, 2008(5): 210-215.
- [11] 李志江,关 琛,翟爱华,等. 糙米酵素发酵工艺对 γ -氨基丁酸和谷胱甘肽含量影响研究[J]. 农产品加工, 2014, 1(1): 6-8.
- [12] 李 玲. 植物生理学模块实验指导[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 101-105.
- [13] 牛广财,朱 丹,左 锋,等. 糙米酵素制备方法的比较研究[J]. 农业科技与装备, 2014(9): 54-57.
- [14] 杨慧萍,李常钰,唐培安,等. 发芽对糙米理化特性的影响[J]. 粮食与饲料工业, 2012(5): 1-6.
- [15] 丁晓艳,任 清,卢舒娴,等. 微生物酵素主要功效酶活力的测定[J]. 食品科技, 2008, 33(4): 193-196.

欢迎订阅2017年 中国酿造杂志

《中国酿造》创刊于1982年,是由中国商业联合会主管,中国调味品协会及北京食品科学研究院主办的综合性科技期刊。《中国酿造》历次被评为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、《中国知网》重点收录期刊、《万方数据库》全文收录期刊、《中文科技期刊数据库》来源期刊、中国学术期刊网出版总库收录期刊、美国《乌利希期刊指南》(UPD)收录期刊、英国《食品科学文摘》(FSTA)收录期刊、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI)收录期刊、美国《化学文摘》(CA)收录期刊、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)收录期刊、中国科学评价研究中心(RCCSE)数据库收录期刊,也是学位与研究生教育的中文重要期刊。

《中国酿造》重点刊登调味品、酿酒、生物工程技术、生物化工、食品生物技术等研究方向的新工艺、新技术、新设备以及分析检测、安全法律法规及标准、综合利用、质量保障体系等方面的基础理论、应用研究及综述文章。主要栏目有: 研究报告、专论综述、创新与借鉴、经验交流、分析与检测、产品开发、酿造文化、海外文摘等。

《中国酿造》为月刊,大16开,每期200页,25元/期,全年300元(免邮费)。

订阅方式:

直接联系本社订阅: 电话: 010-83152308/83152738、010-63026114 邮箱: zgnzzz@163.com

网上订阅: 登陆中国酿造主页 www.chinabrewing.net.cn

全国各地邮政局(所)均可订阅: 邮发代号2-124 国内统一连续出版物号CN 11-1818/T5 国际标准连续出版物号ISSN 0254-5071

汇款方式:

银行转账: 建行陶然亭支行 账户: 北京中酿杂志社 账号: 1100 1189 5000 5250 0191

邮局汇款: 北京市西城区禄长街头条4号《中国酿造》编辑部 邮编: 100050

欢迎订阅、投稿、刊登广告!

