

超声强化制备大豆蛋白-乳糖接枝物工艺条件的优化

穆利霞¹, 赵谋明², 颜小平², 廖森泰¹

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所/广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610)

(2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 本文通过单因素结果并结合中心组合设计和相应面分析, 研究了超声强化制备大豆分离蛋白(SPI)-乳糖接枝物的反应条件对接枝度的影响并得到了数学模型, 优化了超声促进接枝反应的条件。结果表明: 超声功率、超声时间和蛋白浓度对大豆蛋白-乳糖接枝物的接枝程度影响显著($P < 0.05$)。超声强化制备 SPI-乳糖接枝物的最佳工艺条件为: 超声功率 250 W, 超声时间 25 min, 蛋白浓度为 11 mg/mL, 在此工艺条件下, 接枝度最高可达到 45.53%。结果表明: 超声可以显著提高大豆蛋白-乳糖的接枝速率。

关键词: 超声强化; 大豆分离蛋白(SPI); 接枝反应; 优化

文章编号: 1673-9078(2013)1-96-101

The Optimization of Soy Protein-lactose Conjugates Prepared by Ultrasonic Assistance

MU Li-xia, ZHAO Mou-ming, YAN Xiao-ping, LIAO Sen-tai

(1. Sericulture & Farm Produce Processing Research Institute/ Guangdong Key laboratory of Agricultural Product processing, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510610, China)

(2. College of Light industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Optimization of graft reaction of soy protein and lactose by ultrasonic assistance was investigated using response surface methodology and central composite design after single factor. The influences of the variables of graft processes were studied and the regression equation of soy protein isolates -lactose conjugates prepared by ultrasonic assistance was established. Degree of graft was primarily affected by ultrasonic power, time and protein concentration. The optimum conditions were protein concentration (11 mg/mL), ultrasonic power (250 W), and ultrasonic time (25 min). Comparing with traditional heating, ultrasonic assistance could shorten reaction time to 1/3. It suggested that ultrasonic assistance could accelerate graft reaction of soy protein isolates and lactose.

Key words: ultrasonic assistance; soy protein isolates; graft reaction; optimization

大豆是世界上极其重要的经济作物之一^[1]。大豆蛋白具有一定的乳化特性, 在天然食品添加剂中应用广泛, 提高其加工性能是研究的热点^[2,3]。近年来, 蛋白与糖的接枝改性受到广泛的关注, 经接枝改性的蛋白质功能性(如水溶性、乳化性、热稳定性等)有很大的改善, 是目前蛋白改性中较为理想的方法之一^[4-7]。但目前蛋白与糖的接枝反应效率并不高^[4-8], 因此, 寻找一种更加快速有效的蛋白与糖接枝的方法, 成为国内外许多研究小组研究的热点和关键。

由于超声波在介质中传播时可引发强烈的次级物理和化学效应, 在化学工业中的应用十分广泛, 而且发挥着相当重要的作用。超声波技术作为一种物理的

手段和工具, 为科研工作者提供了一条能够把能量引入到分子中的高效途径和方法, 它不仅可以改善反应条件, 加快反应速度, 提高反应产率^[9], 还可以使一些难以进行的化学反应得以实现。管涌光等研究发现, 超声处理可以加速氨基乙酸和葡萄糖之间的美拉德反应^[10]。但对大分子量的蛋白与糖的接枝反应研究较少。

本研究以超声为协助手段, 研究超声处理对 SPI 与乳糖接枝反应的影响, 并通过响应面实验设计优化接枝反应条件, 为 SPI 与乳糖的接枝反应提供一条新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

SPI (自制), 来自低温脱脂豆粕 (山东禹王)。GA: SD 型, TIC Gums Co. (Philadelphia, USA), 主

收稿日期: 2012-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20806030)

作者简介: 穆利霞(1980-), 女, 博士

通讯作者: 赵谋明 (1964-), 男, 博士, 教授

要成分如下: 2.13% 蛋白, 85.27% 多糖, 10.59% 水分, 2.01% 灰分; 赖氨酸: 华美生物技术公司; 邻苯二甲醛 (OPA): Sigma 公司。乳糖, 氢氧化钠, 十二烷基硫酸钠 (SDS), β -巯基乙醇, 硼砂, 甲醇, 磷酸氢二钾, 磷酸二氢钾等均为分析纯。

1.2 主要仪器

高速冷冻离心机 (CR22G), 日本日立; 紫外可见分光光度计 (TU-1810), 上海棱光科技有限公司; 超声设备 (TDS220), 广州新动力超声设备有限公司; 精密 pH 计 (320-S), 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司; 集热式磁力搅拌器 (DF-1), 金坛市新一佳仪器厂; 真空冷冻干燥机 (Vizard2.0), 美国 VirTris 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 SPI 的制备

依照 Sorgentini and Wagner 的方法稍加改进^[11], 具体工艺如下:

低温脱脂豆粕 (山东禹王) 打粉, 200 目过筛→低温脱脂豆粕→豆粕:水=1:10 (m/V) 料水比溶解豆粕→2 mol/L NaOH 调 pH 至 8.0, 常温搅拌 2 h→离心 (10000 ×g 20 min, 4 °C) →上清液用 2 mol/L HCl 调 pH 至 4.5→离心 (5000 ×g 5 min, 4 °C) →溶解 (5~10% 干物质) →2 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0→透析 (4 °C ×24 h, 溶液/透析水=1/100) →冷冻干燥→自制的 SPI

1.3.2 SPI-糖接枝物的制备

将 SPI 与乳糖按照 1:1 的比例 (w/w), 蛋白浓度为 0.1~2% (W/V), 室温下磁力搅拌器搅拌 2 h, 加入少量的叠氮钠以防滋生微生物, 置于 4 °C 冰箱中水化过夜, 第二天取出后继续搅拌直至液体温度平衡到室温, 每个处理取样 150 mL, 预热到 80 °C, 混合物置于超声装置 (0~600 W, 15 kHz) 处理一定的时间。反应结束后迅速冷却至室温, 测定其反应程度。

1.3.3 SPI-多糖接枝反应条件的确立

以接枝程度、接枝物褐变反应为指标, 对超声功率、超声时间、溶液浓度进行单因素实验, 在此基础上对接枝反应的反应条件进行多因素实验优化。

1.3.4 接枝度 (degree of graft, DG) 计算

OPA 测定自由氨基^[12~13]: 准确称取 40.0 mg 的 OPA 溶解于 1.0 mL 甲醇中, 再加入 20% (m/m) 的十二烷基硫酸钠 (SDS) 2.5 mL, 硼砂 (0.1 mol/L) 25.0 mL, β -巯基乙醇 100 μ L 最后用蒸馏水定容到 50 mL (现配现用)。测定时, 取 4.0 mL OPA 试剂于试管中, 加入 200 μ L 样品, 混合均匀, 放入 35 °C 水浴中反应 2 min 后在 340 nm 下测吸光值 A_{340} , 另取 4.0 mL OPA 试剂于试管中, 加入 200 μ L 水作为空白对照。用相同的方法, 以赖氨酸代替样品作出标准曲线,

根据曲线计算样品中自由氨基的含量 C 。

接枝度可以用此公式计算:

$$\text{接枝度} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100\%$$

其中: C_0 : 接枝反应前溶液中自由氨基的含量, mol/L; C_1 : 接枝反应后溶液中自由氨基的含量, mol/L。

1.4 数据分析

实验中所有结果都是三次测定的平均值, 计算标准偏差。利用新复极差检验 (Duncan's multiple-range test) 评价样品平均值间的显著性差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 超声处理对 SPI-糖接枝反应的影响

表 1 超声处理对 SPI-乳糖 DG (%) 的影响

Table 1 The effect of ultrasonic treatment on DG values (%) of

时间 /min	80 °C 湿热		超声促进	
	DG	褐变 (A_{420nm})	DG	褐变 (A_{420nm})
5	1.23±0.12	0.07±0.00	5.13±0.23	0.12±0.01
10	3.93±0.20	0.1±0.02	17.06±0.17	0.15±0.00
15	7.06±0.17	0.15±0.02	21.47±0.32	0.21±0.06
20	12.70±0.24	0.23±0.05	27.18±0.47	0.27±0.03
30	16.43±0.41	0.29±0.01	32.53±0.18	0.38±0.07
40	22.19±0.52	0.34±0.04	40.16±1.53	0.51±0.01
60	27.88±1.02	0.49±0.05	42.58±0.97	0.62±0.13

乳糖属于还原性糖, 能够在湿热条件下与 SPI 的自由氨基发生美拉德反应。表 1 结果表明: 超声处理能够显著提高 SPI-乳糖接枝反应的速度和接枝度, 等接枝度下褐变程度降低, 有利于改善产品的外观质量。在湿热反应的条件下, 当 SPI-乳糖的 DG 达到 27.88 时, 需要 60 min, 而超声辐射条件下仅需要 20 min, 反应时间为原来的 1/3, 大大缩短了达到一定反应程度所需要的时间, 极大降低了反应的能耗, 提高了反应的效率。

超声波与介质相互作用的空化效应是功率超声波在液体中产生超声效应的主动动力, 主要包括稳态空化和瞬态空化两种类型, 稳态空化是在声强度较低时产生的空化泡, 大小在其平衡尺寸附近振荡, 振荡可以持续多个声波周期; 而瞬态空化是指在较大声强作用下空化泡只能存在一个或几个声波周期时间, 在声波作用下空化泡迅速增大, 随之在声波正压相作用下迅速收缩至崩溃。一般认为空化泡崩溃时所产生的高温 (可达 5000 K 以上) 和高压 (可达 1000 个大气压) 是声化学反应的主要动力之一^[14~15]。蛋白与糖的反应

属于合成反应,该反应的进行需要能量的输入,超声波在液体介质中空化效应在为蛋白与糖之间接枝反应提供能量的同时,诱导介质中蛋白和糖分子产生剧烈的振动,使反应的基团之间充分靠近,碰撞几率增加,反应加速。

2.2 单因素研究

分别对超声功率、超声时间、反应物的浓度等影响因素进行单因素实验。

2.2.1 超声功率对接枝反应的影响

表 2 超声功率对 SPI-乳糖接枝反应的影响

Table 2 The effect of ultrasonic power on graft reaction between

SPI and lactose		
功率/W	DG/%	褐变程度(A _{420nm})
100	21.46±0.37	0.46±0.05
200	36.14±1.13	0.54±0.12
300	53.17±2.73	0.83±0.05
400	47.67±1.24	0.98±0.06

能量供给对化合物的合成反应是至关重要的,在超声频率恒定的条件下,高强度超声设备的功率直接影响着对介质溶液的能量输入,从而影响到介质中的各种反应,因此合适的功率将有助于接枝反应速度的改善。在固定超声处理时间为 20 min 时,超声功率对接枝反应的影响见表 2。结果表明,超声功率对 SPI-糖接枝反应的 DG 有显著影响,SPI-糖在单位时间内的 DG 变化随着超声功率的增强先增加后减小。温度是决定单位时间内接枝反应程度的关键因素^[16],超声功率是描述超声能量输入的一个重要指标,在介质状态相同的情况下,不同的功率会导致介质中不同的温度变化,从而影响蛋白-糖的接枝反应。同时,适当的超声处理会改善蛋白溶解性,增加自由氨基的含量,从而增加蛋白自由氨基和糖类羰基的接触几率,改善接枝反应的效率。然而,随着功率的继续增大,DG 开始降低,可能是高强度的超声引起了蛋白结构更加剧烈的变化,导致肽键断裂,N-末端残基数目增多,导致自由氨基基数的增大,从而表现 DG 下降。接枝物的褐变程度也受到超声功率的影响,过高的功率会导致溶液的局部温度增加过快,溶液中乳糖自身也会发生糖基化反应,从而造成反应溶液的褐变程度更加严重。

2.2.2 超声时间对接枝反应的影响

图 1 结果表明,SPI-乳糖接枝反应的 DG 随着超声时间的延长呈现先增加后逐渐平缓的趋势,甚至略有降低,这与超声本身对蛋白质的影响有关。汤虎等人^[17]研究发现,当超声功率恒定时,蛋白质的溶解性随着超声时间的延长出现先升高后降低的趋势,在超声波

的作用下,蛋白质分子的结构变得疏松,蛋白质溶解性增加。溶液中蛋白质的可用自由氨基含量显著增加,增加了与糖的碰撞几率,促进 SPI-糖接枝反应的进行。随着处理时间的延长,DG 的变化平缓甚至有一定的程度的降低,这可能是由于在超声造成蛋白质部分肽链的断裂,同时蛋白质展开的肽链重新聚集,可用的自由氨基重新被包埋,导致 DG 降低或者变化不明显。

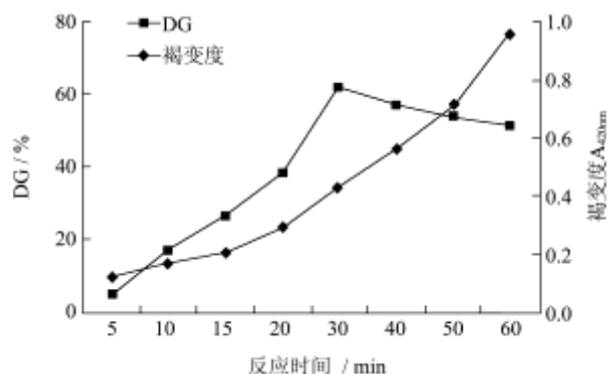


图 1 超声时间对超声促进 SPI-乳糖接枝反应的影响

Fig.1 Effect of ultrasonic time on graft reaction of SPI and lactose

2.2.3 蛋白浓度对接枝反应的影响

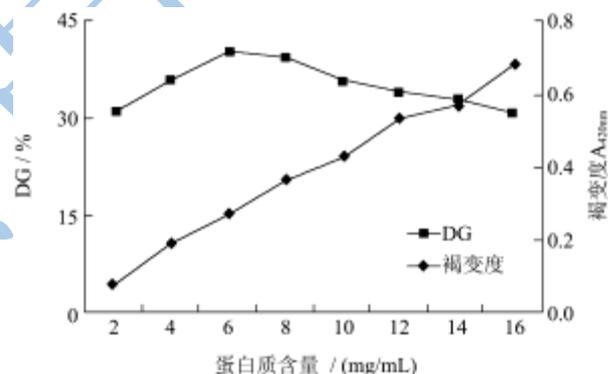


图 2 蛋白浓度对超声促进 SPI-乳糖接枝反应的影响

Fig.2 Effect of protein concentration on graft reaction of SPI and lactose

当超声功率和时间恒定时,介质溶液的浓度直接影响到超声的作用效果。图 2 结果表明,在相同的条件下,随着溶液中蛋白浓度的增加,超声强化的 SPI 和糖接枝反应的 DG 先增加后降低,在 SPI 浓度为 14 mg/mL 时,SPI 和乳糖接枝反应的 DG 最大。蛋白的浓度会影响超声波的作用效果,在适当的蛋白质浓度范围内,超声波的空化作用随着蛋白含量的增大而增大,蛋白中更多的自由氨基暴露,与乳糖的碰撞几率增大;当蛋白含量继续增大时,在相等时间内,超声波空化作用减弱,过高的浓度导致相同时间内超声波对反应体系的作用减弱,从而影响其产生特殊的物理化学效应^[18]。同时,过高的反应底物浓度导致溶液中分子的运动降低,空间位阻效应增加,降低蛋白-乳糖的接枝

反应速率。

2.3 超声强化接枝反应条件的优化

2.3.1 响应面分析方案及实验结果

表 3 响应面分析因素与水平

Table 3 Varieties and levels for response surface design in graft reaction

水平	因素		
	X ₁ [蛋白浓度/(mg/mL)]	X ₂ (超声时间/min)	X ₃ (超声功率/W)
-1	10	20	200
0	14	30	300
1	18	40	400

通过单因素实验可知：蛋白浓度、超声时间、超声功率对 SPI-乳糖接枝反应的 DG 影响显著。利用 3 因素 3 水平的中心组合设计，选择的 3 个因素为：蛋白浓度(X₁)、超声时间(X₂)、超声功率(X₃)，因素和水平的取值见表 3。

表 4 响应面分析方案及实验结果

Table 4 Results derived from response surface design of graft reaction

编号	因素及水平			DG/%
	X ₁	X ₂	X ₃	
1	14	30	300	63.12
2	14	30	200	34.10
3	10	20	300	39.54
4	14	20	400	43.12
5	14	30	300	62.86
6	18	30	400	46.34
7	14	30	300	56.14
8	18	20	300	35.04
9	18	30	200	20.70
10	14	30	300	63.57
11	10	40	200	34.75
12	14	30	400	50.63
13	18	40	400	51.02
14	10	20	200	23.28
15	10	40	300	48.91
16	14	40	300	53.77
17	14	30	300	62.78

如表 4 所示，响应面实验设计 17 个实验。通过响应面软件 Design-Expert 7.0 的分析得到结果见表 5 和表 6。R²=0.9793，失拟项不显著(0.5642 > 0.1000)，说明回归方程的拟合程度较好，模型是显著的。回归模型的 F-检验显著，说明所拟合的二次回归方程合适，该模型的预测值和实际值比较接近(如图 3)。

表 5 回归方程的方差分析表

Table 5 Variance and significant analysis for regression equation

项目	平方和	自由度	均方	F 值	Prob>F	显著性
模型	2915.28	9	323.97	36.73	<0.0001	*
X ₁	91.44	1	91.44	10.37	0.0147	*
X ₂	281.52	1	281.52	31.92	0.0008	*
X ₃	766.19	1	766.19	86.88	<0.0001	*
X ₁ X ₂	0.034	1	0.034	3.820E-003	0.9524	
X ₁ X ₃	20.69	1	20.69	2.35	0.1695	
X ₂ X ₃	3.17	1	3.17	0.36	0.5675	
X ₁ ²	321.52	1	321.52	36.46	0.0005	*
X ₂ ²	314.32	1	314.32	35.64	0.0006	*
X ₃ ²	948.79	1	948.79	107.59	<0.0001	*
残差	61.73	7	8.82			
失拟项	22.76	3	7.59	0.78	0.5642	
净误差	38.97	4	9.74			
校正项	2977.01	16				

注：“prob>F”<0.0500 表示显著；“prob>F”>0.1000 表示不显著。

表 6 模型分析表

Table 6 Analysis for regression model

指标	标准差	均数	离散系数	R ²	调整 R ²
结果	2.97	46.45	6.39	0.9793	0.9526

以接枝度 (DG) 为响应值，经回归拟合后，各因子对响应值的影响可用下面回归方程表示：
 $DG = -348.13 + 17.77X_1 + 6.01X_2 + 1.10X_3 + 2.29X_1X_2 - 5.69X_1X_3 - 8.91X_2X_3 - 0.55X_1^2 - 0.09X_2^2 - 1.50X_3^2$ 。

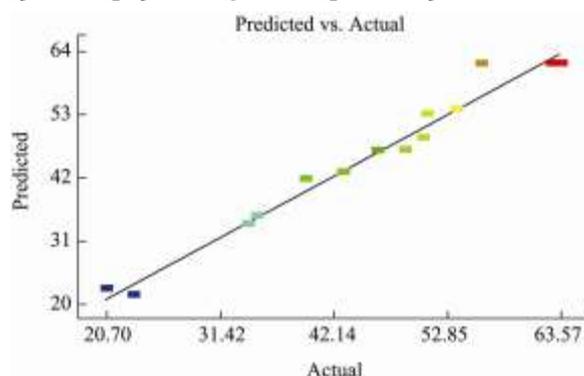


图 3 预测值和实际值的关系图

Fig.3 Relationship between estimated DG and resultant DG

2.3.3 各因素间的交互作用

由表 4 可知，X₁、X₂、X₃、X₁²、X₂²、X₃² 对 DG 有比较显著的影响，而其他因素的影响相对较小。

蛋白浓度与超声时间的交互作用如图 4 所示，在不同的蛋白浓度下，超声时间对 SPI-乳糖接枝反应的 DG 的影响趋势基本相同。随着超声时间的延长，DG

呈现先增加后变化平缓的趋势。超声时间较短时，DG随着蛋白浓度的变化不明显，当超声时间增加到蛋白与糖接枝的最佳时间范围时，DG随蛋白浓度的增加而显著增加。

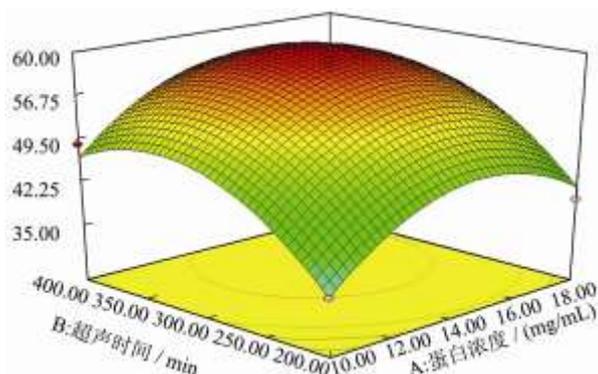


图4 SPI 浓度和超声时间的交互作用图

Fig.4 Interaction of the content of SPI and ultrasonic time on the reaction

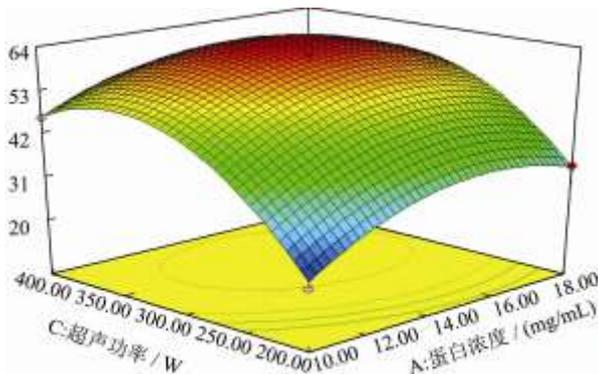


图5 SPI 浓度和超声功率的交互作用图

Fig.5 Interaction of the content of SPI and ultrasonic power on the reaction

蛋白浓度与超声功率的交互作用如图5所示，不同的蛋白浓度下，超声功率对SPI-乳糖的DG的影响趋势基本相同。随着超声功率的增加，SPI-乳糖的DG呈现先上升后下降的趋势。在较低的功率条件下，SPI-乳糖接枝反应的DG随蛋白浓度的变化不显著；只有在合适的功率范围，蛋白质浓度的增加才会使DG显著增加。

超声作用时间与超声功率的交互作用如图6所示，在较低的超声功率下，超声时间对SPI-乳糖接枝反应的DG的影响远远低于较高的功率条件，这主要是由于较高的功率对介质溶液和蛋白本身的影响较大，有利于DG的提高。同样，超声时间的延长有利于DG的增加，且高功率条件下的SPI-乳糖接枝反应的DG增加的更显著。但是，当功率过高时或者处理时间过长时，介质溶液的温度比较高，蛋白质发生热聚集，溶解性降低，从而导致溶液中自由氨基含量降低，DG降低。

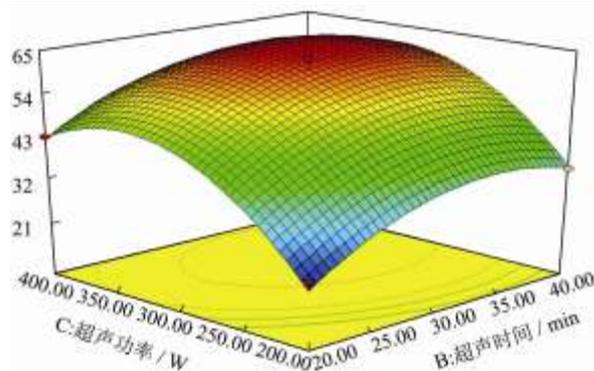


图6 超声时间和功率的交互作用图

Fig.6 Interaction of ultrasonic time and power

对超声处理所得SPI-乳糖接枝反应的DG的模型进行数学分析，以减少能量损耗和反应时间为基准，优化出最佳反应条件为超声功率为263.40 W，蛋白浓度为10.95 mg/mL，超声时间为23.61 min，所得到DG为49.06%。考虑到具体实验的可操作性，本研究选择超声功率250 W，蛋白浓度为11 mg/mL，超声时间为25 min，采用上述条件对上述模型进行验证，测定得到的接枝度为45.53%，验证试验结果与理论预测值接近，证明优化结果可信，具有实用价值。

3 结论

- 3.1 超声可以显著改善大豆蛋白与乳糖的接枝反应速率。
- 3.2 单因素结果表明：超声时间、超声功率、蛋白浓度对接枝反应的速率有显著影响。
- 3.3 通过响应面优化，超声功率250 W，蛋白浓度为11 mg/mL，超声时间为25 min时，大豆蛋白与乳糖的接枝度可达到45.5%。

参考文献

- [1] N S Hettiarachchy, G. R Ziegler (Eds). Protein functionality in food systems [M]. New York: Marcel Dekker, 1994
- [2] Comas D I, Wagner J R, Tomás M C. Creaming stability of oil in water (O/W) emulsions: Influence of pH on soybean protein–lecithin interaction [J]. Food Hydrocolloids, 2006, 20(7): 990-996
- [3] Molina E, Papadopoulou A, Ledward D A. Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins [J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15: 263-269
- [4] Dickinson E, Galazka V B. Emulsion stabilization by ionic and covalent complexes of β -lactoglobulin with polysaccharides [J]. Food Hydrocolloids, 1991, 5: 281-296
- [5] Diftis N, Kiosseoglou V. Improvement of emulsifying properties of soybean protein isolate by conjugation with

- carboxy methyl cellulose [J]. Food Chemistry, 2003, 81: 1-6
- [6] Diftis N, Kiosseoglou V. Physicochemical properties of dry-heated soy protein isolate-dextran mixtures [J]. Food Chemistry, 2006, 96: 228-233
- [7] Kato Y, Aoki T, Kato N, et al. Modification of ovalbumin with glucose 6-phosphate by amino-carbonyl reaction: Improvement of protein heat stability and emulsifying activity [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1995, 43: 301-305
- [8] 穆利霞, 崔春, 赵谋明, 等. 阿拉伯胶-大豆分离蛋白接枝工艺优化及产物理化特性的研究 [J]. 食品工业科技, 2009, 8: 174-177
- [9] 李记太, 臧洪俊. 超声波应用于有机合成方面的新进展 [J]. 河北大学学报(自然科学版), 2000, 20(1): 96-102
- [10] Guan YG, Zhang BS, Yu SJ, et al. Effects of ultrasound on a glycin-glucose model system—a means of promoting maillard reaction [J]. Food Bioprocess Technololy, 2011, 4: 1391-1398
- [11] Sorgentini DA, Wagner JR. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soy bean proteins [J]. Food Chemistry, 1999, 23: 489-507
- [12] Brands CMJ, van Boekel MAJS. Kinetic modelling of reactions in heated disaccharide-casein systems [J]. Food Chemistry, 2003, 83: 13-26
- [13] Chevalier F, Hobert JM, Popineau Y, et al. Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar [J]. International Dairy Journal, 2001, 11: 145-152
- [14] Byler DM, Brouillette JN, Susi H. Quantitative studies of protein structure by FT-IR spectral deconvolution and curve fitting [J]. Spectroscopy, 1986, 1: 29-32
- [15] Ellepola SW, Choi SM, Ma CY. Conformational study of globulin from rice (*Oryza sativa*) seeds by Fourier-transform infrared spectroscopy [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 37: 12-20
- [16] 管军军. 微波合成大豆蛋白-糖接枝物机理、机构及功能性 [M]. 江南大学博士学位论文, 2005
- [17] 汤虎, 孙智达, 徐志宏, 等. 超声波改性对小麦面筋蛋白溶解度影响的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(12): 368-372
- [18] Suslick KS. The temperature of cavitation [J]. Science, 1991, 253(5026): 1397-1399