

响应面法优化谷朊粉 α - 淀粉酶单独酶解 分离制备工序参数

钟昔阳, 杨积东, 郑志, 徐玉红, 王士雷, 姜绍通
(合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽 合肥 230009)

摘要: 以小麦面粉为原料, 通过单因素试验和响应面设计法, 优化单独添加 α - 淀粉酶分离制备谷朊粉的工艺参数, 并建立数学模型, 通过建立的数学模型预测出最佳的工艺参数为酶解温度 58℃、加酶量 2.58%、酶解时间 4.0h、酶解 pH5.94, 此时制备的谷朊粉纯度预测值 80.28%。但从实际操作的方便和经济效益方面考虑, 对数据修正为固液比 1:15、酶解温度 55℃、加酶量 2.5%、酶解时间 4.0h、酶解 pH6.0, 通过验证实验, 测得制备的谷朊粉纯度实际值为 77.57%, 表明模型的预测较为准确。

关键词: 响应面法; α - 淀粉酶; 酶解; 谷朊粉

Application of Response Surface Methodology to Optimize Process Parameters for Single Enzymatic Extraction of Wheat Gluten with α -Amylase

ZHONG Xi-yang, YANG Ji-dong, ZHENG Zhi, XU Yu-hong, WANG Shi-lei, JIANG Shao-tong
(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: The process parameters, temperature, enzyme dosage, hydrolysis time and pH, for enzymatic extraction of gluten from defatted wheat flour with α -amylase alone were optimized by one-factor-at-a-time method and response surface methodology. A mathematical predictive model was established for gluten purity as a function of the process parameters. The optimal process conditions were predicted using the model to be enzyme dosage 2.58%, temperature 58 °C, pH 5.94, and hydrolysis time 4.0 h. Under these conditions, the predicted gluten purity was 80.28%. Further, in view of practical operating convenience and economic cost, the optimal process conditions were modified to be enzyme dosage 2.5%, temperature 55 °C, pH 6.0, and hydrolysis time 4.0 h. The results from the validation experiments showed that the actual gluten purity was 77.57% under the modified conditions. Thus, the established model could provide accurate prediction.

Key words: response surface methodology; α -amylase; enzyme; wheat gluten

中图分类号: TS211.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0167-05

谷朊粉又称活性面筋粉、小麦面筋蛋白, 由于其具有自然资源丰富、应用范围广、经济性好、含有人体必需的十五种氨基酸、营养丰富等诸多优点, 从 70 年代初期开始, 在全球范围内就已开展广泛生产。1980 年全世界谷朊粉的年产量约为 12 万吨, 现在年产量约为 50 万吨^[1-2], 谷朊粉在现代食品工业中得到了广泛的应用^[3-6]。目前, 谷朊粉的分离均是在小麦或面粉原料中加入大量的水, 然后通过物理分离的手段而得以实现的, 这种加工过程水的消耗量非常大, 产生的废水多, 且加工能耗高^[7], 寻找一种用

水量小、更为经济有效的加工方法一直是谷朊粉加工产业研究的热点。

酶工程技术是一种近年来在食品工业得到广泛应用、且发展迅速的新兴技术。目前已有利用酶工程技术分离大米蛋白^[8-9]、大豆蛋白^[10]的研究报道, 但还未见利用该技术分离谷朊粉的报道。本实验利用 α - 淀粉酶先行分解面粉中的小麦淀粉, 使谷朊粉与其分离开来, 然后再次通过少量的 α - 淀粉酶、木聚糖酶进行纯化得到纯度较高的谷朊粉。通过本次研究, 以期为开发生产高品质谷朊粉产品寻求一种新的加工方法。

收稿日期: 2010-12-21

基金项目: 合肥工业大学博士专项基金项目(210HGBZ0570); 国家大学生创新性实验计划项目(101035938)

作者简介: 钟昔阳(1973—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为粮油食品加工。E-mail: sunriset@sina.com

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

特一级小麦面粉(蛋白含量 11.73%) 安徽省亳州市利辛县面粉厂; α -淀粉酶(食品级) 枣庄市杰诺生物酶有限公司; 木聚糖酶(食品级) 济宁和美生物工程有限公司; 酒石酸钾钠、氢氧化钠、五水合硫酸铜、盐酸(均为分析纯) 合肥工业大学化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

HH-2数显恒温水浴锅 江苏省金坛市荣华仪器有限公司; TDL-40B 高速离心分离机 上海安亭科学仪器厂; CM-2 均质机 上海尚贵流体有限公司; DZF-1B 真空干燥箱 江苏省南通市锐锋制药有限公司; PHS-3B 精密 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; KDY-9810 型凯氏定氮仪 北京市通润机电有限公司。

1.3 方法

1.3.1 小麦粉脱脂的方法

每次取 60g 的小麦粉, 用 1:10(g/mL) 体积的无水乙醚加入搅拌 30min 进行 2 次脱脂, 脱脂后置于慢速滤纸上除去乙醚, 并用少量的无水乙醚清洗滤纸, 之后放在通风厨通风 5~6h 待乙醚全部挥发之后, 然后放在 4℃ 冰箱中保存待用^[1]。

1.3.2 制备谷朊粉

准确称脱脂小麦粉 3g, 按一定的固液比(g/mL)加水混合搅拌并均质 10min, 用 0.1mol/L 盐酸和氢氧化钠溶液调节 pH 值到一定的值, 再加一定量的 α -淀粉酶, 然后放在振荡器内, 在一定的温度下振荡一段时间, 5000r/min 离心 10min, 取离心分离出的固形物先在 1:10 的固液比下搅拌均质 10min, 后在温度 55℃, pH6.0, 加 0.5% 的 α -淀粉酶和 0.2% 木聚糖酶的操作条件下酶解 40min, 酶解结束后 85℃ 灭酶 5min, 5000r/min 离心 10min, 65℃ 真空干燥 5~6h, 连续两次称量的质量变化不超过 0.002g 为止, 制备谷朊粉。

1.3.3 蛋白的测定和计算方法

干燥后得到的谷朊粉按照国标 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》凯氏定氮法测定其中蛋白含量, 蛋白纯度按如下公式计算。

$$\text{谷朊粉纯度}/\% = \frac{\text{谷朊粉中蛋白含量}}{\text{谷朊粉干物质质量}} \times 100$$

1.3.4 响应面试验设计^[12-13]

通过单因素试验后, 确定固液比 1:15、选择酶解 pH 值、提取温度、提取时间和加酶量进行 4 因素 3 水平的响应面试验, 工艺参数范围: 酶解温度 45~65℃; 加酶量 1%~3%; pH5.0~7.0; 酶解时间 2~4h, 以制

备的谷朊粉纯度作为响应值, 采用 Box-Behnken 设计, 因素水平表见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in response surface analysis

因素	编码	水平		
		-1	0	1
温度/℃	X_1	45	55	65
加酶量/%	X_2	1	2	3
时间/h	X_3	2	3	4
pH	X_4	5	6	7

1.3.5 数据处理与分析

利用 Design-Expert 7.1.6 软件对试验数据进行多元回归拟合和分析, 得到温度(X_1)、加酶量(X_2)、提取时间(X_3)及 pH 值(X_4)对谷朊粉纯度(R_1)影响的二次多项回归方程如下:

$$R_1 = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i X_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 b_{ij} X_i X_j$$

式中: b_0 为常数项, b_i 为一次项系数, b_{ii} 为二次项系数, b_{ij} 为交互项系数。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 温度对谷朊粉纯度的影响

在固液比 1:20、pH6.0, α -淀粉酶的添加量为 2.0%, 温度分别选择 40、45、50、55、60、65℃, 振荡时间为 3h(20r/min)的条件下进行 1.3.2 节的操作, 结果如图 1 所示。

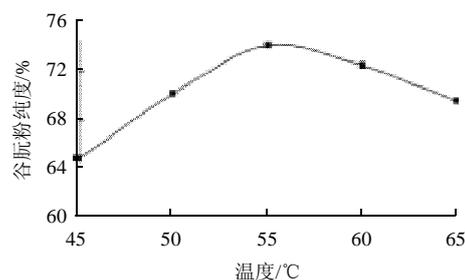


图 1 温度对谷朊粉纯度的影响

Fig.1 Effect of temperature on purity of wheat gluten

由图 1 可知, 在温度 45~55℃ 之间, 随着温度的升高, 谷朊粉的纯度增加; 在 55℃ 时, 谷朊粉的纯度达到最大值为 74.12%; 随着温度的继续升高, 谷朊粉的纯度开始下降。这可能的原因是在 55℃ 之前, 随着温度升高, α -淀粉酶的活性逐渐增强, 催化反应速度

加快^[14]；当达到 55℃时淀粉酶的活性最强；随着温度继续升高部分酶开始失活，催化力下降，所以本实验选择最适酶解温度为 55℃。

2.1.2 固液比对谷朊粉纯度的影响

在固液比分别选择为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30，pH6.0、 α -淀粉酶的添加量 2.0%、温度 55℃，振荡时间为 3h(20r/min)的条件下进行 1.3.2 节操作，结果如图 2 所示。

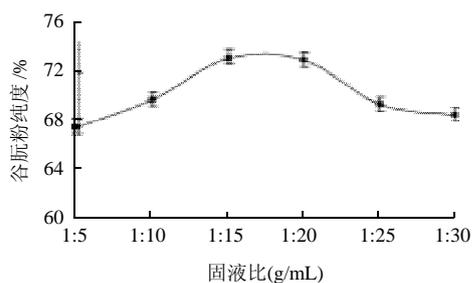


图 2 固液比对谷朊粉纯度的影响

Fig.2 Effect of solid-to-liquid ration on purity of wheat gluten

由图 2 可知，固液比在 1:15 之前，随着固液比的增加，谷朊粉纯度呈增大的趋势；当固液比达到 1:15 时谷朊粉纯度达到最大，最大值为 73.24%；随着固液比继续增加，纯度出现下降的趋势，这可能是因为较高的固液比条件下，底物浓度较小，酶与底物的接触机率下降，所以本实验的固液比 1:15 为最佳。

2.1.3 加酶量对谷朊粉纯度的影响

在固液比 1:15，pH6.0， α -淀粉酶的添加量分别为 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%，温度 55℃，振荡时间为 3h(20r/min)的条件下进行 1.3.2 节的操作，结果如图 3 所示。

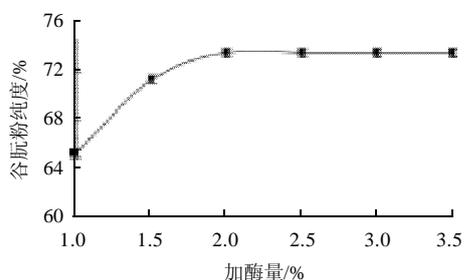


图 3 加酶量对谷朊粉纯度的影响

Fig.3 Effect of enzyme concentration on purity of wheat gluten

由图 3 可知，当酶的添加量在 1%~2%，随着加酶量的增加，谷朊粉的纯度增加；当酶的添加量达到 2% 时，谷朊粉的纯度达到最大为 73.51%；随着加酶量

的继续增加，谷朊粉的纯度基本趋于稳定，这可能是因为在加酶量为 2% 之前，随着加酶量的增多，酶与底物的接触率增大，淀粉酶解更充分；当达到 2% 时，淀粉酶的酶解速率达到最大；随着酶量继续增加，酶解液中的酶量与底物的作用达到了饱和，所以继续加酶对谷朊粉纯度影响不大，所以本实验酶最佳的添加量为 2%。

2.1.4 时间对谷朊粉纯度的影响

在固液比 1:15、pH6.0、 α -淀粉酶的添加量 2.0%、温度 55℃，振荡时间为 1.5、2、2.5、3、3.5、4h (20r/min)的条件下进行 1.3.2 节的操作，结果如图 4 所示。

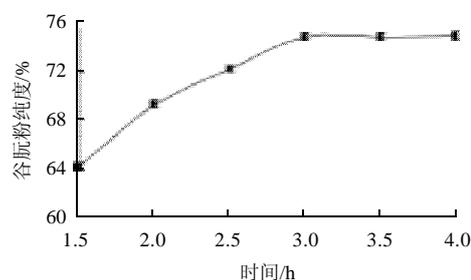


图 4 时间对谷朊粉纯度的影响

Fig.4 Effect of time on purity of wheat gluten

由图 4 可知，时间在 3h 之前，随着时间的延长，谷朊粉的纯度呈增加的趋势；当到达 3h 时纯度达到最大，最大值为 74.78%；但随着时间的继续延长，谷朊粉的纯度基本稳定，可能是因为酶解液中单糖的浓度随着酶解时间的延长而增加，体系的黏度也随之增加，增加到一定程度后，就会对淀粉酶起到抑制的作用，所以本实验选择最佳的酶解时间为 3h。

2.1.5 pH 值对谷朊粉纯度的影响

在固液比 1:15，调节 pH 值分别为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5， α -淀粉酶的添加量 2.0%，温度 55℃，振荡时间 3h(20r/min)的条件下进行 1.3.2 节操作，结果如图 5 所示。

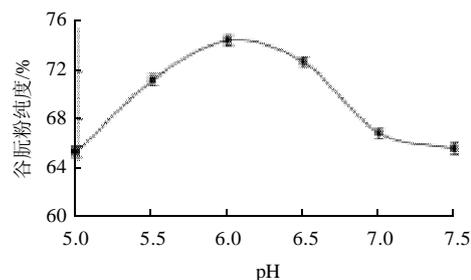


图 5 pH 值对谷朊粉纯度的影响

Fig.5 Effect of pH value on purity of wheat gluten

由图5可知,当pH值在5.5~6.0之间时,随着pH值的增加,谷朊粉纯度呈增大趋势;当pH值达到6.0时谷朊粉纯度达到最大,最大值为74.59%,分析其原因,有可能是在pH6.0时酶的活性最强,催化率最大;随着pH值的继续增大,谷朊粉的纯度开始下降,这可能是因为 α -淀粉酶的活性下降,酶解力减弱;所以本实验的最佳pH6。

2.2 响应面试验

2.2.1 Box-Behnken 试验设计及结果

Box-Behnken 试验设计及结果如表2所示。

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	X ₁ 温度/℃	X ₂ 加酶量/%	X ₃ 时间/h	X ₄ pH	谷朊粉纯度/%
1	45	1	3	6	65.75 ± 0.03
2	55	2	3	6	76.67 ± 0.18
3	45	3	3	6	58.89 ± 0.17
4	65	3	3	6	72.45 ± 0.21
5	55	2	2	5	71.43 ± 0.56
6	55	2	4	5	69.79 ± 0.38
7	55	2	2	7	58.95 ± 0.24
8	55	2	4	7	72.46 ± 0.11
9	45	2	3	5	61.56 ± 0.34
10	55	2	3	6	74.67 ± 0.83
11	45	2	3	7	63.78 ± 0.23
12	65	2	3	7	56.78 ± 0.16
13	55	1	2	6	75.99 ± 0.47
14	55	3	2	6	57.77 ± 0.32
15	55	1	4	6	76.65 ± 0.43
16	55	3	4	6	80.47 ± 0.89
17	45	2	2	6	66.65 ± 0.13
18	65	2	4	6	71.25 ± 0.21
19	45	2	4	6	63.65 ± 0.04
20	55	2	3	6	82.67 ± 0.28
21	55	1	3	5	68.67 ± 0.17
22	55	3	3	5	69.78 ± 0.15
23	55	1	3	7	68.79 ± 0.23
24	55	3	3	7	62.45 ± 0.22
25	65	1	3	6	68.74 ± 0.26
26	55	2	3	6	80.67 ± 0.17
27	65	2	3	5	71.29 ± 0.44
28	65	2	2	6	74.32 ± 0.15
29	55	2	3	6	78.65 ± 0.36

2.2.2 方程的建立与显著性检验

利用 Design-Expert 7.1.6 软件对表2 试验数据进行二元回归拟合并将影响不显著的项删除,得到温度(X₁)、加酶量(X₂)、提取时间(X₃)及pH值(X₄)对谷朊粉纯度(R₁)影响的预测方程如下。

$$R_1 = 78.67 + 2.88X_1 + 2.43X_3 - 2.44X_4 - 4.18X_1X_4 + 5.51X_2X_3 - 7.79X_1^2 - 3.88X_2^2 - 7.71X_4^2$$

响应值二次模型的方差分析及显著性如表3所示。

表3 响应值二次模型的方差分析

Table 3 Analysis of variances for the developed quadratic regression model

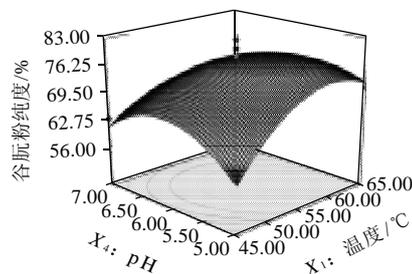
变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1246.2393	14	89.0171	6.1126	0.0009	*
X ₁	99.4752	1	99.4752	6.8307	0.0204	*
X ₂	43.2440	1	43.2440	2.9694	0.1069	
X ₃	70.8588	1	70.8588	4.8657	0.0446	*
X ₄	71.5897	1	71.5897	4.9159	0.0437	*
X ₁ X ₂	27.9312	1	27.9312	1.9180	0.1878	
X ₁ X ₃	0.0012		0.0012	8.41 × 10 ⁻⁵	0.9928	
X ₁ X ₄	69.9732	1	69.9732	4.8049	0.0458	*
X ₂ X ₃	121.4404	1	121.4404	8.3390	0.0119	*
X ₂ X ₄	13.8756	1	13.8756	0.9528	0.3456	
X ₃ X ₄	57.3806	1	57.3806	3.9402	0.0671	
X ₁ ²	393.6771	1	393.6771	27.0328	0.0001	**
X ₂ ²	97.6124	1	97.6124	6.7028	0.0214	*
X ₃ ²	33.0352	1	33.0352	2.2684	0.1543	
X ₄ ²	385.8835	1	385.8834	26.4976	0.0001	**
残差	203.8813	14	14.5629			
失拟项	163.8810	10	16.3880	1.6388	0.3353	
纯误差	40.0003	4	10.0001			
总和	1450.1206	28				

注: ** .P < 0.0001 影响极显著; * .P < 0.05 影响显著。

由表3 方差分析结果可以看出,模型 $P = 0.0009 < 0.01$,模型达到显著。失拟项 $P = 0.3353 > 0.05$ 不显著,因此二次模型成立,应用此模型可以分析和预测酶法分离蛋白的工艺优化。其中一次项 X₁、X₃、X₄ 均显著, X₂ 不显著;二次项除了 X₃ 不显著,其他均显著,交互项 X₁X₄ 和 X₂X₃ 显著,所以得出影响谷朊粉纯度的因素依次:温度 > pH 值 > 时间 > 加酶量。

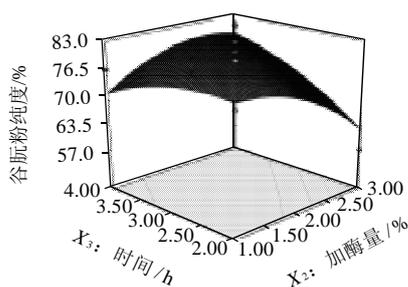
2.2.3 各因素交互影响响应面分析

根据回归方程得出的曲面图和等高线如图6、7所示。



固定水平: 加酶量 2%; 提取时间 3h。

图6 温度(X₁)和pH值(X₄)的交互作用影响的响应曲面和等高线
Fig.6 Response surface and contour plots showing the interactive effects of temperature and pH value on purity of wheat gluten



固定水平：提取温度 55℃；pH6。

图7 加酶量(X₂)和时间(X₃)的交互作用影响的响应曲面和等高线
Fig.7 Response surface and contour plots showing the interactive effects of enzyme dosage and time on purity of wheat gluten

由图 6、7 可知，温度和 pH 值、加酶量和时间的等高线均呈椭圆^[15]，表示交互作用显著，意味着温度和 pH 值、加酶量和时间的交互作用能显著影响谷朊粉的纯度；而对于图 6 的曲面：随着温度、pH 值的增大，谷朊粉纯度呈先增加后下降的趋势，所以谷朊粉的纯度能达到一个极大值，且曲面比较陡，表明温度、pH 值的影响较为显著，此时能够确定一组最佳的酶解温度和 pH 值；对于图 7 的曲面：随着加酶量、时间的增大和延长，谷朊粉纯度的变化趋势比较平缓，在加酶量和时间的交叉区域谷朊粉纯度也存在一个极大值点，此时能够确定一组最佳的加酶量和时间。

2.2.4 对酶解法分离谷朊粉工艺参数的最佳工艺条件确定

通过 Design-Expert 软件分析，由二次回归方程预测^[6]最佳酶解参数，由 Design-Expert 软件分析出最佳酶解参数为酶解温度 58℃、加酶量 2.58%、酶解时间 4.0h、酶解 pH5.94，此时谷朊粉纯度预测值能达到 80.28%，经验证测定该条件下谷朊粉的纯度实为 80.71%。但从实际操作的方便和经济效益方面的考虑，对数据进行修正为酶解温度 55℃、加酶量 2.5%、酶解时间 4.0h、酶解 pH6.0，测得此时谷朊粉纯度实际值为 77.57%，在此基础上测得谷朊粉的制备得率为 76.70%，表明模型建立合理，预测的结果较为准确。

3 结论

3.1 通过单因素试验考察固液比、酶解温度、加酶量、酶解时间、酶解的 pH 值对谷朊粉纯度的影响，最终确定固液比 1:15，其他因素的工艺参数范围定为酶解温度 45~65℃；加酶量 1%~3%；pH5.0~7.0；酶解时间 2~4h。

3.2 利用 Design-Expert 7.1.6 软件对试验数据进行多元回归拟合，得到谷朊粉的纯度(R₁)对温度(X₁)、加酶量(X₂)、提取时间(X₃)及 pH 值(X₄)的预测方程如下：

$$R_1 = 78.67 + 2.88X_1 + 2.43X_3 - 2.44X_4 - 4.18X_1X_4 + 5.51X_2X_3 - 7.79X_1^2 - 3.88X_2^2 - 7.71X_4^2$$

3.3 由各因素的显著性分析得出影响谷朊粉纯度的因素依次为提取温度 > pH 值 > 提取时间 > 加酶量。

3.4 由模型和曲面图分析优化得到最佳的酶解工艺参数酶解温度 58℃、加酶量 2.58%、酶解时间 4.0h、酶解 pH5.94，此时谷朊粉纯度的预测值能达到 80.28%，但从实际操作的方便和经济效益方面的考虑，对数据进行修正为固液比 1:15、酶解温度 55℃、加酶量 2.5%、酶解时间 4.0h、酶解的 pH6.0，通过验证实验，测得的谷朊粉纯度实际值能达到 77.57%，此时谷朊粉的制备得率为 76.70%，表明模型的预测较为准确。

参考文献：

- [1] LENS J P, MULDER W J, KOLSTER P. Modification of wheat gluten for nonfood applications[J]. Cereal Foods World, 1999, 44: 5-9.
- [2] 王金水. 酶解-膜超滤改性小麦面筋蛋白功能特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2007: 1-189.
- [3] GONTARD N, GUIBERT S, CUQ J L. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology[J]. Journal of Food Science, 2006, 57(1): 190-195.
- [4] WEBB K A, GATLIN D M. Effects of dietary protein level and form on production characteristics and ammonia excretion of red drum *Sciaenops ocellatus*[J]. Aquaculture, 2003, 225(4): 17-26.
- [5] POMMET M, REDLA A, MOREL M H, et al. Study of wheat gluten plasticization with fatty acids[J]. Polymer, 2003, 44(1): 115-122.
- [6] YAMAMOTO T, SHIMA T, FURUITA H. Antagonistic effects of branched-chain amino acids induced by excess protein-bound leucine in diets for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Aquaculture, 2004, 232(4): 539-539.
- [7] 钟昔阳. 高活性小麦谷朊粉产业化加工技术研究及其应用概述[J]. 食品科学, 2004, 25(21): 95-100.
- [8] 葛娜, 易翠平, 姚惠源, 等. 碱性蛋白酶提取大米水解蛋白的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2006(4): 25-27.
- [9] 陈季旺, 孙庆杰, 夏文水, 等. 碱酶两步法提取米渣中蛋白质的研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(5): 169-172.
- [10] 冯子龙, 杨振娟, 袁保龙, 等. 大豆分离蛋白生产工艺与实践[J]. 中国油脂, 2004(11): 29-30.
- [11] 邓红, 田芸芸, 田子卿, 等. 响应曲面法优化文冠果仁蛋白的碱溶酸沉提取工艺[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8): 197-199.
- [12] 刘军海, 黄宝旭, 蒋德超. 响应面分析法优化艾叶多糖提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 114-118.
- [13] GUO L. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* by response surface methodology[J]. Food Science, 2010, 31(16): 117-120.
- [14] 吴晓红. 酶法提取红松种子蛋白工艺的研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(9): 145-146.
- [15] 张玉香, 屈慧鸽, 杨润亚, 等. 响应面法优化蓝莓叶黄酮的微波提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(16): 36-37.
- [16] 李梦琴, 李运罡, 吴坤, 等. 玉米黄粉酶解提取浓缩蛋白工艺优化研究[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 269-271.