

# 响应面分析法在米渣水解蛋白-麦芽糊精 Maillard 反应物乳化特性研究中的应用

吴 姣, 郑为完, 赵伟学, 任东东, 李春莉  
(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

**摘 要:** 通过二次回归通用旋转正交试验设计, 应用响应面分析法对米渣水解蛋白-麦芽糊精(RRHP-MD) Maillard 反应过程中的各反应条件进行分析, 建立数学模型, 优化反应条件参数, 以求得到乳化活性(EA)佳的 RRHP-MD Maillard 反应共聚物。结果表明: 在 58℃, 采用水解度(DH)为 6 的 RRHP, 保持其与 MD 的比例为 8:1, pH 为 6.5, 反应 3d 可以得到高乳化活性的反应共聚物。在此最佳反应条件下对反应共聚物的乳化活性进行了研究, 证实了预测值和实测值是一致的。此时, 反应物乳化活性比国外进口的酪氨酸钠还要好。

**关键词:** 米渣水解蛋白; 乳化活性; 响应面分析

Optimization of Emulsification Activities of Rice Residues Hydrolyzed Protein—Malt Dextrin Maillard  
Conjugation by Response Surface Methodology

WU Jiao, ZHENG Wei-wan, ZHAO Wei-xue, REN Dong-dong, LI Chun-li  
(Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract:** The factors such as rice residues hydrolyzed protein (RRHP) of different DH, different ratios of substrate to malt dextrin (MD), temperature, pH and reaction time affecting the Maillard reaction kinetics were discussed. Response surface methodology was used to optimize Maillard reaction factors in order to get the Maillard conjugation with the highest emulsification activities. The results indicated that the DH 6, the weight ratio of RRHP to MD 8:1, temperature 58℃, pH 6.5, and reaction time 3 days were the optimum reaction conditions. On these conditions, the actual emulsification activities value was higher than sodium casein.

**Key words** RRHP; emulsification activities; response surface methodology

中图分类号: TS210.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)10-0155-04

蛋白质分子是天然的高分子乳化剂, 广泛用于食品、医药和化妆品行业, 但是蛋白质的乳化特性受到温度、离子强度、pH 等因素的影响<sup>[1]</sup>。物理改性(热处理、超高静压处理等)和化学改性(磷酸化、乙酰化、琥珀酰化等)可以改善蛋白质的乳化特性, 但在实际应用中却存在许多缺陷, 尤其是化学改性存在的试剂残留、毒性等问题限制了其应用于食品和医药行业。目前, 欧美和日本等国家积极研究蛋白质与多糖的 Maillard 反应及其对蛋白质功能特性的影响。Maillard 反应发生于蛋白质分子中氨基酸侧链的自由氨基(主要是赖氨酸侧链上的 ε 氨基)和多糖分子还原末端的羟基之间, 在较低的相对湿度和温度下自发进行, 不需添加任何化学试剂, 属于“绿色加工工艺”<sup>[2-3]</sup>。国内对大豆分离蛋白与高

分子多糖间的 Maillard 反应及其乳化特性变化的研究较多。由于大豆分离蛋白的溶解性很低, 在高粘度的多糖溶液中发生热力学不相容性相分离, 使得多糖分子不能与大豆分离蛋白有效接触, 反应效率低下。米渣是以大米为原料发酵生产乳酸、谷氨酸、柠檬酸及生化药品或水解制备糊精等工序中大量产生的副产物。米渣蛋白是一种极优异的、过敏性最低的蛋白质, 其中的蛋白质含量有的高达 70% 以上(干基), 远高于大米蛋白含量, 它的氨基酸构成模式与人体需求模式基本一致, 价格远低于大豆分离蛋白<sup>[4]</sup>。通过低度水解不仅可以较好地提高米渣蛋白溶解性, 而且可以得到乳化功能良好的水解产物。麦芽糊精分子链较短, 溶解性好, 高浓度时的粘度低, 与蛋白的接触位点相对较多。本

收稿日期: 2007-07-25

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0540)

作者简介: 吴姣(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微胶囊技术在食品加工中的应用。

研究通过二次回归通用旋转正交试验设计,应用响应面分析法研究影响米渣水解蛋白-麦芽糊精(RRHP-MD) Maillard 反应共聚物的乳化特性的反应因素,优化反应条件参数,以期开发出具有价廉物美的天然高分子乳化剂。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

米渣蛋白 江西维尔宝食品生物有限公司;米渣水解蛋白粉(RRHP 粉) 实验室自制;麦芽糊精(MD, DE=18) 江西维尔宝食品生物有限公司;碱性内切酶(Alcalase 2.4L, FG 活力为 2.4AU/ml) Novozymes 公司;酪氨酸钠 德国;0.1%SDS 溶液、氢氧化钠、盐酸、溴化钾均为分析纯;食用花生油 市售。

### 1.2 仪器

8500型紫外可见分光光度计 上海天美公司;FSH-II 高速电动匀浆器 江苏金坛市环宇科学仪器厂;FD-1 冷冻干燥机 北京得天佑科技发展有限公司;海尔超低温冰箱(-70℃);恒温水浴锅;电子分析天平;微量移液器等。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 不同水解度(DH)米渣水解蛋白的制备

米渣蛋白(干基)→加水调浆→调 pH 值到 8.3→加适量 Alcalase 2.4L FG 酶水解(在线滴加 NaOH)→灭酶→离心→取上清液→喷雾干燥→米渣水解蛋白粉(备用)

根据 pH-stat 法水解过程,通过控制酶解过程 NaOH 的加入量,即可控制该过程的水解度,分别称取五份新鲜米渣蛋白,控制 NaOH 的加入量分别为 0、9、18、27、63ml,测得水解液的水解度(DH)分别是 3、4、5、6、10。

#### 1.3.2 样品的制备<sup>[5]</sup>

称取一定量的麦芽糊精,用蒸馏水溶解在烧杯中,溶解完全后按一定的质量比(分别为 1:10、1:5、1:1、5:1、10:1)加入不同 DH 的 RRHP 粉,搅拌均匀并水化 30min,用氢氧化钠溶液调节到所需的 pH,分装后冷冻干燥备用。

#### 1.3.3 RRHP-MD Maillard 反应共聚物的制备

冷冻干燥后的上述样品经粉碎混匀,放置在盛有相对湿度为 79% 的饱和 KBr 溶液的密闭容器内,在所需的温度条件下反应,分别在不同的时间(1、3、5、7、9d)取样。

#### 1.3.4 乳化活性的测定

采用浊度法<sup>[6]</sup>,并做适当调整。取固形物含量为 2% 的样品水溶液 10ml,一边搅拌一边加入 3ml 食用油,然后 10000r/min 下高速剪切乳化 2min,制成乳状液。立

即用微量进样器准确量取容器底部乳状液 50μl,以 25ml 0.1% SDS(十二烷基磺酸钠)溶液稀释,充分混匀,于 500nm 波长处测定吸光度(A<sub>500</sub>),其中空白为以 25ml 0.1% SDS 溶液稀释的 50μl 水解液。以乳化活性指数表示乳化性(EA),每个数据测定三次取平均值。乳化活性指数(EAI)=A<sub>500</sub>。测得国外进口的酪氨酸钠的乳化活性为 0.2695。

### 1.3.5 RRHP-MD Maillard 反应影响因素响应面分析

采用二次回归通用旋转正交设计(五因素、五水平,1/2 实施)安排试验,其中五因素包括反应温度(X<sub>1</sub>,℃)、RRHP 与 MD 的比例(X<sub>2</sub>,g/g)、RRHP 的 DH(X<sub>3</sub>)、pH 值(X<sub>4</sub>)、反应时间(X<sub>5</sub>,day),考察响应值 RRHP 与 MD Maillard 反应聚合物的乳化活性(EA)。采用 SAS 软件对试验结果进行响应面分析,建立数学模型,并应用脊岭分析优化工艺参数,最后应用 MATLAB 进行直观作图分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 RRHP 与 MD Maillard 反应影响因素响应面分析试验设计与结果

采用二次回归通用旋转正交设计(五因素、五水平,1/2 实施)安排试验,因素和水平取值见表 1。

表 1 响应面因素、水平表  
Table 1 Factors and levels of response surface

编码值	X <sub>1</sub> 温度(℃)	X <sub>2</sub> RRHP:MD(g:g)	X <sub>3</sub> (RRHP 的 DH)	X <sub>4</sub> (pH)	X <sub>5</sub> 时间(d)
2(6)	120	10:1	3	4	1
1	100	5:1	4	5.5	3
0	80	1:1	5	7	5
-1	60	1:5	6	8.5	7
-2(-1)	40	1:10	10	10	9

RRHP-MD Maillard 反应影响因素响应面分析试验设计与结果见表 2。

运用 SAS- RSREG(response surface regression)程序对以上各试验点的响应值进行回归分析,得出回归模型方程为:

$$Y = -0.105985 + 0.001424 X_1 + 0.059383 X_2 + 0.076648 X_3 + 0.020451 X_4 - 0.075373 X_5 - 0.00002261 X_1 X_2 - 0.000508 X_2 X_3 - 0.001259 X_2 X_4 + 0.000018125 X_3 X_1 + 0.000610 X_3 X_2 - 0.002714 X_3 X_3 + 0.000302 X_4 X_1 + 0.000861 X_4 X_2 - 0.008083 X_4 X_3 - 0.001602 X_4 X_4 + 0.000423 X_5 X_1 - 0.000659 X_5 X_2 + 0.000175 X_5 X_3 + 0.005196 X_5 X_4 + 0.000811 X_5 X_5$$

同时还可得到方差分析结果(见表 3)。由方差分析可以看出,回归方程的一次项在  $\alpha=0.01$  水平上是极显著的,交互作用的影响其次,二次项相对不显著。由因

表2 二次回归通用旋转正交试验设计和结果

Table 2 Results of orthogonal rotational regression combinatorial design

序号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	E A
1	100	5:1	4	5.5	3	0.1617
2	100	5:1	4	8.5	7	0.2734
3	100	5:1	6	5.5	7	0.1867
4	100	5:1	6	8.5	3	0.1791
5	100	1:5	4	5.5	7	0.1388
6	100	1:5	4	8.5	3	0.1528
7	100	1:5	6	5.5	3	0.1361
8	100	1:5	6	8.5	7	0.1928
9	60	5:1	4	5.5	7	0.1685
10	60	5:1	4	8.5	3	0.2423
11	60	5:1	6	5.5	3	0.2513
12	60	5:1	6	8.5	7	0.2120
13	60	1:5	4	5.5	3	0.1139
14	60	1:5	4	8.5	7	0.1138
15	60	1:5	6	5.5	7	0.0709
16	60	1:5	6	8.5	3	0.0665
17	120	1:1	5	7	5	0.2310
18	40	1:1	5	7	5	0.0503
19	80	10:1	5	7	5	0.2698
20	80	1:10	5	7	5	0.0592
21	80	1:1	3	7	5	0.1599
22	80	1:1	10	7	5	0.0768
23	80	1:1	5	4	5	0.1269
24	80	1:1	5	10	5	0.7955
25	80	1:1	5	7	1	0.1722
26	80	1:1	5	7	9	0.2050
27	80	1:1	5	7	5	0.1679
28	80	1:1	5	7	5	0.2057
29	80	1:1	5	7	5	0.1532
30	80	1:1	5	7	5	0.1823
31	80	1:1	5	7	5	0.1735
32	80	1:1	5	7	5	0.1811

素检验可以看出, RRHP 与 MD 的比例( $X_2$ )的影响在 $\alpha=0.01$ 水平上是极显著的, 温度( $X_1$ )的影响在 $\alpha=0.05$ 水平上是显著的, 剩余三个因素的影响不显著, 且五个因素对反应物乳化活性的影响, 依次是:  $X_2 > X_1 > X_4 > X_5 > X_3$ , 即 RRHP 与 MD 的比例>反应温度> pH > 反应时间>不同 DH 的 RRHP。从方差分析可知, 方程复相关系数的平方数 $R^2=0.8704$ , 拟合度良好, 能较好地描述各影响因素对 RRHP-MD Maillard 反应物乳化活性的影响。

## 2.2 响应面直观分析

运用 Matlab 软件对二次回归模型进行规范分析, 考察曲面图, 结果如图 1~6。固定其它三个因素为零水平, 考察两两因素对乳化活性的影响。从图中还可以直观地看出各因素对响应值乳化活性的交互影响。由图 1 可以明显的看出, 温度的最佳点比零水平(60℃)稍低, 与 SAS 拟合出的结果(58℃)一致; 从图 2 可以看出, RRHP 与 MD 的比例和温度这两个因素对反应物乳化活性

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

回归项	自由度	平方和	$R^2$	F 值	大于 F 的概率	显著性
一次项	5	0.064224	0.5944	10.09	0.0008	**
二次项	5	0.006352	0.0588	1.00	0.4623	
交互项	10	0.023468	0.2172	1.84	0.1650	
总回归	20	0.094044	0.8704	3.69	0.0150	*
$X_1$	6	0.031286		4.10	0.0209	*
$X_2$	6	0.053293		6.98	0.0029	**
$X_3$	6	0.009464		1.24	0.3578	
$X_4$	6	0.012962		1.70	0.2115	
$X_5$	6	0.009538		1.25	0.3538	

注: \*\* 表示极显著, \* 表示显著。

的交互非常影响明显, 当 RRHP 与 MD 的比例低时, 反应物乳化活性随着温度增加而增加, 随着 RRHP 与 MD 的比例逐渐增加, 反应物乳化活性随温度增加的趋势减缓, 当 RRHP 与 MD 的比例最大时, 反应乳化活性反而随温度降低。综合图 3~5 可见, pH、反应时间、不同 DH 的 RRHP 对反应物乳化活性的影响 RRHP 与 MD 的比例这个因素的影响大, 即 RRHP 与 MD 的比例( $X_2$ )最显著; 此外可见 RRHP 与 MD 的最佳比例在一、二水平之间(5:1 和 10:1 之间), 这与 SAS 拟合的(8:1)相符。图 6 为反应时间、不同 DH 的 RRHP 这两个相对不显著因素对反应物乳化活性的影响。

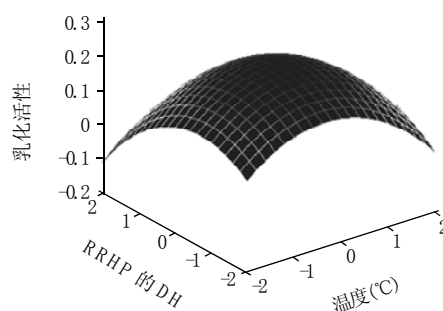


图1 温度和 RRHP 的 DH 对反应物乳化活性的影响

Fig.1 Interactive effects of reaction temperature and different DHs on EAI

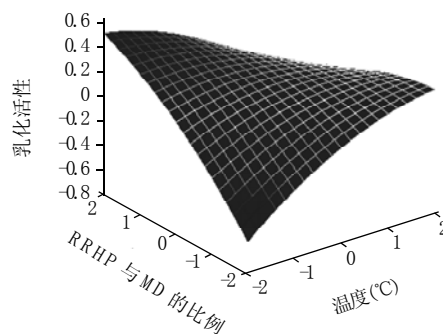


图2 温度和 RRHP 与 MD 的比例对反应物乳化活性的影响

Fig.2 Interactive effects of reaction temperature and different substrate ratios on EAI

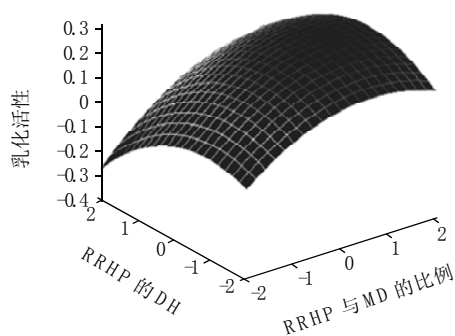


图3 RRHP与MD的比例和RRHP的DH对反应物乳化活性的影响

Fig.3 Interactive effects of different substrate ratios and different DHs on EAI

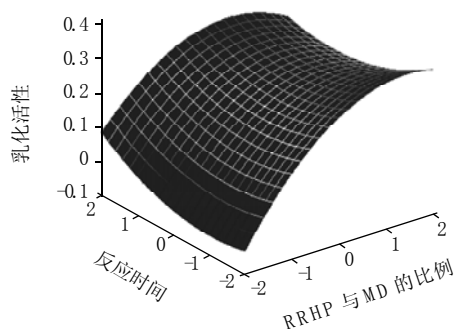


图4 RRHP与MD的比例和反应时间对反应物乳化活性的影响

Fig.4 Interactive effects of different substrate ratios and reaction time on EAI

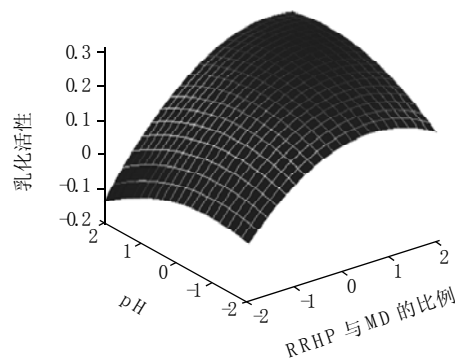


图5 RRHP与MD的比例和pH对反应物乳化活性的影响

Fig.5 Interactive effects of different substrate ratios and pHs on EAI

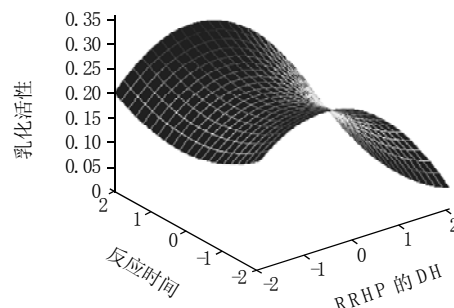


图6 RRHP的DH和反应时间对反应物乳化活性的影响

Fig.6 Interactive effects of different DHs and reaction time on EAI

### 2.3 RRHP-MD Maillard 反应最佳反应条件的优化

采用SAS 脊岭分析试验结果进行寻优。结果表明,  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$  理论上分别取 57.5434、8.0646、6.2960、6.2988、2.9766 时可以得到理论最优乳化活性 0.313117。结合实际操作条件, 得最佳反应条件如下: 反应温度为 58℃, RRHP 与 MD 的比例为 8:1, RRHP 的 DH 为 6, pH 为 6.5, 反应时间 3d。在此条件下做三次平行验证实验, 结果如表 4。反应物乳化活性实测值与反应物乳化活性理论值的平均 RSD 为 0.403%, 在  $\alpha=0.01$  水平无显著性差异。且得到此时 RRHP-MD Maillard 反应聚合物的乳化活性可达到 0.3170, 比国外进口的酪氨酸钠 (0.2695) 还要好。

表 4 验证实验结果  
Table 4 Confirmatory experiment results

实验号	1	2	3	平均值
反应物乳化活性实测值	0.3200	0.3155	0.3155	0.3170
反应物乳化活性理论值	0.3113	0.3113	0.3113	0.3113
RSD (%)	0.615	0.297	0.297	0.403

### 3 结 论

通过二次回归通用旋转正交试验设计, 应用响应面分析, 得到反应温度 58℃, RRHP 的 DH 为 6, RRHP

与 MD 的比例为 8:1, pH 为 6.5, 反应时间 3d 为高乳化活性 RRHP-MD Maillard 反应物的最佳反应条件。并在此条件下对反应共聚物的乳化活性进行了验证研究, 得到实测值与理论值的平均 RSD 为 0.403%, 在  $\alpha=0.01$  水平无显著性差异, 即证实了预测值和实测值是一致的。且此时反应物乳化活性可达到 0.3170 比国外进口的酪氨酸钠 (EAI=0.2695) 还要好。

### 参考文献:

- PHILLIPS G O, WEDLOCK D J, WILLIAMS P A. Gums and stabilizers for industry[M]. England: Oxford, 1988: 323-336.
- SHEPHERD R, ROBERTSON A, OFMAN D. Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein-maltodextrins[J]. Food Hydrocolloids, 2000, 14(4): 281-286.
- AL-HAKKAK J, KAVALE S. Improvement of emulsification properties of sodium caseinate by conjugating to pectin through the Maillard reaction[C]. International Congress Series, 2002: 491-499.
- HELM, BURKS A W. Hypoallergenicity of rice bran[J]. Cereal Food World, 1996, 41(11): 839-843.
- 胡坤, 方少瑛, 王秀霞, 等. 大豆分离蛋白-麦芽糊精 Maillard 反应共聚物的乳化特性研究[J]. 食品工业与科技, 2005, 26(6): 72-76.
- 莫文敏, 曾庆孝. 蛋白质改性研究进展[J]. 食品科学, 2000, 21(2): 23-25.
- 袁超, 金征宇. 响应面法优化羟丙基  $\beta$  环糊精制备工艺[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 147-151.
- 吴肖, 赵谋明, 等. 响应面分析法在清炖牛肉烹饪中的应用[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 171-174.