

碱法制取米糠蛋白过程中 美拉德反应的抑制

王雪¹, 于鹏¹, 周雪松², 张智², 于殿宇^{1*}

(1.东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030;

2.黑龙江省北大荒米业集团有限公司, 黑龙江哈尔滨 150090)

摘要:应用葡萄糖氧化酶(GOD)对米糠中的葡萄糖进行氧化抑制,通过单因素实验,考察了酶解过程中反应温度、pH、反应时间、GOD添加量对蛋白色素抑制率的影响,并在单因素水平的基础上进行响应面优化实验,确定了反应的最佳条件:反应温度45℃,pH5.5,反应时间25min,GOD添加量0.035%,在优化出的最佳条件下进行反应,得到的蛋白色素抑制率为62.73%,说明向米糠中添加GOD可有效改善碱提酸沉法提取米糠蛋白后的色泽,提高蛋白的色素抑制率。

关键词:米糠蛋白,葡萄糖氧化酶,色素抑制率

Inhibition of the maillard reaction in the process of making rice bran protein by alkali method

WANG Xue¹, YU Peng¹, ZHOU Xue-song², ZHANG Zhi², YU Dian-yu^{1*}

(1.School of Food Science and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2.Beidahuang Rice Company of Heilongjiang Province, Harbin 150090, China)

Abstract:The purpose of the present study was to optimize the process of making rice bran protein by alkali method using single-factor tests and response surface methodology, glucose oxidase was used to inhibit the oxidation of glucose in the rice bran. The effect of reaction temperature, pH, reaction time, the GOD addition amount on the protein pigment inhibition rate in the enzymatic process was investigated, and on the basis of the single-factor test, the optimum conditions of reaction was determined by response surface methodology. The reaction temperature was 45℃, the reaction pH was 5.5, the reaction time was 25min, the addition amount of GOD was 0.035%. The pigment inhibition rate reached to 62.73% on the optimum conditions. Results indicated that this method could improve the color after extraction of rice bran protein by alkali extraction and acid precipitation, and increase protein pigment inhibition rate effectually.

Key words:rice bran protein; glucose oxidase; pigment inhibition rate

中图分类号:TS201.1

文献标识码:B

文章编号:1002-0306(2013)12-0279-05

米糠蛋白是一种优质植物蛋白资源,含有的必须氨基酸齐全^[1-2],氨基酸组成接近FAO/WHO模式,具有生物效价高、消化性良好、营养价值高、低过敏性等特点^[3],故应用前景广阔。目前,提取米糠蛋白的方法主要有碱法、酶法和物理法^[4]:物理法蛋白提取率较低;碱法工艺成本低,但pH较高时,产品颜色加深、提取率降低;酶法虽然反应条件温和,但其工艺成本较高^[5]。然而,无论是哪种方法提取米糠蛋白,所制得的米糠蛋白成品因美拉德反应,褐变严重、色泽较差,使米糠蛋白无法在食品中得到像大豆蛋白一

样的推广和应用^[6]。因此要想让米糠蛋白在国内有更多的应用,就必须解决其蛋白色泽的问题。

葡萄糖氧化酶(Glucose Oxidase, E.C.1.1.3.4,简称GOD)的系统名称为β-D-葡萄糖氧化还原酶,是一种需氧脱氢酶。GOD具有去除葡萄糖、脱氢、杀菌等功能,因其天然无毒、副作用,已广泛应用于食品行业中^[7-10]。用GOD处理食品,能将葡萄糖分子上的醛基转变为羧基,生成葡萄糖酸,消除美拉德反应。避免褐变的发生,从而保持产品的色泽^[11],延长了产品的货架期^[12]。因此,本文从生产成本出发,选择碱提酸沉法从原料米糠中提取米糠蛋白,通过向生产工艺中添加GOD,将原料中的葡萄糖进行氧化,从而消除产品中的美拉德反应,改善产品的色泽。通过单因素实验及响应面优化实验对GOD的添加工艺进行研究,得出GOD的最佳添加工艺,为将来工业化生产提供参考。

收稿日期:2012-12-24 * 通讯联系人

作者简介:王雪(1988-),女,在读硕士,研究方向:粮食、油脂及植物蛋白。

基金项目:国家十二五科技支撑计划:商品米品质提升与高效利用关键技术研究与示范(2012BAD34B02)。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

米糠 黑龙江250农场; GOD 10000BGU/g 诺维信酶制剂公司; 正己烷 天津市科密欧化学试剂有限公司; 氢氧化钠 天津市天力化学试剂有限公司; 盐酸 北京化工厂; 亚铁氰化钾、乙酸锌、酒石酸钾钠、乙醚 天津市风船化学试剂科技有限公司; 冰乙酸 天津市富宇精细化工有限公司; 硫酸铜 天津市化学试剂三厂; 次甲基蓝 天津市天新精细化工开发中心。

722型可见分光光度计 上海菁华科技仪器公司; TD5GL型台式过滤离心机 湖南赛特湘离心机仪器有限公司; DHG-9240A型高温烘箱 合肥赛帆实验设备有限公司; ESJ200-4型电子分析天平 河南兄弟仪器设备有限公司; JJ-1型电动搅拌器 常州国华电器有限公司; NKS Y型恒温水浴锅 常州诺基仪器公司。

1.2 工艺流程

在碱性条件下, 所有还原糖中对美拉德反应色度影响最大的还原糖为葡萄糖, 因此本实验在不调整工艺参数的基础上, 通过GOD对葡萄糖进行脱除, 从而抑制美拉德反应。但是由于GOD在pH>8.0或pH<3.0时会迅速失活, 而且GOD最适pH为5.0左右^[13-14], 因此在工艺中采用先脱葡萄糖再进行浸出的步骤进行, 具体工艺如下:

米糠→加酶脱糖→离心烘干→己烷浸出→低温造粒→脱脂米糠→碱液浸出→浸出分离→酸沉→酸沉分离→蛋白凝乳→中和→蛋白液。

1.3 主要原料成分含量测定

脂肪含量的测定: 索氏抽提法(GB/T 5009.6-2003); 蛋白质含量测定: 凯氏定氮法(GB/T 5009.5-1985), 样品的系数为5.95; 水分含量测定: 直接干燥法(GB/T 5009.3-2003); 还原糖总含量测定: 直接滴定法(GB/T 5009.7-2008)。

1.4 色素抑制率的计算

取中和后的米糠蛋白液, 在波长为420nm处, 用分光光度计测其吸光度值(当吸光值大于0.8时, 用蒸馏水进行1:9稀释后再进行吸光度值的测量)。色素抑制效果以色素抑制率表示, 公式如下:

$$\text{色素抑制率}(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 —未经抑制色变的吸光度值; A —经抑制色变的吸光度值。

1.5 响应面优化实验

在单因素研究的基础上, 确定各因素的水平值范围, 采用响应面中心组和实验设计, 研究各参数对考察指标的影响规律。选取反应温度、pH、反应时间、GOD添加量4个因素为自变量, 以色素抑制率为响应值, 其因素水平编码表见表1。

1.6 数据处理

每个实验重复三次, 所有实验数据均做三次平行实验取均值得到。采用SAS 9.1统计分析软件对实验数据进行响应面分析, 应用Origin 7.5进行画图。

表1 因素水平编码表

Table 1 Code of factors and levels

编码	因素			
	x_1 反应温度(°C)	x_2 pH	x_3 反应时间(min)	x_4 GOD添加量(%)
-2	30	4.5	15	0.01
-1	35	5	20	0.02
0	40	5.5	25	0.03
1	45	6	30	0.04
2	50	6.5	35	0.05

2 结果与分析

2.1 主要原料成分

表2 主要原料成分含量测定(%)

Table 2 Determination results of main raw material(%)

原料	蛋白质(干基)	残油	水分	还原糖
米糠	15.23	17.80	9.22	12.26
脱脂米糠	17.11	0.39	10.53	7.48

从以上数据中可以看出, 经工艺流程操作得到的脱脂米糠, 还原糖含量明显降低, 说明葡萄糖被充分氧化。

2.2 葡萄糖氧化酶添加工艺的 单因素实验

2.2.1 反应温度对色素抑制率的影响 由于GOD的最适温度为30~60°C, 因此本次实验选取酶解反应温度分别为20、30、40、50、60°C五个水平, 考察酶解反应温度对色素抑制率的影响。其他条件为pH5.5, 反应时间25min, GOD添加量0.02%, 其结果如图1所示。

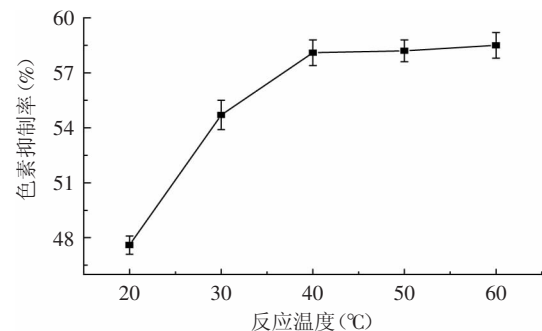


图1 反应温度对色素抑制率的影响

Fig.1 Influence of the temperature on the inhibition rate of pigment

由图1可以看出, 反应温度较低时, 米糠蛋白的色素抑制率随着酶解反应温度的升高而逐渐升高, 当反应温度达到40°C时, 色素抑制率随着反应温度的升高而逐渐趋于平缓, 这是因为随着温度的升高, GOD的活性逐渐增强, 直至达到其最适温度范围内, 这时随着温度的升高, 酶活性的表达趋于稳定, 因此, 本实验选择反应温度为40°C。由此可见, 在一定范围内增加GOD酶解反应温度, 蛋白质色泽变浅, 说明对蛋白质的褐变具有一定的抑制作用。

2.2.2 pH对色素抑制率的影响 葡萄糖氧化酶的最适pH为3.5~6.5, 但是由于米糠蛋白的等电点在pH为4.2左右, 因此本实验为避免米糠蛋白沉淀尽量远离

等电点,选择pH分别为4.5、5.0、5.5、6.0、6.5五个水平,考察反应pH对色素抑制率的影响。其他条件为温度40℃,反应时间25min,GOD添加量0.02%,其结果如图2所示。

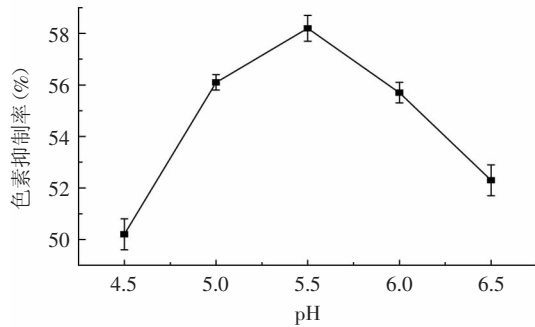


图2 pH对色素抑制率的影响

Fig.2 Influence of the PH on the inhibition rate of pigment

由图2可以看出,米糠蛋白的色素抑制率随着酶解pH的升高而逐渐升高,在pH为5.5时达到最大值,说明GOD的活性随着pH的增大而逐渐增强,在pH5.5时达到最大,而米糠中的葡萄糖也在此时被氧化的程度最高,随后随着pH的升高而逐渐降低,且降低明显,这可能是因为pH升高,GOD活性降低甚至失活所导致,说明此后的蛋白液色泽变深,为尽量远离蛋白的等电点,本实验选择pH为5.5。

2.2.3 反应时间对色素抑制率的影响 从工业化角度考虑,本次实验选择反应时间分别为15、20、25、30、35min五个水平,考察反应时间对蛋白色素抑制

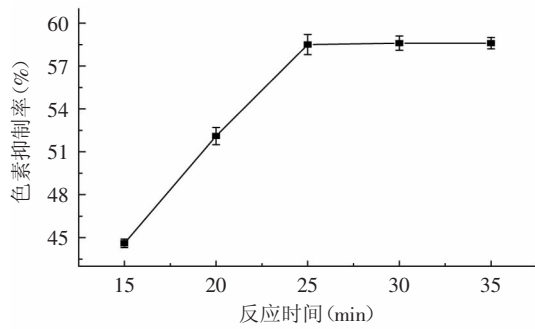


图3 反应时间对色素抑制率的影响

Fig.3 Influence of the reaction time on the inhibition rate of pigment

率的影响。其他条件为温度40℃,pH5.5,GOD添加量0.02%,其结果如图3所示。

由图3可以看出,米糠蛋白的色素抑制率随着酶解反应时间的延长而逐渐升高,当反应时间达到25min时,色素抑制率随着反应温度的升高而逐渐趋于平缓,说明随着GOD反应时间的增加,米糠蛋白中葡萄糖被GOD氧化程度较高,经GOD脱糖的米糠蛋白基本未发生美拉德反应,因此碱法提取米糠蛋白的蛋白液色泽变浅,色素抑制率得到明显提高,但在工业化生产时应考虑生产工艺的连续性,因此本实验选择反应时间为25min。

2.2.4 GOD添加量对色素抑制率的影响 本次实验选择GOD添加量分别为0.01%、0.02%、0.03%、0.04%、0.05%五个水平,考察GOD添加量对蛋白色素抑制率的影响。其他条件为反应时间25min,pH5.5,温度40℃,其结果如图4所示。

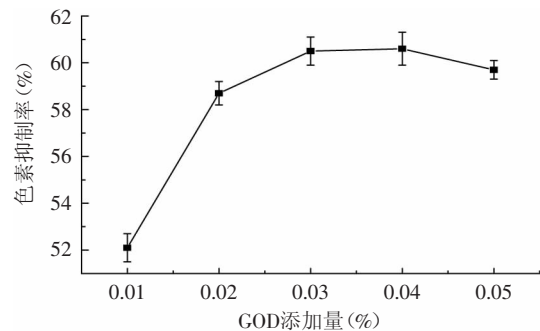


图4 GOD酶添加量对色素抑制率的影响

Fig.4 Influence of the GOD enzyme added on the inhibition rate of pigment

由图4可以看出,随着GOD添加量的增大,米糠中的葡萄糖逐渐被氧化,米糠蛋白的蛋白色素抑制率也逐渐增大,当达到0.03%时,色素抑制率逐渐平缓,而在添加量为0.05%时,色素抑制率有略微的降低,这可能是由于GOD酶聚集,影响其活性的表达。在工业化生产时应考虑生产成本控制,因此本实验选择GOD添加量为0.03%。

2.3 葡萄糖氧化酶添加工艺的响应面优化实验

本实验应用响应面优化法进行过程优化。以各反应参数 x_1 、 x_2 、 x_3 、 x_4 为自变量,以色素抑制率为响应值,响应面实验方案及结果见表3。实验号1~26为析

表3 实验安排及结果

Table 3 Experimental design and results

实验号	x_1	x_2	x_3	x_4	Y 色素抑制率 (%)
1	-1	-1	-1	-1	62.44
2	-1	-1	-1	1	56.80
3	-1	-1	1	-1	51.28
4	-1	-1	1	1	58.74
5	-1	1	-1	-1	58.22
6	-1	1	-1	1	51.11
7	-1	1	1	-1	60.52
8	-1	1	1	1	61.52
9	1	-1	-1	-1	64.48

续表

实验号	x_1	x_2	x_3	x_4	Y 色素抑制率 (%)
10	1	-1	-1	1	63.44
11	1	-1	1	-1	55.11
12	1	-1	1	1	62.60
13	1	1	-1	-1	61.44
14	1	1	-1	1	60.26
15	1	1	1	-1	61.56
16	1	1	1	1	63.67
17	-2	0	0	0	56.10
18	2	0	0	0	63.67
19	0	-2	0	0	60.02
20	0	2	0	0	56.36
21	0	0	-2	0	63.38
22	0	0	2	0	63.37
23	0	0	0	-2	57.38
24	0	0	0	2	55.28
25	0	0	0	0	63.02
26	0	0	0	0	61.38
27	0	0	0	0	62.95
28	0	0	0	0	61.88
29	0	0	0	0	62.75
30	0	0	0	0	63.68
31	0	0	0	0	62.76
32	0	0	0	0	64.88
33	0	0	0	0	62.48
34	0	0	0	0	62.40
35	0	0	0	0	63.80
36	0	0	0	0	61.56

因实验, 27~36为10个中心实验, 用以估计实验误差。

通过统计分析软件SAS 9.1进行数据分析, 建立二次响应面回归模型如下:

$$Y = 62.795 + 1.96x_1 - 0.163x_2 - 0.134x_3 - 0.046x_4 - 0.7062x_1^2 - 0.05x_1x_2 - 0.636x_1x_3 + 0.73x_1x_4 - 1.13x_2^2 + 2.23x_2x_3 - 0.84x_2x_4 + 0.167x_3^2 + 2.06x_3x_4 - 1.59x_4^2$$

回归与方差分析结果见表4, 交互项显著的响应面分析图5。

由表4可知, 方程因变量与自变量之间的线性关系明显, 该模型回归显著 ($p < 0.0001$), 失拟项不显著 ($p > 0.05$), 并且该模型 $R^2 = 92.65\%$, $R^2_{Adj} = 88.41\%$, 说明该模型与实验拟合良好, 自变量与响应值之间线性关系显著, 可以用于该反应的理论推测。由 F 检验可以得到因子贡献率为: $x_1 > x_3 > x_2 > x_4$, 即反应温度 > 反应时间 > pH > GOD 添加量。

由图5分析结果可看出: x_1x_3 、 x_1x_4 、 x_2x_4 、 x_3x_4 的交互作用对色素抑制率的影响。当其中一个因素固定不变时, 另一个因素的变化趋势均与单因素实验趋势相符。由此可知, 在碱提酸沉法提取米糠蛋白过程中4个因素的交互作用对色素抑制率均有显著影响, 并且有明显的极值出现。由此可知, 在日后的工业化生产中对此4个参数的调控均有限制。

应用响应面优化分析方法对回归模型进行分

表4 回归与方差分析结果

Table 4 Results of regression and variance analysis

变量	自由度	平方和	均方	F值	$p > F$
x_1	1	92.31604	92.31604	51.91891	0.0001
x_2	1	0.637004	0.637004	0.241612	0.0063
x_3	1	0.429337	0.429337	0.358254	0.5559
x_4	1	0.051338	0.051338	0.028872	0.8667
x_1x_2	1	0.041006	0.041006	0.023062	0.8807
x_1x_3	1	6.464306	6.464306	3.635551	0.0403
x_1x_4	1	8.511806	8.511806	4.787074	0.0401
x_2x_3	1	79.52181	79.52181	44.72338	0.0001
x_2x_4	1	11.30641	11.30641	6.358768	0.0198
x_3x_4	1	68.18631	68.18631	38.34825	0.0001
x_1^2	1	15.94713	15.94713	8.968728	0.0069
x_2^2	1	40.8382	40.8382	22.96757	0.0001
x_3^2	1	0.887778	0.887778	0.49929	0.4876
x_4^2	1	81.3769	81.3769	45.76669	0.0001
回归	14	406.5154	406.5154	16.33042	<0.0001
剩余	21	37.33971	1.778081		
失拟	10	26.50141	2.650141	2.669679	0.0599
总和	35	443.8551			

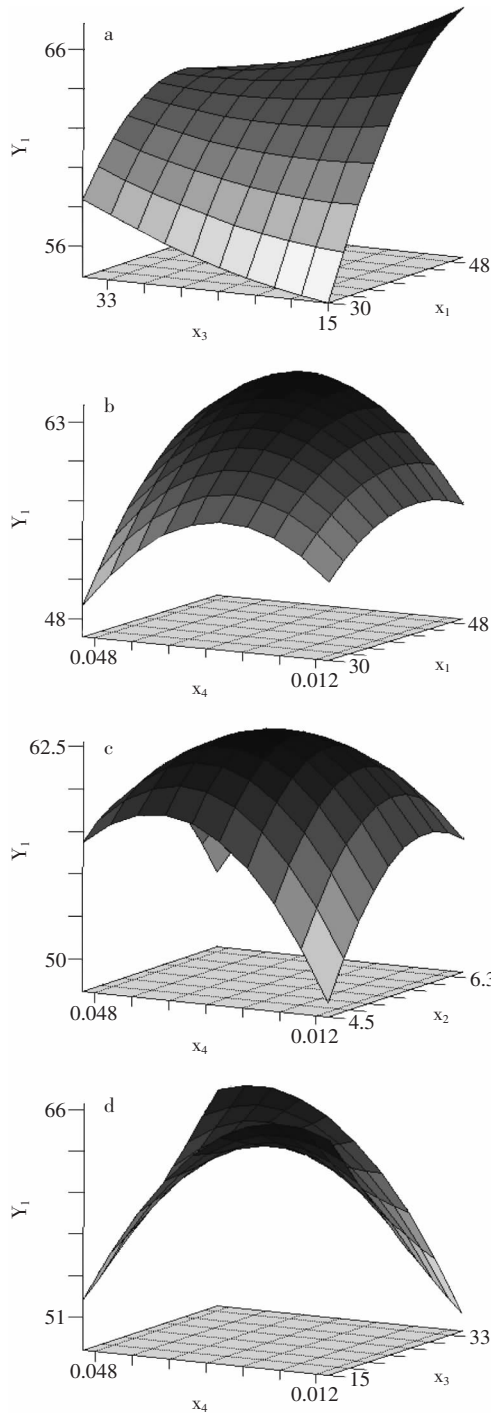


图5 交互项显著的响应面分析

Fig.5 Response surface analysis of significant effective interaction items

注: a: $y_1=f(x_1, x_3)$ 的响应面; b: $y_1=f(x_1, x_4)$ 的响应面;
c: $y_1=f(x_2, x_4)$ 的响应面; d: $y_1=f(x_3, x_4)$ 的响应面。

表5 响应面寻优结果

Table 5 Results of response surface optimization

因素	优化值	实验值	色素抑制率(%)	
			优化值	实验值
x_1	44.600	45.000		
x_2	5.480	5.500		
x_3	26.000	25.000	64.270	62.73
x_4	0.035	0.035		

析,寻找最优响应结果见表5。

2.4 验证实验

为检验响应面方法所得结果的可靠性,按照上述整理值进行3组验证性实验,得到的蛋白的色素抑制率平均值为62.73%。预测值与实验值之间的良好拟合性证实了模型的有效性。表明所得出的回归方程可以很好的反映反应温度、pH、反应时间和GOD添加量与色素抑制率的关系。因此响应面分析法所得到的合成条件参数准确可靠,在实践中具有可行性。

3 结论

本实验研究了在碱提酸沉法提取米糠蛋白过程中,添加GOD氧化抑制米糠中葡萄糖的条件。通过单因素实验和响应面分析法优化了GOD添加工艺的最佳条件:反应温度45℃, pH5.5, 反应时间25min, GOD添加量0.035%。采用响应面优化的结果进一步验证了此种方法的可行性,得到的蛋白的色素抑制率为62.73%,效果较为理想,具有产业化推广的可能性,发展前景开阔。

参考文献

- [1] 石彦国. 大豆制品工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005.
- [2] Prakash J. Rice bran proteins:properties and food use [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,1996,36(6): 537-552.
- [3] 康艳玲,王章存. 米糠蛋白研究现状[J]. 粮食与油脂,2006(3):22-24.
- [4] Roberts P J,Simmond D H. Extraction of protein and solid from wheat bran[J]. Journal of Science Food Agriculture,1985,36(1):5-10.
- [5] 周凤超,王腾宇,关海宁,等. 米糠蛋白的提取及应用现状[J]. 粮油加工,2010(1):55-57.
- [6] 李坤,刘颖,窦博鑫. 米糠蛋白提取中褐变抑制剂的筛选[J]. 食品工业科技,2012(2):218-222.
- [7] 王树春,刘秀华. 葡萄糖氧化酶及其在食品工业上的应用[J]. 食品科技,2001(3):30-31.
- [8] 梅丛笑,方元超. 葡萄糖氧化酶在食品及饮料中的应用[J]. 江苏食品与发酵,2000(1):22-25.
- [9] Decamps K, Joye I J, Haltrich D, et al. Biochemical characteristics of *Trametes multicolor* pyranose oxidase and *Aspergillus niger* glucose oxidase and implications for their functionality in wheat flour dough[J]. Food Chemistry,2012,131(4):1485-1492.
- [10] Whiting R C. Microbial modeling in foods[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,1995,35(6):467- 494.
- [11] Dalgaard P, Mejlholm O, Huss H H. Application of an iterative approach for development of a microbial model predicting the shelf-life of packed fish[J]. International Journal of Food Microbiology,1997,38(2-3):169-179.
- [12] 徐雅琴,杨严俊,曹如燕. 葡萄糖氧化酶法去除蛋清中葡萄糖的工艺研究[J]. 食品与发酵工业,2005,31(2):55-58.
- [13] 李艳,李静. 葡萄糖氧化酶及其应用[J]. 食品工程,2006,3(2):9-11.
- [14] 康辉,李红飞,郝晓霞. 葡萄糖氧化酶简介及其应用[J]. 农业工程技术:农产品加工业,2008(1):16-19.