大豆蛋白超声磷酸化加工工艺的 Box-Behnken 模型优化*

王喜波　迟玉杰
（东北农业大学食品学院，哈尔滨 150030）

【摘要】 采用超声波处理技术协同大豆蛋白磷酸化加工以提高大豆蛋白的乳化性质，利用 Box-Behnken 模型对加工工艺过程进行优化，所得模型拟合度高，可用于实际分析和预测。利用响应面分析法探讨了三聚磷酸钠（STP）质量分数、超声波功率、超声波处理时间 3 因素对改性产物乳化性质的影响，优化的制备工艺条件为：STP 质量分数 9.65%、超声波功率 490 W、超声波处理时间 34 min，在此条件下产物乳化活性为 70.8，乳化稳定性为 30.2 min，分别是空白样品的 2.18 倍和 1.57 倍。

关键词：大豆蛋白　乳化性质　超声波　磷酸化作用　工艺优化
中图分类号：TS201.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-1298(2011)11-0130-05

Optimization on the Technology of Ultrasound-phosphorylation Soybean Proteins by Box-Behnken Model

Wang Xibo　Chi Yujie
(*College of Food Science*, *Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030, *China*)

Abstract

Ultrasound-phosphorylation was used to modify soybean proteins to improve the emulsification property. Based on the single factor experiments, technology was established and optimized by central composite design theory of Box-Behnken. The response model was valid in analyzing and predicting the extent of EAI due to its higher fitting degree and less experimental error. The effect on emulsifying properties of soybean proteins modified by ultrasound-chemistry phosphorylation (UP - SP) were analyzed, and the optimized conditions of preparation of UP - SP were as follows: STP 9.65%, ultrasound power 490 W, and time of reaction 34 min, then the emulsifying activity and emulsion stability of UP - SP, were 70.8 and 30.2 min, 2.18 and 1.57 fold against control experiment respectively. The results show that ultrasound-phosphorylation is an efficient method to improve the emulsification properties of soybean proteins.

Key words　Soybean proteins, Emulsification property, Ultrasound, Phosphorylation, Technology optimization

引言

超声波技术已应用在功能性成分提取[1~7]、过滤[8~11]、脱气[12~14]、降解[15~17]、冷冻结晶[18]、解冻[19]、肉的嫩化[20]、杀菌[21]等方面，但其对蛋白质的影响尤其是对大豆蛋白分子构象及其功能特性变化规律的影响方面，还缺乏系统深入的研究。大豆蛋白具有较高的营养价值和重要的功能性质[22~23]，在食品加工业中应用非常广泛，但是天然大豆蛋白的功能性质较差，无法满足食品加工的需求，必须对其进行适度的加工处理来适应不同产品的要求。关于蛋白质改性加工的方法主要集中在化学[24]、物

收稿日期：2011-01-30　修回日期：2011-03-01
*国家高技术研究发展计划（863 计划）资助项目（2006AA10Z322）、黑龙江省自然科学基金重点项目（ZD200902）、国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目和黑龙江省教育厅科学技术研究项目（11531022）
作者简介：王喜波，副教授，主要从事农产品贮藏与加工研究，E-mail：wangxibo@yahoo.cn
通讯作者：迟玉杰，教授，博士生导师，主要从事食品化学及农产品加工研究，E-mail：yjchi@126.com

理[25]、生物法等方面，且绝大多数研究是采用单一方法，停留在实验室阶段，关于超声波协同磷酸化制备功能性大豆蛋白的工艺技术研究尚未见报道。

本文以大豆蛋白为原料，在超声波环境作用下协同进行磷酸化加工研究，探索并优化协同处理的工艺条件，旨在为高乳化型大豆蛋白的工业化生产提供理论和技术支持。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

大豆蛋白（哈高科大豆食品有限责任公司）；大豆油（九三集团哈尔滨惠康食品有限公司）；三聚磷酸钠（STP）、十二烷基磺酸钠（SDS）为化学纯；其他试剂均为分析纯。

JY92－2D 型超声仪，宁波新芝生物科技股份有限公司；FDU－1100 型冻干机，日本 EYELA 公司；KND－HYP8 型消化炉，上海纤检仪器有限公司；KDN－2008 型全自动定氮仪，上海纤检仪器有限公司；DU730 型紫外-可见分光光度计，贝克曼库尔特公司；FS－1 型可调高速匀浆机，金坛市荣华仪器制造有限公司；LD4－2A 型离心机，北京医用离心机厂；FE20 型 pH 计，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司。

1.2　试验方法

1.2.1　超声波协同磷酸化大豆蛋白制备工艺

用蒸馏水配制一定浓度的大豆蛋白溶液，搅拌均匀并添加定量 STP，置于经改装后的超声波处理器隔音箱中，在设定超声波功率下反应一定时间，反应过程用 1 mol/L NaOH 溶液维持 pH 值8.0 ±0.2，温度控制在 20 ~40 ℃，反应结束后将溶液 pH 值调至 4.0，4 000 r/min离心 20 min，取沉淀部分，用蒸馏水重复离心水洗 2 ~3 次，水洗 3 次后回调 pH 值至 7.0，冷冻干燥后即得改性产物。

1.2.2　普通改性大豆蛋白制备工艺

用蒸馏水配制一定浓度的大豆蛋白溶液，添加质量分数为 9.65% STP 并搅拌均匀，30 ℃下反应 3 h，反应过程用 1 mol/L NaOH 溶液维持 pH 值 8.0 ±0.2，反应结束后离心水洗，反应结束后将溶液 pH 值调至 4.0，4 000 r/min 离心 20 min，取沉淀部分，用蒸馏水重复离心水洗 2 ~3 次，水洗 3 次后回调 pH 值至 7.0，冷冻干燥后即得改性产物。

1.2.3　超声波改性大豆蛋白制备工艺

用蒸馏水配制大豆蛋白溶液，搅拌均匀置于超声波处理器隔音箱中，在设定工作时间、间歇时间、处理功率等条件下进行改性，处理温度控制在 20 ~40 ℃。将处理后蛋白溶液 pH 值调至 4.0，并在 4 000 r/min下离心 20 min，取沉淀部分，回调 pH 值至 7.0，冷冻干燥后即得改性产物。

1.2.4　乳化性质的测定

乳化性测定参照文献[26]方法，略有改进：配制 100 mL、1 g/L 的大豆蛋白磷酸盐溶液（pH 值 7.0，0.1 mol/L），取 30 mL 溶液，加 10 mL 大豆色拉油，于高速匀浆机中10 000 r/min 均质 1 min 后，分别在 0 min 与 10 min 时从底部吸取 100 μL 分散于 10 mL、1 g/L SDS 溶液中，于 500 nm 处测定吸光度（测定 3 次取平均值）。乳化活性和乳化稳定性计算公式为

$$E_A = 100A_0 \tag{1}$$

$$E_S = \frac{\Delta T A_0}{A_0 - A_{10}} \tag{2}$$

式中　E_A——乳化活性　E_S——乳化稳定性，min

A_0——0 min 时的吸光度

ΔT——两次时间间隔，本文取 10 min

A_{10}——10 min 时的吸光度

1.2.5　加工装置设计

超声波协同磷酸化制备装置由循环水冷却装置、进料装置、超声波处理装置组成，参数设置在超声波工作仪控制面板上完成，用泵输送样品，原理如图 1所示。

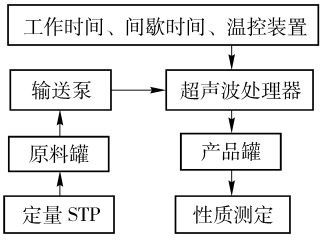


图 1　超声波处理装置原理图

Fig. 1　Schematic diagram of ultrasound-phosphorylation processing apparatus

1.2.6　试验设计

根据单因素试验结果，采用 Design-Expert 软件建立 Box-Behnken 模型优化超声波协同处理条件下 STP 质量分数、超声波处理时间、超声波功率对大豆蛋白乳化活性和乳化稳定性的影响，并对数据进行统计分析，试验因素水平编码见表 1。

表 1　Box-Behnken 设计试验因素水平编码

Tab. 1　Factors, levels and coding table of Box-Behnken design test

编码	因素		
	STP 质量分数 x_1/%	超声波功率 x_2/W	超声波处理时间 x_3/min
－1	6	200	20
0	8	400	30
1	10	600	40

2 结果与讨论

2.1 Box-Behnken 中心设计优化制备工艺

对影响大豆蛋白乳化活性的 STP 质量分数、超声波处理时间、超声波功率 3 个因素进行优化,设计了三因素三水平中心组合设计,共有 17 个试验点,其中 12 个为分析因子,5 个为零点,零点试验进行 3 次以估计误差,试验结果见表 2。

表 2 Box-Behnken 试验条件及结果

Tab. 2 Design and results of Box-Behnken experiment

试验序号	X_1	X_2	X_3	乳化活性
1	1	1	0	69.6
2	0	0	0	66.1
3	1	-1	0	58.1
4	0	1	-1	56.4
5	-1	-1	0	46.7
6	0	0	0	66.9
7	0	-1	-1	48.6
8	-1	0	1	54.3
9	0	1	1	62.6
10	-1	0	-1	49.2
11	0	0	0	67.7
12	0	0	0	67.2
13	0	-1	1	54.9
14	1	0	-1	59.1
15	-1	1	0	53.1
16	1	0	1	66.8
17	0	0	0	67.9

表 2 的试验结果经 Design-Expert 7.1.3 软件进行回归拟合得到超声波协同磷酸化改性大豆蛋白乳化活性的回归方程模型为

$$Y = -100.25 + 18.01X_1 + 0.12X_2 + 3.38X_3 + 0.003X_1X_2 + 0.033X_1X_3 - 0.000\,01X_2X_3 - 1.070X_1^2 - 0.000\,1X_2^2 - 0.055X_3^2$$

Box-Behnken 试验方差分析结果见表 3。

从表 3 的方差分析结果可知,回归方程极显著($p < 0.01$),模型的失拟项不显著($p > 0.05$),说明模型方程与实际情况拟合较好,能够很好拟合真实响应面并反映出乳化活性与 STP 质量分数、超声波功率、处理时间之间的关系,且试验外因素对试验结果的干扰较小。试验误差小,模型成立,可以利用此模型对超声波协同磷酸化制备高乳化型大豆蛋白的反应过程进行预测和分析。根据表 3 的方差分析结果对模型方程进行优化:模型方程式中一次项 X_1、X_2、X_3 和二次项 X_1^2、X_2^2、X_3^2 的影响达到极显著水平($p < 0.01$),交互项 X_1X_2 的影响达到显著水平($p < 0.05$),其他项影响不显著($p > 0.05$),表明各种影响因素对加工产物乳化性影响不是简单的线性关系,通过 GLM Procedure 对模型处理,保留 $p < 0.30$ 的各项,即得到优化后的回归模型为

表 3 Box-Behnken 试验方差分析

Tab. 3 Variance analysis of Box-Behnken design test

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
模型	942.60	9	104.73	112.02	<0.000 1
X_1	316.26	1	316.26	338.27	<0.000 1
X_2	139.45	1	139.45	149.15	<0.000 1
X_3	80.01	1	80.01	85.58	<0.000 1
X_1X_2	6.50	1	6.50	6.96	0.033 6
X_1X_3	1.69	1	1.69	1.81	0.220 7
X_2X_3	0.002 5	1	0.002 5	0.0027	0.960 2
X_1^2	77.13	1	77.13	82.50	<0.000 1
X_2^2	151.83	1	151.83	162.40	<0.000 1
X_3^2	128.76	1	128.76	137.72	<0.000 1
残差	6.54	7	0.93		
失拟	4.51	3	1.50	2.96	0.160 8
纯误差	2.03	4	0.51		
总回归	949.14	16			

$$Y = -100.25 + 18.01X_1 + 0.12X_2 + 3.38X_3 + 0.003X_1X_2 + 0.033X_1X_3 - 1.070X_1^2 - 0.000\,1X_2^2 - 0.055X_3^2$$

对模型的回归方程进行中心标准化处理,分析各因素对加工产物乳化活性的影响从大到小依次为:STP 质量分数、超声波处理时间、超声波功率。

2.2 自变量对响应值影响分析

将模型中 STP 质量分数、超声波处理时间、超声波功率中一个因素固定在零水平,可得到另两个因素交互作用对制备的大豆蛋白产物乳化活性的影响子模型,并根据子模型绘制三维响应面图,如图 2 所示。

从图 2 可以看出,制备产物的乳化活性随 STP 质量分数而增加,但 STP 质量分数超过 9.5% 后,产物乳化活性增加不明显,表明 STP 与蛋白分子结合后,引入了带负电荷的磷酸根基团,降低了乳液体系的表面张力[27],提高了其乳化活性。但过量使用 STP 时,蛋白质分子间电负性增加,分子间静电斥力过大,阻止了乳状液膜的形成,乳化活性反而降低。超声波处理功率和处理时间对产物乳化活性影响显著,高乳化活性集中在中心区域,原因可能是在一定

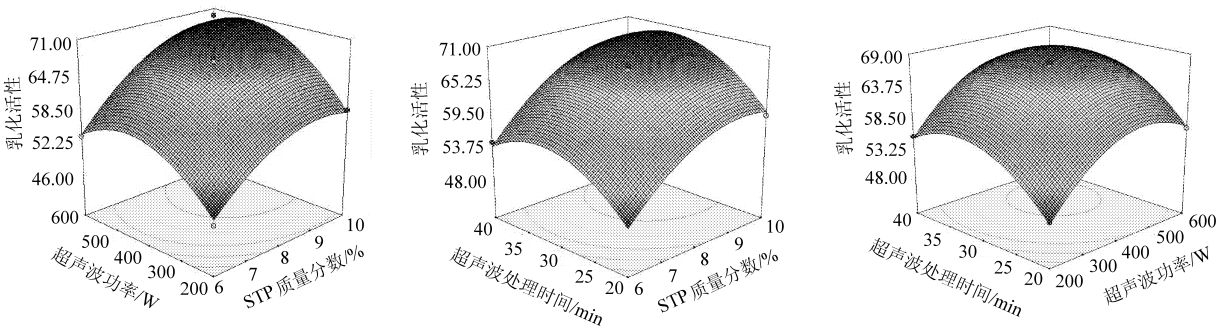


图 2　影响乳化活性因素的响应面分析

Fig. 2　Effects of variables on the EAI by response surface analysis

功率和时间下蛋白质分子在超声波的综合作用下，一方面破坏了高级空间结构，蛋白分子部分展开，有利于发生化学磷酸化反应，提高了化学反应效率和产物乳化活性；另一方面在超声波作用下，促进了蛋白质分子的解聚，内部疏水基团暴露出来，使得蛋白质更易于分散到油水界面，提高乳化活性；第三方面可能是在超声环境下，降低了蛋白化学磷酸化反应的活化能，加快了反应速度和磷酸化程度，从而提高改性产物乳化活性。但当超声波功率和处理时间持续增大时，改性产物的乳化活性反而降低，表明超声波处理过度使蛋白质发生较强烈的变性而使其乳化活性降低。

2.3　加工工艺的优化

利用 Design-Expert 7.1.3 软件，以乳化活性为指标，优化出超声波协同磷酸化大豆蛋白制备工艺条件为：STP 质量分数 9.65%、超声波功率 490 W、超声波处理时间 34 min，在此条件下进行了 5 次试验，平均乳化活性 70.8，预测模型的预测值为 71.2，相对误差为 0.56%，差异不显著，表明本模型优化出的工艺参数可靠，具有实用价值。对比空白样品（N－SP）、超声波处理样品（U－SP）、磷酸化样品（S－SP）、超声波协同磷酸化样品（US－SP）的乳化活性，结果如表 4 所示。

表 4　不同改性方法产品乳化活性

Tab. 4　EAI of products from different methods

蛋白样品	乳化活性	乳化稳定性/min
N－SP	32.5	19.2
U－SP	46.8	24.8
S－SP	47.5	26.4
US－SP	70.8	30.2

对比试验结果表明（表 4），单一使用超声波处理或磷酸化可以使制备产物的乳化活性和稳定性明显提高，而 US－SP 的乳化活性、乳化稳定性要优于 U－SP 或 S－SP，说明 US－SP 的乳化活性和乳化稳定性大幅提高是物理超声波作用和磷酸化协同作用的结果。优化后制备产物的乳化活性和乳化稳定性分别是空白样品的 2.18 倍和 1.57 倍。

3　结论

（1）超声波作用能提高磷酸化大豆蛋白的反应速率，有效提高产物的乳化活性和乳化稳定性。

（2）建立了超声磷酸化大豆蛋白 Box-Behnken 模型，并优化了制备工艺，方差分析结果表明方程拟合较好，优化的制备技术条件为 STP 质量分数 9.65%、超声波功率 490 W、超声波处理时间 34 min，制备产物乳化活性和乳化稳定性都有显著提高。

参　考　文　献

1　Entezari M H, Hagh N S, Haddad K M H. The direct effect of ultrasound on the extraction of date syrup and its micro-organisms [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2004, 11(6): 379 ~ 384.

2　Jacques R A, Péres V F, Freitas L S, et al. Chemical composition of mate tea leaves (Ilex paraguariensis): a study of extraction methods [J]. Journal of Separation Science, 2006, 29(18): 2 780 ~ 2 784.

3　易阳，张名位，廖森泰，等. 龙眼多糖超声波酶解辅助提取工艺优化[J]. 农业机械学报，2010，41(5)：131 ~ 136.
Yi Yang, Zhang Mingwei, Liao Sentai, et al. Optimization of ultrasonic-enzyme-assisted extraction technology of polysaccharides from longan pulp [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(5): 131 ~ 136. (in Chinese)

4　冯宗帅，吴彩娥，方升佐，等. 青钱柳叶总黄酮超声辅助提取工艺优化[J]. 农业机械学报，2009，40(2)：130 ~ 134.
Feng Zongshuai, Wu Caie, Fang Shengzuo, et al. Technology optimization of total flavonoids extraction from cyclocarya paliurus leaves by ultrasonic assistance [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(2): 130 ~ 134. (in Chinese)

5　Cabredo-Pinillos S, Cdron-Fernandez T, Gonzalez-Briongos M, et al. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds

from wine samples: optimization of the method [J]. Talanta, 2006, 69(5): 1 123 ~ 1 129.

6 李秀霞, 韩鲁佳. 玉米蛋白粉叶黄素超声提取工艺优化[J]. 农业机械学报, 2008, 39(5): 81 ~ 85.
Li Xiuxia, Han Lujia. Optimization on ultrasound-assisted extraction technology of xanthophylls from corn gluten meal [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2008, 39(5): 81 ~ 85. (in Chinese)

7 Jadhav D, Rekha B N, Gogate P R, et al. Extraction of vanillin from vanilla pods: a comparison study of conventional soxhlet and ultrasoundassisted extraction [J]. Journal of Food Engineering, 2009, 93(4): 421 ~ 426.

8 Kyllönen H, Pirkonen P, Nyström M, et al. Experimental aspects of ultrasonically enhanced cross-flow membrane filtration of industrial wastewater [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2006, 13(4): 295 ~ 302.

9 Smythe M C, Wakeman R J. The use of acoustic fields as a filtration and dewatering aid [J]. Ultrasonics, 2000, 38(1 ~ 8): 657 ~ 661.

10 Wen X, Sui P, Huang X. Exerting ultrasound to control the membrane fouling in filtration of anaerobic activated sludge-mechanism and membrane damage [J]. Water Science and Technology, 2008, 57(5): 773 ~ 779.

11 Muthukumaran S, Kentish S E, Ashokkumar M, et al. Mechanisms for the ultrasonic enhancement of dairy whey ultrafiltration [J]. Journal of Membrane Science, 2005, 258(1 ~ 2): 106 ~ 114.

12 Tervo J T, Mettin R, Lauterborn W. Bubble cluster dynamics in acoustic cavitation [J]. Acta Acustica United with Acustica, 2006, 92(1): 178 ~ 180.

13 Mettin R. Bubble structures in acoustic cavitation [M]// Doinikov A A. Bubble and particle dynamics in acoustic fields: modern trends and applications, research signpost, Kerala, 2005: 1 ~ 36.

14 Matsuura K, Hirotsune M, Nunokawa Y, et al. Acceleration of cell growth and ester formation by ultrasonic wave irradiation [J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1994, 77(1): 36 ~ 40.

15 Jambrak A R, Herceg Z, Šubaric D, et al. Ultrasound effect on physical properties of corn starch [J]. Carbohydrate Polymers, 2010,79(1): 91 ~ 100.

16 Vodenicarova M, Drimalova G, Hromadkova Z, et al. Xyloglucan degradation using different radiation sources: acomparative study [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2006, 13(2): 157 ~ 164.

17 Drimalova E, Velebny V, Sasinkova V, et al. Degradation of hyaluronan by ultrasonication in comparison to microwave and conventional heating [J]. Carbohydrate Polymers, 2005, 61(4): 420 ~ 426.

18 Sun D W, Li B. Microstructural change of potato tissues frozen by ultrasound-assisted immersion freezing [J]. Journal of Food Engineering, 2003, 57(4): 337 ~ 345.

19 Miles C A, Morley M J, Rendell M. High power ultrasonic thawing of frozen foods [J]. Journal of Food Engineering, 1999, 39(2): 151 ~ 159.

20 Pohlman F W, Dikeman M E, Zayas J F. The effect of low intensity ultrasound treatment on shear properties, color stability and shelf-life of vacuumpackaged beef semitendinosus and biceps femoris muscles [J]. Meat Science, 1997, 45(3): 329 ~ 337.

21 Cameron M, McMaster L D, Britz T J. Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components [J]. Dairy Science and Technology, 2009, 89(1): 83 ~ 98.

22 Richert S J, Kolar C W. Value of isolated soy protein in food products [M]// Jacqueline Dupont, Osman E M. Cereals and legumes in the food supply. Ames, IA: Iowa State University Press, 1987: 73 ~ 90.

23 Russell T A. Comparison of sensory properties of whey and soy protein concentrates and isolates [D]. Releigh, NC: North Carolina State University, 2004.

24 Mirmoghtadaie L, Kadivar M, Shahedi M. Effects of succinylation and deamidation on functional properties of oat protein isolates [J]. Food Chemistry, 2009,114 (1): 127 ~ 131.

25 Puppo N, Chapleau F, Speroni M, et al. Physicochemical modifications of high-pressure-treated soybean protein isolates [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(6): 1 564 ~ 1 571.

26 Pearce K N, Kinsella J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1978, 26(3): 716 ~ 723.

27 Zhang K S, Li Y Y, Ren Y X. Research on the phosphorylation of soy protein isolate with sodium tripoly phosphate [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 79 (4): 1 233 ~ 1 237.

28 陈俊高,迟玉杰,王喜波,等. 提高大豆分离蛋白乳化性的工艺优化及性质分析[J]. 食品与发酵工业,2010,36(11): 67 ~ 72.
Chen Jungao, Chi Yujie, Wang Xibo, et al. Optimization of technology for improving emulsifying properties of soybean protein isolate and analysis its properties[J]. Food and Fermentation Industries, 2010,36(11):67 ~ 72.