

超声波辅助花生浓缩蛋白糖基化改性研究

杨伟强¹, 杜德红², 江晨¹, 于丽娜^{1*}, 王明清¹, 韩守萍³, 宋昱¹, 孙杰^{1*},
毕洁¹, 张初署¹, 徐同成⁴

(1. 山东省花生研究所, 青岛 266100; 2. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 青岛 266109;
3. 青岛市黄岛区农业农村局, 青岛 266400; 4. 山东省农业科学院农产品研究所, 济南 250000)

摘要: **目的** 研究超声波辅助花生浓缩蛋白糖基化改性工艺。**方法** 以低温冷榨花生蛋白粉为原料, 以糖基化改性蛋白的乳化活性指数(emulsifying activity index, EAI)和乳化稳定性指数(emulsifying stability index, ESI)为考察指标, 采用单因素和响应面实验优化工艺条件。**结果** 超声波辅助花生浓缩蛋白糖基化改性的最优工艺参数为蛋白浓度 5.0 mg/mL、糖浓度 104 mg/mL、pH 值 8.5、反应温度 57 °C、反应时间 43 min、超声波功率 210 W、超声波频率 45 kHz; 此工艺条件下的 EAI 和 ESI 理论值分别为 47.40 m²/g 和 69.13%, 验证实验值分别为(48.61±0.32) m²/g 和(67.59±2.08)%; EAI 和 ESI 值的实验值与理论值相差分别为 2.55%和 2.23%。在 pH 2~12 范围内, 糖基化改性花生浓缩蛋白的乳化活性高于未改性蛋白。**结论** 本研究的响应面模型与实际情况拟合较好, 验证了所预测模型的正确性, 为花生浓缩蛋白糖基化改性的制备和应用提供理论基础。

关键词: 花生浓缩蛋白; 糖基化改性; 超声波辅助; 乳化性质

Evaluation of ultrasonic assisted glycosylation modification of peanut protein concentrate

YANG Wei-Qiang¹, DU De-Hong², JIANG Chen¹, YU Li-Na^{1*}, WANG Ming-Qing¹,
HAN Shou-Ping³, SONG Yu¹, SUN Jie^{1*}, BI Jie¹, ZHANG Chu-Shu¹, XU Tong-Cheng⁴

(1. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China; 2. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China; 3. Qingdao Huangdao District Agricultural and Rural Bureau, Qingdao 266400, China; 4. Agricultural Products Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250000, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the optimization process of glycosylation modification of peanut protein concentrate with ultrasonic assisted extraction. **Methods** Optimization of process conditions were determined by

基金项目: 山东省农业科学院农业科技创新工程(CXGC2016B16, CXGC2018E21)、山东省 2018 年度农业重大应用技术创新项目、青岛市民生科技计划项目(19-6-1-61-nsh)、国家重点研发计划项目(2018YFD0300605)、山东省自然科学基金(ZR2017MC062, ZR2017MC060, ZR2016YL021, ZR2016CM43)、2019 年山东省人才引进成果示范推广项目、山东省农业重大应用技术(SD2019ZZ0121-1)

Fund: Supported by the Agricultural Science and Technology Innovation Project of Shandong Academy of Agricultural Sciences (CXGC2016B16, CXGC2018E21), Major Agricultural Application Technology Innovation Project of Shandong Province in 2018, Qingdao People's Livelihood Science and Technology Project (19-6-1-61-nsh), National Key R&D Program Projects (2018YFD0300605), Shandong Natural Science Foundation (ZR2017MC062, ZR2017MC060, ZR2016YL021, ZR2016CM43), Demonstration and Promotion Project of Talent Introduction Achievements in Shandong Province in 2019, Major Application Technology of Agriculture in Shandong Province (SD2019ZZ0121-1)

***通讯作者:** 于丽娜, 副研究员, 主要研究方向为植物蛋白和功能食品的开发研究与利用。E-mail: lhlyln0626@163.com

孙杰, 研究员, 主要研究方向为花生食品营养与安全。E-mail: sjj605@163.com

***Corresponding author:** YU Li-Na, Associate Professor, Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China. E-mail: lhlyln0626@163.com

SUN Jie, Professor, Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China. E-mail: sjj605@163.com

single factor and response surface experiments using the low temperature pressed peanut protein powder as the raw material and the emulsifying activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) as main value indexes.

Results The optimum conditions obtained were protein concentration of 5.0 mg/mL, glucose concentration of 104 mg/mL, pH value of 8.5, reaction temperature of 57 °C, reaction time of 43 min, ultrasonic power of 210 W and ultrasonic frequency of 45 kHz. The model predictive values of EAI and ESI could reach 47.40 m²/g and 69.13%, respectively, and the verification experiment values were (48.61±0.32) m²/g and (67.59±2.08)%, respectively. The differences between the experimental and model predictive values were 2.55% and 2.23%, respectively. In the range of pH 2–12, the emulsifying properties of glycosylated peanut protein concentrate were higher than those of unmodified protein. **Conclusion** The response surface model of this study fits well with the actual situation. And the correctness of the predicted model is verified. Therefore, this study provides a theoretical basis for the preparation and application of glycosylation modification of peanut protein concentrate.

KEY WORDS: peanut protein concentration; glycosylation modification; ultrasonic assisted extraction; emulsifying properties

1 引言

花生蛋白是一种营养价值极高的优质植物蛋白,其在花生米中的含量为25%~36%,在花生粕中的含量约为50%^[1]。采用乙醇洗涤技术从花生粕中得到花生浓缩蛋白,其蛋白含量可达到70%以上,它在食品领域中的应用要比花生粕广泛^[2]。然而,乙醇洗涤使花生浓缩蛋白的溶解性、乳化活性和起泡性等功能性性质减小,降低了其精深加工利用的可能性^[3]。花生浓缩蛋白的乳化性质等功能性性质的改善可以进一步拓宽其应用范围,从而提高其产品附加值。浓缩蛋白功能性性质的改善通常用蛋白改性方法。曹迪等^[4]用中性蛋白酶和超声波改性花生浓缩蛋白,改性后的花生浓缩蛋白的溶解性和吸油性增大,但乳化稳定性减小。赵雪淞等^[5]研究超声处理花生浓缩蛋白,其改性后的乳化活性等均有显著提高。李鹏等^[6]用胰蛋白酶对花生浓缩蛋白进行改性,改性后的花生浓缩蛋白的吸油性较改性前提高79.6%。这些改性方法用到了酶法和超声波物理改性技术,但没涉及到糖基化改性技术。食品蛋白质的氨基和糖的羰基在适宜的条件下发生羰氨反应,生成糖基化改性蛋白。糖基化改性蛋白的功能特性较未改性蛋白都有较大的改善^[7]。曾茂茂等^[8]用葡萄糖和麦芽糖分别与花生分离蛋白进行糖基化反应,发现2种糖基化改性花生分离蛋白的乳化活性均提高。鉴于此,本研究利用先进的超声波辅助糖基化改性技术,拟对花生浓缩蛋白改性,优化超声波辅助糖基化改性花生浓缩蛋白的工艺,为花生浓缩蛋白糖基化改性的制备和应用提供理论基础。

2 材料与方 法

2.1 原料和试剂

低温冷榨花生蛋白粉(青岛长寿食品有限公司);十二

烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、2,4,6-三硝基苯磺酸(picrylsulfonic acid solution, TNBS)(分析纯,美国Sigma公司);盐酸、无水乙醇、氢氧化钠、葡萄糖(分析纯,上海国药集团化学试剂有限公司)。

2.2 仪器与设备

FR223CN 电子分析天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司]; KQ-300VDE 台式三频数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); FE28 台式酸度计[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司]; L550 台式低速大容量离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); PiloFD5 冷冻干燥机[西盟国际金西盟(北京)仪器有限公司]; UV-4802 双光束扫描型紫外/可见分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司)。

2.3 花生浓缩蛋白的提取工艺流程

低温冷榨花生蛋白粉(蛋白浓度10%)→加入蒸馏水→28 kHz 和 300 W 超声辅助分散溶解→Viscozyme L 酶解(0.3%)→4000 r/min 离心 10 min→28 kHz 和 300 W 超声辅助乙醇(浓度70%)浸提 30 min→4000 r/min 离心 10 min→乙醇和蒸馏水交替洗涤→4000 r/min 离心 10 min→沉淀冷冻干燥→花生浓缩蛋白^[2]。

2.4 超声波辅助花生浓缩蛋白糖基化改性工艺

称取花生浓缩蛋白和葡萄糖,加入蒸馏水中,搅拌,混合均匀,用1 mol/L的NaOH溶液调节pH值,定容到一定体积,得到蛋白和葡萄糖的混合溶液。将混合溶液置于超声波清洗器,在一定的超声波功率、超声波频率、温度、时间条件下进行改性反应,反应结束后即用冷水迅速冷却,在4000 r/min条件下离心10 min,取上清液待测。

2.5 超声波辅助花生浓缩蛋白糖基化改性的试验设计

2.5.1 单因素试验

以蛋白浓度、糖浓度、pH、温度、时间、超声波功率、

超声波频率作为试验因素,以乳化活性指数(emulsifying activity index, EAI)和乳化稳定性指数(emulsifying stability index, ESI)作为考察指标进行单因素试验设计。单因素基本试验条件是:蛋白浓度 10 mg/mL、糖浓度 100 mg/mL、超声波频率 28 kHz,超声波功率 300 W, pH 值 9.0, 温度 60 °C, 时间 30 min。单因素试验的因素水平见表 1。

2.5.2 响应面(response surface methodology, RSM)设计试验

在单因素试验基础上,固定:超声波频率 45 kHz、超声波功率 210 W 和 pH 8.5,以蛋白浓度(X_1)、糖浓度(X_2)、时间(X_3)和温度(X_4) 4 个因素为自变量,运用 Box-Behnken 试验设计,进行四因素三水平的响应面分析试验,以乳化活性指数和乳化稳定性指数作为响应变量(Y_1 和 Y_2)。各因素水平设计见表 2。试验设计与分析采用 Design-expert(8.0)软件。

2.6 实验方法

2.6.1 乳化活性指数和乳化稳定性的测定

乳化活性指数和乳化稳定性的测定参考 Yu 等^[9]的方法。

2.6.2 接枝度的测定

接枝度的测定参考曾茂茂等^[8]的方法。测定接枝度就是测定糖基化反应后获得的糖基化改性花生浓缩蛋白减少的游离氨基的数量。糖基化反应后离心的上清液 125 μ L 或 125 μ L 蒸馏水(参比液)各加入 0.21 mmol/L 的 2.0 mL (pH 8.2) 磷酸缓冲液和 0.01% 的 1.0 mL 的 TNBS, 分别在旋涡混合器混匀,2 种反应液分别在 50 °C 恒温水浴避光反应 30 min, 再各加入 0.1 mmol/L 的 2.0 mL 亚硫酸钠终止反应,之后 2 种反应体系都室温静置 15 min。在 420 nm 测定吸光值,该吸光值所对应的浓度即为蛋白中自由氨基含量,以

参比液反应混合物调节“0”点。*L*-亮氨酸的吸光值的测定方法同上述糖基化样品的测定方法,根据 *L*-亮氨酸的浓度和吸光值绘制标准曲线,获得 *L*-亮氨酸的自由氨基含量回归方程。再根据 *L*-亮氨酸含量的回归方程确定所测蛋白的自由氨基含量。

$$\text{接枝度}/\%=(C_0-C)/C_0\times 100$$

式中: C_0 为糖基化反应前花生浓缩蛋白自由氨基的含量, mg/mL; C 为糖基化反应后花生浓缩蛋白自由氨基的含量, mg/mL。

3 结果与分析

3.1 单因素试验结果

3.1.1 蛋白浓度对糖基化改性花生浓缩蛋白乳化性质的影响

不同的花生浓缩蛋白浓度对乳化活性指数和乳化稳定性指数的影响,见图 1A 所示。乳化活性和乳化稳定性均随着蛋白浓度的增加先上升后下降,当蛋白浓度在 7.5 mg/mL 时二者均取得最大值。当蛋白浓度大于 7.5 mg/mL 时,乳化活性下降幅度较大,乳化稳定性下降幅度小。反应体系的糖浓度一定时,只有一部分的蛋白质与糖进行反应。当蛋白浓度增大时,糖基化反应生成的产物要少于没有参与反应的蛋白,由于糖基化蛋白乳化活性要好于原有蛋白^[10],因此蛋白浓度越大,反应体系中未参与反应蛋白越多,乳化活性越小。而当蛋白浓度为 7.5 mg/mL,糖基化反应进行的较完全,反应产物中糖基化蛋白多,改善了蛋白的乳化活性。所以此浓度条件下的乳化活性和乳化稳定性都是最大的。因此,蛋白浓度选择 5、7.5、10 mg/mL 作为响应面实验因素水平。

表 1 单因素试验因素水平表

Table 1 Factor and level table of single factor experiment

	1	2	3	4	5	6	7
蛋白浓度/(mg/mL)	5	7.5	10	12.5	15	20	
糖浓度/(mg/mL)	50	75	100	125	150	175	200
pH 值	8	8.5	9	9.5	10	10.5	
温度/°C	50	55	60	65	70	75	80
时间/min	10	20	30	40	50	60	
超声波功率/W	150	180	210	240	270	300	
超声波频率/kHz	28	45	100				

表 2 响应面试验分析因素水平

Table 2 Factors and levels of response surface methodology

水平	因素			
	X_1 蛋白浓度/(mg/mL)	X_2 糖浓度/(mg/mL)	X_3 时间/min	X_4 温度/°C
-1	5	75	30	50
0	7.5	100	40	55
1	10	125	50	60

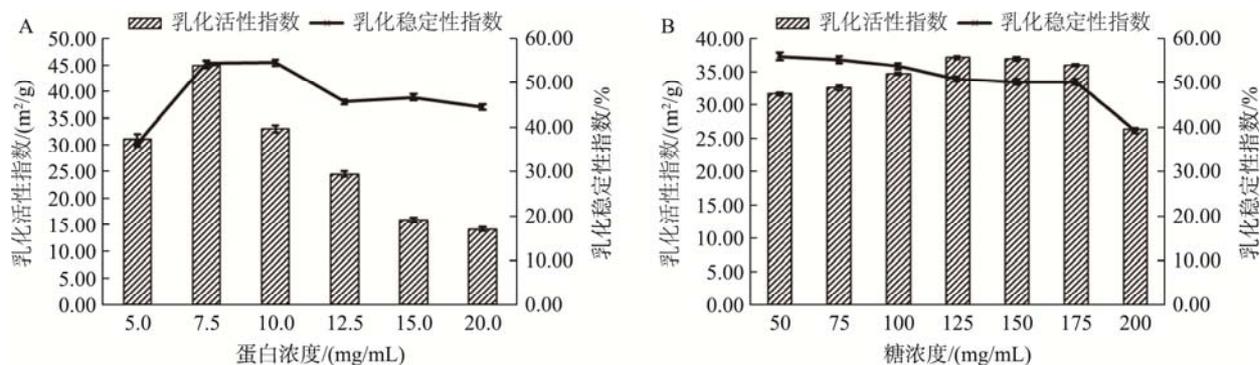


图1 蛋白浓度(A)和糖浓度(B)对糖基化改性花生浓缩蛋白乳化性质的影响($n=3$)

Fig.1 Effects of protein concentration (A) and sugar concentration (B) on emulsifying properties of glycosylation modified peanut protein concentrate ($n=3$)

3.1.2 糖浓度对糖基化改性花生浓缩蛋白乳化性质的影响

反应体系中不同的糖浓度对乳化活性指数和乳化稳定性指数的影响见图1B所示。乳化活性随糖浓度的增大呈现先上升后下降的趋势,在糖浓度为125 mg/mL时,乳化活性最大。乳化稳定性呈缓慢降低趋势。蛋白质糖基化反应,是糖的羰基与蛋白的疏水端氨基酸残基的反应。当反应体系中蛋白质的量一定时,蛋白分子中所含有的可参与反应的氨基酸残基的数量也是一定的,因此糖的需求量也是特定的。糖浓度在50~125 mg/mL范围内,随着糖浓度增大,生成的改性蛋白增多,改善了蛋白原有的结构,同时改善了乳化活性,使得乳化活性逐渐增大。当糖浓度达到一定数量时,过多的羰基竞争参与糖基化反应,反而降低了糖基化蛋白生成量^[11],所以乳化活性和乳化稳定性呈现降低趋势。因此选择75、100、125 mg/mL糖浓度作为响应面实验因素水平。

3.1.3 pH值对糖基化改性花生浓缩蛋白乳化性质的影响

图2A为不同pH值条件对乳化活性指数和乳化稳定性指数的影响。在pH 8~10.5范围内,乳化活性和乳化稳定性均呈现先上升后下降趋势。在pH 8.5时,乳化活性和乳化稳定性出现最大值。pH值会影响蛋白和糖的结构,同时也会影响二者的溶解性。花生浓缩蛋白属于醇不溶性蛋白,蛋白含量在70%左右,还含有30%左右的碳水化合物类物质。花生蛋白随着pH值的增大,溶解度增大,并伴随着一些碱水解,使得结构改变^[12]。而葡萄糖和浓缩蛋白中的碳水化合物类物质,在高pH值条件下,也会发生一些水解作用,不利于糖基化反应的羰基与蛋白的疏水氨基酸残基反应。所以在做响应面实验时就要固定pH值为8.5。

3.1.4 温度对糖基化改性花生浓缩蛋白乳化性质的影响

在50~65 °C范围内,乳化活性先升高而后下降,在60 °C取得最大值;温度从65 °C升到80 °C,乳化活性升高(图2B)。乳化稳定性在50~70 °C范围内先增大后减小,当反应温度为60 °C时出现最大值;在70~80 °C范围内,乳化

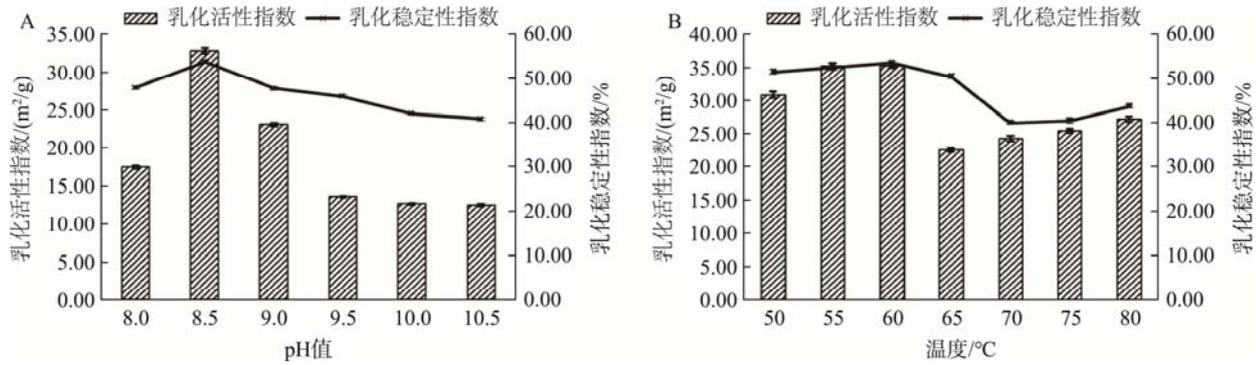
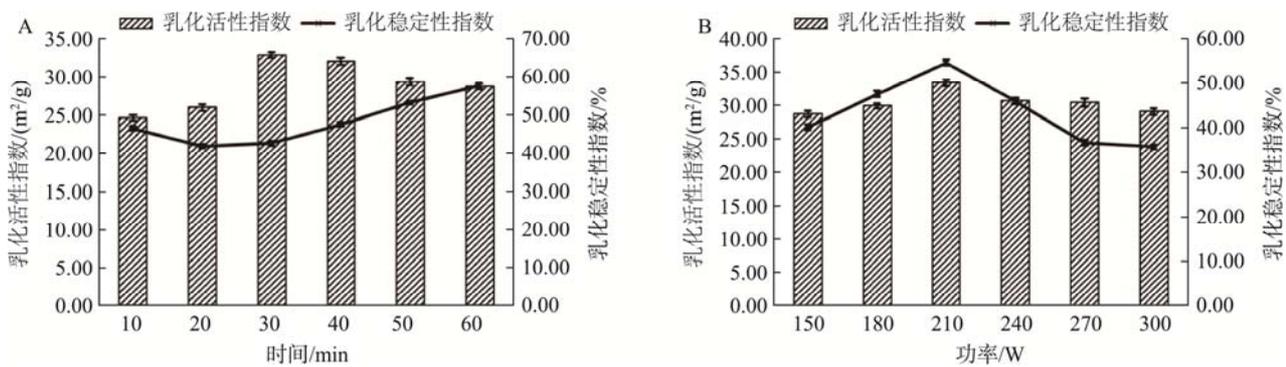
稳定性增大。温度是影响蛋白糖基化反应的一个重要因素,60 °C时是花生浓缩蛋白的一个变性温度点。超过60 °C时,花生蛋白变性,结构变得紧密,可参与糖基化反应的氨基酸残基减少。当温度继续升高时,蛋白变性程度增加,使得紧密的蛋白分子结构逐渐松散,内部疏水性残基暴露出来^[13],与糖反应生成的糖基化蛋白增多,则乳化活性比刚变性的时候大,同样乳化稳定性指数也比刚变性时大。综合乳化活性指数和乳化稳定性指数,温度选择50、55、60 °C作为响应面实验因素水平。

3.1.5 时间对糖基化改性花生浓缩蛋白乳化性质的影响

图3A为不同反应时间对乳化活性指数和乳化稳定性指数的影响。乳化活性指数先增大后减小,30 min出现最大值;乳化稳定性呈现先减小后增大趋势,20 min的值最小,60 min的值最大。随着反应的进行,产物增多,改善了乳化活性,则乳化活性逐渐增长到30 min取得最大值。当反应时间继续延长时,原有蛋白的疏水性氨基酸残基与糖的羰基发生了接枝反应,阻碍了游离的糖分子进一步与蛋白进行反应,因此乳化活性指数减小^[14]。选择30、40、50 min作为响应面实验因素水平。

3.1.6 超声波功率对糖基化改性花生浓缩蛋白乳化性质的影响

不同超声波功率对乳化活性指数和乳化稳定性指数的影响见图3B所示。在超声波功率150~300 W范围内,乳化活性指数和乳化稳定性都先增大后减小,在210 W时出现最大值。超声波对反应物有着空化、剪切和热效应等3种作用,随着超声波功率的加强,3种作用逐渐增强,可促进糖分子与蛋白分子反应,生成的糖基化蛋白数量增多,乳化活性指数和乳化稳定性在210 W都取得最大值。当超声波功率继续增大,热效应使得蛋白分子有可能轻微变性,蛋白分子结构变得紧密,糖分子与蛋白分子反应减缓,生成的反应产物减少,则乳化活性指数和乳化稳定性减小^[15]。综合考虑,选择210 W作为响应面中超声波功率的参数。

图 2 pH 值(A)和温度(B)对糖基化改性花生浓缩蛋白乳化性质的影响($n=3$)Fig.2 Effects of pH (A) and temperature (B) on emulsifying properties of glycosylation modified peanut protein concentrate ($n=3$)图 3 时间(A)和超声波功率(B)对糖基化改性花生浓缩蛋白乳化性质的影响($n=3$)Fig.3 Effects of time (A) and ultrasonic power (B) of on emulsifying properties of glycosylation modified peanut protein concentrate ($n=3$)

3.1.7 超声波频率对糖基化改性花生浓缩蛋白乳化性质的影响

不同超声波频率对乳化活性指数和乳化稳定性指数的影响见图 4 所示。乳化活性指数增大, 乳化稳定性指数先增大后减小。超声波频率越小, 所释放的能量越大, 可以促进糖基化反应进程。但是, 从图 4 中可以看出, 当超声波频率为 100 kHz 时乳化活性指数要大于小频率的, 可能原因是高能量的超声波使得蛋白和糖分子结构发生改变, 导致其结构变得紧密, 疏水性氨基酸残基隐蔽起来, 不利于糖基化反应进行^[16]。而 45 kHz 的超声波频率具有最大的乳化稳定性指数, 乳化活性指数也较好, 因此, 响应面实验时选择 45 kHz 作为固定因素。

3.2 响应面设计结果分析

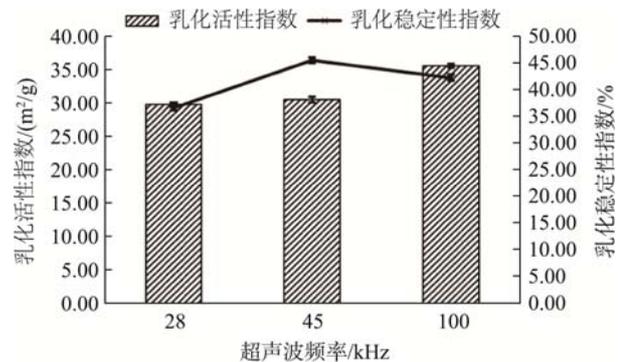
3.2.1 模型的建立与显著性分析

选取 29 组实验进行响应面实验设计, 乳化活性指数和乳化稳定性指数结果见表 3。通过二次多项式回归拟合, 获得了响应值 EAI 和 ESI 与蛋白浓度(X_1)、糖浓度(X_2)、时间(X_3)和温度(X_4)的二次回归方程, 如下:

$$\text{EAI} = 43.45 + 0.74X_1 - 0.35X_2 + 3.21X_3 + 1.6X_4 - 6.31X_1X_2 + 1.25X_1X_3 - 7.66X_1X_4 - 1.18X_2X_3 - 0.36X_2X_4 + 3.94X_3X_4 + 0.74X_1^2 - 6.85X_2^2 - 10X_3^2 - 2.64X_4^2$$

$$\text{ESI} = 68.09 - 2.53X_1 - 0.097X_2 + 0.82X_3 - 1.63X_4 + 0.41X_1X_2 -$$

$$1.11X_1X_3 + 0.91X_1X_4 + 0.4X_2X_3 + 0.25X_2X_4 + 0.62X_3X_4 - 0.7X_1^2 - 3.71X_2^2 - 3.06X_3^2 - 0.61X_4^2$$

图 4 超声波频率对糖基化改性花生浓缩蛋白乳化性质的影响 ($n=3$)Fig.4 Effects of ultrasonic frequency on emulsifying properties of glycosylation modified peanut protein concentrate ($n=3$)

2 个模型方程的方差分析见表 4。2 个模型的 P 值分别为 0.0034 和 0.0032 ($P < 0.01$), 表明 2 个模型方程能较好的拟合试验结果, 可以用于试验真实值的分析和预测。2 个模型具有较高的相关系数(r)0.9075 和 0.9081, 说明响应值的预测值和试验值的相关性程度较高。它们的失拟项的

P 值分别为 0.3362 和 0.5024 ($P>0.05$), 拟合不足检验不显著, 2 个回归方程可以较好的拟合试验结果; 由于自变量与响应值的线性关系显著, 所以回归模型能用在响应值的理论预测中。此外, 由模型较好的变异系数(coefficient of variation, CV)13.55%和 2.91%可知方程拟合度较好。2 个模型的信噪比 7.909 和 8.313 均大于 4, 表明响应面空间的设计可以由模型完成。

表 4 为回归方程的回归系数的显著性检验。EAI 模型中, 因素 X_3 对 EAI 的线性效应显著; 因素 X_2^2 和 X_3^2 对 EAI

的曲面效应分别是高度显著和极显著; X_1X_2 和 X_1X_4 对 EAI 的交互影响分别是显著和高度显著。ESI 模型中, 因素 X_1 和 X_4 对 ESI 的线性效应分别是极显著和高度显著; 因素 X_2^2 和 X_3^2 对 ESI 的曲面效应分别是极显著和高度显著。显著性检验结果说明试验因素的二次项和交互项对响应值的影响也显著, 而不是简单的线性关系。回归模型中一次项的方差的大小可以确定试验因素的主次顺序。各因素对 EAI 影响程度大小为 $X_3 > X_4 > X_1 > X_2$, 对 ESI 影响程度大小为 $X_1 > X_4 > X_3 > X_2$ 。

表 3 RSM 设计及结果
Table 3 The RSM design and results

组数	X_1	X_2	X_3	X_4	乳化活性指数 $Y_1/(m^2/g)$	乳化稳定性指数 $Y_2/\%$
1	-1	-1	0	0	32.94	68.73
2	1	-1	0	0	49.93	61.26
3	-1	1	0	0	43.39	66.37
4	1	1	0	0	35.12	60.53
5	0	0	-1	-1	30.02	66.16
6	0	0	1	-1	32.68	64.92
7	0	0	-1	1	27.07	62.69
8	0	0	1	1	45.48	63.92
9	-1	0	0	-1	33.65	72.64
10	1	0	0	-1	49.06	65.15
11	-1	0	0	1	51.17	65.33
12	1	0	0	1	35.94	61.50
13	0	-1	-1	0	22.10	60.90
14	0	1	-1	0	26.16	61.14
15	0	-1	1	0	31.20	60.53
16	0	1	1	0	30.55	62.36
17	-1	0	-1	0	30.55	63.02
18	1	0	-1	0	28.06	62.37
19	-1	0	1	0	30.03	69.72
20	1	0	1	0	32.53	64.64
21	0	-1	0	-1	29.27	66.26
22	0	1	0	-1	28.36	65.68
23	0	-1	0	1	32.47	63.66
24	0	1	0	1	30.12	64.10
25	0	0	0	0	41.77	68.68
26	0	0	0	0	42.74	66.10
27	0	0	0	0	50.29	67.80
28	0	0	0	0	42.71	67.00
29	0	0	0	0	39.75	70.87

表 4 回归模型显著性检验和方差分析
Table 4 Regression model of significance test and variance analysis

EAI 模型				ESI 模型			
因素	均方差	F 值	P 值	因素	均方差	F 值	P 值
模型	109.09	4.67	0.0034	模型	16.84	4.7	0.0032
X_1	6.62	0.28	0.6031	X_1	76.81	21.45	0.0004
X_2	1.48	0.063	0.8052	X_2	0.11	0.031	0.8621
X_3	123.59	5.29	0.0374	X_3	8.02	2.24	0.1567
X_4	30.75	1.32	0.2707	X_4	32.05	8.95	0.0097
X_1X_2	159.52	6.82	0.0205	X_1X_2	0.66	0.19	0.6733
X_1X_3	6.23	0.27	0.6139	X_1X_3	4.91	1.37	0.2613
X_1X_4	234.7	10.04	0.0068	X_1X_4	3.35	0.94	0.3499
X_2X_3	5.55	0.24	0.6338	X_2X_3	0.63	0.18	0.6808
X_2X_4	0.52	0.022	0.8838	X_2X_4	0.26	0.073	0.7915
X_3X_4	62.02	2.65	0.1257	X_3X_4	1.53	0.43	0.5246
X_1^2	3.58	0.15	0.7014	X_1^2	3.21	0.9	0.3599
X_2^2	304.53	13.02	0.0028	X_2^2	65.22	18.21	0.0008
X_3^2	648.56	27.74	0.0001	X_3^2	60.92	17.01	0.0010
X_4^2	45.27	1.94	0.1858	X_4^2	2.41	0.67	0.4257
残差	23.38	/	/	残差	3.58	/	/
失拟项	26.3	1.63	0.3362	失拟项	3.68	1.11	0.5024
纯误差	16.09	/	/	纯误差	3.33	/	/
$r^2=0.8235$; CV(%)=13.55; 信噪比=7.909;				$r^2=0.8247$; CV(%)=2.91; 信噪比=8.313;			

注: $P \leq 0.05$, 影响显著; $P \leq 0.01$, 影响高度显著; $P \leq 0.001$, 影响极显著; $P > 0.05$, 影响不显著。

3.2.2 响应面直观分析

由 2 个模型回归方程可以分析出, 蛋白浓度、时间和温度与乳化活性指数呈正相关, 糖浓度与乳化活性指数呈负相关; 时间与乳化稳定性指数呈正相关, 蛋白浓度、糖浓度和温度与乳化稳定性指数呈负相关。图 5 和图 6 分别为蛋白浓度、糖浓度、时间、温度 4 个因素交互影响对乳化活性指数和乳化稳定性指数的响应面分析图。

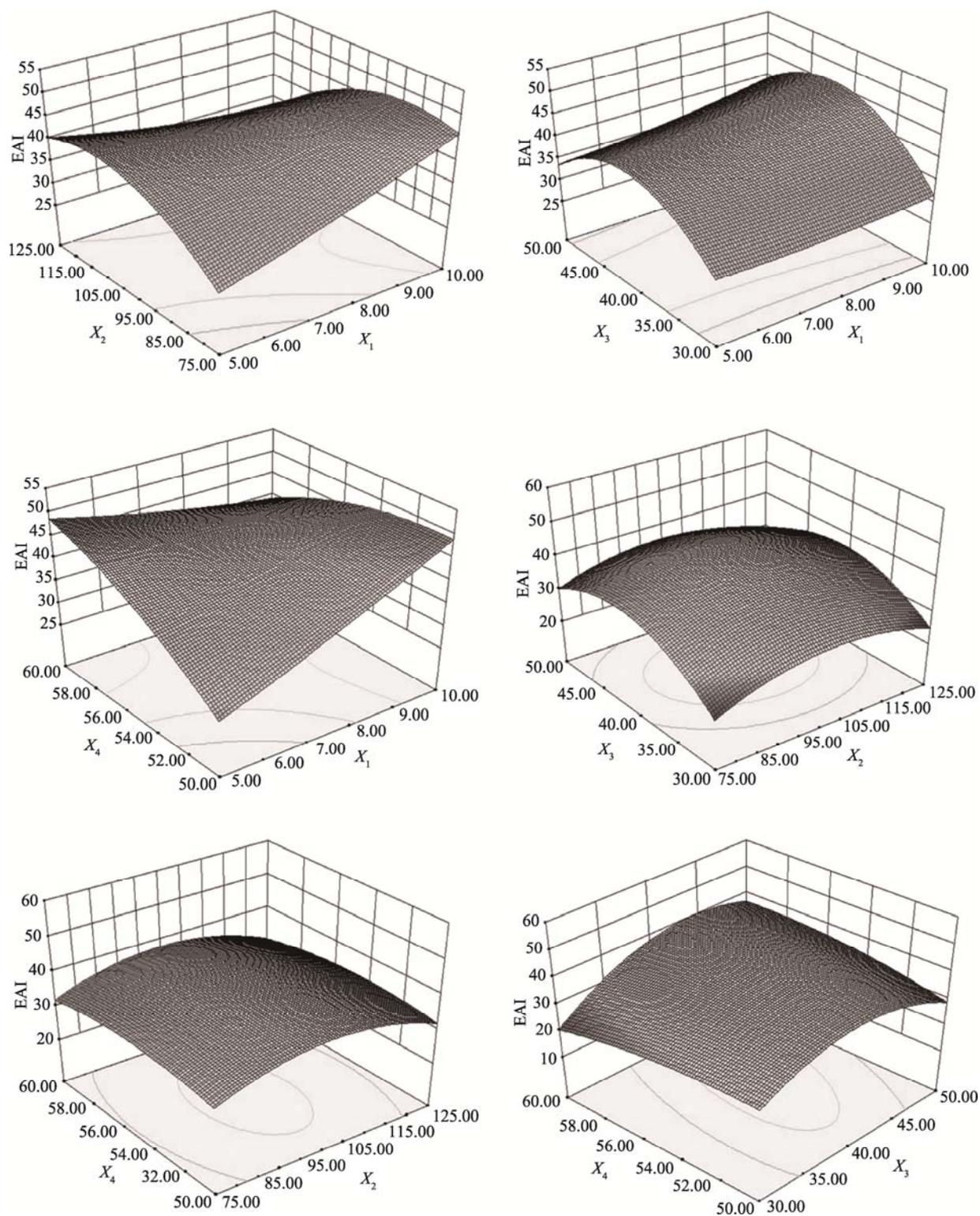
3.2.3 最优工艺条件的确定

回归模型的典型性分析获得超声波辅助花生浓缩蛋白糖基化改性最优条件为蛋白浓度 5 mg/mL、糖浓度 103.58 mg/mL、时间 42.57 min、温度 56.86 °C, EAI 和 ESI 理论值分别为 47.40 m²/g 和 69.13%。综合考虑实际操作的便利性, 工艺参数修正为: 蛋白浓度 5.0 mg/mL、糖浓度 104 mg/mL、时间 43 min、温度 57 °C。3 次平行试验得到的平均 EAI 和 ESI 分别为 (48.61±0.32) m²/g 和 (67.59±2.08)%, EAI 和 ESI 值的实验值与理论值相差分别

为 2.55%和 2.23%, 表明回归模型能较好的拟合实际情况, 预测模型正确。因此响应面法对超声波辅助花生浓缩蛋白糖基化改性工艺条件的优化是可行和具有实际应用价值的。

3.2.4 改性花生浓缩蛋白的接枝度和乳化性质研究

最优工艺条件下制备的改性花生浓缩蛋白的接枝度是(31.65±1.19)%。花生浓缩蛋白的自由氨基和葡萄糖的羰基在优化的反应温度、pH 值等条件下发生羰氨反应生成糖基化花生浓缩蛋白。在 pH 2~12 范围内, 测定了改性前后花生浓缩蛋白的乳化活性指数和乳化稳定性指数(图 7)。乳化活性指数随着 pH 值的增大先减小后增大, 浓缩蛋白的乳化活性指数在 pH 值 4.0 时取得最小值, 而改性花生浓缩蛋白的乳化活性指数在 pH 5.0 有最小值。乳化稳定性指数随着 pH 值的增大呈现先增大再减小再增大的趋势。pH 2~12 的范围内, 糖基化改性花生浓缩蛋白的 EAI 和 ESI 都高于未改性蛋白。



注: X_1 蛋白浓度、 X_2 糖浓度、 X_3 时间、 X_4 温度, 下图同。

图 5 各因素对乳化活性指数的趋势图

Fig.5 Effects of various factors on emulsifying activity index

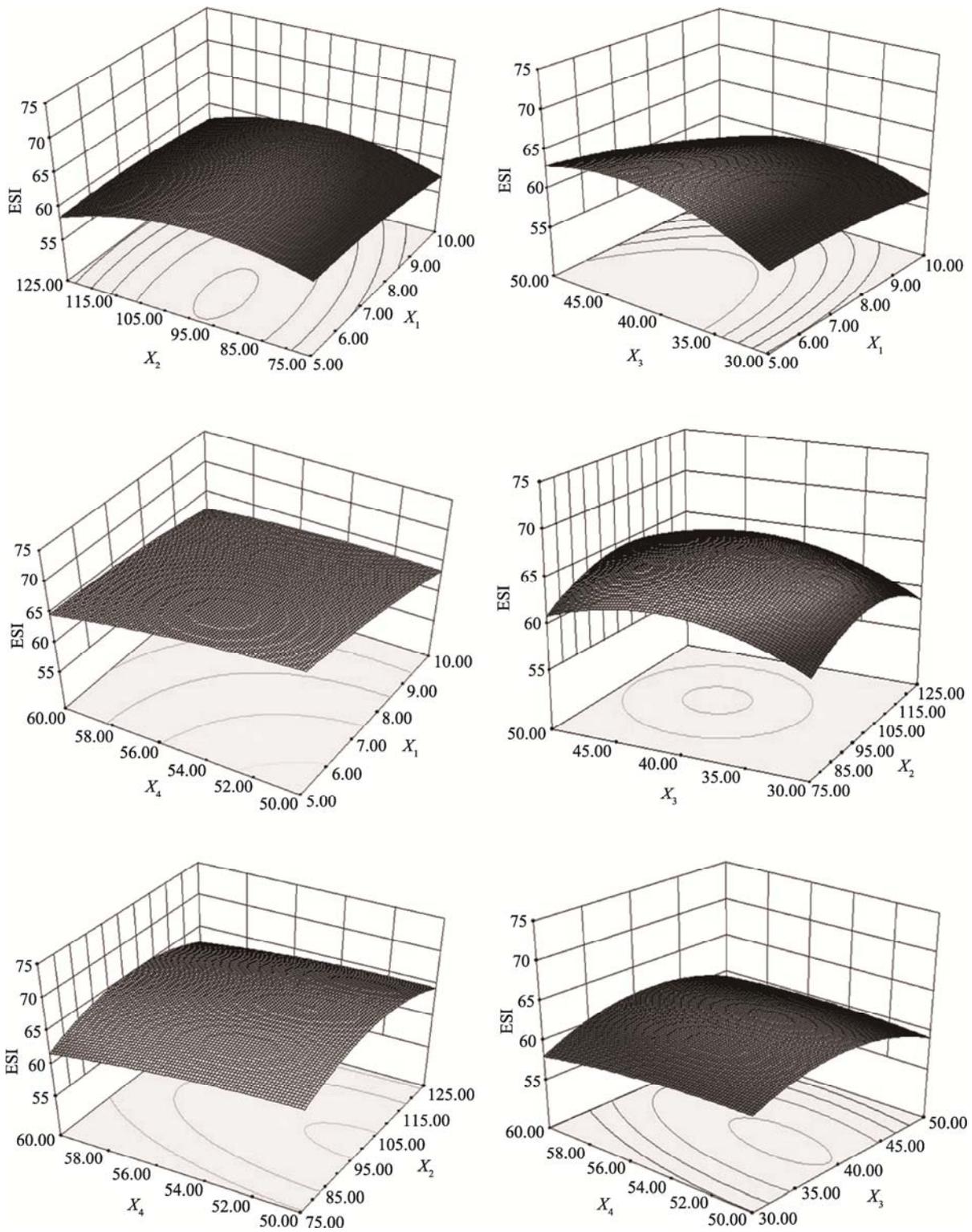


图 6 各因素对乳化稳定性指数的趋势图
Fig.6 Effects of various factors on emulsification stability index

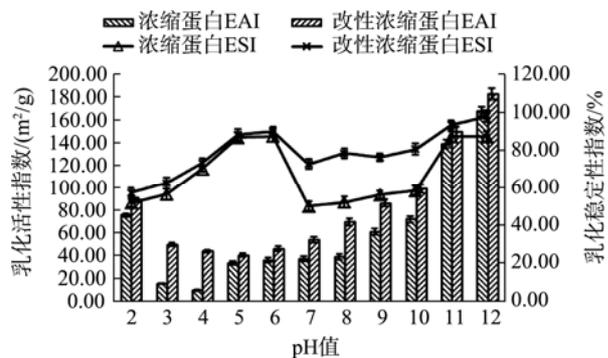


图7 花生浓缩蛋白的乳化活性指数和乳化稳定性指数($n=3$)

Fig.7 Emulsifying activity index and emulsifying stability index of peanut protein concentrate ($n=3$)

4 结论与讨论

单因素和响应面分析优化的超声波辅助花生浓缩蛋白糖基化改性工艺条件为: 蛋白浓度 5.0 mg/mL、糖浓度 104 mg/mL、时间 43 min、温度 57 °C、pH 值 8.5、超声波功率 210 W、超声波频率 45 kHz。此条件制备的糖基化改性花生浓缩蛋白的 EAI 和 ESI 分别为 $(48.61 \pm 0.32) \text{ m}^2/\text{g}$ 和 $(67.59 \pm 2.08)\%$, 改性后的花生浓缩蛋白的乳化性质好于未改性蛋白。本研究利用超声波辅助糖基化改性技术优化了葡萄糖改性花生浓缩蛋白工艺, 获得一种乳化性质良好的改性蛋白产品。研究结果将为植物蛋白糖基化改性的加工工艺及新型糖基化改性蛋白产品的研发提供参考。糖基化蛋白可制备成米粉及米乳粉等婴幼儿辅助食品、发酵制品、乳制品、烘焙制品、冰淇淋、组织蛋白、肉制品等食品专用蛋白基料, 填补新型蛋白质生物材料领域的空白。

参考文献

- [1] 于丽娜, 杜德红, 彭娅萍, 等. 响应面法优化磷酸化改性花生分离蛋白-多肽膜的制备工艺[J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(1): 130-143.
Yu LN, Du DH, Peng YP, *et al.* Optimization of phosphorelated modified peanut protein isolate - polypeptide films preparation by response surface methodology [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2019, 41(1): 130-143.
- [2] 于丽娜, 齐宏涛, 彭娅萍, 等. Viscozyme L 预处理花生粕提取花生浓缩蛋白的研究[J]. 粮油食品科技, 2019, 27(1): 34-40.
Yu LN, Qi HT, Peng YP, *et al.* Research on extraction of peanut protein concentrate by pretreatment of peanut meal with Viscozyme L. [J]. Sci Technol Cere Oil Food, 2019, 27(1): 34-40.
- [3] Liu JJ, Li PF, Jiang ZM, *et al.* Characterisation of peanut protein concentrates from industrial aqueous extraction processing prepared by spray and freeze drying methods [J]. Int J Food Sci Technol, 2019, 54(10): 1597-1608.
- [4] 曹迪, 范远景, 黄婷耿, 等. 不同改性方法对花生浓缩蛋白结构及功能特性的影响[J]. 食品工业, 2014, 35(10): 186-190.
Cao D, Fan YJ, Huang TG, *et al.* Effects of modified methods on conformational and functional properties of peanut protein concentrate [J]. Food Ind, 2014, 35(10): 186-190.
- [5] 赵雪焱, 蔺雅菲, 刘民. 花生浓缩蛋白超声改性的工艺条件[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(3): 147-152.
Zhao XS, Lin YF, Liu M. The technological conditions of ultrasonic modification of peanut protein concentrate [J]. Food Ferment Ind, 2014, 40(3): 147-152.
- [6] 李鹏, 杨伟强. 酶法改性对花生浓缩蛋白吸油性的影响[J]. 粮油食品科技, 2011, 19(5): 22-25.
Li P, Yang WQ. Effect of enzymatic modification on the oil absorption of peanut protein concentrate [J]. Sci Technol Cere Oil Food, 2011, 19(5): 22-25.
- [7] Chevalier F, Chobert JM, Popineau Y, *et al.* Improvement of functional properties of β -actoglobulin glycosylated through the maillard reaction is related to the nature of the sugar [J]. Int Dairy J, 2001, 11(3): 145-152.
- [8] 曾茂茂, 曲刚, 陈洁, 等. 糖基化反应对花生分离蛋白乳化性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(4): 37-41.
Zeng MM, Qu G, Chen J, *et al.* Effects of glycation reaction on the emulsifying properties of peanut protein isolate [J]. Food Ferment Ind, 2011, 37(4): 37-41.
- [9] Yu LN, Yang WQ, Sun J, *et al.* Preparation, characterisation and physicochemical properties of the phosphate modified peanut protein obtained from *Arachin Conarachin* L. [J]. Food Chem, 2015, 170: 169-179.
- [10] 夏秀芳, 洪岩, 郑环宇, 等. 湿法糖基化改性对大豆分离蛋白溶解性和乳化能力的影响[J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 167-172.
Xia XF, Hong Y, Zheng HY, *et al.* Effect of wet glycosylation modification on solubility and emulsifying activity of soybean protein isolate [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2016, 16(1): 167-172.
- [11] Yang S, Lee S, Pyo MC, *et al.* Improved physicochemical properties and hepatic protection of Maillard reaction products derived from fish protein hydrolysates and ribose [J]. Food Chem, 2017, 221: 1979-1988.
- [12] Taş NG, Gökmen V. Effect of alkalization on the Maillard reaction products formed in cocoa during roasting [J]. Food Res Int, 2016, 89(2): 930-936.
- [13] Ajandouz E, Desseaux V, Tazi S, *et al.* Effects of temperature and pH on the kinetics of caramelization, protein cross-linking and maillard reactions in aqueous model systems [J]. Food Chem, 2008, 107(3): 1244-1252.
- [14] 孟祥勇, 张慧恩, 宋腾, 等. 响应面法优化微波辅助米渣蛋白糖基化改性工艺[J]. 食品工业科技, 2018, 39(1): 156-161, 166.
Meng XY, Zhang HE, Song T, *et al.* Response surface methodology for optimization of microwave-assisted technology parameters [J]. Sci Technol Food Ind, 2018, 39(1): 156-161, 166.
- [15] 王麒, 李宛蓉, 秦新光, 等. 超声辅助处理对乳清分离蛋白糖基化产物的理化特性影响[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(1): 88-92.
Wang Q, Li WR, Qin XG, *et al.* Effect of ultrasonic assisted treatment on physicochemical properties of whey protein isolate glycosylation [J]. J Chin Cere Oil Asso, 2019, 34(1): 88-92.
- [16] Arzeni C, Martínez K, Zema P, *et al.* Comparative study of high intensity

ultrasound effects on food proteins functionality [J]. J Food Eng, 2012, 108(3): 463-472.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



杨伟强, 副研究员, 主要研究方向为花生蛋白利用与食品安全。
E-mail: qdywq@126.com



于丽娜, 副研究员, 主要研究方向为粮油植物蛋白工程及功能食品。
E-mail: lhtyln0626@163.com



孙杰, 研究员, 主要研究方向为花生食品营养与安全。
E-mail: sjj605@163.com

更正说明

《食品安全质量检测学报》发表于 2020 年 11 卷第 1 期的《基于稳定性同位素技术的水果及其制品产地溯源研究进展》一文(Page121-127)作如下更正:

作者姓名由“蒋越^{1,2*}, 李安¹, 靳欣欣¹, 潘立刚¹, 张志勇²”

更正为“蒋越^{1,2}, 李安¹, 靳欣欣¹, 潘立刚^{1*}, 张志勇²”

脚注信息由“*通讯作者: 蒋越, 主要研究方向为食品真实性溯源。E-mail: 2533369723@qq.com

*Corresponding author: JIANG Yue, Beijing Agricultural Quality Standards and Testing Technology Research Center, Beijing 100193, China. E-mail: 2533369723@qq.com”

更正为“基金项目: 北京市农林科学院青年科研基金项目(QNJ201928)

Fund: Supported by Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science Fund for Youths (QNJJ201928)

*通讯作者: 潘立刚, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: panlg@brcast.org.cn

*Corresponding author: PAN Li-Gang, Ph.D, Professor, Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Beijing 100097, China. E-mail: panlg@brcast.org.cn”

《食品安全质量检测学报》编辑部