

响应面法优化弹簧糊精的酶解制备工艺

闵丹丹, 徐学明, 焦爱权, 潘小卫, 金征宇*

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要:以蜡质玉米淀粉为原料,通过单因素试验和响应面设计法,优化了普鲁兰酶酶解制备弹簧糊精的工艺参数,并建立数学模型,得到的最佳工艺参数为:pH 4.96、酶解温度 53.32 °C、酶用量 420 U/g、酶解时间 6 h,此工艺条件下制备的弹簧糊精纯度为 99.2%。测定了制备的弹簧糊精的链长分布,实验结果表明聚合度(以 DP 表示)小于 60 的弹簧糊精占总弹簧糊精质量分数的 95.5%,其中聚合度为 DP 6~12、13~24、25~36、37~60 的弹簧糊精质量分数分别为 24.40%、45.08%、19.60%及 10.92%。

关键词:弹簧糊精;酶解;响应面优化;链长分布

中图分类号:TS 236 **文献标志码:**A **文章编号:**1673—1689(2018)07—0701—06

Application of Response Surface Methodology to Optimize Spring Dextrin Preparation Parameters by Enzyme Hydrolysis

MIN Dandan, XU Xueming, JIAO Aiquan, PAN Xiaowei, JIN Zhengyu*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The spring dextrin were prepared by enzymatic hydrolysis of waxy maize starch with pullulanase alone, and the process parameters were optimized by one-factor-at-a-time method and response surface methodology. The optimal results were observed at conditions of enzyme dosage 420 U/g, hydrolysis for 6 h at 53.32 °C, pH 4.96, predicted using mathematical predictive model. Under these conditions, the spring dextrin purity was 99.2%. The chain-length distribution of the prepared spring dextrin were also evaluated. Results showed that the proportion of spring dextrin with DP < 60 were 95.5%, and the relative contents of spring dextrin with DP 6~12, DP 13~24, DP 25~36 and DP 37~60 were 24.40%, 45.08%, 19.60% and 10.92%, respectively.

Keywords: spring dextrin, enzyme hydrolysis, response surface methodology, chain-length

弹簧糊精是由葡萄糖单元由 α -(1→4) 糖苷键连接而成的线性,多分散性的多糖,因其柔性螺旋结构像弹簧一样具有可逆的拉伸和松弛特性而得名^[1]。弹簧糊精的特殊结构,使其在淀粉抗老化,包

埋活性物质以及手性分离方面展现了广阔的应用前景^[1-5]。

弹簧糊精的制备方法主要有酶法合成和酶法分解。酶法合成反应成本高,反应工艺复杂,难以进

收稿日期: 2016-05-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31501418)。

* 通信作者: 金征宇(1960—),男,江苏扬州人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事食品组分与物性的研究。

E-mail: jinlab2008@yahoo.com

引用本文: 闵丹丹,徐学明,焦爱权,等. 响应面法优化弹簧糊精的酶解制备工艺[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(07):701-706.

行工业化生产。2012年,徐等^[6]采用 α -淀粉酶酶解直链淀粉制备弹簧糊精,在制备过程中,需要对支链淀粉和直链淀粉进行分离,这使得加工过程变得繁琐。并且由于 α -淀粉酶作用位点随机,产物聚合度分布广,且产率较低。

Tokuya等^[7]使用凝胶排阻层析法分析普鲁兰酶对支链淀粉的剪切方式,发现普鲁兰酶首先是从外侧水解支链淀粉,而普鲁兰酶水解物中只有聚合态支链淀粉和线性葡聚糖,即弹簧糊精。并且,普鲁兰酶专一水解 α -(1 \rightarrow 6)糖苷键。采用普鲁兰酶制备弹簧糊精的反应过程容易控制,产物聚合度较为集中。由于蜡质玉米淀粉几乎全部为支链淀粉,直链淀粉很少,选其为原料,可以省去繁琐的分离步骤。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蜡质玉米淀粉:杭州普罗星淀粉有限公司产品;普鲁兰酶(1 000 U/mL):诺维信(中国)生物技术有限公司产品;配有多角度激光光散射仪检测器和示差检测器的凝胶色谱系统(HPSEC-MALLS-RI检测系统):美国Wyatt公司产品;DHG-9123A电热恒温鼓风干燥箱:上海柏欣仪器设备厂产品;Dionex ICS-5000高效阴离子交换色谱系统(HPAEC-PAD):美国戴安公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 弹簧糊精的制备 准确称取5 g蜡质玉米淀粉,加入90 mL去离子水,在沸水浴中搅拌15 min,使其预糊化,再于121 $^{\circ}$ C条件下高压处理15 min,使其彻底糊化,冷却至室温后,加入5 mL一定pH值的醋酸钠缓冲溶液,再加入一定体积的普鲁兰酶,然后放入一定温度的水浴锅中震荡一段时间;将完成上述酶解反应的溶液煮沸,冷却后在离心机中以5 000 r/min的速度离心10 min,除去变性酶,取上清液旋转蒸发浓缩后60 $^{\circ}$ C度烘干,即得弹簧糊精粗品。

1.2.2 弹簧糊精相对分子质量信息的测定 使用HPSEC-MALLS-RI检测系统对弹簧糊精样品的平均相对分子质量和相对分子质量分布进行测定^[8]。流动相为0.3 mol/L NaNO₃溶液(含有质量分数0.02%的NaN₃),经0.45 μ m的滤膜过滤后,超声30 min;流动相流量0.5 mL/min,流动相折光指数为1.331,进样量200 μ L,柱温50 $^{\circ}$ C,折光指数增量

(dn/dc)为0.147。采用Astra软件对激光散射信号和示差折光检测器信号进行采集、分析和计算。

取25~30 mg弹簧糊精粗品,溶解于3 mL流动相溶液中,经0.45 μ m滤膜过滤后进样。

1.2.3 弹簧糊精聚合度分布的测定 使用配有ED-40型脉冲电流检测器的高效阴离子交换色谱(HPAEC-PAD)对弹簧糊精的链长分布进行检测^[9-10]。色谱柱型号为戴安CarboPAC PA200。流动相:100 mmol/L NaOH(A),100 mmol/L NaOH + 600 mmol/L NaAC(B)。采用线性梯度洗脱:0 min时为体积分数20%的洗脱液B,在60 min时为体积分数100%的洗脱液B。流量为1 mL/min,进样量25 μ L。将弹簧糊精溶于去离子水后加热溶解,配成3 mg/mL的溶液,过0.25 μ m的滤膜后进样。

1.2.4 弹簧糊精纯度的计算 图1为使用HPSEC-MALLS-RI检测系统所测出的普鲁兰酶酶解蜡质玉米淀粉不同时间所得到的酶解产物的相对分子质量分布。peak1和peak2是普鲁兰酶酶解蜡质玉米淀粉所得线性葡聚糖(即弹簧糊精)的相对分子质量分布(1 200~18 000),此结果与Cai等^[11]使用异淀粉酶酶解蜡质玉米淀粉所得线性葡聚糖的相对分子质量分布相近,peak3代表未被彻底酶解的聚合态支链淀粉。

$$\text{弹簧糊精纯度} = \frac{(S_1 + S_2)}{(S_1 + S_2 + S_3)} \times 100\%$$

式中: S_1 为peak1的面积; S_2 为peak2的面积; S_3 为peak3的面积。

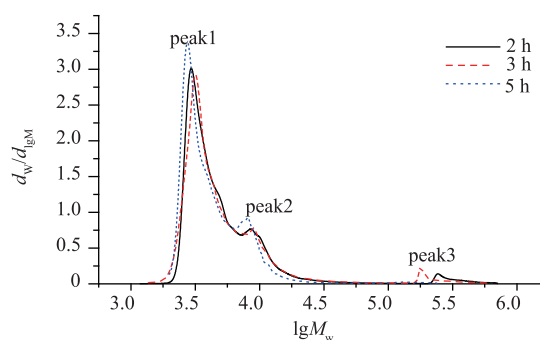


图1 普鲁兰酶酶解蜡质玉米淀粉不同时间所得产物的相对分子质量分布

Fig. 1 Mw distribution of products from waxy corn starch debranched by pullulanase at different times

1.2.5 响应面试验设计 根据单因素实验,采用

Box-Behnken 设计,以弹簧糊精纯度(Y)为响应值,对温度、pH、时间、酶用量进行优化,因素水平表见表 1。

1.2.6 数据处理 采用 Design-Expert v8.0.6.1 软件进行实验数据处理、分析,采用 Origin 8.5 软件进行绘图。

表 1 响应面试验因素与水平表

Table 1 Coded values of the variables for the Box-Behnken design

因素	温度/℃	时间/h	酶用量/(U/g)	pH
-1	50	4	300	4.7
0	55	5	400	5.1
1	60	6	500	5.9

2 结果与讨论

2.1 单因素实验

2.1.1 温度对弹簧糊精纯度的影响 根据预实验,设定 pH 为 5.1,酶添加量 400 U/g,酶解时间 5 h,研究温度分别为 45、50、55、60、65 ℃时,温度对弹簧糊精纯度的影响,结果如图 2 所示。

由图 2 可知,当温度在 45~55 ℃之间时,弹簧糊精的纯度随着温度的升高而增加。这主要是在温度低于 55 ℃时,普鲁兰酶的活性随着温度的升高而逐渐增强,反应速度逐渐加快。当温度继续升高时,普鲁兰酶部分失活,弹簧糊精的纯度会有所下降。温度在 50~60 ℃之间时,弹簧糊精的纯度均较高;温度为 55 ℃时,弹簧糊精的纯度最高。所以 50~60 ℃为普鲁兰酶作用的适宜温度范围,选则 55 ℃作为最适反应温度。

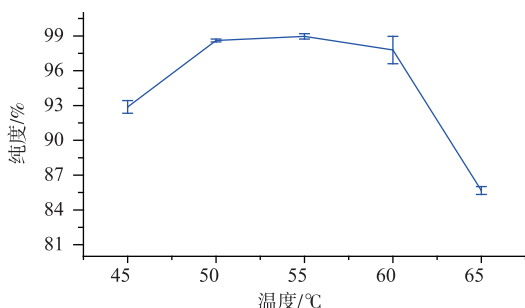


图 2 温度对弹簧糊精纯度的影响

Fig. 2 Effect of temperature on purity of spring dextrin

2.1.2 pH 对弹簧糊精纯度的影响 根据预实验,设定温度为 55 ℃,酶添加量 400 U/g,酶解时间 5 h,研究 pH 分别为 4.3、4.7、5.1、5.5、5.9 时,pH 对弹

簧糊精纯度的影响,结果如图 3 所示。

由图 3 可知,当 pH 小于 4.7 时,弹簧糊精的纯度会随着 pH 的提高而显著增加;当 pH 高于 5.1 时,弹簧糊精的纯度呈下降趋势。这说明普鲁兰酶的活性会受到 pH 的显著影响;普鲁兰酶在 pH4.7~5.1 时,能快速水解 α -(1→6)糖苷键,产生较多的弹簧糊精。在 pH 5.1 时,弹簧糊精的纯度最高,故选择 pH 5.1 为最适反应 pH。

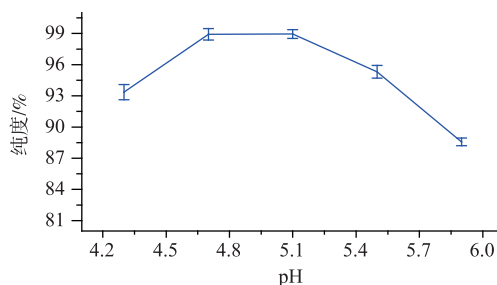


图 3 pH 对弹簧糊精纯度的影响

Fig. 3 Effect of pH on the purity of spring dextrin

2.1.3 酶用量对弹簧糊精纯度的影响 根据预实验,设定温度为 55 ℃,pH 5.1,酶解时间 5 h,研究酶用量分别为 50、200、300、400、500、600 U/g 时,酶用量对弹簧糊精纯度的影响,结果如图 4 所示。

由图 4 可知,当酶用量小于 300 U/g 时,随着酶添加量的增加,弹簧糊精的纯度逐渐增加,两者呈线性关系。这说明底物未被酶所饱和,反应速度主要取决于酶添加量。当酶用量大于 400 U/g 时,弹簧糊精的纯度随酶用量的增加而增长缓慢,从经济角度和弹簧糊精纯度综合考虑,作者选择的最佳酶用量为 400 U/g。

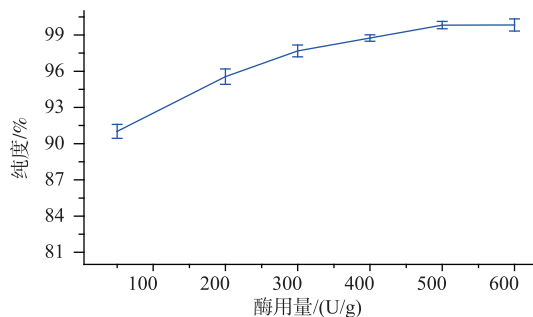


图 4 酶用量对弹簧糊精纯度的影响

Fig. 4 Effect of enzyme concentration on the purity of spring dextrin

2.1.4 时间对弹簧糊精纯度的影响 根据预实验,设定温度为 55 ℃,pH 5.1,酶用量 400 U/g,研究酶

解时间分别为 1、2、3、4、5、6 h 时, 酶解时间对弹簧糊精纯度的影响, 结果如图 5 所示。

由图 5 可知, 时间在 5 h 前, 弹簧糊精的纯度随着时间的延长呈增加趋势; 当时间继续延长, 弹簧糊精的纯度增长缓慢, 基本趋于稳定。这是因为支链淀粉具有不同长度的支链, 普鲁兰酶能较快地水解以 α -(1 \rightarrow 6)糖苷键连接的短链葡聚糖; 随着反应时间的延长, 普鲁兰酶只能以极慢的速度水解还未被水解的长链葡聚糖^[12]。因此, 作者选择 5 h 为最佳酶解时间。

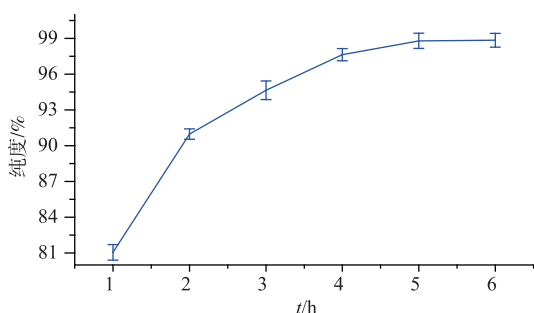


图 5 时间对弹簧糊精纯度的影响

Fig. 5 Effect of time on the purity of spring dextrin

2.2 响应面实验

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 响应面实验设计及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	温度 (X_1)	时间 (X_2)	酶用量 (X_3)	pH (X_4)	弹簧糊精纯度 (Y)
1	0	-1	0	-1	97.90
2	1	0	1	0	97.38
3	1	0	0	1	95.23
4	-1	-1	0	0	98.01
5	1	0	-1	0	97.10
6	0	-1	0	1	97.72
7	0	0	0	0	98.79
8	-1	0	0	1	97.10
9	0	0	-1	1	96.25
10	0	0	0	0	98.50
11	0	0	0	0	99.19
12	0	0	-1	-1	97.61
13	0	1	1	0	98.99
14	0	1	0	-1	98.58
15	0	-1	1	0	99.08
16	-1	0	-1	0	98.12

续表 2

试验号	温度 (X_1)	时间 (X_2)	酶用量 (X_3)	pH (X_4)	弹簧糊精纯度 (Y)
17	0	1	0	1	97.10
18	0	1	-1	0	98.42
19	-1	0	0	-1	97.81
20	0	0	0	0	99.11
21	1	-1	0	0	98.09
22	0	0	1	1	97.63
23	-1	0	1	0	98.70
24	-1	0	0	-1	97.52
25	1	1	0	0	98.20
26	0	0	1	-1	98.82
27	0	0	0	0	98.99
28	0	-1	-1	0	96.86
29	1	0	0	-1	97.79

2.2.2 响应面模型的选择 由表 3 知, 一阶线性模型和二因素交互关系模型的失拟项 P 值均小于 0.01, 为极显著, 表示这两个模型出现失误的概率比较大, 不适宜进行数据拟合; 二阶模型和三阶模型的失拟项 P 值都大于 0.05, 但是三阶模型的序变模型 P 值大于 0.05, 为不显著, 说明采用三阶模型容易出现混杂的模型^[13]。二阶模型的 $R^2=0.9088$, 表示该模型能够解释 90.88% 的总变异, 仅有 9.12% 的变异无法用该模型解释^[14]。综上所述, 采用二次模型进行弹簧糊精制备预测是切实可行的。

表 3 模型拟合概要

Table 3 Model fit summary

来源	序变模型 P 值	失拟项 P 值	Adj. R^2	R^2
一阶线性模型	0.035 1	0.006 4	0.229 3	0.339 4
二因素交互关系模型	10.627 9	0.004 8	0.174 6	0.469 4
二阶模型	<0.000 1	0.126 4	0.817 7	0.908 8
三阶模型	0.130 9	0.218 1	0.904 6	0.979 6

2.2.3 二次模型建立与显著性检验 对表 2 结果进行回归分析, 拟合的温度 (X_1)、时间 (X_2)、酶用量 (X_3)、pH (X_4) 对弹簧糊精纯度 (Y) 影响的二次回归方程为:

$$Y = 98.92 - 0.41X_1 + 0.22X_2 + 0.52X_3 - 0.61X_4 - 0.23X_1X_2 - 0.075X_1X_3 - 0.49X_1X_4 - 0.41X_2X_3 - 0.32X_2X_4 - 0.043X_3X_4 - 0.71X_1^2 - 0.017X_2^2 - 0.4X_3^2 - 1.09X_4^2$$

响应值二次模型的方差分析及显著性如表 4

所示。由表 4 可以看出,模型 $P<0.000 1$,模型达到极显著。失拟项 $P=0.050 5>0.05$ 不显著,因此该二次模型拟合度良好。

其中一次项 X_1 、 X_3 、 X_4 均显著, X_2 不显著;二次项 X_1 、 X_3 、 X_4 显著,其他不显著,交互项 X_1X_4 和 X_2X_3 显著,所以得出影响弹簧糊精纯度的因素依次:pH 值>酶用量>温度>时间。

通过分析计算得到酶法制备弹簧糊精的最优条件为:酶解 pH 4.96,酶解温度 53.32 °C,酶解时间 6 h,酶用量 420 U/g 淀粉,弹簧糊精纯度预测值为 99.4%,经验证试验,在该实验条件下得到的弹簧糊精纯度为 99.2%。与预测值基本一致,说明该方程与实际情况相符合,拟合程度较好。

表 4 响应值二次模型的方差分析

Table 4 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	21.68	14	1.55	9.97	<0.000 1	**
X_1	1.78	1	1.78	11.48	0.004 4	**
X_2	0.5	1	0.5	3.23	0.093 9	
X_3	3.24	1	3.24	20.89	0.000 4	**
X_4	4.76	1	4.76	30.61	<0.000 1	**
X_1X_2	0.14	1	0.14	0.88	0.363 2	
X_1X_3	0.023	1	0.023	0.14	0.709 2	
X_1X_4	1.15	1	1.15	7.41	0.016 5	*
X_2X_3	0.68	1	0.68	4.38	0.055 0	
X_2X_4	0.42	1	0.42	2.72	0.121 4	
X_3X_4	0.007 23	1	0.007 23	0.047	0.832 4	
X_1^2	3.08	1	3.08	19.82	0.000 5	**
X_2^2	0.001 65	1	0.001 65	0.011	0.919 4	
X_3^2	1.01	1	1.01	6.49	0.023 2	*
X_4^2	7.65	1	7.65	49.27	<0.000 1	**
残差	2.17	14	0.16			
失拟项	1.83	9	0.2	2.9	0.126 4	
纯误差	0.35	5	0.07			

注:**表示极显著水平($P<0.01$);*表示显著水平($P<0.05$)

2.3 弹簧糊精链长分布情况

图 6 是采用 HPSEC-MALLS-RI 检测系统所测出的弹簧糊精分子量信息,可知弹簧糊精的相对分子质量分布为 1 200~18 000,其中相对分子质量小于 9 720(DP<60)的弹簧糊精占 95.5%。HPAEC 用来测定聚合度在 6~60 之间的葡聚糖^[15],所以可采用 HPAEC 测定绝大部分弹簧糊精的聚合度分布,结果如图 7 所示。根据聚合度差异,将弹簧糊精分为 4 组^[16],即 DP 6~12,13~24,25~36,37~60,它们所占的比例分别为 24.40%,45.08%,19.60%,10.92%。

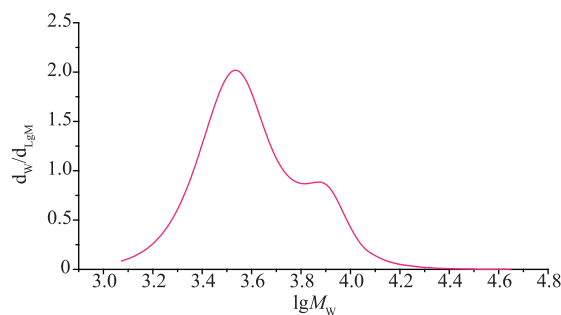


图 6 弹簧糊精的相对分子质量分布

Fig. 6 Molecular weight distribution of spring dextrin

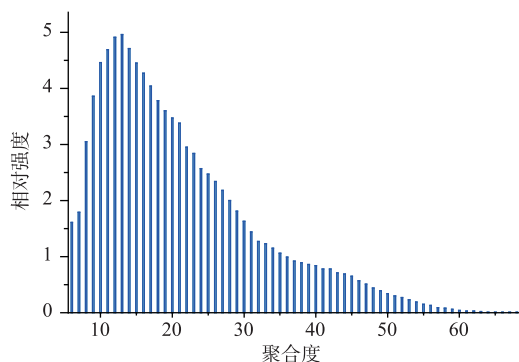


图7 弹簧糊精的聚合度分布

Fig. 7 Degree of polymerization distribution of spring dextrin

3 结语

作者通过响应面实验对酶解工艺参数进行优化,以期对蜡质玉米淀粉脱支完全,实现弹簧糊精的较高得率。

参考文献:

- [1] XU J, FAN X, NING Y, et al. Effect of spring dextrin on retrogradation of wheat and corn starch gels [J]. **Food Hydrocolloids**, 2013, 33(2):361-367.
- [2] XU J, ZHAO W, NING Y, et al. Can helical spring dextrin be composed of higher eight glucose units [J]. **Journal of Molecular Structure**, 2013, 1036:274-278.
- [3] XU J, ZHAO W, NING Y, et al. Comparative study of spring dextrin impact on amylose retrogradation [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2012, 60(19):4970-4976.
- [4] XU J, ZHAO W, NING Y, et al. Improved stability and controlled release of ω 3/ ω 6 polyunsaturated fatty acids by spring dextrin encapsulation[J]. **Carbohydrate Polymers**, 2013, 92(2):1633-1640.
- [5] 徐进. 弹簧糊精制备及关键性质研究[D]. 无锡:江南大学, 2013.
- [6] 徐学明, 徐进. 一种采用 α -淀粉酶水解直链淀粉制备弹簧糊精的方法: 中国, CN102618600A[P]. 2012-08-01.
- [7] TOKUYA H, AKIRAMI S, HIROSHI A, et al. Characterization of Pseudomonas isoamylase by its action on amylopectin and glycogen: Comparison with Aerobacter pullulanase[J]. **Biochimica et Biophysica Acta: Enzymology**, 1972, 268:497-505.
- [8] HU X, LIU C, JIN Z, et al. Fractionation of starch hydrolysate into dextrin fractions with low dispersity by gradient alcohol precipitation[J]. **Separation and Purification Technology**, 2015, 151:201-210.
- [9] WHITE DR, HUDSON P, ADAMSON J T. Dextrin characterization by high-performance anion-exchange chromatography-pulsed amperometric detection and size exclusion chromatography-multi-angle light scattering-refractive index detection [J]. **Journal of Chromatography A**, 2003, 997(1-2):79-85.
- [10] XU Jingjing, LI Youran, ZHANG Liang, et al. Mechanism analysis of Thermobifida fusca isoamylase [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 07:690-695.
- [11] CAI L, SHI Y C, RONG L, et al. Debranching and crystallization of waxy maize starch in relation to enzyme digestibility [J]. **Carbohydrate Polymers**, 2010, 81(2):385-393.
- [12] KOBAYASHI S, KAINUMA K, SUZUKI S. Purification and some properties of Bacillus macerans cycloamylose glucanotransferase[J]. **Carbohydrate Research**, 1978, 61(1):229-238.
- [13] 王玉蓉, 田景振. 物理药剂学[M]. 北京:科学出版社, 2005.
- [14] XIAO Huaiqiu, LI Yuzhen, LIN Qinlu, et al. Optimization of polypeptide preparation parameters from cold-pressed peanut meal by box-behnken response surface methodology [J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**, 2014, 29(10):106-111+117. (in Chinese)
- [15] LIU G, HONG Y, GU Z, et al. Pullulanase hydrolysis behaviors and hydrogel properties of debranched starches from different sources[J]. **Food Hydrocolloids**, 2015, 45:351-360.
- [16] YASUI T, ASHIDA K, SASAKI T. Chain-length distribution profiles of amylopectin isolated from endosperm starch of waxy and low-amylose bread wheat lines with common genetic background[J]. **Starch-Stärke**, 2009, 61(12):677-686.