

响应面分析法优化红小豆分离蛋白的提取工艺

宋龙渊¹, 王静², 邓小蓉³, 张正红², 雷用东^{3*}

(1. 新疆维吾尔自治区和田地区药品检验所, 新疆和田 848000; 2. 农业部食品质量监督检验测试中心, 新疆石河子 832000; 3. 新疆农垦科学院农产品加工研究所, 新疆石河子 832000)

摘要 [目的]采用响应面分析法优化红小豆分离蛋白的提取工艺。[方法]在单因素试验的基础上,选取因素与水平,根据中心组合试验 Box-Behnken 设计原理采用 4 因素 3 水平的响应面分析法,优化红小豆分离蛋白的提取工艺。[结果]各因素对豆粉分离蛋白提取率的影响顺序从大到小为 pH、固液比、温度、时间;通过经典分析确定豆粉分离蛋白最佳提取工艺:pH 9.0,温度为 45 °C,固液比为 1:20,时间为 60 min。在该条件下,豆粉分离蛋白提取率理论值为 81.3%,实际红小豆分离蛋白提取率为(24.3±2.0)%。[结论]响应面分析法用于优化红小豆分离蛋白的提取工艺可行,建立的数学模型与试验数据相符,可为红小豆的综合开发利用提供理论依据。

关键词 红小豆;分离蛋白;提取率;响应面分析

中图分类号 S521 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)31-0004-04

Optimization of Extraction Process for Isolate Protein from Red Adzuki Bean by Response Surface Methodology

SONG Long-yuan¹, WANG Jing², DENG Xiao-rong³, LEI Yong-dong^{3*} et al (1. Hetian Drug Inspection of Xinjiang Uygur Autonomous Region of China, Hetian, Xinjiang 848000; 2. Supervision and Testing Center for Food Quality Ministry of Agriculture, Shihezi, Xinjiang 832000; 3. Institute of Agro-products Processing Science and Technology, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Science, Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract [Objective]The aim was to optimize the extraction process for isolate protein from red adzuki bean by response surface methodology. [Method]We selected the factors and levels on the basis of single factor experiment, and designed the experiment with 4 factors and 3 levels based on the principle of Box-Behnken's design to optimize the extraction process for isolate protein from red adzuki bean. [Result]The effect of the factors of extraction pH, solid-liquid ratio, temperature and time on extraction ratio was in decreasing sequence. The optimal extraction technology obtained through the classical analysis was as followed: pH for 9.0, extraction temperature at 45 °C, the ratio of solid to liquid being 1:20 and extraction for 60 min. Under this condition, the theoretical value of the extraction rate of soybean powder isolate protein was 81.3%, and the actual extraction rate of for isolate protein from red adzuki bean was(24.3±2.0)%. [Conclusion]The obtained values agree with the predicted values of the mathematic models, and the Box-Behnken experimental design is suitable for optimizing the extraction of the isolate protein from red adzuki bean powder, which could provide scientific basis for the comprehensive development and utilization of red beans.

Key words Red adzuki bean; Isolate protein; Extraction rate; Response surface methodology

红小豆(*Vigna umbellata*),即赤小豆,又名赤豆、蛋白豆、赤山豆,是豆科植物,外形与红豆相似而稍微细长^[1]。红小豆是我国食用豆类之一,其蛋白质平均含量为 22.65%,比禾谷类蛋白质含量高 2~3 倍,现作为经济作物在全国各地普遍栽培。红小豆是一种高蛋白、低脂肪、多营养的功能食品,具有清热解毒、消化积瘀等疗效,是日常生活必备的家用食材^[2-4]。经查阅国内外相关文献^[5-7],目前尚无较好的红小豆分离蛋白提取工艺。为此,笔者采用单因素试验结合星点设计一效应面法优化红小豆分离蛋白的提取工艺,同时利用 Design-Expert 8.0.5 软件对试验模型进行典型性分析^[8],确定红小豆分离蛋白的最佳提取工艺,为红小豆分离蛋白的后续开发利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料 红小豆购自新疆石河子市金马农贸市场。试剂:石油醚、氢氧化钠、盐酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、硫酸铜、硫酸钾、浓硫酸、硼酸、甲基红-溴甲酚绿,均为分析纯;实验室用水均为去离子水。仪器:紫外可见分光光度计(721 型,上海第三分析仪器厂)、pH 计(pH S-3C 型,上海精密科学仪器公司)、凯式定氮仪(SKD-800 型,上海沛欧分析仪器公司)、高速冷冻离心机(Neofuge15R 型,上海力康公司)、高

速粉碎机(MK-200 型,南京威利朗公司)、真空冷冻干燥机(LG-1.0 型,沈阳航天新阳公司)、大容量离心机(LXJ-II B 型,上海安亭科学仪器厂)、恒温水浴锅(HSQ-3 型,上海智域分析仪器制造公司)、电子天平和磁力搅拌机。

1.2 方法

1.2.1 单因素试验。

1.2.1.1 原料预处理。称取 1 kg 样品,浸泡杂质,干燥 12 h,粉碎 3 次,石油醚浸泡 3 h 去除油脂后,晾干,获得豆粉备用。

1.2.1.2 分离蛋白提取。设计 pH、温度、时间和固液比 4 个单因素提取条件,研究提取条件对分离蛋白提取率的影响。称取 10 g 预处理后的豆粉,经不同 PBS 缓冲液(固液比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)、不同 pH(8.0、8.5、9.0、9.5 和 10.0)、不同搅拌提取时间(30、40、50、60 和 70 min)和不同温度(35、40、45、50 和 55 °C)提取后,在 4 °C 下 4 000 r/min 离心 15 min 取上清液弃沉淀,用 0.1 mol/L HCl 调节上清液的 pH 到等电点 pI 4.0,继续离心 15 min,弃上清取沉淀,用蒸馏水重复洗涤 2~3 次,经真空冷冻干燥得到分离蛋白,得到干燥物后测定溶液蛋白质含量及确定最佳提取条件。

1.2.2 响应面分析法优化提取。以蛋白提取率为响应值,采用 Design-Expert 8.0.5 软件,应用响应面分析法,选用 Box-Behnken 通过试验数据拟合响应面模型,对单因素试验结果进行响应面试验,研究工艺条件对提取效果的影响,确

作者简介 宋龙渊(1988—),男,新疆和田人,助理工程师,从事食品、化药检验及质量控制研究。*通讯作者,助理研究员,硕士,从事农产品加工与保鲜研究。

收稿日期 2017-08-02

定最佳工艺路线。

选用 Factors = 4, Runs = 29 的中心组合设计,通过试验数据拟合响应面模型,确定试验运行顺序,进行试验并收集数据,分析试验数据,优化因素的设置水平,最终确定最佳提取条件。

1.2.3 分离蛋白含量测定。参照 GB 5009.5—2016 食品中蛋白质的测定第一法凯氏定氮法,测定其红小豆分离蛋白的含量^[9]。3 次重复,同时做空白试验。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果 由图 1 可知,pH < 9.0 时,随着 pH 的增加,蛋白质提取率明显上升;pH > 9.0 时,蛋白质提取率有所下降,可能是由于碱性的增强,部分改变的蛋白质分子表面的带电情况增加了部分蛋白质的水溶性,在酸沉时造成部分蛋白质的损失;同时当碱性过强时,容易发生蛋白质脱氨、脱羧等,引起脱赖反应产生有毒物质,同时还会产生异味,造成蛋白质的损失,因而蛋白质提取率降低^[10]。由图 2 可知,提取温度方面,当低于 45 °C 时,蛋白质提取率随着温度的升高而增加;当高于 45 °C 时,蛋白质提取率有所下降。可能是随着温度的升高,蛋白质结构发生变化或者部分蛋白质变性,导致提取率下降。

由图 3 可知,提取时间方面,小于 60 min 时,提取率随着时间的延长而增加,变化比较明显;当大于 60 min 时,蛋白质的溶出率变化不大,所以蛋白质提取率基本没有变化。由图 4 可知,固液比方面,随着固液比的增大,蛋白质提取率不断增加,因为在低的固液比环境下,料液体系分散不均匀,不利于蛋白质的充分溶解,所以此时蛋白质提取率较低;当固液比增加到 1:20 时,蛋白质提取率增加并不明显。综合上述结果,提取合适条件为:pH 8.5 ~ 9.0,提取温度 40 ~ 45 °C,提取时间 60 ~ 70 min,固液比 1:25 ~ 1:20。

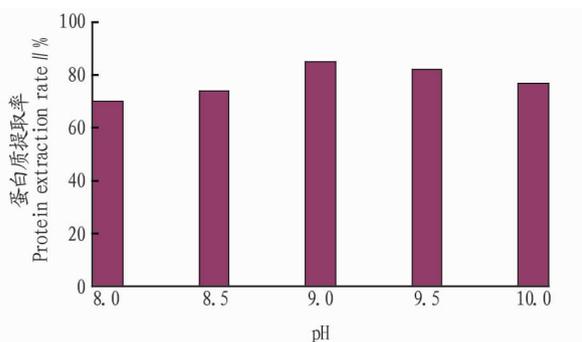


图 1 pH 对蛋白质提取率的影响

Fig.1 Effect of pH on protein extraction rate

2.2 响应面分析法优化提取

2.2.1 响应面分析因素水平的选取。通过单因素试验,得到每个单因素的相对合适的条件,在此基础上对影响蛋白质提取率的单因素固液比、pH、温度、时间进行 4 因素 3 水平的响应面试验,响应面试验因素与水平见表 1。

2.2.2 响应面分析实验设计方案。以提取 pH、温度、时间、固液比为自变量,以红小豆蛋白质提取率为响应值,进行响应面分析试验,结果见表 2。

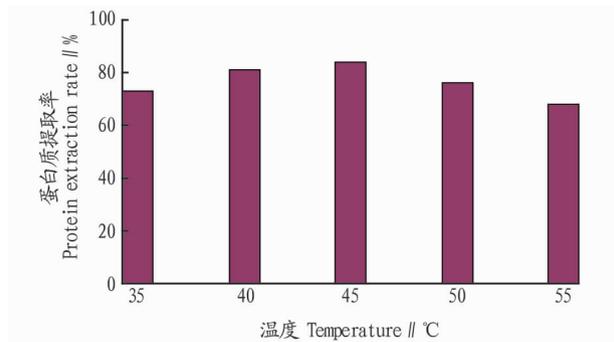


图 2 温度对蛋白质提取率的影响

Fig.2 Effect of temperature on protein extraction rate

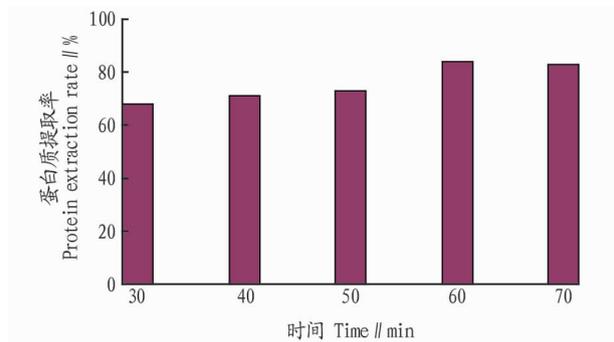


图 3 时间对蛋白质提取率的影响

Fig.3 Effect of time on protein extraction rate

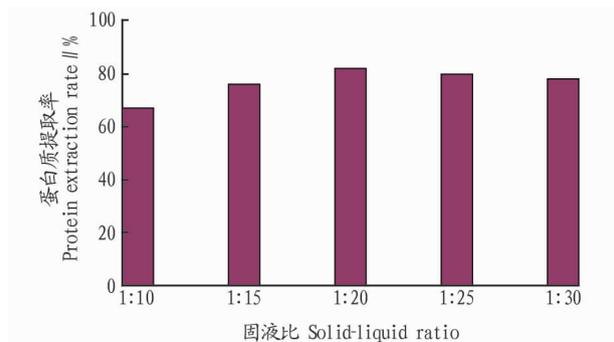


图 4 固液比对蛋白质提取率的影响

Fig.4 Effect of solid-liquid ratio on protein extraction rate

表 1 响应面试验因素与水平

Table 1 Response surface factors and levels

水平 Level	pH (A)	温度 Temperature (B) / °C	时间 Time (C) min	固液比 Solid-liquid ratio (D)
-1	8.5	40	50	1:15
0	9.0	45	60	1:20
1	9.5	50	70	1:25

2.2.3 多元二次响应面回归模型的建立与分析。通过 Design - Expert 软件程序对表 2 试验结果进行二次回归响应面分析,建立多元二次响应面回归模型,得二次多元回归模型为

$$Y = 81.40 + 0.76A + 1.26B - 1.05C - 1.10D + 0.64AB - 0.32AC + 0.051AD + 2.02BC + 1.00BD - 0.41CD - 1.64A^2 - 0.55B^2 - 1.98C^2 - 2.36D^2$$

式中, Y 为提取量; A 为提取 pH; B 为提取温度; C 为提取时间; D 为固液比。

表2 响应面试验设计及试验结果

Table 2 Design and experimental results of response surface analysis

Run	因素 Factors				提取率 Extraction rate//%
	A	B	C	D	
1	-1.000	-1.000	-1.000	1.000	72.51
2	-1.000	1.000	1.000	-1.000	74.34
3	0.000	2.000	0.000	0.000	83.75
4	-1.000	-1.000	1.000	1.000	68.10
5	1.000	1.000	-1.000	1.000	75.62
6	0.000	0.000	0.000	0.000	82.51
7	1.000	1.000	1.000	-1.000	78.91
8	0.000	0.000	0.000	2.000	72.20
9	1.000	-1.000	1.000	1.000	69.52
10	2.000	0.000	0.000	0.000	78.83
11	0.000	0.000	0.000	0.000	82.33
12	0.000	0.000	0.000	0.000	81.51
13	-2.000	0.000	0.000	0.000	74.72
14	-1.000	1.000	-1.000	1.000	71.73
15	0.000	-2.000	0.000	0.000	78.52
16	0.000	0.000	0.000	0.000	78.12
17	-1.000	-1.000	1.000	-1.000	73.21
18	0.000	0.000	0.000	0.000	82.51
19	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000	77.83
20	1.000	1.000	-1.000	-1.000	74.42
21	0.000	0.000	2.000	0.000	72.17
22	0.000	0.000	-2.000	0.000	78.64
23	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	79.91
24	1.000	-1.000	1.000	-1.000	72.60
25	1.000	1.000	1.000	1.000	75.72
26	1.000	-1.000	-1.000	1.000	75.55
27	-1.000	1.000	1.000	1.000	72.60
28	-1.000	1.000	-1.000	-1.000	69.80
29	0.000	0.000	0.000	-2.000	75.61

对该模型进行方差分析。结果表明,回归决定系数(R^2)为0.845 2,修正决定系数(Adj R - Squared)为0.690 4,说明该模型能解释0.690 4的变化,矢拟项不显著($P > 0.05$),表明该模型拟合程度良好,试验误差小,可以用该模型对红小豆分离蛋白提取试验进行分析和预测。通过直接比较方程中一次项系数绝对值大小来判断因素影响的主次性,对红小豆中蛋白质提取率的影响因素从大到小依次是 pH、固液比、温度、时间。

2.2.4 响应面分析法分析各因素间的相互作用结果。利用响应面分析 pH、温度、时间和固液比各因素之间的相互作用。

由图5可知,提取时间和 pH 对蛋白质提取率都显示出二次效应,随着两者的增加,蛋白质提取率均呈现先增加后减少的趋势,说明两者的交互作用对蛋白质提取率影响显著。

由图6可知,提取温度和 pH 对红小豆蛋白质提取率都显示出二次影响,随着温度的升高,提取率呈现先增加后减

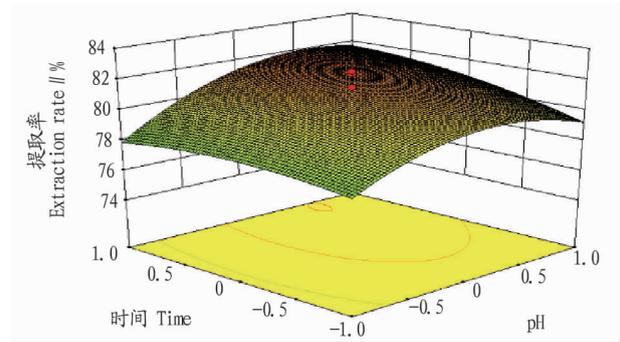


图5 时间与 pH 对蛋白质提取率的影响

Fig.5 Effect of extraction time and pH on protein extraction rate

少的趋势,而随着 pH 的增加,蛋白质提取率呈上升趋势,说明两者的交互作用对蛋白质的提取率均有影响。

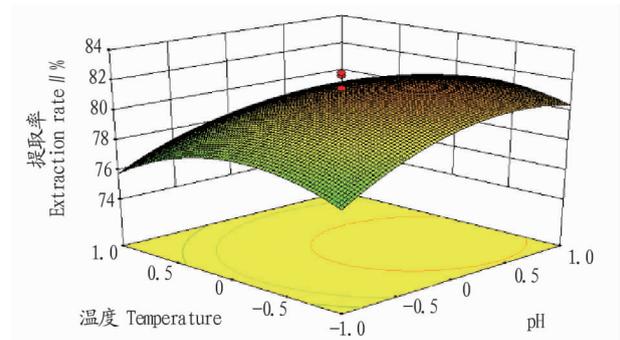


图6 温度与 pH 对蛋白质提取率的影响

Fig.6 Effect of temperature and pH on protein extraction rate

由图7可知,固液比和 pH 对蛋白质提取率都显示出二次效应,随着两者的增加,蛋白质提取率均呈现先增加后减少的趋势,说明两者的交互作用对蛋白质提取率影响显著。

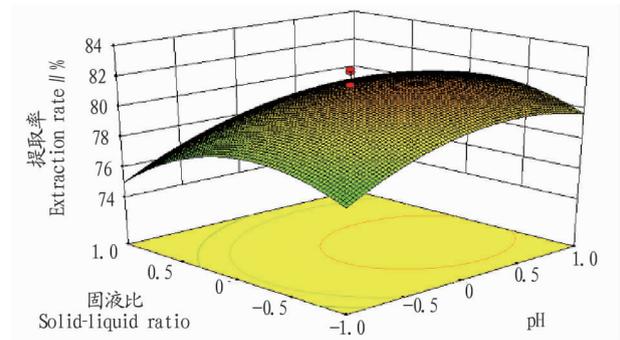


图7 固液比与 pH 对蛋白质提取率的影响

Fig.7 Effect of solid-liquid ratio and pH on protein extraction rate

由图8可知,提取温度和提取时间对蛋白质提取率都显示出二次影响,而且曲面的坡度比较陡,说明二者之间的交互作用对蛋白质提取率的影响特别显著。

由图9可知,提取时间对蛋白质提取无显著影响,但是随着固液比的增加,蛋白质提取率呈现先上升后下降的趋势。

由图10可知,固液比和温度对蛋白质提取率的影响都显示出二次影响,而且曲面的坡度比较陡,说明二者之间的

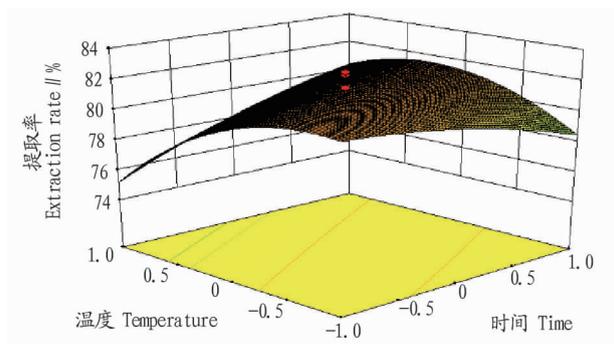


图8 温度与时间对蛋白质提取率的影响

Fig. 8 Effect of temperature and time on protein extraction rate

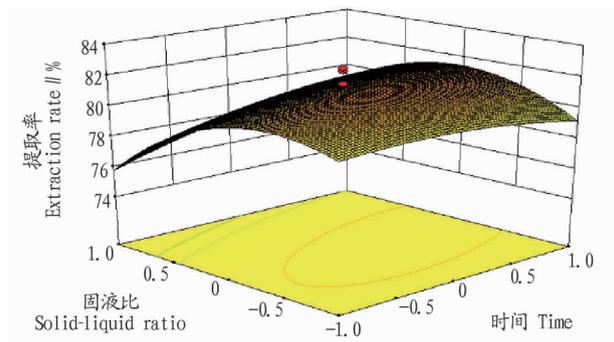


图9 固液比与时间对蛋白质提取率的影响

Fig. 9 Effect of solid-liquid ratio and time on protein extraction rate

交互作用对蛋白质提取率的影响特别显著。

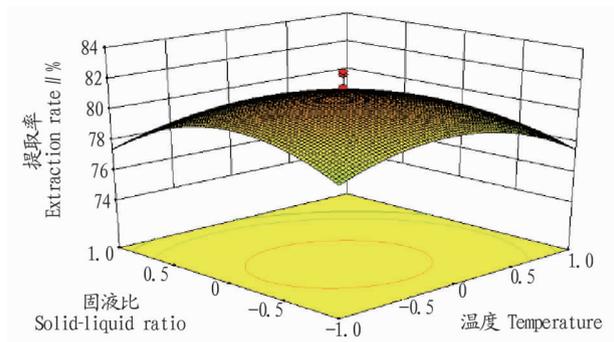


图10 固液比与温度对蛋白质提取率的影响

Fig. 10 Effect of solid-liquid ratio and temperature on protein extraction rate

综合分析,固液比、pH 和温度变化时,响应值变化较大,表现为曲线较陡。pH、固液比和温度对提取率的影响较显

著,提取时间影响不大。

2.2.5 最优条件的确定及验证。利用 Design-Expert 软件对模型进行进一步分析,以获得最优的提取条件。经分析得最佳的提取条件:pH 9.0,固液比 1:20,温度 45℃,时间 60 min。在上述条件下,豆粉蛋白质提取率的理论预测值为 81.3%。在最佳的提取条件下进行 3 次重复试验,蛋白质提取率达 79.3%,与理论值相差 2 百分点。由此可见,响应面分析的优化结果与实际值较吻合,得到的提取工艺条件具有一定的应用价值。

3 结论

红小豆分离蛋白在提取固液比为 1:20、pH 为 9.0、温度为 45℃、时间为 60 min 的条件下,提取率较高,通过计算,10 g 豆粉含蛋白质 7.93 g,分离蛋白提取率达 79.3%,原料预处理损失系数为 3.3,最终原始红小豆样品分离蛋白提取率为 $(24.3 \pm 2.0)\%$ 。该法的回收率高,重现性好,方法简单,适用于红小豆分离蛋白提取的质量控制。该研究采用响应面法优选红小豆分离蛋白的提取工艺,最终确定了其最佳提取条件。在最佳条件下,实测值与预测值比较吻合,相对偏差较小,为响应面法应用于中药及食品提取工艺的优化提供了理论依据。

参考文献

- [1] 傅翠真,李安智,张丰德,等.中国食用豆类营养品质分析研究与评价[J].中国粮油学报,1991,6(4):8-11.
- [2] 吴朝霞,丁霞.杂粮的营养价值及杂粮保健食品的开发和应用[J].杂粮作物,2001,21(5):48-50.
- [3] 凌霞,陈亚娟.速食红小豆的研制[J].黑龙江粮油科技,1999(3):11-13,15.
- [4] 李新贵.浅谈红小豆的经济药用价值与加工综合利用[J].现代化农业,2005(7):19.
- [5] AMAROWICZ R, TROSZYŃSKA A, BARYLKO-PIKIELNA N, et al. Polyphenolics extracts from legume seeds: Correlations between total antioxidant activity, total phenolics content and astringency[J]. Journal of food lipids, 2004, 11(4): 278-286.
- [6] FUKUDA T, PRAK K, FUJIOKA M, et al. Physicochemical properties of native adzuki beans (*Vigna angularis*) 7S globulin and the molecular cloning of its cDNA isoforms[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2007, 55(9): 3667-3674.
- [7] 王瑛瑶,王璋.水酶法从花生中提取蛋白质与油——碱提工艺研究[J].食品科技,2002(7):6-8.
- [8] 金日生,徐冰彦,袁传勋.响应面法优化酶法提取油茶籽饼粕多糖工艺[J].安徽农业科学,2016,44(11):107-109.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品中蛋白质的测定:GB 5009.5—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [10] 刘志红,刘铮,丁富新,等.用泡沫分离法浓缩和分离蛋白质(II)[J].清华大学学报(自然科学版),1998,38(6):20-22.

科技论文写作规范——工作单位

在圆括号内书写作者的工作单位(用全称)、城市名及邮政编码。若为外国的工作单位,则加国名。多个作者不同工作单位时,在名字的右上角分别加注“1”“2”,和地址前注“1.”“2.”。