

响应面法优化超声波辅助提取 苦杏仁渣中杏仁蛋白工艺

殷振雄¹, 张继^{1,*}, 赵保堂², 宋 珅¹, 蔺彦斌¹, 张继¹

(1.西北师范大学生命科学学院, 甘肃兰州 730070;

2.西北师范大学化学化工学院, 甘肃兰州 730070)

摘 要:利用超声波辅助碱溶酸沉法研究了从甘肃产苦杏仁渣中提取杏仁蛋白质的工艺。在单因素实验的基础上,利用响应面法优化了三个提取参数(提取时间、pH、温度)对蛋白提取率的影响。建立了杏仁蛋白提取率与因素变量的二次回归模型方程,该回归模型显著。响应面分析结果表明,最佳提取条件为:超声波辅助下温度 48℃,提取时间 1.2h, pH 11。在此条件下,蛋白质的提取率为 79.74% ± 0.60%。

关键词:杏仁蛋白, 超声辅助, 提取

Study on ultrasonic extraction of almond cake protein from cake waste

YIN Zhen-xiong¹, ZHANG Ji^{1,*}, ZHAO Bao-tang², SONG Shen¹, LIN Yan-bin¹, ZHANG Ji¹

(1.College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China;

2.College of Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Ultrasound-assisted extraction of protein from *Prunus armeniaca L var ansu Maxim* in Gansu was studied. The three parameters (extraction time, pH value and extraction temperature) were optimized using the Box-Behnken design (BBD) with a quadratic regression model built by using response surface methodology (RSM). The optimal extraction conditions for protein were determined as follows: extraction time 1.2h, pH 11 and extraction temperature 48℃, the highest yield of protein 79.74% ± 0.60% was achieved.

Key words: almond protein; ultrasonic assisted; extraction

中图分类号: TS229

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)19-0262-05

杏仁,蔷薇科植物山杏(*Prunus armeniaca L var ansu Maxim*)、西伯利亚杏(*Prunussibirica L*)、东北杏(*Prunus mandshurica Maxim*)或杏(*Prunus armeniaca L*)的干燥成熟种子^[1]。《本草纲目》记载,杏仁有“润肺脾、消食积、散滞气”三大好处,其本身含有丰富的蛋白质,既是高级营养品,又可供药用^[2]。杏仁含蛋白质 22.5%、脂肪 44.8%、糖 23.9%、膳食纤维 8.0%。杏仁含有丰富矿物质,每 100g 杏仁中含钙 234mg、磷 504mg、镁 260mg、钾 773mg、铁 4.7mg、锌 3.11mg、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 E 和胡萝卜素,杏仁中特有的苦杏仁苷达 3%^[3]。杏仁蛋白的氨基酸比例平衡,最优氨基酸组合和其他植物蛋白的质量相当,是一种良好的植物蛋白资源^[4]。目前蛋白质提取大多利用稀盐和缓冲系统的水溶液提取法,对于不溶于水、稀盐溶液、稀酸或稀碱中,可用乙醇、丙酮和丁醇等的有机溶剂提取法等。甘肃省平凉、庆阳地处陇

东黄土高原沟壑区,自然条件非常适合杏树生长,杏产量占全省 70% 左右^[4]。本研究利用超声波辅助提取法^[5-7],以甘肃产苦杏仁渣为原料,以杏仁蛋白提取率为指标,通过单因素和响应面实验^[8-12],研究超声波辅助条件下碱提酸沉法的不同因素变化对杏仁蛋白提取率的影响,优化了杏仁蛋白的提取工艺,并与大豆蛋白、小麦蛋白进行了性能比较,以期为进一步研究其理化功能等奠定一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

苦杏仁 产于甘肃省平凉市,提取杏仁油后的苦杏仁渣粉碎后过 40 目筛;考马斯亮蓝 G250 北京西美杰科技有限公司,分析纯;柠檬酸、NaOH、硫酸铜、硫酸钾、硫酸、硼酸、甲基红、溴甲酚绿 天津市福晨化学试剂厂,分析纯;牛血清白蛋白 纯度 98%,分析纯, Bio Basic 公司。

JJ-1 精密定时电动搅拌机 金坛市荣华仪器制造有限公司;KQ-250B 型超声波发生器 昆山市超声仪器有限公司;pHS-25 数显 pH 计 上海精密科学仪器有限公司;紫外可见分光光度计 北京莱伯泰科仪器有限公司;LJG-18S 冷冻干燥机 北京泰华仪器有限责任公司;TBL5M 台式超大容量冷冻离

收稿日期:2013-03-06 * 通讯联系人

作者简介:殷振雄(1984-),男,研究生在读,研究方向:植物资源开发利用。

基金项目:国家自然科学基金(31200255);西南突发性灾害应急与防控技术集成与示范(2012BAD20B06)。

离心机 湘仪离心机厂。

1.2 实验方法

1.2.1 杏仁蛋白的提取流程 见图 1。

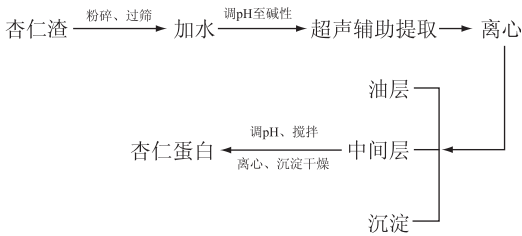


图 1 杏仁蛋白的提取流程

Fig.1 The flow diagram of extraction

1.2.2 超声辅助提取杏仁蛋白的单因素实验

1.2.2.1 超声时间对杏仁蛋白提取率的影响 准确称量 2.0g 样品,在料液比 1:20, pH 9.5, 温度 45℃ 下用超声波并搅拌浸提 0.5、1、1.5、2、2.5h, 然后以 4000r/min 离心 20min。去掉油层和沉淀,取清液 2.5mL 稀释 20 倍,利用考马斯亮蓝 G-250 染色法在 595nm 波长下比色。以蛋白质的提取率为指标,绘制时间与提取率的关系曲线。

1.2.2.2 pH 对杏仁蛋白提取率的影响 准确称量 2.0g 已粉碎样品,在温度 45℃,料液比 1:20, pH 为 8、9、10、11、12 的条件下超声波并搅拌提取 1.5h,其余同 1.2.2.1。

1.2.2.3 料液比对杏仁蛋白提取率的影响 准确称量 2.0g 已粉碎样品,在温度 45℃, pH9.5,料液比为 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35 的条件下超声波并搅拌下浸提 1.5h,其余同 1.2.2.1。

1.2.2.4 温度对杏仁蛋白提取率的影响 准确称量 2.0g 已粉碎样品,在 pH9.5,料液比为 1:20,温度分别为 35、40、45、50、55℃ 的条件下超声波并搅拌提取 1.5h,其余同 1.2.2.1。

1.2.3 Box-Behnken 实验设计 采用 Design-Expert 7.0 软件,应用 Box-Behnken 设计杏仁蛋白提取率为响应值对主要影响因素进行优化,从中筛选提取杏仁蛋白提取率的最优提取条件。根据 Box-Behnken 的中心组合实验设计原理,选定提取时间、pH、提取温度 3 个对超声提取影响的因素进行单因素实验。在单因素的基础上,确定响应面实验的因素和水平(见表 1)。

表 1 Box-Behnken 实验设计因素水平

Table 1 Levels of factors of Box-Behnken design

水平	因素		
	X ₁ 时间(h)	X ₂ pH	X ₃ 温度(℃)
1	2.0	11	50
0	1.5	10	45
-1	1.0	9	40

1.2.4 杏仁渣中蛋白质含量的测定 采用凯氏定氮法测定并计算杏仁渣中总蛋白的含量(ω)。通过考马斯亮蓝 G250 染色法测定提取液中蛋白质含量(ρ),并按下列公式计算蛋白提取率(Y)。

$$Y(\%) = \left(\frac{\rho \times V}{\omega \times m} \right) \times 100$$

式中,Y-蛋白提取率(%);ρ-提取液蛋白质量浓度(g/mL);V-提取液体积(mL);ω-杏仁渣中总蛋白含量(%);m-杏仁渣质量(g)。

1.2.5 数据处理方法 运用 Design-Excerpt 软件对响应值进行回归分析、方差分析,用 F 检验判定回归方程中各变量对响应值影响的显著性。

2 结果与讨论

2.1 粗蛋白的测定

经凯氏定氮法测定,杏仁渣中粗蛋白的含量为 45.5%。

2.2 单因素实验

2.2.1 提取时间对杏仁渣中蛋白提取率的影响 在料液比 1:20, pH 9.5, 温度 45℃ 下,不同提取时间对杏仁渣中蛋白提取率的影响如图 2 所示。

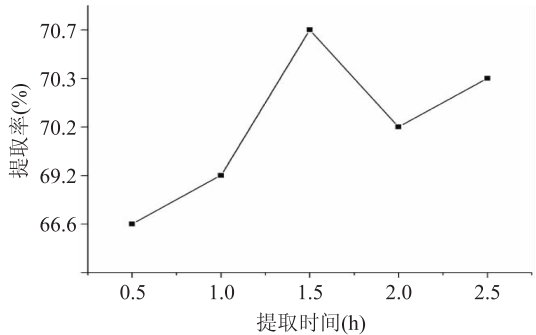


图 2 提取时间对蛋白提取率的影响

Fig.2 The influence of time to the extraction yield

由图 2 可知,杏仁蛋白提取率随时间的增加而增加,当处理时间大于 1.5h 时,杏仁蛋白的提取率开始下降,所以初步确定杏仁渣超声波提取 1.5h。

2.2.2 pH 对杏仁渣中蛋白提取率的影响 在料液比 1:20,提取时间 1.5h,温度 45℃ 下,不同 pH 对杏仁渣中蛋白提取率的影响如图 3 所示。

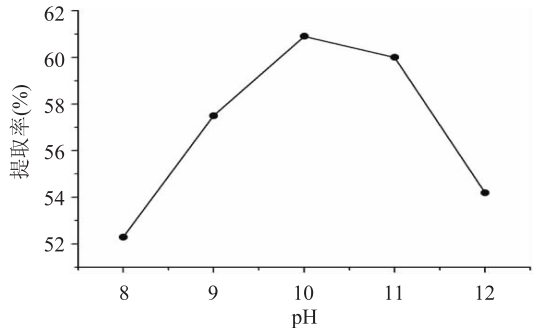


图 3 提取 pH 对蛋白提取率的影响

Fig.3 The influence of pH to the extraction yield

由图 3 可知,pH 对蛋白质的提取率有明显的影 响,当提取液 pH8~10 时,杏仁蛋白质提取率逐渐增加;当 pH 超过 10 以后,杏仁蛋白的提取率随 pH 的增大而减小,因此确定提取液的 pH 为 10。

2.2.3 料液比对杏仁渣中蛋白提取率的影响 在提取时间 1.5h, pH 9.5, 温度 45℃ 下,不同料液比对杏仁渣中蛋白提取率的影响如图 4 所示。

由图 4 可知,随料液比的增大,蛋白质的提取率也在增大,在料液比大于 1:30 后,蛋白质提取率提高

表3 方差分析
Table 3 Variance analysis

项目	平方和	自由度	均方	F 值	p 值	显著性
模型	621.57	9	69.06	7.38	0.0076	*
X ₁	5.78	1	5.78	0.62	0.4577	
X ₂	212.18	1	212.18	22.68	0.0021	**
X ₃	14.58	1	14.58	1.56	0.2521	
X ₁ X ₂	174.24	1	174.24	18.62	0.0035	**
X ₁ X ₃	34.81	1	34.81	3.72	0.0951	
X ₂ X ₃	0.25	1	0.25	0.027	0.8748	
X ₁ ²	89.09	1	89.09	9.52	0.0177	*
X ₂ ²	12.17	1	12.17	1.30	0.2916	
X ₃ ²	62.41	1	62.41	6.67	0.0363	*
残差项	65.50	7	9.36			
失拟项	65.50	3	21.83			
净误差	0.000	4	0.000			
总离差	687.07	16				

注: $p < 0.05$ * ; $p < 0.01$ ** 。

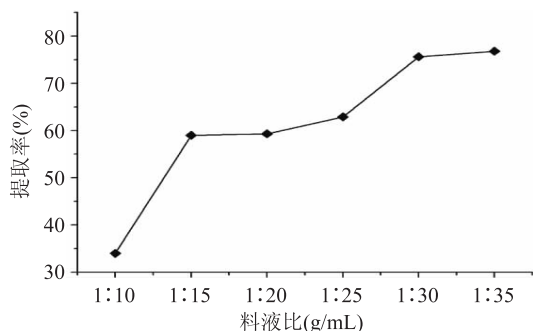


图4 料液比对蛋白提取率的影响

Fig.4 The influence of material to water ratio to the extraction yield

变得缓慢。在实验范围内虽然料液比为 1:35 时的蛋白质提取率最大为 76.8%,而料液比为 1:30 时,蛋白质的提取率也达到了 75.6%,但是太高的料液比不利于后续处理,故选取料液比为 1:30。

2.2.4 提取温度对杏仁渣中蛋白提取率的影响 在提取时间 1.5h, pH 9.5, 料液比 1:30 下,不同提取温度对杏仁渣中蛋白提取率的影响如图 5 所示。

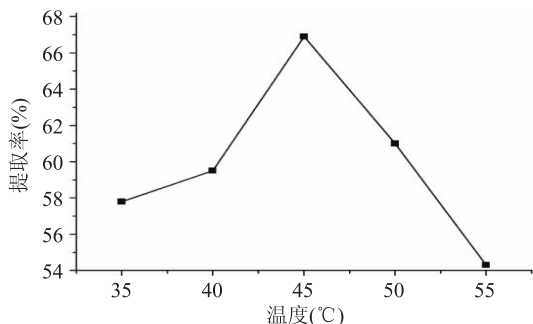


图5 提取温度对蛋白提取率的影响

Fig.5 The influence of temperature to the extraction yield

由图 5 可知,随着温度的增大,杏仁蛋白的提取率呈现先增大后减小的趋势,这是由于在温度过低时,蛋白质在水中的溶解性不高,但是温度过高时,

极易造成蛋白质变性,变性后的蛋白质易沉淀,经过离心,作为沉淀弃除,因此,当杏仁蛋白的提取温度高于 45℃ 时,杏仁蛋白极易变性,导致提取率变低,故确定杏仁蛋白的提取温度为 45℃。

2.3 提取条件优化

通过单因素实验,选择合理的因素水平进行响应面实验,以确定最佳的提取条件。杏仁蛋白提取的 Box-Behnken 实验结果见表 2。

表2 Box-Behnken 实验设计结果

Table 2 Results of data analysis by Box-Behnken design

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	提取率(%)
1	-1	-1	0	53.4
2	1	-1	0	73.6
3	-1	1	0	77.4
4	1	1	0	71.2
5	-1	0	-1	63.2
6	1	0	-1	65.5
7	-1	0	1	73.9
8	1	0	1	64.4
9	0	-1	-1	64.2
10	0	1	-1	74.5
11	0	-1	1	65.3
12	0	1	1	74.6
13	0	0	0	75.2
14	0	0	0	75.2
15	0	0	0	75.2
16	0	0	0	75.2
17	0	0	0	75.2

2.4 响应面分析

以 X₁(时间)、X₂(pH)、X₃(温度)为自变量,杏仁蛋白的提取率 Y 为响应值,所得二次回归方程为:

$$Y = 75.2 + 0.85X_1 + 5.15X_2 + 1.35X_3 - 6.6X_1X_2 - 2.95X_1X_3 - 0.25X_2X_3 - 4.6X_1^2 - 1.7X_2^2 - 3.85X_3^2$$

运用 Design-Excerpt 软件对 17 个实验点的响应值进行回归分析,方差分析结果如表 3 所示,用 F 检验判定回归方程中各变量对响应值影响的显著性,概率越小,则相应变量的显著程度越高。

由表 4 可以看出,模型的决定系数 ($R^2 = 0.9047$),变异系数 $C.V = 4.34\%$,表明多项式模型的精确性、有效性是合理的。

表 4 杏仁蛋白提取率二次项模型的适合度分析

Table 4 Analysis the fitness of quadratic polynomial model for extraction yield				
决定系数 R^2	修订系数 R^2_{Adj}	标准方差	平均值	变异系数 (%)
0.9047	0.7821	3.06	70.42	4.34

2.5 各因素交互作用分析

为了进一步考察 3 个实验因子:超声提取时间 (X_1)、pH (X_2) 及提取温度 (X_3) 的交互作用以及确定最优值,对回归模型采用降维法分析,即可得到两因子的回归模型,并通过 Design-Expert 7.0 软件绘制出响应面曲线图来进行直观的分析。图 6~图 8 分别显示了 3 组以提取率为响应值的趋势图,从响应面图可以直观地反映出两变量交互作用的显著程度。极值条件出现在等高线的圆心处,等高线图最圆,说明它们之间相互作用对杏仁蛋白的提取率的影响最大;而等高线图越扁平,表示因素之间的相互影响越小。

从图 6 可以看出,随着 pH 的增大,杏仁蛋白的提取率逐渐增大;而随着温度的升高,杏仁蛋白的提取率呈先增后平的趋势。

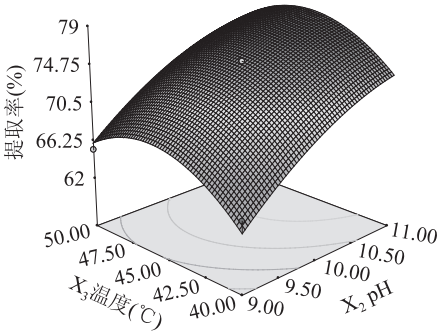


图 6 温度和 pH 的交互作用对蛋白提取率的响应曲面
Fig.6 Response surface showing the effects of temperature and pH on extraction yield

从图 7 可以看出,随着温度的升高,超声时间的延长,杏仁蛋白的提取率呈先增后减的趋势。

从图 8 可以看出,随着 pH 增大,杏仁蛋白的提取率逐渐增大;而随着温度的延长,杏仁蛋白的提取率的变化不明显。

2.6 最佳条件的确定及验证实验

从图 3 及 Design-Expert 7.0 软件分析可得,建立了一个以苦杏仁蛋白质提取率为目标值,以超声温度、pH 和时间为因子的数学模型。方差分析表明其拟合较好。通过对回归方程的优化计算,得到最佳提取工艺条件:在温度 47.76℃、提取时间 1.18h, pH

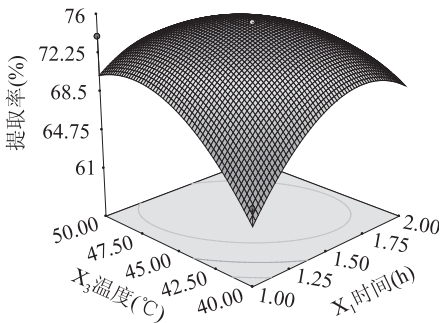


图 7 温度和时间交互作用对蛋白提取率的响应曲面
Fig.7 Response surface showing the effects of temperature and time on extraction yield

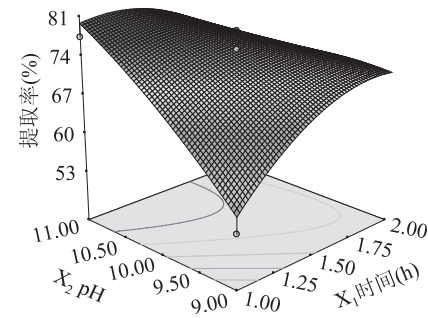


图 8 pH 和时间的交互作用对蛋白提取率的响应曲面
Fig.8 Response surface showing the effects of pH and time on extraction yield

10.97,液料比 1:35g/mL,蛋白质的提取率可达 80.77%。考虑到实际操作方便性,将最优条件进行修订,修订后的参数为温度 48℃、提取时间 1.2h, pH 11,液料比 1:30g/mL,并在此条件下做了验证实验,结果表明在此条件下蛋白质的得率为 79.74% ± 0.60%。

3 结论

在单因素实验基础上,运用响应面分析法对提取杏仁油后杏仁渣中的蛋白的提取条件进行优化。在超声功率恒定,料液比为 1:30g/mL,得出对蛋白提取率影响大小的因素依次为提取时间、提取温度、pH,验证实验进一步证明在温度 48℃、提取时间 1.2h、pH 11 时,蛋白质提取率高达 79.74% ± 0.60%,且外观满足食品加工要求,功能特性优良。本研究为提取杏仁油后的工业废弃物杏仁渣的有效利用提供了理论依据。为当地杏仁蛋白的进一步深加工提供了原料来源。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:187.
[2] 于文清,刘晓辉. 承德野生杏仁和杏叶蛋白质含量的测定[J]. 承德民族师专学报,2011,31(2):54-56.
[3] 杜琨,牟丽丽. 杏仁的营养价值与开发利用[J]. 食品研究与开发,2005,26(5):151.
[4] 李建红. 甘肃省仁用杏栽培现状与分析[J]. 甘肃林业科技,2003,28(3):20.

(下转第 280 页)

结果(-)-棉酚含量为 2.83~4.09mg/g, (+)-棉酚含量约为 4.13~5.69mg/g, 比例约为 1:1.45, 结果见表 4。

表 3 (-)-和(+)-棉酚回收率实验结果($n=3$)

Table 3 Recoveries of (-)-gossypol at three spike levels($n=3$)

成分	空白本底 (μg)	加标量 (μg)	测得量 (μg)	平均回 收率 (%)	RSD (%)
(-)-棉酚	137.9	19.3	19.9	103.0	3.86
		96.7	97.0	100.3	2.23
		290.2	290.1	99.9	1.63
(+) -棉酚	216.8	20.3	19.9	99.4	3.50
		101.5	103.3	101.7	1.99
		304.5	308.6	101.3	1.27

表 4 样品测定结果($n=3$)

Table 4 Contents of (-)-and(+)-gossypol in samples determined by the method($n=3$)

成分	样品(mg/g)					
	I	II	III	IV	V	VI
(-)-棉酚	2.92	2.83	3.73	2.99	4.09	3.63
(+) -棉酚	4.46	4.13	5.14	4.29	5.69	5.23

3 结论

本实验采用高效液相-质谱法测定棉籽仁中左旋和右旋棉酚的含量, 在样品前处理方法、质谱条件和色谱条件等方面进行优化, 实验结果表明, 新疆地区的棉籽仁中左旋棉酚的含量低于右旋棉酚, 两者的比例约为 1:1.38~1.54。该方法专属性强, 灵敏度高, 样品处理简便易行, 适于食品和饲料中(-)和(+)-棉酚的含量测定。

参考文献

- [1] Wang M S, Lorenzo B J, Reidenberg M M. NAD- and NADP-dependent 11β -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in guinea pig kidney with gossypol inhibition[J]. Acta Pharmacol Sin, 1997, 18(6): 481-485.
- [2] 王益鑫, 陈振兴. 棉酚所致低血钾及其与棉酚剂量关系的可能机理[J]. 生殖与避孕, 1991, 11(2): 34-38.
- [3] 朱卫. 男性抗生育植物药研究近况[J]. 科学进展, 1987, 5: 29-31.
- [4] Uzal F A, Puschner B, Tahara J M, et al. Gossypol toxicosis in a dog consequent to ingestion of cottonseed bedding[J]. J Vet

Diagn Invest, 2005, 17(6): 626-629.

- [5] 关慕贞, 王乃功. (+), (-) 和 ($\pm$) 棉酚在雌大鼠抗早孕作用的研究[J]. 药学学报, 1996, 31(1): 10-12.
- [6] Chen B B, Lin H, Hu G X, et al. The (+) - and (-) - gossypols potently inhibit human and rat 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009, 113: 177-181.
- [7] GB 5009.148-2011 植物性食品中游离棉酚的测定[S].
- [8] NY/T 1382-2007 棉籽中棉酚旋光体的测定 HPLC 法[S].
- [9] 栾姝, 孟磊, 姚军, 等. 高效液相色谱法测定棉籽仁中棉酚的含量[J]. 食品科学, 2010, 31(4): 198-200.
- [10] 姚军, 栾姝, 于红, 等. 高效液相色谱法测定家兔血浆中棉酚含量[J]. 分析实验室, 2010, 29(7): 23-25.
- [11] Vshivkov S, Pshenichnov E, Golubenko Z, et al. Capillary electrophoresis to quantitate gossypol enantiomers in cotton flower petals and seed[J]. J Chromatogr B, 2012, 908(1): 94-97.
- [12] 姚军, 马晓丽, 栾姝, 等. 高效毛细管电泳法测定新疆南疆棉籽仁中棉酚的含量[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(2): 119-123.
- [13] Xue B C, Liu E B. Determination of gossypol in trace level by flow injection analysis with chemiluminescence detection[J]. Chin Chem Lett, 2006, 17(1): 57-60.
- [14] Mirghani M E S, Man Y B C. A new method for determining gossypol in cottonseed oil by FTIR spectroscopy[J]. JAOCs, 2003, 80(7): 625-628.
- [15] 刑其毅. 基础有机化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 514-515.
- [16] Lee K J, Dabrowski K. High - performance liquid chromatographic determination of gossypol and gossypolone enantiomers in fish tissues using simultaneous electrochemical and ultraviolet detectors[J]. J Chromatogr B, 2002, 779(2): 313-319.
- [17] 杨春梅, 唐辉, 顾承志, 等. 光学活性棉酚衍生物的拆分及性质测定[J]. 山东医药, 2006, 46(35): 1-2.
- [18] 杨春梅. 棉酚光学异构体的拆分研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2007.
- [19] Hron R J, Kim H L, Calhoun M C, et al. Determination of (+) -, (-) -, and total gossypol in cottonseed by High - Performance Liquid Chromatography[J]. JAOCs, 1999, 76(11): 1351-1355.
- [20] 王立琦, 贺利民, 曾振玲, 等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展[J]. 质谱学报, 2011, 32(6): 321-329.

(上接第 265 页)

- [5] 李宏睿, 舒晓慧, 程学辉. 超声波辅助提取杏仁油工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 6(26): 56-59.
- [6] 邓刚, 焦聪聪, 许杭琳, 等. 超声辅助提取佛手废渣果胶的工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(14): 103-105.
- [7] 李凤林, 李应华. 超声波法提取白灵菇多糖的工艺研究[J]. 食用菌, 2009(3): 74-75.
- [8] 田桦, 张大伟, 王惠娟. 正交设计法优化芍药苷的超声提取工艺[J]. 黑龙江医药科学, 2011, 34(5): 37-38.
- [9] 白靖文, 叶非, 贾旭. 正交实验优选东北延胡索超声辅助提取工艺[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(10): 819-820.

- [10] 秦梅颂, 时维静, 邢闪闪. 正交实验法优选荷叶中总黄酮超声提取工艺[J]. 中兽医药杂志, 2011(4): 45-49.
- [11] 孙利伟, 赵辉, 蔡楠楠. 正交实验优选杜仲中绿原酸的提取工艺[J]. 中国药业, 2011, 20(18): 41-45.
- [12] 邓肿, 颜永刚, 杨乖利, 等. 正交实验设计优化杜仲总木脂素提取工艺[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(8): 45-47.
- [13] 黄晓钰, 刘邻渭. 食品化学综合实验[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002: 122.
- [14] 任燕冬, 宋宏杉, 陈巧云, 等. 超临界二氧化碳萃取杏仁油的研究[J]. 中国现代医生, 2011, 49(13): 61-62.