

响应面法优化卡布里鹰嘴豆蛋白提取工艺

张俊杰^{1,2,3}, 郭晨¹, 刘毅飞¹, 方彩¹, 王志伟¹, 王义虬¹, 纵伟^{1,2,*}

(1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 河南郑州 450002;

2. 食品生产与安全河南省协同创新中心, 河南郑州 450002;

3. 河南省冷链食品质量安全控制重点实验室, 河南郑州 450002)

摘要:以云南产卡布里品种鹰嘴豆为原料, 采用碱溶酸沉法提取鹰嘴豆蛋白, 并分别通过单因素实验和响应面法对蛋白质的提取工艺条件进行优化, 然后采用半微量凯氏定氮法测定所提取鹰嘴豆蛋白粉的纯度。结果表明, 最佳工艺为液料比 12:1 mL/g, 碱溶 pH10, 碱溶时间 120 min, 在此条件下, 脱脂鹰嘴豆蛋白的得率达 12.66% ± 0.14%, 与理论值相差 2.39%。经过凯氏定氮法测定, 用本论文优化方法所提取鹰嘴豆蛋白粉的纯度为 77.82% ± 0.53%, 优于已有提取方法, 表明利用该论文提出的优化条件可以获得更高纯度的鹰嘴豆蛋白粉。

关键词:鹰嘴豆, 碱溶酸沉法, 提取工艺, 响应面法, 蛋白纯度

Optimization of Extraction Technology of Kabuli Chickpea Protein by Response Surface Methodology

ZHANG Jun-jie^{1,2,3}, GUO Chen¹, LIU Yi-fei¹, FANG Cai¹, WANG Zhi-Wei¹, WANG Yi-qiu¹, ZONG Wei^{1,2,*}

(1. School of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;

2. Collaborative Innovation Center for Food Production and Safety, Henan Province, Zhengzhou 450002, China;

3. Henan Key Laboratory of Cold Chain Food Quality and Safety Control, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Chickpea protein was extracted from Kabuli chickpea seed powder produced in Yunnan by using alkali soluble and acid sinking method. The extracting conditions were optimized by single-factor experiment and response surface methodology. Protein putity was examined by using Semi-micro Kjeldahl Method in extracted chickpea protein powder. Results showed the optimum conditions were as follows: the ratio of water to material was 12:1 mL/g, alkali-soluble pH was 10, alkali-soluble time was 120 min and under these optimized conditions, the yield of chickpea protein reached 12.66%. Furthermore, the protein purity in chickpea extracted protein powder was 77.82%, better than the known methods, which indicated that the higher purity of the extracted chickpea protein powder could be obtained by the optimized methods in this study.

Key words: chickpea; alkali soluble acid sinking method; extrouction technology; response surface methodology; protein purity

中图分类号: TS253.4

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2018)17-0167-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.17.028

引文格式: 张俊杰, 郭晨, 刘毅飞, 等. 响应面法优化卡布里鹰嘴豆蛋白提取工艺[J]. 食品工业科技, 2018, 39(17): 167-172.

鹰嘴豆 (*Cicer arietinum* L.) 是豆科 (Leguminosae) 鹰嘴豆属 (*Cicer*) 唯一栽培种^[1], 世界第二大种植豆类, 仅次于大豆^[2], 也是世界第三大作为膳食蛋白质来源的豆类作物^[3], 已经有几千年的栽培历史^[4]。鹰嘴豆是一种天然植物蛋白资源, 蛋白质含量占籽粒干基总量的 13%~33%^[5], 贮藏蛋白主要由清蛋白、球蛋白和谷蛋白组成^[6]。鹰嘴豆含有 18 种氨基酸, 包括人体必需的 8 种氨基酸^[7]。鹰嘴豆蛋白因其氨基酸组成均衡、生物利用率高和抗营养因子低而被作为植物蛋白的重要来源^[8], 且鹰嘴豆蛋白本身就具有一定的抗氧化活性^[9], 是一种非常好的全

价蛋白^[10]。

卡布里鹰嘴豆的传统种植区是在地中海沿岸和中亚地区^[11]。我国鹰嘴豆主要分布于新疆、青海、甘肃和云南等省^[12], 其中, 新疆的木垒县和奇台县是我国鹰嘴豆的主产区^[13]。该地区根瘤菌的遗传多样性已被充分研究。根瘤菌可以与鹰嘴豆共生固氮, 进一步影响鹰嘴豆籽粒品质, 如蛋白质含量等。而云南文山地区是首次引种卡布里鹰嘴豆, 对其籽粒中蛋白尚未见相关研究报道。

综合国内外对于蛋白质提取的研究, 普遍采用的方法有溶液提取法、酶提取法、超声波提取法和双

收稿日期: 2017-12-22

作者简介: 张俊杰 (1984-), 男, 博士, 讲师, 主要从事应用微生物方面的研究, E-mail: kirka640@163.com。

* 通讯作者: 纵伟 (1965-), 男, 博士, 教授, 主要从事农产品加工与贮藏方面的研究, E-mail: zzulisp@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31400008); 国家人社部留学回国人员科技活动项目 (豫留学函[2016]1 号文件)。

水相萃取法^[14]。碱溶酸沉法是溶液提取法的一种,主要是利用蛋白质在等电点(Isoelectric point, pI)溶解度最小的原理,在 pH 较高时溶解蛋白,然后调节 pH 至 pI 使之凝聚沉淀^[15]。该法具有操作简单、易于控制、成本低廉等优点^[16]。之前周丽卿等^[17]以新疆鹰嘴豆为原料探究了其蛋白质的最佳提取工艺参数,但尚未对其蛋白纯度进行研究。

本文以云南文山卡布里鹰嘴豆为原料,采用碱溶酸沉法提取鹰嘴豆蛋白,并进一步优化了蛋白提取工艺,同时保证了高蛋白得率与高蛋白纯度,旨在为云南地区鹰嘴豆的推广种植与综合利用提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

卡布里鹰嘴豆 云南文山自治州丘北县;氢氧化钠、盐酸、浓硫酸、硼酸、溴甲酚绿、甲基红、石油醚(沸程 60~90 ℃) 分析纯,天津市永大化学试剂有限公司。

400Y 粉碎机 浙江金华铂欧五金厂;TGL-20M 台式高速冷冻离心机 上海卢湘仪离心机仪器有限公司;AE224 电子分析天平 上海舜宇恒平科学仪器有限公司;250 mL 索氏抽提器 郑州中天实验仪器有限公司;101-2 电热鼓风干燥箱 北京中兴伟业仪器有限公司;T6 新世纪紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;HYP-3 智能消化炉、KDN-103F 型自动定氮仪 上海纤检仪器有限公司等。

1.2 实验方法

1.2.1 粉碎 选择成熟且颗粒饱满的鹰嘴豆籽粒,用粉碎机以 30000 r/min 的转速粉碎,过 100 目筛。将过筛的豆粉放入烘箱中,40 ℃ 烘干至恒重,装入自封袋 4 ℃ 保存备用。

1.2.2 脱脂 索氏抽提参照国家标准 GB/T 5009.6-2003^[18]。将干燥至恒重的豆粉用滤纸包好放入索氏抽提器中,以沸程为 60~90 ℃ 的石油醚为提取剂进行脱脂。抽提温度 80 ℃,抽提时间 8 h,至抽提器中石油醚由黄色变为透明无色,以保证脱脂完全。脱脂后的豆粉放于烘箱中,40 ℃ 进行干燥至恒重,装入自封袋 4 ℃ 保存备用。

1.2.3 等电点的测定 Sanchez-Vioque 等^[19]测定了鹰嘴豆总蛋白的等电点为 4.3,初步判断云南卡布里鹰嘴豆的等电点主要在 4~5 之间。采用紫外分光光度法测定。称取 0.5 g 脱脂豆粉 9 份,制备碱溶上清液 10 mL,用 5 mol/L HCl 溶液调节 pH 分别为 3.5、4.0、4.1、4.3、4.5、4.7、4.9、5.0、5.5,6000 r/min 离心 15 min,分别吸取 1 mL 上清液,在 595 nm 处比色测定吸光值^[20]。上清液吸光度最低,即残留蛋白最少,所对应的 pH 为蛋白的等电点。

1.2.4 卡布里鹰嘴豆蛋白的提取 用文献[21]中报道的方法并做适当修改,从云南卡布里鹰嘴豆中提取蛋白。称取脱脂后的豆粉 3 g 置于锥形瓶中,分别编号,按照一定比例加入蒸馏水,摇匀后滴加 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH,搅拌溶解一定时间

后,将溶液转移到离心管中进行离心,在 6000 r/min 的转速下离心 15 min。离心完毕,取上清液倾倒入前一步的锥形瓶中。然后用 0.5 mol/L HCl 溶液调节上清液 pH 至鹰嘴豆蛋白等电点 4.9,继续在 6000 r/min 的转速下离心 15 min。之后将上清液倾倒干净,所得沉淀物即为云南卡布里鹰嘴豆蛋白粗提物。

1.2.5 单因素实验 按照上述步骤,以提取鹰嘴豆蛋白的液料比、碱溶 pH、碱溶温度、碱溶时间为试验因素,以鹰嘴豆粗蛋白得率作为试验指标,分别做单因素实验,以分析各因素对鹰嘴豆蛋白得率的影响。

以液料比为单因素时,在碱溶温度 40 ℃,碱溶时间 30 min,碱溶 pH9.5,酸沉 pH4.9 的条件下,将液料比梯度分别设置为 8:1、10:1、12:1、14:1 和 16:1 mL/g 提取蛋白质。

以碱溶 pH 为单因素时,在液料比 12:1 mL/g,碱溶温度 40 ℃,碱溶时间 30 min,酸沉 pH4.9 的条件下,将碱溶 pH 梯度设置为 8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5 和 11.0 提取蛋白质。

以碱溶温度为单因素时,在液料比 12:1 mL/g,碱溶 pH9.5,碱溶时间 30 min,酸沉 pH4.9 的条件下,将碱溶温度梯度设置为 20、30、40、50、60 ℃ 提取蛋白质。

以碱溶时间为单因素时,在液料比 12:1 mL/g,碱溶 pH9.5,碱溶温度 40 ℃,酸沉 pH4.9 的条件下,将碱溶时间梯度设置为 30、60、90、120、150 min 提取蛋白质。

1.2.6 响应面试验 在单因素实验的基础上,选取碱溶 pH、液料比和碱溶时间三个因素,每个因素中选取三个对蛋白质得率影响较大的水平,建立三因素三水平的 Box-Behnken 中心组合试验,以蛋白质得率为响应值,各因素的三个水平采用 -1、0、1 进行编码,如表 1。每个试验组合重复测定 2 次,取其平均值作为得率结果,试验结果采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件分析。

表 1 Box-Behnken 实验设计因素及水平表

Table 1 Variables and levels for Box-Behnken design

因素	编码水平		
	-1	0	1
A 碱溶 pH	9	10	11
B 液料比(mL/g)	10:1	12:1	14:1
C 碱溶时间(min)	60	90	120

1.2.7 计算公式 对采用碱溶酸沉法最终产物蛋白质得率按照以下公式计算。

蛋白质得率(%) = 提取出粗蛋白质的质量/脱脂豆粉的质量 × 100

鹰嘴豆粉纯度测定按照国家标准 GB5009.5-2016^[22]计算,采用凯氏定氮法进行,氮含量换算蛋白质含量的换算系数:6.25。计算公式如下:

$$\text{纯度}(\%) (\text{干基}) = [(V_2 - V_1) \times (N \times 0.0140 \times K \times 100)] / [W \times (100 - X) \times 100]$$

式中: V_2 - 滴定试样时消耗酸标准溶液的体积

(mL); V_1 - 滴定试样时消耗酸标准溶液的体积 (mL); N - 酸标准溶液的当量浓度; K - 氮换算成粗蛋白质的系数; W - 试样质量 (g); X - 试样水分含量; 0.0140 - 每毫克当量氮的克数。

1.2.8 数据处理 利用 OriginPro 9.0、Design-Expert 8.0.6 Trial 和 SPSS Statistics 17.0.0.236 进行数据处理及分析。

2 结果与分析

2.1 鹰嘴豆脱脂蛋白等电点测定结果

从图 1 可以看出,在所测的 pH 范围内,随着 pH 的增大,上清液的吸光度呈现出先减小后增大的趋势。在 pH 为 4.9 处,上清液的吸光度最小,表明了上清液中所残留的蛋白质浓度最低,该 pH 即为鹰嘴豆蛋白质的等电点。与张涛等^[23]报道的鹰嘴豆分离蛋白等电点 $pI = 5$ 相似。

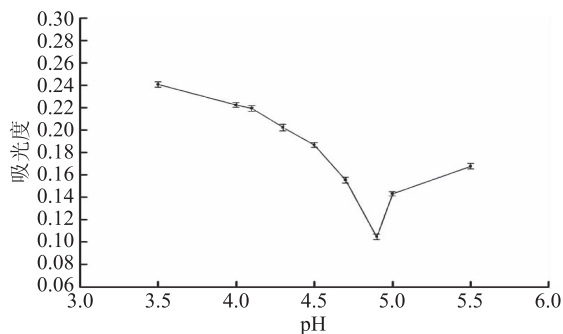


图 1 吸光度随 pH 变化曲线

Fig.1 Absorbency with pH change curves

2.2 单因素试验结果

2.2.1 液料比对鹰嘴豆蛋白质得率的影响 由图 2 可得,蛋白质得率基本在 10.50% 左右,并随着加水量的增加先增大,在液料比为 12:1 mL/g 时得率为最大,达到 10.69%,之后得率逐渐减小。这是由于适当增加液料比有助于增加蛋白质的溶出量,提高得率;但液料比过大,蛋白质分子与水分子之间相互作用增加,使蛋白质分子之间不容易发生聚沉,在酸沉时会导致蛋白质流失到上清液中,反而造成蛋白质损失^[20],从而降低得率。综合考虑,提取鹰嘴豆蛋白质的最佳液料比为 12:1 mL/g。

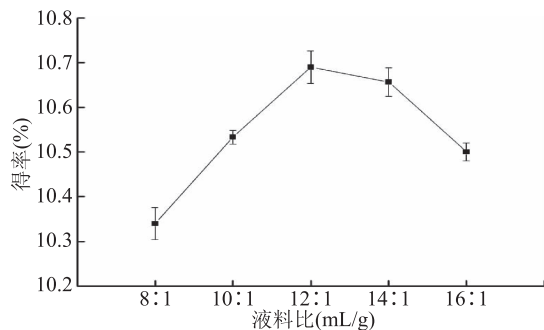


图 2 液料比对鹰嘴豆蛋白质得率的影响

Fig.2 Effect of ratio of water to material on the yield of Chickpea protein

2.2.2 碱溶 pH 对鹰嘴豆蛋白质得率的影响 由图 3 可见,随着 pH 的升高,蛋白质得率逐渐提高,由

10.34% 一直上升到了 12.48%,在碱溶 pH 为 10 时达到峰值。但碱溶 pH 大于 10 时,蛋白质得率急剧下降,这符合一般植物蛋白在不同 pH 下的溶解规律。随着碱溶 pH 的升高,有利于蛋白质在碱性条件下溶解,从而得率升高;但是过高的 pH 会使蛋白质对水的亲和性增加,从而一部分非水溶性蛋白转变为水溶性蛋白,同时,过高的 pH 改变了蛋白质分子表面的带电荷状况,引起脱羧、脱氨、胱赖反应、肽键断裂等^[24],在两个因素的综合作用下导致了高 pH 下蛋白质得率急剧降低。所以最佳碱溶 pH 为 10.0。

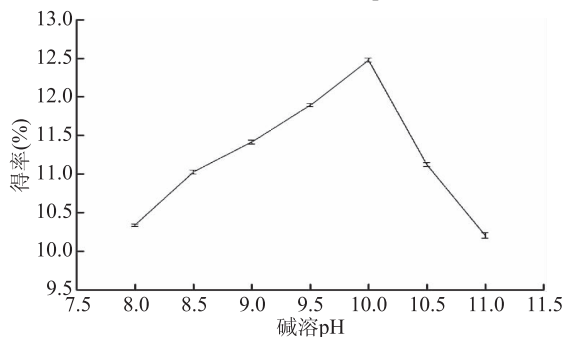


图 3 碱溶 pH 对鹰嘴豆蛋白质得率的影响

Fig.3 Alkali soluble pH value on yield of Chickpea protein

2.2.3 碱溶温度对鹰嘴豆蛋白质得率的影响 由图 4 可知,鹰嘴豆蛋白的得率在碱溶温度较低时随温度的升高而增大,20~30 °C 得率升高明显,由 10.22% 上升到了 11.89%,在 40 °C 时得率达到最高,为 12.04%。继续升高温度时,蛋白得率反而下降,在 60 °C 时降到了 9.04%。得率升高是由于温度增加,蛋白质的分子构象轻微改变,分子的立体结构伸展,有利于蛋白质分子和水分子的运动及其相互作用,温度起到增溶作用^[25]。蛋白质得率从 40 °C 后开始下降,这是因为水分子的热运动加剧使得蛋白质结构展开,维持蛋白质空间构象的次级键被破坏,非极性基团的暴露,导致蛋白质分子间发生聚集和沉淀,造成了得率降低^[26]。因此确定最佳碱溶温度为 40 °C。

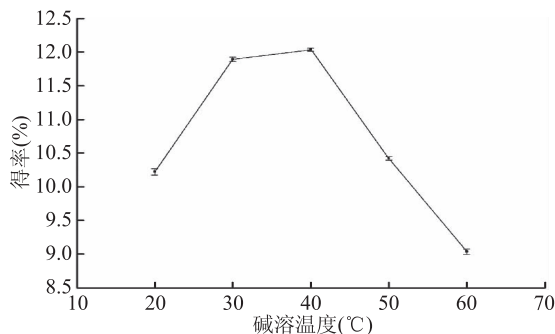


图 4 碱溶温度对鹰嘴豆蛋白质得率的影响

Fig.4 Alkali soluble temperature on yield of Chickpea protein

2.2.4 碱溶时间对鹰嘴豆蛋白质得率的影响 由图 5 可知,在其它条件相同的情况下,蛋白质溶解度会随着时间延长略有增加,碱溶时间从 30 min 增加到 90 min,得率也由 9.04% 增加到了 9.77%。但溶液达到饱和后,增加碱溶时间对蛋白质得率的提高并不是很明显,甚至还略微有所下降,当碱溶时间达

150 min 时,得率又降低至 9.16%。这是由于溶解一定时间后,蛋白的溶出达到饱和,溶出率趋于平衡,若再进一步延长碱溶时间,可能因为长时间的搅拌导致部分蛋白质变性,从而使得率降低,或者是鹰嘴豆淀粉与蛋白质发生结合,导致蛋白质难以溶出^[20]。因此,最佳碱溶时间为得率最高的 90 min。

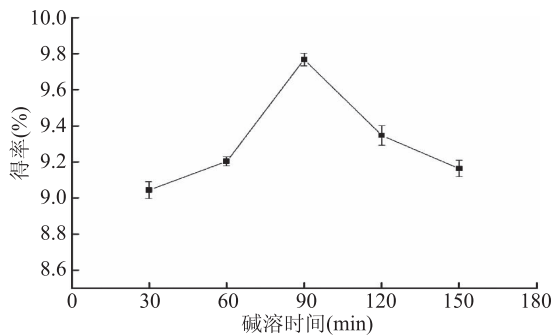


图5 碱溶时间对鹰嘴豆蛋白质得率的影响

Fig.5 Alkali soluble time on yield of Chickpea protein

2.3 响应面实验结果

2.3.1 回归模型的建立及显著性检验 根据单因素试验结果,由 Design-Expert 8.0.6 Trial 统计分析软件设计出的试验方案及结果见表 2。以鹰嘴豆蛋白得率为响应值,以碱溶 pH(A)、液料比(B)、碱溶时间(C)为自变量,建立三因素三水平中心组合试验设计,共包括 17 个试验方案。

对表 2 试验结果进行多元回归拟合,得鹰嘴豆蛋白质得率对 pH(A)、液料比(B)和提取时间(C)的二次多项式回归模型为:

$$Y = -49.32175 + 12.57250A + 1.08912B - 0.14126C + 0.24875AB + 9.91667 \times 10^{-3}AC + 3.33333 \times 10^{-4}BC - 0.83600A^2 - 0.15087B^2 + 2.46111 \times 10^{-4}C^2$$

从表 3 可知,以蛋白质得率为响应值时,模型 $p < 0.0001$,表明该二次方程模型极显著。同时失拟项 $p = 0.0611 > 0.05$,失拟项不显著,说明所得方程与实际拟合中非正常误差所占比例小,可用该回归方

表 2 响应面试验方案及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface experiment

试验号	A	B	C	Y 蛋白得率(%)
1	-1	-1	0	11.90
2	1	-1	0	10.31
3	-1	1	0	10.94
4	1	1	0	11.34
5	-1	0	-1	12.35
6	1	0	-1	11.27
7	-1	0	1	12.03
8	1	0	1	12.14
9	0	-1	-1	12.04
10	0	1	-1	11.85
11	0	-1	1	12.47
12	0	1	1	12.36
13	0	0	0	12.53
14	0	0	0	12.50
15	0	0	0	12.56
16	0	0	0	12.60
17	0	0	0	12.62

程代替实验真实点对实验结果进行分析^[27]。其方程的决定系数 $R^2 = 0.9927$,表明有 99.27% 的数据可用此方程解释。本实验的 CV 值为 0.72%,说明其置信度较高,模型方程能够较好地反映真实的试验值,可用此模型分析响应值的变化^[28-29]。由表 4 还可以看出,A、C、AB、AC、 A^2 、 B^2 、 C^2 对鹰嘴豆蛋白质得率的影响极显著($p < 0.01$),B、BC 对鹰嘴豆蛋白质得率的影响不显著($p > 0.05$)。影响蛋白质得率的主次因素依次为 $A > C > B$,即碱溶 pH > 碱溶时间 > 液料比。

2.3.2 响应曲面分析 由图 6a 可知,碱溶时间为 90 min 时,随着碱溶 pH 的升高,在低液料比下,蛋白质得率呈增大趋势,但在高液料比下,蛋白质得率却

表 3 回归模型及方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	Pr > F	显著性
模型	7.01	9	0.78	105.15	<0.0001	**
A	0.58	1	0.58	78.73	<0.0001	**
B	6.613E-003	1	6.613E-003	0.89	0.3726	
C	0.28	1	0.28	37.46	0.0005	**
AB	0.99	1	0.99	133.65	<0.0001	**
AC	0.35	1	0.35	47.79	0.0002	**
BC	1.600E-003	1	1.600E-003	0.22	0.6562	
A^2	2.94	1	2.94	397.24	<0.0001	**
B^2	1.53	1	1.53	207.01	<0.0001	**
C^2	0.21	1	0.21	27.89	0.0011	**
残差	0.052	7	7.408E-003			
失拟项	0.042	3	0.014	5.81	0.0611	
纯误差	9.680E-003	4	2.420E-003			
总和	7.06	16				

注: * 表示差异显著($p < 0.05$); ** 表示差异极显著($p < 0.01$)。表 5 同。

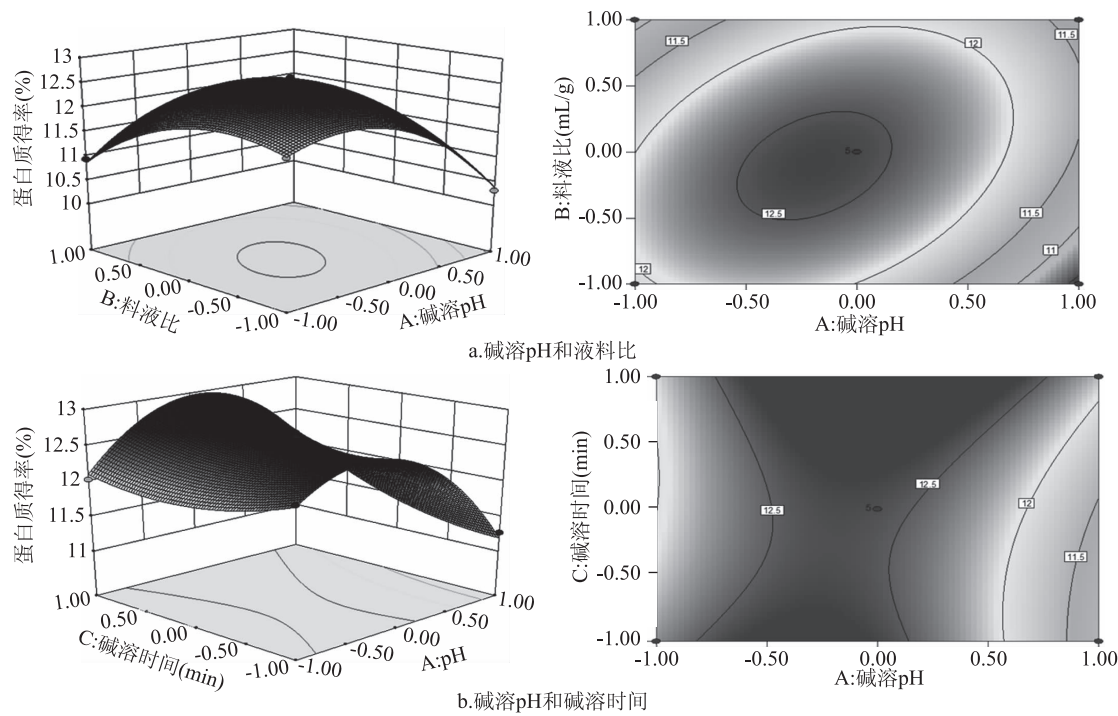


图6 两因素及其交互作用响应面图和等高线图

Fig.6 Response surface and contour plots showing the effects of three process parameters on the extraction rate of chickpea protein
注:固定水平:碱溶 pH10,液料比 12:1 mL/g,碱溶时间 90 min。

呈现出下降趋势,这与液料比与 pH 之间负交互作用高度显著有关。由图 6b 可以看出,液料比为 12:1 mL/g,在碱溶时间为较低水平时,蛋白质得率随着 pH 升高呈先升高后降低趋势。

2.3.3 验证实验 通过软件分析计算得出理论最佳提取工艺:碱溶 pH10.02,液料比 12.00:1 mL/g 和碱溶时间 120.00 min,鹰嘴豆蛋白理论得率可达 12.97%。进行验证实验时,为方便实际操作将碱溶 pH 定为 10,其余条件不变,对优化参数进行 3 次平行验证实验,得鹰嘴豆蛋白平均得率为 $12.66 \pm 0.14\%$,与理论值相差 2.39%,误差较小说明实验可行。

2.4 与已知优化方法的比较

周丽卿等^[20]对新疆鹰嘴豆进行过蛋白质提取条件的优化,与本优化条件差异明显。本优化条件中的液料比和碱溶 pH 分别为 12.00:1 mL/g 与 10.00,相较于参考方法中的 17.70:1 mL/g 与 11.00 明显降低;而本优化条件中的碱溶温度和碱溶时间分别为 40 ℃ 与 120.00 min,则显著高于参考方法中的 20 ℃ 与 88.40 min。所以,本研究参考周丽卿等的最佳优化参数对云南卡布里鹰嘴豆进行了三次蛋白质提取的重复实验,同时将冷冻干燥得到的蛋白晶体研磨成粉后,测定了蛋白粉中的粗蛋白含量来验证其纯度,就蛋白质得率与蛋白粉纯度与本研究中的优化方法

进行比较,结果如表 5 所示。

如表 5 所示,仅从蛋白质得率来看,本法的得率 ($12.66\% \pm 0.14\%$) 要低于参考方法 ($14.64\% \pm 0.30\%$),差异极显著 ($p = 0.003 < 0.01$)。但是从所得蛋白粉的纯度来看,经本法所提取的云南卡布里鹰嘴豆蛋白粉纯度 ($77.82\% \pm 0.53\%$) 高于按照参考方法所提的蛋白质纯度 ($69.86\% \pm 1.57\%$),差异极显著 ($p = 0.007 < 0.01$)。

用本优化条件与周丽卿等人报道的方法^[20]相比较,发现两地的鹰嘴豆蛋白质等电点并不相同,这可能是由于选择鹰嘴豆的来源不同,周丽卿等用的是来自新疆的鹰嘴豆,而本研究中的鹰嘴豆来源于云南文山州,两地土壤、光照等生长条件的不同可能导致鹰嘴豆籽粒中蛋白质类型的不同,最终造成两地鹰嘴豆蛋白质等电点的不同。采用本法提取鹰嘴豆蛋白,其得率略低于参考方法,但本方法得到的蛋白质纯度却显著高于参考方法所得的蛋白质纯度。本法与参考方法相比,所用的酸沉 pH 较高,本法为 4.9,参考方法为 4.3。在酸沉过程中不可避免地会引入少量淀粉等杂质。不同的酸沉 pH 使沉淀过程中引入杂质的量不同。而本法所用的最佳碱溶 pH 较低,只有 10,而参考方法中所用的碱溶 pH 达到了 11。过高的 pH 条件会引起蛋白质的变性。这可能是导致本法蛋白质得率略低但是所提蛋白粉纯度较

表5 蛋白质得率与蛋白粉纯度比较

Table 5 Comparison of yield and purity of protein powder in different optimization parameters

	本法	参考方法	Pr > F	显著性
蛋白质得率 (%)	12.66 ± 0.14	14.64 ± 0.30	0.003	**
蛋白粉纯度 (%)	77.82 ± 0.53	69.86 ± 1.57	0.007	**

高的原因。

3 结论

本试验确定了云南文山的卡布里品种鹰嘴豆总蛋白的等电点为4.9,可以为进一步测定云南卡布里品种鹰嘴豆中清蛋白和球蛋白的等电点提供依据。并通过 Box-Behnken 设计,建立了碱溶酸沉法云南卡布里鹰嘴豆蛋白提取工艺参数的二次多项式数学模型,经检验该模型是合理可靠的,能够比较准确地预测鹰嘴豆蛋白的得率。碱溶酸沉法工艺参数中碱溶 pH、碱溶时间对鹰嘴豆蛋白得率有极显著影响($p < 0.01$),各因素影响主次顺序为碱溶 pH > 碱溶时间 > 液料比。完成了对碱溶酸沉法条件的优化,确定了最佳工艺为 40 ℃ 条件下液料比 12:1 mL/g、碱溶 pH10、碱溶时间 120 min,此时蛋白得率可达 12.66% ± 0.14%,与理论值相差 2.39%。

本文所得到的工艺参数具有针对性,既可以充分提取云南卡布里鹰嘴豆中的蛋白质,又可以得到较高纯度的蛋白粉,并用于鹰嘴豆蛋白质的进一步研究,如功能肽的提取等;也可以用于食用蛋白粉的工业化生产,产生经济效益,有助于推广鹰嘴豆在云南地区进一步种植。

参考文献

- [1] 聂石辉,彭琳,王仙,等.鹰嘴豆种质资源农艺性状遗传多样性分析[J].植物遗传资源学报,2015,16(1):64-70.
- [2] Zhang J J, Yang X, Guo C, et al. *Mesorhizobium muleiense*, and *Mesorhizobium* gsp. nov. are symbionts of *Cicer arietinum* L. in alkaline soils of Gansu, Northwest China[J]. Plant & Soil, 2017, 410(1-2):103-112.
- [3] Archak S, Tyagi R K, Harer P N, et al. Characterization of chickpea germplasm conserved in the Indian National Genebank and development of a core set using qualitative and quantitative trait data[J]. The Crop Journal, 2016, 4(5):417-424.
- [4] Yilmaz D, Sagiroglu H C. Development of measurement system for grain loss of some chickpea varieties[J]. Measurement, 2015, 66:73-79.
- [5] Zia-Ul-Haq M, Khan B A, Landa P, et al. Platelet aggregation and anti-inflammatory effects of garden pea, Desi chickpea and Kabuli chickpea[J]. Acta Polonica Pharmaceutica, 2012, 69(4):707-711.
- [6] Singh P K, Shrivastava N, Chaturvedi K, et al. Characterization of seed storage proteins from chickpea using 2D electrophoresis coupled with mass spectrometry[J]. Biochemistry Research International, 2016, 2016(12):1049462.
- [7] 石庆华,王希东,张桦,等.鹰嘴豆种子蛋白分析[J].新疆农业科学,2009,46(3):516-520.
- [8] 李芳,董聪,王琳,等.酶解条件对鹰嘴豆多肽抗氧化活性的影响[J].食品工业,2015,36(8):9-12.
- [9] 施文卫,王伟,胡冰,等.胰蛋白酶制备鹰嘴豆抗氧化肽的条件优化[J].食品科学,2016,37(15):185-191.
- [10] 尉万聪,赵宪争,刘玉堂,等.鹰嘴豆肽脱苦脱色研究[J].食品科技,2013,38(6):85-88.
- [11] Cobos M J, Rubio J, Fernández-Romero M D, et al. Genetic analysis of seed size, yield and days to flowering in a chickpea recombinant inbred line population derived from a Kabuli × Desi cross[J]. Annals of Applied Biology, 2010, 151(1):33-42.
- [12] 张金波,苗昊翠,王威,等.鹰嘴豆的应用价值及其研究与利用[J].作物杂志,2011(1):10-12.
- [13] 张俊杰.新疆鹰嘴豆根瘤菌的生物学特征研究[D].北京:中国农业大学,2013.
- [14] 金秋阳,刘鑫宇,胡晶红.蛋白质的提取、分离与纯化研究进展[J].山东化工,2017,46(14):35-38.
- [15] 范维江,王丽斌,王立东,等.大豆蛋白提取工艺参数的研究[J].山东商业职业技术学院学报,2015,15(5):57-58, 112.
- [16] 张涛.鹰嘴豆分离蛋白的制备及其功能性质研究[D].无锡:江南大学,2005.
- [17] 周丽卿,杜双奎,赵佳,等.响应面法优化鹰嘴豆蛋白提取工艺[J].食品科学,2012,33(8):66-70.
- [18] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.6-2003 食品中脂肪的测定[S].北京:中国标准出版社,2003:45-46.
- [19] 崔竹梅,王红玲,张占琴,等.鹰嘴豆籽粒清蛋白和球蛋白等电点、相对分子量的测定[J].干旱地区农业研究,2007, 25(6):89-95.
- [20] 周丽卿.鹰嘴豆多肽的制备及其改性研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2012.
- [21] 李桂菊,王小强,何启刚,等.碱溶时间对大豆蛋白提取率和得率的影响[J].安徽农业科学,2011,39(4):2292-2293, 2296.
- [22] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. GB 5009.5-2016 食品安全国家标准,食品中蛋白质的测定[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [23] 张涛,江波,王璋.鹰嘴豆分离蛋白质的功能性质[J].食品科技,2005(4):19-22.
- [24] 李淑芬.碱溶酸沉法提取大豆蛋白条件的优化[J].大豆科学,2014,33(2):274-276,280.
- [25] 刘珊,刘晓艳.热变性对蛋白质理化性质的影响[J].中国食品添加剂,2006(6):108-112.
- [26] 吴桂玲,刘立品,李文浩,等.碱溶酸沉法提取青稞蛋白质的工艺研究[J].食品研究与开发,2015(5):19-24.
- [27] 白雨鑫,郭斌,韩冠英,等.罗摩果壳多糖提取工艺优化及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2015,36(20):278-283.
- [28] 李莉,张赛,何强,等.响应面法在试验设计与优化中的应用[J].实验室研究与探索,2015,34(8):41-45.
- [29] 林建原,季丽红.响应面优化银杏叶中黄酮的提取工艺[J].中国食品学报,2013,13(2):83-90.