

# 均匀设计优化碱法提取银杏蛋白工艺

贾韶千, 吴彩娥\*, 范龚健, 李婷婷, 彭方仁  
(南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

**摘要:** 为提高银杏蛋白的提取率, 通过碱法提取银杏种仁中的蛋白质, 以蛋白质的提取量为指标, 采取混合水平均匀设计研究提取时间、料液比和 NaOH 溶液质量分数 3 个因素对银杏蛋白提取效果的影响, 通过二次多项式逐步回归分析获得最佳组合。结果表明: 最佳工艺条件为: 提取时间 12 h、料液比 1:26、NaOH 溶液质量分数 0.2%, 提取量为 99.99 mg/g, 提取率达到了 89.14%。超氧阴离子自由基清除率为 38.83%, 还原能力  $A_{700}$  为 0.807, 表明碱法提取的银杏蛋白具有良好的抗氧化性, 可进一步加工利用。

**关键词:** 均匀设计; 提取; 银杏; 蛋白

## Uniform Design Optimization of Alkali Extraction of Protein from *Ginkgo biloba* L. Seeds

JIA Shao-qian, WU Cai-e\*, FAN Gong-jian, LI Ting-ting, PENG Fang-ren  
(College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

**Abstract:** In order to maximize protein extraction from *Ginkgo biloba* L. seeds with NaOH solution, a mixed-level uniform design was employed to investigate the effects of time, solid-to-liquid ratio and NaOH concentration on the yield of protein extract. Through quadratic polynomial stepwise regression analysis, the optimum extraction conditions were determined as follows: extraction time 12 h, solid-to-liquid ratio 1:26, NaOH concentration 0.2%. Under such conditions, the yield of protein extract obtained from *Ginkgo biloba* L. seeds was 99.99 mg/g, and the recovery of protein was 89.14%. The extract obtained showed a superoxide anion free radical scavenging rate of 38.83% and a reducing power  $A_{700}$  of 0.807, thereby having excellent antioxidant effect and being worth further processing and utilizing.

**Key words:** uniform design; extraction; *Ginkgo biloba* L.; protein

中图分类号: S664.3; TS255.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)10-0018-03

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科银杏属多年生落叶乔木, 在我国种植相当广泛, 而且品种很多, 《中国果树志·银杏卷》记载了 46 个品种<sup>[1]</sup>。银杏种仁(俗称白果)营养丰富, 碳水化合物含量约为 38.2%、蛋白质 13%、脂肪 2.4%、粗纤维 1.2%, 此外还含有黄酮类、多糖类、酚类、氨基酸、白果酸、银杏内酯、微量元素等成分<sup>[1-3]</sup>。银杏种仁中蛋白质以清蛋白和球蛋白为主, 而且具有许多功能作用, 如抗氧化<sup>[4-6]</sup>、抑菌<sup>[7-8]</sup>、抗肿瘤<sup>[9]</sup>、抗衰老<sup>[10]</sup>和免疫调节<sup>[11-12]</sup>等。因此, 从银杏种仁中提取蛋白质并进一步开发利用, 可以有效利用银杏资源, 带来更高的产品附加值, 从而带动银杏产业的发展。

制备蛋白的方法有碱法制备、酶法制备、以及有机溶剂法制备等。碱法制备得到的蛋白具有良好的起

性、持水性等功能特性, 更适合应用于食品加工中<sup>[13]</sup>。黄文等<sup>[4,8,14]</sup>主要研究了白果蛋白的功能性质, 均未对提取工艺进行研究。李莹莹等<sup>[15]</sup>通过 Tris-HCl 法对白果蛋白进行提取, 得到了 Tris-HCl 法提取白果蛋白的工艺, 但提取率较低, 仅为 75.01%。因此, 通过合理的试验方法优化银杏蛋白的提取工艺十分必要。

均匀设计是基于试验点在整个试验范围内均匀散布的从均匀性角度出发的一种试验设计方法, 特别适合于多因素、多水平的试验, 其试验次数比正交设计明显减少。均匀设计现已成功应用于国防科技和国民经济的诸多领域, 如航天、船舶、化工、电子、机械、建筑、食品、农业、医药等<sup>[16-17]</sup>。

本实验将均匀设计应用于碱法提取银杏种仁蛋白, 确定碱法提取银杏种仁蛋白的最佳工艺。试验获得的银

收稿日期: 2010-10-28

基金项目: 教育部博士点基金项目(200802980004); 国家自然科学基金项目(30872055);

江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(CX10B\_244Z)

作者简介: 贾韶千(1983—), 男, 博士, 研究方向为林产食品资源加工与利用。E-mail: qian12358@163.com

\*通信作者: 吴彩娥(1963—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品活性物质分离纯化。E-mail: sxwucaie@163.com

杏蛋白可进一步加工利用,如酶解制得生物活性多肽等,为银杏的深加工产业提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

银杏:采自江苏泰兴市,品种为大佛指。

氢氧化钠、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯高铁、磷酸二氢钠和磷酸氢二钠等均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

LGJ25 冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂;BS 210S 型天平 赛多利斯科学仪器有限公司;TU-1800PC 型紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;电热鼓风干燥箱 南京盈鑫实验仪器有限公司;PB-21 型酸度计 北京赛多利斯天平有限公司;2-16K 型冷冻高速离心机 德国 Sigma 公司。

### 1.3 银杏蛋白的提取

银杏种仁经过冷冻干燥,粉碎,超临界  $\text{CO}_2$  流体萃取法脱脂,得到银杏种仁粉末。分别称取银杏粉末 15.0g,置于 500mL 烧杯中,配制不同质量分数的 NaOH 溶液,按一定的料液比与银杏种仁粉末混合,置于 4℃ 冰箱中提取,每 30min 搅拌 1 次(以保证提取液与物料充分接触,达到较好的提取效果)。提取完成后,3000r/min 离心 15min,取上清液,调整 pH 值到 4.62(等电点),5000r/min 离心 20min,沉淀即为银杏蛋白。

### 1.4 均匀试验设计

试验选取料液比、提取时间和 NaOH 溶液质量分数 3 个因素,采用  $U_{12}(12^2 \times 6)$  均匀设计试验法,对银杏蛋白的最佳提取工艺进行优化。

### 1.5 验证实验

通过回归方程分析,得出最佳的工艺条件,根据最优条件进行实验,重复 3 次,实验结果与最佳理论值进行对比。

### 1.6 蛋白质含量的测定

微量凯氏定氮法<sup>[18]</sup>,用于测定试验原料的总蛋白质含量。

考马斯亮蓝法<sup>[19]</sup>:牛血清蛋白为标准蛋白,考马斯亮蓝 G250 染色,做标准曲线方程为  $Y=7.8286X+0.0119$ ,  $R^2=0.9991$ 。

$$\text{蛋白质提取率}/\% = \frac{\text{提取液中蛋白质含量}}{\text{实验原料中蛋白质含量}} \times 100$$

### 1.7 蛋白质活性验证

采用超氧阴离子自由基清除率<sup>[20]</sup>和还原能力<sup>[21]</sup>测定蛋白质的抗氧化性,以 Tris-HCl 法<sup>[18]</sup>提取的蛋白质做对照。

### 1.8 数据分析

试验数据采用 DPS 统计软件进行分析。

## 2 结果与分 析

### 2.1 均匀设计对提取工艺的优化

以蛋白提取量为指标进行均匀试验设计,蛋白提取量为每克银杏种仁粉末提取所得到的蛋白质质量。碱法提取银杏蛋白的均匀试验结果见表 1。

表 1  $U_{12}(12^2 \times 6)$  均匀试验设计与结果( $CD_2=0.1604$ )

Table 1 Uniform design matrix and experimental results

试验号	$X_1$ 提取时间/h	$X_2$ 料液比	$X_3$ NaOH 溶液质量分数/%	蛋白提取量/(mg/g)
1	1(4)	6(1:14)	4(0.20)	72.09
2	2(5)	12(1:26)	2(0.10)	84.39
3	3(6)	5(1:12)	6(0.30)	74.97
4	4(7)	11(1:24)	3(0.15)	83.72
5	5(8)	4(1:10)	1(0.05)	46.76
6	6(9)	10(1:22)	5(0.25)	86.86
7	7(10)	3(1:8)	2(0.10)	56.93
8	8(11)	9(1:20)	6(0.30)	84.08
9	9(12)	2(1:6)	4(0.20)	60.02
10	10(13)	8(1:18)	1(0.05)	64.17
11	11(14)	1(1:4)	5(0.25)	46.65
12	12(15)	7(1:16)	3(0.15)	82.59

通过 DPS 软件建立多元回归模型,采用二次多项式逐步回归,获得提取银杏蛋白的回归方程:  $Y=20.880+2.423X_2+16.293X_3-1.573X_3^2+0.199X_1X_2-0.312X_1X_3$ 。

回归方程相关系数  $R=0.974$ ,  $F=22.087(P=0.0008<0.01)$ ; Durbin-Watson 统计量  $d$  为 2.061,接近 2。对回归方程各因素进行通径分析,决定系数为 0.948、剩余通径系数为 0.227,说明通径分析成立。综合分析结果表明上述回归方程可以反映多元线性回归模型,回归分析有效。

表 2 各因素的显著性检验

Table 2 Significance of each variable term in the fitted regression equation for the yield of protein extract

	$X_2$	$X_3$	$X_3^2$	$X_1X_2$	$X_1X_3$
偏相关	0.840	0.828	-0.746	0.696	-0.630
$t$ 值	3.794	3.613	2.746	2.376	1.986
$P$ 值	0.007	0.009	0.029	0.049	0.087

从回归方程可以看出,  $X_1$  项未被选入方程,说明该因素(提取时间)对蛋白的提取量无显著性影响。表 2 的显著水平检验表明  $X_2$ (料液比)、 $X_3$ (NaOH 溶液质量分数)两个因素对蛋白的提取量影响显著,且料液比的影响大于 NaOH 溶液质量分数。提取时间和料液比的交互影响达到了显著水平,提取时间和 NaOH 溶液质量分数之间也存在交互作用,但影响不显著。

### 2.2 最佳提取条件的验证

通过回归方程模拟, 获得碱法提取银杏蛋白的最佳理论组合为  $X_1=9$ 、 $X_2=12$ 、 $X_3=4.034$ , 即提取时间 12h、料液比 1:26、NaOH 溶液质量分数 0.2%。在此工艺条件下, 银杏蛋白提取量为 103.61mg/g。

为进一步验证最佳理论组合的有效性, 根据优化后的工艺参数提取银杏蛋白, 实验重复 3 次, 蛋白提取量为 99.99mg/g, 提取率达到了 89.14%。结果与回归方程计算结果相近, 且高于均匀设计各组合。试验结果说明由均匀设计经多元回归分析所获得的最佳理论组合可以应用于碱法提取银杏蛋白。

### 2.3 蛋白质活性验证

分别采用碱法和 Tris-HCl 法<sup>[18]</sup>从银杏种仁中提取蛋白, 通过清除超氧阴离子自由基和还原能力测定比较这两种方法所提取蛋白的抗氧化性, 结果见图 1、2。从图 1、2 可以看出, 碱法提取的蛋白清除超氧阴离子的能力略高于 Tris-HCl 法, 但还原能力却略低于 Tris-HCl 法, 两种方法提取的银杏蛋白的抗氧化性没有显著性差异。

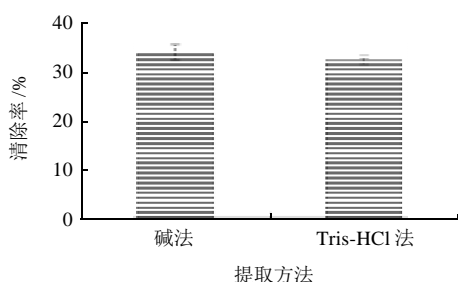


图 1 清除超氧阴离子自由基活性比较

Fig.1 Comparison of superoxide anion scavenging activity of *G. biloba* L. seed proteins extracted by the method and Tris-HCl

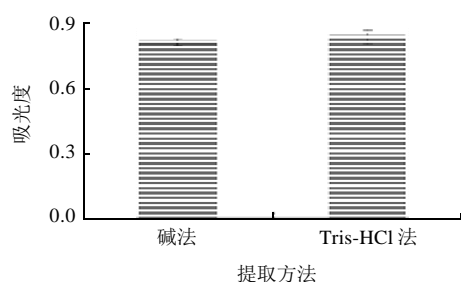


图 2 还原能力比较

Fig.2 Comparison of reducing power of *G. biloba* L. seed proteins extracted the method and Tris-HCl

## 3 结 论

采用  $U_{12}(12^2 \times 6)$  均匀设计表, 用 12 次试验对 2 个

因素的 12 个水平和 1 个因素的 6 个水平进行考察, 最终通过二次多项式逐步回归分析得到了最佳的工艺参数。试验确定的碱法提取银杏蛋白的最佳工艺为提取时间 12h、料液比 1:26、NaOH 溶液质量分数 0.2%, 在此条件下, 蛋白质的提取量为 99.99mg/g, 提取率达到了 89.14%。碱法提取的银杏蛋白保留了良好的抗氧化性, 为进一步酶解制备银杏抗氧化肽提供了实验基础。

### 参考文献:

- [1] 曹福亮. 中国银杏志[M]. 北京: 中国林业出版社, 2007.
- [2] 王琴, 温其标. 银杏种仁中活性成分及其药理作用的研究进展[J]. 现代食品科技, 2006, 22(1): 164-167.
- [3] SMITH V J, LUO Y. Studies on molecular mechanisms of *Ginkgo biloba* extract[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64(3): 465-472.
- [4] 黄文, 谢笔钧, 王益, 等. 白果蛋白质的分离, 纯化理化特性及其抗氧化活性研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(10): 1537-1543.
- [5] HUANG Wen, DENG Qianchun, XIE Bijun. Purification and characterization of an antioxidant protein from *Ginkgo biloba* seeds[J]. Food Research International, 2010, 43(1): 86-94.
- [6] 黄文, 谢笔钧, 姚平, 等. 白果活性蛋白的抗生物氧化作用研究[J]. 营养学报, 2002, 24(2): 192-194.
- [7] 牛卫宁, 郭嵩光. 银杏种仁中抗菌蛋白的纯化及性质[J]. 西北植物学报, 2003, 23(9): 1545-1549.
- [8] 黄小炯, 区子丹, 王琴. 银杏抗菌蛋白的提取及其抗菌性研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(10): 139-145.
- [9] 邓乾春, 黄文, 谢笔钧. 白果清蛋白抑制肿瘤活性及其机制的初步研究[J]. 营养学报, 2006, 28(3): 259-262.
- [10] 邓乾春, 汪兰, 吴佳, 等. 一种白果清蛋白的抗衰老活性研究[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(3): 352-357.
- [11] 邓乾春, 段会轲, 谢笔钧, 等. 白果清蛋白对免疫功能低下小鼠的调节作用[J]. 食品科学, 2006, 27(6): 195-199.
- [12] 邓乾春, 唐瑛, 黄文, 等. 白果清蛋白的免疫调节活性研究[J]. 食品科学, 2006, 27(3): 219-223.
- [13] 孙雁, 任发政, 范金波, 等. 碱法制备蚕蛹蛋白浸提条件的优化[J]. 农业工程学报, 2009, 25(2): 285-289.
- [14] DENG Qianchun, WANG Lan, WEI Fang, et al. Functional properties of protein isolates, globulin and albumin extracted from *Ginkgo biloba* seeds[J]. Food Chemistry, 2011, 124(4): 1458-1465.
- [15] 李莹莹, 吴彩娥, 杨剑婷, 等. 白果蛋白质提取及 SDS-PAGE 分析[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 36-40.
- [16] 方开泰, 王元. 数论方法在统计中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1996: 5-36.
- [17] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 1-30.
- [18] GB/T 5009.5—2003 食品中蛋白质的测定[S].
- [19] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Ana Biochem, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [20] 李艳红. 鹰嘴豆蛋白酶解物的制备及其抗氧化肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [21] ZHU Kexue, ZHOU Huiming, QIAN Haifeng, et al. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase[J]. Process Biochem. 2006, 41(6): 1296-1302.