

响应面法优化鹰嘴豆蛋白提取工艺

周丽卿, 杜双奎*, 赵 佳, 杨红丹

(西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 以脱脂鹰嘴豆粉为材料, 采用碱溶酸沉法提取鹰嘴豆蛋白, 利用单因素试验和响应面法对鹰嘴豆蛋白的提取工艺条件进行分析与优化。结果表明, 碱溶酸沉工艺参数对鹰嘴豆蛋白提取率有显著影响, 因素影响主次顺序为 pH 值>液料比>提取时间。鹰嘴豆蛋白碱溶酸沉提取优化工艺参数: pH11.0、液料比 17.7:1(mL/g)、提取时间 88.4min、提取温度 20℃, 蛋白提取率达到 82.33%。所得鹰嘴豆蛋白提取回归模型高度显著($R^2 = 0.9630$), 拟合性好, 可用于预测蛋白提取率。

关键词: 鹰嘴豆蛋白; 工艺参数; 响应面优化

Optimization of Chickpea Protein Extraction Using Response Surface Methodology

ZHOU Li-qing, DU Shuang-kui*, ZHAO Jia, YANG Hong-dan

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: The purpose of the present study was to optimize alkali protein extraction from defatted chickpea using one-factor-at-a-time method and response surface methodology. The results showed that all investigated parameters had a notable effect on the extraction yield of chicken protein and could be ranked in decreasing order of importance in their effects as follows: pH > liquid-to-material ratio > extraction time. The optimal extraction parameters were pH 11.0 and 17.7:1 (mL/g) of liquid-to-material ratio for 88.4 min of extraction at 20 °C, resulting in an extraction yield of 82.33%. The established regression model describing the extraction yield of chicken protein as a function of three extraction parameters was highly significant ($R^2 = 0.9630$). The predictive and experimental results were found to be in good agreement. Thus, the model was applicable for the prediction of protein yield.

Key words: chickpea protein; process parameters; response surface optimization

中图分类号: TS214.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)08-0066-05

鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L), 属野豌豆族^[1], 为一年生或多年生草本植物, 是豆科植物中的稀有品种, 因其种子外形独特, 类似鹰嘴而被称为鹰嘴豆。鹰嘴豆耐干旱、耐贫瘠, 主要分布在温暖而又比较干旱的地区, 如印度、巴基斯坦、墨西哥等。20 世纪 80 年代在我国新疆、甘肃、青海、云南等地试种, 是世界第二大消费豆类, 产量居世界豆类第二^[2-3]。近几年, 我国鹰嘴豆产量成倍增长, 具有“鹰嘴豆之乡”之称的新疆木垒县目前已经形成了 10 万亩的鹰嘴豆种植面积, 占我国鹰嘴豆种植面积的 83%。植物蛋白是人类所需蛋白质的重要来源之一, 是解决当前世界人口日益膨胀问题的一种新的食物蛋白来源^[4]。鹰嘴豆蛋白含量

因种的不同而有较大差异, 在 15%~30% 之间。鹰嘴豆蛋白是一种低过敏性、高生物效价的优质植物蛋白质, 蛋白质功效比值、氨基酸含量和消化率等均优于其他豆类, 如木豆、绿豆^[5-6], 被誉为“黄金豆”、“珍珠果仁”。我国平均每人每天摄入的蛋白质含量约为 80g, 相比发达国家, 我国蛋白质的摄入量还处在较低水平^[7]。鹰嘴豆蛋白作为一种新型植物蛋白资源, 开发利用鹰嘴豆蛋白对缓解我国蛋白质资源紧张有重要意义。

目前, 有关鹰嘴豆的研究主要集中在对其药理作用的探讨^[1,8-9], 而对鹰嘴豆蛋白资源综合利用报道较少。本研究以鹰嘴豆为原料, 采用碱溶酸沉法提取蛋白质,

收稿日期: 2011-04-09

基金项目: 陕西省科技厅科技攻关项目(2008K01-02)

作者简介: 周丽卿(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为杂豆开发与利用。E-mail: zhouliqingisagirl@yahoo.com.cn

* 通信作者: 杜双奎(1972—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为杂粮资源开发与利用。

E-mail: dushuangkui@nwsuaf.edu.cn

研究提取工艺, 优化工艺参数, 旨在为鹰嘴豆蛋白的提取及综合开发利用提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鹰嘴豆 新疆大龙王食品有限责任公司; G-250 考马斯亮蓝 科邦生物公司; 石油醚(30~60℃) 天津博迪化工股份有限公司。

1.2 仪器与设备

UV mini-1240 型紫外分光光度计 日本岛津公司; KJELTEC2100 型半自动凯式定氮仪 瑞典富斯-特卡托公司; PHS-3C 型精密 pH 计 上海精密科学仪器有限公司; HJ-3 型数码恒温磁力搅拌器 福州精科仪器仪表有限公司; KDC-40 型低速离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 原料预处理

豆粉制备: 用水浸泡鹰嘴豆过夜, 捞去杂物, 沥去水分, 采用手工去皮, 40℃烘干后, 高速粉碎机粉碎, 过 80 目筛, 装自封袋 4℃保存备用。

豆粉脱脂: 取 4L 石油醚加入到 2kg 豆粉中, 室温下连续搅拌 60min, 豆粉自然沉降与上层有机溶剂分离, 倾出有机溶剂进行回收, 沉淀豆粉再加石油醚重复上述操作 2 次。随后将鹰嘴豆粉置于通风橱中室温干燥 12h, 将处理好的脱脂豆粉装自封袋中 4℃保存、备用。

1.3.2 鹰嘴豆蛋白的提取

采用碱溶酸沉法提取鹰嘴豆蛋白^[10]。

工艺步骤: 脱脂鹰嘴豆粉→碱溶、浸提→离心→等电点沉淀→洗涤→低温干燥→鹰嘴豆蛋白。

1.3.3 鹰嘴豆蛋白等电点测定

采用紫外分光光度法测定^[10]。

1.3.4 鹰嘴豆总蛋白含量测定

按 GB/T 5511—2008《谷物和豆类氮含量测定和粗蛋白质含量计算: 凯氏法》方法进行^[11]。

1.3.5 鹰嘴豆提取的蛋白含量测定

采用考马斯亮蓝法^[12]。考马斯亮蓝法测定蛋白质含量的标准曲线方程为: $A = 0.0066C - 0.0002$, $R^2 = 0.9987$ (其 A 为吸光度, C 为蛋白质质量浓度/(μg/mL)), 表明在一定范围内, 蛋白质质量浓度与吸光度呈线性关系。

样品蛋白含量测定: 用 2mol/L NaOH 溶液将碱溶酸沉法提取得到的蛋白质溶解, 定容至 25mL。吸取 10μL 蛋白液, 测定其蛋白含量, 再换算成 25mL 蛋白液中的蛋白含量即为提取的蛋白含量。

$$\text{鹰嘴豆蛋白提取率/\%} = \frac{\text{提取的蛋白含量}}{\text{豆粉总蛋白质量}} \times 100$$

1.3.6 鹰嘴豆蛋白提取单因素试验

以提取鹰嘴豆蛋白的 pH 值、液料比、时间、温度为试验因素, 以鹰嘴豆蛋白提取率作为试验指标, 分别做单因素试验, 以分析各因素对鹰嘴豆蛋白提取率的影响。

1.3.7 鹰嘴豆蛋白质提取工艺的响应面试验

在单因素试验的基础上, 选取提取 pH 值、提取液料比、提取时间为试验因素, 以蛋白提取率为响应指标, 设计 Box-Behnken 试验。

2 结果与分析

2.1 鹰嘴豆蛋白等电点的确定

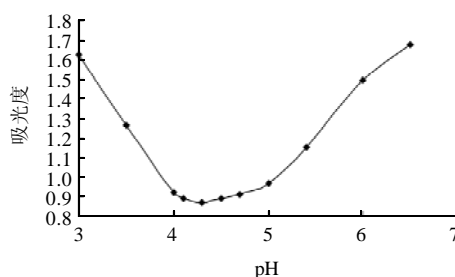


图1 吸光度随 pH 值变化曲线

Fig.1 Absorbance of extract supernatant of chickpea with pH

由图 1 可以看出, 随着 pH 值变化, 上清液的吸光度先减小后增大。当 pH4.3 时, 上清液的吸光度最小, 表明上清液中残留的蛋白质含量最少, 此时, 体系 pH 值为蛋白质的等电点, 蛋白质净的正、负电荷数总和为零, 蛋白质-蛋白质间静电排斥作用降低而聚合沉淀。表明鹰嘴豆蛋白质的等电点 $pI = 4.30$, 这与 Boye 等^[13]报道的鹰嘴豆蛋白的 pI 值一致。

2.2 鹰嘴豆蛋白提取工艺单因素试验

2.2.1 pH 值的选择

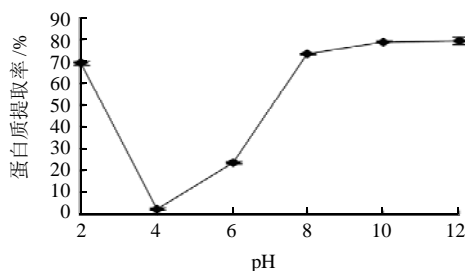


图2 pH 值对鹰嘴豆蛋白提取率的影响

Fig.2 Effect of pH on extraction rate of chickpea protein

在提取温度 20℃、液料比 10:1、提取时间 60min 条件下, pH 值对鹰嘴豆蛋白提取率的影响结果见图 2。

从图 2 可以看出, pH 值对鹰嘴豆蛋白质提取率有显著影响。随着浸提溶液 pH 值升高, 提取率呈上升趋势, 碱性条件下的提取率显著高于酸性条件下, pH10~12 提取率差异不显著, 这与一般植物蛋白在不同 pH 值下的溶解规律一致, 但 pH 值过高会导致蛋白质发生不利的化学反应, 如影响产品色泽, 形成有毒的缩和氨基酸, 从而降低蛋白质食用价值^[14]。综合考虑, 选择 pH 值范围为 9~11。

2.2.2 液料比的确定

在提取温度 20℃、pH8.0、提取时间 60min 条件下, 液料比对鹰嘴豆蛋白提取率的影响结果见图 3。

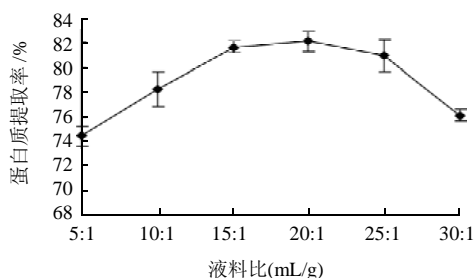


图 3 液料比对鹰嘴豆蛋白质提取率的影响

Fig.3 Effect of liquid/material ratio on extraction rate of chickpea protein

从图 3 可知, 当液料比在 5:1~20:1 变化时, 随着提取溶剂比例的增加, 提取率增大。但当液料比继续增加时, 蛋白质提取率下降。因为适当增大液料比, 有利于蛋白质的充分溶出, 而使提取率增大^[15-16]。但液料比过大, 使得蛋白质分子与水分子之间的相互作用增加, 使得蛋白质分子不容易沉淀, 在酸沉时会导致蛋白质流失到上清液, 反而造成蛋白质损失^[17]。因此, 合适液料比为 20:1。

2.2.3 提取时间的选择

在提取温度 20℃、pH8.0、液料比 10:1 条件下, 提取时间对鹰嘴豆蛋白提取率的影响结果见图 4。

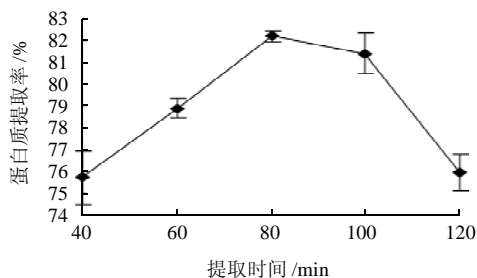


图 4 提取时间对鹰嘴豆蛋白质提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on extraction rate of chickpea protein

由图 4 可知, 随着提取时间延长, 蛋白质提取率呈现先增加后降低趋势, 当提取时间为 80min, 鹰嘴豆蛋白的提取率达到最大。分析原因可能是由于一定时间后, 蛋白的溶出达到饱和, 则溶出率趋于平衡, 若再进一步延长浸提时间, 可能因为长时间的搅拌使蛋白质变性, 从而使提取率降低^[17]。还有可能是鹰嘴豆淀粉与蛋白质发生结合, 从而导致蛋白质难以溶出^[10], 因此提取时间选择 80min。

2.2.4 提取温度的选择

在 pH8.0、液料比 10:1、提取时间 60min 条件下, 提取温度对鹰嘴豆蛋白提取率的影响结果见图 5。

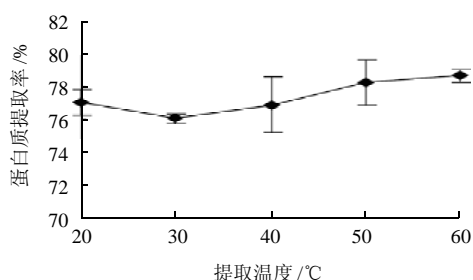


图 5 提取温度对鹰嘴豆蛋白质提取率的影响

Fig.5 Effect of extraction temperature on extraction rate of chickpea protein

由图 5 可知, 随着提取温度的升高, 蛋白质提取率呈现先降低后增加的趋势, 但变化幅度不明显。在 30℃ 时出现低谷, 可能是因为温度升高导致部分易变性蛋白质变性, 其蛋白质提取率降低与部分热变性温度较高的蛋白质提取率增加共同作用的结果。不同提取温度下鹰嘴豆蛋白质提取率没有显著差异。因此, 从节约能源及简化提取工艺考虑, 提取温度采用 20℃。

2.3 鹰嘴豆蛋白提取工艺参数的优化

2.3.1 回归模型的建立

响应曲面设计的因素水平编码见表 1, 试验方案及结果见表 2。每个试验组合重复试验 2 次, 取其平均值作为提取率结果, 试验结果采用 Design-Expert 7.0.0 软件分析。

表 1 鹰嘴豆蛋白提取工艺 Box - Behnken 设计因素及水平编码
Table 1 Variables and their coded levels for Box-Behnken design

因素	编码水平(X_i)		
	-1	0	1
A pH	9	10	11
B 液料比(mL/g)	17.5:1	20:1	22.5:1
C 时间/min	70	80	90

注: $X_1 = (A - 10)/1$; $X_2 = (B - 20)/2.5$; $X_3 = (C - 80)/10$ 。

对表 2 试验结果进行多元回归拟合, 得鹰嘴豆蛋白得率对 pH(X_1)、液料比(X_2)和提取时间(X_3)的二次多项式回归模型为:

$$Y = 78.90 + 1.92X_1 + 1.56X_2 + 1.16X_3 - 4.24X_1X_2 + 1.36X_1X_3 - 0.22X_2X_3 - 1.60X_1^2 + 0.19X_2^2 - 0.94X_3^2$$

表2 响应面试验方案及结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	X_1	X_2	X_3	Y 蛋白提取率/%
1	-1	-1	0	70.13
2	1	-1	0	81.43
3	-1	1	0	82.04
4	1	1	0	76.37
5	-1	0	-1	73.97
6	1	0	-1	76.13
7	-1	0	1	73.87
8	1	0	1	81.47
9	0	-1	-1	74.93
10	0	1	-1	78.77
11	0	-1	1	75.80
12	0	1	1	80.33
13	0	0	0	79.17
14	0	0	0	77.90
15	0	0	0	80.03
16	0	0	0	78.03
17	0	0	0	79.38

表3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance for the established regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	160.73	9	17.86	20.23	0.0003
残差	6.18	7	0.88		
失拟项	2.47	2	1.23	1.66	0.2802
纯误差	3.72	5	0.74		
总和	166.57	16			

表4 回归系数的显著性检验

Table 4 Significance test of each regression coefficient

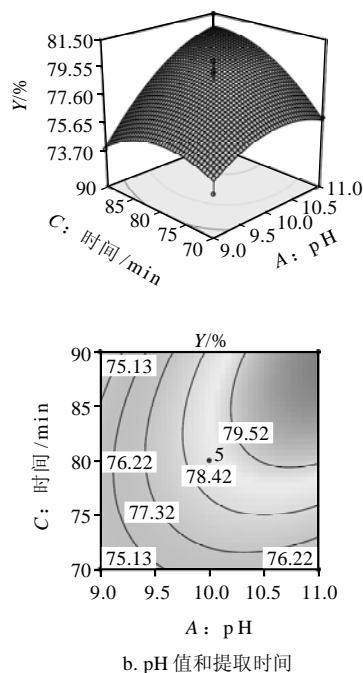
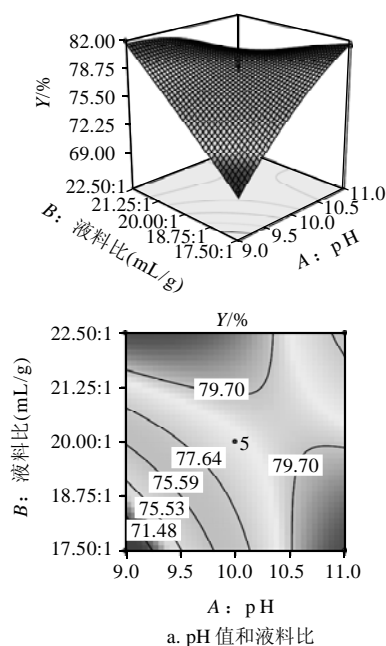
变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
X_1	29.61	1	29.61	33.53	0.0007	**
X_2	13.60	1	13.60	15.40	0.0057	**
X_3	7.48	1	7.48	8.47	0.0226	*
X_1X_2	72.00	1	72.00	81.54	< 0.0001	**
X_1X_3	7.40	1	7.40	8.38	0.0232	*
X_2X_3	0.11	1	0.11	0.12	0.7396	
X_1^2	8.77	1	8.77	9.93	0.0161	*
X_2^2	0.12	1	0.12	0.14	0.7213	
X_3^2	3.06	1	3.06	3.47	0.1048	

注: *.差异显著($P < 0.05$); **.差异极显著($P < 0.01$)。

由回归模型方差分析结果可以看出(表3), 模型 $P = 0.0003 < 0.01$, 高度显著, 失拟项 $P = 0.2802 > 0.05$ 不显著, 表明所建立的回归二次模型成立, 可用此模型来分析和预测蛋白质碱溶酸沉提取工艺参数。由表4回

归模型系数显著性检验结果可知, X_1 、 X_2 、 X_1X_2 对鹰嘴豆蛋白质提取率的影响高度显著, X_3 、 X_1X_3 、 X_1^2 对鹰嘴豆蛋白质提取率的影响显著, X_2X_3 、 X_3^2 、 X_2^2 对鹰嘴豆蛋白质提取率的影响不显著。影响蛋白质提取率的主次因素依次为 $A > B > C$, 即 pH 值 > 液料比 > 提取时间。

2.3.2 响应曲面分析



固定水平: pH10, 液料比 20:1(mL/g), 时间 80min。

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

由图 6a 可知,提取时间为 60min 时,随着 pH 值的升高,在低液料比下,蛋白质提取率呈增大趋势,但在高液料比下,蛋白质提取率却呈现出下降趋势,这与液料比与 pH 值之间负交互作用高度显著有关。由图 6b 可以看出,液料比为 20:1,在提取时间为较低水平时,蛋白质提取率随着 pH 值升高呈先升高后降低趋势。当提取时间延长,提取液的 pH 增大时,蛋白提取率达最大。

对回归模型分析,得鹰嘴豆蛋白碱溶优化工艺参数为 pH11.0、液料比 17.7:1 和时间 88.4min,鹰嘴豆蛋白理论提取率可达 83.47%。对优化参数进行 3 次重复验证实验得鹰嘴豆蛋白提取率为 82.33%,与理论值偏差 1.38%,没有显著差异。

3 结 论

采用 Box-Behnken 设计,建立了碱溶酸沉法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,能够较好地预测鹰嘴豆蛋白的提取率。碱溶酸沉法工艺参数对鹰嘴豆蛋白提取率有显著影响,因素影响主次顺序为 pH 值>液料比>提取时间。鹰嘴豆蛋白提取优化工艺参数为 pH11.0、液料比 17.7:1、时间 88.4min、提取温度 20℃,鹰嘴豆蛋白提取率可达 82.33%。因此,利用响应面分析方法对碱溶酸沉法提取鹰嘴豆蛋白工艺进行优化,获得优化工艺参数,可为工业化蛋白提取提供理论依据和指导。

参考文献:

- [1] 杨建梅,张慧,余琛,等. 鹰嘴豆的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(1): 89-90.
- [2] 张涛,江波,王璋. 鹰嘴豆分离蛋白质的特性[J]. 食品与生物技术学

报, 2010, 38(10): 145-158.

- [3] POLTRONIERI F, AREAS J A G, COLLI C. Extrusion and iron bioavailability in chickpea (*Cicer arietinum* L.)[J]. Food Chem, 2000, 70(2): 175-178.
- [4] 饶国华,赵谋明,林伟锋,等. 低次烟叶蛋白质提取工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(11): 67-72.
- [5] ZER S, KARAKY T, TOKLU F, et al. Nutritional and physicochemical variation in Turkish kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) landraces [J]. Euphytica, 2010, 175(2): 237-249.
- [6] ERCAN R, KKSEL H, ATLI A, et al. Cooking quality and composition of chickpea grown in Turkey[J]. Gida, 1995, 20(5): 289-293.
- [7] CHIESA S, GNANSOUNOU E. Protein extraction from biomass in a bioethanol refinery-possible dietary applications: use as animal feed and potential extension to human consumption[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 427-436.
- [8] 全智慧,徐敬海. 鹰嘴豆的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 3111-3112.
- [9] 包兴国,杨蕊菊,舒秋萍. 鹰嘴豆的综合开发与利用[J]. 草业科学, 2006, 23(10): 34-37.
- [10] 朱振宝,易建华. 碱溶酸沉法提取甜荞麦蛋白及其氨基酸分析[J]. 食品科技, 2009, 34(8): 193-197.
- [11] 全国粮油标准化技术委员会. GB/T 5511—2008 谷物和豆类氮含量测定和粗蛋白质含量计算[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [12] 李凤英,崔蕊静,李春华. 葡萄籽蛋白质的提取工艺研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(4): 36-39.
- [13] BOYE J I, AKSAY S, ROUFIK S, et al. Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultra filtration and isoelectric precipitation techniques[J]. Food Research International, 2010, 43(2): 537-546.
- [14] 管斌,林洪,王广策. 食品蛋白质化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 335-336.
- [15] 邓红,田芸芸,田子卿. 响应曲面法优化文冠果种仁蛋白的碱溶酸沉提取工艺[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8): 197-203.
- [16] SUN Xiaohong, ZHU Kexue, ZHOU Huiming. Optimization of a novel backward extraction of defatted wheat germ protein from reverse micelles [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2009(10): 328-333.
- [17] 矫丽媛,吕敬军,陆丰升. 花生分离蛋白提取工艺优化研究[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 196-201.