响应面优化三氯乙酸沉淀测定豆酱游离氨基酸中蛋白质

张 苗，武俊瑞，代金月，邱小玉，岳喜庆*
(沈阳农业大学食品学院，辽宁 沈阳 110866)

摘 要：采用三氯乙酸(TCA)沉淀法结合双缩脲比色法除去并测定蛋白质，探讨TCA质量浓度、沉淀温度、离心转数对蛋白质沉淀效果的影响，并采用Box-Behnken试验设计建立数学模型，进行响应面分析优化，确定最佳沉淀蛋白质条件。结果表明：TCA质量浓度8.3g/100mL、沉淀温度47℃、离心转数1726r/min时蛋白质沉淀效果量佳，蛋白质沉淀量为23.29g/100g，对游离氨基酸含量测定影响最小。

关键词：豆酱；氨基酸；蛋白质；沉淀；响应面分析

Optimized Conditions of Trichloroacetic Acid Precipitation for the Determination of Free Amino Acids in Fermented Soybean Paste

ZHANG Miao，WU Jun-rui，DAI Jin-yue，QIU Xiao-yu，YUE Xi-qing*
(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract：In this study, trichloroacetic acid precipitation for protein removal coupled with biuret colorimetry was applied to determine protein in fermented soybean paste. The influence of three factors such as precipitant dosage and concentration, temperature and centrifuge speed was examined, and aa mathematical model was established by Box-Behnken design for statistical optimization of the factors by response surface analysis. The results showed that the optimal conditions for trichloroacetic acid precipitation were TCA concentration 8.3 g/100 mL, precipitation temperature 47 ℃, and centrifugal speed 1726 r/min and had the smallest effect on the determination of free amino acids. The precipitate obtained under these conditions contained 23.29 g/100 g prtoein.

Key words：fermented soybean paste；amino acid；protein；precipitation；response surface analysis
中图分类号：TS207.2 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)10-0016-05
doi:10.7506/spkx1002-6630-201310004

豆酱(soybean paste)是我国四大传统的发酵豆制品之一，它是以大豆为主要原料制成的酱，经自然发酵而成的半流动状态的发酵食品，也称黄豆酱、黄酱或大豆酱[1]。传统发酵豆酱具有独特的风味，豆酱具有独特的风味，其风味是由酿造过程中微生物引起的生物化学反应形成的。把原料中的不溶性高分子物质，分解成低分子化合物，这些物质的相互结合形成了种类繁多的呈味物质[2]。这些呈味物质主要是氨基酸。因此豆酱中氨基酸的种类和数量决定了豆酱的品质，分析其含量和数量就显得尤为重要。

氨基酸自动分析仪对所进样品要求很严格，需要所进样品除去有机酸、脂肪、蛋白等物质。虽然样品溶解在水中后，游离态氨基酸可溶解在水中，但非水解样品溶液中的部分水溶性蛋白经过高速离心仍无法除去，因此需选用蛋白沉淀剂除去经高速离心后仍无法去除的水溶性蛋白[3]。三氯乙酸(TCA)沉淀法原理是：TCA作为蛋白质变性剂可使蛋白质构象发生改变，暴露出较多的疏水基团，使之聚集沉淀[4]。本研究利用蛋白质遇TCA产生沉淀的特点，结合双缩脲比色法测其含量[5]，以此为指标来确定TCA沉淀测定豆酱游离氨基酸中蛋白的最佳实验条件，为氨基酸含量测定提供简便可行的方法。

收稿日期：2012-10-11
基金项目：沈阳农业大学研究生创新培育项目(201203160002)；国家自然科学基金青年科学基金项目(31000805)；国家“863”计划项目(2011AA100902)；沈阳农业大学青年教师科研基金项目(20091028)
作者简介：张苗(1987—)，女，硕士研究生，研究方向为动物性食品加工。E-mail：zhangmiao713@163.com
*通信作者：岳喜庆(1966—)，男，教授，博士，研究方向为动物性食品加工。E-mail：yxqsyau@126.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

豆酱，采自当地农家自制的传统发酵豆酱，样品保存于密封袋中，4℃冷藏备用。

酪蛋白标准品(生化试剂，纯度≥99%) 北京世纪奥科生物技术有限公司；三氯乙酸(TCA)、氢氧化钾溶液、酒石酸钾钠($KNaC_4H_4O_6\cdot 4H_2O$)、硫酸铜($CuSO_4\cdot 5H_2O$)、95%乙醇、四氯化碳(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司；混合氨基酸标准溶液、茚三酮 德国Sykam公司；实验用水为超纯水；磺酸型阳离子树脂分离柱(4.6mm×60mm，3μm) 日本Hitachi公司。

1.2 仪器与设备

CR22GⅡ/CR21GⅡ日立高速冷冻离心机 日立工机株式会社本社工厂；KQ-500DB型超声波清洗机 昆山市超声仪器有限公司；UV-5100B紫外分光光度计 上海元析仪器有限公司；L-8800全自动氨基酸分析仪 日本Hitachi公司。

1.3 方法

1.3.1 样品干燥

样品在恒温干燥箱中55℃烘干至恒质量。

1.3.2 三氯乙酸沉淀蛋白与双缩脲比色法测定蛋白质含量[6-11]

1.3.2.1 标准曲线回归方程的建立

准确称取10、20、30、40、50、60mg酪蛋白标准品分别置于6个50mL离心管内，各加入20.0mL双缩脲试剂，摇匀。静置10min后，以双缩脲试剂调零，540nm波长处测定各标准溶液的吸光度，以吸光度(y)为纵坐标，以酪蛋白质量浓度(mg/mL)为横坐标绘制标准曲线，得回归方程：$y=0.1759x+0.0023$，$r^2=0.9994$。

1.3.2.2 蛋白质含量的测定

称取1g研磨均匀的豆酱干粉，加入8g/100mL TCA溶液，再充分研磨混匀转移至50mL容量瓶，25℃水浴条件下超声30min，10000r/min离心10min，倾去上清液，沉淀用95%乙醇10mL洗涤。向沉淀中加入四氯化碳2mL和双缩脲试剂20mL，置于超声波清洗器中振荡均匀，静置显色10min，在10000r/min离心20min，取上层清液，540nm波长处测吸光度。试样中蛋白质含量以ρ(g/100g)表示，结果按下式计算，实验平行测定3次。

$$\rho=\frac{A_{540nm}-0.023}{0.1759m_0}\times 50\times 100$$

式中：m_0为取样量/mg；A_{540nm}为测得的吸光度。

1.3.3 单因素试验

分别考察沉淀剂TCA质量浓度、沉淀温度、离心转数3个因素对前处理中蛋白质沉淀效果的影响，以蛋白质含量为评定指标。

表1 单因素试验设计

Table 1 One-factor-at-a-time design

因素	TCA质量浓度/(g/100mL)	沉淀温度/℃	离心转数/(r/min)
水平	2、4、6、8、10	25、35、45、55、65	4000、8000、12000、16000、20000

1.3.4 响应面试验设计

根据单因素试验确定各因素的取值水平范围，结合Box-Behnken试验设计原理，分别选取TCA质量浓度(A)、沉淀温度(B)、离心机转数(C)作为自变量，以蛋白质含量作为响应值设计响应面试验。利用Design-Expert 7.0软件进行回归分析，预测沉淀蛋白质的最佳条件。

1.3.5 游离氨基酸测定

称取研磨均匀的豆酱干粉1g，加入8.3g/100mL的TCA溶液，再充分研磨混匀转移至50mL容量瓶，47℃温度条件下超声波超声提取1h，1726r/min离心30min，取上清液2mL于蒸发皿中蒸干。加入2.5mL 0.02mol/L的盐酸溶液溶解，经0.22μm的滤膜过滤，作为待测液。

色谱条件[12]：色谱柱：磺酸型阳离子树脂分离柱(4.6mm×60mm，3μm)；梯度洗脱：循环时间53min，分离柱柱温57℃，反应柱柱温135℃，缓冲液流速0.4mL/min，茚三酮流速0.35mL/min；通道1：检测波长570nm，采集时间32min；通道2：检测波长440nm，采集时间10min；进样量20μL。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

蛋白质沉淀效果受TCA质量浓度、沉淀温度和离心转数影响，由图1可知，TCA质量浓度在2～10g/100mL时，测定样品中蛋白质含量呈上升的趋势，8g/100mL以后趋于平稳，考虑到过高的TCA会对氨基酸检测带来影响，故选择8g/100mL TCA质量浓度。TCA质量浓度从2～10g/100mL时，酸度逐渐增强，TCA在酸性条件下与蛋白质形成不溶性盐，并作为蛋白质变性剂使蛋白质构象发生改变，暴露出较多的疏水性基团，使蛋白质聚集沉淀[13]。此外，沉淀温度对蛋白质沉淀效果也存在影响，当反应温度从25℃升至65℃时，蛋白质含量增加不明显，可见温度对TCA沉淀蛋白质作用影响不大，这与任国谱等[14]的报道是一致的。但随温度的提高，分子运动速率提高，蛋白质沉淀速率加快，有助于缩短反应时间，综合考虑选择温度45℃。随离心转数的增加，蛋白质含量呈上升的趋势，16000r/min后趋于平稳，当离心转数16000r/min，测定样品中蛋白质含量达到最高值。

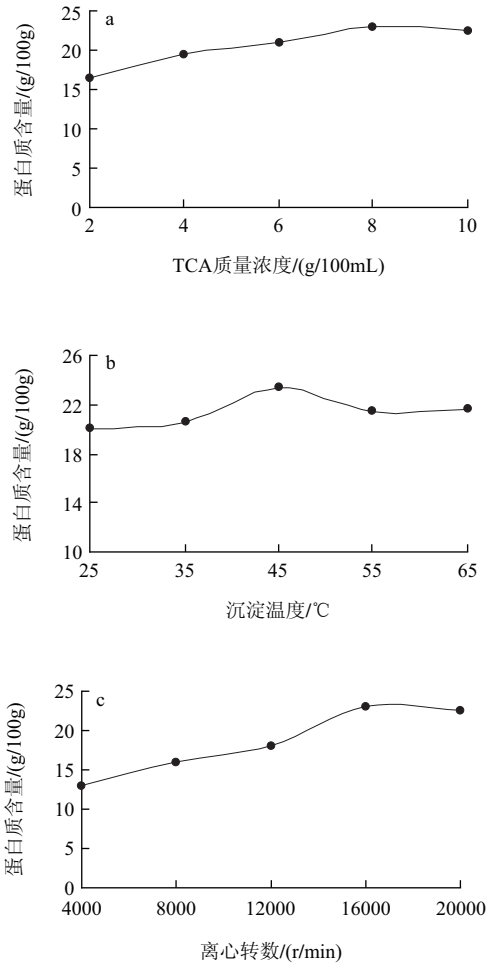


图 1 TCA质量浓度(a)、沉淀温度(b)、离心转数(c)对蛋白质沉淀的影响

Fig.1 Effect of three factors on protein precipitation

2.2 响应面法优化蛋白沉淀条件

2.2.1 Box-Behnken试验设计及结果

在单因素试验基础上，根据Box-Behnken试验设计原理[15-17]，选择TCA质量浓度(*A*)、沉淀温度(*B*)、离心转数(*C*)，作为响应面优化的考察因素，每个因素取三水平，以(－1，0，1)编码，以测定的蛋白质含量为响应值，设计三因素三水平试验。试验因素及水平见表2。

表 2 Box-Behnken试验因素及水平

Table 2 Variables and coded values for Box-Behnken design

因素	水平		
	－1	0	1
A TCA质量浓度/(g/100mL)	6	8	10
*B*沉淀温度/℃	35	45	55
*C*离心转数/(r/min)	12000	16000	20000

应用Design-Expert 7.0软件进行Box-Behnken试验设计，依次进行试剂的配制，蛋白质含量测定(每组3个平行)[18-19]，以样品中蛋白质含量为响应值(*Y*)，进行响应面试验，结果如表3所示。

表 3 Box-Behnken试验设计及结果

Table 3 Experimental design and results of Box-Behnken design

试验号	*A* TCA质量浓度	*B*沉淀温度	*C*离心转数	蛋白质含量/(g/100g)
1	－1	－1	0	20.56
2	1	－1	0	20.31
3	－1	1	0	20.78
4	1	1	0	21.45
5	－1	0	－1	19.89
6	1	0	－1	20.56
7	－1	0	1	20.78
8	1	0	1	22.35
9	0	－1	－1	21.12
10	0	1	－1	21.23
11	0	－1	1	21.02
12	0	1	1	22.12
13	0	0	0	23.12
14	0	0	0	23.35
15	0	0	0	23.01

2.2.2 回归模型的建立及统计分析

根据表3的试验结果，通过Design Expert 7.0软件处理确定回归方程，该试验的回归方程为：Y=23.16＋0.33A＋0.32B＋0.43C＋0.23AB＋0.23AC＋0.25BC－1.43A^2－0.95B^2－0.83C^2 (1)

回归模型进行方差分析及可信度分析结果见表4。

表 4 回归方程的统计分析

Table 4 Statistical analysis of the fitted regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	*F*值	*P*值	显著性
A	0.88	1	0.88	4.79	0.0803	
B	0.83	1	0.83	4.47	0.0882	
C	1.51	1	1.51	8.15	0.0356	*
A^2	7.56	1	7.56	40.95	0.0014	**
AB	0.21	1	0.21	1.15	0.3334	
AC	0.20	1	0.20	1.10	0.3430	
B^2	3.36	1	3.36	18.18	0.0080	**
BC	0.25	1	0.25	1.33	0.3015	
C^2	2.57	1	2.57	13.90	0.0136	*
模型	15.72	9	1.75	9.46	0.0117	
误差项	0.92	5	0.18			
失拟项	0.86	3	0.29	9.56	0.0962	
纯误差	0.060	2	0.030			
所有项	16.65	14				
相关系数(R^2)	0.9445					
调整后相关系数(R^2_{Adj})	0.8447					
变异系数(CV)	2					

注：*. 差异显著(P＜0.05)；**. 差异极显著(P＜0.01)。

由表4可知，TCA质量浓度和沉淀温度的二次项对蛋白质沉淀效果影响均具显著性(P＜0.01)，离心转数和它的二次项对蛋白质沉淀效果影响也具显著性(P＜0.05)，其他变量影响均不显著(P＞0.05)，无统计学差异。根据α=0.05显著水平剔除不显著项，简化后的回归方程为：

Y=23.16＋0.43C－1.43A^2－0.95B^2－0.83C^2 (2)

根据表4可知，模型极显著(P＜0.01)，因变量与自变量之间的线性关系显著(R^2=0.9445)，模型调整复相关系数R^2_{Adj}=0.8447，说明该模型能解释84.47%响应值的变

化，拟合程度较好。失拟项不显著($P>0.05$)，说明试验所得二次回归方程能很好地对响应值进行预测[20-21]。

2.2.3 蛋白沉淀条件的响应面分析及优化

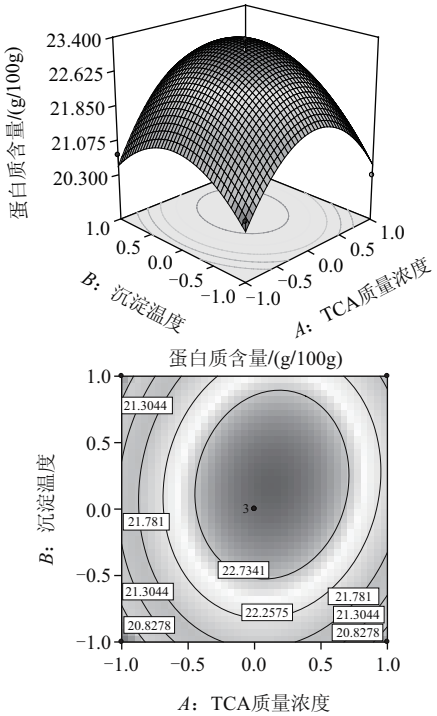


图2 *Y*=*f*(*A*，*B*)响应面立体图及等高线图

Fig.2 Response surface and contour plots showing the effects of precipitant concentration and temperature on protein precipitation

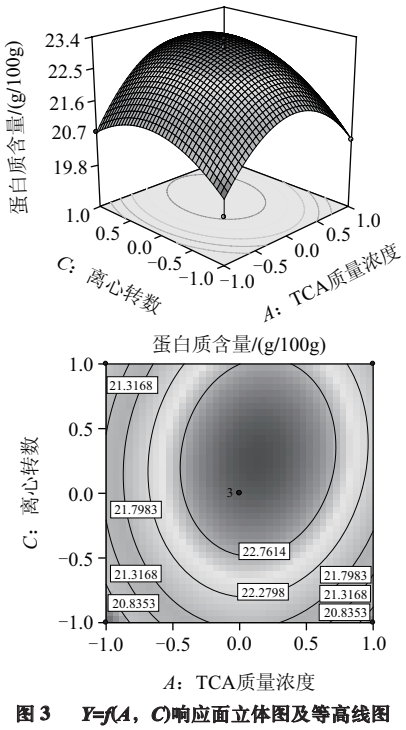


图3 *Y*=*f*(*A*，*C*)响应面立体图及等高线图

Fig.3 Response surface and contour plots showing the effects of precipitant concentration and centrifuge speed on protein precipitation

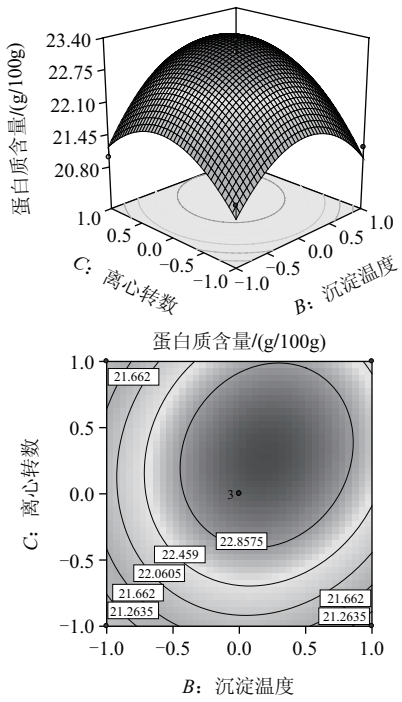


图4 *Y*=*f*(*B*，*C*)响应面立体图及等高线图

Fig.4 Response surface and contour plots showing the effects of temperature and centrifuge speed on protein precipitation

根据回归方程绘制响应面分析图，运用Design Expert 7.0软件对模型进行分析，寻求蛋白质含量的稳定点及对应的因素水平，由图2～4可知，回归模型存在稳定点，稳定点即极大值点，通过对回归模型求一阶偏导，得到各因素*A*、*B*、*C*的编码值为0.1588、0.2283、0.3160，利用编码公式$X_i=(X_j-X_0)/\Delta j$将上述编码值转变为实际参数为TCA质量浓度8.320g/100mL、沉淀温度47.280℃、离心转数1726.060r/min，考虑实际操作性，将各沉淀工艺参数修正为TCA质量浓度8.3g/100mL、沉淀温度47℃、离心转数1726r/min。此时蛋白质沉淀效果最佳，为23.29g/100g。为了检验回归模型预测的准确性，在所得最佳沉淀条件下进行3组平行实验进行验证，沉淀中蛋白质实际含量分别为23.12、23.09、23.18g/100g，与预测值十分接近，可见该模型能较好地预测实际蛋白质沉淀情况。

2.3 豆酱中游离氨基酸含量测定

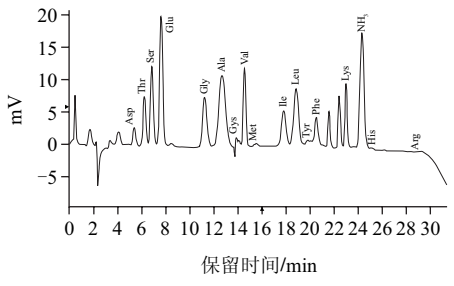


图5 处理后豆酱中游离氨基酸测定色谱图

Fig.5 Chromatogram of free amino acids in fermented soybean paste after protein removal

采用最佳蛋白质沉淀操作条件处理后，按照1.3.5节方法测定样品中游离氨基酸含量，结果见图5。

由图5可以看出，豆酱中的氨基酸分离效果很好，并且在检测过程中柱压稳定。

3 结 论

通过单因素试验和Box-Behnken试验，采用响应面分析法优化豆酱中蛋白质沉淀条件，得出沉淀工艺条件参数为TCA质量浓度8.3g/100mL、沉淀温度47℃、离心转数1726r/min，此条件下蛋白质沉淀量可达到23.29g/100g。并采用此法沉淀蛋白质后进行豆酱中游离氨基酸含量测定，各氨基酸分离效果很好，并且柱压稳定，由此可知样品中的蛋白充分的得到清除。

参考文献：

[1] 包启安. 酱及酱油的起源及其生产技术(一)[J]. 中国调味品, 1992(9): 1-4.

[2] 廖杰. 论酱油风味、香气的产生及形成[J]. 中国调味品, 2004(10): 5-7.

[3] 钟秋瓒. 乳饮料及乳制品中游离甘氨酸的测定[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(2): 159-161.

[4] 牛巍, 侯彩云, 祝晓芳. 三氯乙酸沉淀法与硫酸铜沉淀法在液态奶蛋白质检测中适用性研究[J]. 中国乳品工业, 2008, 36(9): 59-61.

[5] 余兰, 于香安. 三氯乙酸沉淀法结合双缩脲比色法测定水蛭提取液中总蛋白含量[J]. 中国药物与临床, 2004, 4(9): 685-686.

[6] 陈少迁, 吴少雄, 柳陈坚, 等. 三氯乙酸沉淀液态奶蛋白的最佳实验条件研究[J]. 乳业科学与技术, 2009(6): 278-281.

[7] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.124—2003中国标准书号[S] . 北京: 中国标准出版社, 2003.

[8] 中华人民共和国农业部. NY/T 1678—2008 乳与乳制品中蛋白质的测定 双缩脲比色法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008.

[9] 刘莹, 傅泽田, 侯彩云. 人为添加三聚氰胺液态乳中蛋白质含量测定方法的研究[J]. 中国农业大学学报, 2009(2): 16-21.

[10] 刘媛, 谢孟峡, 龙梅, 等. FMOC-CL为柱前衍生化试剂对氨基酸PR-HPLC定量分析方法的研究[J]. 现代仪器, 1999(6): 14-17.

[11] 刘惠文. 柱前和柱后衍生高效液相色谱分析氨基酸方法进展与评述[J]. 氨基酸和生物资源, 1995, 17(2): 50-55.

[12] 王翔, 杨晓燕, 张钰萍. 侗家奇液酒中游离氨基酸含量测定分析[J]. 中国酿造, 2012, 31(2): 182-186.

[13] 郭立安, 阎哲, 张晓楠, 等. 三氯乙酸对蛋白质结构稳定性的影响[J]. 第四军医大学学报, 2001(22): 40.

[14] 任国谱, 李忠海, 彭美纯, 等. 奶粉中低聚肽质量浓度测定方法[J]. 中国乳品工业, 2007, 35(10): 47-49.

[15] JOSHI S, YADAV S, DESAI A J. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum medium components for the enhanced production of lichenysin by *Bacillus licheniformis* R2[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 41(2): 122-127.

[16] 袁辉, 白云凤. 中心组合和响应面分析优化枇杷果酒发酵工艺[J]. 中国酿造, 2010(2): 103-106.

[17] 郑君晓, 麻成金, 肖旺, 等. 响应面法优化椪柑果酒发酵工艺研究[J]. 饮料工业, 2011(5): 12-17.
冯培勇, 钟旭生, 杨立红, 等. 利用响应面法优化茶薪菇产纤维素酶的发酵条件[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 162-165.

[18] 秦嘉炎, 于娜, 岳喜庆, 等. 酶法水解卵黄蛋白制备多肽的工艺优化[J]. 食品科学, 2012, 33(1): 147-151.
吴竹青, 陈景, 黄群, 等. 响应面法优化雪莲果酒发酵工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 182-187.

[19] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002: 110-115.