

响应面法优化猕猴桃糖蛋白提取工艺研究

王岸娜¹, 孙玉丹¹, 李龙安², 黄 萍³

(1. 河南工业大学 粮油食品学院, 河南 郑州 450001; 2. 新乡职业技术学院, 河南 新乡 453006;

3. 郑州市农业技术推广站, 河南 郑州 450006)

摘要: 为确定乙醇浸提法提取猕猴桃糖蛋白的最优条件, 采用响应面分析法, 以液料比、乙醇体积分数、提取温度及提取时间为独立变量进行中心组合设计, 以猕猴桃蛋白质提取率为响应值进行数学模型拟合, 研究了各独立变量对猕猴桃糖蛋白提取率的影响。结果表明: 当液料比为 6.5 : 1、乙醇体积分数 24%、提取温度 24 °C、提取时间 45 min 时, 糖蛋白的提取率最高可达到 63.05%, 与试验设计结果相符, 有助于设计猕猴桃蛋白质提取的最佳工艺。

关键词: 响应面法; 猕猴桃糖蛋白; 优化; 蛋白质提取

中图分类号: S663.4 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)08-0121-07

Optimization of Response Surface Methodology for Kiwifruit Glycoprotein Extraction

WANG An-na¹, SUN Yu-dan¹, LI Long-an², HUANG Ping³

(1. College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. Xinxiang Vocational and Technical College, Xinxiang 453006, China;

3. Zhengzhou Agricultural Technology Popularization Station, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Response surface methodology was used to determine optimum conditions for extraction of protein from kiwifruit by ethanol extraction. A central composite design including independent variables of material/solvent ratio, ethanol concentration, extraction temperature and extraction time was used. Selected response (dependent variable) which evaluated the extraction process was protein yield. The effect of each independent variable on the kiwifruit glycoprotein extraction rate was investigated and obtained the best extraction process. The optimum conditions of protein extraction were obtained when solvent/material ratio, ethanol volume fraction, extraction temperature and extraction time were 6.5 : 1 (*v/v*), 24%, 24 °C, 45 min, respectively. Under this condition, the experimental maximum protein extracted was 63.05%, which coincided with the predicted values. The adequacy of the model was confirmed by extracting the glycoprotein under optimum values given by the model. These results help in designing the process of optimal glycoprotein extraction from kiwifruit.

Key words: response surface methodology; kiwifruit glycoprotein; optimization; protein extraction

猕猴桃属于猕猴桃科(Actinidiaceae)猕猴桃属(*Actinidia*)的一种落叶性藤本植物, 原产于我国陕西、湖南等地, 故又叫“中华猕猴桃”^[1]。其果肉中含有多种营养成分, 如叶黄素、叶酸、维生素 A 前体、维生素 C、维生素 B₆、泛酸、烟酸、维生素 B₁、维

生素 B₂、钙、镁、钾、铁及磷等, 并富含镍、钛、钒、锆、铍、铟、钇、硒、锂和锶等多种稀有元素^[2], 有“长寿之果”和“水果之王”的美称^[3], 并且具有很高的药用价值, 可以抑制动脉硬化、降低血压、抗癌、抗衰老和提高免疫力等^[4]。Paul Lachance^[5]对 27 种常见水果

收稿日期: 2012-05-24

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(102102210123)

作者简介: 王岸娜(1972-), 女, 陕西洪洞人, 副教授, 博士, 主要从事大分子在食品中的应用研究。

E-mail: wanganna2006@yahoo.com.cn

的营养含量进行系统综合比较,证明所有常见水果中猕猴桃营养最丰富,近年来已成为世界各国竞相发展的果品之一。

我国猕猴桃年产量在 20 万 t 以上,加工量占总产量的 10% 左右^[6]。目前,猕猴桃产品由单一的水果产品向饮料、酒品、果脯等产品拓展^[7-9],猕猴桃加工已成为猕猴桃综合利用的重要环节之一^[9]。猕猴桃果实中的蛋白质含有 17 种游离氨基酸^[11],其中含有 10 种药效氨基酸、11 种必需和半必需氨基酸、13 种香甜味氨基酸;刘小彦等^[11]采用乙醇浸提法从猕猴桃榨汁中提取蛋白,经试验证明所提蛋白为糖蛋白。糖蛋白是生物体内重要的生物活性物质,对人类健康有重要作用,如增强免疫力、抗肿瘤、抗氧化、降低血糖和血脂等^[13-15]。猕猴桃糖蛋白作为一种资源丰富并具有独特生理功能的植物糖蛋白质资源,对其进行合理开发既可拓宽猕猴桃深加工领域,又可以开发新的糖蛋白质资源。鉴于此,本研究运用响应面分析法对影响乙醇浸提法提取猕猴桃糖蛋白提取率的几个重要因素进行了系统研究,采用 Design-Expert 7.0 软件的中心组合,研究试验因素及其交互作用对蛋白提取率的影响,并对拟合数学模型进行描述,以优化乙醇浸提法提取猕猴桃糖蛋白的最佳工艺条件,为其工业化生产和综合利用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试中华猕猴桃品种为陕西周至,购于郑州大中原果品城。

1.2 糖蛋白的提取方法

将猕猴桃表面擦净,去皮,去籽,捣碎,取样品 5 mL 于三角瓶中,分别按一定的液料比(乙醇溶液和样品的体积比值,3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1)和一定的乙醇体积分数(5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%)加入三角瓶中,在一定温度(10、15、20、25、30、35、40、45 °C)下,提取一定时间(10、20、30、40、50、60、70、80 min),提取液于 4 500 r/min 离心 10 min,取上清液,测定蛋白含量。

1.3 糖蛋白提取率的计算方法

猕猴桃组织液乙醇提取液中糖蛋白含量的测定,采用考马斯亮蓝染料比色法^[16]。

考马斯亮蓝 G-250 显色剂的配制:100 mg 考马斯亮蓝 G-250 于 50 mL 95% 乙醇中溶解,再加 120 mL 85% 磷酸,二次蒸馏水定容至 1 000 mL,滤去不溶物,于棕色瓶中 4 °C 保存备用。

牛血清蛋白标准曲线的绘制:10 mg 牛血清蛋白蒸馏水溶解至 100 mL,得到 0.1 g/L 的标准牛血清蛋白质溶液,按表 1 配比加入显色剂,混匀 5 min 后在可见—紫外分光光度计 595 nm 处测定吸光度值,作牛血清蛋白质的含量与吸光度之间的标准曲线图。

一定体积的提取液中,加入 4 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,摇匀 5 min 后在可见—紫外分光光度计 595 nm 处测定吸光度,对应牛血清标准曲线,得到样品提取液中的蛋白含量。蛋白含量(mg/mL) = $(C \times V_1 \times N) / (V_2 \times 1\,000)$,式中, C 为标准曲线上所对应的蛋白质的质量浓度; V_1 为取样量; N 为稀释倍数; V_2 为测定液体积。计算蛋白提取率,蛋白提取率 = 乙醇提取液中的蛋白质质量浓度 / 组织液中的粗蛋白质质量浓度 $\times 100\%$ 。

表 1 牛血清蛋白标准曲线的试剂添加量表

添加试剂	管号						
	1	2	3	4	5	6	7
0.1 g/L 标准蛋白溶液/mL	0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
G-250 染色剂/mL	4	4	4	4	4	4	4
蒸馏水/mL	1.0	0.9	0.8	0.6	0.4	0.2	0
蛋白质质量浓度/(mg/L)	0	10	20	40	60	80	100

2 结果与分析

2.1 牛血清蛋白标准曲线

由图 1 可见,标准曲线的回归方程为: $y = 0.005x + 0.0187$, $R^2 = 0.9958$,标准曲线的相关性良好。根据提取的上清液的吸光度值,对应牛血清标准曲线,可以计算出提取液中的蛋白含量,进一步可计算出蛋白的提取率。

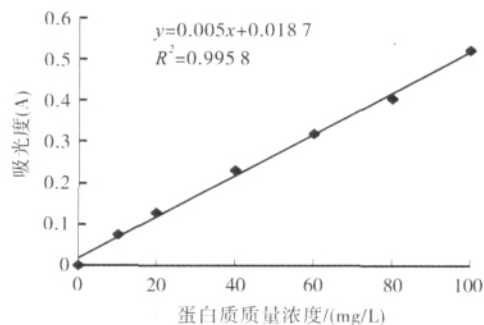


图 1 牛血清蛋白标准曲线

2.2 猕猴桃糖蛋白提取条件的单因素试验

2.2.1 液料比 固定乙醇体积分数 20%,提取温度 25 °C,提取时间 40 min,分别以 3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1 的液料比进行试验,比较液料比对糖蛋白提取效果的影响,结果见

图 2。由图 2 可知,随着液料比比值的增大,糖蛋白提取率先升高后降低。其中,在液料比为 6 : 1 时,糖蛋白提取率达到最大值(53.14%),之后液料比继续增加,糖蛋白提取率则略有减小,不但浪费乙醇溶剂,也影响后期的加工处理,造成浓缩制备困难,所以,初步确定最佳液料比为 6 : 1。

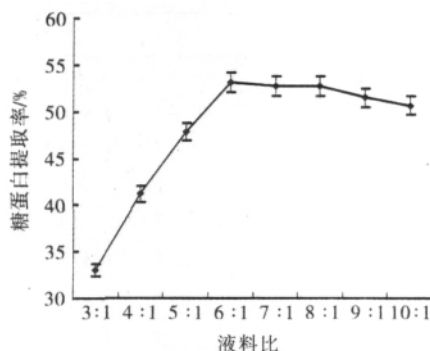


图 2 液料比对猕猴桃糖蛋白提取率的影响

2.2.2 乙醇体积分数 固定液料比 6 : 1, 提取温度 25 ℃, 提取时间 40 min, 分别以 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40% 的乙醇体积分数进行试验, 比较乙醇体积分数对糖蛋白提取效果的影响, 结果见图 3。由图 3 可知, 随着乙醇体积分数的提高, 糖蛋白提取率不断增大, 在乙醇体积分数为 25% 时, 糖蛋白提取率最大, 达 50.67%, 之后糖蛋白提取率迅速减小。这可能是体积分数过高会对蛋白质的组织结构有一定影响, 引起蛋白质脱去水化层以及降低介电常数而增加带电点间的相互作用, 致使蛋白质颗粒容易凝集而沉淀。所以, 初步确定乙醇最佳体积分数为 25%。

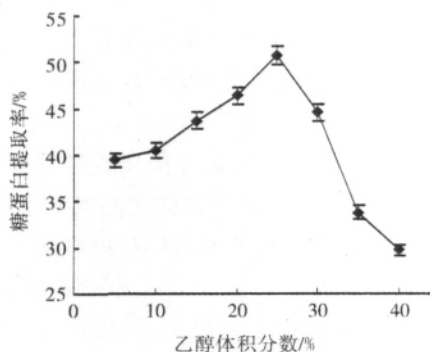


图 3 乙醇体积分数对猕猴桃糖蛋白提取率的影响

2.2.3 提取温度 固定液料比 6 : 1, 提取时间 40 min, 乙醇体积分数 25%, 分别在提取温度 10、15、20、25、30、35、40、45 ℃ 的条件下进行提取, 考察提取温度对糖蛋白提取效果的影响, 结果见图 4。由图 4 可知, 随着提取温度的升高, 糖蛋白提取率增大, 25 ℃ 时糖蛋白提取率达到 42.71%, 之后糖蛋白

提取率迅速减小。这是因为在低温条件下, 蛋白质不能充分溶解于溶剂中, 提取不充分; 温度升高, 蛋白质与有机溶剂的作用加强, 提取率升高; 温度过高, 易引起蛋白质天然结构解体、疏水基团暴露和展开, 使蛋白质分子凝固沉淀。所以, 初步确定最佳提取温度为 25 ℃。

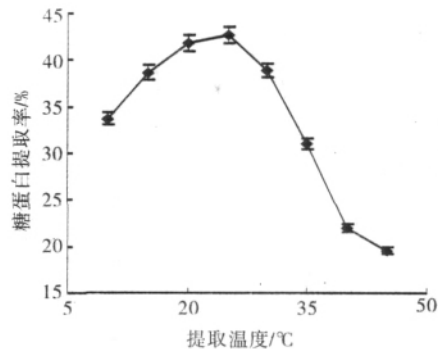


图 4 提取温度对猕猴桃糖蛋白提取率的影响

2.2.4 提取时间 固定液料比 6 : 1, 乙醇体积分数 25%, 提取温度 25 ℃, 分别提取 10、20、30、40、50、60、70、80 min, 考察提取时间对糖蛋白提取效果的影响, 结果见图 5。如图 5 所示, 猕猴桃糖蛋白的提取率最初随着提取时间的增加呈现上升趋势, 至 40 min 时, 蛋白提取率最高, 达 55.17%, 之后又呈下降趋势。说明适当延长提取时间, 蛋白分子充分溶胀, 有利于蛋白质的溶出, 但提取时间过长, 蛋白质颗粒之间的作用增强, 易凝集而沉淀。因此, 初步确定最佳提取时间为 40 min。

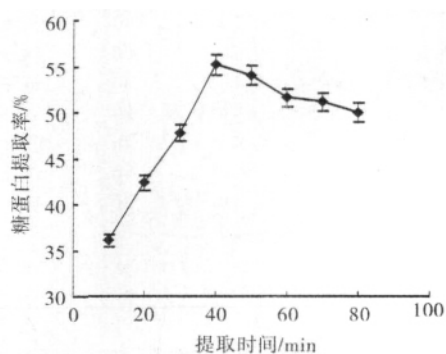


图 5 提取时间对猕猴桃糖蛋白提取率的影响

2.3 猕猴桃糖蛋白提取条件的响应面分析以及提取工艺的优化

2.3.1 响应面分析数学模型的建立与检验 根据单因素试验结果, 确定猕猴桃糖蛋白最佳提取条件为液料比 6 : 1、乙醇体积分数 25%、提取温度 25 ℃、提取时间 40 min, 各因素在最佳条件点左右分别选取 1 个试验点, 进行四因素三水平的响应面试验, 响应面分析因素和水平见表 2。

表 2 猕猴桃糖蛋白提取响应面分析因素和水平

水平	因素			
	X_1 (液料比)	X_2 (乙醇体 积分数)/%	X_3 (提取 温度)/℃	X_4 (提取 时间)/min
-1	5:1	20	20	30
0	6:1	25	25	40
1	7:1	30	30	50

利用 Design-Expert 7.0 软件中的中心组合设计选项,共有 30 个试验组合,试验结果见表 3,得到蛋白质的提取率为 44.40%~64.55%。

表 3 猕猴桃糖蛋白提取响应面分析方案及结果

试验 序号	X_1	X_2 /%	X_3 /℃	X_4 /min	Y 蛋白 提取率/%
1	6:1	25	25	40	61.70
2	5:1	20	30	50	48.43
3	5:1	30	30	50	44.40
4	7:1	30	30	50	45.11
5	5:1	20	20	30	49.85
6	4:1	25	25	40	47.48
7	6:1	25	15	40	48.90
8	7:1	20	30	50	49.14
9	6:1	25	25	40	61.46
10	7:1	20	30	30	48.19
11	7:1	20	20	50	54.12
12	6:1	25	25	40	64.55
13	6:1	25	25	40	61.70
14	6:1	35	25	40	46.29
15	6:1	15	25	40	51.75
16	5:1	20	20	50	52.93
17	7:1	30	30	30	46.77
18	5:1	30	20	30	44.63
19	8:1	25	25	40	57.20
20	6:1	25	25	20	50.32
21	6:1	25	35	40	45.82
22	6:1	25	25	60	56.96
23	5:1	20	30	30	47.01
24	7:1	20	20	30	51.27
25	6:1	25	25	40	62.17
26	5:1	30	20	50	44.87
27	7:1	30	20	30	46.06
28	7:1	30	20	50	51.03
29	6:1	25	25	40	60.75
30	5:1	30	30	30	46.06

对表 3 结果进行统计分析,得到二次回归方程:

$$Y = 67.29 + 1.489X_1 - 1.938X_2 - 1.167X_3 + 1.06X_4 - 3.082X_1^2 - 3.981X_2^2 - 4.431X_3^2 - 2.728X_4^2 + 0.305X_1X_2 - 0.466X_1X_3 + 0.273X_1X_4 + 0.755X_2X_3 - 0.434X_2X_4 - 0.819X_3X_4$$

对二次回归方程进行方差分析,结果见表 4。从表 4 可知, P 值小于 0.05 表明这个模型是显著的,在这个试验里, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 和 X_4^2 对糖蛋白提取率有显著影响,其中一次项影响较为显著($P < 0.05$),二次项均表现出极显著水平($P <$

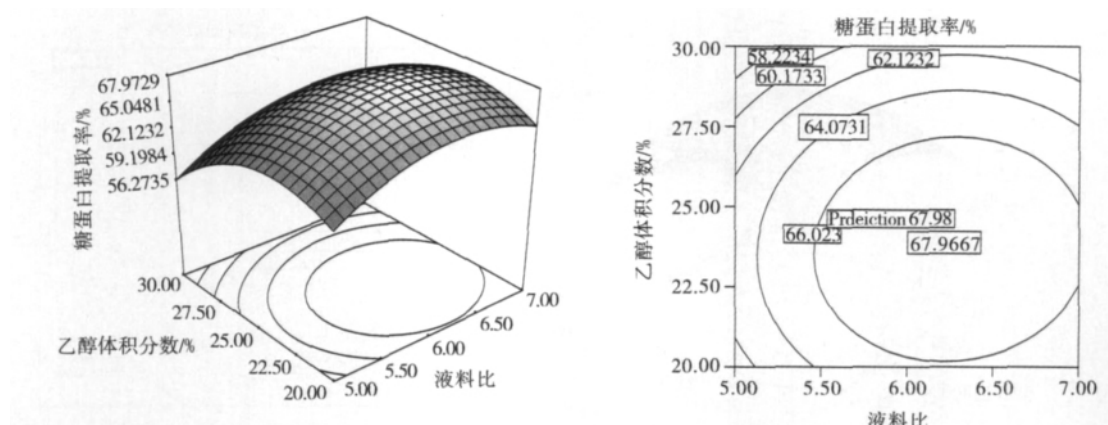
0.01)^[17-18],而交互作用项的 P 值均大于 0.05,表明交互作用不显著。失拟项的 P 值为 0.080 8,表明相对于纯误差,该模型失拟不显著。回归方程整体模型比较显著,并且失拟项不显著,表明该回归模型与实测值能较好地拟合。

表 4 回归方程方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.782 7	14	0.055 9	16.088 3	< 0.000 1
X_1	0.033 0	1	0.033 0	9.489 1	0.007 6
X_2	0.055 9	1	0.055 9	16.089 8	0.001 1
X_3	0.020 3	1	0.020 3	5.835 1	0.028 9
X_4	0.016 7	1	0.016 7	4.813 5	0.044 4
X_1^2	0.161 5	1	0.161 5	46.474 7	< 0.000 1
X_2^2	0.269 6	1	0.269 6	77.568 9	< 0.000 1
X_3^2	0.333 9	1	0.333 9	96.086 4	< 0.000 1
X_4^2	0.126 6	1	0.126 6	36.426 2	< 0.000 1
X_1X_2	0.000 9	1	0.000 9	0.265 9	0.613 6
X_1X_3	0.002 1	1	0.002 2	0.619 6	0.443 5
X_1X_4	0.000 7	1	0.000 7	0.212 9	0.651 1
X_2X_3	0.005 7	1	0.005 7	1.627 5	0.221 5
X_2X_4	0.001 9	1	0.001 9	0.537 1	0.475 0
X_3X_4	0.006 7	1	0.006 7	1.916 1	0.186 5
残差	0.052 1	15	0.003 5		
失拟项	0.045 9	10	0.004 6	3.699 9	0.080 8
净误差	0.006 2	5	0.001 2		
总离差	0.834 8	29			

2.3.2 各因素影响程度分析 各因素的 F 值可以反映出各因素对试验指标的重要性, F 值越大,表明对试验指标的影响越大。从方差分析结果(表 4)可知: $F(X_1) = 9.489 1$, $F(X_2) = 16.089 8$, $F(X_3) = 5.835 1$, $F(X_4) = 4.813 5$,即各因素对猕猴桃糖蛋白提取率的影响程度大小顺序为:乙醇体积分数>液料比>提取温度>提取时间。

2.3.3 响应面分析 为了考察交互项对糖蛋白提取率的影响,在其他因素条件固定不变的情况下,考察交互项对蛋白提取率的影响,对模型进行降维分析^[19-21]。经 Design-Expert 7.0 软件分析,所得的响应面和等高线见图 6—图 11。由图 6—图 11 可知,随着每个因素的增大,响应值增大;当响应值增大到极值后,随着因素的增大,响应值逐渐减小。在交互项对蛋白提取率的影响中,液料比×提取时间(X_1X_4)对提取率的影响最小,液料比×乙醇体积分数(X_1X_2)与其相似,其次是乙醇体积分数×提取时间(X_2X_4)、液料比与提取温度(X_1X_3)、乙醇体积分数与提取温度(X_2X_3)、提取温度与提取时间(X_3X_4)对提取率的影响较大。



为方便响应面设计,将响应面和等高线图上的液料比值 5:1、6:1 和 7:1,简称为 5、6 和 7。下同

图 6 $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面和等高线

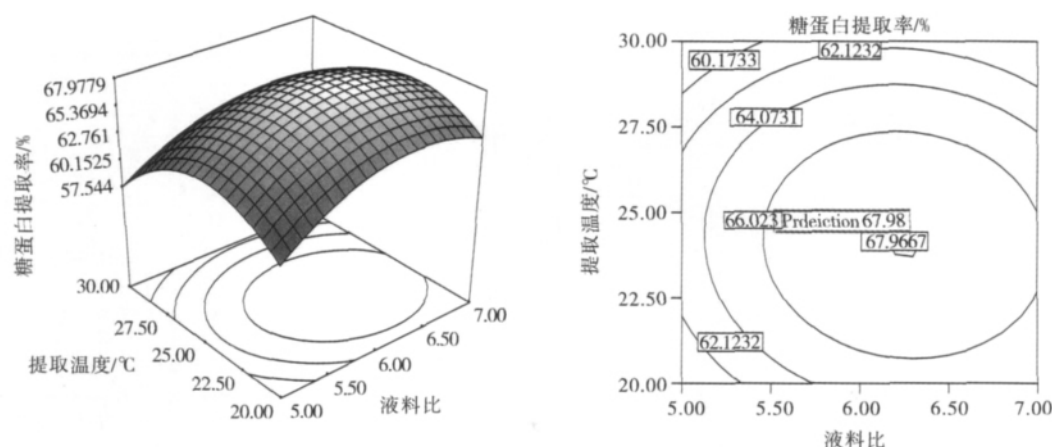


图 7 $Y=f(X_1, X_3)$ 的响应面和等高线

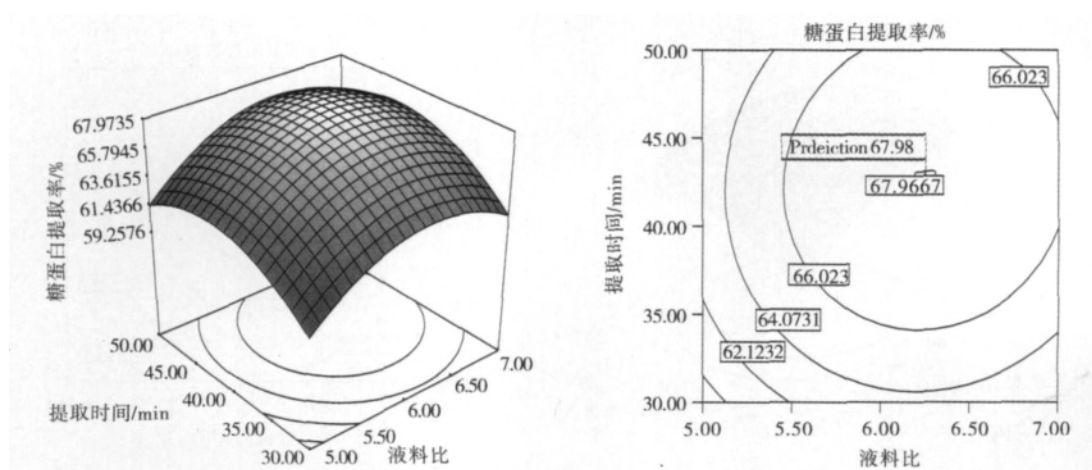
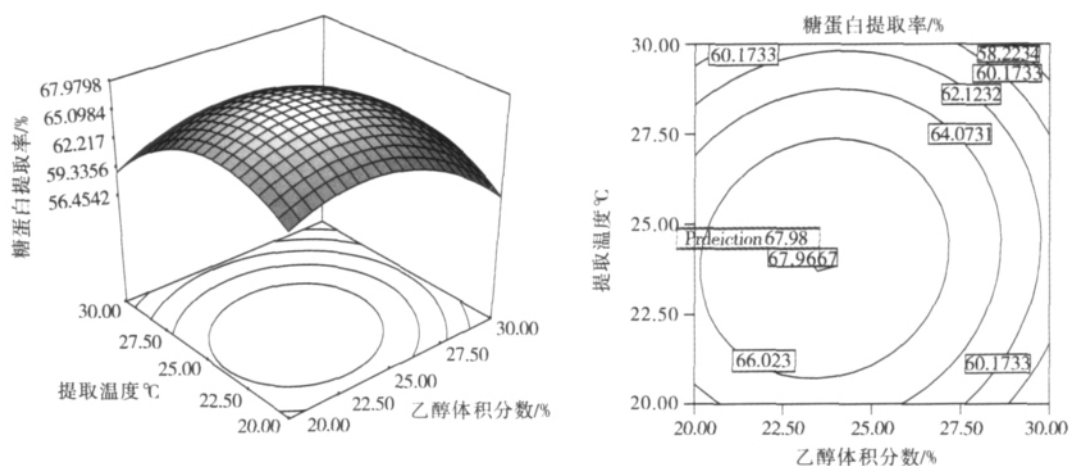
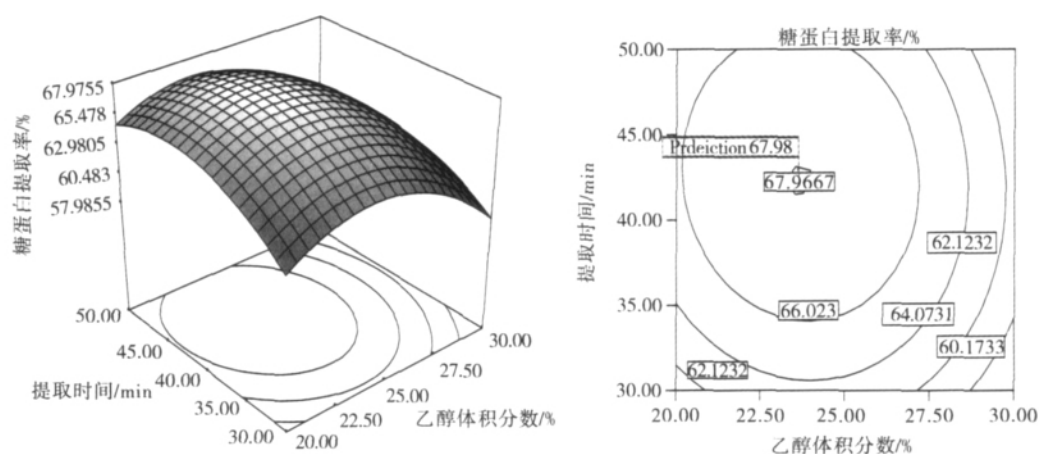
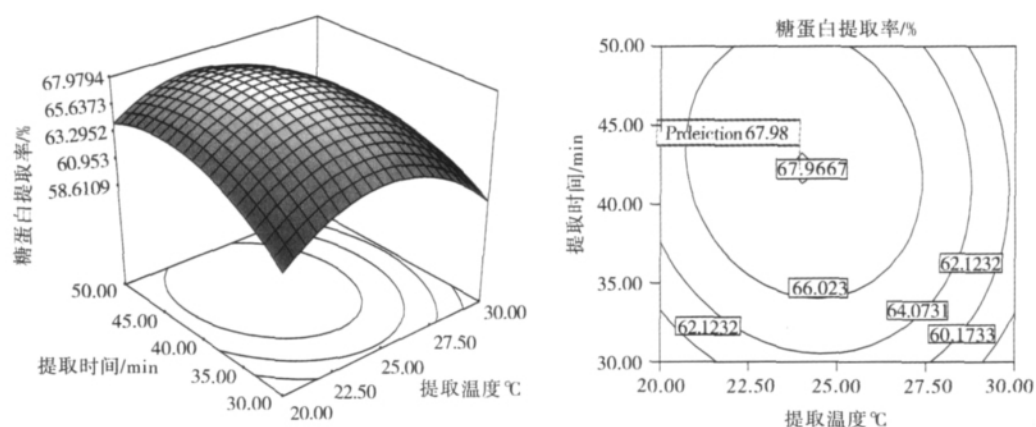


图 8 $Y=f(X_1, X_4)$ 的响应面和等高线

2.3.4 提取条件优化 通过软件分析,得到最优提取条件为液料比 6.25:1、乙醇体积分数 23.67%、提取温度 24.04 °C、提取时间 42.58 min,得到蛋白提取率为 67.98%。根据实际操作要求,选取最佳工艺条件为液

料比 6.5:1、乙醇体积分数 24%、提取温度 24 °C、提取时间 45 min,经过 3 组平行试验,得到猕猴桃糖蛋白的提取率为 63.05%,稍低于试验设计值,但接近于最优提取条件的预测值,所以试验值与预测值相符合^[22]。

图 9 $Y=f(X_2, X_3)$ 的响应面和等高线图 10 $Y=f(X_2, X_4)$ 的响应面和等高线图 11 $Y=f(X_3, X_4)$ 的响应面和等高线

3 结论

采用响应面法明确了猕猴桃糖蛋白提取有最优条件,液料比、乙醇体积分数、提取温度和提取时间

各因素对猕猴桃糖蛋白提取率都有影响,影响程度大小顺序为:乙醇体积分数>液料比>提取温度>提取时间;猕猴桃糖蛋白质提取的最佳工艺条件为液料比 6.5 : 1、乙醇积分数 24%、提取温度 24 °C、

提取时间 45 min,糖蛋白的提取率可达到 63.05%。

参考文献:

- [1] 薛效贤,薛芹.鲜果品加工技术及工艺配方[M].北京:科学技术文献出版社,2005:261-262.
- [2] Torreggiani D, Fornie E, Maestrell A, *et al.* Influence of osmotic dehydration on texture and pectic composition of kiwifruit slices[J]. *Drying Technology*, 1998, 177:19-22.
- [3] 清硕.水果之王——猕猴桃[J].*世界农业*, 1998, 228(4):54-56.
- [4] 石碧,狄莹.植物多酚[M].北京:科学出版社,2000:112-116.
- [5] Paul Lachance. The nutrient density of the 27 most commonly consumed fruits[J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 1997, 16(5):86-92.
- [6] 李加兴,孙金玉,孙飞,等.超声波辅助提取猕猴桃籽油的工艺优化[J].*中国粮油学报*, 2010(8):11-14.
- [7] 郭靖.猕猴桃果实及其酒香成分研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2007:54.
- [8] 张晶,赵梅.磷酸盐缓冲液提取猕猴桃粗多糖的工艺[J].*粮油食品科技*, 2010, 18(5):61-62, 68.
- [9] 费云华.猕猴桃香精的调配[J].*香料香精化妆品*, 2010(4):53-55.
- [10] Korsak T, Yong S P, Shela G. Quality properties of wine from Korean kiwifruit new cultivars[J]. *Food Research International*, 2011, 106:143-152.
- [11] 揣冰洁.猕猴桃果实中氨基酸含量分析与利用[J].*农业与技术*, 1999, 19(5):67-68.
- [12] 王岸娜,刘小彦,朱海兰.猕猴桃蛋白质的分离及类型鉴定[J].*河南工业大学学报*, 2009, 30(3):25-29.
- [13] Lim K T, Son Y O, Lee J C, *et al.* Effects of glycoprotein from *Ulmus davidiana* Nakai on hydroxyl radical induced-cytotoxicity, and on activation of nuclear factor-kappa B and an activator protein-1 in cultured mouse primary thymocytes[J]. *Kor J Food Sci Biotechnol*, 2002, 11:172-178.
- [14] Lee S J, Heo K S, Oh P S, *et al.* Glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* Nakai inhibits TPA-induced apoptosis through nuclear factor-kappa B in NIH/3T3 cells[J]. *Toxicology Letters*, 2004, 146(2):159-174.
- [15] Heon-Yeong J, Kye-Taek L. Glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* Bureau inhibits iNO and COX-2 expression through modulation of NF-kB in LPS-stimulated RAW 264.7 cells[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2009, 27:247-252.
- [16] 刘小彦.猕猴桃蛋白质的提取纯化[D].郑州:河南工业大学,2009.
- [17] 周海旭,高晗,曲良苗,等.响应面法优化山楂叶中黄酮提取工艺[J].*河南农业大学学报*, 2011, 45(6):712-715.
- [18] 李啸,张娅,姚娟,等.响应面法优化紫红红球菌的发酵培养基[J].*天津农业科学*, 2011, 17(5):15-19.
- [19] 华承伟,谢凤珍,陈晓静.响应面法优化玉米芯木聚糖提取条件[J].*河南农业科学*, 2012, 41(2):157-160.
- [20] 曹川,包建强.响应面法优化蛋白酶提取贻贝蛋白的工艺参数[J].*山西农业科学*, 2011, 39(11):1196-1201.
- [21] 张平安,赵秋艳,李宁,等.响应曲面优化木瓜蛋白酶提高大豆分离蛋白乳化性的研究[J].*河南农业大学学报*, 2011, 45(5):585-589.
- [22] Wani A A, Sogi D S, Grover L, *et al.* Effect of temperature, alkali concentration, mixing time and meal/solvent ratio on the extraction of watermelon seed proteins — a response surface approach[J]. *Biosystems Engineering*, 2006, 94(1):67-73.