



## 柠条叶蛋白碱性提取的响应面分析法优化

刘杰, 贾士儒, 钟成, 李宾, 范利花

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 柠条是一种粗蛋白含量较高的灌木,而且富含全部的人体必需氨基酸.从丰富的柠条资源中提取蛋白对于部分缓解我国目前的蛋白质资源紧缺以及环境保护等问题具有积极作用;因此,通过 Box-Behnken 实验设计进行柠条叶蛋白碱性提取的响应面优化,得到了适当的模型,并确定了重要参数的最佳水平.根据系统给定的参数得到的预测值与实测值相当接近;柠条叶蛋白提取的最佳工艺条件为:NaOH 溶液浓度 0.12 mol/L,絮凝 pH 2.9,温度 75 °C.最终可得柠条叶蛋白浓缩物相对得率(RLPCY)和蛋白相对得率(RPY)分别为 16.2%和 41.5%.

**关键词:** 柠条; 叶蛋白; 碱性提取; 响应面法

中图分类号: Q946.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2011)01-0001-04

## Optimization of Leaf Protein Alkaline Extraction from *Caragana microphylla* Lam. by Response Surface Methodology

LIU Jie, JIA Shi-ru, ZHONG Cheng, LI Bin, FAN Li-hua

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** *Caragana microphylla* Lam. is shrub with high protein level and all of the essential amino acid. Extracting protein from *C. microphylla* Lam. offers good alternative to partly eliminate protein shortage and improve environmental concerns in China. Leaf protein alkaline extraction was optimized by Box-Behnken design coupled with response surface methodology, and a regressive model was obtained. The predicted values matched well with the experimental data within the given experimental conditions. The optimal technological parameters were optimized as follow: concentration of NaOH 0.12 mol/L, flocculation of pH 2.9 and flocculation of temperature 75 °C. In optimized condition, the relative leaf protein concentrates yield (RLPCY) and relative protein yield (RPY) of *C. microphylla* Lam. could reach 16.2% and 41.5% respectively.

**Keywords:** *C. microphylla* Lam.; leaf protein; alkaline extraction; response surface methodology

柠条是锦鸡儿属(*Caragana* Fbar.)植物栽培种的通称,为典型的欧-亚草原植物地区落叶灌木,具有萌蘖力强、易成林、抗寒、抗旱、耐贫瘠、根系发达可固氮等特性,是我国北方干旱、半干旱地区水土保持、防风固沙的先锋植物<sup>[1]</sup>.由于柠条具有相对较高的蛋白质含量,通常含粗蛋白 14.9%~23.1%(干质量)<sup>[1]</sup>且必需氨基酸含量较为丰富<sup>[2]</sup>,因此,开发其作为饲料应有较大的实用价值.但是,无论是直接饲用还是微生物发酵后饲用,其适口性均较差<sup>[3-5]</sup>,所以,从柠条中提

取蛋白质作为饲料添加剂,有可能是一条利用柠条的有效途径.为此,本文根据柠条等植物蛋白质的溶解特性<sup>[6]</sup>,研究了提取工艺参数对柠条叶蛋白提取的影响,采用 Box-Behnken 方法对碱性提取过程进行了优化,并对回归模型进行了验证.

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料来源与处理

柠条(小叶锦鸡儿, *C. microphylla* Lam.),采自内

收稿日期: 2010-09-03; 修回日期: 2010-11-18

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAK36B05-4); 天津科技大学引进人才科研启动基金资助项目(20100413)

作者简介: 刘杰(1982-),男,湖北潜江人,硕士研究生; 通信作者: 贾士儒,教授, jiashiru@tust.edu.cn.

蒙古凉城县,包括枝和叶.自然风干后粗蛋白含量为12.9%,水分含量为7.46%.

先将自然风干的柠条枝叶采用 FZ102 微型植物试样粉碎机(河北省黄骅市齐家务科学仪器厂)进行粉碎,再过 20 目标准筛(浙江上虞市华康化验仪器厂),然后直接加入水(单因素实验)或 NaOH 溶液(优化实验)进行浸提,过滤,再采用 pH SJ-4A 型实验室 pH 计(上海精密科学仪器有限公司),采用 1.0 mol/L 的 HCl 或 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液调节滤液 pH 后进行水浴加热,再以 CR22G 型离心机(日本 Hitachi 公司)5 000 r/min 离心 10 min,最后干燥得柠条叶蛋白浓缩物<sup>[7]</sup>.

## 1.2 蛋白质定量方法

柠条粉碎样品粗蛋白含量采用凯氏定氮法测定<sup>[8]</sup>.

蛋白提取液蛋白含量以 Bradford 法<sup>[9]</sup>进行检测,并以牛血清蛋白(Albumin Fraction V 冻干粉,美国 Genview 公司)作为标准蛋白,在 722 s 型可见分光光度计的 595 nm 处检测吸光度,制作标准曲线.

其中,涉及到的相关计算公式如下:柠条叶蛋白溶出率 = (溶出的蛋白量/柠条样品中的粗蛋白量)×100%;蛋白沉淀率 = (提取液中沉淀出的蛋白量/提取液中所溶解的蛋白总量)×100%;柠条叶蛋白浓缩物相对得率 = (柠条叶蛋白质量/[柠条质量×(1-柠条的水分含量)])×100%;蛋白相对得率 = 柠条叶蛋白中的蛋白含量/柠条干物质粗蛋白含量)×100%.

## 1.3 单因素实验与碱性提取的优化

单因素实验中,考察料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30),浸提时间(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 h),NaOH 溶液浓度(0.00、0.01、0.05、0.10、0.50 mol/L)对柠条叶蛋白溶出的影响;考察絮凝 pH(2.0、2.5、3.0、3.5、4.0),加热时间(5、10、15、20、25 min),加热温度(50、60、70、80、90 °C)对蛋白沉淀的影响.响应面优化实验中,选取了对柠条叶蛋白提取影响相对较大的 3 个因素:NaOH 溶液浓度、絮凝 pH 和加热温度.

碱性提取的优化实验中,以 Box-Behnken 实验设计研究 NaOH 溶液浓度、絮凝 pH 和絮凝温度对柠条叶蛋白浓缩物相对得率(RLPCY)和蛋白相对得率(RPY)的影响.每次实验进行 3 次,每个样品检测 3 次.

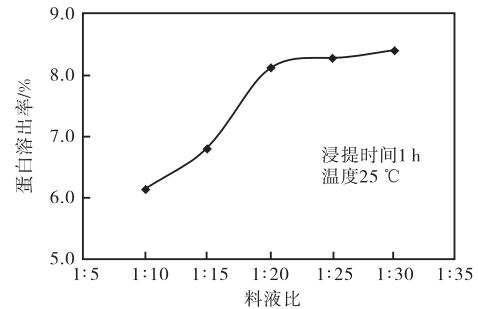
## 1.4 数据分析

单因素实验数据采用 Origin 8.0 进行分析,优化实验所得响应值均采用 Design Expert 7.1.3 来研究其显著性( $P < 0.05$ ),并进行方差及回归分析.

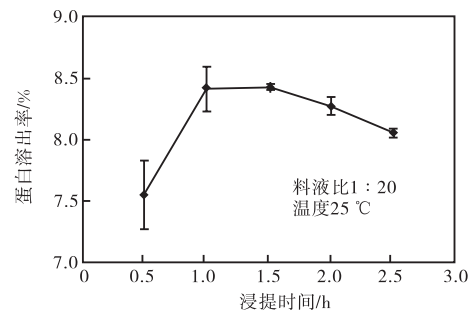
## 2 结果与讨论

### 2.1 工艺参数对柠条叶蛋白溶出和沉淀的影响

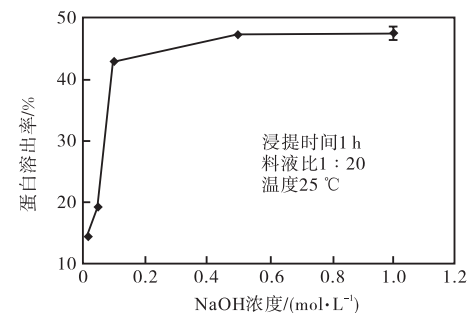
考察料液比、浸提时间、NaOH 浓度对柠条叶蛋白溶出的影响,结果如图 1 所示.适宜的条件是料液比为 1:20,浸提时间为 1 h,NaOH 溶液浓度为 0.10 mol/L.



(a) 料液比(浸提液为蒸馏水)



(b) 浸提时间(浸提液为蒸馏水)



(c) NaOH 浓度(浸提液为 NaOH 溶液)

图 1 工艺参数对柠条叶蛋白溶出的影响

Fig.1 Effect of technological parameters on solubilized leaf protein of *C. microphylla* Lam.

由图 1 可以看出,料液比和浸提时间对柠条叶蛋白溶出率的影响相对较小,其最佳条件时的溶出率也不到 9%;但对于 NaOH 溶液来说,则影响显著,当其浓度由 0.01 mol/L 增加到 0.10 mol/L 时,柠条叶蛋白的溶出率从总蛋白的 14.2% 增加到了 42.6%;进一步增加 NaOH 溶液浓度到 0.50 mol/L 时,柠条叶蛋白浓缩物

及蛋白相对得率提高得不多. 增加 NaOH 溶液浓度, 有可能在破坏柠条的细胞结构上起较大的作用, 可使细胞内的蛋白溶出, 这与 Bals 等<sup>[10]</sup>运用 NaOH 溶液从酒糟中提取蛋白质的研究结果相似. 但他们最高得到不足总蛋白量 30% 的蛋白质, 而本研究可以得到将近 50% 的总蛋白溶出量, 这可能是所用原料本身所含蛋白的不同所致. 另外, 加入更多的碱达不到预期的效果, 还会增加后续的沉淀工序中酸的用量, 使成本增加, 所以确定 NaOH 溶液的浓度为 0.10 mol/L.

絮凝因素对溶出叶蛋白沉淀的影响如图 2 所示. 调节蛋白提取液的 pH 对柠条叶蛋白沉淀影响大, 适宜的絮凝 pH 为 3.0 (图 2(a)). 以 70 °C 作为絮凝温度研究加热时间的影响, 发现其对叶蛋白沉淀影响较小, 故此, 确定絮凝加热时间为 5 min 即可 (图 2(b)). 而加热温度对叶蛋白沉淀的影响较大, 从 50 °C 的 88.5% 到 90 °C 的 97.2% 有 9.80% 的提高, 而当温度为 80 °C 时, 就已有 95.5% 的叶蛋白被沉淀出, 故确定絮凝温度为 80 °C (图 2(c)).

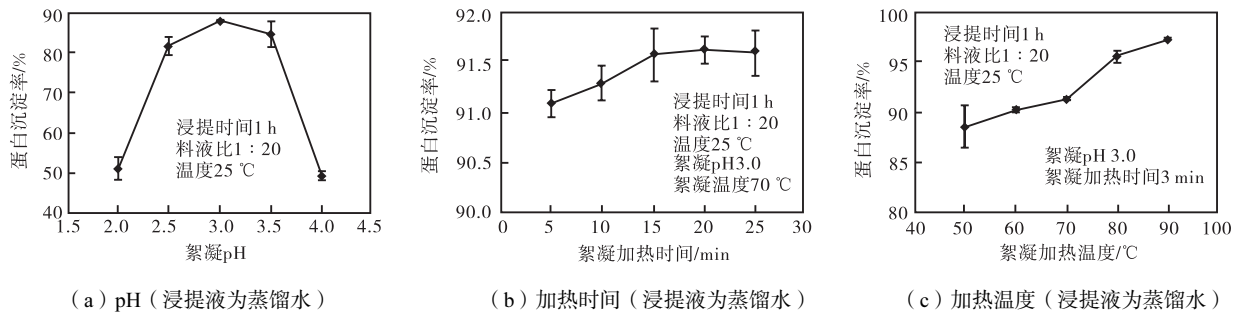


图 2 工艺参数对柠条叶蛋白沉淀的影响

Fig.2 Effect of technological parameters on coagulated leaf protein of *C. microphylla* Lam.

2.2 响应面法优化柠条叶蛋白的提取

2.2.1 回归模型的建立

依据 Box-Behnken 实验设计进行实验, 得到如表 1 所示的相应结果, 以 Design Expert 7.1.3 软件, 得出了各自的回归方程:

$$RLPCY = 3.238 + 2.397 5X_{c(\text{NaOH})} - 0.069 25X_{\text{pH}} -$$

$$0.076 6X_t - 0.08X_{c(\text{NaOH})}X_{\text{pH}} - 0.003X_{c(\text{NaOH})}X_t + 0.0017X_{\text{pH}}X_t - 8.1X_{c(\text{NaOH})}^2 - 0.009X_{\text{pH}}^2 + 0.000 44X_t^2$$

$$RPY = 0.884 5 + 5.788X_{c(\text{NaOH})} + 0.018 3X_{\text{pH}} - 0.028 73X_t + 0.07X_{c(\text{NaOH})}X_{\text{pH}} - 0.003X_{c(\text{NaOH})}X_t + 0.000 9X_{\text{pH}} \cdot X_t - 24.116 7X_{c(\text{NaOH})}^2 - 0.043 17X_{\text{pH}}^2 + 0.000 168X_t^2$$

表 1 Box-Behnken 实验设计及响应值(n = 3)

Tab.1 Box-Behnken design and responses(n = 3)

标准序号	运行序号	因素			响应值	
		$c_{\text{NaOH}}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	pH	$t/^\circ\text{C}$	RLPCY/ $(\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	RPY/ $(\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$
1	12	0.05	2.5	80	0.118	0.255
2	10	0.15	2.5	80	0.143	0.354
3	15	0.05	3.5	80	0.128	0.249
4	5	0.15	3.5	80	0.145	0.355
5	2	0.05	3.0	75	0.129	0.268
6	7	0.15	3.0	75	0.169	0.354
7	11	0.05	3.0	85	0.126	0.284
8	8	0.15	3.0	85	0.163	0.367
9	13	0.10	2.5	75	0.179	0.367
10	9	0.10	3.5	75	0.174	0.371
11	4	0.10	2.5	85	0.147	0.360
12	6	0.10	3.5	85	0.159	0.373
13	14	0.10	3.0	80	0.158	0.377
14	3	0.10	3.0	80	0.159	0.370
15	1	0.10	3.0	80	0.151	0.376

2.2.2 回归模型的显著性分析

由模型预测出 RLPCY 和 RPY 值与实测值相关

性较高, 其相关系数分别为 0.92 和 0.99.

3 个影响因素对柠条叶蛋白浓缩物相对得率和

叶蛋白相对得率均具有显著的二次效应. 其中, NaOH 溶液浓度影响显著, 可以通过其显著线性项 (RLPCY 和 RPY 分别为 +2.397 5 和 +5.788) 和 2 次项 (RLPCY 和 RPY 分别为 -8.1 和 -24.116 7) 来直接描述.

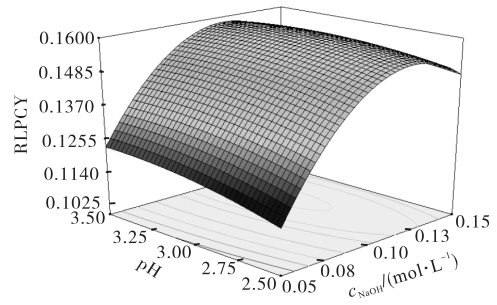
在 3 个因素间, NaOH 溶液的浓度与絮凝 pH 的交互效应最大, NaOH 溶液的浓度与絮凝温度次之, 絮凝 pH 与温度最小, 所以, NaOH 溶液的浓度与絮凝 pH 这两个因素对于柠条叶蛋白浓缩物及蛋白相对得率影响显著.

2.2.3 在优化的碱性条件下提取蛋白质

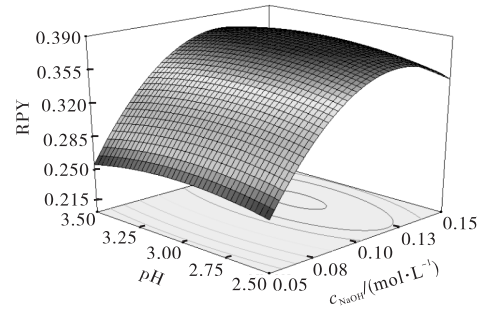
NaOH 溶液浓度对于柠条叶蛋白浓缩物和蛋白相对得率的影响如图 3 所示. 使用碱液浸提, 得到最大 RLPCY 和 RPY 值时具有较适宜的 NaOH 浓度和絮凝 pH.

2.2.4 模型的验证

根据以上所得出的优化条件进行模型的验证. 实验所得结果与预测结果进行比较(表 2), 2 个实测值均在 99%的预测区间内, 故所得模型的稳定性良好, 并能够反映上述参数对 RLPCY 和 RPY 的影响.



(a) 柠条叶蛋白浓缩物相对得率



(b) 蛋白相对得率

图 3 响应面及相应的等高线图

Fig.3 Response surface and base isolines

表 2 依据所得优化选项( $c_{NaOH} = 0.12 \text{ mol/L}$ 时)验证模型

Tab.2 RLPCY and RPY of extractions at  $c_{NaOH} = 0.12 \text{ mol/L}$  performed for the models verification

优化选项	$c_{NaOH}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	pH	$t/^\circ\text{C}$	响应值				
				参数	实测值	预测值	预测区间(95%)	预测区间(99%)
1	0.12	2.9	75	RLPCY	0.162 2	0.177 4	0.150 9 ~ 0.204 0	0.135 8 ~ 0.219 0
				RPY	0.415 0	0.384 5	0.357 3 ~ 0.411 8	0.341 8 ~ 0.427 3

注: 验证实验共进行 3 次, 每次实验设 3 个平行, 结果(实测值)取 3 次实验的平均值.

3 结 论

采用 Box-Behnken 实验设计, 对柠条叶蛋白提取的工艺条件进行 3 因素 3 水平的响应面优化分析, 确定其最佳工艺条件为: NaOH 溶液浓度 0.12 mol/L, 絮凝 pH 2.9, 加热温度 75 °C. 此时, 柠条叶蛋白浓缩物相对得率为 16.2%, 蛋白相对得率为 41.5%.

参考文献:

[1] 格根图. 非常规粗饲料柠条、猪毛菜、杨树叶的饲用研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2005.  
 [2] 周进军. 柠条营养价值及对荷斯坦育成母牛饲喂效果的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2005.  
 [3] 罗惠娣, 毛杨毅, 牛西午, 等. 柠条喂羊消化试验[J]. 中国草食动物, 2003(z1):104-106.  
 [4] 王丁. 柠条饲料化开发利用试验研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2007.

[5] 姚志刚, 李凤学. 柠条在草食动物饲料中的利用[J]. 中国农学通报, 2007, 23(4):9-12.  
 [6] Pickardt C, Neidhart S, Griesbach C, et al. Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus* L.) meal[J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(7):1966-1973.  
 [7] Aletor O, Oshodi A A, Ipinmoroti K. Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates[J]. Food Chemistry, 2002, 78(1):63-68.  
 [8] 周瑞宝. 植物蛋白功能原理与工艺[M]. 北京:化学工业出版社, 2008:326-327.  
 [9] 李建武, 萧能赓, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京:人民教育出版社, 1994:174-176.  
 [10] Bals B, Balan V, Dale B. Integrating alkaline extraction of proteins with enzymatic hydrolysis of cellulose from wet distiller's grains and solubles[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(23):5876-5883.