

· 中药工业 ·

## 响应面法优化莲子蛋白提取工艺研究<sup>△</sup>

孙天霞<sup>1</sup>, 尹翌秋<sup>2</sup>, 张鹏飞<sup>1</sup>, 王敏<sup>1</sup>, 张丽轩<sup>1</sup>, 赵雨<sup>1</sup>, 王思明<sup>1\*</sup>

(1. 长春中医药大学 中医药与生物工程研究开发中心, 吉林 长春 130117;

2. 长春金赛药业有限责任公司, 吉林 长春 130012)

**[摘要]** 目的: 研究莲子蛋白质水提取的最佳条件。方法: 在单因素试验分析的基础上, 采用合理的实验设计方案, 通过响应面法优化莲子蛋白的提取条件。结果: 提取莲子蛋白的最佳工艺参数为提取 pH 值 8.0, 料液比 1:15, 提取时间 7 h, 蛋白提取率为 14.53%。结论: 响应面法优化的莲子蛋白提取条件简便易行, 准确性和重现性好, 具有实际应用价值。

**[关键词]** 莲子; 蛋白质; 提取条件; 响应面法

### Optimization of Extraction Process of Protein from Lotus Seed by Response Surface Methodology

SUN Tianxia<sup>1</sup>, YIN Yiqiu<sup>2</sup>, ZHANG Pengfei<sup>1</sup>, WANG Min<sup>1</sup>, ZHANG Lixuan<sup>1</sup>, ZHAO Yu<sup>1</sup>, WANG Siming<sup>1\*</sup>

(1. Traditional Chinese Medicine and Biotechnology Research and Development Center,

Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Jilin Province, Changchun 130117, China;

2. GenScience Pharmaceuticals Co., Ltd. Jilin Province, Changchun 130012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize the extraction process for protein from lotus seed. **Methods:** Based on the single factor analysis, the lotus seed protein extraction conditions were optimized by the response surface method. **Results:** The results showed that the optima extraction conditions were as follows: initial pH 8.0, solid-liquid ratio 1:15, extraction time 7 h, which resulted in an extraction yield of 14.53%. **Conclusion:** By using the response surface methodology extraction technology, the extraction process was easy to operate and accurate and good reproducible and has a practical application value.

**[Keywords]** Lotus seed; protein; extraction condition; extraction technology

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.2.019

莲子又名水之丹, 是我国特有的种质资源, 属睡莲科多年水生草本植物莲的成熟种子。据《本草纲目》记载<sup>[1]</sup>, 莲子有“补中养神, 止渴去热, 安心止痢, 交心肾, 固精气, 强筋骨, 补虚损, 利耳目, 除寒湿”等功能。现代研究表明<sup>[2]</sup>, 莲子中蛋白质含量高, 是较理想的优质植物蛋白, 其中氨基酸数量和比例较平衡, 蛋氨酸达到了世界卫生组织规定标准, 可有效补充豆类蛋白中蛋氨酸的不足。同时莲子又富含赖氨酸, 可弥补谷类蛋白质中赖氨酸的不足, 大大提高了莲子的营养价值。

然而迄今为止, 市场上以莲子为主要成分的产品比较单一, 莲子作为营养珍品长期以来仅停留在糖水莲子、制成蜜饯等简单工艺加工上, 未见与莲

子蛋白质相关的保健食品<sup>[3]</sup>。其主要原因是莲子蛋白质的提取率普遍偏低, 严重制约了对其系统研究和开发。

响应面分析法是一种综合实验设计和数学模型优化的分析方法, 采用多元二次回归方法作为函数估计的工具, 将多因子实验中的因素与指标之间的相互关系用多项式近似拟合, 给出直观等高线图和三维立体图, 依此可对函数的响应面和等高线进行分析, 可研究因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系, 并可进行优化<sup>[4-6]</sup>。与目前广泛使用的“正交试验设计法”相比, 其具有实验周期短、求得的回归方程精度高、预测性能好, 能研究几种因素间交互作用、能设计最优组合, 和计算响应目标

<sup>△</sup> [基金项目] 吉林省中药生物技术重点实验室(20140622003JC)

\* [通信作者] 王思明, 医学硕士, 研究方向: 中药蛋白质; Email: lwsm126030@126.com

的最优值等优点<sup>[7]</sup>。

本研究针对莲子蛋白提取率低的问题,结合响应面分析法,着重对莲子蛋白质的提取方法进行实验,通过单因素试验确定各影响因素,优化了莲子蛋白质的提取条件,为将莲子用于生产莲子蛋白粉或其他含莲蛋白保健品及莲子蛋白本身的进一步研究提供参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

pH计 FE20(美国梅特勒-托利多公司);冷冻离心机 Gentrifuge 5804R(德国 Eppendorf 公司);低温真空冷冻干燥机 LL3000(德国 Heto);Infinite M200Pro 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);电子天平 AL204(美国梅特勒-托利多公司)。

### 1.2 试剂

莲子购于宏检大药房;Bradford 蛋白定量试剂盒购于天根;磷酸盐缓冲液(PBS)由实验室配置;氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠(北京化工厂)。

## 2 方法

### 2.1 蛋白质提取及含量测定

莲子经高速粉碎机粉碎,精密称取 1 g 莲子粉置于圆底烧瓶中,按照各项预设条件(料液比、pH 值、提取时间、提取次数)进行水提,以 6000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,取上清液,冻干(浓缩)后称重,取冻干后的样品,精密称取 1 mg,溶于 1 mL 水中,配置成质量浓度为 1 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液。

采用考马斯亮蓝 G250 法<sup>[8]</sup>,分别准确吸取 1 mg·mL<sup>-1</sup>的牛血清蛋白 0、1、2、3、4、5、6 μL,分别加入 96 孔板中,另加入 PBS 缓冲液 15、14、13、12、11、10、9 μL,再各加入 285 μL 考马斯亮蓝 G250,震荡混匀,室温放置 6 min,于 595 nm 处测其吸光度。以蛋白浓度(mg·mL<sup>-1</sup>)为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制出标准曲线。

样品中蛋白质浓度的测定:取 15 μL 不同实验条件下所提取的蛋白溶液,加入 285 μL 考马斯亮蓝 G250,在 595 nm 处测其吸光度,从而计算出总蛋白的提取率。

$$\text{提取率}(\%) = \frac{\text{冻干后莲子蛋白克数}}{\text{莲子克数}} \times 100\%$$

### 2.2 提取条件单因素试验设计

2.2.1 提取时间对蛋白提取率的影响 分别精密称取莲子粉 1 g 于 100 mL 容量瓶中,以料液比(W/V) 1:25, pH 7.0,提取时间分别为 1.0、2.0、4.0、7.0、10.0、24.0 h,搅拌提取<sup>[9]</sup>。

2.2.2 pH 值对蛋白提取率的影响 分别精密称取莲子粉 1 g 于 100 mL 容量瓶中,料液比(W/V) 1:25,用 HCl、NaOH 溶液调节提取液 pH 值,分别取 pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,搅拌提取 5.0 h<sup>[10]</sup>。

2.2.3 料液比对蛋白提取率的影响 分别精密称取莲子粉 1 g 于 100 mL 容量瓶中,以料液比(W/V) 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25, pH 为 7.0,搅拌提取 5.0 h<sup>[11]</sup>。

2.2.4 提取次数对蛋白提取率的影响 分别精密称取莲子粉 1 g 于 100 mL 容量瓶中,料液比(W/V) 1:25, pH 7.0,搅拌提取 5.0 h,分别提取 1、2、3、4 次,将提取液合并<sup>[12]</sup>。

2.2.5 莲子蛋白等电点对提取率的影响 将莲子蛋白提取液用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸调 pH 值分别为 3、3.5、4、4.5、5,使蛋白质沉淀,离心后取上清液进行比色测定,吸光度最小的即为等电点。

### 2.3 响应面法对莲子蛋白提取条件进行优化

综合单因素试验结果,采用 Design-Expert. 8.0 软件中的 Box-Behnken<sup>[13]</sup> 中心组合实验设计原理,对料液比、提取时间、pH 值 3 个影响蛋白质提取效果的因素进行考察,以莲子蛋白质提取率为响应值。共 17 个试验点,其中 12 个为析因子,5 个为中心试验,用以评估误差。设计三因素三水平的响应分析试验,建立二次多项式回归模型,各因素水平及编码见表 1。

表 1 Box-Behnken 因素水平表

水平	因素		
	A PH	B 料液比(W/V)	C 提取时间/h
-1	7	1:10	4
0	8	1:15	7
1	9	1:20	10

## 3 结果与分析

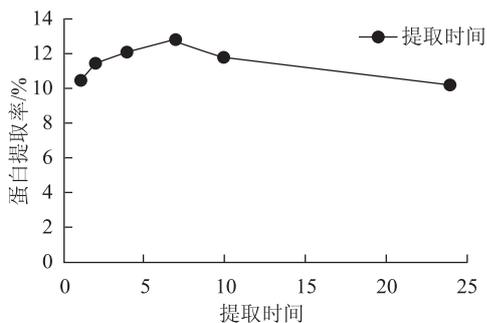
### 3.1 标准曲线的绘制

以牛血清蛋白浓度(mg·mL<sup>-1</sup>)为横坐标,吸光

度(A)为纵坐标,绘制出标准曲线,得回归方程: $Y=1.649X+0.413$ ,  $r=0.9950$ , 式中Y为吸光度, X为蛋白浓度( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

### 3.2 莲子蛋白提取单因素试验

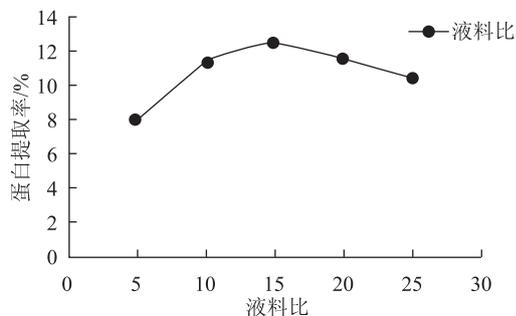
3.2.1 提取时间对提取率的影响 固定pH值、料液比、提取次数等影响因素,在不同提取时间下研究其对莲子蛋白提取率的影响。见图1。随着提取时间的延长,蛋白提取率在7h前增加较为明显,7h后急剧下降,从蛋白稳定性考虑,确定最佳莲子蛋白提取时间为7h。



注:提取时间从左到右依次为1、2、4、7、10、24 h。

图1 提取时间与提取率的关系

3.2.2 料液比对提取率的影响 固定提取时间、pH值、提取次数等因素,研究料液比对莲子蛋白提取率的影响。见图2。料液比为1:15时,莲子蛋白的提取率最大,料液比从1:5到1:15莲子蛋白提取率显著增加,随着其提取液体积的逐渐增大,莲子蛋白提取率逐渐下降。同时大量提取液在后续工序中需经浓缩,从提取效率和节约资源综合来考虑,确定莲子蛋白提取的最佳料液比为1:15。

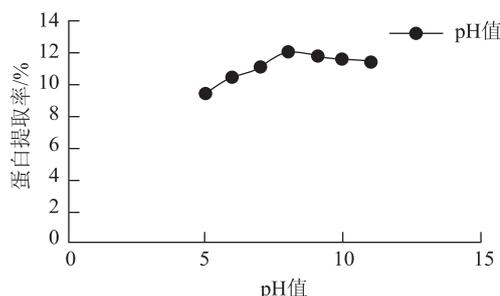


注:液料比从左到右依次为5、10、15、20、25。

图2 液料比与提取率的关系

3.2.3 pH值对提取率的影响 固定提取时间、料液比、提取次数等因素,研究pH值对莲子蛋白提取率的影响。从图3可以看出,随着pH值在5.0到

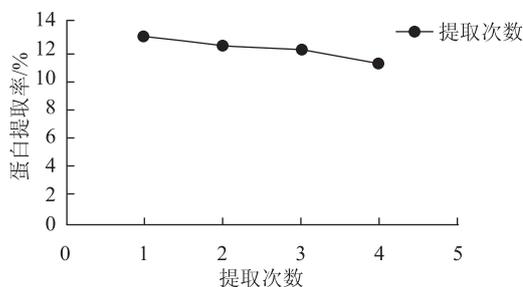
8.0,提取率明显上升,8.0之后缓慢下降。预测该pH值与莲子蛋白的等电点较接近。选择最佳提取pH值为8.0。



注:pH值从左到右依次为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0。

图3 pH值与提取率的关系

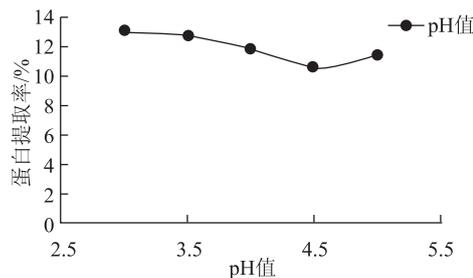
3.2.4 提取次数对提取率的影响 固定提取时间、料液比、pH值等因素,研究提取次数对莲子蛋白提取率的影响。由图4所示,随着提取次数的增加,莲子蛋白提取率逐渐下降,从工序的角度及成本节约考虑,将其提取次数固定为一次。



注:提取次数从左到右依次为1、2、3、4。

图4 提取次数与提取率的关系

3.2.5 莲子蛋白等电点对提取率的影响 固定pH值、料液比、pH值、提取次数等因素,研究莲子蛋白等电点对莲子蛋白提取率的影响。pH值在3.0到4.5区间明显下降,在4.5时提取率最低,之后蛋白提取率有明显上升趋势。因此判断pH值4.5为莲子蛋白等电点。



注:pH值从左到右依次为3、3.5、4、4.5、5。

图5 莲子蛋白等电点与提取率的关系

### 3.3 提取条件的响应面实验结果与分析

在上述单因素试验的基础上, Box-Behnken 中心组合实验设计原理, 对莲子蛋白提取工艺中的 pH 值、料液比、提取时间 3 个因素做进一步优化。以 A = pH、B = 料液比、C = 提取时间为自变量, 莲子蛋白的提取率为响应值 R, 3 因素 3 水平的响应面分析方案及结果见表 2<sup>[14]</sup>。

表 2 响应面分析方案及结果

实验号	A	B	C	响应值 R
1	-1	0	-1	12.53
2	0	0	0	14.53
3	1	0	-1	11.03
4	1	-1	0	10.60
5	-1	1	0	11.23
6	-1	-1	0	11.96
7	0	1	-1	10.63
8	0	0	0	14.53
9	0	0	0	14.43
10	0	-1	-1	11.96
11	0	0	0	14.40
12	1	0	1	13.63
13	0	-1	1	12.80
14	0	1	1	12.43
15	0	0	0	14.43
16	1	1	0	10.90
17	-1	0	1	10.56

表 3 莲子蛋白提取回归分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	$P(F > F_x)$	显著性
模型	36.41	9	4.05	13.81	0.001 1	**
A	$1.8 \times 10^{-3}$	1	$1.8 \times 10^{-3}$	$6.15 \times 10^{-3}$	0.939 7	
B	0.57	1	0.57	1.94	0.206 7	
C	1.34	1	1.34	4.56	0.070 0	
AB	0.27	1	0.27	0.91	0.373 0	
AC	5.22	1	5.22	17.83	0.003 9	**
BC	0.23	1	0.23	0.79	0.404 6	
A × A	11.53	1	11.53	39.35	0.000 4	**
B × B	11.28	1	11.28	38.52	0.000 4	**
C × C	3.20	1	3.20	10.93	0.013 0	*
残差	2.05	7	0.29			
失拟项	2.04	3	0.68	179.46	0.000 1	**
绝对误差	0.015	4	$3.78 \times 10^{-3}$			
总离差	38.46	16				

注: \* 表示对结果影响显著 ( $P < 0.05$ ); \*\* 表示对结果影响极显著 ( $P < 0.01$ )。

表 4 回归模型方差分析

标准值	均值	变异系数	预测平方和	拟合度	校正拟合度	预测拟合度	信噪比
0.54	12.5	4.33	32.58	0.946 7	0.878 2	0.152 8	9.86

按照 Box-behnken Design (BBD) 实验设计方法的统计学要求, 对提取率的响应面优化试验结果进行多元非线性回归分析, 得到料液比、pH、提取时间对莲子蛋白提取率 (Y) 的拟合方程:  $Y = 14.46 - 0.015A - 0.27B + 0.41C - 0.26AB + 1.14AC + 0.24BC - 1.65A^2 - 1.64B^2 - 0.87C^2$ 。表 3 显示, 模型的  $P < 0.005$ , 表明本实验所采用的二次模型极显著, 可用来进行响应值 (莲子蛋白提取率) 的预测<sup>[15]</sup>。由 F 检验来判定, 概率  $P(F > F_\alpha)$  的值越小, 则相应变量的显著程度越高。在二次项中, PA, PB 小于 0.01, 说明 pH 值和料液比对提取率 (响应值) 的影响极显著, 而 PC 小于 0.05, 说明提取时间对提取率影响显著。交互项中, PAC 小于 0.05, 说明 pH 值与料液比交互作用对提取率的影响显著。其他各个因素作用不显著。由表 4 可知, 莲子蛋白提取率的负相关系数  $r$  为 0.946 7, 表明该回归模型拟合情况良好, 回归方程代表性较好, 可以准确预测实际情况; 校正系数  $R_{Adj} = 0.878 2$ , 表明 87.82% 的实验数据的变异性可用该模型来解释; 变异系数  $CV = 4.33\%$ , 变异系数越低说明本次实验的可信度与精密度越高; 精密度 (Adeq Precision) 实验中此值大于 4 视为合理, 本次实验精密密度为 9.86, 表明该模型精密度良好。综上所述, 该模型可以较好地反应响应值的变化。根据回归分析结果作出相应的响应曲面图进一步直观地确认料液比、pH 值、提取时间三因素的交互作用对莲子蛋白提取率的影响, 结果见图 3~8。

利用 Design-Expert 8.0 软件进行拟合, 进一步直观了解料液比、pH 值、提取时间之间两两交互作用对莲子蛋白提取率的影响, 结果见图 6~8。交互效应的强弱根据等高线的形状可反映, 圆形表示两因素交互作用较弱, 而椭圆形则与之相反<sup>[16]</sup>。

对图 6~8 进行分析可得出, 提取时间和 pH 值对莲子蛋白提取率的影响较为显著。由等高线图可知, pH 值应选择 7.5~8.5, 料液比应该选择在 1:12~1:17; 提取时间应在 5.5~10 h。以上响应面图和等高线图的分析结果也进一步验证了通过单因素分析而获得的最佳提取工艺参数。

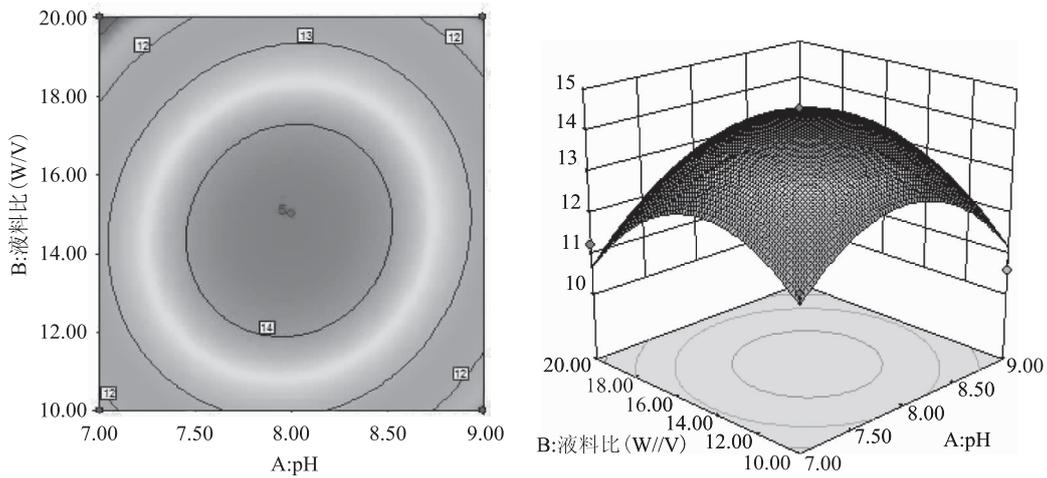


图6 pH与液料比的交互作用响应面及等高线

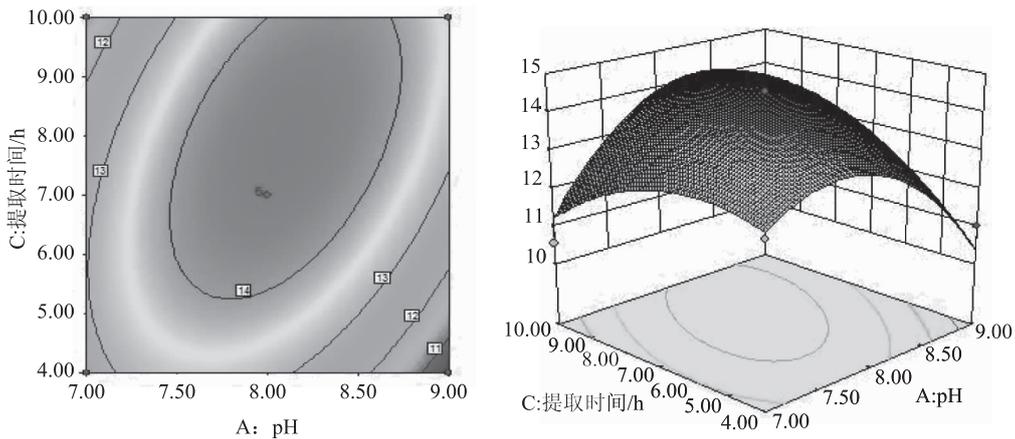


图7 pH与提取时间的交互作用响应面及等高线

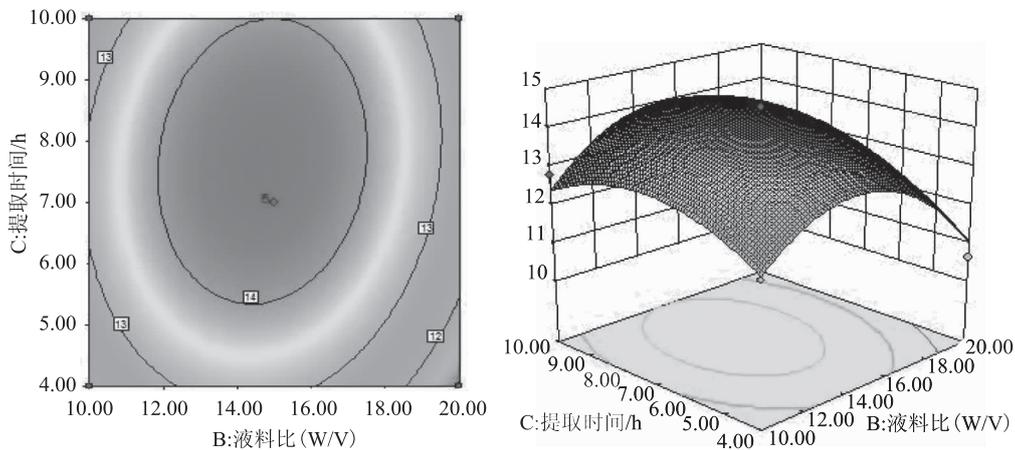


图8 液料比与提取时间的交互作用响应面及等高线

通过模型分析<sup>[17]</sup>，响应值R取最大值时，提取条件的取值：料液比为1:15，提取时间为7h，提取pH值为8.0，莲子蛋白理论提取率最大。在上述提取条件下，通过进一步实验对模型的可靠性进行验证<sup>[18]</sup>，重复进行3次实验，得到的莲子蛋白的平均提

取率为14.53%，与预测值14.46%的误差为0.54%，说明该回归方程可以较好地预测莲子蛋白的提取率。

#### 4 结论

莲子的药用食用价值很大，但是现在还没有得

到完全开发,无论是从使用状况方面还是经济效益方面来看都是没有益处的。以前经常用的方法是正交试验找到最佳提取条件,但是正交试验有很多缺点,可能会使实验结果不准确。而响应面法就可以很大程度地弥补这些缺点。

本研究以莲子蛋白提取率为考察指标,选取料液比、提取时间、pH值、提取次数四个因素,考察其对蛋白提取率的影响,在单因素试验基础上,利用响应面法建立料液比、提取时间、pH值与总蛋白提取率之间的数学回归模型,并结合相关的方差分析,探讨了关键因素及其相互作用,并结合 Design-Expert 8.0 软件中的 Box-Behnken 进行响应试验分析。

回归分析和验证实验结果表明,此提取方法简单、合理、可行。得到莲子蛋白提取的最佳条件:料液比 1:15,提取时间 7 h,提取 pH 值 8.0,蛋白的实际提取率为 14.53%。

#### 参考文献

- [1] 唐佩华,姜华,李群英. 莲子贮存蛋白的主要亚基及积累模式[J]. 植物学报,1999,41(2):176-180.
- [2] 郑宝东,郑金贵,曾绍校. 我国主要莲子品种营养成分的分析[J]. 营养学报,2003,25(2):153-156.
- [3] 张羽,郑铁松,陈静. 莲子蛋白质提取工艺研究[J]. 食品科学,2007,8(9):144-147.
- [4] 李光,李学兰,孙慧峰,等. 响应面法优化铁皮石斛多糖提取条件[J]. 中国现代中药,2012,21(8):917-920.
- [5] 王永菲,王成国. 五味子果梗总木脂素超声提取工艺的响应面优化[J]. 时珍国医国药,2013,24(9):2093-2095.
- [6] Bhattacharjee R, Sil P C. Protein isolate from the herb, *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), plays hepatoprotective role against carbon tetrachloride induced liver damage via its antioxidant properties[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007,45(5):817-826.
- [7] 宋倩,赵声兰,刘彬球,等. 响应面法优化核桃壳总黄酮提取工艺的研究[J]. 食品工业科技,2013,18(11):214-217.
- [8] Bhattacharjee R, Sil P C. Protein isolate from the herb, *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), plays hepatoprotective role against carbon tetrachloride induced liver damage via its antioxidant properties[J]. Food and Chemical Toxicology, 2007,45(5):817-826.
- [9] 谢海荣,孙永,李红艳,等. 响应面法优化提取三叶青叶中总黄酮的两种工艺比较[J]. 中国食品学报 2015,15(11):105-112.
- [10] LI Q H, FU C L. Application of response surface methodology for extraction optimization of germinant pumpkin seeds protein[J]. Food Chemistry, 2005,92(4):701-706.
- [11] 李化,柯华香,李发洁,等. Box-Behnken 响应面法优选五味子多糖双水相提取工艺[J]. 中药材,2016,39(3):593-597.
- [12] Liu W, Yu Y, Yang R, et al. Optimization of TotalFlavonoid Compound Extraction from *Gynura medica* Leaf Using Response Surface Methodology and Chemical Composition Analysis[J]. Int J Mol Sci, 2010,11(11):4750-4763.
- [13] 肖卫华,韩鲁佳,杨增玲,等. 响应面法优化黄芪黄酮提取工艺的研究[J]. 中国农业大学学报,2007,12(5):52-56.
- [14] Zhao W, Yu Z, Liu J, et al. Optimized extraction of polysaccharides from corn silk by pulsed electric field and response surface quadratic design[J]. J Sci Food Agric, 2011,91(12):2201-2209.
- [15] 孟宪军,李冬男,汪艳群,等. 响应曲面法优化五味子多糖的提取工艺[J]. 食品科学,2010,31(4):111-115.
- [16] 王永菲,王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学学报:自然科学版,2005,14(3):236-240.
- [17] 田泱源,李瑞芳. 响应面法在生物过程优化中的应用[J]. 食品工程,2010(2):8-11.
- [18] Mao W H, Han L J, Shi B. Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoid from *Radix Astragalus* using response surface methodology[J]. Sep. Sci. Technol, 2008,43(12):671-681.

(收稿日期 2016-07-12)