

藜麦蛋白泡沫分离工艺的优化及功能特性分析

隋成博, 张 炜*, 乜世成, 高 红, 宋 林, 荆永康

(青海师范大学 化学化工学院, 青海 西宁 810008)

摘要: 以藜麦种子为原料, 在单因素实验基础上, 采用 Box-Behnken 设计对藜麦蛋白的泡沫分离工艺条件进行优化, 考察了料液比、载液量、温度和 pH 对藜麦蛋白回收率和富集度的影响, 并对藜麦蛋白的亚基分布和功能特性进行了研究。得到的优化工艺条件为: 温度 35 °C, pH 4.0, 载液量 260 mL, 料液比 0.3 g/L, 在该条件下泡沫分离藜麦蛋白, 藜麦蛋白的回收率为 95.68%, 富集度为 7.89; 分离得到的藜麦蛋白具有相对分子质量分别为 50、32~39、22~23 和 8~9 kDa 的基本亚基, 在 60 °C 下, 藜麦蛋白的最高持水量为 9.733 g/g, 最高持油量为 5.848 g/g; 随着藜麦蛋白质量浓度的增加, 藜麦蛋白溶液的乳化能力、乳液稳定性、发泡能力和泡沫稳定性均呈先增大后减小的趋势; 其 DPPH 自由基清除率与剂量呈正相关, 在藜麦蛋白质量浓度为 2.5 g/L 时, 对 3 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液中的 DPPH 自由基清除率达到 56.01%±1.34%。

关键词: 泡沫分离; 藜麦蛋白; 响应面方法; 亚基; 功能性质; 食品化学

中图分类号: TS210.1 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2022) 11-2312-09

Optimization and function characteristics analysis of foam fractionation of quinoa protein

SUI Chengbo, ZHANG Wei*, NIE Shicheng, GAO Hong, SONG Lin, JING Yongkang

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Qinghai Normal University, Xining 810008, Qinghai, China)

Abstract: The foam separation conditions of quinoa protein from quinoa seeds were optimized via Box-Behnken design based on single-factor test. The effects of material to solvent ratio, loading liquid dosage, temperature and pH on recovery and enrichment ratios of quinoa protein were then investigated, followed by analyses on its subunit distribution and functional characteristics. The recovery and enrichment ratios of quinoa protein reached 95.68% and 7.89, respectively, under the optimum process conditions of temperature 35 °C, pH 4.0, loading dosage of 260 mL and ratio of material to solvent 0.3 g/L. The quinoa protein obtained were composed of basic subunits with relative molecular mass of 50, 32~39, 22~23, and 8~9 kDa, respectively. Moreover, the highest water- and oil-holding capacities of quinoa protein were found to be 9.733 g/g and 5.848 g/g, respectively, at 60 °C. Meanwhile, with the increase material to solvent ratio, the emulsifying capacity, emulsion stability, the foaming capacity, and foam stability of quinoa protein showed an initial increase then decrease tendency. The scavenging rate of DPPH radical was positively correlated with the quinoa protein dosage. The scavenging rate of DPPH radical in 3 mL 0.2 mmol/L DPPH solution reached 56.01%±1.34% at a mass concentration of quinoa protein of 2.5 g/L.

Key words: foam separation; quinoa protein; response surface method; subunits; functional properties; food chemicals

藜麦 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 是一种双子叶植物, 发现于南美洲安第斯地区, 已经种植了 5000

多年^[1]。这种作物是印加人的重要食物^[2], 所以被他们称为“粮食之母”。藜麦中含有大量优质蛋白, 其

收稿日期: 2022-04-19; 定用日期: 2022-06-27; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220372

基金项目: 高原人工湿地生态平衡构建与应用示范 (2021-SF-139)

作者简介: 隋成博 (1999—), 男, 硕士生, E-mail: 2351678024@qq.com。联系人: 张 炜 (1972—), 女, 教授, E-mail: zhangwei@qhnu.edu.cn。

蛋白含量高于水稻、大麦、玉米等农作物^[3]。文献报道藜麦种子蛋白平均含量为 12%~23%^[4]。主要贮藏蛋白为 2S 白蛋白和 11S 球蛋白^[5], 谷蛋白和醇溶蛋白含量较低, 是谷蛋白过敏人群的理想选择^[6-8]。目前, 对藜麦蛋白的提取纯化报道较少, 主要提取方法有碱提酸沉法、有机溶剂法、盐析法、微生物发酵法和酶法^[9]。但这些方法存在产量低、成本高、溶剂用量大、污染环境、能耗大、蛋白纯度不够等缺点。

泡沫分离技术是利用液相中形成的气泡作为载体^[10]来分离液相中的溶质或颗粒。该技术基于吸附原理, 在含有表面活性剂分子的液体中鼓泡, 使液体中的表面活性剂吸附在气液界面上, 在液体表面上方形成泡沫层, 将泡沫层与液体分离, 可达到表面活性剂浓缩、液体净化的目的^[11-14]。泡沫分离技术具有设备简单、放大方便、操作简单、能耗低、可连续操作等优点。在常温低浓度条件下杂质去除率高, 可达到较高的蛋白分离效率^[15-17]。同时, 该法对蛋白的功能特性影响小, 因此, 在降低分离植物蛋白成本和保证蛋白功能性方面有巨大潜力^[18-19]。藜麦蛋白的起泡性和气泡稳定性优于大豆蛋白低于乳清蛋白, 且都与浓度呈正相关, 当藜麦蛋白达到一定浓度时可与乳清蛋白性能相当, 可用于制作不含过敏原蛋糕; 而吸水性和吸油性有助于减少水分流失, 从而提供食品所需要的质地, 并起到改善口感的作用^[20]。

本研究以藜麦种子为原料, 建立了以泡沫分离技术纯化藜麦蛋白的工艺方法, 以单因素实验和响应面法对工艺条件进行优化, 并对得到的纯化藜麦蛋白进行部分功能特性测定, 考察纯化后藜麦蛋白的抗氧化活性。该法可利用泡沫分离技术实现高品质藜麦蛋白的大规模工业分离纯化, 并进一步了解藜麦蛋白的生物活性, 为藜麦在食品工业中的开发应用提供科学依据。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

脱皮藜麦种子, 青海卡约初禾生态农业科技有限公司; 牛血清白蛋白(质量分数 98%)、考马斯亮蓝 G250、2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH), HPLC 级, 上海源叶生物科技有限公司; ColorMixed 蛋白标记(11~180 kDa)、5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液, 北京 Solarbio 科学与技术有限公司; SDS-PAGE 凝胶试剂盒, 福州飞净生物科技有限公司; 十二烷基硫酸钠、氯化钠, AR, 国药集团化学试剂有限公司; 大豆油, 益海嘉里(兴平)粮油食品工业有限公司; 无水乙醇、NaOH、磷酸、石油醚, AR, 天津市凯

通化学试剂有限公司; 抗坏血酸, AR, 天津市光复精细化工研究所。

TU-1901 双光束紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; PB-10 pH 计, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; H1850 高速离心机, 湖南湘仪实验仪器开发有限责任公司; VFD-2000 冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; 循环水恒温泡沫分离柱(见图 1), 实验室自制。

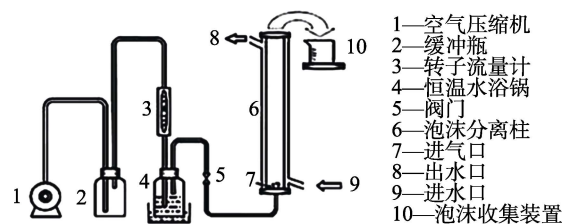


图 1 泡沫分离装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of foam fractionation apparatus

1.2 牛血清白蛋白质量浓度的测定

以牛血清白蛋白溶液质量浓度(ρ , mg/L)为横坐标, 以相应质量浓度下溶液的吸光度(A)为纵坐标绘制校准曲线^[21], 得到标准曲线方程为 $A = 0.00937\rho + 0.00424$, 相关系数 $R^2 = 0.9993$ 。

1.3 藜麦蛋白的提取与泡沫分离纯化

将饱满干燥脱皮的藜麦种子粉碎, 过 60 目筛烘干后, 以石油醚为溶剂在索氏提取器中于 75 °C 提取 8 h 脱脂备用。将脱脂后藜麦种子粉和蒸馏水以料液比 1 : 3 (g : L) 充分混合, 用 NaOH 溶液调整 pH 至 4.0 在 50 °C 下搅拌 2 h, 然后在 8000 r/min 下离心 15 min, 收集液体并用考马斯亮蓝染色法测定蛋白含量^[21]。打开空气压缩机和设备阀, 调节转子流量计, 然后打开恒温水浴系统调整至所需的温度, 并将 260 mL 液体(即载液量)倒入泡沫分离柱, 调整气速为 500 mL/min, 收集泡沫层并倒出残留液体, 得到藜麦蛋白浓缩液, 然后经冷冻干燥(-30 °C、真空度 10 Pa)成粉末。工艺评价指标为藜麦蛋白回收率和藜麦蛋白富集度, 按式(1)和(2)^[22]计算。

$$R / \% = \frac{\rho_f V_f}{\rho_f V_f + \rho_s V_s} \times 100 \quad (1)$$

$$E = \frac{\rho_f V_0}{\rho_f V_f + \rho_s V_s} \quad (2)$$

其中: R 是藜麦蛋白的回收率, %; E 是藜麦蛋白的富集度; ρ_f 、 ρ_s 分别是泡沫层和残留溶液中蛋白的质量浓度, g/L; V_0 、 V_f 、 V_s 分别是初始负载液、泡沫层和残留溶液的体积, mL。

1.4 泡沫分离藜麦蛋白的响应面优化实验

根据 Box-Behnken 设计和回归分析原理, 采用

四因素三水平响应面法对藜麦蛋白泡沫分离工艺进行优化。在单因素实验基础上,选取 pH 为 4.0、温度为 35 °C、载液量为 250 mL、料液比为 0.3 g/L 为 0 水平,每个因素的实验水平分别用 -1、0、1 进行编码(表 1),共设计 29 个实验组,其中 24 个因子点为每个因素形成的三维顶点上的单因素值,5 个零点为区域中心点。响应值为藜麦蛋白的富集度和回收率^[16]。

表 1 响应面设计中使用的因素和水平
Table 1 Factors and levels of response surface design

因素	水平		
	-1	0	1
A 温度/°C	30	35	40
B pH	3.5	4.0	4.5
C 载液量/mL	200	250	300
D 料液比/(g/L)	0.2	0.3	0.4

1.5 藜麦蛋白功能特性的测定

1.5.1 持水能力测定

精确称量 6 份 0.1 g 藜麦蛋白粉样品倒入离心管中,再加入 10 mL 蒸馏水,分别在 20、30、40、50、60、70 °C 下水浴加热 1 h,然后以 3000 r/min 离心 15 min,弃去上清液并称量下层沉淀质量。持水量由式(3)计算:

$$\text{持水量}/(\text{g/g}) = \frac{m_2 - m_1}{m} \quad (3)$$

其中: m 是藜麦蛋白粉样品质量, g ; m_1 是离心管和样品的总质量, g ; m_2 是离心管和沉淀物的总质量, g 。

1.5.2 持油能力测定

精确称量 6 份 0.1 g 藜麦蛋白粉样品加入离心管中,再加入 10 mL 豆油,分别在 20、30、40、50、60、70 °C 的水浴中加热 1 h,然后以 3000 r/min 离心 15 min,去掉上清液,称量下层沉淀物质量。持油量由式(4)计算:

$$\text{持油量}/(\text{g/g}) = \frac{m'_2 - m'_1}{m'} \quad (4)$$

其中: m' 是藜麦蛋白粉样品的质量, g ; m'_1 是离心管和样品的总质量, g ; m'_2 是离心管和沉淀物的总质量, g 。

1.5.3 乳化能力和乳液稳定性测定

分别配制质量浓度为 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0 g/L 的藜麦蛋白水溶液,每份取 2 mL,加入 20 mL 大豆油,然后以 10000 r/min 均质 2 min。精确吸取底部乳液 0.1 mL,立即加入 25 mL 质量分数为 0.1% 的十二烷基硫酸钠(SDS)溶液。使用质量分数为 0.1% 的 SDS 溶液作为对照,并在 500 nm

处测量溶液的吸光度。乳化能力(EC)由式(5)计算:

$$\text{EC}/\% = A_{500} \times 100 \quad (5)$$

将均质化乳液静置 30 min,用相同方法测定其吸光度,标记为 EC_{30} 。乳液稳定性(ES)由式(6)计算:

$$\text{ES}/\% = (\text{EC}_{30} / \text{EC}) \times 100 \quad (6)$$

1.5.4 发泡能力和泡沫稳定性测定

分别配制质量浓度为 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0 g/L 的藜麦蛋白溶液,每份取 20 mL,然后以 10000 r/min 均质 2 min。记录均质化结束时的泡沫体积,发泡能力(FC)由式(7)计算:

$$\text{FC}/\% = (V_1 / V) \times 100 \quad (7)$$

其中: V_1 是均质化结束时的泡沫体积, mL; V 是均质化前的溶液体积, mL。

室温下均质化乳液静置 30 min 后记录泡沫体积,泡沫稳定性(FS)由式(8)计算:

$$\text{FS}/\% = (V_2 / V_1) \times 100 \quad (8)$$

其中: V_2 是静置 30 min 后的泡沫体积, mL。

1.6 相对分子质量分布测定

使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)来测定藜麦蛋白的相对分子质量(简称分子量)分布^[23]。用质量分数为 12% 丙烯酰胺配成质量分数为 4% 的丙烯酰胺堆积凝胶,进样量 5 μL ,调节电压至 60 V 开始电泳。当样品进入丙烯酰胺堆积凝胶时,电压调为 100 V,电泳产生的蛋白条带用考马斯亮蓝 G250 染色。

1.7 抗氧化性测定

以 DPPH 自由基清除率来评价藜麦蛋白的抗氧化性。分别取 1 mL 质量浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 g/L 的藜麦蛋白(或 V_C)溶液,加 3 mL DPPH (0.2 mmol/L)水溶液,充分摇匀反应 90 s,在 517 nm 处测量混合液的吸光度,并由式(9)计算抗氧化物质对 DPPH 自由基的清除率^[24]。

$$\text{DPPH清除率}/\% = [1 - (A_X - A_0) / A] \times 100 \quad (9)$$

其中: A_X 是提取液与 DPPH 混合液的吸光度; A_0 是空白溶液(提取液与水的混合溶液,不含 DPPH)的吸光度; A 是 DPPH 溶液的吸光度。

1.8 数据处理

本文所有实验平行进行 3 次,取平均值进行分析,使用 Origin 8.5 进行映射和数据分析,并使用 Design-Expert V8.0.6.1 对工艺参数进行优化。

2 结果与讨论

2.1 藜麦蛋白泡沫分离工艺单因素实验

2.1.1 酸碱度对回收率和富集度的影响

溶液的酸碱度是影响泡沫分离效果的重要因素

之一。在温度为 35 °C、料液比为 0.3 g/L、载液量为 250 mL 的条件下,研究了溶液酸碱度对藜麦蛋白回收率和富集度的影响,结果见图 2。

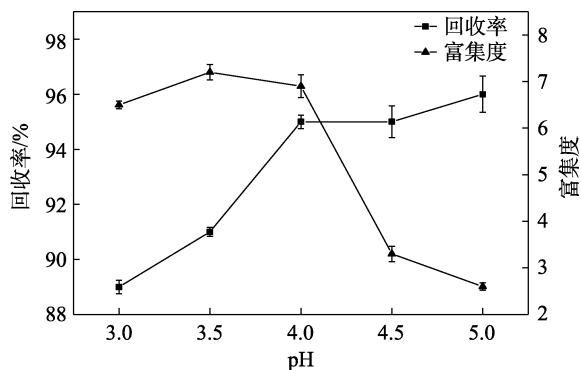


图 2 pH 对富集度和回收率的影响

Fig. 2 Effect of pH on enrichment ratio and recovery ratios

如图 2 所示,随着 pH 从 3.0 增加到 5.0,藜麦蛋白的回收率呈上升趋势,在 pH 为 5.0 时藜麦蛋白的回收率为 96.0%;藜麦蛋白的富集度在 pH 为 3.5 时达到最高 7.2, pH>3.5 后富集度逐渐下降。由于在等电点时,蛋白溶液表现出良好的发泡能力和泡沫稳定性,大大增加了气液传质界面和蛋白的吸附能力。当酸碱度偏离等电点时,蛋白分子再次带电,分子间排斥和溶解度增加。因此,藜麦蛋白的回收率和富集率有一个最大峰值^[25]。因此,选择 pH=4.0 为进一步研究条件。

2.1.2 温度对回收率和富集度的影响

在 pH 为 4.0,载液量为 250 mL,料液比为 0.3 g/L 的条件下,研究了温度对藜麦蛋白回收率和富集度的影响,结果如图 3 所示。

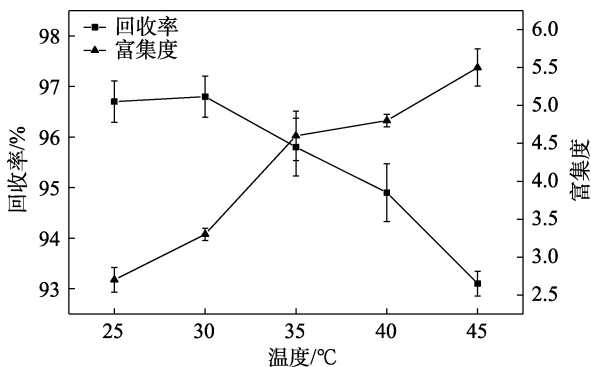


图 3 温度对富集度和回收率的影响

Fig. 3 Effect of temperature on enrichment and recovery ratios

如图 3 所示,随着温度的升高,藜麦蛋白的富集度逐渐增加,当温度为 45 °C 时富集度为 5.5,而藜麦蛋白回收率在 30 °C 时达到最大值,为 96.8%。随着温度的升高,溶液的黏度和扩散阻力都降低,导致吸附阻力降低,吸附容量增加。当温度过高时,

泡沫稳定性下降,回收率下降,但富集度随着泡沫层含水量的降低而增加^[26]。综合考虑回收率和富集度,选择 35 °C 作为进一步研究条件。

2.1.3 载液量对回收率和富集度的影响

在 pH 为 4.0、温度为 35 °C、料液比为 0.3 g/L 的条件下,研究了载液量对藜麦蛋白回收率和富集度的影响,结果如图 4 所示。

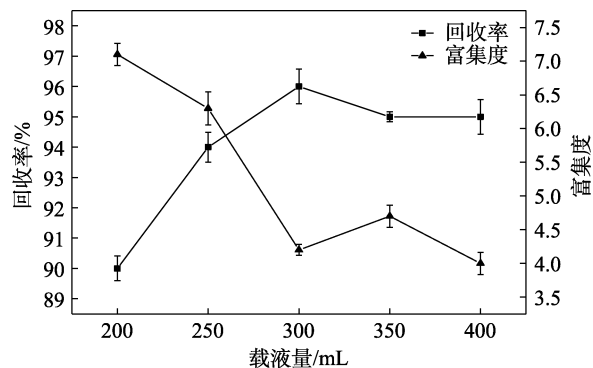


图 4 载液量对富集度和回收率的影响

Fig. 4 Effect of loading liquid dosage on enrichment and recovery ratios

如图 4 所示,随着载液量的增加,藜麦蛋白的回收率呈先升高后降低趋势,当载液量为 300 mL 时,回收率为 96.0%;藜麦蛋白的富集度随载液量升高总体呈下降趋势。当载液量过大时,气泡在液体中的停留时间变短,缩短了蛋白在界面上的吸附时间,从而降低了藜麦蛋白的富集度,提高了回收率。相反,当载液量太小时,气泡在液体中停留的时间变长,泡沫层携带的液体回流过多,导致藜麦蛋白浓度升高,富集度提高,回收率降低^[27]。综合考虑,选择 250 mL 载液量作为进一步研究的条件。

2.1.4 料液比对回收率和富集度的影响

在 pH 为 4.0、温度为 35 °C、载液量为 250 mL 的条件下,研究了料液比对藜麦蛋白回收率和富集度的影响,结果如图 5 所示。

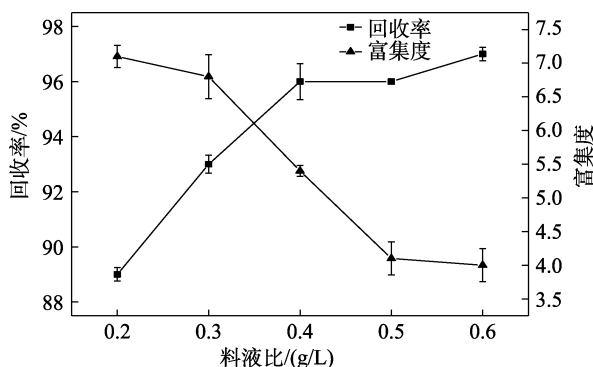


图 5 料液比对富集度和回收率的影响

Fig. 5 Effect of ratio of material to solvent on enrichment and recovery ratios

如图 5 所示, 随着料液比的增加, 藜麦蛋白的富集度呈降低趋势, 回收率呈增加趋势。随着料液比的增加, 形成的泡沫越多, 泡沫的稳定性越好, 表面吸附趋于饱和, 泡沫层携带的液体几乎不再回流, 同时泡中的水分含量也增加, 蛋白的富集速率降低, 回收率趋于提高^[28]。综合考虑回收率和富集度, 选择 0.3 g/L 的料液比作为进一步研究条件。

2.2 藜麦蛋白泡沫分离工艺响应面实验

2.2.1 结果与方差分析

采用泡沫分离法纯化藜麦蛋白, 在单因素实验基础上, 以温度、pH、载液量、料液比 4 个因素为自变量, 藜麦蛋白回收率与富集度为响应值, 设计中心组合实验。根据 Box-Behnken 设计和回归分析的原理, 共进行 29 次实验, 结果如表 2 所示。

表 2 响应面设计和实验结果

Table 2 Response surface design and experimental results

No.	温度/°C	pH	载液量/mL	料液比/(g/L)	回收率/%	富集度
1	35.0	3.5	250.0	0.4	95.0	5.3
2	30.0	4.5	250.0	0.3	96.0	4.2
3	35.0	4.0	300.0	0.4	96.8	4.0
4	35.0	4.0	250.0	0.3	97.0	5.0
5	40.0	4.5	250.0	0.3	93.6	4.3
6	35.0	4.5	250.0	0.4	97.8	2.5
7	30.0	4.0	300.0	0.3	97.9	3.6
8	35.0	4.0	300.0	0.2	96.9	6.9
9	35.0	4.0	200.0	0.4	96.7	3.8
10	40.0	4.0	250.0	0.2	90.4	8.0
11	35.0	4.0	250.0	0.3	96.6	7.1
12	30.0	4.0	250.0	0.4	97.0	2.9
13	35.0	4.0	250.0	0.3	97.4	7.6
14	35.0	4.0	200.0	0.2	93.7	8.7
15	40.0	4.0	200.0	0.3	94.7	6.8
16	30.0	3.5	250.0	0.3	93.9	4.1
17	30.0	4.0	250.0	0.2	93.3	6.2
18	30.0	4.0	200.0	0.3	94.5	5.0
19	35.0	4.5	250.0	0.2	91.2	7.1
20	40.0	4.0	300.0	0.3	94.1	6.9
21	35.0	4.5	300.0	0.3	97.6	4.4
22	35.0	4.0	250.0	0.3	96.8	8.3
23	40.0	3.5	250.0	0.3	92.0	7.7
24	40.0	4.0	250.0	0.4	96.9	4.5
25	35.0	3.5	250.0	0.2	91.2	7.2
26	35.0	4.0	250.0	0.3	96.2	7.8
27	35.0	3.5	200.0	0.3	93.6	8.0
28	35.0	4.5	200.0	0.3	95.8	4.7
29	35.0	3.5	300.0	0.3	96.2	5.3

采用统计软件 Design-Expert V8.0.6.1 进行拟合, 得到了藜麦蛋白回收率 (R) 和富集度 (E) 的响应值。并对回归方程进行了分析, 得出各系数的绝对值越高, 各因素对响应值的影响越大,

正负系数反映了影响的方向^[29], 如表 3、4 所示。

$$R = -117.29 + 4.74A + 50.17B + 0.18C + 22.58D - 0.05AB - 4.00 \times 10^{-0.03}AC + 1.40AD - 8.00 \times 10^{-0.03}BC + 14.00BD - 0.16CD - 0.06A^2 - 6.12B^2 + 1.18 \times 10^{-0.04}C^2 - 115.42D^2$$

$$E = -142.36 + 4.22A + 40.06B - 0.07C + 56.72D - 0.35AB + 1.50 \times 10^{-0.03}AC - 0.10AD + 0.02BC - 13.50BD + 0.10CD - 0.04A^2 - 3.94B^2 - 2.29 \times 10^{-0.04}C^2 - 69.67D^2$$

表 3 回收率反映的方差分析

Table 3 ANOVA for response of recovery ratio

来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值	显著性
模型	117.29	14	8.38	9.86	<0.0001	**
A 温度	9.90	1	9.90	11.65	0.0042	**
B pH	8.50	1	8.50	10.01	0.0069	**
C 载液量	9.19	1	9.19	10.81	0.0054	**
D 料液比	46.02	1	46.02	54.17	<0.0001	**
AB	0.062	1	0.062	0.074	0.7902	
AC	4.00	1	4.00	4.71	0.0477	*
AD	1.96	1	1.96	2.31	0.1510	
BC	0.16	1	0.16	0.19	0.6709	
BD	1.96	1	1.96	2.31	0.1510	
CD	2.40	1	2.40	2.83	0.1148	
A ²	14.19	1	14.19	16.71	0.0011	**
B ²	15.17	1	15.17	17.85	0.0008	**
C ²	0.57	1	0.57	0.67	0.4274	
D ²	8.64	1	8.64	10.17	0.0066	**
残差	11.89	14	0.85			
失余项	11.09	10	1.11	5.55	0.0566	
纯误差	0.80	4	0.20			
总和	129.18	28				

注: *表示差异显著 (P < 0.05); **表示差异极显著 (P < 0.01)。下同。

如表 3 和表 4 所示, 两个模型的 P 值均 < 0.0001, 两个模型的 F 值均 > 0.05, 表明回归模型具有高度显著性。对于回收率, 模型的确定系数 (R²=0.9079) 表示模型可以解释 90.79% 响应值的变化, 调整后的确定系数 (R²_{adj}=0.8159) 表明模型的拟合度较好, 实验误差较小, 可用于设计内预测^[29-30]。A、B、C、D、AC、A²、B²、D² 对模型有显著影响, 影响因素大小顺序为料液比 > 温度 > 载液量 > pH。对于富集度, 模型的确定系数 (R²=0.9123) 表示模型可以解释 91.23% 响应值的变化, 调整后的确定系数 (R²_{adj}=0.8246) 表明模型的拟合度较好, 实验误差较小, 可用于设计范围内的预测。A、B、C、D、AB、A²、B²、D² 对模型有显著影响, 影响因素大小顺序为料液比 > 温度 > pH > 载液量。

表 4 富集度反映的方差分析
Table 4 ANOVA for response of enrichment ratio

来源	平方和	自由度	均方值	F 值	P 值	显著性
模型	81.95	14	5.85	10.40	< 0.0001	**
A 温度	12.40	1	12.40	22.04	0.0003	**
B pH	9.01	1	9.01	16.01	0.0013	**
C 载液量	2.90	1	2.90	5.15	0.0395	*
D 料液比	37.10	1	37.10	65.92	< 0.0001	**
AB	3.06	1	3.06	5.44	0.0351	*
AC	0.56	1	0.56	1.00	0.3344	
AD	0.01	1	0.01	0.018	0.8959	
BC	1.44	1	1.44	2.56	0.1320	
BD	1.82	1	1.82	3.24	0.0935	
CD	1.00	1	1.00	1.78	0.2038	
A ²	7.28	1	7.28	12.93	0.0029	**
B ²	6.28	1	6.28	11.16	0.0048	**
C ²	2.12	1	2.12	3.77	0.0727	
D ²	3.15	1	3.15	5.59	0.0330	*
残差	7.88	14	0.56			
失余项	1.31	10	0.13	0.080	0.9993	
纯误差	6.57	4	1.64			
总和	89.83	28				

2.2.2 响应面分析

对表 3 中的数据进行二次多元回归拟合, 得到二次回归方程的响应面图, 如图 6 所示。其中, 藜麦蛋白回收率在固定温度时, 随 pH 升高先增加再

减少; 藜麦蛋白回收率随着载液量与料液比的变化会产生较大变化, 载液量越大、料液比越大, 藜麦蛋白回收率越高。图 6 直观地反映了泡沫分离过程中各因素之间的交互作用对藜麦蛋白回收率的影响, 在中心点附近, 藜麦蛋白回收率最高, 与表 3 分析结果一致。

对表 4 中的数据进行二次多元回归拟合, 得到二次回归方程的响应面图, 如图 7 所示。其中, 藜麦蛋白富集度在固定料液比时, 随温度升高先增加再减少; 由料液比与温度交互响应面可知, 料液比越小温度越高, 藜麦蛋白富集度越高。图 7 直观地反映了泡沫分离过程中各因素之间的交互作用对藜麦蛋白富集度的影响, 在中心点附近, 藜麦蛋白富集度最高, 与表 4 分析结果一致。

响应值有一个极大值, 各参数之间的等高线呈椭圆形, 交互作用显著, 最高点清晰可见, 说明 4 个因素交互作用显著。统计软件 Design-Expert V8.0.6.1 为响应面分析提供了最佳条件优化模式, 优化工艺为: 温度 35.30 °C, pH 3.98, 载液量 259.61 mL, 料液比 0.29 g/L, 在此条件下藜麦蛋白的回收率为 96.71%, 富集度为 7.27。

2.2.3 预测模型的验证

为了验证响应面设计实验结果的可靠性, 同时结合实际工艺条件, 确定了最佳工艺条件为: 温度 35 °C, pH 4.0, 载液量 260 mL, 料液比 0.3 g/L, 在此条件下藜麦蛋白的回收率为 95.68%, 富集度为 7.89。实验结果与预测值非常接近, 表明响应面设计对于优化藜麦蛋白泡沫分离工艺是可行的。

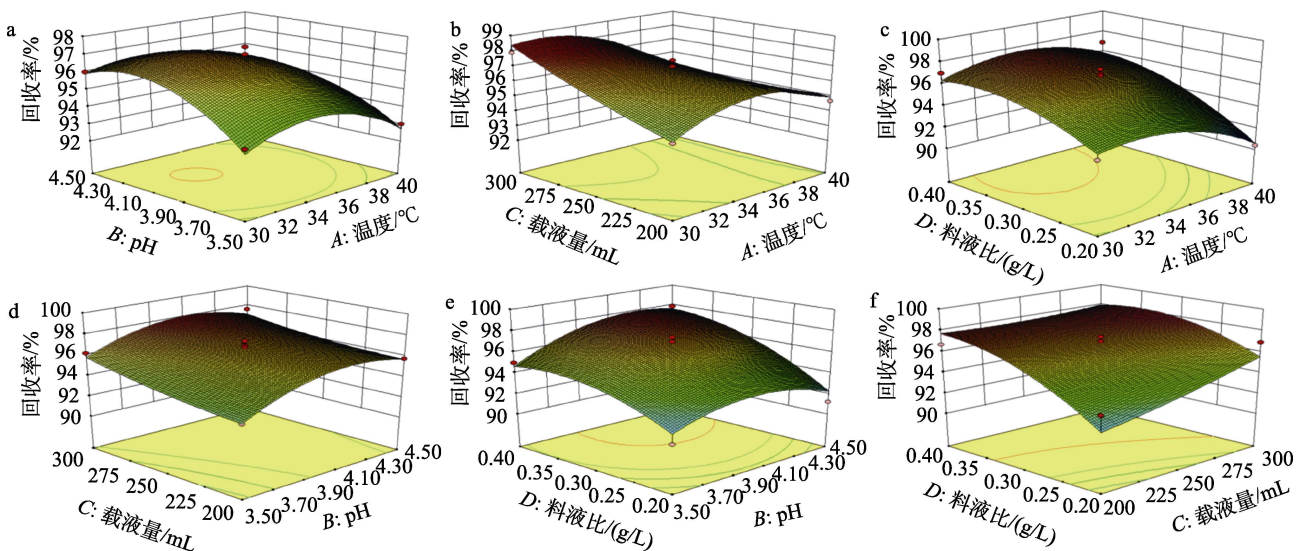


图 6 实验因素对泡沫分离回收率的响应面图

Fig. 6 Response surface diagrams of experimental factors to foam separation recovery ratios

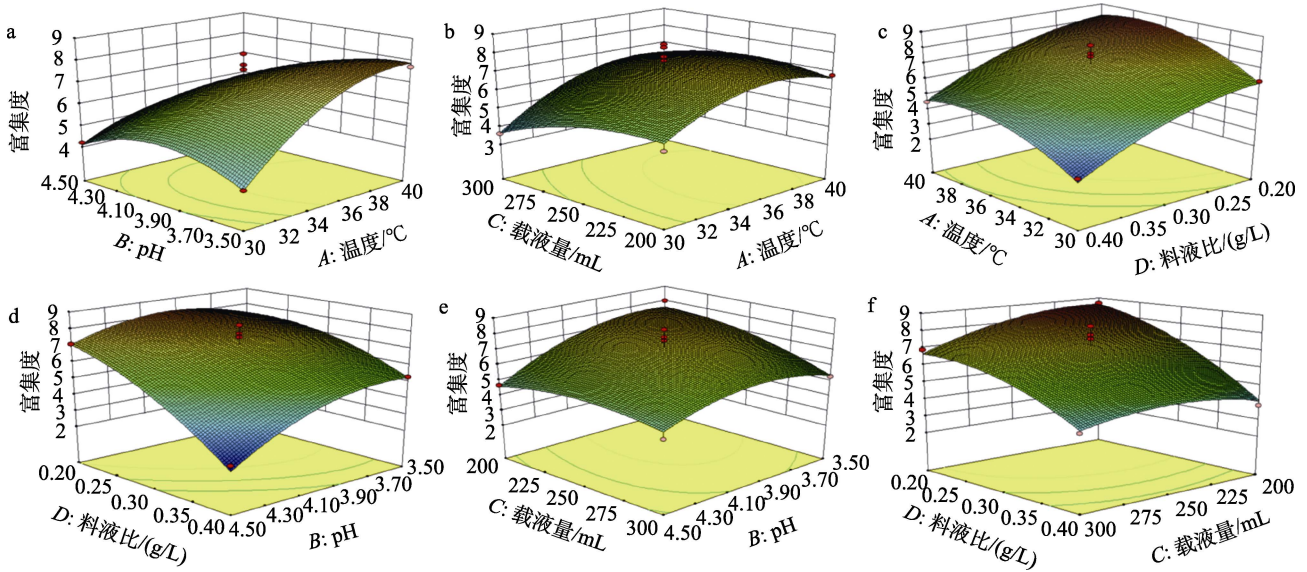
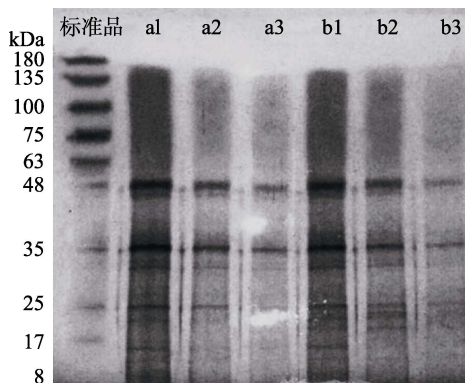


图 7 实验因素对泡沫分离富集度的响应面图

Fig. 7 Response surface diagrams of experimental factors to foam separation enrichment ratios

2.3 藜麦蛋白分子量测定结果

藜麦蛋白的 SDS-PAGE 谱图见图 8。



注: a1~a3 为碱提藜麦蛋白条带, b1~b3 为泡沫分离藜麦蛋白条带

图 8 藜麦蛋白的 SDS-PAGE 谱图

Fig. 8 SDS-PAGE profiles of quinoa protein

如图 8 所示, a2、a3、b2、b3 均为稀释后的藜麦蛋白条带, 碱提藜麦蛋白条带与泡沫分离藜麦蛋白条带几乎没有差异。藜麦蛋白在 50、32~39、22~23 和 8~9 kDa 内有基本亚基条带, 泡沫分离技术纯化的藜麦蛋白分子量与碱法提取的藜麦蛋白(分子量)基本一致[24], 表明泡沫分离技术不会破坏蛋白结构。

2.4 藜麦蛋白的功能特性分析

2.4.1 藜麦蛋白持水性分析

温度对持水量的影响见图 9。如图 9 所示, 在 30~70 °C 内, 随着温度的升高, 藜麦蛋白的持水量呈现先增大后减小的趋势, 在 60 °C 时可达 9.733 g/g, 可能是因为低温下随着温度的升高, 蛋白分子会被适当拉伸, 一些亲水基团与水合氢离子充分结合[30], 从而提高了藜麦蛋白的持水能力。然而, 当温度高于变性温度时, 蛋白分子间的氢键相互作用

和离子基团间的水合作用会减弱, 水解程度会增强, 或者蛋白变性发生聚集, 导致持水能力下降。

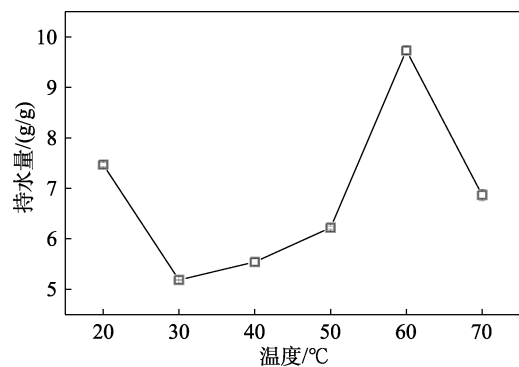


图 9 温度对持水量的影响

Fig. 9 Effect of temperature on water-holding capacity

2.4.2 藜麦蛋白持油能力分析

温度对持油能力的影响见图 10。

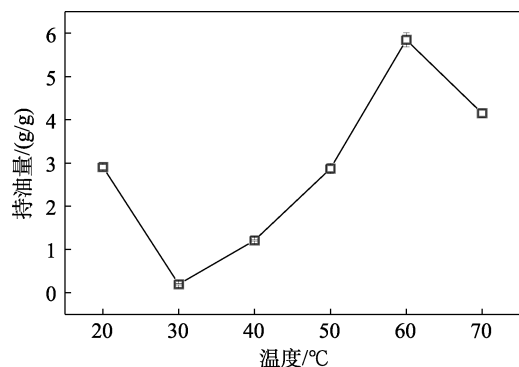


图 10 温度对持油能力的影响

Fig. 10 Effect of temperature on oil-holding capacity

如图 10 所示, 随着温度的升高, 藜麦蛋白的持油能力在 60 °C 时达到最高值 5.848 g/g, 然后开始

下降。随着温度的升高, 油的黏度降低, 导致流动性增加。同时, 由于蛋白变性, 它们之间的相互作用减弱, 从而导致持油能力下降^[31]。

2.4.3 藜麦蛋白乳化能力和乳液稳定性分析

蛋白作为一种表面活性物质, 既含有亲水基团又含有亲油基团, 可降低油水界面的表面张力, 使其易于乳化^[32]。另外, 蛋白分散在不连续相和连续相之间的界面, 防止不连续相的积累, 然后稳定乳液。不同质量浓度藜麦蛋白溶液对乳化能力和乳液稳定性的影响如图 11 所示。

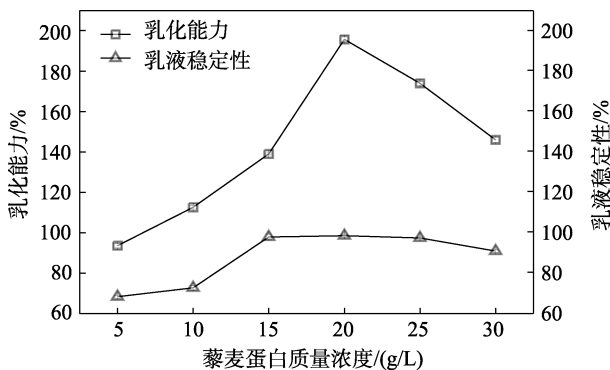


图 11 不同质量浓度藜麦蛋白溶液对乳化能力和乳液稳定性的影响

Fig. 11 Effects of quinoa protein solutions with different mass concentrations on emulsifying capacity and emulsion stability

由图 11 可见, 随着藜麦蛋白溶液质量浓度的增加, 藜麦蛋白的乳化能力和乳液稳定性先增加后降低, 这是因为藜麦蛋白溶液质量浓度越高, 界面膜越厚, 从而提高了膜强度, 乳化能力提高。然而, 继续增大藜麦蛋白溶液质量浓度超过 20 g/L 后, 参与界面相互作用的蛋白量不会增加并达到饱和, 乳化能力不再增加。

2.4.4 藜麦蛋白发泡能力和泡沫稳定性分析

发泡能力是指蛋白在气液界面形成坚韧薄膜的能力, 这使得大量气泡进入并稳定下来。泡沫稳定性是指泡沫形成后的维持能力^[32]。不同质量浓度藜麦蛋白溶液对发泡能力和泡沫稳定性的影响如图 12 所示。

由图 12 可以看出, 随着藜麦蛋白质量浓度的增加, 发泡能力先增大后减小。在高质量浓度下, 液体高速搅拌时, 分子间的相互作用增强, 表面张力进一步降低, 与更多的气体结合形成稳定的气泡。当藜麦蛋白质量浓度为 20 g/L 时, 发泡能力可达 335%, 表明藜麦蛋白具有较好的起泡性。随着藜麦蛋白质量浓度的增加, 泡沫稳定性呈现先增大后减小的趋势, 当藜麦蛋白质量浓度为 20 g/L 时, 泡沫稳定性最高为 77%, 表明藜麦蛋白具有较好的泡沫稳定性。

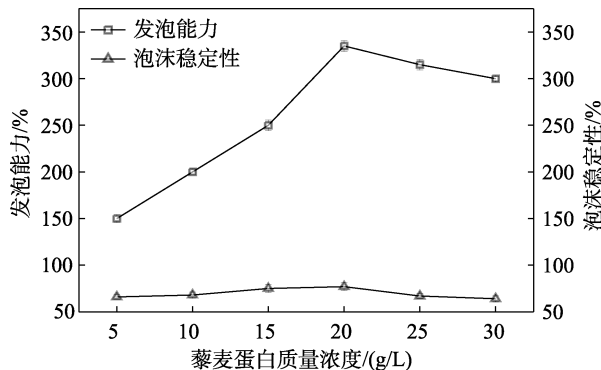


图 12 不同质量浓度藜麦蛋白溶液对发泡能力和泡沫稳定性的影响

Fig. 12 Effects of quinoa protein solutions with different mass concentrations on foaming ability and foam stability

2.5 藜麦蛋白抗氧化性分析

藜麦蛋白的 DPPH 自由基清除率见图 13。

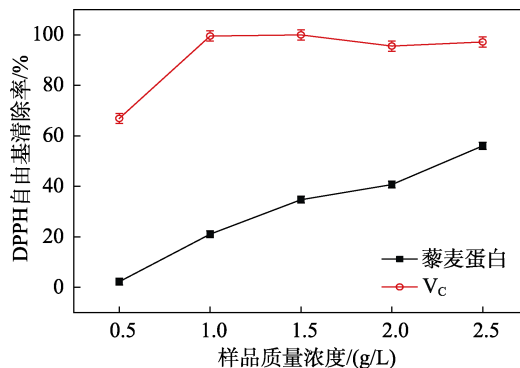


图 13 样品的 DPPH 自由基清除率

Fig. 13 DPPH free radical scavenging rate of sample

如图 13 所示, 在质量浓度为 0.5~2.5 g/L 范围内, 藜麦蛋白对 DPPH 自由基有清除能力, 且与质量浓度呈正相关。当藜麦蛋白质量浓度为 2.5 g/L 时, 其对 3 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液中 DPPH 自由基的清除率为 56.01%±1.34%, 在此质量浓度下 Vc 对 DPPH 自由基的清除率为 97.2%±2.01%, 明显优于藜麦蛋白。结果表明, 藜麦蛋白质量浓度越大, 其 DPPH 自由基清除能力越强^[33]。

3 结论

利用响应面法优化了藜麦蛋白的纯化工艺, 得到的最佳条件为温度 35.30 °C, pH 3.98, 装载量 259.61 mL, 料液比为 0.29 g/L, 在此条件下, 藜麦蛋白回收率为 96.71%, 富集度为 7.27。考虑到实际操作, 优化工艺为温度 35 °C, pH 4.0, 载液量 260 mL, 料液比为 0.3 g/L, 在此条件下, 藜麦蛋白回收率为 95.68%, 富集度为 7.89。泡沫分离技术是分离藜麦蛋白的一种有效、低成本的方法, 可为藜麦蛋白的

开发利用提供理论基础。

泡沫分离得到的藜麦蛋白的分子量范围为 50、32~39、22~23 和 8~9 kDa。藜麦蛋白在 60 °C 时的最高持水量为 9.733 g/g，最高持油量为 5.848 g/g。随着藜麦蛋白溶液质量浓度的增加，藜麦蛋白的乳化能力、乳液稳定性、发泡能力和泡沫稳定性都呈先增加后降低的趋势。藜麦蛋白的 DPPH 自由基清除率具有剂量依赖性，在藜麦蛋白质量浓度为 2.5 g/L 时，对 3 mL 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液中的 DPPH 自由基清除率达到 56.01%±1.34%。藜麦蛋白功能特性的研究结果可为藜麦蛋白功能特性的改善及其产业的发展带来新的研究机遇。

参考文献：

- [1] WEI Z, ZHOU H, XIA X, *et al.* Characteristics of *Chenopodium quinoa* and development recommendations[J]. *Asian Agricultural Research*, 2017, 9(11): 28-31.
- [2] ABUGOCH L, ROMERO N, TAPIA C, *et al.* Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein isolates[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2008, 56(12): 45-47.
- [3] ABUGOCH L. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, chemistry, nutritional, and functional properties[J]. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2009, 58(9): 1-31.
- [4] WRIGHT K H. Composition of atriplex hortensis, sweet and bitter *Chenopodium quinoa* seeds[J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67(4): 1383-1385.
- [5] GERALDINE R, XIAO W K, BOEKEL M, *et al.* Effect of extraction pH on heat-induced aggregation, gelation and microstructure of protein isolate from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)[J]. *Food Chemistry*, 2016, 209: 203-210.
- [6] TANG Y, TSAO R. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: A review[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017: 23-63.
- [7] FAO. Quinoa: An ancient crop to contribute to world food security[R]. Italy: Food and Agriculture Organization, 2011.
- [8] SCHLICK G, BUBENHEIM D. Quinoa: An emerging new crop with potential for CELSS[R]. NASA Technology, 1993.
- [9] WANG J F, LIU L, ZHENG Y C, *et al.* Technology for plant leaf protein extraction and utilization[J]. *Pratacultural Science*, 2003, (1): 7-11.
- [10] ZHANG Q, LO C M, JU L K. Affinity foam fractionation of trichoderma cellulase[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, 132(1/2/3): 1051-1065.
- [11] LI Z Q, ZHENG H J, WU Z L. Separation of bovine serum albumin by foam fractionation with sieve tray column[J]. *Separation Science and Technology*, 2015, 50(17): 2747-2751.
- [12] LIU L, ZHANG W, YU X D, *et al.* Process optimization for foam separation of yak whey protein by response surface methodology[J]. *Separation Science and Technology*, 2018: 1-11.
- [13] XIAO Z Y, LI X R, SHAO W Y, *et al.* Purification and concentration of the total saikosaponins extracted from *Radix Bupleuri* using foam fractionation[J]. *Separation Science and Technology*, 2014, 49(3): 469-475.
- [14] LI R, WU Z L, WANG Y J, *et al.* Separation of total saponins from the pericarp of *Sapindus mukorossi* Gaerten. by foam fractionation [J]. *Industrial Crops and Products*, 2013, 51: 163-170.
- [15] JIANG J X, WU Z L, LIU W, *et al.* Separation of soybean saponins from soybean meal by a technology of foam fractionation and resin adsorption[J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 46(4): 346-353.
- [16] CHEN Y C, PARLAR H. Enrichment behavior of immunoglobulin by foam fractionation using response surface methodology[J]. *Separation and Purification Technology*, 2013, 107: 102-108.
- [17] LI R, WU Z L, WANG Y J, *et al.* β -Cyclodextrin preventing protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 103(4): 234-241.
- [18] MARUYAMA H, SEKI H. Recovery of milk whey proteins by foam separation[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2022, 159: 566-574.
- [19] ZHANG K K (张可可), HU N (胡楠), LI H Z (李会珍), *et al.* Advances in foam fractionation technology of plant protein[J]. *Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业)*, 2020, 46(24): 278-283.
- [20] JI J Y (吉静筠), LI H Y (李洪岩), WANG J (王静). Research progress on the functional properties of quinoa protein[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology (中国食品学报)*, 2021, 21(11): 368-376.
- [21] GRINTZALIS K, GEORGIU C D, SCHNEIDER Y J. An accurate and sensitive Coomassie Brilliant Blue G-250-based assay for protein determination[J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 480: 28-30.
- [22] SUN R P (孙瑞婷), YIN H (殷昊), LU K (卢珂), *et al.* Technology of soy protein separation from wastewater by two-stage foam fractionation[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (农业工程学报)*, 2010, 26(11): 374-378.
- [23] YI L Y, LAKEMON C, SAGIS L, *et al.* Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species[J]. *Food Chemistry*, 2013, 141(4): 3341-3348.
- [24] WANG N (王宁), ZHANG Y T (张叶楠), LU X F (卢晓芳). Extraction of Isoflavones from glycine max and its ability to scavenge DPPH free radicals[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences (安徽农业科学)*, 2022, 50(1): 171-176.
- [25] JEONG G, PARK E, WAHLIG V, *et al.* Effect of pH on the foam fractionation of *Mimosa pudica* L. seed proteins[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2004, 45(10): 1581-1587.
- [26] LIU H B, ZHANG W, CHEN Y T, *et al.* Optimization of foam separation of mulberry leaf protein by response surface methodology [J]. *Food Science*, 2015, 36(8): 97-102.
- [27] ZHANG Y, REN H W. Study on potato protein recovery by batch foam separation[J]. *Advanced Materials Research*, 2013, 807/808/809: 1236-1240.
- [28] JIANG C S, WU Z L, LI R, *et al.* Technology of protein separation from whey wastewater by two-stage foam separation[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 55(1): 43-48.
- [29] ANDERSON C, BORROR C, MONTGOMERY D. Response surface design evaluation and comparison[J]. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 2009, 139(2): 629-641.
- [30] CHEN M J, LIN C W. Factors affecting the water-holding capacity of fibrinogen/plasma protein gels optimized by response surface methodology[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 67(7): 2579-2582.
- [31] ASSADPOUR E, JAFARI S, MAHOONAK A, *et al.* Evaluation of protein solubility and water and oil holding capacity of the legume flours[J]. *Iranian Food Science & Technology Research Journal*, 2010, 6(3): 184-192.
- [32] HUNG S, ZAYAS J. Emulsifying capacity and emulsion stability of milk proteins and corn germ protein flour[J]. *Journal of Food Science*, 1991, 56(5): 1216-1218.
- [33] AN Y J (安英杰), LI T T (李田田), WANG R L (王若琳), *et al.* Preparation of dodecyl succinate cyclodextrin ester and its emulsifying properties[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(1): 97-102.