

马铃薯粗蛋白的提取工艺优化及体外抗氧化活性分析

张莉¹, 张建军², 郭永福^{1,*}, 刘汉斌^{1,*}, 李雅丽¹

(1. 定西市人民医院, 甘肃定西 743000;

2. 甘肃中医药大学定西校区, 甘肃定西 743000)

摘要:目的: 为充分利用马铃薯中的粗蛋白资源, 减少资源的浪费和环境污染, 优化了马铃薯粗蛋白工艺。方法: 采用单因素试验结合响应面法, 以马铃薯的粉碎粒度、提取时间、料液比为自变量, 以马铃薯粗蛋白含量为响应值, 得到马铃薯粗蛋白的优选提取工艺。结果: 马铃薯粗蛋白的最佳提取工艺为粒度 80 目, 提取时间 4 h, 料液比 1:25 g/mL, 此时得到马铃薯粗蛋白的含量为 0.27 mg/g, 与预测值 0.28 mg/g 接近。相对误差为 2.56%。体外抗氧化实验表明, 马铃薯粗蛋白对 ABTS⁺·(2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐)、DPPH·(1,1-二苯基-2-苦肼基)、·OH 清除能力较强, 当浓度为 1 mg/mL 时, 其对 ABTS⁺·清除率高达 92.54%。结论: 此工艺稳定可靠, 可用于实际工业生产中马铃薯粗蛋白含量的提取, 为进一步开发利用马铃薯粗蛋白提供理论依据。

关键词: 马铃薯, 粗蛋白, Box-Behnken 响应面法, 提取工艺优化, 体外抗氧化活性

Extraction Technology Optimization and Antioxidant Activity of Potato Crude Protein *in Vitro*

ZHANG Li¹, ZHANG Jianjun², GUO Yongfu^{1,*}, LIU Hanbin^{1,*}, LI Yali¹

(1. Dingxi People's Hospital, Dingxi 743000, China;

2. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Dingxi 743000, China)

Abstract: Objection: In order to make full use of potato protein resources and reduce the waste of potato protein resources and environmental pollution, the optimum extraction process of potato protein was optimized. Method: The optimum extraction technology of potato protein was obtained by single factor experiment combined with response surface methodology, taking particle size, extraction time, solid-liquid ratio as independent variables and potato protein content as response value. Results: The optimum extraction technology of potato protein was 80 meshes in diameter, 4 hours in extraction time and 1:25 g/mL in solid-liquid ratio. At this time, the content of potato protein was 0.27 mg/g, which was closed to the predicted value 0.28 mg/g. The relative error was 2.56%. *In vitro* antioxidant experiments showed that potato protein had a strong ability to scavenge ABTS⁺·, DPPH·, ·OH. When the concentration was 1 mg/mL, the scavenging rate of potato protein to ABTS reached 92.54%. Conclusion: This process was stable and reliable, and could be used to optimize the extraction of potato protein content in actual industrial production. It would provide a theoretical basis for further development and utilization of potato protein.

Key words: potato; soluble protein; Box-Behnken response surface method; optimization of extraction process; antioxidant activity *in vitro*

中图分类号: TS255.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2021)04-0149-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020040342

引文格式: 张莉, 张建军, 郭永福, 等. 马铃薯粗蛋白的提取工艺优化及体外抗氧化活性分析[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 149-154, 160.

ZHANG Li, ZHANG Jianjun, GUO Yongfu, et al. Extraction Technology Optimization and Antioxidant Activity of Potato Crude Protein *in Vitro* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 149-154, 160. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 为重要的粮食作物和经济作物, 在世界各地 100 多个地区均有广泛

收稿日期: 2020-04-29

作者简介: 张莉(1990-), 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向: 中药有效成分与质量标准, E-mail: gszyxyzl@163.com。

* 通信作者: 郭永福(1974-), 男, 本科, 副主任药师, 研究方向: 临床药学, E-mail: 627387844@qq.com。

基金项目: 甘肃省中医药管理局项目(GZK-2017-77)。

种植,马铃薯中的蛋白含量仅次于淀粉,约为4.6%,马铃薯蛋白含有19种氨基酸^[1],营养价值与鸡蛋中的蛋白接近^[2]。按照分子量大小将马铃薯蛋白可分为糖蛋白、高分子量蛋白质、蛋白酶抑制剂3类,其中马铃薯糖蛋白约占蛋白总量的40%,蛋白酶抑制剂占蛋白总量的50%,近年来研究发现马铃薯蛋白酶抑制剂具有抗癌和调节饮食等功效^[3],马铃薯糖蛋白具有抗氧化^[4]、抗肿瘤^[5]、预防紫外线对皮肤伤害^[6]等多种药理活性,还具有酯酞基水解活性、凝胶性、起泡性、乳化性等多种优良加工特性,在食品、保健品以及制药行业具有较高的潜在利用价值^[2,7]。

马铃薯蛋白在我国的资源分布广泛,主要为生产淀粉的过程中产生。据统计,1000 kg马铃薯在生产淀粉的过程中大约可以产生5~12 m³的废液,其中含有1%~2%的蛋白质^[8]。

这些蛋白质常常被废弃或者用作猪饲料,并没有高效提取开发利用。若能充分利用废液中的马铃薯,不仅解决马铃薯生产淀粉过程中所产生的的环境污染和资源浪费的问题,而且对马铃薯蛋白相关产品的开发利用具有较高价值。但国内目前研究马铃薯蛋白瓶颈主要有:提取马铃薯蛋白的工艺尚不成熟^[2,9-10],除杂过程繁杂且所需设备材料价格高昂,无法得到可用于食品级和药用级别的马铃薯蛋白。文献调研发现目前提取马铃薯蛋白的方法有:丙酮提取法、盐提取法、三氯乙酸提取法、酚提取法、醇提取法^[11-14]等,研究结果表明5种提取马铃薯粗蛋白的方法中,磷酸盐缓冲液提取法得到的马铃薯粗蛋白含量最高^[15],且得到马铃薯蛋白的活性较高。但对提取马铃薯蛋白的相关工艺并未做详细研究。基于以上研究背景,本实验采用响应面法对磷酸盐缓冲液提取马铃薯粗蛋白的工艺进行优化,并研究马铃薯粗蛋白的体外抗氧化活性,以期为马铃薯更合理、更环保得用于制药行业以及食品业奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 购自甘肃省定西市安定区西岩路菜市场;邻苯三酚、KH₂PO₄、Na₂HPO₄、NaHSO₃、乙醇(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;考马斯亮蓝 G250(Ultra Pure Grade, No.C8816) Solarbio;牛血清白蛋白(No. B0052) Roche;1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)、2,2-联氨双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)(2,2-azinobis)(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonate, ABTS) 美国 Sigma-Aldrich 公司。

VFD1000 型真空冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;KDC-160HR 型高速冷冻离心机 科大创新股份有限公司;PHS-3C 型精密 pH 计 上海雷磁仪器厂;TU-1950 型紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;FA2104N 型分析天平 上海民桥精密科学仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 马铃薯粗蛋白提取工艺流程 参考陈美林等^[15]提取马铃薯粗蛋白的方法,将新鲜马铃薯洗净,

切成约1 cm³的小块,称取0.50 g,采用1% NaHSO₃溶液护色10 min,取出马铃薯块,置于破壁机中,加入40 mL磷酸盐缓冲液,研磨至匀浆后,加入磷酸盐缓冲液定容至50 mL,静置1 h,充分提取马铃薯粗蛋白,离心:5000 r/min,4 ℃离心5 min,弃渣取上清液,在上清液中加入95% (NH₄)₂SO₄,并且边加入(NH₄)₂SO₄边匀速搅拌,于冰箱中冷藏,静置过夜,取出,离心(4000 r/min,20 min),弃上清液取沉淀,用磷酸盐溶液溶解沉淀,溶液在4 ℃下,透析,3 d后,吸取5 mL透析液置于玻璃试管,加入适量酸性硝酸钡溶液,没有白色沉淀析出,取出蛋白溶液,4000 r/min离心20 min,取上清液,冷冻干燥,48 h后取出得到粉末干燥物,密闭保存。

1.2.2 单因素实验 准确称取0.50 g的新鲜马铃薯,置于1%的NaHSO₃溶液护色,加入一定量的磷酸盐缓冲液研磨成匀浆后备用。经查阅文献,影响蛋白提取的关键因素有:提取时间、料液比、粒度等^[16-20],因此选择马铃薯粉碎粒度、提取时间、料液比为单因素,分别考察其对马铃薯粗蛋白含量的影响。其中粒度分别选择药典1号筛(10目)、3号筛(50目)、5号筛(80目)、7号筛(120目)、9号筛(200目),提取时间分别选择1、2、3、4、5、6 h,料液比分别选择1:6、1:10、1:14、1:18、1:22、1:26 g/mL。各因素固定水平值:粒度为80目(5号筛),提取时间1 h,料液比1:10 g/mL。

1.2.3 响应面试验 在单因素实验结果的基础上,利用Design-Expert 8.0.6软件进行3因素3水平试验设计,以粒度、提取时间、料液比为自变量,以马铃薯粗蛋白含量为响应值,建立二次回归模型,根据模型得到提取马铃薯粗蛋白的最佳工艺条件并进行验证。具体因素与水平设计见表1。

表1 响应面因素水平设计

Table 1 Factors and level value of response surface methodology

水平	因素		
	A 粒度 (目)	B 提取时间 (h)	C 料液比 (g/mL)
-1	20	3	1:18
0	50	4	1:22
1	80	5	1:26

1.2.4 考马斯亮蓝法测定粗马铃薯粗蛋白含量 标准曲线制作:精密称取0.1007 g牛血清白蛋白,定容至100 mL,配制成1 mg/mL的溶液,分别移取0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2 mL溶液置于10 mL容量瓶中定容。分别移取0.5 mL牛血清白蛋白溶液置于试管中,加入5 mL考马斯亮蓝G-250显色液,摇匀,静置5 min,于595 nm下测定其吸光度,以粗蛋白质含量(mg)为横坐标x,以吸光度y为纵坐标绘制标准曲线: $y = 0.290x - 0.01$, $R^2 = 0.998$ 。

样品的测定:取0.5 mL马铃薯提取液置于试管中,加入5 mL考马斯亮蓝显色液,放置5 min,于595 nm下测定吸光度,空白为0.5 mL蒸馏水代替马

铃薯粗蛋白提取液。每个样品重复测定3次,通过标准曲线计算马铃薯粗蛋白含量。

$$\text{样品中蛋白质含量}(\text{mg/g}) = (C \times N \times V_i) / W_f$$

式中: C 为查标准曲线值(mg/mL); N 为稀释倍数; V_i 为提取液总体积(mL); W_f 为样品鲜重(g)。

1.2.5 马铃薯粗蛋白体外抗氧化实验 在最优提取条件下获得的马铃薯蛋白粉末,分别配制成质量浓度为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的马铃薯蛋白溶液,以 V_c 为对照组进行体外抗氧化活性实验。

1.2.5.1 DPPH 自由基清除能力测定 1,1-二苯基-2-苦肼基(DPPH)自由基清除能力的测定参考赵武^[21] 等方法进行试验,并稍作修改。利用移液枪分别移取5 mL 质量浓度为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的马铃薯蛋白溶液和相同质量浓度的 V_c 溶液置于棕色试管中,加入2 mL 浓度为0.2 mmol/L 的DPPH 溶液摇匀,避光反应30 min,在595 nm 波长处测定溶液的吸光度,每个质量浓度设置3个平行试验,取平均值,并依据下式计算DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

其中: A_1 为样品与DPPH 混合液的吸光度; A_2 为样品与无水乙醇混合液的吸光度; A_0 为蒸馏水与DPPH 混合液的吸光度。

1.2.5.2 ABTS⁺ 自由基清除能力测定 2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS)自由基清除能力的测定参考Wang 等^[22] 的方法并稍作修改。依据ABTS 试剂盒的说明,配制好ABTS 工作液,30 ℃ 水浴中避光孵育10~30 min,利用移液枪分别移取2 mL 不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL) 的马铃薯蛋白溶液和相同质量浓度的 V_c 溶液置于棕色具塞刻度试管中,再加入4 mL 的ABTS 工作液,在30 ℃ 水浴中避光反应6 min,595 nm 波长处测定吸光度,每个质量浓度设置3组平行试验,取平均值,并依据下式计算其对ABTS⁺ 自由基的清除率:

$$\text{ABTS}^+ \text{ 自由基清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

其中: A_1 为样品与ABTS 混合液的吸光度; A_2 为样品与甲醇混合液的吸光度; A_0 为蒸馏水与ABTS 混合液的吸光度。

1.2.5.3 ·OH 自由基清除能力测定 羟自由基清除能力的测定参考王晗等^[23] 的方法进行试验并稍作修改。利用移液枪准确吸取不同质量浓度(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL) 的马铃薯蛋白溶液和相同质量浓度的 V_c 溶液各2 mL,置于具塞试管中,然后依次加入2 mL 9 mmol/L 的FeSO₄ 溶液、2 mL 9 mmol/L 的水杨酸溶液和2 mL 9 mmol/L 的双氧水溶液,充分混合均匀,置于37 ℃ 水浴中反应30 min,于595 nm 波长处测定吸光度,每个浓度设置3个平行试验,取平均值,并依据下式计算羟基自由基的清除率:

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100$$

其中: A_0 为FeSO₄ 溶液、H₂O₂ 溶液、水杨酸和蒸馏水混合液的吸光度; A_1 为FeSO₄ 溶液、H₂O₂ 溶液、水杨酸和样品溶液混合液的吸光度; A_2 为FeSO₄ 溶液、蒸馏水、水杨酸和样品溶液混合液的吸光度。

1.3 数据处理

标准曲线绘制及单因素实验数据处理采用Excel 作图,采用Design expert 8.0.6 进行响应面实验数据优化,用SPSS 21.0 软件进行方差分析,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

2.1.1 粒度对马铃薯粗蛋白含量的影响 由图1可知,随着粒度的减小目数的增大,马铃薯粗蛋白含量显著增加,当粒度增加到50目时,马铃薯粗蛋白含量达到最大;当粒度继续增大至50~200目范围内时,马铃薯粗蛋白含量逐渐降低,因此,选择50目为响应面提取马铃薯粗蛋白的中心点。

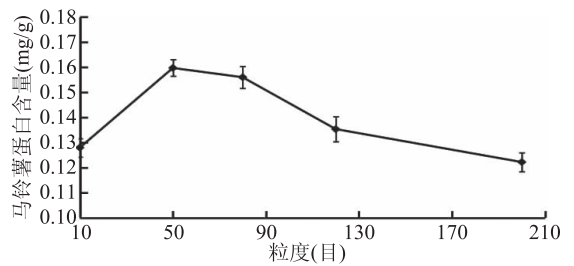


图1 不同粒度对马铃薯粗蛋白含量的影响

Fig.1 Effect of different particle size on potato protein content

2.1.2 提取时间对马铃薯粗蛋白含量的影响 由图2可知,在前4 h之内,随着提取时间的增加,马铃薯粗蛋白含量也随之提高,当提取时间超过4 h以后,马铃薯粗蛋白含量出现拐点,即随着提取时间的延长,马铃薯粗蛋白含量不再增加反而显著($P < 0.05$)降低。这可能是由于随着提取时间的延长,马铃薯中的粗蛋白质的溶出随之增大,当提取时间达到4 h时,马铃薯粗蛋白溶出达到饱和,若再继续延长提取时间,马铃薯中的粗蛋白出现凝聚沉淀与残渣一同被离心除去会降低蛋白质的提取效率^[24-26]。因此,选择4 h为响应面提取马铃薯粗蛋白的中心点。

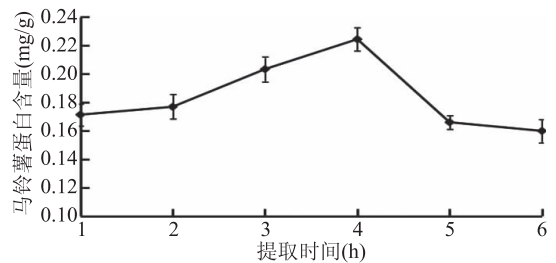


图2 不同提取时间对马铃薯粗蛋白含量的影响

Fig.2 Effect of different extraction time on potato protein content

2.1.3 料液比对马铃薯粗蛋白含量的影响 由图3可知,当料液比在1:6~1:22 g/mL 范围内时,随着提取溶剂的增多,马铃薯粗蛋白含量逐渐升高,当料液比为1:22 g/mL 时马铃薯粗蛋白含量达到最大,此时若继续增加提取溶剂的量,马铃薯粗蛋白含量反而显著降低,因此最终选择1:22 g/mL 为响应面提取马铃薯粗蛋白的中心点。

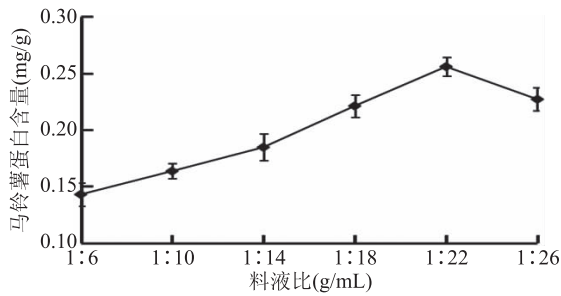


图3 不同料液比对马铃薯粗蛋白含量的影响

Fig.3 Effect of different feed-liquid ratios on potato protein content

2.2 响应面法优化马铃薯粗蛋白提取工艺

2.2.1 响应面法优化实验设计及结果 采用 Design Expert 8.0.6 软件的 ANOVA 分析表 2 中的响应面回归参数,得到回归方程: $Y = 0.24 + 0.077A + 0.012B + 0.020C + 9.6 \times 10^{-3}AB + 0.020AC + 0.012BC - 0.052A^2 - 0.053B^2 - 0.035C^2$ 。

方程中系数绝对值的大小可以反应三个单因素对响应值马铃薯粗蛋白含量影响的强弱程度,系数的正负值反应对响应值影响的方向^[25]。从上述方程中及表 3 可以得出影响马铃薯粗蛋白含量的强弱顺序为:A > C > B,即粒度 > 料液比 > 提取时间。由表 3 数据可以得到,决定系数 $R^2 = 0.9947$,修正后决定系数 $R^2_{Adj} = 0.9880$,两者相近,表明试验值与预测值之间具有高度相关性。模型 P 值 < 0.0001,表明此回归模型极显著;失拟项 P 值 = 0.0542 > 0.05,不显著,表明此模型的拟合程度较好,可用此试验模型来预测磷酸盐缓冲液提取马铃薯可溶性蛋白的结果。三个因素对马铃薯粗蛋白含量的影响顺序依次为:粒度(A) > 料液比(C) > 提取时间(B),与方程中的影响顺序结果一致。其中一次项中粒度、料液比、提取时间对马铃薯粗蛋白含量的影响均为极显著($P <$

表 2 响应面优化实验结果

Table 2 Results of response surface experiments

序号	A	B	C	马铃薯粗蛋白含量(mg/g)
1	80	3	1:22	0.1856
2	20	3	1:22	0.059
3	50	5	1:18	0.1258
4	80	4	1:18	0.1968
5	20	5	1:22	0.0603
6	50	4	1:22	0.2356
7	50	3	1:18	0.124
8	50	5	1:26	0.1998
9	80	5	1:22	0.2253
10	50	4	1:22	0.2353
11	20	4	1:18	0.073
12	50	4	1:22	0.2454
13	50	3	1:26	0.1484
14	80	4	1:26	0.2664
15	50	4	1:22	0.2355
16	20	4	1:26	0.0624
17	50	4	1:22	0.2352

0.01);交互项中粒度与提取时间交互作用对马铃薯粗蛋白含量的影响、粒度与料液比交互作用对马铃薯粗蛋白含量的影响均为极显著($P < 0.01$),料液比与提取时间交互作用对马铃薯粗蛋白含量的影响为显著($P < 0.05$);平方项中粒度的平方、料液比的平方、提取时间的平方对马铃薯蛋白含量的影响均为极显著($P < 0.01$)。

2.2.2 双因素间交互作用影响 三因素间交互作用对马铃薯粗蛋白含量的影响见图 4、图 5、图 6,若三维图坡面较陡峭,等高线图呈椭圆形,表明两因素交

表 3 方差分析结果

Table 3 The result of variance analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.086	9	9.598×10^{-3}	147.16	<0.0001	**
A	0.048	1	0.048	735.29	<0.0001	**
B	1.109×10^{-3}	1	1.109×10^{-3}	17.01	0.0044	**
C	3.097×10^{-3}	1	3.097×10^{-3}	47.48	0.0002	**
AB	3.686×10^{-4}	1	3.686×10^{-4}	5.65	0.0049	**
AC	1.608×10^{-3}	1	1.608×10^{-3}	24.65	0.0016	**
BC	6.15×10^{-3}	1	6.150×10^{-4}	9.43	0.0180	*
A ²	0.012	1	0.012	176.92	<0.0001	**
B ²	0.012	1	0.012	177.93	<0.0001	**
C ²	5.276×10^{-3}	1	5.276×10^{-3}	80.90	<0.0001	**
残差	4.566×10^{-4}	1	6.522×10^{-5}			
失拟项	3.765×10^{-4}	1	1.255×10^{-4}	6.27	0.0542	
纯误差	8.010×10^{-5}	7	2.003×10^{-5}			
总和	0.087	3				
R ²	0.9947	4				
R ² _{Adj}	0.9880	16				

注: * 表示显著($P < 0.05$), ** 表示极显著($P < 0.01$)。

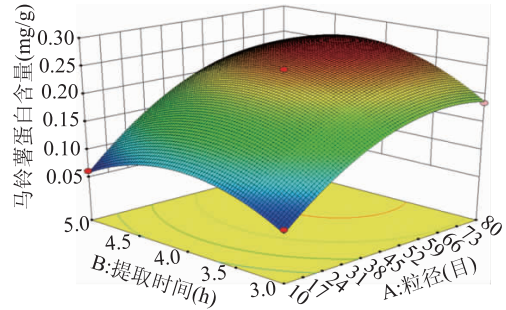
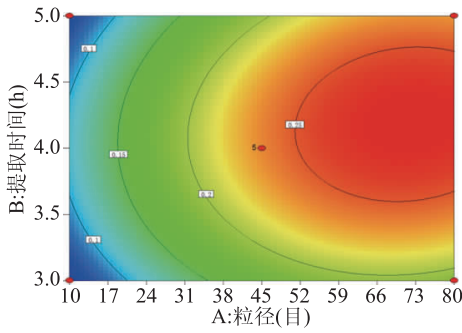


图4 粒度和提取时间交互作用的等高线和响应面图

Fig.4 Contour and response surface diagram of interaction between particle size and extraction time

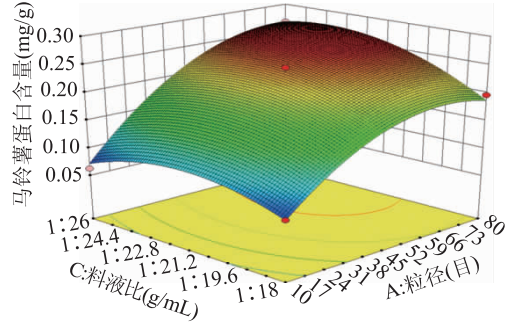
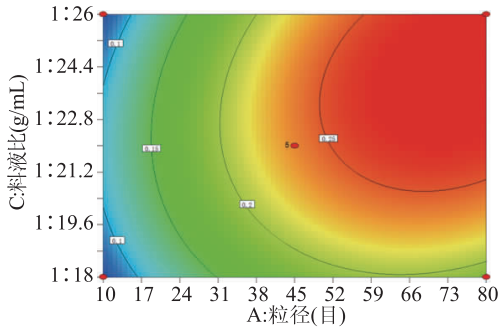


图5 粒度和料液比交互作用的等高线和响应面图

Fig.5 Contour and response surface diagram of interaction between particle size and material-liquid ratio

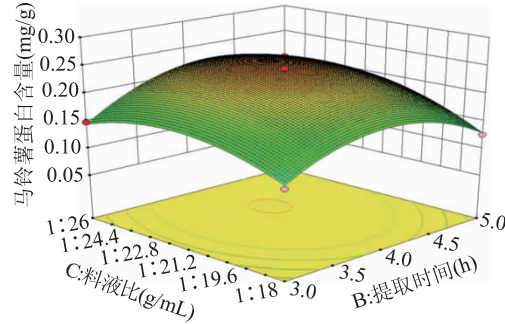
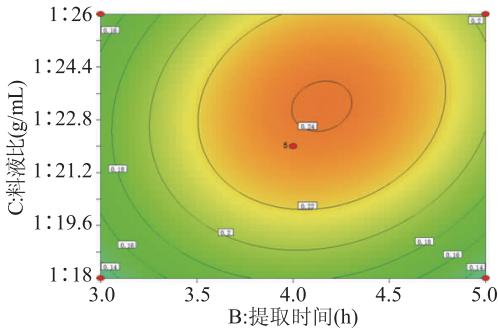


图6 提取时间和料液比交互作用的等高线和响应面图

Fig.6 Contour and response surface diagram of interaction between extraction time and material-liquid ratio

互作用对马铃薯蛋白含量影响较大。由图4可知,粒度和提取时间交互作用对马铃薯粗蛋白含量的影响极显著,由图5可知,粒度和料液比交互作用对马铃薯粗蛋白含量的影响极显著,由图6可知,提取时间和料液比交互作用对马铃薯粗蛋白含量的影响显著。

2.2.3 提取马铃薯粗蛋白最优工艺条件的确定和验证 根据 Design Expert 8.0.6 软件优化提取马铃薯粗蛋白的最佳工艺条件:粒度为 80 目,提取时间为 4.28 h,料液比为 1:24.5 g/mL,此时马铃薯粗蛋白含量为 0.28 mg/g。为了实际试验过程中的可操作性,选择粒度为 80 目,提取时间为 4 h,料液比为 1:25 g/mL 进行验证试验,试验重复 6 次,得到马铃薯粗蛋白含量为 0.27 ± 0.005 mg/g 与预测值 0.28 mg/g 相对误差为 2.53%,表明实验值与预测值吻合良好,优化后的提取马铃薯粗蛋白的方法工艺可行,可用于实际工业生产。

2.2.4 马铃薯粗蛋白抗氧化实验 马铃薯粗蛋白对 DPPH· 的清除作用如图7所示,由图7可知,马铃薯蛋

白具有一定的抗氧化能力,但与 V_C 相比,其抗氧化能力相对较弱。当质量浓度在 0.2~1.0 mg/mL 范围内时,随着马铃薯蛋白质量浓度的增加,对 DPPH· 的清除能力增加,其半数清除浓度 IC_{50} 为 0.247 mg/mL。

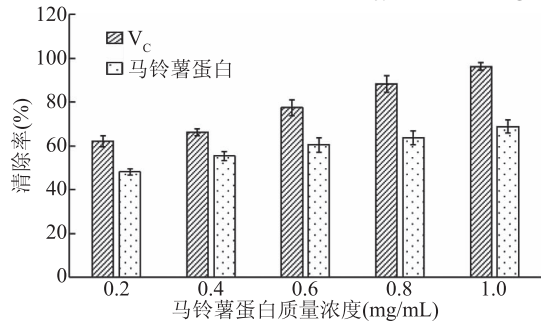


图7 马铃薯蛋白对 DPPH· 的清除作用

Fig.7 Scavenging effect of potato protein on DPPH·

马铃薯粗蛋白对 $ABTS^+$ 的清除作用如图8所示,由图8可知,马铃薯蛋白质量浓度在 0.2~1.0 mg/mL 范围内,随着马铃薯蛋白质量浓度的增加,对 $ABTS^+$

的清除能力增加,但与活性强的 V_c 相比,其清除 $ABTS^+$ 的能力相对较弱。

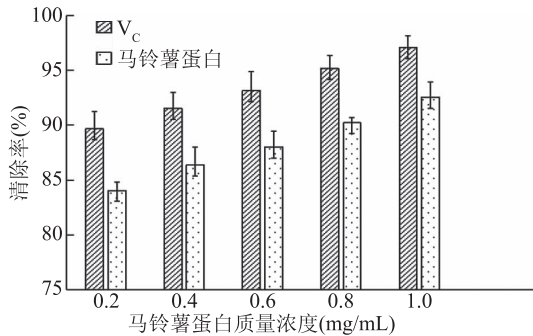


图8 马铃薯蛋白对 $ABTS^+$ 的清除作用

Fig8 Scavenging effect of potato protein on $ABTS^+$

马铃薯粗蛋白对 $\cdot OH$ 的清除作用如图9所示,由图9可知,马铃薯蛋白质量浓度在 0.2~1.0 mg/mL 范围内时,随着马铃薯蛋白质量浓度的增加,对 $\cdot OH$ 的清除能力增加,但与抗氧化活性强的 V_c 相比,其对 $\cdot OH$ 的清除能力较弱。其半数清除浓度 IC_{50} 为 0.496 mg/mL。

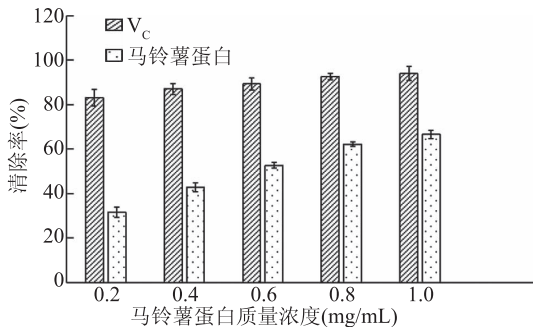


图9 马铃薯蛋白对 $\cdot OH$ 的清除作用

Fig.9 Scavenging effect of potato protein on $\cdot OH$

3 结论

本实验通过响应面法来优化磷酸盐缓冲液提取马铃薯蛋白的工艺,以马铃薯的粉碎粒度、提取时间、料液比为单因素,以马铃薯蛋白含量为响应值,采用 Design Expert 8.0.6 软件优化马铃薯粗蛋白的最佳提取工艺,最后得到马铃薯粗蛋白的最佳提取工艺为粒度 80 目,提取时间 4 h,料液比 1:25 g/mL,此时得到马铃薯粗蛋白的含量为 0.27 mg/g,与预测值 0.28 mg/g 接近。相对误差为 2.56%。在此基础上研究了马铃薯粗蛋白的抗氧化活性。体外抗氧化实验表明,马铃薯粗蛋白对 $ABTS^+$ 、 $DPPH\cdot$ 、 $\cdot OH$ 均具有一定程度的清除能力,当浓度为 1 mg/mL 时,其对 $ABTS^+$ 清除率高达 92.54%,但与活性较强的 V_c 溶液相比,其抗氧化能力相对较弱。本实验提供了一种提取马铃薯蛋白的工艺条件,为工业上更广泛开发利用马铃薯蛋白提供科学依据。但本研究只得到马铃薯蛋白的粗提物,对马铃薯粗蛋白的纯化及相关产品的研究尚待更进一步研究。

参考文献

[1] 曾凡远,刘刚.马铃薯粗蛋白的分离及氨基酸组成分析

[J].食品科学,2014,35(9):53-56.

[2] 刘焱彤,孙伟,李苏红,等.马铃薯糖蛋白 patatin 的研究进展[J].食品科学,2019,40(11):331-337.

[3] Kennedy A R. Chemopreventive agents: Protease inhibitors [J]. Pharmacology and therapeutic, 1998, 78(3):167-209.

[4] 江洪波,徐鑫,高梦祥,等.马铃薯粗蛋白提取方法综述[J].安徽农业科学,2019,47(3):9-11,15.

[5] 王改萍,彭方仁,李生平.银杏叶片蛋白质含量动态变化的电泳分析[J].南京林业大学学报,2006,30(4):114-118.

[6] Hurkman W J, Tanaka C K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis [J]. Plant Physiology, 1986, 81(3):802-806.

[7] 张文会.马铃薯分离蛋白溶液流变学特性及热稳定性研究[D].长春:吉林农业大学,2011.

[8] 邵锦震,邱昌恩,丁毅.不同提取剂对麦醇溶蛋白提取效果的电泳比较[J].武汉植物学研究,2003,21(3):262-266.

[9] 潘牧,彭慧元,雷尊国,等.马铃薯蛋白的研究进展[J].贵州农业科学,2012,40(10):22-26.

[10] Blanco A C, Molina M A, Fernandez S E, et al. Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth [J]. Journal of Biological Chemistry, 1998, 273:12370-12377.

[11] 唐世明,曹军迈,陈彦云,等.马铃薯块茎蛋白质提取方法的筛选[J].江苏农业科学,2016,44(9):326-329.

[12] 李萌萌,蒋继志,王会仙.几种提取马铃薯块茎蛋白质方法的比较研究[J].安徽农学通报,2009,15(23):37-38.

[13] 木泰华,李鹏高.马铃薯中生物活性成分及其功能[J].食品科学,2016,37(19):269-276.

[14] 江昕昕,卢充伟,王秀冬.Lowry 法测定马铃薯中蛋白质提取物的含量[J].解放军药学报,2013,29(4):348-350.

[15] 陈美林,陈业,张玉婷,等.衰减全反射中红外光谱测定马铃薯中粗蛋白含量[J].中国粮油学报,2018,33(12):118-126.

[16] 晋海军,蒋廷红,张嘉,等.川续断根蛋白提取工艺的优化及分析[J].生物学杂志,2020,37(3):102-105.

[17] 王标诗,李雪儿,张世奇,等.响应面法优化水酶法提取辣木籽蛋白质的工艺及其功能性质研究[J].天然产物研究与开发,2019,31(4):587-594,674.

[18] 邱慧,兰梦,李春楠,等.响应面法优化鹿筋蛋白提取工艺及体外抗类风湿性关节炎活性[J].食品工业科技,2020(22):178-184.

[19] 孙天霞,尹翌秋,张鹏飞,等.响应面法优化莲子蛋白提取工艺研究[J].中国现代中药,2017,19(2):250-255.

[20] 王远茜,陈艳艳,王思明,等.响应面法优化黄精总蛋白提取工艺及其氨基酸含量[J].食品工业,2020(5):81-86.

[21] 赵武,严铭铭,郭焱,等.五味子糖蛋白的纯化及抗氧化活性[J].食品工业科技,2018,39(1):241-247.

[22] Wang L L, Xiong Y L. Inhibition of lipid oxidation in cooked beef patties by hydrolyzed potato protein is related to its reducing and radical scavenging ability [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(23):9186-9192.

[23] 邓辉,崔绍进,陈乃富,等.霍山石斛糖蛋白的提取方法

(下转第 160 页)

方案实施的可操作性,对上述工艺条件进行调整为:料液比 1:19,柠檬酸浓度 10.5%,超声时间为 65 min,以此条件在功率为 450 W 的超声下进行三次平行试验测得实际脱钙率为 $99.18\% \pm 0.14\%$,说明该方程与实际情况拟合良好,实际值与预测值的误差约为 0.15%,误差较小,可能是由于条件差异导致。此数据也高于试验中的最高值 99.02%,因而说明运用响应面法优化黄花鱼鱼鳞脱钙工艺的方法相对较为合理,得到拟合方程适用于对黄花鱼鱼鳞脱钙工艺条件进行参数优化和分析。

2.4.4 最优条件下鱼鳞脱钙胶原蛋白的损失率结果 在最优条件工艺下对鱼鳞脱钙液测定胶原蛋白含量,进行三次平行试验,最终得到胶原蛋白损失率为 $4.08\% \pm 0.36\%$,胶原蛋白损失不大。因此表明超声波辅助柠檬酸对黄花鱼鱼鳞的胶原蛋白影响较小,可以对鱼鳞中钙进行有效脱除能进行工艺优化,这将为黄花鱼鱼鳞进行下一步提取胶原蛋白的研究提供很好的基础。

3 结论

通过响应面法设计建立了鱼鳞脱钙的液料比、柠檬酸浓度和超声时间三因素的回归模型,表明该模型与实验拟合程度较好,可利用该模型对黄花鱼鱼鳞脱钙提取率进行分析和预测。三个自变量对鱼鳞脱钙率的影响大小的结果依次为:超声时间 > 料液比 > 柠檬酸浓度。通过优化分析得出黄花鱼鱼鳞最佳脱钙工艺条件为:在超声波功率 450 W 下,料液比为 1:19,柠檬酸浓度为 10.5%,超声时间为 65 min,在此条件下鱼鳞脱钙率高为 $99.18\% \pm 0.46\%$,胶原蛋白损失率为 $4.08\% \pm 0.36\%$,说明超声波辅助可以有效提高柠檬酸对黄花鱼鱼鳞脱钙效果,而且对鱼鳞胶原蛋白的损失极小,这为后续提取鱼鳞胶原蛋白奠定了好的基础。

参考文献

[1] 周爱林. 试论我国渔业发展现状、问题及出路[J]. 农民致富之友, 2018(23):126.
 [2] 张俊杰, 曾庆孝. 鱼鳞的开发利用前景[J]. 中国水产, 2004(5):74-75.
 [3] 杨立. 鱼鳞胶原肽与活性钙的回收、活性评价及相关产品开发[D]. 武汉:华中农业大学, 2011.
 [4] 石维焕, 许永安. 鱼鳞利用的研究进展[J]. 福建水产, 2011, 33(4):67-72.

(上接第 154 页)

优选及抗氧化活性分析[J]. 生物学杂志, 2019(2):107-111.
 [24] 王丹, 江英, 王晨强, 等. 脱脂葡萄籽粕蛋白质提取工艺优化[J]. 农产品加工, 2015(3):22-26.
 [25] Huang C, Ma W Y, Ryan C A, et al. Proteinase inhibitors I and II from potatoes specifically block UV-induced activator protein-1 activation through a pathway that is independent of

[5] 段婷婷, 郑威, 黄玉松. 鱼鳞的结构及其仿生材料[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2017, 38(4):288-292.
 [6] 吴凌涛, 林晨, 李季平, 等. 十种淡水鱼脂肪酸组成及其营养价值分析[J]. 食品工业, 2017, 38(8):269-271.
 [7] Wei Z H, Ma J, Pan X Y, et al. Dietary hydroxyproline improves the growth and muscle quality of large yellow croaker *Larimichthys crocea*[J]. Aquaculture, 2016, 464:497-504.
 [8] Wu T T, Ge Y J, Li Y, et al. Quality enhancement of large yellow croaker treated with edible coatings based on chitosan and lysozyme[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 120(Pt A):1072-1079.
 [9] 吴锁连, 康怀彬, 李冬姣. 鱼鳞有效成分提取技术的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(27):110-112, 141.
 [10] Wang Y, Regenstein J M. Effect of EDTA, HCl, and citric acid on Ca salt removal from Asian (silver) carp scales prior to gelatin extraction[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(6):C426-C431.
 [11] 蒋柏泉, 曾芳, 曾庆芳, 等. 鳙鱼鱼鳞盐酸脱钙工艺及动力学研究[J]. 南昌大学学报(工科版), 2014, 36(2):108-112.
 [12] 彭元怀, 刘小美, 李杏清. 柠檬酸法鱼鳞脱钙的工艺研究[J]. 农业机械, 2012(21):132-135.
 [13] 王梅英, 陈慧斌, 吴云辉. 超声波辅助脱钙法脱除鱼鳞钙工艺研究[J]. 宁德师范学院学报(自然科学版), 2013, 25(4):383-385, 392.
 [14] 肖莉, 郭玉华, 李敬芬. 青鱼鱼鳞柠檬酸法脱钙工艺的优化[J]. 湖州师范学院学报, 2017, 39(4):21-25.
 [15] 胡爱军, 宋飞莹, 郝捷, 等. 利用柠檬酸脱除鲢鱼鱼鳞中钙的工艺条件优化[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(16):77-81.
 [16] 周如意, 刘明华. 草鱼鳞盐酸脱钙工艺研究[J]. 农产品加工, 2017(7):22-25.
 [17] 陈正平, 万丽娟, 魏林生, 等. 柠檬酸浸取脱除鳙鱼鱼鳞钙的研究[J]. 食品与机械, 2014, 30(4):151-154.
 [18] Muthumari K, Anand M, Maruthupandy M. Collagen extract from marine finfish scales as a potential mosquito larvicide[J]. The Protein Journal, 2016, 35(6):391-400.
 [19] 高玲玲, 侯成立, 高远, 等. 胶原蛋白热稳定性研究进展[J]. 中国食品学报, 2018, 18(5):195-207.
 [20] 郭恒斌, 曾庆祝. 分光光度法测定鱼皮中羟脯氨酸含量[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(10):145-148.
 [21] 崔潇, 江虹锐, 刘小玲, 等. 响应面法优化罗非鱼鱼皮胶原多肽螯合镁的工艺条件的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(15):238-241, 245.

extracellular signal-regulated kinases, c-JUN-N-terminal kinases, and P38 kinase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(22):11957-11962.

[26] 吴启康, 杨芝芝, 郝爱平, 等. 枸杞蛋白提取工艺的优化[J]. 贵州农业科学, 2020(10):140-142.