

反胶束提取扁桃仁蛋白工艺优化及理化特性比较

张永松, 丁真真, 陈辛杰, 宋晶晶, 夏娜*

(喀什大学生命与地理科学学院, 新疆帕米尔高原生物资源与生态重点实验室, 新疆喀什 844000)

摘要: 以 AOT 为表面活性剂构建的反胶束体系对扁桃仁蛋白的提取。对前、后提取分别进行单因素试验并阐述其影响作用, 在此基础上对前提取进行响应面优化试验。最终前提取的最佳工艺参数分别为料液质量比 1:15、AOT 质量浓度 0.11 g/mL、温度 41 °C、pH 值为 7.0 和后提取的 KCl 浓度 0.5 mol/L、温度 45 °C、新水相 pH 值为 8.0。该条件下扁桃仁蛋白的前提取率为 67.37%, 后提取率为 66.50%。其理化特性的试验结果显示乳化性和起泡性在 20~100 °C 范围内先升高后降低, 在 pH 值 3.0~9.0 范围内缓慢下降后持续升高, 在 40 °C 下和 pH 值为 9.0 时的乳化性和起泡性较好, 分别为乳化性: 48.93 m²/g、60.22 m²/g; 起泡性: 75.70%、88.05%。这结果与温度对表面疏水性的影响有较大差异 (80 °C 时蛋白表面疏水性最好)。抗氧化活性试验结果显示扁桃仁蛋白对 ABTS⁺ 的清除能力强于 DPPH。其他如溶解性 (74.84%)、持水性 (4.34 g/g) 和持油性 (5.77 g/g) 等特性均较理想。综上所述, 反胶束法用于扁桃仁蛋白的提取有助于得到高质量的扁桃仁蛋白, 为反胶束法应用于扁桃仁蛋白的提取提供科学依据。

关键词: 扁桃仁蛋白; 反胶束; 响应面; 理化特性

文章编号: 1673-9078(2024)08-252-262

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.8.0031

Process Optimization of Almond Protein Extraction by Reverse Micelles and Comparison of Its Physicochemical Properties

ZHANG Yongsong, DING Zhenzhen, CHEN Xinjie, SONG Jingjing, XIA Na*

(College of Life and Geographic Sciences, Kashi University, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Ecology of Pamirs Plateau, Kashi 844000, China)

Abstract: Almond protein was extracted by a reverse micelle system constructed using AOT as the surfactant. Single-factor experiments were conducted on the first and second extraction processes to study their effects. Based on this, response surface optimization experiments were performed on the first extraction process. The optimal parameters for the first extraction are as follows: a solid to liquid mass ratio of 1:15, an AOT mass concentration of 0.11 g/mL, a temperature level of 41 °C, and a pH value of 7.0. For the second extraction, the optimal conditions are as follows: a KCl concentration of 0.5 mol/L, a temperature level of 45 °C, and a pH value of 8.0 for the new aqueous phase. Under these conditions, the almond protein extraction rate of the first and second extraction processes reaches 67.37% and 66.50%, respectively. The physical and chemical properties indicate that emulsifiability and foamability initially increase and then decrease as the temperature rises within the

引文格式:

张永松, 丁真真, 陈辛杰, 等. 反胶束提取扁桃仁蛋白工艺优化及理化特性比较 [J]. 现代食品科技, 2024, 40(8): 252-262.

ZHANG Yongsong, DING Zhenzhen, CHEN Xinjie, et al. Process optimization of almond protein extraction by reverse micelles and comparison of its physicochemical properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(8): 252-262.

收稿日期: 2024-01-08

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2022D01A233); 喀什大学高层次人才科研启动经费项目 (GCC2023002); 喀什大学研究生科研创新项目 (KD2022KY003); 大学生创新创业训练计划项目 (202310763004)

作者简介: 张永松 (1999-), 男, 硕士生, 研究方向: 生物活性物质研究, E-mail: 1879095948@qq.com

通讯作者: 夏娜 (1985-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物活性物质研究, E-mail: conniexn@126.com

range of 20 to 100 °C, while they decrease slowly and then increase continuously as the pH value increases from 3.0 to 9.0. The emulsifiability and foamability of the extracted almond protein are optimal at 40 °C and pH 9.0. More specifically, the emulsifiability reaches 48.93 m²/g and 60.22 m²/g, respectively, whereas the foamability reaches 75.70% and 88.05%, respectively. These results differ from the effects of temperature on surface hydrophobicity, as the highest surface hydrophobicity is observed at 80 °C. Antioxidant activity analysis revealed that almond protein exhibits stronger scavenging ability against ABTS compared to DPPH. Other properties, including solubility (74.84%), water holding capacity (4.34 g/g), and oil holding capacity (5.77 g/g), are favorable. In conclusion, applying the reverse micelle method for almond protein extraction is beneficial in obtaining high-quality almond protein, and the above finding provide a scientific basis for the application of this method in almond protein extraction.

Key words: almond protein; reverse micelle; response surface; physicochemical properties

扁桃 (Almond, *Amygdalus communis* L.), 又称巴旦木, 是蔷薇科扁桃属的小型落叶乔木, 其果实扁而平, 是世界性著名干果^[1]。扁桃仁脂肪和蛋白含量都较高, 分别占扁桃仁总质量的 32%~66% 和 10%~29%, 还含有多种维生素、糖类和无机盐, 具有很高的食用价值^[2]。近年来, 植物蛋白被开发为人类饮食中的动物蛋白替代品, 以扁桃仁蛋白为原料的饮品、乳制品等新型产品进入到大众的视野中。而利用植物蛋白的关键在于选择合适的提取技术, 传统的提取手段如水基、盐、溶剂等以及非常规的细胞破坏方法如酶、微波、高压、超声等辅助提取技术可能会引起蛋白质变性或降解而导致较低的提取率。有研究显示新兴的蛋白质提取技术如静电分离^[3]、亚临界水提取^[4]、水两相系统提取^[5]、反胶束提取^[6]等能显著提高蛋白质提取率及其理化特性。

反胶束 (Reverse Micelle) 是由表面活性剂在非极性有机溶剂中形成的体系: 当表面活性剂溶解于有机溶剂的质量浓度超过临界胶束浓度时, 非极性基团尾部暴露在有机溶剂中, 而极性基团自发向内排列形成“极性水池”, 形成一种有异于正常胶束的体系, 称为反胶束^[7]。极性水池中可以溶解亲水性生物分子, 如蛋白质、酶、氨基酸^[8]等。反胶束系统形成水—表面活性剂—有机溶剂的三相体系, 在该系统中, 极性水池内的生物分子避免了与有机溶剂的直接接触而导致的变性, 水池的大小也对生物分子在胶束中的溶解起着重要作用^[9]。该系统是在纳米尺度上自发形成的, 因此既是动态平衡系统, 又是稳定的热力学系统^[10]。反胶束提取蛋白质的过程包括两个基本步骤: 前提取和后提取, 前提取是在表面活性剂的作用下使蛋白质转移进入极性水池, 油脂转移到有机相中, 后提取则是提高反

胶束系统的离子强度, 使蛋白质从极性水池中释放, 转移到水相中进行回收, 导致水相和油相分离^[11], 实现蛋白质的提取。

二 (2-乙基己基) 琥珀酸酯磺酸钠 (Bis (2-Ethylhexyl) Sulfosuccinate Sodium Salt, AOT) 是一种常用的表面活性剂 (阴离子磺酸盐), 不需要在助表面活性剂的帮助下形成反胶束^[12]。AOT 具有支链双烷基链和单头基, 具有特殊的立体化学, 分子几何形状为楔型, 是表面活性剂在非极性溶剂中最稳定的构象, 因此, AOT 形成的反胶束具有明显的单分散性和球形, 形成的反胶束团具有尺寸大 (1~14 nm) 和能团簇大量水的能力^[12]。

反胶束提取法在植物蛋白提取中报道较多, 但是在扁桃仁蛋白提取的应用中鲜有报道, 本研究将利用 AOT 为表面活性剂制备的反胶束体系对扁桃仁蛋白进行提取研究, 为反胶束在扁桃仁蛋白提取应用中提供科学依据, 为实现反胶束提取技术的工业化应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

扁桃, 购自新疆喀什市环疆农贸市场; AOT (分析纯): 上海麦克林生化科技公司; 十二烷基磺酸钠 (SDS)、异辛烷、氢氧化钾、氢氧化钠、氯化钾、正己烷、乙酸等均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

MTW220 电子天平, 深圳市美孚电子有限公司; 4-20R 高速冷冻离心机, 湖南恒诺仪器设备有限公司; PHSJ-3F pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; RF-6000 荧光检测器、UV-1800 紫外可见分光

光度计, 日本岛津仪器厂; KQ-200VDB 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; DGJ-5C 实验型冻干机, 上海博登生物科技有限公司; HJ-6A 磁力搅拌器, 深圳市鼎鑫宜实验设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 脱脂扁桃仁粉的制备

扁桃仁破壳后、取仁、用粉碎机粉碎, 过 60 目筛网; 扁桃仁粉用正己烷在室温下脱脂, 将脱脂后的扁桃仁粉在通风橱中风干 24 h, 置于冰箱 4 °C 冷藏。采用凯氏定氮法测定脱脂扁桃仁粉的蛋白质含量, 测得扁桃仁的总蛋白质量分数约为 20.33%。

1.2.2 反胶束提取扁桃仁蛋白工艺

1.2.2.1 反胶束溶液的配制

参考和丽等^[13]和 Fang 等^[14]的方法并做适当改变。将准确称取的 AOT 放入烧杯中, 加入异辛烷, 搅拌使其完全溶解, 再加入 2 mL 含有 0.05 mol/L KCl 的不同 pH 值 (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 的 0.05 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate Buffered Saline, PBS), 将其配置成不同质量浓度和 pH 值的 AOT 反胶束溶液, 根据加入的 PBS 来调节反胶束溶液的 W_0 值至 25 ($\text{H}_2\text{O}/$ 表面活性剂), 以 3 000 r/min 离心 20 min 后得到透明澄清的反胶束溶液。

1.2.2.2 反胶束法前提取脱脂扁桃仁蛋白工艺

按照适量的料液质量比 (1:5、1:10、1:15、1:20、1:25) 将准确称量的 5 g 脱脂扁桃仁粉加入到反胶束溶液中, 用超声清洗器在固定超声条件 (24 kHz, 100 W) 和不同温度 (30、35、40、45、50 °C) 下超声 1 h, 3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液 (前提取液), 取 5 mL 前提取液测定蛋白质前提取率, 蛋白质前提取率计算方式如式 (1):

$$P_1 = \frac{E_1}{E_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

P_1 ——反胶束提取扁桃仁蛋白前提取率, %;

E_1 ——前提取液中蛋白质量, mg;

E_2 ——样品总蛋白质量, mg。

1.2.2.3 反胶束法后提取脱脂扁桃仁蛋白工艺

在准确称量的 10 mL 前提取液中加入等体积的含有不同浓度 (0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mol/L) KCl 和 pH 值 (5.0、6.0、7.0、8.0、9.0) 的 PBS, 用超声清洗器在固定超声条件 (24 kHz, 100 W)

和适当温度下 (30、35、40、45、50 °C) 超声 1 h, 然后以 3 000 r/min 离心 20 min, 上层为表面活性剂溶液, 下层为水相。上层可通过旋转蒸发仪回收异辛烷, 下层水相通过透析袋透析 (MD77-14000), 透析后的蛋白水溶液通过冷冻干燥得到扁桃仁蛋白固体粉末。蛋白质后提取率计算方式如式 (2):

$$P_2 = \frac{E_3}{E_4} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

P_2 ——反胶束提取扁桃仁蛋白后提取率, %;

E_4 ——冻干后蛋白质量, mg;

E_3 ——后提取液中蛋白质量, mg。

1.2.3 单因素试验

通过控制单一变量, 分别研究 AOT 反胶束前提取扁桃仁蛋白过程中的料液质量比、AOT 质量浓度、pH 值、提取环境温度的影响以及后提取中 KCl 浓度、pH 值和环境温度的影响, 单因素试验中除单一变量外其他影响因素条件不变。

1.2.4 响应面试验

以单因素试验为基础, 固定料液比, 考察温度、pH 值和 AOT 质量浓度 3 个因素对前提取率的影响, 利用软件 Design Exper.13 设计前提取响应面优化试验。因素水平见表 1。

表 1 响应面因素水平

因素	水平		
温度/°C	35	40	45
pH 值	6.0	7.0	8.0
AOT 质量浓度/(g/mL)	0.08	0.10	0.12

1.3 扁桃仁蛋白理化特性研究

1.3.1 乳化性和乳化稳定性

参照 Sui 等^[15]的方法, 称取 0.5 g 扁桃仁蛋白溶于 50 mL 蒸馏水中, 分为 5 份, 每份 10 mL, 再分别调节蛋白溶液 pH 值为 3.0~9.0; 以上述质量浓度再次配置 50 mL 的扁桃仁蛋白溶液, 调节 pH 值至 7.0, 分为 5 份装入试管, 每份 3 mL, 分别在 20、40、60、80、100 °C 的水浴锅中水浴 20 min。分别加入等体积的大豆油, 用高速均质分散器以 10 000 r/min 均质 1 min 后; 从试管底部吸取 50 μL 乳液加入到 5 mL 1 g/L 的 SDS 溶液中, 测量在 500 nm 处的吸光度 A_0 和 10 min 后吸光度 A_{10} 。乳化性 (EAI) 和乳化稳定

性 (ESI) 分别如式 (3)、(4) 计算:

$$E_{AI}=2 \times T \times \frac{A_0 \times N}{10\,000 \times \theta \times L \times C} \quad (3)$$

$$E_{SI}=\frac{A_{10}}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

E_{AI} —乳化性 (EAI), m^2/g ;

E_{SI} —乳化稳定性 (ESI), %;

$T=2.303$;

A_0 —0 min 时的吸光度;

A_{10} —10 min 时的吸光度;

N —稀释系数 (100);

θ —油相所占比例 (0.5);

L —比色皿光路长度 (1 cm);

C —扁桃仁蛋白质量浓度, g/mL 。

1.3.2 起泡性和泡沫稳定性

扁桃仁蛋白起泡性及起泡稳定性参考 Acho 等^[16]的方法并做适当的修改。将准确称取的 0.05 g 扁桃仁蛋白用 5 mL 蒸馏水完全溶解, 再分别调节蛋白溶液 pH 值为 3.0~9.0。以上述质量浓度再次配置 50 mL 的扁桃仁蛋白溶液, 调节 pH 值至 7.0, 分为 5 份, 每份 3 mL, 分别在 20、40、60、80、100 °C 的水浴锅中水浴 20 min。装入离心管中以 10 000 r/min 均质 1 min, 及时取出记录 0 min 和 10 min 时的泡沫体积。起泡性和泡沫稳定性分别如式 (5)、(6) 计算:

$$D_1=\frac{V_0}{V} \times 100\% \quad (5)$$

$$D_2=\frac{V_{10}}{V} \times 100\% \quad (6)$$

式中:

D_1 —起泡性, %;

D_2 —泡沫稳定性, %;

V —液体总体积, mL;

V_0 —0 min 时的泡沫体积, mL;

V_{10} —10 min 时的泡沫体积, mL。

1.3.3 表面疏水性

扁桃仁蛋白表面疏水性的测定参考马天怡等^[17]的方法并做适当改变。将扁桃仁蛋白用蒸馏水溶解, 使其质量浓度为 15 mg/mL, 并用 pH 值 7.0、0.05 mol/L PBS 稀释至 1~5 mg/mL 的梯度。将稀释液分别置于 20、40、60、80、100 °C 下水浴 30 min,

取水浴后的稀释液 4 mL, 加入 20 μ L、0.01 mol/L ANS 溶液, 室温黑暗环境中反应 15 min 后, 用荧光检测器测定其荧光强度, 设置 $\lambda_{ex}=365$ nm, $\lambda_{em}=484$ nm。以蛋白质量浓度为横坐标, 荧光强度为纵坐标, 拟合一条回归曲线, 其斜率即为样品的表面疏水性^[17]。

1.3.4 抗氧化活性

1.3.4.1 DPPH 自由基清除能力

DPPH 自由基清除能力参考 Chen 等^[18]的方法并做适当修改。利用 $\varphi=95\%$ 乙醇配制 0.25 mg/mL DPPH 测试液, 用 $\varphi=95\%$ 乙醇稀释使其吸光度为 0.6~1.0 之间。将蛋白质用蒸馏水溶解为 15 mg/mL。根据预实验, 将蛋白溶液稀释为 300、600、900、1 200、1 500 μ g/mL, 取 1 mL 稀释液加入到 3 mL 测试液中, 测定 519 nm 处的吸光度。DPPH 自由基清除率按式 (7) 计算。

1.3.4.2 ABTS⁺ 自由基清除能力

ABTS⁺ 自由基清除能力的测定参考徐倩等^[19]的方法并做适当的修改。将 ABTS 储备液 (7.4 mmol/L) 与过硫酸钾 ($K_2S_2O_8$) 储备液 (2.6 mmol/L) 等体积混合, 适当稀释后制成 ABTS⁺ 自由基工作液。根据预实验, 将蛋白溶液稀释为 60、120、180、240、300 μ g/mL, 取 1 mL 稀释液加入到 3 mL 工作液中, 测定 734 nm 处的吸光度。ABTS⁺ 自由基清除率按式 (7) 计算:

$$Q=\frac{A_0-A_1}{A_0} \times 100\% \quad (7)$$

式中:

Q —DPPH 或 ABTS⁺ 清除率, %;

A_0 —不加样品的工作液吸光度;

A_1 —加入样品后工作液的吸光度。

1.3.5 溶解性测定

蛋白质溶解性的测定参考 Han 等^[20]的方法并做适当修改。配置 5 mg/mL 的扁桃仁蛋白溶液, 调节其 pH 值至 7.0, 离心后用考马斯亮蓝法测定上清液中蛋白质量, 溶解性按式 (8) 计算:

$$R=\frac{B_1}{B_2} \times 100\% \quad (8)$$

式中:

R —蛋白质溶解性, %;

B_1 —上清液中蛋白质量, mg;

B_2 —蛋白样品质量, mg。

1.3.6 持水性和持油性

蛋白质的持水/持油性测定参考 Acho 等^[16]的方法并做适当修改。准确称取 0.5 g 扁桃仁蛋白粉末放入离心管中,记录离心管加样品的总质量,加入 5 mL 蒸馏水或大豆油,混匀后在 4 000 r/min 下离心 20 min,除去上清液(游离水或上层油相),将离心管倒置 30 min 后记录总质量。持水/持油性按式(9)计算:

$$C = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100\% \quad (9)$$

式中:

C —持水或持油性, g/10g;

m_1 —离心管和样品离心前的质量, g;

m_2 —离心管和样品离心后的质量, g;

m_0 —蛋白样品质量, g。

1.4 数据处理

至少进行三次重复试验,结果以三次重复试验的平均值表示。采用软件 Origin Pro 2018C 和 Design Exper.13 进行绘图和数据分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

考察了料液质量比、AOT 质量浓度、前提取温度和溶剂 pH 值对反胶束提取扁桃仁蛋白前提取率的影响。料液质量比对扁桃仁蛋白反胶束前提取率影响如图 1a 所示。蛋白质前提取率随料液比的增大而先升高后趋于平缓,在料液比为 1:15 时,达到最高提取率(63.83%)。大量的扁桃仁蛋白进入反胶束溶剂中,但受制于反胶束团的数量和大小,以及原料质量浓度过大,导致过量的蛋白质无法进入反胶束团实现蛋白质的提取,因此蛋白质前提取率随着料液比的增大而升高;但是当料液比过大时,过量的溶液不仅造成试剂的浪费,还会使蛋白质量浓度被稀释,故提取率降低^[21]。

图 1b 显示了 AOT 质量浓度对扁桃仁蛋白前提取率的影响。随着 AOT 质量浓度的增加,提取率也随之升高后降低,在 AOT 质量浓度为 0.10 g/mL 时达到最大提取率(66.20%),随后提取率开始降低。AOT 质量浓度(图 1b)的增加导致反胶束团数量的增加,使扁桃仁蛋白的反胶束前提取率增高。然而,过高的 AOT 质量浓度反而会使反胶束体系粘度增大,表面张力降低,引起反胶束形状的变化,

导致对蛋白质的提取能力下降^[22]。

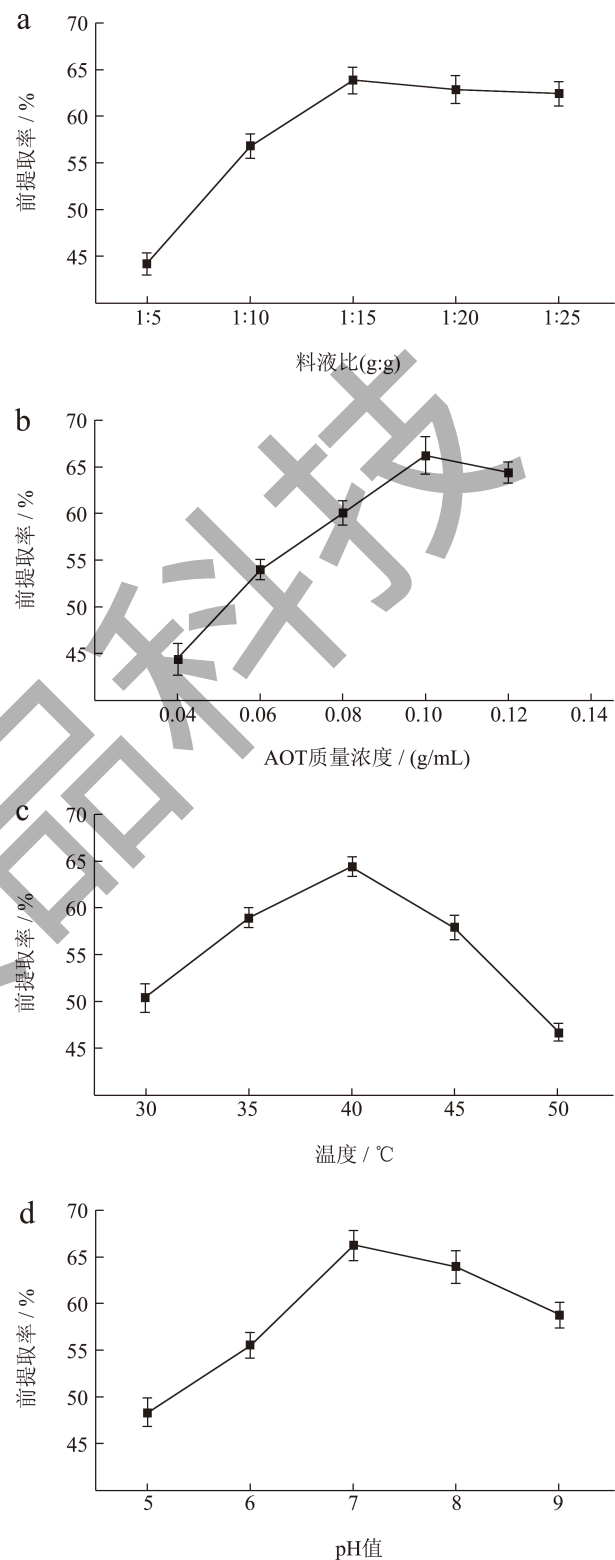


图 1 料液质量比 (a)、AOT 质量浓度 (b)、前提取温度 (c)、溶剂 pH 值 (d) 对反胶束提取扁桃仁蛋白前提取率的影响

Fig.1 Effects of solid-liquid mass ratio (a), AOT mass concentration (b), pre-extraction temperature (c) and solvent pH value (d) on the extraction rate of amygdala protein before reverse micellar extraction

提取温度对提取率的影响如图 1c 所示。扁桃仁蛋白提取率在 30~50 °C 的温度范围内呈现抛物线的形状, 在 40 °C 时提取率最高 (65.33%), 40 °C 之后温度的升高反而使得提取率下降。温度较低时, AOT 反胶束团水池中水分含量较低, 蛋白质不易进入水核, 导致蛋白质在反胶束团中的溶解度下降^[9]。当温度升高时, AOT 反胶束中分子运动速度加快, 水分越来越多地被反胶束包围在极性水池中, 水池中溶解的蛋白含量也随着胶束聚集数的增加而增加, 提取率也随之增高。然而, 温度过高不仅会导致蛋白质变性, 还会降低表面活性剂之间以及表面活性剂和水的亲和力^[23], 导致反胶束团不稳定, 影响了提取效率。

pH 值对扁桃仁蛋白反胶束前提取的影响如图 1d 所示。在反胶束溶液 pH 值为 7.0 时, 提取率最高 (66.16%)。当 pH 值越远离 7.0 时提取率越低。这是因为蛋白质在等电点以上带负电荷时, 以 AOT 为表面活性剂形成的反胶束内表面也带负电荷, 增溶作用的主要驱动力则是蛋白质与表面活性剂之间的疏水相互作用导致^[24]。通常, 蛋白质只被转移到净电荷与表面活性剂基团相反的反胶束上, 但是增溶作用也受蛋白分子与表面活性剂基团之间的静电相互作用控制^[25], 而随着 pH 值的升高, 逐渐增大的静电作用反而会影响了蛋白质的溶解, 降低了提取率。

表 2 响应面设计及其结果

Table 2 Design and results of response surface test

编号	A 温度 / °C	B pH 值	C AOT 质量浓度 (g/mL)	前提取 率 / %
1	35	6	0.10	59.33
2	35	7	0.12	63.27
3	35	8	0.10	60.85
4	35	7	0.08	61.44
5	40	6	0.12	61.22
6	40	6	0.08	60.52
7	40	8	0.12	63.84
8	40	7	0.10	67.59
9	40	8	0.08	60.57
10	40	7	0.10	68.14
11	40	7	0.10	67.38
12	45	8	0.10	62.44
13	45	7	0.12	64.87
14	45	7	0.08	61.76
15	45	6	0.10	61.47

2.2 响应面设计及其结果分析

响应面设计结果见表 2, 利用软件 Design Exper.13 对表 2 中的数据进行回归拟合, 获得回归方程:

$$Y=352.60+8.63\times A+54.38\times B+791.15\times C-0.03\times A\times B+3.20\times A\times C+32.13\times B\times C-0.11\times A^2-3.99\times B^2-5\ 441.67\times C^2$$

对上述结果进行显著性检验, P 值及方差分析结果见表 3。在本试验设计范围内, 回归方程模型显著, 且失拟项不显著, 该模型能解释响应值的变化, 该方程可以比较准确地描述各因素与响应值之间的真实关系。

表 3 方差分析

Table 3 Analysis of variance

变异来源	平方和	自由度	均方值	F	P	显著性
模型	110.04	9	12.23	72.85	<0.000 1	显著
A (温度)	3.99	1	3.99	23.77	0.004 6	显著
B (pH 值)	3.33	1	3.33	19.83	0.006 7	显著
C (AOT 质量浓度)	9.92	1	9.92	59.12	0.000 6	显著
AB	0.075 6	1	0.075 6	0.450 6	0.531 8	
AC	0.409 6	1	0.409 6	2.44	0.179 0	
BC	1.65	1	1.65	9.84	0.025 8	显著
A ²	26.75	1	26.75	159.38	<0.000 1	显著
B ²	58.76	1	58.76	350.06	<0.000 1	显著
C ²	17.49	1	17.49	104.22	0.000 2	显著
残差	0.839 2	5	0.167 8			
失拟项	0.531 2	3	0.177 1	1.15	0.496 5	不显著
纯误差	0.308 1	2	0.154 0			
总离差	110.88	14				

注: 差异显著 ($P<0.05$); 差异极显著 ($P<0.01$)。

2.3 扁桃仁蛋白反胶束前提取响应面分析

为了更直观地表现两个因素对扁桃仁蛋白前提取率的影响, 选取温度、pH 值和 AOT 质量浓度这 3 个因素之一取中间水平, 分析另外两个因素对扁桃仁蛋白前提取率的影响。

根据回归方程得到不同因素的三维响应曲面和等高线, 结果如图 2。等高线图和响应曲面图相对应, 响应曲面越平缓, 等高线图形越接近圆形, 则响应值受条件的影响也越小; 反之响应曲面越陡峭, 等高线图形越远离圆形, 则响应值对于条件的改变越敏感^[26]。

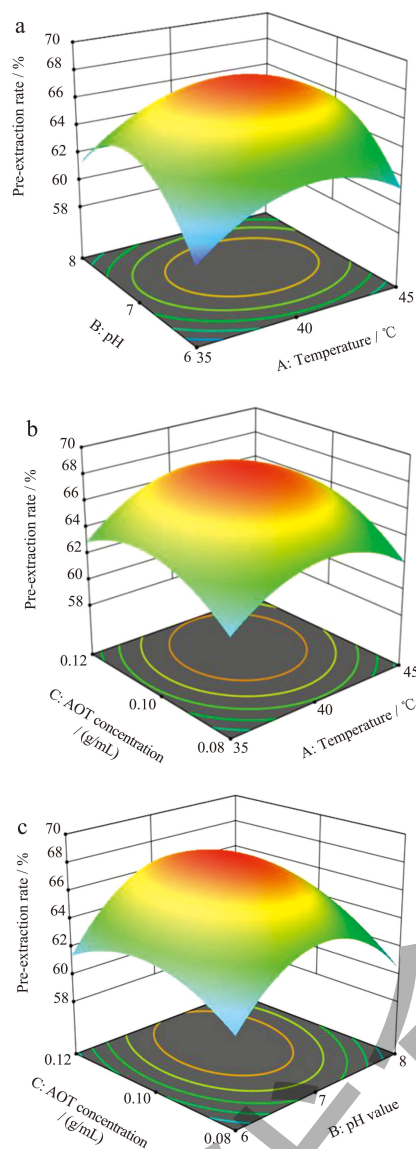


图2 pH值和提取温度(a)、AOT质量浓度和提取温度(b)、AOT质量浓度和溶剂pH值(c)交互作用对反胶束前提取率的影响

Fig.2 Effects of pH value and extraction temperature (a), AOT mass concentration and extraction temperature (b), AOT mass concentration and solvent pH value (c) on the pre-reverse micelle extraction rate

从图2a可以看出,温度和pH值图形曲面较陡峭,等高线远离圆形,表明温度和pH值对反胶束前提取率的影响和交互作用明显。当pH值不变时,前提取率随温度的升高而先增大后减小。

从图2b可知,AOT质量浓度和温度对反胶束前提取率的影响都比较明显而交互作用不明显(曲面陡峭,等高线接近圆形)。前提取率随AOT质量浓度的增加而先增大后减小。当AOT质量浓度固定,

前提取率随温度的增加先增加后减小。

从图2c可以看出,曲面陡峭、等高线都远离圆形,表明AOT质量浓度和pH值对扁桃仁蛋白的前提取率的影响和它们之间的交互作用明显。当AOT质量浓度不变时,前提取率随pH值的升高而先增大后减小。

经过响应面分析优化试验和Design expert.13软件对回归方程进行计算,得到反胶束提取扁桃仁蛋白的最佳工艺条件为温度41℃、pH值为7.0、AOT质量浓度0.11 mg/mL,在此条件下,模型预测的扁桃仁蛋白反胶束前提取率为67.94%。

通过对响应面优化得到的反胶束提取扁桃仁蛋白的最佳工艺条件进行了验证试验,得到扁桃仁蛋白的前提取率为67.37%,与预测值接近,试验结果与模型拟合良好,利用响应面分析优化后的反胶束前提取扁桃仁蛋白的工艺准确可靠,具有一定的可行性。

2.4 各因素对反胶束提取扁桃仁蛋白后提取率的影响

在反胶束后提取过程中,盐离子强度、新水相pH值和后提取温度对提取率的影响较大,故本研究选择这三个变量考察其对反胶束提取扁桃仁蛋白后提取率的影响。新水相pH值对反胶束后提取的影响如图3a所示。随着新水相pH值的升高,后提取率先升高后降低,在pH值为8.0时扁桃仁蛋白的后提取率最高(63.29%)。较高的新水相pH值和离子强度破坏了反胶束团的结构,使蛋白质更容易从水池中释放,且在碱性条件下蛋白质的溶解性更高,但是pH值过高会导致蛋白质之间静电斥力增强,影响提取率^[27]。

温度对后提取的影响如图3b所示。在45℃时达到最大提取率(65.91%),随后提取率开始下降。温度对后提取的影响和对前提取的影响相似,不同的是温度对后提取的影响是在盐离子破坏反胶束体系后,在蛋白质进入新水相的过程中起作用。较高的温度影响着分子间键的强弱,其热力学平衡稳定性也降低,使反胶束团体积缩小甚至破裂^[23],促进扁桃仁蛋白的提取。然而过高的温度会导致表面活性剂分子和蛋白质的聚集和变性,聚集形成的“牢笼”包围蛋白分子,使得蛋白质无法进入新水相^[23]。

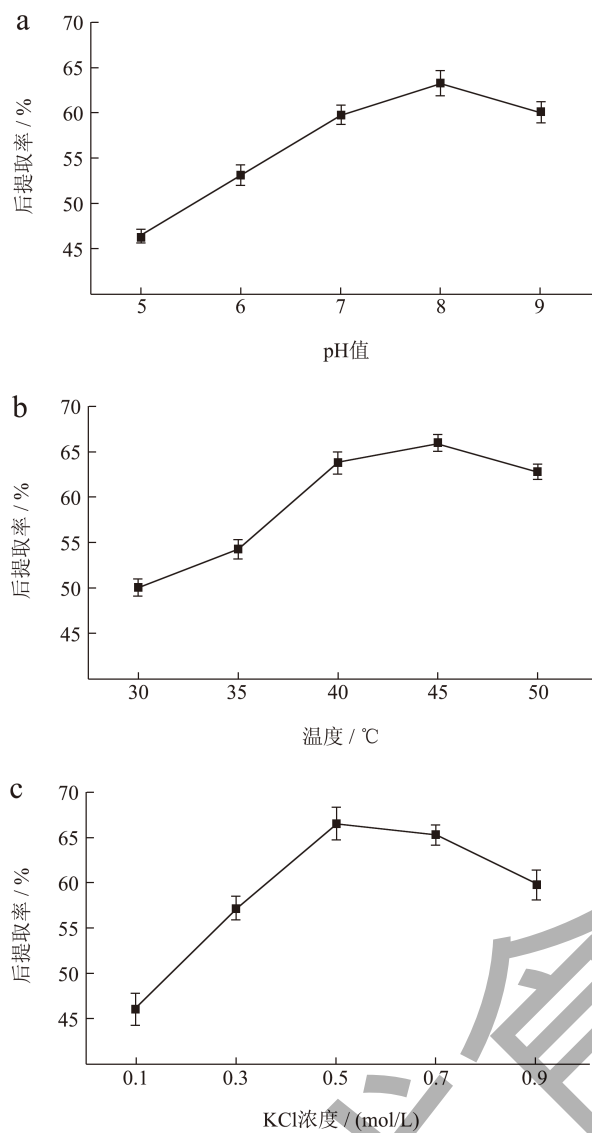


图3 KCl浓度(c)、新水相pH值(a)、后提取温度(b)对反胶束提取扁桃仁蛋白后提取率的影响

Fig.3 Effects of KCl concentration (c), pH value (a) and extraction temperature (b) on the extraction rate of amygdala protein after reverse micellar extraction

KCl浓度对扁桃仁蛋白反胶束后提取率的影响如图3c所示。随着盐离子强度的增加,扁桃仁蛋白提取率在离子强度为0.5 mol/L时达到最高(66.50%)。盐离子破坏了反胶束的稳定性,削弱了蛋白分子与反胶束的内表面和表面活性剂之间极性头部的相互作用^[25],使蛋白质从水池中释放出来,进入新水相。此外,离子浓度的增加可能对反胶束产生盐析作用,使反胶束中的水量减少,促进扁桃仁蛋白的释放^[7]。但是当离子强度不断增加时,胶束之间的相互作用越来越强,会导致胶束团簇的形成,影响了蛋白质的释放^[28]。

2.5 扁桃仁蛋白理化特性研究

2.5.1 扁桃仁蛋白乳化性和乳化稳定性

由图4a可知,扁桃仁蛋白的乳化性随温度的升高而先升高后快速降低,40℃处理下乳化性最大(48.93 m²/g)。这是因为加热能使蛋白质结构展开,暴露疏水基团,提高蛋白质的疏水性,使得蛋白质更容易吸附到油-水界面,增强其乳化性^[29]。而当温度过高会导致蛋白质变性而聚集,还会使乳化颗粒运动加快,降低蛋白质膜的粘度和硬度,影响了蛋白质的乳化性^[30],扁桃仁蛋白在不同温度下的乳化稳定性也近似乳化性的变化趋势。

由图4b可知,扁桃仁蛋白的乳化性和乳化稳定性在pH值3.0~9.0范围内逐渐升高,在pH值为4.0时乳化性最低(23.24 m²/g),pH值9.0时最高(60.22 m²/g),原因是等电点附近因蛋白质所带正负电荷相近,蛋白质会聚集沉降,其乳化性降低。当pH值远离等电点,溶解性升高,表现出良好的乳化性和乳化稳定性^[31]。

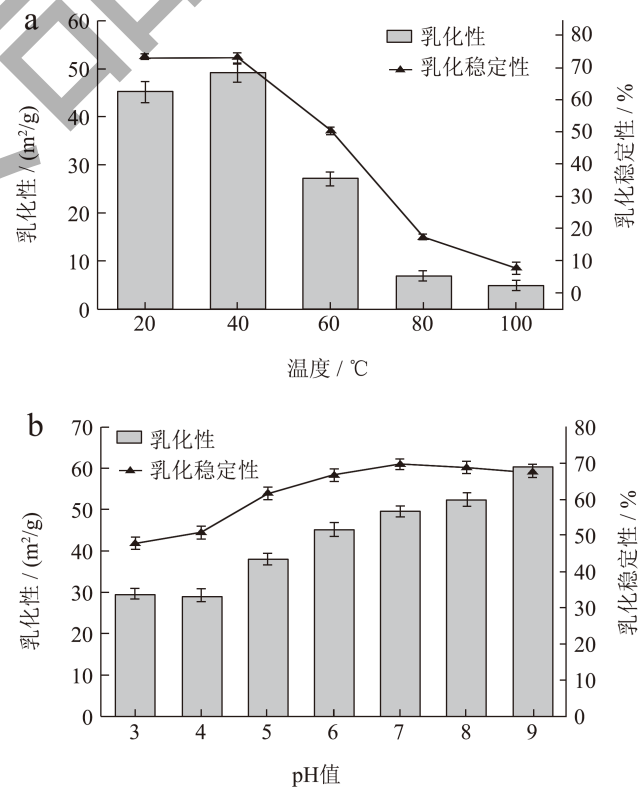


图4 不同温度(a)和pH值(b)下扁桃仁蛋白的乳化性及其稳定性

Fig.4 Emulsification and stability of almond protein at different temperatures (a) and different pH values (b)

2.5.2 扁桃仁蛋白的起泡性和起泡稳定性

由图 5a 可知, 随着温度的升高, 扁桃仁蛋白的起泡性先缓慢上升后快速降低, 在 40 °C 时起泡性较好 (75.70%), 泡沫稳定性为 54.59%。温度升高, 蛋白分子运动加快, 可以快速扩散到气-液界面, 在界面处吸附、展开和重排, 有利于形成分子界面膜, 发泡能力增强^[32]。当温度继续升高, 蛋白质可能会发生变性, 同时界面膜变薄, 导致起泡性和起泡稳定性降低。

由图 5b 可知, pH 值在 3.0~9.0 范围内, 扁桃仁蛋白起泡性先缓慢降低后持续上升, 在 pH 值 4.0 的时候起泡性最低 (40.81%), 但泡沫稳定性却最好 (77.87%), 在 pH 值为 9.0 时起泡性最佳 (88.05%)。这是因为等电点附近蛋白质所带净电荷较少, 静电斥力也较小^[33], 造成起泡性较差。而泡沫稳定性恰恰相反, 在 pH 值为 4.0 时稳定性最好 (77.87%), 这可能是因为较低的溶解性使蛋白质以固形物的方式附着在气泡上增强了气泡的强度^[34]。

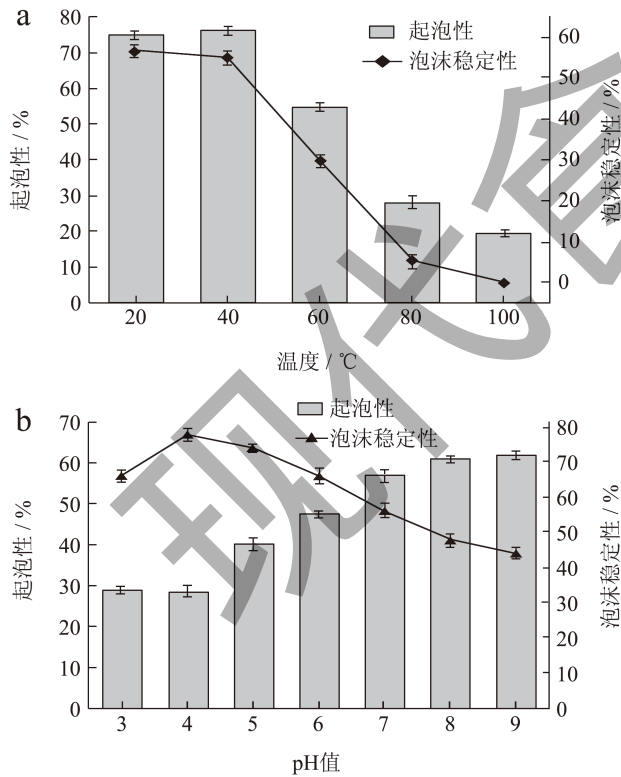


图 5 不同温度 (a) 和 pH 值 (b) 下扁桃仁蛋白的起泡性及其稳定性

Fig.5 Foamability and stability of almond protein at different temperatures (a) and different pH values (b)

2.5.3 扁桃仁蛋白的表面疏水性

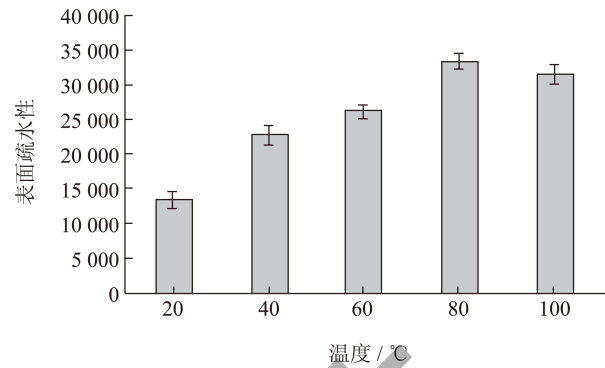


图 6 温度对扁桃仁蛋白疏水性的影响

Fig.6 Effect of temperature on the hydrophobicity of almond protein

温度对扁桃仁蛋白表面疏水性的影响如图 6 所示, 表面疏水性随温度升高而先升高后降低, 在 80 °C 时蛋白表面疏水性达到最大。因为温度升高易导致蛋白质空间结构性的变化, 易使疏水性基团暴露^[24]。当温度过高会使蛋白质变性、聚集沉降, 减弱了蛋白质的表面疏水性。

2.5.4 扁桃仁蛋白的抗氧化活性

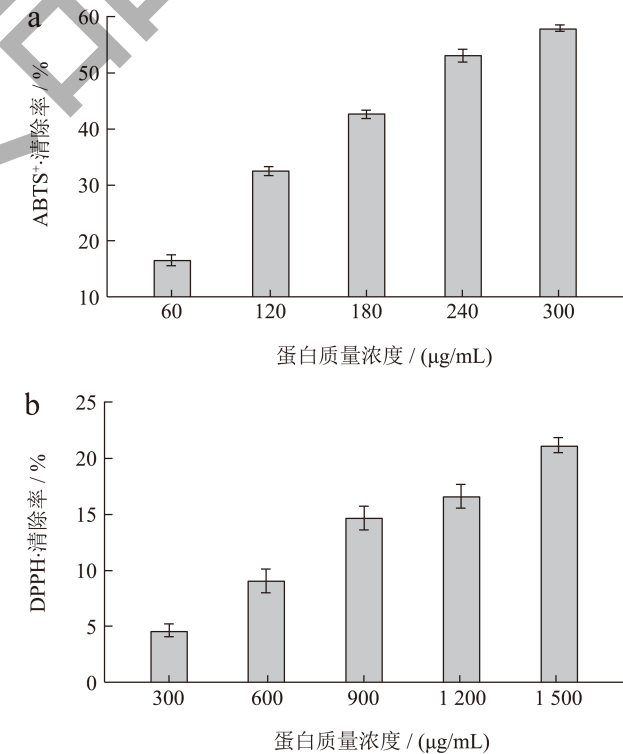


图 7 不同扁桃仁蛋白质量浓度的 DPPH· 清除率 (a) 和 ABTS⁺ 清除率 (b)

Fig.7 DPPH· (a) and ABTS⁺ (b) clearance at different almond protein mass concentrations

DPPH· 和 ABTS⁺· 自由基清除能力是评价蛋白质抗氧化能力的有效指标。由图 7a、7b 可知, 随着蛋白质质量浓度的增大, 扁桃仁蛋白抗氧化能力越大。扁桃仁蛋白对 ABTS⁺· 自由基清除能力较强 (蛋白质质量浓度 300 μg/mL 时 ABTS⁺· 清除率 57.86%), 而对 DPPH 自由基的清除能力较弱 (相同蛋白质质量浓度下 DPPH· 清除率 4.52%), 造成两种方法抗氧化能力差异的原因之一可能是 DPPH 测试液中醇溶液的影响, 造成蛋白质聚集沉淀, 从而影响了 DPPH 的清除效率。

2.5.5 扁桃仁蛋白其他理化特性

表4 pH值7.0、25 °C下微波辅助碱溶法和反胶束法提取的扁桃仁蛋白部分功能性质比较

Table 4 Comparison of partial functional properties of amygdala protein extracted by microwave assisted alkali dissolution method and reverse micelle method at pH 7.0 and 25 °C

功能性质	微波辅助碱溶法	反胶束法
乳化性/(m ² ·g)	25.94 ± 0.15	49.62 ± 1.27
乳化稳定性/%	6.94 ± 0.12	69.59 ± 1.14
起泡性/%	74.86 ± 0.38	80.70 ± 2.15
泡沫稳定性/%	71.22 ± 0.42	56.16 ± 1.93
溶解性/%	55.24 ± 0.25	74.84 ± 1.02
持水性/(g/10g)	4.11 ± 0.12	4.34 ± 0.22
持油性/(g/10g)	6.21 ± 0.08	5.77 ± 0.25

反胶束提取的扁桃仁蛋白在 pH 值 7.0、室温条件下的溶解性为 74.84%, 比杨文敏等^[35]的微波辅助碱溶法 (见表 4) 高约 19.6%, 可能是反胶束中的透析步骤除去大量盐离子, 改善了蛋白溶解性。而持水性 (4.34 g/10g) 较其高约 0.23 g/10g, 持油性 (5.77 g/10g) 较其低约 0.44 g/10g, 差距较小。在 pH 值 7.0 和室温下反胶束提取的蛋白乳化性 (49.62 m²·g) 和乳化稳定性 (69.59%) 比碱溶法高约 23.68 m²·g 和 62.65%, 起泡性 (80.70%) 相较于碱溶法高约 5.84%, 而泡沫稳定性 (56.16%) 相较于碱溶法低约 15.06%。总体经反胶束提取得到的扁桃仁蛋白拥有良好的功能特性, 各特性相较于微波辅助碱溶法得到的扁桃仁蛋白均得到不同程度的改善。

3 结论

本研究以脱脂扁桃仁粉为原料, 构建适合于提取扁桃仁蛋白的反胶束萃取体系, 分别研究单因素

对反胶束提取扁桃仁蛋白的影响。并以单因素试验结果为基础, 选取前提取中温度、pH 值和 AOT 质量浓度 3 个因素进行响应面试验, 探讨其对前提取率的影响。试验表明, 独立因素对前提取过程的影响显著。料液质量比 1:15、AOT 质量浓度 0.11 g/mL、温度 41 °C、pH 值 7.0 为反胶束前提取的最佳工艺条件; 单因素试验结果表明 KCl 浓度 0.5 mol/L、温度 45 °C、新水相 pH 值 8.0 为后提取最佳工艺条件。在此条件下前提取扁桃仁蛋白的前提取率 67.37%, 后提取率为 66.50%。经反胶束提取得到的扁桃仁蛋白具有良好的功能特性, 在 pH 值 7.0 和室温条件下, 溶解性、乳化性、乳化稳定性和起泡性等较微波辅助碱溶法提取的扁桃仁蛋白分别提高了约 19.6%、23.68 m²·g、62.65% 和 5.84%, 持水 / 持油性两种方法提取的蛋白相差较小, 同时反胶束提取的扁桃仁蛋白对 ABTS⁺· 的清除能力强于 DPPH 的清除能力。在 80 °C 时表面疏水性最大, 可能是微乳粒或气泡受温度的影响较大, 致使乳化性和起泡性在此温度下与表面疏水性的研究结果相差较大。综上所述, 利用反胶束提取得到的扁桃仁蛋白具有良好的理化特性和较高的提取效率, 为扁桃仁蛋白的提取提供了一种新的可行性方案, 同时为反胶束法的应用提供理论依据。

参考文献

- [1] 梅立新, 刘文倩, 魏钰, 等. 中国扁桃资源与利用价值分析 [J]. 西北林学院学报, 2014, 29(1): 69-72.
- [2] OMISHIMA H, LUO K, MITCHELL A E. The Almond (*Prunus dulcis*): Chemical properties, utilization, and valorization of coproducts [J]. Annual Review of Food Science and Technology, 2022, 13: 145-166.
- [3] XING Q H, UTAMI D P, DEMATTEY M B, et al. A two-step air classification and electrostatic separation process for protein enrichment of starch-containing legumes [J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2020, 66: 102480.
- [4] SOLANKI D, PRAKASH S, HANS N, et al. Subcritical water hydrolysis of *Chia* seed proteins and their functional characteristics [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 143: 108883.
- [5] CHONG K Y, STEFANOVA R, ZHANG J, et al. Aqueous two-phase extraction of bioactive compounds from *Haskap* leaves (*Lonicera caerulea*): Comparison of salt/ethanol and sugar/propanol systems [J]. Separation and Purification Technology, 2020, 252: 117399.
- [6] POJIĆ M, MIŠAN A, TIWARI B. Eco-innovative technologies for extraction of proteins for human consumption from renewable protein sources of plant origin [J]. Trends in

- Food Science & Technology, 2018, 75: 93-104.
- [7] WANG L M, LIU K L, CHEN F S, et al. Size changes of reverse micelles after extraction of Peanut protein and their forward extraction rates [J]. Grain & Oil Science and Technology, 2018, 1(1): 32-39.
- [8] SINGH N, SHARMA L. Novel carbohydrate based non-ionic gemini surfactants with flexible spacer as reverse micellar systems for encapsulation of D-and L-enantiomers of some aromatic α -amino acids in n-hexane [J]. Tenside Surfactants Detergents, 2018, 55(3): 220-225.
- [9] WANG Z, ZHAO X, HU H, et al. Improved backward extraction of walnut protein using AOT reverse micelles with microwave and its characteristics [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2021, 45(6): e15470.
- [10] DU Y, ZHANG Q, ZHAO X, et al. Effect of reverse micelle on physicochemical properties of Soybean 7S globulins[J]. Journal of Food Engineering, 2020, 282: 110026.
- [11] 孙雪,赵晓燕,朱运平,等.反胶束对植物蛋白的结构、功能性和应用的影响研究进展[J].中国粮油学报,2020, 35(1):196-202.
- [12] ARSENE M L, RĂUT I, CĂLIN M, et al. Versatility of reverse micelles: From biomimetic models to nano (bio) sensor design [J]. Processes, 2021, 9(2): 345.
- [13] 和丽,吴君瑞,王雪峰,等.反胶束法提取辣木籽蛋白工艺优化[J].中国油脂,2021,46(7):80-85,98.
- [14] FANG B, GU Z, OHM J B, et al. Reverse micelles extraction of *Hemp* protein isolate: Impact of defatting process on protein structure, functionality, and aromatic profile [J]. Food Hydrocolloids, 2023, 135: 108158.
- [15] SUI X, BI S, QI B, et al. Impact of ultrasonic treatment on an emulsion system stabilized with soybean protein isolate and lecithin: Its emulsifying property and emulsion stability [J]. Food Hydrocolloids, 2017, 63: 727-734.
- [16] ACHO M A, OSEMWEGIE O O, AMONSOU E O, et al. Physico-chemical and functional characteristics of *Neem* seed protein isolate [J]. Scientific African, 2023, 21: e01774.
- [17] 马天怡,郭凤仙,何振东,等. L-精氨酸/L-赖氨酸改性大豆分离蛋白乳化性[J].精细化工,2022,39(1):150-157,163.
- [18] CHEN M L, NING P, JIAO Y, et al. Extraction of antioxidant peptides from rice dreg protein hydrolysate via an angling method [J]. Food Chemistry, 2021, 337: 128069.
- [19] 徐倩,陈洲,王青华,等.核桃球蛋白的分离纯化、鉴定及抗氧化性分析[J].食品工业科技,2022,43(18):105-113.
- [20] HAN W, SHI W, GONG D, et al. Improvement of solubility, emulsification property and stability of Potato protein by pH-shifting combined with microwave treatment and interaction with pectin [J]. Food Bioscience, 2023, 56: 103301.
- [21] 王悦.反胶束法提取核桃蛋白及蛋白理化性质的研究[D].邯郸:河北工程大学,2018.
- [22] HE S, SHI J, WALID E, et al. Reverse Micellar extraction of lectin from black turtle bean (*Phaseolus vulgaris*): Optimisation of extraction conditions by response surface methodology [J]. Food Chemistry, 2015, 166: 93-100.
- [23] BU G, LIU H, CHEN F, et al. Effects of different factors on the forward extraction of soy protein in reverse micelle systems [J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(28): 7247-7257.
- [24] 郭珍.反胶束体系分离花生蛋白过程中传质机理的研究[D].郑州:河南工业大学,2014.
- [25] SUN X H, ZHU K X, ZHOU H M. Protein extraction from defatted wheat germ by reverse micelles: Optimization of the forward extraction [J]. Journal of Cereal Science, 2008, 48(3): 829-835.
- [26] 张玲,梁妍,郑小武,等.响应面法优化反胶束提取花生粕蛋白前萃工艺[J].粮食与油脂,2017,30(9):59-63.
- [27] CHUO S C, AHMAD A, MOHD-SETAPAR S H, et al. Utilization of green sophorolipids biosurfactant in reverse micelle extraction of Antibiotics: kinetic and mass transfer studies [J]. Journal of Molecular Liquids, 2019, 276: 225-232.
- [28] MATHEW D S, JUANG R S. Improved back extraction of papain from AOT reverse micelles using alcohols and a counter-ionic surfactant [J]. Biochemical Engineering Journal, 2005, 25(3): 219-225.
- [29] LUO X, WANG Q, WU Y, et al. Mechanism of effect of heating temperature on functional characteristics of thick egg white [J]. LWT, 2022, 154: 112807.
- [30] 孟妍,曾剑华,李美莹,等.汉麻籽分离蛋白提取技术优化及其组成和乳化性表征[J].中国食品学报,2021,21(5): 250-262.
- [31] TANG S, DU Q, LI Y, et al. Effect of pH on the structure and emulsification properties of ultrasonicated water-soluble protein from *Moringa oleifera* seed [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2024, 59(1): 627-638.
- [32] DOKIĆ L, KRSTONOŠIĆ V, NIKOLIĆ I. Physicochemical characteristics and stability of oil-in-water emulsions stabilized by OSA starch [J]. Food Hydrocolloids, 2012, 29(1): 185-192.
- [33] 林洋.黑木耳蛋白质的提取、分离纯化及特性研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2016.
- [34] 冯建国.大豆蛋白和燕麦蛋白合成类蛋白的研究[D].长春:吉林农业大学,2013.
- [35] 杨文敏,杨冬,任昊天.微波辅助提取巴旦木蛋白工艺优化及其功能性质研究[J].食品工业科技,2021,42(10):183-188.