

鹰嘴豆铁蛋白提取工艺优化研究

辛 敏^{1,2}, 黄 昀², 郝鹏飞^{1,2}, 詹 欣^{1,2}, 唐劲天^{1,2*}, 盛 军^{1,3*}¹北京中医药大学中药学院, 北京 100102; ²清华大学工程物理系粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084;³云南农业大学, 普洱茶学教育部重点实验室, 昆明 650201

摘要:本研究以鹰嘴豆为原料,研究了缓冲液种类、缓冲液 pH 值、料液比、盐析盐种类、盐浓度等因素对鹰嘴豆铁蛋白提取率、总蛋白提取率及干重的影响。在单因素实验的基础上,以 $L_9(3^4)$ 正交实验方法优化鹰嘴豆铁蛋白提取工艺。结果表明:各因素对鹰嘴豆铁蛋白提取率的影响顺序依次为:料液比 > 盐浓度 > 温度 > pH。最优提取工艺为:料液比 1:4,浓度为 70 mmol/L $MgCl_2$ 盐析,温度 50 °C, KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液 pH 7.5, 最优提取率为 0.002643%。

关键词: 鹰嘴豆; 铁蛋白; 提取工艺; 正交实验

中图分类号: TS214.9

文献标识码: A

Optimization of Extraction Conditions of Ferritin from Chickpea Seed

XIN Min^{1,2}, HUANG Yun², HAO Peng-fei^{1,2}, ZHAN Xin^{1,2}, TANG Jin-tian^{1,2*}, SHENG Jun^{1,3*}¹Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; ²Institute of Nuclear Energy Technology, Tsinghua University,Beijing 100084, China; ³Yunnan Research Centre for Advance Tea Processing, Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: Chickpea seeds were widely used as raw material to extract ferritin. To maximize the extraction yield of ferritin, extraction parameters, including buffer types, buffer pH, solid-liquid ratio, type and concentration of salt were investigated by single factor experiments followed by four factor-three level orthogonal experiments. The extraction yield of ferritin, total protein and dry weight in chickpea seeds were examined. The results showed that the effect of the investigated factors on the extraction yield of chickpea ferritin was in sequence of solid-liquid ratio > salt concentration > temperature > pH. The optimal extraction condition was as follows: solid-liquid ratio 1:4, 70 mmol/L $MgCl_2$, extraction temperature 50 °C, KH_2PO_4 -NaOH buffer solution at pH 7.5. The optimal extraction yield was 0.002643%.

Key words: chickpea; ferritin; extraction technology; orthogonal text

鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.)是豆科鹰嘴豆属植物,作为重要的植物蛋白来源广泛种植于世界诸多地区,具有极高的营养价值^[1]。同时,鹰嘴豆是重要的维吾尔医用传统药材,具有悠久的药用历史,对缺铁性疾病引起的乏力、食欲不振、皮肤瘙痒等症状具有明显改善作用。植物铁蛋白是广泛存在于动物、植物及微生物体中的一种铁贮藏蛋白,由 24 个同源或异源亚基所结合成的一个蛋白质复合体。目前已在豆科植物,如大豆、豌豆、黄豆、蚕豆、黑豆、红小豆、羽扇豆中都发现了植物铁蛋白的存在。铁蛋白是植物光合作用和固氮等生化反应的铁源,具有调节生物体细胞内铁代谢平衡的功能^[2]。作为一种重要的胁迫反应蛋白,铁蛋白在植物发育中起了

重要作用^[3]。近年来研究发现,植物铁蛋白补铁效果好,可有效地缓解铁缺乏症,且无毒副作用,是一种新型的天然铁补充剂。同时,植物铁蛋白还具有降脂降糖、抗肿瘤、抗氧化、抗 HIV 等诸多生物活性^[4]。

本研究以鹰嘴豆为研究对象,在单因素实验基础上采用正交实验方法,综合考虑生产成本及提取率等因素,成功优化铁蛋白的提取工艺,为其作为植物补铁制剂进一步开发与利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鹰嘴豆于 2011 年 10 月购自新疆木垒县,经中国医学科学院药用植物研究所刘新民教授鉴定为豆科鹰嘴豆属植物鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.);凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);其余试剂均为国产分析纯;二次蒸馏

水;超纯水。

himac CF 16RX 冷冻离心机(日本日立公司); iMark 酶标仪(美国伯乐公司); MH-2 微量振荡器(澳门市其林贝尔仪器制造有限公司); BM255C 搅拌机(美的集团有限公司); Venticell 烘箱(德国 MMM 公司); Seven Easy 酸度计(美国梅特勒-托利多公司); NANOpure 超纯水系统(美国巴恩斯特德公司); AL204-IC 电子天平(美国梅特勒-托利多公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 Fe^{2+} 浓度标准曲线方程的测定

准确称取 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 晶体 1.0000 g, 加水溶解并于 10 mL 棕色容量瓶中定容。精密量取此溶液 1 mL, 加入 100 mL 棕色容量瓶中稀释至刻度, 作为待测母液。精密移取母液 0、1、2、3、4、5 μL 于 96 孔板中, 加水稀释至 180 μL , 加入 30 μL 20% 连二亚硫酸钠溶液还原后, 再加入 40 μL 0.1% 邻菲咯啉溶液染色。混匀, 放置 2 min 后, 酶标仪混匀 10 s 在 510 nm 波长下检测吸光值。以吸光度(A)为纵坐标, 浓度(C, $\mu g/mL$)为横坐标, 绘制出标准曲线, 并计算出标准回归方程。

1.2.2 邻菲咯啉显色法测定提取液中 Fe^{2+} 含量

根据 Fe^{2+} 与邻菲咯啉络合后显特殊的桔红色的反应原理, 在 96 孔酶标板小孔中加入 10 μL 待测液, 20 μL 超纯水, 30 μL 20% 的连二亚硫酸钠溶液还原后, 再加入 40 μL 0.1% 邻菲咯啉溶液, 混匀, 放置 2 min 后, 酶标仪混匀 10 s 在 510 nm 波长下检测^[5]。根据所测吸光度, 可计算 Fe^{2+} 浓度 = (吸光度-常数项)/回归系数。

1.2.3 蛋白质浓度标准曲线方程的测定

用凯基 Bradford 蛋白含量检测试剂盒, 以吸光度(A)为纵坐标, 浓度(C, g/L)为横坐标, 绘制出标准曲线, 并计算出标准回归方程。

1.2.4 Bradford 分光光度法测定提取液中蛋白质含量

利用考马斯亮蓝 G-250 与蛋白质结合显蓝色的

特性, 在 96 孔酶标板小孔中加入 1 μL 待测液, 4 μL 超纯水, 195 μL 考马斯亮蓝 G-250 染色后, 混匀, 放置 2 min 后, 酶标仪混匀 10 s 在 570 nm 波长下检测。根据所测吸光度, 可计算总蛋白浓度 = (吸光度-常数项)/回归系数。

1.2.5 提取液干重的测定

精密量取 7.5 mL 待测提取液于干燥培养皿中进行 60 $^{\circ}C$ 鼓风干燥直至恒重, 平行测定 3 次, 即可测得提取液干重。

1.2.6 单因素实验

参考袁小红^[5]豌豆种子铁蛋白预处理及盐析, 增加种子匀浆后缓冲液清洗 3 次(20、20、10 mL)步骤。分别考虑缓冲液种类(KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液、Tris-HCl 缓冲液)、pH 值(7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)、料液比(1:1、1:2、1:3、1:4)、盐析盐种类(50 mmol/L 的 $MgCl_2$ 、饱和度为 15% ~ 20% 的 $(NH_4)_2SO_4$ 、盐析浓度(10、20、30、40、50、60、70、80 mmol/L)对鹰嘴豆铁蛋白提取工艺的影响^[6-9]。

采用 1.2.2、1.2.4、1.2.5 方法进行铁浓度、蛋白浓度、总提取物干重的测定。以铁含量代表铁蛋白含量, 按如下公式分别计算铁蛋白提取率, 总蛋白提取率。

铁蛋白提取率 = 稀释倍数 \times Fe^{2+} 浓度 \times 待测液体积 / 鹰嘴豆种子质量

总蛋白提取率 = 稀释倍数 \times 总蛋白浓度 \times 待测液体积 / 鹰嘴豆种子质量

1.2.7 正交实验优化提取工艺

根据单因素实验结果及文献^[7]报道温度对铁蛋白提取的影响, 确定鹰嘴豆种子中提取铁蛋白的正交实验因素和水平, 采用 SPSS 软件进行 $L_9(3^4)$ 正交实验设计, 优化铁蛋白提取工艺, 平行重复 3 次。

采用 1.2.2、1.2.4、1.2.5 方法进行铁浓度、蛋白浓度、干重的测定。

表 1 铁蛋白提取 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal experimental design for extraction of ferritin

水平 Levels	A 酸碱度 pH	B 盐浓度 Salt concentration (mmol/L)	C 料液比 Solid-liquid ratio (W/V)	D 温度 Temperature($^{\circ}C$)
1	7.0	50	1:2	50
2	7.5	60	1:3	55
3	8.0	70	1:4	60

1.2.8 数据处理

各实验均重复3次以确保实验结果的准确性,所得实验数据用SPSS17.0处理行t检验及方差分析。

2 结果与分析

2.1 线性关系及回归方程

以1.2.1方法测定 Fe^{2+} 线性关系,得到 Fe^{2+} 标准曲线方程: $A = 0.142C - 0.023, R^2 = 0.9990$ 。表明在4~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, Fe^{2+} 浓度与吸光度呈线性关系。

表2 不同缓冲液下铁蛋白提取率、总蛋白提取率及干重的比较

Table 2 Comparison of ferritin extraction yield, protein extraction yield and dry weight under different buffers

	铁蛋白提取率 Ferritin extraction yield($\times 10^{-4}$)	总蛋白提取率 Protein extraction yield($\times 10^{-2}$)	干重 Dry weight(g)
KH_2PO_4 -NaOH 缓冲液 KH_2PO_4 -NaOH buffer	13.78%	4.63%	0.4011
Tris-HCl 缓冲液 Tris-HCl buffer	12.39%	7.13%	0.5283

由表2可知, KH_2PO_4 -NaOH缓冲液组铁蛋白提取率高于Tris-HCl缓冲液组铁蛋白提取率,组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。 KH_2PO_4 -NaOH缓冲液组总蛋白提取率低于Tris-HCl缓冲液组总蛋白提取率,组间存在显著性差异($P < 0.05$)。 KH_2PO_4 -NaOH缓冲液组干重均值0.1337 g 低于Tris-HCl缓冲液组干重均值0.1761 g,组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

KH_2PO_4 -NaOH缓冲液组在铁含量检测中高于Tris-HCl缓冲液组,且在总蛋白提取率及物质干重方面低于Tris-HCl缓冲液组,说明 KH_2PO_4 -NaOH缓冲液利于铁蛋白的富集,且所含杂蛋白少,纯度高,故选择 KH_2PO_4 -NaOH缓冲液作为鹰嘴豆铁蛋白提取的缓冲液。

2.2.2 缓冲液pH值的筛选

在 KH_2PO_4 -NaOH缓冲液,50 mmol/L的 MgCl_2 盐析,料液比1:2提取条件下,缓冲液pH值对鹰嘴豆铁蛋白提取的影响结果如表3所示。

以铁蛋白提取率为指标,当缓冲液pH为7.5时,与pH为7.0、8.0、8.5、9.0组比较,均存在显著性差异($P < 0.05$),且缓冲液pH为7.5时铁蛋白提取率存在最大值。以总蛋白提取率为指标,缓冲液pH 7.5组与pH 7.0组、9.0组存在显著性差异($P < 0.05$),其余各组间无统计学意义。当缓冲液pH为7.5时总蛋白提取率存在最大值。以干重为指

以1.2.3方法测定总蛋白线性关系,得到总蛋白标准曲线方程: $A = 19.400C + 0.028, R^2 = 0.9960$ 。表明在0.005~0.025 g/L定范围内,总蛋白浓度与吸光度呈线性关系。

2.2 单因素实验

2.2.1 缓冲液种类的筛选

在缓冲液pH 7.0,50 mmol/L的 MgCl_2 盐析,料液比1:2提取条件下,缓冲液种类对鹰嘴豆铁蛋白提取的影响结果如表2所示。

标,缓冲液pH 7.5组与pH 7.0组、8.5组、9.0组存在显著性差异($P < 0.05$),其余各组间无统计学意义。当缓冲液pH为7.5时物质干重存在最大值。

表3 不同pH值下铁蛋白提取率、总蛋白提取率及干重的比较

Table 3 Comparison of ferritin extraction yield, protein extraction yield and dry weight under different pH

pH	铁蛋白提取率 Ferritin extraction yield($\times 10^{-4}$)	总蛋白提取率 Protein extraction yield($\times 10^{-2}$)	干重 Dry weight(g)
7	20.08%	12.11%	0.3873
7.5	22.10%	14.11%	0.4722
8	18.83%	13.55%	0.4095
8.5	18.73%	12.60%	0.3864
9	18.17%	12.36%	0.3927

由表3可知,缓冲液pH值对鹰嘴豆铁蛋白提取有显著影响。当缓冲液pH为7.5时,鹰嘴豆铁蛋白提取率存在最大值,且与其余组存在显著性差异,当pH继续升高,一方面降低铁蛋白含量,另一方面会降低铁蛋白食用价值^[10]。故pH 7.5为鹰嘴豆铁蛋白提取缓冲液pH最适值。

2.2.3 盐析盐种类的筛选

在pH 7.5的 KH_2PO_4 -NaOH缓冲液,料液比1:2提取条件下,盐种类对鹰嘴豆铁蛋白提取的影响结果如表4所示。

表4 不同盐种类下铁蛋白提取率、总蛋白提取率及干重的比较

Table 4 Comparison of ferritin extraction yield, protein extraction yield and dry weight under different salt

盐种类 Salt	铁蛋白提取率 Ferritin extraction yield($\times 10^{-4}$)	总蛋白提取率 Protein extraction yield($\times 10^{-2}$)	干重 Dry weight(g)
MgCl ₂	21.62%	14.87%	0.4257
(NH ₄) ₂ SO ₄	13.75%	10.70%	0.3192

50 mmol/L 的 MgCl₂ 盐析组铁蛋白提取率高于饱和度为 15% ~ 20% 的 (NH₄)₂SO₄ 盐析组, 组间存在极显著性差异 ($P < 0.01$)。50 mmol/L 的 MgCl₂ 盐析组总蛋白提取率高于饱和度为 15% ~ 20% 的 (NH₄)₂SO₄ 盐析组, 组间无统计学意义 ($P > 0.05$)。50 mmol/L 的 MgCl₂ 盐析组物质干重高于加饱和度为 15% ~ 20% 的 (NH₄)₂SO₄ 盐析组物质干重, 组间存在极显著性差异 ($P < 0.05$)。

在鹰嘴豆铁蛋白分离纯化过程中, 加入 MgCl₂ 先析出淀粉, 再析出铁蛋白, 可以通过离心去除部分淀粉^[7]。实验数据表明, MgCl₂ 可特异的从鹰嘴豆种子提取液中盐析出铁蛋白, 且盐析效果显著优于 (NH₄)₂SO₄ 盐析, 与文献^[2]报道一致, 故选取 MgCl₂ 盐析。

2.2.4 盐浓度的筛选

在 pH 7.5 的 KH₂PO₄-NaOH 缓冲液, MgCl₂ 盐析, 料液比 1:2 提取条件下, 盐浓度对鹰嘴豆铁蛋白提取的影响结果如表 5 所示。

表5 不同盐浓度下铁蛋白提取率、总蛋白提取率及干重的比较

Table 5 Comparison of ferritin extraction yield, protein extraction yield and dry weight under different salt concentration

盐浓度 Salt concentration (mmol/L)	铁蛋白提取率 Ferritin extraction yield($\times 10^{-4}$)	总蛋白提取率 Protein extraction yield($\times 10^{-2}$)	干重 Dry weight(g)
10	15.86%	8.52%	0.1866
20	16.33%	10.32%	0.2229
30	17.83%	11.40%	0.2589
40	19.27%	16.92%	0.3192
50	19.52%	17.76%	0.3471
60	21.64%	21.12%	0.5187
70	20.43%	24.36%	0.5913
80	19.14%	21.48%	0.5472

由表 5 可知, 当盐浓度在 10 ~ 60 mmol/L 变化

时, 随着盐浓度的增加, 铁蛋白提取率增大。但当盐浓度继续增加时, 铁蛋白提取率下降。60 mmol/L 时存在最大值。当盐浓度在 10 ~ 70 mmol/L 变化时, 随着盐浓度的增加, 总蛋白提取率、干重增大。但当盐浓度继续增加时, 总蛋白提取率及干重均下降。70 mmol/L 时总蛋白提取率最高为 2.436%, 干重最高为 0.5913 g。当盐浓度为 60 mmol/L 时, 铁浓度存在最大值, 且杂蛋白含量低于 70 mmol/L, 利于铁蛋白的富集, 故选取 60 mmol/L 为 MgCl₂ 盐析浓度。

2.2.5 料液比的筛选

在 pH 7.5 的 KH₂PO₄-NaOH 缓冲液, 50 mmol/L 的 MgCl₂ 盐析提取条件下, 料液比对鹰嘴豆铁蛋白提取的影响结果如表 6 所示。

表6 不同料液比下铁蛋白提取率、总蛋白提取率及干重的比较

Table 6 Comparison of ferritin extraction yield, protein extraction yield and dry weight under different solid-liquid ratio

料液比 Solid-liquid ratio	铁蛋白提取率 Ferritin extraction yield($\times 10^{-4}$)	总蛋白提取率 Protein extraction yield($\times 10^{-2}$)	干重 Dry weight(g)
1:1	12.83%	14.15%	0.3728
1:2	27.28%	26.37%	0.4431
1:3	30.54%	38.68%	0.6486
1:4	35.51%	45.03%	0.7106

实验数据表明, 随着料液比的增大, 所得鹰嘴豆铁蛋白提取率、总蛋白提取率、物质干重均逐步增加, 且趋于平台区。因为适当增大料液比, 有利于蛋白质的溶出, 从而使铁蛋白含量增加。但料液比过大会使铁蛋白浓度降低, 且增加后续工艺中提取液的浓缩成本。故选取 1:4 为最佳料液比。

2.3 正交实验

根据单因素实验结果, 以鹰嘴豆种子中铁蛋白提取率、总蛋白提取率、干重为考察指标, 进行 L₉(3⁴) 正交实验, 实验结果见下表。

表 7-1 L₉(3⁴) 正交实验设计及铁蛋白提取率结果Table 7-1 L₉(3⁴) orthogonal array design and results of ferritin extraction yields

实验号 No.	A	B	C	D	铁蛋白提取率
					Ferritin extraction yield ($\times 10^{-4}$)
1	1	1	1	1	17.73

2	1	2	2	2	20.96
3	1	3	3	3	26.01
4	2	1	2	3	22.96
5	2	2	3	1	26.36
6	2	3	1	2	18.76
7	3	1	3	2	24.15
8	3	2	1	3	14.90
9	3	3	2	1	24.61
K ₁	64.70	64.84	51.39	68.70	
K ₂	68.08	62.22	68.52	63.87	
K ₃	63.66	69.38	76.52	63.87	
R	4.42	7.15	25.13	4.83	

表 7-2 L₉(3⁴) 正交实验铁蛋白提取率方差表

Table 7-2 Analysis of variance for ferritin extraction yield with different extraction conditions

方差来源 Source	偏差平方和 Sum of Squares	自由度 DOF	F 值 F value	P 值 P value
B	8.737	2	2.451	P > 0.05
C	109.87	2	30.82	P < 0.05
D	5.188	2	1.455	P > 0.05

由表 7-1 极差分析可知,以铁蛋白提取率为指标,影响鹰嘴豆铁蛋白提取工艺因素的主次顺序为料液比 > 盐浓度 > 温度 > pH,经方差分析,料液比对鹰嘴豆铁蛋白的提取有显著影响。最佳提取工艺条件为 A₂B₃C₃D₁,即缓冲液 pH 7.5,70 mmol/L 氯化镁盐析,料液比 1:4,温度 50 ℃ 提取。

表 8-1 L₉(3⁴) 正交实验设计及总蛋白提取率结果

Table 8-1 L₉(3⁴) orthogonal array design and results of protein extraction yield

实验号 No.	A	B	C	D	总蛋白提取率 Protein extraction yield (× 10 ⁻²)
1	1	1	1	1	22.56
2	1	2	2	2	24.58
3	1	3	3	3	31.92
4	2	1	2	3	37.20
5	2	2	3	1	40.14
6	2	3	1	2	27.51
7	3	1	3	2	48.70
8	3	2	1	3	27.94
9	3	3	2	1	36.29
K ₁	79.06	108.45	78.00	98.99	
K ₂	104.85	92.66	98.06	100.78	

K ₃	112.93	95.72	120.77	97.06
R	33.87	15.79	42.77	3.73

表 8-2 L₉(3⁴) 正交实验总蛋白提取率方差表

Table 8-2 Analysis of variance for protein extraction yield with different extraction conditions

方差来源 Source	偏差平方和 Sum of Squares	自由度 DOF	F 值 F value	P 值 P value
A	208.6	2	90.08	P < 0.05
B	46.78	2	20.20	P < 0.05
C	305.2	2	131.8	P < 0.05

由表 8-1 极差分析可知,以总蛋白提取率为指标,影响鹰嘴豆铁蛋白提取工艺因素主次顺序为料液比 > pH > 盐浓度 > 温度,经方差分析,pH、盐浓度、料液比对鹰嘴豆铁蛋白提取有显著性影响。最佳提取工艺为 A₃B₁C₃D₂,即缓冲液 pH 8.0,50 mmol/L 氯化镁盐析,料液比 1:4,温度 55 ℃ 提取。

表 9-1 L₉(3⁴) 正交实验设计及干重结果

Table 9-1 L₉(3⁴) orthogonal array design and results of dry weight

实验号 No.	A	B	C	D	干重 Dry weight (g)
1	1	1	1	1	0.8793
2	1	2	2	2	1.1188
3	1	3	3	3	1.0577
4	2	1	2	3	1.1392
5	2	2	3	1	0.9705
6	2	3	1	2	1.0095
7	3	1	3	2	1.1723
8	3	2	1	3	0.8796
9	3	3	2	1	0.8705
K ₁	3.0558	3.1908	2.7684	2.7203	
K ₂	3.1192	2.9689	3.1285	3.3006	
K ₃	2.9225	2.9378	3.2006	3.0765	
R	0.1967	0.2530	0.4322	0.5803	

表 9-2 L₉(3⁴) 正交实验干重方差表

Table 9-2 Analysis of variance for dry weight with different extraction conditions

方差来源 Source	偏差平方和 Sum of Squares	自由度 DOF	F 值 F value	P 值 P value
B	0.013	2	1.887	P > 0.05
C	0.036	2	5.311	P > 0.05
D	0.057	2	8.487	P > 0.05

由表 9-1 极差可知,以干重为指标,影响鹰嘴豆铁蛋白提取工艺因素主次顺序为温度 > 料液比 > 盐浓度 > pH。最佳提取工艺为 A₂B₁C₃D₂,即缓冲液 pH 7.5,50 mmol/L 氯化镁盐析,料液比 1:4,温度 55 °C 提取。

综合鹰嘴豆铁蛋白提取正交实验结果的极差分析、方差分析,以铁蛋白提取率、总蛋白提取率、干重为评价指标,最终确定提取工艺条件为 A₂B₃C₃D₁,即缓冲液 pH 7.5,70 mmol/L 氯化镁盐析,料液比 1:4,温度 50 °C 提取,可使铁蛋白浓度最大化时,尽可能降低杂蛋白、淀粉、糖等物质含量。

2.4 验证实验

用上述确定的最佳提取工艺条件进行 3 次平行实验,鹰嘴豆铁蛋白提取率为 0.002643%,说明所选取的工艺稳定。

3 结论

本研究以干燥鹰嘴豆种子为原料,在单因素实验的基础上,进行 L₉(3⁴) 正交实验确定的最优工艺参数为,pH 7.5 的 KH₂PO₄-NaOH 缓冲液,浓度 70 mmol/L 的 MgCl₂ 盐析,料液比 1:4,作用温度 50 °C。本工艺具有操作简单、提取效果好、成本低等优点,可为工业化鹰嘴豆铁蛋白的提取提供一定理论依据。

参考文献

1 Torres-Fuentes C, Alaiz M, Vioque J. Affinity purification and characterization of chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chem*, 2011, 129:485-490.

(上接第 220 页)

8 Guo XZ(郭晓庄). Toxic herbal dictionary(有毒中草药大辞典). Tianjin: Tianjin Science and Technology Translation Publishing, 1994. 853.

9 Hou CY(侯翠英), Liu YL(刘永隆), Sun NJ(孙南君). The extraction separation and identification of lipophilic glycoside from *Strophanthus divaricatus*. *China Tradit Herb Drugs*(中草药), 1980, 11:259-293.

10 Kopp B, Kubelka W. New cardenolides from *Convallaria majalis*. *Planta Medica*, 1982, 45:195-202.

11 Chen RF, Abe F, Yamauchi T, et al. Cardenolide glycosides of *Strophanthus divaricatus*. *Phytochemistry*, 1987, 26:2351-2355.

2 Laullhere JP, Lescure AM, Briat JF. Purification and characterization of ferritins from maize, pea, and soyabean seeds. *J Biol Chem*, 1998, 263:10289-10294.

3 Chen LP(陈丽萍), Zhang LJ(张丽静), Fu H(傅华). Progress in research on plant ferritin. *Acta Pratac Sin*(草业学报), 2010, 19:263-371.

4 Yang JM(杨建梅), Zhang H(张慧), Yu C(余琛), et al. Progress in research on chickpea seed. *J Liaoning Univ TCM*(辽宁中医药大学学报), 2010, 12:89-90.

5 Yuan XH(袁小红). Purification of ferritin from pea seed and preparation of its antiserum. Chongqing: Southwest Agricultural University(西南农业大学), MSc. 2002.

6 Singh N, Kayastha AM. Purification and characterization of α -galactosidase from white chickpea (*Cicer arietinum*). *J Agric Food Chem*, 2012, 60:3253-3259.

7 Hu J(胡菊), Liao XY(廖夏云), Deng JJ(邓建军), et al. New method of soybean seed ferritin purification and comparison of activity with pea seed ferritin. *Chem J Chin U*(高等学校化学学报), 2009, 30:2003-2008.

8 Liu WY(刘文营). Purification, characterization and biochemical properties of ferritin from chick pea seeds. Xinjiang: Shihezi University(石河子大学), MSc, 2011.

9 Yun SJ, Yang SP, Huang LY. Isolation and characterization of a new phytoferritin from broad bean (*Vicia faba*) seed with higher stability compared to pea seed ferritin. *Food Res Int*, 2012, 48:271-276.

10 Zhou LQ(周丽卿), Du SK(杜双奎), Zhao J(赵佳), et al. Optimization of chickpea protein extraction using response surface methodology. *Food Sci*(食品科学), 2012, 33(8):66-70.

12 Tsukamoto H, Hisada S, Nishibe S. Lignans from bark of *Fraxinus mandshurica* var. *japonica* and *F. japonica*. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32:4482-4489.

13 Kawaguchi K, Asaka I, Hirofumi M, et al. Cardenolides in the regenerated plants obtained from *Strophanthus divaricatus* calli. *Phytochemistry*, 1993, 34:1317-1321.

14 Ching HT(景厚德), Gue GW(郭纳婉). Comparative studies on the therapeutic index of *Strophanthus divaricatus* (Lour.) Hook et Arn and g-strophanthin. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 1965, 12:325-331.

15 Hwang B, Lee J, Liu QH, et al. Antifungal effect of (+)-pinoresinol isolated from *Sambucus williamsii*. *Molecules*, 2010, 15:3507-3516.