

响应面法优化牦牛肝蛋白提取工艺研究

柳青海^{1,2}, 张唐伟^{1,2}, 李天才^{1*}

(1 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 对牦牛肝中主要营养成分进行测定, 然后用单因素和响应面分析法确定牦牛肝蛋白的最佳提取工艺。通过单因素试验选取影响因素与水平, 在此基础上采用四因素三水平的响应面分析法, 根据回归分析确定最佳提取工艺。试验结果表明: 鲜牦牛肝水分含量为 70.85%、灰分含量为 0.7%、蛋白含量为 19.70%、粗脂肪含量为 2.92%; 最佳提取工艺为: 液料比 (ml: g) 7、碱液浓度 $0.14 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、提取时间 68 min、提取温度 53°C , 采用该条件蛋白提取率可达 88.38%。

关键词: 牦牛; 肝蛋白; 工艺优化; 响应面分析

中图分类号: Q5

文献标识码: A

文章编号: 1006-8376(2011)01-0029-06

牦牛 (*Bos grunniens*) 属于偶蹄目、牛科、牛亚科动物中的稀有种。主要分布在青藏高原和喜马拉雅山脉海拔 2500 ~ 6000 m 的高寒地区, 能耐零下 30°C ~ 40°C 的严寒, 牦牛是世界上生活在海拔最高处的哺乳动物之一, 我国的牦牛占世界总量 92% 以上^[1,2], 牦牛肝资源丰富, 目前除了传统的食用外, 尚未进一步开发利用, 利用效率较低。传统的藏民族医药中^[3], 牦牛肝及其浸提物作为一种常用药材使用已久, 曾在药典中也出现过, 主要用于治疗贫血、营养不良等症状, 这些使用方法存在着不科学和不合理的地方。为进一步规范、合理的使用这一资源, 本文对牦牛肝蛋白提取工艺进行研究。近年来对肝蛋白研究较多, 主要集中于肝蛋白多肽的活性方面, 对开发利用蛋白类药物有着十分重要意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

鲜牦牛肝购于西宁市东川屠宰场。

考马斯亮蓝 G-250、氢氧化钠、牛血清蛋白、浓硫酸、硫酸铜、硫酸钾、硼酸、碳酸钠、盐酸、石油醚均为分析纯。

1.2 仪器与设备

绞肉机, 凯氏定氮仪, AR1140 电子天平, 电热恒温干燥箱 (上海跃进医疗器械厂), 高速离心机 (LG10-2.4A)、721-可见分光光度计、索氏提取器、马福炉。

1.3 实验方法

1.3.1 试样的制备 新鲜牦牛肝清除表面结缔组织, 洗去表面血迹。取少量的鲜牦牛肝烘干粉碎后过 40 目筛, 用于测蛋白和脂肪含量, 剩余牦牛肝用绞肉机绞碎后置于 4°C 冰箱保存备用。

1.3.2 牦牛肝中主要营养成分测定

水分测定采用重量法^[4], 灰分测定采用灼烧重量法^[5], 蛋白含量采用微量凯氏定氮法分析^[6], 索氏提取法测定脂肪^[7]。

1.3.3 牦牛肝蛋白等电点测定^[8] 称取 20 g 样品, 加 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠 200 mL, 在 60°C 水浴锅中保温提取 90 min, 然后在 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的条件下离心 10 min, 得蛋白水溶液, 等量量取 6 份, 每份 30 mL, 用 $0.33 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 调节 pH 值为: 3.6、3.9、4.2、4.5、4.8、5.1, 静置, $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃去上清液后干燥称重, 重复一次, 沉淀量最大点所对应的 pH 即为牦牛肝蛋白等电点。

1.3.4 牦牛肝蛋白提取工艺 称取适量原料于三角瓶中, 加入一定比例、一定浓度氢氧化钠溶液, 在一定的温度下, 恒温提取一段时间后, 以 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 调节 pH 至等电点, 在 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 沉淀用去离子水洗 2 ~ 3 次, 调 pH 值至中性, 重新溶解沉淀, 测定其体积。蛋白浓度测定采用考马斯亮兰法 (Bradford 法)^[9]。蛋白提取率计算公式如下:

$$\text{蛋白提取率} \% = \frac{\text{提取液体积} \times \text{蛋白浓度}}{\text{鲜牦牛肝重量} \times \text{鲜牦牛肝蛋白含量}} \times 100\%$$

1.3.5 牦牛肝蛋白提取的单因素试验 以不同的液料比 (ml: g 为 3、5、7、9、11)、碱液浓度 (0.05、0.1、

收稿日期: 2010-12-09

作者简介: 柳青海, 男 (1985-), 硕士研究生, 研究方向: 药用植物化学, E-mail: qhailiu@163.com

* 通讯作者: teli@nwipb.ac.cn.

基金项目: 青海省科技厅项目 (0733211D01)。

0.2、0.4、0.6 mol · L⁻¹）、提取时间(30、60、90、120、150 min)、提取温度(40、50、60、70、80℃)为单因素,考察各因素对牦牛肝蛋白提取率的影响。

1.3.6 牦牛肝蛋白提取工艺的设计试验 在单因素试验的基础上,运用 Design - expert8.0 软件程序,根据 Box - Behnken 中心组合实验设计原理^[10],采用四因素三水平的响应面分析法,以蛋白提取率为响应值,通过响应曲面分析对提取条件进行优化。

2 结果与分析

2.1 牦牛肝中主要营养成分测定结果

由测定结果知,新鲜牦牛肝含水量约为 70.85%、灰分为 0.7%、蛋白含量为 19.7%、脂肪含量为 2.92%,可见牦牛肝是一种高蛋白低脂肪食物。

2.2 牦牛肝蛋白等电点

测定结果如下图 1,由图可知牦牛肝蛋白等电点约为 pH4.2 左右。

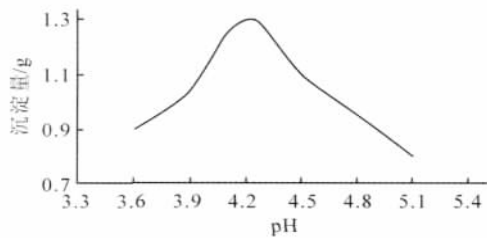


图 1 沉淀量与 pH 关系

2.3 单因素试验结果

2.3.1 液料比对牦牛肝蛋白提取率的影响

液料比的大小会影响两相的混合情况,尤其在搅拌不充分的情况下,会改变表观传质系数,从而影响传质速率^[11]。在一定的条件下,液料比越大,越有利于蛋白质的溶解,液料比达到一定程度,蛋白的溶出率达到了动态平衡,若液料比过大,导致母液的体积大,不仅增加了提取液的消耗,而且增加了后续工作的难度和物料消耗,同时蛋白提取率下降。从图 2 可以看出,在保持其它条件不变(提取时间为 60 min、温度为 60℃、碱液浓度为 0.2 mol · L⁻¹),液料比为 7ml/g 时牦牛肝蛋白的提取率最高。因此,选取液料比为 7 ml/g 左右为佳。

2.3.2 碱液浓度对牦牛肝蛋白提取率的影响

从图 3 可以看出,保持其它条件不变(提取时间为 60 min、温度为 60℃、液料比为 7ml/g),碱液浓度为 0.1 mol · L⁻¹时,蛋白提取率最高。当碱液浓度大于 0.2 mol · L⁻¹时,蛋白提取率急剧下降,主要

原因是因为碱性太强,引起蛋白高级结构改变^[12],因此碱液浓度控制在 0.1 mol · L⁻¹左右。

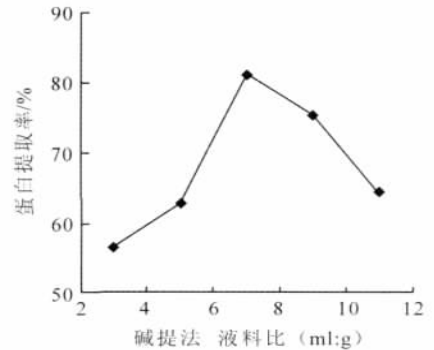


图 2 液料比对提取率的影响

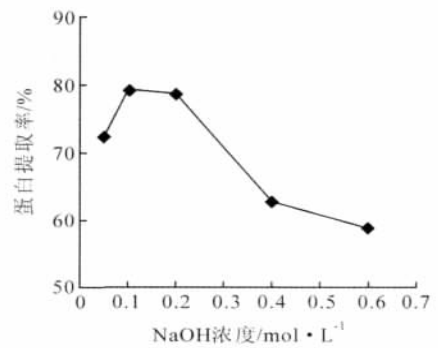


图 3 NaOH 浓度对提取率的影响

2.3.3 提取时间对牦牛肝蛋白提取率的影响

在其它条件保持不变(提取温度为 60℃、液料比为 7ml/g、碱液浓度为 0.2 mol · L⁻¹),改变提取时间,提取率随时间的变化如图 4 所示。在提取时间 30 ~ 60 min 之间蛋白提取率随温度升高而快速增加,当提取时间大于 60 min 后,提取增加缓慢,蛋白浸出率达到平衡,再增加提取时间不但提取率变化不大反而浪费时间,所以提取时间选择 60 min 左右较好。

2.3.4 提取温度对牦牛肝蛋白提取率的影响

在保持其它条件不变(提取时间为 60 min、液料比为 7 ml/g、碱液浓度为 0.2 mol · L⁻¹),改变提取温度,提取率随温度的变化如图 5 所示,提取温度超过 50℃时,随着温度的升高提取率降低的较显著,随着温度的升高,牦牛肝蛋白结构被破坏,会使浸提液的粘度增加,使溶出困难^[13,14],从而影响牦牛肝蛋白的提取率。因此,牦牛肝蛋白最佳提取温度应控制在 50℃左右。

2.4 响应面分析法对牦牛肝蛋白提取工艺的优化

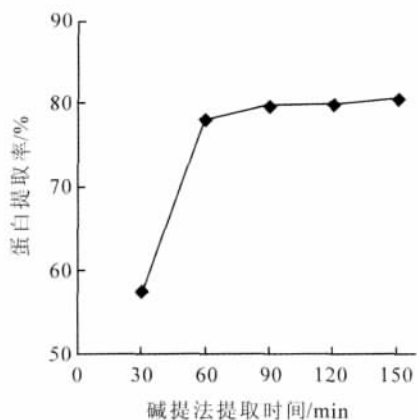


图4 提取时间对提取率的影响

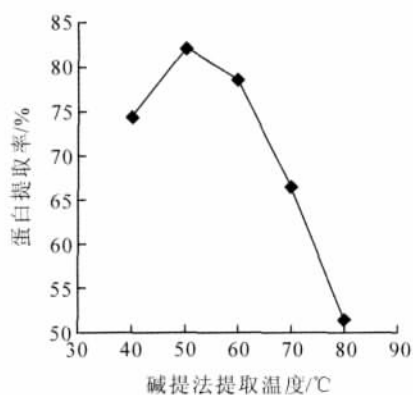


图5 提取温度对提取率的影响

2.4.1 响应面分析因素水平的选取 根据 Box - Behnken 中心组合实验设计原理,以 X_1 (液料比)、 X_2 (碱液浓度)、 X_3 (提取时间)、 X_4 (提取温度) 为自变量,以牦牛肝蛋白提取率为响应值,设计四因素三水平的响应面分析试验。试验因素和水平取值见表 1。

表1 响应面分析因素与水平

| 水平 | 因素 | | | |
|----|---------------|--------------------------------|--------------|------------|
| | 液料比 /ml: g | 碱液浓度 /mol · L ⁻¹ | 提取时间 /min | 提取温度 /℃ |
| -1 | 5 | 0.05 | 30 | 40 |
| 0 | 7 | 0.1 | 60 | 50 |
| 1 | 9 | 0.15 | 90 | 60 |

2.4.2 响应面模型建立及结果 响应面分析的实验结果见表 2。

表2 响应面分析的试验结果

| 实验序号 | X_1 | X_2 | X_3 | X_4 | 蛋白提取率/% |
|------|-------|-------|-------|-------|---------|
| 1 | -1 | 0 | 0 | 1 | 72.31 |
| 2 | 0 | -1 | 1 | 0 | 73.87 |
| 3 | -1 | 0 | 0 | -1 | 75.43 |
| 4 | -1 | 0 | 1 | 0 | 76.54 |
| 5 | 1 | 0 | -1 | 0 | 78.26 |
| 6 | 0 | -1 | -1 | 0 | 76.11 |
| 7 | 0 | 0 | 1 | 1 | 78.61 |
| 8 | 0 | 0 | -1 | -1 | 76.57 |
| 9 | -1 | 1 | 0 | 0 | 77.80 |
| 10 | 1 | 0 | 0 | -1 | 78.94 |
| 11 | 0 | 0 | -1 | 1 | 73.71 |
| 12 | 0 | 1 | -1 | 0 | 78.21 |
| 13 | 0 | 1 | 0 | 1 | 83.83 |
| 14 | 0 | -1 | 0 | -1 | 74.53 |
| 15 | 0 | -1 | 0 | 1 | 79.12 |
| 16 | 1 | 0 | 0 | 1 | 85.15 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 83.11 |
| 18 | 0 | 1 | 1 | 0 | 83.92 |
| 19 | 1 | -1 | 0 | 0 | 81.07 |
| 20 | -1 | 0 | -1 | 0 | 78.26 |
| 21 | -1 | -1 | 0 | 0 | 75.76 |
| 22 | 0 | 1 | 0 | -1 | 77.40 |
| 23 | 0 | 0 | 1 | -1 | 73.87 |
| 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 83.83 |
| 25 | 1 | 1 | 0 | 0 | 87.26 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 83.62 |
| 27 | 1 | 0 | 1 | 0 | 86.74 |

采用 Design - expert8.0 软件程序对试验数据进行回归分析,得牦牛肝蛋白提取率的回归方程如下:

$$Y = 21.68 - 4.05X_1 - 22.30X_2 - 0.26X_3 + 2.89X_4 + 10.39X_1X_2 + 0.04X_1X_3 + 0.12X_1X_4 + 1.33X_2X_3 + 0.92X_2X_4 + 0.006X_3X_4 - 0.26X_1^2 - 647.92X_2^2 - 0.004X_3^2 - 0.04X_4^2$$

其决定系数 $R^2 = 0.9314$,说明回归方程适用于牦牛肝蛋白提取率的理论预测值。

对回归方程做显著性检验与方差分析,结果见表 3。

从方差分析结果可知,模型在 $P \leq 0.01$ 时水平差异显著,因变量与所有自变量之间的线性关系显著 ($R^2 = 0.9314$),说明该模型能够较好地描述试验结果。由表 3 可知,模型一次项 X_1 ($P = 0.0001$)、 X_2 ($P = 0.0004$),交互项 X_1X_3 ($p = 0.0092$) 及二次项 X_3^2 ($P = 0.0005$)、 X_4^2 ($P = 0.0001$) 差异极显著;一次项 X_3 ($P = 0.0497$)、 X_4 ($P = 0.0159$),交互项 X_1X_4 ($p = 0.0151$)、 X_2X_3 ($P = 0.0324$) 及二次项 X_2^2 ($P = 0.0422$) 差异显著,说明响应值的变化相当复杂,试

表3 二次响应面回归模型方差分析

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
|----------|--------|-----|--------|-------|--------|-----|
| X_1 | 142.22 | 1 | 142.22 | 52.53 | 0.0001 | ** |
| X_2 | 65.19 | 1 | 65.19 | 24.08 | 0.0004 | ** |
| X_3 | 12.89 | 1 | 12.89 | 4.76 | 0.0497 | * |
| X_4 | 21.31 | 1 | 21.31 | 7.87 | 0.0159 | * |
| X_1X_2 | 4.32 | 1 | 4.32 | 1.59 | 0.2307 | |
| X_1X_3 | 25.98 | 1 | 25.98 | 9.59 | 0.0092 | ** |
| X_1X_4 | 21.75 | 1 | 21.75 | 8.03 | 0.0151 | * |
| X_2X_3 | 15.84 | 1 | 15.84 | 5.85 | 0.0324 | * |
| X_2X_4 | 0.85 | 1 | 0.85 | 0.32 | 0.5848 | |
| X_3X_4 | 14.45 | 1 | 14.45 | 5.34 | 0.0395 | * |
| X_1^2 | 5.78 | 1 | 5.78 | 2.13 | 0.1698 | |
| X_2^2 | 13.99 | 1 | 13.99 | 5.17 | 0.0422 | * |
| X_3^2 | 61.43 | 1 | 61.43 | 22.69 | 0.0005 | ** |
| X_4^2 | 87.21 | 1 | 87.21 | 32.21 | 0.0001 | ** |
| 总回归 | 441.46 | 14 | 31.53 | 11.65 | 0.0001 | ** |
| 残差 | 32.49 | 12 | 2.71 | | | |
| 失拟差 | 32.21 | 10 | 3.22 | 23.23 | 0.062 | |
| 纯误差 | 0.28 | 2 | 0.14 | | | |
| 总离差 | 473.95 | 26 | | | | |

注: * 代表差异显著 ($P < 0.05$), ** 代表差异极显著 ($P < 0.01$)。

验因子对响应值的影响不是简单的线性关系。失拟项 F 值很小,说明方程对试验的拟合情况好,试验误差小。同时由表 4 可知,模型 ($p = 0.0001$) 说明回归方程描述各因子与响应值之间的关系时,其应变量与全体自变量之间的线性关系是显著的;同时

变异系数 ($CV = 2.08$) 也说明了这种试验方法是可靠的。复相关系数的平方 ($R^2 = 93.14$) 由这 4 个因素及其二次项可以解释 93.14% 的响应值的变化,能描述牦牛肝蛋白提取的变化规律,因此可用该回归方程代替试验真实点对试验结果进行分析^[15,16]。通过对 Y 的回归系数检验可知,各因素对牦牛肝蛋白提取率的影响大小顺序为:液料比 (X_1) > 碱液浓度 (X_2) > 提取温度 (X_4) > 提起时间 (X_3)。

表4 DH 模型的方差分析

| 模型 | $p = 0.0001$ |
|--------------|--------------|
| 均值 | 79.03 |
| 复相关系数的平方 / % | 0.9314 |
| 复相关系数 / % | 0.8515 |
| 变异系数 | 2.08 |

2.4.3 响应面与等高线 根据回归方程,得出响应面和等高线图,考察拟合响应曲面的形状,分析液料比、碱液浓度、提取温度和提取时间对牦牛肝蛋白提取率的影响,如图 6 ~ 11 所示。等高线的形状可以反映出交互作用的强弱,椭圆形表示两因素交互作用显著,而圆形则与之相反^[17]。比较图 6 ~ 11 可知,对牦牛肝蛋白提取率的影响大小顺序为液料比 (X_1)、碱液浓度 (X_2) 最为显著;而提取温度 (X_4)、提取时间 (X_3) 次之。

Design-Expert?Softwar

87.26
72.31
X1=A:液料比
X2=B:碱液浓度
Actual Factor
C:提取时间=60.00
D:提取温度=50.00

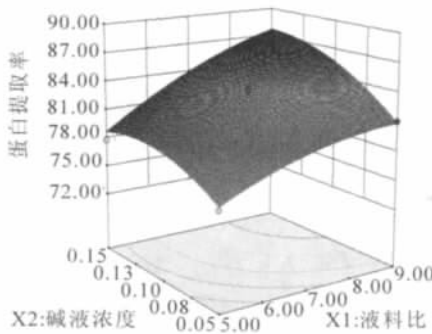
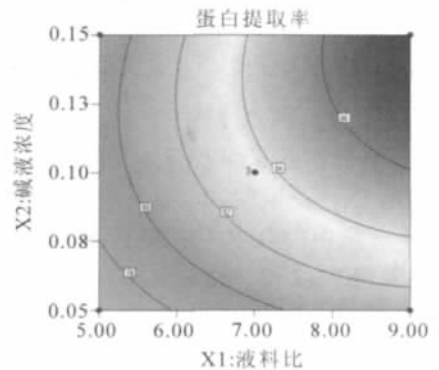


图6 $Y = f(X_1, X_2)$ 的响应面与等高线



Design-Expert?Softwar

87.2624
72.3126
X1=A:液料比
X2=C:提取时间
Actual Factor
B:碱液浓度=0.10
D:提取温度=50.00

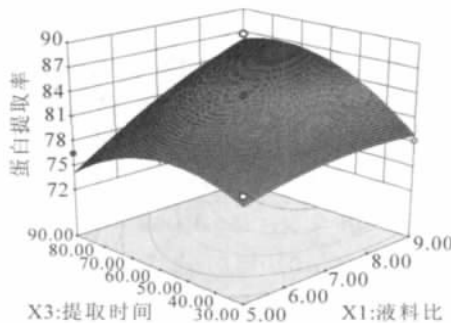
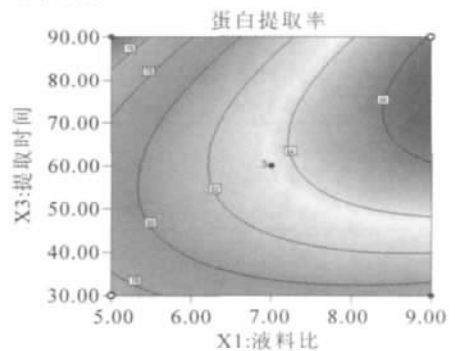


图7 $Y = f(X_1, X_3)$ 的响应面与等高线



2.4.4 提取工艺条件的确定 为进一步确定最佳提取条件,利用 Design - expert8.0 软件程序对工艺条件进行优化,可得牦牛肝蛋白提取率的最佳方案为:液料比为 8.89ml/g、碱液浓度为 $0.14\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、提取时间 68.41min、提取温度为 52.78°C ,蛋白提取率为 89.52%。但考虑到实际操作的便利,将牦牛肝蛋白的提取工艺参数修正为:液料比为 9ml/g、碱液浓度为 $0.14\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、提取时间 68 min、提取温度为 53°C 。在此条件下实际测得的平均提取率为 88.38%,与理论预测值相比相对误差为 1.14% 左右,说明该数学模型能很好的预测各因素同提取率之间的关系。因此采用修正后的提取方法得到的提取参数准确可靠,具有实用价值。

3 结论

鲜牦牛肝含水量约为 70.85%、灰分为 0.7%、蛋白含量为 19.7%、脂肪含量为 2.92%,可见牦牛肝是一种高蛋白低脂肪食物,是一种开发前景较好的食品。

通过单因素试验设计,在此基础上设计 4 因素 3 水平响应面法实验,利用响应面法对牦牛肝蛋白的提取工艺进行了优化,得到碱提酸沉法提取牦牛肝蛋白的最佳工艺条件为:液料比 9ml/g、碱液浓度 $0.14\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、提取时间 68 min、提取温度 53°C ,在此条件下实际测得的平均提取率为 88.38%。建立的数学模型能很好的预测各因素同提取率之间的关系。

利用响应面分析方法对牦牛肝蛋白工艺进行优化,可获得最优的工艺参数,能有效减少工艺操作的盲目性,为进一步的试验研究奠定基础,对牦牛肝蛋白的开发具有重要意义。

参考文献

- [1] 郭宪,阎萍,梁春年,等. 中国牦牛业发展现状及对策分析[J]. 中国牛业科学,2009,35(2):55~57.
- [2] Wiener G, Jianlin H, Ruijun L eds. The Yak (2nd ed). Bangkok: Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2003,460.
- [3] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社,1991:524~525.
- [4] 中华人民共和国国家标准. 食品安全国家标准食品中水分的测定,GB 5009.3~2010.
- [5] 中华人民共和国国家标准. 食品安全国家标准食品中灰分的测定,GB 5009.4~2010.
- [6] 中华人民共和国国家标准. 食品安全国家标准食品中蛋白质的测定,GB5009.5~2010.
- [7] 中华人民共和国国家标准. 食品中脂肪的测定,GB/T5009.6~2003.
- [8] 舒友琴,梁丽琴,扶庆权,等. 菠菜叶蛋白的提取研究[J]. 食品科学,2005,10(26):124~127.
- [9] Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding [J]. Analytical Biochemistry,1976,72:248~254.
- [10] BOX G E P, HUNTER W G. Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building [M]. New York: Wiley, 1990: 289~356.
- [11] 肖怀秋,李玉珍. 黑豆皮中红色色素萃取工艺的响应面优化[J]. 氨基酸与生物资源,2010,32(2):30~34.
- [12] Renkema J M S, Gruppen H, van Vliet T. Influence of pH and ionic strength on heat - induced formation and rheological properties of soy protein gels in relation to denaturation and their protein compositions [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50 (21): 6064~6071.
- [13] Ilankovan Paraman, N. S. Hettiarachchy, Christian Schaefer, et al. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of enzyme - modified rice endosperm protein [J]. Cereal Chemistry, 2007, 84(4):343~349.
- [14] 雷淑芳,晁芳芳,张雪苍. 大豆分离蛋白的生产工艺及其在食品工业中的应用[J]. 粮食加工,2004(4):53~56.
- [15] Alsarra, I. A. , Neau, S. H. , Howard, M. A. Effects of preparative parameters on the properties of chitosan hydrogel beads containing Candida rugosa lipase [J]. Biomaterials, 2004,25:2645~2655.
- [16] Mundra, P. , Desai, K. , Lele, S. S. Application of response surface methodology to cell immobilization for the production of palatinose [J]. Bioresource Technology, 2007, 98:2892~2896.
- [17] Nilsang, S. , Lertsiri, S. , Suphantharika, M. , Assavanig, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases [J]. Journal of Food Engineering, 2005,70: 571~578.

(01) : 141 ~ 146.

培养基的优化 [J]. 现代食品科技, 2010, (01) : 34 ~ 37.

[6] 刘忠, 杨文博. 酶法生产 L-半胱氨酸培养基的响应面分析优化 [J]. 南开大学学报, 2004, 37(1) : 83 ~ 87.

[8] 吴晓燕, 钱绍松等. 酶法分离制备 γ -氨基丁酸和 L-天冬氨酸 [J]. 精细化工, 2006, 22(12) : 895 ~ 902.

[7] 冯宇, 高年发, 张颖. 短乳杆菌生产 γ -氨基丁酸培

Preparation of Gamma – Amino Butyric Acid Using γ – Lactamase

JIANG Guang – yu, LIU Yang, WANG Yan

(Anhui Huaheng Bioengineering Co., Ltd, Hefei 231131, China)

Abstract: Strains capable of producing γ – lactamase were screened from soil samples collected in several districts, and particularly 2 – pyrrolidone was used as sole carbon source. Fermentation medium was optimized using response surface analysis method and enzymatic reactions for gamma – amino butyric acid (GABA) production were optimized. Results showed that: the strain named HHSW – 16 had the best hydrolysis activity. The best fermentation medium was glucose $11.50\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, beef extract $6.35\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, yeast extract $5.58\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ $5.0\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $1.5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1.0\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $8\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.0. The optimum enzymatic reaction conditions were as follows: temperature 40°C , pH 7.0. Under these conditions, $10\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ substrate and 1% wet biomass, giving the reaction 6 hours, transformation ratio yield was up to 99.0%.

Key words: gamma – amino butyric acid (GABA); γ – lactamase; 2 – pyrrolidone

(上接第 34 页)

Optimization of Extraction Conditions for Protein from Yak (*Bos grunniens*) Liver by Response Surface Methodology

LIU Qing – hai^{1,2}, ZHANG Tang – wei^{1,2}, LI Tian – cai¹

(1Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Science, Xining 810008;

2Graduate University, Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: The contents of nutrient components in liver of yak (*Bos grunniens*) were determined. The optimum extraction of yak liver protein was determined with the single factor and the response surface analysis. The four factors chosen for the present investigation were based on the results of a single – factor test. Then the optimum extraction process condition was determined based on the regression analysis on the basis of single factor experiment using a 4 – factor, 3 – level response surface methodology. The experiment results showed that moisture, crude ash, crude protein, and crude fat in fresh liver of yak were 70.85%, 0.7%, 19.70%, 2.92%, respectively. The optimum extraction conditions of yak liver protein were: liquid – solid ratio was 7ml/g, extraction time was 68min, and extraction temperature was 53°C . Under these optimum extraction conditions, the extraction rate of the protein reached 88.38%.

Key words: yak; liver protein; technology optimization; response surface analysis