

苜蓿叶蛋白提取工艺参数优化试验研究

吴万灵^{1,2} 韩鲁佳^{1,2} 王唯涌^{1,2,3}

(1. 中国农业大学工学院,北京 100083; 2. 现代精细农业系统集成研究教育部重点实验室,北京 100083;
3. 中国水产科学研究院,北京 100039)

摘要 以水为提取溶剂,对热絮凝法提取苜蓿中叶蛋白的工艺参数进行优化。分别考察了加水倍量、打浆时间、苜蓿汁液 pH、保温时间和温度对提取效果的影响;在单因素基础上,采用四因素三水平正交试验对工艺进行了优化。试验结果表明:保温 10 min 蛋白提取率达 24.4%;随着苜蓿汁液 pH 的增大,叶蛋白中蛋白提取率和质量分数总体上呈下降趋势;pH 为 3 时提取率最高,为 23.3%,pH 为 6(原浆)时质量分数最高,为 61.5%;pH 对叶蛋白中叶黄素质量分数有显著影响,pH 为 6 时叶黄素质量分数最高,为 1 022.1 μg/g,碱性时次之,酸性最小。综合考虑的优化工艺参数为:温度 90 ℃、pH6、打浆时间 3 min、加水倍量 2.5,此条件下蛋白提取率为 33.1%,叶蛋白中叶黄素质量分数为 1 200 μg/g。

关键词 叶蛋白;叶黄素;苜蓿;提取工艺

中图分类号 TS 219

文章编号 1007-4333(2006)05-0065-05

文献标识码 A

Experimental study on parameter optimization of extraction process of leaf protein from alfalfa

Wu Wanling^{1,2}, Han Lujia^{1,2}, Wang Weiyong^{1,2,3}

(1. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China; 2. Key Laboratory of Modern Precision Agriculture System Integration, Ministry of Education, Beijing 100083, China; 3. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract Using water as extracting solvent, the extraction processing parameters of leaf protein from alfalfa were studied. The effects of the ratio of water to alfalfa, pulping time, pH of juice, heat preservation time and temperature were investigated, respectively. Based on these experiments, the orthogonal experimental design was adopted in an extraction process with heat preservation time of 10 min. The results show that pH of juice has significant effects on the yield of protein, protein content and lutein content of leaf protein. But the other parameters have a remarkable influence on the yield of protein only. From the analysis by synthesis the optimized extraction processing parameters, at constant pH value of 6, are temperature of 90 ℃, pulping time of 3 min. and the ratio of water to alfalfa of 2.5.

Key words leaf protein; lutein; alfalfa; extraction processing parameter

叶蛋白是一种植物性蛋白质,由茎叶细胞质内可溶性良好的细胞质蛋白和叶绿体内的基质蛋白,以及一部分线粒体蛋白组成,具有很高的营养价值。叶蛋白主要从新鲜牧草或青绿植物的茎叶中提取得到。从苜蓿中提取叶蛋白不仅可以缓解当前蛋白饲料资源短缺的局面,也是对牧草深加工和综合利用的有效途径之一^[1]。

近年来,对叶蛋白提取工艺及其参数的研究报道中,常用的提取方法为热絮凝法^[2],也有其他如超滤^[3]、盐析、结晶等^[4]。相关工艺参数主要有溶剂倍量、溶剂盐浓度^[5]、溶剂 pH^[6-7]、溶剂温度^[8]、提取时间、汁液 pH^[9]、絮凝时保温温度和保温时间等^[10-12];多数研究都以叶蛋白中蛋白质量分数、蛋白提取率或叶蛋白得率为考察指标,对不同提取工

收稿日期:2006-03-31

基金项目:北京市科技计划项目课题(Y0704003040511)

作者简介:吴万灵,硕士研究生;韩鲁佳,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事生物质资源开发与利用研究,E-mail:hanlj@cau.edu.cn

艺对叶蛋白中胡萝卜素的影响^[13],以及对所得叶蛋白进行化学成分和功能特性分析^[14-15]的研究较少;将叶蛋白中叶黄素质量分数为考察指标的未见报道。叶黄素有很高的价值^[16-17],考察提取工艺参数对叶黄素的影响具有现实意义。

本研究以苜蓿为原料,采取常用的热絮凝法,以蛋白提取率、蛋白质量分数和叶蛋白中叶黄素质量分数为指标,考察各工艺参数对考察指标的影响,以期获得叶蛋白提取的优化工艺参数。

1 材料与方法

1.1 原料、试剂及仪器

原料:第1茬生长期全株紫花苜蓿,含水率为21.92%,干基蛋白质量分数23.69%,2005-05-10前后采自北京小汤山科技农业示范园,于-5℃密闭保存。

主要试剂:盐酸、氢氧化钠、硼酸、溴甲酚绿、甲基红、乙醇、浓硫酸、凯氏消化片、丙酮、甲苯、正己烷、硫酸钠,分析纯;叶黄素标准品,购自美国 Chromadex 公司;乙腈、乙酸乙酯,色谱纯。

主要仪器:ARC120 电子精密天平,量程 3 100 g,感量 0.01 g,奥豪斯国际贸易(上海)有限公司;AB204-E 型电子分析天平,量程 210 g,感量 0.1 mg,瑞士梅特勒公司;多功能搅拌打浆机 EBR100,伊莱克斯电器有限公司;数显恒温水浴锅 HH-4,国华电器有限公司;LXI-B 型低速大容量多管离心机,上海安亭科学仪器厂;电热干燥箱,重庆银河试验仪器有限公司;LG-18 型冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;Foss 2300 自动凯氏定氮仪,消化炉;日立高效液相色谱仪,包括 L-7200 自动进样器,L-7420 型紫外可见检测器,L-7300 柱温箱,L-7100 泵和 L-7610 真空脱气机;HI9024 型便携式高精度 pH 计,精度 0.1,北京哈纳科仪科技有限公司。

1.2 试验设计

提取叶蛋白工艺路线为:鲜苜蓿剪切至 1~2 cm,混匀,称取约 100 g 按一定质量比加水,用打浆机第 1 档打浆,过滤;将得到的浆液调整 pH,在设定温度下水浴加热;以 3 000 r/min 离心 10 min,得到沉淀物叶蛋白;冷冻干燥得到叶蛋白提取物,称其质量。

叶蛋白提取物进行蛋白质量分数和叶黄素质量分数的测定。计算公式为:

$$\text{叶蛋白得率} = \frac{\text{叶蛋白质量}}{\text{鲜苜蓿质量} \times (1 - \text{苜蓿含水率})} \times 100\%$$

蛋白提取率 =

$$\frac{\text{叶蛋白得率} \times \text{叶蛋白质量分数}}{\text{苜蓿干物质蛋白质量分数}} \times 100\%$$

1.2.1 单因素试验

1) 加水倍量对蛋白提取率及蛋白质量分数的影响。打浆时间 2 min,汁液 pH 6,保温时间 10 min,温度 70℃,加水倍量分别为 1.5、2.0、2.5 和 3.0 时测定叶蛋白得率和蛋白质量分数。

2) 打浆时间对蛋白提取率及蛋白质量分数的影响。加水倍量 2,汁液 pH 6,保温时间 10 min,温度 70℃,打浆时间分别为 1、2、3 和 4 min 时测定叶蛋白得率和蛋白质量分数。

3) pH 对蛋白提取率及蛋白质量分数的影响。加水倍量 2,打浆时间 2 min,保温时间 10 min,温度 70℃,pH 分别为 3.0、5.0、6.0、9.0、11.0、13.0 和 14.0 时测定叶蛋白得率和蛋白质量分数。

4) 保温时间对蛋白提取率及蛋白质量分数的影响。加水倍量 2,打浆时间 2 min,汁液 pH 6,温度 70℃,保温时间为 5、10、15、20 和 25 min 时分别测定叶蛋白得率和蛋白质量分数。

5) 温度对蛋白提取率及蛋白质量分数的影响。加水倍量 2,打浆时间 2 min,汁液 pH 6,保温时间 10 min,温度为 60、70、80 和 90℃ 时分别测定叶蛋白得率和蛋白质量分数。

1.2.2 正交试验 在单因素试验基础上,采用四因素三水平正交试验考察各因素对蛋白提取率和叶蛋白中叶黄素质量分数的影响,正交试验设计见表 1。

表 1 叶蛋白提取试验因素及水平

Table 1 Factors and levels of extraction experiments

水平	因素			
	温度/℃	pH	打浆时间/min	加水倍量
1	80	3.0	1	1.5
2	90	6.0	2	2.0
3	100	9.0	3	2.5

注: pH 6.0 为原浆 pH。

1.3 检测分析方法

蛋白质量分数测定方法按 GB/T 6432—94《饲料中粗蛋白测定方法》;叶黄素质量分数的测定,前处理提取方法按 AOAC970.64,提取液用 HPLC 法测定叶黄素质量浓度。

色谱条件:色谱柱,SupelocsilTM C18(4.6 mm × 250 mm,5 μm);紫外检测波长 447 nm;柱温 26℃;

流速 1.0 mL/min; 流动相 A 为乙酸乙酯, B 为乙腈, 梯度洗脱, 0~35 min 乙腈体积比从 100% 降低到 0, 35~40 min 乙腈体积比保持 100%; 停止时间 40 min; 进样量 10 μ L。

试验数据用 SPSS 分析。单因素试验以蛋白提取率为指标, 正交试验分别以蛋白提取率和叶黄素质量分数为指标。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

1) 加水倍量对蛋白提取率及蛋白质质量分数的影响。加水倍量对提取叶蛋白的蛋白质质量分数影响不大, 对蛋白提取率有显著影响(图 1(a))。当加水倍量为 2 时, 蛋白提取率最高, 为 18.01%, 分别为加水倍量为 1.5 和 2.5 时的 1.5 和 1.3 倍, 即高出了 5.8% 和 3.9%。

2) 打浆时间对蛋白提取率及蛋白质质量分数的影响。打浆时间对叶蛋白蛋白质质量分数影响不大, 对蛋白提取率有显著影响(图 1(b))。打浆时间 1~3

min 时, 蛋白提取率随打浆时间的延长而提高, 打浆时间分别为 3 和 4 min 时的蛋白提取率没有显著差异。随着打浆时间的延长, 蛋白溶出就越多, 因此蛋白提取率提高。

3) pH 对蛋白提取率及蛋白质质量分数的影响。试验结果表明, pH 对叶蛋白蛋白质质量分数和蛋白提取率都有显著的影响(图 1(c))。总体看, 随着 pH 的增加, 蛋白质质量分数和提取率均下降; pH 为 3 时, 蛋白提取率最高, 达 23.3%; pH 在 5~9 之间时, 蛋白提取率和质量分数变化不大。

4) 保温时间对蛋白提取率及蛋白质质量分数的影响。保温时间对叶蛋白蛋白质质量分数的影响不大, 对蛋白提取率有较大影响(图 1(d))。保温 5 min 提取率较低, 可能是由于时间太短, 汁液内部温度还没有来得及上升到可以使蛋白絮凝的温度。保温 10 min 后, 保温时间对蛋白提取率的影响不大。

5) 温度对蛋白提取率及蛋白质质量分数的影响。温度对叶蛋白蛋白质质量分数的影响不大; 而对蛋白提取率有显著影响(图 1(e))。随着温度的升高, 蛋

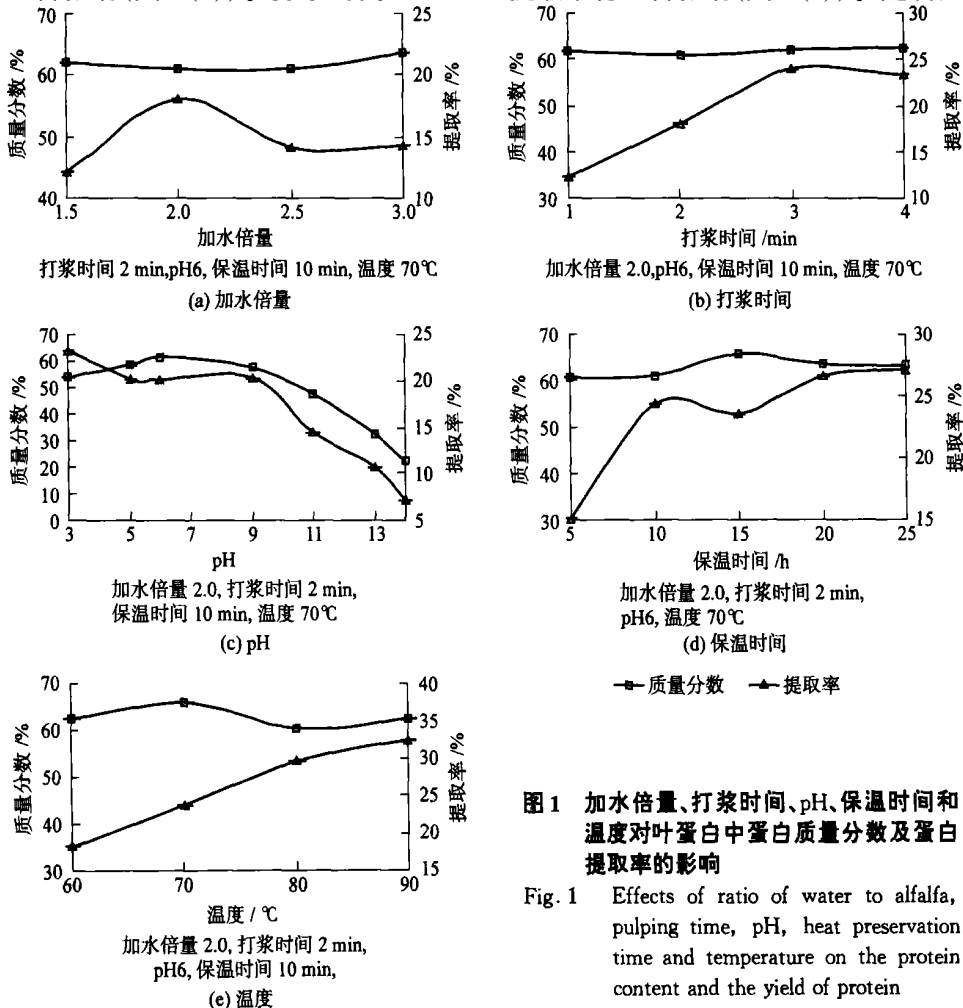


图 1 加水倍量、打浆时间、pH、保温时间和温度对叶蛋白中蛋白质质量分数及蛋白提取率的影响

Fig. 1 Effects of ratio of water to alfalfa, pulping time, pH, heat preservation time and temperature on the protein content and the yield of protein

白提取率一直呈上升的趋势。

2.2 正交试验

2.2.1 以蛋白提取率为指标

各因素对蛋白提取率都有显著影响(表2)。温度2、3水平间没有显著差异,且都显著好于1水平,但从经济性考虑,选择2水平、90。pH的1水平显著好于2水平,且均与3水平无显著差异,从实际

生产角度选择不加酸碱的2水平,即用原始浆汁。打浆时间3个水平间都有显著差异,选择效果最好的3水平,即打浆时间3 min。加水倍量2水平显著好于1水平,2、3水平间无显著差异,因此选择加水倍量为2.0。以蛋白提取率为指标的叶蛋白提取优化工艺参数为:温度90、pH6、打浆时间3 min、加水倍量2.0。

表2 叶蛋白提取工艺参数优化试验结果

Table 2 Result analysis of parameter optimization experiment of leaf protein extracting process

水平	蛋白提取率/ %				叶黄素质量分数/ (μg/ g)			
	温度	pH	打浆时间	加水倍量	温度	pH	打浆时间	加水倍量
1	19.7 a	22.4 a	14.5 a	14.1 a	727.5 a	485.2 a	716.0 a	707.8 a
2	22.1 b	19.9 b	22.9 b	24.4 b	819.3 b	1022.1 b	734.2 a	717.2 a
3	21.8 b	21.3 ab	26.2 c	25.1 b	767.7 a	807.2 c	864.3 b	890.0 b

注:同一列数字尾字母相同表示无显著差异($P>0.05$),不同为差异显著($P<0.05$)。

2.2.2 以叶蛋白中叶黄素质量分数为指标

HPLC法测定的叶黄素标准谱图和提取液谱图见图2。以叶蛋白中叶黄素质量分数为指标的正交试验结果(表2)表明,各因素对叶蛋白中的叶黄素质量分数有显著影响。

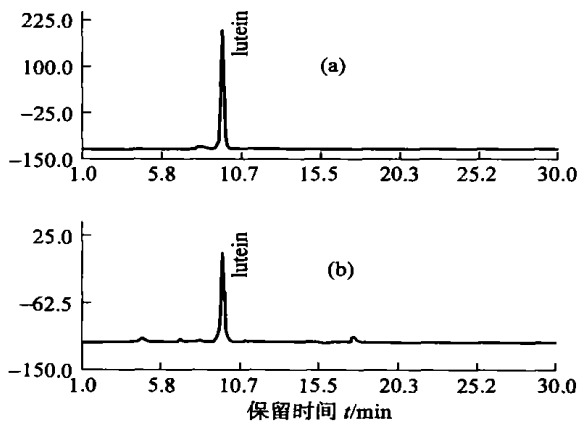


图2 叶黄素标准品(a)和提取液(b)的HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of lutein standard and lutein extraction

温度2水平(90)显著好于1和3水平。pH的3个水平间都有显著差异,2水平(pH6)最好,其次是3水平,1水平时叶黄素质量分数最低。打浆时间3水平(3 min)显著优于其他水平。加水倍量3水平(2.5)显著优于其他水平。以叶蛋白中叶黄素质量分数为指标的叶蛋白提取优化工艺参数为:温度90、pH6、打浆时间3 min、加水倍量2.5。

从以上2个优化工艺的结果看,工艺参数基本

相同,只在加水倍量上有些差异。而从表2中可以看出,加水倍量为2水平和3水平时蛋白提取率无显著差异,因此选择3水平对蛋白提取率没有影响。综合考虑确定的优化工艺参数为:温度90、pH6、打浆时间3 min、加水倍量2.5。

3 结论

除pH外,其他因素对叶蛋白中蛋白质质量分数的影响不大,而对蛋白提取率和叶蛋白中叶黄素质量分数有显著影响;pH对这3个指标都有显著影响,pH为6时提取效果最好。

综合考虑蛋白提取率和叶蛋白中叶黄素质量分数2个指标,确定的优化工艺参数为:温度90、pH6、打浆时间3 min、加水倍量2.5,此条件下蛋白提取率为33.1%,叶蛋白中叶黄素质量分数为1200 μg/g。

参考文献

- [1] 田丽萍,刘青广. 苜蓿综合利用及深加工技术研究进展[J]. 草食家禽,2004,6(2):39-41
- [2] 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,2005,26(10):124-127
- [3] Koschuh W, Povoden G, Thang V H, et al. Production of leaf protein concentrate from ryegrass (*Lolium perenne multiflorum*) and alfalfa (*Medicago sativa* subsp. *sativa*). Comparison between heat coagulation/ centrifugation and ultrafiltration[J]. Desalination, 2004, 163 (1-

- 3):253~259
- [4] 王晋峰,刘凌,郑玉才,等. 植物叶蛋白提取技术及开发利用研究[J]. 草业科学,2003,20(1):7~11
- [5] 朱宇旌,张勇,李玉杰,等. 苜蓿干草中提取叶蛋白最佳工艺的研究[J]. 食品工业科技,2006(1):142~145
- [6] 饶国华,赵谋明,林伟锋,等. 低次烟叶蛋白质提取工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(11):67~72
- [7] 赵谋明,饶国华,林伟锋,等. 低次烟叶中蛋白质提取工艺优化及氨基酸分析研究[J]. 农业工程学报,2006,22(1):142~146
- [8] 衣丹,刘发义. 盐生植物中亚滨藜叶蛋白提取工艺的研究[J]. 海洋科学进展,2003,21(1):83~87
- [9] 熊军功. 一种用鲁梅克斯杂交酸模制备叶蛋白的制备方法及其产品:中国,ZL 98101850.5[P]. 2003~09~17
- [10] 周青平,魏臻武. 不同提取条件对苜蓿叶蛋白凝集的影响[J]. 草业科学,2002,19(7):23~25
- [11] 田少君,张磊. 烟叶叶蛋白的提取研究[J]. 食品科技,2005(5):15~17
- [12] 李勇,宋慧. 竹叶蛋白的分离提取及其副产物的利用[J]. 食品与发酵工业,2005,31(3):136~138,141
- [13] 姚爱兴,崔慰贤,王玲. 串叶松香草和紫花苜蓿叶蛋白提取技术研究[J]. 中国饲料,2000(3):33
- [14] Fasakin E A. Nutrient quality of leaf protein concentrates produced from water fern(*Azolla Africana* Desv) and duckweed(*Spirodela polyrrhiza* L. Schleiden) [J]. *Bioresource Technology*,1999,69(2):185~187
- [15] Aletor O,Oshodi A A,Ipinmoroti K. Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates[J]. *Food Chemistry*,2002,78(1):63~68
- [16] Alves-Rodrigued A,Shao A. The science behind lutein [J]. *Toxicology Letters*,2004,150(1):57~83
- [17] 陈贵堂,赵霖. 植物蛋白的营养生理功能及开发利用[J]. 食品工业科技,2004,25(9):137~140