

樟树叶蛋白提取工艺及四季含量动态分析

王 娜, 褚衍亮, 李 静, 王凯旋

(江苏科技大学 生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212018)

摘 要: 采用酸碱法及加热法初步研究了提取樟树叶蛋白的工艺。结果表明: 樟树叶蛋白的最佳提取工艺条件: 常温下浸提剂的 pH 为 5, 料液比为 1 : 15, 打浆时间 4 min, 浸提时间 4 min。叶蛋白的分离条件: 温度为 90 °C 时, 沉淀分离出叶绿体蛋白质, 调节 pH 为 3 时分离出细胞质蛋白质 I, 调节 pH 为 11 时分离出细胞质蛋白质 II。在此工艺条件下四季叶蛋白得率分别为 6.22%、5.25%、15.05% 和 5.34%。

关键词: 樟树; 叶蛋白; 提取工艺

中图分类号: TQ 936.2 文献标识码: B

文章编号: 1001-0009(2011)07-0051-04

植物叶片具有很高的经济利用价值, 包括食用、药用、饲用、用作轻工业原料或其它用途^[1], 而叶蛋白更是宝贵的营养物质资源库, 其浓缩物中含有蛋白质、糖类、脂肪、维生素等多种营养成分, 营养价值很高。樟树 (*Cinnamomum camphora* (L.) Presl.) 为常绿乔木, 是重要的材用和特种经济树种, 更有涵养水源、固土防沙和美化环境的作用。由于樟树对土壤要求不严, 在我国分布广泛, 资源十分丰富。该试验对樟树叶蛋白的提取工艺进行优化^[2,5], 并配合使用加热法^[6]和酸碱法^[7]分离沉淀叶蛋白, 为樟树叶蛋白的大规模提取和生产提供一定的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 材料及处理 樟树四季成熟叶片分别于 2008 年 4、7、10 月和 2009 年 1 月采自江苏科技大学校园内, 采集后洗净晾干, 备用; 另外采集一部分叶片, 经清洗、晾干、烘干、粉碎后保存备用。

1.1.2 试剂和仪器 所用试剂均为国产分析纯; 主要仪器为 SHZ-D(III) 循环水式真空泵, 日本岛津 UV-2450 紫外可见分光光度计, JJ-2 组织捣碎匀浆机, PHSJ-4A 数显酸度计, DHG-9240 型电热鼓风干燥箱。

1.2 试验方法

水分测定采用常压干燥法。蛋白含量的测定^[8]采用凯氏定氮法和双缩脲法。双缩脲法牛血清白蛋白标准曲线回归方程为 $Y = 0.0465X + 0.005$ ($r^2 = 0.9985$)。将鲜叶洗净晾干, 在适量的浸提剂中打浆浸提后, 用 8 层

纱布过滤得其滤液, 再将滤液抽滤得到澄清汁液, 采用双缩脲法测定吸光度值。比较不同的浸提剂 pH、料液比、打浆时间和浸提时间对提取效果的影响。采用正交分析确定最优组合的提取条件。将最优组合条件下获得的滤液放入恒温水浴锅内快速加热到规定温度, 得到絮凝物, 低速离心分离 (5 000 r/min, 10 min) 得叶绿体叶蛋白沉淀物, 60 °C 烘干称重。上清液用 HCl 和 NaOH 调节不同的 pH 值, 低速离心分离得细胞质叶蛋白沉淀物, 60 °C 烘干称重。根据沉淀率比较得出最佳絮凝温度和 pH, 最后将诸多条件组合为樟树叶蛋白的提取工艺流程。樟树叶蛋白总和 = 叶绿体叶蛋白 + 细胞质叶蛋白 I + 细胞质叶蛋白 II; 叶蛋白提取率 (%) = 提取的蛋白干重 / 叶片鲜重; 叶蛋白得率 (%) = 提取的蛋白干重 / 粗蛋白量。

2 结果与分析

2.1 叶蛋白提取工艺

2.1.1 浸提剂 pH 对叶蛋白提取的影响 准确称取 5 份 30 g 鲜叶, 用不同 pH 的水作为浸提剂 (pH 4、5、6、7、8 和 9), 按 1 : 10 的料液比打浆 3 min, 浸提 10 min 后, 过滤得滤液, 分别吸取 0.5 mL 样品加 1.5 mL 的生理盐水和 4 mL 的双缩脲充分混匀后静置 0.5 h, 以空白为对照, 在 540 nm 处测其吸光度。由图 1 可知, 当 pH 为 5 时, 双缩脲法测出的蛋白含量最大, 因此选用 pH 为 5 的水作为浸提剂。

2.1.2 料液比对叶蛋白提取的影响 以不同的料液比 1 : 5、1 : 7、1 : 10、1 : 12 和 1 : 15 加入 pH 为 5 的水浸提剂, 打浆 3 min, 浸提 10 min, 过滤后得其滤液, 双缩脲法测定滤液中蛋白含量, 由图 2 可看出, 料液比为 1 : 12 时浸提效果最好。当料液比过小时, 水分太少, 浸提不充分, 使蛋白质溶解不完全, 从而影响了浸提效果; 当料

第一作者简介: 王娜 (1976-), 女, 山东烟台人, 硕士, 讲师, 研究方向为植物生理生化。E-mail: biojustwn@126.com。

收稿日期: 2011-02-11

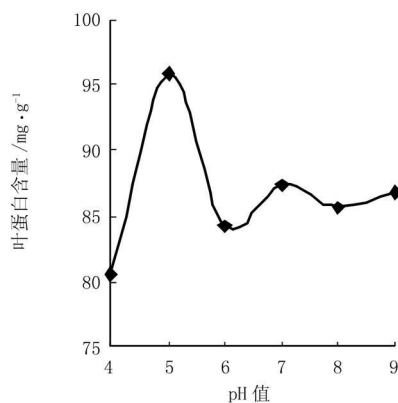


图 1 浸提剂 pH 值对叶蛋白提取的影响

液比增大, 提出的蛋白质明显增加, 当增大到 1 : 12 时达到峰值, 当料液比继续增大, 浓度过稀, 影响提取效果。因此, 选用 1 : 12 的料液比较为合适。

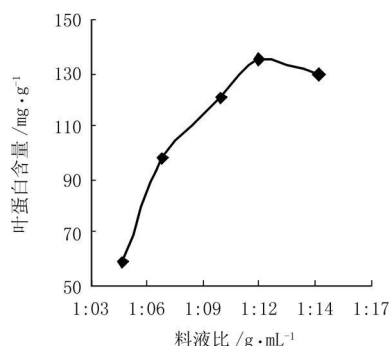


图 2 料液比对叶蛋白提取的影响

2.1.3 打浆时间对叶蛋白提取的影响 准确称取 5 份 25 g 鲜叶, 以料液比 1 : 12 加入 pH 为 5 的浸提剂, 打浆时间分别取 1、2、3、4 和 5 min, 对原料进行粉碎打浆, 浸提 10 min, 过滤后得其滤液。双缩脲法测定滤液中蛋白含量。由图 3 可知, 随着打浆时间的增加, 溶解的蛋白质也随之增多, 3 min 以后蛋白质的含量变化不大, 考虑到时间因素, 确定 3 min 为较佳的打浆时间。

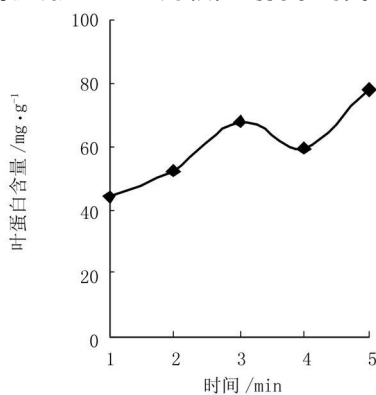


图 3 打浆时间对叶蛋白提取的影响

2.1.4 浸提时间对叶蛋白提取的影响 准确称取 5 份 25 g 鲜叶, 以料液比 1 : 12 加入 pH 为 5 的浸提剂, 打浆 4 min, 分别浸提 2、3、4、5 和 6 min。过滤后得其滤液, 双缩脲法测定滤液中蛋白含量。由图 4 可知, 当浸提时间为 3 min 时提取效果最好。

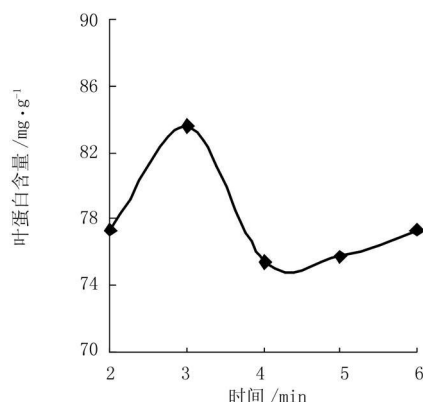


图 4 浸提时间对叶蛋白提取的影响

2.1.5 叶蛋白提取的正交实验^[9] 在各单因子实验的基础上对影响提取效果的主要因素: 浸提剂 pH 值、料液比、打浆时间和浸提时间等进行正交实验。由表 1 可知, 4 个因素中, 打浆时间对提取液中蛋白含量影响最大, 其次为料液比、浸提剂 pH 值和浸提时间。其理论最优提取工艺为 A₂B₃C₃D₃, 即浸提剂 pH 为 5、料液比 1 : 15、打浆时间 4 min 和浸提时间 4 min, 其组合条件不在该正交实验组中, 按照 A₂B₃C₃D₃, 进行补充试验, 其提取液中蛋白含量为 103.2 mg/g, 高于正交实验中的最高值。因此采用浸提剂 pH 5, 料液比 1 : 15, 打浆时间 4 min, 浸提时间 4 min 作为樟树叶蛋白提取的最佳提取条件。

表 1 正交实验设计

实验号	浸提剂 pH 值	料液比 / g·mL ⁻¹	打浆时间 / min	浸提时间 / min	叶蛋白含量 / mg·g ⁻¹
1	4	1 : 10	2	2	65.8
2	4	1 : 12	3	3	71.7
3	4	1 : 15	4	4	96.8
4	5	1 : 10	3	4	84.7
5	5	1 : 12	4	2	93.9
6	5	1 : 15	2	3	85.8
7	6	1 : 10	4	3	83.9
8	6	1 : 12	2	4	77.4
9	6	1 : 15	3	2	87.1
10 **	5	1 : 15	4	4	103.2
K ₁	234.3	234.4	229	246.8	
K ₂	264.4	243	243.5	241.4	
K ₃	248.4	269.7	274.6	258.9	
X ₁	78.1	78.1	76.3	82.3	
X ₂	88.1	81	81.1	80.5	
X ₃	82.8	89.9	91.5	86.3	
极差 R	10.03	11.77	15.2	5.83	

注: ** 为补充试验结果

2.1.6 絮凝温度对叶蛋白沉淀的影响 准确称取 80 g 鲜叶,按照最佳组合工艺打浆浸提得蛋白溶液,定容至 1 000 mL 后双缩脲法测定蛋白含量。将溶液平分为 5 份分别放入不同温度的恒温水浴中加热得絮凝物(70、75、80、85、90℃),离心得叶蛋白沉淀,60℃烘干得叶蛋白干粉,计算叶蛋白沉淀率,由图 5 可知,随着温度的升高,絮凝物沉淀也随之增加,90℃时达到最高值,所以该试验采用 90℃的温度作为较佳絮凝温度。

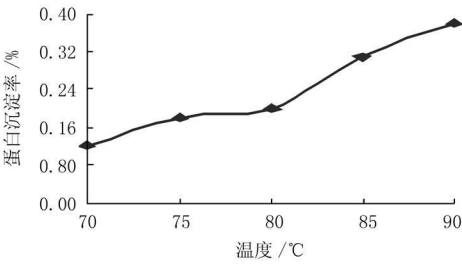


图 5 絮凝温度对叶蛋白提取的影响

2.1.7 汁液 pH 值对叶蛋白提取的影响 按照最优组合,打浆浸提得到汁液,用双缩脲法测出总蛋白后,平均分装到 14 个烧杯中。将汁液用盐酸和氢氧化钠调节 pH,分别为 1~14 间的整数值。将得到的叶蛋白 60℃烘干称重,计算出沉淀率结果,由表 2 可知,樟树叶蛋白沉淀量最大的为 pH 11,其次 pH 3 的沉淀量也较大。说明蛋白溶液呈 2 个等电点,酸性时 pH 3,碱性时 pH 11。因此选用 pH 3 和 pH 11 作为提取叶蛋白的 2 个等电点来调节汁液 pH 值,从而使汁液中的叶蛋白沉淀完全,提高蛋白质的提取率。

表 2 不同 pH 值对蛋白沉淀的影响

pH 值	蛋白沉淀率/%	沉淀物颜色	上清液颜色	pH 值	蛋白沉淀率/%	沉淀物颜色	上清液颜色
1	0.24	灰白	浅黄	8	0.20	草绿	黄棕
2	0.52	灰白	浅黄	9	0.38	深绿	黄棕
3	1.00	灰白	浅黄	10	0.56	棕色	红棕
4	0.59	灰白	浅黄	11	2.40	红棕	红棕
5	0.42	浅绿	黄色	12	1.30	红褐	红棕
6	0.23	浅绿	黄色	13	0.61	红褐	红棕
7	0.23	草绿	黄棕	14	0.22	红褐	红棕

2.2 樟树叶片的蛋白含量分析

2.2.1 含水率的测定 各采集新鲜樟树叶片 3 份,洗净自然晾干后称其鲜重,然后置于 60~80℃下烘干至恒重,称其干重,换算得出含水率,结果为四季叶片含水率平均为 39.8%、52.9%、51.3%和 46.4%。

2.2.2 凯氏定氮法测定叶片粗蛋白含量 将洗净晾干的鲜叶烘干至恒重,粉碎成粉末后,精确称取 0.5 g 加入 3 g 催化剂(10 K₂SO₄·1 CuSO₄·5H₂O)和 10 mL 消化液(浓 H₂SO₄)进行消化,蒸馏,并以 0.01 mol/L 的 HCl 进行滴定。空白对照组加入相同固体质量的催化剂进行消化、蒸馏,同样也以 0.01 mol/L 的 HCl 进行滴定。

结果按计算式:蛋白质含量=(样品消耗 HCl 的体积/对照消耗 HCl 的体积)×0.014×HCl 的浓度×6.25×10/样品质量,得出樟树叶片干粉的蛋白量,再由含水量折算出鲜叶蛋白质含量。四季鲜叶片粗蛋白含率分别为 7.06%、8.4%、6.4%和 5.6%。

2.2.3 四季樟树叶蛋白提取的综合分析 准确称取 100 g 新鲜叶片,根据最佳提取工艺条件得叶蛋白提取液。将蛋白提取液于 90℃温度下絮凝,离心分离得叶绿体蛋白;将上清液调 pH 为 3,离心分离得细胞质蛋白 I;上清液继续调节 pH 为 11,离心分离得细胞质蛋白 II。樟树四季成熟叶片蛋白含量结果见表 3。

表 3 樟树叶片四季各种蛋白含量

	春季	夏季	秋季	冬季
叶绿体蛋白				
/mg·(100g) ⁻¹ 鲜叶	196	27.6	98.8	86.9
细胞质蛋白 I				
/mg·(100g) ⁻¹ 鲜叶	165	62.4	218.6	91.3
细胞质蛋白 II				
/mg·(100g) ⁻¹ 鲜叶	78	350.9	645.5	120.7
叶蛋白总量				
/mg·(100g) ⁻¹ 鲜叶	439	440.9	962.9	298.9
叶蛋白提取率/%	0.44	0.44	0.96	0.30
叶蛋白得率/%	6.22	5.25	15.05	5.34

3 结论

配合使用酸碱法及加热法提取樟树叶蛋白的最佳提取工艺条件为:常温下水浸提的 pH 为 5,料液比为 1:15,打浆时间 4 min,浸提时间 4 min。叶蛋白的分离条件为:温度 90℃时,沉淀分离出叶绿体蛋白质,调节 pH 为 3 时分离出细胞质蛋白质,为灰白色粉末,调节 pH 为 11 时分离出细胞质蛋白质 II,为红棕色粉末。依据此工艺得到四季樟树叶片叶蛋白提取率分别为 0.44%、0.44%、0.96%和 0.30%;叶蛋白得率分别为 6.22%、5.25%、15.05%和 5.34%。

参考文献

[1] 刘胜祥,黎维平.植物学[M].北京:化学工业出版社,2007.
[2] 王桃云,马红昌,刘江颖.葎草叶蛋白提取工艺的优化[J].苏州科技学院学报,2005,22(1): 59-64.
[3] 刘芳,敖常伟.刺槐叶蛋白提取工艺的初步研究[J].中南林学院学报,1999,19(1): 64-67.
[4] 贺筱蓉,李永泉.紫云英叶蛋白提取工艺研究[J].天然产物研究与开发,1994,6(4): 98-102.
[5] 杨丽娥,胡雪华,安渊等.叶蛋白提取方法研究[J].上海交通大学学报,2003,21(B12): 66-70,82.
[6] 董晓燕.生物化学实验[M].北京:化学工业出版社,2003.
[7] 郑集,陈钧辉.普通生物化学[M].4版.北京:高等教育出版社,2007.
[8] 刘志国.生物化学实验[M].武汉:华中科技大学出版社,2007.
[9] 杜荣骞.生物统计学[M].2版.北京:高等教育出版社,2003.

不同浓度营养液浸泡保水剂对黄瓜幼苗生长和光合作用的影响

夏庆平, 吴晓蕾, 宫彬彬, 高洪波, 罗黄颖

(河北农业大学 园艺学院 河北 保定 071001)

摘要: 采用不同浓度营养液浸泡丙烯酰胺-丙烯酸盐(钾)共聚交联物(CAA), 与蛭石混合配制 5 种基质, 研究不同基质对黄瓜穴盘苗的生长、叶绿素荧光参数、光合作用的影响。结果表明: 随营养液浓度的增加, 黄瓜幼苗的生长指标显著提高, 净光合速率(Pn)、最大光化学效率(Fv/Fm)等光合作用指标显著增加; 在 5 种基质处理中, 处理 5(总盐分浓度为 10.98 g/L)效果最明显, 幼苗生长指标、光合参数等均显著高于其它处理; 表明使用高浓度营养液浸泡 CAA 与蛭石混合配制的育苗基质进行黄瓜育苗, 既可以减少施肥次数, 还能显著提高黄瓜的穴盘苗质量, 可作为生产中草炭为主的栽培基质的替代品。

关键词: 营养液; CAA; 黄瓜; 生长; 光合作用

中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2011)07-0054-03

随着设施园艺的迅速发展, 工厂化穴盘育苗技术正在大面积推广和应用, 育苗基质的选用对培育壮苗起着关键的作用^[1]。目前, 穴盘育苗基质大多采用的是以草

炭为主的复合基质, 不但成本高, 而且不能满足幼苗生长所需的全部肥料。为此, 寻找一种能够持续供应营养、满足幼苗生长需要的育苗基质对促进穴盘育苗的发展具有重要的实践意义。

丙烯酰胺-丙烯酸盐共聚交联物 [Cross-linked of poly (acrylamide-co-acrylate), 简称 CAA], 是一种高吸水性树脂, 可作为保水剂在农业生产中应用, 可使土壤形成团粒结构, 提高土壤的保水性、透水性和透气性; 而且还能将吸收的肥料缓慢的释放出来, 现已成为农业节水、节肥、持续增产、水肥高效利用的重要措施^[2-3]。但以往对保水剂的研究大多数集中于在土壤中的应用, 而在无土栽培基质中使用效果的研究较少。试验在借鉴蔬菜

第一作者简介: 夏庆平(1985-), 男, 河北唐山人, 在读硕士, 现主要从事设施蔬菜逆境生理研究工作。E-mail: qingpingxia@163.com。

责任作者: 高洪波(1976-), 女, 河北秦皇岛人, 副教授, 现主要从事设施蔬菜和无土栽培的教学与研究工作。E-mail: hongbogao@hebau.edu.cn。

基金项目: 河北省科技支撑计划资助项目 (07220701D)。

收稿日期: 2011-01-25

Dynamic Analysis on Extraction Technique and Four Seasons Content of Leaf Protein Concentrate from Camphor Trees

WANG Na CHU Yan-liang LI Jing WANG Kai-xuan

(College of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018)

Abstract: The optimum technique of extracting leaf protein concentrate(LPC) from the fresh leaves of camphor trees were studied with the methods of acid, alkali and heating. The results showed that under the normal temperature high yield of LPC could obtained by water(pH 5), solid-liquid ratio of 1:15(g/mL), crushing leaves for 4 min and soaking for 4 min. The most optimum precipitating conditions were the temperature of 90 °C for the chloroplastic proteins, the pH 3 for cytoplasmic proteins I and the pH 11 for the cytoplasmic proteins II. By this technique about 6.22, 5.25, 15.05, 5.34 g LPC could be extracted from 100 g fresh leaves of the four seasons.

Key words: camphor trees; leaf protein concentrate(LPC); extraction technique