北方园艺 2013(12):144～147

菜用黄麻叶蛋白最佳提取工艺研究

林燕如，蔡楷钰

（韩山师范学院 化学系，广东 潮州 521041）

摘　要：以菜用黄麻叶为试材，采用酸提法和加热法制备提取液，在料液比、浸提剂 pH 值、打浆时间、浸提时间等单因素试验基础上，进行 $L_9(3^4)$ 正交实验设计，研究了提取菜用黄麻叶蛋白的最佳工艺条件。结果表明：菜用黄麻叶蛋白最佳提取工艺条件为：浸提剂 pH 5，打浆时间 3 min，料液比 1∶8，浸提时间 6 min；叶蛋白的最佳分离条件为：温度 85℃时，沉淀分离出叶绿体蛋白质，调节提取液 pH 3 和 11 时分别分离出细胞质蛋白质Ⅰ、Ⅱ。菜用黄麻叶蛋白的提取率为 8.07%，得率为 37.59%。

关键词：菜用黄麻；叶蛋白；提取工艺

中图分类号：TS 255.36　**文献标识码：**A　**文章编号：**1001－0009(2013)12－0144－04

随着世界人口的剧增和人民生活水平的不断提高，人类对蛋白质的需求量越来越大。我国植物资源丰富，而在叶蛋白开发方面相对滞后，因此，积极寻求开发新的蛋白资源具有十分重要的意义。叶蛋白原料丰富、营养价值高、食用效果好、经济效益高，是一种具有开发价值的新型蛋白质资源[1]。

菜用黄麻(*Corchorus olitorius* L.)属椴树科黄麻属 1 a 生草本植物。学名长蒴黄麻，又称麻叶菜、埃及野麻婴及帝王菜等，食用部分为植株的嫩茎和幼叶。菜用黄麻是一种富含粗蛋白、矿质元素，且氨基酸种类齐全的营养保健蔬菜，是一种非常好的蛋白质资源，也有很高的药用价值，应用前景广阔[2-3]。但菜用黄麻的供应受季节限制，通常只在夏季以鲜蔬菜销售为主，致使其市场供应能力受到极大限制。现以菜用黄麻叶为试材，采用酸提法和加热法，在料液比、浸提剂 pH 值、打浆时间、浸提时间等单因素试验基础上，进行 $L_9(3^4)$ 正交实验设计，研究提取菜用黄麻叶蛋白的最佳工艺条件，以期为菜用黄麻的深度开发与利用提供参考，并为开发新型蛋白资源提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验材料

菜用黄麻于 2011 年 7 月购自潮州枫春市场，用水冲洗干净后，晾干备用。标准的结晶牛血清蛋白(BSA，上海伯奥生物科技有限公司)；其它试剂均为分析纯。pHS-3C 型 pH 计(上海雷磁仪器厂)；FA2004N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司)；722s 分光光度计(上海棱光技术有限公司)。

1.2　试验方法

1.2.1　菜用黄麻叶提取液的制备　将新鲜菜用黄麻洗净晾干，在适量的浸提剂中打浆浸提后用 4 层纱布抽滤得其滤液，再将滤液离心分离(1 500 r/min，10 min)，得到去除杂质的提取液[8-9]。

1.2.2　单因素试验　用双缩脲法测定其吸光度，比较不同的浸提剂 pH 值、打浆时间、料液比、浸提时间对提取效果的影响。浸提剂 pH 值对叶蛋白提取的影响：准确称取 7 份 20 g 鲜叶，分别用 pH 3、4、5、6、7、8、9 的水作为浸提剂，按 1∶5 的料液比打浆 3 min，浸提 4 min 后抽滤得滤液，离心分离后，分别吸取 0.20 mL 样品加 1.80 mL 的生理盐水和 4.00 mL 的双缩脲充分混匀后静置0.5 h，以空白为对照，在波长为 540 nm 处测其吸光度。打浆时间对黄麻叶蛋白提取的影响：准确称取 6 份 20 g 鲜叶，用 pH 5 的水作为浸提剂，按 1∶5 的料液比，分别取时间为 1、2、3、4、5、6 min 后对鲜叶粉碎打浆，浸提 4 min 后抽滤得滤液，离心分离后，分别吸取 0.10 mL 样品加 1.90 mL 的生理盐水和 4.00 mL 的双缩脲充分混匀后静置 0.5 h，双缩脲法测定滤液中蛋白含量。料液比对叶蛋白提取的影响：准确称取 6 份 20 g 鲜叶，分别按料液比为 1∶3、1∶4、1∶5、1∶6、1∶7、1∶8 加入 pH 5 的水作为浸提剂，打浆 4 min，浸提 4 min 后抽滤得滤液，离心分离后，双缩脲法测定滤液中蛋白含量。浸提时间对叶蛋白提取的影响：准确称取 6 份 20 g 鲜叶，以料液比为 1∶7 加入 pH 为 5 的浸提剂，打浆 4 min，分别浸提 2、

第一作者简介：林燕如(1982-)，女，广东揭阳人，硕士，实验师，现主要从事基础化学研究与食品分析等工作。E-mail：lyrhuaxue@163.com.

基金项目：韩山师范学院青年基金资助项目(LQ200812)。

收稿日期：2013－01－17

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

4、6、8、10 和 12 min 后抽滤得滤液，离心分离后，双缩脲法测定滤液中蛋白含量。

1.2.3 正交实验设计 选取料液比、浸提剂 pH 值、打浆时间、浸提时间 4 个因素，以叶蛋白的含量(mg/g)为指标，进行 $L_9(3^4)$正交实验(表 1)，对叶蛋白提取的最佳工艺进行研究。

表 1 正交实验设计

Table 1 Design of orthogonal test

水平	因素			
	料液比/g·mL^{-1}	浸提剂 pH 值	打浆时间/min	浸提时间/min
1	1∶6	4	3	6
2	1∶7	5	4	8
3	1∶8	6	5	10

1.2.4 絮凝温度和提取液 pH 值对叶蛋白沉淀的影响

絮凝温度对叶蛋白沉淀的影响：准确称取新鲜黄麻叶 100 g，按照最佳组合工艺打浆、浸提、抽滤、离心后得叶蛋白溶液，用双缩脲法测定叶蛋白含量。将溶液平分为 6 份(每份 50 mL)，分别放入不同温度(65、70、75、80、85、90℃)的恒温水浴中加热得絮凝物，以 3 000 r/min 离心 15 min得到叶绿体叶蛋白沉淀物，60℃烘干得叶蛋白干粉，计算叶蛋白沉淀率，根据沉淀率得出最佳凝絮温度。提取液 pH 值对叶蛋白沉淀的影响：以最优组合条件下获得的滤液，用双缩脲法测出总蛋白后，分别吸取 25 mL提取液后装到 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，以 3 000 r/min离心 15 min 得到细胞质叶蛋白沉淀物，将得到的叶蛋白 60℃烘干称重，计算出沉淀率结果，根据沉淀率得出最佳 pH 值。

1.2.5 采用黄麻叶的蛋白含量分析 菜用黄麻叶含水量的测定：准确称取 3 份(样品编号为 1～3)已洗净晾干后的新鲜菜用黄麻叶 2 g，置于恒温干燥箱中 105℃烘干至恒重，再称其干重，计算菜用黄麻叶含水量。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 0.1000 g 于干燥的凯氏烧瓶中，加入 0.2 g 研磨成粉末的 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$，0.3 g K_2SO_4，6 mL 浓硫酸，瓶口放一小漏斗，放置过夜，再进行消化，蒸馏，再用 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，同样也用 0.01 mol/L 的 HCl 进行滴定。菜用黄麻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 85℃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。试验所得沉淀用常压干燥法在 60℃烘干至恒重。重复试验 4 次。

1.3 项目测定

水分含量采用常压干燥法[4]测定；蛋白含量采用凯氏定氮法[5-6]和双缩脲法[7]测定；双缩脲法牛血清白蛋白标准曲线回归方程为 $Y=0.2367X-0.0143$ ($R^2=0.9991$)。菜用黄麻叶蛋白总和＝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[10]。蛋白质含量＝$\frac{C\times(V_1-V_O)\times0.014\times F}{m}\times100$ (单位：g/100g)，(V_1为样品消耗 HCl 的体积，V_0为空白对照消耗 HCl 的体积)，得出菜用黄麻叶干粉的蛋白量，再由含水量折算出鲜叶蛋白质含量。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 浸提剂 pH 值对叶蛋白提取率的影响 由图 1 可知，当 pH 为 5 时，双缩脲法测其叶蛋白含量最大。如果 pH 值继续升高，菜用黄麻叶蛋白有可能发生变性，溶出率反而出现降低现象，因此选用 pH 为 5 的水作为浸提剂，叶蛋白得率最高。

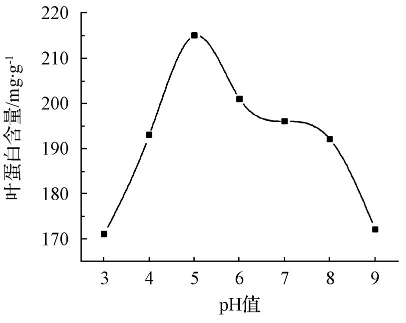

图 1 浸提剂 pH 对叶蛋白提取的影响

Fig. 1 Effect of pH value of the extracting solvent on extraction of leaf protein

2.1.2 打浆时间对叶蛋白提取的影响 由图 2 可知，随着打浆时间的延长，菜用黄麻鲜叶的粉碎程度越大，打得较细的菜用黄麻鲜叶与浸提的接触面积随之增大，进而叶蛋白比较容易被浸提出来。当打浆时间为 4 min 时，粉碎已比较完全，之后略降低后逐渐趋于平稳。因

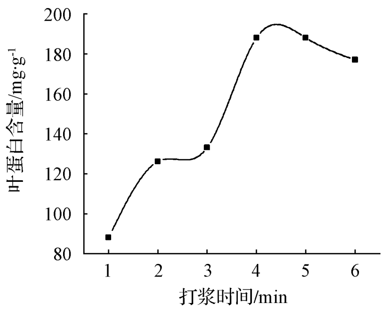

图 2 打浆时间对叶蛋白提取的影响

Fig. 2 Effect of pulping time on extraction of leaf protein

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

北方园艺 2013(12):144～147

此打浆时间选择 4 min 较为合适。

2.1.3　料液比对叶蛋白提取的影响　由图 3 可知,当料液比过小时(1∶3),水太少,浸提不充分,使一部分蛋白质不溶解,从而影响了提取效果;随料液比增大,提取出的蛋白质明显增加,若料液比继续增大到 1∶8 时,尽管提取的蛋白质有所增加,叶蛋白的溶解较充分,但料液比太大时,分离过程中浓度过稀,增加了成本,降低了生产效率,同时还会溶解较多的色素和细小纤维,故以料液比为 1∶7 进行提取比较适宜。

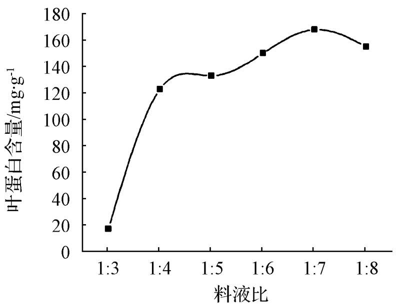

图 3　料液比对叶蛋白提取的影响

Fig. 3　Effect of solid-liquid ratio on extraction of leaf protein

2.1.4　浸提时间对叶蛋白提取的影响　由图 4 可知,当浸提时间为 8 min 时,双缩脲法测其叶蛋白含量最大。若浸提时间过短,浸提不完全,因而吸光度值较小。若浸提时间大于 10 min 时,吸光度值反而变小,且会增加成本,降低生产效率。因此以 8 min 的浸提时间提取效果最好。

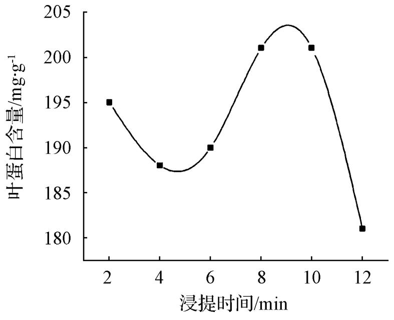

图 4　浸提时间对叶蛋白提取的影响

Fig. 4　Effect of soaking time on extraction of leaf protein

2.2　叶蛋白提取的正交实验

由表 2 可以看出,影响菜用黄麻叶蛋白提取量的因素显著次序为料液比＞浸提剂 pH 值＞浸提时间＞打浆时间。酸提法提取菜用黄麻叶蛋白的理论最佳提取条件是 $A_3B_2C_1D_1$ 组合,在正交实验中未出现,按照 $A_3B_2C_1D_1$ 组合补充试验 10,其叶蛋白提取量为 202.05 mg/g,高于正交实验的最高值。因此以 $A_3B_2C_1D_1$ 的组合为提取菜用黄麻叶蛋白的最佳条件,即浸提剂 pH 值为 5,料液比为 1∶8,打浆时间为 3 min,浸提时间为 6 min。

表 2　正交实验结果

Table 2　Results of orthogonal test

试验号	因素 料液比 /g·mL^{-1}	浸提剂 pH 值	打浆时间 /min	浸提时间 /min	叶蛋白含量 /mg·g^{-1}
1	1∶6	4	3	6	171.81
2	1∶6	5	4	8	172.32
3	1∶6	6	5	10	161.67
4	1∶7	4	4	10	164.37
5	1∶7	5	5	6	183.89
6	1∶7	6	3	8	172.65
7	1∶8	4	5	8	176.36
8	1∶8	5	3	10	195.29
9	1∶8	6	4	6	200.69
10**	1∶8	5	3	6	202.05
k_1	168.600	170.847	179.917	185.463	
k_2	173.637	183.833	179.127	173.777	
k_3	190.780	178.337	173.973	173.777	
R	22.180	12.986	5.944	11.686	

2.3　絮凝温度和提取液 pH 值对叶蛋白沉淀的影响

2.3.1　絮凝温度对叶蛋白沉淀的影响　由图 5 可知,随着絮凝温度的升高,絮凝物沉淀也随之增加,当超过 85℃时沉淀量趋于平稳,90℃时达到最高值。但从生产成本和效率的角度考虑,宜采用 85℃的温度作为较佳的絮凝温度。

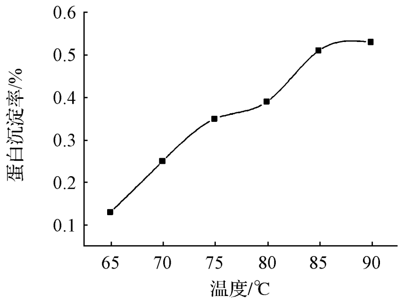

图 5　絮凝温度对叶蛋白沉淀的影响

Fig. 5　Effect of coagulative temperature on protein precipitation

2.3.2　提取液 pH 值对叶蛋白沉淀的影响　由图 6、表 3 可知,随着 pH 的增加,蛋白沉淀量呈现先增加后降低

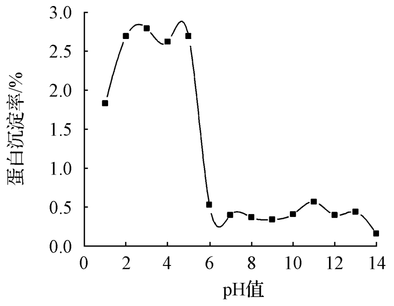

图 6　提取液 pH 值对叶蛋白沉淀的影响

Fig. 6　Effect of pH value of extracting solution on protein precipitation

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

的趋势。当 pH 3 时,菜用黄麻叶蛋白沉淀量最大。其次 pH 11 时沉淀量也较大。说明蛋白溶液呈 2 个等电点,酸性时 pH 3,得到的沉淀为菜用黄麻细胞质叶蛋白Ⅰ,碱性时 pH 11,得到的沉淀则为细胞质叶蛋白Ⅱ。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 3 不同 pH 值对叶蛋白沉淀的影响

Table 3 Effect of different pH values on leaf protein precipitation

pH 值	上清液颜色	沉淀物颜色	pH 值	上清液颜色	沉淀物颜色
1	绿色	绿色	8	浅棕色	浅棕色
2	绿色	绿色	9	浅棕色	浅棕色
3	绿色	绿色	10	浅棕色	浅棕色
4	绿色	绿色	11	棕黄色	棕黄色
5	绿色	绿色	12	棕黄色	棕黄色
6	绿色	绿色	13	棕黄色	棕黄色
7	浅棕色	浅棕色	14	棕黄色	棕黄色

2.4 菜用黄麻叶的蛋白含量分析

试验结果表明,编号 1 菜用黄麻叶的含水量为 78.1%,编号 2 的为 78.0%,编号 3 的为 78.1%,含水量平均为 78.1%。经测定,菜用黄麻叶粗蛋白含量为 21.46%。由表 4 可知,菜用黄麻叶蛋白平均含量为 8.07%。

表 4 综合提取叶蛋白平均含量

Table 4 Comprehensive extraction of content of protein precipitation

编号	1	2	3	4	平均值
叶蛋白含量/%	8.06	7.95	8.25	8.00	8.07

3 结论

为了节省能量,保持产品品质等,综合考虑在实际中的可操作性,菜用黄麻叶蛋白最佳提取工艺为:室温条件下,pH 为 5 的水作为浸提剂,料液比为 1∶8,打浆时间 3 min,浸提时间 6 min,当在絮凝温度为 85℃时维持 8 min、提取液选用 pH 值为 3、11,分别得到叶蛋白叶绿体沉淀、细胞质蛋白Ⅰ沉淀以及细胞质胞质蛋白Ⅱ沉淀,60℃烘干至恒重。在优化的工艺条件下,菜用黄麻叶蛋白的提取率为 8.07%,得率为 37.59%。

参考文献

[1] 柳青海,张唐伟,李天才.叶蛋白提取分离及应用研究进展[J].食品工业科技,2011,32(9):468-470.
[2] 李燕,龚友才,陈基权,等.菜用黄麻嫩梢营养成分测定与分析[J].中国蔬菜,2010(14):67-70.
[3] 巨艳,杜娟,高晓磊,等.墨绿海的有效成分及其应用前景分析[J].西北林学院学报,2009,24(5):132-134.
[4] 杨月欣,王光亚.实用食物营养成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,2002:75-163.
[5] 马丹.凯氏定氮法测定食品中蛋白质含量[J].计量与测量技术,2008,35(6):57-58.
[6] 大连轻工业学院,华南理工大学,郑州轻工业学院,等.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,2007:221-223.
[7] 陶健,刘邻渭,毕磊.双缩脲反应快速测定蛋白质的方法学研究[J].食品科技,2004(1):77-79.
[8] 王桃云,王金虎.桑叶叶蛋白提取工艺的研究[J].食品研究与开发,2006,27(2):79-81.
[9] 周建建,单宇,郑玉红,等.繁缕叶蛋白提取工艺研究[J].食品科学,2009,30(6):109-112.
[10] 王娜,褚衍亮,李静,等.樟树叶蛋白提取工艺及四季含量动态分析[J].北方园艺,2011(7):51-54.

Study on the Best Extraction Technology of Leaf Protein from *Corchorus olitorius* L.

LIN Yan-ru,CAI Kai-yu
(Department of Chemistry,Hanshan Normal University,Chaozhou,Guangdong 521041)

Abstract:Taking the leaves of *Corchorus olitorius* L. as material,on the basis of single factor tests of solid-liquid ratio,pH values of the extracting solvents,pulping time and soaking time,$L_9(3^4)$ orthogonal experiment was used to optimize the extraction conditions of leaf protein concentrate (LPC) using acid method and heating method. The results showed that the best extraction technology was solid-liquid ratio 1∶8,pH values of the extracting solvents 5,pulping time 3 min,soaking time 6 min. The best optimum precipitating conditions were heating temperature 85℃ for the chloroplastic proteins,the pH 3 for cytoplasmic proteins Ⅰ and the pH 11 for the cytoplasmic proteins Ⅱ. Under these conditions,the extraction rate of LPC reached 8.07% and the yield rate was 37.59%.

Key words:*Corchorus olitorius* L.;leaf protein concentrate (LPC);extraction technology

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn