

苋菜叶蛋白提取工艺研究

林燕如, 张晓芝

(韩山师范学院 化学系, 广东 潮州 521041)

摘 要:以市售苋菜为试材,采用单因素试验和正交实验,研究了浸提剂 pH 值、打浆时间、料液比、浸提时间对叶蛋白提取效果的影响,并在此基础上研究了不同絮凝温度及提取液 pH 值对叶蛋白沉淀的影响。结果表明:苋菜叶蛋白提取的最佳工艺条件为浸提剂 pH 5,打浆时间 5 min,料液比 1:7,浸提时间 6 min,当絮凝温度为 85℃,提取液选用 pH 为 3 和 9 时,苋菜叶蛋白的提取率为 2.90%,得率为 23.69%。

关键词:苋菜;叶蛋白;提取工艺

中图分类号:S 636.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)18-0139-04

苋菜(*Amaranthus mangostanus* L.)属苋科苋属 1 a 生草本植物苋的茎叶,其嫩苗和嫩茎叶可食用,分为白苋菜及红苋菜,盛产于夏季。苋菜中富含蛋白质、脂肪、糖类及多种维生素和矿物质,所含的蛋白质比牛奶更能被人体充分吸收,有利于强身健体,提高机体的免疫力,有“长寿菜”之称。苋菜最有潜力的开发利用方面是提取叶蛋白^[1-2]。叶蛋白不仅是畜禽生长发育和生产畜产品的主要营养物质,而且也是人类,特别是青少年的保健营养理想食品,是一种具开发价值的新型蛋白质资源,可开发成具有保健和医用价值等良好发展前景的食品添加剂,用以解决人类面临的蛋白质危机^[3-4]。我国提取叶蛋白的原料来源主要包括苋菜、豆科牧草、禾本科牧草、苦苣菜、甜菜、萝卜等^[5]。该试验采用酸提法和加热法相结合对苋菜叶蛋白进行提取,通过正交实验探讨最佳提取条件,同时对所提取的叶蛋白进行综合分析,以期对苋菜叶蛋白的深度开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试苋菜于 2012 年 7 月购自潮州枫春市场,用水冲洗干净后,晾干备用。

试剂: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。

仪器:FA2004N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);pHS-3C 型 pH 计(上海雷磁仪器厂);KA-1000 型

离心机(上海安亭科学仪器厂);722s 分光光度计(上海棱光技术有限公司)等。

1.2 试验方法

1.2.1 叶蛋白提取液的制备 将苋菜叶洗净晾干,称取 20 g 鲜叶在适量的浸提剂中打浆浸提,用 4 层纱布抽滤得其滤液,离心分离(1 500 r/min,10 min),得去除杂质的提取液^[6]。

1.2.2 单因素试验 浸提剂 pH 值对叶蛋白提取的影响:按 1:6 的料液比打浆 3 min,分别用 pH 为 3、4、5、6、7、8 的水作为浸提剂,浸提 4 min 后抽滤得滤液,离心分离后待测。打浆时间对叶蛋白提取的影响:以 pH 5 的水作为浸提剂,按 1:6 的料液比,分别提取 1、2、3、4、5、6 min,对鲜叶粉碎打浆,浸提 4 min 后抽滤得滤液,离心分离后待测。料液比对叶蛋白提取的影响:pH 为 5 的水作为浸提剂,分别按 1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9 料液比打浆 4 min,浸提 4 min 后抽滤得滤液,离心分离后待测。浸提时间对叶蛋白提取的影响:以料液比为 1:5 加入 pH 为 5 的浸提剂,打浆 4 min,浸提时间分别为 2、4、6、8、10、12 min,抽滤得滤液,离心分离后待测。

1.2.3 正交实验 在各单因素试验的基础上,选出最优的浸提剂 pH 值、打浆时间、料液比、浸提时间,进行正交实验,见表 1。

表 1 正交实验的水平与因素

Table 1 Horizontal and orthogonal factors

水平	因素			
	浸提剂 pH	打浆时间	料液比	浸提时间
1	4	3	1:5	6
2	5	4	1:6	8
3	6	5	1:7	10

1.2.4 絮凝温度对叶蛋白沉淀的影响 准确称取新鲜苋菜 100 g,按照最佳组合工艺打浆、浸提、抽滤、离心后

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实验研究与食品分析等工作。E-mail:lyrhuax-ue@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:2013-04-15

得叶蛋白溶液,吸取 0.50 mL 后用双缩脲法测定叶蛋白含量。将溶液平均分为 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,离心分离得叶蛋白沉淀,60℃烘干得叶蛋白干粉,计算叶蛋白的沉淀率。

1.2.5 提取液 pH 值对叶蛋白沉淀的影响 按照最优组合,打浆浸提得到提取液,吸取 0.50 mL 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。将得到的叶蛋白 60℃烘干称重,计算出沉淀率。

1.3 项目测定

1.3.1 蛋白质标准曲线的测定 双缩脲法^[7-8]牛血清蛋白标准曲线回归方程为: $Y=0.2367X-0.0143$ ($R^2=0.9991$),即蛋白质浓度在 0.40~2.00 mg/mL 范围内与吸光度呈现良好的线性关系。

1.3.2 叶蛋白含量测定 取以上各试验制得的提取液,采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。

1.3.3 苋菜叶绿体叶蛋白及细胞质叶蛋白沉淀 以最优温度和 pH 组合条件下获得的絮凝物烘干得蛋白粉,计算叶蛋白沉淀率。苋菜叶蛋白总和=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^[9]。

1.3.4 苋菜叶含水量测定 采用常压干燥称量法,准确称取 3 份(样品编号为 1~3)已洗净晾干后的新鲜苋菜叶 2 g,置于恒温干燥箱中 105℃烘干至恒重,称其干重,平行 3 次算出苋菜叶含水量^[10]。

1.3.5 粗蛋白含量测定 采用凯氏定氮法,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 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g K_2SO_4 , 6 mL 浓硫酸,瓶口放 1 个小漏斗,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。蛋白质含量(g/100g) = $C \times (V_1 - V_0) \times 0.014 \times F \times 100/m$ 。其中, V_1 为样品消耗 HCl 的体积, V_0 为空白对照消耗 HCl 的体积,得出苋菜叶干粉的蛋白量,再由含水量折算出鲜叶蛋白质含量^[11-12]。

2 结果与分析

2.1 叶蛋白提取工艺的单因素试验

2.1.1 浸提剂 pH 值对叶蛋白提取的影响 由图 1 可知,随着 pH 值的逐渐增大,苋菜叶蛋白的溶出率逐渐升高。当浸提剂 pH 值为 5 时,其叶蛋白含量最大。如果

继续升高 pH 值,有可能导致苋菜叶蛋白发生变性,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。

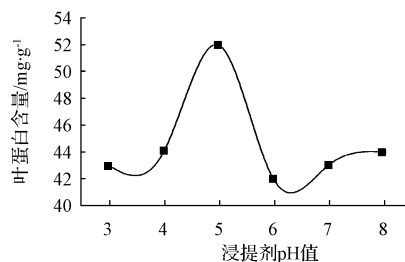


图 1 浸提剂 pH 值对叶蛋白提取的影响

Fig. 1 Effect of pH values of the extracting solvents 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,打浆时间越长,苋菜鲜叶的粉碎程度越大,打得越细的苋菜鲜叶与浸提的接触面积越大,从而使叶蛋白易被浸提,浸提效果越好。当打浆时间超过 4 min 时,叶片粉碎已比较完全,逐渐趋于平稳,对蛋白质提取效率影响较小。因此,打浆时间以 4 min 较为适合。

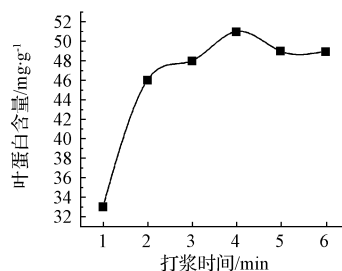


图 2 打浆时间对叶蛋白提取的影响

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

2.1.3 料液比对叶蛋白提取的影响 由图 3 可知,当料液比为 1:5 时,其叶蛋白含量最大。料液比小于 1:4 时,叶蛋白的提取率基本上是随着料水比的加大而增加。这是因为加水量太小,蛋白质不能充分溶解,影响提取效果;而在料液比大于 1:6 时,叶蛋白的提取率趋于平缓,当继续加水量至过大时,影响沉淀效果,且使设备体积增大,降低生产效率。因此选用的料液比为 1:5 比较合适。

2.1.4 浸提时间对叶蛋白提取的影响 由图 4 可知,浸提时间对提取叶蛋白的影响较小,不同浸提时间的叶蛋白含量相差不大。当浸提时间为 8 min 时,叶蛋白含量最大,因此浸提时间 8 min 时提取效果最好。

2.2 叶蛋白提取的正交实验

由表 2 正交实验结果可知,影响苋菜叶蛋白提取量的因素显著(R 值)次序为料液比>打浆时间>浸提剂 pH 值>浸提时间,酸化法提取苋菜叶蛋白的理论最佳

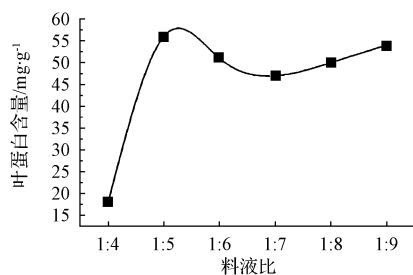


图3 料液比对叶蛋白提取的影响

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

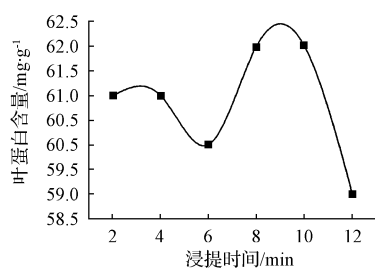


图4 浸提时间对叶蛋白提取的影响

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

提取条件是 $A_2B_3C_3D_1$ 组合,在正交实验中未出现,因此按照 $A_2B_3C_3D_1$ 组合增加试验 10,测其叶蛋白提取量为 72.029 mg/g,高于正交实验的最高值。因此以 $A_2B_3C_3D_1$ 的组合为实际提取苋菜叶蛋白的最佳条件,即浸提剂 pH 值为 5,打浆时间为 5 min,料液比为 1:7,浸提时间为 6 min。

表2 正交实验设计与结果

Table 2 Results of the orthogonal experiment

试验号	因素				叶蛋白含量 /mg·g ⁻¹
	浸提剂 pH 值	打浆时间 /min	料液比 /g·mL ⁻¹	浸提时间 /min	
1	4	3	1:5	6	52.463
2	4	4	1:6	8	57.075
3	4	5	1:7	10	62.329
4	5	3	1:6	10	55.148
5	5	4	1:7	6	67.415
6	5	5	1:5	8	61.504
7	6	3	1:7	8	59.845
8	6	4	1:5	10	58.124
9	6	5	1:6	6	61.029
10*	5	5	1:7	6	72.029
k1	57.289	55.819	57.364	60.302	
k2	61.356	60.871	57.751	59.475	
k3	59.666	61.621	63.196	58.534	
R	4.067	5.802	5.832	1.768	

2.3 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,当提取液加热到 65℃时苋菜叶蛋白开始絮凝,但沉淀量很少。随着温度的上升,蛋白酶发生功能变性,酶反应速度减小,叶蛋白絮凝增加,于是沉淀量增大。

当达到 80℃时,沉淀量明显增大,90℃时达到最高值。但从生产成本和效率的角度考虑,采用 85℃的温度可作为最佳的絮凝温度,所得到的沉淀为苋菜叶绿体叶蛋白。

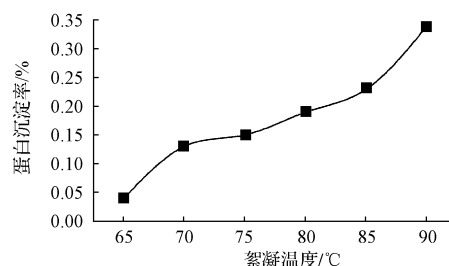


图5 絮凝温度对叶蛋白沉淀的影响

Fig. 5 Effect of coagulative temperature on precipitation of leaf protein

2.4 提取液 pH 值对叶蛋白沉淀的影响

由图 6 和表 3 可知,提取液 pH 值对叶蛋白的粗蛋白提取率有直接影响。当 pH 3 时,叶蛋白沉淀率最大,因此酸性条件对提高苋菜叶蛋白的提取率更为有利。同时,当 pH 为 9 时,叶蛋白沉淀量也较大。说明蛋白溶液呈 2 个等电点,酸性时 pH 3 得到的沉淀为苋菜叶细胞质叶蛋白 I,碱性时 pH 为 9,得到的沉淀则为细胞质叶蛋白 II^[10]。因此选用 pH 3 和 pH 9 作为提取苋菜叶叶蛋白的 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。

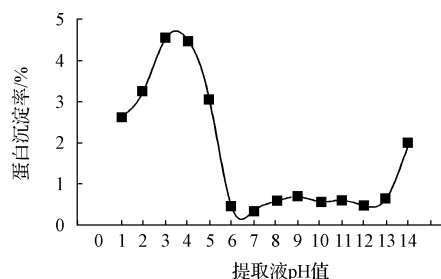


图6 提取液 pH 值对叶蛋白测定的影响

Fig. 6 Effect of pH values of extracting solution on precipitation of leaf protein

2.5 苋菜叶蛋白含量分析

2.5.1 苋菜含水量的测定 经测定编号 1 苋菜叶的含水量为 86.9%,编号 2 为 87.0%,编号 3 为 86.9%,苋菜叶的平均含水量为 87.0%。

2.5.2 凯氏定氮法测定叶片粗蛋白含量 经测定,苋菜粗蛋白含量为 12.24%。

2.5.3 苋菜叶蛋白提取的综合分析 由表 4 可知,4 次试验结果得叶蛋白质量的平均值为 2.90 g,所以,在此综合提取条件下,苋菜鲜叶叶蛋白的提取率为 2.90%,苋菜鲜叶的叶蛋白得率为 23.69%。

表 3

不同 pH 值对蛋白沉淀的影响

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	浅黄色
2	绿色	绿色	9	浅棕色	浅黄色
3	浅绿色	绿色	10	浅棕色	浅黄色
4	浅绿色	绿色	11	棕色	浅黄色
5	浅绿色	绿色	12	棕色	浅黄色
6	浅棕色	绿色	13	棕色	浅黄色
7	浅棕色	绿色	14	棕色	浅黄色

表 4

综合提取试验结果

Table 4 Comprehensive extraction of experimental results

编号	1	2	3	4	平均值
叶蛋白质量/g	2.84	2.89	2.97	2.91	2.90

3 结论

苋菜叶蛋白最佳提取工艺为:室温下以 pH 为 5 的水作为浸提剂,料液比为 1:7,打浆 5 min,浸提时间 6 min,当絮凝温度为 85℃、提取液 pH 为 3 和 9 时,分别得到叶蛋白叶绿体沉淀、细胞质蛋白 I 沉淀和细胞质蛋白 II 沉淀,60℃烘干至恒重。在优化的工艺条件下,苋菜叶蛋白的提取率为 2.90%,得率为 23.69%。酸性条件对提高苋菜叶蛋白的提取率更为有利。苋菜叶蛋白的开发利用具有很好的前景,其原料成本低廉,加工方法简单,产品不仅可作为饲料,还可作为优质蛋白质添加到人类的食品中,其研究和开发对于扩大食用蛋白质资源研究,进而改善我国居民营养缺乏有重要的作用;建议进一步开展苋菜叶及蛋白的毒性评价研究。

参考文献

[1] 赵秀玲. 苋菜的营养成分与保健功能[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8):391-392.

[2] 于淑玲. 药食保健野菜—苋菜的开发利用[J]. 资源开发与市场, 2010, 26(2):141-142.

[3] 张艺,李忠. 植物叶蛋白的开发应用[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(5):102-105.

[4] 黄威,吴文标. 南瓜叶蛋白营养价值的化学评价[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(1):151-154.

[5] 刘信宝,沈益新. 牧草叶蛋白的深加工利用及饲用价值[J]. 江苏农业科学, 2002(4):63-66.

[6] 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.

[7] 李宏梁,丁慧,郭文,等. 双缩脲法和凯氏定氮法测定牛乳中酪蛋白质量分数的比较[J]. 食品科技, 2010, 35(8):229-231.

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

[11] 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.

[12] 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.

Study on the Extraction Technology of *Amaranthus mangostanus* L. Leaf Protein Concentrate

LIN Yan-ru, ZHANG Xiao-zhi

(Department of Chemistry, Hanshan Normal University, Chaozhou, Guangdong 521041)

Abstract: Taking market available *Amaranthus mangostanus* L. as material, through single and orthogonal experiments, the effects of pH values of the extracting solvents, pulping time, solid-liquid ratio, soaking time on the extraction of leaf protein were studied. On the basis of these, the influence of flocculation temperature and pH values of the extracting solvents on precipitation of leaf protein were also discussed. The results showed that the optimal extracting conditions were pH values of the extracting solvents 5, pulping time 5 minutes, solid-liquid ratio 1:7, soaking time 6 minutes, meanwhile flocculation temperature 85℃, pH values of extracting solvents were 3 and 9. Under these conditions, the extraction rate of LPC reached 2.90% and the yield rate was 23.69%.

Key words: *Amaranthus mangostanus* L.; leaf protein concentrate(LPC); extraction technology