

响应面法优化辣木叶中水溶性蛋白提取工艺研究*

代佳和¹, 罗旋飞¹, 史崇颖¹, 赵存朝¹, 盛 军^{1,2**}, 田 洋^{1,3}, 陶 亮^{1**}

(1. 云南农业大学 食品科学技术学院, 云南 昆明 650201;

2. 云南农业大学, 云南省茶深加工工程技术研究中心, 云南 昆明 650201;

3. 国家辣木加工技术研发专业中心, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】辣木总蛋白含量高, 但溶解差, 水溶性蛋白提取率低, 本研究采用超声波辅助酸溶法提取辣木叶中水溶性蛋白。【方法】以辣木叶为原料, 分析超声波功率、超声时间、提取温度、水浴时间和溶液 pH 值 6 个因素对其水溶性蛋白提取率的影响, 在单因素试验的基础上, 通过响应面法优化酸法提取辣木蛋白的最佳工艺条件。【结果】响应面优化结果表明: 对蛋白提取率的影响依次为溶液 pH>料液比>超声时间>水浴温度, 最优提取条件为料液比 1:70 (g:mL)、超声波功率 300 W、超声时间 30 min、浸提水浴温度 53 ℃、溶液 pH 1.4、水浴浸提时间 60 min, 此条件下的水溶性蛋白提取率最高, 可达 (79.36±1.13) mg/g, 与预测值 80.194 mg/g 基本相符。【结论】本研究提高了水溶性蛋白的提取率, 对辣木产业发展及蛋白系列产品开发及蛋白活性研究具有一定的促进意义。

关键词: 辣木叶; 超声波; 水溶性蛋白质; 提取率

中图分类号: S 794.9; TS 201.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2020) 01-0130-09

Optimization of Extraction Process for Water-soluble Protein of *Moringa oleifera* Leaves by Response Surface Methodology

DAI Jiahe¹, LUO Xuanfei¹, SHI Chongying¹, ZHAO Cunchao¹, SHENG Jun^{1,2},
TIAN Yang^{1,3}, TAO Liang¹

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Yunnan Research Center for Advanced Tea Processing, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

3. National Research and Development Center for *Moringa* Processing Technology, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] *Moringa oleifera* protein content is high, but is poor water solubility, and low extraction rate. To study the extraction and increase the extraction rate of soluble protein from *Moringa* leaves. [Method] Application of acid dissolution and ultrasonic wave assisted extraction of protein was studied by using dry *Moringa* leaves as a raw material by single factor experiment and response surface methodology to determine the best extraction process. The extraction of protein was investigated with response to six main variables, including ultrasonic power, ultrasonic time, extraction temperature, bath time and pH value. [Result] The best extraction conditions were determined

收稿日期: 2018-05-22

修回日期: 2019-10-21

网络首发时间: 2020-01-07 17:06:34

*基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (2016YJS061); 国家自然科学基金项目 (31560431); 中国木薯产业技术体系 (CARS-11-YNJS); 农业部热带技术试验示范项目 (K2500053)。

作者简介: 代佳和 (1992—), 女, 云南大理人, 博士研究生, 主要从事食品资源与营养工程研究。

E-mail: 554741219@qq.com

**通信作者 Corresponding authors: 盛军 (1962—), 男, 辽宁本溪人, 博士, 教授, 主要从事生物大健康研究。E-mail: shengj@ynau.edu.cn; 陶亮 (1987—), 男, 山东济南人, 博士, 讲师, 主要从事食品科学研究。E-mail: taowuliang@163.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200107.1335.001.html>



by Box-Behnken center united experimental design as follows: the ratio for material and liquid was 1 : 70 (g : mL), ultrasonic power of 300 W, Ultrasound time of 30 min, bath temperature of 53 °C, pH value of 1.4, bath time of 60 min, the order of influence on the protein extraction rate was alkali solution pH> liquid material ratio> ultrasonic temperature> ultrasonic time, under which the yield of protein in the extracts reached (79.36±1.13) mg/g, consistent with the response surface prediction of 80.194 mg/g. [Conclusion] The extraction rate of water-soluble protein was improved by this method, which was certain significance for the development of *Moringa* industry and the development of protein series products.

Keywords: *Moringa oleifera* leaves; ultrasonic wave; water soluble protein; extraction rate

辣木 (*Moringa oleifera*) 亦称油辣木或鼓槌树, 为辣木科辣木属热带落叶乔木, 原产于北印度喜马拉雅区域及非洲, 耐旱力强, 喜生于沙壤土^[1-2]。目前, 已有 30 多个国家对辣木进行引种栽培, 中国在广东、广西、海南、四川和云南等地种植^[3-4]。云南依托特殊的环境优势, 大力发展辣木产业, 并已初具规模。2012 年, 辣木叶被中华人民共和国国家卫生健康委员会批准为新资源食品^[5]。辣木是一种高钙、高蛋白、高纤维、低脂肪、低胆固醇植物^[6], 并且含有丰富的矿物质、维生素和 19 种氨基酸, 是减肥健身、降血压、控制糖尿病、克服失眠、治疗贫血、抑菌和抗病毒的优质保健食品原料, 素有“神奇之树”的称号^[7-13]。

辣木叶干粉中的蛋白质含量丰富, 可达 27.6%~35.4%^[14], 为牛奶的 4 倍, 不仅是发达国家素食者的理想食物, 还是贫穷地区妇女和儿童的天然营养库^[15]。辣木蛋白的氨基酸含量很高, 其总量达到 24.27% (除色氨酸外), 除第一限制氨基酸 (蛋氨酸和胱氨酸) 外, 其他氨基酸含量均超过 FAO/WHO 推荐模式, 是一种值得开发的优质植物蛋白。但其水溶性蛋白含量只有 3%~4%, 存在难降解、生物效价低、吸收困难的问题。本研究以辣木叶为原料, 蛋白提取率为指标, 采用超声波辅助酸溶法提取, 响应面法优化辣木叶中水溶性蛋白, 旨在研究一种增加水溶性蛋白提取率的方法, 制备水溶性辣木蛋白, 为云南辣木产业发展及辣木蛋白开发利用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

辣木叶粉: 德宏天佑科技开发有限公司; 食

品级盐酸: 购自昆明食品添加剂市场。牛血清蛋白购于 Sigma 公司, 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-1800CP 紫外分光光度计: 上海美谱达仪器有限公司; AR224CN 电子天平: 奥豪斯仪器 (常州) 有限公司; 离心机 TDL-5-A: 上海安亭科学仪器厂; 数字型 pH 计 PHS-3E: 上海精密科学仪器有限公司; 数显恒温水浴锅 HH-4: 金坛市城西丽华实验仪器厂。FD-1A-50 真空冷冻干燥机: 上海比朗仪器制造有限公司; Scientz-500C 多功能恒温超声波萃取仪: 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程

称量辣木粉→调节料液比和 pH 值→超声波辅助提取→水浴浸提→离心分离→收集上清液→测定蛋白质含量→调 pH 到蛋白等电点→离心分离→收集沉淀→水洗沉淀→冷冻干燥→辣木蛋白产品。

1.3.2 单因素试验

以蛋白提取率为参考指标, 考察超声波功率 (200~450 W)、超声时间 (10~60 min)、料液比 (1 : 40~1 : 120)、提取温度 (25~65 °C)、水浴时间 (20~120 min)、溶液 pH 值 (1.0~3.0) 6 个因素对其影响, 确定最佳工艺的因素水平。

1.3.3 响应面试验

在单因素试验的基础上, 利用响应面 Box-Behnken 试验设计, 以辣木蛋白提取率为响应值, 选取对辣木蛋白提取量影响较为显著的 A 料液比 (g : mL)、B 水浴温度 (°C)、C' 溶液 pH、D 超声时间 (min) 4 个因素, 进行 4 因素 3 水平的试验设计, 优化提取辣木蛋白工艺参数。响应面分析因素及水平见表 1。

表 1 响应面试验因素与水平设计表

Tab. 1 Variables and levels in response surface design

水平 level	A	B	C	D
	料液比 (g : mL) ratio of material to solvent	水浴温度/℃ water bath temperature	溶液 pH 值 solution pH	超声时间/min inltrasonic time
-1	1 : 60	45	1.0	20
0	1 : 80	55	1.5	30
1	1 : 100	65	2.0	40

1.4 蛋白含量测定

参照陶亮^[16]和黄秋伟等^[17]的考马斯亮蓝法测定蛋白质含量,在波长 595 nm 处,以牛血清蛋白作标准蛋白,绘制标准曲线,标准曲线回归方程为 $Y = 3.7281X + 0.0123$, $R^2 = 0.9974$,式中, X 为牛血清蛋白质量浓度,mg/mL; Y 为吸光值。以溶液中蛋白提取率确定各工艺参数的最佳条件。

$$\text{蛋白质提取率}(\text{mg/g}) = \frac{C \times V \times N}{M} \quad (1)$$

式中, C 为根据标准曲线算出来的蛋白质质量浓度,mg/mL; V 为提取液体积,mL; N 为提取液稀释倍数; M 为辣木叶粉质量,g。

1.5 数据处理及分析

采用 Excel 2003、Design-Expert 8.0.6 进行数据整理和响应面分析,利用 SPSS 19.0 进行方差显著性分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比对蛋白提取率的影响

称取 3 g 辣木粉于碘价瓶中,按料液比 1 : 40、1 : 60、1 : 80、1 : 100 和 1 : 120 (g : mL) 加入蒸馏水(由于辣木叶粉的水溶性不高,因此设定料液比值较大),混匀,调 pH 至 2.0,超声波浸提(300 W、30 min)后在 55 ℃ 条件下水浴 40 min,5 000 r/min 离心 15 min,取上清液,测定溶液蛋白含量,计算水溶性蛋白提取率。

由图 1 可知:随着料液比的增加,蛋白提取率呈现先上升后下降的趋势,原因是当料液比较小时,辣木粉液比较黏稠,辣木粉无法与水充分混合,分子运动和扩散能力较差,溶解能力较低,辣木细胞中的蛋白质较难分离出来。当料液比为 1 : 80 时,提取液中蛋白含量最高,提取率达到 77.46 mg/g,随着料液比的继续增大,蛋白

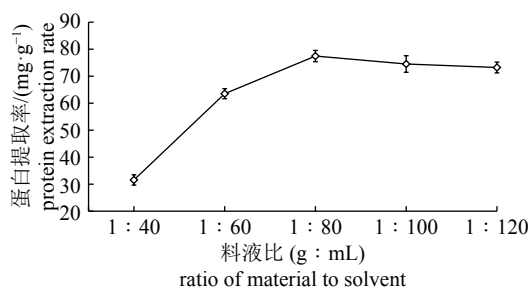


图 1 料液比对蛋白提取率的影响

Fig. 1 Effect of ratio of meal to solvent on the extraction rate of protein

的提取率变化平缓略有下降趋势,这与陈汝财^[18]的研究结果类似。为保证高蛋白提取率、节约成本,确定最佳提取的料液比为 1 : 80。

2.1.2 超声功率对蛋白提取率的影响

称取 3 g 辣木粉于碘价瓶中,按料液比 1 : 80 加入混匀,调 pH 至 2.0,超声波功率设为 200、250、300、350 和 450 W,工作频率 20 kHz,脉冲工作时间 2 s,间歇时间 3 s,浸提 40 min 后,在 55 ℃ 水浴 30 min,5 000 r/min 离心 15 min,取上清液,测定溶液蛋白含量,确定水溶性蛋白提取率,结果见图 2。

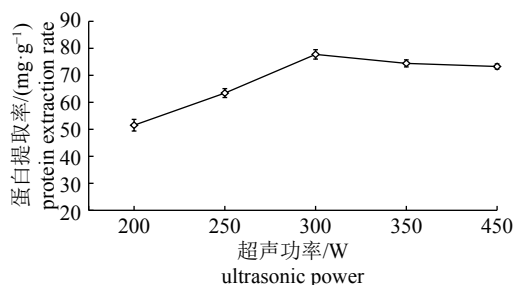


图 2 超声功率对蛋白提取率的影响

Fig. 2 Effect of ultrasonic power on the extraction rate of protein

超声波具有空化作用,产生的气泡经挤压破裂,可以瞬间产生极强的机械剪切力,使蛋白质降解,或者改变蛋白质构象,促使其亲水基团更

多地暴露出来, 提高辣木蛋白质在水中的溶出率和溶解度^[19]。由图 2 可知: 超声波功率大小对蛋白提取率具有一定的影响, 随着超声波功率的提高, 蛋白提取率呈现先上升后下降的趋势, 在 300 W 时, 蛋白提取率从 51.52 mg/g 提高到 77.75 mg/g, 达到最高, 随后蛋白提取率保持平稳并略有下降趋势。这与朱建华等^[20]利用超声处理豆粕提高蛋白的浸出率结果相似。

2.1.3 超声时间对蛋白提取率的影响

称取 3 g 辣木粉于碘价瓶中加水混匀, 设定超声时间为 10、20、30、40、50 和 60 min, 其他参数不变, 测定溶液蛋白含量, 确定水溶性蛋白提取率, 结果见图 3。

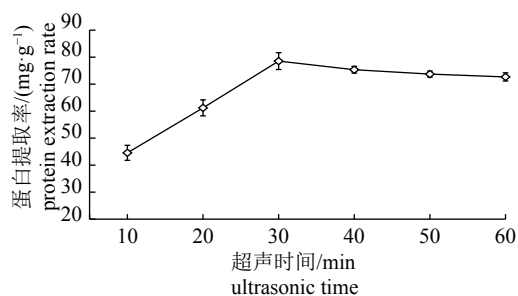


图 3 超声时间对蛋白提取率的影响

Fig. 3 Effect of ultrasonic time on the extraction rate of protein

由图 3 可知: 超声时间对蛋白的提取率具有显著影响, 蛋白提取率随着超声时间的延长, 出现先上升后下降最后趋于平稳。超声时间太短, 机械波的空化效应和机械效应作用发挥不够; 随着超声时间增长, 空化效应和机械效应起到了主导作用, 造成植物细胞组织结构破裂, 促进蛋白分子的释放。超声时间过长可能会使超声机械波的热效应作用导致提取液的温度升高, 蛋白质分子部分变性。超声时间在 30 min, 水溶性蛋白提取效果最好, 提取率为 78.54 mg/g, 是超声时间 10 min 的蛋白提取率的 1.76 倍, 故超声时间确定为 30 min。

2.1.4 pH 值对辣木蛋白提取率的影响

称取 3 g 辣木粉于碘价瓶中加水混匀, 食用盐酸调节溶液 pH 值分别为 1.0、1.5、2.0、2.5 和 3.0, 其他参数、步骤不变, 测定溶液蛋白含量, 确定水溶性蛋白提取率, 结果见图 4。

由图 4 可知: 在 pH 为 1.0~3.0 的蛋白提取率存在显著差异。溶液 pH 值对提高溶液中可溶性

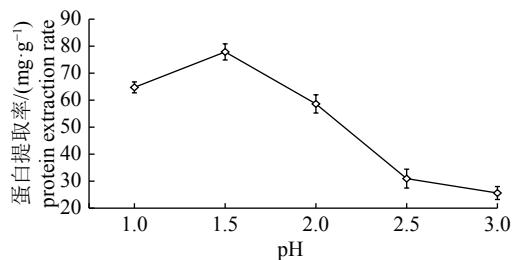


图 4 溶液 pH 对蛋白提取率的影响

Fig. 4 Effect of pH on the extraction rate of protein

蛋白至关重要, 这是因为在较高的酸度条件下可以破坏蛋白的交联糖骨架, 同时可以水解一定量的大分子难溶性蛋白, 进而提高可溶性蛋白含量。试验中溶液 pH 1.5 时, 蛋白提取率达到最高 (77.87 mg/g), 随着 pH 值的升高, 蛋白提取率迅速减低, 原因可能是辣木叶蛋白的等电点在 4.0~4.5 之间, 随着 pH 值的上升, 蛋白质胶体离等电点越近, 蛋白质稳定性变差, 故提取率升高^[21], 说明 pH 值是蛋白溶解性和提取率大小的决定性因素之一。

2.1.5 水浴温度对辣木蛋白提取率的影响

称取 3 g 辣木粉于碘价瓶中加水混匀, 设定水浴温度为 25、35、45、55 和 65 °C, 其他参数、步骤不变, 测定溶液蛋白含量, 确定水溶性蛋白提取率, 结果见图 5。

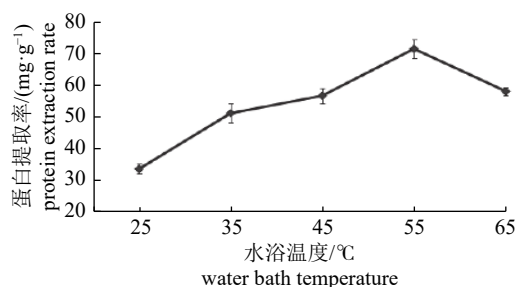


图 5 水浴温度对蛋白提取率的影响

Fig. 5 Effect of temperature on the extraction rate of protein

由图 5 可知: 在 25~55 °C 之间, 随着温度的提高, 蛋白提取率逐渐增大, 且当温度达到 45 °C 后, 蛋白提取率显著增加, 在 55 °C 时蛋白提取率为 71.53 mg/g, 达到最高, 这是由于在较低温度范围内, 随着温度升高, 水分子运动和扩散能力加强, 促进了蛋白质从辣木叶细胞中溶出, 同时, 随着提取温度的升高, 辣木蛋白质的分子构象发生了细微改变, 分子立体结构伸展, 有利于蛋白质分子、水分子的运动及其相互作用, 且温

度升高提高了蛋白质的溶解度,从而提高了辣木蛋白的提取率^[22]。随着温度的继续增加,蛋白提取率显著降低,这可能是因为温度影响蛋白空间构象,蛋白变性沉淀,提取率降低。因此确定最佳水浴温度为 55 ℃。

2.1.6 水浴时间对辣木蛋白提取率的影响

称取 3 g 辣木粉于碘价瓶中加水混匀,超声波浸提后 55 ℃ 水浴保温浸提 20、40、60、80 和 100 min,其他参数、步骤不变,测定溶液蛋白含量,确定水溶性蛋白提取率,结果见图 6。

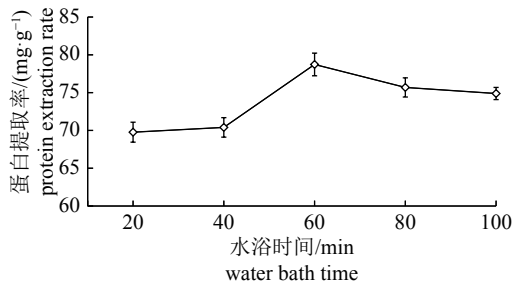


图 6 水浴时间对蛋白提取率的影响

Fig. 6 Effect of water bath time on the extraction rate of protein

由图 6 可知:水浴时间较其他因素对蛋白的提取率影响相对较小,蛋白提取率的变化范围是 69.77~78.73 mg/g,波动范围小。随着时间的延长,蛋白提取率呈现先上升后下降的趋势,最终趋于平缓,在 20~60 min,提取率逐渐增加是因为随着时间的延长,蛋白溶出的总量不断增加,在 60 min 达到最大溶出率。随着时间的继续增加,溶出的蛋白在一定的温度下缓慢发生结构变性,出现少量沉淀,提取率降低。故当水浴时间为 60 min 时蛋白的提取率最佳。

2.2 响应面优化

2.2.1 响应面试验设计及结果分析

从单因素试验结果可知:料液比、水浴提取温度、溶液 pH 值、超声时间对辣木叶中水溶性蛋白的提取率影响显著,以蛋白提取率为响应值,采用 Box-Behnken 中心组合进行试验设计(4 因素 3 水平)优化,方案及结果见表 2,方差分析见表 3。

利用 Design-Expert 8.06 软件对表 2 试验数据进行二次多项式回归拟合得回归模型方程为:蛋白提取率 (Y) = $79.76 - 1.56A - 0.047B - 1.85C + 0.21D - 2.08AB - 0.67AC + 0.29AD - 0.97BC - 1.82BD +$

表 2 响应面分析试验设计及结果

Tab. 2 Experimental design for response surface analysis and corresponding experimental data

编号 No.	A 料液比 (g : mL) ratio of material to solvent	B 水浴温度/℃ water bath temperature	C 溶液 pH 值 solution pH	D 超声 时间/min inltrasonic time	提取率 / (mg·g ⁻¹) extraction rate
1	-1	-1	0	0	73.97±1.12
2	1	-1	0	0	75.68±1.01
3	-1	1	0	0	77.78±1.23
4	1	1	0	0	71.18±0.97
5	0	0	0	0	79.43±3.07
6	0	0	1	-1	66.8±1.78
7	0	0	-1	1	71.52±2.13
8	0	0	1	1	68.34±1.34
9	-1	0	0	-1	73.91±2.06
10	0	0	0	0	80.12±1.29
11	-1	0	0	1	73.57±1.46
12	1	0	0	1	70.56±2.17
13	0	-1	-1	0	73.00±1.07
14	0	1	-1	0	74.94±1.51
15	0	0	0	0	80.29±1.72
16	0	1	1	0	69.08±2.09
17	-1	0	-1	0	74.82±1.22
18	1	0	-1	0	72.83±0.98
19	-1	0	1	0	72.78±1.17
20	0	0	0	0	79.43±1.36
21	0	-1	0	-1	70.27±2.11
22	0	1	0	-1	73.97±2.33
23	0	-1	0	1	74.03±1.37
24	0	1	0	1	70.44±1.26
25	0	0	-1	-1	71.24±1.34
26	1	0	0	-1	69.76±1.21
27	0	-1	1	0	71.01±1.39
28	1	0	1	0	68.11±0.79
29	0	0	0	0	79.55±1.09

$$0.32CD - 2.58A^2 - 2.53B^2 - 5.14C^2 - 5.15D^2。$$

由表 3 方差分析可以看出:模型 $F=190.06$ 、 $P<0.01$,表明该模型是极显著的;失拟项 $F=0.87$ 、 $P=0.610$ $2>0.05$,模型失拟不显著,说明未知因素对结果的影响较小,试验误差主要来源于随机误差,拟合程度较好。模型的确定系数 $R^2=0.9948$,调整系数 $R_{Adj}^2=0.9895$,说明该模型能解释 98.95% 响应值的变化,信噪比 Adeq precisor = 45.046,因而拟合度和可信度较好,可用此模型对辣木叶中水溶性蛋白提取率进行分析和预测。CV (Y) 的

表 3 拟合二次多项式模型的方差分析
Tab. 3 The fitted quadratic polynomial model of ANOVA

方差来源 source of variation	平方和 sum of squares	自由度 variance	均方 mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著性 significant
模型 model	406.53	14	29/04	190.06	<0.000 1	**
<i>A</i>	29.17	1	29.17	190.93	<0.000 1	**
<i>B</i>	0.027	1	0.027	0.18	0.680 2	
<i>C</i>	41.18	1	41.18	269.53	<0.000 1	**
<i>D</i>	0.53	1	0.53	3.44	0.085 0	
<i>AB</i>	17.26	1	17.26	112.99	<0.000 1	**
<i>AC</i>	1.80	1	1.80	11.75	0.004 1	**
<i>AD</i>	0.32	1	0.32	2.13	0.166 8	
<i>BC</i>	3.74	1	3.74	24.51	0.000 2	**
<i>BD</i>	13.29	1	13.29	86.96	<0.000 1	**
<i>CD</i>	0.40	1	0.40	2.60	0.129 3	
<i>A</i> ²	43.16	1	43.16	282.49	<0.000 1	**
<i>B</i> ²	41.50	1	41.50	271.64	<0.000 1	**
<i>C</i> ²	171.34	1	171.34	1 121.42	<0.000 1	**
<i>D</i> ²	171.84	1	171.84	1 124.69	<0.000 1	**
残差 residual	2.14	14	0.15			
失拟项 missing item	1.47	10	0.15	0.87	0.610 2	
纯误差 pure error	0.67	4	0.17			
总方差 total variance	408.67	28				

注: *表示在 $\alpha=0.05$ 水平上显著; **表示在 $\alpha=0.01$ 水平上极显著。模型的确定系数 $R^2=0.994\ 8$, 模型的调整系数 $R_{Adj}^2=0.989\ 5$ 。
Note: * indicates significant at the $\alpha=0.05$ level; ** indicates extremely significant at the $\alpha=0.01$ level. The model's determination coefficient $R^2=0.994\ 8$, and the model's adjustment coefficient $R_{Adj}^2=0.989\ 5$.

变异系数) 表示试验本身的精确度, CV 值越小, 试验的可靠性越高, 本试验中 CV 较低, 为 0.53%, 说明试验操作可信度高, 具有一定的试验指导意义。对模型进行回归方程系数显著性检验可知: 一次项 *A* (料液比)、*C* (pH 值) 影响极显著, *B* (水浴温度)、*D* (超声时间) 不显著, 平方项 *A*²、*B*²、*C*²、*D*² 均极显著。因此, 各因素对辣木叶中水溶性蛋白提取率的影响不是简单的线性关系。根据 *F* 值可知: 各个因素对水溶性蛋白提取率影响顺序为: *C* 溶液 pH>*A* 料液比 >*D* 超声时间>*B* 水浴温度。

2.2.2 各因素交互作用分析

通过拟合模型的回归方程所作的各因素之间交互作用的响应面分析见图 7 所示。

由图 7 所示: 交互项 *AB*、*AC*、*BC*、*BD* 影响极显著 ($P<0.01$), *AD*、*CD* 不显著 ($P>0.05$)。 *AB*、*AC*、*BC*、*BD* 之间交互作用的变化曲面均较陡峭, 说明它们之间交互作用对辣木蛋白提取率影响均较大, 与方差分析结果相符。各因素间交互作用对辣木叶中水溶性蛋白提取率的影响大小

为 *AB*>*BD*>*BC*>*AC*>*CD*>*AD*。

2.2.3 最佳工艺条件预测与验证试验

通过模型优化得出辣木蛋白提取率的最优条件分别是料液比 1 : 73、浸提温度 53.2 ℃、溶液 pH 值 1.415、超声波时间 29.7 min。辣木叶中水溶性蛋白提取率为 80.194 mg/g。实际操作中稍做调整, 确定最佳工艺条件为料液比 1 : 70(g : mL)、浸提温度 53 ℃、溶液 pH 1.4、超声时间 0 min, 此工艺条件下进行验证试验, 试验测得辣木叶中水溶性蛋白提取率为 (79.36±1.13) mg/g, 与预测值基本相符, 说明运用响应面法优化得到的模型参数准确可靠, 具有实际应用价值。

3 讨论

蛋白提取最常见的方法有碱提酸沉法、Tris-HCl 提取法以及氯化钠提取法等, 萃取相有稀酸、稀碱以及盐溶液等^[23], 其最传统的方法为碱溶酸沉法, 如 GHALY 等^[24]采用碱溶酸沉法对苋菜、豇豆、荷兰豆、南瓜、甘薯、卷心菜等 6 种植物提取叶蛋白, 且 6 种植物中南瓜和苋菜的叶

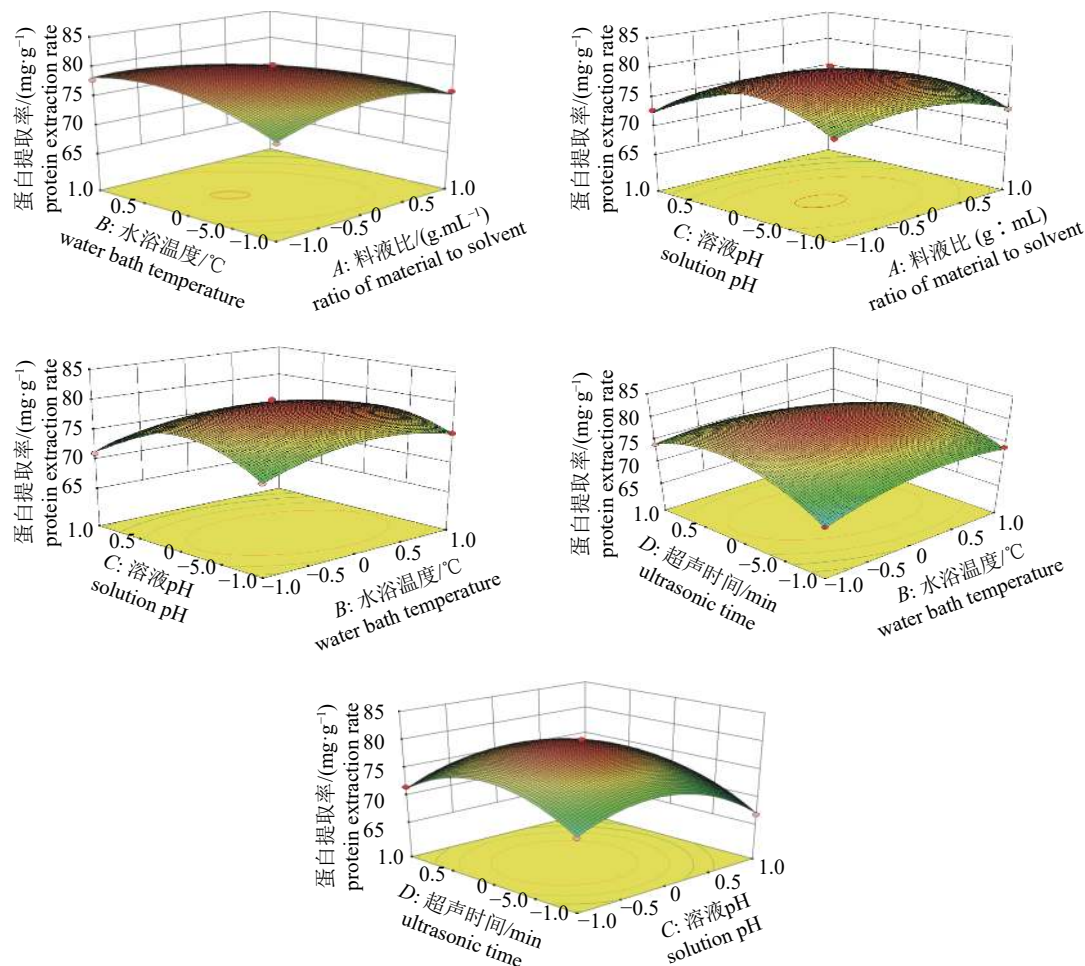


图 7 各两因素交互影响水溶性蛋白得率的响应面图

Fig. 7 Response surface plot showing the effects of two factors interaction to the extraction rate of protein

蛋白含量最高, 分别为 11.75% 和 10.7%。但对于辣木, 经预试验发现碱溶酸沉法的蛋白提取率并不是很高, 且需要消耗大量的碱和酸, 这主要是辣木水溶液的 pH 值较低 (pH 5.3~5.5), 在将溶液环境 pH 值从酸性调至碱性再调至酸性的整个生产过程中需要消耗大量的酸碱, 成本较高。植物中蛋白质的溶出与蛋白组成有关, 辣木中蛋白主要为谷蛋白, 溶于稀酸和稀碱溶液, 因此在酸性环境下利于辣木叶蛋白的溶出, 且酸溶法所消耗的酸量较少, 成本较低。预试验发现: 碱溶酸沉法制备的蛋白黏性较大且颜色较深, 包含了部分糖类物质, 纯度偏低。酸溶蛋白在制备过程中其特性可能发生改变, 包括吸水吸油性、乳化稳定性、凝胶性等。如 OGUNWOLU 等^[25]研究碱提—等电点沉淀与碱提—甲醇沉淀两种方法提取得到的腰果浓缩蛋白和分离蛋白, 发现腰果蛋白的功能性质得到了改善, 均高于脱脂腰果粉。BORA

等^[26]研究不同 pH 值对澳洲坚果分离蛋白的提取率和功能性质的影响, 结果表明: pH 值对澳洲坚果蛋白的功能性质影响显著。KARACA 等^[27]研究等电点沉淀法与盐萃取法制备的油菜籽蛋白与亚麻—蛋白的乳化性能, 并探究其乳化性能与构象之间的关系, 后期可对辣木中的酸溶性蛋白开展相关研究。

本试验同时采用超声波辅助提取水溶性蛋白, 进一步缩短了提取时间及蛋白提取率, 这主要是因为超声波属于高能机械波, 它利用超声波的“空化效应”产生微气穴, 微气穴内部压力可达上千的大气压强, 气压产生的高强度冲击波及撕扯力作用于底物物料, 具有增溶作用, 能有效地打破细胞边界层, 大大提高提取速率, 蛋白质溶出^[15]。超声波在进行叶蛋白提取时, 可缩短提取时间, 并且能有效降低提取温度, 保护蛋白的活性^[28]。梁丽琴等^[29]在酸溶法的基础上采用超声波

辅助提取扁核木叶蛋白,提取率为70.37%。该方法具有操作方便、设备简单、缩短提取时间等优点。近些年超声—微波协同萃取技术广泛应用于提取植物中的生物活性物质,加速植物中有效成分溶出,降低高温对热敏物质的影响,提高其提取效率与提取质量。罗芳等^[30]采用纳米器件研究水葫芦、番茄和菠菜的叶蛋白提取率,认为用纳米高能片处理过的植物提取液能提高蛋白质在提取液中的溶解度,进而提高叶蛋白的提取率,增幅为10%~30%。后期可采用这些物理方法结合酶技术从辣木渣中提取辣木蛋白,增加辣木总蛋白的提取率。

目前,采用酶法提取蛋白也是一种较为可行的方法,且酶的反应条件比较温和,同时不会产生废弃物及污染物^[31-32],但酶的选择是关键,需要选择活性高且能够提高蛋白质溶解性的酶,后期研究可结合酶技术进一步优化提高辣木水溶性蛋白提取率。传统的叶蛋白提取方法集中于可溶性蛋白的提取,而难溶性蛋白则成为废弃物,这是叶蛋白提取率不高的主要原因^[33-34]。辣木蛋白提取率不高,还可从辣木渣中的不溶性蛋白着手,考虑酶技术结合物理技术对辣木渣进行二次提取。同时,酶水解技术也可应用于辣木水提后的残渣处理,进一步改变不溶性蛋白的特性,提高溶解性,增加蛋白提取率。关于酶应用中成本高的问题,可考虑固定化酶技术,其中酶的选择可优先考虑纤维素酶、木聚糖酶、糖化酶等水解大分子糖类物质的酶及碱性蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶等水解大分子蛋白的酶类,进一步释放包裹的蛋白内容物,增加蛋白提取率。

辣木叶蛋白含量高、生长速度快、种植面积广、可采摘后再生等条件,因为达到这些条件的植物可以在短时间内提供大量的叶蛋白,适宜作为叶蛋白产业化生产的材料。研究表明:辣木叶干粉中蛋白质的含量在27.1%以上^[35],虽然人们对辣木的营养价值已有了比较全面的认识,但在产品的开发尤其是蛋白产品开发存在较大局限性,从产品种类到产品质量均有较大的提升空间,同时辣木蛋白具有很好的抗菌、除尘、保水等效果,在日化产品的开发方面也具有较大的潜力,因此,后期辣木蛋白产品的精深加工是促进辣木产业健康发展的重要着力点。

4 结论

提取辣木水溶性蛋白的最佳工艺条件为料液比1:70(g:mL)、超声波超声功率300 W、超声时间30 min、浸提温度53℃、溶液pH 1.4、水浴浸提时间60 min,水溶性蛋白提取率可达 (79.36 ± 1.13) mg/g。

通过凯氏定氮法测得辣木叶中粗蛋白含量很高,但水溶性蛋白含量低,本试验通过超声波辅助酸溶等电点沉淀法一定程度上提高了水溶性蛋白的提取率,但较粗蛋白总量比还有很大的开发空间,采用新技术提高辣木叶中蛋白提取率有待进一步研究,同时应加强对辣木叶一次浸提后残渣中水溶性蛋白再提取技术的关注。

[参考文献]

- [1] 张德,龙会英,郑益兴,等.不同种植密度和栽培管理对辣木农艺性状的影响[J].西南农业学报,2014,27(5): 1870. DOI: 10.3969/j.issn.1001-4829.2014.05.013.
- [2] JAHN S A A. On the introduction of a tropical multipurpose tree to China: traditional and potential utilization of *Moringa oleifera* Lam.[J]. Senckenbergiana Biologica, 1996, 75(1/2): 243.
- [3] 刘昌芬,李国华.辣木的营养价值[J].热带农业科技, 2004, 27(1): 4. DOI: 10.3969/j.issn.1672-450X.2004.01.002.
- [4] 段琼芬,刘飞,罗金岳,等.辣木籽油的超临界CO₂萃取及其化学成分分析[J].中国油脂,2010,35(2): 76.
- [5] 刘凤霞,王苗苗,赵有为,等.辣木中功能性成分提取及产品开发生研究进展[J].食品科学,2015,36(19): 282. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201519051.
- [6] TSAKNIS J, LALAS S, GERGIS V, et al. Characterization of *Moringa oleifera* variety mbololo seed oil of Kenya[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47(11): 4495. DOI: 10.1021/jf9904214.
- [7] COPPIN J P, JULIANI H R, WU Q L, et al. Chapter 79- variations in polyphenols and lipid soluble vitamins in *Moringa oleifera*[M]// PREEDY V. Processing & impact on active components in food. Pittsburgh: Academic Press, 2019.
- [8] GUEVARA A P, VARGAS C, SAKURAI H, et al. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam.[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 1999, 440(2): 181. DOI: 10.1016/S1383-5718(99)00025-X.
- [9] KARTHIVASHAN G, TANGESTANI F M, ARULSELVAN P, et al. Identification of bioactive candidate compounds responsible for oxidative challenge from hydro-ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves[J]. Journal of Food Science, 2013, 78(9): c1368. DOI: 10.1111/1750-3841.12233.
- [10] GUPTA R, MATHUR M, BAJAJ V K, et al. Evaluation

- of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes[J]. Journal of Diabetes, 2012, 4(2): 164. DOI: [10.1111/j.1753-0407.2011.00173.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-0407.2011.00173.x).
- [11] SHOLAPUR H N, PATIL B M. Effect of *Moringa oleifera* bark extracts on dexamethasone-induced insulin resistance in rats[J]. Drug Research, 2013, 63(10): 527. DOI: [10.1055/s-0033-1347238](https://doi.org/10.1055/s-0033-1347238).
- [12] DUANGJAI A, INKANINAN K, LIMPEANCHOB N. Potential mechanisms of hypocholesterolaemic effect of Thai spices/dietary extracts[J]. Natural Product Research, 2011, 25(4): 341. DOI: [10.1080/14786411003754249](https://doi.org/10.1080/14786411003754249).
- [13] WATERMAN C, CHENG D M, ROJAS-SILVA P, et al. Stable, water extractable isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuate inflammation *in vitro*[J]. Phytochemistry, 2014, 103: 114. DOI: [10.1016/j.phytochem.2014.03.028](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.028).
- [14] 段琼芬, 李迅, 陈思多, 等. 辣木营养价值的开发利用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(29): 70. DOI: [10.3969/j.issn.0517-6611.2008.29.058](https://doi.org/10.3969/j.issn.0517-6611.2008.29.058).
- [15] 熊瑶. 辣木叶蛋白质提取及其饮品研制[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [16] 陶亮. 贯筋藤蛋白酶的特性及其凝乳机理初探[D]. 昆明: 云南农业大学, 2014.
- [17] 黄秋伟, 彭欣怡, 黄惠芳. 辣木叶蛋白超声辅助盐提取工艺初步研究[J]. 农业研究与应用, 2016(3): 48. DOI: [10.3969/j.issn.2095-0764.2016.03.011](https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-0764.2016.03.011).
- [18] 陈汝财. 辣木蛋白超声辅助提取试验[J]. 福建农业科技, 2015(10): 31. DOI: [10.13651/j.cnki.fjnykj.2015.10.011](https://doi.org/10.13651/j.cnki.fjnykj.2015.10.011).
- [19] 贾俊强, 马海乐, 曲文娟, 等. 超声预处理大米蛋白制备抗氧化肽[J]. 农业工程学报, 2008, 24(8): 288. DOI: [10.3321/j.issn:1002-6819.2008.08.064](https://doi.org/10.3321/j.issn:1002-6819.2008.08.064).
- [20] 朱建华, 杨晓泉, 熊健, 等. 超声处理对低温脱溶豆粕蛋白质浸提率的影响[J]. 粮油加工与食品机械, 2003(7): 40.
- [21] 杨海涛, 刘军海. 蚕豆蛋白质提取工艺的研究[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(2): 76. DOI: [10.3969/j.issn.1005-6521.2008.02.025](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-6521.2008.02.025).
- [22] 阚欢, 李贤忠, 陆斌. 辣木叶蛋白质提取工艺研究[J]. 西部林业科学, 2007(1): 106. DOI: [10.3969/j.issn.1672-8246.2007.01.023](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-8246.2007.01.023).
- [23] 陈豪, 钟俊桢, 黄宗兰, 等. 3 种方法提取的澳洲坚果蛋白功能性质与构象的关系[J]. 食品科学, 2019, 40(4): 62. DOI: [10.7506/spkx1002-6630-20170901-010](https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-20170901-010).
- [24] GHALY A E, ALKOAIK F N. Extraction of protein from common plant leaves for use as human food[J]. American Journal of Applied Sciences, 2010, 7(3): 331. DOI: [10.3844/ajassp.2010.331.342](https://doi.org/10.3844/ajassp.2010.331.342).
- [25] OGUNWOLU S O, HENSHAW F O, MOCK H P, et al. Corrigendum to functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut[J]. Food Chemistry, 2009, 119(1): 363. DOI: [10.1016/j.foodchem.2009.09.007](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.007).
- [26] BORA P S, RIBEIRO D. Note: influence of pH on the extraction yield and functional properties of macadamia (*Macadamia integrifolia*) protein isolates[J]. Food Science and Technology International, 2004, 10(4): 263. DOI: [10.1177/1082013204045779](https://doi.org/10.1177/1082013204045779).
- [27] KARACA A C, LOW N, NICKERSON M. Emulsifying properties of canola and flaxseed protein isolates produced by isoelectric precipitation and salt extraction[J]. Food Research International, 2011, 44(9): 2991. DOI: [10.1006/j.foodres.2011.07.009](https://doi.org/10.1006/j.foodres.2011.07.009).
- [28] 吕佼, 赵媛, 金世超, 等. 响应面法优化超声波辅助提取板栗蛋白的工艺研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(3): 41.
- [29] 梁丽琴, 魏学智, 段江燕, 等. 超声波辅助提取扁核木叶蛋白的工艺优化[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(12): 96. DOI: [10.3969/j.issn.1003-0174.2012.12.018](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-0174.2012.12.018).
- [30] 罗芳, 熊劲松, 谢致平. 纳米器件对叶蛋白提取的影响[J]. 生物技术通报, 2012(4): 98.
- [31] 荣先萍. 米渣蛋白成分分析及蛋白提取研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.
- [32] 朱天明, 陈冷伶, 杨潇, 等. 纤维素酶辅助提取桑叶中叶蛋白的工艺[J]. 西华大学学报(自然科学版), 2016, 35(2): 77. DOI: [10.3969/j.issn.1673-159X.2016.02.015](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-159X.2016.02.015).
- [33] BARBEAU W E, KINSELLA J E. Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase (rubisco) from green leaves-potential as a food protein[J]. Food Reviews International, 1988, 4(1): 93. DOI: [10.1080/87559128809540823](https://doi.org/10.1080/87559128809540823).
- [34] 施曼, 高岩, 易能, 等. 植物叶蛋白提取及脱色研究进展[J]. 食品工业科技, 2017(21): 349. DOI: [10.13386/j.issn1002-0306.2017.21.066](https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.21.066).
- [35] 刘昌芬, 李国华. 辣木的研究现状及其开发前景[J]. 热带农业科技, 2002, 25(3): 20. DOI: [10.3969/j.issn.1672-450X.2002.03.007](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-450X.2002.03.007).

责任编辑: 何承刚