

孔涛,米平,赵雪淞,等. 碱法提取花生粕蛋白质工艺条件的优化[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):277-279.

碱法提取花生粕蛋白质工艺条件的优化

孔涛^{1,2},米平¹,赵雪淞³,刘民¹

(1. 辽宁工程技术大学理学院,辽宁阜新 123000; 2. 中国科学院沈阳应用生态研究所,辽宁沈阳 110016;

3. 辽宁工程技术大学矿业学院,辽宁阜新 123000)

摘要:采用碱提酸沉法从花生粕中提取花生分离蛋白,用蛋白质提取率作为衡量提取工艺的指标。在单因素试验基础上,以料液比、pH 值、提取温度和提取时间为考察因素,采用正交试验优化最佳提取工艺,确定碱提的最佳工艺条件为:料液比 1 g : 10 mL、pH 值 10.0、提取温度 60 ℃、提取时间 2 h。在此条件下,花生粕蛋白质最高提取率可达 75.88%。在试验影响因素中,影响程度从大到小依次为:提取温度 > pH 值 > 提取时间 > 料液比。

关键词:碱提酸沉;花生蛋白;正交设计;提取工艺

中图分类号: TS214.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0277-03

花生是世界上主要的油料资源之一,种植面积居油料作物第 2 位^[1]。花生仁约含 50% 的脂肪和 30% 的蛋白质,是重要的食用油资源和植物蛋白资源^[2]。我国每年可产 200 万 t 以上的花生饼粕^[3],花生饼粕含蛋白质 40% 以上,其中 10% 为清蛋白,90% 为碱性蛋白^[4]。花生蛋白是一种营养价值较高的植物蛋白,含有人体所需的 8 种必需氨基酸,生物价为

59,蛋白质的净利用率为 51,纯消化率可达 90%,极易被人体消化吸收^[5],与大豆蛋白相比,令肠胃胀气因子和抗营养因子较少^[6],与菜籽、棉籽蛋白相比,所含毒性物质较少,经常食用可预防高血压、动脉硬化和心血管等方面的疾病^[7]。我国对花生饼粕利用很有限,大部分都作为牲畜饲料,甚至丢弃造成环境污染,造成了很大的资源浪费。本试验采用碱提酸沉法研究花生粕中蛋白质的最佳提取工艺条件,为花生粕蛋白质的工业化生产与利用提供技术参考。

收稿日期:2012-12-17

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD36B06);辽宁工程技术大学国家自然科学基金青年基金前期资助项目(编号:11-149)。

作者简介:孔涛(1981—),男,陕西渭南人,博士研究生,讲师,从事食品加工及微生物方面研究。E-mail:kongtao2005@126.com。

由表 2 正交试验结果的极差分析可知,超声提取柿蒂总黄酮的影响因素主次顺序为 A > C > D > B,即提取温度 > 料液比 > 乙醇浓度 > 提取时间。表 3 显示,所选取的 4 个因素中,提取温度对提取效果影响显著,提取时间影响较小。综合直观分析和方差分析的结果,柿蒂总黄酮的最佳提取工艺条件为 A₃B₂C₂D₁,即当提取温度为 70 ℃,料液比为 1 g : 25 mL,乙醇浓度为 60%,提取时间为 50 min 时总黄酮提取量最高。

2.5 验证试验

按上述最佳工艺进行验证试验,重复 3 次,提取的总黄酮含量分别为 4.357、4.391、4.422 mg/g,平均值为 4.390 mg/g (RSD=0.74%),高于正交设计表中任一提取工艺的试验结果,说明通过正交试验得出的优化条件稳定、可靠。

3 结论

采用 AlCl₃ 比色法测定柿蒂中总黄酮含量,确定最大吸收波长为 410 nm,试验结果表明此方法准确可靠。

通过单因素试验和正交试验,优化得出超声波提取柿蒂总黄酮最佳工艺条件:料液比为 1 g : 25 mL,70 ℃ 下,用 60% 乙醇超声波辅助提取 50 min,总黄酮含量可达 4.390 mg/g。正交试验结果表明,提取温度对柿蒂总黄酮提取有显著影响,而乙醇浓度、提取时间影响相对较小。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

花生饼粕(广东瑞丰粮油商贸公司)的成分包括灰分

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:233.
- [2] 熊海涛,唐志华,郑行望. 火焰原子吸收光谱法测定柿蒂中微量元素[J]. 理化检验:化学分册,2010,46(10):1211-1212.
- [3] 潘旭,具敬娥,贾娟,等. 柿蒂化学成分的分离与鉴定[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(5):356-359.
- [4] 周本宏,沈恒,魏嫣,等. 柿蒂药材的高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 广东药学院学报,2011,27(2):147-150.
- [5] 邹盛勤,陈武. 高效液相色谱-光电二极管阵列检测器法同时测定柿蒂中乌索酸和齐墩果酸含量[J]. 时珍国医国药,2007,18(11):2606-2607.
- [6] 宋娟娜,李楠,刘景明,等. 反相离子对高效液相色谱法测定柿叶和柿蒂中的熊果酸和齐墩果酸[J]. 中国药师,2012,15(3):341-343.
- [7] 朱智勇,郑丰,陈武. HPLC 法测定柿蒂中乌索酸与齐墩果酸的含量[J]. 安徽农业科学,2007,35(31):9840-9841.
- [8] 张瑞芬,范杰平,朱衷榜,等. 超声辅助提取柿叶中的总黄酮和总三萜[J]. 现代食品科技,2008,24(11):1133-1136.
- [9] 郭亚健,范莉,王晓强,等. 关于 NaNO₂-Al(NO₃)₃-NaOH 比色法测定总黄酮方法的探讨[J]. 药物分析杂志,2002,22(2):97-99.

5.82%、脂肪 0.57%、水分 5.23%、蛋白 58.7%，经粉碎制得脱脂花生蛋白粉，过 60 目筛。NaOH、HCl(沈阳新西试剂厂)为分析纯。

FA2104N 型电子天平，上海精密科学仪器有限公司；PHS-3C 型 pH 计，上海精密科学仪器有限公司；TD5A-WS 型台式低速离心机，湖南省长沙湘仪离心机仪器有限公司；HH-8 型恒温水浴锅，国华电器有限公司；GZX-9140MBE 型数显干燥箱，上海博迅实业有限公司医疗设备厂；CJJ78-1 型磁力搅拌器，江苏省金坛市大地制动化仪器厂。

1.2 试验方法

1.2.1 花生粕蛋白提取工艺 参照杨伟强等的方法^[8-9]并略有改动：称取一定量的花生粕，按一定比例加水，常温下浸泡，充分溶胀后用高速分散均质机匀浆，用 2 mol/L NaOH 调节 pH 值，于恒温水浴中磁力搅拌浸提，搅拌速度为 40 r/min，达到反应时间后再将浸提液于 3 000 r/min 下离心 20 min，用 200 目滤布过滤，除去脂肪层和沉淀，得到上清液，重复以上步骤，将所得沉淀进行二次提取，合并 2 次提取后的上清液，用 0.1 mol/L HCl 溶液将上清液滴定至花生蛋白等电点 pH 值为 4.5 为止。静置 2 h 后离心，将沉淀放置于 30 ℃烘箱内干燥得到花生蛋白粉。

1.2.2 检测方法及蛋白质提取率计算方法 水分含量的测定参考 GB 5009.3—2010《食品中水分的测定》中的减压干燥法；蛋白质含量的测定参照 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》中的凯氏定氮法，蛋白质提取率 = $\frac{\text{提取的蛋白质重量}}{\text{花生粕重量} \times \text{蛋白质含量}} \times 100\%$ ；脂肪含量的测定参照 GB/T 5512—2008《粮油检验 粮食中粗脂肪含量测定》中的索氏抽提法；灰分含量的测定参照 GB 5009.4—2010《食品中灰分的测定》中的灼烧法。

1.2.3 单因素试验 选取料液比、pH 值、提取温度和提取时间为考察因素，分别以其中一个因素为变量，固定其他因素，试验不同因素的不同水平对花生粕蛋白质提取率的影响，选定不同因素的水平。

1.2.4 正交试验 在单因素试验的基础上，以料液比(A)、提取温度(B)、提取时间(C)及 pH 值(D)为试验因素，每个因素选择 3 个水平，以花生蛋白提取率为指标进行正交设计试验(表 1)。由于正交表的 4 个列被 4 个因素全部占用，没有空白列，不能通过空白列计算正交试验的误差，所以重复 2 次，将 2 次试验结果的误差作为正交设计误差，用 SPSS 16.0 进行方差分析。

表 1 花生粕蛋白提取工艺的正交试验因素水平

水平	A:料液比 (g : mL)	B:pH 值	C:提取温度 (℃)	D:提取时间 (h)
1	1 : 8	9	50	1.5
2	1 : 10	10	60	2.0
3	1 : 12	11	70	2.5

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 料液比对提取率的影响 准确称取花生粕 10 g 于锥形瓶中，在提取温度为 60 ℃、提取时间为 2 h、pH 值为 10 的

条件下，分别按 1 g : 6 mL、1 g : 8 mL、1 g : 10 mL、1 g : 12 mL 的料液比加入蒸馏水，再按提取工艺提取花生蛋白，测定其提取率。由图 1 可看出，在料液比为 1 g : 6 mL ~ 1 g : 10 mL 的范围内，花生蛋白的提取率随提取剂的增加而增加，但当提取剂再增加时，花生蛋白提取率变化不大，故料液比宜为 1 g : 10 mL，正交试验选取料液比 1 g : 8 mL、1 g : 10 mL、1 g : 12 mL 等 3 个水平。

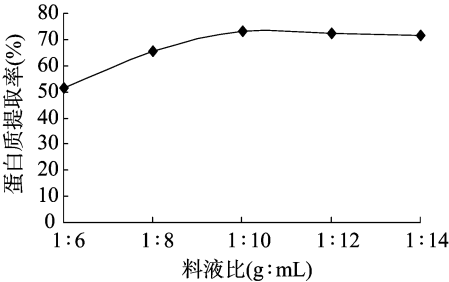


图1 料液比对花生蛋白提取率的影响

2.1.2 碱提 pH 值对提取率的影响 准确称取花生粕 10 g 于锥形瓶中，在提取温度为 60 ℃、提取时间为 2 h、料液比为 1 g : 10 mL 的条件下，pH 值分别设为 8、9、10、11，按提取工艺制取花生蛋白，测定其提取率。由图 2 可知，pH 值在 8 ~ 10 的范围内，花生蛋白的提取率随 pH 值的升高而升高。但当 pH 值达 10 以后，花生蛋白的提取率呈下降趋势，且随着 pH 值的升高，提取液黏度增加，不利于下一步的离心分离过程。另外，加入过多的碱会引起脱氨、脱羧反应，对花生蛋白的理化性质造成不良影响，故 pH 值宜为 10，正交试验的 pH 值宜选取 9、10、11 等 3 个水平。

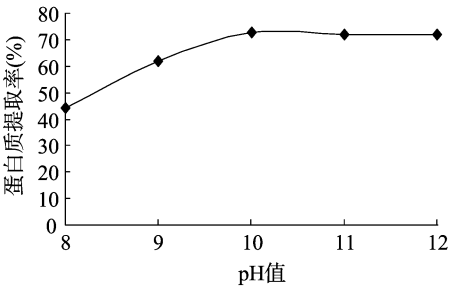


图2 碱提pH值对花生蛋白提取率的影响

2.1.3 提取温度对花生蛋白提取率的影响 准确称取花生粕 10 g 于锥形瓶中，在提取时间为 2 h、料液比为 1 g : 10 mL、pH 值为 10 的条件下，提取温度分别设为 40、50、60、70 ℃，按提取工艺制取花生蛋白，测定其提取率。由图 3 可知，在浸提温度低于 60 ℃时，随着温度的升高，提取率增大；但当温度高于 60 ℃时，提取率下降很明显。主要是因为温度过高时，蛋白质会发生变性，进而形成凝胶，并使溶液黏度增加，分离困难，耗能增加。故浸提温度宜为 60 ℃，正交试验选取浸提温度 50、60、70 ℃等 3 个水平。

2.1.4 提取时间对花生蛋白提取率的影响 准确称取花生粕 10 g 于锥形瓶中，在料液比为 1 g : 10 mL、提取温度为 60 ℃、pH 值为 10 的条件下，按提取工艺分别提取花生蛋白 1、1.5、2、2.5 h，测定其提取率。由图 4 可知，提取 1 ~ 2 h 时，蛋白质提取率的增加幅度随着浸提时间的增加而变大。当浸

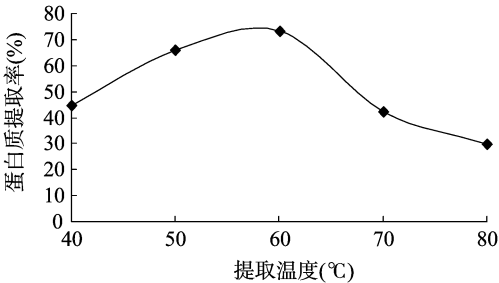


图3 温度对花生蛋白提取率的影响

提时间达到 2 h 时,蛋白质的溶出率达到动态平衡,当浸提时间超过 2 h 时,提取率增加幅度不大,延长浸提时间对蛋白的提取率影响甚微,并且增加了能耗。故宜浸提 2 h,正交试验的浸提时间宜选取 1.5、2、2.5 h 等 3 个水平。

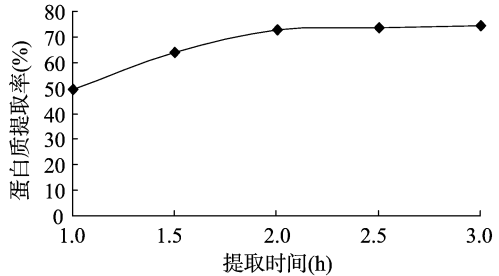


图4 提取时间对花生蛋白提取率的影响

2.2 正交试验

由表 2 可知,花生粕蛋白提取率最高的工艺为 A₂B₂C₂D₂,即料液比为 1 g : 10 mL,pH 值为 10,提取温度为 60 ℃,提取时间为 2 h。由表 2、表 3 可以看出,各因素的主次顺序为提取温度 > pH 值 > 提取时间 > 料液比,其中,提取温度和碱提 pH 值对花生蛋白的提取率具有极显著影响 ($P < 0.01$),提取

表 2 花生粕蛋白提取工艺的正交试验结果

试验号	A	B	C	D	提取率(%)
1	1	1	1	1	60.54
2	1	2	2	2	74.69
3	1	3	3	3	46.51
4	2	1	2	3	73.20
5	2	2	3	1	64.40
6	2	3	1	2	58.74
7	3	1	3	2	61.58
8	3	2	1	3	58.30
9	3	3	2	1	67.76
k ₁	60.58	65.11	59.19	64.23	
k ₂	65.45	65.80	71.88	65.00	
k ₃	62.55	57.67	57.50	59.34	
R	4.87	8.13	14.38	5.66	

表 3 花生粕蛋白提取工艺的方差分析结果

变异来源	平方和	自由度	均方	F	P
A	71.924	2	35.962	3.120	0.093
B	243.646	2	121.823	10.568	0.004 **
C	741.782	2	370.891	32.170	0.000 **
D	113.152	2	56.576	4.908	0.036 *
误差	103.751	9	11.528		

注: *、** 表示差异显著、极显著。

时间对蛋白提取率具有显著影响 ($P < 0.05$),料液比对花生蛋白提取率影响不显著。

2.3 验证试验

取花生饼粕粉末,正交试验得到的最佳工艺条件为料液比 1 g : 10 mL,pH 值为 10、浸提温度 60 ℃、浸提时间为 2 h,测定花生蛋白提取率,重复 3 次,结果提取率的平均值为 75.88%,RSD 为 3.15%,高于正交试验中各组试验的结果,证明试验所得优化水平是可靠的,工艺是可行的。

3 结论

在单因素试验基础上进行 4 因素 3 水平的正交设计,优化提取花生分离蛋白的工艺条件,正交试验分析结果表明,在影响碱液提取效果的因素中,提取温度和 pH 值影响极显著,提取时间影响显著,料液比影响不显著,影响作用按主次顺序排列为:提取温度 > pH 值 > 提取时间 > 料液比;最佳的碱提取条件为:料液比 1 g : 10 mL、pH 值 10.0、浸提温度 60 ℃、浸提时间 2 h,此时花生蛋白质提取率为 75.88%。

参考文献:

[1]王章存,康艳玲. 花生蛋白研究进展[J]. 粮食与油脂,2007(7): 12-13.

[2]林坤耀. 我国花生蛋白质的研究概况[J]. 广东农业科学,2004(增刊):15-16.

[3]刘传富,张兆静. 花生蛋白及其在食品中的应用[J]. 中国食物与营养,2005(1):24-25.

[4]周瑞宝. 花生加工技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003: 58-62.

[5]张维农,刘大川,胡小泓. 花生蛋白产品功能特性的研究[J]. 中国油脂,2002,27(5):60-65.

[6]裴剑慧,王 强,周素梅. 我国花生蛋白资源的开发与利用[J]. 粮油加工与食品机械,2005,12:53-55.

[7]张 伟,孙智达,徐志宏. 花生多肽的制备及生理功能评价的研究进展[J]. 中国油脂,2007,32(1):74-76.

[8]杨伟强,李 鹏,张吉民,等. 冷榨花生饼粕中分离蛋白的制备[J]. 食品科技,2008,33(12):166-168.

[9]矫丽媛,吕敬军,陆丰升,等. 花生分离蛋白提取工艺优化研究[J]. 食品科学,2010,31(20):196-201.