

刘俊利,许能祥,董臣飞,等. 多花黑麦草叶蛋白提取及纯化工艺研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):343-345.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.101

多花黑麦草叶蛋白提取及纯化工艺研究

刘俊利,许能祥,董臣飞,张文洁,程云辉,丁成龙

(江苏省农业科学院畜牧研究所,江苏南京 210014)

摘要:为探索多花黑麦草叶蛋白提取及纯化工艺,采用不同的料水比、pH 值和絮凝温度进行多花黑麦草叶蛋白的提取和选用不同纯化剂进行叶蛋白纯化研究,结果表明,使用酸性热提法提取叶蛋白效果最好。最佳提取条件为 pH 值为 4.0,70 ℃ 水浴加热 10 min,叶蛋白提取率、纯蛋白含量均达到最大值,分别达 46.17% 和 53.13%。多花黑麦草叶蛋白的最佳纯化试剂为醇类物质,叶蛋白纯度提高 6%~7.5%,综合考虑成本、安全等因素,推荐使用乙醇作为叶蛋白的纯化剂。

关键词:多花黑麦草;叶蛋白;提取;纯化

中图分类号:S816.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)11-0343-03

随着社会的不断发展,人均畜产品需求持续增长,饲料粮的供给不足已经成为当前粮食安全的主要问题之一^[1-2]。我国畜牧生产和淡水养殖业蛋白质饲料缺口很大,开发并利用植物蛋白资源对缓解养殖业蛋白资源缺乏具有重要作用^[3-6]。多花黑麦草(*Lolium multiflorum*)为我国长江中下游及其以南地区的重要冷季牧草,具有产量高、品质好、耐湿等优点,是饲养家畜及草食性鱼类的优质饲料,目前主要用作鲜饲和青贮,但由于多花黑麦草供草期集中,短时间内供过于求的现象时有发生,而利用多花黑麦草进行深度开发利用较少^[7-10]。多花黑麦草粗蛋白含量高,利用多花黑麦草生产叶蛋白,对缓解我国蛋白饲料严重短缺有重要意义。本试验以初穗期多花黑麦草为试验材料,进行叶蛋白的提取工艺优化研究,并对叶蛋白的纯化进行了初步研究,以为多花黑麦草叶蛋白的高效提取及利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自江苏省农业科学院六合种养殖基地初穗期的多花黑麦草,多花黑麦草品种为长江 2 号。

1.2 多花黑麦草叶蛋白提取

1.2.1 原料前处理 称取多花黑麦草整株 100 g,清洗,剪成长 1~2 cm 的小段,按试验设计的料水比加入规定量的水,打浆机打浆后,用 3 层纱布过滤,收集滤液,滤渣用蒸馏水洗涤 2 次,弃滤渣后得到的滤液即为含有多花黑麦草叶蛋白的汁液。

1.2.2 调 pH 值 使用 HCl 调节多花黑麦草汁液的 pH 值至

设定的 pH 值。

1.2.3 加热 采用恒温水浴加热的方法将多花黑麦草汁液加热到设定的温度,在水浴锅内恒温一定的时间得到絮凝物。

1.2.4 冷却离心 冷却到室温后装入离心管内,8 000 r/min 离心 7 min,去上清得到多花黑麦草叶蛋白浓缩物。

1.2.5 干燥 采用 55 ℃ 恒温干燥法对多花黑麦草叶蛋白浓缩物进行干燥,烘干 24 h 至恒质量。

1.3 多花黑麦草叶蛋白提取工艺的优化

1.3.1 料水比对叶蛋白提取的影响 称取新鲜多花黑麦草 3 份,按鲜叶与水的重量比例 1:2、1:3、1:4(g:mL)分别加水,打浆、过滤,将 pH 值调到 4,70 ℃ 加热 10 min,重复 3 次。

1.3.2 pH 值对叶蛋白提取的影响 称取新鲜多花黑麦草 5 份,按料水比 1 g:3 mL 加水,打浆、过滤,分别将 pH 值调到 2、4、6、8、10,70 ℃ 加热 10 min,重复 3 次。

1.3.3 絮凝温度对叶蛋白提取的影响 称取新鲜多花黑麦草 4 份,按料水比 1 g:3 mL 加水,打浆、过滤,将 pH 值调到 4,分别在 40、50、60、70、80 ℃ 下加热 10 min,重复 3 次。

1.3.4 絮凝时间对叶蛋白提取的影响 称取新鲜多花黑麦草 4 份,按料水比 1 g:3 mL 加水,打浆、过滤,将 pH 值调到 4,70 ℃ 分别加热 5、10、15、20 min,重复 3 次。

1.3.5 提取工艺的优化 选取料水比、pH 值、絮凝温度 3 个因素,设计 3 个水平正交试验因子的水平表(表 1),按照标准正交表 $L_9(3^3)$ 进行试验。

表 1 多花黑麦草叶蛋白提取正交试验因子水平

序号	A:料水比 (g:mL)	B:pH 值	C:絮凝温度 (℃)
1	1:2	3	50
2	1:3	4	60
3	1:4	5	70

1.4 叶蛋白纯化

分别使用甲醇、无水乙醇、丙酮、四氯化碳、异丙醇、蒸馏水等试剂以料水比 1 g:3 mL 浸洗新鲜提取的叶蛋白粗提物,静置 12 h,3 000 r/min 离心 10 min,去上清,沉淀烘干后测

收稿日期:2016-07-28

基金项目:国家牧草产业技术体系盐城综合试验站项目(编号:CARS-35-31)。

作者简介:刘俊利(1991—),女,山东烟台人,硕士研究生,主要从事牧草调制加工研究。Tel:(025)84391191;E-mail:1530932532@qq.com。

通信作者:丁成龙,博士,研究员,主要从事草饲料调制利用研究。

Tel:(025)84391191;E-mail:dingcl@jaas.ac.cn。

定其纯化蛋白质含量。重复 3 次。

1.5 计算方法

叶蛋白得率 = $\frac{\text{叶蛋白干质量}}{\text{多花黑麦草样品鲜质量}} \times 100\%$;

叶蛋白提取率 = $\frac{\text{叶蛋白干质量} \times \text{粗蛋白含量}}{\text{鲜样烘干后干基质量} \times \text{干基蛋白含量}} \times 100\%$ 。

1.6 数据分析

利用 Microsoft Excel 2007 进行数据处理,采用 SPSS Statistics 17.0 统计软件中的 ANOVA 程序进行 Duncan’s 多重比较分析,不同指标的平均值通过 SAS 9.2 软件采用 Fisher’s LSD 法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 多花黑麦草叶蛋白提取工艺的研究

2.1.1 料水比对叶蛋白提取的影响 不同料水比提取叶蛋白的试验结果(表 2)表明,随着料水比的提高,提取物中蛋白质的含量也逐渐增高,当料水比为 1 g : 3 mL 时,蛋白质含量达到最高,之后呈降低趋势;而叶蛋白提取率和蛋白质的含量呈相关关系,在料水比为 1 g : 3 mL 时,叶蛋白的提取率最高,为 45.39%,显著高于料水比为 1 g : 4 mL 的提取率(41.77%),但料水比为 1 g : 2 mL 和 1 g : 3 mL 的叶蛋白提取率差异不显著。

表 2 不同料水比对叶蛋白提取的影响

料水比 (g : mL)	蛋白质含量 (%)	提取率 (%)
1 : 2	49.15 ± 0.41bB	44.54 ± 0.56aA
1 : 3	51.45 ± 0.52aA	45.39 ± 0.56aA
1 : 4	46.23 ± 0.26cC	41.77 ± 0.41bB

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),下表同。

2.1.2 pH 值对叶蛋白提取的影响 不同的 pH 值条件下,蛋白质含量与叶蛋白提取率差异均达到显著和极显著水平。当 pH 值从 2 增加到 4 时,蛋白质含量与叶蛋白提取率均达到最高,分别为 52.08% 和 45.95%,显著高于 pH 值为 2 时的 46.82% 和 39.92%;当 pH 值逐渐增大,溶液由酸性变为中性至碱性时,蛋白沉淀量与提取率迅速下降,碱性越大,蛋白含量与提取率越低(表 3)。

表 3 不同 pH 值对叶蛋白提取的影响

pH 值	蛋白质含量 (%)	提取率 (%)
2	46.82 ± 0.39cB	39.92 ± 0.30bB
4	52.08 ± 0.27aA	45.95 ± 0.27aA
6	48.23 ± 0.78bB	38.24 ± 0.39cC
8	42.56 ± 0.63dC	25.51 ± 0.64dD
10	15.44 ± 0.54eD	10.04 ± 0.15eE

2.1.3 絮凝温度对叶蛋白提取的影响 絮凝温度升到 50 ℃,多花黑麦草中叶蛋白开始絮凝沉淀,蛋白沉淀量随着温度的升高而逐渐增加,并最终趋于平稳(表 4)。由表 4 可见,当温度由 60 ℃ 升到 70 ℃ 时,多花黑麦草蛋白质含量逐渐增大,从 70 ℃ 升到 80 ℃ 时,蛋白质含量下降,可见由 60 ℃ 到 80 ℃,蛋白质含量先增大后降低,70 ℃ 时的蛋白质含量

(52.39%) 显著高于其他温度;而从叶蛋白提取率来看,随着温度的逐渐升高,提取率一直呈增加状态,但增加速度逐渐趋于平缓。综上可知,70 ℃ 是提取叶蛋白的最佳絮凝温度。

表 4 不同絮凝温度对叶蛋白提取的影响

絮凝温度 (℃)	蛋白质含量 (%)	提取率 (%)
50	50.17 ± 0.56bB	50.34 ± 0.23bB
60	44.45 ± 0.48cC	44.97 ± 0.34cC
70	52.39 ± 0.32aA	46.02 ± 0.30bB
80	48.74 ± 0.49cC	47.17 ± 0.36aA

2.1.4 絮凝时间对叶蛋白提取的影响 在料水比 1 g : 3 mL,pH 值为 4,70 ℃ 的絮凝温度下,将多花黑麦草汁液分别加热不等的时间。由表 5 可以看出,絮凝时间对多花黑麦草叶蛋白提取的影响较小。加热 5 min 与加热 10 min 蛋白质含量与叶蛋白提取率都较高,相比之下加热 10 min 效果更好,提取率(45.97%) 最高。

表 5 不同絮凝时间对叶蛋白提取的影响

絮凝时间 (min)	蛋白质含量 (%)	提取率 (%)
5	51.19 ± 0.20abA	45.26 ± 0.22bAB
10	51.34 ± 0.70aA	45.97 ± 0.40aA
15	50.75 ± 0.24abA	44.70 ± 0.18cB
20	50.63 ± 0.24bA	44.91 ± 0.31bcB

2.1.5 多花黑麦草叶蛋白提取工艺的优化 正交试验结果(表 6)显示,各因素对蛋白质含量与叶蛋白提取率都有显著影响。按照极差 R 的大小,影响多花黑麦草中蛋白质含量因素的大小顺序为 C > B > A,即絮凝温度 > pH 值 > 料水比;影响多花黑麦草中叶蛋白提取率因素的大小顺序为 B > A > C,即 pH 值 > 料水比 > 絮凝温度。表中计算分析后的最佳组合条件为 A₂B₂C₃,在料水比为 1 g : 3 mL、pH 值为 4、絮凝温度 70 ℃ 的条件下,蛋白质含量 53.13%,叶蛋白提取率 46.17%,2 项指标均为最高值。

表 6 多花黑麦草叶蛋白提取工艺正交试验结果

试验号	A:料水比	B:pH 值	C:絮凝温度	蛋白质含量(%)	提取率(%)
1	1	1	1	50.16	43.39
2	1	2	2	50.41	45.06
3	1	3	3	52.04	44.28
4	2	2	3	53.13	46.17
5	2	3	1	50.66	43.69
6	2	1	2	51.50	43.85
7	3	3	2	51.24	42.17
8	3	1	3	50.74	42.66
9	3	2	1	51.48	44.41
k ₁ (含量)	50.87	50.76	50.67		
k ₂ (含量)	51.65	51.67	51.04		
k ₃ (含量)	51.12	51.21	51.94		
R(含量)	0.78	0.92	1.27		
k ₁ (提取率)	44.24	43.30	43.83		
k ₂ (提取率)	44.57	45.21	43.69		
k ₃ (提取率)	43.08	43.38	44.37		
R(提取率)	1.49	1.91	0.68		

2.2 多花黑麦草叶蛋白的纯化

分别用甲醇、无水乙醇、丙酮、四氯化碳、异丙醇、蒸馏水等试剂对新鲜提取的多花黑麦草叶蛋白粗提物进行萃取纯化。试验结果(图1)表明,当未使用纯化剂时,对照组中多花黑麦草叶蛋白的蛋白纯度在56%左右;使用纯化剂后,在各种纯化剂作用下叶蛋白的蛋白纯度均有所上升,影响大小依次为丙酮>乙醇>甲醇>异丙醇>四氯化碳>水。其中丙酮的纯化效果最好,蛋白质纯度达到67%;乙醇次之,为64%;水的效果最差,仅为57%,而甲醇、异丙醇及四氯化碳之间差异不显著($P>0.05$)。

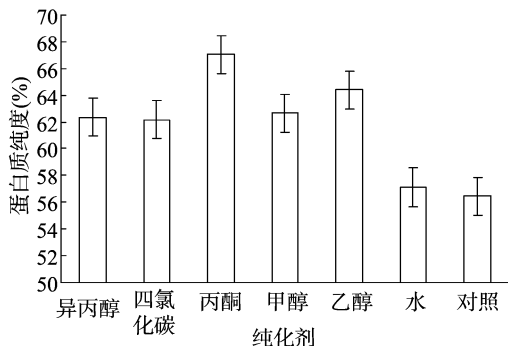


图1 不同试剂对叶蛋白纯化的影响

3 讨论

3.1 多花黑麦草叶蛋白提取工艺

试验中,当料水比达到1 g:3 mL、pH值为4、絮凝温度为70℃、絮凝时间为10 min时,提取物中蛋白质含量最高为53.13%,且叶蛋白提取率也最高,为46.17%。从料水比来看,打浆过程中,加水量太少,使得多花黑麦草鲜样浸泡不充分,打浆不彻底,叶蛋白不能充分提取;随着加水量增多,虽然样品中叶蛋白得到充分浸泡与提取,但是同样会溶解较多的细小纤维与色素,加热过程中蛋白不能完全絮凝沉淀,仍溶解在滤液中,造成提取率下降。

蛋白质是一种两性电解质,当蛋白质所处环境pH值发生改变时,其表面的电荷量会随着溶液pH值的改变而发生相应的变化。在多花黑麦草叶蛋白提取过程中,提取液pH值为4时蛋白絮凝沉淀量最大且叶蛋白提取率最高,表明多花黑麦草叶蛋白呈酸性。

温度是影响蛋白质含量的重要因素。絮凝温度在50~80℃范围内,随温度的升高,多花黑麦草叶蛋白的提取率也随之增加,并逐渐缓和,因为叶蛋白不但受加热变性的影响,同时还要受等电点沉淀因素的作用,蛋白凝聚机会和敏感性得以增加,从而使叶蛋白凝聚速度加快,絮凝出的物质结构紧密且易分离,保证了叶蛋白的高提取率。随着絮凝时间的延长,蛋白质含量与叶蛋白提取率变化相差不大,并不随时间的延长而增加,这说明絮凝时间并不是影响多花黑麦草叶蛋白提取的主要因素。

从选取影响叶蛋白提取的衡量指标来看,大部分类似的试验主要考虑叶蛋白得率,但是由于叶蛋白中粗蛋白含量会随着试验参数的改变而发生较大的变化,所以蛋白质含量这一指标不能准确且全面地反映从多花黑麦草中提取的蛋白质

情况,同理,叶蛋白得率也是如此,为弥补此项不足,通过增加叶蛋白提取率来补充反映蛋白质的提取情况。本试验在多花黑麦草叶蛋白提取工艺的优化中,综合考虑蛋白质含量与叶蛋白提取率2项指标的结果,同时兼顾生产成本及絮凝时间,选择料水比1 g:3 mL、pH值4、絮凝温度70℃、絮凝时间10 min为最佳试验条件,在该条件下,蛋白质含量与叶蛋白提取率均可达到最高值,该结果与杨朝英等报道的试验结果^[11]相一致。

3.2 多花黑麦草叶蛋白的纯化

鲜样中提取的多花黑麦草叶蛋白,由于其中含有多种植物色素如叶绿素、类胡萝卜素,类脂化合物以及能够导致不良气味及颜色的多酚类物质,对其利用有不利影响,而通过使用有机溶剂进行纯化,不但除去了这些不良物质,还提高了叶蛋白的纯度^[12-13]。本试验通过使用各种有机溶剂,提高叶蛋白纯度百分点左右,纯化后的多花黑麦草叶蛋白颜色变浅,无异味,蛋白质含量明显升高。而采用水进行纯化效果最差,因为叶绿素类物质不溶于水中;采用丙酮的纯化效果最好,但是丙酮具有强的刺激性,且易燃易爆,因此,不推荐丙酮作为纯化剂大量使用;醇类效果也较好,其中乙醇作为纯化剂,不但可除去植物色素、类脂化合物及多酚类化合物,而且其成本较低、对人体无毒、易于回收,因此,推荐使用乙醇作为叶蛋白的纯化剂。

参考文献:

- [1] 张炳武,张新跃. 我国南方高效牧草种植系统[J]. 草业科学, 2013,30(2):259-265.
- [2] 王宇涛,辛国荣,陈三有,等. 意大利黑麦草饲喂奶牛效果[J]. 草业科学,2008,25(10):118-123.
- [3] 王向峰,林洁荣. 叶蛋白饲料的研究进展[J]. 福建畜牧兽医, 2007,29(3):46-48.
- [4] 李立人. 国际叶蛋白的研究及开发[J]. 中国饲料,1995(14):10-12.
- [5] 杨文华,林晓春,丛德馨. 植物叶蛋白的生产与利用研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报,1998(3):76-80.
- [6] 陈文荣,邱业先. 叶蛋白资源的利用现状及展望[J]. 食品科学, 2003,24(2):158-161.
- [7] 姜华,毕玉芬,何承刚. 不同时期刈割对黑麦草生产性能、蛋白质含量及光合效率的影响[J]. 云南农业大学学报,2003,18(2):149-152.
- [8] 丁成龙,顾洪如,许能祥,等. 不同刈割期对多花黑麦草饲草产量及品质的影响[J]. 草业学报,2011,20(6):186-194.
- [9] 刘晓颖. 黑麦草叶蛋白等营养成分的提取及性质分析[J]. 安徽大学学报:自然科学版,2007,31(4):81-84.
- [10] 杨秀梅,张伟欣,高亮之,等. 牧草生产潜力模拟模型及其应用[J]. 江苏农业学报,2015,31(2):322-327.
- [11] 杨超英,刘艳,薛正莲,等. 黑麦草叶蛋白提取工艺研究[J]. 中国农学通报,2007,23(5):14-17.
- [12] 杨春波. 苜蓿叶蛋白的提取与应用研究[D]. 无锡:江南大学,2007.
- [13] 李宪刚,张静,李予霞,等. 乙醇纯化苜蓿叶蛋白效果初探[J]. 安徽农学通报,2007,13(5):38-39.