

反胶束法提取花生蛋白后萃工艺的优化

陈茂深, 朱科学

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要:以琥珀酸二(2-乙基己基)酯磺酸钠(AOT)-异辛烷-氯化钾缓冲溶液为前萃体系,对从前萃体系中提取花生蛋白的后萃工艺条件进行了研究。考察了后萃时间、后萃温度、缓冲液 pH、KCl 浓度对花生蛋白后萃率的影响,并在单因素试验基础上,通过正交试验确定后萃最佳工艺条件为:后萃时间 50 min,后萃温度 40℃,缓冲液 pH 9.0, KCl 浓度 1.0 mol/L。在此最佳工艺条件下,花生蛋白后萃率达到 86.49%。

关键词:反胶束;花生蛋白;后萃;正交试验

中图分类号:TS229;TS202

文献标志码:A

文章编号:1003-7969(2010)01-0024-04

Optimization of the backward extraction of protein from peanut by reverse micelles

CHEN Maoshen, ZHU Kexue

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

Abstract: The backward extraction of peanut protein from forward extraction solution was studied. The reverse micellar systems were formed by sulphosuccinic acid bis (2-ethylhexyl) ester sodium salt (AOT), isooctane and KCl buffer solution. The effects of extraction time, extraction temperature, pH and KCl concentration on the backward extraction ratio were tested. On the basis of single-factor experiments, the optimum technical condition was obtained by orthogonal experiments. The results showed that the highest backward extraction ratio of protein were reached at the condition of extraction time 50 min, extraction temperature 40℃, pH 9.0 and KCl concentration 1.0 mol/L. Under this optimum condition, the backward extraction ratio of protein reached 86.49%.

Key words: reverse micelles; peanut protein; backward extraction; orthogonal experiments

我国是世界上花生主产国之一,总产量居世界第一。花生中蛋白质含量为 24%~36%,其主要由花生球蛋白和伴花生球蛋白组成,其中花生球蛋白约占 63%,伴花生球蛋白约占 33%,而且富含人体必需的氨基酸,可消化性高,对促进幼儿发育和人体健康有着重要作用。目前,花生除直接食用外,主要用于制备花生油,常规的制备方法是使用有机溶剂浸提,该法可使粕中残油率降低到 1% 以下,但提油

后湿粕中有机溶剂含量高,脱溶时的高温易使蛋白质发生热变性,从而降低了蛋白质的功能特性和营养特性,因此制油后的花生粕大多数被作为动物饲料和肥料,致使花生蛋白资源未能得到合理的利用^[1]。另外,传统的盐溶碱提酸沉花生蛋白提取方法,会产生大量的废水,造成环境污染。

用反胶束法萃取蛋白质是由瑞士的 Luisi 等^[2]人首次提出的。反胶束是将表面活性剂溶解在非极性有机溶剂中,当其浓度超过临界浓度(Critical Micelle Concentration, CMC)时,会在有机溶剂中形成聚集体,这种聚集体称为反胶束(亦称反胶团)^[3,4]。在反胶束中,极性头向内排列形成一个极性核,极性核有增溶水的能力,极性核增溶水后形成“水池”(Pool),此“水池”具有加溶蛋白质和氨基酸等极性物质的能力。当反胶束溶液与蛋白

收稿日期:2009-06-04;修回日期:2009-08-25

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划项目资助课题(2006BAD05A01)

作者简介:陈茂深(1987),男,本科,食品科学与工程专业。

通讯作者:朱科学,副教授,博士(Tel)0510-85329037(E-mail) kxzh@jiangnan.edu.cn.

质水溶液或固体接触后,蛋白质加溶于反胶束的“水池”中,称为前萃取或前萃。将含有蛋白质的反胶束溶液与另一水相接触,通过改变 pH、离子强度等条件使蛋白质从反胶束溶液转移到水相中从而分离出蛋白质,称为后萃取或后萃。因为蛋白质外表面有一层水膜和一层极性头的保护,使得蛋白质不会与有机溶剂直接接触而发生变性,从而使其功能特性得以保留^[5]。

本研究首次以花生为原料,通过单因素试验和正交试验,探索反胶束提取花生蛋白的最佳后萃工艺条件,并分析各因素对蛋白质后萃率的影响,从而为花生的进一步开发利用提供相关基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

新鲜花生(超市购买),琥珀酸二(2-乙基己基)酯磺酸钠(AOT)、异辛烷、氯化钾、硼酸、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、硫酸铜、硫酸钾、浓盐酸、浓硫酸、溴甲基绿、甲基红、变色硅胶等均为分析纯,所用水为去离子水。

1.2 主要试验仪器

90-2型定时恒温磁力搅拌器,LXJ-II离心沉淀机,PHS-3C精密pH计,电热恒温鼓风干燥箱,ZK-82B型电热真空干燥箱,SHA-B水浴恒温振荡器,HH-4数显恒温水浴锅,微量凯氏定氮装置。

1.3 试验方法

1.3.1 测定方法^[6] 蛋白质含量测定,GB 5511—1985;油脂含量测定,GB 5512—1985;水分含量测定,GB 5497—1985。

1.3.2 缓冲溶液的配制 按照参考文献[7]的方法配制本试验所需要的不同pH的缓冲溶液。

1.3.3 反胶束溶液的配制和前萃液的制备 按照参考文献[8]的方法配制反胶束溶液:称取3.0g表面活性剂AOT,置于100mL的烧杯中,然后按照浓度要求加入50mL异辛烷,磁力搅拌使表面活性剂完全溶解,待溶液透明后,加入3mL pH为8.0的含有0.1mol/L KCl的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液,继续磁力搅拌,接着以3000 r/min离心20 min,若透明则为反胶束溶液,反之则不是^[9](底层少量水对体系影响不大)。按照参考文献[8]的前萃最佳工艺条件制备前萃液。

1.3.4 后萃工艺 向一定体积(精确到0.1 mL)的前萃液中加入等体积的一定浓度KCl的pH缓冲液,在一定温度的水浴恒温振荡器中振荡一段时间后离心(3000 r/min,10 min)分液,上层为含有油脂的有机相,真空旋转蒸发回收异辛烷;下层为含有蛋

白质的水相,凯氏定氮测定蛋白后萃率。

蛋白后萃率 = 水相中蛋白质的总量 / 前萃液中蛋白质的总量 × 100%

1.3.5 后萃的单因素试验 分别以缓冲液pH、后萃时间、后萃温度和KCl浓度为因素,研究其对蛋白后萃率的影响。

1.3.6 $L_9(3^4)$ 正交试验 根据单因素试验结果,以蛋白后萃率为考察指标,选择缓冲液pH、后萃时间、后萃温度、KCl浓度4因素进行正交试验。

2 结果与讨论

2.1 单因素试验

2.1.1 缓冲液pH对花生蛋白后萃率的影响 在缓冲液pH分别为5.0、7.0、9.0、11.0、13.0,后萃时间60 min,后萃温度40℃,KCl浓度1.0 mol/L的条件下进行1.3.4的操作,试验结果如图1所示。

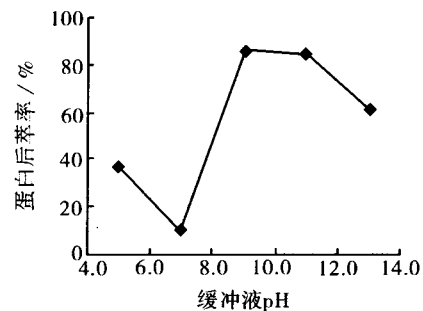


图1 缓冲液pH对花生蛋白后萃率的影响

由图1可见,缓冲液pH从5.0变化到7.0时,蛋白质后萃率显著下降,这是因为AOT为阴离子表面活性剂,在酸性条件下, H^+ 取代与AOT结合的蛋白,使其从“水池”中释放出来。但当缓冲液pH从7.0变化到9.0时,蛋白质后萃率显著增加,但当缓冲液pH继续从9.0增大到13.0时,蛋白质后萃率逐渐下降。这符合花生蛋白在水中的溶解特性。杨伟强等^[10]人在使用碱提酸沉法提取花生蛋白时,其最佳溶解pH也是9.0,与本试验得出的结论一致。因此,选取后萃最适缓冲液pH为9.0。

2.1.2 后萃时间对花生蛋白后萃率的影响 在后萃时间分别为30、40、50、60、70 min,缓冲液pH 9.0,后萃温度40℃,KCl浓度1.0 mol/L的条件下进行1.3.4的操作,试验结果如图2所示。由图2可见,随后萃时间的增加,后萃率逐渐增大,但50 min之后后萃率基本保持不变,说明受后萃水相萃取能力的限制,此时后萃已接近平衡。另外,后萃时间较长也会影响蛋白质的功能特性,所以,无论是从理论上还是从实际应用中考虑都应尽量减少操作时间。因此,选取较适的后萃时间为50 min。

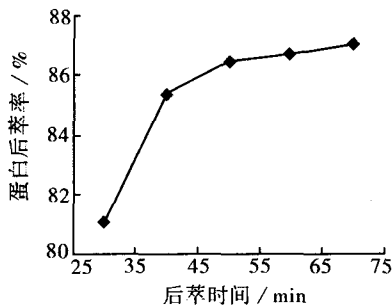


图2 后萃时间对花生蛋白后萃率的影响

2.1.3 后萃温度对花生蛋白后萃率的影响 在后萃温度分别为30、35、40、50、60℃,缓冲液pH 9.0,后萃时间50 min,KCl浓度1.0 mol/L的条件下进行1.3.4的操作,试验结果如图3所示。

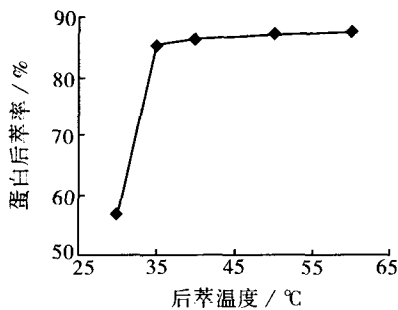


图3 后萃温度对花生蛋白后萃率的影响

由图3可见,随后萃温度的增加,后萃率迅速增加。这是因为随着温度的升高,传质推动力增大,促进了蛋白质的萃取。另外温度增加时,分子运动速率加快,从而使体系混乱度增加,胶团变小,导致“水池”中蛋白质量减少,这也是后萃率增加的另一个原因。但是当后萃温度达到40℃以后,后萃率增加的程度显著减小,最后趋于平稳,说明此时后萃已接近平衡。所以选取后萃温度为40℃。

2.1.4 KCl浓度对花生蛋白后萃率的影响 在KCl浓度分别为0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mol/L,缓冲液pH 9.0,后萃时间50 min,后萃温度40℃的条件下进行1.3.4的操作,试验结果如图4所示。

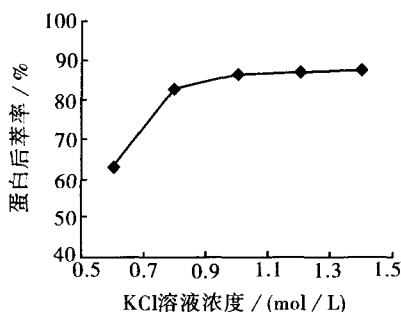


图4 KCl浓度对花生蛋白后萃率的影响

由图4可见,花生蛋白的后萃率随着KCl浓度的增加而增加,但当KCl浓度增加到1.0 mol/L后,蛋白质后萃率增加的程度显著减小,最后趋于平稳。这是因为盐浓度增大时,会使反胶束体系的 $W_0(c(\text{H}_2\text{O})/c(\text{表面活性剂}))$ 减小,迫使包溶在反胶束“水池”中的蛋白质随减少的水分被带出。另外,反胶束“水池”中蛋白质的浓度远大于后萃水相中蛋白质的浓度,从而形成一个较大的传质推动力,使得蛋白质不断从“水池”中移出而进入水相,致使后萃率增加。所以选取KCl浓度为1.0 mol/L。

2.2 正交试验

在单因素试验的基础上,设计了 $L_9(3^4)$ 正交试验。因素水平见表1,正交试验结果见表2,水平趋势图见图5。表2和图5结果表明,在所选试验范围内,各因素对花生蛋白后萃率影响的主次顺序为:后萃温度>KCl浓度>后萃时间>缓冲液pH,最佳工艺条件为 $A_2B_2C_2D_2$ 。

表1 因素水平表

水平	A 后萃时间 /min	B 后萃温度 /°C	C 缓冲液 pH	D KCl 浓度 / (mol/L)
1	40	35	8.0	0.8
2	50	40	9.0	1.0
3	60	45	10.0	1.2

表2 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	后萃率/%
1	1	1	1	1	82.23
2	1	2	2	2	85.37
3	1	3	3	3	83.70
4	2	1	2	3	85.18
5	2	2	3	1	84.82
6	2	3	1	2	84.26
7	3	1	3	2	84.26
8	3	2	1	3	84.82
9	3	3	2	1	83.15
k_1	83.77	83.89	83.77	83.40	
k_2	84.75	85.00	84.57	84.63	
k_3	84.08	83.70	84.26	84.57	
R	0.98	1.30	0.80	1.23	

2.3 验证试验

对正交试验所得最佳方案后萃时间50 min、后萃温度40℃、缓冲液pH 9.0、KCl浓度1.0 mol/L进行验证,此条件下花生蛋白的后萃率可达86.49%,高于正交试验中各组结果,证明所得优化水平是可靠的。

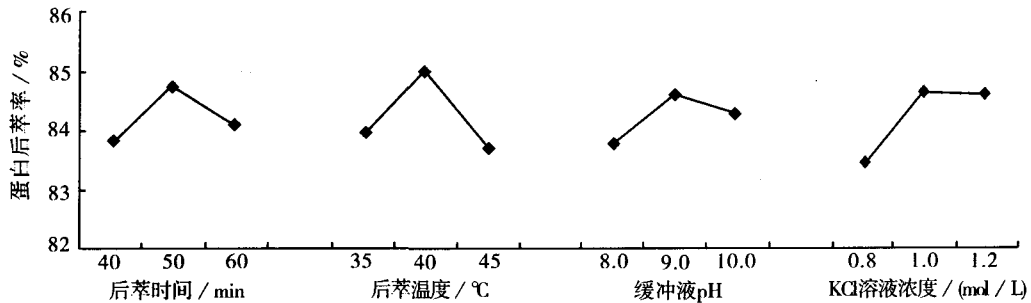


图5 水平趋势图

3 结论

(1)通过试验可知,利用反胶束的方法从未脱脂花生粉中提取花生蛋白是可行的,与传统的花生蛋白提取方法——碱溶酸沉法相比,具有工艺简单,能耗低,所用有机溶剂可以循环使用,容易解决环境污染问题,萃取环境温和等优点,从而为花生的进一步开发利用提供一条新的途径。

(2)在单因素试验基础上,通过正交试验确定后萃最佳工艺条件:后萃时间 50 min,后萃温度 40 °C,缓冲液 pH 9.0,KCl 浓度 1.0 mol/L。在此最佳工艺条件下,花生蛋白后萃率可达到 86.49%。

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] LUISI P L, BONNER F J, PELLEGRINI A, et al. Micellar solubilization of proteins in aprotic solvents and their spectroscopic characterization [J]. Helvetica Chimica Acta, 1979, 62 (3): 740-753.
- [3] 史勤,雷夏,沈忠耀.反微团萃取——一种新型的蛋白质分离方法[J].化工进展,1988(3):28-32.
- [4] 邓修,吴俊生.化工分离工程[M].北京:科学出版社,2000:244-251.
- [5] POMERANZ Y, CARVAJAL M J, HOSENEY R C, et al. Wheat germ in breadmaking. I. composition of germ lipids and germ protein fractions[J]. Cereal Chemistry, 1970, 47: 373-380.
- [6] 王肇慈.粮油食品品质分析[M].北京:中国轻工业出版社,2000.
- [7] 杭州大学化学系分析化学教研室.分析化学手册:第二分册[M].北京:化学工业出版社,1982.
- [8] 孙晓宏,朱科学,周惠明.反胶束法提取小麦胚芽蛋白后萃工艺的优化[J].食品科学,2008(7):208-212.
- [9] 赵俊廷.反胶束溶液同时萃取植物油料中的油和蛋白——反萃工艺研究[J].中国油脂,2001,26(3):31-33.
- [10] 杨伟强,李鹏,袁涛,等.从花生蛋白粉中提取花生分离蛋白的条件优化[J].中国油脂,2009,34(1):34-37.

· 信息 ·

欢迎订阅 2010 年度《中国油脂》

欢迎使用《中国油脂》投稿、查稿系统

《中国油脂》杂志社从 2008 年 8 月 8 日起开始运行新的采编系统。在新的采编系统中,作者可动态查看稿件的投稿、审稿和录用情况。为方便管理,新的采编系统实行投稿作者实名注册制。作者投往《中国油脂》杂志社的稿件,请先登录中国油脂网(www.chinaoils.cn),用真实姓名(用户名或登录账号)进行会员注册,登录后进行投稿。具体操作请登录中国油脂网,点击中国油脂杂志栏目或中国油脂杂志封面图片,在投稿须知栏目内查看投稿流程,按提示内容操作即可。

欢迎广大作者在中国油脂网上投稿、查稿!