

# 超声辅助 DMBAC 反胶束体系后萃取大豆蛋白的研究

杨颖莹<sup>1</sup>, 布冠好<sup>1</sup>, 廖志雄<sup>2</sup>, 陈复生<sup>1</sup>, 高艳秀<sup>1</sup>, 李润洁<sup>1</sup>

(1. 河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450001) (2. 河南科技学院新科学院, 河南新乡 453003)

**摘要:** 本研究采用超声波辅助 DMBAC/异辛烷/正辛醇反胶束体系萃取大豆蛋白, 对温度、KCl 浓度、pH 值、超声功率、时间五个因素进行了单因素研究, 之后进行了正交试验, 由试验结果可知, 因素影响顺序为 KCl 浓度>温度>PH 值>功率, KCl 浓度、温度和 PH 值对后萃取率影响均为极显著, 在最优条件 (pH 为 7, KCl 浓度为 1 mol/L, 功率为 210 W, 温度为 30 ℃) 下进行验证试验, 蛋白后萃取率为 81.44%±0.26%。

**关键词:** DMBAC 反胶束; 萃取; 大豆蛋白

**文章篇号:** 1673-9078(2013)1-130-133

## Research on Ultrasonic Auxiliary DMBAC Reverse Micelle Backward Extraction of Soybean Protein

YANG Ying-ying, BU Guan-hao, CHEN Fu-sheng, GAO Yan-xiu, LI Run-jie

(College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** In the study, ultrasonic auxiliary DMBAC/isooctane/ n-octyl alcohol reverse micelle system was used to extract soybean protein, and effects of single factors (temperature, KCl concentration, pH value, ultrasonic power and time) on the extraction were tested. The orthogonal experiment indicated that influential order of the factors was KCl concentration > temperature > pH value > power. The effects of KCl concentration and temperature and pH value were very significant. Under the optimal conditions (pH 7, KCl concentration 1mol/L, power 210 W, temperature 30 ℃), extracting rate was 81.44% ± 0.26%.

**Key words:** DMBAC reverse micelle; extraction; soybean protein

反胶束是指表面活性剂在超过临界胶束浓度时溶于有机溶剂, 在少量水的存在下, 形成极性头向内、非极性尾朝外的纳米尺度聚集体。溶解水后的极性核形成了“水池”, 它具有加溶蛋白质和氨基酸等极性物质的能力<sup>[1]</sup>。反胶束技术是一种新的生物分离技术, 是表面活性剂分子在非极性溶剂中自发形成的、热力学稳定、表面张力低、透明的纳米级分子聚集体, 是典型的微乳相体系之一。1977 年瑞士的 Luisi<sup>[2]</sup>等人首次提出了用反胶束萃取蛋白质, 此后, 研究者不断深入研究反胶束萃取技术, 并且取得一些显著的成果。本论文研究了一种阳离子表面活性剂形成的反胶束属于非氧化性杀菌剂, 具有广谱、高效的杀菌能力。

收稿日期: 2012-08-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(20976037、21176058、31171790); 郑州市创新型科技人才队伍建设工程; 河南省教育厅科学技术研究重点项目(12A550002); 河南工业大学博士基金项目(2010BS014)

作者简介: 杨颖莹(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品资源开发与利用

通讯作者: 陈复生(1963-), 男, 博士, 教授, 博导, 研究方向为食品资源开发与利用

蛋白质加溶于反胶束的“水池”中, 称为前萃取。将含有蛋白质的反胶束溶液与另一水相接触, 通过改变条件使蛋白质从反胶束相转移到水相中从而分离出蛋白质, 称为后萃取<sup>[1]</sup>。本试验通过超声波辅助的方法进行了反胶束后萃取大豆蛋白的影响因素研究, 包括超声功率、时间、温度、pH 值、KCl 浓度五个因素。并在单因素的基础上进行了正交实验, 确定了此反胶束后萃取大豆蛋白的最佳工艺条件。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要原料与试剂

全脂大豆粉, 安阳漫天雪食品制造有限公司; 异辛烷、甲醇、卡尔费休试剂、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾等(以上均为分析纯); 十二烷基二甲基苄基氯化铵(DMBAC, 纯度 90%), 新乡市金升化工有限公司; 所用水为去离子水。

#### 1.2 主要仪器和设备

BS210S 型电子天平, Sartorius German; THZ-82B 型气浴恒温振荡器, 江苏省金坛市医疗仪器厂; 85-2 控温磁力搅拌器, 江苏省金坛市医疗仪器厂; pH211

型 pH 计, HANNA 公司; 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; 移液枪, Eppendorf 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 基本分析

水分的测定-105 °C恒重法 (GB/T 5009.3-2003); 粗脂肪的测定-索氏抽提法 (GB/T 5009.6-2003); 粗蛋白的测定-凯氏定氮法 (GB/T 5009.5-2003)。

#### 1.3.2 蛋白质标准曲线制作

以牛血清蛋白为标准, 紫外分光光度计测定一定浓度梯度标准蛋白液在 280 nm 处吸光值, 以蛋白质浓度为横坐标, 对应吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线<sup>[4]</sup>。

#### 1.3.3 反胶束溶液的配制

按照反胶束浓度为 0.10 g/mL 称取表面活性剂 DMBAC, 将其置于锥形瓶中, 按比例加入异辛烷和正辛醇。磁力搅拌使表面活性剂完全溶解, 待溶液透明后, 加入一定体积的 0.1 mol/L KCl 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲溶液, 摇床振荡, 室温下静置 12 h, 溶液若透明则为反胶束, 反之则不是。

#### 1.3.4 大豆蛋白前萃取液的制备

按照豆粉加入量为 0.02 g/mL 称取全脂大豆粉置于锥形瓶中, 加入 DMBAC 反胶束溶液 (pH 9.0、KCl 浓度为 0.2 mol/L、 $W_o=15$ )。将锥形瓶置于超声波中, 在温度 40 °C、功率 270 W 的条件下超声 20 min, 以 4000 r/min 的转速离心 15 min, 离心后上层清液即为前萃液, 用紫外分光光度计测定在 280 nm 处吸光值, 从而得出前萃液蛋白质的浓度。

#### 1.3.5 蛋白质后萃取率的计算

将 15 mL 前萃液加入等体积的一定浓度 KCl 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  缓冲液, 在超声波中萃取一定时间。然后将上述溶液置于离心机中, 在 4 °C 以 4000 r/min 离心 10 min, 分液漏斗分层后取下层水相, 后萃取率按下式计算:

$$\text{蛋白质后萃取率 (\%)} = \frac{\text{后萃液中蛋白质的含量}}{\text{前萃液中蛋白质的含量}} \times 100\%$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 原料主要成分分析

表 1 原料主要成分含量

Table 1 Main components of the raw material

油脂/%	蛋白/%	水分/%
24.69	42.17	4.26

### 2.2 蛋白质定量分析标准曲线

牛血清蛋白定量分析标准曲线如图 1 所示。

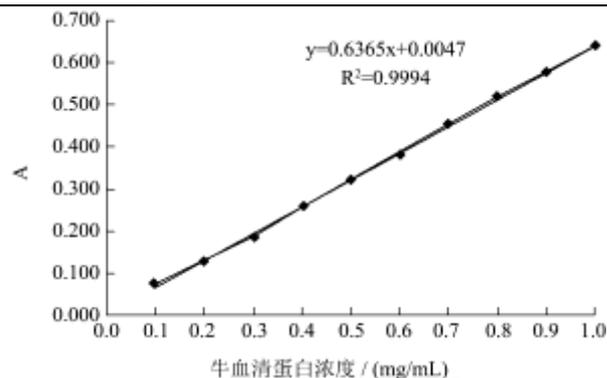


图 1 蛋白质定量分析标准曲线

Fig.1 Calibration curve of the protein contents

### 2.3 DMBAC 反胶束体系后萃取大豆蛋白的单因素研究

#### 2.3.1 温度对后萃取率的影响

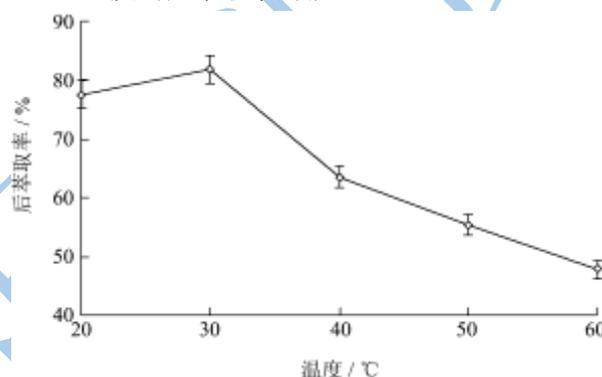


图 2 温度对后萃取率的影响

Fig.2 Effect of temperature on the backward extraction yield

温度分别取为 20 °C、30 °C、40 °C、50 °C、60 °C, 前萃率随温度的变化趋势如图 2 所示, 即随着温度的升高, 后萃取率先是升高, 当温度达到 30 °C 后萃取率下降。

在一定范围内, 温度升高分子的热运动加剧, 反胶束的破坏程度变大, 相互作用增强, 有利于蛋白质的萃取。但温度过高, 一方面会造成蛋白质的变性; 另一方面, 反胶束不稳定, DMBAC 表面活性剂会与蛋白质发生作用, 阻碍蛋白质进入水相, 不利于大豆蛋白的萃取<sup>[5]</sup>。综合考虑, 本实验采用最佳温度为 30 °C。

#### 2.3.2 时间对后萃取率的影响

时间分别取为 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min, 后萃取率随时间的变化趋势如图 3 所示, 10 min~30 min 升高趋势较为明显, 30 min 后虽然还在升高, 但变化趋于平缓, 从经济和节能综合考虑, 最佳时间取 30 min 较为合适。

随着时间延长, 反胶束“水池”的蛋白质分子进入水相的蛋白质增多, 但在一定条件下, 反胶束溶液萃取蛋白质的能力是有限的。与前萃相比, 后萃达到平

衡的时间偏长,因此反胶束对大豆蛋白质的前萃取速率快,后萃取速率慢。由后萃动力学研究可知,后萃过程中存在较大的界面阻力,后萃的传质速率一般比前萃过程最多可慢20倍<sup>[6]</sup>。

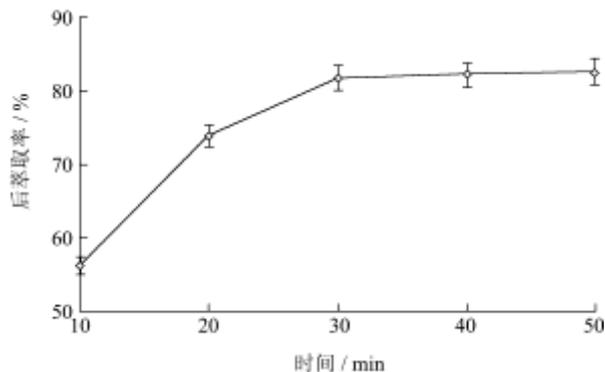


图3 时间对后萃取率的影响

Fig.3 Effect of time on the backward extraction yield

### 2.3.3 pH值对后萃取率的影响

pH值对大豆蛋白后萃取率的影响如图4所示,由图4可知,后萃取率随pH值先升高后降低,在pH为7时,后萃取率最大。

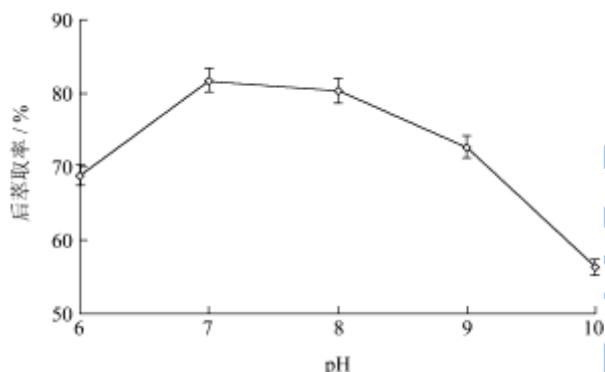


图4 pH对后萃取率的影响

Fig.4 Effect of pH on the backward extraction yield

从图4中可以看出pH对蛋白后萃取率有较明显的影响,这是因为反胶束后萃取必须通过改变pH使蛋白表面电荷与反胶束内表面极性头所带电荷的相互作用降低,才能使蛋白质从反胶束极性核中溶出进入水相。

反胶束后萃大豆蛋白过程中,随着pH值的增加,蛋白质表面所带负电量增加,DMBAC属于阳离子表面活性剂,随着pH值的增加,表面活性剂所带的电荷量增加,所以蛋白质的表面负电荷和反胶束内表面活性剂上的负电荷间的静电排斥作用减小,使蛋白质在反胶束“水池”的增溶作用升高,从而不利于蛋白质从反胶束极性核中溶出,水相中蛋白质的溶解度降低,使后萃取率减小<sup>[7]</sup>,同时pH值过大时,在界面上会产生白色絮状物,这是因为强碱会造成蛋白质变性。在pH为7时的萃取率比pH为6时要高,这不是静电排

斥作用造成的,可能与蛋白质的疏水作用有关。综上所述,本实验选取最佳pH为7。

### 2.3.4 KCl浓度对后萃取率的影响

KCl浓度对后萃取率的影响如图5所示,KCl浓度为0.6~1.0 mol/L时,后萃取率随其升高,KCl浓度为1.0~1.4 mol/L时,后萃取率随其降低。因此,本实验选取KCl浓度为1.0 mol/L。

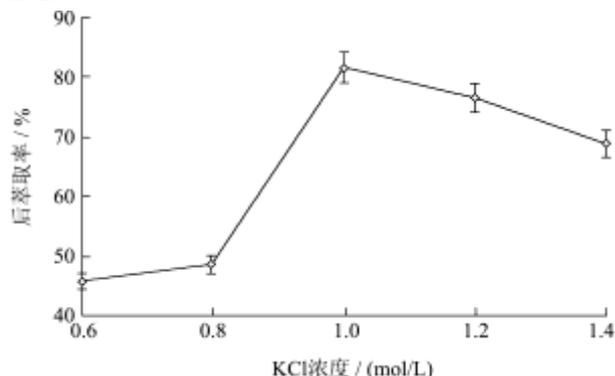


图5 KCl浓度对后萃取率的影响

Fig.5 Effect of KCl concentration on the backward extraction yield

KCl浓度对萃取率的影响主要是由离子对表面电荷的屏蔽作用所决定的,由图5可以看出KCl浓度对后萃取率影响较大。离子强度增大后,反胶束内表面的双电层变薄,减弱了蛋白质与反胶束内表面之间的静电吸引,从而促进了蛋白质的溶出,而且反胶束内表面的双电层变薄后,也减弱了表面活性剂基团之间的斥力,使反胶束变小,也促进了蛋白质的溶出;另一方面,离子强度增加时,离子向反胶束“水池”的迁移增多,促进了蛋白质的溶出<sup>[8]</sup>。但KCl浓度超过1.0 mol/L后,盐与蛋白质或表面活性剂会产生相互作用影响蛋白的后萃,而且也会造成蛋白质的某些功能特性丧失,因此选取KCl浓度为1.0 mol/L最为合适。

### 2.3.5 超声功率对后萃取率的影响

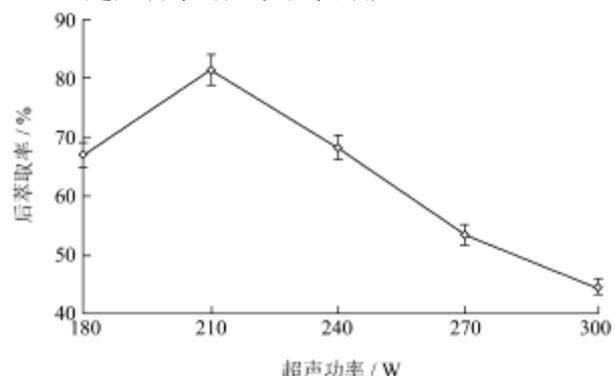


图6 超声功率对后萃取率的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic power on the backward extraction yield

超声功率对后萃取率的影响如图6所示,在210

W 是后萃取率达到最大,之后萃取率随功率的增加而降低,而且降低趋势较为明显。

由动力学研究可知,与前萃相比后萃过程中存在较大的界面阻力,蛋白质难以进入水相,使用超声波技术主要为该萃取起到强化作用,超声的空化效应和机械效应均可增大界面间的湍动程度,同时空化所产生的微射流会促进蛋白质向反胶束的表面扩散,降低了蛋白从反胶束中向水相中扩散的阻力,使得蛋白质分子易于进入水相,可促进蛋白质的浸出和传质,提高蛋白质的后萃取率。但功率过大会造成更多的其它分子溶入因此,本实验选取最佳功率为 210 W。

2.4 DMBAC 反胶束体系后萃大豆蛋白正交试验

表 2 因素水平表

**Table 2 Factors and levels of the test**

水平	因素			
	A (pH 值)	B [KCl 浓度 / (mol/L)]	C (功率 /W)	D (温度 /°C)
1	6	0.8	180	20
2	7	1	210	30
3	8	1.2	240	40

表 3 正交设计方案与结果分析表

**Table 3 Results of the orthogonal test**

试验号	A	B	C	D	萃取率/%
1	1	1	1	1	45.14
2	1	2	2	2	56.74
3	1	3	3	3	65.89
4	2	1	2	3	61.03
5	2	2	3	1	83.48
6	2	3	1	2	62.36
7	3	1	3	2	30.56
8	3	2	1	3	71.53
9	3	3	2	1	57.85
k1	55.92	45.58	59.68	62.16	
k2	68.96	70.58	58.54	49.89	
k3	53.31	62.03	59.98	66.15	
R	15.64	25.01	1.44	16.26	
优化方案	A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>2</sub>	

表 4 方差分析

**Table 4 Variance analysis of the analysis**

因素	偏差平方和	自由度	F 值	F 临界值	显著性
A	421.39	2	122.29	F <sub>0.05</sub> (2,2)	**
B	969.26	2	281.27	=19	**
D	430.99	2	125.07	F <sub>0.01</sub> (2,2)	**
C(误差)	3.45	2		=99	

影响 DMBAC 反胶束体系后萃大豆蛋白的因素主

要有温度、KCl 浓度、pH 值、超声功率,采用四因素三水平正交试验,因素水平表见表 2,实验方案与结果分析表见表 3,方差分析见表 4。

通过表 3 正交试验结果的极差分析可知,四个因素对后萃取率的影响顺序为 KCl 浓度>温度>pH 值>功率,由极差分析可知,超声功率对后萃取率影响较小,因此将其归为误差项进行方差分析,有表 4 可知,KCl 浓度、温度和 pH 值均为极显著。

由极差分析得到最优设计方案为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,在此条件下(pH 为 7, KCl 浓度为 1 mol/L, 功率为 210 W, 温度为 30 °C) 进行验证试验,蛋白后萃取率为 81.44%±0.26%。可见,此工艺条件合理可行,可操作性和重现性好。

3 结论

本试验采用超声辅助 DMBAC 反胶束体系后萃大豆蛋白,对温度、KCl 浓度、pH 值、超声功率、时间五个因素进行了单因素研究,从单因素结果来看,时间对后萃取率影响不显著,因此对温度、KCl 浓度、pH 值、超声功率进行了四因素三水平的正交试验,由极差分析和方差分析可知四个因素对后萃取率的影响顺序为 KCl 浓度>温度>PH 值>功率, KCl 浓度、温度和 PH 值对后萃取率影响均为极显著,在最优条件(pH 为 7, KCl 浓度为 1 mol/L, 功率为 210 W, 温度为 30 °C) 下进行验证试验,蛋白后萃取率为 81.44%±0.26%。可见,此工艺条件合理可行,可操作性和重现性好。

参考文献

- [1] 翁亚军,周小华.反胶束技术在生物工程中的研究进展[J].化学工业与工程,2004,21(4):272-275
- [2] Luisi P L, Henninger F, Joppich M, et al. Micelle solubilization of proteins in aprotic solvents and their spectroscopic characterization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1977, 74(1): 384
- [3] 磨礼现.利用反胶束技术萃取大豆蛋白的研究[J].郑州:郑州工程学院,2004
- [4] 李建武.生物化学试验原理和方法[M].北京:高等教育出版社,1994
- [5] 李润霞,陈复生,李里特.CAB/正庚烷/正己醇反胶束体系后萃大豆蛋白的研究[J].食品科学,2008,29(2):101-105
- [6] 高亚辉,陈复生,赵俊廷.反胶束萃取大豆蛋白后萃过程的动力学研究[J].农业工程学报,2007,23(7):206-211
- [7] 蔡宝玉,许林妹,彭远宝.反胶束萃取大豆蛋白的研究[J].中

- 国油脂,2004,29(6):37-39
- [8] 程小丽.同时分离大豆蛋白和油脂的反胶束体系研究[D].郑州:河南工业大学,2010
- [9] Jorge R, Maria L, Elefteria P, et al. Ultrasoundassisted emulsification-microextraction of phenolic preservatives in water [J]. Talanta, 2009, 79(5): 1387-1397

现代食品科技