

超声辅助 AOT 反胶束提取花生蛋白后萃取工艺的优化

高艳秀, 陈复生, 刘昆仑, 郭珍, 杨颖莹

(河南工业大学粮油食品学院, 河南郑州 450001)

摘要: 研究超声辅助 AOT (二-(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠)/异辛烷反胶束体系萃取花生蛋白的后萃取过程, 并分析各因素对蛋白后萃取率的影响, 通过正交试验得到了最佳后萃取工艺条件为: 缓冲溶液 pH 值为 8.5、萃取时间为 50 min、萃取温度为 40 °C、超声功率 240 W、KCl 浓度为 1.5 mol/L, 在此条件下, 蛋白后萃取率为 82.17±1.52%。

关键词: 超声波; 反胶束; 花生蛋白

文章篇号: 1673-9078(2013)2-311-314

Backward Extraction of Peanut Protein through SDS Reverse Micelles Assisted by Ultrasound

GAO Yan-xiu, CHEN Fu-sheng, LIU Kun-lun, GUO Zhen, YANG Ying-ying

(College of Food Science and Technology, He'nan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The backward of peanut protein was studied by AOT (sodium bis-(2-ethylhexyl) sulfosuccinate)/isooctane reverse micelles system from full-fat peanut powder with sonication. The main factors effecting reverse micelles extraction were analyzed. The orthogonal test design results showed that the optimum conditions of backward extraction were pH 8.5, extraction time 40 min, temperature 40 °C, ultrasonic power 240 W, and KCl concentration 1.5 mol/L, under which the extraction rate was 82.17±1.52%.

Key words: ultrasound; reverse micelles; peanut protein

我国是花生的生产大国, 总产量位居世界第一。传统的碱溶酸沉花生蛋白提取方法, 会产生大量的废水, 造成环境污染^[1]。用反胶束法萃取蛋白质是由瑞士的 Luisi^[2]等人首次提出的。反胶束是表面活性剂在非极性有机溶剂中自发形成的具有热力学稳定性的纳米级聚集体, 其内部形成一个极性核即“水池”, 蛋白质在某种作用力(静电、亲和、疏水)下进入极性核^[3]。当反胶束溶液与蛋白质水溶液或含蛋白质的固相接触后, 蛋白质可加溶于反胶束的“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, 通过改变水相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。

本研究利用超声辅助 AOT/异辛烷反胶束体系萃取花生蛋白, 研究了缓冲溶液 pH 值、萃取时间、萃

收稿日期: 2012-09-10

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

作者简介: 高艳秀(1987-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 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: 食品资源开发与利用

取温度、超声功率、KCl 浓度对蛋白后萃取率的影响, 并设计正交试验^[4], 确定了 AOT 反胶束体系萃取花生蛋白的最佳后萃取工艺条件。

1 材料与amp;方法

1.1 主要试验材料与试剂

全脂花生粉, 购于河南帝鑫食品有限公司; 二-(2-乙基己基)琥珀酸酯磺酸钠(AOT), 上海海曲化工厂; 异辛烷(AR), 天津市博迪化工有限公司; 卡尔费休甲乙液, 天津市科密欧化学试剂开发中心; 磷酸氢二钠, 磷酸二氢钾, 氯化钾, 天津市科密欧化学试剂有限公司。

1.2 主要试验仪器与设备

GL-20L 高速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器有限公司; ZSD-2J 型自动水分测定仪, 上海安亭电子仪器厂;

pH211 型酸度计, 意大利 HANNA; 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; 移液枪, Eppendorf 公司; UV-1901 型紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; KQ-250B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 测定方法^[5]

蛋白质含量测定, GB/T5009.5-2003;

油脂含量测定, GB/T5009.6-2003;

水分含量测定, GB/T5009.3-2003。

1.3.2 蛋白质标准曲线的制作

以牛血清蛋白为标准, 紫外分光光度计测定不同浓度标准蛋白液在 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。

1.3.3 AOT 反胶束溶液的配制

按浓度 0.06 g/mL 配制反胶束溶液: 称取 AOT, 置于 100 mL 的锥形瓶中, 同时加入有机溶剂异辛烷, 在磁力搅拌器上搅拌至 AOT 完全溶解, 加入适量(0.02~0.2 mL/mL 溶液)含 0.2 mol/L KCl, pH 为 8.5 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液, 使 W_o 值为 16, 放入摇床中振摇 2-4 h, 溶液透明则为反胶束, 反之则不是。

1.3.4 前萃取试验

取 1.3.3 配制的 AOT 反胶束溶液 50 mL 置于锥型瓶中, 加入 0.75 g 全脂花生粉, 在温度 40 °C、超声功率 180 W 的条件下超声 20 min, 然后以 3000 r/min 的转速离心分离 10 min。萃取体系分为 2 层, 上层为萃入蛋白质的 AOT 反胶束层, 下层为残渣, 除去残渣, 所得上清液用 UV-1901 型紫外分光光度计在 280nm 波长下测定蛋白质的浓度(以萃取前的反胶束溶液作为空白样)。可计算出蛋白前萃取率^[5]。蛋白前萃取率按如下公计算:

$$\text{前萃取率 (S\%)} = \frac{\text{反胶束溶液中的蛋白质的量(g)}}{\text{样品中的蛋白质的量(g)}} \times 100\%$$

1.3.5 后萃取试验

取一定体积 1.3.4 制备的前萃取液, 加入等体积、一定 KCl 浓度、pH 值的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液。在一定的温度、功率条件下, 超声一定时间, 然后在 5000 r/min 条件下离心 10 min, 用梨形分液漏斗分液, 下层水相即为后萃取液。用 UV-1901 型紫外分光光度计在 280 nm 波长下测定蛋白质的浓度(以缓冲溶液作为空白样)。可计算出蛋白后萃取率^[5]。蛋白后萃取率按如下公计算:

$$\text{后萃取率 (R\%)} = \frac{\text{水相中的蛋白质的量(g)}}{\text{反胶束溶液中蛋白质的量(g)}} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 原料主要组成成分

原料主要组成成分分析如表 1。

2.2 蛋白质定量分析标准曲线

蛋白质定量分析标准曲线如图 1 所示。

表 1 原料主要成分及质量分数 (%)

Table 1 The main composition and quality score in the raw material

样品	粗蛋白 (干基)	粗脂肪 (干基)	水分
全脂花生粉	29.84±0.07	46.15±0.002	4.55±0.07

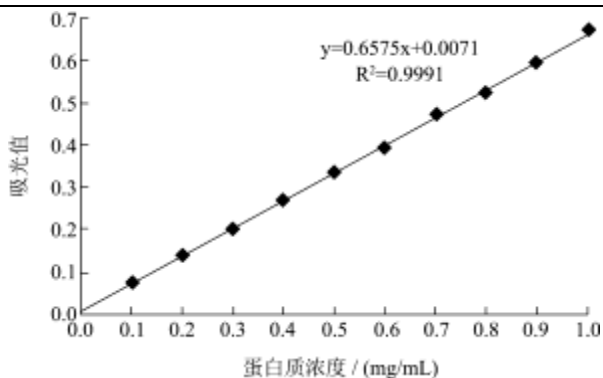


图 1 蛋白质定量分析标准曲线

Fig.1 The standard curve of protein quantitative analysis

2.3 缓冲溶液 pH 对花生蛋白后萃取率的影响

分别配制 pH 为 7、7.5、8、8.5、9、9.5, KCl 浓度为 1.5 mol/L 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液, 按照 1.3.5 进行操作, 在超声温度为 40 °C, 功率 240 W 的条件下超声 40 min, 试验结果如图 2 所示。

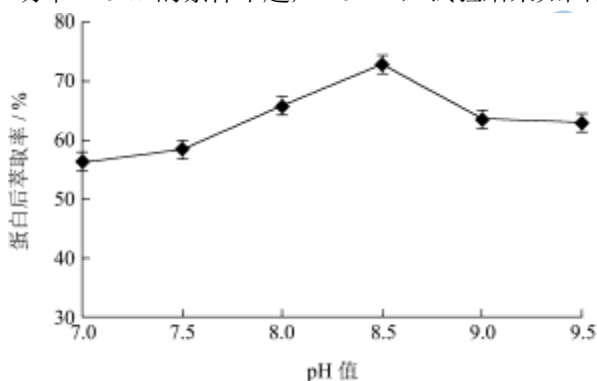


图 2 缓冲溶液 pH 值对花生蛋白后萃取率的影响

Fig.2 Effect of pH on the backward extraction efficiency of peanut protein

由图2可以看出, 当缓冲溶液pH从7到8.5之间变化时, 蛋白后萃取率有逐渐增大的趋势, 但是当pH继续增加时, 后萃取率明显减小, 然后趋于平衡, 在pH值为8.5时, 萃取率达到最大。原因是, 阴离子表面活性剂AOT的极性头朝向反胶束内部, 使反胶束的内壁带负电荷, 而蛋白质是一种两性电解质, 水相的pH值决定了蛋白质分子表面可电离基团的离子化程度。反萃取过程中, 水相的pH值高于蛋白质的等电点(pI), 蛋白质所带的电荷与反胶束内壁所带的电荷性质相同, 由于静电斥力, 使溶入反胶束的蛋白质反向萃取出来。且pH值越高蛋白质分子表面所带电荷的密度越大, 斥力越强, 蛋白质从反胶束内释放的速率越快, 因此后萃取率就越高^[6]。但是当pH值过高时, 蛋白质易变性, 会使蛋白质的萃取率降低。因此, 最佳pH选为8.5。

2.4 萃取时间对花生蛋白后萃取率的影响

配制 pH 为 8.5、KCl 浓度为 1.5 mol/L 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液, 按照 1.3.5 进行操作, 在超声温度为 40 °C, 功率 240 W 的条件下, 分别超声 10、20、30、40、50、60 min, 试验结果如图 3 所示。

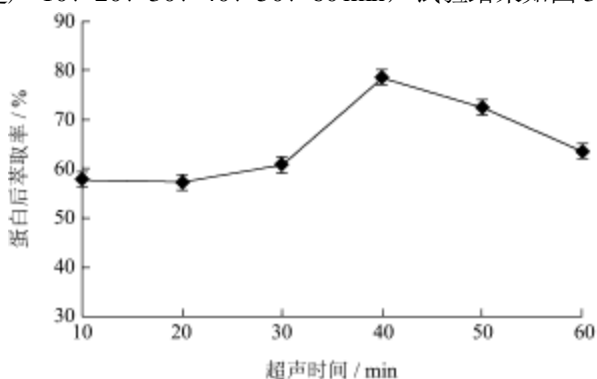


图 3 萃取时间对花生蛋白后萃取率的影响

Fig.3 Effect of extraction time on the backward extraction efficiency of peanut protein

由图3可以看出,随着萃取时间的延长,蛋白后萃取率先逐渐增大,再迅速减小。萃取时间为40min时,蛋白后萃取率达到最大值。说明受后萃取水相萃取能力的限制,此时萃取已接近平衡。继续增加萃取时间,不但蛋白萃取率下降,而且耗时耗材,从经济实用的角度考虑,选取40 min作为后续的萃取时间。

2.5 萃取温度对花生蛋白后萃取率的影响

配制 pH 为 8.5、KCl 浓度为 1.5 mol/L 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液,按照 1.3.5 进行操作,在超声时间为 40min,功率 240W 的条件下,分别设定超声温度为 25、30、35、40、45、50℃,试验结果如图 4 所示。

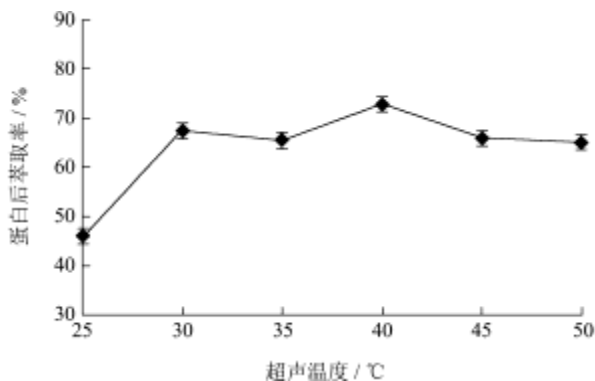


图 4 萃取温度对花生蛋白后萃取率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on the backward extraction efficiency of peanut protein

由图 4 中可以看出,随着萃取温度的升高,蛋白后萃取率逐渐增大。当温度达到 44℃ 时,蛋白后萃取率达到最大值,继续升高温度,后萃取率有所减小。其原因是温度升高时,分子运动速率加快,反胶束与水相之间的分子运动也加快,传质推动力增大,加快了蛋白质的萃取,因此萃取率升高。当温度继续升高,萃取率变化不大,此时萃取已经达到平衡,另外,温度过高会导致蛋白变性。故本试验最佳萃取温度选为 40℃^[7]。

2.6 超声功率对花生蛋白后萃取率的影响

配制 pH 为 8.5、KCl 浓度为 1.5 mol/L 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液,按照 1.3.5 进行操作,在超声时间为 40 min、温度 40℃ 的条件下,分别设定超声功率为 150、180、210、240、270、300 W,试验结果如图 5 所示。

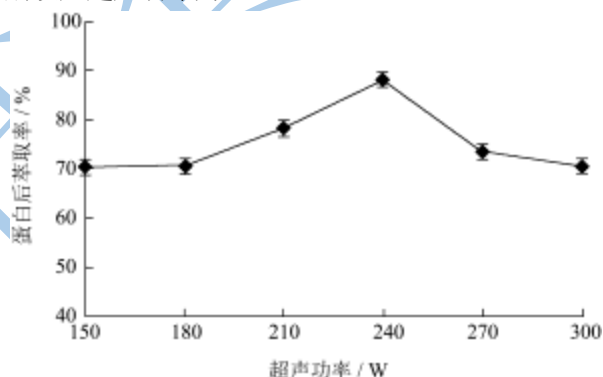


图 5 超声功率对花生蛋白后萃取率的影响

Fig.5 Effect of extraction power on the backward extraction efficiency of peanut protein

由图 5 可以看出,随着超声功率的增大,蛋白后萃取率先逐渐增大然后减小。当功率达到 240 W 时,蛋白后萃取率达到最大值。原因是在后萃取过程中存在较大的界面阻力^[8],使用超声波可以起到强化作用,超声的空化效应和机械效应均可增大界面间的湍动程度^[9],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,因此可以促进蛋白质的浸出和传质,提高蛋白质的萃取率。但是,当超声功率足够大时,增加了全脂花生粉中油脂的运动,从而阻碍了蛋白质的渗出^[10]。因此,本试验选取超声功率为 240 W。

2.7 KCl 浓度对花生蛋白后萃取率的影响

分别配制 pH 为 8.5、KCl 浓度为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mol/L 的 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲溶液,按照 1.3.5

进行操作, 在超声时间为 40 min、温度 40 °C、功率 240 W 的条件下进行试验, 试验结果如图 6 所示。

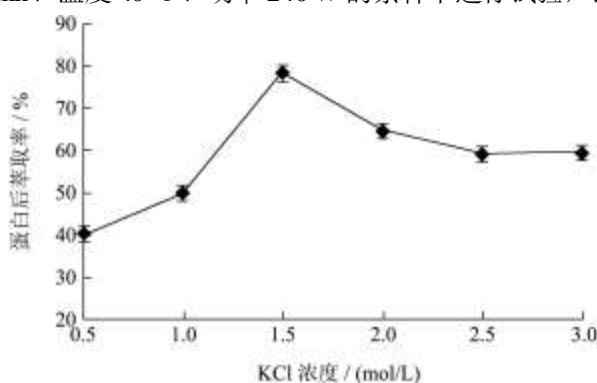


图 6 KCl 浓度对花生蛋白后萃取率的影响

Fig.6 Effect of KCl concentration on the backward extraction efficiency of peanut protein

由图 6 可以看出, 当 KCl 浓度从 0.5 mol/L 增加到 1.5 mol/L 的过程中, 蛋白后萃取率迅速增大, 当 KCl 浓度为 1.5 mol/L 时, 后萃取率最大。随着 KCl 浓度继续增大, 蛋白后萃取率逐渐减小, 并趋于平稳。这是由于随着离子浓度的增大, 反胶束内表面的双电层变薄, 静电引力也就减弱; 另一方面, 减小了表面活性剂极性头之间的排斥作用, 导致反胶束变小^[11]。这两方面的效应都会使蛋白质在反胶束中的溶解性下降, 更容易从反胶束中反萃出来, 从而后萃取率得到提高。但是 KCL 离子浓度越大, 反胶束的 W_o 值则会越小, 使得反胶束极性核所包含的蛋白质随着减少的水分而被带出, 故后萃取率开始减小; 另外, 盐浓度过高时, 对蛋白质会产生盐析作用, 也会导致蛋白质后萃取率降低。故本实验选取 KCL 浓度为 1.5 mol/L^[12]。

2.8 正交试验结果与分析

通过单因素实验可知, 影响蛋白后萃取率的主要因素有缓冲溶液 pH 值、萃取时间、萃取温度、超声功率、KCl 浓度。在单因素实验的基础上, 为了进一步确定萃取的最优工艺条件及影响因素的主次, 采用正交实验设计方法来优化, 确定了 $L_{16}(4^4)$ 正交水平与因素, 见表 2, 以蛋白后萃取率为目标值, 正交试验设计、结果及分析见表 3, 方差分析见表 4。

3 结论

3.1 通过试验可知, 利用反胶束从全脂花生粉中提取花生蛋白是可行的, 与碱溶酸沉法相比, 工艺简单, 能耗低, 无污染, 且条件温和, 蛋白不易变性, 为花生蛋白的进一步开发利用提供了一个新的途径。

3.2 在单因素试验的基础上, 设计正交试验进行工艺优化, 由方差分析可知, 各因素对花生蛋白后萃取率的影响作用大小顺序依次为 KCl 浓度 > pH 值 > 超声功

率 > 萃取时间 > 萃取温度。

3.3 AOT 反胶束萃取花生蛋白的最佳后萃取工艺条件为: pH 值 8.5, KCl 浓度 1.5 mol/L, 温度 40 °C, 时间 50 min, 功率 240 W。在此最佳工艺条件下, 花生蛋白后萃取率为 $82.17\% \pm 1.52\%$ 。

表 2 正交试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of the orthogonal test

试验号	A (pH)	B [KCl 浓度 / (mol/L)]	C (温度 / °C)	D (时间 / min)	E (功率 / W)
1	8	1	35	35	210
2	8.5	1.5	40	40	240
3	9	2	45	45	270
4	9.5	2.5	50	50	300

表 3 正交试验设计及结果

Table 3 Design and results of the orthogonal test

编号	A	B	C	D	E	蛋白萃 取率/%
1	1	1	1	1	1	65.84
2	1	2	2	2	2	74.51
3	1	3	3	3	3	65.05
4	1	4	4	4	4	60.77
5	2	1	2	3	4	71.29
6	2	2	1	4	3	80.92
7	2	3	4	1	2	74.21
8	2	4	3	2	1	66.22
9	3	1	3	4	2	69.93
10	3	2	4	3	1	70.66
11	3	3	1	2	4	64.45
12	3	4	2	1	3	63.27
13	4	1	4	2	3	63.49
14	4	2	3	1	4	68.92
15	4	3	2	4	1	62.68
16	4	4	1	3	2	59.42
k ₁	66.543	67.638	67.657	68.060	66.350	
k ₂	73.160	73.752	67.938	67.168	69.517	
k ₃	67.078	66.597	67.530	66.605	68.183	
k ₄	63.627	62.420	67.282	68.575	66.358	
R	9.533	11.332	0.656	1.970	3.167	
优方案	A ₂	B ₂	C ₂	D ₄	E ₂	

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, Giomini M, Pileni M P, et al. Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules [J]. Biochimica Biophysica Acta., 1988,947: 209-246
- [3] 高艳秀,陈复生,布冠好,等.反胶束技术同时分离蛋白和油脂的研究进展[J].农业机械,2011(12):49-52
- [4] 王晓琴,张学武.响应面法优化小球藻蛋白质提取工艺[J].现代食品科技,2012,28(3):300-303
- [5] 王肇慈.粮油食品品质分析[M].北京:中国轻工业出版社,2000
- [6] 赵晓燕,薛文通,陈复生,等.影响反胶束体系萃取蛋白能力的因素及机理[J].农业工程学报,2009,25(11):354-359
- [7] 陈银鹤,郑竟成.反胶团萃取菜籽蛋白质和油的反萃工艺研究[J].农业机械,2008,11:69-71
- [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] 高亚辉,陈复生,赵俊廷,等.反胶束萃取大豆蛋白反萃过程的动力学研究[J].农业工程学报,2007,23(7):206-211
- [10] 赖富饶,李臻,吴晖,等.甜玉米芯多酚的超声提取工艺优化[J].现代食品科技,2012,28(1):52-55
- [11] 陈茂深,朱科学.反胶束法提取花生蛋白后萃工艺的优化[J].油料蛋白,2010,35(1):24-27
- [12] 刘海远,布冠好,陈复生,等.CTAB 反胶束反萃取大豆蛋白的研究[J].农业机械,2011,10:71-74