

# 碱提酸沉法提取黄秋葵籽蛋白的工艺条件优化

李加兴<sup>1</sup>, 向东<sup>1</sup>, 周炎辉<sup>2</sup>, 黄诚<sup>1</sup>

(1.吉首大学食品科学研究所, 湖南 吉首 416000; 2.湖南奇异生物科技有限公司, 湖南 长沙 410008)

**摘要:**以黄秋葵籽为原料, 采用碱提酸沉法提取其蛋白质, 对提取条件进行优化。首先采用单因素试验考察料液比、提取时间、提取温度、pH值等因素对黄秋葵籽蛋白提取率的影响, 再以此四因素进行 $L_9(3^4)$ 正交试验以确定最佳工艺条件。结果表明: 碱提黄秋葵籽蛋白的最佳工艺条件为料液比1:30(g/mL)、提取时间60min、提取温度50℃、pH9.0, 在此工艺条件下黄秋葵籽蛋白提取率可达72.3%。

**关键词:**黄秋葵; 碱提酸沉法; 蛋白质; 正交试验; 工艺条件

## Optimization of Alkaline Extraction and Acid Precipitation for the Extraction of Okra Seed Protein

LI Jia-xing<sup>1</sup>, XIANG Dong<sup>1</sup>, ZHOU Yan-hui<sup>2</sup>, HUANG Cheng<sup>1</sup>

(1. Institute of Food Science, Jishou University, Jishou 416000, China;

2. Hunan Amazing Grace Biotechnology Co. Ltd., Changsha 410008, China)

**Abstract:** The extraction process for okra seed protein by alkaline extraction and acid precipitation method was optimized. Four process conditions including solid/solvent ratio, extraction time and temperature and solvent pH were investigated for their effect on the extraction efficiency of okra seed protein and optimized using an  $L_9(3^4)$  orthogonal array design. Results showed that the optimal extraction conditions were solid/solvent ratio of 1:30 (g/mL), extraction time of 60 min, extraction temperature of 50 °C, and extraction pH of 9.0. Under these conditions, the yield of okra seed protein was 72.3%.

**Key words:** okra; alkaline extraction and acid precipitation; protein; orthogonal array design; process conditions

中图分类号: TS201.2

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)20-0023-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201320005

黄秋葵(*Hibiscus esculentus* L.), 别名秋葵夹、羊角豆等, 为锦葵科秋葵属一年生草本植物, 原产于非洲, 20世纪引入中国, 目前在我国各地均有种植<sup>[1]</sup>, 而且种植规模还在不断扩大, 常见的品种有长绿、绿星、琦玉五角、东京五角、新东京5号、清福、五福、三乡等<sup>[2]</sup>。据测定<sup>[3]</sup>, 每100g干燥的嫩黄秋葵果实中含蛋白质22.98g、总糖19.92g、脂肪9.4g、多糖2g、黄酮2.56g; 每100g干燥的老果中含蛋白质15.78g、总糖9.48g、脂肪14.36g、多糖1.1g、黄酮1.48g。其种子中的蛋白含量更是高达26.82%, 且富含人体必需氨基酸<sup>[4]</sup>, 极具开发价值。

植物蛋白资源丰富、廉价, 并具有独特的生理功能, 对其开发利用已成为当今的热点<sup>[5]</sup>。可用于提取植物蛋白的方法很多, 如碱提酸沉法、酶法、超声波辅助提取法、微波法等, 其中碱提酸沉法所需设备简单且便于操作, 更适用于提取植物蛋白的工业化生产<sup>[6-13]</sup>。因此, 本研究对黄秋葵籽蛋白的碱提酸沉提取工艺进行优化, 以期开发蛋白新资源提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黄秋葵籽, 产于湖南浏阳, 经检测其蛋白质含量为26.13%。

石油醚(60~90℃)、无水碳酸钠、邻苯二甲酸氢钾、磷酸、无水乙醇、牛血清蛋白、考马斯亮蓝-G250、浓盐酸、浓硫酸、无水硫酸铜、硼酸、氢氧化钠、硫酸钾均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

KDN-2C型定氮仪 上海纤检仪器有限公司;  
FZ102型微型植物粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司;  
SXT-02型索氏抽提装置 上海洪纪仪器设备有限公司;  
LXJ-IIB飞鸽牌离心机 上海安亭科学仪器厂;  
雷磁PHS-J4A型实验室pH计 上海精密科学仪器有限公司;  
723可见分光光度计 上海菁华科技有限公司;  
二列四孔HH.S21-Ni4恒温水浴锅 上海寰熙医疗器械有限

收稿日期: 2013-06-28

基金项目: 湖南省高校科技创新团队支持计划项目(湘教通[2010]212号)

作者简介: 李加兴(1969—), 男, 教授, 博士, 研究方向为植物资源开发利用与功能性食品。E-mail: jslijiaxing@sohu.com

公司; 101-2AB型电热鼓风干燥箱 天津市泰斯特仪器有限公司; JA-5103N高精度电子天平 上海民桥精密科学仪器有限公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 黄秋葵粗蛋白的制备

黄秋葵籽→干燥→粉碎→脱脂→碱提→离心沉淀→调pH值至中性→沉淀干燥→黄秋葵粗蛋白

将黄秋葵籽干燥后粉碎, 以石油醚为溶剂, 用索氏抽提装置脱除其中的油脂, 低温烘干备用。称取脱脂粉末置于烧杯中, 按一定的料液比加入蒸馏水, 并加碱液调整pH值, 在一定的温度和时间条件下提取蛋白, 5000r/min离心20min后去除籽粕, 收集上清液, 上清液加1mol/L稀盐酸调节pH值至蛋白质等电点4.0, 静置2~3h, 离心收集沉淀, 干燥后即得蛋白粗品。

#### 1.3.2 影响黄秋葵籽蛋白提取率的单因素试验

##### 1.3.2.1 料液比对黄秋葵籽蛋白提取率的影响

在pH10.0、提取时间90min、提取温度40℃条件下, 分别按照料液比为1:10、1:20、1:30、1:40、1:50(g/mL)进行黄秋葵籽蛋白质的提取, 探讨料液比对其蛋白提取率的影响。

##### 1.3.2.2 提取时间对黄秋葵籽蛋白提取率的影响

在pH10.0、提取温度40℃、料液比1:30(g/mL)条件下, 分别提取40、50、60、70、80min, 探讨提取时间对黄秋葵籽蛋白提取率的影响。

##### 1.3.2.3 提取温度对黄秋葵籽蛋白提取率的影响

在pH10.0、提取时间60min、料液比1:30(g/mL)的条件下, 控制提取温度分别为30、40、50、60、70℃, 探讨提取温度对黄秋葵籽蛋白提取率的影响。

##### 1.3.2.4 pH值对黄秋葵籽蛋白提取率的影响

在提取温度50℃、料液比1:30(g/mL)、提取时间60min的条件下, 分别调节提取液的pH8.0、9.0、10.0、11.0、12.0, 探讨pH值对黄秋葵籽蛋白提取率的影响。

#### 1.3.3 黄秋葵籽蛋白提取工艺优化试验

在单因素试验的基础上, 对料液比、提取时间、提取温度和pH值采用正交试验进行优化, 以确定提取黄秋葵籽蛋白的最佳工艺条件, 正交试验因素水平见表1。

表1 正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels for orthogonal array design

水平	A料液比(g/mL)	B提取时间/min	C提取温度/℃	D pH
1	1:20	50	40	8.0
2	1:30	60	50	9.0
3	1:40	70	60	10.0

#### 1.3.4 蛋白质含量的测定

采用微量凯氏定氮法测定黄秋葵籽蛋白质含量, 采用考马斯亮蓝法测定上清液中的蛋白质含量<sup>[14]</sup>。

#### 1.3.4.1 标准曲线的制作

分别取0.1mg/mL牛血清蛋白标准溶液0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL, 置于带塞试管中, 加水至1.0mL, 分别加入5.0mL考马斯亮蓝G-250, 充分振荡混合, 放置5min后, 于595nm波长处测吸光度<sup>[15]</sup>。以蛋白质含量为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得线性回归方程为 $y=6.5743x-0.007(R^2=0.9995)$ 。

#### 1.3.4.2 样品测定

将离心后的黄秋葵籽蛋白溶液5mL定容到100mL, 从中取1mL再次定容到50mL后, 取1mL溶液按上述步骤测定吸光度A, 根据标准曲线计算出样品蛋白质含量(mg/g)。

#### 1.3.4.3 蛋白质提取率的计算

$$\text{蛋白质提取率/\%} = \frac{\text{提取液蛋白质量/g}}{\text{脱脂黄秋葵籽蛋白质量/g}} \times 100$$

### 1.4 数据处理

每组实验重复3次, 结果取平均值。采用SAS v6.12软件对实验数据进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 料液比对黄秋葵籽蛋白提取率的影响

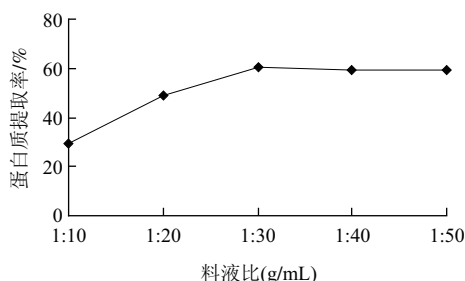


图1 料液比对黄秋葵籽蛋白提取率的影响

Fig.1 Effect of solid/solvent ratio on the yield of okra seed protein

由图1可知, 黄秋葵籽蛋白提取率随着提取液用量的增大而逐渐提高。在料液比为1:10(g/mL)时, 由于溶液的黏度较大, 分子扩散速率较低, 体系分散不均匀, 导致体系pH值不均匀, 影响了提取液中蛋白质的溶出, 因此蛋白质的提取率较低<sup>[6]</sup>。当料液比为1:30(g/mL)时, 提取率达到最大。若再继续增加提取液用量, 对提取率无明显影响。因此, 料液比以1:30(g/mL)为宜。

### 2.2 提取时间对黄秋葵籽蛋白提取率的影响

由图2可知, 随着提取时间的延长, 黄秋葵籽蛋白提取率逐渐增加。当提取时间为60min时, 黄秋葵籽蛋白的提取率达到最大。若继续延长提取时间, 提取率增幅较小。因此, 提取时间以60min左右为宜。

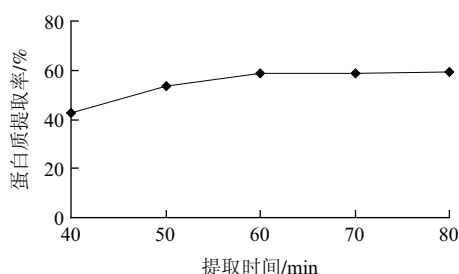


图2 提取时间对黄秋葵籽粕蛋白提取率的影响  
Fig.2 Effect of extraction time on the yield of okra seed protein

### 2.3 提取温度对黄秋葵籽蛋白提取率的影响

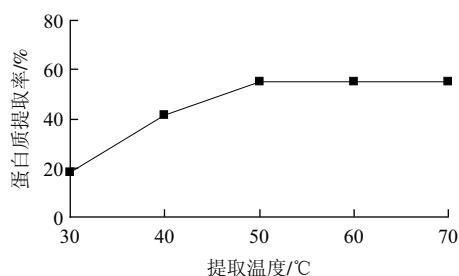


图3 提取温度对黄秋葵籽粕蛋白提取率的影响  
Fig.3 Effect of extraction temperature on the yield of okra seed protein

由图3可知,黄秋葵籽蛋白提取率随着温度的升高而增加,当温度为50℃时,提取率达到最高<sup>[16]</sup>。这是由于温度的上升使蛋白质的构象发生改变,分子的立体结构变得伸展,有利于蛋白质分子和水分子的相互作用,使蛋白质的溶解性增大,提高了黄秋葵籽蛋白的提取率。提取温度继续升高时,由于维持蛋白质空间构象的次级键被破坏,促进了蛋白质分子间相互结合而形成沉淀<sup>[17-19]</sup>,提取率不再增加。因此,提取温度以50℃左右较为适宜。

### 2.4 pH值对黄秋葵籽蛋白提取率的影响

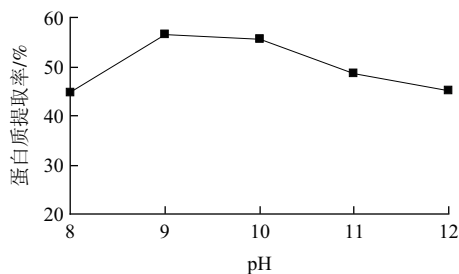


图4 pH值对黄秋葵籽蛋白提取率的影响  
Fig.4 Effect of solvent pH on the yield of okra seed protein

由图4可知,当提取液pH<9.0时,黄秋葵籽蛋白提取率随着pH值的升高而升高。这是因为黄秋葵籽蛋白在碱性环境中带负电荷,蛋白质分子间相互排斥,使溶液分散性、溶解性较好,提高了蛋白提取率<sup>[20]</sup>。此外,

碱液对蛋白质分子的次级键有破坏作用,使蛋白质分子表面具有相同电荷,也起到了增溶的作用。当pH>9.0时,由于蛋白质过度水解,导致了蛋白质提取率反而有所降低<sup>[21-22]</sup>。

### 2.5 黄秋葵籽蛋白的提取工艺优化

碱提酸沉法提取黄秋葵籽蛋白的工艺优化正交试验结果见表2,方差分析见表3。

表2  $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果  
Table 2  $L_9(3^4)$  orthogonal array design and results

试验号	A	B	C	D	蛋白质提取率/%			
					I	II	III	平均值
1	1	1	1	1	53.93	56.71	56.04	55.56
2	1	2	2	2	71.31	73.15	70.34	71.60
3	1	3	3	3	60.33	59.98	63.77	61.36
4	2	1	2	3	65.05	68.40	70.46	67.97
5	2	2	3	1	65.25	63.71	61.60	63.52
6	2	3	1	2	61.21	61.78	63.16	62.05
7	3	1	3	2	58.98	61.32	60.01	60.04
8	3	2	1	3	58.54	61.75	59.98	60.09
9	3	3	2	1	50.12	53.24	52.64	52.00
$k_1$	62.84	61.19	59.23	57.02				
$k_2$	64.51	65.07	63.85	64.56				
$k_3$	57.37	58.47	61.64	63.14				
R	7.14	6.60	4.62	7.54				
最优方案	$A_2$	$B_2$	$C_2$	$D_2$				

表3 方差分析

Table 3 Analysis of variance for the experimental results of orthogonal array design

因素	自由度	离均差平方和	方差	F值	P值
A	2	249.15	124.57	41.45	0.0001
B	2	197.89	98.95	32.92	0.0001
C	2	96.27	48.13	16.02	0.0001
D	2	289.74	144.87	48.20	0.0001
误差	18	54.10	3.01		

由表2极差R值分析可知,各因素对黄秋葵籽蛋白提取效果的影响大小顺序依次为 $D>A>B>C$ ,即pH值>料液比>提取时间>提取温度,最佳工艺组合为 $A_2B_2C_2D_2$ 。由于该工艺条件组合不在正交试验表中,故开展3组平行验证实验,得出黄秋葵籽蛋白提取率平均为72.3%。由表3方差分析可知,各因素对黄秋葵籽蛋白提取率均有极显著影响。因此,黄秋葵籽蛋白最佳提取条件为 $A_2B_2C_2D_2$ ,即料液比1:30(g/mL)、提取时间60min、提取温度50℃、pH9.0。

## 3 结论

采用碱提酸沉法提取黄秋葵籽蛋白,pH值对蛋白提取率的影响最大,其次为料液比与提取时间,而提取温度的影响最小;碱提黄秋葵籽蛋白的最佳工艺条件为

料液比1:30(g/mL)、提取时间60min、提取温度50℃、pH9.0, 提取率可达72.3%。本实验结果可为规模化提取黄秋葵蛋白提供参考, 但其理化性质有待进一步深入研究。此外, 由于碱法也常用于多糖等物质的提取, 因此在后续研究中也应对黄秋葵蛋白的纯化工艺进行探讨。

#### 参考文献:

- [1] 董彩文, 梁少华. 黄秋葵的功能特性及综合开发利用[J]. 食品研究与开发, 2007, 28(5): 180-182.
- [2] 许如意, 肖日升, 范荣, 等. 三亚市黄秋葵品种引进比较试验[J]. 广东农业科学, 2010, 37(11): 102-103.
- [3] 黄阿根, 陈学好, 高云中, 等. 黄秋葵的成分测定与分析[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 451-455.
- [4] 詹忠根, 李煜键, 张宇. 黄秋葵种子主要营养成分测定[J]. 营养学报, 2012, 34(2): 191-192.
- [5] 陈贵, 堂赵霖. 植物蛋白的营养生理功能及开发利用[J]. 食品工业科技, 2004, 25(9): 137-140.
- [6] 王振宇, 杨丽娜, 李宏菊. 碱提酸沉提取红松仁分离蛋白的工艺研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008, 20(6): 71-72.
- [7] 高兴, 李桂娟. 碱提酸沉法提取燕麦蛋白的工艺研究[J]. 中国西部科技, 2010, 9(31): 32-33.
- [8] 杨伟强, 禹山林, 袁涛. 碱提酸沉法制取花生分离蛋白工艺研究[J]. 花生学报, 2008, 37(4): 12-13.
- [9] 陆晨, 张士康, 朱科学, 等. 碱提酸沉法提取茶叶蛋白质的研究[J]. 现代食品科技, 2011, 27(6): 12-13.
- [10] 周丽卿, 杜双奎, 赵佳, 等. 响应面法优化鹰嘴豆蛋白提取工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 66-70.
- [11] 赵节昌. 响应面法优化酸枣仁蛋白提取工艺[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 134-138.
- [12] 孙月娥, 明鸣, 王卫东, 等. 巴旦木蛋白提取工艺[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 19-23.
- [13] 王丰俊, 杨朝晖, 马磊, 等. 响应面法优化核桃蛋白提取工艺研究[J]. 中国油脂, 2011, 36(3): 33-37.
- [14] 赵玉红, 李莉. 超声波辅助提取松仁蛋白的工艺研究[J]. 中国林副特产, 2008(1): 6-8; 90.
- [15] 杨正坤, 王秀丽, 龙施华, 等. 考马斯亮蓝染色法测定大豆茎叶中蛋白质含量[J]. 湖南农业科学, 2012, 51(20): 21-22.
- [16] 陈季旺, 姚惠源, 张小勇, 等. 米糠可溶性蛋白的提取工艺和特性研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(2): 46-50.
- [17] JEBRAIL M J, WHEELER A R. Digital microfluidic method for protein extraction by precipitation[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(1): 330-335.
- [18] BERNARDI R, NEGRI A, RONCHI S, et al. Isolation of the epithio-specifier protein from oil-rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) seed and its characterization[J]. FEBS Letters, 2000, 467(2/3): 296-298.
- [19] 伍小华, 刘丹, 陈玉霞, 等. 栀子渣中植物蛋白提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 336-338.
- [20] 李艳, 郑亚军. 杏仁分离蛋白提取工艺的研究[J]. 现代食品科技, 2007, 23(1): 57-59.
- [21] 刘顺湖, 李桂菊, 王晓强, 等. 大豆蛋白质提取工艺中酸沉pH值的简单效应分析[J]. 济宁学院学报, 2010, 31(6): 37-41.
- [22] 阚俊鹏, 阮长青, 王立东, 等. 大麦芽根蛋白提取工艺条件优化[J]. 食品科学, 2012, 33(22): 95-98.