

山西药科职业学院课题成果公报

公报登记号：SXYK201906

单位名称：山西药科职业学院

课题名称：合草叶蛋白的碱溶酸沉法提取工艺研究

课题负责人：董双涛 讲师 山西药科职业学院

课题批准号：20151117

课题成员：李宝霞等

正文：

一、内容与方法

（一）研究内容

本课题的研究内容：

采用碱溶酸沉法提取聚合草的粗蛋白是本研究的一个创新点，该方法简单，安全，适合工业化生产。通过此项研究的开展，也为聚合草的开发利用提供新的思路。

（二）研究方法

聚合草采自山西农业大学家属院，将鲜草洗净，经60℃恒温箱烘干后粉碎。

1. 基本营养成分的测定

参照 GB5009.5-2010 第一法凯氏定氮法测定聚合草干叶中蛋白质含量；参照 GB/T 5009.88-2008 酶-重量法测定总膳食纤维测定；参照 GB/T 5009.6-2003 第一法索氏抽提法测定脂肪；采用 GB 5009.4-2010 灼烧法测定灰分；采用 GB 5009.3-2010 第一法直接干燥法测定水分。

2. 聚合草粗蛋白提取

(1) 聚合草粗蛋白提取工艺流程

试验选取聚合草的茎和叶，用蒸馏水进行清洗，洗涤后经 37℃ 恒温烘干，经研磨进行粉碎，按照料液比加入一定浓度的 NaOH 溶液在一定的温度下浸提，浸提一定时间后在 5000r/min 下低温离心，离心后取上清液调 pH 至聚合草蛋白质等电点进行蛋白质沉淀，再次在 5000r/min 下低温离心取沉淀，沉淀经低温冷冻干燥得蛋白质。

(2) 溶液中粗蛋白测定方法

吸取 0.1mL 离心上清液，进行 100 倍稀释，加入 5mL 考马氏亮蓝 G-250 染色剂，充分振荡混匀，静置 5 min 后在 595 nm 的波长下测定吸光值。考马氏亮蓝 G-250 染色法原理是考马氏亮蓝 G-250 具有红色和青色两种色调、在酸性溶液中游离状态下为棕红色，当它通过疏水作用与蛋白质结合后，变成蓝色，最大吸收波长从 465 nm 转移到 595 nm 处，在一定的范围内，蛋白质含量与 595 nm 的吸光度成正比，测定 595 nm 处光密度值的增加即可进行蛋白质的定量。

(3) 聚合草粗蛋白等电点的测定

称取 5g 样品，料液比为 1:40，用 NaOH 调 pH 值至 10。温度 30℃ 下搅拌浸提 1 h。离心 (5 000 r/min, 20 min) 后分别取提取液 10 mL 装入 8 支离心管中，用 HCL 调节各个离心管的 pH 值，使得 1~8 个离心管中的 pH 值依次递增，静置 10 min 后离心，干燥称重，得到各个离心管中的粗蛋白沉淀量，根据沉淀量多少确定其最适 pH 值。

(4) 蛋白质提取率的测定和计算

参见 Bradford 方法，配制考马斯亮兰 G-250 蛋白显色液，其组成为：0.01% (w / v) 考马斯亮兰 G-250，4.7% (w / v) 乙醇，8.5% (w / v) 磷酸。以牛血清白蛋白为标准蛋白作标准曲线，取待分析的蛋白溶液 0.1 mL 进行 10 倍稀释再加入 5.0 mL 考马斯亮兰 G-250 显色液，

漩涡振荡混合，放置 5 min 后，用分光光度计测其吸光度值，根据标准曲线即知待分析蛋白液中蛋白的浓度。

(5) 单因素试验

$$\text{蛋白提取率} = \frac{\text{提取液中蛋白质含量}}{\text{粗蛋白含量}} \times 100\%$$

NaOH 溶液浓度对聚合草粗蛋白提取率的影响

选取浸提温度为 30℃，固液比为 1:40，NaOH 溶液浓度 (mol/L) 分别设为：0.1、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35，混匀后提取 60min，离心后取 0.1mL 上清液稀释 100 倍测定 595nm 下吸光值，并计算蛋白质含量。

固液比对聚合草粗蛋白提取率的影响

分别选取固液比为 1:30、1:40、1:50、1:60、1:70，震荡提取 60min，温度和 NaOH 溶液浓度分别为 30℃ 和 0.12mol/L，离心后取 0.1mL 上清液稀释 100 倍测定 595nm 下吸光值，并计算蛋白质含量。

浸提温度对聚合草中粗蛋白提取率的影响

选取固液比为 1:40，NaOH 溶液浓度为 0.12mol/L，分别在 30℃、40℃、50℃、60℃ 和 70℃ 下浸提时间 60min，离心后取 0.1mL 上清液稀释 100 倍测定 595nm 下吸光值，并计算蛋白质含量。

浸提时间对聚合草中粗蛋白提取率的影响

选取浸提温度为 60℃，固液比为 1:40，NaOH 溶液浓度为 0.12mol/L 条件下混匀后浸提 20min、40min、60min、80min、100min 和 120min，离心后取 0.1mL 上清液稀释 100 倍测定 595nm 下吸光值，并计算蛋白质含量。

(6) 正交试验设计

为了优化提取条件，在单因素分析的基础上，以表中所列的影响

蛋白质提取率的pH等为因素进行L₉ (3⁴) 正交试验。

| 水平 | 因 素 | | | |
|----|------------------|--------------|-----------|------------|
| | A NaOH浓度 (mol/L) | B 固液比 (g/mL) | C 温度 (°C) | D 时间 (min) |
| 1 | 0.09 | 1:40 | 50 | 80 |
| 2 | 0.12 | 1:55 | 60 | 100 |
| 3 | 0.15 | 1:70 | 70 | 120 |

3. 聚合草叶蛋白氨基酸组成测定和评价方法

用氨基酸自动分析仪采用 GB/T 5009.124-2003 法进行蛋白质氨基酸组分分析，并通过 EAAI 值显示待测蛋白质中所有必需氨基酸与标准蛋白质必需氨基酸的接近程度。

二、结论与对策

1. 聚合草为天然无毒食用叶蛋白资源，叶蛋白含量高达24.3%，膳食纤维含量为29.52%，脂肪含量为1.2%，碳水化合物含量为19.3%，因此营养丰富，是一种具有开发价值的绿色食品和优良的蛋白质和膳食纤维提取原料。

2. 通过实验验证，聚合草叶蛋白的等电点为3.51，此时蛋白的沉淀量最大。

3. 采用“碱溶酸沉”提取聚合草叶蛋白，通过正交试验优化碱提工艺，以蛋白提取率为指标确定最佳碱提条件为：NaOH溶液浓度为0.15 mol/L，固液比为1:40，浸提时间为100min，浸提温度为60°C，在此工艺条件下提取率达63.42%。

4. 聚合草氨基酸评分高，其氨基酸组成较平衡，氨基酸组成(40.37)高于FAO/WHO模式标准蛋白(35.0)，低于鸡蛋蛋白(49.7)模式。其特征性氨基酸为谷氨酸、天门冬氨酸、亮氨酸。第一限制氨基酸为蛋氨酸，多数植物中缺乏的赖氨酸在聚合草中含量较高。

三、成果与影响

课题研究的前期，课题组完成了四篇论文的撰写，《TCA-丙酮沉淀法提取聚合草叶蛋白的研究》《聚合草粗多糖提取工艺研究》《聚合草粗蛋白的酸化加热法提取工艺研究》《聚合草多糖对油脂抗氧化作用的研究》为本课题研究提供理论支撑。

课题研究过程中，课题组撰写一篇文章《ICP-MS 法测定聚合草根中六种无机元素的含量》。

四、改进与完善

实验目前进行到粗蛋白的提取，在后续实验中期望对粗蛋白进行深加工，拓展其用途。