

## 竹叶蛋白的分离提取及其副产物的利用

李 勇 宋 慧

(徐州工程学院食品工程系, 徐州, 221008)

**摘 要** 研究了浸提时间对竹叶中粗蛋白浸提量及纯度的影响, 得出了最佳浸提时间为 30 min, 然后以打浆时水的温度、pH 值、料液比为因素, 采用正交实验法确定了浸提最佳工艺条件为: 温度 11℃、pH 9、料液比(g:mL) 为 1:20。在此基础上探讨了酶解对提取叶蛋白的影响。另外, 研究了从副产物——叶饼中提取类黄酮的工艺, 试验以体积分数 75% 的丙酮作为萃取剂, 萃取结果表明, 类黄酮粗制品的提取率为 98.276 mg/g, 纯度为 8.12%。用 HPD-700 大孔树脂对黄酮粗制品作精制处理, 最后得到黄酮精制品提取率为 14.851 mg/g, 纯度为 22.09%。

**关键词** 分离, 提取, 粗蛋白, 副产物, 黄酮

竹子属于禾本科竹亚属多年生常绿植物。目前, 关于竹叶方面的研究仅限于糖类、叶绿素、黄酮、竹叶的抗氧化活性及天然竹叶饮料等, 所以开发和利用竹叶蛋白就有重要的现实意义。

## 1 材料与设备

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 材料与辅料

竹叶: 采自徐州工程学院老校区, 桂竹叶。大孔树脂 HPD-700: 河北沧州宝恩化工有限公司; 食盐: 实验室提供。

#### 1.1.2 主要试剂

$K_2SO_4$ 、 $CuSO_4$ 、 $H_2SO_4$ 、 $NaOH$ 、 $HCl$ 、 $Al(NO_3)_3$ 、 $H_3BO_3$ 、 $CH_3CH_2OH$ 、 $CH_3COCH_3$ 、 $NaNO_2$ 、亚甲基红、溴甲酚绿、pH 缓冲液、芦丁。

### 1.2 实验设备

可见分光光度计 7230G, 精密 pH 计 pHS-3C 型, 电子秤 JA2003N, DJ-5 低速大容量离心机, 电磁炉, HH-3 数显恒温磁力搅拌器, HH-4 数显恒温水浴锅, GZX-DH600-II 电热恒温干燥箱, 多功能粉碎机 (878A 型), 凯氏定氮仪。

## 2 实验方法

### 2.1 粗蛋白的分离提取工艺

参考从苜蓿叶中提取叶蛋白的工艺, 结合实验室的条件, 确定竹叶粗蛋白的提取工艺如下。

鲜叶→清洗→粉碎(打浆)→浸提→打浆→压榨过滤→



### 2.2 浸提时间对粗蛋白提取量及纯度的影响

将鲜叶除杂清洗后, 以竹叶(g): 水(mL) = 1:20 的比例, 用 878A 型多功能粉碎机进行一次打浆, 在二次打浆前比较不同时间(10、20、30、45、60 min)对粗提蛋白浸提效果的影响, 从而确定最佳浸提时间。

### 2.3 粗蛋白分离提取最佳工艺参数的确定

根据以上试验确定的最佳浸提时间及提取工艺流程, 再以温度、pH 值、固液比为因素, 采用正交实验确定最佳浸提工艺参数。

### 2.4 副产物黄酮类化合物的提取

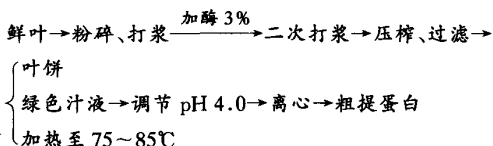
从副产物叶饼中提取黄酮类化合物的提取工艺为: 干燥的叶饼→加 15 倍原料质量的浸提剂、浸泡(17 h)→水浴浸提(1 h)→冷却→抽滤(布氏漏斗)→二次浸提→抽滤(布氏漏斗)→洗滤→黄酮粗提物

### 2.5 黄酮类化合物的精制

取 100 mL 2.4 节中的粗提液以一定的流量流过 HPD-700 大孔树脂, 反复淋洗, 直至流过大孔树脂后的液体的吸光度值基本恒定。然后用体积分数 90% 的丙酮作为解吸液进行黄酮类化合物的解吸, 直至洗出液吸光度值基本保持恒定。

### 2.6 粗蛋白提取的酶解工艺

利用纤维-半纤维-果胶复合酶分解纤维、半纤维、果胶等大分子物质, 使得组织蛋白溶出, 从而提高蛋白质的提取率, 其提取工艺如下:



第一作者: 学士, 副教授。

收稿时间: 2004-10-20

2.7 检测方法

2.7.1 竹叶粗蛋白的测定

用凯氏定氮法。

2.7.2 黄酮类化合物含量的检测

用分光光度法。

2.7.2.1 芦丁标准液配制

准确称取 0.100 g 芦丁标准品,用体积分数 30% 的乙醇溶解并定容至 100 mL,摇匀后得到浓度为 0.100 mg/mL 标准应用液。

2.7.2.2 工作曲线与回归方程的建立

分别取上述芦丁标准液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10 mL 于 7 只 50 mL 容量瓶中,用体积分数 30% 的乙醇补充至 25 mL,加 1.4 mL 质量分数 5% 亚硝酸钠溶液摇匀,放置 5 min 后加入 1.4 mL 质量分数 10% 的亚硝酸铝溶液,6 min 后加入 10 mL 1mol/L 的 NaOH 溶液,混匀,用体积分数 30% 乙醇定容至刻度,10 min 后于 510 nm 处比色法测定,试剂为空白参比,其结果见表 1。

表 1 标准工作曲线数据的测定结果

$V_{\text{芦丁}}/\text{mL}$	0	1	2.0	4	6	8	10
$C_{\text{芦丁}}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0	2	4	8	12	16	20
吸光度值(A)	0	0.008	0.021	0.040	0.058	0.080	0.101

2.7.2.3 工作曲线方程式的回归

用最小二乘法作线性回归,得芦丁浓度  $C(\text{mg/mL})$  与吸光度  $A$  的关系曲线回归方程式  $A=4.000C+9.333\times 10^{-3}$ ,相关系数  $R=0.9985$ 。

2.7.2.4 黄酮类化合物含量的测定及计算

取 2 mL 黄酮类化合物提取液于 50 mL 容量瓶中,用 30% 乙醇溶液补至 25 mL,加入 1~4 mL  $\text{NaNO}_2$  摇匀,放置 5 min 后加入 1.4 mL 质量分数 10%  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ,6 min 后再加入 10 mL 1 mol/L NaOH 混匀,用 30% 乙醇稀释至刻度,10 min 后测其在 510 nm 下的吸光度值,然后计算代入公式计算。

表 4 正交实验结果

序 号	A	B	C	D	粗提蛋白质量/g	含量/%	提取率/%
1	1	1	1	1	0.363	39.182	22.2
2	1	2	2	2	0.540	34.505	29.0
3	1	3	3	3	0.371	35.154	20.3
4	2	1	2	3	0.439	35.174	24.1
5	2	2	3	1	0.428	34.887	23.3
6	2	3	1	2	0.374	34.644	20.2
7	3	1	3	2	0.316	26.854	13.2
8	3	2	1	3	0.332	15.300	7.9
9	3	3	2	1	0.325	9.453	4.8
$K_1$	71.5	59.5	50.3				

3 结果与讨论

3.1 叶蛋白浸提工艺参数的选择

3.1.1 浸提时间的确定

根据 2.1 工艺流程,研究浸提时间对于粗蛋白量、纯度以及提取率的影响,结果见表 2。

表 2 不同浸提时间对粗蛋白质量、纯度及提取率的影响  
(以 10.000 g 竹叶为提取基数)

浸提时间/min	10	20	30	45	60
所得粗蛋白/g	0.471	0.482	0.549	0.475	0.454
纯度/%	16.96	19.69	33.11	36.93	34.97
提取率/%	12.3	14.8	28.3	27.3	24.7

从表 2 可以看出,浸提时间为 30 min 时粗提蛋白质质量最高(0.549 g),45 min 时纯度最高(36.93%)。综合考虑,即以蛋白质提取率为主要因素,确定其最佳浸提时间为 30 min。

3.1.2 正交试验确定最佳提取工艺参数

正交试验条件因素水平与结果见表 3 和表 4。

表 3 条件因素水平表

水 平	温度(A)/℃	pH 值(B)	料液比(C)(g:mL)
1	11	8	1:15
2	30	9	1:20
3	50	10	1:25

从表 4 中可以看出,所得粗蛋白量最高的最佳组合为  $A_1B_2C_2$  与分析最佳组合重合,即温度为 11℃、pH 9、料液比 1:20 最佳;而以含量考虑最佳组合为  $A_1B_1C_1$ ,而分析最佳为  $A_1B_1C_3$ ,又因为  $R_A>R_B>R_C$ ,所以 C 因素对于试验的影响不大,其最佳组合为温度 11℃、pH 8、料液比 1:15 为最佳。综合考虑,二者即以其提取率为指标,其分析最佳组合为  $A_1B_2C_2$  与试验最佳组合重合,最终确定其最佳工艺参数:温度 11℃、pH 9、料液比 1:20。

续表 4

序 号	A	B	C	D	粗提蛋白质量/g	含量/%	提取率/%
$K_2$	67.6	60.2	57.9				
$K_3$	25.9	45.3	56.8				
R	45.6	14.9	7.6				
$K_1'$	1.274	1.118	1.069				
$K_2'$	1.241	1.3	1.304				
$K_3'$	0.973	1.07	1.115				
R	0.301	0.23	0.236				
$K_1'$	108.84	101.21	89.13				
$K_2'$	104.70	84.69	79.13				
$K_3'$	51.61	71.46	96.89				
R	57.23	29.75	17.76				

### 3.2 副产物黄酮类化合物的提纯

#### 3.2.1 粗 提

对副产物叶饼 3.434 g, 以体积分数 75% 的丙酮作为浸提剂, 加量为 15 倍原料质量, 浸泡 17 h, 水浴抽提 1 h, 水浴温度为 80℃。冷却后, 用布氏漏斗抽滤, 滤渣用 25 mL 75% 的丙酮, 80℃ 水浴二次提取 20 min, 抽滤, 用 60 mL 75% 的丙酮分 3 次对滤渣进行洗涤。合并提取液和洗涤液, 定容至 200 mL 容量瓶。取 1 mL 浸提液测得吸光度值为 0.013, 计算黄酮类化合物的提取量为 7.88 mg/g(叶饼中), 而直接干燥后黄酮类化合物粗品的质量为 337.479 mg, 则其纯度为 8.02%。

#### 3.2.2 精 制

将 HPD-700 大孔树脂装填成高 25 cm, 直径为 5 cm 的树脂柱, 取 3.2.1 中粗提取液 100 mL, 让其流过大孔树脂, 如此反复吸附, 直至流出液的吸光度值基本保持不变, 然后用体积分数 90% 的丙酮解吸, 使黄酮类化合物得以提纯精制。精制后黄酮类化合物提取量为 3.28 mg/g(叶饼中)。直接干燥后黄酮精品的质量为 51.000 mg, 其纯度为  $3.28 \times 3.434 / 51 = 22.09\%$ 。

#### 3.3 粗蛋白提取的酶解工艺

鉴于水浸提工艺中, 蛋白质的提取率相对较低, 因此考虑利用果胶-纤维-半纤维复合酶分解果胶、纤维半纤维, 使蛋白质从植物细胞中溶解出来, 使提取率上升。其中粗蛋白, 0.608 g; 含量, 51.96%; 得率, 49.21%。

但加入的酶对于最后粗蛋白纯度的测定是否有影响或影响多大未能有效确定, 所以还不能肯定酶解

是最佳工艺。

### 4 结 论

本课题中选用竹叶进行植物叶蛋白分离提取及副产物的利用研究, 对粗蛋白分离提取研究表明, 最佳提取工艺条件为: 温度 11℃、pH 9、料液比(g:mL) 1:20、提取时间 30 min。

采用上述工艺流程, 其他条件按酶的最适条件考虑, 进行酶解工艺研究, 发现其蛋白质提取率从原来的 29% 上升到 49.21%。

对副产物叶饼中的黄酮类化合物进行提取, 得到黄酮类化合物粗制品的提取率为 98.276 mg/g, 纯度为 8.12%。经大孔树脂精制处理后, 副产物中的黄酮类化合物的提取率为 14.851 mg/g, 其纯度上升到 22.09%, 即精制后纯度为原来的 2.72 倍。

### 参 考 文 献

- 1 刘 萍, 刘学勤. 42 种树叶氨基酸组成的研究[J]. 林业科学, 1989, 25(5): 453~458
- 2 刘晓庚. 植物叶蛋白加工与应用研究进展[J]. 牧草与饲料, 1993(1) 24~30
- 3 邱业先. 植物叶蛋白的开发与利用研究[J]. 江西农业大学学报, 1990, 12(2): 41~44
- 4 葛旦之. 紫云英叶蛋白沉淀方法比较研究[J]. 饲料工业, 1992, 13(7): 47~50
- 5 冯立志. 叶蛋白饲料对蛋鸡生产性能和鸡蛋品质的影响[J]. 饲料工业, 1988(5): 23~24
- 6 许 钢, 张 虹, 胡 剑. 竹叶中的黄酮类化合物的提取研究[J]. 食品与机械, 1999, 6: 23~24

(下转第 141 页)

### 3 结 论

(1) 通过比较试验,适合多糖提取的芦荟品种是库拉索芦荟。

(2) 在芦荟多糖提取中,要通过干燥对原料进行贮藏,采用冻干技术处理,芦荟多糖的提取率最高。

(3) 随着芦荟新鲜叶片冷藏时间的延长,芦荟多糖的提取率明显地降低。

#### 参 考 文 献

- 顾文祥,诸淑琴. 芦荟栽培与加工利用[M]. 上海:上海科学普及出版社,1999. 198~250
- 吴广枫,汤 坚. 芦荟多糖制备方法的研究[J]. 食品与发酵工业,2002,28(6):57~60
- 付西光,董 英,马海乐. 芦荟凝胶的真空冻干研究[J]. 食品科技,2001(5):25~26
- 张慧君,罗仓学,张新申等. 芦荟主要活性成分的检测方法. 陕西科技大学学报,2003(5):105~108
- 汪建明,周红刚. 芦荟多糖制取方法的初步研究[J]. 食品研究与开发,2002,23(3):21~24
- 郑荣珍,袁宏球. 华芦荟多糖的研究(I)[J]. 热带作物学报,1998,19(12):177~180
- 大连轻工业学院等八大院校. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999
- 林 颖. 天然产物中糖含量测定方法正确性的研究[J]. 天然产物研究与开发,1996,8(3):5~8
- 张慧君,罗仓学,张新申等. 超声波提取芦荟苦素的研究[J]. 广州食品工业科技,2004(1):15~17

## Factor Affect on the Extraction Rate of Aloe Polysaccharide

Luo Cangxue Zhang Guangdong Wang Xu Liang Yan

(The Life Science and Engineering College, Shaanxi University of Science & Engineering, Xianyang 712081, China)

**ABSTRACT** The varieties of the Aloe, the drying process and refrigerated-storage are the main factors that affect the extraction rate of polysaccharide. The results showed that the extraction rate increased by using Curacao aloe, Freeze-dry technology and decreased by the storage time.

**Key words** aloe, polysaccharide, variety, drying, refrigerated-storage

(上接第 138 页)

## Protein Extraction from the Bamboo Leaf and Utilization of the Byproducts

Li Yong Song Hui

(Food Engineering Department of Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou, 221008, China)

**ABSTRACT** Technical processing parameters of the protein extraction from the bamboo leaf were first proposed domestically and the utilization of the byproducts was discussed in this paper. The extraction time and its effect to the content and purity of the rough protein were studied. The results showed that the best extraction time is 30 minutes and use the orthogonal method, considering the beating temperature, pH value and ratio of the material and extraction solution, the optimal parameters were: extraction temperature 11℃, pH 9 and ratio of the material and extraction liquid is 1:20. on the basis of these parameters, the effect of enzyme digestion on the protein extraction were studied. The byproducts-flavonoids extracted from the debris was also investigated. Flavonoid compounds could obtained at the rate of 98.276 mg/g with the purity at 8.12% by using 75% acetone as extraction, fine products could reach to 14.851 mg/g with the purity at 22.09% by using HPD-700 macroporous resin.

**Key words** extract, rough protein, by products flavonoid