不同方法提取苜蓿叶蛋白效果的比较及表征

曲 敏[1,2]，马永强[2]，杨大鹏[2]，张 帅[2]，张月学[3,*]
(1.东北林业大学博士后科研流动站，黑龙江 哈尔滨 150040；黑龙江省农业科学院博士后科研工作站，黑龙江 哈尔滨 150086；2.哈尔滨商业大学 食品科学与工程省级重点实验室，黑龙江 哈尔滨 150076；3.黑龙江省农业科学院草业研究所，黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要：分别采用酸热法、碱化法和发酵法3种方法制备苜蓿叶蛋白，通过优化制备工艺并比较叶蛋白得率、氮含量、溶解性、起泡性与泡沫稳定性、乳化性及乳化稳定性、持水性、吸油性等功能性质，并进行电镜观察表征。结果表明，发酵法制备苜蓿叶蛋白的得率和氮含量最高分别为14.9%和45.08%，明显高于酸化法和碱化法；比较其功能性质，碱化法制备的苜蓿叶蛋白在起泡性、持水性和吸油性上优于其他两种方法，分别为200.00%、5.40%和5.31%；发酵法制备的苜蓿叶蛋白溶解性、乳化性及乳化稳定性较好，分别为80.52%、78.60%和20.65%。扫描电镜观察3种方法所制备苜蓿叶蛋白的表面结构，碱化法制备的苜蓿叶蛋白结构疏松，且有一定程度的破坏，酸化法和发酵法的苜蓿叶蛋白表面结构紧密、连续完整，并发现发酵法还具有一定的降解效果。说明利用不同的方法制备苜蓿叶蛋白，其得率、氮含量、功能性质及表面结构有较大差异。

关键词：苜蓿；叶蛋白；提取方法；功能性质；表征

Extraction Efficiency and Characterization of Alfalfa Leaf Protein by Different Methods

QU Min[1,2]，MA Yong-qiang[2]，YANG Da-peng[2]，ZHANG Shuai[2]，ZHANG Yue-xue[3,*]
(1. Postdoctoral Programme of Northeast Forestry University, Harbin 150040, China；Postdoctoral Programme of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China；2. Key Laboratory of Food Science and Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China；3. Horticultural Sub-academy, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract：A comparative investigation of the effectiveness of three extraction methods (heating in an acidic environment, alkalization and fermentation) for alfalfa leaf protein was studied based on extraction yield, nitrogen content, solubility, foaming capacity, foam stability, emulsifying capacity, emulsion stability, water-holding capacity, oil-binding capacity and scanning electron microscopic (SEM) observation. The results showed that the extraction rate and nitrogen content of alfalfa leaf protein from fermentation was 14.9% and 45.08%, respectively, which was significantly higher than those from other two methods. The foaming capacity, water-holding capacity and oil-binding capacity of alfalfa leaf protein obtained from alkalization were 200%, 5.40% and 5.31%, respectively, which were better than those obtained from other two methods. The alfalfa leaf protein obtained from fermentation showed better solubility, emulsifying capacity and emulsion stability, which were 80.53%, 78.60% and 20.65%, respectively. The alfalfa leaf protein prepared by alkalization displayed a loose damaged structure as observed under SEM. The surface structure of the alfalfa leaf protein prepared by other two methods was compact and consecutively intact. Furthermore, fermentation had degrading effect on alfalfa leaf protein. Therefore, different preparation processes can result in differences in the extraction rate, nitrogen content, functional properties of alfalfa leaf protein.

Key words：alfalfa；leaf protein；extraction method；functional properties；characterization
中图分类号：TS201.1 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2012)14-0091-05

收稿日期：2012-04-07
基金项目：黑龙江省自然科学基金项目(C2011-24)；黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511128)；黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z08020)
作者简介：曲敏(1966—)，女，副教授，博士，研究方向为苜蓿品质改良及植物蛋白。E-mail：qumin777@126.com
*通信作者：张月学(1957—)，女，研究员，硕士，研究方向为苜蓿品种改良。E-mail：zyxnky@163.com

植物叶蛋白(leaf protein concentration，LPC)，是从植物幼嫩茎叶中分离干燥制得的高质量蛋白浓缩物，主要由叶绿体内基质蛋白和细胞质内溶解性良好的细胞质蛋白等组成，属于“功能性蛋白质”[1]，含有丰富的蛋白质、脂肪、膳食纤维和天然色素等。动物实验表明，叶蛋白的营养价值与酪蛋白接近[2]。绿色植物富含叶蛋白，是最大的廉价蛋白资源，具有很高的开发利用价值。而富含叶蛋白的植物品种因其资源丰富、成本低廉而主要集中在豆科牧草和禾本科牧草。其中，苜蓿(*Medicago sativa* L.)，俗称金花菜，属豆科多年生草本植物，苜蓿叶蛋白营养价值高于大豆、花生饼[3]。和其他国家相比，我国对植物叶蛋白的研究与开发较晚，自20世纪80年代中后期，一些学者针对植物叶蛋白的资源、生产技术和开发效能等进行了研究，尤其研究了适应我国开发应用的叶蛋白植物资源和生产技术，取得了一批研究成果[2,4-6]。近几年，随着我国畜牧业及牧草种植业的发展，该类研究逐渐升温。但同其他植物蛋白相比，叶蛋白及其深入利用的相关研究相对较少，尤其是基础理论研究更少。以往研究发现，不同的生产方法及不同的干燥方法对于植物叶蛋白的质量有很大的影响，如冷冻干燥可生产高品质的优良叶蛋白产品，适宜叶蛋白研究或生产特优级质量的叶蛋白等领域[7]。本研究分别选择有代表性的酸加热法、碱化法和发酵法3种方法制备苜蓿叶蛋白，通过比较叶蛋白得率、氮含量、溶解性、起泡性与泡沫稳定性、乳化性及乳化稳定性、持水性、吸油性等功能性质及电镜观察表征，说明利用不同的方法制备苜蓿叶蛋白，其得率、氮含量、功能性质及表面结构有较大差异，旨在为苜蓿叶蛋白的生产和开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

“肇东”紫花苜蓿干草　黑龙江省农业科学院草业研究所苜蓿基地；嗜酸乳杆菌　哈尔滨商业大学食品科学与工程省级重点实验室微生物实验室。

KDY-9820半自动凯氏定氮仪　苏州江东精密仪器有限公司；S-3400N电子扫描电镜　日本日立公司。

1.2 苜蓿叶蛋白的制备工艺流程及苜蓿草汁的制备

苜蓿干草叶经粉碎、过筛、浸泡、过滤、弃去草渣得苜蓿绿色草汁，然后分别使用酸化加热法、碱化法和发酵法提取叶蛋白，经絮凝离心，弃上清液得叶蛋白，冷冻干燥，称量。

利用酸加热法、碱化法与发酵法提取苜蓿叶蛋白的过程中，涉及的影响因素有料液比、浸泡时间、粉碎粒度、加热温度、加热时间、pH值、离心时间、离心转数等，但相对来说，料液比、加热温度、加热时间、pH值、接种量、发酵时间、接种量、发酵时间等影响较大。经前期实验，确定浸泡时间24h(时间过长恐微生物污染)、粉碎过筛粒度80目、离心5000r/min、9min等条件的基础上，考察其他因素对苜蓿叶蛋白得率及氮含量的影响。

选用“肇东”紫花苜蓿干草，取嫩茎叶经粉碎后，过80目筛，草粉备用。称取苜蓿草粉10g置于烧杯中以一定的料液比浸泡24h，覆盖、并加入1% NaCl烧杯防止氧化。用8层纱布及滤纸过滤，弃去草渣，制得苜蓿草汁。

1.3 苜蓿叶蛋白的制备

1.3.1 酸加热法制备苜蓿叶蛋白

1.3.1.1 温度对苜蓿叶蛋白提取的影响

高温会破坏蛋白质的活性，为保留苜蓿叶蛋白的活性及所含的天然植物营养素不被破坏，本实验设置两组温度段提取苜蓿叶蛋白，即宽温段55～80℃，比较苜蓿叶蛋白的得率。在此基础上，细化温度设置为50～65℃。

设55、60、65、70、75、80、85、90℃六个处理水平进行试验，以苜蓿草粉和水的料液比1:20(g/mL)加水浸泡24h，取滤液于上述温度下水浴9min，以1mol/L的HCl溶液调节pH值，pH4.0、5000r/min离心9min，弃上清液，冷冻干燥，称量。比较60℃与90℃两个温度段的叶蛋白得率及氮含量。

然后分别设置50、53、56、59、62、65℃六个处理水平进行试验，按上述操作比较苜蓿叶蛋白的得率及氮含量。

1.3.1.2 加热时间对苜蓿叶蛋白提取的影响

在62℃不同水浴时间(7、8、9、10、11、12min)考察苜蓿叶蛋白的得率及氮含量的变化。方法同上。

1.3.1.3 料液比对苜蓿叶蛋白提取的影响

设定料液比1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35六个处理水平进行试验，考察苜蓿叶蛋白的得率及氮含量的变化。方法同上。

1.3.1.4 pH值对苜蓿叶蛋白提取的影响

参照曲敏等[8]方法，以pH2.7～3.7作为沉降苜蓿叶蛋白的最佳沉降范围。以1mol/L的HCl调节pH值，设定pH2.7、3.0、3.3、3.6、3.9、4.2六个处理水平进行试验，考察苜蓿叶蛋白的得率及氮含量的变化。方法同上。

1.3.2 碱化法制备苜蓿叶蛋白

以1mol/L NaOH调节pH值，设定pH8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0六个处理水平进行试验。考察苜蓿叶

蛋白的得率及氮含量的变化。方法同上。

1.3.3 发酵法制备苜蓿叶蛋白

参照曲敏等[8]的研究，以MRS培养基为生长记数培养基，将0.5mL种子液加入9.5mL MRS培养基(3.7×10^8个/mL)，37℃培养24h。以料液比(g/mL)为1:20制备苜蓿草汁，以每毫升苜蓿汁液接种乳酸菌数10^7个，接种于100mL苜蓿草汁中，37℃发酵11h，沉淀苜蓿叶蛋白，离心收集，冷冻干燥，称量。

1.3.4 苜蓿叶蛋白得率的计算

$$叶蛋白得率/\% = \frac{叶蛋白质干质量}{苜蓿草粉质量} \times 100$$

1.3.5 粗蛋白含量的测定

采用半自动凯氏定氮仪进行测定。

1.4 苜蓿叶蛋白的功能性质测定

溶解性：参考文献[9]的方法，以氮溶指数(NSI)表示苜蓿叶蛋白的溶解性。乳化性及乳化稳定性：参考文献[10-11]的方法。泡性及泡沫稳定性：参考文献[12]的方法。持水性：参考文献[13]的方法。吸油性：参考文献[10,14]的方法。

1.5 苜蓿叶蛋白的表征

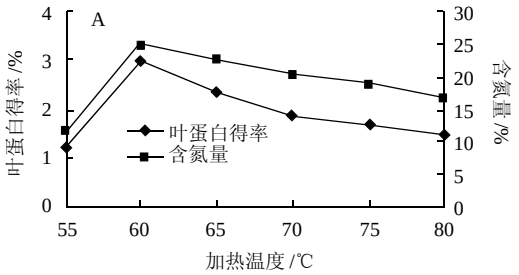
采用电子扫描电镜观察待测样品，待测样品为苜蓿叶蛋白干燥样品：A样品为酸化加热法制备的苜蓿叶蛋白，B样品为碱化法制备的苜蓿叶蛋白，C样品为发酵法制备的苜蓿叶蛋白。观察样品结构时，将样品用戊二醛混合溶液固定，用磷酸缓冲液漂洗，然后乙醇脱水，用醋酸异戊酯置换乙醇后，用临界点干燥法进行干燥，经粒子溅射喷金(金40%，铂60%)，置于扫描电镜下(加速电压20kV)观察，分别放大5000倍时苜蓿叶蛋白的颗粒形态，拍照。

2 结果与分析

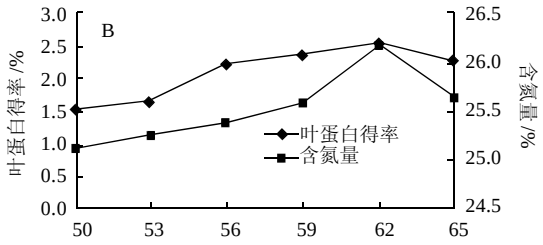
2.1 3种方法提取苜蓿叶蛋白的结果比较

2.1.1 酸化加热法提取苜蓿叶蛋白的效果

2.1.1.1 加热温度的对苜蓿叶蛋白提取效果的影响



A.宽温度段



B.细化温度段

图1 加热温度对苜蓿叶蛋白得率、含氮量的影响

Fig.1 Effect of heating temperature on extraction rate and nitrogen content of alfalfa leaf protein

由图1A可知，当加热温度为60℃时，苜蓿叶蛋白得率最高，为2.93%，氮含量也最高，达11.78%，优于80℃时的提取效果。所以，在下面的实验中，在60℃左右设置单因素。由图1B可知，当加热温度为62℃时，叶蛋白得率最高，达2.53%，氮含量也为同组中最高，达26.12%。62℃以上时，叶蛋白得率有所下降。这是因为蛋白质开始凝聚达到峰值后，继续加热，则蛋白质性质发生改变，不再凝聚，反而因变性而溶于水中。

2.1.1.2 加热时间对苜蓿叶蛋白提取效果的影响

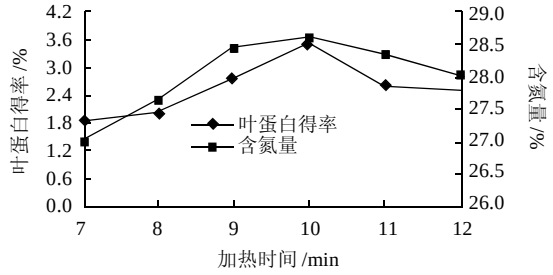


图2 加热时间对苜蓿叶蛋白得率、含氮量的影响

Fig.2 Effect of heating time on extraction rate and nitrogen content of alfalfa leaf protein

由图2可知，随着加热时间的延长，叶蛋白的得率与氮含量相应增加。在加热时间10min时，比加热9min时叶蛋白得率稍高，为3.54%，而氮含量却达到高峰，为28.78%。在10min以后有所下降明显。说明加热到10min后，叶蛋白凝集基本完成。

2.1.1.3 料液比对苜蓿叶蛋白提取效果的影响

由图3可知，随着提取液体积的增加，叶蛋白的得率与粗蛋白含量相应增加。当料液比为1:20(g/mL)时，叶蛋白氮含量最高，为30.56%，同时叶得率相对较高，为3.99%。料液比为1:35时，可溶性蛋白的得率明显降低。这是因为加水量太小，蛋白质不能充分溶解；而加水量过大，则沉淀效果差。

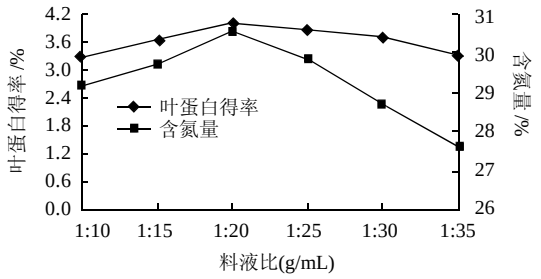


图 3 料液比对苜蓿叶蛋白得率、含氮量的影响

Fig.3 Effect of solid-to-solvent on extraction rate and nitrogen content of alfalfa leaf protein

2.1.1.4 pH 值对苜蓿叶蛋白提取效果的影响

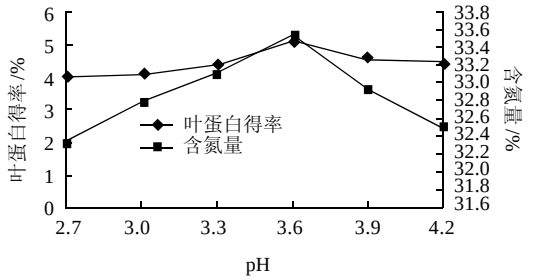


图 4 pH 值(3～4.2)对苜蓿叶蛋白得率、含氮量的影响

Fig.4 Effect of pH 3-4.2 on extraction rate and nitrogen content of alfalfa leaf protein

由图 4 可知，当 pH2.7～4.2 之间，在 pH 值为 3.6 时，苜蓿叶蛋白的得率与氮含量最高，分别为 5.13% 和 33.52%。说明溶液酸环境对叶蛋白得率影响不大，但对氮含量影响稍大，表明酸热法提取苜蓿叶蛋白时，随着 pH 值的变化，会有其他物质沉淀下来，但进而影响苜蓿叶蛋白的氮含量。

2.1.2 碱化法对苜蓿叶蛋白提取效果的影响

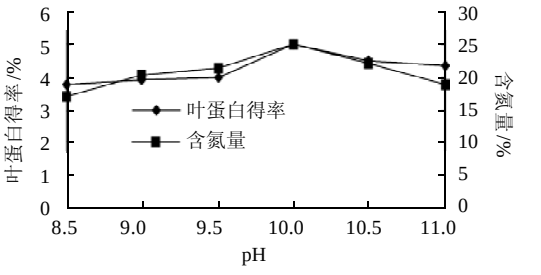


图 5 pH 值(9～11) 对苜蓿叶蛋白得率、氮含量的影响

Fig.5 Effect of pH 9-11 on extraction rate and nitrogen content of alfalfa leaf protein

由图 5 可知，在 pH8.5～11.0 的范围内，随着 pH 值的增大，苜蓿叶蛋白的得率和氮含量也相应的变化。当 pH10.0 时，叶蛋白的得率和氮含量最高，分别为 5.02% 和 24.83%。说明在 pH10 附近的强碱环境对苜蓿叶蛋白的絮凝有较好的效果。

2.1.3 发酵法对苜蓿叶蛋白提取效果的影响

参照曲敏等[8]的研究结果，在嗜酸乳杆菌接种量 10^7 个/mL、料液比 1:20、发酵时间 11h 时，苜蓿叶蛋白的得率为 14.90%，氮含量为 45.08%。

2.2 3 种方法提取苜蓿叶蛋白的比较

由表 1 可见，以苜蓿叶蛋白得率与氮含量作为衡量各工艺的主要指标，比较叶蛋白得率，最高的为发酵法，苜蓿叶蛋白得率为 14.90%，其次酸化加热法与碱化法相差不大；比较叶蛋白的氮含量，最高的为发酵法，氮含量 45.08%，其次为酸化加热法，氮含量 33.52%，碱化法最差为 24.83%。

在叶蛋白功能特性方面，对于溶解性，发酵法最好，其 NSI 为 80.52%，碱化法与酸热法持平，为 61.21% 和 62.08%；对于起泡性，碱化法的最好为 200.00%，而发酵法最差为 129%；对于泡沫稳定性，发酵法最好为 87.45%，碱化法次之，酸热法的最差、为 65.72%；对于乳化性与乳化稳定性，发酵法最好、分别为 78.60% 和 20.65%，而碱化法最差、分别为 59.17% 和 14.98%。持水性和吸油性均以碱化法最高，分别为 5.40% 和 5.31%，酸热法和发酵法稍差。

资料[15]表明，苜蓿叶蛋白的营养价值高，与鸡蛋蛋白的贴近度为 0.72～0.83，具有较好的功能特性。3 种方法制备的苜蓿叶蛋白的功能性质各有不同，但在叶蛋白得率、氮含量、溶解性、乳化性及乳化稳定性方面，发酵法明显优于其他两种方法。

造成不同方法制备的叶蛋白功能性出现一定差异的原因，可能是碱化法在强碱条件能产生较好的絮凝效果，并可破坏如某些酶类、皂素与植物雌激素等多种不利因子，但强碱条件使蛋白质分子的次级键特别是氢键破坏，使蛋白结构疏松、某些极性基团发生解离，促使结合蛋白质分离[6]。导致其起泡性、持水性和吸油性增强。在酸热法和发酵法的条件下，叶蛋白经受等电点沉淀和热变性双重因素的共同作用，增加了蛋白质的凝聚机会，使叶蛋白凝聚快、凝聚物结构紧密、易分离[16]，提高了苜蓿叶蛋白的得率与粗蛋白的含量。导

表 1 叶蛋白得率、氮含量及功能性质比较

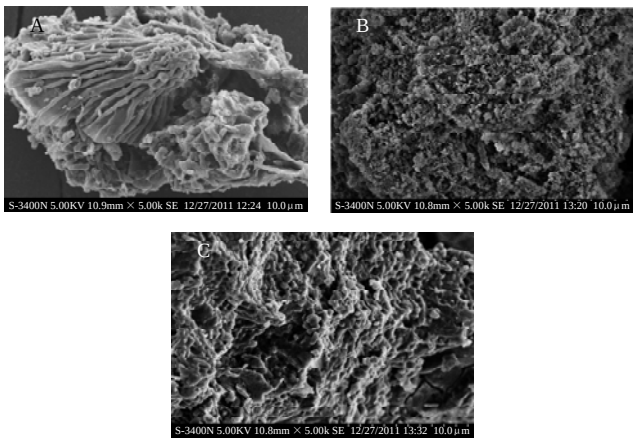
Table 1 Comparison of extraction rate, nitrogen content and functional properties of alfalfa leaf protein

制备方法	叶蛋白得率/%	氮含量/%	NSI/%	起泡性/%	泡沫稳定性/%	乳化性/%	乳化稳定性/%	持水性/(g/g)	吸油性/(g/g)
酸热法	5.13 ± 0.12	33.52 ± 0.52	62.08 ± 0.71	180.00 ± 1.75	65.72 ± 0.66	62.50 ± 0.57	15.62 ± 0.25	4.83 ± 0.09	4.75 ± 0.09
碱化法	5.02 ± 0.14	24.83 ± 0.47	61.21 ± 0.55	200.00 ± 1.84	66.74 ± 0.70	59.17 ± 0.53	14.98 ± 0.19	5.40 ± 0.10	5.31 ± 0.15
发酵法	14.90 ± 0.23	45.08 ± 0.56	80.52 ± 0.80	129.00 ± 1.07	87.45 ± 0.79	78.60 ± 0.68	20.65 ± 0.21	5.05 ± 0.17	4.98 ± 0.13

致其氮含量、溶解性、乳化性及乳化稳定性的提高。而碱法提取时虽然增加了蛋白质的溶解度，但由于没有达到等电点，只在热变性单一因素作用下发生凝聚，沉降效果稍差，造成得率及粗蛋白含量较低。也说明单一使用等电点沉淀或热变性沉淀叶蛋白质，则凝聚物结构疏松、不易分离。

2.3 苜蓿叶蛋白的表征

用扫描电子显微镜观察了分别采用酸化加热、碱化法和发酵法制备的苜蓿叶蛋白的表面结构特征并进行比较。由图6A可以看出，酸加热法制备的苜蓿叶蛋白，颗粒表面有较为连续的空间结构，结构连续且平滑，结构紧密；图6B为碱化法制备的苜蓿叶蛋白，结构疏松，颗粒表面较为粗糙，不规则，说明采用碱化法制备苜蓿叶蛋白对蛋白质的表面结构有一定程度的破坏；图6C为发酵法制备的苜蓿叶蛋白，结构较紧密，颗粒表面光滑，空间结构较为连续，且叶蛋白颗粒表面有较为均匀的蜂窝与孔洞，表明发酵法制备的苜蓿叶蛋白有一定程度的降解。



A.酸化加热法制备的苜蓿叶蛋白；B.碱化法制备的苜蓿叶蛋白；C.发酵法制备的苜蓿叶蛋白。

图6 苜蓿叶蛋白的扫描电镜图

Fig.6 SEM photographs of alfalfa leaf protein prepared by different methods

3 结 论

本实验通过分别利用酸热法、碱化法和发酵法3种方法制备苜蓿叶蛋白，并对3种方法的效果进行比较，结论如下：

发酵法制备苜蓿叶蛋白的得率和氮含量最高，明显高于酸化法和碱化法，分别为14.9%和45.08%。比较其功能性质，碱化法制备的苜蓿叶蛋白在起泡性、持水性和吸油性上优于其他两种方法；发酵法的溶解性、乳化性及乳化稳定性较好。

扫描电镜观察3种苜蓿叶蛋白的表面结构，碱化法对苜蓿叶蛋白结构疏松，且有一定程度的破坏，酸化法和发酵法的苜蓿叶蛋白表面结构紧密、连续完整，并发现发酵法还具有一定的降解效果。说明利用不同方法制备的苜蓿叶蛋白，其得率、氮含量、功能性质及表面结构有较大差异。

根据以上实验结果，在制备苜蓿叶蛋白时，可根据其功能性质和实际应用选择合适的生产工艺。发酵法具有节能、废物少、无污染，使一些抗营养物质失去活性，适合工业化生产，规模大小均可的优点[17]，克服了单一使用等电点沉淀蛋白质凝聚速度慢、凝聚物结构疏松不易分离的缺点，同时也克服了直接加热法耗能大、成本高的不足。而且，可提高苜蓿叶蛋白中为人类所能吸收的自由态色素[16]。因此，发酵法是一种制备苜蓿叶蛋白的好方法。

参考文献：

[1] 刘晓庚, 陈梅梅, 曾锦萍. 叶蛋白的资源特性、加工和综合利用(三)[J]. 林产化工通讯, 1999(2): 39-42.
[2] 薛正莲, 刘艳, 高理所. 黑麦草叶蛋白及其水解物营养价值的评价[J]. 营养学报, 2008, 30(6): 629-630.
[3] TESFAYE M, DENTON M D, VANCE C P, et al. Transgenic alfalfa secretes a fungal endochitinase protein to the rhizospere[J]. Plant and Soil, 2005, 269(1/2): 233-243.
[4] 葛旦之, 罗翠兰. 发酵酸法提取水花生叶蛋白的工艺技术研究[J]. 中国饲料, 1995(15): 12-14.
[5] 于安芬, 李瑞琴, 水蓉, 等. 苜蓿绿、白叶蛋白提取分离及残渣残液营养成分分析[J]. 草业科学, 2009, 26(4): 50-54.
[6] 柳斌, 席亚丽, 穆峰海, 等. 不同处理条件对苜蓿叶蛋白凝聚效果的研究[J]. 草业科学, 2010, 27(1): 114-118.
[7] 王运强. 构树叶中叶绿素和叶蛋白提取技术的研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2010.
[8] 曲敏, 杨大鹏, 梁金钟, 等. 嗜酸乳杆菌发酵制备苜蓿液蛋白的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(19): 152-156.
[9] 谢正军. 苜蓿叶蛋白和酶法制备抗氧化肽的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009.
[10] 王芳, 刘华, 董梅红. 桑叶蛋白的功能特性研究[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 81-86.
[11] LEE S Y, MORR C V, EWANY W H. Structural and functional properties of caseinate and whey protein isolate as affected by temperature and pH[J]. Food Science, 1992, 57(5): 1210-1229.
[12] 王璋, 许时婴, 江波, 等. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.
[13] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
[14] 陈毓荃. 蛋白质化学[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000.
[15] 唐晓玲, 刘振湘. 叶蛋白替代鱼粉饲喂蛋鸡试验[J]. 饲料研究, 1996(5): 12-13.
[16] 姜华, 毕玉芬, 何承刚. 不同时期刈割对黑麦草生产性能、蛋白质含量及光合效率的影响[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(2): 149-152.
[17] D'ALVISE N, LESUEUR-LAMBERT C, FERTIN B, et al. Hydrolysis and large scale ultrafiltration study of alfalfa protein concentrate enzymatic hydrolysate[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2000, 27(3): 286-294; 299.