

火麻仁蛋白的反胶束法提取工艺、理化性质及消化率研究

李云飞 宋露露 郑郭芳 徐睿琦 刘鑫源 王志远 秦楠

(山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619)

摘要: [目的] 利用反胶束法提取火麻仁蛋白, 进行工艺优化并分析所得蛋白的理化性质。[方法] 对前萃取液 2-乙基己基琥珀酸酯磺酸钠 (AOT) 质量浓度、加水量、缓冲液 pH 值、KCl 浓度、料液比、前萃取温度、前萃取时间与后萃取液 pH 值、KCl 浓度、后萃取时间、后萃取温度等影响蛋白提取率的关键因素进行优化, 考察所得蛋白的溶解性、持水性、持油性与消化特性。[结果] 反胶束最佳前萃取条件为 AOT 质量浓度 0.090 4 g/mL、缓冲液 pH 值 6.54、加水量 0.105 8 mL/mL、KCl 浓度 0.05 mol/L、料液比 1:30 (g/mL)、前萃取时间 60 min、前萃取温度 50 °C, 前萃取率达 71.38%; 最佳后萃取条件为 pH 值 7.5、KCl 浓度 1.5 mol/L、后萃取时间 45 min、后萃取温度 27 °C, 后萃取率达 80.59%, 总萃取率为 57.53%。经透析、冷冻干燥所得蛋白为白色、蓬松粉末, 纯度达 98.12%, 其溶解性随 pH 值变化显著, 持水性为 0.71 g/g, 持油性为 3.57 g/g, 消化率为 93.83%。[结论] 火麻仁蛋白可用反胶束法提取, 较好的持油性、高消化率等特性使火麻仁蛋白在食品应用中具有独特的优势。

关键词: 火麻仁; 蛋白; 反胶束; 理化性质

Optimization of extraction process of hemp seed protein by reverse micelle method and study on its physicochemical properties and digestibility

LI Yunfei SONG Lulu ZHENG Guofang XU Ruiqi LIU Xinyuan WANG Zhiyuan QIN Nan

(Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong, Shanxi 030619, China)

Abstract: [Objective] The process was optimized and the physicochemical properties of the obtained hemp seed protein, extracted by using reverse micelle method, were analyzed. [Methods] The key factors affecting the extraction rate of protein, such as Aerosol-OT (AOT) mass concentration, water addition, buffer pH, KCl solution concentration, solid-liquid ratio, extraction temperature and time of pre-extraction process, and pH, KCl concentration, extraction time and temperature of post-extraction progress, were analyzed by single factor analysis and response surface optimization. The solubility, water holding capacity, oil holding capacity and digestion characteristics of the obtained protein were investigated. [Results] The optimal process conditions for the reverse micelle pre-extraction were obtained as follows: AOT mass concentration 0.090 4 g/mL, buffer pH 6.54, water addition 0.105 8 mL/mL, KCl concentration 0.05 mol/L, solid-liquid ratio 1:30 (g/mL), extracted for 60 min at 50 °C. The pre-extraction rate was 71.38%. The optimal process conditions for the reverse micelle post-extraction were obtained as follows: pH 7.5, KCl concentration 1.5 mol/L, post-extraction time 45 min, temperature 27 °C. The post-extraction rate was 80.59%, and the total extraction rate was 57.53%. The white and fluffy protein powder with purity of 98.12% was obtained by dialysis and freeze-drying. Its solubility changed significantly with pH values. The water holding capacity was 0.71 g/g, the oil holding capacity was 3.57 g/g, and the digestibility was 93.83%. [Conclusion] Reverse micelle method can be used to extract hemp seed protein. The characteristics of excellent oil holding capacity and high digestibility make hemp seed protein have unique advantages in food application.

Keywords: hemp seed; protein; reverse micelle; physicochemical property

基金项目: 山西中医药大学科技创新团队项目(编号: 2022TD2008); 校培育项目(编号: 2022PY-TH-56); 企业横向(编号: 20220828)

通信作者: 秦楠(1981—), 男, 山西中医药大学副教授, 博士。E-mail: bszy6688@163.com

收稿日期: 2023-12-02 改回日期: 2024-06-28

火麻仁是桑科草本植物大麻的种仁,火麻仁中蛋白含量达 25%,主要为球蛋白(约 67%)、白蛋白(约 25%)^[1],含人体所需的 20 种氨基酸,营养价值与大豆蛋白、乳清蛋白相当^[2],其高精氨酸/赖氨酸比率表明火麻仁蛋白在心血管健康促进食品中具有巨大的应用潜力^[3]。

目前,火麻仁蛋白提取以碱溶酸沉法为主,提取率为 86.95%^[4],其操作简单、提取率较高,但由于提取的蛋白含酚类物质其色泽、风味等不佳^[5],且强碱性条件下使蛋白变性、酸碱消耗量大、难以回收造成环境污染。相关研究^[6-7]表明,反胶束提取法适合蛋白质等大分子的提取,选择性高、能耗低、提取条件温和、可保持提取物活性、可回收易工业化生产,且可保持蛋白的功能、营养和风味。反胶束是由分散在有机溶剂中的表面活性剂形成的,表面活性剂分子的极性头部朝向水相的内部,而非极性尾部朝向有机相。反胶束的亲水性表面活性剂、溶剂、pH、离子强度等因素影响蛋白质的提取率和结构。通过控制这些参数,可以通过蛋白质和胶束之间的静电、疏水和空间相互作用的多样性来改变提取部分,用于食品和生物蛋白的分离纯化^[8]。

研究^[9-11]表明,反胶束提取法适合大豆、花生、牡丹籽等植物蛋白的提取,目前尚无反胶束法用于提取火麻仁蛋白的研究。试验拟将反胶束法应用于火麻仁蛋白的提取并进行工艺优化,分析所得蛋白的理化性质,以期为火麻仁蛋白功能食品的开发与利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

火麻仁:山西元和堂中药有限公司;

2-乙基己基琥珀酸酯磺酸钠(AOT)、异辛烷:分析纯,上海麦克林生物科技股份有限公司;

氢氧化钠、硼酸、硫酸钾、硫酸铜:分析纯,天津市光复科技发展有限公司;

磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钾、甲基红、亚甲基蓝、硫酸、石油醚:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;

盐酸标准溶液:分析纯,北京北方伟业计量技术研究院;

胃蛋白酶、胰蛋白酶:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

多功能粉碎机:DE-500 型,浙江红景天工贸有限公司;

数控超声波清洗器:KQ-800DE 型,昆山市超声仪器有限公司;

湘立离心机:TD4Z-WS 型,湖南湘立科学仪器有限公司;

分析天平:AR223CN 型,奥豪斯仪器有限公司;

自动凯氏定氮仪:H GK-50 型,上海赫冠仪器有限

公司;

恒温摇床:HZ-2011KB 型,金坛市杰瑞尔电器有限公司;

pH 计:PHS-3C⁺型,成都世纪方舟科技有限公司;

电热鼓风干燥箱:GZX-9140MBE 型,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;

实验室超纯水系统:JL-UPK-II-20T 型,四川金澜科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 火麻仁粉的制备 将火麻仁粉碎,以 3 倍量石油醚振摇脱脂 4 h,用 4 倍量石油醚脱脂过夜,于通风橱自然晾干,60℃干燥,过 40 目筛得火麻仁粉,4℃保存备用。

1.3.2 火麻仁粉基本成分测定

(1) 蛋白质含量:按 GB 5009.5—2016 执行。

(2) 脂肪含量:按 GB 5009.6—2016 执行。

(3) 水分含量:按 GB 5009.3—2016 执行。

1.3.3 蛋白提取率计算 分别按式(1)~式(4)计算火麻仁蛋白前、后、总萃取率及纯度。

$$R_1 = \frac{m_1}{m_0} \times 100\%, \quad (1)$$

$$R_2 = \frac{m_2}{m_1} \times 100\%, \quad (2)$$

$$R_0 = R_1 \times R_2 \times 100\%, \quad (3)$$

$$P = \frac{m_3}{m_4} \times 100\%, \quad (4)$$

式中:

R_1 ——火麻仁蛋白前萃取率,%;

m_1 ——前萃取液中蛋白质量,g;

m_0 ——火麻仁粉中蛋白质量,g;

m_2 ——后萃取液中蛋白质量,g;

R_2 ——火麻仁蛋白后萃取率,%;

R_0 ——火麻仁蛋白总萃取率,%;

P ——火麻仁蛋白纯度,%;

m_3 ——火麻仁蛋白粉中蛋白质量,g;

m_4 ——火麻仁蛋白粉质量,g。

1.3.4 反胶束溶液制备与提取 将 AOT 加入异辛烷中,磁力搅拌使其完全溶解后加入含 KCl 的缓冲溶液调节离子强度和 pH 值,30℃超声 30 min,放置过夜后得到澄清、透明的溶液即为空反胶束液。将空反胶束液置于锥形瓶中,加入火麻仁粉,密封后于恒温摇床 40℃、150 r/min 振摇提取 60 min,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液得含火麻仁蛋白的前萃取液,测定蛋白浓度并计算蛋白前萃取率。

(1) 前萃取单因素试验:以火麻仁蛋白前提取率为指标,分别考察前萃取缓冲 KCl 浓度(0.05,0.10,0.15,0.20,0.25 mol/L)、加水量(0.02,0.05,0.08,0.11,0.14 mL/mL)、缓冲溶液 pH 值(5.6,7,8,9)、AOT 质量浓度(0.04,0.06,

0.08, 0.10, 0.12 g/mL)、料液比[1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 (g/mL)]、前萃取温度(30, 40, 50, 60, 70 °C)、前萃取时间(15, 30, 45, 60, 75 min)对火麻仁蛋白前萃取率的影响。

(2) 响应面优化前萃取工艺:根据单因素试验结果,在缓冲溶液 KCl 浓度 0.05 mol/L、料液比 1:30 (g/mL)、提取时间 60 min、温度 50 °C 下,选择 AOT 质量浓度、缓冲溶液 pH 值、加水量 3 个因素,采用 Design-Expert.8.0.6.1 软件进行 Box-Behnken 设计,优化前萃取工艺。

(3) 后萃取溶液制备:以前萃取优化后的最佳工艺提取火麻仁蛋白制得前萃取液,配制一定 pH 值的 Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲溶液,加入 KCl 制得后萃取溶液,将等体积的前萃取液与后萃取液混匀,于 40 °C 恒温摇床、120 r/min 振荡 60 min, 3 500 r/min 离心 15 min,取下层水相得到含蛋白的后萃取液,测定蛋白浓度并计算蛋白后萃取率。

(4) 后萃取单因素试验:以火麻仁蛋白后萃取率为指标,考察后萃取缓冲溶液 pH 值(5, 6, 7, 8, 9)、KCl 浓度(0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mol/L)、后萃取温度(25, 30, 40, 50, 60 °C)、后萃取时间(15, 30, 45, 60, 75 min)对火麻仁蛋白后萃取率的影响。

(5) 响应面优化后萃取工艺:根据单因素试验结果,在后萃取时间 45 min 条件下,选择缓冲溶液 pH 值、KCl 浓度、提取温度 3 个因素,用 Design-Expert.8.0.6.1 进行 Box-Behnken 设计,优化后萃取工艺。

1.3.5 火麻仁蛋白功能特性与消化率

(1) 火麻仁蛋白溶解性:参照 Shen 等^[12]的方法,按式(5)计算蛋白质溶解度百分比。

$$P_{PS} = \frac{P_{S1}}{P_{S2}} \times 100\%, \quad (5)$$

式中:

P_{PS} ——蛋白溶解度,%;

P_{S1} ——上清液中蛋白含量,g;

P_{S2} ——总蛋白含量,g。

(2) 火麻仁蛋白持水、持油性:参照 Yao 等^[13]的方法,分别按式(6)、式(7)计算蛋白的持水性和持油性。

$$W_{HC} = \frac{M_w - M_1}{M_s}, \quad (6)$$

$$O_{HC} = \frac{M_o - M_1}{M_s}, \quad (7)$$

式中:

W_{HC} ——火麻仁蛋白持水性,g/g;

O_{HC} ——火麻仁蛋白持油性,g/g;

M_w ——吸水后离心管与沉淀物总质量,g;

M_o ——吸油后离心管与沉淀物总质量,g;

M_1 ——离心管与干样品总质量,g;

M_s ——干样品质量,g。

(3) 火麻仁蛋白消化率:参照王丹凤等^[14]的方法,按

式(8)计算样品的体外消化率。

$$D = \frac{N_0}{N_{总}} \times 100\%, \quad (8)$$

式中:

D ——火麻仁蛋白消化率,%;

N_0 ——上清液中氮含量,mg;

$N_{总}$ ——火麻仁蛋白粉中氮含量,mg。

1.4 数据处理

所有试验重复 3 次,采用 Excel 和 Design-Expert.8.0.6.1 软件进行数据统计、分析及绘图。

2 结果与分析

2.1 火麻仁粉中基本成分测定

经测定,火麻仁粉中水分含量为(6.11±0.04)%,蛋白质含量为(34.60±0.21)%,脂肪含量为(34.85±0.07)%。

2.2 前萃取单因素试验

2.2.1 KCl 浓度对火麻仁蛋白前萃取率的影响 由图 1 可知,当 KCl 浓度为 0.1 mol/L 时,前萃取率最高,达 67.55%。当 KCl 浓度 < 0.1 mol/L 时,前萃取率随 KCl 浓度的增大而缓慢增大,当 KCl 浓度 > 0.1 mol/L 时,前萃取率随 KCl 浓度的增大而不断减小。这可能是一定条件下 KCl 浓度的增大增加了离子强度,使表面活性剂之间排斥力降低,从而使反胶束更加稳定,萃取率随之增加。盐离子浓度过大,电场屏蔽效应增强,减小了蛋白与反胶束之间的静电力,且反胶束体积减小,减弱了反胶束对蛋白的萃取能力^[15]。

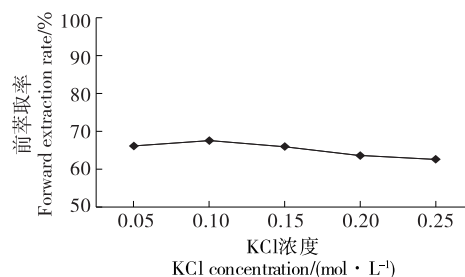


图 1 KCl 浓度对火麻仁蛋白前萃取率的影响

Figure 1 Effects of KCl concentration on the forward extraction rate of hemp seed proteins

2.2.2 pH 值对火麻仁蛋白前萃取率的影响 由图 2 可知,前萃取率随 pH 值的增加先增大后趋于平缓,当 pH 值为 6 时,前萃取率为 70.29%。pH 值通过影响蛋白表面电荷分布而影响反胶束与蛋白结合,AOT 为阴离子型表面活性剂,pH 值 < 6 时蛋白带正电被表面活性剂吸入反胶束内。pH 值 > 6 已超过火麻仁蛋白等电点,蛋白带负电与表面活性剂间产生排斥力,但试验发现 pH 值 > 6 后仍保持较高的蛋白萃取率,说明蛋白进入反胶束主要依靠蛋白的疏水作用而非蛋白与反胶束间的静电力^[16]。

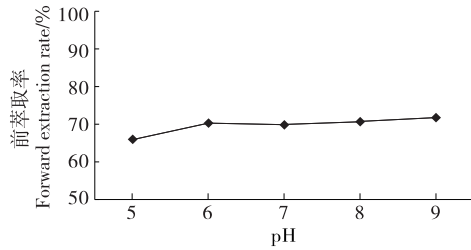


图 2 pH 值对大麻仁蛋白前萃取率的影响

Figure 2 Effects of pH on the forward extraction rate of hemp seed proteins

2.2.3 加水量对大麻仁蛋白前萃取率的影响 由图 3 可知,蛋白前萃取率随加水量的增大先增大后趋于平缓再下降,在加水量为 0.11 mL/mL 时前萃取率最大,为 69.78%。AOT 与增溶水结合形成反胶束, W_0 为反胶束中增溶水与反胶束溶液表面活性剂的物质的量之比,是影响反胶束体系的关键参数。在 AOT 质量浓度一定的条件下加水量增大会增大 W_0 ,使反胶束数量增加可溶解更多蛋白,且反胶束的体积随 W_0 的增加而增大,可使大分子蛋白质进入其中。当 W_0 增大到一定程度时,过多的增溶水使反胶束团界面刚性增强,渗透性减弱,水难以进入反胶束内核,反胶束由单相变为多相,反胶束膨胀、胶团被破坏,蛋白萃取率随之下降^[17]。

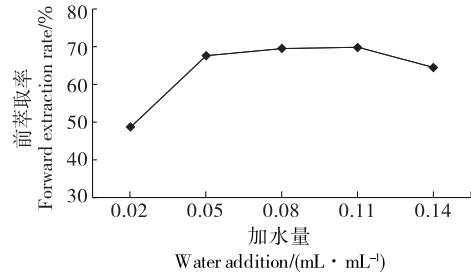


图 3 加水量对大麻仁蛋白前萃取率的影响

Figure 3 Effects of water addition on forward extraction rate of hemp seed proteins

2.2.4 AOT 质量浓度对大麻仁蛋白前萃取率的影响 由图 4 可知,蛋白前萃取率随 AOT 质量浓度的增大先增大后减小,在 AOT 质量浓度为 0.1 g/mL 时前萃取率最高,达 73.29%。AOT 质量浓度增加会增大反胶束溶液中增溶水的量,使反胶束数量增加,且反胶束溶液更加稳定,对蛋白的溶解能力更强。当 AOT 质量浓度增大到一定程度后,过多的 AOT 使反胶束形成更为复杂的聚集,且反胶束溶液极性和黏度增大,胶束分子碰撞减少,蛋白萃取能力减弱^[18]。

2.2.5 料液比对大麻仁蛋白前萃取率的影响 由图 5 可知,蛋白前萃取率随料液比的增大先增大后减小,在料液比为 1:40 (g/mL) 时前萃取率最高,达 76.83%。当料液比

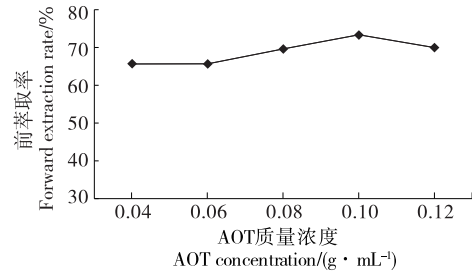


图 4 AOT 质量浓度对大麻仁蛋白前萃取率的影响

Figure 4 Effects of AOT concentration on forward extraction rate of hemp seed proteins

为 1:30 (g/mL) 时,蛋白前萃取率为 71.42%,但相同体积胶束液下料液比为 1:30 (g/mL) 的投料量 (0.266 7 g/mL) 较料液比为 1:40 (g/mL) 的更高,综合考虑实际生产,选取 1:30 (g/mL) 为最佳料液比。

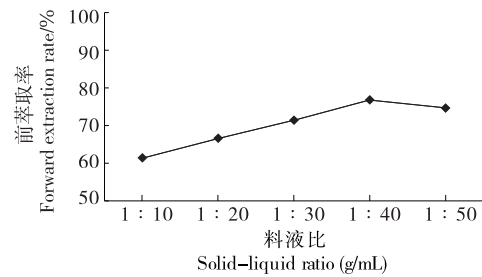


图 5 料液比对大麻仁蛋白前萃取率的影响

Figure 5 Effects of solid-liquid ratio on forward extraction rate of hemp seed proteins

2.2.6 前萃取温度对大麻仁蛋白前萃取率的影响 由图 6 可知,蛋白前萃取率随萃取温度的升高而增加,在 50 °C 时前萃取率达 78.65%,继续升高前萃取温度,蛋白萃取率变化较小。更高的前萃取温度使水分子热运动增加,蛋白与反胶束之间作用力增强,水分子包裹更多的蛋白进入反胶束内^[19]。过高的前萃取温度不仅会破坏反胶束体系还会使蛋白变性,因此 50 °C 为最佳前萃取温度。

2.2.7 前萃取时间对大麻仁蛋白前萃取率的影响 由

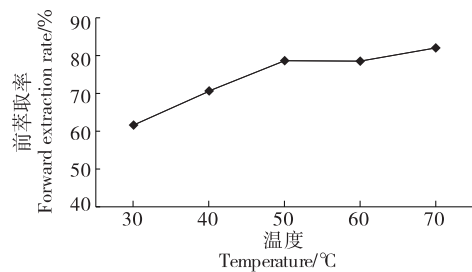


图 6 提取温度对大麻仁蛋白前萃取率的影响

Figure 6 Effects of extraction temperature on forward extraction rate of hemp seed proteins

图7可知,前萃取时间较短时,随着前萃取时间的增加,蛋白前萃取率显著增大,30 min后前萃取率增大趋势趋于平缓,在60 min时萃取率最高,达69.28%,此时受反胶束数量等限制已达反胶束萃取蛋白的最大限度,再增加前萃取时间也不能继续提高前萃取率。

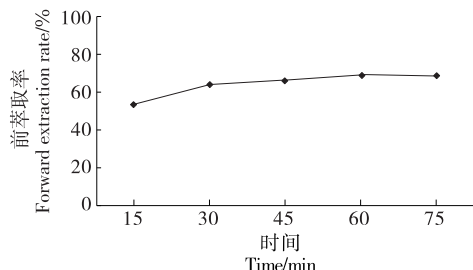


图7 提取时间对火麻仁蛋白前萃取率的影响

Figure 7 Effects of extraction time on forward extraction rate of hemp seed proteins

2.3 前萃取响应面实验

在前萃取单因素试验基础上,以AOT质量浓度、pH值及加水量为自变量,前萃取率为响应值,进行三因素三水平响应面优化试验。试验因素水平见表1,试验设计及结果见表2。

表1 前萃取响应面分析因素与水平

Table 1 Factors and levels of pre-extraction response surface analysis

水平	A AOT质量浓度/ (g·mL ⁻¹)	B pH值	C 加水量/ (mL·mL ⁻¹)
-1	0.06	5	0.05
0	0.08	6	0.08
1	0.10	7	0.11

采用Design-Expert.8.0.6.1软件对表2中的数据进行二次多项式回归拟合,最终的数学模型为:

$$Y=0.68-0.027A-0.042B+0.083C-0.005253AB+0.12AC+0.057BC-0.047A^2+0.014B^2-0.094C^2. \quad (9)$$

由表3可知,模型 $P<0.05$,显著;失拟项 $P=0.0685$,不显著; R^2 为0.9541,说明该模型可解释95.41%的响应值变化,模型的结果符合实际,可以用来对火麻仁蛋白前萃取率进行预测和优化。在该模型中,一次项C和交互项AC对火麻仁蛋白前萃取率影响极显著($P<0.01$),二次项 C^2 对火麻仁蛋白前萃取率影响显著($P<0.05$)。根据F值可知,各因素对火麻仁蛋白前萃取率的影响排序为加水量>pH值>AOT质量浓度。

通过对拟合模型进行分析,响应面优化火麻仁蛋白前萃取的最佳工艺条件为AOT质量浓度0.0904 g/mL、缓

表2 响应面优化试验方案及结果

Table 2 Scheme and results of response surface optimization test

试验号	A	B	C	前萃取率/%
1	0	0	1	68.64
2	0	0	0	67.93
3	0	0	0	68.38
4	0	1	-1	40.05
5	0	0	0	73.10
6	1	-1	0	67.75
7	-1	0	1	58.17
8	0	-1	-1	65.88
9	-1	1	0	62.87
10	-1	-1	0	64.28
11	1	0	-1	26.29
12	1	1	0	64.24
13	1	0	1	68.60
14	-1	0	-1	62.85
15	0	0	0	63.17
16	0	0	0	67.56
17	0	1	1	65.74

表3 前萃取回归模型方差分析†

Table 3 Analysis of variance of pre-extraction regression model

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	0.019	9	0.021	5.93	0.0142	*
A	5.660×10^{-3}	1	5.660×10^{-3}	1.58	0.2490	
B	0.014	1	0.014	3.95	0.0871	
C	0.055	1	0.055	15.23	0.0059	**
AB	1.100×10^{-4}	1	1.103×10^{-4}	0.03	0.8657	
AC	0.055	1	0.055	15.41	0.0057	**
BC	0.013	1	0.013	3.67	0.0969	
A ²	9.190×10^{-3}	1	9.191×10^{-3}	2.57	0.1533	
B ²	8.620×10^{-4}	1	8.618×10^{-4}	0.24	0.6388	
C ²	0.037	1	0.037	10.33	0.0148	*
残差	0.025	7	3.580×10^{-3}			
失拟项	0.020	3	6.710×10^{-3}	5.40	0.0685	
纯误差	4.970×10^{-3}	4	1.240×10^{-3}			
总差	0.220	16				

† *为显著($P<0.05$);**为极显著($P<0.01$); $R^2=0.9541$ 。

冲液pH值6.54、加水量0.1058 mL/mL、KCl浓度0.05 mol/L、料液比1:30 (g/mL)、前萃取时间60 min、前萃取温度50 °C,验证实验测得实际前萃取率71.38%,与

预测值 73.64% 相近。

2.4 后萃取单因素试验

2.4.1 pH 值对火麻仁蛋白后萃取率的影响 由图 8 可知, 蛋白后萃取率随 pH 值的增大先增加后减小, 在 pH 值为 7 时后萃取率最大, 为 74.36%。随着 pH 值的增加, 蛋白表面负电荷增多, 与阴离子表面活性剂间排斥力增大, 从而使蛋白与胶束分离, 蛋白后萃取率增加。当 pH 值 > 7 时, 过高的 pH 值会使蛋白表面带大量负电, 蛋白分子之间排斥力增大, 水相溶解蛋白能力减弱, 同时存在于有机相中的 AOT 带正电荷, 在两相的分界面上会由于静电引力作用形成一层由蛋白和表面活性剂的复合膜, 阻碍蛋白的萃取, 后萃取率反而下降^[16,19]。

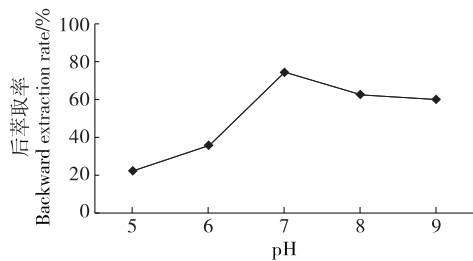


图 8 pH 值对火麻仁蛋白后萃取率的影响

Figure 8 Effects of pH on values the back extraction rate of hemp seed proteins

2.4.2 KCl 浓度对火麻仁蛋白后萃取率的影响 由图 9 可知, 当 KCl 浓度为 1.5 mol/L 时, 蛋白后萃取率为 70.76%, 浓度增大或减小均会使萃取率减小。盐浓度的增加会减小表面活性剂间的排斥力使反胶束体系减小, 反胶束体积减小不能容纳大分子蛋白且蛋白会随水分被排出, 高浓度的盐与胶束间形成浓度差, 加速蛋白流出。盐离子增大到一定程度后反胶束受到破坏, 蛋白大量溶出。而过多的盐会使蛋白与表面活性剂形成聚集体, 蛋白结构改变或盐析形成沉淀, 不利于蛋白的后萃取^[17-20]。

2.4.3 后萃取温度对火麻仁蛋白后萃取率的影响 由图 10 可知, 当后萃取温度 < 30 °C 时, 蛋白后萃取率随萃取

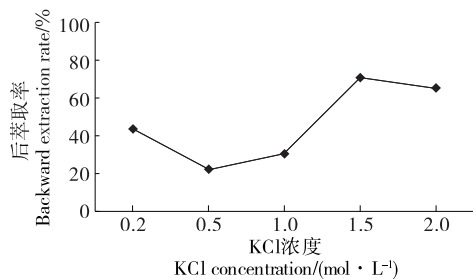


图 9 KCl 浓度对火麻仁蛋白后萃取率的影响

Figure 9 Effects of KCl concentration on the back extraction rate of hemp seed proteins

温度的升高而增大; 当后萃取温度 > 30 °C 时, 后萃取率不再增加。升高后萃取温度会使反胶束与水相分子运动加快, 为蛋白从反胶束核的溶出提供推动力, 后萃取率显著增加, 因此后萃取温度选取 30 °C 为宜。

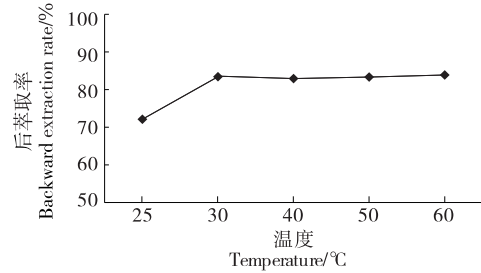


图 10 后萃取温度对火麻仁蛋白后萃取率的影响

Figure 10 Effects of post-extraction temperature on the post-extraction rate of hemp seed proteins

2.4.4 后萃取时间对火麻仁蛋白后萃取率的影响 由图 11 可知, 蛋白后萃取率随萃取时间的延长逐渐增加, 30 min 时大部分蛋白已溶出, 继续延长后萃取时间, 后萃取率也仅有小幅增加, 因此后萃取时间以 45 min 为宜。

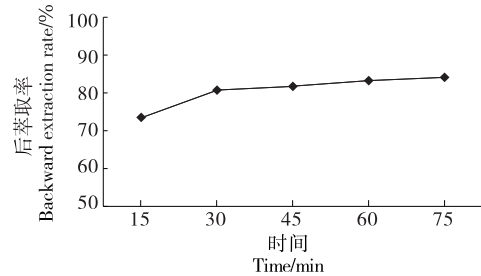


图 11 后萃取时间对火麻仁蛋白后萃取率的影响

Figure 11 Effects of post-extraction time on the post-extraction rate of hemp seed proteins

2.5 后萃取响应面试验

在后萃取单因素试验基础上, 以后萃取温度、pH 值及 KCl 浓度为自变量, 后萃取率为响应值, 进行三因素三水平响应面优化试验。试验因素水平见表 4, 试验设计及结果见表 5。

表 4 后萃取响应面分析因素与水平

Table 4 Factors and levels of back extraction response surface analysis

水平	A 后萃取温度/°C	B pH 值	C KCl 浓度/(mol · L ⁻¹)
-1	25	6	1.0
0	35	7	1.5
1	45	8	2.0

表5 响应面优化试验方案及结果

Table 5 Scheme and results of response surface optimization test

试验号	A	B	C	后萃取率/%
1	-1	-1	0	52.14
2	0	0	0	77.53
3	-1	1	0	77.38
4	1	1	0	73.36
5	0	1	-1	73.80
6	0	0	0	81.66
7	0	0	0	77.83
8	0	0	0	79.04
9	0	1	1	71.45
10	-1	0	-1	79.90
11	1	0	-1	80.82
12	1	-1	0	46.16
13	0	-1	1	44.08
14	1	0	1	69.22
15	0	-1	-1	41.12
16	-1	0	1	71.37
17	0	0	0	70.21

采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件对表 5 中的数据进行二次多项式的逐步回归拟合, 最终的数学模型为:

$$Y=0.77-0.014A+0.14B-0.024C+0.004902AB-0.007687AC-0.013BC+0.014A^2-0.16B^2-0.033C^2.$$

(10)

由表 6 可知, 模型 $P<0.01$, 极显著; 失拟项 P 为 0.390 2 >0.05 , 不显著, 说明拟合效果较好; $R^2=0.972 2$, 说明该模型可解释 97.22% 的响应值变化, 模型的结果符合实际, 可以用来对大麻仁蛋白后萃取率进行预测和优化。一次项 B 和二次项 B^2 对大麻仁蛋白后萃取率影响极显著 ($P<0.01$)。各因素对大麻仁蛋白后萃取率影响排序为 pH 值 $>$ KCl 浓度 $>$ 后萃取温度。

通过对拟合模型进行分析, 响应面优化大麻仁蛋白前萃取的最佳工艺条件为 pH 值 7.5、KCl 浓度 1.5 mol/L、后萃取时间 45 min、后萃取温度 27 °C, 验证实验测得实际后萃取率 80.59%, 与预测值 82.19% 相近。

2.6 反胶束法提取大麻仁蛋白的理化性质

2.6.1 大麻仁蛋白的溶解性 由图 12 可知, 大麻仁蛋白溶解度受 pH 值影响显著, 随着 pH 值的增大, 大麻仁蛋白溶解度先下降后升高, 当 pH 值为 5.0 时溶解度为 19.68%, 当 pH 值为 10.0 时溶解度高达 96.90%。蛋白质的溶解度可以反映蛋白质与水分子之间的水合能力, 水分子与蛋白质之间的水合能力越强则溶解度越高^[21], 良好的溶解性往往意味着良好的蛋白质加工特性^[22]。pH 值 5.0 接近

表6 后萃取回归模型方差分析†

Table 6 Analysis of variance of back extraction regression model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.290	9	0.032	15.50	0.000 8	**
A	1.578×10^{-3}	1	1.578×10^{-3}	0.77	0.409 0	
B	0.160	1	0.160	77.27	$<0.000 1$	**
C	4.766×10^{-3}	1	4.766×10^{-3}	2.33	0.170 8	
AB	9.613×10^{-5}	1	9.613×10^{-5}	0.05	0.834 6	
AC	2.364×10^{-4}	1	2.364×10^{-4}	0.12	0.743 9	
BC	7.053×10^{-4}	1	7.053×10^{-4}	0.34	0.575 6	
A ²	7.785×10^{-4}	1	7.785×10^{-4}	0.38	0.556 9	
B ²	0.110	1	0.110	55.04	0.000 1	**
C ²	4.550×10^{-3}	1	4.550×10^{-3}	2.22	0.179 6	
残差	0.014	7	2.046×10^{-3}			
失拟项	7.066×10^{-3}	3	2.355×10^{-3}	1.30	0.390 2	
纯误差	7.258×10^{-3}	4	1.815×10^{-3}			
总差	0.300	16				

† **为极显著 ($P<0.01$); $R^2=0.972 2$ 。

于大麻仁蛋白等电点, 此时蛋白间静电排斥力最低会聚集沉淀。蛋白结构在碱性条件下变得疏松, 次级键被破坏, 蛋白质分子表面带同种电荷而相互排斥, 因此溶解度随 pH 值的升高而增大^[23]。说明大麻仁蛋白是一种碱性蛋白, 一定条件下较高的溶解度使其适合作为辅料添加至食品中。

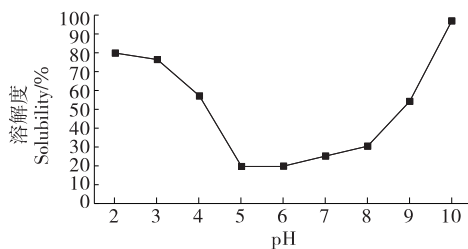


图 12 大麻仁蛋白在各 pH 下的溶解

Figure 12 Solubility of hemp seed protein at different pH values

2.6.2 大麻仁蛋白的持水、持油性 由图 13 可知, 大麻仁蛋白的持水性、持油性分别为 0.71, 3.57 g/g。蛋白质持水/持油性是指蛋白质截留水/油、阻止其渗出的能力^[24], 蛋白质合适的持水、持油性可用于改善食品的口感与风味^[25]。大麻仁蛋白的持水性较差, 可能是中性条件下大麻仁蛋白聚集使极性基团被包裹于内部而疏水, 通过调整 pH 值或进行改性可解决这一问题^[26]。大麻仁蛋白持油性与大豆蛋白相当, 能够应用于高油脂食品的生产加工中。

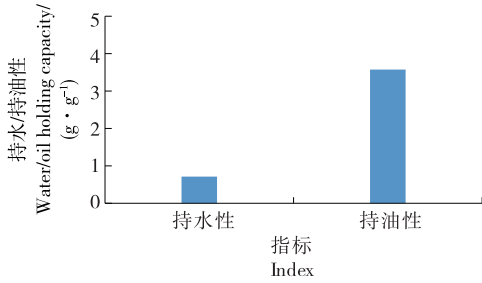


图 13 火麻仁蛋白的持水性与持油性

Figure 13 Water holding capacity and oil holding capacity of hemp seed proteins

2.6.3 火麻仁蛋白的体外消化率 由图 14 可知,火麻仁蛋白经胃肠消化 4 h 后消化率达 93.83%,与 Wang 等^[27]的研究相近。火麻仁蛋白不具有致敏性,具有理想的氨基酸组成。人体对蛋白的需求主要取决于蛋白中的氨基酸,火麻仁蛋白具有平衡的氨基酸谱,含有所有的必需氨基酸,满足粮农组织/世界卫生组织建议的 2~5 岁儿童的蛋白要求,其中精氨酸含量超过大多数食品蛋白,使得火麻仁蛋白作为促进心血管健康的食品配方的营养和生物活性成分特别有价值^[28]。此外,火麻仁蛋白经酶解可产生具有血管紧张素 I 转换酶抑制、肾素抑制、乙酰胆碱酯酶抑制、金属结合能力、抗氧化活性、降胆固醇作用和血糖调节等生物活性的肽,结合火麻仁优异的消化率,火麻仁蛋白在功能性食品中具有广阔前景。

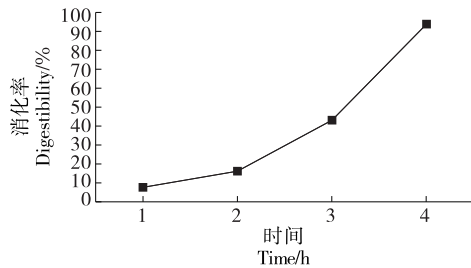


图 14 不同时间火麻仁蛋白体外消化率

Figure 14 In vitro digestibility of hemp seed proteins at different time

3 结论

火麻仁蛋白提取的最佳工艺参数为 2-乙基己基琥珀酸酯磺酸钠质量浓度 0.090 4 g/mL、前萃取液 pH 值 6.54、加水量 0.105 8 mL/mL、KCl 浓度 0.05 mol/L、料液比 1:30 (g/mL)、前萃取时间 60 min、前萃取温度 50 °C、前萃取率达 71.38%;后萃取液 pH 值 7.5、KCl 浓度 1.5 mol/L、后萃取时间 45 min、后萃取温度 27 °C、后萃取率达 80.59%,总萃取率为 57.53%。经后萃取后透析、干燥获得的火麻仁蛋白呈白色的蓬松粉末状,色泽洁白无异味,说明反胶束法不仅可提取出优质的食品级火麻仁蛋白,且提取率

和纯度均较高。相较于其他蛋白而言,火麻仁蛋白具有碱性条件下溶解度高、持油性好、易消化、营养价值高等优势,使火麻仁蛋白在食品应用中具有独特的价值,尤其适合开发为适用于婴幼儿与老龄人群的功能性食品。但中性条件下溶解度较差、如何提高持水性等功能性问题有待进一步研究。

参考文献

[1] ALUKO R E. Hemp seed (*Cannabis sativa* L.) proteins: composition, structure, enzymatic modification, and functional or bioactive properties[M]// NADATHUR A R, WANASUNDARA J, SCANLIN L. Sustainable protein sources. Elsevier: Academic Press, 2017: 121-132.

[2] HADNADEV M, DAPČEVIĆ-HADNADEV T, LAZARIDOU A, et al. Hempseed meal protein isolates prepared by different isolation techniques Part I: physicochemical properties[J]. Food Hydrocolloids, 2018, 79: 526-533.

[3] KARABULUT G, KAHRAMAN O, PANDALANENI K, et al. A comprehensive review on hempseed protein: production, functional and nutritional properties, novel modification methods, applications, and limitations[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 253: 127240.

[4] 张涛, 卢蓉蓉, 钱平, 等. 汉麻籽蛋白的提取及性质研究[J]. 食品与发酵工业, 2008(8): 173-179.

ZHANG T, LU R R, QIAN P, et al. Study on extraction and properties of hemp seed protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2008(8): 173-179.

[5] 徐梦婷, 郝艳宾, 齐建勋, 等. 多酚与蛋白相互作用对蛋白特性影响研究进展[J]. 食品与机械, 2022, 38(10): 224-229.

XU M T, HAO Y B, QI J X, et al. Interactions between food polyphenols and protein and their effects on protein characteristics[J]. Food & Machinery, 2022, 38(10): 224-229.

[6] 孙雪, 赵晓燕, 朱运平, 等. 反胶束对植物蛋白的结构、功能性和应用的影响研究进展[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(1): 196-202.

SUN X, ZHAO X Y, ZHU Y P, et al. Research progress on the effects of reverse micelles on the structure, function and application of plant proteins[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(1): 196-202.

[7] FANG B, GU Z, OHM J B, et al. Reverse micelles extraction of hemp protein isolate: impact of defatting process on protein structure, functionality, and aromatic profile[J]. Food Hydrocolloids, 2023, 135: 108158.

[8] 杨趁仙, 陈复生, 刘昆仑, 等. 反胶束萃取技术及其对植物蛋白质结构特性的影响[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 240-243.

YANG C X, CHEN F S, LIU K L, et al. Progress on reverse micelles technology and its effects on structure characteristics of plant protein[J]. Food & Machinery, 2013, 29(6): 240-243.

[9] 程小丽, 陈复生, 李里特, 等. 超声波辅助 AOT 反胶束体系后萃大豆蛋白的研究[J]. 食品与机械, 2009, 25(5): 71-74.

CHENG X L, CHEN F S, LI L T, et al. Studies of ultrasound on

- backward extraction of soybean protein in AOT reverse micelles system[J]. *Food & Machinery*, 2009, 25(5): 71-74.
- [10] 郭珍, 陈复生, 方志锋. 复合反胶束萃取花生蛋白的工艺优化[J]. *食品与机械*, 2013, 29(2): 100-104.
- GUO Z, CHEN F S, FANG Z F. Optimization of composite reverse micelles extraction of protein from peanut by orthogonal design[J]. *Food & Machinery*, 2013, 29(2): 100-104.
- [11] 簪丽霞, 王宇, 陈君红, 等. 反胶束体系萃取牡丹籽蛋白的两种工艺比较研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(8): 23-27.
- ZAN L X, WANG Y, CHEN J H, et al. Comparative study on two processes of extracting peony seed protein by reverse micelles system[J]. *China Oils and Fats*, 2016, 41(8): 23-27.
- [12] SHEN P, GAO Z, XU M, et al. The impact of hempseed dehulling on chemical composition, structure properties and aromatic profile of hemp protein isolate[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 106: 105889.
- [13] YAO S, LI W, WU Y, et al. The impact of high-intensity ultrasound-assisted extraction on the structural and functional properties of hemp seed protein isolate (HPI)[J]. *Foods*, 2023, 12(2): 348.
- [14] 王丹凤, 薛舒苑, 周学府, 等. 酪蛋白-汉麻籽蛋白复合物制备工艺优化及其消化性和致敏性研究[J]. *中国食品学报*, 2023, 23(7): 267-277.
- WANG D F, XUE S Y, ZHOU X F, et al. Optimization of preparation process of casein-hemp seed protein complex and study on its digestibility and allergenicity[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2023, 23(7): 267-277.
- [15] 李其昌. 反胶束技术分离榛仁蛋白和油脂的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016: 26.
- LI Q C. Study about isolating protein and oil from hazelnut kernel by reverse milles extraction[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016: 26.
- [16] 陈玉婷. 反胶束制备核桃蛋白的工艺及结构与功能性研究[D]. 济南: 济南大学, 2017: 17-28.
- CHEN Y T. Study on the technology, structure and function properties of walnut protein prepared of by reverse micelles [D]. Jinan: University of Jinan, 2017: 17-28.
- [17] 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): 354-360.
- ZHAO X Y, XUE W T, CHEN F S, et al. Factors affecting the extraction ability of protein in reverse micelle system and its mechanism[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2009, 25(11): 354-360.
- [18] 和丽, 吴君瑞, 王雪峰, 等. 反胶束法提取辣木籽蛋白工艺优化[J]. *中国油脂*, 2021, 46(7): 80-85, 98.
- HE L, WU J R, WANG X F, et al. Optimization of *Moringa oleifera* seed protein extraction process by reverse micelle method[J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(7): 80-85, 98.
- [19] 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: 39.
- CHENG X L. The study on reverse micelle system to separate soybean protein and oil[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2010: 39.
- [20] 张玲, 梁妍, 陈金梅, 等. 响应面法优化反胶束提取花生粕蛋白后萃工艺[J]. *粮食与油脂*, 2017, 30(11): 59-63.
- ZHANG L, LIANG Y, CHEN J M, et al. Response surface methodology was used to optimize the backward extraction process of peanut meal protein by reverse micelle extraction [J]. *Cereals & Oils*, 2017, 30(11): 59-63.
- [21] 卢秋玲, 李琅, 杨敏, 等. 超声处理对文冠果种粕蛋白结构及性质的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(20): 79-87.
- LU Q L, LI L, YANG M, et al. Effect of ultrasonic treatment on the structure and properties of *Xanthoceras sorbifolia* seed meal protein[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(20): 79-87.
- [22] 李舒婷, 齐薇燕, 白鹏丽, 等. 吊干杏仁仁蛋白功能特性和结构特性[J]. *食品研究与开发*, 2024, 45(2): 87-95, 102.
- LI S T, QI W Y, BAI P L, et al. Functional and structural properties of dried apricot kernel protein[J]. *Food Research and Development*, 2024, 45(2): 87-95, 102.
- [23] 李琳, 金丽娜, 郭佩佩, 等. 富硒小米蛋白的理化性质、功能特性及结构研究[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(3): 259-267.
- LI L, JIN L N, GUO P P, et al. Study on the physicochemical properties, functional properties and structure of selenium-enriched millet protein[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(3): 259-267.
- [24] 权帆, 王文斌, 朱玲丽, 等. 藜麦蛋白提取工艺优化及其功能特性研究[J]. *中国调味品*, 2022, 47(11): 50-56.
- QUAN F, WANG W B, ZHU L L, et al. Study on extraction process optimization and functional properties of quinoa protein[J]. *China Condiment*, 2022, 47(11): 50-56.
- [25] 吴萍, 周际松, 邓乾春, 等. 核桃蛋白的结构、营养价值、制备、功能特性及在食品中的应用[J]. *食品科学*, 2024, 45(15): 329-337.
- WU P, ZHOU J S, DENG Q C, et al. The structure, nutritional value, preparation, functional properties and application in food of walnut protein[J]. *Food Science*, 2024, 45(15): 329-337.
- [26] TANG C H, TEN Z, WANG X S, et al. Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(23): 8 945-8 950.
- [27] WANG X S, TANG C H, YANG X Q, et al. Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins[J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(1): 11-18.
- [28] WANG Q, XIONG Y L. Processing, nutrition, and functionality of hempseed protein: a review[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(4): 936-952.