

醇洗前处理对樟树籽仁分离蛋白产品 及其蛋白质结构的影响

孙旦,姜秋水,孙逸文,刘轩,沈华

(浙江省粮食科学研究所有限责任公司,杭州310012)

摘要:为解决樟树籽蛋白色泽深、纯度低的问题,将樟树籽脱壳、冷榨脱脂、粉碎后制得脱脂樟树籽仁粉,经不同体积分数乙醇前处理后,用碱溶酸沉法制备樟树籽仁分离蛋白(CPI)。对CPI的白度值、纯度、溶解度、分子质量和结构进行分析。结果表明:经55%~85%乙醇前处理,CPI色泽明显改善,其中经65%乙醇前处理后制备的CPI白度值由 $(0.70 \pm 0.02)\%$ 提高至 $(6.00 \pm 0.02)\%$;经95%乙醇前处理,CPI纯度由 $(60.61 \pm 0.35)\%$ 提高至 $(87.45 \pm 0.14)\%$;经85%乙醇前处理,CPI的溶解度由 $(81.87 \pm 0.15)\%$ 提高至 $(92.12 \pm 0.16)\%$,而经95%乙醇前处理后其溶解度下降至 $(62.72 \pm 0.05)\%$;CPI的分子质量主要分布于48、13 kDa和35 kDa,醇洗前处理后,分子质量为15 kDa的亚基消失,250 kDa的聚合物含量减少(除65%乙醇前处理的)。碱溶酸沉工艺导致蛋白质分子间的氢键被破坏, β -折叠和 β -转角减少,无规卷曲和 α -螺旋增加,而乙醇对CPI二级结构无明显影响。采用醇洗、碱溶酸沉的方法可制备色泽浅、溶解性好、纯度较高的CPI。

关键词:樟树籽仁蛋白;醇处理;结构;溶解能力

中图分类号:TS229;Q51

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)09-0065-07

Effects of ethanol washing pretreatment on camphor seed kernel protein isolate and its protein structure

SUN Dan, JIANG Qiushui, SUN Yiwen, LIU Xuan, SHEN Hua

(Zhejiang Grain Science Research Institute Co., Ltd., Hangzhou 310012, China)

Abstract: In order to solve the problem of deep colour and low purity of camphor seed protein, camphor seed kernel protein isolate (CPI) was prepared by alkali solution and acid precipitation method from dehulled, defatted with cold press and crushed camphor seed cake pretreated by different volume fractions of ethanol. The whiteness value, purity, solubility, molecular weight and structure of CPI were analyzed. The results showed that the colour of CPI was obviously improved after 55%–85% ethanol pretreatment. The whiteness value of CPI increased from $(0.70 \pm 0.02)\%$ to $(6.00 \pm 0.02)\%$ by 65% ethanol pretreatment. The protein purity of CPI increased from $(60.61 \pm 0.35)\%$ to $(87.45 \pm 0.14)\%$ by 95% ethanol pretreatment. After 85% ethanol pretreatment, the solubility of CPI increased from $(81.87 \pm 0.15)\%$ to $(92.12 \pm 0.16)\%$, while after 95% ethanol pretreatment, the solubility decreased to $(62.72 \pm 0.05)\%$. The molecular weight of CPI was mainly distributed in 48, 13 kDa and 35 kDa. After ethanol washing pretreatment, the subunit with the molecular weight of 15 kDa disappeared, and the content of the polymer with the molecular weight of 250 kDa decreased (except that pretreated with 65% ethanol). The hydrogen bonds of protein molecules were destroyed, β -folding and β -turning structure decreased, and random crimp and α -helix structure increased by alkali solution and acid precipitation

收稿日期:2022-05-12;修回日期:2022-07-07

作者简介:孙旦(1995),女,助理工程师,硕士,研究方向为油脂与植物蛋白(E-mail)969631515@qq.com。

通信作者:姜秋水,高级工程师(E-mail)jqs008@163.com。

process, and the secondary structure of CPI was not significantly affected by ethanol. CPI with low colour, good solubility and high purity can be prepared by means of ethanol washing, alkali solution and acid precipitation.

Key words: camphor seed kernel protein; ethanol treatment; structure; solubility

樟树籽仁富含油脂和蛋白质,其油脂含量为55%~65%,油中脂肪酸组成以癸酸和月桂酸等中碳链脂肪酸为主,二者占90%以上;其蛋白质含量约为18%,是一种亟待开发利用的重要植物蛋白资源^[1-2]。目前,对于樟树籽的研究主要集中在樟树籽仁油,而对樟树籽蛋白的提取、理化特性等方面的研究和文献报道较少。

樟树籽蛋白在提取过程中,由于多酚氧化导致蛋白呈咖啡色,同时蛋白的纯度降低,这是樟树籽蛋白加工利用过程中最直接且重要的一个问题。当前,醇洗法在植物蛋白脱色中应用较为普遍,醇溶液具有较强的有机物溶解能力,能够有效去除呈色、呈味物质^[3-4]。然而,醇溶液会改变蛋白质的结构,造成蛋白质变性,从而影响蛋白质的功能性质。有研究报道醇变性蛋白的变性价构象的 α -螺旋程度比天然态构象的更高,而热变性等其他变性方式处理后,蛋白质构象一般从有规律的 α -螺旋、 β -折叠变成不规则的随机卷曲构象^[5-8]。目前,对大豆蛋白变性过程的研究比较透彻,且主要是针对热变性。醇溶液对樟树籽仁蛋白结构的影响及其与溶解性之间相关性的研究未曾报道。

本研究采用乙醇醇洗前处理制备色泽较好的樟树籽仁分离蛋白(CPI),并考察醇洗对CPI结构和溶解性(蛋白溶解性是其在食品加工过程中能够得到广泛应用的一个重要的指标,同时也会影响其乳化性、持水性等其他加工特性)的影响,通过研究不同体积分数乙醇前处理条件下CPI溶解性与其分子质量及二级结构之间的关联,为樟树籽仁蛋白的深加工提供基础理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

小叶香樟籽,江苏亨信种业有限公司;氢氧化钠、浓盐酸、浓硫酸、无水乙醇、三氯甲烷、甲醇、石油醚、无水硫酸钠、十二烷基硫酸钠(SDS)、考马斯亮蓝G-250、2,4-二硫苏糖醇(DTT)、香草醛等试剂,上海凌峰化学试剂有限公司;98%茶皂素标准品,北京索莱宝科技有限公司;没食子酸标准溶液、福林酚,上海源叶生物科技有限公司。

ME204E/02分析天平、pH计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;KDN-DI自动定氮仪,上海新嘉电子有限公司;液压榨油机,南阳乐发机械设备有限公司;高速多功能粉碎机,铂欧五金制造品有限公司;

WSB-VI智能白度仪,杭州大吉光电仪器有限公司;GZX-9070 MBE数显鼓风干燥箱,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;HWS-24电热恒温水浴锅,上海恒一科学仪器有限公司;TG1650-WS台式高速离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;UV1900紫外可见分光光度计,上海菁华科技仪器有限公司;凝胶成像仪、垂直电泳仪,伯乐生命医学产品有限公司;Chirascan V100圆二色光谱仪,英国应用光物理公司。

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理

樟树籽筛选后,脱壳得到樟树籽仁,用冷榨法脱脂得到樟树籽仁饼。樟树籽仁饼经高速多功能粉碎机粉碎后过0.25 mm(60目)筛,得到脱脂樟树籽仁粉,于4℃下保存。

1.2.2 CPI的制备

醇洗前处理:将脱脂樟树籽仁粉分别用体积分数为55%、65%、75%、85%和95%的乙醇以料液比1:20(质量体积比)在室温下搅拌2 h,重复3次,真空过滤后所得滤饼置于通风橱12 h以挥干乙醇,然后置于60℃烘箱干燥6 h,得到醇洗脱脂樟树籽仁粉。

CPI的提取:以醇洗脱脂樟树籽仁粉为原料,在料水比1:9(质量体积比)、pH 9.0下室温提取1 h,离心收集上清液。沉淀重复提取2次。合并上清液,调节pH至4.5,搅拌30 min,并静置30 min,使蛋白在等电点下充分沉淀,离心获得蛋白沉淀。将沉淀分散在蒸馏水中,调节pH至7.0,离心除去不溶性杂质,将上清液冷冻干燥,得到CPI,于4℃下保存。

以CPI中蛋白质含量表示其纯度。CPI提取率(Y_1)按式(1)计算。

$$Y_1 = m_1 / m_2 \times 100\% \quad (1)$$

式中: m_1 为提取液中蛋白质质量; m_2 为原料中蛋白质质量。

1.2.3 基本成分分析

水分的测定,按照GB 5009.3—2016直接干燥法;灰分的测定,按照GB 5009.4—2016食品中总灰分的测定;蛋白质的测定,按照GB 5009.5—2016凯氏定氮法;脂肪的测定,氯仿-甲醇法^[9];多酚的测定,福林酚分光光度法^[10];皂苷的测定,香草醛-浓硫酸法^[11]。

1.2.4 SDS-PAGE分析

将样品与蛋白溶解液(4% SDS,48%甘油,pH 6.8的0.125 mol/L Tris-HCl缓冲液,0.01%溴酚

蓝)混合,最终样品溶液的蛋白质质量浓度为0.2 mg/mL,作为非还原电泳样品。取1 mL样品溶液,加入20 μ L 1 mol/L的DTT,煮沸5 min后作为还原电泳样品。SDS-PAGE分析参考Huang等^[12]的方法,在5%浓缩胶和12.5%分离胶,上样量10 μ L,电流45 mA条件下进行电泳。电泳完成后固定1 h,0.2%考马斯亮蓝G-250染色液染色2 h,最后在脱色液中脱色2 h。用凝胶成像仪拍照,用Image Lab 3.0软件定量分析蛋白条带的强度,并计算条带的含量。

1.2.5 CPI溶解性的测定

参照Deng等^[13]的方法并稍微修改。将CPI配成蛋白质质量浓度为0.002 g/mL的溶液,于10 000 g离心30 min,用凯氏定氮法测定上清液和CPI蛋白质含量,根据式(2)计算溶解性,以氮溶指数(NSI)表示。

$$I_{NS} = m_3/m_4 \times 100\% \quad (2)$$

式中: I_{NS} 为氮溶指数值; m_3 为上清液中蛋白质质量; m_4 为CPI中蛋白质质量。

1.2.6 圆二色谱(CD)分析

远紫外光区CD测定参考Wu等^[14]的方法,将不同体积分数乙醇前处理后制备的CPI溶液用0.01 mol/L PBS溶液稀释至0.2 mg/mL,置于厚度为2 mm的石英比色皿中,以0.01 mol/L PBS溶液为空白对照,在测量温度25 $^{\circ}$ C、扫描速度1 s/nm下,于190~260 nm处测定吸收值。

表1 不同体积分数乙醇前处理的脱脂樟树籽仁粉(DFCP)的基本组成

DFCP	干基含量/%					
	蛋白质	脂肪	碳水化合物	灰分	多酚	皂苷
CK	33.66 \pm 0.11 ^d	23.56 \pm 0.08 ^b	27.17 \pm 0.08 ^b	5.21 \pm 0.02 ^e	2.72 \pm 0.02 ^{ab}	7.68 \pm 0.03 ^b
55%乙醇	39.70 \pm 0.09 ^{bc}	26.92 \pm 0.12 ^a	23.91 \pm 0.10 ^e	5.52 \pm 0.04 ^{de}	1.00 \pm 0.02 ^{ef}	2.95 \pm 0.04 ^d
65%乙醇	39.18 \pm 0.20 ^c	27.51 \pm 0.09 ^a	24.14 \pm 0.12 ^e	5.70 \pm 0.03 ^{cd}	1.18 \pm 0.01 ^e	2.29 \pm 0.05 ^c
75%乙醇	39.70 \pm 0.38 ^{bc}	24.11 \pm 0.09 ^b	25.67 \pm 0.31 ^d	5.96 \pm 0.04 ^c	1.52 \pm 0.03 ^d	3.04 \pm 0.06 ^d
85%乙醇	40.68 \pm 0.10 ^b	19.45 \pm 0.07 ^c	26.21 \pm 0.20 ^c	6.32 \pm 0.05 ^b	2.45 \pm 0.02 ^c	4.89 \pm 0.04 ^c
95%乙醇	45.31 \pm 0.08 ^a	4.45 \pm 0.10 ^d	31.84 \pm 0.11 ^a	7.27 \pm 0.03 ^a	2.98 \pm 0.02 ^a	8.15 \pm 0.03 ^a

注:CK为未经醇洗处理的脱脂樟树籽仁粉;碳水化合物含量=100% - 蛋白质含量 - 脂肪含量 - 灰分含量 - 多酚含量 - 皂苷含量;同列不同上标字母表示有显著性差异($p < 0.05$)

2.2 醇洗前处理对CPI色泽的影响

醇洗对脱脂樟树籽仁粉和CPI色泽(采用白度仪测定)的影响见图1。由图1可见,55%、65%和75%乙醇处理后,脱脂樟树籽仁粉的白度值显著降低($p < 0.05$),由(40.10 \pm 0.08)%分别降低至(21.30 \pm 0.05)%、(25.25 \pm 0.04)%和(32.35 \pm 0.06)% ,说明在此范围内,随着乙醇体积分数的增加,白度值提高。85%乙醇对脱脂樟树籽仁粉的色泽无显著影响($p > 0.05$),95%乙醇处理后白度值提高至(47.90 \pm 0.04)%。结果表明,醇洗脱脂樟树籽仁粉的白度值

1.2.7 数据处理

所有的试验均测定3次取平均值,并利用Origin 8.5软件进行图表绘制。使用SPSS Statistics 17.0在 $p < 0.05$ 水平下对数据进行显著性差异分析。

2 结果与讨论

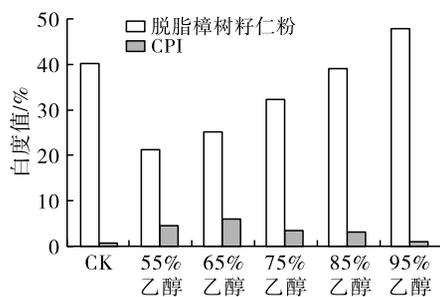
2.1 醇洗前处理后脱脂樟树籽仁粉的基本组成

本研究采用冷榨脱脂法以避免有机溶剂带来的蛋白质变性问题。不同体积分数乙醇前处理对脱脂樟树籽仁粉基本成分的影响见表1。由表1可见,经冷榨脱脂后,樟树籽仁粉中脂肪含量为(23.56 \pm 0.08)% ,蛋白质和碳水化合物含量分别为(33.66 \pm 0.11)%和(27.17 \pm 0.08)% ,还含有一些皂苷和多酚,含量分别为(7.68 \pm 0.03)%和(2.72 \pm 0.02)%。体积分数55%~85%乙醇能够有效脱除多酚和皂苷。55%乙醇对多酚脱除效果最佳,将其含量降至(1.00 \pm 0.02)% ;而65%乙醇对皂苷脱除效果最佳,将其含量降至(2.29 \pm 0.05)% ;95%乙醇对多酚和皂苷无明显脱除效果,但能够使脱脂樟树籽仁粉中脂肪含量显著降低($p < 0.05$),蛋白质含量显著提高($p < 0.05$)。结果表明,低体积分数乙醇有利于皂苷和多酚的提取,而高体积分数乙醇可有效提取脂肪。因此,采用不同体积分数乙醇梯度处理,可有效去除脱脂樟树籽仁粉中的其他成分,提高蛋白提取率和纯度。

与多酚残留量呈正相关,即多酚残留量越高,醇洗脱脂樟树籽仁粉的颜色越浅。原因可能是在醇洗过程中一方面多酚发生氧化而形成红色素,导致颜色加深;另一方面脱脂樟树籽仁粉颗粒内部的多酚转移至乙醇提取液中,随着多酚的氧化,其产物红色素吸附在颗粒表面^[15-18],因此多酚提取量越大,红色素产生得越多,被脱脂樟树籽仁粉颗粒表面吸附得越多,其颜色越深,也即醇洗樟树籽仁粉中残留的多酚越少,颜色越深,反之则越浅。

由图1还可见,脱脂樟树籽仁粉经醇洗前处理后

制备的 CPI 色泽有一定改善,除 95% 乙醇前处理后 CPI 的白度值无显著变化 ($p > 0.05$),其余体积分数乙醇前处理后 CPI 的白度值均显著提高 ($p < 0.05$),65% 乙醇前处理后 CPI 色泽最浅,白度值由 $(0.70 \pm 0.02)\%$ 提高至 $(6.00 \pm 0.02)\%$ 。原因可能为 65% 乙醇前处理后脱脂樟树籽仁粉中多酚和皂苷的残留量最低(见表 1,多酚含量与 55% 乙醇前处理的无显著差异),在蛋白提取过程中多酚氧化程度低,且水溶性的呈色物质在酸沉过程中大部分被去除而呈现较浅的色泽。研究表明,在蛋白提取过程中多酚与蛋白质相互结合,多酚与多酚氧化酶充分接触,发生氧化反应会造成蛋白色泽加深^[19-20]。皂苷作为一种非离子型表面活性剂,能够与蛋白质因静电和氢键的作用形成络合物,进而影响樟树籽仁中蛋白质的结构和功能性质,也可能会影响蛋白质与多酚之间的相互作用,导致蛋白色泽的改变^[21-22]。



注:CK 表示脱脂樟树籽仁粉未经醇洗处理

图 1 醇洗后脱脂樟树籽仁粉和 CPI 的白度值

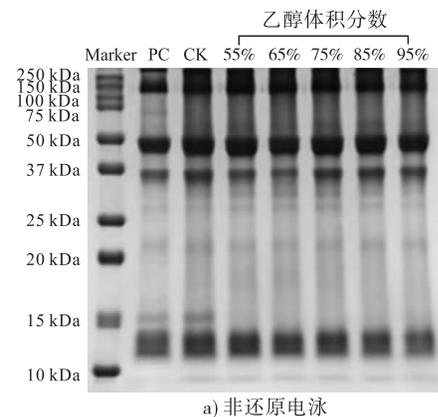
2.3 醇洗前处理对 CPI 结构的影响

2.3.1 亚基分子量

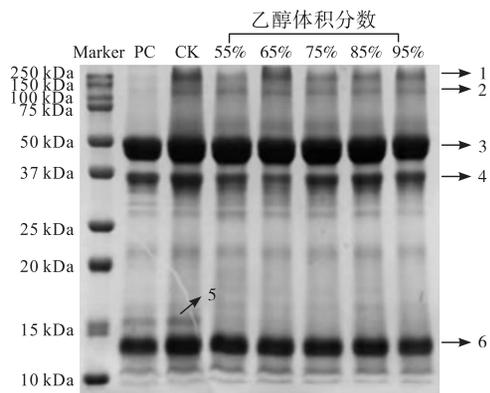
经不同体积分数的乙醇前处理后制备的 CPI 的非还原和还原 SDS - PAGE 图谱见图 2。由图 2 可见,CPI 中主要亚基的分子质量为 48、13 kDa 和 35 kDa,在 25 ~ 35 kDa、22 kDa 和 10 kDa 分子质量附近也有少量亚基。对比图 2a 与图 2b 中的泳道 PC 可知,还原电泳图谱中,150 kDa 和 250 kDa 处的条带消失,而 48、13 kDa 和 35 kDa 3 个主要条带明显加深,30 kDa 和 11 kDa 处出现较浅的新条带。说明分子质量为 150 kDa 和 250 kDa 的聚合物由分子质量为 48、13 kDa 和 35 kDa 这些多肽链组成,还原后二硫键打开,聚合物裂解。比较图 2b 中泳道 PC 与 CK 可知,CK 泳道中分子质量为 250 kDa 的聚合物条带明显加深,说明碱溶酸沉工艺能够促进多肽链以非二硫键的形式结合,推测为多酚与蛋白质之间形成共价键,多肽链之间以多酚为桥梁相互结合^[20,22]。

根据图 2b 和图 2c,比较泳道 CK 与醇洗前处理后 CPI 各泳道可发现,分子质量 15 kDa 处的亚基

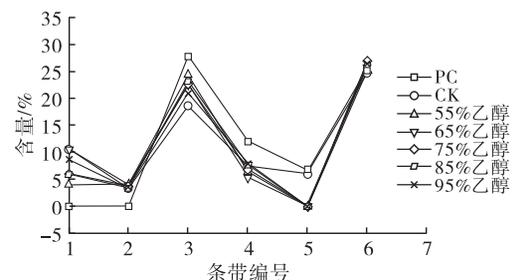
(条带 5)经 55% ~ 95% 乙醇前处理后均消失,250 kDa 处的聚合物(条带 1)除 65% 乙醇前处理后无显著变化($p > 0.05$),其他体积分数乙醇前处理后其含量均显著降低($p < 0.05$),条带 2 经乙醇前处理后无显著变化($p > 0.05$),35 kDa 处亚基(条带 4)经 65% 乙醇处理后含量减少最多,48 kDa 处亚基(条带 3)经乙醇前处理后含量增加,13 kDa 处亚基(条带 6)经乙醇前处理后变化不大。结果表明,醇处理不会改变樟树籽仁蛋白的主要亚基组成,分子质量 48、13 kDa 和 35 kDa 的亚基为樟树籽仁蛋白主要的多肽链,但是醇能够改变部分亚基的含量,如条带 3 含量增加,条带 5 消失。



a) 非还原电泳



b) 还原电泳



c) 还原电泳图谱中条带 1~6 的定量分析

注:Marker. 标准蛋白;PC. 脱脂樟树籽仁粉;CK. 未经醇洗前处理制备的 CPI;55%、65%、75%、85% 和 95% 乙醇分别为相应体积分数乙醇前处理后制备的 CPI。下同

图 2 经不同体积分数乙醇前处理后制备的 CPI 的 SDS - PAGE 图谱及条带定量分析

2.3.2 二级结构

远紫外光区 CD 图谱可用于判断蛋白质的二级结构。 α -螺旋表现为在 208、222 nm 的负峰和 192 nm 的正峰; β -折叠表现为在 216~218 nm 的负峰和 185~200 nm 的强正峰; β -转角在 206 nm 附近有一正峰;无规卷曲在 220 nm 附近有一小而宽的正峰,以及在 198 nm 有负峰^[23-25]。 α -螺旋和 β -折叠中氢键数量多,导致二级结构具有一定的刚性, α -螺旋比例越多,结构则更加有序。 β -转角和无规卷曲中不存在氢键及其他相互作用力,肽段中残基之间自由度更大,表现出更大柔性^[26]。

脱脂樟树籽仁粉及不同体积分数乙醇前处理后制备的 CPI 的 CD 谱图见图 3,CD 图谱二级结构分析见表 2。

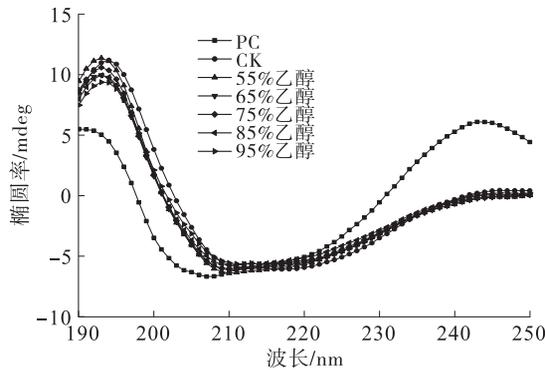


图3 经不同体积分数乙醇前处理后制备 CPI 的 CD 图谱

由图 3 可知,不同体积分数乙醇前处理后制备的 CPI 的 CD 谱图峰型基本一致,表现为在 201~240 nm 有一个宽而大的负峰,在 194 nm 有一个较窄的正峰。乙醇前处理后峰型整体趋于蓝移,194 nm 的正峰峰值(绝对值)减小,其中 95% 乙醇前处理后峰值减少幅度较明显,而其他未表现出明显差异,说明乙醇难以改变 CPI 的二级结构。脱脂樟树籽仁粉的 CD 图谱峰型与 CPI 的存在较大差异,负峰蓝移至 198~231 nm 处,正峰蓝移至 190 nm,峰型变宽而矮,243 nm 处出现一个宽而大的正峰,说明碱溶酸沉工艺对 CPI 二级结构具有很大的影响,可能原因是加工过程中 pH 的改变能够破坏蛋白质的原有结构,有研究证实碱溶液能够完全破坏大豆蛋白的内部结构^[27],另一方面,结合图 2 的 SDS-PAGE 分析结果可知,碱溶酸沉法加工后蛋白质可能以多酚为桥梁而相互聚集,导致蛋白质二级结构改变。

由表 2 可知,经冷榨脱脂后的樟树籽仁粉的蛋白质主要以 β -折叠和无规卷曲为主,分别占 $(45.7 \pm 0.1)\%$ 和 $(33.8 \pm 0.1)\%$, α -螺旋和 β -转角分别占 $(21.1 \pm 0.2)\%$ 和 $(20.5 \pm 0.1)\%$ 。经过碱溶酸沉工艺, β -折叠减少至 $(29.0 \pm 0.4)\%$, β -转角减少至 $(18.5 \pm 0.1)\%$,无规卷曲增加至 $(39.2 \pm 0.2)\%$, α -

螺旋增加至 $(24.7 \pm 0.1)\%$, β -折叠和 α -螺旋的总量明显减少,说明碱溶酸沉工艺制备的 CPI 中蛋白质分子间氢键减少,蛋白质柔性大大增加。经乙醇处理后,二级结构比例无明显变化,可能原因是 CPI 内部结构的内聚力较大,不能被醇分子破坏。与大豆蛋白不同,大豆蛋白经过醇处理, α -螺旋含量大幅增加,结构变得更加有序^[27]。

表 2 CPI 的二级结构占比 %

样品	α -螺旋	β -折叠	β -转角	无规卷曲
PC	21.1 ± 0.2	45.7 ± 0.1	20.5 ± 0.1	33.8 ± 0.1
CK	24.7 ± 0.1	29.0 ± 0.4	18.5 ± 0.1	39.2 ± 0.2
55% 乙醇	25.0 ± 0.1	29.6 ± 0.6	18.7 ± 0.1	37.0 ± 0.1
65% 乙醇	24.3 ± 0.3	31.2 ± 0.1	18.9 ± 0.5	37.4 ± 0.1
75% 乙醇	24.4 ± 0.1	30.8 ± 0.2	18.8 ± 0.1	37.4 ± 0.1
85% 乙醇	23.9 ± 0.1	32.0 ± 0.1	19.0 ± 0.4	37.8 ± 0.1
95% 乙醇	23.7 ± 0.1	32.0 ± 0.1	18.9 ± 0.1	38.6 ± 0.1

2.4 醇洗前处理对 CPI 纯度及溶解性的影响

2.4.1 CPI 的纯度(见表 3)

表 3 醇洗前处理后 CPI 的纯度和提取率

CPI	纯度/%	提取率/%
CK	60.61 ± 0.35^c	81.20 ± 0.24^c
55% 乙醇	75.82 ± 0.31^{bc}	83.71 ± 0.30^b
65% 乙醇	73.39 ± 0.25^d	83.94 ± 0.12^b
75% 乙醇	76.67 ± 0.34^b	84.05 ± 0.12^b
85% 乙醇	74.97 ± 0.42^c	83.65 ± 0.10^b
95% 乙醇	87.45 ± 0.14^a	90.23 ± 0.14^a

注:同列数据不同上标字母表示有显著性差异($p < 0.05$)

由表 3 可见,经醇洗前处理后制备的 CPI 其纯度和提取率显著提高($p < 0.05$)。经 55%、65%、75%、85% 和 95% 乙醇处理后,CPI 纯度由 $(60.61 \pm 0.35)\%$ 分别提高至 $(75.82 \pm 0.31)\%$ 、 $(73.39 \pm 0.25)\%$ 、 $(76.67 \pm 0.34)\%$ 、 $(74.97 \pm 0.42)\%$ 和 $(87.45 \pm 0.14)\%$,提取率由 $(81.20 \pm 0.24)\%$ 分别提高至 $(83.71 \pm 0.30)\%$ 、 $(83.94 \pm 0.12)\%$ 、 $(84.05 \pm 0.12)\%$ 、 $(83.65 \pm 0.10)\%$ 、 $(90.23 \pm 0.14)\%$ 。结合表 1 结果分析,乙醇体积分数为 55%~85% 时,CPI 纯度的提高主要由于皂苷、多酚的有效脱除。乙醇体积分数为 95% 时,CPI 纯度提高了 44.28%,主要原因是脱脂樟树籽仁粉中残留的脂肪基本被脱除。此外,脱脂樟树籽仁粉中脂肪的存在会降低蛋白质提取率。脂质与部分蛋白质之间具有较强亲和力,在碱溶酸沉提取 CPI 过程中高速离心也很难破坏这种相互作用^[28]。因此,脱除脱脂樟树籽仁粉中残留的脂肪对高纯度分离蛋白的制备十分必要。脂肪、皂苷和多酚三者是影响 CPI 纯度的主要因素。本研究结果表明,碱溶酸沉法适用于从脱脂樟树籽仁粉中提取分离较高纯度的分离蛋白,能够应用于工业上 CPI 的生产。

2.4.2 CPI 的溶解性(见图 4)

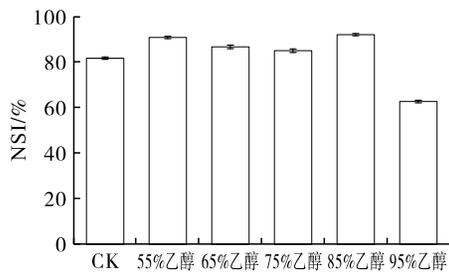


图 4 不同体积分数乙醇前处理后制备的 CPI 的溶解性

由图 4 可见,55%~85%乙醇前处理后,CPI 溶解度显著提高($p < 0.05$),从(81.87 ± 0.15)%分别提高至(90.91 ± 0.20)%、(86.79 ± 0.21)%、(85.10 ± 0.25)%和(92.12 ± 0.16)%。95%乙醇前处理后,CPI 溶解度降低至(62.72 ± 0.05)%。结果表明适当体积分数乙醇前处理能够改善 CPI 的溶解性。这是因为醇处理对 CPI 二级结构无明显影响,可使较大分子质量的聚合体裂解,破坏多肽链间的二硫键,从而增强了蛋白质的溶解能力^[29]。推测乙醇对 CPI 的影响主要体现在三、四级结构上,可能对二硫键具有破坏作用而对氢键的影响较小,有待深入研究 CPI 结构与其溶解性之间的相关性。

3 结论

采用 55%~85% 的乙醇对脱脂樟树籽仁粉进行前处理能够有效脱除其中的皂苷和多酚类物质,提高樟树籽仁分离蛋白(CPI)的纯度,改善其色泽,提高其溶解性。95%乙醇前处理后制备的 CPI 纯度最高,可达(87.45 ± 0.14)%;65%乙醇前处理后制备的 CPI 白度值最高,为(6.00 ± 0.02)% ,85%乙醇前处理后制备的 CPI 溶解度最高,为(92.12 ± 0.16)%。CPI 的主要亚基的分子质量为 48、13 kDa 和 35 kDa。脱脂樟树籽仁粉的蛋白质主要以 β -折叠和无规卷曲为主,经过碱溶酸沉工艺蛋白质二级结构发生变化, β -折叠和 β -转角结构被破坏,无规卷曲和 α -螺旋结构少量增加,氢键被破坏,而醇法对樟树籽蛋白二级结构无明显影响。综合分析,采用醇洗、碱溶酸沉法能够有效地从脱脂樟树籽仁粉中分离得到较高纯度的蛋白质,该法适用于 CPI 的工业化生产。

参考文献:

[1] 赵曼丽,杨辉,杨芳,等.樟树籽仁油和壳油的油脂组成分析[J].南昌大学学报(理科版),2012,36(5):445-448.

[2] 厉秋岳.解决我国食用油资源严重短缺难题的一条创新之路:论樟树籽的开发利用[J].中国油脂,2021,46(2):1-4.

[3] DU J, SHI J, OBADI M, et al. Decolorization of commercial zein via protein precipitation involving organic solvents at low temperatures [J/OL]. Colloid Surface A, 2020,596:124738[2022-05-01]. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124738>.

[4] MUSTAKAS C, KIRK L D, GRIFFIN E L. Flash desolventizing defatted soybean meals washed with aqueous alcohols to yield a high-protein product [J]. J Am Oil Chem Soc, 1962, 39(4):222-226.

[5] TZA B, XLA B, ATAB C, et al. Effect of high intensity ultrasound on the structure and physicochemical properties of soy protein isolates produced by different denaturation methods [J/OL]. Food Hydrocolloid, 2019, 97:105216 [2022-05-01]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105218>.

[6] MAGSUMOV T, LI Z, SEDOV I. Comparative study of the protein denaturing ability of different organic cosolvents [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 160:880-888.

[7] VONDEL J, LAMBRECHT M A, DELCOUR J A. Heat-induced denaturation and aggregation of protein in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds and whole meal [J/OL]. Food Chem, 2022, 372:131330 [2022-05-01]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131330>.

[8] 鲁子贤.蛋白质化学[M].北京:科学出版社,1981.

[9] PHILLIPS K M, MT TARRAGÓ-TRANI, GROVE T M, et al. Simplified gravimetric determination of total fat in food composites after chloroform-methanol extraction [J]. J Am Oil Chem Soc, 1997, 74(2):137-142.

[10] MARTINS G R, MONTEIRO A F, AMARAL F, et al. A validated Folin-Ciocalteu method for total phenolics quantification of condensed tannin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seeds extract [J]. J Food Sci Tech, 2021, 58(12):4693-4702.

[11] 於筱岚.茶叶皂素高效制备及茶皂素在镉污染土壤植物修复中双重作用研究[D].杭州:浙江大学,2020.

[12] HUANG Y, HUA Y, QIU A. Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation [J]. Food Res Int, 2006, 39(2):240-249.

[13] DENG Y J, HUANG L X, ZHANG C H, et al. Physicochemical and functional properties of Chinese quince seed protein isolate [J]. Food Chem, 2019, 283:539-548.

[14] WU W, ZHANG C, KONG X, et al. Oxidative modification of soy protein by peroxy radicals [J]. Food Chem, 2009, 116(1):295-301.

[15] 杨子涵,陈丹丹,季俊夫,等.果蔬汁中多酚介导的非酶褐变研究进展 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(24):367-375.

[16] 刘仲华,黄孝原,黄建安.干燥工艺对绿茶色素物质降解及色泽品质的影响 [J]. 茶叶通讯, 1989(3):38-41.

(下转第 94 页)

- [7] 施光宗. 植物甾醇衍生物合成及抗肿瘤活性的研究和 γ -倒捻子素化合物的合成研究[D]. 南昌:南昌大学, 2011.
- [8] 陈茂彬, 黄琴, 干信, 等. 植物甾醇油酸酯对荷瘤小鼠免疫调节作用研究[J]. 武汉理工大学学报, 2005, 27(3):46-48.
- [9] 谷盼盼, 王芳梅, 张鑫, 等. 超声波辅助提取黑果枸杞中油脂的工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(3):120-126.
- [10] LIU Z G, LIU B L, KANG H L, et al. Subcritical fluid extraction of *Lycium ruthenicum* seeds oil and its antioxidant activity[J]. Int J Food Sci Tech, 2019, 54(1):161-169.
- [11] 王亮, 谷盼盼, 王芳梅, 等. 黑果枸杞籽油的氧化稳定性研究[J]. 中国油脂, 2019, 44(10):42-45, 70.
- [12] 邢海亮, 余旭亚, 耿树香, 等. 核桃虾青素复合油体外抗氧化活性研究[J]. 中国油脂, 2021, 46(5):48-52.
- [13] 万仁口, 贺杨正, 李功景, 等. 酶解制备竹笋可溶性膳食纤维及其抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(3):153-160.
- [14] 杨明非, 苏雯, 王海英. 红松子油的体外抗氧化活性[J]. 东北林业大学学报, 2017, 45(12):80-82.
- [15] CHAMPEILLI - POTOKAR G, DENIS I, GOUSTARD - LANGELEIER B, et al. Astrocytes in culture require docosahexaenoic acid to restore the $n - 3/n - 6$ polyunsaturated fatty acid balance in their membrane phospholipids[J]. J Neurosci Res, 2004, 75(1):96-106.
- [16] 岳崑, 叶诚, 郑冬冬, 等. 多不饱和脂肪酸对大鼠大脑细胞膜脂肪酸组成的影响[J]. 中国酿造, 2014, 33(1):36-39.
- [17] 徐世民, 刘颖, 胡晖. 分子蒸馏富集海狗油中多不饱和脂肪酸[J]. 化学工业与工程, 2006(6):495-498.
- [18] 徐润娴. γ -亚麻酸的药理作用、开发及应用[J]. 交通医学, 2006, 20(4):484-486.
- [19] 董杰明. GLA 粉剂对动物调血脂抗动脉粥样硬化作用研究[J]. 中医药临床杂志, 2006, 18(2):135-136.
- [20] 徐焰, 肖瀛. 功能性 γ -亚麻酸代谢研究的进展[J]. 食品科学, 2005, 26(8):508-512.
- [21] 邢旭光, 郭国庆, 孙晗笑, 等. γ -亚麻酸的防病抗病作用[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(12):1513-1515.
- [22] 王肖行, 余旭亚, 耿树香, 等. 美藤果油体外抗氧化性能研究[J]. 中国油脂, 2021, 46(4):63-67.
- [23] 吴婧婧, 梁贵秋, 陆春霞, 等. 桂桑优 12 种子油提取的响应面工艺优化及其抗氧化分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(1):144-150.
- [24] 朱淑云, 周越, 肖香, 等. 水飞蓟油的体外抗氧化活性及对氧化损伤小鼠的保护作用[J]. 食品科学, 2018, 39(5):234-238.

(上接第 70 页)

- [17] 蒋益花. 樟树果红色素在不同环境条件下稳定性的研究[J]. 食品科技, 2007, 32(7):178-180.
- [18] 周艳华, 文赤夫, 马美湖. 樟树果实红色素各单体的定性分析[J]. 食品科技, 2008, 33(8):161-164.
- [19] QUEIROZ C, MENDES LOPES M L, FIALHO E, et al. Polyphenoloxidase: characteristics and mechanisms of browning control [J]. Food Rev Int, 2008, 24(4):361-375.
- [20] ROHN S. Possibilities and limitations in the analysis of covalent interactions between phenolic compounds and proteins[J]. Food Res Int, 2014, 65:13-19.
- [21] 朱力杰, 许杨杨, 徐清莹, 等. 皂苷-蛋白质相互作用的研究进展[J]. 中国食品学报, 2020, 20(4):300-310.
- [22] QUAN T H, BENJAKUL S, SAE - LEAW T, et al. Protein - polyphenol conjugates: antioxidant property, functionalities and their applications[J]. Trends Food Sci Tech, 2019, 91:507-517.
- [23] HOLZWARTH G, DOTY P. The ultraviolet circular dichroism of polypeptides[J]. J Am Chem Soc, 1965, 87:218-228.
- [24] GREENFIELD N J, FASMAN G D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation [J]. Biochemistry, 1969, 8(10):4108-4116.
- [25] VENYAMINOV S Y, BAIKALOV I A, SHEN Z M, et al. Circular dichroic analysis of denatured proteins: inclusion of denatured proteins in the reference set [J]. Anal Biochem, 1993, 214(1):17-24.
- [26] 毛晓英, 华欲飞. 不同提取工艺制备的核桃蛋白的组成与结构特征[J]. 江苏大学学报(自然科学版), 2011, 32(6):631-635.
- [27] 华欲飞, 谷文英. 醇变性大豆蛋白的结构特征及物化性质的研究[J]. 无锡轻工大学学报, 1996(2):129-134.
- [28] CHRISTIAN S, SKADI K, SUSANNE K, et al. Development of a novel strategy to isolate lipophilic allergens (oleosins) from peanuts [J/OL]. Plos One, 2015, 10(4):e0123419[2022-05-01]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123419>.
- [29] 华欲飞, 孟祥勇, 黄剑旭. 蛋白质分子聚集状态对大豆蛋白溶胀性能的影响[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(1):46-49, 75.