

油料蛋白

萝卜籽蛋白提取及其功能性质研究

王青松¹,肖安红¹,韩立娟¹,齐玉堂¹,杜宣利²,杨帆²,刘小伟³

(1. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院,武汉 430023; 2. 西安中粮工程研究设计院有限公司,西安 710082;

3. 天津利金粮油股份有限公司,天津 300300)

摘要:以萝卜籽为原料,用正己烷脱脂得萝卜籽粕,采用碱溶酸沉法对萝卜籽粕中的蛋白质进行提取,并测定其等电点。通过考察料液比、碱溶 pH、浸提时间和浸提温度对萝卜籽蛋白提取率的影响,确定最佳的萝卜籽蛋白提取条件,并对所提取的萝卜籽蛋白和大豆分离蛋白进行功能性质的对比。结果表明:萝卜籽蛋白溶解度为 84.9%,有很高的营养价值;在料液比 1:20、碱溶 pH 9.0、浸提时间 120 min、浸提温度 50℃ 的条件下,萝卜籽蛋白提取率为 52.3%;萝卜籽蛋白等电点有两个,分别为 pH 0.5 和 pH 4.5;萝卜籽蛋白吸油能力为 328.67%,乳化性及乳化稳定性与大豆分离蛋白相近,起泡性及泡沫稳定性较大豆分离蛋白好。

关键词:萝卜籽粕;碱溶酸沉;蛋白;功能性质

中图分类号:TS201.2;TQ936.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)03-0026-05

Extraction and properties of protein from radish seed meal

WANG Qingsong¹, XIAO Anhong¹, HAN Lijuan¹, QI Yutang¹,
DU Xuanli², YANG Fan², LIU Xiaowei³

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Xi'an COFCO Engineering Research and Design Institute Co., Ltd., Xi'an 710082, China;

3. Tianjin Lijin Grain & Oil Co., Ltd., Tianjin 300300, China)

Abstract: Radish seed was defatted with *n*-hexane and radish seed meal was obtained. The protein was extracted from radish seed meal by alkali-solution and acid-precipitation, then the isoelectric point was measured. The effects of material-liquid ratio, alkali solution pH, extraction time and extraction temperature on the extraction rate of radish seed protein were studied to determine the optimal protein extraction conditions, and the functional properties of radish seed protein and soybean protein isolate were compared. The results showed that the solubility of radish seed protein was 84.9%, and it had high nutritional value. The optimal extraction conditions were obtained as follows: material-liquid ratio 1:20, alkali solution pH 9.0, extraction temperature 50℃ and extraction time 120 min. Under these conditions, the extraction rate of radish seed protein was 52.3%. The radish seed protein had two isoelectric points: pH 4.5 and pH 0.5. The oil absorption ability of radish seed protein was 328.67%, the emulsifying ability and emulsion stability were similar to those of soybean protein isolate, while the foaming ability and foam stability were better than soybean protein isolate.

Key words: radish seed meal; alkali-solution and acid-precipitation; protein; functional property

收稿日期:2017-11-02;修回日期:2017-12-22

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31601505);粮食公益性行业科研专项研究项目(201513003)

作者简介:王青松(1993),男,在读硕士,研究方向为新油料资源开发与利用(E-mail) wangqs_whpu@163.com。

通信作者:韩立娟,讲师,博士(E-mail) hanlj_whpu@hotmail.com。

萝卜籽,为十字花科植物萝卜的成熟种子。萝卜籽是一种新的油料资源,也是重要的蛋白质资源^[1]。目前对于萝卜籽资源的开发与研究主要集中在作为油料资源及整籽的药用价值方面,而对萝卜籽粕中蛋白质的研究较少。有学者认为,蛋白溶解度可以作为衡量饼粕质量标准的重要指标,其与

饼粕的消化性和适口性有一定的相关性^[2]。利用萝卜籽粕中的蛋白质制备高纯度的萝卜籽功能产品,使得其在食品医药保健领域得到更多应用,如根据婴幼儿、老人、临床病人等不同人群开发相对应的蛋白功能产品,可以创造更高的经济效益。

碱溶酸沉法是目前提取植物蛋白最普通和最常用的方法,具有提取率高、成本低、便于操作的优点,适用于工业化生产^[3]。大豆分离蛋白是目前市场上功能性质较好的一种蛋白产品,但市场上植物蛋白种类不全,因此积极开发与大豆分离蛋白相媲美的植物蛋白具有很好的应用价值^[4-5]。本研究采用碱溶酸沉法对萝卜籽粕中的蛋白质进行提取并优化提取工艺条件,并与大豆分离蛋白功能性质进行比较,以期对萝卜籽蛋白的综合开发利用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

萝卜籽,购于武汉市蔬菜科学研究所;大豆分离蛋白(自提);考马斯亮蓝 G-250(国药集团化学试剂有限公司);牛血清白蛋白(BSA)(国药集团化学试剂有限公司);正己烷、乙醚、无水硫酸铜、硫酸钾、浓硫酸、盐酸、氢氧化钠、氢氧化钾等均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

T6新世纪紫外可见分光光度计(北京谱析通用仪器有限公司),FW100高速万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司),HH-2数显恒温水浴锅(国华电器有限公司),IKA 搅拌器(德国 IKA 公司),FE20pH计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),KDN-12C数显温控消化炉(上海新嘉电子有限公司),KDN-103F自动定氮仪(上海纤检仪器有限公司),Alpha 1-2LDplus真空冷冻干燥机(德国 Christ 公司),Sorvall RC6 Plus 冷冻离心机(Thermo),XHF-D高速分散器(宁波新芝生物科技股份有限公司),HJ-8(DF-1)集热式磁力搅拌器(常州国华电器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理

将萝卜籽用粉碎机粉碎,过 60 目筛,收集筛下物于常温下保存备用。取适量的筛下物于烧杯中,加入足量的正己烷,用保鲜膜封口后,在 50℃ 的水浴锅中搅拌 1 h,然后抽滤;将得到的滤渣再次加入正己烷,抽滤,重复 7~9 次至滤液基本为无色。将滤渣平铺在样品盘中,并在上面平铺一层保鲜膜,过

夜除去残留的溶剂,得到脱脂萝卜籽粕。

1.2.2 萝卜籽蛋白溶解度测定

将萝卜籽粕研细,过 60 目筛,取筛下物。称取 1.5 g 样品于 250 mL 烧杯中,加入 75 mL 0.2% 的 KOH 溶液,在磁力搅拌器上搅拌 20 min,然后将 50 mL 溶液移于离心管,2 700 r/min 离心 10 min。取 15 mL 上清液,用凯氏定氮法测其蛋白质含量。按下式计算蛋白溶解度。

蛋白溶解度 = 上清液中粗蛋白质含量/样品中粗蛋白质含量 × 100%

1.2.3 萝卜籽蛋白提取工艺

利用碱溶酸沉法提取萝卜籽蛋白。将脱脂萝卜籽粕与去离子水按一定料液比配制悬浮液并搅拌,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH,浸提一段时间,在 10 000 r/min 冷冻离心机中离心 15 min。收集上清液并用 1 mol/L 盐酸调 pH 至等电点 4.5,静置沉淀蛋白,再次冷冻离心 15 min。收集沉淀并用去离子水水洗 3~4 次,再用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至中性,最后冷冻干燥制得萝卜籽蛋白。按下式计算萝卜籽蛋白提取率。

提取率 = 提取液中粗蛋白质含量/萝卜籽中粗蛋白质含量 × 100%

1.2.4 萝卜籽蛋白等电点的测定

参考叶婧等^[6]的方法并做适当调整。取一定量的萝卜籽粕样品,按料液比 1:15(质量体积比)加入蒸馏水,搅拌均匀后调 pH 至 9,在 50℃ 的恒温水浴锅中搅拌 2 h,然后在 10 000 r/min 的条件下冷冻离心 15 min,收集上清液并将其均分为 14 份,分别调 pH 至 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0,4℃ 下静置 6 h 后 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用 Bradford 法以 BSA 作标准曲线测定其蛋白质的质量浓度,则上清液中蛋白质含量最少(即在 595 nm 下吸光值最低)的 pH 为萝卜籽蛋白的等电点。

1.2.5 萝卜籽蛋白功能性质的测定

对提取制备的萝卜籽蛋白和自制的大豆分离蛋白分别进行溶解性、吸油能力、起泡性及泡沫稳定性、乳化性及乳化稳定性测定^[7-8]。

1.2.6 SDS-PAGE 分离和相对分子质量测定

参考文献[9]的方法对萝卜籽蛋白进行 SDS-PAGE 分析,并对其蛋白质相对分子质量进行测定。

2 结果与amp;讨论

2.1 萝卜籽粕的粗蛋白质含量及蛋白溶解度

采用凯氏定氮法测定萝卜籽粕中粗蛋白质含量

为 $(44.5 \pm 1.3)\%$ 。油料饼粕的蛋白溶解度与氨基酸含量及消化性、动物生产性能等之间具有较好的相关性。因此,用蛋白溶解度来评价油料饼粕的品质是可靠的^[10]。一般油料饼粕的蛋白溶解度推荐范围为 $65\% \sim 85\%$ 。在此范围内,饼粕有较好的消化性和适口性。本试验测得萝卜籽粕的蛋白溶解度为 84.9% ,说明萝卜籽粕可作为良好的蛋白质原料。

2.2 萝卜籽蛋白提取的单因素试验

2.2.1 料液比对萝卜籽蛋白提取率的影响

在 pH 9.0、浸提温度 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、浸提时间 100 min 的条件下,考察料液比对萝卜籽蛋白提取率的影响,结果如图 1 所示。

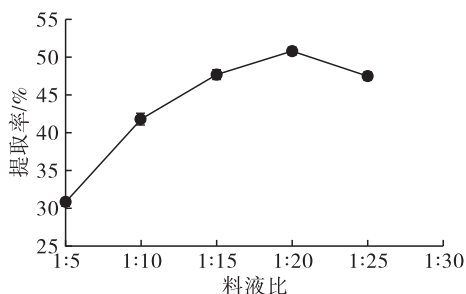


图 1 料液比对萝卜籽蛋白提取率的影响

由图 1 可知,在料液为 1:5 ~ 1:20 之间萝卜籽蛋白提取率逐渐增加;在料液比 1:25 时提取率下降。料液比增加可以提高蛋白质在溶液中的溶出率,但当料液比超过一定比例后,蛋白提取率反而略有下降,这可能是其他物质的溶出阻碍了蛋白质的溶出^[11]。而且料液比过大时,分离时间延长,废水增多,加大了成本。因此,选择的最佳料液比为 1:20。

2.2.2 碱溶 pH 对萝卜籽蛋白提取率的影响

在料液比 1:10、浸提温度 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、浸提时间 60 min 的条件下,考察不同碱溶 pH 对萝卜籽蛋白提取率的影响,结果如图 2 所示。

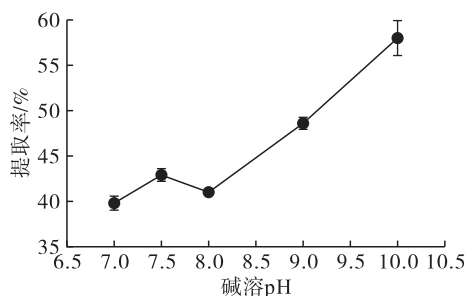


图 2 碱溶 pH 对萝卜籽蛋白提取率的影响

由图 2 可知,当碱溶 pH 逐渐变大时,提取率逐渐增加,说明 pH 的增大有利于蛋白质的溶解。但 pH 过高,容易破坏蛋白质的生物活性,使其变性,并加速美拉德反应,产生大量褐色物质,降低蛋白质纯

度。pH 太大可引起脱氨、脱羧、肽键断裂,引起脱赖反应,对蛋白质的理化特性造成不良影响^[12];而且会使提取液的黏度增加,分离较慢。因此,碱溶 pH 一般控制在 9.0。

2.2.3 浸提时间对萝卜籽蛋白提取率的影响

在 pH 9.0、料液比 1:10、浸提温度 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的条件下,考察浸提时间对萝卜籽蛋白提取率的影响,结果如图 3 所示。

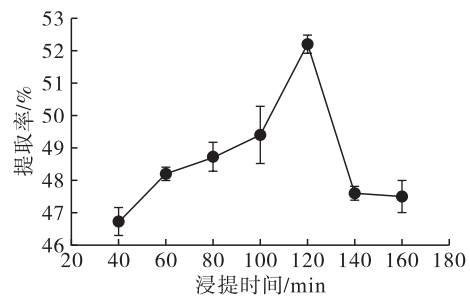


图 3 浸提时间对萝卜籽蛋白提取率的影响

由图 3 可知,萝卜籽蛋白提取率随着浸提时间的延长而增加,在 120 min 时,提取率达到最大,继续延长浸提时间,提取率下降明显。这是由于在浸提初期浸提时间过短,原料尚未与溶液完全接触。而浸提时间过长,多糖从胶质中分离出来,增加了体系的黏度,不利于蛋白质提取^[13]。因此,确定最佳浸提时间为 120 min。

2.2.4 浸提温度对萝卜籽蛋白提取率的影响

在 pH 9.0、料液比 1:10、浸提时间 60 min 的条件下,考察浸提温度对萝卜籽蛋白提取率的影响,结果见图 4。

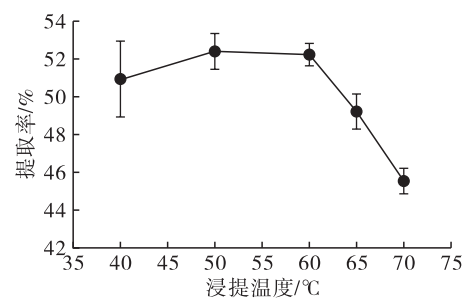


图 4 浸提温度对萝卜籽蛋白提取率的影响

由图 4 可知,浸提温度从 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 上升到 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时萝卜籽蛋白提取率增加缓慢。但是随着浸提温度的继续升高,提取率下降明显。这是因为温度过高,蛋白质易发生变性,导致提取率减小。因此,选择适宜的浸提温度为 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

综上所述,得出最佳的提取工艺条件为料液比 1:20、碱溶 pH 9.0、浸提时间 120 min、浸提温度 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$,此条件下的萝卜籽蛋白提取率为 52.3% 。

2.3 萝卜籽蛋白等电点分析

蛋白质分子在溶液中会产生解离,依据溶液 pH 的不同,解离后所带的电荷也不同,当蛋白质等电点与溶液 pH 相同时,蛋白质分子解离产生的正、负电荷相等(即蛋白质分子所带的净电荷为零),此时蛋白质分子会发生凝聚而产生沉淀。因此,蛋白质在等电点时溶解度最小,最易形成沉淀物。图 5 为不同 pH 对萝卜籽蛋白质量浓度的影响。

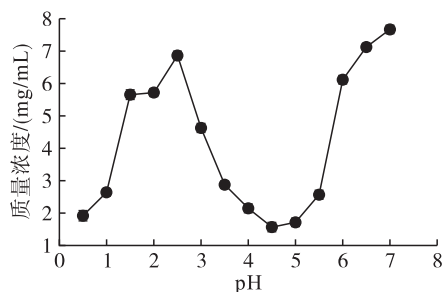


图 5 不同 pH 对萝卜籽蛋白质量浓度的影响

由图 5 可知,萝卜籽蛋白质量浓度曲线呈现出两个较低点,在 pH 4.5 时,溶液中蛋白质质量浓度最低,可以大致认为蛋白的等电点为 4.5。随着 pH 的继续降低,在 pH 0.5 时,溶液中蛋白质质量浓度也达到了较低值,可能是因为酸性太强,使蛋白质变性,从而改变构象,影响了蛋白质在溶液中的浓度。可在生产过程中进行两次沉降,这样可以提高蛋白质的沉降率。不同 pH 沉淀得到的蛋白性质不一样,有不同的应用,后期可分两步沉淀对分别得到的萝卜籽蛋白进行研究。

2.4 萝卜籽蛋白的功能性质

针对萝卜籽蛋白的溶解性、吸油能力、乳化性及乳化稳定性、起泡性及泡沫稳定性与大豆分离蛋白进行对比研究,实验结果如表 1 所示。

表 1 萝卜籽蛋白与大豆分离蛋白功能性质对比

功能性质	萝卜籽蛋白	大豆分离蛋白
溶解性/%	93.44 ± 1.51	97.89 ± 1.34
乳化性/(m ² /g)	119.35 ± 11.88	112.88 ± 12.12
乳化稳定性/min	20.46 ± 1.05	31.02 ± 1.12
起泡性/%	31.00 ± 4.36	25.00 ± 0.57
泡沫稳定性/%	78.81 ± 8.39	68.00 ± 2.84
吸油能力/%	328.67 ± 30.97	754.00 ± 25.31

由表 1 可知,萝卜籽蛋白与大豆分离蛋白相比,其乳化能力优于大豆分离蛋白;乳化稳定性略次于大豆分离蛋白。作为食品加工中的乳化剂,不仅需要有一定的乳化能力,还需要有一定的乳化稳定性。综合考虑,萝卜籽蛋白的乳化特性可拟大豆分离蛋白。因此,可以考虑其作为大豆分离蛋白替代物添加到烤肠和一些烘焙食品中。

蛋白质的起泡性在很大程度上取决于蛋白质的溶解性,在 pH 为 7 时,萝卜籽蛋白的溶解性略低于大豆分离蛋白;但与大豆分离蛋白相比,其具有较强的起泡性和泡沫稳定性。具有良好起泡性的蛋白可以赋予食品以酥松的结构和良好的口感。

与大豆分离蛋白相比,萝卜籽蛋白的吸油能力较差,这种吸油能力之间的差异可能与蛋白质表面亲脂基团与脂类的羟基相结合的能力有关,同时也受分子结构等因素的影响。

2.5 萝卜籽蛋白的 SDS-PAGE 分离

通过碱溶酸沉法得到的萝卜籽蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳后,由凝胶成像仪扫描,结果如图 6 所示。

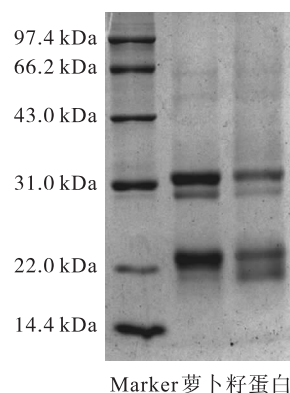


图 6 萝卜籽蛋白的 SDS-PAGE 图谱

由图 6 可知,亚基分离呈现出良好的分离效果,蛋白质主要集中在相对分子质量为 22.0 kDa 和 31.0 kDa,且浓度较高,另外在 43.0 ~ 66.2 kDa 也有少量蛋白质存在,这为进一步纯化萝卜籽蛋白提供了依据。

3 结论

萝卜籽粕的蛋白质溶解度为 84.9%,有很高的营养价值。采用碱溶酸沉法,通过单因素试验,得出萝卜籽蛋白提取的最佳工艺条件为料液比 1:20、碱溶 pH 9.0、浸提时间 120 min、浸提温度 50℃。在最佳工艺条件下,萝卜籽蛋白提取率为 52.3%。对萝卜籽蛋白等电点分析可知,其出现两个等电点,即 pH 4.5 和 pH 0.5。对萝卜籽蛋白的功能性质研究发现,萝卜籽蛋白的乳化性、乳化稳定性、起泡性、泡沫稳定性和吸油能力分别为 119.35 m²/g、20.46 min、31.00%、78.81%、328.67%。通过与大豆分离蛋白对比,其功能可拟大豆分离蛋白,其起泡性优于大豆分离蛋白,可作为良好的发泡剂。通过蛋白凝胶电泳分析,萝卜籽蛋白主要有两种亚基分离组分,其相对分子质量从小到大约为 22.0、31.0 kDa。

(下转第 34 页)

- 离蛋白喷雾干燥的影响[J]. 中国油脂, 2017, 42(10): 47-51.
- [2] SUI X, BI S, QI B, et al. Impact of ultrasonic treatment on an emulsion system stabilized with soybean protein isolate and lecithin; Its emulsifying property and emulsion stability [J]. Food Hydrocoll, 2017, 63:727-734.
- [3] ESLAH F, JONOBI M, FAEZIPOUR M, et al. Preparation and development of a chemically modified bio-adhesive derived from soybean flour protein [J]. Int J Adhes Adhes, 2016, 71:48-54.
- [4] 由耀辉, 陈利维, 项能双, 等. 马来酸酐酰化改性对大豆分离蛋白功能性质的影响[J]. 中国油脂, 2017, 42(4):99-103.
- [5] MUTTAKIN S, KIM M S, LEE D U. Tailoring physicochemical and sensorial properties of defatted soybean flour using jet-milling technology [J]. Food Chem, 2015, 187:106-111.
- [6] 乔一腾, 司玉慧, 盖国胜, 等. 超微粉碎对大豆分离蛋白功能性质的影响 [J]. 中国食品学报, 2012, 12(9): 57-61.
- [7] SHEN L, TANG C H. Microfluidization as a potential technique to modify surface properties of soy protein isolate [J]. Food Res Int, 2012, 48(1): 108-118.
- [8] YU L, YANG W, SUN J, et al. Preparation, characterisation and physicochemical properties of the phosphate modified peanut protein obtained from *Arachin conarachin* L. [J]. Food Chem, 2015, 170:169-179.
- [9] 耿蕊, 卢岩, 孔保华, 等. pH 偏移结合加热处理对大豆分离蛋白乳化特性的影响 [J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 173-180.
- [10] SHEN X, FANG T, GAO F, et al. Effects of ultrasound treatment on physicochemical and emulsifying properties of whey proteins pre- and post- thermal aggregation [J]. Food Hydrocoll, 2016, 63:668-676.
- [11] DISSANAYAKE M, VASILJEVIC T. Functional properties of whey proteins affected by heat treatment and hydrodynamic high-pressure shearing [J]. J Dairy Sci, 2009, 92(4): 1387-1397.
- [12] SUN C, LIU R, WU T, et al. Effect of superfine grinding on the structural and physicochemical properties of whey protein and applications for microparticulated proteins [J]. Food Sci Biotechnol, 2015, 24(5): 1637-1643.
- [13] 孙婵婵, 张民, 田朝杰, 等. 超微粉碎-微粒化组合技术对乳清蛋白结构和加工特性的影响[J]. 现代食品科技, 2015(12):263-268.
- [14] SUN C, LIU R, WU T, et al. Combined superfine grinding and heat-shearing treatment for the microparticulation of whey proteins [J]. Food Bioprocess Technol, 2016, 9(2): 1-9.
- [15] AFIZAH M N, RIZVI S S H. Functional properties of whey protein concentrate texturized at acidic pH: Effect of extrusion temperature [J]. LWT - Food Sci Technol, 2014, 57(1):290-298.
- [16] 孙丰文, 闵德秀, 孙恩惠, 等. 豆粕粉制备胶合板用生物质胶黏剂的研究 [J]. 大豆科学, 2016, 35(2): 301-305.

(上接第 29 页)

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [2] 唐精, 张宝彤, 李爱琴, 等. 蛋白溶解度在四种饼粕品质评价中的应用 [J]. 广东饲料, 2013, 22(7): 32-34.
- [3] 陈凤莲. 碱液浸提法分离小麦麸皮中蛋白质的研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2010, 26(3): 274-276.
- [4] 刘志同. 中国植物油料蛋白生产现状与发展趋势[J]. 中国油脂, 2004, 29(10): 5-10.
- [5] 时玉强, 鲁绪强, 马军, 等. 大豆蛋白在传统豆制品中的应用[J]. 中国油脂, 2017, 42(3): 155-157.
- [6] 叶婧, 曾育蒙, 王秀丽, 等. 腰果蛋白的提取及功能特性研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(6): 43-49.
- [7] JUNG S, MAHFUZ A A. Low temperature dry extrusion and high-pressure processing prior to enzyme-assisted aqueous extraction of full fat soybean flakes [J]. Food Chem, 2009, 114(3): 947-954.
- [8] 张燕鹏. 蒸汽闪爆辅助提取高温豆粕中蛋白质的工艺及其机制研究[D]. 江苏 无锡: 江南大学, 2013.
- [9] RAMÓN-SIERRA J M, RUIZ-RUIZ J C, DE L L O E. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys [J]. Food Chem, 2015, 183: 43-48.
- [10] 周岩民, 吴迪, 刘峰, 等. 蛋白质溶解度法评价几种主要油料饼粕品质的研究[J]. 粮食与饲料工业, 1996(6): 36-39.
- [11] 张寒俊. 碱溶酸沉法制备双低菜子分离蛋白的工艺探讨[J]. 农产品加工(学刊), 2005(5): 40-43.
- [12] 孔涛, 米平, 赵雪淞, 等. 碱法提取花生粕蛋白质工艺条件的优化 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 277-279.
- [13] 赵玉红, 林洋, 张智, 等. 碱溶酸沉法提取黑木耳蛋白质研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(16): 32-36.