

油料蛋白

菜籽清蛋白的主要成分分析及急性毒性试验研究

张瑶,赵蓓,汪雪瑞,白娟,王承明

(华中农业大学 食品科技学院,环境食品学教育部重点实验室,武汉 430070)

摘要:为了探讨菜籽清蛋白作为食品添加剂和蛋白强化剂的可能性,对从菜籽粕中提取的菜籽清蛋白进行主要成分分析和急性毒性试验。结果表明:相比于菜籽粕,超声辅助提取的菜籽清蛋白中的抗营养因子植酸、单宁和硫甙含量明显降低,蛋白质含量大幅提高,水分、灰分和粗脂肪含量有所降低;急性毒性试验结果初步表明菜籽清蛋白无毒,可考虑将其作为蛋白添加剂或营养强化剂应用于食品工业中。

关键词:菜籽清蛋白;超声辅助提取;主要成分分析;急性毒性试验; LD_{50}

中图分类号:TS229;TQ936 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)06-0023-04

Main component analysis and acute toxicity test of rapeseed albumin

ZHANG Yao, ZHAO Bei, WANG Xuerui, BAI Juan, WANG Chengming

(Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To explore the possibility of rapeseed albumin as a food additive and protein fortifier, main component analysis and acute toxicity test of rapeseed albumin extracted from rapeseed meal were carried out. The results showed that compared with rapeseed meal, the contents of anti-nutritional factors such as phytic acid, tannin and glucosinolate in rapeseed albumin extracted by ultrasound-assisted extraction significantly decreased, protein content increased greatly, and contents of moisture, ash and crude fat decreased to some extent. The acute toxicity test preliminarily showed that rapeseed albumin was nontoxic and could be considered as a protein additive or nutritional supplement used in the food industry.

Key words: rapeseed albumin; ultrasound-assisted extraction; main component analysis; acute toxicity test; LD_{50}

菜籽蛋白或菜籽肽具有降血压^[1-2]、抑制肿瘤^[3-4]、结合胆汁酸^[5]等多种生理活性,但多为实验室研究阶段,目前尚未见其实际运用于临床药物或保健品开发。菜籽清蛋白属于菜籽蛋白中的主要成分之一,具有良好的抗氧化活性^[6],尤其是超声辅助提取的菜籽清蛋白^[7]。为保证菜籽清蛋白在食品或药品中应用的安全性,本研究对菜籽清蛋白进

行主要成分分析和急性毒性试验。

急性毒性试验是指动物经一次性或24 h内多次给予受试物后短期内产生的毒性反应^[8]。我国对食品毒性一般分为6级,即极毒、剧毒、中等毒、低毒、实际无毒和无毒,无毒时小鼠一次经口半数致死量(LD_{50})大于15 000 mg/kg^[9]。本研究根据经典急性毒性试验原则,以昆明(KM)小鼠为研究对象,对超声辅助提取的菜籽清蛋白进行毒性评价,观察灌胃后毒性反应,为后期菜籽清蛋白的临床或工业化应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

收稿日期:2018-01-12;修回日期:2018-03-19

作者简介:张瑶(1993),女,硕士研究生,研究方向为食品营养与安全(E-mail)779737699@qq.com。

通信作者:王承明,教授,博士(E-mail)cmwang@mail.hzau.edu.cn。

菜籽粕,益海嘉里(武汉)粮油工业有限公司; KM 小鼠,SPF 级,雌雄各半,体重范围 18~22 g,由湖北省疾病预防控制中心提供。

羧甲基纤维素钠(食品级),郑州强盛食品添加剂有限公司;中性红(分析纯),天津市大茂化学试剂厂;甲基紫(分析纯),天津市河东区红岩试剂厂;无水乙醇(分析纯),国药集团化学试剂有限公司;生理盐水(医药级),河北天成药业股份有限公司;医用酒精(医药级),新泰市百胜酒精制品有限公司。

1.1.2 仪器与设备

AL204 分析天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;KQ 2200DB 型数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;HH-2 恒温水浴锅,金坛市杰瑞尔电器有限公司;WH-2 微型旋涡混合仪,上海沪西分析仪器厂有限公司;12 号灌胃针头,北京恒奥生物科技公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菜籽清蛋白的制备

将菜籽粕粉碎后过 60 目筛,用 60~90℃ 石油醚脱脂后进行超声辅助提取,提取条件参考赵蓓等^[10]的方法,向提取液中加入 75% 饱和度的硫酸铵于 25℃ 下搅拌 2 h,再于 4℃ 下静置数小时以沉淀蛋白,待蛋白充分沉淀后离心,弃去上清液,用 5 倍体积 70% 乙醇洗涤蛋白分离液进行脱色,再将其倒入相对分子质量为 8 000~12 000 Da 的透析袋中,置于 4℃ 冰箱,浸于超纯水中透析 24 h,每 8 h 换水一次。将蛋白透析袋中液体进行真空冷冻干燥 2 d,冻干后于 -18℃ 冰箱保存。急性毒性试验临用前用 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制悬浮液^[11]。

1.2.2 菜籽粕和菜籽清蛋白中主要成分的测定

蛋白质含量的测定采用 GB 5009.5—2010 中的凯氏定氮法;粗脂肪含量的测定采用 GB/T 5512—2008 中的索氏抽提法;水分含量的测定采用 GB 5009.3—2010 中的恒重法;灰分含量的测定采用 GB 5009.4—2010 中的高温灼烧法;单宁含量的测定参照 GB/T 27985—2011 中的 Folin-Denis 比色法;植酸含量的测定参照 GB/T 5009.153—2003 中的三氯化铁-磺基水杨酸法。

硫代葡萄糖甙含量的测定参照甘莉^[12]、王宁惠^[13]等报道的氯化钡法,略做改动:取 100 mg 样品置于 10 mL 刻度具塞试管,在沸水浴中干蒸 10 min,加入 5 mL 沸水后继续蒸煮 30 min,取出冷却后加入蛋白质沉淀剂定容至 10 mL,摇匀后过滤。取 1 mL 滤液于具塞试管,加入 2 mL 0.15% 羧甲基纤维素钠

溶液并摇匀,再加入 1 mL 8 mmol/L 氯化钡显色液,摇匀后于 20~25℃ 下放置 2 h,以氯化钡-羧甲基纤维素钠溶液作空白,用分光光度计在 540 nm 处测其消光值。硫甙含量计算公式:总硫甙含量 = 0.2 + 185.2 × 消光值。

1.2.3 急性毒性 LD₅₀ 试验

取 KM 小鼠 12 只,雌雄各半,按体重随机分为 3 组:空白对照组、溶媒组和给药组。试验条件:给药前禁食 12 h(不禁水),温度 20~25℃,湿度 60%~70%,光照 12 h/12 h。以吸入灌胃针头的菜籽清蛋白悬浮液最大质量浓度为 0.5 g/mL,按灌胃量 20 mL/kg 进行灌胃给药,1 h 后恢复饮食。空白组给以等比例蒸馏水,溶媒组以等比例 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液代替。给药后观察小鼠有无毒性反应及死亡情况,给药后 4 h 持续观察,此后每天观察一次,记录各组小鼠的生理状况等急性毒性观察项目。测定各组小鼠每天采食量及体重变化,在 8 d 时处死小鼠并解剖,观察各脏器(心、肝、脾、肺、肾等)变化。若过程中无死亡或中毒现象,则以最大给药量进行灌胃继续试验。

1.2.4 最大耐受量(MTD)试验

按体重将雌雄各半的 KM 小鼠随机分为 3 组:空白对照组、溶媒组和给药组,试验条件同 1.2.3 设定。给药前禁食不禁水 12 h,给药组为 0.5 g/mL 的菜籽清蛋白悬浮液,空白组为蒸馏水,溶媒组为 0.5% 的羧甲基纤维素钠溶液,给药量均按最大灌胃量 40 mL/kg 进行。给药 1 h 后恢复自由饮食,根据急性毒性观察项目持续观察小鼠 4 h,以后每天观察 2 次(上午、下午),共连续观察 14 d。测定各组小鼠每天采食量及体重变化,试验结束处死小鼠,解剖观察各脏器变化,剔除周围脂肪并用生理盐水清洗,称重后计算脏器系数。脏器系数 = 脏器质量/动物体重 × 10。

1.2.5 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件对试验数据进行单因素方差分析,结果均以“平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)”表示。

2 结果与讨论

2.1 主要成分分析

对菜籽粕和超声辅助提取的菜籽清蛋白进行主要成分分析,结果见表 1。

由表 1 可知,超声辅助提取的菜籽清蛋白中蛋白质含量约为 82.42%,大大高于菜籽粕中的蛋白质含量 39.07%。所制备的菜籽清蛋白为浅灰色粉末状,质地蓬松,焦香味,纯度在 80% 左右,其中营养因子含量较菜籽粕大幅度降低,植酸、单宁和硫

甙含量分别由菜籽粕中的 2.75%、3.06% 和 36.10 $\mu\text{mol/g}$ 降至 0.11%、1.24% 和 4.97 $\mu\text{mol/g}$ 。植酸会影响蛋白质的消化利用率,同时能抑制消化水解酶的活性^[14-15];单宁具有苦涩味和辛辣味,适口性较差^[16];硫甙在芥子酶的作用下水解生成的硫氰酸盐、异硫氰酸盐、腈类等都具有一定的毒性^[17]。这些抗营养因子的降低表明超声辅助提取的菜籽清蛋白的安全性有所提高,为了保证菜籽清蛋白在食品或药品中应用的安全性,本研究进一步对菜籽清蛋白进行了急性毒性试验。

表1 样品的主要成分含量($\bar{x} \pm s$)

主要成分	菜籽粕	菜籽清蛋白
水分/%	8.34 \pm 1.41	5.73 \pm 0.82
灰分/%	8.05 \pm 0.26	1.08 \pm 0.21
蛋白质/%	39.07 \pm 2.01	82.42 \pm 4.37
粗脂肪/%	2.47 \pm 0.06	0.78 \pm 0.07
植酸/%	2.75 \pm 0.11	0.11 \pm 0.06
单宁/%	3.06 \pm 0.08	1.24 \pm 0.09
硫甙/($\mu\text{mol/g}$)	36.10 \pm 2.81	4.97 \pm 0.16

2.2 LD_{50} 试验

灌胃后各组小鼠最初活动量均有所减少,安静倦怠,2 h 后活动量增加,7 d 内小鼠活动正常、排泄无异常、体毛光滑、色泽泛亮、无任何呼吸异常行为、口鼻眼均无异常分泌物,无小鼠死亡现象,并且 3 组间小鼠表现基本无变化。

给药 1 h 后恢复自由饮食,7 d 各组小鼠的平均采食量及体重变化分别见表 2 和图 1。

由表 2 可知,给药后小鼠的平均采食量刚开始比较低,后随时间延长逐渐增加,6 d 后采食量增加变得缓慢,并且各组间差异不显著($P > 0.05$)。结

表3 LD_{50} 试验中小鼠的脏器系数($\bar{x} \pm s$)

组别	心脏系数	肝脏系数	脾脏系数	肺脏系数	肾脏系数
空白组	5.26 \pm 0.09	48.16 \pm 0.61	3.19 \pm 0.11	6.14 \pm 0.04	13.66 \pm 0.21
溶媒组	5.24 \pm 0.13	47.14 \pm 0.85	3.14 \pm 0.18	6.03 \pm 0.06	13.27 \pm 0.76
给药组	5.19 \pm 0.11	47.74 \pm 0.34	3.03 \pm 0.05	6.11 \pm 0.09	13.62 \pm 0.31

2.3 MTD 试验

按照最大灌胃量进行灌胃后,最初小鼠均活动量减少,2 h 内活动恢复正常,排泄无异常、体毛光滑、色泽泛亮、黏膜无水肿出血现象、无任何呼吸异常行为、口鼻眼均无异常分泌物,14 d 内各组小鼠均无死亡现象,表现基本无差异。MTD 试验中,各组小鼠的平均采食量变化及小鼠体重的变化分别见图 2、图 3。由图 2 可知,小鼠的采食量在前两天无明显变化,3~6 d 均出现明显增加,7 d 后增加缓慢并趋于平稳,并且各组间差异不显著($P > 0.05$)。

合图 1 中小鼠自身的体重变化可发现,1 d 时小鼠体重有所减少,之后每天体重呈现稳定上升趋势,溶媒组小鼠体重变化与给药组小鼠体重变化趋势相近,差异不显著。

表2 LD_{50} 试验中小鼠平均采食量的变化($\bar{x} \pm s$)

给药后时间/d	平均采食量/(g/只)		
	空白组	溶媒组	给药组
1	4.48 \pm 0.21	4.53 \pm 0.19	4.32 \pm 0.37
2	4.62 \pm 0.23	4.88 \pm 0.28	4.42 \pm 0.28
3	5.96 \pm 0.32	5.84 \pm 0.33	5.72 \pm 0.41
4	6.33 \pm 0.33	6.12 \pm 0.41	6.31 \pm 0.35
5	6.05 \pm 0.41	6.41 \pm 0.31	6.28 \pm 0.52
6	6.57 \pm 0.46	6.61 \pm 0.29	6.39 \pm 0.37
7	6.81 \pm 0.52	6.63 \pm 0.42	6.92 \pm 0.43

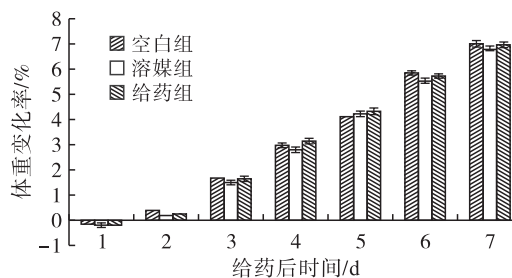


图1 LD_{50} 试验中小鼠体重的变化

LD_{50} 试验过程中无小鼠死亡,肉眼观察各器官的质地、颜色、体积均无异常,各小鼠的脏器系数见表 3。由表 3 可知,与空白组和溶媒组进行对比,给药组小鼠的心脏系数、肝脏系数、脾脏系数、肺脏系数、肾脏系数的差异性均不显著($P > 0.05$),说明该试验过程中各小鼠器官生长正常。由于该试验未能测出 LD_{50} 值,后期将以最大给药量进行灌胃。

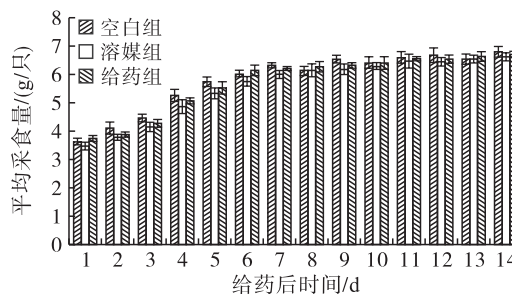


图2 MTD 试验中小鼠平均采食量的变化

由图 3 可知,给药 1 d 各组小鼠体重均出现降低现象,2 d 时则开始恢复体重并上升,与空白组对

比,溶媒组体重变化出现显著差异($P < 0.05$),给药组无显著变化,3 d后各组小鼠的体重变化均无差异变化,且小鼠体重增加幅度变大,8 d后体重变化率增加变缓,且呈稳定缓慢增加并趋于平稳的趋势,各组小鼠的体重变化率无显著差异。

对小鼠解剖后发现,各主要脏器(心、肝、脾、肺、肾等)色泽、体积、质地均无异常,进行脏器系数计算后结果见表4。由表4可知,与空白组进行对照,溶媒组和给药组的脏器系数比较恒定,无显著性差异,表明该试验过程中各器官无水肿、充血、增生肥大、萎缩或其他退行性变化现象,没有对这些器官

造成毒性损坏。且该过程无小鼠死亡现象,表明小鼠对菜籽清蛋白的1 d最大耐受量大于20 g/kg,可基本确定为无毒。

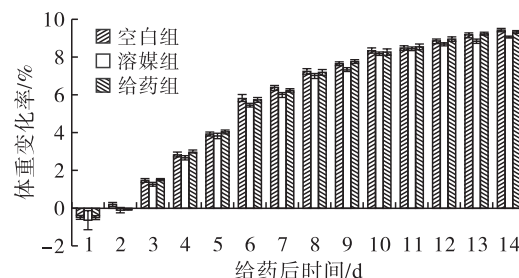


图3 MTD试验中小鼠体重的变化

表4 MTD试验中小鼠的脏器系数($\bar{x} \pm s$)

组别	心脏系数	肝脏系数	脾脏系数	肺脏系数	肾脏系数
空白组	5.27 ± 0.41	46.92 ± 0.81	2.94 ± 0.07	5.93 ± 0.34	14.38 ± 0.79
溶媒组	4.98 ± 0.08	44.03 ± 0.08	2.81 ± 0.28	5.76 ± 0.28	13.99 ± 0.83
给药组	4.96 ± 0.12	45.05 ± 0.06	2.93 ± 0.12	5.98 ± 0.34	13.77 ± 0.72

3 结论

超声辅助提取的菜籽清蛋白为浅灰色粉末状,质地蓬松,焦香味,纯度在80%左右,其蛋白质含量大大高于菜籽粕中的蛋白质含量,水分、灰分、粗脂肪含量均低于菜籽粕,其抗营养因子植酸、单宁和硫甙含量较菜籽粕大幅度降低,在一定程度上提高了菜籽清蛋白的安全性和适口性。为评价菜籽清蛋白的急性毒性,通过小鼠灌胃给药方式进行试验,试验结果显示未测出半数致死量(LD_{50});后以1 d最大给药量20 g/kg灌胃并连续观察14 d,给药组小鼠无死亡,活动表现、体重增长率及平均采食量与空白组和溶媒组无显著差异,且动物处死后主要器官(心、肝、脾、肺、肾等)未发现病理学改变,各组间脏器系数差异性不显著,且菜籽清蛋白的1 d最大耐受量大于20 g/kg,高于15 000 mg/kg,可基本确定为无毒。因此,可考虑将菜籽清蛋白作为添加剂或营养强化剂应用于食品工业中。

参考文献:

[1] 张艳,刘志伟. 分步酶解法制备菜籽降血压肽[J]. 食品科学,2013,34(3):228-232.

[2] HE R, MALOMO S A, GIRGIH A T, et al. Glycyl-histidinyl-serine (GHS), a novel rapeseed protein-derived peptide has blood pressure-lowering effect in spontaneously hypertensive rats[J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(35):8396-8402.

[3] YU W C. Radical-scavenging activity, ACE-inhibiting capability and identification of rapeseed albumin hydrolysate[J]. Food Sci Hum Wellness,2013,2(2):93-98.

[4] 薛照辉,尉万聪,吴谋成,等. 菜籽肽抑制肿瘤作用和对

免疫功能的影响[J]. 中国粮油学报,2007,22(1):73-75.

[5] 张晶. 菜籽抗氧化肽的制备、抗氧化机理及其稳定性研究[D]. 南京:南京财经大学,2016.

[6] 黄明亮,王雪莹,孙颖,等. 菜籽蛋白功能性质及抗氧化的研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(12):405-408,413.

[7] 赵蓓,李欣蓉,魏瑞芝,等. 超声辅助提取对菜籽清蛋白抗氧化活性的影响[J]. 食品科技,2015,40(8):235-239.

[8] 刘密凤,郭家彬,彭双清,等. 体外方法在化学物质急性毒性评价中的应用[J]. 毒理学杂志,2007,21(3):235-238.

[9] 杨杰,董英,邵元龙. 芝麻饼粕蛋白急性毒性试验研究[J]. 食品科技,2009,34(8):68-70.

[10] 赵蓓,王承明,张沙沙. 菜籽粕中清蛋白的超声辅助提取及氨基酸组成研究[J]. 中国粮油学报,2015,30(10):32-36.

[11] 包旭,方素华,蒋文燕,等. 粉末活性炭的急性毒性试验[J]. 四川生理科学杂志,2005,27(3):139-140.

[12] 甘莉,金良. 氯化钡法测定硫代葡萄糖甙含量的最佳测定条件探讨[J]. 华中农业大学学报,1999,18(6):592-595.

[13] 王宁惠. 油菜籽(饼粕)中硫代葡萄糖甙总量速测方法——氯化钡法[J]. 青海农林科技,2009(3):58-59.

[14] COWIESON A J, ACAMOVIC T, BEDFORD M R. Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry[J]. Poult Sci, 2006, 85(5):878-885.

[15] 王晓凡. 固态发酵对菜籽粕及蛋白质品质改良的研究[D]. 武汉:武汉工业学院,2012.

[16] 崔秀敏. 高粱和荞麦中有毒物质的危害与消除[J]. 饲料博览,2017(6):52.

[17] 郭丽萍. 热激、低氧及JA和ABA调控西兰花芽苗萝卜硫素形成机理[D]. 南京:南京农业大学,2015.