

蕨麻蛋白的提取与功能特性的研究

刘雨薇, 夏琳婧, 胡锦涛, 沈群*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 农业部果蔬加工重点实验室, 教育部果蔬加工工程中心, 北京 100083)

摘要: 利用碱溶酸沉法和盐析法提取蕨麻蛋白, 分析了蕨麻蛋白的氨基酸种类、含量以及保水性、吸油性、起泡性、乳化性、凝胶形成性等功能特性。结果表明, 盐析法提取蕨麻蛋白得率高于碱溶酸沉法; 蕨麻蛋白中精氨酸的含量显著高于其蛋白中其他种类氨基酸的含量, 占氨基酸总量的 21.4%; 在不同 pH 的环境中, 蕨麻蛋白的保水性差异较大; 蕨麻蛋白的吸油性随着温度的降低而略有升高; 随着蛋白浓度的增大, 蕨麻蛋白的起泡性能和泡沫稳定性均明显升高; 浓度高的蛋白质溶液具有较高的乳化能力。

关键词: 蕨麻蛋白, 提取, 功能特性

Extraction and functional properties of Potentilla anserina protein

LIU Yu-wei, XIA Lin-jing, HU Jin-rong, SHEN Qun*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, Key Laboratory of Fruits and Vegetables Processing, Ministry of Agriculture, Beijing Engineering Research Centre for Fruits and Vegetables Processing, Ministry of Education, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The protein of Potentilla anserine was obtained by salting-out as well as alkaline and acid precipitation in this test. Amino acids contents of Potentilla anserina protein and functional properties such as water-holding capacity, oil absorbency, foam ability, emulsion and the quality of gel were studied. The results indicated that the yield rate of protein extracted by salt-outing was higher than which extracted by alkaline and acid precipitation. Arginine in Potentilla anserina protein was 21.4% of the total amino acid, which was much higher than the others. The water-holding capacity varied with different pH value. The oil absorbency of the protein increased lightly with the decrease of the temperature. The foam ability and emulsion stability were significantly enhanced with the concentration increased. Also, the emulsifying capacity was relatively better in the protein solution with higher concentration.

Key words: Potentilla anserine protein; extraction; functional properties

中图分类号: TS201.2⁺1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)03-0131-04

蕨麻为鹅绒委陵菜的根, 属蔷薇科, 委陵菜属, 又名委陵菜、曲尖委陵菜、人参果、延寿草等。其味道鲜美, 营养价值高。据记载, 蕨麻有补气益血、健脾利湿、生津止渴等功效^[1]。蕨麻中含有较多的碳水化合物、蛋白质、脂肪以及钾、钙、铁、硒等多种无机盐、矿物质。尚含有鞣质、亚油酸, 富含人类所必需的 18 种氨基酸, 有滋补作用, 无毒副作用^[2]。蛋白质是蕨麻的主要成分之一, 其特性直接影响蕨麻产品的加工特性。从目前收集到的资料来看, 有关蕨麻蛋白质性质的研究国内外均很少。本实验以蕨麻蛋白质为研究对象, 比较碱溶酸沉法与盐析法两种提取蕨麻蛋白的方法, 分析蕨麻蛋白的物理、化学特性, 为蕨麻食品的深加工提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

蕨麻 甘肃陇翠堂提供; 盐酸、硼酸、氢氧化钠、EDTA、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠 分析纯, 北京化工厂; PVP(聚乙烯吡咯烷酮 [k-30]) 分析纯, 广东汕头市西陇化工厂; 大豆油 元宝牌。

精密电子天平 AR5120, 奥豪斯仪器(上海)有限公司; 自然对流烘箱(ED) 德国 binder 公司; 马弗炉 SX2.5-10, 上海实验仪器总厂; 数字酸度计 pH5-25, 上海精科雷磁仪器有限公司; 电热恒温水浴锅 HW-SY11-K, 北京长风仪器公司; 高速冷冻离心机 GL-20G-II, 上海安亭科学仪器厂; 高速分散器 XHF-D, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 电热恒温培养箱 DHP-9052, 上海一恒科技有限公司; 半自动凯氏定氮仪 KDY-9820, 北京通润源机电技术有限责任公司; 多头磁力加热搅拌器 HJ-6, 常州国华电器有限公司; 真空冷冻干燥机 G2S-0.3, 沈

收稿日期: 2010-02-01 * 通讯联系人

作者简介: 刘雨薇(1988-), 女, 本科生, 研究方向: 谷物科学。

基金项目: 北京市大学生科学研究与创业行动计划。

阳北冰洋食品工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蕨麻蛋白的提取

1.2.1.1 碱溶酸沉法^[3-4] 蕨麻→去离子水洗3遍→粉碎机粉碎蕨麻→加入去离子水(蕨麻与去离子水比例为1:5)→加入3%的PVP→用1mol/L NaOH调至不同pH(pH_1)→静置1h→浆液单层纱布过滤→取上清液→离心(4000r/min, 20min)→收集上清液→沉淀加去离子水(1:5)用1mol/L NaOH调至不同pH(pH_1)→离心(4000r/min, 20min)→合并两次上清液→用1mol/L HCl调上清液至不同pH(pH_2)→离心(4000r/min, 20min)→收集沉淀,去离子水洗沉淀比例(1:5),用1mol/L NaOH调pH7.0→真空冷冻干燥(38℃, 16h)→蛋白粉

1.2.1.2 盐析法 蕨麻→去离子水洗3遍→粉碎机粉碎蕨麻→加入去离子水(蕨麻与去离子水比例为1:5)→加3%聚乙烯吡咯烷酮(K-30)→用1mol/L NaOH调pH至8.0→静置1h→浆液单层纱布过滤→取上清液→离心(4000r/min, 20min)→收集上清液→沉淀加去离子水(1:5)用1mol/L NaOH调pH至8.0→离心(4000r/min, 20min)→合并两次上清液→加浓度100%硫酸铵(根据对照表)4℃静置14h→离心(4000r/min, 20min)→收集沉淀,去离子水洗沉淀比例(1:5)

1.2.2 蕨麻蛋白的纯化与干燥 将经粗提获得的蕨麻蛋白在4℃磷酸二氢钾和磷酸氢二钠标准混合缓冲溶液(pH7.41)中透析24h(每6h更换1次标准混合缓冲溶液)。

将用碱溶酸沉法和盐析法获得的蕨麻蛋白采用真空冷冻干燥(38℃, 16h)法获得蛋白粉。

1.2.3 蕨麻蛋白含量及氨基酸种类 采用GB/T5009.5-1985《凯氏定氮法》测定提取蛋白中的蛋白质含量^[5];采用GB/T18246-2000《饲料中氨基酸的测定》分析蕨麻蛋白氨基酸种类及含量^[6]。

1.2.4 蛋白特性 蕨麻蛋白的保水性、吸油性、乳化性、凝胶形成性参照郭兴凤和Beuchat的方法^[7-8];起泡性与泡沫稳定性参照Waniska等人的方法^[9]。

2 结果与讨论

2.1 蕨麻蛋白的提取

碱溶酸沉提取法是依据蛋白结构中有游离的羧基,显弱酸性,遇碱成盐溶解,加酸又游离析出的原理设计的。该种工艺主要是基于调节溶液的pH,从而调节蛋白质的溶解度,在pH调至一定值时,蛋白质处于等电点状态而凝集沉淀下来,经分离后得到蛋白沉淀物,再经洗涤、中和、灭菌、干燥即得分离蛋白产品。作为一种重要的研究手段,盐析法在实验室中常被用来分离蛋白质。而硫酸铵是盐析最常用的无机盐,它具有溶解度大,随温度变化小,对蛋白质有保护作用,高浓度时可抵制微生物和蛋白酶的活性等优点。通过碱溶酸沉法和盐析法获得的蕨麻蛋白含量见表1。

由表1可知,在碱溶的pH一定时($pH_{8.5}$),酸沉的pH为4.0时,蛋白的含量最高。当酸沉的pH一定时($pH_{4.0}$),碱溶的pH为8.0时,蛋白的含量最高。盐析法所提取蕨麻蛋白的含量明显高于碱溶酸沉法。

表1 碱溶酸沉法、盐析法提取蛋白的含量

碱溶酸沉法 $pH_1 = 8.5$		碱溶酸沉法 $pH_2 = 4.0$		盐析法	
pH_2	蛋白含量 (%)	pH_1	蛋白含量 (%)	$pH_{8.0}$	蛋白含量 (%)
4.0	35.16	8.0	37.73	8.0	48.24
4.5	34.64	8.5	36.08		
5.0	30.64	9.0	35.00		
5.5	30.04				
6.0	29.04				

碱溶酸沉法提取蛋白的过程,受水料比、提取液pH、提取温度、提取时间等诸多因素的影响。实验条件设定及控制的难度较大。实验过程中,存在蛋白变性现象。而采用盐析与透析相结合的方法提取蛋白,蛋白不易变性。同时,采用先粗提后纯化的设计,可获得较高的提取率及蛋白纯度。

2.2 蕨麻蛋白的氨基酸种类及含量

蕨麻蛋白中的氨基酸种类及含量见表2。

表2 蕨麻蛋白氨基酸种类及含量(%)

氨基酸种类	含量	氨基酸种类	含量
天冬氨酸	0.78	苏氨酸	0.28
丝氨酸	0.28	蛋氨酸	/
谷氨酸	0.6	异亮氨酸	0.28
脯氨酸	0.56	亮氨酸	0.39
甘氨酸	0.29	酪氨酸	0.18
丙氨酸	0.36	苯丙氨酸	0.26
半胱氨酸	/	赖氨酸	0.40
缬氨酸	0.34	组氨酸	0.62
精氨酸	1.55	色氨酸	/
氨基酸合计		7.25	

从表2可以看出,蕨麻蛋白中含量相对较多的氨基酸依次为:精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、脯氨酸、赖氨酸,占氨基酸总量的63.3%;其中精氨酸的含量显著高于其他种类的氨基酸,占氨基酸总量的21.4%。

赖氨酸含量是谷物氨基酸研究的重点之一。赖氨酸为碱性必需氨基酸。谷物中的赖氨酸含量较低,张林生等^[10]报道,人们的主要粮食中,小麦、大米、小米、玉米的赖氨酸含量分别为0.37%、0.25%、0.10%、0.41%。另外,在加工过程中赖氨酸易被破坏。根据贾健斌等^[11]的调查,以谷物膳食为主人群的第一限制性氨基酸是赖氨酸。而蕨麻中的赖氨酸含量为0.40%,略高于小麦、大米、小米,与玉米基本持平。

2.3 蕨麻蛋白的保水性和吸油性

蛋白特性决定了蛋白的应用范围和产品的品质,蕨麻蛋白的保水性和吸油性见表3。

表3 蕨麻蛋白的保水性

pH	保水性(g/g)
2	2.68 ± 0.21
4	2.18 ± 0.11
6	2.34 ± 0.32

将干燥蛋白质与液态水直接作用,所吸收的水分称为保水性。蛋白质的保水性与食品的粘度相关,受pH、温度、离子强度的影响。从表3可以看出,

在不同 pH 的环境中, 蕨麻蛋白的保水性差异较大。pH 的改变会影响到蛋白质分子的净电荷数值, 从而改变了蛋白质-蛋白质和蛋白质-水之间的相互作用力, 导致了保水性的改变。当 pH4 时, 蛋白的保水性最小, 为 2.18g/g, 这是因为蕨麻蛋白的等电点在 4.0 左右, 当 pH 愈接近等电点时, 蛋白质和蛋白质的相互作用愈强, 整个蛋白质分子呈电中性, 其水化程度较低。

吸油性是指蛋白中产品吸附油的能力。蛋白质可与甘油三酸酯形成脂-蛋白络合物, 因而具有吸油性。影响吸油性的主要因素为蛋白质产品的种类和来源、粒度大小、温度和加工方法。不同温度下蕨麻的吸油性见表 4。本实验所用油脂为大豆油, 由表 4 可以看出, 蕨麻蛋白的吸油性随着温度的降低而略有升高, 此趋势对于蕨麻蛋白体现不明显。其原因可能是, 温度升高, 油的黏度降低, 流动性增强, 减弱了油脂与蛋白质分子的结合, 蕨麻蛋白的吸油性下降。

表 4 蕨麻蛋白的吸油性

温度(°C)	吸油性(g/g)
5	2.52 ± 0.76
25	2.43 ± 0.69
80	2.16 ± 0.36

2.4 蕨麻蛋白的起泡性、泡沫稳定性与乳化性

蕨麻蛋白质分子由于具有典型的两亲结构, 因而在分散液中表现出较强的界面活性, 具有一定程度降低界面张力的作用。蕨麻蛋白质溶胶受到急速机械搅拌时, 会有大量的气体混入, 形成水-空气界面, 溶液中蕨麻蛋白质分子吸附到这些界面上来, 降低界面张力, 促进界面形成。由于蛋白质部分肽链在界面上伸展开来, 并通过肽链间包括分子内和分子间相互作用, 形成一个二维保护网络, 使界面膜得以加强, 这样就促进泡沫的形成与稳定。蛋白质溶液浓度是影响蛋白质起泡性能的主要外在因素。虽然蛋白质起泡能力主要取决于其可溶部分, 蛋白质溶解度是作为良好的起泡能力和稳定性先决条件, 但不溶解的蛋白质粒子在稳定泡沫中也能起着有益作用, 这是由于它们提高了溶液的表面粘度^[12-14]。不同浓度蕨麻蛋白的泡沫体积与泡沫稳定性随时间的变化分别如图 1、图 2 所示。表 5 显示了不同浓度蕨麻蛋白的起泡性、泡沫稳定性与乳化性。

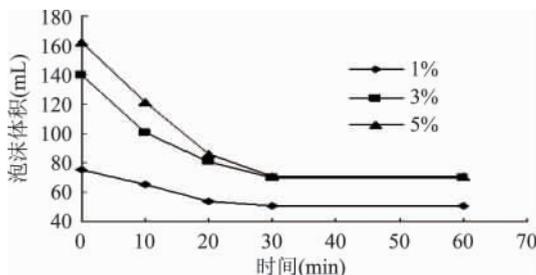


图 1 不同浓度蕨麻蛋白的泡沫体积

由表 5 可知, 提高蛋白质浓度, 蕨麻蛋白的起泡性显著增强, 泡沫稳定性明显增大。随着蛋白浓度的增加, 蛋白扩散并吸附在空气-水界面的能力就

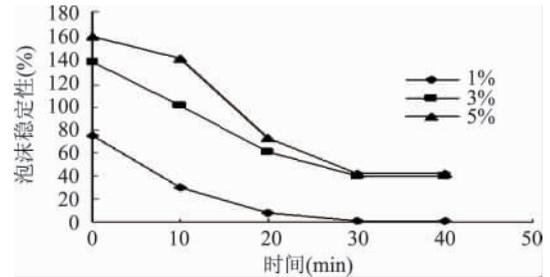


图 2 不同浓度蕨麻蛋白的泡沫稳定性

大, 降低界面张力, 促进泡沫的形成。与此同时, 蛋白肽链形成的二维保护网络逐渐增强, 泡沫稳定性得以提高。

表 5 不同浓度蕨麻蛋白的起泡性、泡沫稳定性和乳化性

pH	指标	浓度 (%)		
		1	3	5
6.0	起泡性	51.4	180.0	224.0
	泡沫稳定性	1.0	40.0	42.0
7.0	乳化性	55.08 ± 0.75	56.69 ± 0.11	59.79 ± 1.18

乳化是指将两种以上不相溶的物质, 其中一种液体以微粒的形式分散到另一种液体里形成均匀分散体系的性能^[14]。蛋白质的乳化能力与蛋白质溶液的浓度和分子结构有很大关系, 本实验研究了蛋白乳化性与蛋白溶液浓度的关系。由表 5 可知, 浓度高的蛋白质溶液具有较高的乳化能力。这可能由于随着蛋白浓度的增大, 蛋白在油-水界面上降低界面张力的能力增大, 同时, 蛋白的成膜能力增强; 但随着蛋白浓度的升高, 变化不明显。

2.5 蕨麻蛋白的凝胶形成性

当适度变性的蛋白质分子聚集, 形成一个有规则的蛋白质网状结构, 此过程即为凝胶作用。其形成受固形物浓度、温度和加热时间、制冷情况、有无盐类、巯基化合物、亚硫酸盐或脂类的影响, 蛋白含量越高, 越易制成结实强韧性的、有弹性的硬凝胶^[15]。经实验发现, 当蕨麻蛋白浓度大于 20%, 温度在 70~90°C 的范围内, 仍不能形成凝胶。

3 结论

采用在 pH8.0 环境中用盐析法提取蛋白的方法, 得到蛋白的含量比碱溶酸沉法高。若采用碱溶酸沉法, 采用 pH8.0 的碱溶条件与 pH4.0 的酸沉环境将获得相对较高的蛋白含量。蕨麻蛋白中含量相对较多的氨基酸依次为: 精氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、组氨酸、脯氨酸, 其中精氨酸的含量显著高于其蛋白中其他种类的氨基酸, 占氨基酸总量的 21.4%。在不同 pH 的环境中, 蕨麻蛋白的保水性差异较大。当 pH4 时, 蛋白的保水性最小, 为 2.18g/g。蕨麻蛋白的吸油性随着温度的降低而略有升高, 25°C 时, 其吸油性为 2.43g/g。随着蛋白浓度的增大, 蕨麻蛋白的起泡性能和泡沫稳定性均明显升高。浓度高的蛋白质溶液具有较高的乳化能力。初步实验得出凝胶在一般条件下无法形成。

蕨麻是我国特有的野生植物, 其营养成分丰富, 具有较优的功能特性, 属于食之佳品。本实验通过

(下转第 138 页)

表6 大豆奶酪挥发性组分分析结果

序号	化学成分	保留时间(min)	峰面积(%)
1	Dichloroacetaldehyde/二氯乙醛	5.944	0.13
2	Furan 2-pentyl- /2-戊基呋喃	6.964	1.33
3	Ethyl alcohol/乙醇	11.375	0.24
4	Acetic acid/乙酸	11.5	1.46
5	2 μ -Decadienal/2 μ -葵二烯醛	19.276	0.2
6	2 μ -Decadienal (E,E) -/(E,E) -2 μ -葵二烯醛	20.231	0.29
7	Hexanoic acid/己酸	20.433	1.11
8	2(3H)-Furanone μ hydro-5-propyl- / γ -庚内酯	24.341	0.26
9	Octanoic Acid/辛酸	24.811	0.55
10	Nonanoic acid/壬酸	26.832	0.25
11	Caprolactam/己内酰胺	27.112	2.24
12	1-Hexanol/己醇	27.839	0.41
13	n-Decanoic acid/十二酸	28.808	1.34
14	Hexadecanoic acid μ ethyl ester/棕榈酸乙酯	29.737	1.33
15	9-Octadecenoic acid(Z) - μ octadecyl ester/十八烷基油酸酯	32.018	1.2
16	Acetic acid μ chloro- μ octadecyl ester/十八(烷) 基氯乙酸酯	32.259	0.13
17	Dichloroacetic acid heptadecyl ester/十七烷基二氯乙酸酯	32.749	0.07
18	Bromoacetic acid hexadecyl ester/十二烷基溴乙酸酯	32.797	0.24
19	1,2-Benzenedicarboxylic acid bis(2-methylpropyl) ester/邻苯二甲酸二异丁酯	33.412	2.85
20	Linoleic acid ethyl ester/亚油酸乙酯	33.997	1.61
21	Phthalic acid μ butyl hexyl ester/邻苯二甲酸丁基己酯	34.613	2.85
22	Oleic Acid/油酸	35.486	0.32
23	Dibutyl phthalate/邻苯二甲酸二丁酯	35.788	2.83
24	Pentadecanoic acid/十五酸	37.741	0.33
25	2-n-Octylfuran/n-二辛基呋喃	39.286	1.03
26	n-Hexadecanoic acid/n-十六酸	40.112	56.72
27	15-Tetracosenoic acid methyl ester (Z) -/(Z) -二十四烯酸甲酯	40.797	2.83
28	Heptadecanoic acid/十七酸	42.991	0.17

ripening stage of sufu, a Chinese fermented soybean food [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2003, 83: 899-904.

[6] Wang YH, Li XF, Liang YX, et al. Enzymatic fractionation of conjugated linoleic acid isomers by selective esterification [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 46: 20-25.

[7] Villeneuve P, Barouh N, Barea B, et al. Chemoenzymatic

synthesis of structured triacylglycerols with conjugated linoleic acids(CLA) in central position [J]. Food Chemistry, 2007, 100: 1443-1452.

[8] 王瑾, 李祖光, 胡伟, 等. 大豆中脂肪酸组成的气相色谱-质谱分析 [J]. 浙江科技学院学报, 2003, 15(5): 16-18.

[9] 田怀香, 郑小平. 奶酪风味的研究进展 [J]. 乳品科学与技术, 2007(5): 213-215.

(上接第133页)

研究蕨麻蛋白的功能特性, 了解其加工适用性, 为蕨麻的进一步深加工提供了理论依据。

参考文献

[1] 青海经济植物志编写组. 青海经济植物志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1978: 270-273.

[2] 黄芳. 活性多糖的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(5): 90-98.

[3] Thompson L U. Preparation evaluation mung bean protein isolates [J]. Journal of Food Science, 1977, 42: 202-206.

[4] 韩丽华. 碱溶酸沉法生产大豆分离蛋白及影响质量、出率的主要因素 [J]. 中国油脂, 1998, 23(6): 29-31.

[5] GB/T 5009.5—1985. 凯氏定氮法 [S].

[6] GB/T 18246—2000. 饲料中氨基酸的测定 [S].

[7] 郭兴凤. 豌豆蛋白的功能特性研究 [J]. 郑州粮油学报, 1996, 17(1): 69-72.

[8] Beuchat I R. Functional and electrophoretic characteristics of succinylated peanut flour protein [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1977, 25: 258-263.

[9] Waniska R D, Kinsella J E. Foaming properties of proteins: evaluation of agglomeration apparatus using albumin [J]. Journal of Food Science, 1979, 44: 1398-1403.

[10] 张林生, 路苹, 曾让. 关于主要谷物的氨基酸组分评价 [J]. 氨基酸杂志, 1989(3): 30-32.

[11] 贾健斌, 杨正雄, 赵文华, 等. 以谷类食物为主人群的蛋白质氨基酸摄入量及健康状况 [J]. 营养学报, 2004, 26(3): 172-175.

[12] Petrucci S, Anon M C. Relationship between the method of intention and the structural and functional properties of soy protein isolates. 2. Surface properties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42(10): 2170-2176.

[13] 秦智伟, 杯凤涛, 周秀艳, 等. 东北大豆蛋白质功能特性的研究 [J]. 中国农学通报, 2005, 21(5): 124-127.

[14] 焦学瞬. 天然食品乳化剂和乳状液 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 1-34, 84.

[15] Mori T, Nakamura T, Utsumi S. Deletion mechanism of soybean 11S globulin: Formation of soluble aggregates as transient intermediates [J]. Journal of Food Science, 1981, 47: 26-30.