

冬小麦抗冻蛋白制备 及其在汤圆中的应用研究

夏 露, 张 超, 王 立*, 张 晖

(江南大学食品学院, 食品科学与工程国家重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘 要:研究了冬小麦麸皮抗冻蛋白的制备方法及其在速冻汤圆中的应用。研究确定冬小麦麸皮抗冻蛋白的提取工艺为:pH8.0, 提取时间3h, 液料比5:1, 该条件下小麦麸皮水溶性蛋白质提取率达到38%, 其中含抗冻蛋白1.6%。抗冻蛋白粗品在汤圆中的应用实验结果显示, 2.5%的蛋白添加量对汤圆的品质有明显的改善效果。

关键词:冬小麦麸皮, 抗冻蛋白, 汤圆, 提取

Preparation and application of antifreeze proteins extracted from winter wheat bran

XIA Lu, ZHANG Chao, WANG Li*, ZHANG Hui

(Food Science and Technology, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The preparation and application of antifreeze proteins (AFPs) were studied. The extraction process of AFPs from winter wheat bran was optimized as following: water/material ratio 5:1, pH 8.0, extraction time 3h. The extraction rate of soluble protein from winter wheat bran was 38%, and the AFPs content in the extraction (crude AFPs) was 1.6%. The application experiment of AFP in rice dumpling showed that the quality of rice dumpling would be improved by adding with 2.5% crude AFPs.

Key words: winter wheat bran; antifreeze proteins; rice dumpling; extraction

中图分类号: TS210.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)11-0241-04

抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs)是一类抑制冰晶生长的蛋白质,能以非依数性形式降低水溶液的冰点,从而导致水溶液的熔点和冰点之间出现差值,这种差值称为热滞活性(thermal hysteresis activity, THA),因此抗冻蛋白亦称为热滞蛋白或温度迟滞蛋白(thermal hysteresis proteins, THPs)^[1-3]。很多越冬的生物会产生抗冻蛋白,这些抗冻蛋白能够吸附到冰晶的表面改变冰晶形态并抑制冰晶的生长^[4-6]。抗冻蛋白在很多生物体内都被发现,不同的抗冻蛋白结构差异非常大。抗冻蛋白能被广泛地应用到农业、水产业和低温储藏器官、组织和细胞,利用转基因技术提高植物的抗冻性具有重要的应用价值。小麦作为人类膳食的主要原料,所具有的营养特性主要集中于小麦的皮层部分,即麸皮。因此,麸皮作为健康食品的原料越来越受到人们的重视^[7]。我国是小麦生产大国,每年加工出的小麦麸皮可达2000万t以上,但大多数都没有进行深加工和再利

用。麸皮中含有较丰富的淀粉酶系、碳水化合物等,相对于胚乳而言,小麦麸皮中蛋白质、矿物质、维生素等营养成分更为富集。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

冬小麦麸皮 山西省农业科学院;糯米粉 市售;考马斯亮蓝 G-250 Sigma 公司;硫酸铵、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、碳酸氢钠、EDTA 分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

LXJ-II 型离心沉淀机 上海医用分析仪器厂; WH-2 微型漩涡混合仪 上海沪西分析仪器厂; Sephadex G75, DEAE Sepharose Fast Flow 瑞典 Pharmacia 公司;浊度仪 上海精密科学仪器有限公司;色差计 江苏环保仪器厂;质构分析仪 Stable Micro System。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白含量分析 考马斯亮蓝比色法。分别精密吸取标准蛋白质溶液 0.0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 于 10mL 具塞试管中,各管加水至 1mL,加入考马斯亮蓝 G-250 溶液 5mL,充分混匀,静置 3min,于

收稿日期:2009-02-03 * 通讯联系人

作者简介:夏露(1986-),女,本科生。

595nm 处测定吸光光度值,绘制标准曲线,如图 1。

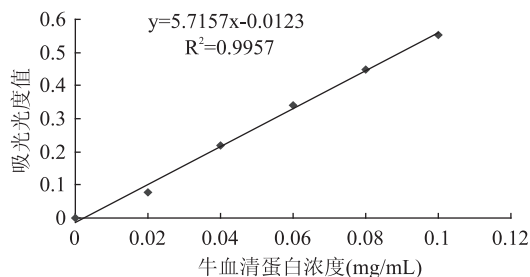


图1 考马斯亮蓝标准曲线

蛋白含量测定:准确量取提取液 1mL,按上述标准曲线的测定方法,分别测定其吸光度值,计算样品中蛋白质的含量。

蛋白质提取率的测定:提取率 = 提出蛋白量(上清液蛋白含量)/总蛋白量(原料蛋白含量) × 100%

1.2.2 水溶性蛋白提取工艺的研究

1.2.2.1 pH 对小麦麸皮蛋白质提取率的影响 温度 25℃,料液比为 1:6,提取 pH 分别调至 7、7.5、8、8.5、9,搅拌提取 2h,离心,测定上清液蛋白含量。

1.2.2.2 提取时间对小麦麸皮蛋白质提取率的影响

温度 25℃,料液比为 1:6,在 pH 8.0 下分别搅拌 1、2、3、4、5h,离心,测定上清液蛋白含量。

1.2.2.3 液料比对小麦麸皮蛋白质提取率的影响 温度 25℃,pH 8.0,液料比分别为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1,搅拌提取 2h,离心,测定上清液蛋白含量。

1.2.3 硫酸铵沉淀法制备麸皮水溶性蛋白 本实验采用饱和硫酸铵沉淀法,25℃下,首先将小麦麸皮在 6 倍体积的 10mol/L pH 8.0 的磷酸盐缓冲液(PBS)中搅拌 3h。悬浮液在 3000r/min 条件下离心 30min;上清液使用 50%~100% 饱和度的硫酸铵进行沉淀,并将溶液 3500r/min 离心 30min,沉淀使用截流分子量为 6kDa 的透析膜透析 12h,浓缩、冻干。

1.2.4 麸皮水溶性蛋白中活性的纯化

1.2.4.1 阳离子交换柱纯化 冻干粉 150mg 溶解于 3mL 10mol/L PBS (pH8.0) 中,使用阳离子交换柱进行分离(DEAE Sepharose Fast Flow column, 2.6 × 50cm)。阳离子交换柱首先使用 10mol/L PBS (pH8.0) 进行平衡,上样后,使用同样的 PBS 洗脱 1h,然后再使用 0~1.5mol/L NaCl 洗脱 5h,流速均为 1.0mL/min,检测波长 220nm。收集显示 THA 活性的组分,将其按照与上述相同的方法,透析并冻干。

1.2.4.2 凝胶过滤色谱纯化 冻干粉 100mg 复溶于 3mL 10mol/L PBS (pH8.0) 中,并使用凝胶过滤色谱进行分离(Sephadex G-75 pre-packed column, 1.0 × 30cm, AKTA purifier 1010 System, Amersham Biosciences, Sweden)。凝胶过滤柱使用 10mol/L PBS (pH8.0) 进行预平衡,上样 0.5mL 后,使用同样的 PBS 按照 0.5mL/min 的流速洗脱大约 70min,检测波长 220nm。收集显示 THA 活性的组分,将其按照与上述相同的方法,透析并冻干。

1.2.4.3 HPLC 法纯化 将冻干粉复溶于 10mol/L PBS (pH 8.0) 中,达到约 1mg/mL 蛋白质含量,使用 HPLC 法(Shodex PROTEIN KW-804 column, 0.80 × 30cm, Shodex, Showa Denko KK, Tokyo, Japan) 进一步

纯化。色谱柱使用相同的 PBS 缓冲液,并在 0~0.3mol/L 的 NaCl 梯度下按照 1.0mL/min 的流速洗脱,大约 30min,检测波长 220nm。

1.2.5 汤圆的制备及品质的检测

1.2.5.1 汤圆的制备 50g 糯米粉,40mL 温水混合,揉搓,搓圆,做对照平行实验。麸皮提取出来的蛋白质作为添加剂,分别以相对于糯米粉 1%、2%、2.5%、5% 的添加量加入到糯米粉与温水中,搓圆,放置 -60℃ 的超低温冰箱中存放,考察汤圆储存期间品质的变化。

1.2.5.2 汤圆的质构 应用全质构分析方法测定样品的硬度和弹性。质构仪参数如下:探头:P25;测试前速度:2.0mm/s;测试速度:2.0mm/s;感应力:10.0g;测试后速度:2.0mm/s;测试距离:75% (样品厚度百分数);引发类型:自动;获取数率:200PPS。

1.2.5.3 汤圆的外观 在 -60℃ 的同等温度下,直接对添加了不同 AFP 量的汤圆进行速冻,时间为 24h。汤圆取出后,观察外观,比较开裂程度。

1.2.5.4 汤圆汤的浊度 浊度计是用于测量悬浮于水(或其他透明液体)中,不溶性颗粒物质所产生的光的散射或衰减的程度,并定量表征这些悬浮颗粒物质含量的仪器。汤圆在煮后浑汤的浊度直接影响到人们对汤圆的食欲,实验中每组汤圆汤测三个样,取平均值。

2 结果与讨论

2.1 pH 对 AFP 提取率的影响

从图 2 可以看出,在 pH 7~9 范围内,提取率几乎随着 pH 升高而线性增加,并不存在最适提取 pH。但随着 pH 的升高,提取液的黏度增加,当 pH 超过 9 以后,提取液变得很黏稠,这样很不利于下一步的离心分离;同时也有研究表明,在强碱性条件下,蛋白质中的赖氨酸与丙氨酸或胱氨酸会发生缩合反应,生成对人体有害的物质,丧失利用价值。综合考虑以上因素,初步选取 pH 8.0 较适宜提取蛋白质。

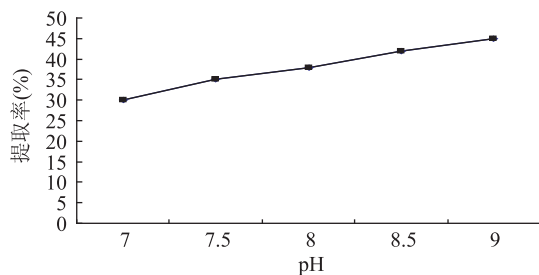


图2 pH 对小麦麸皮蛋白质提取率的影响

2.2 搅拌时间对 AFP 提取率的影响

从图 3 可以看出,搅拌时间长短对蛋白质溶出率影响并不明显。提取 2h,蛋白质的提取率为 32%,将提取时间延长到 4h,提取率仅增至 35%,搅拌到 5h 时,提取率下降为 33%。因此在工艺优化实验中可忽略浸提时间对提取率的影响,选取最佳提取时间为 3h。

2.3 液料比对 AFP 提取率的影响

从图 4 可以看出,随着液料比的增加,蛋白提取

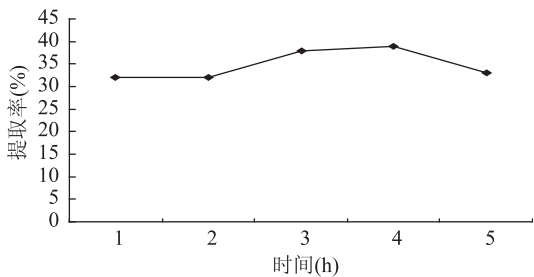


图3 搅拌时间对小麦麸皮蛋白提取率的影响

率也随之升高,但当液料比达到 5:1 之后,继续增加液料比,提取率渐渐趋于平稳。考虑到后续操作的简便,因此蛋白最佳提取的液料比选择为 5:1。

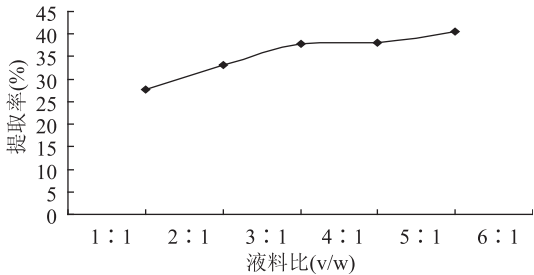


图4 液料比对小麦麸皮提取率的影响

2.4 纯化结果分析

2.4.1 阳离子交换柱纯化结果 离子交换色谱共洗脱出 7 个峰,依次标记为 P1 到 P7(图 5)。检测发现,7 个洗脱峰中,P1、P2、P3、P5 和 P6 具有抗冻活性。但是可以发现,P5 和 P6 的 THA 和相对蛋白质含量都较低,为了简化后续的工作,我们仅对 P1、P2 和 P3 进行收集、透析和冻干,用于后续的凝胶过滤色谱分离。

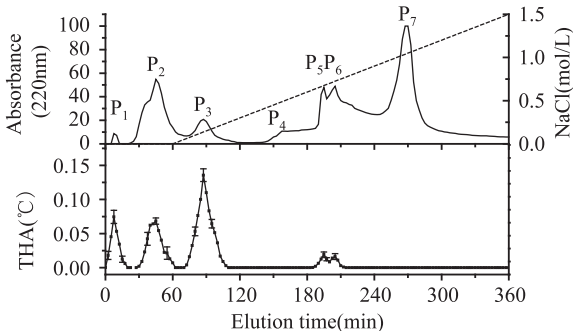


图5 离子交换色谱对冬小麦麸皮 AFP 的分离效果

2.4.2 凝胶过滤色谱纯化结果 接着,我们将离子交换色谱分离得到的三个峰分别使用凝胶过滤色谱进一步进行分离(图 6)。图 6 的上半部分显示了 P1、P2 和 P3 使用 Sephadex G-75 预装柱(1.0 × 30cm)分离的效果,检测波长 220nm。图 6 的下半部分显示了 P1、P2 和 P3 洗脱峰的 THA。可以发现,在三个峰的洗脱曲线中,仅有一个保留时间为 48.46min 峰具有 THA,证明了三个图中的该峰为同一物质。但是,P1、P2 和 P3 种洗脱得到的相对含量也各不相同,P3 的相对含量最高。为了简化后续的分离过程,我们仅对 P3 的峰 P33 进行收集、透析和冻干,用于后续的 HPLC 分离。

2.4.3 HPLC 法纯化结果 最后,我们使用 HPLC 对 P33 进行进一步的分离(图 7)。结果显示,P331 显

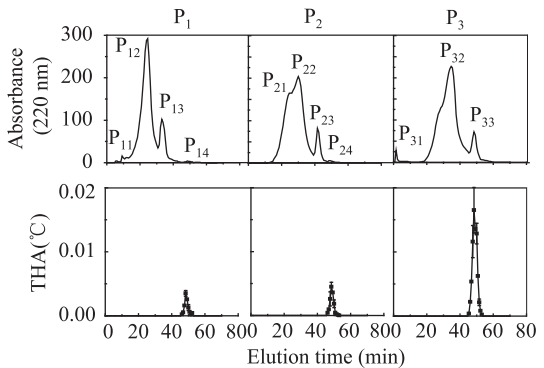


图6 凝胶过滤色谱对 P1、P2

和 P3 分离效果及其 THA 的影响

示最强的 THA,大约 0.016℃;而另外两个峰则显示了较低的 THA,P332 为 0.002℃,P333 未显示 THA。因此,P331 即为 AFP。

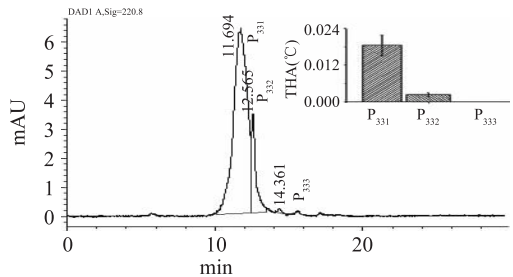


图7 AFP 使用 HPLC 分离效果

2.5 AFP 对汤圆品质的影响

2.5.1 质构 从图 8 中可以看到,加入 AFP 后,汤圆在冷冻过程中的硬度都有所减弱,但变化的幅度有所不同,5% 的 AFP 添加量显示了较低的硬度。硬度是样品达到一定变形时所必须的力;硬度值指第一次穿冲样品时的压力峰值,在感官上是指用牙咬断样品所用的力。硬度值越大,面制品吃起来就越硬,缺乏弹性、绵软、爽口的感觉^[8-10]。单从硬度值上对 AFP 的应用价值考量,添加量越大越好;但是当硬度过小时,汤圆成型性则变差,影响外观,因此 2%、2.5% 的 AFP 添加量即能达到很好的应用效果。

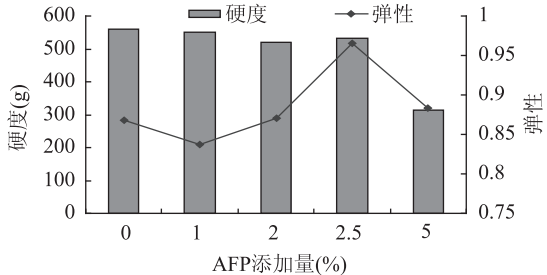


图8 不同 AFP 添加量对汤圆冷冻后硬度和弹性的影响

从图 8 中还可以看出,加入 AFP 的汤圆在冷冻过程中的弹性值都有所增加,这与硬度值减少相吻合。但是随着添加量的加大,这种改变并不明显且有下降的趋势,因此,亦可选取 2.5% 为最合适的添加量。

2.5.2 外观 在-60℃下速冻 24h 后,不同 AFP 添加量的汤圆在外观上有细微的区别。相对于市场上售卖的汤圆来说,进行的空白实验并没有添加变性淀粉之类的稳定剂,因此出现开裂现象,而添加 AFP 的汤圆则呈现较光滑的外观,见图 9。

(下转第 310 页)

性质的稳定性[J].仪器仪表与分析监测,2007(1):33.

[12] 蒋彪,潘永华,龚国斌.光照和温度对叶绿素成分影响的研究与探索[J].光电子技术,2007,12(4):279-280.

[13] 杨国恩,吴志平,李坤平,等.竹叶叶绿素的提取及其性质的稳定性[J].中南林学院学报,2005,6(3):106-110.

[14] FERNANDEZ-LOPEZ J A, ALMELA L, SOLE-DAD-ALMANSAM, et al. Partial purification and properties of chlorophyllase from chlorotic Citrus limon leaves [J]. Phytochemistry, 1992, 31.

[15] 陈文峻,蒯本科.植物叶绿素的降解[J].植物生理学通讯,2001(8):336-339.

[16] 杨晓棠,张昭其,徐兰英,等.植物叶绿素的降解[J].植物生理学通讯,2008(2):7-12.

[17] 王敏,刘邻渭.叶绿素及衍生物研究进展与护绿工艺分析[J].郑州轻工业学院学报:自然科学版,2001(3):63-67.

[18] 殷锦捷.绿叶蔬菜真空冷冻干燥实验研究[J].吉林大学学报:工学版,2003(7):110-112.

[19] 马文锦,刘树兴,凌建刚,等.茭白加工过程中的护绿研究[J].食品工业科技,2008(2):158-160.

[20] 何俊萍,李位华,康云峰,等.枸杞嫩茎叶护绿技术及质

量控制研究[J].食品科技,2005(6):34-36.

[21] 莫开菊,汪兴平,熊四海.绿色蔬菜护色研究[J].湖北民族学院学报:自然科学版,2001,8(3):11-13.

[22] 孙彩支,毕春波.金属叶绿素衍生物的研究进展[J].唐山师范学院学报,2008,3(2):55-58.

[23] 焦凌梅,袁唯.绿色蔬菜加工中护绿技术的研究及进展[J].贮藏与加工,2004(1):13.

[24] 叶倩,梁月荣,陈瑞鸿.绿茶饮料护色技术的研究进展[J].茶叶,2006,32(1):18-22.

[25] 陈萍,朱连平.气调贮藏对蒜薹品质的影响[J].现代农业,2005(5):38-39.

[26] 盛玮,薛建平,许毅,等.壳聚糖涂膜对辣椒采后生理的影响[J].生物学,2005,22(4):32-34.

[27] 乔勇进,徐芹,方强,等.果蔬护色保鲜技术与商业化应用[J].农产品加工·学刊,2007(6):4-8.

[28] Yin Yongguan, Han Yong, Liu Jingbo. A novel protecting method for visual green color in spinach puree treated by high intensity pulsed electric fields [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 79: 1256-1260.

(上接第 243 页)

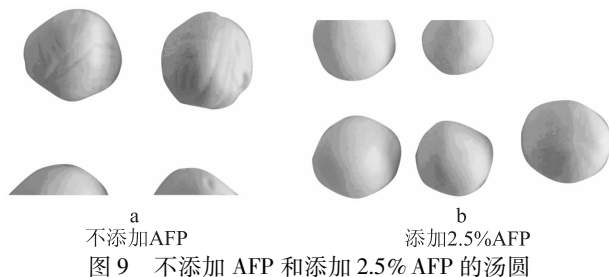


图9 不添加 AFP 和添加 2.5% AFP 的汤圆

2.5.3 浊度 使用蒸馏水对浊度计校零之后,依次测量汤圆汤的浊度,结果见图 10。由图 10 可以看出,随着 AFP 添加量的增加,汤圆汤的浊度随之递减,这可能是由于麸皮蛋白质与糯米粉结合较好的缘故^[11]。因此,添加 AFP 的汤圆在煮熟后,浑汤清晰透明,易被人们所接受。

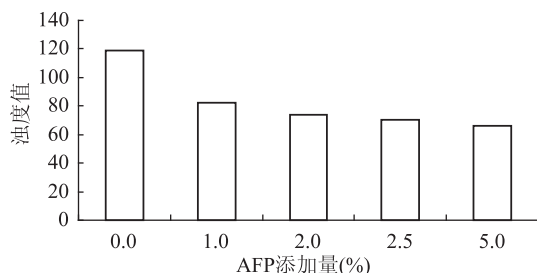


图10 不同 AFP 添加量对汤圆汤浊度的影响

3 结论

3.1 硫酸铵沉淀法制备小麦麸皮蛋白质,通过单因素实验得到提取工艺条件为:液料比 5:1, pH 8.0, 提取时间 3h。该条件下制备蛋白质效果最佳,提取率可达到 38%。产品小麦麸皮蛋白粉为灰褐色粉末,具有清新的香味。

3.2 通过对汤圆的外观、质构分析以及汤圆汤浊度的检测可以发现,添加 2.5% 的 AFP 对速冻汤圆品质

的改善有明显的作。

参考文献

- [1] De Vries A L, Wohlschlag D E. Freezing resistance in some antarctic fishes [J]. Science, 1969(163):1073-1075.
- [2] Graether S P, Kuiper M J, Gagn S M, et al. Helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect [J]. Nature, 2000(406):325-328.
- [3] Li N, Chibber B A, Castellino F J, et al. Mapping of disulfide bridges in antifreeze proteins from overwintering larvae of the beetle *Dendroides Canadensis* [J]. Biochemistry, 1998, 37(18):6343-6350.
- [4] Griffith M, Ala P, Yang D S C, et al. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves [J]. Plant Physiol, 1992(100):593-596.
- [5] Hon WC, Griffith M, Chong P, et al. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Xecale cereale L.*) leaves [J]. Plant Physiol, 1994(104):971-980.
- [6] R W R Crevel, J K Fedyk, M J Spurgeon. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure [J]. Food and Chemical Toxicology, 2002(40):899-903.
- [7] 徐志剑,杜风光,史吉平,等.小麦膳食纤维应用研究进展[J].粮食工程,2006(5):16-17.
- [8] 陈娟,徐学明.软曲奇质地的 TPA 质构分析[J].中国粮油学报,2008,23(1):194-197.
- [9] 楚炎沛.物性测试仪在食品品质评价中的应用研究[J].粮食与饲料工业,2003(7):40-42.
- [10] 姜松,林琳,王海鸥,等.苹果正果 TPA 实验的研究[J].江苏大学学报,2005,25(3):189-192.
- [11] 吴汉东,岳喜庆,查恩辉.乳化盐类对豆乳牛乳干酪质构影响的研究[J].食品工业,2008(1):31-32.