

双低油菜籽分离蛋白提取方法对其功能性的影响

蒋舒婷^{1,2}, 贺颖¹, 仇丹^{1,2}, 王亚娟^{1*}, 邓尚贵^{2*}

¹ 宁波工程学院材料与化学工程学院 浙江宁波 315211

² 浙江海洋大学食品与药学院 浙江舟山 316022)

摘要 油菜籽蛋白是一种氨基酸组成合理的完全蛋白,其营养价值与酪蛋白不相上下,属于一类潜在的可食用优质蛋白。本文选冷榨油菜籽粕为原料,采用碱溶酸沉和电场絮凝的方法提取其中的油菜籽分离蛋白,并比较其结构和功能性。结果显示:电场方法提取的油菜籽蛋白 ERP 的表面疏水性为 5.776 ± 0.222 , 大于碱溶酸沉法的样品 CRP (4.803 ± 0.060), 其乳化性 (49.95%)、乳化稳定性 (90.85%) 及持油性 (166.18%) 均更优。ERP 和 CRP 分子的二硫键含量分别为 $47.51 \mu\text{mol/g}$ 和 $36.67 \mu\text{mol/g}$ 。在电流的作用下,电场提取样品的 α -螺旋及 β -转角所占比例较高。结论:提取方法会影响油菜籽分离蛋白的氨基酸比例、结构及功能性。

关键词 油菜籽粕; 分离蛋白; 提取方法; 功能性

文章编号 1009-7848(2023)09-0140-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.09.015

双低油菜(Canola),亦称芥花,系芸苔属十字花科植物,为加拿大育种专家 Stefsson 于 1974 年通过基因改造,从普通高芥酸油菜籽改良而得的新品种^[1]。与传统的油菜籽相比,双低油菜籽的芥酸含量(<2%,油)、硫代葡萄糖苷含量(<30 $\mu\text{mol/g}$,饼)均大幅度降低^[2]。双低油菜籽压榨所得芥花油中不饱和脂肪酸在 90%以上,主要为亚油酸和亚麻酸,不含反式脂肪酸和胆固醇,而富含维生素 E 和维生素 K,使其具有一定的软化血管,降低冠状动脉心脏病,延缓衰老等功效,且吸收率可达 99%^[3]。自其被发现以来越来越被各国重视,种植面积也越来越广。据美国农业部(USDA)的统计,芥花油目前位居全球第三大食用油,约占全球食用油消费总量的 15%,仅次于棕榈油与大豆油。2019-2020 年度全球菜籽饼粕产量 0.39 亿 t,我国消耗总量达 0.11 亿 t^[4]。经压榨后的油菜籽粕含有极高的蛋白含量(约 20%)^[5],其中必需氨基酸和非必需氨基酸含量之比接近联合国食品 and 农业组织(简称 FAO)和世界卫生组织(WHO)的推荐标准,

属于比较优质的蛋白资源^[6]。

油菜籽蛋白具有产量丰富,营养价值高,使用安全等优点,故许多国家,如加拿大、美国、法国、西欧及日本等很早就开展研究。然而,截止目前,因菜籽饼粕中的硫苷、植酸等抗营养因子,故其最主要用途是饲料行业,甚至被遗弃,用作肥料^[7]。现有研究表明:脱毒后的油菜籽饼是一种品质优良的植物蛋白资源^[8]。近年来,国内外学者对从油菜籽饼粕中高效提取的蛋白质进行了研究,其中将细胞壁的破碎使蛋白质大量溶出是关键工序。目前菜籽蛋白的提取方法主要包括 pH 值分段控制法(即碱溶后等电点沉淀)^[9]、盐溶法^[10]、奥斯本法(OSB 法)^[11]及酶解法^[12]等。这些提取方法或多或少存在一些不足,如碱溶酸沉法中蛋白质易发生水解变性,盐溶过程需配合膜过滤,OSB 法收率较低,酶法、微生物发酵法目前仅限于试验阶段^[13]。同一种植物蛋白,干燥方法的不同会使其理化性及功能有所差异^[14],类似的,提取方法的不同亦会导致其功能性不同。本研究以国产秦杂油 2 号双低油菜籽经冷榨制得的菜籽饼粕为原料,借助碱溶蛋白液中蛋白质分子上的电荷,使其在电场环境中定向移动,提取油菜籽分离蛋白,并与碱溶酸沉法提取的油菜籽蛋白的结构及功能性进行对比,旨在为油菜籽分离蛋白的实际应用提供参考。

收稿日期: 2022-09-25

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(51703100);
国家大学生创新项目(202111058013);宁波市
自然科学基金项目(2021J142)

第一作者: 蒋舒婷,女,硕士生

通信作者: 王亚娟 E-mail: wangyajuan@nbut.edu.cn

邓尚贵 E-mail: dengshanggui@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

秦杂油 2 号冷榨油菜籽粕, 由陕西省杂交油菜研究中心提供; 正己烷(AR), 国药集团化学试剂有限公司; 牛血清蛋白(AR)、考马斯亮蓝 G-250(AR)、8-苯胺-1-萘磺酸(ANS, AR)、三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, AR), 北京索莱宝科技有限公司; 磷酸(AR), 国药集团化学试剂有限公司; PBS 缓冲液, 厦门海标科技有限公司; 甘氨酸(AR)、 β -巯基乙醇(AR), 宁波萃英化学技术有限公司; 乙二胺四乙酸(EDTA, AR)、二硫代二硝基苯甲酸(DTNB, AR)、三氯乙酸(TCA, AR), 上海麦克林生化科技有限公司; 尿素(AR), 天津市大茂化学试剂厂; 十二烷基硫酸钠(SDS, AR), 国药集团化学试剂有限公司。

高速多功能粉碎机, 武义海纳电器有限公司; TG16-WS 台式高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发公司; 手持式 pH 检测计, 东莞万创电子制品有限公司; KEEZO 加热磁力搅拌器, 上海精凿科技有限公司; Scientz-10N 台式冷冻干燥机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; JRJ300-D-I 剪切乳化机, 上海标本模型厂。

1.2 油菜籽粕预处理

利用高速多功能粉碎机将油菜籽饼粕粉碎为 75~270 μm 的颗粒, 而后按料液比 1:4 加入正己烷, 通风橱中机械搅拌 1 h 后于 8 000 $\times g$ 条件下离心 10 min, 回收上清液, 继续往不溶物中加入正己烷, 搅拌离心, 重复 3 次。而后将不溶物平铺在锡箔纸上置于通风橱自然风干, 得脱脂油菜籽粕粉。

1.3 油菜籽分离蛋白的提取

称取适量脱脂油菜籽粕粉, 按料液比 1:20(g/mL) 加入去离子水, 而后使用 NaOH 溶液将 pH 值调至 11.0, 25 $^{\circ}\text{C}$ 机械搅拌 2 h, 期间每隔 15 min 检查混合溶液的 pH 值并保证其在 10.5~11.0, 然后于 5 600 $\times g$ 条件下离心 10 min, 留上清液过滤。

碱溶酸沉法: 将上述滤液用 HCl(1.0 mol/L) 调 pH 值至 4.5~5.0, 而后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 4 h, 于 5 600 $\times g$ 条件下离心 10 min, 刮取下层沉淀物, 加少量去离子水, 并将其调至 pH 值为中性, 冻干后得常规提取油菜籽分离蛋白(conventional rapeseed protein, 简称 CRP), 其纯度采用元素分析法测定其 N

元素含量反推, 淀粉含量采用 GB/T5009.9-2008 《食品中淀粉的测定》酸水解法测定。

电场提取法: 将上述滤液置于电场中, 以石墨为正极, 钛板为负极, 设置电场电压为 16 V, 隔 30 min 收集电场正极板附近的絮凝物, 后加少量去离子水, 调节 pH 值至中性, 冻干后得电场提取油菜籽蛋白(electrostatic rapeseed protein, 简称 ERP), 纯度及淀粉含量的测定同 CRP。

1.4 分离蛋白的功能性测定

1.4.1 持水性 精确称取 0.600 g 分离蛋白样品, 加 10 mL 去离子水至 15 mL 的离心管中, 漩涡振荡使之充分混合, 于 3 000 $\times g$ 条件下离心 30 min, 小心倒去上清液, 称重后使用公式(1)计算其吸水性(water absorption capacity, WAC), 重复 3 次取平均值。

$$\text{WAC}(\%) = \frac{M_2 - M_1}{M_0} \times 100 \quad (1)$$

式中: M_0 ——干分离蛋白的质量, g; M_1 ——干分离蛋白和空离心管的质量, g; M_2 ——吸水后的分离蛋白和离心管的质量, g。

1.4.2 持油性 精确称取 1.000 g 样品与 10 mL 大豆油一起置于 15 mL 离心管, 漩涡振荡使之充分混合, 室温放置 30 min 后于 3 000 $\times g$ 条件下离心 30 min, 而后倒去上清液, 称重后使用公式(2)计算其吸油性(oil absorption capacity, OAC), 重复 3 次取平均值。

$$\text{OAC}(\%) = \frac{M_2 - M_1}{M_0} \times 100 \quad (2)$$

式中: M_0 ——干分离蛋白的质量, g; M_1 ——干分离蛋白和空离心管的质量, g; M_2 ——吸油后的分离蛋白和离心管的质量, g。

1.4.3 溶解度 根据 Petrucelli 等^[15]的方法检测, 并做适量修改: 称取 6 份 0.1000 g 蛋白样品溶于 10 mL 去离子水中, 磁力搅拌使之充分混合, 分别调节 pH 值至 3.0, 4.0, 5.0, 7.0, 9.0 和 12.0。室温下搅拌 30 min, 之后在 4 000 $\times g$ 条件下离心 30 min, 取上清液 1 mL 加入 5 mL 考马斯亮蓝溶液, 充分混合后测定样品在 595 nm 处的吸光度。试样测定 3 次, 结果取平均值。

1.4.4 乳化性及乳化稳定性 参照 Yasumatsu

等^[16]的方法对油菜籽分离蛋白的乳化性及乳化稳定性进行测定:称取 1.75 g 蛋白质样品加入 25 mL 去离子水,高速剪切 30 s,而后加入 25 mL 玉米油,继续剪切乳化 30 s,1 100×g 离心 5 min,乳化能力 EA 按公式(3)计算。乳化稳定性按如下方法:将此离心管在 80 °C 水浴振荡 30 min,后离心测乳液层高度并带入公式(4)计算乳化稳定性 ES。

$$EA = \frac{H_1}{H_0} \times 100\% \quad (3)$$

$$ES = \frac{H_2}{H_1} \times 100\% \quad (4)$$

公式(3)中, H_0 ——离心后样品总高度,cm; H_1 ——乳液层高度,cm;公式(4)中 H_1 ——振荡前乳液层高度,cm; H_2 ——振荡后乳液层高度,cm。

1.4.5 表面疏水性 参考 Timilsena 等^[17]方法取一定量的蛋白质样品,分别加入 20 mmol/L, pH 7.0 的 PBS 缓冲液,并配置成浓度为 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 mg/mL 溶液。设定荧光分光光度计激发波长和发射波长分别为 390 和 470 nm,狭缝宽 5 nm。向 2 mL 蛋白溶液中加入 20 μ L 浓度 8 mmol/L 的 8-苯胺-1-萘磺酸溶液,振荡后静置 5 min 测定荧光强度,以光强对蛋白质浓度作图,斜率即为表面疏水性 S_0 。

1.4.6 游离巯基及二硫键含量 参照 Tang^[18]的方法测定游离巯基,具体方法如下:取 1 mL 10 mg/mL 样品蛋白分别加入 2 mL 缓冲溶液(每升溶液含 10.4 g Tris, 6.9 g 甘氨酸, 1.2 g EDTA, pH 8.0)和 0.02 mL Ellman 试剂(0.2 g DTNB 溶于 50 mL 上述缓冲溶液中),于 25 °C 保温 5 min,在 412 nm 下测定吸光值,按公式(5)计算表面巯基,以不加样品蛋白只加 Ellman 试剂的样为空白。

$$SH_{\text{free}}(\mu\text{mol/g}) = \frac{73.53 \times A_{412\text{nm}} \times D}{m} \quad (5)$$

式中: $A_{412\text{nm}}$ ——有 DTNB 存在时样品的吸光值-无 DTNB 存在时样品的吸光值; D ——稀释倍数; m ——固形物含量,g。

二硫键含量测定参考李丽娜等^[19]的方法并稍作修改:取 10 mg 蛋白样品,在样品中分别加入 4 mL 的尿素-盐酸胍溶液(10.4 mg/mL Tris, 6.9 mg/mL 甘氨酸, 1.2 mg/mL EDTA, 0.48 mg/mg 尿素,

pH 8.0)再加入 0.05 mL β -巯基乙醇。在 25 °C 条件下,水浴保温 1 h,再加入 12% TCA 溶液 10 mL 水浴 1h,将溶液离心,弃上清液,取沉淀,将沉淀溶解在 12% 的 TCA 中保温 1 h 再次离心,加入 10 mL EDTA 缓冲液 1% 的 SDS 溶解沉淀,加入 50 μ L Ellman 试剂,剧烈振荡后于 25 °C 保温 1 h,在 25 °C 条件下,然后离心(10 000 r/min, 30 min),测定 412 nm 处下的吸光值,总巯基含量 SH_{total} 按公式(5)计算,二硫键 SS 的含量按公式(6)计算:

$$SS(\mu\text{mol/L}) = \frac{SH_{\text{total}} - SH_{\text{free}}}{2} \quad (6)$$

1.5 分离蛋白的结构表征

1.5.1 氨基酸组成 采用 GB5009.124-2016 《食品中氨基酸的测定》方法测定 ERP 及 CRP 中氨基酸的种类及所占比例。

1.5.2 圆二色谱 参照叶钰等^[20]的方法,称取 10 mg 样品加入 5 mL 水,4 h 换一次水透析 12 h,而后于 3 000×g 离心 5 min,取上清液,放入圆二色谱仪中,设定扫描范围为 190~250 nm,狭缝宽度 1 nm,扫描速度为 50 nm/min,记录样品的圆二色谱图,得到的数据进一步通过软件拟合计算蛋白质的二级结构含量,结果为 3 次平均。

2 结果与讨论

2.1 分离蛋白组成

使用 2 种方法提取的油菜籽分离蛋白的收率、纯度及其中淀粉含量见表 1。由表 1 可知:相同条件下,使用 ERP 的收率及纯度分别为 12.34% 和 92.56%,均较 CRP 的更高(其值分别为 10.85% 和 89.04%)。油菜籽籽实中含有一定量的淀粉^[21],而在碱溶酸沉提取时,碱液中的淀粉在调节 pH 值时会部分沉淀,因此在后续离心过程中淀粉很难去除,故而使用传统提取方法获得的植物蛋白中淀粉含量较电场中提取的高。

表 1 两种方法提取的分离蛋白收率及纯度

Table 1 Yield and purity of rapeseed protein extracted with two different method

样品	ERP	CRP
收率/%	12.34 ± 0.40	10.85 ± 0.25
纯度/%	92.56 ± 0.51	89.04 ± 0.17
淀粉含量/%	6.19 ± 0.71	8.15 ± 0.42

2.2 氨基酸组成

蛋白质的基本结构单元是氨基酸,氨基酸组成会极大影响蛋白质的理化性及功能性,而蛋白质来源、品种、提取方法都会影响氨基酸比例^[6,14-15]。表 2 列出了 ERP 和 CRP 的氨基酸组成,由该表可知:油菜籽蛋白的氨基酸组成较全,含有人体所需的必需氨基酸,且必需氨基酸含量高于 30%,各种必需氨基酸含量均接近 FAO/WHO 的推荐值^[22];而不同的提取方法得到的油菜籽分离蛋白中氨基酸所占比例不同,如 ERP 疏水性氨基酸占氨基酸总

量的 47.97%,而 CRP 中疏水性氨基酸仅为 43.10%,这就造成了其功能性的不同。

支链氨基酸具有独特的生理功能,是肌肉代谢的重要燃料,可改善肝功能和病人蛋白质营养失常状态及抗疲劳功能^[23],上表中显示油菜籽蛋白中支链氨基酸含量可达约 15.84%~20.42%,意味着经过剧烈运动后,可通过油菜籽蛋白补充损失的蛋白质,因此油菜籽蛋白可作为一种良好的植物蛋白质来源。

表 2 油菜籽分离蛋白的氨基酸组成与含量

Table 2 Amino acid composition and content of CRP and ERP

氨基酸		ERP/mg·g ⁻¹	占比/%	CRP/mg·g ⁻¹	占比/%
疏水性氨基酸	苯丙氨酸 *	30.17	3.40	52.21	5.77
	甲硫氨酸 *	7.73	0.87	31.61	3.49
	亮氨酸 * [○]	64.92	7.31	80.88	8.94
	异亮氨酸 * [○]	35.94	4.05	46.22	5.11
	缬氨酸 * [○]	39.77	4.48	57.68	6.37
	半胱氨酸	1.94	0.22	2.62	0.29
	丙氨酸	51.32	5.78	56.42	6.23
	甘氨酸	56.69	6.39	30.86	3.41
	脯氨酸	137.34	15.47	31.60	3.49
	亲水性氨基酸	苏氨酸 *	35.71	4.02	44.18
赖氨酸 *		82.26	9.27	73.64	8.14
丝氨酸		31.51	3.55	63.41	7.00
组氨酸		29.30	3.30	21.36	2.36
天冬氨酸		75.55	8.51	93.95	10.38
酪氨酸		29.07	3.27	39.31	4.34
谷氨酸		125.06	14.09	126.69	14.00
精氨酸		53.31	6.00	52.53	3.49

注:*为必需氨基酸;○为支链氨基酸。

2.3 持水、持油性

ERP 与 CRP 的持水、持油性详见图 1。植物蛋白的持水、持油性均会影响食品的品质及质构,持水性与蛋白质的保水性、溶胀性、溶解度和凝胶性等关键属性有关,而持油能力则表明蛋白质吸收和保留脂肪的能力。

由图 1 可发现:电场提取出的分离蛋白 ERP 的持水性低于传统方法,相反其持油性略高于 CRP,而持油性与其分子中疏水性氨基酸的含量及暴露量有关^[24],该规律也与表 2 中这两种方法所提的分离蛋白中疏水性氨基酸的占比相符,即

ERP 中疏水性氨基酸占 47.97%,略高于 CRP(其值为 43.10%)。

2.4 溶解度

以牛血清蛋白为标准物,经考马斯亮蓝显色后在 595 nm 处的吸光度为纵坐标,蛋白质含量为横坐标绘制标准曲线,本试验所提分离蛋白 ERP 和 CRP 在不同 pH 值下的溶解度曲线见图 2。

蛋白质的溶解度会显著影响其功能性,而由于其具有两亲性,因此会受到溶液 pH 值、亲水-疏水性氨基酸比例及离子强度的影响^[25-26]。由图 2 可知:随着环境 pH 值的增加,油菜籽蛋白的溶解

性呈先下降后增加的趋势,溶解度的最低点在其等电点附近($\text{pH}=5$),此时 ERP 和 CRP 的溶解度分别为 7.68% 和 0.03%。当溶液 pH 值处于蛋白质等电点时,蛋白自身不带电,与水分子作用力最弱,此时蛋白质分子间的作用力增强,更易聚集;而当溶液 pH 值偏离等电点时,蛋白带不同量的正或负电荷,其与水分子的结合能力增强,溶解度

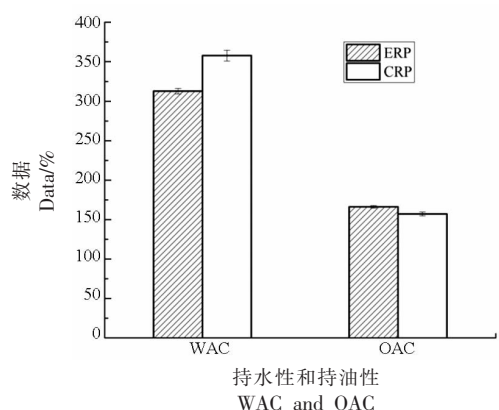


图1 菜籽蛋白持水、持油性对比

Fig.1 WAC and OAC of rapeseed protein

2.5 乳化性及乳化稳定性

蛋白质的乳化性及乳化稳定性会受到蛋白质分子的大小、形状、pH 值、溶解度和疏水性的影响^[29]。本试验所提取的油菜籽分离蛋白的乳化性及乳化稳定性结果见表 3。

表 3 中的数据 displays: ERP 的乳化能力为 $(49.95 \pm 1.33)\%$, 略高于 CRP 的 $(47.13 \pm 1.74)\%$, 分析原因为 ERP 表面的疏水基团的暴露, 使得其与大豆油的结合更强, 同时由于 ERP 具有更小的粒径, 而粒径的减小对应着相对较大的蛋白质片段基团被破坏, 形成更小的蛋白质单位, 链段柔性增加, 蛋白质分子链充分伸展, 促使原来被包裹着的氨基酸残基凸显出来, 因此柔性链段的增加及疏水基团的充分暴露使其具有更大的表面活性^[30-31]。

乳化稳定性指乳液能够保持稳定状态, 且不产生两相分层的现象, 在工业生产中, 乳液稳定性高有利于蛋白在产品中的利用。如表 3 所示 ERP 和 CRP 的乳化稳定性分别为 90.85% 和 88.56%, 即 ERP 的乳化稳定性优于 CRP, 其原因是碱溶酸沉提取时溶液中的 NaCl 无法完全去除, 而盐离子

随之增加^[27]。值得注意的是: 使用电场提取的油菜籽分离蛋白的溶解度均较传统碱溶酸沉方法提取的高, 其原因为 ERP 中更少的淀粉组分, 同时电场环境可能会对蛋白质的三级结构有所破坏, 进而增加其与水分子的结合力。这与胡娟^[28]所得的“在一定的脉冲电压范围内, 蛋白质溶解度会随电压增加而增加”的结论相符。

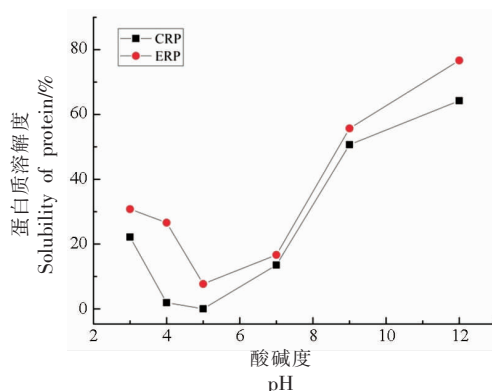


图2 两种方法提取的分离蛋白的溶解性

Fig.2 Solubility rapeseed protein extracted with two methods

表3 两种方法提取的油菜籽分离蛋白的乳化性及乳化稳定性

Table 3 Emulsification and emulsification stability of ERP and CRP

样品	乳化性 EA/%	乳化稳定性 ES/%
ERP	49.95 ± 1.33	90.85 ± 1.52
CRP	47.13 ± 1.74	88.56 ± 1.89

的存在不利于乳液的稳定^[13]; 同时 ERP 样品大量存在的疏水基团的适当暴露(见表 2 中数据)可促进其与油滴的相互作用, 从而降低界面张力, 提高其乳化稳定性^[32]。

2.6 表面疏水性

ERP 和 CRP 的表面疏水性数据见表 4, 如表所示: ERP 的表面疏水性比 CRP 的高 20%, 而蛋白质表面疏水性与蛋白质表面暴露的疏水氨基酸残基的数量和类型有关, 并受蛋白质结构的折叠、展开状态和变性的影响^[33], 因此可推测油菜籽蛋白在电流作用下, 其三级甚至二级结构发生一定程度的改变, 诱使以前隐藏在蛋白内部的疏水基

团暴露出来,从而导致 ERP 的表面疏水性高于 CRP(见图 1)。由于 ERP 的高表面疏水性,使得其持油性高

表 4 两种方法提取的油菜籽蛋白的表面疏水性、巯基及二硫键含量

Table 4 Surface hydrophobicity, sulfhydryl group and disulfide bond contents of ERP and CRP

样品	表面疏水性	SH _{free} /μmol·g ⁻¹	SH _{total} /μmol·g ⁻¹	SS/μmol·g ⁻¹
ERP	5.776 ± 0.222	21.57 ± 2.58	116.60	47.51
CRP	4.803 ± 0.060	34.33 ± 0.63	107.67	36.67

2.7 巯基及二硫键含量

巯基和二硫键是构成蛋白质空间结构的骨架,在稳定蛋白质构象和保持蛋白质活性方面起重要作用,对蛋白质的功能特性有很大的影响,而在一定条件下二硫键与巯基会相互转化^[34]。

电场中提取的油菜籽分离蛋白 ERP 的游离巯基含量约为 21.57 μmol/g,远低于 CRP 的(约为 34.33 μmol/g),相反的,ERP 中二硫键含量高于 CRP,原因为电场的存在会诱导蛋白质的极性基团产生自由基,从而破坏蛋白质分子之间的静电作用,使之构象产生变化^[35]。由于蛋白质的疏水相互作用,使得其表面自由基重新聚集,巯基与巯基之间的氧化作用增强,故而形成二硫键几率更大,

残留在表面的游离巯基含量降低。同时,二硫键含量增加,其疏水性也相应增加;疏水性增强,乳化性及乳化稳定性提升,这也印证了图 1 与表 3 中的结论。

2.8 圆二色谱

蛋白质的二级、三级结构会影响其功能性,圆二色谱中有 3 个特征结构峰:190 nm 处的正峰,208 和 223 nm 处的 2 个负峰对应着蛋白质的 α-螺旋;而 195 nm 左右处的正峰、215 nm 左右的负峰则为 β-折叠结构;200 nm 左右处的负峰是无规卷曲结构形成的^[36]。不同提取方法获得的油菜籽分离蛋白的圆二色谱图及各二级结构所占比例如图 3 所示。

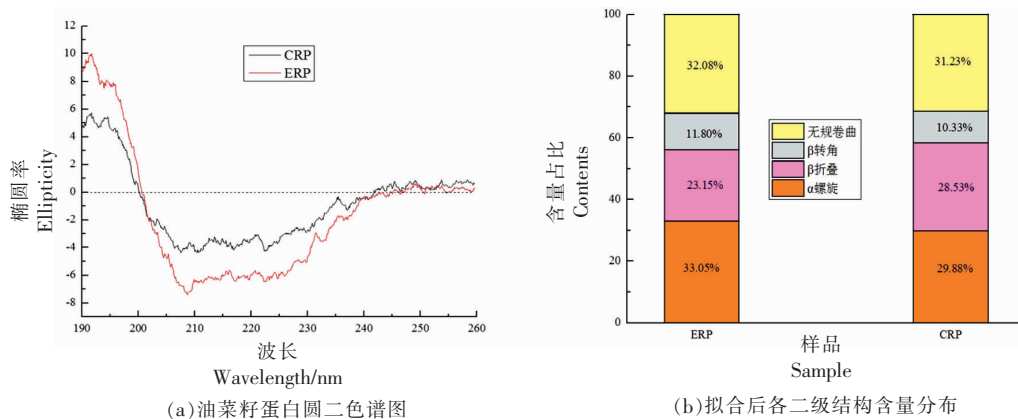


图 3 提取方法对油菜籽分离蛋白二级结构的影响

Fig.3 Effect of extraction methods on secondary structure of rapeseed protein

由图 3b 可以看出;提取方法不同,得到分离蛋白的二级结构比例也有显著差异,如 ERP 和 CRP 的 α-螺旋 β-折叠分别占 33.05%,23.15%和 29.88%,28.53%,即电场提取的油菜籽分离蛋白中 α-螺旋所占比例更大,传统碱溶酸沉提取的蛋白中 β-折叠结构相对较多,而在蛋白质的二级结构

中,氢键对构象的稳定具有重要作用,β-折叠结构比 α-螺旋结构更伸展,故而推测 ERP 的结构及性能较 CRP 更稳定,此部分内容有待后续工作印证。

有文献表明“蛋白质的 α-螺旋结构与其乳状液稳定性之间呈正相关关系”^[37],图 3b 中结果显

示 ERP 中 α -螺旋结构的比例较 CRP 的大,这也解释了表 3 中 ERP 相对较优的乳化性及乳化稳定性。

3 结论

本文将弱电场引入油菜籽蛋白的提取工艺,并比较了弱电场及碱溶酸沉 2 种方法提取的秦杂油 2 号双低油菜籽蛋白 ERP 和 CRP 的功能性,结果表明:ERP 的收率及纯度比 CRP 的高;同时,提取方法对油菜籽蛋白的结构及功能性均有不同程度的影响。氨基酸成分分析显示 ERP 分子中疏水性氨基酸占比较 CRP 的大,进而使得其持油性较高;弱电场所提油菜籽蛋白的表面疏水性及二硫键含量均高于常规碱溶酸沉法,从而保证了其良好的乳化性、乳化稳定性及持油性;ERP 的二级结构中 α -螺旋所占比例更大,CRP 中 β -折叠结构相对较多。本研究可为油菜籽蛋白的研究及开发利用提供理论参考,并对其它植物蛋白的提取及在食品中的应用有一定的借鉴意义。

参 考 文 献

- [1] HAVARD J, ROBERT E W H. Antimicrobial properties of lactoferrin [J]. *Biochimie*, 2009, 91 (1): 19-29.
- [2] AIDER M, BARBANA C. Canola protein: composition, extraction, functional properties, bioactivity, applications as a food ingredient and allergenicity - A practical and critical review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2011, 22(1): 21-39.
- [3] RUCHIRA N, ESKIN N A, ECK P, et al. Cold pressed oils[M]. California: Academic press, 2020, 1-5.
- [4] USDA. Table 12: Rapeseed and products: world supply and distribution[EB/OL]. (2020-05-12)[2022-03-01]. <http://public.govdelivery.com/accounts/USDAFAS/subscriber/new>.
- [5] TSEVEGSUREN N, MUNKHJARGAL B, VERHE R, et al. Lipid composition of rapeseed cultivars from Mongolia[J]. *Journal of Oleo Science*, 2001, 50 (10): 781-785.
- [6] 张欢欢, 梁叶星, 张玲, 等. 双低油菜籽蛋白氨基酸组分分析及营养价值评价[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(12): 235-242.
- [7] ZHANG H H, LIANG Y X, ZHANG L, et al. Amino acid composition and nutritional evaluation of double low rapeseed proteins[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(12): 235-242.
- [7] 易中华, 张建云, 林冬梅. 双低菜籽饼粕的营养价值及其在家禽饲料中的应用[J]. *家禽科学*, 2009, 31(9): 32-35.
- [7] YI Z H, ZHANG J Y, LIN D M. Nutritional value of double low rapeseed meal and its application in poultry feed [J]. *China Poultry Science*, 2009, 31 (9): 32-35.
- [8] 拉加, 吕秉林. 菜籽饼不同脱毒处理方法和添加比例对育肥羊的饲养效果分析[J]. *山东畜牧兽医*, 2018, 39(4): 2-3.
- [8] LA J, LV B L. Effect analysis of different detoxification treatment methods and addition ratio of rapeseed cake on fattening sheep[J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018, 39 (4): 2-3.
- [9] TAN S H, MARLER R J, BLANCHARD C L, et al. Canola proteins for human consumption: extraction, profile and functional properties[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76(1): 16-28.
- [10] 易建华, 朱振宝, 赵天殊. 盐提与膜分离偶联制备双低油菜籽蛋白[J]. *食品科技*, 2011, 36(5): 168-172.
- [10] YI J H, ZHU Z B, ZHAO T S. Extraction of protein from double-low rapeseed by coupling salty solution and membrane separation[J]. *Food Science and Technology*, 2011, 36(5): 168-172.
- [11] KALAYDZHIEV H, IAANOVA P, STPYANOVA M, et al. Valorization of rapeseed meal: influence of ethanol antinutrients removal on protein extractability, amino acid composition and fractional profile[J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2020, 11: 2709-2719.
- [12] SARI Y W, BRUINS M E, SANDERS J P. Enzyme assisted protein extraction from rapeseed, soybean, and microalgae meals[J]. *Industrial Crops & Products*, 2013, 43: 78-83.
- [13] 翟晓娜, 师建芳, 赵慧凝, 等. 菜籽饼粕蛋白的提取、功能特性及其在食品中应用的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(12): 389-397.
- [13] ZHAI X N, SHI J F, ZHAO H N, et al. Extraction, functional properties and food applications of

- rapeseed meal protein isolates[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(12): 389-397.
- [14] SHEN Y T, TANG X, LI Y H. Dry methods affect physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate [J]. Food Chemistry, 2021, 339: 127823-127831.
- [15] PETRUCCELLI S, ANON M C. Relationship between the method of obtention and the structural and functional properties of soy proteins isolates structural and hydration properties[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42(10): 2161-2169.
- [16] YASUMATSU K, SAWADA K, MORITAKA S, et al. Whipping and emulsifying properties of soybean products [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1972, 36(5): 719-727.
- [17] TIMILSENA Y P, ADHIKARI R, BARROW C J, et al. Physicochemical and functional properties of protein isolate produced from Australian chia seeds [J]. Food Chemistry, 2016, 212: 648-656.
- [18] TANG C H. Thermal denaturation and gelation of vicilin -rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study[J]. LWT-Food Science and Technology, 2008, 41(8): 1380-1388.
- [19] 李丽娜, 李军生, 阎柳娟. 分光光度法测定食品蛋白质中二硫键的含量[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 562-564.
- LI L N, LI J S, YAN L J. Determination of disulfide bonds in food proteins by spectrophotometry method[J]. Food Science, 2008, 29(8): 562-564.
- [20] 叶钰, 高金燕, 陈红兵, 等. 超声波加工对蛋清蛋白质结构和凝胶特性的影响[J]. 食品科学, 2018, 39(21): 45-52.
- YE Y, GAO J Y, CHEN H B, et al. Effect of ultrasonic processing on protein structure and gel properties of egg white[J]. Food Science, 2018, 39(21): 45-52.
- [21] 尹亚军, 张翔宇, 张喻. 油菜籽成熟过程中主要营养成分变化研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(5): 339-342.
- YIN Y J, ZHANG X Y, ZHANG Y. Study of major nutrients changes of maturing rapeseed[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(5): 339-342.
- [22] WANG Y Y, YU S L, MA G J, et al. Comparative study of proximate composition and amino acid in farmed and wild *Pseudobagrus ussuriensis* muscles [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2014, 49(4): 983-989.
- [23] 谢小青, 刘亚贤, 陈顺, 等. 支链氨基酸在非酒精性脂肪性肝病发生发展中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(2): 439-442.
- XIE X Q, LIU Y X, CHEN S, et al. Role of branched-chain amino acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease [J]. Journal of Clinical Hepatology, 2022, 38(2): 439-442.
- [24] TANG X, SHEN Y T, ZHANG Y Q, et al. Parallel comparison of functional and physicochemical properties of common pulse proteins[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 146: 111594-111604.
- [25] KINSELLA J E. Functional properties of proteins: possible relationships between structure and function in foams[J]. Food Chemistry, 1981, 7(4): 273-288.
- [26] 任丽琨, 安琪, 边鑫, 等. 罗望子种仁球蛋白结构和功能特性的构效关系[J]. 中国食品学报, 2021, 21(9): 272-280.
- REN L K, AN Q, BIAN X, et al. Extraction of tamarind seed globulin and its functional properties and structure-activity relationship[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(9): 272-280.
- [27] 杨希娟, 党斌, 吴昆仑, 等. 青稞蛋白的超声波辅助提取工艺及其功能特性研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(6): 48-56.
- YANG X J, DANG B, WU K L, et al. Study on functional properties and hullless barley protein by ultrasonic-assisted extraction [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2013, 13(6): 48-56.
- [28] 胡娟. 脉冲电场对肌原纤维蛋白结构、乳化及凝胶特性的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- HU J. Effect of pulsed electric field on the structure, emulsification and gel properties of myofibrillar protein[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021.
- [29] RAGAB D M, BABIKER E E, ELTRINAY A H. Fraction, solubility and functional properties of cowpea (*Vigna unguiculata*) proteins as affected by pH and/or salt concentration[J]. Food Chemistry, 2004, 84(2): 207-212.
- [30] 张慧, 卞科, 万小乐. 超微粉碎对谷朊粉理化特性及功能特性的影响[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 127-131.

- ZHANG H, BIAN K, WAN X L. Effect of ultrafine comminution on physico-chemical and functional properties of vital wheat gluten [J]. *Food Science*, 2010, 31(1):127-131.
- [31] 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.
- QIAO Y T, SI Y H, GAI G S, et al. Effects of ultrafine comminution on functional properties of soybean protein isolate[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(9): 57-61.
- [32] LI C E, NAKAI S, WOOD D F. Hydrophobicity and solubility of meat proteins and their relationship to emulsifying properties[J]. *Journal of Food Science*, 1984, 49(2): 345-350.
- [33] QIAN S, HUBERT R, RODERICK P W, et al. Effect of pulsed electric field and thermal treatment on the physicochemical and functional properties of whey protein isolate[J]. *International Dairy Journal*, 2011, 21(4): 206-213.
- [34] 臧学丽, 陈光. 转谷氨酰胺酶交联大豆分离蛋白的结构变化与凝胶强度的相关性研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2021, 43(6): 685-689.
- ZANG X L, CHEN G. Correlation between structural changes and gel strength of transglutaminase cross-linked soybean protein isolate[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2021, 43(6): 685-689.
- [35] 毕爽, 马文君, 李杨, 等. 脉冲电场-超声波作用对黑豆球蛋白功能性质的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(9): 7-12.
- BI S, MA W J, LI Y, et al. Combined effect of pulse electric field and ultrasound on functional properties of black soybean globulin[J]. *Food Science*, 2016, 37(9): 7-12.
- [36] ROGERS D M, JASIM S B, DYER N T, et al. Electronic circular dichroism spectroscopy of protein [J]. *Chem*, 2019, 5(11): 1-24.
- [37] FETZER A, MULLER K, SCHMID M, et al. Rapeseed proteins for technical applications: Processing, isolation, modification and functional properties -A review [J]. *Industrial Crops & Products*, 2020, 158: 112986-112995.

Effect of Extraction Methods on Functional Properties of Canola Protein Isolate

Jiang Shuting^{1,2}, He Ying¹, Qiu Dan^{1,2}, Wang Yajuan^{1*}, Deng Shanggui^{2*}

¹School of Materials and Chemical Engineering, Ningbo University of Technology, Ningbo 315211, Zhejiang

²College of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, Zhejiang)

Abstract Rapeseed protein is a kind of complete protein with excellent amino acid composition. And its high nutritional values make the rapeseed protein a potential edible food ingredient. The objective of this study was to investigate the effect of different extraction methods, namely conventional alkali-solution and acid-isolation extraction and weak electric field extraction on the functional properties of rapeseed protein isolate, e.g., amino acid composition, sulfhydryl/disulfide content, secondary structure, surface hydrophobicity and so on. The results show that the surface hydrophobicity of ERP was 5.776 ± 0.222 , which was greater than that of CRP (4.803 ± 0.060). So the emulsifying property, emulsifying stability and oil absorption capacity of ERP were better, the datas were 49.95%, 90.85% and 166.18% respectively. The disulfide bonds content of ERP and CRP were 47.51 and 36.67 $\mu\text{mol/g}$, respectively. According to the circular dichroism, the proportion of α -spiral and β -turn in ERP is higher than CRP. Overall, the rapeseed protein isolate with different extraction methods demonstrated distinct functional properties.

Keywords rapeseed meal; protein isolate; extraction methods; functional properties