

菜籽蛋白提取工艺的优化及其对 DPPH 自由基的清除作用

罗 群¹, 张 宏²

(1. 成都师范学院 教育科学学院, 四川 成都 611130; 2. 四川师范大学 生命科学学院, 四川 成都 610066)

摘 要:以高温热榨菜籽粕为试材,研究了碱提酸沉法提取菜籽蛋白的最佳工艺。结果表明:在 pH 值为 11.5,提取温度 55℃,料液比 1:15 g/mL,超声功率 80 W,提取时间 100 min,提取次数为 3 次的条件下,菜籽可溶性蛋白的最佳提取率为 28.21%,菜籽产品蛋白得率为 23.70%。由该产品蛋白分离制备的清蛋白和谷蛋白对 DPPH 自由基的清除率分别为 31.09%和 29.08%,具有较强的自由基清除作用。

关键词:菜籽粕;可溶性蛋白质;优化;自由基清除

中图分类号:S 794.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)14-0136-04

油菜籽是世界上第三大油料作物,我国油菜籽年产量约 1 300 万 t,居世界第 1 位,榨油加工后的菜籽粕约为 700 万 t。菜籽粕含粗蛋白 25%~40%,菜籽蛋白消化率高,必需氨基酸组成合理平衡,是一种高营养、易消化的优质植物蛋白,同时还具有良好的抗氧化活性及抗血栓活性^[1-2]。目前绝大多数菜籽粕被用作肥料或饲料,造成了菜籽粕植物蛋白资源的极大浪费^[3]。我国食用蛋白资源主要依靠进口大豆蛋白,若能以菜籽粕作为提取植物蛋白的原料,势必带来巨大的经济效益和社会效益。

该研究以高温热榨菜籽粕为试材,采用碱提酸沉法超声提取菜籽粕中的可溶性蛋白,研究碱提 pH 值、提取温度、提取时间、料液比、提取次数对可溶性蛋白提取量的影响,并用分离的蛋白组分研究其对 DPPH 自由基的清除作用,以期菜籽粕蛋白的工业生产应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试高温热榨菜籽粕由四川省农业科学院提供,粗蛋白含量为 27.95%。

主要试剂有氢氧化钠、盐酸、考马斯亮蓝 G250、牛血清蛋白等均为分析纯。

第一作者简介:罗群(1979-),女,硕士,讲师,现主要从事生物学及预防医学等研究工作。E-mail:372384664@qq.com.

责任作者:张宏(1965-),女,博士,教授,硕士生导师,现主要从事天然产物化学等研究工作。E-mail:401923129@qq.com.

基金项目:四川省教育厅基金资助项目(2006B035)。

收稿日期:2014-03-13

主要仪器有岛津 UV-1700 紫外分光光度计(岛津株式会社),KQ5200E 超声提取仪(昆山市超声仪器有限公司),HH-W21 恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司),Sartorius BP211 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菜籽蛋白提取工艺流程 称取菜籽粕 10 g,加 NaOH 溶液(一定的料液比),调节 pH 值,超声提取(一定的温度、时间),4 000 r/min,20 min 离心收集上清液,测定可溶性蛋白质的含量,酸沉,4 000 r/min,20 min 离心收集沉淀,冷冻干燥,产品。

1.2.2 蛋白质含量测定 可溶性蛋白质的测定采用考马斯亮蓝法^[4]。菜粕总蛋白质质量=产品质量×蛋白质含量;可溶性蛋白提取率=提取到的蛋白质质量/菜粕总蛋白质质量;产品蛋白质得率=产品蛋白质质量/菜粕总蛋白质质量。

1.2.3 菜籽蛋白的分离制备 清蛋白的制备:将产品蛋白质溶于 300 mL 去离子水,搅拌 1 h 后离心(12 000 r/min,15 min,4℃),收集上清液,冷冻干燥后即得清蛋白样品。球蛋白的制备:经水溶液提取清蛋白后的残留物加适量 0.14 mol/L NaCl 溶液,搅拌 1 h 后离心(12 000 r/min,15 min,4℃),收集上清液,冷冻干燥即得球蛋白样品。醇溶蛋白的制备:经提取清蛋白及球蛋白后的残留物再加适量的 70%乙醇溶液,搅拌 1 h 后离心(12 000 r/min,15 min,4℃),收集上清液,冷冻干燥即得醇溶蛋白样品。谷蛋白的制备:经提取清蛋白、球蛋白及醇溶蛋白后的残留物再加适量的 0.2% NaOH 溶液,搅拌 1 h 后离心(12 000 r/min,15 min,4℃),收集

上清液,冷冻干燥即得谷蛋白样品^[5]。

1.2.4 DPPH 自由基清除能力测定 严梅荣等^[6]用膜分离法制备菜籽蛋白,得出浓度为 2 mg/mL 的菜籽蛋白溶液和浓度为 0.2 mg/mL 维生素 C 溶液对 DPPH 自由基有最佳清除率,故分别称取制备好的菜籽粕产品蛋白、清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白样品各 20 mg,配制 2 mg/mL 各蛋白样品溶液,同时制备 0.2 mg/mL 的维生素 C 溶液为对照。取 2.0 mL 浓度为 2 mg/mL 的样品溶液和 2.0 mL 1.3×10^{-4} mol/L 的 DPPH 甲醇溶液于具塞试管内,摇匀,室温避光反应 60 min 后于 517 nm 测定吸光度 A_1 ,同时测定 2.0 mL 1.3×10^{-4} mol/L 的 DPPH 甲醇溶液和 2.0 mL 蒸馏水混合后的吸光度 A_2 ,以及 2.0 mL 样品和 2.0 mL 甲醇混合后的吸光度 A_3 ,计算各菜籽蛋白样品对 DPPH 自由基的清除率:清除率(%) = $[1 - (A_1 - A_3)/A_2] \times 100\%$ 。

1.2.5 菜籽蛋白提取的单因素试验 碱液 pH 值对菜籽蛋白提取的影响:称取 10 g 菜籽粕,在料液比为 1:10 g/mL 倍(W/V),提取温度 30℃,pH 值分别为 9.0、9.5、10.0、10.5、11.0、11.5 和 12.0 的条件下,超声功率 80 W 提取 1 h,其间每隔 10 min 测定 pH 值,并用 NaOH 溶液调节 pH 至相应值,以 4 000 r/min 离心 20 min,取上层清液,用考马斯亮蓝法测定可溶性蛋白质含量。提取温度对提取菜籽蛋白的影响:在碱液 pH 值为 11.5,料液比为 1:10 g/mL,超声功率 80 W,提取时间为 1 h 的条件下,考察不同的提取温度(30、40、50、60℃)对提取菜籽蛋白的影响。提取时间对提取菜籽蛋白的影响:在碱液 pH 值为 11.5,温度为 50℃,料液比为 1:10 g/mL,超声功率 80 W 的条件下,考察不同的提取时间(30、60、90、120 min)对提取菜籽蛋白的影响。料液比对提取菜籽蛋白的影响:在碱液 pH 值为 11.5,温度为 50℃,提取时间为 90 min,超声功率 80 W 的条件下,考察不同的料液比(1:10、1:15、1:20、1:30 g/mL)对提取菜籽蛋白的影响。提取次数对提取菜籽蛋白的影响:在碱液 pH 值为 11.5,温度为 50℃,提取时间为 90 min,料液比为 1:20 g/mL,超声功率 80 W 的条件下,分别考察 1、2、3、4 次提取对菜籽蛋白的含量影响。酸沉 pH 值对提取菜籽蛋白的影响:称取 10 g 菜籽粕,在碱液 pH 值为 11.5,温度为 50℃,提取时间为 90 min,料液比为 1:20 g/mL,提取次数为 3 次,超声功率 80 W 的条件下提取菜籽粕中的可溶性蛋白,取上清液合并,用 1 mol/L 的盐酸将 pH 分别调至 3、4、5、6、7,搅拌均匀后静置 1 h,以 4 000 r/min 离心 20 min,冷冻干燥,称量产品蛋白质质量。

1.2.6 菜籽蛋白提取工艺的条件优化 根据单因素试验,称取 10 g 菜籽粕,在超声功率 80 W、酸沉 pH 值为 5

的固定条件下,选取碱液 pH 值(A)、提取温度(B)、提取时间(C)、料液比(D)和提取次数(E)5 个条件作为影响菜籽粕蛋白提取的主要因素,采用 $L_{16}(4^5)$ 正交实验进一步优化提取工艺,每组试验 3 个平行,取平均值进行计算,并对结果进行极差分析和方差分析,影响因素及水平见表 1。

2 结果与分析

2.1 菜籽蛋白提取的单因素试验

2.1.1 碱液 pH 值对菜籽蛋白提取的影响 由图 1 可知,碱溶液 pH 值对菜籽粕中可溶性蛋白的提取有较大影响。在 pH 值为 9.0~11.5 时,蛋白质的提取量随 pH 值的增大而明显增加,当 pH 值为 11.5 时,达到高值,虽然 pH 值继续增大到 12 时,蛋白质提取量几乎持平,但是 pH 值达到或超过 12 时,会使蛋白质发生结构改变、变性等导致营养价值降低。因此,提取菜籽粕蛋白的碱液最佳 pH 值选用 11.5。

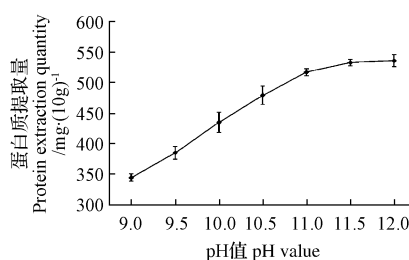


图 1 碱液 pH 值对菜籽蛋白提取的影响

Fig. 1 Effect of pH value on rapeseed protein extraction

2.1.2 提取温度对菜籽蛋白提取的影响 由图 2 可知,随着提取温度的升高,菜籽粕中的可溶性蛋白提取量也逐渐增大。当温度为 50℃时,菜籽粕可溶性蛋白提取量较高;提取温度继续升高到 60℃时,可溶性蛋白提取量又有小幅增加,但由于温度的升高会影响蛋白质的空间结构及其功能,故选取 50℃为最适提取温度。

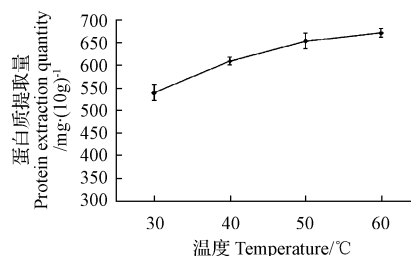


图 2 提取温度对菜籽蛋白提取的影响

Fig. 2 Effect of temperature on rapeseed protein extraction

2.1.3 提取时间对菜籽蛋白提取的影响 由图 3 可知,当提取时间在 30~90 min 时,菜籽粕中可溶性蛋白的提取量随提取时间的延长而增大;提取时间为 120 min 的蛋白提取量与 90 min 时的可溶性蛋白提取量相当,故选

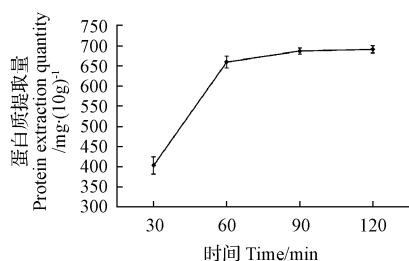


图3 时间对菜籽蛋白提取的影响

Fig. 3 Effect of time on rapeseed protein extraction

取 90 min 为最佳提取时间。

2.1.4 料液比对菜籽蛋白提取的影响 由图 4 可知,不同的料液比对菜籽粕中可溶性蛋白的提取量有一定的影响。随着料液比的增大,菜籽粕中可溶性蛋白的提取量也有所增大,但过大的料液比会将一些水溶性及碱性非蛋白质物质提取出来,增大干扰,故选择 1:20 g/mL 为最佳提取料液比。

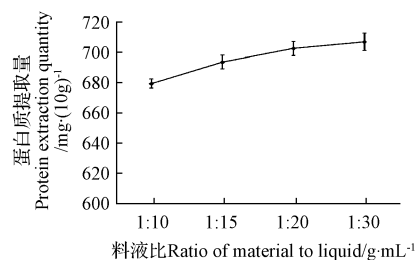


图4 料液比对菜籽蛋白提取的影响

Fig. 4 Effect of ratio of material to liquid on rapeseed protein extraction

2.1.5 提取次数对提取菜籽蛋白的影响 由图 5 可知,提取次数对菜籽粕中可溶性蛋白提取的影响较小。随着提取次数的增多,可溶性蛋白的提取量有所增加,当提取次数为 3 次时,可溶性蛋白提取量达到 762.25 mg;提取次数超过 3 次时,可溶性蛋白提取量的增幅趋于平缓。

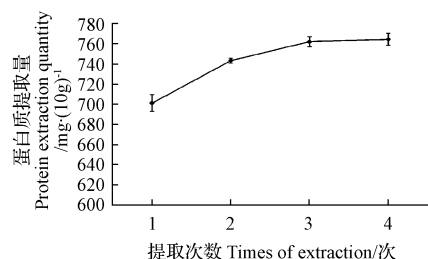


图5 提取次数对菜籽蛋白提取的影响

Fig. 5 Effect of frequency on rapeseed protein extraction

2.1.6 酸沉 pH 值对菜籽蛋白提取的影响 由图 6 可知,酸沉 pH 值对产品蛋白质质量影响明显。当 pH 值为 5 时,蛋白质酸沉的效果最好,所得到的产品蛋白质质量为 629 mg/10g,与上清液中计算得出可溶性蛋白含

量为 762.25 mg/10g 相比,菜籽粕蛋白中的 82.5% 的可溶性蛋白能被沉淀分离出来,达到最大沉淀值。由于蛋白质酸沉是建立在碱液充分提取可溶性蛋白的试验基础上进行的,故最终确定酸沉 pH 值为 5,且不作为碱液提取的正交实验影响因素。

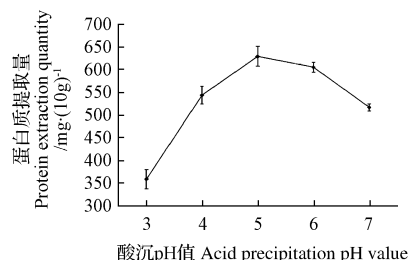


图6 酸沉 pH 值对菜籽蛋白提取的影响

Fig. 6 Effect of different acid precipitation pH on rapeseed protein extraction

2.2 菜籽蛋白提取工艺的条件优化

从表 1 可以看出,5 个影响因素对菜籽蛋白提取的影响均呈极显著差异。从极差分析可以看出,影响最大的因素为提取次数,影响最小的为料液比;5 个影响因素的主次顺序依次为提取次数>温度>pH 值>时间>料液比。综合分析结果,确定菜籽蛋白的最佳提取工艺条

表 1 菜籽粕蛋白提取的正交实验结果和分析

Table 1 Orthogonal test of rapeseed protein extraction

编号 No.	A pH 值 pH value	B 温度 Temperature	C 时间 Time	D 料液比 Ratio of material to liquid	E 提取次数 Times of extraction	可溶性蛋白提取量 Soluble protein yield /mg·(10g) ⁻¹
1	1(10.5)	1(45)	1(70)	1(1:10)	1(1)	520.23±8.92
2	1	2(50)	2(80)	2(1:15)	2(2)	641.86±6.87
3	1	3(55)	3(90)	3(1:20)	3(3)	761.56±7.58
4	1	4(60)	4(100)	4(1:30)	4(4)	717.48±6.15
5	2(11)	1	2	3	4	521.49±7.37
6	2	2	1	4	3	646.77±4.50
7	2	3	4	1	2	674.53±6.01
8	2	4	3	2	1	620.18±4.46
9	3(11.5)	1	3	4	2	580.11±5.92
10	3	2	4	3	1	671.25±10.85
11	3	3	1	2	4	759.47±5.03
12	3	4	2	1	3	786.56±7.59
13	4(12)	1	4	2	3	685.25±5.33
14	4	2	3	1	4	691.28±4.07
15	4	3	2	4	1	587.61±8.65
16	4	4	1	3	2	624.59±4.77
K1	2 641.13	2 307.08	2 551.06	2 672.60	2 399.27	
K2	2 462.97	2 651.16	2 537.52	2 706.76	2 521.09	
K3	2 797.39	2 783.17	2 653.13	2 578.89	2 880.14	
K4	2 588.73	2 748.81	2 748.51	2 531.97	2 689.72	
k1	660.2825	576.7700	637.7650	668.1500	599.8175	
k2	615.7425	662.7900	634.3800	676.6900	630.2725	
k3	699.3475	695.7925	663.2825	644.7225	720.0350	
k4	647.1825	687.2025	687.1275	632.9925	672.4300	
极差 R	334.42	476.09	210.99	174.79	480.87	
F 值	314.76 **	777.43 **	159.46 **	107.83 **	716.87 **	

注:**表示具有极显著差异水平($P<0.01$)。Note:** mean significant difference at $P<0.01$ level.

件为 $A_3B_3C_4D_2E_3$, 即 pH 值 11.5, 提取温度 55°C , 时间 100 min, 料液比 1 : 15 g/mL, 提取次数 3 次。

对正交实验所得出的最佳方案进行验证, 结果表明, 在此工艺条件下, 菜籽粕提取中可溶性蛋白质的提取量为 788.56 mg/10g, 可溶性菜籽蛋白的提取率 28.21%。上清液经 pH 值为 5 的 HCl 沉淀 1 h 后, 以 4 000 r/min 离心 20 min, 冷冻干燥, 产品蛋白质质量为 662.4 mg/10g, 产品蛋白质得率为 23.70%。

2.3 菜籽蛋白对 DPPH 自由基的清除作用

由图 7 可知, 菜籽粕产品蛋白分离制备的清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白溶液对 DPPH 自由基具有一定的清除作用; 各菜籽蛋白对 DPPH 自由基清除作用的顺序为清蛋白 > 谷蛋白 > 醇溶蛋白 > 球蛋白 > 产品蛋白, 其中清蛋白和谷蛋白对 DPPH 自由基的清除率分别为 31.09% 和 29.08%, 为维生素 C 溶液最佳清除率的一半左右, 表明从产品蛋白中分离制备的清蛋白和谷蛋白具有较好的清除自由基效果。

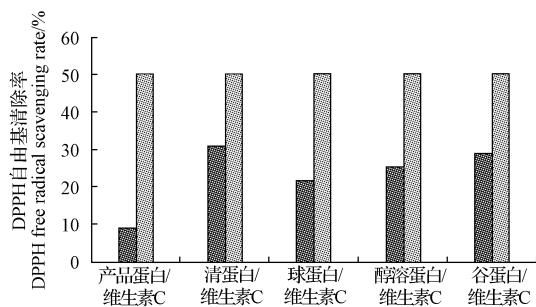


图 7 不同菜籽蛋白对 DPPH 自由基的清除作用

Fig. 7 Scavenging effect of different rapeseed protein on DPPH free radicals

3 结论

该研究结果表明, 在超声波辅助下, 碱提酸沉法能较好地提取高温热榨菜籽粕中的可溶性蛋白, 最佳提取工艺为在 NaOH 溶液 pH 值为 11.5, 提取温度 55°C , 超声功率 80 W, 提取时间 100 min, 料液比 1 : 15 g/mL, 提取次数为 3 次的条件下进行碱液提取, 4 000 r/min, 20 min 离心收集上清液后, 在 pH 值为 5 的条件下进行酸沉能取得最高产品蛋白质质量, 其可溶性菜籽蛋白提取率为 28.21%, 菜籽产品蛋白得率为 23.70%。由该产品蛋白分离制备的清蛋白和谷蛋白对 DPPH 自由基的清除率分别为 31.09% 和 29.08%, 具有较好的自由基清除作用。该研究结果表明菜籽粕能提取出较高的菜籽蛋白, 可丰富自然界蛋白质的来源, 而且菜籽粕分离出的蛋白质还具有抗氧化、抗自由基等重要功能, 为该废弃植物蛋白资源的合理利用提供了理论依据。同时, 该提取方法与水相酶解法、有机萃取法和膜相渗透法相比, 可极大地简化工艺程序、降低生产成本, 更易被应用于工业化生产。

参考文献

- [1] 薛照辉, 尉万聪, 严奉伟, 等. 菜籽肽抗氧化活性的研究[J]. 中国油脂, 2006, 31(8): 48-50.
- [2] Zhang S B, Wang Z, Xu S Y. Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides[J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2008, 85(6): 521-527.
- [3] 钮淡星, 黄凤洪, 倪光远, 等. 菜籽粕的饲用现状和饲用改良技术发展趋势[J]. 中国油脂, 2009, 34(5): 4-7.
- [4] 于冰宾. 生物化学实验指导[M]. 北京: 清华大学出版社, 2010: 206-210.
- [5] 郑集, 陈钧辉. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 70.
- [6] 严梅荣, 王丹丹, 胡蓉, 等. 膜分离制取可溶性菜籽蛋白及其对 DPPH 自由基的清除作用[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 148-151.

Optimization of Protein Extraction Process and Scavenging Function of DPPH Radical From Rapeseed Meal

LUO Qun¹, ZHANG Hong²

(1. College of Education Science, Chengdu Normal College, Chengdu, Sichuan 611130; 2. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu, Sichuan 610066)

Abstract: Taking hot-pressed rapeseed meal as material, the optimum protein extraction process by alkali extraction and acid precipitation was studied. The results showed that the optimal conditions of extraction were follows: pH 11.5, temperature 55°C , ratio of material to liquid 1 : 15 g/mL, ultrasonic power 80 W, extraction time 100 min, 3 times of extraction. Under these conditions, the extraction yield of soluble protein from rapeseed meal was 28.21%, the rapeseed protein yield of end product was 23.70%. The albumin and globulins by isolation of rapeseed protein had powerful scavenging efficiency to DPPH radical, the clearance rate were 31.09% and 29.08% respectively.

Key words: rapeseed meal; soluble protein; optimization; free radical scavenging