

苜蓿冰结构蛋白抗冻活性及功能性研究

李凌俐, 曲敏, 刘羽佳, 陈凤莲, 孙兆国, 鲍欢

(哈尔滨商业大学 食品工程学院, 黑龙江省高等学校食品科学与工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:以“肇东”紫花苜蓿干草为原料,采用磷酸盐缓冲溶液法提取苜蓿冰结构蛋白,研究了温度、pH值、NaCl及蔗糖浓度不同提取因素对苜蓿冰结构蛋白功能的影响。结果表明:苜蓿冰结构蛋白溶液的冰晶体积小、数量多、形状不规则,具有很好的抗冻活性;对苜蓿冰结构蛋白的功能性进行测定,随着溶液pH值的增加,其溶解指数、持水性、乳化性和乳化稳定性、起泡性与泡沫稳定性都呈现出逐渐增大的趋势;随着NaCl浓度的增加,其起泡性和泡沫稳定性先增加后降低、乳化性和乳化稳定性呈现下降趋势;随着蔗糖浓度的增加,其蛋白起泡性和泡沫稳定性逐渐增加,而乳化性和乳化稳定性影响不大。

关键词:苜蓿;冰结构蛋白;抗冻活性;功能性

中图分类号:S 551+.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)07-0113-06

苜蓿(*Medicago sativa* L.)属豆科多年生牧草,俗称金花菜,是世界上分布最广、栽培历史最古老的优良牧草,有“牧草之王”的美誉。苜蓿草多在我国东北、新疆等地有种植,具有很强的抗寒功能。经极端低温(-45℃)后,返青率仍可达到90%以上^[1]。由于苜蓿草蛋白含量丰富,抗寒能力强,且苜蓿草价格低廉,来源广泛,因此研究苜蓿的生物活性成分及开发对于苜蓿的合理利用与育种意义重大。

植物蛋白质是人类重要的蛋白质来源之一^[2],具有丰富的氨基酸。此外,植物蛋白还可作为添加剂在食品工业中大量使用,赋予产品丰富的营养价值和优良的加工性能^[3]。蛋白质的功能特性直接影响着食品感官品质、食品内部结构以及食品食用稳定性等各个方面。在植物蛋白研究领域,有关大豆分离蛋白、菜籽分离蛋白、花生分离蛋白等功能性质研究的文献比较广泛,而苜蓿作为一种优质植物蛋白质资源,对其功能性质的研究鲜有报道。近年,曲敏等^[4]采用不同方法对苜蓿叶蛋

白进行提取并对效果进行了比较,发现通过不同方法制备苜蓿叶蛋白其得率、氮含量、功能性质及表面结构有较大差异。并对嗜酸乳杆菌发酵制备苜蓿叶蛋白进行了深入研究^[5],确定了嗜酸乳杆菌发酵沉降法提取叶蛋白的条件。许英一等^[6]采用纤维素酶法对苜蓿叶蛋白进行提取;肖海峻等^[7]对苜蓿叶蛋白的脱色工艺进行了研究。

冰结构蛋白(ice structuring proteins, ISPs),又称为不冻蛋白、抗冻蛋白(antifreeze proteins, AFPs),是一类由某些鱼类、昆虫、植物、真菌和细菌为抵御外界环境应激反应所产生的多肽,能够有效地抑制冰晶的生长^[8-10]。它具有一定的热滞活性,即能够以非依数性方式降低溶液的冰点,但对熔点影响甚微,使溶液冰点和熔点之间出现差值^[11-12]。曲敏等^[13]利用磷酸盐缓冲液法提取苜蓿冰结构蛋白,通过响应曲面法确定最佳提取工艺,通过冰晶观察确定其具有很好的抗冻活性,应用到冷冻面团中可改善面团质构特性。而在苜蓿抗寒育种的研究中,尹明安等^[14]系统的阐述了冰结构蛋白在植物抗冻基因工程中的应用,申晓慧^[15]和窦玉梅^[16]都对紫花苜蓿的抗寒性研究进展进行了系统的描述;霍智慧等^[17]对紫花苜蓿的耐寒性进行分析,阐述了苜蓿对低温适应的形态变化及生理遗传调控机制。

现选用“肇东”紫花苜蓿干草为研究对象,提取苜蓿蛋白,分析其抗冻活性,并对其功能性质进行了系统的研究,如苜蓿蛋白的溶解性、持油性、持水性、发泡性及乳化性,同时探讨了样品温度、pH值、NaCl浓度以及蔗

第一作者简介:李凌俐(1989-),女,硕士,研究方向为新型植物蛋白。E-mail:18946076937@163.com.

责任作者:曲敏(1966-),女,黑龙江哈尔滨人,博士,教授,现主要从事新型植物蛋白及作物品质选育等研究工作。E-mail:qumin777@126.com.

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(C2011-24);黑龙江省教育厅科学技术研究资助项目(125111128);黑龙江省博士后科研启动基金资助项目(LBH-Q13098);2014年哈尔滨商业大学研究生创新科研资助项目(YJSCX2014-334HSD)。

收稿日期:2015-12-23

糖浓度等因素对苜蓿蛋白功能特性的影响,旨在为苜蓿蛋白作为功能蛋白与食品添加剂应用于食品,为苜蓿耐寒性研究及苜蓿耐寒育种及提高苜蓿种质改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

“肇东”紫花苜蓿采自黑龙江省农业科学院草业研究所兰西苜蓿种植基地;考马斯亮蓝 G-250(分析纯),哈尔滨市化工试剂厂;盐酸(分析纯),天津是永大化学试剂有限公司;氢氧化钠(分析纯),天津市大陆化学试剂厂;氯化钠(分析纯),天津市大陆化学试剂厂;蔗糖(分析纯),天津市致远化学试剂有限公司。

生物显微镜(DM750,瑞士莱卡公司);电热恒温水浴锅(SY-2-4,天津市泰斯特仪器有限公司);电子万用炉(SX2-4-10,北京市永光明医疗仪器有限公司);紫外可见分光光度计(UV-5100B,上海元析仪器有限公司);恒流泵(HL-2S,上海沪西分析仪器厂);电子天平(BSA224S,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);磁力搅拌器(EMS-9A,天津欧诺仪器仪表有限公司);pH计(PHS-2F,上海精密科学仪器有限公司);高速大容量台式离心机(Z366,德国制造)。

1.2 试验方法

1.2.1 苜蓿冰结构蛋白的提取 以苜蓿为原料,采用磷酸盐缓冲溶液法提取苜蓿蛋白,采用考马斯亮蓝比色法,通过测定不同牛血清蛋白浓度绘制标准曲线,采用分光光度计 595 nm 波长下测定样品的吸光值,计算样品中蛋白质的含量及冰提苜蓿 ISPs 的提取率。提取苜蓿蛋白的工艺条件为液料比 20:1,草粉粉碎粒度 80 目,磷酸盐搅拌时间 2 h、缓冲溶液浓度 63 mmol/L、pH 7.7。在此条件下苜蓿蛋白的提取率为 37.77%^[18]。

1.2.2 冰晶观察 将苜蓿蛋白上清液浓缩后,将苜蓿蛋白提取液冷冻干燥制成干粉,配成浓度为 30 mg/mL 的 ISPs 溶液,4 000 r/min 离心 10 min,移液枪取 20 μ L 置加厚载玻片上,-18℃冰箱冷冻 20 min。于 Leica DM750 显微镜 40 \times 观察冰晶。并与同浓度氯化钠、蔗糖溶液及水的冰晶进行对照。观察各溶液及水的冰晶大小与形态^[19-20],并拍照。

1.3 项目测定

1.3.1 溶解性的测定 溶解性指一种物质能够被溶解的程度,该研究使用氮溶指数(NSI)来评价苜蓿 ISPs 的溶解性。配制 5 份 1%(W/V)的苜蓿蛋白溶液各 10 mL,使用 0.5 mol/L HCl 溶液和 0.5 mol/L NaOH 溶液分别将样品的 pH 值调至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0,磁力搅拌 1 h,充分溶解后,离心后取上清液,测定其蛋白质含量,计算氮

溶指数(NSI), $NSI(\%) = \text{上清液中氮含量} / \text{样品中氮含量} \times 100$ 。

1.3.2 持水性的测定 持水性指每克蛋白样品能够吸附水的能力,该研究用每克样品吸附水的克数来表示。向 1 g 干试样中加水 20 mL,使用 0.5 mol/L HCl 溶液和 0.5 mol/L NaOH 溶液分别将样品 pH 值调至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。搅拌均匀后,静置 30 min,使之充分吸水,3 500 r/min 离心分离 10 min,去除没有被吸附的水,测定离心后残留的质量,持水性(g/g)=(离心后残留物质量-试样干质量)/试样干质量。

1.3.3 吸油性的测定 吸油性用每克蛋白样品能够吸附油的体积来表示。称取 0.5 g 苜蓿 ISPs 于离心管中,加入 5 mL 油,混匀 1 min 后,分别在 30、40、50、60、70℃下静置 30 min,3 500 r/min 离心 10 min,测定其上清液体积,体积前后差即为样品吸油量,吸油量(mL/g)=(5 mL-离心后油的体积)/试样干质量。

1.3.4 pH 值对起泡性和泡沫稳定性的影响 将样品配制成 1%(W/V)的苜蓿 ISPs 溶液,取 20 mL 样品溶液置于量筒中,用 0.5 mol/L HCl 溶液和 0.5 mol/L NaOH 溶液分别将苜蓿 ISPs 溶液的 pH 值调至为 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0。在均质机中,6 000 r/min 高速搅拌 2 min,观察量筒刻度,记录泡沫体积,计算样品起泡能力(FC)。起泡能力(%)= $V_0 / 20\text{mL} \times 100$,式中, V_0 表示 2 min 时的泡沫体积(mL)。分别记录放置 10、20、30、60 min 后泡沫的体积,计算泡沫稳定性(FS)。起泡稳定性(%)= $V_t / V_0 \times 100$,式中, V_t 表示静置一定时间后泡沫体积(mL)。

1.3.5 NaCl 浓度对起泡性和泡沫稳定性的影响 将样品配制成 1%(W/V)的苜蓿 ISPs 溶液,调 pH 为 8.0。取 20 mL 蛋白质溶液置于量筒中,加入一定量的 NaCl,使 NaCl 的浓度分别为 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%。在均质机中,6 000 r/min 高速搅拌 2 min,观察量筒刻度,记录泡沫体积,计算样品发泡能力(FC)。记录放置 10、20、30、60 min 后泡沫的体积,计算泡沫稳定性(FS)。

1.3.6 蔗糖浓度对起泡性和泡沫稳定性的影响 将样品配制成 1%(W/V)的苜蓿 ISPs 溶液,调至 pH 为 8.0。取 20 mL 蛋白质溶液置于量筒中,加入一定量的蔗糖,使蔗糖浓度分别为 0%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%。在均质机中,6 000 r/min 高速搅拌 2 min,观察量筒刻度,记录泡沫体积,计算样品发泡能力(FC)。记录放置 10、20、30、60 min 后泡沫的体积,计算泡沫稳定性(FS)。

1.3.7 pH 值对乳化性和乳化稳定性的影响 将样品

配制成 1%(W/V)的苜蓿 ISPs 溶液。取 10 mL 蛋白质溶液置于试管中,用 0.5 mol/L HCl 溶液和 0.5 mol/L NaOH 溶液分别调 pH 至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0,加入 10 mL 大豆油,然后以 8 000 r/min 均质 10 min,制成乳状液,再 2 000 r/min 离心 5 min,计算乳化能力。再将样品 50℃ 水浴 30 min 后,2 000 r/min 离心 10 min,测定乳化层高度,计算乳化稳定性。乳化性(%)=离心管中乳化层高度/离心管中液体总高度×100。乳化稳定性(%)=30 min 后果乳化层高度/初始时的乳化层高度×100。

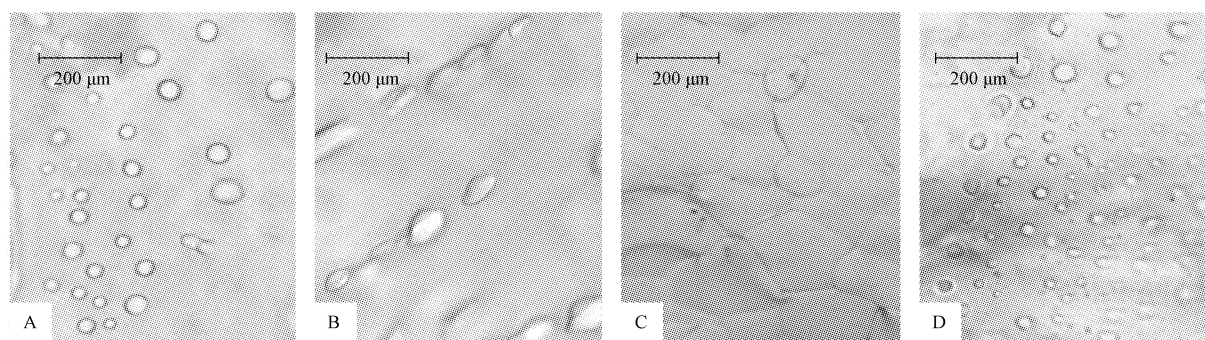
1.3.8 NaCl 浓度对乳化性和乳化稳定性的影响 将样品配制成 1%(W/V)的苜蓿 ISPs 溶液。取 10 mL 蛋白质溶液置于试管中,调至 pH 为 8.0,加入一定量的 NaCl,使 NaCl 浓度分别为 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%。加入大豆油 10 mL,然后以 8 000 r/min 均质 10 min,制成乳状液,再 2 000 r/min 离心 5 min,计算乳化能力。再将样品 50℃ 水浴 30 min 后,2 000 r/min 离心 10 min,测定乳化层高度,计算乳化稳定性。

1.3.9 蔗糖浓度对乳化性和乳化稳定性的影响 将样品配制成 1%(W/V)的苜蓿 ISPs 溶液。取 10 mL 蛋白质溶液置于试管中,调至 pH 为 8.0,加入一定量的蔗糖,使蔗糖浓度分别为 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%。加入大豆油 10 mL,然后以 8 000 r/min 均质 10 min,制成乳状液,2 000 r/min 离心 5 min,计算乳化能力。再将样品 50℃ 水浴 30 min 后,2 000 r/min 离心 10 min,测定乳化层高度,计算乳化稳定性。

2 结果与分析

2.1 冰晶观察结果

由图 1 可知,苜蓿 ISPs 溶液的冰晶体积小,数量多,形态不规则;蔗糖溶液的冰晶数量多,体积小,形态单一,呈小圆形;NaCl 溶液的冰晶体积较小,但形态较为单一,且分散。可见,苜蓿 ISPs 对冰晶生长的抑制及对冰晶的形态修饰作用显著,说明苜蓿 ISPs 具有较好的抗冻活性。



注:A,蔗糖溶液;B,NaCl 溶液;C,水;D,苜蓿 ISPs 溶液。

Note: A, Sucrose solution; B, NaCl solution; C, Water; D, Alfalfa ISPs solution.

图 1 苜蓿 ISPs 与对照的冰晶观察(40×)

Fig. 1 Observation of ice crystals of ISPs and control(40×)

2.2 溶解性的测定结果

蛋白质的功能性质中最重要的就是溶解性,蛋白质的溶解过程中,溶剂之间会有很多氢键、离子之间、偶极和偶极的相互作用,而像蛋白质浓度、pH 值等因素均能影响蛋白质之间和蛋白质与水之间的相互作用,所以,一般情况下蛋白质的溶解性也都受加工条件、pH 值等因素影响。蛋白质拥有好的溶解性能影响着蛋白质的其它功能性质,如乳化性、发泡性等。

由图 2 可以看出,当 pH 值在 2.0~10.0 的范围内,苜蓿 ISPs 的溶解度随着 pH 的变化先降低,后升高,其变化趋势同大多数蛋白一样,在 pH 值为 4.0 时达到最低,此时溶氧指数 NSI 为 7.02%,这是因为 pH 4.0 接近苜蓿蛋白的等电点,溶液 pH 高于和低于等电点都能够

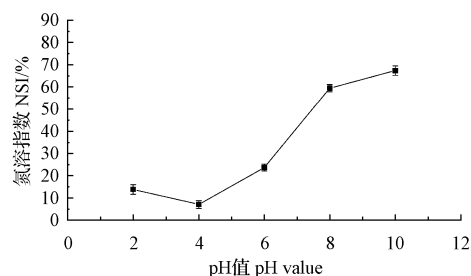


图 2 pH 值对苜蓿 ISPs 溶解度的影响

Fig. 2 Effect of pH value on alfalfa ISPs solubility

明显地提高蛋白的溶解性。

2.3 持水性和吸油性的测定结果

蛋白质的持水能力同样是蛋白质的一个重要的功能特性。蛋白质的持水能力是指蛋白质与水分子的结

合能力。蛋白质分子表面分布许多能够与水分子相互吸引的极性基团,由于这些极性基团与水分子结合,使蛋白质分子变成了高度水化的分子。此外,蛋白质分子固有的网状结构具有毛细管作用,从而使蛋白质分子也能够保持一定数量的水分子。蛋白质的持水能力对食品的加工起着非常重要的作用。例如,向肉制品中添加蛋白质,需要经过加热后依然能够保持水分,只有这样,才能保持好的风味。蛋白质的持水能力与蛋白的结构、食品体系的粘度有关,此外还会受到 pH 值、离子强度、温度及溶液浓度等因素的影响。由图 3 可以看出,当 pH 值在 3.0~8.0 范围内,苜蓿蛋白的持水性随着 pH 的增加先减少后增加,在 pH 4.0 时,苜蓿蛋白的持水性最小为 1.99 g/g,这是因为 pH 4.0 接近苜蓿蛋白的等电点。在等电点时,蛋白间的相互作用最大,结合水的能力最小,所以随着 pH 值的增大或减小,蛋白结合水的能力均表现为增大,持水性增加。

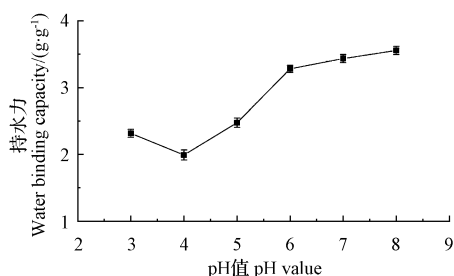


图 3 pH 值对苜蓿 ISPs 持水性的影响

Fig. 3 Effect of pH value on alfalfa ISPs water binding capacity

影响蛋白质吸油性的因素很多,如蛋白质的加工方法、粒度、温度等。由图 4 温度对苜蓿 ISPs 的吸油性的影响可以看出,当温度在 30~70℃ 范围内,苜蓿 ISPs 的吸油性随着温度的升高而下降,但是下降幅度不明显。这是由于随着温度的逐渐升高,油的黏度逐渐降低,低黏度导致了流动性增大,因此蛋白质分子与油的结合能力减弱,最终导致苜蓿 ISPs 的吸油性变低。

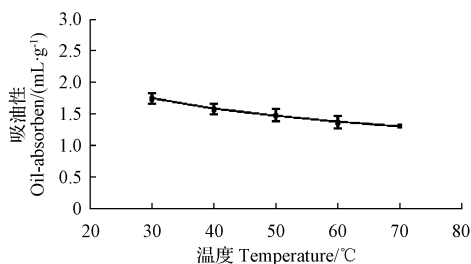


图 4 温度对苜蓿 ISPs 吸油性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on alfalfa ISPs oil-absorbent

2.4 起泡性和泡沫稳定性的测定结果

起泡性质的研究主要包括起泡性和泡沫稳定性。

起泡性是指蛋白质混合搅拌后体积增加量,泡沫稳定性是指搅拌后经一定时间后体积减少量。由表 1 可以看出,当 pH 值在 2.0~8.0 范围内,苜蓿 ISPs 的起泡性随着 pH 的增大先减小后增大,当 pH 为 4.0 时,起泡性到达最低,此时起泡性为 69%,而泡沫稳定性相对较高。这是因为起泡性与溶解性密切相关,蛋白质只有溶解于水才能发挥其作用,此外,在等电点附近,泡沫的稳定性好。

表 1 pH 值对苜蓿 ISPs 起泡性和泡沫稳定性的影响

Table 1 Effect of pH value on alfalfa ISPs foamability and foam stability

pH 值 pH value	起泡性 Foamability/%	泡沫稳定性 Foam stability/%			
		10 min	20 min	30 min	60 min
2.0	80	81.01	67.09	60.76	49.37
4.0	69	83.56	71.60	64.38	56.97
6.0	96	85.41	71.03	59.37	47.98
8.0	110	80.71	70.52	59.64	48.36
10.0	117	81.20	71.79	61.11	52.90

由表 2 可以看出,随着 NaCl 浓度的增加,起泡性和泡沫稳定性都是先增加后降低。当 NaCl 浓度为 2.0% 时,起泡性和泡沫稳定性都达到最大值。这是由于 NaCl 可以影响蛋白质的溶解度、黏度、伸展性等参数,所以能改变蛋白质的起泡性质。

表 2 NaCl 浓度对苜蓿 ISPs 起泡性和泡沫稳定性的影响

Table 2 Effect of NaCl concentration on alfalfa ISPs foamability and foam stability

NaCl 浓度 NaCl concentration/%	起泡性 Foamability/%	泡沫稳定性 Foam stability/%			
		10 min	20 min	30 min	60 min
0.0	110	80.71	70.52	59.64	48.36
0.5	115	80.91	69.99	60.76	52.07
1.0	122	83.42	71.80	61.38	56.67
1.5	130	83.76	72.09	61.37	55.98
2.0	134	81.83	72.52	63.64	57.36
2.5	129	80.29	71.79	62.91	54.90

由表 3 可以看出,蔗糖浓度对苜蓿 ISPs 的起泡性也有一定影响。蔗糖浓度在 1.0%~4.0% 范围内,蛋白起泡性和泡沫稳定性都逐渐增加,而蔗糖浓度大于 4.0%

表 3 蔗糖浓度对苜蓿 ISPs 起泡性和泡沫稳定性的影响

Table 3 Effect of sucrose concentration on alfalfa ISPs foamability and foam stability

蔗糖浓度 Sucrose concentration/%	起泡性 Foamability/%	泡沫稳定性 Foam stability/%			
		10 min	20 min	30 min	60 min
0.0	110	80.7	70.52	59.64	48.36
1.0	90	80.91	70.22	60.06	53.19
2.0	92	81.02	71.08	61.12	56.89
3.0	96	83.90	72.79	62.37	58.18
4.0	98	84.18	73.21	64.20	58.38
5.0	95	81.39	72.79	62.79	56.98

后,蛋白起泡性减小,而泡沫稳定性变化不大。加入蔗糖后,苜蓿 ISPs 的起泡性减小,但泡沫的稳定性相对提高。这是因为加入了蔗糖后,体相的粘度增加,导致泡沫结构中液体泄出的速度减小,从而增强了泡沫稳定性。而在加入蔗糖后使蛋白质的结构变得稳定,使起泡能力的降低^[21]。

2.5 乳化性和乳化稳定性的测定结果

乳化性是指将油和水混合在一起形成乳状液的性能,蛋白质分子同时含有亲水基团和疏水基团,是种天然的表面活性剂,具有乳化剂的性质^[22]。在水油的混合液中,蛋白质能够扩散到油-水界面,使亲水基团朝向水相,疏水基团朝向油相,促使油和水形成乳状液并使乳化液稳定^[23]。许多因素都能够影响到蛋白质乳化性及乳化稳定性,例如蛋白质的浓度、溶液 pH 值、离子强度等。

由图 5 可知,当 pH 值在 2.0~10.0 的范围内,随着 pH 值的增加,苜蓿 ISPs 的乳化性和乳化稳定性先降低再增大,在 pH 值为 4.0 时,乳化性和乳化稳定性都达到最低,当 pH 值在 4.0~10.0 的范围内,乳化性及乳化稳定性却随着 pH 值的升高而增强。乳化性和溶解性有很大联系,苜蓿蛋白的等电点在 pH 4.0 附近,在等电点处,苜蓿溶解度较小。这是因为当 pH 值在等电点处,蛋白质的溶解度最低,可以吸附到油-水界面上的蛋白质量最少,此时形成的乳状液油滴粒径较大,界面面积小,并且吸附在表面油滴上的蛋白质间缺乏排斥作用,容易发生凝聚现在,最终导致乳状液破裂^[21]。因此,当 pH 值在等电点附近时,乳化性能和乳化稳定性最差。

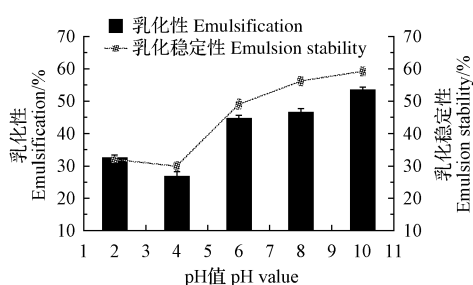


图 5 pH 值对苜蓿 ISPs 乳化性和乳化稳定性的影响

Fig. 5 Effect of pH value on alfalfa ISPs emulsification and emulsion stability

由图 6 可知,NaCl 浓度在 0%~2.0%之间,苜蓿 ISPs 的乳化性及其乳化稳定性随浓度的增加而下降。这是因为一定浓度的盐溶液会破坏蛋白质胶体的水化层膜,降低蛋白质与水间的相互作用,使蛋白质胶体脱水出现凝聚、沉淀,吸附到油-水界面上的蛋白质量减少,进而降低乳化性及乳化稳定性。

由图 7 可知,当蔗糖浓度为 0%~2.0%的范围随着

蔗糖浓度的增加,苜蓿 ISPs 的乳化性和乳化稳定性都小幅度提高,小于 pH 和 NaCl 浓度对其影响。这是因为一定浓度的蔗糖溶液能够提高吸附在界面上的蛋白质膜的硬度,从而提高其乳化性。

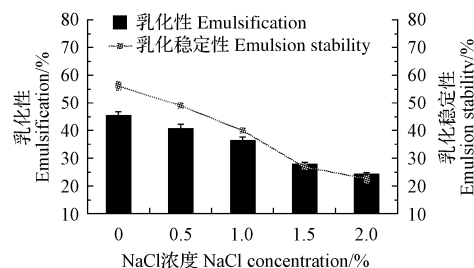


图 6 NaCl 浓度对苜蓿 ISPs 乳化性和乳化稳定性的影响

Fig. 6 Effect of NaCl concentration on alfalfa ISPs emulsification and emulsion stability

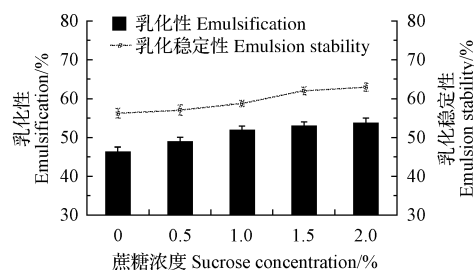


图 7 蔗糖浓度对苜蓿 ISPs 乳化性和乳化稳定性的影响

Fig. 7 Effect of sucrose concentration on alfalfa ISPs emulsification and emulsion stability

3 结论

该试验研究了苜蓿蛋白的功能性,包括溶解性、持水性、吸油性、起泡性及乳化性。结论如下。

1)苜蓿 ISPs 的溶解指数随 pH 值的增加呈先降低再升高的趋势,当 pH 值为 4.0 时达到最低,为 7.02%,当 pH 值为 10.0 时,溶解指数达到 67.42%。

2)苜蓿 ISPs 持水性随着 pH 值的增加先降低,当 pH 值大于 4.0 后,随 pH 值的增加持水性越来越高。随着温度的升高,由于温度升高,苜蓿蛋白的吸油性逐渐降低。

3)苜蓿 ISPs 的起泡性随着 pH 值的增大先减小后增大,当 pH 值为 4.0 时,起泡性到达最低,此时起泡性为 69%,泡沫稳定性相对较高。随着 NaCl 浓度的增加,起泡性和泡沫稳定性都呈现先增加后降低的现象。当 NaCl 浓度为 2.0%时,起泡性和泡沫稳定性均达到最大值。蔗糖浓度在 1%~4%范围内,蛋白起泡性和泡沫稳定性均逐渐增加,而蔗糖浓度大于 4%后,蛋白起泡性减小,而泡沫稳定性变化不大。

4)苜蓿 ISPs 的乳化性和乳化稳定性随着 pH 值的

增大呈现先下降再上升的趋势,在 pH 值为 4 时,乳化性和乳化稳定性都达到最低。当 NaCl 浓度在 0%~2.0%,随着浓度的增加,蛋白的乳化性和乳化稳定性均降低。当蔗糖浓度在 0%~2.0%,随着蔗糖浓度的增加,苜蓿 ISPs 的乳化性和乳化稳定性都小幅度提高。

5)采用生物显微镜对提取的苜蓿 ISPs 进行冰晶形态观察,并以水、蔗糖、NaCl 溶液等做对照进行比较,可以看出苜蓿 ISPs 体积小,数量多,形态不规则,说明苜蓿 ISPs 对于抑制冰晶生长、修饰冰晶形态具有显著的效应,具有较好的抗冻活性。

参考文献

- [1] DING X L,ZHANG H,LIU W H. Extraction of carrot (*Daucus carota*) antifreeze protein and evaluation of their effects on frozen white salted noodles [J]. Food Bioprocess Technol, 2014(7): 842-852.
- [2] 田丽萍,刘清广,薛琳. 苜蓿蛋白营养价值的初步研究[J]. 饲料工业, 2005,26(5):56-59.
- [3] 张辉,丁香丽. 抗冻蛋白在食品中应用研究进展及安全性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2012,31(5):155-157.
- [4] 曲敏,马永强,杨大鹏,等. 不同方法提取苜蓿叶蛋白效果的比较及表征[J]. 食品科学, 2012,33(14):91-95.
- [5] 曲敏,杨大鹏,梁金钟,等. 嗜酸乳杆菌发酵制备苜蓿液蛋白的研究[J]. 食品科学, 2011,32(19):152-156.
- [6] 许英一,江成英,吴红艳,等. 纤维素酶法提取紫花苜蓿叶蛋白的工艺研究[J]. 食品工业, 2012,33(9):87-89.
- [7] 肖海峻,孟利前,杨新建,等. 苜蓿叶蛋白脱色脱腥最佳工艺参数的研究[J]. 食品研究与开发, 2013,34(14):69-72.
- [8] JOANNA L, KELLE Y, JAN E, et al. Functional diversification and evolution of antifreeze proteins in the Antarctic fish *Lycodichthys dearborni* [J]. Mol Evol, 2010,71:111-118.
- [9] 李文轲,马春森. 抗冻蛋白特征、作用机理与预测新进展[J]. 生命科学, 2012,24(10):1089-1097.
- [10] 赵金红,胡悦,刘冰,等. 几种冷冻新技术对食品冻结过程中冰晶形成的影响[J]. 食品与机械, 2012,28(6):241-245.
- [11] 王多佳,曾俨,牟永潮,等. 高寒地区冬小麦 1 号抗冻蛋白的研究[J]. 麦类作物学报, 2009,29(8):823-826.
- [12] 熊小文,黄发泉,黎毛毛,等. 植物抗冻蛋白的研究进展[J]. 江西农业学报, 2009,21(10):112-114.
- [13] 曲敏,董正婷,陈凤莲,等. 苜蓿冰结构蛋白的提取及对冷冻面团的影响[J]. 食品科学, 2014,35(24):57-62.
- [14] 尹明安,崔鸿文,樊代明,等. 抗冻蛋白及其在植物抗冻基因工程中的应用[J]. 西北植物学报, 2001,21(1):8-13.
- [15] 申晓慧. 紫花苜蓿抗寒性研究进展及展望[J]. 安徽农业科学, 2013,41(35):13530,13625.
- [16] 窦玉梅. 国内紫花苜蓿抗寒性机理研究进展[J]. 黑龙江农业科学, 2011(7):146-148.
- [17] 霍智慧,宋丽莉,陈月,等. 紫花苜蓿耐寒育种研究进展[J]. 草业与畜牧, 2015(1):8-11.
- [18] 曲敏,董正婷,陈凤莲,等. 苜蓿冰结构蛋白的提取及对冷冻面团的影响[J]. 食品科学, 2014,35(24):57-62.
- [19] 龚束芳,杨涛,车代弟. 抗冻蛋白溶液中冰晶生长行为的研究[J]. 上海交通大学学报, 2010,28(3):265-268.
- [20] HAWES T C, MARSHALL C J, WHARTON D A. Antifreeze proteins in the Antarctic springtail, *Gressittacantha terranova* [J]. Comp Physiol B, 2011,18(1):713-719.
- [21] 李涛. 青稞蛋白质的提取及特性研究[D]. 郑州:河南工业大学, 2010:28-41.
- [22] 杜蕾蕾,郭涛,万辉,等. 核桃蛋白的分离纯化及功能性质的研究[J]. 中国油脂, 2009,34(5):21-24.
- [23] 杨国燕,陈栋梁,刘莉,等. 菜籽分离蛋白及菜籽蛋白肽的功能性研究[J]. 食品科学, 2007,28(1):76-78.

Study on Antifreeze Activity and Functional of Alfalfa Ice Structuring Proteins

LI Lingli, QU Min, LIU Yujia, CHEN Fenglian, SUN Zhaoguo, BAO Huan

(Key Laboratory for Food Science and Engineering/College of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin, Heilongjiang 150076)

Abstract: Taking 'Zhaodong' alfalfa as materials, ice structuring proteins were extracted using phosphate buffer solution and the effect of temperature, pH value, NaCl and sucrose concentration on the function of ice structuring proteins were studied. The results showed that the ice structuring proteins of alfalfa was small in size, large in number and irregular shape, it had good antifreeze activity. Furthermore, the functional studies of alfalfa protein were showed that the solubility index, water holding capacity, emulsifying property, emulsion stability, foamability and the foam stability were increased gradually with the increase of pH value of the solution. On the other hands, with the increase of NaCl concentration, the foamability and foam stability were increased and then decreased, and the emulsifying property and emulsion stability were decreased. Additionally with the increase of sucrose concentration, the foamability and foam stability were increased gradually.

Keywords: alfalfa; ice structuring protein; antifreeze activity; function