

黄秋葵籽粕分离蛋白理化性质及营养评价

董增, 章建国, 陈忆, 魏兆军* (合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 [目的]分析榨油后黄秋葵籽粕的分离蛋白理化特性和营养价值。[方法]利用碱溶酸沉的方法提取分离蛋白,对分离蛋白的溶解性、乳化性、起泡性、蛋白质分子量范围和氨基酸含量进行分析。[结果]分离蛋白在等电点处理理化性质差,富含亮氨酸,苏氨酸为第一限制性氨基酸,蛋白质的主要亚基在20~26 kD。[结论]黄秋葵分离蛋白具有较大的开发价值。

关键词 黄秋葵籽;蛋白质;氨基酸;营养评价

中图分类号 S565 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)14-06447-03

Nutritional Evaluation and Physicochemical Properties of Okra Seed Protein Isolate

DONG Zeng et al (School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract [Objective] The study aims to analyze the physicochemical properties and nutritional value of okra seed protein isolate (OPI). [Method] OPI was prepared using the methods of alkali extraction and acid precipitation, the solubility, emulsifying activity, foaming capacity, molecular weights and amino acids composition of OPI were studied. [Result] The physicochemical properties of OPI were poor at isoelectric point. Leucine was the most abundant amino acid found in OPI, threonine was found as the first limiting amino acid, molecular weights of OPI were from 20-26 kD. [Conclusion] OPI has huge potential for development.

Key words Okra seed; Protein; Amino acid; Nutritional evaluation

黄秋葵 (*Hibiscusesculentus*) 为锦葵科 1 年生的草本植物,黄秋葵籽含有蛋白质约 20%,脱脂后含量能达到 55%^[1]。目前有些地方已经把黄秋葵籽用于榨油,产生大量的饼粕,为了充分利用黄秋葵籽,有必要研究黄秋葵分离蛋白,促进其进一步在加工中的应用,提高价值。同时,随着人们生活水平的提高,对植物蛋白的需求量越来越大,植物分离蛋白不仅可作为食品添加剂,也可作为保健品补充人体蛋白质。

目前,分离蛋白的制备方法有:①碱溶酸析法。通过蛋白质在不同 pH 下溶解度的不同实现蛋白质的分离。②膜分离法。通过膜截留大分子量的蛋白质,除去小分子的杂质并起到浓缩蛋白液的作用,并且回收了小分子的低聚糖、异黄酮、皂苷等生物活性成分。③离子交换法。通过交换离子改变蛋白液的 pH 从而实现蛋白质的溶解和析出。

笔者利用碱溶酸沉的方法获得黄秋葵籽粕中的分离蛋白,并对分离蛋白的氨基酸组成及含量进行分析,对氨基酸的营养进行评价,然后通过 SDS-PAGE 电泳分析了黄秋葵分离蛋白质分子量范围,最后研究了黄秋葵分离蛋白的一些基本理化性质如乳化性、起泡性、密度等,为以后利用黄秋葵分离蛋白提供参考。

1 材料与方

1.1 材料 榨油后的黄秋葵粕由六安汉华科技生物技术有限公司提供,粗脂肪、粗蛋白、水分、灰分、可溶性糖含量经测定分别为 3.44%、52.3%、8.87%、5.16% 和 6.5%。

1.2 方法

1.2.1 分离蛋白的制备。榨油后的黄秋葵粕粉碎后,将粉末按照 1:10 (W/V) 浸泡在蒸馏水中,然后用 1 mol/L NaOH

调 pH 至 10.0。在室温下振荡提取 2 h 后,在 5 000 r/min 离心 15 min,取上清液后抽滤,沉淀重复提取 2 次,把滤液合并后用 1 mol/L HCl 调节 pH 至 3.9,4 ℃ 放置 2 h 后离心,用蒸馏水洗液沉淀,洗涤后用蒸馏水复溶后调 pH 至 7.0,冷冻干燥后即得到黄秋葵分离蛋白,放置 4 ℃ 备用。

1.2.2 氨基酸测定方法。蛋白质水解应用的为常规水解,即称取蛋白质 5 mg 加入 2 ml 6 mol/L 的 HCl(含有 1% 的苯酚)在液氮中冷冻,抽真空至 $\leq 7 \text{ Pa}$ ($5 \times 10^{-2} \text{ mmHg}$),封管,置 $(110 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 烘箱水解 22~24 h,冷却、混匀、开管,60 ℃ 蒸干,加一定量样品稀释液,过滤后,取上清液,用德国 SYKAM 公司 S-433D 氨基酸自动分析仪测定(色氨酸水解时被完全破坏)。

1.2.3 氨基酸营养分析。通过计算分离蛋白氨基酸的组成来评价分离蛋白的营养价值。必需氨基酸(EAA)占样品总氨基酸(TAA)的比例^[2]:

$$E/T(\text{g/kg}) = (\text{Ile} + \text{Leu} + \text{Lys} + \text{Met} + \text{Cys} + \text{Phe} + \text{Tyr} + \text{Thr} + \text{Trp} + \text{Val}) / (\text{Ala} + \text{Asp} + \text{Arg} + \text{Gly} + \text{Glu} + \text{His} + \text{Ile} + \text{Leu} + \text{Lys} + \text{Met} + \text{Cys} + \text{Phe} + \text{Tyr} + \text{Pro} + \text{Ser} + \text{Thr} + \text{Trp} + \text{Val}) \times 1000$$

蛋白质生物学价值(在动物体内被储存的氮量与被吸收的氮量之比,蛋白质的生物学价值越高,表明其营养价值越高)BV 计算公式^[3]:

$$BV = 10^{2.15} \times q_{\text{Lys}}^{0.41} \times q_{\text{Phe+Cys}}^{0.60} \times q_{\text{Met+Cys}}^{0.77} \times q_{\text{Thr}}^{2.4} \times q_{\text{Trp}}^{0.21}$$

其中,当 a_i 样品 $\leq a_i$ 参考样, $q_i = a_i$ 样品 / a_i 参考样; 当 a_i 样品 $\geq a_i$ 参考样, $q_i = a_i$ 参考样 / a_i 样品。

氨基酸比值系数法。根据世界卫生组织(WHO)和联合国粮农组织(FAO)提出的人类膳食最佳氨基酸模式计算必需氨基酸比值(RAA)、氨基酸比值系数(RC)和氨基酸比值系数分(SRC)

$$\text{氨基酸比值(RAA)} = \frac{\text{样品的必需氨基酸含量}(\text{mg/g})}{\text{WHO/FAO 模式氨基酸参考值}}$$

基金项目 教育部新世纪优秀人才基金项目(NCET-07-0251);安徽省第四批优秀青年科技基金项目(08040106803)。

作者简介 董增(1986-),男,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向:生物资源综合利用,E-mail: dongzeng@163.com。* 通讯作者,教授,博士,博士生导师,从事农产品加工研究,E-mail: zjwei@hfut.edu.cn。

收稿日期 2013-04-05

$$\text{氨基酸比值系数}(RC) = \frac{RAA}{RAA \text{ 的平均数}}$$

式中, $SRC = 100 - CV \times 100$; CV 为 RC 的变异系数; CV 为标准差/均数。

1.2.4 蛋白质理化特性测定。

1.2.4.1 溶解度。分离蛋白溶解度的测定参考^[4]。将 1~2 g 黄秋葵分离蛋白溶于 100 ml 的去离子水中,然后用 0.5 mol/L HCl 或 0.5 mol/L NaOH 调 pH 范围 2~11,然后在室温下振荡 1 h,在 5 000 r/min 离心 20 min。用凯氏定氮法测定上清液中氮含量,溶解度(g/100g)表示为上清液中氮含量与样品总的氮含量百分比。

1.2.4.2 持油性。参考 AOCs^[5]的方法将 1 g (W_0) 蛋白质中加入 10 ml (V_1) 的植物油脂,涡旋振荡 2 min,然后在室温下放置 30 min,3 000 r/min 离心 20 min,离心后将上清液倒入 10 ml 的量筒,测定剩余油脂体积(V_2)。

$$\text{持油性}(FAC) = \frac{V_1 - V_2}{W_0}$$

1.2.4.3 持水性。取 1 g (W_0) 分离蛋白放入 25 ml 离心管中,称重 W_1 ,加入 10 ml 的蒸馏水,涡旋振荡 2 min 后,在室温下放置 30 min,然后在 3 000 r/min 离心 20 min,除去上清液,将离心管倒置于滤纸上,2 min 后称取质量 W_2 。

$$\text{吸水性}(WHC) = (W_2 - W_1)/W_0$$

1.2.4.4 乳化性和乳化稳定性。参考 Pearce 等的方法^[6],分别取 5 ml 植物油脂与 15 ml 0.1% 蛋白质溶液(用磷酸盐缓冲液配制)混合,调节 pH 分别为 3、5、6、7 和 9,在 20 000 r/min 均质 1 min,乳化后在 0 和 10 min 从底部吸取 50 μ l 的均质液与 5 ml 0.1% SDS 溶液混合。最后在波长 500 nm 处测定吸光度。

$$\text{乳化性}(EAI, \text{m}^2/\text{g}) = \frac{2.303 \times 2 \times A_0 \times \text{稀释倍数}}{C \times \Phi \times 10\,000}$$

式中, C 为 0.001 g/ml 蛋白质; Φ 为油脂占乳化液体积比 0.25; 稀释倍数为 100(50 μ l 均质液 + 5 ml 1 g/L SDS)。

$$\text{乳化稳定性}(ES) = \frac{A_0 - A_{10}}{A_0} \times 100$$

式中, A_0 为 0 min 波长 500 nm 处的吸光度; A_{10} 为 10 min 波长 500 nm 处的吸光度。

1.2.4.5 起泡性和起泡稳定性。按照 Onuora 等^[7]所述,20 ml 0.5% 的蛋白液(用磷酸盐缓冲液配制) pH 分别调为 3、5、6、7 和 9 后,涡旋振荡 2 min,在 16 000 r/min 均质 2 min,然后立即转入到 25 ml 的量筒,读出总体积 A_0 。

$$\text{起泡性}(FC) = \frac{A_0 - B}{B} \times 100\%$$

$$\text{起泡稳定性}(FS, \%) = \frac{A_t - B}{B}$$

式中, A_t 为在室温下放置 10 min 后记录体积; B 为初始体积。

1.2.4.6 蛋白质密度。按照施旭丹等方法^[8],取 10 ml 量筒一个,称取重量 M_0 ,加入一定量黄秋葵分离蛋白,压实后,记录体积 V ,然后称取量筒的总重 M 。

$$\text{分离蛋白密度}(\text{g}/\text{cm}^3) = \frac{M - M_0}{V_0}$$

1.2.4.7 蛋白质 SDS-PAGE 电泳分析。参考 Miroljub 等^[9]配制 10% 分离胶和 5% 的浓缩胶。蛋白样品溶解在含有 1% SDS、1% 巯基乙醇、40% 甘油和 0.02% 的溴酚蓝 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液中制备 1 mg/ml 的蛋白溶液。样品充分混合后在沸水中加热 5 min,在 10 000 r/min 离心 10 min。取 10 μ l 样品上样。在浓缩胶电压维持在 80 V,进入分离胶后调电压至 120 V 直到蓝色溴酚蓝 BPB 指示距底部 1 cm 结束电泳。电泳结束后,剥离胶,在 1.0 g/L 考马斯亮蓝 R-250 中染色 30 min,回收染色液。然后讲凝胶浸泡在乙酸-甲醇-蒸馏水(1:1:8)的考马斯亮蓝脱色液中,在 45 $^{\circ}$ C 摇床振荡脱色 72 h,期间更换脱色液 3~5 次。

2 结果与分析

2.1 黄秋葵分离蛋白的氨基酸组成和营养特性 黄秋葵分离蛋白氨基酸组成及含量如表 1,必需氨基酸(EAA)含量 284.58 mg/g,总氨基酸(TAA)为 934.20 mg/g,其中必需氨基酸占总氨基酸含量为 30.46%,接近 FAO/WHO 衡量理想蛋白资源的推荐值(36%)。表 2 比较了分离蛋白含有的必需氨基酸与 FAO/WHO 推荐值,进一步计算了氨基酸比值系数(RC),其中 RC 值最小的为第一限制性氨基酸,因此苏氨酸是第一限制性氨基酸,第二限制性氨基酸为蛋氨酸+胱氨酸、异亮氨酸,其余的除了赖氨酸外均高于 FAO/WHO 推荐值。氨基酸比值系数 SRC 为 33,与参考的比值系数 100 还有一定的差距,这是由于压榨过程中使蛋白变性,从而导致营养价值降低,但是黄秋葵分离蛋白可以作为其他蛋白的补充剂。

表 1 黄秋葵分离蛋白氨基酸组成

氨基酸	API//mg/g	占总氨基酸//%
Asp	100.90	10.80
* Thr	9.42	1.01
Ser	37.19	3.98
Glu	212.51	22.75
Gly	36.31	3.89
Ala	69.93	7.49
Cys	8.67	0.93
* Val	57.85	6.19
* Met	8.35	0.89
* Ile	35.97	3.85
* Leu	86.19	9.23
Tyr	19.73	2.11
* Phe	53.33	5.71
His	27.95	2.99
* Lys	33.46	3.58
Arg	136.43	14.60
EAA	284.58	30.46
NEAA	649.63	69.54
TAA	934.20	

注: * 为必需氨基酸。

2.2 蛋白质功能性质

2.2.1 溶解度。图 1 描述了黄秋葵分离蛋白随着 pH 的变

表 2 OPI 中必需氨基酸与 WHO/FAO 推荐的模式比较

氨基酸	FAO/WHO 推荐值//mg/g	必需氨基 酸比值 RAA//mg/g	氨基酸比 值系数 RC
Ile	70	0.514	0.564
Lue	40	2.155	2.366
Lys	55	0.608	0.668
Met + Cys	35	0.486	0.534
Phe + Tyr	60	1.218	1.337
Thr	40	0.236	0.259
Val	50	1.157	1.271
SRC	33		

化溶解度发生的变化,黄秋葵分离蛋白溶解度最低点接近黄秋葵分离蛋白的等电点(3.9),在等电点附近,蛋白质所带的正电荷与负电荷平衡,这样就降低了蛋白质分子间的静电排斥力,从而使蛋白质发生凝聚而沉淀。在非等电点的区域内,增加了蛋白质之间的静电斥力促进蛋白质的解离,从而使蛋白质的溶解性升高。

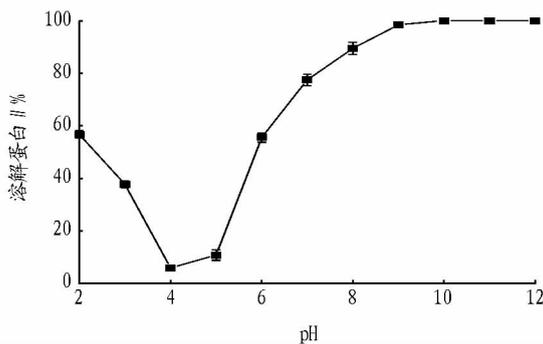


图 1 pH 对黄秋葵分离蛋白溶解度的影响

2.2.2 持油性和持水性。黄秋葵分离蛋白的持油性为 2.27 ml/g,持水性为 1.104 ml/g,堆积密度为 0.513 g/ml。持油性较好,持水性一般,堆积密度较大,在食品加工中的应用需要进一步研究。

2.2.3 乳化性。黄秋葵分离蛋白的乳化活性及乳化稳定性随 pH 的变化如图 2 所示。蛋白质在酸性范围内的乳化性和乳化稳定性小于在碱性范围内,在 pH 4.0 左右出现最低值,这与蛋白质的溶解性呈现正相关性。在蛋白质的等电点状态,蛋白质分子上电荷被中和,因此就抑制了蛋白颗粒表面形成水化层,这样乳状液颗粒相互之间没有排斥作用,蛋白颗粒容易发生聚结导致乳状液滴破裂。在 pH > 4.0 时,乳化性及乳化稳定性随 pH 增大而增大,这是因为随着 pH 增加,蛋白质分子带的电荷增加,从而导致水化层的厚度增加,乳化颗粒间的静电斥力也增加,这样形成的乳状液较稳定。同理,在 pH 为 3.0 时,乳化性和乳化稳定性增加,也是与蛋白质分子表面电荷的增加有关。

2.2.4 起泡性。pH 对蛋白质起泡性的影响见图 3,可以看出黄秋葵分离蛋白的起泡性和稳定性都随着 pH 的变化先降低后增大,也与蛋白质的溶解性呈正相关。在等电点 pH 为 4 时起泡性和起泡稳定性最低,在远离等电点的酸性和碱性范围内,起泡性都较好,这是因为蛋白质的起泡性很大程度

上取决于其在溶液中的溶解度,pH 影响黄秋葵分离蛋白的溶解度、相互作用以及持水力,pH 高于或低于等电点,蛋白质在溶液中是处于伸展状态的,这样就有利于其快速分散到空气与水界面包埋空气颗粒,从而改变了蛋白质的起泡性。

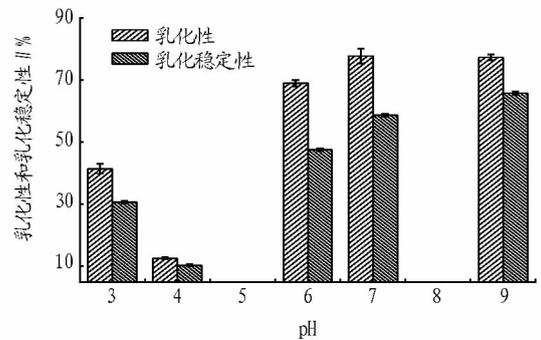


图 2 pH 对乳化性和乳化稳定性的影响

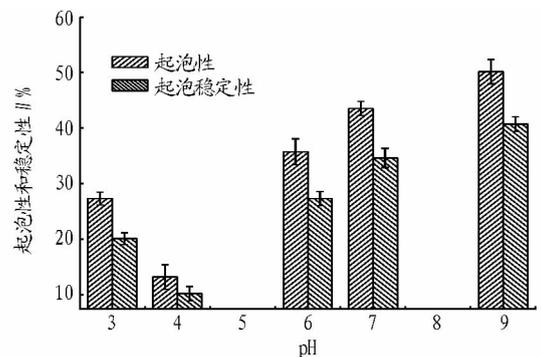


图 3 pH 对起泡性和起泡稳定性的影响

2.2.5 蛋白质 SDS-PAGE 电泳。黄秋葵分离蛋白 SDS-PAGE 条带如图 4 所示,可知黄秋葵分离蛋白的主要亚基分子量范围 20 ~ 26 kD,其次是在 45.0 kD 左右的 2 个条带,因此黄秋葵蛋白以低分子量的蛋白为主。

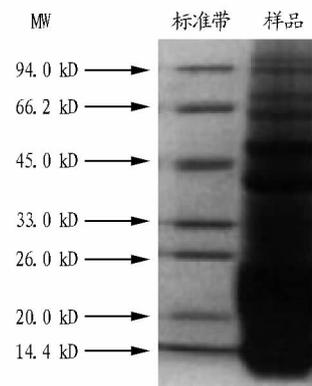


图 4 黄秋葵分离蛋白的 SDS-PAGE 条带

3 结论与讨论

提取的黄秋葵分离蛋白,蛋白质分子量小,主要亚基在 20 ~ 26 kD,其乳化性和乳化稳定性、起泡性和起泡稳定性与溶液 pH 有关,在等电点处最差,远离等电点效果更好。黄秋葵蛋白氨基酸含量种类齐全,其中富含亮氨酸(Lue)、缬氨酸(Val)、苯丙氨酸+酪氨酸(Phe + Tyr),必需氨基酸(EAA)含量 284.58 mg/g,第一限制性氨基酸为苏氨酸,必需氨基酸占

(下转第 6474 页)

2.4.4 烘烤后中部叶杂环、内酯和萜类成分含量。JY-02-3 和云 87 烘烤后中部叶杂环、内酯和萜类成分含量见表 5。通过对 JY-02-3 不同叶龄的比较,2-乙酰基吡咯、2-乙酰基呋喃、二氢猕猴桃内酯的含量以叶龄 65 d 最高,其次是叶龄 70 d;

总体来看,总量为叶龄 65 d > 70 d > 60 d > 75 d。

云 87 不同叶龄叶片中 2-乙酰基呋喃、二氢猕猴桃内酯的含量以叶龄 70 d 最高,2-乙酰基吡咯的含量以叶龄 75 d 最高;总体来看,总量为叶龄 70 d > 60 d > 65 d > 75 d。

表 5 中部叶杂环、内酯和萜类成分含量

中性香气成分	JY-02-3				云 87				μg/g
	60 d	65 d	70 d	75 d	60 d	65 d	70 d	75 d	
2-乙酰基吡咯	0.45	0.46	0.45	0.23	0.28	0.31	0.32	0.38	
2-乙酰基呋喃	0.41	0.54	0.42	0.42	0.74	0.52	0.92	0.82	
二氢猕猴桃内酯	0.43	0.57	0.52	0.34	0.44	0.54	0.72	0.60	
新植二烯	684.48	897.44	765.43	593.37	735.44	735.22	795.23	542.57	
合计	685.80	899.00	766.80	594.40	736.90	736.60	797.20	544.40	

3 结论

综合以上各化学成分的分析结果表明,JY-02-3 下部叶在叶龄 60~65 d(移栽后 80~88 d)、中部叶在 65~70 d(移栽后 97~103 d)、上部叶在 70~75 d(移栽后 118~123 d)时,各项成分含量较适宜;云 87 下部叶在叶龄 60~65 d(移栽后 80~88 d)、中部叶在 70~75 d(移栽后 103~110 d)、上部叶在 70~75 d(移栽后 118~123 d)时,各项成分含量较适宜。

通过从香气物质的总量看,JY-02-3 中部叶 65 d 叶龄的烟叶含量最高,70 d 叶龄的烟叶含量次之。由此可见,JY-02-3 中部叶 65~70 d 叶龄,采收的鲜烟叶具备潜在质量基础,有利于烤后烟叶香气物质含量的提高。云 87 中部叶 70 d 叶龄的烟叶含量最高,75 d 叶龄的烟叶含量次之,在 70~75 d 叶龄适时采收的烟叶具备了由生长发育形成的潜在质量基础,适时采收可提高香气物质总量,加之烘烤工艺与之相适应,最终导致其烤后烟叶香气物质总量最高。

参考文献

[1] 官长荣.烟草调制学[M].北京:中国农业出版社,2003.

- [2] BACON C W, WENER R. Chemical changes during flue-curing [J]. *Ind Chem*, 1977, 44: 292.
- [3] 王瑞新,洪涛,马聪.烤烟香气物质成分与成熟度的关系[J].烟草科技,1991(4):25-28.
- [4] 陆天胜,刘汉传,邵伏文,等.烤烟 40 级不同成熟度与内外观质量研究[J].安徽农业科学,1994,20(3):256-258.
- [5] 孙立娟,李虎林,金哲,等.不同成熟度烤烟外观特征及化学成分的变化[J].湖北农业科学,2008,47(3):318-320.
- [6] 鲁艺,李虎林,姬文秀,等.烤烟不同成熟度叶片外观性状特征与化学成分变化规律的研究[J].安徽农业科学,2008,36(35):15550-15551,15567.
- [7] 官长荣,周义和,杨焕文.烤烟三段式烘烤论[M].北京:科学出版社,2006.
- [8] 王瑞新,韩富根.烟草化学品质分析[M].郑州:河南科学技术出版社,1998.
- [9] CAI J B, LIU B Z, LING P, et al. Analysis of free and bound volatiles by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in uncased and cased tobaccos [J]. *J Chromat A*, 2002, 947: 267-275.
- [10] 朱尊权.当前制约两烟质量提高的关键因素[J].烟草科技,1998(4):3-4.
- [11] 赵铭钦,于建军,程玉渊,等.烤烟烟叶成熟度与香气质量的关系[J].中国农业大学学报,2005,10(3):10-14.
- [12] 中国农业科学院烟草研究所.中国烟草栽培学[M].上海:上海科学技术出版社,1986.
- [13] 史宏志,刘国顺.烟草香味学[M].北京:中国农业出版社,2000.

(上接第 6449 页)

总氨基酸含量为 30.46%,氨基酸比值系数 SRC 为 33。氨基酸比值与已报道的黄秋葵蛋白存在一定差异,这是由于该试验研究的是分离蛋白;另一方面,压榨过程中也使得黄秋葵蛋白质变性,使其营养价值降低。

参考文献

- [1] OYELADE O J, ADE-OMOWAYE B I O, ADEOMI V F. Influence of variety on protein, fat contents and some physical characteristics of okra seeds [J]. *J Food Eng*, 2003, 57: 111-114.
- [2] MORRUP L, OLESEN E S. New method for prediction of protein value from essential amino acid pattern [J]. *Nutrition Reports International*, 1976, 13: 355-365.
- [3] SATTERLEE L D, KENDRICK J G, JEWELL D K, et al. In vitro assay for predicting protein efficiency ratio as measured by rat bioassay, collaborative study [J]. *Journal Association of Official Analytical Chemists*, 1982, 65: 798-809.

- [4] LAWAL O S. Functionality of African locust bean (*Parkia biglobosa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations [J]. *Food Chem*, 2004, 86(3): 345-355.
- [5] Anonymous. Official methods on recommended practices of the AOCS [C]//AOCS official method (Method Ba. 11-65) (5th ed). Campaign, IL: American Oil Chemists' Society (AOCS), 2003.
- [6] PEARCE K N, KINSELLA J E. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique [J]. *J Agr Food Chem*, 1978, 27: 716-723.
- [7] ONUORA J O, KING R D. Preliminary study of enzymic solubilization of nitrogenous constituents of palm kernel cake [J]. *Food Chem*, 1985, 17(4): 297-302.
- [8] 施旭丹.酶解虾壳蛋白制备 ACE 抑制肽及抗氧化肽[D].杭州:浙江大学,2012.
- [9] BARA C M, C ABRILLO S, PE S I C M, et al. Functional properties of pea (*Pisum sativum* L.) protein isolates modified with chymosin [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12: 8372-8387.