# 不同制备方法桑叶蛋白功能性质的比较

孙崇臻[1]，武文佳[1]，闵甜[1]，刘杨[1]，朱建华[2]，赖富饶[1]，吴晖[1]
（1.华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）（2.韶关学院英东食品科学与工程学院，广东韶关 512005）

**摘要：**以广东桑大 10 为原料，采用水提法制备叶蛋白浓缩液，用加热法、酸沉法、酸热法、盐析法沉淀叶蛋白，分别得到蛋白样品 RC、SC、SR、LC。对所得样品进行功能性质测定，与大豆分离蛋白对比，得出不同样品的功能特点。结果表明，异亮氨酸、赖氨酸分别为桑叶粉的第一、第二限制性氨基酸。不同沉淀方法对叶蛋白的功能性质有显著影响：LC 的溶解性、起泡性、乳化性、吸油性最好，均优于 SC、SR 及 RC；SR 的持水性优于 SC 及 RC，但乳化性、起泡性较差；RC、LC 的胶凝性最好。与 SPI 相比，4 个样品的吸油性均优于 SPI，持水性、胶凝性则显著低于 SPI（$p$<0.05）；LC 的乳化稳定性（68.57%）及 SC 的起泡性（40%）最好，显著优于 SPI（54.86%、37.67%），RC 与 SPI 相当，SR 最差，显著低于 SPI（$p$<0.05）。LC 电镜扫描结果显示其具有典型的蜂巢结构。

**关键词：**桑叶；叶蛋白；提取方法；功能特性；扫描电镜；氨基酸分析
**文章篇号：**1673-9078(2015)12-242-249 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.036

# Functional Properties of Mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) Leaf Proteins Extracted by Different Methods

**SUN Chong-zhen[1], WU Wen-jia[1], MIN Tian[1], LIU Yang[1], ZHU Jian-hua[2], LAI Fu-rao[1], WU Hui[1]**
(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.Yingdong College of Food Science and Technology, Shaoguan College, Shaoguan 512005, China)

**Abstract:** Leaf protein concentrates were extracted from mulberry Da10 by water, and the leaf proteins were precipitated using the heating method, acid method, acid-heating method, and salting-out method to yield the corresponding protein samples RC, SC, SR, and LC, respectively. The functional properties of the obtained samples were measured and compared with those of soy protein isolate (SPI) in order to determine the functional characteristics of each sample. The results showed that isoleucine and lysine were the first and second limiting amino acids, respectively, in mulberry leaf flour. The precipitation methods had significant impacts on the functional properties of the mulberry leaf proeins. The LC sample showed the highest solubility, foaming capacity, emulsifying activity, and oil absorption capacity, which were significantly better than those of SC, SR, and RC ($p$ < 0.05). SR displayed a higher water holding capacity than SC and RC but showed relatively poor emulsifying activity and foaming capacity. LC and RC had the best gelling property. Compared with SPI, the four samples exhibited better oil absorption capacity, significantly lower water holding capacity, and poor gelling property. The best emulsion stability (68.57%) and foaming capacity (40%) were found in the LC and SC samples, respectively, which were significantly better than those of SPI (54.86%, 37.67%, $p$ < 0.05). The emulsion stability and foaming capacity of RC were comparable to those of SPI while the two properties were the lowest for SR and were significantly lower than those of SPI ($p$ < 0.05). The scanning electron microscopy result showed that LC had a typical honeycomb structure.

**Key words:** mulberry leaf; leaf protein; extracted methods; functional characteristics; scanning electron microscope (SEM); amino acid composition

植物叶蛋白是以青绿植物茎叶为原料，经压榨取汁、汁液分离、浓缩干燥制备而成的蛋白质浓缩物。它们是自然界中最丰富且可再生的蛋白资源，营养丰富，必需氨基酸分布均衡，生物效价高，可以用作动物饲料或食品添加剂，目前研究较多的叶蛋白来源主要有苜蓿、三七叶、咖喱叶等[1~4]。桑叶是桑树的主要产物，在我国栽培历史悠久，性寒、味甘苦，国家卫生部将其列为药食两用植物。传统蚕桑产业中桑叶主要用作蚕饲料，易出现过剩、浪费等现象，为了实现资源的最优利用，可以将剩余桑叶制备叶蛋白。研究表明，桑叶中蛋白含量为干基重量的 15%-30%，是叶蛋白含量较高的植物[5]。其氨基酸组成与脱脂大豆粉大体一致，可以用作动物饲料添加剂或食品添加剂。

收稿日期：2015-05-21
基金项目：广东省高等学校高层次人才项目（粤财教[2013]246 号）
作者简介：孙崇臻（1987-），女，博士研究生，研究方向：食品安全
通讯作者：吴晖（1967-），男，博士，教授，研究方向：食品天然产物化学和食品安全；赖富饶（1981-），男，博士，研究方向：天然产物化学

用桑叶部分或全部取代谷物添加于猪、鸡等牲畜及家禽饲料中，可提高消化率，改善饲养效果[6~10]。桑叶蛋白作为桑叶提取物，具有成本低、原料易得、营养丰富等特点，这对满足当前日益增长的蛋白需求有着重要意义。

目前国内外对桑叶的研究主要集中在营养组成及品质评价、酚酸、黄酮、生物碱等化学成分及生理活性的分析等方面，对桑叶蛋白的提取优化及功能性分析较少，仅国内少数文献对其进行报导。江洪波等[11]用碱溶酸沉法提取鲜桑叶中的蛋白质，最终提取率为 4.42%。王桃云等[12]用水提酸沉提取出桑叶蛋白，对提取工艺进行优化，

鲜桑叶的叶蛋白得率为 5.17%。屈红森等[13]用枯草芽孢杆菌发酵提取干桑叶中的蛋白质，考察了发酵时间、装液量等因素对桑叶蛋白得率的影响，并对比发酵前后消化率的变化，得出发酵后桑叶蛋白的消化率较发酵前提高 4.29%的结论。王芳等[14]采用盐溶酸沉及超声波辅助提取相结合的方法提取桑叶蛋白，并对 pH、盐离子浓度、温度等对其功能特性的影响进行研究。蛋白质可以通过水溶性及水动力学特性影响食品的持水性、胶凝性等特性，同时不同的纯化及浓缩方法会影响蛋白质的功能性质。目前虽然对桑叶蛋白的提取方法进行了研究，但是尚未对不同提取方法所得桑叶蛋白的功能特性进行对比分析。本研究用不同方法制备桑叶蛋白，并与大豆分离蛋白相比较，对不同方法制备的桑叶蛋白进行功能性质对比研究，以期提高桑叶的应用价值，为桑叶蛋白的实际应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

桑叶（广东桑-大 10），广东省农业蚕业研究所提供；大豆分离蛋白，湖北云梦植物蛋白厂；玉米油，市售；Bradford 蛋白浓度定量试剂盒，上海生工；氢氧化钠、盐酸，分析纯，天津大茂科技有限公司。

### 1.2 仪器与设备

membraPure A300 全自动氨基酸分析仪，德国；KDN-102F 自动定氮仪，上海；SCIENTZ-18N 冷冻干燥机，宁波；PHS-3C 精密 pH 计，上海；HHS 电热恒温水浴锅，上海；Legend micro 17 高速离心机，美国 Thermo；SHZ-88A 往复式水浴恒温振荡器，太仓；GZX-9140MBE 数显鼓风干燥箱，上海；SCIENTZ-IID 超声细胞粉碎仪，宁波；T18 高速分散机，德国 IKA；HITACHI-S-3700N 型扫描电镜，日本。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 桑叶预处理及理化指标的测定

将新鲜桑叶洗净后自然晾干，挑出完整桑叶，剪去叶柄，将处理后的桑叶放入 50 ℃恒温干燥箱中干燥至恒重；放入高速粉碎机粉碎 2 min（28000 r/min）后过 60 目筛；所得桑叶粉装入密封袋，放入-20 ℃冰箱，保存备用。

蛋白质含量测定，参照 GB 50095-2010，微量凯氏定氮；水分含量测定，GB/T 5009.3-2010，直接干燥法；灰分测定，GB 5009.4-2010，灰化法；氨基酸组成分析，氨基酸分析仪，水解体系。氨基酸评分参照 FAO/WHO（2007）儿童(2~5 岁)推荐含量进行计算：

$$\text{氨基酸评分（\%）}=\frac{\text{被测食物蛋白质每克氮或蛋白质氨基酸含量（mg）}}{\text{参考蛋白质的每克氮或蛋白质氨基酸含量（mg）}}\times 100$$

#### 1.3.2 叶蛋白制备方法的选择

在前期研究基础上，确定最优提取液制备条件：取 30 g 桑叶粉加 600 mL 蒸馏水（1:20）混匀，溶解后超声细胞粉碎 15 min，并于 20 ℃水浴提取 15 min，离心（5000 g，4 ℃，20 min）过滤收集滤液，用加热法、酸沉法、酸热法及盐析法沉淀叶蛋白。

1.3.2.1 加热法沉淀桑叶蛋白

取 5 mL 蛋白提取液装入 10 mL 离心管，分别在 65、70、75、80、85 ℃水浴加热 15 min，离心（10000 g，4 ℃，20 min），取沉淀加少量上清液冲洗，移入已烘干恒重的 1.5 mL 离心管中（$m_0$），再次离心（10000 g，4 ℃，10 min），取沉淀并烘干至恒重，记录总重量 $m_t$，$m_t$-$m_0$ 即为叶蛋白含量。每组 3 个平行。

1.3.2.2 酸沉法制备桑叶蛋白

取 5 mL 提取液装入 10 mL 离心管，分别调 pH 2.5、3、3.5、4、4.5、5，常温静置 20 min 后离心，方法同 1.3.4.1。

1.3.2.3 酸热法沉淀桑叶蛋白

在 1.3.2.1 及 1.3.2.2 的基础上，选取不同的加热温度（85 ℃、65 ℃、75 ℃），pH 值（4.5、3.5、3.0），絮凝时间（15 min、20 min、25 min），设计 $L_9(3^3)$正交试验。以叶蛋白质量为指标，得出最佳沉淀条件。

1.3.2.4 硫酸铵沉淀桑叶蛋白

取 25 mL 提取液，加入固体硫酸铵，调至 20%、35%、50%、65%、80%、90%的饱和度，常温静置 20 min 后离心（12000 g，20 min），取上清，用 Bradford

法测定上清吸光值。

### 1.3.3 桑叶蛋白的制备

根据 1.3.2 实验条件，取 150 g 桑叶粉与 3 L 蒸馏水混匀，溶解后超声 15 min，于 20 ℃提取 15 min，离心过滤并收集滤液。将滤液均分四份：盐析，加固体硫酸铵至饱和度 65%，静置 20 min，离心（12000 g，20 min）取沉淀，用去离子水透析，冷冻干燥，记为 LC；酸沉，提取液调 pH 3.5，常温静置 20 min，离心取沉淀，水冲洗后调 pH 中性，冷冻干燥，记为 SC；热沉，75 ℃水浴 20 min，离心取沉淀，冻干，记为 RC；酸热沉淀，调提取液 pH 3.0，75 ℃水浴 15 min，离心取沉淀，水洗后调 pH 中性冻干，记为 SR。平行提取 3 次，测定提取率（冻干后所得沉淀质量与桑叶粉质量百分比），并用微量凯氏定氮法测定各样品的蛋白纯度（沉淀中蛋白含量与沉淀质量百分比）。

### 1.3.4 桑叶蛋白的理化功能性质研究

将 1.3.3 得到的 4 种桑叶蛋白（RC、SC、SR、LC）进行乳化性、起泡性、持水性等功能性质的分析。

#### 1.3.4.1 溶解度的测定[15,16]

取 10 mL 去离子水将配制 2%的蛋白分散液，室温下磁力搅拌 30 min，12000 g 离心 20 min，过滤后取上清。用凯氏定氮法测定上清液中蛋白质含量，上清液的蛋白总含量与样品蛋白总含量比值即为溶解度 S，重复 2 次。

#### 1.3.4.2 持水性(WHC)的测定

参照 Khattab 等[17]实验方法，并稍作改进：在 100 mg 冻干样品加入 1 mL 蒸馏水，混合后漩涡震荡 2 min，室温静置 2 h，离心 30 min (5000 g，25 ℃)，倒出上清并记录上清体积。持水性为每克样品吸收水的体积（mL/g），与 SPI 相比较，每组 3 平行。

#### 1.3.4.3 吸油性(OAC)的测定

在 Ogunwolu 等[18]基础上稍作改进：100 mg 蛋白样品与 1 mL 玉米油混合后漩涡振荡 30 s，室温静置 30 min，13000 g，25 ℃离心 10 min，倒出上清液，将离心管倾斜 45°，静置 20 min。记录上清液体积，吸油性为每克样品吸收油的体积（g/mL）。每组 3 个平行，与 SPI 相比较。

#### 1.3.4.4 乳化活性(EA)及乳化稳定性(ES)的测定[19]

取 2%（*m/V*）的蛋白样品 5 mL，12000 r/min 均质 1 min 后，加入 5 mL 玉米油 20000 r/min 均质 2 min，将乳状液分装四管。EA: 将其中两管液体于 1300 g 离心 5 min，记录离心后总高度 $H_0$ 及乳化层高度 $H_1$. $H_1$ 与 $H_0$ 的百分比即为 EA。ES: 均质后的乳状液于 80 ℃水浴 30 min，于 1300 g 离心 5 min，记录离心后乳化层高度 $H_3$ 及总高度 $H_4$。$H_3$ 与 $H_4$ 的百分比即为 ES。

#### 1.3.4.5 起泡性(FC)及泡沫稳定性(FS)的测定[20]

FC：取 200 mg 蛋白样品与 10 mL 蒸馏水放于 50 mL 带刻度离心管中，用均质机以 15000 r/min 速度混合搅打 3 min，记录搅打前体积 $V_1$ 及搅打后体积 $V_2$。

$FC=(V_2-V_1)/V_1\times100\%$

FS：分别记录搅打后 0、5、10、20、30、40、60、90、120 min 时泡沫的体积，FS 为时间 t 时泡沫体积与静置前原始体积的百分比。同时与大豆分离蛋白样品作对比。

#### 1.3.4.6 最小胶凝浓度(MGC)测定[21]

取 20~200 mg 样品，与 1 mL 去离子水混合配成 2%-20%的悬浮液，100 ℃水浴 1 h，用冷水迅速降温后于 4 ℃冰箱冷却 2 h，将离心管倒置，无样品流出的最小浓度为最小胶凝浓度。

### 1.3.5 扫描电镜分析

对综合功能特性最好的 LC 进行电镜扫描。冷冻干燥后的 LC 经离子溅射喷金处理，固定于样品台上，放入扫描电镜后调节最佳拍摄视野及放大倍数进行拍照观察。

### 1.3.6 统计分析及作图

使用 SPSS 17.0 软件，对数据进行单因素方差分析，结果采用平均值±标准偏差（SD）表示，以 Duncan 多边检验对实验均值进行差异显著性分析（$p<0.05$）。用 Origin 8.0 对分析数据作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 桑叶粉基础理化指标测定结果

不同品种、采摘期的桑叶所含蛋白有所差异。按照 1.3.1 的测定方法，测得桑叶粉的蛋白含量为 24.34%，与低于王芳等[22]研究结果（24.7%）接近，但高于 Guven[23]对不同品种桑叶蛋白测定结果（11.75~23.72%）。水分含量鲜桑叶 73.72%，这与刘军等[24]的结果 61.28%略有差别，分析原因应是采摘季节不同所致。灰分含量 11.65%，氨基酸测定结果如表 1。

由表 1 知，在测定的 17 种氨基酸中，总氨基酸含量为 18.47 g/100g，略低于测得的粗蛋白含量，是因为所测蛋白中包含了修饰性氨基酸及非蛋白质氨基酸；7 种必需氨基酸含量 6.52 g/100g，占总氨基酸的 35.30%，与非必需氨基酸的比值为 64.70%，这与王芳等[22]测得的桑叶蛋白的氨基酸组成结果相似。17 种氨基酸中，谷氨酸、天冬氨酸含量较高，均高于 2.30 g/100 g 样品，半胱氨酸、苯丙氨酸含量较低，与一般植物蛋白氨基酸分布类似。7 种必需氨基酸中，苏氨酸、

缬氨酸、亮氨酸含量较高，分别为 1.71 g/100 g、1.27 g/100 g、1.29 g/100 g，苯丙氨酸的含量最低，仅为 0.14 g/100 g。与 FAO/WHO（2007）成人必需氨基酸推荐标准相比，桑叶粉中仅有苏氨酸、缬氨酸可以满足其需求。氨基酸评分结果显示，异亮氨酸、赖氨酸分别为第一、第二限制性氨基酸。

表 1 桑叶粉的氨基酸组成（g/100g 样品）

**Table 1 Amino acid profiles of mulberry leaf (g/100 g sample)**

| 氨基酸名称 | | 含量 | 必需氨基酸 | 含量 | FAO/WHO | | 氨基酸评分 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 儿童 | 成人 | 儿童 |
| | Asp | 2.37 | Thr | 1.71 | 3.40 | 0.90 | 50.29 |
| | Ser | 0.71 | Val | 1.27 | 3.50 | 1.30 | 36.29 |
| | Glu | 2.74 | Met* | 0.68 | | | |
| | Gly | 1.54 | Ile | 0.26 | 2.80 | 1.30 | 9.29 |
| 非必需氨基酸 | Ala | 0.75 | Leu | 1.29 | 6.60 | 1.90 | 19.94 |
| (NEAA) | Cys* | 0.11 | Phe# | 0.14 | | | |
| | Tyr# | 0.86 | Lys | 0.71 | 5.80 | 1.60 | 12.24 |
| | Pro | 1.69 | His | 0.46 | 1.90 | 1.60 | 24.21 |
| | Arg | 1.20 | EAA 总量 | 6.52 | | | |
| | NEAA 总量 | 11.97 | *含硫氨基酸 | 0.79 | 2.5 | 1.70 | 31.6 |
| 总氨基酸(TAA) | | 18.47 | #芳香族氨基酸 | 1.00 | 6.3 | 1.90 | 15.87 |

注：色氨酸由于酸处理水解过程中被破坏，故无法测出。

## 2.2 沉淀方法的选择

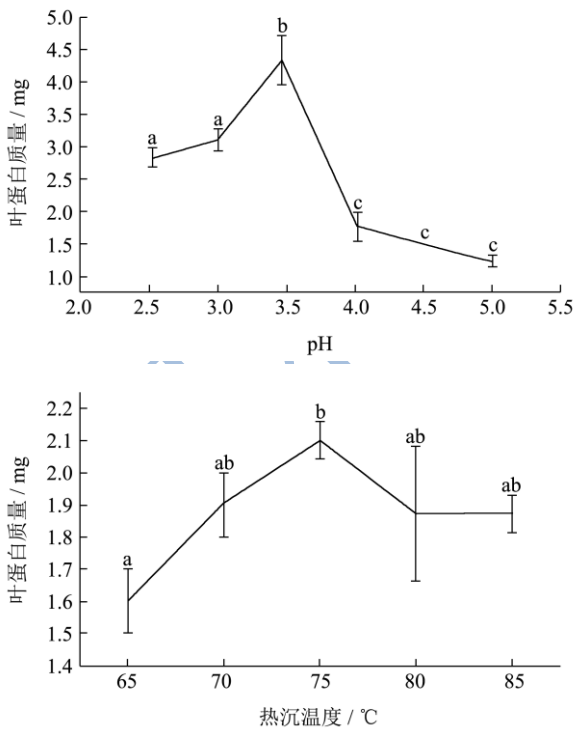



图 1 加热温度及 pH 对蛋白含量的影响

**Fig.1 Influence of heat temperature and pH on protein contents**

注：同一项目中标有不同字母（a~c）的点表示具有显著性差异，$p< 0.05$（n=3）。

由图 1 可知，pH 2.5~3.5，随着 pH 的增加，蛋白沉淀量增加，在 pH 3.5 时达到最大，且显著优于其他 pH 值下的沉淀质量，判断 pH 3.5 为桑叶蛋白的等电点，为酸沉的最佳 pH。65~75 ℃，随着温度的升高，叶蛋白析出，沉淀量逐渐增加；当温度达到 75 ℃时，凝聚量最大，显著高于其他温度；当温度高于 75 ℃，部分蛋白变性溶解，导致蛋白沉淀量减少。因此，加热法的最佳蛋白凝聚温度为 75 ℃。

表 2 酸热法沉淀叶蛋白正交优化结果

**Table 2 Orthogonal optimization results of leaf protein precipitated by heating-acid method**

| 编号 | A (絮凝温度) | B (pH) | C(絮凝时间/min) | D(蛋白质/mg) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 1（85℃） | 1（4.5） | 1（25） | 1.93 |
| 2 | 1 | 2（3.5） | 2（15） | 3.33 |
| 3 | 1 | 3（3.0） | 3（20） | 3.00 |
| 4 | 2（65℃） | 1 | 2 | 2.56 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 2.16 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2.93 |
| 7 | 3（75℃） | 1 | 3 | 2.30 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 2.70 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 4.90 |
| $\bar{k}_1$ | 2.753 | 2.263 | 2.520 | |
| $\bar{k}_2$ | 2.550 | 2.730 | 3.597 | |
| $\bar{k}_3$ | 3.300 | 3.620 | 2.487 | |
| R | 0.750 | 1.347 | 1.110 | |

从表 2 中极差大小可知，影响蛋白含量的因素主次顺序为：絮凝 pH＞絮凝时间＞絮凝温度。由均值大小及蛋白含量可知，最优组合条件为 $A_3B_3C_2$，即絮凝温度 75 ℃，絮凝 pH 3.0，絮凝时间 15 min，实验所得蛋白质量为 4.9 mg。这与酸法沉淀的最优条件 pH 3.5 有所不同，酸热的共同作用影响了蛋白质的性质，由此推测，不同絮凝方法所得的桑叶蛋白，其功能性质不同。

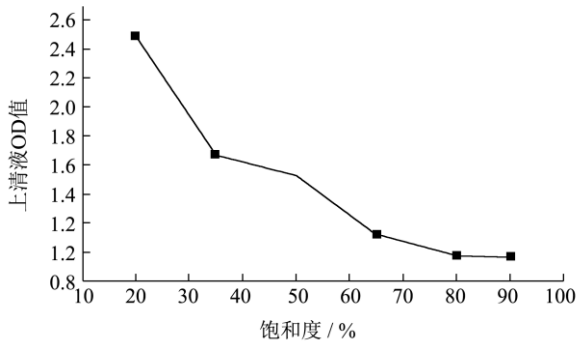



图 2 不同饱和度上清液吸光值

**Fig.2 OD value of the supernatant at different degrees of saturation**

由图 2 可知，20%~65%饱和范围内，吸光值急剧下降，当硫酸铵饱和度达 80%时，上清吸光值基本平稳，说明多数蛋白已被析出，综合考虑沉淀效果及实用效益，选取 65%的饱和度进行盐析。

综上，酸法沉淀的最优 pH 为 3.5，加热沉淀最适温度 75 ℃，酸热法的最优组合为 75 ℃，pH 3.0，提取 15 min，这与柳斌等[25]的研究结论相似。盐析时溶液饱和浓度为 65%。

## 2.3 叶蛋白提取率及纯度测定结果

叶蛋白的提取率及纯度测定结果如表 3 所示。酸热法制备叶蛋白的提取率最高（39.90%），这是由于酸性沉淀与加热絮凝双重因素共同作用，增加了蛋白的凝聚机会与敏感性，提高了絮凝速度与叶蛋白提取效率；酸沉法（39.50%）、盐析法（38.60%）次之，加热法最低（23.50%），但是均高于江洪波等[11]、王桃云等[12]的提取效率。SR、SC、RC、LC 四个蛋白样品的纯度分别为 47.20%、51.90%、57.60%、62.40%，可见提取率最高的酸热法得到的 SR 蛋白纯度最低，提取率居中的盐析法所得样品 LC 纯度最高，后续研究中将选用盐析法制备桑叶蛋白。

表 3 不同提取方法所得桑叶蛋白的提取率及纯度

**Table 3 Extraction efficiency and purity of the mulberry leaf proteins extracted by different methods (%)**

| 项目 | 加热法 | 酸沉法 | 酸热法 | 盐析法 |
|---|---|---|---|---|
| 提取率 | 23.50±0.62 | 39.50±0.32 | 39.90±1.24 | 38.60±0.15 |
| 纯度 | 57.60±1.02 | 51.90±0.64 | 47.20±2.00. | 62.40±1.22 |

## 2.4 桑叶蛋白的理化功能性质分析结果

表 4 理化功能性质测定结果

**Table 4 Physicochemical and functional properties of the mulberry leaf proteins**

| 项目 | SC | RC | SR | LC | SPI |
|---|---|---|---|---|---|
| 溶解度/% | 19.18±0.22$^{a}$ | 16.20±0.49$^{b}$ | 17.57±0.14$^{c}$ | 38.97±0.42$^{d}$ | * |
| OAC/(mL/g) | 2.34±0.15$^{a}$ | 1.49±0.00$^{b}$ | 2.14±0.15$^{c}$ | 2.94±0.09$^{d}$ | 1.46±0.01$^{b}$ |
| WHC/(mL/g) | 2.00±0.00$^{a}$ | 2.49±0.00$^{b}$ | 3.09±0.04$^{c}$ | 3.19±0.09$^{d}$ | 6.49±0.04$^{e}$ |
| ES/% | 63.54±4.88$^{a}$ | 52.58±2.80$^{b}$ | 10.15±1.09$^{c}$ | 68.57±0.54$^{d}$ | 54.86±1.70$^{b}$ |
| EA/% | 51.14±1.32$^{a}$ | 48.24±1.43$^{b}$ | 39.34±1.98$^{c}$ | 54.79±0.75$^{d}$ | 54.00±1.19$^{d}$ |
| FA/% | 40.00±0.00$^{a}$ | 33.33±2.89$^{b}$ | 16.67±2.89$^{c}$ | 37.33±1.53$^{ab}$ | 37.67±2.52$^{a}$ |
| MGC/(g/100 mL) | 20.00±0.00$^{a}$ | 13.33±1.15$^{b}$ | 17.33±1.15$^{c}$ | 13.33±1.15$^{b}$ | 10.67±1.15$^{d}$ |

注：在同一行内标有不同字母（a~d）的数值表示具有显著性差异，$p<0.05$（n=3）；*表示未测定。

### 2.4.1 溶解度测定结果

溶解性是蛋白质表面活性的结果，受氨基酸组成、分子形状、大小、聚体聚集程度等因素的影响。溶解性的高低将影响蛋白质的其他功能性质。高溶解性是蛋白质在食品中作为功能性成分的重要条件。由表 4 可知，4 个蛋白质样品的溶解性不同：LC 溶解性最好（38.97%），SC 次之（19.18%），均显著优于 RC（16.20%）及 SR（17.57%），这是由于 LC 制备过程较温和，蛋白较多保持原有结构及活性。SC 样品冻干前 pH 为中性，偏离等电点，溶解性增加，这与王芳等[14]结论一致。RC 及 SR 溶解性均较差，说明加热对蛋白质的溶解度具有重要影响，加热过程中蛋白的变性程度相对较高，使其物理性状产生不可逆效应，从而降低溶解性。

### 2.4.2 吸油性及持水性测定结果

蛋白质的变性、非蛋白组分的存在及结构解折叠等是影响蛋白质持水性及吸油性的重要因素。持水性对食品的嫩度、多汁性等具有重要影响，当蛋白质的持水性在 1.49 mL/g 至 4.71 mL/g 时，更适合用于诸如汤、肉汁等粘性食品及焙烤食品[26]。由表 4 可知，四

个蛋白样品的持水性在 2.00 mL/g-3.19 mL/g。所测样品中，除 SC 外，其余样品的持水性均优于吸油性。4 个蛋白样品中，LC 的持水性、吸油性最好，分别为 3.19 mL/g 及 2.94 mL/g，均显著优于 SR、SC 及 RC，其中 SC 的持水性最差（2.00 mL/g），RC 的吸油性最差（1.49 mL/g）。分析原因，LC 的溶解性较好，提取过程温和，蛋白质的变性程度相对较低，且蛋白质纯度较高，受非蛋白质组分的影响较小，使其具有较高的持水性及吸油性。而 SC、RC 制备过程中强酸及热的存在，使蛋白质变性相对严重，使更多的疏水集团暴露，降低其持水性及吸油性。与 SPI 相比，4 个蛋白样品的吸油性均优于 SPI，且高于 Aletor 等[25]对多种蔬菜叶蛋白吸油性的测定结果，高吸油性可提高蛋白质在冰淇淋、冷鲜肉制品中的应用价值；持水性则显著低于 SPI（$p$<0.05）（表 4）。

### 2.4.3 乳化性测定结果

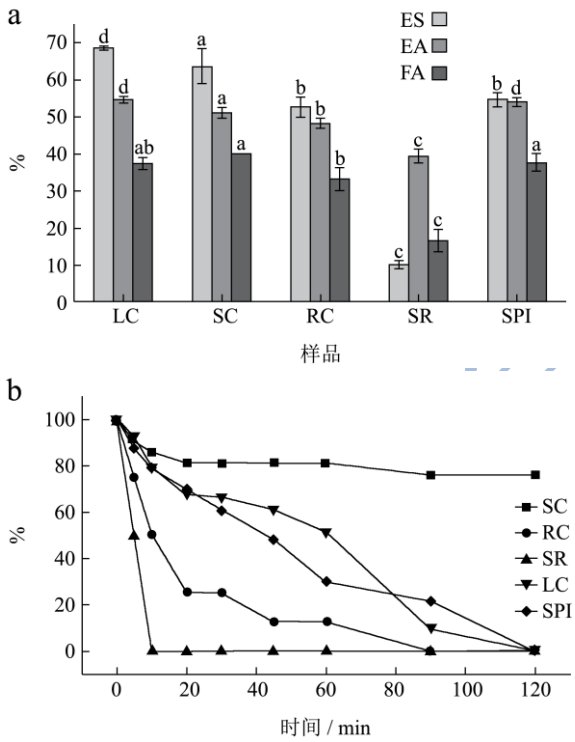



图 3 4 个蛋白样品与 SPI 的乳化性及起泡性测定结果

**Fig.3 Foaming capacities and emulsifying activities of four protein samples and SPI**

注：同一项目中标有不同字母（a~d）的柱形图表示具有显著性差异，$p$< 0.05（n=3），a-乳化活性、乳化稳定性及起泡能力；b-泡沫稳定性。

乳化性是衡量蛋白质促进油-水型乳状液形成能力的指标，与蛋白质的电荷分布、亲水-疏水平衡、溶解性、表面结构等密切相关。由图 3a 及表 4 可知，四个蛋白样品中，LC 的乳化活性及乳化稳定性最优，显著优于其他三个蛋白样品，RC、SR 的较差。分析原因，盐析法得到的 LC 变性程度低，溶解性高，蛋白质在油-水界面吸附量大，增加了油相与水相的相互作用；加热处理使蛋白质严重变性，溶解性降低，聚集体颗粒较大，限制了其在油-水界面的扩散。与 SPI 相比，LC 及 SC 的乳化稳定性均显著优于 SPI，但除 LC 外，其余三个样品的乳化活性均显著低于 SPI。除 SR 外，其余样品的乳化稳定性均优于乳化活性，说明乳化液的强化及稳定主要是由离心前加热引起的，这与 Lamsal[27]的分析结论一致。

### 2.4.4 起泡性及泡沫稳定性测定结果

溶解性的高低是影响起泡性、乳化性的关键因素。由图 3 及表 4 可知，除 SR 外，其余三个蛋白样品的起泡性及乳化性质均与溶解性呈正相关。溶解性较好的 LC 及 SC，其乳化性、起泡性、泡沫稳定性则较好，均优于 RC 及 SR，其中 SC 的 ES 最好，120 min 后仍有泡沫存在；SR 的起泡性及泡沫稳定性最差，起泡性仅为 16.67%（表 4），显著低于其他蛋白样品，且 10 min 后泡沫完全消失。与 SPI 相比，LC 及 SC 的起泡性与 SPI 相似，SC 的泡沫稳定性则优于 SPI，RC、SR 的起泡性及泡沫稳定性则低于 SPI，说明除溶解性的影响外，热处理会使蛋白的表面结构遭到破坏，使其界面活性降低。

### 2.4.5 最小胶凝浓度测定结果

凝胶性可以使食品对水分、脂质等成分产生良好的束缚作用，从而增加其咀嚼感。由表 4 可知，不同制备方法所得样品的最小胶凝浓度有显著差别。SC 的凝胶性最差，SR 次之，说明强酸条件会降低蛋白的凝胶形成能力。与 SPI 相比，4 个蛋白样品胶凝性并无优势，最小胶凝浓度均显著高于 SPI，其中 SC 样品的最小胶凝浓度最大（20.00 g/100 mL），RC 及 LC 的最小（13.33 g/100 mL）。

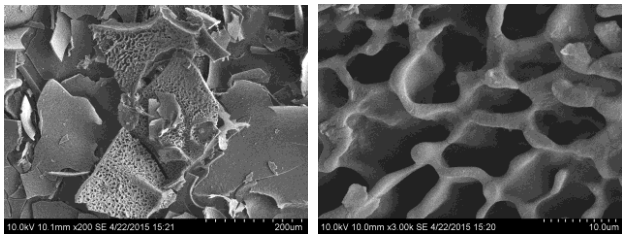
## 2.5 LC 电镜扫描结果

由表 4 可知，4 种蛋白中，LC 的综合功能性质较好，其中吸油性及持水性最优，这与 LC 的微观结构特点密切相关。由图 4 可知，LC 具有典型的蜂巢结构，正面网络均匀分布，孔径约 8 μm，背面则呈平滑的片状分布。这些蜂巢结构具有很好的物理截留作用，从而使 LC 具有较好的持水性及吸油性。

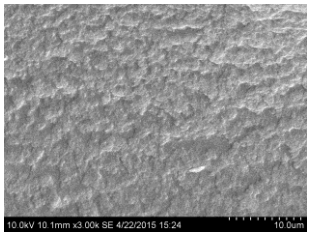
## 3 结论

3.1 用不同絮凝方法浓缩叶蛋白提取液，得出最佳絮凝条件。加热沉淀的最适温度为 75 ℃；酸沉法沉淀叶蛋白的最优 pH 为 3.5；酸热法最佳条件为加热 75 ℃，调 pH 3.0，提取 15 min；盐析法的最佳饱和度

为 65%。酸热法所得蛋白样品的提取率最高，酸沉法、盐析法次之，加热法最低。



a b



c

图 4 LC 电镜扫描图

**Fig.4 SEM images of LC**

3.2 通过对 4 种絮凝方法所得的蛋白样品进行功能性质的对比分析，得知不同沉淀方法对叶蛋白的功能性质有显著影响。其中 LC、SC 的溶解性、起泡性、泡沫稳定性、乳化活性及乳化稳定性最好，均优于 SR 及 RC，其中乳化稳定性、起泡性及泡沫稳定性均优于 SPI，与之相反，SR 的相应性质则最差；与 SPI 相比，四个蛋白样品的吸油性均优于 SPI，其中 LC 的吸油性最好，这除了与样品本身的氨基酸组成及结构有关，其典型的蜂巢结构的物理截留作用也起到重要作用；而持水性、胶凝性则显著低于 SPI；LC 的乳化稳定性显著优于 SPI，乳化活性及起泡性则与 SPI 相当。桑叶蛋白的提取制备，丰富了植物蛋白的资源选择性，提高了桑叶的实用价值；功能性质的对比分析，为桑叶蛋白的选择性应用提供理论依据。4 种桑叶蛋白的溶解性及纯度相对较低，限制了其工业应用范围，后期可以通过改性、提纯等处理提高其溶解性质及纯度。

## 参考文献


[1] 刘青广,田丽萍,薛琳,等.苜蓿最佳生育期提取叶蛋白的研究[J].现代食品科技,2005,21(1):53-54
LIU Qing-guang, TIAN Li-ping, XUE Lin, et al. Studies on extraction of leaf proteins at the different period of alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 21(1): 53-54

[2] Ningappa M B, Srinivas L. Purification and characterization of 35 kDa antioxidant protein from curry leaves (*Murraya koenigii L.*) [J]. Toxicology in Vitro, 2008, 22(3): 699-709

[3] Hew C S, Gam L H. Proteome analysis of abundant proteins extracted from the leaf of *Gynura procumbens* (Lour.) Merr [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165(7-8): 1577-1586

[4] 谢正军.苜蓿叶蛋白和酶法制备抗氧化肽的研究[D].无锡:江南大学,2009
XIE Zheng-jun. Study on the alfalfa leaf protein and preparation of antioxidant peptides by enzymic hydrolyzing [D]. Wuxi: Jiang Nan University, 2009

[5] GÜVEN İ. Effect of species on nutritive value of mulberry leaves [J]. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2012, 18(5): 865-869

[6] Kandylis K, Hadjigeorgiou I, Harizanis P. The nutritive value of mulberry leaves (*Morus Alba*) as a feed supplement for sheep [J]. Tropical Animal Health and Production, 2009, 41(1): 17-24

[7] Alkirshi R A, Alimon A R, Zulkifli I, et al. Utilization of mulberry leaf meal (*Morus alba*) as protein supplement in diets for laying hens [J]. Italian Journal of Animal Science, 2010, 9(3): 265-267

[8] AlKirshi R A, Alimon A, Zulkifli I, et al. Nutrient digestibility of mulberry leaves *(Morus alba)* [J]. Italian Journal of Animal Science, 2013, 12(2): 219-221

[9] Vu C C, Verstegen M W A, Hendriks W H, et al. The nutritive value of mulberry leaves (*Morus alba*) and partial replacement of cotton seed in rations on the performance of growing Vietnamese cattle [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2011, 24(9) : 1233-1242

[10] Jaime S C, Omar C M, Efren R B, et al. Effect of increasing levels of white mulberry leaves (*Morus alba*) on ruminal dry matter degradability in lambs [J]. Tropical Animal Health and Production, 2011, 43(5): 995-999

[11] 江洪波,雷挺.桑叶叶蛋白提取工艺的研究[J].农产品加工,2007,12:19-21
JIANG Hong-bo, LEI Ting. Study on the technology of extracting leaf protein concentrates from *Morus Alba* Leaves [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2007, 12: 19-21

[12] 王桃云,王金虎.桑叶叶蛋白提取工艺的研究[J].食品研究与开发,2006,27(2): 79-81
WANG Tao-yun, WANG Jin-hu. The optimization for extraction technique of leaf protein concentrate (LPC) from *Morus Alba L.* [J]. Food Research and Development, 2006, 27(2): 79-81

[13] 屈红森,游朵,吴琼英,等.用发酵法制备桑叶蛋白的工艺优

化和产品的体外消化率测定[J].蚕业科学,2012,38(5):885-892
QU Hong-sen, YOU Duo, WU Qiong-ying, et al. Optimization of technology for preparation of mulberry leaf protein by fermentation and determination of in vitro digestibility of the prepared product [J]. Science of Sericulture, 2012, 38(5): 885-892

[14] 王芳,刘华,董梅红.桑叶蛋白的功能特性研究[J].食品科学,2010,31(11): 81-86
WANG Fang, LIU Hua, DONG Mei-hong. Functional properties of proteins from mulberry leaves [J]. Food Science, 2010, 31 (11): 81-86

[15] Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, et al. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type [J]. Food Chemistry, 2007, 102(4): 1317-1327

[16] 袁德保.大豆蛋白热聚集行为及其机理研究[D].广州:华南理工大学,2010
YUAN De-bao. Heat-induced aggregation of soy protein and its mechanism [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2010

[17] Khattab R Y, Arntfield S D. Functional properties of raw and processed canola meal [J]. Food Science and Technology, 2009, 42(6): 1119-1124

[18] Ogunwolu S O, Henshaw F O, Mock H P, et al. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale L.*) nut [J]. Food Chemistry, 2009, 115(3): 852-858

[19] Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Martin-Sánchez A, et al. Chemical, physico-chemical and functional properties of pomegranate (*Punica granatum L.*) bagasses powder co-product [J]. Journal of Food Engineering, 2012, 110(2): 220-224

[20] Guan X, Yao H, Chen Z, et al. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin [J]. Food Chemistry, 2007, 101(1): 163-170

[21] Lawal O S, Adebowale K O, Adebowale Y A. Functional properties of native and chemically modified protein concentrates from bambarra groundnut [J]. Food Research International, 2007, 40(8): 1003-1011

[22] 王芳,乔璐,张庆庆,等.桑叶蛋白氨基酸组成分析及营养价值评价[J].食品科学,2015,36(1): 225-228
WANG Fang, QIAO Lu, ZHANG Qing-qing, et al. Amino acid composition and nutritional evaluation of mulberry leaves [J]. Food Science, 2015, 36(1): 225-228

[23] Guven I. Effect of species on nutritive value of mulberry leaves [J]. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 2012, 18(5): 865-869

[24] 刘军,肖更生,廖森泰,等.不同品种桑叶的营养组成与品质评价[J].现代食品科技,2011,27(12):1520-1523
LIU Jun, XIAO Geng-sheng, LIAO Sen-tai, et al. Nutrients analysis and quality evaluation of mulberry leaves from different sources [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(12): 1520-1523

[25] 柳斌,席亚丽,穆峰海,等.不同处理条件对苜蓿叶蛋白凝聚效果的研究[J].草业科学,2010,27(1):114-118
LIU Bin, XI Ya-li, MU Feng-hai, et al. Study on aggregation effect of alfalfa leaf protein in different treatment conditions [J]. Pratacultural Science, 2010, 27(1): 114-118

[26] Aletor O, Oshodi A A, Ipinmoroti K. Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates [J]. Food Chemistry, 78(1), 63-68

[27] Lamsal B P, Koegel R G, Gunasekaran S. Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins [J]. Food Science and Technology, 2007, 40(9): 1520-1526