

# 裸燕麦麸皮蛋白的提取工艺及理化性质研究

张民, 王婵, 毕华, 张丽丽

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 采取裸燕麦麸皮为原料, 优化了蛋白提取的工艺条件, 并测定了蛋白质的等电点、黏度、热力学性质及原子力形貌观察。在裸燕麦麸皮的蛋白提取工艺中, 以 NaOH 浓度、料液比、提取时间、提取次数、提取温度为单因素进行实验, 并用考马斯亮蓝法对蛋白含量进行测定, 根据单因素实验结果做正交实验, 得蛋白质的最佳提取条件为 0.15% 的 NaOH 溶液, 料液比 1:8, 50 °C 提取 4 次, 每次提取 20 min。该条件下, 蛋白质的提取率为 74.43%, 所提取的蛋白质的等电点为 4.8。特性黏度为 10.22 g/mL, 变性温度为 61.49 °C, 原子力显微镜观察呈球状颗粒均匀分布, 部分分子抱团聚集, 高度为 4nm 左右, 最高处可达到 19 nm。

**关键词:** 燕麦麸皮; 蛋白质; 等电点; 黏度

文章编号: 1673-9078(2012)11-1495-1499

## Study on Extraction of Oat Bran Protein and the Physicochemical Property of Oat Bran Protein

ZHANG Min, WANG Chan, BI Hua, Zhang Li-Li

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457)

**Abstract:** The optimization of oat bran protein of the laboratory condition was investigated, and the isoelectric point was analyzed. coomassie blue staining was used as detection method of protein A serial orthogonal experiment was designed and best extraction process was as follows: concentration of NaOH 0.15%, solid-liquid ratio 1:8, extraction time 20 min, extraction times 4, and extraction temperature 50 °C. The extraction was 74.43%, and the isoelectric point was discovered to be  $pI=4.8$ . The Intrinsic viscosity was 10.22 g/mL, and its denaturation temperature was found to be 61.49 °C. AFM scanning atlas indicated that the protein were globular and of uniform size. The three-dimensional graphics showed that the height is about 19 nm.

**Key words:** oat bran; protein;  $pI$ ; viscosity

燕麦, 又名雀麦、野麦, 是一种低糖、高营养、高能食品。现代营养学和医学研究表明, 燕麦含有多种活性营养成分, 具有降血脂、降血糖、减肥和美容等多种功能<sup>[1-3]</sup>。燕麦营养成分涉及燕麦的蛋白质、脂肪、淀粉、膳食纤维、抗氧化物、维生素和矿物质等, 燕麦品种、产地及气候环境变化均会对燕麦营养乃至功能成分产生影响<sup>[4-5]</sup>。燕麦蛋白中的必需氨基酸比重较高, 符合 FAO/WHO 提出的参考蛋白模式<sup>[6]</sup>, 是一种营养全面的优质蛋白质。本文旨在研究燕麦蛋白的提取工艺及其理化性质的研究, 为其生产应用提供基础参数。

### 1 材料与方法

收稿日期: 2012-06-18

基金项目: 国家自然科学基金(31171781); 天津科技大学学校基金(20100212)

作者简介: 张民(1972-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品化学与食品营养

#### 1.1 原料

裸燕麦麸皮(河北省张北县燕北绿色保健食品厂); 氢氧化钠; 盐酸; 考马斯亮蓝试剂; 石油醚等试剂均为分析纯。

#### 1.2 主要仪器设备

JD1000-2 电子天平, 沈阳龙腾; SY-2-4 水浴锅, 天津欧诺仪器仪表有限公司; 752 型紫外-可见分光光度计, 上海青华科技仪器有限公司; DH-101 电热恒温鼓风干燥箱, 天津市中环实验电炉有限公司; DSC-60A 差示量热扫描仪, 日本岛津公司; JSPM-5200 型原子力显微镜, 日本 JEOL 公司; 乌氏黏度计。

#### 1.3 工艺流程

碱法提取裸燕麦麸皮蛋白的工艺流程为: 麸皮→过筛(200目)→石油醚脱脂→碱液浸提→离心分离→上清液→等电点沉降→离心→干燥→燕麦麸皮蛋白

#### 1.4 试验方法

##### 1.4.1 裸燕麦麸皮中蛋白质含量的测定

裸燕麦麸皮中的蛋白质含量测定按照 GB 5009.5

-2010<sup>[8]</sup>。

#### 1.4.2 裸燕麦麸皮蛋白提取的单因素实验

##### 1.4.2.1 NaOH 浓度单因素实验

分别称取 3 g 裸燕麦麸皮,分别配制浓度为 0.05%、0.10%、0.15%、0.20%、0.25%、0.30% 的 NaOH 溶液,料液比选取 1:10,在 50 °C 下,提取 30 min,提取 1 次,根据蛋白提取质量绘制单因素图。

##### 1.4.2.2 提取温度单因素实验

分别称取 3 g 裸燕麦麸皮,料液比选取 1:10,NaOH 溶液浓度为 0.15%,在温度分别为 30 °C、40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C 下,提取 30 min,提取 1 次,根据蛋白提取质量绘制单因素图。

##### 1.4.2.3 料液比单因素实验

分别称取 3 g 裸燕麦麸皮,NaOH 溶液浓度为 0.15%,料液比分别选取 1:6、1:8、1:10、1:12、1:14,于 50 °C 下提取 30 min,提取 1 次,根据蛋白提取质量绘制单因素图。

##### 1.4.2.4 提取时间单因素实验

分别称取 3 g 裸燕麦麸皮,NaOH 溶液浓度为 0.15%,料液比选取 1:10,于 50 °C 下分别提取 20 min、40 min、60 min、80 min、100 min,各提取 1 次,根据蛋白提取质量绘制单因素图。

#### 1.4.3 裸燕麦麸皮蛋白提取的正交实验设计

由单因素实验结果设计选取正交实验因素水平表(见下表 1),做  $L_{16}(4^5)$  实验。

#### 1.4.4 裸燕麦麸皮蛋白等电点测定

裸燕麦麸皮的等电点测定采用酸沉淀法<sup>[9-10]</sup>。分别量取 20 mL 蛋白粗提液,取 6 等份,用 1 mol/L 的盐酸溶液将 pH 值分别调至 3、4、5、6、7、8;放于 4 °C 下静置 4 h。取出于 10000 r/min 离心 30 min,测沉淀质量。根据上述研究结果,进一步对 pH 为 3.6~5.6 的蛋白质沉淀情况进行细化研究,操作方法同上。

#### 1.4.5 裸燕麦麸皮蛋白的黏度测定

配制初始浓度为  $C_1$  的蛋白溶液,选取内径 0.47 mm 的乌氏黏度计,精确量取 7 mL 加入,在 25 °C 水浴中下保温 15 min,测定溶液流出时间,记录液面降至两刻度线的时间差  $T_1$ ,重复测量 3 次。然后依次向其中加入 3.5 mL 溶剂、3.5 mL 溶剂、7 mL 溶剂,浓度依次稀释为  $2/3 C_1$ 、 $1/2 C_1$ 、 $1/3 C_1$ ,分别测定其溶液流出时间  $T_2$ 、 $T_3$ 、 $T_4$ ,再测定溶剂的留出时间,记为  $T_0$ ,计算不同浓度的相对黏度、增比黏度和比浓黏度。以比浓黏度为纵坐标,溶液黏度为横坐标作图,得到回归曲线,通过计算得到裸燕麦麸皮蛋白的特性黏度。

将乌氏黏度计分别置于 20 °C、30 °C、40 °C、

50 °C 下保温 15 min,测定溶液的运动黏度。

$$v=Kt \quad (1)$$

注:  $v$ : 运动黏度;  $K$ : 常数-0.005466 mm<sup>2</sup>/s<sup>2</sup>;  $t$ : 时间。

向蛋白溶液中添加 NaCl 和蔗糖,分别调其浓度为 0.1 mol/L、0.3 mol/L、0.5 mol/L、0.7 mol/L、0.9 mol/L,在 25 °C 下测定其运动黏度。

#### 1.4.6 裸燕麦麸皮蛋白的热力学性质测定

采用差示扫描量热法(DSC)测定其热力学性质。准确称取蛋白 2~3 mg 于固体坩埚中,压片。升温速率 5 °C/min,扫描范围为 25 °C~200 °C,得 DSC 曲线。以空固体坩埚为空白对照。

#### 1.4.7 裸燕麦麸皮蛋白的原子力显微镜形貌观察

AFM 制样:称取 1 mg 的裸燕麦麸皮蛋白溶于 10 mL 的溶剂中,充分搅拌溶解,4 °C 放置过夜,使样品均匀分散。取 3  $\mu$ L 滴于新鲜解离的云母片上,空气中干燥。滴加无水乙醇固定,防止蛋白从盖玻片表面脱附,样品干燥后进行 AFM 观察。

AFM 观测:采用日本 JEOL 公司的 JSPM-5200 型原子力显微镜。分辨率:以云母表面晶格为准,XY 方向 2  $\text{\AA}$ ,Z 方向 <0.5  $\text{\AA}$ ;针尖逼近行程及精度:行程  $\geq 20$  nm,精度  $\leq 0.1$   $\mu$ m。探针为 Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>(弹性系数 7.5 N/m),原子力显微镜微悬臂长 110 $\pm$ 5  $\mu$ m,图像均在 Tapping 模式下获得,共振频率为 1 KHz。所有实验均在大气压及常温(20°C)下完成,湿度为 50%~60%。扫描最大范围为 2.0  $\mu$ m $\times$ 2.0  $\mu$ m。

## 2 结果与讨论

### 2.1 裸燕麦麸皮中蛋白质的含量

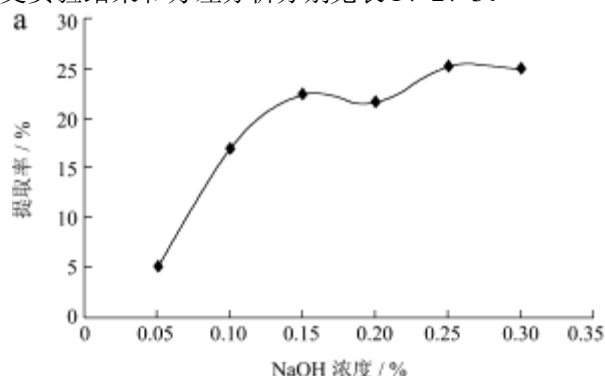
裸燕麦麸皮中蛋白质的含量为 16.7%。

### 2.2 裸燕麦麸皮中蛋白提取单因素实验

由单因素实验结果选取 NaOH 浓度、料液比、提取温度、提取次数的相应水平做正交实验。

### 2.3 裸燕麦麸皮中蛋白提取正交实验结果

裸燕麦麸皮蛋白提取的正交实验因素水平表、正交实验结果和方差分析分别见表 1、2、3。



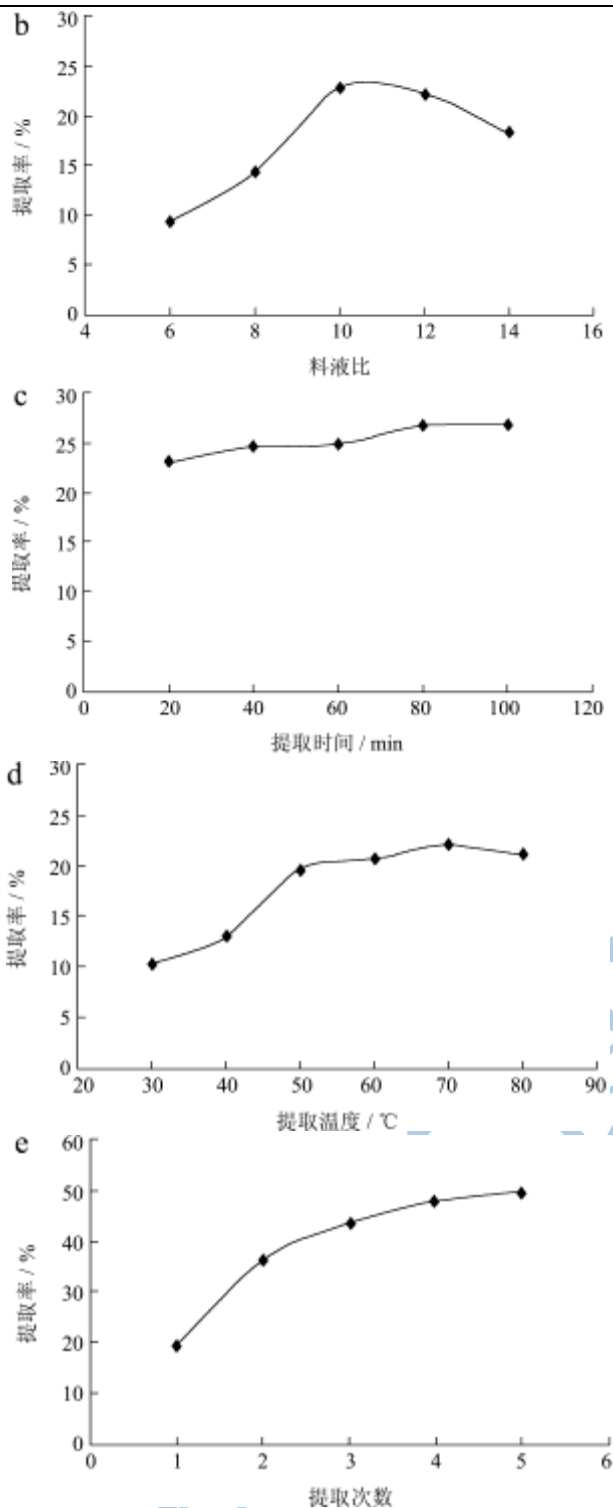


图1 燕麦麸皮蛋白提取单因素实验结果

Fig.1 The single factor experiment result of extraction on oat bran protein

注：a-NaOH 浓度单因素实验；b-料液比单因素实验；c-提取时间单因素实验；d-提取温度单因素实验；e-提取次数单因素实验。

由表 2 的直观分析可以看出各因素的影响顺序依次为：提取次数>NaOH浓度>温度>料液比。

表 1 燕麦麸皮蛋白提取的正交实验因素表

Table 1 The orthogonal factors level table of extraction on oat bran protein

水平	A (NaOH 浓度/%)	B (料液 比)	C (温度 /°C)	D (提取 次数)	E 空白
1	0.15	1: 8	40	1	1
2	0.2	1:12	50	2	2
3	0.1	1:14	70	4	3
4	0.05	1:10	60	3	4

表 2 燕麦麸皮蛋白提取正交实验结果

Table 2 The orthogonal experimental results of extraction on oat bran protein

实验号	A	B	C	D	E	提取率/%
1	1	1	1	1	1	33.49
2	1	2	2	2	2	50.11
3	1	3	3	3	3	74.21
4	1	4	4	4	4	72.02
5	2	1	2	3	4	63.39
6	2	2	1	4	3	67.23
7	2	3	4	1	2	44.16
8	2	4	3	2	1	50.05
9	3	1	3	4	2	36.03
10	3	2	4	3	1	51.79
11	3	3	1	2	4	38.78
12	3	4	2	1	3	18.76
13	4	1	4	2	3	55.14
14	4	2	3	1	4	31.07
15	4	3	2	4	1	58.16
16	4	4	1	3	2	67.78
K <sub>1</sub>	57.46	47.01	51.82	31.87	48.37	
K <sub>2</sub>	56.21	50.05	47.60	48.52	49.52	
K <sub>3</sub>	36.34	53.82	47.84	64.29	53.83	
K <sub>4</sub>	53.04	52.15	55.77	58.36	51.31	
R	21.12	6.81	8.17	32.42	5.46	

表 3 燕麦麸皮蛋白提取正交实验方差分析表

Table 3 The orthogonal experimental analysis if variance of extraction on oat bran protein

来源	平方和	自由度	均方和	F 值	显著性
A	1150.923	3	383.6409	16.93	*
B	103.5806	3	34.52687	1.52	NO
C	179.0555	3	59.68518	2.63	NO
D	2410.913	3	803.6375	35.47	**
误差	67.96617	3	22.65539		

注：\*\*：P < 0.01 F<sub>0.01</sub>(3,3)=29.5；\*：P < 0.05 F<sub>0.05</sub>(3,3)=9.28。

由方差分析可以看出提取次数对蛋白的提取有极显著性影响, NaOH 浓度有显著性影响。结合直观分析和方差分析可以得出最优组合为: D<sub>3</sub>A<sub>1</sub>C<sub>2</sub>B<sub>1</sub>。即为 NaOH 浓度为 0.15%, 提取次数: 4 次, 温度: 50 ℃; 提取时间: 20 min, 料液比: 1:8。

由于该正交实验没燕麦麸皮进行验证实验, 得到蛋白提取率为 74.43%, 符合正交实验结果。

#### 2.4 裸燕麦麸皮蛋白等电点测定结果

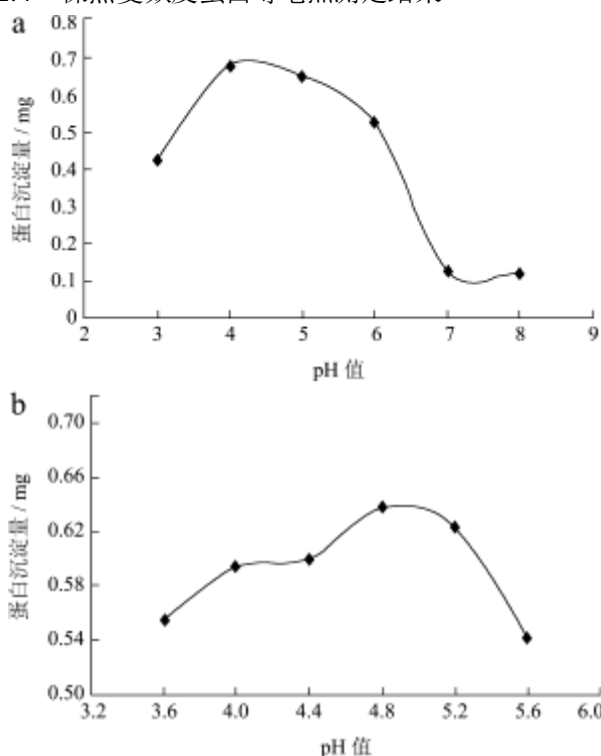


图 2 燕麦麸皮蛋白等电点测定

Fig.2 The PI of oat bran protein

注: a-pH 值 3~8 燕麦麸皮蛋白等电点图; b-pH 值 3.6~5.6 燕麦麸皮蛋白等电点图。

在等电点时, 蛋白质分子以两性离子形式存在, 其分子净电荷为零(即正负电荷相等), 此时蛋白质分子颗粒在溶液中因没有相同电荷的相互排斥, 分子相互之间的作用力减弱, 其颗粒极易碰撞、凝聚而产生沉淀, 所以蛋白质在等电点时, 其溶解度最小, 最易形成沉淀物。测得裸燕麦麸皮蛋白的等电点为 4.8。

#### 2.5 裸燕麦麸皮蛋白的黏度测定结果

由裸燕麦麸皮蛋白的特性黏度实验得回归方程  $y=2792.1x+10.222$ ,  $R^2=0.9977$ 。裸燕麦麸皮的特性黏度为 10.22 g/mL。

从分子运动来看, 流体的粘滞力主要来自分子间相互的吸引力, 粘滞力越小的流体其流动性越好。由于添加蔗糖和 NaCl, 蛋白分子运动空间减小, 粘滞力增大, 运动黏度逐渐增大, 所以运动黏度随着 NaCl 和蔗糖离子强度的增加而逐渐增加, 而蔗糖的分子量大于

NaCl, 蔗糖对蛋白的黏度影响较大; 温度越高, 分子运动加剧, 静摩擦力减小, 随着温度的升高, 黏度逐渐减小。

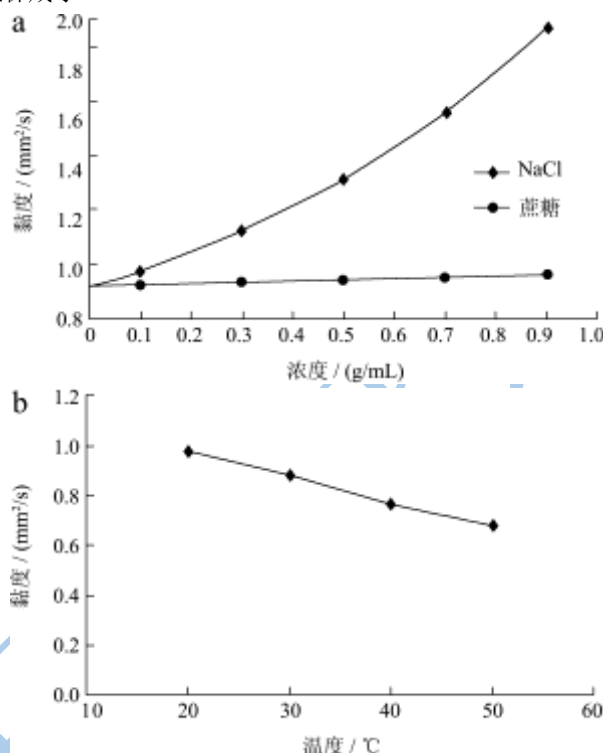


图 3 燕麦麸皮蛋白黏度的测定

Fig.3 The viscosity of oat bran protein

注: a-不同离子强度下裸燕麦麸皮蛋白的黏度曲线; b-不同温度下裸燕麦麸皮蛋白的黏度。

#### 2.6 裸燕麦麸皮蛋白的 DSC 测定结果

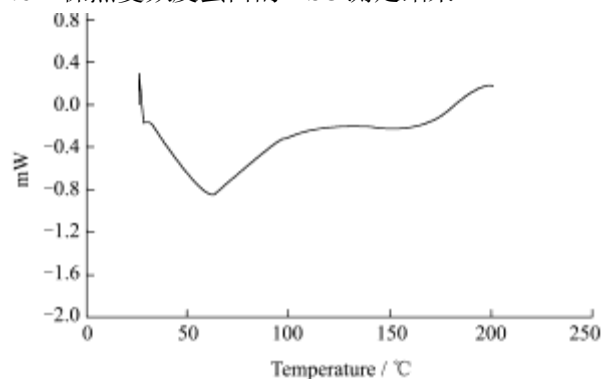


图 4 燕麦麸皮蛋白 DSC 测定

Fig.4 The DSC of oat bran protein

蛋白质是具有一定氨基酸序列的多肽链相互缠绕而形成其所特有的空间构象, 热是蛋白质最普通的物理因素, 由于受到外界因素温度的影响, 随着温度的升高, 氢键断裂, 分子缠绕破坏, 空间结构发生变化, 从而蛋白质发生变性。由裸燕麦麸皮蛋白的 DSC 图中看出, 蛋白的 T<sub>p</sub> 为 61.49 ℃, T<sub>o</sub> 为 66.28 ℃, T<sub>m</sub> 为 71.86 ℃, ΔH 为 2.07 J/g。

#### 2.7 裸燕麦麸皮蛋白的 AFM 测定结果

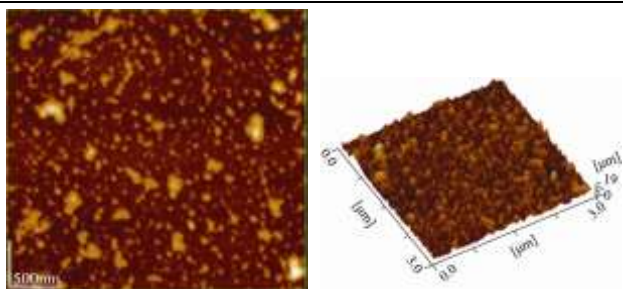


图5 燕麦麸皮蛋白的原子力显微镜照片

Fig.5 The AFM of oat bran protein

由原子力显微镜形貌观察可以看出,燕麦麸皮蛋白在云母片上呈球状颗粒,且分布均匀,有部分分子抱团形成聚集体,高度为4 nm左右,最高处可达到19 nm。

### 3 结论

采用国标测得裸燕麦麸皮中蛋白质含量为16.7%;采用碱提的工艺提取燕麦麸皮中蛋白的最佳工艺条件为:NaOH浓度为0.15%,提取次数:4次,提取温度:50℃;提取时间:20 min,料液比:1:8;燕麦麸皮中的蛋白质等电点为4.8;特性黏度为10.22 g/mL,其运动黏度均随着温度的升高逐渐降低,随着NaCl和蔗糖的添加而逐渐增大,且蔗糖对其影响较大;裸燕麦麸皮蛋白的变性温度为61.49℃,其焓值为2.07 J/g;由

AFM图看出蛋白呈球状颗粒均匀分布,高度为4 nm左右,最高处可达到19 nm。

### 参考文献

- [1] 孙冀平.燕麦中 $\beta$ -葡聚糖研究进展[J].粮食与油脂,2000,2:15-16
- [2] 何照范.保健食品化学及其检测技术[M].北京:中国轻工业出版社,1999
- [3] 于长青.麦胚功能性成分及其综合利用[J].中国畜产与食品,2001,1:46-50
- [4] Mohamed A, Biresaw G. Oats protein isolate: thermal, rheological, surface and functional properties [J]. Food Research International, 2008, 32: 43-50
- [5] 萧安民.美国燕麦及其制品[J].粮食与油脂,1994,1:204-208
- [6] 周建新.大有开发前途的燕麦保健食品[J].食品科技,1999,6:33-36
- [7] 王文平,郭祀远,李琳,等.考马斯亮蓝法测定野木瓜多糖中蛋白质的含量[J].食品研究与开发,2008,29(1):115-117
- [8] 食品中蛋白质的测定,GB/T GB 5009.5-2010.
- [9] 翟爱华,季娜,刘恒芝.燕麦分离蛋白提取工艺研究[J].食品科学,2006,12:1-3
- [10] 董银卯,冯明珠,赵华,等.燕麦麸蛋白质等电点测定及其稀碱法提取工艺优化的研究[J].食品科技,2007,3:1-4