

长白山核桃球蛋白的提取、分离纯化及其功能性研究

王晓飞^{1,2}, 闵伟红^{1,2}, 朱运明^{1,2}, 刘春雷^{1,2}, 吴丹^{1,2}, 崔玲玉^{1,2}, 刘景圣^{1,2}

(1. 吉林农业大学食品科学与工程学院, 吉林长春 130118)

(2. 小麦和玉米深加工国家工程实验室, 吉林长春 130118)

摘要: 球蛋白是长白山核桃 (*Juglans mandshurica* Maxim) 种仁贮藏蛋白主要组分之一, 也是深度开发和利用核桃蛋白资源深加工产品的主要成分。在采用改进的 Osborne 法提取核桃球蛋白并通过离子交换层析纯化球蛋白的基础上, 初步研究其结构特性后, 将其功能性质与大豆分离蛋白做对比, 进行全面分析, 为其在食品加工中的应用提供理论依据。结果表明: 制备的球蛋白含量为 80.71%, 阴离子交换层析图谱出现 4 个峰, 经 SDS-PAGE 分析其相对分子量集中在 14.3 ku 和 27.0 ku, 18.0~21.0 ku, 30.0 ku 和 37.0 ku, 30.0 ku、37.0 ku 以及 44.3~59.0 ku 区间; 必需氨基酸含量基本符合 FAO/WHO 成人推荐标准; 差示扫描量热 (DSC) 图谱分析表明 JMG 干粉出现两个吸热峰, 变性温度分别为 98.08 °C 和 155.33 °C, 对应焓值为 13.06 J/g、764.80 J/g; 傅立叶红外光谱 (FT-IR) 分析其二级结构, 显示 JMG 以 α -螺旋为主; 除起泡性和持水性明显低于大豆分离蛋白 (SPI) 外, JMG 其它功能性质均与 SPI 基本相当。

关键词: 核桃球蛋白; 提取; 分离纯化; 功能性质

文章编号: 1673-9078(2015)4-234-241

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.038

Extraction and Purification of Globulin from *Juglans mandshurica* Maxim and Characterization of Its Functional Properties

WANG Xiao-fei^{1,2}, MIN Wei-hong^{1,2}, ZHU Yun-ming^{1,2}, LIU Chun-lei^{1,2}, WU Dan^{1,2}, CUI Ling-yu^{1,2},
LIU Jing-sheng^{1,2}

(1. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

(2. National Engineering Laboratory on Wheat and Corn Further Processing, Changchun 130118, China)

Abstract: Globulin is a major protein component of walnuts (*Juglans mandshurica* Maxim) from the Changbai mountain. The walnut is rich in proteins; therefore, it must be further developed and processed for appropriate utilization of the protein resources. Walnut globulin was extracted by optimized Osborne method, and purified by ion-exchange chromatography. Walnut globulin was subjected to a preliminary structural analysis; subsequently, its functional properties were comprehensively compared (and analyzed) against those of soy protein isolates (SPI), in order to provide a theoretical basis for its application in food processing. The prepared globulin contained 80.71% protein content. Anion-exchange chromatography showed four peaks; the relative molecular weights corresponding to these peaks were concentrated in the ranges 14.3~27.0 kU, 18.0~21.0 kU, 30.0~37.0 kU, and 44.3~59.0 kU, as determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The essential amino acid content of the prepared globulin conformed to the Adult Standard Recommendation of the FAO/WTO. The differential scanning calorimetry (DSC) spectrogram of the prepared globulin revealed two endothermic peaks, indicating denaturation temperatures of 98.08 °C and 155.33 °C, corresponding to enthalpy values of 13.06 J/g and 764.80 J/g, respectively. The Fourier transform-infrared (FT-IR) spectrum revealed that the prepared globulin mainly consisted of alpha helical secondary structures. The functional properties of the prepared globulin, excluding foamability and water absorption (which were significantly lower than those of SPI), were observed to be comparable to those of SPI.

Key words: walnut globulin; extraction; purification; functional properties

长白山核桃(*Juglans mandshurica* Maxim)又名核

收稿日期: 2014-08-07

基金项目: 国家“863”计划项目(2013AA102206)

作者简介: 王晓飞(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物蛋白工程

通讯作者: 闵伟红(1971-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事发酵工程、

粮油科学与深加工技术研究

桃楸, 是重要的药食同源植物, 主要分布于小兴安岭、完达山脉、长白山区及辽宁东部^[1]。核桃种仁富含不饱和脂肪酸、蛋白质、糖类、维生素、矿物质, 还有少量酚酸和黄酮等, 具有补气养血、乌发健脑等功能, 因其高营养价值备受人们喜爱, 是一种具有经济、食用及开发价值的植物蛋白^[2]。

目前核桃加工以榨油为主,核桃油的副产物脱脂核桃粕中蛋白含量高达 53.89%,富含 18 种氨基酸,但针对脱脂核桃粕的加工利用较少,传统上这些副产物大多作为动物饲料使用,附加值和利用率均较低,有待进一步开发^[3]。研究表明在肉制品中添加核桃粕,能够有效减少消费者的脂肪摄入。Cofrades 等^[4]研究添加天然和预加热脱脂核桃粕对肉制品理化性质、乳化性和流变特性的影响。

国内对核桃 (*Juglans regia* L) 蛋白的研究集中在分离蛋白的提取及其功能性质的测定,杜蕾蕾等^[5]利用酶法结合碱溶酸沉法制备冷榨核桃蛋白,并对其功能性质进行研究。国外研究还包括核桃过敏原的研究, Mikhael 等^[6]在克隆和表达核桃 11S 球蛋白的基础上,研究其与榛子、腰果和花生提取物的交叉反应; Teuber 等^[7]成功克隆和表达 7S 球蛋白,并研究其免疫原性及交叉反应。国内外对中国的另一大类胡桃属品种长白山核桃 (*Juglans mandshurica* Maxim) 蛋白的研究相对较少。

研究表明核桃球蛋白主要组分 7S、11S 球蛋白能引起严重的过敏反应,具有重要的探索价值。本试验在制备长白山核桃球蛋白的基础上,初步研究其结构性质之后,对比分析了核桃球蛋白和大豆分离蛋白的功能性质,为脱脂核桃粕的深度开发利用以及长白山核桃蛋白的研究提供基础数据和参考,具有积极的现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

脱脂核桃粕由敦化广晟生物油脂有限公司提供;大豆分离蛋白购自杜邦有限公司,蛋白含量为 85.34%; DEAE-Sepharose FF, GE-Healthcare 公司; 0.22 μm 聚醚砜膜, GE-Healthcare 公司; β-巯基乙醇、丙烯酰胺、10% SDS、溴酚蓝均购自 Sigma 公司; 其余均为国产分析纯。

1.2 主要仪器设备

AKTA Pure 蛋白质纯化仪, GE-Healthcare 公司; XK16/20 层析柱, GE-Healthcare 公司; UV-1700 紫外可见分光光度计,日本岛津公司; SPECTRA-MAX190 酶标仪,美国 Molecular Devices 公司; Z36HK 型高速冷冻离心机,德国 HERMLE 公司; L-8900 型氨基酸自动分析仪,日本日立公司; SE260 型蛋白电泳仪, GE Healthcare 公司; DSC204F1 差示扫描量热仪,德国 NETZSCH 公司; Nicolet 5700 傅立叶红外光谱仪,

美国尼高力公司。

1.3 试验方法

1.3.1 核桃球蛋白提取

JMG 根据改进的 Osborne 法^[8]制备:将脱脂粉与蒸馏水 1:10 (m/V) 混合,搅拌 30 min, 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清液。对沉淀进行三次上述操作,收集沉淀加入 10 倍体积的 1 mol/L NaCl PBS (50 mmol/L KH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 7.5), 均质 2 min, 磁力搅拌 1 h, 10000 r/min 离心 15 min, 取上清液加入硫酸铵溶液至饱和度为 50%, 冰浴搅拌, 低温静置 3 h, 10000 r/min、4 °C 离心 30 min, 弃上清液。沉淀溶于 5 倍体积提取液, 10000 r/min、4 °C 离心 10 min, 去除沉淀, 收集上清液于 4 °C、蒸馏水透析, 冷冻干燥获得 JMG。

1.3.2 阴离子交换层析纯化核桃球蛋白

用 PBS 平衡层析柱。JMG 在 PBS 中透析 1 h 后上柱。用 PBS 冲洗柱子后, 20 倍柱体积 0~0.6 mol/L PBS 进行线性梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 5 mL/管分管收集。收集各峰组分, 蒸馏水透析, 冷冻干燥。SDS-PAGE 分析各组分。纯化过程均在 4 °C 冷室进行。

1.3.3 SDS-PAGE 检测

依据 Kasran 等^[9]方法进行 SDS-PAGE, 浓缩胶 5%, 分离胶 12%, 样品浓度为 1 mg/mL, 上样量为 20 μL, 电压 100 V, 电泳时间 2 h。

1.3.4 化学成分测定

灰分依据 GB 5009.4-2010^[10]测定; 蛋白含量依据 GB 5009.5-2010^[11]测定, 氮换算为蛋白质的系数为 6.25; 总糖含量依据 Wu 等^[12]方法测定。

1.3.5 差示扫描量热 (DSC) 分析

DSC 依据 Zhu 等^[13]方法测定。取蛋白粉末约 5 mg, 密封于样品盘中, 进行 DSC 扫描, N₂ 流量 40 mL/min, 扫描升温范围: 0~250 °C, 扫描升温速率: 10 °C/min。

1.3.6 傅立叶红外光谱分析

红外光谱依据 Choi 等^[14]方法扫描。将干燥的 2.0(±0.1) mg 蛋白样品与 200 mg 纯 KBr 研细均匀, 采用傅立叶变换红外光谱仪在 4000~400 cm⁻¹ 波数范围测定吸收光谱。扫描次数 128 次, 分辨率 4 cm⁻¹。

1.3.7 核桃球蛋白功能性质测定

1.3.7.1 氨基酸含量测定

氨基酸含量测定依据 GB/T 18246-2000^[15]测定。氨基酸评分计算如下:

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

注: 参考蛋白质的每克氨基酸含量: 2007 年 FAO/WHO

儿童(2-5岁)推荐含量。

1.3.7.2 溶解性测定

溶解性依据 Wu 等^[12]方法测定。精确称取 1.00 mg 样品溶于 1 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液中, pH 范围 3~10。

1.3.7.3 持水性/持油性测定

精确称取 1.00 g 蛋白样品, 加入 10 mL 蒸馏水(或纯大豆油), 依据 Vioque 等^[16]方法测定持水性/持油性。

1.3.7.4 起泡性和泡沫稳定性测定

起泡性和泡沫稳定性依据 Cano-Medina 等^[17]方法测定。样品蛋白含量均为 10 mg/mL, pH 范围 3~10。

1.3.7.5 乳化性和乳化稳定性测定

乳化性和乳化稳定性依据 Cano-Medina 等^[17]方法测定。样品蛋白含量均为 10 mg/mL, pH 范围 3~10。

1.3.8 统计分析

应用 Origin 8.5、Omic 32 软件对试验数据进行统计分析, 所有试验为三个平行。差异显著性采用 one way ANOVA 方法分析, 极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($0.01 < P < 0.05$) 分别用 ** 和 * 表示。

2 结果与讨论

2.1 核桃球蛋白化学成分分析

表 1 JMG 化学成分

Table 1 Chemical composition of *Juglans mandshuica* Maxim globulin (JMG)

指标	JMG
蛋白含量/%	80.71±1.02
总糖含量/%	4.31±0.017
灰分含量/%	2.04±0.03

由表 1 可知, JMG 蛋白含量为 80.71%, 多糖含量为 4.31%, 灰分含量为 2.04%, 其中蛋白含量明显高于之前文献报道的 53.67%^[3]。改进的方法提取液采用 pH7.5 的 PBS 缓冲液, pH 偏碱性, 蛋白溶解性好, 提高了蛋白的提取量。其次, 在提取过程中增加了匀浆的步骤, 使颗粒更细, 蛋白分子分散的更均匀, 增加蛋白质的有效溶出。再次, 为了减少 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶解过程中热量以及泡沫的产生, 本试验在冰浴条件下搅拌均匀, 减少蛋白变性。

2.2 阴离子交换层析纯化核桃球蛋白图谱及

SDS-PAGE 分析

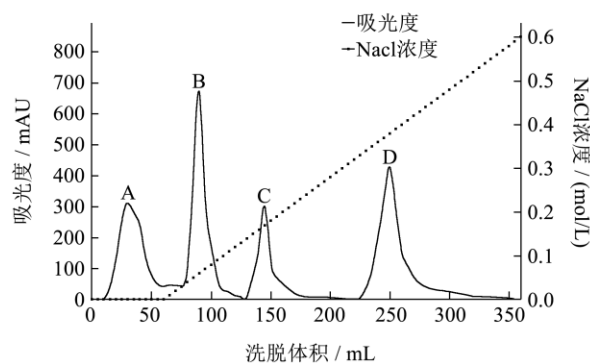


图 1 JMG 阴离子交换层析色谱图

Fig.1 JMG fractions obtained by anion-exchange chromatography

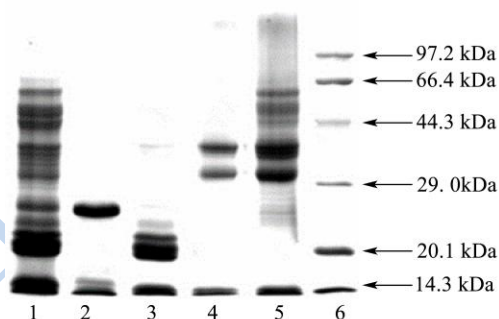


图 2 JMG SDS-PAGE 图谱

Fig.2 SDS-PAGE separation of the four JMG fractions

注: 1.JMG; 2.峰A收集蛋白; 3.峰B收集蛋白; 4.峰C收集蛋白; 5.峰D收集蛋白; 6.Marker。

2.3 核桃球蛋白 DSC 分析

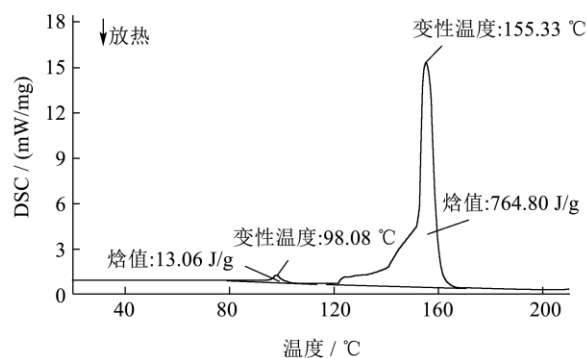


图 3 JMG 热分析图谱

Fig.3 Thermal analysis chart of JMG

DSC 可以监控食品加工中加热导致的蛋白变性。如图 3 所示, JMG 的 DSC 曲线变化显著, 出现两个明显的吸热峰。峰 1、峰 2 的变性温度分别为 98.08 °C 和 155.33 °C, 对应的焓值为 13.06 J/g、764.80 J/g。JMG 变性温度较一般植物蛋白高, 峰 1 蛋白变性温度与葵花籽 11 S 球蛋白^[18]相似, 峰 2 蛋白变性温度与亚麻籽蛋

白^[19]相近。试验结果表明峰1对应的蛋白热稳定性劣于峰2蛋白,且峰1蛋白变性程度大于峰2蛋白,在相同质量时,峰2蛋白比峰1蛋白具有更多有序的空间构象以及维持空间构象所需要的疏水键、二硫键和离子键等功能性官能团^[20]。此外,半峰宽主要反映蛋白在热变性过程中的协同性^[21],由图3可知峰1蛋白半峰宽明显小于峰2蛋白,说明峰2蛋白在较窄的温度范围内即可达到完全的变性,具有良好的变性协同性,而峰2蛋白则具有较高的变性焓值和较差的变性协同性。

2.4 傅立叶红外光谱分析

蛋白质功能性质与二级结构有密切联系,蛋白质的二级结构具有不同类型,可分为 α -螺旋、 β -折叠、 β -转角和无规则卷曲。酰胺 I 带的特征波数通常在 1680~1630 cm^{-1} ,是由蛋白多肽骨架 C=O 伸缩振动引起的,酰胺 I 带通常不受肽链侧基影响,振动频率取决于肽链构型,对三螺旋结构的变化非常敏感^[22]。由图 4 所示,核桃球蛋白酰胺 I 带的波数在 1650.79 cm^{-1} ,符合酰胺 I 带的出峰位置,经酰胺 I 带的谱峰指认,为 α -螺旋结构。由图 4 可知其它二级结构谱峰未出现,说明 JMG 中 α -螺旋结构所占比例最大。JMG 酰胺 II 带的波数出现在 1540.87 cm^{-1} ,主要由蛋白的 C-N 伸缩振动和异相 N-H 弯曲振动引起。此外, JMG 在 3500~3200 cm^{-1} 之间有明显的峰,这是蛋白质 N-H 伸缩振动和 O-H 伸缩振动的特征吸收峰,说明分子间和分子内存在氢键。相似的结果出现在海参胶原蛋白^[23]和胡子鲶鱼皮酸溶性胶原蛋白^[24]的二级结构中。

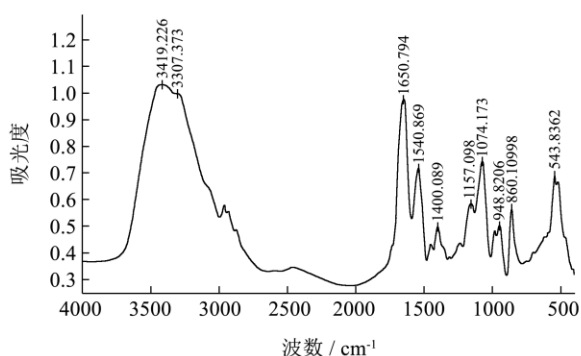


图 4 JMG FT-TR 图

Fig4 FT-IR spectrum of JMG

2.5 核桃球蛋白功能性质分析

2.5.1 氨基酸组分分析

蛋白质中氨基酸含量对其结构及功能性质有重要影响。由表 2 可知, JMG 与 SPI 氨基酸种类齐全,含有人体所需全部必需氨基酸,其中 JMG 必需氨基酸含量占总氨基酸含量的 22.16%,除色氨酸含量明显高

于 SPI 外,其余必需氨基酸含量与 SPI 相差不大。JMG 含有较高的酸性氨基酸 (33.86%) 和疏水氨基酸 (31.31%),使其有较强的疏水性和离子键等非共价作用力。在 NaCl 作用下,非共价力变弱,球蛋白分子之间的电荷斥力加强,使其凝聚性降低,溶解性增强,因此在球蛋白提取液中加入适量 NaCl 有助于提高蛋白提取率和含量^[25]。

表 2 JMG 和 SPI 氨基酸含量 (%)

Table 2 Amino acid composition (%) of JMG and SPI

氨基酸	JMG	SPI	FAO/WHO ^b		氨基酸评分值	
			儿童(2~5岁)	成人	JMG	SPI
天冬氨酸	6.91	8.90				
苏氨酸 ^a	2.63	2.81	3.40	0.90	77.35	82.65
丝氨酸	4.84	3.84				
谷氨酸	17.68	16.97				
甘氨酸	3.88	4.31				
丙氨酸	2.38	3.56				
缬氨酸 ^a	3.62	3.63	3.50	1.30	103.43	103.71
甲硫氨酸 ^a	1.13	0.92	2.70	1.70	41.85	34.07
异亮氨酸 ^a	2.56	3.02	2.80	1.30	91.43	107.86
亮氨酸 ^a	5.11	5.76	6.60	1.90	77.42	82.27
酪氨酸	3.67	3.21				
苯丙氨酸 ^a	2.12	4.32	6.30	1.90	111.58	68.57
组氨酸 ^a	1.57	2.30	1.90	1.60	82.63	121.05
赖氨酸 ^a	1.69	4.79	5.80	1.60	29.14	82.59
精氨酸	9.76	6.90				
脯氨酸	3.06	3.14				
色氨酸 ^a	1.73	1.01	1.10	0.50	157.27	91.82

注: a, 必需氨基酸; b, 2007年FAO/WHO成人/儿童氨基酸推荐值。

除组氨酸和甲硫氨酸外, JMG 必需氨基酸含量均能满足 FAO/WHO 成人推荐标准,因此可以适当补充组氨酸和甲硫氨酸,以提高其生物效用。根据氨基酸评分值, JMG 第一限制氨基酸为赖氨酸,这与大多数植物蛋白一样^[26],第二限制氨基酸为甲硫氨酸。而 SPI 中含有丰富的赖氨酸,可以适当的弥补这种缺陷。JMG 中均衡的氨基酸组成以及高含量的精氨酸组成,可能具有很高的生物学价值。因此, JMG 可以作为蛋白质或氨基酸膳食补充剂。

2.5.2 溶解性分析

由图 5 可知, pH 对 JMG 溶解性影响趋势类似于 U 形曲线,与大部分蛋白溶解性趋势一致。随着 pH 升高, JMG 溶解性先下降后升高,在 pH4.5 附近,溶解性最低。SPI 溶解性曲线趋势与 JMG 相似。在 pH4.0 时,溶解性最小,但是其最小值 (28.93%) 比 JMG

最小溶解性 (8.62%) 要高。同时, 在 pH 3.0~6.0 时, SPI 溶解性均显著高于 JMG; 当 pH 大于 6.0 时, 两者溶解性基本相同。这种差异可能与这两种蛋白质的氨基酸组成、多聚体的聚集程度有关。此外, 两者的主要组成成分 (7S/11S 球蛋白) 比例不同, 也会引起溶解性的差异。研究表明, 7S 球蛋白表面疏水基团低于 11S 球蛋白, 其溶解性较 11S 球蛋白好。

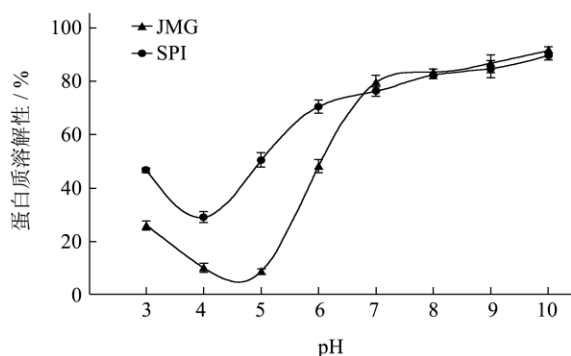


图 5 JMG 和 SPI 溶解性-pH 曲线

Fig.5 Changes in solubility of JMG and SPI corresponding to variations in pH

对两者的溶解稳定性进行比较时, 发现放置一段时间后均不出现分层。JMG 良好的溶解性和溶解稳定性, 有助于其在食品加工中的应用。特别是对不同 pH 溶解性及粘度有较高要求的饮品中, 我们可以尝试 JMG 的应用, 也可以将其应用于沙司、肉制品等的生产中, 以提高这些食品的营养价值和感官品质。

2.5.3 持水性/持油性分析

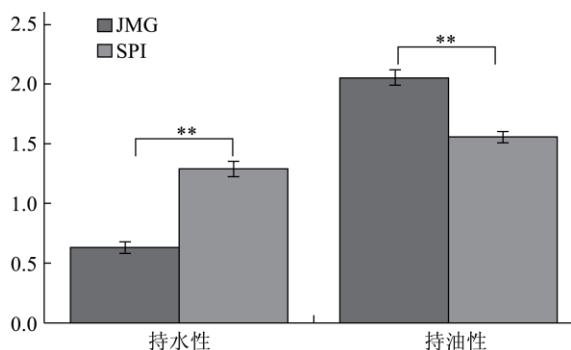


图 6 pH 对 JMG 和 SPI 持水性/持油性的影响

Fig.6 The effect of pH on the water and oil retention capacities of JMG and SPI

蛋白持水性指蛋白将水截留在组织中的能力, 对食品的嫩度、多汁性、柔软性具有重要影响。由图 6 所示, JMG 持水性明显低于 SPI, 早期的报道表明持水性在 1.49~4.72 mL/g 范围内的蛋白适用于粘性食品^[27], 而 JMG 低持水性将限制其在食品高持水构造方面的应用。

持油性对乳化能力有直接影响, 具有重要的实际

应用价值, 例如在蛋黄酱制作中具有较高的应用潜力。由图 6 可知, JMG 持油性显著优于 SPI, 与先前文献报道的红豆球蛋白^[28]和芸豆球蛋白^[29]相比, 均具有一定优势。JMG 良好的持油性可以改善口感、保持风味, 在食品加工中起着重要的作用, 尤其在香肠、冰淇淋等加工中有广阔的应用前景。

2.5.4 起泡性和泡沫稳定性分析

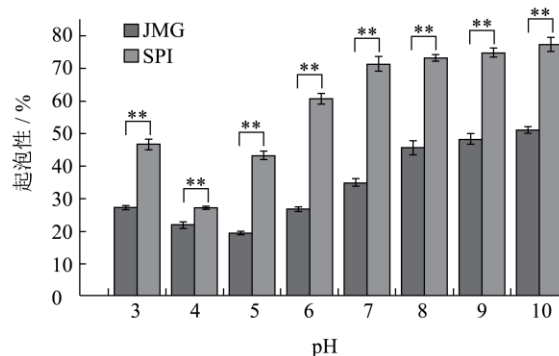


图 7 pH 对 JMG 和 SPI 起泡性的影响

Fig.7 The effect of pH on the foaming properties of JMG and SPI

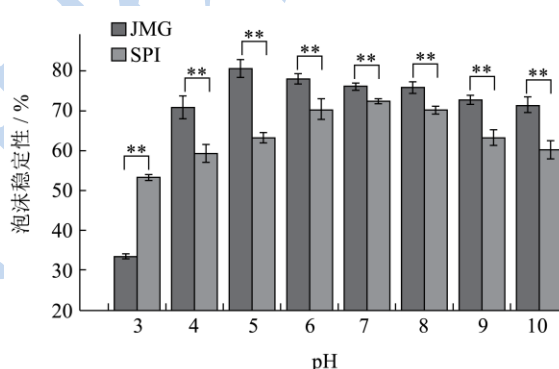


图 8 pH 对 JMG 和 SPI 泡沫稳定性的影响

Fig.8 The effect of pH on the foaming stability of JMG and SPI

蛋白质良好的起泡性取决于蛋白分子能够快速吸附分散在空气-水的界面之间, 并能够迅速改变其构象, 形成新的排列^[30]。由图 7 所示, JMG 和 SPI 起泡性曲线与其溶解性曲线相似, 在接近等电点处起泡性最低, 偏离等电点处逐渐升高。因为随着 pH 的变化, 净电荷逐渐增加, 蛋白质分子间斥力增加, 使其与水作用增强, 起泡性增强, 在等电点时, 净电荷为零, 蛋白质之间斥力最小, 结合更紧密, 起泡性最差。在所检测 pH 范围内 SPI 乳化性均明显高于 JMG。此外, 由图 8 可知, 酸性条件下, JMG 和 SPI 的起泡性均低于碱性条件, 说明两者在碱性条件下更容易起泡。在 pH 3.0~6.0 时, 随着溶解性增加起泡性增强, 说明蛋白质起泡性与溶解性密切相关。JMG 在 pH 7.0~10.0 时, 溶解性与 SPI 基本相同, 但是相应 pH 条件下起泡性却显著高于 SPI, 说明影响 JMG 和 SPI 起泡性还

有其他因素,如疏水性、带电基团及极性基团配置等。此外,球蛋白中 11S/7S 蛋白比值影响其起泡性。天然 11S 球蛋白表面活性及分子弹性低,分子量大,所以起泡性低。

影响泡沫稳定性的因素主要有蛋白膜压力、连续相之间的粘弹性和界面张力。水在重力条件下具有流动性、泡沫之间气体扩散会导致气体不均衡,这是泡沫不稳定的主要因素^[31]。由图 8 所示, JMG 泡沫稳定性在所检测 pH 条件下均优于 SPI。SPI 起泡性虽然很好,但是随着放置时间延长,泡沫迅速减少,一定程度后趋于稳定。JMG 起泡性虽然比 SPI 差,但是其泡沫稳定性明显优于 SPI。与 SPI 相比, JMG 较差的起泡性和持水性,可能会限制其在面团烘烤产品、乳制品以及鸡蛋食品中的应用。

2.5.5 乳化性和乳化稳定性分析

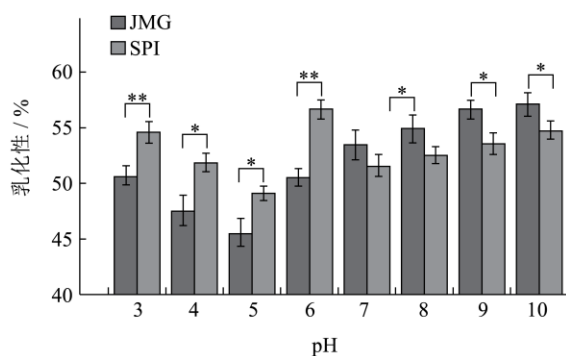


图 9 pH 对 JMG 和 SPI 乳化性的影响

Fig.9 The effect of pH on the emulsion activity of JMG and SPI

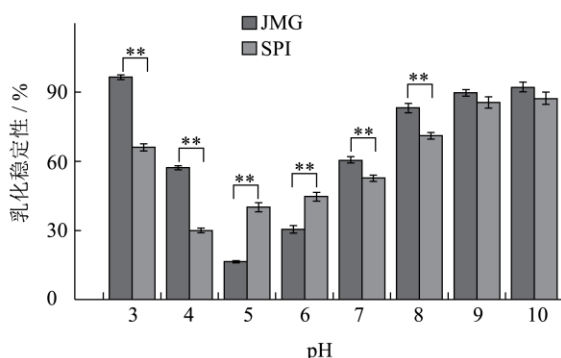


图 10 pH 对 JMG 和 SPI 乳化稳定性的影响

Fig.10 The effect of pH on the emulsion stability of JMG and SPI

蛋白质作为乳化剂在食品工业中应用广泛,它影响食品中油滴的大小并决定食品的感官品质和质构特性。乳化体系包括水包油型和油包水型,蛋白质可以使水包油型的油稳定。蛋白质是两性物质,不同 pH 下,蛋白质溶解性和内部电荷都是不同的,一般来说蛋白质乳化性随着表面电荷和蛋白质溶解性的增加而增强^[32]。JMG 和 SPI 乳化性与 pH 关系如图 9 所示,在测定的

pH 范围内,具有 pH 依赖性。除 pH 6.0 外,随着 pH 的升高, JMG 和 SPI 乳化性先降低,在 pH 5.0 时,乳化性最差,随 pH 的持续增加,乳化性逐渐上升,趋于稳定。在 pH 3.0~6.0 之间, JMG 乳化性均显著低于 SPI, pH 大于 6.0 时, pH 的乳化性高于 SPI。整体趋势与溶解性结果一致,表明蛋白质的乳化性与溶解性有关,与刘岩等^[20]报道的花生蛋白结果相似。在 pH 6.0 时, SPI 的乳化能力最高,与相应溶解性结果不符,说明影响乳化性的还有其他因素,自身表面疏水性、蛋白质组成、溶液离子强度及温度也会有相应的影响。

JMG 和 SPI 乳化稳定性与 pH 关系如图 10 所示。除 pH 5.0 和 6.0 外, JMG 乳化稳定性均高于 SPI。这种差异可能是与两种蛋白质组成有关。与 SPI 相比,除个别 pH 外,其余 pH 条件下 JMG 的乳化性及乳化稳定性均优于 SPI。这一结果与葡萄籽球蛋白相似^[33]。鉴于 JMG 良好的乳化性及乳化稳定性,可尝试应用于传统的乳状液食品中,尤其是对乳化性、适用性及营养价值有较高要求的食品工业,有较好的应用前景。

3 结论

本试验制备的核桃球蛋白含量为 80.71%;该蛋白氨基酸种类齐全,除组氨酸和甲硫氨酸,必需氨基酸含量均高于 FAO/WHO 成人推荐标准,可作为蛋白质或氨基酸膳食补充剂;经过弱阴离子柱纯化,图谱中出现 A、B、C、D 4 个峰,经 SDS-PAGE 分析,峰 A 包含相对分子量约为 14.3 ku 和 27.0 ku 两条带;峰 B 条带集中在 18.0~21.0 ku 区间;峰 C 两条电泳条带分子量分别为 30.0 ku、37.0 ku 左右,峰 D 条带集中在 30.0 ku、37.0 ku 附近以及 44.3~59.0 ku 区间; JMG 干粉 DSC 曲线出现两个峰,变性温度分别为 98.08 °C 和 155.33 °C,对应的焓值为 13.06 J/g、764.80 J/g,表明 JMG 热稳定性好,其中峰 1 蛋白比峰 2 蛋白热稳定性差,但是变性协同性好;其红外光谱主要特征吸收峰酰胺 I 带、酰胺 II 带的波数分别为 1650.79 cm^{-1} 、1540.87 cm^{-1} ,二级结构以 α -螺旋为主, JMG 在 3500~3200 cm^{-1} 之间有明显的峰,表明其分子间和分子内存在氢键; JMG 起泡性和持水性明显低于 SPI,可能会限制其在面团烘烤产品、乳制品以及鸡蛋食品中的应用,其余功能性质均与 SPI 基本相当甚至优于 SPI,这表明 JMG 具备良好的功能性质,在食品加工中具有很大的开发潜力。

参考文献

- [1] 魏丽丽.核桃楸的药理作用研究[J].黑龙江医药, 2009, 22(4):532-534

- WEI Li-Li. Study on pharmacological effects of julans mandshureca maxim [J]. Heilong jiang Medicine Journal, 2009, 22(4): 532-534
- [2] 李敏,刘媛,孙翠,等.核桃营养价值研究进展[J].中国粮油学报,2009,24(6):166-170
- LI Min, LIU Yuan, SUN Cui, et al. Research advance about nutrients and medicinal value of walnut [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(6): 166-170
- [3] Sun L L, Min W H, Liu J S, et al. Functional properties of the protein isolate and fractions prepared from juglans mandshurica maxim kernel in China [J]. Journal of Food Engineering and Technology, 2014, 3(1): 9-17
- [4] Cofrades S, Serrano A, Ayo J, et al. Characteristics of meat batters with added native and preheated defatted walnut [J]. Food chemistry, 2008, 107(4): 1506-1514
- [5] 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(5):21-24
- DU Lei-lei, GUO Tao, WAN Hui, et al. Purification and functional properties of walnut protein [J]. China Oils and Fats, 2009, 34(5): 21-24
- [6] Wallowitz M, Peterson W R, Uratsu S, et al. Jug r 4, a legumin group food allergen from walnut (*Juglans regia* Cv. Chandler) [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2006, 54(21): 8369-8375
- [7] Teuber S S, Jarvis K C, Dandekar AM, et al. Identification and cloning of a complementary DNA encoding a vicilin-like proprotein, Jug r 2, from English walnut kernel (*Juglans regia*), a major food allergen [J]. Journal of allergy and clinical immunology, 1999, 104(6): 1311-1320
- [8] Osborne T B, Mendel L B. Nutritive properties of proteins of the maize kernel [J]. Journal of Biological Chemistry, 1914, 18(1): 1-16
- [9] Kasran M, Cui S W, Goff H D. Emulsifying properties of soy whey protein isolate-fenugreek gum conjugates in oil-in-water emulsion model system [J]. Food Hydrocolloids, 2013, 30(2): 691-697
- [10] GB 5009.4-2010 食品中灰分的测定[S]
GB 5009.4-2010 Determination of ash in foods [S]
- [11] GB 5009.5-2010食品中蛋白质的测定[S]
GB 5009.5-2010 Determination of protein in foods [S]
- [12] Wu D, Min W H, Liu J S, et al. Functional properties of the protein isolate and major fractions of pine nut proteins prepared from the changbai mountain in China [J]. Advanced Materials Research, 2014, 881: 766-775
- [13] 朱科学,周惠明.麦胚球蛋白的分离制备及理化性质研究[J].中国粮油学报,2006,20(6):15-18
- ZHU Ke-xue, Zhou Hui-min. Study on preparation and physicochemical properties of wheat Germ globulins [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2005, 20(6): 15-18
- [14] Choi S M, Ma C Y. Conformational study of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2005, 53(20): 8046-8053
- [15] GB/T 18246-2000饲料中氨基酸的测定[S]
GB/T 18246-2000 Determination of amino acids in feeds [S]
- [16] Vioque J, Alaiz M, Girón-Calle J. Nutritional and functional properties of Vicia faba protein isolates and related fractions [J]. Food Chemistry, 2012, 132(1): 67-72
- [17] Cano-Medina A, Jiménez-Islas H, Dendooven L, et al. Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates [J]. Food Research International, 2011, 44(3): 684-692
- [18] 任健,郑喜群,刘晓兰,等.葵花粕中11S球蛋白的分离制备及性质[J].农业工程学报,2008,24(1):223-227
- REN Jian, ZHENG Xi-qun, LIU Xiao-lan, et al. Preparation and properties of 11S globular proteins in the sunflower meal [J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(1): 223-227
- [19] 宋春芳,毛志怀,王曙光,等.亚麻籽粉含水率对其蛋白质变性温度的影响[J].农业工程学报,2008,24(1):300-302
- SONG Chun-fang, MAO Zhi-huai, WANG Shu-guang, et al. Effects of moisture of flaxseed powder on denaturation temperature of protein [J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(1): 300-302
- [20] 刘岩,赵冠里,苏新国.花生球蛋白和伴球蛋白的功能特性及构象研究[J].现代食品科技,2013,29(9):2095-2101
- LIU Yan, ZHAO Guan-li, SU Xin-guo, et al. Functional and conformational properties of arachin and conarachin [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(9): 2095-2101
- [21] Yin S W, Tang C H, Cao J S, et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate [J]. Food chemistry, 2008, 106(3): 1004-1013
- [22] Xie M X, Liu Y. Studies on the hydrogen bonding of aniline's derivatives by FT-IR [J]. Spectrochimica Acta, Part A, 2002, 58(13): 2817-2826
- [23] 侯虎,孙江,毛家楠,等.海参胶原纤维形态及胶原蛋白理化性质研究[J].现代食品科技,2013,29(7):1491-1495

- HOU Hu, SUN Jiang, MAO Jia-nan, et al. Collagen fibers morphology and physical and chemical properties of collagen of sea cucumber [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(7): 1491-1495
- [24] 李八方,郭鸣,侯虎,等.胡子鲶鱼皮酸溶性胶原蛋白的理化性质研究[J].*现代食品科技*,2013,29(11):2580-2585
- LI Ba-fang, GUO Ming, HOU Hu, et al. Physicochemical properties of acid-soluble collagen from skin of *clarias fuscus* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2013, 29(11): 2580-2585
- [25] 蔡联辉,曾虹燕,王亚举,等.莲子蛋白质的氨基酸组成及其营养评价[J].*营养学报*,2010,5:503-506
- CAI Lian-hui, ZENG Hong-yan, WANG Ya-ju, et al. The amino acid contents of lotus seed protein and its nutritional evaluation [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2010, 5: 503-506
- [26] Fantozzi P. Grape seed: a potential source of protein [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1981, 58(12): 1027-1031
- [27] Aletor O, Oshodi AA, Ipinmoroti K. Chemical composition of common leafy vegetables and functional properties of their leaf protein concentrates [J]. *Food Chemistry*, 2002, 78(1): 63-68
- [28] Meng G, Ma C Y. Characterization of globulin from *Phaseolus angularis* (red bean) [J]. *International journal of food science & technology*, 2002, 37(6): 687-695
- [29] Mundi S, Aluko R E. Physicochemical and functional properties of kidney bean albumin and globulin protein fractions [J]. *Food Research International*, 2012, 48(1): 299-306
- [30] Agyare K K, Addo K, Xiong Y L. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt [J]. *Food Hydrocolloids*, 2009, 23(1): 72-81
- [31] Moro A, Béz G D, Ballerini G A, et al. Emulsifying and foaming properties of β -lactoglobulin modified by heat treatment [J]. *Food Research International*, 2013, 51(1): 1-7
- [32] Del Carmen Vasallo M, Puppo M C, Palazolo G G, et al. Cell wall proteins of *Kluyveromyces fragilis*: Surface and emulsifying properties [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2006, 39(7): 729-739
- [33] 周婷.葡萄籽球蛋白的纯化、表征及其加工特性研究[D].北京:中国农业大学,2010
- ZHOU Ting. Study on purification, characterization and processing properties of globulin from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds [D]. Beijing: China Agricultural University, 2010