

不同方法制备偃松松仁蛋白的理化及其功能特性比较

葛环宇, 李德海

(东北林业大学林学院, 黑龙江省森林食品资源利用重点实验室, 黑龙江哈尔滨 150040)

摘要: 对碱溶液法、超声波辅助法及超声波真空联用技术制备的偃松松仁蛋白的理化及功能性质进行比较与分析。试验结果表明, 超声波真空联用技术制备的偃松松仁蛋白质提取率为 81.33%, 高于碱溶液法及超声波辅助法。三种方法制备的偃松松仁蛋白分子主要条带为 10.26、14.35、23.42、23.85、38.17 ku; 氨基酸含量多于 FAO/WHO 推荐值, 碱溶液法、超声波辅助法及超声真空辅助法制备的偃松松仁蛋白总氨基酸含量分别为 74.6、63.8、64.92 g/100 g, 而且谷氨酸与精氨酸含量丰富。超声波真空联用技术制备的蛋白在吸水性、溶解度、乳化性和乳化稳定性、起泡性和泡沫稳定性等方面优于碱溶法和超声法辅助法制备的蛋白, 其中吸水性尤为突出, 当 pH 值为 10 时, 超声波真空联用技术制备的偃松松仁蛋白吸水性最高为 4.10 g/g, 本试验研究为偃松松仁蛋白质的制备对比分析了一种提取率高、蛋白质功能性质好的提取方法, 为偃松的开发和偃松松仁蛋白的利用提供参考依据。

关键词: 偃松松仁蛋白; 制备方法; 理化性质; 功能特性

文章编号: 1673-9078(2020)08-117-125

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.8.1288

Comparison of Physico-chemical Characteristics and Functional Properties of *Pine pumila* Nut Proteins Prepared by Different Methods

GE Huan-yu, LI De-hai

(College of Forestry, Key Laboratory of Forest Food Resources Utilization of Heilongjiang Province, Northeast Forest University, Harbin 150040, China)

Abstract: The physicochemical characteristics and functional properties of the *Pine pumila* nut proteins prepared by the alkali solution method, ultrasonic-assisted method and ultrasonic-vacuum combined method were compared and analyzed. The analysis results showed that the extraction rate of *Pine pumila* nut protein prepared by ultrasonic-vacuum combined technology was 81.33%, which was higher than those of the alkaline solution method and ultrasonic-assisted method. The main bands of the protein molecules prepared by the three methods were 10.26, 14.35, 23.42, 23.85, and 38.17 ku; The amino acid content was higher than the value recommended by FAO/WHO. The total amino acid contents of the *Pinus pumila* nut proteins prepared by the alkaline solution method, ultrasonic-assisted method and ultrasonic-vacuum combined method were 74.60, 63.80 and 64.92 g/100 g, respectively, with abundant glutamic acid and arginine. The *Pinus pumila* nut protein prepared by the ultrasonic-vacuum combined technology was superior to those prepared by the alkali dissolution method and ultrasonic assisted method in terms of water absorption, solubility, emulsifying property, emulsion stability, foamability and foam stability, with water absorption particularly prominent. When the pH was at 10, the maximum water absorption of pine nut protein prepared by the ultrasonic-vacuum combined technology was 4.10 g/g. This study has developed an extraction method with a high extraction rate and a capacity to produce *Pinus pumila* nut protein with

引文格式:

葛环宇,李德海.不同方法制备偃松松仁蛋白的理化及其功能特性比较[J].现代食品科技,2020,36(8):117-125

GE Huan-yu, LI De-hai. Comparison of physico-chemical characteristics and functional properties of *Pine pumila* nut proteins prepared by different methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 117-125

收稿日期: 2019-12-31

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2572019BA04); 哈尔滨市科技局创新研究基金项目 (2017RAQXJ091)

作者简介: 葛环宇(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学及植物有效成分

通讯作者: 李德海(1976-), 男, 副教授, 研究方向: 食品化学及植物有效成分研究

desirable functional properties, which provides a reference for the development and utilization of *Pinus pumila* nut protein.

Key words: *Pinus pumila* nut protein; preparation method; physico-chemical characteristics; functional properties

偃松 (*Pinus pumila*) 是松科松属的一种常绿蔓生性灌木, 其分布接近高山冻原地带, 构成北寒温带最耐寒的植被群落^[1], 是一种经济价值很高的树种。偃松松仁营养均衡, 必须营养成分全面, 其中大兴安岭林区的偃松松仁中含 17.25% 的蛋白质、65% 的脂肪、8.10% 的碳水化合物, 矿物质和维生素含量也非常高。偃松松仁蛋白是一种优良的植物蛋白质资源, 且氨基酸比例合理, 含有人体必需的 8 种氨基酸, 是一种营养平衡的植物蛋白, 具有很好的开发价值^[2]。另外, 偃松松仁蛋白对降低血脂有一定的功效, 并能软化硬化的血管、血管压力降低, 脑梗血栓之类疾病的发病风险都会大大降低, 还可以减缓细胞老化, 延缓衰老^[3,4]。目前国内外对松仁蛋白的研究多是研究其加工的食品与生物活性, 徐晶等^[5]研制了松仁复合饮料, 回九珍^[6]、张立钢等^[7]对松仁乳饮料稳定性进行研究。这些都是在对松仁加工成食品进行了研究, 对不同方法制备的松仁蛋白功能性质的研究较少, 所以深入研究松仁蛋白质的功能特性具有重要意义与价值。

目前制备蛋白质方法主要有碱提酸沉法、酶法提取、物理提取法等。但是单一的蛋白质制备方法存在提取率低、制备时间长, 同时蛋白质的功能性质受到影响^[8-11]。近年来, 超声波提取技术在成分提取方面得到了广泛应用, 代佳和^[12]在利用超声波辅助法提取辣木叶水溶性蛋白时, 相比酸溶法提取率显著提高。鉴于单独使用超声波提取技术提取率仍较低且耗时耗能, 因此可将超声波提取技术与真空技术联合使用。目前杜惠蓉等^[13]利用超声辅助减压蒸馏技术提取山苍子油, 比常规水蒸气蒸馏法提取率提高 33.98%; 李德海等^[14]利用真空耦合超声波技术提取龙牙楸木皂苷, 提高了皂苷的得率并能有效的缩短提取时间。符群等^[15]利用减压超声辅助醇法提高了薇菜黄酮的得率且不破坏黄酮类化合物的抗氧化活性。但目前将超声波辅助提取法和真空技术联合应用于蛋白质提取的研究尚未见报道。为此, 本研究以碱溶法、超声辅助法、超声波真空联用技术制备偃松松仁蛋白, 并对其部分理化及功能特性进行对比, 以期为建立超声真空联用提取蛋白质新技术提供参考, 为更好地开发利用松仁蛋白, 依据其优越的功能性质开发相应的功能性蛋白产品提供了理论依据和实践指导。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

材料: 偃松松仁, 购自大兴安岭松益果仁食品有限公司。

试剂: 考马斯亮蓝 G-250、牛血清白蛋白 (BSA)、无水乙醇、磷酸、硼酸、98% 浓硫酸、硫酸铜、硫酸钾、混合指示剂、十二烷基磺酸钠、氢氧化钠溶液等, 纯度均为国产分析纯。

主要仪器与设备: YP2002 型电子秤, 上海佑科仪器仪表有限公司; PHS-3E 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; SHB-III 型循环水式多用真空泵, 郑州长城科工贸有限公司; DHG-9240 型电热恒温鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; FM-300 型均质机, 上海右一有限公司; HZS-HA 型水浴振荡器, 哈尔滨东联电子技术开发公司; GG-17 型半微量凯氏定氮蒸馏器, 厦门市玻璃仪器有限公司; TDL-40B-W 型离心机, 上海恒勤仪器设备有限公司; KD-1 型通风柜, 北京世安科兴科技开发有限公司; 722 型可见光分光光度计, 上海光谱仪器有限公司; BSA124S-CW 型电子分析天平, 北京赛多利斯仪器系统有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 原料预处理

偃松松仁粉碎后按液(体积, mL)料(质量, g)比 20:1 液料比加入 30~60 号油醚脱脂 12 h, 过滤, 重复以上步骤两次, 滤渣于通风橱自然挥干溶剂后, 过 60 目筛, 得到脱脂偃松松仁粉, 置于 4 °C 冰箱保藏备用。

1.2.2 偃松松仁蛋白的制备

1.2.2.1 碱提酸沉法制备偃松松仁蛋白

采用蒋丽萍等^[16]的方法, 称取一定量的脱脂偃松松仁粕放置在提取瓶中, 按照液料比 25:1 加入蒸馏水搅拌溶解充分, 用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值到 9.0, 在温度为 35 °C 条件下提取 60 min。提取结束后, 样品倾倒至离心管内, 在 4000 r/min 的速度下离心 15 min。收集上清液, 测定蛋白质含量, 计算蛋白质的提取率。

1.2.2.2 超声辅助法制备偃松松仁蛋白

采用杨立宾等^[17]的方法称取一定量的脱脂偃松

松仁粕放置在提取瓶中,按照液料比 36:1 加入蒸馏水搅拌溶解充分,用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值到 9.0,将提取瓶放置在超声波仪器中,调节功率 300 W,超声温度 38 ℃超声提取一定时间 127 min,提取过程结束后,将样品倾倒至离心管内,在 4000 r/min 的速度下离心 15 min。收集上清液,测定蛋白质含量,计算蛋白质的提取率。

1.2.2.3 超声波真空联用技术制备偃松松仁蛋白

称取一定量的脱脂偃松松仁粕放置在提取瓶中,按照液料比 49:1 加入蒸馏水搅拌溶解充分,用 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值到 9.21,连接循环水真空泵调节真空度 0.08~0.10 MPa,同时将提取瓶放置在超声波仪器中,调节功率 300 W,超声温度 39 ℃超声提取 40 min,提取过程结束后,将样品倾倒至离心管内,在 4000 r/min 的速度下离心 15 min。收集上清液,测定蛋白质含量,计算蛋白质的提取率。

1.2.3 不同方法制备偃松松仁蛋白理化性质的研究

1.2.3.1 蛋白质含量的测定

脱脂松仁粕总蛋白含量采用凯氏定氮法,参考 GB 5009.5-2010。

可溶性蛋白质测定方法采用考马斯亮蓝法。

1.2.3.2 蛋白质氨基酸分析

参考国家标准《食品中氨基酸的测定》(GB 5009.124-2016)。

1.2.3.3 蛋白质 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

采用电泳仪进行不连续双垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。根据 Roshni^[18]等人的方法,略有修改。浓缩胶浓度 5%,分离胶浓度 12%,样品浓度 2 mg/mL,上样量 20 μL,开始电压为 80 V,进入分离胶后为 130 V,电泳时间为 2~2.5 h。电泳结束后用考马斯亮蓝 R-250,室温摇床染色 2 h,脱色液脱色数次直至电泳条带清晰。拍照,根据标准蛋白的迁移率,计算出各组分蛋白的分子量。

1.2.4 不同方法制备偃松松仁蛋白功能特性的研究

1.2.4.1 蛋白质疏水性的测定

采用 ANS 荧光探针法测定蛋白质的表面疏水性。将蛋白溶解于 0.01 mol/L pH 8.0 磷酸盐缓冲液中,BCA 法以牛血清白蛋白为标准蛋白测定上清液中蛋白质浓度,将蛋白浓度控制在 0.005~10.5 mg/mL 之间,加入 8 mmol/L 1-苯氨基萘-8-磺酸,以磷酸盐缓冲液做空白对照,在 395 nm 激发波长和 473 nm 发射波长下测定荧光强度(灵敏度设定为 6)。以荧光强度对蛋白质浓度作图,外推至蛋白质浓度为 0,曲

线初始阶段的斜率即为蛋白质表面疏水性指数。

1.2.4.2 蛋白质溶解性的测定

取三种方法制得的偃松松仁蛋白配制成 0.5 mg/mL 的溶液,调节 pH 至 2.0~10.0,并在室温下振荡 30 min,4000 r/min 离心 15 min,取上清液 0.1 mL 放入试管中加入考马斯亮蓝混匀,595 nm 测吸光值。总蛋白含量由凯氏定氮法测定。每份样品进行 3 次重复。

$$\text{溶解度} = (\text{上清液蛋白含量} / \text{偃松松仁蛋白含量}) \times 100\%$$

1.2.4.3 蛋白质吸水性的测定

取三种方法制得的偃松松仁蛋白各 1 g (质量为 m) 放入 50 mL 离心管中(质量为 m₁),加入 30 mL 蒸馏水,调节 pH 值至 2.0~10.0,振荡 15 min 后静置 10 min,25 ℃环境下 3000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,放入烘箱中 50 ℃烘干 20 min,称离心管及其内蛋白质的质量(m₂)。

$$\text{蛋白质的吸水性} = (m_2 - m_1) / m$$

式中: m: 样品质量; m₁: 吸水前质量; m₂: 吸水后质量。

1.2.4.4 蛋白质乳化性与乳化稳定性的测定

取三种方法制得的偃松松仁蛋白各 1.0 g,溶于 100 mL 的 pH 7.0 的磷酸缓冲液中,分别以 0.1 mol/L NaOH 溶液、0.1 mol/L HCl 溶液调 pH 值分别为 2、4、6、8、10,取蛋白溶液加入 1/3 体积的大豆油,以 10000 r/min 的转速搅拌 5 min,使用 0.1% 的十二烷基硫酸钠溶液稀释 100 倍,用十二烷基硫酸钠溶液做空白对照在 500 nm 下测定吸光值。按照同种方法测定 30 min 之后的吸光度值。

$$\text{EAI}(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{2 \times 2.303 \times A_{500} \times \text{稀释倍数}}{C \times (1 - \varphi) \times L \times 10000}$$

$$\text{ESI}(\%) = \frac{OD_{500} \times \Delta t}{\Delta OD_{500}} \times 100\%$$

式中: EAI-每克蛋白质的乳化面积, m²/g; φ-油相所占的分数,在本实验中油相占 1/4; C-蛋白质的浓度, 1.0 mg/mL; L-比色池光径, 10 mm。

1.2.4.5 起泡性与泡沫稳定性的测定

取三种方法制得的偃松松仁蛋白,各配 10 mg/mL 的蛋白溶液 30 mL,高速剪切均质 2 min,测量搅拌前后的体积,计算起泡性,测定剪切后 0 min 的泡沫体积,静置 30 min 后的泡沫体积,室温下进行。□

$$\text{泡沫稳定性}(\%) = \text{泡沫体积保留量} / \text{原泡沫总体积} \times 100\%$$

$$\text{起泡性}(\%) = (\text{搅拌后体积} - \text{搅拌前体积}) / \text{搅拌前体积} \times 100\%$$

1.3 数据分析

采用 Excel、SPSS 19.0 软件对试验数据进行处理

与分析, 采用 Origin 9.0 软件进行作图。以上实验数据均重复测定 3 次, 其结果以平均值±标准差的形式表示。

2 结果与分析

2.1 偃松松仁总蛋白质含量的测定结果

通过凯氏定氮法测定了脱脂偃松松仁粕的蛋白质含量为 (72.09±1.04) %。

采用 Osboren 分级法制备的偃松松仁清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白及谷蛋白含量分别为 55.62%、14.38%、1.68%、22.36%。

2.2 不同方法制备偃松松仁蛋白的提取率及纯度

由图 1 可以看出, 超声波真空联用技术提取率最高为 81.33%, 相比碱溶液法及超声辅助法显著升高 ($p<0.05$), 分别比碱溶液法和超声辅助法提高了 37.45%、12.15%。说明减压处理比常压更有利于蛋

白质的溶出, 但从蛋白质的纯度方面来看, 三种方法无显著性差异 ($p>0.05$), 低压条件下提取容器内空气稀薄, 提取溶剂内的提取物受到的外力减小, 分子链变大, 需要打破分子链的能量降低, 因此, 相同条件下低压提取较常压提取效率更高。这与金涛^[19]等人的研究结果一致, 在提取燕麦抗冻蛋白时, 真空处理后蛋白质提取率提高了 17.1%。

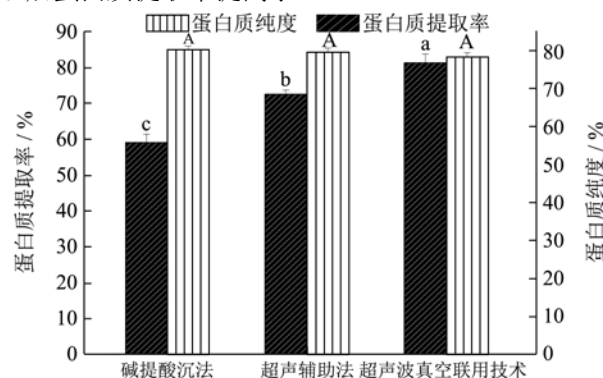


图 1 偃松松仁蛋白的提取率及纯度

Fig.1 Extraction rate and purity of the pine nut proteins

注: 不同小写字母表示蛋白质提取率差异性显著 ($p<0.05$), 不同大写字母表示蛋白质纯度差异性显著 ($p<0.05$)。

表 1 蛋白质的氨基酸组成

Table 1 Amino acid composition of the proteins (g/100 g)

氨基酸	碱提酸沉法	超声辅助法	超声波真空联用	FAO/WHO 推荐值	
				儿童 (2-5 岁)	成人
天门冬氨酸 Asp	6.61	5.46	5.62		
苏氨酸 Thr	2.55	2.24	2.19	3.40	0.90
丝氨酸 Ser	3.70	3.15	3.23		
谷氨酸 Glu	14.24	11.87	12.47		
甘氨酸 Gly	3.02	2.65	2.61		
丙氨酸 Ala	3.05	2.68	2.66		
胱氨酸 Cys	1.38	1.30	1.38		
缬氨酸 Val	3.12	2.82	2.79	3.50	1.30
蛋氨酸 Met	1.71	1.55	1.57	2.70	1.70
异亮氨酸 Ile	3.05	2.58	2.56	2.80	1.30
亮氨酸 Leu	6.08	5.20	5.18	6.60	1.90
酪氨酸 Tyr	3.25	2.86	2.86		
苯丙氨酸 Phe	3.53	3.07	3.02	6.30	1.90
赖氨酸 Lys	4.28	3.49	3.47	5.80	1.60
组氨酸 His	2.53	2.09	2.13	1.90	1.60
精氨酸 Arg	9.46	8.27	8.68		
脯氨酸 Pro	3.04	2.52	2.50		
总氨基酸含量	74.60	63.80	64.90		
必需氨基酸总量	24.32	20.95	20.78		
亲水性氨基酸含量	43.37	36.58	37.79		
疏水性氨基酸含量	26.83	23.28	23.15		

2.3 不同方法制备偃松松仁蛋白的氨基酸分析

蛋白质的氨基酸含量及组成可以直接反映该种蛋白质是否优质,其氨基酸组成是否均衡,通过氨基酸分析仪分析三种方法制备的偃松松仁蛋白的氨基酸组成,结果见表1。

从表1可以看出,碱溶液法、超声辅助法及超声真空辅助法制备的偃松松仁蛋白总氨基酸含量分别为74.60、63.80、64.90 g/100 g,碱溶法制备的偃松松仁蛋白必需氨基酸总量最高为24.32 g/100 g,超声辅助法和超声真空辅助法差别不大。赵楠^[20]等人分析得到红松松仁必需氨基酸总量为21.38 g/100 g,偃松松仁必需氨基酸总量高于红松松仁蛋白,三种方法制备的偃松松仁蛋白中的必需氨基酸含量基本能满足FAO/WHO的成人推荐值,三种方法制备的蛋白质的氨基酸含量最高的是谷氨酸与精氨酸,谷氨酸是一种兴奋的神经递质,参与睡眠及觉醒的发生和维持^[21];精氨酸有调节血管张力,调整血压和血流,胰腺的分泌及肝脏蛋白质的代谢,其对蛋白质的合成有促进作用,能加速伤口的愈合^[22]。不同提取方法制备的蛋白氨基酸组成合理,可作为氨基酸膳食补充剂添加到食品中。

2.4 不同方法制备偃松松仁蛋白的

SDS-PAGE 分析

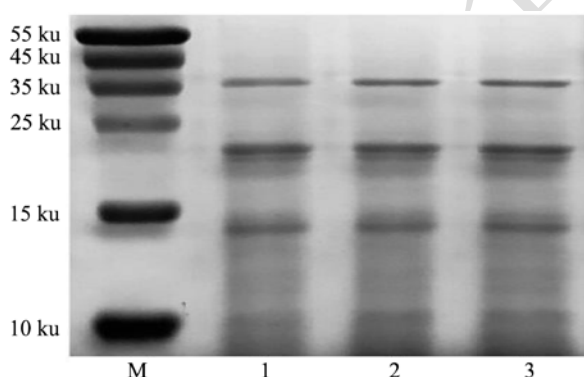


图2 偃松松仁蛋白的 SDS-PAGE 图

Fig.2 SDS-PAGE of the pine nut proteins

注: M: 标准 Marker; 1: 碱溶液法; 2: 超声辅助法; 3: 超声波真空联用技术。

由图2可以看出三种方法制备的偃松松仁蛋白分子的主要条带有10.26、14.35、23.42、23.85、38.17 ku, 先前赵楠^[20]的研究中清蛋白的主要条带为40.4 ku, 球蛋白的主要条带为25.14 ku, 谷蛋白的主要条带为15.23 ku, 因此估计条带38.17 ku为偃松松仁清蛋白, 23.42、23.85 ku为偃松松仁球蛋白, 14.35 ku

为偃松松仁谷蛋白,与红松松仁蛋白分子量有9.74~39.49 ku条带的结果略有差别,分析原因可能是松仁的种类不同所致。相比王晓飞等^[23]提取的长白山核桃的蛋白的分子量有14.3~59 ku的条带,偃松松仁中的各蛋白组分的分子量较小,在一定程度上更容易被人体消化吸收。

2.5 不同方法制备偃松松仁蛋白的功能特性

比较

目前,国内外关于超声波真空联用技术应用到提取法中对蛋白功能性质带来的影响尚属空白,本试验以基础的碱溶法为研究的基础上,还比较了超声波真空联用技术与超声辅助法提取蛋白功能性质。鉴于食品的pH值一般不同,细化的曲线可以作为投入生产的有用依据,因此,本试验探究了不同pH值下,三种方法提出蛋白的功能性质变化趋势。

2.5.1 不同提取方法偃松松仁蛋白疏水性的比较

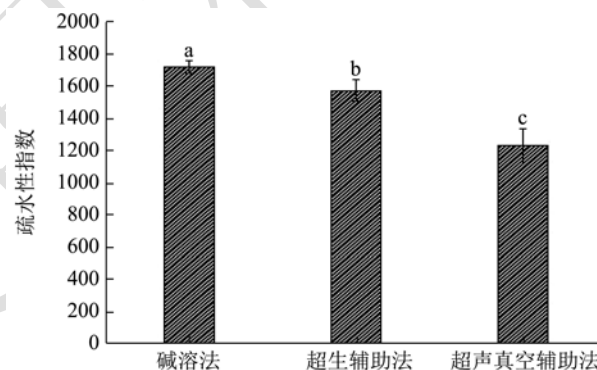


图3 不同方法提取偃松松仁蛋白的疏水性

Fig.3 Hydrophobic of pine nuts protein by different methods

注: 不同小写字母表示不同方法制备的蛋白质疏水性差异性显著 ($p < 0.05$)。

由图3可以看出疏水性由大到小依次为谷蛋白(1719) > 球蛋白(1573) > 清蛋白(1232), 碱溶液法制得的蛋白疏水性显著高于超声辅助法及超声真空辅助法 ($p < 0.05$)。另外,蛋白质的疏水性氨基酸含量对蛋白的疏水性也有影响,由表1可知,超声波真空联用技术制备的偃松松仁蛋白的疏水性氨基酸含量为23.15 g/100 g,与超声辅助法制备的偃松松仁蛋白的疏水性氨基酸含量23.28 g/100 g相近,并远小于碱溶液法制备的偃松松仁蛋白的疏水性氨基酸含量26.83 g/100 g,与蛋白疏水性结果相一致。

2.5.2 不同提取方法偃松松仁蛋白溶解性的比较

由图4可知,当蛋白处于偏离等电点的酸性或碱性环境时,其溶解度都呈增加趋势,并且在碱性环境下的溶解度高于酸性环境下的溶解度,并且有显著性

差异 ($p < 0.05$), 三种方法制备的蛋白质溶解度在 $\text{pH} = 4.0$ 附近时达到最低点, 其中碱溶液法和超声辅助法制备的蛋白质溶解性差异不显著 ($p > 0.05$), 只有 10.76% 左右; 这与温玉青^[24]等人研究青麦仁分离蛋白的溶解性一致, 是因为在等电点处, 蛋白质表面所带正负的电荷为零, 静电斥力减小, 与疏水相互作用协同使蛋白质分子聚集沉淀, 溶解度最小。当 pH 为 10 时, 超声波真空辅助法制备的偃松松仁蛋白溶解性最大为 76.44%, 较超声法溶解性更优一些, 且是碱溶法制备蛋白溶解性的 1.99 倍, 这与图 3 中蛋白质的表面疏水性结果相一致, 疏水性降低, 溶解度有所升高。溶解度好的蛋白质加工起来较容易, 在作为功能性食品配料的前景发展更广阔。

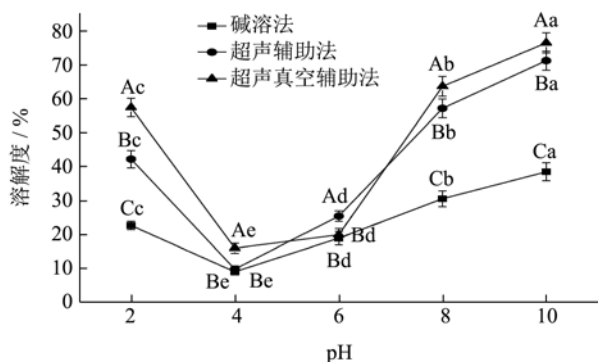


图 4 不同方法提取偃松松仁蛋白的溶解性

Fig.4 Solubility of pine nuts protein by different methods

注: 不同小写字母表示不同 pH 条件下蛋白质溶解性差异性显著 ($p < 0.05$), 不同大写字母表示不同方法制备的蛋白质溶解性差异性显著 ($p < 0.05$), 下同。

2.5.3 不同方法提取偃松松仁蛋白吸水性的比较

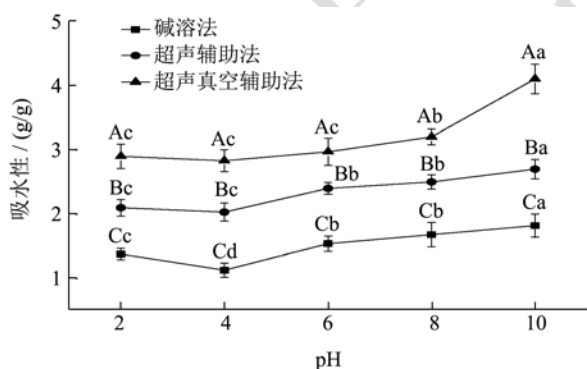


图 5 不同方法提取偃松松仁蛋白的吸水性

Fig.5 The water absorption of pine nuts protein by different methods

由图 5 可知, 当 pH 值为 4 时, 三种方法制备的偃松松仁蛋白的吸水性最低; 其中碱溶法制备的偃松松仁蛋白吸水性最低为 1.13 g/g, 显著低于超声波真空联用技术制备的蛋白吸水性为 2.83 g/g ($p < 0.05$)。当 pH 值为 10 时, 超声波真空联用技术制备的偃松松

仁蛋白显著高于碱溶法及超声辅助法 ($p < 0.05$)。这是由于在等电点时, 整个蛋白质分子呈电中性, 蛋白质与蛋白质相互作用达到最高, 而缔合和收缩的蛋白质呈现最低水化和膨胀; 而电离后蛋白间的相互作用变小, 从而结合水的能力增大, 即吸水性也随之增加。这与吴晓红^[25]等人的研究结果一致, pH 在 2.0~8.0 之间时, 偃松松仁蛋白的吸水性变化较缓; 在等电点附近吸水性最低, 在碱性条件下吸水性明显升高。当 pH 值为 10.0 时, 超声真空法提取的蛋白吸水性明显升高, 是碱溶液法的 2.25 倍。在吸水性上, 超声波真空联用技术优于超声辅助法优于碱溶提取法。可能是因为真空条件会改变溶剂 NaOH 介电常数, NaOH 溶剂的极性发生改变后, 有一部分溶剂带着水被非极性成分结合, 因此吸水度出现了明显的升高。而有超声辅助吸水性更好是因为超声波的改性作用, 使偃松松仁蛋白结构疏松, 极性基团展开, 能够吸附大量的水分子。

2.5.4 不同方法提取偃松松仁蛋白乳化性与乳化稳定性的比较

由图 6、7 可知, pH 对偃松松仁蛋白质乳化性的影响与 pH 对其溶解度的影响基本一致, 也呈现先降低后升高的趋势, 这表明蛋白质乳化性与溶解度有密切关系。当 pH 值为 4 时, 碱溶法、超声辅助法及超声真空辅助法制备的偃松松仁蛋白乳化性最低分别为 14.23、15.17、12.35 m^2/g , 乳化稳定性分别为 20.31%、22.32%、38.76%; pH 向偏酸或偏碱方向移动时, 偃松松仁蛋白的乳化性及乳化稳定性显著提高 ($p < 0.05$), 当 pH 值为 10 时, 乳化性及乳化稳定性显著上升到最高 ($p < 0.05$), 乳化性分别为 41.57、51.12、59.37 m^2/g , 乳化稳定性分别为 55.42%、65.27%、86.91%。SINGH^[26]等人在研究碎米蛋白乳化性及乳化稳定性时, 也得出乳化性及乳化稳定性随 pH 增大先减小后增加的结论。

原因在于当 pH 为 4 时, 接近偃松松仁蛋白等电点, 蛋白质所带净电荷较少, 分子间作用力较小, 蛋白质亲水性降低, 从而使油-水界面的蛋白质减少, 乳化性和乳化稳定性都最低。乳化稳定性的变化趋势与乳化性相同, PH 值变化, 导致蛋白质分子所带电荷增加, 蛋白质间排斥作用增强, 折叠紧密的分子向链向伸展状态转变, 形成蛋白质聚集概率减少, 表现为乳化稳定性提高。在真空的作用下, 蛋白质分子完整性被破坏, 造成空穴, 分子结构变得疏松, 埋藏在分子内部的疏水基团暴露, 使蛋白质疏水基团增多, 乳化能力增强^[27]。超声波真空联用技术提取的松仁蛋白的乳化性及乳化稳定性佳, 可作为营养物质

添加到食品中。

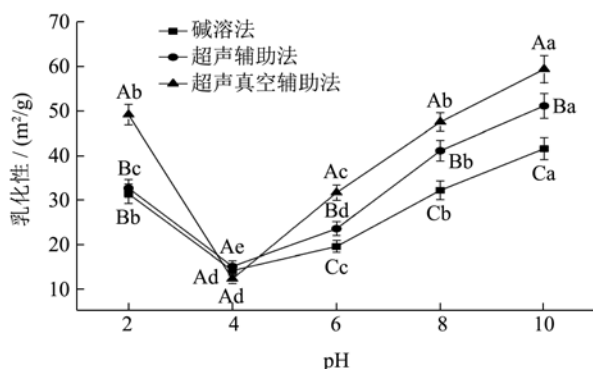


图6 不同方法提取偃松松仁蛋白的乳化性

Fig.6 The emulsification of pine nuts protein by different methods

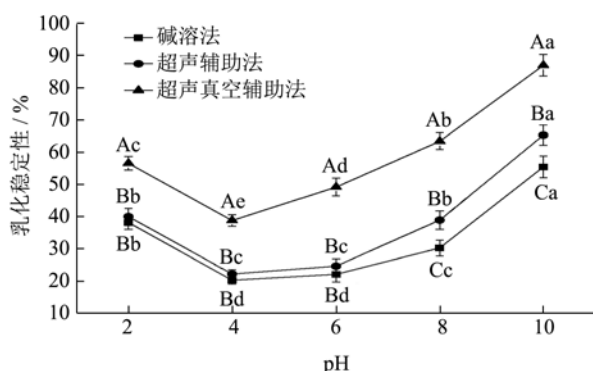


图7 不同方法提取偃松松仁蛋白的乳化稳定性

Fig.7 The emulsifying stability of pine nuts protein by different methods

2.5.5 不同提取方法偃松松仁蛋白起泡性与泡沫稳定性的比较

蛋白质泡沫稳定性取决于蛋白浓度、水合作用、厚度、蛋白质膜的流变性质等，受 pH 影响较大，且蛋白质的泡沫性质可赋予食物良好的口感和松软的结构^[28]。

由图8可以看出，在其他因素一定的情况下，三种方法提取的偃松松仁蛋白的起泡性随 pH 的升高而显著增加 ($p < 0.05$)，且偃松松仁蛋白的起泡性在碱性的环境中更优，分别为 65.13%、74.95%、87.39%，超声真空辅助法制备的偃松松仁蛋白起泡性最好。与赵笑蕾^[29]等人在研究超声对蛋清蛋白起泡性及泡沫稳定性的影响的结果相似，由图9可以看出起泡稳定性随 pH 有同样的变化趋势。当 pH 为 5 和 7 时，碱溶液法和超声辅助法制备的蛋白泡沫稳定性增加趋势不明显 ($p > 0.05$)，pH 为 9 时显著增加 ($p < 0.05$)。无论处于哪个 pH 下，碱溶法提取蛋白的起泡性及泡沫稳定性都是最低的，超声波辅助提取的松仁蛋白的起泡性及起泡稳定性居中，低于超声波真空联用技术的松仁蛋白，可能是由于真空环境下相

对温度高，反应较剧烈，蛋白结构更疏松，起泡性好；空化降低了蛋清蛋白的表面张力，进而导致泡沫体系能量降低，有利于泡沫的稳定。此外，真空条件改变了蛋白的性质，其吸附在气液表面上，以极性基团展开朝向水中，疏水基团伸向空气的方式排列，形成一层蛋白质薄膜，水的表面张力迅速降低，泡沫稳定性较好。

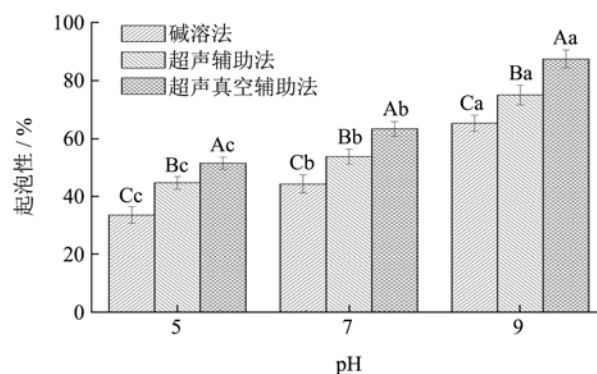


图8 不同方法提取偃松松仁蛋白的起泡性

Fig.8 The foaming of pine nuts protein by different methods

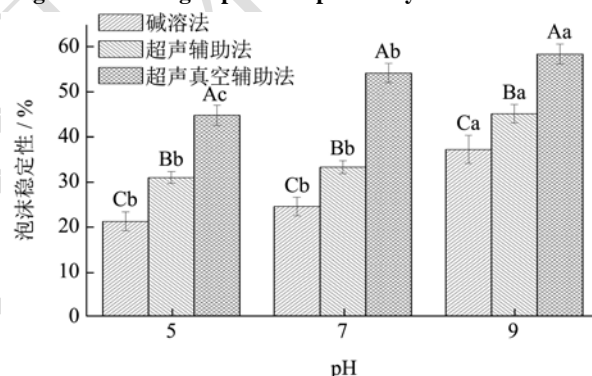


图9 不同方法提取偃松松仁蛋白的泡沫稳定性

Fig.9 The foam stability of pine nuts protein by different methods

3 结论

超声波真空联用技术制备偃松松仁蛋白的测得的蛋白提取率达到 81.33%，高于碱溶法及超声辅助法，蛋白质组成集中分布在 10.26~38.17 ku，三种提取方法提取的蛋白氨基酸组成合理，谷氨酸与精氨酸含量丰富，其中碱溶法总氨基酸含量和必需氨基酸含量最高分别为 74.60、24.32 g/100 g。超声波真空联用技术制备的蛋白在吸水性、溶解度、乳化性和乳化稳定性、起泡性和泡沫稳定性上都普遍优于普通超声辅助法和碱溶法。其中吸水性尤为突出，当 pH 值为 10 时，超声波真空联用技术制备的偃松松仁蛋白吸水性最高为 4.10 g/g，是碱溶液法制备偃松松仁蛋白吸水性的 2.25 倍。综上所述，可以利用超声波真空联用技术提高蛋白的提取率，以更好的加工特性应用到

食品加工方面。

参考文献

- [1] 刘昕哲,朱万昌.偃松籽的营养成分[J].特种经济动植物, 2005,8(6):20-20
LIU Xin-zhe, ZHU Wan-chang. Nutrient composition of pine pumila nut [J]. Special Economic Animals and Plants, 2005, 8(6): 20-20
- [2] 刘学爽,朱万昌,赵厚坤.偃松籽营养成分及松籽油提取技术[J].中国林副特产,2002,3:42-42
LIU Xue-shuang, ZHU Wan-chang, ZHAO Hou-kun. Nutrient composition of pine pumila nut and pine oil extraction technology [J]. Forest By-Product and Speciality in China, 2002, 3: 42-42
- [3] 林春芳,崔克诚.偃松资源开发利用[J].林业科技通讯,2002, 1:41
LIN Chun-fang, CUI Ke-cheng. Development and utilization of pine pumila resources [J]. Forest Science and Technology, 2002, 1: 41
- [4] 尹君,曹海波,崔克城,等.偃松的观赏药用价值及加工利用[J].特种经济动植物,2002,2:29-29
YIN Jun, CAO Hai-bo, CUI Ke-cheng, et al. The ornamental medicinal value and processing of pine pumila [J]. Special Economic Animals and Plants, 2002, 2: 29-29
- [5] 徐晶,夏光辉,姜瑞平,等.金顶侧耳多糖-松仁复合饮料的研制[J].食品科技,2011,9:92-96
XU Jing, XIA Guang-hui, JIANG Rui-ping, et al. Preparation of *Pleurotus ostreatus* polysaccharide-pine kernel compound beverage [J]. Food Science and Technology, 2011, 9: 92-96
- [6] 回九珍.松子乳饮料稳定性试验研究与生产[J].食品科学, 2003,24(11):49-53
HUI Jiu-zhen. Experimental research and production of pine nut milk beverage stability [J]. Food Science, 2003, 24(11): 49-53
- [7] 张立钢,鄂志强.松仁牛乳饮料的研制及体系稳定性研究[J].中国乳品工业,2010,38(4):29-31
ZHANG Li-gang, E Zhi-qiang. Preparation of pine nut milk drink and study on system stability [J]. China Dairy Industry, 2010, 38(4): 29-31
- [8] TANG Xian ming, WANG Zhen yue, TANG Yi hua, et al. Optimization of extration process of *Rumex gemlini* by multiple guidelines grading method [J]. Journal of Chinese Medicinal Meternls, 2009, 32(9): 1460-1462
- [9] 黄浩,秦高一鑫,陈贵堂,等.响应面法优化黄芪下脚料蛋白提取工艺[J].食品工业科技,2017,38(23):170-176
HUANG Hao, QIN Gao-yi-xin, CHEN Gui-Tang, et al. Optimization of protein extraction from *Astragali radix* waste by response surface methodology [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(23): 170-176
- [10] 王雪峰,陈越,赵琼,等.响应面法优化酶法制备辣木籽多肽工艺及其抑菌活性分析[J].现代食品科技,2019,35(1): 173-181,214
WANG Xue-feng, CHEN Yue, ZHAO Qiong, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of moringa oleifera seed protein by response surface methodology and the antibacterial activity of peptides of protein hydrolysate [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(1): 173-181, 214
- [11] 侯兆乾,刘鑫阳,史超,等.冻融法和超声破碎法提取螺旋藻中藻蓝蛋白的工艺研究[J].内蒙古农业大学学报(自然科学版),2017,38(2):69-75
HOU Zhao-qian, LIU Xin-yang, SHI Chao, et al. The research of ex-reaction proceduer by using method of freezing-thawing and ultrasonic broken process to extract phycocyanin from spirulina algae [J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition), 2017, 38(2): 69-75
- [12] 代佳和,罗旋飞,史崇颖,等.响应面法优化辣木叶中水溶性蛋白提取工艺研究[J].云南农业大学学报(自然科学),2020, 35(1):130-138
DAI Jia-he, LUO Xuan-fei, SHI Chong-ying, et al. Optimization of extraction process for water-soluble protein of moringa oleifera leaves by response surface methodology [J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2020, 35(1): 130-138
- [13] 杜惠蓉,朱辉,陈安银.超声辅助减压蒸馏技术提取山苍子油的研究[J].山东农业科学,2018,50(2):133-138
DU Hui-rong, ZHU Hui, CHEN An-yin. Study on extracting *Litsea cubeba* oil by ultrasonic-assisted vacuum distillation [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2018, 50(2): 133-138
- [14] 李德海,朱晓冉,王路,等.真空耦合超声波提取龙牙楸木皂苷及其抗氧化和抑菌活性研究[J].食品工业科技,2019,40 (22):24-33,39
LI De-hai, ZHU Xiao-ran, WANG Lu, et al. Optimization of ultrasonic coupled vacuum assisted extraction and antioxidant and antibacterial activity of saponin from *Aralia elata* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(22): 24-33, 39
- [15] 符群,李卉,王振宇,等.减压-超声辅助醇法提取薇菜黄酮及其对抗氧化活性的影响[J].现代食品科技,2018,34(3):113-

- 120,130
FU Qun, LI Hui, WANG Zhen-yu, et al. The effect of decompression-ultrasonic assisted alcoholic extraction on the flavonoids from *Osmunda japonica* thunb and its antioxidant activity [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(3): 113-120, 130
- [16] 蒋丽萍,高吉喆.松子仁蛋白提取工艺的研究[J].中国科技信息,2005,23:98
JIANG Li-ping, GAO Ji-zhe. Study on extraction technology of pine nut protein [J]. China Science and Technology Information, 2005, 23: 98
- [17] 杨立宾,王振宇,李相阳.超声波辅助提取松仁蛋白的工艺研究[J].北京农学院学报,2008,2:60-62
YANG Li-bin, WANG Zhen-yu, LI Xiang-yang. Factors on ultrasonic-associated extracting of pine nut protein [J]. Journal of Beijing University of Agriculture, 2008, 2: 60-62
- [18] Roshni C, Tanmoy Kumar D, Mahua G, et al. Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application [J]. Food and Bio-products Processing, 2015, 94(109): 70-81
- [19] 金涛,张英,任玮,等.真空渗透离心法提取燕麦抗冻蛋白工艺的研究[J].食品工业科技,2012,33(23):267-271
JIN Tao, ZHANG Ying, REN Wei, et al. Study on the technology of extracting oat antifreeze protein by vacuum infiltration centrifugation [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(23): 267-271
- [20] 赵楠,包怡红,郭阳.提取方法对脱脂松仁粕蛋白性质的影响[J].中国油料作物学报,2017,39(1):117-122
ZHAO Nan, BAO Yi-hong, GUO Yang. Effects of extraction methods on properties of the defatted pine nut protein [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2017, 39(1): 117-122
- [21] 石玉锋,虞燕琴.谷氨酸在睡眠和觉醒中的作用研究进展[J].浙江大学学报:医学版,2013,42(5):583-590
SHI Yu-feng, YU Yan-qin. The roles of glutamate in sleep and wakefulness [J]. Journal of Zhejiang University (Medical Sciences), 2013, 42(5): 583-590
- [22] 雷晓青,吴伟宗,方洛云,等.精氨酸营养生理功能研究新进展[J].中国畜牧杂志,2009,45(3):46-49
LEI Xiao-qing, WU Zong-wei, FANG Luo-yun, et al. Advance in the nutrition and physiological function of arginine [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2009, 45(3): 46-49
- [23] 王晓飞,闵伟红,朱运明,等.长白山核桃球蛋白的提取、分离纯化及其功能性质研究[J].现代食品科技,2015,31(4):234-241
WANG Xiao-fei, MIN Wei-hong, ZHU Yun-ming, et al. Study on extraction, isolation and purification of pecan globulin from Changbai and its functional properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(4): 234-241
- [24] 温青玉,张康逸,屈凌波,等.青麦仁分离蛋白理化性质及功能特性的研究[J].食品工业科技,2020,41(9):26-33
WEN Qing-yu, ZHANG Kang-yi, QU Ling-bo, et al. Study on physical and chemical characteristics of protein isolated from green wheat kernel [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(9): 26-33
- [25] 吴晓红,刘经纬,郑月明,等.红松种子水溶性蛋白吸水性、吸油性及溶解性的研究[J].食品工业科技,2010,31(9):140-143
WU Xiao-hong, LIU Jing-wei, ZHENG Yue-ming, et al. Studies on water absorption, absorbing oil capacity and solubility of water-pine seed protein [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(9): 140-143
- [26] Singh T P, Sogi D S. Comparative study of structural and functional characterization of bran protein concentrates from superfine, fine and coarse rice cultivars [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 111: 281-288
- [27] 张根生,岳晓霞,李继光,等.大豆分离蛋白乳化性影响因素的研究[J].食品科学,2006,7:48-51
ZHANG Gen-sheng, YUE Xiao-xia, LI Ji-guang, et al. Study on affecting factors of emulsification properties of soybean isolated protein [J]. Food Science, 2006, 7: 48-51
- [28] 杨华连,陈莉,卢红梅,等.提取方法对薏仁碎米蛋白氨基酸组成及功能特性的影响[J].食品科技,2018,43(11):262-268
YANG Hua-lian, CHEN Li, LU Hong-mei, et al. Effect of extraction methods on amino acid composition and functional properties of rice-coix seed protein [J]. Food Science and Technology, 2018, 43(11): 262-268
- [29] 赵笑蕾,杨锋,张晓.水力空化对蛋清蛋白功能特性的影响[J].食品科技,2019,44(10):105-109
ZHAO Xiao-lei, YANG feng, ZHANG Xiao. Effects of hydrodynamic cavitation on functional characteristics of egg white protein [J]. Food Science and Technology, 2019, 44(10): 105-109