

菜籽蛋白的提取和纯化

郑美瑜, 陈剑兵, 陆胜民*, 邢建荣

(浙江省农业科学院食品加工研究所, 杭州 310021)

摘 要: 为了对菜籽饼进行综合利用, 以低温压榨制油的双低菜籽饼为原料, 探讨了菜籽蛋白的提取和纯化工艺。通过料液 pH 值的先后调节对比、正交、提取次数和纯化试验, 得到较佳工艺条件: 采用先调 pH 值法, 水溶液的 pH 值为 12, 提取时间为 20 min, 温度为室温, 提取 3 次, 通过 pH5 和 7 的两步沉淀, 经干燥得到分离蛋白, 蛋白纯度达 84.8%, 得率为 38.9%, 且有害物质残留较少。先调 pH 值法与后调法相比, 总的提取率可提高 20 个百分点, 达 90% 以上。

关键词: 菜籽蛋白; 提取; 纯化

中图分类号: TS229; S565.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6819(2008)-8-0267-04

郑美瑜, 陈剑兵, 陆胜民, 等. 菜籽蛋白的提取和纯化[J]. 农业工程学报, 2008, 24(8): 267—270.

Zheng Meiyu, Chen Jianbing, Lu Shengmin, et al. Extraction and purification of rapeseed protein[J]. Transactions of the CSAE, 2008, 24(8): 267—270.(in Chinese with English abstract)

0 引 言

油菜是中国最重要的油料作物, 中国油菜种植面积和总产量均居世界首位^[1], 占世界油菜种植面积和总产量的 30% 左右。菜籽蛋白是指油菜籽榨油后从菜籽饼中提取的蛋白质, 菜籽饼中蛋白质含量在 35%~40% 之间, 中国每年有约 600 万 t^[2] 的菜籽饼粕, 是潜在的仅次于豆粕的大宗植物蛋白源, 但当前却有 80% 的菜籽粕被当作肥料使用, 造成了极大的浪费。同时, 菜籽蛋白与大豆蛋白相比具有营养价值高和原料价格便宜的优势, 因此对菜籽蛋白进行产业化应用研究, 使之取代部分大豆蛋白应用到食品工业中是非常有意义的。

但是目前菜籽蛋白并没有能像大豆蛋白那样得到广泛的应用, 主要有两个原因: 一是菜籽中含有硫苷、植酸等有毒有害物质; 二是对菜籽蛋白的研究力度远不及对大豆蛋白的研究, 直到 20 世纪 90 年代, 国内外学者才逐渐花精力到菜籽蛋白的研究当中, 国外同行对菜籽蛋白的功能性质^[3,4]、结构^[5]及提取工艺^[6,7]进行了相应研究, 国内也有学者研究了菜籽蛋白的提取工艺^[8,9], 但都存在一些诸如提取率低、设备要求高、工艺复杂、蛋白品质低等缺陷, 并未得到产业化应用。随着双低油菜的推广种植, 使得菜籽蛋白作为大宗植物蛋白源成为可能, 从而使得对菜籽蛋白的研究变得更加重要。

在菜籽油的制备工艺中, 虽然压榨法相对于传统高温处理法的出油率低, 但是压榨法得到的菜籽油品质高, 无需化学精炼即可达到新国标四级油标准^[10], 且压榨法得到的饼粕中蛋白的变性程度低, 考虑到其饼粕的综合利用, 压榨制油法将是今后制备菜籽油的趋势。因此本

文以经压榨制油后的双低油菜菜籽饼为原料, 探讨适合生产实际应用的菜籽分离蛋白制备工艺, 为菜籽蛋白的开发和应用研究提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料和仪器

1.1.1 试验材料及预处理

选用未经高温处理、蛋白变性小的菜籽饼, 是制备高品质菜籽分离蛋白的前提。本试验选用双低油菜籽经低温压榨制油后的菜籽饼为原料, 采用干磨法将这些饼粉碎, 过 60 目筛, 装入样品袋内密封备用。经检测样品的成分如表 1 所示。

表 1 冷榨菜籽饼样品主要成分

Table 1 Main components of rapeseed meals deoiled by cold pressing

| 粗蛋白含量 /% | 含水率 /% | 脂肪含量 /% | 植酸含量 /% | 硫苷含量 / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ |
|-------------|-----------|------------|------------|---|
| 39.9 | 9.5 | 12.1 | 1.89 | 27.1 |

试验用牛血清蛋白购于 sigma 公司, 其它试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器设备

CA59G 科美特冷榨油机 (德国 IBG 公司); NK-509 磨粉机 (广东龙的公司); SP-2102 UV 紫外可见分光光度计 (上海光谱仪器有限公司); LXJ-II B 离心机 (上海安亭科学仪器厂); MINI-PELLICON2 超滤设备 (美国 Millipore 公司); SD-Basic 喷雾干燥机 (英国 Lab Plant 公司); FD 5508 真空冷冻干燥机 (香港西盟生命技术有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 菜籽蛋白的提取试验

后调 pH 值提取试验: 即加入菜籽饼后再调节料液 pH 值。称取一定量经预处理后的菜籽饼粉, 加入 20 mL 蒸馏水, 用 1 mol/L NaOH 和 HCl 调至一定的 pH 值, 并

收稿日期: 2007-10-30 修订日期: 2008-05-30

作者简介: 郑美瑜 (1972—), 女, 浙江武义人, 硕士, 助理研究员, 主要从事农副产品深加工与功能性物质的提取方面研究。杭州 浙江省农业科学院食品加工研究所, 310021。Email: zhenmey@sina.com

*通讯作者: 陆胜民 (1969—), 男, 博士, 研究员, 主要从事农副产品深加工与综合利用方面的研究。杭州 浙江省农业科学院食品加工研究所, 310021。Email: lushengmin@hotmail.com

用相应 pH 值的水溶液定容至定值（固液比为 1：15），于常温下提取 40 min，3500r/min 离心分离，测上清液中的蛋白含量。

先调 pH 值提取试验：即加入菜籽饼前预先调节 pH 值。称取一定量经预处理后的菜籽饼粉，加入预先调好一定 pH 值的 NaOH 水溶液（固液比为 1：15），于常温下浸提 30 min，3500 r/min 离心分离，测上清液中的蛋白含量。

先调 pH 值法正交试验：对影响蛋白质提取的因素：料液比、pH 值、温度、时间等，进行了 4 因素 3 水平的正交试验，以分析各因素对提取率的影响情况，确定先调 pH 值法的最佳提取条件。

提取次数试验：由正交试验得到的较佳的工艺条件，在此条件下，我们进行了提取次数的试验，并对比先调 pH 法与后调 pH 法在相同提取次数下的总提取率。

1. 2. 2 菜籽蛋白的纯化试验

提取后的蛋白质溶液含有大量的杂质，本试验对两种纯化方法进行了研究。一为沉淀法，即调节蛋白溶液的 pH 值，使溶液中的蛋白发生沉淀，经离心收集后采用真空冷冻干燥获得分离蛋白样品 1；二是超滤法，即利用超滤膜将蛋白溶液进行浓缩后再进行喷雾干燥制得分离蛋白样品 2。

1. 2. 3 指标和测定方法

1) 蛋白含量的测定：采用双缩脲法^[11]测定。

蛋白提取率 = $\frac{\text{提取后上清液中蛋白质浓度} \times \text{提取液体积}}{\text{样品质量} \times \text{样品蛋白质含量}} \times 100\%$

蛋白得率 = $\frac{\text{蛋白制品的质量}}{\text{样品的质量}} \times 100\%$

2) 植酸含量的测定：硫代硫酸钠返滴定法^[12]。

3) 硫苷含量的测定：硫酸根离子沉淀法^[13]。

2 结果与分析

2. 1 菜籽蛋白的提取

2. 1. 1 菜籽蛋白提取的 pH 值调节工艺确定

在后调 pH 值法中，当 pH>7 时蛋白的提取率随着 pH 值的增大而增大，但当 pH 值超过 11 后增幅较少。综合考虑蛋白的提取率和变性情况，可以选择 pH 11 为菜籽蛋白的最佳提取 pH 值（图 1）。

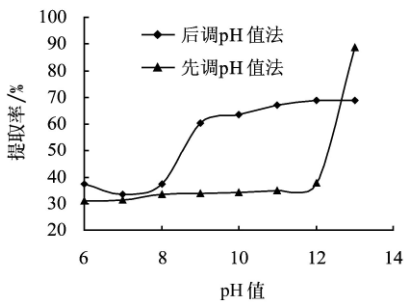


图 1 pH 值及其调整方法对菜籽蛋白提取率的影响
Fig.1 Effect of pH value and its adjustment way of extracting solution on extraction ratio of rapeseed protein

在实际生产中以上这种后调 pH 值的方法比较繁琐，因为菜籽蛋白的成分比较复杂，在调节过程中随着有些组分的溶出，pH 值不断发生变化。为了简化程序，我们用预先调好 pH 值的水溶液来提取菜籽蛋白，结果显示蛋白提取率在 pH12 以下时增加缓慢，而高于 12 时则迅速增加（图 1），其原因是预调提取液 pH12 以下时，加入菜籽饼后，料液的碱性降低，甚至是酸性（pH 值<7），此时蛋白的溶出较少。

2. 1. 2 先调 pH 值法正交试验结果分析

根据图 1 结果，我们结合料液比、温度、时间等因素进行了 4 因素 3 水平正交试验，结果如表 2 所示。根据极差分析可知 4 个因素的主次顺序依次为 pH 值（B）、温度（C）、提取时间（D）和固液比（A），试验的最佳提取条件为 B₃C₁D₁A₃（即 pH 值 13、温度 30℃、时间 20 min、料液比 1：20）。由方差分析（表 3）可知：在各因素中只有水溶液的 pH 值对提取率有显著影响，其它条件对蛋白的提取率影响极小（由 F 值可知），故可根据实际生产情况选择，如在后续的试验中我们选择了料液比为 1：10，这样在生产上可以节水节耗，即经济又环保；pH 值为 13 的提取液，在菜籽饼加入的瞬间，有部分蛋白与高 pH 值的溶液接触可能致使蛋白变性，因此实际生产中可结合提取次数选择稍低一些的 pH 值来提取。

表 2 菜籽蛋白先调 pH 值法提取正交试验

Table 2 Orthogonal experiment on rapeseed protein extraction by adjusting pH value beforehand

| 编号 | A (料液比) | B (pH 值) | C (温度/℃) | D (时间/min) | 提取率 /% |
|----------------|------------|-------------|-------------|---------------|-----------|
| 1 | 1 (1：10) | 1 (11) | 1 (30) | 1 (20) | 42.9 |
| 2 | 1 | 2 (12) | 2 (40) | 2 (30) | 53.6 |
| 3 | 1 | 3 (13) | 3 (50) | 3 (40) | 70.1 |
| 4 | 2 (1：15) | 1 | 2 | 3 | 42.3 |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 1 | 56.5 |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 2 | 74.2 |
| 7 | 3 (1：20) | 1 | 3 | 2 | 34.2 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3 | 68.2 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1 | 86.6 |
| k ₁ | 55.5 | 39.8 | 61.8 | 62.0 | |
| k ₂ | 57.7 | 59.4 | 60.8 | 54.0 | |
| k ₃ | 63.0 | 77.0 | 53.6 | 60.2 | |
| R | 5.3 | 37.2 | 8.2 | 8.0 | |

因素主次 B>C>D>A

表 3 菜籽蛋白先调 pH 值法提取正交试验方差分析结果

Table 3 Variance analysis of orthogonal experiment on rapeseed protein extraction by adjusting pH value beforehand

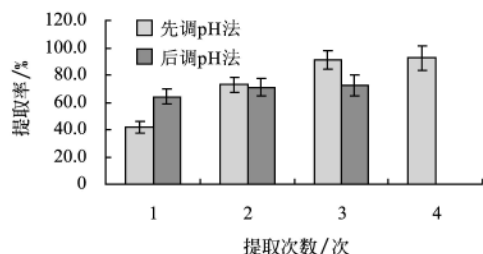
| 变异来源 | 自由度 | 偏差平方和 | 均方 | F 值 | |
|------|-----|--------|--------|---------|--------|
| | | | | D 作误差 | C 作误差 |
| A | 2 | 88.7 | 44.4 | 0.84 | 0.74 |
| B | 2 | 2074.2 | 1037.1 | 19.63** | 17.30* |
| C | 2 | 119.9 | 60.0 | 1.13 | — |
| D | 2 | 105.7 | 52.4 | — | 0.088 |
| 总变异 | 8 | 120.0 | 60.0 | | |

注：F_{0.10}（2，2）=9.00；F_{0.05}（2，2）=19.00；*表示较显著；**表示显著。

2.1.3 提取次数试验

先调 pH 值法：选择 pH 值 12，提取温度为 30℃，时间为 20 min，料液比为 1 : 10，在此条件下进行提取次数试验，每次提取后计算总的提取率，并检测每次提取液的 pH 值，试验结果如图 2、3 所示。后调 pH 值法：根据 2.1 的结果，选择 pH 值为 11，其它条件与先调 pH 值法相同，也进行了提取次数试验，结果如图 2 所示。

由图 2 可知先调 pH 法的提取率一开始比后调法的低，但是后调法的提取率随 pH 值变化平缓，而先调法提取率快速上升，到第 3 次以后提取率上升变得平稳，3 次总的蛋白提取率在 90% 以上，比后调法高了近 20 个百分点，这主要是因为先调 pH 值法在多次提取过程中可以形成一个 pH 值梯度（如图 3 所示，pH 值变化先低后高），适合于提取不同种类的蛋白质，从而提高了整体的蛋白提取率。最终我们确定的菜籽蛋白提取工艺为：先调 pH 值法，pH 值为 12，料液比为 1 : 10，提取温度为 30℃，时间为 20 min，重复提取 3 次。



注：先调 pH 值法：选择 pH 值 12，提取温度为 30℃，时间为 20 min，料液比为 1 : 10；后调 pH 值法：选择 pH 值为 11，其它条件与先调 pH 值法相同

图 2 提取次数对蛋白提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction times on protein extraction ratio

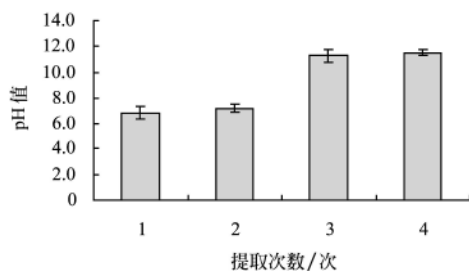


图 3 先调 pH 值法多次提取中的溶液 pH 值

Fig.3 pH value in the solution of several extraction by adjusting pH value beforehand

2.2 菜籽蛋白的纯化

选用 pH3~11 对提取得到的蛋白溶液进行沉淀，其沉淀率变化如图 4 所示。由图可知，在 pH 值为 5 或 7 时，菜籽蛋白的沉淀率较高，均超过 60%，故我们采用 pH5 和 7 的两步沉淀法来制备菜籽蛋白，分别沉淀不同等电点的蛋白质，而 pH5 时植酸和硫苷的溶解度均较高^[8]，达到纯化的目的。

此外，我们在室温下，采用进口压力 2 MPa，料液 pH 9.5 的条件下进行超滤试验，料液的截留率为 50%，并经喷雾干燥得到最终的产品。两种不同工艺的制备效

果见表 4。从该表可知从产品的蛋白纯度、蛋白得率及有害物质的脱除效果来分析，沉淀法都比超滤法优越，这主要是因为我们选用的超滤膜孔径比较细，致使超滤工艺的截留率较大，从而无法彻底脱除植酸和硫苷；此外在进行喷雾干燥时，部分物料发生粘壁现象从而使得产品的得率下降。

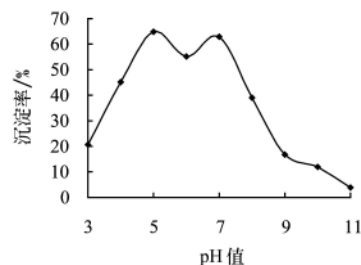


图 4 不同 pH 值下的蛋白沉淀率

Fig.4 Precipitation ratio of rapeseed protein under different pH values

表 4 两种不同工艺产品的比较

Table 4 Comparison in rapeseed proteins under two different processes of purification

| | 蛋白含量 /% | 得率 /% | 含水率 /% | 植酸 /% | 硫苷 / $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ |
|-----|------------|----------|-----------|----------|---|
| 沉淀法 | 84.8 | 38.9 | 5.0 | 0.151 | 未检出 |
| 超滤法 | 73.5 | 35.1 | 4.7 | 0.454 | 3.32 |

3 结论与讨论

以低温压榨制油的双低菜籽饼为原料，得到制备菜籽蛋白的最佳工艺条件如下：

1) 菜籽蛋白的最佳提取工艺为采用先调 pH 值法，溶液的 pH 值为 12，固液比 1 : 10，提取时间为 20 min，温度为室温，提取 3 次，该工艺可提取菜籽饼中 90% 以上的蛋白质。

2) 菜籽蛋白的纯化工艺为 pH5 和 7 的两步沉淀法，该工艺得到的产品蛋白纯度可达 84.8%，得率为 38.9%，且有害物质残留较少。

通过采用先调 pH 值法、适宜的 pH 值和合理的提取次数，得到提取率较高、变性程度相对较低的菜籽蛋白。该工艺操作简单，设备投入少，蛋白提取率高，为菜籽蛋白的工业化生产提供了良好的借鉴。但产品的纯度并未达到 90% 以上，今后需对蛋白的纯化工艺做深入的研究工作。

[参 考 文 献]

- [1] 谭小力, 郭蔼光, 李殿荣. 油菜应用的研究进展[J]. 中国农学通报, 2002, 18(3): 77—81.
- [2] 董加宝, 张长贵, 王祯旭. 食用菜籽蛋白研究及应用[J]. 粮食与油脂, 2005, (12): 11—13.
- [3] Gerbanowski A, Rabiller C, Guéguen J. Behaviors of bovine serum albumin and rapeseed proteins at the air/water interface after grafting aliphatic or aromatic chains[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2003, 262 (2): 391—399.
- [4] Krause J P, Schwenke K D. Behaviour of a protein isolate

- from rapeseed (*Brassica napus*) and its main protein components-globulin and albumin- at air/solution and solid interfaces, and in emulsions[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2001, 21(1-3): 29–36.
- [5] Carrasco B, Harding S E, Torre J G. Bead modeling using HYDRO and SOLPRO of the conformation of multisubunit proteins: sunflower and rape-seed 11S globulins[J]. *Biophysical Chemistry*, 1998, 74(2): 127–133.
- [6] Bernardi Ra, Negri A, Ronchi S, et al. Isolation of the epithiospecifier protein from oil-rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) seed and its characterization[J]. *FEBS Letters*, 2000, 467(2-3): 296–298.
- [7] B érot S, Compoint J P, Larr é C, et al. Large scale purification of rapeseed proteins (*Brassica napus* L.)[J]. *Journal of Chromatography B*, 2005, 818(1): 35–42.
- [8] 郭兴凤, 周瑞宝, 汤 坚, 等. 菜籽蛋白的制备[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22(1): 60–62.
- [9] 刘大川, 周俊梅, 张寒俊, 等. 低植酸、低单宁“双低”菜籽分离蛋白制备工艺的研究[J]. 中国油脂, 2005, 30(8): 38–41.
- [10] 朱文鑫, 胡群亮, 相 海. 油菜籽直接冷榨制油工艺的研究与应用[J]. 中国油脂, 2005, 30(3): 16–18.
- [11] 刘 燕, 张 平, 倪 艳. 双缩脲法测定大豆乳清废水中蛋白质含量[J]. 大豆通报, 2006, (6): 24–26.
- [12] 钱 和, 雕鸿荪, 沈培英. 现行油菜籽加工过程中各种成分的变化[J]. 无锡轻工大学学报, 1995, 14(2): 129–135.
- [13] 褚庆华, 倪听路. 油菜籽及其饼中硫代葡萄糖苷总量快速测定方法的研究[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(1): 79–83.

Extraction and purification of rapeseed protein

Zheng Meiyu, Chen Jianbing, Lu Shengmin*, Xing Jianrong

(Institute of Food Processing, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstracts: This paper aimed at comprehensive utilization of rapeseed meal. The techniques of extraction and purification of rapeseed protein from double-low rapeseed meal deoiled by pressing at low temperature were investigated. Through pH value adjustment, orthogonal experiment, tests of extraction times and purification, preferable technical parameters on rapeseed protein extraction were achieved. The meal was extracted for 3 times, 20 min each time, at room temperature in an alkali solution with pH value 12 adjusted beforehand, and the extract was precipitated successively twice at pH value 5 and pH value 7, and then dried. The isolated rapeseed protein prepared under this condition was in a purity of 84.8%, a yield of 38.9%, and contained less deleterious compositions. The total extraction ratio of rapeseed protein by the method of pH value adjusted beforehand was above 90%, which was 20% higher than that by pH value adjusted afterward.

Key words: rapeseed protein; extraction; purification