

亚麻籽分离蛋白的制备及其主要抗营养因子研究

孔慧广, 田少君*

(河南工业大学粮油食品学院, 郑州 450001)

摘要: 目的 提高亚麻籽饼中蛋白质的利用率, 优化亚麻籽蛋白的提取技术, 同时去除生氰糖苷、植酸等抗营养因子。**方法** 采用碱溶酸沉法从亚麻籽饼中提取分离蛋白, 在单因素试验的基础上, 以提取液 pH、提取温度、提取时间、料液比为 4 因素设计正交试验优化蛋白质提取工艺; 并对最佳工艺条件下提取的分离蛋白的基本成分和主要抗营养成分的含量进行测定。**结果** 亚麻籽分离蛋白提取的最佳工艺为: 提取液 pH 9.5、提取温度为 35 °C、提取时间为 90 min、提取料液比 1:30。最佳工艺条件下, 所得亚麻籽分离蛋白的蛋白含量(干基)为 84.32%, 提取率为 58.13%; 生氰糖苷(以 HCN 当量计算)和植酸分别由原料中的 58.41 mg/kg 和 24.10 mg/g 降低到 4.50 mg/kg 和 4.22 mg/g, 脱除率分别高达 92.30%和 82.49%。**结论** 碱溶酸沉可以得到高蛋白、低氰苷、低植酸的亚麻籽蛋白产品, 可极大的提高蛋白质的营养价值。

关键词: 亚麻籽饼; 分离蛋白; 抗营养因子

Extraction of flaxseed proteins and the main anti-nutritional factors

KONG Hui-Guang, TIAN Shao-Jun*

(College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

ABSTRACT: Objective To improve the utilization rate of protein in flaxseed meal, optimize the extraction technology of flaxseed protein, and remove the anti-nutrition factors such as cyanogen glycoside and phytic acid. **Methods** Alkali soluble acid sinking method was used to extract protein isolated from flaxseed meal, on the basis of single factor test, the extraction process of protein extraction was optimized by the orthogonal experiment using 4 factors of pH, extraction temperature, extraction time and solid/liquid ratio. The basic components of the isolated protein extracted from the optimum technological conditions and the content of the main anti-nutrient components were determined. **Results** The optimal extraction conditions were as follows: extraction pH was 9.5, extraction temperature was 35 °C, extraction time was 90 min, and solid-liquid ratio was 1:30(g/mL). The protein content (dry basis) of flaxseed protein was 84.32%, and the extraction rate was 58.13%. In addition, the content of cyanogenic glycosides (calculated by HCN equivalent) and phytic acid in the raw materials were reduced from 58.41 mg/kg and 24.10 mg/g to 4.50 mg/kg and 4.22 mg/g, respectively. The removal rates were as high as 92.30% and 82.49%, respectively. **Conclusion** Alkali soluble acid precipitation can obtain high protein, low cyanogen and low phytic acid linseed protein products, which can greatly improve the nutritional value of protein.

KEY WORDS: flaxseed meal; flaxseed isolated protein; anti-nutritional factors

*通讯作者: 田少君, 教授, 主要研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。E-mail: shaojun_tian@haut.edu.cn

*Corresponding author: TIAN Shao-Jun, Professor, College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China. E-mail: shaojun_tian@haut.edu.cn

1 引 言

亚麻(*Linum usitatissimum*), 又称胡麻, 是一年生草本植物, 主要种植在北半球^[1]。亚麻籽在我国的种植主要分布在华北、西北部地区, 西南地区也有零星种植^[2]。亚麻籽是一种富含亚麻酸的油料作物, 其中蛋白质含量也较高, 约占种子总重的 10.5%~31%^[3,4], 差异源于亚麻籽品种和生长环境的不同。亚麻籽中的蛋白质除赖氨酸含量稍低外, 其他各种氨基酸相对平衡, 其必需氨基酸含量高达 5.16%^[5]; 亦有研究表明亚麻籽分离蛋白比大豆分离蛋白有更好的持水性、乳化性和起泡性^[6], 是一种优质的蛋白质资源。

目前, 亚麻籽的开发利用多集中在亚麻油, 生氰糖苷、植酸等抗营养因子的存在对其饼粕的利用造成了很大的限制。生氰糖苷本身不存在毒性, 但由于共存酶的作用在动物体内水解产生氢氰酸而引起中毒^[7]; 植酸是一种强的金属离子螯合剂, 可与对人体有益的矿物质络合, 同时也与蛋白质形成复合物, 降低了这些营养成分的生物活性价值^[8]。碱溶酸沉法是我国普遍采用的植物蛋白提取工艺, 该方法能够有效地提高蛋白质提取率, 充分利用蛋白质资源。本文以亚麻籽冷榨饼为原料采用碱溶酸沉法提取蛋白质, 采用正交设计优化提取条件; 并对最优条件下所得分离蛋白产品的中主要抗营养因子生氰糖苷、植酸进行测定, 初步探讨碱溶酸沉工艺生产的亚麻籽蛋白作为一种新的食用蛋白资源的安全可行性, 为其进一步的开发利用提供技术和理论支持。

2 材料与方法

2.1 原料与试剂

亚麻籽冷榨饼(山西宝山鼎盛科技有限公司); 蔗糖、硝酸银、钨酸钠、三氯化铁(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); 硫酸、盐酸(分析纯, 洛阳昊华化学试剂有限公司); 苯酚(分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司); 氢氧化钠(分析纯, 洛阳市化学试剂厂)。

2.2 仪器与设备

PHS-3C 精密酸度计(上海大普仪器有限公司); DHG-9140 型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司); HH-6J 数显恒温水浴锅(上海维诚仪器有限公司); 722s 可见光分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司); SHA-C 数显水浴恒温振荡器(金坛华峰仪器有限公司); FA2004 分析天平(上海上平仪器有限公司); KJELTEC 2300 全自动凯氏定氮仪(美国 FOSS 公司); LGJ-25C 冷冻干燥机(北京四环科学技术有限公司); FW100 型万能粉碎机(北京市永光明医疗仪器厂)。

2.3 实验方法

2.3.1 原料预处理

亚麻籽冷榨饼经万能粉碎研磨, 依次过 30、60、100 目筛除去大部分的亚麻壳与杂质; 留 100 目粉 4 ℃贮存备用。

2.3.2 工艺流程及蛋白质的提取步骤

亚麻籽饼→碱液提取→离心→上清液等电点沉淀→离心→沉淀复溶→冷冻干燥→亚麻籽分离蛋白。

取一定量的亚麻籽饼, 以一定的料液比加入蒸馏水, 用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH, 在一定的温度下恒温搅拌提取一定时间, 将所得浆液 4000 r/min 离心 25 min, 将沉淀物重复提取 1 次, 合并 2 次提取上清液, 用 1 mol/L 的 HCl 调解 pH 至等电点沉淀, 以 4500 r/min 的转速下离心 1 h, 取沉淀物用 1 mol/L 的 NaOH 调节至 pH 为 7 复溶, 冷冻干燥得亚麻籽分离蛋白粉。蛋白质提取率的计算公式如下:

蛋白质提取率% = $\frac{\text{干燥样品中蛋白质的含量}}{\text{亚麻籽粉中蛋白质的含量}} \times 100\%$

2.3.3 正交试验设计

根据单因素试验结果, 以提取液 pH、提取温度、提取时间、料液比 4 因素, 每个因素取 3 个水平设计 $L_9(3^4)$ 正交试验。每个处理取 10 g 亚麻籽饼粕放入三角瓶中, 按照正交条件提取蛋白质, 提取方法参照 2.3.2, 考察每个方案的蛋白质提取率和所得分离蛋白的蛋白含量。正交试验设计方案见表 1。

表 1 正交试验因素和水平编码表
Table 1 Orthogonal experimental factors and level coding table

因素	编码水平		
	-1	0	+1
A pH	9.0	9.5	10
B 温度(℃)	35	40	45
C 时间(min)	30	60	90
D 料液比(g/mL)	1:25	1:30	1:35

2.3.4 分析测定方法

(1)基本指标的测定

粗蛋白含量测定参照国标 GB/T 5009.5-2016^[9]、水分含量测定参照国标 GB/T10358-2008^[10]、灰分含量测定参照国标 GB 5009.4-2016^[11]、粗脂肪含量测定参考国标 GB 5009.6-2016^[12]、可溶性糖含量采用苯酚-硫酸法测定^[13]。

(2)生氰糖苷的测定

生氰糖苷(以 HCN 当量计算)的测定参考 GB/T 13084-2006《饲料中氰化物的测定》^[14], 略有改动。具体方法为: 10 g 干燥的亚麻籽粉移入凯氏烧瓶中, 加 200 mL 水与样品混合。室温下消化 2 h 时后对其进行水蒸汽蒸馏,

蒸馏物收集到装有 20 mL 2.5% 的氢氧化钠溶液的烧杯中,直到蒸馏 100 mL 左右;将所得蒸馏物定容到 250 mL 的容量瓶中,混匀,准确称取 100 mL 上述蒸馏物向其中加入 8 mL 6 mol/L 的氨水和 2 mL 5% 的碘化钾,然后用 0.02 mol/L 的硝酸银进行滴定。氢氰酸按下列公式进行计算:

$$\text{HCN} = \frac{C(V - V_0)}{m} \times 135000$$

式中, C 为硝酸银溶液的摩尔浓度,单位为 mol/L; V_0 为空白样消耗的硝酸银溶液的体积,单位为 mL; V 为样品消耗的硝酸银溶液的体积数,单位为 mL; m 为样品质量,单位为 g。测得的 HCN 含量以每千克样品中含有的 HCN 量计算,表示为 mg/kg。

(3) 植酸含量的测定

植酸含量采用三氯化铁滴定法测定,参照王国蓉等^[15]文献中的方法进行测定。称取 2 g 样品于锥形瓶中,加入 50 mL 1 mol/L 盐酸,超声预处理 15 min,功率 600 W,50 °C 水浴震荡浸提 1.5 h;全部倒入离心管中,4500 r/min 离心 15 min,将全部上清液定容至 100 mL 的容量瓶中。取 20 mL 上述溶液于锥形瓶中,加入 10 滴磺基-水杨酸钠,用 0.01 mol/L 的三氯化铁溶液进行滴定,滴定过程中溶液保持在 60 °C 水浴中,滴定直至紫色不退即为终点。

$$\text{植酸含量}(\%) = \frac{5C \times V \times 0.2357}{m} \times 100$$

式中 C 为三氯化铁溶液的摩尔浓度,单位为 mol/L; V 为消耗三氯化铁溶液的体积,单位为 mL; m 为样品质量,单位为 g; 0.2357 为每分子植酸可络合 2.8 个 Fe^{3+} , 1 mol 三氯化铁相当于 0.2357 g 植酸。

2.3.5 数据分析

实验中所有测定结果均为 3 次平行,实验结果利用 SPSS 20.0 进行数据处理,Origin 8.5 软件进行处理作图。

3 结果与分析

3.1 单因素试验结果

3.1.1 提取液 pH 值对蛋白质提取率的影响

提取液 pH 对蛋白质提取率的影响如图 1 所示。由图 1 可以看出当碱液中的 pH 从 7.0 增加到 9.5 时,蛋白质的提取率呈现增加趋势。当继续增加溶液的 pH 从 9.5 增加到 11 时,蛋白质的提取率却呈现下降的趋势。这可能是因为高 pH 值使得静电荷增加引起强烈的分子静电排斥力致使蛋白质分子的肿胀和展开,甚至导致蛋白质肽链的断裂,使得蛋白质的结构受到破坏^[16-18],从而降低了蛋白质的提取率。在本实验中提取液 pH 在 9.5 时蛋白质的提取率最大。

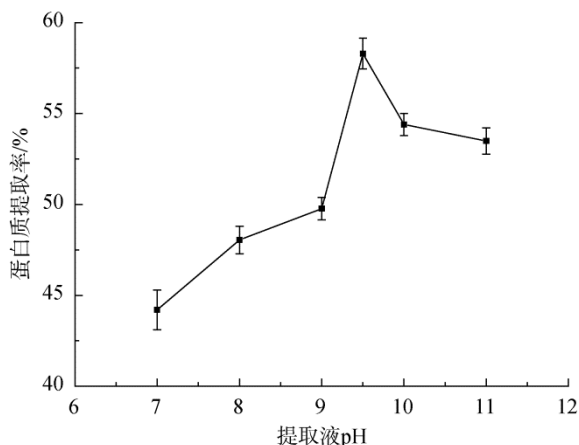


图 1 提取液 pH 对亚麻籽蛋白质提取率的影响($n=3$)

Fig. 1 Effect of pH on the extraction efficiency of protein from flaxseed meal ($n=3$)

3.1.2 提取温度对蛋白质提取率的影响

由图 2 可以看出,随着提取温度的增加,蛋白质的提取率呈现显著的上升趋势,温度为 40 °C 时提取率达到最高,40 °C 上升到 60 °C 时提取率呈现下降的趋势,这原因之一可能是由于高温引起蛋白质的部分变性引起的^[17]。本实验中选择 40 °C 为最佳提取温度。

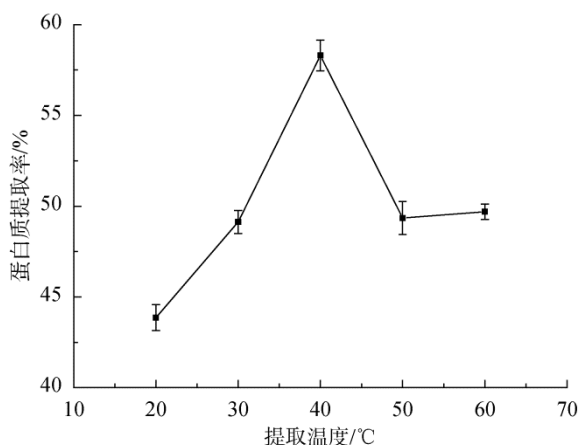


图 2 提取温度对蛋白质提取率的影响($n=3$)

Fig. 2 Effect of temperature on the extraction efficiency of protein from flaxseed meal ($n=3$)

3.1.3 提取时间对蛋白质提取率的影响

由图 3 可知当提取时间从 0.5 h 增加到 1 h 时,蛋白质的提取率显著增加,当超过 1 h 后蛋白质的提取率呈现下降趋势。这可能是因为蛋白质的溶出需要一定的时间,在 1 h 附近达到平衡状态,继续搅打产生的剪切力可能使得空气泡的并入,使得溶出的蛋白质部分吸附至空气界面,引起构象上的变化导致蛋白质变性和沉淀^[16]。再者,提取时间的增加会使得提取蛋白质成本的增加,故本实验中选择的最佳提取时间为 1 h。

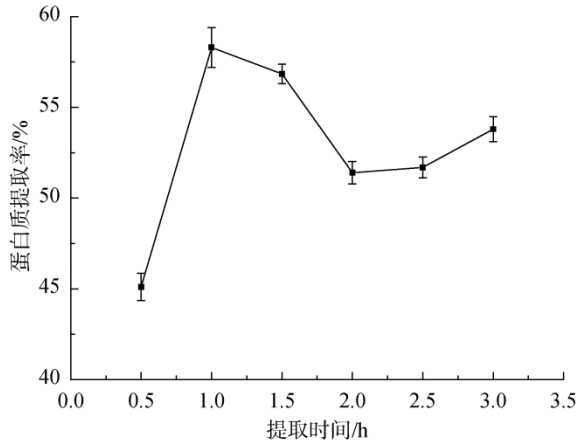


图 3 提取时间对蛋白质提取率的影响($n=3$)
Fig. 3 Effect of time on the extraction efficiency of protein from flaxseed meal ($n=3$)

3.1.4 提取料液比对蛋白质提取率的影响

由图 4 可知随着料液比的增大，蛋白质的提取率呈现上升的趋势，当料液比达到 1:25 时继续增加时，上升趋势缓慢，蛋白质的提取率趋于平衡。由于亚麻籽饼中亚麻胶多糖的存在，低于 1:25 的料液比会使得蛋白提取液的黏度过高，增加提取的难度；而料液比过高会导致在酸沉时球蛋白在上清液中的溶解数量，使得蛋白质的提取率降低^[17]。综合考虑正交试验确定的料液比为 1:30。

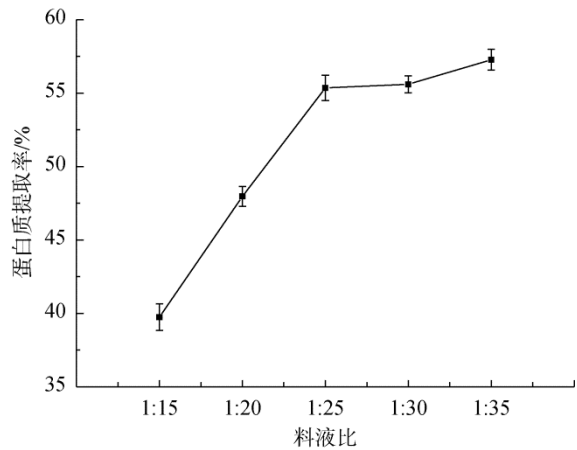


图 4 料液比对蛋白质提取率的影响($n=3$)
Fig. 4 Effect of solid/liquid ratio on the extraction efficiency of protein from flaxseed meal ($n=3$)

3.2 正交试验

正交试验结果见表 2，由表 2 可知，各种因素对碱溶酸沉法提取亚麻籽分离蛋白提取率的影响从大到小依次为：提取液 pH > 提取时间 > 料液比 > 提取温度。综合各因素考虑，碱溶酸沉法提取亚麻籽蛋白的最佳工艺为： $A_2B_1C_3D_2$ ，即：提取液 pH 9.5、提取温度 35℃、提取时间 90 min、提

取料液比 1:30；在此条件下重复 3 次验证实验，所得亚麻籽分离蛋白的蛋白含量(干基)为 84.32%，蛋白质的提取率为 58.13%。

表 2 正交试验设计和结果
Table 2 Orthogonal experimental design matrix and results

试验序号	A pH	B 温度(℃)	C 时间(min)	D 料液比	蛋白纯度(%)	蛋白质提取率(%)
1	10.0	40	90	1:25	83.09	48.35
2	10.0	45	30	1:30	82.24	49.79
3	9.5	35	90	1:30	82.06	57.03
4	9.5	45	60	1:25	79.42	47.31
5	9.5	40	30	1:35	83.94	50.78
6	9.0	45	90	1:35	81.14	45.82
7	9.0	35	30	1:25	82.45	47.27
8	10.0	35	60	1:35	79.19	46.45
9	9.0	40	60	1:30	82.06	46.72
K_1	46.603	50.250	49.280	47.643		
K_2	51.707	48.617	46.827	51.180		
K_3	48.197	47.640	50.400	47.683		
R	5.104	2.610	3.5733	3.537		

3.3 原料及亚麻籽分离蛋白中基本成分

亚麻籽原料及在最优条件下制得分离蛋白产品的基本成分含量见表 3。从中可知所得的分离蛋白的蛋白含量为 84.32%，可溶性糖的含量为 6.57%，亚麻籽中主要的抗营养因子生氰糖苷(以 HCN 计)从 58.4 mg/kg 降低到 4.50 mg/kg 以下水平，符合 GB 2715-2016《食品安全国家标准 粮食》^[19]中的木薯粉总氢氰酸含量≤10 mg/kg 规定，脱除率达到 92.30%，可见碱溶酸沉工艺对生氰糖苷的脱出有很大的贡献。这可能是因为氰苷易溶于水，一部分在适宜条件下可与其共存的水解酶的作用^[20]，水解产生氢氰酸而挥发，另一部分会在酸沉过程中留在上清液中，从而将大部分的氰苷脱除。对植酸而言，其在 pH=5.0 时溶解度最大，使得在酸沉中溶于上清液，脱除率也高达 82.49%；但少量植酸的存在可能是由于其能结合储存蛋白^[21]。

4 结 论

在单因素试验的基础上，采用碱溶酸沉法提取分离蛋白，得到最佳工艺为提取液 pH 9.5、提取温度 35℃、提取时间 90 min、提取料液比 1:30。在此条件下所得亚麻籽分离蛋白的蛋白含量(干基)为 84.32%，蛋白质的提取率为 58.13%。碱溶酸沉法直接提取蛋白质能够脱出大部分的生

表 3 亚麻籽原料及分离蛋白产品的基本成分含量
Table 3 Basic component content of flaxseed raw material and isolated protein

	蛋白 含量 (%)	水分 (%)	灰分 (%)	粗脂 肪 (%)	可溶 性糖 (%)	生氰糖苷 (HCN 当量) (mg/kg)	植酸 (mg/g)
亚麻籽原料	39.13	10.29	6.04	1.02	10.15	58.41	24.1
分离蛋白	84.32	5.28	4.43	0.98	6.57	4.50	4.22

氰糖苷、植酸，使其含量降低到了较低水平。总体来说，碱溶酸沉可以得到高蛋白、低氰苷、低植酸的蛋白产品，可极大地提高蛋白质的营养价值。

参考文献

[1] 李高阳. 亚麻籽双液相萃取脱氰苷及蛋白特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
Li GY. Study on oil extraction and removal of cyanogenic glycosides by two-liquid phase method and physical and chemical properties of protein [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2006.

[2] 周立新, 黄凤洪, 严兴初, 等. α -亚麻酸与 γ -亚麻酸[J]. 西部粮油科技, 2000, 25(6): 46–48.
Zhou LX, Huang FH, Yan CX, *et al.* α -linolenic acid and γ -linolenic acid [J]. China Western Cereals Oils Technol, 2000, 25(6): 46–48.

[3] Rubilar M, Gutiérrez C, Verdugo M, *et al.* Flaxseed as a source of functional ingredients [J]. J Soil Sci Plant Nutr, 2010, 10(3): 373–377.

[4] Kadivar M. Studies on integrated processes for the recovery of mucilage, hull, oil and protein from solin (low linolenic acid flax) [D]. Saskatoon: University of Saskatchewan, 2001.

[5] 但建明, 刘金荣, 赵文斌, 等. 亚麻籽与籽油的营养成分及理化特性研究[J]. 营养学报, 2003, 25(2): 157–158.
Dan JM, Liu JR, Zhao WB, *et al.* Study on the nutritional components and characteristics of the linseed and linseed-oil [J]. Acta Nutr Sin, 2003, 25(2): 157–158.

[6] Dev DK, Quensel E. Functional and microstructural characteristics of linseed (*Linum usitatissimum* L.) flour and a protein isolate [J]. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technol, 1986, 19(4): 331–337.

[7] 周小洁, 车向荣, 于霏. 亚麻籽及其饼粕的营养学和毒理学研究进展[J]. 饲料工业, 2005, 26(19): 46–50.
Zhou XJ, Che XR, Yu F. Review of nutrition and toxicology of flaxseed and its cakes [J]. Feed Ind Mag, 2005, 26(19): 46–50.

[8] Oomah BD, Kenaschuk EO, Mazza G. Phytic acid content of flaxseed as influenced by cultivar, growing season and location [J]. J Agric Food Chem, 1996, 44(9): 2663–2666.

[9] GB 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S].
GB 5009.5-2016 National food safety standard-Determination of protein in food [S].

[10] GB/T 10358-2008 油料饼粕 水分及挥发物含量的测定[S].
GB/T 10358-2008 Oilseed meal-Determination of moisture and volatile content [S].

[11] GB 5009.4-2016 食品安全国家标准 食品中灰分的测定[S].

GB 5009.4-2016 National food safety standard-Determination of ash content in food [S].

[12] GB 5009.6-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定[S].
GB 5009.6-2016 National food safety standard-Determination of fat in food [S].

[13] 王文平, 郭祀远, 李琳, 等. 苯酚-硫酸法测定野木瓜中多糖含量的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(4): 276–279.
Wang WP, Guo SY, Li L, *et al.* Assay study on content of polysaccharides in stanuntonia chinensis by phenol-sulfuric acid method [J]. Food Sci, 2007, 28(4): 276–279.

[14] GB/T 13084-2006 饲料中氰化物的测定[S].
GB/T 13084-2006 Determination of cyanide in feeds [S].

[15] 王国蓉, 万文贵, 王丽, 等. 三氯化铁滴定法测定植酸含量方法的优化及改进研究[J]. 食品科学, 2009, 30(10): 188–190.
Wang GR, Wan WG, Wang L, *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction conditions for determination of phytic acid in wheat bran by FeCl₃ titration method. [J]. Food Sci, 2009, 30(10): 188–190.

[16] 王璋, 许时婴, 汤坚. 食品化学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.
Wang Z, Xu SY, Tang J. Food chemistry [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2003

[17] 夏克东. 星油藤蛋白的制备及其理化性质的研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2016.
Xia KD. Preparation of Sacha Inchi proteins and their physical-chemical properties [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2016.

[18] 陈姿含, 管晓, 李景军. 响应面法优化低温豆粕大豆分离蛋白提取工艺[J]. 生物加工过程, 2012, 10(3): 39–44.
Chen ZH, Guan X, Li JJ. Optimization of extraction conditions of soybean protein isolated from low temperature soybean meal by response surface methodology [J]. Chin J Bioprocess Eng, 2012, 10(3): 39–44.

[19] GB 2715-2016 食品安全国家标准 粮食[S].
GB 2715-2016 National food safety standard-Grain [S].

[20] Yamashita T, Sano T, Hashimoto T, *et al.* Development of a method to remove cyanogen glycosides from flaxseed meal [J]. Int J Food Sci Technol, 2010, 42(1): 70–75.

[21] Jpd W, Shahidi F. Alkanol-ammonia-water/hexane extraction of flaxseed [J]. Food Chem, 1994, 49(1): 39–44.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



孔慧广, 硕士研究生, 主要研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。
E-mail: 83436948@ qq.com。



田少君, 教授, 主要研究方向为粮食、油脂及植物蛋白工程。
E-mail: shaojun_tian@ haut.edu.cn。