

脱酚棉籽蛋白限制性酶解因素的分析

张 余,许雪峰,李 敏,孙艳辉,贾小丽

(滁州学院 化学与生命科学系,安徽 滁州 239012)

【摘 要】 **【目的】**对脱酚棉籽蛋白限制性酶解因素进行分析,为提高棉籽蛋白的溶解性提供参考。**【方法】**采用胰蛋白酶对脱酚棉籽蛋白(CPF)进行限制性酶解,以蛋白质的溶解度和水解度为指标,研究浸泡时间、搅拌方式以及酶解因素(酶用量、体系 pH、底物(CPF)质量浓度、酶解温度、时间)对棉籽蛋白水解的影响。**【结果】**将棉籽蛋白于酶解前在 3 倍量(mL/g)去离子水中浸泡 3 h 有利于酶解。在酶用量为 75 kU/g、pH 为 8、底物质量浓度为 80 g/L、50 ℃条件下磁力搅拌(120 r/min)酶解 3 h,可得到水解度为 10.67%、溶解度为 54.47%的酶解棉籽蛋白。溶解度分析结果表明,限制性酶解棉籽蛋白在 pH 1~11 时具有较好的溶解度,且保持了棉籽蛋白酸溶性的特点。**【结论】**用胰蛋白酶限制性水解脱酚棉籽蛋白,既可以显著提高棉籽蛋白的溶解度,又保持了其酸溶性的特点。

【关键词】 胰蛋白酶;限制性酶解;棉籽蛋白;水解度;溶解度

【中图分类号】 TS201.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)04-0195-06

Parameter analysis of limited enzymolysis to de-gossypol cottonseed protein

ZHANG Cuan, XU Xue-feng, LI Min, SUN Yan-hui, JIA Xiao-li

(Department of Chemistry and Life Science, Chuzhou University, Chuzhou, Anhui 239012, China)

Abstract: **【Objective】** To provide some references for improving the solubility of cottonseed protein, the limited enzymolysis parameters of de-gossypol cottonseed protein were analyzed. **【Method】** The cottonseed protein was partially hydrolyzed by trypsinase. Taking solubility and degree of hydrolysis (DH) as evaluation index, the steeping time before enzymolysis, mixing ways and the enzymolysis parameters (such as trypsinase concentration, substrate concentration, pH value and temperature) were investigated in this paper. **【Result】** Steeping the cottonseed protein flour in three times de-ionized water (mL/g) before enzyme hydrolysis is helpful to enzymolysis. In this test, a proper DH (10.67%) and a higher solubility (54.47%) of cottonseed protein can be obtained on the condition of trypsinase concentration 75 kU/g, pH value 8, CPF mass concentration 80 g/L, the temperature 50 ℃ and hydrolysed 3 h with magnetic force stirring (120 r/min). The results of solubility analyzed in different pH solutions show that the enzymolytic cottonseed protein has higher solubility in pH value from 1 to 11, and it still maintains the acid-soluble character of cottonseed protein before enzymolysis. **【Conclusion】** The solubility of de-gossypol cottonseed protein can be significantly improved by limited hydrolyzed with trypsinase in proper condition, and the acid-soluble character of cottonseed protein is remained.

Key words: trypsinase; limited enzymolysis; cottonseed protein; degree of hydrolysis; solubility

* [收稿日期] 2009-09-30

[基金项目] 安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2009B146);安徽省应用化学省级重点学科建设项目(No. 200802187C);滁州学院博士科研启动基金(2007-12)

[作者简介] 张 余(1970—),女,陕西泾阳人,副教授,博士,主要从事食品化学与营养学、植物蛋白研究。

E-mail: zhangchuan2005@126.com

棉籽是棉花生产中的主要副产品,在我国的年产量为 1 100 万 t(2007 年)^[1],含有丰富的食用油脂和膳食蛋白,脱脂后的棉籽饼粕中蛋白质含量可高达 500 g/kg 以上。棉籽蛋白口味清淡,氨基酸组成合理,含抗营养因子少,其营养价值与大豆蛋白接近,但优于花生蛋白,是一种潜在的膳食植物蛋白资源^[2-3]。

研究表明,棉籽蛋白在中性条件下的溶解性较差,限制了其在食品领域的应用^[4-5]。溶解性是蛋白质的基本特性,也是其他相关功能性质(如吸水、吸油性、起泡性等)的基础。而为了改善蛋白质的功能性质,常需对其进行化学改性,如酰化和酶解。

Lusas 等^[6]、胡传荣等^[7]曾对棉籽蛋白的酰化改性进行了研究,结果表明,酰化改性可以明显改善其吸水性、吸油性、乳化性和起泡性。但酰化改性一般会引入酰化剂(酸酐),还会有副反应和副产物产生,一般不用于膳食蛋白的改性。

在蛋白质的酶法改性中,一般根据蛋白质水解程度(即水解度, DH)将酶解过程分为两类: $DH > 10\%$ 的属于深度水解,所得水解蛋白主要用于蛋白质营养强化或特殊的治疗膳食,如生产低过敏原的蛋白食品; $DH \leq 10\%$ 的称为限制性水解,该类水解蛋白一般具有良好的功能性质,可广泛用于各类食品加工中^[8]。因此,本研究以普通棉籽仁为原料,以改善棉籽蛋白溶解性为主要目标,采用胰蛋白酶对其进行限制性水解(DH 在 10% 左右,溶解度 $\geq 50\%$),并对其主要影响因素进行分析,为拓宽棉籽蛋白在食品领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

普通有腺体棉籽仁,购自安徽省滁州市一家棉花加工厂。

将棉籽用少量去离子水浸泡至棉籽壳软化后,手工去壳,棉籽仁于 45 °C 下干燥 12 h 后,粉碎(粒径为 0.25 mm),装入聚乙烯自封袋,置 4 °C 冰箱内贮存,备用。

1.2 主要仪器与试剂

主要仪器有: CP224S 电子分析天平(德国 Sartorius)、L-550 型离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司)、KDN-102F 型自动定氮仪(上海纤检仪器有限公司)、HYP-1004 型消化炉(上海纤检仪器有限公司)、8-10 型箱式电阻炉(杭州蓝天化验仪器有限公司)、CL-2 型恒温加热磁力搅拌器(郑州长城科工

贸公司)、紫外-可见分光光度计(Cary 100 Scan)。

主要试剂有:胰蛋白酶制剂(国药集团化学试剂有限公司,比活力 2 500 U/mg);棉酚标准品,购自中国药物检验所,纯度 $\geq 99\%$;牛血清白蛋白 V (Roche 分装),购自北京拜尔迪生物技术有限公司;其他常规化学试剂均为分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 脱酚棉籽蛋白粉(CPF)的制备^[9-10] 称取 100 g 左右棉籽粉,以乙醚为溶剂,分批采用索氏脂肪提取仪回流脱脂 4 h。回流结束后,将脱脂棉籽粉于 40 °C 烘箱内挥发除去乙醚,得脱脂棉籽粉。在脱脂棉籽粉中加入 5 倍量(mL/g)体积分数 70 % 丙酮水溶液,室温下搅拌 5 min,离心(4 000 r/min, 5 min)分离,再将沉淀用体积分数 70% 丙酮水溶液重复提取 3~5 次,直至液相呈淡黄色为止。将所得沉淀于 40 °C 烘箱内干燥过夜,粉碎(粒径 0.25 mm),即得脱酚棉籽蛋白粉(CPF),装入聚乙烯自封袋,于 4 °C 冰箱内保存,备用。

1.3.2 CPF 的酶解处理 (1)胰蛋白酶酶液的配制。准确称取 3.00 g 胰蛋白酶试剂溶于 300 mL 蒸馏水中,于 40 °C 水浴恒温浸提 30 min(期间不断搅拌),然后用孔径 0.074 mm 尼龙滤布过滤至试剂瓶即可(酶制剂质量浓度为 1 mg/mL,酶活力为 25 000 U/mL)。

(2)酶解。准确称取 2 g CPF(精确至 0.000 1 g),经预处理后,按试验设定的条件加入胰蛋白酶液进行酶解。酶解结束后,于沸水浴中灭酶 15 min,冷却,调其 pH 值至中性,离心(4 000 r/min, 5 min),取上清液,在沉淀中加入适量蒸馏水,重复提取 1 次。将 2 次上清液合并转入 100 mL 容量瓶内,用蒸馏水定容,即得脱酚棉籽蛋白酶解液,待测。

1.3.3 浸泡时间对棉籽蛋白水解的影响 在酶解前采用 3 倍量(mL/g)的蒸馏水将 CPF 分别浸泡 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 h, 于设定条件(胰蛋白酶用量为 75 kU/g、底物质量浓度为 80 g/L、pH 中性、40 °C)下进行水解,分析浸泡时间对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响。

1.3.4 搅拌方式对棉籽蛋白水解的影响 试验设磁力搅拌(120 r/min)和间歇式搅拌(每 10 min 用玻璃棒搅拌 1 次)2 种搅拌方式,分析相同酶解条件(胰蛋白酶用量为 75 kU/g、底物质量浓度为 80 g/L、pH 中性、40 °C)下,搅拌方式对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响。

1.3.5 酶解因素对棉籽蛋白水解的影响 以下试

验中,棉籽蛋白酶解前均于3倍量(mL/g)的蒸馏水中浸泡3 h,酶解过程采用磁力搅拌(120 r/min)。

(1)酶用量。称取2 g CPF 8份,放入锥形瓶内,经浸泡后,分别加入0,5,10,25,40,50,75和100 kU/g胰蛋白酶,于底物质量浓度100 g/L、pH中性、40℃条件下酶解1 h,分析酶用量对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响。

(2)体系pH值。称取2 g CPF 6份,放入锥形瓶内,经浸泡后,分别加入蒸馏水调整底物质量浓度为100 g/L,用2 mol/L的NaOH溶液和HCl溶液调其pH分别为2,4,6,8,10和12,于酶用量为75 kU/g、50℃条件下酶解1 h,分析体系pH值对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响。

(3)CPF质量浓度。称取2 g CPF 6份,放入锥形瓶内,经浸泡后,分别加入蒸馏水调整底物质量浓度分别为20,50,80,100,120和150 g/L,于酶用量为75 kU/g、pH 8、40℃条件下酶解1 h,分析底物质量浓度对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响。

(4)酶解温度。分别准确称取2 g CPF 7份,放入锥形瓶内,经浸泡后,加入蒸馏水调整底物质量浓度为80 g/L,分别放入20,30,40,50,60,70和80℃水浴中,于酶用量为75 kU/g、pH 8条件下酶解1 h,分析酶解温度对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响。

(5)酶解时间。称取2 g CPF 6份,放入锥形瓶内,经浸泡后,加入蒸馏水调整底物质量浓度为80 g/L,于酶用量为75 kU/g、pH 8、50℃条件下分别酶解1,2,3,4,5和6 h,分析酶解时间对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响。

1.3.6 pH值对酶解棉籽蛋白溶解性的影响 采用试验所得最优酶解工艺,制备酶解棉籽蛋白,并以酶解前的棉籽蛋白为对照,分析酶解棉籽蛋白在不同pH值(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11)下的溶解特性。

1.4 测定项目及方法

1.4.1 棉籽粉主要组分含量的测定 (1)基本组分的含量^[11]。水分含量采用GB/T5009.3—2003方法测定;粗蛋白质含量采用GB/T5009.5—2003方法测定;粗脂肪采用GB/T5009.6—2003方法测定;灰分采用GB/T5009.4—2003方法测定;粗纤维采用GB/T5009.10—2003方法测定。

(2)可溶性糖含量。可溶性糖含量(以蔗糖计)采用苯酚—硫酸法测定^[12]。

(3)游离棉酚含量^[13-14]。利用棉酚易溶于体积

分数70%丙酮水溶液中,该溶液在378 nm处有最大吸收峰,且其吸光值与其中游离棉酚含量呈正比的原理,采用比色法测定。

1.4.2 水解度的测定 (1)蛋白质含量。采用茚三酮比色法测定^[13]。利用氨基酸与茚三酮反应生成的紫色络合物在570 nm处有特征吸收峰的性质,以混合氨基酸配制标准氨基酸溶液,比色测定溶液中氨基酸含量(或相当于蛋白质的含量)与相应的吸光度(A_{570}),绘制标准曲线。所得标准曲线为:蛋白质质量(Y , mg) = $0.457 \times A_{570} + 0.047$,相关系数 $R^2 = 0.9903$ 。

(2)样品水解度(DH)。取1.3.2中所得棉籽蛋白酶解液0.5 mL,先采用茚三酮比色法测定其中的氨基酸含量,然后计算水解度。水解度计算公式为:

$$DH = (B/W) \times (V_1/V_2) \times 100\%$$

式中: B 为由标准曲线计算所得的蛋白质质量,mg; W 为酶解样品中的总蛋白质质量,g; V_1 为水解液的总体积,mL; V_2 为显色时所用的水解液体积,mL。

1.4.3 溶解度的测定 酶解液中蛋白质含量采用Lowry法测定^[15]。蛋白质溶解度定义为溶解的蛋白质质量占样品中总蛋白质质量的百分比。

1.5 数据处理

每样品重复测定3次,取其平均值。以Excel和DPS数据处理软件对测定数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同棉籽原料中主要组分的含量

原料棉籽粉、脱脂棉籽粉和脱酚棉籽蛋白粉(CPF)的主要组分含量如表1所示。经脱脂、脱酚处理后,所得脱酚棉籽蛋白粉色淡黄,气味清淡,其粗蛋白质含量($N \times 5.30$)为681.4 g/kg,已达到浓缩蛋白的要求,游离棉酚含量为0.3 g/kg(表1),符合国家对食用棉籽蛋白粉中游离棉酚含量的要求(≤ 0.42 g/kg)^[10]。

2.2 浸泡时间和搅拌方式对棉籽蛋白水解的影响

图1显示,随着浸泡时间的延长,所得棉籽蛋白的水解度和溶解度均显著增加($P < 0.05$),浸泡3 h后,溶解度增加幅度减少,故酶解前CPF的浸泡时间为3 h。

酶解过程中,对搅拌方式的研究结果显示,在相同的酶解条件下,磁力搅拌、间歇式搅拌所得的棉籽蛋白的水解度和溶解度分别为11.30%,51.50%和8.80%,38.27%,两者差异显著($P < 0.05$),说明采

用磁力搅拌(120 r/min)更有利于棉籽蛋白的水解。r/min)。
故本研究的酶解过程中均采用磁力搅拌(120

表 1 不同棉籽原料中主要组分含量的分析结果

Table 1 Main constituents analysis results of different cottonseed materials g/kg

项 目 Item	棉籽粉 Cottonseed flour	脱脂棉籽粉 Defatted cottonseed flour	脱酚棉籽蛋白粉 De-gossypol cottonseed flour
水分 Water	66.7	78.0	130.0
粗蛋白(N×5.30) Crude protein	413.6	561.0	681.4
粗脂肪 Crude fat	304.9	7.3	—
灰分 Ash	57.5	77.2	85.5
粗纤维 Crude fiber	11.0	17.8	21.1
可溶性糖 Soluble suger	109.6	184.4	41.5
游离棉酚 Free gossypol	8.8	10.7	0.3

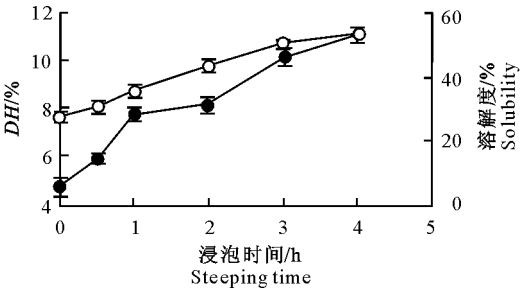


图 1 浸泡时间对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响

—●—, DH; —○—, 溶解度

Fig. 1 Effects of dipping time on the DH and solubility of cottonseed protein

—●—, DH; —○—, Solubility

浸泡及搅拌方式对棉籽蛋白酶解的影响主要缘于对其中棉籽蛋白分子与水和酶分子接触程度的影响。在 CPF 中,除蛋白质外,还含有纤维素、矿物质、色素等组分,这些组分可与蛋白质分子紧密结合。此外,蛋白质分子间也会以各种化学键相互结

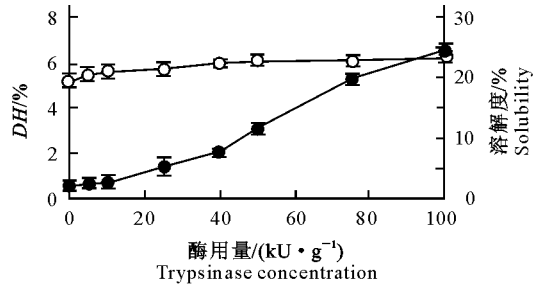


图 2 酶用量对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响

—●—, DH; —○—, 溶解度

Fig. 2 Effects of trypsinase concentration on the DH and solubility of cottonseed protein

—●—, DH; —○—, Solubility

2.3.3 CPF 质量浓度 图 4 显示,在 CPF 质量浓度为 20~80 g/L,水解度变化不明显;之后,随着 CPF 质量浓度的增加,棉籽蛋白水解度显著降低

合,这些结合均会影响蛋白质分子与酶分子的接触。

2.3 棉籽蛋白的限制性酶解因素

2.3.1 酶用量 图 2 显示,在 CPF 质量浓度为 100 g/L、pH 中性、40 ℃酶解 1 h 的条件下,随着酶用量的增加,水解度也逐渐增加,且处理间差异显著 ($P<0.05$);棉籽蛋白的溶解度也呈增加趋势,但当酶用量增加至 75 kU/g 以上时,尽管水解度还呈显著增加趋势,但溶解度的增加幅度不明显。这说明在此条件下,酶用量已经不再是影响棉籽蛋白酶解的主要因素了。因此,胰蛋白酶酶用量以 75 kU/g 较适宜。

2.3.2 体系 pH 值 图 3 显示,随着体系 pH 的增加,DH 呈先逐渐增加,达到最高值后又减小的趋势,其中当体系 pH 值为 8 时,棉籽蛋白水解度达到最高(8.00%),此时的溶解度为 30.54%。因此,选择胰蛋白酶水解棉籽蛋白的最佳 pH 值为 8。

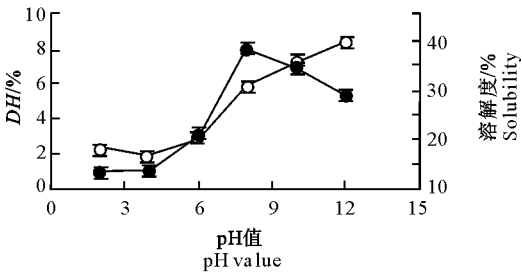


图 3 体系 pH 值对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响

—●—, DH; —○—, 溶解度

Fig. 3 Effects of pH value on the DH and solubility of cottonseed protein

—●—, DH; —○—, Solubility

($P<0.05$)。随着 CPF 质量浓度的增加,溶解度持续降低;当 CPF 质量浓度 >100 g/L 以后,溶解度变化不明显。因此,综合水解度和溶解度的结果,CPF

质量浓度以 80 g/L 为宜,此时棉籽蛋白溶解度为 34.72%。

2.3.4 酶解温度 图 5 显示,在温度为 20~80 ℃ 时,胰蛋白酶水解棉籽蛋白的最适宜温度为 40~60

℃,在此温度范围内,棉籽蛋白的水解度较高,但增幅不显著($P>0.05$),在 50 ℃ 时溶解度达到最高(51.02%)。因此,选择酶解温度为 50 ℃,此时棉籽蛋白的水解度为 10.02%。

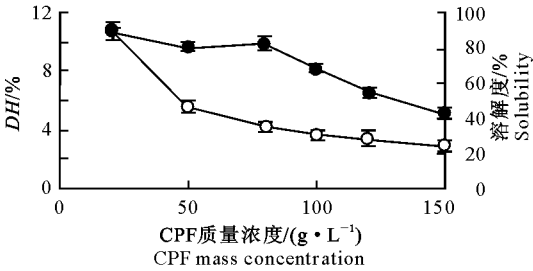


图 4 CPF 质量浓度对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响

—●—, DH; —○—, 溶解度

Fig. 4 Effects of CPF mass concentration on the DH and solubility of cottonseed protein

—●—, DH; —○—, Solubility

2.3.5 酶解时间 图 6 表明,在酶用量为 75 kU/g、pH 为 8、底物质量浓度为 80 g/L、50 ℃ 条件下,随着酶解时间的延长,棉籽蛋白的水解度和溶解度均逐渐增加。本试验是以胰蛋白酶对棉籽蛋白进行限制性水解以改善其溶解性,水解度宜限制在 10% 左右。因此,水解时间以 3 h 为宜,此时棉籽蛋白水解度为 10.67%,溶解度为 54.47%,基本可以满足一般食品加工中对膳食蛋白溶解性的要求。

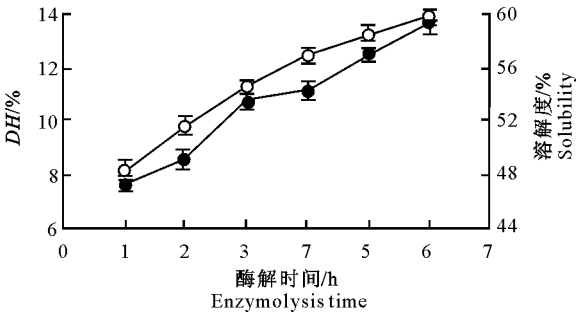


图 6 酶解时间对棉籽蛋白水解度和溶解度的影响

—●—, DH; —○—, 溶解度

Fig. 6 Effects of enzymolysis time on the DH and solubility of cottonseed protein

—●—, DH; —○—, Solubility

2.4 酶解棉籽蛋白水解度(DH)与溶解度的相关性

分析表明,在不同的酶解条件下,酶解棉籽蛋白的水解度($x, \%$)和溶解度($y, \%$)间存在比较明显的线性关系(图 7),相关方程为: $y = 3.2103x + 13.957$,相关系数 $R^2 = 0.8041$,相关性达极显著水平($P < 0.0001$)。在本试验中,棉籽蛋白的水解属

于限制性水解,水解度较低(10% 左右),故蛋白质的溶解度与其分子中肽键的水解程度呈显著的线性相关。

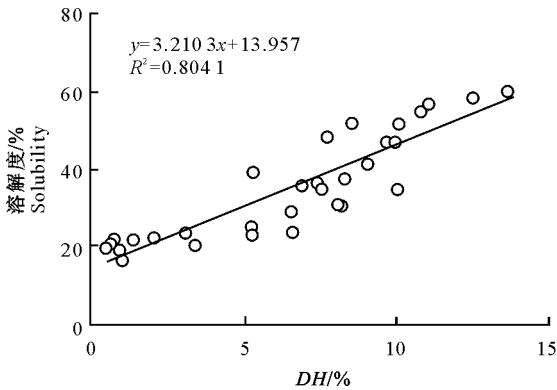


图 7 酶解棉籽蛋白水解度与溶解度的相关性分析

Fig. 7 Correlativity analysis between DH and solubility of enzymolysis cottonseed protein

2.5 酶解棉籽蛋白的溶解性

图 8 显示,棉籽蛋白属酸溶性蛋白,在酸性条件下的溶解性较好,pH = 1.05 时,溶解度较高,为 83.81%;在 pH = 6.04 时最低,仅 11.62%。这与棉籽蛋白本身的分子结构特性有关,棉籽蛋白主要由球蛋白组成(约占 90%),可分离为 2S、7S、12S 3 种,其中 7S、12S 球蛋白约占 60%,在酸性溶液中易解离为低分子量的单体,在中性溶液中又会聚合成寡聚蛋白^[16]。

在本试验条件下,当 pH 为 1~11 时,所得限制性酶解棉籽蛋白的溶解度均高于棉籽蛋白,其中在 pH 为 6~7 时溶解度较低,在偏酸或偏碱条件下溶

解度均迅速增加。这表明,经胰蛋白酶限制性水解的棉籽蛋白,其溶解度显著增加,且仍然保留了棉籽蛋白酸溶性的特点(图 8)。

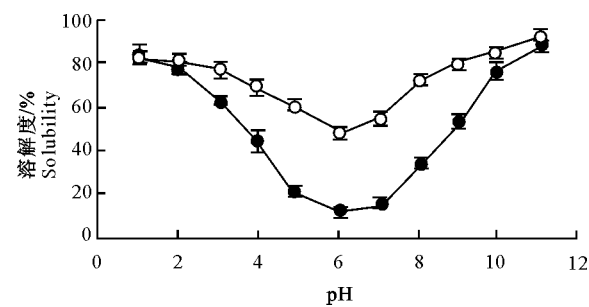


图 8 pH 值对酶解棉籽蛋白溶解性的影响

—●—, 棉籽蛋白;—○—, 酶解棉籽蛋白

Fig. 8 Effects of pH value on the solubility of enzymolytic cottonseed protein

—●—, Cottonseed protein;—○—, Enzymolytic cottonseed protein

3 结 论

本试验以脱酚棉籽蛋白粉(CPF)为原料,对影响 CPF 酶解的主要因素进行了分析,结果表明,影响胰蛋白酶水解脱酚棉籽蛋白的因素除酶用量、pH 值、底物质量浓度和酶解温度等因素外,还包括酶解前的浸泡和酶解时的搅拌方式,酶解前 CPF 在 3 倍量(mL/g)去离子水中浸泡 3 h 有助于其酶解,在酶用量为 75 kU/g、pH 为 8、CPF 质量浓度为 80 g/L、50 ℃条件下磁力搅拌(120 r/min)酶解 3 h,可得到水解度为 10.67 %、溶解度为 54.47%的酶解棉籽蛋白。溶解性分析表明,限制性水解的棉籽分离蛋白在 pH 1~11 时具有较高的溶解性,且仍保持了棉籽蛋白酸溶性的特点。

[参考文献]

[1] 唐金全,宋卫国,黄隽辉. 棉籽精深加工新技术与新工艺 [J]. 中国油脂,2007,32(10):32-35.
Tang J Q, Song W G, Huang J H. The new technology and technique of cottonseed deep-processing [J]. China Oils and Fats, 2007, 32(10): 32-35. (in Chinese).

[2] Spadaro James J, Gardner Homer K. Food uses for cottonseed protein [J]. Journal of the American Chemists' Society, 1979, 56:422-424.

[3] 陆 恒. 棉籽蛋白质的营养价值和食用趋势 [J]. 现代商贸工业, 2003(11):48-51.
Lu H. The cottonseed protein nutritional value and its edible tendency [J]. Modern Trade Industry, 2003 (11): 48-51. (in Chinese)

[4] Tsaliki E, Kechagia U, Doxastakis G. Evaluation of the foaming properties of cottonseed protein isolates [J]. Food Hydrocolloids, 2002, 16: 645-652.

[5] Tsaliki E, Pegiadou S, Doxastakis G. Evaluation of the foaming properties of cottonseed protein isolates [J]. Food Hydrocolloids, 2004, 18: 631-637.

[6] Lusas E W, Jividen G M. Characteristics and uses of glandless cottonseed food orotein ingredients [J]. Journal of the American Chemists' Society, 1987, 64: 973-986.

[7] 胡传荣, 倪培德, 沈蓓英. 无腺体棉籽蛋白化学改性研究 [J]. 中国油脂, 1996, 21(5): 3-6.
Hu C R, Ni P D, Shen B Y. Studies on the chemical modification of glandless cottonseed proteins [J]. China Oils and Fats, 1996, 21(5): 3-6. (in Chinese)

[8] Vioque J, Sanchez-Vioque R, Clemet e A, et al. Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties [J]. Journal of the American Chemists' Society, 2000, 77: 447-450.

[9] Kuk M S, Tetlow R, Dowd M K. Cottonseed extraction with mixtures of acetone and hexane [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2005, 82(8): 609-612.

[10] 杨 锐. 利用有腺体棉籽粕生产食用棉仁分离蛋白的实践 [J]. 中国油脂, 2007, 32(5): 24-26.
Yang R. Production practice of edible cottonseed protein isolate from glandular Cottonseed meal [J]. China Oils and Fats, 2007, 32(5): 24-26. (in Chinese)

[11] 王竹天. 食品卫生检验方法(理化部分)注解(上) [M]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
Wang Z T. Food sanitary inspection methods (physi-chemical section) anotation [M]. Beijing: Chinese Standard Publishing Corporation, 2008. (in Chinese)

[12] 张水华. 食品分析实验 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
Zhang S H. Food analysis experiments [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing Corporation, 2006. (in Chinese)

[13] 周瑞宝. 植物蛋白功能原理与工艺 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
Zhou R B. Vegetable protein functional principle and process [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing Corporation, 2007. (in Chinese)

[14] 唐 辉, 田晨煦, 姚新成 等. 食用棉籽蛋白中总棉酚与游离棉酚含量测定 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2004, 22(1): 53-55.
Tang H, Tian C X, Yao X C, et al. Determination of total gossypol and free gossypol in edible cottonseed protein by phloroglucinol colorimetry [J]. Journal of Shihezi University: Natural Science Edition, 2004, 22(1): 53-55. (in Chinese)

[15] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.
Wang J Z, Fan M. Protein technology handbook [M]. Beijing: Science Publishing Corporation, 2000. (in Chinese)

[16] 赵贵兴. 棉籽蛋白的营养特性和生产应用研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2002(4): 41-43.
Zhao G X. The research on nutritious property, process of cottonseed protein and its aplication [J]. Journal of Heilongjiang Agricultural Science, 2002(4): 41-43. (in Chinese)