

山核桃饼粕蛋白提取工艺的优化

Optimization on protein extraction from walnut dregs

刘双凤

王华生

LIU Shuang-feng WANG Hua-sheng

(湖南省农林工业勘察设计研究总院, 湖南 长沙 410007)

(Hunan Prospecting Designing and Research Institute for Agricultural Forestry
and Industry, Changsha, Hunan 410007, China)

摘要:采用二次正交旋转组合试验设计对碱提酸沉法提取山核桃饼粕蛋白的工艺进行优化。结果表明,山核桃饼粕蛋白的等电点为 pI 5.0;其最佳提取条件为提取液 pH 值 9.0,提取时间 124 min,提取温度 53 ℃,料液比 1:22 ($m:V$),该条件下的实际平均提取率为 $(67.94 \pm 0.05)\%$ 。

关键词:山核桃;饼粕;蛋白质;等电点;碱提酸沉法

Abstract: Using orthogonally rotational combination design, alkali extraction and acid precipitation was proposed for extraction of protein from walnut dregs. The optimal preparation conditions of the protein were as follows: extracting pH 9.0, extracting time 124 min, extracting temperature 53 ℃ and solid-liquid ratio 1:22 ($m:V$). Under the conditions, the yield of protein was $(67.94 \pm 0.05)\%$, and its isoelectric point was pH 5.0.

Keywords: walnut; dregs; protein; isoelectric point; alkali-extracting-acid sedimentation technique

山核桃(*Carya cathayensis* Sarg.)是胡桃科山核桃属植物,主要分布在浙、皖两省交界的天目山一带,是中国特产的优良干果、油料树种^[1,2]。目前,山核桃大部分被用于油脂榨取,压榨后的饼粕基本被直接丢弃^[3]。研究^[4,5]发现,山核桃饼粕中约含有 20% 的蛋白质,其蛋白的效价与动物蛋白相近,含有多种人体必需氨基酸,尤其是精氨酸、谷氨酸、组氨酸、酪氨酸的含量非常高,且必需氨基酸的含量比例合理,接近联合国粮农组织和世界卫生组织规定的标准氨基酸配比,具有很高的食用价值和保健功能。

目前用于蛋白提取的方法主要有十六烷基三甲基溴化铵法、尿素法、脂肪酸盐法、碱提酸沉法等^[6],其中碱提酸沉法因为操作简单、提取率高,被广泛应用于实际生产中^[7],其在山核桃饼粕上的应用也倍受关注。赵见军等^[8]曾对核桃粕中蛋白的提取工艺进行优化,但其采用的超声波辅助浸提

法,由于设备的限制离实际生产应用还有一定距离。杨瑾等^[9]曾优化了碱提酸沉法提取山核桃饼粕的工艺,但其是以冷冻干燥后的粗蛋白为评价指标,有失偏颇。

本课题汲取前人^[8,9]的研究经验并做适当调整,以山核桃为原料,借助二次正交旋转组合试验设计,对碱提酸沉法提取山核桃饼粕蛋白工艺进行优化,以期在山核桃资源的充分利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冷榨山核桃饼粕:河北黄金龙食用油有限公司;
牛血清白蛋白: $\geq 98.5\%$,上海金穗生物科技有限公司;
石油醚(60~90 ℃)、氢氧化钠、盐酸:分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器设备

摇摆式粉碎机:DFY-500D 型,温岭市林大机械有限公司;
智能型蒸馏器:HR-1000 型,上海华睿仪器有限公司;
数显定时消化炉:HR-08 型,上海华睿仪器有限公司;
台式高速离心机:TG16-WS 型,湖南湘仪科学设备有限公司;

数显恒温水浴锅:HH-8 型,江苏省金坛市环宇科学仪器有限公司;

冷冻干燥机:FD-2A 型,上海争巧科学仪器有限公司;
台式精密酸度计:TP310 型,上海雷磁新泾仪器有限公司;

可见分光光度计:722N 型,上海圣科科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 工艺流程

山核桃饼粕→粉碎(过 30 目筛)→干燥(50 ℃,24 h)→脱脂(索氏抽提 8 h)→调至碱性(NaOH)→恒温浸提→离心(3 000 r/min,20 min)→上清液→调至酸性(HCl)→离心(3 000 r/min,20 min)→沉淀→洗至中性(蒸馏水)→真空冷冻干燥(-10 ℃预冻 12 h,-30 ℃干燥 24 h)→山核桃蛋白

作者简介:刘双凤(1980—),女,湖南省农林工业勘察设计研究总院工程师。E-mail:41089880@qq.com

收稿日期:2015-05-30

1.3.2 山核桃饼粕蛋白等电点的测定 准确称取山核桃饼粕 20.0 g 于烧杯中,按料液比 1 : 15 ($m : V$)加入蒸馏水,用 1 mol/L 的 NaOH 溶液调节体系 pH 至 9.0,于 50 ℃ 的恒温水浴锅内浸提 120 min。浸提完成后,3 000 r/min 离心 20 min,获取上清液。取 1 mL 待测液(将 1 mL 的提取上清液定容至 100.0 mL)用分光光度计测吸光度值(在 595 nm 波长下),并根据标准曲线(详见 1.3.6)计算出蛋白质含量;另取 7 份 15 mL 的上清液,以 1 mol/L 的 HCl 溶液调节体系 pH 分别为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0,分别离心(3 000 r/min,20 min)并取 1 mL 稀释了 100 倍的上清液用可见分光光度计测吸光度值(在 595 nm 波长下),根据标准曲线(详见 1.3.6)计算出蛋白质含量。以式(1)计算山核桃饼粕蛋白质的沉淀率,最大时的 pH 值即为其等电点。

$$R_1 = \frac{m_1 - m_2}{m_2} \times 100\%$$

(1)

式中:
 R_1 ——山核桃蛋白质的沉淀率,%;
 m_1 ——酸沉前的蛋白质含量,mg/mL;
 m_2 ——酸沉后的蛋白质含量,mg/mL。

1.3.3 单因素试验设计

- (1) 提取时间:在提取温度为 50 ℃、料液比为 1 : 15 ($m : V$)、pH 为 9.0 的条件下,考察提取时间(30,60,90,120,150,180 min)对山核桃饼粕蛋白提取率的影响。
- (2) 提取温度:在提取时间为 120 min、料液比为 1 : 15 ($m : V$)、pH 为 9.0 的条件下,考察提取温度(40,45,50,55,60,65 ℃)对山核桃饼粕蛋白提取率的影响。
- (3) 料液比:在提取时间为 120 min、提取温度为 55 ℃、pH 为 9.0 的条件下,考察料液比(1 : 10,1 : 15,1 : 20,1 : 25,1 : 30, $m : V$)对山核桃饼粕蛋白提取率的影响。
- (4) pH 值:在提取时间为 120 min、提取温度为 55 ℃、料液比为 1 : 20 ($m : V$)的条件下,考察 pH(8,9,10,11,12)山核桃饼粕蛋白提取率的影响。

1.3.4 二次正交旋转组合优化试验 根据单因素试验的结果,并考虑到 TP310 型台式精密酸度计灵敏度的实际情况,固定浸提的 pH 为 9.0 不变,以提取时间、提取温度、料液比为试验因素,山核桃粕蛋白提取率为响应值,采用二次正交旋转组合试验设计对提取工艺进行优化。

1.3.5 山核桃饼粕中蛋白质含量的测定 按 GB 5009.5—2010 执行。

1.3.6 上清液中蛋白含量的测定 采用考马斯亮蓝法。

(1) 绘制标准曲线:参照文献[10]的方法,以蛋白质含量(X ,mg/mL)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线得线性回归方程 $A = 4.951\,4X - 0.013\,5$ ($R^2 = 0.998$)。

(2) 对样品的测定:将离心分离后的山核桃饼粕蛋白提取液定容至 100 mL,静置后取出 1 mL 稀释 100 倍待测。定时,取待测液 1 mL 参照文献[10]测吸光度 A 值,并计算蛋白含量。

1.3.7 蛋白质提取率的测定 蛋白质提取率按式(2)计算:

$$R_2 = \frac{m_3}{m_4} \times 100\%$$

(2)

式中:
 R_2 ——蛋白沉淀率,%。

m_3 ——上清液蛋白含量,mg/mL;
 m_4 ——脱脂后山核桃饼粕中的蛋白含量,mg/mL。

1.4 数据处理

每次试验重复 3 次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。运用 SPSS 17.0 进行统计分析,显著水平取 $P < 0.05$ (差异显著);借助 DPS 7.05 进行二次正交旋转组合优化试验。

2 结果与分析

2.1 山核桃饼粕蛋白等电点分析

由图 1 可知,在浸提液 pH 为 3.0~6.0 时,随着 pH 的增加,蛋白的沉淀率呈先增后减的趋势,在 pH 为 5.0 时,沉淀率最大($P < 0.05$)。这与文献[8]报道的当 pH 值在 5.0 时蛋白质沉淀迅速,离心后上清液清亮,效果较好的情况一致,故山核桃蛋白的等电点是 pI 为 5.0。

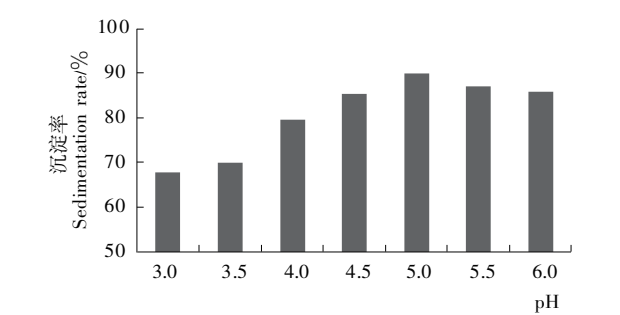


图 1 pH 对蛋白沉淀率的影响
Figure 1 Effects of pH values on protein deposition rate

2.2 单因素试验结果

2.2.1 提取时间对山核桃饼粕蛋白质提取率的影响 由图 2 可知,随着提取时间的延长,山核桃饼粕蛋白的提取率逐渐增加;当提取时间为 120 min 时,蛋白的提取率增幅趋于平缓(与 150 min 时没有显著性差异, $P > 0.05$)。故提取时间宜控制在 120 min 左右。

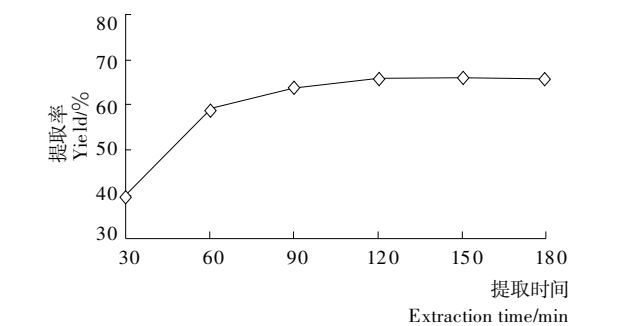


图 2 提取时间对提取率的影响
Figure 2 Effects of different extraction time on protein yield

2.2.2 提取温度对山核桃饼粕蛋白提取率的影响 由图 3 可知,随着提取温度的升高,蛋白质提取率呈先增后减的趋势,当提取温度为 55 ℃ 时提取率达到最大值($P < 0.05$)。可能与蛋白质分子构象随着提取温度的升高而发生改变有关,提取温度的升高,促进了山核桃蛋白立体结构的伸展,使其在水分子的热运动下更易溶解^[11];当提取温度过高时,使得维持蛋白质空间构象的次级键断裂,天然构象解体,蛋白变性,提取率降低^[12]。故提取温度宜控制在 55 ℃ 左右。

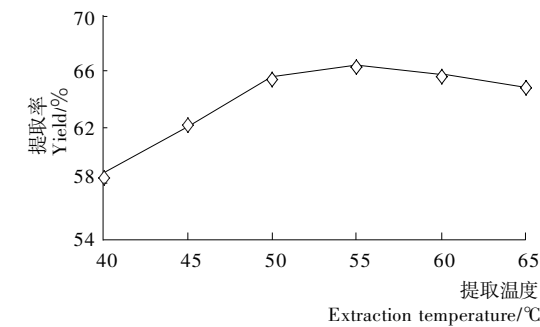


图 3 提取温度对提取率的影响

Figure 3 Ectects of different extraction temperature on protein yield

2.2.3 料液比对山核桃饼粕蛋白提取率的影响 由图 4 可知,当料液比 $\leq 1:20$ ($m:V$)时,蛋白提取率随其增大而增加 ($P<0.05$),之后趋于稳定。可能是在较低料液比时,由于溶液的黏度较大,分子扩散速率较低,体系分散不均匀,导致体系中的蛋白溶出困难;随着液料比的增大,蛋白质更易溶出,因而提取率增加,直至其完全浸出,体系保持动态平衡,提取率不再改变^[13]。故料液比宜控制在 $1:20$ ($m:V$) 左右。



图 4 料液比对提取率的影响

Figure 4 Ectects of different extraction solid-liquid ratio on protein yield

2.2.4 pH 值对山核桃饼粕蛋白质提取率的影响 由图 5 可知,当 pH 值为 9.0 时蛋白提取率最高 ($P<0.05$),过高或者过低的 pH 值都不利于蛋白的提取。可能是蛋白的基本结构中含有氨基和羧基两种官能团,不同的 pH 环境会影响其存在的方式,进而改变溶出效果。并考虑到 TP310 型台式精密酸度计灵敏度的实际情况,确定后续试验提取液的 pH 值为 9.0。

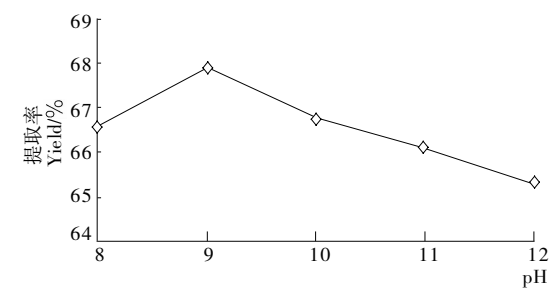


图 5 pH 值对提取率的影响

Figure 5 Ectects of different extraction pH on protein yield

2.3 二次正交旋转组合试验结果

二次正交旋转组合设计的因素水平安排及试验结果分别见表 1、2。

表 1 二次正交旋转组合设计因素水平表

Table 1 Factors and code levels of quadratic orthogonal rotation combination design				
水平	X ₁ 提取时间/min	X ₂ 提取温度/℃	X ₃ 料液比($m:V$)	
−1.681 8	95	47	1:12	
−1	105	50	1:15	
0	120	55	1:20	
1	135	60	1:25	
1.681 8	145	63	1:28	

表 2 二次正交旋转组合试验结果

Table 2 The test results of quadratic orthogonalrotation combination design				
序号	X ₁	X ₂	X ₃	提取率/%
1	1	1	1	67.8
2	1	1	−1	66.1
3	1	−1	1	66.4
4	1	−1	−1	64.2
5	−1	1	1	64.4
6	−1	1	−1	62.4
7	−1	−1	1	63.7
8	−1	−1	−1	62.6
9	−1.681 8	0	0	63.9
10	1.681 8	0	0	64.2
11	0	−1.681 8	0	66.2
12	0	1.681 8	0	66.4
13	0	0	−1.681 8	65.8
14	0	0	1.681 8	67.7
15	0	0	0	68.3
16	0	0	0	67.9
17	0	0	0	68.1
18	0	0	0	65.5
19	0	0	0	67.8
20	0	0	0	68.2
21	0	0	0	68.1
22	0	0	0	67.7
23	0	0	0	67.9

对试验结果进行拟合得到回归方程：
$$Y=67.741\ 12+0.871\ 69X_1+0.302\ 88X_2+0.746\ 54X_3-1.480\ 24X_1^2-0.684\ 75X_2^2-0.525\ 65X_3^2+0.350\ 00X_1X_2+0.100\ 00X_1X_3+0.050\ 00X_2X_3$$
 (3)

由表 3 可知,回归方程的失拟性检验 $F_1=2.598\ 20<F_{0.01}(5,8)=3.69$ 不显著($P=0.076\ 8>0.05$),说明所选的二次回归模型适当;回归显著性检验 $F_2=6.253\ 04>F_{0.01}(9,13)=4.17$ 极显著($P=0.004\ 7<0.01$),说明模型的预测值与实测值接近,模型成立^[9]。在 $\alpha=0.10$ 显著水平剔除不显著项后,得到简化后的回归方程:

$$Y=67.741\ 12+0.871\ 69X_1+0.746\ 54X_3-1.491\ 61X_1^2-0.684\ 75X_2^2-0.525\ 65X_3^2$$
 (4)

由式(4)的各项系数可知,对山核桃饼粕蛋白提取率影响较大的因素依次为 X_1 (提取时间) $>X_3$ (料液比) $>X_2$ (提取温度),且这 3 因素之间不存在差异显著性($P<0.05$)的两两交互作用,故未列出等高线及交互作用图。

由表 4 可知,在 95%的置信区间内当提取时间为 124~

表 3 试验结果方差分析						
Table 3 Variance analysis of test results						
变异来源	平方和	自由度	均方	偏相关	比值 F	P 值
X_1	10.377 1	1	10.377 1	0.634 9	8.780 2	0.011 0
X_2	1.252 8	1	1.252 8	0.274 6	1.060 0	0.322 0
X_3	7.611 3	1	7.611 3	0.575 6	6.440 1	0.024 8
X_1^2	34.815 6	1	34.815 6	-0.833 0	29.458 2	0.000 1
X_2^2	7.450 2	1	7.450 2	-0.571 5	6.303 8	0.026 1
X_3^2	4.390 4	1	4.390 4	-0.471 4	3.714 8	0.076 1
X_1X_2	0.980 0	1	0.980 0	0.244 9	0.829 2	0.379 1
X_1X_3	0.080 0	1	0.080 0	0.072 0	0.067 7	0.798 8
X_2X_3	0.020 0	1	0.020 0	0.036 1	0.016 9	0.898 5
回归	66.512 3	9	7.390 3	$F_2=6.253\ 04$		0.004 7
剩余	15.364 2	13	1.181 9			
失拟	9.508 7	5	1.901 7	$F_1=2.598\ 20$		0.076 8
误差	5.855 6	8	0.731 9			
总和	81.876 5	22				

表 4 各因素的频率分布						
Table 4 The probability distribution of values of each variable						
水平	X_1 提取时间		X_2 提取温度		X_3 料液比	
	次数	频率	次数	频率	次数	频率
-1.681 8	0	0.000 0	0	0.000 0	0	0.000 0
-1	0	0.000 0	6	0.315 8	1	0.052 6
0	10	0.526 3	7	0.368 4	6	0.315 8
1	9	0.473 7	6	0.315 8	6	0.315 8
1.681 8	0	0.000 0	0	0.000 0	6	0.315 8
加权数	0.474 0		0.000 0		0.794 0	
标准误	0.115 0		0.182 0		0.182 0	
95%置信区间	0.249~0.698		-0.357~0.357		0.437~1.151	
提取条件	124~130		53~57		1:22~1:26	

130 min,提取温度为 53~57 ℃,料液比为 1:22~1:26 ($m:V$),pH 值 9.0 时,山核桃蛋白的提取率较高。为节约生产成本,在实际应用中选定各因素的最低值,即提取时间 124 min,提取温度 53 ℃,料液比 1:22 ($m:V$),并进行 5 次验证实验,其山核桃蛋白的平均提取率为 $(67.94\pm0.05)\%$,与预测最高值 67.98%不存在显著性差异($P<0.05$),说明拟合所得的回归方程能较好地指导山核桃蛋白的提取。

3 结论

(1) 山核桃蛋白的等点电为 pI 5.0,这与文献[6]报道的(pI 4.5~5.5)结果相近,但在该等电点下的最大沉淀率仅为 89.8%,要低于文献[6]报道的 94.5%,可能是试验原料及蛋白质检测方法的差异造成的。由于本试验选用的考马斯亮蓝法极易受到样品中多糖等成分的干扰,所以其检测线性范围和结果的准确性均比文献[8]所用的双缩脲法差,下一步将针对此进行对比试验,以明确山核桃蛋白的等电点。

(2) 山核桃蛋白的最佳提取条件为:pH 9.0,提取时间 124 min,提取温度 53 ℃,料液比 1:22 ($m:V$),在该条件山核桃饼粕蛋白的平均提取率为 $(67.94\pm0.05)\%$,与预测的最高值 67.98%不存在显著性差异($P<0.05$)。考虑到考马斯亮蓝法仅能检测水溶性蛋白^[14],故推测山核桃中的实际蛋白含量要高于该值,未来将借助于液相色谱等技术对其进行精确测定。

参考文献

- 陈向明,李军,唐龙华,等. 山核桃外果皮制备焦磷酸钾工艺条件的筛选[J]. 经济林研究, 2008,26(3):47~52.
- 欧阳韶晖,李春娟,罗勤贵. 水代法提取核桃油后蛋白粕溶解乳化特性研究[J]. 中国粮油学报,2008,23(2):99~101.
- 钟海雁,李忠海,袁列江,等. 核桃生产加工利用研究的现状与前景[J]. 食品与机械,2002(4):4~6.
- Szetao K W C, Sathe S K. Walnut(*Juglans regia* L.)proximate composition, protein solubility, protein aminoacid composition and protein in vitro digestibility [J]. Sci. Food Agric., 2000(80): 1 393~1 401.
- 刘森. 核桃仁水剂法取油工艺及核桃乳的研究[D]. 无锡:江南大学,2004.
- 张凯,吴卫国. 大米蛋白提取工艺研究进展[J]. 粮食加工,2010,35(3):38~40.
- 吕飞,许宙,程云辉. 米糠蛋白提取及其应用研究进展展[J]. 食品与机械,2014,30(3):234~237.
- 赵见军,张润光,马玉娟,等. 核桃粕中蛋白提取工艺的优化[J]. 食品科学,2014,35(18):40~46.
- 杨瑾,董明,曹彬彬,等. 山核桃饼粕分离蛋白的提取工艺研究[J]. 食品工业科技,2012,40(5):280~283.
- 李加兴,房惠芳,陈选,等. 牡丹籽粕蛋白提取工艺优化及其等电点分析[J]. 食品与机械,2014,30(3):147~149.
- 赵玉红,李莉. 超声波辅助提取松仁蛋白的工艺研究[J]. 中国林副特产,2008(1):6~8.
- 潘晶,张晖,王立,等. 棉籽蛋白两步法提取及其功能性质研究[J]. 中国油脂,2010,35(7):19~23.
- 彭永健,张安强,马新,等. 玉竹多糖超声提取工艺优化及其保湿性研究[J]. 食品科学,2012,33(14):96~99.
- 孙蓉,吴文标. 食品中蛋白质检测技术研究进展[J]. 食品科学,2012,33(23):393~397.