

李亚萍. 提取核桃蛋白关键参数的优化[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):224-226.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.052

提取核桃蛋白关键参数的优化

李亚萍

(安康学院化学化工学院,陕西安康 725000)

摘要:采用碱提酸沉法从核桃中提取蛋白质,应用单因素试验和正交试验对提取条件进行优化。获得最佳提取参数为料液比为 1 g : 30 mL,提取温度为 50 ℃,碱提 pH 值为 8.0,酸沉 pH 值为 4.0,核桃蛋白提取率可达 12.15%。
关键词:核桃;蛋白质;碱提酸沉法;提取参数;单因素试验;正交试验
中图分类号: TS255.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0224-02

核桃中含有丰富的营养成分,其中油脂含量占比达 40% ~ 65%,蛋白质含量占比达 14% ~ 17%^[1-4]。研究发现,核桃蛋白中含有清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白 4 种蛋白质,分别占蛋白质总量的 6.81%、17.57%、5.33%、70.11%^[5]。这些蛋白中就含有 18 种氨基酸,其中 8 种是人类生命得以存在所必需的氨基酸,且其中精氨酸、谷氨酸、组氨酸、酪氨酸含量在植物蛋白类中相对较高^[6],这些成分都是人体组织细胞代谢不可或缺的重要物质,长时间食用可以对冠心病起到一定的预防作用^[7-9]。安康核桃表现为果质良、易取仁、仁色浅、饱满、风味香、壳薄、出仁率高,其中蛋白质含量以及脂肪含量和其他核桃相比较。本研究采用碱提酸沉法提取核桃中的蛋白质,优点是操作过程简约,试验条件易于控制,且成本低廉。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂及材料

MODEL0406-1 离心机,上海医疗器械(集团)有限公司手术器械厂生产;SY2200-T 超声波清洗机,上海声源超声波设备有限公司生产;1765 半微量定氮蒸馏装置,上海听沪实验设备有限公司生产。试验所用试剂均为分析纯。核桃采自陕西安康地区的山地核桃。

1.2 试验方法

1.2.1 核桃蛋白的提取 筛选安康优质核桃,称取 10 g,粉碎,加入 1 : 1(质量比)的纤维素酶和果胶酶,超声波提取 30 min,灭酶,使用离心机离心 30 min,2 000 r/min,烘干,接着加入适量的 NaOH 溶液并在不同的温度下水浴搅拌 65 min,再次利用离心机离心 30 min,然后加入盐酸,调节 pH 值,使其出现絮状沉淀,然后离心 30 min,洗涤沉淀 2 ~ 3 次,干燥,得到核桃蛋白。操作过程见图 1。

1.2.2 核桃蛋白含量的测定 参照 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准食品中蛋白质的测定》^[10],以凯氏定氮法测定

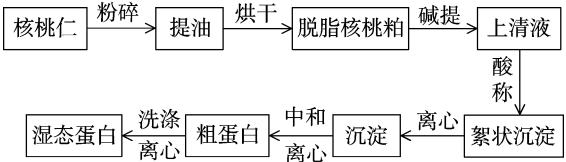


图1 提取核桃蛋白的操作过程

核桃中蛋白质的含量,并计算蛋白提取率。
1.3 碱提核桃蛋白的单因素试验
1.3.1 pH 值的优化 固定料液比为 1 g : 20 mL、提取温度为 45 ℃,依次调节 NaOH 溶液的 pH 值为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0,浸提 65 min 后,计算核桃蛋白的提取率。
1.3.2 提取温度的优化 固定 NaOH 溶液的 pH 值为 8.0、料液比为 1 g : 20 mL,分别在温度为 35、40、45、50、55 ℃ 条件下各浸提 65 min,计算核桃蛋白的提取率。
1.3.3 料液比的优化 固定提取温度为 50 ℃、碱液 pH 值为 8.0,依次以 1 : 10、1 : 20、1 : 30、1 : 40、1 : 50(g : mL) 为料液比浸提 65 min,计算核桃蛋白的提取率。

1.4 碱提核桃蛋白的正交试验

按表 1 所示的影响因素设计正交试验,正交试验结果见表 2,对核桃蛋白碱提的各因素进行综合优化,确定最佳的提取参数。

表 1 核桃蛋白提取正交试验因素和水平

水平	因素		
	A:pH 值	B:料液比(g : mL)	C:提取温度(℃)
1	7.5	1 : 20	40
2	8.0	1 : 30	45
3	8.5	1 : 40	50

1.5 蛋白酸沉 pH 值的确定

在最佳碱提条件下,加入盐酸依次调节核桃蛋白溶液的 pH 值为 3.5、4.0、4.5,接着测定核桃蛋白质的含量,并计算其沉淀率和得率,确定最佳酸沉 pH 值。

2 结果与分析

2.1 碱液 pH 值对核桃蛋白提取率的影响

在固定料液比 1 g : 20 mL、提取温度 45 ℃ 条件下,调节不同的 pH 值。

从图 2 可以看出,在 7.0 < pH 值 < 8.0 的碱性范围内,蛋

收稿日期:2019-04-19
基金项目:陕西省安康市科技局项目(编号:2017AK01-06)。
作者简介:李亚萍(1978—),陕西宝鸡人,硕士,讲师,主要从事天然植物中有效成分的提取分离与检测方面的研究。E-mail: 403800917@qq.com。

白质提取率随着 pH 值的增大而增大,当 pH 值 = 8.0 时,核桃蛋白的提取率最大,随后开始减小。原因是当 pH 值 > 8.0 时,蛋白质变性越来越严重,且赖氨酸的损失增大。

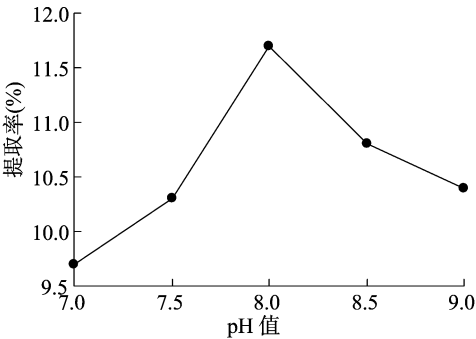


图2 pH 值对核桃蛋白提取率的影响

2.2 提取温度对核桃蛋白提取率的影响

固定 1 g : 20 mL 的料液比,pH 值为 8.0,改变不同温度。从图 3 可以看出,在提取温度低于 50 ℃ 时,蛋白提取率随着温度的升高而增大,当温度为 50 ℃ 时,蛋白的提取率最大。50 ℃ 之后核桃蛋白提取率反而开始减小,是因为温度越高蛋白质变性越严重,还有可能是蛋白质与杂质黏合所致。

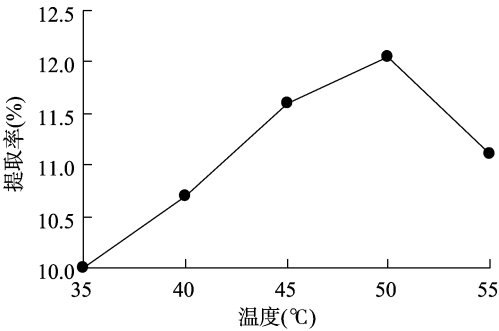


图3 温度对核桃蛋白提取率的影响

2.3 料液比对核桃蛋白提取率的影响

固定提取温度为 50 ℃、碱液 pH 值为 8.0,改变不同的料液比。从图 4 可以看出,当料液比 < 1 g : 30 mL 时,核桃蛋白的提取率会随着料液比的增加而增大,且变化幅度较大。当料液比为 1 g : 30 mL 时,核桃蛋白的提取率最大。料液比 > 1 g : 30 mL 时,提取率反而减小,但变化幅度不大。考虑到加水量增加会导致蛋白分离时间大幅加长,同时必然会增加设备负荷,这就需要投入更多的设备,所以选择料液比为 1 g : 30 mL 较为合适。

2.4 正交试验

以单因素试验所得数据为依据,对核桃蛋白提取条件进行正交试验。从表 2 可以看出,核桃蛋白提取率的影响程度依次为 A > C > B,最佳水平组合为 A₂B₂C₃。核桃蛋白的最佳提取工艺参数为:碱提 pH 值为 8.0、提取温度为 50 ℃、料液比为 1 g : 30 mL,提取率最高可达 12.15%。

2.5 核桃蛋白酸沉最佳条件的确定

分别调节 pH 值为 3.5、4.0、4.5,测定蛋白质的含量,计算沉淀率和得率,得到的酸沉试验结果见表 3。

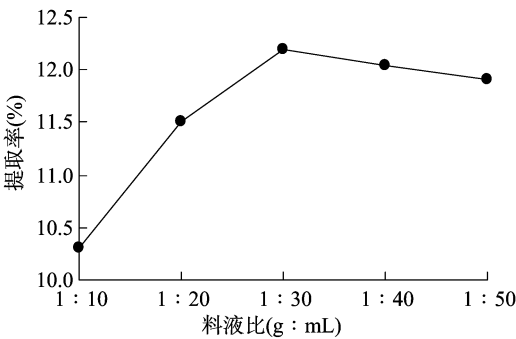


图4 料液比对核桃提取率的影响

表 2 核桃蛋白提取正交试验结果

试验号	A:pH 值	B:料液比	C:提取温度	蛋白质提取率 (%)
1	1	1	1	9.54
2	1	2	2	10.02
3	1	3	3	10.78
4	2	1	2	11.43
5	2	2	3	12.15
6	2	3	1	11.28
7	3	1	3	10.91
8	3	2	1	10.52
9	3	3	2	10.12
K ₁	30.34	31.88	31.34	
K ₂	34.86	32.69	31.57	
K ₃	31.55	32.18	33.84	
k ₁	10.11	10.63	10.45	
k ₂	11.62	10.90	10.52	
k ₃	10.52	10.73	11.28	
R	1.51	0.27	0.83	
因素主次	A > C > B			
最优方案	A ₂ B ₂ C ₃			

从表 3 可以看出,pH 值为 4.0 时,核桃蛋白的质量占比为 14.36%,沉淀率为 97.20%,得率为 1.74%,此时酸沉的效果最好。

表 3 酸沉试验结果

试验号	pH 值	核桃粉质量(g)	核桃蛋白粉质量(g)	蛋白质含量 (%)	沉淀率 (%)	得率 (%)
1	3.5	10	1.06	13.57	95.37	1.44
2	4.0	10	1.21	14.36	97.20	1.74
3	4.5	10	1.14	13.71	96.83	1.56

3 结论

通过单因素试验和正交试验研究结果,核桃蛋白质的最佳提取工艺参数为料液比 1 g : 30 mL,提取温度 50 ℃,碱提和酸沉的 pH 值分别为 8.0、4.0,在该工艺条件下,核桃蛋白的提取率可达 12.15%。采用碱提酸沉法提取核桃蛋白,不仅提高了蛋白的提取率,还降低了蛋白质的变性比率,保证了蛋白质的天然结构和色泽。若进行核桃蛋白的深加工,比如蛋白饮料、多肽口服液,则核桃的附加值会大幅提高。所以应加大其深加工产品的开发力度,推广高纯度核桃蛋白产品在医药、食品工业上的应用。

肖 岚,李 诚,程小平,等. 牦牛血抗氧化低聚肽的稳定性及与其他食源性低聚肽抗氧化互作分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):226-232.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.053

牦牛血抗氧化低聚肽的稳定性及与其他食源性低聚肽抗氧化互作分析

肖 岚^{1,2}, 李 诚², 程小平³, 杜 昕²

(1. 四川旅游学院食品学院, 四川成都 610100; 2. 四川农业大学食品学院, 四川雅安 625014;

3. 四川高金实业集团有限公司, 四川遂宁 629000)

摘要:通过菌酶联合法发酵制备牦牛血低聚肽(分子量 < 1 ku), 研究其氨基酸组成、热稳定性、酸碱稳定性、金属离子稳定性、冻融稳定性及对食品辅料的稳定性; 同时, 运用等辐射分析法评价 3 种食源性低聚肽按不同比例组合后组合肽的抗氧化相互作用。结果表明, 牦牛血低聚肽具有良好的热稳定性, 100 ℃ 水浴热处理 5 h 后的 ·OH 清除活性仍有 84.32%。牦牛血低聚肽在 pH 值为 6~10, 即高 pH 值下 ·OH 清除活性几乎没有受到影响, 而低 pH 值条件下的 ·OH 清除能力较差。Zn²⁺、Cu²⁺ 对牦牛血低聚肽的 ·OH 清除活性影响较大, 当二者浓度达到 500 mg/L 时, 其 ·OH 清除活性保持率仅为 49.35%、46.15%; K⁺、Mg²⁺ 对其 ·OH 清除活性影响较小。牦牛血低聚肽对 ·OH 清除活性保持率随冻融次数增多而降低。食品辅料 NaCl 对其 ·OH 自由基清除活性有增效作用, 特别是 NaCl 添加量为 0.5%~1.5% 时, 而当 NaCl 添加量为 1.5%~2.5% 时, 增效作用不明显; 葡萄糖浓度为 8%~10% 时, 对其 ·OH 清除活性有明显抑制作用; 柠檬酸对其 ·OH 清除活性有明显抑制作用, 但柠檬酸浓度变化对其 ·OH 清除活性影响不大。牦牛血低聚肽的体外抗氧化活性优于商品化的大豆低聚肽以及鱼胶原低聚肽, 将 3 种食源性低聚肽按比例组合后, 在 DPPH 模型和脂质过氧化抑制能力模型中, 大部分组合低聚肽表现出较强的协同作用, 组合低聚肽中的牦牛血低聚肽比例超过 50% 时表现出拮抗作用; 在 ABTS 模型中组合低聚肽中的牦牛血低聚肽比例越高协同作用越低。

关键词:牦牛血低聚肽; 稳定性; 抗氧化互作作用; 食源性低聚肽

中图分类号: TS251.93 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0226-07

在日本、欧美等发达国家, 动物屠宰血液(特别是猪血)用于开发生物肽类药物、功能性食品与食品添加剂等的利用率已达到 60% 以上^[1], 而我国对动物屠宰血液的利用率却非常低。牦牛是我国青藏高原的特殊家畜, 牦牛血中蛋白质含

量明显高于其他畜禽类血液^[2]。因此, 利用牦牛血制备抗氧化低聚肽既能满足人们对抗氧化剂安全性的要求^[3], 又能解决牦牛血随意排放对环境造成污染的问题, 提高牦牛血的附加值。笔者所在试验组以体外抗氧化指标作为评价体系, 采用枯草芽孢杆菌(SICC1.197)联合碱性蛋白酶发酵, 并采用超滤分级已制备出分子量 < 1 ku 的牦牛血抗氧化低聚肽^[1]。然而, 关于牦牛血抗氧化低聚肽物理化学稳定性的报道较少。王雪芹发现, 鲐鱼多肽在 100 ℃ 条件下能保持一定的抗氧化活性, 冻融次数和紫外线照射对多肽的 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH·)和羟基自由基(·OH)清除能力

收稿日期: 2018-04-26

基金项目: 四川省科技项目(编号: 2018JY0317); 四川省教育厅自然科学重点项目(编号: 17ZA0289)。

作者简介: 肖 岚(1981—), 女, 四川南充人, 博士研究生, 副教授, 主要从事畜产品加工与安全控制方面的研究。E-mail: 30430664@qq.com。

参考文献:

- [1] 郭 旭. 汉滨区核桃产业发展现状, 问题与对策研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.
- [2] 恩斯明格. 《食物与营养百科全书》选集(5)[M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- [3] 恩斯明格. 《食物与营养百科全书》选集(1)[M]. 北京: 农业出版社, 1989.
- [4] 李正明. 植物蛋白生产工艺与配方[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.
- [5] 张庆祝, 丁晓雯, 陈宗道, 等. 核桃蛋白质研究进展[J]. 粮食与油脂, 2003(5): 21-23.
- [6] 姜荣庆. 复合酶提取山核桃油及副产物综合利用的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.

- [7] Pereira J A, Oliveira I, Sousa A, et al. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(6): 2103-2111.
- [8] Poulou S M, Bielinski D F, Shukitt-Hale B. Walnut diet reduces accumulation of polyubiquitinated proteins and inflammation in the brain of aged rats[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2013, 24(5): 912-919.
- [9] Albert C M, Gaziano J M, Willett W C, et al. Nut consumption and decreased risk of sudden cardiac death in the Physicians' health study[J]. Archives of Internal Medicine, 2002, 162(12): 1382-1387.
- [10] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定: GB 5009.5—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.