

# 去衣处理对水法提取核桃仁蛋白质和脂质的影响

裴昊铭, 张彩猛, 李兴飞, 孔祥珍, 华欲飞, 陈业明

(江南大学食品学院, 江苏无锡214122)

**摘要:**核桃衣含有大量的酚类成分,对核桃蛋白和脂质的水法提取存在不利影响,研究了核桃仁去衣处理对水法提取蛋白质和脂质的影响。通过浸泡、去衣(常温、无酸碱)、磨浆(料水质量比1:9)和过滤除渣制取核桃浆,以未去衣核桃仁为对照,首先考察了去衣处理对蛋白质和脂质提取和离心分离(4 000 r/min, 15 min)的影响,接着对核桃浆离心分离所得富含蛋白质的沉淀进行了喷雾干燥得到核桃蛋白粉,分析了核桃蛋白粉的基本成分和储藏性。结果显示:去衣处理可将蛋白质和脂质的提取率分别提高至88.03%(未去衣83.20%)和97.76%(未去衣93.80%);去衣处理有利于脂质和蛋白质分别在离心分离所得上浮(油体富集物)和沉淀中富集,它们的分布分别为85.69%(未去衣82.65%)和61.00%(未去衣59.87%),上浮中的脂质干基含量和沉淀中的蛋白质干基含量分别高达95.49%(未去衣88.19%)和85.81%(未去衣70.44%);上浮、清液和沉淀(离心分离所得三相)中的氨基酸组成也受去衣处理的影响。核桃蛋白粉的蛋白质干基含量为85%以上,其在37℃储藏12个月后,无哈败味,Tricine-SDS-PAGE结果显示该蛋白粉也未发生蛋白质交联或降解。

**关键词:**去衣;核桃;蛋白质;脂质;提取率;分离

**中图分类号:**TS201.1;TS224.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2021)12-0011-05

## Effects of peeling on aqueous extraction of proteins and lipids from walnut kernels

PEI Haoming, ZHANG Caimeng, LI Xingfei, KONG Xiangzhen, HUA Yufei, CHEN Yeming

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** Walnut skins contain a high amount of phenolics, which have negative effects on the aqueous extraction of walnut proteins and lipids. Therefore, the effects of walnut kernel peeling on the aqueous extraction of protein and lipids was studied. The whole walnut kernels were soaked and peeled without heat and chemicals, and then the walnut milk was prepared from the peeled walnut kernels by mixing with water (mass ratio of walnut kernels to water 1:9), grinding and filtrating, with the whole walnut kernels as control. Firstly, the effects of peeling on proteins and lipids in extraction and centrifugal separation (4 000 r/min, 15 min) of walnut milk were investigated. Then the protein-rich precipitate obtained by centrifugation from walnut milk was spray-dried, and the basic components and storage stability of the protein powder were analyzed. The results showed that the peeling treatment respectively

increased the extraction rate of proteins and lipids to 88.03% (unpeeling 83.20%) and 97.76% (unpeeling 93.80%), and also enhanced the respective distribution of lipids and proteins into the floating (oil body concentrate) and precipitate fractions obtained by centrifugation, and their distribution were 85.69% (unpeeling 82.65%)

收稿日期:2020-12-23;修回日期:2021-08-24

基金项目:江苏省林业科技创新与推广项目(LYKJ[2020]内容01)

作者简介:裴昊铭(1995),男,硕士研究生,研究方向为油脂与植物蛋白(E-mail)elonpei2018@163.com。

通信作者:陈业明,副教授(E-mail)chenyeming@jiangnan.edu.cn。

and 61.00% (unpeeling 59.87%), respectively. The lipid content (dry basis) in floating and protein content (dry basis) in precipitate were as high as 95.49% (unpeeling 88.19%) and 85.81% (unpeeling 70.44%), respectively. The amino acid compositions in floating, skim and precipitate obtained by centrifugal separation were also affected by peeling treatment. The walnut protein powder had a protein content higher than 85%. After storage at 37 °C for 12 months, there was no rancid odor, and the Tricine-SDS-PAGE results showed that the protein powder did not show crosslinking or degradation.

**Key words:** peeling; walnut; protein; lipid; extraction rate; separation

核桃是世界四大坚果之一,营养价值高。核桃仁中含有 60% ~ 70% 的油脂,油中不饱和脂肪酸含量可达 90% 以上<sup>[1]</sup>。核桃油中的  $\omega-3$ 、 $\omega-6$  脂肪酸含量的比例在 1:4 左右,对促进人体骨骼生长、减弱神经衰退,甚至是减缓肿瘤细胞的生长都有帮助<sup>[2-3]</sup>。核桃仁中的蛋白质含量在 15% 左右,核桃蛋白中精氨酸的占比高达 12% ~ 13%,可以作为一种良好的婴幼儿必需氨基酸的营养补充剂来源<sup>[4]</sup>。

目前,核桃仁加工多以压榨法、浸出法、超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法等提取核桃油,再利用碱溶酸沉法、水酶法等提取核桃粕中的核桃蛋白,或制备核桃肽等<sup>[5-6]</sup>。这些工艺一般不进行去衣处理或部分去衣处理,这使得核桃衣中的多酚物质,诸如单宁等,会造成核桃油品质与口感的降低,还会与蛋白质相互作用形成不溶性物质,影响核桃蛋白的提取以及所得产品的色泽,这对后续产品的处理提出了更高的要求<sup>[7-9]</sup>。

核桃仁去衣的方法主要为碱泡法、微波法和烘烤法等。微波法与烘烤法的去衣效果不甚理想;碱泡法虽然去衣效果良好,但会使核桃仁发生不同程度的褐变,降低核桃油与核桃蛋白的品质<sup>[10-12]</sup>。目前,国内已有食品机械可在常温、无酸碱的条件下对核桃仁进行去衣<sup>[13]</sup>。基于此,本文首先通过对核桃仁磨浆、过滤、离心分离,考察去衣处理对核桃仁中固形物、蛋白质和脂质提取和离心分离的影响,接着将核桃浆(去衣)离心分离所得富含蛋白质的沉淀进行喷雾干燥,考察了核桃蛋白粉的储藏性。本文旨在尝试在去衣处理条件下制取得率更高、品质更好的核桃油(如油体富集物可作为新型植物奶油)和蛋白产品,促进核桃深加工产业的发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

核桃仁,购自河北保定。葡萄糖标准品、二硫苏糖醇(DTT)、氯仿、甲醇、石油醚等。

九阳 JYL-Y5 型破壁料理机,九阳股份有限公司;K9840-半自动凯氏定氮仪,济南海能仪器股份有限公司;TDZ5-WS 型台式低速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;L-8900 型氨基酸自动分析仪,日本 Hitachi 公司;BE-210G 电泳仪,日本 Bio-Craft 株式会社;Chemi Doc XRS+ 凝胶成像仪, Bio-Rad 生命医学产品(上海)有限公司;SES-07 型喷雾干燥机,瑞安市善源机械有限公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 核桃浆的制备工艺

核桃仁→清洗→浸泡(料水质量比 1:5,4 °C, 12 h)→人工去衣(常温,无酸碱)→磨浆(料水质量比 1:9,18 000 r/min,3 min)→过滤除渣(0.075 mm 纱布)→核桃浆→离心(4 °C,4 000 r/min,15 min)→分离三相(轻相,油体富集物;中间相,清液;重相,沉淀)。

以未去衣核桃仁作为对照,仅减少人工去衣步骤,其余与去衣工艺一致。

#### 1.2.2 核桃蛋白粉的制备

取核桃浆(去衣)离心分离所得沉淀,加入去离子水,稀释至固形物含量为 10%,在流速 11 ~ 13 mL/min、进风温度 180 °C、出风温度 85 °C 条件下进行喷雾干燥,得到核桃蛋白粉。

#### 1.2.3 基本指标的测定

水分及固形物含量测定:参考 GB 5009.3—2016 中的直接干燥法。

蛋白质含量测定:参考 GB 5009.5—2016 中的凯氏定氮法。

灰分含量测定:参考 GB 5009.4—2016 中的食品中总灰分的测定。

脂质含量测定:参考居巧苓<sup>[14]</sup>的方法并做一定改进。取 1 ~ 5 g 待测样品(样品质量记为  $m_0$ )于蓝盖瓶中,加入 60 mL 氯仿-甲醇溶液(体积比 2:1),旋盖密封,置于 60 °C 水浴锅中保持微沸 3 h,随后使用砂芯漏斗抽滤,将滤液置于 80 °C 水浴锅中挥发有

机溶剂,冷却后分别加入 25 mL 石油醚和 15 g 无水硫酸钠,振荡 5~10 min,静置分层后倒出石油醚,再用新鲜石油醚洗涤硫酸钠沉淀 3 次,与上述倒出的石油醚混合,并在 4 000 r/min 下离心 5 min。将离心后的上清液置于烘干至恒重的铝盒中(铝盒质量记为  $m_1$ ),40 °C 挥发石油醚后,再置于 105 °C 烘箱中 1 h 后称重(质量记为  $m_2$ ),平行测定 3 次。按照公式(1)计算脂质含量( $Y$ )。

$$Y = (m_2 - m_1) / m_0 \times 100\% \quad (1)$$

总糖含量测定:参考张青等<sup>[15]</sup>的方法并做一定改进。称取 10 mg 烘干的葡萄糖标准品定容至 100 mL 作为标准溶液,分别移取 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 mL 标准溶液至 20 mL 具塞刻度试管中,分别加入 1 mL 质量分数为 5% 的苯酚溶液和 7 mL 浓硫酸后,加去离子水至 20 mL,混匀、密封,置于沸水中孵育 10 min,待冷却到室温后,于 490 nm 下测吸光度,以葡萄糖的质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。待测样品按照以上步骤测定吸光度,并依据标准曲线计算样品的总糖含量,每个样品平行测定 3 次。

#### 1.2.4 氨基酸含量分析

称取一定量样品置于酸水解管中,加入 10 mL 6 mol/L 的盐酸,氮吹 3 min,置于 120 °C 烘箱中水解 22 h。之后,定容到 100 mL,用双层滤纸过滤,取 2 mL 滤液于试管中,用 L-8900 型氨基酸自动分析仪

分析氨基酸含量。

#### 1.2.5 核桃蛋白粉的储藏性分析

将核桃蛋白粉放置于 37 °C 恒温箱中储藏,在 3 个月和 12 个月时分别取样,进行 Tricine - SDS - PAGE 分析。样品处理:将待测样品用去离子水稀释至蛋白质质量浓度为 2 mg/mL,取 0.5 mL 稀释样品与 0.5 mL 蛋白溶解液(1% SDS, 0.25 mol/L Tris - HCl 缓冲液, pH 6.8)、10  $\mu$ L 1% 溴酚蓝指示剂、20  $\mu$ L 1 mol/L DTT 溶液混合均匀,煮沸 5 min,冷却至室温后即可用于还原 Tricine - SDS - PAGE 分析。对于非还原 Tricine - SDS - PAGE 分析,参照上述步骤进行样品处理,只是不加 DTT 和不煮沸处理。Tricine - SDS - PAGE 分析参考 Schagger<sup>[16]</sup>的方法,浓缩胶质量分数为 4%,分离胶质量分数为 16%,样品量 10  $\mu$ L,样品在进入分离胶之前电压为 30 V,进入分离胶后电压调整为 100 V,电泳结束后进行固定、染色、脱色,并用凝胶成像仪拍照。

## 2 结果与讨论

### 2.1 去衣处理对核桃浆离心分离三相中基本成分分布的影响

按 1.2.1 的方法,核桃浆离心分离后可得到油体富集物、清液和沉淀三相,对固形物、蛋白质和脂质在这三相中的分布进行计算(以核桃仁中各成分为 100%),结果见表 1。

表 1 去衣前后基本成分在油体富集物、清液和沉淀中的分布情况

项目	固形物		蛋白质		脂质		%
	未去衣	去衣	未去衣	去衣	未去衣	去衣	
油体富集物	61.36 ± 0.99	64.03 ± 0.96	7.36 ± 0.05	3.44 ± 0.09	82.65 ± 1.25	85.69 ± 1.30	
清液	12.18 ± 0.18	13.44 ± 0.17	15.97 ± 0.34	23.59 ± 0.36	8.29 ± 0.13	10.83 ± 0.17	
沉淀	12.25 ± 0.19	10.49 ± 0.16	59.87 ± 0.90	61.00 ± 0.95	2.86 ± 0.02	1.24 ± 0.11	

由表 1 可知,固形物、脂质和蛋白质集中分布在不同相中,固形物(未去衣 vs 去衣, 61.36% vs 64.03%) 和脂质(未去衣 vs 去衣, 82.65% vs 85.69%) 主要集中分布在油体富集物中,而蛋白质主要分布在沉淀(未去衣 vs 去衣, 59.87% vs 61.00%) 和清液(未去衣 vs 去衣, 15.97% vs 23.59%) 中。与未去衣处理相比,去衣处理可提升固形物(未去衣 vs 去衣, 85.79% vs 87.96%)、蛋白质(未去衣 vs 去衣, 83.20% vs 88.03%) 和脂质(未去衣 vs 去衣, 93.80% vs 97.76%) 的提取率,有利于脂质和蛋白质的离心分离,仅有 3.44% 的蛋白质(未去衣 7.36%) 分布在油体富集物中,仅有

1.24% (未去衣 2.86%) 的脂质分布在沉淀中。这是由于核桃衣中存在的多酚类物质会与蛋白质相互作用,形成不溶性复合物,使得蛋白质提取率下降<sup>[8]</sup>。同理,水法加工提取的脂质主要以油体形式存在,油体表面包裹的单层磷脂膜上所镶嵌的油体蛋白同样会受到多酚类物质的影响,导致脂质提取率降低<sup>[17]</sup>。

### 2.2 去衣处理对核桃浆离心分离三相中基本成分含量的影响

对核桃浆离心分离所得油体富集物、清液和沉淀三相中的固形物、蛋白质和脂质含量进行测定,结果如表 2 所示。

表2 去衣前后油体富集物、清液和沉淀中基本成分含量的变化

%

项目	固形物		蛋白质		脂质	
	未去衣	去衣	未去衣	去衣	未去衣	去衣
油体富集物	67.04 ± 1.01	76.80 ± 1.15	1.11 ± 0.12	0.63 ± 0.11	59.12 ± 0.93	73.34 ± 1.10
清液	1.44 ± 0.02	1.47 ± 0.02	0.27 ± 0.10	0.38 ± 0.08	0.67 ± 0.08	0.81 ± 0.14
沉淀	38.97 ± 0.58	49.27 ± 0.74	27.45 ± 0.18	42.28 ± 0.24	6.22 ± 0.25	3.70 ± 0.21

由表2可知,去衣处理对三相中基本成分的含量均存在不同程度的影响。去衣处理后,油体富集物中主要成分为脂质,固形物和脂质含量分别由未去衣的67.04%和59.12%增加到76.80%和73.34%,脂质的干基含量由88.19%提升至95.49%;沉淀中固形物和蛋白质含量则分别由未去衣的38.97%和27.45%提升至49.27%和42.28%,蛋白质的干基含量由70.44%提升至85.81%;清液中固形物、蛋白质与脂质含量也均有一定程度的增加。

去衣处理后油体富集物中的脂质干基含量和沉淀中蛋白质的干基含量提升的主要原因是核桃衣中存在的多酚与核桃蛋白、油体蛋白结合,降低了蛋白质的溶解性,使得脂质与蛋白质的提取率与分布情况都有所变化。去衣处理后油体富集物中的脂质含量和沉淀中的蛋白质含量大大增加,更易于分离收集和后续加工,并且油体富集物(明亮的乳白色)和

沉淀(色浅)的外观和色泽更佳,这对于实际生产是有利的。

### 2.3 去衣处理对氨基酸含量分布的影响

去衣前后油体富集物、清液和沉淀中氨基酸相对含量见表3。由表3可见,谷氨酸、天冬氨酸、精氨酸、亮氨酸、甘氨酸、丙氨酸为三相中的主要氨基酸。去衣处理后,油体富集物中丙氨酸、酪氨酸、精氨酸、甲硫氨酸、组氨酸、谷氨酸、半胱氨酸、甘氨酸这8种氨基酸相对含量的变化幅度超过20%,清液中有相似变化幅度的氨基酸为甲硫氨酸、半胱氨酸,而沉淀中则为甲硫氨酸、酪氨酸以及组氨酸。通过横向对比发现,清液、沉淀与去衣处理前油体富集物的谷氨酸、丙氨酸、甘氨酸的相对含量较为接近,而去衣处理后这3种氨基酸在油体富集物中相对含量的变化幅度在30%左右,这是因为去衣处理后油体富集物中的非油体蛋白含量减少所致。

表3 去衣前后油体富集物、清液和沉淀中氨基酸相对含量的变化

%

氨基酸	油体富集物		清液		沉淀	
	未去衣	去衣	未去衣	去衣	未去衣	去衣
天冬氨酸	6.88	6.78	8.92	8.86	10.75	10.57
苏氨酸	5.11	5.27	4.04	4.34	3.48	3.66
丝氨酸	5.70	6.78	5.21	5.81	5.32	6.04
谷氨酸	19.67	13.93	19.98	19.29	19.27	19.08
甘氨酸	9.41	12.05	8.97	8.43	7.93	8.82
丙氨酸	7.89	11.04	7.89	7.64	6.58	6.92
缬氨酸	6.42	7.65	5.60	5.75	5.89	6.44
甲硫氨酸	0.57	0.38	1.07	0.63	0.73	0.24
半胱氨酸	0.57	0.41	0.63	0.41	0.71	0.63
异亮氨酸	4.51	4.89	3.85	3.95	4.29	4.21
亮氨酸	8.55	9.79	7.07	7.36	7.65	7.55
酪氨酸	1.62	1.00	2.29	2.24	2.36	1.83
苯丙氨酸	3.90	4.14	3.31	3.60	3.92	3.50
赖氨酸	4.09	4.64	4.04	3.92	2.04	1.99
组氨酸	2.04	1.38	1.90	1.93	1.95	1.51
精氨酸	7.98	5.02	10.67	10.10	12.47	12.80
脯氨酸	5.08	5.27	4.53	4.77	4.65	4.21

## 2.4 核桃蛋白粉的基本性质

### 2.4.1 核桃蛋白粉的基本成分

对按1.2.2方法所得核桃蛋白粉的基本成分进行

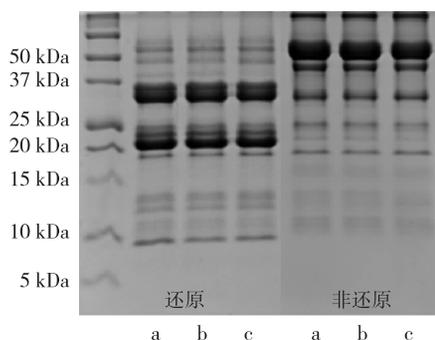
测定,结果见表4。由表4可见,核桃蛋白粉的水分含量为6.47%,蛋白质干基含量为85.81%,而脂质、总糖和灰分的干基含量分别为5.85%、3.07%和4.81%。

表4 核桃蛋白粉的基本成分组成

水分	蛋白质(干基)	脂质(干基)	总糖(干基)	灰分(干基)
6.47 ± 0.17	85.81 ± 0.18	5.85 ± 0.26	3.07 ± 0.13	4.81 ± 0.13

#### 2.4.2 核桃蛋白粉的储藏性

按1.2.5方法考察了核桃蛋白粉的储藏性,不同储藏期核桃蛋白粉的还原和非还原 Tricine - SDS - PAGE 分析结果见图1。



注:a.新鲜沉淀样品;b.蛋白粉37℃储藏3个月;c.蛋白粉37℃储藏12个月。

图1 不同储藏期核桃蛋白粉的还原和非还原 Tricine - SDS - PAGE 分析结果

由图1可见,在还原和非还原条件下,3个样品的主要条带都没有明显的变化。这表明,在储藏期间,核桃蛋白粉未出现蛋白交联或降解。同时,储藏12个月的蛋白粉没有哈败味,说明本方法所制备的核桃蛋白粉的储藏性极佳。

### 3 结论

通过去衣处理,可将核桃蛋白质和脂质的提取率分别提升至88.03% (未去衣83.20%)和97.76% (未去衣93.80%)。去衣处理也有利于核桃浆中脂质和蛋白质的离心分离:可将核桃仁中脂质在油体富集物中的分布提升至85.69% (未去衣82.65%),并将核桃仁中蛋白质在油体富集物中的分布降低至3.44% (未去衣7.36%),油体富集物中的脂质干基含量和沉淀中的蛋白质干基含量分别高达95.49% (未去衣88.19%)和85.81% (未去衣70.44%)。油体富集物、清液、沉淀中的氨基酸组成也受去衣处理的影响。此外,核桃浆(去衣)的离心沉淀物经过喷雾干燥所得的核桃蛋白粉具有极佳的储藏性。总体来说,核桃仁的去衣处理可明显提高蛋白质和脂质的提取率,并且有助于核桃浆中蛋白质和脂质的离心分离。

#### 参考文献:

[1] 王丁丁,赵见军,张润光,等.核桃油研究进展[J].食

品工业科技,2013,34(16):383-387.

- [2] GRIEL A E, KRIS - ETHEERTON P M, HILPERT K F, et al. An increase in dietary *n* - 3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans [J/OL]. *Nutr J*, 2007, 6: 2[2020 - 12 - 23]. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-6-2>.
- [3] HARDMANW E, ION G, AKINSETE J A, et al. Dietary walnut suppressed mammary gland tumorigenesis in the C (3) 1 TAg mouse [J]. *Nutr Cancer*, 2011, 63 (6): 960 - 970.
- [4] 毛晓英.核桃蛋白质的结构表征及其制品的改性研究[D].江苏无锡:江南大学,2012.
- [5] 张有林,原双进,王小纪.中国核桃加工产业现状与对策[J].*陕西林业科技*,2015(1):1-6.
- [6] 高海生,朱凤妹,李润丰.我国核桃加工产业的生产现状与发展趋势[J].*经济林研究*,2008(3):119-126.
- [7] SZE - TAOK W C, SCHRIMPF J E, TEUBER S S, et al. Effects of processing and storage on walnut (*Juglans regia* L.) tannins[J]. *J Sci Food Agric*, 2001, 81: 1215 - 1222.
- [8] 张天财,陈朝银,赵声兰,等.核桃种皮中多酚的测定及种皮对核桃贮藏品质的影响[J].*食品工业科技*,2013(20):60-64,69.
- [9] 李笑笑.核桃内种皮多酚的提取及核桃油与核桃蛋白粉的稳定性研究[D].江苏无锡:江南大学,2017.
- [10] 李秀凤.核桃仁去皮方法的研究[J].*食品研究与开发*,2005,26(4):37-38.
- [11] 刘森,王俊.山核桃仁碱液浸泡法去皮工艺的研究[J].*农业工程学报*,2007,23(10):256-261.
- [12] 荣瑞芬,吴雪疆,李鸿玉,等.核桃仁去皮工艺的研究[J].*食品工业科技*,2004(2):100-101.
- [13] 徐云峰.一种核桃仁清洗去皮初选装置:CN201921131890.4[P].2020-05-22.
- [14] 居巧苓.大豆油体富集物的分离及其功能性质研究[D].江苏无锡:江南大学,2019.
- [15] 张青,张天民.苯酚-硫酸比色法测定多糖含量[J].*山东食品科技*,2004(7):17-18.
- [16] SCHAGGER H. Tricine - SDS - PAGE[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1: 16 - 22.
- [17] TZEN J T C, HUANG A H C. Surface structure and properties of plant seed oil bodies[J]. *J Cell Biol*, 1992, 117(2): 327 - 335.