

# 酶法辅助制备核桃蛋白的工艺优化 及超滤回收核桃蛋白

高盼<sup>1,2,3</sup>, 张慧慧<sup>1</sup>, 王澍<sup>3,4</sup>, 杨歆萌<sup>1</sup>, 胡传荣<sup>1</sup>, 何东平<sup>1,3</sup>,  
张晖<sup>5,6</sup>, 张跃进<sup>6</sup>, 王兴国<sup>1,5,6</sup>

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室, 武汉 430023;  
3. 国家市场监督管理总局重点实验室(食用油质量与安全), 武汉 430012; 4. 武汉食品化妆品检验所, 武汉 430012;  
5. 江南大学食品学院, 江苏无锡 214122; 6. 云南摩尔农庄生物科技开发有限公司, 云南楚雄 675000)

**摘要:**为提高核桃蛋白得率, 分别探索了以碱性蛋白酶、纤维素酶和 $\alpha$ -淀粉酶为辅助酶, 碱溶酸沉法制备核桃蛋白的工艺, 采用超滤工艺回收酸沉废液中核桃蛋白, 比较醋酸纤维素(CA)膜、聚醚砜树脂(PES)膜和聚偏氟乙烯(PVDF)膜3种不同超滤膜的回收效率。结果表明, 酶法辅助碱溶酸沉法制备核桃蛋白的最佳工艺条件为以纤维素酶为辅助酶、酶解时间60 min、酶解pH 3.6、酶添加量0.5%、酶解温度37℃, 在最佳工艺条件下核桃蛋白得率为84.11%。CA膜能显著提高核桃蛋白得率, 在原料液质量浓度0.363 mg/mL、原料液温度30℃的条件下, CA膜的截留率可达92.33%, 核桃蛋白得率可达87.64%。

**关键词:**核桃蛋白; 纤维素酶; 醋酸纤维素膜; 酶法辅助; 超滤回收

中图分类号: TS229; Q814.9 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2022)10-0011-07

## Optimization of enzymatic – assisted preparation of walnut protein and ultrafiltration recovery of walnut protein

GAO Pan<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Huihui<sup>1</sup>, WANG Shu<sup>3,4</sup>, YANG Xinmeng<sup>1</sup>, HU Chuanrong<sup>1</sup>,  
HE Dongping<sup>1,3</sup>, ZHANG Hui<sup>5,6</sup>, ZHANG Yuejin<sup>6</sup>, WANG Xingguo<sup>1,5,6</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;  
2. Key Laboratory of Bulk Grain and Oil Intensive Processing, Ministry of Education, Wuhan 430023, China;  
3. Key Laboratory of Edible Oil Quality and Safety for State Market Regulation, Wuhan 430012, China;  
4. Wuhan Institute for Food and Cosmetic Control, Wuhan 430012, China; 5. School of Food  
Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 6. Yunnan MORRE  
GARDEN Biotechnology Development Co., Ltd., Chuxiong 675000, Yunnan, China)

**Abstract:** In order to improve the yield of walnut protein, alkaline protease, cellulase and  $\alpha$ -amylase were used as auxiliary enzyme to extract walnut protein by alkali – solution and acid – precipitation, walnut protein from acid precipitation waste water was recovered by ultrafiltration process, and the recovery efficiency of cellulose acetate (CA) membrane, polyethersulfone resin (PES) membrane and polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane on walnut protein was compared. The results showed that the

optimal preparation conditions of walnut protein were obtained as follows: with cellulase as auxiliary enzyme, enzymatic hydrolysis time 60 min, enzymatic hydrolysis pH 3.6, dosage of enzyme 0.5%, and enzymatic hydrolysis temperature 37℃. Under the optimal conditions, the yield of walnut protein was 84.11%. CA

收稿日期: 2021-12-23; 修回日期: 2022-04-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(32001735); 云南省重大科技专项计划——生物种业和农产品精深加工重大专项(202102AE090055)

作者简介: 高盼(1990), 女, 讲师, 博士, 研究方向为油脂及植物蛋白工程(E-mail) gaopan925@163.com。

membrane could significantly improve the yield of walnut protein, under the conditions of mass concentration of feed solution 0.363 mg/mL and temperature of feed solution 30 °C, the rejection rate of CA membrane could reach 92.33%, and the yield of walnut protein was 87.64%.

**Key words:** walnut protein; cellulase; cellulose acetate membrane; enzymatic assist; ultrafiltration recovery

核桃除直接食用外,主要用来制油<sup>[1]</sup>,而核桃饼粕绝大部分用作动物饲料,仅有少部分会被利用制备核桃蛋白等产品,造成了核桃蛋白资源的严重浪费。核桃蛋白剩余价值利用不足是造成资源浪费最主要的原因,因此提高核桃蛋白得率,是扩大核桃蛋白资源利用的重点。根据蛋白质含量不同,核桃蛋白分为蛋白质含量小于60%的核桃蛋白粉、蛋白质含量高于70%的核桃浓缩蛋白及蛋白质含量高于90%的核桃分离蛋白<sup>[2]</sup>。一般核桃饼粕会通过脱脂粉碎制备核桃蛋白粉,而进一步制备核桃浓缩蛋白和核桃分离蛋白则需要各种提取工艺。

碱溶酸沉法是使用最广泛的核桃蛋白提取方法<sup>[3-4]</sup>。但是采用碱溶酸沉法提取核桃蛋白,得率普遍在70%左右,得率不高,因此需要辅助工艺来提高得率,在核桃蛋白中应用较多的是超声辅助<sup>[5]</sup>。酶法辅助提取蛋白是近年来较为流行的工艺,在大豆蛋白<sup>[6]</sup>、米糠蛋白<sup>[7]</sup>和小麦胚芽蛋白<sup>[8]</sup>的制备中已有广泛应用,常用的辅助酶主要包括碱性蛋白酶、纤维素酶和 $\alpha$ -淀粉酶。但针对上述3种酶在核桃蛋白制备中的应用比较研究,则未见报道。

采用超滤处理能进一步回收蛋白,提高蛋白得率,该方法已在芝麻蛋白中得到应用<sup>[9-10]</sup>,而在核桃蛋白中未见应用。醋酸纤维素(CA)膜<sup>[11]</sup>、聚醚砜树脂(PES)膜<sup>[12]</sup>和聚偏氟乙烯(PVDF)膜<sup>[13]</sup>被广泛应用于工业生产中,因此本实验选择这3种超滤膜回收核桃蛋白。

本实验分别采用碱性蛋白酶、纤维素酶和 $\alpha$ -淀粉酶为辅助酶,采用碱溶酸沉法提取核桃蛋白,以核桃蛋白得率为指标,优化核桃蛋白制备工艺,并采用超滤回收酸沉废液中的核桃蛋白,以期提高核桃蛋白得率,充分利用核桃蛋白资源。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

脱脂核桃蛋白粉(蛋白质含量为40.80%,脱脂率为99.38%),实验室自制。

碱性蛋白酶(酶活 $2 \times 10^5$  U/g),诺维信(中国)

生物技术有限公司;纤维素酶(酶活 $1 \times 10^4$  U/g)、 $\alpha$ -淀粉酶(酶活 $1 \times 10^4$  U/g),江苏锐阳生物科技有限公司;PES,慈溪市横河王旺塑料制品厂;N,N-二甲基乙酰胺(DMAC),天津市科密欧化学试剂有限公司;CA、聚乙烯吡咯烷酮K-30(PVP)、PVDF、氢氧化钠、盐酸、硼酸溶液、硫酸铜、硫酸钾、硫酸、磷酸、甲基红指示剂、溴甲酚绿指示剂、无水乙醇、95%乙醇溶液、乙醚,国药集团化学试剂有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器,K9840自动凯氏定氮仪,八孔消化炉,FD-8型冷冻干燥机,TDSZ台式离心机,通用实验室pH计,pH-Stat装置,SZ-93自动双重纯水蒸馏器,MSC300超滤杯,101-1-S数显鼓风干燥箱,RW-20数显型置顶式机械搅拌器,SHZ-D循环式真空泵,7200紫外可见分光光度计。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 酶法辅助碱溶酸沉法提取核桃蛋白

根据张娅妮等<sup>[13]</sup>碱溶酸沉法提取核桃蛋白的实验条件,分别采用不同酶辅助提取核桃蛋白。

##### 1.2.1.1 碱性蛋白酶辅助碱溶酸沉法提取核桃蛋白

脱脂核桃蛋白粉→加水混合→调节pH至11→加入碱性蛋白酶→酶解→高温灭酶(90 °C, 10 min)→4 000 r/min离心10 min→取上清液→调节pH至4.5→搅拌(200 r/min, 100 min)→4 000 r/min离心10 min→取沉淀→水洗沉淀至中性→真空冷冻干燥→核桃蛋白。

##### 1.2.1.2 纤维素酶辅助碱溶酸沉法提取核桃蛋白

脱脂核桃蛋白粉→加水混合→加入纤维素酶→酶解→高温灭酶(90 °C, 10 min)→调节pH至11→4 000 r/min离心10 min→取上清液→调节pH至4.5→搅拌(200 r/min, 100 min)→4 000 r/min离心10 min→取沉淀→水洗沉淀至中性→真空冷冻干燥→核桃蛋白。

##### 1.2.1.3 $\alpha$ -淀粉酶辅助碱溶酸沉法提取核桃蛋白

脱脂核桃蛋白粉→加水混合→调节pH至11→4 000 r/min离心10 min→取上清液→加入 $\alpha$ -淀粉酶→酶解→高温灭酶(90 °C, 10 min)→调节pH至

4.5→搅拌(200 r/min, 100 min)→4 000 r/min 离心 10 min→取沉淀→水洗沉淀至中性→真空冷冻干燥→核桃蛋白。

## 1.2.2 超滤回收酸沉废液中核桃蛋白

### 1.2.2.1 膜的制备

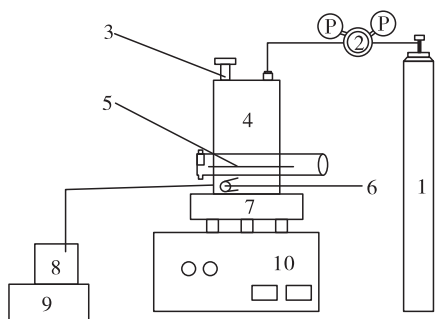
CA膜的制备:称取42 g DMAC和8 g CA于圆底烧瓶中,置于40℃油浴锅中,以300 r/min的速率搅拌至CA完全溶解,溶液为清澈、黏稠的铸膜液,于45℃烘箱中静置脱泡17 h,待液体冷却,在玻璃板上倒铸膜液,均匀刮板,使制作的膜光滑,放置约45 s后迅速放入20℃的蒸馏水中成膜,静置后,将膜取下放在蒸馏水中24 h,备用。

PES膜的制备:称取78 g DMAC、20 g PES和2 g PVP于圆底烧瓶中,置于65℃油浴锅中,以300 r/min的速率搅拌直至PES和PVP完全溶解,溶液为清澈、黏稠的铸膜液,于45℃烘箱中静置脱泡12 h,后续与CA膜制备方法一致。

PVDF膜的制备:称取81 g DMAC、3 g PVP和16 g PVDF于圆底烧瓶,置于40℃油浴锅中,以300 r/min的速率搅拌至PVP和PVDF完全溶解,溶液为清澈、黏稠的铸膜液,于45℃烘箱中静置脱泡12 h,后续与CA膜制备方法一致。

### 1.2.2.2 超滤回收酸沉废液中核桃蛋白

超滤回收酸沉废液中核桃蛋白的实验装置如图1所示。



注:1. 氮气瓶;2. 压力阀门;3. 进料口;4. 超滤杯;5. 膜盒;  
6. 出料口;7. 底座;8. 烧杯;9. 电子天平;10. 磁力搅拌器

图1 超滤回收酸沉废液中核桃蛋白的实验装置

从图1可以看出,超滤装置主要由超滤杯、膜盒、氮气瓶和磁力搅拌器组成,膜通过面积为50.24 cm<sup>2</sup>。取10~100 mL酸沉废液,将其用漏斗倒入超滤杯中,打开氮气阀门注入氮气,慢慢调节至所需压力(CA膜、PES膜为0.01 MPa, PVDF膜为0.05 MPa)。从流出第一滴液体开始计时,间隔相同时间记录电子天平的读数,记录透过液的质量,收集截留液和透过液,测定蛋白质含量。

## 1.2.3 基本指标的测定

### 1.2.3.1 核桃蛋白得率

参照GB 5009.5—2016测定蛋白质含量。核桃蛋白得率为产物中蛋白质质量与原料中蛋白质质量的比值。

### 1.2.3.2 膜通量

按下式计算膜通量( $J$ )<sup>[14]</sup>。

$$J = m / (S \times t) \quad (1)$$

式中: $m$ 为超滤过程中通过超滤膜的溶液质量, g; $S$ 为膜的有效通过面积, cm<sup>2</sup>; $t$ 为超滤时间, min。

### 1.2.3.3 截留率

按下式计算截留率( $R_0$ )<sup>[14]</sup>。

$$R_0 = (1 - C_p / C_f) \times 100\% \quad (2)$$

式中: $C_p$ 为透过液中的蛋白质质量, mg; $C_f$ 为原料液中蛋白质的质量, mg。

## 1.2.4 数据处理

采用Excel 2010和Design-Expert 8.0.6软件进行数据处理、分析、作图,所有数据取平均值( $n=3$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶法辅助提取核桃蛋白的单因素实验

#### 2.1.1 酶添加量对核桃蛋白得率的影响

取8 g脱脂核桃蛋白粉,按1.2.1方法提取核桃蛋白。分别加入0.5%、1.0%、1.5%、2.0%和2.5%的碱性蛋白酶、纤维素酶和 $\alpha$ -淀粉酶,其中碱性蛋白酶酶解条件为酶解温度45℃、酶解时间90 min、酶解pH 9.5,纤维素酶酶解条件为酶解温度35℃、酶解时间60 min、酶解pH 4.0, $\alpha$ -淀粉酶酶解条件为酶解温度50℃、酶解时间120 min、酶解pH 6.5,研究酶添加量对核桃蛋白得率的影响,结果如图2所示。

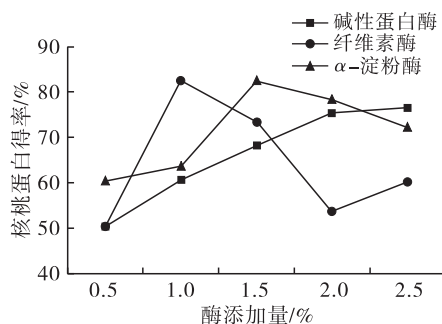


图2 酶添加量对核桃蛋白得率的影响

从图2可以看出,核桃蛋白得率随着碱性蛋白酶添加量的增加而增大,当酶添加量超过2.0%时,核桃蛋白得率增速减缓,这可能是因为酶添加量达到2.0%后,酶浓度与原料浓度达到了平衡,对原料的酶解效果不再增强。因此,从节约成本的角度考虑,选择碱性蛋白酶添加量为2.0%。随着纤维素酶添加量增大,核桃蛋白得率总体呈先上升后下降

的趋势,在纤维素酶添加量为 1.0% 时达到最大值,可能因为此时纤维素酶裂解细胞壁,暴露蛋白质,提高了蛋白质的溶出率,但酶添加量过大,引发酶的竞争性抑制,与蛋白质形成复合体系,抑制酶活力,降低了核桃蛋白得率。因此,选择纤维素酶添加量为 1.0%。随着  $\alpha$ -淀粉酶添加量的增加,核桃蛋白得率先增大后降低,当酶添加量为 1.5% 时,核桃蛋白得率最高。因此,选择  $\alpha$ -淀粉酶添加量为 1.5%。对比发现,碱性蛋白酶、纤维素酶和  $\alpha$ -淀粉酶的核桃蛋白得率最大值分别为 76.59%、82.59% 和 82.59%,碱性蛋白酶的提取效率明显低于其他两种酶。

### 2.1.2 酶解时间对核桃蛋白得率的影响

取 8 g 脱脂核桃蛋白粉,按 1.2.1 方法提取核桃蛋白。调节碱性蛋白酶、纤维素酶和  $\alpha$ -淀粉酶的酶解时间分别为 30、60、90、120 min 和 150 min,其中碱性蛋白酶酶解条件为酶添加量 2.0%、酶解温度 45  $^{\circ}\text{C}$ 、酶解 pH 9.5,纤维素酶酶解条件为酶添加量 1.0%、酶解温度 35  $^{\circ}\text{C}$ 、酶解 pH 4.0, $\alpha$ -淀粉酶酶解条件为酶添加量 1.5%、酶解温度 50  $^{\circ}\text{C}$ 、酶解 pH 6.5,研究酶解时间对核桃蛋白得率的影响,结果如图 3 所示。

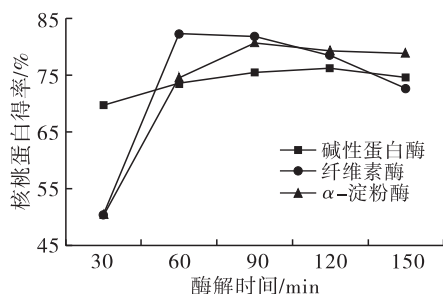


图 3 酶解时间对核桃蛋白得率的影响

从图 3 可以看出,核桃蛋白得率随着碱性蛋白酶酶解时间的延长而略微增加,当酶解时间超过 90 min 后,核桃蛋白得率趋于稳定。从提取效率方面考虑,选择碱性蛋白酶酶解时间为 90 min。随着纤维素酶酶解时间的延长,核桃蛋白得率先上升后下降,在酶解时间 60 min 时达到最大值。主要原因可能是酶解时间过短,细胞壁裂解不彻底,不利于核桃蛋白的提取,随着酶解时间延长得率迅速升高,但酶解时间过长,反而造成部分蛋白质损失,得率略微降低。因此,选择纤维素酶的酶解时间为 60 min。随着  $\alpha$ -淀粉酶酶解时间的延长,核桃蛋白得率不断增加,当酶解时间达到 90 min 时,得率最大,继续延长酶解时间,支链淀粉的减少以及过多的小分子淀粉的产生抑制淀粉的水解,使得核桃蛋白得率逐渐趋于稳定。综上,选择  $\alpha$ -淀粉酶的酶解时间为

90 min。对比发现,碱性蛋白酶、纤维素酶和  $\alpha$ -淀粉酶的核桃蛋白得率最大值分别为 76.30%、82.30% 和 81.72%,其中纤维素酶的核桃蛋白得率明显高于其他两种酶,而碱性蛋白酶表现最差。

### 2.1.3 酶解温度对核桃蛋白得率的影响

取 8 g 脱脂核桃蛋白粉,按 1.2.1 方法提取核桃蛋白。调节碱性蛋白酶、纤维素酶和  $\alpha$ -淀粉酶的酶解温度分别为 35、40、45、50、55  $^{\circ}\text{C}$ ,其中碱性蛋白酶酶解条件为酶添加量 2.0%、酶解时间 90 min、酶解 pH 9.5,纤维素酶酶解条件为酶添加量 1.0%、酶解时间 60 min、酶解 pH 4.0, $\alpha$ -淀粉酶酶解条件为酶添加量 1.5%、酶解时间 90 min、酶解 pH 6.5,研究酶解温度对核桃蛋白得率的影响,结果如图 4 所示。

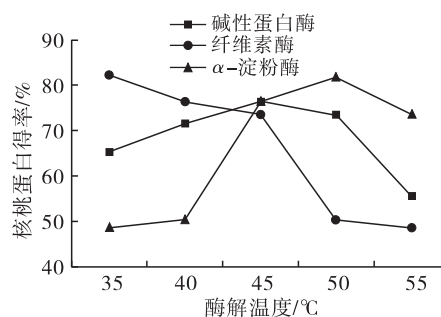


图 4 酶解温度对核桃蛋白得率的影响

由图 4 可知,核桃蛋白得率随着碱性蛋白酶酶解温度的升高先增加后降低,这可能是因为低温状态下酶的活性不高,导致酶解效率较低,随着酶解温度的升高,酶的活性越来越强,而当酶解温度过高时,部分酶开始变性失活,导致酶解效率下降。因此,选择碱性蛋白酶酶解温度为 45  $^{\circ}\text{C}$ 。随着纤维素酶酶解温度的升高,核桃蛋白得率呈下降的趋势,且下降趋势由缓变陡,在酶解温度为 35  $^{\circ}\text{C}$  时核桃蛋白得率最大。主要原因是酶的活力受温度的影响较大,在最适温度范围内活力较强。温度过低,酶活较弱,不利于蛋白的提取,温度过高引发淀粉糊化,阻碍蛋白质溶出,降低蛋白得率。因此,选择纤维素酶酶解温度为 35  $^{\circ}\text{C}$ 。随  $\alpha$ -淀粉酶酶解温度升高,核桃蛋白得率先增大后降低,50  $^{\circ}\text{C}$  时得率最大。酶解温度超过 50  $^{\circ}\text{C}$ , $\alpha$ -淀粉酶酶解效果明显下降。此外,酶解温度高也会导致淀粉降解,非酶解液还原糖的升高亦会导致核桃蛋白得率降低。综上,选择  $\alpha$ -淀粉酶的酶解温度为 50  $^{\circ}\text{C}$ 。对比发现,碱性蛋白酶、纤维素酶和  $\alpha$ -淀粉酶的核桃蛋白得率最大值分别为 76.47%、82.47% 和 82.06%。其中纤维素酶的核桃蛋白得率高于其他两种酶,而碱性蛋白酶表现最差。

综合比较碱性蛋白酶、纤维素酶和 $\alpha$ -淀粉酶在最优条件下的核桃蛋白得率发现,纤维素酶的核桃蛋白得率最高,因此优选纤维素酶作为碱溶酸沉法制备核桃蛋白的辅助酶,其最佳酶解条件为酶添加量1.0%、酶解时间60 min、酶解pH 4.0、酶解温度35℃。

## 2.2 酶法辅助提取核桃蛋白的响应面实验

为了进一步提高核桃蛋白得率,在单因素实验基础上,选择纤维素酶,以酶解时间(*A*)、酶解pH(*B*)、酶添加量(*C*)和酶解温度(*D*)为因素,核桃蛋白得率(*Y*)为指标,进行响应面实验设计。响应面实验因素水平见表1,响应面实验设计及结果见表2。

表1 响应面实验因素水平

水平	酶解时间/min	酶解pH	酶添加量/%	酶解温度/℃
-1	40	3.5	0.5	30
0	60	4.0	1.0	40
1	80	4.5	1.5	50

表2 响应面实验设计及结果

实验号	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>Y</i> /%
1	-1	0	0	-1	72.79
2	-1	0	0	1	77.78
3	-1	0	-1	0	67.63
4	0	0	-1	1	75.91
5	0	0	1	1	82.13
6	0	1	1	0	83.55
7	0	-1	1	0	71.39
8	0	0	-1	-1	67.91
9	1	0	1	0	82.31
10	0	1	-1	0	72.65
11	-1	0	1	0	75.45
12	1	-1	0	0	73.12
13	0	1	0	-1	78.38
14	0	1	0	1	80.25
15	0	-1	0	1	76.16
16	0	-1	-1	0	68.95
17	0	0	0	0	78.03
18	1	0	-1	0	77.31
19	0	0	0	0	75.68
20	0	-1	0	-1	67.91
21	0	0	0	0	74.92
22	1	1	0	0	81.19
23	0	0	1	-1	75.19
24	1	0	0	1	80.19
25	1	0	0	-1	73.44
26	0	0	0	0	77.14
27	-1	-1	0	0	69.12
28	-1	1	0	0	79.61
29	0	0	0	0	78.44

根据表2数据得到二次多元回归模型: $Y=78.69-0.22A-2.73B-0.36C-1.17D-4.56AB$

$-1.45AC-1.86AD+3.08BC-1.69BD-0.70CD-1.98A^2-4.80B^2+0.55C^2-1.06D^2$ 。对回归模型进行方差分析,结果见表3。

表3 方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>p</i>
模型	440.47	14	31.46	3.01	0.023 9
<i>A</i>	0.58	1	0.58	0.06	0.817 7
<i>B</i>	89.54	1	89.54	8.57	0.011 0
<i>C</i>	1.56	1	1.56	0.15	0.705 4
<i>D</i>	16.36	1	16.36	1.57	0.231 3
<i>AB</i>	83.17	1	83.17	7.96	0.013 6
<i>AC</i>	8.38	1	8.38	0.80	0.385 5
<i>AD</i>	13.76	1	13.76	1.32	0.270 2
<i>BC</i>	37.82	1	37.82	3.62	0.077 8
<i>BD</i>	11.42	1	11.42	1.09	0.313 3
<i>CD</i>	1.97	1	1.97	0.19	0.670 4
<i>A</i> <sup>2</sup>	25.36	1	25.36	2.43	0.141 5
<i>B</i> <sup>2</sup>	149.68	1	149.68	14.33	0.002 0
<i>C</i> <sup>2</sup>	1.94	1	1.94	0.19	0.673 4
<i>D</i> <sup>2</sup>	7.36	1	7.36	0.70	0.415 4
残余	146.22	14	10.44		
失拟项	101.61	10	10.16	0.91	0.590 8
纯误差	44.62	4	11.15		
总误差	588.69	28			

注: $p < 0.05$  显著,  $p < 0.01$  极显著

由表3可知,模型*p*小于0.05,显著,且失拟项*p*为0.590 8,大于0.05,失拟不显著,说明实验得到的二次多元回归模型良好。其中因素*B*、*AB*显著,*B*<sup>2</sup>极显著,表明酶解pH对核桃蛋白制备工艺有显著影响。影响核桃蛋白得率的因素主次顺序为*B* > *D* > *C* > *A*,即酶解pH > 酶解温度 > 酶添加量 > 酶解时间。

通过对拟合回归模型方程的计算,得到纤维素酶辅助碱溶酸沉法提取核桃蛋白的最佳工艺条件为酶解时间60 min、酶解pH 3.6、酶添加量0.5%、酶解温度37℃。在最佳工艺条件下进行3次验证实验,核桃蛋白平均得率为84.11%。后续以最佳工艺条件下得到的酸沉废液为原料,采用超滤工艺回收其中的核桃蛋白。

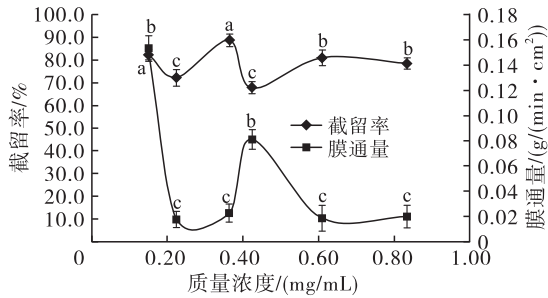
实验室前期研究中<sup>[2]</sup>,采用碱性蛋白酶辅助碱溶酸沉法提取核桃蛋白,核桃蛋白得率为78.11%,明显低于纤维素酶辅助的结果。

## 2.3 超滤回收酸沉废液中核桃蛋白

### 2.3.1 原料液质量浓度对不同膜的影响

配制原料液质量浓度分别为0.150、0.224、0.363、0.423、0.609 mg/mL和0.833 mg/mL,在室温下分别用CA膜、PES膜和PVDF膜3种不同的膜超滤10 min,考察原料液质量浓度对3种膜截留率

和膜通量的影响,结果如图5~图7所示。



注:同指标不同字母表示差异显著( $p < 0.05$ )。下同

图5 原料液质量浓度对CA膜截留率和膜通量的影响

从图5可以看出,随着原料液质量浓度的增加,CA膜截留率呈波浪线式变化,在质量浓度为0.363 mg/mL时,截留率最高,达到88.67%,证明此时蛋白质的回收效率最高。另外,此时CA膜的膜通量相对较小,仅为0.023 g/(min·cm<sup>2</sup>)。

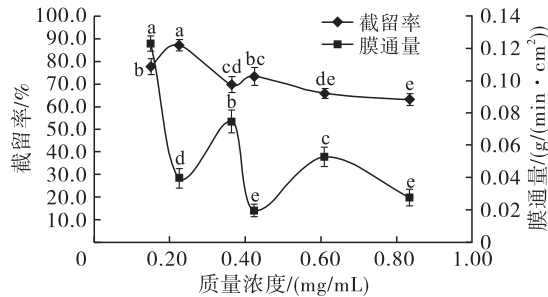


图6 原料液质量浓度对PES膜截留率和膜通量的影响

从图6可以看出,随着原料液质量浓度逐渐增加,PES膜截留率先上升后下降。在质量浓度为0.224 mg/mL时,截留率最高,为87.23%,此时蛋白质的回收效率最高。理论上对于质量浓度较低的原料液,绝大部分的蛋白质分子通过了超滤膜,而随质量浓度增加,膜面上凝胶层愈来愈厚,阻力越来越大,蛋白质不易透过膜到透过液中,因此截留率升高。本实验结果与理论不一致,推测可能是蛋白质与膜发生了电吸附或实验室自制膜存在一定缺陷。此时,PES膜的膜通量为0.04 g/(min·cm<sup>2</sup>)。

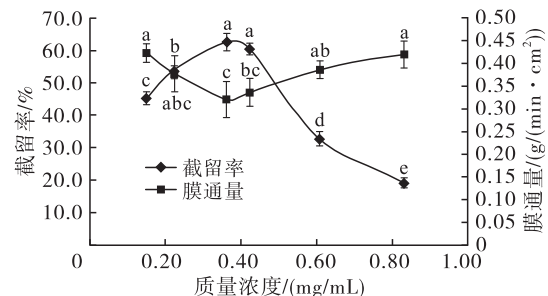


图7 原料液质量浓度对PVDF膜截留率和膜通量的影响

从图7可以看出,随着原料液质量浓度增加,截留率先增大后减小。在质量浓度为0.363 mg/mL时,截留率最高,为62.67%,此时蛋白质的回收效率

最高。此时,膜通量最小,仅为0.322 g/(min·cm<sup>2</sup>)。

比较发现,PVDF膜的截留率最低,而CA膜与PES膜相对稳定,因此仅选用CA膜和PES膜进行后续研究。

### 2.3.2 原料液温度对截留率和膜通量的影响

设置0、10、20、30、40℃ 5个原料液温度梯度,CA膜原料液质量浓度为0.363 mg/mL,PES膜的原料液质量浓度为0.224 mg/mL,分别用两种膜超滤10 min,计算截留率和膜通量,结果如图8、图9所示。

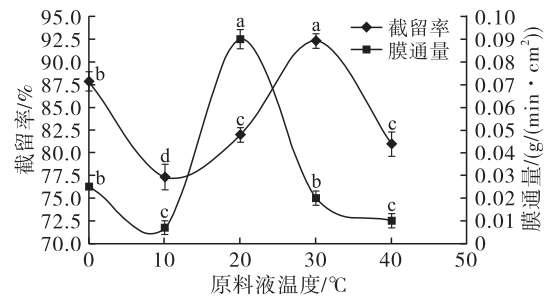


图8 原料液温度对CA膜截留率和膜通量的影响

从图8可以看出,随着原料液温度的升高,截留率波动变化,当原料液温度为30℃时,截留率最高,为92.33%。可能由于CA膜本身受温度影响较大。在原料液温度变化时,截留率存在极值点。膜通量在20℃时最大,为0.090 g/(min·cm<sup>2</sup>)。

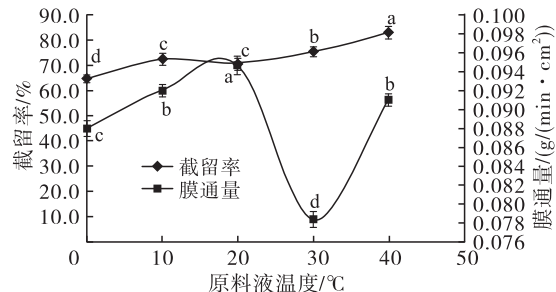


图9 原料液温度对PES膜截留率和膜通量的影响

从图9可以看出,随着原料液温度的升高,截留率呈上升趋势,在原料液温度为40℃时达到最高,为83.00%。膜通量波动变化,在30℃时膜通量最小,仅为0.078 g/(min·cm<sup>2</sup>)。

综上,利用超滤工艺对酸沉废液进行核桃蛋白的回收,通过比较不同膜随着原料液质量浓度和温度的变化,发现CA膜最稳定,截留率最高可达92.33%,具有极佳的蛋白质回收效果。因此,选择CA膜处理酸沉废液,可提高核桃蛋白得率。在原料液质量浓度0.363 mg/mL、原料液温度30℃条件下采用CA膜超滤回收酸沉废液中的核桃蛋白,核桃蛋白得率达到87.64%,显著提高了核桃蛋白得率。

## 3 结论

采用不同酶辅助碱溶酸沉法制备核桃蛋白,并

比较不同膜回收酸沉废液中的核桃蛋白。结果表明:核桃蛋白最佳提取工艺条件为以纤维素酶为辅助酶、酶解时间 60 min、酶解 pH 3.6、酶添加量 0.5%、酶解温度 37℃,在此条件下核桃蛋白得率高达 84.11%。再采用 CA 膜超滤回收酸沉废液中核桃蛋白,在原料液质量浓度 0.363 mg/mL、原料液温度 30℃条件下,CA 膜截留率达到 92.33%,核桃蛋白得率率达到 87.64%。但是本实验未对核桃蛋白的纯度进行检测,下一步可继续纯化制备核桃浓缩蛋白,使其品质更佳。

### 参考文献:

- [1] GAO P, LIU R J, JIN Q Z, et al. Effects of processing methods on the chemical composition and antioxidant capacity of walnut (*Juglans regia* L.) oil [J/OL]. *LWT - Food Sci Technol*, 2021, 135: 109958 [2021-12-20]. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109958>.
- [2] 高盼, 杨歆萌, 马开创, 等. 核桃蛋白制备工艺研究[J]. *中国油脂*, 2021, 46(1): 52-56, 75.
- [3] 杜蕾蕾, 郭涛, 万辉, 等. 冷榨核桃饼中核桃蛋白的提取与纯化的研究[J]. *粮油加工*, 2008(10): 79-80.
- [4] 姜莉, 徐怀德, 何玉君, 等. 核桃渣中蛋白质的提取工艺及其功能性研究[J]. *食品科技*, 2007, 32(4): 237-240.

- [5] 张研彦, 马云睿, 杨歆萌, 等. 超声辅助核桃饼脱脂和多肽制备工艺的优化[J]. *中国油脂*, 2021, 46(3): 57-61.
- [6] 朱秀清, 曾剑华, 房媛媛, 等. 纤维素酶结合碱性蛋白酶提高冷榨大豆出油率的工艺优化[J]. *中国油脂*, 2019, 44(5): 13-17.
- [7] 王蕾, 田少君, 张争全. 纤维素酶辅助碱法提取米糠蛋白的工艺优化[J]. *粮食与油脂*, 2019, 32(4): 44-47.
- [8] 吴定, 谢慧慧, 黄卉卉, 等. 固定化  $\alpha$ -淀粉酶制备麦胚蛋白工艺条件优化[J]. *中国粮油学报*, 2016, 31(3): 115-119.
- [9] 朱秀灵, 戴清源, 贾冬, 等. 芝麻蛋白提取液超滤浓缩工艺及其功能特性研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(1): 244-249.
- [10] 李林英, 薛彩霞. 膜分离技术的应用及研究进展[J]. *内蒙古石油化工*, 2013(2): 102-103.
- [11] 杨弋星, 吴文标, 张敏. 超滤膜制膜材料研究进展和发展趋势[J]. *粮食与油脂*, 2005(5): 15-18.
- [12] 刘闪闪, 金建波, 韩玉, 等. 聚醚砜和磺化聚醚砜膜结构及性能研究[J]. *水处理技术*, 2011, 37(7): 17-20.
- [13] 张娅妮, 阮晓惠, 陈浩, 等. 核桃蛋白的酶解工艺优化及产物特性研究[J]. *中国油脂*, 2021, 46(10): 18-23.
- [14] 江连州, 吴海波, 王秋京. 酶解改性大豆蛋白的膜过滤制备技术研究[J]. *中国油脂*, 2010, 35(1): 23-27.

(上接第 10 页)

备核桃油的工艺条件调整为原料颗粒度 120 目、原料水分 1.5%、入榨温度 60℃,在此条件下进行验证试验,核桃饼残油率为 13.43%,该结果与预测值相近,说明该模型的预测性较好,优化的工艺条件可靠。

### 3 结论

通过单因素试验和响应面法对全自动卧式液压压榨机制备核桃油的工艺条件进行优化。结果表明,全自动卧式液压压榨机制备核桃油的最佳工艺条件为原料颗粒度 120 目、原料水分 1.5%、入榨温度 60℃,在此条件下核桃饼残油率为 13.43%。本研究可以为利用全自动卧式液压压榨机制备核桃油提供一定的参考。

利用全自动卧式液压压榨机可以实现核桃仁连续压榨制油,但本研究未对生产的核桃油中活性营养成分进行研究,今后可以对不同工艺条件生产的核桃油营养成分进行探究,以提高核桃油的品质。

### 参考文献:

- [1] 缪福俊, 耿树香, 肖良俊, 等. 核桃油生物活性研究进展[J]. *中国油脂*, 2021, 46(6): 85-88.
- [2] 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(16): 383-387.
- [3] 黄黎慧, 张晓燕, 倪小英. 水酶法提取核桃油工艺研究

[J]. *粮食科技与经济*, 2010, 35(4): 30-32.

- [4] 王婷, 阙欢. 核桃油生产工艺研究[J]. *现代食品*, 2017, 22(2): 108-111.
- [5] 张清安. 核桃油对小鼠肝脏与脑组织的抗氧化作用[J]. *营养学报*, 2004, 26(5): 408-409.
- [6] 王志平, 杨栓平, 李文德, 等. 核桃油及维生素 E 复合核桃油对动物功能行为影响的研究[J]. *山西医药杂志*, 2000, 29(4): 325-326.
- [7] 赵声兰, 陈朝银, 葛锋, 等. 核桃油功效成分研究进展[J]. *云南中医学院学报*, 2010, 33(6): 71-74.
- [8] 陈丹, 赵声兰. 核桃油保健及药用功效研究[J]. *亚太传统医药*, 2009(1): 27-28.
- [9] 周凤娟, 苏朋, 孔翠萍, 等. 核桃油体外清除自由基活性的研究[J]. *中国油脂*, 2007, 32(7): 32-33.
- [10] 肖仁显, 陈中海, 陈秋平, 等. 冷榨法、超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法和有机溶剂浸出法提取山核桃油比较[J]. *食品科学*, 2012, 33(20): 51-55.
- [11] 王翔宇, 罗珍岑, 李键, 等. 超声波辅助溶剂浸出法提取巴塘核桃油工艺优化及脂肪酸组分分析[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(11): 173-176.
- [12] 王丰俊, 王建中, 王宪昌, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 流体萃取核桃油工艺条件的研究[J]. *北京林业大学学报*, 2004, 26(3): 67-80.
- [13] 王丰俊, 王建中, 王宪昌, 等. 冷榨制取与超临界 CO<sub>2</sub> 萃取核桃油的氧化稳定性比较研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(5): 41-43.