

# 榛子蛋白提取及纯化的工艺优化

刘 辉<sup>1</sup>, 马齐兵<sup>1</sup>, 胡传荣<sup>1,2</sup>, 何东平<sup>1,2</sup>, 高盼<sup>1,2</sup>

(1. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 武汉 430023; 2. 国家粮食局粮油资源综合开发工程技术研究中心, 武汉 430023)

**摘要:**以榛子粕为原料,采用碱性蛋白酶酶解辅助碱溶酸沉法提取榛子蛋白,然后加入碱液复溶、碱性蛋白酶酶解、酸沉纯化。在单因素试验的基础上采用响应面法对提取过程中酶解工艺条件进行优化,采用正交试验优化榛子蛋白纯化工艺。结果表明:最优酶解工艺条件为酶解温度 46℃、pH 8、酶解时间 3.7 h,在此条件下榛子蛋白提取率达到 53.16%;最佳纯化条件为反应温度 50℃、液料比 5:1、复溶 pH 11,在此条件下榛子蛋白纯度为 95.23%。

**关键词:**榛子蛋白;酶解;碱性蛋白酶;提取;纯化

中图分类号:TQ936.2;TS229

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2021)05-0071-05

## Process optimization for extraction and purification of filbert protein

LIU Hui<sup>1</sup>, MA Qibing<sup>1</sup>, HU Chuanrong<sup>1,2</sup>, HE Dongping<sup>1,2</sup>, GAO Pan<sup>1,2</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Grain and Oil Resources Comprehensive Exploitation and Engineering Technology Research Center of State Administration of Grain, Wuhan 430023, China)

**Abstract:** Filbert meal was used as raw materials to extract protein by alcalase assisted alkali solution and acid precipitation, then by adding alkali solution to reconstitute, alcalase to enzymolyze and acid to precipitate, filbert protein was purified. Based on the single factor experiment, the response surface methodology was used to optimize the enzymolysis process conditions in the extraction, and the orthogonal experiment was used to optimize the purification conditions of filbert protein. The results showed that the optimal enzymolysis conditions were obtained as follows: enzymolysis temperature 46℃, pH 8 and enzymolysis time 3.7 h, and the extraction rate of filbert protein reached 53.16% under these conditions. The optimal purification conditions were obtained as follows: reaction temperature 50℃, liquid to material ratio 5:1, reconstitution pH 11, and the purity of filbert protein was 95.23% under the optimal conditions.

**Key words:** filbert protein; enzymolyze; alcalase; extraction; purification

榛子(*Corylus heterophylla* Fisch)又名榧子、平榛等,属桦木科植物的种仁<sup>[1]</sup>,是极具营养价值的坚果<sup>[2]</sup>。榛子性味甘、平,具有益气养血和补脾健胃等功效<sup>[3]</sup>。榛子仁的蛋白质含量为 16.2%~23.6%,脂肪含量为 50.6%~63.8%<sup>[4]</sup>。榛子仁在提油后得到的副产品榛子粕,也有丰富的营养成分<sup>[5]</sup>,但其多被作为饲料、肥料使用,没有得到最大限度的利用<sup>[6]</sup>,造成资源浪费。

本研究以榛子粕为原料,采用碱性蛋白酶酶解辅助碱溶酸沉法提取榛子蛋白,采用单因素试验研究酶解温度、pH、酶解时间对榛子蛋白提取率的影响,确定各因素的最佳水平值范围,并采用响应面法优化榛子蛋白提取过程中的酶解工艺条件,同时加入碱液复溶、碱性蛋白酶酶解、酸沉纯化榛子蛋白,并对纯化工艺条件进行优化,为榛子蛋白的提取及纯化提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

榛子粕,实验室自制,由榛子仁超临界 CO<sub>2</sub> 流

收稿日期:2020-07-11;修回日期:2020-12-29

作者简介:刘 辉(1995),男,硕士研究生,研究方向为油脂及植物蛋白(E-mail)liuhui989805@163.com。

通信作者:高 盼,讲师,博士(E-mail)gaopan925@163.com。

体提油后得到;碱性内切蛋白酶(200 000 U/g),南宁庞博生物工程有限公司;氢氧化钠、盐酸、乙醚、硫酸铜、硫酸钾、硫酸等,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

### 1.1.2 仪器与设备

K9840 自动凯氏定氮仪,徐州准博仪器设备有限公司;KQ-AS5000DE 型数控超声波清洗器,北京海天友诚科技有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器,上海竟明仪器有限公司;中型冷冻干燥机,北京博医康实验仪器有限公司;101-1-S 数显鼓风干燥箱,上海昕怡仪器仪表有限公司;TD5A-WS 台式离心机,张家港鑫中大离心机有限公司;FE20 pH 计,上海名君国际贸易有限公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 榛子粕主要成分的测定

粗脂肪的测定,GB/T 14772—2008《食品中粗脂肪的测定》;粗蛋白质的测定,GB/T 14489.2—2008《粮油检验 植物油料粗蛋白质的测定》;灰分的测定,GB 5009.4—2010《食品安全国家标准 食品中灰分的测定》;水分的测定,GB 5009.3—2010《食品安全国家标准 食品中水分的测定》。

### 1.2.2 榛子蛋白的提取

将榛子粕粉碎,称取 50 g 榛子粕粉,按液料比 6:1 与水混匀得到一次浆液,调节 pH 至 8~8.5,在 400 W 功率下超声辅助萃取 2 h,离心,取下层沉淀与按液料比 6:1 水混匀得到二次浆液,调节 pH 至 8.5~9,在 400 W 功率下超声辅助萃取 2 h,离心,合并两次上清液,得到榛子蛋白萃取液;调节萃取液 pH,加入 0.2% 的碱性蛋白酶进行超声辅助酶解一定时间;在 90 °C 下灭酶 10 min,冷却至室温,调节溶液 pH 至 4.5 进行酸沉,离心(4 000 r/min、5 min),得到榛子粗蛋白。按式(1)计算榛子蛋白提取率(Y)。

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

式中: $m_1$  为产品中蛋白质质量; $m_2$  为原料中蛋白质质量。

### 1.2.3 榛子蛋白的纯化

向榛子粗蛋白中加入一定量的水,用 NaOH 溶液调节 pH,并在一定温度下完全溶解,得到蛋白复溶液;维持温度不变,按研究确定的碱性蛋白酶酶解条件加入 0.2% 碱性蛋白酶进行酶解;调节 pH 至 4.4~4.6 进行酸沉,沉淀进行微波灭酶处理后,水洗至中性,经冷冻干燥后得到榛子蛋白。

## 2 结果与分析

### 2.1 榛子粕的主要成分

经测定,本试验所用榛子粕的主要成分含量为:粗蛋白质 44.6%,粗脂肪 8.9%,水分 6.8%,灰分 7.5%。

### 2.2 榛子蛋白提取的单因素试验

#### 2.2.1 酶解温度对榛子蛋白提取率的影响

在榛子蛋白萃取液 pH 为 8.5,碱性蛋白酶添加量 0.2%,酶解温度分别为 40、45、50、55 °C,酶解时间 3 h 条件下,按 1.2.2 方法提取榛子蛋白,考察酶解温度对榛子蛋白提取率的影响,结果见图 1。

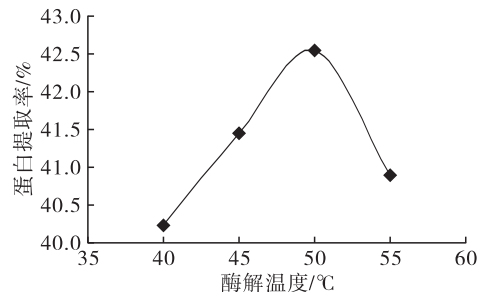


图 1 酶解温度对榛子蛋白提取率的影响

由图 1 可知,随酶解温度的升高,榛子蛋白提取率增加,在酶解温度为 50 °C 时,榛子蛋白提取率最大,超过 50 °C 时,榛子蛋白提取率降低。其原因是所用碱性蛋白酶的最适温度为 50 °C,当温度升高时,酶的活性增加,对底物的作用显著;当酶解温度高于 50 °C 时,酶的活性中心结构被破坏,导致酶部分或完全失去催化活性<sup>[8]</sup>。因此,最适的酶解温度为 50 °C。

#### 2.2.2 pH 对榛子蛋白提取率的影响

在碱性蛋白酶添加量 0.2%,榛子蛋白萃取液 pH 分别为 7.0、7.5、8.0、8.5,酶解温度 45 °C,酶解时间 3 h 条件下,按 1.2.2 方法提取榛子蛋白,考察 pH 对榛子蛋白提取率的影响,结果见图 2。

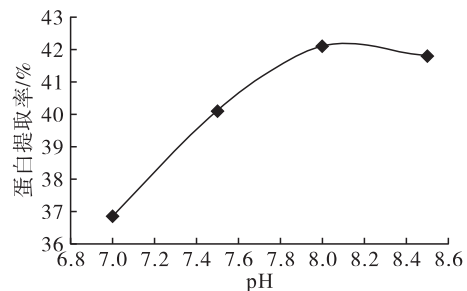


图 2 pH 对榛子蛋白提取率的影响

由图 2 可知,随着 pH 的增加,榛子蛋白提取率逐渐增加,在 pH 为 8 时榛子蛋白提取率最高,pH 超过 8 时,榛子蛋白提取率降低。其原因是碱性蛋白酶的最适 pH 在 8 左右,当 pH 在 8 附近时,酶的

活力最高,对底物的作用效果最好,使得蛋白提取率高<sup>[9]</sup>。因此,酶解的最适 pH 为 8。

### 2.2.3 酶解时间对榛子蛋白提取率的影响

在榛子蛋白萃取液 pH 8.5,碱性蛋白酶添加量 0.2%,酶解温度 50℃,酶解时间分别为 2、3、4、5 h 条件下,按 1.2.2 方法提取榛子蛋白,考察酶解时间对榛子蛋白提取率的影响,结果见图 3。

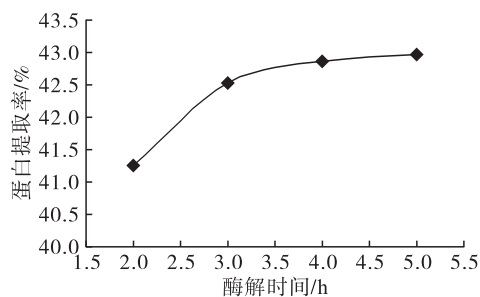


图3 酶解时间对榛子蛋白提取率的影响

由图3可知,当酶解时间低于3 h时,榛子蛋白提取率随着酶解时间的延长呈快速上升趋势,酶解时间超过3 h时,随酶解时间延长,榛子蛋白提取率增加缓慢。这表明随着酶解时间的延长,底物不断减少,酶解充分<sup>[10]</sup>。因此,最佳的酶解时间为3 h。

## 2.3 榛子蛋白提取的响应面优化试验

### 2.3.1 响应面试验设计及结果

在单因素试验的基础上,采用 Box - Behnken 试验设计方案,选取酶解温度、pH、酶解时间为自变量,以榛子蛋白提取率作为响应值,优化榛子蛋白提取工艺。响应面试验因素与水平见表1,响应面试验设计及结果见表2。

表1 响应面试验因素与水平

水平	A 酶解温度/℃	B pH	C 酶解时间/h
-1.682	36.59	7.159	1.318
-1	40	7.5	2
0	45	8.0	3
1	50	8.5	4
1.682	53.41	8.841	4.682

表2 响应面试验设计及结果

试验号	A	B	C	蛋白提取率/%
1	-1	-1	-1	38.02
2	1	-1	-1	42.57
3	-1	1	-1	44.83
4	1	1	-1	44.48
5	-1	-1	1	42.35
6	1	-1	1	46.50
7	-1	1	1	46.96
8	1	1	1	48.47
9	-1.682	0	0	38.68

续表2

试验号	A	B	C	蛋白提取率/%
10	1.682	0	0	46.67
11	0	-1.682	0	42.73
12	0	1.682	0	44.54
13	0	0	-1.682	46.24
14	0	0	1.682	51.83
15	0	0	0	51.78
16	0	0	0	51.24
17	0	0	0	51.56
18	0	0	0	52.55
19	0	0	0	52.37

### 2.3.2 多元二次响应面回归模型的建立与方差分析

通过统计分析软件 DE 8.06 进行数据分析,3 个因素经过拟合建立二次响应面回归模型为:  $Y = 52.32 + 1.71A + 1.34B + 1.74C - 0.94AB + 0.18AC - 0.27BC - 3.49A^2 - 3.15B^2 - 1.24C^2$ 。

回归方程方差分析见表3。

表3 回归方程方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	379.20	9	42.13	20.14	<0.0001***
A	39.74	1	39.74	19.00	0.0018**
B	24.64	1	24.64	11.78	0.0075**
C	41.41	1	41.41	19.80	0.0016**
AB	7.11	1	7.11	3.40	0.0984
AC	0.27	1	0.27	0.13	0.7294
BC	0.57	1	0.57	0.27	0.6135
A <sup>2</sup>	166.23	1	166.23	79.47	<0.0001***
B <sup>2</sup>	135.47	1	135.47	64.77	<0.0001***
C <sup>2</sup>	21.02	1	21.02	10.05	0.0114*
残差	18.82	9	2.09		
失拟	11.82	5	2.36	1.35	0.1393
纯误差	7.01	4	1.75		
总误差	398.03	18			

注: \* 代表有显著性影响( $P < 0.05$ ), \*\* 代表有非常显著性影响( $P < 0.01$ ), \*\*\* 代表有极显著性影响( $P < 0.001$ )。

由表3可知,该模型回归极显著( $P < 0.0001$ ),失拟项不显著,并且该模型  $R^2$  为 94.45%,  $R^2_{Adj}$  为 90.54%,说明该模型与试验拟合良好,试验误差小,可以用此模型来分析和预测碱性蛋白酶酶解辅助碱溶酸沉法提取榛子蛋白的结果。因此,可认为此回归方程模型是合适的,由  $F$  检验可以得到各因素影响大小依次为  $C > A > B$ ,即酶解时间 > 酶解温度 > pH。

通过对拟合回归方程模型进行分析,得到榛子

蛋白提取过程的最优酶解工艺条件为:酶解温度 46.21 °C, pH 8.07, 酶解时间 3.7 h。在最优工艺条件下, 榛子蛋白提取率为 53.23%。

### 2.3.3 验证试验

为便于试验操作, 将最优工艺条件修正为:酶解温度 46 °C, pH 8, 酶解时间 3.7 h。在修正的工艺条件下进行 3 次平行试验, 榛子蛋白提取率平均值为 53.16%, 与回归方程预测的 53.23% 吻合良好, 证明通过响应面法优化的榛子蛋白提取工艺具有可行性。

## 2.4 榛子蛋白纯化的单因素试验

### 2.4.1 反应温度对蛋白纯度影响

在液料比 5:1, 复溶 pH 10, 反应温度分别为 40、45、50、55 °C 条件下, 按 1.2.3 方法进行榛子蛋白的纯化, 考察反应温度对榛子蛋白纯度的影响, 结果如图 6 所示。

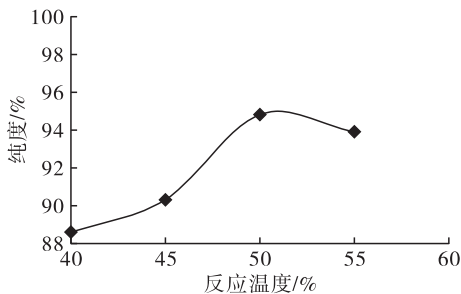


图 6 反应温度对榛子蛋白纯度的影响

由图 6 可知, 随反应温度升高, 榛子蛋白纯度增大, 在反应温度为 50 °C 时榛子蛋白纯度达到最大, 随着反应温度的继续升高, 榛子蛋白纯度下降, 这是因为温度大于 50 °C 后酶的活性降低。因此, 选择反应温度为 50 °C。

### 2.4.2 液料比对蛋白纯度的影响

在反应温度 50 °C, 复溶 pH 10, 液料比分别为 3:1、4:1、5:1、6:1 的条件下, 按 1.2.3 方法进行榛子蛋白的纯化, 考察液料比对榛子蛋白纯度的影响, 结果如图 7 所示。

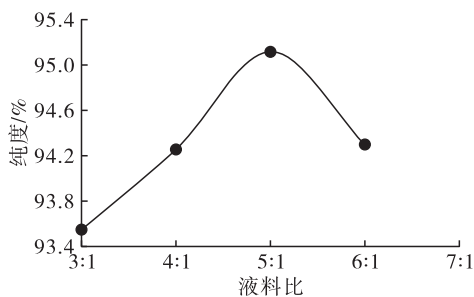


图 7 液料比对榛子蛋白纯度的影响

由图 7 可知, 随着液料比的增加, 榛子蛋白纯度先升高后缓慢下降, 在液料比 5:1 时达到峰值。这

是因为加水量太少, 料液非常黏稠, 导致酶与底物反应不完全; 加水量过大, 在反应体系中酶与底物浓度都会降低, 酶分子与底物分子碰撞的概率降低, 导致酶作用效果下降<sup>[11]</sup>。因此, 选择液料比为 5:1。

### 2.4.3 复溶 pH 对蛋白纯度影响

在反应温度 50 °C, 液料比 5:1, 复溶 pH 分别为 8、9、10、11 的条件下, 按 1.2.3 方法进行榛子蛋白的纯化, 考察复溶 pH 对榛子蛋白纯度的影响, 结果如图 8 所示。

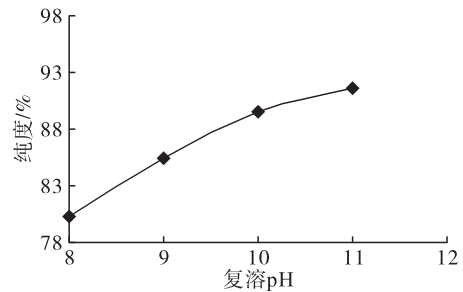


图 8 复溶 pH 对榛子蛋白纯度的影响

由图 8 可知, 随着复溶 pH 的升高, 榛子蛋白纯度增大, 在 pH 达到 10 后榛子蛋白纯度增大趋势变缓。因此, 选择复溶 pH 为 10。

## 2.5 榛子蛋白纯化的正交优化试验

在榛子蛋白纯化单因素试验的基础上, 以复溶 pH、反应温度和液料比为因素, 榛子蛋白纯度为考察指标, 进行  $L_9(3^4)$  正交试验。正交试验因素与水平见表 4, 正交试验设计及结果见表 5。

表 4 正交试验因素与水平

水平	A 反应温度/°C	B 液料比	C 复溶 pH
1	40	4:1	9
2	45	5:1	10
3	50	6:1	11

表 5 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	空列	蛋白纯度/%
1	1	1	1	1	70.12
2	1	2	2	2	88.62
3	1	3	3	3	85.57
4	2	1	2	3	90.27
5	2	2	3	1	93.41
6	2	3	1	2	87.62
7	3	1	3	2	94.51
8	3	2	1	3	93.54
9	3	3	2	1	89.57
$k_1$	81.44	84.97	83.76	84.37	
$k_2$	90.43	91.86	89.49	90.25	
$k_3$	92.54	87.59	91.16	89.79	
R	11.10	6.89	7.40	5.88	

(下转第 81 页)

- interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and three common polyphenols using multi-spectroscopy and modeling methods[J]. Food Chem, 2017, 228: 143-151.
- [37] WU X L, LU Y Q, XU H X, et al. Reducing the allergenic capacity of  $\beta$ -lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols[J]. Food Chem, 2018, 256: 427-434.
- [38] ROHN S. Possibilities and limitations in the analysis of covalent interactions between phenolic compounds and proteins[J]. Food Res Int, 2014, 65: 13-19.
- [39] ZHANG Y, HE S D, SIMPSON B K. Enzymes in food bioprocessing: novel food enzymes, applications, and related techniques[J]. Curr Opin Food Sci, 2018, 19: 30-35.
- [40] DBROWSKA A, BAJZERT J, BABIJK, et al. Reduced IgE and IgG antigenic response to milk proteins hydrolysates obtained with the use of non-commercial serine protease from *Yarrowia lipolytica* [J/OL]. Food Chem, 2019, 302: 125350 [2020-07-11]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125350>.
- [41] FENG N, ZHANG H Y, LI Y, et al. A novel catalytic material for hydrolyzing cow's milk allergenic proteins: papain-Cu<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O-magnetic nanoflowers[J/OL]. Food Chem, 2019, 311: 125911 [2020-07-11]. <https://doi.org/j.foodchem.2019.125911>.
- [42] EKEZIE F G, CHENG J H, SUN D W. Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: a review of recent research advances[J]. Trends Food Sci Tech, 2018, 74: 12-25.
- [43] PANCHAL B, CHANG T, QIN S T, et al. Optimization and kinetics of tung nut oil transesterification with methanol using novel solid acidic ionic liquid polymer as catalyst for methyl ester synthesis[J]. Renew Energ, 2020, 151: 796-804.
- [44] ZHANG Q, CHEN Q H, HE G Q. Effect of ultrasonic-ionic liquid pretreatment on the hydrolysis degree and antigenicity of enzymatic hydrolysates from whey protein [J/OL]. Ultrason Sonochem, 2020, 63: 104926 [2020-07-11]. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104926>.
- [45] ZHONG J, LUO S, LIU C, et al. Steady-state kinetics of tryptic hydrolysis of  $\beta$ -lactoglobulin after dynamic high-pressure microfluidization treatment in relation to antigenicity[J]. Eur Food Res Technol, 2014, 239(3): 525-531.
- [46] 俞宏达. DHPM处理对 $\beta$ -乳球蛋白与油酸复合物的形成机制、致敏性和功能性质的影响[D]. 南昌:南昌大学, 2016.
- [47] ZHONG J Z, FU S L, YU H D, et al. Antigenicity of  $\beta$ -lactoglobulin reduced by combining with oleic acid during dynamic high-pressure microfluidization: multi-spectroscopy and molecule dynamics simulation analysis[J]. J Dairy Sci, 2019, 102(1): 145-154.
- [48] XU L, GONG Y S, GERN J E, et al. Influence of whey protein hydrolysis in combination with dextran glycation on immunoglobulin E binding capacity with blood sera obtained from patients with a cow milk protein allergy[J]. J Dairy Sci, 2020, 103(2): 1141-1150.

(上接第74页)

由表5可知,各因素对榛子蛋白纯度影响的主要顺序为A>C>B,即反应温度>复溶pH>液料比,最优组合为A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>,即反应温度50℃,液料比5:1,复溶pH11。在最佳条件下,进行3次平行试验,榛子蛋白纯度平均值为95.23%。

### 3 结论

采用碱性蛋白酶酶解辅助碱溶酸沉法提取榛子蛋白,采用单因素试验和响应面法对提取过程中的酶解工艺条件进行优化,得到最优酶解工艺条件为:酶解温度46℃,pH8,酶解时间3.7h。在最优酶解工艺条件下,榛子蛋白提取率达到53.16%。对得到的粗蛋白碱液复溶后再次碱性蛋白酶酶解、酸沉纯化榛子蛋白,经单因素试验和正交试验优化得到的最佳纯化工艺条件为反应温度50℃、液料比5:1、复溶pH11。在最佳纯化工艺条件下,榛子蛋白纯度为95.23%。

### 参考文献:

- [1] 李杨,江连洲,王胜男,等.水酶法提取榛子蛋白工艺优

化[J].食品科学,2012,33(2):143-148.

- [2] 时德通,吕佼,王旭旭,等.榛子蛋白提取工艺及性能研究进展[J].食品工业,2018,39(10):279-282.
- [3] 关紫峰,姜波,王英坡.榛子脂肪酸组成的比较研究[J].辽宁师范大学学报(自然科学版),2003,26(3):284-285.
- [4] 吕春茂,魏雅静,孟宪军,等.平欧榛子蛋白分离及功能特性分析[J].食品与发酵工业,2013,39(12):85-89.
- [5] 马勇,周佩.榛子粉的主要成分和功能特性研究[J].食品与发酵工业,2008,34(11):72-75.
- [6] 全梦卓,赵文恩.榛子的综合利用[J].广州化工,2013,41(21):28-30.
- [8] 李桂英,袁永俊.水酶法提取菜籽油的研究[J].中国油脂,2005,30(10):33-35.
- [9] 杨波,杨光,张静.水酶法提取花生蛋白工艺的研究[J].食品科学,2006,27(11):253-256.
- [10] 宋玉卿,于殿宇,王谨,等.水酶法提取榛子油工艺条件研究[J].食品科学,2008,29(8):261-264.
- [11] ZHANG S B, WANG Z, XU S Y. Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates[J]. J Am Oil Chem Soc, 2007, 84(1): 97-105.