

澳洲坚果分离蛋白的酶法纯化工艺优化 及功能特性分析

缪福俊¹, 李文珩¹, 刘润民¹, 王高升¹, 郭刚军², 宁德鲁¹

(1. 云南省林业和草原科学院, 昆明 650201; 2. 云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100)

摘要:为获得高纯度的澳洲坚果蛋白粉, 以低纯度澳洲坚果蛋白粉为原料, 采用单因素试验和正交试验确定糖化酶纯化澳洲坚果蛋白粉的最佳工艺条件, 在最佳工艺条件下进行中试生产实践(澳洲坚果仁—压榨制油—粉碎—脱脂饼粉—加水磨浆—碱溶酸沉—酶解纯化—喷雾干燥—纯化蛋白粉), 对纯化后蛋白粉的溶解度、乳化性、持水性和吸油性进行测定, 并比较了纯化前后蛋白粉的氨基酸组成及含量。结果表明:澳洲坚果蛋白粉最佳纯化工艺条件为加酶量 100 U/g、酶解温度 55℃、酶解时间 90 min、料液比 1:8, 在此条件下进行中试生产实践, 制备的蛋白粉蛋白质含量为 76.87%, 蛋白得率为 32.56%, 蛋白质提取率为 94.81%; 纯化蛋白粉在 pH 5.0 时溶解度最小、乳化性最低, 持水性和吸油性在 60℃ 时达到最大; 纯化后蛋白粉的氨基酸组成丰富, 富含 7 种必需氨基酸, 氨基酸总量为 65.17 g/100 g, 高于纯化前的。综上, 澳洲坚果纯化蛋白粉具有良好的品质和功能特性。

关键词:澳洲坚果; 蛋白粉; 糖化酶; 生产实践; 功能特性

中图分类号: TS229; TS255.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2024)08-0064-05

Optimization of purification process of macadamia nut protein isolate with enzyme method and analysis of its functional properties

MIAO Fujun¹, LI Wengan¹, LIU Runmin¹, WANG Gaosheng¹,
GUO Gangjun², NING Delu¹

(1. Yunnan Academy of Forestry and Grassland, Kunming 650201, China; 2. Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong 666100, Yunnan, China)

Abstract: In order to obtain macadamia nut protein powder with high purity, single factor and orthogonal experiments were used to determine the optimal conditions for purification of macadamia nut protein powder by glucoamylase with low purity macadamia nut protein powder as material. Pilot production (macadamia nut kernel—pressing—crushing—defatted macadamia nut cake powder—adding water and grinding—alkaline solution and acid precipitation—enzymatic hydrolysis purification—spray drying—purified protein powder) was practiced under the optimal process conditions. The solubility, emulsification, water-holding and oil-absorption capacities of the purified protein powder were determined, and the amino acid composition and content of the protein powder before and after purification were compared. The results showed that the optimal purification conditions for macadamia nut protein were as follows: enzyme dosage 100 U/g, enzyme hydrolysis temperature 55℃, enzyme

hydrolysis time 90 min, and material-liquid ratio 1:8. Under the optimal conditions, the pilot production showed that the protein content of the purified protein powder was 76.87%, the protein yield was 32.56%, and the protein extraction rate was 94.81%. The solubility of the purified protein powder was the smallest at pH 5.0, and

收稿日期: 2023-07-11; 修回日期: 2024-04-22

基金项目: 云南省重大科技专项计划(202202AE090006);

2023年云南省林草科技创新项目(2023KJCX002)

作者简介: 缪福俊(1986), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为木本油料资源化利用(E-mail) miaofujun@yeah.net。

通信作者: 宁德鲁, 研究员(E-mail) ningdelu@163.com; 郭刚军, 研究员(E-mail) guogangjun2001@126.com。

the emulsification was the lowest, the water - holding and oil - absorption capacities reached the maximum value at 60 °C. The amino acid composition of the purified protein powder was rich in 7 essential amino acids, and the total amino acid amount was 65.17 g/100 g, which was higher than that of the pre - purification. In conclusion, the purified protein powder of macadamia nut has good quality and functional properties.

Key words: macadamia nut; protein powder; glucoamylase; production practice; functional property

澳洲坚果是我国重要的木本油料之一,因富含油脂和蛋白质,具有较高的营养和商业价值^[1-2]。澳洲坚果饼粕中蛋白质含量高达 25%,是蛋白质的优质来源^[3-4]。澳洲坚果蛋白主要由谷蛋白(63.18%)、球蛋白(14.58%)、醇溶蛋白(14.95%)、清蛋白(7.29%)组成,经碱溶酸沉方法制备的澳洲坚果蛋白粉中蛋白质含量为 65.46%,纯度较低,不适合应用于高品质蛋白粉的精深加工,因此须对其进行纯化处理^[5]。

蛋白纯化方法主要有沉淀法、层析法、过滤法、酶解法等,其中酶解法主要是将蛋白粉中可溶性糖等非蛋白质组分溶出,在蛋白纯化方面有着广泛的应用^[6-7]。目前,糖化酶已在核桃蛋白^[8-9]、米糠蛋白^[10]、棉籽蛋白^[11]、美藤果蛋白^[12]等蛋白的纯化中应用,并取得了较好的纯化效果。例如:高盼等^[8]采用糖化酶纯化核桃分离蛋白,蛋白纯度高达 94.37%,并证明了糖化酶纯化法得到的核桃分离蛋白品质较好;代暘鑫等^[9]采用糖化酶对核桃分离蛋白进行了纯化,最佳纯化条件为加酶量 0.4%、料液比 1:40、pH 4.5、酶解温度 53 °C、酶解时间 129 min,在此条件下蛋白质含量提高至 94.48%;彭吟雪等^[12]采用糖化酶纯化美藤果蛋白,产品纯度高达 90%。

本研究采用糖化酶对澳洲坚果分离蛋白进行纯化,通过单因素试验和正交试验确定最佳纯化工艺条件,并结合云南省木本油料工程研究中心建立的木本油料蛋白粉制备中试生产线,对澳洲坚果分离蛋白的最佳酶法纯化工艺进行中试生产实践,以期

为澳洲坚果蛋白的精深加工提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

澳洲坚果蛋白粉〔由澳洲坚果仁经液压压榨制油后获得的脱脂饼(蛋白质含量 26.40%)经碱溶(pH 10.0)、酸沉(pH 5.0)、喷雾干燥后^[5]获得(蛋白质含量为 64.37%)〕,云南省木本油料工程技术研究中心;糖化酶(酶活力 20 万 U/g),庞博生物公司。

UDK-159 全自动凯氏定氮仪,意大利 VELP 公司;6YY-280 全自动液压榨油机,山东沂水阳东机械有限公司;40 kg/d 蛋白粉生产线,云南省木本油料工程技术研究中心;A300 氨基酸自动分析仪,德国曼默博尔公司;LGJ-100F 真空冷冻干燥机,北京松源华兴科技发展有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 澳洲坚果蛋白粉的纯化流程

取 10 g 澳洲坚果蛋白粉,按照一定料液比向其中加入一定质量的水,混合均匀,调节混合液 pH 至 5.0,添加一定量的糖化酶,在一定温度下酶解一定时间,酶解完成后高温灭酶(90 °C, 15 min),5 000 r/min 下离心 20 min,收集提取液,调节 pH 为 7.0,真空冷冻干燥后获得纯化蛋白粉。

1.2.2 澳洲坚果蛋白粉中试生产实践工艺流程

澳洲坚果蛋白粉制备中试生产线主要由胶体磨、碱溶罐、酸沉罐、酶解罐、卧式离心机、浓缩机、高压均质机、喷雾系统、包装机等组成,产量为 40 kg/d。工艺流程如图 1 所示。

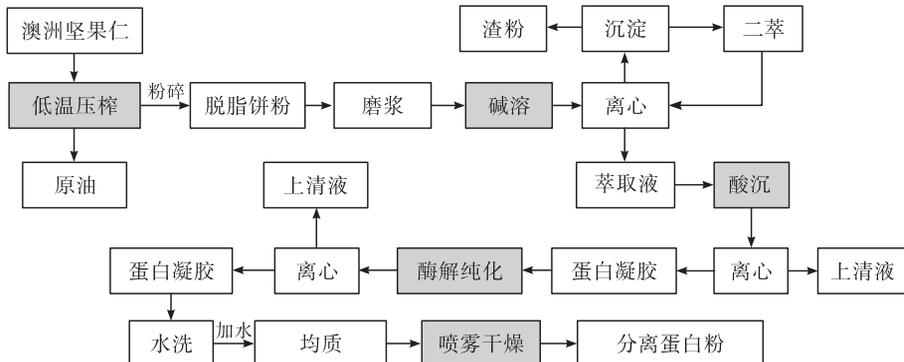


图 1 澳洲坚果蛋白粉中试生产实践工艺流程

1.2.3 蛋白纯度测定

参考 GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》，采用全自动凯氏定氮仪测定蛋白质含量，产品中蛋白质含量即为其纯度。中试生产线中，蛋白质提取率(X_1)按照式(1)计算，蛋白得率(X_2)按照式(2)计算。

$$X_1 = m_1 C_1 / (m_2 C_2) \times 100\% \quad (1)$$

$$X_2 = m_1 / m_2 \times 100\% \quad (2)$$

式中： m_1 为纯化蛋白粉质量，g； C_1 为纯化蛋白粉中蛋白质含量； m_2 为澳洲坚果脱脂饼粉质量，g； C_2 为澳洲坚果脱脂饼中蛋白质含量。

1.2.4 功能特性的测定

参考程赞等^[13]的方法对澳洲坚果纯化蛋白粉在不同 pH 条件下的溶解性和乳化性以及不同温度

条件下的持水性和吸油性进行测定。

1.2.5 氨基酸组成及含量的测定

依据 GB 5009.124—2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》采用氨基酸自动分析仪测定纯化前后澳洲坚果蛋白粉的氨基酸组成及含量。

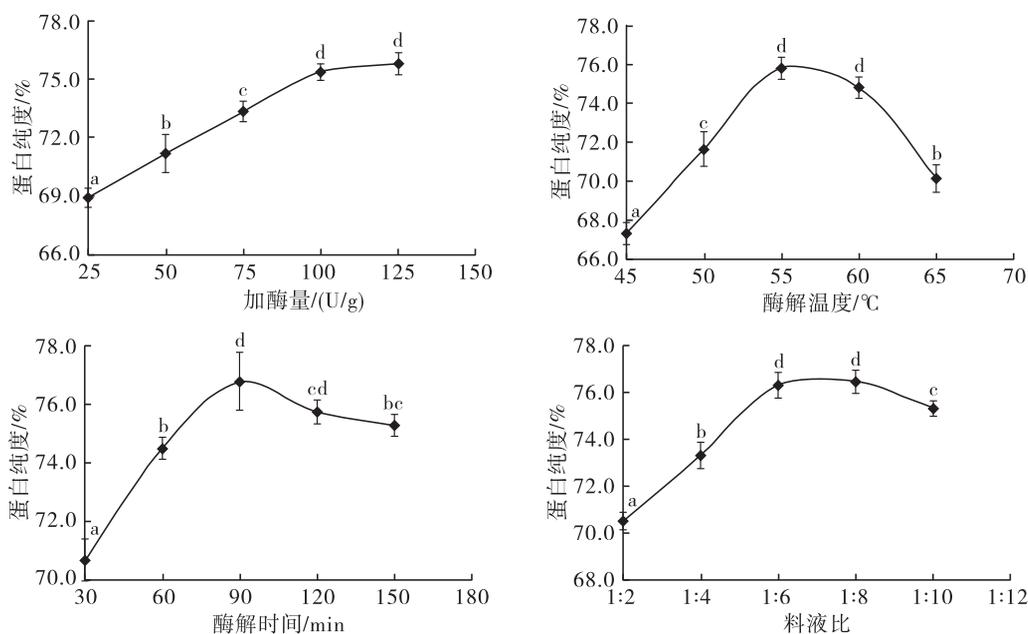
1.2.6 数据处理

分别采用 Excel 和 SPSS 软件进行数据处理和绘图。

2 结果与分析

2.1 澳洲坚果蛋白粉纯化工序单因素试验

按 1.2.1 方法，采用单因素试验考察加酶量、酶解温度、酶解时间、料液比 4 个因素对澳洲坚果蛋白纯度的影响，结果如图 2 所示。



注：基础试验条件为料液比 1:6、酶解时间 60 min、酶解温度 55℃、加酶量 100 U/g；不同小写字母表示具有显著性差异($p < 0.05$)

图 2 加酶量、酶解温度、酶解时间和料液比对澳洲坚果蛋白纯度的影响

由图 2 可知：随着加酶量的增加，澳洲坚果蛋白纯度不断提高，当加酶量超过 100 U/g 时，蛋白纯度增幅趋于平缓，考虑到生产成本，选取最适加酶量为 100 U/g；当酶解温度为 45~65℃ 时，澳洲坚果蛋白纯度呈现典型的峰形，在 55℃ 时达到最大值，因此选取最适酶解温度为 55℃；随着酶解时间的延长，澳洲坚果蛋白纯度先上升后下降，在酶解 90 min 时达到最大值，因此选取最适酶解时间为 90 min；随着料液比的减小，澳洲坚果蛋白纯度逐渐增加，当料液比达到 1:6 后，蛋白纯度增幅趋于平缓，当料液比超过 1:8 后，蛋白纯度下降，因此选取最适料液比为 1:6。

2.2 澳洲坚果蛋白粉纯化工序正交试验

在单因素试验的基础上，选取加酶量(A)、酶解温度(B)、酶解时间(C)、料液比(D)为考察因素，以蛋白纯度为考察指标，设计 $L_9(3^4)$ 四因素三水平正交试验，以优化澳洲坚果蛋白粉纯化工序。正交试验因素与水平见表 1，正交试验设计及结果见表 2。

表 1 正交试验因素与水平

水平	A 加酶量/(U/g)	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/min	D 料液比
1	50	50	60	1:4
2	75	55	90	1:6
3	100	60	120	1:8

表2 正交试验设计及结果

试验号	A	B	C	D	蛋白纯度/%
1	1	1	1	1	70.26
2	1	2	2	2	73.86
3	1	3	3	3	73.93
4	2	1	2	3	72.14
5	2	2	3	1	73.56
6	2	3	1	2	72.58
7	3	1	3	2	72.65
8	3	2	1	3	75.34
9	3	3	2	1	74.68
k_1	72.68	71.68	72.73	72.83	
k_2	72.76	74.25	73.56	73.03	
k_3	74.22	73.73	73.38	73.80	
R	1.54	2.57	0.83	0.97	

由表2可知,4个因素对澳洲坚果蛋白纯度影响的主次顺序为B>A>D>C,即酶解温度>加酶量>料液比>酶解时间。澳洲坚果蛋白粉纯化最佳工艺条件为A₃B₂C₂D₃,即加酶量100 U/g、酶解温度55℃、酶解时间90 min、料液比1:8。

2.3 澳洲坚果蛋白粉纯化中试生产实践

采用正交试验最佳工艺条件进行澳洲坚果蛋白粉纯化中试生产实践,具体操作如下。

(1)脱脂饼粉制备:将澳洲坚果仁通过全自动液压榨油机进行压榨制油(室温,48 MPa,4 h),饼经万能粉碎机粉碎后过250 μm(60目)筛,获得脱脂饼粉。

(2)加水磨浆:将30 kg脱脂饼粉加入到物料

罐,加入30 L软水进行搅拌,输送至胶体磨进行磨浆2~3次。

(3)碱溶酸沉:将浆料输送至碱溶罐中,加入270 L软水,60 r/min搅拌并加热至45℃,调pH至10.0,碱溶60 min,泵入卧螺离心机分离,固相可进行二次碱溶萃取,萃取液泵入酸沉罐(加热至45℃),调pH至5.0,酸沉30 min,泵入卧螺离心机分离,固相蛋白凝胶输送至酶解罐。

(4)酶解纯化:由于糖化酶最适pH与酸沉pH相近,故酸沉获得蛋白凝胶后直接进行酶解纯化工序。按料液比1:8加入软水,60 r/min搅拌并加热至55℃,调节pH至5.0,加入15 g糖化酶(100 U/g),酶解90 min后,泵入卧螺离心机分离,固相蛋白凝胶输送至水洗罐,水洗3~4次。

(5)喷雾干燥:按固形物25%加入软水,泵入高压均质机均质3次,再泵入喷雾干燥塔进行干燥(进风温度170~190℃,出风温度70~85℃),获得澳洲坚果分离蛋白粉。

中试生产实践结果表明,澳洲坚果分离蛋白得率为32.56%,蛋白质提取率为94.81%,蛋白纯度为76.87%。

2.4 澳洲坚果蛋白粉的功能特性

澳洲坚果纯化蛋白粉的溶解度、乳化性、持水性和吸油性如图3所示。

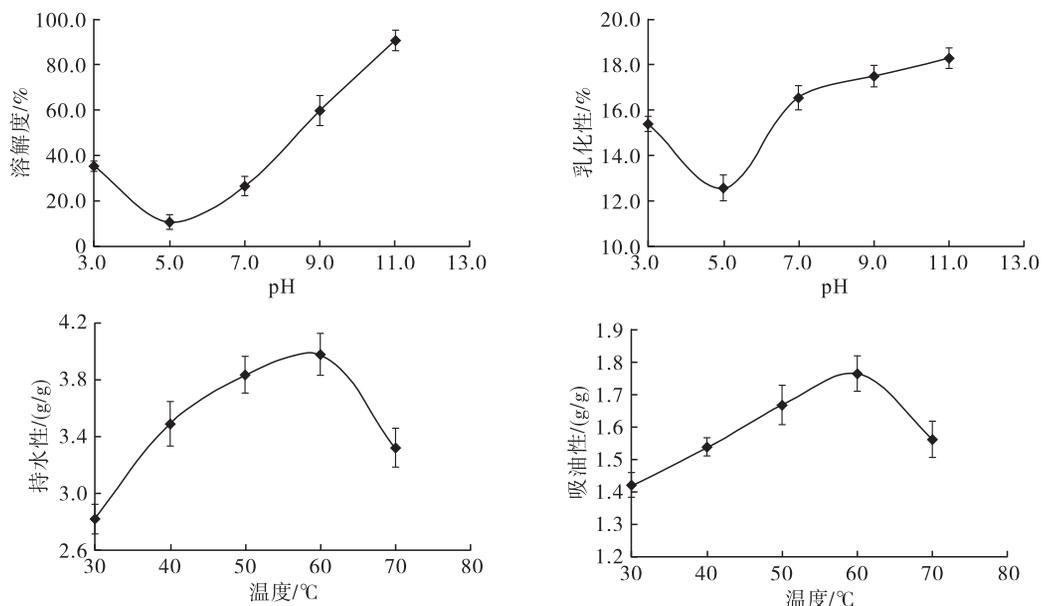


图3 澳洲坚果蛋白粉的溶解度、乳化性、持水性、吸油性

由图3可知:澳洲坚果蛋白粉的溶解度随pH的升高先下降后升高,在等电点pH 5.0^[5]时溶解度最小;在等电点pH 5.0时,澳洲坚果蛋白粉乳化性最低,在碱性条件下其乳化性增加,与溶解度变化规

律相似,均呈V型曲线,说明蛋白粉的溶解性越好,其乳化性也越好,但蛋白粉的乳化性主要与蛋白质的亲水亲油平衡性密切相关^[14];澳洲坚果蛋白粉持水性随着温度的升高先增高,在60℃时持水性达到

最大值,超过 60℃ 时持水性降低,这是因为温度过高促使蛋白质变性,导致吸水能力变弱;随着温度的升高,澳洲坚果蛋白粉的吸油性先升高后降低,在 60℃ 时达到最大值。

2.5 澳洲坚果蛋白粉氨基酸组成

纯化前后澳洲坚果蛋白粉的氨基酸组成与含量见表 3。

表 3 纯化前后澳洲坚果蛋白粉的

氨基酸组成及含量 g/100 g

氨基酸	纯化前	纯化后
谷氨酸 Glu	11.60	13.84
精氨酸 Arg	7.83	8.04
天冬氨酸 Asp	5.50	5.92
亮氨酸 Leu*	4.54	5.24
甘氨酸 Gly	3.25	3.76
酪氨酸 Tyr	3.32	3.66
缬氨酸 Val*	2.89	3.34
丙氨酸 Ala	2.66	3.16
丝氨酸 Ser	2.59	2.86
苯丙氨酸 Phe*	2.25	2.74
异亮氨酸 Ile*	2.29	2.68
苏氨酸 Thr*	2.15	2.48
赖氨酸 Lys*	2.30	2.30
脯氨酸 Pro	1.99	2.14
组氨酸 His	1.37	1.52
蛋氨酸 Met*	1.05	1.49
合计	57.58	65.17

注: * 表示必需氨基酸

由表 3 可知,纯化后澳洲坚果蛋白粉氨基酸总量为 65.17 g/100 g,含有 7 种人体必需氨基酸(色氨酸未测),必需氨基酸含量为 20.27 g/100 g,总体均高于未纯化的。澳洲坚果纯化蛋白粉必需氨基酸中第一限制氨基酸为蛋氨酸,第二限制氨基酸为赖氨酸。澳洲坚果纯化蛋白粉中含量高于 5 g/100 g 的氨基酸有 4 种,即 Glu、Arg、Asp 和 Leu, Glu 含量高达 13.84 g/100 g。Glu、Arg、Asp 等具有较强的抗氧化活性^[15]。

3 结论

本研究采用单因素试验和正交试验优化得到糖化酶纯化澳洲坚果蛋白粉的最佳工艺条件为加酶量 100 U/g、酶解温度 55℃、酶解时间 90 min、料液比 1:8,在此条件下进行中试生产实践,形成了澳洲坚果分离纯化蛋白粉特殊生产工艺,制备的纯化蛋白粉蛋白质含量为 76.87%,蛋白得率为 32.56%,蛋

白质提取率为 94.81%,且氨基酸组成丰富,具有良好的品质和功能特性。

参考文献:

- [1] 贺熙勇,陶亮,柳颀,等. 我国澳洲坚果产业概况及发展趋势[J]. 热带农业科技, 2015, 38(3): 12-16,19.
- [2] 谭秋锦,陈海生,韦媛荣,等. 澳洲坚果种质果仁主要营养成分分析与评价[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(2): 150-154.
- [3] TIWARI U P, JHA R. Nutrients, amino acid, fatty acid and non-starch polysaccharide profile and *in vitro* digestibility of macadamia nut cake in swine[J]. Anim Sci J, 2017, 88(8): 1093-1099.
- [4] 郭刚军,邹建云,徐荣,等. 澳洲坚果粕营养成分测定与氨基酸组成评价[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9): 421-423.
- [5] 郭刚军,胡小静,马尚玄,等. 液压压榨澳洲坚果粕蛋白质提取工艺优化及其组成分析与功能性质[J]. 食品科学, 2017, 38(18): 266-271.
- [6] 杨文盛,张军东,刘璐,等. 不同来源蛋白质提取分离技术的研究进展[J]. 中国药学杂志, 2020, 55(11): 861-866.
- [7] 卢忠英,陈仕学,姚元勇,等. 蛋白质分离纯化方法的研究进展[J]. 广州化工, 2015, 43(17): 12-13,27.
- [8] 高盼,李恒彬,陈哲,等. 核桃分离蛋白的制备工艺优化及功能特性[J]. 中国油脂, 2022, 47(8): 34-39.
- [9] 代锡鑫,徐莹,毕爽,等. 核桃粕蛋白提取纯化工艺优化及其功能性质分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 241-252.
- [10] 邹翀,何东平,尤梦圆,等. 米糠蛋白提取及纯化工艺的研究[J]. 农业机械, 2013(3): 32-36.
- [11] 宁程茜,叶展,王斌,等. 糖化酶纯化棉籽分离蛋白的工艺研究[J]. 食品工业, 2016, 37(9): 75-79.
- [12] 彭吟雪,张莹,刘祥龙,等. 超声辅助碱溶酸沉法提取美藤果蛋白的工艺研究[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(5): 66-70.
- [13] 程赞,赵晓燕,张晓伟,等. 核桃分离蛋白酶解产物结构与功能的变化[J]. 中国油脂, 2022, 47(6): 85-91.
- [14] 王雪,郭兴凤. 蛋白质乳化性研究进展[J]. 粮食加工, 2017, 42(1): 39-43.
- [15] SHENG J, YANG X, CHEN J, et al. Antioxidative effects and mechanism study of bioactive peptides from defatted walnut (*Juglans regia* L.) meal hydrolysate[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(12): 3305-3312.