

# 巴旦木蛋白提取工艺

孙月娥<sup>1,2</sup>, 明 鸣<sup>1</sup>, 王卫东<sup>1</sup>, 高明侠<sup>1</sup>

(1. 徐州工程学院食品学院, 江苏 徐州 221111;

2. 江苏省食品生物加工工程技术研究中心, 江苏 徐州 221111)

**摘 要:** 以巴旦木为原料, 采用碱提酸沉法和超声波辅助碱液浸提法制备巴旦木蛋白, 并对其理化性质进行研究。结果表明: 碱提酸沉法提取巴旦木蛋白的最佳工艺条件是料液比 1:25、pH10.0、60℃浸提 40min; 超声辅助碱液浸提法提取巴旦木蛋白的最佳工艺条件是 pH9.0、料液比 1:20、提取时间 15min、超声功率 125kW, 在此条件下提取率为 37.16%。与碱提酸沉法比较, 超声波辅助碱液提取法时间短、得率高。

**关键词:** 巴旦木; 蛋白; 提取; 性质

## Optimization of Protein Extraction from *Amygdalus communis* L. Seed Kernel

SUN Yue-e<sup>1,2</sup>, MING Ming<sup>1</sup>, WANG Wei-dong<sup>1</sup>, GAO Ming-xia<sup>1</sup>

(1. College of Food Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221111, China;

2. Jiangsu Engineering Research Center for Food Biology Processing, Xuzhou 221111, China)

**Abstract:** Orthogonal array design was used to optimize the extraction of protein from almond (*Amygdalus communis* L.) seed kernel by alkaline extraction and acid precipitation method or ultrasonic-assisted alkaline extraction method. The optimal conditions for protein extraction by alkaline extraction and acid precipitation were obtained as follows: material/liquid ratio 1:25, pH 10.0, extraction time 40 min, and extraction temperature 60 °C. The optimal ultrasonic-assisted alkaline extraction conditions were material/liquid ratio 1:20, pH 9.0, extraction time 15 min, and ultrasonic power 125 kW, resulting in an extraction efficiency of 37.16%. Therefore, the ultrasonic-assisted alkaline extraction method revealed the advantages of shorter extraction time and higher extraction efficiency over the alkaline extraction and acid precipitation method.

**Key words:** *Amygdalus communis* L.; protein; extraction; properties

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0019-05

巴旦木又名巴旦杏, 是蔷薇科李亚科桃属乔木, 因其形扁如桃, 又名扁桃, 为世界上著名的木本油料树和干果树种, 也是新疆维吾尔人民最珍视的干果, 有“圣果”之称。巴旦木含有丰富的脂肪、蛋白质、多种维生素、糖类及无机盐等营养成分, 具有很高的药用价值, 为不可多得的滋补佳品, 60% 以上的维吾尔民族药配方含有它, 也可作为食品加工业的重要原料<sup>[1-4]</sup>。但是目前对巴旦木的研究开发还处于起步阶段, 发展潜力较大。本研究通过单因素试验和正交试验分别研究碱提酸沉法<sup>[5-7]</sup>、超声辅助碱法<sup>[8-9]</sup>提取巴旦木蛋白的工艺, 旨在为巴旦木蛋白的进一步开发利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

巴旦木 产于新疆库尔勒地区; 碱性蛋白酶 上海索莱宝生物科技有限公司; 中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、植物水解蛋白酶 丹麦 Novo Nordisk 公司; 其他试剂均为分析纯。

PC-1000 数显式电热恒温水浴锅 上海跃进医疗器械厂; T756 紫外-可见分光光度计 上海成光仪器有限公司; LGJ-18A 冷冻干燥机 常州普天仪器制造有限公司; FA-2104N 电子分析天平、CW-2000 超声波-微波协同萃

收稿日期: 2011-06-01

基金项目: 苏北科技发展计划项目(BN2010005); 徐州工程学院培育项目(XKY2009216)

作者简介: 孙月娥(1973—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为功能性食品。E-mail: sunyuee416@yahoo.com.cn

取仪 上海精密科学仪器有限公司; 80-1/2 台式离心机 常州国华电器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 巴旦木理化性质的测定

水分: 烘箱干燥法<sup>[10]</sup>; 灰分: 干法灰化法<sup>[10]</sup>; 粗蛋白: 凯氏定氮法<sup>[11]</sup>; 粗脂肪: 索氏提取法<sup>[12]</sup>; 总糖: 苯酚-硫酸法<sup>[11]</sup>; 膳食纤维: 酶-质量法<sup>[13]</sup>。

### 1.2.2 巴旦木的脱脂

将巴旦木手工去壳后于 40℃ 烘箱干燥, 粉碎过 40 目筛, 室温下用石油醚(30~60℃)脱脂 3h, 置通风橱中 12h 以挥发溶剂, 得脱脂巴旦木粕, 于 4℃ 保存备用。

### 1.2.3 巴旦木蛋白的提取及提取率计算

工艺流程: 巴旦木→脱脂巴旦木粕→粉碎→碱提/超声处理(加水→调 pH 值→置于恒温水浴)→离心(3000r/min、20min)→上清液→酸沉→离心(3000r/min、20min)→沉淀物冷冻干燥→巴旦木蛋白。

采用考马斯亮蓝法测定提取液中的蛋白质含量, 按下式计算蛋白提取率。

$$\text{蛋白提取率} / \% = \frac{\text{提取液中蛋白质含量}}{\text{巴旦木粕中蛋白质含量}} \times 100$$

### 1.2.4 巴旦木蛋白等电点测定

称取 1g 巴旦木蛋白质样品用水溶解, 料液比 1:20 (g/mL), 用 NaOH 溶液调 pH 值至 9.0, 50℃ 搅拌浸提 50min。离心(3000r/min、20min)取上清液, 沉淀物再重复提取 1 次, 合并两次上清液, 分别取上清液 6 份各 10mL, 加盐酸调 pH3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5, 离心(3000r/min、20min), 收集沉淀物即为巴旦木蛋白, 绘制沉淀量与 pH 值的曲线图, 沉淀量最大时的 pH 值即为巴旦木蛋白的等电点。

### 1.2.5 实验设计

采用碱提酸沉法提取巴旦木蛋白, 分别以料液比、浸提液 pH 值、浸提时间和浸提温度为影响因素, 通过单因素试验考察其对提取率的影响。在单因素试验的基础上, 采用正交试验优化碱提酸沉提取巴旦木蛋白的工艺参数。

同时采用超声辅助碱提的方法, 考察料液比、浸提液的 pH 值、超声功率和超声时间对提取率的影响, 然后采用正交试验对超声辅助碱提法的工艺参数进行优化。

## 2 结果与分析

### 2.1 巴旦木的主要成分

由表 1 可见, 巴旦木中含有丰富的脂肪和蛋白质, 应该充分开发、利用这一新疆特产资源, 提高其附加值。

表 1 巴旦木基本组成

Table 1 Basic chemical composition of almond seed kernel

成分含量/%	水分	灰分	粗脂肪	粗蛋白	总糖	膳食纤维
巴旦木	6.19	2.44	54.12	23.22	9.86	11.43

### 2.2 巴旦木蛋白的等电点

通过加酸至等电点是从提取液中分离蛋白质的一种较简便方法, 它能确保提取液的蛋白质出现最大量的沉淀。由图 1 可见, 巴旦木粕蛋白的沉淀量在 pH4 时最大, 故提取巴旦木蛋白的等电点为 pH4。

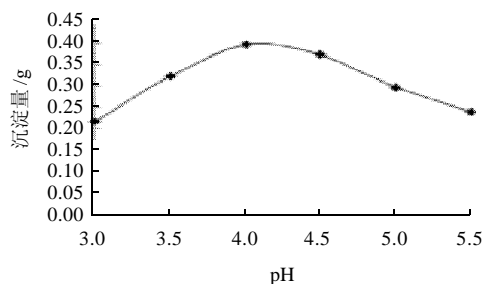


图 1 巴旦木蛋白等电点

Fig.1 Isoelectric point of almond seed kernel protein

### 2.3 脱脂处理对可溶性蛋白提取量的影响

在植物种子中, 许多蛋白质以脂蛋白的形式存在, 脂肪会阻碍蛋白质的溶出。取等量过 40 目筛的脱脂巴旦木粉与未脱脂巴旦木粉, 与水按 1:20(g/mL)混合, 用 1mol/L NaOH 溶液调整 pH9.0, 在 50℃ 条件下磁力搅拌浸提 50min, 然后 3000r/min 离心 20min。用考马斯亮蓝法测定上清液的吸光度, 计算两者的提取率。脱脂巴旦木粉蛋白提取率(32.27 ± 0.08)%、未脱脂巴旦木粉蛋白提取率(27.73 ± 0.68)%。经过脱脂处理后, 巴旦木中可溶性蛋白提取量提高了 4.54%, 所以在提取巴旦木蛋白前, 脱脂是必要的。

### 2.4 碱提酸沉法提取巴旦木蛋白的工艺参数

#### 2.4.1 料液比的影响

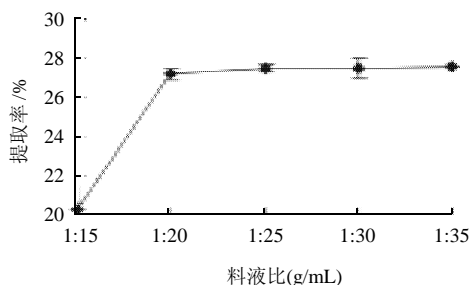


图 2 料液比对巴旦木蛋白提取率的影响

Fig.2 Effect of material/liquid ratio on almond seed kernel protein yield using alkaline extraction and acid precipitation method

取等量过 40 目筛的脱脂巴旦木粕, 用不同料液比浸提, 调整浸提液 pH 9.0, 在 50℃ 水浴条件下振荡浸提 50min, 测定蛋白质的提取率, 由图 2 可知, 蛋白质的提取率随料液比的降低而升高, 当料液比降低到 1:20 以后, 蛋白提取率虽然升高, 但增加速度减缓, 考虑到食品工业生产过程中, 料液比太低会增加后处理的负担, 使产品成本增大, 因此选取料液比 1:20 进行提取比较适宜。

#### 2.4.2 浸提液 pH 值对蛋白提取率的影响

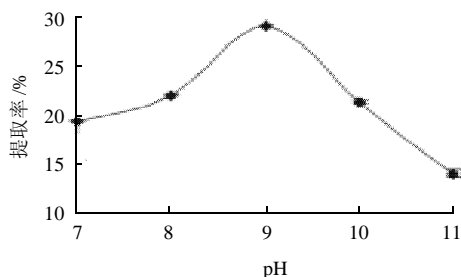


图 3 提取液 pH 值对巴旦木蛋白提取率的影响

Fig.3 Effect of extraction pH on almond seed kernel protein yield using alkaline extraction and acid precipitation method

取等量过 40 目筛的脱脂粕, 当料液比 1:20 时用 NaOH 溶液调整浸提液的 pH 值分别为 7、8、9、10、11, 在 50℃ 水浴条件下浸提 50min, 测定蛋白质的提取率, 由图 3 可见, 随着 pH 值在 7.0~9.0 范围增大, 巴旦木蛋白的提取率不断升高, 当 pH 9.0 时提取率最大, 此后提取率开始下降, 这可能是由于碱性太强导致脱氨、脱羧、肽键断裂, 引起脱赖反应, 将氨基酸转变为有毒化合物<sup>[14]</sup>。故选取 pH 9.0 进行提取比较适宜。

#### 2.4.3 浸提时间的影响

取等量过 40 目筛的脱脂粕, 当料液比 1:20, 浸提液 pH 值 9.0 时, 在 50℃ 条件下分别浸提 30、40、50、60、70min, 测定蛋白质提取率, 由图 4 可见, 在 30~50min, 随着浸提时间延长, 蛋白的提取率也随之增加, 当 50min 时提取率最大, 此后提取率基本不受浸提时间影响, 单纯延长浸提时间意义不大。因此选取浸提时间 50min 进行提取比较适宜。

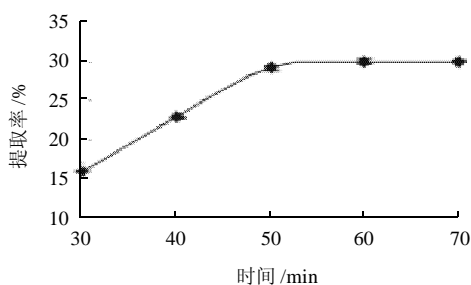


图 4 浸提时间对巴旦木蛋白提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction time on almond seed kernel protein yield using alkaline extraction and acid precipitation method

#### 2.4.4 浸提温度对蛋白提取率的影响

取等量过 40 目筛的脱脂粕, 当料液比 1:20, 浸提液 pH 9.0 时, 分别在 30、40、50、60、70℃ 条件下浸提 50min, 测定蛋白质的提取率, 由图 5 可见, 随着温度升高, 蛋白提取率不断增加, 50℃ 时提取率达最大, 此后提取率开始下降, 这可能是由于蛋白质高于 50℃ 易受热变性, 使部分已水解的蛋白质发生交联和聚合, 反而降低蛋白的溶解度<sup>[15]</sup>, 使提取率下降。故选取 50℃ 进行提取为宜。

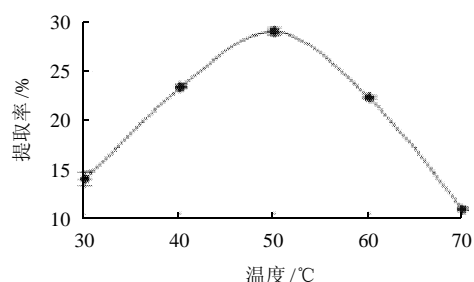


图 5 温度对巴旦木蛋白提取率的影响

Fig.5 Effect of extraction temperature on almond seed kernel protein yield using alkaline extraction and acid precipitation method

#### 2.4.5 正交试验确定最佳工艺参数

在单因素试验基础上, 以浸提时间、pH 值、料液比、浸提温度为因素, 蛋白提取率为指标设计  $L_9(3^4)$  正交试验优化碱提酸沉法提取巴旦木蛋白的最佳工艺参数, 试验设计与结果见表 2。

表 2 巴旦木蛋白碱提酸沉工艺正交试验设计及结果

Table 2  $L_9(3^4)$  orthogonal array design and results using alkaline extraction and acid precipitation method

水平	A 料液比(g/mL)	B 浸提液 pH	C 浸提温度/℃	D 浸提时间/min	提取率/%
1	1(1:15)	1(8.0)	1(40)	1(40)	11.98
2	1	2(9.0)	2(50)	2(50)	16.63
3	1	3(10.0)	3(60)	3(60)	25.79
4	2(1:20)	1	2	3	14.17
5	2	2	3	1	29.42
6	2	3	1	2	23.98
7	3(1:25)	1	3	2	18.23
8	3	2	1	3	27.34
9	3	3	2	1	30.31
$k_1$	54.4	44.38	63.3	71.71	
$k_2$	67.57	73.39	61.11	58.84	
$k_3$	75.88	80.08	73.62	67.3	
R	21.48	35.7	12.51	12.87	
因素主次	$B > A > D > C$				
优方案	$A_3B_3C_3D_1$				

从表 2 可以看出, 影响巴旦木蛋白浸提率的因素主次顺序为  $B > A > D > C$ , 即对蛋白提取率影响最大的

因素是浸提液 pH 值, 其次为料液比、浸提时间、浸提温度。蛋白提取最佳工艺条件为  $A_3B_3C_3D_1$ , 即料液比 1:25、pH10、60℃浸提 40min。按此优化条件进行验证实验, 巴旦木粕蛋白提取率为 32.27%。

## 2.5 确定超声辅助碱法提取巴旦木蛋白的最佳工艺

### 2.5.1 料液比的影响

取等量过 40 目筛的脱脂粕, 分别选取料液比 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30, 调整浸提液 pH9.0, 在 50kW 时超声 10min, 测定蛋白质的提取率, 由图 6 可见, 当料液比从 1:10 降低 1:25 时巴旦木蛋白的提取率不断升高, 此后随着料液比进一步降低提取率虽然升高, 但基本趋于稳定, 考虑到食品工业生产过程中, 料液比太小会增加后处理的负担, 使产品成本增大, 因此选取料液比 1:25 进行提取比较适宜。

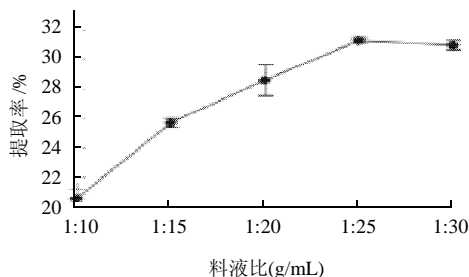


图 6 料液比对巴旦木蛋白提取率的影响

Fig.6 Effect of material/liquid ratio on almond seed kernel protein yield using ultrasound-assisted alkaline extraction method

### 2.5.2 pH 值的影响

取一定量过 40 目筛的脱脂巴旦木粕, 当料液比为 1:25, 分别调整 pH 值为 7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 在 50kW 功率下超声 10min, 测定蛋白质的提取率。由图 7 可见, pH 值在 7.0~9.0 范围内变化时, 巴旦木蛋白的提取率不断升高, pH 值 9.0 时提取率最大, 到 9.0 之后提取率开始下降, 因此选取 pH 值 9.0 进行提取比较适宜。

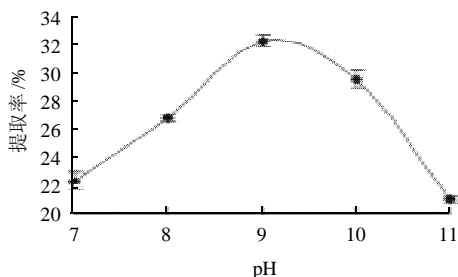


图 7 提取液 pH 值对巴旦木蛋白提取率的影响

Fig.7 Effect of pH on almond seed kernel protein yield using ultrasound-assisted alkaline extraction method

### 2.5.3 超声功率的影响

取一定量过 40 目筛的脱脂巴旦木粕, 当料液比

1:25、pH9.0 时, 分别在功率为 50、75、100、125kW 条件下超声 10min, 测定蛋白质的提取率。

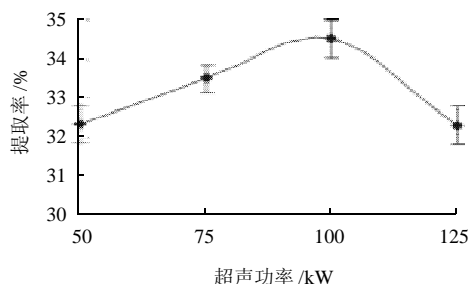


图 8 超声功率对巴旦木蛋白提取率的影响

Fig.8 Effect of ultrasound power on almond seed kernel protein yield using ultrasound-assisted alkaline extraction method

由图 8 可见, 当功率在 50~100kW 的范围内变化时, 巴旦木蛋白的提取率不断升高, 功率 100kW 时提取率最大, 到 100kW 之后提取率开始下降, 因此选取超声功率 100kW 进行提取比较适宜。

### 2.5.4 超声时间的影响

取一定量过 40 目筛的脱脂巴旦木粕, 当料液比为 1:25、pH9.0 时, 在功率为 50kW 条件下分别超声 5、10、15、20、25min, 测定蛋白质的提取率。

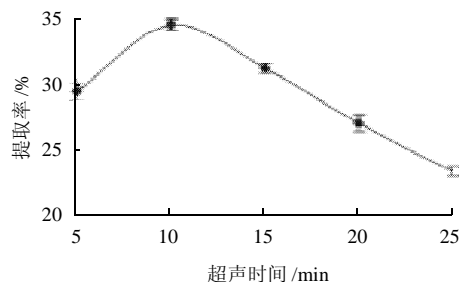


图 9 超声时间对巴旦木蛋白提取率的影响

Fig.9 Effect of extraction time on almond seed kernel protein yield using ultrasound-assisted alkaline extraction method

图 9 反映了超声时间对巴旦木蛋白提取率的影响, 可以看出在 5~10min 时, 随着提取时间的延长, 巴旦木蛋白的提取率不断升高, 当超声 10min 时提取率达到最大, 此后再增加提取时间则提取率有下降趋势, 因此选取超声功率 10min 进行提取比较适宜。

### 2.5.5 正交试验确定超声辅助碱法提取巴旦木蛋白的最佳工艺

在单因素试验基础上, 以料液比、pH 值、超声功率以及超声时间为因素, 提取率为指标设计  $L_9(3^4)$  正交试验优化超声辅助碱法提取巴旦木蛋白的最佳工艺参数。由表 3 可见, 影响巴旦木蛋白浸提率的因素主次顺序为  $A > B > D > C$ , 即料液比影响最大, 其次为浸提液 pH 值、超声时间、超声功率。超声辅助碱法提

取巴旦木蛋白最佳工艺为  $A_1B_2C_3D_3$ , 即巴旦木蛋白的提取条件为 pH9.0、料液比 1:20、超声时间 15min、超声功率 125kW, 验证实验获得提取率 37.16%。

表 3 巴旦木蛋白超声辅助碱法提取工艺正交试验设计及结果

Table 3  $L_9(3^4)$  orthogonal test design and results using ultrasound-assisted alkaline extraction method

水平	A料液比(g/mL)	B浸提液pH	C超声功率/kW	D超声时间/min	提取率/%
1	1(1:20)	1(8.0)	1(75)	1(5)	28.92
2	1	2(9.0)	2(100)	2(10)	30.29
3	1	3(10.0)	3(125)	3(15)	36.66
4	2(1:25)	1	2	3	19.94
5	2	2	3	1	25.85
6	2	3	1	2	20.24
7	3(1:30)	1	3	2	19.65
8	3	2	1	3	25.54
9	3	3	2	1	20.94
$k_1$	95.87	68.51	74.7	75.71	
$k_2$	66.03	81.68	71.17	70.18	
$k_3$	66.13	77.84	82.16	82.14	
R	29.84	13.17	10.99	11.96	
因素主次	$A > B > D > C$				
优方案	$A_1B_2C_3D_3$				

相比两种提取方法, 超声辅助碱提的时间短、提取率高, 但是巴旦木含油高, 即使脱油后经超声还是会有部分会乳化。综合比较, 超声辅助碱提法更好。

### 3 结 论

采用碱提酸沉法提取巴旦木粕蛋白的最佳条件为料液比 1:25、pH10、浸提时间 40min、浸提温度 60℃, 按此优化条件进行验证实验, 巴旦木粕蛋白提取率为 32.27%。采用超声辅助碱法提取巴旦木粕蛋白的最佳工艺参数为料液比 1:20、pH9.0、超声时间 15min、浸超

声功率 125kW, 在最优条件做验证实验, 巴旦木粕的蛋白提取率为 37.16%。根据巴旦木蛋白在不同 pH 值条件下的溶解性, 测得巴旦木蛋白的等电点在 pH4 左右。

### 参考文献:

- [1] 朱琼林. 新疆巴丹杏[M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1984.
- [2] 张凤云, 毛富春, 杨秀平. 巴旦杏仁氨基酸营养评价[J]. 西北农业学报, 2000, 9(3): 83-85.
- [3] 李颖, 易晓华, 李庆典. 新疆巴旦姆种仁高级脂肪酸与氨基酸营养评价[J]. 中国食品学报, 2004, 4(4): 64-70.
- [4] 刘金荣, 但建明, 赵文彬, 等. 维药巴旦杏的微量元素分析[J]. 微量元素与健康研究, 2002, 19(1): 29-30.
- [5] 杜蕾蕾, 郭涛, 万辉, 等. 核桃蛋白的分离纯化及功能性质的研究[J]. 中国油脂, 2009, 34(5): 21-24.
- [6] 丁丹华, 彭光华, 夏辉, 等. 油茶籽粕蛋白提取工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 102-105.
- [7] 王章存, 王雷, 董吉林, 等. 花生蛋白的不同提取工艺及其功能性质研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(3): 117-120.
- [8] 李婷, 侯晓东, 陈文学, 等. 超声波萃取技术的研究现状及展望[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(13): 3188-3190.
- [9] 赵玉红, 李莉. 超声波辅助提取松仁蛋白的工艺研究[J]. 中国林副特产, 2008(1): 6-8.
- [10] 张水华. 食品分析实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [11] 李志洲, 刘军海. 甜杏仁有效成份分析及多糖的体外抗氧化性研究[J]. 氨基酸和生物资源, 2008, 30(4): 34-36.
- [12] 张郁松. 索氏法提取杏仁油的工艺研究[J]. 油脂工程, 2001(9): 70-71.
- [13] 杨月欣, 王光亚. 实用食物营养成分分析手册[M]. 2 版, 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
- [14] 邵佩兰, 徐明. 提取大豆分离蛋白的工艺研究[J]. 粮油加工与食品机械, 2005(9): 47-51.
- [15] PARAMAN I, HETTIARACHCHY N S, SCHAEFER C, et al. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein[J]. Cereal chemistry, 2007, 84(4): 343-349.