

菠萝蛋白酶提取葡萄籽仁蛋白质工艺优化

赵怡红, 左银虎

(常州工程职业技术学院, 江苏 常州 213164)

摘要:以酿酒葡萄籽仁为原料,通过单因素法和正交设计法对葡萄籽仁蛋白质的菠萝蛋白酶提取工艺条件进行研究。结果表明:在料液比 1:30 条件下,各因素对蛋白质提取率的影响次序为:pH>酶解温度>酶用量>提取时间,最佳工艺参数:菠萝蛋白酶量为 $0.20\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、酶解温度 45°C 、酶解 pH7.5、提取时间 70 min。在此最佳工艺下,蛋白提取率达 93.6%。

关键词:葡萄籽仁蛋白质;菠萝蛋白酶;提取

中图分类号:TQ93 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)12-0124-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.12.0124

葡萄籽是葡萄酿酒和果汁饮料生产中产生的资源性副产物,葡萄籽蛋白是一种新的优质蛋白资源,含有 18 种氨基酸,其中包括了 8 种人体必需的氨基酸,其营养丰富,可用于保健药物,更是天然产物开发与利用研究中的热点,结合植物蛋白质的性质与操作的经济性酶提法是近年来应用较广泛的技术^[1]。已有的报道中,采用复合糖酶和木瓜蛋白酶提取葡萄籽中蛋白质,并取得较好的效果,但鲜见菠萝蛋白酶提取的研究^[2],由于菠萝蛋白酶来源丰富,应用广泛^[3],且葡萄籽中蛋白主要分布在胚乳和胚(籽仁)中,以结合状态和游离状态存在于细胞的膜系统和胞内、外基质环境中^[2],本试验应用脱壳(种皮)后的胚乳和胚与菠萝蛋白酶反应提取葡萄籽中的蛋白质,探讨菠萝蛋白酶浓度、料液比、酶解温度、pH 和酶解时间对其蛋白质提取率的影响,以期葡萄酿酒副产物的低值资源高值化提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试葡萄籽取自宁夏玉泉葡萄酒厂;供试试剂有 95%乙醇、硫酸、盐酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸、考马斯亮蓝 G-250、分析纯(丹阳市永丰化学试剂厂)、菠萝蛋白酶、牛血清蛋白标准品(上海源叶生物有限公司)。

供试仪器有紫外可见分光光度计(UV-7502,上海欣茂仪器有限公司)、KDN-05A 定氮仪(上海贝特仪器设备有限公司)、高效多功能粉碎机(RHP-

500A 型,永康市荣浩工贸公司)、数显恒温干燥箱(DH6-9073,常州博宏高科技设备有限公司)、数显恒温水浴锅(B-260,上海亚荣生化仪器厂)、高速冷冻离心机(GL-21M,上海市离心机机械研究所有限公司)、循环水真空泵(SHZ-DⅢ,巩义市予华仪器有限责任公司)、电子天平(FA1104,上海舜宇恒平科学仪器有限公司)、PHSJ-3F 酸度计(上海雷磁仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 提取工艺流程 葡萄籽→粉碎→加水离心分离种皮与籽仁(胚乳和胚)→干燥籽仁→酶提→低温离心→膜过滤→滤液用等电点沉淀蛋白→离心分离→洗涤沉淀蛋白→干燥→粗蛋白。

1.2.2 葡萄籽仁蛋白质含量测定 葡萄籽粉碎后加 40%的蒸馏水在 $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,将分离出的籽仁干燥,采用凯氏定氮法测定蛋白质含量,参照 GB/T5009.5-2003《食品中蛋白质的测定方法》^[4]。酶提液中蛋白质含量采用 $30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 考马斯亮蓝染色法测定^[5],其标准曲线见图 1。

1.2.3 葡萄籽仁蛋白质提取工艺及其优化 将干燥籽仁加入磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液,加一定量的酶,在一定温度、pH 条件下酶促反应一定时间后, 90°C 灭酶 13 min,反应液以 $7\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 低温离心 15 min,收集上清液,膜过滤并测定其蛋白质含量;滤液用等电点沉淀蛋白,用蒸馏水洗涤沉淀蛋白 3~5 次,干燥得蛋白质提取物。

采用料液比(籽仁粉与 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液的比例)、菠萝蛋白酶浓度、酶解温度、温度和 pH5 个对蛋白质提取影响显著的因素进行单因素试验,在此试验结果的基础上,用 $L_9(3^4)$ 正交

收稿日期:2015-07-06

第一作者简介:赵怡红(1961-),女,陕西省兴平市人,学士,副教授,从事生物技术与天然产物开发与应用研究和教学工作。E-mail: yzhzhao@email.czie.net。

表设计正交试验,优化葡萄籽仁蛋白质提取工艺。

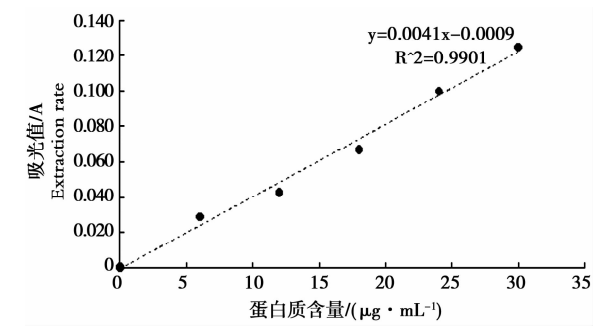


图1 考马斯亮蓝染色法测定蛋白质的标准曲线
Fig. 1 Standard curve of protein determined by Coomassie Blue method

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 料液比对蛋白质提取率的影响 由图2可知,在酶用量为 $0.18\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、温度 55°C 、时间 60 min 、 $\text{pH}7.5$ 的条件下,蛋白质的提取率随着料液比在 $1:5$ 至 $1:30$ 间的增加而提高,但当料液比超过 $1:25$ 后,蛋白质提取率增幅较小,符合酶促反应动力学。料液比增大,反应体积也随之增加,从试剂成本和降低浓度消耗等因素考虑,菠萝蛋白酶提取葡萄籽仁蛋白质的料液比在 $1:25$ 至 $1:30$ 间最佳。

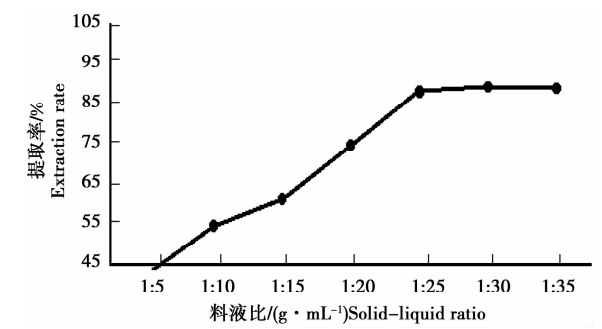


图2 不同料液比对提取率的影响
Fig. 2 Effect of solid-liquid ratio on protein yield

2.1.2 菠萝蛋白酶浓度对籽仁蛋白提取率的影响 由图3可知,在料液比 $1:30$ 、时间 60 min 、温度 55°C 、 $\text{pH}7.5$ 的条件下,蛋白质的提取率随着酶用量的增加而上升,当菠萝蛋白酶用量上升到 $0.18\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后,蛋白质提取率增幅变化不明显。故酶用量在 $0.18 \sim 0.20\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 较好。

2.1.3 酶解温度对葡萄籽仁蛋白提取的影响 由图4可知,在料液比 $1:30$ 、菠萝蛋白酶用量为 $0.18\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、时间 60 min 、 $\text{pH}7.5$ 的条件下,蛋白质的提取率随着酶解温度的上升而提高,超过

55°C 后,温度与酶活性仍维持在较高水平。因此,从降低能耗、节约生产成本考虑,提取温度 50°C 为宜。

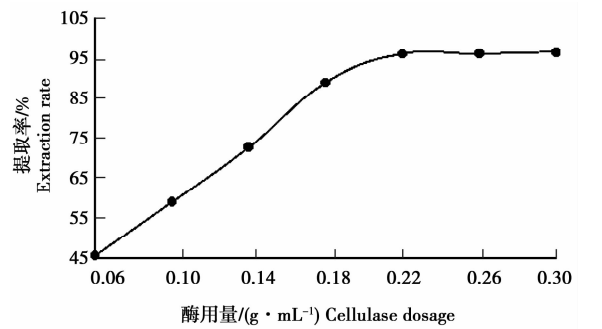


图3 酶用量对蛋白质提取率的影响
Fig. 3 Effect of cellulase dosage on protein yield

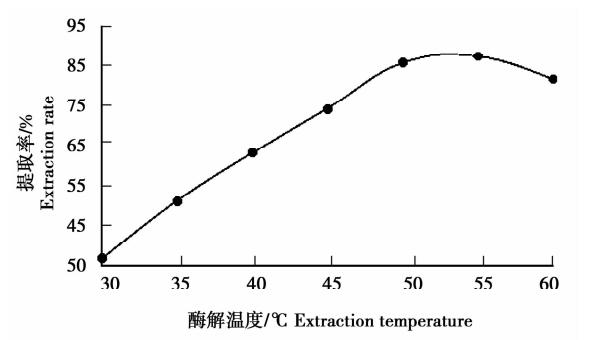


图4 酶解温度对蛋白质提取率的影响
Fig. 4 Effect of extraction temperature on protein yield

2.1.4 酶解时间对葡萄籽仁蛋白提取率的影响 由图5可知,在料液比 $1:30$ 、菠萝蛋白酶用量为 $0.18\text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、温度 55°C 、 $\text{pH}7.5$ 的条件下,蛋白质的提取率随着酶解时间的延长而迅速提高,当反应时间达到 55 min 后,提取的幅度变化不大,且有缓慢下降的趋势。因此,从缩短生产周期考虑,提取时间应在 55 min 为宜。

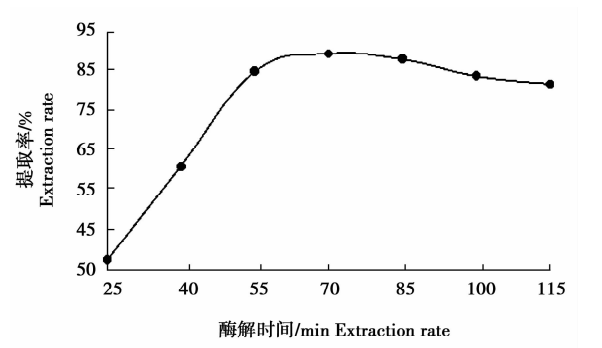


图5 酶提时间对蛋白质提取率的影响
Fig. 5 Effect of extraction time on protein yield

2.1.5 pH 对葡萄籽仁蛋白提取的影响 由图6

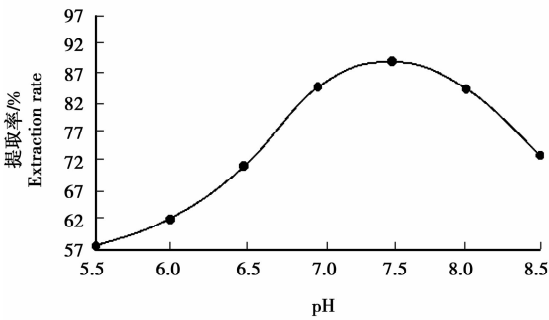


图 6 酶解 pH 对提取量的影响

Fig. 6 Effect of pH value on protein yield

可知，在料液比 1∶30、菠萝蛋白酶用量为 0.18 g·mL⁻¹、温度 55℃、时间 60 min 条件下，蛋白质的提取率在 pH6.0~7.5 时，pH 与酶活性呈

正比关系，当 pH 超出 8.0，溶液变为强碱性时，酶活性降低，提取率迅速降低。因此提取蛋白质时的最适 pH 为 7.5。

2.2 菠萝蛋白酶提法工艺优化

在进行菠萝蛋白酶提取葡萄籽仁蛋白的单因素分析的基础上，进行了 L₉(3⁴) 正交试验，对最佳工艺参数进行探讨，正交试验分析结果(见表 1)可知，在料液比 1∶30 时，各因素对蛋白质提取率的影响次序为：pH>酶解温度>酶用量>酶解时间，经验证试验得出最佳工艺组合为 M₂S₁P₂T₃，蛋白提取率达 92.7%。通过对 M₂S₁P₂T₃ 进行 3 次重复验证试验，平均提取率 93.6%，其中 pH 与酶解温度对提取率影响较大，其次是酶用量，酶解时间在 70 min 为最好。

表 1 正交试验结果

Table 1 Results of orthogonal test

实验号 Treatments	酶用量/(g·mL ⁻¹) Cellulase dosage	温度/℃ Extraction temperature	pH	时间/min Extraction time	蛋白质提取率/% Extraction rate of protein
1	M(0.18)	S1(45)	P1(7.0)	T1(50)	63.7
2	M1	S2(50)	P2(7.5)	T2(60)	86.4
3	M1	S3(55)	P3(8.0)	T3(70)	71.5
4	M2(0.20)	S1	P2	T3	91.5
5	M2	S2	P3	T1	75.7
6	M2	S3	P1	T2	76.3
7	M3(0.22)	S1	P3	T2	67.2
8	M3	S2	P1	T3	82.6
9	M3	S3	P2	T1	86.7
K ₁	221.6	222.4	226.6	226.1	
K ₂	243.5	244.7	264.6	229.9	
K ₃	236.6	234.5	214.4	245.6	
R	21.9	22.3	50.2	19.5	

3 结论

本试验在 pH 为 7.5、酶用量为 0.20 g·mL⁻¹ 的菠萝蛋白酶、45℃下提取时间为 70 min 的工艺条件下，提取葡萄籽仁中的蛋白质提取率达到 91.5%，此结果与吴炳云等^[5]、仵昱舟等^[5] 的单一酶提法(89.9%、94.1%)的结果相近。但籽仁优选分离后，具有酶用量少，提取的蛋白质外观色泽纯白，不需进一步脱色处理，分离出的籽壳和皮渣可进一步提取原花青素等优点，此法对综合开发利用酿酒葡萄的下脚料具有一定的应用价值。

参考文献：

[1] 左媛,王晓闻.葡萄籽提取物研究进展综述[J].山西科技,

2010,25(3):138-139.

[2] 任继波,胡文效.葡萄籽蛋白质利用研究进展[J].中外葡萄与葡萄酒,2014(3):58-66.

[3] Salampessy J,Phillips M,Seneweera S,et al. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (Meuschenia sp.) insoluble proteins [J]. Food Chemistry,2010,120(2): 556-560.

[4] 中华人民共和国国家标准. GB/T5009.5-2003 食品中蛋白质的测定方法[M].北京:中国标准出版社,2003.

[5] 吴炳云,黄晓辉.酶法提取葡萄籽中蛋白质的工艺研究[J].化学工程与装备,2014(2):34-38.

[6] 仵昱舟,冯翠萍.酶法提取葡萄籽中蛋白质工艺优化[J].食品科学,2010,31(2):63-66.