

# 双酶法提取角瓜籽仁蛋白质的工艺研究

夏光辉<sup>1,2</sup>, 刘欢<sup>1</sup>, 何文兵<sup>1</sup>

(1. 通化师范学院 长白山食品工程研究中心, 吉林 通化 134002; 2. 通化师范学院 制药与食品科学学院, 吉林 通化 134002)

**摘要:**以角瓜籽为试材,采用超声波进行预处理,选取纤维素酶和 Alcalase 碱性蛋白酶以 2:1 比例复配为复合酶制剂,研究了双酶法提取角瓜籽仁蛋白质的最佳工艺条件。结果表明:角瓜籽仁蛋白质的最佳提取工艺为:料液比 1:20 g/mL、总加酶量 7%、酶解温度 55℃、酶解时间 120 min,酶解 pH 7.5,在此条件下角瓜籽仁蛋白质的提取率最高,为 74.2%。

**关键词:**角瓜籽;蛋白质;酶;提取;工艺

**中图分类号:**S 642.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0137-04

角瓜籽是葫芦科南瓜属 1 a 生草本植物角瓜的种子,其不但含有丰富的蛋白质和脂肪,还具有碳水化合物、膳食纤维、胡萝卜素、硫胺素、核黄素、维生素 E、甾醇、钾、钠、硒、铜、锌、锰、铁、镁、钙等营养成分,具有辅助降血脂、降胆固醇、润肺滋肠和养颜护肤等保健功效<sup>[1]</sup>。角瓜籽是吉林省长白山地区的特色产品之一,也是我国传统出口商品<sup>[2]</sup>。市场上销售的角瓜籽主要是籽用角瓜的种子,我国吉林、黑龙江和河北 3 个省份是籽用角瓜的主产区,产量逐年提升。研究角瓜籽蛋白质的提取分离,可以进一步开发相应的产品,有助于扩大角瓜籽的内需,拉动地方经济增长。传统的蛋白质提取方法以

碱溶酸沉法为主,具有提取率低、蛋白质品质差等缺点<sup>[3]</sup>。酶法提取蛋白质是近年发展起来的新兴技术,虽操作复杂、成本高,但提取出的蛋白质品质好,提取率高,反应条件温和,是一种环保型的蛋白质提取技术<sup>[4]</sup>。超声波常用作辅助提取物料中有些成分的有效手段<sup>[5]</sup>,杨萌萌等<sup>[6]</sup>研究了超声波前处理对酶法提取胶原蛋白的影响,利用一定功率的超声波能提高蛋白质的得率。该试验利用超声波进行酶解前的预处理,研究双酶法提取角瓜籽仁蛋白质的工艺方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试角瓜籽产于吉林省通化市。

供试牛血清蛋白质由北京奥博星生物技术有限责任公司提供;氢氧化钠、95%乙醇、浓盐酸、浓硫酸、硼酸、硫酸铜、硫酸钾、考马斯亮蓝、甲基红、溴甲酚绿,均为分

**第一作者简介:**夏光辉(1978-),男,吉林通化人,硕士,讲师,现主要从事农产品加工与贮藏等研究工作。E-mail:xiaghui@163.com.  
**收稿日期:**2013-09-23

## Study on the Microwave Extraction and Hydroxyl Radical Scavenging of Yam Polysaccharide

HU Yue-fang

(College of Chemistry and Bioengineering, Hezhou University, Hezhou, Guangxi 542899)

**Abstract:** Taking yam as material, polysaccharide was extracted from yam by microwave, and  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment based on extraction time, extraction power, material-liquid ratio and extraction times was tested to optimize the extraction technology. The hydroxyl radical scavenging effect was studied by spectrophotometry method. The results showed that the best extracting technology was extraction time for 6 min, extraction power for 400 W, material-liquid ratio of 1:20 g/mL and extraction times was 3 times. Under these conditions, the yield of yam polysaccharide was 6.32%. The results showed that the yam polysaccharide had the good ability to scavenge the hydroxyl radicals, which had the dose-effect relationship between the concentration of yam polysaccharide.

**Key words:** yam; polysaccharide; microwave extraction; hydroxyl radicals

析纯;纤维素酶、酸性蛋白酶、果胶酶、中性蛋白酶由四川省山野生物科技有限公司生产;Alcalase 碱性蛋白酶由诺维信生物技术有限公司生产。

DS-1 高速组织捣碎机(上海精科实业有限公司);KQ-200KDB 超声波清洗机(昆山市超声波仪器有限公司);DHG-9101-2S 恒温鼓风干燥箱(上海三发科学仪器有限公司);DHS-3 酸度计(上海大普仪器有限公司);722 可见分光光度计(上海元析仪器有限公司);TDL80-2D 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 双酶法提取角瓜籽仁蛋白质工艺 采用筛选、挑选、磁选等方式去除原料角瓜籽中的各种杂质,用脱壳机去掉角瓜籽的外壳,得到角瓜籽仁。把角瓜籽仁于鼓风干燥箱内低温烘干,然后用粉碎机粉碎,经 80 目筛筛分,过粗颗粒再次粉碎。用蒸馏水按一定加水比稀释角瓜籽仁粉,稀释液用超声波清洗机在 720 W 功率下处理 10 min。再调整料液的 pH 和温度至酶解适宜的范围,接酶后放入恒温水浴锅内搅拌一定时间,期间用自动滴定仪维持酶解 pH 的稳定。然后升温灭酶,冷却后用高速离心机 4 000 r/min 离心 15 min,分别收集油脂、乳化液、上清液和残渣。上清液即为角瓜籽蛋白质溶液,经喷雾干燥处理便可得到角瓜籽仁粗蛋白质。采用凯氏定氮法检测角瓜籽仁粉中蛋白质含量,采用考马斯亮蓝法测定酶解后经离心分离获得的上清液中蛋白质含量。蛋白质提取率计算公式为:蛋白质提取率=(上清液的蛋白质含量×上清液体积)/(角瓜籽仁粉质量×原料蛋白质含量)×100%。

1.2.2 双酶法提取角瓜籽仁蛋白质的单因素试验 酶的种类对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响:选取纤维素酶、Alcalase 碱性蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶和果胶酶 5 种常用的商品酶分别按照厂家提供的酶作用最适条件进行角瓜籽蛋白质的酶解试验,根据酶解后的蛋白质提取率来选择合适的酶种类。双酶对比对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响:根据 Zhang 等<sup>[7]</sup>研究成果,2 种酶一起使用,能够简化水解操作,缩短水解时间,提高蛋白质得率。该试验确定选择纤维素酶和 Alcalase 酶 2 种酶同时使用,固定总加酶量为 5%,研究纤维素酶:Alcalase 酶分别为 1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1,研究不同加酶量对比对蛋白质提取率的影响。料液比对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响:分别用 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40 g/mL 料液比来进行角瓜籽仁粉末的酶解试验,计算各料液比下的蛋白质提取率,根据蛋白质提取率的高低确定最佳料液比。试验操作时各料液比下均添加 5% 的纤维素酶和 Alcalase 酶,按 2:1 比例使用,调节底物 pH 为 7.0,50℃ 维持 60 min。加酶量对角瓜籽仁蛋白质

提取率的影响:分别选用 3%、4%、5%、6%、7%、8% 和 9% 的总加酶量来进行角瓜籽仁粉末的酶解试验,计算各加酶量下的蛋白质提取率,根据蛋白质提取率的高低确定最佳加酶量。试验操作时按 1:20 g/mL 加水比例稀释底物,纤维素酶和 Alcalase 酶按 2:1 比例使用,调节底物 pH 为 7.0,50℃ 维持 60 min。酶解温度对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响:分别选用 35、40、45、50、55、60、65℃ 的酶解温度进行试验,分析确定最佳酶解温度。试验操作时按 1:20 g/mL 加水比例稀释底物,添加 6% 的 2:1 比例的纤维素酶和 Alcalase 酶,调节底物 pH 为 7.0,各酶解温度下均维持 60 min。酶解时间对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响:分别选用 30、45、60、75、90、105、120、135、150 min 的酶解时间进行试验,分析确定最佳酶解时间。试验操作时按 1:20 g/mL 加水比例稀释底物,添加 6% 的 2:1 比例的纤维素酶和 Alcalase 酶,调节底物的 pH 为 7.0、温度为 55℃。酶解 pH 对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响:分别选用 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 和 8.5 的酶解 pH 进行试验,分析确定最佳酶解 pH。试验操作时按 1:20 g/mL 加水比例稀释底物,添加 6% 的 2:1 比例的纤维素酶和 Alcalase 酶,55℃ 维持 105 min。

1.2.3 双酶法提取角瓜籽仁蛋白质的正交实验 依据单因素试验结果,选取对蛋白质提取率有较大影响的加酶量、酶解温度、酶解 pH 和酶解时间 4 个因素,以蛋白质提取率为评价指标,各因素均取 3 个水平(表 1),进行正交实验,以优化双酶法提取角瓜籽仁蛋白质的工艺条件。

表 1 正交实验因素与水平

Table 1 Factor and level of orthogonal experiment

水平	因素			
	A 加酶量/%	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/min	D 酶解 pH
1	5	50	90	7.0
2	6	55	105	7.5
3	7	60	120	8.0

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

2.1.1 不同酶制剂对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响 从图 1 可以看出,不同酶制剂对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响不同,Alcalase 酶对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响较大,当酶解时间超过 120 min 以后,纤维素酶与 Alcalase 酶的蛋白质提取率高于其它酶,因此,该试验选用纤维素酶与 Alcalase 酶进行角瓜籽仁蛋白质提取的双酶复配。

2.1.2 不同双酶对比对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响 从图 2 可以看出,纤维素酶与 Alcalase 酶的不同对比对角瓜籽仁蛋白质的提取率影响较大,二者的配比为 2:1 时达到工艺条件下的最大提取率 65.95%。故确定纤维素酶与 Alcalase 酶的适宜配比为 2:1。

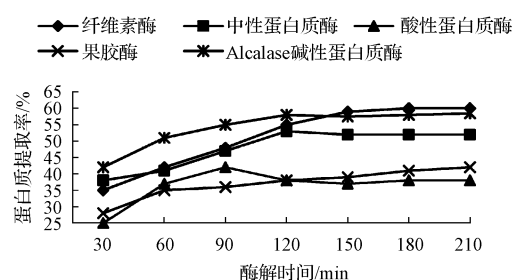


图1 不同酶种类下的角瓜籽仁蛋白质提取率

Fig. 1 The zucchini seed protein extraction efficiency under different enzymes

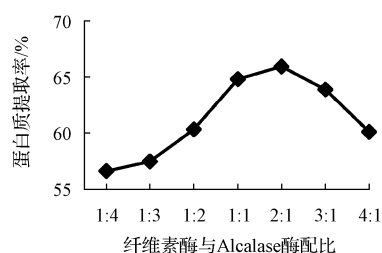


图2 不同酶配比下的角瓜籽仁蛋白质提取率

Fig. 2 The zucchini seed protein extraction efficiency under different cellulase and alcalase ratios

### 2.1.3 不同料液比对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响

从图3可以看出,增大料液比可提高蛋白质的提取率,但当料液比达到一定比例后,蛋白质提取率变化幅度较小。谭志光等<sup>[8]</sup>对此现象进行了研究和分析,认为料液比较小时,料液体系的黏度较大,使混合物中的蛋白质分子无法充分润湿,影响酶解的传质过程,所以蛋白质的提取率较低;较大的料液比又会大幅度降低酶与底物的接触几率,故蛋白质的提取率不会大幅增加。料液比越大,工艺成本越高,综合考虑确定最佳料液比为1:20 g/mL。

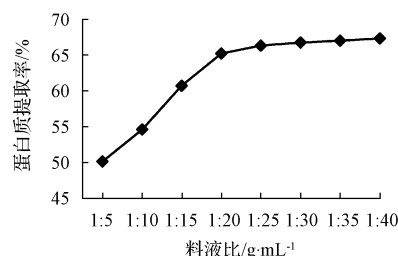


图3 不同料液比下的角瓜籽仁蛋白质提取率

Fig. 3 The zucchini seed protein extraction efficiency under different material and liquid ratios

### 2.1.4 不同加酶量对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响

从图4可以看出,在6%的限度内增加总的酶用量,角瓜籽仁蛋白质的提取率会随之增加,超过此限度后,角瓜

籽仁蛋白质提取率的增加幅度较小。结合工艺的经济性,确定总加酶量6%为宜。

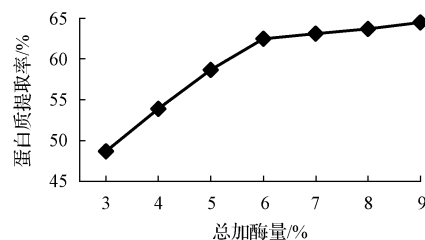


图4 不同加酶量的角瓜籽仁蛋白质提取率

Fig. 4 The zucchini seed protein extraction efficiency under different dose of total enzyme

### 2.1.5 不同酶解温度对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响

从图5可以看出,升高酶解温度,角瓜籽仁蛋白质的提取率会随之增加,55℃时为67.6%,达到该工艺条件下的最大值,继续升高温度蛋白质的提取率反而下降。酶的活性与温度有密切关系,一定范围内升温会提高酶活性,温度过高会导致酶活性受抑制甚至失活。故确定角瓜籽仁复合酶酶解的最适温度为55℃。

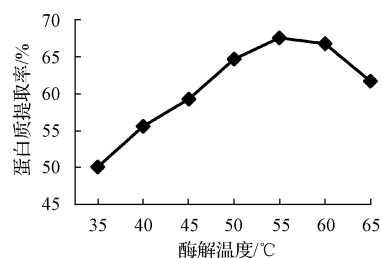


图5 不同酶解温度下的角瓜籽仁蛋白质提取率

Fig. 5 The zucchini seed protein extraction efficiency under different enzymolysis temperatures

### 2.1.6 不同酶解时间对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响

从图6可以看出,随着酶解时间的延长,蛋白质的提取率逐渐增高。由于酶解初期底物浓度高,105 min以下时蛋白质提取率增加幅度较大;105 min以后由于酶解作用的底物浓度较低,故蛋白质提取率的增幅较小。最适酶解时间在105 min左右。

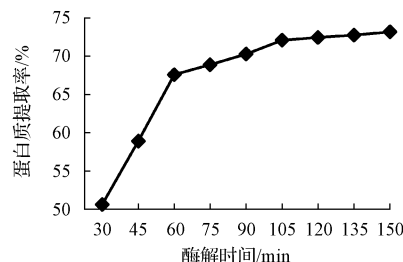


图6 不同酶解时间下的角瓜籽仁蛋白质提取率

Fig. 6 The zucchini seed protein extraction efficiency under different enzymolysis time

## 2.1.7 不同酶解 pH 对角瓜籽仁蛋白质提取率的影响

从图 7 可以看出,试验所选的 pH 范围是纤维素酶和 Alcalase 酶的适宜 pH 的综合。酶解操作时升高底物的 pH,角瓜籽仁蛋白质的提取率先升高后减小,pH 在 7.5 左右时达到最大值,然后随 pH 的升高蛋白质提取率逐渐减小。故确定最适酶解 pH 值为 7.5。

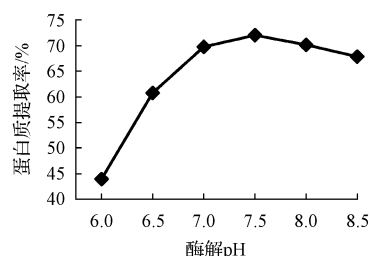


图 7 不同酶解 pH 下的角瓜籽仁蛋白质提取率

Fig. 7 The zucchini seed protein extraction efficiency under different enzymolysis pH

表 1 双酶法提取角瓜籽仁蛋白质的正交实验结果

Table 1 The orthogonal experimental result of double enzyme hydrolysis extracting zucchini seed protein technology

试验号	因素				蛋白质提取率/%
	A 加酶量 /%	B 酶解温度 /℃	C 酶解时间 /min	D 酶解 pH	
1	1	1	1	1	68.3
2	1	2	2	2	72.3
3	1	3	3	3	71.8
4	2	1	2	3	72.1
5	2	2	3	1	70.3
6	2	3	1	2	71.6
7	3	1	3	2	73.4
8	3	2	1	3	72.1
9	3	3	2	1	70.6
K <sub>1</sub>	212.40	213.80	212.00	209.20	
K <sub>2</sub>	214.00	214.70	215.00	217.30	
K <sub>3</sub>	216.10	214.00	215.50	216.00	
k <sub>1</sub>	70.80	71.27	70.67	69.73	
k <sub>2</sub>	71.33	71.57	71.67	72.43	
k <sub>3</sub>	72.03	71.33	71.83	72.00	
R	1.23	0.30	1.16	2.70	

## 2.2 角瓜籽仁蛋白质提取工艺正交实验结果

由表 1 可知,影响角瓜籽仁蛋白质提取率的因素大小为 D>A>C>B,即酶解 pH>加酶量>酶解时间>酶解温度。最佳提取方式组合为 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>,即总加酶量为 7%,酶解温度为 55℃,酶解时间为 120 min,酶解 pH 为 7.5。按此组合重新进行酶解提取角瓜籽仁蛋白质,蛋白质的提取率为 74.2%,高于正交实验中的最好水平,也高于纤维素酶和 Alcalase 酶分别单独使用时的最好水平,证明最佳组合有效。

## 3 结论

纤维素酶和 Alcalase 酶是双酶水解制取角瓜籽仁蛋白质的最佳复配酶,二者的最佳配比为 2:1;稀释原料的最佳料液比为 1:20 g/mL,总加酶量为 7%,水解操作时的适宜工艺参数为酶解 pH 7.5、酶解温度 55℃、酶解时间 120 min。按上述条件进行操作,角瓜籽仁蛋白质的提取率可达 74.2%,显著高于纤维素酶和 Alcalase 酶分别单独使用时的最高水平。

## 参考文献

- [1] 陈聪颖,陈泽乃.西葫芦的化学和药理研究[J].国外医药(植物药分册),1998(5):215-217.
- [2] 刘畅,宋振伟.白瓜籽剥壳分离设备的开发与应用[J].农业机械,2009(16):103-104.
- [3] 麻成金,黄伟,黄群,等.复合酶法提取仿栗籽蛋白的工艺优化[J].食品科学,2012,33(20):34-39.
- [4] 芮闯,侯彩云,刘莹,等.水酶法提取花生蛋白质的研究[J].粮油食品科技,2009,17(4):22-25.
- [5] 方芳,许凯扬,朱强,等.超声波辅助水酶法萃取葫芦籽油的研究[J].中国粮油学报,2012,27(10):62-66.
- [6] 杨萌萌,郭兆斌,余群力,等.超声波辅助法提取胶原蛋白工艺研究[J].甘肃农业大学学报,2013,48(3):121-126.
- [7] Zhang S B, Wang Z, Xu S Y. Optimization of aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2007, 84(1): 97-105.
- [8] 谭志光,唐书泽,汪勇,等.酶法制取早籼米浓缩蛋白[J].食品科学,2006,32(4):54-57.

## Study on Extraction Technology of Zucchini Seed Protein Using Double Enzyme Hydrolysis

XIA Guang-hui<sup>1,2</sup>, LIU Huan<sup>1</sup>, HE Wen-bing<sup>1</sup>

(1. Research Center of Changbai Mountain Food Engineering, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134002; 2. College of Pharmaceutical and Food Science, Tonghua Normal University, Tonghua, Jilin 134002)

**Abstract:** Taking the zucchini seed as material, using ultrasonic to preprepared, the cellulase and alcalase as multi-enzyme with a mixture of cellulase and alcalase at 2:1 activity ratio was chosen to study the optimal hydrolysis conditions for double enzyme hydrolysis extraction technology of zucchini seed protein. The results showed that the optimum extraction technology were diluted the substrate with water at the ratio of 1:20 g/mL, added the multi-enzyme with 7% total dose, hydrolyzed the protein at the pH 7.5 and temperature of 55℃ for 120 min. The protein extraction efficiency of 74.2% could be observed under these conditions.

**Key words:** zucchini seed; protein; enzyme; extraction; technology