

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2017.02.044

# 大豆水酶法水解液中蛋白质超滤回收及特性研究

江连洲 张巧智 李 杨 王中江 齐宝坤 隋晓楠

(东北农业大学食品学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 采用超滤法回收水解液中的蛋白质,在单因素试验的基础上,通过 Box-Behnken 响应面法试验设计建立了操作压力、溶液质量分数、溶液 pH 值对膜通量影响的模型。研究表明,各因素对膜通量的影响由大到小依次为溶液质量分数、操作压力、溶液 pH 值。经优化得到的最佳工艺参数为:操作压力 0.20 MPa、溶液质量分数 5.60%、溶液 pH 值 8.50。在此条件下超滤膜通量为 7.02 L/(m<sup>2</sup>·h),回收物中蛋白质质量分数增至 88.63%,红外光谱显示构成大豆蛋白的各官能团特征峰明显,高效液相色谱结果显示超滤对水解液中低聚糖类物质的脱除效果较好,所回收蛋白在功能特性上溶解性得到提升,且在酸性 pH 值范围内有明显改善,而乳化活性指数和乳化稳定性指数有所降低。超滤法回收水解液蛋白可实现同步浓缩与杂质分离,为水解液的增值利用提供了可行方法。

**关键词:** 大豆蛋白; 超滤; 功能特性; 水酶法; 工艺优化

中图分类号: TS221 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2017)02-0327-08

## Ultrafiltration Recovery of Skim Protein from Enzyme-assisted Aqueous Extraction Process of Soybean and Its Functional Properties

JIANG Lianzhou ZHANG Qiaozhi LI Yang WANG Zhongjiang QI Baokun SUI Xiaonan

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** Enzyme-assisted aqueous extraction processing (EAEP) has long been considered as a promising alternative to traditional solvent oil extraction, which has gained increasing attention recently. After EAEP of soybeans, three distinct layers are formed: cream, skim and residual fraction. The skim fraction contains substantial amount of protein as well as oil, sugar and other impurities. In order to recover value from this liquid fraction, ultrafiltration was employed for protein concentration and isolation. To investigate the interrelationship between operating parameters and membrane flux, Box-Behnken response surface methodology was introduced. The results indicated that the three factors' effects on membrane flux followed the decreasing order as: solution mass fraction, transmembrane pressure and solution pH value. The improved regression model was fitted with determination coefficient of 0.9975 and optimal factors were as follows: operative pressure of 0.20 MPa, solution mass fraction of 5.60%, and solution pH value of 8.50. The permeate flux under above conditions was 7.02 L/(m<sup>2</sup>·h) and protein purity was increased to 88.63%. The infrared spectrum and HPLC analysis showed evidently characteristic peaks of functional groups in soybean protein and remarkable low levels of undigestible oligosaccharides. Besides, the protein extracted from EAEP showed improved solubilities especially at acidic pH value, but it slightly decreased emulsifying activity index and emulsifying stability index. Further improvement can be achieved if industrial fractionation unit was employed and process optimization was conducted. A complete cost-effectiveness analysis would also need to be done to estimate the economic viability of this application.

**Key words:** soybean protein; ultrafiltration; functional properties; enzyme-assisted aqueous extraction process; process optimization

收稿日期: 2016-07-02 修回日期: 2016-08-04

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFD0401402、2016YFD0400700)、国家自然科学基金重点项目(31430067)和国家自然科学基金面上项目(31571876)

作者简介: 江连洲(1960—),男,教授,博士生导师,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: jlname@163.com

通信作者: 隋晓楠(1987—),男,副教授,主要从事粮食、油脂及植物蛋白工程研究,E-mail: xiaonan.sui@neau.edu.cn

## 引言

水酶法是一种新兴的绿色提油技术,通过机械破碎和酶解手段,破坏细胞壁及油脂体膜,使油脂得以释放。该方法萃取条件温和,避免了传统提油工艺中有机试剂及高温处理的介入,所制油品质高、杂质含量低<sup>[1]</sup>,具有十分广阔的应用前景。通过对原料预处理及乳状液破乳工艺的研究,大豆水酶法游离油得率已提升至 92.6%<sup>[2-3]</sup>。但与此同时,水相提取体系伴随产生的副产物——水解液,由于含有大部分原料中的可溶性物质,作为废液会造成大量资源浪费,极大地限制水酶法提油技术的经济可行性。已有研究表明,大豆水酶法水解液的主要成分为限制性酶解蛋白<sup>[4-5]</sup>,可作为大豆蛋白的丰富来源,但水解液中可溶性糖类、细小油滴、盐类等其他成分的存在会对产品的感官品质及功能特性产生不利影响。因此,提取回收水解液中的蛋白质、脱除非蛋白组分对大豆水酶法工艺的产业化推广具有重要意义。

传统的大豆分离蛋白提取方法主要利用其在等电点(pH 值 4.5)附近溶解度较低的特性进行提取,但由于酶解处理后大豆蛋白在酸性 pH 值范围内溶解度提升,碱溶酸沉法仅能回收约 30% 水解液蛋白<sup>[6]</sup>。超滤技术作为一种膜分离方法,通过压力差的推动可选择性地将溶液中较大溶质分子截留于微孔滤膜之上,具有操作简捷、分离系数大、高效节能、无相变、无二次污染等特点<sup>[7]</sup>,已广泛应用于蛋白质提取、分离纯化等领域。李旭等<sup>[8]</sup>利用不同截留分子量的超滤膜分离油茶籽蛋白并对各组分的功能特性进行了研究;YANG 等<sup>[9]</sup>利用植酸酶酶解辅助超滤分离法大幅度降低了大豆分离蛋白中植酸及异黄酮的含量。CAMPBELL 等<sup>[6]</sup>利用超滤回收水酶法蛋白但仅得到 70% 纯度的产品,且仍含有油脂、低聚糖等杂质成分。将超滤技术应用于水解液蛋白质的回收,可为开发利用水解液资源提供一种行之有效的方法,该领域国内尚无相关报道。在超滤操作过程中,工艺条件的选择是决定超滤效果及工艺成本的关键因素。因此,本文在探讨水解液蛋白超滤过程中影响膜通量及蛋白质截留率主要因素的基础上,通过响应面法试验设计确定最佳的超滤工艺条件,并进一步对所得水解液蛋白的功能特性进行研究,为大豆水酶法水解液蛋白超滤回收的工业化生产提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

全脂大豆片(东农 42 号,含水率 10.54%,粗脂

肪质量分数 19.73%,粗蛋白质量分数 38.48%,灰分质量分数 4.21%),大豆分离蛋白(粗蛋白质量分数 92.37%),聊城蓝山集团;Alcalase 2.4L 碱性内切蛋白酶,杰能科(中国)生物工程有限公司;蔗糖、水苏糖、棉籽糖标准品,Sigma-Aldrich 公司;乙腈、三氟乙胺均为色谱纯,石油醚、乙醚、SDS 等均为分析纯。

T20 型双螺杆挤压机,法国 Cletral 公司;PHS-25 型数显台式酸度计,上海雷磁仪器厂;FD5 型冷冻干燥机,美国西盟国际集团;RE-52CS-1 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;3-18K 型高速冷冻离心机,Sigma-Aldrich 公司;1、3、5 kDa 平板聚醚砜超滤膜、MSC300 型杯式超滤器,上海摩速科学器材有限公司;K-436 型快速消解仪、K-370 型自动凯氏定氮仪,瑞士步琦有限公司;高速剪切乳化机,上海昂尼仪器仪表有限公司;分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;e2695 型高效液相色谱仪(配有四元溶剂管理器、自动进样器、柱温箱、示差折光检测器),美国 Waters 公司;BEH Amide 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm),美国 Waters 公司;IRTracer-100 型傅里叶变换红外光谱仪,日本岛津公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 基本化学成分测定

含水率,依据 GB/T 5497—1985《粮食、油料检验 水分测定法》进行测定;粗脂肪质量分数,依据 GB/T 14772—2008《食品中粗脂肪的测定》进行测定;粗蛋白质量分数,依据 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》进行测定;灰分质量分数,依据 GB/T 5009.4—2010《食品中灰分的测定》进行测定。

#### 1.2.2 大豆水酶法水解液的制备

水解液作为大豆水酶法提油工艺的副产物,所采用的提取条件为 LI 等<sup>[2-3]</sup>优化的最佳提油工艺,其主要流程如下:全脂大豆片→粉碎→调节含水率为 14.5%→挤压膨化(60℃、300 r/min)→粉碎过 60 目筛→调节固液比至 6 mL/mg→调节温度为 50℃、pH 值为 8.5→酶解 3 h(加酶量 1.85 mL/(100 g))→灭酶(100℃、10 min)→离心分离(8 000 g、20 min)→收集水解液→冷冻干燥→水解液冻干粉。

#### 1.2.3 水解液蛋白质的超滤回收及膜的选择

为避免水解液中的少量油滴污染超滤膜,提升所得蛋白的产品质量,预先将水解液冻干粉经正己烷浸提 12 h 以除去残余油脂,再用超纯水复溶。通过实验室级超滤装置对水解液中的蛋白质进行回收,如图 1 所示,考虑到水解液中杂质成分的种类,

分别采用截留分子量为 1、3、5 kDa 的超滤膜进行蛋白回收,待系统稳定后准确记录一段时间内透过液的体积,当体积缩减至初始值 1/4 时分别收集透过液和截留液,冷冻干燥备用。膜通量及蛋白质截留率计算公式<sup>[7,9-10]</sup>分别为

$$R = \frac{V}{AT} \quad (1)$$

式中  $R$ ——膜通量,  $L/(m^2 \cdot h)$   
 $V$ ——透过液体积,  $L$       $T$ ——超滤时间,  $h$   
 $A$ ——膜有效面积,  $m^2$

$$P = \left(1 - \frac{C'}{C}\right) \times 100\% \quad (2)$$

式中  $P$ ——蛋白质截留率, %  
 $C$ ——初始溶液的蛋白质量浓度,  $mg/mL$   
 $C'$ ——透过液的蛋白质量浓度,  $mg/mL$

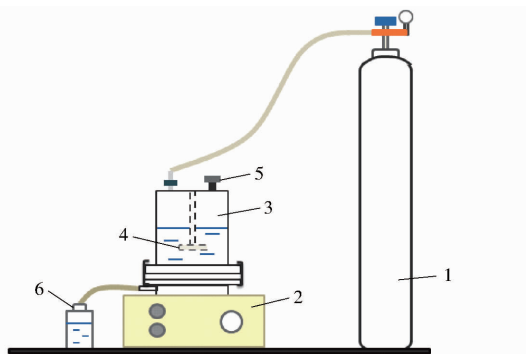


图 1 超滤装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of ultrafiltration device

1. 氮气瓶 2. 磁力搅拌器 3. 超滤杯 4. 搅拌杆 5. 进料口  
 6. 出料口

## 1.2.4 试验设计

### (1) 单因素试验

在超滤回收水解液蛋白的过程中,影响超滤效果的因素主要有操作压力、溶液质量分数及溶液 pH 值。首先进行单因素试验,以选取试验因素及水平。选取操作压力为 0.10、0.14、0.16、0.18、0.20、0.22 MPa,溶液质量分数为 2.5%、4.0%、5.5%、7.0%、8.5%、10.0%,溶液 pH 值为 3.5、4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5。以膜通量和蛋白质截留率为评价指标确定最佳超滤工艺。

### (2) 响应面试验

在上述单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 设计原理,以操作压力、溶液质量分数及溶液 pH 值为自变量,以膜通量为响应值,试验因素水平与编码见表 1。

### 1.2.5 可溶性糖类测定

大豆水酶法水解液中除蛋白外还含有部分糖类物质,为分析水解液中可溶性糖类的组成及分布以及超滤操作对于糖类的脱除效果,采用 HPLC-RID

表 1 响应面试验因素水平

Tab. 1 Levels and variables of response surface method

| 编码 | 因素             |                 |               |
|----|----------------|-----------------|---------------|
|    | 操作压力 $x_1/MPa$ | 溶液质量分数 $x_2/\%$ | 溶液 pH 值 $x_3$ |
| -1 | 0.18           | 4.0             | 7.5           |
| 0  | 0.20           | 5.5             | 8.5           |
| 1  | 0.22           | 7.0             | 9.5           |

方法进行测定<sup>[4,11]</sup>。分析前,为除去蛋白质,先将 0.3 mL 样品与 0.7 mL 乙腈混合,在 10 000  $g$  下离心 10 min。取 10  $\mu L$  上清液注入高效液相色谱仪,柱温为 35 $^{\circ}C$ 。采用 75% 乙腈溶液(添加 0.2% TEA)在 0.6 mL/min 的流速下进行等度洗脱。将样品峰的保留时间与标准品进行对照,并根据各糖标准品的外标曲线进行定量。

### 1.2.6 红外光谱测定

将水解液蛋白冻干粉与 KBr 以质量比 1:100 混合后在玛瑙研钵中研磨均匀,并用压片机压成薄片,在 500~4 000  $cm^{-1}$  范围内以 4  $cm^{-1}$  的分辨率扫描 32 次,采集样品图谱数据,并在样品测试相同条件下采集背景<sup>[12-13]</sup>。

### 1.2.7 蛋白质功能特性测定

#### (1) 蛋白质氮溶解指数

参照 LIU 等<sup>[14]</sup>的方法测定超滤回收蛋白在不同 pH 值下的氮溶解指数(Nitrogen soluble index, NSI),即利用微量凯氏定氮法测定离心后上清液中的氮含量占总氮含量的百分比,氮溶解指数计算公式为

$$N = \frac{m}{m'} \times 100\% \quad (3)$$

式中  $N$ ——氮溶解指数, %  
 $m$ ——上清液中的氮质量,  $g$   
 $m'$ ——初始溶液中的氮质量,  $g$

#### (2) 蛋白质乳化性

参照 GHRIBI 等<sup>[15-16]</sup>的方法测定超滤回收蛋白的乳化活性指数(Emulsifying activity index, EAI)及乳化稳定性指数(Emulsifying stability index, ESI)并做若干修改:将质量浓度 0.02  $g/mL$  蛋白质样品溶液与大豆油以体积比例 3:1 混合,置于高速均质机在 20 000  $r/min$  下均质 1 min。立即用 0.001  $g/mL$  SDS 溶液稀释 1 000 倍,记录此时及 15 min 后在 500 nm 处的吸光度,乳化活性指数和乳化稳定性指数计算公式为

$$E_{AI} = \frac{2 \times 2.303AD}{10\,000\varphi c} \quad (4)$$

$$E_{SI} = \frac{At}{A - A'} \quad (5)$$

式中  $E_{AI}$ ——乳化活性指数,  $m^2/g$   
 $E_{SI}$ ——乳化稳定性指数, min  
 $A$ ——乳液在 0 min 时在 500 nm 处吸光度  
 $A'$ ——乳液在 15 min 时在 500 nm 处吸光度  
 $\varphi$ ——油脂所占体积分数, %  
 $c$ ——样品溶液中蛋白质质量浓度,  $g/mL$   
 $D$ ——稀释倍数, 取 1 000  
 $t$ ——间隔时间, 取 15 min

## 2 结果与讨论

### 2.1 大豆水酶法水解液的主要化学组成

表 2 所示为大豆水酶法水解液的主要化学组成。由表 2 可知, 水解液中主要含有 70.46% 蛋白质、11.48% 脂肪、12.99% 碳水化合物及 5.07% 灰分。若 1 kg 大豆经水酶法提取后产生 4.6 kg 水解

液, 以 10% 干物质计, 则水解液中将包含大豆原料中约 46% 的固形物, 其中包括 84.23% 蛋白质、26.77% 油脂及 22.10% 糖类, 若加以分离利用将能产生可观的经济效益。脱去油脂后, 水解液中蛋白质质量分数提升至 78.62%, 超过市售大豆浓缩蛋白纯度 (70%), 可作为大豆蛋白的丰富来源, 具有较高的潜在经济价值。水酶法水解液中除蛋白质外的主要非蛋白组分是可溶性碳水化合物, 主要为蔗糖、水苏糖和棉籽糖。其中后两者属大豆低聚糖类, 由于人体或动物缺乏  $\alpha$ -半乳糖苷酶而易引起胀气、消化不良等症状<sup>[17-18]</sup>, 被认为是大豆蛋白产品中的主要抗营养因子之一。此外, 由于水解液中干物质含量较低, 常规浓缩方法将增加蛋白回收耗能<sup>[19]</sup>, 利用超滤操作回收蛋白可实现同步浓缩与杂质分离, 为水解液的增值利用提供了可行办法。

表 2 大豆水酶法水解液的化学成分组成 (质量分数, 以干基计)

Tab. 2 Chemical composition of skim from EAEP of soybeans

%

| 水解液类别 | 油脂           | 蛋白           | 蔗糖          | 水苏糖         | 棉籽糖         | 灰分          |
|-------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 原始    | 11.48 ± 0.09 | 70.46 ± 0.21 | 7.58 ± 0.07 | 4.06 ± 0.05 | 0.75 ± 0.03 | 5.07 ± 0.09 |
| 脱脂后   |              | 78.62 ± 0.13 | 8.50 ± 0.05 | 4.56 ± 0.08 | 0.81 ± 0.05 | 5.77 ± 0.07 |

### 2.2 膜截留分子量对超滤效果的影响

膜截留分子量 (Molecular weight cut-offs, MWCO) 对超滤效果及工艺成本具有重要影响, 根据水解液中杂质成分的分子量特征, 分别选择截留分子量为 1、3、5 kDa 的平板聚醚砜超滤膜对水解液中的蛋白进行回收, 考察膜截留分子量对膜通量及蛋白质截留率的影响, 结果如图 2 所示。

留率由 91.38% 升至 97.32%, 说明低 MWCO 超滤膜对水解液蛋白有较好的回收效果, 且当 MWCO 为 3 kDa 时, 膜通量及蛋白质截留率均较理想, 考虑到超滤效率及操作成本, 后续试验将选择 3 kDa 作为水解液蛋白回收所用膜的截留分子量。

### 2.3 超滤回收水解液蛋白的单因素试验分析

#### 2.3.1 操作压力

在溶液质量分数为 5.5%, pH 值为 8.5 条件下, 操作压力对膜通量及蛋白质截留率的影响如图 3 所示。

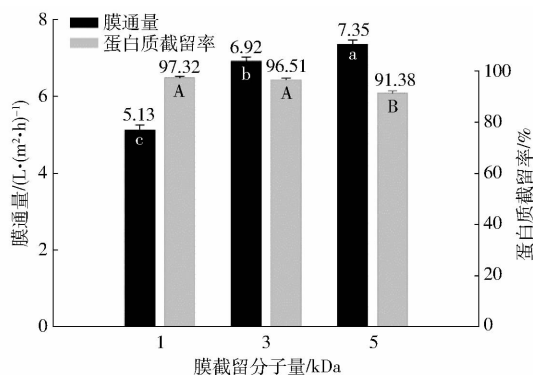


图 2 膜截留分子量对超滤效果的影响

Fig. 2 Influence of membrane molecular weight cuts-off on ultrafiltration performance

由图 2 可知, 随超滤膜截留分子量的降低, 膜通量随之下降, 且当 MWCO 为 1 kDa 时下降较为剧烈, 其原因可能是 1 kDa 时, 绝大部分蛋白质被截留、聚集并压实于超滤膜表面, 出现了浓差极化现象进而形成凝胶层, 部分堵塞超滤膜孔, 使膜通量大幅下降<sup>[20-21]</sup>。另一方面, MWCO 的降低使蛋白质截

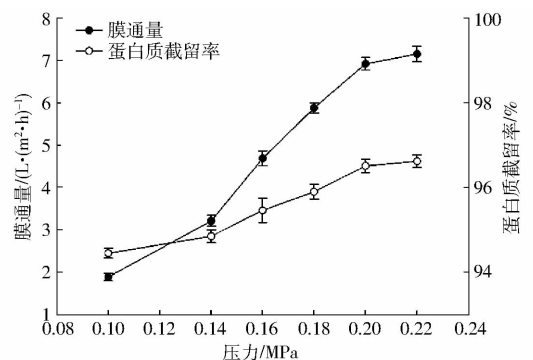


图 3 操作压力对超滤效果的影响

Fig. 3 Influence of operational pressure on ultrafiltration performance

压力是影响超滤效果的重要因素, 由图 3 可知, 随操作压力的增大, 膜通量呈上升趋势, 这是由于跨膜压力的增加, 使料液流速加快并呈现湍流状, 此时

浓差极化现象不显著,膜通量显著上升。但当压力超过一定范围时,浓差极化现象加剧并导致部分溶质聚集于膜表面形成凝胶层,使得膜通量增幅趋慢<sup>[22]</sup>;操作压力对蛋白质截留率影响较小,跨膜压力由 0.10 MPa 增加至 0.22 MPa 可使蛋白质截留率提高 2.17%,但压力过大易导致超滤膜孔堵塞及污染,增加后续不必要的能耗损失,因此在优化操作压力时选择 0.20 MPa 为中心点。

### 2.3.2 溶液质量分数

在操作压力为 0.20 MPa、溶液 pH 值为 8.5 时,溶液质量分数对膜通量及蛋白质截留率的影响如图 4 所示。

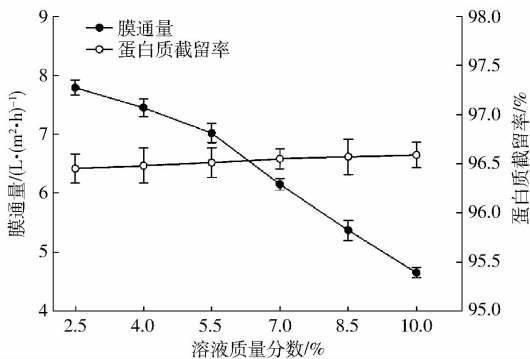


图 4 溶液质量分数对超滤效果的影响

Fig. 4 Influence of solution concentration on ultrafiltration performance

由图 4 可知,膜通量随料液质量分数的增加而逐渐降低,且在大于 5.5% 时下降较为剧烈。产生这一现象的原因可能是料液体积分数增大使得溶液粘度增加,溶质分子间相互作用增强,扩散系数降低,更易在超滤膜表面形成浓差极化及凝胶层,增大透过阻力,使得膜通量逐渐下降<sup>[23]</sup>,但料液质量分数过低时会导致超滤时间延长,增大工艺耗能,为后续膜清洗带来困难;随溶液质量分数的增加,蛋白质截留率稍有上升,其原因可能是蛋白质分子间较强的相互作用阻碍了小分子蛋白透过超滤膜,使透过液中蛋白质浓度降低,综合考虑膜通量与蛋白回收效果,在优化溶液质量分数时选择 5.5% 为中心点。

### 2.3.3 溶液 pH 值

在操作压力为 0.20 MPa、溶液质量分数为 5.5% 时,溶液 pH 值对膜通量及蛋白质截留率的影响如图 5 所示。

由图 5 可知,当溶液 pH 值为 4.5 和 5.5 时,膜通量达到最低值,蛋白质截留率最高,此时接近水解液蛋白等电点,溶解度最小,蛋白质分子间静电斥力几乎为零,易析出并聚集于膜表面形成吸附层,增加透过阻力<sup>[24]</sup>,该结论与黄群等<sup>[10]</sup>研究结果相一致。

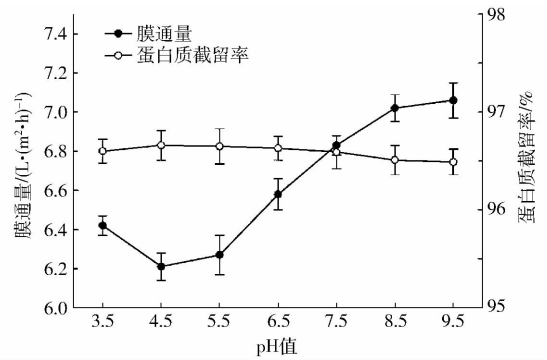


图 5 溶液 pH 值对超滤效果的影响

Fig. 5 Influence of solution pH value on ultrafiltration performance

当 pH 值小于 4.5 或大于 5.5 时,膜通量随 pH 值偏离等电点程度的增加而上升,且在 6.5 ~ 8.5 范围内增幅显著,此时溶液中蛋白质与水分子亲和作用增强,分子间静电斥力可削弱膜表面的浓差极化现象,蛋白质截留率有小幅降低,当 pH 值大于 8.5 时,继续增加 pH 值对膜通量及蛋白质截留率影响不大,且 pH 值 8.5 接近水酶法酶解体系终点 pH 值,可避免额外加入碱类物质。因此,在优化溶液 pH 值时选择 8.5 为中心点。

## 2.4 超滤回收水解液蛋白的响应面试验分析

在上述单因素试验中,可以看出各因素对膜通量有显著影响,而对蛋白质截留率影响较小(回归模型不显著),蛋白质截留率始终在 94% 以上,说明超滤操作对水解液蛋白截留效果良好。为进一步确定超滤操作的最佳工艺,以膜通量为响应值,选择操作压力、溶液质量分数和溶液 pH 值 3 个因素,采用 Box-Behnken 试验设计进行响应面分析。试验设计及结果见表 3,表中  $X_1 \sim X_3$  为  $x_1 \sim x_3$  的编码值。

表 3 Box-Behnken 试验设计及结果

Tab. 3 Experimental design and results of Box-Behnken

| 试验序号 | $X_1$ | $X_2$ | $X_3$ | $R/(L \cdot (m^2 \cdot h)^{-1})$ |
|------|-------|-------|-------|----------------------------------|
| 1    | -1    | -1    | 0     | 5.50                             |
| 2    | 1     | -1    | 0     | 5.75                             |
| 3    | -1    | 1     | 0     | 5.74                             |
| 4    | 1     | 1     | 0     | 5.81                             |
| 5    | -1    | 0     | -1    | 5.56                             |
| 6    | 1     | 0     | -1    | 5.68                             |
| 7    | -1    | 0     | 1     | 5.72                             |
| 8    | 1     | 0     | 1     | 5.79                             |
| 9    | 0     | -1    | -1    | 5.63                             |
| 10   | 0     | 1     | -1    | 5.98                             |
| 11   | 0     | -1    | 1     | 5.80                             |
| 12   | 0     | 1     | 1     | 5.86                             |
| 13   | 0     | 0     | 0     | 7.03                             |
| 14   | 0     | 0     | 0     | 7.03                             |
| 15   | 0     | 0     | 0     | 7.01                             |
| 16   | 0     | 0     | 0     | 6.98                             |
| 17   | 0     | 0     | 0     | 6.95                             |

通过 Design-Expert 8.0.6 软件,对表 3 中数据进行多元回归拟合,得到超滤膜通量( $R$ )对操作压力( $X_1$ )、溶液质量分数( $X_2$ )、溶液 pH 值( $X_3$ )的回归方程模型为

$$R = 7.00 + 0.064X_1 + 0.089X_2 + 0.040X_3 - 0.045X_1X_2 - 0.013X_1X_3 - 0.073X_2X_3 - 0.72X_1^2 - 0.59X_2^2 - 0.60X_3^2$$

对膜通量数据进行 ANOVA 方差分析,结果见表 4。由方差分析结果可知,所得回归模型极显著( $P_r < 0.01$ ),失拟项不显著( $P_r > 0.05$ ),模型  $R^2 = 0.9975$ ,说明该方程中参数可解释 99.75% 的因变量变化,模型与试验数据拟合效果较好,可通过该模型对实际超滤工艺参数进行预测。由表 3 可以看出,回归方程中一次项  $X_1$ 、 $X_2$  极显著,说明操作压力和溶液质量分数对膜通量的线性效应显著,平方项  $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  极显著,说明各参数对膜通量的曲面效应极显著,交互项  $X_2X_3$  影响显著( $P_r < 0.05$ ),表明各参数对膜通量的影响不是简单的线性关系。从回归方程中各因素回归系数绝对值大小,判断各因素对膜通量的影响由大到小次序为:溶液质量分数、操作压力、溶液 pH 值。

在回归方程基础上,对模型进行降维分析,以考

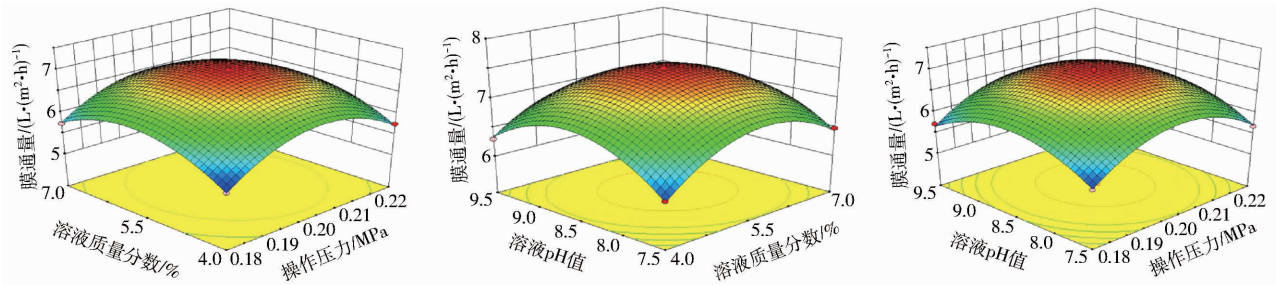


图 6 超滤回收工艺参数对膜通量影响的响应曲面

Fig. 6 Response surfaces exhibiting effects of ultrafiltration parameters on membrane flux

通过 Design-Expert 软件分析,得到超滤回收水解液蛋白的最佳工艺参数为:操作压力 0.20 MPa、溶液质量分数 5.61%、溶液 pH 值 8.49,在此条件下超滤膜通量预测值为  $7.0353 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ 。考虑到实际可操作性,将上述条件修正为:操作压力 0.20 MPa,溶液质量分数 5.60%、溶液 pH 值 8.50,在此最优条件下进行验证试验,得到的超滤膜通量为  $7.02 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ ,与预测值较为接近,说明响应面优化得到的超滤工艺条件准确可靠,具有一定的实际参考价值。

在上述最佳超滤回收工艺基础上,进一步考察超滤法对水解液蛋白中杂质的脱除效果,对回收物中可溶性糖类物质及灰分含量进行了测定,结果见表 5。

由表 5 可知,超滤法对水解液中可溶性糖类物质的脱除效果较好,其中对蔗糖和水苏糖的脱除率分别为 54.94% 和 49.12%,棉籽糖脱除率高达 100%,但对盐类物质脱除效果欠佳,增加超滤、反渗

表 4 响应面结果方差分析

Tab. 4 ANOVA of response surface results

|          | 平方和   | 自由度 | 均方    | $F$            | $P_r$                |
|----------|-------|-----|-------|----------------|----------------------|
| 模型       | 5.830 | 9   | 0.650 | 313.10         | <0.0001              |
| $X_1$    | 0.033 | 1   | 0.033 | 15.72          | 0.0054               |
| $X_2$    | 0.063 | 1   | 0.063 | 30.47          | 0.0009               |
| $X_3$    | 0.013 | 1   | 0.013 | 6.19           | 0.0417               |
| $X_1X_2$ | 0.008 | 1   | 0.008 | 3.92           | 0.0883               |
| $X_1X_3$ | 0.006 | 1   | 0.006 | 0.30           | 0.5996               |
| $X_2X_3$ | 0.021 | 1   | 0.021 | 10.17          | 0.0153               |
| $X_1^2$  | 2.150 | 1   | 2.150 | 1040.95        | <0.0001              |
| $X_2^2$  | 1.440 | 1   | 1.440 | 696.83         | <0.0001              |
| $X_3^2$  | 1.500 | 1   | 1.500 | 726.93         | <0.0001              |
| 残差       | 0.014 | 7   | 0.002 |                |                      |
| 失拟项      | 0.010 | 3   | 0.003 | 2.69           | 0.1817               |
| 纯误差      | 0.005 | 4   | 0.001 |                |                      |
| 总和       | 5.84  | 16  |       | $R^2 = 0.9975$ | $R_{adj}^2 = 0.9943$ |

察各因素及因素间交互作用对膜通量的影响,所得响应曲面如图 6 所示。由图 6 可知在所考察因素范围内,膜通量均随操作压力、溶液质量分数、溶液 pH 值的增大呈现先上升后下降的趋势,与上述单因素试验结果相一致,且各曲面均为下开口凹面,中心位于所考察区域内,说明所考查范围内存在膜通量的最大值。

表 5 超滤回收水解液蛋白中的杂质组成

(质量分数,以干基计)

Tab. 5 Impurity contents in skim protein recovered from

| 参数   | EAEP of soybeans |                  |                | 灰分              |
|------|------------------|------------------|----------------|-----------------|
|      | 蔗糖               | 水苏糖              | 棉籽糖            |                 |
| 质量分数 | $3.83 \pm 0.05$  | $2.32 \pm 0.04$  |                | $5.22 \pm 0.11$ |
| 脱除率  | $54.94 \pm 0.08$ | $49.12 \pm 0.09$ | $100 \pm 0.09$ | $9.53 \pm 0.20$ |

透等膜分离工序可能会改善脱除效果。超滤操作后,回收物中蛋白纯度可提升至 88.63%,超过市售大豆浓缩蛋白纯度,并接近大豆分离蛋白纯度,且抗营养性低聚糖含量较低,可作为蛋白质的优质来源,具有巨大的附加经济价值。

## 2.5 水解液蛋白的红外光谱分析

超滤回收处理前后水解液蛋白的红外光谱如图 7 所示。

由图 7 可知, $3305 \text{ cm}^{-1}$ 处较宽的吸收峰对应为

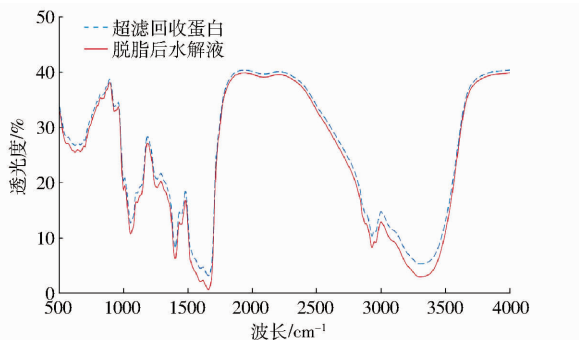


图 7 水解液蛋白的红外光谱图

Fig. 7 Infrared spectra of skim protein

分子间氢键 O—H 和 N—H 的伸缩振动;  $2\ 956\ \text{cm}^{-1}$  和  $2\ 929\ \text{cm}^{-1}$  处重叠峰对应—C—H<sub>2</sub> 的不对称伸缩振动;  $1\ 653\ \text{cm}^{-1}$  处强吸收为酰胺 I 带—C=O 伸缩振动<sup>[12]</sup>;  $1\ 541\ \text{cm}^{-1}$  处和  $1\ 241\ \text{cm}^{-1}$  处的吸收峰则分

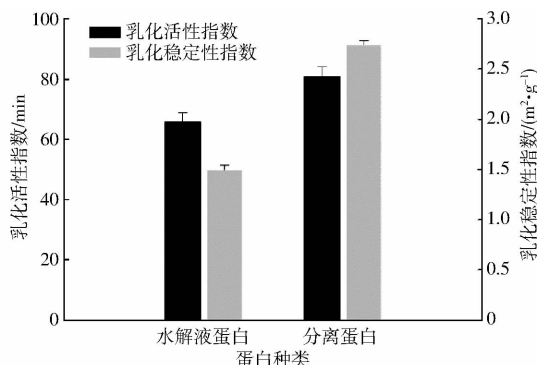
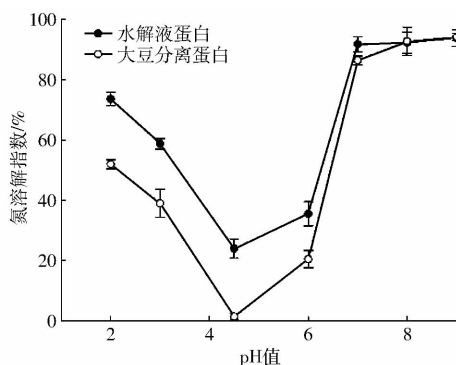


图 8 水解液蛋白质的功能特性

Fig. 8 Functional properties of skim protein

如图 8 所示,水解液蛋白及分离蛋白的溶解性—pH 值曲线呈现典型的 U 型曲线,即在 pH 值 4.5 (大豆蛋白等电点)附近溶解性最低,在 pH 值 2.0~7.0 范围内,水解液蛋白的溶解性均较分离蛋白有所提升,且在酸性条件下提升较显著,如在 pH 值 3.0 和 4.5 处,水解液蛋白的氮溶解指数较大豆分离蛋白分别提高了 0.51 和 15.6 倍。蛋白酶解后小分子片段的增加、亲水性基团的释放以及表面积的增加促进了水合作用,使蛋白溶解性得到增强。大豆蛋白由于其酸溶性的限制在饮料加工领域应用十分有限,而水解液蛋白这一特性的改善可在一定程度上扩大其在酸性食品体系中的应用,如果汁、酸乳饮料、碳酸饮料等。图 8 所示为水解液蛋白及分离蛋白的乳化活性指数及乳化稳定性指数随 pH 值变化的曲线。与分离蛋白相比较,水解液蛋白的乳化性略有下降,其乳化活性指数及乳化稳定性指数分别较分离蛋白下降了 45.42% 和 18.61%。这一结论与 ALMEIDA 等<sup>[25]</sup>对 Protex 6L 酶解后蛋白的乳化特性测定结果趋势相似。水酶法提取过程中蛋白酶的介入在不同程度上破坏了蛋白质结构中氢

键、疏水相互作用、离子键等作用力,并产生较小分子量的肽段或氨基酸,它们无法同大分子蛋白一样稳定存在于油水界面并维持界面张力<sup>[16]</sup>,致使乳化活性指数及乳化稳定性指数有所降低。

## 2.6 水解液蛋白的功能特性分析

水酶法提取过程中伴随着大豆蛋白的限制性酶解,蛋白多肽链长短及三维空间结构发生变化,并导致部分被包埋的氨基酸残基暴露出来<sup>[12]</sup>,这一过程必然对蛋白质的功能特性产生影响,本研究分别考察了超滤回收后水解液蛋白质的氮溶解指数、乳化活性指数及乳化稳定性指数,并与大豆分离蛋白进行对比,结果如图 8 所示。

键、疏水相互作用、离子键等作用力,并产生较小分子量的肽段或氨基酸,它们无法同大分子蛋白一样稳定存在于油水界面并维持界面张力<sup>[16]</sup>,致使乳化活性指数及乳化稳定性指数有所降低。

## 3 结束语

采用超滤法回收水解液中的蛋白质,在单因素试验的基础上,通过响应面法试验设计建立了操作压力、溶液质量分数、溶液 pH 值对膜通量影响的模型。研究表明,各因素对膜通量的影响由大到小依次为溶液质量分数、操作压力、溶液 pH 值。经优化得到的最佳工艺参数为:操作压力 0.20 MPa、溶液质量分数 5.60%、溶液 pH 值 8.50。在上述条件下超滤膜通量为  $7.02\ \text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ ,回收物中蛋白质质量分数增至 88.63%,接近市售大豆分离蛋白纯度。红外光谱结果显示构成大豆蛋白的各官能团特征峰明显,蛋白制品纯度较理想,色谱结果显示超滤对水解液中的可溶性糖类物质尤其是棉籽糖脱除效果较好,所回收蛋白在功能特性上溶解性得到明显改善,而乳化活性指数及乳化稳定性指数有所降低。

## 参 考 文 献

- 1 YUSOFF M M, GORDON M H, NIRANJAN K. Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods: a review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2015, 41(1):60-82.
- 2 LI Y, SUI X N, QI B K, et al. Optimization of ethanol-ultrasound-assisted destabilization of a cream recovered from enzymatic extraction of soybean oil[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2014, 91(1):159-168.
- 3 LI Y, JIANG L Z, QIAO G H. Effect of extruding parameters on soybean oil yield of enzyme-assisted aqueous extraction processing[J]. Advanced Materials Research, 2010, 148-149:7-18.
- 4 DE MOURA BELL J M L N, MAURER D, YAO L, et al. Characteristics of oil and skim in enzyme-assisted aqueous extraction of soybeans[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2013, 90(7):1079-1088.
- 5 ROVARIS A A, DIAS C O, CUNHA P D, et al. Chemical composition of solid waste and effect of enzymatic oil extraction on the microstructure of soybean (*Glycine max*) [J]. Industrial Crops and Products, 2012, 36(1):405-414.
- 6 CAMPBELL K A, GLATZ C E. Protein recovery from enzyme-assisted aqueous extraction of soybean [J]. Biotechnology Progress, 2009, 26(2):488-495.
- 7 王周利, 伍小红, 岳田利, 等. 苹果酒超滤澄清工艺的响应面法优化[J/OL]. 农业机械学报, 2014, 45(1):209-213. [http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view\\_abstract.aspx?file\\_no=20140133&flag=1](http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20140133&flag=1). DOI: 10.6041/j.issn.1000-1298.2014.01.033.
- WANG Zhouli, WU Xiaohong, YUE Tianli, et al. Application of ultra-filtration technology in cider clarification [J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2014, 45(1):209-213. (in Chinese)
- 8 李旭, 邓俊琳, 申世安, 等. 油茶籽粕分离蛋白及其超滤组分的功能特性研究[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(10):37-42.
- LI Xu, DENG Junlin, SHEN Shian, et al. Functional properties of *Camellia oleifera* seed cake separated protein and its ultrafiltration fractions[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2015, 30(10):37-42. (in Chinese)
- 9 YANG J, GUO J, YANG X Q, et al. A novel soy protein isolate prepared from soy protein concentrate using jet-cooking combined with enzyme-assisted ultra-filtration[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 143(143):25-32.
- 10 黄群, 马美湖, 黄茜, 等. 鸡蛋清卵白蛋白与溶菌酶的两步超滤法分离[J/OL]. 农业机械学报, 2012, 43(3):146-151. [http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view\\_abstract.aspx?file\\_no=20120327&flag=1](http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20120327&flag=1). DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2012.03.027.
- HUANG Qun, MA Meihu, HUANG Xi, et al. Separation of ovalbumin and lysozyme from chicken eggwhite using two-stage ultrafiltration technique[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(3):146-151. (in Chinese)
- 11 MOURA J M L N D, CAMPBELL K, MAHFUZ A, et al. Enzyme-assisted aqueous extraction of oil and protein from soybeans and cream de-emulsification[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2008, 85(10):985-995.
- 12 李琳琳, 金华丽, 崔彬彬, 等. 基于近红外透射光谱的大豆蛋白质和粗脂肪含量快速检测[J]. 粮食与油脂, 2014(12):57-60.
- LI Linlin, JIN Huali, CUI Binbin, et al. Rapid determination of soybean protein and crude fat content by near-infrared transmittance spectroscopy[J]. Journal of Cereals and Oils, 2014(12):57-60. (in Chinese)
- 13 NIU F, DONG Y, SHEN Fei, et al. Phase separation behavior and structural analysis of ovalbumin-gum arabic complex coacervation[J]. Food Hydrocolloids, 2015, 43:1-7.
- 14 LIU A, YIN S, LI L. Structure, trypsin inhibitor activity and functional properties of germinated soybean protein isolate[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2014, 49(3):911-919.
- 15 GHRIBI A M, GAFSI I M, SILA A, et al. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate[J]. Food Chemistry, 2015, 187:322-330.
- 16 DOMBROWSKI J, DECHAU J, KULOZIK U. Multiscale approach to characterize bulk, surface and foaming behavior of casein micelles as a function of alkalisation[J]. Food Hydrocolloids, 2016, 57:92-102.
- 17 LIENERI E. Implications of antinutritional components in soybean foods[J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 1994, 34(1):31-67.
- 18 杨道强, 邢建荣, 陆胜民. 大豆不同前处理方式对豆浆品质的影响[J]. 食品科学, 2016(1):69-73.
- YANG Daoqiang, XING Jianrong, LU Shengmin. Effect of different soybean pretreatment methods on the quality of soy milk[J]. Food Science, 2016(1):69-73. (in Chinese)
- 19 OSMAN A, GRINGER N, SVENDSEN T, et al. Quantification of biomolecules in herring (*Clupea harengus*) industry processing waters and their recovery using electroflocculation and ultrafiltration[J]. Food & Bioproducts Processing, 2015, 96:198-210.
- 20 陈全胜, 赵杰文, 岳鹏翔. 中空纤维超滤膜分离菜籽饼粕中蛋白质的试验[J]. 农业机械学报, 2006, 37(8):1-4.
- CHEN Quansheng, ZHAO Jiewen, YUE Pengxiang. Study on application of hollow fiber ultrafilter in separating protein from rapeseed meal[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2006, 37(8):1-4. (in Chinese)
- 21 陈婷, 余群力, 赵莉, 等. 超滤膜分离技术回收乳清蛋白工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010(4):226-228.
- CHEN Ting, YU Qunli, ZHAO Li, et al. Study on the technology of ultrafiltration membrane separation in recycling of whey protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010(4):226-228. (in Chinese)
- 22 CAMPBELL K A, GLATZ C E, JOHNSON L A, et al. Advances in aqueous extraction processing of soybeans[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2011, 88(4):449-465.
- 23 MOURA J M L N D, CAMPBELL K, ALMEIDA N M D, et al. Protein extraction and membrane recovery in enzyme-assisted aqueous extraction processing of soybeans[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2011, 88(6):877-889.
- 24 MOLEK J, RUANJAIKAEN K, ZYDNEY A L. Effect of electrostatic interactions on transmission of PEGylated proteins through charged ultrafiltration membranes[J]. Journal of Membrane Science, 2010, 353(1):60-69.
- 25 DE ALMEIDA N M, DE MOURA BELL J M L N, JOHNSON L A. Properties of soy protein produced by countercurrent, two-stage, enzyme-assisted aqueous extraction[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2014, 91(6):1077-1085.