分类号： 密 级：非密级

学 号：2012306005 单位代码：10759

**石河子大学**

**硕** 士 学 位 论 文

赤霞珠葡萄籽蛋白质提取工艺研究

|  |  |
| --- | --- |
| 学 位 申 请 人 | **吴芳** |
| 指 导 教 师 | **李开雄** **教授** |
| 申 请 学 位 类 别 | **农业推广硕士** |
| 专 业 名 称 | **食品加工与安全** |
| 研 究 领 域 | **农产品加工** |
| 所 在 学 院 | **食品学院** |

中国·新疆·石河子

2015 年 11 月

**Study on Extraction Technology of red pepper in Capsanthin**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

**Master of Agriculture**

**Processing and Storage of Agricultural Products**

**By**

**Wu Fang**

Dissertation Supervisor: Professor Li Kai-Xiong

November 2015

I

万方数据

II

摘要

在本次实验中，以新疆张裕葡萄酒业有限公司提供的赤霞珠葡萄籽为原材料，详细探讨了赤霞珠葡萄籽蛋白质的提取工艺参数、脱色技术条件及干燥工艺条件，以期为赤霞珠葡萄籽的深加工及综合利用提供具有一定意义的理论基础。实验内容及主要结果如下：

（1）利用单因素实验结合响应面法优化赤霞珠葡萄籽蛋白质的最佳提取工艺参数。实验利用碱液溶解、盐溶两种方法对赤霞珠葡萄籽蛋白质提取工艺进行探讨。实验表明，碱液溶解法提取赤霞珠葡萄籽蛋白质较优于盐溶法，经过实验条件的优化，当提取液的pH值、液料比、原料粉碎度、提取温度和提取时间分别为11.5、25:1、60目筛、37℃和60min时，赤霞珠葡萄籽蛋白质的提取率达到最高，为53.04%。

（2）本实验利用活性炭、大孔树脂及双氧水对提取的葡萄籽蛋白进行脱色，结果表明：①活性炭添加量为25%时，脱色率达到最大值，为55.43%，然而蛋白质损失率达到40%。；②大孔树脂X-5脱色效果较好，脱色率达到53.91%，但是蛋白质损失率高达23.85%；③双氧水最佳脱色工艺参数为：双氧水添加量、脱色温度和脱色时间分别为4%，25℃和60 min，通过色差计测定其△E为23.92，表明脱色效果较好。通过对三种脱色方法进行比较，双氧水脱色效果最好，因此确定双氧水为最佳的脱色剂。

（3）为了得到粉末状的葡萄籽蛋白质，实验采用喷雾干燥法对葡萄籽蛋白质提取液进行喷雾干燥。利用单因素及均匀设计实验结合优化喷雾干燥工艺条件，结果表明，进风流量、进风温度、进料流量和雾化压力分别设定为0.65 m3/min、180℃、400 mL/h和200 kPa，在此条件下，各项指标都达到较好的效果。其集粉率、PDI和含水量分别为45.43％、73.1％和1.03%。

关键词：赤霞珠葡萄籽；蛋白质提取；脱色；喷雾干燥

III

**Abstract**

In this experiment, we take Cabernet Sauvignon grape seeds which are provided by Xinjiang Changyu Grape Wine Limited Company as raw materials, and detailedly discuss extraction technological parameter, decoloration technical condition and drying process condition of Cabernet Sauvignon grape seeds, and expect to provide significant theoretical basis for further processing and comprehensive utilization of Cabernet Sauvignon grape seeds. Experimental content and main results as follow:

Utilize the combination of single factor experiment and response surface method to optimize extraction technological parameter of Cabernet Sauvignon grape seeds' protein. The experiment uses lye dissolution and salt dissolution to discuss the extraction process of Cabernet Sauvignon grape seeds' protein and shows when extracting Cabernet Sauvignon grape seeds' protein, the method of lye dissolution has an advantage over salt dissolution. Though optimizing experiment condition, when the extracting solution's PH reaches 11.5, ratio of liquor to material is 25:1, material grinding degree is 60 meshes, extraction

Temperature is 37℃and the extraction time reaches 60 minutes, the extraction ratio of

Cabernet Sauvignon grape seeds' protein can reach the highest that is 53.04%.

This experiment makes use of activated carbon, macroporous resin and hydrogen peroxide to decolor extractive grape seeds' protein. Its result shows: ①When the additive amount of activated carbon is 25%, decolorization ratio reaches the maximize of 55.43%, but the loss ratio of protein reaches 40%;②The decolorization effect of macroporous resin X-5 is much better, and its decolorization ratio reaches 53.91%, but the loss ratio of protein reaches up to 23.85%③The optimum decoloring technological parameter of hydrogen peroxide is: additive amount of hydrogen peroxide is 4%; decolorization temperature is 25℃;

Decolorization time is 60 minutes. Through comparing the three decolorization methods, hydrogen peroxide has the best decolorization effect, so it is optimal decolorizing agent.

In order to get powdered grape seeds' protein, the experiment adopts the spray-drying process to dry the extracting solution of grape seeds' protein. Use single factor and the combination of uniform design experimentation to optimize sprat-drying process condition. Its result shows that under those conditions where inlet air flow is set as 0.65 m3/min; the inlet

Air temperature is set as 180℃; the feedstock flow is set as 400 mL/h and atomizing pressure

Is set as 200 kPa, all indexes can reach the better effect. Its collection retention is 45.43%; PDI is 73.1% and the water content is 1.03%.

**Key words:** Cabernet Sauvignon; Grape seed; Protein extraction; Decolorization spray-drying

IV

目 录

[摘要](#_Toc686626535) 4

**[Abstract](#_Toc686626536)** 4

[第一章 绪论](#_Toc686626537) 7

[1.1 葡萄籽概述](#_Toc686626538) 7

[1.2 葡萄籽蛋白概述](#_Toc686626539) 7

[1.3 葡萄籽蛋白Th产工艺研究现状](#_Toc686626540) 7

[1.3.1 工艺流程](#_Toc686626541) 7

[1.3.2 葡萄籽蛋白的提取](#_Toc686626542) 7

[1.3.3 葡萄籽蛋白的纯化](#_Toc686626543) 8

[1.3.4 葡萄籽蛋白的检测](#_Toc686626544) 8

[1.3.5 葡萄籽蛋白的脱色](#_Toc686626545) 8

[1.3.6 葡萄籽蛋白的干燥](#_Toc686626546) 9

[1.4 课题的研究意义及研究内容](#_Toc686626547) 9

[1.4.1 课题的研究意义](#_Toc686626548) 9

[1.4.2 课题研究的内容](#_Toc686626549) 10

[1.4.3 技术路线](#_Toc686626550) 10

[第二章 响应面法优化赤霞珠葡萄籽蛋白提取工艺](#_Toc686626551) 10

[2.1 实验材料与试剂](#_Toc686626552) 10

[2.1.1 实验材料](#_Toc686626553) 10

[2.1.2 实验试剂与仪器](#_Toc686626554) 10

[2.2 实验方法](#_Toc686626555) 13

[2.2.1 样品处理](#_Toc686626556) 13

[2.2.2 蛋白质提取率测定方法](#_Toc686626557) 13

[2.2.3 不同粉碎粒度对蛋白质提取率的影响](#_Toc686626558) 13

[2.2.4 不同料液比对蛋白质提取率的影响](#_Toc686626559) 13

[2.2.5 不同浸提液pH值对蛋白质提取率的影响](#_Toc686626560) 14

[2.2.6 不同盐浓度对蛋白质提取率的影响](#_Toc686626561) 14

[2.2.7 不同提取温度对蛋白质提取率的影响](#_Toc686626562) 14

[2.2.8 不同提取时间对蛋白质提取率的影响](#_Toc686626563) 14

[2.2.9 盐溶法、碱溶法提取葡萄籽蛋白的响应面实验方法](#_Toc686626564) 14

[3.1 单因素实验结果分析](#_Toc686626565) 14

[3.1.1 原料粉碎粒度对葡萄籽中蛋白质提取率的影响](#_Toc686626566) 14

[3.1.2 液料比对葡萄籽中蛋白质提取率的影响](#_Toc686626567) 14

[3.1.3 盐浓度对葡萄籽中蛋白质提取率的影响](#_Toc686626568) 15

[3.1.4 不同pH值对葡萄籽蛋白质提取率的影响](#_Toc686626569) 16

[3.1.5 温度对葡萄籽中蛋白质提取率的影响](#_Toc686626570) 16

[3.1.6 提取时间对葡萄籽中蛋白质提取率的影响](#_Toc686626571) 17

[3.2 响应面法优化提取葡萄籽中蛋白质实验结果与分析](#_Toc686626572) 18

[3.2.1 盐溶法响应面试验设计及实验结果分析](#_Toc686626573) 18

[3.2.2 盐溶法响应面的交互作用及提取工艺优化](#_Toc686626574) 26

[3.2.3 碱溶法响应面试验设计及实验结果分析](#_Toc686626575) 27

[3.2.4 碱溶法响应面的交互作用及提取工艺优化](#_Toc686626576) 35

[3.2.5 响应面法优化工艺的验证](#_Toc686626577) 35

[第三章 赤霞珠葡萄籽蛋白提取液脱色工艺的研究](#_Toc686626578) 37

[3.1 实验材料与方法](#_Toc686626579) 37

[3.1.1 实验材料](#_Toc686626580) 37

[3.1.2 实验试剂与仪器](#_Toc686626581) 37

[3.1.3 实验方法](#_Toc686626582) 40

[3.2 葡萄籽蛋白脱色实验结果与分析](#_Toc686626583) 40

[3.2.1 葡萄籽蛋白提取液全波长扫描结果](#_Toc686626584) 40

[3.2.2 活性炭对葡萄籽蛋白提取液脱色效果分析](#_Toc686626585) 41

[3.2.3 大孔树脂对葡萄籽蛋白提取液脱色效果分析](#_Toc686626586) 41

[3.2.4 双氧水对葡萄籽蛋白脱色结果分析](#_Toc686626587) 43

[第四章 葡萄籽蛋白干粉的制备](#_Toc686626588) 46

[4.1 实验材料与试剂](#_Toc686626589) 46

[4.1.1 实验材料](#_Toc686626590) 46

[4.1.2 实验试剂与仪器](#_Toc686626591) 46

[4.2 实验方法](#_Toc686626592) 49

[4.2.1 葡萄籽蛋白等电点测定](#_Toc686626593) 49

[4.2.2 葡萄籽蛋白的酸沉及水洗](#_Toc686626594) 49

[4.2.3 葡萄籽蛋白粉的制备方法](#_Toc686626595) 49

[4.3 数据处理方法](#_Toc686626596) 50

[4.4 结果与分析](#_Toc686626597) 50

[4.4.1 葡萄籽蛋白等电点的确定](#_Toc686626598) 50

[4.4.2 葡萄籽蛋白提取液酸沉及水洗](#_Toc686626599) 50

[4.4.3 进风温度对干燥效果的影响](#_Toc686626600) 50

[4.4.4 进料流量对干燥效果的影响](#_Toc686626601) 51

[4.4.5 雾化压力对干燥效果的影响](#_Toc686626602) 52

[4.5.4 进风流量对干燥效果的影响](#_Toc686626603) 52

[4.5.5 均匀设计实验优化喷雾干燥工艺](#_Toc686626604) 53

[第五章 总结及创新点](#_Toc686626605) 57

[5.1 结论](#_Toc686626606) 57

[5.2 创新点](#_Toc686626607) 57

[第六章 研究展望](#_Toc686626608) 57

[参考文献](#_Toc686626609) 58

[作者简介](#_Toc686626610) 61

VI

# 第一章 绪论

葡萄经过酿制葡萄酒及提取天然多酚类物质后会产生大量的葡萄籽废弃物，此外，葡萄籽经过榨油后也会产生更多的废弃残渣，然而这些经过深加工残留的葡萄籽含有丰富的蛋白质资源，若对其进一步开发利用，则会带来良好的社会经济效益，同时也具有一定的环保效益。

本实验主要以酿制葡萄酒后的副产物葡萄籽作为实验原材料，详细的分析探讨葡萄籽蛋白质分离提取工艺参数、脱色技术工艺以及制备蛋白质粉进行的喷雾干燥工艺技术。利用单因素及响应面分析法及均匀设计实验对各个环节的工艺条件技术进行详细优化，以确定最佳的工艺参数。以期为将来的赤霞珠葡萄籽的再次加工利用提供一套理论技术依据，从而提高葡萄的再次利用价值，增加农民的经济收入，提升当地的社会经济效益。

## 1.1 葡萄籽概述

葡萄籽主要是生产葡萄酒后的副产物，目前世界每年有上百万吨的葡萄籽产生。将葡萄籽加以合理利用，即可以避免环境污染，又可以增加葡萄酒行业的附加值，提高经济效益[1]。在中国，尤其是在新疆这块儿肥沃的土地上，具有独特的地理条件和迥异的气候环境，使得这里拥有多种葡萄品种，而且产量非常巨大。据有关文献记载，2012年，全国种植的葡萄其年产量约为627万t，其中有80%的葡萄用来酿制葡萄酒[2]，因此，随之产生的大量的加工副产物葡萄籽，利用率最大的就是将其进行再加工成饲料而出售，经济效益低，从而造成极大的资源浪费。新疆维吾尔族自治区是我国重要的葡萄种植区，随着新疆经济的发展，葡萄酒产业得到长足发展，从而产生了大量而丰富的葡萄籽资源[3]。

提取油脂或花青素后被丢弃的葡萄籽中仍然具有丰富的营养价值，如多酚物质、脂质体、拥有人体可以利用的蛋白质及矿物质资源等。另外，葡萄籽中很多酚类抗氧化物质[4]；此外还含有丰富的不饱和脂肪酸[5-6]；10%左右为粗蛋白[7]，因此，综上研究记录说明，葡萄籽的再开发利用具有很大的上升空间。目前，多数国内外研究学者都将葡萄籽的开发重点放在了花青素和葡萄籽油上，关于葡萄籽蛋白的开发鲜有报导[8]。如果能够将葡萄籽资源充分利用，既节约了资源，又增加了农民收入。不但可以带动当地社会经济的发展，而且能够提升当地农民的经济的收入。

## 1.2 葡萄籽蛋白概述

蛋白质是一种具有两性的物质，带有羧基和氨基。科学研究表明，葡萄籽蛋白质的等电点p值为3.8，分子量分布在40000～70000Da之间[9]，氨基酸种类有18种，人体必需氨基酸有7种。实验研究发现，葡萄中所含的所有氨基酸含量均高于居民膳食营养

1

素参考摄入量的建议服用量[10-11]，且缬氨酸、精氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸含量可比肩大豆蛋白，十分适合运用于强化食品、保健药品等的生产[12]。此外，其中的谷氨酸含量高于大豆中所含谷氨酸含量，为19.62%。可作为味精的生产原料[13]。有研究表明，葡萄籽蛋白提取物能诱导白血病细胞凋亡[14]，葡萄籽粗品糖蛋白可增强人体免疫能力[15]。通过控制葡萄籽蛋白的水解度，可以获得具有生物活性且易被人体吸收的多肽，具有许多独特的生理功能，在国外，它已用于保健食品或调味品的开发[16]。

## 1.3 葡萄籽蛋白Th产工艺研究现状

### 1.3.1 工艺流程

葡萄籽→清理→烘干处理→粉碎→脱脂处理→分离提取蛋白质→离心过滤→上清液→调等电点→离心去除上清液→沉淀→蒸馏水进行冲洗→调节pH值至中性→喷雾干燥→葡萄籽蛋白→包装

将葡萄籽在一定温度下置于烘箱中进行烘干处理，再用小型中药粉碎机进行粉碎，过一定目数的筛子，利用石油醚或乙醚进行脱脂处理，按照试验设定的条件进行分离提取其中的蛋白质，经离心过滤后所得的上清液利用酸沉发进行等电点沉淀，离心去除上清液，沉淀利用蒸馏水进行冲洗，再用酸或碱调节pH值至中性，然后进行喷雾干燥得到葡萄籽蛋白。

### 1.3.2 葡萄籽蛋白的提取

#### 1.3.2.1 碱溶法

在碱性条件下，支撑植物体紧密结构组织会物理性的破坏，使其结构变得松散，尤其是对植物蛋白质而言，能够使其空间结构重新排布，从而使其变得更加松散，还会造成氢键的断裂，从而让蛋白质的表面附着的极性基团发生解离现象，进而使得蛋白质较容易的溶解于碱液中，增加其溶解度，提高蛋白质的提取效率[17]。碱液提取蛋白质具有一定的优势，也有其一定的缺点。优点在于其工艺操作较为简单，提取成本不是很高；而缺点在于，高浓度的碱性溶液会造成蛋白质不可逆性的变性，此外，一些非目的蛋白或其他杂质也会增加溶解速率，从而影响蛋白质提取的纯度。更重要的是，浓度过高的碱性溶液会极大程度地摧毁蛋白质氨基酸的结构，从而造成有毒、有害物质产生[18]，因此，在某种程度上破坏了葡萄籽蛋白质原有的营养价值。

将葡萄籽进行脱脂处理后，在特定的提取温度条件下，置于盛有一定浓度的碱性溶液中一段时间，利用高速冷冻离心机进行离心分离，弃去沉淀留下上层清液，即为葡萄籽蛋白粗提取液。夏辉等[19-20]通过利用碱液溶解法分离提取葡萄籽蛋白，实验结果表明，

NaOH浓度、料液比、提取温度和提取时间分别为0.1 mol/L、1:25、40℃和35 min时，蛋白质提取率达到最高，为70.60%。同时得出影响最显著的因素是碱液浓度，其余三个因素影响次之。赵毅敏等[21]采用同样的方法，实验结果表明，葡萄籽粉碎后过40 目

2

筛，浸提液的pH值为10.0，料液比为1: 10，提取温度为55℃，提取时间为45 min的条件下提取率达到最高，为67.14 %。然而，赵等考虑到生产成本及工业化生产的可操作性，将浸提液的pH值调整为9.0，料液比为1: 10，提取温度设置为50℃，提取时间设定为45 min，在上述条件下提取率为62.91％。李凤英等[22]同样采用碱溶法得出最佳工艺为NaOH溶液的浓度为1×10 -5 mol/L，料液比为1: 15，提取温度为40℃、浸提时

间为40 min，在上述条件下，葡萄籽蛋白水解液浓度为6.2 g/L，蛋白质提取率为60.8%。

叶润等[23]采用碱法提取葡萄籽蛋白，在碱浓度0.15 mol/L，料液比、温度及时间分别为1: 25，35℃，30 min时提取率为84.4%。

#### 1.3.2.2 盐溶法

蛋白质的内部和外部都分布有不同程度地疏水基团，这些疏水基团与水分子的相互作用很容易受到盐浓度的不同程度地影响。盐（NaCl）溶液的浓度较低时，疏水基团与水分子相结合，使得溶液中的有效水量减少，从而增加了盐溶液的浓度，使其溶解度上升；盐浓度在较高时，围绕在疏水基团周围的水分子变得越来越少，那么蛋白质与蛋白质开始结合发生凝聚效应，凝聚到一定程度形成沉淀而沉降下来[24]。此外，利用盐溶液提取蛋白质具有很多优点，不仅操作步骤简单易行，整个反应体系较为温和，这样对蛋白质固有的天然的功能特性具有一定的保护性。

葡萄籽经过一定前处理后与一定浓度的盐溶液进行混合，在预先实验设定好的提取温度下进行分离提取蛋白质，然后于高速冷冻离心机进行离心分离，弃去沉淀留下上层清液，即为葡萄籽粗蛋白提取液。邹圣冬等人[25]采用盐溶法提取脱脂葡萄籽中的蛋白，实验结果发现，最佳的葡萄籽蛋白质提取工艺参数为，盐浓度10%，固液比1: 25，温度40℃，时间40 min，提取率为57.25%。

#### 1.3.2.3 酶法

通过蛋白质酶的专一性特性，将固定在植物组织或动物组织中的特定蛋白质进行酶解，水解成多肽片段从而增加其溶解性，使其更容易溶出。利用酶法提取同样具有很多优点，比如整个反应体系条件温和，而且由于酶的专一性，直接作用于其专一位点，不会产生太多的副反应，从而产生其他杂质，对蛋白质组成的氨基酸破坏程度极小，而且环保，有利于修缮或修饰特性蛋白质的固有特性[26]。

葡萄籽经过脱脂处理后，按照试验预设的比例添加PBS（磷酸）缓冲液与葡萄籽原料混合，加热至提取温度，尽量避免酶失活，然后向水解液中添加一定比例的蛋白酶，水解一定时间后，在高速冷冻离心机中进行离心分离，弃去沉淀，留下上层清液，即为葡萄籽粗蛋白提取液。酶法提取蛋白质具有节省时间，反应体系条件较为温和，不会产生有毒、有害物质等，而且提取效果较好，唯一缺点，成本较高。值得注意的一点是，反应时间一结束就应该马上进行灭酶操作，如果处理不及时，则会使得蛋白质水解过渡

3

而产生过多的氨基酸。仵昱舟等[27]人借助木瓜蛋白酶对葡萄籽进行酶法提取蛋白，实验结果发现，提取率高达94%。吴炳云等人[28]经过实验研究发现，采用蛋白酶法提取葡萄籽蛋白，其最优工艺参数为为：温度40℃，料液比1: 20，pH值7.0，时间40 min，木瓜蛋白酶添加量0.8000 g。

#### 1.3.2.4 酶辅助提取法

首先利用复合酶对葡萄籽前处理一段时间，破坏植物细胞壁中的纤维素，然后再通过一定浓度碱溶液进行分离提取，经过复合酶处理葡萄籽有利于较多蛋白质的溶出。此外，复合酶处理后的葡萄籽，不要太高浓度的碱溶液就可以很容易的将其中更多的蛋白质溶解于水解液中，随之其提取率也会增加。叶润等人[23]通过采用上述方法，酶法辅助结合碱液提取，实验结果表明，提取葡萄籽蛋白的最优工艺参数为：加酶量70 mL/100g，

pH 3.7，温度30℃，时间1.5 h。利用该方法的最大优点在于半纤维素酶的用量较少，提取的蛋白质的纯度较高，可以有效的增加蛋白质的提取率，其提取率为84.6%。

### 1.3.3 葡萄籽蛋白的纯化

#### 1.3.3.1 酸沉法

在碱性环境中，绝大多数的蛋白质都有利于溶于水解液当中。通过调节pH值来改变水解液的碱浓度，因OH—离子的作用，会使得分布在蛋白质外层的电子发生相应的变化，从而改变蛋白质溶解度的高低。又因为蛋白质是两性物质，因此每一种蛋白质都具有特定的等电点，在等电点附近，蛋白质的溶解度最低，此时蛋白质开始凝聚结块而形成沉淀，析出在溶液中[18]。所以可以利用蛋白质的这一特性来达到纯化的目的。酸沉法

[29]的原理是：几乎所有的蛋白质的等电点都处于pH值5左右，也就是在酸性范围内，因此可以利用这一条件，将葡萄籽加入碱性溶液中，蛋白质会尽可能溶解于水解液中，所以通常先采用碱液进行溶解，然后再利用酸性溶液调节至其等电点进行沉淀来提取纯化蛋白质，该方法被简称为碱溶酸沉法。此方法对于蛋白质提取具有较高的效率，经常用于植物蛋白质的分离提取纯化，而且同时也应用在工业化生产中。

#### 1.3.3.2 膜分离法

膜分离技术：该技术主要是利用不同渗透压产生于膜两边，在半透膜的性质作用下形成分子筛效应，将气体或液体分离并富集。膜分离技术可以分为多种类型，半透膜的孔径和大小的选择直接关系到实验的成功与失败。根据蛋白质的大小要合理选择膜的大小和种类。

膜分离大致可以分为以下几种类型：微滤膜分离、超滤膜分离、纳滤膜分离和反渗透膜分离等。在蛋白质分离纯化过程中，超滤膜是众多科学家最常用的一种选择，利用

4

超滤膜[30]进行分离，可以根据超滤膜孔径的大小很容易的分离得到想要的目的物，如小分子的糖类、醇类等。正因为膜分离技术在分离纯化天然产物上具有独特的优势，因此广泛应用于科学研究上。它具有纯化效率高[31]，操作简便，节省能源，成本较低，对环境的破坏极小，因此，现在在食品领域、化工领域和医药领域应用非常广泛。张喜峰等人[32]采用孔径100 nm的陶瓷复合膜分离设备超滤葡萄籽蛋白提取液，将葡萄籽蛋白质浓缩，经过正交试验优化，得出最佳工艺参数为：操作压力为0.1 MPa，料液比为1: 120，

pH值为8.0。在最优技术参数下，蛋白质回收率88.54%，膜污染率6.98%，浓缩效率

331.07 L/m2\*h，膜通量350 L/m2\*h。

### 1.3.4 葡萄籽蛋白的检测

在蛋白质提取过程中，现代常用的定量检测蛋白质的方法有有凯氏定氮法、紫外吸收法、双缩脲试剂法、福林酚试剂法及考马斯亮蓝G-250法等[33-34]。其中较为经典且准确的定量蛋白质含量的测定方法优选凯氏定氮法，主要是依据含氮量来换算蛋白质的含量。凯氏定氮法操作起来相对简单容易，科研实验中广泛应用之。然而其最大的缺点就是花费时间较长。如果想要快速的定量蛋白质含量，则在实验过程中通常选用双缩脲法。主要是利用其于蛋白质会发生较为明显的颜色反应，而且在特定波长下具有较强的吸收峰，利用这一特性，我们可以快速且较为准确的测定蛋白质含量。使用双缩脲试剂法具有较好的重复性，而且其线性回归模型拟合较好，其不足之处是灵敏度较低，检测蛋白质含量有一定范围受限，具有一定的局限性。福林酚试剂法是对双缩脲试剂的一种改进，使其颜色反应较为剧烈，从而进一步增加其灵敏度。然而福林酚试剂法测定蛋白质含量要严格要求反应时间，而且反应时间较长。除此之外，该方法所绘制的标准曲线并非成线性的，缺乏专一性，因此干扰因素较多。因此，福林酚试剂法测定蛋白质含量，其局限性很大。就目前科研实验过程中，蛋白质定量使用最多且最为广泛的就属考马斯亮蓝G-250法。其具有操作简单易行，耗费时间较短，且具有较为准确的测量值，而且样品使用量较少，参与反应物质较少，因此受其他物质干扰较小，颜色反应较为稳定。但是，也有一定的缺点，就是不同种类、不同性质的目的蛋白反应后呈现的颜色深浅不一，变化较大，而且其标准曲线线性回归拟合程度不够好。综上所述，虽然在定量检测蛋白质过程中可供选择的方法很多，但是都具有一定的局限性。因此，具体情况具体分析，不同蛋白质提取实验应合理的选用定量检测方法，以将实验误差降到最低。

最常采用检测葡萄籽蛋白的方法是凯氏定氮法，尤其用作测定葡萄籽中粗白质含量最为合适。而蛋白提取液中的蛋白含量则可以考虑采用考马斯亮蓝法。

### 1.3.5 葡萄籽蛋白的脱色

植物中色素[35]主要种类有叶绿素、类胡萝卜素、黄酮类以及其他酚类。而在众多的色素中各自都有自己独特的性质，因此，可以根据其溶解性的难易程度进行分类，能够溶于水的色素称之为水溶性色素，能够溶于油脂中称之为脂溶性色素，既不溶于水又不溶于油脂的称之为其他种类。能够溶于水的色素也可以溶于乙醇中，但是不溶于乙醚、

5

氯仿等有机溶剂中。能够与脂质互溶的色素则极易溶于乙醇但是绝不溶于水。因此，在葡萄籽进行脱脂处理时，通常会带着其脂溶性色素也部分除去，但水溶性的色素则会留在提取液中。

尽管科学技术不断进步，但是，目前蛋白质的提取方法仍然存在一定的局限性，而且往往植物组织中组成成分十分复杂，因此得到的粗蛋白提取液其色泽不太容易让人迅速接受，因此导致其推广应用受到一定局限性。由此可见，蛋白质提取过程中，优化脱色工艺技术参数显得尤为重要。科学研究表明，较为成熟的脱色技术为多糖脱色，然而蛋白质提取液的脱色技术工艺研究相对。在脱色过程中，我们通常采用化学法和物理法，其中物理法[36]常利用活性炭或者是大孔树脂吸附法；化学法[37]则多采用双氧水法等。

#### 1.3.5.1 活性炭吸附脱色法

活性炭，呈现黑色的粉末状，一般以颗粒状态存在于自然界，没有其他异味儿更没有臭味存在。因为活性炭的孔径较大，所以其比表面积很大、具有很强的吸附能力，一般情况下，在一定温度下其理化性质较为稳定。活性炭在水中的溶解度极差，也很难溶于其他溶剂中，因此在去除异味过程中成为了首要选择的一种物质。现在，活性炭在自来水净化中早有应用[38]，同时，活性炭还可以用于气体净化，如空气净化，在食品生产行业中，各种液体饮料等产品也用活性炭进行脱臭脱色等[39]。杨云[40]等在研究中对活性炭有这样的认识：在使用活性炭进行脱臭脱色时，不需要剧烈的反应条件，也就是整个反应体系温和，取得实验效果较好，而且还可以再生重复利用，耗费成本低廉，而且没有有毒物质产生，非常适用于工业化生产，环保高效。

#### 1.3.5.2 大孔树脂吸附脱色法

大孔树脂属于非离子型共聚物[41]。根据极性强弱，可以将大孔树脂划分为非极性、弱极性和极性三种类型。大孔树脂的吸附性也比较强，同样也是因为其孔径，微观的网状结构较大较多，从而形成较大的比表面积。这就造就了大孔树脂吸附能力较强，吸附量也很大。大孔树脂具有较稳定的的理化性质，正是因为大孔树脂具有较强的稳定性，所以在液体中也会稳定存在，不会发生任何化学或物理变化，同样在气体中也能够稳定存在。另一方面，大孔树脂还可以再生从而进行重复利用，利用率高，重复性好，因此在科学研究中应用非常广泛。如今，绝大多数天然或合成色素的分离提取纯化技术以及有效中药成分的分离纯化都在广泛使用大孔树脂进行脱色[42-45]。而且，在葡萄籽蛋白质提取液的脱色技术工艺也有类似应用[46]。

#### 1.3.5.3 双氧水脱色法

双氧水的氢键极不稳定，非常容易断裂，再加上其自身含有的过氧键一旦断裂，就

6

会产生一种叫做过氧自由基的物质，该物质具有很强的夺走电子的能力。绝大部分带有颜色较深的物质，一旦遇到双氧水则会立刻发生氧化反应，结果就会使其原有的颜色褪去，而且不会再还原。不管色素是单体还是混合物，还是通过某些化学键与蛋白质相结合，双氧水都有能力将其氧化脱色而且不会被还原。双氧水在水的电离作用下会生成HO2-离子，它的主要作用的化学键是物质中的不饱和共轭键，使得有机物上的发色基团遭到不可逆的破坏，从而达到高效脱色的目的。在碱性环境中，双氧水的脱色作用会受到不同程度地电离度的影响[39]。

### 1.3.6 葡萄籽蛋白的干燥

#### 1.3.6.1 热风干燥法

热风干燥是一种常用的干燥液体的方法，其主要工作原理是通过干燥介质将更多的热量输送到要干燥的液体的表层，使得其中的水分在受热的情况下尽可能多的扩散到空气中，通过逐渐不断的扩散，内部水分会也会通过扩散逐渐传递到空气中，这样逐渐形成循环过程，液体中的水分就会逐步一层一层的扩散到外界中从而达到干燥的目的。该方法主要优点在于操作起来较为容易且简单，花费成本较低，但是用于蛋白溶液干燥时候，要考虑到其温度较高，且暴露于空气中，很容受热变性且容易受空气中的氧气氧化，从而导致蛋白质发生颜色变化及性质改变等，因此在干燥蛋白质提取液时要谨慎选用此方法。

曹环等[47]通过借助热风干燥技术对虾水解后所得的蛋白质提取液进行干燥制粉，此外，他还对热风干燥中选择的干燥助剂、热风干燥温度以及材料厚度等因素对干燥后制成蛋白粉质量的影响进行详细探讨。最后经过技术工艺参数的优化，得到最佳热风干燥工艺为：温度90℃，干燥助剂添加量1.5: 1，物料厚度为0.6 cm，得出的蛋白粉含量为2.75%，氨基酸态氮含量为3.61%。

#### 1.3.6.2 冷冻干燥法

真空冷冻干燥是干燥液料最好用的一种方法，该方法不会破坏物料本身固有理化性质，特别是一些天然的营养物质，更不会破坏其中有效成分的变化，在极大程度上保持物料原有的性质。该方法主要是利用在温度和压力极低的情况下使水结冰后直接升华到气态，从而达到去除水分、干燥物料的目的。样本在干燥会形成较多的孔，但是对营养成分几乎没有什么影响，而且还可以迅速的重新溶解于水中，因此，目前科研试验中采用的干燥方法一般都是用冷冻干燥法[48]。

#### 1.3.6.3 喷雾干燥法

喷雾干燥：其主要原理就是将液体经过高压状态下瞬间喷射出来而形成雾状的小小

7

的液滴，然后经过一定温度的热空气将其中液滴的水分去除而达到干燥的目的。液体的状态一般根据溶质的分散状态分为溶液、乳浊液、悬浮液，也可是熔融液或膏状物。喷雾干燥的优点在于效率高，目的蛋白质几乎是在瞬时受热，受温度影响较小，可极大程度地减小蛋白质性质变化的程度，而且经过喷雾干燥后得到产品其复水性较好、固有的颜色保持较好和原有的风味几乎没有太大的变化。此外，在整个喷雾干燥过程中除了压力和温度外，几乎没有其他因素影响目的物的性质，而且操作环境较为封闭，因此蛋白质营养成分几乎没有损失，能够保证原有的营养价值，因此，该方法已经广泛应用于工业化大生产中[49]。

#### 1.3.6.4 新型喷雾干燥法的研究与进展

喷雾冷冻干燥：主要工作原理是将喷雾干燥与冷冻干燥相结合，将两者的优点发挥至最高。这两种方法的结合不但能够大大缩短操作时间还可以尽可能的保持原有产品的品质。现在，主要通过利用液态氮制冷时水迅速结冰然后运用真空冷冻干燥技术来达到实验预设的效果。Sooner等[50]和Leuenberger等[51]对上述方法进行详细的分析研究，实验结果发现此方法简单可行，效率较高。然而，对此方法在工业化大生产进行推广应用还面临一定的困难。黄立新等[52]研发出的新式喷雾冷冻干燥设备解决了这个问题。该装备选择冷冻除湿脱水直到得到冷湿空气，配合特别的雾化装置，实现持续制冰和干燥。

超临界喷雾干燥结合了超临界流体技术和喷雾干燥。在西方国家，对该技术已经进行了较大量的分析研究，但是在我国目前报导该方法的研究及应用还相对较少。Michael Wiggenhorn等[53]研究了较多的干燥技术，其中包括超临界喷雾干燥技术和亚临界喷雾干燥技术。

综上所述，关于料液的干燥技术，研究最为先进广泛应属喷雾干燥技术和新型喷雾干燥技术。如今而言，在生产加工蛋白质粉过程中，应用技术较为成熟还是喷雾干燥。

## 1.4 课题的研究意义及研究内容

### 1.4.1 课题的研究意义

进入21世纪以来，就葡萄籽等一些加工副产物的再利用而言，同时面临社会，科技，经济，工业等的快速发展，寻求发现或探索原料利用率最大化成为世界关注的主题，废物利用更是目前研究的热点话题。针对葡萄籽废弃物的再利用主要集中在炼油和提取具有一定保健功效的多酚类物质，然而关于葡萄籽蛋白质的提取纯化及其相关产品的研究鲜有报道。

新疆张裕葡萄酒业有限公司坐落于石河子开发区，其每年榨酒季节会产生大量的赤霞珠葡萄籽，为了更好的利用这些加工副产物产生更多的经济效益和社会效益，本实验拟以其葡萄籽并且进行脱脂处理后作为实验原材料，对其中富含的蛋白质进行提取纯化、并且对蛋白质提取液进行脱色处理后继续结合干燥工艺技术制成蛋白质粉，以期能

8

够为今后葡萄产业的深加工发展提供一套有力的数据基础。实验将通过单因素结合响应面设计或均匀设计对葡萄籽蛋白质的提取工艺参数优化进行详细的分析探讨以便确定其最优工艺参数。

### 1.4.2 课题研究的内容

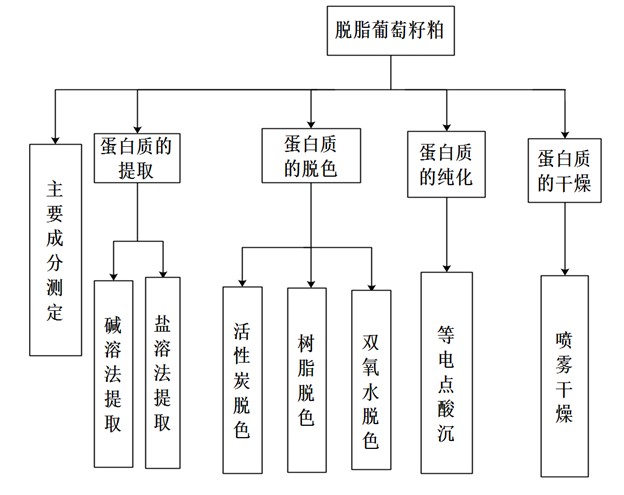
本实验的主要研究内容为葡萄籽蛋白质的提取、纯化，具体实验内容如下：

（1）葡萄籽蛋白提取：利用两种方法对葡萄籽蛋白质进行提取，一种是盐溶法、另一种是碱溶法。实验将利用单因素先初步确定各因素的较好水平，然后再利用响应面分析法对各个因素进行详细的优化，以期得到最佳的提取蛋白质的工艺参数。

（2）蛋白水解液的脱色：实验将利用活性炭、大孔树脂和双氧水等等各种脱色方式对葡萄籽蛋白脱色效果的优劣，选择简单高效的葡萄籽蛋白脱色方式，找出最佳脱色方法及条件。

（3）葡萄籽蛋白粉的制备：以喷雾干燥法制备葡萄籽蛋白粉，通过单因素实验和采用均匀设计实验，得出喷雾干燥的最佳工艺参数。

### 1.4.3 技术路线



9

# 第二章 响应面法优化赤霞珠葡萄籽蛋白提取工艺

赤霞珠葡萄主要用于酿酒，近年来，随着工业的快速发展，葡萄酒发展更是迅速，在其酿制过程中，近30%的葡萄皮渣、葡萄籽等副产物被丢弃，多数生产厂家或企业会选择将其廉价出售给制作饲料的企业，或可以用来当做染料。如此长期以来，会最大程度地对自然环境造成严重的污染、破坏，另一方面，葡萄籽中含有丰富的蛋白质资源，直接被丢弃更是一种可利用资源的浪费。然而，如果借助现代科学技术手段将其重新加工利用，那么既可以将企业成本降至最低，同时避免了废弃物对环境的污染[54-55]。

近年来，葡萄籽的深度加工深受全世界的研究学者的青睐，然而他们所研究的主要内容是从葡萄籽中压榨食用油，提取抗衰老、抗氧化等天然产物，对其蛋白质的分离提取鲜有报导。为了将其加工副产物利用率达到最大化，本章对新疆石河子本地的赤霞珠葡萄籽蛋白质的分离、提取进行了详细的探讨。

## 2.1 实验材料与试剂

### 2.1.1 实验材料

实验原料：赤霞珠脱脂葡萄籽，新疆张裕天珠葡萄酒业有限公司提供。

### 2.1.2 实验试剂与仪器

实验所需试剂与仪器如表2-1、表2-2所示。

**表2-1** **实验试剂**

| 试剂名称 | 纯度 | 生产厂家 |
| --- | --- | --- |
| 牛血清白蛋白 | - | 上海江莱生物科技有限公司 |
| 正己烷 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 氢氧化钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 硫酸铜 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 硫酸钾 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 硼酸 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 氯化钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 磷酸氢二钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 磷酸二氢钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 考马斯亮蓝 G-250 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 95%乙醇 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 85%磷酸 | 分析纯 | 上海光华化学试剂厂 |
| 溴甲酚绿-甲基红 | 分析纯 | 汕头市西陇化工厂有限公司 |

10

表2-2 实验仪器

| 仪器名称 | 型号 | 生产厂家 |
| --- | --- | --- |
| 凯氏定氮仪 |  | 天津玻璃仪器厂 |
| 旋转蒸发仪 |  | 上海亚荣生化仪器厂 |
| 电子天平 | BS2000s | 德国赛多利斯公司 |
| 可见分光光度计 | 722s | 上海第三分析仪器厂 |
| 数显恒温水浴锅 | DK-8D | 金坛市医疗仪器厂 |
| 磁力搅拌器 | 79-1 | 江苏医疗仪器厂 |
| 台式高速冷冻离心机 | Thermo3X | 赛默飞世尔科技（中国）有限公司 |
| 普通型移液器 | 10ul、200ul、1000ul | 日本日立金属精密仪器公司 |
| 高速中药粉碎机 |  | 上海百丰粉碎食品机械有限公司 |
| 水流抽气机 | A-1000S | 上海爱朗仪器有限公司 |
| pH 计 | PHS-3C | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 数控超声波清洗器 | KQ-200VDE | 昆ft市超声仪器有限公司 |
| 消化炉 | KDN-08 | 上海昕瑞仪器仪表有限公司； |
| 玻璃层析柱 |  | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 数显恒流泵 | HL-2B | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 色度色差计 | I-400 | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 自动收集器 | BS2-100 | 上海精科实业有限公司 |
| 喷雾干燥机 | SD-1000 | 日本 Eyela 公司 |
| 高压均质机 | NS1001L | 意大利 Niro-Soavi |

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 样品处理

将赤霞珠葡萄籽置于高速粉碎机中进行粉碎，分别过20目，40目，60目，80目和

100目筛。用正己烷按1: 5的料液比进行脱脂，脱脂时间2 h，重复3次。

### 2.2.2 蛋白质提取率测定方法

赤霞珠葡萄籽总蛋白质含量依据国家标准（GB/T5009.5-2003）进行测定。浸提液蛋白质含量利用考马斯亮蓝法进行测定。

标准曲线绘制：准确称取0.1000 g牛血清白蛋白置于盛有50 mL蒸馏水的100 mL的烧杯中，然后转至100 mL的容量瓶中，配制成浓度为1μg/μL的标准蛋白溶液。分别吸取20、40、60、80、100μL置于试管中，最后以蒸馏水将其补足至1.0 mL，再用移液器移取5.0 mL的考马斯亮蓝G-250于试管中，充分混匀静置2 min。然后利用紫外分光光度计在波长为595 nm的条件下进行比色测定，以蒸馏水作为对照。横轴代表蛋白质量（μg），纵轴代表吸光值，以此绘制本次实验的标准曲线，其回归方程为：

*y=0.0055x+0.0015*，回归系数*R2*=0.9999.

样品蛋白质含量测定：吸取提取液0.1 mL，以蒸馏水将其补足至1.0 mL，再用移液

11

器移取5.0 mL的考马斯亮蓝G-250于试管中，充分混匀静置2 min。然后利用紫外分光光度计在波长为595 nm的条件下进行比色测定，以蒸馏水作为对照。每个处理重复三次，取平均值±标准偏差作为实验记录数据。



### 2.2.3 不同粉碎粒度对蛋白质提取率的影响

将料液比、浸提液pH值、盐浓度、浸提时间和浸提温度分别设定为20: 1、10.0、

8%、60 min和50 ℃，在上述条件下探讨不同粉碎程度（20目，40目，60目，80目和

100目筛）对葡萄籽蛋白质提取率的影响，从而确定最佳的粉碎粒径。

### 2.2.4 不同料液比对蛋白质提取率的影响

将粉碎粒径、浸提液pH值、盐浓度、浸提温度和浸提时间分别设定为60目、10.0、

8%、50℃和60 min，在上述条件下探讨不同料液比（10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1）对葡萄籽蛋白的提取率的影响，从而确定最佳料液比。

### 2.2.5 不同浸提液pH值对蛋白质提取率的影响

将粉碎粒径、料液比、盐浓度、浸提温度和浸提时间分别设定为60目、25: 1、8%、50℃和60min，在上述条件下探讨不同浸提液pH值对葡萄籽蛋白提取的影响，从而确定最佳的浸提液pH值。

### 2.2.6 不同盐浓度对蛋白质提取率的影响

将粉碎粒径、料液比、浸提液pH值、浸提温度和浸提时间分别设定为60目、25: 1、

11.0、50℃和60min，在上述条件下探讨不同盐浓度对葡萄籽蛋白提取的影响，从而确定最佳的盐浓度。

### 2.2.7 不同提取温度对蛋白质提取率的影响

将粉碎粒径、料液比、浸提液pH值、盐浓度和浸提时间分别设定为60目、25: 1、

11.0、10%和60min，在上述条件下探讨不同浸提温度对葡萄籽蛋白提取的影响，从而确定最佳的浸提温度。

### 2.2.8 不同提取时间对蛋白质提取率的影响

将粉碎粒径、料液比、浸提液pH值、盐浓度和浸提温度分别设定为60目、25: 1、

11.0、10%和40℃，在上述条件下探讨不同提取时间对葡萄籽蛋白提取的影响，从而确定最佳的提取时间。

### 2.2.9 盐溶法、碱溶法提取葡萄籽蛋白的响应面实验方法

在单因素实验的基础上，为了更好的得到最优提取工艺参数，本实验选用响应面分析软件辅助设计优化实验。将粉碎粒度固定在60目，选择液料比、盐浓度或浸提液pH

12

值、温度及时间四个因素设计响应面实验。对试验数据进行回归分析，得到回归模型；并对模型方差分析显著性检验，确定各因素对目标值的影响规律，分析因素间交互作用，绘制相关图线。

## 3.1 单因素实验结果分析

### 3.1.1 原料粉碎粒度对葡萄籽中蛋白质提取率的影响

控制其他反应条件在固定水平，分析探讨不同原料粉碎粒度对葡萄籽蛋白质提取率的影响，其实验结果如图2-1所示。

NaCl NaOH

**55**

**50**

**蛋白质提取率（%）**

**45**

**40**

**35**

**20目**40目 60目 80目 100目

**粒度**

**图2-1** **不同粒度对葡萄籽中蛋白提取率的影响**

**Fig 2-1 Different particle size on the effect of grape seed meal protein extraction rate**

由图2-1可知，赤霞珠葡萄籽蛋白质的提取率随着粉碎粒度的增加而呈现上升的趋

势，当粉碎粒度达到60目时，赤霞珠葡萄籽蛋白质提取率达到一个较高的水平，继续增加粉碎粒度，其提取率呈现出平缓趋势。此外，粉碎粒径越大越容易溶出其他杂质，这对后期纯化增加一定难度[56]。因此，粉碎粒度为60目最为合适。

### 3.1.2 液料比对葡萄籽中蛋白质提取率的影响

控制其他反应条件在固定水平，分析探讨不同液料比对葡萄籽蛋白质提取率的影响，其实验结果如图2-2所示。

NaCl

NaOH

58

56

54

52

**蛋白质提取率（%）**

50

48

46

44

42

40

38

36

5 10 15 20 25 30 35 40

**液料比（V/W）**

**图2-2** **不同液料比对葡萄籽中蛋白提取率的影响**

**Fig 2-2 Different liquid ratio on the effect of grape seed meal protein extraction rate**

由图2-2可以明显看出，随着液料比的增加，赤霞珠葡萄籽蛋白的提取率也在随之

13

不断的升高，当液料比增加至25: 1时，蛋白质提取率出现平缓未继续上升的趋势，继续增加液料比，反而出现下降的趋势。这可能是由于水分子之间的相互作用增强而造成葡萄籽蛋白溶出较为困难[57]。所以，本次单因素实验最佳液料比为25: 1(v/w)。

### 3.1.3 盐浓度对葡萄籽中蛋白质提取率的影响

控制其他反应条件在固定水平，分析探讨不同盐浓度对葡萄籽蛋白质提取率的影响，其实验结果如图2-3所示。

44

42

40

**蛋白质提取率（%）**

38

36

34

32

30

28

26

24

6 8 10 12 14 16

**浓度(%)**

**图2-3** **不同盐浓度对葡萄籽中蛋白质提取率的影响**

**Fig 2-3 Different salt concentration on the effect of grape seed meal protein extraction rate**

由图3-3得知，随着NaCl浓度的不断升高，赤霞珠葡萄籽蛋白质的提取率呈现出不断上升的趋势。当其浓度达到10%时，蛋白质提取率达到最高，继续增加NaCl浓度，其提取率呈现出近乎直线下降的趋势。这可能是因为高强度高浓度的离子溶液对蛋白质的溶解具有一定正效应，然而，离子浓度过高反而不利于其溶解[58]；另一方面，盐浓度过高提取出蛋白质，在后期酸沉过程中会析出大量的盐，这将会对进一步纯化蛋白质带来困难。所以，本次单因素实验选择10%的盐浓度作为最佳水平。

### 3.1.4 不同pH值对葡萄籽蛋白质提取率的影响

控制其他反应条件在固定水平，分析探讨不同pH值对葡萄籽蛋白质提取率的影响，其实验结果如图2-4所示。

60

58

56

54

52

**蛋白质提取率（%）**

50

48

46

44

42

40

38

36

34

32

30

28

26

8 9 10 11 12 13

**pH**

**图2-4** **不同pH值对葡萄籽中蛋白质提取率的影响**

**Fig 2-4 Different alkali concentration on the effect of grape seed meal protein extraction rate**

由图2-4可知，随着浸提液pH值的不断增加，赤霞珠葡萄籽蛋白质的提取率呈现出不断上升的趋势，当pH值增大至11.0时，其上升趋势较为平缓。在强碱溶液条件下，

14

对蛋白质提取有一定的促进作用，但是太强的碱性溶液会破坏蛋白质的固有结构导致其发生变性[59]并会伴有美拉德反应的进行、其自身组成氨基酸种类会发生相应变化，失去天然的营养利用价值[60-61]。综合考虑，本次试验中的最佳pH值为11.0。

### 3.1.5 温度对葡萄籽中蛋白质提取率的影响

控制其他反应条件在固定水平，分析探讨不同浸提温度对葡萄籽蛋白质提取率的影响，其实验结果如图2-5所示。

NaCl

NaOH

56

52

48

**蛋白质提取率（%）**

44

40

36

32

28

30 35 40 45 50

**温度（℃）**

**图2-5** **不同温度对葡萄籽中蛋白质提取率的影响**

**Fig 2-5 Different temperature on the effect of grape seed meal protein extraction rate**

由图2-5可知，葡萄籽蛋白质的提取率随着浸提温度的升高呈现出先上升后下降的趋势。当提取温度达到40℃时，不论是盐提取还是碱提取，二者的提取率都达到最高值。继续升温，则都出现不同程度的下降趋势。因此，升高温度有利于使结构排列紧密的蛋白质分子溶出，这可能是因为原先埋藏在蛋白质结构内部的非极性基团暴露，促进集聚和沉淀，提取率升高；温度过高，极易使得蛋白质受热过渡，破坏其空间结构从而使其变性，进而造成提取率下降[62]。因此，本实验选择40℃为最佳提取温度。

### 3.1.6 提取时间对葡萄籽中蛋白质提取率的影响

控制其他反应条件在固定水平，分析探讨不同提取时间对葡萄籽蛋白质提取率的影响，其实验结果如图2-6所示。

Nacl

NaOH

56

52

48

**蛋白质提取率（%）**

44

40

36

32

28

30 40 50 60 70 80 90

**时间（min）**

**图2-6** **不同提取时间对葡萄籽中蛋白质提取率的影响**

**Fig 2-6 Different extraction time on the effect of grape seed meal protein extraction rate**

由图2-6可知，随着提取时间的不断延长，赤霞珠葡萄籽蛋白提取率呈现出先上升

15

后下降的趋势，采用NaCl提葡萄籽蛋白质在在45 min提取率达到最大，而碱液提取法在60 min时出现最大值，继续延长提取时间，蛋白质提取率呈现出平缓的下降趋势，但是降幅基本无明显变化。这可能是因为蛋白溶解度已经达到饱和状态[63]。综上所述，盐溶法的最佳提取时间为45 min，碱溶法的最佳提取时间为60 min。

## 3.2 响应面法优化提取葡萄籽中蛋白质实验结果与分析

通过单因素实验的初步筛选，确定各因素较佳的水平，再利用响应面软件对各因素进行进一步的优化，以期得到最优蛋白质提取工艺条件参数。因此，本实验采用Design-Expert 8.0软件中Central Composite Design（CCD）模块进行响应面设计[64]。

### 3.2.1 盐溶法响应面试验设计及实验结果分析

**表2-3** **盐溶法因素水平编码表**

Table 2-3 Salt-soluble factor level coding table

|  |  |  | 因素 |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 编码 | A  浓度/(%) | B  温度/(℃) | C  时间/(min) | D  液料比/(v/w) |
| -1  0  1 | 8%  10%  12% | 35  40  45 | 30  45  60 | 20  25  30 |

**表2-4** **盐溶法响应面实验结果**

Table 3-2 The results of Salting method response surface

| 试验号 | A | B | C | D | Y 蛋白提取率/％ |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 0 | 1 | -1 | 0 | 31.09 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 45.29 |
| 3 | -1 | 0 | 1 | 0 | 44.88 |
| 4 | 0 | 0 | 1 | 1 | 41.76 |
| 5 | -1 | 0 | 0 | 1 | 44.55 |
| 6 | -1 | 1 | 0 | 0 | 32.79 |
| 7 | 0 | -1 | 0 | -1 | 40.11 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 46.41 |
| 9 | -1 | -1 | 0 | 0 | 40.71 |
| 10 | -1 | 0 | 0 | -1 | 44.56 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 46.29 |
| 12 | 0 | -1 | -1 | 0 | 38.41 |
| 13 | 0 | 1 | 1 | 0 | 30.65 |
| 14 | 0 | -1 | 0 | 1 | 35.27 |
| 15 | 0 | 1 | 0 | -1 | 28.86 |
| 16 | 1 | 0 | -1 | 0 | 39.18 |
| 17 | 1 | -1 | 0 | 0 | 36.18 |
| 18 | 1 | 1 | 0 | 0 | 30.09 |
| 19 | 0 | 0 | -1 | -1 | 41.09 |
| 20 | -1 | 0 | -1 | 0 | 44.42 |
| 21 | 0 | -1 | 1 | 0 | 41.32 |
| 22 | 1 | 0 | 0 | -1 | 40.68 |
| 23 | 1 | 0 | 1 | 0 | 39.54 |
| 24 | 0 | 0 | 1 | -1 | 43.77 |
| 25 | 0 | 1 | 0 | 1 | 29.88 |
| 26 | 0 | 0 | -1 | 1 | 39.36 |
| 27 | 1 | 0 | 0 | 1 | 41.31 |

16

对表2-4进行回归分析得到二次回归方程，建立的二次响应面回归方程如下：

Y=46.01-2.50A-3.97B+0.12C-0.15D-0.067AB+0.46AC-0.13AD-0.34BC+2.18BD-1.30 CD-1.99A2-10.21B2-0.91C2-1.95D2

对回归方程进行方差分析，结果见表2-5。

**表2-5** **盐溶法方差分析**

Table 3-3 Salt solution method of analysis of variance

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 模型 | 892.9159 | 14 | 63.77971 | 433.1614 | < 0.0001 | \*\* |
| A | 75.25021 | 1 | 75.25021 | 511.0636 | < 0.0001 | \*\* |
| B | 189.1308 | 1 | 189.1308 | 1284.4863 | < 0.0001 | \*\* |
| C | 0.185008 | 1 | 0.185008 | 1.2564885 | 0.2842 |  |
| D | 0.264033 | 1 | 0.264033 | 1.7931887 | 0.2054 |  |
| AB | 1.82E-02 | 1 | 1.82E-02 | 1.24E-01 | 0.7311 |  |
| AC | 0.837225 | 1 | 0.837225 | 5.686034 | 0.0345 | \* |
| AD | 6.50E-02 | 1 | 6.50E-02 | 4.42E-01 | 0.5189 |  |
| BC | 0.4761 | 1 | 0.4761 | 3.2334445 | 0.0973 |  |
| BD | 19.05323 | 1 | 19.05323 | 129.4004 | < 0.0001 | \*\* |
| CD | 6.7081 | 1 | 6.7081 | 45.55822 | < 0.0001 | \*\* |
| A2 | 21.02336 | 1 | 21.02336 | 142.7806 | < 0.0001 | \*\* |
| B2 | 556.4224 | 1 | 556.4224 | 3778.956 | < 0.0001 | \*\* |
| C2 | 4.372156 | 1 | 4.372156 | 29.6936 | 0.0001 | \*\* |
| D2 | 20.31468 | 1 | 20.31468 | 137.9676 | < 0.0001 | \*\* |
| 残差 | 1.766908 | 12 | 0.147242 |  |  |  |
| 失拟项 | 1.131908 | 10 | 0.113191 | 0.356507 | 0.8921 |  |
| 纯误差 | 0.635 | 2 | 3.18E-01 |  |  |  |
| 总误差 | 894.68 | 26 |  |  |  |  |

注：\*为显著（*P<0.05*）, \*\*为极显著（*P<0.01*）

由表2-5可知，响应面模型的*p<0.0001*，表明在本次实验中该模型极显著；又因为失拟项*p=0.8921> 0.05*，说明失拟模型不显著；说明实验选取的模型表现出高度的显著性。相关系数*R2=0.9980*，说明模型拟合程度良好，能够较准确地预测和分析实际情况；模型的校正系数*R2Adj=0.9957*，说明实验误差小，该模型与数据拟合度良好，可以用此模型分析和预测盐溶法葡萄籽蛋白提取的工艺结果。

### 3.2.2 盐溶法响应面的交互作用及提取工艺优化

由图2-7可知，随着提取时间的不断增加，葡萄籽蛋白质的提取率呈现出先上升后下降的趋势；固定提取时间于一定水平，当盐浓度不断增加时，其提取率也呈现出先上升后下降的趋势。从图中还可以看出盐浓度与提取时间两个因素之间的交互作用不是特别明显，从表2-5方差分析也可以得出PAB=0.7311＞0.05，因此二者的交互作用对葡萄

17

籽蛋白的提取没有显著性的影响。

由图2-8可知，随着提取液温度的不断增加，葡萄籽蛋白质的提取率呈现出先增加后减少的趋势；随着液料比的不断增加，葡萄籽蛋白质的提取率先升高后降低。从图中可以明显看出，液料比与提取温度对葡萄籽蛋白质的提取率表现出较为显著的影响，从表2-5方差分析中看出PBD<0.0001，更加说明二者对葡萄籽蛋白提取率的影响是极其显著的。

由图2-9可知，随着液料比的升高，葡萄籽蛋白质提取率先升高后降低；液料比不

变时，随着时间的延长，葡萄籽蛋白质提取率先增后减。综合响应曲面图2-9与方差分

析表2-5可以得出，液料比与提取时间对葡萄籽蛋白质的提取率的影响是极显著的。图

2-9中液料比与提取时间都呈现出二次关系，表2-5中PCD<0.0001，表明影响极显著。

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| **图2-7** **盐浓度与提取时间交互作用**  **Fig.** **2-7** **Interaction on salt concentration and time** | **图2-8** **提取温度与液料比交互作用**  **Fig.** **2-8** **Interaction on temperature and liquid ratio** |
|  | |
| **图2-9** **提取时间与液料比对葡萄籽蛋白提取的影响**  **Fig 2-9** Interaction on extraction time and liquid **ratio** | |

利用软件对各个因素进行优化得到最佳工艺参数为：盐浓度9.57%，温度39.80℃，时间49.01 min，液料比26.40: 1。在上述条件下，葡萄籽蛋白质的提取率达到46.24%。

18

### 3.2.3 碱溶法响应面试验设计及实验结果分析

**表2-6** **碱溶法因素水平编码表**

**Table** **2-6** **Alkali fusion factor level coding table**

| 因素 | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 编码 | A  pH | B  温度/(℃) | C  时间/(min) | D  液料比/(v/w) |
| -1  0  1 | 10  11  12 | 35  40  45 | 45  60  75 | 20  25  30 |

**表2-7** **碱溶法响应面实验结果**

Table 2-7 Alkali fusion response surface experiments

| 试验号 | A | B | C | D | Y 蛋白提取率/％ |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | -1 | -1 | 0 | 0 | 44.19 |
| 2 | 0 | 1 | -1 | 0 | 51.56 |
| 3 | 0 | -1 | 1 | 0 | 51.85 |
| 4 | 0 | -1 | -1 | 0 | 49.66 |
| 5 | 0 | 0 | 1 | -1 | 52.31 |
| 6 | -1 | 0 | 0 | -1 | 46.33 |
| 7 | -1 | 0 | 0 | 1 | 47.52 |
| 8 | 1 | 0 | -1 | 0 | 53.56 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 52.57 |
| 10 | -1 | 0 | -1 | 0 | 45.27 |
| 11 | 0 | 1 | 1 | 0 | 52.34 |
| 12 | 0 | 0 | 1 | 1 | 52.41 |
| 13 | -1 | 1 | 0 | 0 | 47.51 |
| 14 | 1 | -1 | 0 | 0 | 53.48 |
| 15 | 1 | 0 | 0 | -1 | 53.61 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 52.63 |
| 17 | 0 | 1 | 0 | 1 | 51.74 |
| 18 | 0 | -1 | 0 | -1 | 50.22 |
| 19 | 1 | 0 | 0 | 1 | 54.12 |
| 20 | 0 | 0 | -1 | 1 | 51.59 |
| 21 | 0 | 0 | -1 | -1 | 50.75 |
| 22 | 0 | 1 | 0 | -1 | 51.57 |
| 23 | 1 | 0 | 1 | 0 | 54.16 |
| 24 | 0 | -1 | 0 | 1 | 51.45 |
| 25 | 1 | 1 | 0 | 0 | 53.63 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 52.77 |
| 27 | -1 | 0 | 1 | 0 | 47.54 |

通过对表2-7的实验结果进行二次回归分析，建立的二次响应面回归方程如下：

Y=52.66+3.68A+0.63B+0.68C+0.34D-0.79AB-0.42AC-0.17AD-0.35BC-0.27BD-0.19C D-1.98A2-0.94B2-0.47C2-0.39D2

19

对所得的二次回归方程进行进一步的方差分析，结果见表2-8。

**表2-8** **碱溶法方差分析**

**Table** **2-8** **Alkali fusion analysis of variance**

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 | 显著性 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 模型 | 201.076483 | 14 | 14.362606 | 168.8752557 | < 0.0001 | \*\* |
| A | 162.803333 | 1 | 162.80333 | 1914.238589 | < 0.0001 | \*\* |
| B | 4.6875 | 1 | 4.6875 | 55.1155385 | < 0.0001 | \*\* |
| C | 5.6307 | 1 | 5.6307 | 66.20566669 | < 0.0001 | \*\* |
| D | 1.36013333 | 1 | 1.3601333 | 15.99242263 | 0.0018 | \*\* |
| AB | 2.51E+00 | 1 | 2.51E+00 | 2.95E+01 | 0.0002 | \*\* |
| AC | 0.697225 | 1 | 0.697225 | 8.197958684 | 0.0143 | \* |
| AD | 1.16E-01 | 1 | 1.16E-01 | 1.36E+00 | 0.2663 |  |
| BC | 0.497025 | 1 | 0.497025 | 5.844010778 | 0.0325 | \* |
| BD | 0.2809 | 1 | 0.2809 | 3.302817016 | 0.0942 |  |
| CD | 0.1369 | 1 | 0.1369 | 1.609667674 | 0.2286 |  |
| A2 | 20.8824083 | 1 | 20.882408 | 245.5349718 | < 0.0001 | \*\* |
| B2 | 4.75020833 | 1 | 4.7502083 | 55.85286193 | < 0.0001 | \*\* |
| C2 | 1.171875 | 1 | 1.171875 | 13.77888462 | 0.0030 | \*\* |
| D2 | 0.81640833 | 1 | 0.816408 | 9.599314118 | 0.0092 | \*\* |
| 残差 | 1.02058333 | 12 | 0.0850486 |  |  |  |
| 失拟项 | 0.99951667 | 10 | 0.099952 | 9.489082278 | 0.0990 |  |
| 纯误差 | 0.02106667 | 2 | 1.05E-02 |  |  |  |
| 总误差 | 202.0970667 | 26 |  |  |  |  |

注：\*为显著（*P<0.05*）, \*\*为极显著（*P<0.01*）

由表2-8的方差分析可知，模型*p<0.0001*，说明回归模型极其显著；失拟项*p=0.0990*，不显著；相关系数*R2=0.9950*，表明模型拟合程度良好，可以用此模型分析和预测碱溶法葡萄籽蛋白提取的工艺结果。

### 3.2.4 碱溶法响应面的交互作用及提取工艺优化

由图2-10可知，随着提取温度的不断升高，葡萄籽蛋白的提取率先上升后下降；随着pH 的升高，葡萄籽蛋白提取率先升高后降低。由表2-8 方差分析可以得出，

PAB=0.0002<0.01，说明提取温度和pH值对葡萄籽蛋白提取率的交互作用影响极显著。

由图2-11看出，随着提取时间的不断延长，葡萄籽蛋白质提取率先上升后下降；随着提取液pH值的升高，葡萄籽蛋白质提取率先增加后减少。由表2-8方差分析可以得出，PAC=0.0143<0.05，说明提取时间和pH值对葡萄籽蛋白提取率的交互作用影响显著。

由图2-12明显可以看出，随着提取温度的不断升高，葡萄籽蛋白质提取率先上升

20

后下降；随着提取时间的不断延长，葡萄籽蛋白提取率先升高后降低。由表2-8方差分析可以得出，PAB=0.0325<0.05，说明提取温度和提取时间对葡萄籽蛋白提取率的交互作用影响显著。

通过响应面软件优化该工艺参数，得到最佳的工艺参数为：提取液pH值、提取温度、提取时间和液料比分别为11.94、37.05℃、60 min、24.96: 1时，葡萄籽蛋白提取率最高为54.13%。

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| **图2-10** **pH与温度对葡萄籽蛋白提取的影响**  **Fig 2-10 Interaction on pH and temperature** | **图2-11** **pH与时间对葡萄籽蛋白提取的影响**  **Fig 2-11 Interaction on pH and time** |
|  | |
| **图2-12** **提取时间与温度对葡萄籽蛋白提取影响**  **Fig 2-12 Interaction on Extraction time and temperatur** | |

### 3.2.5 响应面法优化工艺的验证

在盐溶液浓度9.5%，温度40℃，时间50 min，液料比25: 1的实验条件下进行验证试验，蛋白质提取率为45.23%，该试验值与模型预测值（46.24%）的差值仅占预测值的2.18%。

在pH 11.5，温度37℃，时间60 min，液料比25: 1的实验条件下进行验证试验，蛋白质提取率为53.04%，该试验值与型预测值（54.13%）的差值仅占预测值的2.01%。

通过上述比较，利用盐溶法提取葡萄籽蛋白其提取率最高为45.23%，而碱溶法的

21

提取率可以达到53.04%，所以在提取葡萄籽蛋白的过程中，碱溶法要优于盐溶法。此外，通过实验数据可以看出，盐溶法不仅提取率要低于碱熔法，而且盐溶法的最佳提取工艺参数中的提取温度和提取时间要比碱溶法分别高3℃和长10min。如果投入工业化大生产，在成本核算上碱溶法的资金投入要远远低于盐溶法，所以碱溶法是本课题研究中最优的选择。

22

# 第三章 赤霞珠葡萄籽蛋白提取液脱色工艺的研究

通过碱液溶解蛋白质从而分离提取葡萄籽蛋白质是一种常见的蛋白质提取方法。然而，利用此方法也存在一定的缺陷，那就是提取出来的蛋白质水解液通常会带有不太容易让人接受的颜色存在，这在一定程度上影响蛋白质的纯度，极大程度地限制了所制备的蛋白质的应用范围，更降低其商业价值。所以，在本次实验中，我们采用不同脱色手段对其水解液进行脱色处理，同时对脱色工艺进行了较为详细的优化。

## 3.1 实验材料与方法

### 3.1.1 实验材料

实验原料：脱脂葡萄籽蛋白质提取液

### 3.1.2 实验试剂与仪器

本章所用实验试剂与仪器如表3-1、表3-2所示。实验所需的大孔树脂型号及相关参数如表3-3所示。

表3-1 实验试剂

| 试剂名称 | 纯度 | 生产厂家 |
| --- | --- | --- |
| 颗粒活性炭 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 大孔吸附树脂 | 分析纯 | 西安电力树脂厂提供 |
| 氢氧化钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 氯化钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 双氧水（30%） | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |

表3-2 实验仪器

| 仪器名称 | 型号 | 生产厂家 |
| --- | --- | --- |
| 电子天平 | BS2000s | 德国赛多利斯公司 |
| 可见分光光度计 | 722s | 上海第三分析仪器厂 |
| 数显恒温水浴锅 | DK-8D | 金坛市医疗仪器厂 |
| 磁力搅拌器 | 79-1 | 江苏医疗仪器厂 |
| 台式高速冷冻离心机 | Thermo3X | 赛默飞世尔科技（中国）有限公司 |
| 水流抽气机 | A-1000S | 上海爱朗仪器有限公司 |
| pH 计 | PHS-3C | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 数控超声波清洗器 | KQ-200VDE | 昆ft市超声仪器有限公司 |
| 数显恒流泵 | HL-2B | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 色度色差计 | I-400 | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 自动收集器 | BS2-100 | 上海精科实业有限公司 |

23

**表3-3** **大孔吸附树脂的型号及相关参数**

Table 3-3 Macroporous resin models and related parameters

| 型号 | 极性 | 表面积/(m2/g) | 平均孔径/nm | 含水率/% |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| HPD 100 | 非极性 | 650～700 | 9.0～10.0 | 63.85 |
| HPD 400 | 中极性 | 500～550 | 7.5～8.0 | 56.89 |
| HPD 500 | 极性 | 500～550 | 10.0～12.0 | 61.59 |
| AB-8 | 弱极性 | 480～520 | 13.0～14.0 | 61.80 |
| D101 | 弱极性 | 400～600 | 10.0～12.0 | 64.12 |
| NKA-9 | 弱极性 | 250～290 | 15.0～16.5 | 58.63 |
| X-5 | 弱极性 | 500～600 | 29～30 | 45.69 |
| LSA-21 | 弱极性 | 500～540 | 8.5～9.0 | 56.23 |
| NKA-2 | 极性 | 160～200 | 14.5～15.5 | 59.21 |

### 3.1.3 实验方法

#### 3.1.3.1 活性炭与大孔树脂对葡萄籽蛋白提取液脱色效果评价方法

通过全波长扫描确定蛋白质提取液的最强吸收峰所对应的波长。利用该波长对本实验提取液蛋白质进行全程检测，通过测定脱色前后提取液蛋白质吸光值的变化来换算脱色率，其主要计算公式如下：

脱色率 脱色前提取液吸光度-脱色后提取液吸光度100%

脱色前提取液吸光度

蛋白质损失率 脱色前提取液中蛋白质含量-脱色后提取液蛋白质含量100%

脱色前提取液中蛋白质含量

#### 3.1.3.2 活性炭对葡萄籽蛋白提取液脱色方法

活性炭的预处理：将实验所用的活性炭与1mol/L的盐酸混合以使其充分活化，2h后用水冲洗至pH 7.0，然后在60℃下干燥6h，最后冷却保存以供实验使用。

葡萄籽蛋白质提取液的脱色：按照一定比例（5%、10%、15%、20%、25%、30%、

35%）称取活性炭与葡萄籽蛋白质提取液进行搅拌混合一定时间（60 min），然后在3000 r/min, 20 min，4℃的条件下进行离心分离，然后再进行过滤操作，将活性炭从提取液中去除，收集脱色液，计算相关指标。

#### 3.1.3.3 大孔树脂对葡萄籽蛋白质提取液脱色方法

大孔树脂预处理：首先将大孔树脂进行水洗，然后利用20%的乙醇溶液处理4 h至6 h，紧接着采用1mol/L盐酸处理4 h至6 h，然后用水洗至中性，再换用1mol/L的氢氧化钠处理4 h至6 h，最后再用蒸馏水冲洗至中性，保存备用。

24

动态吸附法去除葡萄籽蛋白质提取液的色素，通过湿法装住法将大孔树脂填装入层析柱中，经过平衡后的大孔树脂柱即可加入样品进行动态吸附脱色操作。待蛋白质提取液完全吸附于大孔树脂柱后，用0.2 mol/L NaCl洗脱，直到在280 nm波长处蛋白质不再检出。收集洗脱液，在50℃、60r/min的条件下进行旋转蒸发，蒸发到洗脱液为100 mL，然后计算脱色率和蛋白质损失率。

#### 3.1.3.4 双氧水对葡萄籽蛋白质提取液脱色方法色差计测定葡萄籽蛋白质色度：

葡萄籽蛋白粉制备：根据第二章优化的提取工艺参数进行提取葡萄籽蛋白，提取液

经过冷过干燥后即个葡萄籽蛋白粉。

将制备好的赤霞珠葡萄籽蛋白粉均匀的铺撒于白卡纸，利用色差计测其色度值，每份样品取六个部位检测，取“平均值±标准偏差”作为实验结果。在色差计算中，L\*代表白度，L接近于0时表明样品的颜色偏黑，L接近100时表明样品的颜色偏白；a\*> 0时表示红色，其值越大表明红色越深，a\*＜0表示绿色，其值越小表明绿色越深；b\*> 0表示黄色，其值越大表明黄色越深，b\*＜0表示蓝色，其值越小表明蓝色越深。

双氧水脱色法：按照实验设定的不同比例（0.5%、0.7%、1%、2%、3%、4%、5%）向样品溶液中缓慢加入双氧水脱色液，在25℃下缓慢搅拌30 min，调pH值至等电点后静置30min，在3000r/min, 15min的条件下进行离心分离，弃去上清液，取沉淀，然后测定色度值。

为了能够更好地发挥双氧水脱色的效果，实验通过设定不同温度来考察双氧水在不同温度下的脱色效果，以便选取的最佳的脱色温度。实验预设温度为20、30、40、50和60℃。其他操作同活性炭脱色，最后同样以脱色效率和蛋白质损失率为检测指标。

## 3.2 葡萄籽蛋白脱色实验结果与分析

### 3.2.1 葡萄籽蛋白提取液全波长扫描结果

2.0

1.8

1.6

1.4

1.2

**吸光值（A）**

1.0

0.8

0.6

0.4

0.2

150 200 250 300 350 400

**波长（nm）**

**图3-1** **葡萄籽蛋白提取液全波长扫描曲线**

**Fig 3-1 Grape seed meal extract protein full wavelength scanning curve**

25

由图3-1可知，葡萄籽蛋白提取液在360 nm具有最大吸收峰，这个特征峰与原花青素在该波长下的特征峰类似。这就表明，在蛋白质提取液中很有可能有花青素或是其氧化产物黄酮等物质存在。此外，在蛋白质分离提取当中，极有可能在碱性环境中发生了某种反应而导致颜色变化，进而产生了在该波长下有较强吸收峰的物质。总而言之，蛋白质提取液的吸收波长就确定360nm。

### 3.2.2 活性炭对葡萄籽蛋白提取液脱色效果分析

脱色率

蛋白损失率

80

70

60

**脱色率及蛋白损失率（%）**

50

40

30

20

5 10 15 20 25 30

**活性炭添加量(%)**

**图3-2** **活性炭添加量对脱色效果的影响**

**Fig 3-2The influence of the addition ratio of active carbon on decoloring**

由图3-2可以看出，葡萄籽蛋白质提取液的脱色率随着活性炭添加量的增加而呈现出明显的上升趋势，当其添加量达到25%时，脱色率达到最大值，为55.43%，然而蛋白质损失率达到40%。因为活性炭的选择吸附性不够强，在吸附了呈色类物质的同时也会把部分水解液中的蛋白质也吸附在活性炭的表面，从而造成蛋白质含量的损失。

### 3.2.3 大孔树脂对葡萄籽蛋白提取液脱色效果分析

**表3-4** **大孔树脂对葡萄籽蛋白提取液的脱色效果**

Table 3-4 Macroporous resin decolorization liquid extraction of grape seed mealprotein

| 型号 | 脱色率/% | 蛋白损失率/% |
| --- | --- | --- |
| HPD 100 | 46.26 | 28.54 |
| HPD 400 | 48.89 | 29.24 |
| HPD 500 | 49.75 | 31.17 |
| AB-8 | 51.35 | 25.91 |
| D101 | 50.82 | 26.43 |
| NKA-2 | 47.51 | 27.49 |
| NKA-9 | 52.94 | 29.59 |
| X-5 | 53.91 | 23.85 |
| LSA-21 | 45.03 | 30.29 |
| HZ-818 | 38.19 | 24.85 |

由表3-4可知，各类型号的树脂脱色效果并不是很理想，主要是因为蛋白质损失率太高，选用该类树脂脱色极大程度地降低了葡萄籽蛋白质的再生产利用，与本实验预期的目的相违背。这可能是因为树脂能够形成易与色素结合的氢键，而且表现较好的应该

26

是对游离色素的吸附。然而在葡萄籽蛋白提取液中，大多数的呈色基团在其蛋白表面

[65-66]。此外，葡萄籽蛋白的疏水性可能较强，容易与树脂形成疏水作用；使得目的蛋白

牢牢地吸附在树脂孔径中；而且树脂表面也有电荷可带，这样因为电场的作用，也可能将蛋白质吸附在其表面。综上所述，大孔树脂在本实验中不适用于蛋白质提取液的脱色。

### 3.2.4 双氧水对葡萄籽蛋白脱色结果分析

#### 3.2.4.1 双氧水添加量对葡萄籽蛋白提取液脱色效果影响

**表3-5** **双氧水用量对葡萄籽蛋白脱色效果的影响**

Table 3-5 Hydrogen peroxide affects grape seed meal protein decolorization

| 添加量/% | L\* | a\* | b\* | △L | △a | △b | △E |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 0 | 71.73 | 12.38 | 30.28 | -25.71 | 12.71 | 28.6 | 40.50319 |
| 0.5 | 72.25 | 10.03 | 21.66 | -25.19 | 10.36 | 19.98 | 33.77967 |
| 0.7 | 72.88 | 9.38 | 21.45 | -24.56 | 9.71 | 19.77 | 32.98986 |
| 1 | 73.01 | 7.26 | 21.32 | -24.43 | 7.59 | 19.64 | 32.25155 |
| 2 | 73.87 | 7.07 | 15.71 | -23.57 | 7.4 | 14.03 | 28.41031 |
| 3 | 75.06 | 6.78 | 15.14 | -22.38 | 7.11 | 13.46 | 27.06636 |
| 4 | 75.62 | 5.42 | 14.04 | -21.82 | 5.75 | 12.36 | 25.72828 |
| 5 | 75.78 | 5.17 | 11.95 | -21.66 | 5.5 | 10.27 | 24.59428 |

由表3-5可知，双氧水脱色剂的添加量自0.5%增加至5%，蛋白质水解液的白度也在逐渐增加，红绿度a\*值大于零，而且是红度逐渐降低，黄蓝度b\*值大于零，同样也是呈现降低的趋势。所以蛋白质水解液的红色和黄色都在变浅。从表中还可以看出4%和5%的用量，对于蛋白质水解液的脱色效果没有太大的变化，考虑到节约成本等问题，本次实验选择最佳双氧水浓度为4%。

#### 3.2.4.2 反应温度对双氧水脱色效果的影响

**表3-6** **反应温度对葡萄籽蛋白脱色效果的影响**

Table 3-6 Reaction temperature affect grape seed meal protein decolorization

| 温度/℃ | L\* | a\* | b\* | △L | △a | △b | △E |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 20 | 75.37 | 5.52 | 14.48 | -22.07 | 5.85 | 12.8 | 26.17532 |
| 30 | 75.73 | 5.32 | 13.11 | -21.71 | 5.65 | 11.43 | 25.1772 |
| 40 | 75.76 | 5.25 | 12.72 | -21.68 | 5.58 | 11.04 | 24.96078 |
| 50 | 76.52 | 5.04 | 7.76 | -20.92 | 5.37 | 6.08 | 22.43768 |
| 60 | 75.96 | 5.06 | 10.73 | -21.48 | 5.39 | 9.05 | 23.92373 |

由表3-6可以明显看出，随着温度的不断升高，蛋白质水解液的白度先增加后降低，当温度升高至50℃，此时的水解液白度到达顶峰，继续升高温度，白度开始出现下降的趋势，这可能是双氧水在高温环境中发生热反应分解，从而降低其脱色效果[67-68]。由此可知，选用双氧水脱色时，一定要严格控制温度不能超过50℃。结合实验数据，综合实际出发，使用双氧水进行脱色时，温度控制在室温最好，简单易行，脱色效率也较好。

27

# 第四章 葡萄籽蛋白干粉的制备

新疆远离海洋，深居内陆，四周有高ft阻隔，海洋气流不易到达，形成明显的温带大陆性气候。气温温差较大，日照时间充足，因此这里的瓜果香甜可口。尤其是新疆吐鲁番的葡萄、库尔勒的香梨等闻名中外。因此，葡萄、香梨等瓜果经济作物是新疆农业经济发展的重要基础之一。大规模种植的葡萄除了鲜食之外，还可以用来酿制葡萄酒，压榨葡萄籽油等来增加其附加值，然后酿酒及榨油后废弃的葡萄籽中还含有较为丰富的蛋白质，如果能够将其再次提取纯化，精致成蛋白质粉，不仅能够减少自然环境的污染，同时又成倍的增加了葡萄产业的附加值，而且还会带动当地农民经济收入。为此，本章就葡萄籽蛋白质提取液进行纯化，然后利用喷雾干燥制备成蛋白质干粉，以期能够为今后葡萄籽的开发利用提供理论依据。

## 4.1 实验材料与试剂

### 4.1.1 实验材料

实验原料：赤霞珠脱脂葡萄籽，新疆张裕天珠葡萄酒业有限公司提供。

### 4.1.2 实验试剂与仪器

实验所需试剂与仪器如表4-1、表4-2所示。

表4-1 实验试剂

| 试剂名称 | 纯度 | 生产厂家 |
| --- | --- | --- |
| 牛血清白蛋白 | - | 上海江莱生物科技有限公司 |
| 正己烷 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 氢氧化钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 硫酸铜 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 硫酸钾 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 硼酸 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 盐酸 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 浓硫酸 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 氯化钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 双氧水（30%） | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 磷酸氢二钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 磷酸二氢钠 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 考马斯亮蓝 G-250 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 95%乙醇 | 分析纯 | 天津市大茂化学试剂厂 |
| 85%磷酸 |  | 上海光华化学试剂厂 |
| 溴甲酚绿-甲基红 | 分析纯 | 汕头市西陇化工厂有限公司 |

28

表4-2 实验仪器

| 仪器名称 | 型号 | 生产厂家 |
| --- | --- | --- |
| 凯氏定氮仪 |  | 天津玻璃仪器厂 |
| 旋转蒸发仪 |  | 上海亚荣生化仪器厂 |
| 电子天平 | BS2000s | 德国赛多利斯公司 |
| 可见分光光度计 | 722s | 上海第三分析仪器厂 |
| 数显恒温水浴锅 | DK-8D | 金坛市医疗仪器厂 |
| 磁力搅拌器 | 79-1 | 江苏医疗仪器厂 |
| 台式高速冷冻离心机 | Thermo3X | 赛默飞世尔科技（中国）有限公司 |
| 普通型移液器 | 10ul、200ul、1000ul | 日本日立金属精密仪器公司 |
| 高速中药粉碎机 |  | 上海百丰粉碎食品机械有限公司 |
| 水流抽气机 | A-1000S | 上海爱朗仪器有限公司 |
| pH 计 | PHS-3C | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 数控超声波清洗器 | KQ-200VDE | 昆ft市超声仪器有限公司 |
| 消化炉 | KDN-08 | 上海昕瑞仪器仪表有限公司； |
| 玻璃层析柱 |  | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 数显恒流泵 | HL-2B | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 色度色差计 | I-400 | 上海精密科学仪器有限公司 |
| 自动收集器 | BS2-100 | 上海精科实业有限公司 |
| 喷雾干燥机 | SD-1000 | 日本 Eyela 公司 |
| 高压均质机 | NS1001L | 意大利 Niro-Soavi |

## 4.2 实验方法

### 4.2.1 葡萄籽蛋白等电点测定

用量筒分别量取100 ml蛋白水解液于12个150 mL的三角瓶，然后利用一定浓度的盐酸调节pH值分别为3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6和4.7，静置一段时间后将水解液于高速冷冻离心机中进行离心分离处理，弃去沉淀，留下上清液，然后在特定波长下进行比色，在等电点处的吸光值为最小。

### 4.2.2 葡萄籽蛋白的酸沉及水洗

用1.00 moL/L的盐酸调节蛋白质水解液的pH至pI，静置一段时间后于3500 r/min条件下离心分离15 min，取沉淀溶于水中。用氢氧化钠调pH 7.0，即得葡萄籽粗蛋白质提取液。

### 4.2.3 葡萄籽蛋白粉的制备方法

在制备蛋白质干粉实验中，我们选用目的蛋白粉的含水量、喷雾干燥后的集粉率和喷雾干燥所得的蛋白质粉的分散系数（PDI）作为考擦检测指标。

首先通过单因素实验确定在喷雾干燥过程中的进料温度、进料流量和雾化压力等技术参数的最佳组合。然后再利用均匀设计实验优化工艺条件，从而确定最优喷雾干燥工

29

艺技术条件。

#### 4.2.3.1 分析、检测方法

式中：s——集粉率，％；

*S* *m* 100*v* *c*

m——收集到的蛋白粉质量，g；

v——提取液的体积，ml；

c——提取液的浓度，g/ml。

蛋白质分散系数（PDI）：取一只50 mL的离心管，称取1g (m2)蛋白质样品置于其中，然后再向其中加入20 mL水，于漩涡混合器中充分搅拌均匀，再在3000 r/min的转速下离心分离10 min，将上清液转移至另一只干净的离心管中备用；剩余的沉淀物再次用10mL水进行上述同样的处理，离心分离，此次上清液与上次上清液进行合并，检测其中的蛋白质含量（m1）。

#### 4.2.3.2 单因素实验方法

*PDI* *m*1

*m*2

进风温度的确定：固定进料流量400mL/h，雾化压力180 kPa和进风流量0.6 m3/min，考察不同进风温度（130、140、150、160、170、180℃）对蛋白质水解液干燥的影响，从而确定最佳的进风温度。

进料流量的确定：固定进风温度160℃、雾化压力180 kPa和进风流量0.6 m3/min，考察不同进料流量（200、300、400、500、600、700 mL/h）对喷雾干燥葡萄籽蛋白质水解液的影响，从而得出最佳的进料流量。

雾化压力的确定：固定进风温度160 ℃，进料流量400 mL/h和进风流量0.6 m3/min，考察不同雾化压力（100、120、140、160、180、200 kPa）对喷雾干燥制备葡萄籽蛋白质粉的影响，从而确定最佳的雾化压力。

进风流量的确定：固定进风温度160℃，进料流量400 mL/h和雾化压力180 kPa，考察不同进风流量（0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70 m3/min）对喷雾干燥蛋白质水解液的影响，从而确定最佳的进风流量。

#### 4.2.3.3 均匀设计实验

以进风流量、进风温度、进料流量和雾化压力为影响葡萄籽蛋白喷雾干燥的主要因素，根据喷雾干燥机的工况条件进行均匀实验设计[61]，利用EXCEL辅助DPS 7.05软件做回归分析。对实验数据进行显著性分析，建立回归方程，确定干燥最佳工艺条件。

30

## 4.3 数据处理方法

以上实验均设三个平行组，实验结果取其平均值，使用Excel和DPS软件进行数据的统计与分析。

## 4.4 结果与分析

### 4.4.1 葡萄籽蛋白等电点的确定

0.16

0.14

0.12

0.10

**吸光值（A）**

0.08

0.06

0.04

0.02

0.00

#### 3.4 3.6 3.8 4.0 4.2 4.4 4.6 4.8

**pH**

**图4-1** **蛋白质提取液吸光度随pH值变化图**

**Fig 4-1 Protein extract absorbance with pH change map**

由图4-1可知，葡萄籽蛋白质的等电点pI为3.8。

### 4.4.2 葡萄籽蛋白提取液酸沉及水洗

用1 mol/L盐酸调节蛋白质水解液pI 3.8，在4000 r/min条件下离心10 min，沉淀用蒸馏水溶解。用1mol/L氢氧化钠调pH 7.0，然后进行喷雾干燥制备蛋白粉。

### 4.4.3 进风温度对干燥效果的影响

PDI

集 粉 率 水分含量

4.0

70

3.5

60 3.0

**PDI及集粉率（%）**

2.5

**水分含量 (%)**

50

2.0

40

1.5

30 1.0

130 140 150 160 170 180

**进风温度（℃）**

**图4-2** **进风温度对干燥效果的影响**

**Fig 4-2 Inlet air temperature affect the drying**

31

在喷雾干燥过程中，进风温度是影响蛋白质性质变化的重要因素之一，然而在此过程中的唯一能源就是温度，因此选择合适的进风温度不仅能够提高干燥效率而且还可以在最低能耗条件下得到更好的蛋白质粉产品。

由图4-2可知，集粉率随着喷雾干燥机进风温度的升高而呈现出不断上升的趋势，

当进风温度达到160 ℃时，集粉率达到最高，继续升高进风温度，集粉率开始呈现下降

趋势。因此，就集粉率而言，进风温度选择160 ℃最佳。

水分含量随着进风温度的升高呈现出近乎直线下降的趋势，当进风温度升高至

160℃时，水分含量仅为1.5%。蛋白质粉在较低含水量的情况下有益于长时间的贮藏而不形成块儿状导致变质。

葡萄籽蛋白质分散系数随着进风温度的的升高而逐渐降低。这可能是因为在高温环境蛋白质变性而导致的

综合所查阅资料，结合实验数据，喷雾干燥选择160 ℃的进风温度为最好。

### 4.4.4 进料流量对干燥效果的影响

PDI及集粉率集粉率

水分含量

65

3.5

60

55 3.0

50 2.5

**PDI及集粉率 (%)**

**水分含量 (%)**

45

2.0

40

1.5

35

30

200 300 400 500 600 700

**进料流量（mL/h）**

1.0

**图4-3** **进料流量对干燥效果的影响**

**Fig 4-3 Feed flow impact on the drying effect**

由图4-3可知，蛋白粉含水量随着进料流量的增加而不断增加。这可能是因为进料流量的增加使得在一定时间内加大了进入干燥室的样品量，样品量加大会引发受热不均匀，干燥不充分等问题。将进料流量增加至500 mL/h时，蛋白粉的水分含量就已经超过了2.0%。

集粉率随着进料流量的增加而呈现出先小幅度上升而后大幅度下降的趋势。这主要原因是进料流量过小，雾化充分，蛋白粉粘在塔底，干燥不完全，从而导致效率较低。进料流量增加必定增加样品的总量，在能量供给一定的情况下，必定干燥不够充分，水

32

分不可能彻底蒸发，导致粘壁情况，因此造成集粉率随后呈现急剧下降的趋势。

蛋白粉的分散系数（PDI）随着进料流量的不断增加呈现出逐渐下降的趋势，然而进料流量为400mL/h至500 mL/h时，PDI前后变化较为明显，这可能是因为进料流量大，干燥不充分，蛋白粉品质受到一定影响，从而影响了其溶解度。

综合所查阅资料，结合实验数据，400 mL/h为最佳进料速度。

### 4.4.5 雾化压力对干燥效果的影响

PDI及集粉率集粉率

水分含量

70 3.5

65

3.0

60

55 2.5

**PDI及集粉率 (%)**

**水分含量 (%)**

50

2.0

45

40 1.5

35

1.0

30

100 120 140 160 180 200

**雾化压力（kPa）**

**图4-4** **雾化压力对干燥效果的影响**

**Fig 4-4 Atomization pressure influence on drying**

由图4-4可以看出雾化压力越大葡萄籽蛋白提取液的干燥效果越好。

含水量随着雾化压力的不断升高呈现逐渐下降的趋势，与之相反，集粉率和PDI随着雾化压力的升高而增加。将雾化压力升高至180 kPa时，蛋白粉的水分含量小于1.5%。蛋白质水解液进入雾化室时，经过瞬间高压环境使之在短时间内形成雾状液滴，紧接着在短时间内加热到较高温度，从而起到快速干燥的目的。根据雾化器原理可以得知，如果压力较小，则形成雾状液滴较大，这样就会造成干燥不充分和不彻底，由此得到的蛋白质粉颗粒较大，此外，部分因含水量较大会黏在塔壁。在上述情况下干燥处的蛋白质粉，因其水分含量相对较大，PDI也相应较低。随着雾化压力的增大，蛋白质水解液被雾化形成更加细小的雾状液滴，如此干燥便会更加充分彻底。PDI和集粉率也会随之发生相应变化而升高。综上所述，最佳的雾化压力为200 kPa。

### 4.5.4 进风流量对干燥效果的影响

由图4-5可知，蛋白质粉水分含量随着进风流量的不断增加而逐渐降低，当进风流量增大至0.65 m3/min时，葡萄籽蛋白质粉水分含量小于1.6%。另外，集粉率与分散系数随着进风流量的增加而逐渐升高。

33

进风流量较小，被干燥的蛋白质水解液被高压雾化后与水蒸气接触时间较长，极易导致被干燥物料吸湿受潮，从而导致水分含量增加；进风流量过大，虽然水分含量会减少，但是会有部分被干燥蛋白质粉随着热风被带走，从而造成蛋白质粉量的减少。鉴于此，选择合适的进风流量对于喷雾干燥工艺显得尤为重要。从图中还可以看出，进风流量的大小对PDI的影响并不明显。综上所述，最佳的进风流量为0.65 m3/min。

PDI及集粉率集粉率

水分含量

2.1

62

2.0

60

58 1.9

56 1.8

**PDI及集粉率 (%)**

**水分含量 (%)**

54 1.7

52 1.6

50

48

46

0.45 0.50 0.55 0.60 0.65 0.70

**进风流量（m3/min）**

**图4-5** **进风流量对干燥效果的影响**

**Fig4-5 Inlet flow affect the drying**

1.5

1.4

### 4.5.5 均匀设计实验优化喷雾干燥工艺

在单因素实验基础上，通过均匀设计实验对喷雾干燥技术工艺进行优化。以影响葡萄籽蛋白喷雾干燥的进风流量（X1）、进风温度（X2）、进料流量（X3）和雾化压力（X4）四个因素为主要考察对象，设计四因素六水平优化实验，因素水平如表4-3所示，实验

结果如表4-4所示。

**表4-3** **均匀设计因素水平表**

Table 4-3 Uniform design factor level table

| 因素 | | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 水平 | X1  进风流量(m3/min) | X2  进风温度（℃） | X3  进料流量(mL/h) | X4  雾化压力(kPa) |
| 1  2  3  4  5  6 | 0.45  0.50  0.55  0.60  0.65  0.70 | 130  140  150  160  170  180 | 200  300  400  500  600  700 | 100  120  140  160  180  200 |

34

**表4-4** **均匀设计四因素六水平***U* \* (64 )**实验结果**

6

Table 4-4 Uniform design four factor six level results

| 试验编号 | X1 | X2 | X3 | X4 | Y1 | Y2 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 进风流量/  （m3/min） | 进风温度  /(℃) | 进料流量  /(mL/h) | 雾化压力  /(kPa) | 集粉率  /(％) | PDI  /(％) |
| 1 | 1(0.45) | 2(140) | 3(400) | 6(200) | 47.71 | 47.73 |
| 2 | 2(0.50) | 4(160) | 6(700) | 5(180) | 34.72 | 63.83 |
| 3 | 3(0.55) | 6(180) | 2(300) | 4(160) | 48.34 | 78.35 |
| 4 | 4(0.60) | 1(130) | 5(600) | 3(140) | 27.25 | 68.24 |
| 5 | 5(0.65) | 3(150) | 1(200) | 2(120) | 46.32 | 52.83 |
| 6 | 6(0.70) | 5(170) | 4(500) | 1(100) | 43.86 | 56.43 |

首先以集粉率为指标得到回归方程为Y=45.37-0.21X22-0.96X3 +0.17X4 +0.952X2X3，模型方程*P=0.0281*，相关系数*R=0.9998*，由方程可以看出进料流量是影响喷雾干燥集粉率的主要因素，经过DPS软件计算分析并优化所得集粉率最高时，各因素最优组合：进风流量0.65 m3/min，进风温度为180℃，进料流量为400mL/h和雾化压力为200kPa。

2 2

以PDI为指标得出回归方程为：Y=46.99-12.81X2+2.01X22+2.51X1X4+0.43X2X3，模

型方程*P=0.0642*，相关系数*R=0.9991*，由方程可以看出进风温度是影响喷雾干燥PDI的主要因素，经过DPS软件计算分析并优化所得分散系数最高时，各因素最优组合：进风流量0.64 m3/min，进风温度为180℃，进料流量为390mL/h和雾化压力为200kPa。

综上所述，结合实际试验操作情况，喷雾干燥技术最佳工艺为：进风流量0.65

m3/min，进风温度180℃，进料流量400 mL/h，雾化压力200 kPa。在此条件下进行验证实验，集粉率45.43％，PDI为73.1％，与预期的实验结果较符合。此时的蛋白粉水分含量为1.03%。

35

# 第五章 总结及创新点

## 5.1 结论

（1）通过单因素及响应面软件相结合，本实验确定了最佳的碱熔法赤霞珠葡萄籽蛋白质提取的工艺条件：粉碎粒度60目，碱液pH值为11.5、液料比25: 1、提取温度

37℃、提取时间60 min，在此条件下所得的蛋白质提取率为53.04％。

（2）通过对比，最后选择最佳脱色剂为双氧水。最佳脱色工艺条件为：双氧水添加量4%，脱色温度室温，脱色时间60 min，色度色差分析表明：脱色前葡萄籽蛋白的

L\*为71.73，a\*为12.38，b\*为30.28，脱色后葡萄籽蛋白L\*为76.52，a\*为5.04，b\*为

7.76，葡萄籽蛋白由红褐色变为浅黄色。

（3）葡萄籽蛋白经喷雾干燥制得葡萄籽蛋白粉。其最佳喷雾干燥工艺为：进风流量0.65 m3/min，进风温度180℃，进料流量400 mL/h，雾化压力200 kPa，进行验证实验，所得的各项指标为集粉率45.43％，PDI为73.1％，含水量1.03%，产品纯度为91.4%。

## 5.2 创新点

本文详细的比较了碱熔法与盐溶法提取葡萄籽蛋白质，并且对葡萄籽蛋白质提取液进行了全面的脱色分析。

利用喷雾干燥技术对葡萄籽蛋白质提取液进行制粉处理。

36

# 第六章 研究展望

进入21世纪以来，就葡萄籽等一些加工副产物的再利用而言，同时面临社会，科技，经济，工业等的快速发展，寻求发现或探索原料利用率最大化成为世界关注的主题，废物利用更是目前研究的热点话题。

葡萄籽蛋白质的氨基酸种类有18种，人体必需氨基酸有7种。葡萄中所含的所有氨基酸含量均高于居民膳食营养素参考摄入量的建议服用量，且缬氨酸、精氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸含量可比肩大豆蛋白，十分适合运用于强化食品、保健药品等的生产。此外，其中的谷氨酸含量高于大豆中所含谷氨酸含量，为19.62%。可作为味精的生产原料。有研究表明，葡萄籽蛋白提取物能诱导白血病细胞凋亡，葡萄籽粗品糖蛋白可增强人体免疫能力。通过控制葡萄籽蛋白的水解度，可以获得具有生物活性且易被人体吸收的多肽，具有许多独特的生理功能，在国外，它已用于保健食品或调味品的开发。

由此可见，葡萄籽蛋白在食品领域和医药领域具有很好的发展前景。

37

参考文献

[1] 李银平, 薛雪萍, 袁春龙, 等. 葡萄籽成分与营养评价[J]. 食品与发酵工业, 2006, 12: 108-132.

[2] 温建辉, 刘冷. 葡萄籽成分的开发与综合利用[J]. 晋中学院学报. 2014, 31(3): 32-36.

[3] 史学伟, 程卫东, 肖婧.等. 新疆脱脂葡萄籽天然蛋白的研究现状[J]. 肉类研究2010(3): 80-83.

[4] 万本屹, 李宏, 董海洲. 葡萄籽原花青素提取及其应用研究进展[J]. 粮食与油脂, 2002, (2): 43-45.

[5] 王四维. 葡萄籽油开发利用[J]. 粮食与油脂, 2007, (7): 17-19.

[6] 王晋, 韩娟, 张钟宪. 葡萄籽油提取工艺的优化[J]. 首都师范大学学报, 2006, 27(2): 43-45.

[7] 李凤英, 李润丰. 葡萄籽中主要化学成分及其开发应用(综述)[J]. 河北职业技术师范学院学报, 2002, 16(2): 65-67.

[8] 高德艳, 胡文效. 葡萄籽多酚及葡萄籽利用现状[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2013, (1): 53-56.

[9] 叶润, 马宝英, 牟德华. 从脱脂葡萄籽中提取蛋白质的工艺研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2009, (1): 17-21.

[10] 张乐乐. 葡萄籽在动物营养中的研究进展[J]. 饲料工业, 2009, 30(19): 46-48.

[11] 吴嘉惠, 袁春龙, 宋洋波. 葡萄籽功能性成分及其应用[J]. 日用化学工业, 2011, 4(3): 216-222.

[12] 王四维, 蒋蕴珍, 陈志华. 葡萄籽的综合开发与利用[J]. 粮油食品科技, 2008, 16(1): 39-41.

[13] 周建华. 葡萄籽中提取油和蛋白质的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2000(10): 48-49.

[14] Ning Gao, Amit Budhraja, Senping Cheng, et al. Induction of Apoptosis in Human Leukemia Cells by Grape Seed Extract Occurs via Activation of c-Jun NH2-Terminal Kinase. [J] Clin Cancer Res, 2009(15): 140-149.

[15] 王芍. 葡萄籽糖蛋白的提取纯化及免疫活性研究[D]. 西安: 西北大学, 2011.

[16] 邹磊, 魏国印, 鲁凤娟.等. 葡萄酒副产品深度利用的研究进展[J]. 中国环境管理干部学院学报2012, 4(22) 2.42-44, 58.

[17] 徐永斌, 邓攀博, 季祥. 葡萄籽油制取工艺及产品的应用开发[J]. 园艺与种苗, 2011(5): 96-98.

[18] 吴少辉, 刘光明. 蛋白质分离纯化方法研究进展[J]. 中国药业, 2012, 26(1): 1-3.

[19] Ivo M. Rodrigues, Jorge F. J. Coelho, M. Graça V. S. Carvalho. Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential[J]. Journal of Food Engineering, 2012, 109(3): 337-346.

[20] 夏辉, 丁丹华, 万辉, 等. 葡萄籽蛋白提取工艺的研究[J]. 粮油加工, 2008, (8): 37-39.

[21] 赵毅敏. 葡萄籽蛋白提取工艺研究[J]. 河南科学, 2009, 27(10): 1230-1231.

[22] 李凤英, 权英. 碱溶法提取葡萄籽中蛋白质的工艺[J]. 河北职业技术师范学院学报, 2003, 17(3): 26-29.

[23] 叶润, 马宝英, 牟德华. 从脱脂葡萄籽中提取蛋白质的工艺研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2009, (1): 17-21.

[24] L. Jervis, W. S. Pierpoint. Purification technologies for plant proteins[J]. Journal of Biotechnology, 1989, 11(2-3): 161-198.

[25] 邹圣冬, 蔡永梅, 代绍娟, 等. 脱脂葡萄籽中蛋白的提取工艺研究[J]. 农业机械, 2013, (7): 51-55.

[26] Lianqing Shen, Xiangyang Wang, Zhongying Wang, et al. Studies on tea protein extraction using38

Alkaline and enzyme methods [J]. Food Chemistry, 2008,107(2):929-928.

[27] 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.

[28] 吴炳云, 黄晓辉, 杨振杰, 等. 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.

[29] 蒋梅, 杨仕标, 王秀琼, 等. 蛋白质提纯的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008, (3): 25-26.

[30] 陈婷, 余群力, 赵莉, 等. 超滤膜分离技术回收乳清蛋白的工艺研究[J]. 食品工业科技, 2008(8): 37-39.

[31] 高孔荣, 黄惠华, 梁照为. 食品分离提取技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1998: 10-24, 34-43, 127, 132.

[32] 张喜峰, 孙亚莉, 苏风贤, 等. 膜分离可溶性葡萄籽蛋白质及膜清洗方案[J]. 食品工业科技, 粮油加工, 2008(8): 37-39.

[33] 大连轻工业学院等八大院校编. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 214-230.

[34] [美] IS. Suzanne Nielsen著, 杨严俊等译. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002: 218.

[35] 彭子模, 李进孟, 冬丽. 植物源天然色素的开发与应用研究现状与展望[J]. 新疆师范火学学报: 自然科学版. 2009, 19(4): 44-45．

[36] 张亨. 吸附脱色研究进展[J]. 现代化工. 1998, (7): 13-15.

[37] 张亨. 化学脱色研究进展[J]. 现代化工. 1999, 19(9): 15-18.

[38] 王丁明, 曹国凭, 贾云飞, 等. 活性炭吸附技术在水处理中的应用[J]. 北方环境. 2011, 23(11): 190-191.

[39] 霍汉镇, 谭必明. 活性炭-高效的糖液脱色剂[J]. 广西轻工业. 2003, 3: 16-19.

[40] 杨云, 田润涛, 苗明三, 等. 大枣渣多糖活性炭脱色工艺研究[J]. 河南中医学院学报2004, 19(110): 35-36.

[41] 何炳林, 黄文强. 离子交换与吸附树脂[M]. 人民卫生出版社, 1995, 2: 29-348.

[42] 李剑君. 葛根总黄酮中葛根素的分离研究[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2001, 31(4): 311-314.

[43] 萧伟祥, 钟瑾. 应用树脂吸附分离制取茶多酚[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 6(11): 44-49.

[44] 张虹, 柳正良, 王洪泉. 大孔吸附树脂在药学领域的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2001, 32(1): 41-44.

[45] 王继峰, 薛冬, 藏晶. 大孔吸附树脂在分离提纯中药有效成份中的应用[J]. 湖南中医药学报, 2001, 7(3): 125-126.

[46] 赵文恩, 陈雷, 韩雅珊. 葡萄皮渣原花色素提取分离的初步研究[J]. 食品科学, 2000, 21(12): 68-69.

[47] 曹环, 周爱梅, 朱翠文, 等. 热风干燥应用于对虾加工废弃物制造水解蛋白粉的研究[J]. 现代食品科技, 2010 (1): 66-70.

[48] 朱克庆, 吕少芳. 真空冷冻干燥技术在食品工业中的应用[J]. 粮食加工, 2011, 36(3): 49-51.

[49] 黄群, 麻成金, 周姣, 等. 干燥方法及理化因素对鹌鹑蛋白粉功能特性的影响[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 299-302.

[50] 李伟锋, 王鹏, 徐幸莲, 等. 喷雾干燥鸡血浆蛋白粉工艺优化[J]. 农业工程学报, 2012, 28(21): 248-255.

[51] 刘贺, 王雪, 李君, 等. 扁杏仁水解蛋白的喷雾干燥及其抗氧化活性[J]. 食品科学, 2012, 33(16): 18-23.

[52] Sonner C. Protein loaded powders by spray freeze drying[D]. Erlangen: Friedrich-Alexandar University, 2002.

[53] Leuenberger H, Plitzko M, Puchkov M Spray-freeze Drying in a Fluidized Bed at Normal and Low Pressure[J]. Drying Technology, 2006, 24(6): 71-720.

[54] 黄立新, 周瑞君. 喷雾干燥的研究进展[J]. 干燥技术与设备, 2009, 7(5): 195-198.39

[55] Michael Wiggenhorn. Scale-Up of Liposome Manufacturing: Combining High Pressure Liposome Extrusion with DryingTechnologies [D]. Munich: Ludwig-MaximiliansUniversity, 2007.

[56] 张爱军, 沈继红, 马小兵, 等. 葡萄籽的开发与利用[J]. 中国油脂, 2004, 29 (3): 55-57.

[57] 魏福祥, 韩菊. 葡萄废渣的综合利用研究[J]. 河北工业科技, 2001, 18(2): 27-30.

[58] 《蛋白质资源与开发利用》编写组. 蛋白质资源与开发利用[M]. 北京: 轻工业出版社1988: 200-204.

[59] 江志炜, 沈蓓英, 潘秋琴. 蛋白质加工技术[M] 北京: 化学工业出版社, 2003.

[60] 杨潞芳, 郝利平. 植物蛋白和植物油脂分离提取技术进展[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(3): 5-8.

[61] Ansharullah, James A H, Colin F C. Application of Carbohydrases in Extracting Protein from Rice Bran[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1997, 74(2) 141-146.

[62] Shih F F, Daigle K. Use of Enzymes for the Separation of Protein from Rice Flour[J] Cereal Chemistry. 1997, 74(4): 437-441.

[63] 赵健. 食品中蛋白质的功能(八)蛋白质在食品加工中的变化[J]. 肉类研究, 2009, (11): 64-67.

[64] 叶荣飞, 杨晓泉, 郑田要, 等. 热变性和热聚集对大豆分离蛋白溶解性的影响[J]. 食品科学, 2008, 9(7): 106-108.

[65] 刘野, 邹婷婷, 宋焕禄. 响应曲面法优化西瓜籽蛋白提取工艺[J] 食品工业科技, 2013, (3): 250-254.

[66] AliAbas Wani, Devinder Kaur, Idrees Ahmed, et al. Extraction optimization of watermelon seed protein using response surface methodology[J]. Journal of Food Science and Technology, 2007, 10: 1-7.

[67] Ali Abas Wani1, D. S. Sogi1, L. Grover, et al. Effect of Temperature, Alkali Concentration, Mixing Time and Meal/Solvent Ratio on the Extraction of Watermelon Seed Proteinsa Response Surface Approach[J]. Biosystems Engineering, 2006, 94(1): 7-73.

[68] Sogi, D. S., Arora, M. S., Garg, S K, et al. Response surface methodology for the optimisation of tomato seed protein[J]. Journal of Food Science and Technology, 2003, 40(3): 67-271.

40

致谢

岁月如梭，转眼间，三年的研究生求学生活即将结束。站在毕业的门槛上，手中托着沉甸甸的论文，心里感慨万千，在此，我谨向所有关心、爱护、帮助我的人们表示最诚挚的感谢与最美好的祝愿。

本论文从选题到完成，每一步都是在导师李开雄教授的悉心指导下完成的，倾注了导师大量的心血。在此，谨向恩师李开雄教授表示崇高的敬意和衷心的感谢！导师李开雄教授渊博的专业知识，严谨的治学态度，精益求精的工作作风，诲人不倦的高尚师德，严以律己、宽以待人的崇高风范，朴实无华、平易近人的人格魅力对我影响深远。导师不仅授我以文，而且教我做人，虽历时三载，却赋予我终生受益无穷之道。不仅使我树立了远大的学术目标，掌握了基本的研究方法，还使我明白了许多待人接物与为人处事的道理。

从开始写作至论文最终定稿，总共花费了一年多的业余时间，虽说在繁忙的工作之余要完成这样一篇论文并不是一件轻松的事情，但各位老师、同学和朋友的关心与帮助给予了我莫大的支持与帮助。感谢石河子大学食品学院为我们提供的这次学习机会，感谢所有的任课老师，感谢班主任吴超老师，是你们让我能够静静地坐下来，在知识的海洋里吸取更多的营养，从而能够为自己进一步的加油充电。通过学习，使我能够系统、全面的掌握有关食品安全与生产新型的、先进的前沿知识，并得以借鉴众多专家学者的宝贵经验，这对于我今后的工作，无疑是不可多得的宝贵财富。还要特别感谢在百忙之中评阅本论文的专家、教授，感谢你们提出了宝贵意见使得本论文得以完善。

最后，特别感谢我的家人和朋友，这些年对我学业的默默鼓励和支持，你们的支持是我不竭的动力和不断进取的保证。

41

# 作者简介

吴芳，女，生于1982年1月，汉族，籍贯甘肃。2000年毕业于石河子大学医学院临床医学专业，获医学学士学位。2006年至2009年在石河子市人民医院任住院医师，后参加兵团公务员考试进入政府机关，现就职于石河子市卫生局从事医疗卫生管理工作。2012年7月起在石河子大学攻读在职研究生。

**在学期间发表的文章**

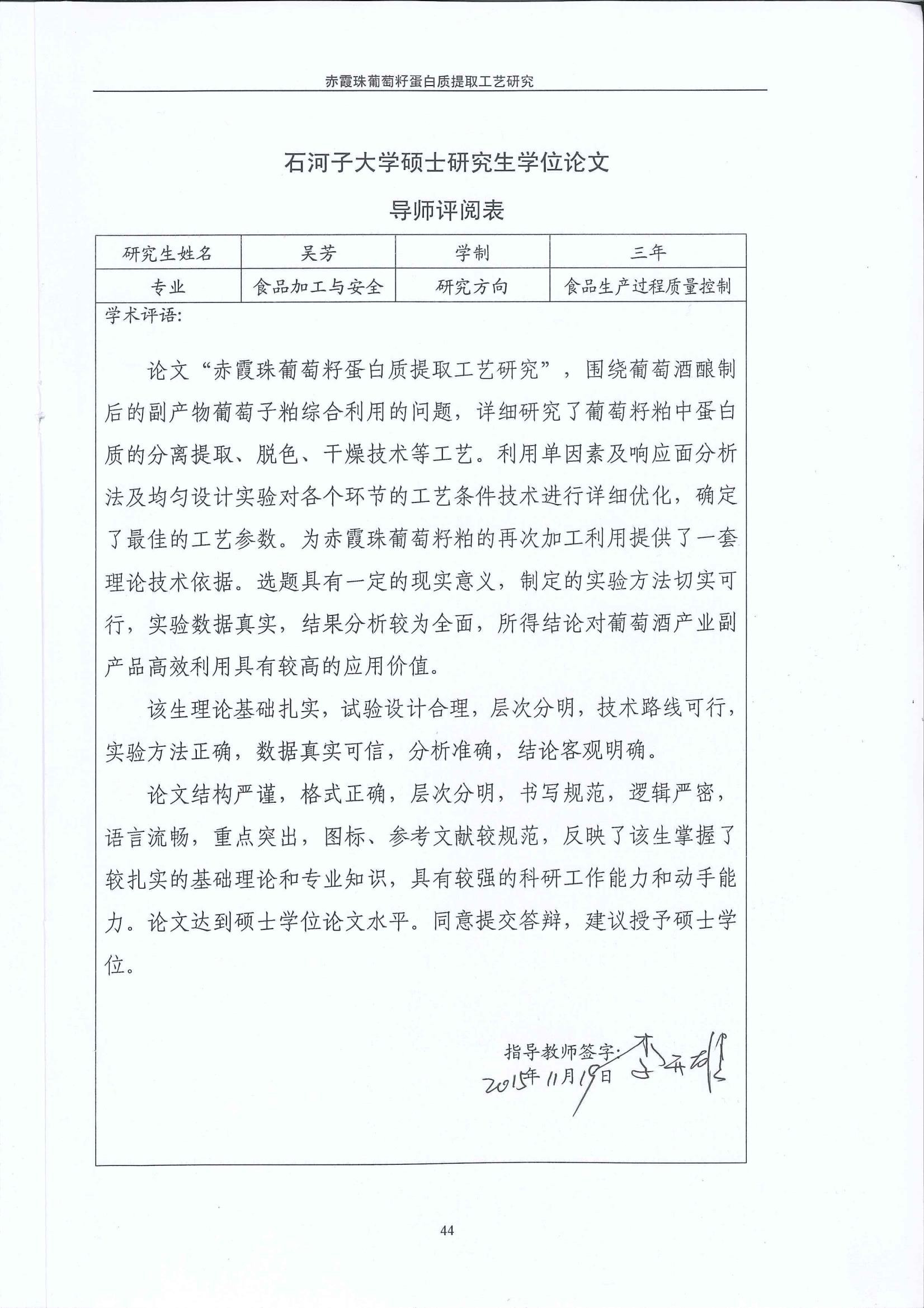
1.吴芳，李开雄，许程剑.响应面法优化葡萄籽蛋白质提取工艺.食品研究与开发，2016

（2）：134-137

42

赤霞珠葡萄籽蛋白质提取工艺研究

43



万方数据