

碱性蛋白酶提取米糠蛋白的研究

王晓雅^{1,2,3}, 朱新鹏^{2,3}, 樊明涛^{1*}, 何小兰²

(1. 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 安康学院 农学与生命科学院, 陕西 安康 725000; 3. 陕西省富硒食品工程实验室, 陕西 安康 725000)

摘要: 为建立高效的米糠蛋白提取工艺, 对碱性蛋白酶提取米糠蛋白的工艺条件进行了研究。以蛋白提取率为考察指标, 在单因素试验的基础上, 通过正交试验进一步优化米糠蛋白提取工艺条件。结果表明, 料液比对米糠蛋白提取率的影响最大, 其次为 pH 值, 温度、时间和加酶量影响较小。优化后的工艺条件为: 温度 60 ℃, 时间 3.0 h, 料液比 1 : 20, 加酶量 2.5%, pH 值 9.5。在此条件下, 蛋白提取率可达 75.42%, 同时测得米糠蛋白的等电点为 4.5。影响米糠蛋白提取率的主要因素顺序为: 料液比 > pH 值 > 温度 > 时间 > 加酶量。

关键词: 米糠蛋白; 碱性蛋白酶; 提取率; 工艺条件; 优化

中图分类号: S39 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)06-0038-04

Extraction of Rice Bran Protein by Alcalase

WANG Xiao-ya^{1,2,3}, ZHU Xin-peng^{2,3}, FAN Ming-tao^{1*}, HE Xiao-lan²

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;
2. College of Agriculture and Life Science, Ankang University, Ankang 725000, China;
3. Selenium-enriched Food Engineering Laboratory of Shaanxi Province, Ankang 725000, China)

Abstract: To establish a highly efficient extraction technology, extraction conditions of rice bran protein by alcalase were studied. Taking the extraction rate as target, the optimal processing conditions were determined by the single factor and orthogonal tests. The results revealed that the solid-liquid ratio was the most important factor to affect the extraction rate, followed by pH, temperature, time and alcalase concentration had little effect. After optimizing, the extraction conditions were: temperature 60 ℃, time 3.0 h, solid-liquid ratio 1 : 20, alcalase concentration 2.5%, pH 9.5. Under the conditions, the extraction rate reached 75.42%. Moreover, the isoelectric point of rice bran protein was 4.5.

Key words: rice bran protein; alcalase; extraction rate; processing conditions; optimization

米糠是糙米在碾白过程中碾下的皮层、米胚和少量碎米屑的混合物。通常米糠中脂肪含量 16%~20%, 蛋白质 12%~18%, 膳食纤维 14%, 灰分 11%, 碳水化合物总量 50% 左右^[1], 具有较高的营养价值。我国年产米糠 1 000 万 t 以上, 主要用作动物饲料, 米糠含有稻米 64% 的重要营养成分及

90% 以上的人体必需元素^[2], 是一种极具开发潜力的高附加值资源。米糠用作饲料, 其价值未能很好开发利用。米糠蛋白质含量几乎高出普通精米的 1 倍, 在提取糠油后, 进一步开发米糠蛋白, 可极大提高米糠的应用价值。本试验采用碱性蛋白酶对脱脂米糠进行酶解提取米糠蛋白, 优化提取工艺条件, 以

收稿日期: 2011-10-05

基金项目: 安康学院专项科研项目(2011AYZXZR04)

作者简介: 王晓雅(1979-), 女, 陕西旬阳人, 讲师, 在读硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术。

E-mail: akxywangxiaoya@163.com

* 通讯作者: 樊明涛(1963-), 男, 陕西富平人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品生物技术与食品安全研究。

E-mail: mingtaofan@163.com

期为米糠蛋白的开发应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

米糠(安康市兴安米业公司);碱性蛋白酶(英国 BDH 公司);石油醚(沸程 60~90℃)、 H_2SO_4 、 $NaOH$ 、 HCl 、 H_3BO_3 、 K_2SO_4 、 $CuSO_4$ 、甲基红、溴甲酚绿、甲醛,均为分析纯。

JJ-2 组织捣碎机(常州国华电器有限公司);pHS-3CpH 计(上海精密科学仪器有限公司);水浴恒温振荡器(国华电器有限公司);101-1A 型电热恒温干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);K9840 自动凯氏定氮仪(济南海能仪器有限公司);TGL-216G 高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 米糠脱脂 原料米糠经组织捣碎机进一步粉碎,过 0.301 mm 孔径筛,以 1:2($m:v$)的比例加入石油醚,在 40℃ 水浴恒温振荡器中保持 2 h,过滤,滤渣在 45℃ 下烘干,即得脱脂米糠。

1.2.2 米糠蛋白提取 脱脂米糠按比例加水,调节至所需 pH 值,加入酶,在水浴恒温振荡器中保温反应一定时间,取出在 80℃ 下灭酶 10 min。然后以 3 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,调节 pH 值至等电点,再 3 000 r/min 离心 20 min,沉淀经水洗,在 45℃ 下干燥即得米糠蛋白。公式如下:

$$\text{米糠蛋白提取率} = \frac{C_1}{C_2} \times 100\%,$$

式中: C_1 为提取液蛋白含量/g; C_2 为脱脂米糠蛋白含量/g。

1.2.3 米糠蛋白等电点的测定 取一定量脱脂米糠,与蒸馏水以料液比 1:15 混合,加 2%(质量百分比,下同)的碱性蛋白酶,用 20% 氢氧化钠调 pH 值至 9.5,50℃ 水浴振荡 2.5 h,取出后于 80℃ 下灭酶 10 min,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,测酸沉淀前上清液蛋白含量。并将其等体积分为 8 份,用 1 mol/L 盐酸调 pH 值依次为 3.9、4.1、4.3、4.5、4.7、4.9、5.1、5.3,室温静置 2 h,3 000 r/min 离心 20 min,分别测酸沉淀后上清液蛋白质含量,上清液蛋白质残留率最低者,即为米糠蛋白的等电点。公式如下:

$$\text{上清液蛋白质残留率} = \frac{C_2}{C_1} \times 100\%,$$

式中: C_1 为沉淀前上清液中蛋白质含量/g; C_2

为沉淀后上清液中蛋白质含量/g。

1.2.4 米糠蛋白提取单因素试验 以米糠蛋白提取的酶解温度、时间、料液比、加酶量、pH 值作为影响因素,以米糠蛋白提取率为指标,进行单因素试验,确定各影响因子对提取效果的影响。

1.2.5 米糠蛋白提取正交试验 在单因素试验的基础上,以酶解温度、时间、pH 值、料液比、加酶量为因素,以米糠蛋白提取率为指标,采用 $L_{16}(4^5)$ 进行正交试验,优化碱性蛋白酶法提取米糠蛋白的条件。因素水平见表 1。

表 1 米糠蛋白提取正交试验因素水平编码

水平	因素				
	温度/℃	时间/h	料液比	加酶量/%	pH
1	50	1.5	1:10	1.5	9.0
2	55	2.0	1:15	2.0	9.5
3	60	2.5	1:20	2.5	10.0
4	65	3.0	1:25	3.0	10.5

1.2.6 蛋白质含量的测定 采用凯氏定氮法(GB 5009.5-2010)测定蛋白质含量。

1.2.7 蛋白质水解度的测定 提取液中氨基酸态氮含量的测定采用甲醛滴定法^[3]。公式如下:

$$DH = \frac{N \times V \times 5.95}{G \times P} \times 100\%,$$

式中: DH 为水解度/%; N 为水解液中氨基酸态氮含量/(g/mL); V 为样品水溶液体积/mL; G 为脱脂米糠样品质量/g; P 为脱脂米糠蛋白质含量/%;5.95 为蛋白质换算系数。

2 结果与分析

2.1 米糠蛋白等电点的确定

蛋白质在 pH 值为等电点的溶液中溶解度最小。因此,从提取液中分离的蛋白可以调节 pH 值至等电点,从而使提取液中的蛋白最大程度地沉淀析出。米糠蛋白等电点测定结果如图 1 所示。由图 1 可知,米糠蛋白于不同 pH 值条件下沉淀后,上清液中的蛋白质残留率在 pH 值为 4.5 时最低。因此,4.5 为米糠蛋白的等电点,以此作为酸沉 pH 值。

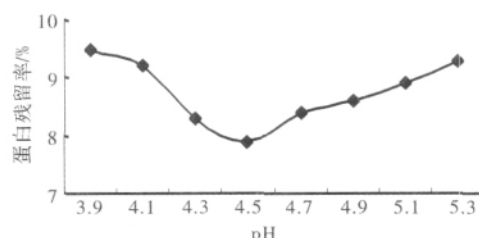


图 1 米糠蛋白等电点测定结果

2.2 米糠蛋白提取的单因素试验结果

2.2.1 温度对米糠蛋白提取率的影响 取 5 g 脱脂米糠,在料液比 1:15、pH 值 9、加酶量 2%、时间 2.5 h 的条件下,设置温度分别为 30℃、40℃、50℃、60℃、65℃、70℃ 进行处理,结果如图 2 所示。

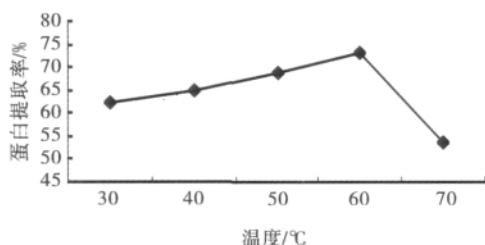


图 2 酶解温度对米糠蛋白提取率的影响

由图 2 可知,随着温度的升高,蛋白提取率不断增加,在 60℃ 时达到最高值;之后随着温度继续升高,可能酶受热变性,蛋白提取率下降。因此,温度控制在 60℃ 为宜。

2.2.2 酶解时间对米糠蛋白提取率的影响 取 5 g 脱脂米糠,在料液比 1:15、pH 值 9、加酶量 2%、温度 50℃ 的条件下,设置酶解时间分别为 1.0 h、1.5 h、2.0 h、2.5 h、3.0 h、3.5 h 进行处理,结果如图 3 所示。

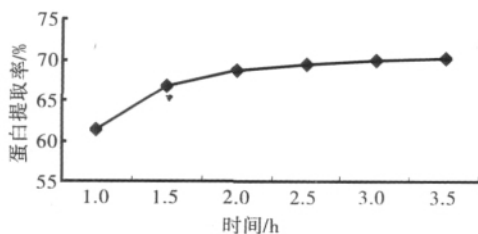


图 3 酶解时间对米糠蛋白提取率的影响

由图 3 可知,在 1.0~1.5 h,随着酶解时间的延长,蛋白提取率增加最快,在 1.5 h 后,蛋白提取率随时间延长增加缓慢,3.0 h 后基本平稳。

2.2.3 料液比对米糠蛋白提取率的影响 取 5 g 脱脂米糠,在 pH 值 9、加酶量 2%、温度 50℃、时间 2.5 h 的条件下,设置料液比分别为 1:5、1:10、1:15、1:20、1:25、1:30 进行处理,结果如图 4 所示。

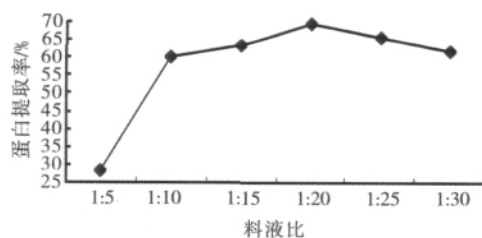


图 4 料液比对米糠蛋白提取率的影响

由图 4 可知,当料液比较低时,蛋白提取率低,

因为米糠中含有一定量的膳食纤维和淀粉,吸水膨胀能力较强^[4],料液比过小使得物料流动性差,难以搅拌混合,体系分散不均匀,不利于酶与米糠的有效反应,导致提取率低。随着料液比增加,蛋白提取率增大,当料液比达到 1:20 以后,蛋白提取率下降,这可能是过大的料液比降低了酶的相对浓度所致^[5]。因此,料液比可选择 1:20。

2.2.4 加酶量对米糠蛋白提取率的影响 取 5 g 脱脂米糠,在料液比 1:15、pH 值 9、温度 50℃、时间 2.5 h 的条件下,设置加酶量分别为 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5% 进行处理,结果如图 5 所示。

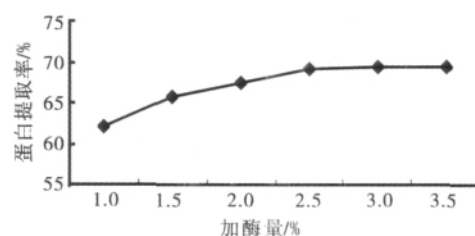


图 5 加酶量对米糠蛋白提取率的影响

由图 5 可知,加酶量从 1.0%~2.5% 增加时,蛋白提取率增幅较大,这主要是因为酶量的增加使得酶与底物结合的几率增加,酶解效率提高。加酶量从 2.5%~3.5% 增加时,蛋白提取率变化不明显,这可能是当加酶量达到 2.5% 后,酶的数量趋于饱和,再继续增加酶量,单位时间内一部分酶不与底物结合,酶解程度趋缓^[6]。因此,加酶量可确定为 2.5%。

2.2.5 pH 值对米糠蛋白提取率的影响 取 5 g 脱脂米糠,在料液比 1:15、加酶量 2%、温度 50℃、时间 2.5 h 的条件下,设置 pH 值分别为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11.0 进行处理,结果如图 6 所示。

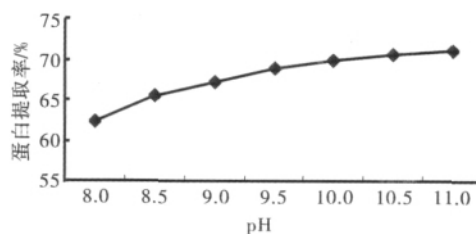


图 6 pH 值对米糠蛋白提取率的影响

由图 6 可知,随着 pH 值的升高,蛋白提取率持续增加,在 pH 值小于 10 时蛋白提取率增幅较大,pH 值大于 10 后增幅较小。pH 值过高,会导致淀粉糊化,以及酸沉时消耗大量酸,导致产品中的盐分增加,不利于后续分离工序的进行;同时 pH 值过高

还会引起脱氨、脱羧、肽键断裂以及生成有潜在毒性的赖氨酰胺丙氨酸^[7]。因此,适宜的 pH 值应小于 10。

2.3 米糠蛋白提取的正交试验结果

在单因素试验结果的基础上进行正交试验,结果见表 2。

表 2 米糠蛋白提取正交试验结果

编号	温度	时间	料液比	加酶量	pH	提取率 /%
1	1	1	1	1	1	52.79
2	1	2	2	2	2	68.41
3	1	3	3	3	3	67.26
4	1	4	4	4	4	66.45
5	2	1	2	3	4	67.24
6	2	2	1	4	3	52.68
7	2	3	4	1	2	67.86
8	2	4	3	2	1	70.56
9	3	1	3	4	2	71.06
10	3	2	4	3	1	71.19
11	3	3	1	2	4	52.85
12	3	4	2	1	3	69.55
13	4	1	4	2	3	68.58
14	4	2	3	1	4	66.89
15	4	3	2	4	1	66.57
16	4	4	1	3	2	56.24
K ₁	254.92	259.69	214.58	257.10	261.13	
K ₂	258.36	259.18	271.78	260.42	263.58	
K ₃	264.66	254.56	275.78	261.95	258.08	
K ₄	258.30	262.81	274.10	256.77	253.45	
k ₁	63.73	64.92	53.64	64.27	65.28	
k ₂	64.59	64.79	67.94	65.10	65.89	
k ₃	66.16	63.64	68.94	65.48	64.52	
k ₄	64.57	65.70	68.52	64.19	63.36	
R	2.43	2.06	15.30	1.29	2.53	

由表 2 可以看出,影响米糠蛋白提取率的主次因素顺序为:料液比>pH 值>温度>时间>加酶量。优化的米糠蛋白提取条件为:温度 60 ℃,时间 3.0 h,料液比 1:20,加酶量 2.5%,pH 值 9.5。以此条件进行 2 次验证试验,水解度分别为 7.69%和

7.80%,米糠蛋白提取率分别为 75.31%和 75.53%,提取率平均值为 75.42%,均高于正交试验最高值 71.19%,说明正交试验结果可靠。

3 结论

本研究测得米糠蛋白的等电点为 4.5。正交试验表明,在选定的试验条件下,各因素对米糠蛋白提取的影响大小顺次为:料液比>pH 值>温度>时间>加酶量。优化的碱性蛋白酶法提取米糠蛋白工艺条件为:温度为 60 ℃,时间为 3.0 h,料液比为 1:20,加酶量为 2.5%,pH 值为 9.5。在此工艺条件下,米糠蛋白提取率可达 75.42%。本试验对米糠蛋白提取工艺的研究,将为进一步研究米糠蛋白的特性、开发其利用价值提供科学依据。

参考文献:

[1] 赵东海,张建平,王云.米糠蛋白提取工艺和功能性质评价[J].食品工业,2005,27(5):24-28.

[2] 赵丽霞,刘学文.米糠多肽蛋白粉酶法生产新工艺研究[J].江西食品工业,2009,13(1):112-115.

[3] 黄伟坤.食品检验与分析[M].北京:轻工业出版社,1989:57-58.

[4] 李静,汪志华.米糠蛋白的特性及提取工艺[J].湖北农业科学,2006,45(6):123-127.

[5] 欧克勤,林立,王亚琴,等.不同蛋白酶处理对米糠蛋白溶解性的影响[J],食品科技,2009,34(2):78-82.

[6] 池爱平,陈锦屏,张海生,等.脱脂米糠酶法水解制备米糠营养素工艺研究[J].食品科学,2006,27(12):156-160.

[7] 金世合,陈正行.米糠蛋白提取和功能性质研究[J].粮食与油脂,2003,(6):46-49.

[8] 陈正行.米糠浓缩蛋白的提取及功能性质评价[J].食品与发酵工业,2000,26(4):17-19.