

## 米糠蛋白提取工艺优化研究

张金建<sup>1</sup>,赵优萍<sup>1</sup>,唐思煜<sup>1</sup>,蔡成岗<sup>1,2,3</sup>,毛建卫<sup>1,2,3</sup>

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院,杭州 310023;2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室,  
杭州 310023;3. 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心,杭州 310023)

**摘 要:** 采用超声辅助酶法提取米糠蛋白,并对蛋白质的氨基酸组成进行了初步的分析。结果表明,以纤维素酶提取米糠蛋白效果较好,其最佳工艺条件为提取温度 60 ℃、提取时间 5 h、料液质量体积比 1 : 9、pH 值 5.0、纤维素酶添加量 0.5%,在此条件下米糠蛋白提取率达到 63.11%。超声波辅助纤维素酶法提取的米糠蛋白含有 17 种氨基酸,其中 8 种为人体必需氨基酸;最高的 3 种为谷氨酸、赖氨酸和亮氨酸,含量最少的为脯氨酸、蛋氨酸和酪氨酸。研究结果可作为米糠蛋白提取的参考。

**关键词:** 米糠蛋白;酶法提取;工艺优化

**中图分类号:** TS210.9      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1671-8798(2017)03-0214-05

## Study on optimization of rice bran protein extraction process

ZHANG Jinjian<sup>1</sup>, ZHAO Youping<sup>1</sup>, TANG Siyu<sup>1</sup>, CAI Chenggang<sup>1,2,3</sup>, MAO Jianwei<sup>1,2,3</sup>

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Produce, Hangzhou 310023, Zhejiang, China; 3. Zhejiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agricultural Biological Resources Biochemical Manufacturing, Hangzhou 310023, Zhejiang, China)

**Abstract:** The article applied the ultrasonic assisted enzymatic method to extract rice bran protein and conducted the preliminary analysis on composition of the amino acid in the extracted protein. The results showed that cellulase was the optimal enzyme for extracting rice bran protein, and the extraction rate of rice bran protein was the highest, up to 63.11% when it was extracted at 1 : 9 rate of solid to solution and at 60 ℃ for 5 hours with pH value of 5.0 and

**收稿日期:** 2017-03-02

**基金项目:** 科技部国际科技合作专项项目(2010DFA34370);国家自然科学基金项目(30870553);浙江省重点研发计划项目(2015C02031);浙江省国际科技合作专项项目(2013C14012);浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心开放项目(2016KF0035,2016KF0044);浙江省分析测试科技计划研究项目(2017C37049)

**通信作者:** 毛建卫(1964— ),男,浙江省奉化人,教授,硕士,主要从事农业生物资源生化制造研究。E-mail: zjhzjmjw@163.com。

0.5% amount of cellulase. The extracted rice bran protein contained 17 kinds of amino acids, among which 8 were indispensable to human body and the highest in concentration were glutamic acid, lysine and leucine, and the lowest proline, methionine and tyrosine. The results can shed light on development of the rice bran protein.

**Keywords:** rice bran protein; enzymatic extraction; process optimization

中国每年的米糠产量为1 400多万t,居世界之首。米糠中含有30%~40%的淀粉、12%~18%的蛋白质、13%~22%的脂肪、23%~30%膳食纤维、8%~12%的灰分、7%~14%水分,以及丰富的维生素和矿物质<sup>[1-3]</sup>,其开发潜力巨大,但目前精深加工不足。米糠蛋白由清蛋白、球蛋白、谷蛋白和醇溶蛋白组成,其中所含的氨基酸组成比例接近人体需要。米糠蛋白还具有其独特的性质,如低过敏性,根据其低过敏的性质,常被用作婴幼儿食品原料。同时,它还具有良好的乳化、溶解、稳定等应用特性,在婴儿配方食品、功能食品、功能性多肽等行业,以及焙烤食品、咖啡、糖果、酱料和其他调味品等产品形式中得到广泛应用<sup>[4-6]</sup>。米糠蛋白的低过敏性凸显了其应用潜力。

目前提取米糠蛋白的方法包括碱法<sup>[7]</sup>、物理法和酶法<sup>[8-12]</sup>,采用辅助手段包括超声波等方法<sup>[13]</sup>。其中,碱法中过高的pH值会破坏蛋白质的营养特性,对产品风味、色泽等理化性质也有不利影响;物理法如采用胶体磨等超微粉碎装置提取米糠蛋白,则效率低、设备投入大;酶法提取可以将蛋白质适度降解为活性肽,有利于胃肠道的消化和吸收,具有工业化的潜力<sup>[14-15]</sup>。综合考虑上述方法的优劣后,笔者运用超声波辅助水酶法提取米糠蛋白,在采用不同酶的条件下选取优质酶,并在此基础上进行单因素和正交试验以作优化,以期米糠蛋白的综合利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与试剂

新鲜米糠(浙江恒乐粮食有限公司),脱脂后冷藏备用。氢氧化钠(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),考马斯亮蓝G250(上海迈坤化工有限公司)、葡萄糖(广州市德松化工有限公司)、尿素(天津市鼎盛鑫化工有限公司),以及5种酶制剂,试剂均为分析纯。

### 1.2 试验仪器

数显恒温水浴锅HH-4(金坛市天瑞仪器有限公司),博讯BSD-YF3600立式双层智能精密恒温摇床(上海百典仪器有限公司),上海雷磁PHS-3C型pH计(上海仪电科学仪器股份有限公司),电子分析天平(上海方瑞仪器有限公司),UV-1100紫外分光光度计(上海美普达有限公司),离心机TDL-20B(上海安亭科学仪器厂),L-8900全自动氨基酸测定仪(日本日立公司),600W超声波清洗器(北京科玺超声波清洗机有限公司)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 米糠蛋白提取的工艺流程

米糠蛋白超声波辅助水酶法提取工艺流程为:将脱脂米糠粉碎→按照一定料液质量体积比加入蒸馏水→搅拌→超声提取→80℃条件下使酶失活10min→8 000 r/min离心20min→40℃旋转蒸发→去离子水定容测定蛋白质含量。

#### 1.3.2 单因素试验设计

1.3.2.1 酶的选择 称取脱脂米糠20g,在料液质量体积比1:8,提取时间为4h,反应温度为60℃,以及pH值为5.0的条件下,300W的超声功率提取20min,考察酶的选择对提取效率的影响:加入1%纤维素酶(最适温度为45~65℃、最适pH值为4.0~5.5),1%木瓜蛋白酶(最适温度为50~60℃、最适pH值为5.0~7.0),1%中性蛋白酶(最适温度为40~60℃、最适pH值为6.0~8.0),1%复合蛋白酶(最适温度为35~60℃、最适pH值为5.5~7.5)和1%碱性蛋白酶(最适温度为50~60℃、最适pH

值为 8.0~9.0)。

1.3.2.2 其他条件的优化 在上述基本试验条件不变的情况下,采用纤维素酶,分别以料液质量体积比 1:5、1:6、1:8、1:9、1:10,酶解时间 60、120、180、240、300 min,酶解温度 20、30、40、50、60 ℃,酶解 pH 值 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0,加酶量 0%、0.125%、0.25%、0.5%、1%为因素,对脱脂米糠进行单因素试验。

### 1.3.3 正交试验设计

在单因素试验的基础上,通过选取酶解时间、酶解温度和料液质量体积比 3 个影响较大的因素作为变量,设计  $L_9(3)^3$  正交试验,通过正交试验选取更优的米糠蛋白提取工艺参数。正交试验因素和水平如表 1 所示。

### 1.3.4 可溶性蛋白质含量测定

采用考马斯亮蓝比色法:测定的蛋白质总含量除去加入的酶含量即为提取的米糠蛋白的含量。

### 1.3.5 米糠蛋白氨基酸组成分析

参照 GB/T 5009.124—2003《食品中氨基酸的测定方法》测定游离氨基酸。配制 6 mol/L 的 HCl 溶液,称量 50 mg 蛋白样品于 100 mL 烧杯中,在烧杯中加入 10 mL 6 mol/L 的 HCl 溶液,充入  $N_2$ ,用耐高温的橡胶套袋进行真空密封,将其放在干燥箱中,保持温度在 110 ℃ 的条件下水解 24 h,在常温下冷却,用去离子水定容至 100 mL,量取 5 mL 样液进行真空冷冻干燥,加入 3 mL 0.02 mol/L HCl 溶液,震荡使其充分溶解,再进行抽滤,取液体通过 0.22  $\mu m$  滤膜,以氨基酸自动分析仪进行分析。按照上述方法对纤维素酶中氨基酸含量进行检测作为对照,以除去酶对米糠蛋白中氨基酸检测的影响。

## 2 结果与讨论

### 2.1 牛血清蛋白的标准曲线

建立米糠蛋白测定的标准曲线,如图 1 所示。由图 1 可知,该标准曲线的  $R^2$  为 0.997 6,  $y=6.503 6x+0.004 2$ ,符合测定标准。本文中关于蛋白质含量的计算都运用此公式。

### 2.2 单因素试验结果

#### 2.2.1 酶种类对米糠蛋白提取率的影响

不同种类的酶对提取结果的影响不同,5 种酶在相同添加量的情况下,对蛋白提取率促进作用由大到小依次为:纤维素酶(提取率为 62.8%)> 木瓜蛋白酶(提取率为 54.6%)> 中性蛋白酶(提取率为 43.2%)> 复合蛋白酶(提取率为 41.3%)> 碱性蛋白酶(提取率为 30.06%)。纤维素酶是一种糖酶,其主要作用是分解细胞壁,而米糠的细胞壁主要由纤维素和多糖类物质组成,通过运用纤维素酶破坏其细胞壁,以达到细胞壁内蛋白类物质的释放,这样有助于提高蛋白的提取率。

#### 2.2.2 温度对米糠蛋白提取率的影响

以脱脂米糠作为反应原料称取 20 g,料液质量体积比为 1:8,提取时间 4 h,pH 值为 5,超声波处理时间为 15 min,超声功率为 300 W,纤维素酶添加量为 0.5%,调节温度分别为 20、30、40、50、60 ℃ 进行提取,研究不同温度对米糠蛋白提取率的影响,如图 2 所示。由图 2 可知,随着温度的升高米糠蛋白的提取率逐渐上升,在温度低于 50 ℃ 时,随着温度的上

表 1 正交试验因素和水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal experiments

水平	因素		
	A	B	C
	温度/℃	时间/h	料液质量体积比
1	40	3	1:8
2	50	4	1:9
3	60	5	1:10

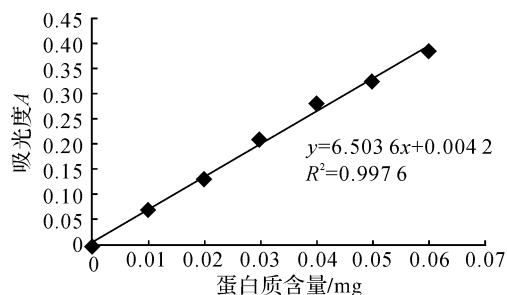


图 1 考马斯亮蓝法测定蛋白标准曲线

Fig. 1 Standard curve of protein concentration analyzed by Bradford method

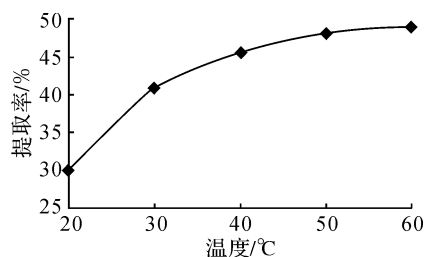


图 2 温度对米糠蛋白提取率的影响

Fig. 2 Effects of different temperatures on rice bran protein extraction rate

升,米糠蛋白的提取率上升得较快,对蛋白的提取有利;而当温度高于 50 ℃后,蛋白的提取率上升较慢且基本保持不变,因此选择最佳温度为 50 ℃。

### 2.2.3 pH 值对米糠蛋白提取率的影响

以脱脂米糠为反应原料称取 20 g,料液质量体积比为 1:8,提取时间为 4 h,温度为 60 ℃,超声波处理时间为 15 min,超声功率为 300 W,纤维素酶添加量为 0.5%,调节 pH 值分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 进行提取,研究不同 pH 值对米糠蛋白提取率的影响,如图 3 所示。从图 3 可以看出,在较低 pH 值下,随着 pH 值的不断升高,蛋白提取率呈不断增加的趋势,至 pH 值为 5.0 左右达到最佳水平。这可能是因为较高的 pH 值影响纤维素酶的活性,进而对蛋白的提取产生一定的影响。

### 2.2.4 纤维素酶添加量对米糠蛋白提取率的影响

调节纤维素酶添加量分别为 0%、0.125%、0.25%、0.5%、1% 进行提取,研究纤维素酶添加量对米糠蛋白提取率的影响。由图 4 可知,随着加酶量的不断提高,米糠蛋白提取率不断上升,当添加量达到 0.25% 时,提取率趋于稳定。原因可能是当加酶量在 0.125%~0.25% 时,随着加酶量的增加,增大了酶和底物相结合的概率而使提取率升高。当加酶量大于 0.25% 时,酶的数量趋于饱和状态,无法再与底物相结合,因而提取率没有明显增加。当酶的添加量大于 0.5% 时,米糠蛋白提取率下降。

### 2.2.5 时间对米糠蛋白提取率的影响

从图 5 可以看出,随着时间的增加,米糠蛋白的提取率不断增加。在提取时间少于 3 h 时,米糠蛋白提取率随着时间的增加上升幅度较大;而在提取时间超过 3 h 后,米糠蛋白的提取率上升比较缓慢。在综合生产成本和效率的情况下,选择最佳提取时间为 3 h。

### 2.2.6 料液质量体积比对米糠蛋白提取率的影响

以脱脂米糠作为反应原料称取 20 g,提取时间为 4 h,温度为 60 ℃,超声波处理时间为 15 min,超声功率为 300 W,pH 值为 5.0,纤维素酶添加量为 0.5%,料液质量体积比为 1:5、1:6、1:8、1:9、1:10 进行提取,研究料液质量体积比对米糠蛋白提取率的影响,如图 6 所示。

由于米糠中含有较多的膳食纤维和淀粉,具有较强的吸水膨胀能力,料液质量体积比过低时,物料变得黏稠,流动性差,难以搅拌,体系分散不均匀,使底物无法完全与酶相结合,从而导致较低的提取率。降低料液质量体积比虽然可以提高蛋白质的提取率,但无疑又增加了水的用量,使废水排放量增加。从图 6 可以看出,液料质量体积比为 1:9 时,虽然蛋白质提取率仍在升高,但增幅不大,因此,选择液料质量体积

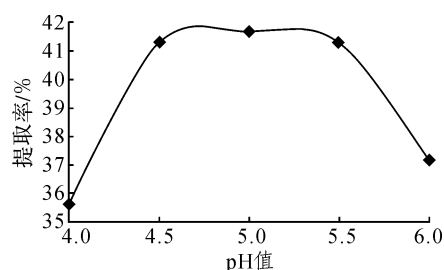


图3 pH 值对米糠蛋白提取率的影响

Fig. 3 Effects of different pH values on rice bran protein extraction rate

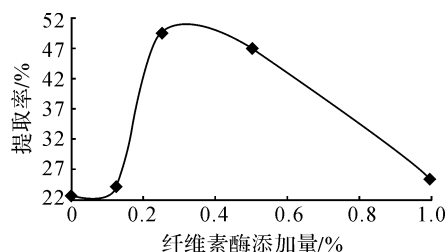


图4 纤维素酶添加量对米糠蛋白提取率的影响

Fig. 4 Effects of cellulase quantities on rice bran protein extraction rate

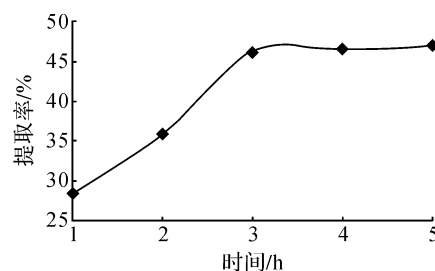


图5 时间对米糠蛋白提取率的影响

Fig. 5 Effects of time on rice bran protein extraction rate

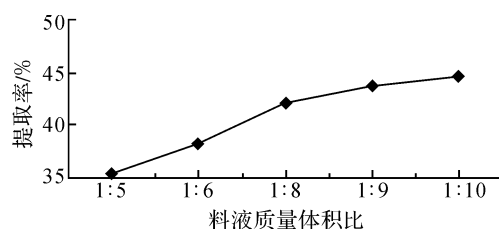


图6 料液质量体积比对米糠蛋白提取率的影响

Fig. 6 Effects of solid-to-solution ratio on rice bran protein extraction rate

比为 1 : 9 较合适。

2.2.7 正交试验结果

由表 2~3 可以看出,设定的三因素主次顺序为: $A>B>C$ ,即酶解温度>酶解时间>料液质量体积比。

表2 正交试验方案结果

Table 2 Results of orthogonal experiments				
实验号	A	B	C	提取率/%
1	1(40)	1(3)	1(1 : 8)	45.93
2	1(40)	2(4)	2(1 : 9)	49.87
3	1(40)	3(5)	3(1 : 10)	55.63
4	2(50)	1(3)	2(1 : 9)	53.47
5	2(50)	2(4)	3(1 : 10)	60.23
6	2(50)	3(5)	1(1 : 8)	55.28
7	3(60)	1(3)	3(1 : 10)	58.27
8	3(60)	2(4)	1(1 : 8)	62.78
9	3(60)	3(5)	2(1 : 9)	63.11

表3 极差分析结果

Table 3 Range analysis results			
K 值	A	B	C
$K_1$	151.43	157.67	163.99
$K_2$	168.98	172.88	166.45
$K_3$	184.16	174.02	174.13
$k_1$	50.48	52.56	54.66
$k_2$	56.33	57.63	55.48
$k_3$	61.39	58.01	58.04
R	10.91	5.45	3.38
主次顺序	$A>B>C$		
最优水平	$A_3$	$B_3$	$C_2$
最优组合	$A_3B_3C_2$		

2.3 米糠蛋白氨基酸组成分析

从超声波辅助纤维素酶法提取的米糠蛋白中分离出 17 种氨基酸,结果如表 4 所示。由表 4 可知,米糠蛋白含有 17 种氨基酸,含有人体必需的 8 种氨基酸,其中氨基酸的比例与人体必需的氨基酸比例比较接近,含量最高的 3 种氨基酸为谷氨酸、赖氨酸和亮氨酸,含量最少的氨基酸为脯氨酸、蛋氨酸和酪氨酸。从营养学角度来看,米糠蛋白中氨基酸与其他谷物蛋白中氨基酸相比较,米糠蛋白中氨基酸的组成更接近世界卫生组织所提供的人体必需的氨基酸标准模式。米糠蛋白中谷氨酸的含量最高,谷氨酸是一种酸性氨基酸,在生物体内的蛋白质代谢中起重要的作用,在医学上用于改善儿童的智力发育,现在被广泛地应用在日用化妆品上。

表4 100 g 米糠蛋白中氨基酸的组成

Table 4 Amino acids composition of rice bran protein per 100 g g

氨基酸种类	含量
亮氨酸	5.79
精氨酸	5.18
脯氨酸	0.92
赖氨酸	6.87
异亮氨酸	2.68
蛋氨酸	1.42
酪氨酸	2.45
组氨酸	2.76
苯丙氨酸	4.05
谷氨酸	9.89
丝氨酸	4.03
半胱氨酸	2.91
天冬氨酸	5.26
甘氨酸	3.87
苏氨酸	3.57
缬氨酸	3.16
丙氨酸	3.60

3 结 论

通过单因素试验和正交试验,对超声波辅助纤维素酶提取米糠蛋白的工艺进行优化,选取了最佳的工艺条件:提取温度为 60 ℃、提取时间为 5 h、料液质量体积比为 1 : 9、pH 值为 5、纤维素酶添加量为 0.5%,在此条件下米糠蛋白提取率达到 63.11%。米糠蛋白含有 17 种氨基酸,有 8 种是人体必需的氨基酸,其中最高的 3 种为谷氨酸、赖氨酸和亮氨酸,含量最少的为脯氨酸、蛋氨酸和酪氨酸。本研究结果可供米糠蛋白的提取参考。

参考文献:

[1] 俞明伟,张名位,孙远明,等.米糠蛋白及其活性肽的研究与利用进展[J].中国粮油学报,2009,24(5):154.  
[2] 江爱芝,王燕.米糠蛋白提取方法的研究进展[J].粮食与油脂,2009(10):35.