

文章编号:2095-7386(2016)01-0099-05

DOI:10.3969/j.issn.2095-7386.2016.01.022

米渣蛋白双酶法制备工艺的研究

曾国强¹, 胡中泽^{1,2}

(1. 武汉轻工大学 食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023; 2. 农产品加工湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430023)

摘 要:以淀粉糖生产过程中产生的副产物米渣为原料,先用正己烷进行脱脂,采用高温 α -淀粉酶和纤维素酶双酶法对米渣进行酶解,提高蛋白质的纯度,研究了液固比、高温 α -淀粉酶添加量、纤维素酶添加量、双酶酶解时间对蛋白质纯度的影响。在单因素试验的基础上,通过正交试验优化,确定了米渣蛋白的最佳提取工艺为:液固比8:1,高温 α -淀粉酶添加量300 U/mL,纤维素酶添加量110 U/g,高温 α -淀粉酶作用时间1.5 h,纤维素酶作用时间2.5 h。在此条件下米渣蛋白的纯度为93.8%,得率为88.76%。

关键词:米渣蛋白;蛋白质纯度;酶添加量

中图分类号:TS 210.9

文献标识码:A

Study on double enzymatic preparation of rice residue protein

ZENG Guo-qiang¹, HU Zhong-ze^{1,2}

(1. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;

2. Hubei Collaborative Innovation Center for Processing of Agricultural Products, Wuhan 430023, China)

Abstract: By product rice residue of starch sugar production process for raw materials, rice residue was first de-greased with n-hexane, rice residue was hydrolysed at high temperature α - amylase and cellulase double enzyme, to improve the purity of protein. Effects of liquid-solid ratio, the amount of high-temperature α - amylase, cellulase dosage, double enzyme hydrolysis time on protein purity were studied. On the basis of single factor test, through or-thogonal experiment, best rice residue protein good extraction process was determined: liquid to solid ratio of 8:1, the amount of high-temperature α -amylase 300U/mL, cellulase enzyme dosage 110U/g, high temperature α - amyl-ase time 1.5h, the cellulase reaction time 2.5h. Under these conditions, rice residue protein purity was 93.8%, yield was 88.76%.

Key words: rice residue protein; purity of protein; the amount of enzyme

1 引言

米渣是以早籼稻或碎米为原料生产淀粉糖或发
酵生产谷氨酸、柠檬酸、乳酸以及生化药品时,米粉

高温液化或是糖化后的副产品。在以大米为原料的
工业生产(如发酵和淀粉糖等)中一般只利用大米的
淀粉部分,副产品米渣中蛋白质含量为40%以上,
是纯大米的5—7倍^[1]。米渣中的蛋白质虽然经
过高温处理,但它仍保留了大米中蛋白质的部分性

收稿日期:2015-11-30.

作者简介:曾国强(1991-),男,硕士研究生,E-mail:974401442@qq.com.

质,具有大米蛋白的很多优点,不含影响食物利用的毒性和酶阻碍物^[2]。大米蛋白氨基酸组成平衡合理,与 WHO/FAO 推荐理想模式非常接近^[3]。大米蛋白具有良好的氨基酸组成配比和低过敏性,消化率较高,是一种优良的植物蛋白^[4]。在谷物蛋白中,大米蛋白的生物价(B. V.)和蛋白价(P. V.)均比其他蛋白质高^[5]。长期以来,米渣以干粉的形式廉价卖给饲料厂,经济效益很低,米渣的增值利用一直是企业难以解决的难题^[6]。

米渣中提取大米蛋白的方法主要有碱洗酸沉法、纤维素酶和酸洗法,碱酶两步法等^[7]。强碱能使大米淀粉的紧密结构变得疏松,同时,碱液对蛋白质分子的次级键特别是氢键有破坏作用,从而促使淀粉和蛋白质分离,但是强碱的处理会引起大米蛋白理化性质的改变,降低其营养价值,产生有毒物质。另外,碱法还具有等电点要大量消耗酸、脱盐纯化难度大等问题^[8]。酶法提取主要是采用一些蛋白酶对大米蛋白进行降解和修饰作用,使其变成可溶性多肽而被提取,酶法提取的米渣蛋白溶解性较好,但酶法提取率较低^[9]。米渣中除蛋白质外,非蛋白成分主要有油脂、未经酶水解或水解不完全而残留的纤维素、淀粉和糊精等糖类物质。除杂法实质上是一个纯化的过程,从理论上分析具有更多的合理性。由于纤维素酶和淀粉酶的使用使提取成本有所提高,因此提取的工艺需要进一步优化,降低生产成本,提高产品的纯度和提取率^[10]。本文采用排杂法制备米渣蛋白,先用正己烷脱脂,用高温 α -淀粉酶酶解去除大部分淀粉,在用纤维素酶酶解去除大部分纤维素等多糖,用高温水水洗米渣蛋白去除糊精、酶解产生的糖类物质和盐类物质,最后获得高纯度的米渣蛋白。

2 材料与方法

2.1 主要材料与试剂

米渣:(湖北仙源米业集团有限公司),高温 α -淀粉酶:20 000 U/mL,(江苏锐阳生物科技有限公司),纤维素酶:10 000 U/g,(阿拉丁(上海)试剂有限公司),正己烷、氢氧化钠、浓硫酸、浓盐酸、定氮指示剂、硫酸铜、硫酸钾:均为分析纯。

2.2 主要设备和仪器

pH 计 FE20:(梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司);85-2 数显恒温磁力搅拌器:(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司);SHA-C2 水浴恒温振荡器:(常州华冠仪器制造有限公司);k9840 自动凯式

定氮仪:(济南海能仪器股份有限公司);电热鼓风干燥箱:(上海一恒科学仪器有限公司);SHZ-III 型循环水真空泵:(上海亚荣生化仪器厂)。

2.3 试验方法

2.3.1 米渣蛋白提取工艺流程

米渣→过 20 目筛→脱脂→抽滤→通风厨吹干→加入一定比例的水→用氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.0→90 ℃水浴 10 min,摇速 120 r/min→加入高温 α -淀粉酶反应一段时间→冷却→调节 pH 值至 4.5→55 ℃水浴 10 min,摇速 120 r/min→加入纤维素酶反应一段时间→抽滤→90 ℃水洗→抽滤→电热鼓风干燥箱内干燥并保存样品

2.3.2 蛋白质含量测定方法

蛋白质:按 GB5009.5-2010 中的凯式定氮法进行测定,其中蛋白质系数为 6.25。

2.3.3 米渣脱脂

参照文献[1]的方法加以改进,称取 20 g 过 20 目筛的米渣,加入正己烷,料液比为 1:3,在 60 ℃水浴恒温振荡器下脱脂 4 h,摇速为 120 r/min。

2.3.4 单因素试验

单因素试验在液固比 8:1、高温 α -淀粉酶添加量 200 U/mL、纤维素酶添加量 100 U/g、酶解时间:高温 α -淀粉酶 1 h 与纤维素酶 2 h 的基础上,相应变换某因素的水平。液固比选择 4:1、6:1、8:1、10:1,高温 α -淀粉酶添加量选择 100 U/mL、200 U/mL、300 U/mL、400 U/mL,纤维素酶添加量选择 60 U/g、80 U/g、100 U/g、120 U/g,酶解时间选择高温 α -淀粉酶 1 h 与纤维素酶 1 h、高温 α -淀粉酶 1 h 与纤维素酶 2 h、高温 α -淀粉酶 2 h 与纤维素酶 3 h、高温 α -淀粉酶 2 h 与纤维素酶 4 h,按提取工艺流程提取,测样品的蛋白质纯度,考察各因素对蛋白质纯度的影响。

2.3.5 正交试验

选取液固比、高温 α -淀粉酶添加量、纤维素酶添加量、酶解时间 4 个因素,以样品的蛋白质纯度为指标,用 $L_9(3^4)$ 正交实验表进行正交实验,因素水平表如表 1 所示。

3 结果与分析

3.1 单因素实验结果与分析

3.1.1 液固比对米渣蛋白质纯度的影响

液固比影响酶与底物接触和碰撞的几率,与酶解工艺相关,因此会影响蛋白质纯度,液固比对蛋白质纯度的影响如图 1 所示。

表 1 正交试验因素水平表

水平	因素			
	(A) 液固比	(B) 高温 α-淀 粉酶添加量 /(U/mL ⁻¹)	(C) 纤维素酶 添加量 /(U/g ⁻¹)	(D) 酶解时间
1	7	250	90	高温 α-淀 粉 酶 0.5 h, 纤维素酶 1.5 h
2	8	300	100	高温 α-淀 粉 酶 1 h, 纤维素酶 2 h
3	9	350	110	高温 α-淀 粉 酶 1.5 h, 纤维素酶 2.5 h

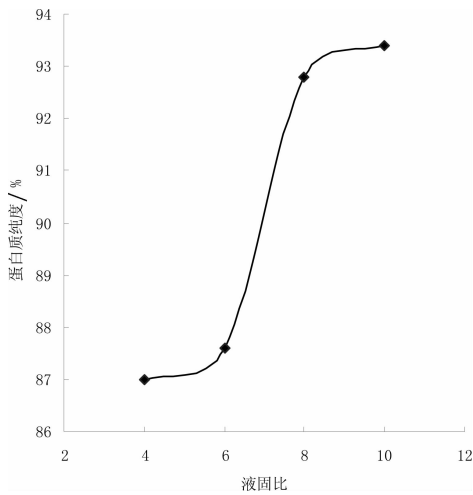


图 1 液固比对蛋白质纯度的影响

从图 1 可看出,液固比增大,蛋白质纯度呈上升趋势,液固比从 4 到 6 时,蛋白质纯度不高,而且上升趋势趋于平稳。液固比从 6 到 8,蛋白质纯度有明显的上升趋势,可能是液固比从 6 开始,酶与底物碰撞几率越来越大,因此蛋白质纯度越来越高,液固比从 8 开始,酶与底物接触的几率很大且趋于稳定,从后期液体处理量以及经济角度考虑,选择液固比 8。

3.1.2 高温 α-淀粉酶添加量对蛋白质纯度的影响

高温 α-淀粉酶添加量直接影响酶解工艺,影响去淀粉的程度和能力,从而影响蛋白质的纯度,高温 α-淀粉酶添加量对蛋白质纯度的影响如图 2 所示。

从图 2 看出高温 α-淀粉酶添加量从 100 U/mL 到 300 U/mL 时,蛋白质纯度呈上升趋势,从 300 U/mL 开始,蛋白质纯度呈下降趋势,可能是 300 U/mL 之前,高温 α-淀粉酶添加量越大,酶与底物接触和碰撞的几率就越大,酶解越彻底,蛋白质纯度就越高,300 U/mL 之后,高温 α-淀粉酶添加量越大,反

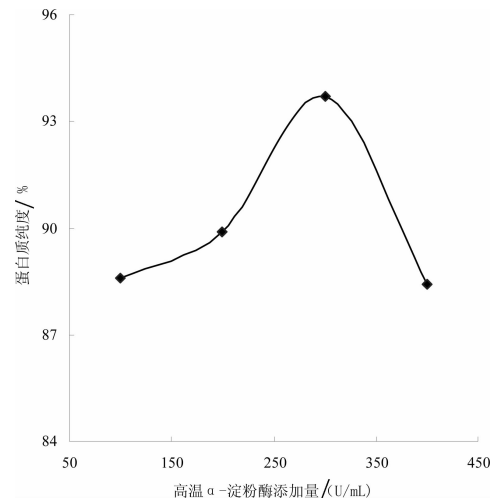


图 2 高温 α-淀粉酶添加量对蛋白质纯度的影响

而抑制了酶与底物接触和碰撞,酶解不彻底,蛋白质纯度更低。因此选择高温 α-淀粉酶添加量为 300 U/mL。

3.1.3 纤维素酶添加量对蛋白质纯度的影响

纤维素酶添加量影响去纤维素等多糖的程度和能力,从而影响蛋白质纯度,纤维素酶添加量对蛋白质纯度的影响如图 3 所示。

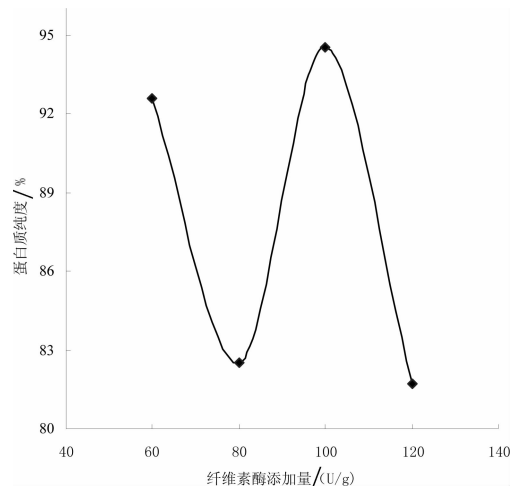


图 3 纤维素酶添加量对蛋白质纯度的影响

从图 3 可看出,随着纤维素酶添加量变化,蛋白质纯度呈波浪形变化,纤维素酶添加量从 60 U/g 到 80 U/g,蛋白质纯度呈下降趋势。纤维素酶添加量从 80 U/g 到 100 U/g,细胞壁破裂的较多,纤维素酶添加量越大,加速了纤维素等物质的酶解,蛋白质纯度呈上升趋势。纤维素酶添加量从 100 U/g 到 120 U/g,随着纤维素酶添加量增加,反而抑制了酶与底物接触与碰撞。因此选择纤维素酶添加量为 100 U/g。

3.1.4 酶解时间对蛋白质纯度的影响

高温 α-淀粉酶和纤维素酶的酶解时间影响去

除淀粉和纤维素等物质的程度,从而影响蛋白质纯度,酶解时间对蛋白质纯度的影响如图 4 所示。

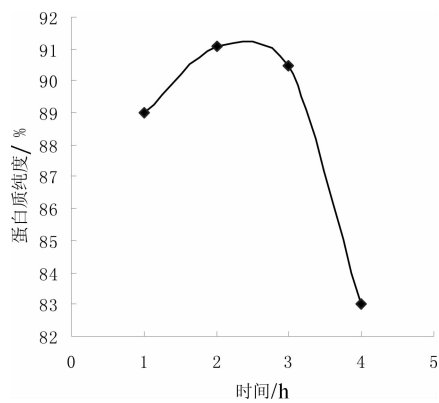


图 4 酶解时间对蛋白质纯度的影响

注:1 表示高温 α -淀粉酶 1 h,纤维素酶 1 h,2 表示高温 α -淀粉酶 1 h,纤维素酶 2 h,3 表示高温 α -淀粉酶 2 h,纤维素酶 3 h,4 表示高温 α -淀粉酶 2 h,纤维素酶 4 h

从图 4 可看出,从高温 α -淀粉酶 1 h、纤维素酶 1 h 到高温 α -淀粉酶 1 h、纤维素酶 2 h,随着纤维素酶时间从 1 h 到 2 h,可能是此时底物浓度较大,随着纤维素酶酶解时间增长,蛋白质纯度增加。从高温 α -淀粉酶 1 h、纤维素酶 2 h 到高温 α -淀粉酶 2 h、纤维素酶 3 h,蛋白质纯度趋于平稳趋势。从高温 α -淀粉酶 2 h、纤维素酶 3 h 到高温 α -淀粉酶 2 h、纤维素酶 4 h,蛋白质呈下降趋势,可能是因为随着纤维素酶的作用时间增长,酶活力下降。因此选择高温 α -淀粉酶 1 h,纤维素酶 2 h。

3.2 正交试验结果及分析

正交试验结果及分析如表 2 和表 3 所示。

表 2 正交试验结果

试验号	A	B	C	D	蛋白质 纯度/%
1	1	1	1	1	89.4
2	1	2	2	2	91.7
3	1	3	3	3	92.3
4	2	1	2	3	92.1
5	2	2	3	1	93.3
6	2	3	1	2	92.7
7	3	1	3	2	90
8	3	2	1	3	92.5
9	3	3	2	1	89.2
K1	276.1	277.5	270.9	184.4	
K2	276	274.2	185.6	274.8	
K3	181.7	182.1	277.3	274.6	
k1	91.1	90.5	91.5	90.6	
k2	92.7	92.5	91	91.5	
k3	90.6	91.4	91.9	92.3	
极差 R	2.1	2	0.9	1.7	

表 3 主体间效应的检验

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	37.320 ^a	8	4.665	67.718	0.000
Intercept	150.590	1	150.590	2185.994	0.000
A	14.653	2	7.327	106.355	0.000
B	12.040	2	6.020	87.387	0.000
C	2.293	2	1.147	16.645	0.001
D	8.333	2	4.167	60.484	0.000
Error	0.620	9	0.069		
Total	150.628	18			
Corrected Total	37.940	17			

注:a 表示 R Squared 0.984(Adjusted 及 squared =0.969)

根据表 2 的试验结果可知:蛋白质纯度影响因素由大到小依次是液固比 A > 高温 α -淀粉酶添加量 B > 酶解时间 D > 纤维素酶 C,由各因素的平均值可以比较出最优水平,并初步确定最佳组合为 A₂B₂C₃D₃,即液固比 8:1,高温 α -淀粉酶添加量 300 U/mL,纤维素酶添加量 110 U/g,高温 α -淀粉酶酶解时间 1.5 h,纤维素酶酶解时间 2.5 h。

根据表 3 的试验结果可知:液固比 A、高温 α -淀粉酶添加量 B、纤维素酶 C、酶解时间 D 对蛋白质纯度都有非常显著的影响,影响因素的主次顺序为液固比 A > 高温 α -淀粉酶添加量 B > 酶解时间 D > 纤维素酶 C,与极差法分析结果一致。对最优组合条件进行验证的结果:蛋白质纯度为 93.8%,得率为 88.76%。

3 结论

采用双酶法制备米渣蛋白,蛋白质纯度和得率均较高,通过实验确定了米渣蛋白双酶法制备的最佳工艺为:液固比 8:1,高温 α -淀粉酶添加量 300 U/mL,纤维素酶添加量 110 U/g,高温 α -淀粉酶作用时间 1.5 h,纤维素酶作用时间 2.5 h。在此条件下米渣蛋白的纯度为 93.8%,得率为 88.76%。

参考文献:

[1] 孙红星,庞雪凤,尤梦圆,等. 从米渣中制备米渣蛋白的研究[J]. 农业机械,2013(23):50-53.

- [2] 李明,李赞高,高红艳. 大米蛋白研究概述[J]. 粮食与油脂, 2006(8):3-5.
- [3] 姚惠源,周素梅,王立,等. 米糠和米糠蛋白的开发利用[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(3):312-316.
- [4] 董欢欢,曹树稳,余燕影. 异抗坏血酸钠改善米渣蛋白加工性能的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(4):167-191.
- [5] 余兆海. 稻谷综合利用[M]. 北京:中国农业出版社, 1987:1-15.
- [6] 王威,曾里. 中性蛋白酶提取米渣中大米蛋白的工艺研究[J]. 饲料工业, 2008, 29(6):35-37.
- [7] 黄军,熊华,李亮,等. 米渣美杰工艺及其蛋白等电点测定[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9):174-176.
- [8] 陈季旺,孙庆杰,夏文水,等. 碱酶两步法制备大米蛋白的研究[J]. 农业工程学报, 2006, 22(5):169-172.
- [9] 李清筱,王修法. 碱性蛋白酶提取米蛋白的功能特性研究[J]. 广西轻工业, 2006, 6:17-18.
- [10] 江漓,林洮,赵小虎,等. 除杂和酶法相结合提取米渣蛋白[J]. 2011, 36(12):179-186.
- [11] 任东东. 米渣蛋白改性及在高蛋白粉末油脂中的应用[D]. 南昌:南昌大学, 2008.