

粟米米糠水溶性蛋白的提取工艺优化

李新华, 马博, 钱丹丹, 白宏琦

(沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866)

摘要:以粟米米糠为原料,采用碱溶酸沉法提取其中蛋白质并对提取工艺进行响应面优化。探讨了pH、提取温度、提取时间、水料比等因素对粟米米糠蛋白质提取率的影响。在单因素实验结果的基础上,选取了影响蛋白质提取率的3个关键因素(水料比、温度、pH)进行三因素三水平Box-Behnken中心组合实验设计,以蛋白质提取率为响应值,建立数学模型并得到粟米米糠蛋白质提取最佳条件为:提取时间1.5h、pH10、提取温度46℃、水料比11:1,蛋白质提取率达到79.15%。

关键词:粟米米糠,蛋白质,提取工艺,响应面优化

Optimization of extraction process for corn bran protein

LI Xin-hua, MA Bo, QIAN Dan-dan, BAI Hong-qi

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In this study, the protein was extracted from corn bran and alkali extraction was selected to optimize by response surface method. The effects of extraction pH, extraction time, extraction temperature, solvent/material ratio and on extraction efficiency were explored. Based on the single-factor experiments, the three key factors, including pH, temperature, solvent/material ratio were selected to design the three-factors-three-levels Box-Behnken experiments design. As a result, a mathematical model was established and the optimum protein extraction condition of corn bran were: extraction time 1.5h, extraction temperature 46℃, pH10, material/solvent ratio 1:11, resulting in an extraction yield of 79.15%.

Key words: corn bran; protein; extraction process; response surface optimization

中图分类号: TS213.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2014)20-0295-05

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2014.20.056

粟(*Setaria italica*)俗称谷子,是我国北方干旱和半干旱地区的主要杂粮作物,在我国种植面积约有200万公顷,年产量500万吨左右。粟米米糠是谷子在碾米过程中被褪下的种皮、糊粉层和米胚芽的混合物,约占谷子的7%~12%,其中含有丰富的蛋白质(15%~20%)且营养价值很高^[1],消化率为94%,高于小米蛋白,8种必需氨基酸的AAS和CS分都大于1,达到全价蛋白的标准且氨基酸的组成更接近FAO/WHO的推荐标准模式,营养价值堪比牛奶和鸡蛋^[2]。另外,粟米米糠蛋白质中没有过敏原物质,是已知谷物中过敏性最低的蛋白质,可添加在婴儿食品中^[3]。然而,我国虽然有丰富的粟米米糠资源,但粟米米糠蛋白质的研究还是空白,国内外关于粟米米糠蛋白提取工艺的研究报道很少,也未见生产和开发粟米米糠蛋白食品的报道,与大米米糠蛋白的利用还有很大的差距^[4]。本研究利用粟米加工的内层米糠(不含颖壳)为原料,对其蛋白质提取工艺进行优化,旨在为开拓粟米米糠利用新途径,提供新的蛋白质食品原料资源,提高粟米米糠产品的附加值,为研制更

多更好的粟米营养食品提供技术支撑,对增加农副产品的附加值也将具有现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

粟米米糠 北票永丰杂粮食品有限公司;氢氧化钠、氯化氢、硫酸、硫酸铜、硫酸钾、硼酸 均为分析纯,顶国化学试剂有限公司。

XA-1型固体样品粉碎机 河南省巩义市光压仪器厂;pH-3C型酸度计 上海雷磁仪器厂;SHZ-III B型循环水真空泵 上海华琦科学仪器有限公司;TDL-5000B型离心机 上海安亭科学仪器厂;JAC-300N型数控超声波清洗器 山东济宁奥波超声电气有限公司;DZF6050型真空干燥箱 上海一恒科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质提取率的测定 蛋白质含量的测定:半微量凯氏定氮法。

$$\text{蛋白质提取率}(\%) = \frac{\text{提取出蛋白质的质量}}{\text{原料中蛋白质的总质量}} \times 100$$

1.2.2 蛋白质提取工艺流程 5g粟米米糠→粉碎机→过筛(60目)→水料比(10:1)→5% NaOH调pH10→恒温(45℃)水浴超声波振荡1.5h→5000r/min离心10min→取上清液抽滤→5% HCl调pH3.5→4000r/min离心15min→真空干燥。

收稿日期:2014-01-14

作者简介:李新华(1955-),男,博士,教授,研究方向:粮油加工与转化。

1.2.3 单因素实验设计 参照谷糠、大米米糠蛋白提取工艺,再结合粟米米糠蛋白提取的实际操作,选取影响蛋白质提取率的几个关键因素设计单因素实验^[5]。

1.2.3.1 提取时间对蛋白质提取率的影响 在pH10, 45℃, 水料比10:1的条件下,考察不同提取时间(0.5、1、1.5、2、2.5h)对蛋白质提取率的影响。

1.2.3.2 pH对蛋白质提取率的影响 在提取时间1.5h, 45℃, 水料比10:1的条件下,考察不同提取pH(8、9、10、11、12)对蛋白质提取率的影响。

1.2.3.3 水料比对蛋白质提取率的影响 在提取时间1.5h, 45℃, pH10的条件下,考察不同水料比(6:1、8:1、10:1、12:1、14:1)对蛋白质提取率的影响。

1.2.3.4 温度对蛋白质提取率的影响 在提取时间1.5h, 水料比10:1, pH10的条件下,考察不同提取温度(25、35、45、55、65℃)对蛋白质提取率的影响。

1.2.4 响应面实验设计 在单因素实验的基础上,根据Box-Behnken实验设计原理,由于提取时间对蛋白质提取率的影响范围很小所以舍去,仅选取提取温度(X_1), pH(X_2), 水料比(X_3)为自变量,以粟米米糠蛋白提取率为响应值(Y),设计三因素三水平的响应面分析实验^[6],实验因素和水平见表1。

表1 响应面分析实验设计表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in response surface analysis

水平	因素		
	X_1 提取温度(℃)	X_2 提取pH	X_3 水料比
-1	35	9	8:1
0	45	10	10:1
1	55	11	12:1

1.2.5 数据处理 采用Design-Expert8.0软件进行Box-Behnken中心组合实验设计,再将所得的数据进行方差分析,建立回归模型,响应面分析,优化提取工艺。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 提取时间对蛋白质提取率的影响 如图1所示,随着时间的延长,蛋白质提取率逐渐递增,蛋白

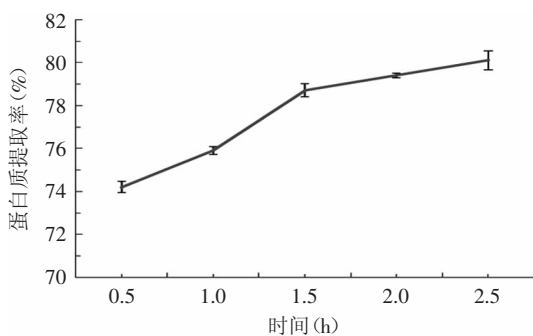


图1 提取时间对蛋白提取率的影响

Fig.1 Effect of extraction time on extraction rate of corn bran protein using alkali extraction metho

质提取率变化范围从74.2%~80.1%不大。在1.5h以后,蛋白质提取率递增速度减缓逐渐趋于平稳。反应时间过长反而会增加提取成本,降低劳动效率,而且还会影响提取蛋白质的品质,所以最佳提取时间确定为1.5h。

2.1.2 pH对蛋白质提取率的影响 如图2所示,在pH8~10,随着pH的升高,蛋白质提取率呈递增趋势;在pH10时,蛋白质提取率达到最大;在pH10以后,随着碱浓度继续增加,蛋白质提取率呈递减趋势;由于强碱条件下粟米米糠蛋白中会发生一些不良反应,如蛋白质水解和变性,美拉德反应加速,产生黑褐色物质,提取物中非蛋白质含量增加,纯度降低^[7],从而使蛋白质提取率下降,所以最佳的提取pH确定为10。

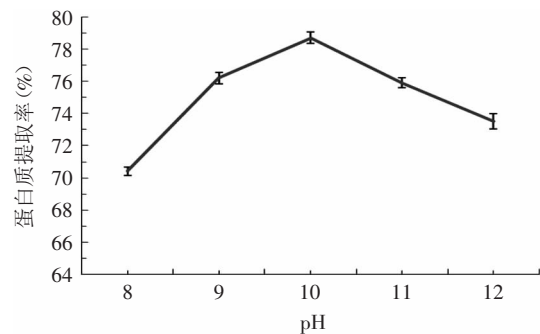


图2 pH对粟米米糠蛋白提取率的影响

Fig.2 Effect of extraction pH on extraction rate of corn bran protein using alkali extraction method

2.1.3 水料比对蛋白质提取率的影响 如图3所示,随着水料比的不断增大,蛋白质提取率整体呈上升趋势。在水料比6:1~10:1时,蛋白质提取率递增明显。由于粟米米糠中含有一定量的膳食纤维和淀粉,具有较强的吸水膨胀能力,水料比过低时,物料会变得粘稠,流动性差,难于搅拌,升高水料比可以提高蛋白质提取率^[8];在水料比10:1以后,蛋白质提取率递增缓慢逐渐趋于平稳,这时水和碱的用量也会随水料比的增大而增加,这样会增加提取成本,所以最佳的提取水料比确定为10:1。

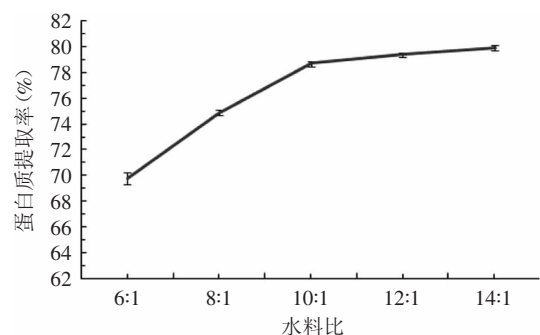


图3 水料比对粟米米糠蛋白提取率的影响

Fig.3 Effect of liquid-material ratio on extraction rate of corn bran protein using alkali extraction method

2.1.4 温度对蛋白质提取率的影响 如图4所示,在温度25~45℃时,随温度的升高,蛋白质提取率呈递

增趋势;在45℃时,蛋白质提取率达到最大;在温度45℃以后,随着温度持续升高,蛋白质提取率明显下降。这是因为当温度较低时,水分子与蛋白质分子间相互作用较小,温度适当增加,蛋白质分子的构象发生改变,分子立体结构伸展,有利于蛋白分子与水分子的运动及相互作用,此时温度起到增溶的作用^[9-10]。温度继续升高,使蛋白质空间构相某些弱键断裂,破坏了肽键的特定结构,使得原来在分子内部的一些非极性基团暴露在分子表面,因而降低了蛋白质的溶解度,促使蛋白质分子之间的相互结合而凝结沉淀^[11],所以最佳的提取温度确定为45℃。

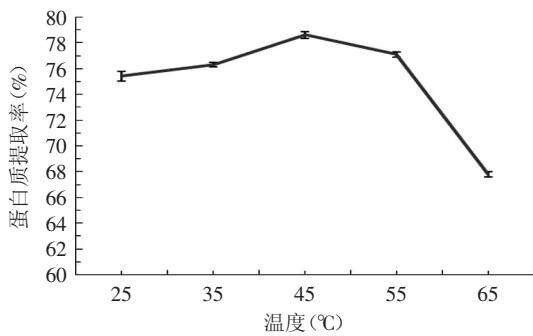


图4 提取温度对粟米米糠蛋白提取率的影响

Fig.4 Effect of extraction temperature on extraction rate of corn bran protein using enzymatic hydrolysis method

2.2 响应面优化提取工艺

2.2.1 实验设计及结果 根据单因素实验分析,进行Box-Behnken中心组合实验设计,共17个实验,其中12个析因实验,5个中心实验。中心点重复实验用来估计实验误差。采用Design-Expert 8.0软件对所得的数据进行实验设计与分析^[12],结果见表2。

表2 Box-Behnken实验设计及结果

Table 2 Box-Behnken design and experimental results for response surface analysis

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	Y 提取率 (%)
1	-1	0	1	76.1
2	1	0	-1	70.4
3	0	0	0	77.9
4	1	1	0	72.6
5	0	-1	1	74.5
6	0	-1	-1	68.5
7	0	1	-1	67.8
8	1	-1	0	74.2
9	0	0	0	78.6
10	-1	1	0	73.2
11	-1	-1	0	73.8
12	0	0	0	78.4
13	-1	0	-1	69.2
14	1	0	1	76.5
15	0	1	1	75.2
16	0	0	0	78.9
17	0	0	0	78.7

2.2.2 响应面模型的建立 采用Design-Expert 8.0软件对实验数据进行回归分析,得出粟米米糠蛋白提取率(Y)的回归方程如下: $Y=78.50+0.54X_1-0.56X_2+3.37X_3-0.025X_1X_2-0.050X_1X_3+0.35X_2X_3-1.79X_1^2-3.49X_2^2-3.51X_3^2$

回归方程中各因素响应值的显著性由F值来判断,p值越小,显著性越高。对回归方程做显著性检验与方差分析^[13],结果见表3。

表3 响应面回归模型方差分析

Table 3 ANOVA for response surface quadratic model analysis of variance table

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	p>F	显著性
模型	225.42	9	25.05	56.24	<0.0001	**
X ₁	2.31	1	2.31	5.19	0.0568	
X ₂	2.53	1	2.53	5.68	0.0486	*
X ₃	91.12	1	91.12	204.61	<0.0001	**
X ₁ X ₂	0.0025	1	0.0025	0.0005613	0.9424	
X ₁ X ₃	0.01	1	0.01	0.022	0.8851	
X ₂ X ₃	0.49	1	0.49	1.10	0.3291	
X ₁ ²	13.45	1	13.45	30.21	0.0009	**
X ₂ ²	51.21	1	51.21	114.99	<0.0001	**
X ₃ ²	51.95	1	51.95	116.64	<0.0001	**
残差	3.12	7	0.45			
失拟项	2.54	3	0.85	5.83	0.0607	
纯误差	0.58	4	0.15			
总离差	228.54	16				
				R ² =0.9864	R ² _{Adj} =0.9688	

注:*表示显著(p<0.05);**表示极显著(p<0.01)。

从表3结果可知,模型p<0.0001极显著,同时模型失拟项p=0.0607不显著,说明模型成立且误差小,模型的决定系数R²=0.9864,校正决定系数R²_{Adj}=0.9688,说明该模型能解释96.88%响应值的变化,仅有总变异的3.12%不能用此模型来解释,综上所述该模型拟合程度良好,可以用此模型分析碱法提取工艺参数^[14];回归方程的一次项中各因素对蛋白质提取率的影响为水料比(X₃)极显著、pH(X₂)显著、提取温度(X₁)不显著,二次项对其影响均极显著,交互项对其影响均不显著,说明响应值的变化相当复杂,实验因素对响应值的影响不是简单的线性关系;各因素的F值可以反映出各因素对蛋白质提取率影响的重要性,F值越大,表明因素影响越大^[15],所以各因素对蛋白提取率影响的大小顺序为:水料比(X₃)>pH(X₂)>提取温度(X₁)。

2.2.3 响应曲面 根据回归方程,做出响应曲面,考察拟合响应曲面的形状,分析提取温度(X₁),pH(X₂),水料比(X₃)对粟米米糠蛋白提取率的影响,如图5~图7所示,随着每个因素的增大,响应值增大,当响应值增大到极值后,随着因素的增大,响应值逐渐减小^[16]。比较图5~图7可知,水料比(X₃)对蛋白质提取率的影响最为显著;而提取pH(X₂)、提取温度(X₁)次之;在交互项对蛋白质提取率的影响中,提取

pH与水料比(X_2X_3)的交互作用对蛋白质提取率的影响最大,提取温度与水料比(X_1X_3)次之,提取温度与提取pH(X_1X_2)最小。

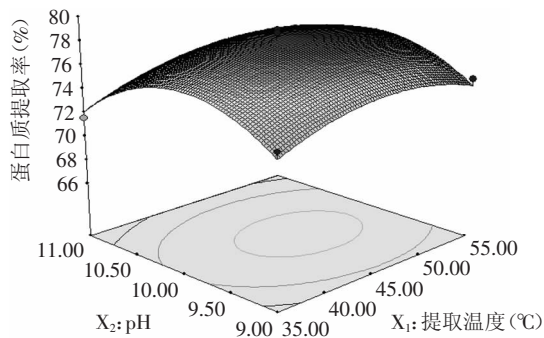


图5 $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面

Fig.5 Responsive surfaces of $Y=f(X_1, X_2)$

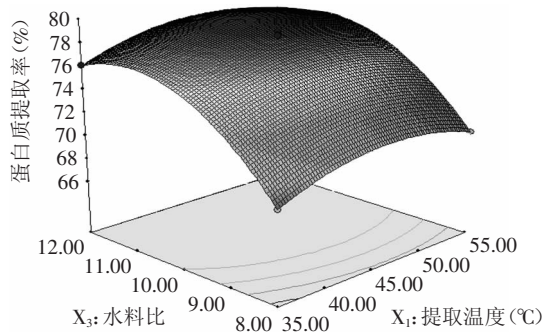


图6 $Y=f(X_1, X_3)$ 的响应面

Fig.6 Responsive surfaces of $Y=f(X_1, X_3)$

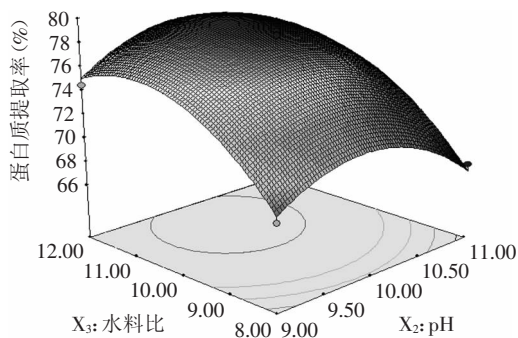


图7 $Y=f(X_2, X_3)$ 的响应面

Fig.7 Responsive surfaces of $Y=f(X_2, X_3)$

2.2.4 工艺优化 为进一步确定最佳提取条件,利用Design-Expert 8.0软件对提取工艺进行优化,得到的碱法提取粟米米糠蛋白的最佳条件是:提取温度46.44℃,pH9.94,水料比10.95:1,提取时间1.5h,在此工艺条件下,粟米米糠蛋白提取率的预测值是79.36%。为了方便实际操作,将工艺参数调整为:提取温度46℃,pH10,水料比11:1,提取时间1.5h,将此条件参数代入回归方程得到的新预测值为79.34%,在此条件下进行三组平行实验,实际测得粟米米糠蛋白提取率为79.15%,与预测值仅相差0.19个百分点,稍低于实验设计值,但接近于最优提取条件的预测值,所以实验值与预测值相符合^[1],说明调整后的工艺参

数准确可靠,具有实用价值。

3 结论

利用碱溶酸沉法对粟米米糠进行蛋白质提取,提取率高,操作简单,成本较低,可以推广至工业化生产;Box-Behnken中心组合实验设计建立了碱法粟米米糠蛋白提取工艺参数的二次回归模型,经验证该模型误差小,拟合程度好,合理可靠,能够较好地预测粟米米糠蛋白的提取率。通过对方差、响应曲面、二次回归方程的分析得到,各因素对粟米米糠蛋白提取率影响程度为:水料比>提取pH>提取温度;两因素交互作用对蛋白质提取率的影响程度为:提取pH与水料比>提取温度与水料比>提取温度与提取pH;提取最佳条件为:提取时间1.5h、提取pH10、提取温度46℃、水料比11:1,蛋白质提取率实际测得79.15%,达到了优化的目的。

参考文献

- [1] 韩秀丽,张如意,马晓健,等. 米糠的综合利用及其前景[J]. 农产品加工,2007(7):62-64.
- [2] 张超,张晖,李翼新. 小米的营养以及应用研究进展[J]. 中国粮油学报,2007(1):51-53.
- [3] 陈正行,姚惠源,周素梅. 米蛋白和米糠蛋白开发利用[J]. 粮食与油脂,2002(4):6-9.
- [4] 许洁. 小米谷糠蛋白的提取及其保健功能的研究[D]. 太原:山西大学,2012.
- [5] 李新华,富艳鑫,郑煜焱. 米糠蛋白提取工艺条件的优化[J]. 食品科学,2010(22):251-254.
- [6] TOMPSON D. Response surface experimentation[J]. Journal of Food Processing and Preservation,1982(6):155-188.
- [7] FrederiekF Shih, Kim W Daigl. Preparation and characterization of rice protein isolates[J]. Journal of American Oil Chemistry Society,2000,77(8):885-887.
- [8] 李静,汪志. 米糠蛋白的特性及提取工艺[J]. 湖北农业科学,2006(6):810-813.
- [9] RAVIN G. Protein concentrate from unstabilized and stabilized rice bran:preparation and properties[J]. Journal of Food Science,1995,60(5):1066-1069.
- [10] HAMADA J S. Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases[J]. Journal of Food Science,2000(2):178-179.
- [11] 赵东海,张建平,王云. 米糠蛋白提取工艺和功能性评价[J]. 食品工业,2005(5):9-11.
- [12] 吴晓红,华美玲,石媛,等. 响应面法优化脱脂松仁水溶性蛋白提取工艺[J]. 中国油脂,2010(8):34-37.
- [13] 徐向宏,何明珠. 实验设计与Design Expert,SPSS应用[M]. 北京:科学出版社,2010:155-160.
- [14] 邹鲤岭,李昌盛. 响应面法优化米糠蛋白提取工艺[J]. 粮食与饲料业,2008(10):22-23.
- [15] 王岸娜,孙玉丹,李龙安,等. 响应面法优化猕猴桃糖蛋白提取工艺研究[J]. 河南农业科学,20012(8):121-127.
- [16] 易军鹏,朱文学,马海乐,等. 牡丹籽油超声波辅助提取工艺的响应面法优化[J]. 农业机械学报,2009(6):103-110.

(下转第302页)

的数学模型,采用Design expert 8.0统计软件对工艺参数进行优化,得到最佳工艺条件为预干燥后水分含量19.9%,切片厚度4.1mm,微波时间62s,此时膨化率预测值为73.1%。在最佳工艺条件下进行三组验证实验(为便于操作,水分含量取20%,切片厚度为4mm),测得猕猴桃脆片的膨化率平均为73.8%,与理论预测值相比相对误差在0.5%以内,说明此模型可以用来预测猕猴桃片微波膨化率。

2.5 膨化对猕猴桃片水分和V_C含量的影响

分别将猕猴桃预干燥不同时间,采用750W微波膨化62s,测定水分和V_C含量(干基),结果如图5、图6所示。由图5可见,水分含量随着预干燥时间的增加而减少,膨化后水分含量小于膨化前。当干燥时间达到2.5h时,此时猕猴桃水分含量为20.1%,膨化后水分含量为5.4%。果蔬脆片的口感、出品率和耐藏性与水分活度、水分含量密切相关。当水分含量控制在6%左右时,水分活度是在0.59~0.65之间,此范围为果蔬脆片的适宜范围^[15]。

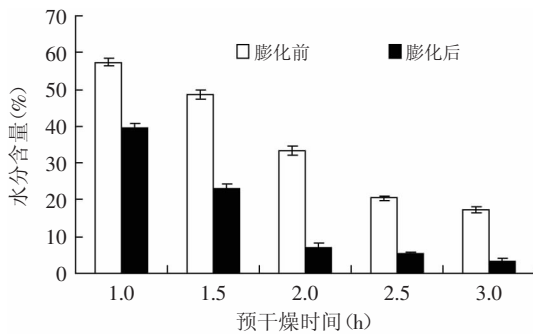


图5 膨化对水分含量的影响

Fig.5 Effect of puffing on moisture content

由图6可见,V_C含量随着预干燥时间的增加而减少,膨化后V_C含量小于膨化前。随着干燥时间的延长,膨化前与膨化后V_C含量的差距减小。优良的猕猴桃加工品需要保持其丰富的V_C,因此,如何减少V_C的损失还需要在工艺技术方面进一步研究。

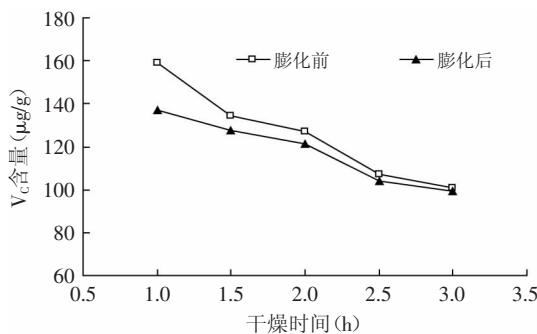


图6 膨化对V_C含量的影响

Fig.6 Effect of puffing on content of V_C

3 结论

采用Box-Behnken及响应面分析,建立了微波膨化猕猴桃片白的二次多项式数学模型。经检验证明该模型切实可行,能较好地预测微波膨化猕猴桃片的膨化率。利用模型响应面对影响膨化率的各因素及其交互作用进行了分析。微波膨化猕猴桃脆片的最优工艺参数为:猕猴桃片水分含量预干燥至20%,切片厚度4mm,微波时间62s。此条件下猕猴桃脆片膨化率可达73.8%。预干燥和膨化都使得猕猴桃片中的水分含量减少,在最佳工艺附近得到的猕猴桃脆片水分含量为5.4%,口感酥脆。猕猴桃片在干燥和膨化后的V_C含量都减少了,并且干燥时间越长,V_C含量越少。

参考文献

- [1] 杨丹,曾凯芳. 猕猴桃果实抗氧化活性物质及其在贮藏中的变化[J]. 食品工业科技,2010,31(8):393-395.
- [2] Park Y S, Im M H, Ham K S, *et al.* Nutritional and pharmaceutical properties of bioactive compounds in organic and conventional growing kiwifruit[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2013,68:57-64.
- [3] Figoli A, Tagarelli A, Cavaliere B, *et al.* Evaluation of pervaporation process of kiwifruit juice by SPME-GC/ion trap mass spectrometry[J]. Desalination,2010,250(3):1113-1117.
- [4] 朱春华,龚琪,李进学,等. 猕猴桃果实加工综合利用研究进展[J]. 保鲜与加工,2013(2):57-62.
- [5] 齐琳琳. 以干香菇为原料的香菇脆片加工工艺研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [6] 徐圣兰,石彦国,李春阳. 微波膨化南瓜脆片的工艺优化[J]. 食品工业科技,2011,32(5):279-281.
- [7] 芮汉明,贺丰霞,刘锋. 重组型香蕉脆片关键技术研究[J]. 食品与发酵工业,2008,34(10):85-88.
- [8] 吕健. 桃脆片加工工艺优化及品质评价研究[D]. 北京:中国农业科学院,2013.
- [9] 张水华. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,2010.
- [10] SHAM P W Y, SCAMAN C H, DURANCE T D. Texture of vacuum microwave dehydrated apple chips as affected by calcium pretreatment, vacuum level, and apple variety[J]. Journal of Food Science,2001,66(9):1341-1347.
- [11] 黄儒强,芮汉明,曾庆孝. 爆裂玉米与普通玉米微波真空膨化特性比较[J]. 华南理工大学学报:自然科学版,2003,31(1):88-90.
- [12] 李惠华,林月娟,徐严平,等. 间接分光光度法测定抗坏血酸含量的正交实验[J]. 光谱实验室,2012,29(5):2977-2979.
- [13] 阳辛凤. 微波膨化木瓜脆片的加工工艺[J]. 食品工业科技,2008,29(1):173-175.
- [14] 肖子亚,曹发海,朱德泉. 微波技术在膨化食品加工中的应用[J]. 现代农业装备,2004(7):61-62.
- [15] 刘勤生,韩建义. 果蔬脆片的水分含量、水分活度及含油量的关系[J]. 食品工业科技,2002,23(4):31-32.

(上接第298页)

[17] Wani A A, Sogi D S, Grover L, *et al.* Effect of temperature, alkali concentration, mixing time and meal/solvent ratio on

the extraction of watermelon seed proteins—a response surface approach[J]. Biosystems Engineering,2006(1):67-73.