

亚临界水萃取米糠蛋白工艺与功能特性研究^{*}

张海晖 武 妍 段玉清 任晓锋 胡 玥
(江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013)

【摘要】 以米糠蛋白提取率为指标,通过单因素和正交试验,优选出米糠蛋白的亚临界水萃取工艺参数并对其功能特性评价。结果表明,压力为 8.0 MPa、体系 pH 值 9.0、萃取温度 200℃、水料比 15 mL/g、提取时间 25 min 时,米糠蛋白提取率达 55.9%,其蛋白乳化活性为 119.8 mL/g,乳化稳定性为 81.3 min,起泡性为 71.5%,起泡稳定性为 37.4%,持水性为 5.6%,持油性为 3.7%,溶解度为 68.4%。与碱水浸提法和超声波辅助碱水提取法相比,米糠蛋白的亚临界水萃取法在提取时间和提取率方面均具有明显的优势(碱水提取法和超声波辅助碱水提取法的提取时间和提取率分别为 120 min、35.6% 和 30 min、48.1%)。

关键词: 米糠 蛋白 亚临界水 萃取

中图分类号: TS209 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2011)11-0139-05

Optimization for the Extraction and Function Characteristics
of Protein from Rice Bran by Subcritical Water

Zhang Haihui Wu Yan Duan Yuqing Ren Xiaofeng Hu Yue
(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract

With the aim to optimize the technology parameter of subcritical water extracting protein from rice bran, the single factor and orthogonal experiments were conducted by taking protein yield as index, and the function characteristics of protein from rice bran were studied. The results were as follows: the ratio of protein in the extracts was 55.9% at 8.0 MPa, pH value 9.0, 200℃ for 25 min with the liquid-solid ratio of 15 mL/g, the emulsion activity index of rice bran protein was 119.8 mL/g, and the emulsion stability indicator was 81.3 min; the foamability and the stability of foam were 71.5% and 37.4% respectively; the water/oil absorption and the solubility were 5.6%, 3.7% and 68.4% respectively. The extract time and the protein yield of rice bran extracted by the methods of alkaline water and ultrasonic assisted alkaline water were 120 min, 35.6%, and 30 min, 48.1% respectively. Compared with the previous two methods, subcritical water extracting protein from rice bran has obvious advantage in saving time and extraction ratio.

Key words Rice bran, Protein, Subcritical water, Extraction

引言

米糠中蛋白质量分数为 12% ~ 20%,营养效价高^[1-2]。目前米糠蛋白的提取方法有碱法和酶法或

物理方法辅助提取。碱法简单易行^[3],但高浓度的碱会产生有毒物质。酶法提取以蛋白酶最为常用^[4],在使用蛋白酶时,因控制较低的水解度,导致提取率低。物理处理法辅助提取有超声法、微波法、

收稿日期: 2010-11-29 修回日期: 2010-12-15

^{*} 国家自然科学基金资助项目(309700309)、中国博士后科学基金资助项目(20100471379)、江苏高校优势学科建设工程资助项目和江苏大学人才基金资助项目(128300289)

作者简介: 张海晖,副教授,主要从事农产品活性因子提取分离技术研究, E-mail: zhanghh@ujs.edu.cn

通讯作者: 段玉清,副教授,主要从事农产品加工与贮藏工程研究, E-mail: dyq101@ujs.edu.cn

高压法和亚临界水萃取法等,在食品加工中比碱法和酶法更适于应用^[5-7]。

亚临界水萃取(sub-critical water extraction,简称SWE)是以水为提取溶剂,在适当压力下,当水温加热到100~374℃之间时,水仍然保持液体状态,但与常温常压水相比更类似于有机溶剂^[8]。通过温度程序升温可以选择性分类萃取^[9]。因亚临界水萃取对目标成分的回收率高,原料无需干燥,环境友好,具有高效、省时等优点,近年来国内外已有利用亚临界水萃取天然活性成分^[10-15]的相关报道,但活性蛋白的亚临界水提取少见报道。本文将亚临界水运用于米糠蛋白的提取,并对其工艺条件进行优化,提供简便、快捷和高效的蛋白提取方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

米糠:镇江市润扬米业公司提供。

1.2 方法

1.2.1 亚临界水萃取

提取工艺为:脱脂米糠→加入一定量的蒸馏水(调成一定pH值)→放入萃取釜→8 MPa下提取(控制适当温度和时间)→冷却→离心(3 500 r/min, 20 min)→取上清液→等电点沉淀(pH值4.5)→离心(3 500 r/min, 20 min)→收集沉淀→水溶并定容到一定体积→测定蛋白质含量→计算米糠蛋白提取率。

1.2.2 碱水提取

提取工艺为:脱脂米糠→按水料比15 mL/g添加pH值9.0的蒸馏水→95℃下抽提5 h→离心(3 500 r/min, 20 min)→取上清液→等电点沉淀(pH值4.5)→离心(3 500 r/min, 20 min)→收集沉淀→水溶并定容到一定体积→测定蛋白质含量→计算米糠蛋白提取率。

1.2.3 超声波法提取

提取工艺为:脱脂米糠→按水料比15 mL/g添加pH值9.0蒸馏水→60℃超声辅助提取30 min→离心(3 500 r/min, 20 min)→取上清液→等电点沉淀(pH值4.5)→离心(3 500 r/min, 20 min)→收集沉淀→水溶并定容到一定体积→测定蛋白质含量→计算米糠蛋白提取率。

1.2.4 测定方法

蛋白含量:固体物料蛋白的测定采用凯氏定氮法,参照GB5009.5—2010;液体物料蛋白的测定采用福林酚法^[16]。脂肪含量:参照GB/T 5009.6—2003。水分和干重:参照GB5009.3—2010。蛋白提取率计算公式为

$$R_1 = m_2 / m_1 \times 100\%$$

式中 m_2 ——酸沉蛋白质总质量,g

m_1 ——物料中蛋白质总质量,g

1.2.5 亚临界水萃取米糠蛋白的单因素试验

温度:称取脱脂米糠1.0 g,按水料比20 mL/g加入pH值9.0的蒸馏水于萃取釜中,控制压力为8.0 MPa,萃取30 min,考察不同萃取温度(120、140、160、180、200、220℃)对米糠蛋白提取效果的影响。

时间:称取脱脂米糠1.0 g,按水料比20 mL/g加入pH值9.0的蒸馏水,压力为8.0 MPa,浸提温度为200℃,考察不同萃取时间(10、15、20、25、30、40、50 min)对米糠蛋白提取效果的影响。

水料比:称取脱脂米糠1.0 g,蒸馏水调pH值9.0,压力为8.0 MPa,200℃下萃取30 min,考察不同水料比(5、10、15、20、25、30 mL/g)对米糠蛋白提取效果的影响。

pH值:称取脱脂米糠1.0 g,分别加入水料比15 mL/g的蒸馏水,控制压力为8.0 MPa,200℃下浸提30 min,考察不同pH值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)对米糠蛋白提取提取率的影响。

1.2.6 亚临界水萃取米糠蛋白的正交试验

在单因素试验的基础上,对影响米糠蛋白提取率的主要因素(温度、提取时间和pH值)按 $L_9(3^4)$ 进行正交试验,优化出最佳工艺参数。

1.2.7 米糠蛋白功能性质的测定

(1)溶解度

在pH值7.0磷酸钠缓冲液中加入2.5 g样品,25℃搅拌1 h,3 000 r/min离心20 min,测上清液蛋白含量。溶解度计算公式为

$$S = C_1 / C_0 \times 100\%$$

式中 C_1 ——可溶性蛋白含量,mg/g

C_0 ——样品蛋白含量,mg/g

(2)持水(油)性

5.0 g样品分散于95 mL水(或油)中,25℃搅拌15 min后静置2 h,3 900 r/min离心5 min,弃去上清液,称沉淀质量。持水(或油)率计算公式为

$$R_2 = m_3 / m_0 \times 100\%$$

式中 m_3 ——沉淀质量,g

m_0 ——样品质量,g

(3)乳化稳定性及乳化活性

采用浊度法。在0.2 mol/L pH值7.0磷酸钠缓冲溶液中配置质量浓度1 g/mL米糠蛋白溶液,按体积比0.025 L/L加入大豆色拉油,均质成均匀乳化液。分别在0 min和10 min取1 mL新制备乳化液,加99 mL蒸馏水稀释100倍,然后取1 mL被稀释乳化液加入到39 mL十二烷基磺酸钠(1 g/kg)稀

释 40 倍,最终稀释度为 4 000 倍。将最后溶液在 500 nm 下测吸光度(测 9 次取平均值)。乳化稳定性计算公式为

$$S_t = [A_0 T / (A_0 - A_{10})] \times 100\%$$

式中 S_t ——乳化稳定性,min
 A_0 ——均质后迅速被稀释的乳化液的吸光度
 A_{10} ——乳化液在静止 10 min 后的吸光度
 T ——时间,本文取 10 min

乳化活性计算公式为

$$E = 4.606nA_0 / (1\,000C_1X)$$

式中 E ——乳化活性,mL/g
 C_1 ——乳化液形成前蛋白水溶液中蛋白质量浓度,g/mL
 X ——乳化液中油的体积分数,本文取 2.5 %
 n ——样品稀释倍数,本文取 4 000

(4) 起泡性及泡沫稳定性

配置 50 mL 质量分数 2% 的蛋白溶液,搅拌 20 min后置于高速组织捣碎机于 10 000 r/min 搅打 30 s,记录搅打停止时的泡沫及液体总体积 V_1 和搅打停止 30 min 后泡沫及液体总体积 V_2 。起泡性和泡沫稳定性计算公式分别为

$$E_f = (V_1 - V_0) / V_1 \times 100\%$$
$$F_s = (V_2 - V_0) / V_0 \times 100\%$$

式中 V_0 ——搅打前蛋白液体积,mL

2 结果与分析

脱脂米糠原料中蛋白质质量分数为 19.1%,含水率为 12.2%,灰分质量分数为 11.2%,脂肪质量分数为 1.3%。

2.1 单因素试验结果与分析

2.1.1 温度

图 1 为温度对米糠蛋白提取率的影响。由图可见,温度在 200℃ 以下时,随着萃取温度的升高,米糠蛋白的提取率随之增大,当温度在 200℃ 左右时,米糠蛋白的提取率最高。此后随着提取温度的升高,蛋白提取率反而下降,这可能是随着温度的升高,其他成分也被浸提出来,导致蛋白的提取率有所

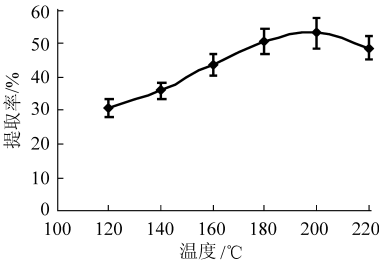


图 1 温度对提取率的影响

Fig. 1 Effect of temperature on extraction rate

下降。因此,最佳提取温度在 200℃ 左右为宜。

2.1.2 提取时间

提取时间对米糠蛋白提取率的影响见图 2,从图可见,随着时间延长,提取率随之增大,在 30 min 时达到最大值;之后随着时间延长,提取率趋于平衡,故提取时间以 30 min 左右为宜。

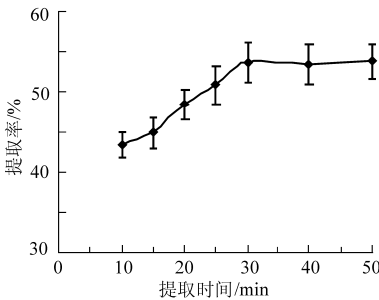


图 2 提取时间对提取率的影响

Fig. 2 Effect of extract time on extraction rate

2.1.3 水料比

图 3 是水料比对米糠蛋白提取率的影响。从图可以看出,随水料比的增加,蛋白提取率逐渐增高,当水料比为 15 mL/g 以后,蛋白提取率达到最大值,并趋于平衡。选水料比 15 mL/g 左右为宜。

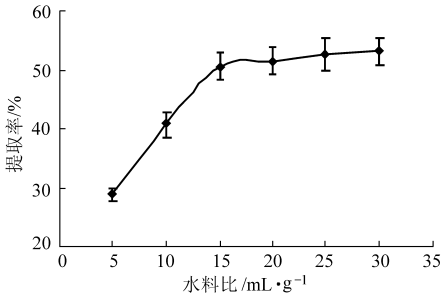


图 3 水料比对提取率的影响

Fig. 3 Effect of liquid-solid ratio on extraction rate

2.1.4 pH 值

pH 值对米糠蛋白提取率的影响见图 4。从图可见,提取体系在碱性条件下时更有利于米糠蛋白的提取,说明此 pH 值下能使米糠蛋白更好地溶出。因为碱性过强对蛋白的功能特性有不良影响^[3],本试验未再上调 pH 值,故本试验亚临界水体系的 pH 值选用 9.0 以下。

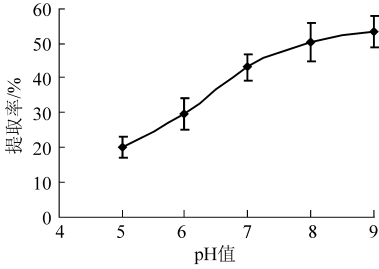


图 4 pH 值对提取率的影响

Fig. 4 Effect of pH value on extraction rate

2.2 正交试验结果

在单因素试验的基础上,选温度、提取时间和 pH 值进行正交试验。脱脂米糠粉 1.0 g,提取压力 8.0 MPa,水料比 15 mL/g 条件下因素水平设计见表 1。

表 1 正交试验因素水平

Tab.1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	温度 A/℃	提取时间 B/min	pH 值 C
1	180	25	7.0
2	200	30	8.0
3	220	35	9.0

通过正交试验确定亚临界水萃取米糠蛋白的最佳工艺条件,结果见表 2。当提取压力为 8.0 MPa,水料比为 15 mL/g 时,温度、提取时间和 pH 值对米糠蛋白的提取率均有不同程度的影响,各种因素对蛋白提取率影响从大到小依次为:A、C、B。亚临界水法提取的最优条件为 A₂B₁C₃,即,温度 200℃,提取时间 25 min,pH 值 9.0。

表 2 正交试验结果

Tab.2 Results of orthogonal test

试验序号	A	B	C	提取率/%
1	1	1	1	46.3
2	1	2	2	47.4
3	1	3	3	49.2
4	2	1	2	54.6
5	2	2	3	53.1
6	2	3	1	51.5
7	3	1	3	50.1
8	3	2	1	46.3
9	3	3	2	48.4
K ₁	47.663	50.333	48.033	
K ₂	53.067	48.933	50.133	
K ₃	48.267	49.700	50.800	
R	5.434	1.400	2.767	

在最优组合下,经 3 次验证试验得到米糠蛋白的提取率为 55.9%,均高于正交表的任意组合。

2.3 不同提取方法对米糠蛋白提取率的影响

表 3 为不同提取方法对米糠蛋白提取率的影响,从表中可以看出,与传统碱水浸提法(蛋白提取率为 35.6%)和超声波辅助碱水提取法(蛋白提取率为 48.1%)相比,亚临界水萃取法对米糠蛋白的

提取具有较明显的优势(蛋白提取率为 55.9%)。这是因为在一定压力下,随着温度的升高,水呈现亚临界状态,极性降低,对中极性和弱极性有机物的溶解力增强,使米糠蛋白在水中的溶解量增大,故使米糠蛋白提取率增高。

表 3 不同提取方法对米糠蛋白提取率比较

Tab.3 Effect of methods on the yields of protein extracted from rice bran

提取方法	温度 /℃	水料比/ mL·g ⁻¹	提取时间 /min	提取率 /%
碱水浸提法	50	15	120	35.6
超声波辅助碱水法	50	15	30	48.1
亚临界水萃取法	200	15	25	55.9

2.4 米糠蛋白功能性质

蛋白质制品在食品工业的应用性能取决于其功能特性,本试验对米糠蛋白的溶解性、起泡性、乳化性、持水性、持油性进行了研究,测定结果见表 4,从表中可以看出,亚临界水提取的米糠蛋白同碱水提取及超声波辅助碱水提取法在功能性质上基本一致,并未对米糠蛋白造成不利影响,但其组成和结构分析,有待于进一步研究。

表 4 米糠蛋白功能性质

Tab.4 Function characteristics of protein from rice bran

参数	提取方法		
	碱水浸提法	超声辅助碱水法	亚临界水萃取法
乳化活性/mL·g ⁻¹	99.2	107.1	119.8
乳化稳定性/min	81.5	80.2	81.3
起泡性/%	69.2	69.8	71.5
泡沫稳定性/%	36.5	36.9	37.4
持水性/%	4.5	4.3	5.6
持油性/%	3.6	3.8	3.7
溶解度/%	52.1	55.4	68.4

3 结论

(1)通过单因素和正交试验,在压力为 8.0 MPa 和水料比为 15 mL/g 条件下,优化出亚临界水萃取米糠蛋白的最佳工艺条件为:温度 200℃、提取时间 25 min、萃取用蒸馏水的 pH 值为 9.0。

(2)亚临界水萃取米糠蛋白同其他方法相比具有提取率高、快速、清洁、易于操作等优势,是很有应用前景的蛋白提取新方法。

参 考 文 献

- 1 Adrizal, Ohtani S, Yayota M. Dietary energy source and supplements in broiler diets containing defatted rice bran[J]. The Journal of Applied Poultry Research, 2002, 11(4): 410 ~ 417.
- 2 姚惠源,周素梅,王立,等. 米糠与米糠蛋白质的开发与利用[J]. 无锡轻工大学学报, 2002, 21(3): 312 ~ 316.
Yao Huiyuan, Zhou Sumei, Wang Li, et al. Exploitation and utilization of rice bran and rice bran protein [J]. Journal of Wuxi University of Light Industry, 2002, 21(3): 312 ~ 316. (in Chinese)
- 3 陈季旺,姚惠源,张小勇,等. 米糠可溶性蛋白的提取工艺和特性研究[J]. 中国油脂, 2003, 28(2): 46 ~ 50.
Chen Jiwang, Yao Huiyuan, Zhang Xiaoyong, et al. Extraction and characteristic of soluble protein from rice bran [J]. China Oils and Fats, 2003, 28(2): 46 ~ 50. (in Chinese)
- 4 王雪飞,于国萍,徐红华. 不同酶类提取米糠蛋白的研究[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(1): 8 ~ 11.
Wang Xuefei, Yu Guoping, Xu Honghua. Extracting rice bran protein with different enzymes[J]. Chinese Cereals and Oils Association, 2004, 19(1): 8 ~ 11. (in Chinese)
- 5 Sereewatthanawut I, Prapintip S, Watchiraruj K, et al. Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(3): 555 ~ 561.
- 6 Tang Shanhu, Hettiarachchy Navam S, Shell Hammer Thomas H. Protein extraction from heat-stabilized rice bran 1. Physical processing and enzyme treatments [J]. Journal Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(25): 7 444 ~ 7 448.
- 7 Shih Fred F. An update on the processing of high-protein rice products[J]. Nahrung/food, 2003, 47(6): 420 ~ 424.
- 8 Smith R M. Extractions with superheated water [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 975(1): 31 ~ 46.
- 9 Ramos L, Kristenson E M, Brinkman U A. Current use of pressurized liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 975(1): 3 ~ 29.
- 10 Khajenoori M, Haghighi Asl A, Hormozi F. Proposed models for subcritical water extraction of essential oils[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2009, 17(3): 359 ~ 365.
- 11 丛艳波,张永忠,刘潇. 亚临界水提取槐角中总异黄酮的研究[J]. 中草药, 2010, 14(5): 717 ~ 720.
Cong Yanbo, Zhang Yongzhong, Liu Xiao. Study on total isoflavones from Fructus Sophorae by subcritical water extraction [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2010, 14(5): 717 ~ 720. (in Chinese)
- 12 陈贇,李建明,章丽娟,等. 亚临界水萃取技术及其在天然产物分析中的应用[J]. 中药材, 2009, 32(4): 636 ~ 641.
Chen Yun, Li Jianming, Zhang Lijuan, et al. Subcritical water extraction technique and its application in natural product analysis[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2009, 32(4): 636 ~ 641. (in Chinese)
- 13 Hassas-Roudsari M, Chang P R, Pegg R B, et al. Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction[J]. Food Chemistry, 2009, 114(2): 717 ~ 726.
- 14 García-Marino M, Rivas-Gonzalo J C, Ibáñez E, et al. Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 563(1 ~ 2): 44 ~ 50.
- 15 Shotipruk A, Kiatsongserm J, Pavasant P, et al. Pressurized hot water extraction of anthraquinones from the roots of Morinda citrifolia[J]. Biotechnology Progress, 2004, 20(6): 1 872 ~ 1 875.
- 16 董晓燕. 生物化学实验 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 62 ~ 63.