

## 酶法辅助提取、纯化米糠蛋白工艺优化

胡博<sup>1</sup>,高盼<sup>1,2,3</sup>,毛燕妮<sup>3,4</sup>,田杰<sup>1</sup>,钟武<sup>1,2,3</sup>,胡传荣<sup>1,2</sup>,何东平<sup>1,2,3</sup>

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院,武汉 430023; 2. 大宗粮油精深加工教育部重点实验室,武汉 430023;  
3. 国家市场监督管理总局重点实验室(食用油质量与安全),武汉 430012; 4. 武汉食品化妆品检验所,武汉 430012)

**摘要:**旨在为米糠副产品的精深加工利用提供指导,利用碱性蛋白酶辅助碱溶酸沉法提取米糠蛋白,并进一步以纤维素酶纯化米糠蛋白,在单因素实验的基础上通过正交实验优化提取、纯化工艺条件。结果表明:米糠蛋白提取的最佳工艺条件为酶解 pH 10.5、酶解温度 50℃、料液比 1:10、酶解时间 120 min、加酶量 2.5%,在此条件下米糠蛋白提取率为 75.2%;米糠蛋白纯化的最佳工艺条件为酶解温度 50℃、酶解 pH 5.0、酶解时间 60 min、加酶量 4%、料液比 1:10,在此条件下米糠蛋白纯度为 81.6%,提取率为 72.6%。采用此方法可以得到提取率和纯度均较高的米糠蛋白。

**关键词:**米糠蛋白;提取;纯化;碱性蛋白酶;纤维素酶

中图分类号:TQ644.2;Q518.4 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2023)08-0115-07

## Optimization of enzyme assisted extraction and purification of rice bran protein

HU Bo<sup>1</sup>, GAO Pan<sup>1,2,3</sup>, MAO Yanni<sup>3,4</sup>, TIAN Jie<sup>1</sup>, ZHONG Wu<sup>1,2,3</sup>,  
HU Chuanrong<sup>1,2</sup>, HE Dongping<sup>1,2,3</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China;  
2. Key Laboratory for Deep Processing of Major Grain and Oil of Ministry of Education, Wuhan 430023,  
China; 3. Key Laboratory of Edible Oil Quality and Safety for State Market Regulation,  
Wuhan 430012, China; 4. Wuhan Institute for Food and Cosmetic  
Control, Wuhan 430012, China)

**Abstract:** In order to provide guidance for the deep processing and utilization of rice bran by-products, the rice bran protein was extracted using alkaline protease assisted alkaline dissolution and acid precipitation method, and further purified with cellulase. The extraction and purification process conditions were optimized by orthogonal experimental based on single factor experiment. The results showed that the optimal conditions of extraction of rice bran protein were obtained as follows: enzymatic hydrolysis temperature 50℃, enzymatic hydrolysis pH 10.5, enzymatic hydrolysis time 120 min, material-liquid ratio 1:10, and dosage of enzyme 2.5%. Under these conditions, the extraction rate of rice bran protein was 75.2%. The optimal conditions of purification of rice bran protein were obtained as follows: enzymatic hydrolysis temperature 50℃, enzymatic hydrolysis pH 5.0, enzymatic hydrolysis time 60 min, material-liquid ratio 1:10, and dosage of enzyme 4%. Under these conditions, the purity and extraction rate of rice bran protein were 81.6% and 72.6%, respectively. The rice bran protein with high purity and extraction rate can be obtained by this method.

**Key words:** rice bran protein; extraction; purification; alkaline protease; cellulase

收稿日期:2022-09-13;修回日期:2023-05-10

作者简介:胡博(1997),男,硕士研究生,研究方向为粮食、油脂及植物蛋白(E-mail)hubogeren@126.com。

通信作者:高盼,讲师,博士(E-mail)gaopan925@163.com。

米糠是稻谷脱壳加工过程中的主要副产物,通常占稻谷质量的 8%~12%。我国作为农业大国,每年米糠产量高达 2 000 万 t<sup>[1-2]</sup>。米糠中含有丰富的蛋白质,含量占米糠总质量的 15%~20%<sup>[3]</sup>,米糠蛋白氨基酸组成合理,生物效价高,与 FAO/

WHO 推荐模式相近<sup>[4]</sup>, 相比其他谷物蛋白有着更高的消化率和生物学功能<sup>[5]</sup>; 米糠蛋白具有低过敏性, 不会对人体产生过敏反应, 非常适合婴幼儿和特殊人群<sup>[6-7]</sup>, 是一种极具发展潜力的优质蛋白。

米糠蛋白的分子结构中存在大量二硫键和疏水基团, 致使其难以被提取, 且米糠中的蛋白质易与纤维素形成复合物, 导致制备的米糠蛋白纯度过低, 难以直接利用<sup>[8]</sup>。目前, 主要采用碱溶酸沉法和酶法提取米糠蛋白<sup>[9-10]</sup>。碱溶酸沉法是利用在碱性环境下氢和酰胺键被破坏以达到溶解米糠蛋白的效果, 是公认工艺简便的一种方法<sup>[11]</sup>。谢宇霞等<sup>[12]</sup>采用碱法提取米糠蛋白, 在 NaOH 浓度 0.10 mol/L、料液比 1:10、提取温度 25 ℃、提取时间 150 min 条件下, 米糠蛋白提取率为 74.3%。但碱溶酸沉法仍存在提取效率较低等问题。现通常采用酶法或物理法辅助<sup>[13]</sup>碱法提取米糠蛋白, 以进一步提高提取效率, 其中, 酶法提取相对温和的反应条件既能保留更多的营养价值, 亦能得到较高蛋白质提取率<sup>[14]</sup>。

随着生活水平的提高, 人们对蛋白产品品质的要求也在不断提高, 高纯度的蛋白产品是蛋白精深加工与利用的目标, 也是延长产业链、提高副产物利用价值的极佳途径。因此, 有必要对米糠蛋白进行纯化。纤维素酶能破坏米糠的细胞壁, 分解纤维素, 阻止其与蛋白质交联<sup>[15]</sup>, 有利于米糠蛋白的进一步纯化, 但目前少见米糠蛋白纯化方面的报道。因此, 本研究采用酶法辅助碱溶酸沉法提取米糠蛋白, 并在此基础上进一步使用纤维素酶对米糠蛋白进行纯化, 为米糠蛋白制备工艺研究提供理论和数据基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 原料与试剂

米糠, 唐山圣昊农科发展有限公司; 碱性蛋白酶 (20 万 U/g), 南宁市庞博生物有限公司; 纤维素酶 (40 万 U/g), 上海源叶生物科技有限公司; NaOH、HCl, 均为分析纯, 开封市东大化工有限公司; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、乙醚, 均为分析纯, 天津市科密欧有限公司; CuSO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 分析纯, 天津市天试化学试剂有限公司; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、溴甲酚绿, 分析纯, 天津博迪化工股份有限公司。

#### 1.1.2 仪器与设备

K-9840 凯氏定氮仪、SOX-406 自动脂肪测定仪, 济南市海能仪器股份有限公司; ST3100 pH 计, 瑞士梅特勒-托利多公司; FA224 电子天平, 杭州市旌斐股份有限公司; TD5A 中低速离心机, 湖南凯达

仪器有限公司; DF101S 恒温加热磁力搅拌器, 巩义于华仪器股份有限公司; SK-3300 超声清洗仪, 上海科导超声仪器股份有限公司; 101-S 鼓风恒温干燥箱, 上海博迅实业股份有限公司; Freezone 冷冻干燥机, 美国拉博康公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 米糠脱脂处理

称取 500 g 米糠, 按料液比 1:8 加入正己烷, 400 W 超声辅助提取 4 h。重复提取 1 次, 抽滤并收集残渣。对残渣旋蒸回收残留正己烷, 将旋蒸后的残渣置于通风橱晾干, 得到脱脂米糠, 于 4 ℃ 储存备用。

#### 1.2.2 基础指标测定

水分的测定, GB 5009.3—2016《食品安全国家标准 食品中水分的测定》直接测定法; 蛋白质的测定, GB 5009.5—2016《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》微量凯氏定氮法; 粗脂肪的测定, GB 5009.6—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪的测定》索氏抽提法。

#### 1.2.3 米糠蛋白等电点的测定

称量 5 g 脱脂米糠, 按料液比 1:10 溶解于去离子水中, 用 1 mol/L 盐酸溶液分别调节溶液 pH 为 3.5、3.8、4.1、4.4、4.7、5.0、5.3、5.6、6.0, 并在室温下于 1 000 r/min 磁力搅拌 30 min, 然后于 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 测定其蛋白质含量, 按式 (1) 计算米糠蛋白溶解度 (Y), 并绘出溶解度随着溶液 pH 变化的曲线图, 米糠蛋白等电点为溶解度最小时溶液的 pH。

$$Y = M_1 / M_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $M_0$  为样品中的总蛋白质含量;  $M_1$  为上清液中的蛋白质含量。

#### 1.2.4 酶法辅助碱溶酸沉法提取米糠蛋白

称取 50 g 脱脂米糠, 按一定的料液比加入去离子水溶解, 并使用 2 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH, 加入一定量的碱性蛋白酶, 在一定的温度下反应一定时间后, 于 100 ℃ 水浴 10 min 灭酶, 再于 40 ℃、超声功率 160 W 条件下碱提 2 h, 将碱提后的溶液以 6 000 r/min 离心 10 min, 取出上清液后将残渣加入适量蒸馏水复溶, 同样条件离心后合并上清液; 使用 1 mol/L 盐酸溶液将上清液调至米糠蛋白等电点进行酸沉, 静置 1 h 后以 6 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 真空冷冻干燥得到米糠粗蛋白。

#### 1.2.5 纤维素酶酶解纯化米糠蛋白

称取 50 g 米糠粗蛋白, 按一定的料液比加入去离子水溶解, 并使用 1 mol/L 盐酸溶液调节 pH, 加入一定量的纤维素酶, 在一定温度下酶解一定时间

后,升温至 85 ℃ 灭酶 15 min,以 5 000 r/min 离心 10 min,取沉淀加入适量蒸馏水使沉淀复溶并调节 pH 至 7.0,冷冻干燥获得纯化米糠蛋白。

### 1.2.6 米糠蛋白提取率的计算

米糠蛋白提取率( $y_1$ 、 $y_2$ )按式(2)、式(3)计算。

$$y_1 = m_1/m_0 \times 100\% \quad (2)$$

$$y_2 = m_2/m_0' \times 100\% \quad (3)$$

式中: $m_1$ 为提取的米糠粗蛋白的质量; $m_0$ 为原料脱脂米糠中蛋白的质量; $m_2$ 为纯化米糠蛋白的质量; $m_0'$ 为待纯化的米糠粗蛋白质量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 米糠及脱脂米糠主要组分

对米糠及脱脂米糠主要组分进行测定,结果见表 1。

表 1 米糠及脱脂米糠的主要组分 %

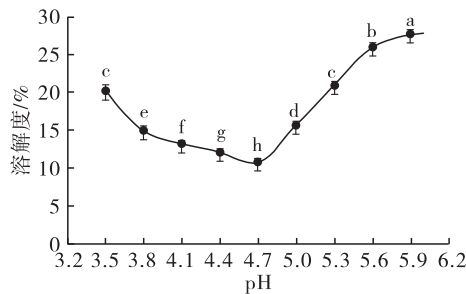
| 项目   | 水分    | 粗脂肪   | 蛋白质(N×6.25) |
|------|-------|-------|-------------|
| 米糠   | 11.55 | 17.52 | 16.45       |
| 脱脂米糠 | 7.89  | 0.95  | 31.45       |

注:粗脂肪、蛋白质均为干基含量

由表 1 可知,脱脂米糠中蛋白质含量达 31.45%,相较于脱脂前有了显著的提升,且脱脂米糠的粗脂肪含量降到了 0.95%,粗脂肪的降低有利于米糠蛋白的提取。

### 2.2 米糠蛋白等电点

pH 与米糠蛋白溶解度的关系如图 1 所示。



注:不同字母代表差异显著( $p < 0.05$ )。下同

图 1 pH 与米糠蛋白溶解度的关系

由图 1 可知,随着 pH 的升高,米糠蛋白的溶解度呈现先下降再上升的趋势。当 pH 为 4.7 时,米糠蛋白溶解度最小,仅为 10.6%,因此米糠蛋白的等电点为 pH 4.7。在溶液中,蛋白质以两性离子的形式存在,在等电点时,两性离子的正负电荷相等,其分子静电荷为零,蛋白质之间的分子作用力减小,易相互碰撞并形成大分子而沉淀,此时最利于蛋白质的提取。通过等电点的检测,得到最佳酸沉 pH 为 4.7。

### 2.3 酶法辅助碱溶酸沉法提取米糠蛋白的工艺优化

#### 2.3.1 单因素实验

##### 2.3.1.1 酶解温度对米糠蛋白提取率的影响

在酶解时间 120 min,酶解 pH 10.5,加酶量 2.5%,料液比 1:10,酶解温度分别为 45、50、55、60、65 ℃ 的条件下,探究酶解温度对米糠蛋白提取率的影响,结果如图 2 所示。

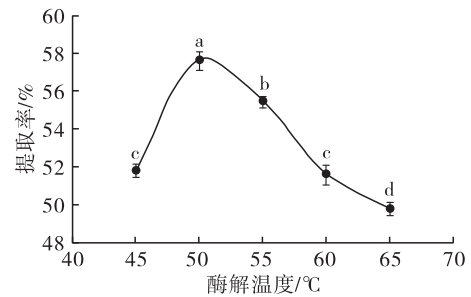


图 2 酶解温度对米糠蛋白提取率的影响

由图 2 可知,米糠蛋白提取率随着酶解温度的升高先增大后减小,在 50 ℃ 时达到最大值,此时提取率为 57.6%。适宜的温度能使碱性蛋白酶发挥最大的活性,从而提高提取率,当温度过低时会影响酶的活性,反之过高的温度会导致酶发生变性,影响酶解效果。因此,最佳酶解温度为 50 ℃。

##### 2.3.1.2 酶解 pH 对米糠蛋白提取率的影响

在酶解时间 120 min,酶解温度 50 ℃,加酶量 2.5%,料液比 1:10,酶解 pH 分别为 9.0、9.5、10.0、10.5、11.0 的条件下,探究酶解 pH 对米糠蛋白提取率的影响,结果见图 3。

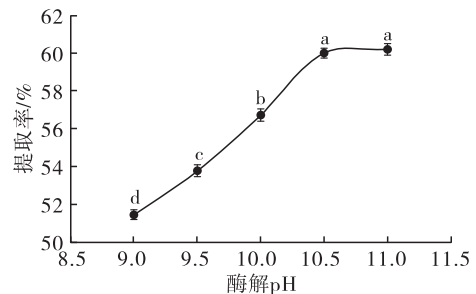


图 3 酶解 pH 对米糠蛋白提取率的影响

由图 3 可知,随着酶解 pH 的升高,米糠蛋白提取率不断上升,米糠的结构在碱性环境下会变得疏松,蛋白质的溶出不断增加,这是因为米糠蛋白中二硫键的含量相对较高,在弱碱性条件下溶解度低,当 pH 增加,二硫键以及以氢键为主的次级键被破坏,米糠蛋白的溶解度增加。同时,碱性蛋白酶在此时具有更高的活性,能相对充分地酶解米糠蛋白,进一步增强了蛋白质的溶出,提取率也随之上升。当酶解 pH 为 10.5 时,提取率为 60.0%,当酶解 pH 继续增加时,提取率变化较小,故最佳酶解 pH 为 10.5。

2.3.1.3 酶解时间对米糠蛋白提取率的影响

在酶解温度 50℃, 酶解 pH 10.5, 加酶量 2.5%, 料液比 1:10, 酶解时间分别为 60、90、120、150、180 min 的条件下, 探究酶解时间对米糠蛋白提取率的影响, 结果见图 4。

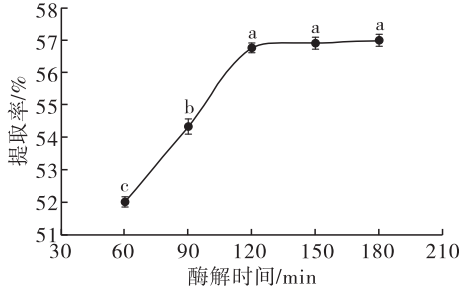


图 4 酶解时间对米糠蛋白提取率的影响

由图 4 可知, 随着酶解时间的延长, 米糠蛋白提取率呈先上升再逐渐趋于平缓的趋势。酶解时间过短, 米糠蛋白细胞壁裂解不够彻底, 导致米糠蛋白无法被彻底释放出来, 提取率也相对较低; 随着酶解时间的延长, 米糠蛋白不断溶出, 提取率不断上升, 在酶解时间 120 min 时, 提取率为 56.9%, 继续延长酶解时间, 提取率变化较小。综合考虑提取效率和成本的因素, 选择最佳酶解时间为 120 min。

2.3.1.4 加酶量对米糠蛋白提取率的影响

在酶解温度 50℃, 酶解 pH 10.5, 料液比 1:10, 酶解时间 120 min, 加酶量分别为 1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的条件下, 探究加酶量对米糠蛋白提取率的影响, 结果见图 5。

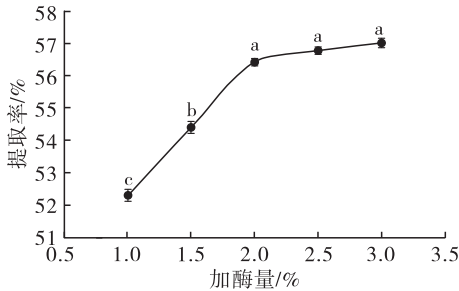


图 5 加酶量对米糠蛋白提取率的影响

由图 5 可知, 随着加酶量的提高, 米糠蛋白提取率不断上升, 当加酶量为 2.5% 时, 提取率为 56.8%, 之后趋于平缓。在加酶量较低时, 因底物浓度较大, 酶无法与底物中的蛋白质反应完全, 随着加酶量的不断增大, 酶的浓度趋于饱和, 提取率也趋于平缓<sup>[16]</sup>。综合考虑, 选择最佳加酶量为 2.5%。

2.3.1.5 料液比对米糠蛋白提取率的影响

在酶解 pH 10.5, 酶解温度 50℃, 酶解时间 120 min, 加酶量 2.5%, 料液比分别为 1:8、1:9、1:10、1:11、1:12 的条件下, 考察料液比对米糠蛋白

提取率的影响, 结果如图 6 所示。

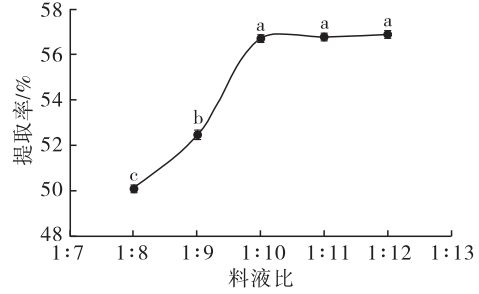


图 6 料液比对米糠蛋白提取率的影响

由图 6 可知, 米糠蛋白提取率随料液比升高而上升, 在料液比达到 1:10 后, 提取率趋于稳定。过低的料液比溶液黏稠度较大, 降低了酶与底物相结合的概率, 无法使酶达到最大的酶解效果。因此, 选择最佳料液比为 1:10。

2.3.2 正交实验

在单因素实验的基础上, 以米糠蛋白提取率为考察指标, 酶解 pH(10.0、10.5、11.0、11.5)、酶解温度(40、45、50、55℃)、加酶量(1.5%、2.0%、2.5%、3.0%)、料液比(1:9、1:10、1:11、1:12)和酶解时间(90、120、150、180 min)为考察因素, 设计五因素四水平  $L_{16}(4^5)$  的正交实验, 优化酶法辅助碱溶酸沉法提取米糠蛋白的工艺条件。正交实验设计及结果见表 2。

表 2 米糠蛋白提取正交实验设计及结果

| 实验号   | A 酶解 pH | B 加酶量/% | C 酶解温度/℃ | D 料液比 | E 酶解时间/min | 提取率/% |
|-------|---------|---------|----------|-------|------------|-------|
| 1     | 10.0    | 1.5     | 40       | 1:9   | 90         | 60.3  |
| 2     | 10.0    | 2.0     | 45       | 1:10  | 120        | 68.7  |
| 3     | 10.0    | 2.5     | 50       | 1:11  | 150        | 67.9  |
| 4     | 10.0    | 3.0     | 55       | 1:12  | 180        | 64.2  |
| 5     | 10.5    | 1.5     | 45       | 1:11  | 180        | 66.1  |
| 6     | 10.5    | 2.0     | 40       | 1:12  | 150        | 67.2  |
| 7     | 10.5    | 2.5     | 55       | 1:9   | 120        | 70.9  |
| 8     | 10.5    | 3.0     | 50       | 1:10  | 90         | 70.1  |
| 9     | 11.0    | 1.5     | 50       | 1:12  | 120        | 68.8  |
| 10    | 11.0    | 2.0     | 55       | 1:11  | 90         | 67.2  |
| 11    | 11.0    | 2.5     | 40       | 1:10  | 180        | 67.0  |
| 12    | 11.0    | 3.0     | 45       | 1:9   | 150        | 68.2  |
| 13    | 11.5    | 1.5     | 55       | 1:10  | 150        | 69.1  |
| 14    | 11.5    | 2.0     | 50       | 1:9   | 180        | 68.6  |
| 15    | 11.5    | 2.5     | 45       | 1:12  | 90         | 66.1  |
| 16    | 11.5    | 3.0     | 40       | 1:11  | 120        | 66.4  |
| $k_1$ | 65.3    | 66.1    | 65.2     | 67.0  | 66.0       |       |
| $k_2$ | 68.6    | 67.9    | 67.3     | 68.7  | 68.7       |       |
| $k_3$ | 67.8    | 68.0    | 68.9     | 66.9  | 68.1       |       |
| $k_4$ | 67.6    | 67.2    | 67.9     | 66.6  | 66.5       |       |
| R     | 3.3     | 1.9     | 3.6      | 2.1   | 2.8        |       |

由表 2 可知, 各因素中对米糠蛋白提取率的影

响最大的为酶解温度,其次从大到小依次为酶解 pH、酶解时间、料液比、加酶量。最佳因素水平组合为 A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>2</sub>E<sub>2</sub>,即酶解 pH 10.5、加酶量 2.5%、酶解温度 50℃、料液比 1:10、酶解时间 120 min。在最佳工艺条件下进行 3 次平行验证实验,米糠蛋白的平均提取率为 75.2%。

## 2.4 纤维素酶酶解纯化米糠蛋白工艺优化

### 2.4.1 单因素实验

#### 2.4.1.1 酶解温度对米糠蛋白纯度的影响

在酶解时间 60 min,酶解 pH 5.0,加酶量 4%,料液比 1:10,酶解温度分别为 40、45、50、55、60、65、70℃的条件下,探究酶解温度对米糠蛋白纯度的影响,结果如图 7 所示。

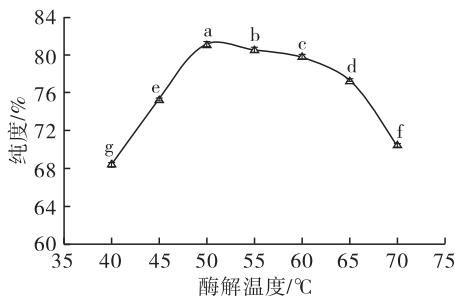


图 7 酶解温度对米糠蛋白纯度的影响

由图 7 可知,随着酶解温度的升高,米糠蛋白纯度不断升高,在 50℃左右时最高。原因可能是酶只有在最适温度才有最大的酶解效果,低于最适温度酶活性不够,温度过高时会导致纤维素酶失活,无法分解纤维素。因此,最佳酶解温度为 50℃。

#### 2.4.1.2 酶解 pH 对米糠蛋白纯度的影响

在酶解时间 60 min,酶解温度 50℃,加酶量 4%,料液比 1:10,酶解 pH 分别为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 的条件下考察酶解 pH 对米糠蛋白纯度的影响,结果见图 8。

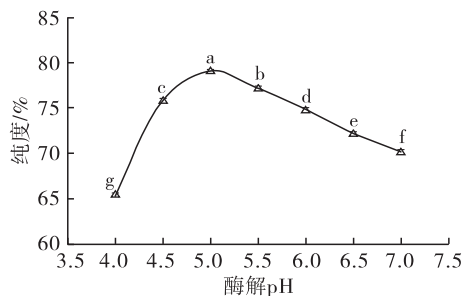


图 8 酶解 pH 对米糠蛋白纯度的影响

由图 8 可知,米糠蛋白纯度随着酶解 pH 的增大而呈现先上升后下降的趋势。米糠蛋白纯度在 pH 为 5.0 时达到最大值。纤维素酶的活性会受到过高或者过低的 pH 的影响,其酶解效果也会显著减小,从而影响米糠蛋白纯度,只有在最适 pH 的条

件下才能有最大的酶解效果。在 pH 为 5.0 时,纤维素分解相对完全,利于蛋白质的提取,故最佳 pH 为 5.0。

#### 2.4.1.3 酶解时间对米糠蛋白纯度的影响

在酶解温度 50℃,酶解 pH 5.0,料液比 1:10,加酶量 4%,酶解时间分别为 20、40、60、80、100、120 min 的条件下,考察酶解时间对米糠蛋白纯度的影响,结果如图 9 所示。

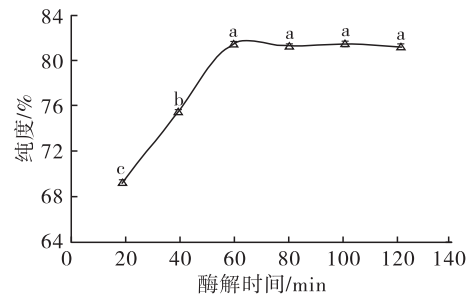


图 9 酶解时间对米糠蛋白纯度的影响

由图 9 可见,酶解时间从 20 min 延长到 60 min,米糠蛋白纯度大幅增加,60 min 之后趋于稳定,其原因可能是一定时间后,酶解反应生成的杂质会阻碍纤维素酶与底物的进一步结合,从而使纯度无法继续提高<sup>[17]</sup>。因此,最佳酶解时间为 60 min。

#### 2.4.1.4 加酶量对米糠蛋白纯度的影响

在酶解 pH 5.0,酶解温度 50℃,料液比 1:10,酶解时间 60 min,加酶量分别为 1%、2%、3%、4%、5%、6% 的条件下,探究加酶量对米糠蛋白纯度的影响,结果见图 10。

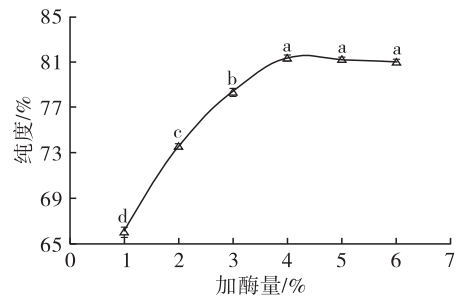


图 10 加酶量对米糠蛋白纯度的影响

由图 10 可知,米糠蛋白纯度随着加酶量的增加不断增大,在加酶量 4% 时趋于稳定,原因可能是随着加酶量不断增大,足量的纤维素酶与底物充分结合,再添加纤维素酶也无法提高蛋白质的纯度,故最佳加酶量为 4%。

#### 2.4.1.5 料液比对米糠蛋白纯度的影响

在酶解温度 50℃,酶解 pH 5.0,酶解时间 60 min,加酶量 4%,料液比分别为 1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12 的条件下,探究料液比对米糠蛋白纯度的影响,结果见图 11。



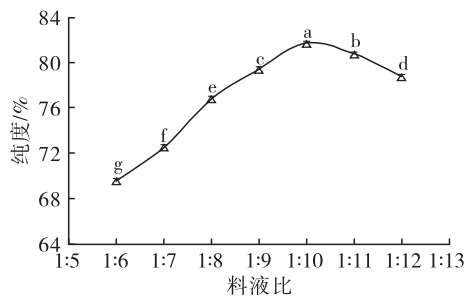


图 11 料液比对米糠蛋白纯度的影响

由图 11 可知:随着料液比的增大,米糠蛋白纯度呈现先升高后降低的趋势,在料液比 1:10 时达到最高值(81.79%)。当料液比较低时,体系黏度较大,酶与底物无法充分结合,随着料液比的不断增大,蛋白质与酶结合的概率增大,米糠蛋白纯度随之上升;继续增大料液比会稀释酶与底物,从而影响米糠蛋白的纯化。因此,最佳料液比为 1:10。

#### 2.4.2 正交实验

在单因素实验的基础上,以米糠蛋白纯度为考察指标,酶解温度(40、45、50、55℃)、酶解 pH(4.5、5.0、5.5、6.0)、酶解时间(40、60、80、100 min)、加酶量(3%、4%、5%、6%)和料液比(1:8、1:9、1:10、1:11)为考察因素,设计五因素四水平  $L_{16}(4^5)$  正交实验优化米糠蛋白纯化工艺条件,正交实验设计及结果见表 3。

表 3 米糠蛋白纯化正交实验设计及结果

| 实验号   | A 酶解温度/℃ | B 酶解 pH | C 酶解时间/min | D 加酶量/% | E 料液比 | 纯度/% |
|-------|----------|---------|------------|---------|-------|------|
| 1     | 40       | 4.5     | 40         | 3       | 1:8   | 72.1 |
| 2     | 40       | 5.0     | 60         | 4       | 1:9   | 80.8 |
| 3     | 40       | 5.5     | 80         | 5       | 1:10  | 80.2 |
| 4     | 40       | 6.0     | 100        | 6       | 1:11  | 77.2 |
| 5     | 45       | 4.5     | 60         | 5       | 1:11  | 79.9 |
| 6     | 45       | 5.0     | 40         | 6       | 1:10  | 79.3 |
| 7     | 45       | 5.5     | 100        | 3       | 1:9   | 79.6 |
| 8     | 45       | 6.0     | 80         | 4       | 1:8   | 79.7 |
| 9     | 50       | 4.5     | 80         | 6       | 1:9   | 79.4 |
| 10    | 50       | 5.0     | 100        | 5       | 1:8   | 80.8 |
| 11    | 50       | 5.5     | 40         | 4       | 1:11  | 78.8 |
| 12    | 50       | 6.0     | 60         | 3       | 1:10  | 80.1 |
| 13    | 55       | 4.5     | 100        | 4       | 1:10  | 78.6 |
| 14    | 55       | 5.0     | 80         | 3       | 1:11  | 80.1 |
| 15    | 55       | 5.5     | 60         | 6       | 1:8   | 78.6 |
| 16    | 55       | 6.0     | 40         | 5       | 1:9   | 75.6 |
| $k_1$ | 77.6     | 77.5    | 76.4       | 78.0    | 77.8  |      |
| $k_2$ | 79.6     | 80.2    | 79.9       | 79.4    | 78.8  |      |
| $k_3$ | 79.8     | 79.3    | 79.8       | 79.1    | 79.6  |      |
| $k_4$ | 78.2     | 78.1    | 79.0       | 78.6    | 79.0  |      |
| R     | 2.2      | 2.7     | 3.4        | 1.5     | 1.8   |      |

由表 3 可知,各因素中对米糠蛋白纯度影响最大的为酶解时间,其次从大到小依次为酶解 pH、酶解温度、料液比和加酶量。最佳因素水平组合为  $A_3B_2C_2D_2E_3$ ,即酶解温度 50℃、酶解 pH 5.0、酶解时间 60 min、加酶量 4%、料液比 1:10。在最佳工艺条件下进行 3 次平行验证实验,米糠蛋白平均纯度为 81.6%,提取率为 72.6%。

### 3 结论

在碱溶酸沉法的基础上采用酶法辅助提取米糠蛋白,利用单因素实验和正交试验优化得到提取米糠蛋白的最佳工艺条件:酶解温度 50℃,酶解时间 120 min,酶解 pH 10.5,加酶量 2.5%,料液比 1:10。在最佳提取条件下,米糠蛋白提取率为 75.2%。进一步采用纤维素酶纯化米糠蛋白,通过单因素实验和正交实验优化得到纤维素酶纯化米糠蛋白的最佳工艺条件:酶解温度 50℃,酶解 pH 5.0,酶解时间 60 min,加酶量 4%,料液比 1:10。在最佳纯化条件下,米糠蛋白纯度为 81.6%,提取率为 72.6%。本文不仅采用酶法辅助碱溶酸沉法提取米糠蛋白,获得较高的提取率,并采用纤维素酶对提取的粗蛋白进行纯化,能获得纯度较高的米糠蛋白,为米糠蛋白的生产应用提供了依据。米糠蛋白的提取率依然有上升空间,有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] WU W, LI F, WU X J. Effects of rice bran rancidity on oxidation, structural characteristics and interfacial properties of rice bran globulin[J/OL]. Food Hydrocolloid, 2021, 110: 106123 [2022-09-13]. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106123>.
- [2] 陈静,唐振闯,程广燕.我国稻谷口粮消费特征及其趋势预测[J].中国农业资源与区划,2020,41(4):108-116.
- [3] 马桶.三种不同处理工艺对米糠蛋白功能特性的影响研究[D].黑龙江大庆:黑龙江八一农垦大学,2018.
- [4] 周秀琴.大米副产物米糠的价值与国内外的开发应用[J].发酵科技通讯,2010,39(2):40-42.
- [5] AMAGLIANI L, OREGAN J, KELLY A L, et al. The composition, extraction, functionality and applications of rice proteins: a review [J]. Trend Food Sci Technol, 2017, 64: 1-12.
- [6] RAFFA A, MOUSAVI S S, SHAHIDI S. Dynamic rheological behavior of rice bran protein (RBP): effects of concentration and temperature[J]. J Cereal Sci, 2014, 60(3): 514-519.
- [7] GUL K, YOUSUF B, SINGH A K, et al. Rice bran: nutritional values and its emerging potential for development of functional food: a review [J]. Bioact Carbohydr Diet Fibre, 2015, 6(1): 24-30.

(下转第 136 页)

- [8] HOU L X, ZHANG Y J, WANG X D. Characterization of the volatile compounds and taste attributes of sesame pastes processed at different temperatures[J]. *J Oleo Sci*, 2019, 68(6): 551 – 558.
- [9] HOU L X, CHEN L Y, SONG P Q, et al. Comparative assessment of the effect of pretreatment with microwave and roast heating on the quality of black sesame pastes[J]. *J Food Sci*, 2021, 86(12): 5353 – 5374.
- [10] 王颖颖, 侯利霞, 胡爱鹏, 等. 主成分分析法评价市售芝麻酱产品品质[J]. *食品科学*, 2017, 38(6): 310 – 314.
- [11] 刘怡真, 马传国, 陈小威, 等. 凝胶剂对芝麻酱稳定性及感官特性的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(22): 61 – 69.
- [12] 任欣, 娄阁, 沈群. 高压热处理对复合芝麻酱品质特性的影响[J]. *中国食品学报*, 2016, 16(8): 140 – 148.
- [13] 朱雨萱, 问亚琴, 许晓青, 等. 感官词典建立方法及食品中应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(5): 396 – 407.
- [14] IRIE K, MAEDA T, KAZAMI Y, et al. Establishment of a sensory lexicon for dried long pasta [J/OL]. *J Sens Stud*, 2018, 33(4): 12438 [2022 – 06 – 13]. <https://doi.org/ARTN e1243810.1111/joss.12438>.
- [15] PUJCHAKARN T, SUWONSICHON S, SUWONSICHON T. Development of a sensory lexicon for a specific subcategory of soy sauce: seasoning soy sauce[J]. *J Sens Stud*, 2016, 31(6): 443 – 452.
- [16] ROSALES C K, SUWONSICHON S. Sensory lexicon of pomelo fruit over various cultivars and fresh – cut storage [J]. *J Sens Stud*, 2015, 30(1): 21 – 32.
- [17] PEREIRA J A, DIONÍSIO L, MATOS T J S, et al. Sensory lexicon development for a portuguese cooked blood sausage: Morcela de Arrozde Monchique – to predict its usefulness for a geographical certification [J]. *J Sens Stud*, 2015, 30(1): 56 – 67.
- [18] 杨丽, 张英静, 王竹. FP/QDA 法在无糖酸奶感官性质分析中的比较[J]. *中国乳品工业*, 2022, 50(1): 60 – 64.
- [19] 戴前颖, 安琪, 郑芳玲, 等. 基于定量描述分析法和适合项勾选法的黄大茶香气感官特性及喜好度分析[J]. *食品科学*, 2022, 43(21): 23 – 33.
- [20] 戴前颖, 叶颖君, 李明洳, 等. 定量描述分析法和 Flash Profile 法在祁门红茶香气评价中的应用[J]. *食品科学*, 2021, 42(22): 224 – 231.
- [21] 戴前颖, 叶颖君, 安琪, 等. 黄大茶感官特征定量描述与风味轮廓构建[J]. *茶叶科学*, 2021, 41(4): 535 – 544.
- [22] NEWMAN J, O'RIORDAN D, JACQUIER J C, et al. Development of a sensory lexicon for dairy protein hydrolysates [J]. *J Sens Stud*, 2014, 29(6): 413 – 424.
- [23] 常玉梅, 钟芳. 豆腐干质构感官分析及评价小组能力评估[J]. *食品与生物技术学报*, 2013, 32(1): 37 – 42.
- [24] 徐淑臻, 黄伟, 陈荣荣. PanelCheck 检测评价小组对乳酸菌饮料的感官评估能力[J]. *饮料工业*, 2018, 21(2): 12 – 17.
- [25] 龙慧, 覃柳迪, 王世雄, 等. 大米粉饺感官评价标准体系的建立[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(17): 37 – 43.
- [26] 李敬, 崔繁荣, 叶治兵. 泡椒牛皮感官评价指标体系的构建[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(13): 206 – 209, 214.
- [27] 罗丽, 王敏, 王洪伟. 怪味胡豆风味特征的定量描述分析[J]. *中国调味品*, 2018, 43(12): 7 – 12.
- 
- (上接第 120 页)
- [8] TANG S, HETTIARACHCHY N S, SHELLHAMMER T H. Protein extraction from heat – stabilized defatted rice bran. 1. Physical processing and enzyme treatments[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(25): 7444 – 7448.
- [9] 曹慧英, 李航, 段庆松, 等. 米糠蛋白提取工艺研究进展[J]. *食品工业*, 2021, 42(7): 280 – 283.
- [10] ZAKY A A, ABDELATY A M, MA A, et al. An overview on antioxidant peptides from rice bran proteins: extraction, identification, and applications [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 62(5): 1350 – 1362.
- [11] BERNARDI S, CORSOM P, BARALDI I J, et al. Obtaining concentrated rice bran protein by alkaline extraction and stirring: optimization of conditions [J]. *Int Food Res J*, 2018, 25(3): 1133 – 1139.
- [12] 谢宇霞, 吴家乾, 黄玉. 碱法提取米糠中粗蛋白的几个影响因素探讨[J]. *粮食加工*, 2022, 47(3): 34 – 36.
- [14] BEDIN S, NETTO F M, BRAGAGNOLO N, et al. Reduction of the process time in the achieve of rice bran protein through ultrasound – assisted extraction and microwave – assisted extraction [J]. *Sep Sci Technol*, 2020, 55(2): 300 – 312.
- [13] 张兆琴, 万小保. 米糠蛋白提取研究进展[J]. *农产品加工*, 2017(12): 54 – 60.
- [15] CRIQUET S. Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter[J]. *J Microbiol Meth*, 2002, 50(2): 165 – 173.
- [16] 王晓雅, 朱新鹏, 樊明涛, 等. 碱性蛋白酶提取米糠蛋白的研究[J]. *河南农业科学*, 2012, 41(6): 38 – 41.
- [17] 邹翀, 何东平, 尤梦圆, 等. 米糠蛋白提取及纯化工艺的研究[J]. *农业机械*, 2013(3): 32 – 36.