

黑米蛋白提取工艺的优化

姜珊珊¹, 王红艳², 王 乾¹, 叶 丽^{1*}¹复旦大学药学院, 上海 201203; ²湖北省洪湖市第一人民医院, 洪湖 433200

摘要:以黑米为原料, 研究黑米蛋白提取工艺的优化。采用“碱提酸沉”法, 研究了提取液 pH 值、温度、搅拌速度、料液比、提取时间、及粒径大小等对黑米蛋白提取率的影响。在单因素试验的基础上, 以 $L_9(3^4)$ 正交实验法优化黑米蛋白提取工艺。结果表明: 各因素对黑米蛋白提取率的影响顺序依次为: pH 值 > 粒径 > 料液比 > 转速。本实验中, 黑米蛋白提取的最佳工艺条件为: 提取液 pH 12.5、温度 28 °C、搅拌转速 800 rpm、料液比 1:10 g/mL、提取时间为 1 h、酸沉淀时间为 1 h、粒径大小为能通过 100 目筛。优化后黑米水溶性蛋白提取率提高到 96.77%, 纯度为 97.75%。

关键词:黑米蛋白; 提取率; 碱提酸沉法; 控制变量法

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.1.025

Optimization of Protein Extraction from Black Rice

JIANG Shan-shan¹, WANG Hong-yan², WANG Qian¹, YE Li^{1*}¹School of Pharmacy, Fudan university, Shanghai, 201203, China; ²The first people's hospital of Honghu, Hubei province, Honghu, Hubei, 433200, China

Abstract: The objective of this study was to optimize the extraction process of protein from black rice by alkali extraction and acid precipitation. The optimal extraction process was established through controlling extraction conditions such as pH value, temperature, stirring rate, solid to liquid ratio, extraction time and particle size. Based on single factor experiments, four factor-three level orthogonal experiments were designed. The results showed that the effect of the investigated factors on the extraction yield of black rice protein was in sequence of pH value, particle size, solid to liquid ratio and stirring rate. The optimal extraction process of black rice protein was solution pH 12.5, temperature 28 °C, stirring rate 800 rpm, solid to liquid ratio 1:10 g/mL, extraction time 1 h, acid precipitation 1 h, particles size 100 mesh. The extraction yield of water-soluble protein improved to 96.77% with the purity of 97.75%.

Key words: black rice protein; extraction yield; alkali extraction and acid precipitation; control variable method

黑米是稻米中的珍贵品种, 属于糯米类, 由植物稻经长期培育形成的一类特色品种。糙米呈黑色或黑褐色, 所含锰、锌、铜等无机盐大都比普通大米高 1~3 倍^[1], 还有大米所缺乏的维生素 C、叶绿素、花青素、胡萝卜素及强心甙等特殊成分^[2]。我国民间有“逢黑必补”之说, 黑米外表墨黑, 营养丰富, 有“黑珍珠”和“世界米中之王”的美誉。用黑米熬制的米粥清香油亮, 软糯适口, 营养丰富, 具有很好的滋补作用, 被称为“补血米”、“长寿米”等。现代医学证实, 黑米富含花色甘类抗氧化色素, 具有抗衰老作用^[3,4], 此外, 黑米还具有滋阴补肾, 健脾暖肝、补益脾胃, 益气活血, 养肝明目等疗效。经常食用黑米, 有利于防治头昏、目眩、贫血、白发、眼疾、腰膝酸

软、肺燥咳嗽、大便秘结、小便不利、肾虚水肿、食欲不振、脾胃虚弱等症^[5]。

黑糙米的蛋白质含量在 11.3% ~ 15.2% 之间, 远比普通白米高^[6]。虽然黑米养生功效的报道屡见不鲜, 但作为主要营养成分的黑米蛋白提取工艺却鲜为报道。本研究采用“碱提酸沉”法, 对提取液 pH、碱提取时间、温度、料液比、酸沉淀时间、搅拌速度、粒径大小等条件进行研究, 通过单因素实验及正交优化实验, 探索黑米蛋白提取的最佳工艺, 为黑米蛋白的产业化生产和应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料: 黑米, 由上海知萌生物医药科技有限公司提供; 试剂: 氢氧化钠, 浓盐酸, 均为分析纯, 国药集

团化学试剂有限公司;BCA 蛋白定量试剂盒,碧云天生物技术公司;SMOBio 预染蛋白 Marker,上海明睿生物技术有限公司;考马斯亮蓝蛋白染色液,TIANGEN 生化科技有限公司。

1.2 仪器与设备

仪器:高速冷冻离心机,Thermo 公司;pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;85-2 恒温磁力搅拌器,上海梅颖浦公司;BJ-200 型高速多功能粉碎机,上海拜节实业有限公司;FN2004 电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;冷冻干燥机,美国 LABCONCO 公司;酶标仪,DYNEX 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 黑米蛋白提取工艺

充分粉碎黑米,分别用 50 目、80 目、100 目孔径的筛网过滤,得到黑米粉,置于 4 °C 环境下保存备用。精确称取 5 g 黑米粉,加入到 0.05 mol/L (pH 12.7) 的 50 mL NaOH 溶液中,磁力搅拌浸提 1 h,4000 rpm 冷冻离心 20 min,除去沉淀。盐酸调 pH 至 4.8,静置沉淀 1 h 后,4000 rpm 冷冻离心 20 min,蒸馏水清洗沉淀 3 遍,所得蛋白冷冻干燥、称重。

1.3.2 蛋白定量

采用 5 mg/mL 的牛血清蛋白 (BSA) 作为标准蛋白。在 96 孔板中加入待测样品后,每孔加入 200

μL BCA (A 液:B 液 = 50:1) 试液,放入 37 °C 恒温箱孵育 30 min,于酶标仪 592 nm 下测吸光度值。

1.3.3 SDS-PAGE 凝胶电泳

配制 10% 的凝胶,电泳,电泳结束后置胶体于马斯亮蓝染色皿中染色 6 h。加入脱色液脱色,观察。

1.3.4 黑米蛋白提取率的计算

黑米蛋白提取率 (%) = $W1 \times V1 / W2 \times V2 \times 100\%$

W1 为提取液中可溶性蛋白的浓度 (g/mL);V1 为提取液的体积 (mL);W2 为黑米中可溶性蛋白质质量浓度 (g/mL);V2 为黑米样品液体积 (mL)。

1.3.5 最佳条件提取蛋白分析

精确称量条件优化后得到的黑米蛋白 2.0 mg,复溶到 2 mL 0.05 mol/L 的氢氧化钠溶液中,进行蛋白定量,上样 20 μg 总蛋白,SDS 凝胶电泳,观察黑米蛋白中各蛋白种类及相对含量。

1.3.6 正交实验优化提取工艺

在单因素试验的基础上,考察粒径、pH、料液比、转速四个因素对黑米蛋白提取的影响,采用 3 因素 4 水平 $L_9(3^4)$ 正交实验确定最佳提取工艺条件,各因素水平见表 1。

表 1 黑米蛋白提取 $L_9(3^4)$ 正交实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of $L_9(3^4)$ orthogonal experimental design for the extraction of protein from black rice

水平 Level	因素 Factors			
	(A) 粒径 Particles size (mesh)	(B) pH	(C) 料液比 Solid-liquid ratio (W/V)	(D) 转速 Stirring rate (rpm)
1	50	10.5	1:5	0
2	80	11.5	1:10	400
3	100	12.5	1:20	800

2 结果与分析

2.1 pH 对黑米蛋白提取率的影响

如图 1 所示,当 pH 小于 10 时,黑米蛋白的提取率几乎为零,而当 pH 大于 10 时,黑米蛋白的提取率随着 pH 的升高呈迅速上升趋势。可能由于碱性条件下,黑米中淀粉结构变得松散,淀粉与蛋白质分离,蛋白质从淀粉内溶出^[7]。此外,碱液对蛋白质中的次级键具有破坏作用^[8],增加了蛋白质的溶解性。当 pH 过大时,强碱会导致黑米中的淀粉糊

化,溶液粘度的增加使提取更难进行。

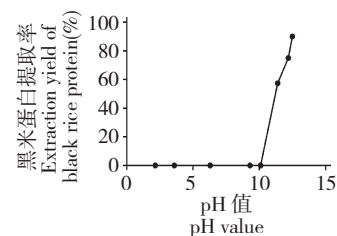


图 1 提取液 pH 对黑米蛋白提取率的影响

Fig. 1 The effect of pH value on the extraction of protein from black rice

2.2 温度对黑米蛋白提取率的影响

温度对黑米蛋白提取率的影响如图 2 所示,在 0~28℃,黑米蛋白的提取率随着温度的升高而增加。温度的升高加快碱液与淀粉的融合,导致淀粉质密的结构疏松,加快蛋白质的溶出。当温度高于 28℃,可能由于蛋白质高级结构二硫键、氢键等遭到破坏,导致蛋白质分子中疏水性基团大量暴露,蛋白溶解度值下降,提取率降低。

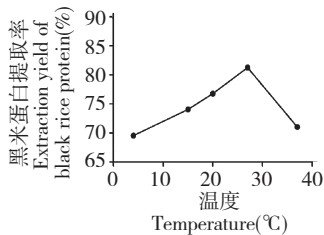


图 2 提取温度对黑米蛋白提取率的影响

Fig. 2 The effect of extraction temperature on the extraction of protein from black rice

2.3 提取时间对黑米蛋白提取率的影响

考察提取时间对黑米蛋白提取率的影响(图 3),在 0~60 min 内,随着时间的增加,蛋白质逐渐溶出并溶解在碱液中,蛋白质溶解度增加,在 60 min 左右时,溶解度达到最大,随着时间的延长黑米蛋白溶解度不再升高,提取率保持平衡。

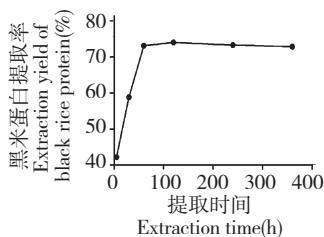


图 3 提取时间对黑米蛋白提取率的影响

Fig. 3 The effect of extraction time on the extraction of protein from black rice

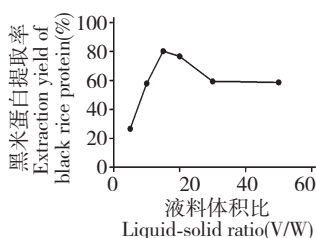


图 4 料液比对黑米蛋白提取率的影响

Fig. 4 The effect of solid to liquid ratio on the extraction of protein from black rice

2.4 料液比对黑米蛋白提取率的影响

图 4 表明随着液料比的增加,等量的黑米蛋白由过饱和状态到未饱和状态,溶解性增加。当液体体积过多时(大于 20:1 g/mL),会造成提取过程中的损失,提取率降低。

2.5 酸沉淀时间对黑米蛋白提取率的影响

图 5 表明在 60 min 内,调整溶液 pH 至等电点附近时,随着时间的延长,蛋白质逐渐凝集并沉淀析出,60 min 后,蛋白质的析出与溶解达到相对平衡且提取率不再增加。此处是利用黑米蛋白在高 pH 时溶解度大,在等电点附近溶解度小的原理,使蛋白质凝聚沉淀。

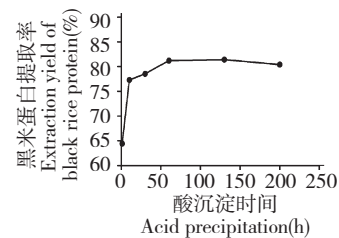


图 5 酸沉淀时间对黑米蛋白提取率的影响

Fig. 5 The effect of acid precipitation on the extraction of protein from black rice

2.6 搅拌速度对黑米蛋白提取率的影响

图 6 表示随着搅拌速度的加快,黑米蛋白的提取率也随之增大,可能由于黑米粉与提取液接触频率增加,加快了蛋白质的溶出。但如果搅拌速度过快,水面间会产生横向剪切力,可能会对蛋白质分子造成损伤,因此,在实际提取中对搅拌速度要进行适当控制。

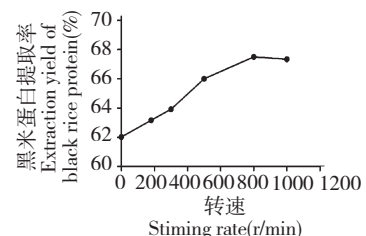


图 6 搅拌速度对黑米蛋白提取率的影响

Fig. 6 The effect of stirring rate on extraction yield of black rice protein

2.7 粒径大小对黑米蛋白提取率的影响

本实验考察了分别能通过 50 目、80 目和 100 目筛网黑米粉的提取率,结果如图 7 所示,黑米粉的粒径越小,蛋白质分子与提取液的相互作用面积越

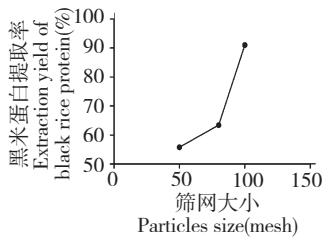


图7 黑米粒径对黑米蛋白提取工艺的影响

Fig. 7 The effect of particles size on extraction yield of black rice protein

大,从而使蛋白质分子充分溶出,提取率增加。但实际黑米粉研磨不均一,筛网目数过大会导致筛网堵塞,黑米粉滤过困难,增加实际生产工艺的难度。

2.8 正交实验优化黑米蛋白提取率

正交实验结果如表2所示,通过极差分析,4个因素的极差大小顺序为 $R_B > R_A > R_C > R_D$,即提取液 pH 值对黑米蛋白提取率影响最大,其次是黑米粒径、料液比,转速对其影响最小。最优提取条件组合为 $A_3B_3C_2D_3$,即: pH 12.5,粒径大小为能通过100目筛,料液比 1:10 g/mL,转速 800 rpm。

表2 黑米蛋白提取正交实验结果

Table 2 The result of orthogonal test

实验编号 No.	因素 Factors				提取率 Extraction yield (%)
	(A) 粒径 Particles size (mesh)	(B) pH 值 pH value	(C) 料液比 Solid-liquid ratio (W/V)	(D) 转速 Stirring rate (rpm)	
1	1	1	1	1	6.28
2	1	2	2	2	29.38
3	1	3	3	3	56.00
4	2	1	2	3	68.00
5	2	2	3	1	36.82
6	2	3	1	2	60.54
7	3	1	3	2	39.02
8	3	2	1	3	42.52
9	3	3	2	1	89.14
K1	91.66	113.3	109.34	132.24	
K2	165.36	108.72	186.52	128.94	
K3	169.68	205.68	131.84	166.52	
k1	30.55	37.76	36.45	44.08	
k2	55.12	36.24	62.17	42.98	
k3	56.56	68.56	43.95	55.50	
R	26.01	32.32	25.72	12.52	

2.9 最适条件下黑米蛋白提取率

综合上述实验结果,采取最优的提取条件:提取液 pH 为 12.5、温度为 28 °C、转速为 800 rpm、料液比为 1:10 g/mL、提取时间为 1 h、酸沉淀时间为 1 h、黑米粉过 100 目筛网,黑米蛋白的提取率达到了 96.77%。图 8 为最优提取条件下黑米蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳图。

通过 BCA 蛋白定量法,测得提取的黑米蛋白含量为 97.75%,黑米中的蛋白组成较复杂,主要有 10 K、12 K、20 K、32 K、60 K、180 K 等不同分子量的蛋白(图 8)。大米主要由清蛋白、球蛋白、谷蛋白和醇溶蛋白四种蛋白组成^[10]。其中,醇溶蛋白由单肽链

通过分子内二硫键连接而成,其相对分子量在 7 ~ 12.6 kDa 之间,清蛋白、球蛋白相对分子量分别为 10 ~ 200 kDa 和 16 ~ 130 kDa,谷蛋白占总蛋白的 80% 以上,是大米谷粒中最重要的一类蛋白质,由二硫键连接的几条多肽链构成,分子量从 105 至数百万道尔顿不等^[11]。SDS-PAGE(图 8)显示了不同黑米蛋白的分子量及含量。

3 讨论与结论

黑米蛋白种类繁多,具有较高的营养价值,可对其进行提取作为食品加工的原料。目前国内对米蛋白提取的主要方式为酶法提取与碱法提取^[12]。本

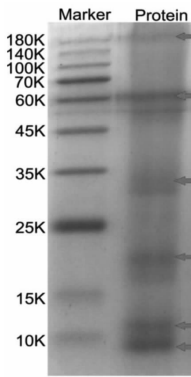


图8 黑米蛋白的 SDS-PAGE
Fig. 8 SDS-PAGE of black rice

实验采用“碱提酸沉”法,首先通过控制单一变量对能影响黑米蛋白提取工艺的条件如提取液 pH、碱提取时间、温度、料液比、酸沉淀时间、搅拌速度、粒径大小进行研究,随后又通过正交实验进行条件优化。结果得到黑米蛋白的最佳提取条件为:pH 12.5,粒径过 100 目筛,料液比 1:10 g/mL,搅拌速度 800 rpm,提取时间 60 min,酸沉淀时间 60 min,提取温度 28 ℃。最终黑米蛋白提取率提高到 96.77%,纯度达到 97.75%,为黑米蛋白提取及产业化生产提供借鉴,为黑米蛋白的扩大利用奠定基础。

参考文献

- Xie BJ(谢笔钧),Hu WW(胡慰望),Wang XH(王小红). Study on the trace elements Fe,Zn,Cu and pigment of black rice. *Food Sci* (食品科学),1993,6:18-19.
- Zhu ZW(朱智伟),Yang W(杨炜),Lin RH(林榕辉). Nutrient value of rice protein on different rice types. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学),1991,5:157-162.
- Wu X,Beecher GR,Holden JM,*et al.* Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *J Agric Food Chem*,2006,54:4069-4075.
- Guo H,Ling W,Wang Q,*et al.* Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats. *Plant Foods Hum Nutr*,2007,62:1-6.
- Lu H(陆恒). Nutritional effects of black rice and edible technical countermeasures. *Mod Business Trade Ind* (现代商贸工业),2003,15(10):50-52.
- Li JQ(黎杰强),Zhu BY(朱碧岩),Chen MQ(陈敏清). Nutrient analysis of special rice. *J South China Normal Univ* (华南师范大学学报),2005,1:95-98.
- Cao M(曹萌),Lin CQ(林陈强),Lin RB(林戎斌),*et al.* Study on extraction and analysis of protein from *Dictyophora echinvolvata* Pileus. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2014,26:475-479.
- Zhang M(张敏),Zhou M(周梅),Wang CY(王长远). Extraction and functional properties of four proteins from rice bran. *Food Sci* (食品科学),2013,34:18-21.
- Lu C(陆晨),Zhang SK(张士康),Zhu KX(朱科学),*et al.* Extraction of tea protein using alkali extraction-acid precipitation method. *Mod Food Sci Technol* (现代食品科技),2011,27:673-677.
- Wang ZC(王章存),Shen RL(申瑞玲),Yao HY(姚惠源). Research progress in rice protein. *J Chin Cereals Oils Assoc* (中国粮油学报),2004,19(2):11-15.
- Jin R(金融),Zhao N(赵念),Chen SS(陈莎莎),*et al.* The research and utilization of rice protein. *Sci Technol Food Ind* (食品工业科技),2007,28:231-234.
- Guo RR(郭荣荣),Qan SY(潘思轶),Wang KX(王可兴). Comparing research on functionality of rice protein extracted by alkali and enzyme. *Food Sci*(食品科学),2005,26:173-177.