

薏米蛋白提取方法比较研究

曹向宇, 刘剑利*, 芦秀丽, 李其久, 侯 潇

(辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘 要: 利用碱法和盐法提取薏米蛋白质, 对薏米蛋白提取方法进行优选。以蛋白提取率为指标, 碱法以提取液 pH 值、料液比、提取温度及提取时间进行单因素试验, 盐法以盐质量分数、料液比、提取温度及提取时间进行单因素试验; 通过 $L_9(3^4)$ 正交试验优化提取工艺条件, 并对提取方法进行比较。结果表明: 碱法优于盐法, 碱法最佳提取条件为料液比 1:12(g/mL)、提取温度 35℃、提取时间 5h、pH11, 在此条件下, 蛋白质的提取率可达 43.56%。

关键词: 薏米; 蛋白质; 提取

Comparative Study on Methods for Extracting Protein from Job's Tears Seed

CAO Xiang-yu, LIU Jian-li*, LU Xiu-li, LI Qi-jiu, HOU Xiao

(School of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: Two extraction methods, namely alkaline method and salt method were used to extract protein from Job's Tears seeds, and their effects on the extraction rate of protein from Job's Tears seed were compared. In the alkaline extraction method, the extraction parameters pH, material-to-liquid ratio, temperature and extraction time were optimized by single factor and orthogonal array design methods based on the extraction rate of protein from Job's Tears seed. The extraction parameters optimized (also by single factor and orthogonal array design methods) in the salt extraction method were salt concentration, material-to-liquid ratio, temperature and extraction time. The results showed that the optimum material-to-liquid ratio, temperature, extraction time and pH for the alkaline extraction of Job's Tears seed protein were 1:12, 35 °C, 5 h and 11, respectively. Under these conditions, the extraction rate of protein was up to 43.56%. Overall, the alkaline extraction method was superior to the salt extraction method.

Key words: Job's Tears seed; protein; extraction

中图分类号: TQ93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)08-0088-05

薏米又称薏苡仁、薏仁米、药玉米等, 是禾本科植物薏苡(*Coix lachry-majobi* L.)的成熟种仁, 是我国最古老作物之一。薏米在我国大部分地区都有种植, 主要产于福建、辽宁、河北、广东、海南等地。薏米不仅营养成分全面, 含蛋白质 18%~21%, 脂肪 4%~6%、碳水化合物 79.2%, 还含有人体所需 18 种氨基酸, 多种维生素和矿物质, 并且营养价值非常高, 在禾本科植物中位居第一, 有着“世界禾本科植物之王”的美誉^[1]。

目前, 国内外对薏米资源的研究与开发极为重视, 但研究主要集中于薏苡仁酯、多糖、薏苡仁油等成分的提取工艺和生物学功能研究上, 对薏米蛋白提取的研究却相对较少^[2-11]。辽宁薏米资源丰富, 特别是辽宁台安、盘锦等地区盛产薏米, 质量好、产量高, 但目

前尚未充分开发利用^[12]。薏米蛋白具有很高的经济价值, 可作为食品工业中的蛋白原料和蛋白质强化剂, 也可经过酶解制备功能性多肽^[13]。因此, 薏米蛋白的研究开发非常有意义。并且研究薏米蛋白的提取工艺, 提高薏米蛋白提取率, 提升薏米的综合利用率, 对于充分利用薏米资源具有重要的意义。本研究采用碱法和盐法两种方法, 通过单因素及正交试验就薏米蛋白提取工艺进行比较, 以期找到最佳的工艺参数, 为薏米蛋白综合利用和工业化生产提供参考和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

薏米(产自辽宁台安) 市售; 考马斯亮蓝 G250 上海蓝季科技发展有限公司; 其他试剂为国产分析纯。

收稿日期: 2010-07-15

基金项目: 辽宁省教育厅高等学校科学技术研究项目(2009A811; L20100154); 辽宁省科技厅农业攻关计划项目(2009209001); 辽宁大学“211 工程”三期建设项目

作者简介: 曹向宇(1980—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: xiangyucao@yahoo.cn

* 通信作者: 刘剑利(1980—), 男, 讲师, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: jianlililiu@yahoo.com.cn

1.2 仪器与设备

PB-10 标准型 pH 计 德国 Sartorius 公司; SCR 20BC 型高速冷冻离心机 日本日立公司; 721 型分光光度计 上海第三分析仪器厂; HH-6 型数显恒温水浴锅 金坛市城东科辉仪器厂; LNK-871 型凯氏定氮仪 江苏省宜兴市科教仪器研究所。

1.3 方法

1.3.1 薏米主要成分分析

总蛋白含量测定: 采用凯氏定氮法^[14]; 碳水化合物的测定: 采用苯酚-硫酸法^[15]; 脂肪测定: 按 GB 5009.6—85《食品中脂肪的测定方法》进行; 灰分测定: 按 GB 5009.4—85《食品中灰分的测定方法》进行^[16]。

1.3.2 薏米蛋白提取工艺

薏米→粉碎→过筛(60 目)→加碱液(或盐液)→浸提→3500r/min 离心分离→上清液(碱法样品调 pH 值至 7)→测蛋白质浓度

1.3.3 薏米蛋白提取率的测定

提取液中蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝法^[14], 碱法测定蛋白之前, 将其 pH 值调整到 7.0, 迅速测定蛋白含量。

薏米蛋白提取率/%=(提取液中蛋白质含量/薏米总蛋白含量)×100

1.3.4 碱法提取薏米蛋白

1.3.4.1 碱法提取单因素试验

以料液比(1:6、1:8、1:10、1:12、1:14)、温度(30、35、40、45、50℃)、时间(1~5h)、pH(8~12)为单因素, 在其他条件一定的前提下, 进行单因素试验, 以确定正交试验的因素水平。

1.3.4.2 碱法提取正交试验

根据单因素试验测定最佳提取条件, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。

1.3.5 盐法提取薏米蛋白

1.3.5.1 盐法提取单因素试验

以料液比(1:6、1:8、1:10、1:12、1:14)、温度(30、35、40、45、50℃)、时间(1~5h)、盐质量分数(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)为单因素进行单因素试验, 确定正交试验的因素水平。

1.3.5.2 盐法提取正交试验

根据单因素试验测定最佳提取条件, 进行 $L_9(3^4)$ 正交试验。

1.4 数据分析

所有单因素及正交试验设 3 次重复, 结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果与分析

2.1 薏米主要成分分析

经分析薏米中蛋白质含量 18.6%、碳水化合物 71.3%、脂肪 6.8%、总灰分含量 1.5%。

2.2 碱法提取蛋白

2.2.1 单因素试验

2.2.1.1 料液比对薏米蛋白提取率的影响

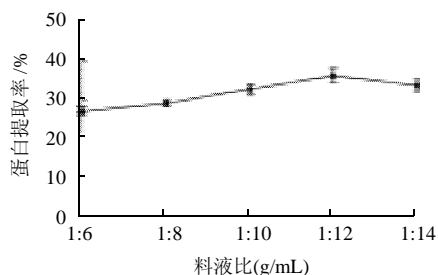


图1 料液比对薏米蛋白提取率的影响

Fig.1 Effect of material-to-liquid ratio on extraction rate of Job's Tears seed protein

由图 1 可得, 随着碱液的不断增加, 薏米蛋白提取率逐渐上升, 当料液比达到 1:12 时, 蛋白提取率最高, 当料液比继续升高时, 蛋白提取率基本稳定, 略有下降。料液比 1:6 时, 蛋白提取率最小, 这是因为加水量太小, 蛋白质不能充分溶解; 料液比 1:14 时, 蛋白提取率开始减小, 可能是因为加水量过大, 沉淀效果差, 损失增大, 同时料液比过大, 设备容积增大, 能耗加大, 成本增加。因此设定碱法提取薏米的最适合料液比为 1:12。

2.2.1.2 提取温度对薏米蛋白提取率的影响

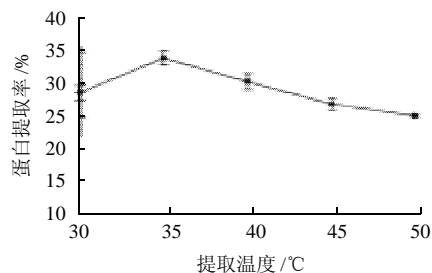


图2 提取温度对薏米蛋白提取率的影响

Fig.2 Effects of temperature on extraction rate of Job's Tears seed protein

由图 2 可得, 在温度较低的 30℃ 时, 薏米蛋白的提取率较低, 但随着温度的升高, 提取率曲线总体走势呈先上升, 后下降趋势, 在 35℃ 时蛋白提取率最高, 为 32.15%, 温度继续升高后, 薏米蛋白的提取率有所下降, 其原因可能是温度过高, 蛋白溶液的黏度变大,

分子的运动速度减慢^[17]。而且,在长时间加热的作用下蛋白质易产生变性,导致蛋白提取率下降,故选定温度为35℃。

2.2.1.3 提取时间对薏米蛋白提取率的影响

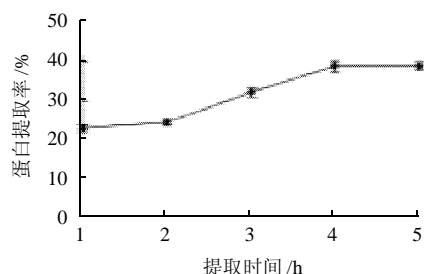


图3 提取时间对薏米蛋白提取率的影响

Fig.3 Effects of extraction time on extraction rate of Job's Tears seed protein

由图3可以看出,提取时间1~2h时,由于提取时间较短,薏米不能与碱性物质充分接触,导致薏米蛋白不易与其他组分分开;当提取时间为5h时,薏米蛋白提取率最高,但与4h相比没有较大变化,从规模化生产节约能源角度考虑故选取4h作为最佳提取时间。

2.2.1.4 pH值对薏米蛋白提取率的影响

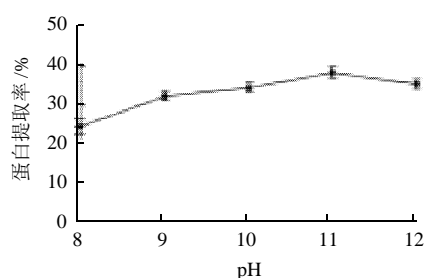


图4 pH值对薏米蛋白提取率的影响

Fig.4 Effects of pH on extraction rate of Job's Tears seed protein

由图4可以看出,在pH8时薏米蛋白的提取率较低,随着pH值不断增加,薏米蛋白的提取率也随之增加,当pH11时,薏米蛋白的提取率最高,pH12时,薏米蛋白的提取率有所下降,可能是pH值过高蛋白质变性或降解^[18]。

2.2.2 正交试验

由单因素试验结果可知,碱法提蛋白最佳提取条件为料液比1:12、提取温度35℃、提取时间4h、pH11,按表1进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,结果见表2。

表1 碱法提取薏米蛋白正交试验因素水平表

Table 1 Factors and levels in orthogonal array design for optimizing alkaline extraction of Job's Tears seed protein

水平	料液比(g/mL)	提取温度/℃	提取时间/h	pH
1	1:11	30	3	10
2	1:12	35	4	11
3	1:13	40	5	12

表2 碱法提取薏米蛋白正交试验设计及结果

Table 2 Scheme and experimental results of orthogonal array design for optimizing alkaline extraction of Job's Tears seed protein

试验号	料液比(g/mL)	提取温度/℃	提取时间/h	pH	提取率/%
1	1:11	30	3	10	26.35
2	1:11	35	4	11	36.87
3	1:11	40	5	12	28.95
4	1:12	30	4	12	30.31
5	1:12	35	5	10	41.28
6	1:12	40	3	11	38.16
7	1:13	30	5	11	34.42
8	1:13	35	3	12	39.04
9	1:13	40	4	10	31.19
k_1	30.72	30.36	34.52	32.94	
k_2	36.58	39.06	32.79	36.48	
k_3	34.88	32.77	34.88	32.77	
R	5.86	8.70	2.09	3.71	

由表2可得出,碱法提取薏米蛋白的影响因素为提取温度>料液比>pH值>提取时间。通过正交试验得出碱法提取薏米蛋白最佳提取条件为料液比1:12、提取温度35℃、提取时间5h、pH11,在此条件下重复试验,测得蛋白提取率为43.56%。

2.3 盐法提取蛋白

2.3.1 单因素试验

2.3.1.1 料液比对薏米蛋白提取率的影响

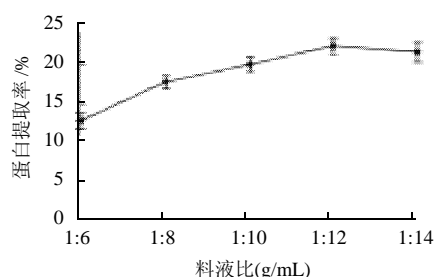


图5 料液比对薏米蛋白提取率的影响

Fig.5 Effect of material-to-liquid ratio on extraction rate of Job's Tears seed protein

由图5分析可以看出在料液比1:6~1:12之间时,薏米蛋白提取率逐渐增加,但为1:12时薏米蛋白提取率最高,当为1:14之后蛋白质的提取率略有下降,其原因可能是当料液比为1:6时,加水量太小,蛋白质未充分溶解;料液比1:14时,蛋白提取率开始减小,这是因为加水量过大,沉淀效果差,损失增大。所以盐法提取薏米蛋白的料液比定为1:12。

2.3.1.2 提取温度对薏米蛋白提取率的影响

由图6可以看出,当温度低于40℃时,薏米蛋白提取率随提取温度的升高而增大,当温度到达40℃时,提取率最大,随后降低,可能由于疏水基团的暴露和

展开, 蛋白质分子聚集, 使蛋白质溶解度下降, 导致蛋白提取率下降^[17]。因此, 对于薏米蛋白的提取温度不宜过高, 以 40℃ 为最佳提取温度。

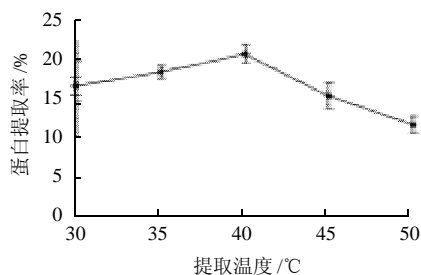


图6 提取温度对薏米蛋白提取率的影响

Fig.6 Effects of temperature on extraction rate of Job's Tears seed protein

2.3.1.3 提取时间对薏米蛋白提取率的影响

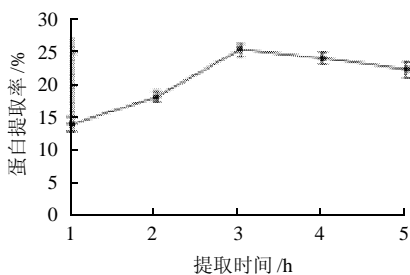


图7 提取时间对薏米蛋白提取率的影响

Fig.7 Effects of extraction time on extraction rate of Job's Tears seed protein

由图7可以得出, 提取时间1~2h时, 由于时间太短, 蛋白质不易与其他成分分离, 从而蛋白质提取率小, 但随着时间增大到3h时, 蛋白提取率最大; 随着提取时间进一步加长, 薏米蛋白的提取率并没有显著增加, 故提取时间选择为3h。

2.3.1.4 盐质量分数对薏米蛋白提取率的影响

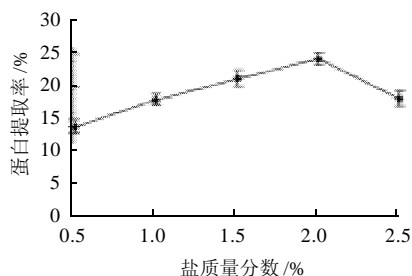


图8 盐质量分数对薏米蛋白提取率的影响

Fig.8 Effects of salt concentration on extraction rate of Job's Tears seed protein

由图8可知, 在盐质量分数1%~2%之间时, 蛋白提取率逐渐增加, 但当盐质量分数为2%时蛋白提取

率最高, 当为2.5%后蛋白质的提取率逐渐下降。原因可能是较高的盐质量分数造成蛋白盐析沉淀, 使提取率下降, 所以提取薏米蛋白的盐质量分数为2%。

2.3.2 正交试验

由单因素试验结果可知, 盐法提取蛋白的最佳提取条件为料液比1:12、温度40℃、时间3h、盐质量分数2.0%, 在此基础上按表3进行 $L_9(3^4)$ 正交试验, 结果见表4。

表3 盐法提取蛋白 $L_9(3^4)$ 正交试验表

Table 3 Factors and levels in orthogonal array design for optimizing salt extraction of Job's Tears seed protein

水平	料液比(g/mL)	提取温度/°C	提取时间/h	盐质量分数/%
1	1:11	35	2	1.5
2	1:12	40	3	2.0
3	1:13	45	4	2.5

表4 盐法提取蛋白正交试验设计及结果

Table 4 Scheme and experimental results of orthogonal array design for optimizing salt extraction of Job's Tears seed protein

试验号	料液比(g/mL)	提取温度/°C	提取时间/h	盐质量分数/%	提取率/%
1	1:11	35	2	1.5	19.28
2	1:11	40	3	2.0	25.87
3	1:11	45	4	2.5	14.31
4	1:12	35	3	2.5	22.15
5	1:12	40	4	1.5	15.11
6	1:12	45	2	2.0	17.36
7	1:13	35	4	2.0	18.65
8	1:13	40	2	2.5	16.33
9	1:13	45	3	2.0	20.01
k_1	19.82	20.03	17.66	18.13	
k_2	18.21	19.10	22.68	20.63	
k_3	18.33	17.23	16.02	17.60	
R	1.61	2.80	6.66	3.03	

由表4可得出, 盐法提取薏米蛋白的决定因素为提取时间>盐质量分数>提取温度>料液比。通过正交试验得出盐法提取薏米蛋白最佳提取条件为料液比1:11、温度35℃、时间3h、盐质量分数2%, 测得蛋白提取率为29.51%。

3 结论

3.1 碱法提取薏米蛋白最佳提取条件为料液比1:12、温度35℃、时间5h、pH11, 此提取条件下, 薏米蛋白提取率可达43.56%。

3.2 盐法提取薏米蛋白最佳提取条件为料液比1:11、温度35℃、时间3h、盐质量分数2%, 此提取条件下, 薏米蛋白的提取率可达29.51%。

3.3 比较两种薏米蛋白提取方法可知, 碱法提取薏米

蛋白提取率较高, 容易控制, 操作简单, 便于大规模工业化生产, 此法有望成为薏米深加工和综合利用的一条主要途径之一。

参考文献:

- [1] 周忠宇, 吕慧卿, 郑丽萍, 等. 浅析薏米的开发利用价值[J]. 杂粮作物, 2006, 26(1): 58-59.
- [2] ARY M B, SHEWRY P R, RICHARDSON M. The amino acid sequence of a cereal Bowman-Birk type trypsin inhibitor from seeds of Jobs' tears (*Coix lachryma-jobi* L.)[J]. FEBS Letters, 1988, 229(1): 111-118.
- [3] ARY M B, RICHARDSON M, SHEWRY P R. Purification and characterization of an insect α -amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's Tears (*Coix lachryma-jobi*) [J]. Protein Structure and Molecular Enzymology, 1989, 999(3): 260-266.
- [4] NAKAJIMA H, ISHIDA T, OTSUKA Y, et al. Phytotoxins and related metabolites produced by *Bipolaris coicis*, the pathogen of Job's tears[J]. Phytochemistry, 1997, 45(1): 41-45.
- [5] 金宏, 朱庆书, 赵文英, 等. 微波法提取薏苡仁油的研究[J]. 化学与生物工程, 2009, 26(7): 52-54.
- [6] 张启华. 薏苡仁药理作用及临床应用研究进展[J]. 实用中医药杂志, 2006, 22(8): 517-518.
- [7] 杜邵龙, 周春山. 微波辅助提取薏苡仁油的研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(2): 79-81.
- [8] YU Fei, GAO Jing, ZENG Yong, et al. Inhibition of *Coix* seed extract on fatty acid synthase, a novel target for anticancer activity[J]. J Ethnopharmacology, 2008, 119(2): 252-258.
- [9] WOO J H, LI Dapeng, WILSBACH K, et al. *Coix* seed extract, a commonly used treatment for cancer in China, inhibits NF kappa B and protein kinase C signaling[J]. Cancer Biology and Therapy, 2007, 6(12): 2005-2011.
- [10] 刘春兰, 周宜君, 巴特. 薏苡多糖的提取及其单糖组分的分析[J]. 中央民族大学学报, 2005, 14(1): 49-52.
- [11] 胡少华, 肖小年, 易醒, 等. 薏苡仁的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(5): 1059-1060.
- [12] 回瑞华, 侯冬岩, 郭华, 等. 薏米中营养成分的分析[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 375-377.
- [13] 丁丹华, 彭光华, 夏辉, 等. 油茶籽粕蛋白提取工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(8): 102-105.
- [14] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 47-52.
- [15] 吴谋成. 食品分析与感官评定[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 67-73.
- [16] 章银良. 食品检验教程[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 225-264.
- [17] 伍小华, 刘丹, 陈玉霞, 等. 栀子渣中植物蛋白提取工艺的研究[J]. 食品科学, 2008, 29(12): 336-338.
- [18] 徐忠, 薄凯, 张珍珠. 麦麸蛋白的碱法提取工艺及乳化性质研究[J]. 食品工业科技, 2006, 29(9): 66-69.