

不同方法提取米糠多糖工艺的优化研究

王莉, 陈正行, 张兵

(江南大学食品学院, 食品科学与安全教育部重点实验室, 江苏 无锡

214036)

摘要: 以脱脂挤压米糠为原料, 采用热水浸提、超声波和高压脉冲强化提取三种不同方法提取米糠多糖。结果表明: 热水浸提法、超声波法和高压脉冲法提取米糠多糖得率分别为 2.02%、2.87% 和 2.59%。与传统热水浸提法相比较, 采用超声波和高压脉冲法强化提取米糠多糖具有迅速、节能、高效、提取率高等诸多优点。

关键词: 脱脂挤压米糠; 多糖; 提取; 超声波; 高压脉冲

Study on Different Extraction Processes of Rice Bran Polysaccharide

WANG Li, CHEN Zheng-xing, ZHANG Bing

(School of Food Science and Technology, Key Laboratory of Food Science and Safety, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: Several extraction processes, such as traditional hot water extraction method, supersonic method and pulsed electric field (PEF) method, were used respectively to optimize the extraction process of defatted rice bran polysaccharide. The extraction rates of polysaccharide are 2.02%, 2.87% and 2.59% respectively. The results showed that the latter two methods are simpler,

收稿日期: 2006-04-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(20576048)

作者简介: 王莉(1981-), 女, 博士研究生, 主要从事健康食品的研究与开发。

对四种表面活性剂提取大豆蛋白质进行电泳实验。结果如图 8 所示。

从图 8 中可以看出, 碱提大豆蛋白在分子量为 35.0 kDa 附近的亚基条带没有提取出来, 而 AOT 和 SDS 反胶束体系所提取的大豆蛋白与 SPT 蛋白相比, 得到 35.0~20.0 之间的亚基较少, 这也说明了反胶束对较大分子量的蛋白质的萃取能力存在不足, 对较小分子量的蛋白质的萃取能力较强, 而这一点恰恰弥补了传统的碱溶酸沉法回收乳清液中低分子蛋白质困难的缺陷。从图 8 可以看出 CTAB 和 TritonX-100 所提取的大豆蛋白含量较少, 通过上面的水分测定, 推测原因可能是这两种反胶束体系所形成的聚集数较少。

3 结 论

3.1 通过对这四种表面活性剂的研究, 得出不同的表面活性剂浓度的高低直接影响到蛋白质的提取率, 按本实验的结果, 阴离子表面活性剂所形成的反胶束提取蛋白质较多, AOT、SDS、CTAB 和 TritonX-100 这四种反胶束体系提取大豆蛋白质的最佳浓度分别是: 0.08、0.08、0.08、0.10g/ml。

3.2 Karl-fischer 法测定水分结果表明, 不同的表面活性剂, 所形成反胶束的“水池”大小不同, 从而蛋白质提取率也不同。

3.3 SDS-PAGE 电泳实验表明, 反胶束可以用来分离不同的蛋白。

参考文献:

- [1] FENDLER J H. Membrane mimetic chemistry[M]. New York: John Wiley and Sons, 1982.
- [2] 杨宏顺, 陈复生. 新型反胶束系统增溶水的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(10): 24-27.
- [3] 杨宏顺, 陈复生, 赵翊, 等. 反胶束中枯草杆菌中性蛋白酶的活力研究[J]. 郑州工程学院学报, 2002, 23(2): 10-13.
- [4] 磨礼现, 陈复生, 杨宏顺. 反胶束溶液萃取大豆蛋白胶萃工艺的研究[J]. 食品科学, 2004, 25(3): 93-96.
- [5] LUISI P L, GIOMINI M, PILENI M P, et al. Reverse micelles as hosts for protein and small molecules[J]. Biochimica Biophysica Acta, 1988, 947, 209-246.
- [6] SMITH P K, KROHN P I, HERMANSON G T, et al. Measurement of protein using bichinchoninic acid[J]. Analytical Biochemistry, 1985, 150, 76-85.
- [7] 黄伟坤. 食品检验与分析[M]. 北京: 轻工业出版社, 1989.
- [8] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

more convenient and efficient than the former two.

Key words defatted rice bran polysaccharide extraction; supersonic; pulsed electric field

中图分类号 TS201.1

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2007)04-0112-05

稻谷是我国第一大粮食品种, 占全国粮食总产量的42%。米糠是稻谷加工的副产品, 我国年产量约900万吨, 实为一种量大面广的可再生资源。联合国工业发展组织把米糠称为一种未充分利用的原料, 米糠的进一步开发与利用, 可为食品工业提供丰富的生产原料^[1]。美国农业部的一份研究报告称, 稻谷中64%的营养素集中在米糠中。米糠多糖存在于稻谷颖果皮层里, 是目前尚未被开发和广泛应用的主要营养成分之一。我国古书上有记载“米糠, 味甘平, 无毒, 具有通肠、开胃、下气、磨积块之功能”。米糠中含有丰富的活性多糖、蛋白质、脂肪、生育酚、生育三烯酚等生理功能卓越的活性物质。米糠多糖有着显著的生物活性和保健功能, 具有抗肿瘤、降血糖、降胆固醇、抗细菌感染和增强免疫力等多种功能^[2-7]。自20世纪80年代以来, 随着糖生物学的迅猛发展, 关于米糠多糖的结构以及生理活性方面的研究受到了人们越来越多的重视, 而寻找一种简便、快速、高效且不破坏其生理活性成分的提取方法是首要解决的问题之一。近年来, 超声波、高压脉冲、微波等强化提取方法已应用于多糖的提取^[8-11]。超声波在介质传播中产生空化效应, 空化效应产生的极大压力造成被破碎物在瞬间破碎, 同时超声波产生的振动作用加强了被破碎物的扩散和溶解。在高压脉冲中, 根据极化机制理论, 当一个外部电场加到细胞两端时, 便产生了通透膜位差, 这种位差导致了细胞极化, 电场处理导致了电介质破坏, 细胞膜破裂, 这种破裂导致了细胞膜结构紊乱和通透性的提高, 高压脉冲电场可以使细胞膜瞬间破裂, 改变细胞膜的通透性, 使得细胞内容物快速溶出。本研究首次将超声波和高压脉冲运用于米糠多糖的提取, 并对其工艺条件进行优化, 提供了简便、快捷、高效的多糖提取方法, 为后续多糖纯化、结构分析和生理活性的研究奠定基础, 同时也为工业化提取米糠多糖提供简便、高效的方法。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

脱脂挤压米糠(-4℃保存) 浙江省杭州市中谷油脂有限公司。

LXJ-II 型离心机; DHG-9075A 型鼓风干燥箱; SH288-1 型台式恒温振荡器; Delta-320 型酸度计; KMO 2 basic 型磁力搅拌器; UNIC WFZ UV-2100 型光栅分光光度计; MP-501A 型超级恒温槽; VCX500 型超声波破

碎机 USA Sonics & materials Inc.; OSU-4L 高压脉冲仪 俄亥俄州立大学。

1.2 试剂与溶液

浓硫酸(分析纯 95.5%); 80% 苯酚: 80g 苯酚(分析纯重蒸馏试剂)溶于 20g 水中使之溶解; 6% 苯酚: 临用前以 80% 苯酚配制; 三氯乙酸(TCA)(分析纯); 标准葡聚糖 Dextran 瑞典 Pharmacia 公司; 耐高温 α -淀粉酶(90000U/ml)、糖化酶(2000U/ml) 无锡杰能科生物制品有限公司。

1.3 分析方法

多糖测定: 苯酚-硫酸法^[12]。

$$\text{多糖得率}(\%) = \frac{\text{提取液中多糖的含量}}{\text{米糠多糖样品干物质质量}} \times 100$$

粗多糖中的蛋白质采用 12% 三氯乙酸(TCA) 去除。

1.4 制作标准曲线

准确称取标准葡聚糖 20mg 于 500ml 容量瓶中, 加水至刻度, 分别吸取 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8ml, 各以水补至 2.0ml, 然后加入 6% 苯酚 1.0ml 以及 5.0ml 浓硫酸, 静置 10min, 摇匀, 室温放置 20min 后, 于 490nm 下测光密度。以 2.0ml 水按同样显色操作为空白, 横坐标为多糖微克数, 纵坐标为多糖光密度值, 得标准曲线。

1.5 样品含量测定

吸取样品 1.0ml (相当于 40μg 左右的多糖), 按 1.4 中的步骤操作, 测光密度, 以标准曲线计算多糖含量。

1.6 工艺流程

1.6.1 常规热水浸提工艺条件

常规热水浸提(按各种设定的条件)

脱脂挤压米糠(过 120 目筛)→水浸提→离心(3000r/min, 20min)→取上清液→加 α -淀粉酶(pH6.0, 1h)→加糖化酶(pH4.0, 1h)→离心(3000r/min, 20min)→取上清液→加 TCA(pH4.5)→离心(1200r/min, 10min)→取上清液→75% 乙醇静置过夜→离心(2000r/min, 10min)→取沉淀→稀释→苯酚-硫酸法测定多糖含量

1.6.2 超声波辅助提取米糠多糖的工艺条件

超声波辅助提取(按各种设定的条件)

脱脂挤压米糠(过 120 目筛)→水浸提→离心(3000r/min, 20min)→取上清液→加 α -淀粉酶(pH6.0, 1h)→加糖化酶(pH4.0, 1h)→离心(3000r/min, 20min)→取上清液→加 TCA(pH4.5)→离

心(1200r/min, 10min)→取上清液→75%乙醇静置过夜→离心(2000r/min, 10min)→取沉淀→稀释→苯酚-硫酸法测定多糖含量

1.6.3 高压脉冲辅助提取米糠多糖的工艺条件

高压脉冲辅助提取(按各种设定的条件)

脱脂挤压米糠(过120目筛)→水浸提→离心(3000r/min, 20min)→取上清液→加 α -淀粉酶(pH6.0, 1h)→加糖化酶(pH4.0, 1h)→离心(3000r/min, 20min)→取上清液→加TCA(pH4.5)→离心(1200r/min, 10min)→取上清液→75%乙醇静置过夜→离心(2000r/min, 10min)→取沉淀→稀释→苯酚-硫酸法测定多糖含量

2 结果与分析

2.1 水提取米糠多糖工艺条件的单因素分组实验

2.1.1 提取时间对米糠多糖得率的影响

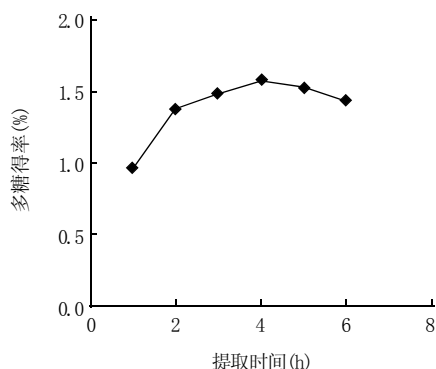


图1 提取时间对米糠多糖得率的影响
Fig.1 Effects of extraction time on extraction rate

提取时间对米糠多糖提取率有较大影响, 由图1可知在4h之内, 米糠多糖的提取率随时间的增加而明显增大, 到4h时达到最大值; 而后随着时间的增加, 提取率开始缓慢下降, 这主要是由于长时间的提取使大分子多糖的糖苷键断裂而造成了多糖的部分损失, 故用热水提取选择4h为宜。

2.1.2 提取温度对米糠多糖得率的影响

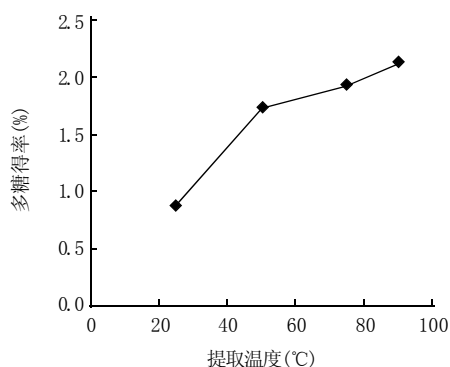


图2 提取温度对米糠多糖得率的影响
Fig.2 Effects of extraction temperature on extraction rate

从图2可以看出, 在所选四个温度下, 随着温度的升高, 多糖的提取率随之提高, 其中多糖的提取率从25℃低温条件到55℃中温条件有非常明显的提高, 到达90℃时提取率达到最大。由于大于100℃提取需要压力设备, 使得提取成本增加, 因此高温条件下选择90℃为宜。

2.1.3 料液比对米糠多糖得率的影响

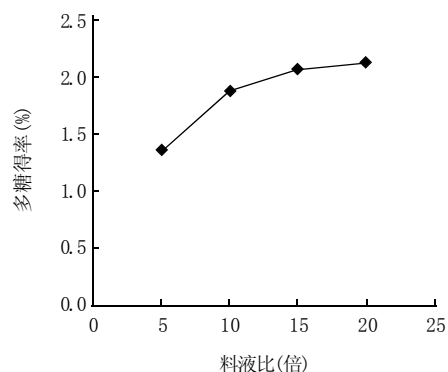


图3 料液比对米糠多糖得率的影响
Fig.3 Effects of extraction solid-liquid rate on extraction rate

从图3可以看出, 随着料液比的增加, 提取率也随之升高, 但料液比过高会给后续实验带来较多的不便, 考虑到经济等因素用热水浸提法选择料比1:10~1:15为宜。

2.2 超声波辅助提取米糠多糖工艺条件的分组实验

2.2.1 时间对米糠多糖得率的影响

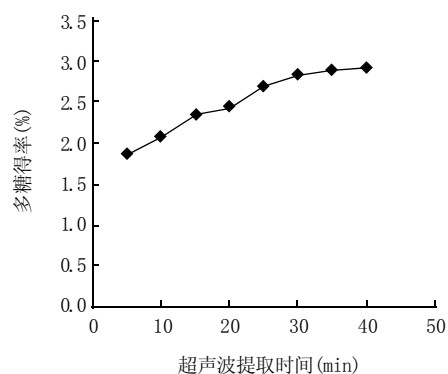


图4 超声波提取时间对米糠多糖得率的影响
Fig.4 Effects of ultrasonic extraction time on extraction rate

由图4可以看出, 提取时间在40min内, 提取时间越长, 米糠多糖的提取率就越高, 当提取时间超过25min之后, 多糖提取率增加变缓。

2.2.2 功率对米糠多糖得率的影响

从图5中可以看出, 功率在100W到300W的范围内, 随着功率的增大, 多糖的得率也不断增大, 但300W到500W的范围内, 多糖的得率变化不大。

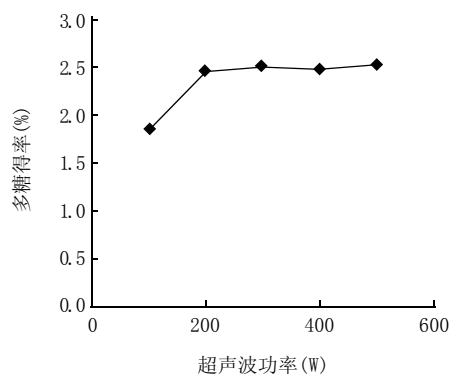


图5 超声波功率对米糠多糖得率的影响

Fig.5 Effects of ultrasonic extraction power on extraction rate

2.2.3 起始提取温度对米糠多糖得率的影响

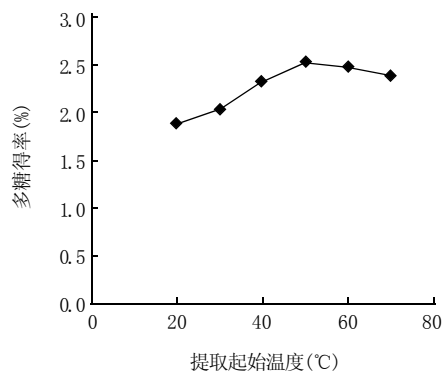


图6 提取起始温度对米糠多糖得率的影响

Fig.6 Effects of ultrasonic extraction temperature on extraction rate

从图6可以看出,从20℃到50℃范围内,随着温度的增加,多糖得率也明显增加,但超过50℃多糖得率反而下降,这主要是由于在超声波的提取过程中会释放大量的能量和热量,若起始温度过高可能会造成大分子多糖糖苷键断裂,所以多糖的得率反而会有所下降,故应用超声波强化提取米糠多糖时,选用50℃左右的中温是比较适宜的。

2.2.4 米糠多糖超声波辅助提取工艺正交优化试验

根据单因素试验的结果,选择超声波提取时间、功率以及料水比三个因素,各取3个水平,进行采用 $L_9(3^3)$ 正交试验设计。

从正交试验可以看出,运用超声波辅助提取影响米糠多糖提取因素的主次顺序为 $A > C > B$,最佳工艺为

表1 正交设计因素和水平表
Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因 素		
	A 超声波时间(min)	B 超声波功率(W)	C 料液比
1	20	300	1:10
2	30	400	1:15
3	40	500	1:20

表2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

实验号	A 超声波时间	B 超声波功率	C 料液比	多糖得率(%)
1	1	1	1	1.87
2	1	2	2	1.91
3	1	3	3	2.02
4	2	1	3	2.18
5	2	2	1	2.87
6	2	3	2	2.56
7	3	1	2	2.65
8	3	2	3	2.47
9	3	3	1	2.73
K_1	5.8	6.7	7.47	
K_2	7.61	7.25	7.12	
K_3	7.85	7.31	6.67	
R	2.05	0.61	0.8	

$A_2B_2C_1$,即超声波时间为30min,超声波功率400W,料水比为1:10,多糖得率达到2.87%。超声波法操作简单,副产品少,目标物易分离,能达到比常规提取更理想的结果,对天然产物和生物活性成分的提取尤其优势。

2.3 高压脉冲辅助提取米糠多糖工艺条件的分组实验

2.3.1 电场强度对多糖得率的影响

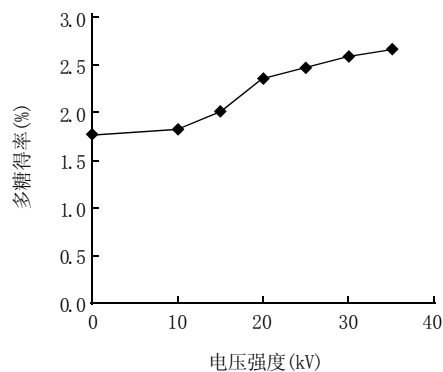


图7 电场强度对米糠多糖得率的影响

Fig.7 Effects of electric field intensity on extraction rate

从图7可以看出,随着电场强度的升高,多糖得率也随之升高,这主要是由于外加电场使得穿透膜电位差增大,当穿透膜电位差高于细胞膜的临界电位差时,细胞膜破裂就发生了,这种破裂导致了细胞膜结构紊乱和通透性的提高^[13],故多糖得率会随着电场强度的升高而增加。

2.3.2 脉冲频率对多糖得率的影响

从图8可以看出,随着脉冲频率的升高,多糖得率也随之升高,频率的升高也导致了细胞膜结构的紊乱使得细胞通透性得以提高,当频率达到600pps(pulse per second)时,多糖得率达到最大值。

2.3.3 高压脉冲辅助提取米糠多糖工艺正交优化试验

在单因素考察的基础上,用正交试验对高压脉冲电

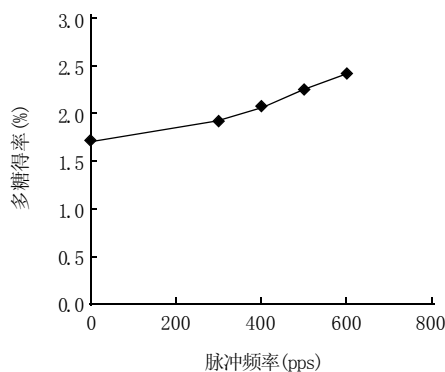


图8 脉冲频率对米糠多糖得率的影响

Fig.8 Effects of pulse frequency on polysaccharide extraction

场强度、脉冲频率以及料水比三个因素进行优化, 选用 $L_9(3^3)$ 对高压脉冲强化提取米糠多糖工艺进行研究, 正交试验设计结果见表4。

表3 正交设计因素和水平表

Table 3 Factors and levels of orthogonal test

水平	因 素		
	A 电场强度 (kV/cm)	B 脉冲频率 (pps)	C 料液比
1	20	400	1:10
2	30	500	1:15
3	40	600	1:20

表4 正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal test

实验号	A 电场强度	B 脉冲频率	C 料液比	多糖得率 (%)
1	1	1	1	1.69
2	1	2	2	1.90
3	1	3	3	2.13
4	2	1	3	2.18
5	2	2	1	2.25
6	2	3	2	2.57
7	3	1	2	2.48
8	3	2	3	2.53
9	3	3	1	2.59
K_1	5.72	6.35	6.53	
K_2	7	6.68	6.95	
K_3	7.6	6.84	6.84	
R	1.88	0.49	0.42	

从正交试验可以看出, 运用高压脉冲辅助提取影响米糠多糖提取因素的主次顺序为 $A > B > C$, 最佳工艺为 $A_3B_3C_1$, 即电场强度为 40 kV/cm , 脉冲强度为 600 pps , 料水比为 $1:10$, 多糖得率达到 2.59% 但是由于脉冲频率过高, 有时机会出现打火现象, 对机器损耗较大, 且多糖得率也较高, 故选择 $A_3B_2C_1$ 为最佳工艺条件。

3 结 论

表5 三种提取方法结果比较

Table 5 Compare of three extraction methods

提取方法	时间 (min)	温度 (°C)	料液比	多糖得率 (%)
热水浸提	240	90	1:15	2.02
超声波	30	50	1:10	2.87
高压脉冲	—	50	1:10	2.59

从表5可以看出, 与传统热水浸提的方法相比较, 采用超声波和高压脉冲辅助强化提取米糠多糖的方法均明显地缩短了提取时间, 降低了提取温度, 避免了高温对活性成分的破坏, 提高了提取效率。所以, 以上两种方法都具有迅速、节能、高效的特点, 是强化辅助提取多糖的好方法。其中超声波法效果最显著, 米糠多糖得率高达 2.87% 。利用超声波法和高压脉冲辅助强化提取米糠多糖, 既节省时间, 又降低能量消耗, 在实际生产中也是可行的, 是很有应用前景的多糖提取新方法。

参考文献:

- [1] 陈正行. 21世纪稻米精深利用的发展趋势[J]. 无锡轻工大学报, 2004, 23(4): 104-110.
- [2] 汪艳, 吴曙光, 徐继红. 米糠多糖与环磷酸腺苷联合抗肿瘤作用的免疫药理学机制研究[J]. 解放军报, 2001, 11(6): 291-294.
- [3] TANIGAMI Y. Partial degradation and biological activities of an anti-tumor polysaccharide from rice bran[J]. Chem Pharm Bull, 1991, 39(7): 1782-1787.
- [4] GREMLI H, JULIANO B O. Studies on alkali-soluble, rice bran hemicelluloses[J]. Carbohydrate Research, 1970(12): 273-276.
- [5] TAKEDA Y, YOSHIKAI Y, OHNO S, et al. Augmentation of host defense against bacterial infection pretreated intraperitoneally with an alpha-glucan RBS in mice[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1990, 12(3): 457-477.
- [6] YAMAGISHI T, TSUBOI T, KIKUCHI K, et al. Potent natural immunomodulator, rice water-soluble polysaccharide fractions with anti-complementary activity[J]. Cereal Chemistry, 2003, 80(1): 5-8.
- [7] SUGURU T. Studies on an antitumor polysaccharide RBS derived from rice bran. Preparation and general properties of RON, an active fraction of RBS[J]. Chem Pharm Bull, 1998, 36: 3609-3613.
- [8] LUQUE-GARCIA A J L, LUQUE DE CASTRO M D. Ultrasound: a powerful tool for leaching[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22(1): 41-47.
- [9] 韩玉珠, 殷涌光, 李风伟, 等. 高压脉冲电场提取中国林蛙多糖的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(9): 337-339.
- [10] 聂少平, 谢明勇, 罗珍. 微波技术提取茶多糖的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(11): 103-106.
- [11] 向东, 赖凤英, 梁平. 植物性多糖的强化提取[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(5): 81-84.
- [12] 张维杰. 糖复合物生化研究技术[M]. 2版. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 11-12.
- [13] 卢敏, 殷涌光, 刘喻. 高压电脉冲提取小麦谷朊肽影响因素研究[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 205-207.