

正交设计优化米糠抗氧化肽的制备工艺

刘梁¹, 孙维矿¹, 赵玲¹, 李赫宇², 陈新^{1*}

(1. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院, 湖北 武汉 430023;

2. 天津市益倍建生物技术有限公司, 天津 300457)

摘要: 为获得制备高抗氧化活性米糠肽的生产工艺, 分别研究了提取温度、提取时间、乙醇体积分数、液料比四个提取工艺单因素参数对所得米糠肽抗氧化活性的影响, 并以超氧阴离子自由基清除率为指标, 通过对四个单因素设计正交试验优化出最佳提取条件为: 提取温度为 50 ℃, 提取时间为 3 h, 乙醇体积分数为 70 %, 液料比为 20 (mL : mg), 此工艺所得米糠肽的超氧阴离子自由基清除率为 71.56 %。

关键词: 正交优化; 米糠; 抗氧化肽; 超氧阴离子自由基

Study on the Extraction of Antioxidant Peptide from Rice Bran by Orthogonal Experiments

LIU Liang¹, SUN Wei-kuang¹, ZHAO Ling¹, LI He-yu², CHEN Xin^{1*}

(1. School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, Hubei, China; 2. Tianjin Ubasichealth Nutrition Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: In order to obtain the proper process for preparing high antioxidant rice bran peptide, the influence of extraction temperature, extraction time, ethanol concentration, the ratio of liquid and material on the antioxidant activity of rice bran peptide were studied by orthogonal experiments. The results determined the best extraction approach, and the parameters were extraction temperature 50 ℃, extraction time 3 h, ethanol concentration 70 %, liquid material ratio 20 (mL : mg). Superoxide radical scavenging rate of rice bran peptide was 71.56 % at the above condition.

Key words: orthogonal design; rice bran; antioxidant peptide; superoxide radical

目前用于食品抗氧化剂的大多为一些人工合成化合物, 如 BHA(叔丁基羟基茴香醚)、BHT(2,6-二叔丁基对甲酚)、TBHQ(叔丁基对苯二酚)、PG(没食子酸丙酯)^[1-2]。但随着科学家对它们的进一步深入研究, 发现其具有毒性、致癌性等副作用^[3-4]。近些年, 功能活性肽因其健康安全等特点已成为食品领域研究热点, 而从植物蛋白中提取活性肽更受人们青睐, 其中抗氧化肽是最为热门的课题之一^[5]。目前米糠中抗氧化功能成分的研究主要集中在对单一功能成分的研究, 而有研究显示, 米糠中总蛋白提取物的抗氧化活性较单一肽更加显著^[6-7]。因此, 研究利用酶法提取米糠肽, 以超

氧阴离子自由基清除率为指标, 以得到抗氧化活性最佳的米糠肽为目的, 通过正交优化米糠中提取抗氧化肽的工艺, 为进一步开发高活性米糠抗氧化肽提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

米糠蛋白(水分 9.6%, 蛋白质 70.96%, 脂肪 2.22%, 灰分 2.53%): 湖北洪森集团提供, 碱性蛋白酶(酶活 6 000 U/mg)、酸性蛋白酶(酶活 6 000 U/mg)、中性蛋白酶(酶活 6 000 U/mg): 合肥博美生物科技有限责任公司; 复合蛋白酶(Protamex)、风味酶(Flavourzyme): Novo Nordisk 公司(北京分公司); 三羟甲基氨基甲烷、邻苯三酚、氢氧化钠: 国药集团化学试剂有限公司; 氯化钠、盐酸、三氯乙酸和三氯化铁均为分析纯: 天津市大茂化学试剂。

作者简介: 刘梁(1981—), 男(汉), 讲师, 博士, 研究方向: 食品功能因子研究。

* 通信作者: 陈新(1978—), 男(汉), 副教授, 博士, 研究方向: 食品活性物质研究与开发。

1.2 仪器和设备

PHS-2C 型精密酸度计:上海雷磁仪器厂;RE52-99 型旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂;LXJ-II 型离心沉淀机:上海医用分析仪器厂;SHB-III 型循环水式多用真空泵:郑州长城科工贸公司;电热恒温水浴锅:巩义市英峪予华仪器厂;752N 型紫外可见分光光度计:上海光谱仪器有限公司;Waters 600 液相色谱,Waters 公司;AL204-01 电子天平:梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 制备米糠提取液工艺流程

米糠提取液提取工艺:称取 2.5 kg 米糠,按一定的体积分数的乙醇,在 30 ℃提取 10 h,得到醇提物浓缩液在 6 000 r/min 离心 20 min,得到上清液,上清液用 0.1 mol/L HCl 调节 pH 进行等电点测定,利用紫外监测蛋白浓度,确定 pH 至 4.5,静置沉淀,6 000 r/min 离心 20 min,沉淀经真空冷冻干燥后得到米糠蛋白→得到的米糠蛋白→搅拌调适当的 pH (依据各酶而定)→加酶→反应一定时间(期间加 HCl、NaOH 维持 pH 在 ±0.05 范围内)→离心(6 000 r/min、20 min)→灭酶(T=95 ℃,10 min)→离心(3 000 r/min、20 min)→取上清液定容。

1.3.2 超氧阴离子自由基清除能力测定方法

Tris-HCl 缓冲液 2.8 mL,pH 为 8.2,浓度为 50 mmol/L 中加入 0.1 mL 蒸馏水,于 25 ℃保温 10 min,然后加入 25 ℃预温的 60 mmol/L 的连苯三酚 0.1 mL (空白管样品用 0.1 mL,10 mmol/L 的盐酸代替,测样品用 0.1 mL,50 mmol/L 提取液代替),体积为 3.0 mL,在 420 nm 处,测得总吸光度为 A_1 ,样品吸光度 A_2 ,空白对照吸光度 A_3 。

$$O_2^- \text{清除率}/\% = (A_1 - (A_2 - A_3)) / A_1 \times 100 \%$$

1.3.3 米糠提取液提取单因素试验

选取提取温度、提取时间、乙醇体积分数、液料比四个因素进行测定。

1.3.4 米糠提取液提取正交试验

分析上述单因素试验数据,根据单因素试验得出的各因素最适范围,对提取温度、提取时间、乙醇体积分数、液料比四个因素设计正交试验,以超氧自由基清除率为指标确定最佳提取条件。

2 结果与讨论

2.1 米糠提取液提取单因素试验

提取温度对米糠提取物抗氧化活性影响:本试验提取温度分别选择为 35、40、45、50、55、60 ℃,在提取时间 120 min,在盐酸浓度为 2 mol/L,液料比为 1 mL:mg,计算米糠提取物超氧自由基清除率。米糠蛋白在不同

温度、提取时间下提取后的超氧自由基清除能力变化如图 1 所示。

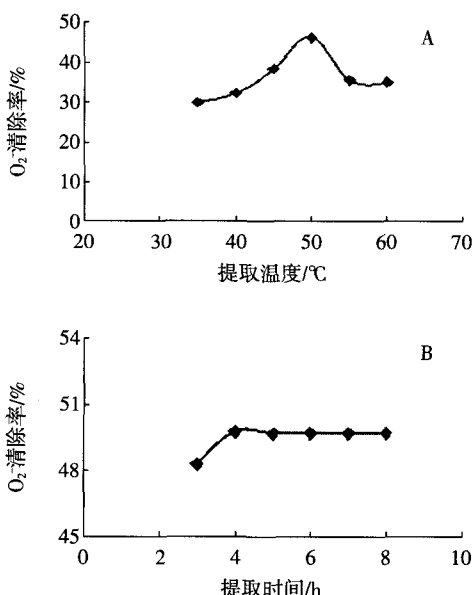


图 1 提取温度(A)、时间(B)对米糠提取物抗氧化活性影响
Fig.1 The influence of temperature (A) and time (B) on the antioxidant activity of the extracts from rice bran

由图 1(A)可以看出,随着提取温度的升高,米糠活性肽抗氧化效果逐渐增强,当温度升至 50 ℃时,米糠多肽有效活性成分对超氧自由基的清除效果都达到最强。一定温度变化范围内,温度上升加快了反应速度,使超氧自由基的清除效果增强,在 50 ℃达到最大,增大温度,超氧自由基的清除效果明显降低。故选择最佳提取温度为 50 ℃。

提取时间对米糠提取物抗氧化活性影响:本试验提取时间分别选择为 3、4、5、6、7、8 h,盐酸浓度为 2 mol/L,液料比为 1 mL:mg,提取温度为 50 ℃,计算米糠提取物超氧自由基清除率。不同提取时间下的超氧自由基清除能力变化如图 1(B)所示。

由图 1(B)可以看出,随着提取时间的增加,米糠提取物超氧自由基清除率微慢上升后趋于平缓。由此得出:提取时间对米糠提取物超氧自由基清除率效果的影响很小。为了节约成本,选择提取时间 4 h 最佳。

乙醇体积分数对米糠提取物抗氧化活性影响:本试验乙醇体积分数分别选择为 50%、60%、70%、80%、90%、100%,提取时间 120 min,盐酸浓度为 2 mol/L,液料比为 1 mL:mg,提取温度为 50 ℃,计算米糠提取物超氧自由基清除率。在不同乙醇体积分数、液料比下的超氧自由基清除能力变化如图 2 所示。

由图 2(A)可以看出,随着乙醇体积分数的增加,米糠提取物超氧自由基清除率微慢上升后达到 80%

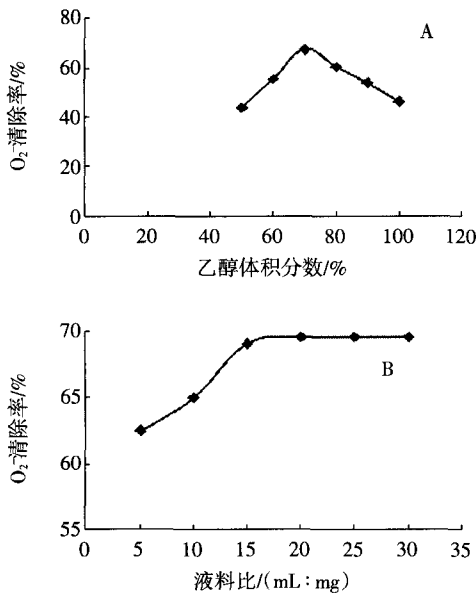


图2 乙醇体积分数(A)、液料比(B)对米糠提取物抗氧化活性影响
Fig.2 The influence of alcohol percent (A) and solid-liquid ratio (B) on the antioxidant activity of the extracts from rice bran

后降低。由此得出,选择乙醇体积分数为70%最佳。

液料比对米糠提取物抗氧化活性影响:分别选择为5、10、15、20、25、30 mL:mg,乙醇体积分数为70%,在盐酸浓度为2 mol/L,提取温度为50℃,提取4 h,米糠提取物超氧自由基清除率随液料比的变化见图2。

由图2(B)可以看出,随着液料比的增加,米糠提取物超氧自由基清除率缓慢上升后趋于平缓。由此得出:液料比对米糠提取物超氧自由基清除率效果的影响很小。为了节约成本,选择液料比10:1(mL:mg)最佳。

2.2 正交试验

在单因素试验基础上,采用正交试验设计方案。选定影响米糠提取物超氧自由基清除率效果显著的四个因素:A-提取温度(℃),B-提取时间(h),C-乙醇体积分数(%),D-液料比(mL:mg)为参考因素,以米糠提取物超氧自由基清除率为指标,优化米糠提取物超氧自由基清除的最佳工艺路线,确定最佳提取工艺条件,实验结果见表1。

表1 正交因素与水平

Table 1 The factors and levels of orthogonal

因素	A/℃	B/h	C/%	D/(mL:mg)
1	45	3	60	10
2	50	4	70	15
3	55	5	80	20

正交试验直观的分析结果,由此可以判断出各因素对考察指标的影响大小。极差越大,该因素水平的

表2 正交试验结果极差分析表

Table 2 The range analysis of orthogonal test results

试验号	A	B	C	D	O ₂ 清除率/%
1	1	1	1	1	47.11
2	1	2	2	2	70.24
3	1	3	3	3	47.31
4	2	1	2	3	71.56
5	2	2	3	1	60.63
6	2	3	1	2	62.21
7	3	1	3	2	56.92
8	3	2	1	3	44.95
9	3	3	2	1	66.45
K ₁	54.887	58.530	51.423	58.063	
K ₂	64.800	58.607	69.417	63.123	
K ₃	56.107	58.657	54.953	54.607	
R	9.913	0.127	17.994	8.516	

变化对指标的影响也越大,由正交试验结果中极差分析得到:各因素对提取效果主次顺序为C>A>D>B。从正交试验结果可以看出,四因素的最佳值应为:A₂B₁C₂D₃。即在以上最佳条件下做了三次验证实验,米糠提取物超氧自由基清除率分别为71.56%、71.10%、70.68%,3次提取液中的米糠提取物超氧自由基清除率均无显著性差异,说明此条件为理想的米糠提取物超氧自由基清除条件。

乙醇体积分数和提取温度两因素对米糠提取物超氧自由基清除率有显著性影响,提取时间和液料比对提取的影响次之,其影响顺序为:乙醇体积分数>提取温度>提取液料比>提取时间。

根据得到的实验指标平均值K₁、K₂、K₃绘制米糠提取物超氧自由基清除,平均值与因素水平的关系图,结果如图3所示。

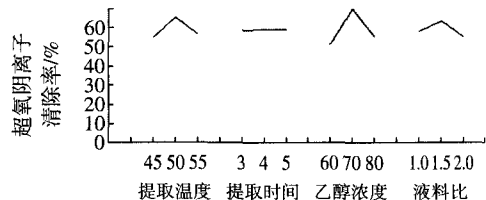


图3 米糠提取物超氧自由基清除率的曲线效应图

Fig.3 The effect of rice bran extract on the scavenging rate to superoxide radical

由米糠提取物超氧自由基清除率的曲线效应图可知,在一定范围内随着乙醇体积分数的提高米糠提取物超氧自由基清除率随之增高,说明一定浓度范围内乙醇体积分数提高对米糠提取物超氧自由基清除率有利;提取时间对米糠提取物超氧自由基清除率的影响最小。分析图正交试验曲线效应可知米糠提取物

超氧自由基清除率的最优条件是最佳提取 (mL:mg) 条件为:A-提取温度为 50 (°C), B-提取时间为 3(h), C 乙醇体积分数为 70(%), D-液料比为 20(mL:mg)

表 3 正交试验方差分析表

Table 3 The variance analysis of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
A	175.337	2	7 305.708	19.000	*
B	0.024	2	1.000	19.000	
C	545.409	2	22 725.375	19.000	*
D	110.086	2	4 586.917	19.000	*
误差	0.02	2			

表 3 方差分析结果表明,乙醇体积分数对米糠提取物超氧自由基清除率效果有显著性影响。其次,提取温度是影响提取重要的因素;提取工艺条件可看出,提取条件温和,米糠提取物超氧自由基清除率高,适于工业上米糠提取物生产。

3 结论

本试验优化米糠提取液提取工艺,根据单因素试验得出的各因素最适范围,对提取温度、提取时间、乙醇体积分数、液料比四个因素设计正交试验,以超氧

自由基清除率为指标确定最佳提取条件。分析正交试验结果,米糠提取物超氧自由基清除率的最优条件是最佳提取条件为:A-提取温度为 50 °C, B-提取时间为 3 h, C 乙醇体积分数为 70 %, D-液料比为 20(mL:mg), 此时,米糠提取物超氧自由基清除率分别为 71.56 %。

参考文献:

- [1] 周小理,李红敏. 植物抗氧化肽(活性)肽的研究进展[J]. 食品工业,2006(3): 11-13
- [2] 李文林,黄凤洪. 天然抗氧化剂研究现状[J]. 粮食与油脂,2003(10): 10-13
- [3] 杨科峰,厉曙光. 食品抗氧化剂 BHT 的安全研究[J]. 同济大学学报:医学版,2001, 22(5): 86-92
- [4] 彭辉,李惠宜,黄胜桥,等. 石墨炉法测定食品抗氧化剂 TBHQ 中铅含量[J]. 中国油脂,2006,31(3): 33-34
- [5] 张昊,任发政. 天然抗氧化肽的研究进展[J]. 食品科学,2008, 29(4): 443-447
- [6] 张强,周正义,马玉涵,等. 米糠肽抗氧化活性的研究[J]. 中国粮油学报,2008,23(5): 9-12
- [7] 樊金娟,罗霞,董智. 米糠抗氧化肽的提取和纯化工艺研究[J]. 食品科技,2008, 33(12): 169-173

收稿日期:2014-12-03

(上接第 97 页)

3)糖渣蛋白提取工艺的报道主要集中在碱法,酶法、碱酶或双酶分步法。碱法提取的是 80 %的碱溶性谷蛋白,酶法提取的是水溶性蛋白、醇溶蛋白及难溶性蛋白,且抗氧化活性可以得到很好的保持,采用酶法提取反应条件温和,反应的固液比小,提取率不高,纯度也较低,但酶法提高了蛋白质的溶解性,蛋白经部分酶解提高了营养价值,有利于消化、吸收,而且糖渣蛋白特定肽链的降解还可能产生具有多种活性的生物活性肽,具有更高的开发价值^[1]。

4)正交优化碱性蛋白酶的催化条件,可以有效提升玉米淀粉糖渣中谷氨酸、亮氨酸等的含量,对玉米淀粉糖渣的开发和企业废渣的有效利用提供了理论依据,但提取率还有些低,有文献报道采用中性蛋白酶和碱性蛋白酶双酶法水解大米糖渣,可以提高蛋白质的提取率,并使蛋白质中多种呈味氨基酸和功能性小肽的含量增加^[2],该方法也是玉米淀粉糖渣今后可以进一步研究的方向。

参考文献:

- [1] 高东宁,曹磊,许赣荣.以玉米淀粉糖渣为原料制备米曲发酵酱油[J].生物加工过程,2011,5(3)61-65

- [2] 陈中爱,曾海英,董宏伟.酶法提取糖渣蛋白的工艺研究[J].食品科技,2011,6(38):236-241
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009.5-2010 食品中粗蛋白含量的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2010
- [4] 中华人民共和国卫生部. GB/T14772-2008 食品中粗脂肪含量的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2008
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009.3-2010 食品中水分的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2010
- [6] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009.4-2010 食品中灰分的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2010
- [7] 中华人民共和国卫生部. GB/T5009.5-2010 食品中氨基酸的测定[S]. 北京:中国标准出版社, 2003
- [8] 高东宁.玉米淀粉糖渣为原料培养米曲和红曲及酱油酿造[D].无锡:江南大学,2010
- [9] 奚海燕,张晖.大米蛋白的提取及改性研究[D].无锡:江南大学, 2008
- [10] 奚海燕,张晖,姚惠源.碱酶分步法从米粉中提取大米蛋白工艺的研究[J].粮油食品科技,2007,15(6):12-14
- [11] 吴欣欣,玉米蛋白酶解物抗氧化活性研究[D].郑州:河南工业大学,2013
- [12] 李绮丽,吴卫国,张喻,等.双酶法水解米渣蛋白工艺研究[J].粮食与油脂,2011(1):19-22

收稿日期:2014-07-07