

玉米麸皮水溶性多糖除蛋白条件研究

杨国力, 王文侠*, 张慧君, 孙晓慧

(齐齐哈尔大学食品学院, 齐齐哈尔大学农产品加工黑龙江省
普通高校重点实验室, 黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要: 采用 TCA 法、Sevag 法、酶法、酶法-TCA 法结合和酶法-Sevag 法结合对玉米麸皮水溶性多糖进行除蛋白研究, 以蛋白质脱除率和多糖损失率为指标。结果表明: 酶法-TCA 法结合除蛋白最佳条件为: 酶解温度 55℃, 酶解时间 1.5h, pH7.5, 加酶量 2% (以底物计), TCA 终浓度为 1%, 其蛋白质脱除率为 95.24%, 多糖损失率为 20.02%, 优于其他四种方法。此方法可用于玉米麸皮水溶性多糖中蛋白质的去除。

关键词: 玉米麸皮, 水溶性多糖, 蛋白质

Removal of protein from water solvable polysaccharide of corn bran

YANG Guo-li, WANG Wen-xia*, ZHANG Hui-jun, SUN Xiao-hui

(College of Food Science and Engineering, Qiqihar University, Key Laboratory
of Processing Agricultural Products of Heilongjiang Province, Qiqihar 161006, China)

Abstract: Trichloroacetic acid (TCA), Sevag, enzymatic hydrolysis, the combination of enzyme and Sevag, and the combination of enzyme and TCA were used to remove protein from water solvable polysaccharide of corn bran. These methods based on deproteinization rate and recovery rate of the polysaccharide. The results showed that the optimal conditions of the combination of enzyme and TCA were 55℃, pH7.5 and 1.5h, enzyme concentration of 2.0% (base substrate), TCA final concentration of 1%. Under the optimal conditions, the deproteinization rate and the recovery rate of polysaccharide was 95.24% and 20.02%, respectively. The combining enzyme and TCA could largely improve the removal of protein.

Key words: corn bran; water solvable polysaccharide; protein

中图分类号: TS241

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2012)21-0239-04

玉米麸皮是玉米淀粉湿法加工的副产物, 其含有丰富的粗纤维、淀粉、蛋白质、粗脂肪和少量的灰分及酚类化合物^[1]。长期以来, 玉米麸皮除生产玉米油和用作动物饲料以外, 很少体现出商业价值。玉米麸皮水溶性多糖作为非淀粉多糖, 具有明显的减肥、降血糖和抗便秘等重要的生理功能^[2-4], 在功能食品和临床医学等方面都有重要的应用价值。但是在提取过程中多糖产品常含有一定的蛋白质, 对其分离纯化、结构表征和生理活性的研究都有一定影响, 因此, 如何有效地去除玉米麸皮水溶性多糖中的蛋白质, 并且提高其生理活性和经济价值是整个课题研究中的重要步骤。目前, 除蛋白的方法主要有经典的 Sevag 法、TCA 法、三氯乙酸-正丁醇法、三氯三氟乙烷与 Sevag 联用法、大孔吸附树脂法、等电点沉淀法、酶解法及综合法等。其中, Sevag 法^[5]是利用有机溶剂使蛋白质变性成不溶状态而分离出去, 但其试剂消耗量大, 操作复杂, 费时, 因此, 在工业应

用上受到限制; TCA 法^[6]则是使蛋白质带正电荷并与负离子结合呈不溶性的盐类而分离出去, 但其反应剧烈, 浓度过高时, 可能会引起多糖结构的破坏; 酶法是在蛋白酶的作用下使蛋白质分解成为小肽, 醇沉时小肽不能随多糖一起沉降。本研究采用 TCA 法、Sevag 法、酶法、酶法-TCA 法结合和酶法-Sevag 法结合对玉米麸皮水溶性多糖进行除蛋白, 对比这几种方法对粗多糖液的蛋白脱除率和多糖损失率的效果, 以此筛选出最佳的除蛋白工艺, 对接下来的分离纯化、结构表征和生理活性研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

玉米麸皮 黑龙江省镜泊湖农业开发股份有限公司; 耐高温 α-淀粉酶 (120KUN/g)、碱性蛋白酶 (2.4AU/g)、中性蛋白酶 (0.8AU/g) 诺维信公司; 无水乙醇、氯仿、正丁醇、酒石酸钾钠 天津市凯通试剂有限公司; 无水碳酸钠 西安化学试剂厂; 硫酸铜 天津市巨能化学有限公司; 氢氧化钠、三氯乙酸、葡萄糖 均购自天津市科密欧试剂开发中心; 浓硫酸 沈阳市华东试剂厂。

LG10-2.4A 高速离心机 北京医用离心机厂; 722S 可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公

收稿日期: 2012-06-27 * 通讯联系人

作者简介: 杨国力 (1987-), 硕士, 研究方向: 农产品深加工。

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (B201115); 齐齐哈尔大学研究生创新科研项目 (YJSCX2001-042X)。

司;101-2-BS 电热恒温鼓风干燥箱、SHZ-C 水浴恒温振荡器 上海跃进医疗器械厂;DZKW-S-4 电热恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器厂;BS124S 分析天平 北京赛多利斯仪器系统有限公司;ACS-30 型电子计价器 永康市风华衡器有限公司;CEIP503 中空纤维膜组件 天津膜天膜工程技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 玉米麸皮水溶性多糖的提取^[7] 玉米麸皮经过 CO₂ 超临界脱脂后,过 40 目筛,称取 150g 脱脂玉米麸皮,按照料液比 1:40 添加蒸馏水,混合均匀后,置于沸水浴中糊化 30min,调 pH 为 6,加入 5% 耐高温 α-淀粉酶(以底物计),在 95℃ 恒温搅拌 2h,冷却至常温,调 pH8,加入 5% 碱性蛋白酶(以底物计),55℃ 恒温搅拌 2h。过滤,所得滤液经过 10000u 的中空纤维膜超滤,所得截留液即为玉米麸皮水溶性粗多糖溶液。

1.2.2 多糖含量测定 采用苯酚-浓硫酸比色法^[8] 测定样品中的多糖含量。标准曲线方程为: $y = 0.0118x + 0.0178$, 相关系数 $R^2 = 0.9944$ 。

1.2.3 多糖损失率计算

$$\text{多糖损失率}(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

式中: A_0 为初始样品中多糖含量; A_1 为经过除蛋白处理后样品中多糖的含量。

1.2.4 蛋白质含量测定 采用 Folin-酚法^[8] 测定样品中的蛋白质含量。标准曲线方程为: $y = 0.0019x + 0.007$, 相关系数 $R^2 = 0.998$ 。

1.2.5 蛋白脱除率计算

$$\text{蛋白脱除率}(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100$$

式中: C_0 为初始样品中蛋白质的含量; C_1 为经过除蛋白处理后样品中蛋白质的含量。

1.3 除蛋白方法

1.3.1 TCA 法^[5] 除蛋白 各取玉米麸皮水溶性粗多糖浓缩液 5mL,以 1:1 的体积加入三氯乙酸溶液,使其最终浓度分别为 0.25%、0.5%、1%、2%、3%、4%、6%,混合均匀后,静置 30min,5000r/min 离心 10min 去除沉淀,测定上清液中多糖和蛋白质的含量,并计算多糖损失率和蛋白脱除率。

1.3.2 Sevag 法^[6] 除蛋白 取玉米麸皮水溶性粗多糖浓缩液 30mL,加入 0.5 倍体积的 Sevag 试剂 ($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{正丁醇}} = 4:1$),用摇床剧烈振摇 20min,5000r/min 离心 10min 去除中间变性蛋白质和下层的有机试剂,留取 5mL 上清液,剩余上清液重复 2 次上述步骤,分别测定四次上清液中多糖和蛋白质的含量,并计算多糖损失率和蛋白脱除率。

1.3.3 酶法^[9] 除蛋白 在预实验的基础上,选择加酶量,酶解温度,酶解时间和 pH 四因素,各自选取三个水平,以蛋白质含量为检测指标,做 $L_9(3^4)$ 正交实验。因素水平表如表 1 所示。

1.3.4 酶法-TCA 法^[10] 结合除蛋白 按照 1.3.3 优化出酶解除蛋白的最佳条件对粗多糖液进行处理,之后再按照 1.3.1 确定的最佳 TCA 法条件对酶解液处

理,分别计算多糖损失率和蛋白脱除率。

表 1 酶解除蛋白实验因素水平表

Table 1 Factor level of protein removal with the enzyme

水平	因素			
	A 温度 (°C)	B 时间 (h)	C pH	D 加酶量 (%)
1	50	1.0	7.5	2.0
2	55	1.5	8.0	3.0
3	60	2.0	8.5	4.0

1.3.5 酶法-Sevag 法^[11] 结合除蛋白 按照 1.3.3 优化出酶解除蛋白的最佳条件对粗多糖液进行处理,之后再按照 1.3.2 确定的最佳 Sevag 法条件对酶解液处理,分别计算多糖损失率和蛋白脱除率。

2 结果与分析

2.1 TCA 法除蛋白

三氯乙酸作为有机酸溶剂,可以使样品中的蛋白质带上正电荷与负离子结合形成不溶性盐类,使蛋白质变性沉淀出来,由于其反应剧烈,当浓度过高时可能会引起多糖结构的破坏,因此综合考虑要使其最终浓度低于 7% 左右^[12]。由图 1 可以看出,在 TCA 终浓度为 0.25%~2% 的范围内,随着 TCA 终浓度的增大,蛋白质脱除率呈先增大后降低的趋势,但是趋势较缓,多糖损失率是先降低后增大,变化趋势较剧烈;在 TCA 终浓度为 2%~6% 的范围内,随着 TCA 终浓度的增大,蛋白质脱除率先增大后趋于平缓,多糖损失率急剧下降直至平缓,单因素方差分析结果表明,TCA 终浓度对蛋白脱除率和多糖损失率都高度显著影响 ($p < 0.05$),并通过比较各水平下的实验数据平均值,可确定蛋白脱除率最高和多糖损失率最低时,TCA 终浓度分别为 3% 和 1%。综合考察,确定 TCA 终浓度为 1%,此时,多糖损失率最低,蛋白脱除率为 62.85%。

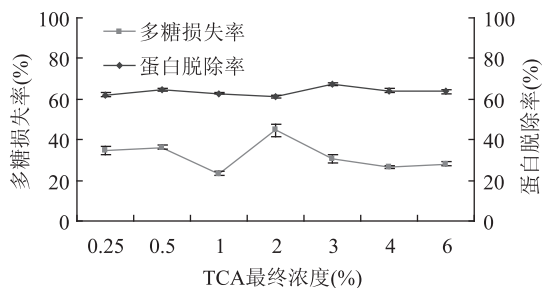


图 1 TCA 法脱蛋白的效果

Fig.1 The effect of protein removal with the TCA

2.2 Sevag 法除蛋白

Sevag 法是经典的除蛋白方法,利用有机溶剂使蛋白质变性成不溶状态而分离出来^[13]。由图 2 可以看出,随着 Sevag 试剂处理的次数增加,蛋白质脱除率不断增加,多糖损失率也是随着处理次数增加而增大,其增大的趋势大于蛋白质脱除率的趋势。在处理第 3 次时,离心后发现试管中已没有中间变性蛋白层,但是多糖损失率却增大了很多。方差分析结果表明,Sevag 试剂处理次数对蛋白脱除率和多糖损失率都高度显著影响 ($p < 0.05$),并通过比较各水平下的实验数据平均值,可确定蛋白脱除率最高和

表3 方差分析
Table 3 Variance analysis

方差来源	偏差平方和	自由度	方差	F 值	F _a	显著性
A	1846.93	2	923.46	260.29	F _{0.01} (2, 18) = 6.01	**
B	372.93	2	186.46	52.56	F _{0.05} (2, 18) = 3.55	**
C	1937.83	2	968.92	273.11		**
D	1509.29	2	754.64	212.71		**
误差	63.86	18	3.55			
总和	5730.84	26				

注: ** 代表 $p < 0.05$, 极显著。

多糖损失率最低时, Sevag 试剂处理次数分别为 3 次和 1 次。考虑到多糖除蛋白的前提是在较少损失多糖的情况下尽可能多的除去蛋白质, 三次处理, 蛋白质脱除率增加已不太明显, 因此, 选择 Sevag 试剂作用一次, 其蛋白脱除率达 57.60%, 多糖损失率为 3.28%。

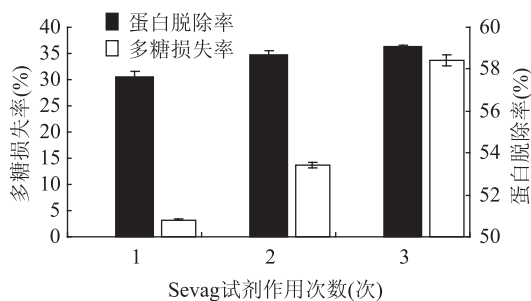


图2 Sevag 法脱蛋白的效果

Fig.2 The effect of protein removal with Sevag method

2.3 酶法除蛋白

酶法除蛋白是利用蛋白酶降解多糖中的蛋白质使其分解成小肽, 处于较好的水溶性状态, 通过醇沉从而与多糖分离开来。按照表 1 进行正交实验, 结果如表 2 所示。

表2 酶解除蛋白实验正交结果
Table 2 Results of orthogonal test on protein removal by enzyme

实验号	A	B	C	D	蛋白脱除率 (%)
1	1	1	1	1	86.2 ± 0.44
2	1	2	2	2	72.6 ± 0.56
3	1	3	3	3	55.2 ± 0.95
4	2	1	2	3	59.7 ± 0.46
5	2	2	3	1	77.9 ± 0.26
6	2	3	1	2	78.6 ± 0.26
7	3	1	3	2	37.8 ± 1.13
8	3	2	1	3	60.5 ± 0.36
9	3	3	2	1	64.2 ± 0.52
k ₁	71.3	61.2	75.1	76.1	
k ₂	72.1	70.3	65.5	63.0	
k ₃	54.2	66.0	56.9	58.5	
R	17.9	9.1	18.2	17.6	

注: 蛋白脱除率数据用 $\bar{x} \pm SD$ 表示 ($n = 3$)。

从表 2 极差分析结果可知, 各因素作用的主次顺序是 C > A > D > B, 由 k 值大小可知, 最佳组合是 A₂B₂C₁D₁。方差分析结果如表 3 所示, 因素 A、B、C、D 极显著。因素作用的主次顺序 C > A > D > B, 与极

差分析结果一致。由于最优组合 A₂B₂C₁D₁ 未出现在正交表中, 所以对该组合进行重复三次的验证实验, 结果显示: 蛋白脱除率为 87.4%。所得到的蛋白脱除率比正交表中的都高, 说明正交实验所确定的条件是合适的, 因此确定酶法脱除玉米麸皮水溶性多糖中蛋白质的最佳条件是: 酶解温度 55℃, 酶解时间 1.5h, pH7.5, 加酶量 2%。

2.4 酶法-TCA 法, 酶法-Sevag 法结合除蛋白

酶法除蛋白条件比较温和, 操作简便, 但是除蛋白不够彻底, 常与其他化学除蛋白法结合, 通过协同作用, 通常能够彻底脱除玉米麸皮水溶性多糖中的蛋白质。分别用酶法-TCA 法结合和酶法-Sevag 法结合处理玉米麸皮水溶性多糖, 结果如表 4 所示, 对于蛋白脱除率的效果要远远高于酶法-Sevag 法结合, 但是酶法-TCA 法结合的多糖损失率要高一些, 综合考虑, 酶法-TCA 法结合除蛋白效果要好于酶法-Sevag 法结合, 蛋白脱除率高达 95.24%。

表4 酶法-TCA 法和酶法-Sevag 法脱除蛋白的效果

不同去除蛋白的方法	蛋白脱除率 (%)	多糖损失率 (%)
酶法-TCA 法	95.24 ± 1.41	20.02 ± 1.42
酶法-Sevag 法	73.32 ± 2.23	10.09 ± 0.55

注: 蛋白脱除率和多糖损失率数据用 $\bar{x} \pm SD$ 表示 ($n = 3$)。

2.5 综合分析

从图 3 可知, 单独使用 TCA 法, 蛋白脱除率为 62.85%, 多糖损失率为 23.01%, 而使用酶法-TCA 法结合的方法, 蛋白质脱除率达到 95.24%, 远远高于前者, 多糖损失率为 20.02%, 略低于前者; 单独使用 Sevag 法, 蛋白脱除率为 57.60%, 多糖损失率为 3.28%, 而使用酶法-Sevag 法结合的方法, 蛋白质脱除率达到 73.32%, 高于前者, 多糖损失率为 10.09%。通过对比以上不同除蛋白方法和结合图 3 可知, 单独使用 TCA 法、Sevag 法除蛋白, 效果没有用酶法-TCA 法, 酶法-Sevag 法结合除蛋白的效果好, 而酶法-TCA 法与酶法-Sevag 法相比较, 酶法-TCA 法效果更佳。

3 结论

本文对 5 种除蛋白的方法做了对比研究, 结果发现酶法-TCA 法结合更优于酶法-Sevag 法结合、单一的 TCA 法、Sevag 法和酶法。最终确定酶法-TCA (下转第 245 页)

表8 正交实验方差分析表

Table 8 Variance analysis of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

方差来源	SS	MS	F	显著性	
酥脆度	A	0.2467	0.1233	2.8462	
	B	1.1267	0.5633	13.0000	
	C	2.1800	1.090	25.1538	*
	误差	0.0867	0.0433		
	总变异	3.5534	1.7766		
色泽	A	0.0800	0.040	1.7143	
	B	0.6467	0.3233	13.8571	
	C	0.5067	0.2533	10.8571	
	误差	0.0433	0.0233		
	总变异	1.2800	0.6166		
硬度	A	3.0022	1.5011	31.4186	*
	B	8.1622	4.0811	85.4186	*
	C	10.8956	5.4478	114.0233	**
	误差	0.0956	0.0478		
	总变异	22.1556	11.0300		

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$, * 表示差异显著, ** 表示差异极显著。

表9 验证实验

Table 9 Verifying test

处理方式	M	N
酥脆度	8.5a	8.0b
色泽	8.3a	7.8b
硬度 (kg/cm^2)	13.6a	17.0b

3 结论

预糊化改变淀粉颗粒的结晶结构,并提高蚕豆的保水性,使蚕豆在油炸过程中更蓬松、酥脆。经过 15°C 清水复水 48h, 80°C 水中预糊化 9min,可在较短

(上接第 241 页)

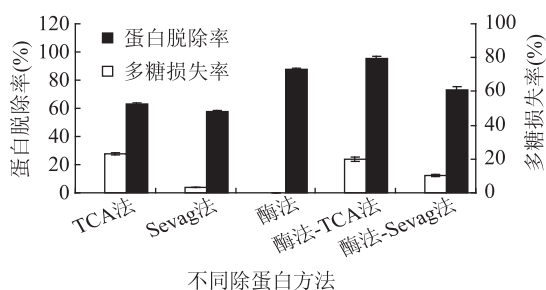


图3 几种除蛋白方法效果的比较

Fig.3 Comparison of several protein removal methods

法结合去除玉米麸皮水溶性多糖最佳条件为:先用 2% (以底物计) 的碱性蛋白酶在 55°C , pH 为 7.5 的条件下作用 1.5h, 再在酶解液中加入等体积的 TCA 溶液,使其终浓度为 1%,静置 30min 后,其蛋白质去除率达 95.24%,糖损失率为 20.02%。

参考文献

[1] Devin J Rose, George E Inglett, Sean X Liu. Utilisation of corn (Zeamays) bran and corn fiber in the production of food components [J]. J Sci Food Agric, 2010, 90: 915-924.
 [2] 高利忠, 周素梅, 殷文政. 玉米皮活性多糖的研究进展 [J]. 粮油加工, 2007(11): 114-116.

时间内使蚕豆达到充分预糊化目的,并且能保持豆粒完整外形,油炸后产品酥脆可口。预糊化技术可以替代复合磷酸盐在蚕豆油炸生产中推广应用,且达到节约水资源和减少环境污染等目的,具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] 谷成林, 段红平. 中国蚕豆生产的回顾与发展趋势 [J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(5): 671-675.
 [2] 尹基宇, 王文勇, 李涛. 可降解塑料生物降解特性研究 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(14): 6592-6593.
 [3] YU L, KATHERINE DEANA, LI L. Polymer blends and composites from renewable resources [J]. Prog Polym Sci, 2006, 31: 576-602.
 [4] 龚彦铭, 熊绿云, 王绍美. 改性淀粉的研究现状与进展 [J]. 中国皮革, 2009, 38(5): 46-49.
 [5] 鲍祖本, 方红霞. 淀粉基生物降解塑料的研究现状和发展方向 [J]. 塑料包装, 2008, 18(1): 21-24.
 [6] 叶茵. 中国蚕豆学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 25.
 [7] 黄蓉, 刘敦华. 水煮蚕豆加工中存在的问题及防治措施 [J]. 农业科学研究, 2010, 31(2): 73-75.
 [8] 张政委, 任鹏刚. 淀粉基可生物降解塑料的研究现状 [J]. 材料导报, 2008, 22(7): 44-47.
 [9] BILIADERIS C G. Structures and phase transitions of starch polymers [M]. WALTER R H. Poly saccharide association structures in foods. New York: Marcel Dekker, 1998: 57.
 [10] 高建华, 蔡雅图, 宁正祥. 油炸蚕豆工艺研究 [J]. 广州食品工业科技, 1997, 13(2): 16-20.
 [3] 张艳荣, 张雁南, 王大为. 玉米活性多糖的抗便秘作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2005, 31(4): 509-511.
 [4] 张艳荣, 陈丽娜, 王大为. 玉米活性多糖对糖尿病小鼠的降血糖作用 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2005, 31(6): 846-848.
 [5] 张潇艳, 陈正行, 王莉. 米糠多糖的脱蛋白研究 [J]. 食品工业科技, 2008, 29(3): 163-165.
 [6] Staub A M. Removal of proteins Sevag method [J]. Methods in Carbohydr Chem, 1965(5): 5-6.
 [7] 郑学玲, 李利民, 姚惠源. 小麦麸皮水溶性戊聚糖的分离及分级纯化 [J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(2): 1-4.
 [8] 宁正祥. 食品成分分析手册 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
 [9] 姚文华. 大枣多糖脱蛋白研究 [J]. 食品研究与开发, 2009, 30(5): 49-52.
 [10] 何传波, 陈玲, 李琳. 巴戟天多糖脱蛋白方法的研究 [J]. 食品科技, 2005(6): 25-27.
 [11] 刘成梅, 万茵, 涂宗财. 百合多糖脱蛋白方法的研究 [J]. 食品科学, 2002, 23(1): 89-90.
 [12] 张善玉. 天然产物多糖脱蛋白方法研究 [J]. 中国药房, 2009, 20(33): 2633-2635.
 [13] 周鸿立, 杨晓红. 玉米须多糖中蛋白质脱除的 Sevag 与酶法连用工艺优化 [J]. 食品科学, 2011, 32(8): 129-132.