

文章编号:1673-1689(2009)01-0028-05

高蛋白含量米蛋白肽制备及产品营养成分分析

周侃¹, 熊华^{*2}, 陈升军², 吴小平¹

(1. 南昌大学 生命科学学院, 江西 南昌 330031; 2. 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学, 江西 南昌 330047)

摘 要: 以米渣为原料, 通过预处理及限制性酶解, 对酶解液浓缩后喷雾干燥得到米蛋白肽粉进行了组成分析测定。最佳酶解工艺条件为: 用酶量为 1%, 酶解温度为 50 ℃, 固液比为 1:5, pH 值为 8, 酶解时间为 3 h; 产品蛋白质含量为 91.5%, 相对分子质量大部分在 3 000 下, 短肽含量为 77.87%, 必需氨基酸含量丰富, 作为一种优质植物蛋白资源可更好的应用到食品中。

关键词: 米渣; 酶解; 米蛋白肽; 营养成分

中图分类号: TS 201.2⁺1

文献标识码: A

The High Protein of the Rice Protein Peptide Preparation and the Product Nutrition Ingredient Analysis

ZHOU Kan¹, XIONG Hua^{*2}, CHEN Sheng-jun², WU Xiao-ping¹

(1. The College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The experiment took rice residue as material, Through the pretreatment and the restrictive enzymolysis to the rice residue, Spray drying obtained the rice protein peptide powder after the enzymolysis fluid concentration. The optimum conditions of enzymatic hydrolysis of rice dregs were as follows: the enzyme amount of 1%, temperature 50 ℃ at pH 8 for 3 hours, ratio of solid/ liquid at 1:5; Equally, we had a research on nutritional ingredient of the rice protein peptide product: protein content and the molecular weight, the short peptide content, the amino acid composition analysis. The result displayed: The product protein content was 91.5%, the majority of molecular weight was under 3 000, the short peptide content was 77.87%, the essential amino acids content was rich, the rice protein peptide product took one kind of high quality albumen, we should take further exploitation on application value of the rice protein peptide and utilize it into food better.

Key words: rice residue, enzymolysis, rice protein peptide, nutritional ingredient

收稿日期: 2007-04-02

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD27B00); 国家 863 计划项目(SQ2007AA10Z330663); 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT0540); 2006 年南昌市重点攻关及产业化资助项目。

* 通讯作者: 熊华(1957-), 男, 江西南昌人, 教授, 博士生导师, 主要从事食品微胶囊技术加工。

Email: huaxiong10@yahoo.com

米渣是生产糖浆的副产品,蛋白质质量分数在60%以上,而且氨基酸组成合理,是少有的无抗原植物蛋白质来源,但多年来都被简单地当作饲料处理,生物利用率不高,经济价值也很低。目前,米渣中提取大米蛋白质的方法主要有碱洗酸沉法、纤维素酶和酸洗法、碱酶两步法等方法^[1,2]。但是上述方法在提取过程中采用较高浓度的碱溶液,蛋白质中赖氨酸与丙氨酸发生缩合反应,生成有毒化合物,赖氨酸营养价值大为降低;且成品颜色深,味道苦,实用性差。因此,从经济角度上看,该方法所得蛋白质回收率低,产品功能性质也未得到改善。

天然生物体蛋白肽生物体含量低,加工成本高,大量提取会造成物种资源萎缩。化学合成法常用于合成高营养价值、中等长度的医药用肽,但活性肽反应底物和反应试剂价格高,反应过程中会产生有害物质。酶合成法反应温和,酶催化位置有方向性,但反应副产物多,最适酶缺乏及产率过低等制约它的发展。DNA重组技术只能合成大分子肽类和蛋白质,对人类需求的有营养价值的小肽,这种方法受到一定限制,此外欧美等国消费者也普遍不接受基因生物工程生产的食品。

而本研究拟采用蛋白酶限制性酶解的方法提取米渣中的蛋白质。该方法反应条件温和,对蛋白质的影响很小,可以很好的控制反应条件,可以产生需要的目标生物活性肽,并把蛋白降解为不同链长的肽,使其更容易消化吸收。对得到的蛋白肽产品进行蛋白质相对分子质量、短肽含量、氨基酸组成等营养成分分析,以此开发米渣蛋白的营养价值和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

米渣:由江西省恒天实业有限公司提供;复合胰蛋白酶(活力4 000 U/g):诺维信公司(中国)产品;混合指示剂:1份0.1%甲基红乙醇溶液与5份0.1%溴钾绿乙醇溶液;0.1 mol/L盐酸标准溶液;2%硼酸溶液和40%氢氧化钠溶液;流动相:0.2 mol/L柠檬酸三钠缓冲液、四元梯度洗脱浓硫酸、甲醛、盐酸、硼酸、氢氧化钠、三氯乙酸(TCA)等;试剂为分析纯。

1.2 仪器与设备

1100 高效液相色谱仪:美国 Agilent 公司生产;HITACHI L-8800 氨基酸分析系:Agilent 公司产品;JB-3 型磁力搅拌器:上海雷磁新径仪器有限公司产品;电子天平:瑞典 Mettler toledo 仪器公司产

品;KDY-9820 凯氏定氮仪:厦门精艺兴业科技有限公司产品;DGG-9123AD 台式电热恒温鼓风干燥箱:上海森信实验仪器有限公司产品;RE-52AA 真空旋转蒸发器:上海亚荣生化仪器厂产品;高压均质机:上海申鹿均质机有限公司生产;MDRP-5 型离心、压力二流体喷雾造粒塔:锡山市现代喷雾干燥机厂生产;WYT-J0-32%手持糖度计:成都兴晨光学仪器有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 米渣预处理 米渣→脱脂(醚洗)→去可溶性糖(水洗)→酶解。

在米渣中仍含有脂肪及部分可溶性糖,醚洗及水洗能够提高米渣原料蛋白含量。

醚洗:米渣与石油醚1:1混合,搅拌30 min,过滤,自然晒干,取少量测蛋白含量。

水洗:米渣经石油醚脱脂后按料液比1:5加水稀释,在50℃水浴温度下搅拌30 min,离心弃去上层液,沉淀按上法重复水洗离心两次,取出少量沉淀烘干测蛋白含量,其余酶解。

1.3.2 米渣酶解 酶解工艺流程:米渣→加酶→加水→调节pH值→调温→酶解(随时调pH值)→灭酶→离心→酶解液→测定蛋白提取率和水解度→浓缩喷雾干燥。

以水解度和提取率为标准,选择酶解因素的影响水平进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,通过显著性分析,确定最佳酶解工艺条件。

1.3.3 分析检测方法

1) 蛋白质的提取率(RE)的测定:

$$RE = \frac{\text{滤液中的蛋白质质量}}{\text{总蛋白质质量}} \times 100\%$$

2) 蛋白质的水解度(DH)的测定:

$$DH = h / h_{\text{tot}} \times 100$$

h 为蛋白质水解后每克蛋白中被裂解的肽键的毫摩尔数,为氨基酸含量; h_{tot} 为每克原料蛋白中肽键的毫摩尔数,即为总氮含量。总氮含量的测定:凯氏定氮法(GB/T5009.5—2003)。氨基氮的含量测定:甲醛滴定法(GB/T5009.39—2003)。

1.3.4 米蛋白肽营养成分分析

1) 蛋白质含量测定见文献[3]。

2) 蛋白质相对分子质量测定

相对分子质量分布的测定方法是将米蛋白肽粉溶解于水,进行凝胶过滤后,用高效液相色谱法(HPLC)测定各组份的相对分子质量。

HPLC 凝胶条件:流动相,磷酸盐缓冲液(50 mmol/L),体积流量为1 mL/min,紫外检测波长

220 nm,凝胶柱 TSK-3000。

3) 短肽含量测定

原理:利用三氯乙酸作蛋白质沉淀剂,将酶解蛋白粉中的蛋白质和肽链较长的肽沉淀,并将其中的短链小肽用酸溶解出来,经离心、过滤、消化、蒸馏,测定其蛋白质量^[4,5]。

方法:称取一定样品烧杯中,加入 15%(三氯乙酸)溶液 25 mL,混合均匀,静置。将溶液定量转移,离心后取全部上清夜用滤纸过滤,移取滤液于消化管中,按测定粗蛋白质方法消化、定容消化液蒸馏,测定其粗蛋白质含量。同时做空白。

短肽%(干基)=(V-V₀)×C×6.25×
0.014 / m×100%

式中:V 为样品消耗 HCl 的体积,mL;V₀ 为空白消耗 HCl 的体积,mL;C 为盐酸的摩尔浓度, mol / L;6.25×0.014 为蛋白质转换系数。*m* 为称取样品质量,g。

短肽%(占蛋白质干基)=短肽/粗蛋白质×100%

4) 氨基酸分析 采用柱后茚三酮衍生法。称取约 0.25 g 样品于安瓿瓶中,加 5 mL 6 mol/L HCL,封口,在 110 ℃水解 24 h。取出冷却,定容于 50 mL 容量瓶中,稀释 10 倍。过 0.22 μm 滤膜,待上机分析。

氨基酸自动分析仪条件参数:固定相 Na 型阳离子交换柱;流动相 0.2 mol/L 柠檬酸三钠缓冲液,四元梯度法洗脱。

2 结果与分析

2.1 米渣预处理

由于米渣中仍含有质量分数 9%左右的脂肪,从图 1 可以看出,米渣经石油醚脱脂后蛋白质质量分数提高了 7.4%,即从米渣蛋白质含量的 56.1%提高到了 63.5%,所以米渣经石油醚脱脂后除去了大部分的脂肪。

从图 1 可以看出,水洗可以较显著的提高蛋白质含量,最后水洗米渣蛋白质质量分数达到了 75.3%。由于米渣中含有部分可溶解于水的糖及可溶性纤维等成分,这些成分经过滤后大部分溶解于水中。水洗作为一种简便经济的预处理方式,可在以后的生产中推广使用。

2.2 米渣酶解

采用胰蛋白复合酶加酶量为 1%,温度 40~60 ℃、固液比 1:5~1:15、酶解时间为 2~4 h,pH 值 7.0~9.0 的因素水平进行正交试验(表 1),以确定最佳工艺条件。

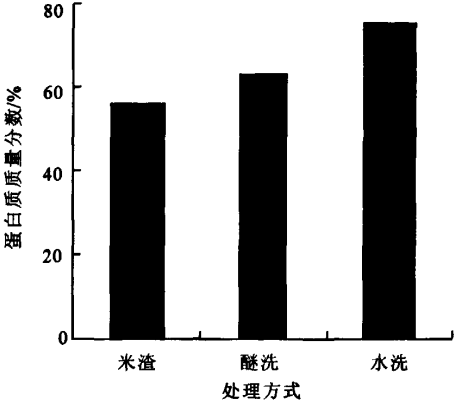


图 1 不同处理方法的米渣中蛋白质含量

Fig. 1 The rice residue protein content of different processing method

表 1 酶解试验因素水平表

Tab. 1 The factors and levels of the test

	A 温度/℃	B 固液比	C pH	D 时间/h
1	40	1:5	7.0	2
2	50	1:10	8.0	3
3	60	1:15	9.0	4

表 2 正交试验结果和极差分析

Tab. 2 The results and analysis of the test

实验号	A	B	C	D	DH/%
1	1	1	1	1	6.58
2	1	2	2	2	8.35
3	1	3	3	3	6.93
4	2	1	2	3	8.51
5	2	2	3	1	7.36
6	2	3	1	2	8.03
7	3	1	3	2	7.63
8	3	2	1	3	6.72
9	3	3	2	1	7.29
K ₁	21.86	22.72	21.33	21.23	
K ₂	23.90	22.43	24.15	24.01	
K ₃	21.64	22.25	21.92	22.16	
R	2.26	0.47	2.81	2.78	

从正交实验结果的极差分析(表 2)可以看出,四因素对水解度的影响顺序为 C>D>A>B;最佳试验条件为 A₂B₁C₂D₂,即米渣蛋白酶解的最适条件是:酶解温度 50 ℃,固液比 1:5,pH 为 8,

时间 3 h,此时蛋白液的水解度为 8.69%,蛋白质提取率为 85.6%,酶解液浓缩后喷雾干燥测得米蛋白肽产品蛋白质含量为 91.5%。

2.3 米蛋白肽产品营养成分分析

2.3.1 蛋白质相对分子质量分布 相对分子质量是蛋白质的主要特征参数之一,当发现一种新的蛋白质时,首先应准确测定其相对分子质量^[6]。

对图 2 相对分子质量分布图谱进行分析得到表 3 相对分子质量分布表,从表 3 看出,酶解后的米蛋白肽产品相对分子质量大部分都集中在 3 000 下,占 89.29%。其中,1 000 下占 70.92%。说明产品中蛋白质大部分都以短肽或氨基酸形式存在。

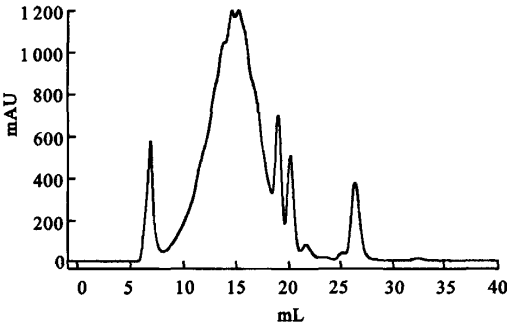


图 2 米蛋白肽蛋白质分子量分布图谱
Fig. 2 The molecular weight distribution of the rice protein peptide

表 3 米蛋白肽产品蛋白质相对分子质量分布表 Tab. 3 The molecular weight of the rice protein peptide	
相对分子质量	米蛋白肽
>10 000	5.60
5 000~10 000	1.84
3 000~5 000	3.27
1 000~3 000	18.36
120-1 000	52.24
<120	18.68

2.3.2 短肽含量 经计算,短肽在米蛋白肽产品中占总蛋白含量的 77.87%,说明产品中蛋白质大部分是以短形式存在,与表 3 对比知,与蛋白质相对分子质量分布相吻合。蛋白质相对分子质量分布测定和短肽含量测定两种方法测定相对分子质量分布结果相同,前者为分子量分布定性测定,后者可以对分子量分布定量测定。

本实验所得的米蛋白肽产品中蛋白质大部分为短肽,并且短肽具有许多重要生理功能^[7-10],如

促进氨基酸吸收,提高蛋白质沉积率;促进矿物质元素吸收利用;促进瘤胃微生物对营养物质的利用;提高动物生产性能;参与机体免疫调节,提高其免疫性能;具有抗氧化作用等功能。所以可进一步开发米蛋白肽产品在食品中的应用价值。

2.3.3 氨基酸分析 米蛋白肽产品的氨基酸图谱及氨基酸组成见图 3、表 4。

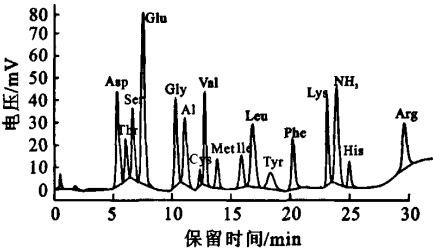


图 3 米蛋白肽的氨基酸图谱
Fig. 3 The amino acid atlas of the rice protein peptide

表 4 米蛋白肽产品中氨基酸组成(mg/g) Tab. 4 The amino acids composition of the rice protein peptide	
氨基酸名称	米蛋白肽粉/(mg/g)
天门冬氨酸(Asp)	60.663
苏氨酸*(Thr)	18.656
丝氨酸(Ser)	33.675
谷氨酸(Glu)	123.522
甘氨酸(Gly)	30.268
丙氨酸(Ala)	35.143
半胱氨酸(Cys)	11.923
缬氨酸*(Val)	37.700
蛋氨酸*(Met)	8.982
异亮氨酸*(Ile)	22.853
亮氨酸*(Leu)	48.140
酪氨酸(Tyr)	31.486
苯丙氨酸*(Phe)	36.015
赖氨酸*(Lys)	22.085
组氨酸*(His)	14.667
精氨酸(Arg)	54.865
脯氨酸(Pro)	23.142
色氨酸*(Trp)	3.078
氨基酸总量	616.863

* 必需氨基酸

由表4可知,米蛋白肽含有18种氨基酸,8种必需氨基酸。米蛋白肽中谷氨酸和天门冬氨酸分别占到氨基酸总量的20.1%和9.8%。谷氨酸在人体内可促进氨基丁酸的合成,从而降低血氨,促进脑细胞呼吸,可以用于治疗神经精神疾病,如精神分裂症和脑血管障碍等引起的记忆和语言障碍、小儿智力不全等^[11]。天门冬氨酸是一种良好的营养增补剂,可以用于治疗心脏病,肝脏病,高血压症,具有防止和恢复疲劳的作用^[12]。

米蛋白肽粉中必需氨基酸含量丰富,达到了总量的39.1%,米蛋白肽中的亮氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸和苏氨酸则分别占到必需氨基酸总量的19.4%,15.1%,13.3%,7.4%。

3 结 语

通过对米渣预处理,蛋白质质量分数由56.1%提高到75.3%;以复合胰蛋白酶对米渣进行酶解的最佳条件为:用酶量为1%,酶解温度50℃,固液比1:5, pH 8,时间3 h,此时水解度为8.69%;对米蛋白肽产品进行分析知:蛋白质质量分数为91.5%,蛋白质分子量大部分在3 000下,短肽占总蛋白质质量分数的77.87%,氨基酸组成合理,必需氨基酸含量丰富。通过对米蛋白肽进行营养成分知,米蛋白肽作为一种优质植物蛋白资源,可进一步开发米蛋白肽的营养价值和应用价值。

参考文献(References):

- [1] 王亚林. 碱酶两步法提取米渣中蛋白质的工艺研究[J]. 中国油脂, 2002, 27(3): 53—54.
Wang ya lin, et al. Study on extraction of protein from rice dregs by alkali dissolution and enzyme hydrolysis [J]. *China Oils and Fats*, 2002, 27(3): 53—54. (in Chinese)
- [2] 王亚林. 应用纤维酶解和酸洗法从米渣中提取蛋白质的研究[J]. 中国酿造, 2003, (2): 24—25.
WANG Ya-lin. Study on The protein production from the rice dregs making use of the technology, cellulase hydrolysis and acid-washing disposal [J]. *China Brews*, 2003, (2): 24—25.
- [3] GB/T 5009.5-2003
- [4] 孔毅, 吴梧桐, 吴如金. 蛋白质分子量测定方法比较研究[J]. 分析仪器, 2003, 2: 44—47.
KONG Yi, WU Wu-tong, WU Ru-jin. Comparison of methods used for determination of molecular weight of a newly found protein [J]. *Analyzing Instrument*, 2003, 2: 44—47.
- [5] Kevin N Pearce, John E Kinsella. Emulsifying properties of proteins; evaluation of a turbidimetric technique [J]. *J Agric Food Chem*, 1978, 26(3): 716—723.
- [6] Popineau Masson P, Thebaudin J. Enzymatic processing of wheat proteins. In: Godon B. ed. *Bioconversion of Cereal Products*. VCH Publishers, 1993: 129—131.
- [7] Ganapathy V, F H Leibach. Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit [J]. *Biol Chem*, 1983, 258: 14189.
- [8] Takuwa N, T Shimada, H Matsumoto, et al. Proton-coupled transport of glycylglycine in rabbit renal brush-border membrane vesicles [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1985, 814: 186.
- [9] Boyd C A R, M R Ward. A micro-electrode study of oligopeptide absorption by the small intestinal epithelium of *Neoturus maerosus* [J]. *Physiol*, 1982, 324: 411.
- [10] Daniel. Physiological importance and characteristics of peptide transport in intestinal epithelial cells [A]. In: souffrant W B, H hagemeister ed. *10th international symposium on digestive physiology in pigs* [C] I(80): 1—7 Dummerstorf Pub, 1994.
- [11] Steven T K Ha, Charles L. Wilkins. Analysis of antimycin A by reversed-phase liquid chromatography/nuclear magnetic resonance spectrometry [J]. *Anal Chem*, 1990, 61(5): 404—408.
- [12] 陆东林. 牛奶中的氨基酸含量及其营养价值[J]. 中国乳业, 1999, 24(6): 24—26.
LU Dong-lin. Amino acid content and nutritional value in milk [J]. *China Dairying*, 1999, 24(6): 24—26.

(责任编辑: 杨 萌)