

初志战, 巫光宏, 刘小林. 玉米醇溶蛋白的提取及酶解工艺研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(3): 86-89.

玉米醇溶蛋白的提取及酶解工艺研究

初志战¹, 巫光宏¹, 刘小林²

(1 华南农业大学 生命科学院/广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室, 广东 广州 510642;
2 江西宜春学院, 江西 宜春 336000)

摘要:【目的】优化水解醇溶蛋白生产功能肽的工艺, 提高玉米醇溶蛋白的应用价值. 【方法】通过正交试验获得从玉米蛋白粉中提取醇溶蛋白的最佳提取时间、提取温度、料液比、乙醇浓度等提取条件; 通过碱性蛋白酶和蛋白酶 K 对玉米醇溶蛋白进行水解生产玉米多肽. 【结果和结论】通过正交试验获得了从玉米蛋白粉中提取醇溶蛋白的最佳条件, 即: 料液比 1:4 (g/mL), 60 ℃ 水浴加热, 乙醇体积分数为 75%, 提取 3 h. 两步酶解法效率高于单酶解法, 两步酶解法先加蛋白酶 K 反应后再加碱性蛋白酶时水解效果最佳.

关键词:玉米醇溶蛋白; 提取; 水解
中图分类号:Q556 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)03-0086-04

A research on extraction and enzymatic hydrolysis of zein

CHU Zhizhan¹, WU Guanghong¹, LIU Xiaolin²

(1 College of Life Sciences/Guangdong Provincial Key Laboratory of Protein Function and Regulation in
Agricultural Organisms, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2 Yichun University, Yichun 336000, China)

Abstract:【Objective】The production of short peptide from zein was investigated to greatly promote the application of zein. 【Method】The conditions such as extraction time, temperature, ethanol concentration and ratio of liquid to solid were optimized by orthogonal test. Zein was hydrolyzed by protease K and alkaline protease in this study. 【Result and conclusion】The optimal conditions of extracting zein were as follows: the ratio of solid to liquid was 1:4; the extracting time was 3 hours; the extracting temperature was 60 ℃ and the concentration of ethanol was 75%. Results showed that the zein could be hydrolyzed more efficiently by combining two enzymes than by only using one of the two enzymes. Zein hydrolyzed by protease K and alkaline protease in turn is the best enzymatic hydrolysis method.

Key words:zein; extraction; hydrolysis

玉米蛋白粉(CGM), 俗称玉米渣, 是玉米湿法生产淀粉过程中的主要副产品. 玉米蛋白粉中蛋白质高达 40% ~ 70%, 其中醇溶蛋白约占总蛋白的 68%, 谷蛋白约占 28%, 同时含有少量的球蛋白和白蛋白. 由于玉米醇溶蛋白中含有大量的非极性氨基酸, 因此在体积分数为 60% ~ 95% 的醇类水溶液中溶解度较高, 而在水溶液中溶解性很差. 在我国, 玉米蛋白粉作为生产淀粉的下脚料, 大部分作为“工业三废”排放掉了, 不仅没有实现资源的循环利用, 还造成了严重浪费和环境污染, 经济效益极低. 近年来随着对玉米醇溶蛋白研究的不断深入, 玉米醇溶蛋白组成的特殊性逐渐引起人们的重视, 不断开发出新的产品, 例如利用玉米醇溶蛋白制作保鲜膜、缓释胶囊、可降解塑料等环境友好材料. 如何利用醇溶蛋

白的营养价值,成为进一步提高醇溶蛋白开发的核心.研究发现,玉米醇溶蛋白中支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)含量相当高,可用于制取高 F 值(支链氨基酸对芳香族氨基酸的摩尔比称为 F 值)寡肽分子,以改善肝、肾、肠、胃疾病患者的营养,可用于功能性食品或医药产品中.栾新红等^[1]发现玉米蛋白多肽能影响鹅肉品质及机体代谢.玉米蛋白含有高比例缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、脯氨酸和谷氨酰胺等,而赖氨酸等碱性氨基酸很少,这种不平衡氨基酸组成可以抑制人体中的血管紧张素转移酶(ACE),使玉米醇溶蛋白成为降血压肽很好的来源.

目前,对玉米醇溶蛋白开发和研究较为成熟的是日本和美国.日本用玉米多肽开发出了低热量的早餐饮料.我国酶解制备玉米多肽的研究起步较晚,最早的研究记录在20世纪90年代末.1998年,吴建平^[2]用复合酶(碱性蛋白酶+胃蛋白酶)对玉米蛋白进行水解,获得了相对分子质量较小、有明显抑制ACE活性的玉米多肽.王雄等^[3]用碱性蛋白酶处理玉米黄粉,获得多肽.1999年王梅等^[4]用3种碱性蛋白酶、2种中性蛋白酶、3种酸性蛋白酶对蛋白进行水解比较研究,指出用碱性蛋白酶水解得到的蛋白水解物其溶解性好,营养价值高.2000年赵国华等^[5]用AS1398酶处理玉米蛋白,得到流动性好、黏度低、热稳定性较好、乳化性好的玉米多肽分子.但由于玉米醇溶蛋白的纯水不溶性与蛋白酶必需的水溶液环境相冲突,使得玉米醇溶蛋白酶解程度较低,达不到可以应用的程度,这已成为玉米多肽开发的瓶颈.本研究根据醇溶蛋白可溶于高pH缓冲液这一特点,将提取的醇溶蛋白液加入pH>11.5的缓冲液中,然后筛选在碱性条件中仍保持较高活性的酶——碱性蛋白酶和蛋白酶K,比较醇溶蛋白的降解程度,为玉米多肽产品的开发提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

玉米蛋白粉由华南农业大学动物科学学院提供.

蛋白酶K和碱性蛋白酶为美国Sigma公司产品;其余试剂均为国产分析纯.

1.2 试验方法

称取一定量玉米蛋白粉,放入烘箱中80℃烘6h,粉碎后过100目筛,利用有机溶剂法^[6-7]提取得到玉米醇溶蛋白,然后用考马斯亮蓝G-250法测定提取液中玉米醇溶蛋白的含量.

醇溶蛋白的水解先采用碱性蛋白酶和蛋白酶K分别对玉米醇溶蛋白进行水解,确定每种酶的最佳作用条件,然后再选用两步酶法水解.水解度的测定

采用pH-stat法^[8-9]和SN-TCA指数法^[10].采用袁斌等^[11]改进的pH-stat法初步测定醇溶蛋白各种加酶方式的水解度,然后与SN-TCA指数法测定的水解度进行比较,确定最适的加酶方式.

2 结果与分析

2.1 乙醇法提取醇溶蛋白参数的选择

2.1.1 乙醇体积分数对玉米醇溶蛋白提取效果的影响 玉米醇溶蛋白能够溶解在体积分数为60%~95%的乙醇溶液中,本试验对比了体积分数为65%、75%、85%和95%的乙醇对提取效果的影响,结果表明,用65%~85%的乙醇作为溶剂时,蛋白的提取率都大大高于用95%乙醇作为溶剂时的提取率,而用75%乙醇作为溶剂的提取率最高.故选择体积分数为65%、75%、85%作为正交试验的3个水平(图1).

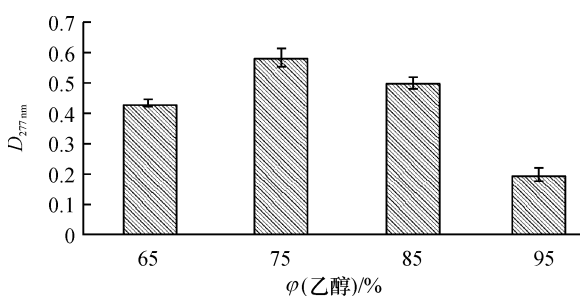


图1 乙醇体积分数对提取效果的影响

Fig.1 Effects of ethanol concentration on zein extraction

2.1.2 提取温度对提取效果的影响 从图2中可以看出,在60℃以下,温度的升高能够使提取率增大,30~40℃时提取率有较明显的提高,40与50℃时的提取率非常接近,50℃时稍高,60℃时提取率达到最高,而70℃时提取率反而有明显的下降.因此,以玉米蛋白粉为原料提取醇溶蛋白的温度不宜超过60℃.故选取40、50和60℃作为正交试验的3个水平.

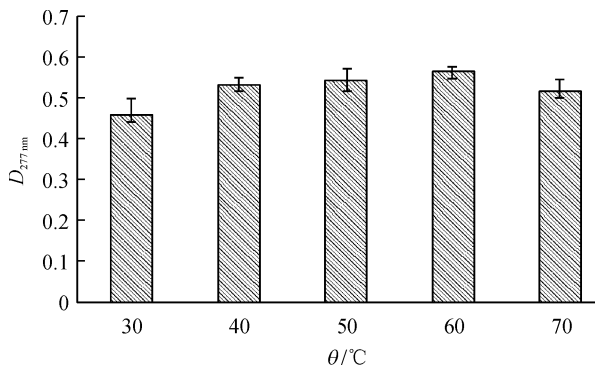


图2 温度对提取效果的影响

Fig.2 Effects of temperature on zein extraction

2.1.3 料液比对提取效果的影响 从图3中可以看出,随着料液比(g/mL)的增大,提取效果呈上升

趋势,当料液比为 1:8 时,提取效果最好,1:8 之后提取效果开始下降,1:10 时提取效果最差.可见,溶剂乙醇用量少会减少玉米蛋白粉中的玉米醇溶蛋白的溶出量,但溶剂用量过多也不会增加玉米醇溶蛋白的溶出量.因而,选取料液比为 1:4、1:6 和 1:8 作为正交试验的 3 个水平.

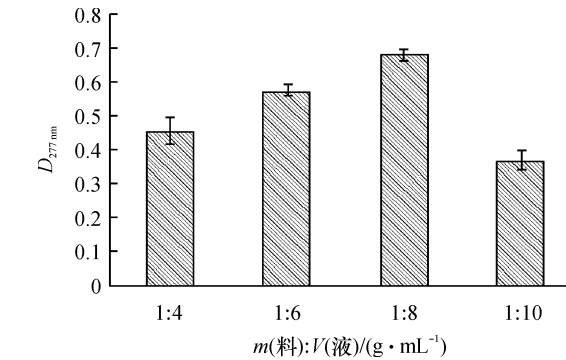


图 3 料液比对提取效果的影响

Fig. 3 Effects of material/liquid ratio on zein extraction

2.1.4 提取时间对提取效果的影响 提取时间对提取效果影响很大,提取 2 h 比提取 1 h 的提取率有显著的提高,而 2 h 后提取率反而逐渐下降,4 h 以后的提取率与提取 1 h 的提取率相差不大(图 4).可能是因为较长时间的加热导致玉米醇溶蛋白中少部分的蛋白质与 CGM 中的淀粉粘连,造成蛋白的提取率下降.因此,宜选择 1、2、3 h 作为正交试验的 3 个水平.

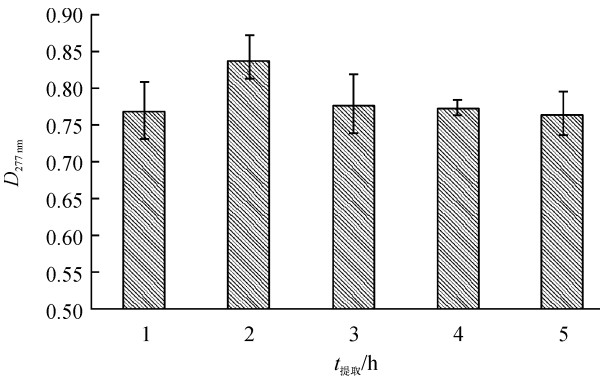


图 4 提取时间对提取效果的影响

Fig. 4 Effects of extracting time on zein extraction

2.1.5 正交试验 根据单因素试验结果,设计正交试验,结果见表 1.

根据统计结果分析,加热搅拌提取玉米醇溶蛋白的最佳工艺条件为 $A_3B_3C_2D_1$,即料液比 1:4 (g/mL),60 ℃ 水浴加热,乙醇体积分数是 75%,提取 3 h.料液比对提取效果影响最大,其次是温度和乙醇体积分数,时间对提取效果的影响程度在 4 个因素中最小.温度为 60 ℃ 时提取效果最好,比 50 ℃ 稍高,较 40 ℃ 时有显著提高;提取 1 h 的效果最差,2 和 3 h 的提取效果接近;乙醇体积分数为 75% 时的

提取率最高,比 65% 时的提取率稍高,体积分数为 85% 乙醇的提取效果最差;料液比 1:6 和 1:8 的提取效果接近,1:4 时有显著提高.

表 1 $L_9(3^4)$ 正交试验结果及极差分析表

Tab. 1 $L_9(3^4)$ orthogonal experiment results and range analyses

试验号	A ($\theta/^\circ\text{C}$)	B (t/h)	C [$\varphi(\text{乙醇})/\%$](料液比)	D (料液比)	$D_{277\text{ nm}}$
1	1(40)	1(1)	1(65)	1(1:4)	0.531
2	1	2(2)	2(75)	2(1:6)	0.352
3	1	3(3)	3(85)	3(1:8)	0.181
4	2(50)	1	2	3	0.287
5	2	2	3	1	0.545
6	2	3	1	2	0.389
7	3(60)	1	3	2	0.344
8	3	2	1	3	0.279
9	3	3	2	1	0.615
Σk_1	0.349	0.381	0.394	0.558	
Σk_2	0.407	0.392	0.418	0.362	
Σk_3	0.413	0.395	0.357	0.249	
R	0.064	0.014	0.061	0.309	
排序	2	4	3	1	

2.2 酶解玉米醇溶蛋白条件的确定

由于玉米醇溶蛋白溶于高体积分数的乙醇溶液(φ 为 75% 乙醇)和高 pH 水溶液(pH 12.0),目前没有报道蛋白水解酶在该环境中仍具有水解活力,因此我们将玉米醇溶蛋白提取烘干后用 pH 12.0 的 NaOH- Na_2HPO_4 缓冲溶液溶解.在如此高 pH 溶液中有活力的酶不多,我们选择蛋白酶 K 和碱性蛋白酶进行酶解试验.由于过多的醇溶蛋白底物会对酶活性产生抑制作用,因此本试验的底物量为 0.628 mg/mL(图 5).参考蛋白酶 K 和碱性蛋白酶单独水解的最佳作用条件,本试验中,2 种酶的试验条件分别设

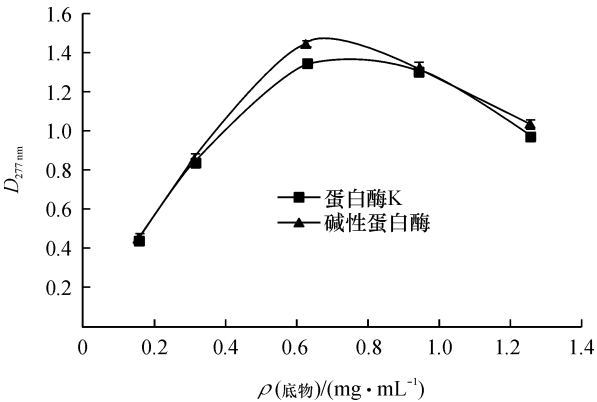


图 5 底物质量浓度对酶解的影响

Fig. 5 Effects of substrate mass concentration on zein enzymatic hydrolysis

为:0.05 mg 蛋白酶 K、反应时间 20 min、反应温度 35 ℃;0.05 mg 碱性蛋白酶、反应时间 15 min、反应温度 45 ℃. 分别采取以下 4 种加酶顺序进行反应:只加蛋白酶 K;只加碱性蛋白酶;先加蛋白酶 K 反应后再加碱性蛋白酶、先加碱性蛋白酶反应后再加蛋白酶 K.

采用 pH-stat 法及 SN-TCA 指数法分别测定 4 种加酶方式下玉米醇溶蛋白的水解度,据此选出最好的酶解方法,结果见表 2 和表 3.

表 2 pH-stat 法测定玉米醇溶蛋白水解度
Tab.2 Enzymatic hydrolysis degree of zein determined by pH-stat method

加酶顺序	NaOH 用量/mL	pH		水解度/ %
		反应前	反应后	
蛋白酶 K	0.87	11.73	10.63	19.33
碱性蛋白酶	0.44	11.73	10.64	9.78
蛋白酶 K-碱性蛋白酶	1.04	11.73	10.42	23.11
碱性蛋白酶-蛋白酶 K	1.24	11.73	10.42	27.55

表 3 SN-TCA 指数法测定玉米醇溶蛋白水解度
Tab.3 Enzymatic hydrolysis degree of zein determined by SN-TCA method

加酶顺序	$D_{277\text{ nm}}$	SN-TCA 指数 ¹⁾ / %
蛋白酶 K	1.000	34.49
碱性蛋白酶	0.490	16.90
蛋白酶 K-碱性蛋白酶	1.250	43.12
碱性蛋白酶-蛋白酶 K	1.005	34.67

1) SN-TCA 指数:代表水解程度.

3 讨论与结论

随着 Evans 等^[12]在 20 世纪 40 年代开始研究玉米醇溶蛋白的提取,目前醇溶蛋白的研究已经在多种材料上展开,如水稻、椰子、小麦、高粱等,提取的试剂也很多,如乙醇、乙二醇、异丙醇等^[13-15]. 考虑到后续产品的食用价值,本试验采用乙醇提取. 根据玉米醇溶蛋白提取的统计结果分析,提取玉米醇溶蛋白的最佳工艺条件为 A₃B₃C₂D₁,即料液比 1:4 (g/mL),60 ℃水浴加热,乙醇体积分数为 75%,提取 3 h. 料液比对提取效果影响最大,其次是温度和乙醇体积分数,时间对提取效果的影响程度在 4 个因素中最小. 温度为 60 ℃时提取效果最好,比 50 ℃稍高,较 40 ℃时有显著提高;提取 1 h 的效果最差,2 和 3 h 的提取效果接近;乙醇体积分数为 75% 时的提取率最高,比体积分数为 65% 时的提取率稍高,85% 乙醇的提取效果最差;料液比 1:6 和 1:8 的提取效果接近,料液比为 1:4 时提取效果有显著提高. 玉米醇溶蛋白质量浓度可达 15.688 mg · mL⁻¹.

由于醇溶蛋白的溶解特性,以及色氨酸含量很

少,因此醇溶蛋白的酶解产物快速检测比较困难,最常用的方法为 pH-stat 法和 SN-TCA 指数法. 本研究发现,双酶解效果比采用单一酶水解效果好,先加蛋白酶 K 后加碱性蛋白酶与先加碱性蛋白酶后加蛋白酶 K 的水解度分别达到 23.11%、27.55% (pH-stat 法)和 43.12%、34.67% (SN-TCA 指数法). 根据 pH-stat 法测定的双酶水解的水解度相差不大,而采用 SN-TCA 指数法测得先加蛋白酶 K 后加碱性蛋白酶的水解效果更明显. 故采用两步酶解法可明显提高玉米蛋白水解反应的水解度,两步酶解的加酶顺序为先加蛋白酶 K 然后加碱性蛋白酶. 该研究为进一步利用玉米醇溶蛋白生产高附加值的短肽提供参考数据.

参考文献:

[1] 栾新红,曹中赞,曹敏建,等. 玉米蛋白多肽对豁眼鹅血清离子水平及肉品质的影响[J]. 中国家禽,2012,34(1):11-14.

[2] 吴建平. 抗消化淀粉的研究进展及其应用前景[J]. 食品与发酵工业,1998,25(2):66-70.

[3] 王雄,吴正奇,万端极,等. 膜酶结合制备玉米多肽的工艺研究[J]. 科学技术与工程,2013,13(7):2000-2003.

[4] 王梅,谷文英. 酶解黄粉蛋白制备可溶性肽[J]. 粮油食品科技,1999,9(1):1-3.

[5] 赵国华,陈宗道,王光慈,等. 改性对玉米蛋白质功能性质和结构的影响(I):酶解[J]. 中国粮油学报,2006,15(3):28-30.

[6] 赵华,张英华. 玉米醇溶蛋白制备与应用研究进展[J]. 粮食与饲料工业,2006(12):16-17.

[7] 段纯明,董海洲,侯汉学,等. 生物降解材料-玉米醇溶蛋白提取工艺的优化研究[J]. 包装与食品机械,2008,26(3):1-6.

[8] 徐英操,刘春红. 蛋白质水解度测定方法综述[J]. 食品研究与开发,2007,28(7):173-176.

[9] 檀志芬,生庆海,邱泉若,等. 蛋白质水解度的测定方法[J]. 分析检测,2005,26(7):174-176.

[10] 范远景,姬莹莹,张焱. 大豆蛋白酶解肽的分子量分布及抑制 ACE 活性关系研究[J]. 食品科学,2007,28(10):57-61.

[11] 袁斌,吕桂善,刘小玲. 蛋白质水解度的简易测定方法[J]. 广西农业生物科学,2002,21(2):113-115.

[12] EVANS C D, MANLEY R H. Ternary solvents for zein[J]. Ind Eng Chem,1944,36(5):408-410.

[13] 蒋冬花,杨宝峰,蔡敏杰,等. 水稻醇溶蛋白提取条件和总含量分布[J]. 浙江农业学报,2007,19(3):174-178.

[14] 郑亚军,李艳,赵松林,等. 椰肉中醇溶蛋白抗氧化活性[J]. 热带作物学报,2009,30(7):1035-1038.

[15] 王伟,印丽萍,刘许佳,等. 种子醇溶蛋白提取及检测条件探索[J]. 西北植物学报,2007,27(1):21-27.

【责任编辑 李晓卉】