



# 米糠蛋白提取工艺优化及 分离纯化

白莉, 杨忠亮, 接伟光  
(黑龙江东方学院, 哈尔滨 150080)

**摘要:** 米糠蛋白作为一种新型蛋白质资源, 广泛用于改善食品的营养和结构。细胞破壁酶类对米糠蛋白提取有重要作用, 从中选取纤维素酶为最佳酶类, 并确定了该酶的最佳用量以及最适反应条件, 在最适条件下, 蛋白提取率为 43.93%。并先后经 DEAE-52 阴离子交换及 SephadexG-75 凝胶过滤层析对米糠粗蛋白进行纯化, SDS-聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)检测纯化效果明显, 为相对分子量 20.0 ku 的一种蛋白质。

**关键词:** 米糠蛋白; 分离; 纯化; 分子量

中图分类号: Q 503

文献标志码: A

文章编号: 1005-9989(2010)05-0173-04

## Extracting and purification of rice bran protein

BAI Li, YANG Zhong-liang, JIE Wei-guang

(Heilongjiang Oriental College, Harbin 150080)

**Abstract:** Rice bran protein as a new type of protein resources is widely used to improve food nutrition and structures. Cell wall enzymes on the extraction of rice bran protein plays an important role, selects cellulose is the best enzyme and determines the best dosage of enzyme and optimum reaction conditions. In optimum conditions, the protein extraction rate is 43.93%. And successively by DEAE-52 anion-exchange and SephadexG-75 gel filtration chromatography purifies the crude rice bran protein, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) tests the effective of purification, the relative molecular of the protein is 20.0 ku.

**Key words:** rice bran protein; extracting; purification; molecular

米糠是稻谷脱壳后依附在糙米上的表面层, 是一种廉价、利用率低但营养丰富的稻米加工副产品。中国是世界上最大的稻米生产国, 年产量约为 1.85 亿 t, 米糠作为大米加工的副产品, 可利用资源相当丰富<sup>[1]</sup>, 但米糠的综合开发利用及相应理论研究仍处于较低水平。米糠蛋白的营养价值虽高, 但过去仅作为饲料应用, 造成极大的浪费, 如能将米糠中的蛋白质和其他营养成分提取出来, 经济效益将非常可观<sup>[2]</sup>。

因此寻找一种米糠蛋白的最佳水解提取工艺, 探索一种实用、高效的米糠蛋白的分离、纯化方法是十分必要的。并测定其分子量, 为进一步研究米糠蛋白的结构和组成提供一定的理论基础和实验依据, 为深度开发米糠产品带来巨大经济效益作良好铺垫。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

收稿日期: 2009-08-26

作者简介: 白莉(1980-), 硕士, 讲师, 研究方向为生化与分子生物学。



新鲜粗米糠(蛋白质含量约为14.0%),经60目筛子除杂质,向过筛米糠中以1:6的比例加入乙醚:石油醚(1:1)的混合液,室温下搅拌3 h,4000 r/min离心10 min,沉淀在通风橱中室温晾干,得脱脂米糠为实验材料。

## 1.2 方法

1.2.1 米糠蛋白的提取 脱脂米糠5 g→加缓冲液50 mL(料液比1:10)→适当温度搅拌→加酶→反应一定时间→灭酶(60 °C、30 min)→离心(3000 r/min、30 min)→收集上清液→测蛋白质含量。

1.2.2 细胞破壁酶选择 利用细胞破壁酶处理,可以降解植物细胞壁的纤维素成分,使细胞壁内有效成分释放,提高细胞内蛋白的提取率。根据表1比较蛋白质提取率,从中选出最佳细胞破壁酶。

表1 不同细胞破壁酶水解条件

酶的种类	pH	温度/°C	[E]/[S]/%	[S]/%	时间/h
空白对照	-	50	2	10	2
α-淀粉酶	6.0	50	2	10	2
纤维素酶	5.0	50	2	10	2
果胶酶	4.0	35	2	10	2

1.2.3 米糠蛋白的纯化 DE-52纤维素阴离子交换层析初步纯化:DE-52纤维素经0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.1)平衡缓冲液室温平衡24 h后装柱,在装柱过程中不断搅拌使得柱床面平整。用平衡缓冲液平衡12 h,流速为3 mL/min<sup>[4]</sup>。

将3 mL米糠蛋白粗提液缓慢上样,先用平衡缓冲液以3 mL/min的流速洗脱,编号收集各蛋白。冲洗至基线后,接着用含0.1 mol/L NaCl、0.5 mol/L NaCl的平衡缓冲液分段洗脱<sup>[5]</sup>,编号收集流出液。测OD<sub>280</sub>,电泳检测。取浓度最高的峰,合并相应管,备用。

Sephadex G-75凝胶过滤层析柱再次纯化:Sephadex G-75用0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.1)平衡缓冲液<sup>[5]</sup>平衡后装柱,将经纤维素DE-52层析纯化后合并的样品上样。以0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.1)平衡缓冲液0.5 mL/min的流速进行洗脱<sup>[6]</sup>。编号收集各蛋白,每管收集3 mL,冲洗至基线后则停止。分别测OD<sub>280</sub>,有两个吸收峰。

蛋白质样品浓度的测定:大多数蛋白质在280 nm波长处最大光吸收,这是由于蛋白质中有Tyr、Trp和phe存在的缘故,利用这个特征性吸收,可以计算蛋白质的含量<sup>[7]</sup>。如果没有干扰物的存在,在280 nm处的吸收可用于测定0.1~0.5 mg/mL含量的

蛋白质溶液。部分纯化的蛋白质常含有核酸,核酸在260 nm波长处有最大吸收。有核酸时,所测得的蛋白质浓度必须作适当校正,一般按下述公式计算:

$$\text{蛋白质浓度(mg/mL)} = 1.45A_{280} - 0.74A_{260}$$

SDS-PAGE测纯化蛋白相对分子量以及纯化结果:借鉴生化实验技术<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞破壁酶的选择

为了比较各种细胞壁酶对蛋白质提取的效果,筛选出合适的提取用酶,分别采用α-淀粉酶、纤维素酶、果胶酶对米糠进行水解,比较蛋白质提取率,结果如表2所示。

表2 不同细胞破壁酶对蛋白质提取率的影响

酶类	蛋白质提取率/%
空白对照	12.79
α-淀粉酶	37.85
纤维素酶	43.93
果胶酶	30.73

添加不同的细胞破壁酶均可以提高米糠中蛋白的提取率。由于米糠细胞壁的主要成分为纤维类物质,它们与一些蛋白质通过氢键紧密缠绕在一起,阻碍了酶的水解作用,使这些蛋白质无法溶出。而其他成分含量较少,因此纤维素酶对蛋白质提取率的影响最高,对于米糠是一种较好的细胞破壁酶。

### 2.2 纤维素酶提取米糠蛋白的单因素分析

2.2.1 pH对蛋白质提取率的影响 采用pH单因素实验,选用不同的pH对米糠进行水解,其他作用条件为:温度50 °C,[S]=10%,[E]/[S]=2%,时间2 h,实验结果如表3所示。

表3 pH对蛋白质提取率的影响

pH	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0
提取率/%	38.42	42.31	43.93	41.11	40.29

在pH4.0~5.0范围内,随pH的升高,蛋白质的提取率呈上升趋势,在pH5.0时,蛋白质提取率最大,为43.93%。随后再随pH值的升高,蛋白质提取率基本没有多大变化。

2.2.2 温度对蛋白质提取率的影响 采用温度单因素实验,选用不同温度对米糠进行水解,其他作用条件为:pH5.0,[S]=10%,[E]/[S]=2%,时间2 h,实验结果如表4所示。

米糠淀粉的糊化温度为58~61 °C,为防止淀粉

表4 温度对蛋白质提取率的影响

温度/℃	30	40	50	60	70
提取率/%	30.74	35.28	43.93	28.02	24.90

在蛋白质提取过程中糊化溶出,提取温度应控制在50℃以下。从表4中可以看出,纤维素酶的最适作用温度50℃,所以酶解温度应控制在45~50℃,以便充分发挥酶的活力。

2.2.3 酶用量对蛋白质提取率的影响 采用酶用量单因素实验,选用不同酶用量对米糠进行水解,其他作用条件为:pH5.0,温度50℃,[S]=10%,时间2h,实验结果如表5所示。

表5 酶用量对蛋白质提取率的影响

[E]/[S]/%	1	2	3	4	5
提取率/%	39.80	43.93	41.67	42.86	42.98

在米糠蛋白提取过程中,添加适量的纤维素酶可以提高蛋白质的提取率。当添加量为由1%增加到2%时,蛋白质提取率增幅很大,当从2%到3%时,随添加量的增加,蛋白质提取率反而下降,可能随添加量的增加,溶解在米糠水解液中的可溶性纤维含量也有所增加,导致最终的蛋白质提取率下降。当添加量由3%增加到5%时,蛋白质提取率只有缓慢的增加,所以2%为纤维素酶的最适添加量。

2.2.4 时间对蛋白质提取率的影响 采用时间单因素实验,选用不同时间对米糠进行水解,其他作用条件分别为:pH5.0,温度50℃,[S]=10%,[E]/[S]=2%,实验结果如表6所示。

表6 时间对蛋白质提取率的影响

时间/h	1	2	3	4
蛋白质提取率/%	36.77	43.93	45.98	46.02

在米糠蛋白提取过程中,随着时间的延长,蛋白质的提取率呈增加趋势。当时间为2h时,蛋白质的提取率为43.93%,虽然3~4h能加大提取率但效果不明显,从节约时间和能源的角度看选择2h为最适反应时间。

### 2.3 米糠蛋白的分离纯化

2.3.1 粗蛋白的纤维素DE-52阴离子交换层析纯化 米糠蛋白粗提液经纤维素DE-52阴离子交换层析柱分离时,因为米糠蛋白在pH7.1时,带负电荷,用DE-52纤维素柱层析分离时被交换上,不存在于流出液中,当换用含NaCl的洗脱液洗脱时,氯离子能将交换上的米糠蛋白置换下来,所以米糠蛋白存在于洗脱液中,收集的洗脱峰即为初步纯化含有目的蛋白的样品。用紫外分光光度计检测流

出液,得到3个流出峰,收集了77管,编号为1~77。然后用含0.1 mol/L NaCl的0.05 mol/L Tris-HCl (pH7.1)的平衡缓冲液继续洗脱,得到1个洗脱峰,收集了51管,编号78~128。接着换含0.5 mol/L NaCl的0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.1)的平衡缓冲液继续洗脱,得到1个洗脱峰,收集了81管,编号129~210。曲线如图1所示。

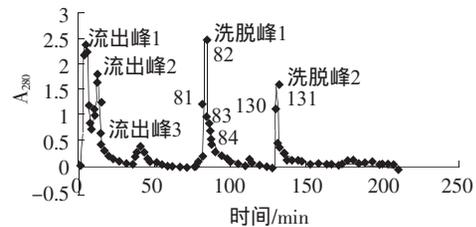
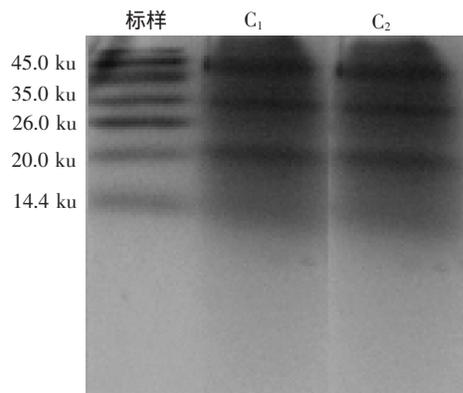


图1 粗蛋白在纤维素DE-52阴离子交换层析柱上的初步纯化

该曲线表明在收集的210个管子中81~84和130~131号富含大量的蛋白质。因为洗脱峰中的目的蛋白,所以将洗脱峰1中的81~84号管合并,编号C<sub>1</sub>,将洗脱峰2中的130、131号管合并,编号C<sub>2</sub>。为了解C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>中的蛋白质种类及含量多少,对C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>进行电泳检测,结果如图2所示。

图2 粗蛋白经纤维素DE-52阴离子交换层析收集合并的C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>样品电泳图

C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>二者极为相似,都有明显的3条带,只是C<sub>1</sub>的条带重,C<sub>2</sub>的条带轻,分子量也大致相同。电泳检测结果与曲线大致相符,洗脱峰的主峰分布在81~84、130~131号管处,并且主峰含有至少3类不同的量很大的蛋白质。为验证电泳结果的可靠性,测定合并后蛋白质的OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>、体积,计算蛋白质含量,结果如表7所示。

表7 纤维素DE-52阴离子交换层析样品蛋白含量

合并的样品	合并后命名	总体积/mL	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	蛋白质量/mg
81~84	C <sub>1</sub>	19	2.468	2.483	33.7066
130、131	C <sub>2</sub>	5.5	1.614	1.367	4.3328



根据表7可以看出,其中C<sub>1</sub>蛋白质含量较多,C<sub>2</sub>蛋白质含量较少,与层析和电泳结果相符。

2.3.2 Sephadex G-75凝胶过滤层析柱进行再次纯化 将通过纤维素DE-52阴离子交换层析纯化后得到的C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>蛋白质样品合并,总体积为24.5 mL,进一步通过SephadexG-75凝胶层析柱,利用分子排阻原理将不同分子量的蛋白分开。经凝胶层析后得到2个较为明显的洗脱峰,合并3-6号管,编号为G<sub>1</sub>、合并27、28号管,编号为G<sub>2</sub>。结果如图3所示。

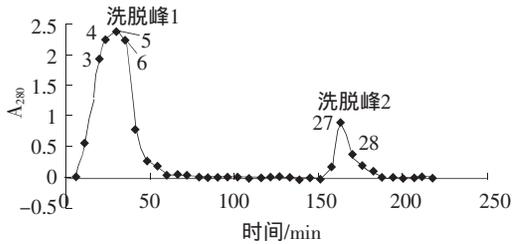


图3 Sephadex G-75凝胶过滤层析流出液

由于待纯化的蛋白质分子量较小,所以该蛋白质洗脱时间应较长,所以目的蛋白应存在于G<sub>2</sub>洗脱峰中。为了解G<sub>2</sub>中的蛋白质种类及含量,对G<sub>2</sub>进行电泳检测,电泳结果如图4所示。

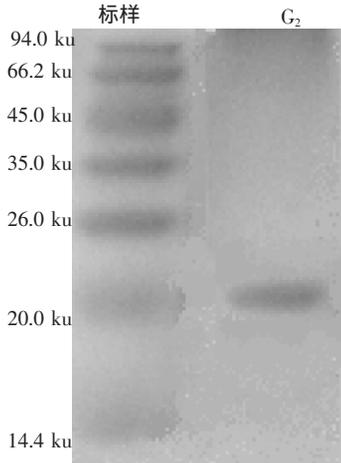


图4 SephadexG-75凝胶过滤后洗脱峰G<sub>2</sub>样品电泳图

从图4可看出,过柱后得到一条相对分子量约

表8 Sephadex G-75凝胶过滤层析样品蛋白含量

合并样品	合并命名	总体积/mL	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	蛋白质含量/mg
27、28	G <sub>2</sub>	13.8	0.486	0.404	5.5992

为20.0 ku的单带,证实经上述方法得到了一条纯度较高米糠蛋白G<sub>2</sub>。为验证电泳结果的可靠性,测定合并后蛋白质的OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub>、体积,计算蛋白质溶液含量,结果如表8所示。

### 3 结论

米糠蛋白是存在于稻米米糠中的蛋白质统称,具有很高的营养价值。通过本实验,首先对脱脂米糠进行酶解粗提,进一步采用DE-52阴离子交换层析、Sephadex G-75凝胶层析两种纯化方法,对米糠蛋白结合SDS-PAGE电泳分析,最终分离纯化到一种纯净蛋白质,并且经电泳检测为单一蛋白条带,相对分子量为20.0 ku,为后续纯化蛋白功能与性质研究做铺垫。

#### 参考文献:

- [1] 陈正行,等.米蛋白和米糠蛋白开发利用[J].粮食与油脂,2002,(4):6-9
- [2] 陈义勇,等.米糠和米糠蛋白的深度开发现状[J].粮食加工,2006,36:24-28
- [3] 赵东还,等.米糠蛋白提取工艺和功能性质评价[J].食品工业,2005,(5):9-11
- [4] 钟芳,张晓梅,麻建国.大豆肽的离子交换色谱分离及其活性评价[J].食品与机械,2006,(5):16-19
- [5] 张强,等.米糠抗氧化肽分离纯化研究[J].安徽科技学院学报,2008,22(1):29-33
- [6] 赵亚华.生物化学与分子生物学实验技术教程[M].北京:高等教育出版社,2005:179-180
- [7] 张洪渊.生物化学(第二版)[M].北京:化学工业出版社,2006:49-50
- [8] 蒋立科.现代生物化学实验技术(第二版)[M].北京:中国农业出版社,2003:242-244
- [9] 王雪飞.不同细胞破壁酶提取米糠蛋白的研究[J].西部粮油科技,2003,(3):34-36

全国中文核心期刊 食品行业的优秀伙伴  
 广告服务热线: 010-51816355  
 订阅热线: 010-67913893