

响应面法优化天然低共熔溶剂提取米糠蛋白工艺

刘伟麒, 邓媛元, 魏振承, 张雁, 唐小俊, 刘光, 周鹏飞, 张名位

Optimization of Rice Bran Protein Extraction Processing by Response Surface Methodology with Natural Deep Eutectic Solvents

LIU Weiqi, DENG Yuanyuan, WEI Zhencheng, ZHANG Yan, TANG Xiaojun, LIU Guang, ZHOU Pengfei, and ZHANG Mingwei

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2022100049>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于COSMO-RS方法筛选低共熔溶剂及银杏叶类黄酮提取工艺优化

COSMO-RS-Based Screening of Natural Deep Eutectic Solvents and Optimization of Flavonoids Extraction from *Ginkgo biloba* Leaves

食品工业科技. 2020, 41(17): 181-186 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.17.030>

超声辅助低共熔溶剂提取苹果叶中的总黄酮

Ultrasonic-assisted Deep Eutectic Solvents Extraction of Total Flavonoids from Apple Leaves

食品工业科技. 2020, 41(14): 134-139,147 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020.14.022>

响应面法优化米糠多酚的醇提工艺

Optimization of ethanol extraction technique of polyphenols from rice bran by response surface methodology

食品工业科技. 2017(16): 194-198 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.16.036>

响应面法优化面包果淀粉的酶法提取工艺

Optimization of Enzymatic Extraction Technology of Starch from Breadfruit by Response Surface Methodology

食品工业科技. 2020, 41(21): 139-144 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020010004>

响应面优化溶剂法提取马铃薯皮酚类物质的工艺

Optimization of extraction process for phenolic substance from potato (*Solanum tuberosum* L.) peel using response surface methodology

食品工业科技. 2018, 39(5): 209-213 <https://doi.org/>

响应面法优化金花葵花水溶性黄酮和总多糖提取工艺

Optimization of Extraction Technology of Water-soluble Flavonoids and Total Polysaccharides from *Aurea helianthus* Flower by Response Surface Methodology

食品工业科技. 2019, 40(15): 135-142 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.15.022>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

刘伟麒, 邓媛元, 魏振承, 等. 响应面法优化天然低共熔溶剂提取米糠蛋白工艺 [J]. 食品工业科技, 2023, 44(17): 194–201. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100049

LIU Weiqi, DENG Yuanyuan, WEI Zhencheng, et al. Optimization of Rice Bran Protein Extraction Processing by Response Surface Methodology with Natural Deep Eutectic Solvents[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(17): 194–201. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100049

· 工艺技术 ·

响应面法优化天然低共熔溶剂提取 米糠蛋白工艺

刘伟麒^{1,2}, 邓媛元¹, 魏振承¹, 张 雁¹, 唐小俊¹, 刘 光¹, 周鹏飞^{1,*}, 张名位^{1,*}

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 农业农村部功能食品重点实验室, 广东省农产品加工
重点实验室, 广东广州 510610;

2. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘 要: 本研究采用天然低共熔溶剂 (Natural deep eutectic solvents, NADES) 提取米糠蛋白的工艺并利用响应面方法对工艺参数进行优化, 且通过采用傅里叶红外光谱和投射扫描电镜分析对天然低共熔溶剂提取米糠蛋白进行表征。结果表明, 米糠蛋白提取最佳工艺条件为: 含有 4.7% 水分的脯氨酸-甘油 (摩尔比 2:5) 溶剂体系中, 米糠和溶剂料液比为 9:30 g/g, 水浴搅拌 3.0 h, 反应温度为 65 ℃, 此时米糠蛋白提取率为 82.69%, 通过采用傅里叶红外光谱分析发现提取米糠蛋白过程中没有生成新物质, 且天然低共熔溶剂能有效破坏米糠组织结构, 释放米糠蛋白, 从而提高米糠蛋白提取率。本研究为天然低共熔溶剂提取植物蛋白提供一定参考依据。

关键词: 天然低共熔溶剂, 米糠蛋白, 响应面法, 提取

中图分类号: TS201.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2023)17-0194-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022100049



本文网刊:

Optimization of Rice Bran Protein Extraction Processing by Response Surface Methodology with Natural Deep Eutectic Solvents

LIU Weiqi^{1,2}, DENG Yuanyuan¹, WEI Zhencheng¹, ZHANG Yan¹, TANG Xiaojun¹, LIU Guang¹,
ZHOU Pengfei^{1,*}, ZHANG Mingwei^{1,*}

(1. Sericultural & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of
Functional Foods, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products
Processing, Guangzhou 510610, China;

2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this text, rice bran protein (RBP) was extracted from rice bran using natural deep eutectic solvents (NADES), as well as the extraction processing of parameters were systemically optimized. RBP was characterized by fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and scanning electron microscopy (SEM). Results showed that, the optimization extraction of RBP parameters were carried out as follows: Proline-glycerol (molar ratio 2:5), 4.7% of water in system, solid-liquid ratio of 9:30 g/g for rice bran to NADES, reaction temperature at 65 ℃ for 3.0 h. The maximum extraction efficiency of RBP was 82.69% under the aforementioned conditions. The new chemical compound in the extraction processing of RBP were not able to be observed in terms of FTIR. The micrograph structure of rice bran was effectively damaged as shown in SEM, which might be a reasonable answer for the better extraction efficiency of RBP in NADES. The results in the present work

收稿日期: 2022-10-09

基金项目: 广东省财政厅专项 (粤财农〔2022〕167号, 粤财农〔2021〕170号); 广州市基础与应用基础研究项目 (202201010605); 广东省现代农业产业
共性关键技术研发创新团队建设项目 (2023KJ117); 科技创新战略专项资金 (高水平农科院建设) (R2018PY-JC002, R2020QD-40)。

作者简介: 刘伟麒 (1998-), 男, 硕士, 研究方向: 粮油加工及副产物综合利用, E-mail: weiqi657657@163.com。

*** 通信作者:** 周鹏飞 (1987-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 粮油加工及副产物综合利用, E-mail: pfzhougz@foxmail.com。

张名位 (1966-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 粮油加工与功能食品, E-mail: mwzh@vip.tom.com。

guided for extraction of plant-based proteins with a designed NADES.

Key words: natural deep eutectic solvents; rice bran protein; response surface methodology; extraction

米糠(Rice bran, RB)是稻米精炼加工生成的副产物,是一种丰富的可再生资源。我国米糠资源总量一直位列世界之首,年产量至少可达 1400 万吨。米糠富含碳水化合物、膳食纤维、维生素、蛋白质、 γ -谷维素等生物活性成分,占稻米总营养的 64%,且均为人体必须营养素^[1-2]。

米糠蛋白(Rice bran protein, RBP)在米糠营养物质中占 10%~15%^[3],其必需氨基酸组成完美契合世界卫生组织建议的最佳模式,且具备丰富的赖氨酸^[4]。目前,深度开发 RBP 产品是米糠高值化利用研究的热点之一。然而,RBP 在米糠中存在状态非常复杂,RBP 中的二硫键使蛋白质发生高度聚合,导致 RBP 提取率低^[5]。目前提取 RBP 的方法主要有碱法制备 RBP^[6-8]、酶法制备 RBP^[9] 以及物理法制备 RBP^[10-12]。碱法制备 RBP,较高的 pH 会导致蛋白质结构被破坏、产生不良风味、色泽发生较大变化等不良作用^[13];物理法能够有效减少对米糠蛋白结构的破坏,但物理方式提取率较低^[14];酶法制备 RBP 则是通过蛋白酶裂解米糠细胞壁,使部分蛋白质暴露,降低了碱溶时间,减少有毒物质的生成和蛋白褐变,但酶制剂因价格昂贵限制运用于实际生产^[15]。因此,寻找一种高效便捷、绿色环保的提取方法制备 RBP 对促进其工业化进程具有重要意义。

天然低共熔溶剂(Natural deep eutectic solvents, NADES)是一种新型溶剂^[16],其组成成分是由生物体内代谢产物如有机酸类、氨基酸类、醇类、胆碱衍生物、糖类等充当氢键供体(HBD)或氢键受体(HBA),按照一定比例混合制备且在室温下呈均匀稳定的液体^[17]。与传统试剂相比,NADES 具有廉价易得,无毒无害,可生物降解等优势^[18],在天然物质的分离及提取^[19-20]、油脂精炼^[21-22] 等方面具有广泛的应用价值。研究表明 NADES 在植物蛋白质、动物蛋白质、酶及氨基酸的提取等方面有显著效果,如 Lin 等^[23] 采用氯化胆碱-尿素 NADES 体系提取沙棘籽粕中的蛋白质相较于传统碱提法其氨基酸含量更高,且具有更好的体外消化率;Ester 等^[24] 通过高压放电并结合 NADES 提取石榴籽中的蛋白质和多酚,发现 NADES 可以提高蛋白质和多酚的提取效率;Pang 等^[25] 通过采用由氯化胆碱-聚乙二醇来组成的 NADES 并结合钠盐建立水性双相系统用于提取牛血清白蛋白以及木瓜蛋白酶,发现两者蛋白提取率分别为 95.16% 和 90.95%;同时有研究发现采用不同组分的 NADES 提取蛋白并不会改变蛋白质的结构,再次证实了 NADES 水性两相体系提取蛋白的有效性^[26]。基于有关天然低共熔溶剂在提取植物蛋白质中具有较好优势的启发,选择环境友好、安全的绿色新型溶剂用于米糠蛋白的提取可实现米糠资源的高值化利用,而

且 NADES 具有一定的酸碱性能有效破坏米糠组织结构,提升米糠蛋白提取效率,同时提取过程温和,不生成其他组分^[27]。

本文通过设计不同组分 NADES 及采用不同提取工艺对米糠蛋白提取,筛选出提取率优势明显的 NADES 溶剂并建立其提取工艺,最后以料液比、反应温度、含水量以及提取时间开展单因素实验及响应面优化,确定最优工艺参数,进一步获得高提取率的米糠蛋白,并对 NADES 提取米糠蛋白进行表征,为天然低共熔溶剂在开发米糠资源利用方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

米糠 广东海纳农业有限公司;氯化胆碱、L-脯氨酸、甜菜碱、无水苹果酸、DL-乳酸、乙醇酸、乙二醇、甘油、木糖醇、尿素、乙酰胺 均购买自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

MILLI-Q 超纯水处理系统 Millipore 公司;SQP 电子天平 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;N-1300V-WB 旋转蒸发仪 上海爱郎仪器有限公司;Cytation™ 5 酶标仪 美国 Bio Tek 公司;SH10A 水分计 上海菁海仪器仪表有限公司;FiveEasy Plus™ FE28 pH 计 梅特勒-托利多仪器有限公司;AquaLab 4 TEV 水分活度仪 山东立博迪科学仪器股份有限公司;AR 1500EX 流变仪 美国 TA 仪器;SB-800 DTD 超声清洗机 宁波新芝生物科技股份有限公司;DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器 巩义市予华仪器有限责任公司;Allegra 64R 台式高速大容量离心机 贝克曼库尔特有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 天然低共熔溶剂的制备 通过称取一定质量的氢键受体和氢键供体,按特定摩尔比例混合,并在旋转蒸发仪上以 80 ℃ 的条件旋蒸至形成稳定透明液体。10 种溶剂具体组成如下表 1 所示。

表 1 天然低共熔溶剂的制备

Table 1 Preparation of NADES

分类	序号	组成(HBA-HBD)	简称	摩尔比(HBA-HBD)
有机酸类	1	氯化胆碱-苹果酸	CMa	1:1
	2	氯化胆碱-乳酸	CLa	1:2
	3	氯化胆碱-乙醇酸	CGa	1:2
多元醇类	4	氯化胆碱-乙二醇	CEG	1:2
	5	氯化胆碱-甘油	CG	1:2
	6	氯化胆碱-木糖醇	CX	1:1
胺类	7	氯化胆碱-尿素	CU	1:2
	8	氯化胆碱-乙酰胺	CA	1:2
氨基酸类	9	脯氨酸-乳酸	PLa	1:1
	10	脯氨酸-甘油	PG	2:5

1.2.2 米糠蛋白的提取 对照组模式体系为精确称取 4 g 米糠,与 30 g 蒸馏水混合均匀,用 1 mol/L NaOH 调至 pH 至 10.0。实验组模式体系为精确称取 4 g 米糠,加入 30 g NADES 于 50 ℃ 水浴恒温提取 2 h, 10000 r/min 离心 5 min,收集上清液作为待测液,以上提取过程作为模式体系。同时本研究采用超声和水浴搅拌两种处理方式考察对米糠蛋白提取的影响,6 种处理方法具体过程如下:方法 1-水浴提取 2 h;方法 2-超声提取 2 h(50 ℃、180 W);方法 3-先水浴提取 30 min,再超声提取 30 min,循环操作 2 次;方法 4-先超声提取 30 min,再水浴提取 30 min,循环操作 2 次;方法 5-先水浴提取 60 min,再超声提取 60 min;方法 6-先超声提取 60 min,再水浴提取 60 min。每组实验平行操作 3 次。

1.2.3 提取米糠蛋白单因素实验与响应面优化

1.2.3.1 提取米糠蛋白单因素实验 根据上述条件设计综合考量,选取最适的 NADES 对米糠蛋白进行提取。同时对样品处理的条件为提取温度 50 ℃、提取时间 2 h、含水量为 4%,以此考察米糠/NADES 料液比(4:30、5:30、6:30、7:30、8:30、9:30 g/g)对 RBP 提取率的影响;对样品处理的条件为提取温度 50 ℃、提取时间 2 h、料液比为 9:30,以此考察 NADES 体系含水量(1%、2%、3%、4%、5%)对 RBP 提取率的影响;对样品处理的条件为提取温度 50 ℃、含水量 4%、料液比为 9:30 g/g,以此考察提取时间(1、2、3、4、5 h)对 RBP 提取率的影响;对样品处理的条件为提取时间 2 h、含水量 4%、料液比为 9:30 g/g,以此考察提取温度(40、50、60、70、80 ℃)对 RBP 提取率的影响。其中,探究每组实验平行操作 3 次。

1.2.3.2 响应面试验优化提取米糠蛋白提取条件 由单因素实验 1.2.3.1 的结果,选取提取时间(A)、提取温度(B)和 PG 含水量(C)为 3 个显著性因素,各因素综合考虑米糠蛋白提取率最高因素,且实验室前期发现,以各单因素最高点并延后两个梯度点,在该条件下同时可以提取米糠酯酶,酯酶活性较高^[28],故选取提取时间为 4%、含水量为 4% 以及提取温度为 70 ℃ 通过 Box-Behnken Design(BBD)实验进一步确定最优提取工艺,具体设计如表 2,每组实验平行操作 3 次。

表 2 BBD 的因素及水平
Table 2 Variables and levels of Box-Behnken Design

因素	名称	水平		
		-1	0	+1
A	提取时间(h)	3	4	5
B	含水量(%)	3	4	5
C	提取温度(℃)	60	70	80

1.2.4 米糠蛋白质提取率的测定 RBP 浓度的测定采用 Bradford^[29] 法。

标准曲线的绘制:采用考马斯亮蓝 G-250 染料

试剂盒中方法进行梯度稀释,检测时分别在 96 孔板加入 5 μL BSA 和 200 μL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,混匀,2 min 后在 595 nm 下测定吸光值。每组三次平行实验。以蛋白浓度和对应的吸光值绘制标准曲线^[29],结果公式为 $y=0.0431x+0.039$,决定系数为 $R^2=0.999$ 。

蛋白浓度的测定:NADES 富集相中的 RBP,按照上述方法测定蛋白质的浓度。不同条件下改变样品稀释倍数确保测定结果的准确性。每一样品组均设立相应的空白组,同时设立对照组,减少 NADES 对吸光度测定的干扰。

蛋白提取率的计算:参照 GB 5009.5-2016 中凯氏定氮法测定米糠中蛋白质的含量。NADES 提取 RBP 的提取率按照公式(1)算:

$$\text{蛋白质的提取率(\%)} = \frac{\text{NADES富集相的RBP含量}}{\text{RBP的含量}} \times 100$$

式(1)

1.2.5 天然低共熔溶剂提取米糠蛋白的表征

1.2.5.1 红外(Fourier transform infrared, FT-IR)测定

水处理组精确称取 4 g 米糠,与 30 g 蒸馏水混合均匀,用 1 mol/L NaOH 调至 pH 至 10.0,经反应后将样品以 8000 r/min 转速离心 10 min 后取上清液;PG 处理组采用 4 g 米糠与 30 g PG 试剂在由响应面实验确定的最佳工艺条件进行反应后以 8000 r/min 转速离心 10 min 后取上清液;PG 试剂组为 1.2.1 方法制备的 PG 溶剂。

将三组样品进行傅里叶红外光谱检测,观察在提取蛋白质过程中蛋白质与 NADES 之间是否存在相互作用。参考 Zhou 等^[30]的方法,探究 NADES 的傅里叶红外光谱扫描 500~4000 cm^{-1} 范围内的吸收图谱。

1.2.5.2 扫描电镜(Scanning electronic microscopy, SEM)检测

对未处理米糠、对照组提取后残渣及 NADES 溶剂处理后残渣进行了表面形貌分析。样品处理如下:未处理的米糠和对照组提取后残渣用正己烷脱脂,风干水分得待测样品。NADES 溶剂提取后的残渣取适量,用超纯水清洗残留溶剂,至清洗液 pH 至 7.0,再风干水分,即得提取后残渣待测样。将风干后的样品用导电胶固定在载物台上,镀金后采用 JSM-IT100 InTouchScopeTM 扫描电子显微镜研究样品的结构。

1.3 数据处理

实验均进行三次平行实验,响应面实验设计和数据处理采用 Design expert 软件,实验结果以平均值±标准差表示。所有数据通过 SPSS 26 进行单因素方差的 Duncan 事后检验,图中小写字母标识相同溶剂不同方法之间的显著性差异($P<0.05$),大写字母标识同种方法不同溶剂之间显著性差异($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 提取方法和天然低共熔溶剂的筛选

本实验比较了 NADES 体系中超声和水浴搅拌及两种方式结合的方法对 RBP 提取率的影响,由图 1

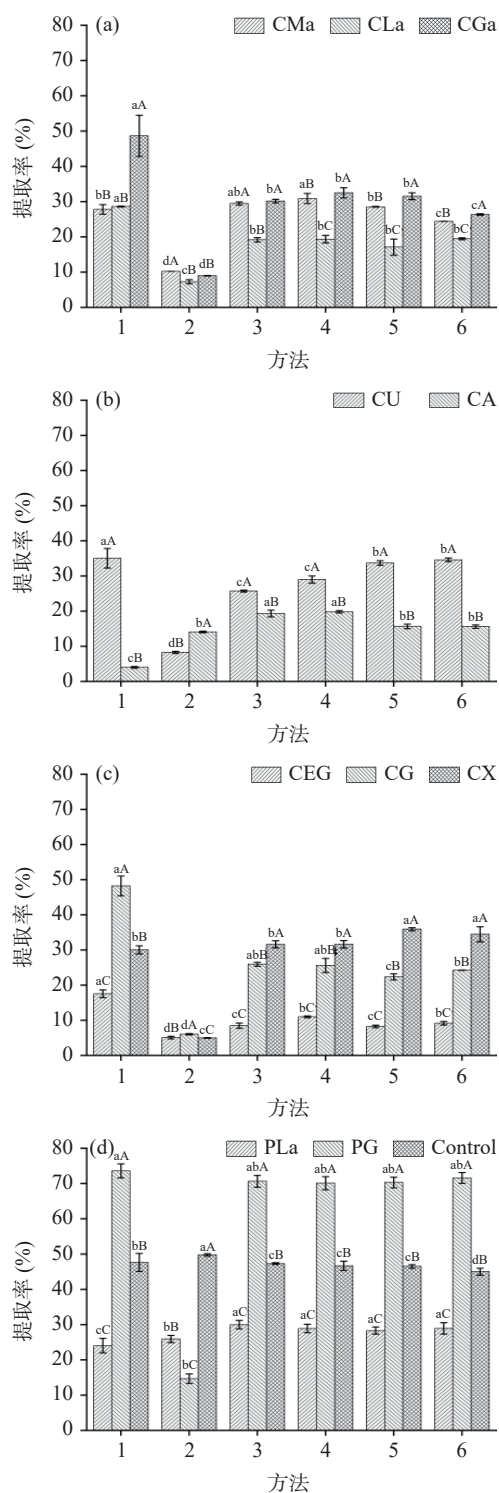


图 1 有机酸类(a)、胺类(b)、多元醇类(c)、氨基酸类(d) NADES 提取的 RBP 提取率

Fig.1 Extraction efficiency of RBP in organic acid (a), amine (b), polyols (c), amino acid (d)-based NADES

注: 不同大写英文字母表示不同溶剂提取数据差异显著, $P < 0.05$; 不同小写英文字母表示同一溶剂不同提取方法间数据差异显著, $P < 0.05$ 。

可知, 部分 NADES 采用水浴法提取其 RBP 提取率均高于其他方法, 其中 CGa、CU、CG、PG 体系通过水浴搅拌法 RBP 提取率分别达到 48.62%、35.06%、48.24% 以及 73.55%, 并且 PG 体系在除了超声方法处理组外其余方法组表现较好的提取效果, 故选取 PG 体系, 水浴搅拌法对后续样品组进行处理。

2.2 单因素实验

2.2.1 料液比对米糠蛋白提取的影响 由图 2 可知随着米糠添加量不断增加, RBP 的提取率在料液比为 8:30 g/g 时显著升高 ($P < 0.05$), 继续增加米糠量, RBP 提取率整体无明显变化, 当料液比为 9:30 g/g 时, RBP 提取率最高, 提取率为 73.55%。随着料液比增加, 能最大程度实现溶剂与米糠物料发生反应, 致使 RBP 提取率增高, 此后随着物料增加 PG-RB 体系搅拌愈发困难, 这导致米糠物料与溶剂之间接触不充分, 影响处理过程物料间传质, 故最终选择料液比为 9:30 g/g 进行下一步实验。

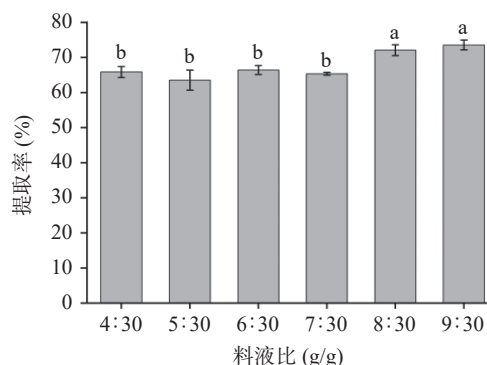


图 2 料液比(米糠/NADES)对 RBP 提取率的影响

Fig.2 Effect of material-liquid ratios (rice bran/NADES) on the extraction efficiency of RBP

注: 不同小写英文字母表示数据差异显著 ($P < 0.05$); 图 4~图 6 同。

2.2.2 天然低共熔溶剂的含水量对米糠蛋白提取的影响 由于 NADES 粘度较高, 在操作过程中存在局限性, 因此有必要降低 PG (526.4 mPa·s) 的粘度。添加少量水分能有效降低 NADES 的粘度^[31]。作者团队探究了不同含水量对 NADES 粘度的影响, 结果如图 3 所示。当在 50 °C 时, PG 溶剂粘度为 526.4 mPa·s,

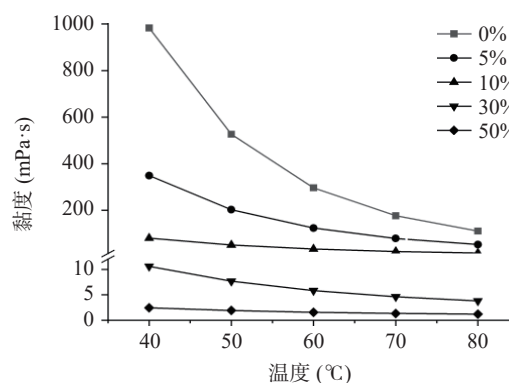


图 3 温度对不同含水量 PG 粘度的影响

Fig.3 Effect of temperature on the viscosity of PG with different water contents

含水量为 5% 时,其粘度降低到 202.4 mPa·s。研究发现,NADES 体系少量的水有利于维持其稳定结构,体系过多水分则会破坏溶剂本身氢键网络结构,其分子间相互作用减少,从而使 NADES 粘度降低^[32]。本文希望通过添加少量的水使得 NADES 粘度降低,与米糠物料充分发生反应,达到提高 RBP 提取率的目的,因此探究了不同含水量(0%、1%、2%、3%、4%、5%)对 RBP 提取率的影响。结果如图 4,在极低的含水量(0~3%)的 PG 中,蛋白质提取率显著增加($P<0.05$),这是因为水分含量的增加降低了 PG 的粘度,使得蛋白质的扩散速率大大增加^[33]。含水量继续增加后(4%~5%),蛋白质提取率开始降低,这是由于 NADES 粘度降低,氢键网络结构遭到破坏,PG 与蛋白质之间的相互作用减弱。故选择 3%~5% 含水量的 PG 溶剂进一步优化。

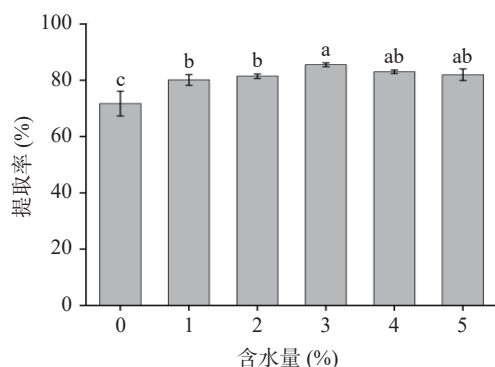


图 4 含水量对 RBP 提取率的影响

Fig.4 Effect of water content on the extraction efficiency of RBP

2.2.3 提取时间对米糠蛋白提取的影响 在料液比 9:30 g/g, PG 含水量为 4% 时,考察了处理时间对 RBP 提取率的影响,结果如图 5 所示。提取时间在 0.5~3 h 之间, RBP 提取率逐渐增加,说明在提取过程中,提取时间过短会导致提取不充分,影响 RBP 的提取率,而随着提取时间延长,NADES 与米糠物料充分反应, RBP 提取率显著增加。当反应时间为 3 h 时,到达 NADES 与该米糠料液比例达到最大反应速度,故 3 h 后 RBP 提取率无明显变化,选择 3~5 h 提取时间进一步优化。

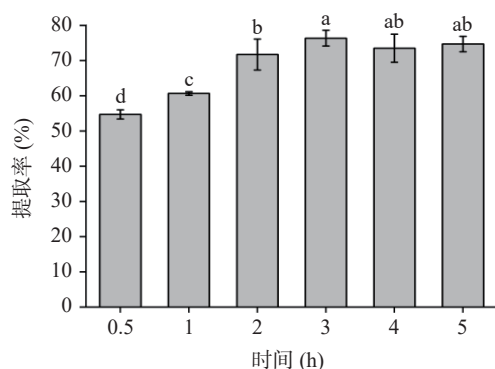


图 5 提取时间对 RBP 提取率的影响

Fig.5 Effect of extraction time on the extraction efficiency of RBP

2.2.4 反应温度对米糠蛋白提取的影响 在料液比 9:30 g/g, PG 含水量为 4% 以及处理时间为 3 h 时,研究了 40~80 °C 温度范围下对 RBP 提取率的影响。结果如图 6 所示,发现随着温度升高, RBP 提取率增高,这可能是温度增加了物料之间的传质有利于米糠蛋白的释放。温度到达 60 °C 后, RBP 提取率呈现降低的趋势,这可能是由于温度过高,提取的米糠蛋白发生变性,导致蛋白提取率降低。反应温度为 60 °C 时, RBP 的提取率最高,故选择 60~80 °C 进一步优化。

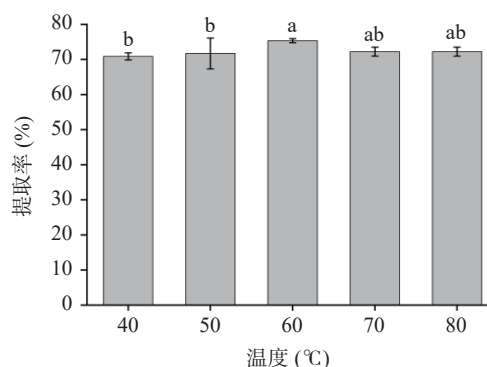


图 6 不同反应温度对 RBP 提取率的影响

Fig.6 Effect of different reaction temperatures on the extraction efficiency of RBP

综合考虑,并参照四个因素显著性分析结果,确定料液比为 9:30 g/g,选用含水量、温度以及时间 3 个因素进行后续响应面优化分析。

2.3 响应面优化试验

本团队研究发现采用 NADES 可以有效地提取米糠酯酶^[28],且效果较优,其单因素最优条件为料液比 9:30,提取时间 4 h,含水量 4%,反应温度为 70 °C,该条件均与天然低共熔溶剂提取米糠蛋白单因素实验最优条件无显著性差异,故将上述反应条件作为中心平行的实验方案。确定提取时间(A)、含水量(B)、提取温度(C)3 个水平,设定 3 因素 3 水平、5 次中心平行的实验方案,实验设计及米糠蛋白的提取率见表 3。通过 Design-Expert 10 软件对响应值进行二次响应面回归分析,结果见表 3。

经拟合回归后,得到米糠蛋白提取率相对各因素实际值的二次响应面回归方程为: $Y = 78.39 - 2.22A + 2.69B - 3.48C - 0.69AB - 1.16AC - 0.49BC - 0.031A^2 - 1.29B^2 - 3.03C^2$ 。回归方程分析表可知,米糠蛋白提取率的回归模型 $P < 0.0001$,表明回归方程具有很高的可靠性,结果有效。 R^2 和校正系数 $R^2_{\text{调整后}}$ 分别为 0.9994 和 0.9987。失拟项 $P = 0.063773 > 0.05$ 说明相对于纯误差不显著,该模型拟合程度高,实际值与预测值之间高度一致,实验结果误差对实验结果影响较小。根据回归方程分析结果(表 4)发现,提取时间和提取温度及其 P 值均为 < 0.0001 , F 值分别为 617.2028 和 7437.858,而含水量 P 值则为 0.0126, F 值为 11.09156,说明对米糠蛋白提取率影响最大的因素是提取温度,其次是提取时间,最后是含水量。

表 3 响应面试验设计与响应值
Table 3 Response design and results of experiment

实验号	A提取时间	B含水量	C提取温度	提取率(%)
1	1	-1	0	72.88
2	0	1	-1	80.73
3	0	0	0	78.20
4	-1	-1	0	76.03
5	1	0	-1	77.86
6	0	-1	-1	74.24
7	-1	0	-1	79.92
8	1	0	1	68.43
9	-1	0	1	75.12
10	0	1	1	72.94
11	0	0	0	78.46
12	1	1	0	76.75
13	-1	1	0	82.64
14	0	0	0	78.43
15	0	0	0	78.43
16	0	0	0	78.45
17	0	-1	1	68.39

2.3.1 响应面分析 根据二次响应面回归方程构建三维响应面图和等高线图,描绘不同因素对 RBP 提取率的影响及交互作用大小如(图 7)所示,提取时间和 PG 含水量之间的交互作用对米糠蛋白提取率影响最大,提取温度和 PG 含水量之间的交互作用次之。

2.3.2 验证实验 由软件 Design-Expert 10.0.1 结果显示最优条件为提取时间 3.0847 h,反应温度为 65.0807 ℃,含水量为 4.77451%,该条件下 RBP 提取率为 82.8438%。结合实际操作方便,后续验证实验确定最佳提取工艺为:提取时间为 3 h,反应温度为 65 ℃,含水量为 4.7%,在最佳实验条件下开展三

表 4 响应值的回归方程分析

Table 4 Analysis of variance (ANOVA) for hydrolysis activity

方差源	平方和	自由度	均方差	F值	P值	显著性
模型	250.55	9	1382.64	2590.81	<0.0001	***
A	39.56	1	1964.76	617.2028	<0.0001	***
B	57.89	1	2875.03	11.09156	0.0126	*
C	97.09	1	4822.06	7437.858	<0.0001	***
AB	1.88	1	93.22	596.7249	<0.0001	***
AC	5.36	1	266.16	0.019925	0.8917	
BC	0.94	1	46.73	116.7475	<0.0001	***
A ²	3.981E-003	1	0.20	134.9993	<0.0001	***
B ²	6.99	1	347.04	9.930107	0.0161	*
C ²	38.68	1	1920.81	4026.622	<0.0001	***
残差	0.14	7	2.60			
失拟项	0.093	3	1382.64	5.653402	0.063773	
纯误差	0.048	4	1964.76			
总和	250.70	16				

$R^2=0.9994$; $R^2_{\text{adj}}=0.9987$; $R^2_{\text{pred}}=0.9938$; C.V.%=0.19

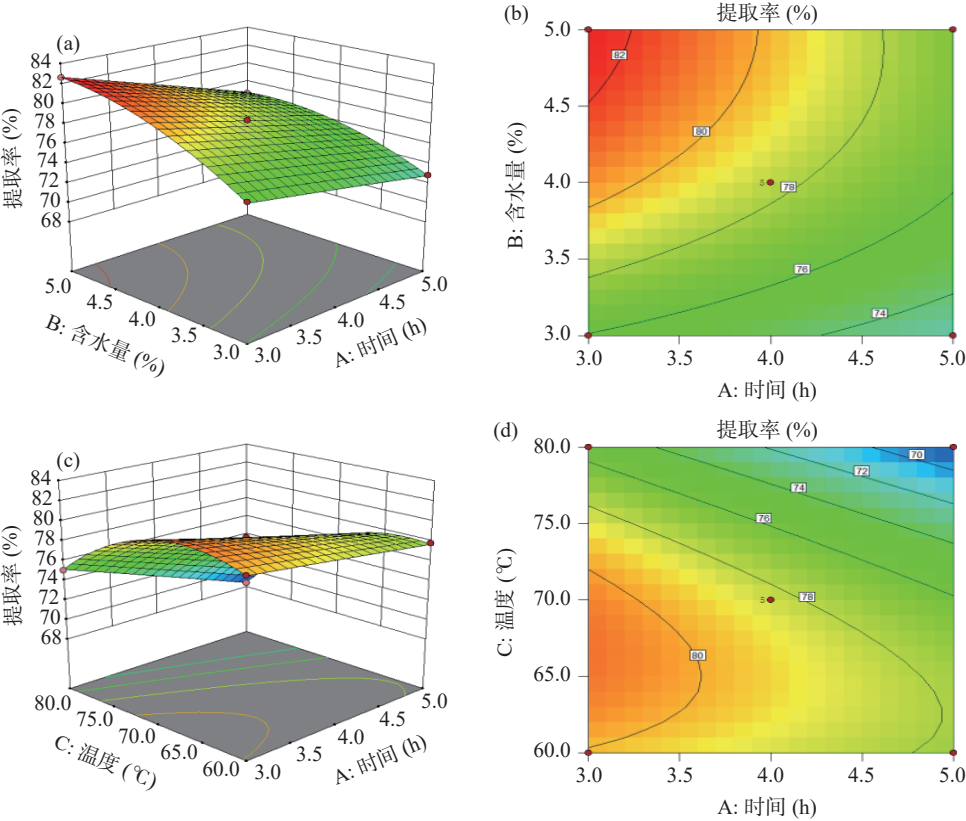
注:表中*表示 $P<0.05$,两者之间差异具有显著性;**表示 $P<0.01$,两者之间差异具有极显著性;***表示 $P<0.001$,两者之间差异具有非常显著性。

次平行实验,得到 PG 体系米糠蛋白提取率为 82.69%±1.02%,实验结果与上述预测值接近,说明该模型准确性良好。

2.4 天然低共熔溶剂提取米糠蛋白表征

采用 FT-IR 和 SEM 考察了萃取前后米糠及其残渣结构的变化,以初步探究 NADES 提取 RBP 的行为。

2.4.1 FT-IR 测定 两种处理组及 PG 的 FT-IR 分析光谱见图 8。PG 与 PG 处理组相对于水处理组在 3000~3700 cm^{-1} 处明显发现其振吸收范围变宽,



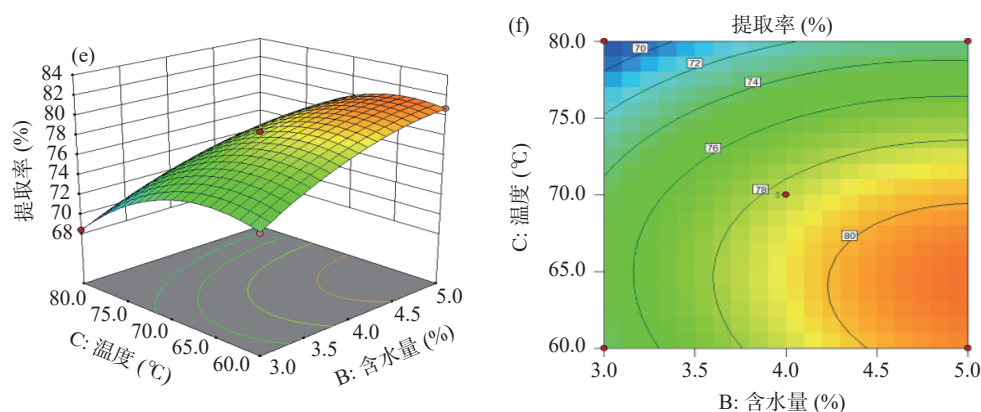


图7 提取温度、含水量及提取时间对RBP提取率的交互影响

Fig.7 Response surface of interaction of various factors for extraction yield of RBP

这表明了PG与PG处理组形成了氢键作用,且作用力更强。将PG和PG处理组进行光谱分析,发现提取前后光谱图像相似,没有出现新的峰,这表明提取过程中没有产生新成分。

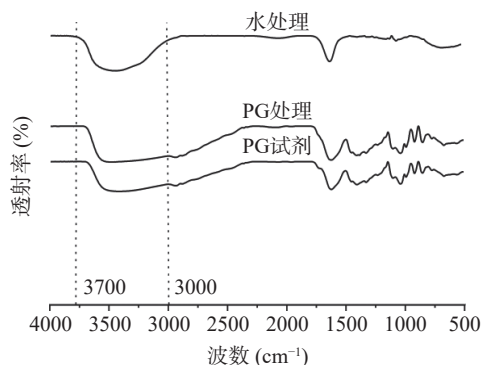


图8 对照组和PG提取后蛋白质富集相的FT-IR光谱

Fig.8 FT-IR spectra of the protein-enriched phases after extraction of control group and PG

2.4.2 SEM分析 通过采用SEM分析了米糠经过不同方法处理后的表面形貌,结果如图9。结果显示,水提取后的米糠表面平滑,微观结构完好,米糠表面形态没有发生明显变化;PG处理组的米糠微观结构明显被破坏,米糠内容物(如RBP)释放,说明PG

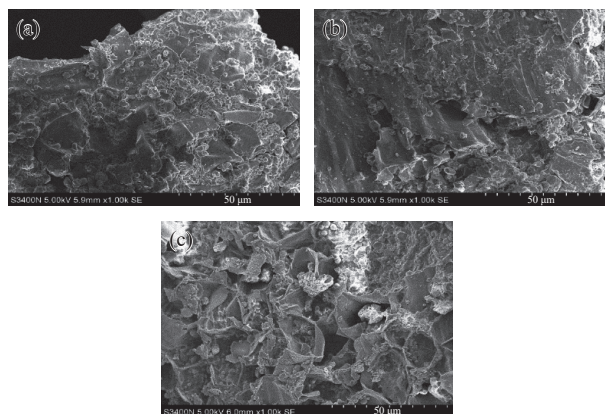


图9 米糠和米糠残渣的SEM(50 μm)

Fig.9 SEM of rice bran and rice bran residue (50 μm)

注:(a)未处理米糠;(b)对照组的米糠;(c)处理组的米糠。

溶剂对RBP的提取有显著作用,这与图1得出的结论一致。

由FT-IR和SEM数据可知,使用PG溶剂处理米糠,米糠细胞遭到破坏,米糠中RBP被大量释放,RBP提取效率增加,同时在反应过程中,PG溶剂并不会与RBP发生反应,仅作为溶剂参与RBP提取反应。

3 结论

本研究建立了一种NADES辅助水浴搅拌法提取米糠蛋白的工艺。通过单因素和响应面优化实验,得到最优工艺条件为:反应体系为脯氨酸-甘油(摩尔比2:5),米糠与溶剂料液比为9:30 g/g,含水量为4.7%,水浴搅拌3.0 h,反应温度为65℃,米糠蛋白提取率为82.69%±1.02%。相较于传统水提法,采用NADES提取能有效破坏米糠细胞,释放蛋白,且在反应过程中不会产生新组分。结果表明,NADES提取法具有简单、绿色环保且能高效提取米糠蛋白的优势。本研究结果对米糠深度加工及新型绿色溶剂在食品领域中的应用提供理论依据。

参考文献

- [1] KIM J S, GODBER J S, KING J M, et al. Inhibition of cholesterol autoxidation by the nonsaponifiable fraction in rice bran in an aqueous model system[J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001, 78(7): 685-689.
- [2] 王永斌. 米糠中功能性成分的研究现状与发展趋势[J]. *中国食物与营养*, 2006(5): 17-20. [WANG Y B. Research status and development trend of functional components in rice bran[J]. *Food and Nutrition in China*, 2006(5): 17-20.]
- [3] WU W, LI F, WU X J. Effects of rice bran rancidity on oxidation, structural characteristics and interfacial properties of rice bran globulin[J]. *Food Hydrocolloids*, 2021, 110: 1-8.
- [4] 陈正行, 周彤. 米糠: 一种潜在的健康食品优质原料[J]. *粮食与饲料工业*, 1999(10): 40-43. [CHEN Z X, ZHOU T. Rice bran: A potential and healthful foodstuff[J]. *Cereal & Feed Industry*, 1999(10): 40-43.]
- [5] TANG S H, HETTIARACHCHY N S, SHELLHAMMER T H. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran. 1. Physical processing and enzyme treatments[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(25): 7444-7448.
- [6] SUN L H, LV S W, HE L Y. Comparison of different physical technique-assisted alkali methods for the extraction of rice bran pro-

- tein and its characterizations[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2017, 13(10): 70–71.
- [7] 谢宇霞, 吴家乾, 黄玉, 等. 碱法提取米糠中粗蛋白的几个影响因素探讨[J]. *粮食加工*, 2022, 47(3): 34–36. [XIE Y X, WU J Q, HUANG Y, et al. Discussion on several influencing factors of alkaline extraction of crude protein from rice bran[J]. *Grain Processing*, 2022, 47(3): 34–36.]
- [8] RAJCHMAN M, GUTIERREZ M B, CURUTCHET A, et al. Green extraction of rice bran proteins and full revaluation of the remaining by-products[J]. *Cereal Chemistry*, 2021, 99(1): 184–193.
- [9] 付珊珊, 周显青, 张玉荣, 等. 超声辅助酶法和碱法对米糠蛋白提取率的影响研究[J]. *食品科技*, 2021, 46(9): 149–155. [FU S S, ZHOU X Q, ZHANG Y R, et al. Study on the effect of ultrasound-assisted enzymatic and alkaline methods on the extraction rate of rice bran protein[J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(9): 149–155.]
- [10] SUN L H, YU F, WANG Y Y, et al. Effects of ultrasound extraction on the physicochemical and emulsifying properties of rice bran protein[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2021, 17(5): 327–335.
- [11] BEDIN S, ZANELLA K, BRAGAGNOLO N, et al. Implication of microwaves on the extraction process of rice bran protein[J]. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2019, 36(4): 1653–1665.
- [12] 易佳, 刘昆仑. 超微联合超声波优化提取米糠蛋白及其对米糠蛋白溶解性的影响[J]. *食品研究与开发*, 2022, 43(19): 117–123. [YI J, LIU K L. Optimization of extraction process of rice bran protein by ultrafine grinding combined with ultrasound and effect of extraction on protein solubility[J]. *Food Research and Development*, 2022, 43(19): 117–123.]
- [13] 曹慧英, 李航, 段庆松, 等. 米糠蛋白提取工艺研究进展[J]. *食品工业*, 2021, 42(7): 280–283. [CAO H Y, LI H, DUAN Q S, et al. Research progress on extraction technology of rice bran protein[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(7): 280–283.]
- [14] 张琴秋, 秦文, 胡欣洁. 米糠蛋白提取和利用的研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(19): 307–313. [ZHANG Q Q, QIN W, HU X J. Research progress on extraction and utilization of rice bran protein[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(19): 307–313.]
- [15] 王乔, 侯同刚, 咸漠, 等. 两步酶解提取米糠蛋白的工艺研究及优化[J]. *氨基酸和生物资源*, 2016, 38(4): 77–83. [WANG Q, HOU T G, JIAN M, et al. Study and optimization on the extraction of rice bran protein by Two-Step enzymatic hydrolysis[J]. *Biotic Resources*, 2016, 38(4): 77–83.]
- [16] HANSEN B B, SPITTLE S, CHEN B, et al. Deep eutectic solvents: A review of fundamentals and applications[J]. *Chemical Reviews*, 2020: 9–14.
- [17] MAGDALENA P, SASCHA S, SELIN K, et al. Deep eutectic solvents as efficient solvents in biocatalysis[J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(9): 943–959.
- [18] SVIGELJ R, DOSSI N, GRAZIOLI C, et al. Deep eutectic solvents (DESS) and their application in biosensor development[J]. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2021, 21(13): 4263–4263.
- [19] POPOVIC B M, MICIC N, POTKONJAK A, et al. Novel extraction of polyphenols from sour cherry pomace using natural deep eutectic solvents-ultrafast microwave-assisted NADES preparation and extraction[J]. *Food Chemistry*, 2022, 366: 130562.
- [20] ZANNOU O, PASHAZADEH H, IBRAHIM S A, et al. Green and highly extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from kinkeliba (*Combretum micranthum* G. Don) by natural deep eutectic solvents (NADESs) using maceration, ultrasound-assisted extraction and homogenate-assisted extraction[J]. *Arabian Journal of Chemistry*, 2022, 15(5): 1–14.
- [21] ZULLAIKAH S, WIBOWO N D, WAHYUDI I M G E, et al. Deacidification of crude rice bran oil (CRBO) to remove FFA and preserve γ -oryzanol using deep eutectic solvents (DES)[J]. *Materials Science Forum*, 2019, 964: 109–114.
- [22] MULIA K, NASIKIN M, KRISANTI E A, et al. Deacidification of palm oil using betaine monohydrate-carboxylic acid deep eutectic solvents: Combined extraction and simple solvent recovery[J]. *Processes*, 2020, 8(5): 543–543.
- [23] LIN J J, XIANG H, D, SUN D X, et al. Deep eutectic solvents and alkaline extraction of protein from seabuckthorn seed meal: A comparison study[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2022, 11(4): 1028–1035.
- [24] ESTER H C, NADIA B, MARÍA L M, et al. High voltage electrical discharges followed by deep eutectic solvents extraction for the valorization of pomegranate seeds (*Punica granatum* L.)[J]. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2022, 79: 103055–103055.
- [25] PANG J Y, SHA X F, CHAO Y T, et al. Green aqueous biphasic systems containing deep eutectic solvents and sodium salts for the extraction of protein[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(78): 49361–49367.
- [26] ZHOU Y H, WU W, ZHANG N, et al. Deep eutectic solvents as new media for green extraction of food proteins: Opportunity and challenges[J]. *Food Research International*, 2022, 161: 111842–11842.
- [27] ZHOU P F, LI J B, YAN T, et al. Selectivity of deproteinization and demineralization using natural deep eutectic solvents for production of insect chitin (*Hermetia illucens*)[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 225: 115255–115256.
- [28] 李淑婷, 邓媛元, 魏振承, 等. 天然低共熔溶剂提取米糠酯酶工艺优化及其纯化与酶学性质研究[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(6): 210–219.
- [29] BRADOFRD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1–2): 248–254.
- [30] ZHOU P, WANG X, YANG B, et al. Chemoenzymatic epoxidation of alkenes with *Candida antarctica* lipase B and hydrogen peroxide in deep eutectic solvents[J]. *RSC Advances*, 2017, 7(21): 12518–12523.
- [31] LIU X, WANG M, ZHANG X, et al. The correlation between the physicochemical properties of water-based deep eutectic solvents and catalytic activity of lipase Novozym 435[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020: 115200–115200.
- [32] YUN T, GEERT-JAN W, ROBRET V, YOUNG H. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications[J]. *Food Chemistry*, 2015, 187–188.
- [33] SHI L, ZHENG L, ZHAO C, et al. Effects of deacidification methods on high free fatty acid containing oils obtained from sea buckthorn (*Hippophaë hamnoides* L.) berry[J]. *Industrial Crops and Products*, 2018, 124: 797–805.