

玉米醇溶蛋白提取及其对酒精发酵的影响

赵 华, 张英华, 陶 静

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300222)

摘 要: 用磷酸盐缓冲液在 40 ℃ 浸泡玉米 36 h 后, 进行脱胚芽处理, 用胚乳提取醇溶蛋白。实验确定了提取玉米醇溶蛋白的最佳工艺条件为: 添加液料比为 6:1 的 75 %乙醇溶液, 在 60 ℃ 浸提 2 h 后, 离心分离, 醇溶蛋白回收率为 67.37 %。分别用浸泡过的整粒玉米和胚乳及未经浸泡的胚乳提取玉米醇溶蛋白, 结果表明, 浸泡有利于醇溶蛋白的提取。将提取醇溶蛋白后的玉米胚乳残渣进行酒精发酵, 淀粉出酒率为 53.40 %, 略高于对照试验的 53.04 %。

关键词: 燃料酒精; 玉米; 醇溶蛋白; 提取; 酒精发酵

中图分类号 :TQ93 ;TQ92 ;TS261.21 文献标识码 :A 文章编号 :1001- 9286(2006)09- 0030- 04

Extraction of Corn Zein & Its Effects on Ethanol Fermentation

ZHAO Hua, ZHANG Ying-hua and TAO Jing

(Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, College of Bioengineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: The corn was steeped in phosphate buffer at 40 ℃ for 36 h and then degermed. Then zein was extracted from corn endosperm. The optimal technical conditions were summed up as follows in zein extraction: addition of 75 % ethanol solution (ratio of solution and materials as 6:1), then 2 h lixiviation at 60 ℃, then centrifugal separation, and the recovery rate of zein achieved 67.37%. Steeped corn endosperm and unsoaked corn endosperm were used respectively for zein extraction. The results indicated that steeping was helpful for the extraction. The residual corn endosperm after the extraction was used for ethanol fermentation, and the ethanol yield of starch achieved 53.40 %, little higher than that of the contrast group (53.04 %).

Key words: fuel alcohol; corn; zein; extraction; ethanol fermentation

燃料酒精作为石油的替代品, 因其从可再生资源发酵得到^[1], 且按合适的比例加入汽油中, 会提高汽油的辛烷值^[2], 降低汽车尾气中一氧化碳和碳氢化合物的排放, 减少对环境的污染^[3], 越来越受到广泛的重视。在中国, 生产燃料酒精的主要原料是玉米。现阶段燃料酒精的生产还必须依靠政府的补贴, 成本问题已成为制约燃料酒精生产发展的关键性问题^[4]。由于燃料酒精生产成本大部分来源于原料玉米^[5], 实践证明, 开发具有高附加值的副产品并对玉米生物量进行合理的综合利用, 是降低燃料酒精生产成本的有效途径。目前, 已开发的包括玉米超氧化物歧化酶(SOD)^[6,7]、醇溶蛋白^[8]、谷蛋白^[9]、玉米油^[10]、纤维素^[11]等, 对改善燃料酒精生产企业产品单一、资源利用率低、生产成本高等问题具有积极的作用。

玉米醇溶蛋白(zein)是玉米中主要的贮藏蛋白, 主要分布在胚乳中, 约占总蛋白含量的 40 %^[12], 是一种易

溶于 60 %~95 %Vol 乙醇水溶液^[13]的蛋白质。玉米中醇溶蛋白具有良好的耐水、阻氧和易成膜性^[14], 被广泛用于食品、造纸、印刷、纺织以及医药卫生等方面, 尤其是作为果蔬食品的保鲜膜、可食性包装、生物可降解塑料和黏合剂^[15], 具有广阔的市场前景。已经报道的从玉米中提取醇溶蛋白的方法, 主要以玉米蛋白粉^[16]、玉米渣^[17]和干法粉碎的玉米粉^[18]为原料。有时提取醇溶蛋白, 为了减少玉米胚芽中油脂对提取回收率的影响, 也可先用 95 %Vol 的乙醇将油脂溶解后再用 70 %Vol 的乙醇提取醇溶蛋白^[19]。

本研究作为降低燃料酒精生产成本研究的一部分, 是在胚芽提取超氧化物歧化酶的基础上^[6,7], 将用磷酸盐缓冲液浸泡过后分离出的胚乳提取醇溶蛋白, 最后再进行酒精发酵。采用此工艺提取醇溶蛋白, 不仅可以减少胚芽中油脂对提取醇溶蛋白的影响, 提高其回收率, 还

收稿日期: 2006- 05- 30

作者简介: 赵华(1963-), 男, 天津人, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事微生物发酵和生物分离工程研究。

可以提高玉米的综合利用价值,有效抵消酒精生产成本。本文主要探讨了用磷酸盐缓冲液浸泡后分离的玉米胚乳提取醇溶蛋白的最佳工艺条件,同时考察了用提取醇溶蛋白后的玉米残渣进行酒精发酵的可行性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉米(郑单 958):购于天津市场。

耐高温酒精活性干酵母(AADY):安琪酵母股份有限公司。

1.2 主要仪器

多功能食物搅拌机:SS230-A, 顺德市容桂区家成电器厂;低速离心机:LD-10, 北京医用离心机厂;定氮仪:KDN-0813, 上海新嘉电子有限公司。

1.3 玉米醇溶蛋白提取试验

用 pH 7.8 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液在 40 ℃ 浸泡玉米籽粒 36 h, 沥干后分离胚芽与胚乳。用粉碎机将胚乳粉碎后过 60 目筛。称取 15 g 胚乳粉, 加入乙醇, 在水浴摇床中待醇溶蛋白充分溶解后, 离心取上清液, 即得玉米醇溶蛋白提取液。测定提取液中蛋白质含量和固形物含量, 重复试验 3 次。

1.4 浸泡过的整粒玉米、胚乳和干胚乳提取玉米醇溶蛋白的比较

准确称取 100 g 玉米籽粒共 3 份。1 份不经浸泡进行胚芽与胚乳分离; 另外 2 份玉米籽粒用 pH 7.8 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲液在 40 ℃ 浸泡 36 h, 将其中的 1 份进行胚芽与胚乳分离。分别称取浸泡后的整粒玉米、胚乳和未浸泡的胚乳, 按照液料比 6:1(v/w) 加入浓度为 75 % Vol 的乙醇, 60 ℃ 水浴摇床中保温 2 h 后, 离心取上清液, 得到玉米醇溶蛋白提取液。测定提取液中蛋白质含量和固形物含量, 重复试验 3 次。

1.5 酒精发酵试验

准确称取 50 g 的玉米粒共 3 份。1 份不经浸泡进行胚芽与胚乳分离; 2 份浸泡后进行胚芽与胚乳分离, 其中 1 份胚乳用于玉米醇溶蛋白提取。将分离得到的胚乳和提取醇溶蛋白的残渣置于 500 mL 三角瓶中, 按照 1:3 加入 70 ℃ 水, 滴加 0.1 mL 液化酶(2 万单位/mL), 沸水浴糊化 30 min, 再在 121 ℃ 下液化 1 h 后冷却到 60~62 ℃, 按 150 u/g 原料加入糖化酶, 60 ℃ 水浴糖化 1 h。糖化醪冷却到 30 ℃, 加入 5 mL 干酵母活化液和 2 mL 活化蛋白酶上清液, 加发酵栓, 置 30 ℃ 培养箱中培养 12 h 后再转至 37 ℃ 培养箱中发酵 60 h。每个酒精发酵试验做 2 个平行样。

1.6 分析方法

1.6.1 玉米醇溶蛋白的测定

蛋白质含量:凯氏定氮法^[19], 蛋白质系数为 6.25。

固形物含量:在烘箱中于 103 ℃ 干燥至恒重^[20]。

1.6.2 玉米醇溶蛋白含量和回收率的计算

玉米胚乳中醇溶蛋白占胚乳中总蛋白的 47 %^[21]。

$$\text{提取液中醇溶蛋白的含量}(\%) = \frac{\text{提取液中醇溶蛋白的浓度}(\text{mg/mL})}{\text{提取液中总固形物含量}(\text{mg/mL})} \times 100$$

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{提取液中醇溶蛋白浓度}(\text{mg/mL}) \times \text{提取液体积}(\text{mL})}{\text{玉米醇溶蛋白的总量}(\text{mg/mL})} \times 100$$

1.6.3 原料出酒率

将 500 mL 三角瓶中的成熟发酵醪全部转移入 1000 mL 蒸馏瓶中, 再用 100 mL 蒸馏水冲洗三角瓶, 洗液全部倒进蒸馏瓶一起蒸馏。接馏出液 100 mL, 用酒精计和温度计同时测定酒精度和温度, 并查表换算成为 20 ℃ 时的酒精度。

$$95\% \text{Vol 酒精原料出酒率}(\%) = \frac{D \times 0.81144}{95} \times \frac{100}{W} \times 100$$

式中: D——试样在 20 ℃ 时的酒精度, %Vol;

0.81144——95 %Vol 酒精(20 ℃)的比重;

W——原料重量, g。

1.6.4 玉米淀粉含量的测定: 斐林试剂滴定法^[9]。

1.6.5 玉米淀粉出酒率

$$\text{淀粉出酒率}(\%) = \frac{\text{原料出酒率}(\%)}{\text{淀粉含量}(\%)} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 玉米醇溶蛋白提取工艺的确定

2.1.1 乙醇浓度对玉米醇溶蛋白提取的影响

添加不同浓度的乙醇对提取玉米醇溶蛋白的影响(见图 1)。由图 1 可知, 玉米醇溶蛋白溶于 60%~95% 的乙醇水溶液中, 且提取液中醇溶蛋白的含量随乙醇浓度的增加而增加, 在乙醇浓度为 75 %Vol 时达到最大值为 89.49 %, 此时回收率为 37.17 %。当添加乙醇浓度超过 75 %后, 提取液中玉米醇溶蛋白的含量又开始逐渐下降, 当乙醇浓度达到 95 %Vol 时, 仅有少量醇溶蛋白溶出。由此可知, 该实验条件下玉米醇溶蛋白在乙醇浓度为 75 %Vol 时溶出率最大, 高浓度的乙醇不利于醇溶蛋白的溶出。

2.1.2 温度对玉米醇溶蛋白提取的影响

试验考察了温度对玉米醇溶蛋白提取的影响(见图 2)。由图 2 可知, 玉米醇溶蛋白的提取量随着温度的升高, 在 30~60 ℃ 之间逐渐增加, 在 60 ℃ 时达到最大值,

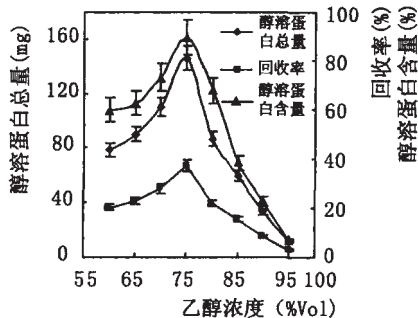


图1 乙醇浓度对玉米醇溶蛋白提取的影响

提取的醇溶蛋白量为 144.52 mg, 回收率为 36.80 %; 后温度再升高, 则提取量呈下降趋势。其原因可能是醇溶蛋白在温度高于 60 时会发生部分变性, 造成醇溶蛋白提取量下降。因此, 确定 60 为提取玉米醇溶蛋白的最佳温度。

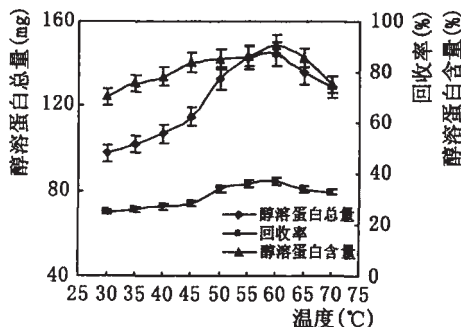


图2 提取温度对玉米醇溶蛋白提取的影响

2.1.3 液料比对玉米醇溶蛋白提取的影响

乙醇添加量对醇溶蛋白提取成本影响较大。乙醇添加量太少, 无法充分溶出醇溶蛋白; 随着乙醇添加量的增加, 醇溶蛋白提取的量亦增加, 但相应的生产成本也会提高。因此, 试验考察了乙醇添加量对玉米醇溶蛋白提取的影响, 结果见图 3。

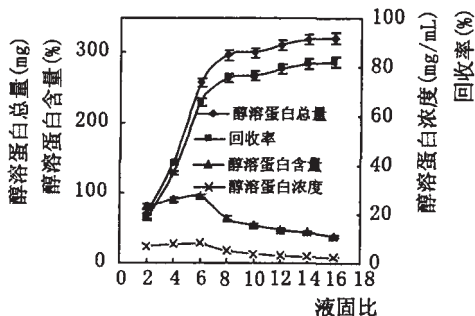


图3 液料比对玉米醇溶蛋白提取的影响

由图 3 可知, 随着乙醇溶液添加量的逐渐增加, 醇溶蛋白的提取量也逐渐增加。但在液固比从 2:1 到 6:1 的区间内醇溶蛋白的提取量增加速率较快, 再提高乙醇溶液的添加量, 醇溶蛋白提取量的增长趋缓。另外, 提取

液中醇溶蛋白的含量和浓度则在液固比从 2:1 到 6:1 的区间内逐渐增加, 之后则呈明显的下降趋势。因此, 综合考虑醇溶蛋白提取量与成本的关系, 确定最佳液料比为 6:1, 此时回收率为 65.75 %。

2.1.4 提取时间对玉米醇溶蛋白提取的影响

提取时间决定了提取醇溶蛋白的生产周期, 因此, 考察不同提取时间对提取玉米醇溶蛋白的影响, 结果见图 4。

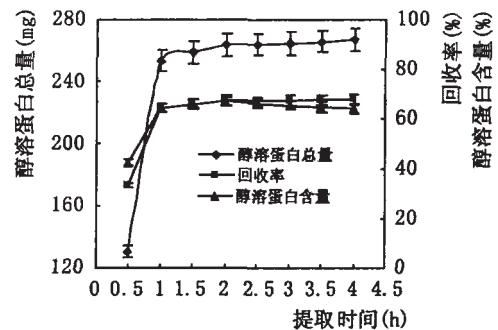


图4 提取时间对玉米醇溶蛋白提取的影响

由图 4 可知, 随着提取时间的延长, 提取得到的醇溶蛋白总量不断增加。但是, 在 1 h 内醇溶蛋白溶出速度较快, 在 1~2 h 内溶出速度明显下降, 2 h 后基本保持不变。而提取液中醇溶蛋白的含量也是在 2 h 之前呈上升趋势, 且 1 h 内增加速度较快, 但 2 h 后呈现下降趋势。说明醇溶蛋白开始较易溶解于 75%Vol 的乙醇溶液中, 1 h 后接近溶解饱和度。而 2 h 后在乙醇溶液中除了醇溶蛋白的溶出外, 其他物质的溶出量也增加, 从而影响了提取效果。因此, 确定醇溶蛋白的最佳提取时间为 2 h, 此时提取得到的醇溶蛋白为 263.85 mg, 回收率为 67.19 %。如果希望缩短生产周期, 也可根据情况, 选择 1 h。

2.1.5 提取次数对玉米醇溶蛋白提取的影响

多次提取有利于提高醇溶蛋白的回收率。试验对玉米胚乳中的醇溶蛋白进行了 3 次提取, 考察抽提次数对玉米醇溶蛋白提取量的影响, 试验结果见图 5。

由图 5 可知, 随着提取次数的增加, 提取得到的醇溶蛋白的量逐渐增加。同时, 第一次提取得到醇溶蛋白的量较多, 回收率达到 67.37 %; 第二次提取的回收率达到 80.42 %; 抽提第三次的回收率为 85.13 %。由此可见, 抽提第一次时溶出的醇溶蛋白较多, 第二次时已降低很多, 到第三次时只有少量醇溶蛋白溶出。因此, 可根据具体情况考虑提取次数, 本实验确定提取次数为 1 次。

2.2 浸泡过的整粒玉米和胚乳与未浸泡的胚乳提取玉米醇溶蛋白的比较

按照 2.1 确定的提取玉米醇溶蛋白的最佳工艺条件, 分别采用浸泡过的整粒玉米、胚乳和未浸泡的胚乳,

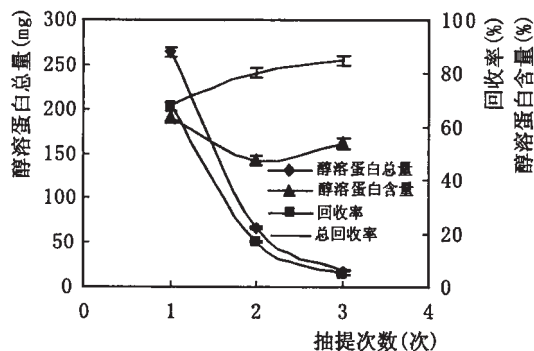


图5 提取次数对玉米醇溶蛋白提取的影响

提取玉米醇溶蛋白, 结果见表 1。

表 1 浸泡对玉米醇溶蛋白提取的影响

原料	醇溶蛋白总量 (mg)	醇溶蛋白的含量 (%)	回收率 (%)
浸泡过的整粒玉米	1934.6±5.3	82.23±2.09	62.16±1.52
浸泡过的胚乳	1877.0±20.4	86.58±2.33	66.75±1.20
未浸泡的胚乳	1647.1±30.1	85.74±2.13	62.45±1.61

由表 1 可知, 用浸泡过的胚乳提取醇溶蛋白, 得到的醇溶蛋白的回收率高于未浸泡的胚乳, 其原因可能是玉米中的蛋白质在浸泡阶段充分软化, 因而较有利于醇溶蛋白的溶出。同时, 用浸泡过的胚乳提取醇溶蛋白的回收率较浸泡过的玉米整粒高出 4.59%。由此可见, 玉米胚芽中含有的油脂对醇溶蛋白提取的影响较大, 在玉米醇溶蛋白提取过程中应先进行油脂分离^[10]以有利于醇溶蛋白的提取。因此, 采用浸泡后分离的胚乳提取醇溶蛋白, 可大幅度提高提取回收率, 从而降低醇溶蛋白的生产成本。

2.3 玉米醇溶蛋白提取对酒精发酵的影响

玉米酒精发酵主要利用的是玉米中的淀粉。将用磷酸盐溶液浸泡提取醇溶蛋白的玉米胚乳渣和未提取醇溶蛋白的玉米胚乳分别进行酒精发酵, 并以未浸泡的玉米胚乳作为对照, 考察用磷酸盐浸泡和提取醇溶蛋白对酒精发酵的影响, 结果见表 2。

表 2 提取玉米醇溶蛋白对酒精发酵的影响

原料	原料出酒率 (%)	淀粉出酒率 (%)
对 照	43.29±0.21	53.04±0.23
浸泡过的胚乳	42.98±0.16	53.47±0.20
提取醇溶蛋白后的胚乳	42.89±0.31	53.40±0.27

由表 2 可知, 用磷酸盐浸泡过及提取醇溶蛋白后的玉米残渣进行酒精发酵, 其原料出酒率略低于未浸泡的对照样, 主要是由于浸泡和提取过程会造成少量淀粉的损失。但是两者的淀粉出酒率却都高于对照样, 且提取醇溶蛋白后的淀粉出酒率与浸泡过的相差不大。由此可

见, 在浸泡和提取阶段, 玉米胚乳中的淀粉被软化, 且提取醇溶蛋白后减少了蛋白质对淀粉水解的干扰, 从而有利于淀粉的充分利用。因此, 提取玉米醇溶蛋白可促进酒精发酵的进行, 采用此工艺提取醇溶蛋白是可行的。

3 结论

3.1 先将玉米在 40℃ 经磷酸盐缓冲液浸泡 36 h 后, 再进行胚芽与胚乳的分离; 胚芽可用于提取超氧化物歧化酶, 胚乳用于提取醇溶蛋白。提取玉米醇溶蛋白的最佳工艺条件为: 添加液料比为 6:1 的 75%Vol 乙醇溶液, 在 60℃ 浸提 2 h 后, 离心分离, 得到醇溶蛋白提取液, 回收率为 67.37%。连续 3 次抽提后, 得到醇溶蛋白的回收率为 85.13%。

3.2 用磷酸盐浸泡玉米对醇溶蛋白的提取影响较大。通过比较可知, 浸泡可有效提高醇溶蛋白的回收率。同时, 脱胚芽工艺减少了胚芽中所含油脂对醇溶蛋白提取的干扰, 也有利于醇溶蛋白的提取。

3.3 将提取醇溶蛋白后的玉米残渣进行酒精发酵, 其淀粉出酒率达到 53.40%, 略高于对照试验的 53.04%, 证明此工艺是可行的。

参考文献:

- [1] Seungdo Kim, Bruce E Dale. Environmental aspects of ethanol derived from no-tilled corn grain: nonrenewable energy consumption and greenhouse gas emissions [J]. Biomass and Bioenergy, 2005, 28(5): 475- 489.
- [2] Robert K. Niven. Ethanol in gasoline: environmental impacts and sustainability review article [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2005, 9(6): 535- 555.
- [3] Haroon S, Khesghi, Roger C Prince. Sequestration of fermentation CO₂ from ethanol production [J]. Energy, 2005, 30(10): 1865- 1871.
- [4] Ellen Burnes, Dennis Wichelns, John W Hagen. Economic and policy implications of public support for ethanol production in California's San Joaquin Valley [J]. Energy Policy, 2005, 33(9): 1155- 1167.
- [5] Leland C Dickey. Corn coproduct cuts ethanol production costs [J]. Agricultural Research, 2002, 4: 20- 21.
- [6] 赵华, 陶静. 玉米胚芽超氧化物歧化酶提取及对酒精发酵的影响[J]. 酿酒科技, 2005, (6): 54- 57.
- [7] 赵华, 陶静. 玉米酒精发酵前提取超氧化物歧化酶的研究[J]. 农业工程学报, 2005, 21(6): 176- 179.
- [8] Rishi Shukla, Munir Cheryan, Richard E DeVor. Solvent extraction of zein from dry-milled corn [J]. Cereal Chem, 2000, 77(6): 724- 730.
- [9] Mila P Hojilla-Evangelista, Lawrence A Johson. Optimizing extraction of zein and glutelin-rich fraction during sequential extraction processing of corn [J]. Cereal Chem, 2003,

(下转第 36 页)

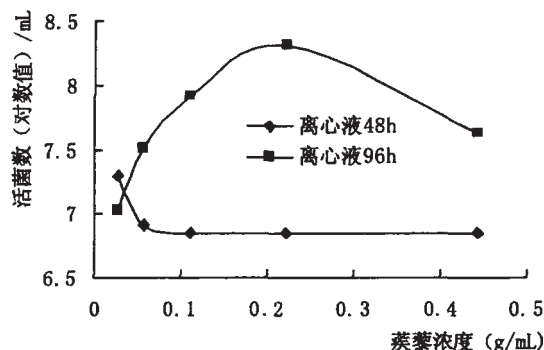


图 6 不同浓度蒺藜药液离心后对 L.B.生长的影响

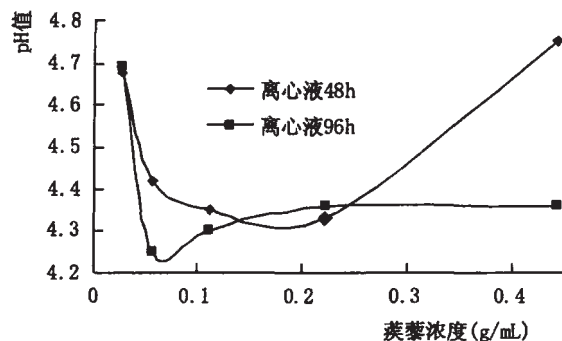


图 7 L.A.对不同浓度蒺藜离心液 pH 的影响

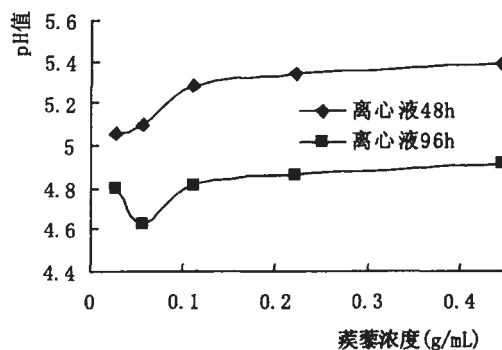


图 8 L.B.对不同浓度蒺藜离心液 pH 的影响

3 结论

蒺藜药液培养嗜酸乳杆菌和保加利亚乳杆菌的最佳浓度均为 0.111 g/mL; 药液离心对嗜酸乳杆菌的生长和药液的 pH 几乎没有影响; 药液离心对 L.B.的生长和药液的 pH 均有较大影响, 和对照相比, 其菌体减少, pH 升高。

参考文献:

[1] 国家药典委员会编.中国药典 2005 版(一部)[M].北京:化学工

业出版社,2005.

- [2] J. Conrada, D. Dinchevb, I. Klaiibera, etc. Anovel furostanol saponin from Tribulus terrestris of Bulgarian origin[J]. Fitoterapia, 2004,75:117- 122.
- [3] E.De Combarieu, N.Fuzzati, M.Lovati, etc. Furostanol saponins from Tribulus terrestris [J]. Fitoterapia, 2003,74:583- 591.
- [4] Maija Saxelin, Soile Tynkkynen, Tiina Mattila-Sandholm, etc. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms [J].Current Opinion in Biotechnology, 2005, 16(2): 204- 211.
- [5] Sanders M E, Kleanhammer T R. Invited review: the scientific basic of Lactobacillus acidophilus NCFM functionality as a probiotic [J]. Journal of Dairy Science 2001, 84 (2):319- 331.
- [6] Pei-Ren Lo, Roch-Chuiyu, Cheng-Chun Cho, etc.Antimutagenic activity of several probiotic bifidobacteria against Benzo[a] pyrene [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2002, 94 (2):148- 153.
- [7] Erika Isolauri, Seppo Salminen, Arthur C. Ouwehand,probiotics [J]. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 2004, 18(2):299- 313.

工与机械, 2003, (6): 50- 52.

(上接第 33 页)

- 80(9): 481- 484.
- [10] F Feng DJ Myers, MP Hojilla-Evangelista, KA Miller, LA Johnson, SK Singh. Quality of corn oil obtained by sequential extraction processing [J]. Cereal Chem, 2002, 79(8): 707- 709.
- [11] Vijay Singh, David B Johnston, Robert A Moreau, Kevin B Hicks, Bruce S Dien, R J Bothast. Pretreatment of wet-milled corn fiber to improve recovery of corn fiber oil and phytosterols [J]. Cereal Chem, 2003, 80(9): 118- 122.
- [12] 张钟, 齐爱云.玉米醇溶蛋白提取工艺及功能性质研究[J].粮食与饲料工业, 2004, (9): 21- 23.
- [13] 吴波, 李永明.玉米醇溶蛋白的耐热性研究[J].武汉食品工业学院学报, 1997, (3): 1- 5.
- [14] 杜立斌, 韩孝族.玉米醇溶蛋白生产新工艺的研究[J].中国粮油学报, 1998, 13(6): 28- 31.
- [15] 陈涛, 刘耘, 李理, 等.玉米醇溶蛋白的特性与应用[J].粮食加

- [16] 吴波, 李永明, 闫中一.从玉米蛋白中制备醇溶蛋白的研究 [J].中国油脂, 1997, 22(4): 50- 52.
- [17] 李鑫. 玉米渣提取玉米醇溶蛋白工艺初探[J].重庆工商大学学报, 2004, 21(4): 336- 338.
- [18] Chen, L-F, Hoff, J.E. Grain extraction milling. U.S. patent 4,716,218.
- [19] L C Dickey, M F Dallmer, E R Radewonuk, N Parris, Kurantz, and J.C. Zein batch extraction from dry-milled corn: cereal disintegration by dissolving fluid shear [J]. Cereal Chem, 1998, 75(4): 443- 448.
- [20] Dickey, L C, Dallmer, M F, Radewonuk, E R, Parris, N, Kurantz, M, and Craig, J.C. Hydrocyclone separation of dry-milled corn [J]. Cereal Chem, 1997, 74(3): 676- 680.
- [21] 尤新.玉米深加工技术[M].北京: 中国轻工业出版社, 1999.