

柳 荫,吴凤智,王晓丹,等. 响应面法优化胰蛋白酶酶解核桃蛋白的工艺[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):239-242.

响应面法优化胰蛋白酶酶解核桃蛋白的工艺

柳 荫,吴凤智,王晓丹,邱树毅,周鸿翔

(贵州大学/发酵工程与生物制药省级重点实验室,贵州贵阳 550025)

摘要:以液压冷榨油后的核桃饼粕为原料,综合单因素试验分析,并利用响应面分析方法获得胰蛋白酶酶解核桃蛋白的优化条件:酶解温度 37 ℃、底物质量浓度 31 g/L、反应时间 125 min、加酶量 $[E]:[S]=3.2:100$,各因素对核桃蛋白酶解的影响顺序为酶解时间>加酶量>底物质量浓度。通过验证试验表明,利用优化的酶解条件,核桃蛋白利用指数可达 47.25%,效果较好。

关键词:胰蛋白酶;酶解条件;蛋白利用指数;工艺优化

中图分类号: TS201.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0239-04

核桃别称羌桃、胡桃,隶属胡桃科胡桃属。核桃蛋白含有人体所必需的 8 种氨基酸,且含量接近世界卫生组织(WHO)和联合国粮农组织(FAO)规定的标准^[1-2],是一种氨基酸齐全的植物蛋白资源。目前,国内外对核桃的研究偏重于对核桃油的提取与精炼,而对核桃蛋白质的开发利用研究很少。生物活性肽是指能够调节生物机体生命活动或某些生理活性的一类肽的总称^[3-4]。某些低肽不仅能提供人体生长、发育所需的营养物质,而且还能调节人体机能^[5-8]。经酶解后的蛋白质主要以低肽的形式存在并被吸收。采用现代酶解技术

对核桃蛋白进行酶解,不仅可改变其物理化学性质和功能特性,还能产生营养丰富、供人体生长发育所需要的物质。因此,对核桃蛋白的开发利用具有十分重要的意义。本试验在前期筛选出胰蛋白酶为酶解核桃蛋白最佳用酶的基础上,利用胰蛋白酶酶解核桃饼粕,对其酶解条件进一步优化,为核桃功能多肽开发的利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验原料为实验室液压冷榨油后的核桃饼粕;胰蛋白酶,由北京索来宝公司生产; K_2SO_4 、 $CuSO_4$ 、 H_2SO_4 、HCl、NaOH、 H_3BO_3 及混合指示剂等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

FW-100 高速万能粉碎机,天津市泰斯特仪器有限公司生产;集热式恒温加热磁力搅拌器,郑州长城科工贸有限公司

收稿日期:2013-10-11

基金项目:贵州省农业攻关(编号:黔科合 NZ[2013]3016 号)。

作者简介:柳 荫(1987—),女,满族,硕士研究生,主要从事食品生物技术研究。E-mail:liuyin0130@163.com。

通信作者:周鸿翔(1975—),男,副教授,主要从事油脂加工和食品生物技术研究工作。E-mail:zhou-hx@163.com。

参考文献:

- [1] 泰米迈 A Y,罗宾逊 R K. 酸乳科学与技术[M]. 北京:中国农业出版社,2003.
- [2] Beganovic J, Kos B, Lebos P A, et al. Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92[J]. *Anaerobe*, 2013, 20: 58-64.
- [3] Boehringer M. Methods of enzymatic food analysis using test-combination[M]. Germany: Boehringer Mannheim GmbH, 1984.
- [4] Flambard B, Helinck S, Richard J, et al. The contribution of caseins to the amino acid supply for *Lactococcus lactis* depends on the type of cell envelope proteinase[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(6): 1991-1996.
- [5] Simova E, Simov Z, Beshkova D, et al. Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107(2): 112-123.
- [6] Zhang Q L, Ren J Y, Zhao M M, et al. Isolation and characterization of three novel peptides from casein hydrolysates that stimulate the growth of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13): 7045-7053.

- [7] Stuknyte M, De Noni I, Guglielmetti S, et al. Potential immunomodulatory activity of bovine casein hydrolysates produced after digestion with proteinases of lactic acid bacteria[J]. *International Dairy Journal*, 2011, 21(10): 763-769.
- [8] Horiuchi H, Sasaki Y. Short communication: effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* [J]. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(6): 2904-2909.
- [9] Neviani E, Giraffa G, Brizzi A, et al. Amino acid requirements and peptidase activities of *Streptococcus thermophilus* [J]. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 79(3): 302-307.
- [10] El-Ghaish S, Dalgalarondo M, Choiset Y A, et al. Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity[J]. *European Food Research and Technology*, 2010, 230(4): 635-643.
- [11] 毛 健,王 豪,苏米亚,等. 开菲尔中生物活性物质的益生作用[J]. *中国乳品工业*, 2010, 38(12): 30-35.
- [12] 王 豪,于 鹏,刘振民,等. 贮藏温度对开菲尔发酵乳理化性质及菌相的影响[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(7): 226-228.
- [13] Beshkova D M, Simova E D, Frengova G I, et al. Production of amino acids by yogurt bacteria[J]. *Biotechnology Progress*, 1998, 14(6): 963-965.

生产;FA-1004 型电子分析天平,上海良平仪器仪表有限公司生产;消化炉、凯氏定氮仪,上海洪纪仪器设备有限公司生产。

1.3 试验方法

1.3.1 核桃粗蛋白的制备 冷榨后的核桃饼粕加入沸程为 60~90℃的石油醚,在 50℃、料液比 1 g:3 mL、浸提 2 次的条件下浸泡去除残油;脱脂后,将蛋白粉置于通风橱中风干 72 h,粉碎,过 100 目筛,即得核桃粗蛋白。

1.3.2 氮含量的测定 参照 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》,采用凯氏定氮法测定可溶性氮含量和核桃蛋白的总氮含量。

1.3.3 核桃蛋白的蛋白利用指数计算 蛋白利用指数=可溶性氮含量/核桃蛋白总氮含量×100%。

1.4 酶解条件的确定

1.4.1 底物质量浓度 加酶量为[E]:[S]=3:100、温度为 37℃,在底物质量浓度分别为 10、30、50、70、90 g/L 条件下水解 1 h,以蛋白利用指数为指标,分析底物质量浓度对核桃蛋白酶解的影响。

1.4.2 加酶量 底物质量浓度为 30 g/L、温度为 37℃,在加酶量[E]:[S]分别为 1:100、2:100、3:100、4:100、5:100 的条件下水解 1 h,以蛋白利用指数为指标,分析加酶量对核桃蛋白酶解的影响。

1.4.3 酶解时间 底物质量浓度为 30 g/L、加酶量[E]:[S]=3:100,在 37℃分别水解 30、60、90、120、150、180 min,以蛋白利用指数为指标,分析酶解时间对核桃蛋白酶解的影响。

1.4.4 酶解条件的优化 基于单因素试验数据,根据 Central composite 试验设计原理,选择对蛋白利用指数有影响的 3 个因素即底物质量浓度、加酶量和酶解时间,进行 3 因素 3 水平的响应面分析试验,酶解温度固定在 37℃,经过 Design-Expert 优化胰蛋白酶酶解核桃蛋白的条件。响应面分析与水平编码表见表 1。

表 1 响应面分析与水平编码

水平	A:底物质量浓度 (g/L)	B:加酶量 (%)	C:酶解时间 (min)
-1	20	2.5	100
0	30	3.0	120
1	40	3.5	140

2 结果与分析

2.1 核桃饼粕和去除残油后的核桃粗蛋白的基本成分

由表 2 可见,核桃粗蛋白与核桃饼粕相比,粗蛋白含量明显上升,粗脂肪含量显著降低;除粗纤维含量有所下降外,其他成分含量均有所增加,且差异不大。

表 2 核桃饼粕和核桃粗蛋白基本成分

原料	基本成分的含量(%)						
	粗蛋白	粗脂肪	水分	灰分	还原糖	淀粉	粗纤维
核桃饼粕	47.83	25.64	7.04	5.99	0.99	7.01	5.21
核桃粗蛋白	59.58	7.34	9.26	6.54	1.37	11.9	3.83

2.2 各因素对胰蛋白酶酶解核桃蛋白的影响

2.2.1 底物质量浓度 由图 1 可知,底物质量浓度低于 30 g/L 时,蛋白利用指数随着底物质量浓度的增大而升高,之后蛋白利用指数上升趋势趋于平缓甚至有下降趋势。这可能是因为低质量浓度时,溶液的流动性较好,酶与底物接触比较充分;而在高质量浓度时,溶液的流动性较差,酶与底物接触不够充分,限制了酶解反应的进行。综合考虑,选择胰蛋白酶酶解核桃蛋白的最佳底物质量浓度为 30 g/L。

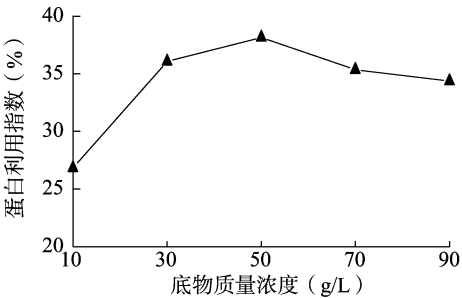


图1 底物质量浓度对核桃蛋白利用指数的影响

2.2.2 加酶量 由图 2 可知,随着加酶量的增加,蛋白利用指数增加,在加酶量为[E]:[S]=3:100 达到最高,随后基本稳定。这是因为加酶量过大时,蛋白质分子可能已被酶所饱和,过多的酶量并没有提高蛋白利用指数,反而使其下降。选择适宜的加酶量[E]:[S]=3:100。

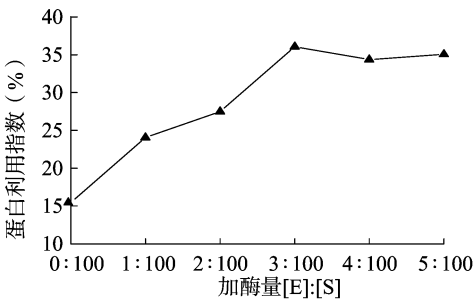


图2 加酶量对核桃蛋白利用指数的影响

2.2.3 酶解时间 由图 3 可知,酶解反应开始后,蛋白利用指数随酶解时间的延长而升高,胰蛋白酶酶解到达 120 min 后,反应趋于平缓,变化幅度很小。这可能是由于随着反应的进行,酶的浓度逐渐降低,活性降低,酶的活性部位已被核桃蛋白分子所饱和,反应趋于平衡。适宜的酶解时间为 120 min。

2.3 响应面优化酶解工艺

2.3.1 二次方程数学模型的建立及最佳化分析 综合单因素数据,基于 Box-Behnken 中心组合设计原理^[9-10],以蛋白利用指数为评价指标,采用 Design Expert 7.1 软件设计响应面试验方案(表 3),建立数学回归模型,以反映不同因素间的交互影响,最佳化分析酶解工艺参数。

2.3.2 响应面结果分析 为了检验回归方程的有效性,进一

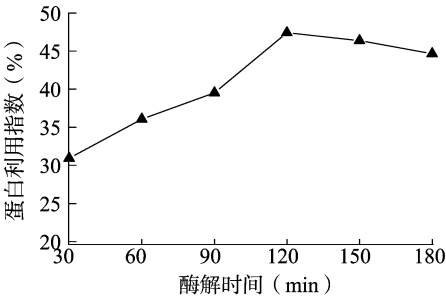


图3 酶解时间对核桃蛋白利用指数的影响

表3 响应面试验设计方案及结果

试验号	A	B	C	蛋白利用指数 (%)
1	-1	0	-1	33.51
2	0	0	0	47.42
3	0	0	0	45.63
4	0	0	0	46.40
5	1	0	1	39.36
6	0	-1	-1	34.37
7	0	0	0	46.52
8	-1	0	1	38.15
9	0	-1	1	39.42
10	0	1	1	42.95
11	-1	1	0	40.61
12	1	-1	0	41.24
13	1	0	-1	35.61
14	-1	-1	0	33.51
15	1	1	0	42.78
16	0	0	0	47.40
17	0	1	-1	37.80

步确定各单因素对蛋白利用指数的影响程度,对回归模型进行了方差分析(表4)。以蛋白利用指数为响应值的函数二次回归方程为: $R = -342.47550 + 38.67575A + 73.87800B + 3.41701C - 2.78000AB - 0.011125AC + 0.0025BC - 4.55825A^2 - 10.32300B^2 - 0.013646C^2$ 。由表4可见,一次项中A、B、C偏回归系数均极显著,说明加酶量、底物质量浓度、酶解时间对蛋白利用指数均具有显著性影响;交互项中AB达显著水平,二次项中 A^2 、 B^2 、 C^2 偏回归系数达极显著水平;失拟项 $P > 0.05$,差异不显著,说明残差均由随机误差引起。该模型 $R^2 = 0.9776$,说明响应值的变化有97.76%来源于底物质量浓度、加酶量、酶解时间,影响蛋白利用指数的因素作用大小为酶解时间>加酶量>底物质量浓度。

由图4可见,核桃蛋白利用率曲线出现先升高到平缓再略下降的状态;提高底物质量浓度与加酶量均能提高核桃蛋白利用指数,当底物质量浓度和加酶量分别增大到一定程度时,蛋白利用率趋于饱和,响应曲面变平缓;随后,若再增大底物质量浓度和加酶量,提取率会略有下降。因此,最佳取值点应取蛋白利用率不再显著增高的坐标点处。

由图5可见,底物质量浓度在[2,3.1]范围内、时间在[100,120]范围内时,两者的增效作用明显,蛋白利用指数随着底物质量浓度和时间的增加而升高,超过这个范围之后趋于平缓,再增加蛋白利用指数下降。底物质量浓度在3.1附

表4 回归方程的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	369.62	9	41.07	33.97	<0.0001	**
A	21.81	1	21.81	18.04	0.0038	**
B	30.42	1	30.42	25.16	0.0015	**
C	43.20	1	43.20	35.73	0.0006	**
AB	7.73	1	7.73	6.39	0.0393	*
AC	0.20	1	0.20	0.16	0.6978	
BC	0.0025	1	0.0025	0.0026	0.9650	
A^2	87.48	1	87.48	72.36	<0.0001	**
B^2	28.04	1	28.04	23.20	0.0019	**
C^2	125.44	1	125.44	103.76	<0.0001	**
残差误差	8.46	7	1.21			
失拟	6.19	3	2.06	3.63	0.1224	
纯误差	2.27	4	0.57			
合计	378.08	16				

注: * 为显著($P < 0.05$); ** 为极显著($P < 0.01$)。

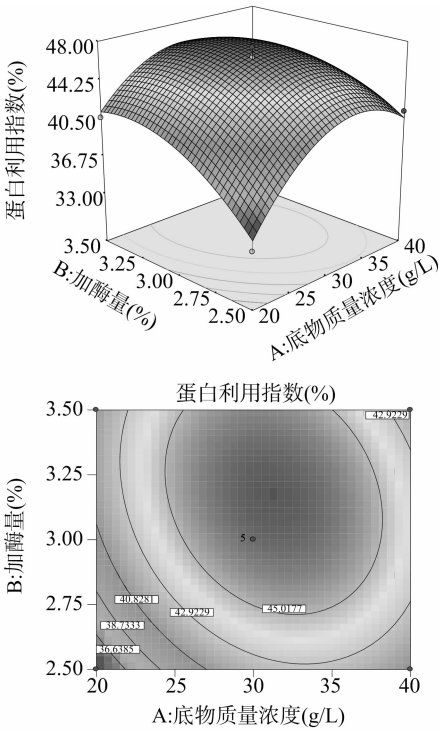


图4 底物质量浓度与加酶量交互影响蛋白利用指数曲面图和等高线图

近、时间在120左右时,两者的协同作用达到最大。由图6可见,当加酶量在[2.5,3.25]范围时、酶解时间在[100,120]范围时,两者存在显著的增效作用,蛋白利用指数值随着加酶量和酶解时间的增加而增加。加酶量在3.2附近、酶解时间在120 min左右时,两者的协同作用达到最大,继续增加时蛋白利用指数反而下降,这说明此时两者在此区间存在明显的拮抗作用。利用 Design - Expert 8.05 软件求解方程,得出蛋白利用指数的最优工艺条件为加酶量[E]:[S]=3.2:100,反应时间125 min,底物质量浓度31 g/L,由回归方程预测蛋白利用指数的理论值可达47.3581%。

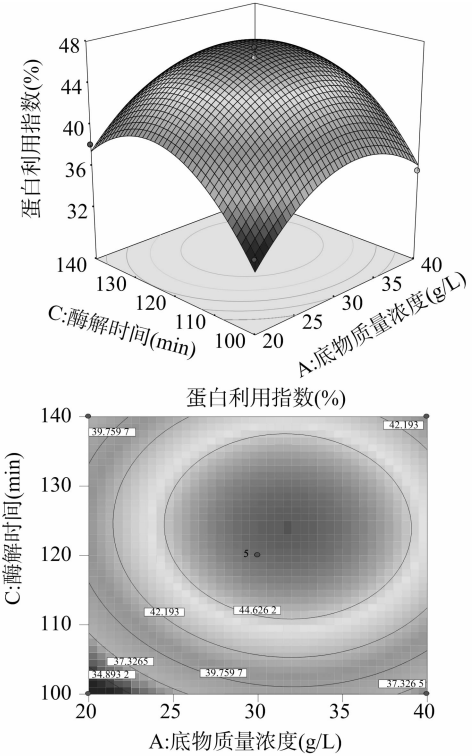


图5 底物质量浓度与酶解时间交互影响蛋白利用指数曲面图和等高线图

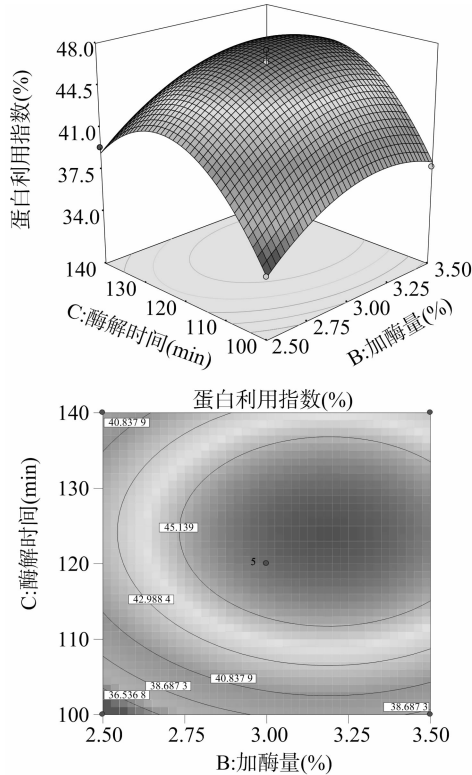


图6 加酶量与酶解时间交互影响蛋白利用指数曲面图和等高线图

指数为 47.25%,与预测值接近,预测值与试验值之间具有良好的拟合性,表明该模型具有有效性。这说明回归方程能够比较真实地反映各因素对蛋白利用指数的影响。

表5 验证试验结果

序号	实测蛋白利用指数(%)	平均值(%)	模型预测蛋白利用指数(%)
1	47.24	47.25	47.358 1
2	47.20		
3	47.32		

3 小结

本试验研究了底物质量浓度、加酶量、酶解时间对蛋白利用的影响,各因素对胰蛋白酶酶解核桃蛋白的影响顺序为酶解时间 > 加酶量 > 底物质量浓度。

响应面优化设计法是一种常用的优化试验条件的数学统计方法^[11-14]。经检验,证明该模型切实可行,能较好地预测蛋白利用指数。确定核桃蛋白的蛋白利用指数最佳酶解条件为反应时间 125 min、底物质量浓度 31 g/L、加酶量[E] : [S] = 3.2 : 100、酶解温度 37 ℃,蛋白利用指数可达 47.25%。

参考文献:

[1] 张庆祝,丁晓雯,陈宗道,等. 核桃蛋白质研究进展[J]. 粮食与脂,2003,16(5):21-23.

[2] 寇文国,高红庆. 核桃产品的开发利用[J]. 中国油脂,2000,25(6):112-113.

[3] 裴凌鹏,吴颖. 多肽研究进展[J]. 首都师范大学学报:自然科学版,2004,25(3):56-60.

[4] 吴建中,赵谋明,宁正祥. 食品中的生物活性多肽[J]. 食品与发酵工业,2002,28(11):46-50.

[5] Clareand D A, Swaisgood H E. Bioactive milk peptides, a prospectus[J]. J Dairy Sci,2000,28(11):1187-1195.

[6] 励建荣,封平. 功能肽的研究进展[J]. 食品科学,2004,25(11):415-419.

[7] Yasuyaki T, Yoshikawa M. Introduction of enterostatin (VPDPR) and a related sequence into soybean proglycinin AlaB1b subunit by site directed mutagenesis[J]. Biotechnol Biochem,2000,64(12):2731-2733.

[8] 苏秀兰. 生物活性肽的研究进展[J]. 内蒙古医学院学报,2006,28(5):471-474.

[9] Boxgep, Hunter W G. Statistics for experiments; an introduction to design, data analysis and model building[M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1978.

[10] 王世磊. Design-Expert 软件在响应面优化法中的应用[D]. 郑州: 郑州大学, 2009.

[11] 唐明霞,陈惠,袁春新,等. 通豆6号大豆响应面法微波烫漂工艺的优化[J]. 江苏农业学报,2013,29(4):870-875.

[12] 朱兴一,陈秀,谢捷,等. 基于响应面法的闪式提取香菇多糖工艺优化[J]. 江苏农业科学,2012,40(5):243-245.

[13] 袁志发,周静芋. 试验设计与分析[M]. 北京: 高等教育出版社,2000:360-370.

[14] 谢捷,于波,朱兴一,等. 响应面法优化深层培养中国被毛袍虫草多糖闪式提取工艺[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):284-286.

2.4 验证试验

为证实模型预测值与实测值之间的拟合程度,在优化的理论值下进行验证试验。由表5可见,试验得到的蛋白利用