

张红波,高艳平,周恩旭,等. 响应面法对酶解法提取鲤鱼多肽工艺的优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(3):151-154.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.043

响应面法对酶解法提取鲤鱼多肽工艺的优化

张红波¹,高艳平²,周恩旭¹,赵亚影¹,付莉¹,高慧茹¹,任元静¹,朱小菲¹,秦少通¹

(1.河南城建学院,河南平顶山 467036; 2.驻马店市环境监测站,河南驻马店 463000)

摘要:用胃蛋白酶对鲤鱼鱼肉进行水解,并在单因素试验的基础上选取酶浓度、pH 值、反应温度、反应时间作为影响蛋白提取率的因素。根据 Box - Behnken 中心组合试验设计原理,采用 4 因素 3 水平响应面分析法对鲤鱼多肽的提取工艺进行优化研究,确定胃蛋白酶提取鲤鱼多肽时的最佳工艺参数。结果表明,胃蛋白酶酶解的最佳条件为酶质量浓度 17.77 mg/mL、温度 36.65 °C、时间 3.7 h、pH 值 1.07,在该条件下多肽提取质量浓度为 1.97 mg/mL。

关键词:鲤鱼;胰蛋白酶;多肽;响应面法

中图分类号: TS254.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)03-0151-04

鲤鱼属鱼纲鲤科,是淡水鱼类中品种最多、分布最广、养殖历史最悠久、产量最高的品种之一。从消费品种上看,我国水产品中鱼类消费占 50% 以上;在消费的水产品中,消费总量超过 200 万 t 的鱼类有草鱼、鲮鱼、鲢鱼、鲫鱼、鲤鱼,这 5 类鱼占淡水鱼消费总量的 70% 以上。鲤鱼味道鲜美,深受广大消费者的喜爱,其鱼肉中蛋白质含量高,质量极佳,易被人体消化吸收。蛋白质在人体内由蛋白酶水解成小肽进行吸收。研究发现,多肽比氨基酸更易被人体吸收利用,且多肽具有多种生物学作用。某些多肽能够清除生物体内过量的游离基、自由基等,抑制脂质过氧化物的发生,保护细胞及其细胞器的正常生理结构和功能^[1]。有些多肽还具有抗疲劳、耐缺氧、抗肿瘤、抗肿瘤的生物学作用^[2-6]。此外,有些多肽具有免疫调节^[7]、抗菌^[8]、舒张血管的作用^[9]。然而,我国对鱼类的加工技术还不是特别成熟,水产养殖与相关食品加工行业的生产效益并不高,且加工形式比较单调。本研究根据鲤鱼多肽的性质,利用酶解法提取鲤鱼多肽,并在单因素试验的基础上,根据 Box - Behnken 中心组合试验设计原理,采用响应面分析法对酶解法制备鲤鱼多肽的工艺进行优化研究,以期得到合理的提取工艺,提高鲤鱼多肽的提取率,为探究鲤鱼的附加价值和工业化生产奠定理论基础和科学依据。

1 材料与与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期:2015-12-17

基金项目:河南省教育厅科学技术研究重点项目(编号:13A180044)。

作者简介:张红波(1982—),男,河南遂平人,硕士,讲师,主要从事生物工程研究。E-mail:zhanghongbo009@163.com。

approach[J]. Food and Chemical Toxicology,2010,48(48):1-6.

[15]Boulaid M, Aguilera A, Camacho F, et al. Effect of household processing and unit-to-unit variability of pyrifenoxy, pyridaben, and tralomethrin residues in tomatoes [J]. Agricultural and Food Chemistry,2005,53(10):4054-4058.

[16]王向未,仇厚援,陈文学,等. 不同加工方式对豇豆中毒死蜱残

鲜活鲤鱼,购自当地市场。胃蛋白酶、Tris-碱,均购自上海百赛生物技术有限公司;双缩脲 A、B,购自上海振品化工有限公司。其他试剂均为分析纯。

主要仪器:B1312511 型超纯水仪,HWS28 型电子恒温水浴锅(上海一恒科技仪器有限公司),101-1SA 型定时恒温鼓风干燥箱(金坛市盛蓝仪器制造有限公司),FE20 型实验室 pH 计,ME204E 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),EnSpire™ 型酶标仪(铂金埃尔默仪器[上海]有限公司),WND 型二两装高速中药粉碎机(浙江省兰溪市伟能达电器有限公司)。

1.2 多肽的提取与测定

取新鲜鲤鱼,去除鳞片和内脏等器官,洗净。选取鱼腹肉,称质量后煮熟,按 1:3 的质量比添加调好 pH 值的 Tris-HCl 缓冲液,用绞碎机绞碎;取 0.5 mL 鱼浆,按 1:2 的体积比添加一定浓度的蛋白酶液,在恒温水浴锅中进行水浴,之后用 100 °C 沸水灭酶活处理 10 min,以 4 000 r/min 离心 15 min;取上清,按 1:1 的体积比添加 10% 三氯乙酸(TCA),充分混匀后静置 10 min,以 4 000 r/min 离心 15 min;取上清,与 5% TCA 按 1:9 的体积比充分混合,静置 10 min;取 120 mL 上述溶液,按 3:2 的体积比与双缩脲试剂混合(以 5% TCA 作为空白对照),静置 10 min,以 2 000 r/min 离心 10 min;取上清,置于 96 孔板中,于 540 nm 测定吸光度^[11]。

1.3 标准曲线的绘制

配置 4 mg/mL 的四肽甘氨酸-甘氨酸-酪氨酸-精氨酸(Gly-Gly-Tyr-Arg)溶液,用 5% TCA 进行稀释,分别稀释至 3.500、3.000、2.500、2.000、1.500、1.000、0.500、0.250、0.125 mg/mL。取不同稀释程度的四肽溶液(包括 4 mg/mL)120 mL,按 3:2 的体积比添加双缩脲试剂,静置 10 min 使之

留量的影响[J]. 食品工业科技,2012,33(16):53-56,60.

[17]陈志强,徐志,冯信平,等. 家庭处理对豇豆中 4 种常见农药残留的影响[J]. 食品科学,2014,35(17):209-213.

[18]Soliman K M. Changes in concentration of pesticide residues in potatoes during washing and home preparation[J]. Food and Chemical Toxicology,2001,39(2):887-891.

充分反应;以 2 000 r/min 离心 10 min,取上清置于 96 孔板中,于 540 nm 测定吸光度,根据所得 $D_{540\text{ nm}}$ 绘制标准曲线。

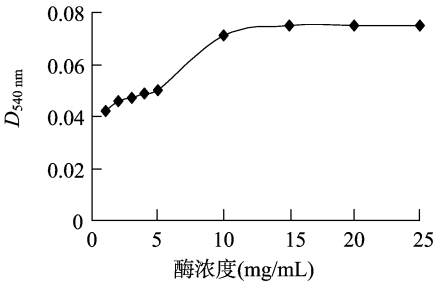
1.4 单因素试验

单因素水平如下:胃蛋白酶质量浓度分别为 1、2、3、4、5、10、15、20、25 mg/mL,pH 值分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0,温度分别为 30、35、40、45、50、55、60 ℃,时间分别为 2、3、4、5、6、7 h。

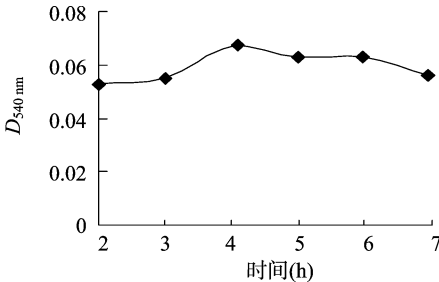
1.5 酶解制备多肽响应面优化设计

在单因素试验的基础上,按照 Box - Behnken 中心组合试验设计原理,以酶解温度、时间、酶质量浓度、pH 值为自变量,以 $D_{540\text{ nm}}$ 为响应值,自变量的高、中、低水平分别用 1、0、-1 编码值表示(表 1)。

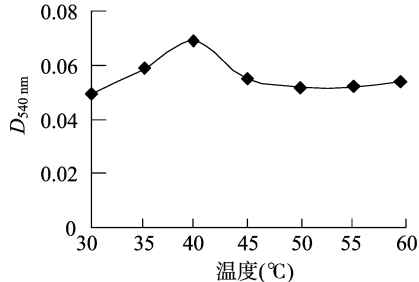
表 1 胃蛋白酶水解提取多肽的 Box - Behnken 试验因素水平				
水平	A:温度 (℃)	B:时间 (h)	C:酶质量浓度 (mg/mL)	D:pH 值
-1	30	3	10	0.5
0	40	4	15	1.0
1	50	5	20	1.5



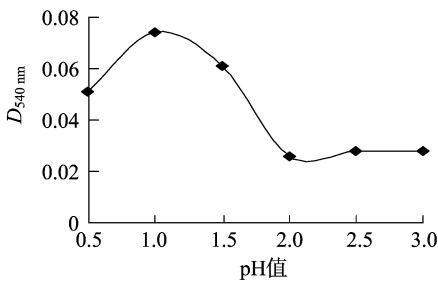
A.酶浓度对酶解的影响



B.反应时间对酶解的影响



C.反应温度对酶解的影响



D.pH值对酶解的影响

图1 各因素对酶解结果的影响

酶质量浓度 15 mg/mL、反应时间 4 h、反应温度 40 ℃时,以 pH 值为变量,测定 pH 值对多肽提取的影响。结果显示,当 pH 值小于 1.0 时, $D_{540\text{ nm}}$ 随着 pH 值的增大而提高;当 pH 值为 1.0 时, $D_{540\text{ nm}}$ 有最大值(图 1 - D)。选择 1.0 作为反应的最佳 pH 值。

2.2 响应面分析胃蛋白酶水解效果

根据单因素试验结果,选择酶解温度、酶解时间、酶质量浓度、pH 值作为 4 个因素,以 $D_{540\text{ nm}}$ 为响应值,设计 4 因素 3 水平的响应面试验。根据 Box - Behnken 试验设计进行了 27 组试验,其中 1 ~ 24 组为分析试验和零点试验,25 ~ 27 组为中心点重复试验,试验组合见表 2。

采用 Design - Expert 8.0.6.1 软件对 $D_{540\text{ nm}}$ 与各水解因素进行多元回归拟合,得到回归方程: $D_{540\text{ nm}} = 0.085 + 7.250 \times 10^{-4} \times A - 8.917 \times 10^{-4} \times B + 3.525 \times 10^{-3} \times C + 4.958 \times 10^{-3} \times$

2 结果与分析

2.1 胃蛋白酶处理的单因素试验结果

pH 值 1.5、反应时间 4 h、反应温度 40 ℃时,测定不同酶质量浓度对多肽提取的影响。图 1 - A 结果显示,当酶质量浓度小于 15 mg/mL 时, $D_{540\text{ nm}}$ 随着酶质量浓度的增大而增大;当酶质量浓度为 15 mg/mL 时, $D_{540\text{ nm}}$ 达最大值。选择 15 mg/mL 作为反应的最佳酶质量浓度。

pH 值 1.5、反应温度 40 ℃、酶质量浓度 15 mg/mL 时,以酶解时间为自变量,测定酶解时间对多肽提取的影响。结果显示,当酶解时间低于 4 h 时, $D_{540\text{ nm}}$ 随着温度的升高而提高;当酶解时间为 4 h 时, $D_{540\text{ nm}}$ 有最大值(图 1 - B)。选择 4 h 作为反应的最佳酶解时间。

pH 值 1.5、反应时间 4 h、酶质量浓度 15 mg/mL 时,以酶解温度为变量,测定酶解温度对多肽提取的影响。结果显示,当温度低于 40 ℃时, $D_{540\text{ nm}}$ 随着温度的升高而提高;当温度为 40 ℃时, $D_{540\text{ nm}}$ 有最大值(图 1 - C)。选择 40 ℃作为反应的最佳酶解温度。

$D + 2.425 \times 10^{-3} \times A \times B - 2.250 \times 10^{-3} \times A \times C - 3.350 \times 10^{-3} \times A \times D - 1.700 \times 10^{-3} \times B \times C - 2.750 \times 10^{-3} \times B \times D - 2.325 \times 10^{-3} \times C \times D - 2.454 \times 10^{-3} \times A^2 - 4.979 \times 10^{-3} \times B^2 - 4.079 \times 10^{-3} \times C^2 - 0.022 \times D^2$ 。

方差分析结果(表 3)显示,试验中一次项 C(酶质量浓度)、D(pH 值)及时间、酶质量浓度、pH 值的二次项影响较为显著,在试验范围内模型的“P 值 > F 值” < 0.000 1,表明该二次多项式回归方程模型达到了极显著水平,具有较高的可靠性; $R^2 = 0.946\ 8$,表明试验值与预测值高度相关,即相应值的变化有 94.68% 来自所选变量;同时变异系数(CV) = 5.61%,且失拟项不显著($P = 0.069\ 7 > 0.05$),表明实际值与模型预测值有较好的拟合度。可见,试验所建立的数学回归模型拟合度高,可较好地反映各因素与响应值间的真实关系,因此采用该数学模型预测胃蛋白酶提取鲤鱼多肽的提取

表 2 胃蛋白酶酶解提取鲤鱼多肽试验设计及结果

序号	A:酶解 温度(℃)	B:酶解 时间(h)	C:酶质量浓度 (mg/mL)	D:pH 值	$D_{540\text{ nm}}$
1	-1	-1	0	0	0.079 0
2	-1	1	0	0	0.073 3
3	1	-1	0	0	0.074 7
4	1	1	0	0	0.078 7
5	0	0	-1	-1	0.048 7
6	0	0	-1	1	0.062 7
7	0	0	1	-1	0.058 0
8	0	0	1	1	0.062 7
9	-1	0	0	-1	0.051 7
10	-1	0	0	1	0.071 7
11	1	0	0	-1	0.053 7
12	1	0	0	1	0.060 4
13	0	-1	0	0	0.069 4
14	0	-1	1	0	0.082 7
15	0	1	0	0	0.069 7
16	0	1	1	0	0.076 4
17	-1	0	-1	0	0.070 7
18	-1	0	1	0	0.081 7
19	1	0	-1	0	0.083 7
20	1	0	1	0	0.085 7
21	0	-1	0	-1	0.054 7
22	0	-1	0	1	0.067 3
23	0	1	0	-1	0.058 7
24	0	1	0	1	0.060 3
25	0	0	0	0	0.084 7
26	0	0	0	0	0.083 7
27	0	0	0	0	0.086 0

条件。

各因素对 $D_{540\text{ nm}}$ 的影响不是简单的线性关系,其影响效果由 F 值得得,4 个因素对响应值的影响大小依次为 D(pH

值) > C(酶质量浓度) > B(时间) > A(温度)。

利用二次多项式回归方程和 Design - Expert 8.0.6.1 软件作图分析(图 2)。所得回归方程为 $D_{540\text{ nm}} = 0.085 + 7.250 \times 10^{-4} \times A - 8.917 \times 10^{-4} \times B + 3.525 \times 10^{-3} \times C + 4.958 \times 10^{-3} \times D + 2.425 \times 10^{-3} \times A \times B - 2.250 \times 10^{-3} \times A \times C - 3.350 \times 10^{-3} \times A \times D - 1.700 \times 10^{-3} \times B \times C - 2.750 \times 10^{-3} \times B \times D - 2.325 \times 10^{-3} \times C \times D - 2.454 \times 10^{-3} \times A^2 - 4.979 \times 10^{-3} \times B^2 - 4.079 \times 10^{-3} \times C^2 - 0.022 \times D^2$ 。

对上述回归方程求解,可得 $A = 36.65$ 、 $B = 3.70$ 、 $C = 17.77$ 、 $D = 1.07$, $D_{540\text{ nm}}$ 有最大值 0.086 1。对照标准曲线即可得到当前体系下多肽的质量浓度为 1.97 mg/mL,即胃蛋白酶酶解鲤鱼多肽的最佳条件组合为温度 36.65 ℃、时间 3.7 h、酶质量浓度 17.77 mg/mL、pH 值 1.07,此时 $D_{540\text{ nm}}$ 为 0.086 1。为验证模型预测的准确性,于温度 36.7 ℃、时间 3.7 h、加酶量 17.74 mg/mL、pH 值 1.06 条件下进行试验,实际测得 $D_{540\text{ nm}}$ 为 0.086 3。实测值与理论值的误差在 $\pm 1\%$ 左右,可见此模型能较好地预测酶水解的最佳条件,预测条件可作为最佳水解条件。

3 结论与讨论

3.1 酶质量浓度对酶解结果的影响

当酶用量过少时,底物浓度远远大于酶浓度,反应系统中酶促反应速度与酶浓度成正比,随着酶用量的增大,酶解液中蛋白质、多肽与酶作用的机会大大增加,分解为游离氨基酸^[10]。酶分子过量时,很多酶分子根本不能发挥作用,水解度相对降低,造成不必要的浪费。本试验中,当酶质量浓度为 15 mg/mL 时反应效果最佳。响应面分析表明,酶质量浓度对胃蛋白酶的提取效果影响较大。

3.2 pH 值对反应结果的影响

酶分子是一种特殊的蛋白质分子,具有若干个活性部位,

表 3 以 $D_{540\text{ nm}}$ 为响应值的二次多项式模型方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
A(温度)	6.307×10^{-6}	1	6.307×10^{-6}	0.41	0.534 9	
B(时间)	9.541×10^{-6}	1	9.541×10^{-6}	0.62	0.447 3	
C(酶质量浓度)	1.491×10^{-4}	1	1.491×10^{-4}	9.65	0.009 1	*
D(pH 值)	2.950×10^{-4}	1	2.950×10^{-4}	19.09	0.000 9	*
AB	2.352×10^{-5}	1	2.352×10^{-5}	1.52	0.240 9	
AC	2.025×10^{-5}	1	2.025×10^{-5}	1.31	0.274 7	
AD	4.489×10^{-5}	1	4.489×10^{-5}	2.90	0.114 1	
BC	1.156×10^{-5}	1	1.156×10^{-5}	0.75	0.404 1	
BD	3.025×10^{-5}	1	3.025×10^{-5}	1.96	0.187 1	
CD	2.162×10^{-5}	1	2.162×10^{-5}	1.40	0.259 8	
A^2	3.212×10^{-5}	1	3.212×10^{-5}	2.08	0.175 0	
B^2	1.322×10^{-4}	1	1.322×10^{-4}	8.56	0.012 7	*
C^2	8.874×10^{-5}	1	8.874×10^{-5}	5.74	0.033 7	*
D^2	2.524×10^{-3}	1	2.524×10^{-3}	163.31	< 0.000 1	**
残差	1.855×10^{-4}	12	1.545×10^{-5}			
失拟	1.828×10^{-4}	10	1.828×10^{-5}	13.74	0.069 7	
误差	2.660×10^{-6}	2	1.330×10^{-6}			
模型	3.302×10^{-3}	14	2.359×10^{-4}	15.26	< 0.000 1	**
总和	3.488×10^{-3}	26				

注:“*”“**”分别表示在 0.05、0.000 1 水平下差异显著。 $R^2 = 0.946\ 8$, $CV = 5.61\%$ 。

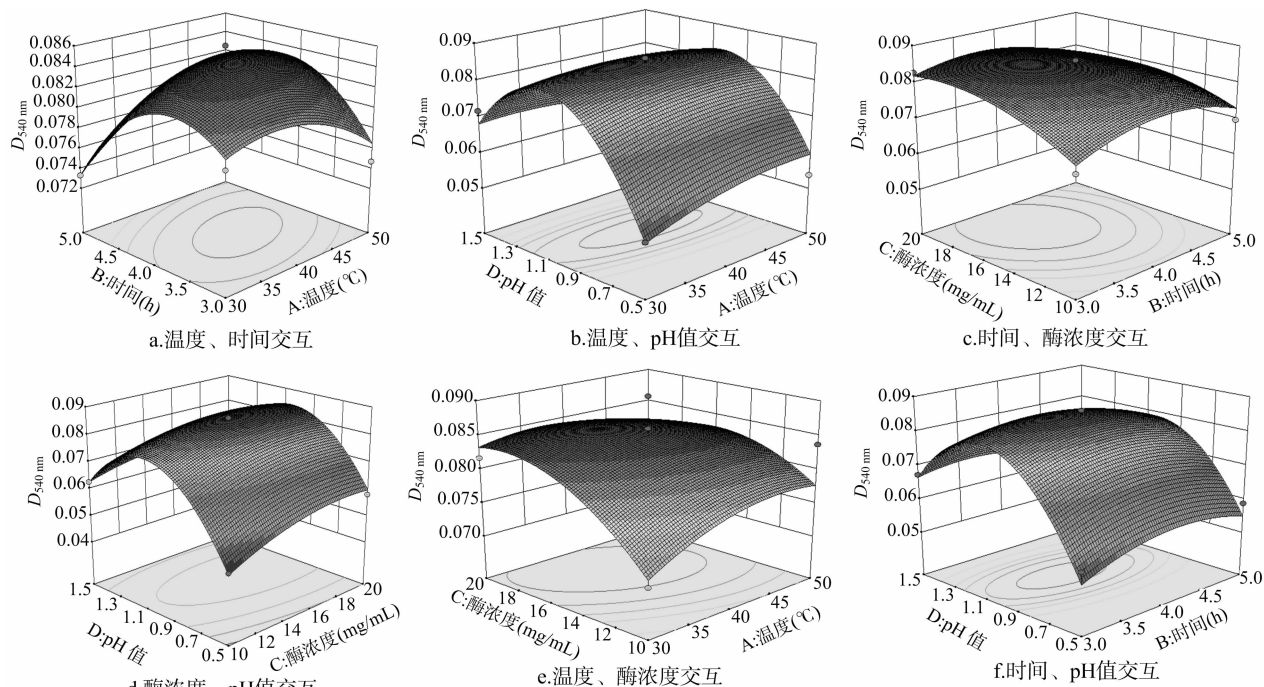


图2 2个因素交互对酶解结果的影响

酶的活性部位由结合位点和催化位点组成。结合部位和催化部位对反应体系的 pH 值变化比较敏感,其解离状态随 pH 值的变化而变化,这些变化影响了酶分子的特殊构象。pH 值的变化直接影响了酶与底物的结合和催化,是酶催化反应的主要因素之一^[11]。胃蛋白酶的最适 pH 值范围约为 1.0~2.0,试验测得最佳 pH 值为 1.06,符合胃蛋白酶的反应要求。响应面综合分析各因素表明,pH 值对胃蛋白酶的影响较大。

3.3 反应温度对反应结果的影响

温度对酶活力的影响较大^[12-13]。温度较低时,酶活力受到抑制;随着温度的升高,加速水解反应处于主导地位,达到最适温度后,酶失活处于主导地位,酶活随温度的升高而下降^[14]。因此,本研究选取反应温度为 36.65℃。响应面分析表明,温度对胃蛋白酶的影响较小。

3.4 反应时间对反应结果的影响

随着酶解时间的延长,多肽被继续水解成氨基酸^[15],当反应时间为 4 h 时, $D_{540\text{ nm}}$ 达到最大值,可作为最佳的提取条件。达到最适时间后出现了下降趋势,可能是由于水解过于充分,导致水解产生了单个氨基酸,在双缩脲反应中无法产生颜色反应。

3.5 结论

通过单因素试验和响应面分析,得到了胃蛋白酶处理的最佳条件为温度 36.65℃、时间 3.7 h、酶质量浓度 17.77 mg/mL、pH 值 1.07,此体系下的多肽提取质量浓度为 1.97 mg/mL。本研究表明,基于响应面法分析所得的优化胃蛋白酶酶解提取鲤鱼多肽的工艺参数准确可靠,具有实用价值。

参考文献:

[1] Saito T. Antihypertensive peptides derived from bovine casein and whey proteins[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*,

2008,606(1):295-317.
 [2] 张睿. 蚕蛹抗疲劳多肽提取工艺优化研究[J]. *食品工业*, 2015,36(1):30-32.
 [3] 刘娟. 青斑鱼多肽提取及对小鼠抗疲劳和耐缺氧能力研究[J]. *食品工业*, 2014,35(12):53-56.
 [4] 徐曼, 窦岫, 杨春霞, 等. 大豆活性肽的研究进展[J]. *食品工业*, 2012,33(4):126-129.
 [5] 沈先荣, 缪辉南, 贾福星, 等. 几种海洋生物活性多肽的抗肿瘤作用研究[C]. 武汉:中国生物化学与分子生物学会、海洋生物化学与分子生物学会, 2005:41-50.
 [6] 郭永娥, 侯颖春. 癌细胞/组织靶向多肽研究进展[J]. *玉林师范学院学报*, 2014,35(5):2-11.
 [7] 刘丹, 李兴暖, 秦仲君, 等. 土鳖虫多肽的制备及免疫调节作用研究[J]. *中药材*, 2012,35(9):1382-1385.
 [8] Li J R, Li T, Jiang Y. chemical aspects of the preservation and safety control of sea foods [J]. *RSC Advances*, 2015, 5 (39): 31010-31017.
 [9] 李静, 华琦, 刘荣坤. 钠利尿多肽与高血压[J]. *中国医药导刊*, 2002,4(4):295-297.
 [10] 丁利君, 张敏玲. 鲤鱼蛋白控制酶解及其酶解产物抗氧化研究[J]. *食品科学*, 2011,32(8):70-73.
 [11] 马井喜, 孙永杰, 冯印, 等. 鲤鱼肽的酶法制备工艺及其抗氧化性[J]. *食品科学*, 2013,34(1):225-229.
 [12] 李双石, 张虎成, 李淳, 等. 酶法提取葡萄酒废酵母胞壁多糖的工艺[J]. *江苏农业科学*, 2015,43(7):311-313.
 [13] 刘金雷, 刘天佳, 于莹, 等. 木质素降解酶系在毕赤酵母中的表达及降解木质素的活性[J]. *江苏农业科学*, 2015,43(11):58-62.
 [14] 张雪, 陈复生, 隋继学. 鲮鱼活性多肽酶法制备工艺研究[J]. *河南科学*, 2013,31(3):297-302.
 [15] 王海生, 伍曾利, 李介钟. 双酶法提取肌肽的工艺研究[J]. *热带农业科学*, 2012,32(2):76-78,83.