

颜 辉,蔡 豪,贾俊强,等.牡丹籽酶解制备降血糖肽工艺的响应面优化[J].江苏农业科学,2017,45(14):167-170.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.047

# 牡丹籽酶解制备降血糖肽工艺的响应面优化

颜 辉,蔡 豪,贾俊强,江明珠,吴琼英

(江苏科技大学生物技术学院,江苏镇江 212018)

**摘要:**为开发一种新型降血糖肽,以牡丹籽蛋白为原料,探索使用生物酶法制备牡丹籽降血糖肽。以  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性为标准,使用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶进行最佳酶类筛选,选择抑制活性最好的酶,然后使用单因素试验、响应面试验优化工艺条件。胰蛋白酶的抑制效果最好,响应面优化得到最优工艺条件:蛋白浓度为 0.8%、加酶量为 5 401.57 U/g、温度为 37.62  $^{\circ}\text{C}$ 、时间为 43.18 min、pH 值 = 8.07。该条件下经过试验验证  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的实际抑制率达到 22.21%,与预测值 22.11% 基本吻合,模型回归显著。该结论为牡丹籽降血糖肽进一步研究与生产提供基础,也为牡丹籽蛋白高效利用提供新方向。

**关键词:**牡丹籽蛋白; $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率;酶解;响应面法;最优工艺条件

**中图分类号:** R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0167-04

牡丹油是我国新型的食用油,其中牡丹籽的含油率为 29%<sup>[1]</sup>,粗蛋白含量约占 20%,蛋白含量较为丰富。牡丹油营养价值高,需求量也越来越大。迄今为止,油料牡丹的种植面积已达 2 万  $\text{hm}^2$  以上<sup>[2]</sup>。榨油后的牡丹籽粕多作为饲料,深层次的加工利用较少,如何高效利用牡丹籽蛋白是本领域亟待解决的问题<sup>[3]</sup>。

糖尿病是一种严重影响人们身体健康的疾病<sup>[4]</sup>。近年来,随着经济飞速发展,人们的饮食越来越好,运动却日趋减少,糖尿病的发病率逐年增加。传统的降血糖药分为葡萄糖苷酶抑制剂、胰岛素增敏剂、胰岛素促分泌剂、中成药、胰岛素、双胍类、磺酰脲类等 7 种药物类型<sup>[5-7]</sup>,由于药物治疗存在副作用,长期使用患者难以接受。近年来,通过食疗达到控制血糖的方法越来越受到人们的青睐,其中新开发的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制物是专家学者的努力方向。

最新研究表明,蛋白质经过蛋白酶酶解之后所获得的生物活性物质多肽具有降血压、降血脂等功效<sup>[8]</sup>,杂色蛤、蚕丝、蛋清、乳清等蛋白经过酶解也表现出一定的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用,可以起到辅助降血糖作用<sup>[9-14]</sup>。以牡丹籽蛋白为酶解底物、酶解多肽对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性抑制率为评价指标,建立制备方法,并采用响应面法进行工艺优化,获得最佳酶解参数,为开发新型降血糖多肽提供试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

试验动物为昆明小鼠,购自江苏大学试验动物中心(合格证编号:20152299)。

试验材料与药品:牡丹籽购自安徽省亳州市谯城区万亩药材种植农民专业合作社;对硝基苯酚- $\alpha$ -吡喃葡萄糖苷

(pNPG)购自阿拉丁试剂(上海)有限公司;胰蛋白酶(质量比 1:250)、木瓜蛋白酶均购自国药集团化学试剂有限公司;碱性蛋白酶购自北京奥博星生物技术有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 牡丹籽蛋白的制备 牡丹籽经 65  $^{\circ}\text{C}$  烘干 12 h,剥壳,65  $^{\circ}\text{C}$  烘干 8 h,榨油,将所得牡丹籽粕烘干粉碎,与蒸馏水按照料液比 1 g:10 mL 混溶,1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 9.5,50  $^{\circ}\text{C}$  超声水浴 2 h,3 800 r/min 离心 15 min;所得沉淀重复提取 2 次,合并所得溶液,4 mol/L 盐酸调节 pH 值至 4.5,4 000 r/min 离心 15 min,弃上清;将所得沉淀 55  $^{\circ}\text{C}$  烘干,粉碎,过 40 目筛得到牡丹籽蛋白。

1.2.2  $\alpha$ -葡萄糖苷酶制备 脱白处死小鼠,取小肠浸泡于 0  $^{\circ}\text{C}$  生理盐水中,洗去杂物,液氮研磨。将研磨粉与 pH 值 = 6.8 的 0.05 mol/L 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,简称 PBS)质量体积比 1 mg:10 mL 加入,涡旋振荡 30~60 s,4  $^{\circ}\text{C}$  8 000 r/min 离心 10 min,取上清。

1.2.3 检测方法 酪氨酸标准曲线与酶活力的测定方法参照周景祥等的方法<sup>[15]</sup>;  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率测定方法参照 Lee 等的方法<sup>[14]</sup>。

1.2.4 单因素条件的筛选与响应面试验设计 以  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率为评价指标,通过单因素试验对加酶量、底物浓度、温度、时间、pH 值等条件进行筛选。根据单因素试验结果,将加酶量、温度、时间、pH 值作为响应面设计的响应值进行分析。

1.2.5 数据分析 通过 Design Expert 8.0.6 软件建立响应面模型与分析数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶类筛选的结果

分别选取猪胰蛋白酶、地衣芽孢杆菌碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶进行蛋白酶的筛选试验。反应体系为 50 mL,时间为 3 h,底物浓度为 2%,按照各自适宜 pH 值、温度进行反应。酶解反应容器放在恒温水浴锅内,间歇搅拌,加入 1 mol/L

收稿日期:2016-03-13

基金项目:江苏省镇江市重点研发计划(编号:GY2015006)。

作者简介:颜 辉(1971—),男,江苏镇江人,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为农产品加工与贮藏。E-mail:yanh1006@163.com。

NaOH 溶液维持 pH 值稳定。反应结束后,沸水浴 10 min 灭酶,冷却之后 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液检测  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率。

由表 1 可知,碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶的酶解多肽产物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制效果较差,胰蛋白酶酶解产物抑制效果较好。这可能是因为碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶的酶切位点较为广泛导致产物多样,胰蛋白酶酶切位点较为特殊,酶切位点集中在精氨酸(arginine,简称 Arg)、赖氨酸(lysine,简称 Lys)为羧基端的肽键部分<sup>[16]</sup>,特殊序列能对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶分子产生抑制作用。因此,选择胰蛋白酶进行试验。

表 1 不同种类蛋白酶对抑制率的影响

| 蛋白酶   | 加酶量(U/g) | pH 值 | 温度(℃) | 抑制率(%) |
|-------|----------|------|-------|--------|
| 胰蛋白酶  | 5 000    | 8.0  | 37    | 23.0   |
| 碱性蛋白酶 | 5 000    | 8.5  | 55    | 8.5    |
| 木瓜蛋白酶 | 5 000    | 7.5  | 50    | 3.3    |

2.2 单因素试验结果

2.2.1 不同酶解时间对抑制率的影响 在不同时间点 0、10、20、30、40、50、60、70 min,加酶量为 5 000 U/g,底物浓度为 0.8%,温度为 37℃,pH 值=8.0 的条件下分别检测抑制效果。由图 1 可知,在 0~40 min 时抑制率不断上升,可能是因为胰蛋白酶将牡丹籽蛋白质切成具有抑制活性的多肽不断增多,在 40 min 时抑制率达到最高,继续延长反应时间,抑制率并未有明显增加,因此选择 40 min 作为最优时间。

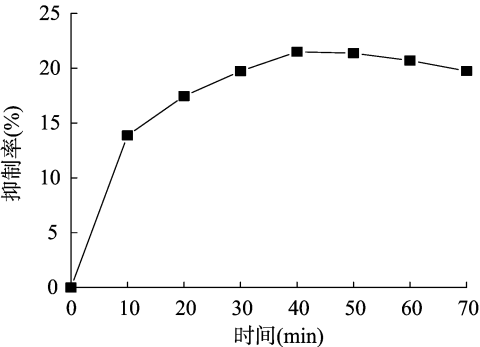


图1 不同酶解时间对抑制率的影响

2.2.2 不同加酶量对抑制率的影响 在加酶量为 0、2 000、3 000、4 000、5 000、6 000 U/g,时间为 40 min,底物浓度为 0.8%,温度为 37℃,pH 值=8.0 的条件下分别检测抑制效果。由图 2 可知,加酶量在 0~6 000 U/g 范围内, $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率随着加酶量增加明显增强,当超过 5 000 U/g 之后增幅平缓,这可能是酶分子结合位点达到饱和,反应速度增加缓慢。因此,选择 5 000 U/g 的加酶量作为最适加酶量。

2.2.3 不同底物浓度对抑制率的影响 在底物浓度为 0、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0%、2.0%、3.0%,加酶量为 5 000 U/g,时间为 40 min,温度为 37℃,pH 值=8.0 条件下分别检测抑制效果。由图 3 可知,底物浓度在 0~0.8% 内,随着底物的逐渐增多,抑制率明显上升,在 0.8%~3.0% 内,抑制率上升缓慢,一方面可能是蛋白中存在一定的蛋白酶抑制剂<sup>[17]</sup>,一方面酶分子达到饱和。为了更加经济,选择 0.8% 浓度进行响应面设计。

2.2.4 不同pH值对抑制率的影响 在pH值为6、7、8、9、

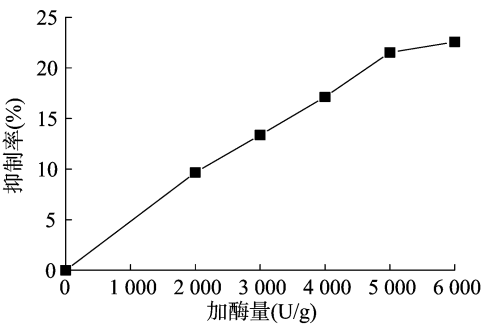


图2 不同加酶量对抑制率的影响

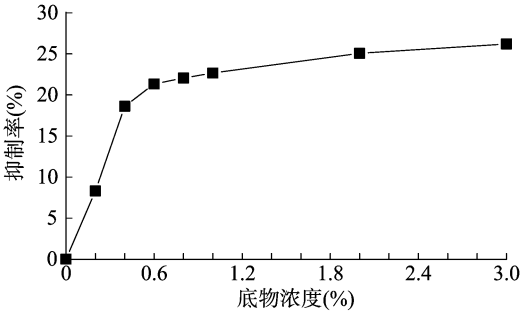


图3 不同底物浓度对抑制率的影响

10,加酶量为 5 000 U/g,时间为 40 min,温度为 37℃,底物浓度为 0.8% 时,分别检测抑制效果。由图 4 可知,在 6~10 的范围内,随着 pH 值的增加, $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率呈现先上升后下降的趋势;在 pH 值为 8.0 时达到最大值;pH 值在 8~10 范围内,抑制率下降。这表明胰蛋白酶的最适 pH 值为 8.0,因此选择 8.0 作为最优 pH 值。

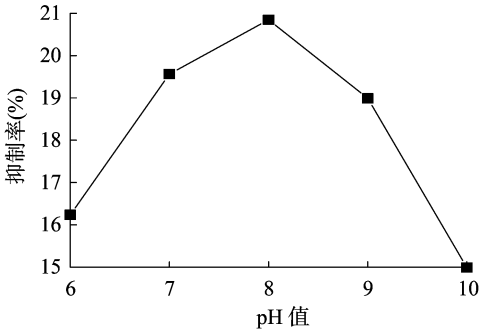


图4 不同 pH 值对抑制率的影响

2.2.5 不同温度对抑制率的影响 在温度为 31、34、37、40、43℃,加酶量为 5 000 U/g,时间为 40 min,底物浓度为 0.8%,pH 值为 8.0 时分别检测抑制效果。由图 5 可知,在温度 31~37℃ 范围内,随着温度升高,抑制率逐渐增高,对于  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的抑制率呈快速上升趋势,37℃ 时达到顶点,然后在 37~43℃ 时缓慢下降,表明胰蛋白酶的最适温度为 37℃,因此选择 37℃ 作为最优温度。

2.3 响应面优化试验

2.3.1 响应面试验设计与结果 为优化酶解工艺,在单因素试验的基础上,采用二次回归旋转组合设计,对酶解工艺进行优化试验,选取加酶量(A)、温度(B)、时间(C)、pH 值(D)作为 4 个因素,每个因素选取 5 个显著水平结合前期单因素结果,设定各因素水平编码(表 2),响应面设计与结果如表 3 所示。

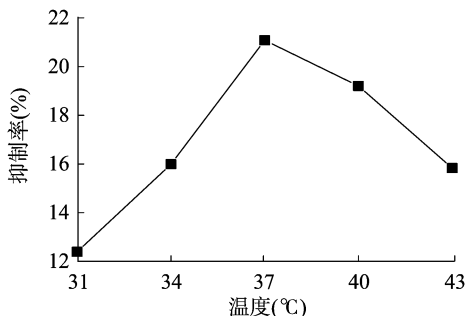


图5 不同温度对抑制率的影响

表 2 响应面试验的因素和水平编码

| 设计水平   | 因素             |             |               |        |
|--------|----------------|-------------|---------------|--------|
|        | A:加酶量<br>(U/g) | B:温度<br>(℃) | C:时间<br>(min) | D:pH 值 |
| -2     | 3 000          | 43          | 20            | 6      |
| -1.189 | 3 810          | 33.43       | 28.11         | 6.81   |
| 0      | 5 000          | 37          | 40            | 8      |
| 1.189  | 6 189          | 40.57       | 51.89         | 9.189  |
| 2      | 7 000          | 43          | 60            | 10     |

表 3 响应面试验设计与结果

| 编号 | A:加酶量  | B:温度   | C:时间   | D:pH 值 | 抑制率<br>(%) |
|----|--------|--------|--------|--------|------------|
| 1  | 0      | 0      | 0      | 0      | 17.52      |
| 2  | 1.189  | -1.189 | 1.189  | 1.189  | 17.24      |
| 3  | -1.189 | -1.189 | -1.189 | -1.189 | 15.84      |
| 4  | 0      | 0      | 0      | 2      | 18.928     |
| 5  | 1.189  | 1.189  | -1.189 | -1.189 | 21.65      |
| 6  | 0      | 0      | 0      | 0      | 14.57      |
| 7  | -1.189 | 1.189  | 1.189  | 1.189  | 17.74      |
| 8  | 1.189  | -1.189 | -1.189 | 1.189  | 16.23      |
| 9  | 0      | 0      | 0      | 0      | 20.16      |
| 10 | 0      | 0      | 2      | 0      | 20.01      |
| 11 | 1.189  | 1.189  | 1.189  | -1.189 | 13.40      |
| 12 | 0      | -2     | 0      | 0      | 19.04      |
| 13 | 0      | 0      | 0      | 0      | 12.61      |
| 14 | 0      | 0      | 0      | -2     | 21.26      |
| 15 | 0      | 0      | -2     | 0      | 16.33      |
| 16 | -1.189 | 1.189  | -1.189 | 1.189  | 13.76      |
| 17 | 0      | 2      | 0      | 0      | 13.98      |
| 18 | 0      | 0      | 0      | 0      | 22.74      |
| 19 | 2      | 0      | 0      | 0      | 12.47      |
| 20 | -1.189 | -1.189 | 1.189  | -1.189 | 14.18      |
| 21 | -2     | 0      | 0      | 0      | 23.60      |

2.3.2 模型方差分析 在蛋白质酶解的工艺参数中,影响抑制效果的因素按照主次顺序排列:A(加酶量)>B(温度)>C(时间)>D(pH 值)。加酶量和温度有显著差异,时间和 pH 值无差异显著性;加酶量与温度、pH 值存在交互作用,达到显著水平。模型极其显著,失拟项不显著;总决定系数  $R^2 = 0.958\,5$ ,调整决定系数  $R^2 = 0.896\,3$ ,说明该模型的拟合程度较好,该方程模型成立,可以进行预测(表 4)。

抑制率 =  $21.7 + 1.49A + 1.23B + 0.61C - 0.52D - 1.5AB - 0.6AC + 1.72AD + 0.76CD - 1.74A^2 - 2.09B^2 - 0.85C^2 - 2.09D^2$ 。

表 4 回归方程模型方差分析

| 变异来源           | 平方和     | 自由度 | 均方和    | F 值    | P 值       |
|----------------|---------|-----|--------|--------|-----------|
| 模型             | 221.300 | 12  | 18.440 | 15.410 | 0.0003**  |
| A              | 30.180  | 1   | 30.180 | 25.230 | 0.0010**  |
| B              | 8.506   | 1   | 8.506  | 7.109  | 0.0285*   |
| C              | 5.086   | 1   | 5.086  | 4.250  | 0.0732    |
| D              | 1.559   | 1   | 1.559  | 1.303  | 0.2867    |
| AB             | 7.471   | 1   | 7.471  | 6.244  | 0.0370*   |
| AC             | 2.843   | 1   | 2.843  | 2.376  | 0.1618    |
| AD             | 9.767   | 1   | 9.767  | 8.163  | 0.0212*   |
| CD             | 4.623   | 1   | 4.623  | 3.863  | 0.0849    |
| A <sup>2</sup> | 45.080  | 1   | 45.080 | 37.680 | 0.0003**  |
| B <sup>2</sup> | 64.970  | 1   | 64.970 | 54.290 | <0.0001** |
| C <sup>2</sup> | 10.810  | 1   | 10.810 | 9.035  | 0.0169*   |
| D <sup>2</sup> | 65.210  | 1   | 65.210 | 54.500 | <0.0001** |
| 残差             | 9.572   | 8   | 1.196  |        |           |
| 失拟项            | 1.931   | 4   | 0.483  | 0.253  | 0.8943    |
| 纯误差            | 7.641   | 4   | 1.910  |        |           |
| 总和             | 230.800 | 20  |        |        |           |

注: \*、\*\* 分别表示在 0.05、0.01 水平差异显著; $R^2 = 0.958\,5$ ,调整  $R^2 = 0.896\,3$ 。

在分析回归模型结果的基础上,根据上述二次方程,作酶解加酶量、温度、时间、pH 值对抑制率影响的响应面图,分析 2 个因素交互作用的影响<sup>[18]</sup>。由图 6-a 可知,沿酶解加酶量方向等高线比温度方向等高线密集,说明加酶量对抑制率的影响要大于酶解温度的影响;由图 6-b 可知,沿加酶量等高线比时间等高线密集,说明加酶量对抑制率的影响大于时间的影响;由图 6-c 可知,沿 pH 值等高线远远比加酶量等高线密集,说明 pH 值对抑制率的影响高于加酶量;由图 6-d 可知,沿 pH 值的等高线密度比时间因素等高线密集,说明 pH 值对抑制率的影响高于时间。

在底物浓度为 0.8% 的条件下,经过响应曲面分析得出酶解牡丹籽蛋白最优工艺条件:加酶量为 5 401.57 U/g,温度为 37.62℃,时间为 43.18 min,pH 值为 8.07,此条件预测抑制率达到 22.11%。为验证模型可靠性,进行 3 次验证,测得抑制率为 22.21%,与预测值基本一致。可见,得到的优化工艺参数准确可靠,具有实用性。

3 结论

牡丹籽蛋白是一种新型的蛋白,作为传统饲料利用价值较低。本研究选用牡丹籽蛋白,以  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制率为指标,通过单因素筛选和响应面试验得出最优酶解工艺:蛋白浓度为 0.8%、加酶量为 5 401.57 U/g、温度为 37.62℃、时间为 43.18 min、pH 值为 8.07,抑制率达到 22.11%,经过验证试验抑制率为 22.21%,因此模型可靠,回归显著,具有应用价值。本试验为酶法制备牡丹籽降血糖肽的进一步研究提供基础,也为牡丹籽蛋白的高效利用指引一条新的道路。

参考文献:

[1] 庞雪风,何东平,胡传荣,等. 牡丹籽蛋白功能特性的研究[J]. 中国粮油学报,2014,29(7):45-48,79.

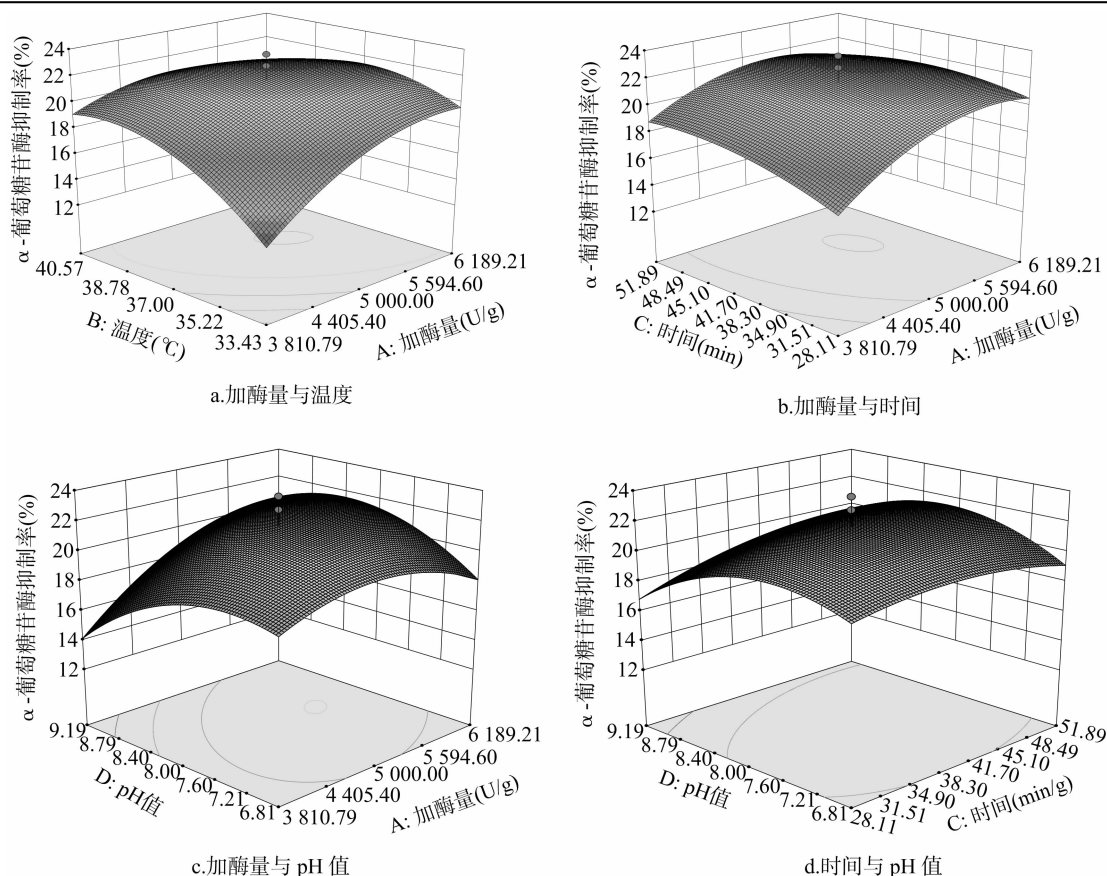


图6 各因素交互作用对抑制率影响的响应曲面结果

- [2] 白喜婷, 朱文学, 罗磊, 等. 牡丹籽油的精炼及理化特性变化分析[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 351–354.
- [3] 吴静义, 曹丹亮, 刘永刚, 等. 牡丹籽粕的化学成分研究[J]. 中医药学报, 2014, 42(1): 9–11.
- [4] 魏开敏. 高血糖的危害种种[J]. 现代养生, 2001(11): 4–5.
- [5] 姚军. 警惕高血糖的危害[J]. 医学与保健(上旬版), 2008, 16(9): 42.
- [6] 孙凤兰. 2010—2012 年我院口服降血糖药物的临床应用分析[J]. 大家健康(学术版), 2013, 7(11): 238.
- [7] 王俊玲. 2005—2008 年兰州市中医院降血糖药物利用分析[J]. 甘肃科技纵横, 2009, 38(2): 154, 195.
- [8] 邓乾春, 黄庆德, 黄凤洪, 等. 蛋白质溶液构象的研究方法[J]. 生物物理学报, 2009, 25(4): 237–246.
- [9] 吴晖, 罗美琪, 赖富饶, 等. 酶解丝素蛋白制备  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的研究[J]. 食品科技, 2012, 37(2): 27–31.
- [10] 李志博, 姜文杰, 齐阳, 等. 杂色蛤酶解制备  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制肽的工艺研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(24): 135–138.
- [11] Lee H J, Lee H S, Choi J W, et al. Novel tripeptides with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity isolated from silk cocoon hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011,

59(21): 11522–11525.

- [12] Yu Z P, Yin Y G, Zhao W Z, et al. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting  $\alpha$ -glucosidase[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1376–1382.
- [13] Lacroix I M E, Li-Chan E C. Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and  $\alpha$ -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(31): 7500–7506.
- [14] Lee H J, Lee H S, Choi J W, et al. Novel tripeptides with  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity isolated from silk cocoon hydrolysate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(21): 11522–11525.
- [15] 周景祥, 王桂芹, 余涛. 蛋白酶和淀粉酶活性检测方法探讨[J]. 中国饲料, 2001(11): 23–27.
- [16] 喻峰, 卢大儒, 陈薇. 测序级胰蛋白酶的制备工艺与质量检测[J]. 生物技术通讯, 2014, 25(1): 76–81.
- [17] 王克夷, 戚正武. 胰蛋白酶的天然抑制剂[J]. 生理科学进展, 1965, 7(2): 133–145.
- [18] 郑明洋, 王元秀, 张桂香, 等. 响应面法优化玉米黄粉蛋白的酶解工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(4): 71–76.