

响应面法优化长柄扁桃肽的酶解制备工艺

李 聪¹, 苏晨灿¹, 李皓瑜^{1,2}, 魏 冰³, 张 煜³, 史宣明³, 陈 邦¹, 申烨华¹

(1. 西北大学 化学与材料科学学院, 西安 710127; 2. 延安大学 化学与化工学院, 陕西 延安 716000;

3. 中粮工科(西安)国际工程有限公司, 西安 710082)

摘要:为高值化开发长柄扁桃种仁蛋白,以长柄扁桃种仁为原料,脱脂后提取水溶性蛋白,采用蛋白酶对其酶解制备长柄扁桃肽。通过比较5种蛋白酶对长柄扁桃水溶性蛋白水解度及酶解产物抗氧化活性的影响,优选合适的酶解用酶,在此基础上,采用单因素实验和响应面实验优化了长柄扁桃多肽的制备工艺。结果表明:采用碱性蛋白酶酶解可以得到更高的长柄扁桃蛋白水解度(16.03%)和酶解产物DPPH自由基清除率(59.49%),更适于长柄扁桃蛋白的酶解;长柄扁桃蛋白的最优酶解工艺条件为酶解温度57℃、酶解时间4h、碱性蛋白酶用量1192U/g、pH8.4,在此条件下长柄扁桃蛋白水解度为18.12%。酶解长柄扁桃蛋白制备多肽可提高长柄扁桃种仁的附加值,同时可为功能性肽产品提供优质原料。

关键词:长柄扁桃;多肽;酶解;响应面优化

中图分类号:TS229;TS201.2 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2024)03-0111-05

Optimization of preparation of *Amygdalus pedunculata* Pall peptides using response surface methodology

LI Cong¹, SU Chencan¹, LI Haoyu^{1,2}, WEI Bing³, ZHANG Yu³,
SHI Xuanming³, CHEN Bang¹, SHEN Yehua¹

(1. College of Chemistry and Materials Science, Northwest University, Xi'an 710127, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China; 3. COFCO ET(Xi'an) International Engineering Co., Ltd., Xi'an 710082, China)

Abstract: To develop *Amygdalus pedunculata* Pall seed protein for high-value, the water soluble protein was extracted from *Amygdalus pedunculata* Pall seed after defatting, then hydrolyzed by protease to prepare *Amygdalus pedunculata* Pall peptides. The effects of five proteases on the hydrolysis degree of the water soluble protein of *Amygdalus pedunculata* Pall seed and antioxidant activity of hydrolysate were studied, and the suitable hydrolytic enzyme was selected. Then the preparation process of *Amygdalus pedunculata* peptides was optimized by single factor experiment and response surface methodology. The results showed that the alcalase was more suitable for hydrolysis of *Amygdalus pedunculata* Pall protein with higher hydrolysis degree (16.03%) and DPPH free radical scavenging activity (59.49%). The optimal hydrolysis conditions of *Amygdalus pedunculata* Pall protein were obtained as follows: enzymatic

收稿日期:2023-02-02;修回日期:2023-12-01

基金项目:陕西省科技厅重点产业链项目(2018ZDXM-NY-087);陕西省秦创原“科学家+工程师”队伍建设项目(2022KXJ-148);陕西省创新能力支撑计划项目(2021PT-035)

作者简介:李 聪(1982),女,高级工程师,博士,研究方向为植物蛋白和多肽的功能与开发(E-mail)licong@nwu.edu.cn。

通信作者:申烨华,教授(E-mail)yhshen@nwu.edu.cn。

hydrolysis temperature 57℃, enzymatic hydrolysis time 4 h, dosage of alcalase 1192 U/g, pH 8.4. Under the optimal conditions, the hydrolysis degree of *Amygdalus pedunculata* Pall protein was 18.12%. It is feasible to prepare polypeptides by enzymatic hydrolysis of *Amygdalus pedunculata* Pall seed protein. It can improve the added value of *Amygdalus pedunculata* Pall seed, and can provide high-quality raw materials for functional

peptide products.

Key words: *Amygdalus pedunculata* Pall; polypeptide; enzymatic hydrolysis; response surface optimization

木本油料通常含有丰富的油脂和蛋白质,榨油后的饼粕可以作为制备优质植物蛋白及多肽的原料^[1]。大力发展木本油料产业是我国应对粮油危机的重要举措,油用牡丹、文冠果、元宝枫、长柄扁桃等特色木本油料作物逐渐受到各级政府及相关研究者的重视。长柄扁桃(*Amygdalus pedunculata* Pall),又名野樱桃、柄扁桃,是蔷薇科扁桃属的落叶灌木,分布在中国西北毛乌素沙漠、内蒙古,以及蒙古国、俄罗斯西伯利亚东部等地。长柄扁桃耐寒耐旱,根系发达,保水性好,生命周期长,是防风固沙的优良树种^[2],在环保方面具有一定作用;长柄扁桃叶可制备杀虫剂^[3],其桃壳可开发成高品质的碳材料^[4],具有较好的经济价值;长柄扁桃种仁油脂含量在40%以上^[5],富含不饱和脂肪酸、维生素E和角鲨烯等,有着较好的抗氧化、降血脂、保护肝脏的功效^[6],且其蛋白质含量大于20%,蛋白质氨基酸组成齐全,具有较高的营养价值^[7]。长柄扁桃种仁中的水溶性蛋白具有较好的持油力、乳化性、起泡性、热稳定性,是开发多肽的潜在优良原料。多肽是一种极具潜力的活性功能成分,可广泛应用于食品、保健品、化妆品等领域,具有广阔的应用前景和良好的经济效益,是食品、生物医学领域的研究热点^[8]。

课题组前期研究比较了稀碱溶液、水溶液和盐溶液对长柄扁桃蛋白提取率的影响,发现碱法的提取率略高于水提法,但碱法对长柄扁桃蛋白的色泽有不利影响^[5]。目前有关长柄扁桃肽的研究尚未见报道。本文将长柄扁桃种仁脱脂提取水溶性蛋白,再经酶解制备多肽,通过比较5种生物酶的蛋白水解度及酶解液的DPPH自由基清除能力,优选合适的酶解用酶,并以水解度为指标采用响应面法优化了长柄扁桃肽制备工艺,以期对长柄扁桃蛋白的高值化开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

长柄扁桃种子,采自陕西省榆林市,脱壳后得到长柄扁桃种仁,冷藏备用;胃蛋白酶(1.00×10^4 U/g)、胰蛋白酶(2.50×10^5 U/g)、中性蛋白酶(5.00×10^4 U/g)、碱性蛋白酶(2.00×10^4 U/g)、木瓜蛋白酶(1.00×10^4 U/g),西安优博生物有限公司;正己烷,分析纯,西安化学试剂厂;氢氧化钠,分

析纯,天津志远化工有限公司。

JP-500C-8高速粉碎机,永康市久品工贸有限公司;ME204电子分析天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;Avanti J-26XP高速冷冻离心机,美国Beckman公司;Freezone冷冻干燥机,美国Labconco公司。

1.2 实验方法

1.2.1 长柄扁桃水溶性蛋白的制备

长柄扁桃种仁经热烫(80℃热水中10s)、手工去皮后于40℃下烘干,用高速粉碎机粉碎,得到长柄扁桃种仁粉,以料液比1:5向其中加入正己烷进行索氏抽提脱脂后,于25℃干燥得到长柄扁桃种仁脱脂粉,于4℃保存备用。将长柄扁桃种仁脱脂粉和蒸馏水以1:16的比例混合,在25℃下搅拌90min,4000 r/min离心10min,收集上清液,加稀盐酸(1 mol/L)调pH至4.5酸沉,过滤,沉淀物冷冻干燥后得到长柄扁桃水溶性蛋白粉。

1.2.2 长柄扁桃肽的酶解制备

取一定量长柄扁桃水溶性蛋白粉配制成质量浓度为4 g/mL的溶液,在90℃下加热10min。调节溶液pH,加入一定量蛋白酶,在一定温度下酶解一定时间后,于100℃下水浴10min灭酶,离心(8000 r/min,10min),取上清液(酶解产物溶液),冷冻干燥后得到长柄扁桃肽。

1.2.3 水解度的测定

采用pH-stat法测定长柄扁桃蛋白的水解度。当长柄扁桃蛋白酶解时,需要加入碱液维持反应体系的pH不变,碱液的消耗量与被酶解的肽键数量成正比,根据消耗碱液的体积和浓度计算长柄扁桃蛋白的水解度(X),其计算见公式(1)。

$$X = \frac{CV}{a \times m_p \times h_{tot}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C 为酶解过程中碱液的浓度, mol/L; V 为酶解过程中所消耗的标准碱液的体积, mL; m_p 为底物蛋白质总质量, g; a 为氨基的平均解离度; h_{tot} 为底物蛋白质中肽键总数, mmol/g。长柄扁桃蛋白的 h_{tot} 是7.60 mmol/g。

1.2.4 DPPH自由基清除能力的测定

取2.0 mL酶解产物溶液,加入2.0 mL 60 μ mol/L的DPPH-乙醇溶液,室温条件下避光反应

30 min,于517 nm处测定其吸光度,蒸馏水作为参比溶液。DPPH 自由基清除率(Y)的计算见公式(2)。

$$Y = \frac{A_0 - (A - A_1)}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_0 为DPPH-乙醇溶液的吸光度; A 为酶解产物混合DPPH-乙醇溶液的吸光度; A_1 为蒸馏水混合乙醇溶液的吸光度。

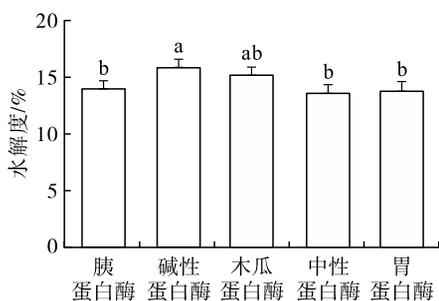
1.2.5 数据处理

所有测量均重复3次,使用SPSS 19软件处理数据。除酶的筛选结果以“平均值+偏差”表示外,其他均以平均值表示。

2 结果与分析

2.1 最适酶解用酶的筛选

不同蛋白酶有不同的酶切位点,同一种蛋白原料采用不同蛋白酶酶解,会有不同的水解度,进而影响酶解产物的肽组成和生物功能。按1.2.2的方法,分别以胃蛋白酶(最适温度37℃,最适pH 2.5)、胰蛋白酶(最适温度37℃,最适pH 7.5)、中性蛋白酶(最适温度50℃,最适pH 7.3)、碱性蛋白酶(最适温度55℃,最适pH 9.0)、木瓜蛋白酶(最适温度50℃,最适pH 7.5)作为酶解用酶,在酶用量为1 680 U/g,各自最适温度和pH下酶解4 h,考察蛋白酶对长柄扁桃蛋白水解度及其酶解产物DPPH自由基清除能力的影响,结果如图1、图2所示。



注:不同字母代表具有显著性差异($p < 0.05$)。下同

图1 蛋白酶对长柄扁桃蛋白水解度的影响

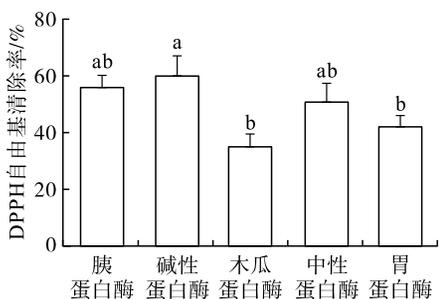


图2 蛋白酶对长柄扁桃蛋白酶解产物DPPH自由基清除能力的影响

由图1可看出,用碱性蛋白酶酶解长柄扁桃蛋

白的水解度最高,达到16.03%,其次为木瓜蛋白酶(水解度为15.40%),中性蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶的长柄扁桃蛋白水解度较低,且显著低于碱性蛋白酶的($p < 0.05$)。由图2可知,碱性蛋白酶酶解产物的DPPH自由基清除能力最高,其次为胰蛋白酶和中性蛋白酶的,三者的DPPH自由基清除率分别为59.49%、55.15%和51.04%,并且碱性蛋白酶酶解产物的DPPH自由基清除能力显著强于木瓜蛋白酶和胃蛋白酶的($p < 0.05$)。综上,后续选择碱性蛋白酶作为长柄扁桃蛋白的酶解用酶。

2.2 单因素实验

2.2.1 酶解温度对碱性蛋白酶酶解效果的影响

在酶用量1 680 U/g、pH 9.0、酶解时间4 h的条件下,考察酶解温度对碱性蛋白酶酶解效果的影响,结果如图3所示。

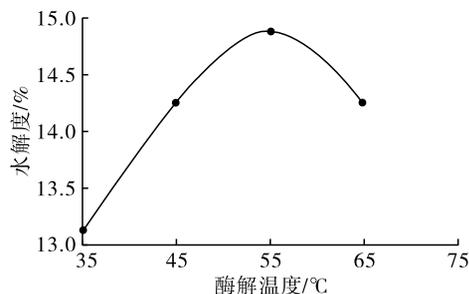


图3 酶解温度对碱性蛋白酶酶解效果的影响

由图3可知,随酶解温度的升高,长柄扁桃蛋白的水解度升高,在酶解温度为55℃时,长柄扁桃蛋白水解度最高,超过55℃后,随着酶解温度的升高,长柄扁桃蛋白水解度下降。酶解温度超过55℃,水解度下降的原因可能是随着酶解温度的升高,碱性蛋白酶的结构发生改变,从而使其活性降低。因此,选择碱性蛋白酶的酶解温度为55℃。

2.2.2 酶用量对碱性蛋白酶酶解效果的影响

在酶解温度55℃、pH 9.0、酶解时间4 h的条件下,考察酶用量对碱性蛋白酶酶解效果的影响,结果如图4所示。

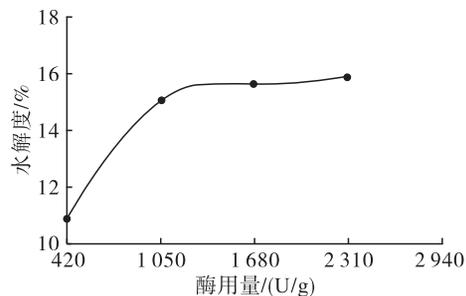


图4 酶用量对碱性蛋白酶酶解效果的影响

从图4可看出,当酶用量小于1 050 U/g时,随

着酶用量的增加,水解度增速较快,但随着酶用量的继续增大,水解度虽然继续增加,但是变化不明显。从经济角度考虑,选择较适的酶用量为 1 050 U/g。

2.2.3 pH 对碱性蛋白酶酶解效果的影响

pH 不仅会影响蛋白酶的活力,也会影响原料蛋白的解离状态,进而影响原料的水解度^[9]。在酶解温度 55 ℃、酶用量 1 050 U/g、酶解时间 4 h 的条件下,考察 pH 对碱性蛋白酶酶解效果的影响,结果如图 5 所示。

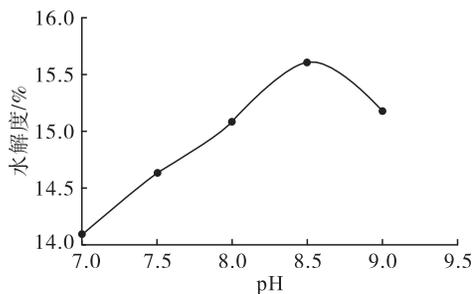


图 5 pH 对碱性蛋白酶酶解效果的影响

由图 5 可知,pH 从 7.0 升高到 8.5 时,水解度由 14.10% 增加到 15.61%,继续增加 pH 时,水解度反而下降。这是由于酶作为一种特殊的蛋白质分子,其催化反应能力与环境中的 pH 密切相关,随着环境 pH 的变化,酶分子的构象和酶分子及底物分子的解离状态也表现出不同,从而影响酶与底物的结合和催化,促进或抑制酶的活性和酶促反应速度,pH 过高或过低均会对酶促反应产生不利影响^[10]。因此,选择 8.5 作为碱性蛋白酶的最适 pH。

2.2.4 酶解时间对碱性蛋白酶酶解效果的影响

在酶解温度 55 ℃、酶用量 1 050 U/g、pH 8.5 的条件下,考察酶解时间对碱性蛋白酶酶解效果的影响,结果如图 6 所示。

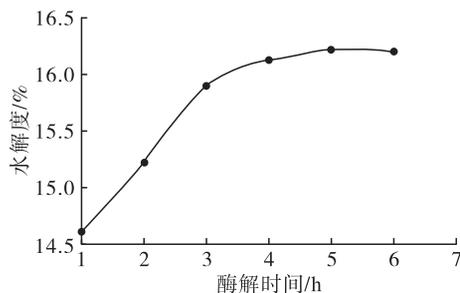


图 6 酶解时间对碱性蛋白酶酶解效果的影响

由图 6 可知,在酶解的前 4 h 内,随酶解时间的延长,长柄扁桃蛋白水解度增加较大。主要原因是酶解开始时,酶的活力很高,产物抑制较小。4 h 以后水解度的增加趋于平缓。因此,确定碱性蛋白酶的最佳酶解时间为 4 h。

2.3 响应面实验

以单因素实验为基础,采用酶解温度(A)、酶用量(B)、pH(C)和酶解时间(D)作为考察因素,长柄扁桃蛋白的水解度(Y)为考察指标,根据 Box - Behnken 实验设计原则,设计了长柄扁桃蛋白酶解工艺的四因素三水平响应面优化实验,响应面实验因素及水平、响应面实验设计方案与结果、回归模型方差分析分别见表 1、表 2、表 3。

表 1 响应面实验因素及水平

水平	A 酶解温度/℃	B 酶用量/(U/g)	C pH	D 酶解时间/h
-1	45	420	8.0	3
0	55	1 050	8.5	4
1	65	1 680	9.0	5

表 2 响应面实验设计方案与结果

实验号	A	B	C	D	水解度/%
1	0	1	1	0	15.18
2	0	-1	0	-1	12.53
3	1	0	-1	0	16.02
4	0	1	0	1	15.29
5	0	0	1	-1	15.32
6	0	0	0	0	18.39
7	-1	0	-1	0	13.16
8	1	0	0	1	15.37
9	0	-1	-1	0	12.59
10	-1	0	0	-1	13.28
11	1	0	1	0	14.98
12	0	1	-1	0	15.18
13	0	0	-1	-1	15.85
14	-1	-1	0	0	11.76
15	0	0	0	0	18.42
16	0	-1	1	0	12.32
17	-1	0	1	0	13.98
18	-1	1	0	0	12.96
19	0	0	1	1	15.43
20	1	-1	0	0	11.96
21	0	0	0	0	18.32
22	-1	0	0	1	14.14
23	0	0	-1	1	15.65
24	0	0	0	0	18.19
25	1	0	0	-1	15.54
26	0	-1	0	1	12.91
27	0	0	0	0	18.48
28	1	1	0	0	16.51
29	0	1	0	-1	15.84

表3 回归模型方差分析

项目	平方和	自由度	方差	F	p	显著性
回归模型	117.56	14	8.40	261.04	<0.000 1	**
A	10.27	1	10.27	319.19	<0.000 1	**
B	23.77	1	23.77	739.03	<0.000 1	**
C	0.13	1	0.13	3.98	0.065 8	
D	0.02	1	0.02	0.48	0.500 2	
AB	2.81	1	2.81	87.22	<0.000 1	**
AC	0.86	1	0.86	26.89	0.000 1	**
AD	0.27	1	0.27	8.25	0.012 3	*
BC	0.02	1	0.02	0.57	0.464 1	
BD	0.22	1	0.22	6.72	0.021 3	*
CD	0.02	1	0.02	0.75	0.402 0	
A ²	34.18	1	34.18	1 062.47	<0.000 1	**
B ²	53.58	1	53.58	1 665.79	<0.000 1	**
C ²	15.49	1	15.49	481.60	<0.000 1	**
D ²	11.98	1	11.98	372.51	<0.000 1	**
残差	0.45	14	0.03			
失拟项	0.40	10	0.04	3.25	0.133 8	
纯误差	0.05	4	0.01			
合计	118.01	28				

注: ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$

从表3可看出,各因素的 F 值大小排序为 $B > A > C > D$,即酶用量 $>$ 酶解温度 $>$ pH $>$ 酶解时间。该模型的相关系数为0.996 2,调整相关系数为0.992 4,模型拟合度较高,另外,模型失拟项的 F 值为3.25, p 值为0.133 8,大于0.05,失拟项不显著,说明能够使用该模型来预测长柄扁桃蛋白的最优酶解工艺。

利用Design-Expert 10.0.1软件对实验数据进行拟合分析,得到二次多项回归方程: $Y = 18.36 + 0.925A + 1.407B - 0.103C + 0.036D + 0.837AB - 0.465AC - 0.257AD + 0.067BC - 0.232BD + 0.077CD - 2.295A^2 - 2.87B^2 - 1.545C^2 - 1.359D^2$ 。

综合考虑酶解温度、酶解时间、pH和酶用量之间的交互作用对长柄扁桃蛋白水解度的影响,以长柄扁桃蛋白的水解度为优化目标,根据Design-Expert 10.0.1软件运行结果,长柄扁桃蛋白的最优酶解工艺条件为酶解温度57.25℃、酶解时间3.97 h、酶用量1 191.75 U/g和pH 8.42,在此条件下模型预测的长柄扁桃蛋白水解度为18.66%。

根据响应面软件预测结果,结合实际工艺条件的可行性,取酶解温度57℃、酶用量1 192 U/g、pH

8.4、酶解时间4 h为长柄扁桃蛋白的最优酶解条件,在此条件下进行3次重复实验,平均水解度为18.12%,该值与模型预测结果接近,说明基于该响应面模型优化酶解长柄扁桃蛋白制备多肽工艺的方法是可行的。

3 结论

本文通过比较碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶对长柄扁桃蛋白酶解效率的影响,发现碱性蛋白酶的长柄扁桃蛋白水解度最高(16.03%),且酶解产物具有更高的DPPH自由基清除率(59.49%),被确定为最适酶解用酶。对碱性蛋白酶酶解长柄扁桃蛋白制备多肽的工艺进行响应面实验优化,得到长柄扁桃蛋白的最优酶解工艺条件为酶解温度57℃、酶解时间4 h、酶用量1 192 U/g、pH 8.4,在最优条件下长柄扁桃蛋白水解度为18.12%。

参考文献:

- [1] 张盼盼,褚治强,焦强,等. 木本油料副产物加工利用研究进展[J]. 林产工业,2022,59(2):63-68.
- [2] 李婷婷,贺玥玥,张晶晶,等. 不同生长阶段长柄扁桃叶蛋白质组学及有机酸代谢通路研究[J]. 分析化学,51(1):72-86.
- [3] 田渭花,王高学,李聪,等. 长柄扁桃叶杀灭指环虫活性部位的研究[J]. 广州化工,2009,37(2):70-73.
- [4] SHU Y, MARUYAMA J, IWASAKI S, et al. Activated carbon monolith derived from *Amygdalus pedunculata* shell and polyacrylonitrile for supercapacitors[J]. Bull Chem Soc Jpn, 2017,90(12):1333-1336.
- [5] 藏小妹,陈邦,李聪,等. 长柄扁桃种仁蛋白粉的提取方法研究[J]. 西北大学学报(自然科学版),2012,42(6):940-944.
- [6] GAO Y, LI C, CHEN B, et al. Anti-hyperlipidemia and antioxidant activities of *Amygdalus pedunculata* seed oil[J]. Food Funct,2016,7(12):5018-5024.
- [7] LI C, YANG J Z, YAO L, et al. Characterisation, physicochemical and functional properties of protein isolates from *Amygdalus pedunculata* Pall seeds [J/OL]. Food Chem, 2020, 311: 125888 [2023-12-01]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125888>.
- [8] 黄小梨,徐紫婷,巫胜源,等. 生物活性多肽及其应用研究进展[J]. 食品安全导刊,2022(31):158-160.
- [9] 薛加雯,王鹏,骆晓慧,等. 响应面法优化香榧降血糖肽制备工艺[J]. 中国粮油学报,2023,38(7):148-154.
- [10] 吴琼,程建军,杨秋萍,等. 碱性蛋白酶水解大豆分离蛋白的研究[J]. 食品工业科技,2009,30(10):191-193.