

油料蛋白

复合蛋白酶水解棉粕制备多肽的工艺优化

潘进权, 郑玉霞, 张耀尹

(岭南师范学院 生命科学与技术学院, 广东 湛江 524048)

摘要:为提高棉粕蛋白资源的利用率,考察了复合蛋白酶水解脱酚棉粕制备多肽的工艺。以多肽得率和水解度为评价指标,比较了不同蛋白酶对棉粕蛋白水解能力的差异,确定了以胰蛋白酶与米曲霉蛋白酶按照酶活比3:1构建的复合蛋白酶作为水解棉粕蛋白的最佳蛋白酶。采用单因素试验及响应面试验对影响棉粕蛋白水解的因素底物蛋白质量浓度、加酶量、pH、酶解温度以及酶解时间进行了分析,并确定了棉粕蛋白水解的最佳工艺条件为:棉粕蛋白质量浓度25 g/L,加酶量5 000 U/g, pH 8.91,酶解温度50~55℃,酶解时间5.92 h。在最佳工艺条件下,水解棉粕蛋白的多肽得率可以达到71.85%。多肽的氨基酸分析结果表明,酶水解制备的多肽能基本保持原棉粕蛋白的氨基酸组成,其氨基酸种类较齐全,8种必需氨基酸含量丰富,营养价值较高。

关键词:复合蛋白酶;棉粕;水解;多肽;工艺优化

中图分类号:TS229;TS201.1

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2018)12-0059-06

Optimization of hydrolysis process of cottonseed meal by composite protease for preparation of polypeptides

PAN Jinqun, ZHENG Yuxia, ZHANG Yaoyin

(School of Life Science and Technology, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, Guangdong, China)

Abstract: To improve the utilization ratio of protein resources from cottonseed meal, the preparation process of polypeptides from the hydrolysis of gossypol removed cottonseed meal by composite protease was investigated. Taking the yield of polypeptides and degree of hydrolysis as the evaluation indexes, the different types of proteases on hydrolysis capability of protein from cottonseed meal were compared, and a composite protease composed with trypsin and *Aspergillus oryzae* protease in a enzyme activity ratio of 3:1 was determined as the optimal protease for the hydrolysis process. Then, the hydrolysis process conditions, including protein mass concentration of cottonseed meal, enzyme dosage, pH, hydrolysis temperature and hydrolysis time were analyzed and optimized by single factor experiment and response surface methodology. And the optimal process conditions were determined as follows: protein mass concentration of cottonseed meal 25 g/L, enzyme dosage 5 000 U/g, pH 8.91, hydrolysis temperature 50–55℃ and hydrolysis time 5.92 h. Under the optimal conditions, the yield of polypeptides was 71.85%. The results of amino acid composition showed that polypeptides could effectively maintain the amino acid composition of cottonseed meal protein, the variety of amino acids was complete, contents of eight kinds of essential amino acids were abundant and the nutritive value was high.

Key words: composite protease; cottonseed meal; hydrolysis; polypeptides; process optimization

收稿日期:2018-03-26;修回日期:2018-04-16

基金项目:广东省公益研究与能力建设专项资金项目(2015A010107016, 2016A010105024);国家星火计划项目(2013GA780084)

作者简介:潘进权(1978),男,副教授,博士,研究方向为酶工程(E-mail)panjq@lingnan.edu.cn。

棉粕是棉籽经过脱壳、去绒,提取油脂后所得的副产品。棉粕中蛋白质含量相当丰富,平均可达40%左右,其氨基酸组成较合理,是一类优质的饲料蛋白^[1-2]。多年来,棉粕在我国常被用作饲料中替代鱼粉的植物蛋白源^[3-4]。然而,由于棉粕中含有棉酚、环丙烯脂肪酸、单宁等抗营养因子,尤其是棉

酚,极易引起动物中毒甚至死亡^[5-7]。这在很大程度上制约了棉粕的推广使用。

近年来,随着国内棉花种植规模及产量的逐年上升,我国已成为世界最大的产棉国,棉粕每年的产出都在 600 万 t 以上^[8],因此开展棉粕加工及利用对于提高棉花副产物的经济价值有重要意义。此外,随着我国养殖业的发展,集约化养殖模式的广泛推广,饲料的消费量呈逐年上升趋势,作为饲料主成分的鱼粉、豆粕等蛋白质饲料资源的需求供不应求,甚至严重不足^[9-10]。因此,开展棉粕蛋白资源的饲料加工已成为当务之急。

目前,国内外对棉粕的开发研究多集中在微生物发酵法,借助微生物的作用消除棉粕中的抗营养因子及棉酚的毒性,研究主要侧重于微生物菌株的筛选^[11-12]、发酵工艺的探究^[13-15]、发酵棉粕的应用等。但由于棉粕微生物发酵多是采用固态发酵工艺,发酵过程较粗放,自动化程度低,工艺放大也较困难。考虑到棉粕中主要成分是蛋白质,作为鱼粉替代也是希望利用其中的蛋白质资源,因此本研究提出了棉粕中蛋白质的酶法水解工艺,借助蛋白酶的水解作用有效地提取棉粕中的蛋白质,并将其转化为利用效率更高的饲用多肽。研究结果将为棉粕蛋白的加工与利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

棉粕:购于农贸市场;胰蛋白酶:国药集团化学试剂有限公司;碱性蛋白酶:南京奥多福尼生物科技有限公司;中性蛋白酶:Novo 酶制剂公司;木瓜蛋白酶:北京鼎国生物技术有限责任公司;米曲霉蛋白酶:实验室自制;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器与设备

SKD-08S2 红外智能消化炉、SKD-600 自动凯氏定氮仪;723N 可见分光光度计;HWS28 型电热恒温水浴锅;L550 台式低速大容量离心机;湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;PHS-3C 数显 pH 计;HJ-2A 数显恒温多头磁力搅拌器;DFY-200 手提式高速中药粉碎机。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白酶酶活的测定

蛋白酶活力测定采用 Folin-酚法^[16]。

1.2.2 棉粕的脱酚

棉粕→粉碎→筛分→酸性乙醇混合溶液浸提→离心→沉淀→60℃烘箱烘干→脱酚棉粕^[17]。

操作要点:取 90 mL 浓盐酸和 800 mL 无水乙

醇,混合后加水定容至 1 000 mL,配制得到酸性乙醇混合溶液;按照每克棉粕粉加入 25 mL 酸性乙醇混合溶液,将棉粕粉与酸性乙醇混合溶液混合并置于 60℃水浴保温 4 h;将处理后的棉粕粉于 4 000 r/min 条件下离心 10 min,收集沉淀并烘干即得到脱酚棉粕粉。

1.2.3 棉粕的酶解

脱酚棉粕→加入蒸馏水→调节 pH 至酶解适宜 pH→加入蛋白酶液→保温酶解→调节 pH 至 4.5→沸水浴灭酶→离心分离→蛋白水解液。

操作要点:加入蒸馏水配制底物蛋白质质量浓度为 30 g/L 的脱酚棉粕溶液,80℃水浴保温 20 min,冷却后调节其 pH 至 8.0,按照 3 000 U/g 的加酶量加入蛋白酶液,充分混匀后置于 50℃水浴中保温酶解 4 h;调节酶解液 pH 至 4.5,在 100℃水浴中保温 10 min 进行灭酶;在 4 000 r/min 的条件下离心 10 min,收集上清液即得到蛋白水解液。

1.2.4 水解液中蛋白水解度的测定

采用凯氏定氮法测定原料液中总氮含量;采用甲醛滴定法测定水解液中的氨基态氮含量^[18]。

水解度定义为蛋白质水解中被裂解的肽键数占原料蛋白质总肽键数的百分数。即水解度 = 水解液中氨基态氮含量/原料液中总氮含量 × 100%。

1.2.5 水解液中多肽含量的测定及得率计算

水解液中多肽含量的测定采用酸溶性蛋白测定方法:取蛋白水解液 5 mL,加入浓度 2 mol/L 的三氯乙酸 5 mL,充分混匀后静置 10 min;然后于 8 000 r/min 离心 10 min,收集上清液;采用凯氏定氮法测定上清液中氮含量。水解液中多肽得率按下式计算:

$$\text{多肽得率} = \text{水解液中肽氮含量} / \text{原料液中总氮含量} \times 100\%$$

1.2.6 多肽的氨基酸组成分析

取蛋白水解液 5 mL,加入浓度为 2 mol/L 的三氯乙酸 5 mL,充分混匀后静置 10 min;然后于 8 000 r/min 离心 10 min,收集得到上清液;取一定量上清液经酸水解后利用氨基酸自动分析仪测定样品中各氨基酸的含量。

1.2.7 蛋白酶的比较及优选

按照 1.2.3 所述方法,在其他条件不变的前提下,分别采用碱性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、米曲霉蛋白酶进行酶水解试验并测定蛋白水解液的多肽得率及水解度,比较不同蛋白酶对棉粕蛋白水解效率的差异,筛选出适于棉粕蛋白水解的蛋白酶类型。

1.2.8 蛋白酶的复配

以胰蛋白酶作为主酶,分别与碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、米曲霉蛋白酶按照 1:1(酶活比,下同)组合配制复合蛋白酶液;按照 1.2.3 所述方法进行酶水解试验并测定蛋白水解液的多肽得率及水解度,考察不同复合蛋白酶对棉粕蛋白水解效率的差异,由此确定适于棉粕蛋白水解的复合蛋白酶。

1.2.9 蛋白酶复配比例的选择

设计胰蛋白酶与米曲霉蛋白酶按照 1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1 的比例进行复配,以复配后的复合蛋白酶按照 1.2.3 的方法进行酶水解试验并测定蛋白水解液的多肽得率及水解度,确定复合蛋白酶的复配比例。

1.2.10 酶水解工艺的单因素试验

1.2.10.1 底物蛋白质量浓度对蛋白水解的影响

配制底物蛋白质量浓度分别为 10、20、25、30、35、40、50、60 g/L 的脱酚棉粕溶液,在其他条件不变条件下,按照 1.2.3 所述方法进行酶水解试验并测定蛋白水解液的多肽得率,考察底物蛋白质量浓度对棉粕蛋白水解的影响。

1.2.10.2 加酶量对蛋白水解的影响

按照 1.2.3 所述方法,在其他条件不变条件下,在加酶量为分别 1 000、2 000、3 000、4 000、5 000、6 000、7 000、8 000 U/g 的条件下,进行酶水解试验并测定蛋白水解液的多肽得率,考察加酶量对棉粕蛋白水解的影响。

1.2.10.3 pH 对蛋白水解的影响

按照 1.2.3 所述方法,在其他条件不变条件下,在 pH 分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 的条件下,进行酶水解试验并测定蛋白水解液的多肽得率,考察 pH 对棉粕蛋白水解的影响。

1.2.10.4 酶解温度对蛋白水解的影响

按照 1.2.3 所述方法,在其他条件不变条件下,在酶解温度分别为 35、40、45、50、55、60、65 °C 的条件下,进行酶水解试验并测定蛋白水解液的多肽得率,考察酶解温度对棉粕蛋白水解的影响。

1.2.10.5 酶解时间对蛋白水解的影响

按照 1.2.3 所述方法,在其他条件不变条件下,在酶解时间分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 h 的条件下,进行酶水解试验并测定蛋白水解液的多肽得率,考察酶解时间对棉粕蛋白水解的影响。

1.2.11 酶解工艺的响应面试验

在单因素试验的基础上,筛选出对棉粕蛋白水解有较显著影响的 3 个工艺条件:pH、加酶量、酶解

时间,以及各因素的适宜取值范围。采用响应面分析法中的 Box - Behnken 试验设计,对这 3 个因素做进一步考察,由此确定棉粕蛋白水解的最佳工艺条件。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的比较及优选(见表 1)

表 1 不同蛋白酶对棉粕蛋白水解效果的比较

蛋白酶	最佳 pH 条件	水解度/%	多肽得率/%
碱性蛋白酶	9.0	6.34 ± 0.66	45.44 ± 1.41
胰蛋白酶	9.0	7.05 ± 0.43	51.41 ± 1.64
木瓜蛋白酶	7.0	4.17 ± 0.38	31.59 ± 1.25
中性蛋白酶	7.0	6.19 ± 0.52	43.22 ± 1.48
米曲霉蛋白酶	7.5	10.37 ± 0.64	48.18 ± 1.18

由表 1 可知,胰蛋白酶对棉粕蛋白的水解效果相对最好,初步说明胰蛋白酶的肽键选择性对棉粕蛋白的肽键组成及分布有较好的适应性;此外,米曲霉蛋白酶对棉粕蛋白也显示出较强的水解能力,而且其水解液的水解度明显高于其他几种蛋白酶,这与该蛋白酶中所含有的部分外切型蛋白酶酶活有直接关系;在试验的 5 种蛋白酶中木瓜蛋白酶对棉粕蛋白的水解效果最差。

2.2 蛋白酶的复配(见表 2)

表 2 不同复合蛋白酶对棉粕蛋白水解效果的比较

蛋白酶的复配组合	水解度/%	多肽得率/%
胰蛋白酶 + 碱性蛋白酶	6.91 ± 0.45	52.73 ± 1.46
胰蛋白酶 + 木瓜蛋白酶	5.19 ± 0.28	46.57 ± 1.28
胰蛋白酶 + 中性蛋白酶	7.91 ± 0.69	50.01 ± 1.84
胰蛋白酶 + 米曲霉蛋白酶	11.78 ± 0.52	56.10 ± 1.52

由表 2 可知,与胰蛋白酶配伍后,木瓜蛋白酶和中性蛋白酶的水解效率有了明显的提升;而胰蛋白酶与米曲霉蛋白酶复配后更是显示出了协同性,复合酶的水解效果均优于单一蛋白酶。根据试验结果确定以胰蛋白酶与米曲蛋白酶配伍构建复合蛋白酶。

2.3 蛋白酶复配比例的选择(见表 3)

表 3 蛋白酶复配比例对棉粕蛋白水解效果的比较

复配比例	水解度/%	多肽得率/%
1:4	12.46 ± 0.22	47.89 ± 0.89
1:3	12.80 ± 0.18	49.07 ± 1.55
1:2	12.51 ± 0.31	52.81 ± 1.24
1:1	11.79 ± 0.22	57.24 ± 1.08
2:1	11.37 ± 0.28	61.04 ± 1.62
3:1	10.78 ± 0.32	62.54 ± 1.31
4:1	8.84 ± 0.41	60.22 ± 1.22

由表 3 可知,提高胰蛋白酶在复合蛋白酶中的

比例,则可增加多肽的得率;而增加复合蛋白酶中米曲霉蛋白酶的比例,则在一定程度上可增加水解液的水解度。鉴于本研究的目的在于提高多肽得率,因此确定复合蛋白酶中胰蛋白酶与米曲霉蛋白酶的复配比例为 3:1。后续工艺研究均采用此复合蛋白酶。

2.4 酶水解工艺的单因素试验

2.4.1 底物蛋白质量浓度对蛋白水解的影响(见图 1)

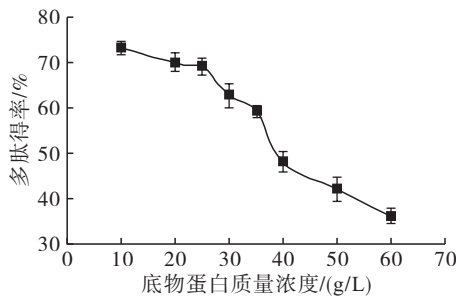


图 1 底物蛋白质量浓度对棉粕蛋白水解的影响

由图 1 可知,多肽得率随着底物蛋白质量浓度的增加而呈现下降的趋势,尤其是当底物蛋白质量浓度超过 25 g/L 以后下降趋势更显著。这可能是由于棉粕蛋白经过了热处理及酸处理后,其变性程度很高而难溶于水,从组织中分散到水溶液的效率较低,影响了酶水解效率;而且,随着棉粕蛋白质量浓度增加,酶水解体系中小肽浓度随之增加,小肽对蛋白酶的反馈抑制作用增强,从而导致酶水解体系中有有效酶活降低;另外,随着底物质量浓度的增加,酶水解体系的黏稠度会迅速上升,将导致蛋白质分子运动能力降低,从而降低了蛋白的水解效率。根据以上试验结果,确定酶水解体系适宜的底物蛋白质量浓度为 25 g/L。

2.4.2 加酶量对蛋白水解的影响(见图 2)

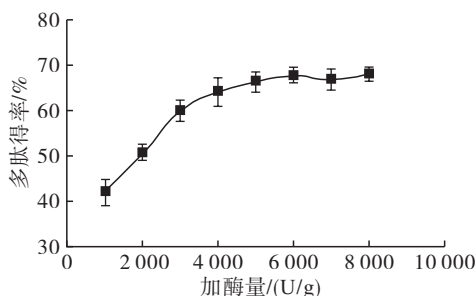


图 2 加酶量对棉粕蛋白水解的影响

由图 2 可知,随加酶量的增加多肽得率呈增长趋势,说明在设定的酶水解条件下棉粕蛋白的水解程度不断提高;当加酶量超过 5 000 U/g 后,多肽得率趋于稳定,说明酶水解体系中蛋白酶相对棉粕蛋白已趋于饱和,进一步提升加酶量的意义不大。通过

试验初步确定适宜的加酶量为 5 000 U/g。

2.4.3 pH 对蛋白水解的影响(见图 3)

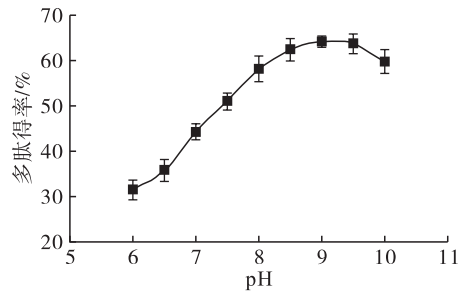


图 3 pH 对棉粕蛋白水解的影响

由图 3 可知,多肽得率对 pH 变化较为敏感,碱性条件可显著提高多肽得率,这与胰蛋白酶及米曲霉蛋白酶在偏碱性条件下较强的酶活有直接关系;此外,碱性条件也有利于提高棉粕蛋白的溶出速率,增加棉粕蛋白在水溶液中的溶解度。通过以上试验可初步确定酶水解体系适宜的 pH 在 9.0 左右。

2.4.4 酶解温度对蛋白水解的影响(见图 4)

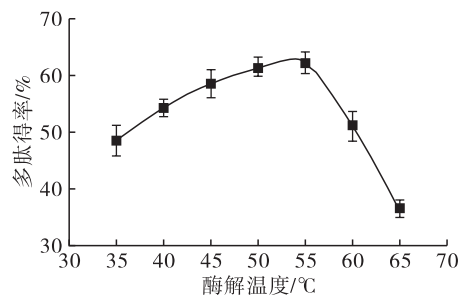


图 4 酶解温度对棉粕蛋白水解的影响

由图 4 可知,在 35 ~ 55 °C 范围内,多肽得率随着酶解温度的升高而增加,这说明体系中棉粕蛋白的水解程度逐步上升,由于适当升温在一定程度上增加了蛋白酶的活力,而且提高了棉粕蛋白的溶出速率;当酶解温度超过 55 °C,多肽得率随着酶解温度的升高迅速下降,这是由于高温导致了蛋白酶变性失活。根据以上结果,可确定复合蛋白酶水解棉粕蛋白的适宜温度在 50 ~ 55 °C。

2.4.5 酶解时间对蛋白水解的影响(见图 5)

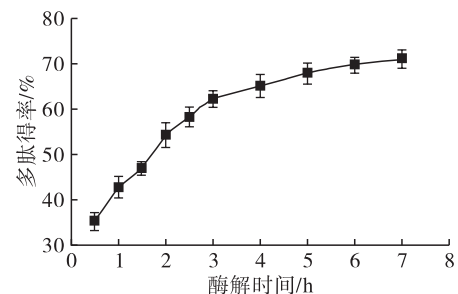


图 5 酶解时间对棉粕蛋白水解的影响

由图 5 可知,棉粕蛋白的水解过程可以分为两个阶段:0.5 ~ 3 h 是快速水解期,在此期间体系的多肽得率迅速上升。这是由于棉粕蛋白向水溶液中

扩散溶出的速率较高,复合蛋白酶对底物蛋白上最敏感的肽键进行了切割,导致体系中可溶性蛋白及多肽浓度得以迅速增加;3 h以后为缓慢水解期,在这一阶段由于体系中底物蛋白浓度较低,棉粕蛋白的溶出速率大幅下降,胰蛋白酶主要作用于大片段肽段上的次级敏感键,酶活性相对降低,因此体系的多肽得率表现为缓慢上升并在6 h后逐步趋于稳定。

2.5 酶水解工艺的响应面试验

通过单因素试验,固定酶解温度50~55℃,底物蛋白质量浓度25 g/L,选取pH、加酶量及酶解时间3个因素进行响应面优化试验。响应面试验的因素水平见表4,响应面试验设计与结果见表5。

表4 响应面试验的因素水平

水平	A pH	B 加酶量/(U/g)	C 酶解时间/h
-1	8	3 000	3
0	9	4 000	5
1	10	5 000	7

表5 响应面试验设计与结果

试验号	A	B	C	Y 多肽得率/%
1	0	0	0	67.4
2	0	-1	-1	60.8
3	0	0	0	68.2
4	1	-1	0	62.4
5	0	0	0	68.6
6	0	0	0	67.2
7	1	0	1	63.2
8	-1	0	1	62.4
9	1	1	0	65.6
10	0	-1	1	60.8
11	-1	-1	0	58.2
12	-1	0	-1	56.4
13	0	0	0	68.8
14	0	1	-1	65.4
15	0	1	1	70.1
16	1	0	-1	60.2
17	-1	1	0	66.8

以多肽得率Y为响应值,对表5中的试验结果进行回归分析,可以拟合得到以下数学模型:

$$Y = 68.04 + 0.95A + 3.21B + 1.71C - 1.35AB - 0.75AC + 1.17BC - 4.26A^2 - 0.53B^2 - 3.23C^2$$

对表5的试验结果及回归模型进行方差分析,结果如表6所示。由表6可知,因素B和因素C对试验结果有极显著影响($P < 0.01$);因素A对试验结果有显著影响($P < 0.05$);此外,因素A、B间以及因素B、C间均表现出显著的交互作用($P < 0.05$)。对模型分析的结果表明,以上拟合得到的模型具有

极高的显著性($P < 0.0001$),失拟项不显著($P = 0.2445 > 0.05$);模型的相关系数 $R^2 = 0.9803$,显示该模型对试验结果有非常高的拟合度,运用此模型可以对各因素取值范围内98.03%的试验结果进行有效的数学预测。

表6 响应面试验结果的方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方和	F	P
模型	258.88	9	28.76	38.61	<0.0001
A	7.22	1	7.22	9.69	0.0170
B	82.56	1	82.56	110.83	<0.0001
C	23.46	1	23.46	31.49	0.0008
AB	7.29	1	7.29	9.79	0.0166
AC	2.25	1	2.25	3.02	0.1258
BC	5.52	1	5.52	7.41	0.0296
A ²	76.32	1	76.32	102.45	<0.0001
B ²	1.19	1	1.19	1.60	0.2460
C ²	44.00	1	44.00	59.06	0.0001
残差	5.21	7	0.74		
失拟项	3.18	3	1.06	2.09	0.2445
净误差	2.03	4	0.51		
总离差	264.10	16			

通过Design Expert 10.0软件分析可确定出相应曲面上的最大响应值为 $Y = 71.40\%$,与之对应的各因素取值分别为:pH(A)8.91,加酶量(B)5 000 U/g,酶解时间(C)5.92 h。

根据以上的单因素试验及响应面试验结果确定棉粕蛋白的最佳酶水解工艺条件为:采用胰蛋白酶与米曲霉按3:1构成的复合蛋白酶,加酶量5 000 U/g,底物蛋白质量浓度25 g/L,pH 8.91,酶解温度50~55℃,酶解时间5.92 h。在最佳酶水解工艺条件下进行了验证性试验,经过5次独立酶水解试验,其结果(70.84%、72.28%、72.49%、71.64%和72.02%)的平均值为71.85%,与模型预测值相吻合,进一步验证了该模型的可靠性。且该结果显著高于微生物法的多肽转化率^[11,14]。

2.6 多肽的氨基酸组成分析

用三氯乙酸沉淀法对蛋白水解液进行脱蛋白处理后分离得到酸溶性肽,运用氨基酸自动分析仪对水解液中酸溶性肽的氨基酸组成进行了分析,结果如表7所示。由表7可看出,棉粕蛋白具有较好的营养价值,含有动物体所需的17种氨基酸(因检测条件限制没能检测色氨酸),人体所需的必需氨基酸含量丰富;经复合蛋白酶水解棉粕蛋白制备得到的酸溶性多肽混合物能较好地保持原棉粕蛋白的氨

氨基酸组成,大多数氨基酸的百分含量保持不变。

表7 酸溶性肽氨基酸组成 %

氨基酸	棉粕粉		水解液	
	氨基酸含量	占氨基酸总量	氨基酸含量	占氨基酸总量
天冬氨酸	4.27	9.502	0.24	10.213
苏氨酸	1.57	3.494	0.10	4.255
丝氨酸	1.61	3.583	0.09	3.830
谷氨酸	8.68	19.315	0.32	13.617
甘氨酸	2.66	5.919	0.22	9.362
丙氨酸	2.60	5.785	0.14	5.957
胱氨酸	0.24	0.534	0.02	0.851
缬氨酸	2.18	4.851	0.13	5.532
蛋氨酸	0.57	1.268	0.01	0.426
异亮氨酸	1.47	3.271	0.07	2.979
亮氨酸	3.28	7.299	0.26	11.064
酪氨酸	1.64	3.649	0.04	1.702
苯丙氨酸	2.96	6.587	0.16	6.809
赖氨酸	2.38	5.296	0.16	6.809
组氨酸	1.28	2.848	0.02	0.851
精氨酸	5.33	11.860	0.20	8.511
脯氨酸	2.22	4.940	0.17	7.234

3 结论

本研究以提高棉粕蛋白的利用率为目标,探讨复合蛋白酶水解棉粕蛋白制备多肽的工艺路线。比较了不同蛋白酶对棉粕蛋白水解效果的差异。结果表明:胰蛋白酶对棉粕蛋白具有较好的适应性,其水解效率较高,而木瓜蛋白酶对棉粕蛋白的水解效果最差;胰蛋白酶与米曲霉蛋白酶之间有较好的协同性,两者按照酶活比3:1构建的复合蛋白酶对棉粕蛋白有最强的水解能力。采用单因素试验及响应面试验对复合蛋白酶水解棉粕蛋白的工艺条件进行了优化,确定最佳的酶水解工艺条件为:加酶量5 000 U/g,底物蛋白质量浓度25 g/L,pH 8.91,酶解温度50~55℃,酶解时间5.92 h。在最佳酶水解工艺条件下,多肽得率可以达到71.85%。对水解液中酸溶性多肽的氨基酸组成进行了分析,结果显示:酶水解得到的多肽能基本保持原棉粕蛋白的氨基酸组成,多肽的氨基酸种类较齐全,8种必需氨基酸含量丰富,营养价值高。以上结果表明,采用复合蛋白酶水解棉粕蛋白制备多肽的工艺具有较好的可行性。

参考文献:

[1] 刘少娟,陈家顺,姚康,等. 棉粕的营养组成及其在畜禽生产中的应用[J]. 畜牧与饲料科学,2016,37(9):45-49.

[2] 元秀晔,谢全喜,陈振,等. 中性蛋白酶降解棉粕中棉酚

的研究[J]. 中国酿造,2017,36(10):144-148.

- [3] 郭春燕,程发祥,王文奇,等. 低发酵棉粕日粮对奶牛产奶量及乳成分的影响[J]. 饲料研究,2015(8):31-33.
- [4] JAZI V, BOLDAJI F, DASTAR B, et al. Effects of fermented cottonseed meal on the growth performance, gastrointestinal microflora population and small intestinal morphology in broiler chickens[J]. Brit Poultry Sci, 2017, 58(4):402-408.
- [5] 马珍,李吕木,许发芝,等. 微生物发酵改善棉粕饲用品质的研究[J]. 中国油脂,2013,38(5):30-34.
- [6] JALEES M M, KHAN M Z, SALEEMI M K, et al. Effects of cottonseed meal on hematological, biochemical and behavioral alterations in male Japanese quail (*Coturnix japonica*) [J]. Pakistan Veterin J, 2011, 31(3):211-214.
- [7] 王晓玲,刘倩,韩伟,等. 棉酚脱除菌株的筛选及棉粕混菌固态发酵研究[J]. 粮油食品科技,2016,24(1):81-85.
- [8] 欧阳龙. 我国棉籽加工产业的发展现状与展望[J]. 湖南饲料,2012(5):11-13.
- [9] HUANG Y J, ZHANG N N, FAN W J, et al. Soybean and cottonseed meals are good candidates for fishmeal replacement in the diet of juvenile *Macrobrachium nipponense* [J]. Aquacult Int, 2018, 26(1):309-324.
- [10] TANG J W, SUN H, YAO X H, et al. Effects of replacement of soybean meal by fermented cottonseed meal on growth performance, serum biochemical parameters and immune function of yellow-feathered broilers [J]. Asian Aust J Anim Sci, 2012, 25(3):393-400.
- [11] 敖维平,钱文熙. 不同菌种固态发酵降解棉粕蛋白效果分析[J]. 塔里木大学学报,2017,29(3):35-40.
- [12] 王云超,米军,刘孟健,等. 棉粕固态发酵菌种的筛选及复配[J]. 饲料工业,2017,38(21):57-61.
- [13] SUN H, TANG J W, YAO X H, et al. Improvement of the nutritional quality of cottonseed meal by *Bacillus subtilis* and the addition of papain [J]. Int J Agric Biol, 2012, 14(4):563-568.
- [14] 韩伟,李晓敏,刘倩,等. 微生物固态发酵和酶解工艺处理棉粕的研究[J]. 中国油脂,2017,42(1):112-115.
- [15] 李巧云,侯冰,王潇,等. 复合微生物发酵棉粕的生产工艺研究[J]. 饲料研究,2014(7):58-60.
- [16] 张树政. 酶制剂工程[M]. 北京:科学出版社,1998:446-447.
- [17] 吴媛瑾,王承明,吴谋成. 响应面优化棉籽饼粕中棉酚的提取条件[J]. 棉花学报,2009,21(2):94-99.
- [18] 王剑锋,孙爽,李瑶,等. 甲醛滴定法测定牛血清蛋白的酶解度[J]. 大连民族学院学报,2012,14(5):441-444.