

油料蛋白

酶解蚕豆蛋白制备降胆固醇肽及其响应面优化

陈丹阳¹, 韩涛¹, 杜斌¹, 丁轲¹, 卞科²

(1. 北京农学院 食品科学与工程学院, 北京 102206; 2. 河南工业大学 粮油食品学院, 郑州 450052)

摘要: 为了得到具有较高降胆固醇活性的蚕豆肽, 对蚕豆蛋白的酶解条件进行了研究。通过比较 6 种蛋白酶对蚕豆蛋白的酶解程度以及降胆固醇能力, 选择碱性蛋白酶进一步优化酶解条件。以水解度(DH)与降胆固醇能力为指标, 利用单因素试验和响应面试验优化确定了酶解蚕豆蛋白制备降胆固醇肽的工艺参数。结果表明, 最佳酶解参数为: 酶解温度 40℃, pH 9.0, 酶解时间 60 min, 加酶量 8 000 U/g, 料液比 1:20。验证试验后得到的水解度为 14.29% 蚕豆多肽产品, 其对胆酸钠、甘氨酸钠、牛磺胆酸钠抑制率分别为 52.98%、31.87%、25.17%, 与理论模型预测值 52.49%、31.44%、24.76% 基本相符。

关键词: 蚕豆; 蛋白质; 酶解; 胆固醇; 多肽

中图分类号: TS214; TS218

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2018)10-0046-07

Optimization of preparation of hypocholesterolemic peptides from broad bean protein by enzymatic hydrolysis using response surface methodology

CHEN Danyang¹, HAN Tao¹, DU Bin¹, DING Ke¹, BIAN Ke²

(1. Food Science and Engineering College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China)

Abstract: The hypocholesterolemic peptides from broad bean protein by enzymatic hydrolysis were investigated. In order to obtain broad bean peptides with high cholesterol-lowering activity, six proteinases were compared on the degree of hydrolysis (DH) of broad bean protein and the hypocholesterolemic ability, and alkaline protease was employed. Then the DH and hypocholesterolemic ability were used as indicators, single factor experiment and response surface methodology were applied to get the optimal enzymatic hydrolysis parameters of broad bean protein. The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis parameters for alkaline protease were obtained as follows: enzymolysis temperature 40℃, pH 9.0, enzymolysis time 60 min, dosage of enzyme 8 000 U/g and ratio of material to liquid 1:20. Under the optimal conditions, broad bean peptides with 14.29% DH could be obtained, and its inhibition rates on sodium cholate, sodium glycine and sodium taurocholate were predicted 52.49%, 31.44% and 24.76%, and the validation tests gave 52.98%, 31.87% and 25.17%, respectively.

Key words: broad bean; protein; enzymatic hydrolysis; cholesterol; peptides

蚕豆属豆科(Leguminosae)巢菜属, 又名川豆、罗汉豆、楼豆等^[1], 其蛋白质含量达 25%~30%^[2], 在豆科植物中位居第二, 仅次于大豆(35%~45%), 亦显著高于其他植物蛋白源; 蚕豆蛋白氨基

酸组成接近于人体和动物所需要的理想比例, 赖氨酸含量是谷物的 3 倍, 甲硫氨酸是第一限制性氨基酸, 若强化蛋氨酸和色氨酸, 可接近全价蛋白质^[3]。但蚕豆中含有抗营养成分^[4], 如蛋白酶抑制剂、植酸、凝集素, 目前市场上还没有蚕豆蛋白及其深加工制品。

高胆固醇血症指血脂中胆固醇含量超过体内正常血脂的水平, 可引起动脉粥样硬化、冠心病、动脉

收稿日期: 2018-07-01; 修回日期: 2018-08-10

作者简介: 陈丹阳(1993), 女, 在读硕士, 研究方向为农产品加工及功能性研发(E-mail) 281871518@qq.com。

通信作者: 韩涛, 教授(E-mail) taohan00@163.com。

斑块等一些严重危害人体健康的疾病。近年来高胆固醇血症成为慢性病中对人类影响最大的一种^[5],长期服用他汀类药物会带来如肌肉无力、恶心呕吐等副作用,而新兴的高效无毒且具降胆固醇活性的小分子肽引起更多的关注^[6]。某些动植物蛋白酶解后具有一定的降胆固醇效果,如大豆蛋白^[7]、乳蛋白^[8]、紫菜蛋白^[9]、花生蛋白^[10]、鹰嘴豆蛋白^[11]、卵黄蛋白^[12]、苦荞蛋白^[13]、山杏蛋白^[14]、扇贝边蛋白^[15]、鲈鱼蛋白^[16]、丝素蛋白^[17]、葵花籽蛋白^[18]、豇豆蛋白^[19]、亚麻籽蛋白^[20]等。尚未见蚕豆蛋白酶解物降胆固醇效果的报道。

刘淳^[21]、苏海玲^[22]等研究了不同种类蛋白酶对蚕豆蛋白的酶解效果,李慧等^[23]在此基础上,研究了蚕豆蛋白酶解物的抗氧化活性与水解度的关系。本研究以崇礼蚕豆为原料,以对胆固醇抑制率为指标,比较了蚕豆蛋白酶解物的降胆固醇能力,分析了酶解条件,如酶解温度、pH、料液比、加酶量及酶解时间等的影响,为进一步研究利用蚕豆蛋白提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蚕豆:市售;胃蛋白酶(酶活 250 U/mg,最适温度 37℃、pH 3.0 和 pH 4.5)、胰蛋白酶(酶活 250 U/mg,最适温度 37℃、pH 7.0~9.0)、碱性蛋白酶(酶活 200 U/mg,最适温度 40~50℃、pH 9.0~12.0)、中性蛋白酶(酶活 200 U/mg,最适温度 30~60℃、pH 5.5~7.5)、木瓜蛋白酶(酶活 100 U/mg,最适温度 50~55℃、pH 6.0~7.0)和风味蛋白酶(酶活 20 U/mg,最适温度 45~55℃、pH 6.0~8.0):北京索莱宝科技有限公司;糠醛,胆酸盐(SC),甘氨酸胆酸盐(SGC),牛磺胆酸盐(STC);其余试剂均为分析纯。

HWCL-3 型磁力搅拌反应浴;DHG-9036A 型电热恒温鼓风干燥箱;实验室 FE28 型 pH 计;B-260 型恒温水浴锅;BS 224S 型电子分析天平;FW135 型中草药粉碎机;ZD-88 型振荡培养箱;L530 型台式低速离心机。

1.2 试验方法

1.2.1 蚕豆蛋白的提取及酶解

蚕豆浸泡后手工去皮,干燥后粉碎,过 60 目筛,得到蚕豆粉。采用碱提酸沉的方法^[21],得到蚕豆粗蛋白,冻干后 -18℃ 冰箱保存。取 5 g 蚕豆干蛋白用磷酸盐缓冲液(pH 8.0)溶解,滴加 2 mol/L NaOH 调 pH 至适宜酶解环境,加入适量蛋白酶后恒温水

浴搅拌酶解一定时间,得到酶解物。采用 pH-stat 法^[24]测定水解度(DH)。

1.2.2 蚕豆蛋白酶解物降胆固醇能力的测定

体外螯合胆酸盐检测降胆固醇能力的原理^[25]是通过小肽结合胆酸盐使其成为不溶物从体内排出,由于胆汁酸的合成以胆固醇为底物,胆汁酸被排出,能导致血液中胆固醇更多地用来合成胆汁酸,从而降低血液中胆固醇的含量。

蚕豆蛋白酶解物对胆酸盐的络合作用采用糠醛显色法测定^[25],以酶解物对胆酸盐、牛磺胆酸盐、甘氨酸胆酸盐 3 个胆酸盐的吸附能力为指标,评价酶解物的降胆固醇活性。

1.2.2.1 胆酸盐标准曲线的建立^[26]

分别称取胆酸盐 20、40、60、80、100、200 mg,去离子水溶解后定容至 50 mL,配成胆酸盐标准溶液。取胆酸盐标准溶液 1 mL,加入 6 mL 40% 硫酸溶液,振荡,加入 1% 糠醛溶液 1 mL,混匀,60℃ 保温 40 min,温度降到室温后,于 620 nm 测吸光度。以质量浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

通过拟合,分别得到胆酸盐(SC)、甘氨酸胆酸盐(SGC)、牛磺胆酸盐(STC)的质量浓度(x)与吸光度(y)的标准曲线方程为 $y = 0.2989x$, $R^2 = 0.99273$; $y = 0.3958x$, $R^2 = 0.99627$; $y = 0.2585x$, $R^2 = 0.99312$ 。SC、SGC、STC 的标准曲线,拟合程度良好。

1.2.2.2 蚕豆蛋白酶解物对胆酸盐吸附能力的测定^[16]

取 4 mL 2 mg/mL 的胆酸盐溶液,分别加入 20 mg/mL 蚕豆蛋白酶解物溶液 2.5 mL,37℃ 恒温振荡培养 1 h,待反应物降到室温后,4 000 r/min 离心分离 15 min,吸取上清液 1 mL 按糠醛显色法测其吸光度,由标准曲线方程计算上清液中胆酸盐质量浓度。按下式计算抑制率:

$$\text{抑制率} = (C_1 - C_2) / C_1 \times 100\%$$

式中: C_1 为胆酸盐溶液的初始质量浓度,mg/mL, C_2 为吸附后胆酸盐溶液的质量浓度,mg/mL。

1.2.3 数据处理

各试验重复 3 次,试验结果使用 SPSS 19.0 和 Design-Expert 8.0.6 软件进行分析。

2 结果与讨论

2.1 制备降胆固醇肽的蚕豆蛋白水解用酶筛选

在加酶量 10 000 U/g、料液比 1:20,各酶最适条件下进行蚕豆蛋白酶解试验,不同酶酶解时间下水解度的变化见图 1。

由图 1 可知,胃蛋白酶、胰蛋白酶、中性蛋白酶、

碱性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶对蚕豆蛋白酶解趋势大致相同,即酶解开始时速度快,随后变得缓慢,直至酶解停止;但不同酶的酶解程度不同,甚至差异很大,胃蛋白酶和木瓜蛋白酶的最终水解度即酶解程度最低且接近,其中胃蛋白酶 120 min 后酶解停止,水解度达到 11.03%;木瓜蛋白酶 270 min 后接近停止,其酶解物的水解度达到 11.21%;胰蛋白酶酶解程度稍高但与前两者差距不大;中性蛋白酶和风味蛋白酶的酶解程度大致相同,风味蛋白酶在短时间(60 min)即达到接近最大酶解程度,总体上,这两个酶的酶解程度高出胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶酶解物的 1~2 倍;碱性蛋白酶的酶解程度最高,酶解 120 min 时,水解度为胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶的 3 倍左右;酶解 480 min 时,碱性蛋白酶的酶解速度开始变缓,670 min 时酶解接近停止,水解度为胰蛋白酶、胃蛋白酶和木瓜蛋白酶的 4 倍左右。6 种蛋白酶在其最适条件下对蚕豆蛋白的酶解存在差异,甚至较大。

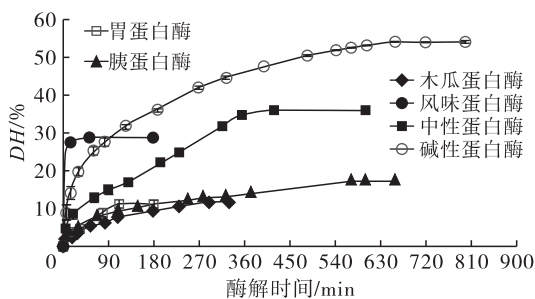
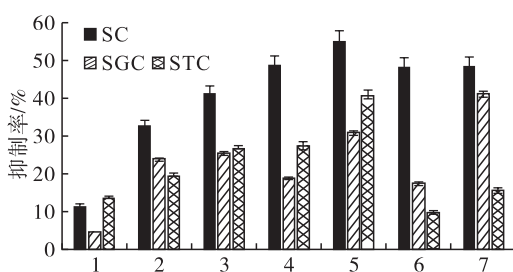


图1 不同酶酶解时间下水解度的变化

6 种蛋白酶在最适条件下得到的蚕豆蛋白酶解物以及蚕豆蛋白对 3 个胆酸盐的抑制率如图 2 所示。



注:1. 蚕豆蛋白;2. 胃蛋白酶酶解物;3. 胰蛋白酶酶解物;4. 中性蛋白酶酶解物;5. 碱性蛋白酶酶解物;6. 风味蛋白酶酶解物;7. 木瓜蛋白酶酶解物。

图2 蚕豆蛋白及其酶解物对胆酸盐的抑制率

由图 2 可见,未酶解蚕豆蛋白对胆酸盐的抑制率较低;木瓜蛋白酶酶解物对 SGC 的抑制率最高,显著高于其他 5 种酶的酶解物($P < 0.05$),但木瓜蛋白酶酶解物对 STC 的抑制率较低,与其他 5 种酶的酶解物有极显著差异($P < 0.01$)。碱性蛋白酶酶

解物对 3 个胆酸盐的抑制程度均较高,且对 SC 和 STC 的抑制率显著高于其他酶的酶解物($P < 0.05$),因此选择碱性蛋白酶酶解较为理想。

2.2 碱性蛋白酶酶解蚕豆蛋白制备降胆固醇肽的酶解条件单因素试验

2.2.1 酶解温度的影响

在 pH 10.0、加酶量 10 000 U/g、料液比 1:20、酶解时间 900 min 条件下,考察不同酶解温度下酶解物对胆酸盐的抑制率,结果见图 3。

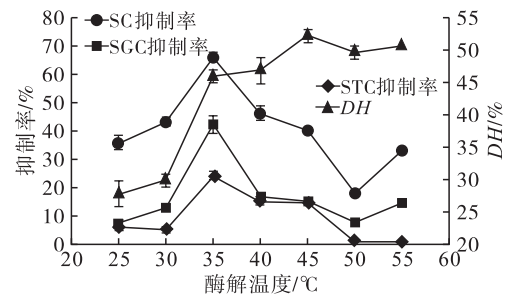


图3 不同酶解温度下酶解物对胆酸盐的抑制率

由图 3 可见,随着酶解温度的升高,酶解物水解度增大,当酶解温度由 25 °C 升至 35 °C 时水解度大幅增高,酶解物对 3 个胆酸盐的抑制率随之升高;酶解温度升至 55 °C 时,酶解物水解度只有轻微的提高,但酶解物对 3 个胆酸盐的抑制率大幅减小。因此,选择 35 °C 为最佳酶解温度。

2.2.2 pH 的影响

在酶解温度 35 °C、加酶量 10 000 U/g、料液比 1:20、酶解时间 900 min 条件下,考察不同 pH 下酶解物对胆酸盐的抑制率,结果见图 4。

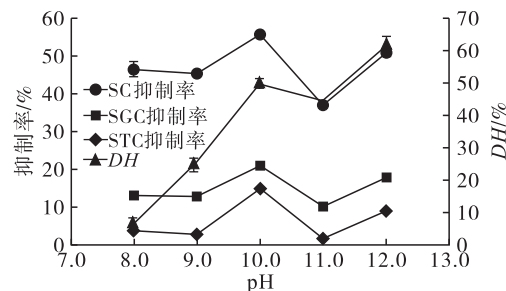


图4 不同 pH 下酶解物对胆酸盐的抑制率

由图 4 可见,随着 pH 的升高,酶解物水解度增大,pH 由 8.0 升至 10.0 时水解度大幅增高,酶解物对 3 个胆酸盐的抑制率随之升高,但 pH 在 8.0 和 9.0 之间差异不明显;pH 升至 12.0 时,酶解物水解度仍有小幅提高,但酶解物对 3 个胆酸盐抑制率有不同幅度的下降。因此,选择 pH 10.0 为最佳酶解 pH。

2.2.3 加酶量的影响

在酶解温度 35 °C、pH 10.0、料液比 1:20、酶解时间 900 min 条件下,考察不同加酶量下酶解物对胆酸盐的抑制率,结果见图 5。

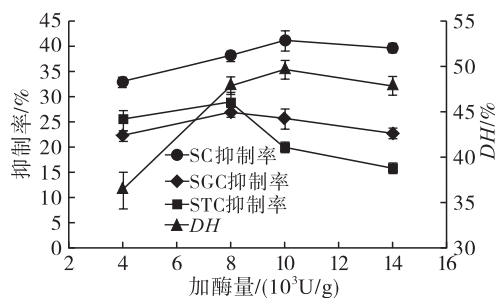


图5 不同加酶量下酶解物对胆酸盐的抑制率

由图5可见,加酶量由4 000 U/g升至10 000 U/g时,酶解物水解度大幅增高,酶解物对3个胆酸盐中SC抑制率随之升高;加酶量升至14 000 U/g时,酶解物水解度有小幅降低;酶解物对SGC和STC抑制率则在加酶量8 000 U/g时最高,随后有不同幅度的下降。因此,选择8 000 U/g为最佳加酶量。

2.2.4 料液比的影响

在酶解温度35℃、pH 10.0、加酶量8 000 U/g、酶解时间900 min条件下,考察不同料液比下酶解物对胆酸盐的抑制率,结果见图6。

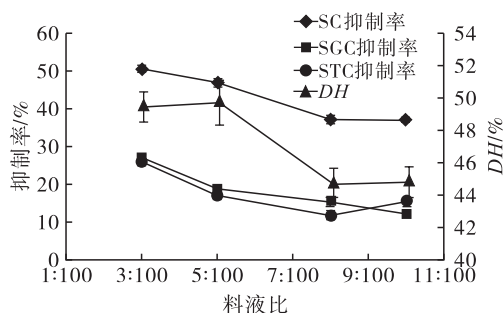


图6 不同料液比下酶解物对胆酸盐的抑制率

由图6可见,料液比为1:20(5:100)的水解度最大,但与1:33(3:100)差异不显著,显著高于1:12.5(8:100)和1:10(10:100);SGC抑制率随料液比的增大一直明显下降,SC和STC抑制率在料液比为1:33~1:12.5的范围内明显下降。综合经济和时间因素,料液比过低会给分离纯化酶解物带来大量废液。因此,选择料液比1:20为最佳酶解条件。

2.2.5 酶解时间的影响

在酶解温度35℃、pH 10.0、加酶量8 000 U/g、料液比1:20条件下,考察不同酶解时间下酶解物对胆酸盐的抑制率,结果见图7。

由图7可见,在前30 min酶解最快,随后酶解速度稳定;酶解物对3个胆酸盐的抑制率总体呈上升趋势,前期上升较快,随后趋于平稳。综合经济和生产因素,选择60、120、240 min进行响应面优化试验。

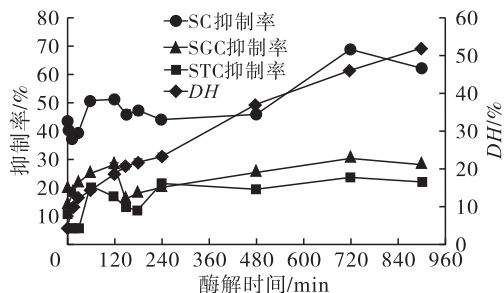


图7 不同酶解时间下酶解物对胆酸盐的抑制率

2.3 碱性蛋白酶酶解蚕豆蛋白制备降胆固醇肽酶解条件的响应面优化试验

2.3.1 Box-Behnken 试验设计及结果

综合单因素试验结果,固定加酶量8 000 U/g和料液比1:20,选择酶解温度35℃、pH 10.0和酶解时间120 min 3个因素为响应面优化的中心条件,以降胆固醇能力为指标,将酶解物质量浓度设为20 mg/mL,根据Box-Behnken试验设计原理进行三因素三水平试验设计,利用Design-Expert 8.0.6软件进行数据拟合,优化蚕豆蛋白酶解制备降胆固醇肽的工艺条件。响应面试验设计因素和水平见表1,响应面试验设计方案及结果见表2。

表1 响应面试验设计因素和水平

水平	A 酶解温度/℃	B pH	C 酶解时间/min
-1	30	9.0	60
0	35	10.0	120
1	40	11.0	240

表2 响应面试验设计方案及结果

试验号	A	B	C	SC 抑制率/%	SGC 抑制率/%	STC 抑制率/%
1	0	0	0	29.30	18.06	13.67
2	0	0	0	26.23	14.67	11.98
3	0	1	-1	39.96	26.19	15.43
4	-1	1	0	42.57	21.35	10.49
5	-1	0	1	35.11	15.47	6.24
6	-1	0	-1	41.04	23.75	15.69
7	0	-1	1	28.00	5.86	5.80
8	0	-1	-1	40.92	22.42	17.91
9	0	1	1	40.74	16.02	14.26
10	0	0	0	35.92	24.70	14.56
11	1	1	0	39.93	14.82	6.40
12	-1	-1	0	32.70	14.27	11.21
13	0	0	0	27.14	22.75	13.12
14	1	0	-1	49.56	31.46	21.90
15	1	-1	0	37.90	21.57	17.55
16	1	0	1	24.91	5.89	6.46
17	0	0	0	33.05	18.91	15.90

2.3.2 回归模型的建立及显著性检验

2.3.2.1 酶解物对胆酸盐抑制率的回归模型及显著性检验

利用 Design - Expert 8.0.6 对表 2 数据进行多元回归拟合,建立 SC 抑制率(Y)的二阶响应回归模型,拟合二次多项式方程为: $Y = 27.92 - 0.66A + 3.50B - 5.34C - 1.96AB - 4.60AC + 3.24BC + 4.10A^2 + 3.85B^2 + 5.63C^2$ 。

对该回归方程和系数进行显著性分析,结果见表 3。

表 3 酶解物对胆酸盐抑制率的回归模型

显著性检验结果					
方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	644.9	9	71.66	4.47	0.030 6*
A	3.28	1	3.28	0.20	0.664 8
B	93.10	1	93.10	5.80	0.046 8*
C	228.12	1	228.12	14.22	0.007 0**
AB	15.37	1	15.37	0.96	0.360 3
AC	89.38	1	89.38	5.57	0.050 3
BC	44.32	1	44.32	2.76	0.140 4
A^2	70.73	1	70.73	4.41	0.073 9
B^2	62.36	1	62.36	3.89	0.089 2
C^2	99.79	1	99.79	6.22	0.041 3*
残差	112.27	7	16.04		
失拟项	45.58	3	15.19	0.91	0.510 9
纯误差	66.69	4	16.67		
总和	757.17	16			

注:** 差异极显著($P < 0.01$); * 差异显著($P < 0.05$); 模型 $R^2 = 0.851 7, R_{Adj}^2 = 0.661 1$ 。

由表 3 可见,该模型 $P < 0.05$,模型差异显著,失拟项 $P > 0.05$,没有显著性差异,说明该模型对本试验拟合程度良好。模型一次项 B 对 SC 抑制率影响显著($P < 0.05$),一次项 C 对 SC 抑制率影响极显著($P < 0.01$);二次项 C^2 对 SC 抑制率影响显著($P < 0.05$)。3 个因素对 SC 抑制率的影响依次为 $C > B > A$,即酶解时间 $>$ pH $>$ 酶解温度。剔除不显著项,将拟合方程修正为: $Y = 27.92 + 3.50B - 5.34C + 5.63C^2$ 。

2.3.2.2 酶解物对甘氨酸胆酸盐抑制率的回归模型及显著性检验

利用 Design - Expert 8.0.6 对表 2 数据进行多元回归拟合,建立 SGC 抑制率(Y)的二阶响应回归模型,拟合二次多项式方程为: $Y = 17.43 - 0.84A + 2.12B - 7.26C - 3.46AB - 4.20AC + 2.05BC$ 。

对该回归方程和系数进行显著性分析,结果见表 4。

表 4 酶解物对甘氨酸胆酸盐抑制率的回归模型

显著性检验结果					
方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	611.63	6	101.94	9.08	0.001 4**
A	5.33	1	5.33	0.47	0.506 5
B	34.29	1	34.29	3.06	0.111 0
C	446.04	1	446.04	39.74	<0.000 1**
AB	47.82	1	47.82	4.26	0.065 9
AC	74.45	1	74.45	6.63	0.027 6*
BC	17.75	1	17.75	1.58	0.237 1
残差	112.24	10	11.22		
失拟项	49.39	6	8.23	0.52	0.771 6
纯误差	62.85	4	15.71		
总和	723.87	16			

注:** 差异极显著($P < 0.01$); * 差异显著($P < 0.05$); 模型 $R^2 = 0.844 9, R_{Adj}^2 = 0.751 9$ 。

由表 4 可见,该模型 $P < 0.01$,模型差异极显著,失拟项 $P > 0.05$,没有显著性差异,说明该模型对本试验拟合程度良好。模型一次项 C 对 SGC 抑制率影响极显著($P < 0.01$);AC 交互项对 SGC 抑制率影响显著($P < 0.05$)。3 个因素对 SGC 抑制率的影响依次为 $C > B > A$,即酶解时间 $>$ pH $>$ 酶解温度。剔除不显著项,将拟合方程修正为: $Y = 17.43 - 7.26C - 4.20AC$ 。

2.3.2.3 酶解物对牛磺胆酸盐抑制率的回归模型及显著性检验

利用 Design - Expert 8.0.6 对表 2 数据进行多元回归拟合,建立 STC 抑制率(Y)的二阶响应回归模型,拟合二次多项式方程为: $Y = 12.07 + 0.88A - 0.19B - 4.47C - 2.61AB - 1.25AC + 3.30BC$ 。

对该回归方程和系数进行显著性分析,结果见表 5。

表 5 酶解物对牛磺胆酸盐抑制率的回归模型

显著性检验结果					
方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	262.95	6	43.83	5.40	0.009 9**
A	5.83	1	5.83	0.72	0.416 4
B	0.27	1	0.27	0.03	0.860 0
C	169.51	1	169.51	20.88	0.001 0**
AB	27.20	1	27.20	3.35	0.097 1
AC	6.64	1	6.64	0.82	0.387 2
BC	45.86	1	45.86	5.65	0.038 8*
残差	81.17	10	8.12		
失拟项	72.40	6	12.07	5.50	0.060 3
纯误差	8.77	4	2.19		
总和	344.12	16			

注:** 差异极显著($P < 0.01$); * 差异显著($P < 0.05$); 模型 $R^2 = 0.764 1, R_{Adj}^2 = 0.622 6$ 。

由表5可见,该模型 $P < 0.01$,模型差异极显著,失拟项 $P > 0.05$,没有显著性差异,说明该模型对本试验拟合程度良好。模型一次项 C 对STC抑制率影响极显著($P < 0.01$); BC 交互项对STC抑制率影响显著($P < 0.05$)。3个因素对STC抑制率的影响依次为 $C > A > B$,即酶解时间 > 酶解温度 > pH。剔除不显著项,将拟合方程修正为: $Y = 12.07 - 4.47C + 3.30BC$ 。

2.3.3 响应面试验条件优化及验证

通过对回归模型分析得出制备蚕豆降胆固醇肽的最佳工艺条件为:酶解时间 60 min,酶解温度 40℃,pH 9.0。在最佳条件下,预测SC、SGC、STC抑制率分别为52.49%、31.44%、24.76%。对最佳条件进行验证试验,重复试验3次,得到水解度为14.29%蚕豆多肽产品,并测得其对SC、SGC、STC平均抑制率分别为52.98%、31.87%、25.17%(见表6),与理论预测值的相对误差在1.7%内,表明此模型可靠。

表6 响应面验证试验结果 %

指标	SC抑制率	SGC抑制率	STC抑制率
模拟值	52.49	31.44	24.76
验证均值	52.98	31.87	25.17
验证试验RSD	0.02	0.02	0.03
验证均值与模拟值的相对误差	0.93	1.37	1.66

研究发现,在一定时间范围内,随酶解时间的延长,酶解物降胆固醇能力越来越高。但是,在前期酶解过程中(0~240 min),酶解物降胆固醇活性变化显著且复杂,水解度增加可能导致有效的肽段被进一步酶解,故可探究应用较短的酶解时间,得到活性较高的蚕豆多肽,节约时间和人力成本,为实际应用提供指导。今后要应用体外模拟胃肠道进行消化以及利用其他高效且准确的检测方法^[19]对降胆固醇活性肽进行深入研究。

3 结论

本研究以碱提酸沉法得到蚕豆粗蛋白,以水解度(DH)与降胆固醇能力为指标,采用单因素试验和响应面法优化,得到了碱性蛋白酶酶解制备蚕豆降胆固醇肽的最优酶解条件为:酶解时间60 min,酶解温度40℃,pH 9.0,加酶量8 000 U/g,料液比1:20。在最佳条件下所制备的蚕豆蛋白酶解物对SC、SGC、STC抑制率分别为52.98%、31.87%、25.17%,与理论预测值的相对误差在1.7%内,模型建立良好。

参考文献:

- [1] 茹卡亚. 不同国家常见豆类物理性质及化学组分的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2014.
- [2] 宋晓敏,李素芬,刘建福,等. 20种蚕豆样品蛋白质含量与其蛋白组分的分子质量[J]. 中国粮油学报,2013,28(12):42-46.
- [3] 刘凤芹. 冀西北蚕豆优异资源筛选评价[D]. 北京:中国农业科学院,2009.
- [4] 焦凌梅,袁唯. 蚕豆中抗营养因子的研究[J]. 粮油加工与食品机械,2004(2):51-53.
- [5] CABANOS C, EKYO A, AMARI Y, et al. High-level production of lactostatin, a hypocholesterolemic peptide, in transgenic rice using soybean A1aB1b as carrier[J]. Transg Res, 2013, 22(3):621-629.
- [6] GONZÁLEZ-ORTEGA L O, LÓPEZ-LIMÓN A R, MORALES-DOMÍNGUEZ J F, et al. Production and purification of recombinant hypocholesterolemic peptides[J]. Biotech Lett, 2015, 37(1):41-54.
- [7] PAK V V, KOO M, LEE N, et al. Structure-activity relationships of the peptide Ile-Ala-Val-Pro and its derivatives revealed using the semi-empirical AM1 method[J]. Chem Nat Compd, 2005, 41(4):454-460.
- [8] 高学飞. 乳清蛋白源降胆固醇活性肽的制备及其生物学功能的研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2006.
- [9] 王茵,苏永昌,吴靖娜,等. 紫菜多肽降血脂及抗氧化作用的研究[J]. 食品工业科技,2013,34(16):334-337.
- [10] 宋玲钰. 花生降胆固醇肽的制备及饮料开发[D]. 山东泰安:山东农业大学,2016.
- [11] YAO Y, ZHANG J, HUI H, et al. Preparation and bioactivity of chickpea hypocholesterolemic peptides[J]. J Chin Cereal Oils Assoc, 2015, 30(1):33-38.
- [12] 于娜. 卵黄多肽的分离纯化及降血脂活性研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2012.
- [13] 文浪. 具有胆酸盐吸附作用的苦荞寡肽的制备及活性评价[D]. 上海:上海应用技术大学,2016.
- [14] 黄昆. 山杏仁多肽的制备及其对胆酸盐络合能力的研究[D]. 北京:北京林业大学,2013.
- [15] 白利峰,刘金双,周培根. 扇贝边多肽提取物对高脂血症大鼠血脂以及脂质氧化的影响[J]. 安徽农业大学学报,2008,35(4):615-618.
- [16] 江锟. 鲈鱼蛋白的酶解工艺优化及活性肽的功能特性研究[D]. 武汉:华中农业大学,2013.
- [17] 蓝建京,刘旭辉,伍善广,等. 酶法制取丝素降胆固醇肽的工艺研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(21):13119-13121.
- [18] MEGÍAS C, PEDROCHE J, DEL M Y M, et al. Sunflower protein hydrolysates reduce cholesterol micellar solubility[J]. Plant Food Hum Nutr, 2009, 64(2):86-93.
- [19] MARQUES M R, FONTANARI G G, PIMENTA D C, et

- al. Proteolytic hydrolysis of cowpea proteins is able to release peptides with hypocholesterolemic activity [J]. Food Res Int, 2015, 77:43-48.
- [20] 郑睿. 降胆固醇亚麻籽蛋白酶解肽的制备及结构表征[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学, 2016.
- [21] 刘淳, 张海英, 韩涛, 等. Alcalase 碱性蛋白酶酶解蚕豆蛋白的研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(12):29-33.
- [22] 苏海玲, 张海英, 韩涛, 等. 蚕豆蛋白酶解工艺及响应面法的优化[J]. 中国食品学报, 2013, 13(5):39-46.
- [23] 李慧, 丁轲, 韩涛, 等. 响应面法优化蚕豆蛋白酶解工艺条件的研究[J]. 中国食物与营养, 2015, 21(4):31-35.
- [24] 宋晓敏. 蚕豆蛋白的提取、功能特性及酶水解研究[D]. 天津:天津商业大学, 2013.
- [25] 吴继美. 粮食水溶性蛋白结合胆酸盐能力及胆酸盐免疫检测方法的研究[D]. 广州:暨南大学, 2014.
- [26] 周小理, 黄琳, 周一鸣. 苦荞水溶性蛋白体外吸附胆酸盐能力的研究[J]. 食品科学, 2011, 32(23):77-81.

· 信息 ·

特种油脂木本油料西部行——走进云南源天集团

[本刊讯]近日,由中粮西安院、《中国油脂》《中国食品报》《粮油市场报》组成的特种油脂木本油料西部行调研小组来到了位于云南峨山县金水工业园区的云南源天生物集团有限公司,对源天集团进行了为期两天的调研。调研小组来到源天集团特种油脂加工厂,一进厂区大门就被里面园林式的办公环境吸引,蓝天白云,空气清新,道路两旁鲜花怒放,仿佛置身于城市的公园中。

云南源天集团是一家集种植、养殖、生产、开发、加工、销售为一体的综合性生物资源开发集团化企业,依托云南高原丰富的生物资源优势,已形成了油脂、生物农药、有机无机复混肥、生态养殖和种植等产业,是一个集产、学、研为一体的省级高原特色农业产业化龙头企业、省级林业龙头企业。

“高原农业庄园”战略——源天集团副董事长李光明介绍,源天集团于2015年底实施了“高原农业庄园”战略,庄园建设规模10 828亩,其中开发利用9 654亩,建设内容含甸中综合基地及橄榄庄园,大龙潭水果基地,化念综合基地及特种木本油料庄园。集团将加大科技投入,提升科技创新能力,加快以橄榄木本油料基地为主题,具有示范、休闲和培训学习为一体的庄园经济建设,致力于打造“万亩田园综合体”。

规模化特种油料基地——源天集团副总经理胡志东介绍,云南源天生物集团有限公司依托云南高原丰富的生物资源优势,致力于发展高原特色生物产业,在发展木本食用油方面独树一帜,已形成了高原木本油料种植、生产、经营规模化、集约化、特色化。已建立了10万亩核桃、15万亩的茶叶果、2万亩的火麻合作基地;具有5万吨各种高端油生产能力,形成了年产1 000吨普洱茶籽油、1 000吨火麻籽油、5 000吨核桃油的产品规模。

高原特色木本食用油——源天集团营销总监王永康介绍,源天集团木本食用油与普通食用油相比有其独具的特点,首先原料生长在海拔2 000米以上,常年日照充足、四季如春、雨水充沛,不施化肥农药,收获采摘由人工精挑细选;其次在生产加工、贮运环节,采用低温冷榨技术尽可能多地保留营养成分,七道检测环节严控质量。

另外,茶籽油、火麻籽油和核桃油均经过了有机绿色认证。融合核桃油、普洱茶籽油和火麻籽油精华的营养均衡油——多元特种食用油荣获国家实用新型专利。

“源于自然、天成健康”,源天人依托得天独厚的自然环境和生态资源,秉承原生自然之道,致力于为消费者提供天然、营养、健康、安全的特色木本食用油产品。