

响应面优化酶解法制备岩豆抗氧化肽工艺

屠瀚超¹, 阳晓晶², 罗松明¹

(1. 四川农业大学 食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 千禾味业食品股份有限公司, 四川 眉山 620010)

摘要:以岩豆为原料, 分别以盐提法和水提法提取蛋白, 通过比较盐溶蛋白和水溶蛋白的 DPPH 自由基清除能力, 得出盐溶蛋白的 DPPH 自由基清除能力较高。以岩豆盐溶蛋白为原料, 采用响应面优化酶解法制备岩豆抗氧化肽的工艺条件。结果表明, 以 DPPH 自由基清除率为评价指标, 筛选出胃蛋白酶为最优酶制剂。酶解法制备岩豆抗氧化肽最优工艺条件为底物质量浓度 0.8 mg/mL、酶解温度 34 °C、酶添加量 1 100 U/g、酶解时间 36 min、酶解 pH 2.0, 此条件下岩豆抗氧化肽的 DPPH 自由基清除率为 70.41%, 多肽得率为 53.63%。

关键词:岩豆; 抗氧化肽; 盐溶蛋白; 胃蛋白酶; 酶解; DPPH 自由基清除率

中图分类号: Q51; TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2020)06-0036-05

Optimization of enzymolysis production of *Milletia dielsiana* antioxidant peptide by response surface methodology

TU Hanchao¹, YANG Xiaojing², LUO Songming¹

(1. College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China;

2. Qianhe Weiye Food Co., Ltd., Meishan 620010, Sichuan, China)

Abstract: Using *Milletia dielsiana* as raw material, the protein was extracted by salt extraction method and water extraction method respectively. Comparing the DPPH free radical scavenging ability of salt soluble protein and water soluble protein, it was concluded that the DPPH free radical scavenging ability of salt soluble protein was higher. Then, with *Milletia dielsiana* salt soluble protein as material, enzymolysis production process of *Milletia dielsiana* antioxidant peptide was optimized by response surface methodology. The results showed that pepsin was selected as the best enzyme with DPPH free radical scavenging rate as index. The optimal conditions for preparing *Milletia dielsiana* antioxidant peptide were determined as follows: substrate mass concentration 0.8 mg/mL, enzymolysis temperature 34 °C, enzyme amount 1 100 U/g, enzymolysis time 36 min, and enzymolysis pH 2.0. Under the optimal conditions, the DPPH free radical scavenging rate of *Milletia dielsiana* antioxidant peptide was 70.41% and the yield of polypeptide was 53.63%.

Key words: *Milletia dielsiana*; antioxidant peptide; salt soluble protein; pepsin; enzymolysis; DPPH free radical scavenging rate

岩豆 (*Milletia dielsiana* Harms ex Diels) 是香花崖豆藤 (*Milletia dielsiana* Harms) 的种子。香花崖豆藤是豆科崖豆藤属的植物, 为攀缘藤本或木本植

物, 多以藤茎入药, 其中药名为昆明鸡血藤。香花崖豆藤主要分布于我国四川、贵州、云南等地, 在四川万源、长宁等地有大规模种植^[1]。岩豆中的蛋白质含量丰富, 且不含胆固醇, 可以提高食品营养价值, 预防心血管疾病^[2]。

目前国内外对岩豆方面的成分开发利用研究较少, 主要集中在香花崖豆藤的化学成分^[3-5]、岩豆凝集素^[6-7]等方面, 对岩豆抗氧化肽的研究几乎没有。

收稿日期: 2019-09-11; 修回日期: 2020-02-01

作者简介: 屠瀚超 (1994), 男, 硕士研究生, 主要从事植物蛋白资源开发研究 (E-mail) ttchh94@126.com。

通信作者: 罗松明, 副教授, 博士 (E-mail) luosming519@163.com。

利用蛋白酶解蛋白质制得活性肽具有反应条件温和、省时高效的优点^[8],还可以很好地保留小肽的营养价值,甚至可以去除部分致敏原^[9],同时制得的多肽具有较好的抗氧化活性,是当前大规模制备抗氧化活性肽的主要手段。目前利用响应面优化并结合酶解法制备岩豆抗氧化肽工艺的研究鲜见报道。本研究在单因素试验的基础上,通过响应面法优化岩豆盐溶蛋白酶解制备抗氧化肽的工艺条件,为研究岩豆抗氧化肽的活性、分离纯化及生产提供一定的依据,以提高岩豆的综合利用水平及产业附加值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

岩豆,采购于四川省达州市万源县。

胃蛋白酶(酶活力3 000 U/g)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),索莱宝生物公司;木瓜蛋白酶(酶活力300 000 U/g)、中性蛋白酶(酶活力50 000 U/g)、菠萝蛋白酶(酶活力800 000 U/g),上海瑞永科技有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

Milli-Q Reference 超纯水装置,美国 Millipore 公司;UV-2802 紫外可见分光光度计;PHS-3C pH 计;D-37520 高速冷冻离心机,美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 岩豆盐溶蛋白提取工艺

岩豆→去皮→粉碎→石油醚脱脂 10 h→加入 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液(料液比 1:50)→磁力搅拌 30 min(恒温 38℃)→离心(8 000 r/min, 15 min)→取上清液→调节 pH 至 4.3→离心(8 000 r/min, 15 min)→取沉淀冷冻干燥→岩豆盐溶蛋白。

1.2.2 岩豆水溶蛋白的提取工艺

岩豆→去皮→粉碎→石油醚脱脂 10 h→加入超纯水(料液比 1:50)→磁力搅拌 40 min(恒温 50℃)→离心(8 000 r/min, 15 min)→取上清液→调节 pH 至 4.5→离心(8 000 r/min, 15 min)→取沉淀冷冻干燥→岩豆水溶蛋白。

1.2.3 岩豆盐溶蛋白的酶解

酶液的配制:酶试剂→加入相应 pH 的缓冲液(浓度为 20 U/mL)→预热 15 min→酶液。

酶解:岩豆盐溶蛋白→加超纯水溶解→加入酶液进行酶解→每隔 30 min 振荡摇匀 1 次→一定时间后沸水浴处理 10 min 灭酶→7 000 r/min 离心 10 min→上清液→酶解液。

同时设置 1 组空白对照组(不加酶)。

1.2.4 蛋白酶的筛选

以胃蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶为筛选对象,选择底物质量浓度 0.8 mg/mL、酶添加量 1 500 U/g,酶解温度和 pH 在各自最适条件(表 1)下进行酶解反应,并分别在 5、15、30、60、120、180、240、300、360 min 时取样测定 DPPH 自由基清除率,以 DPPH 自由基清除率为指标,筛选出酶解最优酶。

表 1 蛋白酶酶解条件

蛋白酶	pH	酶解温度/℃
胃蛋白酶	2.0	37
中性蛋白酶	7.0	45
木瓜蛋白酶	6.5	65
菠萝蛋白酶	6.8	50

1.2.5 DPPH 自由基清除率的测定

参照 Xie 等^[10]的方法略有改进。将 DPPH 溶于 95% 乙醇中配制成浓度为 0.2 mmol/L 的 DPPH 溶液。取 2 mL 酶解液和 2 mL 的 DPPH 溶液进行混合,摇匀后放置室温下 30 min,在 517 nm 处测定吸光值($A_{\text{样品}}$),空白组以等体积 95% 乙醇溶液替换 DPPH,在 517 nm 处测定其吸光值($A_{\text{空白}}$),对照组以等体积相应 pH 的缓冲液代替样品溶液,在 517 nm 测定吸光值($A_{\text{对照}}$),按下式计算 DPPH 自由基清除率。

$$\text{DPPH 自由基清除率} = \left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{对照}}}\right) \times 100\%$$

1.2.6 多肽得率的测定

多肽含量参照 Lowry 法进行测定^[11]。取 4 mL 待测样品,加入 15% 等体积的三氯乙酸(TCA)溶液,放置 10 min 后,置于离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液采用 Lowry 法测定上清液中多肽含量。按下式计算多肽得率。

$$\text{多肽得率} = N_1 / N_2 \times 100\%$$

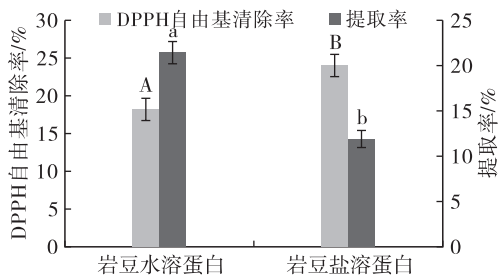
式中: N_1 为多肽含量; N_2 为底物总蛋白含量。

2 结果与分析

2.1 酶解底物的选择

分别采用 1.2.1、1.2.2 制备岩豆盐溶蛋白与水溶蛋白,对其 DPPH 自由基清除能力及蛋白提取率进行比较,结果见图 1。

由图 1 可知,岩豆水溶蛋白的提取率(21.32%)高于盐溶蛋白(11.79%),但是用超纯水配制成相同浓度的蛋白液后(未添加酶液),盐溶蛋白的 DPPH 自由基清除率(24.01%)高于水溶蛋白(18.22%),且差异显著。故选取岩豆盐溶蛋白为后续试验原料。



注:不同大小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

图1 岩豆水溶蛋白与盐溶蛋白 DPPH 自由基清除能力及蛋白提取率的比较

2.2 蛋白酶的筛选

按照 1.2.4 的方法采用 4 种蛋白酶进行岩豆盐溶蛋白的酶解,随着酶解时间的延长,4 种蛋白酶处理后所得酶解液的 DPPH 自由基清除能力比较如图 2 所示。

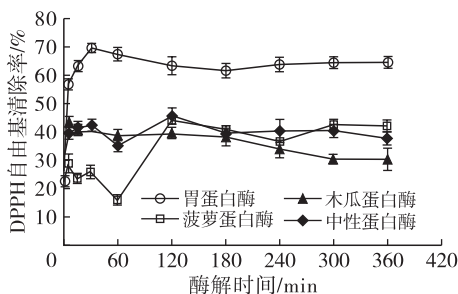


图2 4种蛋白酶处理后酶解液的 DPPH 自由基清除能力比较

由图 2 可知,岩豆盐溶蛋白在经过 4 种蛋白酶处理后,DPPH 自由基清除率大体上均呈现出先上升后下降最后趋于稳定的趋势,说明延长酶解时间对酶解产物提高 DPPH 自由基清除能力效果不显著。利用胃蛋白酶酶解岩豆盐溶蛋白得到的酶解液对 DPPH 自由基具有较高清除能力,在 30 min 时达到 69.84%。经菠萝蛋白酶和中性蛋白酶处理 120 min 后,酶解液的 DPPH 自由基清除率分别达到 44.23% 和 45.70%。胃蛋白酶 9 个时间点的 DPPH 自由基清除率均显著高于其他 3 种酶处理。可能是因为胃蛋白酶在对岩豆盐溶蛋白进行剪切时,能够识别具有一定特异性的氨基酸序列^[12],酶解后得到具有较强抗氧化能力的小肽。同时,酶解液的 DPPH 自由基清除率均高于未加酶的空白组(24.01%),说明酶解法确实有利于抗氧化肽的制备。因此,选择胃蛋白酶为酶解优化的酶制剂。

2.3 单因素试验

2.3.1 酶解时间对酶解效果的影响

固定酶解 pH 2.0、酶添加量 1 500 U/g(以底物质量计,下同)、底物质量浓度 0.8 mg/mL、酶解温度 35 °C 条件下,考察酶解时间对酶解效果的影响,结果见图 3。

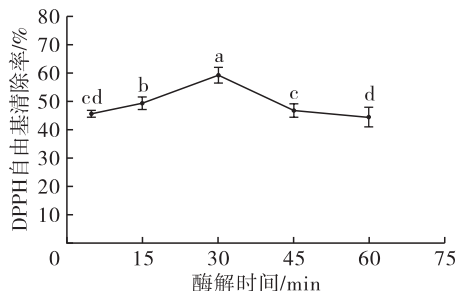


图3 酶解时间对酶解效果的影响

由图 3 可知,随着酶解时间的延长,DPPH 自由基清除率逐渐增大,在 30 min 达到最高值(59.41%),继续延长酶解时间,DPPH 自由基清除率出现下降趋势。可能是随着酶解时间的延长,原本具有较高活性的肽被酶解成活性较低的小肽或氨基酸^[13],使得抗氧化肽活性下降,之后溶液中多肽和氨基酸的浓度达到饱和,酶解反应停止,抗氧化活性逐渐趋于稳定。因此,选取 30 min 为最适酶解时间。

2.3.2 酶解温度对酶解效果的影响

固定酶解 pH 2.0、酶添加量 1 500 U/g、底物质量浓度 0.8 mg/mL、酶解时间 30 min 条件下,考察酶解温度对酶解效果的影响,结果见图 4。

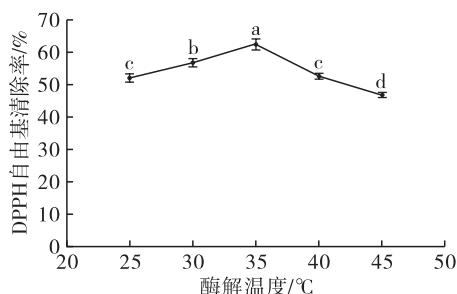


图4 酶解温度对酶解效果的影响

由图 4 可知,当酶解温度由 25 °C 升高至 35 °C 时,岩豆盐溶蛋白酶解液的 DPPH 自由基清除率显著增加,继续升高酶解温度,DPPH 自由基清除率显著下降。可能是由于温度的升高,使得胃蛋白酶的结构发生了一定的改变,从而影响了酶解效果,也可能是由于温度的升高改变了岩豆抗氧化肽的结构,使其活性下降。当酶解温度为 35 °C 时,DPPH 自由基清除率达到最大值(62.67%)。因此,选择 35 °C 为最适酶解温度。

2.3.3 酶添加量对酶解效果的影响

固定酶解 pH 2.0、酶解温度 35 °C、底物质量浓度 0.8 mg/mL、酶解时间 30 min 条件下,考察酶添加量对酶解效果的影响,结果见图 5。

由图 5 可知,随酶添加量的增大,DPPH 自由基清除率呈上升趋势,在酶添加量达到 1 500 U/g 时,DPPH 自由基清除率达到最大值(64.91%)。当酶

添加量超过 1 500 U/g 后, DPPH 自由基清除率下降, 随后趋于稳定, 可能是因为胃蛋白酶的有效成分与底物蛋白的特异性结合位点达到饱和^[14], 酶解效率变化不显著, 同时由于过多的胃蛋白酶参与酶解, 使得抗氧化活性较强的肽段被酶解为活性较弱的小肽, 造成了 DPPH 自由基清除率的下降。因此, 选取 1 500 U/g 为最适酶添加量。

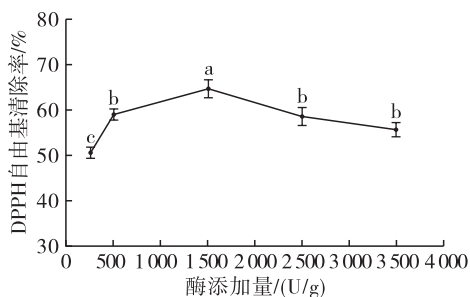


图5 酶添加量对酶解效果的影响

2.3.4 底物质量浓度对酶解效果的影响

固定酶解 pH 2.0、酶添加量 1 500 U/g、酶解温度 35℃、酶解时间 30 min 条件下, 考察底物质量浓度对酶解效果的影响, 结果见图 6。

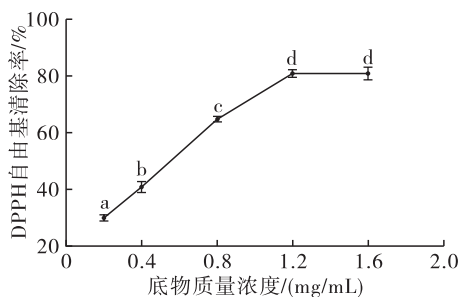


图6 底物质量浓度对酶解效果的影响

由图 6 可知, DPPH 自由基清除率随底物质量浓度的增大而增大, 在底物质量浓度为 1.2 mg/mL 时取得最大值 (81.24%), 但是在后续试验中发现在底物质量浓度大于 0.8 mg/mL 时改变酶添加量, 对 DPPH 自由基清除率的影响不显著, 无法确定最适酶添加量。并且在底物质量浓度大于 1.2 mg/mL 时, DPPH 溶液与酶解液混合后溶液变得浑浊, 影响吸光值的测定。可能是由于酶解底物浓度过高, 造成酶解液中含有的有效抗氧化活性成分达到饱和析出^[15], 从而使 DPPH 自由基清除率虽然有提升但是对酶添加量的变化不敏感。因此, 选择 0.8 mg/mL 为最适底物质量浓度。

2.4 响应面试验

2.4.1 响应面试验设计及结果

在单因素试验结果的基础上, 固定底物质量浓度 0.8 mg/mL、酶解 pH 2.0, 采用 Design Expert 8.0.6 软件, 根据 Box - Behnken 中心组合设计原理, 以酶解

温度(A)、酶添加量(B)、酶解时间(C)为考察因素, 以 DPPH 自由基清除率(Y)为响应值, 设计三因素三水平的响应面试验, 进行二次多元回归方程拟合及其优化分析。响应面试验因素水平见表 2, 响应面试验设计及结果见表 3。

表2 响应面试验因素水平

水平	A 酶解温度/ ℃	B 酶添加量/ (U/g)	C 酶解时间/ min
-1	25	500	15
0	35	1 500	30
1	45	2 500	45

表3 响应面试验设计及结果

试验号	A	B	C	Y/%
1	-1	1	0	53.50
2	0	-1	-1	41.97
3	1	0	1	46.53
4	1	0	-1	43.53
5	0	0	0	69.40
6	0	0	0	71.58
7	0	1	1	51.26
8	-1	0	-1	49.67
9	0	0	0	67.90
10	-1	-1	0	40.23
11	-1	0	1	47.86
12	0	-1	1	37.18
13	0	1	-1	47.22
14	1	-1	0	37.44
15	1	1	0	46.99

利用 Design Expert 8.0.6 软件对表 3 数据进行多元回归拟合, 响应值与各因素之间的二次多元回归方程式如下:

$$Y = 69.63 - 2.10A + 5.27B + 0.055C - 0.93AB + 1.20AC + 2.21BC - 11.30A^2 - 13.79B^2 - 11.43C^2$$

对该模型进行方差分析, 结果如表 4 所示。

由表 4 可知, 模型的 $P < 0.0001$, 说明模型达到极显著水平, 响应值与各因素的回归方程的关系是极显著的, 失拟项 P 为 $0.8671 > 0.05$, 说明方程与实际拟合中非正常误差所占比例小, 回归模型能够较好地预测胃蛋白酶酶解岩豆盐溶蛋白制备抗氧化肽的工艺条件。 R^2 为 99.47%, 说明预测值与实际值之间具有高度的相关性, R_{Adj}^2 为 98.50%, 说明试验有 98.50% 受控制变化的因素影响, 未控制因素对试验结果的影响很小, 故该模型可以用于分析和预测岩豆盐溶蛋白酶解后抗氧化能力的变化。同时可看出 A、B、 A^2 、 B^2 、 C^2 影响极显著, BC 影响显著。影响岩豆盐溶蛋白酶解液抗氧化能力因素

的主次顺序为酶添加量(B) > 酶解温度(A) > 酶解时间(C)。

表4 回归方程方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	1 724.12	9	191.57	103.44	<0.000 1 **
A	35.15	1	35.15	18.98	0.007 3 **
B	222.08	1	222.08	119.91	0.000 1 **
C	0.02	1	0.02	0.01	0.913 4
AB	3.46	1	3.46	1.87	0.229 9
AC	5.78	1	5.78	3.12	0.137 4
BC	19.49	1	19.49	10.53	0.022 8 *
A ²	471.33	1	471.33	254.50	<0.000 1 **
B ²	701.97	1	701.97	379.04	<0.000 1 **
C ²	482.45	1	482.45	260.51	<0.000 1 **
残差	9.26	5	1.85		
失拟项	2.41	3	0.80	0.23	0.867 1
纯误差	6.85	2	3.42		
总离差	1 733.38	14			

注: ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$); * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4.2 模型验证试验

通过 Design Expert 软件,以最大 DPPH 自由基清除率为指标分析响应面试验结果,获得酶解岩豆盐溶蛋白制备抗氧化肽的最优酶解条件为酶解温度 34.07 °C、酶添加量 1 098.14 U/g、酶解时间 35.43 min,此时 DPPH 自由基清除率为 70.25%。为方便验证同时结合实际情况,将参数修正为酶解温度 34 °C、酶添加量 1 100 U/g、酶解时间 36 min。在最优条件下做 3 次平行试验,测得此条件下 DPPH 自由基清除率为 70.41%,接近于理论值,表明该模型可较好地预测各因素与响应值之间的影响关系,并测得该条件下多肽得率为 53.63%。

3 结论

以岩豆盐溶蛋白为原料,DPPH 自由基清除率为评价指标,利用单因素试验和响应面优化胃蛋白酶酶解岩豆盐溶蛋白制备抗氧化肽的工艺,得到最优酶解条件为酶解温度 34 °C、酶添加量 1 100 U/g、酶解时间 36 min、酶解 pH 2.0、底物质量浓度 0.8 mg/mL,此条件下 DPPH 自由基清除率为 70.41%、多肽得率为 53.63%。本研究表明岩豆盐溶蛋白酶解液具有一定的抗氧化活性,可以利用岩豆盐溶蛋白制备抗氧化肽。本研究为增加岩豆的附加值提供

一种思路,并为分离纯化岩豆抗氧化肽,研究其抗氧化机理奠定了基础。

参考文献:

- [1] 宋建兴,胡旺云,罗士德. 香花崖豆藤化学成分的研究[J]. 西南林学院学报,1992,12(1): 40-43.
- [2] 冯洁,成军,梁鸿,等. 崖豆藤属植物化学成分及生物活性[J]. 医学教育探索,2007(5): 185-191.
- [3] 黄诗琦,韦雅妮,赵雨川,等. 鸡血藤总黄酮对大肠杆菌败血症的治疗作用[J]. 中国畜牧兽医,2019,46(5): 1541-1550.
- [4] 官杰,冯兴中,刘剑刚. 鸡血藤防治动脉硬化相关药理作用的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2019,30(3): 385-389.
- [5] 王中华,蔡同强,杨丛远,等. 鸡血藤多糖的硫酸化修饰、表征及活性研究[J]. 广西大学学报(自然科学版),2018,43(5): 2041-2046.
- [6] 高顺. 岩豆凝集素的化学修饰与光谱分析;风雨花甘露糖结合凝集素基因的生物信息学分析及其在大肠杆菌中的表达与纯化[D]. 成都:四川大学,2005.
- [7] 牟航,周红,鲍锦库,等. 岩豆凝集素分子中色氨酸残基的化学修饰及其荧光光谱研究[J]. 应用与环境生物学报,2000,6(4): 317-320.
- [8] 郑锐,郑云峰,高潮. 生物活性肽的种类、制备方法及其生理功能的研究进展[J]. 国外畜牧学(猪与禽),2016,36(6): 102-107.
- [9] 马涛,张海欣,马永庆,等. 三文鱼小清蛋白定向酶解模型及致敏活性分析[J]. 食品工业,2017,38(2): 179-183.
- [10] XIE Z J, HUANG J R, XU X M, et al. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate[J]. Food Chem, 2008, 111(2): 370-376.
- [11] 付玉梅,许锦珍,廖群,等. Lowry 法测定寡肽的研究[J]. 药物分析杂志,2011,31(4): 739-741.
- [12] 姚成虎,王志耕,梅林,等. 胃蛋白酶水解珠蛋白获得 ACE 抑制肽的工艺优化[J]. 农业工程学报,2008,24(5): 284-288.
- [13] KARANGWA E, ZHANG X, MUREKATETE N, et al. Effect of substrate type on sensory characteristics and antioxidant capacity of sunflower Maillard reaction products[J]. Eur Food Res Tech, 2015, 240(5): 939-960.
- [14] LIU C Y, MA X M, CHE S, et al. The Effect of hydrolysis with neutrase on molecular weight, functional properties, and antioxidant activities of Alaska pollock protein isolate[J]. J Ocean Univ Chin, 2018, 17(6): 1423-1431.
- [15] 吴立国. 羊血浆蛋白肽抗氧化功能评价与应用[D]. 北京:中国农业科学院,2018.