

响应面法优化胃蛋白酶制备蛋清多肽的研究

Emmanuel Kargan Dangan¹, 蔡成岗^{1,2,3}, 谢金海^{1,2,3}, 王珍珍¹, 毛建卫^{1,2,3}

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 杭州 310023; 3. 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心, 杭州 310023)

摘要: 以蛋清粉为原料,以酶解液的抗氧化能力为指标,优化了胃蛋白酶酶解蛋清粉的工艺条件。单因素实验结果表明,酶解温度 50 ℃、酶解 pH 值 2.5 和质量分数 5% 的蛋清粉,经酶解后可以获得较佳的抗氧化能力;响应面实验结果表明,在 pH 值 2.1、蛋清粉质量分数 3.5%、反应温度 49 ℃ 时,酶解液产生的多肽具有最优的抗氧化活性。研究结果为进一步开发蛋清多肽打下了一定的基础。

关键词: 蛋清粉;胃蛋白酶;多肽;响应面法

中图分类号: TS201.2;TS253.9

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2016)03-0225-05

Optimization of conditions for egg white protein peptides production by pepsin hydrolysis

Emmanuel Kargan Dangan¹, CAI Chenggang^{1,2,3}, XIE Jinhai^{1,2,3}, WANG Zhenzhen¹, MAO Jianwei^{1,2,3}

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Produce, Hangzhou 310023, China; 3. Zhejiang Collaborative Innovation Center of Chemical and Biological Manufacturing for Agricultural Biological Resources, Hangzhou 310023, China)

Abstract: The Egg white protein powder as the substrates for the peptides preparation by pepsin hydrolysis were studied. The hydrolysis conditions were optimized based on the reducing power and DPPH radical scavenging analysis. The single factor experimental results showed that the reaction temperature of 50 ℃, the buffer solution pH value of 2.5 and 5% substrate concentration are the better conditions for the antioxidant activity. The response surface methodology results showed that the optimal conditions are hydrolysis temperature of 49 ℃, pH value of 2.1 and 3.5% substrate concentration, respectively. The results will be the basis for the further

收稿日期: 2016-04-11

基金项目: 浙江省重大科技专项计划项目(2013C02007);浙江科技学院科研启动基金项目(F702103E03)

作者简介: Emmanuel Kargan Dangan (1988—),男,利比里亚人,硕士研究生,研究方向为食品生物技术。

通信作者: 蔡成岗,副教授,博士,主要从事食品生物技术相关的教学和研究。

production of egg white protein peptides.

Keywords: egg white protein powder; pepsin; peptide; response surface methodology

鸡蛋营养价值丰富,在世界范围内得到广泛的食用。随着食品工业的发展,鸡蛋来源的配料也日渐在食品产业中占有一定的份额,如蛋清粉、蛋黄粉、溶菌酶和蛋源免疫球蛋白、DHA 等^[1-3],这些东西的使用很方便,同时还减少了运输成本。生物活性肽是以蛋白质为底物,采用酶解的方法进行生产的功能性成分,主要包括免疫肽、抗菌肽、降压肽等^[4-6],它们在保健食品、医药等领域得到广泛应用。目前有报道采用酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶等多种酶制剂对蛋清进行酶解制备活性肽^[7-9]。

本研究采用猪源胃蛋白酶对蛋清粉进行酶解处理,以酶解后多肽还原力变化和清除 DPPH 自由基能力为指标,考察较优的酶解条件,以便为进一步利用蛋清多肽打下一定的基础。

1 实验部分

1.1 材料和试剂

蛋清粉,长兴艾格生物制品有限公司。胃蛋白酶(EC 编号:232-629-3,规格 1:3 000)、透析袋(截留分子量 6 945 u),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;DPPH 购自 Sigma 公司;HCl、KCl、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、Tris 碱、H₂O₂、H₃PO₄、CH₃OH、K₃[Fe(CN)₆]、FeCl₃、C₇H₅NaO₃ 等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司和华东医药股份有限公司器材试剂分公司。

1.2 实验设备

磁力搅拌器 JB-2,上海雷磁有限公司;紫外可见分光光度计 752N,上海精科仪器有限公司;离心机 Micro17R,美国热电(上海)科技仪器有限公司;酸度计 PB-10,梅特勒托利多仪器(上海)有限公司;水浴摇床 SHA-C,江苏金坛市宏华仪器厂;其他常规玻璃器皿。

1.3 实验技术路线

蛋清粉→实验条件选择→酶解实验控制→灭酶与抗氧化分析→实验条件优选→参数确定。

1.4 实验设计

1.4.1 单因素实验设计

设定胃蛋白酶用量为蛋清粉用量的 1%,在酶解时间 2 h 的条件时,以温度、缓冲液 pH 值和蛋清粉质量分数为单因素变量,以还原力和 DPPH 自由基清除率为指标进行单因素实验。其中,设计蛋清粉质量分数为 2%、4%、6%时,在 50 ℃、pH2 的缓冲溶液中酶解时间 2 h,测定酶解效果;考察 40、50、60 ℃时,蛋清粉质量分数 4%、pH2 的缓冲液中酶解 2 h 后的酶解效果;以蛋清粉质量分数 4%,研究 pH 值为 1、2、3 的缓冲液中 50 ℃酶解 2 h 后的酶解效果。

1.4.2 Box-Behnken 实验设计

以酶降解缓冲液的酸碱性(pH 值)、蛋清蛋白量和反应温度为实验条件开展研究。采用 Design Expert 软件 7.0 版本中的 Box-Behnken 方法进行设计。实验因素水平根据单因素实验结果为参考,具体见表 1。

表 1 响应面优化因素和水平表
Table 1 Levels and factors of Box-Behnken experiment

水平	因素		
	pH 值	温度/℃	蛋清粉质量分数/%
	A	B	C
-1	1.5	40	2
0	2.5	50	5
1	3.5	60	8

1.5 抗氧化活性测定

还原力和 DPPH 自由基清除率测定参考文献[9]的方法。

2 实验结果

2.1 单因素实验结果

2.1.1 蛋清粉质量分数对抗氧化结果的影响

在缓冲溶液 pH2, 50 °C 酶解 2 h 后, 质量分数 4% 的蛋清粉具有最大的还原力和 DPPH 自由基清除率, 高于质量分数 2% 和 6% 时的蛋清粉, 如图 1 所示。因此, 在后续的实验中选择质量分数 4% 的蛋清粉。

2.1.2 酶解温度对抗氧化效果的影响

反应温度对蛋清粉多肽清除 DPPH 自由基和还原力有一定的影响(图 2)。结果表明, 温度在 50 °C 时, 蛋清粉的酶解产物显示了较佳的抗氧化能力, 高于 40 °C 和 60 °C 时的效果, 因此, 在后续试验中选择 50 °C 作为酶解温度。

2.1.3 反应液酸碱度对抗氧化效果的影响

在反应温度 50 °C、反应时间 2 h 的条件下, 选择 pH 值为 1(氯化钾-盐酸)、2(甘氨酸-盐酸)和 3(甘氨酸-盐酸)的缓冲液, 研究合适的反应液酸碱度。结果表明(图 3), 当选择 pH2 的甘氨酸-盐酸缓冲液时, 酶解后得到的产物显示了高于 pH 值分别为 1 和 3 的缓冲液, 因此, 在后续的研究中选择 pH 值为 2 的甘氨酸-盐酸缓冲液。

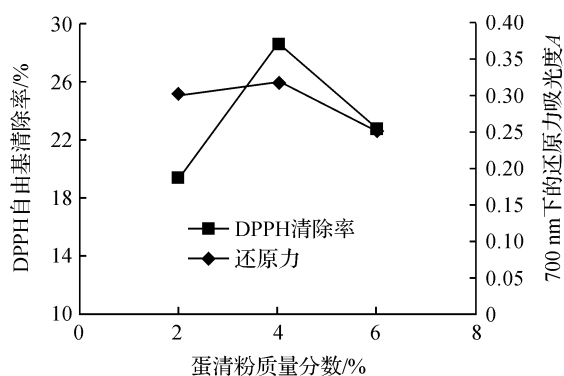


图 1 蛋清粉质量分数对酶解液 DPPH 清除和还原力的影响

Fig. 1 Influence of substrate contents on reducing power and DPPH scavenging of hydrolysates

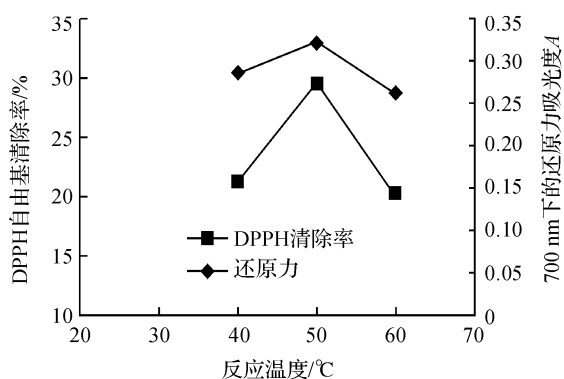


图 2 温度对酶解液 DPPH 清除和还原力的影响

Fig. 2 Influence of temperature on reducing power and DPPH scavenging percent of hydrolysate

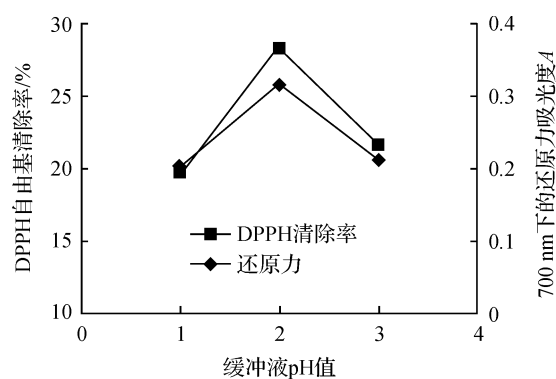


图 3 缓冲液 pH 值对水解肽的还原力和清除 DPPH 自由基的影响

Fig. 3 Influence of different pH values on reducing power and DPPH scavenging percent of hydrolysate

2.2 响应面实验结果

2.2.1 实验结果和方差分析

为考察较佳的酶解条件, 选择了酶解液的还原力及清除 DPPH 自由基的能力为指标, 开展了 Box-Behnken 优化实验, 并对还原力的结果进行了分析, 结果如表 2 所示。

由实验结果得到还原力方程如式(1)所示:

$$\begin{aligned} \text{还原力} = & 0.42 - 0.079A - 0.011B - 0.028C + 0.027AB + 0.095AC + \\ & 0.046BC - 0.13A^2 - 0.18B^2 - 0.12C^2 \end{aligned} \quad (1)$$

根据结果进行分析后得到方差分析表, 如表 3 所示。由结果可知, 模型的显著性为极显著 ($P=0.0011$), 模型的失拟性不显著 ($P=0.6501$), 表明根据实验结果得到了较好的模型。同时预测的 $R^2=$

0.947 4,调整的 $\text{Adj } R^2=0.879\ 8$,该结果说明了所建方程具有很好的拟合性。

表 2 响应面分析实验结果

Table 2 Box-Behnken experiment results

序号	A	B	C	700 nm 下的还原力吸光度 A	DPPH 清除率/%
1	1	1	0	0.067	20.1
2	-1	1	0	0.167	38.9
3	1	-1	0	0.009	1.53
4	1	0	1	0.127	41.7
5	0	1	1	0.138	28.2
6	-1	0	1	0.101	33.7
7	0	0	0	0.334	21.0
8	-1	-1	0	0.215	25.9
9	0	0	0	0.433	29.5
10	0	-1	1	0.094	16.8
11	0	0	0	0.380	26.7
12	1	0	-1	0.045	14.5
13	0	-1	-1	0.190	31.7
14	0	1	-1	0.051	14.9
15	0	0	0	0.493	26.0
16	-1	0	-1	0.399	38.5
17	0	0	0	0.447	29.9

表 3 响应面实验的方差分析表

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) of Box-Behnken experiment

模型来源	平方和	自由度	平方均值	F 值	P 值	显著性
	0.4	9	0.044	14.02	0.001 1	极显著
A	0.05	1	0.05	16.00	0.005 2	
B	9.031E-004	1	9.031E-004	0.29	0.608 4	
C	6.328E-003	1	6.328E-003	2.01	0.198 7	
A ²	2.809E-003	1	2.809E-003	0.89	0.375 8	
B ²	0.036	1	0.036	11.4	0.011 6	
C ²	8.372E-003	1	8.372E-003	9	0.146 5	
AB	0.067	1	0.067	2.67	0.002 4	
AC	0.13	1	0.13	21.48	0.000 3	
BC	0.064	1	0.064	41.68	0.002 8	
残差	0.022	7	3.141E-003	20.23		
失拟性	6.795E-003	3	2.265E-003	0.6	0.650 1	不显著
R ²	0.947 4					
Adj. R ²	0.879 8					

2.2.2 因素间的交互作用

Box-Behnken 实验设计为响应面实验方法的一种,可以考察不同因素之间的交互作用,根据研究结果对酶解温度、缓冲液 pH 值及蛋清粉质量分数三因素相互作用进行分析,结果如图 4 所示。由图 4 可知,酶解反应 pH 值和反应温度在接近中心位置时具有相对较高的抗氧化值,说明在单因素实验具有较好的实验结果,响应面实验选取的区间范围合适。两者的交互作用也得到了较佳的实验结果。

在酶解反应 pH 值一定时,蛋清粉质量分数在接近选取的中心点时具有较佳的抗氧化性;相应地,在蛋清粉质量分数一定时,酶解反应 pH 值在中心点也具有较好的实验结果(图 5)。两者交互作用得到了良好的实验结果。

在酶解反应温度固定时,蛋清粉质量分数在编码值由-1 到 1 的变化过程中,抗氧化值呈现先增加

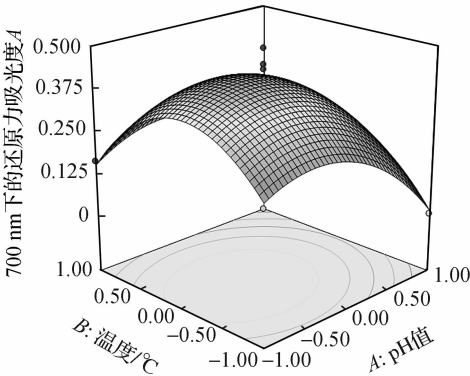


图 4 酶解 pH 值与酶解温度交互作用

Fig. 4 Interaction effects of hydrolysis pH value and temperature

后降低的趋势,在蛋清粉质量分数一定时,随着酶解反应温度的改变,抗氧化值也呈现先增加后降低的趋势,两者在中心位置附近具有接近最佳的实验结果(图6)。

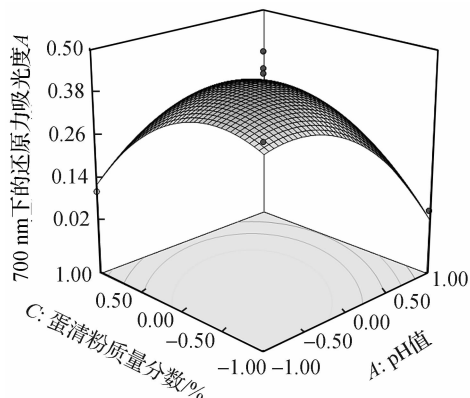


图5 酶解 pH 值与蛋清粉质量分数交互作用

Fig. 5 Interaction effects of hydrolysis pH value and substrate concentration

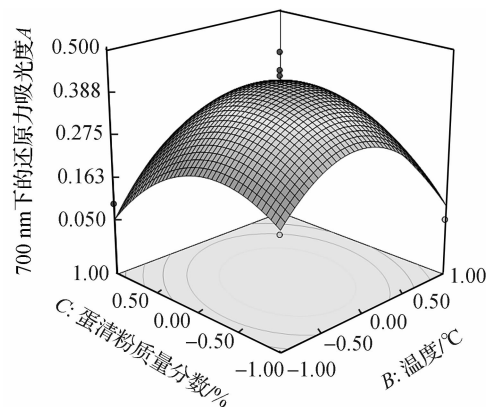


图6 酶解温度与蛋清粉质量分数交互作用

Fig. 6 Interaction effects of hydrolysis temperature and substrate concentration

对实验所得的方程和交互作用图等实验结果进行优化后,得到一组最佳的实验结果,此时 pH 值编码为-0.44,温度为-0.1,蛋清粉质量分数为-0.3,预测的 700 nm 下的还原力吸光度 A 为 0.440,换算为实际的反应溶液为 pH2.1,反应温度 49 ℃,蛋清粉质量分数 3.5%,在最优的条件下进行水解后发现,得到的 700 nm 下的还原力吸光度 A 为 0.472 ± 0.03 ,DPPH 自由基清除率为 $33.4\% \pm 0.02\%$,较优化前结果平均值有一定的增加。

3 结 语

蛋清粉富含蛋白等功能分子,酶解后得到的多肽显示了较好的抗氧化效果,应用潜力较好。采用胃蛋白酶进行酶解条件优化后,结果表明,酶解温度 50 ℃、酶解 pH2.5 和质量分数 5% 的蛋清粉,经酶解后可以获得较佳的抗氧化能力;响应面实验结果表明,在 pH2.1、蛋清粉质量分数 3.5%、反应温度 49 ℃ 时,酶解液产生多肽具有较佳的抗氧化活性。本研究结果为进一步开发蛋清多肽打下了一定的基础。

后续研究需在活性肽的分离方面进一步展开,如可以通过膜分离、柱层析等方法获得纯化的活性多肽,并进行结构分析和研究;在此基础上开展胃蛋白酶的固定化方面的研究,以提高酶解的效率;同时通过定向酶解法提高活性肽含量;进而在小试基础上开展中试研究,为后续的实际生产提供一定的工艺参数。

参考文献:

- [1] 周永昌. 蛋与蛋制品工艺学[M]. 北京, 中国农业出版社, 1995: 20-32.
- [2] BHAT Z F, KUMAR S, BHAT H F. Bioactive peptides of animal origin; a review[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(9): 5377.
- [3] 刘建涛, 赵利, 苏伟. 鸡蛋中的生物活性蛋白质和肽[J]. 中国酿造, 2008(24): 27.
- [4] LIU J B, YU Z P, ZHAO W Z, et al. Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2010, 122(4): 1159.
- [5] WATANBE K, TSUGE Y, SHIMOYAMADA M. Binding activities of pronase-treated fragments from egg white ovomucin with anti-ovomucin antibodies and Newcastle disease virus[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1998, 46(11): 4501.
- [6] MIGUEL M, RECIO I, GÓMEZ-RUIZ J A, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(9): 1914.
- [7] DÁVALOS A, MIGUEL M, BARTOLOMÉ B, et al. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(9): 1939.
- [8] CHEN C, CHI Y J, ZHAO M Y, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate[J]. Amino Acids, 2012, 43(1): 457.
- [9] 蔡成岗, 沙如意, 朱瑞瑜, 等. 蛋清粉酶解制备蛋清肽工艺优化研究[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(5): 43.