

响应面法优化制备南瓜籽抗氧化肽的工艺

范三红, 毛强强, 王亚云, 冯雨薇, 刘艳荣

(山西大学生命科学学院, 山西 太原 030006)

摘要: 以南瓜籽分离蛋白为原料, 采用酸性蛋白酶酶解制备南瓜籽抗氧化肽。选用加酶量、酶解温度、pH 值、底物质量浓度、酶解时间作为研究对象, 以酶解液对 DPPH 自由基的清除率为评价指标, 在单因素试验的基础上, 运用 Plackett-Burman 筛选试验确定显著因素, 然后通过三因素三水平的 Box-Behnken 响应面分析法优化制备南瓜籽抗氧化肽的酶解工艺条件。结果表明: 酸性蛋白酶酶解南瓜籽蛋白质的最佳工艺条件为: 酶解温度 50℃、pH2.5、酶解时间 5h、底物质量浓度 0.05g/mL、加酶量 6000U/g pro, 在此条件下, DPPH 自由基清除率可达到 92.82%。
关键词: 响应面法; 南瓜籽; 抗氧化肽; 酶解工艺; 优化

Optimization of Preparation Process for Antioxidant Peptides from Pumpkin Seed by Response Surface Methodology

FAN San-hong, MAO Qiang-qiang, WANG Ya-yun, FENG Yu-wei, LIU Yan-rong

(College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Pumpkin seed protein isolate was hydrolyzed by acidic protease to prepare antioxidant peptides. One-factor-at-a-time experiments were done to explore the effects of enzyme concentration, pH, temperature, substrate concentration and hydrolysis time on the scavenging activity of pumpkin seed hydrolysate against DPPH free radicals. Enzyme concentration, substrate concentration and hydrolysis time were identified as main affecting parameters and optimized using response surface analysis based on a three-variable, three-level Box-Behnken design. The optimal hydrolysis conditions were determined as hydrolysis temperature of 50 °C, hydrolysis pH of 2.5, enzyme concentration of 6000 U/g, substrate concentration of 0.05 g/mL and hydrolysis time of 5 h. Under these conditions, the scavenging activity of DPPH free radicals was up to 92.82%.

Key words: response surface methodology; pumpkin seed; antioxidant peptide; enzymatic hydrolysis; optimization
中图分类号: TS255.36; TS218 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2012)11-0241-06

随着人们生活水平的提高, 活性氧和自由基导致的各种疾病严重危害了人类的健康, 已经引起了社会各界的广泛关注。近年来, 评价和筛选具有强抗氧化活性的天然资源已成为生物学、医学和食品科学研究的新趋势, 而各种原料产生的抗氧化肽由于其低毒、高效等特点, 成为国内外研究的热点。

目前, 从廉价易得的动植物原料制备抗氧化肽的研究有很多, 这些原料主要有大豆蛋白^[1]、玉米蛋白^[2]、麦胚蛋白^[3]、乳蛋白^[4]、鱼类蛋白^[5]等, 此外在牛奶蛋白、家蝇幼虫蛋白等动物蛋白原料, 以及黑米、菜籽、灵芝、枸杞等植物蛋白原料中均获得了具有抗氧化作用的活性肽^[6]。由此可见, 生产抗氧化肽的原料范围非常广泛。

南瓜籽作为南瓜的副产品, 来源广泛, 产量巨

大, 其榨油后的饼粕含有丰富的蛋白质^[7], 直接废弃造成资源的极大浪费。本实验即利用酸性蛋白酶酶解南瓜籽蛋白制备抗氧化肽, 同时应用响应面法^[8-10]优化酶解工艺, 为南瓜籽蛋白的充分利用和南瓜籽肽类产品的开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

南瓜籽分离蛋白(总蛋白含量91.07%) 实验室自制; 酸性蛋白酶(固态, 酶活力为 10 万 U/g pro 以上) 宁夏和氏璧公司; 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH) 美国 Sigma 公司; 氢氧化钠、盐酸等均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-2800AH型紫外-可见分光光度计 龙尼柯(上海)

收稿日期: 2011-06-23

基金项目: 山西省科技攻关项目(20080311015); 山西省高等学校高新技术产业化项目(20111003)

作者简介: 范三红(1963—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为食品科学。E-mail: fsh729@sxu.edu.cn

仪器有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅 国华电器有限公司; AL204 电子分析天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; TG16A-WS 台式高速离心机 湖南赛特湘仪离心机有限公司; 868 型 pH 测试仪 美国奥立龙公司。

1.3 方法

1.3.1 DPPH 自由基清除率的测定^[11]

DPPH 自由基清除率采用比色法, 具体过程为: 在反应管中加入 2mL 0.2mmol/L 的 DPPH 乙醇溶液, 再加入 2mL 南瓜籽蛋白水解液, 混合均匀, 室温条件下避光反应 50min 后, 于 517nm 波长处测定吸光度。同时以 2mL DPPH 溶液与 2mL 蒸馏水混合后的吸光度为对照组; 以 2mL 蒸馏水与 2mL 乙醇混合后的吸光度为空白组。

$$\text{清除率}/\% = (1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}) \times 100$$

式中: A_1 为加水解液后 DPPH 溶液的吸光度; A_2 为空白组的吸光度; A_3 为未加水解液时 DPPH 溶液的吸光度。

1.3.2 南瓜籽蛋白酶解液的制备

配制一定质量浓度的南瓜籽分离蛋白溶液, 在沸水中加热处理 10min, 冷却至酶解反应的最适温度, 调节一定的 pH 值, 然后按一定比例加入蛋白酶, 反应过程中使 pH 值保持恒定。反应到预定时间, 沸水浴灭酶 10min, 冷却后 5000r/min 离心 20min, 上清液置于冰箱中待用。

1.3.3 单因素试验设计

1.3.3.1 酶添加量的确定

配制底物质量浓度为 0.05g/mL 的南瓜籽蛋白溶液 5 份, 调 pH 值为 3.5, 在温度为 50℃, 加酶量分别为 500、2000、4000、6000、8000U/g pro 的条件下酶解 4h。以 DPPH 自由基清除率为指标, 确定较适的加酶量。

1.3.3.2 酶解温度的确定

配制底物质量浓度为 0.05g/mL 的南瓜籽蛋白溶液 5 份, 调 pH 值为 3.5, 在加酶量为 6000U/g pro, 温度分别为 30、40、45、50、55℃ 的条件下酶解 4h。以 DPPH 自由基清除率为指标, 确定酶解的较适温度。

1.3.3.3 pH 值的确定

配制底物质量浓度为 0.05g/mL 的南瓜籽蛋白溶液 5 份, 在加酶量为 6000U/g pro、温度为 50℃, pH 值分别为 2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 的条件下酶解 4h。以 DPPH 自由基清除率为指标, 确定酶解的较适 pH 值。

1.3.3.4 底物质量浓度的确定

分别配制底物质量浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、

0.10g/mL 的南瓜籽蛋白溶液, 在 pH 值为 2.5、加酶量为 6000U/g pro、温度为 50℃ 条件下酶解 4h。以 DPPH 自由基清除率为指标, 确定酶解的较适底物质量浓度。

1.3.3.5 酶解时间的确定

配制底物质量浓度为 0.05g/mL 的南瓜籽蛋白溶液 5 份, 调 pH 值为 2.5, 在加酶量为 6000U/g pro、温度为 50℃ 的条件下分别酶解 2、4、6、8、10h, 测定酶解液的 DPPH 自由基清除率, 确定较适的酶解时间。

1.3.4 响应面试验设计

在单因素试验的基础上, 设计了 $N = 12$ 的 Plackett-Burman 筛选实验, 以 DPPH 自由基清除率为响应值 Y , 筛选出影响最显著的 3 个因素即: 加酶量、底物质量浓度、酶解时间, 然后结合 Box-Behnken 中心组合试验设计原理^[16], 开展三因素三水平的响应面试验。试验共有 15 个试验点, 其中 12 个为分析因子, 3 个为零点, 零点试验进行 3 次, 以估计误差。试验以随机次序进行, 重复 3 次。试验设计见表 1。

表 1 响应面分析因素水平表

Table 1 Factors and their coded levels tested in response surface analysis

水平	因素		
	A 加酶量/(U/g pro)	B 底物质量浓度/(g/mL)	C 酶解时间/h
-1	2000	0.02	2
0	5000	0.04	4
1	8000	0.06	6

1.4 数据分析

采用软件 MINITAB15.0 处理。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 加酶量对抗氧化活性的影响

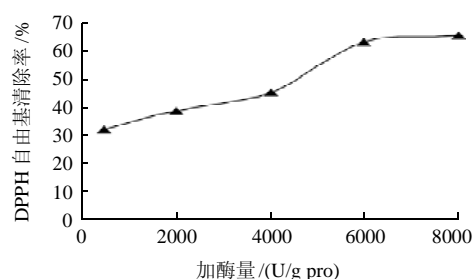


图 1 加酶量对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.1 Effect of enzyme concentration on DPPH free radicalscavenging activity of pumpkin seed hydrolysate

由图 1 可知, 南瓜籽蛋白酶解液对 DPPH 自由基的清

除率随着酶用量的增加而增强,当加酶量超过 6000U/g pro 时,这种趋势变得缓慢。这可能是由于加酶量小于 6000U/g pro 时,在底物质量浓度一定的情况下,增加的酶量未使底物质量浓度饱和,随着加酶量的增大,反应速度越快,蛋白质水解度也越高,得到的多肽液清除 DPPH 自由基的能力越强。而当加酶量继续增加时,底物质量浓度相对较低,酶分子过饱和,所以水解程度变化不大,活性多肽的量不再增加。同时,酶量的增加也会使生产成本大大增加,所以选择酶用量为 6000U/g pro 较为合适。

2.1.2 温度对抗氧化活性的影响

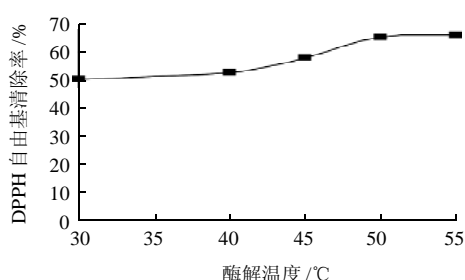


图2 酶解温度对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis temperature on DPPH free radicalscavenging activity of pumpkin seed hydrolysate

温度对酶催化反应的影响是多方面的,温度提高会影响酶的稳定性和底物转化成产物的速度^[12]。由图 2 可知,50℃左右时南瓜籽蛋白酶解液表现出最强的 DPPH 自由基清除能力,这可能是因为随着温度的升高,酶促反应的速度加快,水解度增大,活性多肽的含量增加;当温度高于 50℃时,蛋白酶结构发生改变,酶活降低,使活性肽的含量保持在一定水平。因此较适宜的酶解温度为 50℃。

2.1.3 pH 值对抗氧化活性的影响

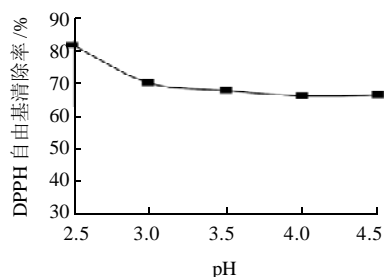


图3 pH 值对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis pH on DPPH free radicalscavenging activity of pumpkin seed hydrolysate

pH 值能影响酶活性部位的解离和底物蛋白的解离,从而直接影响了酶与底物蛋白的结合与催化,每个催化反应都有一个最适宜的 pH 值^[13],此外,不同的反应条件

对酶解产物的结构、性质有着不同的影响,从而使产物表现出不同的清除 DPPH 自由基的活性^[12]。由图 3 可知,当 pH 值为 2.5 时酶解液的 DPPH 自由基清除能力最强,随着 pH 值继续升高,活性下降并逐渐趋于平缓。本实验旨在得到活性高的多肽片段,因此选择 pH2.5 作为较适 pH 值。

2.1.4 底物质量浓度对抗氧化活性的影响

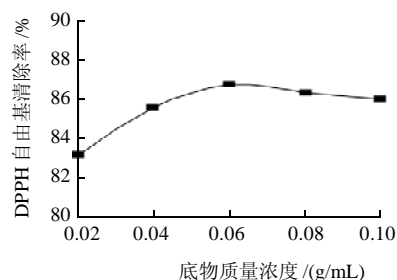


图4 底物质量浓度对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.4 Effect of substrate concentration on DPPH free radicalscavenging activity of pumpkin seed hydrolysate

由图 4 可知,随着底物质量浓度的增大,酶解液的 DPPH 自由基清除率先增大后减小,在 0.06g/mL 左右达到最大。在低质量浓度时,溶液太稀不利于酶分子与蛋白质分子相互作用,而实际生产也希望底物质量浓度较大,获得较多的活性多肽;但是质量浓度过高,溶液比较黏稠,也会阻碍酶与蛋白之间的充分作用^[14],故初步确定酶解体系的较适底物质量浓度为 0.06g/mL。

2.1.5 酶解时间对抗氧化活性的影响

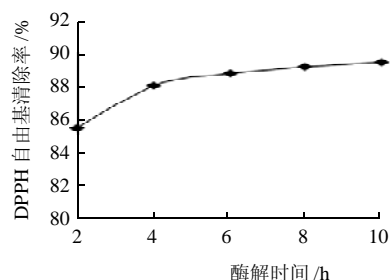


图5 酶解时间对 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis time on DPPH free radicalscavenging activity of pumpkin seed hydrolysate

由图 5 可知,从 2~4h 时, DPPH 自由基清除率显著增大,4h 以后增加缓慢。由于在反应的初始阶段,蛋白酶活力最强,能与底物充分结合,而且底物质量浓度最大,酶作用位点也最多,此时反应最快,酶解

液活性显著增加。随着反应的继续进行,底物质量浓度减少,反应位点相应减少,产物质量浓度增加,对酶催化反应起到抑制作用,反应达到某一动态平衡,同时酶活力也随时间的延长而降低^[15]。这些因素的综合作用导致酶解液的活性增加趋于平缓,因此初步选择较适酶解时间为4h。

2.2 酸性蛋白酶酶解南瓜籽蛋白的响应面试验分析

2.2.1 多元二次模型方程的建立及检验

酸性蛋白酶酶解南瓜籽蛋白的响应面分析试验根据Box-Behnken设计进行了15组试验,其中3组中心点重复试验,结果见表2。利用Minitab15.0软件对表2试验数据进行多元回归拟合,得到编码空间的酸性蛋白酶水解南瓜籽蛋白的三元二次回归方程如下:

$$Y = 90.9767 + 1.0113A + 4.4488B + 1.8225C - 0.7596A^2 - 2.7946B^2 - 1.2721C^2 - 0.3275AB - 0.4200AC - 0.7450BC$$

表2 响应面试验设计与结果

Table 2 Box-Behnken design and results for response surface analysis

试验号	A	B	C	DPPH 自由基清除率/%	
				试验值	预测值
1	0	-1	-1	80.05	79.8937
2	0	-1	1	84.47	85.0288
3	0	0	0	91.32	90.9767
4	0	0	0	90.95	90.9767
5	0	1	-1	90.84	90.2813
6	0	0	0	90.66	90.9767
7	-1	-1	0	81.63	81.6350
8	1	-1	0	84.72	84.3125
9	1	0	1	91.51	91.3588
10	-1	1	0	90.78	91.1875
11	1	1	0	92.56	92.5550
12	-1	0	1	90.74	90.1763
13	0	1	1	92.28	92.4363
14	1	0	-1	87.99	88.5538
15	-1	0	-1	85.54	85.6913

表3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variances for the fitted regression model

来源	自由度	平方和	均方	F值	P
回归	9	230.247	25.5830	67.12	0.000
线性	3	193.084	64.3614	168.87	0.000
平方	3	33.808	11.2694	29.57	0.001
交互作用	3	3.355	1.1182	22.9	0.138
失拟	3	1.687	0.5623	5.14	0.167
误差	2	0.219	0.1094		
合计	14	232.152		$R^2=0.9918$	$R^2_{Adj}=0.9970$

从该模型的方差分析表3可知,本实验所选用的二次多项模型具有高度的显著性($P < 0.0001$)^[16]。失拟项在 $\alpha = 0.05$ 水平上不显著($P = 0.167 > 0.05$),其决定系数为0.9918,校正决定系数为0.9770,说明该模型能解释

97.70%响应值的变化,仅有总变异的2.30%不能用此模型来解释,说明该模型拟合程度良好,用该模型对酸性蛋白酶水解制备南瓜籽抗氧化肽的工艺进行优化是合适的。

表4 回归系数显著性分析

Table 4 Significance test for each regression coefficient of the fitted regression model

项	系数	系数标准误	t	P
常量	90.9767	0.3564	255.244	0.000
A	1.0113	0.2183	4.633	0.006
B	4.4488	0.2183	20.382	0.000
C	1.8225	0.2183	8.350	0.000
A ²	-0.7596	0.3213	-2.364	0.064
B ²	-2.7946	0.3213	-8.698	0.000
C ²	-1.2721	0.3213	-3.959	0.011
AB	-0.3275	0.3087	-1.061	0.337
AC	-0.4200	0.3087	-1.361	0.232
BC	-0.7450	0.3087	-2.414	0.061

对方程的回归系数显著性分析(表4)表明,试验中常量、A、B、C、B²、C²这几个因素对酶解液清除率的影响显著,表明在酸性蛋白酶水解南瓜籽蛋白过程中,加酶量、酶解时间、底物质量浓度对DPPH自由基清除率有显著影响;B²、C²的影响显著也说明酶解过程中酶解时间和底物质量浓度对酶解液的抗氧化活性影响是非线性的。

2.2.2 响应面分析与优化^[13]

通过上述二次多项回归方程所作的响应曲面图和等高线图见图6~8。通过该组动态图即可对任何两因素交互影响DPPH自由基清除率效应进行分析与评价,并从中确定最佳因素水平范围。等高线的形状反映出交互效应的强弱大小,圆形表示两因素交互作用不显著,而椭圆形则与之相反^[17]。

图6显示了加酶量和酶解时间对DPPH自由基清除率的交互影响效应。从其等高线图可以直观的看出加酶量和酶解时间的交互作用不显著,加酶量在4000~8000U/g pro之间,时间在4~6h之间存在最高值,DPPH自由基清除率最高值在91%~93%之间。图7显示了加酶量和底物质量浓度对DPPH自由基清除率的交互影响效应,加酶量在3000~8000U/g pro之间,底物质量浓度在0.04~0.06g/mL之间存在最高值,DPPH自由基清除率最高值在92%~96%之间。图8显示了底物质量浓度和酶解时间对DPPH自由基清除率的交互影响效应,由等高线图可见,该两因素对DPPH自由基清除率的交互作用比较显著,当底物质量浓度约为0.045~0.06g/mL,酶解时间约为3~6h时,DPPH自由基清除率最高值在92%~96%之间。

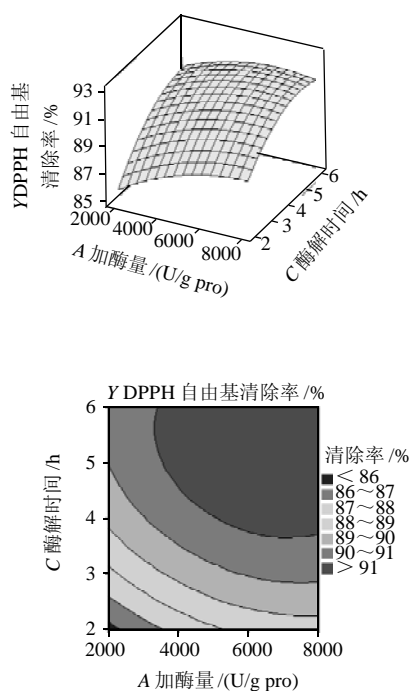


图6 加酶量和酶解时间交互影响DPPH 自由基清除率的响应面图和等高线图

Fig.6 Response surface and contour plots for the effects of enzyme concentration and hydrolysis time on DPPH free radicals scavenging activity of pumpkin seed hydrolysate

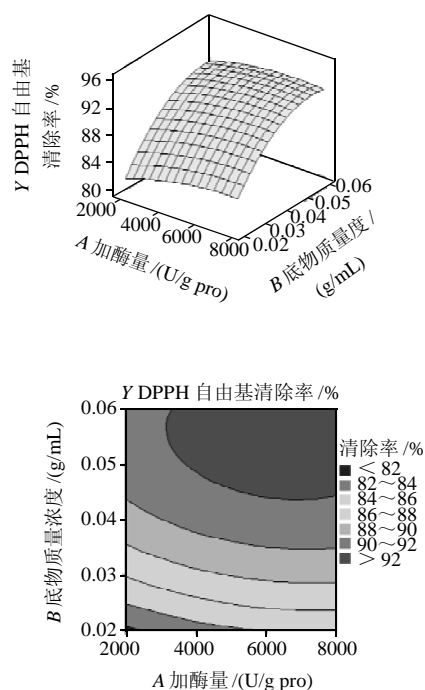


图7 加酶量和底物质量浓度交互影响DPPH 自由基清除率的响应面图和等高线图

Fig.7 Response surface and contour plots for the effects of enzyme concentration and substrate concentration on DPPH free radical scavenging activity of pumpkin seed hydrolysate

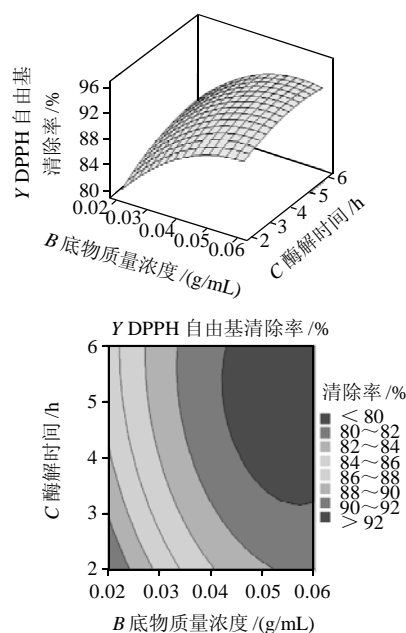


图8 底物质量浓度和酶解时间交互影响DPPH 自由基清除率的响应面图和等高线图

Fig.8 Response surface and contour plots for the effects of substrate concentration and hydrolysis time on DPPH free radical scavenging activity of pumpkin seed hydrolysate

2.2.3 南瓜籽蛋白酶解工艺条件的确定及验证

根据 Box-Behnken 试验所得的结果和二次多项回归方程, 利用 MINITAB15.0 软件获得了 DPPH 自由基清除率最高时的最佳酶解条件为: 酶解温度 50℃、pH2.5、酶解时间 4.87h、底物质量浓度 0.0543g/mL, 加酶量 6181.82U/g pro, 在此酶解条件下, DPPH 自由基清除率的预测值为 93.17%。为了检验模型预测的准确性, 在最佳酶解条件下进行酶解, 考虑到操作的可行性, 实际酶解条件修正为: 温度 50℃、酶解 pH 2.5、酶解时间 5h、底物质量浓度 0.05g/mL、加酶量 6000U/g pro。

在以上优化条件下进行验证实验, 共进行 3 次实验, 所得 DPPH 自由基清除率结果分别为 92.15%、93.08% 和 93.23%, 平均值为 92.82%, 与预测值较为接近, 证明该模型能较好地预测南瓜籽酶解液的实际 DPPH 自由基清除率效果。

3 结 论

本研究在单因素试验的基础上, 运用 Plackett-Burman 筛选试验结合 Box-Behnken 响应面设计确定加酶量、底物质量浓度、酶解时间三因素为显著因素, 并且优化得到酸性蛋白酶水解制备南瓜籽抗氧化肽的最佳酶解条件为加酶量 6000U/g pro, 底物质量浓度 0.05g/mL、酶解时间 5h、温度 50℃、pH2.5, 在此酶解条件下, DPPH 自由基清除率可达到 92.82%。经方差分析得知酶解时间

和底物质量浓度对 DPPH 自由基清除率的影响都是显著的而且是非线性的, 而它们之间的交互影响不显著。实验证明, 响应面分析法可以有效地优化酶解制备南瓜籽抗氧化肽的工艺条件, 这为进一步分离纯化南瓜籽抗氧化肽提供了数据参考。

参考文献:

- [1] 刘明, 倪辉, 吴永沛. 大豆抗氧化活性肽研究进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 897-901.
- [2] 朱艳华, 谭军. 玉米抗氧化肽酶解工艺的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2007(4): 22-23.
- [3] 殷微微, 赵永焕, 李永臣, 等. 酶法制备麦胚抗氧化肽过程的优化[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008, 20(1): 36-39.
- [4] 彭新颜, 孔保华, 熊幼翎. 乳清蛋白水解物抗氧化活性的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 167-172.
- [5] 宋茹, 谢超, 崔晓旭. 酶解法制备鱿鱼蛋白抗氧化肽工艺研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2009, 28(3): 311-314.
- [6] 张昊, 任发政. 天然抗氧化肽的研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 443-447.
- [7] 李燕杰, 甄成, 陈洪涛, 等. 南瓜籽饼粕中蛋白的综合利用[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(8): 173-175.
- [8] 杨文雄, 高彦祥. 响应面法及其在食品工业中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2005(2): 68-71.
- [9] PERICIN D, RADULOVIC L J, TRIVIC S, et al. Evaluation of solubility of pumpkin seed globulins by response surface method[J]. Journal of Food Engineering, 2008, 84(4): 591-594.
- [10] PERICIN D, RADULOVIC-POPOVIC L J, VASTAG Z, et al. Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: application of response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2009, 115(2): 753-757.
- [11] XIE Zhengjun, HUANG Junrong, XU Xueming, et al. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 370-376.
- [12] 周徐惠, 钱平, 卢蓉蓉, 等. 酶法制备汉麻籽蛋白抗氧化肽[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(5): 76-81.
- [13] 张强, 阚国仕, 陈红漫, 等. 酶解玉米蛋白粉制备抗氧化肽[J]. 食品工业科技, 2005, 26(6): 109-111.
- [14] 胡筱波, 徐明刚, 刘志伟, 等. 响应面法优化油菜花粉谷蛋白酶解条件[J]. 食品科学, 2007, 28(7): 117-121.
- [15] 喻峰, 熊华, 吕培蕾, 等. 核桃粕酶解工艺研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 89-91.
- [16] BOX G E P, BEHNKEN D W. Some new three level design for the study of quantitative variables[J]. Technometrics, 1960, 2(4): 455-475.
- [17] 高丹丹, 常通, 曹郁生, 等. 响应面法优化中性蛋白酶水解棉籽蛋白工艺[J]. 食品科学, 2009, 30(16): 153-157.