

雄蚕蛾蛋白制备功能性多肽酶解条件优化研究

张鹭^{1,2}, 唐道邦¹, 肖更生^{1,*}, 刘吉平², 徐玉娟¹, 邹宇晓¹

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东省农产品加工公共试验室, 广东 广州 510610;

2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 以水解度(DH)和肽得率为指标, 分别考察温度、pH值、底物浓度、加酶量对碱性蛋白酶酶解雄蚕蛾蛋白制备功能性多肽的影响, 通过二次回归正交旋转组合设计确定碱性蛋白酶酶解反应的最佳优化参数为: 温度 64.5℃、pH 9.36、底物浓度 4.46%、加酶量 6660U/ml、反应时间 300min。在此条件下, 酶解液水解度达到 21.65%、肽得率达到 34.81%。

关键词: 雄蚕蛾; 功能性多肽; 碱性蛋白酶; 二次回归正交旋转组合设计

Optimization of Enzymatic Preparation Conditions of Functional Polypeptide from Male Silkworm Moth Protein

ZHANG Lu^{1,2}, TANG Dao-bang¹, XIAO Geng-sheng^{1,*}, LIU Ji-ping², XU Yu-juan¹, ZOU Yu-xiao¹

(1. Sericulture and Farm Product Processing Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangdong Open Access Laboratory of Agricultural Product Processing, Guangzhou 510610, China; 2. School of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Taking hydrolysis degree and peptide yield as an indexes, the effect of temperature, pH, substrate concentration, alkaline amount on enzymolysis of male silkworm moth protein were studied. The optimal conditions are determined by orthogonal rotation combination design as follows: 64.5 °C, pH 9.36, substrate concentration 4.46%, protease amount 6660 U/ml; and reaction time 300 min. Under these conditions, the hydrolysis degree is up to 21.65% and the peptide yield is up to 34.81%.

Key words: male silkworm moth; functional polypeptides; alkaline protease; orthogonal rotation combination design

中图分类号: S886.9; TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)12-0417-05

雄蚕蛾蛋白是一种氨基酸组成比较齐全、营养丰富、物美价廉的天然动物性蛋白^[1]。交配后的雄蚕蛾仍含有一定量的蛋白质, 经测定为 40.37%, 将其直接废弃是一种资源浪费。蛋白质在酶水解作用下, 可产生分子量相对较小、具有一定功能的肽段, 采用酶法水解雄蚕蛾蛋白制备具有特定生理功能的生物活性肽, 可以提高交配后的雄蚕蛾蛋白资源价值。

对某一底物蛋白的水解产物而言, 随着水解过程的进行, 水解度逐渐增大, 水解产物中蛋白质、肽、游离氨基酸的组成、含量会发生相应的变化, 所以可通过控制水解度的大小来控制水解产物中肽的组成和含量, 但不同的蛋白质其自身性质不同, 因此其合适的水解度也不同, 需通过具体实验确定。在酶解过程中, 对水解度影响的条件很多, 必需在研究各条件影响的基础上对工艺进行优化, 才能得到最佳效果^[2]。

本实验以水解度和肽得率为指标, 分别考察温度、pH值、底物浓度、加酶量对碱性蛋白酶酶解雄蚕蛾蛋白反应的影响, 通过二次回归正交旋转组合设计方法确定了碱性蛋白酶酶解雄蚕蛾蛋白制备功能性多肽的最佳优化条件。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雄蚕蛾蛋白(以干燥后的雄蚕蛾经 CO₂ 超临界萃取脱脂后制得), 蛋白质含量为 76.84%; 碱性蛋白酶 Alcalase (酶活力 91012U/ml) 维诺信公司。

1.2 仪器与设备

TDL-5-A 台式离心机 上海安亭科学仪器厂; Sartorius 精密 pH 计; 电热恒温水浴锅 上海悦丰仪器仪表有限公司; UV 1700 Pharmaspec 分光光度计 日本岛津公

收稿日期: 2007-10-31

基金项目: 国家茧丝绸发展风险基金项目(国茧协办函[2005]41); 广东省社会发展计划项目(2007B031100004)

作者简介: 张鹭(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事蚕桑资源利用与加工研究。E-mail: lulu19830124@163.com

* 通讯作者: 肖更生(1965-), 男, 研究员, 主要从事蚕桑资源综合利用与农产品加工。E-mail: gshxia@yahoo.com.cn

司; JB90-S 数字显示转速电动搅拌机 上海标本模型厂。

1.3 方法

1.3.1 雄蚕蛾蛋白酶解反应

将雄蚕蛾蛋白粉配置为一定浓度的蛋白溶液, 放入电热恒温水浴锅中, 调节温度、pH 值, 加入一定量碱性蛋白酶进行水解, 根据单因素试验分析, 并考虑到时间过长易导致蛋白变性, 酶解时间定位 5h, 通过加入氢氧化钠来保持 pH 值不变, 记录碱液消耗量, 换算成水解度(DH), 在特定水解时间时取样 10ml 用于肽得率测定。

1.3.2 水解度测定

采用 pH-stat 法^[3-5]。

1.3.3 肽得率计算

$$\text{肽得率} = \frac{\text{清液中多肽的质量}}{\text{原料中总蛋白的质量}} \times 100\%$$

式中, 清液多肽的质量 = 三氯乙酸沉淀后上清液的总氮质量 - 酶解上清液中氨态氮质量^[6-7]。

1.3.4 平均肽链长度(PCL)

平均肽链长度(PCL)是指平均每条肽链的氨基酸残基数。根据 Alder-Nissen^[8]提议的方法, PCL 可用下式估算:

$$\text{PCL} = \frac{1}{\text{DH}}$$

1.3.5 响应曲面因素表的确定

表 1 碱性蛋白酶旋转中心组合设计试验因素水平及其编码表
Table 1 Levels and codes of variables chosen for CCD on alkaline protease hydrolysis conditions

因素	编码值	水平				
		-2	-1	0	1	2
温度(°C)	X ₁	55	60	65	70	75
pH	X ₂	8.0	9.0	10.0	11.0	12.0
底物浓度(%)	X ₃	2	4	6	8	10
加酶量(U/ml)	X ₄	2000	4000	6000	8000	10000

中心组合设计(central composite-orthogonal design, CCD)对因素和水平的组合具有广泛的适用性, 是研究多因素问题强有力的工具, 在食品工业中应用最为广泛^[9]。本试验在完整的单因素试验结果基础上, 综合考虑水解过程温度、pH 值、底物浓度和加酶量四个因素共同作用, 以 DH、肽得率为响应值, 按照表 1 的试验设计进行四因素五水平共 31 次试验点的响应面分析试验, 结果见表 2。运用 SAS8.1 统计软件对数据进行分析处理, 建立 DH、肽得率与各因素关系的数学模型, 并通过对该模型的分析以获得最佳的工艺条件。

2 结果与分析

2.1 酶水解各因素对 DH 的影响

为考察单个因素对水解度的影响, 以 DH 为指标, 对表 3 的试验结果进行分析, 可得四因子与 DH 之间的回归方程为:

$$Y_{\text{DH}} = 15.2186 - 1.0829X_1^2 - 1.9546X_2 + 1.5296X_4 - 1.6220X_1 - 1.1794X_1X_2 - 1.4295X_2^2 - 0.5658X_3^2 - 0.8283X_4^2 \quad (1)$$

表 2 碱性蛋白酶二次回归正交旋转组合设计试验及结果

Table 2 CCD test design matrix and results on alkaline protease hydrolysis conditions

试验号	X ₁ 温度(°C)	X ₂ pH	X ₃ 底物浓度(%)	X ₄ 加酶量(U/ml)	DH (%)	肽得率 (%)
1	-1	-1	-1	-1	11.91	30.17
2	-1	-1	-1	1	14.25	32.23
3	-1	-1	1	-1	11.33	25.48
4	-1	-1	1	1	14.13	26.83
5	-1	1	-1	-1	8.55	19.39
6	-1	1	-1	1	11.85	24.04
7	-1	1	1	-1	9.91	22.24
8	-1	1	1	1	12.70	24.71
9	1	-1	-1	-1	12.22	28.42
10	1	-1	-1	1	14.53	32.94
11	1	-1	1	-1	11.22	25.23
12	1	-1	1	1	14.58	26.92
13	1	1	-1	-1	6.05	16.4
14	1	1	-1	1	6.67	21.08
15	1	1	1	-1	5.26	14.45
16	1	1	1	1	7.09	16.98
17	-2	0	0	0	10.99	28.18
18	2	0	0	0	6.50	24.94
19	0	-2	0	0	12.22	26.51
20	0	2	0	0	6.81	13.04
21	0	0	-2	0	12.86	32.93
22	0	0	2	0	13.08	25.61
23	0	0	0	-2	7.58	26.42
24	0	0	0	2	16.26	28.8
25	0	0	0	0	14.57	32.22
26	0	0	0	0	14.70	34.6
27	0	0	0	0	15.36	34.01
28	0	0	0	0	15.29	33.8
29	0	0	0	0	16.01	35.21
30	0	0	0	0	15.62	34.73
31	0	0	0	0	14.98	32.56

对回归模型(1)进行方差分析, 结果见表 3。从表 3 可以看出, 回归模型达到(p=0.0001)极显著的水平, 而误差项不显著, 说明回归方程与实际情况吻合的很好。由方程(1)可知, 加酶量对 DH 有正影响, 温度、pH 值、温度的二次项、pH 值的二次项、底物浓度二次项、加酶量的二次项对 DH 有负影响; 回归模型中显示了 X₁X₂ 交互作用。从表 3 中作用极显著的是 X₁、X₂、X₄、X₁²、X₁X₂、X₂²、X₃²、X₄²。

2.1.1 各因素对 DH 的重要性分析

表3 碱性蛋白酶DH方差分析表
Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for the fitted quadratic polynomial model on hydrolysis degree

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	p 值	显著性
X ₁	1	28.145	28.145	35.3402	0.0001	**
X ₂	1	91.6895	91.6895	115.1296	0.0001	**
X ₃	1	0.0165	0.0165	0.0208	0.8872	
X ₄	1	56.151	56.151	70.5058	0.0001	**
X ₁ ²	1	75.2357	75.2357	94.4694	0.0001	**
X ₁ X ₂	1	22.2548	22.2548	27.9442	0.0001	**
X ₁ X ₃	1	0.5006	0.5006	0.6285	0.4395	
X ₁ X ₄	1	0.6045	0.6045	0.7590	0.3965	
X ₂ ²	1	58.4377	58.4377	73.3771	0.0001	**
X ₂ X ₃	1	0.7613	0.7613	0.9559	0.3428	
X ₂ X ₄	1	0.3221	0.3221	0.4044	0.5338	
X ₃ ²	1	9.1540	9.1540	11.4942	0.0037	**
X ₃ X ₄	1	0.3053	0.3053	0.3833	0.5446	
X ₄ ²	1	19.6185	19.6185	24.6338	0.0001	**
模型	14	331.5316	23.6808	29.7347	0.0001	**
误差	16	12.7424	0.7964			
总和	30	344.2741				

注: *.在α=0.05水平上显著; **.在α=0.01水平上极显著。下同。

对各因素的重要性分析采用贡献率法^[10]。

$$\delta = \begin{cases} 0 & \text{若 } F \leq 1 \\ 1 - \frac{1}{F} & \text{若 } F \geq 1 \end{cases}$$

设各因素回归系数显著性检验的均方比为 F(j), F(ij), F(jj)。

各因素对指标的贡献率可表示为:

$$\Delta_j = \delta_j + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \delta_{ij} + \delta_{jj} (j=1, 2, \dots, n)$$

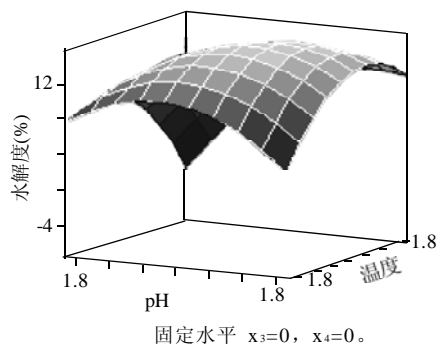
据表3均方比F,可知酶解温度、pH值、底物浓度、加酶量对DH的贡献率分别为Δ₁=2.4432, Δ₂=2.4598, Δ₃=0.9130, Δ₄=1.9452,因为Δ₂>Δ₁>Δ₄>Δ₃,所以对DH作用大小依次为pH值>酶解温度>加酶量>底物浓度。

2.1.2 碱性蛋白酶温度和pH值交互作用对DH响应面分析

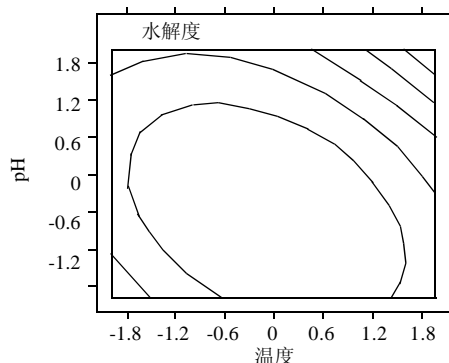
由图1可知,随着温度的增加,DH逐渐增加;在碱性条件下,酶解温度的升高,也会加剧雄蚕蛾蛋白的变性,增加用碱量使DH变大。随着pH值的减小,DH逐渐提高;说明酶解温度和pH值之间存在交互作用,使优化的最佳酶解温度降低。

2.2 酶解各因素对肽得率的影响

为考察各因素对水解度的影响,以肽得率为指标,



固定水平 x₃=0, x₄=0。



固定水平: x₃=0, x₄=0。

图1 碱性蛋白酶温度和pH交互作用对DH响应面和等势线分析
Fig.1 Response surface and contour plots for interaction effects temperature and pH value on hydrolysis degree

表4 碱性蛋白酶肽得率方差分析表
Table 4 Analysis of variance (ANOVA) for fitted quadratic polynomial model on polypeptide yield

方差来源	自由度	平方和	均方	F 值	p 值	显著性
X ₁	1	35.4051	35.4051	13.8229	0.0019	**
X ₂	1	382.9607	382.9607	149.5159	0.0001	**
X ₃	1	55.4192	55.4192	21.6368	0.0003	**
X ₄	1	34.3443	34.3443	13.4088	0.0021	**
X ₁	1	125.2669	125.2669	48.9068	0.0001	**
X ₁ X ₂	1	25.6796	25.6796	10.0258	0.006	**
X ₁ X ₃	1	4.7198	4.7198	1.8427	0.1935	
X ₁ X ₄	1	0.5220	0.5220	0.2038	0.6577	
X ₂	1	410.5877	410.5877	160.3021	0.0001	**
X ₂ X ₃	1	17.5771	17.5771	6.8625	0.0186	*
X ₂ X ₄	1	1.3865	1.3865	0.5413	0.4725	
X ₃	1	57.2949	57.2949	22.3691	0.0002	**
X ₃ X ₄	1	3.8711	3.8711	1.5113	0.2367	
X ₄	1	95.8157	95.8157	37.4085	0.0001	**
模型	14	1117.84	79.8457	31.1734	0.0001	**
误差	16	40.9814	2.5613			
总和	30	1158.821				

对表4的试验结果进行分析,可得四因子与肽得率之间的回归方程为:

$$Y_{\text{肽得率}} = 33.8757 - 1.2146X_1 - 3.9946X_2 - 1.5196X_3 + 1.1963X_4 - 2.0930X_1^2 - 1.2669X_1X_2 - 3.7892X_2^2 + 1.0481X_2X_3 - 1.4155X_3^2 - 1.8305X_4^2 \quad (2)$$

对回归模型(2)进行方差分析, 结果见表4。从表4可以看出, 回归模型达到($p=0.0001$)极显著的水平, 而误差项不显著, 说明回归方程与实际情况吻合的很好。由方程(2)可知, 加酶量对肽得率有正影响, 酶解温度、pH值、底物浓度、加酶量、温度的二次相、pH值的二次相、底物浓度的二次相、加酶量的二次相对肽得率有负影响; 回归模型中显示了 X_1X_2 和 X_2X_3 交互作用。从表4中作用极显著的是 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_1X_2 、 X_2X_3 、 X_3X_4 、 X_2X_3 交互作用显著相关。

2.2.1 各因素对肽得率的重要性分析

据表4均方比F, 参考2.1.1的方法; 可知酶解温度、pH值、底物浓度、加酶量对肽得率的贡献率分别为 $\Delta_1=2.5861$, $\Delta_2=2.8644$, $\Delta_3=2.7341$, $\Delta_4=2.0679$, 因为 $\Delta_2 > \Delta_3 > \Delta_1 > \Delta_4$, 所以对肽得率作用大小依次为: pH值 > 底物浓度 > 酶解温度 > 加酶量。

2.2.2 碱性蛋白酶温度和pH值交互作用对肽得率响应面分析

由图2可知, 随着酶解温度的增加, 肽得率逐渐增加; 在碱性条件下, 酶解温度的升高, 也会加剧雄蚕蛾蛋白的变性, 使肽得率向着增大的趋势发展。随着pH值的增大, 肽得率先增大后减小, 形成一个脊型图。

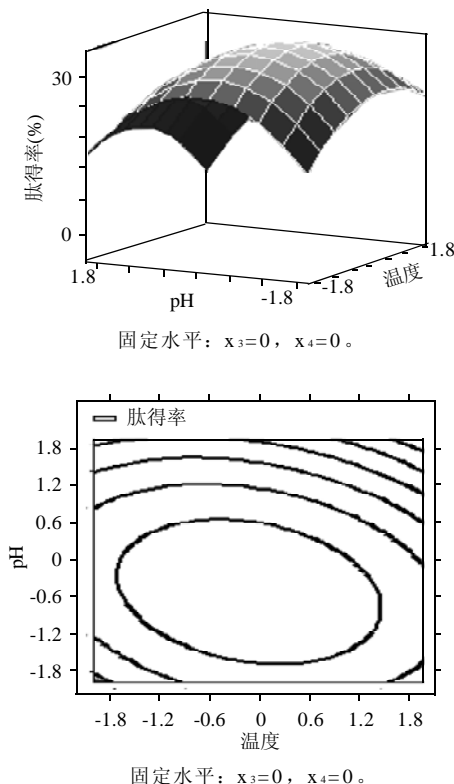


图2 碱性蛋白酶温度和pH交互作用对肽得率响应面和等势线分析
Fig.2 Response surface and contour plots for interaction effects of temperature and pH value on polypeptide yield

2.2.3 pH值和底物浓度的交互作用对肽得率响应面分析

由图3可知, 随着pH值的增加, 肽得率先增加后减小; 随着底物浓度的增加, 肽得率先增加后减小, pH值和底物浓度之间存在交互作用。

2.3 酶解工艺的参数优化组合

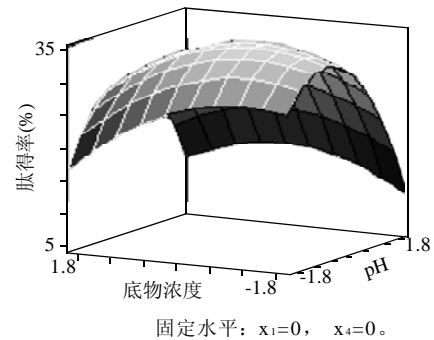


图3 碱性蛋白酶pH和底物浓度交互作用对肽得率响应面和等势线分析
Fig.3 Response surface and contour plots for interaction effects of pH value and substrate concentration on polypeptide yield

通过SAS响应面分析模拟得出DH得率最高的优化组合为 $X_1=-0.1$ 、 $X_2=-0.64$ 、 $X_3=0$ 、 $X_4=0.92$, 即温度为 64.5°C 、pH值为9.36、底物浓度为6%、加酶量为7840U/ml; 通过SAS响应面分析模拟得出肽得率指数最高的优化组合为 $X_1=-0.1$ 、 $X_2=-0.62$ 、 $X_3=-0.77$ 、 $X_4=0.33$, 即温度 64.5°C 、pH9.38、底物浓度4.46%, 加酶量6660U/ml。考虑底物浓度对DH的影响不显著, 对肽得率的影响极显著的, 因此, 综合各因素的影响大小, 确定碱性蛋白酶酶解雄蚕蛾蛋白的最佳工艺参数为温度为: 64.5°C 、pH9.36、底物浓度4.46%、加酶量6660U/ml。

2.3.1 最佳条件下酶解时间的确定

由图4可知, 随着酶解时间的延长, DH不断增加; 但是当达到300min水解趋势平缓, 趋于稳定值。因此, 确定酶解时间为300min, DH达到21.65%。

由图5可知, 随着酶解时间的延长, 肽得率逐渐

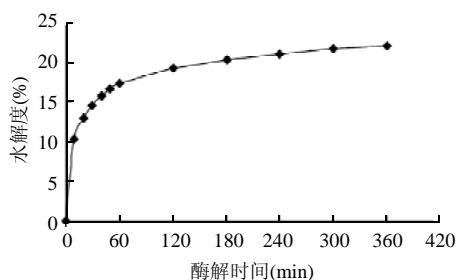


图4 酶解时间对DH的影响

Fig.4 Effects of time on hydrolysis degree

加大; 当达到300min时, 趋于平缓, 变化较小。因此, 确定酶解时间为300min, 肽得率达到34.81%。

2.3.2 最佳优化工艺条件下的PCL随时间的变化

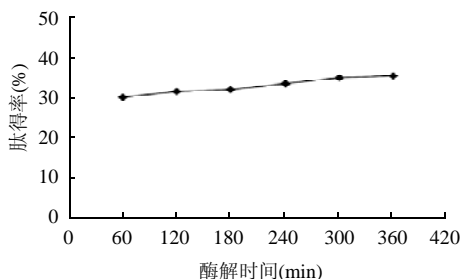


图5 酶解时间对肽得率的影响

Fig.5 Effects of time on polypeptide yield

由图6可知, 在最佳优化条件下, 随着酶解时间的延长, 平均肽链长度(PCL)逐渐减小; 当酶解时间达到300min时, 曲线趋于一条直线。此时PCL达到4.62。尽管PCL与水解物的平均分子量具有相关性, 可以通过

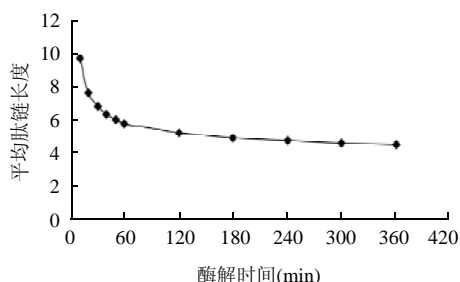


图6 平均肽链长度随酶解时间的变化趋势

Fig.6 Change curve of peptide chain length with hydrolysis time extending

PCL估计水解物平均分子量分布。但有一点须指出的是: 具有相同PCL的水解物可能具有显著不同的肽分子量分布。同时酶的专一性也影响肽的分子量分布。内切酶作用可以产生各种不同长度的肽段。研究表明, 控

制水解产物中的肽链长度对选择最佳生理性水解产物具有重要意义。

3 结论

本实验利用碱性蛋白酶酶解雄蚕蛾蛋白制备多肽, 水解温度(X_1)、pH值(X_2)、底物浓度(X_3)及加酶量(X_4)通过完整的单因素试验和响应面分析得到以下结论。

3.1 以水解度(DH)为响应值, 其回归模型为: $Y_{DH} = 15.2186 - 1.0829X_1 - 1.9546X_2 + 1.5296X_3 - 1.6220X_4^2 - 1.1794X_1X_2 - 1.4295X_2^2 - 0.5658X_3^2 - 0.8283X_4^2$, 因素 X_1 、 X_2 、 X_4 、 X_1^2 、 X_1X_2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 极显著相关; 对DH作用大小顺序依次为: pH值 > 酶解温度 > 加酶量 > 底物浓度。

3.2 以肽得率为响应值, 其回归模型为: $Y_{\text{肽得率}} = 33.8757 - 1.2146X_1 - 3.9946X_2 - 1.5196X_3 + 1.1963X_4 - 2.0930X_1^2 - 1.2669X_1X_2 - 3.7892X_2^2 + 1.0481X_2X_3 - 1.4155X_3^2 - 1.8305X_4^2$, 因素 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_1^2 、 X_1X_2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 极显著相关; X_2X_3 交互作用显著相关。对肽得率作用大小顺序依次为: pH值 > 底物浓度 > 酶解温度 > 加酶量。

3.3 确定碱性蛋白酶酶解雄蚕蛾蛋白制备功能性多肽的最佳水解工艺参数为: 酶解温度64.5℃, pH9.36、底物浓度4.46%、加酶量6660U/ml, 反应时间300min。在此条件下, 水解度达到21.65%, 肽得率达到34.81%。

参考文献:

- [1] 顾美儿, 傅淑清, 时连根. 雄蚕蛾开发利用研究进展[J]. 蚕桑通报, 2007, 38(1): 15-19.
- [2] 杨梅琳. 蚕蛹蛋白的酶法水解及其产物的抗氧化性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [3] ALDER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food proteins [M]. London: Elsevier Applied Science Publishers Led, 1986: 9-24.
- [4] ROSENTHAL A, PYLE D L, NIRANJAN K, et al. Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2001, 28 :499-509.
- [5] CALDERO N, DE LABARCA A M, RUIZS-ALAZAR R A, et al. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties [J]. Food Chemistry and Toxicology, 2000, 65(2): 247-253.
- [6] 游丽君, 赵谋明, 崔春, 等. 酶解泥鳅蛋白制备小分子肽的工艺研究 [J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(9): 164-167.
- [7] 林伟锋. 可控酶解从海洋鱼蛋白中制备生物活性肽的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2003.
- [8] ADLER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food proteins[M]. London : Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 13-14
- [9] 慕运动. 响应面方法及其在食品工业中的应用[J]. 郑州工程学院学报, 2001, 22: 91-94.
- [10] 徐位力, 苏开君, 王伟平, 等. 用二次正交旋转组合设计优化马占相思增殖培养基[J]. 广东林业科技, 2003, 19(4): 13-16.