

响应面法优化谷朊粉短肽酶法制备工艺研究

刘洋^{1*}, 呼志远¹, 张榆敏²

¹滁州学院生物与食品工程学院, 安徽 滁州

²安徽顺鑫盛源生物食品有限公司, 安徽 滁州

Email: *chzu_liuyang@sina.com

收稿日期: 2021年4月15日; 录用日期: 2021年5月17日; 发布日期: 2021年5月25日

摘要

本文采用酶解法制备谷朊粉短肽, 分别考察了底物浓度、加酶量、酶解温度、酶解时间等单因素对酶解效率的影响, 并通过响应面法优化酶解工艺。结果显示, 以木瓜蛋白酶酶解谷朊粉获得短肽的最佳条件为底物浓度8.0%、加酶量1.2%, 酶解温度为65℃, 酶解时间2.9 h, 此时的谷朊粉的水解度为3.775%。该试验用响应面法优选出的酶解工艺合理可行, 为谷朊粉短肽的开发利用提供了理论依据。

关键词

谷朊粉, 短肽, 酶解

Optimization of Enzymatic Preparation Process of Gluten Short Peptides by Response Surface Methodology

Yang Liu^{1*}, Zhiyuan Hu¹, Yumin Zhang²

¹College of Biological and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou Anhui

²Anhui Shunxin Shengyuan Biological Food Co., Ltd., Chuzhou Anhui

Email: *chzu_liuyang@sina.com

Received: Apr. 15th, 2021; accepted: May 17th, 2021; published: May 25th, 2021

Abstract

In this paper, the enzyme hydrolysis method was used to prepare short gluten peptides, and the

*通讯作者。

influence of single factors such as substrate concentration, amount of enzyme, hydrolysis temperature, and hydrolysis time on the effect of hydrolysis was investigated, and the enzymatic hydrolysis process was optimized through response surface experiments. The results showed that the best conditions for obtaining short peptides by papain enzymatic hydrolysis of gluten were substrate concentration of 8.0%, enzyme content of 1.2%, enzymatic hydrolysis temperature of 65°C, enzymatic hydrolysis time of 2.9 h, and the gluten powder at this time. The degree of hydrolysis is 3.775%. The enzymatic hydrolysis process optimized by the response surface method in this experiment is reasonable and feasible, which provides a theoretical basis for the development and utilization of gluten short peptides.

Keywords

Gluten Powder, Short Peptide, Enzymatic Hydrolysis

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

小麦是全世界主要生产的粮食之一，我国小麦产量很高，谷朊粉是小麦的加工产品，是将小麦中的淀粉和其它水溶性物质除去后所留下的粉末状产品，颜色为淡黄色，属于天然蛋白[1]。谷朊粉营养价值高，其中蛋白质含量可以达到70%~85% [2]，其中麦醇溶蛋白占48%，麦谷蛋白占52% [3]，同时它还具有多达15种氨基酸，其中人体必需的6种氨基酸约占20% [4]。谷朊粉作为一种优质的植物蛋白，不仅营养价值高、价格低廉、来源广泛，还含有良好的吸水性、薄膜成型性、黏弹性、伸缩性等，在烘焙、肉制品加工和食品保鲜等领域有广泛的应用[5]。

一般认为人体中的蛋白质需要被酶解成游离的氨基酸后才能够被吸收利用，而现有的研究表明，蛋白质经消化后一般是转变为小分子肽而被肠道吸收，肠道直接吸收氨基酸所占的比例却很少[6]。肽分为短肽和多肽，目前肽的提取方法主要有微生物发酵法、人工嫁接法和酶解法，其中酶解法是目前利用谷朊粉制备短肽常用的方法之一。李清丽等[7]采用复合酶解法，利用胰蛋白酶和复合蛋白酶按一定比例获得最佳酶解工艺，但是这种方法工艺复杂，操作难度系数高，多用于科学研究，不适合大规模生产。刘树兴等[8]采用碱性蛋白酶酶解谷朊粉制备短肽，并利用超声波辅助提升其提取率，但是该方法需要利用分离纯化技术来纯化短肽，工艺复杂，经济成本较高，并且该方法的后续处理会对环境造成较大影响。

从谷朊粉中提取的生物活性肽类物质具有多种功效，它是氨基酸供体，能促进生物体的消化吸收，也是一种生理调节剂，参与生物体内的免疫调节，同时还具有降血压，抗血栓等功能[9] [10] [11]。因此，如何从谷朊粉中提取活性短肽已经逐渐成为研究的主要方向。本文主要研究如何通过单一种类的酶酶解谷朊粉制备短肽，筛选最优酶和最佳的酶解条件，最大程度的精简生产流程，节省成本，为其大规模的生产应用提供一定的参考价值。

2. 材料和方法

2.1. 试验材料

谷朊粉，封丘县华丰粉业有限公司；碱性蛋白酶，复合酶，中性蛋白酶，河南圣斯德实业有限公司；风味蛋白酶，浙江一诺生物科技有限公司；木瓜蛋白酶，南宁庞博生物工程有限公司；亚铁氰化钾、碘

化钾(AR, 天津博迪化工股份有限公司)、氢氧化钠、95%乙醇、石油醚(AR, 天津市科密欧化学试剂)、苯骈茚三酮(AR, 国药集团化学试剂有限公司)、盐酸(上海博河精细化学品有限公司)、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠。

2.2. 试验方法

2.2.1. 酶法制备短肽工艺流程

谷朊粉→过 100 目筛→配置谷朊粉溶液→80℃前处理→冷却 50℃→加入蛋白酶→恒温酶解→灭酶→离心→上清液喷雾干燥→谷朊粉短肽→包装成品

2.2.2. 蛋白酶的筛选

选择复合蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶。然后添加相应的 1%的蛋白酶并在其最适条件下对谷朊粉进行酶解。通过测定酶解物的可溶性固形物含量来筛选最佳蛋白酶。

2.2.3. 单因素试验

1) 底物浓度

取 5 只试管, 底物浓度设置为 4%、8%、12%、16%、20%, 分别加入 1.0%木瓜蛋白酶, 50℃酶解 120 min, 结束后在沸水中处理 20 min 灭酶, 离心, 测定酶解液上清水解度和可溶性固形物含量, 确定最佳底物浓度。

2) 加酶量

取 5 只试管, 底物浓度 12%, 分别加入 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4%木瓜蛋白酶, 50℃酶解 120 min, 结束后在沸水中处理 20 min 灭酶, 离心, 测定酶解液上清水解度和可溶性固形物含量, 确定最佳加酶量。

3) 酶解温度

取 5 只试管, 底物浓度 12%, 加入 1.0%木瓜蛋白酶, 设置酶解温度 45℃、55℃、65℃、75℃、85℃酶解 120 min。结束后在沸水中处理 20 min 灭酶, 离心, 测定酶解液上清水解度和可溶性固形物含量, 确定最佳酶解温度。

4) 酶解时间

取 5 只试管, 底物浓度 12%, 加入 1.0%木瓜蛋白酶, 设置酶解温度 65℃, 分别酶解 1 h、2 h、3 h、4 h, 结束后在沸水中处理 20 min 灭酶, 离心, 测定酶解液上清水解度和可溶性固形物含量, 确定最佳酶解时间。

2.2.4. 响应面优化试验

利用软件 Design-Expert 10 进行中心组合实验设计[12]。参考单因素试验的结果, 以水解度为指标, 选择底物浓度、木瓜蛋白酶添加量、酶解温度、酶解时间作为考察因素进行响应面试验。再对实验结果进行合理分析, 得到酶解制备短肽的最佳工艺。

3. 结果与讨论

3.1. 蛋白酶的筛选

由图 1 可知, 试验选用的 5 种酶对谷朊粉的酶解效果具有差异较大, 其中木瓜蛋白酶的酶解效果最好, 所获得的可溶性固形物含量为 74.15 g/100g, 其次为碱性蛋白酶、复合蛋白酶、中性蛋白酶和风味蛋白酶, 因此下面的单因素试验则选择木瓜蛋白酶作为酶解试验的蛋白酶。

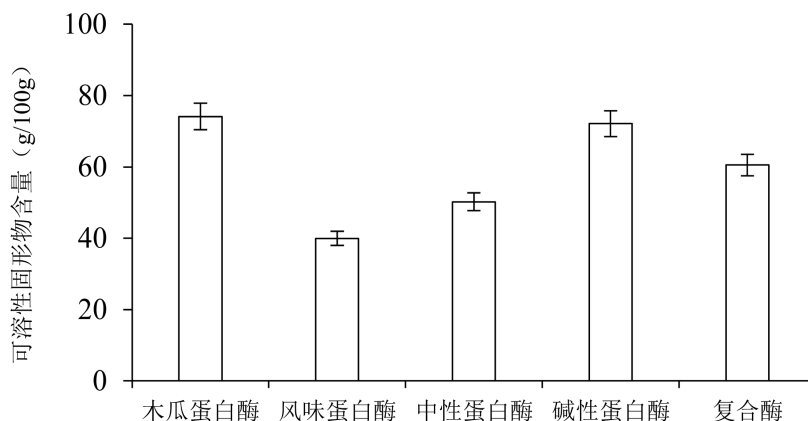


Figure 1. The effect of different proteases on the preparation of short peptides by enzymatic hydrolysis of gluten
图 1. 不同蛋白酶对酶解谷朊粉制备短肽的影响

3.2. 单因素试验

单因素试验结果如图 2 所示,当底物浓度从 4% 增加到 20% 时,可溶性固形物含量和水解度变化趋势都是逐渐减少。当加酶量从 0.6% 到 1.4% 时,可溶性固形物含量和水解度均逐渐增加。酶解温度从 45℃ 到 85℃ 时,可溶性固形物含量的变化趋势逐渐增加,水解度的变化趋势是先增大再减少。酶解时间从 1 h 到 4 h 时,可溶性固形物含量和水解度的变化趋势都是先增加再趋于平缓。

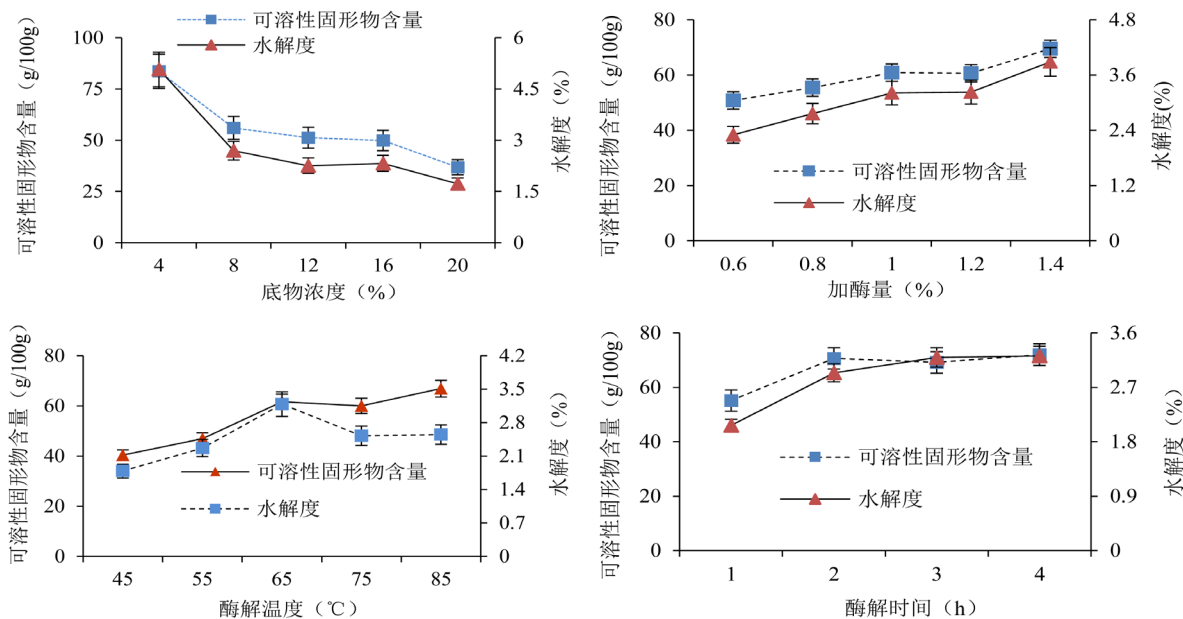


Figure 2. The influence of four single factor conditions on the efficiency of enzymolysis
图 2. 四种单因素条件对酶解效率的影响

3.3. 酶解工艺条件的优化

3.3.1. 响应面试验设计与结果分析

在单因素试验的基础上,根据 Box-Behnken 试验设计,以水解度(Y)为响应值,选取 A (底物浓度)、B (加酶量)、C (酶解温度)和 D (酶解时间)四个因素进行响应面优化实验,实验结果见表 1。

Table 1. Experimental design and result of Box-Behnken
表 1. Box-Behnken 试验设计及结果

实验序号	A 底物浓度(%)	B 加酶量(%)	C 酶解温度(°C)	D 酶解时间(h)	水解度(%)
1	12	1	65	2	2.55
2	8	1.2	65	2	3.75
3	12	1	65	2	2.65
4	8	0.8	65	2	2.82
5	8	1	75	2	2.54
6	12	1	55	3	2.23
7	12	1	65	2	2.65
8	12	1.2	75	2	2.34
9	8	1	65	1	2.82
10	12	0.8	65	3	2.59
11	12	0.8	55	2	1.93
12	16	1	65	3	3.02
13	8	1	55	2	2.51
14	12	0.8	75	2	1.93
15	12	1	65	2	2.53
16	16	0.8	65	2	2.12
17	12	1.2	65	3	3.42
18	16	1	75	2	1.91
19	12	1.2	65	1	2.45
20	12	1	75	3	2.42
21	16	1	55	2	1.65
22	8	1	65	3	3.24
23	12	1	55	1	1.74
24	16	1.2	65	2	2.42
25	16	1	65	1	1.63
26	12	1	65	2	2.38
27	12	0.8	65	1	1.94
28	12	1.2	55	2	2.35
29	12	1	75	1	1.72

根据表 1 结果, 采用 Design-Expert 10 对表格中的每个因素和响应值分析, 拟合出的二次多项回归方程为:

$$Y = +2.55 - 0.41A + 0.28B + 0.037C + 0.39D - 0.16AB + 0.058AC + 0.24AD - 0.0025BC + 0.08BD + 0.053CD + 0.13A^2 + 0.086B^2 - 0.51C^2 - 0.019D^2$$

3.3.2. 回归模型的建立与显著性分析

由表 2 可知响应面结果所拟合的模型为极显著($P < 0.001$), 失拟项 $P = 0.5819 > 0.05$ 为不显著, 说明实验所选回归模型可行。表中可得 A (底物浓度)、B (加酶量)、D (酶解时间)对谷朊粉的酶解效果极显著($P < 0.001$), 而 C(酶解温度)对谷朊粉的酶解效果不显著($P = 0.3052$)。在其余的二次项中 C^2 极其显著($P < 0.001$), AB、AD、 A^2 均为显著($P < 0.05$), AC、BC、BD、CD、 B^2 、 D^2 不显著($P > 0.05$)。决定系数 $R^2=0.97$, 纯误差 = 0.012, 说明该模型与实际值拟合良好。并且由 F 值判断可知, 结合单因素试

验可判断出 A、B、C、D 四个因素对最终谷朊粉的酶解效果影响次序为 A (底物浓度) > D (酶解时间) > B (加酶量) > C (酶解温度), 而在交互实验作用下的影响次序为 AD (底物浓度、酶解时间) > AB (底物浓度、加酶量) > BD (加酶量、酶解时间) > AC (底物浓度、酶解温度) > CD (酶解温度、酶解时间) > BC (加酶量、酶解温度)。

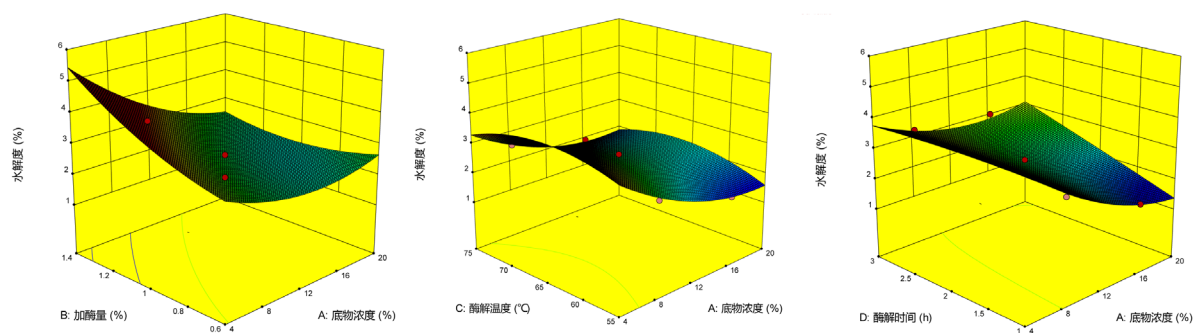
Table 2. Response surface experimental variance analysis result table
表 2. 响应面实验方差分析结果表

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Model	7.38	14	0.53	35.39	<0.0001***
A-底物浓度(%)	2.03	1	2.03	135.98	<0.0001***
B-加酶量(%)	0.96	1	0.96	64.68	<0.0001***
C-酶解温度(°C)	0.017	1	0.017	1.13	0.3052
D-酶解时间(h)	1.78	1	1.78	119.42	<0.0001***
AB	0.099	1	0.099	6.66	0.0218*
AC	0.013	1	0.013	0.89	0.3620
AD	0.24	1	0.24	15.79	0.0014*
BC	0.000025	1	0.000025	0.001678	0.9679
BD	0.026	1	0.026	1.72	0.2109
CD	0.011	1	0.011	0.74	0.4041
A ²	0.11	1	0.11	7.63	0.0153*
B ²	0.048	1	0.048	3.23	0.0940
C ²	1.70	1	1.70	114.46	<0.0001***
D ²	0.002321	1	0.002321	0.16	0.6990
残差	0.21	14	0.015		
失拟项	0.16	10	0.016	1.29	0.4334
纯误差	0.049	4	0.012		
总离差	7.59	28			

注: $P > 0.05$ 为不显著, $*P < 0.05$ 为显著, $***P < 0.001$ 为极显著。

3.3.3. 各因素交互作用对水解率的响应面分析

在响应面试验结果上, 采用 Design-Expert 10 软件对数据进行处理, 做出直观的因素之间相互作用的 3D 曲面图(图 3)。由图 3 可知, 底物浓度与加酶量、底物浓度与酶解时间交互作用明显, 底物浓度与酶解温度、加酶量与酶解温度、加酶量与酶解时间、酶解温度与酶解时间交互作用均表现不显著。



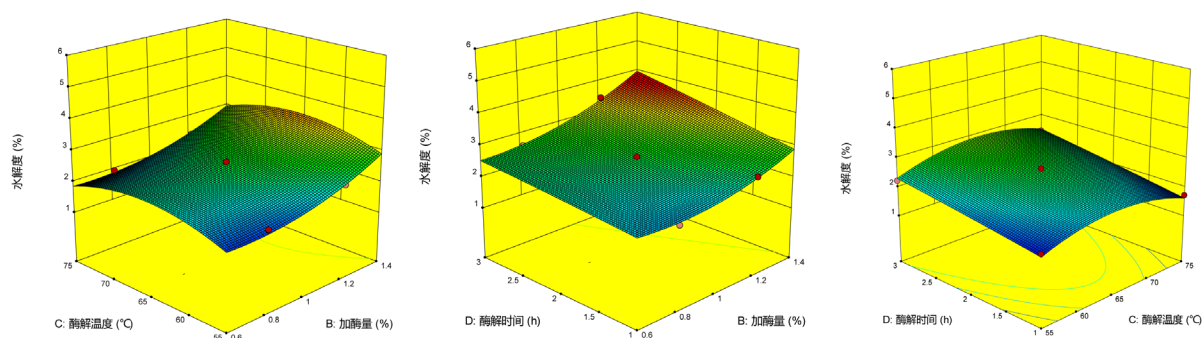


Figure 3. Surface graph of the influence of the interaction of various factors on the degree of hydrolysis

图 3. 各因素的交互作用对水解度影响的曲面图

3.3.4. 最佳工艺的确定和回归模型的验证

通过上述实验分析之后,由 Design-Expert 10 软件拟合出的最优工艺为:底物浓度为 8.12%、加酶量为 1.19%,酶解温度为 65.22℃,酶解时间为 2.92 h,所得到的水解度为 3.759%。实际操作中调整确定的最佳工艺条件为底物浓度 8.0%、加酶量 1.2%,酶解温度为 65℃,酶解时间 2.9 h,在此条件下进行验证实验所得到的水解度为 3.775%,与模型的预测值基本相符。

4. 结论

本文研究以谷朊粉为原料,采用单一酶解法制备谷朊粉短肽,通过酶的种类选择,发现木瓜蛋白酶是酶解谷朊粉的最佳酶,以可溶性固形物含量和水解度为指标,分别考察了底物浓度、加酶量、酶解温度、酶解时间等单因素对酶解效果的影响。在此基础上,通过响应面试验优化酶解工艺,结果显示,以木瓜蛋白酶酶解谷朊粉获取短肽的最佳工艺条件为底物浓度 8.0%、加酶量 1.2%,酶解温度为 65℃,酶解时间 2.9 h,此时的谷朊粉的水解度为 3.775%。

基金项目

安徽省高等学校自然科学研究重点项目(KJ2020A0715);滁州学院科研启动基金项目(2018qd14);企业横向课题(HX2020120)。

参考文献

- [1] 莫文敏, 曾庆孝. 蛋白质改性研究进展[J]. 食品科学, 2000, 21(6): 6-10.
- [2] Qiu, C., Sun, W., Zhao, Q., et al. (2013) Emulsifying and Surface Properties of Citric Acid Deamidated Wheat Gliadin. *Journal of Cereal Science*, **58**, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2013.04.002>
- [3] 邓敏, 付时雨, 詹怀宇. 小麦谷朊蛋白的特性与应用研究综述[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(12): 146-152.
- [4] 孟丹阳, 赵伟, 杨瑞金, 等. 小麦面筋蛋白酶解过程中功能性质的变化规律研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(5): 115-119.
- [5] 钟昔阳, 姜绍通, 潘丽军, 等. 高活性小麦谷朊粉产业化加工技术研究及其应用概述[J]. 食品科学, 2004, 25(s1): 95-100.
- [6] 冯秀燕, 计成. 寡肽在蛋白质营养中的作用[J]. 动物营养学报, 2001, 13(3): 8-13.
- [7] Drum, S., Arntzen, M., Qiao, S.W., et al. (2010) The Preferred Substrates for Transglutaminase 2 in a Complex Wheat Gluten Digest Are Peptide Fragments Harboring Celiac Disease T-Cell Epitopes. *PLoS One*, **5**, e14056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014056>
- [8] 李清丽, 王卫国. 双酶复合水解谷朊粉制备小肽的工艺条件研究[J]. 饲料工业, 2007, 28(11): 17-18.
- [9] Tsou, M.-J., Lin, W.-T., et al. (2010) The Effect of Limited Hydrolysis with Neutrase and Ultrafiltration on the Anti-Adipogenic Activity of Soy Protein. *Process Biochemistry*, **45**, 217-222.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.09.010>

- [10] Moure, A., Domínguez, H. and Carlos, P.J. (2006) Antioxidant Properties of Ultrafiltration-Recovered Soy Protein Fractions from Industrial Effluents and Their Hydrolysates. *Process Biochemistry*, **41**, 447-456.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.014>
- [11] 黄薇, 宋永康, 余华, 等. 酶法制备玉米抗氧化肽[J]. 中国食品学报, 2014, 14(8): 69-76.
- [12] 王吉标, 欧阳臻, 赵明, 尚磊, 王璠, 汪愿, 杨婧骅, 等. 响应面分析法优化金蝉花多糖的提取工艺[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(3): 438-443.