

响应面法优化碱性蛋白酶酶解蚂蚁蛋白工艺

韦良东, 丁浩, 李明霞, 王琦, 韩建群, 潘新春, 董明*

安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036

摘要: 试验以蛋白质酶解的多肽的含量(R_1)和 DPPH 清除率(R_2)作为响应值。选取 pH 值、时间、酶与底物比 3 个反应因素, 通过 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 响应面法分析优化蚂蚁蛋白的酶解条件。实验结果表明: 碱性蛋白酶水解蚂蚁蛋白的最佳提取工艺参数为 pH 值为 9.3、提取时间为 5.2 h、酶与底物比为 0.95%。验证优化工艺参数得到的多肽含量(R_1)2.000 mg/mL 和 DPPH 的清除率(R_2)43.24%, 与模型预测值非常接近, 采用响应面法优化碱性蛋白酶酶解蚂蚁蛋白工艺合理可行。

关键词: 蚂蚁; 响应面; 酶解; 多肽的含量; DPPH 清除率

中图分类号: TS202.1

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.S.035

Optimization of Alkaline Protease Extraction of Ant Protein Using Response Surface Methodology

WEI Liang-dong, DING Hao, LI Ming-xia, WANG Qi, HAN Jian-qun, PAN Xin-chun, DONG Ming*

School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China

Abstract: Ant protein were used as the material to extract polypeptide by Alkaline protease. Response surface methodology (RSM) was employed to maximize Content of peptides (R_1) and DPPH-Scavenging rate (R_2) based on a central composite design involving 3 factors (pH, Extraction time and Enzyme substrate ratio) at 3 levels, Hydrolysis condition optimization of ant protein enzyme analysis by means of 3 factors and 3 levels of response surface methodology of Box-Behnken. Results showed the optimal process parameters is the pH value 9.3, extraction time 5.2 h, Enzyme substrate ratio concentration 0.95%. Under such conditions, the observed values of R_1 2.000mg/mL and R_2 43.24%, respectively in close agreement with predicted values. This reveals the applicability of RSM to the optimization of Alkaline Protease enzymolysis process of Ant protein.

Key words: ant; response surface methodology; enzymolysis; content of peptides; DPPH scavenging rate

蚂蚁属于动物界、节肢动物门、昆虫纲、膜翅目、蚁科^[1]。蚂蚁虽小,但它是世界动物中种类最多、数量最大、分布最广、生物量最高的一种昆虫。人类对蚂蚁开发利用的研究至今已有 3000 多年的历史^[2]。现代科学研究证明,蚂蚁含有丰富的蛋白质和多种营养成分以及其显著功效的生物活性物质,有营养宝库之称。目前我国已批准蚂蚁食品为新资源食品^[3]。

蛋白质是人体必不可少的营养素之一,但不同蛋白质由于其氨基酸组成和空间结构不同,在人体内的消化吸收率也大不相同^[3]。蛋白质水解为多肽,可以大大提高其消化吸收率。近代研究表明,蛋白质在体内消化后并不完全以氨基酸的形式吸收,

而大都是以寡肽的形式吸收。本文利用双缩脲法,10%的三氯乙酸沉淀样品酶解液中的大分子蛋白质,经离心过滤后,在上清液中加入加入双缩脲试剂,于 540 nm 测定其 OD 值,继而在牛血清蛋白标准曲线查样品中的多肽的含量^[4]。

国内外已有许多学者认为 DPPH 是一种人合成的稳定的自由基,其反应机理为:从动物或植物蛋白中酶解得到抗氧化活性多肽^[5]。DPPH · + AH = DPPH-H + A · 由于其在可见光区有特征吸收,比色测定简便快速,同时 DPPH 法具有良好的重现性。尽管 DPPH 并非人体内产生的自由基,但此法能有效评价物质的抗氧化性^[6-8]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

长白山黑蚂蚁, DPPH ALDRICH 公司;牛血清

蛋白, Roche 试剂优级纯。双缩脲试剂: 取五水硫酸铜 1.5 g 和四水酒石酸钾钠 6.0 g, 溶于 500 mL 蒸馏水中, 在搅拌的同时加入 300 mL 10% NaOH 溶液定容至 1000 mL 碱性蛋白酶 Bisharp 公司、三氯乙酸、无水乙醇均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-5800PC 型紫外分光光度计, 上海元析有限公司; 粉碎机 60 目筛子, 抽滤机, HH-6 数显恒温水浴锅, 金坛市杰瑞尔电器有限公司; Anke DL-5-B 低速离心机; 数显鼓风干燥箱 GXZ-9240MBE, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 实验方法

1.3.1 蚂蚁酶解液的制备

用清水洗净蚂蚁→烘干→粉碎机粉碎→过 60 目筛子→取 2 g 干蚂蚁粉末加入 40 mL 的缓冲液→按一定比例加入蛋白酶→在 50 °C 下酶解一段时间→灭酶 100 °C 15 min→过滤留滤液

1.3.2 多肽含量和 DPPH 清除率测定方法

1.3.2.1 牛血清蛋白标准曲线

牛血清蛋白标准液: 称取 0.5 g 溶于 100 mL 蒸馏水中, 在 4 °C 冰箱中放置使络蛋白完全溶解, 放至室温, 定容 100 mL, 现配现用。

取 6 个 50 mL 容量瓶, 编号, 准确移取 0.0、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 mL 牛血清蛋白标准溶液, 加入双缩脲试剂各 20 mL, 定容, 摇匀, 静止反应 30 min 后, 在 540 nm 波长下测吸光度(以第一管做空白对照)。以蛋白质含量(mg), 为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线: $Y = 0.3312X - 0.0009$, $R^2 = 0.9994$ 。

1.3.3 多肽含量和 DPPH 清除率的测定

取过滤后的酶解液 10 mL 加入 10 mL 10% TCA 溶液混合摇匀, 静置 10 min, 然后在 4200 rpm 下离心 15 min, 将上清液全部转移到 50 mL 的容量瓶中, 加入 20 mL 双缩脲试剂定容到 50 mL 静置 30 min, 然后在 517 nm 下测定吸光度值对照标准曲线可得多肽的浓度^[9]。

精确称取 5 mg DPPH 溶解于无水乙醇中, 定容 100 mL, 在 4 °C 冰箱中避光放置。

DPPH 清除率 = $[1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100\%$ ^[10,11]

式中: 2 mL 过滤后酶解溶液与 2 mL DPPH 无水乙醇混合 30 min 后测吸光度值为 A_{sample} , 2 mL 过

后酶解溶液与 2 mL 无水乙醇混合 30 min 后吸光度为 A_{blank} , 2 mL DPPH 无水乙醇溶液与 2 mL 无水乙醇混合 30 min 后测吸光度为 A_{control} 。

1.4 蛋白酶的选择和酶解单因素实验

1.4.1 蛋白酶的选择

选择木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、胰酶、碱性蛋白酶作为水解实验用酶, 分别进行单酶水解。水解条件为: 蚂蚁: 缓冲液为 1:20 (g/mL), 在各种蛋白酶最适添加量、最适温度、pH 条件下、水解时间 4h, 以多肽的含量和 DPPH 清除率评价指标, 选择最佳实验用酶。

1.4.2 酶解单因素实验

单因素试验设计采用相同的温度和料液比, 以多肽的含量和 DPPH 清除率为评价指标, 研究不同的加酶量、pH 值和反应时间对蛋白酶解效果的影响, 每组试验重复 3 次。

1.5 响应面的设计

在单因素实验的基础上, 采用响应面设计试验, 运用 Box-Behnken 中心组合试验设计原理^[12], 选择对水解显著影响的因素: 时间、pH 值、酶与底物比, 进行三因素三水平的响应面设计, 试验设计见表 1, 每组试验重复 3 次。

表 1 试响应面 3 因素 3 水平设计

Table 1 Factors and Levels of texts

水平 Level	因素 Factor		
	A pH 值 pH value	B 时间 Time (h)	C 酶与底物比 Enzyme/substrate ratio (%)
-1	8.7	4	0.75
0	9.4	5	0.90
1	10.1	6	1.05

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 提取过程中 pH 值对多肽的含量和 DPPH 清除率的影响

由图 2 可知, 随着 pH 值得增加, 多肽的浓度和 DPPH 的清除率先增大后减小, 当 pH 值为 9.4 时吸光度和 DPPH 清除率最大。这是由 pH 值过低时碱性蛋白酶的活性受到抑制, 酶解蚂蚁蛋白质得到的多肽少, DPPH 清除率就低。当 pH 继续增大时, 酶的活性基团受到抑制, 蛋白质酶解的少, DPPH 清除率低。

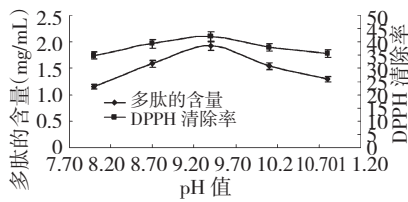


图2 pH值对多肽的含量和DPPH清除率的影响

Fig. 2 Effect of pH on content of peptides and DPPH scavenging rate

2.1.2 酶与底物比对多肽的含量和DPPH清除率的影响

由图3可知,当酶与底物比的比值增加,酶解液的吸光度增加和DPPH的清除率也增加,在0.90%时达到最大值。这是由于酶量很低时,底物与酶结合的位点较少,此时随着酶用量的加大,底物与酶结合的位点增多。但是,酶量过大,多余的酶就会酶解多肽,生成小片段的多肽或氨基酸,降低酶解液中多肽的含量,从而使DPPH的清除率降低。

2.1.3 酶解时间对多肽的含量和DPPH清除率的影响

由图4可知,通过酶时间的增加,酶解液的多肽浓度增加和DPPH的清除率增加,在5h时多肽浓度和DPPH清除率达到最大值。这是因为酶解时间小于5h时,蛋白质被酶解成多肽,所以浓度增加,

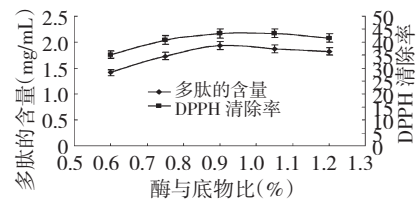


图3 酶与底物比对多肽的含量影响和DPPH的清除率

Fig. 3 Effect of Enzyme substrate ratio on content of peptides and DPPH scavenging rate

酶解时间大于5h,多肽又被碱性蛋白酶酶解成小片段的多肽或氨基酸,浓度下降但是DPPH清除率跟多肽片段的大小有关系基本保持不变。时间一长小片段的多肽也被酶解成氨基酸这时DPPH的清除率就变小了。

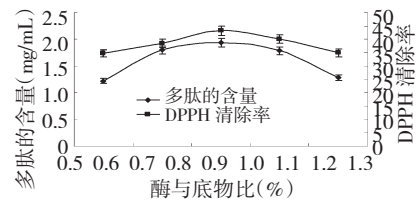


图4 酶解时间对多肽的含量和DPPH清除率的影响

Fig. 4 Effect of reaction time on content of peptides and DPPH scavenging rate

2.2 响应面法酶解条件的优化

2.2.1 响应面实验设计及结果分析

表2 蚂蚁蛋白酶酶解响应面分析设计及结果

Table 2 Design and results of response surface analysis

试验号 No.	A pH 值 pH value	B 时间 Time	C 酶与底物比 Enzyme/substrate ratio (%)	R ₁ 多肽浓度 Content of peptides (mg/mL)	R ₂ DPPH 清除率 DPPH scavenging rate (%)
1	0	1	1	1.851	41.57
2	0	-1	1	1.751	40.04
3	0	0	0	1.968	42.54
4	0	-1	-1	1.530	37.03
5	1	0	1	1.476	36.78
6	1	0	-1	1.298	34.97
7	0	0	0	1.893	41.31
8	1	1	0	1.458	38.15
9	0	1	-1	1.660	40.05
10	-1	1	0	1.597	39.47
11	0	0	0	2.038	43.46
12	0	0	0	1.956	43.12
13	0	0	0	1.962	42.75

14	-1	0	-1	1.645	39.51
15	-1	0	1	1.703	41.16
16	-1	-1	0	1.591	37.09
17	1	-1	0	1.410	35.01

采用 Design-ExpertV. 8 软件进行分析,3 个因素经拟合后得到的多肽浓度 (R_1) 和 DPPH 清除率 (R_2) 的回归方程如下:

$$R_1 = + 1.96 - 0.11A + 0.036B + 0.081C + 0.010AB + 0.030AC - 7.500E - 003BC - 0.31A^2 - 0.14B^2 - 0.12C^2$$

$$R_2 = +42.64 - 1.54A + 1.26B + 1.00C + 0.19AB$$

$$+ 0.040AC - 0.37BC - 3.39A^2 - 1.82B^2 - 1.14C^2$$

两个方程的 R^2 值分别为 0.9667 和 0.9441, 都十分接近于 1, 说明通过二次回归得到的吸光度值和 DPPH 清除率的模型与试样拟合较好。建立的回归整体模型均为极显著 ($P < 0.01$), 当“Prob > F”小于 0.05 时即表示该项指标显著。进一步对方程进行分析, 其系数显著性如表 3、表 4

表 3 R_1 多肽浓度实验结果方差分析表

Table 3 R_1 Analytical results of Content of peptides

R ₁ 多肽的含量						
变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
					Prob > F	
模型	0.77	9	0.085	22.57	0.0002	极显著
A-pH 值	0.100	1	0.100	26.48	0.0013	
B-时间	1.104E-003	1	0.010	2.67	0.1461	
C-酶与底物比 (%)	0.052	1	0.052	13.91	0.0074	
AB	4.410E-004	1	4.410E-004	0.12	0.7425	
AC	3.600E-003	1	3.600E-003	0.95	0.3612	
BC	2.250E-004	1	2.250E-004	0.060	0.8141	
A ²	0.40	1	0.40	106.19	<0.0001	
B ²	0.084	1	0.084	22.17	0.0022	
C ²	0.065	1	0.065	17.29	0.0043	
残差	0.026	7	3.773E-003			
失拟项	0.016	3	5.269E-003	1.99	0.2580	不显著
绝对误差	0.011	4	2.650E-003			
总离差	0.79	16				

由表 3 可知, 实验所建立的模型中, 试验模型极显著 ($P < 0.01$), 失拟相不显著 ($P = 0.2594$)。A、

C、A²、B²、C² 达到显著水平, 且对响应值影响的大小依次为 pH 值 > 酶与底物比 (%) > 时间。

表 4 DPPH 清除率实验结果方差分析表

Table 4 R_2 Analytical results of DPPH-scavenging rate

R ₂ DPPH 清除率						
变异源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	
					Prob > F	
模型	114.18	9	12.69	13.13	0.0013	显著
A-pH 值	18.97	1	18.97	19.64	0.0030	
B-时间	12.68	1	12.68	13.12	0.0085	

C-酶与底物比 (%)	7.98	1	7.98	8.26	0.0239	
AB	0.14	1	0.14	0.15	0.7105	
AC	6.400E-003	1	6.400E-003	6.624E-003	0.9374	
BC	0.56	1	0.56	0.57	0.4732	
A ²	48.30	1	48.30	49.99	0.0002	
B ²	13.94	1	13.94	14.42	0.0067	
C ²	5.51	1	5.51	5.71	0.0483	
残差	6.76	7	0.97			
失拟项	4.07	3	1.36	2.01	0.2544	不显著
绝对误差	2.69	4	0.67			
总离差	120.94	16				

由表 4 可知,实验所建立的模型中,试验模型极显著($P < 0.01$),失拟相不显著($P = 0.2544$)。A、B、C、A²、B²、C² 达到显著水平,且对响应值影响的大小依次为 pH 值 > 时间 > 酶与底物比 (%)。

2.3 响应面分析

2.3.1 多肽的含量 R₁ 各因素的交互作用响应面的 3D 分析图

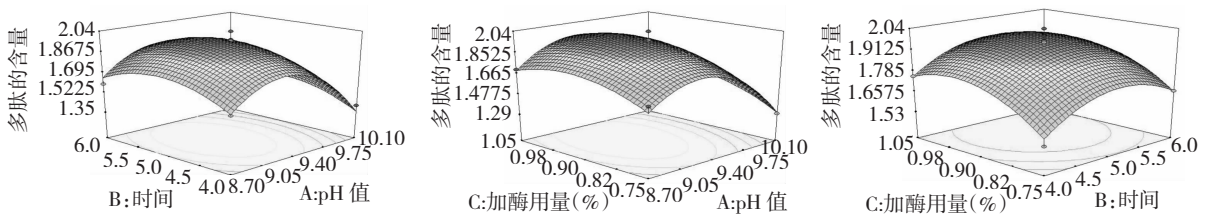


图 5 R₁ = f(A, B)、f(A, C)、f(B, C) 的响应面图

Fig. 5 Response surface plots of R₁ = f(A, B) f(A, C) f(B, C)

图 5 是 3D surface 图是响应值多肽的含量对三个影响因子 A、B、C 所构成的三维空间的曲面图,从响应面分析图上可形象地看出最佳参数及各参数之间的相互作用,从三维空间点到底面的投影可得到

椭圆形等高线图。由图可以看出 AB、AC、BC 的交互作用都不显著。

2.3.2 DPPH 清除率 R₂ 各因素的交互作用响应面的 3D 分析图

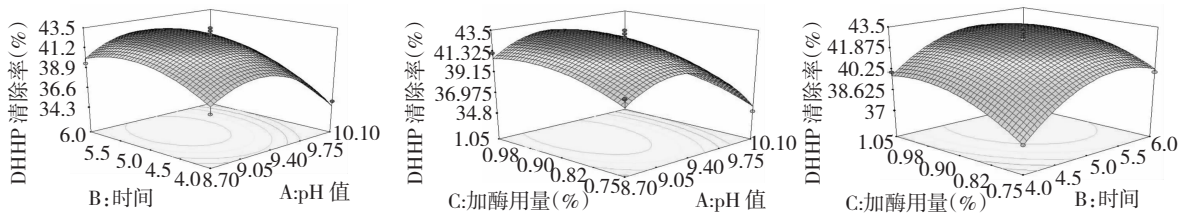


图 6 R₂ = f(A, B)、f(A, C)、f(B, C) 的响应面图

Fig. 6 Response surface plots of R₂ = f(A, B) f(A, C) f(B, C)

图 6 是 3D surface 图是响应值 DPPH 清除率对三个影响因子 A、B、C 所构成的三维空间的曲面图,从响应面分析图上可形象地看出最佳参数及各参数之间的相互作用,从三维空间点到底面的投影可得到椭圆形等高线图。由图可以看出 AB、AC、BC 的交互作用都不显著。

3 结论

经过响应面分析可知,影响 R₁ 多肽的含量的因素按主次顺序排列:pH 值 > 酶与底物比 > 酶解时间。影响 R₂ DPPH 清除率的因素按主次顺序排列:pH 值 > 酶解时间 > 酶与底物比。通过响应面法分

析优化,经过 DX. 8 分析,得到了酶解的最佳工艺条件为 pH 值为 9.26、酶解时间 5.22 h、酶与底物比 (%) 为 0.95。为了方便实际的操作生产采用 pH 值为 9.3、酶解时间为 5.2 h、酶与底物比 (%) 为 0.95。按照此工艺下得到的多肽的含量 2.000 mg/mL, DPPH 的清除率为 43.24%。验证结果与理论值较为接近,说明该设计模型是合理可行。

参考文献

- 1 Wei MC(魏美才), Liu GQ(刘高强). The research and exploitation of insect protein. *Instit Entomoresol CSFU*(中南林业学报), 2001, 2:86-90.
 - 2 Gao FC(高福成), Wang HX(王洪新). *New Resource of Food*(食品新资源). Beijing: China Light Industry Press, 2002.
 - 3 Wang ZW(江志炜), Sheng BY(沈蓓英), Pan QQ(潘秋琴). *Protein processing Technology*(蛋白质加工技术). Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
 - 4 Lu W(鲁伟), Ren GP(任国谱), Song JM(宋俊梅). Determination of content of peptides in protein hydrolysates. *Food Sci*(食品科学), 2005, 26:169-171.
 - 5 Zhang H(张昊), Ren FZ(任发政). Research advance of natural antioxidant peptides. *Food Sci*(食品科学), 2009, 29:443-447.
 - 6 Cheng J(成静), Zhou GY(周国仪), Chen DL(陈栋梁), et al. Study on the detection on free-radical scavenging effects of ovalbumin peptide by DPPH · method. *Sci Tech Food Ind*(食品工业科技), 2009, 30:121-123.
 - 7 Yin RL, LYeap FOO. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem*, 2000, 68:81-85.
 - 8 Brand WW, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 1995, 28:25-30.
 - 9 Luo Q(罗钦), Luo TY(罗土炎), Song YK(宋永康), et al. Detection of oligopeptides in fermented fishmeal. *J Agric Sci*(福建农业学报), 2012, 27:747-749.
 - 10 Wang J(王婧). The study of proteolysis of *Polyrhachis vicina* Roger and properties of hydrolysates. Guangzhou: South China University of Technology(华南理工大学), MSc. 2011.
 - 11 Zhang PY(张培宜), Zhang S(张帅), Feng CP(冯翠萍). The DPPH free radical activity and emulsification property of Chinese chestnut polypeptide. *J Shanxi Agric Univ*(山西农业大学学报), 2010, 30:553-555.
 - 12 Gao DD(高丹丹), Chang T(常通), Cao YS(曹郁生), et al. Response surface optimization of neutrase-catalyzed hydrolysis of cottonseed protein. *Food Sci*(食品科学), 2009, 30:153-157.
- (上接第 204 页)
- 84 Fyfe MCT, et al. GPR119 Agonists Are Potential Novel Oral Agents for the Treatment of Diabetes. 67th American Diabetes Association Annual Scientific Sessions, Chicago, 2007, Abs-0532-P.
 - 85 Swain S, et al. A Novel Dual DPP-IV Inhibitor and GPR119 Agonist That Exhibits Superior Glucose Lowering to Sitagliptin in Diabetic ZDF Rats. 69th American Diabetes Association Annual Scientific Sessions, New Orleans, 2009, Abs 453-P.
 - 86 Roberts B, et al. MBX-2982, a Novel Oral GPR119 Agonist for the Treatment of Type 2 Diabetes: Results of Single & Multiple Dose Studies. 69th American Diabetes Association Annual Scientific Sessions, New Orleans, 2009, Abs-164-OR.