



响应面法优化脱酚棉籽蛋白双酶水解的工艺条件

黄薇, 林虬, 宋永康, 姚清华

(福建省农业科学院中心实验室/福建省精密仪器农业测试重点实验室, 福州 350003)

摘要:为研究 Alcalase 水解蛋白酶和 Flavourzyme 风味蛋白酶分步水解脱酚棉籽蛋白的最佳条件, 以水解度为评价指标, 采用 Plackett-Burman(PB)设计和 Box-Behnken 响应面分析法对影响双酶分步水解棉籽蛋白的 9 个工艺条件进行筛选优化。双酶分步水解脱酚棉籽蛋白的最优操作条件为: 先用 Alcalase 水解蛋白酶在底物浓度(w/v) 9.66%, 温度 60.5℃、pH 8.0、酶用量 25000 U/g 的条件下水解 150 min, 灭酶后再用 Flavourzyme 风味蛋白酶在温度 50℃、pH 6.0、酶用量 26576 U/g 的条件下水解 120 min。在此条件下水解液的水解度可达到 42.73%。试验结果可为棉籽蛋白多肽的开发利用提供依据。

关键词:棉籽蛋白; 双酶分步水解; Plackett-Burman 设计; 响应面分析法

中图分类号: S562

文献标志码: A

论文编号: 2012-0159

Response Surface Optimization of Two-step-hydrolysis Condition of Cottonseed Protein

Huang Wei, Lin Qiu, Song Yongkang, Yao Qinghua

(Central Laboratory, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Key Laboratory of Precise Measurement of Agricultural, Fuzhou 350003, Fujian, China)

Abstract: To optimize the stepwise double-enzyme hydrolysis condition of cottonseed protein by Alcalase protease and Flavourzyme protease. Plackett-Burman (PB) design and Box-Behnken design were applied to screening and optimizing 9 factors for the hydrolysis of cottonseed protein by Alcalase protease and Flavourzyme protease, in which the degree of hydrolysis (DH) was regarded as an index. It was shown that the optimum hydrolysis conditions were as follows: substrate concentration 9.66% (w/v), firstly, Alcalase hydrolyzed for 150 min under the conditions of 60.5℃, pH 8.0 and enzyme/substrate 25000 U/g, then Flavorzyme hydrolyzed for 120 min under the conditions of 50℃, pH 6.0 and enzyme/substrate 26576 U/g. Under this condition, the DH of enzyme-hydrolyzed product was 42.73%. The experimental results provided the basic data for the utilization of cottonseed protein.

Key words: Cottonseed Protein; Stepwise Double-enzyme Hydrolysis; Plackett-Burman Design; Response Surface Methodology

0 引言

棉籽蛋白的营养价值高于谷类蛋白, 接近豆类蛋白质, 是一种理想的植物蛋白质资源^[1]。但长期以来, 棉籽蛋白因含有棉酚等有毒有害物质而使其用途受到局限, 未能得到很好地开发利用。随着棉酚提取工艺和棉籽去毒工艺的日趋完善, 以及无腺棉籽种植的广

泛推广, 棉籽蛋白资源受到了食品工业和饲料工业的广泛关注, 如何进一步开发和利用棉籽蛋白资源成为了当前研究的热点^[2]。利用酶解技术将低值的蛋白源转化成多肽、寡肽等高值蛋白原料是目前棉籽蛋白质开发利用的新途径。棉籽蛋白经蛋白酶水解后, 其功能特性发生很大的变化, 这些特性的改变较大程度取

基金项目:福建省公益类科研院所基本科研专项“棉粕蛋白质酶解技术研究”(2010R1027-1); 福建省科技重大专项“利用生物技术进行饲料原料预处理的研究及应用”(2010NZ0002-1); 福建省农科院青年人才创新基金“棉籽粕酶解产物中多肽的分子量分布研究”(2010QC-17); 福建省农科院双百项目“寡肽蛋白在水产饲料中应用技术示范推广”(sbmd1226)。

第一作者简介:黄薇, 女, 1986 年出生, 研究实习员, 主要从事水产饲料蛋白源研究。通信地址: 350003 福建省福州市五四路 247 号福建省农科院中心实验室, Tel: 0591-87869394, E-mail: lifehuangwei@yahoo.cn。

通讯作者:林虬, 男, 1963 年出生, 福建福州人, 副研究员, 本科, 学士, 主要从事水产饲料科学研究。通信地址: 350003 福建省福州市五四路 247 号福建省农科院中心实验室, Tel: 0591-87869172, E-mail: linqiu3163@yahoo.com.cn。

收稿日期:2012-03-23, **修回日期:**2012-07-03。

决于水解度的大小^[3]。有研究显示,一定时间内,产物水解度的大小与其生物活性的高低呈现正相关^[4]。因此,对水解工艺进行优化和控制至关重要。

在试验条件优化方面,依靠正交试验或均匀设计难以得到较快较好的结果^[5]。Plackett-Burman(PB)^[6-8]设计能够利用最少试验次数从众多的考察因素中快速有效地筛选出对目标值影响最大的关键因素,从而大大减少优化过程考察的因素数和试验次数。响应面分析法(response surface methodology, RSM)利用中心组合实验拟合出一个完整的二次多项式模型,依此对函数的响应面和等高线进行分析,精确地表述因子与响应面之间、因子与因子之间的关系,具有试验周期短,回归方程精度高等优点^[9]。笔者采用Alcalase水解蛋白酶和Flavourzyme风味蛋白酶对棉籽蛋白进行双酶分步水解,利用Plackett-Burman设计考察影响双酶分步水解棉籽粕的9个试验因素,筛选出关键因素,进一步利用Box-Behnken响应面分析法对关键因素进行响应面优化分析,得到最佳的工艺条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

脱酚棉籽蛋白购自新疆震企油脂有限公司,蛋白含量为48.00%;Alcalase水解蛋白酶、Flavourzyme风味蛋白酶购自诺维信公司;对苯二甲醛(OPA)购自国药集团化学试剂有限公司;十二烷基磺酸钠(SDS)、二巯苏糖醇(DTT)购自上海生物工程有限责任公司,氢氧化钠、盐酸等其他试剂均为分析纯。

1.2 主要设备

紫外分光光度计(日本Hitachi U-3900),电子分析天平(瑞士METTLER TOLEDO AL204),恒温磁力搅拌器(国华企业 HJ-3),恒温振荡器(国华企业 3HA-C),离心机(长沙湘仪离心机 TD5A-WS),pH酸

度计(上海雷磁 PHS-3C)。

1.3 试验方法

1.3.1 棉籽蛋白酶解前处理 由于棉籽蛋白的溶解性较差,酶解前对棉籽蛋白进行前处理可以显著提高水解效果^[10]。首先对棉籽蛋白进行粉碎过筛,过筛粒度控制在60目左右。利用粉碎过筛后的棉籽蛋白配制成一定质量浓度的蛋白溶液,用1.0%氢氧化钠调pH至8.0,40℃浸提2 h,作为酶反应的底物溶液。

1.3.2 酶解液的制备 调节棉籽蛋白底物溶液至一定的pH,按一定比例加入Alcalase水解蛋白酶,在一定温度下进行水解一定时间后,95℃水浴灭酶15 min,再调pH、调温度加入Flavourzyme风味蛋白酶继续水解至预定时间,完毕后灭酶,冷却。酶解液5000 r/min离心20 min,上清液即为棉籽蛋白水解产物,保存在4℃待分析用。

1.3.3 水解度的测定 水解度(degree of hydrolysis, DH)的定义是指蛋白质水解过程中,被断裂的肽键数 h (mmol/g蛋白质)与给定蛋白质的总肽键数 h_{tot} (mmol/g蛋白质)之比。水解度的测定方法采用邻苯二甲醛(OPA)法^[11],其计算公式如式(1)。

$$DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

1.3.4 Plackett-Burman设计 在前期单因素试验的基础上,采用Plackett-Burman设计试验对影响双酶分步水解棉籽蛋白的9个因素进行评估。Plackett-Burman设计试验因素水平见表1,每个因素各取低水平(-1)和高水平(+1)2个水平,其中 X_{10} 、 X_{11} 为估计误差而设置的对照虚拟因子。

1.3.5 响应面试验设计 运用Box-Behnken中心组合试验设计原理^[12],对Plackett-Burman设计试验筛选出的

表1 Plackett-Burman设计试验因素水平

编码	因子	低水平(-1)	高水平(+1)
X_1	底物浓度/%	8	12
X_2	Alcalase水解蛋白酶酶解时间/min	120	180
X_3	Alcalase水解蛋白酶加酶量/(U/g)	20000	30000
X_4	Alcalase水解蛋白酶反应pH	7.5	8.5
X_5	Alcalase水解蛋白酶反应温度/℃	55	65
X_6	Flavourzyme风味蛋白酶酶解时间/min	90	150
X_7	Flavourzyme风味蛋白酶加酶量/(U/g)	20000	30000
X_8	Flavourzyme风味蛋白酶反应pH	5.5	6.5
X_9	Flavourzyme风味蛋白酶反应温度/℃	45	55
X_{10}, X_{11}	虚拟因素	-1	+1

[illegible]

表4 Plackett–Burman 试验设计方差分析和回归系数估计

因子	回归系数	贡献率/%	自由度	平方和	F值	Prob(P)>F	显著性
截距	37.64	—	—	—	—	—	—
X ₁	-2.37	50.64	1	67.31	122.48	0.0081	1
X ₂	0.27	0.65	1	0.86	1.57	0.3368	6
X ₃	0.58	2.99	1	3.97	7.22	0.1151	5
X ₄	-0.22	0.43	1	0.57	1.04	0.4146	7
X ₅	-1.24	13.81	1	18.36	33.41	0.0287	3
X ₆	0.86	6.75	1	8.98	16.33	0.0561	4
X ₇	1.61	23.32	1	31.00	56.41	0.0173	2
X ₈	-0.18	0.30	1	0.39	0.72	0.4860	8
X ₉	-0.18	0.29	1	0.38	0.69	0.4925	9
模型	—	99.18	9	131.83	26.65	0.0367	—
误差	—	0.82	2	1.10	—	—	—

注： $R^2=0.9917$ ，Adj $R^2=0.9545$ ，信噪比为 16.271。

表5 Box–Behnken 设计矩阵和响应数据的实测值与拟合值

序号	因子			DH/%	
	X ₁	X ₂	X ₃	实测值	拟合值
1	-1	-1	0	39.16	39.10
2	1	-1	0	37.22	37.48
3	-1	1	0	40.08	39.82
4	1	1	0	38.28	38.34
5	-1	0	-1	39.95	40.09
6	1	0	-1	38.23	38.03
7	-1	0	1	40.58	40.77
8	1	0	1	39.88	39.74
9	0	-1	-1	38.87	38.80
10	0	1	-1	39.56	39.69
11	0	-1	1	40.22	40.09
12	0	1	1	40.72	40.79
13	0	0	0	42.46	42.55
14	0	0	0	42.24	42.55
15	0	0	0	42.45	42.55
16	0	0	0	42.53	42.55
17	0	0	0	43.08	42.55

0.9668，表明此回归模型能解释 96.68%响应值的变异，说明模型对实际情况拟合程度良好；模型的信噪比为 20.908>4，说明本模型的设计对双酶分步水解棉籽蛋白的条件进行优化是合适的。

2.2.2 交互作用分析 经过 Design Expert 软件分析，得到各交互因素对水解度的响应面曲面图及其等高线图，见图 1~3。

从图中可以分析和评估任何 2 个因素的交互作用对水解度的影响效应，从中确定最佳因素水平。

图 1 显示了底物浓度和 Alcalase 水解蛋白酶反应温度对水解度的交互影响效应。从图中可以直观的看出底物浓度和 Alcalase 水解蛋白酶反应温度与水解度呈抛物线型关系。当其他条件一定时，水解度随着底



表6 二次多项模型方差分析表

方差来源	自由度	平方和	均方	F值	Prob(P)>F
X_1	1	4.77	4.77	47.69	0.0002
X_2	1	1.25	1.25	12.49	0.0095
X_3	1	2.86	2.86	28.56	0.0011
$X_1 X_2$	1	0.00	0.00	0.05	0.8303
$X_1 X_3$	1	0.26	0.26	2.64	0.1480
$X_2 X_3$	1	0.01	0.01	0.09	0.7689
X_1^2	1	17.30	17.30	172.85	< 0.0001
X_2^2	1	14.30	14.30	142.95	< 0.0001
X_3^2	1	3.18	3.18	31.81	0.0008
模型	9	47.49	5.28	52.73	< 0.0001
失拟项	3	0.31	0.10	1.04	0.4654
误差项	4	0.39	0.098	—	—
总和	16	48.19	—	—	—

注: $R^2=0.9855$, Adj $R^2=0.9668$, 信噪比为 20.908。

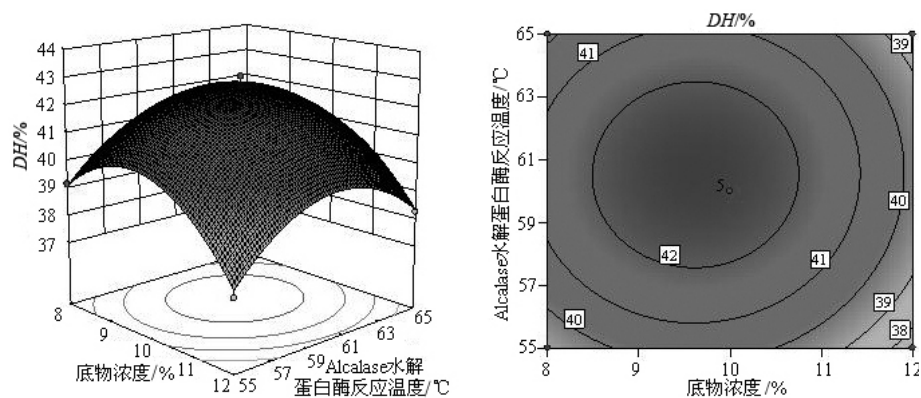


图1 底物浓度和Alcalase水解蛋白酶反应温度交互影响的三维曲面图和等高线图

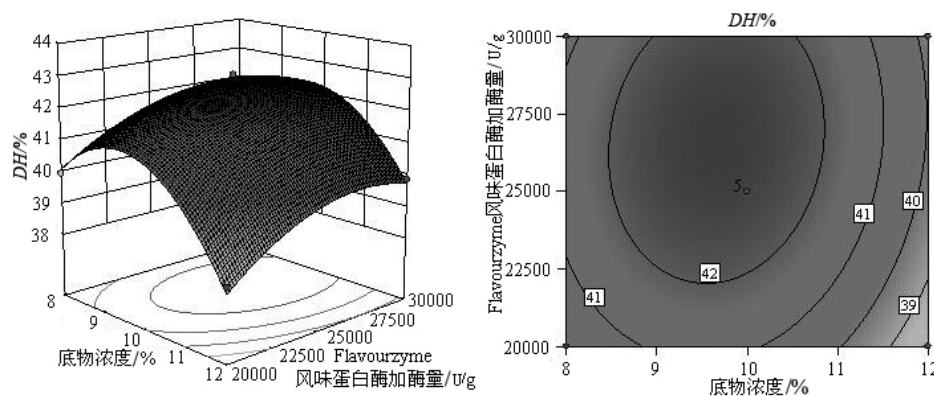


图2 底物浓度和Flavourzyme风味蛋白酶加酶量交互影响的三维曲面图和等高线图

物浓度和Alcalase水解蛋白酶反应温度的增加先升高后缓慢降低。在本次试验水平范围内,当底物浓度约为9.64%,Alcalase水解蛋白酶反应温度在60.6℃,水解度可达到42.65%。

底物浓度和Flavourzyme风味蛋白酶加酶量对水解度的交互作用见图2。底物浓度和Flavourzyme风味蛋白酶加酶量与水解度呈抛物线型关系,有极大值。这点出现在底物浓度为9.66%、Flavourzyme风味

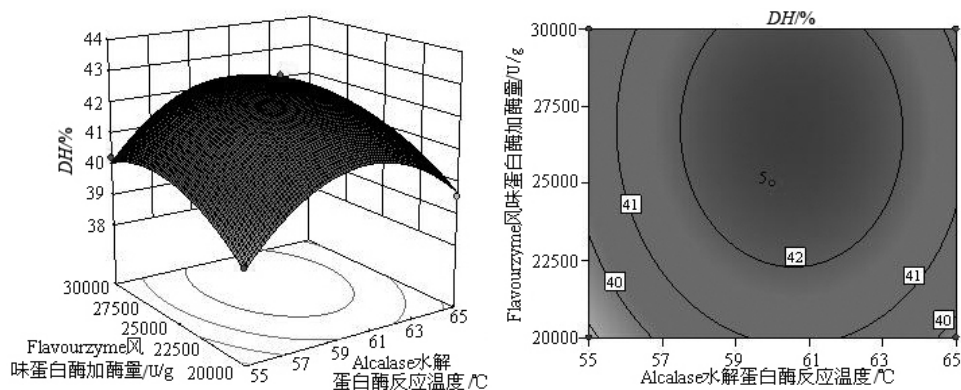


图3 Alcalase水解蛋白酶反应温度和Flavourzyme风味蛋白酶加酶量交互影响的三维曲面图和等高线图

蛋白酶加酶量在27300 U/g的交汇处。

从图3中可以看出Alcalase水解蛋白酶反应温度和Flavourzyme风味蛋白酶加酶量对水解度的交互作用。当Alcalase水解蛋白酶反应温度约为60.5℃、Flavourzyme风味蛋白酶加酶量约为26800 U/g时、水解度可以达到本研究中的最大值(42.68%)。

2.3 验证试验

根据Box-Behnken试验所得的结果和二次多项回归方程,得到最佳水解条件为底物浓度(w/v) 9.66%, Alcalase水解蛋白酶在温度60.5℃、pH8.0、酶用量25000 U/g的条件下水解150 min,再用Flavourzyme风味蛋白酶在温度50℃、pH 6.0、酶用量26576 U/g的条件下水解120 min,酶解液的水解度可达到42.73%。为了检验模型预测的准确性,在最优水解条件下进行棉籽蛋白水解验证试验,实测水解度结果分别为42.42%、42.62%和42.34%,与预测值较接近,表明PB和BBD方法联用的可行性以及所得模型能较好地预测实际水解情况。

3 结论与讨论

目前,国内外有关棉籽蛋白酶解的报道不多,研究主要集中在单酶水解上。采用双酶分步水解脱酚棉籽蛋白法的研究鲜见报道。有研究表明^[13-15],单一蛋白酶水解很难在短时间内获得高水解度、高得率的多肽,双酶分步水解效果比单酶水解更好,其原因可能是不同蛋白酶具有不同的切割位点和催化特性,2种蛋白酶分步加入,势必先后断裂底物不同的肽键位点,从而产生的小肽和游离氨基酸必然会增多,因而水解度升高。因此,本试验选择深度内切Alcalase水解蛋白酶和具有外切酶活性的Flavourzyme风味蛋白酶对棉籽蛋白进行分步酶解。

响应面分析法(response surface methodology,

RSM)是一种优化工艺条件的有效方法^[7-8,16],可用于确定试验因素及其交互作用在工艺过程中对指标响应值的影响,精确地表述因素和响应值之间的关系。高丹丹等^[3]通过3因素3水平的Box-Behnken响应面分析法优化了中性蛋白酶水解棉籽蛋白质的工艺条件。姜晓娇等^[17]以棉籽多肽产率为响应值,应用响应面法的Box-Behnken中心组合实验对碱性蛋白酶酶解制备棉籽多肽的条件进行了优化。Plackett-Burman(PB)^[6-8]方法主要应用于微生物发酵培养基成分的优化和发酵工艺关键参数的筛选,通过试验设计和数据分析,能够从众多操作条件中快速有效的筛选出主效因素,从而减少优化过程中的考察因素数和试验次数。目前将PB筛选和响应面分析联合应用于棉籽蛋白酶解工艺的优化尚未见报道。笔者将PB筛选和RSM分析相结合成功地应用于棉籽蛋白双酶分步水解的工艺条件优化,确定最佳水解条件为,底物浓度(w/v) 9.66%, Alcalase水解蛋白酶温度60.5℃、pH 8.0、酶用量25000 U/g、酶解时间150 min, Flavourzyme风味蛋白酶温度50℃、pH 6.0、酶用量26576 U/g、酶解时间120 min,在此条件下,棉籽蛋白的水解度可达到42.73%。这对棉籽肽蛋白的工业化生产具有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 赵冬冬,刘晓宇.棉籽蛋白的研究进展[J].农产品加工·学刊,2009, 5:27-30.
- [2] 李艳玲,李松彪,王毓蓬.棉籽蛋白的开发利用[J].中国棉花加工, 2005(3):22-23.
- [3] 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.
- [4] Peng X Y, Xiong Y L, Kong B H. Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron



- spin resonance[J]. Food Chemistry, 2009,113(1):196-201.
- [5] 朱英波,史凤玉,蔡爱军,等.产壳聚糖酶培养基统计学筛选及响应面优[J].江苏农业科学,2010(6):435-438.
- [6] Weuster-Botz D. Experimental design for fermentation media development: statistical design or global random search? [J]. J Biosci Bioeng, 2000,90:473-483.
- [7] Myers W R. Response surface methodology[M]. Encycloedia of biopharmaceutical statistics, New York: Marcel Dekker, 2003: 858-869.
- [8] Plackett R L, Burman J P. The design of optimum multifactorial experiments[J]. Biometrika, 1946,33:305-325.
- [9] 李亚娜,林永成,余志刚.响应面分析法优化羊栖菜多糖的提取工艺[J].华南理工大学学报:自然科学版,2004,32(11):28-32.
- [10] 刘志强,邓光炳.酶法制取棉籽水解蛋白研究[J].粮食与油脂,1999, 2:19-21.
- [11] Nielsen P M, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis[J]. Journal of Food Science, 2001,66:642-646.
- [12] Box G P, Behnken D W. Some new three level design for the study of quantitative variables [J]. Technometrics, 1960,2:456-475.
- [13] 郭城,郑竟成.酶法水解棉籽蛋白的研究[J].中国油脂,2007,32(8): 38-40.
- [14] 高海燕,赵镭,尹京苑,等.制备抗氧化棉籽肽用蛋白酶的筛选[J].食品科学, 2007,28(08):297-302.
- [15] 张丽霞,顾振新,周剑忠,等.双酶水解麦胚制备抗氧化肽的工艺优化[J].江苏农业学报,2010,26(3):601-606.
- [16] 陈魁.试验设计与分析[M].北京:清华大学出版社,1996:94-180.
- [17] 姜晓娇,王承明.响应面优化脱酚棉籽粕制备棉籽多肽研究[J].中国油脂,2010,6:22-26.

(上接第31页)

- [12] Fisher J B. Branching pattern and angles in trees[A].In: Givnish JT ed. On the economy of plant form and function[C].London: Cambridge University Press,1986:493-518.
- [13] Horn J S. Adaptation from the perspective of optimality[A].In: Solbrig OT et al ed. Topics in plant population biology[C].New York: Columbia University Press,1979:48-61.
- [14] 林勇明,洪滔,吴承祯,等.不同起源与方位下桂花的构型差异[J].福建林学院学报,2009,29(2):135-138.
- [15] 林勇明,洪滔,吴承祯,等.桂花植冠的枝系构型分析[J].热带亚热带植物学报,2007,15(4):301-306.
- [16] 陈灿,洪伟,吴承祯,等.东南沿海防护林木麻黄种群生命表及生存分析[J].农学学报,2011,1(4):37-41.
- [17] 王舒凤,郑郁善,陈雄,等.木麻黄湿地松混交林生物量研究[J].福建林学院学报,2001,21(2):153-156.
- [18] 吴锡麟.厚荚相思木麻黄混交林分结构和生物量的研究[J].福建林学院学报,2003,23(3):236-239.
- [19] 丁国昌,何宗明,林宇,等.木麻黄迹地不同更新树种土壤剖面的变化特征及表聚性特征[J].江西农业大学学报,2012,34(1):66-71.
- [20] 钟章成,曾波.植物种群生态研究进展[J].西南师范大学学报:自然科学版,2001,26(2):230-236.
- [21] Maillette L. Structural dynamics of silver birch. I. The fates of buds [J].J Appl Ecol,1982,19:203-218.
- [22] Borchert B, Slade N A. Bifurcation ratios and the adaptive geometry of trees[J].Bot Gaz,1981,142:394-401.
- [23] Whitney G G. The bifurcation ratio as an indicator of adaptive strategy in woody plant species[J].Bulletin of Torrey Botanical Club,1976,103:67-72.
- [24] Halle F, Oldeman R A A, Tomlinson P B. Tropical Trees and Forests, an Architecture Analysis[M].Berlin: Springer-Verlag,1978: 441-445.
- [25] 孙书存,陈灵芝.东灵山地区辽东栎的叶群体统计[J].植物生态学报,1998,22 (6):538-544.
- [26] Lee D W, Richards J H. Heteroblastic development in vines[A].In: Putz F E, Mooney HA . on the economy of plant form and function [C].Cambridge University Press,1991:205-243.
- [27] 祝宁,陈力.刺五加构型研究[A].祝宁.植物种群生态学研究现状与进展[C].哈尔滨:黑龙江科学技术出版社,1994:69-73.

(上接第43页)

- [3] 刘林真,杨盛国,廖一鹏.基于WinCE5.0的烤烟房温湿度巡检仪系统设计[J].福建师范大学福清分校学报,2011,5:21-25.
- [4] 聂平,徐兴强,李万扬,等.基于单片机的烟叶烘烤温湿度控制系统[J].机械与电子,2005,7:79-80.
- [5] 罗汝林,褚金奎,沈洪源.基于模糊控制的烟叶烘烤温湿度控制仪的设计[J].仪表技术与传感器,2007,3:26-28.
- [6] 王暑,杨晓京.基于模糊神经网络的烟叶烘烤温湿度监控系统研究[J].计算机测量与控制,2009,17(2):332-334.
- [7] 李仁政,杜传印,孟庆宏,等.密集烤房温湿度自控设备应用对比分析[J].中国烟草科学,2009,30(2):66-70.
- [8] 王智慧,赵鹏,党军政,等.普通烤房的智能化改造与应用[J].烟草科技,2008,9:59-62.
- [9] 潘建斌,冯朝岭,王丽娟,等.烟叶烘烤自控专家系统的研究与应用[J].河南农业大学学报,2005,39(3):297-303.
- [10] 庞全,杨翠容.烟叶烘烤温湿度智能控制仪[J].仪器仪表学报,1999, 20(3):296-299.
- [11] 谭林彬.烤烟密集烤房适宜风机研究[J].湖南农业科学,2011,9: 38-39.
- [12] 艾复清,许齐.不同变频风速对南江3号上部烟叶烤后质量的影响[J].贵州农业科学,2012,40(1):75-78.
- [13] 何亚浩,贺帆.密集烘烤过程中风机变频技术对烟叶质量影响[J].西北农业学报,2011,20(4):76-81.
- [14] 李旭华,邱妙文.变频电机对密集烘烤烟叶质量的影响[J].中国烟草科学,2012,33(1):74-77.
- [15] 刘闯,王学龙.变频调速技术在烟叶密集烘烤中的应用研究初报[J].浙江农业科学,2010,3:563-566.