

基于响应面的玉米分离蛋白酶解工艺研究*

林 峰,蔡木易,谷瑞增,易维学

(中国食品发酵工业研究院,北京,100027)

摘 要 以高纯度的玉米分离蛋白为原料,研究玉米低聚肽的酶法制备工艺,并对工艺条件进行优化。通过单因素分析和响应面试验设计,确定玉米低聚肽的制备工艺条件为:加酶量 3 000 U/g,底物浓度为 5.6%,温度为 54.4℃,pH 为 8.54,酶解时间 3 h,其蛋白转化率达到 86.57%。并通过分析氨基酸组分发现该工艺下玉米低聚肽产品的氨基酸组成与玉米分离蛋白基本保持一致,较好地保持了玉米蛋白特定的氨基酸模式。

关键词 玉米分离蛋白,玉米低聚肽,酶解,响应面法,氨基酸分析

通过酶法水解提高蛋白食品的加工性能、营养性以及释放出生理保健功能已经受到广泛重视^[1]。

玉米蛋白的水合性质较差,大大限制了其在食品和医药行业的应用,造成了极大的玉米蛋白质资源的浪费^[2]。本研究以蛋白纯度 90% 以上的玉米分离蛋白(corn protein isolate CPI)为底物,通过蛋白酶水解作用,增加其在水中的溶解度,降低粘度,增加流动性和热稳定性,且易被人体吸收,降低了食品的抗原性。同时控制酶解程度,优化酶解条件,制备出分子质量区域集中在 200~1 000 u 的小分子肽,使一些原来隐藏于玉米蛋白质分子内部的具有特定氨基酸序列的肽段释放出来,形成具有各种不同生理活性的短肽片断^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂

玉米分离蛋白(CPI)、蛋白酶,中国食品发酵工业研究院功能食品中心提供;三氯乙酸、H₂SO₄、Cu-SO₃、K₂SO₄、硼酸、HCl、NaOH 均为分析纯。

1.2 仪器与设备

凯氏定氮仪、电子天平、电热恒温水浴锅、高速离心机、恒温磁力搅拌器、真空旋转蒸发器、陶瓷膜实验设备、实验室微型喷雾干燥机、氨基酸分析仪。

1.3 试验方法

1.3.1 玉米低聚肽的制备工艺流程

玉米分离蛋白→加水调浆→升温调节 pH→加入蛋白酶→保温水浴酶解→灭酶→高速离心→多级膜过滤→喷雾干燥→玉米低聚肽

1.3.2 酶解工艺条件的评价指标

pH-Stat 法监测水解度^[4]、蛋白转化率^[5]。

由于不同温度下 α-氨基酸的解离度不同,导致 pH-Stat 法测定的水解度偏差略大。试验通过实时记录耗碱量来计算水解度,具有在线监测性,所以本试验采用 pH-Stat 法来在线监测酶解的程度。由于玉米分离蛋白的水不溶性,酶法水解可以将蛋白转变成可溶性肽。所以通过 TCA 法测定可溶性氮来评价蛋白酶解的程度,即测定蛋白转化率。

1.3.3 实验设计与数据处理

试验采用单因素设计和响应曲面设计^[6],数据处理采用 SAS9.1 软件。

1.3.4 氨基酸成分测定^[7]

氨基酸分析仪。

2 结果与讨论

2.1 单因素分析

2.1.1 底物浓度对蛋白转化率的影响

试验中选取蛋白底物浓度 4%、6%、8%、10% 和 12% 等 5 个水平。考察酶解反应之后的蛋白转化率。结果见图 1。

表 1 响应面分析因素水平表

因 素	水 平		
	-1	0	1
X ₁ (温度)/℃	85	90	95
X ₂ (pH)	8.5	9	9.5
X ₃ (底物浓度)/%	4	6	8

由图 1 可知,随着底物浓度的升高,蛋白转化率呈先升后降的趋势。其中,最高点在底物浓度 6% 水平,达到 83.51%,最低点在底物浓度 12% 水平,达到 80.10%。底物浓度为 4%、6%、8% 时,蛋白含量维持一个较高的水平。

中心络合物学说^[8]认为,当酶催化时,酶首先合底物结合生成中间复合物(ES),然后生成产物(P),

第一作者:硕士研究生。

* 科技部院所基金资助项目

收稿日期:2007-10-12

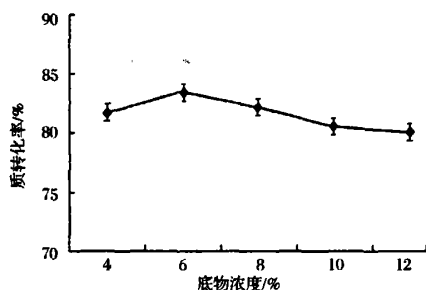


图1 底物浓度对蛋白质转化率的影响

并释放出酶。也就是说在较高底物浓度下,酶被完全饱和,导致水解速率下降,从而造成单位时间内蛋白质转化率较低。然而在较低底物浓度下,酶与底物的接触机率下降,也会导致水解速率下降。6%底物浓度下蛋白质转化率最高,说明其底物浓度水平适中,所以在进行响应面条件优化时,选择料液比为4%、6%、8%三个水平。

2.1.2 加酶量对蛋白转化率的影响

试验中选取加酶量1 000 U/g、2 000 U/g、3 000 U/g、4 000 U/g、5 000 U/g和6 000 U/g等6个水平。考察酶解反应之后的蛋白转化率。结果见图2。

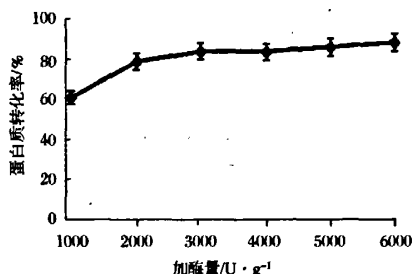


图2 加酶量对蛋白转化率的影响

由图2可知,随着加酶量的升高,蛋白转化率先上升,但上升速率逐渐趋缓。其中,最高点在6 000 U/g水平,蛋白质转化率达到87.99%;最低点在1 000 U/g,蛋白质转化率仅为60.73%。加酶量在1 000 U/g、2 000 U/g、3 000 U/g水平时,蛋白转化率上升明显,到3 000 U/g,蛋白转化率达到83.51%。

这主要是因为在一定底物浓度下,加酶量较低时,酶可能被饱和,所以加酶量越高,酶解速率越高,蛋白转化率上升明显。随着加酶量的逐渐加大,反应体系中酶的浓度升高,酶与酶产生了竞争性抑制,导致尽管酶量成倍增加,蛋白转化率却仅有少许的上升。从节约成本考虑,选择3 000 U/g加酶量水平。

2.1.3 pH对蛋白转化率的影响

在酶的最适pH范围内,选取酶解pH8、8.5、9、9.5和10等5个水平,考察酶解反应之后的蛋白质转化率。结果见图3。

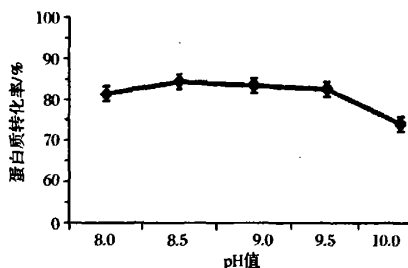


图3 pH值对蛋白转化率的影响

由图3可知,随着pH值的升高,蛋白质转化率呈先上升后下降的趋势。其中,最高点在pH8.5水平,蛋白转化率达到84.49%;最低点在pH10水平,蛋白转化率下降明显,仅为74.19%。

这主要是因为酶的活力受环境pH的影响^[8]。对于玉米蛋白底物来说,在pH10相对高碱的环境下,蛋白与酶结合力变小,从而影响了蛋白转化率。试验结果表明,该酶在酶解玉米蛋白时不宜采用高pH条件,所以在进行响应面条件优化时,选择酶解pH8.5、9、9.5三个水平。

2.1.4 温度对蛋白质转化率的影响

在酶的最适温度范围内,选取酶解温度40℃、45℃、50℃、55℃和60℃等5个水平。考察酶解反应之后的蛋白质转化率。结果见图4。

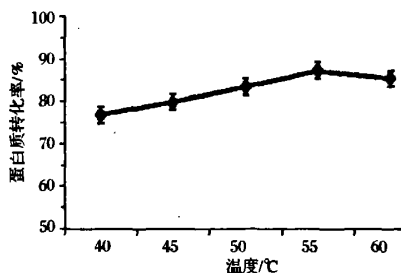


图4 温度对蛋白转化率的影响

由图4可知,随着水浴温度的升高,蛋白质转化率呈先上升后下降的趋势,且在40℃、45℃、50℃、55℃四水平上,蛋白转化率呈线性上升趋势。最高点在55℃水平,达到87.36%;60℃水平的蛋白转化率略有下降;最低点在40℃水平,仅为76.83%。

酶与大多数化学反应有相同之处,在较低温度下,当温度升高时,反应速率加快,蛋白质转化率逐渐上升^[8]。但是随着温度继续升高,酶蛋白会逐渐变性

而失活,引起酶反应速率下降,导致蛋白质转化率下降。故在响应面条件优化时选择水浴温度 50℃、55℃和 60℃三个水平。

2.1.5 酶解时间对蛋白转化率的影响

试验以 pH-Stat 法在线监测酶解进度,以蛋白质转化率作为酶解评价指标,选取酶解时间 1 h、2 h、3 h、4 h 和 5 h 等 5 个水平。考察酶解反应之后的蛋白转化率。结果见图 5。

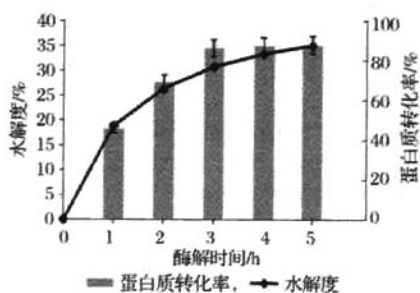


图5 酶解时间对蛋白质转化率的影响

由图 5 可知,随着酶解时间的延长,蛋白质转化率呈上升趋势,且在 3h 后上升趋势变缓。其中,3h 的蛋白转化率已达到 86.39%,3 h、4 h 和 5 h 的蛋白转化率相差不大。通过 pH-Stat 法在线监测酶解进度也可以发现酶解开始之初,反应速率很快,随着时间的延长,反应速率几乎为 0。

这主要是因为酶解之初,底物浓度高,在加酶量一定的情况下,酶解速率高。当蛋白底物逐渐被转化之后,底物被饱和,酶解速率下降。同时,温度使酶蛋白变性是随时间累加的,随着时间的延长,部分酶发生失活也是导致酶解后期速率下降的一个原因。综合水解度合蛋白转化率,试验确定酶解时间为 3 h。

2.2 响应面分析优化碱性蛋白酶水解条件

2.2.1 响应面试验设计与结果

根据单因素分析的试验结果,采用响应面 Box-Benhken 中心组合设计^[9],以蛋白转化率为响应值,考察反应体系中温度、pH 和底物浓度对蛋白转化率的影响。每个因素设计 3 水平,因素水平见表 1,响应面试验设计与结果见下表 2。

试验号 1~12 是析因试验,试验号 13~15 是中心试验。15 个试验点分为析因点和 0 点,其中析因点为自变量取值在 X_1 、 X_2 、 X_3 所构成的三维顶点;0 点为区域的中心点,0 点试验重复 3 次,用以估计试验误差。运用 SAS RSREG 程序对这 15 个试验点的响应值进行回归分析,建立响应面回归模型,分别得到回归方程为:

表 2 响应面分析的试验设计及结果

试验号	因素			蛋白质转化率/%
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	0	69.68 ± 0.61
2	-1	1	0	75.20 ± 0.45
3	1	-1	0	80.13 ± 0.55
4	1	1	0	79.03 ± 0.53
5	0	-1	-1	69.02 ± 0.39
6	0	-1	1	73.78 ± 0.45
7	0	1	-1	78.53 ± 0.36
8	0	1	1	81.41 ± 0.59
9	-1	0	-1	69.14 ± 0.33
10	1	0	-1	80.41 ± 0.60
11	-1	0	1	71.03 ± 0.49
12	1	0	1	80.29 ± 0.56
13	0	0	0	85.25 ± 0.63
14	0	0	0	85.39 ± 0.57
15	0	0	0	84.08 ± 0.66

$$Y_1 = 85.6 - 0.0625 \times X_1 - 1.13125 \times X_2 - 0.67375 \times X_3 - 3.13875 \times X_1 \times X_1 + 0.48 \times X_1 \times X_2 + 1.31 \times X_1 \times X_3 - 0.63625 \times X_2 \times X_2 - 0.0225 \times X_2 \times X_3 - 2.05125 \times X_3 \times X_3。$$

由表 3 可知,方程的 F 值为 15.992 9, $F > F_{0.01(9,5)} = 10.15$,表明方程描述各因子与响应值之间的关系时,因变量与全体自变量之间的线性关系是高度显著的^[10]。

表 3 回归方程的方差分析

来源	SS	DF	MS	F	Pr>F
模型	70.493 3	9	7.832 6	15.992 9	0.003 5
X_1	0.031 3	1	0.031 3	0.063 8	0.810 6
X_2	10.237 8	1	10.237 8	20.904 0	0.006 0
X_3	3.631 5	1	3.631 5	7.415 0	0.041 6
$X_1 \times X_1$	36.375 7	1	36.375 7	74.273 3	0.000 3
$X_1 \times X_2$	0.921 6	1	0.921 6	1.881 8	0.228 5
$X_1 \times X_3$	6.864 4	1	6.864 4	14.016 0	0.013 4
$X_2 \times X_2$	1.494 7	1	1.494 7	3.051 9	0.141 1
$X_2 \times X_3$	0.002 0	1	0.002 0	0.004 1	0.951 2
$X_3 \times X_3$	15.535 9	1	15.535 9	31.721 7	0.002 4
残差	2.448 8	5	0.489 8		
失拟	1.512 2	3	0.504 1	1.076 4	0.051 5
纯误差	0.936 6	2	0.468 3		
总变异	72.942 1	14			

2.2.2 碱性蛋白酶水解条件的优化

从图 6 中可以看出, X_3 (底物浓度)一定时,在选定的条件范围内,蛋白转化率较好的值落在 X_1 (温度)的 0 水平和 X_2 (pH)的负水平上,2 个因素的改变都会引起提取率的降低。

从图 7 中可以看出, X_2 (pH)一定时,在选定的

条件范围内,蛋白转化率较好的值落在 X_1 (温度) 的 0 水平和 X_3 (底物浓度) 的负水平附近,2 个因素的改

变都会引起提取率的降低。

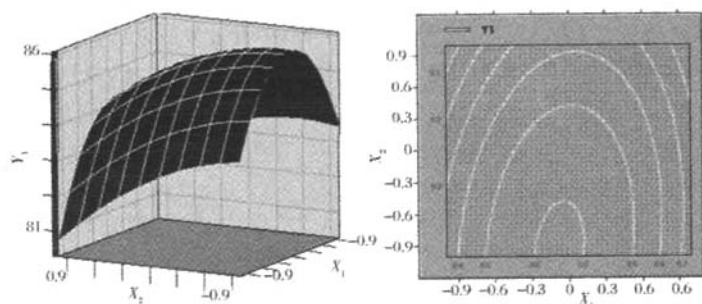


图 6 $Y=f(X_1, X_2)$ 的响应面图和等高线图($X_3=0$)

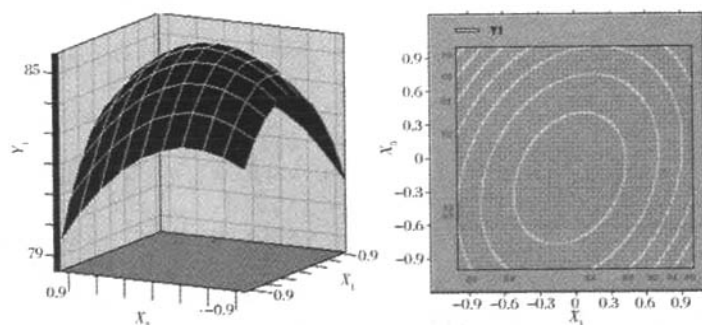


图 7 $Y=f(X_1, X_3)$ 的响应面图和等高线图($X_2=0$)

从图 8 中可以看出, X_1 (温度) 一定时, 在选定的条件范围内, 蛋白转化率较好的值落在 X_2 (pH) 的负

水平和 X_3 (底物浓度) 的零水平附近, 2 个因素的改变都会引起提取率的降低。

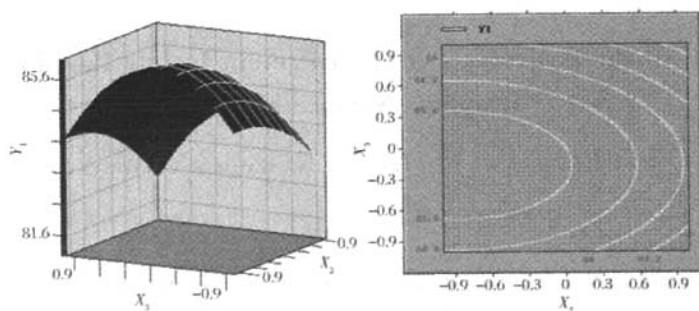


图 8 $Y=f(X_2, X_3)$ 的响应面图和等高线图($X_1=0$)

通过用 SAS 软件分析, 可以看到, 其稳定点在最高点。微分求解上述回归方程可得, $X_1 = -0.13$, $X_2 = -0.93$, $X_3 = -0.20$ 时, Y 有最大值 86.20%, 即当温度为 54.4℃, pH 为 8.54, 底物浓度为 5.6% 时

蛋白转化率最高。

优化条件, 在优化的稳定点进行验证试验, 共进行 3 次重复试验, 测定蛋白含量平均值为 86.57%,

与预测结果接近。

2.3 氨基酸组成对比

将实验所得的玉米低聚肽产品和玉米分离蛋白进行氨基酸组成分析,结果见表4。

表4 玉米分离蛋白与玉米低聚肽的氨基酸组成对比

氨基酸种类	绝对摩尔数比例/%	
	玉米分离蛋白	玉米低聚肽
天门冬氨酸(Asp)	4.88	5.07
苏氨酸(Thr)	2.62	3.06
丝氨酸(Ser)	6.05	5.90
谷氨酸(Glu)	20.85	21.12
甘氨酸(Gly)	1.97	2.95
丙氨酸(Ala)	14.25	13.94
缬氨酸(Val)	3.59	3.97
蛋氨酸(Met)	2.05	2.16
异亮氨酸(Ile)	3.00	3.42
亮氨酸(Leu)	19.56	17.88
酪氨酸(Tyr)	2.85	3.90
苯丙氨酸(Phe)	5.63	4.53
赖氨酸(Lys)	0.18	0.22
组氨酸(His)	1.06	1.13
精氨酸(Arg)	1.18	1.32
脯氨酸(Pro)	9.99	9.24
色氨酸(Trp)	0.17	0.00
胱氨酸(Cys)	0.11	0.19

由表4可知,玉米分离蛋白与玉米低聚肽在氨基酸组成上基本一致,从而说明该种玉米低聚肽的制备工艺在一定程度上保持了玉米蛋白的特定氨基酸模式。

3 结 论

(1) 通过单因素分析和响应面试验设计,确定玉

米低聚肽的制备工艺条件为:加酶量 3 000U/g,底物浓度为 5.6%,温度为 54.4℃,pH 为 8.54,酶解时间 3h,其蛋白转化率达到 86.57%。

(2) 对玉米低聚肽进行氨基酸组成分析,并与玉米分离蛋白进行对比,发现其氨基酸组成基本一致,表明仍保持了玉米蛋白特定的氨基酸模式。

参 考 文 献

- 1 Chiba H, Yoshikawa M. Bioactive peptides derived from food proteins[J]. Kagaku to Seibutsu, 1991, 29: 454~458
- 2 沈蓓英. 玉米蛋白深层次开发[J]. 粮食与油脂, 1998, (3): 39~40
- 3 林峰, 蔡木易, 易维学. 玉米蛋白深加工现状及发展趋势[J]. 食品发酵与工业, 2006, 11(32): 123~127
- 4 Jens Adler-Nissen. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by Trinitrobenesulfonic Acid[J]. J Agric Food Chem, 1979, 27(6): 1 256~1 262
- 5 林 莉, 马 莺. 酶法水解玉米蛋白的研究[J]. 食品工业, 2003
- 6 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002
- 7 黄国清, 李世敏, 刘 冬, 等. 玉米蛋白酶解产物氨基酸组成的测定[J]. 深圳职业技术学院学报, 2004, (4): 25~27
- 8 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003
- 9 Mead R, Pike D J. A Review of Response surface methodology from a biometrics viewpoint[J]. Biometrics, 1975, 31(12): 803~851
- 10 姜 荷, 谷文英. 姬松茸菌丝体粗多糖提取工艺的优化[J]. 生物活性物质分离与提纯, 2005, 7(31): 137~140

Study on the Hydrolysis of Corn Protein Isolate Based on the Response Surface Method

Lin Feng, Cai Muiyi, Gu Ruizeng, Yi Weixue

(China National Research Institute of Food & Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

ABSTRACT Corn Protein Isolate (CPI), a new kind of material with high protein content, is hydrolyzed by proteases to produce corn oligo-peptides. Through the signal factor test and the Response Surface Method, the optimum hydrolyzing conditions have been determined: enzyme dosage 3 000U/g, substrate concentration 5.6%, temperature 54.4℃, pH 8.54, hydrolyzing time 3 hours, and the protein conversion ratio is 86.57%. It is found that the AA content of the corn oligo-peptides are almost consistent with CPIs by the AA analysis, which shows that the corn oligo-peptides maintain the special AA pattern of original corn protein.

Key words CPI, corn oligo-peptides, hydrolysis, response Surface Method, AA analysis.