

响应曲面法优化卵白蛋白 抗氧化肽制备工艺研究

徐明生 戴浩亮 吴少福 杜华英

(江西农业大学 食品科学与工程学院 江西 南昌 330045)

摘要:为优化酶解卵白蛋白制备抗氧化肽的工艺条件。以酶解物羟自由基($\text{HO}\cdot$)清除率为指标,在单因素实验的基础上选取实验因素和水平 根据 Box - Behnken 设计原理采用三因素三水平的响应面分析法,研究底物浓度 酶添加量和水解时间工艺的影响 对酶解条件进行优化研究。结果胃蛋白酶酶解卵白蛋白制备抗氧化肽的最优条件为:底物浓度 3.24%、胃蛋白酶添加量 11 332.12 U/g 蛋白、水解时间 7.8 h。酶解液的羟自由基清除率为 44.20% 与预测值的相对误差为 4.088% ,理论值与预测值基本一致 与模型预测具有较好的拟合性。结论建立的模型在实践中进行预测是可行的。

关键词:响应曲面法;卵白蛋白;酶解;抗氧化肽

中图分类号:TS218. +2 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)03-0589-08

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Ovalbumin for Production of Antioxidant Peptides Using Response Surface Methodology

XU Ming-sheng ,DAI Hao-liang ,WU Shao-fu ,DU Hua-ying

(College of Food Science and Engineering ,JAU ,Nanchang 330045 ,China)

Abstract: In order to optimize enzymolysis conditions for production of antioxidant peptides from egg ovalbumin. Hydroxyl radical scavenging activity was chosen as the response value on the basis of single factor test ,combined with central composite experimental design principle , response surface methodology was used to optimize the technical parameters. The optimum hydrolytic conditions were substrate concentration 3.24% with enzyme concentration of 11 332.12 U/g pro and enzymolysis time of 7.8 h. The maximum scavenging rate of hydroxyl radical was 44.2%. The relative error was 4.088% , and the actual experimental value was basically consistent with the predicted value of the model. The predicted model could reflect actual circumstances well. Their predictive models are feasible in practice.

Key words: response surface methodology; ovalbumin; antioxidant peptides; enzymatic hydrolysis

抗氧化肽属于生物活性肽的一种 不仅具有多肽产品的营养作用 而且具备抗氧化和清除自由基的功能 帮助机体消除多余的自由基 增强人体抗衰老、抗疾病能力。抗氧化肽的主要来源可分为天然抗氧化肽、人工合成抗氧化肽和蛋白水解产生抗氧化肽三类。酶法水解蛋白质生产制备抗氧化肽是获得抗氧化肽的主要途径。近年来 已从大豆蛋白、酪蛋白、鱼皮蛋白等酶解物中获得具有抗氧化肽^[1-5]。

收稿日期:2010-09-07 修回日期:2011-04-20

基金项目:江西省教育厅项目(GJJ98134)

作者简介:徐明生(1963-) 男,博士,教授,主要从事食品科学研究,E-mail: xmsjy@sina.com。

鸡蛋来源丰富,是人们主要的食物营养蛋白,易被人体消化吸收。鸡蛋中的卵白蛋白是鸡蛋蛋白主要蛋白质,它含有 8 种人体所必需的氨基酸,也是获得生物活性肽很好资源。Fujita^[6]将卵白蛋白用胃蛋白酶水解 3 h,用 RP-HPLC 分离出具有血管舒张活性的物质 OA358-365;在胰凝乳蛋白酶酶解物中也分离出 Ovokinin(2-7)和 OA359-364,这二种肽对自发性高血压大鼠具有降压作用^[7]。徐明生的研究发现卵白蛋白酶解物具有强抗氧化活性^[8]。但对卵白蛋白抗氧化肽的研究报道较少,本研究以卵白蛋白为研究对象,以抗氧化活性作为检测指标,研究酶水解过程对抗氧化活性的影响,从而确定生产抗氧化肽的较佳用酶和合适的水解度,为鸡蛋抗氧化肽的生产提供理论依据和工艺参数。

1 材料与方法

1.1 试验材料

卵白蛋白(A5503、纯度 98%) Sigma 公司;胃蛋白酶:P7000 Sigma 公司(实测酶活力 517 080 U/g); α -脱氧核糖, Sigma 公司;三羟甲基氨基甲烷(Tris), amresco 公司;硫代巴比妥酸(TBA):上海化学试剂公司。

1.2 主要仪器

UV-754 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);LXJ-11B 低速大容量多管离心机(厦门精艺兴业科技有限公司);TGL-20M 高速台式冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

1.3 试验方法

配制一定浓度的鸡蛋卵白蛋白溶液,水浴至试验设定的温度,调 pH 至试验设定值,加入反应所需的酶量并低速搅拌。在反应过程中以 1 mol/L 的 NaOH 维持 pH 值恒定,水解至预定时间后,酶解液调 pH7,置沸水浴 5 min 钝化蛋白酶,冷却后在 2 000 g 的离心力条件下离心 10 min,取上清液冻干,置冰箱中待分析用。

1.3.1 酶解时间对卵白蛋白水解的影响 底物浓度 3%,E/S 8 000 U/g 条件下分别水解 0.5,1,2,3,4,5,6 h,取上清液测定酶解物的水解度和羟自由基清除率。

1.3.2 底物浓度对卵白蛋白水解的影响 在 pH 2.0、反应温度为 37 °C,酶和底物之比为 8 000 U/g、反应时间 6 h 的条件下,分别对底物浓度(%) 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 蛋白质溶液进行水解,测定酶解物的 DH 和羟自由基清除率。

1.3.3 酶用量对卵白蛋白水解的影响 配制底物浓度 3% 蛋白质溶液,在 pH 2.0、反应温度 37 °C,分别按酶和底物之比为 4 000 U/g、8 000 U/g、12 000 U/g 加入不同量的酶进行酶解 6 h,测定酶解物的 DH 和羟自由基清除率。

1.3.4 最佳酶解条件的优化 在胃蛋白酶水解卵白蛋白单因素的基础上,进行最适水解条件的优化。采用 Box- Behnken 设计方法,对底物浓度、酶用量和酶解时间设计三因素三水平的响应曲面分析(Response surface methodology, RSM) 试验 3 个因素分别以 x_1 、 x_2 、 x_3 表示,并以 +1、0、-1 分别代表自变量的高、中、低水平,按方程 $z_i = (x_i - x_0) / \Delta x$ 对自变量进行编码。其中 z_i 为自变量的编码值, x_i 为自变量的真实值, x_0 为试验中心点处自变量的真实值, Δx 为自变量的变化步长。根据单因素试验各因素取值范围分别为 2% ~ 4%、6 000 ~ 12 000 μ /g、4 ~ 8 h。以酶解物羟自由基清除率为响应值,重复 2 次,获得的羟自由基清除率的平均值用 Design-Expert 6.0.10 来进行试验统计分析。试验自变量因素编码及水平见表 1。

表 1 试验因素水平及编码
Tab. 1 Code and level of factors chosen for the trials

因子 Factor	代码 Symbol coded		水平 Level		
	编码 Code	非编码 Uncode	-1	0	1
底物浓度/% Substrate amount	z_1	x_1	2	3	4
酶用量/($\mu \cdot g^{-1}$) Enzyme concentration	z_2	x_2	6 000	9 000	12 000
酶解时间/h Reaction time	z_3	x_3	4	6	8

$$z_1 = (x_1 - 3) / 1; z_2 = (x_2 - 9\ 000) / 3\ 000; z_3 = (x_3 - 6) / 2。$$

1.3.5 测定方法 (1) 蛋白质水解度(Degree of hydrolysis, DH)的测定^[9]: 水解度(%) = (氨基态氮/总氮) × 100%。

(2) 总氮测定: 采用微量凯氏定氮法(GB5009.5-2010)。

(3) 氨基氮测定^[10]: 分别吸取 10 mL 不同水解度的水解液于 100 mL 烧杯中加蒸馏水 60 mL, 开动磁力搅拌器, 用 0.050 mol/L 氢氧化钠标准溶液滴定至 pH=8.20 时停止搅拌, 加入甲醛 10 mL(pH=9.20), 用磁力搅拌器混匀, 再用 0.050 mol/L NaOH 滴定至 pH=9.20, 记下加入甲醛后消耗的 0.050 mol/L 氢氧化钠体积(mL), 同时做空白实验。

$$\text{氨基氮含量} = \frac{(V - V_0) \times N \times 0.014}{10} \times 100\%$$

其中: V : 样品耗用氢氧化钠标准溶液毫升数; V_0 : 空白耗用氢氧化钠标准溶液毫升数; N : 氢氧化钠标准溶液摩尔浓度。

(4) 酶解液清除·OH的测定(脱氧核糖法)^[11-12]: 取 0.2 mL(10 mmol/L)的 FeSO₄-EDTA 混合液于具塞试管中, 加入 0.5 mL(10 mmol/L)的 α-脱氧核糖溶液, 然后加入 0.2 mL 一定浓度的酶解液, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH=7.4)定容至 1.8 mL, 再加入 0.2 mL H₂O₂(10 mmol/L), 混匀后置于 37 °C 恒温水浴中反应 1 h, 然后加入 2.8% 三氯乙酸(TCA)溶液 1 mL, 1% 硫代巴比妥酸(TBA)溶液 1 mL, 混匀后置于沸水浴中反应 15 min, 冷却后于 532 nm 处比色测定吸光值为 A , 对照管除不加酶解液外, 其它相同, 所测吸光值为 A_0 , 空白管以磷酸缓冲液调零。清除剂对·OH的清除能力用 SA(Scavenging activity)表示:

$$\text{SA}(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100\%$$

1.3.6 数据统计与分析 所有数据用 Design-Expert6.0.10 和 DPS(V6.55 专业版) 统计软件处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

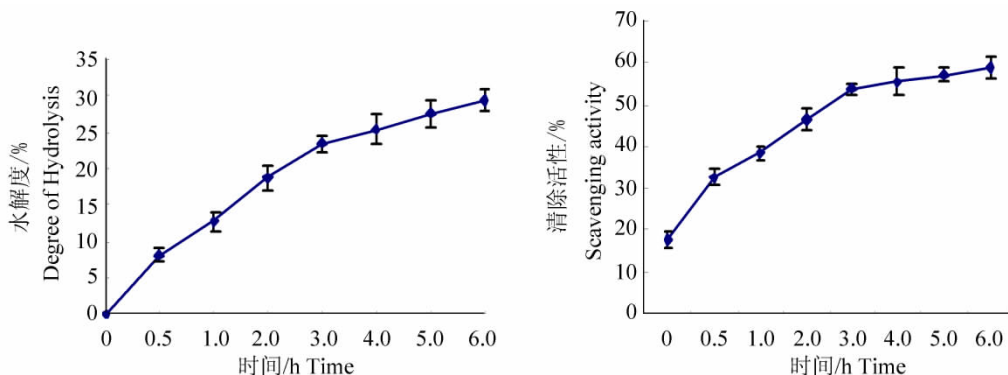


图1 酶解时间对鸡蛋卵白蛋白水解的影响

Fig. 1 Effects of various protease on degree of hydrolysis of ovalbumin

2 结果与分析

2.1 酶解时间对卵白蛋白水解的影响

由图1可见, 卵白蛋白的DH随酶解时间延长而逐渐增大, 酶解最初3h, DH增加较明显, 3h后变缓。因为胃蛋白酶属内切酶, 作用于芳香族氨基酸(Tyr、Typ、Phe)形成的肽键^[13], 因此, DH不可能达到100%。当DH达到一定程度时, 酶对其专一肽键的水解基本完全, 因此, 随水解时间的进一步延长, DH变化不大。另外, 随着酶解反应的进行, 底物浓度减小, 产物浓度增加, 其竞争性抑制变强, 酶活性降低及中间复合物在经历了初始阶段的积累后达到稳态, 趋于恒定。

卵白蛋白经酶水解后, 其抗氧化活性均得到增强, 在最初3h明显提高, 随后上升缓慢。因此, 胃蛋白酶对卵白蛋白水解3h后可得抗氧化能力强的酶解产物。Suesuna等人^[14]利用胃蛋白酶水解酪蛋白, 在pH 2.0, 37 °C, E/S=2%的条件下, 反应进行20h的产物具有强烈超氧阴离子清除能力。同样

利用胃蛋白酶在 39 °C ,E/S = 1% 的条件下反应 18 h ,Hattori 等人^[15] 将不溶性的弹性蛋白转化为具有明显抑制油酸氧化的可溶性抗氧化肽。

2.2 底物浓度对卵白蛋白水解的影响

不同底物浓度对卵白蛋白 DH、酶解物羟自由基清除率的结果如图 2 所示。

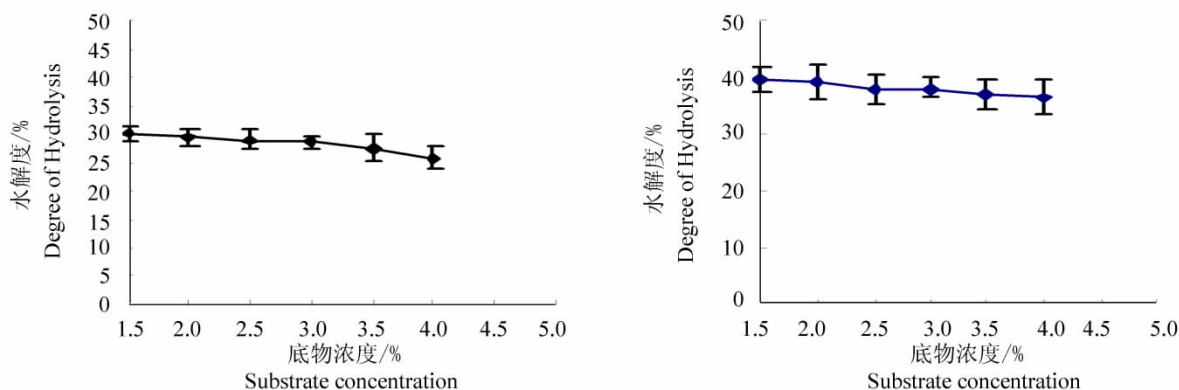


图 2 底物浓度对鸡蛋卵白蛋白水解的影响

Fig. 2 Effect of substrate concentration on ovalbumin hydrolization

由图 2 可见 随着底物浓度的增加 ,DH 和羟自由基清除率缓慢降低 ,可能是由于过高底物浓度易造成水解液粘度增大 ,影响蛋白酶扩散 ,降低水份活度 ,对水解反应有抑制作用。为了提高生产效率可适当增加底物浓度 取值范围为 2% ~ 4% 。

2.3 酶用量对卵白蛋白水解的影响

图 3 显示随着酶量的增加 ,DH 和羟自由基清除率也不断增加 ,当 8 000 u/g 和 12 000 u/g 添加量时 ,DH 和 SA 均极显著高于 ($p < 0.01$) 4 000 u/g 的添加量; 而 8 000 u/g 和 12 000 u/g 之间无显著差异 ($p > 0.05$)。表明酶用量的增加可以增加酶与底物接合的几率 ,从而增强水解程度 ,当酶量增加到一定值后 ,上升趋势平缓。在底物浓度一定的时候 ,理论上讲酶分子越多则酶与底物之间作用越频繁 ,随着酶量的增加 ,酶的数量就趋于过剩 ,单位时间内一部分酶分子不与底物结合 ,造成水解程度增加变缓慢。另外 ,由于酶本身也是一种蛋白质 ,也会发生酶解 ,如果量太大了则会干扰酶解物的组成。另外 ,酶试剂价格较贵 ,过量添加成本较高。因此确定酶解反应的酶浓度为 8 000 ~ 12 000 U/g 蛋白。

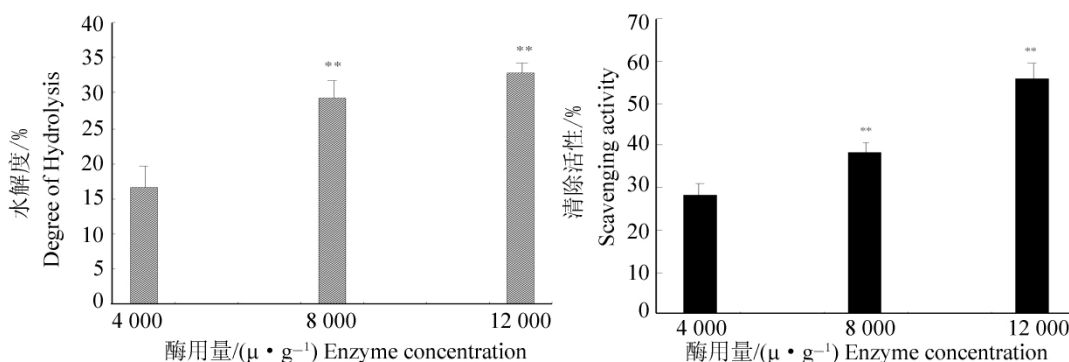


图 3 胃蛋白酶添加量对鸡蛋卵白蛋白水解的影响

Fig. 3 Effects of pepsin concentration on ovalbumin hydrolization

2.4 酶解条件的优化

2.4.1 胃蛋白酶水解鸡蛋卵白蛋白酶解物清除羟自由基试验分析与回归方程建立 采用统计软件 Design - Expert 6.0.10 进行试验设计。优化出来的 17 组试验安排以及试验结果见表 2。为了保证试验结果的科学性 ,按照要求随机挑选组别进行。

对表 2 试验数据进行回归分析 ,得编码值的二次多元回归方程(模型)为:

$$Y = 39.3 - 0.23z_1 + 8.8z_2 + 2.15z_3 - 0.032z_1^2 - 5.6z_2^2 - 0.53z_3^2 + 0.1z_1z_2 + 0.12z_1z_3 - 0.13z_2z_3$$

表2 试验设计及其结果
Tab.2 Experimental designs and results

Std	Run		x_1	x_2	x_3	响应值 Response	
						实测值 Observed response	预测值 Predicted response
11	1	IBFact	3	6 000	8	26.77	26.66
14	2	Center	3	9 000	6	40.07	39.30
4	3	IBFact	4	12 000	6	42.45	42.35
17	4	Center	3	9 000	6	39.10	39.30
3	5	IBFact	2	12 000	6	42.97	42.60
10	6	IBFact	3	12 000	4	39.84	39.95
2	7	IBFact	4	6 000	6	24.17	24.54
12	8	IBFact	3	12 000	8	43.63	44.00
16	9	Center	3	9 000	6	39.73	39.30
8	10	IBFact	4	9 000	8	41.05	40.79
5	11	IBFact	2	9 000	4	36.67	36.93
9	12	IBFact	3	6 000	4	22.45	22.08
13	13	Center	3	9 000	6	38.39	39.30
7	14	IBFact	2	9 000	8	40.99	41.00
6	15	IBFact	4	9 000	4	36.24	36.23
1	16	IBFact	2	6 000	6	25.1	25.2
15	17	Center	3	9 000	6	39.22	39.30

对应的真实值二次多元回归方程(模型)为:

$$Y = -47.5 - 0.709x_1 + 0.014 2x_2 + 2.69x_3 - 0.032 2x_1^2 - 0.000 000 622x_2^2 - 0.133x_3^2 + 0.000 034 2x_1x_2 + 0.061 2x_1x_3 - 0.000 022 1x_2x_3$$

对该模型进行方差分析 结果见表3 模型系数显著性检验见表4。由表3 方差分析可以看出: $F_{模型} = 259.1 > (F_{0.01(9,4)} = 14.66)$ 模型 $P < 0.01$ 表明模型极其显著; $F_{失拟} = 0.59 < (F_{0.05(9,3)} = 8.81)$ 失拟项 $P = 0.655 1 > 0.05$ 模型失拟度不显著。

模型的调整绝对系数 $R^2 = 0.993 2$, 说明该模型能解释 99.32% 响应值的变化, 因该模型拟合程度良好, 试验误差小, 可以用此模型对胃蛋白酶水解鸡蛋卵白蛋白酶解物清除羟自由基进行分析和预测。

从表4 回归方程系数显著性检验可知, 一次项底物浓度 x_1 ($P = 0.306 2$) 不显著、酶浓度 x_2 ($P < 0.000 1$)、酶解时间 x_3 ($P < 0.000 1$) 极显著; 二次项 x_1^2 ($P = 0.912 8$)、 x_3^2 ($P = 0.103 2$) 不显著、 x_2^2 ($P < 0.000 1$) 极显著; 交互项 x_1x_2 ($P = 0.735 5$)、 x_1x_3 ($P = 0.686 9$) 和 x_2x_3 ($P = 0.663 2$) 均不显著。

采用逐步回归分析的方法在剔除了不显著项后得到真实值的优化的回归方程为: $Y = -48.1 - 0.228x_1 + 0.014 1x_2 + 2.68x_3 - 0.000 000 622x_2^2 - 0.133x_3^2$ 。此时回归方程失拟项 $F_{失拟} = 0.31 < (F_{0.05(5,7)} = 3.97)$ 失拟项 $P = 0.914 2 > 0.05$ 失拟度检验不显著, 说明未知因素对试验结果干扰很小; 模型项 $F_{模型} = 682.09 > (F_{0.01(5,4)} = 15.52)$ 模型 $P < 0.01$ 表明拟合检验极显著, 同时决定系数达 0.993 5, 说明该方程与实际情况拟合很好, 较好地反映了酶解物羟自由基清除率与底物浓度、酶用量和酶解时间的关系, 因此所得的回归方程能较好的预测酶解物羟自由基清除率随各参数的变化规律。

x_1 、 x_2 、 x_3 及其交互作用对响应值的影响如图4、图5、图6所示。

图4 为固定水解时间 $x_3 = 6$ h, 不同底物浓度和酶添加量条件下酶解物清除羟自由基的变化情况。在底物浓度 (x_1) 为 2% ~ 4%, 变化步长为 1%; 酶添加量 (x_2) 为 6 000 ~ 12 000 u/g, 变化步长为 3 000 u/g 的等高线图中可以看到: 底物浓度不变, 随着酶添加量的增大, 酶解物清除羟自由基的能力急

表 3 回归模型方差分析
Tab. 3 Analysis of variance (ANOVA) for regression equation

方差来源 Variance source	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	F 比值 F alue	P
模型 Model	792.65	9	88.07	259.1	<0.000 1
z ₁	0.41	1	0.41	1.22	0.306 2
z ₂	619.52	1	619.52	1 822.59	<0.000 1
z ₃	37.15	1	37.15	109.30	<0.000 1
z ₁ ²	0.004	1	0.004	0.013	0.912 8
z ₂ ²	131.91	1	131.91	388.08	<0.000 1
z ₃ ²	1.19	1	1.19	3.51	0.103 2
z ₁ z ₂	0.042	1	0.042	0.12	0.735 5
z ₁ z ₃	0.06	1	0.06	0.18	0.686 9
z ₂ z ₃	0.070	1	0.070	0.21	0.663 2
残差 Residual	2.38	7	0.34		
失拟 Lack of fit	0.73	3	0.24	0.59	0.655 1
误差 Error	1.65	4	0.41		
总和 Total	795.03	16			
模型的绝对系数 R ² R - squared				0.997 0	
模型的调整绝对系数 Adj - R ² adj. R - squared				0.993 2	

表 4 回归模型系数显著性检验
Tab. 4 Test of significance for regression coefficient

系数项 Coefficient	系数估计值 Coefficient estimate	自由度 df	标准差 Standard error	95% 置信度的置信区间		P
				低端值 Low	高端值 High	
截距 B ₀	39.30	1	0.26	38.69	39.92	<0.000 1
B ₁	-0.23	1	0.21	-0.71	0.26	0.306 2
B ₂	8.80	1	0.21	8.31	9.29	<0.000 1
B ₃	2.15	1	0.21	1.67	2.64	<0.000 1
B ₁₁	-0.032	1	0.28	-0.70	0.64	0.912 8
B ₂₂	-5.60	1	0.28	-6.27	-4.93	<0.000 1
B ₃₃	-0.53	1	0.28	-1.20	0.14	0.103 2
B ₁₂	0.10	1	0.29	-0.59	0.79	0.735 5
B ₁₃	0.12	1	0.29	-0.57	0.81	0.686 9
B ₂₃	-0.13	1	0.29	-0.82	0.56	0.663 2

剧增加,即 y 值随之增加;酶添加量不变,随着底物浓度的增大, y 值随之减小,但变化梯度较小。

图 5 为固定酶添加量 x₂ = 9 000 u/g,不同水解时间和不同底物浓度条件下酶解物清除羟自由基的变化情况。在底物浓度(x₁)为 2% ~ 4%,变化步长为 1%;水解时间(x₃)为 4 ~ 8 h,变化步长为 2 h 的等高线图中可以看到:底物浓度不变,随着水解时间的延长,酶解物清除羟自由基的能力急剧增加,即 y 值增加,变化梯度大;水解时间不变,随着底物浓度的增大, y 值随之减小,但变化梯度较小。

图 6 为固定底物浓度 x₁ = 3%,不同酶添加量和不同水解时间的酶解物清除羟自由基的变化情况。在酶添加量(x₂)为 6 000 ~ 12 000 u/g,变化步长为 3 000 u/g;水解时间(x₃)为 4 ~ 8 h,变化步长为 2 h 的等高线图中可以看到:水解时间不变,随着酶添加量的增大,酶解物清除羟自由基的能力急剧增加,即 y 值随之增加,变化梯度较大;酶添加量不变,随着水解时间的增大, y 值随之增加,变化梯度较小。

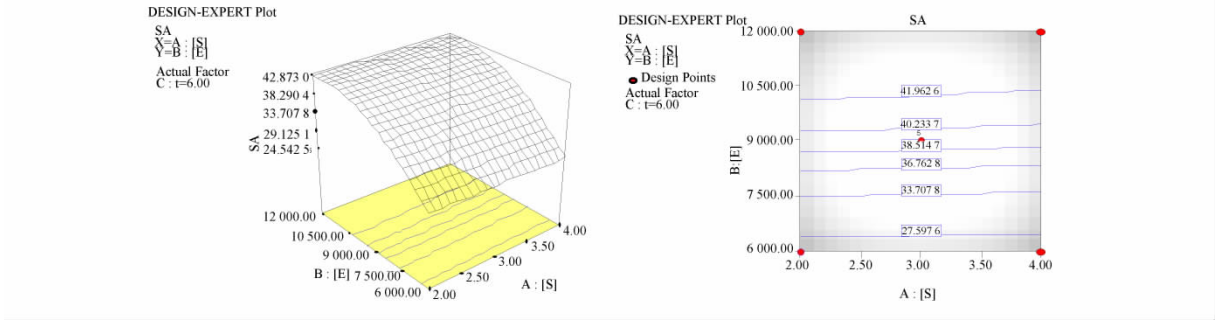


图 4 酶解物羟自由基清除率与底物浓度和酶添加量的响应面分析

Fig. 4 Response surface plot for hydroxyl radical (HO·) scavenging rate as a function of substrate concentration and enzyme amount

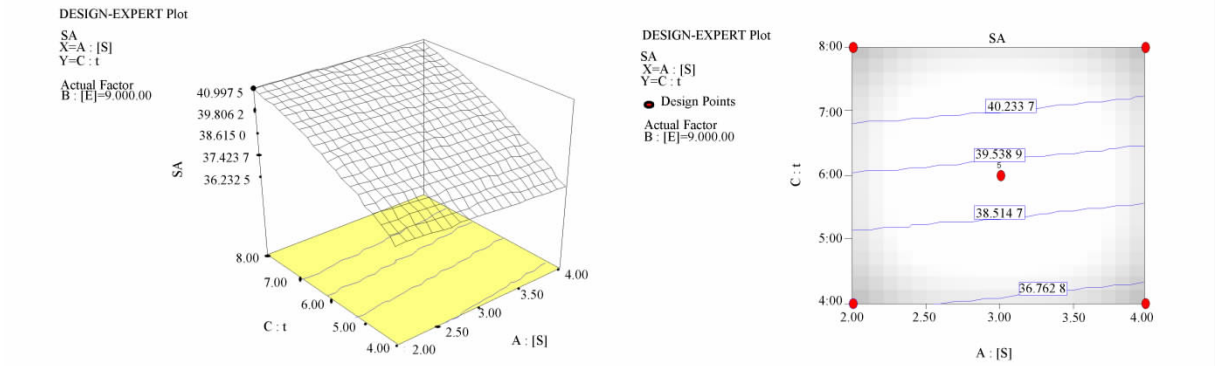


图 5 酶解物羟自由基清除率与水解时间和底物浓度的响应面分析

Fig. 5 Response surface plot for hydroxyl radical (HO·) scavenging rate as a function of reaction time and substrate concentration

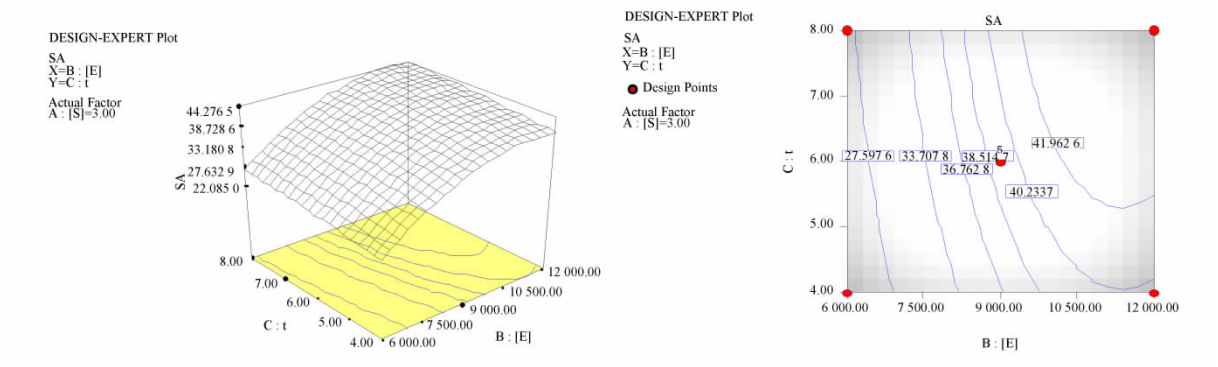


图 6 酶解物羟自由基清除率与酶添加量和水解时间响应面分析

Fig. 6 Response surface plot for hydroxyl radical (HO·) scavenging rate as a function of enzyme amount and reaction time

可以看出,在试验水平范围内各因素对酶解物清除羟自由基的能力影响由大到小依次是酶添加量、水解时间、底物。

2.4.2 胃蛋白酶水解鸡蛋卵白蛋白工艺条件的优化和回归模型的检验 为了确保在以上 17 组试验基础上所建回归模型的准确性,并且优化出若干组具有较好清除羟自由基的能力的工艺参数。首先用上述回归模型预测优化出 10 组羟自由基清除率≥40% 的工艺参数,再按照 10 组优化工艺参数进行试验验证,利用统计软件 DPS 进行分析,结果见表 5。

由表 5 可以看出,回归模型预测优化出 10 组羟自由基清除率≥40% 的 3 种自变量参数(即工艺参数)取值范围是:底物浓度 x_1 为 2.22% ~ 3.76% 酶添加量 x_2 为 8 738.24 ~ 11 176.63 u/g,水解时间 x_3 为 4.05 ~ 7.77 h。

表 5 回归模型所优化的 10 组响应预测值 ≥40% 的酶解工艺参数以及验证结果

Tab.5 Verified results of hydrolization parameters of optimum ten groups from regression equation with the predicted response value more than 40%

试验号 Order	自变量 Variable			响应值 Response		相对误差 /% Relatively error
	$x_1 / \%$	$x_2 / (u \cdot g^{-1})$	x_3 / h	预测值(≥40%) Predicted response	试验值 Observed response	
1	3.32	10 468.02	4.29	40.000 1	42.53	6.33
2	2.72	9 500.73	5.40	39.999 6	43.25	8.12
3	2.31	8 957.29	6.72	39.998 8	37.36	6.60
4	3.76	11 176.63	4.05	40.000 2	40.58	1.45
5	2.22	9 449.11	5.42	39.998 9	41.14	2.85
6	3.17	9 099.31	6.44	39.999 5	39.42	1.45
7	2.17	8 921.75	6.83	40.001 6	41.76	4.40
8	2.86	8 772.61	7.58	39.998 5	40.38	0.95
9	2.92	8 738.24	7.77	40.001 3	38.96	2.60
10	3.45	9 973.34	4.81	39.999 0	42.45	6.13

按照上述 10 组酶解工艺参数进行水解验证实验,结果证明:实现了酶解物羟自由基清除率 y 值 ≥40% 的目标,平均相对误差为 4.088;已建立的回归模型准确可行,可以用来预测底物浓度为 2% ~4% ,酶添加量为 6 000 ~12 000 u/g ,水解时间为 4 ~8 h 范围内以及附近取值的胃蛋白酶酶解工艺参数。

在选取的各因素范围内,根据回归模型,通过 Design Expert 软件分析得出,胃蛋白酶水解鸡蛋卵白蛋白最佳工艺条件为:底物浓度 3.24%、酶添加量 11 332.12 u/g、水解时间 7.80 h,羟自由基清除率的预测值为 44.20。

3 结 论

采用回归设计建立胃蛋白酶水解卵白蛋白的回归方程 $Y = -48.1 - 0.228x_1 + 0.0141x_2 + 2.68x_3 - 0.000000622x_2^2 - 0.133x_3^2$ 。该方程能较好地预测酶解物羟自由基清除率随各参数的变化规律。通过响应曲面分析优化得到胃蛋白酶水解鸡蛋卵白蛋白最佳工艺条件为:底物浓度 3.24%、酶添加量 11 332.12 u/g、水解时间 7.80 h,此条件下卵白蛋白酶解物羟自由基清除率达到 44.20%。

参考文献:

[1]Chen H M , Muramoto K , Yamauchi F , et al. Antioxidative properties of histidine - containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a sobean protein[J]. J Agric Food Chem ,1998 46(1) : 49-53.

[2]Kim S K , Kim Y T , Byun H G , et al. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska Pollack skin[J]. J Agric Food Chem ,2001 49: 1984 - 1989.

[3]荣建华, 李小定, 谢笔钧. 大豆肽抗氧化效果的研究[J]. 食品科学 2002 23(11) : 118-120.

[4]牛瑞, 孙谧, 于建生, 等. 扇贝裙边酶解制备抗氧化肽的实验研究[J]. 中国水产科学, 2011 18(1) : 214-221.

[5]Hu M , McClements D J , Decker E A. Lipid oxidation in corn oil - in - water emulsions wtabilized by casein , whey protein isolate , and soy protein isolate[J]. J Agric Food Chem ,2003 51(6) : 1696-1700.

[6]Fujita H , Sasaki R , Yoshikawa M. Potentiation of the antihypertensive activity of orally administered ovokinin , a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin , by emulsification in egg phosphatidylcholine[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry ,1995 59(12) : 2344-2345.

[7]Matoba N , Usui H , Fujita H , et al. A novel anti - hypertensive peptide derived from ovalbumin induces nitric oxide - mediated vasorelaxation in an isolated SHR mesenteric artery[J]. FEBS Letters ,1999 452(3) : 181-184.

[8]Xu M S , Shanguan X C , Wang W J , et al. Antioxidative activity of hen egg ovalbumin hydrolysates[J]. Asia Pac J Clin Nutr 2007 16: 178-182.

(下转第 607 页)

and Agri-cultural ,2003 83:624 - 629.

- [4]许玲玲,李群力,麻佳蕾.微波萃取法萃取鲜姜有效成分6-姜酚的工艺研究[J].现代食品科技,2009,25(6):620-621,332.
- [5]宣伟东,卞俊.生姜化学成分的研究[J].中草药,2008,39(11):1616-1619.
- [6]余珍,张荣平,吴曙光等.姜的辣味成分分析[J].昆明医学院学报,2010,22(4):57-60.
- [7]葛毅强,倪元颖,张振华等.新技术在生姜、大蒜、洋葱深加工中的应用[J].中国调味品,2003(8):7-13.
- [8]阎东海.不同产地及不同规格生姜的含水率比较[C].第六届中国药学会学术年会论文集,2006:2150-2153.
- [9]GB/T 12729.6-2008.香辛料和调味品水分含量的测定(蒸馏法)[G].北京:中国标准出版社,2008.
- [10]陆婉珍.现代近红外光谱分析技术[M].2版.北京:中国石化出版社,2006:35.
- [11]李璞.近红外检测技术对药品中水分进行快速测定的研究[J].中国医药导报,2009,35(6):22-24,29.
- [12]范维燕,邢邯,林家永,等.近红外光谱快速测定稻谷水分含量的研究[J].粮油食品科技,2008,16(5):49-52,69.
- [13]金华丽,卞科.近红外光谱法检测小麦粉中的水分含量[J].中国粮油学报,2010,25(8):109-112.
- [14]冯军勤,周誉昌,吕华,等.运用近红外漫反射光谱技术检测中药水分含量[J].大众科技,2006(2):46-47.
- [15]于千桂.脱水姜片的加工工艺[J].保鲜与加工,2010(5):25.

(上接第596页)

- [9]Mahmoud M L, Malone W I, Cordle C T. Enzymatic hydrolysis of Casein. Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties[J]. J of Food Sci, 1992, 57(5): 1223-1229.
- [10]宁正祥.食品成分分析手册[M].北京:中国轻工业出版社,1998:120-121.
- [11]李琳,赵谋明.鳙鱼蛋白酶解液清除自由基的研究[J].水产科学,2005,24(10):15-18.
- [12]Chung S K, Osawa T, Kawakishi S, Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from Brown Mustard (Brassica nigra) [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1997, 61: 118-123.
- [13]姚焕章.食品添加剂[M].北京:中国物资出版社,2001:251-256.
- [14]Kunio Suetsuna, Hiroyuki Ukeda, Hirotauo Ochi. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides from casein[J]. J of Nutritional biochemistry, 2000, 11(3): 128-131.
- [15]Makoto Hattori, Kaori Yamaji - Tsukamoto, Hiroto Kumagai, et al. Antioxidative activity of soluble elastin Peptides[J]. J Agric Food Chem, 1998, 46: 2167-2170.