

响应面优化南极磷虾蛋白酶解工艺及蛋白肽组分分析

刘云姣^{1,2}, 张海燕², 刘淑晗^{1,2}, 汪宇^{1,2}, 韩峰², 孔聪², 王媛², 张璇², 沈晓盛²

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306) (2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘要: 以南极磷虾蛋白酶解液中的氨基氮含量为指标, 采用甲醛电位滴定法测定胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶、风味蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶 6 种生物酶在其最适酶解条件下对南极磷虾蛋白酶解效果, 筛选出酶解南极磷虾蛋白最佳生物酶。在单因素试验基础上, 以酶解液中氨基氮含量为响应值, 选择酶解温度、时间、pH 为自变量, 通过三因素三水平 Box-Bohnken 响应面分析法对筛选出来的生物酶解工艺进行优化。在优化酶解工艺的基础上, 利用 SDS-PAGE 凝胶电泳方法分析南极磷虾酶解蛋白肽及南极磷虾蛋白的分子量分布范围。结果表明: 胰蛋白酶为酶解南极磷虾蛋白的理想蛋白酶; 响应面分析法建立二次多项回归方程: $Y=51.07-0.83A+1.72B-2.06C+0.25AC+1.15BC-3.06A^2-2.77B^2-3.69C^2$, 模型 $p<0.0001$, 而失拟项 $p>0.05$, 表明模型极显著且比较稳定, 通过模型分析得最佳条件: 酶解温度 44.48 °C、酶解时间 8.52 h、pH 7.88, 考虑实际应用可行性, 我们在酶解温度 45.0 °C、酶解时间 8.5 h、pH 7.9 条件下实验得到的氨基氮含量为 50.96±1.07 mg/g, 与理论预测值 51.57 mg/g 基本一致。通过电泳分析得到南极磷虾蛋白分子量范围在 15 ku 以上, 主要集中在分子量范围 15 ku~45 ku; 胰蛋白酶解多肽分子量在 25 ku 以下, 主要分子量分布在 5 ku 以下。

关键词: 南极磷虾; 甲醛电位滴定法; 生物酶; 响应面法; SDS-PAGE

文章编号: 1673-9078(2019)01-144-151

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.1.021

Response Surface Optimization of Proteolytic Process and Protein Peptide Composition Analysis of Antarctic Krill

LIU Yun-jiao^{1,2}, ZHANG Hai-yan², LIU Shu-han^{1,2}, WANG Yu^{1,2}, HAN Feng², KONG Cong², WANG Yuan², ZHANG Xuan², SHEN Xiao-sheng²

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

(2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

Abstract: The amino nitrogen content in the antarctic krill hydrolysate was used as an indicator. The hydrolysis results of trypsin, papain, alkaline protease, pepsin, flavor protease and subtilisin were evaluated by formaldehyde potentiometric titration. The enzymatic hydrolysis of Antarctic krill protein was optimized for the enzymatic hydrolysis of Antarctic krill. On the basis of single factor experiment, the amino acid content in the enzymatic hydrolysate was used as the response value, and the enzymatic hydrolysis temperature, time and pH were selected as independent variables. The three-factor and three-level Box-Bohnken response surface analysis method was used to screen the bio-enzymatic solution. The process is optimized. Based on the optimized enzymatic hydrolysis process, the molecular weight distribution range of Antarctic krill enzymatic protein peptide and Antarctic krill protein was analyzed by SDS-PAGE gel electrophoresis. The results showed that trypsin was the ideal protease for enzymatic hydrolysis of Antarctic krill protein; the response surface analysis method was used to establish a quadratic multiple regression equation: $Y=51.07-0.83A+1.72B-2.06C+0.25AC+1.15BC-3.06A^2-2.77B^2-3.69C^2$, the model $p<0.0001$, and the missing term $p>0.05$, indicating that the model is extremely significant and stable, the best condition obtained by model analysis is: Enzymatic hydrolysis temperature was 44.48 °C, the enzymatic hydrolysis time was 8.52 h, and the pH was 7.88. Considering the practical application feasibility, the amino nitrogen content of the experiment was 50.96±1.07 mg/g under the conditions of enzymatic hydrolysis temperature of 45.0 °C, hydrolysis time of 8.5 h and pH 7.9, which is basically consistent with the theoretical prediction value of 51.57 mg/g. The molecular

收稿日期: 2018-09-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31471672); 上海市自然科学基金项目 (17ZR1439400); 中央级公益性科研院所基本科研业务费 (1893-Z)

作者简介: 刘云姣 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 南极磷虾质量安全

通讯作者: 沈晓盛 (1977-), 男, 副研究员, 研究方向: 南极磷虾质量安全

weight of Antarctic krill protein was over 15 ku by electrophoresis analysis, and the main molecular weight range was 15 ku~45 ku. The molecular weight of trypsin peptide was below 25 ku, and the main molecular weight distribution was below 5 ku.

Key words: Antarctic krill; formaldehyde potentiometric titration; biological enzyme; response surface methodology; SDS-PAGE

南极磷虾蛋白丰富,且资源量巨大,被认为是21世纪重要的后备蛋白资源库^[1,2],其开发与利用已成为我国海洋战略性新兴产业发展的重要载体。但由于南极磷虾捕捞成本高、加工运输要求严格以及自溶酶、高氟含量的存在,南极磷虾优质蛋白并未得到深入研究和高值化利用,故寻求有效的蛋白提取技术对南极磷虾蛋白分析及今后资源开发具有重要意义。目前应用于南极磷虾蛋白提取技术主要为等电促溶促沉技术(ISP)^[3,4],该方法简易、成本低、回收蛋白质量高,但蛋白提取率低,不到蛋白总量59%;廖鄂等^[5]也通过多级逆流技术提取南极磷虾蛋白,此法通过多次提取保证提取效果,同时节约水量,但是方法过于繁杂,较一次提取费时费力;郭静等^[6]研究了南极磷虾蛋白的碱提取工艺,并通过正交试验获得最佳提取工艺,此法提取工艺简单,蛋白提取率可达69%,但会对环境造成一定损害,且不适用于食品工业生产。随着科学研究进步,酶解法、微生物发酵法等成为研究南极磷虾蛋白的热点,酶解法操作条件比较温和,蛋白得率高蛋白回收率可达80%以上^[7],酶解后的残渣可以回收利用,安全无害,可用于食品工业生产,此外有研究表明小分子肽具有更高活性,且更易被人体吸收利用^[8],故近年来,利用酶法制备南极磷虾多肽再进行加工利用成为开发南极磷虾资源新趋势,目前已有较多通过生物酶法来提取海洋生物活性肽^[9-11]和生物酶法优化磷虾蛋白酶解液脱氟工艺的报道^[12-14]。由于南极磷虾氟含量很高,而人们对其蛋白中氟的研究主要集中在含量和形态方面,通过生物酶法制备的南极磷虾酶解液也多用于化学反应脱氟工艺上,虽然近年来对南极磷虾肽的氨基酸组成也有部分研究,但对氟与磷虾蛋白肽分子量结合范围乃至氨基酸结合结构考察较少^[15],故本文研究了六种生物酶对南极磷虾的酶解效果,并筛选出胰蛋白酶为酶解南极磷虾最佳生物酶,在单因素试验基础上,采用响应面法优化得到南极磷虾在最佳酶解工艺,通过电泳得到南极磷虾胰蛋白酶解肽与南极磷虾蛋白的分子量大致范围,目的为今后南极磷虾蛋白肽的分离纯化、探究氟与蛋白肽分子量结合范围、氨基酸结合结构、结合形式打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验原料

南极磷虾冷冻干燥后制成的虾粉。

1.1.2 酶制剂

碱性蛋白酶(≥ 200000 U/g)、胃蛋白酶(≥ 250 U/mg)均购于北京索莱宝科技有限公司;风味蛋白酶(≥ 20 U/mg)和枯草杆菌蛋白酶(≥ 400000 U/g)购于上海源叶生物科技有限公司;胰蛋白酶(≥ 50000 U/g)、木瓜蛋白酶(≥ 6000 U/mg)购于国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 主要试剂

SDS-PAGE 凝胶电泳试剂:考马斯亮蓝 G-250、30% PAA (29:1)、40% PAA (19:1)、十二烷基硫酸钠(SDS)、N-三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、二硫苏糖醇(DTT)、10% PAGE 胶凝固剂(10% APS)、PAGE 胶促凝剂(TEMED)均购于北京索莱宝科技有限公司;乙二醇(电泳级)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;甲醛、盐酸、氢氧化钠等其他试剂均为国产分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器与设备

SHZ-88A 往复式水浴恒温振荡器,太仓市实验设备厂;ST320-pH计,奥豪斯仪器(常州)有限公司;16RX II 高速冷冻离心机,日本 HITACHI CF 公司;PoeerPac TM 多用电泳仪,美国 BIO-RAD;HETO Power Dry LL 1500 冷冻干燥机,美国 Thermo 公司;Milli-Q 超纯水机,美国 Millipore 公司;碱式滴定管,海门市台联玻璃仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 氨基氮含量的测定

参考文献^[16,17]采用甲醛电位滴定法,取15 mL 酶解液,用0.05 M 氢氧化钠标准溶液调pH至8.2,加入5 mL 甲醛,再用0.05 M 氢氧化钠标准溶液滴定至pH 9.2,记录氢氧化钠消耗量 V_1 。用水做空白对照,记录氢氧化钠消耗量 V_2 ,由以下公式计算氨基氮的质量分数:

$$X(\text{mg/g}) = \frac{(V_1 - V_2) \times C \times 14 \times (50/15)}{0.2}$$

注: X-氨基氮的质量分数, mg/g; C-NaOH 的质量摩尔浓度; V_1 、 V_2 -氢氧化钠消耗的体积。

1.3.2 生物酶解效果实验

以冷冻干燥后的整虾粉为原材料,选取胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶六种生物酶在各个酶最适酶解条件下进行酶解(水解条件如表1),将酶解液于100℃下加

热10 min,终止酶解反应,冷却至室温,于离心机8000 r/min条件下5℃离心10 min,收集上清液,以酶解液中氨基氮含量为指标,采用甲醛电位滴定法测定各酶解液中氨基氮含量,比较各个酶的酶解效果。

表1 生物酶的酶解条件

Table 1 Enzymatic conditions of biological enzymes

酶种类	酶底浓度/%	最适温度/℃	酶解时间/h	最适 pH
胰蛋白酶	8%	50	8	8.0
木瓜蛋白酶	8%	55	8	6.0
碱性蛋白酶	8%	50	8	10.0
胃蛋白酶	8%	37	8	2.0
风味蛋白酶	8%	55	8	7.0
枯草蛋白酶	8%	55	8	8.5

表2 凝胶的制备

Table 2 Gel configuration

组分	分离胶(15%)	浓缩胶(5%)
40% PAA (19:1)	1.875 mL	/
40% PAA (29:1)	/	0.500 mL
4X 凝胶缓冲液	1.250 mL	1.000 mL
乙二醇(电泳级)	1.825 mL	/
DdH ₂ O	/	2.500 mL
10% APS	0.050 mL	0.030 mL
TEMED	0.005 mL	0.006 μL

1.3.3 单因素实验

以筛选出来的生物酶对南极磷虾粉进行酶解,酶解基础条件:虾粉 0.2 g,酶底浓度 8.0%,温度 45.0℃,pH 8.0,酶解 8.0 h,定容至 50 mL。各因素梯度:温度:35.0℃、40.0℃、45.0℃、50.0℃、55.0℃;时间:4.0 h、6.0 h、8.0 h、10.0 h、12.0 h、14.0 h;pH:7.0、7.5、8.0、8.5、9.0;酶底浓度:4.0%、6.0%、8.0%、10.0%、12.0%、14.0%。反应结束后,100℃灭酶10 min,8000 r/min离心10 min,取上清液测定 ANN 含量。

1.3.4 响应面实验设计

选择单因素实验中对酶解度有显著影响的三因素,根据 Box-Behnken 进行实验设计,以酶解液中氨基氮含量为响应值,取-1、0、1 代表变量三水平,并对实验数据进行多项式回归分析,建立二次响应面分析模型,拟合得到二次回归方程。共进行 17 个实验,每个实验 3 平行,其中 5 个实验为零点,用于估算误差,12 个为析因点,实验结果表示为平均值±标准差。

1.3.5 SDS-PAGE 电泳分析

1.3.5.1 marker 的选取

参考相关文献^[15,18],南极磷虾蛋白酶解肽分子量范围主要在 1~100 ku 之间,故本实验选择生工型号为 C610016 的 Marker。

1.3.5.2 电泳凝胶的制备

本实验选取生工型号为 C610016 Marker 的最佳凝胶浓度即分离胶为 15%,浓缩胶浓度为 5%进行实验,具体配置如表 2。

1.3.5.3 染色方法的选取

本实验通过查阅资料以及参考相关文献^[19]蛋白染色方法,本实验对南极磷虾大分子蛋白采用染色方便的考马斯亮蓝染色法,对胰蛋白酶解肽采用染色灵敏度高,显现性好的银染色法,具体参考福因德生物科技 Tricine-SDS-PAGE Portocol (中文版)蛋白染色方法。

1.3.5.4 电泳条件

将适量样品溶于 2XTricine 蛋白上样缓冲液(1:1),用移液枪分别量取 5 μL marker 和蛋白样品加入点样孔,80 V 电泳 30~60 min 左右,待指示前沿到达分离胶上沿时,将电压调至 120 V,待指示前沿至分离胶 3/4 位置时停止电泳。

1.4 数据分析

实验数据采用 Design-Expert 7.0.0、Excel 97-2003 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同生物酶对南极磷虾蛋白的酶解效果

以酶解液中氨基氮含量为指标,6 种生物酶的酶解效果如图 1 所示,胰蛋白酶水解得到的酶解液中氨基氮含量最高,可达到 49.36 mg/g,碱性蛋白酶酶解效果次之,胃蛋白酶酶解液氨基氮含量最低,仅有 20.42 mg/g,因此本实验选取胰蛋白酶为酶解南极磷虾蛋白的理想生物酶。

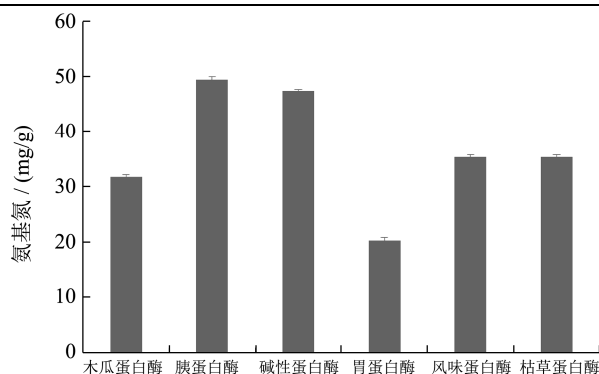


图1 不同生物酶对南极磷虾蛋白的酶解效果

Fig.1 Enzymatic hydrolysis effect of different biological enzymes on Antarctic krill protein

2.2 单因素实验结果

2.2.1 酶底浓度对南极磷虾蛋白酶解效果的影响

由图2可知,酶底浓度由4.0%逐渐增大至8.0%过程中,酶解液中氨基氮含量从45.15 mg/g逐渐增大到最大值49.59 mg/g,继续增大酶底浓度至12.0%,氨基氮含量在最大值呈稳定趋势,当持续增加酶底浓度至14.0%,酶解液中氨基氮含量开始呈现下降趋势。这是因为底物一定时,随着酶量的增多,底物与酶的接触机会增多,酶促反应逐渐增强,当酶底物浓度达到饱和时,酶促反应速率达到最大值,之后增大酶底浓度会有一段平稳期,即达到酶促反应的零级反应,若持续增大酶用量,体系流动性会变差,影响分子的扩散运动,反应速率反而会呈现下降趋势^[20],故选择最佳酶底浓度为8.0%。

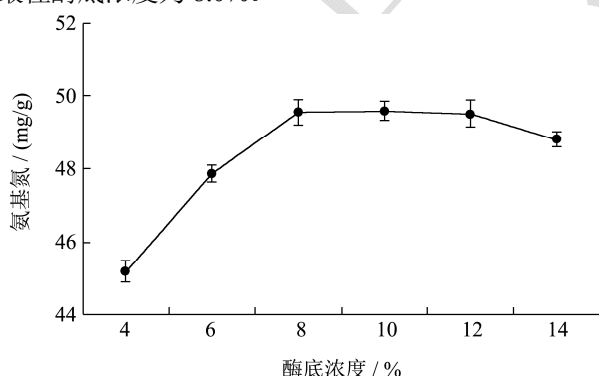


图2 酶底浓度对南极磷虾蛋白酶解效果的影响

Fig.2 Effect of enzyme concentration on the proteolytic effect of Antarctic krill

2.2.2 酶解温度对南极磷虾蛋白酶解效果的影响

如图3所示,在35.0℃~45.0℃范围内,氨基氮含量从46.61 mg/g逐渐升高到最高值49.91 mg/g,当温度超过45.0℃时,随着温度的升高,氨基氮含量持

续下降,当到达55.0℃时,氨基氮含量下降到42.93 mg/g。这是因为在一定温度范围内,随温度的升高,酶的活性增强,酶促反应加快,当温度达到最佳酶促反应温度时,酶解速率也达到最大值,而后继续升高温度,酶的活性降低、天然构象破坏而导致酶变性,使其永久性失活,从而使酶解速率降低^[21]。因此,选择最佳酶解温度为45.0℃。

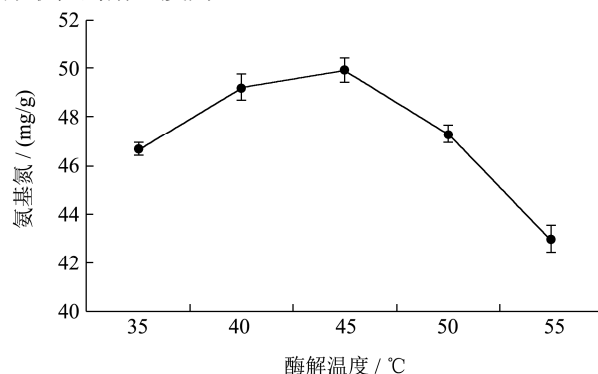


图3 酶解温度对南极磷虾蛋白酶解效果的影响

Fig.3 Effect of enzymatic hydrolysis temperature on proteolytic effect of Antarctic krill

2.2.3 酶解时间对对南极磷虾蛋白酶解效果的影响

由图4可知,在4.0h~8.0h范围内,随着酶解时间延长,酶解液中氨基氮含量从43.72 mg/g逐渐增大到49.56 mg/g,之后8.0h~12.0h范围内,随着时间延长酶解变化不明显,当酶解时间达14.0h时,酶解液氨基氮含量略微下降。这是因为随着反应的进行,酶与底物逐渐结合,催化反应向正方向进行,当酶的活性部位与底物结合达到饱和时,反应趋向于平衡,但持续增大反应时间,酶解产物浓度增加,竞争性抑制作用变强,而新生成的小分子肽、氨基酸等产物容易发生副反应,故酶促反应开始下降^[21],考虑到工业生产效率和能耗问题,因此选择最佳酶解时间为8.0h。

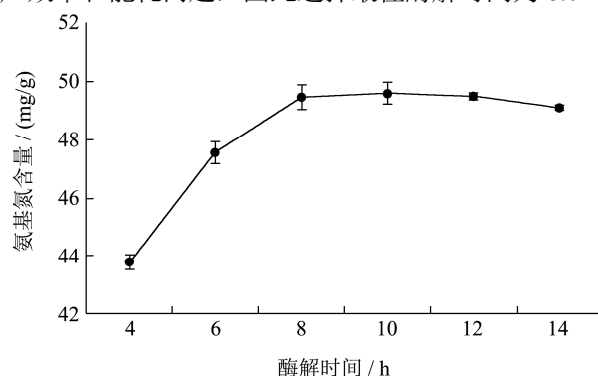


图4 酶解时间对对南极磷虾蛋白酶解效果的影响

Fig.4 Effect of enzymatic hydrolysis time on proteolytic effects of Antarctic krill

2.2.4 初始 pH 对对南极磷虾蛋白酶解效果的

影响

如图 5 所示, 在 pH 7.0~8.0 范围内, 酶解液中氨基酸含量从 45.41 mg/g 逐渐升高到 49.40 mg/g, 水解度达到最大值, 之后继续增大至 pH 为 9.0, 酶解液中氨基酸含量迅速下降至 42.76 mg/g。这是因为酶作为一种特殊蛋白质, 其酶促反应速率与 pH 关系密切, 当 pH 达到某一值时, 酶活性最高, 酶促反应速率最大, 当 pH 高于或低于这一值时, 酶的天然构象和酶与底物的解离状态会受到影响, 进而影响酶的稳定性、抑制酶的活性甚至失活^[22], 因此选择最佳 pH 为 8.0。

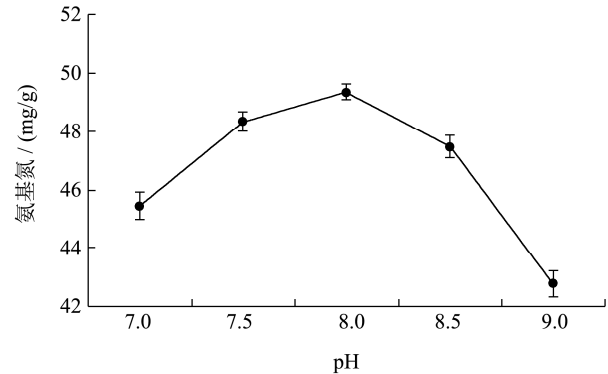


图 5 初始 pH 对对南极磷虾蛋白酶解效果的影响

Fig.5 Effect of initial pH on the proteolytic effect of Antarctic krill

2.3 响应面结果分析

2.3.1 响应面因素水平设计

根据单因素实验结果, 筛选出对酶解度有显著影响的三因素 (A: 酶解温度、B: 酶解时间、C: 初始 pH), 进行因素与水平设计, 见表 3。

表 3 响应面试验因素水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A(酶解温度/℃)	40	45	50
B(酶解时间/h)	6	8	10
C(初始 pH)	7.5	8	8.5

表 4 响应面设计方案及结果

序号	因素			氨基酸含量/(mg/g)
	A	B	C	
1	1	-1	0	42.85
2	0	0	0	51.01
3	0	0	0	50.72
4	0	0	0	51.01
5	0	-1	1	39.63
6	1	1	0	46.59
7	0	1	-1	47.30
8	0	1	1	45.76
9	1	0	-1	46.06
10	-1	0	1	43.72
11	0	-1	-1	45.76
12	0	0	0	51.59
13	-1	1	0	47.15
14	-1	-1	0	44.60
15	0	0	0	51.01
16	1	0	1	40.51
17	-1	0	-1	47.00

表 5 回归模型的方差分析及显著性检验

Table 5 Analysis of variance and significance test of regression model						
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Model	213.723	9	23.747	136.2387	<0.0001	significant
A-温度	5.54445	1	5.54445	31.80903	0.0008	
B-时间	23.6672	1	23.6672	135.7809	<0.0001	
C-PH	34.03125	1	34.03125	195.2405	<0.0001	
AB	0.245025	1	0.245025	1.405731	0.2744	
AC	1.288225	1	1.288225	7.390667	0.0298	
BC	5.267025	1	5.267025	30.21742	0.0009	
A ²	39.30338	1	39.30338	225.4872	<0.0001	
B ²	32.19624	1	32.19624	184.7129	<0.0001	
C ²	57.33872	1	57.33872	328.9576	<0.0001	
Residual	1.22013	7	0.174304			
Lack of Fit	0.81645	3	0.27215	2.69669	0.1810	not significant
Pure Error	0.40368	4	0.10092			
Cor Total	214.9431	16				

表 6 回归方程的可信度分析

Table 6 Credibility analysis of regression equation

项目	数值	项目	数值
Std. Dev.	0.417498	R-Squared	0.994323
Mean	46.59235	Adj R-Squared	0.987025
C.V. %	0.896065	Pred R-Squared	0.93629
PRESS	13.69395	Adeq Precision	35.55679

2.3.2 响应面设计方案、方差及可信度分析

利用 Desig-Experpt 7.0.0 对表 4 中的实验数据进行多元回归拟合，得到二次多项回归方程： $Y=51.07-0.83A+1.72B-2.06C+0.25AC+1.15BC-3.06A^2-2.77B^2-3.69C^2$ 。

用 Desig-Experpt 进一步对拟合出的回归方程进行误差统计分析，对方差、可信度、多元相关系数进行计算，见表 5、表 6 所示。F 与 P 值的大小代表相关性系数的显著性与否^[23]，模型 $p<0.0001$ ，表明模型极显著，而失拟项 $p>0.05$ ，表明模型比较稳定， $CV\%<10\%$ ，表明可信度比较高。一次项 A、B 和 C、交互项 BC 及二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对酶解效果影响极显著，交互项 AC 对酶解效果影响显著，交互项 AB 对结果影响不显著。另外该模型的 $R^2_{Adj}=0.987$ 、 $R^2=0.994$ 表明残差相互独立，拟合程度良好，实验误差小，以上分析结果表明该模型可用于对南极磷虾蛋白酶解条件优化的预测。

2.3.3 响应曲面图分析

酶解温度、时间、pH 三因素间交互作用对南极磷虾酶解效果影响见图 6~8。等高线的形状可反映各因素间的交互作用显著与否，椭圆形表示交互作用显著，圆形表示交互作用不显著；根据三维立体图的陡峭程度可反映各因素对响应值的影响^[15]。

图 8 的等高线图为椭圆形，表明酶解时间与 pH 交互作用极显著，从三维立体图中可看出，在合适的时间与 pH 交互作用下，酶解液中的氨基氮含量具有极大值，该极大值出现在 pH 7.75~8.00 之间，8.00 h~9.00 h 范围内。从图 7 的椭圆形等高线图可看出，酶解温度与 pH 交互作用显著，从三维立体图可看出在 pH 7.75~8.00 之间，温度 42.50℃~45.00℃ 范围内，酶解液中氨基氮含量存在极大值。图 6 的等高线图为圆形，表明酶解温度与时间交互作用不明显，从三维立体图可知，随着时间从 6.00 h~8.00 h 范围内，氨基氮含量一直处于上升趋势，8.00 h 后变化不在明显，温度在 40.00℃~50.00℃ 范围内，氨基氮含量呈现先升高后下降，在 45.00℃ 左右，酶解时间 8.00~9.00 h 会出现极大值。从结果分析可知，最佳酶解温度、时间、pH 都在设定的实验范围内。

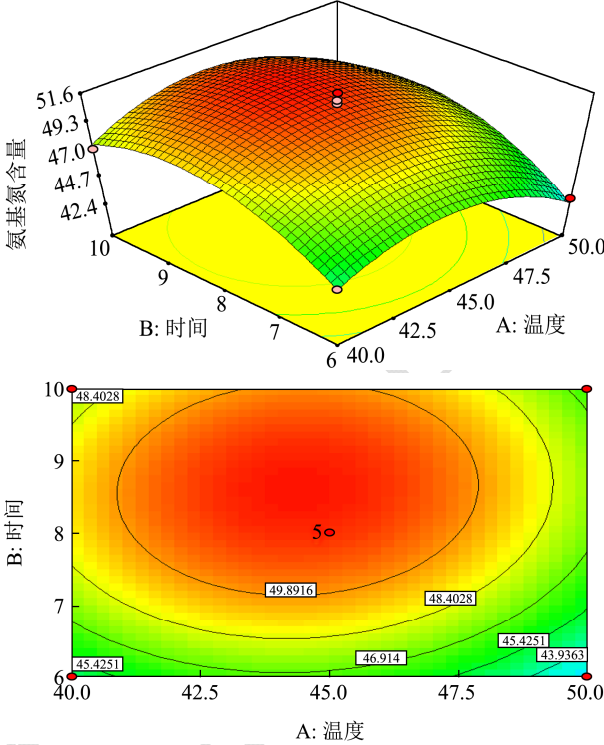


图 6 酶解温度与时间影响南极磷虾蛋白酶解效果的响应面图
Fig.6 Response surface diagram of the effect of enzymatic hydrolysis temperature and time on the proteolytic effect of Antarctic krill

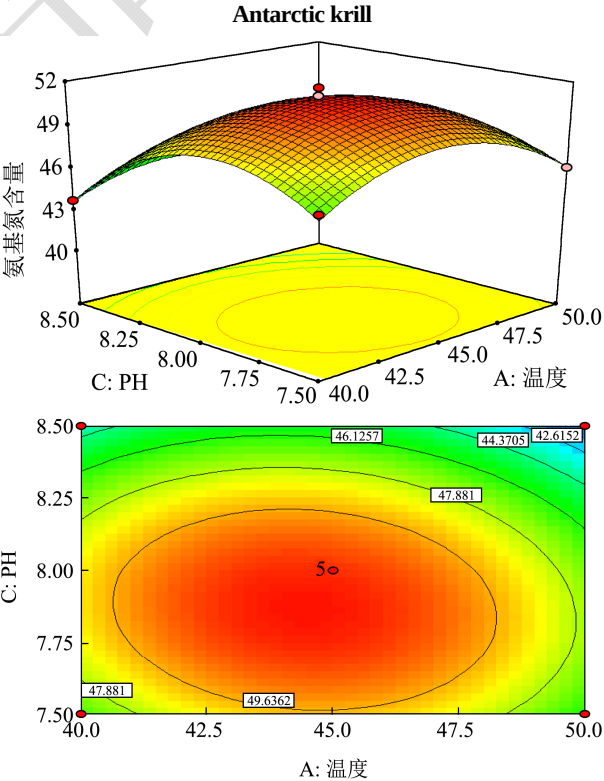


图 7 酶解温度与 pH 影响南极磷虾蛋白酶解效果的响应面图
Fig.7 Response surface diagram of the effect of enzymatic hydrolysis temperature and pH on the proteolytic effect of Antarctic krill

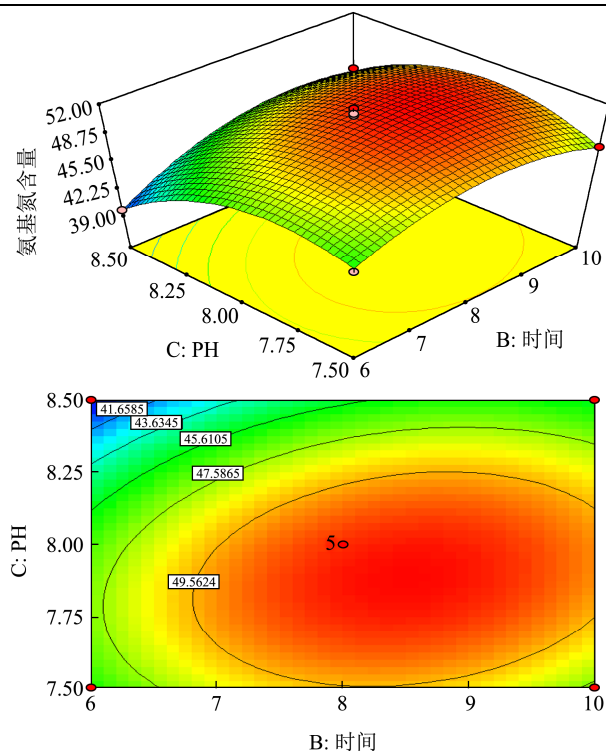


图8 酶解时间与 pH 影响南极磷虾蛋白酶解效果的响应面图

Fig.8 Response surface diagram of the effect of enzymatic hydrolysis time and pH on the proteolytic effect of Antarctic krill

采用 Desig-Expert 软件优化功能,在试验因素取值范围内选择响应值最大值(maximum),可得到最佳实验条件为:酶解温度 44.48、酶解时间 8.52、pH 7.88,此时预测的酶解液中氨基酸含量为 51.57 mg/g。

2.3.4 验证性实验

为了验证回归方程预测结果的可靠性,需要在理论得到的最优酶解条件(酶解温度 44.48 °C、酶解时间 8.52 h、pH 7.88)下进行验证性实验,又考虑到实际操作可行性,我们取最优酶解条件为:酶解温度 45.0 °C、酶解时间 8.5 h, pH 7.9,实验重复 3 次,此条件下实际得到的氨基酸含量为 50.96 ± 1.07 mg/g,与模型理论预测值 51.57 mg/g 基本一致,说明该工艺的模型预测值与实际情况拟合度很高,响应面分析法对最优工艺的预测准确可行。

2.4 南极磷虾蛋白肽分子量电泳分析

通过考马斯亮蓝染色法(左 1~3)与银染色法(右 4~7),分别得到如图 9 所示的南极磷虾蛋白电泳条带和胰蛋白酶解多肽电泳条带,通过对比分析,南极磷虾蛋白样品可见清晰的 8 条带,从 8 条带分布范围来看,分子量主要分布在 15 ku~45 ku, 75 ku 及以上也有少量分布,而 5 ku 以下没有条带,说明南极磷虾蛋白分子量在 5 ku 以上,并且分子量跨度比较大;南极

磷虾胰蛋白酶解多肽可见 2 条清晰的条带,分别在 25 ku 和 15 ku 左右,此外 10~15 ku 与 0~5 ku 可清晰看到未能分离开来的多肽条带团,从条带的分子量分布范围与条带颜色深浅来看,南极磷虾酶解多肽分布在 25 ku 以下,并且以 5 ku 以下的片段为主,相比较考染出来的蛋白分子量大小,可见胰蛋白酶酶解效果比较明显,酶解后可得到分子量较小的多肽。从蛋白分离效果来看,Tricine-SDS-PAGE 获得的电泳图谱整体来说,背景颜色浅、分辨率高、蛋白条带清晰,虽然酶解多肽有部分条带出现拖尾并出现过饱和现象,这可能与上样量过高有关,也可能是酶解出来的 5 ku 以下小分子量肽很高,而选择的 Marker 在 0~5 ku 的区分度比较小,小分子量肽未能全部跑开。

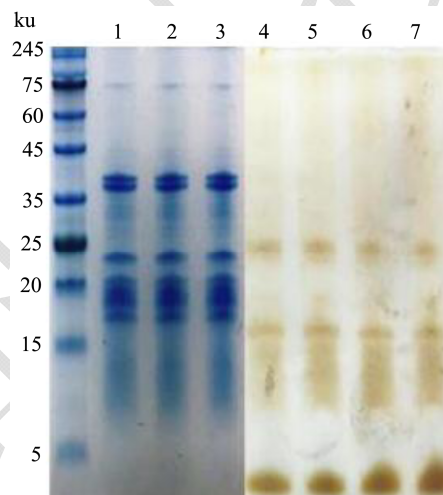


图9 南极磷虾蛋白及胰蛋白酶解多肽的 SDS-PAGE

Fig.9 SDS-PAGE of Antarctic krill protein and trypsin polypeptide

3 结论

3.1 实验从木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、风味蛋白酶六种生物酶中筛选出胰蛋白酶是酶解南极磷虾的最佳生物酶,在单因素试验基础上,采用响应面优化南极磷虾酶解工艺条件为:酶解温度 45.0 °C、酶解时间 8.5 h, pH 7.9,此条件下得到的氨基酸含量为 50.96 ± 1.07 mg/g,与模型理论预测值 51.57 mg/g 基本一致。

3.2 在最佳酶解条件基础上,通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分析得到胰蛋白酶解多肽分子量在 25 ku 以下,并且集中分布在 5 ku 以下,相比较南极磷虾蛋白分子量主要分布范围(15 ku~45 ku),且没有低于 5 ku 以下的小分子肽,说明胰蛋白酶酶解效果较明显,为今后南极磷虾蛋白分离及活性研究提供基础研究。

参考文献

- [1] Tou J C, Jaczynski J, Chen Y C. Krill for human consumption: Nutritional value and potential health benefits [J]. Nutrition Reviews, 2007, 65(2): 63-77
- [2] Gigliotti J C, Jaczynski J, Tou J C. Determination of the nutritional value, protein quality and safety of krill protein concentrate isolated using an isoelectric solubilization/precipitation technique [J]. Food Chemistry, 2008, 111, 209-214
- [3] Parka J D, Poowakanjanab S, Parka J W. Biochemical properties of pelagic fish proteins as affected by isolation methods and gel properties by heating methods [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2012, 21, 307-320
- [4] Wang L Z, Xue C H, Wang Y M, et al. Extraction of proteins with low fluoride level from Antarctic krill (*Euphausia superba*) and their composition analysis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59, 6108-6112
- [5] 廖鄂. 南极磷虾蛋白提取技术研究[D]. 中国海洋大学, 2014
- LIAO E. Study on extraction technology of Antarctic krill Abstract [D]. Ocean University of China, 2014
- [6] 郭静, 李学才, 于春芳, 等. 南极磷虾蛋白的提取及其复合纤维的性能[J]. 大连工业大学学报, 2014, 33(4): 270-273
- GUO Jing, LI Xue-cai, YU Chun-fang, et al. Extraction of Antarctic krill protein and properties of its composite fibers [J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2014, 33(4): 270-273
- [7] 任艳. 南极磷虾蛋白加工利用的初步研究[D]. 中国海洋大学, 2009
- REN Yan. Preliminary study on processing the protein of Antarctic krill abstract [D]. Ocean University of China, 2009
- [8] Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N, et al. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases [J]. Bio Factors, 2001, 12(1-4)
- [9] 任娇艳, 赖婷, 江燕清, 等. 乳清蛋白肽的酶法制备、分离纯化及活性评价[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2015, 43(2): 1-7
- REN Jiao-yan, LAI Ting, JIANG Yan-qing, et al. Enzymatic preparation, purification and activity evaluation of whey protein peptides [J]. Journal of South China University of Technology (Natural Science Edition), 2015, 43(2): 1-7
- [10] 李荣乔. 菠萝蛋白酶酶解海湾扇贝裙边制备抗氧化肽的研究[D]. 河北农业大学, 2014
- LI Rong-qiao. Preparation of Antioxidant Peptides from Scallop skirt of *Argopecten irradians* by bromelain hydrolysis [D]. Hebei Agricultural University, 2014
- [11] Se-kwon Kim, Yong-tae Kim, Hee-guk Byun, et al. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of alaska pollack skin [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(4): 1984-1989
- [12] ZHANG Nong, YAMASHITA Yamashiita, NOZAKI Yukinori. Effect of protein hydrolysate from Antarctic krill meat on the state of water and denaturation by dehydration of lizard fish myofibrils [J]. Fisheries Science [Serial Online], 2002, 68(3): 672-679
- [13] 任艳. 南极磷虾蛋白加工利用的初步研究[D]. 中国海洋大学, 2009
- REN Yan. Preliminary study on processing the protein of Antarctic krill [D]. Ocean University of China, 2009
- [14] 李红艳, 薛长湖, 王灵昭, 等. 南极磷虾酶解液氯化钙法脱氟工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2011, 3: 330-333
- LI Hong-yan, XUE Chang-hu, WANG Ling-zhao, et al. Study on defluoridation technology of Antarctic krill hydrolysate by adding calcium chloride [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 3: 330-333
- [15] 倪玲, 吴文惠, 张启, 等. 蛋白水解酶联合自溶作用的南极磷虾多肽氨基酸分析[J]. 食品工业科技, 2013, 34(8): 102-107
- NI Ling, WU Wen-hui, ZHANG Qi, et al. Amino acid analysis of Antarctic krill peptide obtained by protease related autolysis peptide [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(8): 102-107
- [16] 张恒, 郭应龙. 鸡骨的酶解及酶解液的电泳分析[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(9): 102-105
- ZHANG Heng, WU Ying-long. Study on the hydrolysis of chicken bone and electrophoretic analysis of the hydrolysate [J]. Food and Fermentation Industries, 2010, 36(9): 102-105
- [17] GB5009.235-2016, 食品中氨基酸态氮的测定[S]
- GB5009.235-2016, Determination of Amino Acid Nitrogen in Food [S]
- [18] 高颖, 王彦超, 常耀光, 等. 三种低氟南极磷虾肽的 ACE 抑制作用及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 82-87, 92
- GAO Ying, WANG Yan-chao, CHANG Yao-guang, et al. ACE inhibition and antioxidant activities of three types of Antarctic krill (*Euphausia superba*) peptides with low fluorine content [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(2): 82-87, 92