

Study on Enzymatic Hydrolysis and Separation and Preparation of Pea Protein O²⁻ Scavenging Peptide

Shucheng Zhang^{1,2}, Jinjie Yang^{1,2}, Hui Li^{3,4}, Chuanxing Feng^{3,4}, Qi Wang^{3,4},
Quancheng Zhou^{3,4*}

¹Yantai Shuangta Food Co., Ltd., Yantai Shandong

²Test Center of Yantai Shuangta Food Co., Ltd., Yantai Shandong

³Department of Food Science, School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo Shandong

⁴Key Laboratory of Shandong Provincial Universities for Technologies in Functional Agricultural Products, Zibo Shandong

Email: *542469641@qq.com

Received: Jul. 31st, 2019; accepted: Aug. 19th, 2019; published: Aug. 26th, 2019

Abstract

The enzymatic conditions of pea protein with water content of 30% by neutral protease were optimized to the clearance ratio for O²⁻ by response surface methodology. The separation and molecular weight determination of the hydrolysates were determined by dialysis and high performance liquid phase, in order to get high antioxidant pea protein peptide. The optimum conditions were as follows: enzyme amount 10.6% (E/S), temperature 40.3°C, pH 7.02 and the substrate concentration 6.80% (g/ml). Under this condition, the best O²⁻ clearance rate was 78.1%. The antioxidant activity of the hydrolysates with molecular weight less than 1 ku was 81.3%. And its molecular weight concentrated in about 200~800 u, was 2~8 peptides. The model obtained from the experiment is accurate and reliable, hydrolysates with high antioxidant activity, and it can be used to guide the parameter setting and separation selecting of pea protein in actual production. Dialysis could significantly improve clearance ability to free radicals of antioxidant peptides.

Keywords

Pea Protein, Neutral Protease, Enzymolysis, Free Radical Clearance Ratio, Separation

*通讯作者。

豌豆蛋白O²⁻清除肽酶解优化及分离制备工艺研究

张树成^{1,2}, 杨进洁^{1,2}, 李 慧^{3,4}, 冯传兴^{3,4}, 王 琪^{3,4}, 周泉城^{3,4*}

¹烟台双塔食品股份有限公司, 山东 烟台

²烟台双塔食品股份有限公司检测中心, 山东 烟台

³山东理工大学, 农业工程与食品科学学院, 食品科学系, 山东 淄博

⁴农产品功能化技术山东省高校重点实验室, 山东 淄博

Email: 542469641@qq.com

收稿日期: 2019年7月31日; 录用日期: 2019年8月19日; 发布日期: 2019年8月26日

摘 要

本研究以含水量为30%的豌豆蛋白为主要原材料, 选用中性蛋白酶对其进行酶解, 利用响应曲面实验设计优化酶解条件及在此条件下的O²⁻清除率。采用透析对酶解产物进行分离, 高效液相进行分子量的确定, 以期得到具有高抗氧化活性的豌豆蛋白肽。经实验可得酶解最佳条件为: 加酶量10.6% (E/S)、温度40.3℃、pH 7.02、底物浓度6.80% (g/ml), 此条件下, O²⁻清除率为78.1%。分子量小于1 ku的酶解液抗氧化活性最强, 为81.3%。其分子量集中在200~800 u左右, 为2~8肽。实验得到的模型准确可靠, 酶解产物抗氧化性高, 可用于指导实际生产中豌豆蛋白酶解条件的参数设定及分离方式的选定。透析能显著提高抗氧化肽对自由基的清除能力。

关键词

豌豆蛋白, 中性蛋白酶, 酶解, 自由基清除率, 分离

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

豌豆(*Pisum sativum* Linn)又名麦豌豆、寒豆、麦豆, 是重要的食用和饲用豆类作物, 是一种营养性食品[1], 在成分方面, 豌豆富含淀粉、蛋白质、纤维素等物质[2]。其淀粉组成与谷物和薯类相比较, 以直链淀粉为主, 占有24%~65%的比例。我国对于豌豆的利用以淀粉为主, 其对蛋白质的利用率较低。但在现阶段, 豌豆蛋白的综合利用成为了国际上的一个研究热点。与其他豆科植物相比, 豌豆富含赖氨酸, 是世界卫生组织推荐值的1.5倍[3]。但其蛋氨酸和胱氨酸的含量较低, 仅为推荐值的四分之一和五分之一。

中性蛋白酶是由枯草芽孢杆菌经深层次液体发酵提炼而成, 能将大分子蛋白质水解成蛋白质胨、多肽、氨基酸等, 不能分解角质蛋白[4]。其作用条件温和, 根据来源可分为霉菌中性蛋白酶、细菌中性蛋白酶等运用于深加工领域以及医药治疗等领域[5], 目前, 国内外关于中性蛋白酶的研究也相当多。中性蛋白酶是最早发现并广泛应用于工业化生产的蛋白酶制剂, 可用于焙烤食品工业中、阿斯巴甜的合成、

蛋白水解物苦味的去除, 运用于大米深加工领域[6], 目前, 国内外关于中性蛋白酶的研究也相当多。

本研究旨在以豌豆蛋白为原料, 用中性蛋白酶进行酶解, 实验中以 O^{2-} 自由基清除率作为抗氧化活性的评价指标, 通过响应曲面实验设计优化利用中性蛋白酶酶解豌豆蛋白酶解条件并预测酶解产物自由基清除率模型, 通过透析和高效液相相结合的方法, 对酶解产物进行分离及分子量的确定并测定其抗氧化活性, 从而为豌豆蛋白的开发利用和加工拓宽思路、提供参考。

2. 材料与方法

2.1. 材料与设备

中性蛋白酶购自济宁元素高科生物科技有限公司, 中性蛋白酶活力为 47362 u/g。甲醛溶液等所用试剂均为分析纯。豌豆蛋白购自烟台双塔食品股份有限公司, 主要组成为水分 $4.6\% \pm 0.02\%$, 蛋白质 $73.2\% \pm 0.23\%$, 粗脂肪 $0.22\% \pm 0.01\%$, 灰分 $4.62\% \pm 0.03\%$ 。

2.2. 豌豆蛋白的酶解

称取一定质量的豌豆蛋白, 加入一定质量的中性蛋白酶和一定 pH 值的磷酸盐缓冲溶液, 摇匀, 置于恒温振荡水浴锅中, 酶解 3 h, 沸水浴灭酶 10 min。冷却后, 将蛋白酶液过滤, 取滤液待测, 记为酶解物。

2.3. 自由基清除活性响应曲面实验设计

通过查阅相关资料及文献初步确定影响酶解条件的显著因素, 利用预实验选定各因素大致的用量范围, 以自由基清除活性为评判指标, 确定最佳水平范围, 利用软件 Design-Expert8.0.6, 进行响应曲面实验设计优化, 由方差分析及 R^2 综合分析可知以二次方进行建模最为简洁, 故而得出多元二次回归方程, 由得出的回归方程及响应曲面图与之对应的等高线图可以确定最佳酶解条件[7] [8]。

2.4. 酶解产物自由基 O^{2-} 清除率的测定

根据玄红专等人的方法[9]。

2.5. 透析袋分离豌豆蛋白抗氧化肽

采用 7、3.5、1 ku 的透析袋, 对酶解液进行依次分离。预处理好的透析袋中加入约三分之二的酶解液, 两端封好, 放在蒸馏水中进行搅拌, 每隔一段时间换一次水, 直至透出液不再有颜色变化, 将透出液用旋转蒸发仪浓缩, 对浓缩液进行冷冻干燥, 得到豌豆蛋白抗氧化肽粉。

2.6. 豌豆蛋白抗氧化肽的抗氧化活性测定

对 1.5 中收集得到的分子量为小于 1 ku、1~3.5 ku、1~3.5 ku 和大于 7 ku 的豌豆蛋白抗氧化肽粉进行 O^{2-} 清除率的测定。

2.7. 豌豆蛋白酶解产物分子量分布的测定

用 Waters Protein-Pak 125A 300 mm \times 7.8 mm 色谱柱对经透析袋分离后得到的分子量小于 1 ku 的组分进行分子量分布的分析。流动相: 乙腈/水/三氟乙酸, 45/55/0.1 (V/V), 检测波长: 220 nm 流速: 0.5 mL/min 柱温: 30 $^{\circ}$ C。

2.8. 数据分析

每个操作 3 次平行。利用 SAS 9.1 软件建立回归模型方程, 对数据进行 ANOVA 分析, Duncan test

确定平均值差异。

3. 实验结果与分析

3.1. 响应面法优化酶解物 O²⁻清除活性实验

通过查阅相关资料及文献可知,加酶量(A)、温度(B)、pH 值(C)、底物浓度(D)为影响酶解效果的显著因素,固定酶解时间 3 h,以酶解物的自由基清除率活性为评价指标,设计 4 因素 5 水平共 26 个试验点的响应分析实验进行二次回归设计实验和分析。实验方案、实验条件及结果列于表 1 中。

Table 1. Response surface experiment design and results

表 1. 响应面实验设计及结果

A/%	B/°C	C	D/%	清除率/%
加酶量	温度	pH	底物浓度	O ²⁻
1 (12)	1 (45)	1 (7.6)	1 (8)	48.3
1	1	1	-1 (6)	58.7
1	1	-1 (6.7)	1	48.9
1	1	-1	-1	51.0
1	-1 (35)	1	1	45.5
1	-1	1	-1	48.7
1	-1	-1	1	47.5
1	-1	-1	-1	43.3
-1 (8)	1	1	1	30.8
-1	1	1	-1	41.0
-1	1	-1	1	38.1
-1	1	-1	-1	30.6
-1	-1	1	1	45.5
-1	-1	1	-1	30.7
-1	-1	-1	1	45.8
-1	-1	-1	-1	31.6
2 (14)	0 (40)	0 (7)	0 (7)	31.5
-2 (6)	0	0	0	29.3
0	2 (50)	0	0	31.8
0	-2 (30)	0	0	30.2
0	0	2 (7.6)	0	42.2
0	0	-2 (6.4)	0	45.9
0	0	0	2 (9)	49.3
0	0	0	-2 (5)	68.8
0	0	0	0	77.0
0	0	0	0	78.1

以 O^{2-} 清除率为响应值, 经回归拟合后, 中性蛋白酶酶解豌豆蛋白的 O^{2-} 清除率的回归方程为: O^{2-} 清除率 = $-5910.27398 + 52.76521 \times A + 35.87850 \times B + 1285.16019 \times C + 141.98292 \times D + 0.21906 \times AB + 0.91563 \times AC - 1.17969 \times AD + 0.32958 \times BC - 0.56538 \times BD - 6.80208 \times CD - 2.87747 \times A^2 - 0.45400 \times B^2 - 89.94329 \times C^2 - 4.35490 \times D^2$, 中性蛋白酶酶解挤出物的 O^{2-} 清除率的回归方程方差分析表, 见下表 2。

Table 2. Variance analysis for the scavenging rate of O^{2-}
表 2. O^{2-} 清除率的各因素方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F	显著性
Model	4228.86	24	302.06	7.57	0.0009	**
A	435.46	1	435.46	10.92	0.0070	**
B	5.87	1	5.87	0.15	0.7085	
C	1.00	1	1.00	0.025	0.8773	
D	24.58	1	24.58	0.62	0.4490	
AB	76.78	1	76.78	1.93	0.1928	
AC	4.83	1	4.83	0.12	0.7344	
AD	89.07	1	89.07	2.23	0.1632	
BC	3.91	1	3.91	0.098	0.7600	
BD	127.86	1	127.86	3.21	0.1009	
CD	66.63	1	66.63	1.67	0.2227	
A ²	2312.34	1	2312.34	57.98	<0.0001	**
B ²	2248.50	1	2248.50	56.38	<0.0001	**
C ²	1143.75	1	1143.75	28.68	0.0002	**
D ²	331.03	1	331.03	8.30	0.0149	*
残差	438.71	11	39.88			
失拟项	438.12	10	43.81	73.75	0.0904	not significant
纯误差	0.59	1	0.59			
总和	4667.57	25				

注: *为显著($P < 0.05$), **为极显著($P < 0.01$), A: 加酶量、B: 温度、C: pH、D: 底物浓度。

由表 2 可知, 模型的 $P = 0.0009 < 0.01$ 说明所建模型是显著的, 失拟项的 $P = 0.0904$, 大于 0.05, 是不显著的, 说明该模型与真实测量值拟合良好。底物浓度的二次方的 P 值小于 0.05, 说明其对 O^{2-} 清除率的影响是显著的, 加酶量的二次方、温度的二次方、pH 的二次方的 P 值小于 0.01, 说明其对 O^{2-} 清除率的影响是极显著的。由 F 值可知, 各因素对豌豆蛋白酶解液 O^{2-} 清除率的影响次序: 加酶量(A) > 底物浓度(D) > 酶解温度(B) > pH (C)。根据回归方程作各因素及交互作用对 O^{2-} 清除率影响的响应曲面图见图 1。

通过图 1, 可以进一步看出加酶量、pH、温度、底物浓度, 任何两因素的交互作用对 O^{2-} 清除率的影响。每两个因素交互作用的响应曲面图都存在极值点, 证明有最优解, 响应曲面图于底部的投影为圆形或椭圆形, 证明各因素的显著范围选择合理, 验证了实验的准确性。

3.2. 最佳自由基清除率条件

以 O^{2-} 清除率为评价指标,对回归方程进行偏微分,得出最佳酶解条件:加酶量为 10.6%、温度 40.3℃、pH 7.02、底物浓度为 6.80%。

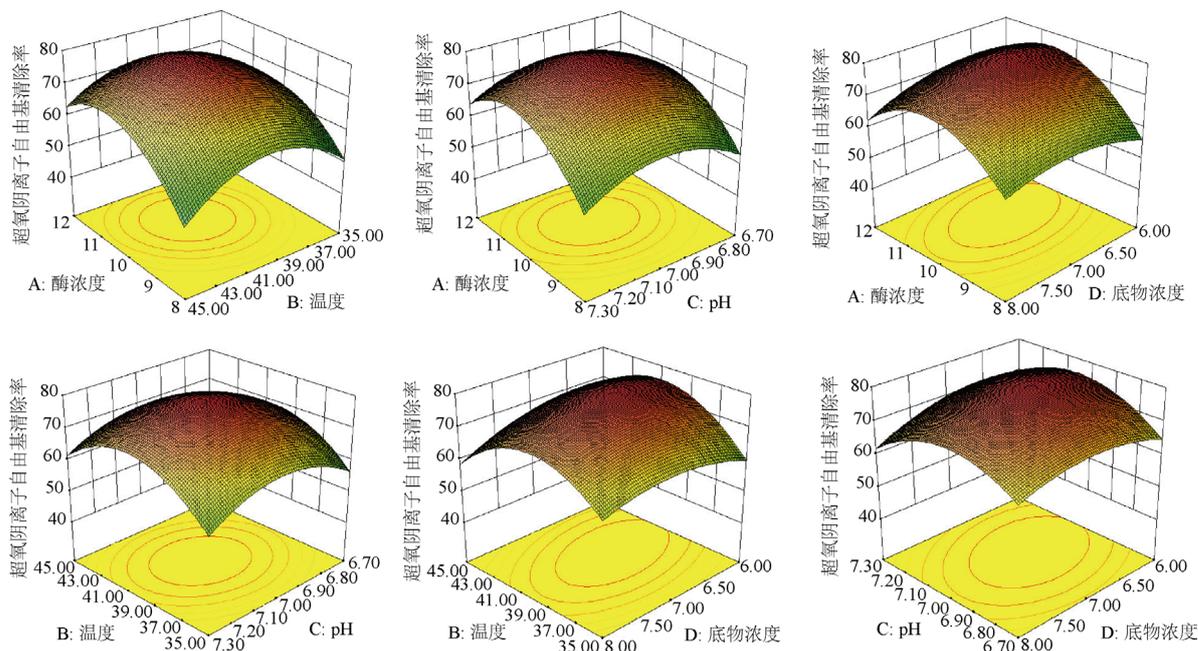


Figure 1. Response surface plot of the scavenging rate of O^{2-}
图 1. O^{2-} 清除率响应曲面图

3.3. 验证实验

在此条件下, O^{2-} 清除率为 78.1%。经验证,在此条件下酶解液 O^{2-} 清除率为 $79.8 \pm 0.28\%$ 。方差分析无显著性差异。这说明该模型预测准确,可用于自由基 O^{2-} 清除率抗氧化性预测及酶解条件筛选。

3.4. 豌豆蛋白抗氧化肽的分离

对用透析袋分离得到的四个不同分子量的组分进行 O^{2-} 清除测定,测定结果见表 3。

Table 3. Antioxidant activity of hydrolysis of pea protein hydrolysate by papain
表 3. 中性蛋白酶酶解豌豆蛋白酶解液的抗氧化活性

分子量范围/ku	O^{2-} 清除率/%
<1	81.3
1~3.5	35.2
3.5~7	20.3
>7	12.4

由表 3 可知,不同分子量的豌豆蛋白抗氧化肽均具有 O^{2-} 的清除能力,其清除能力随分子量减小而增大。分子量小于 1 ku 的清除能力最强。这与文献报道一致[9] [10]。因此后边实验以分子量小于 1 ku 的组分为研究材料。

3.5. 豌豆蛋白酶解物小于 1 ku 组分的分子量分析

3.5.1. 分子量标准曲线

校正曲线: $\text{Lg}(\text{MW}) = 7.382 - 0.248T$ $R^2 = 0.9994$ 。

3.5.2. 分子量小于 1 ku 的酶解产物分子量分布图

由图 2、图 3 可知, 经 1 ku 透析袋分离后的酶解液, 分子量大多集中在 200~800 u 左右, 说明酶解后得到的肽大多是 2~8 肽, 张秋萍等研究发现分子量约在 600~1700 范围内的多肽具有较高的抗氧化性, 与本实验中所得到的结论基本一致[10] [11]。

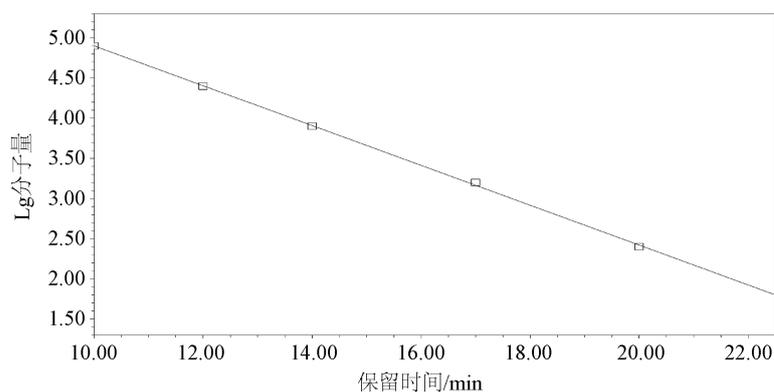


Figure 2. Molecular weight calibration curve

图 2. 分子量校正曲线

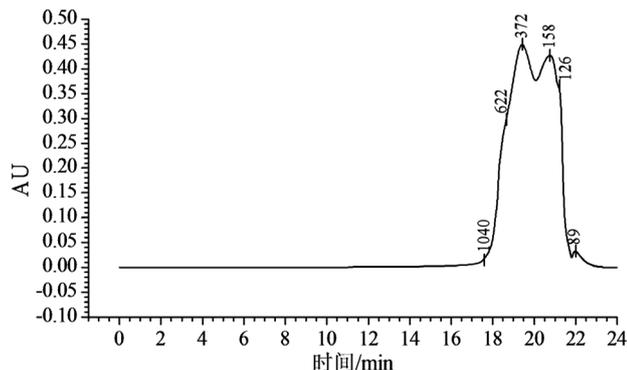


Figure 3. Molecular weight distribution of hydrolysates of pea protein

图 3. 豌豆蛋白酶解物分子量分布图

4. 结论

中性蛋白酶酶解豌豆蛋白酶联合挤出物的最佳酶解条件: 加酶量为 10.6%、温度 40.3℃、pH 7.02、底物浓度为 6.80%, 在此条件下, $\text{O}^{\cdot-}$ 清除率为 78.1%, 得到了豌豆蛋白酶联合挤出物中性蛋白酶酶解产物自由基清除预测模型, 该模型预测准确可靠, 可用于生产预测和工艺开发。采用透析技术对酶解液分离, 发现分子量小于 1 ku 的酶解液抗氧化活性最强为 81.3%, 分析其分子量集中在 200~800 U 左右。说明透析能纯化肽, 并能提高肽的抗氧化能力。分离出的抗氧化肽具有良好的抗氧化活性, 可用于食品防腐, 被人体摄入可清除体内自由基, 抑制自由基过氧化反应及提高机体其它系统的抗氧化能力。

参考文献

- [1] Zhou, Q.-C., Liu, N. and Feng, C.-X. (2016) Research on the Effect of Papain Co-Extrusion on Pea Protein and Enzymolysis Antioxidant Peptides. *Journal of Food Processing and Preservation*, **41**, e13301.
- [2] 孙旭. 挤压玉米蛋白粉酶法生物活性肽制备及特性[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- [3] 叶鸿剑, 肖志刚, 魏旭, 等. 豆渣粉低温加酶挤压技术研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(11): 99-105.
- [4] 王小强, 韩秀楠, 曹馨月, 等. 豌豆品种对绿色型豌豆蚜种群参数的影响[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(8): 1004-1008.
- [5] 母应春, 解春芝, 杨夫光, 等. 加酶挤压碎米生产淀粉糖浆工艺优化[J]. 食品科技, 2014, 39(7): 163-167.
- [6] Naguleswaran, S., Li, J., Vasanthan, T., et al. (2012) Amylolysis of Large and Small Granules of Native Triticale, Wheat and Corn Starches Using a Mixture of α -Amylase and Glucoamylase. *Carbohydrate Polymers*, **88**, 864-874. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.027>
- [7] 葛英亮, 马艳秋. 响应面法优化蓝莓澄清型果汁饮料工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(12): 52-57.
- [8] 王涛, 颜明, 郭海波. 一种新的回归分析方法——响应曲面法在数值模拟研究中的应用[J]. 岩性油气藏, 2011, 23(2): 100-104.
- [9] 朱国洪, 彭超英. 食品挤压技术研究新进展[J]. 食品与机械, 2000(2): 12-13.
- [10] 王东, 荣家萍, 唐自钟, 等. 响应面法优化枯草芽孢杆菌产中性蛋白酶的发酵条件[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(1): 143-151.
- [11] 王凤青. 枯草芽孢杆菌发酵合成聚 γ -谷氨酸的研究[D]: [硕士学位论文]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2011.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网首页: <http://cnki.net/>, 点击页面中“外文资源总库 CNKI SCHOLAR”, 跳转至: <http://scholar.cnki.net/new>, 搜索框内直接输入文章标题, 即可查询;
或点击“高级检索”, 下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2166-613X, 即可查询。
2. 通过知网首页 <http://cnki.net/>顶部“旧版入口”进入知网旧版: <http://www.cnki.net/old/>, 左侧选择“国际文献总库”进入, 搜索框直接输入文章标题, 即可查询。

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjfn@s-hanspub.org