

响应面优化水解黑豆 7S 球蛋白制备抗氧化肽的研究

张茂迎, 赵森, 刘畅, 厉煜伟, 李跃辉, 杨凤旭, 邹险峰*

(长春大学 食品科学与工程学院, 长春 130022)

摘要:以黑豆 7S 球蛋白为原料, 研究黑豆 7S 球蛋白抗氧化活性肽的酶解工艺。以羟自由基清除率为指标, 采用单因素试验及响应面试验设计优化黑豆 7S 球蛋白的酶解工艺。结果表明, 在酶解温度 49 ℃, pH 9.07, 酶解时间 88.79 min, 酶添加量 8560 U/g 时, 黑豆 7S 球蛋白活性肽显示出较强的抗氧化活性, 得到的羟自由基清除率为 $56.03\% \pm 0.18$, 为黑豆蛋白的深加工和调味品领域研发提供了理论基础。

关键词:黑豆 7S 球蛋白; 碱性蛋白酶; 羟自由基清除率; 响应面法

中图分类号: TS201.21

文献标志码: A

doi: 10.3969/j.issn.1000-9973.2022.06.004

文章编号: 1000-9973(2022)06-0018-05

Study on Optimization of Preparation of Antioxidative Peptides from Hydrolyzed Black Bean 7S Globulin by Response Surface Methodology

ZHANG Mao-ying, ZHAO Miao, LIU Chang, LI Yu-wei, LI Yue-hui,

YANG Feng-xu, ZOU Xian-feng*

(College of Food Science and Engineering, Changchun University, Changchun 130022, China)

Abstract: Using black bean 7S globulin as the raw material, the enzymatic hydrolysis process of antioxidative active peptides from black bean 7S globulin is studied. Taking the scavenging rate of hydroxyl radicals as the index, single factor and response surface experiments are designed to optimize the enzymatic hydrolysis process of black bean 7S globulin. The results show that when the enzymatic hydrolysis temperature is 49 ℃, pH is 9.07, enzymatic hydrolysis time is 88.79 min, and the additive amount of enzyme is 8560 U/g, the active peptides from black bean 7S globulin show stronger antioxidant activity, and the scavenging rate of hydroxyl radicals is $56.03\% \pm 0.18$, which has provided a theoretical basis for the deep processing of black bean protein and research and development in the field of condiments.

Key words: black bean 7S globulin; alkaline protease; scavenging rate of hydroxyl radicals; response surface methodology

黑豆(black bean)是一种豆科大豆属植物大豆(*Glycine max* (Linn.) Merr.)的黑色种子。黑豆的营养价值非常高,黑豆中含有高达 36%~40% 的蛋白质,大约是肉类含量的 2 倍、鸡蛋的 3 倍、牛奶的 12 倍;黑豆的赖氨酸高于其他颜色的大豆,因此有“植物蛋白之王”的美誉^[1]。

黑豆蛋白中的有些序列处于蛋白质分子结构内部,没有展现活性,经过酶解后,将这些序列释放出来,才表现出生理活性。黑豆多肽一般是用酶水解法或发酵法来制备的一种混合肽,通常由 2~20 个氨基酸残基组成,相对分子质量<10000 Da,而且不同的肽具有不同的氨基酸序列^[2]。黑豆多肽含有人体所需的 8 种

必需氨基酸,且含量较高^[3]。

有研究表明,黑豆多肽具有抗氧化性,能够清除体内的自由基^[4],而且除抗氧化性外,黑豆多肽还有降血脂、降血压^[5]、降低胆固醇^[6]、抗疲劳^[7]等功效。目前一般用酶解法、化学法以及辅助提取法等方式来制备黑豆多肽^[8-9]。许庆鹏等通过碱性蛋白酶水解豌豆蛋白制备水解肽,水解肽的分子质量越小,抗氧化能力越强^[10]。高嘉唯等通过对英国红芸豆蛋白进行酶解,酶解肽的总抗氧化能力高达 186.97 U/mg^[11]。张浩玉等采用碱性蛋白酶水解法酶解绿豆蛋白,制备出的绿豆蛋白水解肽具有羟自由基消除能力,在 25 mg/mL 时清除率达到最大值 61.3%^[12]。同时,通过生物酶法

收稿日期:2021-12-15

作者简介:张茂迎(1998-),男,硕士,研究方向:食品科学。

* 通讯作者:邹险峰(1971-),男,副教授,博士,研究方向:食品生物技术。

引文格式:张茂迎,赵森,刘畅,等. 响应面优化水解黑豆 7S 球蛋白制备抗氧化肽的研究[J]. 中国调味品, 2022, 47(6): 18-22.

制备的水解肽有一些是呈味肽和生物活性肽^[13]。范海茹等以高温豆粕为原料,通过探究不同的酶组合连续水解制备鲜味肽^[14]。

本试验以黑豆 7S 球蛋白为原料,采用碱性蛋白酶水解黑豆 7S 球蛋白制备抗氧化肽,以羟自由基清除率作为指标。在单因素试验的基础上,通过响应面法优化黑豆 7S 球蛋白酶解制备抗氧化肽清除羟自由基的工艺条件,为研究 7S 球蛋白水解肽的抗氧化活性、分离纯化及生产提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

黑豆:市售;碱性蛋白酶(酶活力 200000 U/g):北京鸿润宝顺科技有限公司。氢氧化钠、亚硫酸氢钠、氯化钠等试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器与设备

高速冷冻离心机 美国 Sigma 公司;UV-1900 型紫外分光光度计 日本岛津公司;XIANOU-12 型冷冻干燥机 吉林省华业科教仪器设备有限公司;PHS-3C 型酸度计 上海雷磁仪器有限公司;FW100 型高速万能粉碎机 天津市泰斯特仪器有限公司;GDE 酶消解池 意大利 VELP 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 黑豆 7S 球蛋白的提取工艺

黑豆 7S 球蛋白的提取工艺参照 Nagano 等的方^[15-16]并稍加修改:黑豆→粉碎→过筛→石油醚脱脂过夜重复 3 次→脱脂黑豆粉→加水混合→调节 pH 至 7.5(1 mol/L NaOH)→提取 2 h→离心(9000 r/min, 15 min)→上清液→添加亚硫酸钠(0.98 g/L)→调节 pH 至 6.4→4 ℃过夜→离心(9000 r/min, 15 min)→上清液→添加 NaCl(0.25 mol/L)→调节 pH 至 5.0(1 mol/L HCl)→提取 1 h→离心(8500 r/min, 30 min)→上清液冰水稀释 2 倍→调节 pH 至 4.8(1 mol/L HCl)→离心(8500 r/min, 15 min)→沉淀→冻干→黑豆 7S 球蛋白。

1.3.2 黑豆 7S 球蛋白的酶解工艺

黑豆 7S 球蛋白→加超纯水搅拌溶解→95 ℃水浴加热→冷却至 25 ℃→调节 pH 值→加酶水解一定时间→95 ℃加热 10 min 灭酶→离心(5000 r/min, 15 min)取上清液→测定羟自由基清除率。

1.3.3 单因素试验

本试验以黑豆 7S 球蛋白为原料,研究碱性蛋白酶水解制备抗氧化肽的工艺,以羟自由基清除率作为指标。以黑豆 7S 球蛋白质量作为基准,以酶解温度、pH、酶解时间以及酶添加量单因素进行试验。

1.3.3.1 酶解温度对羟自由基清除率的影响

酶解时间 90 min、pH 9.0、酶添加量 8000 U/g 作为固定条件,测定当酶解温度为 40、45、50、55、60 ℃条件下制备的水解肽对羟自由基清除率的影响。

1.3.3.2 pH 对羟自由基清除率的影响

酶添加量 8000 U/g、酶解温度 50 ℃、酶解时间 90 min 作为固定条件,测定当 pH 为 8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 条件下制备的水解肽对羟自由基清除率的影响。

1.3.3.3 酶解时间对羟自由基清除率的影响

酶解温度 50 ℃、pH 9.0、酶添加量 8000 U/g 作为固定条件,测定当酶解时间为 30、60、90、120、150 min 条件下制备的水解肽对羟自由基清除率的影响。

1.3.3.4 酶添加量对羟自由基清除率的影响

pH 9.0、酶解时间 90 min、酶解温度 50 ℃作为固定条件,测定当酶添加量为 4000、6000、8000、10000、12000 U/g 条件下制备的水解肽对羟自由基清除率的影响。

1.3.4 羟自由基清除率的测定

羟自由基的测定参照罗丹明 B-Fenton 体系光度法^[17]。

1.3.4.1 空白体系光密度值的测定

在 2 mL Tris-HCl 缓冲液中加入 6.6 mL H₂O 和 1.4 mL 罗丹明 B 混匀,放置 5 min 后采用紫外分光光度计测定 550 nm 波长处的吸光度,记录为 A。

1.3.4.2 羟自由基的测定

在 2 mL Tris-HCl 缓冲液中加入 4.6 mL H₂O、1.4 mL 罗丹明 B、1 mL Fe²⁺和 1 mL H₂O₂混匀,放置 5 min 后采用紫外分光光度计测定 550 nm 波长处的吸光度,记录为 A₁。

1.3.4.3 样品对羟自由基的清除作用

在 2 mL Tris-HCl 缓冲液中加入 3.6 mL H₂O、1.4 mL 罗丹明 B、1 mL 不同浓度的肽溶液、1 mL Fe²⁺和 1 mL H₂O₂混匀,放置 5 min 后采用紫外分光光度计测定 550 nm 波长处的吸光度,记录为 A₂。

$$\text{羟自由基清除率: } Y = \frac{A_2 - A_1}{A - A_1} \times 100\%$$

式中:Y 为羟自由基清除率,%;A 为空白吸光度;A₁为羟自由基吸光度;A₂为样品清除自由基吸光度。

1.3.5 响应面分析试验

在单因素试验的基础上,根据 Box-Behnken 的原理,选取酶解温度(X₁)、pH(X₂)、酶解时间(X₃)和酶添加量(X₄)4 个因素作为自变量,以羟自由基清除率(Y)为响应值,进行 4 因素 3 水平响应面试验,因素水平编码见表 1。

表 1 响应面试验因素水平
Table 1 Response surface test factors and levels

水平	因素			
	X ₁ 酶解温度/℃	X ₂ pH	X ₃ 酶解时间/min	X ₄ 酶添加量/(U/g)
-1	45	8.5	60	6000
0	50	9.0	90	8000
1	55	9.5	120	10000

1.4 数据处理

试验重复 3 次,并用 Origin 2019 软件作图。使用 Design Expert 8.0.6 设计响应面实验,并对试验数据进行方差分析及二次多项式回归拟合。

2 结果与分析

2.1 黑豆 7S 球蛋白酶解单因素试验

2.1.1 酶解温度对羟自由基清除率的影响

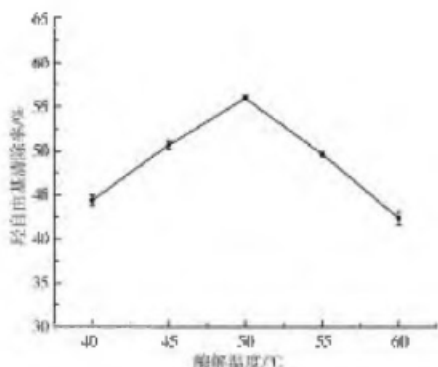


图 1 酶解温度对羟自由基清除率的影响

Fig. 1 The effect of enzymatic hydrolysis temperature on the scavenging rate of hydroxyl radicals

由图 1 可知,在酶解温度 40~50 °C 区间内,羟自由基清除率的变化随着温度的提高而逐渐增大,在 50 °C 以后,羟自由基清除率开始降低。在温度 50 °C 时,羟自由基清除率最高,推测出碱性蛋白酶在 50 °C 时发挥出较强的酶活性,水解产生更多的肽段,使羟自由基清除率增强。继续升高温度,酶可能部分失活,使酶不能充分水解 7S 球蛋白,因此羟自由基清除率比较低。因为酶只有在合适的温度下才能发挥出最佳活性,高于最适温度或者过低的酶解温度都会影响酶的活性,所以最适酶解温度为 50 °C。

2.1.2 pH 对羟自由基清除率的影响

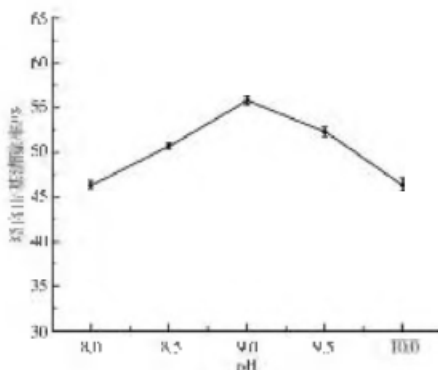


图 2 pH 对羟自由基清除率的影响

Fig. 2 The effect of pH on the scavenging rate of hydroxyl radicals

由图 2 可知,随着 pH 值的不断增大,羟自由基的

清除率也在不断增大,在 pH 9.0 时达到最大,当 pH 大于 9 继续提高时,羟自由基的清除率会不断降低,这是因为碱性蛋白酶只在 pH 9.0 下表现出较高的活性,当碱性蛋白酶在 pH 过高时结构会被破坏,或者不是适宜的 pH 条件下碱性蛋白酶不能发挥出应有的酶活性,导致黑豆 7S 球蛋白无法完全水解,因此羟自由基清除率不断下降^[18],所以最适酶解 pH 为 9.0。

2.1.3 酶解时间对羟自由基清除率的影响

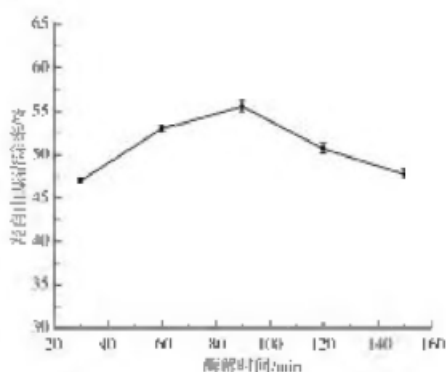


图 3 酶解时间对羟自由基清除率的影响

Fig. 3 The effect of enzymatic hydrolysis time on the scavenging rate of hydroxyl radicals

由图 3 可知,随着酶解的进行,时间在 30~90 min 的过程中,羟自由基清除率逐渐增大,在 90 min 时达到最大值,继续增加碱性蛋白酶的酶解时间,羟自由基清除率开始出现下降趋势。可能是随着反应的进行,酶解时间延长,一方面,酶活性逐渐丧失;另一方面,少量肽被酶解成氨基酸,使得抗氧化肽活性下降,所以,最适酶解时间为 90 min。

2.1.4 酶添加量对羟自由基清除率的影响

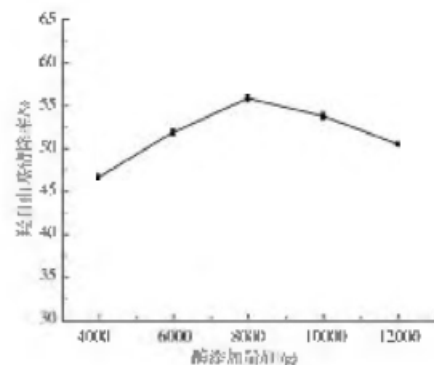


图 4 酶添加量对羟自由基清除率的影响

Fig. 4 The effect of additive amount of enzyme on the scavenging rate of hydroxyl radicals

由图 4 可知,随着碱性蛋白酶添加量的不断增加,羟自由基的清除率同样呈现出先增大后减小的趋势。在 4000 U/g 时羟自由基清除率最低,这可能是因为酶与底物反应不完全,产生较少的抗氧化肽,进而影响

了羟自由基的清除率。在 8000 U/g 时羟自由基清除率达到最大,这可能是酶与底物结合较完全,水解产生较多的抗氧化肽。随着酶添加量的不断增加,清除率降低,一方面,酶与底物结合,酶过量会抑制酶解反应的进行;另一方面,可能是酶过量使抗氧化肽水解成小分子肽段,抗氧化活性降低^[19],所以最佳酶添加量为 8000 U/g。

2.2 响应面法优化试验设计及结果分析

进一步采用响应面法对酶解黑豆 7S 球蛋白酶解工艺进行优化。以酶解温度(X_1)、pH(X_2)、酶解时间(X_3)、酶添加量(X_4)作为自变量,羟自由基清除率作为响应值的响应面试验结果见表 2。

表 2 响应面试验设计与试验结果
Table 2 Design and results of response surface test

序号	X_1 酶解温度/ ℃	X_2 pH	X_3 酶解时间/ min	X_4 酶添加量/ (U/g)	羟自由基清除率/ %
1	0	0	0	0	55.318
2	0	-1	1	0	44.365
3	-1	-1	0	0	47.729
4	-1	0	1	0	46.378
5	0	0	0	0	56.167
6	0	0	-1	-1	47.892
7	1	0	-1	0	43.217
8	-1	0	-1	0	49.256
9	0	0	1	1	50.421
10	0	0	0	0	56.612
11	0	0	-1	1	50.724
12	-1	1	0	0	51.486
13	1	-1	0	0	44.021
14	0	0	0	0	53.428
15	0	1	0	1	50.866
16	0	0	0	0	55.349
17	0	-1	0	1	49.683
18	0	1	-1	0	47.196
19	-1	0	0	-1	47.681
20	1	0	0	-1	45.327
21	1	0	1	0	46.673
22	0	-1	0	-1	45.438
23	1	0	0	1	45.021
24	0	1	1	0	50.469
25	1	1	0	0	46.756
26	0	0	1	-1	48.364
27	0	-1	-1	0	50.455
28	0	1	0	-1	48.652
29	-1	0	0	1	52.443

对表 2 中试验数据进行二次多项回归拟合,获得响应

面回归方程: $Y=55.37-2.00X_1+1.14X_2-0.17X_3+1.32X_4-0.26X_1X_2+1.58X_1X_3-1.27X_1X_4+2.34X_2X_3-0.51X_2X_4-0.19X_3X_4-4.88X_1^2-3.49X_2^2-3.70X_3^2-2.81X_4^2$ 。

羟自由基清除率的回归方程模型的方差分析见表 3。

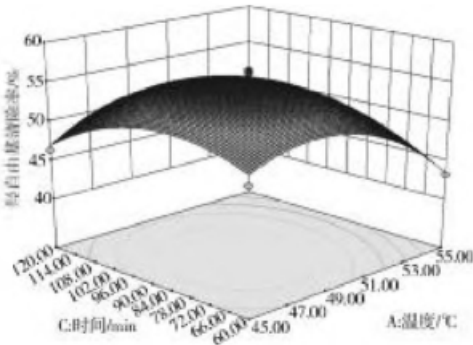
表 3 回归方程模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance of regression equation model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	371.14	14	26.51	24.21	<0.0001	***
X_1	47.83	1	47.83	43.68	<0.0001	***
X_2	15.72	1	15.72	14.35	0.002	**
X_3	0.36	1	0.36	0.33	0.577	
X_4	20.81	1	20.81	19.01	0.0007	**
X_1X_2	0.26	1	0.26	0.24	0.6329	
X_1X_3	10.03	1	10.03	9.16	0.0091	**
X_1X_4	6.42	1	6.42	5.86	0.0296	*
X_2X_3	21.92	1	21.92	20.01	0.0005	**
X_2X_4	1.03	1	1.03	0.94	0.3483	
X_3X_4	0.15	1	0.15	0.14	0.7167	
X_1^2	154.28	1	154.28	140.88	<0.0001	***
X_2^2	78.82	1	78.82	71.98	<0.0001	***
X_3^2	88.76	1	88.76	81.05	<0.0001	***
X_4^2	51.27	1	51.27	46.82	<0.0001	***
残差	15.33	14	1.1			
失拟项	9.38	10	0.94	0.63	0.748	
纯误差	5.95	4	1.49			
总和	386.47	28				

注:“*”表示差异显著($0.01 < P < 0.05$),“**”表示差异较显著($P < 0.01$),“***”表示差异极显著($P < 0.0001$)。

由表 3 可知,对所建立的回归模型进行分析,模型的 $P < 0.0001$,表明该回归模型极显著;模型的失拟项不显著, P 为 0.748,大于 0.05。模型的决定系数(R^2)为 0.9603,调整决定系数(R_{Adj}^2)为 0.9207,说明此模型的实际测量结果与预测的结果拟合较好,误差小。该模型中一次项 X_2 、 X_4 和交互项 X_1X_3 、 X_2X_3 均差异较显著,一次项 X_1 和二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 均差异极显著。由 F 值可看出,4 个因素对羟自由基清除率的影响顺序依次为 X_1 (酶解温度) $>X_4$ (酶添加量) $>X_2$ (pH) $>X_3$ (酶解时间)。



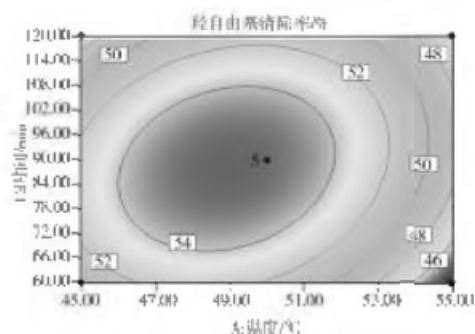


图 5 酶解温度和酶解时间的交互作用对羟自由基清除率影响的响应面图和等高线图

Fig. 5 Response surface diagram and contour plot of the interaction of enzymatic hydrolysis temperature and enzymatic hydrolysis time on the scavenging rate of hydroxyl radicals

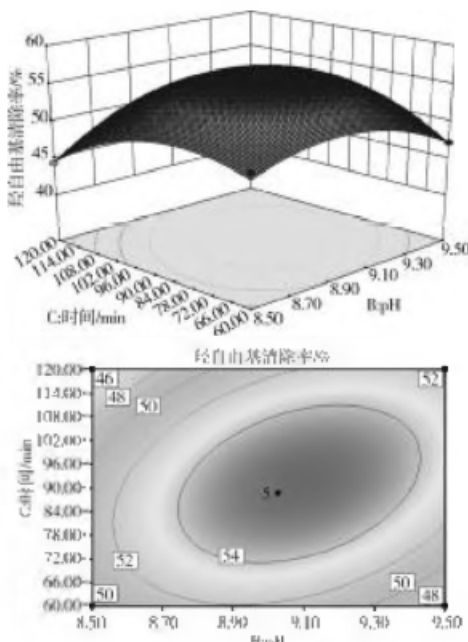


图 6 pH 和酶解时间的交互作用对羟自由基清除率影响的响应面图和等高线图

Fig. 6 Response surface diagram and contour plot of the interaction of pH and enzymatic hydrolysis time on the scavenging rate of hydroxyl radicals

交互效应的强弱可以由等高线的形状反映出来,由图 5 和图 6 可知,交互作用等高线颜色变化明显,而且呈椭圆形,说明酶解温度和酶解时间以及 pH 和酶解时间的交互作用对羟自由基清除率的影响明显。3D 图中,交互作用曲线较陡峭,随着水平的增加,羟自由基清除率先增大后减小。

2.3 模型验证试验

采用 Design Expert 8.0.6 软件分析,得到羟自由基清除率最大的酶解条件:酶解温度 48.74 °C、pH 9.07、酶解时间 88.79 min、酶添加量 8559.67 U/g,预测羟自由基清除率为 55.893%。为进一步验证响应面的结果

是否可靠,在实际操作过程中,将最佳条件调整为:酶解温度 49 °C、pH 9.07、酶解时间 88.79 min、酶添加量 8560 U/g,进行 3 次验证试验。最终试验结果得到的羟自由基清除率的平均值是 56.03%±0.18,与分析值相差 0.25%,与响应面预测的结果比较吻合,说明响应面得出的最优参数具有可行性。

3 结论

试验利用单因素结合响应面分析方法优化了碱性蛋白酶水解黑豆 7S 球蛋白对羟自由基清除率的影响,并根据实际操作得到最优酶解参数:酶解温度为 49 °C、pH 9.07、酶解时间为 88.79 min、酶添加量为 8560 U/g,在此条件下得到的羟自由基清除率为 56.03%±0.18。为黑豆 7S 球蛋白水解肽进一步应用在食品加工以及调味品领域提供了依据。

参考文献:

- [1]周凯琳,陶莎,薛文通. 黑豆蛋白及其抗氧化肽研究进展[J]. 食品工业,2015,36(5):204-207.
- [2]杨爽,董艳娇,肖瑜,等. 碱性蛋白酶水解红豆粉的工艺优化及产物抗氧化活性分析[J]. 农产品加工,2020(22):39-43.
- [3]于栋,高洋,何新蕾. 酶法制备黑豆粕粉多肽的工艺研究[J]. 中国酿造,2021,40(4):143-147.
- [4]高岩松. 黑豆多肽-蓝莓复合饮料研制及抗氧化活性的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2019.
- [5]张月圆,陈佩瑶,刘露,等. 醋制对黑豆蛋白含量及多肽 ACE 抑制活性的影响[J]. 大豆科学,2017,36(6):932-937.
- [6]刘恩岐,李华,巫永华,等. 降胆固醇黑豆肽的分离纯化与结构鉴定[J]. 食品科学,2013,34(19):128-132.
- [7]刘恩岐,李华,巫永华,等. 黑豆肽的抗氧化活性与缓解体力疲劳作用[J]. 食品科学,2013,34(11):273-277.
- [8]陈忠琴. 豆类蛋白功能性质及黑豆肽与花青苷的制备与活性研究[D]. 天津:天津大学,2017.
- [9]刘辉,童星. 大豆水解蛋白中抗氧化肽的研究进展[J]. 中国调味品,2021,46(1):191-195.
- [10]许庆鹏,姜秀杰,周荣荣,等. 挤压豌豆蛋白肽酶解工艺优化及抗氧化性研究[J]. 食品科技,2021,46(8):155-161.
- [11]高嘉唯,韩晶,左豫虎,等. 英国红芸豆蛋白抗氧化肽酶解工艺的研究[J]. 食品工业科技,2017,38(3):234-237,243.
- [12]张浩玉,高云,王欣,等. 绿豆多肽的酶法制备及抗氧化活性研究[J]. 粮食与油脂,2020,33(11):116-119.
- [13]杨文君,段杉,崔春. 豌豆蛋白深度酶解制备咸味肽的研究[J]. 中国调味品,2021,46(8):1-5.
- [14]范海茹,李淑英,许斌,等. 内外切蛋白酶连续酶解制备豆粕鲜味肽的研究[J]. 中国调味品,2021,46(1):77-82.
- [15]NAGANO T, HIROTSUKA M, MORI H, et al. Dynamic viscoelastic study on the gelation of 7S globulin from soybeans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,1992,40(6):941-944.
- [16]马福建,高长城,解迪,等. 大豆 11S 球蛋白水解肽的制备及抗氧化研究[J]. 食品研究与开发,2019,40(11):89-93.
- [17]李鸿梅. 玉米功能肽的制备及其生理活性的研究[D]. 长春:吉林大学,2008.
- [18]孙菁茹,富天听. 响应面法优化绿豆抗氧化肽的制备工艺[J]. 中国食品添加剂,2020,31(6):55-60.
- [19]屠瀚超,阳晓晶,罗松明. 响应面优化酶解法制备岩豆抗氧化肽工艺[J]. 中国油脂,2020,45(6):36-40.