

双酶水解黄粉虫蛋白制备生物活性肽的工艺优化

张莉莎, 张建新

(西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**对胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 双酶组合水解黄粉虫蛋白制备生物活性肽的工艺进行优化, 为获得高活性黄粉虫蛋白多肽及有效利用黄粉虫蛋白提供科学依据。**【方法】**以水解度和酸溶性肽得率为指标, 研究了酶解时间、酶活比、料液比、加酶量、pH 和酶解温度 6 种因素对酶解反应的影响。在此基础上设计了 3 因素(加酶量、pH 和酶解温度)3 水平的响应面试验。**【结果】**胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 双酶水解黄粉虫蛋白的最佳酶解条件为: 酶解时间 120 min, 酶活比 1 : 1, 料液比 1 : 3, 加酶量 23.41 mg/g, pH 8.77, 酶解温度 53.41 ℃。**【结论】**利用优化双酶水解条件制得的低分子多肽的水解度高达 21.61%, 酸溶性肽得率为 92.09%。

[关键词] 黄粉虫蛋白; 双酶酶解; 响应面法; 生物活性肽; 工艺优化

[中图分类号] TS201.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)02-0165-08

Study on preparation technique optimization of bioactive peptides from bienzyme-hydrolyzed Yellow mealworm protein by response surface method

ZHANG Li-sha, ZHANG Jian-xin

(College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**In order to obtain the bioactive peptides, the Yellow mealworm protein was hydrolyzed by the mixture of Trypsin and Alkaline Protease and the conditions of enzymatic reaction were determined and optimized. **【Method】**By measuring the degree of hydrolysis (DH) and the yield of acid-soluble peptide (YASP), time, the effects of ratio of protease energy, ratio of solid to liquid, dosage of protease, pH, and temperature on DH and YASP were studied in single factor test. On this basis, three factors (dosage of protease, pH, and temperature) and three levels' test by response surface method (RSM) were designed. **【Result】**The optimum conditions were: time 120 min, ratio of protease energy 1 : 1, ratio of solid to liquid 1 : 3, dosage of protease 23.41 mg/g, pH 8.77, and temperature 53.41 ℃. **【Conclusion】**Under these conditions, DH was 21.61%, and YASP 92.09%.

Key words: Yellow mealworm protein; bienzyme hydrolysis; RSM; bioactive peptide; technique optimization

黄粉虫 (*Tenebrio molitor* L.) 属昆虫纲, 鞘翅目, 拟步行虫科, 粉甲属。其幼虫含蛋白质 64.8%, 脂肪 25.5%, 无机盐 1.64%, 维生素 0.12%, 其他 7.94%。黄粉虫蛋白含有 18 种氨基酸, 其中人体必

需氨基酸含量占氨基酸总量的 39.14%, 接近 FAO/WHO 建议的优良蛋白质必需氨基酸占氨基酸总量 40% 的标准, 是一种优质的蛋白资源^[1-3]。黄粉虫幼虫干粉滤液具有较好的抗疲劳、延缓衰老、降低血脂

* [收稿日期] 2008-04-11

[基金项目] 西北农林科技大学科研专项

[作者简介] 张莉莎(1984—), 女, 河南安阳人, 在读硕士, 主要从事食品营养与安全研究。

[通信作者] 张建新(1959—), 男, 陕西咸阳人, 副教授, 主要从事食品营养与安全及标准化研究。E-mail: zhangjx59@foxmail.com

及促进胆固醇代谢的功能,并能提高小鼠外周淋巴细胞转化和降低骨髓微核率^[4]。为充分开发黄粉虫蛋白的保健功能,利用酶法对黄粉虫蛋白质进行改性,不仅可改变其物理化学性质和功能特性,还有助于人体消化吸收,对黄粉虫蛋白的开发利用具有十分积极的意义。

生物活性肽是对生物机体的生命活动有益或具有生理作用的肽类化合物。近年来,研究发现蛋白质经水解后得到的多肽具有除营养功能外的广泛的生理调节功能,如降低血压和胆固醇,促进免疫及营养物质的消化吸收,且在体内的消化吸收性能明显优于单个氨基酸^[5-8],目前,国内外有关利用植物蛋白和动物蛋白进行蛋白酶水解生产多肽的研究很多^[9-10],但关于黄粉虫蛋白多肽的相关报道很少^[11-12],对其生理功能活性的研究尚未见报道。为此,本研究对胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 双酶水解黄粉虫蛋白制备生物活性肽的工艺条件进行了优化,以期获得高活性黄粉虫蛋白多肽和有效利用黄粉虫蛋白提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄粉虫幼虫:由陕西秦虫黄粉虫科技发展有限公司提供,经粉碎、脱脂、烘干后过孔径 180 μm (80 目)筛,得到黄粉虫蛋白粉,备用。

药品及试剂:胰蛋白酶(250 U/mg),由西安润德生物技术有限公司生产;碱性蛋白酶 Alcalase (100 U/mg),由上海中信生物有限公司生产。氢氧化钠、盐酸、硫酸铜、酒石酸钾钠、硫酸钾、锌粉、硼酸溶液等,均为分析纯。

主要仪器与设备:TDL-40B 型台式离心机,由上海安亭科学仪器厂生产;DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器,由郑州科丰仪器设备有限公司生产;ZDJ-4A 型自动电位滴定仪,由上海精密科学仪器有限公司生产。

1.2 黄粉虫蛋白的酶解

称取 10 g 黄粉虫蛋白粉,加入适量蒸馏水,搅拌均匀,加热至所需温度,恒温,调溶液 pH 至适当值;加适量的蛋白酶开始酶解,并不断搅拌。同时加入 0.5 mol/L 的 NaOH 维持溶液的 pH 值恒定,记录水解时间和 NaOH 的消耗体积。酶解反应至预定时间后,迅速升温至 95 $^{\circ}\text{C}$,保持 15 min,灭酶活,冷却至室温后,调水解液 pH 至 3.8~4.0,离心 15 min(4 000 r/min),取上清液,洗涤沉淀再次离心 15

min(4 000 r/min),取上清液,合并 2 次上清液,超滤浓缩,冷冻干燥,即得黄粉虫多肽粉^[13-14]。

1.3 测定项目及方法

1.3.1 蛋白质含量的测定 采用凯氏定氮法 GB/T 14489.2—1993^[15]。

1.3.2 水解度的测定 参照文献^[16]的方法进行。在碱性条件下水解度的计算公式为:

水解度(DH)/% = $[(C_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}}) / (a \times Mp \times h_{\text{tot}})] \times 100\%$ 。

式中: C_{NaOH} 、 V_{NaOH} 分别为酶解过程中所加入 NaOH 溶液的浓度(mol/L)和体积(mL); a 为氨基的平均解离度, $a = 1 + 10^{(pK - \text{pH})}$,其中 pK 为 a 氨基的解离常数,计算时取 7.5, pH 为试验时采用的 pH 值; Mp 为原料中净蛋白质质量(g); h_{tot} 为 1 g 原料蛋白质中所含肽键的毫摩尔数(mmol/g),按酪蛋白的 $h_{\text{tot}} = 8.2$ 计算。

1.3.3 酸溶性肽得率的测定 参照文献^[17]的方法进行。酸溶性肽得率的计算公式为:

酸溶性肽得率(YASP)/% = 酸沉淀后上清液中蛋白质的总量/所加底物蛋白质的总量 $\times 100\%$ 。

1.4 黄粉虫蛋白双酶水解反应的单因素试验

(1)酶解时间。在料液比为 1 : 3,加酶量为 5 mg/g, pH 为 8.0,酶解温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,分别酶解 60, 120, 180 min。以水解度为指标,分析酶解时间对胰蛋白酶、碱性蛋白酶 Alcalase 及其组合酶解黄粉虫蛋白的影响。

(2)酶活比。在料液比为 1 : 3,加酶量为 5 mg/g, pH 为 8.0,酶解温度为 55 $^{\circ}\text{C}$,胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 的酶活比分别为 3 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 和 1 : 3 条件下酶解 120 min。以水解度和酸溶性肽得率为指标,分析酶活比对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响。

(3)料液比。在胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 的酶活比为 1 : 1,加酶量为 5 mg/g, pH 为 8.0,酶解温度为 55 $^{\circ}\text{C}$,料液比分别为 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4, 1 : 5 和 1 : 10 条件下酶解 120 min。以水解度和酸溶性肽得率为指标,分析料液比对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响。

(4)加酶量。在胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 的酶活比为 1 : 1,料液比为 1 : 3, pH 为 8.0,酶解温度为 55 $^{\circ}\text{C}$,加酶量分别为 1, 3, 5, 10, 15 和 20 mg/g 条件下酶解 120 min。以水解度和酸溶性肽得率为指标,分析加酶量对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响。

(5)pH。在胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 的酶活比为 1 : 1,料液比为 1 : 3,加酶量为 15 mg/g,酶解温度为 55 ℃,pH 分别为 7.0,7.5,8.0,8.5 和 9.0 条件下酶解 120 min。以水解度和酸溶性肽得率为指标,分析 pH 对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响。

(6)酶解温度。在胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 的酶活比为 1 : 1,料液比为 1 : 3,加酶量为 15 mg/g,pH 为 8.5,酶解温度分别为 45,50,55,60 和 65 ℃条件下酶解 120 min。以水解度和酸溶性肽得率为指标,分析酶解温度对黄粉虫蛋白双酶水解反

表 1 黄粉虫蛋白双酶水解工艺优化试验因素水平编码表

Table 1 Coding table of factors and levels on hydrolyzed action of Yellow mealworm protein

编码 Code	X ₁ 加酶量/(mg·g ⁻¹) Dosage of protease	X ₂ pH	X ₃ 酶解温度/℃ Temperature	编码 Code	X ₁ 加酶量/(mg·g ⁻¹) Dosage of protease	X ₂ pH	X ₃ 酶解温度/℃ Temperature
+1.682	23.41	9.34	63.41	-1	10	7.00	50
+1	20	9.00	60	-1.682	6.59	7.66	46.59
0	15	8.50	55	Δ _j	5	0.5	5

2 结果与分析

2.1 黄粉虫蛋白双酶水解的单因素试验结果

2.1.1 酶解时间对黄粉虫蛋白酶解反应的影响
由图 1 可见,胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 的双酶组合对黄粉虫蛋白酶解的水解度明显大于单一酶,这是由于单酶水解具有专一性,采用双酶混合水解有利于提高底物转化率。由图 1 还可以看出,随着水解时间的增加,水解度也增大,尤其在前,60

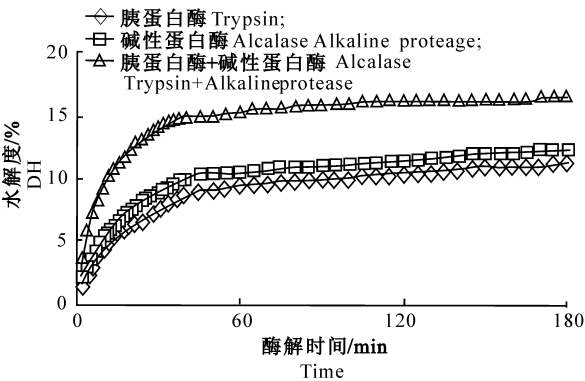


图 1 酶解时间对黄粉虫蛋白酶解反应的影响
Fig.1 Effect of time on hydrolyzed action of Yellow mealworm protein

2.1.3 料液比对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响
由图 3 可见,料液比对黄粉虫蛋白酶解的效果有直接影响,料液比过大或过小都会造成负面影响。料液比小时,溶液流动性好,酶与底物接触充分,水解度呈上升趋势;当料液比为 1 : 3 时水解度及酸溶

应的影响。

1.5 黄粉虫蛋白双酶水解工艺优化试验

采用中心旋转组合试验设计(CCD)和响应面法(RSM),优化黄粉虫蛋白的双酶水解条件^[18]。在双酶水解条件参数中,试验固定酶解时间为 120 min,胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 的酶活比为 1 : 1,料液比为 1 : 3,着重研究加酶量、pH、酶解温度 3 个因素对水解效果的影响。通过单因素试验确定 3 因素的取值水平范围,以加酶量、pH、酶解温度为自变量,水解度及酸溶性肽得率为响应值进行试验,因素编码及水平见表 1。

min 内,水解度增加较快,到 120 min 时,水解度增加趋于稳定。故在双酶水解工艺条件的单因素试验时,水解时间以 120 min 为宜。

2.1.2 酶活比对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响

由图 2 可见,胰蛋白酶和碱性蛋白酶 Alcalase 的比例不同,水解效果也存在差异,在胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 的酶活比为 1 : 1 时,水解度及酸溶性肽得率均达到最大值。因此,双酶水解的胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 的酶活比以 1 : 1 为宜。

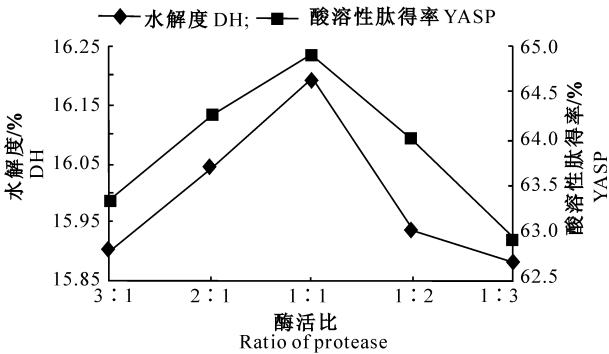


图 2 酶活比对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响
Fig.2 Effect of ratio of protease on hydrolyzed action of Yellow mealworm protein

性肽得率均达到最高;其后随着料液比的增大,水解度反而开始下降。当料液比达到 1 : 2 时,溶液流动性差,酶与底物接触不充分,限制了反应的进行。这与王文亮等^[19]的研究结果一致。因此,黄粉虫蛋白酶解的料液比以 1 : 3 为宜。

2.1.4 加酶量对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响

由图 4 可见,随着加酶量的增加,水解度及酸溶性肽得率均随之增大,前期增加幅度较大,当加酶量超过 15 mg/g 时,两者增加趋势均不再明显。这是因为加酶量较大时,蛋白质的相对浓度较小,已经被酶

饱和,有一部分酶分子将不能与蛋白质分子结合^[16]。另外,考虑到酶量过大,在实际生产中会加大成本,所以选择 15 mg/g 作为酶解黄粉虫蛋白反应的最佳加酶量。

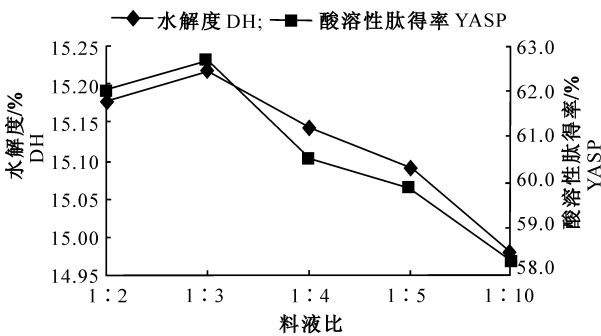


图 3 料液比对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响
Fig. 3 Effect of ratio of solid to liquid on hydrolyzed action of Yellow mealworm protein

2.1.5 pH 对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响
胰蛋白酶单独作用的最适 pH 为 8.0,碱性蛋白酶 Alcalase 单独作用的最适 pH 为 8.5,故在 pH 7.0~9.0 选择双酶共同作用的最适 pH。由图 5 可见,pH 为 8.5 时,双酶水解反应的水解度及酸溶性肽得率均达到最大值,因此以 pH 8.5 作为酶解黄粉虫蛋白的最佳 pH。

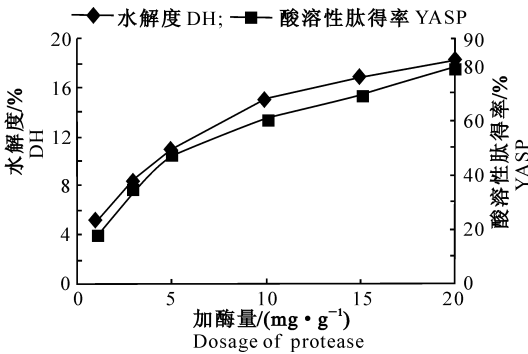


图 4 加酶量对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响
Fig. 4 Effect of dosage of protease on hydrolyzed action of Yellow mealworm protein

2.1.6 酶解温度对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响

由图 6 可见,温度对水解效果影响显著,当酶解温度为 45~55 ℃时,随着温度的升高,水解度及酸溶性肽得率增大,在 55 ℃时达到最大值,继续升高温度,水解度及酸溶性肽得率反而呈下降趋势。这是因为过高的酶解温度会导致蛋白酶的变性,使酶活力减弱,不利于酶解反应的进行^[20]。因此,黄粉虫蛋白双酶水解的温度以 55 ℃为宜。

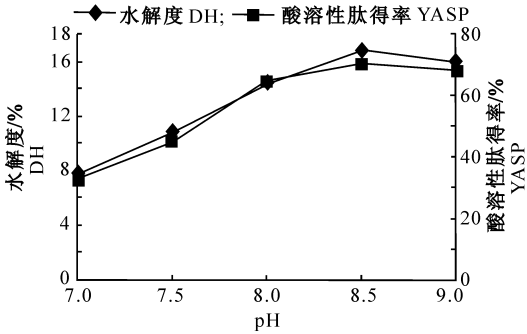


图 5 pH 对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响
Fig. 5 Effect of pH on hydrolyzed action of Yellow mealworm protein

2.2 黄粉虫蛋白双酶水解工艺条件的优化

根据单因素试验结果,确定酶解时间为 120 min,胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 的酶活比为 1:1,料液比为 1:3,综合考虑水解过程中加酶量、pH 和酶解温度 3 个因素的共同作用,以水解度和酸溶性肽得率为响应值,设计了 3 因素 3 水平共 20 次试验点的响应面分析试验,结果如表 2 所示。

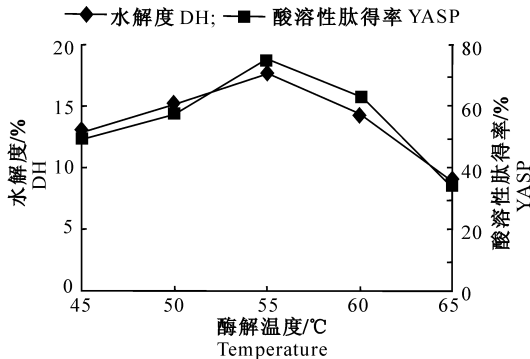


图 6 酶解温度对黄粉虫蛋白双酶水解反应的影响
Fig. 6 Effect of temperature on hydrolyzed action of Yellow mealworm protein

2.2.1 二次回归模型的拟合及方差分析 (1)水解度回归模型的拟合及方差分析。为了考察各因素对水解度的影响,以 DH(Y_1)为指标,利用 Design-expert7.55 数据处理软件对表 2 的试验结果进行分析,可得 3 因子与水解度之间的回归方程(模型)为:
$$Y_1 = 17.47 + 2.44X_1 + 0.63X_2 - 0.84X_3 - 0.23X_1^2 - 0.60X_2^2 - 1.46X_3^2 - 0.33X_1X_2 +$$

$$0.36X_1X_3-1.09X_2X_3。$$
 (1)

对回归模型(1)进行方差分析,结果见表 3,其模型系数显著性检验结果见表 4。由表 3 可知,水解度回归方程(模型)的 $P<0.000\ 1$,表明该模型极显著;模型的复相关系数为 0.986 3,说明该模型能解释 98.63%响应值的变化,拟合程度良好,试验误

差小,可以用此模型对水解度进行分析和预测。由表 4 可知,该模型中一次项加酶量(X_1)、pH(X_2)、酶解温度(X_3)对水解度的影响均达到极显著水平,二次项和交互项中,除 X_1^2 、 X_1X_2 对水解度影响不显著外,其余均达显著水平。这说明该回归方程(模型)是有效的。

表 2 响应面试验设计方案及试验结果

Table 2 Designs and results of response surface method

序号 No.	X ₁ 加酶量/(mg·g ⁻¹) Dosage of protease	X ₂ pH	X ₃ 酶解温度/℃ Temperature	Y ₁ 水解度/% DH	Y ₂ 酸溶性肽得率/% YASP
1	1	1	1	16.268	66.997 9
2	1	1	-1	19.289 2	87.537 2
3	1	-1	1	17.894 8	76.330 4
4	1	-1	-1	16.035 6	65.172 2
5	-1	1	1	11.852 4	59.151 2
6	-1	1	-1	15.803 2	64.366 2
7	-1	-1	1	11.62	57.587 7
8	-1	-1	-1	11.736 2	58.859 9
9	-1.682	0	0	12.549 6	61.258 6
10	1.682	0	0	21.380 8	92.033 5
11	0	-1.682	0	15.106	61.802 4
12	0	1.682	0	16.732 8	68.959 6
13	0	0	-1.682	15.338 4	62.016 1
14	0	0	1.682	11.62	58.238 4
15	0	0	0	17.43	73.135 4
16	0	0	0	16.965 2	69.688
17	0	0	0	17.616	75.427 3
18	0	0	0	17.755 4	76.01
19	0	0	0	17.546 2	74.009 5
20	0	0	0	17.43	72.727 6

表 3 水解度回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for DH

方差来源 Source	自由度 DF	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F	P	复相关系数 R-square
模型 Model	9	141.84	15.76	80.29	<0.000 1	0.986 3
残差 Error	5	0.37	0.073			
总和 Corrected total	19	143.80				

表 4 水解度回归模型系数显著性检验结果(t 检验)

Table 4 Test of significance for DH (t -Test)

系数项 Parameter	自由度 DF	系数估计值 Estimate	标准误差 Standard error	t	P
截距 Intercept	1	17.47	0.18		
X_1	1	2.44	0.12	20.36	<0.000 1
X_2	1	0.63	0.12	5.29	0.000 4
X_3	1	-0.84	0.12	-7.01	<0.000 1
X_1^2	1	-0.23	0.12	-1.98	0.075 9
X_2^2	1	-0.60	0.12	-5.15	0.000 4
X_3^2	1	-1.46	0.12	-12.54	<0.000 1
X_1X_2	1	-0.33	0.16	-2.13	0.058 8
X_1X_3	1	0.36	0.16	2.32	0.042 9
X_2X_3	1	-1.09	0.16	-6.95	<0.000 1

(2)酸溶性肽得率回归模型的拟合及方差分析。 为了考察各因素对酸溶性肽得率的影响,以 YASP

(Y_2)为指标,利用 Design-expert7.55 数据处理软件对表 2 的试验结果进行分析,可得 3 因子与酸溶性肽得率之间的回归方程(模型)为:

$$Y_2=73.50+7.90X_1+2.35X_2-1.63X_3+1.11X_1^2-2.87X_2^2-4.73X_3^2+0.75X_1X_2-0.36X_1X_3-4.46X_2X_3 \quad (2)$$

对回归模型(2)进行方差分析,结果见表 5,其模型系数显著性检验结果见表 6。由表 5 可以看出,酸溶性肽得率回归方程(模型)的 P 为 0.000 2,

表明该模型极显著;模型的复相关系数为 0.918 7,说明该模型能解释 91.87%响应值的变化,拟合程度良好,试验误差小,可以用此模型对酸溶性肽得率进行分析和预测。由表 6 可知,该模型中一次项加酶量(X_1)及 pH(X_2)对酸溶性肽得率的影响达到极显著水平,酶解温度(X_3)的影响不显著,二次项和交互项中,除 X_2^2 、 X_3^2 、 X_2X_3 对酸溶性肽得率的影响达极显著水平外,其余均不显著。这说明该回归方程(模型)是有效的。

表 5 酸溶性肽得率回归模型的方差分析
Table 5 Analysis of variance (ANOVA) for YASP

方差来源 Source	自由度 DF	平方和 Sum of squares	均方 Mean square	F	P	复相关系数 R -square
模型 Model	9	1 581.40	175.71	12.56	0.000 2	0.918 7
残差 Error	5	25.54	5.11			
总和 Corrected total	19	1 721.35				

表 6 酸溶性肽得率回归模型系数显著性检验结果(t 检验)
Table 6 Test of significance for YASP (t -Test)

系数项 Parameter	自由度 DF	系数估计值 Estimate	标准误差 Standard error	t	P
截距 Intercept	1	73.50	1.53		
X_1	1	7.90	1.01	7.80	<0.000 1
X_2	1	2.35	1.01	2.32	0.042 4
X_3	1	-1.63	1.01	-1.61	0.139 1
X_1^2	1	1.11	0.99	1.13	0.286 5
X_2^2	1	-2.87	0.99	-2.92	0.015 4
X_3^2	1	-4.73	0.99	-4.80	0.000 7
X_1X_2	1	0.75	0.32	0.56	0.585 5
X_1X_3	1	-0.36	0.32	-0.27	0.790 0
X_2X_3	1	-4.46	0.32	-3.37	0.007 1

2.2.2 双酶水解效果影响因素的交互作用分析
(1)水解度影响因素的交互作用。从图 7 可见,pH 不变,随着加酶量的增大,水解度急剧增加;加酶量不变,随着 pH 的增加,水解度也随之增加,但增加幅度较小。从图 8 可见,酶解温度不变,随着加酶量

的增大,水解度急剧增加;加酶量不变,随着酶解温度的增加,水解度先增加,后下降。从图 9 可见,pH 不变,随着酶解温度的增加,水解度先增加,后略有下降;酶解温度不变,随着 pH 的增加,水解度随之增加。

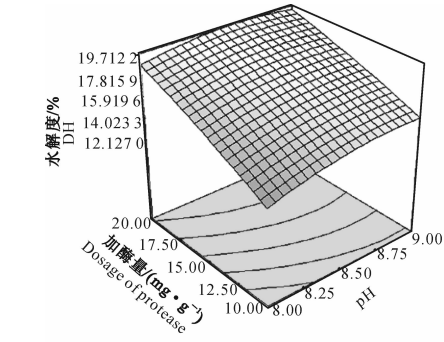


图 7 加酶量和 pH 对水解度的交互作用响应曲面
Fig.7 Response surface of interaction to DH by dosage of protease and pH

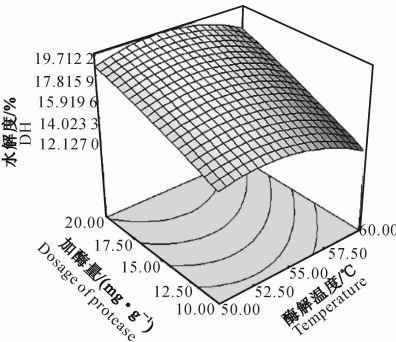


图 8 加酶量和酶解温度对水解度的交互作用响应曲面
Fig.8 Response surface of interaction to DH by dosage of protease and temperature

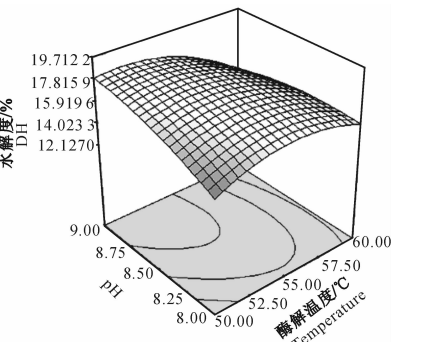


图 9 pH 和酶解温度对水解度的交互作用响应曲面
Fig.9 Response surface of interaction to DH by pH and temperature

综合图 7、图 8 和图 9 可以看出,在本试验条件下,加酶量和酶解温度是水解度的主要影响因素,pH 为次要影响因素。

(2)酸溶性肽得率影响因素的交互作用。从图 10 可见,pH 不变,随着加酶量的增加,酸溶性肽得率急剧增加;加酶量不变,随着 pH 的增加,酸溶性肽得率也随之增加,但达到最大值后略有下降。从图 11 可见,酶解温度不变,随着加酶量的增加,酸溶性肽得率急剧增加;加酶量不变,随着酶解温度的增

加,酸溶性肽得率先增加,达到最大值后又开始下降。从图 12 可见,pH 不变,随着酶解温度的增加,酸溶性肽得率变化出现 2 种情况:低温时增加幅度大,高温时减少幅度小;酶解温度不变,随着 pH 的增加,酸溶性肽得率随之增加。

综合图 10、图 11 和图 12 可以看出,在本试验条件下,加酶量是酸溶性肽得率的主要影响因素,pH 和温度为次要影响因素。

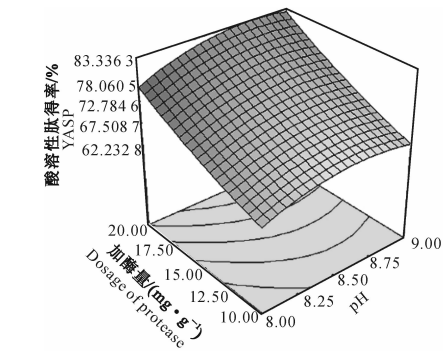


图 10 加酶量和 pH 对酸溶性肽得率的交互作用响应曲面
Fig. 10 Response surface of interaction to YASP by dosage of protease and pH

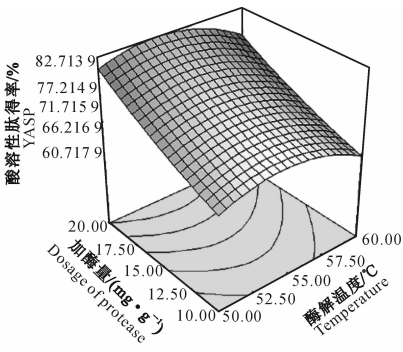


图 11 加酶量和酶解温度对酸溶性肽得率的交互作用响应曲面
Fig. 11 Response surface of interaction to YASP by dosage of protease and temperature

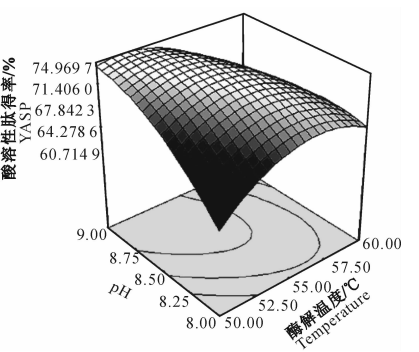


图 12 pH 和酶解温度对酸溶性肽得率的交互作用响应曲面
Fig. 12 Response surface of interaction to YASP by pH and temperature

2.3 双酶水解条件的优化参数组合及验证

利用 Design-expert7.55 数据处理软件对上述回归模型进行处理,优化出 5 组工艺参数,按照此工艺参数进行试验验证,结果见表 7。由表 7 可知,综

合考虑水解度和酸溶性肽得率,在加酶量 23.41 mg/g,pH 8.77,酶解温度 53.41 ℃时酶解效果最好。在此条件下,水解度可达到 21.61%,酸溶性肽得率可达到 92.09%。

表 7 双酶水解回归模型优化的 5 组工艺参数的验证结果

Table 7 Verified results of hydrolyzed by double-protease combinations of optimum three groups from regression equation

试验序号 No.	自变量(X) Variable			响应值(Y) Response value				偏差 Variance	
	加酶量/ (mg·g ⁻¹) Dosage of protease	pH	酶解温度/℃ Temperature	水解度/% DH		酸溶性肽得率/% YASP		水解度/% DH	酸溶性 肽得率/% YASP
				实测值 Actual value	预测值 Predicted value	实测值 Actual value	预测值 Predicted value		
1	23.41	8.77	53.35	20.98	20.892 9	92.08	92.032 9	0.415 1	0.051 2
2	23.41	8.77	53.41	21.61	20.892 3	92.09	92.032 9	3.321 1	0.062
3	23.41	8.77	53.44	21.09	20.891 5	92.10	92.033 2	0.941 2	0.072 5
4	24.38	8.78	53.31	20.74	20.877 1	91.96	92.032 9	-0.661 0	-0.079 3
5	23.41	8.93	52.41	20.53	20.747 4	92.58	92.768 1	-1.059 0	-0.203 2

注:偏差=(实测值-预测值)/实测值×100%。
Note: Variance=(Actual value-Predicted value)/Actual value×100%。

3 结 论

(1)胰蛋白酶和碱性蛋白酶 Alcalase 双酶组合水解黄粉虫蛋白的效果较单一酶好,且水解作用集中在前 60 min。

(2)采用中心旋转组合试验设计和响应面方法优化,得到了双酶水解黄粉虫蛋白的最佳酶解条件,即酶解时间为 120 min,胰蛋白酶与碱性蛋白酶 Alcalase 的酶活比为 1:1,料液比为 1:3,加酶量为 23.41 mg/g,pH 为 8.77,酶解温度为 53.41 ℃。验

证试验表明,利用优化的水解条件可取得较好的水解效果,水解度高达 21.61%,酸溶性肽得率为 92.09%。

[参考文献]

[1] 谢保令. 黄粉虫营养成分的分析研究 [J]. 昆虫知识, 1994, 31 (3): 175-176.
Xie B L. Analysis on nutrients of *Tenebrio molitor* [J]. Entomological Knowledge, 1994, 31(3): 175-176. (in Chinese)

[2] 赵大军. 黄粉虫食品的开发利用 [J]. 农牧产品开发, 2000(3): 9-11.
Zhao D J. Development and utilization of *Tenebrio molitor* food [J]. Agriculture Products Development, 2000 (3): 9-11. (in Chinese)

[3] 王文亮, 孙爱东. 黄粉虫在食品加工中的开发利用 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(5): 87-89.
Wang W L, Sun A D. Development and utilization of *Tenebrio molitor* in food processing [J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(5): 87-89. (in Chinese)

[4] 杨兆芬, 林跃鑫, 陈寅山, 等. 黄粉虫幼虫营养成分分析和保健功能的实验研究 [J]. 昆虫知识, 1999, 36(2): 97-100.
Yang Z F, Lin Y X, Chen Y S, et al. Nutritional components of the larvae of *Tenebrio molitor* L. and its control [J]. Entomological Knowledge, 1999, 36(2): 97-100. (in Chinese)

[5] 杨建军. 生物活性肽的研究及生产 [J]. 广东饲料, 2003, 12 (1): 28-30.
Yang J J. Research and production of Bioactive peptides [J]. Guangdong Feed, 2003, 12(1): 28-30. (in Chinese)

[6] Pessi A, Bianchi E. Application of capillary electrophoresis to characterization of multiple antigen peptides [J]. Chromatography, 1991, 577: 307-313.

[7] Clareand D A, Swaisgood H E. Bioactive milk peptides, a prospectus [J]. J Dairy Sci, 2000, 82(1): 1187-1195.

[8] Weeb K E J. Internal absorption of protein hydrolysis products: A review [J]. J Anim Sci, 1990, 68(9): 3011-3022.

[9] Kristinsson H G, Rasco B A. Hydrolysis of salmon muscle proteins by an enzyme mixture extracted from atlantic salmon (*Salmonsalar*) [J]. J Food Biochem, 2000(24): 177-187.

[10] Ney K H. Hydrolysis of deliberated proteins [J]. Journal of Food Science, 2002, 24(3): 87-89.

[11] 杨兆芬, 林跃鑫, 张东弛, 等. 黄粉虫复合氨基酸的提取及氨基酸虫酒的制作 [J]. 昆虫知识, 1998, 35(5): 290-292.
Yang Z F, Lin Y X, Zhang D C, et al. The extraction of amino acid from *Tenebrio molitor* and the production of amino acids

pest-wine [J]. Entomological Knowledge, 1998, 35 (5): 290-292. (in Chinese)

[12] 崔蕊静, 林学岷, 周丽艳. 黄粉虫蛹水解蛋白发酵营养液的研制 [J]. 食品科学, 1999, 20(1): 42-44.
Cui R J, Lin X M, Zhou L Y. Development on fermentation nutrient solution from hydrolyzed protein of *Tenebrio molitor* pupae [J]. Food Science, 1999, 20(1): 42-44. (in Chinese)

[13] 陈杰林, 白卫东, 李伟敏. 黄粉虫蛋白分析及酶解工艺研究 [J]. 农牧产品开发, 1999(1): 24-25.
Chen J L, Bai W D, Li W M. The analysis of *Tenebrio molitor* protein and study on enzyme-hydrolyzed conditions [J]. Agriculture Products Development, 1999(1): 24-25. (in Chinese)

[14] 熊燕飞. 酶法水解蚕蛹蛋白制备多肽的工艺研究 [J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 1999(3): 287-290.
Xiong Y F. Preparation of peptide from silkworm pupa protein with enzymic hydrolysis [J]. Journal of Hubei University: Natural Science Edition, 1999(3): 287-290. (in Chinese)

[15] 大连轻工业学院, 华南理工大学, 西北轻工业学院, 等. 食品分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
Dalian Light-technic University, South China University of Technology, Northwest Light-technic University, et al. Food analysis [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1994. (in Chinese)

[16] Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of food proteins [M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986.

[17] 谭 斌, 曾凡坤, 吴永炯. 花生肽的酶法生产工艺研究 [J]. 食品与机械, 2000(3): 14-16.
Tan B, Zeng F K, Wu Y X. Technology of enzymatic hydrolysis of peanut peptides [J]. Food and Machinery, 2000(3): 14-16. (in Chinese)

[18] 白厚义. 回归设计及多元统计分析 [M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2003.
Bai H Y. Design and multiple regression analysis [M]. Nan-ning: Guagnxi Sci Tech Press, 2003. (in Chinese)

[19] 王文亮, 孙爱东. 胰蛋白酶水解黄粉虫蛋白工艺条件的优化 [J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(10): 160-162.
Wang W L, Sun A D. The optimization of *Tenebrio molitor* protein hydrolyzed by trypsin [J]. Food and Fermentation Industries, 2005, 31(10): 160-162. (in Chinese)

[20] 王 璋. 食品酶学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1996: 194-195.
Wang Z. Food enzyme [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1996: 194-195. (in Chinese)