

方格星虫蛋白酶解工艺优化

Study on hydrolysis conditions of *Sipunculus nudus* by response surface methodology

孙雪萍¹ 杨家林¹ 徐艳¹ 刘海娟¹ 任义²

SUN Xue-ping¹ YANG Jia-lin¹ XU Yan¹ LIU Hai-juan¹ REN Yi²

(1. 广西海洋研究所, 广西北海 536000; 2. 北海艺术设计职业学院环境艺术设计系, 广西北海 536000)

(1. Guangxi Institute of Oceanology, Guangxi Key Laboratory of Marine Biotechnology, Beihai, Guangxi 536000, China; 2. Environmental Art Design, Beihai Vocational Institute of Art & Design, Beihai, Guangxi 536000, China)

摘要:以水解度为指标,比较 7 种蛋白酶对方格星虫的水解效果。在单因素试验考察的基础上,采用 Box-Behnken 模型响应面设计,建立方格星虫蛋白酶解的二次回归模型,确定最佳的水解条件。结果表明,复合蛋白酶对方格星虫蛋白的水解效果最佳,最佳水解条件为:酶与底物比为 7.8%,酶解时间为 4 h,酶解温度为 50 ℃。该条件下,方格星虫蛋白的水解度达到 24.81%。

关键词:方格星虫;蛋白质;酶解;水解度

Abstract: Using DH (degree of hydrolysis) as the main index, hydrolysis effects on *Sipunculus nudus* protein of seven proteases were compared. On the basis of single factor experiment, response surface methodology and Box-Behnken model were employed to establish the quadratic model for optimization the hydrolysis conditions. Results showed that the DH of Protamex was higher than those of others. The optimum hydrolysis conditions were as follows: the ratio of enzyme to substrate of 7.8%, hydrolysis time of 4 h and the hydrolysis temperature at 50 ℃. Under this condition, DH reached 24.81%. This study was aimed to provide theoretical basis for the development and utilization of *S. nudus*.

Keywords: *Sipunculus nudus*; protein; enzymolysis; degree of hydrolysis

方格星虫(*Sipunculus nudus*),俗称沙虫,属于星虫动物门,星虫科,方格星虫属动物,在中国海域有广阔的资源分布。据记载^[1],沙虫性寒、味甘、咸,具有滋阴降火、清肺补虚、活血强身及补肾养颜等功能,可以治疗骨蒸潮热,阴虚盗汗、肺虚喘咳等多种病症。近年来大量的研究^[2-4]发现,天然

来源的蛋白质经过酶促反应水解后,得到的小肽具有多种生理功能,如抗氧化、抗菌、降血压、降血脂及免疫调节等作用。现代研究^[5-7]亦表明方格星虫含有丰富的蛋白质,多种氨基酸和微量元素,具有抗氧化、抗菌、抗辐射等多种生物活性。目前已有研究^[8]表明,方格星虫经过生物酶解后获得的酶解产物含有蛋白质、多肽以及游离氨基酸等成分,并具有较强的抗氧化作用。本研究拟采用响应面分析法优化采集自广西北部湾海域的方格星虫的蛋白酶解工艺,旨在为方格星虫的开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

方格星虫:采自广西北海的广西海洋研究所海水养殖示范基地的沙虫养殖大塘,干燥后粉碎,过 80 目筛备用,凯氏定氮法测定蛋白含量为(69.3±5.41)%;

三硝基苯磺酸(TNBS),美国 Sigma 公司;

胃蛋白酶(5 万 U/g)、木瓜蛋白酶(9 万 U/g)、碱性蛋白酶(55 万 U/g)、复合蛋白酶(8 万 U/g)、风味蛋白酶(3 万 U/g)和中性蛋白酶(5 万 U/g);诺维信生物技术有限公司;

胰蛋白酶:1 万 U/g,广西南宁东恒华道生物科技有限公司;

其余试剂为分析纯。

1.1.2 仪器与设备

电热恒温浴锅:DK-S26 型,上海精宏实验设备有限公司;

紫外可见分光光度计:TU-1810 型,北京普析通用仪器有限责任公司;

精密电子天平:ME104 型,梅特勒—托利多仪器有限

基金项目:广西科学院基本科研业务费资助项目(编号:13YJ22HYS15);广西海洋生物技术重点实验室开放基金资助课题(编号:GLMBT-201407)

作者简介:孙雪萍(1982—),女,广西海洋研究所助理研究员,博士。
E-mail:sunxueping2012@126.com

收稿日期:2015-01-22

公司;

精密 pH 计:PB-10 型,赛多利斯科学仪器有限公司;

氮磷钙测定仪:NPCa-02 型,上海洪纪仪器设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 水解用酶的筛选 取 1.5 g 方格星虫蛋白粉,加入 30 mL 水,按照表 1 中 7 种蛋白水解酶最适宜酶解条件进行酶解,酶与底物比设定为 5%,搅拌酶解 4 h 后,沸水灭酶 10 min,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定水解度。

表 1 7 种蛋白水解酶最适宜的反应条件

Table 1 Optimal hydrolysis conditions of seven proteases

蛋白酶	pH	温度/℃
胃蛋白酶	2.0	37
木瓜蛋白酶	6.0	60
胰蛋白酶	7.5	55
碱性蛋白酶	8.5	50
复合蛋白酶	7.0	50
风味蛋白酶	6.0	50
中性蛋白酶	7.0	55

1.2.2 水解度的测定 取水解上清液 0.5 mL,加入 1% SDS 2.5 mL 混合均匀。取混合液 15 μL,依次加入 1% SDS 35 μL,pH 8.2 磷酸缓冲溶液 1 000 μL,0.1% 三硝基苯磺酸 (TNBS) 500 μL。混匀后置于 50 ℃ 烘箱中避光反应 1 h 后,加入 0.1% HCl 2 mL 终止反应,室温静置 30 min 后,340 nm 下测定吸光值。以赖氨酸为对照品制作标准曲线。按照式(1)、(2)计算水解度(degree of hydrolysis,DH)^[9]。

$$DH = \frac{C_1 - C_0}{P} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

DH——水解度,%;

C₁——水解后的游离氨基浓度,mmol/mL;

C₀——水解前的游离氨基浓度,mmol/mL;

P——总肽键浓度,mmol/mL。

$$P = C_h \times h_{tot} \quad (2)$$

式中:

C_h——水解液蛋白浓度,g/mL;

h_{tot}——底物中肽键总数,由氨基酸分析结果得到方格星虫为 9.6 mmol/g。

1.2.3 单因素考察 在确定水解用酶的基础上,考察了酶与底物比(Enzyme/Substrate, E/S),酶解时间和酶解温度 3 个因素对方格星虫蛋白酶解效果的影响。

(1) 酶与底物比对水解度的影响:取方格星虫蛋白 1.5 g,加入 30 mL 水,按照不同的酶与底物比(4%,5%,6%,7%,8%),50 ℃ 搅拌酶解 4 h 后,开水煮沸 10 min 灭

酶,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定水解度。

(2) 酶解时间对水解度的影响:取方格星虫蛋白 1.5 g,加入 30 mL 水,按照 E/S 为 7%,50 ℃ 搅拌酶解不同时间(2,3,4,5,6 h),灭酶,离心后测定水解度。

(3) 酶解温度对水解度的影响:取方格星虫蛋白 1.5 g,加入 30 mL 水,按照 E/S 为 7%,在不同酶解温度下(40,45,50,55,60 ℃)搅拌酶解 5 h 后,灭酶,离心后测定水解度。

1.2.4 响应面分析试验设计 在单因素试验考察的基础上,确定了 E/S、酶解时间和酶解温度 3 个因素的最适宜考察范围。采用 Design Expert 8.05 软件,根据 Box-Behnken 中心组合设计原理,以 E/S、酶解时间和酶解温度为自变量,以水解度为响应值,设计三因素三水平响应面分析试验。

1.2.5 统计分析 重复 3 次试验,结果取其平均值。采用 Design Expert 8.05 软件对数据进行响应面分析,包括显著性差异分析、方差分析以及最佳试验条件和最佳响应值预测。

2 结果与分析

2.1 水解用酶的筛选

由图 1 可知,7 种蛋白水解酶对方格星虫蛋白水解效果相差较大。胃蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解效果较差。胰蛋白酶、碱性蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶和中性蛋白酶水解效果较好。复合蛋白酶的水解效果最佳,在相同的酶解条件下,水解度达到 20.95%。因此选择复合蛋白酶用于水解方格星虫蛋白。

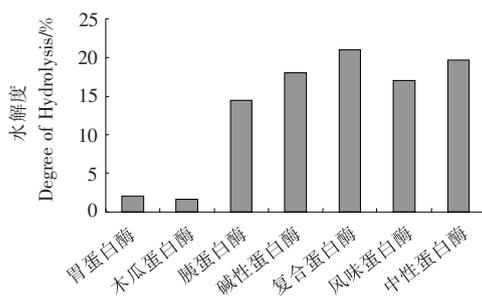


图 1 7 种蛋白水解酶的水解效果

Figure 1 The hydrolysis effects of seven different proteases

2.2 单因素考察

2.2.1 酶与底物比(E/S)对水解度的影响 由图 2 可知,在一定范围内,随着 E/S 的升高,水解度随之升高。但当 E/S 超过 7%,水解度出现下降的趋势,可能是由于酶浓度逐渐为底物所饱和的原因,因此选择 E/S 为 6%~8% 作为响应面考察的范围。

2.2.2 酶解时间对水解度的影响 由图 3 可知,在 2~5 h 时,随着酶解时间的延长,方格星虫蛋白的水解度相应地增加。当酶解时间超过 5 h 后,水解度有所下降。结果表明在 5 h 左右时蛋白基本水解达到平衡,因此选择 4~6 h 作为考

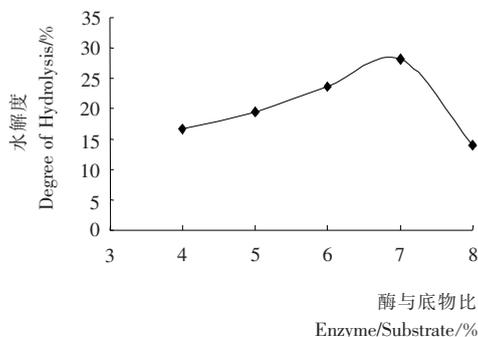


图 2 酶与底物比对水解度的影响

Figure 2 Effects of E/S on DH

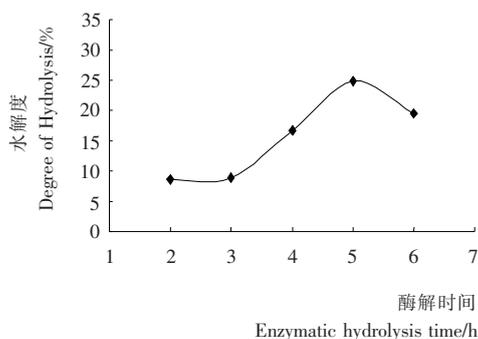


图 3 酶解时间对水解度的影响

Figure 3 Effects of hydrolysis time on DH

察范围。

2.2.3 酶解温度对水解度的影响 由图 4 可知,随着酶解温度的不断升高,水解度呈现先上升而后下降的变化趋势。在 40~50 °C 时,水解度随着酶解温度的升高而升高。当酶解温度超过 50 °C,水解度有所下降。虽然酶解温度的升高能够提高酶解反应的速率,但是酶是一种具有催化活性的蛋白质,温度过高会导致其部分失去催化活性,从而会减低酶促反应速率,因此选择 45~55 °C 作为考察范围。

2.3 响应面试验设计分析及结果

2.3.1 模型建立及显著性差异分析 本研究在考察单因素的基础上,采用响应面分析法对方格星虫蛋白的最优酶解工

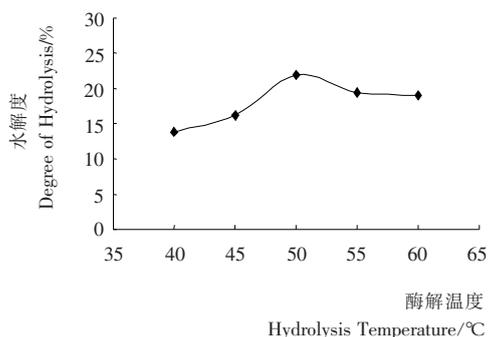


图 4 酶解温度对水解度的影响

Figure 4 Effects of hydrolysis temperature on DH

艺进行优化。试验因素及水平取值见表 2。利用 Design-expert 软件对表 3 的数据进行多元回归拟合,得到对 E/S、酶解时间和酶解温度的二元多次回归方程为:

$$Y = 22.28 + 0.24X_1 - 0.49X_2 + 0.75X_3 - 2.90X_1X_2 - 0.16X_1X_3 - 0.27X_2X_3 - 1.92X_1^2 - 0.38X_2^2 - 2.38X_3^2 \quad (3)$$

表 2 响应面分析因素及水平表

Table 2 Factor and level of response surface experiment

水平	X ₁ E/S/%	X ₂ 酶解时间/h	X ₃ 酶解温度/°C
-1	6	4	45
0	7	5	50
1	8	6	55

表 3 响应面试验设计及结果

Table 3 Design and results of response surface experiment

试验号	X ₁	X ₂	X ₃	水解度(Y)/%
1	-1	-1	0	17.11
2	1	-1	0	23.66
3	-1	1	0	22.11
4	1	1	0	17.05
5	-1	0	-1	16.78
6	1	0	-1	17.30
7	-1	0	1	18.99
8	1	0	1	18.86
9	0	-1	-1	19.29
10	0	1	-1	18.67
11	0	-1	1	20.92
12	0	1	1	19.23
13	0	0	0	21.90
14	0	0	0	22.51
15	0	0	0	20.73
16	0	0	0	24.99
17	0	0	0	21.28

由表 4 可知,模型二次项 X₁X₂、X₁² 和 X₃² 差异显著。同时由 P 值可知,在 E/S、酶解时间和酶解温度 3 个因素中,酶解温度对水解度的影响最大,其次为酶解时间和 E/S。同时由方差分析结果可以看出,回归模型的 P 值为 0.015 9,表明回归模型显著。失拟项的 P 值为 0.976 2,表明失拟误差相对于纯误差是不显著的,该模型具有较好的回归系数 (R² = 0.879 9),说明该试验设计是合理稳定的,能够较好地描述试验结果,使用回归方程代替真实的试验点进行方格星虫蛋白酶解的分析和预测是可行的。

2.3.2 响应面直观分析 由图 5 可知,酶与底物比和酶解时间对水解度的影响不大,在两个因素的全值变化范围内,水解度随酶与底物比的增加呈现先增加后降低的趋势,随着

表4 响应面分析方差分析表

Table 4 Variance analysis of response surface design

项目	平方和	自由度	均方	F	P
模型	83.99	9	9.33	5.70	0.015 9
X ₁	0.44	1	0.44	0.27	0.619 6
X ₂	1.92	1	1.92	1.17	0.314 8
X ₃	4.44	1	4.44	2.71	0.143 7
X ₁ X ₂	33.70	1	33.70	20.57	0.002 7
X ₁ X ₃	0.11	1	0.11	0.064	0.806 9
X ₂ X ₃	0.29	1	0.29	0.17	0.688 5
X ₁ ²	15.56	1	15.56	9.50	0.017 8
X ₂ ²	0.60	1	0.60	0.37	0.564 4
X ₃ ²	23.80	1	23.80	14.52	0.006 6
残差	11.47	7	1.64		
失拟项	0.52	3	0.17	0.064	0.976 2
净误差	10.94	4	2.74		
总离差	95.46	16			

酶解时间的不断延长,水解度趋于平稳。由图6可知,酶解温度的变化对水解度的影响高于E/S,在两个因素的全值变化范围内,水解度均呈现先增加后降低的趋势,两者的交互作用在图形中反映出适宜的条件会使水解度到达最大值,但是过高或过低都会使水解度降低。由图7可知,酶解时间和酶解温度的相互作用呈现同样的变化趋势。

综合以上单因素及响应面分析试验结果,使用 Design-expert软件,得到最佳的酶解条件为:E/S7.81%,酶解时间

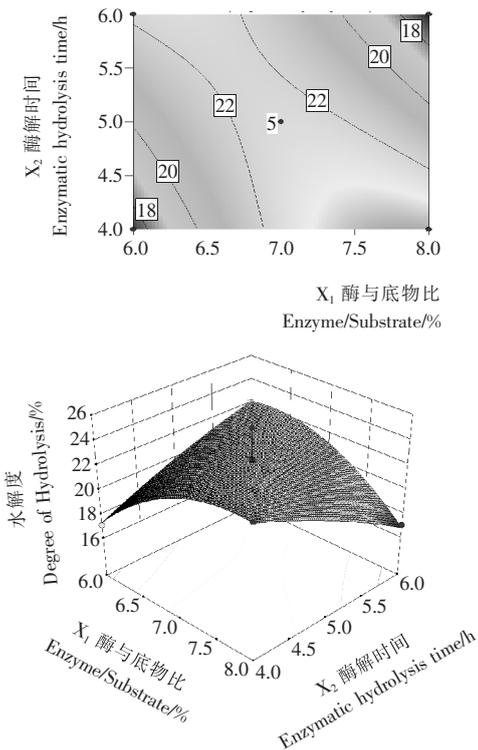


图5 酶与底物比与酶解时间的等高线图和响应面图
Figure 5 Contour diagram and response surface plot of effects of E/S and enzymatic hydrolysis time

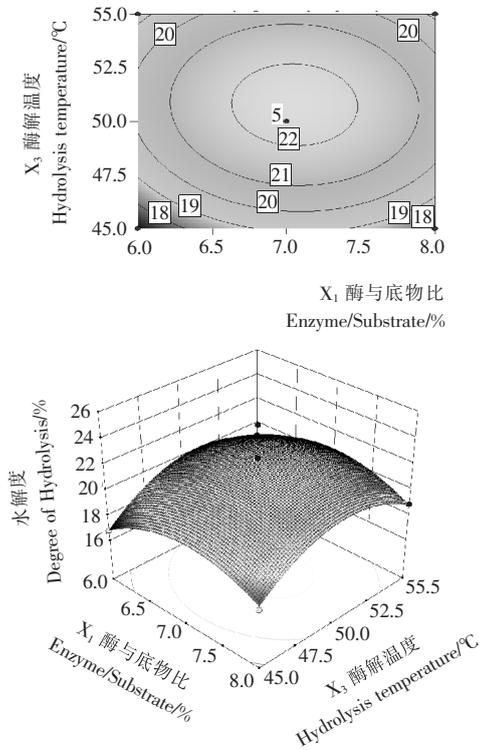


图6 酶与底物比与酶解温度的等高线图和响应面图
Figure 6 Contour diagram and response surface plot of effects of E/S and hydrolysis temperature

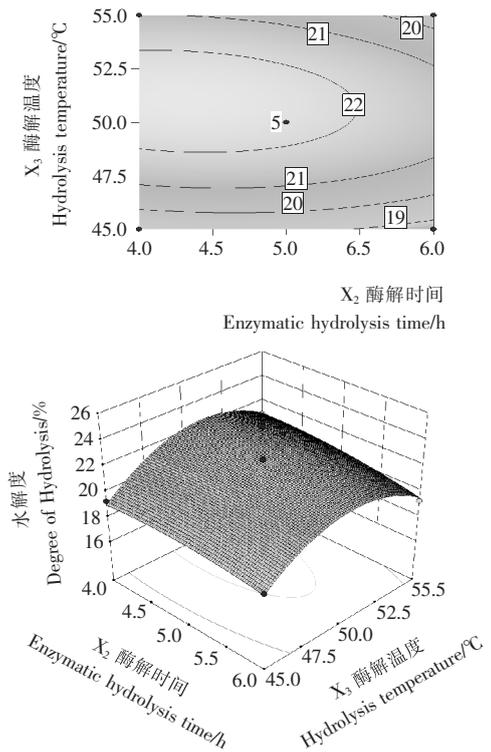


图7 酶解时间与酶解温度的等高线图和响应面图
Figure 7 Contour diagram and response surface plot of effects of enzymatic hydrolysis time and hydrolysis temperature

4 h, 酶解温度 50.93 °C, 预期达到的水解度为 23.76%。考虑实际生产情况, 最佳酶解条件修正为酶与底物比 7.8%, 酶解时间 4 h, 酶解温度 50 °C。按照确定的最佳酶解条件进行酶解验证实验 ($n = 3$), 所得的实际水解度为 (24.81 ± 1.72)%, 说明所建立的试验模型能够真实反映三因素对于复合蛋白酶酶解方格星虫蛋白的影响, 该酶解工艺可靠稳定。

3 结论

本研究通过单因素试验和响应面分析法, 考察了酶与底物比、酶解时间和酶解温度 3 个对方格星虫蛋白水解的影响, 经过优化得到最佳酶解条件, 采用复合蛋白酶酶解, 酶与底物比为 7.8%, 酶解时间为 4 h, 酶解温度为 50 °C。在此条件下, 水解度达到 24.81%, 说明该工艺稳定可靠, 对实际生产具有指导意义。大量研究^[10-12]表明, 生物活性肽是以非活性状态存在于蛋白质中, 通过适当的酶解作用, 可以将潜在形式存在于蛋白质的活性肽释放出来, 从而得到具有特殊生物学功能的活性肽。因此本研究可为后续方格星虫蛋白的开发和利用提供理论依据, 同时方格星虫蛋白酶解产物的生物活性有待于今后进一步的研究。

参考文献

- 1 陈细香, 林秀雁, 卢昌义, 等. 方格星虫属动物的研究进展[J]. 海洋科学, 2008, 32(6): 66~69.
- 2 Liu Xin, Zhang Mian-song, Zhang Chao, et al. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory, antihypertensive and antihyperlipidaemic activities of protein hydrolysates from *Rhopilema*

- esculentum*[J]. Food Chemistry, 2012, 134(4): 2134~2140.
- 3 Sudhakar S, Nazeer R A. Structural characterization of an Indian squid antioxidant peptide and its protective effect against cellular reactive oxygen species [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 14: 502~512.
- 4 Pompilio A, Scocchi M, Pomponio S, et al. Antibacterial and anti-biofilm effects of cathelicidin peptides against pathogens isolated from cystic fibrosis patients [J]. Peptides, 2011, 32(9): 1807~1814.
- 5 朱银玲, 李思东, 方富永. 方格星虫多肽的酶解法制备工艺优化与抗氧化作用研究[J]. 化学通报, 2012, 75(7): 642~647.
- 6 张桂和, 赵谋明, 巫光宏. 方格星虫酶解物成分分析及其抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(3): 80~84.
- 7 董兰芳, 张琴, 童童, 等. 方格星虫多糖抗菌和抗氧化活性研究[J]. 广西科学, 2013, 20(4): 289~293.
- 8 朱银玲, 刘华忠, 李思东, 等. 酶解法制备方格形成多肽及其抗氧化作用研究[J]. 化学研究与应用, 2012, 24(9): 1397~1401.
- 9 Cian R E, Martínez-Augustin O, Drago S R. Bioactive properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis from protein by-products of *Porphyra columbina*[J]. Food Research International, 2012, 49(1): 364~372.
- 10 任婷婷, 董秀萍, 朱薇薇, 等. 响应面法优化海参胶原蛋白肽的制备条件[J]. 食品与机械, 2010, 26(3): 120~123.
- 11 徐向英, 王岸娜, 林伟静, 等. 响应面法优化燕麦全粉中蛋白质提取工艺[J]. 食品与机械, 2011, 27(5): 96~99.
- 12 刘新, 张绵松, 孟秀梅, 等. 海蜇 ACE 抑制肽水解用酶的筛选[J]. 食品工业, 2012, 33(3): 64~66.

(上接第 198 页)

同时还能发挥纯天然, 安全又绿色的优势, 在食品保鲜领域拥有着广阔的前景。

参考文献

- 1 鲁晓晴, 王莎莎, 邱真真, 等. 一种新型复方中草药消毒剂的性能研究[J]. 中国消毒学杂志, 2013, 30(10): 907~909.
- 2 戴聪杰, 林培庆. 白花败酱草乙醇提取液的抑菌作用及其稳定性研究[J]. 食品与机械, 2011, 27(6): 157~159.
- 3 郭红珍, 杜鹃, 史振霞, 等. 几种常见香辛料的抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(17): 10273~10274.
- 4 陈树生. 香辛料防腐剂的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(12): 3.
- 5 江旺, 刘晓丽, 于泓鹏, 等. 香辛料精油对油料花生气相防霉作用研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 164~167.
- 6 丛建民, 郝成欣. 香辛料提取物保鲜草莓研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(3): 106~108.
- 7 张璟晶. 天然香辛料的抑菌作用及对冰鲜银鲳的保鲜效果[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(11): 303~306.
- 8 钱昆, 周涛. 植物香辛料复配抑菌效果的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(2): 93~95.

- 9 夏秀芳, 孔保华, 于长青. 几种天然香辛料提取物延长冷却肉货架期的研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(3): 55~59.
- 10 李妍, 苏倩清. 巴戟天水提取物油脂抗氧化性和抗菌活性研究[J]. 食品与机械, 2008, 24(1): 93~95.
- 11 李巍. 香辛料提取物抑菌效果的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2012(3): 142~143.
- 12 崔海英. 一种天然植物提取物的混合物及其制备方法和应用: 中国, 201210451815.2[P]. 2013-02-20.
- 13 Adisakwattana S, Lerdsuwankij O, Poputtachai, et al. Inhibitory activity of cinnamon bark species and their combination effect with acarbose against intestinal α -glucosidase and pancreatic α -amylase [J]. Plant Foods Hum Nutr, 2011(66): 143~148.
- 14 张赞彬, 郭媛. 香辛料精油抑菌机理研究进展及其在食品保藏中的应用[J]. 中国调味品, 2011, 36(7): 4~10.
- 15 郭媛. 八角茴香精油的抗菌机理研究及其在冷却肉保鲜中的应用[D]. 上海: 上海应用技术学院, 2012.
- 16 王振强, 申森. 利用纳豆菌提取抗菌物质的研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(5): 90~92.
- 17 文洁, 李婕, 曹维. 天然茶树油消毒剂抗菌活性与应用前景[J]. 中药材, 2011, 34(3): 487~489.