

# 酶法制备花椒籽蛋白铁结合肽的工艺优化

## Preparation of iron-chelating peptides from *Zanthoxylum Bungeanum* seed protein using enzymatic hydrolysis

原洪<sup>1</sup> 柴丽琴<sup>1</sup> 权俐<sup>2</sup> 王立霞<sup>1</sup> 田呈瑞<sup>1</sup> 王晓宇<sup>1</sup>

YUAN Hong<sup>1</sup> CHAI Li-qin<sup>1</sup> QUAN Li<sup>2</sup> WANG Li-xia<sup>1</sup> TIAN Cheng-rui<sup>1</sup> WANG Xiao-yu<sup>1</sup>

(1. 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 陕西 西安 710119;

2. 西安力邦肇新生物科技有限公司, 陕西 西安 710077)

(1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710119, China;

2. Xi'an Libang Zhaoxin Biotechnology Co., Ltd., Xi'an, Shaanxi 710077, China)

**摘要:**采用不同的蛋白酶水解花椒籽蛋白,以花椒籽蛋白铁结合肽水解度和铁结合能力为指标,筛选出制备花椒籽蛋白铁结合肽的最佳蛋白酶,并利用最佳蛋白酶酶解花椒籽蛋白制备铁结合肽。在单因素试验的基础上,应用 Box-Behnken 方法进行四因素三水平的试验设计,考察底物浓度、酶添加量、pH 值、酶解温度和酶解时间对铁结合能力的影响,优化花椒籽蛋白制备铁结合肽工艺。结果表明:最佳蛋白酶为碱性蛋白酶,最佳工艺条件为:底物浓度 27.70 mg/mL、酶添加量 0.09 mg/mL、酶解 pH 10.47、酶解温度 65 ℃、酶解时间 2.5 h,该条件下酶解产生水解液的水解度为 7.23%,铁结合能力为 585.66 mg EDTA/g·蛋白质。

**关键词:**花椒籽蛋白;铁结合肽;碱性蛋白酶;水解度

**Abstract:** Zanthoxylum bungeanum seed protein was hydrolyzed with different proteases, and the optimal protease was screened based on the hydrolysis degree and iron-chelating ability of hydrolysates, then iron-chelating peptides were prepared by the optimal protease. Single factor method and response surface methodology based on Box-Behnken design using four factors and three levels were carried out to optimize the conditions of Zanthoxylum bungeanum seed iron-chelating peptide, and the effects, including substrate concentration, enzyme/substrate ratio, hydrolysis pH, temperature, time on iron-chelating ability of hydrolysate were studied. The results indicated alcalase proteases was the optimal protease to prepare iron-chelating peptides from Zanthoxylum bungeanum seed protein. The optimal hydrolysis conditions were as followed: the substrate concentration 27.70 mg/mL, enzyme concentration 0.09 mg/mL, pH 10.47, hy-

drolysis temperature 65 ℃ and time 2.5 h. Based on this condition, the hydrolysate performed higher iron-chelating ability and degree of hydrolysis, which were 585.66 mg EDTA/g·Protein and 7.23% respectively.

**Keywords:** Zanthoxylum bungeanum seed protein; iron-chelating peptide; alcalase protease; hydrolysis degree

花椒籽作为花椒生产中的主要副产物,其种仁脱脂后蛋白含量达 60.34%,且氨基酸组成比较合理,是一种优质的植物蛋白资源<sup>[1]</sup>。但长期以来一直没有得到较好的开发及利用,大量的花椒籽经榨油后被当做废物丢弃,既造成了资源浪费,又导致了环境污染。近年来,花椒籽蛋白质资源的兴起,为花椒的综合利用开辟了一条新的途径。目前,关于花椒籽蛋白的研究主要集中在蛋白质的提取工艺<sup>[2]</sup>及从蛋白质中提取抗氧化肽<sup>[3-4]</sup>、降血压肽<sup>[5]</sup>、抑菌肽<sup>[6]</sup>等方面。

矿物元素结合肽由于其结合矿物元素的不同而能够产生不同的生物活性。一般来说,铁肽、锌肽及钙肽主要有抑菌和抗氧化活性,铬肽等对预防由糖尿病引发的肝脏损伤有积极作用<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8-9]</sup>表明,矿物质元素与多肽结合在一起,会更加容易吸收。缺铁性贫血是各国普遍存在的营养缺乏病之一,主要通过服用无机补铁剂防治,但利用率低,而且会产生一些副作用。作为一种新型的生物态铁,多肽铁螯合物可直接由肠道黏膜细胞吸收,生物利用率高,且不会产生任何不良症状,是较为理想的铁补充剂<sup>[10]</sup>。目前有关铁结合肽的研究报道较多,按蛋白来源主要分动物蛋白源和植物蛋白源。其中植物蛋白源的研究较少,目前主要集中在大豆蛋白肽<sup>[11-12]</sup>、米蛋白肽<sup>[13]</sup>以及一些藻类蛋白肽<sup>[14]</sup>方面,但有关花椒籽源蛋白肽铁螯合物的研究尚未见报道。

本试验以花椒籽蛋白为原料,分别采用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶对其进行酶解,研究水

**基金项目:**陕西省重点研发计划项目(编号:2017NY-142)

**作者简介:**原洪,女,陕西师范大学在读硕士研究生。

**通信作者:**田呈瑞(1955—),男,陕西师范大学教授,博士。

E-mail: chrtian@snnu.edu.cn

**收稿日期:**2017-05-26

解过程中的水解度、多肽的含量及其螯合亚铁离子能力,对酶解花椒籽蛋白制备铁结合肽的条件进行优化,以期为花椒籽的深度开发及铁结合肽在食品中的应用提供理论依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

花椒籽粕:大红袍花椒籽榨油后所得,源自陕西省韩城市;

花椒籽蛋白:蛋白质含量约为74.05%,实验室自制;

碱性蛋白酶(20万U/g)、中性蛋白酶(5万U/g)、木瓜蛋白酶(1万U/g):英国BDH公司;

风味蛋白酶:5万U/g,丹麦诺维信(Novo)公司;

牛血清白蛋白、福林酚:分析纯,美国Sigma公司;

菲洛嗉:分析纯,上海源叶生物科技有限公司;

氢氧化钠、浓盐酸、无水碳酸钠、酒石酸钾钠、硫酸铜、EDTA二钠盐、FeSO<sub>4</sub>等:分析纯,市售。

### 1.2 仪器与设备

真空冷冻干燥机:LGJ-18C型,北京四环科学仪器厂;

台式离心机:800B型,上海安亭科学仪器厂;

循环水式真空泵:SHZ-D(III)型,巩义市予华仪器有限责任公司;

旋转蒸发器:RE-52A型,上海亚荣生化仪器厂;

雷磁精密pH计:PHS-3C型,上海仪电科学仪器股份有限公司;

恒温振荡器:SHA-C型,金坛市富华仪器有限公司;

透析袋:截留分子量10kD,USA。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 工艺流程

花椒籽蛋白→加蒸馏水→调pH→调温→酶解→灭酶(沸水浴)→冷却→离心→收集上清液→水解度及铁结合能力测定

#### 1.3.2 指标测定

(1) 酶活力:采用福林酚法,按QB/T 1803—1993执行。

(2) 水解度:采用pH-stat法<sup>[15]</sup>。

(3) 多肽的含量:采用福林酚法<sup>[16]</sup>。

(4) 多肽的铁结合能力:参照文献<sup>[17]</sup>。

1.3.3 单因素试验 利用不同蛋白酶酶解花椒籽蛋白,筛选出最适蛋白酶。再用最适蛋白酶酶解花椒籽蛋白,分别研究酶解时间、底物浓度、pH、酶添加量、酶解温度对花椒籽蛋白水解度和铁结合能力的影响,确定提取铁结合肽适宜的单因素条件。

(1) 花椒籽蛋白质水解用酶的筛选:一定量的花椒籽蛋白粉中加入蒸馏水(底物浓度为2%),在锥形瓶中搅拌均匀。根据不同蛋白酶推荐的最适使用条件(见表1)进行水解,水解4.0h后,灭酶10min(沸水浴)。冷却后3000r/min离心20min,取上清液,测定水解度、多肽含量和铁结合能力,筛选花椒籽蛋白制备铁结合肽的合适蛋白酶。

(2) 酶解时间:设定底物浓度25mg/mL,碱性蛋白酶添加酶量0.08mg/mL,pH10,水解温度60℃,水解时间分别

表1 不同蛋白酶的推荐反应条件

Table 1 Recommended conditions of different protease

酶类	温度/℃	pH	时间/h	加酶量/%
碱性蛋白酶	55	8.0	4.0	5
中性蛋白酶	50	7.0	4.0	5
木瓜蛋白酶	65	6.5	4.0	5
风味蛋白酶	50	7.0	4.0	5

为1.0,1.5,2.0,2.5,3.0,3.5h,考察酶解时间对花椒籽蛋白水解度和铁结合能力的影响。

(3) 底物浓度:碱性蛋白酶添加酶量0.08mg/mL,pH10,水解温度60℃,水解时间2.5h,底物浓度分别10,15,20,25,30,35mg/mL,考察底物浓度对花椒籽蛋白水解度和铁结合能力的影响。

(4) 酶解pH:分别调节碱性蛋白酶酶解液的pH为7,8,9,10,11,12,酶添加酶量0.08mg/mL,水解温度60℃,水解时间2.5h,底物浓度25mg/mL,考察pH对花椒籽蛋白水解度和铁结合能力的影响。

(5) 酶添加量:设定碱性蛋白酶添加量分别为0.02,0.04,0.06,0.08,0.10,0.12mg/mL,pH10,水解温度60℃,水解时间2.5h,底物浓度25mg/mL,考察酶添加量对花椒籽蛋白水解度和铁结合能力的影响。

(6) 酶解温度:碱性蛋白酶添加酶量0.08mg/mL,pH10,水解时间2.5h,底物浓度25mg/mL,水解温度分别为45,50,55,60,65,70℃,考察酶解温度对花椒籽蛋白水解度和铁结合能力的影响。

1.3.4 响应面优化 在单因素试验结果的基础上,选择4个主要因素:pH、酶添加量、水解温度和底物浓度为自变量,以水解度和铁结合能力为响应值进行响应面试验,得出最佳的酶解工艺。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白酶活力的测定

以酪氨酸浓度为横坐标(X),吸光度值为纵坐标(Y),绘制标准曲线并得出回归方程: $Y = 0.0094X - 0.0151$ ,  $R^2 = 0.9965$ 。然后对4种蛋白酶活力进行测定,结果见表2。

由表2可知,碱性蛋白酶活力最高(160689.10U/g);中性蛋白酶和风味蛋白酶活力次之,木瓜蛋白酶活力较小,说明碱性蛋白酶催化反应的速率最快。

### 2.2 碱性蛋白酶酶解花椒籽蛋白制备铁结合肽的条件确定

#### 2.2.1 花椒籽铁结合肽最佳制备用酶的筛选

(1) 不同蛋白酶对水解花椒籽蛋白的影响:由图1可知,

表2 不同蛋白酶的酶活力

Table 2 Enzymatic activity of different protease

蛋白酶	酶活力/(U·g <sup>-1</sup> )
碱性蛋白酶	160689.10±657.95
中性蛋白酶	30597.05±708.48
木瓜蛋白酶	5701.47±263.93
风味蛋白酶	19075.35±69.11

随着水解时间的延长,水解度变化趋势逐渐变缓慢。以碱性蛋白酶对花椒籽蛋白的水解度最大,水解 210 min 水解度达 8.89%,而木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、复合风味蛋白酶 3 种酶对花椒籽蛋白的水解度较小,分别为 4.10%,2.63%,2.55%;碱性蛋白酶前 150 min 水解较另外 3 种蛋白酶快,水解度随时间变化明显,水解效果最好。这是由于各种蛋白酶的来源不同,其酶学特性及对花椒籽蛋白的作用位点不同,或者酶活力的不同,导致不同酶水解花椒籽蛋白的水解度和水解速率不同。

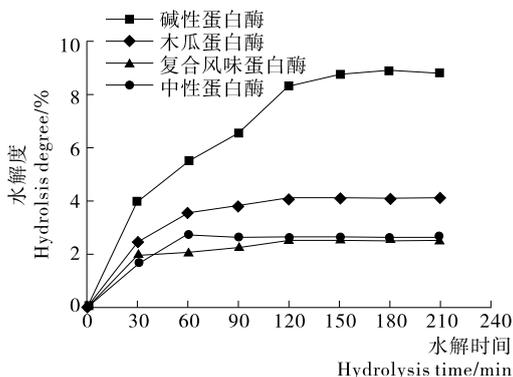


图 1 不同蛋白酶水解花椒籽粕蛋白的影响

Figure 1 Effect of different protease to *Z. Bungeanum* Maxim seed protein

(2) 不同蛋白酶酶解液多肽含量及铁结合能力的测定:以牛血清白蛋白溶液浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制出标准曲线,并得到回归方程: $Y=0.9374X+0.0206$ ,  $R^2=0.9976$ 。对 4 种蛋白酶酶解液进行测定,结果见表 3。以 EDTA 二钠盐浓度为横坐标,铁结合率为纵坐标,绘制出标准曲线,并得到回归方程: $Y=10.422\ln X+84.194$ ,  $R^2=0.9909$ 。

表 3 不同蛋白酶水解花椒籽蛋白产物分析

Table 3 Analysis of different protein hydrolysis product

蛋白酶	多肽含量/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	铁结合能力/ (mg EDTA · g <sup>-1</sup> · Protein)
碱性蛋白酶	46.44 ± 0.06	730.19 ± 16.19
中性蛋白酶	40.94 ± 0.38	0.35 ± 0.00
木瓜蛋白酶	44.00 ± 0.66	0.16 ± 0.01
风味蛋白酶	43.16 ± 0.19	0.40 ± 0.14
花椒籽蛋白	—	637.29 ± 17.53

由表 3 可知,花椒籽蛋白经碱性蛋白酶水解后的酶解液中多肽含量最多(46.44 mg/mL)。木瓜蛋白酶和风味蛋白酶所得水解液多肽含量次之,中性蛋白酶水解所得多肽的含量最少。碱性蛋白酶水解后的酶解液铁结合能力最强,达到 730.19 mg EDTA/g · 蛋白质,高于花椒籽蛋白本身的铁结合能力;而经风味蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解所得液铁结合能力很弱,远远低于碱性蛋白酶水解后的酶解液铁结合能力,且远低于花椒籽粕蛋白本身的铁结合能力。这是由于不同蛋白酶酶切位点的不同,导致水解生成了无铁

结合能力的产物。综上可得,碱性蛋白酶是水解花椒籽蛋白制备促铁结合肽的最佳用酶。

2.2.2 酶解时间单因素试验 由图 2 可知,花椒籽蛋白水解度随水解时间的延长而增加,当水解时间达到 2.5 h 后,水解度增加很少;铁结合能力随着时间的延长呈先上升后降低的趋势,在 2.5 h 时铁结合能力达到最大值,可能是随着时间的延长,水解成的多肽进一步水解成了无铁结合能力的氨基酸<sup>[18-19]</sup>。综合考虑,花椒籽蛋白水解制备铁结合肽的时间以 2.5 h 为宜。

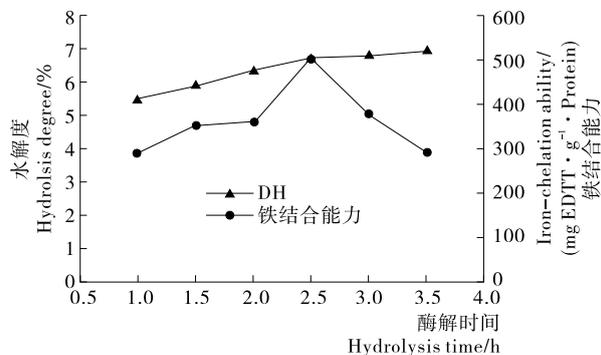


图 2 水解时间对花椒籽蛋白水解度和铁结合能力的影响

Figure 2 Effect of time on hydrolysis degree and iron-chelating ability

2.2.3 底物浓度单因素试验 由图 3 可知,花椒籽蛋白水解度随着底物浓度的增加而增大。当底物浓度在 10~25 mg/mL 时,水解度增加较快;底物浓度在 25~35 mg/mL 时,水解度几乎不再变化。这是由于底物浓度低时,溶液的流动性好,酶能够与底物充分地接触,水解度较大;随着底物浓度的增加,体系中有效水分的浓度降低,溶液的流动性减弱,降低了底物及蛋白酶的扩散和运动,酶与底物接触不充分,限制了反应进行,且底物浓度过高会对酶产生竞争性抑制,因此水解度变化不再明显<sup>[20]</sup>。此外,花椒籽蛋白酶解液的铁结合能力随着底物浓度的增加呈先升高后降低的趋势,在底物浓度为 25 mg/mL 时铁结合能力最强,可能是底物浓度低时,花椒籽多肽与铁离子不易形成稳定的络合物,质量浓度高时,会导致酶解物中多肽含量过高,体系流动性变差,多肽与铁离子接触不够充分,导致铁整合率下降<sup>[21]</sup>,且整合反应后有多肽剩余。综合以上情况,确定花椒籽蛋白水解的底物浓

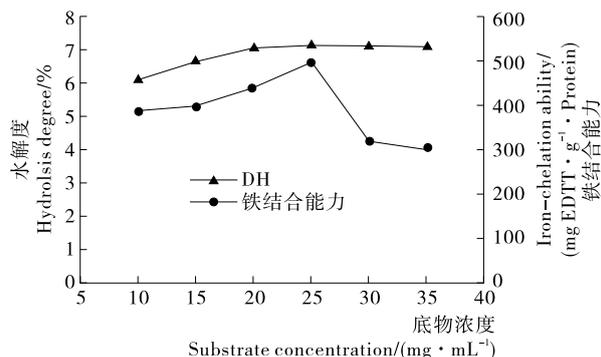


图 3 底物浓度对花椒籽蛋白水解度和铁结合能力的影响

Figure 3 Effect of substrate concentration on hydrolysis degree and iron-chelating ability

度以 25 mg/mL 为宜。

2.2.4 酶解 pH 单因素试验 由图 4 可知,在 pH 7~10 时,花椒籽蛋白的水解度随 pH 值变化增加的幅度快,之后水解度增幅变小;同时,花椒籽蛋白酶解液的铁结合能力随着 pH 的增加呈先升高后降低的趋势,且在 pH 10 时铁结合能力达到最强,可能是在酸性条件下,  $H^+$  会与铁离子竞争,争夺供电基团,不利于络合物的形成, pH 过大,羟基易与供电基团竞争铁离子形成氢氧化物沉淀,从而影响配合物的形成<sup>[22-23]</sup>。因此,花椒籽蛋白水解制备铁结合肽的最适 pH 为 10。

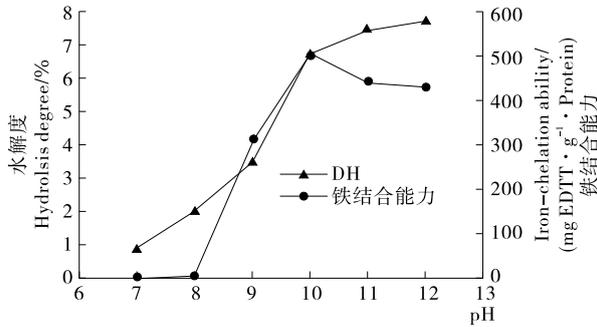


图 4 pH 对花椒籽蛋白水解度和铁结合能力的影响  
Figure 4 Effect of pH on hydrolysis degree and iron-chelating ability

2.2.5 酶添加量单因素试验 由图 5 可知,花椒籽蛋白水解度随酶添加量的增加呈上升趋势。酶添加量在 0.02~0.08 mg/mL 时,水解度增加的幅度较快;酶添加量 >0.08 mg/mL 时,水解度增加幅度缓慢,可能是酶浓度低时,随着酶添加量的增加可提高酶与底物结合的几率,从而增强水解的程度,加酶量增到一定程度后,有一部分酶分子将不能与蛋白质分子结合,从而水解度增加缓慢。铁结合能力随着酶添加量的增加呈先升高后降低的趋势,在加酶量 0.08 mg/mL 时达到最大。因此,花椒籽蛋白水解的酶添加量以 0.08 mg/mL 为宜。

2.2.6 酶解温度单因素试验 温度是影响酶活力的主要因素之一,在酶的最适温度以下,随着反应温度的升高反应物的能量及分子间有效接触的机会增多,反应速度加快。当温度上升到一定程度,酶的结构被破坏,活性丧失或者部分丧失,导致蛋白水解度下降<sup>[24]</sup>。由图 6 可知,在 45~60 °C 时,

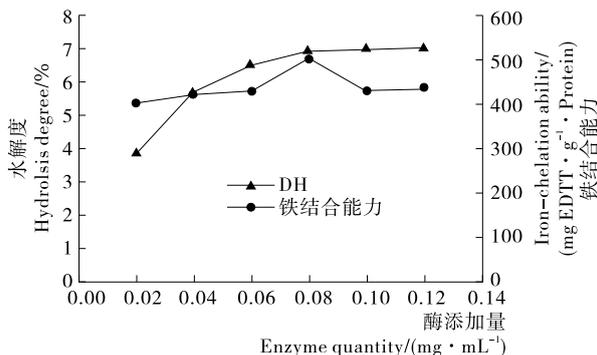


图 5 酶添加量对花椒籽蛋白水解度和铁结合能力的影响  
Figure 5 Effect of the quantity of enzyme on hydrolysis degree and iron-chelating ability

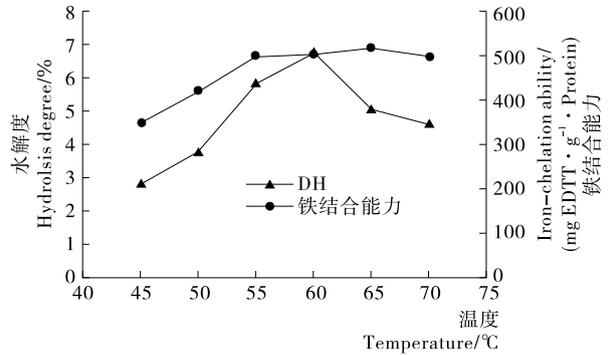


图 6 水解温度对花椒籽蛋白水解度和铁结合能力的影响  
Figure 6 Effect of temperature on hydrolysis degree and iron-chelating ability

花椒籽仁蛋白水解度随水解温度的升高而升高,60~70 °C 时,水解度随水解温度升高而降低;在 45~55 °C 时,随温度的升高铁结合能力增强较快,55~65 °C 时,铁结合能力增强减缓,65~70 °C 时,铁结合能力下降,可能是温度过高,会破坏配合物的稳定性,导致螯合物分解,从而降低铁结合能力<sup>[21]</sup>。综合考虑,花椒籽蛋白水解的适宜温度为 60 °C 左右。

2.2.7 响应面优化 单因素试验表明,pH、酶添加量、水解温度、底物浓度是影响花椒籽蛋白水解度的主要因素。为此采用 Box-Behnken 设计原理,以水解度和铁结合能力为响应值进行响应面设计。响应面优化因素水平编码见表 4。试验设计及结果见表 5。

对表 5 数据进行多项式回归拟合,得到水解度和铁结合能力的回归方程分别为:

$$Y_1 = 6.88 - 0.22X_1 + 1.23X_2 - 0.017X_3 - 0.022X_4 + 0.053X_1X_2 - 0.12X_1X_3 + 0.041X_1X_4 - 0.53X_2X_3 + 0.57X_2X_4 + 0.28X_3X_4 - 0.50X_1^2 - 0.78X_2^2 - 0.43X_3^2 + 0.23X_4^2 \quad (1)$$

$$Y_2 = 556.11 - 79.56X_1 - 21.33X_2 + 22.73X_3 + 12.46X_4 + 78.84X_1X_2 + 114.66X_1X_3 + 106.37X_1X_4 - 8.73X_2X_3 + 79.61X_2X_4 + 46.09X_3X_4 - 87.51X_1^2 - 50.50X_2^2 - 18.88X_3^2 - 77.05X_4^2 \quad (2)$$

对回归方程进行方差分析,结果见表 6、7。

由表 6 可知模型极显著 ( $P < 0.0001$ ),而失拟项 ( $P = 0.1061$ ) 不显著,表明回归方程与实际试验拟合良好,模型稳定,能够用于花椒籽蛋白酶解物螯合铁提取工艺的分析及预测。模型调整系数  $Adj R^2 = 0.9817$ ,说明此模型能够解释 98.17% 响应值的变化。表 6 直观地反映出:一次项  $X_1$ 、 $X_2$

表 4 响应面因素与水平表

Table 4 Factors and levels of Box-Behnken design

水平	X <sub>1</sub> 底物浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	X <sub>2</sub> 酶解 pH	X <sub>3</sub> 酶添加/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	X <sub>4</sub> 酶解温度/ °C
-1	20	9.5	0.07	55
0	25	10.0	0.08	60
1	30	10.5	0.09	65

极显著;交互项中  $X_2 X_3$ 、 $X_2 X_4$ 、 $X_3 X_4$  极显著,其他交互项均不显著;平方项  $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$ 、 $X_4^2$  极显著,表明各试验因素对水解度的影响呈二次关系。各因素对水解度的影响程度: $pH > \text{底物浓度} > \text{温度} > \text{酶添加量}$ 。

由表 7 可知,该模型极显著( $P < 0.000 1$ ),而失拟项( $P =$

$0.100 3$ ) 不显著,说明试验数据与模型相符,可以被用于预测各酶解因素对花椒籽蛋白酶解物制备整合铁工艺的铁结合能力的影响。模型调整系数  $\text{Adj } R^2 = 0.9792$ ,说明此模型能够解释 97.92% 响应值的变化。表 7 直观地反映出:一次项  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$  影响显著;交互项中  $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ 、 $X_1 X_4$ 、

表 5 Box-Behnken 试验设计及结果表

Table 5 Box-Behnken experimental design and results

试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y_1$ 水解度/%	$Y_2$ 铁结合能力/(mg EDTA · g <sup>-1</sup> · Protein)	试验号	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$Y_1$ 水解度/%	$Y_2$ 铁结合能力/(mg EDTA · g <sup>-1</sup> · Protein)
1	-1.00	-1.00	0.00	0.00	4.59	575.80	16	1.00	0.00	0.00	1.00	6.56	433.74
2	0.00	0.00	0.00	0.00	6.92	551.74	17	0.00	-1.00	0.00	-1.00	5.66	522.78
3	1.00	-1.00	0.00	0.00	4.08	282.08	18	0.00	1.00	0.00	-1.00	6.92	319.67
4	0.00	1.00	0.00	1.00	7.80	508.04	19	0.00	0.00	-1.00	1.00	6.41	387.13
5	0.00	-1.00	1.00	0.00	5.10	537.36	20	-1.00	0.00	0.00	-1.00	6.87	573.27
6	1.00	0.00	1.00	0.00	5.43	511.01	21	-1.00	0.00	0.00	1.00	6.87	387.47
7	0.00	0.00	0.00	0.00	6.92	545.70	22	-1.00	0.00	-1.00	0.00	6.11	632.26
8	-1.00	0.00	1.00	0.00	6.24	456.50	23	0.00	1.00	-1.00	0.00	7.43	464.72
9	0.00	-1.00	-1.00	0.00	3.88	484.03	24	1.00	1.00	0.00	0.00	6.70	392.41
10	0.00	0.00	0.00	0.00	6.92	553.77	25	0.00	0.00	0.00	0.00	6.82	569.01
11	1.00	0.00	0.00	-1.00	6.45	194.04	26	0.00	0.00	-1.00	-1.00	7.09	460.64
12	-1.00	1.00	0.00	0.00	6.70	370.79	27	0.00	0.00	1.00	1.00	6.82	526.24
13	0.00	1.00	1.00	0.00	6.51	483.14	28	0.00	0.00	1.00	-1.00	6.38	415.38
14	1.00	0.00	-1.00	0.00	5.77	228.11	29	0.00	0.00	0.00	0.00	6.79	560.31
15	0.00	-1.00	0.00	1.00	4.49	392.71							

表 6 水解度响应面方差分析表<sup>†</sup>

Table 6 Variance analysis for the response surface of hydrolysis degree

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	$P > F$	显著性
模型	28.24	14	2.02	154.57	$< 0.000 1$	* *
$X_1$	0.58	1	0.58	44.39	$< 0.000 1$	* *
$X_2$	18.16	1	18.16	1 391.24	$< 0.000 1$	* *
$X_3$	3.656E-003	1	3.656E-003	0.28	0.604 9	
$X_4$	5.928E-003	1	5.928E-003	0.45	0.511 3	
$X_1 X_2$	0.01	1	0.01	0.87	0.366 4	
$X_1 X_3$	0.05	1	0.05	4.17	0.060 4	
$X_1 X_4$	6.740E-003	1	6.740E-003	0.52	0.484 2	
$X_2 X_3$	1.14	1	1.14	87.72	$< 0.000 1$	* *
$X_2 X_4$	1.28	1	1.28	97.96	$< 0.000 1$	* *
$X_3 X_4$	0.31	1	0.31	24.03	0.000 2	* *
$X_1^2$	1.61	1	1.61	123.59	$< 0.000 1$	* *
$X_2^2$	3.96	1	3.96	303.25	$< 0.000 1$	* *
$X_3^2$	1.20	1	1.20	92.18	$< 0.000 1$	* *
$X_4^2$	0.35	1	0.35	27.15	0.000 1	* *
残差	0.18	14	0.01			
失拟	0.17	10	0.02	3.77	0.106 1	
纯误差	0.02	4	4.377E-003			
总方差	28.43	28				

<sup>†</sup> \* 表示影响显著,  $P < 0.05$ ; \* \* 表示影响极显著,  $P < 0.01$ 。

表7 铁结合能力响应面方差分析表<sup>†</sup>

Table 7 Variance analysis for the response surface of mental-binding activity

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P>F	显著性
模型	3.255E+005	14	23 250.90	95.33	<0.000 1	* *
X <sub>1</sub>	75 953.25	1	75 953.25	311.41	<0.000 1	* *
X <sub>2</sub>	5 461.45	1	5 461.45	22.39	0.000 3	* *
X <sub>3</sub>	6 199.45	1	6 199.45	25.42	0.000 2	* *
X <sub>4</sub>	1 863.42	1	1 863.42	7.64	0.015 2	*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	24 860.52	1	24 860.52	101.93	<0.000 1	* *
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	52 591.37	1	52 591.37	215.63	<0.000 1	* *
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	45 262.24	1	45 262.24	185.58	<0.000 1	* *
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	304.72	1	304.72	1.25	0.282 5	
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	25 349.88	1	25 349.88	103.94	<0.000 1	* *
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	8 498.64	1	8 498.64	34.85	<0.000 1	* *
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	49 668.32	1	49 668.32	203.64	<0.000 1	* *
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	16 542.60	1	16 542.60	67.83	<0.000 1	* *
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	2 311.29	1	2 311.29	9.48	0.008 2	* *
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	38 509.24	1	38 509.24	157.89	<0.000 1	* *
残差	3 414.58	14	243.90			
失拟	3 097.82	10	309.78	3.91	0.100 3	
纯误差	316.76	4	79.19			
总方差	3.289E+005	28				
总方差	28.43	28				

<sup>†</sup> \* 表示影响显著, P<0.05; \* \* 表示影响极显著, P<0.01。

X<sub>2</sub>X<sub>4</sub>、X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>影响极显著;平方项 X<sub>1</sub><sup>2</sup>、X<sub>2</sub><sup>2</sup>、X<sub>3</sub><sup>2</sup>、X<sub>4</sub><sup>2</sup>影响极显著。各因素对铁结合能力的影响程度:底物浓度>酶添加量>pH>温度。

2.2.8 酶解工艺条件的验证实验 软件优化得最佳提取条件为:底物浓度 27.70 mg/mL、酶添加量 0.09 mg/mL、酶解 pH 10.47、酶解温度 65.00 °C。为检验响应面法所得结果的准确性,采用上述优化条件进行铁结合肽的制备,测得水解度 7.23%,铁结合能力 585.66 mg EDTA/g·蛋白质,与理论预测值水解度 7.50%,铁结合能力 601.56 mg EDTA/g·蛋白质的误差都在 5%以内。另外,采用上述优化条件制备铁结合肽,虽然所得水解度 7.23%略低于 Box-Behnken 试验设计(表 5)中 4 号试验所得水解度(7.80%),铁结合能力 585.66 mg EDTA/g·蛋白质略低于 22 号试验所得铁结合能力(632.26 mg EDTA/g·蛋白质),但 4 号试验中铁结合能力(508.04 mg EDTA/g·蛋白质)和 22 号试验中的水解度(6.11%)均明显低于采用优化条件所得铁结合肽的指标。因此,综合考虑水解度和铁结合能力 2 个指标,采用响应面法优化碱性蛋白酶酶解花椒籽蛋白的参数准确可靠,具有实用性。

### 3 结论

采用不同水解酶酶解花椒籽蛋白,通过测定酶解产物的水解度、多肽含量及铁结合能力,筛选出碱性蛋白酶为花椒籽蛋白制备铁结合肽的最佳蛋白酶。在单因素试验基础上,利用响应面法得出制备花椒籽蛋白铁结合肽的最佳工艺条件为:底物浓度 27.70 mg/mL、酶添加量 0.09 mg/mL、酶解 pH 10.47、酶解温度 65 °C。在此条件下花椒籽蛋白水解液

水解度为 7.23%,铁结合能力为 585.66 mg EDTA/g·蛋白质。为了获得纯度更高、铁结合能力更强的多肽,后续还应对所得酶解产物进行分离纯化,确定其肽段组成,研究其理化性质和功能性质。

### 参考文献

- [1] 杨令叶,田呈瑞,权麻玉.大红袍花椒籽种仁蛋白的分类研究[J].中国油脂,2008,33(9):16-18.
- [2] 寇明钰.花椒籽蛋白质分离提取及功能性质的研究[D].重庆:西南大学,2006:11-26.
- [3] YUAN Hong, WANG Hui, WANG Li-xia, et al. Nutritional evaluation and functional properties of the antioxidant polypeptide from Zanthoxylum bungeanum Maxim seeds kernel protein hydrolysate[J]. CyTA-Journal of Food, 2017, 15(3): 425-432.
- [4] 王辉,田呈瑞,马守磊,等.花椒籽仁抗氧化肽水解用酶的筛选研究[J].食品与发酵工业,2009,35(3):119-123.
- [5] 吴红洋,姜太玲,胡惠茗,等.响应面法优化酶解花椒籽蛋白制备降血压肽工艺[J].食品科学,2014,35(21):180-185.
- [6] 姜太玲,吴红洋,王微,等.响应面法优化胃蛋白酶制备花椒籽蛋白抗菌肽的研究[J].食品工业科技,2014,35(20):226-231.
- [7] 刘温,楼乔明,杨文鸽.多肽金属元素螯合物研究进展[J].食品与发酵工业,2014,40(4):142-146.
- [8] WU Hao-hao, LIU Zun-ying, ZHAO Yuan-hui, et al. Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle protein[J]. Food Research International. 2012, 48(2): 435-441.

(下转第 173 页)

- [4] 刘远平, 韩硕, 李钰金. 岩藻聚糖硫酸酯的生物活性研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013(2): 42-44.
- [5] 孙抗, 林江, 张婷, 等. 海藻多糖抗肿瘤机制研究综述[J]. 广西中医学院学报, 2012, 15(2): 103-105.
- [6] 田鑫, 李秀霞, 吴科阳, 等. 海藻多糖提取纯化及生物活性的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(6): 81-85.
- [7] CHANG Hu-xue, YU Fang, HONG Lin, et al. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica* [J]. Journal of Applied Phycology, 2001, 13(1): 67-70.
- [8] 谢瑾, 林宗毅, 王智荣, 等. 海带多糖酶法降解及其产物生物活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(20): 23-27.
- [9] 董雪敏, 丛培云. 海带岩藻聚糖硫酸酯的饮料开发[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(3): 39-43.
- [10] UENO M, TAMURA Y, TODA N, et al. Sodium alginate oligosaccharides attenuate hypertension in spontaneously hypertensive rats fed a low-salt diet[J]. Clinical and Experimental Hypertension, 2012, 34(5): 305-310.
- [11] 张璐妮, 邵玉, 张玉影, 等. 海带多糖防辐射作用的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2015, 36(5): 375-377.
- [12] 李斌, 永沛, 刘翼翔, 等. 海带渣中岩藻黄素的酶法提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2014(21): 192-196.
- [13] 刘萌, 刘光明, 刘翼翔, 等. 生物酶法制备海带多酚的工艺研究[J]. 集美大学学报, 2017(1): 21-28.
- [14] 张换, 曾艳, 管于平, 等. 响应面法优化海带多糖的酶法提取工艺及其抗氧化研究[J]. 食品科技, 2013, 38(5): 197-202.
- [15] 王亚. 海洋弧菌 QY105 中褐藻胶裂解酶的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013: 10-16.
- [16] 汤海青, 欧昌荣, 郑晓东. 1 株产褐藻胶裂解酶海洋细菌的分离鉴定及其酶学性质[J]. 浙江大学学报, 2013, 39(4): 387-395.
- [17] 王雪莹. 一种海洋硫酸多糖降解酶降解岩藻聚糖硫酸酯和糖胺聚糖的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 17-32.
- [18] 柏超. 海带降解复合菌的选育及其功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012: 14-25.
- [19] ARIYO B T. Alginate oligosaccharides as enhancers of penicillin production in cultures of penicillium chrysogenum[J]. Biotechnology & Bioengineering, 1997, 53(1): 17-20.
- [20] HONDA S, AKAO E, SUZUKI S, et al. High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives[J]. Analytical Biochemistry, 1989, 180(2): 351-357.
- [21] 付海宁, 赵峡, 于广利, 等. 盐藻多糖单糖组成分析的几种色谱方法比较[J]. 中国海洋药物, 2008, 27(4): 30-34.
- [22] 仇哲. 海带酶解产物及对海参生长的影响[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2015: 9-15.
- [23] 徐扬, 杨保伟, 柴博华, 等. 超声波-酶法提取海带多糖及其抑菌活性[J]. 农业工程学报, 2010, 26(增刊 1): 356-361.
- [24] 刘志新, 刘金富, 徐凤, 等. 超声波复合酶法提取海带多糖的工艺优化[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(20): 8 467-8 469.
- [25] 董学前, 张艳敏, 张永刚, 等. 复合酶法综合提取海带中褐藻糖胶与海藻酸的研究[J]. 中国食品添加剂, 2017(9): 171-176.
- [26] LIU Yan, JIANG Xiao-lu, LIAO Wei, et al. Analysis of oligogulonic acids with NMR, electrospray ionization-mass spectrometry and high-performance anion-exchange chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 968(1/2): 71-78.

(上接第 168 页)

- [9] SUN Na, WU Hai-tao, DU Ming, et al. Food protein-derived calcium chelating peptides: A review[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 58: 140-148.
- [10] 刘永, 叶娟, 韦寿莲. 罗非鱼鳞胶原蛋白肽铁螯合物制备工艺的优化[J]. 精细化工, 2013, 30(7): 761-765.
- [11] LU Ying, LIU Qi, BAO Iao-lan, et al. Identification and characteristics of iron-chelating peptides from soybean protein hydrolysates using IMAC-Fe<sup>3+</sup> [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(11): 4 593-4 597.
- [12] 张美玲, 赵新淮. 大豆蛋白水解物的酶法修饰及其亚铁和钙离子的螯合能力[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(12): 26-30.
- [13] 曹银娣, 陈巧云, 熊华, 等. 米蛋白肽铁的螯合条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 61-64.
- [14] KIM Nam-Ho, JUNG Seung-Hun, KIM Jaehan, et al. Purification of an iron-chelating peptide from spirulina protein hydrolysates[J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2014, 57(1): 91-95.
- [15] ADLER-NISSEN J. Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes [J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 1984, 34(3): 215-222.
- [16] 周慧江. 核桃蛋白源 ACE 抑制剂肽的酶法制备及分离、纯化[D]. 西安: 陕西科技大学, 2013: 40.
- [17] DECKER Eric A, Welch Barbara. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38: 674-677.
- [18] WANG Chan, LI Bo, AO Jing. Separation and identification of zinc-chelating peptides from sesame protein hydrolysate using IMAC-Zn<sup>2+</sup> and LC-MS/MS[J]. Food Chemistry, 2012, 134(2): 1 231-1 238.
- [19] 金杜欣, 刘晓兰, 郑喜群. Alcalase 和 Flavourzyme 协同修饰玉米蛋白制备抗氧化活性蛋白水解物[J]. 食品与机械, 2015, 31(2): 25-31.
- [20] 赵静, 王燕. 辣椒粕分离蛋白酶解工艺条件的优化[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 162-166.
- [21] 曾庆瑞, 钱文举, 王梦璠, 等. 宽体金线蛭多肽-锌螯合物的制备及其结构表征[J]. 食品与机械, 2016, 32(5): 11-15.
- [22] 崔潇, 江虹锐, 刘小玲, 等. 响应面法优化罗非鱼鱼皮胶原多肽螯合镁的工艺条件的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(15): 238-241, 245.
- [23] 唐军虎, 康玮丽, 任志艳, 等. 响应面法玉米蛋白肽锌制备条件的优化[J]. 食品工业科技, 2011, 32(3): 294-296, 300.
- [24] 王俊形, 郑喜群, 刘晓兰. 酶解玉米黄粉制备降血压肽的研究[J]. 食品与机械, 2013, 29(3): 212-215.