

酶法制备家蝇幼虫抗氧化肽条件的优化

王丽媛, 赵永焕

(黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要:以家蝇幼虫为原料, Alcalase 碱性蛋白酶为水解酶, 采用五因子二次旋转正交组合设计优化水解条件, 用清除 DPPH· 活性的方法测定水解所得家蝇幼虫肽的抗氧化活性。结果表明, 制备家蝇幼虫抗氧化肽的最佳酶解条件为: $[E]/[S] = 3.62\%$ 、温度 62.17°C 、pH 8.20、底物浓度 11.71% 、时间 3.05h。在该水解条件下家蝇幼虫抗氧化肽对 DPPH· 有很强的清除作用, 清除率为 86.387% 。

关键词:家蝇幼虫, 酶解, 抗氧化肽

Optimization of enzymatic producing of musca domestica larvae antioxidant peptide

WANG Li-yuan, ZHAO Yong-huan

(Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China)

Abstract: By using musca domestica larvae as substrate in this experiment, alcalase alkaline protease as hydrolysis enzyme, orthogonal quadratic regression rotation combinatorial design as optimized hydrolysis condition, antioxidant activity of musca domestica larvae peptide produced by hydrolysis was studied by method of activity of DPPH·. Results showed that the optimum hydrolytic condition for producing musca domestica larvae antioxidant peptide was $[E]/[S] = 3.62\%$, 62.17°C , pH 8.20, substrate concentration 11.71% , 3.05h. Under this condition, produced musca domestica larvae peptide had strong scavenging activities to DPPH· and the scavenging rate was 86.387% .

Key words: musca domestica larvae; enzymatic hydrolysis; antioxidant peptide

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)10-0213-03

家蝇幼虫营养成分分析表明, 蝇蛆(干基)含粗蛋白 $59\% \sim 65\%$, 脂肪 $10\% \sim 14\%$, 甲壳素 $8\% \sim 10\%$, 同时还含有丰富的维生素(如维生素 A、D 和 B 族维生素)及微量元素(如铁、锌、锰、磷、钴、镍、硼)等。家蝇幼虫蛋白质的氨基酸评分(AAS)为 99, 限制性氨基酸为亮氨酸。近年来, 国内外研究人员对家蝇幼虫的研究主要集中在抗菌肽上, 而对家蝇幼虫抗氧化肽的研究甚少。抗氧化肽作为一种自由基清除剂, 可清除体内过多的自由基, 避免对生物大分子物质和各种细胞器的损伤, 减缓机体的衰老进程并预防各种疾病。因此, 开发抗氧化肽的新资源为保健食品的开发提供了一个有前途的基料。本研究对家蝇幼虫抗氧化肽的制备工艺条件及对自由基的清除作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

家蝇幼虫 齐齐哈尔市金三角养殖有限责任公司; Alcalase 碱性蛋白酶 丹麦诺维信(NOVO)公司;

其它试剂 均为国产分析纯。

pH 计 梅特勒-托利多仪器上海有限公司; 台式低速离心机 北京京立离心机有限公司; 紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; 电动搅拌器 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; 高速组织捣碎器, 水浴锅, 电磁炉, 真空旋转蒸发仪等。

1.2 测定方法

1.2.1 水解度的测定 pH-stat 法。

1.2.2 清除 DPPH· 活性的测定 取家蝇幼虫水解液 0.5mL, 加入 $1 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ 的 DPPH· 无水甲醇溶液 3.5mL, 混匀后在室温避光保存 30min, 并在 4000r/min 下离心 10min, 取上清液在 517nm 下测定吸光度 A_1 , 空白组以等体积无水甲醇溶液代替溶液, 对照组以等体积蒸馏水代替样品溶液, 并以等体积蒸馏水和无水甲醇混合液空白调零, 与同浓度的 V_0 溶液做对照, 所有测定值均为三次结果的平均值, 清除率按下式计算:

$$\text{清除率 } I(\%) = [1 - (A_1 - A_0) / A_0] \times 100\%$$

式中: A_0 : 对照组吸光度; A_1 : 样品组吸光度; A_2 : 空白组吸光度。

1.3 家蝇幼虫抗氧化肽的制备过程

收稿日期: 2009-07-29

作者简介: 王丽媛(1984-), 女, 硕士研究生, 从事食品营养与安全方面的研究。

将烘干家蝇幼虫经高速粉碎机粉碎后用定量滤纸包好,放入索氏脂肪提取器中,加入无水乙醚进行脂肪提取。抽提完脂肪的的滤纸包经挥发、50℃烘干后,得到脱脂家蝇幼虫粉。按一定的底物浓度准确称取脱脂家蝇幼虫粉,溶于适量蒸馏水配成悬浊液,搅拌均匀;调溶液酸碱度至一定的 pH,放入恒温水浴锅中,保温至所需温度,加入适量的酶并低速搅拌,开始水解。反应过程中注意维持 pH 恒定;水解至预定时间后,沸水浴灭活 10min,中止反应。冷却后调节 pH 至中性,4000r/min 离心 15min,取上清液,即得到家蝇幼虫水解液,浓缩至一定浓度,冷冻干燥,即得到家蝇幼虫抗氧化肽。

1.4 酶解工艺条件的优化

以加酶量、酶解温度、pH、酶解时间、底物浓度五个因素为自变量,酶解物清除自由基能力为评价指标,按照五因子二次旋转正交组合设计方案进行实验。实验以随机次序进行,响应值测三次,实验结果以三次结果的平均值表示,因素水平及编码值如表 1。

表 1 因素水平编码表

编码	因素				
	X ₁ 加酶量 (%)	X ₂ 温度 (°C)	X ₃ pH	X ₄ 底物浓度 (%)	X ₅ 时间 (h)
+2	6	70	9.0	13	6
+1	5	65	8.5	11	5
0	4	60	8.0	9	4
-1	3	55	7.5	7	3
-2	2	50	7.0	5	2
Δ _j	1	5	0.5	2	1

2 结果与分析

2.1 回归模型的建立和检验

本实验的前期研究工作,分别以加酶量、pH、温度、时间和底物浓度为变量进行了单因素实验研究,根据单因素的实验结果,采用五元二次回归正交旋转组合设计实验,实验方案及结果见表 2。

表 2 二次旋转正交组合设计实验方案及结果表

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₄	DPPH·清除率 (%)
1	1	1	1	1	1	76.26
2	1	1	1	-1	-1	83.76
3	1	1	-1	1	-1	85.82
4	1	1	-1	-1	1	70.26
5	1	-1	1	1	-1	86.91
6	1	-1	1	-1	1	74.37
7	1	-1	-1	1	1	87.69
8	1	-1	-1	-1	-1	87.06
9	-1	1	1	1	-1	87.56
10	-1	1	1	-1	1	80.46
11	-1	1	-1	1	1	88.97
12	-1	1	-1	-1	-1	69.03
13	-1	-1	1	1	1	87.09
14	-1	-1	1	-1	-1	78.26
15	-1	-1	-1	1	-1	88.20
16	-1	-1	-1	-1	1	79.26
17	2.0	0	0	0	0	81.91

续表

实验号	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₄	DPPH·清除率 (%)
18	-2.0	0	0	0	0	80.86
19	0	2.0	0	0	0	81.25
20	0	-2.0	0	0	0	81.75
21	0	0	2.0	0	0	81.97
22	0	0	-2.0	0	0	86.87
23	0	0	0	2.0	0	86.18
24	0	0	0	-2.0	0	65.83
25	0	0	0	0	2.0	78.65
26	0	0	0	0	-2.0	84.92
27	0	0	0	0	0	79.01
28	0	0	0	0	0	81.89
29	0	0	0	0	0	82.58
30	0	0	0	0	0	83.45
31	0	0	0	0	0	84.56
32	0	0	0	0	0	82.79
33	0	0	0	0	0	83.94
34	0	0	0	0	0	84.32
35	0	0	0	0	0	85.97
36	0	0	0	0	0	83.01

2.2 多因素组合优化实验的分析

利用实验结果和二次回归正交旋转组合设计统计方法进行编程,并对结果进行分析得回归方程,回归方程的方差分析和各项的方差分析及显著性分析的主要结果归纳分别见表 3、表 4。

表 3 回归方程的方差分析

方差来源	自由度	平方和	均方和	F 值	P 值
回归模型	20	965.9404	48.29702	10.72	<0.0001
误差	15	67.58379	4.505586		
总计	35	1033.5242			

表 4 回归方程各项的方差分析

回归方差来源	自由度	平方和	均方和	F 值	P 值
一次项	5	563.460450	112.69209	25.01	<0.0001
二次项	5	88.933140	17.786628	3.95	0.0175
交互项	10	313.546850	31.354685	6.96	0.0005
失拟项	6	36.359030	6.059838	1.75	0.2169
纯误差	9	31.224760	3.469418		
总误差	15	67.583790	4.505586		

由表 3 和表 4 可以看出:二次回归模型的 F 值为 10.72, P 值 < 0.001, 大于在 0.01 水平上的 $F_{(20,35)0.01} = 2.45$, 而失拟项的 F 值为 1.75, 小于在 0.05 水平的 $F_{(6,15)0.05} = 2.79$, 说明该模型拟合结果好。一次项的 F 值大于 0.01 水平上的 F 值, 二次项的 F 值大于 0.05 水平上的 F 值, 说明它们对清除率有显著的影响, 而交互项的 F 值大于 0.01 水平上的 F 值, 说明其对清除率有极显著的影响。

通过分析可知, 各因素影响程度从大到小的依次排列为加酶量、底物浓度、酶解时间、酶解温度、酶解 pH。以 DPPH· 的清除率为 Y 值, 将中心处理公式及各因素编码公式代入, 得到加酶量、底物浓度、酶解时间、酶解温度、酶解 pH 的编码值为自变量的五元二次回归方程为:

$$Y = 203.695920 + 47.261875X_1 - 4.983000X_2 - 51.542083X_3 + 21.954687X_4 + 22.822500X_5 - 0.200208X_1^2$$

$$- 0.164250X_1X_2 - 0.006858X_2^2 - 2.180000X_1X_3 + 0.738500X_2X_3 + 2.234167X_3^2 - 0.736875X_1X_4 + 0.026000X_2X_4 - 1.506250X_3X_4 - 0.386302X_4^2 - 2.981250X_1X_5 + 0.022500X_2X_5 - 1.797500X_3X_5 + 0.165000X_4X_5 - 0.100208X_5^2$$

方程的显著性分析得 $F_1 = 10.72$, 相应的概率值 < 0.0001 , 大于在 0.01 水平上的 F 值, 失拟性检验分析得 $F_2 = 1.75$, 相应的 P 值等于 0.2169, 决定系数为 0.9346。由方程的显著性检验可知, 该方程的模型达到极其显著; 失拟性分析表明, 该回归方程无失拟因素存在, 回归模型与实测值能较好地拟合。最佳酶解条件及清除率见表 5。

表 5 响应面回归结果

因素	标准化	非标准化	最大清除率 (%)
加酶量	-0.188844	3.622312	
温度	0.216638	62.166380	
pH	0.202498	8.202498	86.387057
底物浓度	0.678339	11.713355	
时间	-0.475826	3.048348	

清除率最高时的加酶量、温度、pH、底物浓度和时间的值分别为: 加酶量 3.62%、温度 62.17℃、pH8.20、底物浓度 11.71%、时间 3.05h, 该条件下得到 DPPH· 最大清除率为 86.387%。

3 结论

本实验采用五因子二次旋转正交回归设计建立的回归模型, 通过 F、t 检验和应用验证, 证明模型 $Y = 203.695920 + 47.261875X_1 - 4.983000X_2 - 51.542083X_3 + 21.954687X_4 + 22.822500X_5 - 0.200208X_1^2 - 0.164250X_1X_2 - 0.006858X_2^2 - 2.180000X_1X_3 + 0.738500X_2X_3 + 2.234167X_3^2 - 0.736875X_1X_4 +$

$0.026000X_2X_4 - 1.506250X_3X_4 - 0.386302X_4^2 - 2.981250X_1X_5 + 0.022500X_2X_5 - 1.797500X_3X_5 + 0.165000X_4X_5 - 0.100208X_5^2$ 理论上与实际情况吻合良好, 能较真实地反映酶解过程与 DPPH· 清除率内在关系。

Alcalase 碱性蛋白酶水解家蝇幼虫粉制备抗氧化肽的最优条件为: $[E]/[S] = 3.62\%$ 、水解温度 62.17℃、水解 pH 8.20、底物浓度 11.71%、水解时间 3.05h。在该水解条件下家蝇幼虫抗氧化肽对 DPPH· 的清除率达到最大, 为 86.387%。

参考文献

- [1] 张泽生. 家蝇幼虫蛋白质营养价值的生物评价[J]. 食品工业科技, 1998(2): 12-14.
- [2] 胡文琴, 王恬, 孟庆利. 抗氧化活性肽的研究进展[J]. 中国油脂, 2004, 29(5): 42-45.
- [3] 徐中儒. 农业实验最优回归设计[M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1998.
- [4] 赵鹏, 董秀萍, 叶楠, 等. 酶解蚕蛹蛋白工艺的研究及产物分析[J]. 大连轻工业学院学报, 2005, 24(2): 123-127.
- [5] Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins [M]. London: Elsevier Applied Science publishers, 1986.
- [6] Junfeng Fan, Masayoshi Saito, Zhang Yanyan, et al. Gelforming Ability and Radical-scavenging Activity of Soy Protein Hydrolysate Treated with Transglutaminase [J]. Journal of Food Science, 2005, 70: 1, 87-92.
- [7] Pyo-Jam Park, Won-Kyo Jung, Kyung-Soo Nam, et al. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2001, 78(6): 651-656.
- [12] Sian HK, Said M, Hassan O, et al. Purification and characterization of cyclodextrin glucanotransferase from alkaliphilic *Bacillus* sp. G1 [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 1101-1111.
- [13] Shin HD, Park HT, Lee YH. Site-directed mutagenesis and functional analysis of maltose-binding site of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus* var. alkalophilus [J]. Biotechnology Letters, 2000, 22: 115-121.
- [14] Pishtiyski I, Zhekova, B. Effect of different substrates and their preliminary treatment on cyclodextrin production [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006, 22: 109-114.
- [15] Yim DG, Sato HH, Park YH, et al. Production of cyclodextrin from starch by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus firmus* and characterization of purified enzyme [J]. J Industrial Microbiol Biotechnol, 1997, 18: 402-405.
- [16] Hill DE, Aldape R, Rozzell JD. Nucleotide sequence of a cyclodextrin glucosyltransferase gene, *cgtA*, from *Bacillus licheniformis* [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 199-200.

(上接第 212 页)

341-359.

[6] Aga H, Yoneyama M, Sakai S, et al. Synthesis of 2-O- α -glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* [J]. Agric Biol Chem, 1991, 55: 1751-1756.

[7] Suzuki Y, Suzuki K. Enzymatic formation of 4-G- α -D-glucopyranosyl-rutin [J]. Agric Biol Chem, 1991, 55: 181-187.

[8] Tanaka O. Improvement of taste of natural sweeteners [J]. Pure & Appl Chem, 1997, 69(4): 675-683.

[9] 田辉, 杨国武, 徐颐玲, 等. 环状糊精与环状糊精葡萄糖基转移酶[J]. 工业微生物, 1995, 25(2): 33-38.

[10] Park CS, Park KH, Kim SH. A rapid screening method for alkaline β -cyclodextrin glucanotransferase using phenolphthalein-methyl orange-containing-solid medium [J]. Agric Biol Chem, 1989, 53: 1167-1169.

[11] Atanasova N, Petrova P, Ivanova V, et al. Isolation of novel alkaliphilic *Bacillus* strains for cyclodextrin glucanotransferase production [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2008, 149: 155-167.