

响应面法优化微波辅助酶解制备 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽工艺

于丽娜¹, 杜德红², 张初署¹, 毕洁¹, 王明清¹, 江晨¹, 杨庆利², 彭娅萍¹, 杨珍¹, 孙杰^{1,*}

(1. 山东省花生研究所, 山东青岛 266100;

2. 青岛农业大学, 山东青岛 266109)

摘要:为了优化微波辅助酶解制备 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽工艺,以冷榨花生蛋白粉为原料,以酶解得到的 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽复合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率为考察指标,在单因素实验基础上,通过响应面 Box-Behnken 实验设计进行工艺优化。结果表明,最优工艺条件为底物浓度 9.77%、加酶量 0.94%、温度 59℃、时间 10 min、pH 9.0、微波功率 1000 W;此工艺条件下的 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽复合物对 α -葡萄糖苷酶的抑制率的响应面模型预测值为 84.80%,验证实验的抑制率为 90.21% $\pm$ 0.93%,两者的差异值为 6.38%。本研究结果为花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的分离、纯化和应用等研究提供了理论基础。

关键词: α -葡萄糖苷酶抑制活性肽,响应面优化,微波辅助酶解, α -葡萄糖苷酶抑制率

Optimization of preparation process of α -glucosidase inhibitory activity peptide with microwave assisted enzymatic hydrolysis reaction by response surface methodology

YU Li-na¹, DU De-hong², ZHANG Chu-shu¹, BI Jie¹, WANG Ming-qing¹, JIANG Chen¹,
YANG Qing-li², PENG Ya-ping¹, YANG Zhen¹, SUN Jie^{1,*}

(1. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China;

2. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: In order to optimize the preparation process of α -glucosidase inhibitory activity peptide with microwave assisted enzymatic hydrolysis reaction, cold pressed peanut protein powder was used as raw material, the α -glucosidase inhibitory rate of α -glucosidase inhibitory activity peptide complexes obtained from enzymatic hydrolysis reaction was used as the index. On the basis of single factor experiment, the process was optimized by response surface methodology and Box-Behnken design. The results showed that the optimum technological conditions were substrate concentration of 9.77%, enzyme dosage of 0.94%, temperature of 59℃, time of 10 min, pH value of 9.0, microwave power of 1000 W. The model predictive inhibitory rate under this process condition was 84.80%. And the inhibitory rate of verification experiment was 90.21% $\pm$ 0.93%. The difference between the two values was 6.38%. The results provide a theoretical basis for studying the isolation, purification and application of peanut α -glucosidase inhibitory activity peptide.

Key words: α -glucosidase inhibitory activity peptide; response surface methodology optimization; microwave assisted enzymatic hydrolysis reaction; α -glucosidase inhibitory rate

中图分类号: TS201.2⁺5

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2018)04-0117-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2018.04.023

随着人们生活水平的提高,糖尿病的发病率也在逐年上升,成为继肿瘤、心血管疾病的第三大疾病^[1]。其中,Ⅱ型糖尿病患者占有糖尿病患者的90%以上。Ⅱ型糖尿病的发病原因是患者的胰岛素分泌能力及身体对胰岛素的敏感性逐渐降低,血糖

升高,主要表现为餐后血糖高于正常值,从而导致糖尿病^[2]。Ⅱ型糖尿病可以通过口服降糖药如双胍类、磺脲类、噻唑烷二酮类、苯甲酸衍生物类、 α -葡萄糖苷酶抑制剂(阿卡波糖和伏格列波糖)来治疗。其中, α -葡萄糖苷酶抑制剂是通过抑制 α -葡萄糖苷酶

收稿日期: 2017-07-14

作者简介: 于丽娜(1974-)女,博士,副研究员,研究方向:花生营养与食品加工, E-mail: lhtyln0626@163.com。

*通讯作者: 孙杰(1981-)女,博士,副研究员,研究方向:功能食品, E-mail: sjj605@163.com。

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2016CM43, ZR2016YL021); 山东省重点研发计划(2015GGX108006); 山东省农科院重大科技成果培育计划(2016CGPY10); 山东省农业科学院青年科研基金(2016CGPY10); 山东省农业科学院农业科技创新工程(CXGC2016B17)。

的活性,减少碳水化合物水解成葡萄糖的量,从而减小小肠黏膜上皮吸收葡萄糖的速度,达到降低餐后高血糖的目的^[3]。

蛋白酶水解动植物蛋白,将具有降血糖活性的肽段释放出来,能得到 α -葡萄糖苷酶抑制肽,其天然、安全、无副作用,能替代阿卡波糖等人工合成的 α -葡萄糖苷酶抑制剂用于Ⅱ型糖尿病的治疗。包美丽等^[4]以马鹿茸为原料,用碱性蛋白酶和风味蛋白酶顺序水解,条件分别是:pH8.0、60℃、底物质量分数12%、加酶量5000 U/g、时间3 h和pH6.5、45℃、底物质量分数5%、加酶量6000 U/g、时间1 h,得到的酶解产物对 α -葡萄糖苷酶抑制率达到94.09%。王林等^[5]用胃蛋白酶水解鲑鱼肝脏蛋白,在底物浓度0.4%,酶与底物的质量比3.0%,pH3.0,温度37℃,反应时间12 h条件下的酶解产物再经Sephadex LH-20凝胶层析,获得的组分Ⅲ对 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度 IC_{50} 值为0.215 mg/mL。张灿等^[6]在pH7.36、时间4.4 h、酶底比5%、温度57.9℃条件下,用木瓜蛋白酶水解银杏蛋白,获得的3 kDa以下的肽对 α -葡萄糖苷酶抑制率为50.43%。顾欣等^[7]用Alcalase水解山杏仁蛋白,采用工艺料液比50 g/L、加酶量0.75%、pH9.0、温度50℃、时间6 h获得的酶解物经分离和纯化得到两种 α -葡萄糖苷酶抑制肽,它们对 α -葡萄糖苷酶的半抑制浓度 IC_{50} 值分别为23.97和22.93 μ mol/L。

花生含有25%~36%的蛋白,而冷榨花生粕的蛋白含量超过45%,是一种优质的植物源蛋白^[8]。花生蛋白含有人体必需的八种氨基酸,且不含抗营养因子,可以制备成如磷酸化改性花生蛋白等高营养、高功能性的蛋白产品^[9]。此外,花生多肽具有抗氧化活性、血管紧张素转化酶抑制活性、抗血栓活性等^[10-12]。目前花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的研究还没有报道。微波辅助酶解是近年发展起来的一种新技术,在微波能的作用下,蛋白大分子空间构象发生变化,更多的酶切位点暴露出来,增大了酶与底物的结合几率,加快酶解速率,提高酶解效率,酶解反应在很短的时间内完成,有利于保持酶解产物活性,降低制备成本^[13-15]。本研究利用微波辅助Alcalase酶解花生蛋白,以 α -葡萄糖苷酶抑制率为考察指标,通过响应面方法优化了花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的制备工艺,旨在为花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的分离、纯化、构效关系、降血糖的应用等方面的深入研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

冷榨花生蛋白粉 青岛长寿食品有限公司;氢氧化钠、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 Na_2CO_3 均为分析纯试剂,上海国药集团化学试剂有限公司;对硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(PNPG)(纯度 $\geq 99\%$)、 α -葡萄糖苷酶(酶活750 UN) 美国Sigma公司;Alcalase(2.4 L FG,标称酶活2.4 AU-A/g) 诺维信(中国)生物医药有限公司。

FR223 CN型电子分析天平 奥豪斯仪器(上

海)有限公司;L 420型低速离心机 湖南湘仪离心机仪器有限公司;XH-100 A型电脑微波催化合成/萃取仪 北京祥鹄科技发展有限公司;FE 20型实验室pH计 梅特勒-托利多仪器有限公司;UV-4802型双光束扫描型紫外/可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 微波辅助蛋白酶解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽工艺 取花生蛋白粉于三口烧瓶中,加入蒸馏水,轻轻摇动使花生蛋白粉与水混匀,用1 mol/L的氢氧化钠溶液调节pH,再加入Alcalase酶,再加入蒸馏水至一定体积,在微波催化合成/萃取仪中,调节反应液温度、微波功率,微波辅助酶解一定时间,酶解结束后,将反应液倒入塑料离心瓶中,盖上盖子,在沸水浴中灭酶5 min,立刻在冷水浴中冷却,调平衡后,在4000 r/min离心10 min,上清液倒入100 mL容量瓶,用蒸馏水定容,最后将容量瓶内液体倒入100 mL三角瓶,测定 α -葡萄糖苷酶抑制率。

1.2.2 单因素实验 以 α -葡萄糖苷酶抑制率为指标,研究底物浓度、pH、加酶量、温度、时间、微波功率对微波辅助蛋白酶解制备的花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的葡萄糖苷酶抑制率的影响。

1.2.2.1 底物浓度对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响 采用微波辅助蛋白酶解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽,在pH为9.5,加酶量为1.4%,温度55℃,时间8 min,微波功率1000 W的条件下,研究底物浓度分别为2%、4%、6%、8%、10%、12%时,花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率。

1.2.2.2 pH对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响 采用微波辅助蛋白酶解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽,在底物浓度为10%,加酶量为1.4%,温度55℃,时间8 min,微波功率1000 W的条件下,研究pH分别为7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0时,花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率。

1.2.2.3 加酶量对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响 采用微波辅助蛋白酶解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽,在底物浓度为10%,pH为9.5,温度55℃,时间8 min,微波功率1000 W的条件下,研究加酶量分别为0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4%、1.6%时,花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率。

1.2.2.4 温度对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响 采用微波辅助蛋白酶解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽,在底物浓度为10%,pH为9.5,加酶量为1.4%,时间8 min,微波功率1000 W的条件下,研究温度分别为40、45、50、55、60、65℃时,花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率。

1.2.2.5 时间对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响 采用微波辅助蛋白酶解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽,在底物浓度为10%,pH为9.5,加酶量为1.4%,温度55℃,微波功率1000 W的条件下,研究时间分别为2、4、6、8、10、12 min时,花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率。

1.2.2.6 微波功率对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响 采用微波辅助蛋白酶解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽,在底物浓度为 10%, pH 为 9.5, 加酶量为 1.4%, 温度 55 $^{\circ}\text{C}$, 时间 8 min 的条件下, 研究微波功率分别为 500、600、700、800、900、1000 W 时, 花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的 α -葡萄糖苷酶抑制率。

1.2.3 响应面 (Response surface methodology, RSM) 实验 在单因素实验基础上, 以 α -葡萄糖苷酶抑制率为考察指标, 固定: pH9.0、微波功率 1000 W, 选取底物浓度 (X_1)、加酶量 (X_2)、温度 (X_3) 和时间 (X_4) 4 个因素为考察因素, 每个因素设计 3 个水平, 进行响应面实验。因素水平设计见表 1。

表 1 响应面实验分析因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface methodology				
因素				
水平	X_1 底物浓度 (%)	X_2 加酶量 (%)	X_3 温度 ($^{\circ}\text{C}$)	X_4 时间 (min)
-1	8	0.6	55	6
0	10	0.9	60	9
1	12	1.2	65	12

1.2.4 葡萄糖苷酶抑制率测定方法 按照张玉等^[16]的方法进行测定, 稍作改动。将 0.5 mL 的 0.1 mol/L (pH6.8) 磷酸盐缓冲溶液、0.5 mL 样品溶液和 0.5 mL 的 3 mmol/L 的 PNPG 溶液放入 10 mL 的带刻度的塑料离心管内, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温水浴 10 min; 向离心管内加入 0.5 mL 的 0.1 U/mL 的 α -葡萄糖苷酶溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温水浴 40 min; 向离心管内加入 1.5 mL 的 0.2 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应。在波长为 405 nm 处, 以蒸馏水调节“0”点, 测定吸光值, 得到样品吸光值 $A_{\text{样品}}$; 同时做样品空白, 空白以缓冲液代替 α -葡萄糖苷酶溶液, 得到样品吸光值 $A_{\text{样品空白}}$ 。反应体系中用 0.5 mL 蒸馏水代替 0.5 mL 样品液作为对照实验, 其他操作步骤与样品相同, 405 nm 处测定吸光值, 得到对照吸光值 $A_{\text{对照}}$ 。抑制率计算公式:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A_{\text{对照}} - (A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})}{A_{\text{对照}}} \times 100$$

1.3 数据分析

各实验重复 3 次, 取平均值作为结果。响应面实验设计与分析采用 Design-expert 软件 (Static Made Easy, Minneapolis, MN, USA. Version 8.0, 2011)。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 底物浓度对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响 如图 1 所示, 随着底物浓度的增大, 抑制率呈现先减小后增大再缓慢减小的趋势, 底物浓度为 10% 时的抑制率极显著的大于其它浓度的抑制率 ($p < 0.01$)。在酶解反应体系中, 一定量的蛋白酶将一定数量的底物水解成活性产物, 此时的酶解反应刚好处于平衡状态, 这时得到的产物抑制率最大^[17]。当底物浓度在 2%~6% 范围内时, 底物浓度相对于蛋白酶的量少, 所以, 反应体系中多余的蛋白酶有可能水解了有活性的酶解产物变成了无活性的更小的肽, 导致

抑制率减小。当底物浓度在 6%~10% 范围时, 酶解产生的活性产物逐渐增多, 直到最大值, 抑制率也逐渐增大到最大值。综合考察底物浓度对抑制率的影响曲线, 选择 8%~12% 作为响应面实验中底物浓度因素的水平范围。

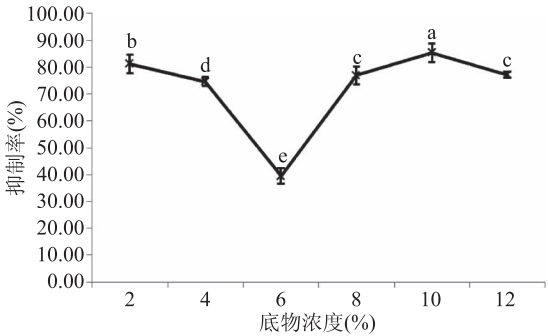


图 1 底物浓度对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响
Fig.1 Effect of substrate concentration on the α -glucosidase inhibitory rate

注: 不同字母代表具有显著性差异 $p < 0.01$; 图 2~图 6 同。

2.1.2 pH 对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响 在不同的 pH 条件下, 酶解反应速率受到 Alcalase 的活性、蛋白大分子空间构象变化以及酶与底物的相互作用的影响。由图 2 可以看出, 在 pH7.5~9.0 范围内, 抑制率缓慢增大, pH 为 9.0 时出现最大值 ($p < 0.01$), 当 pH 大于 9.0 时, 抑制率减小。这主要是因为 pH 由 7.5 增大到 9.0 时, Alcalase 酶活逐渐增大, 花生蛋白的溶解度逐渐增大, 蛋白分子结构变得疏松, 分子表面酶活位点增多, 酶与底物结合几率增大, 生成的活性产物增多, 抑制率增大^[18]。pH 继续增大时, Alcalase 酶活降低, 蛋白分子有可能变性, 酶活位点减少, 酶解速率降低, 导致抑制率减小。因此, 选择 pH9.0 作为响应面实验的 pH 固定水平。

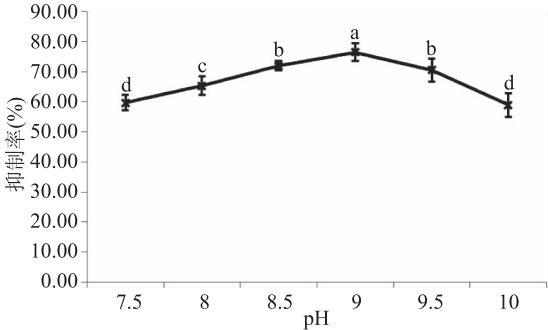


图 2 pH 对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响
Fig.2 Effect of pH value on the α -glucosidase inhibitory rate

2.1.3 加酶量对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响 如图 3 所示, 随着加酶量的增加, 抑制率先增大后减小, 加酶量为 1.2% 时的抑制率极显著的大于其它加酶量 ($p < 0.01$)。酶解反应体系中, 底物浓度一定时, 增大蛋白酶的量有利于酶解反应进行, 酶解得到的活性产物增多, 则抑制率增大。当加酶量超过一定数值时, 一定量的底物不能满足逐渐增多的蛋白酶, 有可能蛋白酶水解了体系中已有的活性产物, 使其活性减小或失去活性, 从而抑制率减小^[19]。加酶量为 0.6% 时的抑制率极显著大于加酶量为 0.8%、1.4% 和

1.6%时的抑制率值($p < 0.01$), 响应面试验中的加酶量取值范围定在 0.6%~1.2%, 将有利于加酶量因素的优化。因此, 选择加酶量 0.6%~1.2% 为响应面实验中的加酶量因素水平范围。

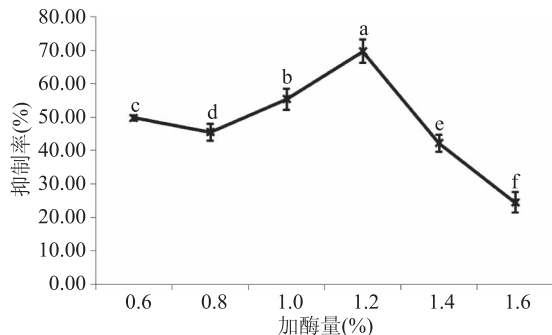


图3 加酶量对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.3 Effect of enzyme dosage
on the α -glucosidase inhibitory rate

2.1.4 温度对葡萄糖苷酶抑制率的影响 在一定的温度范围条件下, 蛋白酶才具有水解活性。如图4所示, 随着反应温度的升高, 抑制率先增大后减小, 当温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 时, 酶解产物的抑制率最大值($p < 0.01$)。反应温度升高, 能够增加反应体系中底物蛋白大分子和蛋白酶相结合的几率, 使得酶解反应速率增大, 获得更多的活性产物, 抑制率随之增大, 直到达到一个峰值^[20]。当温度高于 55 $^{\circ}\text{C}$ 时, 花生蛋白开始变性, 分子空间构象发生变化, 不利于与蛋白酶的水解位点结合, 则酶解的活性产物量逐渐减少, 表现为抑制率减小^[21]。温度为 65 $^{\circ}\text{C}$ 时的抑制率极显著地大于温度为 40、45 和 50 $^{\circ}\text{C}$ 时的抑制率值, 且较高的温度能加速反应进程。因此, 综合考察温度对抑制率的影响曲线, 选择 55~65 $^{\circ}\text{C}$ 作为响应面实验温度因素的水平范围。

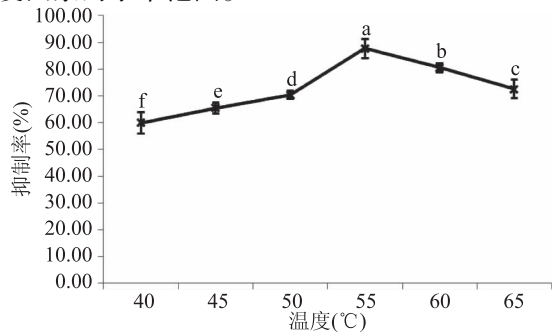


图4 温度对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.4 Effect of temperature on the α -glucosidase inhibitory rate

2.1.5 时间对葡萄糖苷酶抑制率的影响 随着反应时间的延长, 抑制率总体呈现先增大后减小的趋势, 时间 10 min 出现最大值($p < 0.01$) (图5)。酶解反应体系中, 底物与蛋白酶的结合以及蛋白酶酶切肽键都需要一定的反应时间才能完成。在传统的水浴加热酶解反应体系中, 由外到里加热, 热传导慢, 导致酶解反应时间长, 一般都在 3~12 h, 酶解效率低^[4-7]。微波辅助酶解时, 微波照射反应体系, 使电能转换为高频振动能, 从而使体系中的酶、蛋白大分子和介质溶液的温度均匀快速升高, 提高了有效碰

撞和反应效率, 反应在几分钟内即可完成, 大幅减少了反应时间^[22]。时间为 6 min 时的抑制率极显著地大于时间为 2、4 和 8 min 的抑制率, 响应面试验中时间因素的 3 个水平定在 6、9 和 12 min, 更有利于时间因素的优化。因此, 综合分析时间对抑制率的影响曲线, 选择 6~12 min 作为响应面实验时间因素的水平范围。

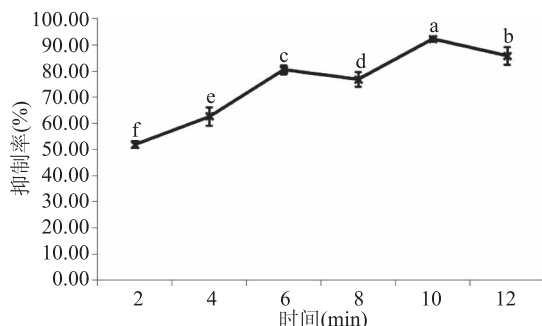


图5 时间对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.5 Effect of time on the α -glucosidase inhibitory rate

2.1.6 微波功率对葡萄糖苷酶抑制率的影响 在微波功率 500~1000 W 范围内, 抑制率总体呈现上升趋势, 微波功率 1000 W 的抑制率极显著的大于其它功率的抑制率数值($p < 0.01$) (图6)。在微波辅助酶解过程中, 高频电磁波穿透介质溶液, 到达蛋白大分子的内部, 微波能迅速转化为热能, 使蛋白分子空间构象发生变化, 酶解位点暴露于分子表面。另外, 在微波的交变电磁场作用下, 引起蛋白大分子强烈的极性振荡, 导致分子间氢键松弛, 这也有利于酶与蛋白分子相结合, 加速酶解反应^[23]。根据微波功率对葡萄糖苷酶抑制率的影响曲线, 选择 1000 W 作为响应面实验微波功率因素的固定值。

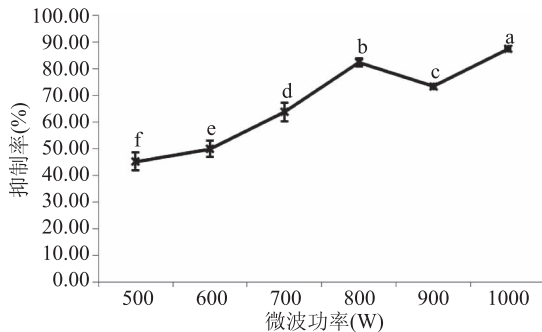


图6 微波功率对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响

Fig.6 Effect of microwave power
on the α -glucosidase inhibitory rate

2.2 响应面设计结果分析

2.2.1 Box-Behnken 实验结果 根据单因素实验结果, pH 和微波功率对 α -葡萄糖苷酶抑制率影响不显著, 所以选定响应面实验因素为底物浓度(X_1)、加酶量(X_2)、温度(X_3)和时间(X_4), α -葡萄糖苷酶抑制率为响应值(Y), 采用 Design-expert 软件按照 Box-Behnken 实验设计了 29 组实验, 24 组为析因点实验, 5 组为重复零点实验, 各实验组重复 3 次, 取平均值作为结果见表 2。

2.2.2 拟合模型的建立及显著性分析 对表 2 实验数据进行二次多项式回归拟合, 统计分析后获得了

α -葡萄糖苷酶抑制率预测值(Y)为目标函数的二次回归方程:

$$Y = 84.44 + 0.28X_1 + 0.44X_2 - 0.4X_3 + 1.79X_4 - 2.57X_1X_2 - 0.35X_1X_3 - 3.79X_1X_4 - 2.92X_2X_3 - 2.02X_2X_4 - 4.53X_3X_4 - 5.01X_1^2 - 4.14X_2^2 - 3.57X_3^2 - 5.14X_4^2$$

表2 响应面 Box-Behnken 实验设计及结果
Table 2 Design and results of the response surface methodology (RSM) and Box-Behnken

组数	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y:α-葡萄糖苷酶抑制率(%)
1	-1	-1	0	0	69.98
2	1	-1	0	0	75.14
3	-1	1	0	0	78.38
4	1	1	0	0	73.27
5	0	0	-1	-1	67.48
6	0	0	1	-1	77.41
7	0	0	-1	1	80.87
8	0	0	1	1	72.70
9	-1	0	0	-1	68.88
10	1	0	0	-1	76.29
11	-1	0	0	1	79.25
12	1	0	0	1	71.49
13	0	-1	-1	0	74.54
14	0	1	-1	0	81.26
15	0	-1	1	0	77.42
16	0	1	1	0	72.45
17	-1	0	-1	0	76.15
18	1	0	-1	0	78.68
19	-1	0	1	0	76.55
20	1	0	1	0	77.68
21	0	-1	0	-1	73.48
22	0	1	0	-1	76.02
23	0	-1	0	1	81.15
24	0	1	0	1	75.62
25	0	0	0	0	84.59
26	0	0	0	0	82.99
27	0	0	0	0	86.37
28	0	0	0	0	83.68
29	0	0	0	0	84.55

为检验微波辅助蛋白酶制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽工艺的回归方程有效性,对回归方程进行方差分析和显著性检验,结果见表3。由表3可知,该实验所建立的二次多项模型具有高度的显著性(模型方程的 $p < 0.0001$);失拟项 $p = 0.1475 > 0.05$ 不显著;校正决定系数 $R^2_{Adj} = 0.8314$,表明模型方程大约有 83.14% 的 α -葡萄糖苷酶抑制率的变化能由此模型进行解释;方程的决定系数 $R^2 = 0.9157$,表明 α -葡萄糖苷酶抑制率建立的方程对实验的拟合程度较好,因此该模型可以预测实际情况。同时,模型的变异系数 $CV = 2.59\%$,信噪比(Adeq Precision)为 $11.179 > 4$,也表明模型方程拟合度较好,该模型可用于 α -葡萄糖苷酶抑制率的理论预测。显著性检验

表明(表3),方程一次项因素 X_4 (时间)对 α -葡萄糖苷酶抑制率的线性效应高度显著($p < 0.01$);各因素的 F 值大小反映了其对实验响应值影响的重要性, F 值越大则影响越大,因此,各因素对 α -葡萄糖苷酶抑制率影响程度大小为:时间 $>$ 加酶量 $>$ 温度 $>$ 底物浓度。交互项 X_1X_2 、 X_2X_3 对 α -葡萄糖苷酶抑制率的交互影响显著($p < 0.05$), X_1X_4 对 α -葡萄糖苷酶抑制率的交互影响高度显著($p < 0.01$), X_3X_4 对 α -葡萄糖苷酶抑制率的交互影响极显著($p < 0.001$)。二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 和 X_4^2 对 α -葡萄糖苷酶抑制率的曲面效应极显著($p < 0.001$)。

表3 回归模型的方差分析
Table 3 Variance analysis of regression model

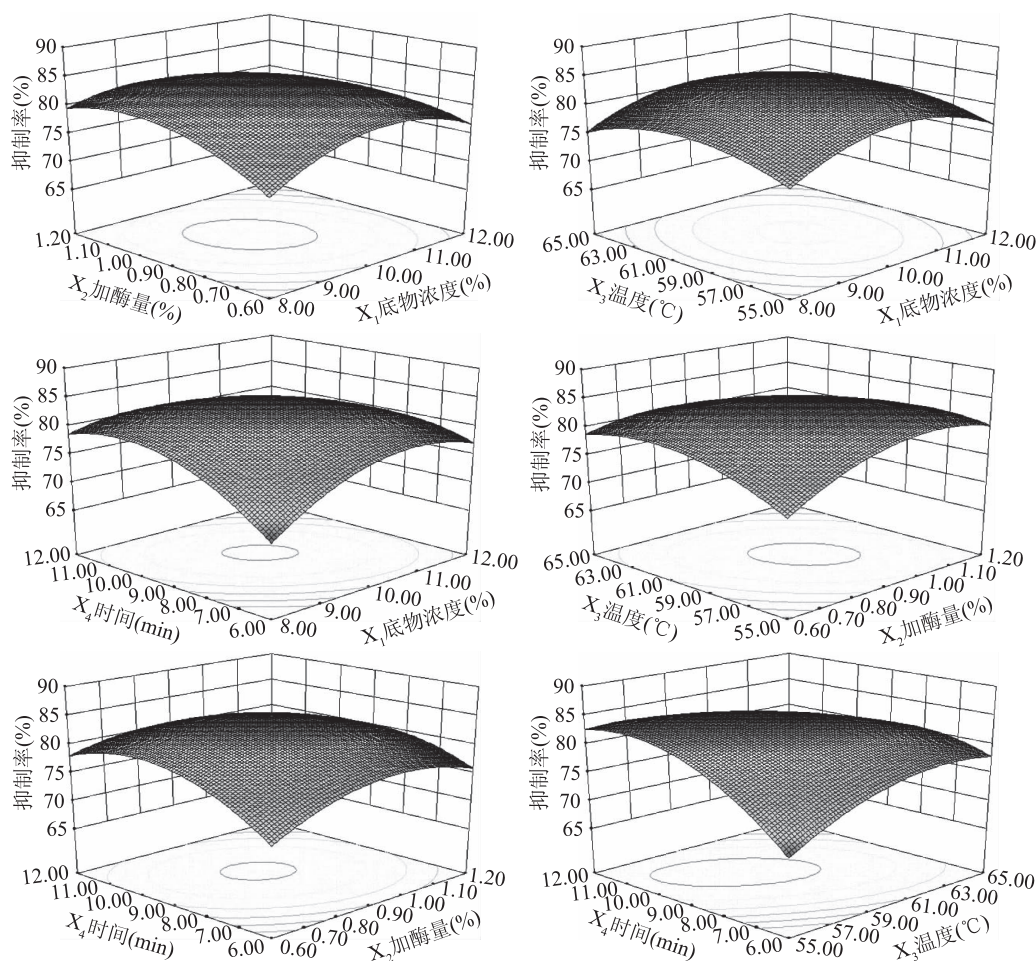
因素	平方和	自由度	均方	F 值	Prob > F
intercept	603.73	14	43.12	10.86	<0.0001
X ₁	0.95	1	0.95	0.24	0.6327
X ₂	2.32	1	2.32	0.58	0.4576
X ₃	1.90	1	1.90	0.48	0.5009
X ₄	38.61	1	38.61	9.73	0.0075
X ₁ X ₂	26.38	1	26.38	6.65	0.0219
X ₁ X ₃	0.49	1	0.49	0.12	0.7307
X ₁ X ₄	57.53	1	57.53	14.49	0.0019
X ₂ X ₃	34.12	1	34.12	8.60	0.0109
X ₂ X ₄	16.25	1	16.25	4.09	0.0626
X ₃ X ₄	81.94	1	81.94	20.64	0.0005
X ₁ ²	162.61	1	162.61	40.96	<0.0001
X ₂ ²	110.96	1	110.96	27.95	0.0001
X ₃ ²	82.83	1	82.83	20.87	0.0004
X ₄ ²	171.62	1	171.62	43.23	<0.0001
残差	55.57	14	3.97	/	/
失拟项	49.12	10	4.91	3.04	0.1475
纯误差	6.46	4	1.61	/	/
总和	659.3	28	/	/	/

$R^2 = 0.9157; R^2_{Adj} = 0.8314; CV(\%) = 2.59;$
Adeq Precision = 11.179

注: $p \leq 0.05$,影响显著; $p \leq 0.01$,影响高度显著; $p \leq 0.001$,影响极显著; $p > 0.05$,影响不显著。

2.2.3 两因素间的交互效应分析 图7的响应曲面图和等高线图可以反映出模型中任何两个因素交互作用对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响程度,等高线的形状越接近于椭圆形,则两个因素交互作用越显著;反之,等高线的形状越接近于圆形,则两个因素交互作用越不显著;此外,椭圆形排列得越紧密,则两个因素交互作用越显著。由图7可知,底物浓度(X_1)和加酶量(X_2)、加酶量(X_2)和温度(X_3)的交互作用对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响显著,底物浓度(X_1)和时间(X_4)的交互作用对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响高度显著,温度(X_3)和时间(X_4)的交互作用对 α -葡萄糖苷酶抑制率的影响极显著。图7的6个响应面均为凸型曲面,说明 α -葡萄糖苷酶抑制率存在极高值,且极值出现在椭圆形的圆心处。

2.2.4 制备工艺条件优化 回归模型预测的微波辅

图7 各因素对 α -葡萄糖苷酶抑制率影响的趋势图Fig.7 Effects of various factors on the α -glucosidase inhibitory rate

助蛋白酶制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的最佳工艺条件为:底物浓度9.77%、加酶量0.94%、温度58.47℃、时间9.99 min,在此条件下 α -葡萄糖苷酶抑制率模型预测值为84.80%。为检验响应面实验结果的可靠性,并综合考虑实际操作的便利性,将工艺参数修正为:底物浓度9.77%、加酶量0.94%、温度59℃、时间10 min,进行微波辅助蛋白酶解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的实验。3次平行实验得到的平均 α -葡萄糖苷酶抑制率为 $90.21\% \pm 0.93\%$,验证实验值与模型预测值的差值为6.38%,说明模型与实际情况拟合较好,验证了所预测模型的正确性。因此,响应面法对微波辅助蛋白酶解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽工艺条件的参数优化是可行的,得到的工艺条件具有实际应用价值。

3 结论

以微波能替代传统的水浴加热,通过响应面的Box-Behnken实验设计优化了微波辅助Alcalase酶解制备花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的工艺条件。获得的最佳工艺为:底物浓度9.77%、pH9.0、加酶量0.94%、温度59℃、时间10 min、微波功率1000 W,该最佳工艺条件下制备的水解产物对 α -葡萄糖苷酶抑制率为 $90.21\% \pm 0.93\%$ 。该工艺技术极大地缩短了酶解反应时间,将酶解时间由传统的3 h以上缩短为10 min,提高了酶解效率,酶解产物活性高。花生 α -葡

萄糖苷酶抑制活性肽的研究和开发为进一步开发利用花生蛋白这一优质植物蛋白资源提供了一条新途径;并对花生 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽的分离、纯化、结构鉴定、构效关系的研究提供了理论基础。

参考文献

- [1]段义爽,孙红文.环境有机污染物与糖尿病关系的研究进展[J].环境化学,2017,36(4):753-766.
- [2]Mishra S, Mishra B. Study of lipid peroxidation, nitric oxide end product, and trace element status in type 2 diabetes mellitus with and without complications [J]. International Journal of Applied and Basic Medical Research, 2017, 7(2): 88-93.
- [3]Cadejiani F A, Silva O S. Acarbose promotes remission of both early and late dumping syndromes in post-bariatric patients [J]. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy, 2016, 9: 443-446.
- [4]包美丽,杨添植,张立钢,等.双酶法制备马鹿茸降血糖肽工艺优化及其对 α -葡萄糖苷酶的抑制效果[J].食品科学,2017,38(6):88-95.
- [5]王林,王鹏,胡建恩,等.鲑鱼肝脏蛋白中 α -葡萄糖苷酶抑制肽的研究[J].食品科技,2015,40(4):315-321.
- [6]张灿,吴彩娥,范龚健,等.酶解银杏蛋白制备 α -葡萄糖苷酶抑制肽的研究[J].食品与机械,2016,32(11):137-141.
- [7]顾欣,崔洁,李迪,等.山杏仁蛋白源 α -葡萄糖苷酶抑制肽

(下转第136页)

2015,17(3):277-286.

[4] Goncalves JL, Roma EH, Gomes - Santos AC, et al. Pro-inflammatory effects of the mushroom *Agaricus blazei* and its consequences on atherosclerosis development [J]. *Eur J Nutr*, 2012,51(8):927-937.

[5] Oh TW, Kim YA, Jang WJ, et al. Semipurified fractions from the submerged - culture broth of *Agaricus blazei* Murill reduce blood glucose levels in streptozotocin-induced diabetics [J]. *J Agr Food Chem*, 2010,58(7):4113-119.

[6] 王昭晶. 碱蓬水溶性多糖 SPB 的分离纯化以及活性的初步研究[J]. *食品科技*, 2010,35(9):236-238.

[7] Zhang J Y, Chen X G, Hu Z D, et al. Quantification of noradrenaline and dopamine in *Portulaca oleracea* L. by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002,471(2):203-204.

[8] 张建军. 红平菇菌丝体多糖的提取、结构分析和抗糖尿病作用研究[D]. 山东: 山东农业大学, 2016:5-6.

[9] 王金奎. 平菇多糖分离纯化、结构表征与修饰及抗氧化性的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2013:2-3.

[10] 赵肖通, 解军波, 潘炳成, 等. 响应面分析法优化姬松茸多糖的脱色工艺[J]. *食品工业科技*, 2016,37(9):207-212.

[11] 汪荣斌, 秦亚东, 周娟娟. 青钱柳叶多糖双氧水脱色工艺研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2016,18(9):60-62.

[12] 吴光杰, 李玉萍, 李资玲, 等. 马齿苋多糖的活性炭脱色工艺优选[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013,19(12):43-45.

[13] 罗玺. 利用大孔树脂对灵芝多糖脱色的研究[A]. 中国菌

物学会、中国农学会食用菌分会. 第九届全国食用菌学术研讨会摘要集[C]. 中国菌物学会、中国农学会食用菌分会, 2010:1-2.

[14] 刘志刚. 甜菜糖蜜中甜菜碱的分离提取研究[D]. 浙江: 浙江工业大学, 2013:3-4.

[15] 王萌, 童军茂, 魏长庆, 等. 响应面法优化棉籽壳木聚糖酶解液活性炭脱色工艺[J]. *食品工业*, 2014,35(6):147-151.

[16] 单晓菊, 邱明磊, 张岩, 等. 响应面法优选苦豆子多糖活性炭脱色工艺[J]. *中国药房*, 2011,22(47):4443-4446.

[17] 谢建华, 申明月, 聂少平, 等. 青钱柳多糖活性炭脱色工艺[J]. *南昌大学学报:理科版*, 2013,37(4):382-385.

[18] 刘敏, 郭丽梅, 张丽. 苯酚-硫酸法测定油松花粉多糖含量研究[J]. *时珍国医国药*, 2010,21(6):1526-1528.

[19] 李双明, 代福玲, 杨雪姣, 等. 响应面法优化东北红豆杉多糖脱色工艺[J]. *食品工业*, 2014,35(10):31-35.

[20] Liu C L, Lin T H, Juang R S. Optimization of recombinant hexaoligochitin - producing chitinase production with response surface methodology [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2013,62(10):518-522.

[21] Ghorbel B O, Hajji S, Younes I, et al. Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013,61(2):243-250.

[22] 张黎明, 李瑞超, 郝利民, 等. 响应面优化玛咖叶总黄酮提取工艺及其抗氧化活性研究[J]. *现代食品科技*, 2014,30(4):233-239.

(上接第122页)

的分离、纯化及鉴定[J]. *中国粮油学报*, 2016,31(8):116-121.

[8] Yu L N, Yang Q L, Feng J X, et al. Preparation and antioxidant activities of peanut (*Arachin conarachin* L.) protein peptides by *Lactobacillus* solid state fermentation method [J]. *Applied Mechanics and Materials*, 2014,668-669:1573-1576.

[9] Yu L N, Yang W Q, Sun J, et al. Preparation, characterisation and physicochemical properties of the phosphate modified peanut protein obtained from *Arachin Conarachin* L. [J]. *Food Chemistry*, 2015,170:169-179.

[10] Yu L N, Sun J, Liu S F, et al. Ultrasonic - assisted enzymolysis to improve the antioxidant activities of peanut (*Arachin conarachin* L.) antioxidant hydrolysate [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012,13:9051-9068.

[11] Jimsheena V K. Arachin derived peptides as selective angiotensin I - converting enzyme (ACE) inhibitors: structure - activity relationship [J]. *Peptides*, 2010,31(6):1165-1176.

[12] Zhang S B. *In vitro* antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates [J]. *Food Chemistry*, 2016,202:1-8.

[13] Yu L N, Gong Q X, Yang Q L, et al. Technology optimization on microwave-assisted extraction water soluble dietary fiber from peanut hull and its antioxidant activity [J]. *Food Science and Technology Research*, 2011,17(5):401-408.

[14] Zhang H C, Yu L N, Yang Q L, et al. Optimization of a microwave-coupled enzymatic digestion process to prepare peanut peptides [J]. *Molecules*, 2012,17:5661-5674.

[15] Rashed M M A, Tong Q Y, Nagi A, et al. Isolation of essential oil from *Lavandula angustifolia* by using ultrasonic -

microwave assisted method preceded by enzymolysis treatment, and assessment of its biological activities [J]. *Industrial Crops & Products*, 2017,100:236-245.

[16] 张玉, 王伟, 张一帆, 等. 响应面法优化蚕蛹蛋白源 α -葡萄糖苷酶抑制肽酶解条件 [J]. *中国食品学报*, 2016,16(4):137-144.

[17] 徐树来, 吴阳, 金慧荣, 等. 基于响应曲面法的中老年营养米粉酶解工艺优化研究 [J]. *食品工业科技*, 2016,37(10):236-241.

[18] Wang L, Liu H Z, Liu L, et al. Prediction of peanut protein solubility based on the evaluation model established by supervised principal component regression [J]. *Food Chemistry*, 2017,218:553-560.

[19] 胡杨, 杨莉莉, 熊善柏, 等. 水解进程对酶法制备的鱼鳞胶原蛋白肽性能的影响 [J]. *华中农业大学学报*, 2017,36(1):103-109.

[20] 王芳, 李学文, 廖亮, 等. 响应面法优化油菜籽粕中硫苷酶解工艺及其降解产物抑菌作用的初步研究 [J]. *食品工业科技*, 2017,38(5):264-268,273.

[21] 马铁铮, 王静, 王强. 物理改性方法提升花生蛋白溶解性的研究 [J]. *中国油脂*, 2017,22(1):93-98.

[22] Moreira M M, Barroso M F, Boeykens A, et al. Valorization of apple tree wood residues by polyphenols extraction: comparison between conventional and microwave - assisted extraction [J]. *Industrial Crops & Products*, 2017,104:210-220.

[23] 李荣斌, 董绪燕, 魏芳, 等. 微波辅助 NaOH 预处理提高油菜籽酶解效率的研究 [J]. *可再生能源*, 2012,30(7):46-50.