

# 响应面法优化酸水解制备波纹巴非蛤小分子肽工艺

陈晓刚<sup>1</sup>, 李文海<sup>1</sup>, 陈忻<sup>1</sup>, 戎海武<sup>2</sup>, 苗晴<sup>2</sup>, 孙恢礼<sup>3</sup>

(1.佛山科学技术学院化学与化工系, 广东 佛山 528000; 2.佛山科学技术学院信息科学与数学系, 广东 佛山 528000; 3.中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301)

**摘要:**应用响应面分析法优化酸水解制备波纹巴非蛤小分子肽的工艺条件。采用二次正交旋转组合设计试验, 以波纹巴非蛤肽得率为响应值, 进行3因素5水平的响应面分析, 建立二次回归模型, 其拟合优度为92.09%。获得的最优酸水解条件为: 固液质量比1:3、盐酸浓度6.4mol/L、酸水解温度92℃、酸水解时间5.3h。在此条件下肽得率为82.21%, 与模型预测的肽得率84.04%接近。SDS-PAGE电泳测得酸水解液组分的最小分子质量小于2kD。  
**关键词:**响应面分析; 波纹巴非蛤; 酸水解; 小分子肽

Response Surface Methodology for Optimization of Small Peptide Preparation from *Paphia undulate* Meat by Acid Hydrolysis

CHEN Xiao-gang<sup>1</sup>, LI Wen-hai<sup>1</sup>, CHEN Xin<sup>1</sup>, RONG Hai-wu<sup>2</sup>, MIAO Qing<sup>2</sup>, SUN Hui-li<sup>3</sup>

(1. Department of Chemistry and Chemical Engineering, Foshan University, Foshan 528000, China

2. Department of Information Sciences and Mathematics, Foshan University, Foshan 528000, China

3. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy Sciences, Guangzhou 510301, China)

**Abstract:** In this study, an acid hydrolysis procedure for preparing small peptides from *Paphia undulate* meat was proposed and optimized using response surface methodology (RSM). A quadratic regression model describing small peptide yield as a function of 3 variables was created based on a 5-level quadratic orthogonal rotation combination design, whose goodness of fit was 92.09%. The optimal hydrolysis conditions were found as follows: raw material-to-water ratio of 1:3, hydrochloric acid concentration of 6.4 mol/L, hydrolysis temperature of 92 °C and hydrolysis time of 5.3 h. Under the optimal conditions, the predicted and experimental recovery rates of small peptides were 84.04% and 82.21%, respectively. SDS-PAGE revealed that the smallest peptides in the resulting hydrolysate were less than 2 kD.

**Key words:** response surface methodology; *Paphia undulata*; acid hydrolysis; small peptide

中图分类号: TQ914.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)21-0218-05

生物活性肽是一类具有多种生物学功能的蛋白片段<sup>[1]</sup>, 如抗氧化<sup>[2]</sup>、抗菌<sup>[3-4]</sup>、抗癌<sup>[4]</sup>、降血压<sup>[5]</sup>等, 它由小到2个氨基酸大到数十个氨基酸通过肽键连接而成, 而且常经过糖苷化、磷酸化或酰化衍生, 在细胞生理及代谢功能的调节上具有重要的作用<sup>[6]</sup>。目前短肽已经成为药物和功能性食品的开发应用热点<sup>[7-8]</sup>。

小肽的制备方法主要有人工合成和蛋白质水解。人工合成的小肽产品成本太高, 不适合作饲料添加剂和营

养品。蛋白质可经酸、碱和酶水解生成小肽。酶法水解蛋白质生产周期长且水解度不高, 所得产品以大分子多肽为主。碱水解时, 丝氨酸、苏氨酸、精氨酸等大部分被破坏, 且大部分氨基酸都会发生消旋作用, 所得产品为D型和L型氨基酸的混合物, 营养成分损失大。酸水解具有水解彻底、且不会引起氨基酸的消旋作用, 易于大规模生产的特点, 同时国内外用酸水解法制备贝类小肽的研究报道较少, 故本研究以波纹巴非

收稿日期: 2011-06-25

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2008BAD94B08); 广东省2009院省合作项目(2009B091300018); 广东省2010院省合作项目(2010B090900027)

作者简介: 陈晓刚(1979—), 男, 讲师, 硕士, 主要从事应用化学研究。E-mail: fscxg@189.cn

蛤为原料, 选用酸水解, 探讨盐酸浓度、酸水解温度、酸水解时间等因素对肽得率的影响变化规律, 并用响应面法进行优化, 以肽得率为响应值选出最优酸水解条件, 为其他蛋白质酸水解工艺研究提供参考。

响应面分析法(response surface methodology, RSM)由 Box 及其合作者于 20 世纪 50 年代提出并逐步完善, 它以回归方程作为函数估算的工具, 将多因子试验中因素与试验结果的关系用多项式拟合, 将因子与试验结果的关系函数化, 因此, 可对函数的面进行分析, 研究因子与响应值之间、因子与因子之间的相互关系, 并进行优化<sup>[9]</sup>。目前利用响应面分析法的研究主要集中在酶解工艺条件的优化方面, 如 Guo 等<sup>[10]</sup>通过响应面分析法水解大豆蛋白制备抑制 ACE 酶的肽; 也有采用响应面优化方法从鱼胶中提取抗氧化肽<sup>[11-12]</sup>, 而酸水解法制备贝类小分子肽的研究较少。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

波纹巴非蛤 佛山市禅城区山紫市场, 由中国科学院南海海洋研究所孙恢礼研究员鉴定。

丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、溴酚蓝、Tris 加拿大 BBI 公司; 过硫酸铵、四乙基乙二胺 广州威佳科技有限公司;  $\beta$ -巯基乙醇、甘氨酸、考马斯亮蓝 R250 广州翔博生物科技有限公司; 以上试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

SHZ-82A 恒温水浴振荡器 金坛市富华仪器有限公司; pH5-3C 型精密 PH 计 上海雷磁仪器厂; FA2004N 电子天平 上海精密科学仪器有限公司; BP252AG 搅拌器 广东美的生活电器制造有限公司; KDN-102C 型定氮仪 上海纤检仪器有限公司; SYC-15 超级恒温水浴南京桑力电子设备厂; 85-Z 恒温磁力搅拌器 常州市国华仪器厂; 电炉 中国广州电子瓦礫厂; DYCZ-24A 型电泳仪 北京六一仪器厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 波纹巴非蛤的酸水解方法

##### 1.3.1.1 原料处理

新鲜波纹巴非蛤泡于水中吐沙, 去壳摘除内脏, 清洗, 沥水, 然后分装成若干份实验用样品, 每份样品 10 g, 冷冻贮藏。

##### 1.3.1.2 贝肉酸水解前的预处理

从冰箱中取出 10g 冷藏贝肉若干份, 按贝肉与水的质量比为 1:3 加水匀浆。

##### 1.3.1.3 酸水解处理

将贝肉匀浆液置于 250mL 锥形瓶中, 加入一定量的

盐酸, 于一定温度的恒温水浴锅内计时进行酸水解。整个酸水解过程中, 需不停振荡以保证反应充分。

#### 1.3.1.4 过滤

酸水解结束后, 冷却, 加入 50mL 质量分数 20% 三氯乙酸, 过滤, 得到波纹巴非蛤酸水解滤液, 将滤液定容为 250mL。

#### 1.3.2 总氮含量的测定<sup>[13]</sup>

采用半微量凯氏定氮法测定水解滤液的总氮含量, 计算方法如下。

$$T/\% = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times 0.0140 \times 6.25}{V_0 \times \frac{V}{V'}} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $T$  为上清液中总氮含量;  $V_2$  为样品消耗盐酸标准溶液的体积 /mL;  $V_1$  为空白消耗盐酸标准溶液的体积 /mL;  $c$  为盐酸标准溶液的浓度 /mol/L; 0.0140 为氮的毫克当量数; 6.25 为氮换算为蛋白质的系数;  $V_0$  为样品的体积 /mL;  $V$  为试样分解液总体积 /mL;  $V'$  为试样分解液蒸馏用体积 /mL。

#### 1.3.3 氨态氮含量的测定<sup>[14-15]</sup>

利用甲醛法测定水解滤液的氨态氮含量, 计算方法如下。

$$A = \frac{(V_2 - V_1) \times c \times 0.0140}{V \times \frac{20}{100}} \times 100 \quad (2)$$

式中:  $A$  为上清液中氨态氮含量 /mg/100mL;  $V_2$  为测定用样品加入甲醛后滴定至终点(pH9.2)所消耗氢氧化钠标准溶液的体积 /mL;  $V_1$  为空白实验加入甲醛后滴定至终点所消耗氢氧化钠标准溶液的体积 /mL;  $c$  为氢氧化钠标准溶液的浓度 /mol/L;  $V$  为测定用样品溶液的体积 /mL; 0.0140 为氮的毫摩尔质量 /g/mmol)。

#### 1.3.4 肽得率的测定<sup>[16]</sup>

采用三氯乙酸(TCA)沉淀法与甲醛滴定法相结合进行测定。按下式进行计算。

$$\text{肽的总氮含量} = \text{上清液总氮含量} - \text{上清液氨态氮含量} \quad (3)$$

$$\text{肽得率}/\% = \frac{\text{上清液肽氮量}}{\text{原料总蛋白氮量}} \times 100 \quad (4)$$

#### 1.3.5 小分子多肽的分析<sup>[17-19]</sup>

利用 SDS-PAGE 电泳分析小分子多肽。配制 15% 分离胶和 5% 浓缩胶, 开始设定电泳仪电压为 80V, 电流为 30mA。当进入分离胶时, 将电压设定为 110V。将 TCA 沉淀后的上清液浓缩, 波纹巴非蛤滤液上样量为 15  $\mu$ L 和 20  $\mu$ L。最后于含有考马斯亮蓝 R250、甲醇、乙酸的染色液中染色 30min, 用甲醇、乙酸脱色液脱色, 在脱色摇床上进行脱色直至凝胶板染色条带清晰为止。

## 2 结果与分析

### 2.1 酸水解的响应面设计与分析

根据马永全等<sup>[20]</sup>对河蚬蛋白酸水解工艺的单因素试验研究,本试验酸水解单因素选定底物浓度为固液质量比1:3,以肽得率为响应值,试验因素包括盐酸浓度为(5~7mol/L),加热温度为(80~100℃),加热时间为(4~6h)下置于恒温水浴振荡器中酸水解。

#### 2.1.1 回归模型的建立

根据二次正交旋转组合试验设计的原理,本试验所确定的原变量与编码变量之间的关系见表1。3因素5水平二次正交旋转组合设计结果见表2。

表1 试验因素水平编码

Table 1 Coded values and corresponding actual values of optimization parameters in response surface analysis

因素	水平				
	-2	-1	0	1	2
X <sub>1</sub> 盐酸浓度/(mol/L)	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
X <sub>2</sub> 水解温度/℃	80	85	90	95	100
X <sub>3</sub> 水解时间/h	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0

表2 二次正交旋转组合试验设计与结果

Table 2 Quadratic orthogonal rotation combination design and results for response surface analysis

试验号	矩阵设计			Y 肽得率/%
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
1	-2	-2	-2	59.19
2	-2	-1	-1	66.72
3	-2	0	0	73.39
4	-2	1	1	70.56
5	-2	2	2	67.23
6	-1	-1	-2	64.38
7	-1	0	-1	74.11
8	-1	1	0	81.84
9	-1	2	1	71.14
10	-1	-2	2	67.84
11	0	0	-2	75.35
12	0	1	-1	78.84
13	0	2	0	80.12
14	0	-2	1	68.82
15	0	-1	2	70.90
16	1	1	-2	73.61
17	1	2	-1	79.63
18	1	-2	0	67.23
19	1	-1	1	75.65
20	1	0	2	73.23
21	2	2	-2	68.42
22	2	-2	-1	66.15
23	2	-1	0	74.78
24	2	0	1	77.58
25	2	1	2	75.35
26	0	0	-2	82.45
27	0	0	-1	83.28
28	0	0	0	83.61
29	0	0	1	82.93
30	0	0	2	83.79

利用 SAS 9.2 软件对表 2 的试验结果进行处理,得到了酸水解液中肽得率(Y)与各因素之间的相互关系,回归模型为:  $Y = -639.84053 + 51.04636X_1 + 78.05642X_2 + 75.47109X_3 + 6.03870X_1X_2 - 4.81661X_1X_3 + 4.2277X_2X_3 - 6.5698X_1^2 - 7.36030X_2^2 - 8.32907X_3^2$ 。(5)

#### 2.1.2 回归模型的方差分析

表3 回归方程各项回归系数的t检验

Table 3 t-test significance of each regression coefficient in the fitted regression equation

方差来源	自由度	非标准化系数	标准差	t 值	P 值	显著性
模型	9					
常数项	1	-639.8405	119.4648	-5.3600	<0.0001	**
X <sub>1</sub>	1	51.0464	15.7339	3.2400	0.0041	*
X <sub>2</sub>	1	78.0564	23.3574	3.3400	0.0032	*
X <sub>3</sub>	1	75.4711	14.2985	5.2800	<0.0001	**
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	-6.5698	1.1829	-5.5500	<0.0001	**
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	-7.3603	1.1830	-6.2200	<0.0001	**
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	1	-8.3291	1.1830	-7.0400	<0.0001	**
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	6.0387	2.0245	2.9800	0.0074	*
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1	-4.6166	2.0245	-2.2800	0.0337	
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1	4.2277	2.0245	2.0900	0.0498	

表4 回归方程的方差分析

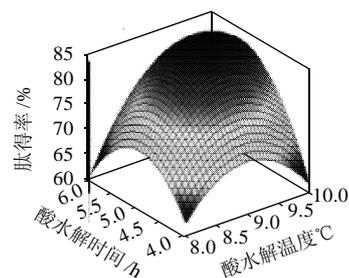
Table 4 Variance analysis for the fitted regression equation

方差来源	自由度	平方和	均方和	F 值	P 值	R <sup>2</sup>
回归模型	9	1145.6132	127.2904	25.8700	<0.0001	
误差	20	98.3998	4.9200			
总和	29	1244.0130				0.9209

从表4可以看出,F检验结果表明,肽得率Y的回归项达到高度显著水平(P<0.0001),且该回归方程的拟合优度是92.09%(R<sup>2</sup>=0.9209),说明方程拟合较好。

#### 2.1.3 酸水解温度与时间对肽得率的影响

响应面是响应值对各试验因子所构成的三维空间的曲面图,从响应面分析图上可形象看出各参数之间的相互作用。根据回归方程作出不同因子的相应分析图,借助软件 Matlab 绘出响应面分析立体图。根据软件操作要求,将温度数值作调整,调整为实际温度的1/10。



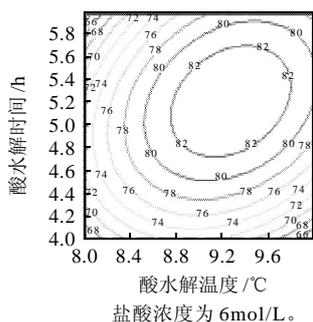


图1 水解温度与时间对肽得率的影响

Fig.1 Response surface and contour plots showing the interactive effect between hydrolysis temperature and hydrolysis time on peptide yield from *Paphia undulata*

从图1可见, 盐酸浓度固定为6mol/L的条件下, 随着酸水解温度的升高, 肽得率呈先上升后下降的趋势, 主要是因为温度过高, 小分子肽开始大量地进一步分解为游离氨基酸, 导致肽得率下降。且温度过高, 赖氨酸会进一步分解, 使酸水解液呈黑色, 并有特殊味道。而酸水解时间从4~5h过程中, 肽得率呈持续上升趋势, 5.2h达到最大值, 之后呈下降趋势, 主要是因为随着加热时间的增加, 酸水解液中的小分子肽会进一步分解, 导致肽得率下降。

2.1.4 盐酸浓度与酸水解时间对肽得率的影响

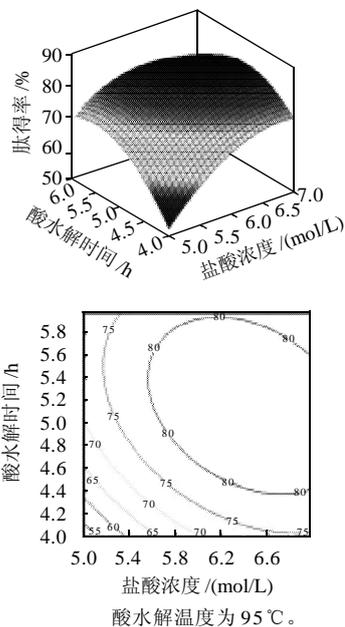


图2 盐酸浓度与酸水解时间对肽得率的影响

Fig.2 Response surface and contour plots showing the interactive effect between hydrochloric acid concentration and hydrolysis time on peptide yield from *Paphia undulata*

从图2可见, 酸水解温度固定为95℃的条件下, 当酸水解时间在5.2h左右时肽得率较高, 随盐酸浓度增加肽得率也呈上升趋势并逐渐趋于平稳, 可能由于随着盐

酸浓度增大, 底物蛋白分解增多, 但是蛋白分解成的肽也进一步降解为氨基酸, 从而肽含量增加程度减小。

2.1.5 盐酸浓度与酸水解温度对肽得率的影响

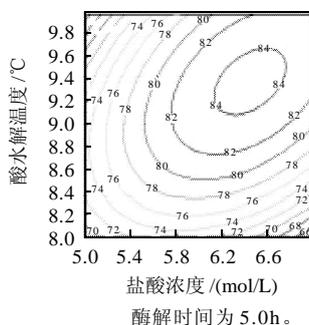
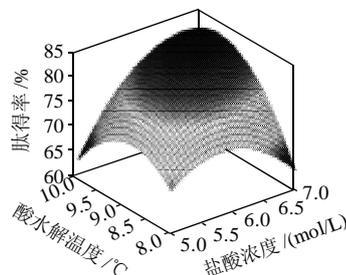


图3 盐酸浓度与酸水解温度对肽得率的影响

Fig.3 Response surface and contour plots showing the interactive effect between hydrochloric acid concentration and hydrolysis temperature on peptide yield from *Paphia undulata*

从图3可见, 在酸水解时间固定为5.0的条件下, 盐酸浓度在6.4mol/L左右肽得率较高, 肽得率也在约95℃时出现最大值。盐酸浓度与酸水解温度存在交互作用, 即增大盐酸浓度和升高温度对肽降解为氨基酸的速度快于底物蛋白降解为肽的速度。

2.1.6 酸水解最优工艺参数的确定

首先在Excel表格中分析得出: 当 $X_1=6.0$ 、 $X_2=9.5$ 、 $X_3=5.0$ 条件下的肽得率最高, 对响应面试验结果利用SAS 9.0软件进行优化分析, 对方程(5)进行一阶求导。

求导知:

$$\frac{\partial Y}{\partial X_1} = 51.04636 - 13.13966X_1 + 6.03870X_2 - 4.61661X_3 = 0 \quad (6)$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_2} = 78.05642 - 14.7206X_2 + 6.03870X_1 + 4.22766X_3 = 0 \quad (7)$$

$$\frac{\partial Y}{\partial X_3} = 75.47109 - 16.65814X_3 - 4.61661X_1 + 4.22766X_2 = 0 \quad (8)$$

并分别把  $\begin{cases} X_2=9.5, X_3=5.0 \\ X_1=6.0, X_3=5.0 \\ X_1=6.0, X_2=9.5 \end{cases}$  代入式  $\begin{cases} (6) \\ (7) \\ (8) \end{cases}$  解得  $\begin{cases} X_1=6.4 \\ X_2=9.2 \\ X_3=5.3 \end{cases}$

由此可知, 在盐酸浓度为6.4mol/L, 酸水解温度为92℃, 酸水解时间为5.3h条件下, 肽得率最高。

2.1.7 回归模型的验证

本实验进一步验证该回归模型是否对波纹巴非蛤酸

水解工艺具有预测及控制的作用。故在固液质量比 1:3 条件下, 选择盐酸浓度 6.4mol/L、酸水解温度 92℃、酸水解时间 5.3h 对波纹巴非蛤进行酸水解, 经过实际测定发现, 酸水解液的肽得率为 82.21%, 与回归模型计算所得值 84.04% 非常相近。这说明该回归模型能较好地反映酸水解制备波纹巴非蛤小分子肽的变化规律, 可为实际操作提供良好的指导。

## 2.2 SDS-PAGE 电泳结果

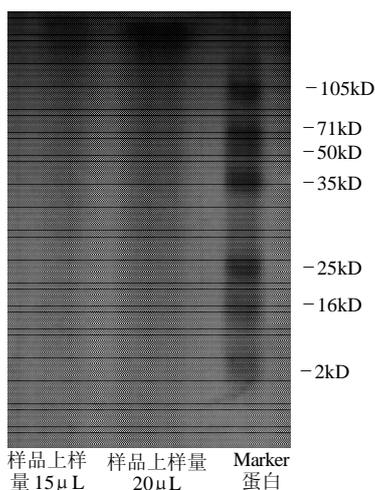


图 4 样品的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE of small peptide samples from *Paphia undulata*

由图 4 可知, 波纹巴非蛤酸水解后蛋白质可降解成不同分子质量的肽, 最小的分子质量小于 2kD。说明酸水解较为彻底。

## 3 结 论

采用响应面分析法对酸水解制备波纹巴非蛤小分子肽工艺进行优化, 在最优工艺条件下, 肽得率可达到 82.21%, 该值与响应面模型预测值(84.04%)非常接近, 说明响应面模型可以很好的应用于制备波纹巴非蛤小分子肽酸水解工艺条件的优化。由 SDS-PAGE 电泳分析可知, 在最优条件下的酸水解液中蛋白质可降解成不同分子质量的肽, 最小的分子质量小于 2kD, 可为其他利用贝类蛋白制备小分子肽提供参考。

## 参 考 文 献:

- [1] KAMAU S M, LU R R, CHEN W, et al. Functional significance of bioactive peptides derived from milk proteins[J]. Food Reviews International, 2010, 26(4): 386-401.
- [2] SARMADI B H, ISMAIL A. Antioxidative peptides from food proteins: a review[J]. Peptides, 2010, 31(10): 1949-1956.
- [3] BENKERROUM N. Antimicrobial peptides generated from milk proteins: a survey and prospects for application in food industry. a review[J]. International Journal of Dairy Technology, 2010, 63(3): 320-338.
- [4] LOPEZ-EXPOSITO I, RECIO I. Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties[J]. Bioactive Components of Milk, 2008, 606: 271-293.
- [5] ALUKO R E. Determination of nutritional and bioactive properties of peptides in enzymatic pea, chickpea and mung bean protein hydrolysates [J]. Journal of AOAC International, 2008, 91(4): 947-956.
- [6] 王竹清, 李八方. 生物活性肽及其研究进展[J]. 中国海洋药物, 2010, 29(2): 60-68.
- [7] ANEIROS A, GARATEIX A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004, 803(1): 41-53.
- [8] TIDONA F, CRISCIONE A, GUASTELLA A M, et al. Bioactive peptides in dairy products[J]. Italian Journal of Animal Science, 2009, 8(3): 315-340.
- [9] BOX G. Response surface methodology-current status and future directions- response[J]. Journal of Quality Technology, 1999, 31(1): 67-72.
- [10] GUO Yuxing, PAN Daodong, TANOKURA M. Optimisation of hydrolysis conditions for the production of the angiotensin-I converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from whey protein using response surface methodology[J]. Food Chemistry, 2009, 114(1): 328-333.
- [11] ZHUANG Yongliang, SUN Liping. Preparation of reactive oxygen scavenging peptides from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: optimization using response surface methodology[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(3): C483-C489.
- [12] YOU Lijun, REGENSTEIN J M, LIU Ruihui. Optimization of hydrolysis conditions for the production of antioxidant peptides from fish gelatin using response surface methodology[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(6): C582-C587.
- [13] 张玉葵, 尔太. 凯氏定氮(半微量)法测定牛乳中蛋白质含量的方法[J]. 乳品加工, 2005(6): 35-36.
- [14] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 117-121.
- [15] 宋萍. 甲醛法测定铵盐中总氮含量的有关问题讨论[J]. 宜春学院学报, 2003, 25(5): 39-68.
- [16] 任娇艳, 赵谋明, 崔春, 等. 基于响应面分析法的草鱼蛋白酶解工艺 [J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2006, 34(3): 95-100.
- [17] 翟旭光, 潘志芬, 商闯, 等. 燕麦麦谷蛋白 SDS-PAGE 电泳分析[J]. 农业学报, 2009, 22(1): 24-28.
- [18] 石继红, 赵永同, 王俊楼, 等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析小分子多肽[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(6): 761-763.
- [19] 石继红, 赵永同, 张英起, 等. 应用 SDS-PAGE 显示小分子多肽技术的探讨[J]. 生物工程进展, 2001, 21(1): 38-41.
- [20] 马永全, 胡林子, 于新. 酸法水解河蚬蛋白质的工艺优化研究[J]. 食品工业科技, 2011(11): 288-290.