复合酶水解蚕蛹蛋白制备功能性寡肽的工艺研究

方佳茂[1]，刘偲琪[2]，庄楚周[1]，孙中涛[2]
（1.广东环西生物科技股份有限公司，广东普宁 515300）（2.山东农业大学生命科学学院，山东泰安 271018）

摘要：为了制备分子量低、肽含量高的蚕蛹功能性寡肽，本文采用单素实验与响应面分析法，对不同蛋白酶及其不同组合、温度、pH 值、底物浓度、酶的添加量等因素对蚕蛹分离蛋白水解工艺的影响进行了研究。研究结果表明，多酶复合水解可显著提高蚕蛹蛋白的水解度和寡肽得率，其中胰酶、风味蛋白酶与中性蛋白酶是最佳多酶组合，其最佳水解条件为底物浓度 7.33%、酶添加量[E]/[S]3.62%、pH7.38、水解温度 54.6 ℃、水解时间 6 h。在此条件下，蚕蛹蛋白的水解度高达 29.2%，寡肽得率高达为 81.14%。酶解后产品数均分子量为 665.5 Da，重均分子量为 726.9 Da，肽含量高达 74.6%，而游离氨基酸含量仅为 7.33%，表明复合酶解虽然提高了蚕蛹蛋白的水解度，但主要产物仍然是低分子寡肽，并没有大量生成游离氨基酸。

关键词：蚕蛹蛋白；功能性肽；酶解；响应面分析法
文章篇号：1673-9078(2012)3-323-328

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Conditions for Preparation of Functional Oligopeptide from Silkworm Pupa Protein

FANG Jia-mao [1], LIU Si-qi[2], ZHUANG Chu-zhou[1], SUN Zhong-tao[2]
(1.Guangdong Huanxi Biotechnology Co.,Ltd, Puning 515300, China)
(2.College of Life Science, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: In order to optimize the production process of functional polypeptides from silkworm pupa protein by enzymatic hydrolysis, the effects of different proteases, temperature, pH, substrate concentration and enzyme amount on the degree of hydrolysis (DH) and the trichloroacetic acid nitrogen solubility index (TCA-NSI) were explored using response surface methodology. It was proved that trypsinase, flavourzyme and neutral protease were the most effective enzymes for the hydrolysis of silkworm pupa protein. The optimal conditions were found to be hydrolysis temperature of 54.6℃, pH 7.38, substrate concentration of 7.33%, protease dosage of 3.62% and hydrolysis time of 6 h. Under these optimized conditions, DH of 29.2 and TCA-NSI of 81.14% were obtained. In the obtained functional polypeptides, the content of peptide reached 74.6%, with a number average molecular weight of 665.5 Da and a weight average molecular weight of 726.9 Da, while the content of free amino acid was only 7.33%, which indicated that the low molecular peptide instead of free amino acids was the main ingredient, although the silkworm pupa protein was enzymatic hydrolysis by depth.

Key words: silkworm pupa protein; functional peptide; enzymatic hydrolysis; response surface methodology

功能性肽（bioactive peptides）是指对生命活动有益或具有生理作用的肽类化合物，是氨基酸以不同组成和排列方式构成的从二肽到复杂的线性、环形结构的不同肽类的总称，具有免疫调节、激素调节、降血压、降血脂、抗疲劳、抗氧化等生理调节功能[1]。大豆、花生、玉米、小麦、蚕蛹等动植物蛋白的多肽链内部普遍存在着功能区，经适当的蛋白酶水解后都可释放出各种生物活性肽[2]。因此，酶解动植物蛋白以获取特定生物活性肽的研究迅速成为动物营养学和生理学界的研究热点。但目前国内外对天然蛋白活性肽的研究主要集中于大豆活性肽与花生活性肽，而对蚕蛹寡肽的研究才刚刚起步，普遍存在产品水解低、收率低、生物活性低等问题[3~5]。

蚕蛹是蚕茧抽丝后剩下的主要副产品，产量巨大，我国干蚕蛹年产量高达 50 多万 t[6]。蚕蛹营养价值丰富，蛋白含量约为 60%，含有人体必需的 8 种氨基酸，是一种优质的蛋白资源[7]。但由于蚕蛹蛋白的水溶性、起泡性、乳化性和持水性较差，异味物质与色素往往脱除不彻底，限制了它在食品工业中的应用，造成了优质蛋白资源的极大浪费[8]。将蚕蛹蛋白酶解为寡肽，不仅可改善其蛋白特性，而且可以拓宽其应用领域，提高其资源价值。

本实验以蚕蛹分离蛋白为原料，采用单素实验与

收稿日期：2012-01-03
通讯作者：孙中涛(1973-)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事发酵工程与酶工程方向的研究工作

响应面分析法探究不同蛋白酶及其不同组合、温度、pH 值、底物浓度、酶的添加量等因素对蚕蛹蛋白水解工艺的影响，以提高蚕蛹蛋白的水解度和收率，降低寡肽的分子量，提高其生理活性，为蚕蛹寡肽的产业化生产提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蚕蛹分离蛋白由山东泰安信得利生物工程公司提供，蛋白质含量 89.1%；风味蛋白酶（500LAPU/g）由丹麦诺维信公司提供；碱性蛋白酶（2×105 U/g）、木瓜蛋白酶（2×105 U/g）、中性蛋白酶（1×105 U/g）、胰蛋白酶（2000 U/g）等酶制剂均由济宁和美生物工程有限公司提供。其他试剂为国产分析纯试剂。

1.2 仪器与设备

精密 pHS-3C 数字酸度计，上海雷磁仪器厂；KA-1000 离心机，上海安亭科学仪器厂；R-210 旋转蒸发仪，上海申胜生物技术有限公司；1.0 L 小型喷雾干燥机，常州力马干燥设备有限公司；电子天平，上海恒平科学仪器有限公司；数显恒温水浴锅，国华电器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 不同蛋白酶对蚕蛹蛋白水解度（DH）与寡肽得率（TCA-NSI）的影响

准确称取 40 g 蚕蛹分离蛋白，置于 500 mL 的具塞三角瓶中，加入 460 mL 去离子水，搅拌均匀，90 ℃水浴加热 10 min 使蛋白质适度变性，然后冷却至 55 ℃，用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 溶液调 pH 值至各种蛋白酶的最适作用 pH 值，然后分别加入 1%的碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶，置于 55 ℃、150 r/min 的恒温振荡器中酶解 4 h，迅速升温至 90 ℃并保温 10 min 进行灭酶。冷却后于 4000 r/min 离心 15 min，收集上清液，测定 DH 与 TCA-NSI。

1.3.2 多酶复合水解对蚕蛹蛋白 DH 与 TCA-NSI 的影响

多酶复合水解是指同时加入多种蛋白酶对蚕蛹分离蛋白进行酶解。在单酶水解实验的基础上，选择酶解效果最好的胰酶（1%，*m/m*）作为第一种酶，分别再加入（0.5%，*m/m*）的其他蛋白酶进行双酶水解实验；然后选择酶解效果最好的胰酶（1%，*m/m*）与风味酶（0.5%，*m/m*）双酶组合，再分别加入（0.5%，*m/m*）的其他蛋白酶进行三酶水解实验；最后选择酶解效果最好的胰酶（1%，*m/m*）、风味酶（0.5%，*m/m*）和中性蛋白酶（0.5%，*m/m*）三酶组合，再分别加入（0.5%，*m/m*）的其他蛋白酶进行四酶水解实验。多酶水解的方法同单酶水解实验。

1.3.3 二次回归正交旋转组合实验

对温度、pH 值、底物浓度与酶-底物比（[E]/[S]）等四个因素设计二次回归正交旋转组合实验，其因素与水平如表 1 所示。为使拟合方程具有旋转性和通用性，中心点重复 7 次。以 DH 和 TCA-NSI 为响应值，采用 Design Expert 7.1 进行多元回归分析，建立 DH 和 TCA-NSI 与各影响因素的数学模型，并通过对模型的分析获得最佳水解条件。

表 1 中心组合实验的因素和水平

Table 1 Experimental ranges and levels of the independent variables in the central composite design

因素	水平				
	-2	-1	0	1	2
X1 (温度/℃)	45	50	55	60	65
X2 (pH)	6	7	8	9	10
X3 [底物浓度/(%, *m/m*)]	6	7	8	9	10
X4 {[E]/[S]/(%, *m/m*)}	1	2	3	4	5

1.3.4 水解度与寡肽得率的测定

水解度（DH）是水解过程中所断裂的肽键数占总肽键数的百分比。肽键断裂后生成多肽和氨基酸，溶液中 α-氨基氮含量增加，α-氨基氮的量由甲醛滴定法测定[9]，样品总含氮量由凯氏定氮法测定[10]，然后依据下式计算 DH：

DH（%）=（水解后生成的 α-氨基氮的量/样品总含氮量）×100%

寡肽得率的测定采用三氯乙酸-可溶性氮法（TCA-NSI）[11]。TCA 可溶性氮溶解指数（TCA-NSI）按下式计算：

TCA-NSI = TCA 上清液总氮量/蛋白溶液总氮量 ×100%

1.3.5 蚕蛹寡肽相对分子质量分布与产品成分分析

蚕蛹分离蛋白酶解液经离心分离后，上清液于进口温度 180 ℃、出口温度 120 ℃的条件下进行喷雾干燥，获得蚕蛹寡肽的固态产品。因为蚕蛹寡肽目前尚无国家标准，参照大豆肽的国家标准 GBT 22492-2008 所规定的检测方法对其进行相对分子质量分布与产品质量分析，测定粗蛋白、粗脂肪、水分、灰分、脲酶、肽含量等理化指标。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶种类对蚕蛹蛋白水解度与寡肽得率的影响

单酶水解实验结果如图 1 所示，各种蛋白酶对水

解度与寡肽得率的影响并不一致，水解度从大到小依次是胰酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶，但寡肽得率从大到小的次序却是胰酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和风味蛋白酶，这主要是因为各种蛋白酶的内切酶活力与外切酶活力的比值不同，水解度是内切酶活力与外切酶活力协同作用的结果，而寡肽得率主要取决于内切酶活力，与外切酶活力关系不大。胰酶对蚕蛹蛋白的水解能力最强，其水解度与寡肽得率与其他蛋白酶的差异均达到了显著水平（P<0.05）。碱性蛋白酶水解时，水解度略高于中性蛋白酶，但寡肽得率却低于中性蛋白酶。风味蛋白酶水解时，水解度很大，但寡肽得率却很低，这是因为其外切酶活力较强而内切酶活力相对较低的原因。

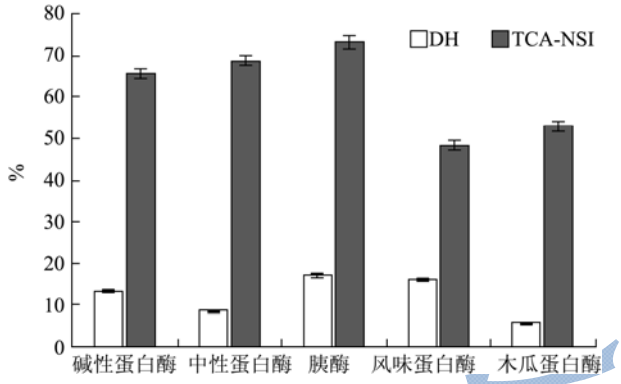


图 1 不同蛋白酶对蚕蛹蛋白水解度与寡肽得率的影响

Fig.1 Effect of different proteases on the DH and TCA-NSI

2.2 多酶复合水解对蚕蛹蛋白水解度与寡肽得率的影响

表 2 多酶复合水解对蚕蛹蛋白水解度与寡肽得率的影响

Table 2 Effect of complex enzymes on the DH and TCA-NSI

蛋白酶种类与用量/(%, *m/m*)	DH/%	TCA-NSI/%
胰酶 1	17.09±0.47 a	73.06±0.54 a
胰酶 1+碱性蛋白酶 0.5	18.33±0.51 b	77.31±0.76 b
胰酶 1+中性蛋白酶 0.5	19.41±0.43 b	77.82±0.87 b
胰酶 1+木瓜蛋白酶 0.5	17.74±0.45 b	77.74±0.56 b
胰酶 1+风味蛋白酶 0.5	22.45±0.75 c	77.93±0.64 b
胰酶 1+风味蛋白酶 0.5+碱性蛋白酶 0.5	22.52±0.84 c	78.05±0.51 b
胰酶 1+风味蛋白酶 0.5+木瓜蛋白酶 0.5	22.14±0.68 c	77.65±0.32 b
胰酶 1+风味蛋白酶 0.5+中性蛋白酶 0.5	24.87±0.53 d	78.64±0.89 b
胰酶 1+风味蛋白酶 0.5+中性蛋白酶 0.5+碱性蛋白酶 0.5	25.02±0.46 d	79.41±0.74 b
胰酶 1+风味蛋白酶 0.5+中性蛋白酶 0.5+木瓜蛋白酶 0.5	24.95±0.78 d	77.78±0.59 b

注：表中数据为 3 次重复的平均值，同列中不同字母表示在 P<0.05 水平上差异显著。

蛋白酶具有底物特异性，不同蛋白酶的酶切位点不同，多酶协调作用更有利于将蛋白质水解成低分子肽类。由表 2 可知，多酶复合水解时蚕蛹蛋白的水解度均高于单酶水解，且差异极显著（P<0.01）。胰酶与风味蛋白酶是最佳的双酶组合，水解度与其他双酶组合差异极显著（P<0.01）。胰酶、风味蛋白酶与中性蛋白酶是最佳的三酶组合，水解度与其他三酶或双酶组合差异显著（P<0.05）。但复合酶解时并非酶的种类越多越好，四酶组合与“胰酶-风味蛋白酶-中性蛋白酶”三酶组合的水解度差异并不显著（P>0.05）。多酶水解时寡肽得率均显著高于单酶水解（P<0.01），但不同多酶组合间的差异并不显著（P>0.05）。综合考虑水解度、寡肽得率和生产成本，确定“胰酶-风味蛋白酶-中性蛋白酶”为最佳多酶组合。

2.3 酶解时间对水解度和寡肽得率的影响

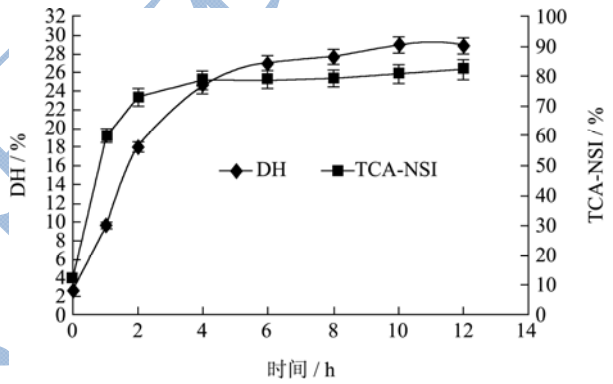


图 2 酶解时间对 DH 和 TCA-NSI 的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis time on DH and TCA-NSI

由胰酶、风味蛋白酶与中性蛋白酶组成的复合酶水解蚕蛹蛋白时 DH 和 TCA-NSI 的变化曲线如图 2 所示。随水解时间的延长，DH 和 TCA-NSI 不断上升。水解初期 DH 和 TCA-NSI 呈快速上升趋势，且 TCA-NSI 上升速度比 DH 更快；水解 2 h 时 TCA-NSI 达到其最大值的 86%，而 DH 仅达到其最大值的 59%；水解 4 h 时，TCA-NSI 达到其最大值的 95%，而 DH 仅达到其最大值的 84%；4 h 以后，TCA-NSI 几乎不再增加，但 DH 仍然在缓慢增加，至水解 6 h 时，方达到其最大值的 93%。综合考虑 DH、TCA-NSI 和生产成本，选定 6 h 为最佳水解时间。

2.4 中心组合实验结果分析

中心组合实验结果如表 3 所示，采用 Design Expert 7.1 软件对实验数据进行回归分析，剔除在 α=0.05 水平上不显著的项，得到水解度和寡肽得率对自变量 x_1~x_4 的回归方程为：

$$Y_1=26.18-1.90X_1-3.36X_2+2.61X_4-2.00X_1X_2-2.74X_1^2$$

$-2.49X_2^2-1.01X_3^2-1.46X_4^2$ (1)

$Y_2=75.34-2.70X_1-8.88X_2-3.38X_3+2.66X_4-2.82X_1X_2+2.33X_2X_3-4.65X_1^2-8.43X_2^2-3.15X_3^2-4.07X_4^2$ (2)

注：式中，Y_1为水解度（%，*m/m*），Y_2为寡肽得率（%，*m/m*），X_1~X_4为自变量的编码值。

表 3 中心组合实验设计和结果

Table 3 Experimental design and results of central composite design experiments

处理	X1	X2	X3	X4	DH/%	TCA-NSI/%
1	-1	-1	-1	-1	20.42	67.10
2	-1	-1	-1	1	24.43	71.69
3	-1	-1	1	-1	19.41	56.68
4	-1	-1	1	1	24.22	59.67
5	-1	1	-1	-1	14.66	43.13
6	-1	1	-1	1	20.31	53.46
7	-1	1	1	-1	17.01	49.46
8	-1	1	1	1	21.41	54.96
9	1	-1	-1	-1	20.96	63.21
10	1	-1	-1	1	24.90	73.27
11	1	-1	1	-1	19.23	56.12
12	1	-1	1	1	24.99	59.87
13	1	1	-1	-1	10.38	36.48
14	1	1	-1	1	11.44	46.89
15	1	1	1	-1	9.01	32.14
16	1	1	1	1	12.16	37.77
17	-2	0	0	0	19.50	62.67
18	2	0	0	0	11.15	55.48
19	0	-2	0	0	20.96	58.96
20	0	2	0	0	11.67	29.00
21	0	0	-2	0	22.04	73.24
22	0	0	2	0	22.42	56.96
23	0	0	0	-2	12.99	58.76
24	0	0	0	2	27.87	64.06
25	0	0	0	0	24.98	71.67
26	0	0	0	0	25.20	76.95
27	0	0	0	0	26.33	75.62
28	0	0	0	0	26.22	75.17
29	0	0	0	0	28.05	78.32
30	0	0	0	0	26.78	77.25
31	0	0	0	0	25.68	72.42

对两个回归方程的方差分析结果如表 4 所示，两个回归模型均极显著（P<0.01），失拟项均不显著（P>0.05），相关系数 R2 分别为 0.9602 与 0.9646，这表明回归方程的拟合度和可信度均较高，能够很好的对蚕蛹蛋白的酶解过程进行描述与预测。模型（1）的一次项（X_3除外）与二次项对水解度的影响均为极显著（P<0.01），交互项中仅有 X_1X_2 对水解度的影响极显著（P<0.01）。模型（2）的一次项与二次项对寡肽得率影响极显著（P<0.01），交互项中 X_1X_2 的影响极显著（P<0.01），X_2X_3 的影响显著（P<0.05）。在交互项中，温度（X_1）与 pH 值（X_2）对 DH 和 TCA-NSI 的交互影响均达极显著水平（P<0.01），由其响应面和等高线分析图（图 4）可知，其等高线分析图的椭圆长轴与对角线接近平行，表明温度和 pH 值具有很强的交互作用，其中一个参数改变时，会显著影响另一个参数的最佳水平点的位置。

由均方分析（表 4）可知，各参数对 DH 与 TCA-NSI 的影响大小并不一致，影响 DH 的主次顺序是 pH 值（X_2）、酶的用量（X_4）、温度（X_1）、底物浓度（X_3），而影响 TCA-NSI 的 4 因素的主次顺序是 pH 值（X_2）、底物浓度（X_3）、酶的用量（X_4）和温度（X_1），即底物浓度对 TCA-NSI 具有极显著的影响（P<0.01），但对 DH 的影响并不显著（P>0.05）。

采用 Design Expert 7.1 软件分别对两个回归模型进行优化求解，可以得出 DH 与 TCA-NSI 的最大值及其对应的最佳水解条件。但模型（1）与模型（2）的最佳水平点并不一致，也就说水解度的最大值与寡肽收率的最大值无法在同一实验点实现。在实际生产时，必须兼顾水解度与寡肽得率，因此，对水解度与寡肽得率设定相同的权重，采用 Design Expert 7.1 软件对两个回归模型同时进行优化求解，模型最佳预测点的各因素编码值为 X_1=-0.08、X_2=-0.62、X_3=-0.47、X_4=0.62，解码后可求出其真实值，即水解温度 54.6 ℃、pH7.38、底物浓度 7.33%、酶添加量[E]/[S] 3.62%。在此最佳条件下，模型预测的最大水解度为 28.31%，最大寡肽得率为 79.32%。在上述最佳条件下对模型进行验证实验，水解度的实测值为（29.2±0.63）%，寡肽得率的实测值为（81.14±0.58）%，均与预测值基本一致，说明预测结果与实际情况较符合，该模型是准确有效的。

2.5 蚕蛹寡肽的相对分子质量分布

采用 Tskgel G2000SW$_{XL}$ 300mm×2.8mm（内径）凝胶柱对蚕蛹寡肽的分子量分布进行分析，使用凝胶色谱测定分子质量分布的专用数据处理软件（即 GPC 软件）对色谱图及其数据进行处理，得到的蚕蛹寡肽的相对分子质量大小及分布范围如表 5 所示。蚕蛹寡肽的相对分子质量主要分布在 1000 Da 以下，数均分子量为 665.5 Da，重均分子量为 726.9 Da。据报道，生物活性肽的相对分子质量一般在 1000 Da 以下，这预示着本工艺制备的蚕蛹寡肽符合功能性肽对肽段相

对分子质量的要求，可能具有一定的生理功能[12]。但产品中也存在少量大分子物质，分子量大于 5000 的大分子肽段的数量小于 1.7%，这说明有部分蛋白质很难被蛋白酶水解。

表 4 二次回归模型的回归分析结果

Table 4 Regression results from the data of Central Composite Design experiments

方差源	DH/%				TCA-NSI/%			
	SS	MS	F 值	Prob>F	SS	MS	F 值	Prob>F
Model	977.69	69.83	27.59	<0.0001**	5529.54	394.97	31.18	<0.0001**
x_1	86.26	86.26	34.11	<0.0001**	174.99	174.99	13.82	0.0019**
x_2	271.72	271.72	107.35	<0.0001**	1894.48	1894.48	149.55	<0.0001**
X_3	0.02	0.02	0.01	0.9261	274.10	274.10	21.63	0.0003**
X_4	163.15	163.15	64.38	<0.0001**	169.92	169.92	13.42	0.0021**
X_1X_2	64.00	64.00	25.29	0.0001**	126.95	126.95	10.02	0.0060**
X_1X_3	1.27	1.27	0.50	0.4892	23.38	23.38	1.85	0.1931
X_1X_4	1.53	1.53	0.60	0.4484	2.59	2.59	0.20	0.6578
X_2X_3	1.99	1.99	0.78	0.3893	86.92	86.92	6.87	0.0185*
X_2X_4	1.13	1.13	0.45	0.5127	6.84	6.84	0.54	0.4728
X_3X_4	0.74	0.74	0.29	0.6001	19.17	19.17	1.52	0.2361
x_1^2	214.10	214.10	84.56	<0.0001**	619.56	619.56	48.89	<0.0001**
X_2^2	177.12	177.12	70.02	<0.0001**	2031.37	2031.37	160.31	<0.0001**
X_3^2	29.18	29.18	11.52	0.0037**	283.23	283.23	22.36	0.0002**
X_4^2	60.97	60.97	24.07	0.0002**	473.91	473.91	37.41	<0.0001**
残差	40.54	2.53			202.72	12.67		
失拟项	33.99	3.40	3.11	0.0887	165.43	16.54	2.66	0.1216
纯误差	6.55	1.09			37.28	6.21		
总和	1018.23				5732.26			

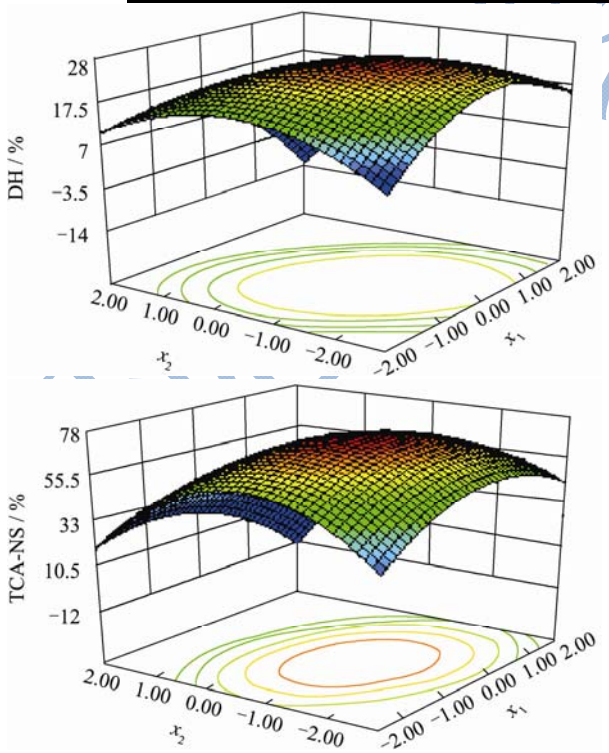


图 3 温度和 pH 对蚕蛹蛋白水解度和寡肽得率影响的响应面图

Fig.3 Effect of temperature and pH on the DH and TCA-NSI

表 5 蚕蛹寡肽的分子量分布

Table 5 Molecular weight distribution of silkworm pupa peptide

分子质量范围/Da	峰面积百分比/%	数均分子量/Da	重均分子量/Da
12196~4857	1.7	6063	6854
4857~2048	3.21	3065	3712
2048~1396	4.8	1787	1846
1396~755	14.08	976	1042
755~273	43.24	376	395
<273	31.54	218	237

2.6 蚕蛹寡肽的产品质量分析

蚕蛹寡肽的化学组成如表 6 所示，水解后粗蛋白含量略有下降，可能是由于酶制剂的载体和水中的少量无机盐在产品中积聚的结果；肽含量由 1.87%增加至 74.6%，表明蚕蛹蛋白基本都已被水解为寡肽；游离氨基酸含量仅 7.33%，说明虽经深度酶解，数均分子量低至 1000 以下，但产品主要还是以低分子肽的形式存在，并没有大量的水解为游离氨基酸。

表 6 蚕蛹寡肽产品成分分析结果 (%, *m/m*)

Table 6 Composition analysis results of silkworm pupa peptide

项目	蚕蛹分离蛋白	蚕蛹寡肽
粗蛋白	89.13	83.22
粗脂肪	0.81	0.93
灰分	5.12	7.35
水分	7.53	7.31
肽含量	1.87	74.6
游离氨基酸	0.32	7.33
脲酶	阴性	阴性

3 结论

本实验采用单因素实验设计和响应面分析对胰酶、风味蛋白酶与中性蛋白酶等多种酶制剂水解蚕蛹蛋白制备功能性寡肽的工艺条件进行了优化，研究结果表明胰酶、风味蛋白酶与中性蛋白酶联合水解，增加了对蛋白质催化位点，可更有效地将蚕蛹蛋白水解成相对分子质量较低的小分子肽，水解度与寡肽得率显著优于单酶水解（P<0.01）。三酶复合水解的最佳条件为：底物浓度 7.33%、酶添加量[E]/[S]3.62%、pH7.38、水解温度 54.6℃、水解时间 6 h。在此条件下，蚕蛹蛋白的水解度高达 29.2%，寡肽得率高达为 81.14%。对蚕蛹寡肽相对分子质量分布的分析结果表明，其相对分子质量主要分布在 1000 Da 以下，数均分子量为 665.5 Da，重均分子量为 726.9 Da，产品中肽含量高达 74.6%，而游离氨基酸含量仅为 7.33%，这表明蚕蛹蛋白虽然被深度酶解，但主要还是以低分子肽的形式存在，并没有被大量的水解为游离氨基酸。

参考文献

[1] Clare M H, Susan K and Deborah W. Functional foods and cardiovascular disease [J]. Current Atherosclerosis Reports, 2000, 2(6): 467-475

[2] 杨春花,王冬梅,赵怀升,等.生物活性肽的营养生理功能及其应用[J].畜牧与饲料科学, 2011,32(5): 37-39

[3] Kazunobu T, Tsutomu S,KeisukeT, et al. Functional propertie of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis [J]. LWT-Food Science and Technology, 2005, 38(3): 255-261

[4] 李高扬,崔堂兵,陈亮.蚕蛹蛋白酶解制备抗氧化肽的初步研究[J].现代食品科技, 2011, 27(7): 810-814

[5] Bernard FG, Alexandre Z, Robert M, et al. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food [J]. Food Research International, 2004, 37(2): 123-131

[6] Zhou J, Han D X. Proximate, amino acid and mineral composition of pupae of the silkworm Antheraea pernyi in China [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(8): 850-853

[7] Yang Yunan, Tang Liman, Tong Ling, et al. Silkworms culture as a source of protein for humans in space [J]. Advances in Space Research, 2009,43(8):1236-1242

[8] 贾俊强,徐金玲,谭广秀,等.蚕蛹水溶性蛋白营养学评价及理化性质分析[J].食品研究与开发, 2011,32(8):121-125

[9] 大连轻工业学院,华南理工大学合编,食品分析[M].北京:中国轻工业出版社, 1994, 141-160

[10] 邵伟,乐超银,涂志英等.响应面法优化发酵大豆多肽工艺条件研究[J].食品科技, 2006, 6: 81-85

[11] Chavan V D, Mckenzie D B, Shahidi F. Functional properties of protein isolates from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) [J]. Food Chemistry, 2001, 74: 177-187

[12] 汤国营,戴军,蔡木易,等.大豆低聚肽分子质量分布的测定及体外消化实验[J].食品与发酵工业, 2006, 32(5): 131-133