

# 苦杏仁醇溶蛋白酶解抗氧化肽的制备工艺优化

徐杨林, 严宏孟, 高蕾, 伊力夏提·艾热提, 靳红, 周建中  
(新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830000)

**摘要:** 以苦杏仁醇溶蛋白为原料, 采用甲醛电位滴定法以水解度和自由基清除率为评价指标对风味蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和胃蛋白酶五种生物酶在最适条件下对苦杏仁醇溶蛋白的酶解效果进行酶的优选。在单因素实验的基础上, 以酶添加量、底物浓度、pH、时间为自变量, 通过四因素三水平 Box-Bohnken 响应面分析法对生物酶解工艺进行优化。结果表明碱性蛋白酶为酶解苦杏仁醇溶蛋白的最优选择, 预测最优工艺条件为时间: 4.12 h、酶添加量 5208.93 U/g、底物浓度 3.21%、pH 9.22, 根据最终试验目的, 选取条件为: 时间: 4.0 h、酶添加量 5000.0 U/g、底物浓度 3.0%、pH 9.0。通过验证试验得出响应值 DH% 为 26.74%±0.54%, DPPH 自由基清除率为 97.86%±0.58%, 与预测值相差较小, 故此条件下酶解苦杏仁醇溶蛋白抗氧化肽为最优工艺。

**关键词:** 苦杏仁; 分级蛋白; 生物酶; 响应面法; 甲醛电位滴定法

文章编号: 1673-9078(2021)06-201-210

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.1111

## Optimizing Antioxidant Peptide Preparation using the Proteolysis of the Prolamins Produced by *Prunus dulcis* var. *amara*

XU Yang-lin, YAN Hong-meng, GAO Lei, YILIXIATI Aireti, JIN Hong, ZHOU Jian-zhong  
(College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China)

**Abstract:** The degree of hydrolysis, as measured by potentiometric titration in the presence of formaldehyde, and free radical scavenging rate in five bioenzymes, namely flavor proteases, alkaline proteases, papains, neutral proteases, and pepsins were compared to identify the bioenzyme with the best proteolytic performance against the *Prunus dulcis* var. *amara* prolamins under optimal conditions. The effects of independent variables such as enzyme addition, substrate concentration, pH and reaction time were explored via single-factor experiments. Box-Behnken response surface methodology considering these four factors at three levels was then used to optimize the proteolysis of these five bioenzymes. The results demonstrate that alkaline proteases outperform the other enzymes when using the *Prunus dulcis* var. *amara* prolamins as substrate. The optimal conditions were determined to be as follows: a reaction time of 4.12 h; a total of 5208.93 U/g of the enzyme should be added; the substrate concentration should not exceed 3.21%; and the pH should be maintained at 9.22. Final evaluations using these conditions allowed for an additional round of refinement and we determined that the optimal conditions are as follows: a reaction time of 4.0 h; 5000.0 U/g of enzyme; substrate at 3.0%; and the pH at 9.0. These conditions were then validated by the evaluation of the end product with these processed peptides increasing the DH% and DPPH free radical scavenging rate to 26.74%±0.54% and 97.86%±0.58%, respectively. These values are very similar to the predicted values from our in silico evaluation, confirming that these are the optimal conditions for the proteolysis of the prolamins produced by *Prunus dulcis* var. *amara*.

**Key words:** *Prunus dulcis* var. *amara*, graded protein, bioenzymes, response surface methods, potentiometric titration

引文格式:

徐杨林,严宏孟,高蕾,等.苦杏仁醇溶蛋白酶解抗氧化肽的制备工艺优化[J].现代食品科技,2021,37(6):201-210,+192

XU Yang-lin, YAN Hong-meng, GAO Lei, et al. Optimizing antioxidant peptide preparation using the proteolysis of the prolamins produced by *Prunus dulcis* var. *amara* [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 201-210, +192

收稿日期: 2020-12-01

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2019YFD1002300)

作者简介: 徐杨林 (1997-), 男, 在读研究生, 研究方向: 农产品精深加工及植物蛋白工程

通讯作者: 周建中 (1979-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 农产品精深加工及植物蛋白工程

杏原产于我国, 有文献记载的栽培时间就有4000多年之久<sup>[1]</sup>, 主要集中在我国的北方各地, 以新疆、吉林、辽宁、山东、陕西地区最多<sup>[2]</sup>。仁用杏根据口味差别又可分为甜杏仁和苦杏仁两种<sup>[3]</sup>。苦杏仁富含油脂, 虽然无异味, 但是味较苦<sup>[4]</sup>, 我国苦杏仁产量丰富, 但是未充分发挥苦杏仁加工增值率优势<sup>[5]</sup>。据统计<sup>[6]</sup>, 绝

大多数苦杏仁没有得到高效的利用,将苦杏仁进行加工、提取的方式,提高苦杏仁资源的利用价值<sup>[7]</sup>。

多肽具有大分子蛋白质和游离氨基酸所不具备的生物学功能<sup>[8]</sup>,具有抗氧化活性,且更容易被人体吸收<sup>[9]</sup>。抗氧化肽是蛋白质被水解释放后,表现出抑制、延缓脂质氧化等抗氧化活性的物质<sup>[10]</sup>。石宁蕙<sup>[11]</sup>等人对甜杏仁粕蛋白酶解动力学特性进行了研究,揭示了水解度与生物活性的关系。刘媛<sup>[12]</sup>等以杏仁粕为原料,研究了不同蛋白酶种类,加酶量,时间,温度等因素对水解度和DPPH自由基清除率的影响。代晨曦<sup>[13]</sup>等人采用响应面法优化双酶酶解杏仁蛋白工艺条件。目前主要以碱法和酶法两种方式提取多肽,但是碱法提取会多肽理化性质改变<sup>[14]</sup>,酶法提取则具有反应条件温和,对环境友好<sup>[15]</sup>。

本文通过研究苦杏仁醇溶蛋白酶解抗氧化肽的制备工艺,拓展苦杏仁在食品中的利用途径,根据文献可知<sup>[16]</sup>,醇溶蛋白酶解产物普遍具有较高的抗氧化性;为避免蛋白质资源浪费,效果较差,对醇溶蛋白酶解工艺进行研究以提高苦杏仁蛋白精准利用,增加蛋白质的利用率,同时为苦杏仁蛋白在食品中的利用途径进行了探索,为苦杏仁蛋白在食品中的应用提供了参考。

## 1 材料及方法

### 1.1 原料与试剂

#### 1.1.1 原料

苦杏仁蛋白(蛋白质质量分数 93%),实验室自制;木瓜蛋白酶( $\geq 20000$  U/g),生物酶制剂有限公司;碱性蛋白酶( $\geq 20000$  U/g),生物酶制剂有限公司;风味蛋白酶( $\geq 20000$  U/g),生物酶制剂有限公司;透析袋(截留分子量 300),索莱宝科技有限公司;氢氧化钠、盐酸、甲醛、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)、铁氰化钾、三氯乙酸、三氯化铁、无水乙醇、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐、过硫酸钾等试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.2 仪器设备

UV-2000 型紫外可见分光光度计,尤尼柯仪器有限公司;B-1A 磁力搅拌器,山东高密彩虹分析仪器有限公司;仪表恒温水浴锅,上海树立仪器仪表有限公司;FA220B 分析天平,上海精科天美科学仪器有限公司;pHS-3C pH 测定仪,上海理达仪器厂;LCJ-10D 冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂有限公司;低速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;涡旋振荡器,江苏金仪仪器有限公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 苦杏仁醇溶蛋白的制备

参考 Osborne 方法<sup>[17]</sup>,对蛋白质进行分级,制备醇溶蛋白。

### 1.2.2 单因素试验

表 1 五种蛋白酶的最适酶解条件

Table 1 Optimal enzymolysis conditions for five proteases

标号	蛋白酶	最佳 pH	最适温度 T/°C	E/S
1	碱性蛋白酶	8.0	55	5000
2	木瓜蛋白酶	6.5	55	5000
3	胃蛋白酶	2	37	5000
4	风味蛋白酶	7.0	55	5000
5	中性蛋白酶	7.0	50	5000

醇溶蛋白用蒸馏水进行溶解,配置成 4% (W/V) 的蛋白溶液,调节酶最适的温度,预热 10 min,使用 0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液调节至反应 pH,在最适条件下进行酶解。酶解条件如表 1 所示,酶解过程中每 30 min 调节一次 pH,酶解结束后迅速放入恒温 95 °C 的水浴锅中,灭酶 15 min,终止反应<sup>[18]</sup>。

### 1.2.3 苦杏仁醇溶蛋白酶解条件优化

选择抗氧化活性最优的一组蛋白酶进行优化,主要优化条件如下:酶添加量(3000、4000、5000、6000、7000 U/g),酶解 pH(6、7、8、9、10),底物浓度(1%、2%、3%、4%、5%)和酶解时间(1、2、3、4、5 h),分析以上四个因素对抗氧化活性的影响。

### 1.2.4 响应面优化实验

采用 Design-Expert 8.0.6 软件进行响应面分析,以水解度(DH%)、DPPH 自由基清除率两个指标为响应值,对显著性影响因素进行优化,筛选出最优的苦杏仁醇溶蛋白酶解工艺,依据 Box-Behnken 试验设计原理,对酶添加量、pH、底物浓度、酶解时间四个因素进行单因素试验。以单因素试验为基础,确定出响应面的因素和水平。

表 2 响应面设计试验因素水平及编码表

Table 2 Response surface design test factor level and coding table

因素	水平		
	-1	0	1
酶添加量	4000 U/g	5000 U/g	6000 U/g
pH	8	9	10
酶解时间	2 h	3 h	4 h
底物浓度	2%	3%	4%

### 1.2.5 水解度(DH%)测定

采用甲醛电位滴定法<sup>[19]</sup>测定蛋白质水解度。取 20

mL 灭酶酶解液, 根据酶解液 pH 使用 0.05 mol/L 的氢氧化钠溶液滴定至 pH 8.2, 加入甲醛 20 mL, 用 0.05 mol/L 的氢氧化钠溶液滴定至 pH 9.2, 记录所消耗的氢氧化钠的体积 ( $V_1$ ), 以蒸馏水作为空白试验, 计算多肽液中氨基氮的含量。氨基氮计算公式如下:

$$\text{氨基氮含量}/(\text{g/mL}) = \frac{(V_1 - V_2) \times C_{\text{NaOH}} \times 0.014}{m \times (V_3/100)} \times 100$$

式中:  $V_1$ : 样品稀释液加入甲醛后消耗 NaOH 标准溶液体积, mL;  $V_2$ : 空白试验加入甲醛消耗 NaOH 标准溶液体积, mL;  $V_3$ : 样品稀释取用量, mL; 0.014: 1 mL 浓度的 1.0 mol/L NaOH 标准溶液相当于氮的含量;  $m$ : 称取样品的质量, g。

水解度计算公式如下:

$$\text{水解度}/\% = \frac{\text{氨基氮含量}}{\text{总氮含量}} \times 100\%$$

### 1.2.6 DPPH 自由基清除率的测定

将酶解液取 0.5 mL 加入试管中, 再加入 3.5 mL 0.5 mmol/L DPPH 乙醇溶液, 混匀后在 37 °C 水浴并避光的条件下反应 30 min, 于 517 nm 处测定吸光值 (OD), 以乙醇溶液作为空白对照, 平行测定 3 次取平均值。自由基清除率公式如下:

$$\text{清除率} S/\% = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%$$

式中:  $A_i$ : 样品 DPPH 试剂混合液的吸光值;  $A_j$ : 样品与乙醇试剂混合液的吸光值;  $A_0$ : DPPH 试剂与乙醇试剂混合液的吸光值。

### 1.2.7 数据处理

采用 Origin Pro 2018 软件进行数据制图, 采用 Design Expert 12 进行响应面设计及结果分析, 每一组试验对其待测指标测定三次, 取平均值。

## 2 结果分析

### 2.1 蛋白酶的优选

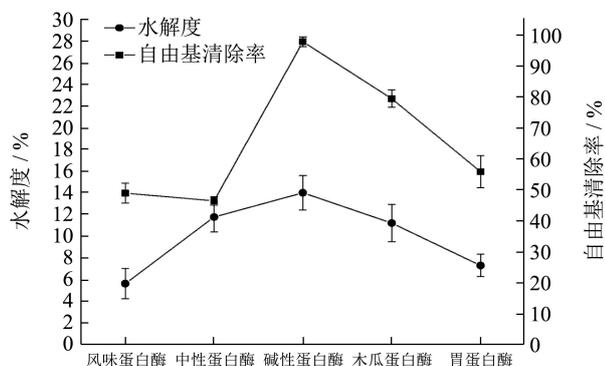


图1 不同蛋白酶对苦杏仁醇溶蛋白的酶解效果

Fig.1 The enzymatic effect of different proteases on the prolamin

不同的蛋白酶在酶解的过程中, 对最终产物的功能效果影响会产生不同的影响<sup>[20]</sup>, 以水解度和 DPPH 自由基清除率为指标, 考察五种蛋白酶对苦杏仁醇溶蛋白的酶解效果, 由图 1 可知, 在各种蛋白酶最优条件下, 碱性蛋白酶 DPPH 自由基清除率在 95% 以上, DH 则在 13%~14% 之间, 风味、中性、木瓜和胃蛋白酶 DPPH 自由基清除率在 12%~80% 之间, DH 在 5%~12% 之间, 因此选择碱性蛋白酶作为后续酶解的工具酶。

### 2.2 酶解工艺及抗氧化能力单因素试验

#### 2.2.1 酶添加量对水解度和抗氧化能力的影响

由图 2 可知, 随着酶添加量增加, 酶的水解作用逐渐增强, 酶解液的 DH% 也逐渐升高, DPPH 自由基清除率与 DH% 存在正相关关系。当加酶量在 3000 U/g~5000 U/g 时, 酶解液的 DH% 与自由基清除率随着加酶量的增加而迅速升高, 当酶添加量达到 5000 U/g 时, DH% 与自由基清除率达到最高, 若酶添加量继续增加, 则出现了轻微的酶抑制作用, 导致 DH% 出现下降的趋势。根据酶动力学原理, 酶的用量过少不利于水解, 过多不仅水解效果差<sup>[21]</sup>, 还会造成一定程度上的资源浪费。综合考虑酶的作用效果与经济成本, 故选取酶添加量在 5000 U/g 左右。

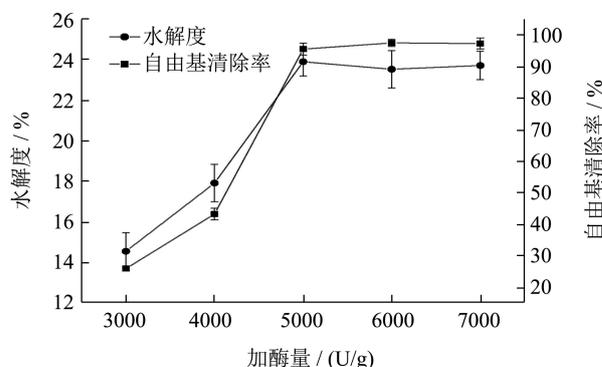


图2 酶添加量对苦杏仁醇溶蛋白酶解的影响

Fig.2 The effect of enzyme addition on the proteolysis of *Amygdalus amygdalus*

#### 2.2.2 底物浓度对水解度和抗氧化能力的影响

由图 3 可知, 随着底物浓度的增加, 酶解液的 DH% 和 DPPH 自由基清除率不断升高, 底物浓度达到 3% 时, 继续增加底物浓度, DH% 的增加逐渐减弱, 而自由基清除率在底物浓度为 3% 时达到最高点, 继续增加底物浓度, 由于底物浓度过大, 导致酶水解产生抑制, 无法高效的进行水解作用, 自由基清除率出现下降趋势。由此可以看出, 底物浓度在 3% 较为合适, 故选取底物浓度为 3% 左右。

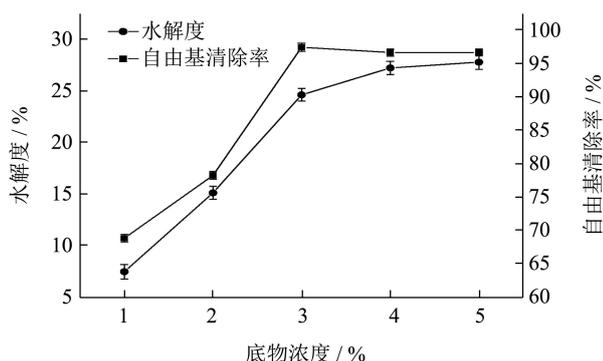


图3 底物浓度对苦杏仁醇溶蛋白酶解的影响

Fig.3 The effect of substrate concentration on the proteolysis of amygdalin

### 2.2.3 pH 对水解度和抗氧化能力的影响

根据图4可知, pH在6~10的范围内, 酶解液的水解度和DPPH自由基清除率呈现先增加后下降的趋势, 当pH达到9时, 水解度与自由基清除率达到最高, 当pH达到10时, 水解度与自由基清除率出现下降的趋势, 由此可以看出, 当蛋白质水解得到过程中, 过酸过碱的环境都会破坏蛋白酶的空间结构<sup>[22]</sup>, 导致水解能力下降, 因碱性蛋白酶在碱性环境中的效果较好, 但不宜过碱, 故选取水解pH在9左右。

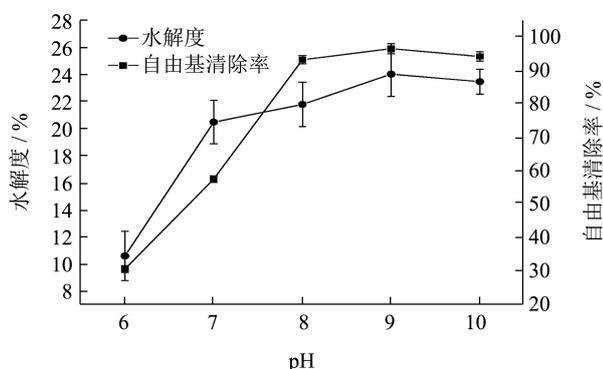


图4 pH对苦杏仁醇溶蛋白酶解的影响

Fig.4 The effect of pH on the proteolysis of amygdala

### 2.2.4 温度对水解度和抗氧化能力的影响

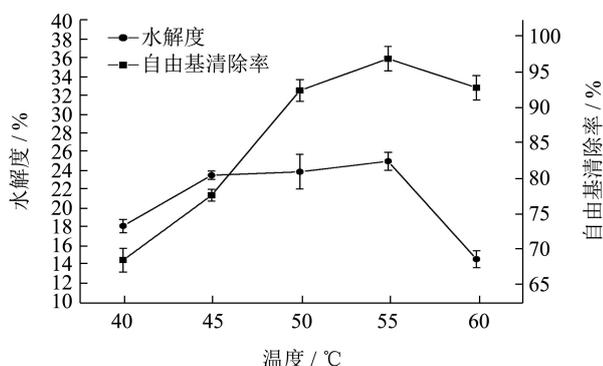


图5 酶解温度对苦杏仁醇溶蛋白酶解的影响

Fig.5 The effect of enzymolysis temperature on the proteolysis of Amygdalus

由图5可知, 温度在40 °C~55 °C范围内, 随着温度的升高, DH%与自由基清除率也随之增大, 且温度在55 °C时达到最高, 当温度超过55 °C时, 酶解液的水解度和自由基清除率出现明显的下降趋势, 这是由于当温度达到一定程度会导致蛋白酶分子结构的次级键解离, 导致蛋白酶变性<sup>[23]</sup>, 从而使酶活性降低, 导致水解作用减弱, 结合试验结果, 决定蛋白酶酶解最佳水解温度为55 °C。

### 2.2.5 时间对水解度和抗氧化能力的影响

由图6可知, 水解时间为1 h~3 h时, 酶解液的水解度和自由基清除率随着时间的增加而升高, 并在3 h后逐渐趋于平稳, 在水解时间为3 h时, 酶解液的水解度与自由基清除率达到最高值, 这是由于水解产物与底物之间形成了抑制现象所引起<sup>[24]</sup>, 以致DH%与自由基清除率无增加趋势, 综合考虑DH%、自由基清除率与水解时间成本, 故选取水解时间在3 h左右。

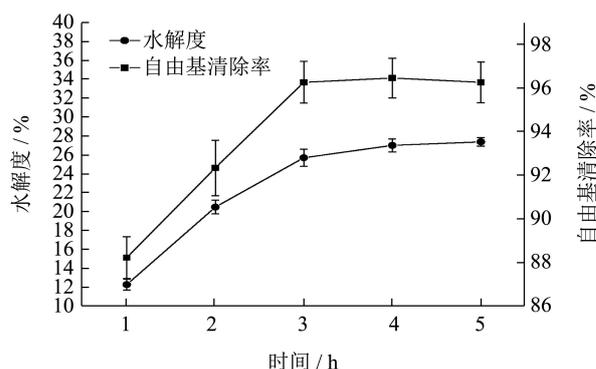


图6 酶解时间对苦杏仁醇溶蛋白酶解的影响

Fig.6 The effect of enzymolysis time on the proteolysis of amygdala

## 2.3 响应面优化试验设计及结果

响应面优化试验设计及结果见表2, 利用Design Expert 8.0.6软件对表2试验数据进行方差分析, 结果见表3, 表4。

利用Design Expert对表1 DH%与自由基清除率进行非线性拟合, 方程如下。

水解度二次多项回归模型方程:

$$Y = 26.33 + 0.44A + 0.64B + 1.57C + 1.53D - 0.32AB + 0.79AC + 0.55AD + 1.26BC + 0.89BD + 0.22CD - 2.76A^2 - 2.56B^2 - 4.52C^2 - 4.26D^2$$

DPPH 自由基清除率二次多项回归模型方程:

$$Y = 97.60 + 0.94A + 0.57B + 1.29C + 1.94D + 0.15AB - 0.60AC + 1.00AD + 1.23BC + 0.48BD + 0.80CD - 3.29A^2 - 3.58B^2 - 4.48C^2 - 5.36D^2$$

表2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface test design and results

实验号	因素				DH/%	自由基清除率/%	实验号	因素				DH/%	自由基清除率/%
	A	B	C	D				A	B	C	D		
1	0	1	0	-1	17.16	86.67	16	0	0	0	0	26.75	97.62
2	-1	0	0	-1	18.49	87.53	17	0	-1	-1	0	19.28	89.45
3	1	0	0	1	20.87	91.67	18	0	0	-1	1	19.34	88.65
4	-1	0	0	1	18.81	87.82	19	-1	0	1	0	20.34	90.82
5	1	0	1	0	22.74	92.36	20	0	0	1	1	20.34	91.45
6	0	0	0	0	26.74	97.32	21	1	0	0	-1	18.35	87.37
7	0	1	-1	0	16.64	86.46	22	1	-1	0	0	21.34	90.24
8	0	-1	0	-1	17.85	86.67	23	-1	1	0	0	21.93	90.89
9	0	0	1	-1	15.78	85.26	24	0	1	1	0	22.79	92.67
10	0	0	0	0	26.74	96.97	25	0	0	-1	-1	15.92	85.64
11	0	-1	1	0	18.98	89.47	26	1	1	0	0	22.68	92.35
12	1	0	-1	0	20.15	90.76	27	0	1	0	1	21.14	92.27
13	0	0	0	0	25.79	97.94	28	0	-1	0	1	19.83	90.44
14	-1	0	-1	0	16.69	86.84	29	-1	-1	0	0	17.86	88.18
15	0	0	0	0	25.61	98.14							

表3 响应面试验结果方差分析(水解度)

Table 3 Analysis of variance of response surface test results (degree of hydrolysis)

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	308.89	14	22.06	17.35	<0.0001	significant
A-时间	2.36	1	2.36	1.85	0.1947	
B-加酶量	4.94	1	4.94	3.89	0.0688	
C-pH	29.70	1	29.70	23.36	0.0003	
D-底物浓度	27.97	1	27.97	22.00	0.0003	
AB	0.4032	1	0.4032	0.3171	0.5823	
AC	2.51	1	2.51	1.98	0.1816	
AD	1.21	1	1.21	0.9516	0.3459	
BC	6.33	1	6.33	4.97	0.0426	
BD	3.13	1	3.13	2.46	0.1388	
CD	0.1849	1	0.1849	0.1454	0.7087	
A <sup>2</sup>	49.24	1	49.24	38.72	<0.0001	
B <sup>2</sup>	42.43	1	42.43	33.37	<0.0001	
C <sup>2</sup>	132.67	1	132.67	104.34	<0.0001	
D <sup>2</sup>	117.86	1	117.86	92.69	<0.0001	
残差	17.80	14	1.27			
失拟项	16.48	10	1.65	4.98	0.0677	not significant
纯误差	1.32	4	0.3306			
总和	326.69	28				

由 Design Expert 软件进行回归及方差分析,见表3、表4。对数学模型进行方差分析,结果表明模型的总回归也极显著( $p < 0.01$ ),决定系数  $R^2$  分别为0.9515、0.9724,说明该模型在试验范围内拟合度较高,对数

学模型进行失拟检验,显示失拟性不显著 ( $p > 0.05$ ),说明该模型在试验范围内拟合度也是比较高。对该数学模型的回归系数检验可知:水解度结果方差分析中,pH 与底物浓度对试验的影响极显著 ( $p < 0.01$ )。通过

F 值的大小判断可得各个因素对苦杏仁醇溶蛋白水解度影响力为  $X_C > X_D > X_B > X_A$ , 即 pH > 底物浓度 > 酶添加量 > 时间。DPPH 自由基清除率结果方差分析中, pH 与底物浓度对试验的影响极显著 ( $p < 0.01$ ), 时间与酶

添加量对试验的影响显著 ( $p < 0.05$ ), 通过 F 值的大小判断可知各因素影响为  $X_D > X_C > X_A > X_B$ , 即底物浓度 > pH > 时间 > 酶添加量。

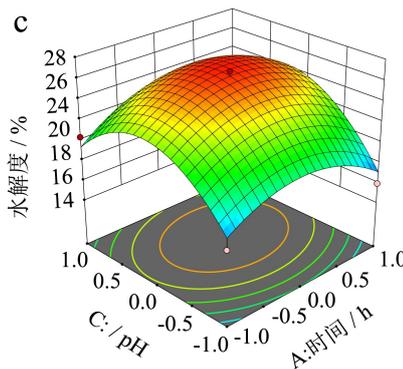
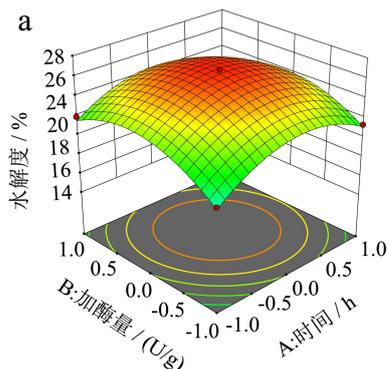
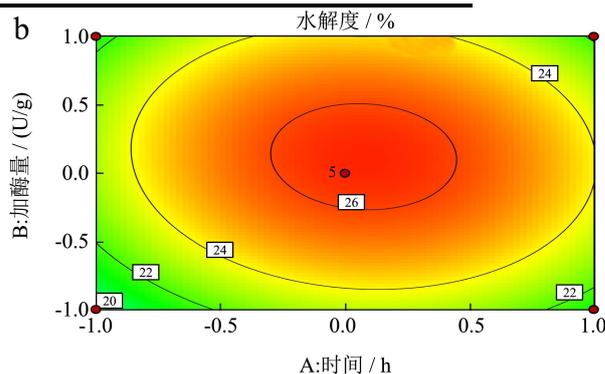
表 4 响应面试验结果方差分析 (DPPH 自由基清除率)

Table 4 Analysis of variance of response surface test results (DPPH free radical scavenging rate)

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	404.18	14	28.87	34.01	< 0.0001	significant
A-时间	10.68	1	10.68	12.58	0.0032	
B-加酶量	3.92	1	3.92	4.62	0.0496	
C-pH	20.02	1	20.02	23.59	0.0003	
D-底物浓度	45.01	1	45.01	53.03	< 0.0001	
AB	0.0870	1	0.0870	0.1025	0.7535	
AC	1.42	1	1.42	1.67	0.2174	
AD	4.02	1	4.02	4.74	0.0472	
BC	6.05	1	6.05	7.13	0.0183	
BD	0.9120	1	0.9120	1.07	0.3175	
CD	2.53	1	2.53	2.98	0.1064	
A <sup>2</sup>	70.36	1	70.36	82.90	< 0.0001	
B <sup>2</sup>	82.95	1	82.95	97.73	< 0.0001	
C <sup>2</sup>	129.96	1	129.96	153.11	< 0.0001	
D <sup>2</sup>	186.08	1	186.08	219.23	< 0.0001	
残差	11.88	14	0.8488			
失拟项	11.00	10	1.10	4.98	0.0677	not significant
纯误差	0.8829	4	0.2207			
总和	416.07	28				

2.3.1 水解度的因素交互效应分析

从图 7 可看出, 三维图总体趋势为向上凸起, 说明该数学模型具有最大值。利用 Design Expert 软件对试验数据进一步分析, 并对拟合的回归方程进行计算, 理论水解度最大为 26.75%, 实际测得的结果为 26.74%±0.54%, 软件在该点的估计值为 26.75%与预测值相比, 误差仅为 0.1%接近预测值, 表明在该试验模型下得到的最佳工艺条件具有较高的可靠性, 可以用于预测苦杏仁醇溶蛋白酶解最终的水解度。



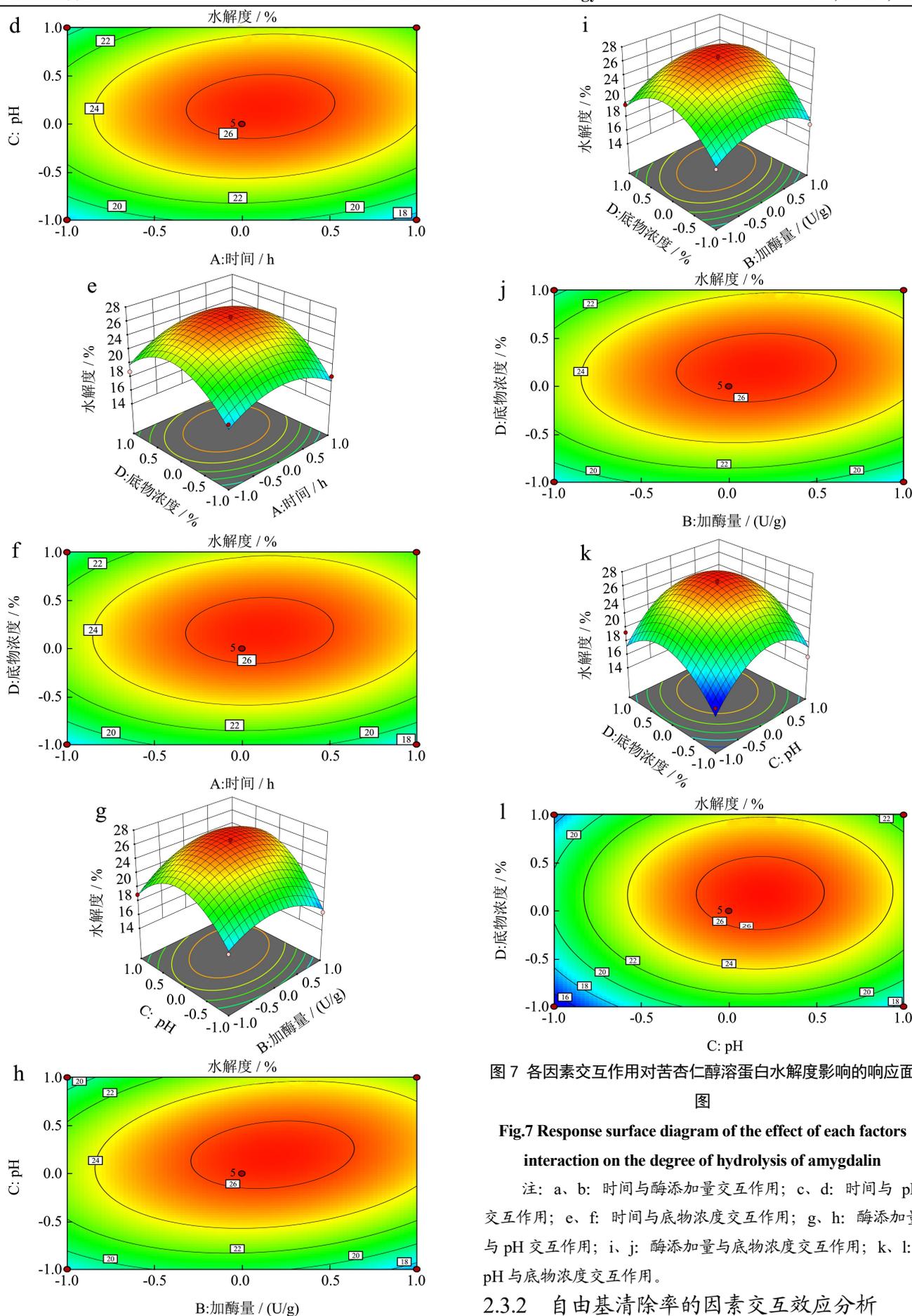
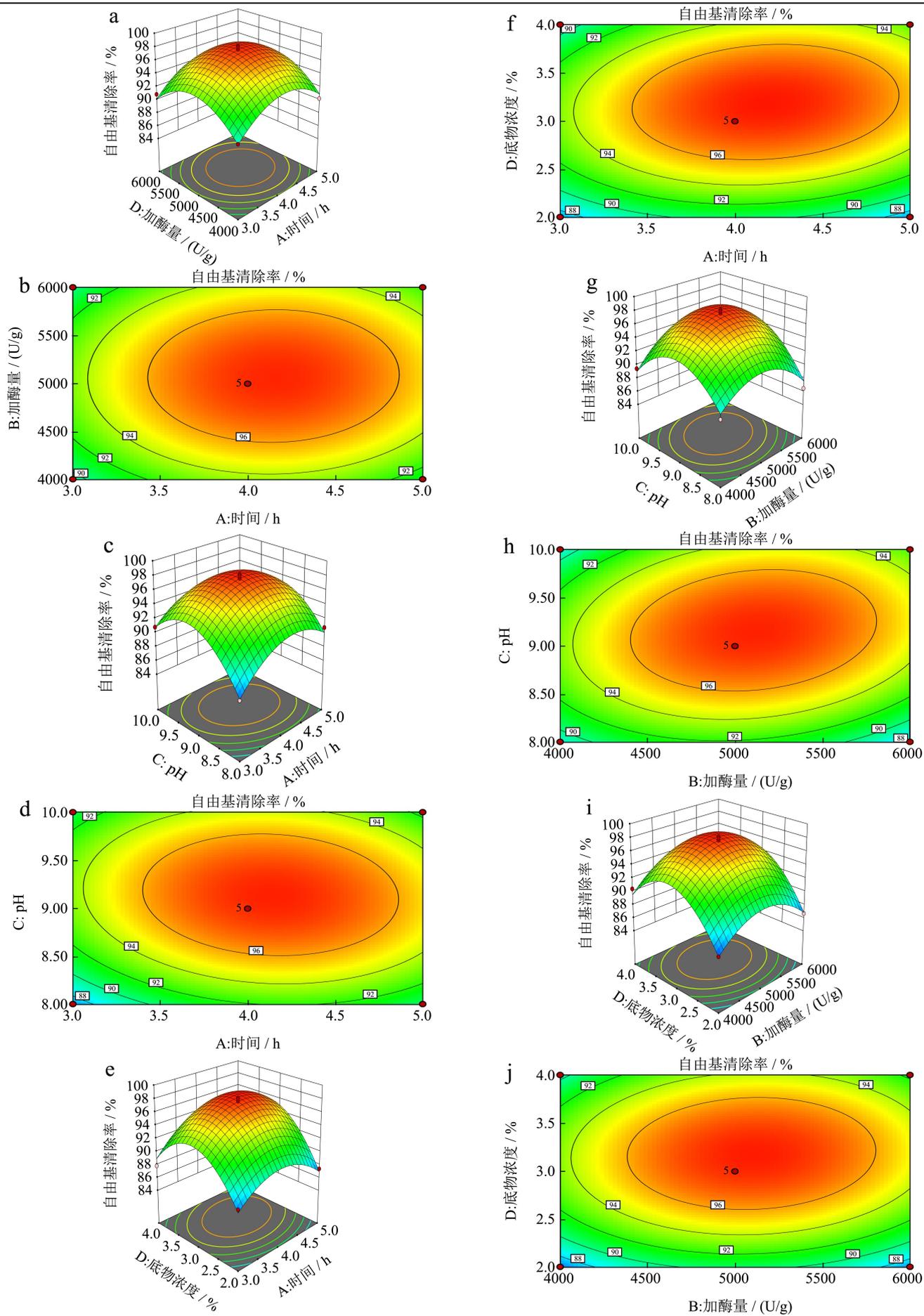


图7 各因素交互作用对苦杏仁醇溶蛋白水解度影响的响应面图

Fig.7 Response surface diagram of the effect of each factors interaction on the degree of hydrolysis of amygdalin

注: a、b: 时间与酶添加量交互作用; c、d: 时间与 pH 交互作用; e、f: 时间与底物浓度交互作用; g、h: 酶添加量与 pH 交互作用; i、j: 酶添加量与底物浓度交互作用; k、l: pH 与底物浓度交互作用。

### 2.3.2 自由基清除率的因素交互效应分析



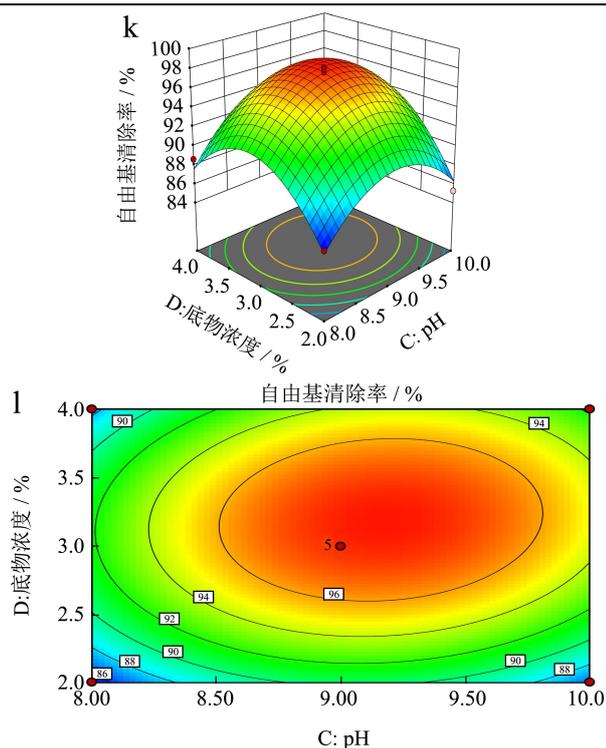


图8 各因素交互作用对苦杏仁醇溶蛋白 DPPH 自由基清除率的影响

Fig.8 The effect of the interaction of each factors interaction on the scavenging rate of DPPH free radical of amygdalin

注: a、b: 时间与酶添加量交互作用; c、d: 时间与 pH 交互作用; e、f: 时间与底物浓度交互作用; g、h: 酶添加量与 pH 交互作用; i、j: 酶添加量与底物浓度交互作用; k、l: pH 与底物浓度交互作用。

根据图8中6组响应面及等高线的形状来分析酶添加量、酶解 pH、酶解温度和酶解时间四个主要因素间的交互作用对苦杏仁多肽 DPPH 自由基清除率的影响, 结果发现自由基清除率响应值呈现先升高后下降的趋势, 酶添加量与 pH (BC)、酶解时间与底物浓度 (AD) 交互作用与其他几组相比更强。

根据图8可知, 三维图总体趋势为向上凸起, 说明该数学模型具有最大值。预测苦杏仁醇溶蛋白酶解多肽的最佳工艺条件当预测最优工艺条件为时间: 4.121 h、酶添加量 5208.930 U/g、底物浓度 3.21%、pH 9.22, 理论自由基清除率最大为 98.02%, 由于实验条件限制, 将该条件修订为酶添加量为 5000 U/g, pH 为 9, 底物浓度为 3%, 酶解时间为 4 h 时, 对该条件进行验证试验, 实际测得的结果为 97.86%±0.58%, 软件在该点的估计值为 98.02%与实测值相比, 误差仅为 0.16%, 接近预测值, 可以用于预测苦杏仁醇溶蛋白酶解的工艺条件。

根据文献可知, 刘媛<sup>[12]</sup>等人通过响应面法优化了杏仁粕酶解工艺, 研究其酶解液的抗氧化活性, 其最

终水解度与 DPPH 自由基清除率分别为 29.36%和 86.16%, 与本文的研究相比较, 水解度优化程度相差 2.61%, 但是本文的 DPPH 自由基清除率优化程度明显优于对方, 高出 11.7%。

### 3 结论

本研究通过响应面实验设计优化了苦杏仁醇溶蛋白抗氧化肽的制备工艺。通过响应面分析可知, 酶解时间、pH、底物浓度, 酶添加量都对水解度和自由基清除率存在影响, 最终通过软件得到优化酶解条件为时间 4 h, 酶添加量 5000 U/g, 底物浓度 3%, pH 9, 此时苦杏仁醇溶蛋白的水解度与 DPPH 自由基清除率均为最高, 通过验证试验实际测得水解度与 DPPH 自由基清除率分别 26.74%±0.54%与 97.86%±0.58%, 与预测值相差较小, 证明此响应面可以准确地预测苦杏仁醇溶蛋白酶解抗氧化肽最优工艺。本研究结果可以为苦杏仁在食品工业上的实际运用提供参考。

### 参考文献

- [1] 薛蕾.苦杏仁蛋白及抗氧化活性肽制备工艺研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2012  
XUE Lei. Study on preparation technology of bitter almond protein and antioxidant active peptides [D]. Yangling: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2012
- [2] 王玉珍.不同杏良种在甘肃河西走廊适生性栽培试验研究[J].林业科技通讯,2017,2:49-51  
WANG Yu-zhen. Study on the suitable cultivation experiment of different apricot varieties in Hexi Corridor of Gansu [J]. Forestry Science and Technology Newsletter, 2017, 2: 49-51
- [3] 骆灵静.树上干杏系列产品的开发[D].石河子:石河子大学, 2020  
LUO Ling-jing. Development of a series of dried apricots on the tree [D]. Shihezi: Shihezi University, 2020
- [4] 王晟.山杏(*Armeniaca sibirica*)仁蛋白辅助降血糖饮料开发[D].北京:北京林业大学,2014  
WANG Sheng Development of *Armeniaca sibirica* kernel protein-assisted hypoglycemic beverage [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2014
- [5] 张清安,姚建莉.苦杏仁资源加工与综合利用研究进展[J].中国农业科学,2019,52(19):3430-3447  
ZHANG Qin-an, YAO Jian-li. Research progress of bitter almond resource processing and comprehensive utilization [J]. Chinese Agricultural Sciences, 2019, 52(19): 3430-3447
- [6] 李大文.苦杏仁蛋白提取工艺研究[D].杨凌:西北农林科技

- 大学,2013
- LI Da-wen. Study on the extraction process of bitter almond protein [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2013
- [7] 吴东栋,张清安,范学辉,等.苦杏仁皮中生物活性成分的研究进展[J].食品与发酵工业,2019,45(7):288-293
- WU Dong-dong, ZHANG Qin-an, FAN Xue-hui, et al. Research progress of bioactive components in bitter almond peel [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(7): 288-293
- [8] 姬中伟.小米醇溶蛋白肽的制备及其抗氧化与抗炎活性研究[D].无锡:江南大学,2020
- Ji Zhong-wei. Preparation of millet prolamin peptide and its antioxidant and anti-inflammatory activities [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020
- [9] Yoshikawa M, Fujita H, Matoba N, et al. Bioactive peptides derived from food proteins preventing lifestyle-related diseases [J]. Bio Factors, 2001, 12(1-4)
- [10] ZHENG Jie-xia, BU Ting-ting, LIU Ling, et al. Naturally occurring low molecular peptides identified in egg white show antioxidant activity, 2020, 138(prepublish): 109766
- [11] 石宁蕙,叶健明,杨海燕,等.甜杏仁粕蛋白的碱性蛋白酶酶解动力学研究[J].保鲜与加工,2020,20(3):90-95
- SHI Ning-hui, YE Jian-ming, YANG Hai-yan et al. Study on alkaline protease hydrolysis kinetics of sweet almond meal protein [J]. Freshness and Processing, 2020, 20(3): 90-95
- [12] 刘媛,王健,杨立亭,等.响应面法优化杏仁粕蛋白酶解工艺及酶解液抗氧化活性研究[J].粮食与油脂,2019,32(10):13-17
- LIU Yuan, WANG Jian, YANG Li-ting, et al. Optimization of almond meal proteolysis technology and antioxidant activity of enzymatic hydrolysate by response surface methodology [J]. Food and Oils, 2019, 32(10): 13-17
- [13] 代晨曦,程卫东.基于响应面优化杏仁蛋白酶解工艺的研究[J].食品工业,2018,39(7):141-146
- DAI Chen-xi, CHENG Wei-dong. Research on optimization of almond proteolysis process based on response surface [J]. Food Industry, 2018, 39(07): 141-146
- [14] Kim J M, Yoon K Y. Functional properties and biological activities of perilla seed meal protein hydrolysates obtained by using different proteolytic enzymes [J]. Food Science and Biotechnology, 2020, 29(11): 1553-1562
- [15] 崔炳群.燕麦多肽的制备工艺研究[J].现代食品科技,2012,28(8):1040-1042
- CUI Bing-qun. Study on the preparation technology of oat peptides [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(8): 1040-1042
- [16] 赵晨焯,李瑞婷.文冠果油粕蛋白的分离及其酶解产物抗氧化性研究[J].农产品加工,2020,20:20-25
- ZHAO Chen-xuan, LI Rui-ting. Isolation of Araliaceae oil meal protein and study on the antioxidant activity of enzymatic hydrolysis products [J]. Agricultural Products Processing, 2020, 20: 20-25
- [17] 瞿瑗,余国贤,黎杉珊,等.Osborne法分级提取青椒籽蛋白质及其理化性质研究[J].核农学报,2018,32(12):2373-2379
- QU Yuan, YU Guo-xian, LI Shan-shan, et al. Osborne method for fractional extraction of green pepper seed protein and its physical and chemical properties [J]. Journal of Nuclear Agriculture, 2018, 32(12): 2373-2379
- [18] 陈金玉,曲金萍,张坤生,等.酶解制备苦荞蛋白抗氧化肽及其分离纯化研究[J].食品研究与开发,2020,41(12):14-20
- CHEN Jin-yu, QU Jin-ping, ZHANG Kun-shen, et al. Preparation of tartary buckwheat protein antioxidant peptide by enzymatic hydrolysis and its separation and purification [J]. Food Research and Development, 2020, 41(12): 14-20
- [19] 张浩玉,高云,王欣,等.绿豆多肽的酶法制备及抗氧化活性研究[J].粮食与油脂,2020,33(11):116-119
- ZHANG Hao-yu, GAO Yun, WANG Xin, et al. Enzymatic preparation and antioxidant activity of mung bean peptides [J]. Food and Oils, 2020, 33(11): 116-119
- [20] 丁慧璞,欧阳伟虹,黄玉婷,等.小黄鱼边角料的酶解工艺及酶解液性能研究[J].核农学报,2020,34(9):2021-2031
- DING Hui-pu, OUYANG Wei-hong, HUANG Yu-ting, et al. Study on the enzymatic hydrolysis process of small yellow croaker leftovers and the performance of enzymatic hydrolysis solution [J]. Journal of Nuclear Agriculture, 2020, 34(9): 2021-2031
- [21] 叶健明,石宁蕙,周建中,等.鹰嘴豆短肽的分步酶解法制备及其营养价值评价[J].保鲜与加工,2020,20(1):140-148
- YE Jian-ming, SHI Ning-hui, ZHOU Jian-zhong. Preparation of chickpea short peptides by enzymatic hydrolysis method and evaluation of their nutritional value [J]. Fresh-keeping and Processing, 2020, 20(1): 140-148
- [22] 范方宇,阚欢,许善午,等.中性蛋白酶水解核桃蛋白工艺[J].食品研究与开发,2011,32(11):78-81
- FAN Fang-yu, KAN Huan, XU Shan-wu, et al. The process of hydrolyzing walnut protein with neutral protease [J]. Food Research and Development, 2011, 32(11): 78-81

(下转第 192 页)