

复合酶法制备小麦面筋蛋白咸味酶解液的工艺优化

董彩虹, 温青玉, 李天齐, 张康逸, 张雨, 刘清浩

Optimization of the Technology for Preparing Salty Wheat Gluten Protein Hydrolysate by Compound Enzyme Method

DONG Caihong, WEN Qingyu, LI Tianqi, ZHANG Kangyi, ZHANG Yu, and LIU Qinghao

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021080296>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

海参体壁蛋白ACE抑制肽酶解工艺及产物分子量分布研究

Study on hydrolysis condition and molecular weight distribution of ACE inhibitory peptide derived from sea cucumber protein

食品工业科技. 2017(17): 163-167

乳清分离蛋白酶解制备抗氧化和ACE抑制活性产物

Antioxidant and ACE inhibition Activity of Hydrolysates Obtained from Whey Protein Isolate

食品工业科技. 2020, 41(16): 169-175

酶解-发酵法制备鱼鲜汁的工艺优化

Optimization of Enzymatic Hydrolysis-Fermentation Process for Preparing Fish Juice

食品工业科技. 2021, 42(22): 185-192

酶法制备阿拉斯加鳕鱼降压肽的工艺优化及其产物的结构鉴定

Extraction Optimization and Structure Identification of Anti-hypertensive Peptide from Alaskan Cod by Enzymatic Method

食品工业科技. 2020, 41(5): 163-168,174

响应面法优化复合酶酶解制备可口革囊星虫胶原蛋白抗氧化肽工艺研究

Optimization of the Preparation of Collagen Antioxidant Peptides from *Phascolosoma esculenta* by Compound Enzymatic Hydrolysis by Response Surface Methodology

食品工业科技. 2021, 42(22): 230-239

超声波辅助复合酶法制备藏系绵羊胎盘肽的工艺优化

Optimization of preparation of Tibetan sheep placenta peptide by ultrasonic-assisted composite enzymatic hydrolysis

食品工业科技. 2017(21): 130-136



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

董彩虹, 温青玉, 李天齐, 等. 复合酶法制备小麦面筋蛋白咸味酶解液的工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(3): 222–230. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080296

DONG Caihong, WEN Qingyu, LI Tianqi, et al. Optimization of the Technology for Preparing Salty Wheat Gluten Protein Hydrolysate by Compound Enzyme Method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(3): 222–230. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080296

· 工艺技术 ·

复合酶法制备小麦面筋蛋白咸味酶解液的工艺优化

董彩虹¹, 温青玉², 李天齐³, 张康逸², 张雨³, 刘清浩^{1,*}

(1. 中北大学化学工程与技术学院, 山西太原 038507;

2. 河南省农业科学院农副产品加工研究中心, 河南省全谷物小麦制品加工国际联合实验室,
河南省全谷物鲜食加工工程技术研究中心, 河南郑州 450002;

3. 河南省安康食品科技研究院, 河南郑州 450006)

摘要: 为优化小麦面筋蛋白咸味酶解液的制备工艺, 并考察其咸度及分子量大小。基于单因素实验, 采用 Box- Behnken 响应面法, 以酶添加量、酶解 pH、底物浓度以及酶解温度为考察因素, 水解度为指标, 优化小麦面筋蛋白咸味酶解液的制备工艺, 并采用电子舌测定其咸度; 高效液相色谱测定其分子量分布。结果表明: 制备小麦面筋蛋白咸味酶解液的最优工艺为底物浓度 4.9%, 酶解温度 55.7 °C, pH7.4, 复合酶添加量 3799 U/g (蛋白), 在此条件下, 小麦面筋蛋白咸味酶解液的水解度为 (33.12%±0.45%), 实测值与理论值相差较小, 表明此模型可用于优化小麦面筋蛋白咸味酶解液的制备工艺。该法得到的 2% 小麦面筋蛋白咸味酶解液咸度为 (7.63±0.02), 分子量分布主要集中在 1000 Da 以下。此研究为面筋蛋白咸味肽以及咸味香精的开发和应用奠定了基础。

关键词: 小麦面筋蛋白, 复合酶酶解, 工艺优化, 分子量分布, 咸味分析

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)03-0222-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080296

本文网刊:



Optimization of the Technology for Preparing Salty Wheat Gluten Protein Hydrolysate by Compound Enzyme Method

DONG Caihong¹, WEN Qingyu², LI Tianqi³, ZHANG Kangyi², ZHANG Yu³, LIU Qinghao^{1,*}

(1. School of Chemical Engineering and Technology, North University of China, Taiyuan 038507, China;

2. Center of Agricultural Products Processing, Henan Academy of Agricultural Sciences, Henan Province International Joint Laboratory for Whole Grain Wheat Processing, Province Whole Grain Fresh Food Processing Engineering Technology Research Center, Zhengzhou 450002, China;
3. Henan Ankang Food Science and Technology Research Institute, Zhengzhou 450006, China)

Abstract: The aim of this study was to optimize the preparation process of salty enzymatic hydrolysate of wheat gluten protein and to investigate its saltiness and molecular weight. Based on single factor experiment, Box-Behnken response surface methodology was used to optimize the preparation process of salty enzymatic hydrolysate of wheat gluten protein, with taking enzyme addition, enzymatic hydrolysis pH, substrate concentration and enzymatic hydrolysis temperature as the factors, and hydrolysis degree as the index, and its saltiness was determined by electronic tongue measures; its molecular weight distributions were determined by high performance liquid chromatography. The results showed that the optimal process for preparing wheat gluten protein salty enzymatic hydrolysate was substrate concentration 4.9%, enzymatic hydrolysis temperature 55.7 °C, pH7.4, and compound enzyme addition amount 3799 U/g(protein). Under these conditions,

收稿日期: 2021-08-26

基金项目: 山西省中北大学横向项目 (202001); 河南省重大公益专项 (201300110300); 河南省农业科学院杰出青年科技基金 (2020JQ04)。

作者简介: 董彩虹 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物质资源的开发与应用, E-mail: dongcaihong9512@163.com。

* 通信作者: 刘清浩 (1979-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 生物质资源的开发与应用, E-mail: liuqinghao@nuc.edu.cn。

the degree of hydrolysis of the salty wheat gluten protein hydrolysate was (33.12%±0.45%), and the difference between the measured value and the theoretical value was small, indicating that this model can be used to optimize the preparation process of the salty wheat gluten protein hydrolysate. The salty taste of the salty wheat gluten protein hydrolysate(2%) prepared by this method was (7.63±0.02), and the molecular weight distribution was mainly concentrated below 1000 Da. This study lays the foundation for further research to obtain salty wheat gluten protein peptides.

Key words: wheat gluten protein; complex enzyme hydrolysis; process optimization; molecular weight distribution; saltiness analysis

咸味俗称“百味之王”,作为一种重要的基本味,是调制各种复合风味的基础,在食品调味中不可或缺^[1]。世界卫生组织建议成人的盐摄入量一天应该不超过6 g,而调查显示我国居民实际盐摄入量在12 g左右^[2]。流行病学、干预和迁移研究以及动物实验表明,食盐摄入与高血压、心血管疾病和饮食类疾病之间存在直接相关性^[3-5]。此外,干预研究还表明,减少饮食中钠的摄入量可以降低高血压的发病率^[6-7]和抑郁症的患病风险^[8]。因此,要实现全民健康,减盐是极其重要的一个方面。目前,针对于减盐的措施主要有:减少食盐添加量、改善食品加工工艺、优化食盐物理形态、开发食盐替代物低钠盐等。市场上食盐替代物有咸味肽、咸味增强肽、风味改良剂等^[9],其中咸味肽是一种较为理想的食盐替代物^[10],尤其对于需低钠食品的特殊群体来说,咸味肽产品是未来研发的重点。而咸味酶解液作为制备咸味肽和咸味香精的基础,其研究对于咸味肽的开发和应用具有重要意义。

目前已有多项关于咸味酶解液研究的实验,原料多数为动物源蛋白质,如王欣等^[11]利用木瓜蛋白酶和中性蛋白酶协同酶解哈氏仿对虾蛋白,获得咸味酶解液;李迎楠等^[12]通过酶解牛骨获得咸味酶解液,经进一步分离获得一种单一的咸味肽;SCHINDLER等^[13]通过2种蛋白酶水解鱼肉蛋白制得咸味酶解液,经进一步分离纯化得到具有一定咸味的L-精氨酸和精氨酰二肽(RA、AR、RP、RS、RG、RV、VR、RM)。然而动物蛋白不易储存、成本较高、存在药物残留、重金属污染等安全隐患。相比来说,植物蛋白来源更加广泛,成本低且相对安全,如彭增起等^[14]通过2种蛋白酶酶解大豆蛋白,经进一步分离纯化,得到一种纯净的咸味肽,其氨基酸序列为Gly-Lys;杨文君等^[15]通过风味蛋白酶酶解豌豆蛋白,获得咸味酶解液,为研究豌豆蛋白咸味肽奠定基础。

小麦面筋蛋白又称谷朊粉、活性面筋蛋白,是小麦淀粉加工过程中的副产物,其蛋白质含量高达75%~85%,而且含有人体必须的十五种氨基酸,是一种价格低廉、营养丰富的植物蛋白资源。迄今为止,小麦面筋蛋白酶解制备肽的研究主要集中于抗氧化肽^[16]、抗菌肽^[17]、ACE抑制肽^[18]、富含谷甘氨酸肽^[19]等方面,也有关于利用酶解小麦面筋蛋白制备呈味肽的研究,如鲜味肽^[20]、低苦味肽^[21],还未发现在咸味方面的研究。

本实验以酶解温度、酶解pH、底物浓度以及酶

添加量为考察因素,研究不同酶解工艺参数对面筋蛋白水解度以及酶解液咸味感官评分的影响,并通过响应面法进一步优化小麦面筋蛋白咸味酶解液制备工艺,以期实现对小麦面筋蛋白的高值化利用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小麦面筋蛋白 封丘县华丰粉业有限公司;复合酶(风味蛋白酶(28000 U/g):碱性蛋白酶(46000 U/mL):复合蛋白酶(44000 U/g)=0.45:0.36:0.19),三种酶的酶活均为实际测定 谷维信(中国)生物技术有限公司;食用氢氧化钠 天津市津华化工厂;食用盐酸 开封市旭信化工有限公司;食用NaCl

河北绿海康信多品种食盐有限公司;甲醛、甲醇、乙腈 均为分析纯。

YP-N型电子分析天平 上海精密仪器仪表有限公司;DSHZ-300型多用途恒温水浴振荡器 江苏太仓市实验设备厂;JW1042低速离心机 安徽嘉文仪器装备有限公司;FD-100S真空冷冻干燥机 北京惠城佳仪科技有限公司;SA402B电子舌 日本INSENT公司;Agilent 1260(四元泵)高效液相色谱仪 安捷伦科技(中国)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 小麦面筋蛋白酶解工艺流程 称取一定量小麦面筋蛋白粉与蒸馏水混合成悬浊液,用0.1 mol/L的NaOH溶液或HCl溶液调节溶液pH,放置水浴锅中预热后添加复合酶进行酶解,6 h后煮沸灭酶15 min,冷却至室温,3000 r/min离心15 min,上清液即为小麦面筋蛋白咸味酶解液,-35 °C下冷冻干燥70 h,4 °C贮藏待用。

1.2.2 单因素实验 设定单因素水解的基本条件为:复合酶加酶量为3000 U/g,底物浓度为5%,pH为7.0,反应温度为50 °C,反应时间6 h。以小麦面筋蛋白的水解度和咸味感官评分为指标,改变其中一个条件,固定其他条件并分别考察复合酶添加量、酶解pH、底物浓度以及酶解温度对小麦面筋蛋白水解效果的影响。各因素梯度设定:复合酶添加量分别为1000、2000、3000、4000、5000 U/g蛋白;酶解pH分别为6.0、6.5、7.0、7.5、8.0;底物浓度分别为5%、6%、7%、8%、9%;酶解温度分别为40、45、50、55、60 °C。

1.2.3 响应面设计实验 参照单因素实验结果,以水解度指标,通过响应面设计进一步优化4个因素对提取小麦面筋蛋白咸味酶解液的影响。4个因素为

变量, 分别以 A、B、C、D 表示, 以水解度 Y 为响值, 以-1、0、1 分别代表变量的水平。实验设计的因素水平如表 1。

表 1 响应面因素和水平
Table 1 Factors and levels of response surface experiments

因素	水平		
	-1	0	1
A: 酶解温度(℃)	50	55	60
B: 酶解 pH	7.0	7.5	8.0
C: 底物浓度(%)	4.5	5.0	5.5
D: 酶添加量(U/g蛋白)	3000	4000	5000

1.2.4 水解度的测定 采用甲醛滴定法测定蛋白质水解度^[22]。步骤如下: 取离心后上清液 5 mL, 加入 60 mL 蒸馏水, 进行磁力搅拌(60 r/min), 首先用 0.1 mol/L 标准 NaOH 溶液滴定至溶液 pH 至 8.2, 再加入 20 mL pH 为 8.2 的甲醛溶液, 搅拌 1 min 后用 0.1 mol/L 标准 NaOH 溶液滴定溶液 pH 至 9.2, 并记录第 2 次滴定所消耗的 NaOH 的体积 V₁; 以蒸馏水为替代样品, 同时做空白实验, 滴定所消耗的 NaOH 的体积 V₂。公式如下:

$$\text{酶解液中氨基氮含量}(\%) = \frac{(V_1 - V_2) \times 0.014 \times C}{M} \times \frac{V}{5} \times 100$$

$$\text{水解度}(\%) = \frac{\text{氨基氮}}{\text{总氮}} \times 100$$

式中, C 表示 NaOH 标准溶液浓度(mol/L); V 表示水解液总体积(mL); M 表示酶解小麦面筋蛋白的质量(g)。

1.2.5 咸味感官评价 参考陈瑞霞等^[23]对淘汰鸡蛋酶解液的咸味评定方法, 对面筋蛋白咸味酶解液进行感官评定。感官评价小组由经过专业培训的 8 名男性和 8 名女性组成, 年龄在 20~35 岁之间。咸味评分采用 10 分制(0 表示没有咸味, 3 表示咸味较淡, 5 表示咸味适中, 7 表示咸味较强, 10 表示咸味强烈)。评定过程在温度为(25±2)℃ 的感官评价室进行, 感官评价人员每次取 1 mL 样品进行评价, 10 s 后吐出, 蒸馏水漱口, 每个样品间隔 1 min。以感官评分的平均值作为最终咸味得分。

1.2.6 电子舌咸度测定 通过电子舌检测 2% 浓度的样品溶液咸度, 以 0.2%~1.0% 的食盐溶液为对照。采用日本 INSENT 公司的 SA402B 电子舌系统, 该系统包括 CAO、COO、AE1、AAE、CTO 5 个传感器阵列、一个参比电极(Ag/AgCl)、电信号处理器以及模式识别系统组成。其中, CTO 反映样品的咸味强度。在正式测定前传感器和参比电极需要进行前处理、校准、初始化过程, 以此确保数据的稳定性和可靠性。每个样品均采集 4 次, 采用最后三次的数据。

1.2.7 酶解液分子量分布的测定 参考任娇艳等^[24]

的方法并略作修改。以溶菌酶(相对分子量 14400 Da), 胰岛素(相对分子量 5800 Da), 维生素 B₁₂(相对分子量 1300 Da), 还原型谷胱甘肽(相对分子量 300 Da)为标准品, 高效液相色谱法检测不同分子的保留时间, 作分子量与保留时间的标准曲线。通过比较样品不同组分的保留时间计算样品的分子量分布。高效液相色谱条件: 样品过 0.22 μm 微孔滤膜, 色谱柱 TSK-GELG 2000 SWxl 7.8 mm×300 mm, 进样量 20 μL, 温度 35℃, 检测波长 220 nm, 流速 0.5 mL/min, 流动相为乙腈: 水: TFA=20:80:0.1。

1.3 统计分析

每个实验均为 3 次, 结果以 X±RD 表示, 通过 SPSS13 软件进行分析; 采用 Origin 2017 软件作图; 响应面试验结果用 Design-Expert 8.0.6 软件进行参数优化及方差分析。

2 结果与分析

2.1 单因素实验结果

研究报道表明, 在小麦面筋蛋白酶解过程中, 小麦面筋蛋白水解度受酶解温度、酶解 pH、底物浓度以及酶添加量的影响^[25]。

由图 1A 可知, 随着复合酶添加量的增大, 水解度和咸味感官评分增大, 加酶量超过 4000 U/g 后, 水解度和咸味感官评分减小。酶添加量为 4000 U/g 时, 水解度和咸味感官评分均达到最大, 分别为(32.85%±0.5%) 和 (6.16±0.11)。酶添加量达到 4000 U/g 后, 水解度降低, 可能是由于酶浓度超过底物浓度, 导致蛋白酶之间相互水解及酶活降低。马诗文等^[26]的研究同样表明在酶解过程中, 相同时间内酶用量会影响蛋白酶与底物的结合, 也可能导致酶作为一种蛋白, 相互发生酶解反应, 使水解效果增幅变缓。综合两者结果, 酶添加量选用 4000 U/g。

由图 1B 可知, 随着酶解温度的增大, 水解度与咸味感官评分显著增大($P<0.05$), 当酶解温度为 55℃ 时, 水解度与咸味评分达到最大分别为(31.37%±0.47%) 与 (6.07±0.12), 超过 55℃ 时, 水解度与咸味感官评分减小。由于蛋白酶有其适宜的温度, 温度过低时, 会抑制蛋白酶的活性; 温度过高, 可能会引起蛋白酶次级键解离, 蛋白酶的结构被破坏, 丧失部分或全部催化活性^[27]。综合两者结果, 酶解温度选用 55℃。

由图 1C 可知, 随着酶解 pH 的增加, 水解度与咸味感官评分不断增加, pH 超过 7.5 时, 水解度与咸味感官评分减少。酶解 pH 为 7.5 时, 水解度和咸味评分均达到最大, 分别为(31.07%±0.35%) 和 (6.14±0.09)。可能是由于不同蛋白酶有其适宜的 pH, pH 过高或过低都会影响蛋白酶结构的稳定性, 从而影响蛋白酶与底物的水解过程。宁芯等^[28]研究发现溶液的 pH 会引起 H⁺浓度的变化, 可以影响蛋白酶自身的解离和底物的解离, 从而影响酶与底物蛋白的结合与催化。综合两者结果, 酶解 pH 选用 7.5。

由图 1D 可知, 小麦面筋蛋白的水解度以及咸味

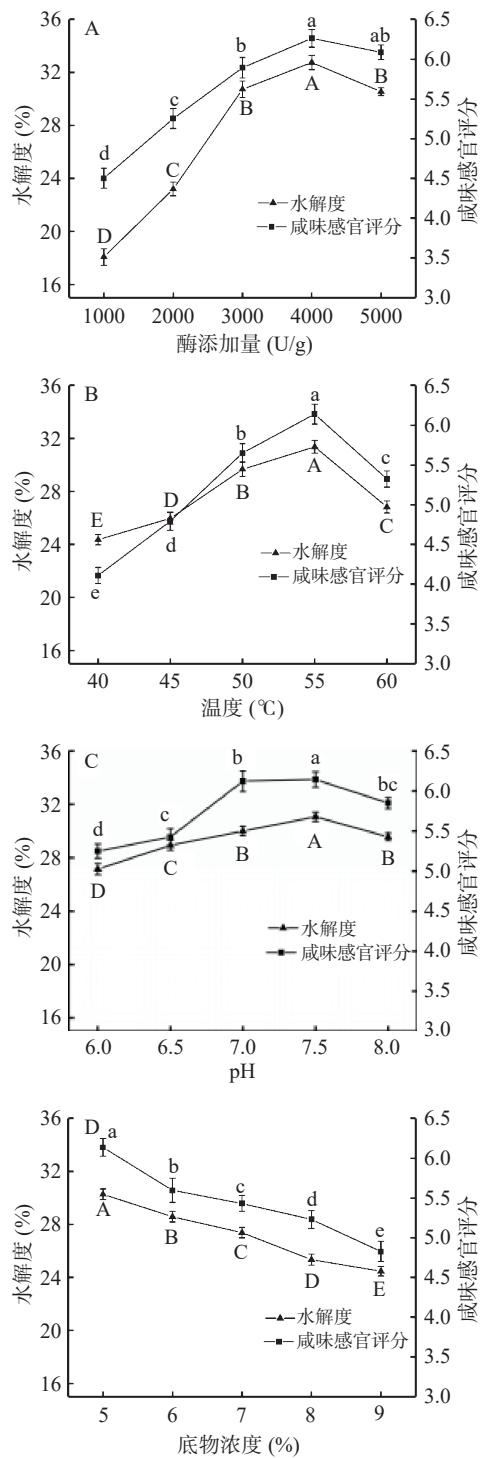


图 1 4 种因素对小麦面筋蛋白水解度和咸味感官评分的影响

Fig.1 The effects of 4 factors on hydrolysis degree and salty taste sensory score of wheat gluten

注: 不同大写字母表示水解度差异显著($P<0.05$); 不同小写字母表示感官评分差异显著($P<0.05$)。

感官评分随着底物浓度的增大而减小, 底物浓度为 5% 时, 水解度与酶解液的咸味评分达到最大分别为 $(30.27\% \pm 0.40\%)$ 与 (6.13 ± 0.11) , 可能是由于在相同酶添加量的条件下, 较高的底物浓度会导致酶解体系的流动性差, 蛋白酶与底物不能充分接触, 抑制酶解反应速率。刘英丽等^[22]研究同样表明底物浓度增大影响了蛋白酶与底物蛋白的混合, 使得酶与底物不能

充分接触, 导致水解降低。底物浓度太低, 得到的咸味酶解液较少, 增加后期样品制备难度。综合考虑, 底物浓度选用 5%。

2.2 响应面设计实验结果

2.2.1 回归模型的建立与显著性分析 响应面法是实验优化方法中最常用的一种, 该法已广泛应用于制备生物肽的实践中^[29-31]。由单因素实验结果可以看出, 小麦面筋蛋白的水解度与咸味感官评分成正比, 因此响应面实验设计以水解度为响应值。运用 Design-Expert 8.0.6 中 Box-Behnken 设计进行实验优化, 4 个因素分别设置 3 个水平, 共 29 组实验组合。实验设计方案及结果如表 2 所示。

表 2 响应面实验设计方案及结果
Table 2 The schemes and results of response surface design

编号	A	B	C	D	Y水解度(%)
1	-1	0	-1	0	27.82
2	1	0	1	0	29.05
3	0	0	0	0	33.05
4	-1	0	0	-1	30.86
5	0	-1	0	1	29.93
6	0	1	0	-1	29.84
7	0	0	1	1	29.73
8	1	1	0	0	29.91
9	0	1	0	1	30.44
10	0	0	-1	-1	31.56
11	0	-1	-1	0	29.79
12	0	1	1	0	31.01
13	0	-1	0	-1	30.59
14	0	0	0	0	33.25
15	0	1	-1	0	28.21
16	0	0	-1	1	29.97
17	0	0	0	0	32.67
18	-1	0	1	0	28.70
19	-1	1	0	0	29.70
20	-1	-1	0	0	27.90
21	0	0	0	0	33.37
22	0	-1	1	0	28.10
23	1	0	0	-1	30.33
24	0	0	0	0	33.16
25	1	-1	0	0	30.89
26	1	0	0	1	29.41
27	0	0	1	-1	29.47
28	1	0	-1	0	30.95
29	-1	0	0	1	29.77

通过 Design-Expert 8.0.6 响应面分析软件对 29 组水解度实验结果进行回归拟合, 得到 Y(水解度)的回归方程为:

$$Y=32.28+33.28A+0.23B-0.10C-0.52D-0.70AB-0.69AC+0.29AD+1.12BC+0.54BD+0.71CD-1.98A^2-1.84B^2-2.10C^2-1.39D^2$$

通过软件对回归方程进一步进行方差分析, 结果见表 3。

由表 3 可知, 一次项中 A、D 以及二次项中 BC 对小麦面筋蛋白咸味酶解液的水解度的影响极显著($P<0.01$); 二次项中 AB、AC 对小麦面筋蛋白咸味酶解液的水解度的影响显著($P<0.05$)。由此可知, 各

表 3 响应面方差分析

Table 3 Response surface analysis of variance

方来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	77.85	14	5.56	19.72	<0.0001	**
A	3.84	1	3.84	13.63	0.0024	**
B	0.66	1	0.66	2.33	0.1489	
C	0.13	1	0.13	0.45	0.5112	
D	3.31	1	3.31	11.73	0.0041	**
AB	1.93	1	1.93	6.85	0.0203	*
AC	1.93	1	1.93	6.85	0.0203	*
AD	0.34	1	0.34	1.21	0.2892	
BC	5.04	1	5.04	17.87	0.0008	**
BD	1.17	1	1.17	4.14	0.0614	
CD	2.03	1	2.03	7.20	0.0178	*
A^2	25.40	1	25.40	90.09	<0.0001	**
B^2	21.94	1	21.94	77.80	<0.0001	**
C^2	28.48	1	28.48	100.99	<0.0001	**
D^2	12.54	1	12.54	44.46	<0.0001	**
残差	3.95	14	0.28			
失拟性	3.47	10	0.35	0.39	0.1564	
纯误差	0.48	4	0.12			
总和	81.79	28				

注: * $P<0.05$, 差异显著; ** $P<0.01$, 差异极显著。

因素之间的交互作用比较显著, 各具体试验因素对麦面筋蛋白咸味酶解液的水解度的影响不仅仅是简单的线性关系。由表 3 可知, $P_{r>F}<0.0001$ 表明回归方程的模型显著; 模型失拟项为 $0.1564>0.05$ 无显著性影响, 表明模型的拟合程度较好, 对水解度的分析可采用此回归方程解释。方程的决定系数 R^2 为 0.9517 表明方程的相关性较好, 可以通过该模型对水解度很好的做出预测; $R_{\text{Adj-Squared}}$ 为 0.9035, 说明此模型可以解释 90.35% 的小麦面筋蛋白水解度数据的响应值变化; $R_{\text{Pre-Squared}}(0.7464)$ 与 $R_{\text{Adj-Squared}}(0.8643)$ 差值小于 0.2, 表明回归模型可以充分说明小麦面筋蛋白酶解过程。实验的精确度可以用离散系数表示^[32], 此次实验的精确度为 1.76%, 说明模型方程能够较好地反映真实值。

2.2.2 三维响应面分析 三维响应面图和等高线图可以对回归方程进行更清楚的描述, 能够直接表现出每个因素与响应值之间的关系以及因素间的交互作用, 进一步生成最优工艺条件^[33]。图 2~图 7 显示, 随着各因素水平的升高, 水解度均呈现先增大后减小的趋势, 说明 4 个因素在所选范围内均存在极值。等高线是响应面水平方向的投影, 等高线为椭圆时, 交互作用显著; 等高线为圆形时, 交互作用不显著^[34]。图 2~图 7 中, BC、CD 的等高线图为椭圆, 表明交互作用显著, 其次是 AB 与 AC, 而 AD 与 BD 等高线图为圆形, 表明交互作用弱, 这与 F 值结果一致。图 2 表明在酶添加量为 4000 U/g, 底物浓度为 5%, 酶解时间 6 h 的条件下, 酶解温度与酶解 pH 相互作用对小麦面筋蛋白水解度的影响。酶解温度在 50~56 °C, pH 在 7.0~7.5 的范围内, 水解度随着温度和 pH 的增大而增大, 温度超过 56 °C 和 pH 超过 7.5 时, 水解度

呈下降趋势。图 3、5 同理, 底物浓度在 4.5%~4.9% 的范围内, 小麦面筋蛋白水解度逐渐增大; 在 4.9%~5.5% 的范围内, 小麦面筋蛋白水解度逐渐减小。由

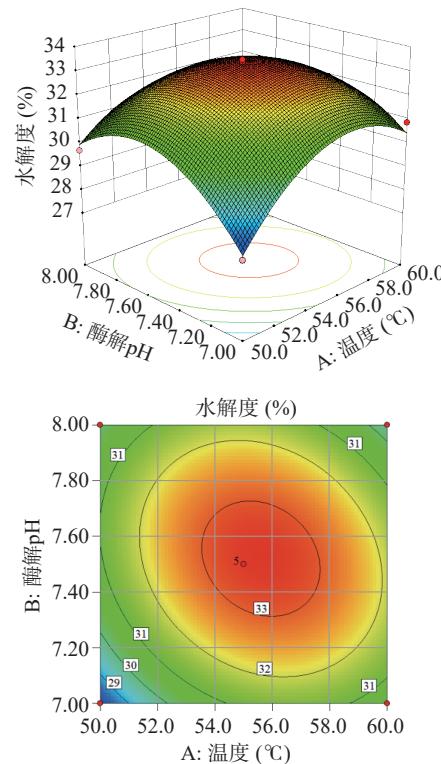


图 2 温度与酶解 pH 交互作用的响应面图和等高线图

Fig.2 Response surface map and contour map of the interaction between temperature and enzymatic pH

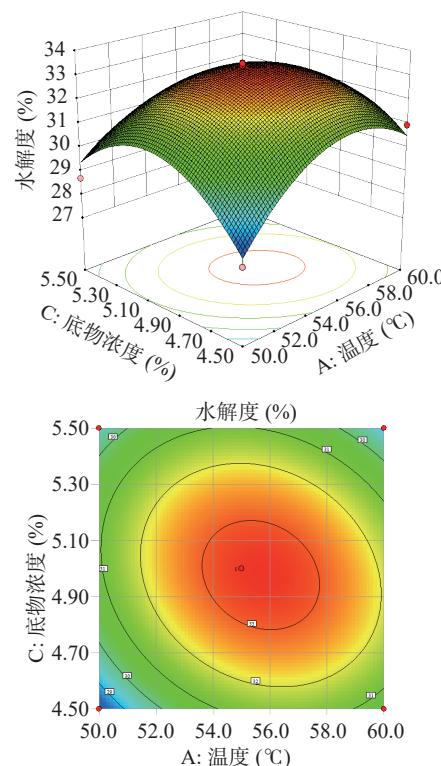


图 3 温度与底物浓度交互作用的响应面图和等高线图

Fig.3 Response surface map and contour map of the interaction between temperature and substrate concentration

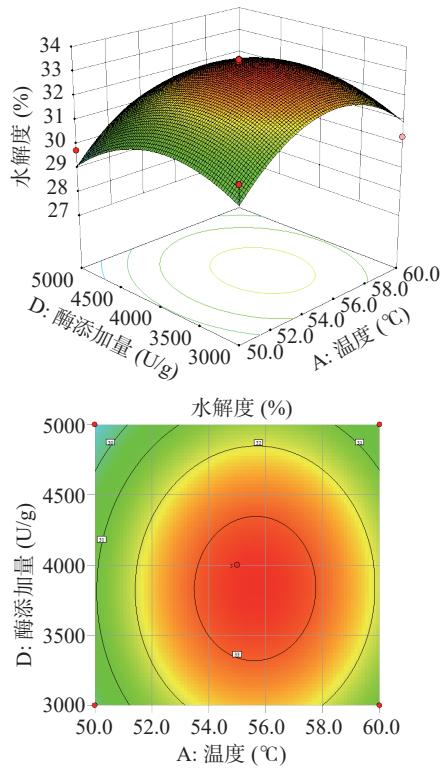


图 4 酶添加量与温度交互作用的响应面图和等高线图

Fig.4 Response surface map and contour map of the interaction between enzyme addition and temperature

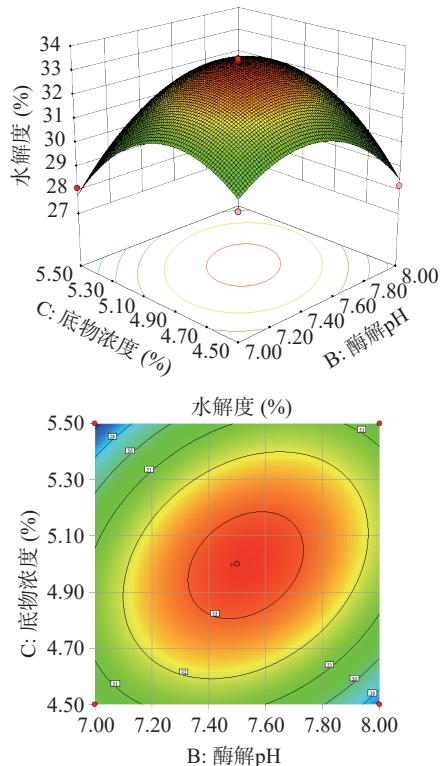


图 5 酶解 pH 与底物浓度交互作用的响应面图和等高线图

Fig.5 Response surface map and contour map of the interaction between pH and substrate concentration

图 4、6、7 可以看出, 酶添加量在 3000~4000 U/g 的范围内, 水解度随着酶添加量的增大而增大, 而超过 4000 U/g 时, 水解度趋于平缓。从图 2~图 7 整体来看, 每两个因素之间均存在协同作用, 与单因素实验

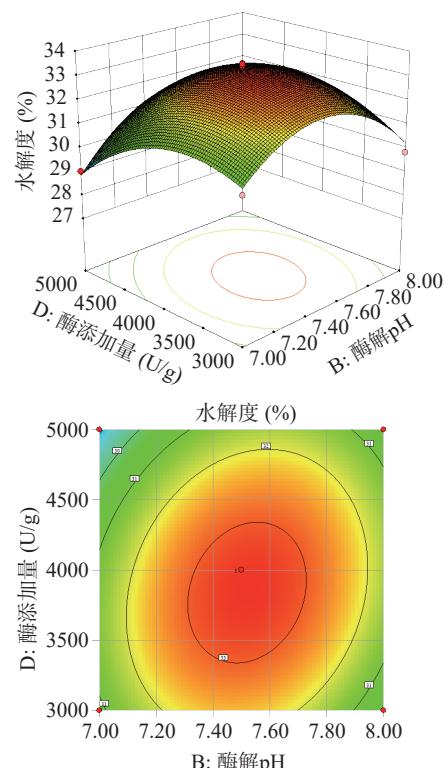


图 6 酶解 pH 与酶添加量交互作用的响应面图和等高线图

Fig.6 Response surface map and contour map of the interaction between pH and substrate concentration

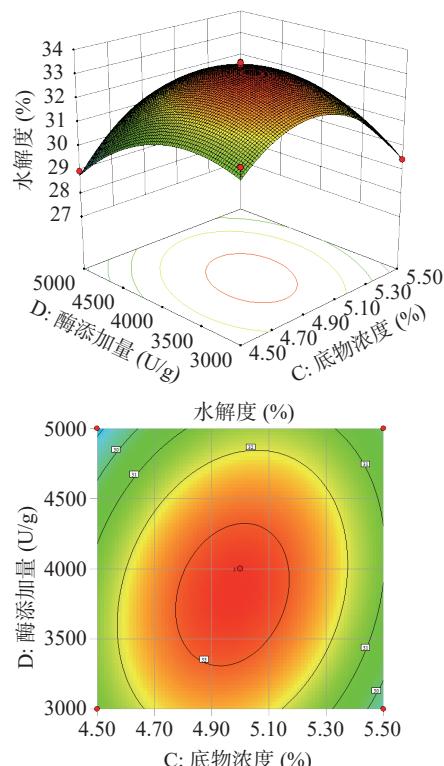


图 7 底物浓度与酶添加量交互作用的响应面图和等高线图

Fig.7 Response surface map and contour map of the interaction between substrate concentration and enzyme addition

中所表现出来的趋势一致。

2.2.3 最优条件组合验证 通过 Design-Expert 8.0.6 响应面分析软件进行优化, 可以得出小麦面筋蛋白咸味酶解液的最优工艺条件为: 酶解温度 55.7 °C,

pH7.4, 复合酶添加量 3799 U/g, 底物浓度 4.9%。在此条件下水解度的理论值为 33.47%。通过 3 次验证试验发现, 在此条件下所得水解度依次为 32.61%, 33.49% 和 33.26%, 均与模型预测值 33.47% 相差较小, 表明此模型可以很好的预测小麦面筋蛋白水解工艺。

在最优工艺下得到的咸味感官评分为 (6.47±0.22)。表明在此工艺下, 既可以减少原料的浪费, 又可以得到更高的小麦面筋蛋白咸味酶解液。可以选用此工艺进行下一步分离纯化。

2.3 电子舌分析

电子舌是模拟人体味觉机理研制出的一种基于化学传感器和模式识别的智能电子系统, 能够模拟人的舌头对样品的酸、甜、苦、咸、鲜和涩味进行评价, 是近年来快速发展的一种分析检测液体滋味的新型手段^[35]。表 4 为不同浓度的食盐溶液测定结果。

表 4 食盐溶液咸度测定

Table 4 Determination of salinity of table salt solution

浓度	0.3%	0.4%	0.5%	0.6%	0.7%	0.8%	0.9%	1.0%
咸度值	3.05±0.03	4.65±0.01	5.77±0.01	6.83±0.02	7.61±0.02	8.31±0.02	8.97±0.01	9.52±0.01

2% 的小麦面筋蛋白咸味酶解液通过电子舌测定, 咸度值为 (7.63±0.02)。与表 4 中不同浓度的食盐溶液咸度值比较, 可以看出, 2% 浓度的酶解液与 0.7% 的食盐溶液咸度相当。因此, 在同等咸度下, 此酶解液可代替约 35% 的食盐, 具有一定的实际应用价值。

2.4 酶解液的分子量分布

由图 8 可知, 对四种标准品的相对分子量的对数以及保留时间做曲线, 得出的标准曲线为 $Y = -0.17087X + 6.22$, $R^2 = 0.9696$, 说明线性良好。将最优酶解工艺条件下得到的小麦蛋白酶解产物进行分子量分布分析(图 9), 根据标准曲线计算各分子段 ($MW < 1000$ Da, $1000\sim 3000$ Da, $3000\sim 5000$ Da 及 >5000 Da)百分比(表 5)。

由表 5 可知, 在最优工艺条件下, 小麦面筋蛋白酶解产物的分子量主要集中在 5000 Da 以下, 其中

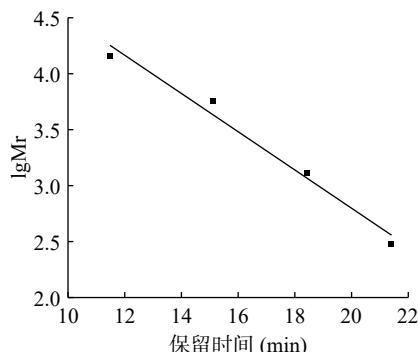


图 8 标准品的相对分子质量分布图

Fig.8 Molecular weight distribution profiles of standard samples

小于 3000 Da 的肽占主要部分, 约为 92.07%, 其中分子量小于 1000 Da 的肽占 78.33%。LIOE 等^[36] 研究表明风味肽主要是分子量小于 3000 Da 的肽。李迎楠等^[12] 研究表明, 咸味肽的组分是分子量小于 1000 Da 的短肽。因此, 此酶解条件下制备的小麦面筋蛋白咸味酶解液可以为后续深入研究小麦咸味肽奠定基础。

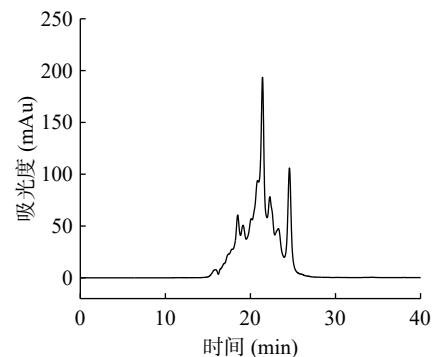


图 9 酶解产物色谱图

Fig.9 Chromatogram of enzymolysis products

表 5 小麦面筋蛋白酶解产物的肽分子量分布

Table 5 The molecular weight distribution of peptides from WG hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis

分子量范围(Da)	占比(%)
>5000	1.77±0.07
3000~5000	6.16±0.10
1000~3000	13.74±0.19
<1000	78.33±0.17

3 结论

本实验通过单因素实验研究组合酶酶解小麦面筋蛋白水解度以及咸味感官评分, 再通过响应面设计优化出酶解小麦面筋蛋白最佳工艺为: 底物浓度 4.9%, 酶解温度 55.7 °C, pH7.4, 复合酶添加量 3799 U/g(蛋白)。经实际验证, 在此条件下, 小麦面筋蛋白咸味酶解液水解度和感官评分达到最佳, 分别为 (33.12%±0.45%) 和 (6.47±0.22), 进一步通过电子舌数据分析, 在同等咸度下, 此酶解液可代替约 35% 的食盐。通过分子量分布分析, 酶解液以相对分子量小于 1000 Da 的小分子肽为主, 推测其咸度可能与其小分子多肽含量有关。此研究为咸味肽的开发利用提供了新的渠道, 对于替代高钠调味品有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 黄文垒, 毕继才, 闫寒. 咸味肽研究进展 [J]. 食品工业, 2020, 41(10): 261~264. [HUANG W L, BI J C, YAN H. Advances in salty peptides [J]. The Food Industry, 2020, 41(10): 261~264.]
- [2] 吴定, 高云. 食品营养与卫生保健 [M]. 北京: 中国计量出版社, 2008: 190~191. [WU D, GAO Y. Food nutrition and health care [M]. Beijing: China Metrology Press, 2008: 190~191.]
- [3] SUNG K H. Dietary salt intake and hypertension [J]. Electro-

- lytes & Blood Pressure, 2014, 12(1): 7–18.
- [4] MICKLEBOROUGH T D, FOGARTY A. Dietary sodium intake and asthma: An epidemiological and clinical review[J]. International Journal of Clinical Practice, 2010, 60(12): 1616–1624.
- [5] CAPPUCCIO F P, BEER M, STRAZZULLO P. Population dietary salt reduction and the risk of cardiovascular disease. A scientific statement from the European Salt Action Network[J]. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases, 2019, 29: 107–114.
- [6] PENZ E D, JOFFRES M R, CAMPBELL N R. Reducing dietary sodium and decreases in cardiovascular disease in Canada[J]. Canadian Journal of Cardiology, 2008, 24(6): 497–501.
- [7] AJANI U A, DUNBAR S B, FORD E S, et al. Sodium intake among people with normal and high blood pressure[J]. American Journal of Preventive Medicine, 2005, 29(5): 63–67.
- [8] 广少芬. 成年人膳食钠和膳食钾摄入与抑郁症的关系研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2019. [GUANG S F. Study on the relationship between dietary sodium and potassium intake and depression in adults[D]. Qingdao: Qingdao University, 2019.]
- [9] 张杰, 赵志峰, 郝罗, 等. 减盐策略及低钠盐研究进展[J]. 中国调味品, 2021, 46(3): 179–184. [ZHANG J, ZHAO Z F, HAO L, et al. Salt reduction strategy and research progress of low sodium salt[J]. China Condiment, 2021, 46(3): 179–184.]
- [10] 张雅玮, 郭秀云, 彭增起. 食盐替代物研究进展[J]. 肉类研究, 2011, 25(2): 36–38. [ZHANG Y W, GUO X Y, PENG Z Q. A review of research progress in salt substitutes[J]. Meat Reserch, 2011, 25(2): 36–38.]
- [11] 王欣, 安灿, 陈美龄, 等. 酶水解哈氏仿对虾蛋白提高咸味的研究[J]. 中国调味品, 2017, 42(5): 12–16. [WANG X, AN C, CHEN M L, et al. Enzymatic hydrolysis of *Parapenaeopsis hardwickii*(Miers) protein for enhancing saltiness[J]. China Condiment, 2017, 42(5): 12–16.]
- [12] 李迎楠, 刘文营, 张顺亮, 等. 色谱纯化和质谱分析法研究牛骨源咸味肽[J]. 肉类研究, 2016(3): 25–28. [LI Y N, LIU W Y, ZHANG S L, et al. Separation, purification and analysis of salty peptides derived from bovine bone by chromatography and mass spectrometry[J]. Meat Reserch, 2016(3): 25–28.]
- [13] SCHINDLER A, DUNKEL A, STÄHLER F, et al. Discovery of salt taste enhancing arginyl dipeptides in protein digests and fermented fish sauces by means of a sensomics approach[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(23): 12578–12588.
- [14] 彭增起. 一种多肽食盐替代物及其制备方法: 中国, 201110121195.1[P]. 2011-10-26. [PENG Z Q. A polypeptide salt substitute and its preparation method: China, 201110121195.1 [P]. 2011-10-26.]
- [15] 杨文君, 段杉, 崔春. 豌豆蛋白深度酶解制备咸味肽的研究[J]. 中国调味品, 2021, 46(8): 1–5. [YANG W J, DUAN S, CUI C. Study on preparation of salty peptides by deep enzymatic hydrolysis of pea protein[J]. China Condiment, 2021, 46(8): 1–5.]
- [16] SUETSUNA K, CHEN J R. Isolation and characterization of peptides with antioxidant activity derived from wheat gluten[J]. Food Science and Technology Research, 2002, 8(3): 227–230.
- [17] 周世成. 小麦蛋白抗菌肽的制备及其特性研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2011. [ZHOU S C. The studies on preparation and properties of antimicrobial peptides from wheat gluten[D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2011.]
- [18] ZHANG P, CHANG C, LIU H, et al. Identification of novel angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate by the protease of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 65: 103751.
- [19] 孙媛, 孔祥珍, 华欲飞. 小麦面筋蛋白含半胱氨酸小麦肽的富集与表征[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(19): 64–69. [SUN Y, KONG X Z, HUA Y F. Enrichment and characterization of cysteine-containing peptides in wheat gluten protein[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(19): 64–69.]
- [20] 崔春, 钱杨鹏, 彭晓晓, 等. 谷胱粉发酵液中鲜味肽的分离、鉴定与呈味分析[J]. 现代食品科技, 2015, 31(9): 175–179. [CUI C, QIAN Y P, PENG H H, et al. Isolation, purification, identification, and sensory evaluation of umami peptide in wheat gluten fermentation broth[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(9): 175–179.]
- [21] 刘伯业. 小麦蛋白低苦味肽的制备及其脱苦机理研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017. [LIU B Y. Study on the preparation of low-bitterness peptide powders from gluten and debittering mechanism[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.]
- [22] 刘英丽, 张慧娟, 王静, 等. 酶解花生粕制备抗氧化肽工艺研究[J]. 中国食品学报, 2014, 14(8): 62–68. [LIU Y L, ZHANG H J, WANG J, et al. Study on the preparation of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis of peanut meal[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2014, 14(8): 62–68.]
- [23] 陈瑞霞, 孙思远, 相悦, 等. 以淘汰鸡蛋为原料利用蛋白酶解技术制备咸味增强肽[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(1): 166–171. [CHEN R X, SUN S Y, XIANG Y, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis for rejected hen protein for salt-enhanced peptides preparation[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(1): 166–171.]
- [24] 任娇艳, 史传超, 常博, 等. 核桃蛋白的分离制备及其酶解物的抗氧化特性[J]. 现代食品科技, 2019, 35(3): 118–124. [REN J Y, SHI C C, CHANG B, et al. Separation and preparation of walnut protein and antioxidant properties of its enzymatic hydrolysate[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(3): 118–124.]
- [25] 王金水. 酶解_膜超滤改性小麦面筋蛋白功能特性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2007. [WANG J S. Functional properties of modified wheat gluten by enzymatic hydrolysis-membrane ultrafiltration[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2007.]
- [26] 马诗文, 高云, 代西龙, 等. 碱性蛋白酶解绿豆蛋白制备低聚肽工艺优化[J]. 食品工业, 2019, 40(6): 62–65. [MA S W, GAO Y, DAI X L, et al. Optimization of the preparation of oligopeptides with mung bean protein treated by alcalase protease[J]. Food Industry, 2019, 40(6): 62–65.]
- [27] 李宁, 刘红芝, 刘丽, 等. 中性蛋白酶分步酶解花生分离蛋白制备花生短肽的研究[J]. 中国农业科学, 2013, 46(24): 5237–5247. [LI N, LIU H Z, LIU L, et al. Preparation of peanut oligopeptides from peanut protein isolated by neutral proteinase stepping hydrolysis[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(24): 5237–5247.]

5237–5247.]

- [28] 宁芯, 罗志辉, 墨紫梅, 等. 响应面法优化莜麦蛋白的酶解工艺及酶解物抗氧化活性的研究 [J]. 粮食与饲料工业, 2019(6): 25–29. [NING X, LUO Z H, MO Z M, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis technology of naked oat protein and antioxidant activity of hydrolysates by response surface method [J]. Cereal & Feed Industry, 2019(6): 25–29.]
- [29] SHU G W, SHI X Y, CHEN H, et al. Optimization of goat milk with ACE inhibitory peptides fermented by *Lactobacillus bulgaricus* LB6 using response surface methodology [J]. *Molecules*, 2017, 22(11): 2001.
- [30] YANG J, HUANG J C, ZHU Z S, et al. Investigation of optimal conditions for production of antioxidant peptides from duck blood plasma: Response surface methodology [J]. *Poultry Science*, 2020, 99(12).
- [31] 包怡红, 王銮, 李倩, 等. 响应面法优化酶解红松松仁粕制备抗氧化肽 [J]. *中国酿造*, 2018, 37(7): 150–155. [BAO Y H, WANG L, LI Q, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of *Pinus koraiensis* nut meal to prepare antioxidant peptides by response surface methodology [J]. *China Brewing*, 2018, 37(7): 150–155.]
- [32] 裴斐, 陶虹伶, 蔡丽娟, 等. 响应面试验优化辣木叶多酚超声辅助提取工艺及其抗氧化活性 [J]. *食品科学*, 2016, 37(20): 24–30. [PEI F, TAO H L, CAI L J, et al. Optimization of poly-

phenols from *Moringa oleifera* Lam. leaves by ultrasound-assisted extraction using response surface methodology and their antioxidant activities [J]. *Food Science*, 2016, 37(20): 24–30.]

- [33] KADAM S U, TIWARI B K, SMYTH T J. Optimization of ultrasound assisted extraction of bioactive components from brown seaweed *Ascophyllum nodosum* using response surface methodology [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2015(23): 308–316.

[34] 彭易鑫, 陆旭丽, 代亚萍, 等. 响应面法优化复合酶解制备可口草囊虫胶原蛋白抗氧化肽工艺研究 [J]. *食品工业科技*, 2021, 22(42): 231–240. [PENG Y X, LU X L, DAI Y P, et al. Optimization of the preparation of collagen antioxidant peptides from *Phascolosoma esculenta* by compound enzymatic hydrolysis by response surface methodology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 22(42): 231–240.]

[35] 徐永霞, 曲诗瑶, 赵洪雷, 等. 鲣鱼蒸煮液及酶解液的风味特性分析 [J]. *现代食品科技*, 2019, 35(12): 267–275. [XU Y X, QU S Y, ZHAO H L, et al. Analysis of flavor characteristics in *en-graulis japonicas* cooking liquid and enzymatic hydrolysates [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2019, 35(12): 267–275.]

[36] LIOE H N, KINJO A, YASUDA S, et al. Taste and chemical characteristics of low molecular weight fractions from *tofuyo*—Japanese fermented soybean curd [J]. *Food Chemistry*, 2018, 252: 265–270.