

基于特征粘度的鳕鱼骨胶原蛋白酶解预测模型*

侯虎 彭喆 苏世伟 陆姣含 李八方

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 青岛 266003)

摘要:以鳕鱼骨为原料制备胶原蛋白并对其酶解,利用人工神经网络建立鳕鱼骨胶原蛋白酶解反应的预测模型。结果显示,胶原蛋白及水解物的粘度随温度的升高而下降,随着胶原蛋白的水解程度加深,肽链长度与分子量减小,特征粘度呈现下降趋势,水解度与特征粘度呈一一映射关系。以水解产物的特征粘度、温度为输入参数,水解度作为输出参数,建立神经网络预测模型。样本值与仿真值的 R^2 值为0.9916,平均相对误差为2.5%,所建网络预测模型性能好、预测精度高。验证试验的相对误差为1.06%~4.32%,实现了鳕鱼骨胶原蛋白酶解反应的仿真预测与监控。

关键词:胶原蛋白 酶解产物 特征粘度 神经网络 预测模型

中图分类号: TS254.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2014)03-0227-05

引言

海洋蛋白质营养安全,且含有多种生物活性序列,如何控制酶解进程获得目标肽成为国内外研究热点。国内外可控酶解的研究主要集中在数学动力学模拟和酶解参数的优化^[1-3]。然而酶解过程是一个相当复杂的过程,易受到外界因素影响,如温度波动、搅拌速率改变等,并不能够保证水解反应符合理想的预期。新的酶解预测理论与技术成为活性肽制备中亟待解决的重要课题。研究发现,胶原蛋白肽的粘度特征可以反映其水解程度,但数学关系不明确^[4-5]。人工神经网络(ANNs)是由大量神经元相互联接而成的自适应非线性动态系统,可以充分逼近任意复杂的非线性关系,有很强的鲁棒性和容错性^[6-7]。刘斌等采用神经网络模型实现了紫菜降压肽工艺优化,并建立最优模型^[8]。另外,Khanmohammadi等以红外光谱作为检测手段,实现了BP-ANNs模型对酸奶中蛋白的快速定量^[9]。

本文以鳕鱼骨胶原蛋白及水解产物的特征粘度、温度为输入参数,通过人工神经网络建立酶解进程的预测模型。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

鳕鱼排由山东东方海洋科技股份有限公司提

供,-20℃贮藏;胰蛋白酶购于广西南宁庞博生物工程有限公司;谷胱甘肽GSH、杆菌酶、胰岛素、细胞色素C、牛血清白蛋白等标准品购于Sigma公司;色谱纯乙腈购于德国Merck公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 主要仪器与设备

BR4i型低温冷冻离心机(法国Jouan公司);SHA-B型双数显水浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司);Agilent 1100型液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);UV-2102PC型紫外分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);PHS-3C型精密酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 鳕鱼骨胶原蛋白及酶解多肽的制备

鳕鱼排流水解冻,采用酶法去除鱼排上碎肉,用0.2 mol/L的EDTA溶液浸泡脱钙,4%盐酸浸泡溶胀16 h,水洗至中性,匀浆,80℃热水提取4 h,4 000 r/min离心10 min,收集上清液,冷冻干燥得到鳕鱼骨胶原蛋白。

将胶原蛋白配成1%溶液,用1 mol/L的NaOH调节pH值至8.0,加入一定量的胰蛋白酶,50℃恒温搅拌,水解至设定时间,沸水浴5 min灭酶活,离心取上清液。

1.3.2 水解度的测定

水解度的测定采用茚三酮比色法^[10],以甘氨酸

收稿日期:2013-04-03 修回日期:2013-05-11

*国家自然科学基金资助项目(30871943)和中国博士后科学基金面上资助项目(2012M511549)

作者简介:侯虎,讲师,博士,主要从事水产胶原蛋白及多肽研究,E-mail:houhu@ouc.edu.cn

通讯作者:李八方,教授,博士生导师,主要从事水产胶原蛋白及多肽研究,E-mail:bfli@ouc.edu.cn

为标准品,利用标准曲线计算水解蛋白液中—NH₂的浓度(μmol/mL),利用凯氏定氮法测定水解液中总氮的含量。水解度(C_{DH})的计算公式为

$$C_{DH} = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\%$$

式中 h ——水解后被裂解肽键的摩尔质量浓度, mmol/g

h_{tot} ——原料蛋白质的肽键的摩尔质量浓度, 取 8.4 mmol/g

1.3.3 旋转粘度的测定

将样品配成不同浓度的溶液,利用 MCR101 流变仪分别测定 10、20、30、40、50、60℃的粘度。采用直径为 50 mm 的平行板测量系统,设定上下探测平行板间距 1 mm,待平行板间完全充满样品溶液,擦去多余溶液,以 200 s⁻¹剪切速率测定。

1.3.4 分子量的测定

胶原蛋白及酶解物的分子量采用凝胶排阻色谱法测定^[11]。色谱柱:TSK GEL G3000PWXL;流动相:乙腈/水/三氟乙酸(体积比 50:50:0.1);流速:0.5 mL/min;柱温:25℃;紫外检测波长 $\lambda = 225$ nm;以 GSH、杆菌酶、胰岛素、细胞色素 C、牛血清白蛋白为分子量标准品。

1.3.5 平均肽链长度

平均肽链长度的计算公式为

$$L = \frac{1}{C_{DH}} = \frac{h_{tot}}{h} \times 100\%$$

1.3.6 胶原蛋白人工神经网络降解预测模型

利用 Matlab 软件 NNT 工具箱中提供的 BP-ANNs 建立预测模型,以输出值与试验值的相对误差来表征所建 ANN 模型的精度。输入层与隐含层之间使用 logsig 传递函数,隐含层与输出层之间使用线性 purelin 函数,网络训练函数采用 trainlm,适应性学习函数采用 LEARN_GDM,性能函数采用 MSE,训练目标误差设为 0.001。通过 51 组样本训练网络模型,当满足目标精度要求时,停止训练。确定训练函数以及各项参数后,以该模型仿真鳕鱼骨胶原蛋白酶解进程。

2 结果与分析

2.1 鳕鱼骨胶原蛋白的分子量与特征粘度分析

鳕鱼骨胶原蛋白的分子量通过凝胶过滤色谱法测定,以保留时间 t 为横坐标,分子量 M_r 的对数值 $\lg M_r$ 为纵坐标作图,得到分子量标准曲线。由图 1 可知,胶原蛋白的出峰时间为 10.98 min,分子量为 63 kDa。如图 2 所示,随着鳕鱼骨胶原蛋白溶液质量浓度增加,其粘度逐渐升高。这是由于质量浓度

增加,胶原蛋白的疏水作用超过排斥作用,胶原蛋白溶液分子内和分子间的氢键作用增强从而引起粘度增加^[12-13]。胶原蛋白的粘度随温度的升高而下降,并且溶液的质量浓度越高,胶原蛋白的粘度随温度的变化幅度越大。这是因为随着温度的升高,胶原蛋白侧链间氢键等各种次级键被削弱或破坏,同时热运动加剧,这些因素导致分子间的引力减弱,故粘度下降^[14]。溶液的 pH 值是影响胶原蛋白粘度的另一因素,但影响较小^[14],在此研究中均为中性条件下测定。

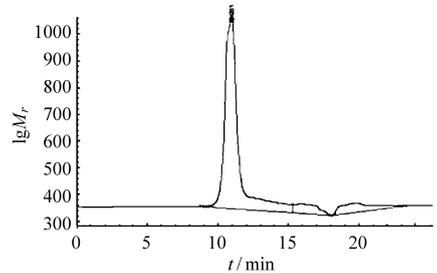


图 1 鳕鱼骨胶原蛋白的凝胶过滤图谱

Fig. 1 Gel permeation chromatography of bone collagen from pollock

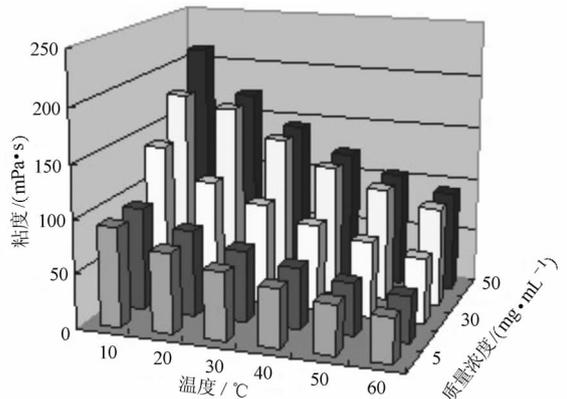


图 2 不同温度与质量浓度下鳕鱼骨胶原蛋白的粘度特性

Fig. 2 Viscosity characteristics of COL under different temperatures and concentrations

2.2 鳕鱼骨胶原蛋白的酶法降解特性

与鳕鱼骨胶原蛋白类似,其水解产物的粘度呈现相似的特征(见表 1)。鳕鱼骨胶原蛋白降解产物的水解度、平均肽链长度、平均分子量呈规律性变化。在一定浓度下,随着加酶量的增加与酶解时间的延长,胶原蛋白的水解度增大,肽链的断裂程度增加,平均肽链长度减小,平均分子量减小,特征粘度呈现下降趋势。在胶原蛋白降解过程中,胶原蛋白大分子转化为多肽小分子,甚至转化成氨基酸,导致胶原蛋白酶解产物粘度的下降。尽管胶原蛋白降解程度与降解产物的特征粘度数学关系不明确,但存在一一映射关系(见图 3)。因此可以通过胶原蛋白降解产物的特征粘度反映其降解情况。

的隐含层节点数^[15]。若隐含层节点数太少,网络性能很差,容错性差。若隐含层节点数太多,容易陷入局部极小值而得不到最优解^[16-18]。在本试验中,当神经元的数目小于4个时,收敛时间长,收敛步数大于1000,而隐含层节点数为4时,收敛速度快,符合本试验要求。

2.3.2 神经网络预测模型的建立

图4与图5分别为胰酶水解进度预测模型的结构图与误差平方和的曲线图,在收敛步数小于4时,随着收敛步数的增加,模型网络的误差平方和急剧减小,当收敛步数大于4时,误差平方和曲线逐渐趋于平缓。在训练步数为52时,误差平方和就降低到设定值以下。

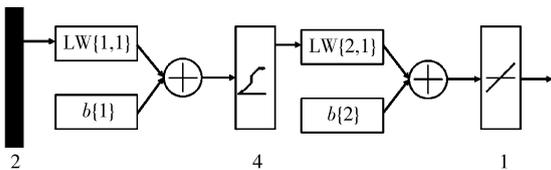


图4 神经网络预测模型结构图

Fig. 4 Structure chart of BP-ANNs

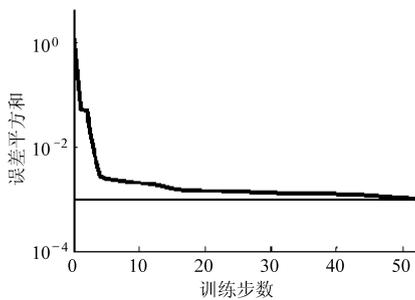


图5 误差平方和曲线

Fig. 5 Curve of error square sum

根据上述参数设定,通过建立的神经网络进行仿真,得到水解度样本的仿真值与仿真误差如图6所示。对样本值与仿真值进行回归分析,神经网络输出值与目标样本值之间误差较小。此神经网络模型的 R^2 值为0.9916,样本值和仿真值一致,模型的仿真度较高。对水解度样本的仿真误差分析可知,误差值小,平均相对误差仅为2.5%。尽管在水解反应之初,有极少量的样本值与仿真值存在一定偏差,但是对于整个复杂的水解过程来说,实现了胶原

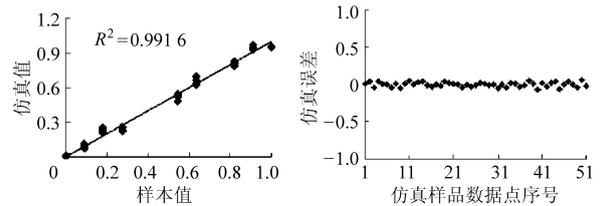


图6 样本的仿真值与仿真误差分析

Fig. 6 Analysis of simulation value and simulation error of samples

蛋白胰酶水解进程的预测。

验证试验的水解度与仿真值如表2所示,水解度验证试验的相对误差为1.06%~4.32%。此模型在一定程度上实现了仿真预测与监控,对预测和控制鲑鱼骨胶原蛋白水解反应有重要意义。

表2 验证样本的试验值与预测值

Tab. 2 Experimental value and simulation value of verification test

温度归一化值	粘度归一化值	水解度试验值的归一化值	水解度拟合值的归一化值	相对误差/%
0.200 0	0.236 7	0.640 7	0.649 3	1.34
0.400 0	0.370 2	0.229 4	0.239 3	4.32
0.600 0	0.306 2	0.272 9	0.270 0	1.06

3 结论

(1) 鲑鱼骨胶原蛋白的分子量为63 kDa,其粘度随温度的升高而下降,随着溶液浓度的增大而升高,且溶液的浓度越高,胶原蛋白的粘度随温度的变化幅度也越大。

(2) 鲑鱼骨胶原蛋白的水解度增加,肽链的断裂程度加强,平均肽链长度减小,平均分子量减小,特征粘度呈现下降趋势。尽管水解度与降解产物的特征粘度数学关系不明确,但存在一一映射关系。

(3) 以温度与特征粘度为输入参数,以水解度为输出参数,建立鲑鱼骨胶原蛋白降解的神经网络预测模型,样本值与仿真值回归分析的 R^2 值为0.9916,平均相对误差为2.5%,验证试验表明模型的相对误差为1.06%~4.32%,实现了鲑鱼骨胶原蛋白酶解反应的仿真预测与监控。

参 考 文 献

- Hou H, Li B, Zhao X, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of Alaska pollock frame for preparing protein hydrolysates with low-bitterness [J]. LWT—Food Science and Technology, 2011, 44(2): 421–428.
- Gauthier S F, Pouliot Y, Saint-Sauveur D. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(11): 1315–1323.
- 刘静波,于志鹏,赵文竹,等. 蛋清肽酶解工艺及血管紧张素转化酶抑制活性研究[J]. 农业机械学报, 2010, 41(7): 147–152.
- Liu Jingbo, Yu Zhipeng, Zhao Wenzhu, et al. Enzymatic hydrolysis technology for ACE-inhibitory peptides from egg white [J].

- Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(7): 147–152. (in Chinese)
- 4 Paulson Jack C, Deatherage F E. Viscosity changes during initial stages of hydrolysis of gelatin by hydrochloric acid and sulfonated polystyrene catalysis [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1955, 56(2): 363–368.
 - 5 郭文字, 张以民, 聂晴, 等. 酸水解胶原蛋白黏度性能变化研究[J]. 皮革科学与工程, 2010, 20(2): 20–22.
 - 6 Schuster A. Robust artificial neural network architectures [J]. International Journal of Computational Intelligence, 2008, 4(2): 88–94.
 - 7 Basheer I A, Hajmeer M. Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application [J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 43(1): 3–31.
 - 8 刘斌, 马海乐, 李树君, 等. 紫菜降压肽酶膜耦合反应制备工艺 RBF 神经网络优化[J]. 农业机械学报, 2010, 41(5): 120–125.
 - Liu Bin, Ma Haile, Li Shujun, et al. Production of ACE inhibitor peptides from porphyra yezoensis in batch membrane reactor based on RBF-ANN [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(5): 120–125. (in Chinese)
 - 9 Khanmohammadi M, Garmarudi A B, Ghasemi K, et al. Artificial neural network for quantitative determination of total protein in yogurt by infrared spectrometry [J]. Microchemical Journal, 2009, 91(1): 47–52.
 - 10 赵新淮, 冯志彪. 蛋白水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, 11: 65–67.
 - Zhao Xinhuai, Feng Zhibiao. The determination of degree of hydrolysis of protein hydrolysates [J]. Food Science, 1994, 11: 65–67. (in Chinese)
 - 11 Hou H, Li B, Zhao X, et al. The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice [J]. Food Chemistry, 2009, 115(3): 945–950.
 - 12 付丽红, 孙彩霞, 邱化玉, 等. 胶原蛋白在不同条件下的黏度变化[J]. 日用化学工业, 2002, 32(6): 29–33.
 - 13 Duan R, Zhang J, Chen L, et al. Study on the properties of gelatins from skin of carp (*Cyprinus carpio*) caught in winter and summer season [J]. Food Hydrocolloids, 2011, 25(3): 368–373.
 - 14 苏秀榕, 孙蓓, 李研妍, 等. 星虫胶原蛋白的生物学特性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(1): 48–52.
 - Su Xiurong, Sun Bei, Li Yanyan, et al. Biological characterization of collagen of sipunculid [J]. Natural Product Research and Development, 2009, 21(1): 48–52. (in Chinese)
 - 15 罗晓曙. 人工神经网络理论·模型·算法与应用[M]. 桂林: 广西师范大学出版社, 2005: 21–27.
 - 16 Basheer I A, Hajmeer M. Artificial neural networks: fundamentals, computing, design, and application [J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 43(1): 3–31.
 - 17 Zhu Q M. A back propagation algorithm to estimate the parameters of non-linear dynamic rational models [J]. Applied Mathematical Modelling, 2003, 27(3): 169–187.
 - 18 郭孝玉, 孙玉军, 王轶夫, 等. 基于改进人工神经网络的植物叶面积测定[J]. 农业机械学报, 2013, 44(2): 200–204, 199.
 - Guo Xiaoyu, Sun Yujun, Wang Yifu, et al. Improved artificial neural network for determination of plant leaf area [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2013, 44(2): 200–204, 199. (in Chinese)

Enzymatic Hydrolysis Prediction Model of Bone Collagen from Pollock Based on Intrinsic Viscosity

Hou Hu Peng Zhe Su Shiwei Lu Jiaohan Li Bafang

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Collagen was extracted from pollock bones and hydrolyzed with trypsin. An enzymatic hydrolysis prediction model of pollock bone collagen was established based on artificial neural network. It shows that the viscosity of collagen and its hydrolysates is decreased with the increasing of temperature. With the hydrolysis degree increasing, the peptide chain length, the molecular weight decrease, and the intrinsic viscosity decrease. In addition, it exhibited a one-to-one mapping relationship between the hydrolysis degree and the intrinsic viscosity. Using the intrinsic viscosity and the temperature as input parameters and the degree of hydrolysis as output parameter, a neural network was trained and simulated by 51 samples. The value of R^2 is 0.9916 and the average relative error is only 2.5%, which indicates a good relevance between the sample actual value and the simulation value. Then three verification tests were performed using the prediction model, and the theoretical value is in agreement with the experimental value. The relative error is in range of 1.06% ~ 4.32%. Therefore, the model can predict and monitor the hydrolysis of pollock bone collagen.

Key words: Collagen Hydrolysates Intrinsic viscosity Artificial neural network Prediction model