

微波酸处理对骨胶原蛋白酶解效果的影响研究

王洁昀¹, 李亚欣¹, 乐国伟^{1,2}, 林云鉴¹, 施用晖^{1,2,*}

(1.江南大学食品学院, 江苏无锡 214122;

2.江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 江苏无锡 214122)

摘要:以骨胶原蛋白为原料,采用微波酸处理辅助酶解制备胶原蛋白肽,以水解度及抗氧化能力为指标确定最佳水解条件。通过比较实验确定最佳微波酸处理条件为:微波功率 510W 作用 270s;通过对酸性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶及碱性蛋白酶水解结果比较,确定中性蛋白酶水解产物的水解度及 ABTS、DPPH 自由基清除率最高;通过单因素实验及正交实验优化中性酶最佳酶解条件为:酶与底物比 10%,底物浓度 4%,反应温度 55℃,pH 7.0。结果表明,与单独酶解相比,微波酸处理能够使骨胶原蛋白酶解时间缩短 1/2,水解度上升 3.2%,产物的 ABTS、DPPH 自由基清除率分别提高 8.7% 和 3.1%。

关键词:骨胶原蛋白,微波酸水解,酶解,水解度,抗氧化

Study on effect of microwave-acid treatment on enzymolysis of collagen

WANG Jie-yun¹, LI Ya-xin¹, LE Guo-wei^{1,2}, LIN Yun-jian¹, SHI Yong-hui^{1,2,*}

(1.School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2.The State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Collagen hydrolysate produced with microwave-acid treatment pretreatment combined with hydrolysis by enzyme. The optimum technology conditions were studied with the degree of hydrolysis and antioxidant activity as index. Through the comparison test, the optimum conditions for microwave treatment were determined as follows: microwave output power 510W, microwave radiation time 270s. Neutral protease was chosen as the best enzyme by the comparison of acid protease, papain, neutral protease and alkaline protease. The optimum hydrolysis technology for enzymolysis with neutral protease was confirmed through the orthogonal test: $[E]/[S] = 10\%$, $[S] = 4\%$, temperature 55℃, pH 7.0. Compared with conventional enzymolysis, the reacting time was shortened by 1/2, degree of hydrolysis increased by 3.2%, ABTS and DPPH radical scavenging activity of hydrolysate were increased by 8.7% and 3.1% respectively.

Key words: collagen; microwave-acid hydrolysis; enzymolysis; degree of hydrolysis; antioxidant activity

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2010)02-0097-04

胶原蛋白(collagen)是哺乳动物体内含量最多的蛋白质^[1],其类型多、结构复杂,目前已发现 7 个亚类、二十余种不同类型的胶原^[2]。胶原蛋白具有共同的特征:由重复出现的 Gly-X-Y 肽段以左手螺旋方式形成 α 肽链,每 3 条 α 肽链以右手螺旋方式形成稳定的三股螺旋结构,即胶原区域^[3]。这些结构特征决定了胶原蛋白具有稳定的性质,不易被人体充分消化吸收。将胶原蛋白水解成为胶原多肽,可大大提高其营养价值和吸收利用率,具有保护消化道粘

膜、促进骨形成、促进皮肤胶原代谢等生理功能。目前,国内外多采用酶法对胶原蛋白进行水解,由于胶原蛋白本身性质限制,水解时间长,能耗大,产率较低^[4-5]。近年来微波辅助反应方法以其快速和节能的特点已经在食品及化学领域中得到广泛的应用,国内外研究表明,使用微波辅助蛋白质水解可有效提高水解效率及产率,与传统化学水解及酶解方法相比具有快速、简便、高效的特点^[6-9],而微波酸处理辅助酶解胶原蛋白鲜有报道。本研究将微波辅助酸水解与传统酶解方法相结合,为胶原蛋白水解效率的提高提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

猪骨胶原蛋白 实验室提供; DPPH、ABTS、酸性蛋白酶、碱性蛋白酶 均购于 Sigma 公司;木瓜蛋白

收稿日期:2009-04-17 * 通讯联系人

作者简介:王洁昀(1984-),女,硕士研究生,研究方向:营养与食品卫生学。

基金项目:863 计划项目(2007AA10Z325);科技部十一五支撑计划项目(2006BAD27)。

酶 庞博生物工程公司;中性蛋白酶 夏盛实业集团公司;其余试剂 均为国产分析纯。

微波炉 松下 NN-S563JF;UV-2102 PCS 型紫外可见分光光度计 尤尼柯(上海)仪器有限公司;Waters 600 高效液相色谱仪 Waters 公司;Delta320 pH Meter 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;85-2 型恒温磁力加热搅拌器 江苏省金坛市通济仪器厂;DL-5 型低速大容量离心机 上海安亭科学仪器厂。

1.2 微波酸处理方法

准确称取适量骨胶原蛋白,加入一定浓度磷酸溶液,半干状态浸润过夜,放入微波炉中,在设定微波功率及时间条件下水解处理。

1.3 胶原蛋白的水解实验流程

微波酸处理→冷却后调解 pH、浓度至酶解条件→加入蛋白酶→控制水解条件进行酶解→100℃ 灭酶 10min→5000r/min 离心 15min 去沉淀→上清液定容→测定水解度、抗氧化活性

1.4 酶解实验条件

1.4.1 蛋白酶的选择 选用四种酶在推荐最适条件下水解,实验条件如表 1 所示。

表 1 各酶水解胶原蛋白的实验条件

酶的名称	酶底比 (%)	底物浓度 (%)	温度 (℃)	pH	酶解时间 (h)
酸性蛋白酶	5	5	55	3.5	3
木瓜蛋白酶	5	5	50	6.0	3
中性蛋白酶	5	5	55	7.0	3
碱性蛋白酶	5	5	55	8.5	3

1.4.2 最佳酶解条件的确定 对选定的最佳蛋白酶水解底物浓度、酶与底物比、水解温度、pH 等因素进行单因素实验确定最优水平,通过正交实验确定最优水平组合。对正交结果进行验证实验,并与常规酶解结果对比,确定最佳水解条件。

1.5 测定方法

水解度(DH)的测定:采用茚三酮比色法^[10];ABTS⁺·清除率的测定:采用分光光度比色法,由 Roberta Re 的方法^[11]改进;DPPH·清除率的测定:采用分光光度比色法^[12];相对分子质量分布测定:采用 HPLC(高效液相色谱)法。

2 结果与分析

2.1 微波酸处理条件对酶解效果影响

微波酸处理过程中不同微波功率和微波作用时间对最终酶解产物水解度的影响见表 2。

表 2 微波功率及作用时间与产物水解度的关系

微波功率 (W)	作用时间(s)			
	210	240	270	300
330	12.8	15.3	16.7	17.0
510	15.9	17.4	19.1	18.4
700	16.1	16.5	17.7	*

注:*表示原料焦糊。

微波酸处理实际是一种微波预水解的过程,如表 2,最终酶解产物的水解度大小总体上与预处理时的作用时间和微波辐射强度成正比,而在作用时间过长(如 300s)以及功率过大(如 700W)时有水解度

下降甚至蛋白焦糊的情况。这是由于随着微波辐射强度的提高,体系内分子碰撞加剧、热量迅速上升,加快了蛋白水解速率;而当微波辐射强度超出一定范围,体系热量上升过快,导致胶原蛋白结构受损甚至焦糊。因此,确定微波功率 510W、作用 270s 为微波酸处理条件。

2.2 蛋白酶的选择

在相同底物浓度、酶底比、水解时间下反应,以水解度、ABTS⁺·和 DPPH·清除率为判断指标,如图 1 所示,在四种蛋白酶中水解效果最好的是中性蛋白酶,因而将中性蛋白酶定为最佳用酶。

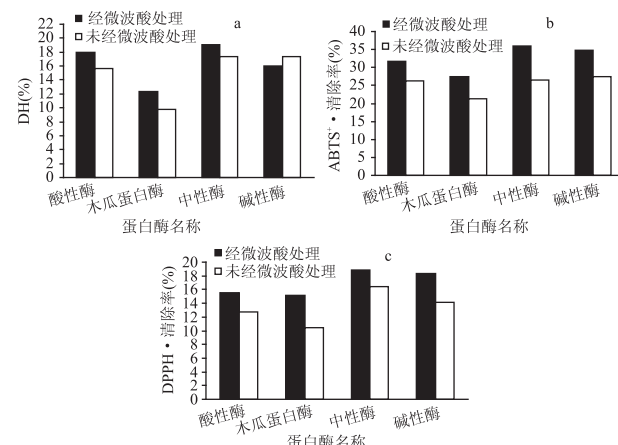


图 1 各酶解产物水解度及自由基清除率比较

2.3 酶解最佳工艺条件的确定

2.3.1 酶与底物比([E]/[S])对酶解效果的影响

控制酶解条件为:底物浓度 5%,反应温度 55℃,pH7.0,时间 3h。图 2 表明,随着酶浓度的增加,水解度在酶与底物比 2%~6% 范围内上升明显,6% 后由于酶的数量达到饱和,此时酶的增加对水解速度影响不大,因而水解度变化趋于缓慢。考虑到酶的利用率与生产成本问题,将酶与底物比的最适范围定为 6%~10%。

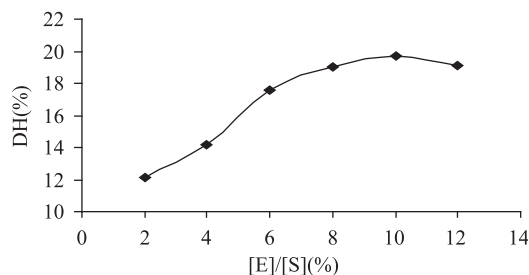


图 2 酶与底物比对酶解效果的影响

2.3.2 底物浓度([S])对酶解效果的影响

控制酶解条件为:酶与底物比 5%,反应温度 55℃,pH7.0,时间 3h。图 3 表明,底物浓度为 4% 时水解度达到最高,高于或低于此值均下降。底物浓度过高,体系有效水浓度低,溶液流动性下降,酶与底物发生有效碰撞的几率降低,同时过量的底物遮蔽了酶的作用位点;底物浓度过低,酶浓度随之下降。因此,确定 3%~5% 为反应的最适底物浓度。

2.3.3 温度对酶解效果的影响

控制酶解条件为:酶与底物比 5%,底物浓度 5%,pH7.0,时间 3h。图 4 表明,酶解过程中水解度随温度变化明显。当反应

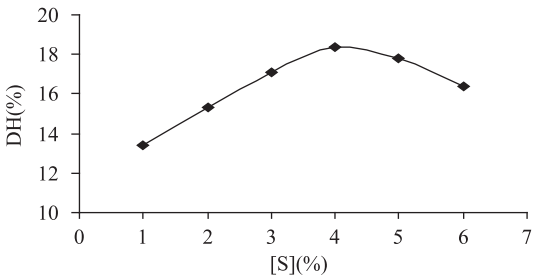


图3 底物浓度对酶解效果的影响

温度从40℃升高到55℃,水解度逐渐升高,55℃时达到最高,60℃时有明显下降。这说明在适宜的温度范围内,酶的活性随着温度上升而逐渐升高,而当温度过高,酶的活性受到抑制,甚至失活。因此,酶解温度取值范围为45~55℃。

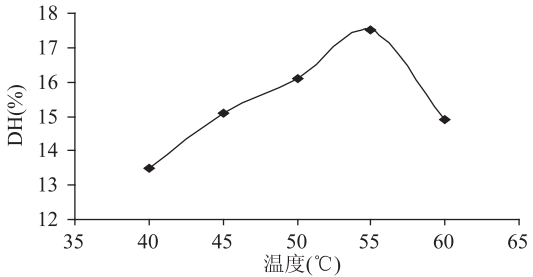


图4 温度对酶解效果的影响

2.3.4 pH对酶解效果的影响 控制酶解条件为:酶与底物比5%,底物浓度5%,反应温度55℃,时间3h。图5表明,当反应体系pH控制在7.0时的水解度最高,pH6.0~7.0范围内水解度迅速上升,大于7.0后逐渐下降。酶活性部位的可解离基团需要在特定的pH范围内才能充分解离,此时酶的构象处于活性状态。底物蛋白的构象在不同的pH下也有不同,当pH同时满足酶和底物的需要,才能使酶的活性中心与底物蛋白最大程度地结合。因此,确定反应pH范围为6.5~7.5。

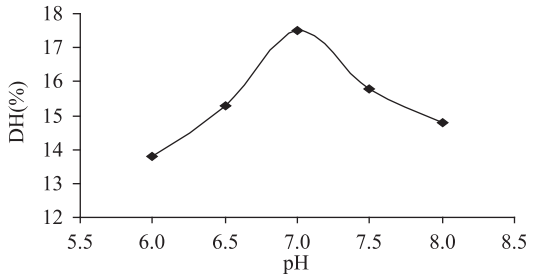


图5 pH对酶解效果的影响

2.3.5 酶解最佳工艺条件的确定 由表3结果可知,影响因素的主次顺序为pH>温度>底物浓度>酶与底物比。中性蛋白酶的最佳酶解条件为:酶与底物比10%,底物浓度4%,反应温度55℃,水解液pH7.0。

表3 正交实验因素水平表L₉(3⁴)

水平	因素			
	A 酶底比 (%)	B 底物浓度 (%)	C 温度 (°C)	D pH
1	6	3	45	6.5
2	8	4	50	7.0
3	10	5	55	7.5

表4 正交实验结果

实验号	A	B	C	D	DH(%)
1	1	1	1	1	13.4
2	1	2	2	2	17.8
3	1	3	3	3	17.0
4	2	1	2	3	15.2
5	2	2	3	1	18.4
6	2	3	1	2	17.8
7	3	1	3	2	19.5
8	3	2	1	3	16.8
9	3	3	2	1	15.7
k ₁	16.067	16.033	16.000	15.833	
k ₂	17.133	17.667	16.233	18.367	
k ₃	17.333	16.833	18.300	16.333	
R	1.2660	1.6340	2.300	2.534	
最优水平	A ₃	B ₂	C ₃	D ₂	
主次因素	D>C>B>A				

2.4 最佳水解条件结果验证

骨胶原蛋白分别通过中性酶最优条件微波酸处理酶解(微波功率510W作用270s,酶与底物比10%,底物浓度4%,反应温度55℃,pH7.0)以及相同酶解条件下单独酶解,两种水解方法下的水解度曲线对比如图6所示,3h水解产物水解度、自由基清除率如图7所示,相对分子量分布如图8所示。

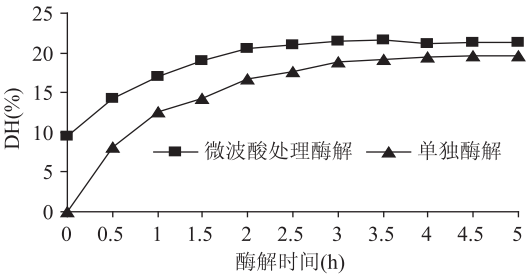


图6 中性酶最优水解条件下水解度曲线对比

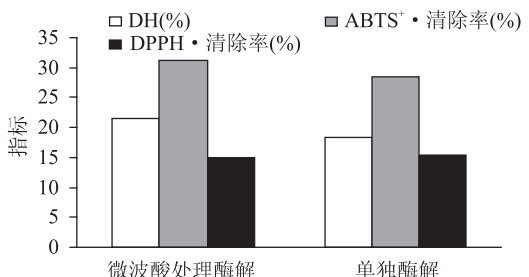


图7 水解度及抗氧化活性对比

由图6可知,经微波酸处理后骨胶原蛋白已得到一定程度的水解,酶解过程中快速接近最高水解度,在水解1.5h时已达到单独酶解3h的水平,反应时间缩短一半,最终水解度高于后者,3h后基本平缓,验证最佳酶解时间为3h。图7结果表明,将胶原蛋白经微波酸处理提高了酶解产物的水解度及自由基清除率,水解度上升3.2%,ABTS⁺·、DPPH·清除率分别提高8.7%和3.1%。图8表明,两者的分子量分布趋势相似,8a图的分布范围较宽,分子量在500~1000的肽约占17%,500以下占65%以上;8b图中分子量在500~1000的肽约占22%,500以下约占58%,这与水解度差异相对应。由此说明,微波酸处理对提高骨胶原蛋白的酶解效率及酶解产物的抗氧化活性效果明显。

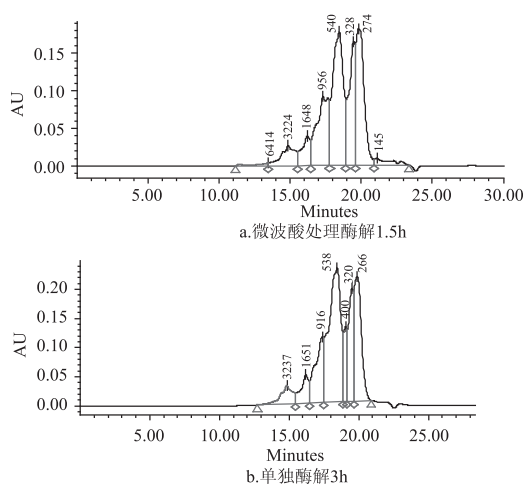


图8 分子量分布对比

胶原蛋白的水解是分子中肽键受到破坏而断裂,生成中间产物最终形成肽的过程。微波酸处理是一种预水解过程,酸可攻击肽键使其断裂,蛋白质固有频率(5×10^{10} Hz)恰好处于微波频率($3 \times 10^8 \sim 3 \times 10^{11}$ Hz)范围,蛋白质分子交变在电磁场中振动,每个分子的正负电荷都受到交变电场力的作用,造成蛋白质部分降解或空间结构改变,并提高了酸作用的效率并增加了之后加入的酶的作用靶部位,大大缩短水解时间。中性蛋白酶属于外切蛋白酶,它的水解部位是亮氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸等疏水大分子氨基酸的氨基。多种作用方式结合提高了肽键断裂的效率。而肽链片段的氨基酸组成、数量、序列直接影响产物的抗氧化活性,不同水解方式得到产物的抗氧化活性不同,微波酸处理辅助酶解的作用方式提高了具有抗氧化活性多肽的产率。

3 结论

3.1 微波酸处理对胶原蛋白酶解效率的提高具有十分显著的作用,与常规单独酶解方法相比,反应时间缩短一半;相同酶解时间下,水解度及 ABTS⁺·、DPPH·清除率均高于单独酶解。

3.2 微波酸处理条件对酶解结果有明显影响,通过比较实验确定最佳微波酸处理条件为:微波功率 510W,处理时间 270s。

3.3 中性蛋白酶的酶解效果优于酸性蛋白酶、碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶,其最佳水解条件为:酶与底物比 10%,底物浓度 4%,控制反应温度 55℃,pH 7.0。产物水解度为 20.5%。各因素影响顺序为 pH > 温度

> 底物浓度 > 酶与底物比。

3.4 胶原蛋白经微波酸处理辅助酶解所得水解产物中分子量在 500~1000 的肽约占 17%,500 以下占 65% 以上,具体组成还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Gelse K, Paschl E, Aigner T. Collagens—structure, function, and biosynthesis [J]. Advanced Drug Delivery, 2003, 55: 1531–1546.
- [2] Hans P B, Nicholas P M, Janice M D. Thermal stability and folding of the collagen triple helix and the effects of mutations in osteogenesis imperfecta on the triple helix of type I collagen [J]. American Journal of Medical Genetics, 1993, 45(2): 152–162.
- [3] Takaki K. Designed triple-helical peptides as tools for collagen biochemistry and matrix engineering [J]. Philosophical Transactions of the Royal Society, 2007, 362: 1281–1291.
- [4] 付刚, 李诚, 马长中, 等. 猪骨抗氧化肽的酶解制备研究 [J]. 现代食品科技, 2006, 22(3): 136–138.
- [5] 李少华, 赵驻军, 管景颖. 木瓜蛋白酶水解猪皮制备胶原多肽的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(05): 195–198.
- [6] Shinyashiki N, Asaka N, Mashimo S, et al. Microwave dielectric study on hydration of moist collagen [J]. Biopolymers, 1990, 29(8–9): 1185–1191.
- [7] L Hua, TY Low, SK Sze. Microwave-assisted specific chemical digestion for rapid protein identification [J]. Proteomics, 2006(6): 586–591.
- [8] Hongying Z, Sandra L M, Liang L. Microwave-assisted acid hydrolysis of proteins combined with liquid chromatography MALDI MS/MS for protein identification [J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005, 16(4): 471–481.
- [9] B N Pramanik, U A Mirza, Y H Ing, et al. Microwave-enhanced enzyme reaction for protein mapping by mass spectrometry: A new approach to protein digestion in minutes [J]. Protein Science, 2002, 11(11): 2676–2687.
- [10] 郭兴凤. 蛋白质水解度的测定 [J]. 中国油脂, 2000, 25(6): 176–177.
- [11] R Robert, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. Free Radical Biology & Medicine, 1999, 26(9–10): 1231–1237.
- [12] 邹磊, 汪立君, 程永强. 加工工艺对豆豉抗氧化能力的影响 [J]. 食品科学, 2006, 27(8): 174–177.

processing [J]. Cereal Chemistry, 1995, 72: 564–567.

[16] Yin S W, Tang C H, Cao J S, et al. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate [J]. Food Chemistry, 2008, 106: 1004–1013.

[17] Grosch W, Wieser H. Redox reactions in wheat dough as affected by ascorbic acid [J]. Journal of Cereal Science, 1999, 29: 1–16.

[18] 周秀琴. 日本天然调味料开发现状 [J]. 中国调味品, 1993(11): 1–8.

(上接第 96 页)

[12] 大连轻工业学院, 等. 食品分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 223.

[13] Lioe H N, Apriyanton A, Takara K, et al. Low Molecular Weight Compounds Responsible for Savory Taste of Indonesian Soy Sauce [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 5950–5956.

[14] 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: 华南理工大学博士论文, 2007.

[15] Ummadi P, Chenoweth W L, Ng P K W. Changes in solubility and distribution of semolina proteins due to extrusion