

酶水解猪血红蛋白过程 蛋白质降解和氨基酸释放

郭善广¹, 赵谋明², 蒋爱民^{1,*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642;

2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 采用商业酶(Pancreatin, Protamex, Pancreatin/Protamex) 水解肉品加工业的副产品猪血血红蛋白。水解后的血红蛋白产物采用凝胶过滤色谱(GPC)及 HPLC 分析水解过程蛋白质降解及氨基酸释放规律。Protamex 水解产物具有宽泛的分子量分布且含有大量的大分子肽(>15kDa); Pancreatin 水解产物同样具有宽泛的分子量分布, 但含有大量的小分子肽(<5kDa)。氨基酸组成分析结果表明, Pancreatin 酶和 Protamex 酶均对疏水性氨基酸有较强的作用能力, 而且这两种酶的作用位点有互补效应。Pancreatin/Protamex 水解产物具有最为复杂的分子量分布图谱, 在酶解 24h 后, 水解得到最高的蛋白质回收率为 92.34%。在 Pancreatin/Protamex 水解后期, 产物中的肽尤其是大分子肽(>15kDa) 和含有较多疏水性氨基酸的肽容易聚集沉降, 导致蛋白质回收率的降低。

关键词: 猪血红蛋白, 酶解, 分子量分布, 氨基酸组成, 蛋白质回收率

Protein degradation and amino acid release in the processing of hydrolysis of porcine hemoglobin concentrate

GUO Shan-guang¹, ZHAO Mou-ming², JIANG Ai-min^{1,*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou, 510640, China)

Abstract: Porcine blood hemoglobin, a by-product from meat process industry, was hydrolyzed by using commercial enzymes (Pancreatin, Protamex and Pancreatin/Protamex). After the enzymic procedure the hydrolysates were determined by gel filtration chromatography and HPLC to characterize for protein degradation, amino acid release. Protamex hydrolysates had broad molecular mass distribution and highest proportion big peptides (>15kDa); Pancreatin hydrolysates had broad molecular mass distribution and high proportion small peptides (<5kDa). Amino acid composition analysis demonstrated that two enzymes had specificity for terminal a variety of hydrophobic amino acids and that terminal domain of Protamex was complementary that of Pancreatin. Pancreatin/Protamex hydrolysates had the most complicated molecular mass profile and highest protein recovery 92.34% after 24h hydrolysis. During Pancreatin/Protamex extensive hydrolysis later time, peptides especially for high molecular weight (>15kDa) and for containing more hydrophobic amino acids, aggregated becoming to insoluble, decreased protein recovery (PR).

Key words: porcine blood hemoglobin; hydrolysis; molecular mass distribution; amino acid composition; protein recovery

中图分类号: TS251.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)05-0162-05

将畜产品加工副产物血液中的血红蛋白酶解回收可溶蛋白、肽和氨基酸^[1-3], 已取得了一定的进展, 蛋白质回收率可以达到 70%~80%^[2,3]。但血红蛋白在酶解过程中经常会产生苦味, 限制了血红蛋白酶

解产物在食品中的规模化应用^[4]。本文的前期工作采用组合(复合)酶同步水解血红蛋白, 得到了高回收率且无苦味的酶解产物^[5,6], 为血红蛋白的规模化应用奠定了一定的基础。为了深入研究血红蛋白在这一酶解过程中的降解机制、拓展同类低值蛋白相关酶解技术应用范围和研究视野, 进一步研究血红蛋白在复合酶同步水解过程中的蛋白质降解和氨基酸释放规律是非常有必要的。目前有很多报道采用 pH-Stat 法并利用经验公式研究了多种蛋白质^[7-10]的酶解动力学, 这一方法主要依靠水解度作为检测

收稿日期: 2008-09-11 * 通讯联系人

作者简介: 郭善广(1974-), 男, 讲师, 研究方向: 畜禽产品加工与质量控制。

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2006BAD05A03); 广东省企业技术创新项目(2006)。

表1 蛋白酶水解血红蛋白的实验条件

蛋白酶	实验参数				
	pH	温度(℃)	加酶量(%)	水料比	时间(h)
Protamex	7	50	0.20	2/1	24
Pancreatin	8	50	0.20	1/1	24
Pancreatin/Protamex(3/1,w/w)	7.3	50.5	0.20	1.4/1	4、8、……48

注:加酶量:酶的质量/血红细胞(w/w)的百分比;水料比:水/血红蛋白(w/w)。

指标,因而难以评价或预测酶解过程中的小分子肽类及氨基酸释放状况,以及这些产物对水解过程所产生的影响。本文采用凝胶色谱(GPC)结合氨基酸分析,对组合酶同步水解猪血红蛋白的蛋白质降解及氨基酸释放规律作了较为系统的研究,试图从不同角度评价分析复杂的酶解过程,期望能为改进蛋白质酶解过程、提高生产效率起到一定的指导作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜猪血 广州天河肉联厂;胰酶(Pancreatin, Pan) 杭州三叶生物化工厂,活力 3000U/g; Protamex™(Pro) 诺维信公司;硫酸奎宁 上海齐奥化工科技有限公司;其他试剂 均为国产分析纯。

APV-1000 均质机 丹麦 APV 公司;KDN-2C 型定氮仪 上海纤检仪器有限公司;GL-21M 高速冷冻离心机 长沙湘仪离心机仪器有限公司;高效液相色谱仪(PICO.TAG 氨基酸分析柱) 美国 Waters 公司;Amersham 蛋白质分析纯化系统(Superdex™ Peptide HR 10/300 GL 玻璃柱) 美国通用公司;PHS-3C 精密 pH 计 上海雷磁仪器厂。

1.2 实验方法

1.2.1 血红蛋白(HC)的制备 在新鲜血液中加入 0.33%(w/v)的柠檬酸钠,以防止血液凝结,然后将其在 5℃、3000×g 下离心分离 20min,倾去上清液,得到血红细胞,其蛋白质含量为 33.12±2.57g/100g(w/w),随即采用均质机在 60MPa 压力下破碎血红细胞,使血红蛋白溶出,冷冻备用。

1.2.2 酶解实验 实验前将 HC 在 5℃下解冻,采用 2mol/L NaOH 或 2mol/L HCl 调整 pH,加蒸馏水调整水料比,恒温水浴振摇,待温度达到要求时加酶计时,酶解结束时 100℃水浴 5min 灭酶,同时做空白实验(未加酶)。

1.2.3 蛋白质回收率(PR)的计算 灭酶后的酶解液冷却至室温后,3000×g 离心 20min 得到上清液,弃渣,采用凯氏定氮法分别测定上清液含氮量和原料含氮量。PR 按下式计算:PR(%)=(上清液总 N/原料总 N)×100%

1.2.4 酶解产物分析 灭酶后的酶解液冷却至室温后,3000×g 离心 20min 得到上清液,弃渣,采用凝胶色谱法测定上清液的肽分子量。凝胶色谱的条件为:洗脱液为 0.25mol/L NaCl、pH 7.2 磷酸盐缓冲液,流速 0.5mL/min,检测波长为 214nm。原料及酶解上清液氨基酸组成采用高效液相色谱(HPLC)进行分析,即样品酸解后用 HPLC 分析;色氨酸的分析则是将样品碱解后再用 HPLC 分析。氨基酸检测条件为:美国 Waters 高效液相色谱,PICO.TAG 氨基酸分析

柱,温度为 38℃,流速为 1mL/min,检测波长为 254nm。

2 结果与分析

2.1 Pan 和 Pro 分别水解猪血红蛋白过程中蛋白质降解和氨基酸释放分析

将血红蛋白分别用 Pan 和 Pro 两种酶水解 24h,酶解产物的不同分子量段的分布见表 2,相应酶解产物的凝胶色谱图见图 1a 和图 1b。产物在 280nm 处的色谱图仅显示了 3 个主要的峰,而 214nm 的色谱图显示了多个较为复杂的峰,尤其是在保留体积 12~25mL 这一区间最为复杂。导致这种结果的原因是蛋白质中的酪氨酸和色氨酸在 280nm 有特异性吸收,而这两种氨基酸的含量又比较低的缘故;酶解产物肽(肽键)在 214nm 处的吸收就比较普遍,造就了较为复杂和全面的肽分布谱图。凝胶色谱流出产物的检测一般多使用这两个波长^[11],有时 214nm 图谱中的肽峰在 280nm 色谱图中是无法看到的,这说明在这一酶解产物中的酪氨酸和/或色氨酸的含量都较低。Pro 酶水解产物中分子量 >15kDa 的部分占回收产物的比例非常高,达到了 40.84%,但是它的 PR 很低,只有 25.14%。这说明 Pro 酶对血红蛋白的降解作用比较差,或者说底物血红蛋白对其敏感性比较弱,酶只能零散的作用于血红蛋白的某几个位点,导致产物中大分子肽含量较高。大分子肽的性质不稳定,容易与其它小分子肽或自身结合发生沉降,而且有些大分子肽自身的溶解性就很差,导致了大量蛋白质难以回收。从这一结果来看,作为内切酶的 Pro 在酶解血红蛋白时呈现出更接近于外切酶的性质。相比而言,Pan 由于其组成的原因显得作用位点更为广泛,分子量小于 5kDa 的部分明显高于 Pro 酶,达到了 88.09%,分子量 >5kDa 的部分只有 11.91%,即使如此,仍有 37.66%的底物对其敏感性较弱,PR 也只有 62.34%,因此仍有必要采用组合酶进行酶解,来提高其蛋白质回收率。此外,结合图 1a,从图 1b 中可清楚地观察到 Pan 的酶解产物中保留体积在 15~19mL 的肽段所含酪氨酸和色氨酸的量极低;而 Pro 酶的产物在这一区间仅含有很少量的肽,可以推测组合酶在这一区间的产物主要是 Pan 作用的结果。

表2 按照凝胶色谱计算的不同分子量段 Pan 和 Pro 酶解产物的含量(214nm)

酶	>15kDa (%)	15~5kDa (%)	5~1kDa (%)	<1kDa (%)	PR (%)
Pan	11.91	0	23.36	64.73	62.34
Pro	40.84	5.61	6.51	47.04	25.14

表3 给出了 Pan 和 Pro 两种单酶水解产物中肽

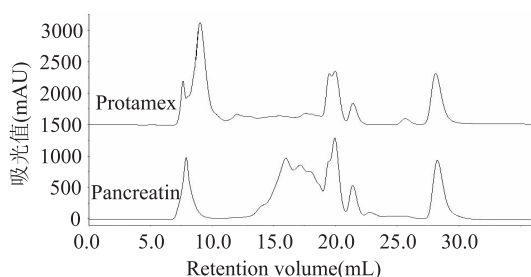


图 1a Pan 和 Pro 酶水解血红蛋白产物的凝胶色谱图(214nm)

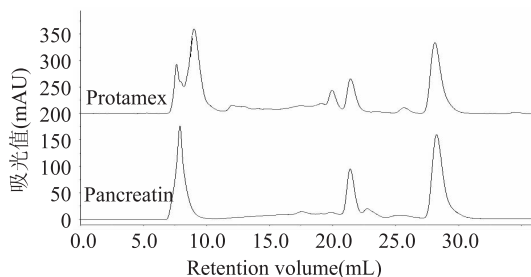


图 1b Pan 和 Pro 酶水解血红蛋白产物的凝胶色谱图(280nm)

氨基酸和游离氨基酸的回收率,由二者游离氨基酸的回收率来看,它们对疏水性氨基酸的敏感性强于亲水性氨基酸,这有利于降低酶解产物的苦味。两种酶对包含 Tyr、Met 和 Phe 的肽链均有较强的作用,而 Pan 具有更强的广谱性,且作用强度更为剧烈;Pro 的广谱性则较差,但它对 Ile 的敏感性却强于 Pan。对于大部分亲水性氨基酸,Pan 的作用力要强于 Pro;但 Pan 对于 Arg 没有明显作用,而 Pro 对 Arg 作用力较强;二者对于 Lys 均有很强作用。Pro 对底物的作用与 Pan 有一定的互补效应,这有利于增强二者复合酶的水解效果,从而进一步提高蛋白质回收率。

表 3 Pan 和 Pro 酶水解产物中肽基氨基酸(PAA)和游离氨基酸(FAA)的回收率

氨基酸及其性质		氨基酸回收率(%)			
		Pan		Pro	
		PAA	FAA	PAA	FAA
疏水性氨基酸	甘氨酸	34.65	3.38	20.72	4.36
	丙氨酸	25.94	6.27	17.89	4.88
	脯氨酸	23.59	4.7	15.02	3.52
	酪氨酸	22.46	19.59	27.9	10.71
	缬氨酸	32.83	8.74	20.21	5
	蛋氨酸	21.78	25.52	21.77	13.71
	半胱氨酸	10.88	14.8	23.7	5.89
	异亮氨酸	38.69	6.79	47.35	8.71
	亮氨酸	27.03	12.37	20.84	5.47
	苯丙氨酸	23.6	16.62	21.62	8.49
亲水性氨基酸	色氨酸	23.81	29.56	27.42	5.82
	天冬氨酸	28.14	2.93	14.95	0.19
	谷氨酸	29.48	3.02	15.31	0.39
	丝氨酸	28.61	2.65	18.03	1.16
	组氨酸	30.3	7.89	20.72	5.03
	精氨酸	22.47	0	20.12	2.14
	苏氨酸	24.15	7.43	20.53	5.83
	赖氨酸	20.89	27.99	33.35	11.85

2.2 Pan/Pro 组合酶水解猪血红蛋白过程蛋白质降解和氨基酸释放分析

2.2.1 酶解过程中血红蛋白的降解及肽分子量的分布 图 2a 和图 2b 分别显示了检测波长在 214nm 和 280nm 处不同酶解时间段(4、8、16、24、32、48h) Pan/Pro 组合酶水解血红蛋白所得产物的分子量分布。在图 2b 中,4h 和 8h 酶解产物在 12mL 和 14mL 处均有小峰出现,在某种程度上可以认为氢键(以及其它不属于共价键的弱键)在酶解体系中会因聚合作用影响产物的分子量^[12],随着酶解的进行这些弱键易遭受破坏,因此在图 2b 其它酶解物图谱中这两个小峰消失了;在图 2a 中虽然不太明显,但也可以观察到这一现象。Pan 是源于动物的天然混合酶制剂,因自然选择的结果其自身的酶系之间会有一定的惰性难以相互自溶,而且水解方面的协同作用也是其先天优势。因此,以 Pan 作为主体酶筛选其他酶制剂协同水解血红蛋白自然就是一个比较好的选择。值得注意的是在 Pan/Pro 水解过程的后期(24h 后),分子量 >15kDa 的肽峰高有明显的降低,这说明大分子肽容易聚集沉降,降低了蛋白质回收率。而由氨基酸分析和酶解产物的分子量分布可知,Pro 对血红蛋白的作用位点与 Pan 有一定的互补作用,可将血红蛋白深度水解,从而提高了回收率。

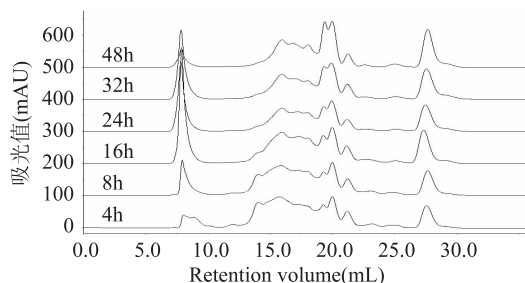


图 2a Pan/Pro 酶解血红蛋白不同水解时间产物的凝胶色谱图(214nm)

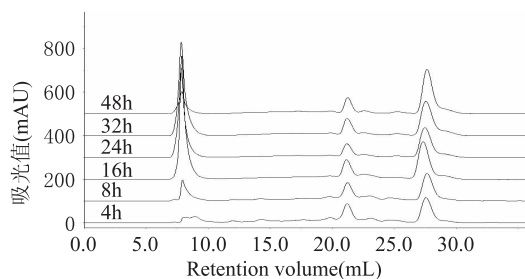


图 2b Pan/Pro 酶解血红蛋白不同水解时间产物的凝胶色谱图(280nm)

2.2.2 酶解过程中游离氨基酸(FAA)的释放及肽基氨基酸(PAA)的组成 图 3a 和 3b 分别显示了疏水性 FAA 和亲水性 FAA 在 Pan/Pro 组合酶水解过程中的变化趋势。大部分游离氨基酸的变化趋势基本呈增加趋势,但疏水性游离氨基酸半胱氨酸、异亮氨酸的变化不稳定,呈下降态势;亲水性氨基酸中丝氨酸和精氨酸在酶解过程中有先增加后下降的趋势。丝氨酸和精氨酸易于沉降,可能与它们自身的性质有关,丝氨酸所含羟基具有一级和二级醇的弱离子化特性,尽管在水溶液中不显示离子化,但这个醇可以参与很多酶的活性部位反应,就像已被离子化一样^[13];而精氨酸是碱性最强的氨基酸,pI 值是 10.76,

在此酶解体系中 ($\text{pH} < 9.0$) 呈离子化态, 接近丝氨酸的特性, 从而易于吸附沉降。疏水性氨基酸的沉降可能主要是其与酶解产物中肽的结合而产生的沉降。

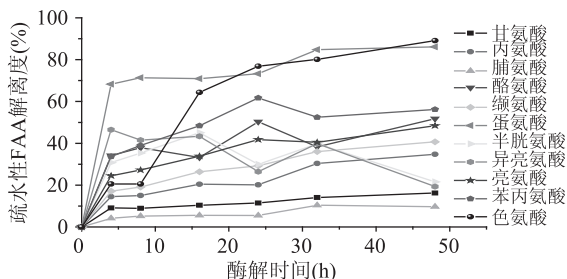


图3a 疏水性游离氨基酸(FAA)在Pan/Pro酶解过程中的释放

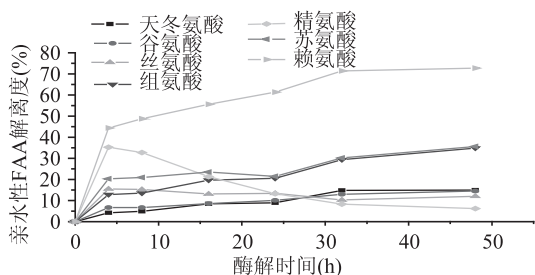


图3b 亲水性游离氨基酸(FAA)在Pan/Pro酶解过程中的释放

观察图4a和4b中疏水性PAA和亲水性PAA的变化, PAA在水解后期均会聚合沉降, 而且疏水性氨基酸组成的肽较之亲水性氨基酸组成的肽更易于发生聚合沉降, 这将导致PR在水解后期下降。这是由于聚合过程中的驱动力就是形成不溶物质时体系中疏水性物质浓度的降低^[14]。因此实验中Pancreatin/Protamex水解血红蛋白在24h时蛋白质回收率最高, 达到了92.34%。在酶解过程中, 肽基氨基酸聚集沉降的时间差异较大, 色氨酸在4h后即开始沉降, 而大部分氨基酸在16h后开始沉降, 亦有在24h(半胱氨酸)、32h(甘氨酸、酪氨酸、苏氨酸)后才开始沉降的, 这表明复合酶对这些氨基酸残基的作用有明显的差异。

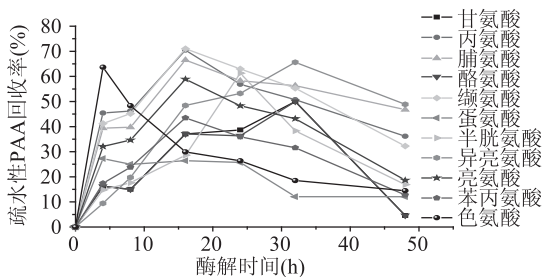


图4a 疏水性肽基氨基酸(PAA)在Pan/Pro酶解过程中的回收率

3 结论

本文采用凝胶色谱(GPC)结合氨基酸分析, 对组合酶水解猪血红蛋白的蛋白质降解及氨基释放规律作了比较详细的研究, 主要研究结论如下:

Pro酶对血红蛋白的降解作用比较差, 或者说底物血红蛋白对其敏感性比较弱, 酶只能零散的作用于血红蛋白的某几个位点。Pan由于其组成的原因

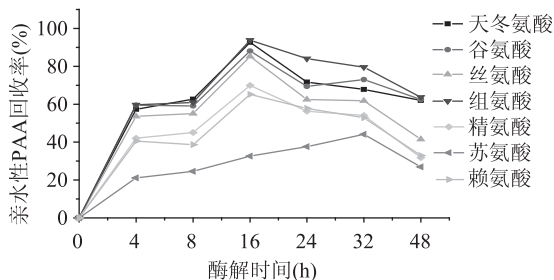


图4b 亲水性肽基氨基酸(PAA)在Pan/Pro酶解过程中的回收率

显得作用位点更为广泛, 但仍有37.66%的底物对其敏感性较弱。Pan和Pro对疏水性氨基酸的敏感性强于亲水性氨基酸, 这有利于降低酶解产物的苦味, 而且二者对包含Tyr、Met和Phe的肽链均有较强的作用。Pro对底物的作用与Pan有明显的互补效应, 这有利于增强二者复合酶的水解效果。

Pan/Pro组合酶水解过程中, 大部分游离氨基酸的变化趋势基本呈增加趋势, 但疏水性游离氨基酸半胱氨酸、异亮氨酸的变化不稳定, 呈下降态势; 亲水性氨基酸中丝氨酸和精氨酸在酶解过程中有先增加后下降的趋势。PAA在水解后期会出现聚合沉降现象, 而且疏水性氨基酸组成的肽较之亲水性氨基酸组成的肽更易于发生聚合沉降, 这将导致PR在水解后期下降。

参考文献:

- [1] Adler-Nissen J. A review of food proteins hydrolysis specific areas [M]. In: Enzymic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publishing Co, Inc, New York, 1986. 97~99.
- [2] Synowiecki J, Jagietka R, Shahidi F. Preparation of hydrolysates from bovine red blood cells and their debittering following plastein reaction [J]. Food Chem, 1996, 57: 435~439.
- [3] Ockerman H W, Hansen C L. Animal by-product and utilization [M]. USA: Technomic Publishing Company, Inc, Lancaster, Pennsylvania, 17604, 2000. 338~343.
- [4] Toldrà M, Elias A, Parés D, et al. Functional properties of a spray-dried porcine red blood cell fraction treated by high hydrostatic pressure [J]. Food Chem, 2004, 88: 461~468.
- [5] 赵谋明, 郭善广, 崔春, 等. 猪血血红蛋白酶解及脱苦 [J]. 吉林大学学报(工学版), 2006, 36(6): 1034~1040.
- [6] Shan - guang Guo, Mou - ming Zhao, Chun Cui, et al. Optimized Nitrogen Recovery and Non-Bitter Hydrolysates from Porcine Hemoglobin [J]. Food Science and Technology Research, 2008, 14: 39~48.
- [7] Guérard F, Dufossé L, Broise D D L, et al. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus Albacares*) wastes using Alcalase [J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2001, 11: 1051~1059.
- [8] Plancken I V D, Delattre M, Indrawati, et al. Kinetic Study on the Changes in the Susceptibility of Egg White Proteins to Enzymatic Hydrolysis Induced by Heat and High Hydrostatic Pressure Pretreatment [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52: 5621~5626.

南丰蜜桔残次果富集培养果酒酵母的研究

杜华英,徐明生*,曾婷婷

(江西农业大学食品科学与工程学院,江西南昌 330045)

摘要:以南丰蜜桔残次果为原料,添加磷酸二氢钾、氯化铵富集培养果酒酵母,对果汁培养基配方和发酵条件进行优化实验,结果表明,果汁培养基最佳配方为:糖含量9%、磷酸二氢钾添加量0.08%、氯化铵添加量0.04%;最适果酒酵母发酵条件为:pH4.5,接种量6%,装液量100mL/250mL,发酵时间16h。

关键词:残次果,果酒酵母,培养基优化

Study on enriching culture ratafia yeast
high with Nanfeng mandarine orange as raw material

DU Hua-ying, XU Ming-sheng*, ZENG Ting-ting

(College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: With the below standard fruit of Nanfeng mandarine orange as main material, ratafia yeast was enriched culture by adding KH_2PO_4 , NH_4Cl . The optimum medium and culture fermentation condition were concluded that sugar content was 9% and KH_2PO_4 recruitment was 0.08%, NH_4Cl recruitment was 0.04%. The optimum culture fermentation conditions were pH4.5 and inoculation amount 6%, media volume 100mL/250mL, fermentation time 16h.

Key words: the below standard fruit; ratafia yeast; culture medium optimization

中图分类号:TS255.1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2009)04-0166-03

南丰蜜桔是江西驰名中外的名优特产,以皮薄、味甜、果香浓郁、无核或少核等为特征,被誉为“贡桔”。南丰蜜桔汁可溶性固形物含量11%~14%,总酸0.3%~0.4%,且含有丰富的维生素和矿物质。南丰蜜桔作为鲜果销售,消费者对鲜果的品质要求很高,一般都会选择品质优良,成熟度高的鲜果购买,这样每到蜜桔丰收时,占柑桔产量10%左右的落果、裂果等残次果就成了果农们最头疼的事。为了让果农摆脱残次果销售难的问题,本文利用南丰蜜桔残次果的果汁为培养基,对果酒酵母高密度培养^[1],拟

消化蜜桔残次果,为果农增收。酵母菌有很高的营养价值,特别是含有较多蛋白质,很多B族维生素、核酸和矿物质,同时也能产生一些保健功能活性物质^[2],将酵母添加到饲料中不仅提高了饲料的营养价值,而且能提高饲料中其他营养物质的利用率,从而使其在饲料工业中得到了广泛的研究与应用。近来国内出现一些以酵母为载体,富集微量元素^[3],如富铁酵母、富硒酵母、富锌酵母等,使之由无机态变成有机态,利于动物机体吸收利用。酵母菌能利用无机氮源或尿素来合成蛋白质,生长速度快,转化效率高,是目前单细胞蛋白的来源^[4],因此,酵母菌可应用于废水处理^[5,6]。总之,酵母菌及其培养物、发酵产物具有广泛的应用前景。

1 材料与方法

收稿日期:2008-07-28 *通讯联系人

作者简介:杜华英(1979-),女,硕士研究生,研究方向:农产品加工及贮藏工程。

[9] Deqing S, Zhimin H, Wei Q. Lumping kinetic study on the process of tryptic hydrolysis of bovine serum albumin[J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 1943~1949.

[10] Márquez M C, Vázquez M A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 1999, 35: 111~117.

[11] Spellman D, Kenny P, O' cuinn G, et al. Aggregation properties of whey protein hydrolysates generated with bacillus licheniformis proteinase activities[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53: 1258~1265.

[12] Fischer M, Gruppen H, Piersma S R, et al. Aggregation of peptides during hydrolysis as a cause of reduced enzymatic extractability of soybean meal proteins[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 4512~4519.

[13] 王希成. 生物化学[M]. 北京:清华大学出版社, 2001. 10~11.

[14] Brownsell V L, Williams R J H, Andrews A T. Application of the plastein reaction to II. Plastein properties[J]. Food Chem, 2001, 72: 337~346.