

苦荞麦蛋白质的酶法水解研究

郭晓娜, 崔颖, 张晖, 姚惠源
(江南大学食品学院, 江苏无锡 214122)

摘要:以苦荞麦蛋白质作为底物,采用碱性蛋白酶(固体)、胰蛋白酶、碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L、高效水解蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶对其进行酶法水解,并对酶解产物的氨基酸组成和相对分子质量进行研究。结果表明,碱性蛋白酶(固体)的酶解程度最高,在酶解 2h 时 DH(水解度)接近 20%,其酶解产物的疏水性氨基酸含量较高,大部分肽链的相对分子质量都低于 1000Da。

关键词:苦荞麦,蛋白质,蛋白酶,水解

Study on enzymatic hydrolysis of tartary buckwheat protein

GUO Xiao-na, CUI Ying, ZHANG Hui, YAO Hui-yuan

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Tartary buckwheat was hydrolyzed respectively with Alkaline protease (solid), Trypsin, Alcalase 2.4L, Highly-effective protease, Neutrase and Papain. Alkaline protease showed the highest hydrolysis degree (DH) (about 20% for 2h) according to the hydrolysis curve. Two different hydrolysis degree of Alkaline hydrolysates were prepared. The amino acid composition and the relative molecular weight distribution were determined. The results showed that the Alkaline hydrolysates contained the higher hydrophobic amino acid and most of the fractions had the lower molecular weight (<1000Da).

Key words: tartary buckwheat; protein; protease; hydrolysis

中图分类号: TS201.2⁺¹

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2009)07-0081-04

荞麦属于蓼科 (*Polygonaceae*), 荞麦属 (*Fagopyrum*), 是双子叶植物。该属有 15 个种, 主要分布在欧亚大陆的温带地区。中国约有 10 个种, 栽培种只有甜荞 (*Fagopyrum esculentum*) 和苦荞 (*Fagopyrum tataricum*), 其余是野生种。中国是荞麦生产大国, 荞麦的分布极其广泛, 其中甜荞主要分布在内蒙古、甘肃、山西等省, 苦荞主要分布在西南地区的云南、四川、贵州等省。尤其是四川省的凉山州是中国苦荞麦分布最集中, 种植面积最大的产区。荞麦蛋白质具有独特的生理功能, 如抑制和降低血液胆固醇^[1]、抑制体内脂肪蓄积^[2]、阻止 7, 12-二甲苯蒽诱发的乳腺癌^[3]、改善便秘^[4]、预防高血压、抑制胆结石的形成^[5]、提高肌肉的抗疲劳功能和抗衰老^[6]等, 国际谷物协会 (ICC) 把荞麦称之为一种新的潜在的颇具开发前景的功能性食品配料。目前, 对于荞麦蛋白质的研究主要集中在提取、结构和功能特性等方面, 对于荞麦蛋白质通过酶法水解制备活性肽

的研究则很少。近年来, 生物小分子抗氧化物质以其分子量小、易吸收、活性高等特点越来越受到人们的青睐, 其中抗氧化肽成为研究的热点之一。目前已从多种食用蛋白酶解液中分离出具有生物活性的抗氧化肽片段, 这些片段从两个氨基酸残基到几十个氨基酸残基不等, 具有抑制生物大分子过氧化或清除体内自由基产物的功效。本文以苦荞麦蛋白质作为底物, 采用碱性蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L、高效水解蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶对其进行酶法水解, 并对酶解产物的氨基酸组成和相对分子质量进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

苦荞粉 购于四川省凉山州小杂粮粉厂; 碱性蛋白酶 (20 万 U/g) 由广西南宁庞博生物工程公司提供; 碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L (2.4AU/g) 由丹麦诺维信生物技术有限公司提供; 胰蛋白酶 (4000U/g)、高效水解蛋白酶 (2000U/g)、中性蛋白酶 (13 万 U/g)、木瓜蛋白酶 (100 万 U/g) 由无锡雪梅酶制剂科技有限公司提供; 其它试剂 均为国产分析纯。

ZOPR-52D 冷冻离心机 日本东京日立 Koki 有限公司; 恒温水浴锅 江苏省医疗器械厂; PHS-3C 精密 pH 计 上海雷磁仪器厂; Agilent 1100 氨基酸分析仪 美国安捷伦公司。

收稿日期: 2008-10-28

作者简介: 郭晓娜 (1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 粮食、油脂及植物蛋白工程。

基金项目: 国家“十一五”支撑计划 (2006BAD05A01); 高等学校博士学科点专项科研基金 (200802951003); 江南大学青年科学基金。

1.2 实验方法

1.2.1 苦荞麦蛋白质的提取 采用传统的碱提酸沉工艺制备苦荞麦蛋白质,工艺流程为:

苦荞麦粉→按照料液比为 1:10 加入去离子水→室温搅拌 30min→用 1.0mol/L NaOH 调节提取液 pH 至 9→35℃ 搅拌 2h,保持溶液 pH 不变→室温,3000r/min,离心 20min→用 1.0mol/L HCl 边搅拌边调节溶液 pH 至 4→4℃ 静置 1h→室温,3000r/min,离心 20min→收集沉淀→用 pH 为 7 的去离子水洗涤 3 次,按上述方法离心收集沉淀→用 50% 的乙醇溶液反复洗涤 1~3 次,按上述方法离心收集沉淀→冷冻干燥→苦荞蛋白

1.2.2 苦荞麦蛋白质的酶法水解

1.2.2.1 酶解产物的制备 用蒸馏水准确配制苦荞麦蛋白悬浊液,放置于恒温酶反应器内,磁力搅拌溶解 20min,温度为各个蛋白酶的最适反应温度,同时用 2mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 为各个蛋白酶的最适 pH,搅拌 20min,加入一定量的蛋白酶,水解反应开始。酶解反应条件按照表 1 所示。水解过程中维持反应溶液的 pH 和温度恒定,用标准 NaOH 溶液维持反应体系的 pH 不变。记录所用 NaOH 溶液的体积及相应时间,绘制酶解曲线。

表 1 各种蛋白酶的酶解反应条件

蛋白酶	pH	温度(℃)
碱性蛋白酶	9	35
碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L	7	60
胰蛋白酶	7.5	45
高效水解蛋白酶	7.5	45
中性蛋白酶	7	35
木瓜蛋白酶	6.5	55

1.2.2.2 水解度测定 采用 pH-stat 法测定反应过程中的水解度^[7]。蛋白质在酶解进程中,肽键水解形成的自由氨基和自由羧基在不同的 pH 下解离状态也不同。当 pH > 6 时,水解蛋白释放出 H⁺ 的量大于被吸收的 H⁺ 的量,这时为了保持反应液的 pH 恒定,就需要向反应液中加碱;当 pH < 5 时,解离的 H⁺ 数量小于被质子化的 H⁺ 数量,这时为了保持反应液的 pH 恒定,就需要向反应液中加酸;当 pH > 6 时,碱液的消耗量与水解的肽键数目成正比,根据消耗碱液的体积和摩尔浓度即可计算出水解度 DH,具体的计算公式如下:

$$DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} = \frac{B \times N_b}{\alpha \times M_p \times h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

公式中:h 为底物蛋白质被水解的肽键的量 (mmol/g 蛋白质);h_{tot} 为底物蛋白质中肽键总数 (mmol/g 蛋白质);B 为标准碱液的消耗量 (mL);N_b 为标准碱液的摩尔浓度;α 为 α-氨基的解离度;M_p 为底物蛋白质的总量 (g)。

1.2.3 苦荞麦蛋白质酶解产物的氨基酸分析 称取样品于 10mL 水解管中,加入一定量 6mol/L 的盐酸溶液进行酸水解,封管后,在 110℃ 水解 24h 以上。切开封管,洗涤定容,采用邻苯二甲醛 OPA 柱前自动衍生^[8],上 Agilent1100 液相色谱仪进行氨基酸组成分析。

1.2.4 苦荞麦蛋白质酶解产物的相对分子质量分

布 采用高效凝胶过滤色谱法测定。称取适量的冷冻干燥后的苦荞蛋白酶解产物,溶解于蒸馏水中,配制成质量浓度为 2mg/mL 的溶液,离心,微孔过滤膜过滤后上 TSKgel2000 色谱柱。色谱条件为:高效液相色谱仪:Waters 600(配 2487 紫外检测器和 M32 工作站);色谱柱:TSKgel2000 SWXL(300mm × 7.8mm);流动相:乙腈/水/三氟乙酸,45/55/0.1(V/V/V);检测:UV220nm;流速:0.5mL/min;柱温:30℃。

以细胞色素 C(MW12500Da)、抑肽酶(MW6500Da)、杆菌酶(MW1450Da)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(MW415Da)、乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(MW189Da)为标准品,做相对分子质量校正曲线,根据所得的相对分子质量与保留时间之间的回归方程测定苦荞蛋白酶解物的相对分子质量分布。

2 结果与讨论

2.1 苦荞麦蛋白质的酶法水解

酶的专一性决定了某种蛋白酶可能只对某些肽键或带有某种基团的氨基酸所形成的肽键作用,不同蛋白酶对苦荞麦蛋白水解所得到的酶解物的种类和生物活性都是不同的。有学者认为水解植物蛋白时使用碱性蛋白酶较合适,特别是碱提酸沉法制备的植物蛋白,碱性蛋白酶对酶解羧端疏水性氨基酸有较强的专一性。在弱碱性及碱性条件下,中性蛋白酶、碱性蛋白酶较易打开带有疏水性侧链的氨基酸前后的肽键,形成含有疏水性氨基酸末端的肽段。因此,本实验分别采用碱性蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L、高效水解蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶对其进行酶法水解,酶解进程曲线如图 1 所示。由图可知,苦荞蛋白在各种蛋白酶作用下,都有不同程度的酶解,其中碱性蛋白酶(固体)和胰蛋白酶的水解速度最快,在酶解 2h 时 DH(水解度)接近 20%;碱性内切蛋白酶 Alcalase 2.4L 和高效水解蛋白酶对苦荞蛋白的酶解程度也相对较高;中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的酶解效果相对较低。此外,随着水解时间的延长,水解度出现先增加后趋于平缓的趋势。在最初 30min 内,水解度增加幅度很快,90min 后水解度的增加幅度变得比较平缓,这主要是由于在水解的最初阶段,蛋白质可断裂的肽键数目很多,敏感性肽键快速断裂,水解速度非常快;但随着水解的进行,可供酶解的肽键减少,酶催化作用趋于完全,水解速度明显变慢。

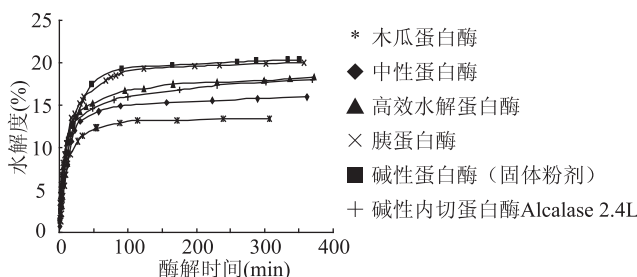


图 1 不同蛋白酶酶解苦荞蛋白的进程曲线

不同的蛋白酶有不同的专一性和不同的作用位点,促使产物多肽的 N-末端和 C-末端氨基酸组成

表2 苦荞蛋白及其两种酶解物的氨基酸组成分析

氨基酸种类	苦荞蛋白的氨基酸 含量(g/100g)	30min 蛋白酶解产物的 氨基酸含量(g/100g)	90min 蛋白酶解产物的 氨基酸含量(g/100g)	FAO/WHO/UNU	
				儿童	成人
必需氨基酸					
缬氨酸 Val	4.83	5.15	5.28	3.5	1.3
蛋氨酸 Met	1.98	2.25	2.05	2.5	1.7
苯丙氨酸 Phe	4.81	4.98	4.86	6.3	1.9
异亮氨酸 Ile	3.73	3.93	3.95	2.8	1.3
亮氨酸 Leu	6.73	6.85	6.74	6.6	1.9
赖氨酸 Lys	5.79	5.56	5.47	5.8	1.6
组氨酸 His	2.52	2.73	2.67	1.9	1.6
苏氨酸 Thr	3.46	3.62	3.51	3.4	0.9
非必需氨基酸					
天冬氨酸 Asp	8.60	9.07	9.02		
谷氨酸 Glu	19.49	19.69	19.72		
丝氨酸 Ser	5.57	5.53	5.37		
甘氨酸 Gly	5.52	5.36	5.21		
精氨酸 Arg	11.38	11.31	11.18		
丙氨酸 Ala	4.14	4.22	4.12		
酪氨酸 Tyr	3.02	3.13	3.02		
半胱氨酸 Cys-s	12.54	13.18	11.70		
脯氨酸 Pro	4.86	2.71	2.98		
疏水性氨基酸 ^a	36.60	35.45	35.19		
不带电极性氨基酸 ^b	24.59	25.46	23.60		
碱性氨基酸 ^c	19.69	19.60	19.32		
酸性氨基酸 ^d	28.09	28.76	28.74		

注：^a 包括 Gly、Ala、Val、Leu、Pro、Met、Phe、Ile；^b 包括 Ser、Thr、Cys、Tyr；^c 包括 Lys、Arg、His；^d 包括 Asp、Glu。

及氨基酸排列顺序各异,这是影响多肽活性的主要因素。水解度大小对肽段长短和游离氨基酸的含量是至关重要的,如果水解度太小,则肽段过长,具有生理活性的一些氨基酸未能断裂而呈现在肽段的N-末端和C-末端,活性就显示不出;如水解度太大,游离氨基酸含量过高,活性则降低。所以,选择合适的蛋白酶和控制适当的水解度是制备苦荞蛋白活性多肽的关键。

2.2 苦荞麦蛋白质酶解产物的氨基酸分析

苦荞麦蛋白酶解产物的生理活性取决于肽段的氨基酸序列和相对分子质量大小,而肽段的氨基酸序列和相对分子质量又取决于所用原料蛋白的氨基酸序列、蛋白酶种类和酶解物的水解度大小。因此,根据原料蛋白的氨基酸组成特点选择合适的蛋白酶,并通过水解度大小控制肽段的相对分子质量,就有可能得到具有确切生理活性的苦荞蛋白肽。根据图1的分析结果,实验选取苦荞蛋白和碱性蛋白酶两种酶解产物(水解度分别为15%和20%)进行氨基酸分析,结果如表2所示。

苦荞蛋白及其两种酶解产物的必需氨基酸含量十分丰富,其中异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、缬氨酸和组氨酸的含量均高于FAO/WHO/UNU成人推荐值,苯丙氨酸的含量稍低于FAO/WHO/UNU儿童推荐值。赖氨酸是我国居民常食用的谷物中的第一限制氨基酸,丰富的赖氨酸对于补充和强化谷物食品中的赖氨酸具有十分重要的意义和实用价值,能弥补我国膳食结构所导致的“赖氨酸缺乏症”的缺陷。另外,从表中可知,苦荞

蛋白及其两种酶解产物的精氨酸含量也非常高,丰富的组氨酸和精氨酸对于婴儿和儿童的健康成长是必需的。

据文献报道,许多氨基酸及其衍生物都具有抗氧化能力,如半胱氨酸、组氨酸、色氨酸、赖氨酸、精氨酸、亮氨酸和缬氨酸等^[9]。另外,一些含疏水性氨基酸的功能短肽也具有明显的抗氧化作用。从表2可知,苦荞蛋白及其酶解产物的疏水性氨基酸如苯丙氨酸、赖氨酸、缬氨酸和亮氨酸的含量都较高。了解苦荞蛋白及其酶解产物中的氨基酸含量,可以为以后开发苦荞麦蛋白抗氧化肽奠定理论基础。

2.3 苦荞麦蛋白质酶解产物的相对分子质量分布

蛋白质被酶解后,生成了很多长度不一的肽片段,因此它们的相对分子质量分布较为宽泛。目前已从食品蛋白酶解产物中分离鉴定出大量的具有各种生物活性的肽,如抗氧化肽、降压肽、免疫肽等。而研究表明,具有抗氧化性的多肽片段由5~16个氨基酸残基组成,分子量分布在600~1700的范围内^[10],因此,了解这两种酶解产物的相对分子质量,可以为以后的超滤、分离和制备苦荞蛋白抗氧化肽奠定基础。

采用高效凝胶过滤色谱测定了碱性蛋白酶两种酶解产物(水解度分别为15%和20%)的相对分子质量,结果如图2A、图2B所示。水解度为15%的碱性蛋白酶酶解产物的相对分子质量分布在4292Da以下,其中,相对分子质量为4292Da和2019Da的组分所占的比例很少,所占比例分别为1.25%和5.43%,大部分肽链的相对分子质量低于1000Da。

水解度为 20% 的碱性蛋白酶酶解产物的相对分子质量相对较低, 2889Da 的组分占图谱面积的比例较少, 为 4.27%, 相对分子质量为 539、421、309Da 的组分所占的图谱面积分别为 25.62%、12.88% 和 21.34%。总体而言, 这两种酶解产物的相对分子质量都较低, 大部分肽链的相对分子质量都低于 1000Da, 水解度为 20% 的碱性蛋白酶酶解产物的相对分子质量明显低于水解度为 15% 的碱性蛋白酶酶解产物的相对分子质量。

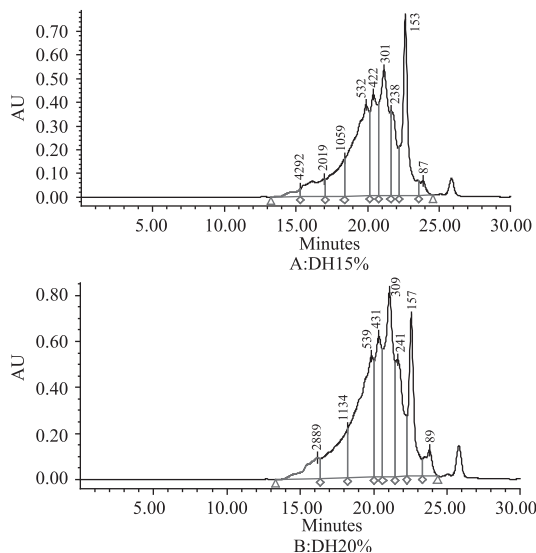


图2 碱性蛋白酶酶解产物的相对分子质量分布图谱

3 结论

本文以苦荞麦蛋白质作为底物, 分别采用碱性蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L、高效水解蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶对其进行酶法水解, 以水解度为检测指标, 监测其水解进程。结果表明, 碱性蛋白酶(固体)和胰蛋白酶的水解速度最快, 在酶解 2h 时 DH(水解度)接近 20%; 碱性内切蛋白酶 Alcalase 2.4L 和高效水解蛋白酶对苦荞蛋白的酶解程度也相对较高; 中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的酶解效果相对较低。此外, 对碱性蛋白酶两种酶解产物(水解度分别为 15% 和 20%) 的氨基酸组成和相对分子质量分别进行分析, 两种不同水解度的酶解产物的疏水性氨基酸含量较高, 相对分子质量都较低, 大部分肽链的相对分子质量都低于 1000Da, 水

解度为 20% 的碱性蛋白酶酶解产物的相对分子质量明显低于水解度为 15% 的碱性蛋白酶酶解产物的相对分子质量。

参考文献

- [1] Tomotake H, et al. Stronger Suppression of Plasma Cholesterol and Enhancement of the Fecal Excretion of Steroids by a Buckwheat Protein Product than by a soy Protein Isolate in Rats Fed on a Cholesterol-free Diet [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65(6): 1412~1414.
- [2] Kayashita J, Nagai H, Kato N. Buckwheat protein extracts suppression of the growth in rats induced by feeding amaranth [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1996, 60: 1530~1531.
- [3] Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M, Kishida N, Kato N. Consumption of a buckwheat protein extract retards 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999, 63: 1837~1839.
- [4] Kayashita J, Shimaoka I, Yamazaki M, Kato N. Buckwheat protein extract ameliorates atropine induced constipation in rats [J]. Current Advance Buckwheat Research, 1995, 2: 941~946.
- [5] Tomotake H, Shimaoka I, Kayashita J, Yokoyama F, Nakajoh M, Kato N. A buckwheat protein products suppression gallstone formation and plasma cholesterol more strongly than soy protein isolate in hamsters [J]. J Nutr, 2000, 130(7): 1670~1674.
- [6] 张政, 王转花, 刘凤艳, 林汝法. 苦荞蛋白复合物的营养成分及其抗衰老作用的研究 [J]. 营养学报, 1999, 21(2): 159~161.
- [7] Adler-Nissen J. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins [M]. U K: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 9~56, 110~169.
- [8] Jarrett H W, Cooksy K D, Ellis B, Anderson J M. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica columns [J]. Anal Biochem, 1986, 153: 189~198.
- [9] 沈蓓英. 大豆蛋白抗氧化肽的研究 [J]. 中国油脂, 1996, 21(6): 21~24.
- [10] Hua-Ming Chen, Koji Muramoto, Fumio Yamauchi. Structural analysis of antioxidative peptides from Soybean β -conglycinin [J]. J Agric Food Chem, 1995, 43: 574~578.

广州市品尼高食品添加剂有限公司

广州市品尼高食品添加剂有限公司系中山大学科技开发公司食品添加剂开发部转制而成, 它拥有一支高素质、集科研、管理、销售的队伍, 依托中山大学雄厚的技术力量, 专门从事食品添加剂系列研究、开发、生产等业务。

公司坚持“高品质”研制原则, 把开发高技术含量和生产高品质产品作为公司发展主旨, 坚持“诚信、创新、品质高”的经营理念, 以满足客户的满意为永恒追求目标。在品质管理上通过执行 ISO9001 质量管理体系认证标准。产品质量均达到国际或国家标准, 并且得到中国人民保险公司承保, 实现了产品质量保证的双保险。

主要成果:

山梨酸钾、脱氢醋酸钠、二氧化硫清除剂、尼泊金酯类、特效防腐剂 DHANA、脱氧保鲜剂(新型)、无硫高效漂白剂、肉类漂白素、米粉专用漂白剂、腐竹专用漂白剂、茶叶保鲜剂、各类干燥剂、鱼类改良剂、鱼类保鲜剂等。

地址: 广州市白云区大朗五社同兴工业区 B13 栋

电话: 020-61117776 61117777 86072614 84039458 传真: 020-61117779