

- 512 ~ 516.
- 9 Juliano. B. O., Perez. C. M., Kinetic Studies on Cooking of Tropical Milled Rice, Food Chemistry, 1986, 20(2): 97 ~ 105.
- 10 Ksuzukik, K., Kubota, M. Omichi, et al, Kinetic Studies on Cooking of Rice, Journal of Food Science, 1979, 41: 1180 ~ 1183.
- 11 Kubota, K, K. Hosokawa, K. Suzuki, et al, Study on the Gelatinization Rate of Rice and Potatoes Starches, J. Food Sci., 1979, 44: 1394 ~ 1397.
- 12 Melcelm, C. C., Texture Profile Analysis, Food Technology, 1978, 7: 52 ~ 66.
- 13 Ong, M. H. and Blanshard, J. M. V., Texture Determinants in Cooked, Parboiled Rice: I. Rice Starch Amylose and the Fine Structure of Amylopectin, J - Cereal - Sci., 1995, 21(3)251 ~ 260.
- 14 Lima, L., Singh, R. P., Objective Measurement of Retrogradation in Cooked Rice During Storage, J - food - Qual., 1993, 16(5): 321 ~ 337.
- 15 Nakazawa, F., Noguchi, S., Takahashi, J., and Takada, M., Gelatinization and Retrogradation Rice Starch Studied by Differential Scanning Calorimetry, Agric. Biol. Chem, 1984, 48(1): 201 ~ 203.
- 16 Windham, W. R., Lyon, B. G., Predication of Cooked Rice Texture Quality Using Near - Infrared Reflectance Analysis of Whole - Grain Samples, Cereal Chem., 1997, 74(2): 626 ~ 632.

# 酪蛋白酶解制备酪蛋白磷酸肽研究

## I. 过程分析与优化

齐崑 何志敏 何丽霞 天津大学化学工程研究所酶工程研究室 300072

**摘要** 以 pH-stat 技术跟踪间歇搅拌反应釜中酪蛋白—碱性蛋白酶抑制酪蛋白磷酸肽 (CPP<sub>s</sub>) 过程特性, 利用水解度 (DH) 表征其反应历程。分析了温度 (T)、pH 值、底物浓度 ([S])、酶浓度 ([E]) 及时间 (t) 等参数对 DH 的影响, 并通过多元线性回归求得其关联式, 确定出最适酶解条件为: T = 40℃, pH = 10, [E] = 0.2%, [S] = 2.5g/L, t = 30min。

**关键词** 酪蛋白 碱性蛋白酶 酪蛋白磷酸肽 水解度 操作参数

**Abstract** Casein was hydrolyzed with alcalase to prepare phosphopeptides (CPP<sub>s</sub>) in a batch stirred tank reactor (BSTR). The effects of operating parameters - temperature, pH, enzyme concentration, substrate concentration and time - on the degree of hydrolysis were studied by the pH-stat technique. The optimal operating conditions (40℃, pH10, 0.2% enzyme, 2.5g/L casein and 30min) were obtained. A correlation was also established in terms of the multiple linear regression.

**Keywords** Casein alcalase phosphopeptides degree of hydrolysis operating parameters

生物多肽大多以非活性状态存在于蛋白源长链中, 可以通过适当的有限酶解反应而被释放出来, 显示出各种生理功效, 是 21 世纪重点开发的药物和功能食品。

酪蛋白—碱性蛋白酶水解体系是制备生物活性多肽——酪蛋白磷酸肽 (CPP<sub>s</sub>) 的有效酶解体系。CPP<sub>s</sub> 是一种含有成簇磷酸丝氨酸残基的活性多肽, 在动物小肠中性或偏碱性条件下与钙形成可溶性复合物, 可防止不溶性磷酸钙沉淀, 从而促进钙的保持和吸收<sup>[1]</sup>。美、日已将其作为补钙功能食品的原料, 德国也将其列入药典, 而国内研究刚刚起步<sup>[2]</sup>。

目前, 对 CPP<sub>s</sub> 的研究主要集中于分子结构确定<sup>[3]</sup>、作用机理探讨<sup>[4]</sup>、功能性特性评价<sup>[5]</sup>、制备工艺改进<sup>[6]</sup>、以及应用开发<sup>[7]</sup>等, 涉及酶解反应过程特性的研究甚少。本文在详细分析各操作参数对水解度 (DH) 影响规律的基础上, 利用多元线性回归得出其关联方

程, 实现了对间歇搅拌反应釜 (BSTR) 中酪蛋白——碱性蛋白酶解反应过程的定量表征, 并确定了最适酶解工艺条件, 为进一步建立反应特征动力学模型提供了可能。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

酪蛋白: 生化试剂, 军事医学科学院天津市东方卫生材料厂, 蛋白氮含量 13.5%; 碱性蛋白酶: 无锡酶制剂厂, 酶活 74800U/g; 其他试剂均为分析纯。

#### 1.2 仪器

自动电位滴定仪: 上海雷磁仪器厂, ZD-2 型; 磁力加热搅拌器: 常州国华电器有限公司; 电子继电器: 黄骅市亚龙仪器仪表有限公司, 6402-D 型。

#### 1.3 方法

酪蛋白含量测定: GB/T 14771-93。

碱性蛋白酶活力测定 QB1805.3-93。

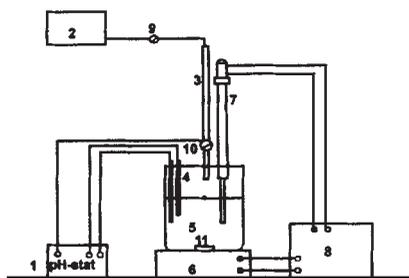
水解度定义为：

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

其中：B = 碱耗量(L)， $N_b$  = 碱摩尔浓度(mol/L)，MP = 蛋白质质量(g)， $h_{tot}$  = 底物中的肽键总数(mol/g)， $\alpha$  =  $\alpha$ -NH<sub>2</sub>的平均解离度。

#### 1.4 酶解步骤

配制一定浓度的酪蛋白溶液；在如图1所示的带有电加热器及磁力搅拌间歇酶解实验装置中，将底物溶液升温至水解温度，并调pH至要求；平衡后迅速加入一定浓度的酶液；反应过程中通过pH-stat技术维持pH恒定，根据所加碱液体积计算DH值；通过加热(T=60℃)和/或调pH(pH=4.6)灭酶终止反应，同时使未反应的酪蛋白沉淀；将酶解混合物离心分离，上清液冷冻保存，有待进一步分析。



1—pH-stat 调控器；2—碱液容器；3—滴液管；4—玻璃电极；5—反应容器；6—磁力加热搅拌器；7—导电表；8—电子继电器；9—阀门；10—磁阀；11—磁转子

图1 BSTR 酶解实验装置示意图

## 2 结果与讨论

固定其他条件不变，逐一改变T、pH、[S]、[E]四项水解参数进行酶促水解反应，绘制相应的酶解曲线，得到该参数对水解度之间的影响规律。

### 2.1 温度的影响

图2表明，随着温度的升高，酪蛋白初始酶解速率加快，随后趋于平缓；40℃转化率最高，45℃开始下降；50℃出现反常，表现为起始酶解速率很快，15min后快速趋于平缓，并与45℃的曲线交叉。因此，可近似认为酪蛋白—碱性蛋白酶体系的最适温度为40℃。

在酪蛋白酶解过程中，温度是一个相当复杂而重要的操作参数，可能从以下几方面影响反应速率：(1)温度变低，残余酶活力升高，反应活化能降低，酶解速率加快；(2)温度升高，酶失活加快，酶解速率降低；(3)在较高的温度下，酪蛋白适度热变性有利于折叠结构

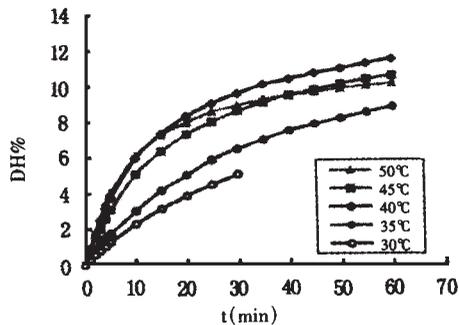


图2 温度对水解度的影响

的舒展(解聚)，肽键更易与酶结合，酶解速率加快。

### 2.2 pH的影响

图3表明，随pH提高，酪蛋白水解度增大，pH=10达到最大值，但在10和11之间出现交叉。即t<40min前，pH=10时其酪蛋白水解度较高；而t>40min后，时其酪蛋白水解度较高。据文献报道<sup>[8]</sup>，碱性蛋白酶的最高活力出现在pH=10~11，而稳定性在8~12之间差别不大。因此，可认为酪蛋白—碱性蛋白酶体系最适pH约为10。

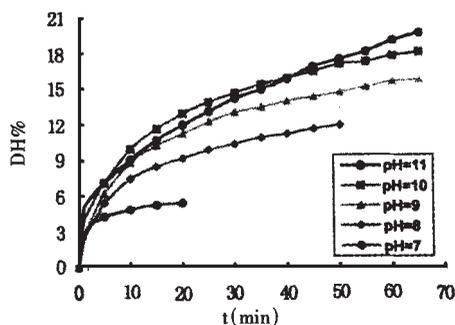


图3 pH对水解度的影响

在蛋白质酶解过程中，pH从以下几方面影响反应速率：(1)pH对底物中结合部位解离状态的影响；(2)pH对酶活力的影响；(3)pH对酶稳定性的影响。后两项本质上是对酶活性中心的催化部位与结合部位侧链基团解离形式的改变，使具有特殊催化功能的离子基团在总酶量中所占比例发生变化，表现为催化能力的差异。又由于蛋白质酶解过程具有由碱性至酸性的特点，所以维持pH值全程恒定，对于酶解反应的控制与优化是至关重要的。

### 2.3 酶浓度的影响

图4和图5分别表示酶浓度对DH和初始反应速率( $r_{s0}$ )的影响。如图可见，随着酶浓度的增大，DH值及酶解速率提高；[E] < 2g/L时，初始反应速率增加较快，但非线性变化，随后趋于平缓。

根据拟稳态假设：



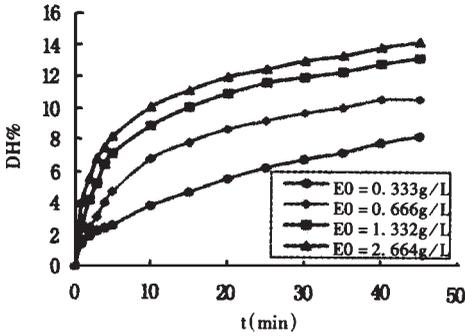


图4 酶浓度对水解度的影响

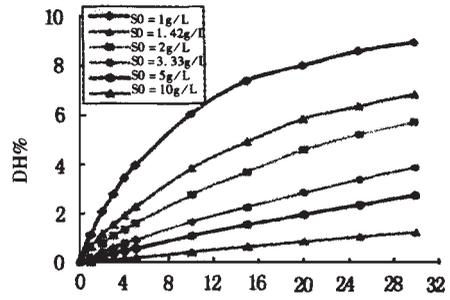


图6 底物浓度对水解度的影响

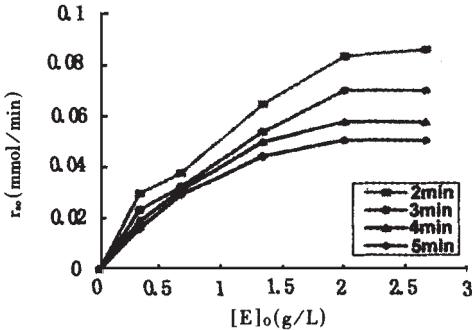


图5 酶浓度对初始反应速度的影响

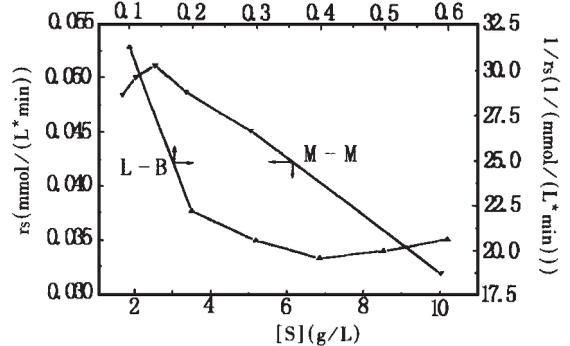


图7 酪蛋白酶解反应的M-M及L-B图

当  $[E]_0 < 0.2\%$  时,随着酶浓度的增加,中间复合物  $[ES]$  不断积累,并进一步生成产物  $P$ ,使酶解速率逐渐加快;当  $[E]_0 > 0.2\%$  时,底物已完全被酶所饱和,再增加酶浓度对反应初速度已无影响。由  $M-M$  方程可知:当初始底物浓度  $[S]_0 \gg K_m$  时  $r_s = K_{cat} \times [E]_0 = r_{s,max}$ ,即  $r_s$  正比于  $[E]_0$ 。但对于酪蛋白-碱性蛋白酶体系而言,在  $[E]_0$  达到饱和前,  $r_s$  与  $[E]_0$  呈非线性变化关系,这一方面说明该反应体系存在明显的竞争性抑制,另一方面也验证了蛋白质酶解反应速率更符合如下关系式<sup>[9]</sup>:  $r_s = k_{cat} \times [E]_0^n$ ,其中  $n$  为底物的溶解度指数,可求得该体系  $n = 0.5545 - 1$ 。因此,在酪蛋白酶解前,通过粉碎、加热等手段尽可能增大底物的溶解度是提高转化率的有效途径之一。

2.4 底物浓度的影响

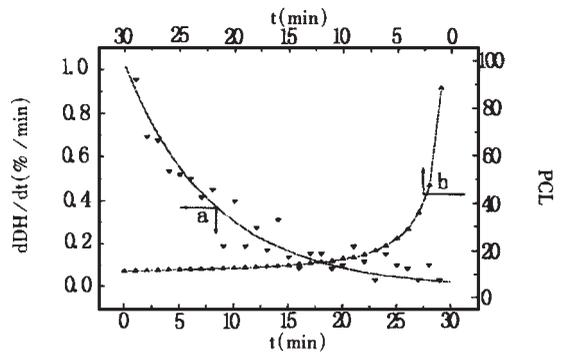
图6表明,随着底物浓度的增大,水解度降低。图7所示的  $M-M$  及  $L-B$  动力学关系直观地说明了酪蛋白-碱性蛋白酶体系存在明显的底物抑制现象:当  $[S]_0 < 2.5 g/L$  时,酶活性中心仍未被饱和,大部分酶处于游离状态,因此反应速率随  $[S]_0$  的增大而迅速增加;  $[S]_0 \approx 2.5 g/L$  为最适底物浓度,此时酶解速率最大,  $r_{s,max} \approx 0.051 mmol/(L \cdot min)$ ;进一步增加底物浓度,酶解速率反而减小。

González 等<sup>[10]</sup>认为,牛乳蛋白(包括酪蛋白和乳清蛋白)中存在着一类类似人体血液中  $\alpha-AT$  物质的丝氨酸蛋白酶抑制剂,它与蛋白酶迅速而不可逆的结

合使得部分酶分子未参与反应即被消耗掉,其含量与底物浓度成正比,因此体现为底物抑制。

2.5 反应时间的影响

底物水解度随酶解时间的延长而增加,并逐渐趋于平缓。究其原因,随着酶解反应的进行:(1)底物浓度减小,反应位点逐渐被酶分子饱和;(2)产物浓度增加,其竞争性抑制变强;(3)酶活性降低;(4)中间复合物  $[ES]$  在经历了初始阶段的积累后达到稳态,趋于恒定。上述因素综合作用的结果使得酶解速率及平均肽链长度(PCL  $\approx 100/DH\%$ )均随时间延长而逐渐减小。对于酪蛋白-碱性蛋白酶体系,由图8所示数据可推算出最适水解时间约为30min。



a 标准水解曲线; b 平均肽链长度曲线  
图8 酶解时间对反应过程的影响

2.6 各参数与 DH 的关联方程

根据本文的实验结果,利用数理统计多元线性回归分析,确定出水解度与各参数间的函数关联式为;

表 1 方差分析表

方差来源	自由度	平方和	均方和	F 值	显著性
回归	4	261.6571	65.4143	32.7033	$F_{0.99}(4, 15) = 4.89$
残差	15	30.0035	2.0002		

$$DH = -12.27 + 2.10pH + 0.10T + 3.38[E] - 0.78[S]$$

表 1 所示方差分析结果表明, 上式精度较高, 可用来近似求算不同操作条件下酪蛋白—碱性蛋白酶体系的水解度。

### 3 结束语

本文利用 pH-stat 技术, 通过研究水解度与各操作参数之间的关系, 较好地揭示了间歇搅拌反应釜中酪蛋白—碱性蛋白酶解反应过程的特性, 优化了操作条件, 确定了最适酶解工艺为:  $T = 40^{\circ}\text{C}$ ,  $pH = 10$ ,  $[E] = 0.2\%$ ,  $[S] = 2.5\text{g/L}$ ,  $t = 30\text{min}$ 。利用多元线性回归得出其关联方程, 以上研究为进一步建立反应本征动力学模型提供了可能。

需要指出的是, 通过本文研究也发现, 仅仅使用碱性蛋白酶水解酪蛋白, 其水解度较低, 因此, 有必要采用性能更好的其它酶种, 或者使用复合酶, 研究最佳复配方案, 不仅可以获得目标产物, 而且能够提高收率, 降低生产成本, 最终实现产业化。

#### 参考文献

1 汤亚杰, 吴思方. 酪蛋白磷酸肽的研究进展. 食品科学,

1998, 19(5) 3~6.

2 庞广昌, 陈庆森. 生物活性肽—酪蛋白磷酸肽 (CPPs) 的研究、应用及展望. 食品科学, 1999, 20(6) 25~29.

3 Eric C R, Peter F R, Nicholas J A. A selective precipitation purification procedure for multiple phosphoserine-containing peptides and methods for their identification. Anal Biochem, 1994, 217: 277~284.

4 Nicholas J A, Eric C R. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: Determination of enzyme specificity. Enzy Microb Tech, 1996, 19: 202~207

5 冯凤琴, 许时婴, 王璋. 酪蛋白磷酸肽 (CPPs) 的分子量及持钙功能的分析. 食品与发酵工业, 1997, 23(2) 18~21.

6 陈庆森, 庞广昌, 林康艺等. 固定化碱性蛋白酶生产 CPP 的研究. 食品科学, 2000, 21(1) 25~28.

7 曾昭颖, 何慧如. CPP(酪蛋白分解物)之生理活性与应用. 食品资讯(台), 1994, (2) 40~43.

8 姜锡瑞. 酶制剂应用手册. 中国轻工业出版社, 1999.

9 陈石根. 酶学. 湖南科学技术出版社, 1986.

10 González P, Camacho F, Jurado E, et al. Enzymatic hydrolysis of whey proteins: I. Kinetic model. Biotech Bioeng, 1994, 44: 523~528.

## 番茄浆料的流变特性研究

罗昌荣 麻建国 许时婴 无锡轻工大学食品学院 214036

**摘要** 对不同浓度 (15、18、20 和 24°Brix) 的番茄浆料分别在 30、40、50 和 60°C 时的流变学性质进行了研究。结果显示, 番茄浆料为假塑体系, 屈服应力值的范围比较宽 (40~140Pa)。通过回归分析, 发现数学模型  $K = K_0 \exp(E_a/RT)$  和  $K = A \exp(BC)$  可以分别用来描述温度和浓度对番茄浆料稠度系数的影响。在实验条件下, 实验值能够很好地拟合模型。并且推导出温度和浓度同时对番茄浆粘度影响的方程。利用这些方程, 可以预测实际加工中不同温度和不同浓度下番茄浆料的粘度。

**关键词** 番茄浆料 浓度 温度 流变特性

**Abstract** The rheological properties of tomato purees determined at four temperatures, 30, 40, 50 and 60°C, and four different concentrations, 15, 18, 20 and 24°Brix showed that the systems exhibited pseudoplastic behavior with large magnitudes of Casson yield stresses (40~140Pa). Two models,  $K = K_0 \exp(E_a/RT)$  and  $K = A \exp(BC)$ , could be used to describe the effect of temperature and concentration on the consistency coefficient of tomato purees respectively, by regression analysis. The results have also showed that those two models were fitted to the experimental data well within the experimental conditions used in this study. Some equations that described the effects of temperature and concentration on the viscosities of tomato purees at the same time were derived. And these equations could be utilized to predict the viscosities of tomato purees processed at different temperatures and different concentrations.