



骨蛋白酶解及风味肽分离 现代技术研究进展

蔡丽华¹, 马美湖²

(1. 湖南农业大学食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

(2. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 本文介绍了影响骨蛋白的酶解因素: 酶解前的预处理、酶解温度、时间、pH 等; 同时介绍了酶解液中苦味物质的产生机理; 并简述了括离子交换色谱, 凝胶色谱, 反相分配色谱法等肽的分离纯化方法并阐述了用质谱法分析肽的分子量和一级结构的方法。

关键词: 骨蛋白; 酶解; 苦味肽; 色谱; 质谱

Research on Bone Protein's Enzymatic Hydrolysis and Separation of Flavor Peptides

Cai Li-hua¹, Ma Mei-hu²

(1. College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: This article introduced the way of selecting appropriate enzyme and factors which work on enzymatic hydrolysis such as pretreatment, temperature, time, pH and so on. The mechanism about how the bitter-peptides were produced was mentioned. It also introduced some methods about how to separate and purified peptides compound and how to analyse the quality and structure of peptide by MS.

Key words: Bone protein; Enzymatic hydrolysis; Bitter-peptides; Chromatogram; MS

中图分类号: TS201.2 文献标志码: A 文章编号: 1001-8123 (2008)06-0057-05

0 引言

骨的营养价值极高。大量科学研究表明: 骨中的蛋白质和脂肪含量可与鲜肉媲美; 钙、磷等矿物质元素比例合理且含量很高; 富含维生素 A、B1、B2、B12; 还含有大脑不可缺乏的磷脂质、磷蛋白、胆碱, 增强皮下细胞代谢和延缓衰老的骨胶原、软骨素, 促进肝功能的蛋氨酸和其它各类氨基酸^[1]。

骨骼中的骨蛋白 90% 为胶原、骨胶原及软骨素(酸性粘多糖), 有增强皮下细胞代谢, 延缓衰老的作用^[2]。骨蛋白是较为全价的可溶性蛋白质, 生物

学效价(BV)高。骨蛋白中的九种必需氨基酸(EAA)含量较高, 每 100mg 骨粉中 EAA 为 5.518mg 占氨基酸总量的 20.67%。胶原蛋白是动物结缔组织的主要成分, 在脊椎动物中约占总蛋白质的 1/3 左右, 任何种系的胶原蛋白, 其氨基酸组成都有一个共同的特征, 即甘氨酸占胶原氨基酸残基的 1/3, 脯氨酸约占 1/4^[3]。胶原蛋白是以三股超螺旋结构形式存在, 故性质十分稳定, 采用物理和化学方法都难以将其分解。因此, 现在采用生物技术即酶工程的方法促使其分解, 而酶的选择和酶解条件是

基金项目: 国家十一五科技支撑项目 (编号 2006BAD05A16)

作者简介: 蔡丽华 (1985 -), 女, 汉族, 湖南常德人, 硕士研究生, 畜产食品科学与生物技术, liusulady2003@yahoo.com.cn

通讯作者: 马美湖 (1957-), 男, 汉族, 湖南常德人, 教授, 博士生导师, 食品生物技术, mameihu@163.com

此技术的关键。

1 酶的选择

蛋白酶按其作用方式可分为内肽酶和外肽酶两类：内肽酶可从蛋白质或多肽的内部切开肽键生成分子质量较小的肽和多肽，外肽酶是从蛋白质或多肽分子的氨基或羧基末端水解肽键而游离出氨基酸。由于蛋白酶的专一性非常复杂，很难根据它们的专一性进行分类，实际上常按酶的来源分类，例如胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶^[4]等。微生物蛋白酶则常根据其作用最适 pH 值分类而分为碱性蛋白酶、中性蛋白酶、酸性蛋白酶等。

张永秀^[3]选用了丹麦 Novo 公司生产的碱性蛋白酶 Alcalase、复合蛋白酶 Protamex、中性蛋白酶 Neutrase、风味蛋白酶 Flavourzyme 四种微生物蛋白酶对酶解牛骨工艺进行了研究，结果表明 Flavourzyme、Protamex 两种酶制剂酶解骨蛋白水解度(DH)、三氯乙酸中可溶性氮(TCA-NSI)、游离氨基酸含量较高，苦味较低。根据结果张永秀又用 Flavourzyme、Protamex 两种酶制剂组合水解牛骨蛋白，得到的产物水解度最高达 32%。赵霞^[3]利用北京新经科的枯草杆菌中性蛋白酶、广州远天酶制剂厂的木瓜蛋白酶、北京新经科的胰蛋白酶酶解羊骨，结果表明中性蛋白酶水解度及三氯乙酸氮溶解指数最高，水解效果最好。陶银华^[6]利用诺维信公司生产的碱性蛋白酶、风味蛋白酶、中性蛋白酶和南宁庞博生物公司生产的动物蛋白水解酶水解牛板筋制造速溶牛板筋粉，结果表明碱性蛋白酶水解程度最大，可水解 79.7% 的牛板筋，而中性蛋白酶、动物蛋白水解酶及风味酶水解程度小。但碱性蛋白酶水解液苦味较重，故采用碱性蛋白酶和风味蛋白酶两种酶对牛板筋进行分步酶解。李帆^[7]等比较了广西南宁庞博生物科技有限公司生产的中性蛋白酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶酶解耗牛骨蛋白的效果，发现木瓜蛋白酶的酶解效果最好。

2 影响酶解的因素

2.1 酶解前的软化处理

由于骨骼具有坚硬紧密地结构，由胶原纤维和埋藏在胶原纤维基质中的羟基磷灰石的微晶组成。骨中胶原纤维胶原蛋白分子单位原胶原分子平行排列成束，通过共价交联，可形成稳定的胶原微纤维，进一步行聚集成束，形成胶原纤维。且胶原纤维二股超螺旋结构通过分子内和分子间的

交联得到进一步增强和稳定，使得一般的短时间加工和低温加热操作很难破坏这种结构将其分解，因而骨中蛋白质的利用受到限制。牛骨经高温蒸煮则可使骨粒软化，使蛋白热变性，部分弱键断裂，内部非极性基团暴露到分子表面，利于骨中蛋白的水溶性，加快骨蛋白的水解速度，同时避免在保藏及长达几个小时的水解过程中的微生物污染。

2.2 酶解条件

2.2.1 pH 的影响

pH 对酶催化反应的影响包括两个方面，即影响酶的稳定性以及酶催化底物转变成产物。在不同 pH 下，蛋白酶对骨泥的水解作用不同。当 pH 为 7.0 解度最高，pH 值低于或高于 7.0 稳定性减弱，酶活降低，酶解率下降。丁小燕^[8]等用复合风味蛋白酶水解鸡骨泥的最适 pH 值为 7.0。

2.2.2 酶解温度的影响

在蛋白质酶解过程中，温度对酶解反应效率的影响包括两个方面，即蛋白酶催化反应速度及蛋白酶的稳定性。在一定范围内升高温度，底物转变成产物的速度加快，酶解效率也相应提高。但若温度过高，酶蛋白变性，酶的稳定性下降。酶解效率随之降低。温度是酶解反应中的重要参数，会影响蛋白酶催化反应的速度和酶本身的稳定性。张永秀^[3]得出用 Flavourzyme 酶对牛骨粉水解的最佳温度为 50℃。此温度时水解度最大，温度过高酶被钝化，酶解率降低。

2.2.3 酶解时间的影响

不同的酶解时间对酶解产物的氨基酸组成影响较大。赵谋明^[9]表明在酶解的初始阶段氨基酸上升幅度较大，随着酶解时间的延长增长速率减慢，后期趋于平衡。酶解 0~24 h，对鲜味有作用的谷氨酸、天冬氨酸、丝氨酸等亲水性氨基酸质量浓度有较大的增加。24 h 后，谷氨酸和天冬氨酸含量无明显增加，鲜味也无明显提高。游离半胱氨酸在 0~24 h 有较大的增加，延长酶解时间略有降低。疏水性氨基酸如组氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸的含量在酶解过程中不断增加，其中亮氨酸和异亮氨酸在 0~6 h 内增幅很大，其它几种疏水性氨基酸在整个过程中变化相对缓慢。

2.2.4 底物浓度与最佳 E/S 比的影响

底物浓度对于反应速率起着重要的作用。原料加水少，水解不彻底，蛋白质提取率低；加水多，有助于水解反应进行，提高了蛋白质提取率。但产物浓度过低，浓缩时能耗大。E/S，即酶浓度与底物浓度之比。比酶浓度本身能更好地反映酶解过

程中的反应速度特征。当底物浓度一定,而增加的酶量又未使底物浓度饱和时, E/S 越大,反应速度也越快,蛋白质的水解率也越高。但 E/S 过大,生产成本也相应提高,同时,也有可能导致酶自身相互水解,使酶活力降低^[10]。

3 酶解产物中的苦味物质

3.1 苦味肽的产生机理^[11, 12]

在完整蛋白质分子中,大部分疏水性氨基酸侧链藏在内部,不与味蕾接触,感觉不到苦味;当蛋白质水解时,肽链中含有疏水性氨基酸暴露出来,接触味蕾,产生苦味,随水解进程继续,疏水性氨基酸侧链暴露越多,苦味强度越大。

天然蛋白质中疏水性氨基酸残基排列在分子内部,不与味蕾接触,故感觉不到苦味;当蛋白质水解时,随着肽链解离,可呈现苦味的疏水性氨基酸残基或其形成小肽游离出来,产生苦味;随着水解深入,苦味物数量增多,苦味增强。但由于呈苦味低分子量肽呈味阈值比相同组成游离氨基酸混合物低,游离氨基酸苦味与苦味肽相比不明显^[13],因此蛋白酶解物中苦味主要是由所含疏水性氨基酸低分子量肽形成的。疏水性氨基酸对苦味肽苦味是必要的,苦味肽分子中均含有一个或多个疏水性氨基酸,如亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸等,且这些疏水性氨基酸一般位于肽链末端。另外,氨基酸排列顺序有时对苦味产生也起重要作用,如在肽链中残留一定量脯氨酸或其羧基末端含有芳香族及支链氨基酸时,其苦味明显增强。

3.2 苦味肽的脱除

苦味肽分子量一般在1000~6000之间,通过控制水解度或利用双酶水解可以降低苦味肽的产生量。苦味的产生限制了酶解产物在食品中的应用,故脱苦的技术研究势在必行,其方法主要包括掩盖法和酶法。赵霞^[3]运用添加4.5%蔗糖、0.7%甘氨酸和0.4%柠檬酸复合进行掩蔽脱苦;杨瑞学^[4]用flavourzyme酶水解乌骨鸡动物蛋白,发现比一般的和传统的酶解有更高的产率和更好的风味及口感;刘海梅^[15]水解菜籽粕中蛋白质,获得无苦味的水解产物。采用含有外切酶的风味蛋白酶脱苦,不仅可以有效提高水解度,还将疏水性氨基酸从脯氨酸末端切除,有效降低骨蛋白多肽的苦味。张永秀^[1]将Protamex酶和Flavourzyme酶组合分别水解牛骨蛋白不仅使苦味物质减少,还具有良好的风味。

4 风味肽的分离纯化

高效液相色谱是在六十年代末期发展起来的

新型分离分析技术,它可根据溶质(样品)在固定相和流动相分离过程的物理化学原理分为吸附色谱、分配色谱(正相、反相),离子交换色谱,凝胶色谱,亲和色谱等。其中的离子交换色谱法、凝胶色谱法、反相色谱法等都可用于生物肽的分离纯化^[16, 17, 18]。

4.1 离子交换色谱法(IEC)分离纯化肽

离子交换色谱法(IEC)的分离原理是基于溶质分子与填料表面上解离基团的相互作用,样品离子和离子交换树脂上带固定电荷的活性交换基团之间发生离子交换。由于不同样品离子对于离子交换树脂上的亲和力不同,即相互作用强度不同,与树脂作用弱的溶质不易保留,首先从柱中被冲洗下来,而与树脂作用强的溶质在柱内保留时间较长,当样品中不同结构的组分通过交换柱时可以得到分离。根据离子交换树脂上的交换基团所带电荷可分为阳离子交换色谱和阴离子交换色谱^[19]。许云禄^[20]用阳离子交换色谱法成功地分离纯化出细胞毒素-F(CTX-F),CTX是由60~63个氨基酸碱残基组成的小肽,分子量约为6000~7000,是眼镜蛇毒中分子量较小的活性多肽。钟芳^[21]等采用Sephadex C-25阳离子交换剂对经过DA201-C型大孔吸附树脂脱盐、乙醇梯度洗脱(75%乙醇洗脱组分)的Alcalase水解大豆肽(DH14%)进行进一步的分离纯化,的Sephadex C-25色谱分离条件为:上样量0.004g/mL IE,起始缓冲液为LM醋酸,上样吸附率为61.19%。

4.2 凝胶色谱法(GFC)分离纯化肽

凝胶色谱法(GFC)是按溶质分子大小进行分离的一种色谱技术。溶质流出凝胶的速率取决于其分子的大小和凝胶阻滞作用的差异。比载体基质孔径大的样品分子不能进入孔内而被排阻,很快从柱子空隙中被洗脱出来,但是比载体基质孔径小的分子进入孔内,由于流程长,移动速度慢,因而保留时间较长。在正常情况下,溶质按分子由大到小递减的次序被洗脱出来。当流动相为有机溶剂时称凝胶渗透色谱(GPC),当流动相为水溶液时称为凝胶过滤色谱(GFC)。它是肽类分离中最常用的最简便方法。倪莉^[22]将丝素经碱性蛋白酶(alcalaseFs)水解后的酶解产物采用凝胶过滤色谱SePhadex G-15分离纯化出丝素肽。分离条件为:凝胶柱1.6cmid × 100cm,洗脱液0.01mol/L的HCl溶液。洗脱液流速200ml/h,检测仪:8802型紫外检测仪,检测波长220nm。邹存媛^[23]等将中性蛋白酶AS1.398水解后的酶解产物采用超滤以及凝胶过滤色谱法分离出分子量小于1200的小肽

并收集。

4.3 反相色谱(RPLC)分离纯化肽

反相色谱(RPLC)的分离肽的机理取决于一系列的相互作用疏水效应,氢键形成及溶质分子中带电的支链与硅胶的作用等。起主要作用的是疏水效应。组成肽的各种氨基酸具有各不相同的侧链,因此可用肽组分氨基酸的极性即疏水性的不同用RP-HPLC进行分离。一般来说RP-HPLC较适用于分子量不太大的肽类^[24]。

用反相色谱分离生物多肽的影响因素:就流动相的组成而言,以pH的影响最为显著,因为环境中的pH值决定了肽的电离状态,直接影响到它的疏水性。例如加入0.1磷酸到乙腈/水的体系中,由于改变了pH的作用,故显著降低某些含自由氨基的肽的保留。在多肽的分离中,当固定相确定后常使用一定pH值的缓冲溶液(如磷酸盐,甲酸盐缓冲溶液)作流动相,且向缓冲液中加入盐(如NaCl),保持一定的盐浓度可减小峰形扩散,改善分离。就检测而言,由于肽键在紫外光200-220nm具有吸收特性,因此对大多数肽的分离,都可使用UV在此波长范围内进行测定。若多肽的肽键中含有可吸收紫外光的酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸时,可直接用254nm检测。当检测灵敏度低时,也可使用邻苯二甲酐(OPA),氟甲氧基羧基(FMOC)等,选进行柱前衍生,然后用荧光检测器检测。

对OPA氨基酸衍生物

$$\lambda_{ex}=330nm, \lambda_{em}=450nm$$

对FMOC氨基酸衍生物

$$\lambda_{ex}=263nm, \lambda_{em}=313nm^{[25]}$$

近年来,关于多肽的RPLC纯化也取得了许多成效。Haught^[26]等用RPLC对抗菌肽进行分离纯化;Nakagomi^[27]等用RPLC纯化了血管紧张素I转换酶抑制肽;Bonetto^[28]等用RPLC纯化了钙结合蛋白D9K;李医明^[29]等用RPLC纯化了蝎毒素多肽BmK4112。

5 风味肽的结构测定

质谱在多肽的鉴定和结构分析等工作中有十分广泛的应用。质谱与HPLC联用,可在线检测出HPLC分离出的每一肽段的分子量,与理论上所得肽段的分子量比较,就能确定HPLC上的每一肽段的峰代表了蛋白质中的哪一段,从而得到完整而精确的质量肽谱结果。如邵晓霞^[30]采用液相色谱-质谱联用法(LC/MS),对一种蛋白质细胞色素c(Cyt.C)的胰蛋白酶酶解产物进行了质量肽谱分析,

确定了各肽段在蛋白质中的位置。

多肽的一级结构分析串联质谱法(tandem mass or MS-MS spectrum)在多肽的氨基酸顺序测定中得到了广泛的应用。多肽片段在串联质谱测定过程中产生的母离子通过碰撞在肽键处断裂,就可得到一系列N端碎片离子(b系列)和一系列C端碎片离子(y系列),通过综合分析这些碎片信息,就能够得到肽段的氨基酸序列。串联质谱的第一个四极杆检测装置的作用是进行全分子离子扫描及选择目标离子进入下一阶质谱的碰撞室,在碰撞室中离子经活化、解离成碎片离子后,由第二个检测器检测出碎片离子峰,给出二级质谱图,获得的二级质谱又称为CID(collison induced dissociation)质谱。分析串联质谱数据就能够得到各肽段的一级序列信息,结合Edman降解测序结果和其他信息,完成蛋白质的一级结构测定。张乃霞^[31]等联合运用串联质谱法和Edman降解法,鉴定了BmK622 N端19个残基的序列,得到BmK622的一级结构为:FGLID VKCFA SSECW TACKK VTGSG QGKCQ NNQCR CY。

6 总结

(1) 畜禽的骨骼来源广泛且具有极高的营养价值,将其开发生产各类产品既有利于资源的回收利用又有利于人类营养的补充,具有重要的实用意义。

(2) 酶的选择以及酶解中的条件控制是酶解技术的关键,此外还应充分考虑骨骼结构的特殊性。

(3) 苦味肽的产生限制了酶解产物在食品中的应用,故脱苦的技术研究势在必行,其方法主要包括掩盖法和酶法。

(4) 肽的分离纯化包括离子交换色谱,凝胶色谱,反相分配色谱等。利用质谱法可以较精确的得到肽的分子量和一级结构。

参考文献

- [1] 杨迎伍. 畜骨的营养价值、开发现状及发展前景[J]. 食品科技, 2002(1): 60-61.
- [2] 程伶. 高吸收性钙材料—CCM[J]. 四川食品工业科技, 1996, (4): 49-50.
- [3] 赵霞, 马佩珍. 羊骨的酶解和多肽饮料的开发[D]. 山西农业大学, 2004.
- [4] 罗璐, 崔健云, 陈尚武等. 添加木瓜蛋白酶对腊肉风味的影响研究[J]. 肉类研究, 25-28.

- [5] 张永秀,王世平.牛骨蛋白的酶解研究[D].中国农业大学,2006.
- [6] 陶银华,刘代成.酶解制造速溶牛板筋粉[J].高校理科研究.
- [7] 李帆,贾冬英,姚开,等.牦牛骨蛋白的酶解条件研究[J].氨基酸和生物资源,2006,28(4):7-10.
- [8] 丁小燕,张雯,陈延锋,等.复合风味蛋白酶水解鸡骨泥工艺条件的研究[J].中国食品学报,2006(3):88-92.
- [9] 赵谋明,崔春,刘珊.低值鱼蛋白酶解产物制备不同肉香型热反应物[J].食品与生物技术学报,2006(5):1-6.
- [10] 王朝旭.酶法水解骨蛋白最佳条件的研究[J].食品科学,2001(2):48-49.
- [11] 李铁晶,陈智斌,赵新淮.鳙鱼蛋白水解液的风味改良[J].农机化研究,2005(9):193-194.
- [12] 杨兰,刘通讯.酶法水解鸡肉蛋白及其水解液脱苦方法的研究[J].食品工业科技,1999(2):4-6.
- [13] 周雪松.蛋白质酶解物苦味形成机理及控制研究[J].粮食与油脂,2004,4:20-24.
- [14] 杨瑞学,朱小艳.乌骨鸡深加工酶解处理条件的探索研究[J].食品科学,2004,25(10):187-191.
- [15] 刘海梅,熊善柏,谭汝成.脱脂菜籽粕中蛋白质的分步酶水解研究[J].中国油脂,2003,28(7):15-17.
- [16] 刘亚琼,朱运平,乔支红.食品风味物质分离技术研究进展[J].食品研究与开发,2006(6):181.
- [17] 莫树平,林嘉慧,柏建玲等.肉制品中的风味物质及其分析方法[J].中国调味品,2007(1):25-47.
- [18] 刘岩梅,张树明.浅谈食品风味物质的分离分析方法[J].中国食品添加剂,2004(3):104-107.
- [19] 张玉奎,张维冰.分析化学手册—液相色谱分析[M].北京:化学工业出版社,2000:19-45;50-52.
- [20] 许云禄,杨丽娟.舟山眼镜蛇毒细胞毒素的分离纯化及其体外抗肿瘤活性[J].中国生物杂志,2003;24(3):127-132.
- [21] 钟芳,张晓梅,麻建国.大豆肽的离子交换色谱分离及其活性评价[J].Food & Machinery,2006;22(5):16-19.
- [22] 倪莉,陶冠军.血管紧张素转化酶活性抑制剂—丝素肽的分离、纯化和结构鉴定[J].色谱,2001;19(3):222-225.
- [23] 邹存媛,郑永杰,卢鹤.凝胶过滤法纯化大豆蛋白肽[J].齐齐哈尔大学学报,2006;22(1):27-30.
- [24] 萨仁娜,毕力夫,苏秀兰.生物多肽色谱分离[J].内蒙古医学院学报,2004,26(4):309-312.
- [25] 于世林.高效液相色谱方法及应用[M].北京:化学工业出版社,2000:251-252.
- [26] Haught C, Davis G D, Subramanian R, et al. Recombinant production and purification of novel antisense antimicrobial peptide in *Escherichia coli*. [J]. Biotechnol. Bioeng, 1998, 57(1): 55-61.
- [27] Nakagomi K, Fujimura A, Ebisu H, et al. Acein-1, a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide i-Peptide isolated from tryptic hydrolysate of human plasma [J]. FEBS Lett, 1998, 438(3):255-257.
- [28] Bonetto V, Kangur L, Palumaa P, et al. Large-scale HPLC purification of calbindin D9K from porcine intestine [J]. Protein Expr. Purif, 1999, 17(3):387-391.
- [29] Li Yiming, Wu Gong, Zhang Naixia. Purification of neuropeptides using gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography with novel detection methodologies [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2000, 32(4):
- [30] 邵晓霞,曹嵘,夏其昌.液相色谱—质谱法(LC-MS)分析细胞色素C酶解肽谱及一级结构[J].质谱学报,1998,19(4):1-6.
- [31] 张乃霞,吴宫,王跃丰,等.马氏钳蝎蝎毒短肽BmK622的分离纯化和一级结构测定[J].化学学报,2003;61(4):630-634.