

菜籽清蛋白小分子肽的制备

薛照辉¹, 吴谋成^{2,*}, 严奉伟², 罗祖友², 周志江¹

(1. 天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072;

2. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430072)

摘要: 本文利用Alcalase和Flavourzyme双酶对菜籽清蛋白进行分步水解, 将水解度由单酶的14.72%提高至28.10%。粗品肽(RSP-R)经Sephadex G-25凝胶层析柱分离纯化, 得到分子量大致分别为大于5000D的RSP-1, 1050D的RSP-2和560D的RSP-3三个级分。RSP-2为主要成分, 其蛋白质含量是79.23%, 总糖含量是13.88%。这些为后续研究小分子菜籽肽活性功能提供了理想的原料和理论依据。

关键词: 菜籽清蛋白; 酶解; 肽; 凝胶色谱

Preparation of Rapeseed Albumin Peptide with Lower Molecular Weight

XUE Zhao-hui¹, WU Mou-cheng^{2,*}, YAN Feng-wei², LUO Zu-you², ZHOU Zhi-jiang¹

(1. College of Agriculture and Bioengineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China

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

Abstract: Rapeseed albumin was hydrolyzed in different steps by Alcalase and Flavourzyme. The degree of hydrolysis of Rapeseed Albumin could go up to 28% from 14.72%. The rapeseed peptide (RSP-R) was separated and purified by Sephadex G-25 gel filtration chromatography, so three parts of peptides were obtained: RSP-1 of molecular weight over 5kD, RSP-2 of molecular weight about 1050D and RSP-3 about 560D. As RSP-2 is the primary part of RSP-R, its protein and total sugars contents are 79.23% and 13.88% respectively. All the results would provide ideal materials and theory foundation for further research.

Key words rapeseed albumin; hydrolyze; peptide; gel filtration chromatography

中图分类号: TS229

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)03-0104-04

油菜是我国大面积种植的油料作物, 脱脂菜籽饼粕(华杂3号, 双低品种)富含蛋白质(38.4%), 其分离蛋白中清蛋白含量最多, 占总蛋白含量的36.8%。且必须氨基酸分布平衡合理, 不存在限制氨基酸, 蛋氨酸、胱氨酸含量明显高于其它植物蛋白^[1]。在食品加工领域有着广泛的应用前景。

通过对蛋白质的酶水解, 可以将大分子蛋白质水解成小分子肽类和游离氨基酸, 易为人体消化和吸收, 且具有较强的生物活性, 从而显著提高菜籽蛋白的生物效应^[2]。

Alcalase是一种非特异性蛋白质肽键内切酶, 来源丰富, 酶解能力强。但由于酶反应的专一性, 单一酶作用范围小, 因此水解时水解度不高, 所得多肽分子量较大。Flavourzyme复合风味酶是一种内切酶和外切酶的混合酶, 可以有效地将疏水性氨基酸从脯氨酸末端

切除, 本实验通过复合酶水解有效地提高了水解度。同时对水解所得的菜籽肽进行分离纯化, 确定各级分子量, 为研究小分子菜籽肽的生物活性提供原料与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菜籽(华杂3号)清蛋白由本实验室自制, 其蛋白含量为81.64%^[1]。

碱性蛋白酶Alcalase 2.4L(活力2.4AU/g)和Flavourzyme复合风味酶500MG(活力为500LAPU/g) 丹麦NOVO公司; Sephadex G-25 Pharmacia; Bactiracin Sigma; Glutathione(Reduced) Amresc; Blue Dextran-2000 Pharnacial, 其它所用化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

精密pH酸度计、电热恒温水浴锅、可控温磁力

收稿日期: 2005-04-15

*通讯作者

基金项目: 国家“十五”科技重点攻关计划(2001BA501A05)

作者简介: 薛照辉(1973-), 男, 讲师, 博士, 研究方向为生物活性物质及功能性食品。

搅拌器、紫外可见分光光度计、电子分析天平、低温高速离心机、真空旋转蒸发器、无级变速电动搅拌机、自动部分收集器、微量凯氏定氮仪。

1.3 方法

1.3.1 菜籽蛋白的酶解反应

配制一定浓度的菜籽蛋白溶液,水浴至试验设定的温度,调pH至试验设定值,加入反应所需的酶量并低速搅拌。在反应过程中以1mol/L的NaOH维持pH值恒定(± 0.1 pH单位),水解至预定时间后,酶解液置沸水浴10min钝化蛋白酶,冷却后用4000r/min的转速离心10min,取上清液于试管中,置冰箱中备用。

1.3.2 蛋白质含量测定^[3]: GB. 5009.5-85(1986)。

1.3.3 总糖含量测定: 苯酚—硫酸法^[4]。

1.3.4 氨基态氮测定: 甲醛快速滴定法。

1.3.5 水解度(DH)的测定^[5,6]

$$\text{DH}(\%) = (\text{游离氨基氮} / \text{总氮}) \times 100$$

水解后产生的游离氨基氮用甲醛滴定法测定,总氮用凯氏定氮法测定。

1.3.6 复合酶水解菜籽清蛋白^[7]

以温度、酶用量和底物浓度三个因素为自变量,以水解度为响应值,根据Box中心组合设计原理,设计三因素三水平的响应面分析试验。依据确定的最佳水解条件进行碱性蛋白酶Alcalase水解菜籽清蛋白1h,加入50LAPU/g复合风味酶Flavourzyme2h。

1.3.7 凝胶层析分离纯化粗品菜籽肽

取粗品菜籽肽以少量蒸馏水溶解,在Sephadex G-25柱上(2.6cm × 50cm)层析分离,以蒸馏水洗脱,流速0.5ml/min,紫外分光光度计280nm处检测,部分收集多肽洗脱峰,冷冻干燥即得各多肽级分。

1.3.8 凝胶柱的性质参数及各级分的分子量的测定

取杆菌肽($M_w = 1422$)、氧化型谷胱甘肽($M_w = 612$)、还原型谷胱甘肽($M_w = 307$)、蓝色葡聚糖-2000、牛血清白蛋白各10mg,分别溶于1ml洗脱液中,制成标准溶液。

将已处理好的交联葡聚糖凝胶(Sephadex G-25)装柱,在前述凝胶色谱测定条件下操作,用记录仪记录流出液吸收情况。洗脱液洗脱至基线平稳,加入标准溶液或水解样品0.2ml,用量筒记录最大吸收峰出现时洗脱液的流出体积(ml)。

用蓝色葡聚糖-2000和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分别测定外水体积及柱的内水体积。分配系数用柱床体积和外水体积来计算。标准曲线用Bactiracin、Glutathione和Glutathione作为标准样品来测定。结合标准曲线计算各组分的分子量范围。

2 结果与分析

2.1 复合酶水解菜籽清蛋白工艺的优化

通过对水解条件的系统研究发现,碱性蛋白酶Alcalase能够有效地水解菜籽清蛋白,其最佳酶解条件确定为pH8.0,温度50℃,底物浓度4.87%,酶用量0.38AU/g。在此条件下水解1h,酶解液水解度可达14.72%左右。

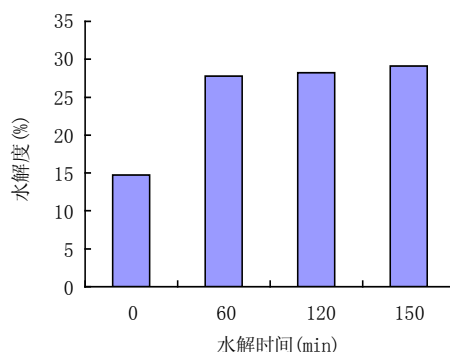


图1 分步水解中Flavourzyme复合风味酶加入后的DH-t

Fig.1 The DH-t of Rapeseed peptide hydrolyzed with Alcalase and Flavourzyme

Alcalase酶水解1h时加入Flavourzyme,试验结果显示,水解液的pH无明显变化,但随着水解时间的变化,水解液中的氨基氮含量有明显上升趋势,水解度较单酶水解有明显提高,主要体现在添加Flavourzyme复合风味酶的2h内,双酶分步水解菜籽清蛋白2h时,水解度可达到28.10%。之后,水解度增幅减缓(如图1)。而且此时水解液苦味很淡,其后随水解度增加,苦味不再有所变化。基于此,确定分步水解中Flavourzyme复合风味酶水解时间为2h^[7]。

2.2 菜籽肽粗品的分离纯化

复合酶水解所得菜籽肽粗品(RSP)经Sephadex G-25柱层析分离图谱见图3。分别收集含量较高的三个出峰时的洗脱液,按出峰先后次序依次命名为RSP-1、RSP-2和RSP-3,根据葡聚糖凝胶层析法分离原理,其分子量逐渐降低。其中,RSP-3较易吸潮,呈粘稠状。经过层析分级后,总回收率为54%,三个级分所占比例依次为30.4%、41.2%和28.4%。

层析所得各级分对双缩脲反应和茚三酮反应均呈阳性,说明其均为肽类物质。而在级分RSP-3之后的洗脱液仅与茚三酮呈阳性反应,但与双缩脲不出现阳性反应,由此可知,RSP-3级分之后主要是氨基酸类。

2.3 菜籽肽级分分子量的测定

凝胶过滤层析技术可分离分子量大小不同的蛋白质并测定其分子量。Sephadex G-25是由葡萄糖(G型右旋糖酐)和3-氯-1,2-环氧丙烷以醚键相互交联而成的,对

蛋白质类的分级是基于排阻效应^[8]。适用于小于5000D的物质,对分子量大于5000D的物质其洗脱液体积(V_e)与外水体积(V_0)相等,分配系数(K_d)为0。

实验所用分子量标准品中,蓝色葡聚糖-2000、牛血清白蛋白的分子量均大于5000D,洗脱出峰体积相差不多,无参考价值;杆菌肽、氧化型谷胱甘肽、还原型谷胱甘肽的对应出峰体积有一定关系,仅以此作为参考,估计水解物的分子量分布情况。

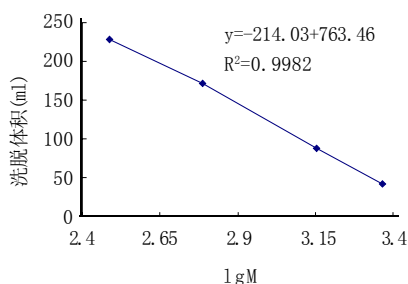


图2 肽标准曲线
Fig.2 The standard curve of peptide

双酶水解肽经Sephadex G-25凝胶过滤色谱分离结果见图3。未水解的清蛋白中,最先出峰体积在42ml,说明分子量大于5000D。随着水解程度增大,洗脱体积42ml处峰高越来越小,说明这部分清蛋白被逐渐水解。另外,最高峰逐渐后移,说明低肽分子越来越多,分子量越来越小。

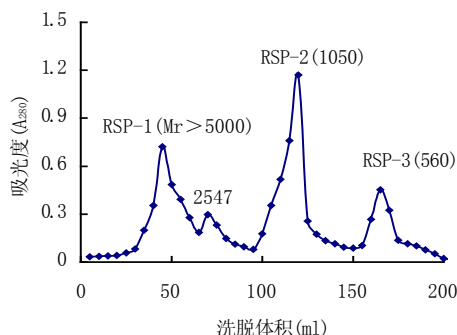


图3 双酶水解菜籽肽凝胶(G-25)过滤色谱图
Fig.3 Gel filtration chromatography of rapeseed albumin hydrolysate (RSP) after Alcalase and Flavourzyme treatment

在测定分子量的实验中需要对凝胶柱的性质进行研究,各组分被排阻的程度(由分配系数 K_{av} 表示)一方面由各组分的分子量范围来决定,另一方面可以通过公式 $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ 来计算。在限定的条件下,对于公式中的参数 V_t 和 V_0 都为恒定值,而 V_e 值却是随着被分离物质分子量的变化而变化的。在本实验中通过蓝色葡聚糖-2000和硫酸铵测出柱的 $V_t = 123\text{ml}$, $V_0 = 42\text{ml}$ 。 K_{av} 的值与各组分的分子量之间的关系可用公式: $K_{av} = -b \times$

$\lg M + c$ 来表示^[9]。在公式中, b 和 c 是常数。实验选用杆菌肽、氧化型谷胱甘肽和还原型谷胱甘肽为标准肽,制作标准肽相对分子量的对数($\lg M$)与各自洗脱体积的标准曲线(见图2)根据回归方程 $y = -214.03x + 763.46$ (即 $V_t = -214.03\lg M + 763.46$)计算得RSP-1, RSP-2和RSP-3组分的分子量分别大致为 ≥ 5000 、1050和560D。

2.4 菜籽肽各级分中蛋白质和总糖含量分析

表1 菜籽肽中各级分的蛋白质和多糖含量
Table 1 Protein and polysaccharide content of the peptides separated from RSP

样品	蛋白质(%)	总糖(%)
RSP-R	77.70	14.52
RSP-1	71.76	22.64
RSP-2	79.23	13.88
RSP-3	86.14	5.16

表1列出了菜籽肽粗品和各级分的蛋白质及总糖含量。从表中可以看出,经过柱层析后各级分仍然含有一定量的糖,这些糖不会是游离的小分子糖类,而是与菜籽肽相结合的糖类,其中以RSP-1的含糖量为最高。

3 结论

3.1 碱性蛋白酶(Alcalase)和复合风味酶(Flavourzyme)在优化的条件下分步作用可以进一步提高对菜籽清蛋白水解的程度,使水解度由单酶的14.72%提高至28.10%。离心分离后,上清液呈亮黄色、澄清,苦味较淡。

3.2 复合酶水解所得菜籽肽粗品(RSP)经Sephadex G-25柱层析分离,收集的三个级分,总回收率为54%,RSP-1, 2, 3所占比例依次为30.4%、41.2%和28.4%。

3.3 利用凝胶层析确定RSP-2和RSP-3分子量约为1050D和560D,这两部分小分子肽为后续进一步深入研究生物活性菜籽肽提供了很好的资源。

3.4 糖蛋白因具有独特的生物活性,逐渐成为目前研究较热的一个领域^[10, 11]。实验所得的三个菜籽肽级分均结合有不同含量的多糖,值得针对其生物活性功能进行持续而深入的研究。

参考文献:

- [1] Xue Zhao-hui, Wu Mou-cheng, Yin Jing-zhang. Isolation and characterization of defatted. Hua-Za 3 meal protein[J]. 食品科学, 2004, 25(3): 25-28.
- [2] 田波, 迟玉杰. 蛋清蛋白水解物的水解程度与分子量关系的研究[J]. 食品工业科技, 2002, 23(11): 14-15.
- [3] 中华人民共和国国家标准GB5009.5-85[S]. 北京: 中标准出版社, 1986.
- [4] 张惟杰. 复合多糖生化研究技术[M]. 上海科学出版社, 1987.
- [5] 张龙翔, 张庭芳, 李媛, 等. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981. 119-123, 171-172.
- [6] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度测定的研究[J]. 食品科学, 1994

超临界 CO₂ 萃取对蒙古口蘑多糖提取率的影响

王大为¹, 单玉玲¹, 图力古尔^{2,*}

(1. 吉林农业大学食品工程学院, 吉林 长春 130118

2. 吉林农业大学农学院, 吉林 长春 130118)

摘要: 采用超临界 CO₂ 流体萃取技术脱除蒙古口蘑中脂类及色素物质, 并研究其对蒙古口蘑多糖提取率的影响。通过正交试验方法确定超临界 CO₂ 流体萃取的最佳工艺条件为: 萃取压力 30MPa、萃取温度 45℃、萃取时间 60 min、CO₂ 流量 25L/h, 萃取率为 2.06%。萃取后所得蒙古口蘑粉为乳白色, 风味纯正, 脂肪含量 0.01%。以其为原料提取蒙古口蘑多糖, 多糖色泽乳白, 无异味, 提取率为 6.24%, 分别为溶剂处理及未处理试样的 4.2 倍和 1.8 倍。

关键词: 蒙古口蘑; 多糖; 超临界 CO₂ 流体萃取

Effect of Extraction Rate of Supercritical CO₂ Extraction on Mongolia Mushroom Polysaccharide

WANG Da-wei¹, SHAN Yu-ling¹, TOLGOR Bau^{2,*}

(1. College of Food Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: To degrease and to decolor on mongolia mushroom through supercritical CO₂ fluid extraction, the effects of this method on polysaccharide extraction were studied. The optimum conditions of supercritical CO₂ fluid extraction were determined through orthogonal test: the pressure 30 MPa, temperature 45℃, time 60min, CO₂ flow 26L/h. The percentage of extraction is 2.11%. The color of product is milk white, the flavor pure and the fat content 0.01%. By using this material to extract the mongolia mushroom polysaccharide, the extraction rate of polysaccharide is 6.24% and the polysaccharide's color is milk white with no strange smell. The extraction rate is 4.2 times and 1.8 times in comparison with non-supercritical CO₂ fluid extraction and treatment by solvent respectively.

Key words mongolia mushroom; polysaccharide; supercritical CO₂ fluid extraction

中图分类号: S646.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)03-0107-04

食用菌是一类营养丰富的食品, 具有高蛋白、低脂肪、低热能、多功效等特点。尤其食用菌多糖具有

收稿日期: 2005-11-11

* 通讯作者

基金项目: 国家“十五”重大科技攻关专项(2001BA501A01)

作者简介: 王大为(1960-), 男, 教授, 博士, 主要从事功能食品的研究和开发工作。

(11): 65-67.

[7] 薛照辉, 吴谋成, 尹经章. 复合酶水解菜籽清蛋白的研究[J]. 中国粮油学报, 2004, 19(3): 57-61.

[8] 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用[M]. 武汉大学出版社, 1994. 113-115.

[9] Farmer L J. Poultry meat science[M]. New York: CAB International,

1999. 127-158.

[10] 武金霞, 赵晓瑜. 糖蛋白的结构、功能及分析方法[J]. 生物技术通报, 2004, (1): 31-34.

[11] Xu H P, Tsao T H. Detection and immunolocalization of glycoproteins of the plasma membrane of maize sperm cells[J]. Protoplasma, 1997, 198: 125-129.