

乳酪蛋白肽制备工艺的优化

陈俊德,何慧灵,高 然,易瑞炷* (国家海洋局第三海洋研究所,福建厦门 361005)

摘要 [目的] 研究制备乳酪蛋白肽的最佳工艺。[方法] 以乳酪蛋白为原料,以水解度为考察指标,确定碱性蛋白酶为乳酪蛋白的最佳水解酶。利用单因素试验考察酶解温度、pH、投酶量、酶解时间和底物浓度对水解度的影响,确定主要影响因素。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验获得碱性蛋白酶的最佳水解条件。利用凝胶色谱法确定乳酪蛋白肽的分子量。[结果] 试验得出制备乳酪蛋白肽的最佳工艺为:酶解温度 60 ℃,pH 7.0,投酶量 1.5%,酶解时间 150 min。制备的乳酪蛋白肽分子量为 2 kD。[结论] 研究可为乳酪蛋白活性肽的产业化研发提供理论依据。

关键词 乳酪蛋白;乳酪蛋白肽;水解度;正交试验;分子量

中图分类号 S879.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)26-358-03

Optimization of Preparation Process for Casein Peptides
CHEN Jun-de, HE Hui-ling, GAO Ran, YI Rui-zao* (The Third Institute of Oceanography of the State Oceanic Administration, Xiamen, Fujian 361005)

Abstract [Objective] This paper studied the best preparation process for preparing casein peptides using casein as experimental material. [Method] Alcalase was the optimal enzyme with hydrolysis degree as evaluation indexes. In single factor experiment, hydrolysis temperature, pH value, enzyme concentration, hydrolysis time and substrate concentration were selected to detect the main influence factors. The optimal hydrolysis conditions of alcalase were obtained from the results of $L_9(3^4)$ orthogonal test. The molecular weight of casein peptides were obtained from the results of gel permeation chromatography. [Result] The optimal hydrolysis conditions were obtained as hydrolysis temperature 60 ℃, pH 7.0, enzyme concentration 1.5% and hydrolysis time 150 min through orthogonal test analysis. Casein peptides showed molecular weight of 2 kD. [Conclusion] This paper will provide important theoretical basis and technical approach for casein peptides research and development.

Key words Casein; Casein peptides; Hydrolysis degree; Orthogonal test; Molecular weight

乳酪蛋白是一种重要的蛋白质,富含人体所需的氨基酸,是科研工作者研究的热点,在我国已形成一定规模的产业集群^[1]。乳酪蛋白的氨基酸序列中潜伏着百余种活性多肽,这些活性多肽具有免疫调节、自由基清除、矿物质载体、抗癌、抗菌、降血压、溶栓等功能特征,在功能食品和药品等领域具有广泛的应用前景^[2-7]。然而,这些活性多肽在乳酪蛋白氨基酸序列中不具备活性功能,只有在特异性蛋白酶的酶解过程中,才能从乳酪蛋白序列中释放出来,并发挥其生物功能。因此,笔者利用碱性蛋白酶酶解法制备乳酪蛋白肽,为乳酪蛋白及其衍生物的高附加值开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 原料及试剂:乳酪蛋白,青海凯兴干酪素有限公司;碱性蛋白酶(10⁵ U/g)、中性蛋白酶(10⁵ U/g)、胰蛋白酶(10⁵ U/g),南宁庞博生物工程有限公司;糜蛋白酶(10⁵ U/g),上海林叶生物科技有限公司;盐酸、氢氧化钠,广西西陇化工股份有限公司;Superdex™ Peptide 10/300 GL 凝胶色谱柱,美国 GE 公司;蛋白质标准样品,美国 Sigma 公司。

主要仪器:电热恒温干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;凯氏定氮仪,福斯赛诺分析仪器有限公司;SG2 便携式 pH 计,梅特勒-托利多仪器有限公司;水浴恒温振荡器,太仓市华利达实验设备有限公司;HH-S4 数显恒温水浴锅,金坛市医疗仪器厂;Milli-Q 超纯水纯化系统,美国 millipore 公

司;AKTA 全自动蛋白层析系统,美国 GE 公司;RC6 PULS 大型高速冷冻离心机,美国 Thermo Fisher Scientific;Epsilon 2-6D 冻干机,德国 Christ 公司。

1.2 方法

1.2.1 乳酪蛋白肽制备方法。取一定量的乳酪蛋白,加入 200 ml 纯水,在 85 ℃ 的恒温条件下加热预处理 15 min,冷却到适当的温度,调整 pH,加入一定量的蛋白酶,水解一段时间,水解过程中保持 pH 不变,反应结束后,升温至 85 ℃ 灭酶 10 min。酶解液冷却离心,取上清液冷冻干燥后冷藏备用。

1.2.2 水解酶的选择。以水解度为考察指标,按“1.2.1”的酶解方法,考察碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶的酶解能力,确定酶解乳酪蛋白的最佳水解酶,蛋白酶的酶解条件如表 1 所示。

表 1 蛋白酶的水解条件					
酶的种类	温度 ℃	pH	投酶量 %	底物浓度 %	酶解时间 min
碱性蛋白酶	50	9.0	3	4	240
中性蛋白酶	50	7.0	3	4	240
糜蛋白酶	50	8.5	3	4	240
胰蛋白酶	37	8.0	3	4	240

1.2.3 单因素试验。取上述水解酶酶解乳酪蛋白,以水解度为考察指标,考察不同酶解温度、pH、酶解时间、加酶量、底物浓度对酶解效率的影响,初步确定该酶的酶解条件。

1.2.4 正交试验。在单因素试验的基础上,根据正交试验的中心组合试验设计原理,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验设计,以水解度为考察指标,确定优先酶的最佳酶解条件。

1.2.5 水解度(DH)的测定。水解度的测定采用 pH-stat

基金项目 福建省科技计划重点项目(2013N0020);国家青年科学基金项目(41106149);厦门市海洋经济创新发展区域示范项目(厦海渔合[2013]19号)。

作者简介 陈俊德(1979-),男,福建漳州人,副研究员,博士,从事生物活性物质研发工作。*通讯作者,研究员,从事药物研发工作。

收稿日期 2015-07-16

法^[8-9],根据水解过程中消耗的氢氧化钠的量计算水解度:

$$DH = (B \times N_b) / (\alpha \times M_p \times h_{tot})$$

式中, B ,水解中消耗氢氧化钠的体积(L); N_b ,所用氢氧化钠的物质的量浓度(mol/L); α , α 氨基的解离度; M_p ,底物蛋白质总量(g); h_{tot} ,每克底物蛋白质中肽键的克当量(mol/g),乳酪蛋白的 h_{tot} 为8.2。

1.2.6 分子量的测定。采用凝胶色谱法检测产品的分子量,检测条件为:色谱柱:Superdex™ 200 10/300 GL;流动相:0.05 mol/L 磷酸缓冲盐缓冲液;流速:0.5 ml/min;检测波长:215 nm。标准蛋白分子量分别为 cytochrome C (12 384 D)、aprotinin (6 512 D)、vitamin B₁₂ (1 855 D)、(Gly)₃ (189 D)、gly (75 D)。

1.2.7 数据处理。所有数据均重复3次,采用 Sigmaplot 软件对试验数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 乳酪蛋白水解酶的确定 根据表1中的蛋白酶的水解条件可以得出,4种蛋白酶对乳酪蛋白的酶解效果各不相同,碱性蛋白酶水解乳酪蛋白时水解度最高,为(21.71±0.15)%;糜蛋白酶水解乳酪蛋白时水解度最低,为(15.03±0.08)%;而中性蛋白酶和胰蛋白酶水解乳酪蛋白时的水解度分别为(19.21±0.27)%、(17.45±0.24)%。因此筛选出碱性蛋白酶为水解乳酪蛋白的最佳蛋白酶。

2.2 碱性蛋白酶水解乳酪蛋白的单因素试验

2.2.1 酶解温度的影响。在酶添加量为3%,底物浓度为4%,pH为9.0,酶解时间为240 min的条件下,考察反应温度为30、40、50、60、70℃对水解度的影响。由图1可知,开始阶段,水解度随着温度的增加而大幅上升;当温度达到60℃时,水解度达到最高;当温度大于60℃时,随着温度的增加,水解度反而下降,这是因为温度过高,部分乳酪蛋白肽被降解成氨基酸。因此,选择酶解温度为60℃。

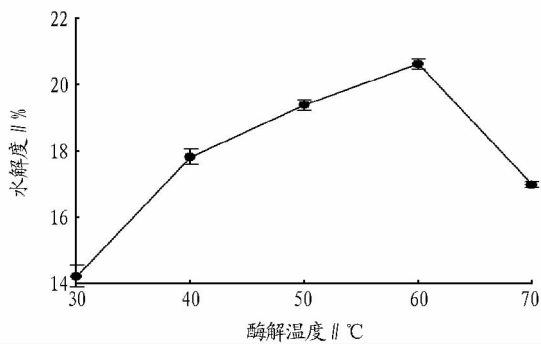


图1 温度对水解度的影响

2.2.2 pH的影响。在酶添加量为3%,底物浓度为4%,温度为60℃,酶解时间为240 min的条件下,考察pH 6.0、7.0、8.0、8.5、9.0对水解度的影响。由图2可知,pH在6.0~7.0时,乳酪蛋白水解度随pH的增加而增加,当pH 7.0时水解度最高。pH在7.0~8.5时,乳酪蛋白水解度随pH的增加而降低,当pH 8.5时水解度最低。pH在8.5~9.0时,乳酪蛋白水解度随pH的增加而增加,当pH 9.0时,碱溶液作用于乳酪蛋白,使得部分乳酪蛋白肽降解成氨基酸,使

得水解度增加。因此,选择pH为7.0。

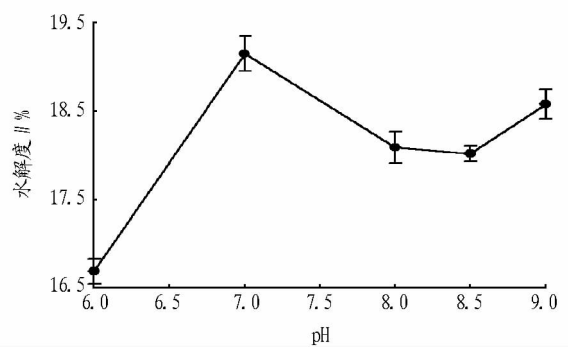


图2 pH对水解度的影响

2.2.3 酶解时间的影响。在酶添加量为3%,底物浓度为4%,温度为60℃,pH为7.0的条件下,考察酶解时间为40、60、105、150、180和240 min对水解度的影响。由图3可知,酶解时间在0~105 min时,乳酪蛋白水解度随酶解时间的增加而迅速增加,这是因为随着时间的延长,酶活力得到充分的利用,酶解反应进行的较完全。酶解时间在105~240 min时,乳酪蛋白水解度随酶解时间的增加而缓慢增加,这是因为在105 min时,碱性蛋白酶完成了大部分乳酪蛋白的酶切位点的酶解,继续增加时间,无法提高大幅度水解度。考虑到酶解时间太短影响酶解效果,时间太长不利于工业化生产,故选择酶解时间为105 min。

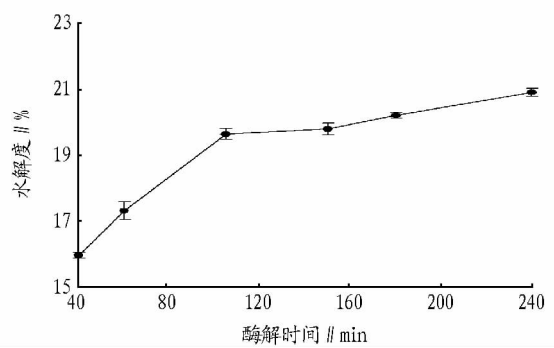


图3 酶解时间对水解度的影响

2.2.4 投酶量的影响。在酶解时间为105 min,底物浓度为4%,温度为60℃,pH为7.0的条件下,考察投酶量为0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、6.0%、8.0%、10.0%和12.0%对水解度的影响。由图4可知,投酶量为0.1%~6.0%时,乳酪蛋白水解度随投酶量的增加而迅速增加,这是因为随着投酶量的增加,乳酪蛋白的酶解反应进行的越完全。在投酶量大于6.0%时,乳酪蛋白水解度随投酶量的增加而缓慢增加,这是因为在投酶量为6.0%时,碱性蛋白酶完成了大部分乳酪蛋白的酶切位点的酶解,继续增加蛋白酶,无法提高大幅度水解度。因此,选择投酶量为6.0%。

2.2.5 底物浓度的影响。在酶解时间为105 min,酶与底物之比为6.0%,温度为60℃,pH为7.0的条件下,考察底物浓度为3.0%、4.0%、6.0%和9.0%对水解度的影响。由图5可知,底物浓度为3.0%~4.0%时,随着底物浓度的增加,水解度随之迅速增大,底物浓度大于4.0%时,随着底物

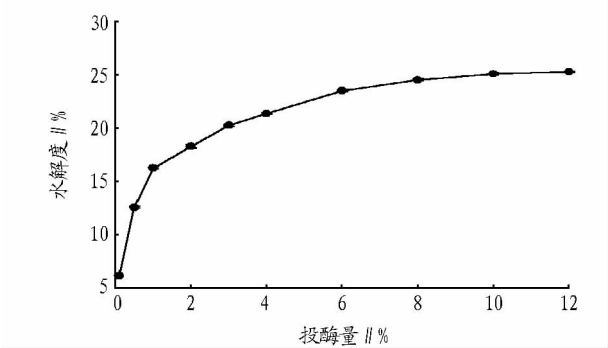


图4 投酶量对水解度的影响

浓度的增加,水解度增加幅度较小。因此,选择底物浓度为4.0%。

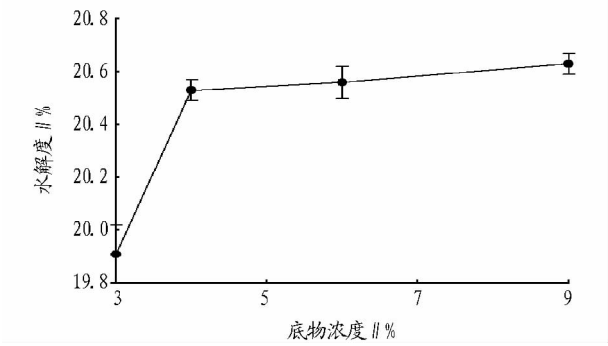


图5 底物浓度对乳酪蛋白水解度的影响

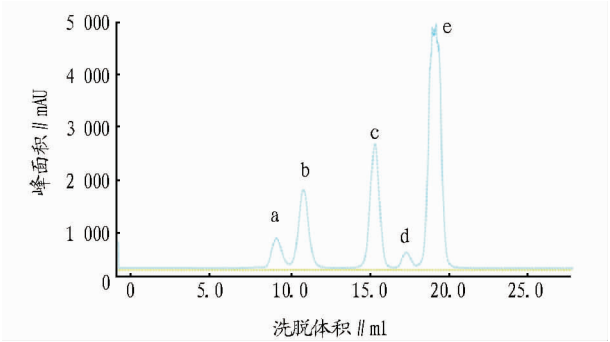
2.3 碱性蛋白酶水解乳酪蛋白的正交试验 根据单因素试验结果分析,底物浓度对水解度的影响最小,因此确定正交试验的4个因素为:温度、pH、投酶量和酶解时间,因素水平设计见表2。通过以上4个因素3水平 $L_9(3^4)$ 进行正交试验,优化出酶的最佳水解条件,试验结果如表3所示。由表3可知,各因素对水解度影响的主次顺序依次为:酶解温度(A)、投酶量(C)、酶解时间(D)、pH(B),其最佳工艺条件为 $A_3B_1C_3D_3$,即酶解温度为60℃,投酶量为1.5%,酶解时间是150 min,pH为7.0。采用最佳工艺条件($A_3B_1C_3D_3$)对乳酪蛋白进行酶解验证,水解度为 $(22.31 \pm 0.82)\%$ 。

表2 碱性蛋白酶酶解正交试验因素水平设计

水平	因素			
	酶解温度(A)/℃	酶解pH(B)	投酶量(C)/%	酶解时间(D)/min
1	40	7.0	0.5	60
2	50	7.5	1.0	105
3	60	8.0	1.5	150

2.4 乳酪蛋白肽的分子量 利用凝胶色谱 Superdex™ peptide 10/300 GL 检测乳酪蛋白肽的分子量,5种标准样品的分子量如图6所示,以各标准样品分子量的对数值对洗脱体积做标准曲线,得到的回归方程为 $\lg Mr = -0.2293V + 6.3758$ ($R^2 = 0.9921$)。式中, Mr 为分子量, V 为洗脱体积。通过乳酪蛋白肽的洗脱体积(图7)计算试验制备的乳酪蛋白肽的分子量为2 kD。

序号	因素				水解度//%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	6.90
2	1	2	2	2	11.51
3	1	3	3	3	13.96
4	2	1	2	3	16.84
5	2	2	3	1	14.66
6	2	3	1	2	12.63
7	3	1	3	2	19.10
8	3	2	1	3	15.30
9	3	3	2	1	15.37
K_1	10.79	14.28	11.61	12.31	
K_2	14.71	13.82	14.57	14.41	
K_3	16.59	13.99	15.91	15.37	
R	5.80	0.46	4.30	3.06	



注:a. cytochrome C ; b. aprotinin ; c. vitamin B₁₂ ; d. (Gly)₃ ; e. gly。

图6 标准样品的洗脱峰

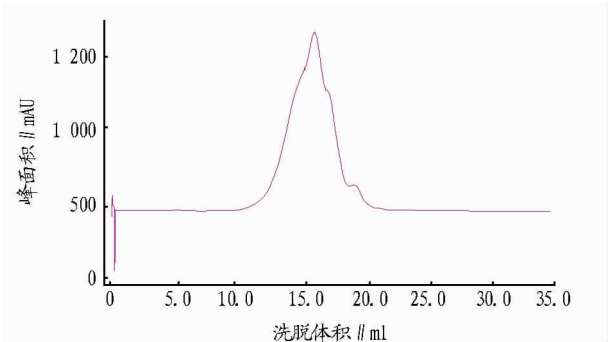


图7 乳酪蛋白肽的洗脱峰

3 结论

该研究通过比较不同蛋白酶对乳酪蛋白酶解效果的影响,确定碱性蛋白酶为乳酪蛋白的最佳用酶,在单因素试验的基础上,利用正交试验优化酶解工艺条件,确定其最佳工艺为酶解温度为60℃,投酶量为1.5%,酶解时间是150 min,pH为7.0。在此条件下,碱性蛋白酶酶解乳酪蛋白的水解度可达 $(22.31 \pm 0.82)\%$,且制备的乳酪蛋白肽分子量为2 kD。该研究可为乳酪蛋白活性肽的产业化研发提供理论依据。

参考文献

[1] 汪玉松, 邹思湘. 乳生物化学[M]. 长春: 吉林大学出版社, 1995.
[2] EBNER J, ASCI ARSLAN A, FEDOROVA M, et al. Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains[J]. Journal of proteomics, 2015, 117: 41–57.

强度显著低于对照,峰值分别为 39.12 和 68.34 mg/(kg·h),这可能是其延缓后熟进程的原因之一。腐胺并没有推迟呼吸高峰到来的时间,可能和试验所用香蕉的成熟阶段有关。吴振先等研究指出,1-甲基环丙烯处理不同成熟阶段香蕉对果实后熟的影响表现不同,对第 2 阶段后的香蕉处理,呼吸高峰出现的时机与对照相同^[16]。

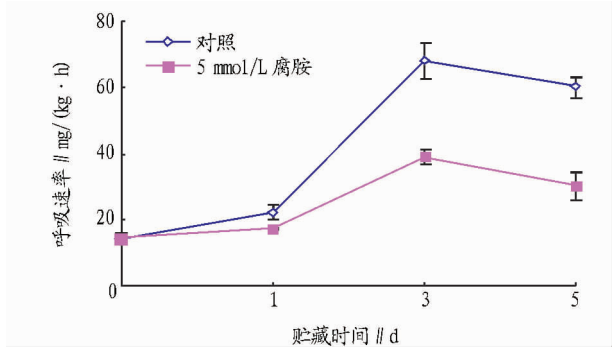


图 5 腐胺对香蕉呼吸强度的影响

3 结论

对香蕉后熟进程的调控直接影响其感官和营养品质,进而影响货架期和经济效益。果皮褪绿转黄和果肉软化是香蕉果实后熟过程中发生的最显著的变化^[17],该试验的研究表明,5 mmol/L 腐胺显著减缓香蕉果皮转黄、果肉软化和可溶性固形物增加速度,同时有效维持了细胞膜的完整性,其作用机理为腐胺降低了香蕉的呼吸强度,但对呼吸高峰的到来时间没有影响。Jiang 等指出,香蕉的乙烯产生和呼吸速率高峰几乎同时出现^[18],所以后续的研究应该分析腐胺对香蕉采后乙烯含量的影响。另外,活性氧过量产生导致膜脂过氧化是加速采后果蔬后熟、衰老的重要原因,草酸减缓香蕉后熟进程的机理之一是提高了抗氧化能力^[13],腐胺延缓香蕉果实后熟是否通过提高抗氧化酶活性、降低活性氧水平有关还需进一步研究。最后,腐胺对后熟相关基因表达的影响也将是今后研究的重点。

参考文献

[1] WALDEN R, CORDEIRO A, TIBURCIO A F. Polyamines; Small molecules

.....

(上接第 360 页)

[3] TANG W T, YUAN H N, ZHANG H, et al. An antimicrobial peptide screened from casein hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane affinity method[J]. Food control, 2015, 50: 413–422.

[4] CARCÍA-TEJEDOR A, SÁNCHEZ-RIVERA L, RECIO I, et al. Dairy *Debaryomyces hansenii* strains produce the antihypertensive casein-derived peptides LHLPLP and HLPLP[J]. LWT-food science and technology, 2015, 61: 550–556.

[5] NONGONIERMA A B, FITZGERALD R J. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides[J]. Journal of functional foods, 2013, 5: 1909–1917.

[6] SU R X, LIANG M, QI W, et al. Pancreatic hydrolysis of bovine casein;

triggering pathways in plant growth and development[J]. Plant physiology, 1997, 113: 1009–1013.

[2] VALEO D, MARTÍNEZ-ROMERO D, SERRANO M. The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit[J]. Trends Food Sci Tech, 2002, 13: 228–234.

[3] KRAMER G H, WANG C Y, CONWAY W S. Inhibition of softening by polyamine application in ‘Golden Delicious’ and ‘Mcintosh’ apple[J]. J Am Soc Hortic Sci, 1991, 116: 813–816.

[4] VALERO D, MARTINEZ-ROMERO D, SERRANO M, et al. Influence of postharvest treatment with putrescine and calcium on endogenous polyamines, firmness and abscisic acid in lemon (*Citrus lemon* L. Burm cv Verna)[J]. J Agri Food Chem, 1998, 46: 2102–2109.

[5] MALIK AU, SINGH Z. Pre-storage application of polyamines improve shelf life and fruit quality of mango[J]. J. Hortic Sci Biotech, 2005, 80: 363–369.

[6] KHAN A S, SINGH Z, ABBASI N A. Pre-storage putrescine application suppresses ethylene biosynthesis and retards fruit softening during low temperature storage in ‘Angelino’ plum[J]. Postharvest Biol Tech, 2007, 46: 36–46.

[7] SHIRI M, GHASEMNEZHAD A, BAKHSHI DAVOOD M, et al. Effect of postharvest putrescine application and chitosan coating on maintaining quality of table grape cv. Shahroudi during long term storage[J]. J Food Process Pres, 2012, 5: 999–1007.

[8] HARINDRA CHAMPA W A, GILL M I S, MAHAJAN BVC, et al. Postharvest treatment of polyamines maintains quality and extends shelf-life of table grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. flame seedless[J]. Postharvest Biol Tech, 2014, 91, 57–63.

[9] McGUIRE R G. Reporting of objective color measurements[J]. Hort Sci, 1992, 27(12): 1254–1255.

[10] 张爱玉, 李俊, 黄秉智, 等. 韭菜提取物对香蕉后熟过程中主要生理指标变化的影响[J]. 食品科学, 2011, 32(20): 253–256.

[11] 林德球, 刘海, 刘海林, 等. 高氧对香蕉果实采后生理的影响[J]. 中国农业科学, 2008, 41(1): 201–207.

[12] 张明晶, 姜微波. 1-MCP 乙烯受体阻断剂对香蕉果实采后生理和品质的影响[J]. 农业工程学报, 2006(9): 270–272.

[13] HUANG H, JING G, GUO L, et al. Effect of oxalic acid on ripening attributes of banana fruit during storage[J]. Postharvest Biol Tech, 2013, 84: 22–27.

[14] 安广杰. 多胺对采后香蕉贮藏生理的影响研究[D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2001.

[15] 周兆禧, 赵家桔, 马蔚红, 等. 3 个品种香蕉果实中糖酸组分及含量的比较分析[J]. 热带作物学报, 2011, 32(8): 1453–1456.

[16] 吴振先, 张延亮, 陈永明, 等. 1-甲基环丙烯处理对不同成熟阶段香蕉果实后熟的影响[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(4): 15–18.

[17] 庞学群, 李云, 徐兰英, 等. 不同温度下后熟香蕉果实果皮生理与颜色变化[J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(6): 531–536.

[18] JIANG Y, JOYCE D C, MACNISH A J. Extension of the shelf life of banana fruit by 1-methylcyclopropene in combination with polyethylene bags[J]. Postharvest Biol Tech, 1999, 16: 187–193.

Peptide release and time-dependent reaction behavior[J]. Food chemistry, 2012, 133: 851–858.

[7] 陈东平, 牟光庆. 不同分子量酪蛋白肽对自由基清除作用研究[J]. 中国酿造, 2010(4): 33–35.

[8] BOUGATEF A, NEDJAR-ARROUME N, RAVALLEC-PLÉ, R et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases[J]. Food chemistry, 2008, 111: 350–356.

[9] 胡新颖. 山核桃蛋白多肽制备方法的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2002.