磷酸化处理对酪蛋白酶解特性的影响

王金水[1]，蔺丹华[2]，苏银杰[2]，高芸芳[2]
（1. 河南工业大学生物工程学院，河南郑州 450001）（2. 河南工业大学粮油食品学院，河南郑州 450001）

摘要：采用三聚磷酸钠（STP）对酪蛋白进行改性，在 pH 为 9、STP 的添加量为 5%、温度为 30 ℃的条件下磷酸化 3 h，此时酪蛋白的磷酸化程度为 18.18 mg 磷/g 酪蛋白。利用胰蛋白酶对不同磷酸化程度的酪蛋白进行酶解。研究了 STP 处理对酶解过程中水解度、水溶性氮含量、氨基氮和肽氮含量变化规律的影响，并且用分子排阻色谱（HPSEC）研究了酶解液中的 MWD（分子量分布）。结果表明：磷酸化处理后，酪蛋白的水解度及酶解液中氨基氮含量较对照组显著提高（P<0.01），并且不同磷酸化程度的酪蛋白之间有显著差异（P<0.05）。磷酸化 3 h 的酪蛋白的酶解液中水溶性氮和肽氮含量显著提高（P<0.01）。磷酸化处理与对照组相比，其保留时间变短，并且在保留时间为 12 min 时出现新的吸收峰，磷酸化处理显著提高酶解液中分子量为 2×10^4~3.5×10^4 u 之间的多肽含量。

关键词：酪蛋白；磷酸化；胰蛋白酶；水解度；分子排阻色谱

文章篇号：1673-9078(2013)12-2816-2820

Influence of Phosphorylation Treatment on Enzymatic Hydrolysis Characteristics of Casein

WANG Jin-shui[1], LIN Dan-hua[2], SU Yin-jie[2], GAO Yun-fang[2]
(1.College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)
(2.College of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Casein was phosphorylated using sodium tripolyphosphate (STP) under the following optimal conditions: 5% STP, 30 ℃ and pH 9. The degree of phosphorylation reached to the largest (18.18 mg phosphorus/g casein) after treatment for 3 h under above conditions. And then the different levels of phosphorylated casein were hydrolyzed with trypsin. The degree of hydrolysis, the changes of soluble nitrogen, aminonitrogen and peptide nitrogen contents during enzymatic hydrolysis process were studied. The molecular weight distribution (MWD) of hydrolysate was detected by high performance size exclusion chromatography (HPSEC). The results showed that the degree of hydrolysis and amino nitrogen content significantly ($P<0.01$) increased after phosphorylated, and obvious ($P<0.05$) differences were found between different levels of phosphorylation. In the hydrolysates of casein phosphorylated for 3 h, the soluble nitrogen and peptide nitrogen contents were significantly ($P<0.01$) improved. Compared with the control, the retention time of phosphorylated was shorter, and a new peak appeared at 12 min. The content of peptides with molecular weight between 2×10^4 u and 3.5×10^4 u increased obviously compared with the control.

Key words: casein; phosphorylation treatment; trypsin; degree of hydrolysis; high performance size exclusion chromatography

酪蛋白在牛乳中占总蛋白的 80%左右，是以胶束形式存在于溶液中。但其在酸性条件下易形成较大凝块，并且其消化率也降低了。通过物理的、化学的和酶法改性可以改变酪蛋白的物理、化学和功能特性[1]。对酪蛋白的研究主要集中在其生理功能上，许多生物活性肽是以一定的氨基酸序列隐藏在酪蛋白分子中，越来越多的课题倾向于研究这些活性肽的释放，现在就大家比较熟悉的方法利用蛋白酶有选择的进行水解。然而，直到现在，这些反应大多在试管中进行，生成活性肽的产率也很低[2]。

收稿日期：2013-07-29
基金项目：国家自然科学基金项目（31071496）
作者简介：王金水（1964-），男，博士，教授，研究方向：食品生物技术

胰蛋白酶是肽链内切酶，它可以把多肽链中赖氨酸（Lys）和精氨酸（Arg）残基中的羧基侧切断。Matheis 等人发现，酪蛋白经过磷酸化改性，磷酸根只能添加到了酪蛋白的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基上[3]，增加了酪蛋白分子的电负性，使酪蛋白分子的构象发生了改变，而现在关于三聚磷酸钠（STP）处理酪蛋白来改善酪蛋白对胰蛋白酶的敏感性的研究还很少。Tong-Xun Liu 等人研究表面，大豆分离蛋白经过化学改性和物理改性是提高酶解液中小肽含量和抗氧化能力的重要手段[4]。R ACHEL B OUTROU 等人通过研究磷酸化和金属离子对酪蛋白的水解，发现磷酸化可以限制多肽酶活性，Cu^{2+}和 Zn^{2+}可以抑制磷酸酶和肽酶活性[5]。Rongxin Su 等人采用胰液处理 4 种不同的

酪蛋白，用液相色谱和质谱连用发跟踪发现它们的酶解速率不同（β-CN>αs1-CN>αS2-CN>K-CN）[6]。对于酪蛋白，高芸芳等人研究超声波处理可以提高其酶解产物中可溶性氮含量[7]，本课题的目的意义在于通过测定酶解过程中试验指标的变化来具体探讨磷酸化改性对其酶解特性影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

酪蛋白（蛋白质含量为 82.84%）：河南省东方惠化工有限公司；胰蛋白酶（酶活力为 1.13×10^5 U/g：Amersco 公司；三聚磷酸钠（STP）：天津市瑞金特化学品有限公司；乙腈：VBS BIOLOGIC INC；其他试剂均是分析纯或优级纯。

1.2 主要仪器与设备

DELTA 320 pH 计，梅特勒托利多仪器有限公司；HJ-4 型多头磁力搅拌器，江苏正基仪器有限公司；DF-Ⅱ集热式磁力加热搅拌器，江苏省金坛市医疗仪器厂；BS210S 型电子天平，北京赛多利斯有限公司；KDN-08C 定氮仪：上海新嘉电子有限公司；TAI SHI LI XIN JI 80-2B，上海安亭科学仪器厂；冷冻干燥机，ALPHA 1-2LD Plus；高效液相色谱仪，Agilent 1260 LC，美国 Agilent 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 胰蛋白酶活力测定

福林法（SB/T 10317-1999）。

1.3.2 酪蛋白的磷酸化处理

称取适量酪蛋白，使其溶解在水中，制备成 5%酪蛋白水溶液。然后缓慢添加 STP，使其浓度为 5%。用 NaOH 溶液调节溶液的 pH 为 9，然后放入设定好一定转速和温度为 30 ℃的恒温摇床中进行磷酸化。到规定时间时取出样品，进行磷酸化测定[8]。

1.3.3 磷酸化后酪蛋白的酶解处理

磷酸化后的酪蛋白溶液→调节溶液 pH 为 8.0→添加一定量的胰蛋白酶→相隔一定时间取出酶解液进行 10 min 沸水浴灭酶→测定水解度、酶解液中可溶性氮含量和氨基氮含量等指标

1.3.4 游离氨基氮的测定

甲醛测定法。

1.3.5 水溶性氮含量的测定

微量凯氏定氮法（GB 50095-2010）。

1.3.6 肽氮含量的测定[7]

肽氮含量（mg/mL）=水溶性氮含量-氨基氮含量

1.3.7 水解度的测定

取蛋白酶解上清液 5 mL 于小烧杯中，加入 60 mL 去 CO_2 水，用 0.1 moL/L NaOH 溶液滴定至 pH 8.2，加调至中性的甲醛(pH 8.2)溶液 20 mL，记录将其 pH 值滴至 9.2 时所消耗的 0.1 mol/L 标准 NaOH 溶液的体积，计算水解度。

$$DH(\%)=\frac{h}{h_{tot}} \qquad h=\frac{C(V_1-V_0)}{V\cdot S\cdot W}$$

其中，C 为标准 NaOH 溶液浓度，mol/L；V_1 为样品耗用标准 NaOH 溶液毫升数，mL；V_0 为空白耗用标准 NaOH 溶液毫升数，mL；V 为吸取酶解液的体积，mL；S 为底物浓度；W 为样品中蛋白质含量，本实验中测定酪蛋白样品中蛋白质含量为 82.84%；h_{tot} 为蛋白质中肽键总数 mmol/g，酪蛋白中肽键总数为 8.2×10^{-3} mol/g。

1.3.8 HPSEC

样品溶解在 10%的乙腈中，其浓度为 0.1 mg/mL。流动相为 10%乙腈，色谱柱是 Agilent PL aquagel-OH MIXED-H（8 μm，300×7.5 I.D.），柱温为 30 ℃，流速设为 0.5 mL/min，进样量 10 μL，检测器为 DAD 检测器，检测波长为 220 nm 处的吸收峰。流动相和样品上柱子前均要用 0.45 μm 的水系膜过滤。

1.4 数据分析

实验指标（水解度、氨基氮含量和水可溶性氮含量）的测定进行 3 组平行试验，结果通过 SPSS 统计分析软件进行 95%和 99%水平方差分析检验。试验指标变化规律的图形绘制用的是 Origin 8.5.1 软件。

2 结果与分析

2.1 胰蛋白酶酶解酪蛋白的最佳条件

根据课题组前期试验成果，以水解度为指标，通过正交试验得到胰蛋白酶酶解酪蛋白的最佳条件为：蛋白质的浓度为 5%，温度为 40 ℃，pH 为 8.0，胰蛋白酶的用量[E/S]=2500 U/g[7]。

2.2 酪蛋白的磷酸化处理

经过上述 1.3.2 中的步骤进行改性，分别测定的在磷酸化了 30 min、1 h、2 h、3 h、4 h 和 5 h 时，酪蛋白的磷酸化程度见图 1。

由图 1 可以看出，在反应的前 3 h 里，磷酸化反应迅速进行，并到 3 h 时磷酸化程度最大，此时新加上的 P 为 18.18 mg/g 酪蛋白。而 Hirotsuk 用 POCL3 对大豆分离蛋白进行磷酸化，磷的添加量为 0.014

mg/mg 大豆分离蛋白[9]。通过试验已经证实磷酸根主要连接在氮原子上，实质上是赖氨酸残基的磷酸氨基酯化。随着反应的继续进行，酪蛋白的磷酸化程度下降，这是因为随着磷酸根添加到酪蛋白分子上，溶液的 pH 值升高，这样就阻碍的更多的磷酸根与酪蛋白结合。在磷酸化 3 h时达到了动态平衡。这与康鹏[10]用吸光度法测的磷酸化程度大致相同。

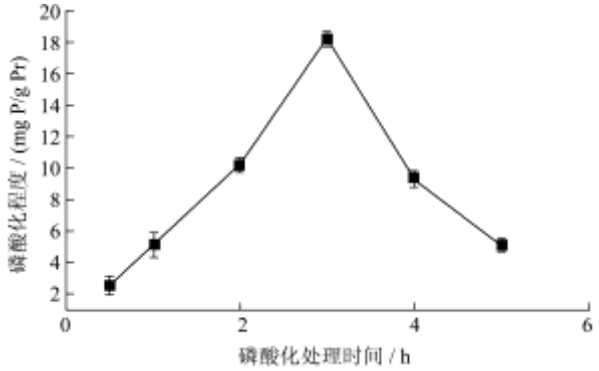


图 1 酪蛋白磷酸化处理时间对磷酸化程度的影响

Fig.1 The influence of processing time on the degree of phosphorylation of casein

2.3 磷酸化处理酪蛋白对其酶解特性的影响

选用磷酸化 30 min 和 3 h 的酪蛋白进行酶解，分析比较不同磷酸化程度的酪蛋白的酶解特性。

2.3.1 不同磷酸化程度的酪蛋白酶解过程中水解度的变化

在胰蛋白酶的最佳酶解条件下（温度为 40 ℃，pH 为 8.0，底物浓度为 5%，加酶量为 2500 U/g 酪蛋白），测定 72 h 内不同时间酶解液的水解度，其结果如图 2。

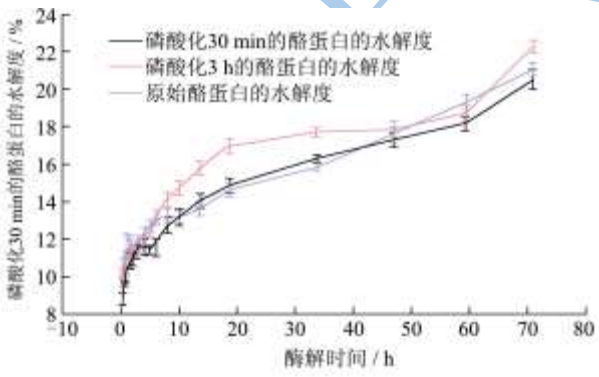


图 2 不同磷酸化程度的酪蛋白酶解过程中水解度的变化

Fig.2 The change of hydrolysis degree of the enzymatic hydrolysates with different phosphorylation level

由图 2 可以看出，未经处理的酪蛋白在前 12 h 的水解过程中，水解度增加显著（P<0.01），符合 y=0.83 ln(x)+11.27（r^2=0.96），即水解度在 12 h 内是呈对数形式增长的。由图可以看出，在酶解 12 h 以内，磷酸化 30 min 和磷酸化 1 h 的酪蛋白与对照组的变化趋势大致一致。但磷酸化 3 h 的酪蛋白的水解度明显比对照组和磷酸化 30 min 的酪蛋白增长显著。酶解 12 h 后，三种酪蛋白的水解度差异显著增大，磷酸化 3 h 的酪蛋白的水解度显著增加，而磷酸化 30 min 的酪蛋白的水解度与对照组相比，水解度的提高不显著。

Rongxin Su 等人研究表明，酪蛋白在溶液中是依聚合物和单体形式动态平衡存在的，并随着胰蛋白酶的水解，单体逐渐减少而聚合物的大小和分子量呈上升趋势，是因为分子间斥力减小的缘故[11]。而磷酸跟的引入，可以提高分子间斥力，从而提高单体的量，继而提高酶解效率。试验表明，磷酸化改性可以不同程度的提高酪蛋白的水解度，并且磷酸化程度越高的酪蛋白，其水解度的提高越显著。

酪蛋白是以 Waugh 胶粒核-壳膜式在溶液中存在的，α-酪蛋白和 β-酪蛋白构成胶粒核，K-酪蛋白构成核膜。在酶解初期，胶粒极易水解，即初期水解度变化显著。而磷酸化改性可以在酪蛋白分子上添加磷酸根基团，增加了分子的电负性，使蛋白分子的结构发生变化，故证明了这种变化利于酶解。

2.3.2 不同磷酸化程度的酪蛋白酶解过程中水溶性氮含量的变化

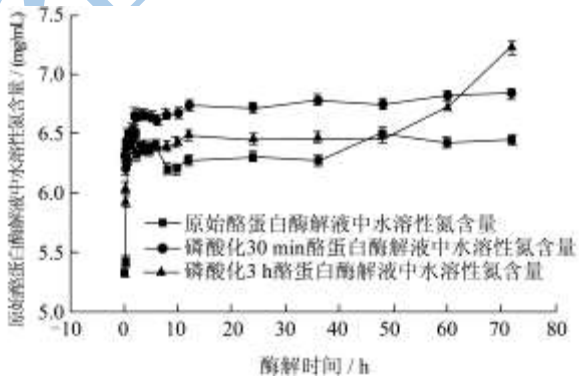


图 3 不同磷酸化程度酪蛋白酶解液中水溶性氮含量

Fig.3 The change of soluble nitrogen content in the enzymolysis liquid with different levels of phosphorylation casein

由图 3 可以看出，在酶解过程中不同磷酸化程度酪蛋白的水溶性氮含量的变化，在酶解 1 h 内，水溶性氮含量增加极显著（P<0.01），磷酸化前后的酪蛋白的水溶性氮含量没有显著差异，而之后可以明显看出，磷酸化后的酪蛋白的水溶性氮含量与对照组相比显著增加。并且在 10 h 到 50 h 内，磷酸化 3 h 的酪蛋白的水溶性氮含量低于磷酸化 30 min 的，并且增加趋势已经趋于平缓。这可能是由于在此时间段，可溶性氮的生成很少，主要生成的是不溶性氮。不溶性氮是由于一些多肽的疏水氨基酸富集，并且暴露在蛋白质的表面，经过聚集形成小颗粒而沉淀。而水解 50 h 后，磷酸化 3 h 的酪蛋白的水溶性氮明显增加，可能是由于

新引进磷酸集团对酪蛋白结构的影响，使那些疏水性肽利于水解，生成的可溶性小肽增加，故水溶性氮含量增加。

2.3.3 不同磷酸化程度的酪蛋白酶解过程中氨基氮含量的变化

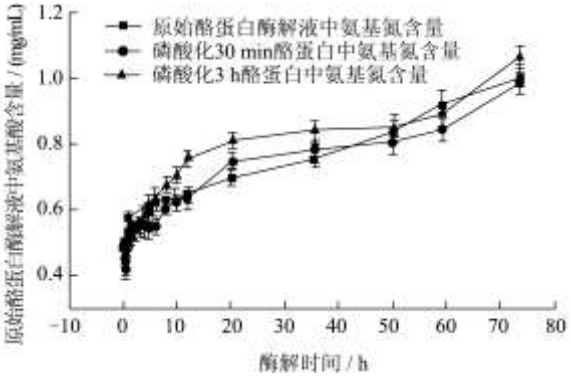


图 4 不同磷酸化程度酪蛋白酶解液中氨基氮含量变化

Fig.4 The change of free amino nitrogen content in the enzymolysis liquid with different levels of phosphorylation casein

由图 4 可知，氨基氮含量呈增大趋势，表示酶解液中氨基酸含量，其测定方法与水解度的测定方法一致，故其变化趋势也一致。即磷酸化处理可以提高酶解过程中游离氨基氮含量。

2.3.4 不同磷酸化程度的酪蛋白酶解过程中肽氮含量的变化

图 5 是不同磷酸化程度下酪蛋白酶解过程中肽氮含量的变化。由此图可以看出，试验组和对照组的肽氮含量在酶解 1 h 内，变化不显著。说明在反应初期，底物充足，酶活性保持最佳，肽氮含量迅速增加。酶解 10 h后，磷酸化 30 min 酪蛋白和对照组的肽氮含量基本不变，而其水解度增大，可溶性氮基本不变，说明此阶段主要是前阶段生成多肽的进一步水解。而磷酸化 3 h 的酪蛋白的肽氮含量在酶解 40 h 后又显著增大，说明磷酸化可以促进胰蛋白酶对酪蛋白的水解，并且磷酸化程度越大，效果越明显。

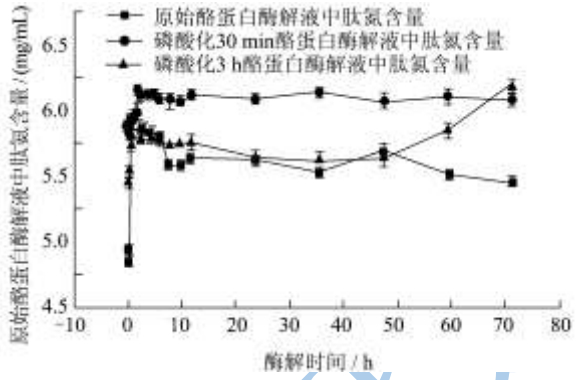


图 5 不同磷酸化程度的酪蛋白酶解过程中肽氮含量变化

Fig.5 The change of peptide nitrogen content in the enzymolysis liquid with different levels of phosphorylation casein

2.3.5 不同磷酸化程度的酪蛋白酶解液中分子量分布

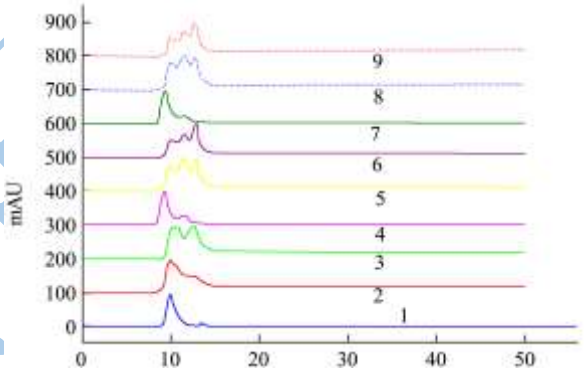


图 6 不同磷酸化程度酪蛋白的酶解液的分子量分布

Fig.6 MWD of the enzymolysis liquid with different levels of phosphorylated casein

表 1 图 6 的分析数据表

Table 1 Data analysis of Fig.6

编号	分子量分布/%				
	2×10^4 u	(2×10^4~3×10^4) u	(3×10^4~3.5×10^4) u	(3.5×10^4~4×10^4) u	4×10^4 u
1	4.35±0.03	1.23±0.01	0.84±0.009	1.09±0.001	88.5±0.04
2	55.51±0.01	10.12±0.007	4.62±0.01	4.91±0.05	24.85±0.02
3	65.72±0.07	10.54±0.13	4.07±0.12	4.33±0.10	16.22±0.08
4	16.81±0.39	14.10±0.37	5.31±0.33	3.39±0.30	61.32±0.28
5	56.09±1.03	23.00±1.07	6.32±1.03	4.39±1.00	16.60±1.03
6	64.58±0.01	14.60±0.01	5.12±0.02	3.22±0.02	12.48±0.01
7	12.73±0.07	12.10±0.06	4.77±0.04	4.57±0.04	66.97±0.05
8	56.26±0.14	16.67±0.05	6.05±0.04	4.00±0.04	17.04±0.03
9	63.55±0.03	14.87±0.02	5.34±0.02	3.24±0.02	12.99±0.01

由图6和表1可以看出，1、2和3分别代表酪蛋白，酶解10 min的和酶解12 h的；4、5和6分别代表磷酸化30 min的酪蛋白，及其酶解30 min和12 h的酶解液；7、8和9分别代表磷酸化3 h的酪蛋白，及其酶解30 min和

12 h的酶解液。由图6可以看出，磷酸化的样品4和7与对照组1相比，其保留时间变短，并且在保留时间为12 min时，出现一个新的吸收峰。而Fidel Toldra´、Laura Molina等人采用固定的猪的组织蛋白酶酶解酪蛋白时，生产的多肽的保留时间在1~20 min[12]，与本试验在20 min后也没有峰出现。随着酶解反应的进行，酪蛋白逐渐被水解成小分子肽，当水解12 h时，磷酸化处理的酪蛋白的酶解液中分子量小于2×10^4 u的肽分别占到56.09%和56.26%，而对照组的占到65.72%，而分子量为2×10^4 u到3.5×10^4 u之间的肽的含量明显增加。并且随着酶解时间的延长，分子量大于4×10^4 u的急剧减少，小于2×10^4 u分子量的肽在酶解开始的一个小时迅速增加。而磷酸化后酪蛋白与对照组相比，分子量为2×10^4 u到3.5×10^4 u之间的肽含量增加，说明磷酸化有利于形成2×10^4~3.5×10^4 u分子量的肽。

3 结论

本试验通过比较不同磷酸化程度的酪蛋白在酶解72 h内，氨基氮含量、水解度、水溶性氮含量和肽氮含量的变化规律，发现在酶解1 h时，磷酸化处理对酪蛋白的酶解特性影响不显著，酶解1 h后，磷酸化程度越大，对酪蛋白的水解度，氨基氮含量提高越显著。并且磷酸化3 h的酪蛋白的水溶性氮和肽氮含量增加极显著（$P<0.01$）。磷酸化处理与对照组相比，其保留时间变短，并且在保留时间为12 min时出现新的吸收峰，磷酸化处理还显著提高酶解液中分子量为2×10^4~3.5×10^4 u之间的多肽含量。

参考文献

[1] Jean-Marc Chobert, Mahmoud Sitohy, John R. Whitaker. Specific Limited Hydrolysis and Phosphorylation of Food Proteins for Improvement of Functional and Nutritional Properties [J]. JAOCS, 1987, 64(12): 1700-1707

[2] Clare D A, Catignani G L, Swaisgood H E. Biodefense properties of milk: The role of antimicrobial proteins and peptides [J]. Current Pharmaceutical Design, 2003, 9 (16): 1239-1255

[3] Matheis G, Penner M H, Feeney R E, et al. Phosphorylation of casein and lysosyme by phosphorus oxychloride [J]. J. Agric. Food Chem., 1983, 31: 379-387

[4] Tong xun Liu, Mou ming Zhao. Physical and chemical modification of SPI as a potential means to enhance small peptide contents and antioxidant activity found in hydrolysates [J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2010, 11: 677-683

[5] R Achel B Outrou, E Lodie Coirre, J Ulienj Ardin, et al. Phosphorylation and Coordination Bond of Mineral Inhibit the Hydrolysis of the β-Casein (1-25) Peptide by Intestinal Brush-Border Membrane Enzymes [J]. J. Agric. Food Chem., 2010, 58: 7955-7961

[6] Rongxin Su, Miao Liang, Wei Qi, et al. Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Peptide release and time-dependent reaction behavior [J]. Food Chemistry, 2012, 133: 851-858

[7] 高芸芳,王金水,苏银杰.超声波处理对酪蛋白-胰蛋白酶体系酶解特性的影响[J].河南工业大学学报,2012,5(33):11
Gao yunfang, Wang jinshui, Su yinjie. Effect of ultrasound treatment on enzymatic hydrolysis characteristics of casein [J]. Academic journal of Henan University of Technology, 2012, 5(33): 11

[8] 李阳阳.大豆分离蛋白磷酸化及功能性质研究[D].天津:天津商学院,2006
Li yangyang. Study on Phosphorylated Modification of Soybean Protein Isolate and Its Functional Properties [D]. Tian Jin: Tian Jin University of Commerce, 2006

[9] Hirotsuka, Motohiko, Taniguchi, et al. Functionality and digestibility of a highly phosphorylated soybean protein. [J] Agricultural and Biological Chemistry, 1984, 48: 93-100

[10] 康鹏.酪蛋白的磷酸化及功能性质研究[D].天津:天津商业大学,2008
Kang peng. The study of Phosphorylation of casein and functional properties [D]. Tianjin: Tianjin commercial university, 2008

[11] Rongxin Su, Zhimin He, Wei Qi. Pancreatic hydrolysis of bovine casein: Changes in the aggregate size and molecular weight distribution [J]. Food Chemistry, 2008, 107: 151-157

[12] Fidel Toldra´, Laura Molina, Sergio Vinuesa, et al. Peptide generation from casein hydrolysis by immobilised porcine cathepsins [J]. Food Chemistry, 2005, 92: 227-233