

碱性蛋白酶 Alcalase 酶解大米蛋白制备小分子肽的动力学研究

吕乐^{1,2}, 刘冬², 万红霞², 李艳², 周丽珍², 陈源², 孙海燕², 杨海燕¹, 余以刚³

(1. 新疆农业大学食品科学与药学学院, 新疆乌鲁木齐 830052) (2. 深圳职业技术学院深圳市发酵精制检测系统重点实验室, 广东深圳 518055) (3. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 以大米蛋白为原料, 用碱性蛋白酶 Alcalase 2.4 L 酶解大米蛋白制备小分子多肽。采用单因素试验方法优化酶解条件, 考察酶解过程中 pH、加酶量、底物浓度和温度酶解初速度的影响, 并建立了酶解动力学方程。研究了最优酶解条件下酶解过程中酶解产物的分子量分布状态。结果表明, Alcalase 2.4 L 酶解大米蛋白的最优 pH 8.5、温度 65 °C、酶底比 0.096 AU/g (底物), 在酶解过程中存在产物抑制, 在研究的底物浓度范围内 (<90 g/kg) 不存在底物抑制。主要动力学参数为: K_m 为 5.76 (g·min)/mmol, V_{max} 为 0.67 mmol/(kg·min), k_2 为 0.28 mmol/(AU·min)。酶解动力学方程为: $1/V_0 = 56.29/[S_0][E_0] + 1/0.28[E_0]$ 。酶解至 3 h 时水解度达到 16%, 酶解产物的分子量在 264~584 u 之间的组分达到 94%, 酶解 3 h 后酶解产物的分子量分布基本保持不变。本研究结果为制备大米蛋白小分子活性肽奠定基础。

关键词: 碱性蛋白酶; 大米蛋白; 酶解动力学

文章编号: 1673-9078(2014)7-149-153

Enzymatic Kinetics of Small Peptides Prepared from Rice Proteins with Alcalase

LV Le^{1,2}, LIU Dong², WAN Hong-xia², LI Yan², ZHOU Li-zhen², CHEN Yuan², SUN Hai-yan², YANG Hai-yan¹, YU Yi-gang³

(1. College of Food Science and Pharmacy, Xinxiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

(2. Shenzhen Key Laboratory of Fermentation, Purification and Analysis, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

(3. School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Enzymatic conditions for preparing small peptides from rice proteins with alcalase 2.4L were optimized by single factor experiment and the enzymatic kinetics was established. The optimal enzymatic conditions were as follows: temperature 55 °C pH 8.5, enzyme-substrate ratio 0.096 AU/g (substrate). Product inhibition was observed during the enzymatic hydrolysis process, but no substrate inhibition was observed within tested substrate concentration (<90 g/kg). The enzymatic kinetic parameters were: $k_2 = 0.28$ mmol/(AU·min), $K_m = 5.76$ (g·min)/mmol, and $V_{max} = 0.67$ mmol/(kg·min). The kinetic enzymatic equation was: $1/V_0 = 56.29/[S_0][E_0] + 1/0.28[E_0]$. After enzymolysis for three hours under the optimal enzymatic condition, the degree of hydrolysis (DH) reached 16% and the hydrolysates content with molecular weight between 264~584 u reached 94%. The molecular weight distribution of hydrolysates was barely changed after 3 h enzymolysis.

Key words: alkaline protease; rice proteins; enzymatic kinetics

收稿日期: 2014-02-24

基金项目: 深圳市科技计划项目 (ZDSY20120619093923525); “十二五”国家科技支撑计划项目 (2012BAD33B10); 广东省科技计划项目 (20B00500006); 广东省高等职业院校珠江学者岗位计划资助项目 (2011 年度)

作者简介: 吕乐 (1988-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与综合利用

通讯作者: 孙海燕 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然活性物质功效及应用; 杨海燕 (1962-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物提取与利用

稻谷是我国产量最高的粮食品种, 占亚洲总产量的37%^[1]。大米及其制品加工过程中的副产物-碎米、米糠、米渣和米糟中含有10%~17%左右的蛋白质。大米蛋白必需氨基酸组成合理, 功效比值为2.0~2.5, 与牛奶中酪蛋白相近, 消化率达90%以上, 其营养价值可与动物蛋白相媲美。除此之外, 大米蛋白是低过敏性蛋白, 不会产生过敏反应, 非常适合作为婴幼儿和特殊人群营养食品^[2-3]。但由于大米蛋白溶解性差、加工性能差等原因, 目前主要作为饲料使用, 资源浪费严重。小分子活性肽又称功能短肽, 是一类具有特定生物活性的肽类总称。现代营养学和临床研究已经证实, 小分子活性肽具有增强机体免疫力、抗高血压、抗氧化、抗疲劳、抗血栓、降血脂、抑菌、抗癌、促进矿物质吸收和促进生长等多种生理功能^[4-5]。此外, 现代营养学和临床研究已经证实, 小分子活性肽(尤其是二肽和三肽)能以完整的形式被人体吸收, 且可以减少游离氨基酸之间的竞争, 具有吸收速度快、耗能低、不易饱和、生物利用度高等优势。国内外已有众多学者开展了以天然动、植物蛋白为原料酶解制备小分子生物活性肽的研究^[6], 研究重点集中在酶解工艺优化(酶的筛选、酶解pH、温度、酶底比优化等)、酶解产物分离和功效学等三个方面。蛋白质酶解制备小分子活性肽工艺的关键是如何提高水解度和小分子活性肽的产率, 而影响水解度和产率的因素除选择合适的酶、适宜酶解pH、温度和酶底比外, 水解过程中的底物抑制和产物抑制作用(即酶解动力学)也是重要的影响因素, 迄今有关蛋白酶解动力学研究报道较少。以大米蛋白为原料酶解制备小分子肽的研究主要集中在制备降血压肽或抗氧化肽的酶解工艺优化和功效学研究^[7-9], 动力学研究未见报道。为此, 本研究采用碱性蛋白酶Alcalase 2.4 L酶解大米蛋白制备小分子活性肽, 通过优化酶解条件和建立酶解动力学模型, 为以后制备小分子功能多肽奠定理论基础, 旨在对大米蛋白进行深度开发利用, 制备出具有特定功能的短肽产品, 应用于营养保健食品产业或医药产业, 提高大米蛋白的利用价值, 提升我国粮食产业深加工水平。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大米蛋白(实验室自己提取, 蛋白含量76.3%); 碱性蛋白酶Alcalase 2.4 L(酶活2.4 AU/g), 丹麦Novo公司; 乙腈(色谱纯), Sigma; 细胞色素C, Sigma; 人血管紧张素II, Sigma; 乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸, Sigma; 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸, Sigma; 其他

试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器

电热恒温水浴锅 XMTD-6000, 北京市长风仪器仪表公司; EUROSTAR Digital S25 德国IKA 数显型电子式搅拌机; 雷磁 PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; Spectramax M5e 多功能酶标仪, 美国 molecular devices 公司; 1200 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; TSKgel G2000SWXL 300 mm×7.8 mm, 日本 TOSOH 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 大米蛋白提取方法

采用稀碱法提取大米蛋白, 提取工艺如下:

米糠→加水(料水比1:10)→提取(pH10.0, 50℃, 3h)→离心(8000 r/min, 15 min)→上清液→等电点沉淀(调至米糠蛋白等电点pI4.5, 静置沉淀3h)→离心(4000 r/min, 15 min)→取沉淀→冷冻干燥→大米蛋白

1.3.2 酶解工艺

准确称取一定量的大米蛋白粉, 用蒸馏水配置成200 g的待酶解蛋白液, 并用NaOH调至酶解pH, 水浴控制酶解温度, 加入Alcalase 2.4 L进行恒温恒pH酶解, 酶解过程中准确记录加入的碱的浓度和体积。

1.3.3 酶解反应初速度的确定

酶解反应初速度以水解肽键速度或生成的游离氨基端速度衡量, 用反应初始阶段NaOH的消耗速度来表示。在酶解反应进行中, 准确记录各时间的耗碱量, 以酶解时间为横坐标, 耗碱量为纵坐标作图, 直线的斜率即为酶解反应初速度 V_0 。

1.3.4 酶解条件优化

单因素试验优化酶解条件。基本酶解条件为: 酶解温度55℃、酶解pH值8.5、加酶量0.024 AU/g、底物浓度4% (m/m)、酶解时间20 min。改变其中一个条件, 固定其他条件, 研究温度、加酶量、底物浓度、pH值对水解初速度的影响。各因素的变化范围如下: 酶解温度45~80℃, 加酶量0.0006~0.24 AU/g, 底物浓度2~90 g/kg, pH值7.0~10.0。

1.3.5 动力学研究

1.3.5.1 米氏常数 K_m 及 V_{max} 确定

碱性蛋白酶是非特异性的水解蛋白酶, 待水解蛋白是大分子蛋白, 酶解反应的过程可以表示如下:



水解在低底物浓度和初始阶段进行时, 可忽略底物和产物抑制的影响。反应初速度(V_0)可用Michaelis-Menten方程表示。通过Lineweaver-burk图解法可求得

米氏常数 K_m 和最大反应速度 $V_{max}^{[10]}$ 。因为

$$V_{max} = k_2[E_0]$$

故通过计算可得 k_2 。

1.3.5.2 产物抑制分析

在底物浓度 4%、加酶量 0.096 AU/g、温度 50 °C 和 pH 8.5 的条件下,加入 2% (*m/m*, 相当于底物浓度的 50%) 不同水解度 (1%~30%) 的水解产物, 计算酶解反应的初速度, 研究不同水解度水解产物对酶解反应初速度的影响。

在底物浓度 4%、加酶量 0.096 AU/g、温度 50 °C 和 pH 8.5 的条件下,加入不同浓度 (0.4%~2.8%) (*m/m*, 相当于底物浓度的 10%~70%) 30% 水解度的水解产物, 计算酶解反应的初速度, 分析不同浓度水解产物对酶解反应初速度的影响。

1.3.6 水解度测定

采用 pH-stat 法测定水解度 (Degree of hydrolysis, *DH*)^[11]。

$$DH = B \times N_b \times 1/\alpha \times 1/M_p \times 1/h_{tot} \times 100\%$$

其中, B -消耗氢氧化钠体积 (mL); N_b -氢氧化钠浓度 (mol/L); M_p -待酶解蛋白溶液中的蛋白质质量 (g); α -氨基的平均解离度 (经测定, 本研究 α 为 0.8968); h_{tot} -待水解蛋白每克所含肽键的总数 (mmol/g), 其中, 大米蛋白 h_{tot} 为 8.4 mmol/g。

1.3.7 不同水解度下分子量分布

在底物浓度 4%、加酶量 0.096 AU/g、温度 50 °C 和 pH 8.5 的条件下酶解, 分别于 0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、8 h、10 h、12 h、16 h、20 h 和 24 h 时取酶解液, 12000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用 RP-HPLC 法测定各酶解时间点上清液中各种短肽的分子量分布情况。流动相为水:乙腈:三氟乙酸=55:45:0.1 (V/V), 检测波长 220 nm; 流速 0.5 mL/min, 柱温 30 °C。标准曲线所用标准品分别为细胞色素 C (M_w 12400)、人血管紧张素 II (M_w 1046.1)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (M_w 451.5) 和乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (M_w 189.17)。

1.3.8 数据处理与统计分析

实验结果用 Mean±SD 表示, 重复三次。显著性采用 SPSS 20.0 软件统计分析, $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 加酶量对初速度的影响

由图 1 可知, 酶底比在 0.006~0.096 AU/g 范围内初速度随加酶量的增加而增大, 酶底比大于 0.096 AU/g 时, 随着加酶量的增加酶解反应的初速度增加不明显 ($p > 0.05$)。因此, 最优酶底比取 0.096 AU/g。

2.2 底物浓度对初速度的影响

底物浓度在 0~90 g/kg 范围内对初速度的影响见图 2, 随着底物浓度的增加, 反应的初速度增加, 说明 Alcalase 2.4 L 水解大米蛋白过程中不存在底物抑制。实验发现当底物浓度大于 90 g/kg 时, 反应体系黏度太大, 无法准确测定酶解初速度。

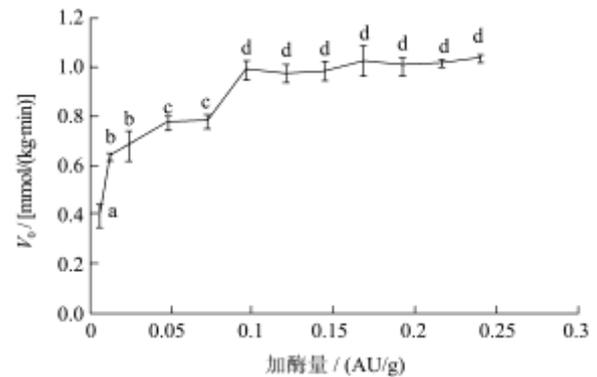


图 1 加酶量对初速度的影响

Fig.1 The influence of enzyme quantity on the initial velocity

注: 曲线上具有共同字母的点表示其无显著性差异, 显著水平为 $p < 0.05$ 。

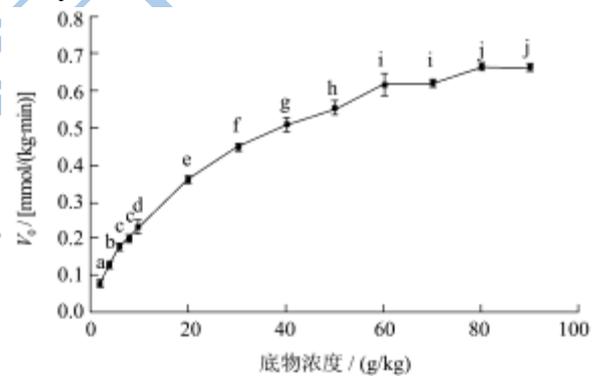


图 2 底物浓度对初速度的影响

Fig.2 The influence of substrate concentration on the initial velocity

注: 曲线上具有共同字母的点表示其无显著性差异, 显著水平为 $p < 0.05$ 。

2.3 pH 对初速度的影响

pH 对初速度的影响见图 3。在 pH 7.0~8.5 之间, 随着 pH 的增加初速度也增加; 在 pH 8.5 和 pH 9.0 的条件下, 酶解反应的初速度达到最大, 随后初速度随着 pH 的增加而下降。取较低的 pH 可减少由于中和反应而带入的盐分, 因此酶解反应 pH 以 8.5 为宜。

2.4 温度对初速度的影响

由图 4 可知, 在 45~65 °C 的范围内, 反应初速度随着温度的增加而增加, 65~75 °C 范围内酶解初速度最大 ($p > 0.05$), 随后初速度随温度增加而减小。因此,

酶解的最优温度为 65 °C。

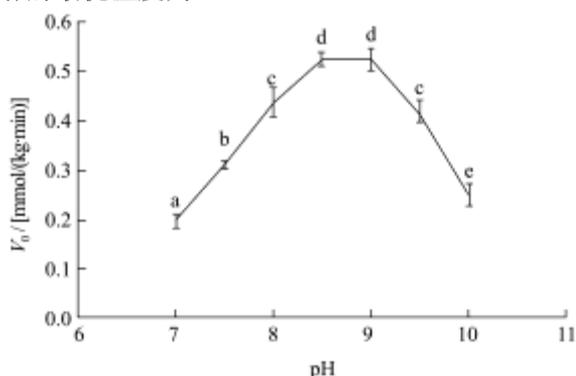


图 3 pH 对初速度的影响

Fig.3 The influence of pH on the initial velocity

注：曲线上具有共同字母的点表示其无显著性差异，显著

水平为 $p < 0.05$ 。

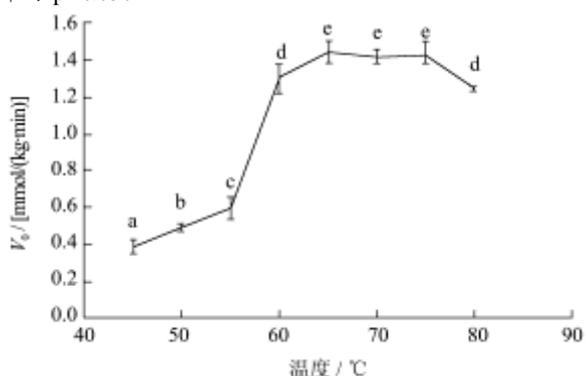


图 4 温度对初速度的影响

Fig.4 The influence of temperature on the initial velocity

注：曲线上具有共同字母的点表示其无显著性差异，显著

水平为 $p < 0.05$ 。

2.5 V_{max} 和 K_m 的确定

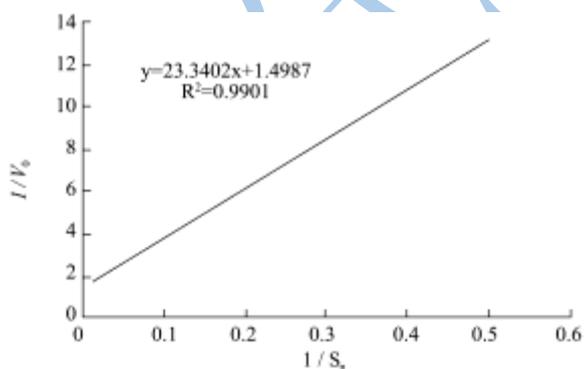


图 5 Lineweaver-Burk 作图法求 K_m 和 V_{max}

Fig.5 K_m and V_{max} estimated by Lineweaver-Burk plot

用在底物浓度 2~90 g/kg、加酶量 0.024 AU/g、温度 50 °C、pH 8.5 条件下所得的初速度 V_0 ，以 $1/S_0$ 为横坐标， $1/V_0$ 为纵坐标，通过 Lineweaver-burk 图解法处理（见图 5），得方程 $y=23.3402x+1.4987$ ， $R^2=0.9901$ ($p < 0.05$)。即可求得 K_m 为 5.76 (g·min)/mmol， V_{max} 为

0.67 mmol/(kg·min)，进而可以求得 k_2 为 0.28 mmol/(AU·min)。

2.6 产物抑制判断

2.6.1 不同水解度产物对初速度的影响

不同水解度产物对初速度的影响见图 6，在加入 2% (m/m) 浓度的水解度为 1%~6% 的水解产物时，对酶解反应有促进作用，原因可能是加入的产物大部分肽键还没有被水解，在酶解反应中继续作为底物参与水解反应。加入 2% 浓度的水解度为 8%~30% 的水解产物时，对酶解反应有抑制作用，原因是加入的产物已经是比较短的肽链了，干扰了酶与底物的结合，从而降低了反应的初速度，抑制了反应进行。

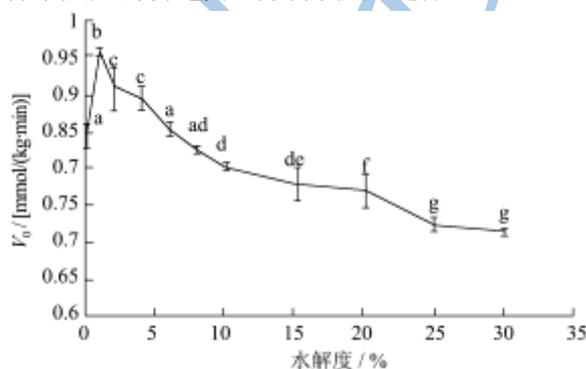


图 6 水解度对初速度的影响

Fig.6 The influence of hydrolysate on the initial velocity at different DHs

注：曲线上具有共同字母的点表示其无显著性差异，显著

水平为 $p < 0.05$ 。

2.6.2 水解度 30% 的水解产物对初速度的影响

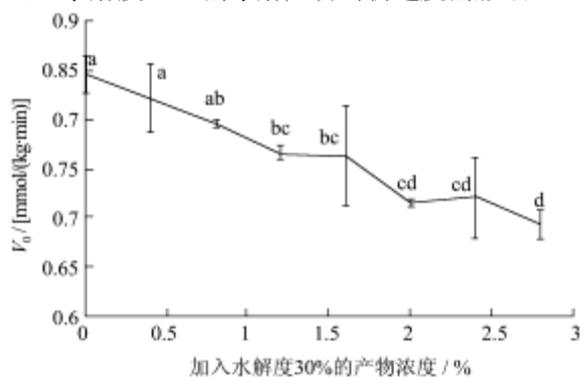


图 7 30% 水解度的水解产物浓度对初速度的影响

Fig.7 The influence of hydrolysate concentration on the initial velocity at 30% DH

注：曲线上具有共同字母的点表示其无显著性差异，显著水平为 $p < 0.05$ 。

30% 水解度的水解产物在不同浓度对水解度的影响见图 7。可见，30% 水解度的大米蛋白水解物（小分子二肽三肽）在不同浓度都对酶解反应有抑制作用，

因此在以酶解制备大米蛋白小分子肽工艺设计中必须考虑将生成的小分子肽（尤其是二肽三肽）不断分离出去，以保证酶解反应的高效率和高产率。

2.7 大米蛋白酶解产物分子量分布

以四种标准物质分子量的对数 $\lg Mw$ 对保留时间作图得到标准曲线，见图 8。标准曲线的回归方程为 $\lg Mw = -0.1947T + 6.5120$ ， $R^2 = 0.9991$ ，这说明各标准品的出峰时间与相对分子量的对数有很好的相关性，可以用来准确测大米酶解产物的分子量分布。

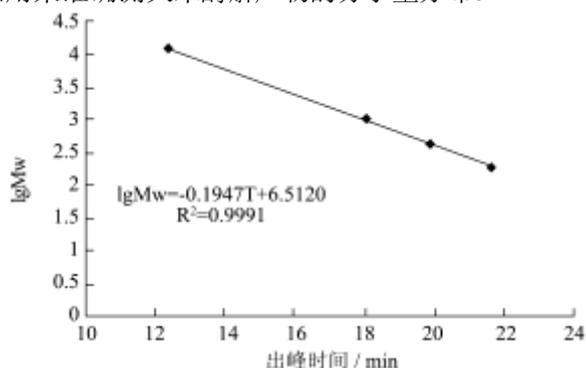


图 8 标准品分子量标准曲线

Fig.8 The curve of standard's molecular weight

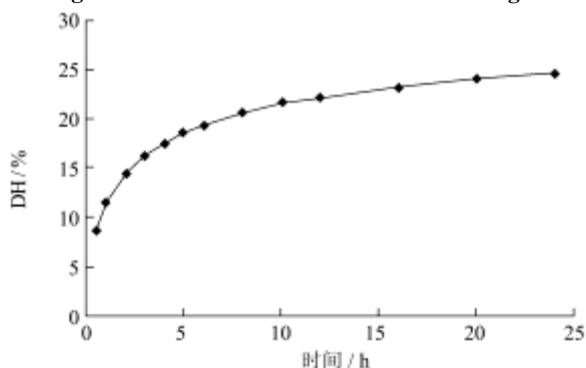


图 9 酶解时间对水解度的影响

Fig.9 The influence of enzymatic hydrolysis time on the DH

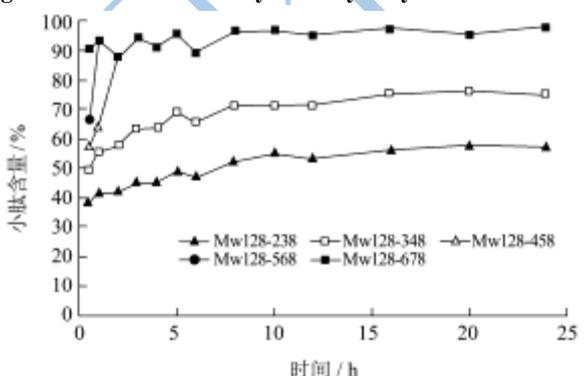


图 10 大米蛋白酶解产物分子量分布

Fig.10 The molecular weight distribution of rice protein hydrolysates

大米蛋白酶解 24 h 内各时间点的水解度和分子量

分布变化情况见图 9 和图 10。可见，在 0~3 h 内，水解度快速增大，3 h 时水解度为 16%，此时产物的分子量在 264~584 u 之间的组分占总水解产物的 94%。此后，水解度增加缓慢，水解至第 8 h 时水解度达到 21%，酶解产物分子量分布在 170~509 u 范围内的组分占总水解产物的 97%，其后随着酶解的进行，酶解产物的组成基本保持不变。在 3 h~8 h 之间水解度增加了 5%，产物分子量分布无明显变化，该分子量范围酶解产物组分仅增加了 3%。因此，酶解大米蛋白制备小分子多肽酶解时间控制在 3 小时即可，长时间反应会造成资源和时间的浪费。

3 结论

3.1 碱性蛋白酶 Alcalase2.4 L 酶解大米蛋白的最优条件为：温度 65 °C，pH 8.5，酶底比 0.096 AU/g（底物）。主要动力学参数为： K_m 为 5.76 (g·min)/mmol， V_{max} 为 0.67 mmol/(kg·min)， k_2 为 0.28 mmol/(AU·min)。

3.2 碱性蛋白酶 Alcalase2.4 L 酶解大米蛋白过程中，在底物浓度小于 90 g/kg 的条件下不存在底物抑制。

3.3 碱性蛋白酶 Alcalase2.4 L 酶解大米蛋白过程中，随着反应进行，水解度大于 8% 的产物对酶解反应有抑制作用。在实际应用中，可通过分离产物解除产物抑制，使酶解反应顺利进行。

3.4 碱性蛋白酶 Alcalase2.4 L 酶解大米蛋白过程中，水解至 3 h 水解度达到 16%，酶解产物的分子量在 264~584（二肽—五肽）之间的组分达到 94%，酶解 3 h 后酶解产物的分子量分布基本保持不变。因此，酶解时间以 3 h 为宜。

参考文献

- [1] 谢申伍.大米蛋白粉在动物饲料生产中的应用[J].湖南饲料, 2013,6:30-38
XIE Shen-wu. The application of rice protein in animal feed [J]. Hunan Feed, 2013, 6: 30-38
- [2] Morita T, Akira O H, Kaori T. Cholesterol-lowering effects of soybean, potato and rice proteins depend on their low methionine contents in rats fed a cholesterol-free purified diet [J]. Journal of Nutrition, 1997, 27(3): 470-477
- [3] Helm R M, Burks A W. Hypoallergenicity of rice protein [J]. Cereal Food World, 1996, 4(1): 839-843
- [4] Zhang H J, Glenn E B, Cheryl R M. Lower weight gain and hepatic lipid content in hamster fed high fat diets supplemented with white rice protein, brown rice protein, soy protein, and their hydrolysates [J]. American Chemical Society, 2011, 59: 10927-10933

- [5] Sharma S, Singh R, Shashank R S. Bioactive peptides: a review [J]. *International Journal Bioautomation*, 2011, 15(4): 223-250
- [6] Udenigwe C C, Aluko R E. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits [J]. *Journal of Food Science*, 2012, 77(1): R11-R24
- [7] 熊尉杰. 利用米渣制备大米肽的研究[D]. 湖南: 湖南农业大学硕士学位论文, 2010
XIONG W J. The study of rice residues to produce rice peptides [D]. Hunan: Hunan Agricultural University College of Life Science, Master's Thesis, 2010
- [8] 方婧杰, 梁盈, 林亲录, 等. 大米活性肽功能效应研究方法及其应用前景[J]. *食品与发酵工业*, 2012, 9(38): 119-123
FANG Jing-jie, LIANG Ying, LIN Qin-lu, et al. The research method and application prospect of rice bioactive peptide [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2012, 9(38): 119-123
- [9] 史云丽, 刘芳, 潘曼, 等. 大米活性肽研究进展[J]. *食品与机械*, 2009, 2(25): 169-171
SHI Yun-li, LIU Fang, PAN Man, et al. Progress in rice bioactive peptides [J]. *Food and Machinery*, 2009, 2(25): 169-171
- [10] Bao Y L, Chen L, Wang H L, et al. A kinetic model for cassava starch hydrolysis under cold enzyme two-stage hydrolysis condition [J]. *Advanced Materials Research*, 2011, 291: 2918-2921
- [11] Jens A N. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid [J]. *American Chemical Society*, 1979, 27(6): 1256-1262