

高谷氨酰胺低聚小麦肽制备用酶的筛选

王延州, 刘丽娅, 钟葵, 佟立涛, 周闲容, 周素梅

(农业部农产品加工综合性重点实验室, 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193)

摘要: 本文研究了胰酶 (Pancreatin)、碱性蛋白酶 (Alcalase)、中性蛋白酶 (Neutrase)、胃蛋白酶 (Pepsin)、酸性蛋白酶 (Acidic protease)、复合蛋白酶 (Protamex) 和风味蛋白酶 (Flavourzyme) 等8种蛋白酶对小麦蛋白的水解作用。以获得高谷氨酰胺低聚小麦肽为目标, 通过分析水解过程中谷氨酰胺释放规律变化, 筛选出Alcalase和Protamex为最佳水解酶。与其余蛋白酶制剂相比, Alcalase和Protamex可实现对小麦蛋白的有效降解、并最大限度减少蛋白酶对酰胺基团的破坏作用, 产物有效谷氨酰胺含量可达20%以上, 其中分子量低于3000 Da的水解产物高达95%, 尤其是Alcalase酶解产物中分子量小于1000 Da的水解产物含量达到75%。与以往研究相比, 本试验以分子量分布替代DH作为蛋白酶筛选的重要依据, 从而更加准确反映蛋白酶解特性和难易程度, 避免了游离氨基酸的干扰。

关键词: 小麦蛋白; 谷氨酰胺肽; 蛋白酶; 酶解

文章编号: 1673-9078(2014)2-177-181

Enzymes Screening for Preparation of High-glutamine Oligopeptide from Gluten

WANG Yan-zhou, LIU Li-ya, ZHONG Kui, TONG Li-tao, ZHOU Xian-rong, ZHOU Su-mei

(Key Laboratory of Agro-Products Processing, Ministry of Agriculture, Institute of Agro-Products Processing Science & Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract: To obtain high-glutamine oligopeptide, eight kinds of proteases including Pancreatin, Alcalase, Neutrase, Pepsin, Acidic protease, Protamex and Flavourzyme were used during gluten hydrolysis process. The releasing characteristic of glutamine peptide was analyzed. Alcalase and Protamex were screened as the best hydrolytic enzyme. Compared with other enzymes, Alcalase and Protamex gave the effective hydrolysis and minimized protease damaging effects of amide groups, with the effective product of glutamine content up to 20%, and molecular weight below 3000 Da was up to 95%. In particularly, 75% of Alcalase hydrolysates had molecular weight less than 1000 Da. Compared with previous studies, the molecular weight distribution was used as an important basis to choose protease instead of DH, which can accurately reflect the features of enzymatic hydrolysis and avoid interference with free amino acid.

Key words: gluten; glutamine peptide; protease; enzymatic hydrolysis

谷氨酰胺 (Gln) 是肌体应激状态下的一种“条件必需氨基酸”, 在饥饿、疲劳、创伤、手术、感染及酸中毒等应激条件下, 人体对 Gln 的需求量远超过体内合成能力, 因此需要大量补充 Gln^[1]。然而, 研究发现游离 Gln 在水溶液中溶解性差, 且极不稳定, 受热后易形成有毒的焦谷氨酸 (pyroglutamic, pGlu)^[2-3]。针对游离 Gln 的应用缺陷, 国外通过化学合成法开发

收稿日期: 2013-09-29

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (201303071); 中国农业科学院创新工程资助项目

作者简介: 王延州 (1987-), 男, 硕士生, 研究方向为粮油加工与功能食品; 刘丽娅为共同第一作者

通讯作者: 周素梅 (1971-), 女, 博士, 研究员, 主要从事粮油加工与功能食品研究

出游离Gln代替品-Gln肽, 常见的有Gly-Gln、Ala-Gln, 但合成率低, 价格昂贵, 推广应用受限。近年来, 随着生物技术的发展, 通过酶解动植物蛋白制备Gln肽受到普遍关注。

我国是小麦生产和消费大国, 小麦年产量在1.05亿吨左右, 其加工副产物—小麦蛋白 (俗称谷朊粉) 年产量已达15万t左右, 占世界产量30%以上。作为一种性质独特的功能蛋白, 小麦蛋白合理、高效利用的问题已提上日程。值得注意的是, 小麦蛋白氨基酸组成中谷氨酸含量高达40%, 且大部分以Gln的形式存在, 这使得以小麦蛋白为原料开发制备Gln肽提供了物质基础。

在小麦蛋白源Gln肽制备过程中, 蛋白酶的筛选至关重要。这是因为Gln肽的活性主要是以肽中非氮端

Gln的含量来表征的。由于不同的蛋白酶对同一底物的酶切位点和水解效率存在着较大差异,选酶不当,不仅会造成水解效率慢,更可能导致酰胺基团破坏,Gln转化为谷氨酸。Tanabe等^[4]首次以小麦蛋白为原料,采用 Molsin (XIII) 和 Actinase E 两种蛋白酶对底物进行 48 小时酶解,再经 Sephadex G-15 纯化后得到高 Gln 小麦低聚肽。我国学者针对小麦蛋白源 Gln 肽的开发也进行了部分工作。但整体来看,由于缺乏对 Gln 肽活性认识不够全面,多以产物 DH 大小作为蛋白酶筛选依据,致使酰胺基团在较强程度的酶解作用下遭到严重破坏,产物有效 Gln 含量普遍较低^[5-6]。

本研究以小麦蛋白水解物 Gln 含量、分子量为蛋白酶筛选的主要指标,兼顾蛋白回收率、短肽得率等指标的变化,考察 8 种蛋白酶水解小麦蛋白过程中 Gln 肽释放特性的变化规律,以期高 Gln 低聚小麦肽开发提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

小麦蛋白(蛋白质含量为 70.3%)由山东省滨州市泰裕麦业有限公司提供;胰酶(Pancreatin)、碱性蛋白酶(Alcalase)、中性蛋白酶(Neutrase)、胃蛋白酶(Pepsin)和酸性蛋白酶(Acidic protease)由北京市鸿润宝顺科技有限公司提供;复合蛋白酶(Protamex)、碱性蛋白酶(Alcalase 2.4 L)和风味蛋白酶(Flavourzyme 1000L,以下简称 Flavourzyme)由诺维信(中国)生物技术有限公司惠赠;其它试剂均为分析纯,市售。

1.2 仪器与设备

2300 自动定氮仪,瑞典 FOSS 公司;UB-7 型酸度计、T-214 电子分析天平,北京市赛多利斯仪器有限公司;Anke LXJ-II B 离心机,上海市安亭科学仪器厂;THZ-82A 水浴恒温振荡器,江苏荣华仪器制造有限公司;Angel 氮气吹扫仪,杭州奥威仪器有限公司;Agilent 1200 高效液相色谱仪。

1.3 实验方法

1.3.1 小麦蛋白酶解工艺流程

称取 20 g 小麦蛋白,在搅拌条件下缓慢加入到 200 ml 去离子水中,形成底物浓度为 10% (m/V) 的均匀悬浮液;将样品预热至酶解反应最适温度后,用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 溶液调节 pH 值至酶作用的最适 pH;加入

蛋白酶,酶与底物比例 1:50 (m/m);酶解一定时间后,将酶解液在沸水浴中灭酶 10 min。将酶解液置于 95 °C 水浴中,保持 10 min 灭酶。之后用冰水浴迅速冷却,离心(4500 r/min, 20 min)得上清液,冷冻干燥得到产品。不同蛋白酶作用的最适条件如表 1 所示。

表 1 各蛋白酶作用最适条件

Table 1 The hydrolytic condition of gluten by different proteases

蛋白酶种类	pH	温度/°C
Pancreatin	8.5	37
Alcalase	8.5	50
Alcalase 2.4 L	8.5	55
Protamex	7.0	50
Flavourzyme	7.0	50
Neutrase	7.0	50
Acidic protease	3.0	37
Pepsin	2.0	37

1.3.2 水解度 (DH) 的测定

DH 的测定采用甲醛滴定法^[7]。具体方法如下:首先采用甲醛滴定法测定样品中的 -NH₂ 或 -COOH 基团的含量,然后代入下式求得其 DH。

$$DH = \frac{h - h_0}{h_{tot}} \times 100\%$$

注: h 采用甲醛滴定法测定的酶解液中的 -NH₂ 或 -COOH 基团的含量, mmol/g; h₀ 采用甲醛滴定法测定的水解前原料中的 -NH₂ 或 -COOH 基团的含量, mmol/g; h_{tot} 每克原料蛋白的肽键毫摩尔数 (mmol/g), 对于小麦蛋白, h_{tot} = 8.38 mmol/g。

1.3.3 蛋白回收率的测定

蛋白回收率采用下式计算,蛋白含量采用凯氏定氮法测定 (GB/T 14771-2003), (N% × 5.7)。

$$\text{蛋白回收率} = \frac{\text{上清液蛋白含量}}{\text{原料小麦蛋白的蛋白含量}} \times 100\%$$

其中原料小麦蛋白的蛋白含量为 70.3%。

1.3.4 平均肽链长度的测定^[8]

测定平均肽链长度需要测定 α-氨基氮 (α-NH₂-N) 含量和总氮 (TN) 含量。用甲醛滴定法测定 α-NH₂-N 含量,总氮用凯氏定氮法测定。然后计算平均肽链长度,公式如下:

$$\text{平均肽链长度 (PCL)} = \frac{TN}{\alpha - NH_2 - N}$$

1.3.5 短肽得率的测定^[9]

三氯乙酸可溶性氮法:将 20 mL 10% 三氯乙酸 (TCA) 溶液添加到 20 mL 待测混合液 (混合液浓度为 10%), 混合液振荡,静置 10 min,在 4000 r/min 下离心 20 min,取上清液测可溶性总氮,计算公式如

下:

$$\text{短肽得率} (TCA - NSI) = \frac{N_1}{N_2} \times 100\%$$

注: TCA-NSI-三氯乙酸-可溶性氮得率, %; N₁-10%TCA中可溶性氮, mg; N₂-原料中总氮, mg

1.3.5 分子量分布的测定

采用高效凝胶过滤色谱法测定^[10]。称取适量小麦蛋白酶解产物冻干粉于去离子水中溶解, 微孔过滤膜过滤后上 TSKgel 2000 色谱柱, 色谱条件如下:

色谱柱: TSKgel 2000SWXL (300 mm×7.8 mm)

流动相: 乙腈/水/TFA=45/55/0.1 (V/V)

检测: UV220 nm

流速: 0.5 mL/min

柱温: 30 °C

以细胞色素 C (M_w 12500 Da)、抑肽酶 (M_w 6500 Da)、杆菌肽 (M_w 1450 Da)、乙氨酰氨-乙氨酰氨-精氨酸 (M_w 451 Da) 和乙氨酰氨-乙氨酰氨-乙氨酸 (M_w 189 Da) 为标准品作相对分子质量校正曲线, 得到相对分子质量与保留时间之间的回归方程 $y = -0.256x + 7.229$ ($R^2 = 0.991$), 进而预测相对分子质量分布。

1.3.6 肽或蛋白中Gln含量的测定

样品经BTI衍生后, 再酸水解处理, 用PITC柱前衍生在反相C₁₈柱上用紫外检测器检测定量, 具体操作步骤参照文献^[11-12]。

1.4 统计分析

采用 Microsoft Excel 进行数据整理, 用 SAS9.2 软件进行显著性分析。

2 结果与讨论

2.1 小麦蛋白酶解过程中产物 DH 变化

DH代表蛋白质在水解过程中, 肽键断裂的程度, 体现了蛋白被水解的程度。图1为不同酶作用下小麦蛋白的水解进程曲线。由图可知: DH随酶解时间增加不断上升, 各蛋白酶DH曲线均在反应初始阶段均呈现较快的速增趋势, 随后逐渐趋于平缓。这是因为随着酶解反应的进行, 底物浓度逐渐减小, 产物浓度不断增加, 蛋白酶的活性降低以及中间产物经历了初始阶段的积累后达到稳态等综合因素造成的^[13]。

不同蛋白酶对底物的水解能力差别很大。在最适条件下, 小麦蛋白经8 h水解, Flavourzyme酶解产物DH最高, DH可达33.4%。这是因为Flavourzyme除了具有内切肽酶的活性外, 还具有外切肽酶的活性, 在水解

过程中生成了大量游离氨基酸, 因而DH较高。Alcalase对小麦蛋白的水解效果仅次于Flavourzyme, 而Pepsin和Acidic protease水解效率较低, 作用3 h后, DH已基本趋于恒定。从DH的结果初步推测出, Pepsin和Acidic protease水解小麦蛋白的效果不佳, 产物中低聚肽的含量可能相对较低。

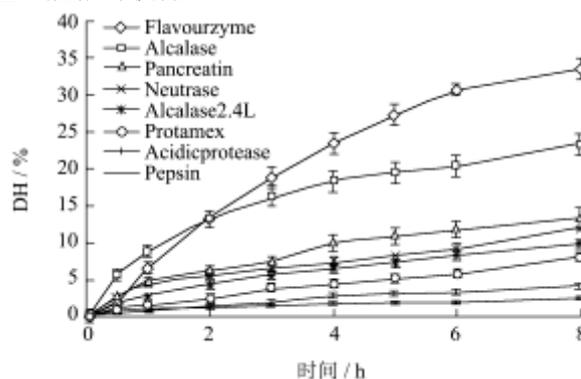


图1 不同酶作用下小麦蛋白DH变化

Fig.1 The DH curve of different proteases

2.2 小麦蛋白酶解产物平均肽链长度 (PCL) 变化

表2 不同酶作用下小麦蛋白酶解产物PCL变化

Table 2 The PCL of the enzymolysis process with different proteases

酶种类	时间/h			
	0.5	1	3	8
Flavourzyme	47.85±1.85	14.97±0.67	5.32±0.23	2.99±0.14
Alcalase	17.09±0.68	11.40±0.43	6.14±0.25	4.28±0.16
Pancreatin	39.91±1.52	19.96±0.80	13.30±5.05	7.48±0.29
Neutrase	34.21±1.09	21.77±0.91	14.97±0.55	8.26±0.27
Alcalase 2.4L	59.87±2.51	34.21±1.27	17.11±0.72	9.98±0.41
Protamex	80.00±3.53	59.88±2.46	26.60±0.82	12.61±0.50
Acidic protease	239.48±10.24	119.74±4.78	47.90±2.06	23.95±1.02
Pepsin	119.74±4.42	79.83±3.51	59.87±2.69	39.91±1.40

水解产物肽链长度 (PCL) 是衡量其生物活性的关键指标之一, 可直观反应蛋白被水解的程度。不同酶作用下小麦蛋白酶解产物 PCL 变化见表 2。结果表明在不同酶的作用下, PCL 均随着酶解时间的延长不断减小, 8 种蛋白酶中, Flavourzyme 和 Alcalase 对肽链的降解作用最强, 作用 8 h 后, PCL 分别降至 2.9 和 4.2。其中 Alcalase 在酶解初期对小麦蛋白的降解效果优于 Flavourzyme, 但经较长时间作用后, Flavourzyme 的酶解产物 PCL 更短。另一方面, 从 PCL 的数据进一步表明, 小麦蛋白经 Pepsin 和 Acidic protease 水解 8 h 后, PCL 仍高达 39.9 和 23.9, 不利

于将小麦蛋白降解为低聚肽。

2.3 小麦蛋白酶解过程中蛋白回收率变化

蛋白质回收率是指经过蛋白酶水解后得到的蛋白质/总氮与原料蛋白质/总氮的比例，该指标常用于表征酶解动植物蛋白制备各种水解蛋白时，原料蛋白的利用率，与DH指标共同表征蛋白酶的水解效率。不同酶作用下蛋白回收率的变化如图2所示。由图可知，在不同蛋白酶的作用下，回收率均随水解时间的延长呈不断增加。这是因为水解过程中伴随着蛋白亚基的解离和肽键的断裂，大分子的蛋白逐渐降解为较短的肽段或氨基酸，从而使溶解度提高，蛋白回收率增加^[4]。整体来讲，小麦蛋白经各酶水解3 h后，回收率已提高至85%以上，继续延长水解时间，增幅较小。

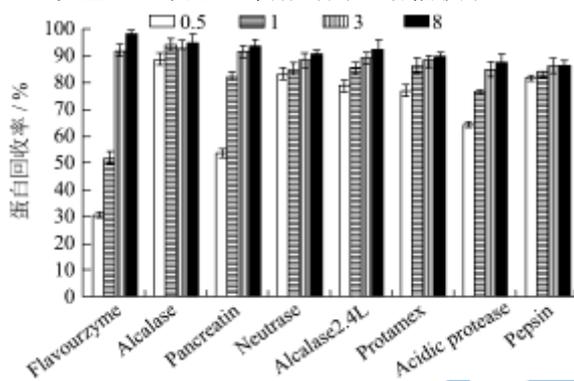


图2 不同酶作用下蛋白回收率变化

Fig.2 Protein recovery of the enzymolysis process with different proteases

2.4 小麦蛋白酶解过程中短肽得率变化情况

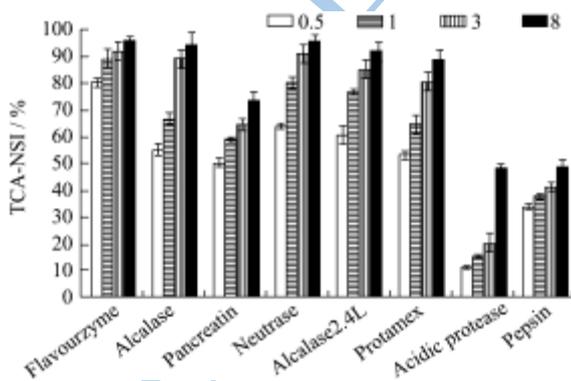


图3 不同蛋白酶酶解过程中的短肽得率

Fig.3 TCA-NSI of the enzymolysis process with different proteases

三氯乙酸作为蛋白质沉淀剂，可以沉淀蛋白质和较长的肽段。对特定的底物而言，三氯乙酸氮溶解指数可以定性地反映蛋白质的水解情况，溶解指数越高，表明较短肽段含量越高。随着蛋白质水解反应的进行，蛋白质肽链被切成大小不等的片段，三氯乙酸氮溶指

数提高。不同蛋白酶酶解过程中的短肽得率如图3所示。结果表明，短肽得率随着水解时间的延长呈现增长的趋势。Flavourzyme、Alcalase、Neutrase、Alcalase2.4L和Protamex水解产物的短肽得率较高，8 h水解产物的短肽得率可达到90%以上，而Pancreatin、Acidic protease和Pepsin短肽得率较低，均在70%以下。

2.5 小麦蛋白3 h酶解产物分子量分布及有效Gln含量

本实验以筛选制备高Gln小麦低聚肽的蛋白酶为目标，因此要同时兼顾酶解产物低聚肽比例及有效Gln含量两个重要指标。在本研究中，小麦蛋白经不同酶作用3 h时，DH、PCL、蛋白回收率、短肽得率分子量分布均较理想，若延长酶解时间，有效Gln含量进一步降低（预实验结果，数据未列出）。因此选取不同蛋白酶作用3 h的水解产物为研究对象，测定分子量分布（图4）及有效Gln含量，结果见图5和图6。

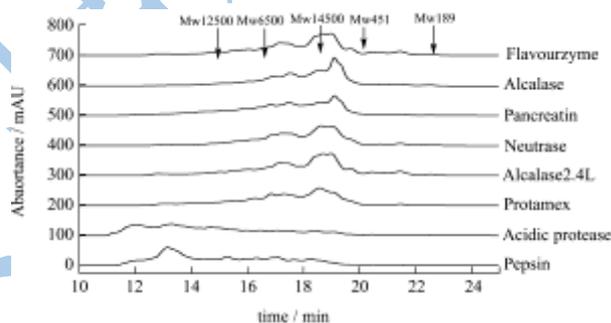


图4 蛋白酶水解3 h后小麦蛋白水解产物的分子量分布

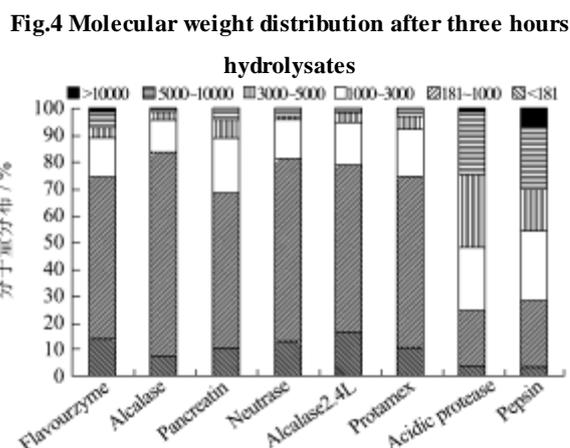


Fig.5 Molecular weight distribution of hydrolysates after three hours

低聚肽是蛋白通过酶解或酸水解的方法制备的小分子肽类物质，主要是由3~6个氨基酸构成，分子量在1000以下。由图5和图6数据可知，在8种蛋白酶

中, Alcalase 和 Protamex 最适宜用作制备高 Gln 低聚小麦肽的水解用酶,两者水解产物中分子量 3000 以下小肽含量达到 95%左右(分子量低于 181 的组分视为游离氨基酸), Gln 含量达到 21.4%; 且 Alcalase 水解产物中低聚肽(Mw 介于 181~1000)所占比例高于 Protamex, 达到 75%。而其余几种蛋白酶的水解产物无法同时满足产物高 Gln 含量及低分子量的要求。其中, Flavourzyme、Pepsin、Neutrase、Alcalase2.4L 水解产物中分子量低于 3000 的多肽含量相对较高,但有效 Gln 含量不够理想,与优选出的两种酶存在显著性差异($p < 0.05$); Acidic protease 和 Pepsin 两种蛋白酶水解产物中肽含量均较低。

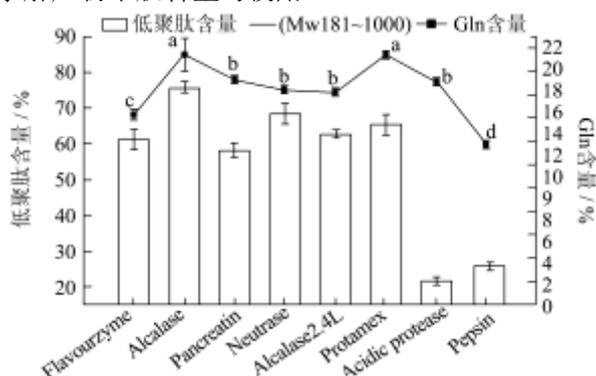


图 6 蛋白酶水解 3 h 后产物低聚肽分子量分布和 Gln 含量

Fig.6 Molecular weight distribution of oligopeptide and Gln content of hydrolysates after three hours

注:表中小写字母代表同列不同蛋白酶水解产物 0.05 水平的差异显著性。

3 结论

3.1 试验研究了 Pancreatin、Alcalase、Neutrase、Pepsin、Acidic protease、Protamex 和 Flavourzyme 等 8 种蛋白酶水解小麦蛋白制备 Gln 肽的效果。以获得高 Gln 低聚小麦肽为目标,通过分析水解过程中 Gln 肽释放规律变化,筛选出 Alcalase 和 Protamex 为制备高 Gln 低聚肽的最佳水解用酶。与其余酶制剂相比,这两种蛋白酶可将小麦蛋白降解为分子量较小的肽段,并最大程度减少蛋白酶对酰胺基团的破坏作用,产物有效 Gln 含量高于 20%,其中分子量低于 3000 Da 的水解产物高达 95%,尤其是 Alcalase 酶解产物中分子量小于 1000Da 的水解产物含量达到 75%。

3.2 现代消化理论认为低聚肽可以直接被消化道吸收,具有转运速度快,耗能低和不易饱和等特点,同时能够消除与游离氨基酸的吸收竞争,大大提高蛋白质的吸收利用率。因此,本研究以酶解产物分子量分布及 Gln 含量为主要指标,作为筛选蛋白酶的依据,为小麦蛋白控制酶解制备活性 Gln 肽提供了理论依据。

3.3 与以往研究相比,本试验以分子量分布替代 DH 作为蛋白酶筛选的重要依据,从而更加准确反映蛋白酶解特性和难易程度,避免了游离氨基酸的干扰。

参考文献

- [1] Ganappathy V. The Absorption of Active Peptide in Intestinal Abstract of Human [J]. Biochemical Pharmacology, 1980, 19: 713-718
- [2] Chelius D, Jing K, Luera A, et al. Formation of Pyroglutamic Acid from N-Terminal Glutamic Acid in Immunoglobulin Gamma Antibodies [J]. Analytical Chemistry, 2006, 78(7): 2370-2376
- [3] Higaki-Sato N, Sato K, Esumi Y, et al. Isolation and Identification of Indigestible Pyroglutamyl Peptides in an Enzymatic Hydrolysate of Wheat Gluten Prepared on an Industrial Scale [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(1): 8-13
- [4] Tanabe S, Watanabe M, Arai S. Production of a High-Glutamine Oligopeptide Fraction from Gluten by Enzymatic Treatment and Evaluation of its Nutritional effect on the small Intestine of Rats [J]. Journal of Food Biochemistry, 1993, 16: 235-24
- [5] 刘文豪,孙智达,魏振承,等.二次酶解麦谷蛋白制备富含谷氨酰胺(Gln)活性肽营养液的研究[J].中国粮油学报, 2009,24(4): 32-36
Wenhao Liu, Zhida Sun, Zhencheng Wei, et al. Glutamine Peptide Prepared from Gluten through Twice Enzymolysis [J]. Journal of Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(4): 32-36
- [6] 张海华.小麦面筋蛋白源谷氨酰胺肽的酶解制备、结构分析与生理活性研究[D].无锡:江南大学,2011
Haihua Zhang. Preparation, Purification and Physiological Activities of Glutamine Peptides from Wheat Gluten Hydrolysis [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2011
- [7] 刘丽娅,孙梦颖,王延州,等.小麦蛋白酶解物制备热反应型肉香调味基料的研究[J].中国粮油学报,2013,28(5):63-68
Liya Liu, Mengying Sun, Yanzhou Wang, et al. Study on Preparation of Meat-like Process Flavor Substance from Enzyme-Hydrolyzed Wheat Protein by Maillard Reaction [J]. Journal of Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(5): 63-68
- [8] 郭玉东,张洋,张均国,等.小肽饲料营养价值及评价方法[J].饲料工业,2007,7(28):13-16
Yudong Guo, Yang Zhang, Junguo Zhang, et al. The Evaluation Method for Nutrition of Small Peptide Feed [J].

- Feed Industry, 2007, 7(28): 13-16
- [9] Jang A, Lee M. Purification and Identification of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Beef Hydrolysates [J]. Meat Science, 2005, 69: 653- 661
- [10] Guowan Su, Jiaoyan Ren, Mouming Zhao. Comparison of Superdex Peptide HR 10/30 Column and TSK Gel G2000 SWXL Column for Molecular Weight Distribution Analysis of Protein Hydrolysates [J]. Food Bioprocess Technol, in press, Doi 10.1007/s11947-012-0965-8.2012
- [11] Kuhn S K, Stehle P, Frst P. Quantitative Analyses of Glutamine in Peptides and Proteins [J]. Journal of Agrculture and Food Chemistry, 1996, 44(7): 1808-1811
- [12] 陶冠军,任国谱,谷文英.蛋白质和肽中谷氨酰胺的HPLC定量分析[J].郑州粮食学院学报,1999,20(4):66-68
- Guanjun Tao, Guopu Ren, Wenying Gu. Quantitative Analysis of Glutamine in Proteins and Peptides by HPLC Method [J]. Journal of Zhengzhou Grain College, 1999, 20(4): 66-68
- [13] Marquez M C, Vazquez M A. Modeling of Enzymatic Protein Hydrolysis [J]. Process Biochemistry, 1999, 35: 111-117
- [14] 孟祥晨,迟玉杰,李妍.不同蛋白酶对鸡蛋清蛋白水解效果比较[J].食品工业,2002,3:34-35.
- Xiangchen Meng, Yujie Chi, Yan Li. Comparison of Different Protease Proteolytic Effect on Egg [J]. Food Industry, 2002, 3: 34-35