

两种蛋白酶水解油松花粉蛋白的比较

尹树花, 郭丽梅

(天津科技大学材料科学与化学工程学院, 天津 300457)

摘要: 本文研究了碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶水解油松花粉蛋白的工艺条件, 对两种蛋白酶水解得到的肽进行了氮溶指数, 清除·OH 自由基和抗氧化能力方面进行了比较分析。其中, 碱性蛋白酶水解得到的肽, 其氮溶指数较高; 木瓜蛋白酶水解得到肽, 其清除·OH 自由基和抗氧化能力较强。

关键词: 油松花粉; 蛋白酶; 水解; 比较

中图分类号: TS201.2; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2007)11-0068-04

Comparison of Hydrolysis of Chinese pine pollen Protein Catalyzed by two Proteases

YIN Shu-hua, GUO Li-mei

(College of Material Science and Chemical Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The hydrolysis of the Chinese pine pollen protein by alkaline protease and papain was studied and the nitrogen solubility index, hydroxygen free radical-cleaning property and the antioxidant activity of the peptides achieved with two methods were compared. The peptide achieved by alkaline protease-catalyzed hydrolysis had higher nitrogen solubility index and lower hydroxygen free radical-cleaning property and antioxidant activity than that achieved by papain-catalyzed hydrolysis of Chinese pine pollen protein.

Keyword: chinese pine pollen; proteases; hydrolysis; comparison

古人称“松柏之气可以使人长寿”, 油松为我国特有的树种之一, 油松花粉富含多种维生素、蛋白质、氨基酸、微量元素、多糖、黄酮、核酸、不饱和脂肪酸, 膳食纤维等众多营养物质, 是维持人体营养平衡的最佳天然营养品, 是多种药品、保健营养品、化妆品的主要原料。

油松花粉中的蛋白质含量高。研究发现, 人类摄入的蛋白质大部分是以短肽的形式吸收^[1]。利用生物方法对植物蛋白进行加工处理, 降低其分子量, 改善营养价值与功能特性, 提高溶解性能, 使其生物效价接近动物蛋白质, 部分代替动物蛋白质, 达到充分利用植物蛋白资源的目的^[2], 生物酶法目前被广泛运用且成为研究热点。酶种类是酶解过程中最重要影响因素之一^[3]。本实验采用碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶分别对油松花粉蛋白进行水解, 从水解条件, 水解的产物的性能等方面比较了使用两种酶各自的优点, 对深入研究开发油松花粉资源提供了依据和前景。

1 材料与方法

收稿日期: 2007-07-17

1.1 材料

木瓜蛋白酶, 碱性蛋白酶均购自天津利华酶制剂有限公司; 破壁后油松花粉由承德畅达天然营养品有限公司提供; 甲基红, 溴甲酚绿, 浓硫酸, 氢氧化钠, 盐酸, 三氯乙酸, 碳酸钠, 硫酸铜, 硫酸钾, 乙醇, 水杨酸钠, 双氧水, 碘化钾, 硫代硫酸钠, 淀粉等试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

恒温水浴, 电动搅拌, 精密 pH 计, 离心机, 分光光度计等。

1.3 方法

1.3.1 测定方法

①酶活力的测定: 福林-酚法^[4]。

②水分含量的测定: 常压烘干法, 参照 GB5495-85。

③氮含量的测定: 微量凯氏定氮法^[5], 取酶解上清液, 加入等量的10%的三氯乙酸(TCA)溶液, 混合振荡30 min, 然后离心分离20 min (4000 r/min), 测得上清液可溶性氮, 然后计算氮溶指数^[6]。氮溶指数 = (水解液中的含氮量/样品中总的氮含量), 氮溶指

数越高,水解度越完全。

④清除·OH自由基能力测定:水杨酸法^[7]

⑤抗氧化活性 AOV 测定^[8-10]

1.3.2 油松花粉制备肽的操作

称取一定量的破壁后的油松花粉于烧杯中,加入一定比例的乙醇和食用溶剂油,对花粉进行预处理,去除花粉中的脂溶性物质,处理后花粉干燥待用。

取上述预处理后的花粉按照一定的比例加入饮用水,搅拌均匀,放入恒温水浴中至所需温度,使用碳酸钠调至所需的 pH 值,搅拌一定时间后,分别加入适量的木瓜及碱性蛋白酶,开始水解。水解结束后,把烧杯放入 90 °C 水浴锅中,保持 15 min,使酶失活。取出烧杯,迅速冷却,将水解液离心 20 min (4000 r/min),取上清液,记录重量,并测定上清液的 NSI 值。样品待用。

1.3.3 油松花粉制备肽条件的初步确定

1.3.3.1 碱性蛋白酶水解条件的优化

利用单因素试验法对水解条件进行初步确定,分别考察温度(35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C)、pH 值(9.0、9.5、10.0、10.5、11.0)、底物浓度(3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%)、酶浓度(4000 U/g 干基油松花粉蛋白,经测定干基花粉蛋白含量为 14.52%,5000 U/g、6000 U/g、7000 U/g、8000 U/g)、反应时间(1 h、2 h、3 h、4 h、5 h)五个单因素对水解条件的影响,用氮溶指数进行衡量,选取出主要影响因素进行正交试验。

依据单因素试验初步确定的酶解条件,选择温度(A)、底物浓度(B)、酶浓度(C)、pH 值(D)作为试验因子,以氮溶指数为指标,采用 L₉(3⁴)正交试验设计,对碱性蛋白酶水解油松花粉蛋白制备花粉肽水解条件进行优化(表 1)。样品处理同“1.3.2”项操作,水解 2.0 h。

表 1 试验方案

Table 1 Experimental design

水平	因素			
	A(温度/°C)	B(底物浓度/%)	C(酶浓度/(U/g))	D(pH)
1	40	4.0	4000	9.0
2	45	4.5	5000	9.5
3	50	5.0	6000	10.0

1.3.3.2 木瓜蛋白酶水解条件的优化

利用单因素试验法对水解条件进行初步确定,分别考察温度(常温、35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C)、pH 值(6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)、酶浓度(1000 U/g 干基油松花粉蛋白,经测定干基花

粉蛋白含量为 14.52%,2000 U/g、3000 U/g、4000 U/g、5000 U/g、6000 U/g)、反应时间(1 h、2 h、3 h、4 h、5 h)四个单因素对水解条件的影响,用氮溶指数进行衡量,选取出主要影响因素进行正交试验。

依据单因素试验初步确定的酶解条件,选择酶浓度(A)、温度(B)、pH(C)作为试验因子,以水解度为指标,采用 L₁₆(4³)正交试验设计,对木瓜蛋白酶水解油松花粉蛋白制备花粉肽水解条件进行优化(表 2)。样品处理同“1.3.2”项操作,水解 2.0 h。

表 2 试验方案

Table 2 Experimental design

水平	因素		
	A(酶浓度/(U/g))	B(温度/°C)	C(pH)
1	2000	40	6.5
2	3000	45	7.0
3	4000	50	7.5
4	5000	55	8.0

1.3.4 清除·OH 自由基能力测定

将水解所得样品进行冷冻真空干燥得油松花粉肽样品,取相同量的碱性蛋白酶水解肽和木瓜蛋白酶水解肽样品配置成样品溶液,分别取 1 mL 样品溶液,依次加入 FeSO₄,水杨酸钠各 1 mL,最后加入 H₂O₂ 1 mL 启动反应。37 °C 反应 1 h,测定 510 nm 处的吸光值。吸光值越大,则清除·OH 效果越好。按下式计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = [A_0 - (A_i - A_{0i})] / A_0 * 100\%$$

式中: A₀ - 用蒸馏水代替样品的对照值; A_i - 加样后的吸光度; A_{0i} - 样品本身的本底值。

1.3.5 抗氧化活性 AOV 测定

将水解所得样品进行冷冻真空干燥得油松花粉肽样品,取一定量的碱性蛋白酶水解肽和木瓜蛋白酶水解肽样品配置成样品溶液,准确吸取待测液各 5 mL,依次加入一定量的配置好的硫酸和过氧化氢溶液,室温下反应 10 min,在加入一定量的 10% 碘化钾溶液,暗处静置 5 min,用已知浓度的硫代硫酸钠溶液进行滴定,以 1% 淀粉溶液指示终点,同时做空白对照实验。

$$\text{AOV} = 34C(V_{\text{空}} - V_{\text{样}}) \times 103 / 5T$$

式中: AOV - 每克样品还原过氧化氢的毫克数; V_空 - 空白消耗硫代硫酸钠的体积 (mL); V_样 - 样品消耗硫代硫酸钠的体积 (mL); C - 硫代硫酸钠的浓度, mol/L; T - 肽含量 (mg/mL); 34 - 过氧化氢的摩尔质量。

2 结果与讨论

2.1 碱性蛋白酶水解正交试验结果分析

通过正交试验, 确定了碱性蛋白酶水解的最适温度、pH 值、底物浓度和酶浓度。正交试验结果见表 3。

表 3 正交试验结果及分析

Table 3 Analysis of orthogonal test results

试验号	A	B	C	D	NSI/%
1	1	1	1	1	72.57
2	1	2	2	2	78.71
3	1	3	3	3	77.24
4	2	1	2	3	77.10
5	2	2	3	1	72.83
6	2	3	1	2	71.99
7	3	1	3	2	79.71
8	3	2	1	3	80.30
9	3	3	2	1	73.37
K1	228.52	229.38	224.86	218.77	
K2	221.92	231.84	229.18	230.41	
K3	233.38	222.6	229.78	234.64	
k1	76.17	76.46	74.95	72.92	
k2	73.97	77.28	76.39	76.80	
k3	77.79	74.20	76.59	78.21	
R	3.82	3.08	1.64	5.29	

通过极差分析, 得出各因素影响的主次关系为:

D>A>B>C, 最佳配比为 D₃A₃B₂C₃, 而试验得出的最佳配比为 D₃A₃B₂C₁。对二者进行追踪比较, 得出 D₃A₃B₂C₁ 为最佳水解条件。即: 最佳温度为 50 ℃, pH 为 10.0, 底物浓度为 4.5%, 酶浓度为 4000 U/g, 在此条件下, 得到油松花粉含复合营养的蛋白肽水解液的氮溶指数为 80.30%。

2.2 木瓜蛋白酶水解正交试验结果分析

通过正交试验, 确定了木瓜蛋白酶水解的最适温度、PH 值和酶浓度。正交试验结果见表 4。

通过极差分析, 得出各因素影响的主次关系为:

A>B>C, 最佳配比为 A₄B₂C₁, 与实验相符, 得木瓜蛋白酶水解的最佳条件, 即: 最佳温度为 45 ℃, pH 为 6.5, 酶浓度为 5000 U/g, 在此条件下, 氮溶指数为 41.63%。

2.3 清除·OH 自由基能力

实验比较相同量的两种蛋白酶水解肽的清除自由基的能力, 碱性蛋白酶水解油松花粉所得肽的抑制率为 10.50%, 木瓜蛋白酶水解油松花粉所得肽的抑制率为 11.70%。

2.4 抗氧化活性 AOV

实验比较相同量的两种蛋白酶水解肽的抗氧化活

性, 碱性蛋白酶水解油松花粉所得肽的抗氧化活性为 9.80 mg/g, 木瓜蛋白酶水解油松花粉所得肽的抗氧化活性为 10.00 mg/g。

表 4 正交试验结果及分析

Table 4 Analysis of orthogonal test results

试验号	A	B	C	NSI/%
1	1	1	1	27.96
2	1	2	2	32.46
3	1	3	3	30.91
4	1	4	4	29.42
5	2	1	3	30.01
6	2	2	4	31.69
7	2	3	1	35.84
8	2	4	2	34.33
9	3	1	4	31.19
10	3	2	3	35.02
11	3	3	2	34.70
12	3	4	1	33.10
13	4	1	2	31.69
14	4	2	1	41.63
15	4	3	4	34.07
16	4	4	3	36.18
K1	120.75	120.85	138.53	
K2	131.87	140.80	133.18	
K3	134.01	135.52	132.12	
K4	143.57	133.03	126.37	
k1	30.1875	30.2125	34.6325	
k2	32.9675	35.2000	33.2950	
k3	33.5025	33.8800	33.0300	
k4	35.8925	33.2575	31.5925	
R	5.7050	4.9875	3.0400	

3 结论

(1)本研究采用正交试验方法得到碱性蛋白酶水解油松花粉蛋白质制备油松花粉肽的最佳水解条件, 温度为 50 ℃, pH 为 10.0, 底物浓度为 4.5%, 酶浓度为 4000 u/g, 水解时间 2.0 h, 氮溶指数达到 80.30%。同时采用正交试验方法得到木瓜蛋白酶水解油松花粉蛋白质制备油松花粉肽的最佳水解条件, 即温度为 45 ℃, pH 为 6.5, 酶浓度为 5000 U/g, 水解时间为 2.0 h, 氮溶指数达到 41.63%。由实验结果可看出, 使用碱性蛋白酶水解油松花粉, 其氮溶指数远远高于使用木瓜蛋白酶。碱性蛋白酶的水解程度高于木瓜蛋白酶。

(下接第 74 页)