

文章编号: 1001-411X(2001)04-0084-04

牛乳酪蛋白水解物的特性分析

郑 华¹, 傅伟龙², 林 捷¹

(1 华南农业大学食品科学系, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学动物科学系, 广东 广州 510642)

摘要:牛乳酪蛋白经胰蛋白酶水解, 对水解物进行氨基氮含量、水解度(DH)和游离氨基酸含量等测定, 并通过 SDS—PAGE 电泳及 Sephadex—G50 凝胶层析, 分析了相对分子质量的分布. 结果表明, 在水解条件为底物质量浓度 50 g/mL, pH 7.4, 温度 45 °C、酶量(m):底物量(m)=1:1 000 时, DH 随时间延长而增大, 水解前期 DH 增长迅速, 3 h 后增长缓慢, 6.0 h 的 DH 为 20.48%. 水解物中必需氨基酸含量约占游离氨基酸总量的 73%~80%, 此含量随水解时间的延长略有降低; 水解物相对分子质量随 DH 的升高有所减小, 经 2~3 h 水解的产物, 相对分子质量分布主要集中于 2 500~3 400 范围.

关键词:牛乳酪蛋白; 胰蛋白酶; 水解物; 特性分析

中图分类号: TS252.1 文献标识码: A

酪蛋白(casein)是牛乳中主要的蛋白质, 其中富含生物活性序列, 在特定条件下对其进行水解, 这些生物活性序列能够被释放出来, 而获得具有生物活性的酪蛋白生物活性肽^[1]. 酶解酪蛋白能够获得具有多种生物活性的生物活性肽, 如降血压肽(ACE 活性抑制肽)^[2]; 免疫调节活性肽^[3]等. OTANI 等^[4]认为, 酪蛋白水解物能显著性地抑制促细胞分裂素诱导的小鼠脾淋巴细胞及兔 Peyer's 斑纹细胞的增殖. β -casomorphin-11(酪啡肽)对免疫细胞具有刺激作用^[5]. 酪蛋白磷酸肽(CPP)具有显著提高大鼠对钙的吸收率及储留率的作用^[6]和较低的免疫原性^[7]. 另外, ST—GELATIN 等^[8]认为, 酪蛋白水解物能够促进乳酸球菌生长, 其中影响乳酸球菌生长的主要因素是水解物中肽的相对分子质量分布, 而非游离氨基酸.

本研究以牛乳酪蛋白为底物, 在胰蛋白酶作用下进行水解, 获得酪蛋白水解物, 并对其特性进行测定分析.

1 材料与方法

1.1 试验材料

牛乳酪蛋白(生化纯, 杭州微生物试剂厂), 胰蛋白酶(farco chemical supplies), 低相对分子质量标准蛋白质(GIBCO/BRL), 葡聚糖凝胶: Sephadex—G50[中科院上海脑研究所, 批号: 961010, 粒度: (M)50~150 μ m].

1.2 试验方法

1.2.1 胰蛋白酶的活力测定 方法参照张龙翔

等^[9], 以酪蛋白为底物进行测定. 酶活力为 1.078 IU/mg 蛋白质.

1.2.2 酪蛋白的水解处理 酪蛋白底物溶液的调制: 将 2.0 g/L 的 NaOH 加热到 85 °C, 按 50 g/L 加入酪蛋白, 搅拌溶解, 然后冷却至室温, 用 2.0 mL/L 的磷酸溶液调 pH 值至 7.4. 胰蛋白酶的溶解: 用适量浓度为 0.1 mol/L 的硼酸缓冲液(pH 7.4)将所需胰蛋白酶进行溶解. 酶量(m):底物量(m)=1:1 000.

酪蛋白水解:将 50 g/mL 的酪蛋白溶液温度调至 45 °C, 加入所需胰蛋白酶溶液, 迅速搅匀, 置于 45 °C 恒温水浴箱中水浴. 分别取出水解 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 h 的水解溶液, 取出后立即在沸水中水浴加热 15 min, 使酶失活, 冷却, 备用.

1.2.3 水解物氨基氮含量的测定 水解物氨基氮的测定方法采用甲醛滴定法, 方法参照张龙翔等^[9], 赵新准等^[10].

水解物的氨基氮含量计算公式如下:

样本氨基含量=(水解液所耗 NaOH 体积/标准氨基酸所耗 NaOH 体积)×标准氨基酸浓度.

式中: 标准氨基酸(甘氨酸)所耗标准 NaOH 的体积=1.03 mL, 标准氨基酸(甘氨酸)的浓度=0.10 mmol/mL.

1.2.4 水解物水解度(DH)的测定 水解物的水解度根据下列公式计算^[11]:

$$DH = (h/h_{\text{tot}}) \times 100 \%,$$

式中: h 为水解后蛋白质被裂解的肽键(mmol/g), h_{tot} 为原料蛋白质肽键(mmol/g), 牛乳酪蛋白 h_{tot} 为 8.3 mmol/g.

收稿日期: 2001-03-21

作者简介: 郑 华(1966—), 男, 讲师, 硕士.

通讯作者: 傅伟龙(1938—), 男, 教授.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39830290); 华南农业大学校长基金资助项目(5100—K97026)

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

$$h = (N - N_0) / C,$$

C: 基础底物的蛋白质质量浓度 (0.05 g/mL), N_0 : 未水解时基础底物中氨基氮的浓度 (mmol/mL), N : 水解后溶液中氨基氮的浓度 (mmol/mL)

1.2.5 水解物游离氨基酸的测定 分别取各水解物原液样品 1.0 mL, 加入 0.2 g/mL 的 5-磺基水杨酸 1.0 mL, 摇匀, 再加 8.0 mL 蒸馏水, 摇匀, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, 滤液用于氨基酸含量测定.

将处理好的样品, 直接上样于氨基酸自动分析仪(日立 835 氨基酸分析仪)进行测定.

1.2.6 水解物相对分子质量分布的测定 葡聚糖—凝胶层析分析: 葡聚糖凝胶为 Sephadex—G50; 柱长 800 mm $\times$ 16 mm; 上样量为 100 μ L; 洗脱液为含 0.05 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0); 流速为 0.98 mL/min; 蠕动泵为 Perkin—Elmer (Norkwalk, Connecticut, U. S. A); 检测仪为 Shimadzu SPD—6A (Shimadzu Corporation); 记录仪为 Hitachi Recorder 056 (Hitachi, Ltd. Tokyo, Japan).

SDS—PAGE 测定蛋白质的相对分子质量的方法参照文献^[9, 12], 并作适当改进.

ρ (浓缩胶)=40 g/L; ρ (分离胶)=170 g/L; 电压(稳压)60 V; 初始电流 15 mA. 用考马斯亮蓝 G—250 染色.

2 结果与分析

2.1 水解时间对氨基氮含量的影响

不同水解时间氨基氮含量的结果如图 1 所示:

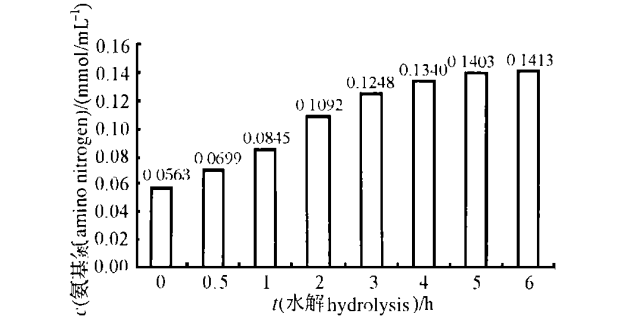


图 1 水解时间与氨基氮含量关系
Fig. 1 Relationship of time and content of amino nitrogen

图 1 表明, 未经水解溶液中含有 0.056 3 mmol/mL 的氨基氮, 水解 6 h 的水解物溶液中含有氨基氮 0.141 3 mmol/mL. 酪蛋白水解物中氨基氮含量随着时间的延长而增加.

图 2 表明, 在水解的最初 1 h, 氨基氮迅速增加, 水解时间超过 1 h 后, 氨基氮增量 $[\Delta c(\text{氨基氮})]$ 与水解时间成反比, 当水解进行到 6 h 时, 氨基氮增量仅为 0.001 0 mmol/(mL $\cdot$ h).

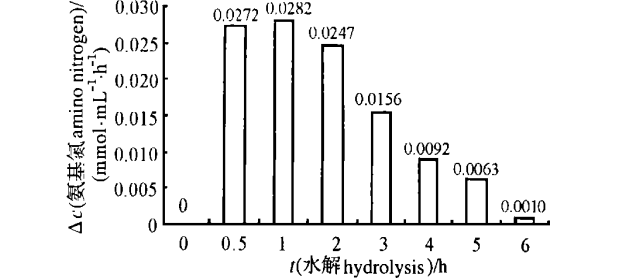


图 2 氨基氮每小时的增加量
Fig. 2 Gain of amino nitrogen per hour

氨基氮含量反映水解物中蛋白质或肽或氨基酸分子的数量. 随着水解时间的延长, 溶液中氨基氮的含量在逐渐增加, 在水解的初期, 胰蛋白酶对酪蛋白有较多的切割位点, 随着水解的进行, 切割位点减少, 水解物中氨基氮的增量也随之减缓.

2.2 水解时间对 DH 的影响

DH 是水解后每克蛋白质被裂解的肽键的毫摩尔数(h)与每克原料蛋白质肽键毫摩尔数(h_{tot})的比值, 即 $DH = (h/h_{\text{tot}}) \times 100\%$, 是指原料蛋白质中肽键被裂解的百分数, 它表示蛋白质被催化水解的程度. 随着蛋白质的不断水解, 蛋白质被裂解的肽键数随之增加, 这可由氨基氮的增量得到反映. 随着氨基氮含量的增加, DH 也在不断的增加, 由于胰蛋白酶是特异性较强的蛋白质水解酶, 只作用于碱性氨基酸 C 末端肽键, 因而, DH 不可能达到 100%, 当 DH 达到一定程度时, 其增加变缓.

图 3 表明, 酪蛋白的 DH 随时间呈梯度上升, 水解前 3 h 梯度较大, 随后减缓.

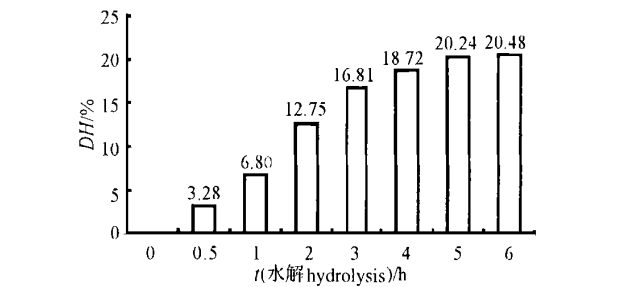


图 3 水解时间与水解度关系
Fig. 3 Relationship of time and DH

2.3 水解时间对游离氨基酸含量的影响

表 1 表明, 在不同水解时间的酪蛋白水解物样品中, 游离氨基酸含量最高的几种氨基酸为: Arg、

Lys、Phe、Tyr 及 Leu，它们的含量约占游离氨基酸总量的 86%~90%。其中必需氨基酸占游离氨基酸总量的 80.76% (水解 1 h)、78.78% (水解 2 h) 和 73.00% (水解 4 h)。另外，酪蛋白水解物中还含有丰富的支链氨基酸：分别为 19.5% (1 h 水解)，16.7% (水解 2 h)，16.4% (水解 4 h)。水解物中必需氨基酸及支

链氨基酸的比例随水解时间延长略有下降。酪蛋白分子构成中，氨基酸含量多少依次为：Pro、Glu、Gln、Ser、Leu、Lys、Val 等，而其水解物中游离氨基酸含量最高的依次为：Arg、Lys、Phe、Tyr 及 Leu，这是由于胰蛋白酶具有很强的水解专一性，不能水解某些肽键。

表 1 酪蛋白水解物中游离氨基酸及含量¹⁾
Tab. 1 Free amino acid and content of casein hydrolysates ($\mu\text{g/mL}$)

氨基酸 amino acid	t (水解 hydrolysis)/h				氨基酸 amino acid	t (水解 hydrolysis)/h			
	0.0	1.0	2.0	4.0		0.0	1.0	2.0	4.0
Asp	0.38	—	4.86	20.59	$\dagger\Delta$ Leu	5.19	40.18	55.58	76.11
$\dagger$ Thr	0.48	5.10	12.04	5.01	Tyr	4.66	36.18	61.05	93.20
Ser	1.08	4.01	5.48	4.97	$\dagger$ Phe	4.97	39.97	65.57	93.82
Glu	0.67	—	7.43	—	$\dagger$ Lys	6.30	39.73	80.88	105.61
Gly	0.32	0.21	—	0.46	$\dagger$ His	—	—	—	—
Ala	0.31	0.46	0.75	1.22	$\dagger$ Arg	23.39	52.43	97.72	114.08
Cys	1.56	3.92	8.73	11.78	Pro	—	—	—	—
$\dagger\Delta$ Val	1.35	5.13	11.93	12.56	NH ₃	—	—	—	—
$\dagger$ Met	0.63	5.49	2.74	15.46	总量 total	51.29	232.81	410.93	557.82
Δ Ileu	—	—	1.19	2.95	$\dagger$ 总量 total	—	188.03	323.72	407.19

1) 表中结果由华南农业大学实验中心 仪器分析室测定， $\dagger$ ：必需氨基酸； Δ ：支链氨基酸；—：未测出

2.4 水解时间对相对分子质量分布的影响

由图 4、5 可见，在 0 h 水解酪蛋白的层析图中，只出现一个峰，峰值达 0.414，此峰为未水解的酪蛋白峰。随着水解时间的延长，酪蛋白在酶作用下水解，该峰值逐渐减小，并伴随有第二、第三和第四峰的出现（1、2、3、4 及 5 h），这些峰为酪蛋白水解后形成的多肽。层析图表明，在超过 2 h 水解的水解物中，多肽物质主要集中于第三峰处。

图 6 显示，0 h 水解酪蛋白样品的电泳图有明显

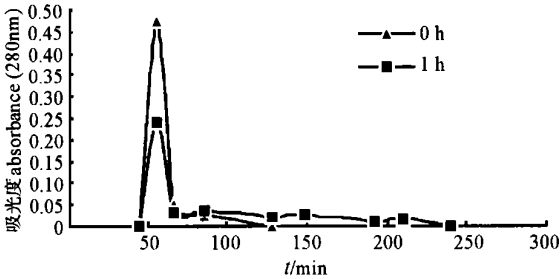
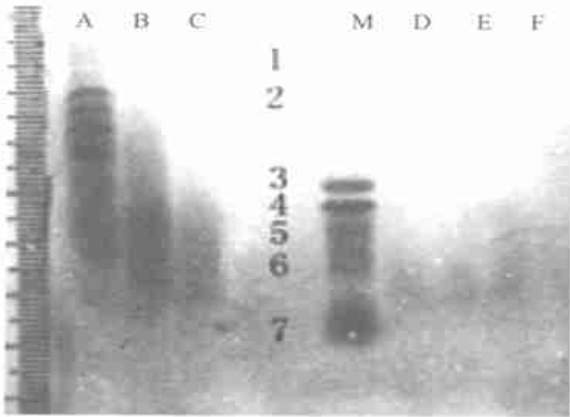


图 4 酪蛋白水解物层析图

的条带出现，在经水解的样品电泳图中均没有明显条带出现。0.5 h 的水解物样品的电泳图中，出现比较大的条带范围，并且有明显的拖尾现象，相对分子质量主要集中分布于 3 000~14 000 之间；水解 1.0 h 的样品相对分子质量集中分布在 3 000~6 200 之间；而水解 2.0、3.0 h 的样品相对分子质量集中分布在



A: 酪蛋白(未水解)样品; B: 经 0.5 h 水解的样品; C: 经 1.0 h 水解样品; D: 经 2.0 h 水解样品; E: 经 3.0 h 水解的样品; F: 经 2.0 h 水解的冻干品样品; M: 标准蛋白质样品
A: casein B: sample of 0.5 h hydrolysis C: sample of 1.0 h hydrolysis D: sample of 2.0 h hydrolysis E: sample of 3.0 h hydrolysis F: sample of frozen hydrolysate for 2.0 h hydrolysis M: sample of standard protein
1: M_r 43 000; 2: M_r 29 000; 3: M_r 184 000; 4: M_r 143 000;
5: M_r 6 200; 6: M_r 3 400; 7: M_r 2 300

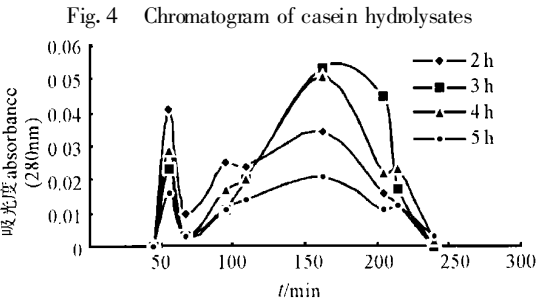


图 5 酪蛋白水解物层析图

图 6 部分酪蛋白水解物及酪蛋白样品的 SDS-PAGE 图片

2 500~3 400 之间,这正是酪蛋白活性肽的主要分布范围。

从各样品的层析图中还可以发现,虽然第一峰随时间的增加而降低,但当水解达到 5 h、 DH 已达 20% 以上时(图 3),第一峰仍然存在,原因可能是此时仍有少量的酪蛋白未被水解,或是胰蛋白酶也在此峰出现,因为胰蛋白酶没有从水解溶液中分离,胰蛋白酶与酪蛋白的相对分子质量极为相近(约 24 000)。

3 小结

牛乳酪蛋白中含有多 种特定生物活性肽的序列,这些序列是否能够从酪蛋白中释放出来,关键在于所使用的酶、水解条件及水解时间。 DH 表示蛋白质被催化水解的程度, DH 必须控制在恰当的范围,才能得到理想的活性肽。在获得活性肽的同时,伴随着丰富的游离氨基酸的释放,其中主要为必需氨基酸和支链氨基酸。支链氨基酸对运动员体力的恢复有重要的意义。本研究是在底物为 50 g/L, pH 7.4, 温度 45℃, 酶量(m):底物量(m)=1:1 000 的条件下对酪蛋白进行水解,在水解 2~3 h 可得到较理想的效果,具体的活性肽分析及生理活性功能有待进一步研究。

参考文献:

- [1] ケビン・R・マシヤル. 乳中の微量成分と生理活性機能. 食品への応用[J]. 食品と開発, 1995, 30(3): 23—26.
- [2] YAMAMOTO N, AKINO A, TAKANO T. Antihypertensive effect of peptides derived from casein by an extracellular proteinase from lactobacillus helveticus CP790[J]. Dairy Sci-

ence 1994, 77: 919—922.

- [3] MIGLIORE—SAMOUR D FLOC H F, JOLLES P. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation[J]. Dairy Research, 1989, 56: 357—362.
- [4] OTANI H, HATA I. Inhibition of proliferative responses of mouse spleen lymphocytes and rabbit Peyer's patch cells by bovine milk caseins and their digests[J]. Dairy Research, 1995, 62: 339—348.
- [5] MEISEL H, FRISTER H. Chemical characterization of bioactive peptides from *in vivo* digests of casein[J]. Dairy Research, 1989, 56: 343—349.
- [6] 张亚非, 周羽井, 吴凤兰, 等. 酪蛋白磷酸肽(CPP)对大鼠钙吸收利用的影响[J]. 营养学报, 1994, 16(1): 73—77.
- [7] HEDDLESON R A, PARK O, ALLEN J C. Immunogenicity of casein phosphopeptides derived from tryptic hydrolysis of β -casein[J]. Dairy Science, 1997, 80: 1 971—1 976.
- [8] ST—GELAIS D, ROY D, HACHE S, et al. Growth of non-proteolytic Lactococcus lactis in culture medium supplemented with different casein hydrolyzates[J]. Dairy Science, 1993, 76: 3 327—3 337.
- [9] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981. 119—123, 171—172.
- [10] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, (11): 65—67.
- [11] POULIOT Y, GAUTHIER S F, BARD C. Skimmilk solids as substrate for the preparation of casein enzymatic hydrolysates[J]. Journal of Food Science, 1995, 60(1): 111—116.
- [12] COOLBEAR K P, ELGAR D F, COOLBEAR T, et al. Comparative study of methods for the isolation and purification of bovine κ -casein and its hydrolysis by chymosin[J]. Dairy Research, 1996, 63: 61—71.

Characterization of Bovine Casein Tryptic Hydrolysates

ZHENG Hua¹, FU Wei-long², LIN Jie¹

(1 Dept. of Food Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 Dept. of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Bovine casein was hydrolyzed with trypsin, the amino nitrogen and free amino acid content, as well as the degree of hydrolysis (DH) of hydrolysates were determined. The distribution of relative molecular mass was analyzed by SDS—PAGE electrophoresis and Sephadex—G50 gel chromatography. The results indicated that, under the condition of 50 g/L substrate concentration, pH 4.5, amount of the enzyme (m):amount of the substrate (m) = 1:1 000, the DH increased with the increase of hydrolysis time. The increase of DH was fast at the beginning, but after 3 hours, it slowed down, and the DH was 20.48% after 6 hours of hydrolysis. The essential amino acid content in hydrolysates was 73%~80% of the total free amino acids, this percentage decreasing with hydrolysis time. The relative molecular mass of hydrolysates decreased with the increase of DH . The distribution of relative molecular mass ranged from 2 500 to 3 400 after 2 and 3 hours of hydrolyzation.

Key words: bovine casein; trypsin; hydrolysate; characterization

【责任编辑 柴 焰】