

胰蛋白酶水解全酪蛋白反应过程中的色谱分析

齐 崑, 何明霞, 何志敏, 史德青

(天津大学化学工程研究所酶工程研究室, 天津 300072)

摘要 将高效凝胶排阻色谱(HPSEC)技术与水解度(DH)概念相结合,对酪蛋白-胰蛋白酶水解体系的酶解反应过程进行色谱分析,得到定量表征复杂酶解反应进程和不同 DH 值时多样性酶解产物相对分子质量分布的二维图线;依据蛋白质结构信息,结合 HPSEC 实验谱图,对胰蛋白酶作用于酪蛋白时的酶解断裂位点进行剖析,初步推断反应历程,并得到理论酶解肽段的相对分子质量分布图及酶解物中活性多肽酪蛋白磷酸肽(CPPs)肽谱。

关键词 酪蛋白;胰蛋白酶;酶促水解;水解度;高效凝胶排阻色谱;酪蛋白磷酸肽;肽谱

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-871X(2002)01-0001-05

Chromatographic Analysis on Tryptic Hydrolysis of Whole Casein

QI Wei, HE Ming-xia, HE Zhi-min, SHI De-qing

(Enzyme Technology Laboratory, Chemical Engineering Research Center,
Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: Tryptic hydrolysis of whole casein was investigated by high performance size exclusion chromatography (HPSEC) in combination with the degree of hydrolysis (DH). In terms of HPSEC chromatograms obtained at different DH values, the complex process of enzymatic reaction and the relative molecular mass distribution of multiple hydrolysates were quantitatively characterized. Based on the information of casein micelle structure, the possible reaction mechanism was deduced from a series of chromatograms. Being taken into account the primary structure of whole casein and the target amino acid of trypsin, the distribution of theoretical peptides were accurately calculated by determining the split sites of complete enzymatic hydrolysis. According to the relationship between retention time and relative molecular mass, the corresponding HPSEC absorption peaks of active peptides in hydrolysates were identified, and caseinophosphopeptides sequences were also characterized.

Key words: casein; trypsin; enzymatic hydrolysis; degree of hydrolysis; high performance size exclusion chromatography; caseinophosphopeptides; peptide mapping

酶法水解酪蛋白所得产物蛋白胨是一种高档微生物氮源,常用于菌种的培养与发酵,酶解物经进一步分离纯化还可制得一类含有成簇磷酸丝氨酸残基(SerP-SerP-SerP-Glu-Glu)的高效促钙吸收生物活性多肽——酪蛋白磷酸肽(CPPs)^[1]。文献中对蛋白质酶解过程研究多采用水解度(DH)值作为衡量反应进程的参量^[2],采用反相高效液相色谱-电喷雾电离质谱联用技术(RP-HPLC/ESIMS)对终态酶解物进行肽谱分析^[3],前者参数单一,后者操作繁琐复杂,而且均不能真实表征酶解反应全过程。

高效凝胶排阻色谱(HPSEC)技术在解决了低相对分子质量蛋白质的测定问题后,有效分离范围

已基本满足酶解物的分析要求,为研究酶促水解反应过程提供了十分有用的工具。

本文利用胰蛋白酶(trypsin)的专一性切割特点,定点酶解全牛乳酪蛋白(casein,包含 α_{s1} , α_{s2} , β 和 κ 4种肽链),将HPSEC技术与DH概念相结合,对不同DH值时肽段的相对分子质量分布进行跟踪监控,分析酶解物组成与DH值之间的对应关系,并结合蛋白质数据库信息,剖析断裂位点、初步推断酶解历程,这种基于结构生物学信息,从分子水平研究酶解反应的策略,对于解释功能位点作用机制,理解活性多肽构效关系均有一定意义,同时也为制备高纯度、高产率的目标产品提供理论基础。

收稿日期 2001-10-15

作者简介 齐 崑,女,1973年生,博士研究生,主要从事酶工程与技术研究。

通讯联系人 何志敏 教授,博士生导师,E-mail zhe@tju.edu.cn,主要从事酶工程与药物控制释放研究。

基金项目 天津市重点科技攻关项目(023602411),该课题获 2000 年度天津市自然科学奖一等奖。

1 实验部分

1.1 材料

酪蛋白:生化试剂,蛋白氮的质量分数为 13.5%,购自军事医学科学院天津东方卫生材料厂;胰蛋白酶:Sigma 公司提供;牛血清白蛋白(66 409, M_r 值,下同)、卵清蛋白(43 000)、牛血红蛋白(31 000)、细胞色素 C(12 327)和维生素 B12(1 355)标准品,购自 Sigma 公司;甲醇:色谱级,购自天津科密欧科技有限公司;其他试剂均为分析纯,市售。

1.2 仪器

分析天平:上海天平仪器厂,FA1004 型;自动电位滴定仪:上海雷磁仪器厂,ZD-2 型;HPSEC:WDL-95 色谱工作站,P200 II 型高压恒流泵,UV-200 II 紫外可变波长检测器,大连依利特科学仪器公司;凝胶排阻色谱柱:美国 Waters 公司,Protein-PAK 125(8 mm i. d. × 300 mm)。

1.3 方法

1.3.1 水解度定义^[2]

$$DH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100\% = \frac{B \times N_b}{MP \times h_{\text{tot}} \times \alpha} \times 100\%$$

其中 B 为碱的消耗量(L), N_b 为碱的浓度(mol/L), MP 为蛋白质质量(g), h_{tot} 为底物中的肽键总数(mol/g), α 为氨基酸残基中 α -氨基的平均解离度。

1.3.2 多肽样品的制备及预处理

配制一定质量浓度的酪蛋白溶液,升温至 40 °C,调 pH=8,按酶与酪蛋白的质量比为 1:50 加入胰蛋白酶溶液,在恒温、恒 pH、恒搅拌速率条件下反应至不同 DH 值(pH-stat 法^[2]计算)。取相应时刻酶解液 5 mL,加三氯乙酸终止反应,再经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,进行 HPSEC 分析。

1.3.3 HPSEC 操作条件

流动相:0.1 mol/L pH 7 磷酸缓冲液;流速:0.5 mL/min;进样量:20 μL ;检测波长:280 nm;检测时间:45 min;柱温:25 °C。

2 结果与讨论

2.1 标准品相对分子质量工作曲线

图 1 是质量分数为 0.1% 的 5 种蛋白质标准品溶液的 HPSEC 检测结果,依据文献[4]报道的方法,经一元回归分析得到标准品相对分子质量(M_r)与保留时间(t_R)之间的关系式为:

$$\log M_r = -0.12t_R + 6.59, r^2 = 0.9957$$

2.2 酶解前底物酪蛋白的色谱分析

图 2-a 为酶解前全酪蛋白的 HPSEC 谱图。底物纯度较高,主体成分集中在单一主峰(峰 1')中,对应 $M_r \approx 121\,339$,远远大于其他 4 种单体成分的

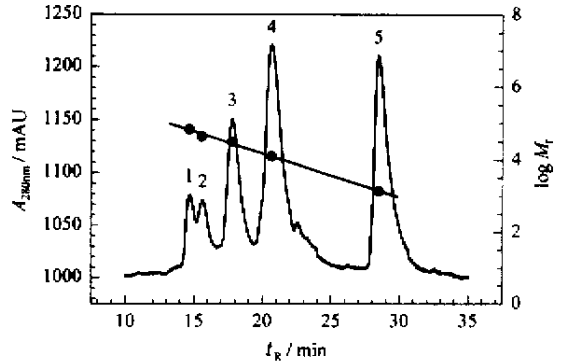


图 1 标准蛋白质相对分子质量工作曲线

Fig.1 High performance size exclusion chromatogram of standard proteins

1. bovine serum albumin; 2. ovalbumin; 3. bovine hemoglobin; 4. cytochrome C; 5. vitamin B12.

相对分子质量。说明酪蛋白以文献中常见的 Waugh 胶粒核-壳模式存在,即由 α -和 β -酪蛋白构成球核,外覆一层由 κ -酪蛋白构成的保护壳^[5]。

2.3 酶促水解反应的色谱实验分析

2.3.1 谱图解析

图 2-b, c, d 是 DH 分别为 5%、10%、15% (相应水解时间为 9 min、31 min、90 min) 时酶解产物的 HPSEC 谱图。主要谱峰保留时间与对应相对分子质量关系如表 1。

与未水解酪蛋白的谱图(图 2-a)相比,随酶解进行(DH 增大),底物主峰很快消失,同时在 $t_R = 17 \text{ min} \sim 32 \text{ min}$ 区域内先后出现对应于某几种相对分子质量的较强谱峰吸收,并在不断积累变化。这说明在酶解作用下, α_{s1} 、 α_{s2} 、 β 和 κ 四肽链构成的 Waugh 胶粒极易解聚,释放的单体被胰蛋白酶专一切割为相对集中的肽段组成,即 M_r 为 2.6 万 ~ 1.9 万的单体片段(峰 2), M_r 为 1.5 万 ~ 0.4 万的大肽片段(峰 3 和峰 4), M_r 为 3 700 ~ 1 000 的多肽片段(峰 5、6),以及 M_r 为 800 以下的寡肽片段(峰 7)。

对比 DH 值不同时的谱图图 2-b, c, d 可知,峰 1 对应的酪蛋白球核,在低 DH 值时出现,高 DH 值时消失,说明 Waugh 胶粒解聚后出现的蛋白聚体逐渐被打碎降解;峰 2 对应的单体肽链吸收强度随 DH 值增大而先升后降(1 040 mAU \rightarrow 1 050 mAU \rightarrow 1 048 mAU),证明反应初期蛋白解聚速率大于酶解速率,表现为吸收强度增加,而高 DH 值时,单体已基本释放完全,水解过程将使吸收强度逐渐减弱;峰 3 和峰 4 对应的大肽片段反应初期即已形成,其峰高随 DH 增大而升高(1 045 mAU \rightarrow 1 052 mAU \rightarrow 1 061 mAU),说明其生成速度快而降解速度慢;峰 5 和峰 6 对应的多肽片段,相对分子质量较小,因此在水解程度较深(DH > 10%)时形成。上述大肽及多

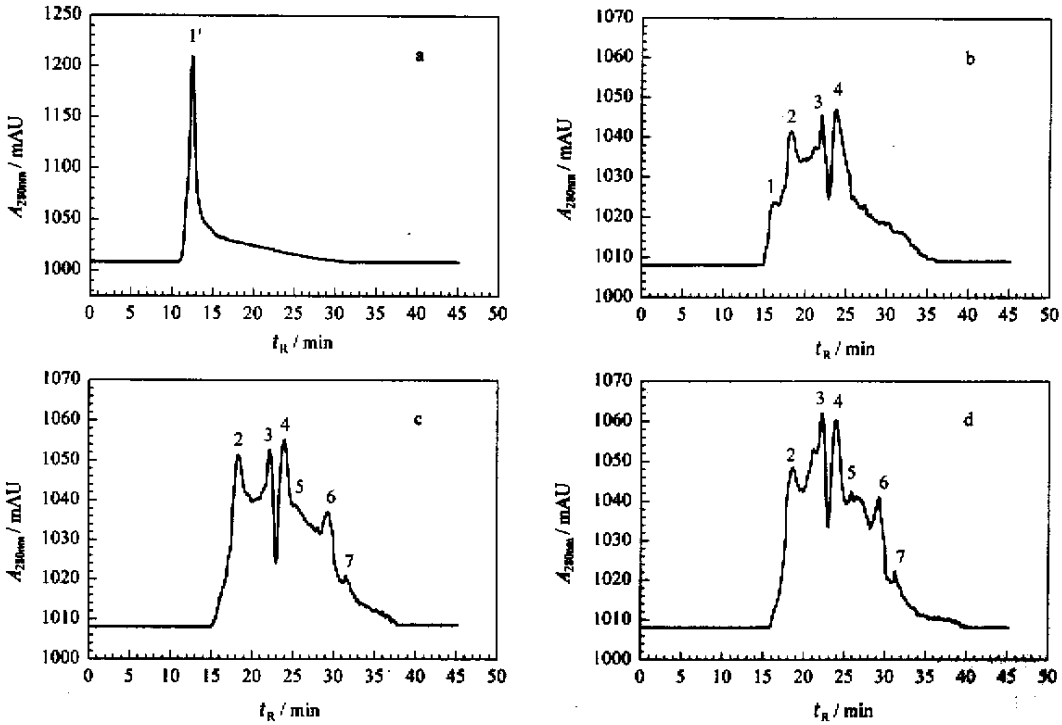


图 2 全酪蛋白-胰蛋白酶水解体系的 HPSEC 谱图

Fig.2 High performance size exclusion chromatograms of tryptic hydrolysis of whole casein

a. whole casein ; b. DH = 5% ; c. DH = 10% ; d. DH = 15% .

For t_R and M_r of the main peaks , see Table 1.

肽片段多含有成簇磷酸丝氨酸残基构成的活性区域,一旦形成,酶解较难。

2.3.2 酶解体系的相对分子质量分布

图 3 是对图 2-b, c, d 各谱图依据谱峰位置按相对分子质量大小分段积分,计算所占质量分数后得到的二维图线。

表 1 全酪蛋白-胰蛋白酶水解体系的色谱峰保留时间及相对分子质量与肽片段对照表

Table 1 The relationship of retention time , relative molecular mass and peptide fragments for tryptic hydrolysis of whole casein

Experimental results of tryptic hydrolysis of whole casein			Theoretical analysis of tryptic hydrolysis of whole casein	
peaks in Fig.2	t_R (min)	M_r ($\times 10^4$)	functional peptides(containing SerP)	common peptides
a1'	12.55	12.13		whole casein
b1	14.02 - 16.20 - 16.72	8.08 - 4.43 - 3.83		casein core (be composed of α_{s1} , α_{s2} , β -casein)
b2, κ 2, d2	16.72 - 18.33 - 19.95	3.83 - 2.46 - 1.51		monomer : α_{s1} , α_{s2} , β κ -casein
b3, κ 3, d3	19.95 - 22.15 - 22.95	1.51 - 0.86 - 0.68		γ -casein and other combination peptides
b4, κ 4, d4	22.95 - 23.98 - 25.20	0.68 - 0.52 - 0.37	α_{s1} -7P(43 - 79) [*] , κ -1P(117 - 169)	α_{s1} (152 - 193), β (49 - 97), β (114 - 169)
d5	25.20 - 25.80 - 28.15	0.37 - 0.31 - 0.16	α_{s1} -2P(43 - 58), α_{s1} -5P(59 - 79), α_{s1} -1P(106 - 119), α_{s2} -4P(1 - 21), α_{s2} -4P(46 - 70), β -4P(1 - 25) [*] , β -1P(33 - 48)	α_{s1} (8 - 22), α_{s1} (23 - 34), α_{s1} (133 - 151), α_{s2} (92 - 113), β (177 - 183), β (184 - 202), κ (1 - 10), κ (47 - 63), κ (69 - 86)
d6	28.15 - 29.25 - 30.80	0.16 - 0.12 - 0.08	α_{s2} -1P(138 - 149), α_{s2} -2P(126 - 136)	α_{s1} (84 - 90), α_{s1} (91 - 100), α_{s1} (125 - 132), α_{s2} (25 - 32), α_{s2} (33 - 41), α_{s2} (81 - 91), α_{s2} (115 - 125), α_{s2} (174 - 181), α_{s2} (182 - 188), β (170 - 176), β (25 - 34), κ (35 - 46), κ (87 - 97), κ (98 - 111)
d7	30.80 - 31.23 - 32.52	0.08 - 0.07 - 0.05	α_{s1} -1P(37 - 42)	α_{s1} (4 - 7), α_{s1} (80 - 83), α_{s1} (120 - 124), α_{s1} (194 - 199), α_{s2} (42 - 45), α_{s2} (71 - 76), α_{s2} (77 - 80), α_{s2} (153 - 158), α_{s2} (161 - 165), α_{s2} (167 - 170), α_{s2} (192 - 197), α_{s2} (200 - 205), β (100 - 105), β (108 - 113), β (203 - 209), κ (17 - 21), κ (64 - 68), κ (113 - 116)

* α_{s1} -7P(43 - 79) is α -caseinophosphopeptid($M_r = 4600$); β -4P(1 - 25) is β -caseinophosphopeptid($M_r = 3100$).

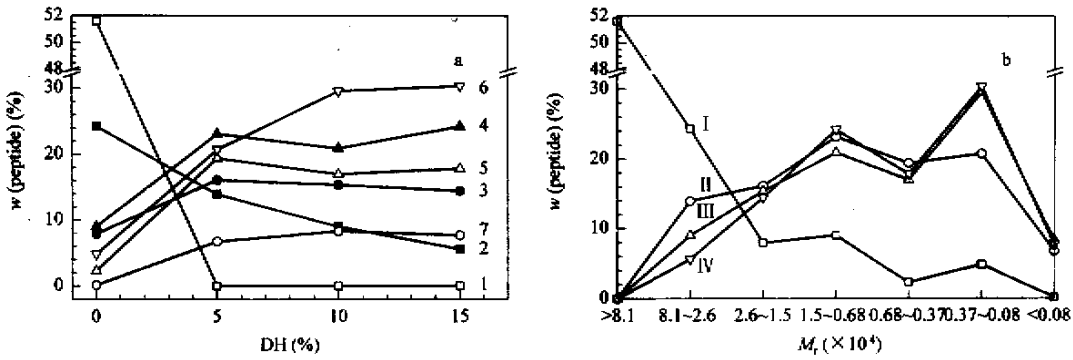


图 3 全酪蛋白-胰蛋白酶水解体系的相对分子质量分布图

Fig.3 Relative molecular mass distributions of tryptic hydrolysis of whole casein

a. the process of enzymatic hydrolysis ; b. variation in the composition of hydrolysates.

$M_r (\times 10^4)$: 1, >8.1 ; 2, 8.1-2.6 ; 3, 2.6-1.5 ; 4, 1.5-0.68 ; 5, 0.68-0.37 ; 6, 0.37-0.08 ; 7, <0.08.

DH (%) : I 0 ; II 5 ; III 10 ; IV 15.

从酶解反应进程看(见图 3-a):反应初期(DH < 5% 时间小于 10 min),原始底物很快消失(52% → 0%),并有部分小分子寡肽迅速生成(约占 7%)。随反应进行(DH = 5% ~ 15%),大分子所占比例逐渐减小(如 8.1 万 ~ 2.6 万蛋白聚体由 24% 降至 6%),而小分子所占比例不断增大,各族肽段因一级序列及空间结构的差异而变化速率不等,但总体趋势因底物中敏感肽键含量的降低以及温度、pH、自水解等因素造成的胰蛋白酶失活而逐渐减慢,并且各肽段所占比例也因胰蛋白酶的专一性极限水解作用而趋于恒定。

从酶解产物组成变化看(见图 3-b):低 DH 值(≤5%)时,相对分子质量介于 8.1 万 ~ 0.08 万的各族肽段所占比例差距较小,高 DH 值(≥10%)时,0.37 万 ~ 0.08 万的多肽片段变化最快,所占比例最高,反应 90 min(DH = 15%)时增至 30%,说明此部分肽段生成容易降解难,可能是酶解反应的终肽。酶解过程中相对分子质量为 2.6 万 ~ 1.5 万,1.5 万 ~ 0.68 万,0.68 万 ~ 0.37 万的中等长度肽段呈波动变化且涨落较小,说明此范围内的各族肽段间高度耦联并相互制约,表现为总体降解速率与生成速率接近,相对分子质量 < 800 的寡肽在反应初期快速形成后增幅最小,所占比例最低,仅为 7% ~ 8%,这与酪蛋白极为松散开放的空间结构易被胰蛋白酶进攻而快速降解以及胰蛋白酶高度专一性的切割特点有关。

2.4 断裂位点剖析与酶解历程推断

查询文献 [5] 及蛋白质数据库,计算得到 α_{s1} , α_{s2} , β 和 κ 4 种主要酪蛋白的结构信息如表 2。由于酪蛋白结构极为松散开放,而胰蛋白酶为高度专一性切割酶,其活性中心疏水袋穴所具有的“ Asp84-

His40-Ser177”电荷中继网可断裂 Lys 及 Arg 羧基端肽键,因此经理论计算求得可能生成的平均肽段数为 224,其相对分子质量分布如图 4。

表 2 酪蛋白结构信息

Table 2 Information of casein structure

Casein	Percentage (%)	$M_r (\times 10^4)$	Number of residue	$n^1)$	$N^2)$
α_{s1} -Casein	44.7	2.36	199	21	253
α_{s2} -Casein	10.5	2.52	207	30	496
β -Casein	32.9	2.40	209	15	136
κ -Casein	11.9	1.90	169	14	120
Average	-	2.34	200	19	224

1) n is the number of Lys and Arg residues ; 2) $N = 2 \cdot n + C_n^2$, N is the number of theoretical hydrolysis peptides.

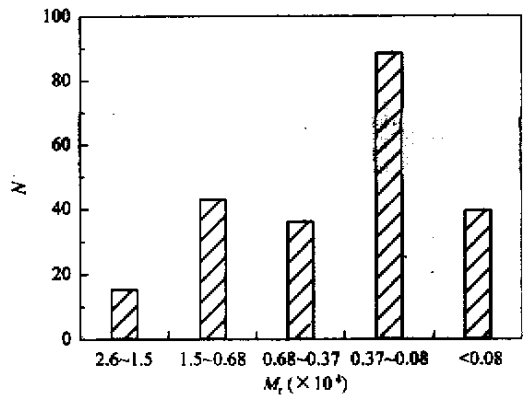


图 4 胰蛋白酶水解全酪蛋白的理论酶解肽段数——相对分子质量区间关系图

Fig.4 The number of theoretical hydrolysis peptides vs relative molecular mass distribution for tryptic hydrolysis of casein

将 HPSEC 实验谱图与文献 [6] 中酪蛋白-胰蛋白酶的酶解物肽序列测定结果进行对比分析,可得到各肽段的谱峰归属(见表 1)。由于具有相近相对分子质量的一族多肽对应于 HPSEC 谱图中的单一

谱峰,所以酶解物中实际肽段数目远远多于谱峰数目。因此,若要建立各肽段与谱峰间精确的对应关系,还需其他更为复杂的分析技术,如反相液相色谱-质谱联用、高效液相色谱-毛细管区带电泳联用等。分析图 4 中计算数据发现,不同谱峰对应的理论酶解肽段数目不等:高 DH 值时,相对分子质量介于 2.6 万~1.5 万的大肽片段数目较少,而 1.5 万~0.08 万的多肽片段较多,这与色谱实验结果相吻合。由此推断,可能的酶解历程为:首先发生 κ -酪蛋白断裂(Lys116-Thr117),生成少量寡肽,同时

Waugh 胶粒被破坏,蛋白球核($M_r \approx 8 \sim 4$ 万)及 α -、 β -、 γ -单体肽链($M_r \approx 2.6 \sim 1.9$ 万)逐渐释放,经初期酶解生成大量 1.5 万~0.68 万及 6 800~3 700 的大肽片段,再经深度酶解,得到 3 700~800 的多肽及 <800 的寡肽和游离氨基酸,其中含不同数目磷酸丝氨酸残基的 CPPs 肽谱如表 3 所示,这些功能性多肽片段因结构上的封闭性极可能为酶解反应的终肽。可见,使用专一性切割酶胰蛋白酶水解酪蛋白,可保证活性中心连续丝氨酸残基的完整性,在制备目标产物 CPPs 等活性多肽时具有特殊功用。

表 3 酪蛋白-胰蛋白酶水解体系的 CPPs 肽谱与 HPSEC 谱峰归属

Table 3 Caseinophosphopeptides mapping and corresponding high performance size exclusion chromatographic peaks

Peptide name	Peptide mapping	M_r	Peak in Fig. 2
α_{s1} -1F(37-42)	Val-Asn-Glu-Leu-SerP-Lys	768	7
α_{s1} -7F(43-79)	Asp-Ile-Gly-SerP-Glu-SerP-Thr-Glu-Asp-Gln-Ala-Met-Glu-Asp-Ile-Lys-Gln-Met-Glu-Ala-Glu-SerP-Ile-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-SerP-Val-Glu-Gln-Lys	4645	4
α_{s1} -1F(106-119)	Val-Pro-Gln-Leu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-SerP-Ala-Glu-Glu-Arg	1659	5
α_{s2} -4F(1-21)	Lys-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-SerP-Gln-Glu-Thr-Tyr-Lys	2745	5
α_{s2} -4F(46-70)	Asn-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-SerP-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys	2898	5
α_{s2} -2F(126-136)	Glu-Gln-Leu-SerP-Thr-SerP-Glu-Glu-Asn-Ser-Lys	1410	6
α_{s2} -1F(138-149)	Thr-Val-Asp-Met-Glu-SerP-Thr-Glu-Val-Phe-Thr-Lys	1465	6
β -4F(1-25)	Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg	3120	5
β -1F(33-48)	Phe-Gln-SerP-Glu-Glu-Gln-Gln-Gln-Thr-Glu-Asp-Glu-Leu-Gln-Asp-Lys	2060	5
κ -1F(117-169)	Thr-Glu-Ile-Pro-Thr-Ile-Asn-Thr-Ile-Ala-Ser-Gly-Glu-Pro-Thr-Ser-Thr-Pro-Thr-Thr-Glu-Ala-Val-Glu-Ser-Thr-Val-Ala-Thr-Leu-Glu-Asp-SerP-Pro-Glu-Val-Ile-Glu-Ser-Pro-Pro-Glu-Ile-Asn-Thr-Val-Gln-Val-Thr-Ser-Thr-Ala-Val	5610	4

3 结论

HPSEC 技术与 DH 值概念相结合是跟踪分析蛋白质酶促水解反应的有效方法,同时还可实现对复杂酶解历程和多样性酶解产物的定量表征。

依据 HPSEC 实验谱图,推断胰蛋白酶水解酪蛋白可能的反应历程为:首先发生 κ -酪蛋白断裂,然后 Waugh 胶粒被破坏, α 、 β 等单体释放,经专一性酶解切割,得到不同相对分子质量范围且相对集中的肽段组成。

依据蛋白质结构信息,得到酶解物中含不同数目磷酸丝氨酸残基的 CPPs 肽谱,其活性中心结构完整,证明胰蛋白酶水解酪蛋白是制备功能性多肽的有效工艺体系,同时作用位点极强的规律性也为酶促水解反应过程研究提供了理想的模型体系。

参考文献:

- [1] TANG Ya-jie, WU Si-fang. Food Science, 1998, 19(5) 3
汤亚杰,吴思方. 食品科学,1998,19(5) 3
- [2] Bressollier P, Petit J M, Julien R. Biotechnol Bioeng, 1988, 31(7) 650
- [3] Eric C R, Peter F R, Nicholas J A. Anal Biochem, 1994, 217 277
- [4] SHEN Tong, WANG Jing-yan. Biochemistry. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1990. 205
沈同,王镜岩. 生物化学. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社, 1990. 205
- [5] Owen R F. Food Chemistry. New York: Marcel Dekker, 1985. 677
- [6] ZHANG Jia-cheng. Food and Fermentation Industries, 1996, 22(6) 54
张佳程. 食品与发酵工业, 1996, 22(6) 54