

# 微波复合酶水解植物蛋白制取小分子多肽的研究

李磊 陈均志 张海平 (陕西科技大学化学与化工学院, 陕西西安710021)

**摘要** [目的] 为了研究微波复合酶水解植物蛋白制取小分子多肽的可行性。[方法] 采用微波加热和中性、酸性蛋白酶双酶复合水解大豆分离蛋白(SPI), 并用高效毛细管电泳和凝胶渗透色谱等分析方法进行了验证, 讨论了反应机理, 还对微波和常规加热进行了对比。[结果] 采用微波加热和复合酶水解蛋白质可得到小分子多肽, 其分子量在2 000~8 000 Da。SPI在微波复合酶水解条件下15 min即达到了常压酸解6 h的水解度, 缩短了反应时间, 提高了分解效率。[结论] 微波加热和复合酶水解是将蛋白分解成多肽的高效方法。

**关键词** 大豆分离蛋白(SPI); 微波; 复合酶; 多肽

中图分类号 Q946 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)19-05655-02

## Study on Preparing Low Molecular Polypeptide by Hydrolyzing Vegetable Protein with Microwave and Compound Enzyme

LI Lei et al (Chemistry and Chemical Industry College, Shaanxi Science and Technology University, Xian, Shaanxi 710021)

**Abstract** [Objective] The study aims to investigate the feasibility of preparing low molecular polypeptide by hydrolyzing vegetable protein with microwave and compound enzyme. [Method] The soybean protein isolated (SPI) were hydrolyzed by microwave heating and bi-enzymatic compound hydrolysis of neutral and acid protease and then that was validated by analysis methods of high-performance capillary electrophoresis (HPCE) and gel permeation chromatography (GPC). Its reaction mechanism was discussed, and the microwave and conventional heating methods were compared. [Result] Low molecular polypeptides could be obtained through hydrolyzing protein by microwave heating and compound enzyme hydrolyzing, with the molecular weight at 2 000~8 000 Daltons. Under the microwave heating and compound enzyme hydrolysis for 15 min, SPI got the hydrolysis degree that needed 6 h in normal pressure acid hydrolysis. This method shortened reaction time and increased decomposition efficiency. [Conclusion] Microwave heating and compound enzyme hydrolysis was the high-efficient method to break down protein into polypeptide.

**Key words** SPI; Microwave; Compound enzyme; Polypeptide

多年来, 有关蛋白质分解成多肽的研究较多<sup>[1-2]</sup>。目前常用的常规酶法分解蛋白质已经达到很高的水解率, 但费时且条件苛刻, 要使水解达到小分子肽阶段, 条件更不易控制。笔者采用微波复合酶对大豆分离蛋白(SPI)进行水解, 经高效毛细管电泳和凝胶渗透色谱仪对大豆分离蛋白的分解物进行了分离和检测, 证明得到含量丰富的多肽蛋白分解物, 从而为进一步制取多肽钙锌络合剂打下基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 原料及仪器** 大豆分离蛋白(SPI), 新乡同飞食品有限公司, 蛋白含量 89%; 中性蛋白酶, 无锡杰能科生物工程有限公司, 雪梅牌(食品级); 碱性蛋白酶, 无锡杰能科生物工程有限公司, 雪梅牌(食品级); 多肽分子量标准, Amersham Biosciences 公司, 毛细管电泳专用; 微波炉, LG 电子电器有限公司, MS 2089T; 甲醛, 西安化学试剂厂, 分析纯; 高效毛细管电泳仪, CE 212, 北京大学制造; 凝胶渗透色谱仪, 2414 515, 美国 Waters。

**1.2 试验方法** 取5 g 大豆分离蛋白, 加入90 g 水, 调匀, 调溶液pH 值到8.0, 加入0.35 g 中性蛋白酶, 微波150 W 加热1 min, 取出降温并补足水分, 再放入微波炉加热1 min, 反复数次, 如此控温40~45℃, 反复加热, 至pH 值不变为止, 此时溶液pH 值为7.0; 调节溶液pH 值到3.5, 加入0.3 g 酸性蛋白酶, 微波150 W 加热, 控温45~50℃, 反复加热, 至pH 值不变为止, 此时pH 值为2~3; 取出备用供检测。

**1.3 检测方法** 水解度及氨基氮的检测用甲醛滴定法(GB/T 14771-1993)。水解度的定义为<sup>[4]</sup>原料蛋白质中肽键被裂解的百分数, 公式为:  $DH = h / h_{tot} \times 100\% = (C_{NH^0} / C_{SPIW} - C_{NH^0} / h_{tot}) \times 100\%$ ; 式中  $h$  为水解后蛋白被裂解的肽键数  $mmol/g$ ,  $h_{tot}$  为原料蛋白质的肽键数  $mmol/g$ ; 对于某一的

特定蛋白质  $h_{tot}$  是一个常数, 大豆蛋白  $h_{tot} = 7.8 mmol/g$ ;  $C_{NH^0}$  为水解蛋白液中氨基酸态氮的含量  $mmol/L$ ,  $C_{SPIW}$  为水解蛋白液中蛋白质的含量  $mg/ml$ ,  $C_{NH^0}$  原料蛋白质中游离氨基氮的含量  $mmol/g$ ; 对大豆蛋白, 取值为0.33  $mmol/g$ 。多肽的检测采用毛细管电泳和凝胶渗透色谱法测其分子量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应机理

**2.1.1 微波反应机理。** 位于微波场中的分子由于电和磁的作用被极化而定向排列, 犹如金属在磁铁上一样。微波又是一种高频的电磁波, 因此, 微波场中的极性分子处于高速摆振状态, 分子运动的结果造成了分子间的碰撞和摩擦加剧, 因而产生大量的热量。微波加热的优势在于介质内外同时加热的特点, 即微波能够同时将能量传递给介质的所有反应活性中心, 因此比其他加热体系有更多的活性中心, 分子发生碰撞反应在瞬间完成, 故而反应速度大大提高。且由此可推知, 溶质中含溶剂量较多的地方, 易于积聚热量, 这同时解释了试验过程中, 蛋白中水分不均匀的时候, 部分蛋白变性甚至糊化的现象。

**2.1.2 复合酶的采用<sup>[3]</sup>。** 高效率的蛋白水解酶除了对底物蛋白质应具有较高的水解率外, 并应具有使用安全、价格便宜、生产条件要求不高等特点。酶作为一种具有生理活性的特殊蛋白质, 其活化中心不同, 相应的水解专一性亦不同, 对同一种蛋白质选用不同的蛋白酶进行水解, 水解效果会有很大差别。根据pH 适用范围不同, 试验采用中性蛋白酶和酸性蛋白酶两种酶联合水解, 以获取高的水解率。

### 2.2 高效毛细管电泳检测

**2.2.1 多肽的检测。** 将蛋白分解物溶于(60  $mmol/L$  Tris/HCl + 1% SDS + 5% 2-巯基乙醇, pH 值=6.0) 的混合液中, 置沸水中5 min, 离心分离10 min(4 000 r/min), 取上清液经0.45  $\mu m$  滤膜过滤, 超声脱气后进样分析。石英毛细管分别以双蒸水0.1  $mol/L$  NaOH、0.1  $mol/L$  HCl 冲洗3 min 后, 用缓冲液

(100 mmol/L Tris/HCl + 0.1% SDS + 0.1% PEO, pH 值 = 8.5) 冲洗至基线平稳, 不加样品运行缓冲液 5 min, 然后以气动进样的方式进样 10 s, 加电压 10 kV 运行, 阴极紫外 (214 nm) 检测。结果见图 1。从图 1 可以看出: 保留时间 10.44、11.90、13.22、14.19、14.70、16.16、19.38 min 处出现肽峰, 且峰形独立, 无拖尾现象, 说明分离效果良好。

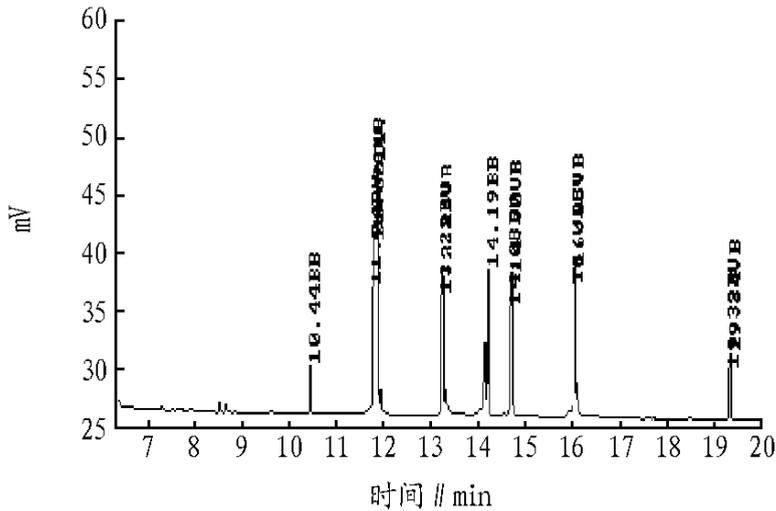
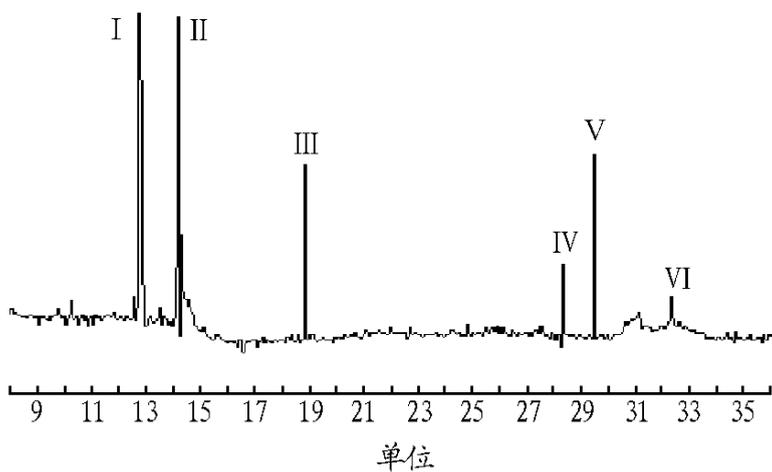


图1 SH 微波酸解后毛细管电泳结果

**2.2.2 多肽分子量的确定。**取 Amersham Biosciences 公司多肽标准品按以上同样方法检测, 结果见图 2。对比图 1、2 可看出: 其中 10.44、11.90 min 肽峰位于 2 512 Da 以下, 说明分解物中含有分子量低于 2 512 Da 的小分子肽; 13.22、14.19 min 肽峰位于 2 512 ~ 6 214 标准峰, 说明分解物中含有分子量位于 2 512 ~ 6 214 Da 的肽; 14.70、16.16 min 肽峰位于 6 214 ~ 8 159 标准峰, 说明分解物中含有分子量位于 6 214 ~ 8 159 Da 的肽; 19.38 min 肽峰位于 8 159 ~ 10 700 标准峰, 但靠近 8 159 标准峰, 说明分解物中含有少量分子量大于 8 159 Da 的肽。另外大豆蛋白分解后的多肽分子量集中在 2 000 ~ 8 000。相比蛋白质大分子量来说 (100 000 ~ 600 000 Da<sup>[6]</sup>), 所得的多肽已经在小分子量范围以内。



注 I 2 512 (MW), II 6 214 (MW), III 8 159 (MW), IV 10 700 (MW), V 14 404 (MW), VI 16 949 (MW)。

图2 多肽分子量标准

### 2.3 凝胶渗透色谱检测

**2.3.1 凝胶渗透仪器系统。**Waters 2414 视差折光检测器 (Refractive Index Detector); 515 高压梯度泵; 7725i 手动进样器; 凝胶色谱柱: Ultrahydrogel™ Linear 7.8 × 300 mm column。色谱条件: 流动相 0.1 M NaNO<sub>3</sub>, 柱温 35 °C, 流速 0.8 ml/min。标准样品: 聚乙二醇分子量标准 (Polyethylene glycol Molecular Weight), 产地为 Polymer standards service USA, 范围为 106、194、440、628、960、1 460、4 290、7 130、12 900、20 600。

**2.3.2 标准曲线的制作。**将标准样品用流动相配制成 0.01% 的溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后分别进样, 以标准

分子量的对数 ln MW 对保留时间作图, 可得到标准分子量工作曲线, 如图 3。

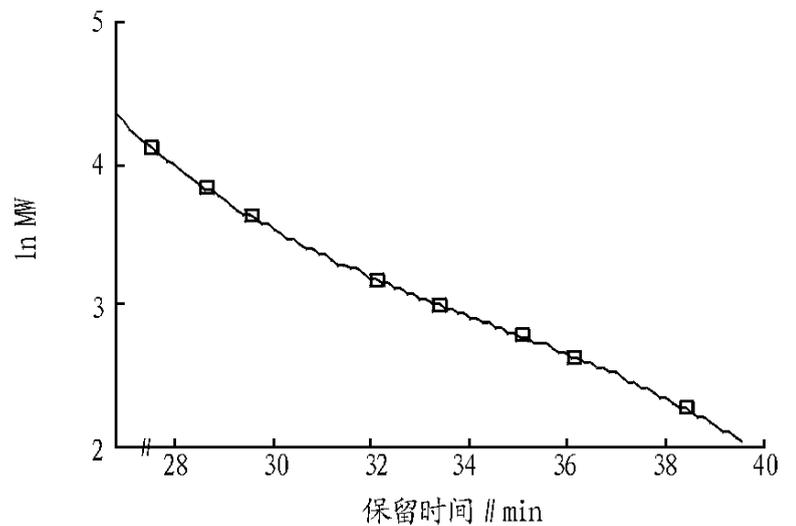


图3 标准分子量工作曲线

**2.3.3 样品测试结果。**将蛋白分解产物用高纯水浸泡过夜, 4 000 r/min 离心分离后取上清液, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 超声脱气后进样分析, 结果见图 4。

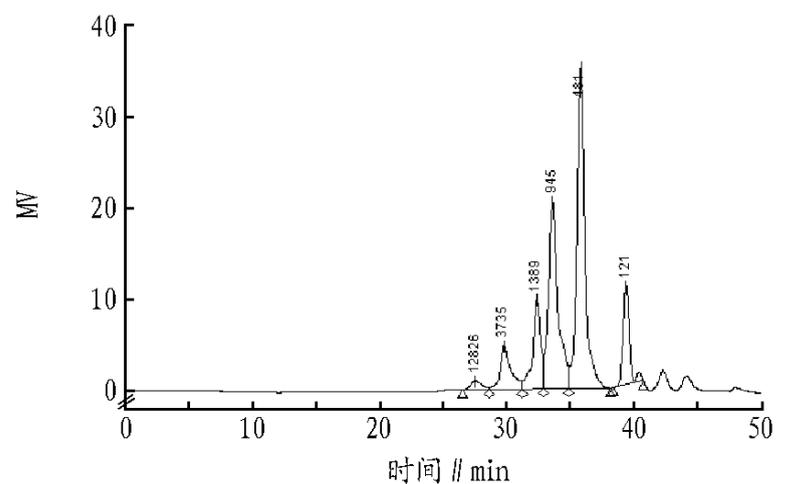


图4 蛋白微波酸解多肽凝胶渗透色谱

将图 3、4 对照可知, 25 ~ 40 min 出现 6 个肽峰 (40 min 以后小分子峰无法积分), 用 Millennium82 色谱工作站积分可得, 分子量分别是 12 826、3 735、1 389、945、481、121 Da, 且大分子量分子含量较少, 多数已集中在小分子量阶段, 与毛细管电泳检测结果相似。且有更低分子量的分子存在, 应是水解过程中产生的氨基酸小分子。

**2.4 对比** 按 1.2 方法制取复合酶解蛋白混合液, 对比采用水浴控温常规条件下加热, 于不同时间段取样, 定氮测其水解度, 结果如表 1。由表 1 可知, SH 在微波复合酶解条件下

表1 SH 不同加热方法水解度变化

	反应时间	水解度 %
常规加热	2 h	7.0
	4 h	18.0
	5 h	25.5
	6 h	40.4
	8 h	44.2
微波加热	1 min	1.5
	5 min	2.0
	8 min	22.3
	10 min	33.0
	15 min	39.8

15 min 即可达到常压酸解 6 h 的水解度, 大大缩短了分解所需的时间, 提高了分解效率。

### 3 结论

采用微波加热复合酶分解的方式分解蛋白质, 可得到小分子量的肽, 其分子量在 2 000 ~ 8 000 Da。采用微波加热的

(下转第 5660 页)

(上接第5656页)

方式反应时间短,效率高。采用多次、间断微波加热,每次1 min,在较短的时间(15 min)内不会使蛋白酶失活。

### 参考文献

- [1] ADIB S A, FOGEL MR, AGRAWAL R M. Comparison of free amino acid and dipeptide absorption in the jejunum of sprue patients [J]. *Gastroenterology*, 1974, 67:586 - 591.
- [2] HARA H, FUNABLI R, IWATA M, et al. Portal absorption of small peptides in

rats under unrestrained condition [J]. *J Nutr*, 1984, 114:1122.

- [3] 李磊, 陈均志. 双酶法水解大豆蛋白的研究 [J]. *西北轻工业学院学报*, 2002, 20(1):35 - 38.
- [4] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定 [J]. *食品科学* 1994, 17(11):65 - 67.
- [5] 王肇慈. 粮油食品品质分析 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000:129 - 130, 144 - 145.
- [6] 王尔惠. 大豆蛋白生产新技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999:37 - 38.
- [7] 张洪渊, 万海清. 生物化学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2001:69 - 70.