

# 油菜蜂花粉蛋白酶解条件的研究

朱晓丽<sup>1</sup>, 孙丽萍<sup>2</sup>, 董捷<sup>2,\*</sup>

(1. 北京百花蜂产品科技发展有限公司, 北京 100176 2. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

**摘要:** 通过单因素试验, 以水解度为标准对中性蛋白酶、木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶的最佳反应条件和对花粉蛋白的酶解能力进行了研究。碱性蛋白酶对于油菜蜂花粉的水解作用最强, 依次减弱为中性蛋白酶和木瓜蛋白酶。碱性蛋白酶的最适条件为 pH9、50℃下加入 3000U/g 的酶量水解 3h。

**关键词:** 油菜蜂花粉; 中性蛋白酶; 木瓜蛋白酶; 碱性蛋白酶; 水解度

## Study on Enzymatic Hydrolysis of Rape Bee-pollen Protein

ZHU Xiao-li<sup>1</sup>, SUN Li-ping<sup>2</sup>, DONG Jie<sup>2,\*</sup>

(1. Beijing Baihua Bee-product Technology Development Co. Ltd., Beijing 100176, China;

2. Honeybee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract:** The enzymatic hydrolysis of rape bee-pollen protein by three protease was studied. With hydrolysis degree as the standard, the best conditions for enzymatic hydrolysis were confirmed by single factor test. The best conditions of alcalase for hydrolysis are pH9, 50℃, the adding amount of 3000U/g, reacting for 3 hours.

**Key words** rape bee-pollen; neutral protease; papain; alcalase; degrees of hydrolysis

中图分类号: S896

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0234-05

蜂花粉是自然界中存在的营养最丰富的一种食品, 并且营养成分搭配合理, 有利于人体吸收, 另外它还含有许多功能因子, 能够加强人体的免疫能力和生理功能, 已经日益受到人们的青睐<sup>[1]</sup>。蜂花粉中蛋白质含量相当丰富, 约占其干重的 7%~35%<sup>[2-3]</sup>, 氨基酸占总量的 20% 以上, 游离氨基酸 1%~2%<sup>[4-5]</sup>。目前, 蜂花粉的研究主要集中在功能因子如黄酮类物质、酚类物质以及其他有效因子上, 大部分为单纯的水提物和醇提物。由于蜂花粉的成分复杂, 特别是蛋白的种类不清楚, 对于占有量较大的花粉蛋白的研究和相关报道相对较少。另外, 由于蜂花粉中的某些蛋白质引起部分人群的过敏反应, 这部分人对蜂花粉敬而远之, 使的花粉这种营养全面的绿色食品不能被很好的利用。

现在人类的研究的焦点是小分子的多肽, 因为生物活性肽由两个或两个以上的氨基酸通过肽键连接而成, 除具有蛋白质的性质外, 还具有涉及神经、激素和免疫调节、抗血栓、抗高血压、抗胆固醇、抗细菌病毒、抗癌、抗氧化、清除自由基、改善氮素吸收关系和矿质运输、促生长、调节食品风味、口味、硬度等多重功效。为了能够更好的利用大自然赋予人类的

瑰宝, 本实验使用蛋白酶降解花粉蛋白旨在增加花粉蛋白在水中的溶解性, 使水不溶性蛋白和难溶性蛋白降解为可溶性蛋白, 提高蜂花粉蛋白的利用价值, 一般过敏蛋白质水解后使之低分子化并降低蛋白的过敏性<sup>[6]</sup>。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料、试剂与设备

破壁花粉(机械破壁) 北京中蜜科技发展有限公司。

木瓜蛋白酶(50 万 U/g, 食品级)、中性蛋白酶(6 万 U/g, 食品级) 北京奥博星生物技术责任有限公司; 碱性蛋白酶(20 万 U/g, 食品级) 南宁东恒华道生物科技有限责任公司; 其余试剂均为分析纯。

凯氏定氮法消化装置、半微量法蒸馏装置、恒温水浴锅、低速大容量离心机、AL204 精密电子天平及 pH 计。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蛋白质含量的测定

半微量凯氏定氮<sup>[7]</sup>。

#### 1.2.2 花粉粗蛋白的分类提取

收稿日期: 2007-03-05

作者简介: 朱晓丽(1979-), 女, 硕士, 主要从事食品生物化学研究。E-mail: zhxili2004@163.com

\* 通讯作者: 董捷(1966-), 女, 副研究员, 主要从事蜂产品的开发和研究。E-mail: jiedong@126.com

## 1.2.2.1 水溶性蛋白的分离

称取 1.0 g 破壁花粉样品于研钵中, 加少量的蒸馏水, 研磨成匀浆。将研磨好的材料转移到离心管中。用蒸馏水冲洗研钵, 并入离心管。用玻棒搅拌离心管中的材料。用数滴水向下淋洗玻棒, 离心, 上清液转入 50ml 容量瓶。向离心管的沉淀中再加少量蒸馏水, 搅拌 5 min, 离心, 上清液并入容量瓶。重复操作 3 次。最后加水定容至 50ml。

## 1.2.2.2 盐溶性蛋白的分离

向上述离心管的残渣中加入 10ml 10% 的 NaCl 溶液, 用玻棒搅拌 5 min, 然后以盐溶液冲洗玻棒, 离心。上清液转入 50ml 容量瓶。用同一盐液洗提 3 次, 离心上清液并入容量瓶, 定容至 50ml。

## 1.2.2.3 醇溶性蛋白的分离

向上述盐液提取后的残留物中加入 10ml 75% 乙醇, 用玻棒搅拌, 将混合液置 80℃ 的水浴中 5 min, 在此期间要随时搅拌。其后取出离心管, 继续搅拌 5 min, 离心, 收集上清液。用 75% 乙醇洗提 3 次, 合并离心上清液, 并以 75% 乙醇定容至 50ml。

## 1.2.2.4 碱溶性蛋白的分离

向上述醇液提取后的残留物中加入 10ml 0.2% NaOH, 用玻棒搅拌 15 min, 离心, 收集上清液。再用 0.2% NaOH 洗提 3 次(后面 2 次搅拌 5 min)。合并离心上清液, 以 0.2% NaOH 定容至 50ml。

吸取上述四种液体进行凯氏定氮, 测定提取液中的总氮含量。

## 1.2.3 酶解的实验过程

粗蛋白的提取使用了不同的溶剂, 对于蛋白酶的活性有很大的影响。本实验称取一定量的原破壁花粉, 以料水比 1:10 加入所需 pH 值的缓冲体系中, 混匀, 调节温度, 加入一定量的蛋白酶在一定温度下进行水解。反应一段时间后, 90℃ 灭酶 10 min, 然后加入 10% 的三氯乙酸沉淀大分子量蛋白, 在 4000r/min 下离心 15 min, 记录上清液的体积, 取 1ml 上清液进行凯氏定氮, 测定可溶性三氯乙酸游离氮的含量, 计算水解度。

## 1.2.4 水解度的测定

$$\text{水解度 DH} = (N_1 - N_0) / (N_2 - N_0)$$

式中,  $N_0$  为油菜蜂花粉中水提取物中游离态氮的含量;  $N_1$  为三氯乙酸中可溶性氮的含量;  $N_2$  为油菜蜂花粉的总氮含量。

1.2.5 单因素试验的方法<sup>[8]</sup>

在其他影响因素相同的条件下, 改变所要测定因素, 以水解度为标准确定最佳实验条件。

## 2 结果与分析

表 1 各蛋白质组分在蜂花粉中的分布

Table 1 Percent of protein in bee pollen

类别	在脱脂蜂花粉中的分布 (%)	在总蛋白中的分布 (%)
水溶蛋白	9.631	31.85
盐溶蛋白	2.264	7.49
醇溶蛋白	6.188	20.47
碱溶蛋白	6.103	20.18
难溶蛋白	6.050	20.01
总和	30.235	100.00

## 2.1 蛋白的分类提取

由表 1 中的数据可以看出, 在油菜蜂花粉中, 各类不同溶性的蛋白所占的比例相差不大。其中, 水溶性蛋白为花粉蛋白的主蛋白, 占花粉总蛋白的 31.85%, 难溶性蛋白所占的比例为 20.01%, 因此, 仅仅用一种单纯的溶剂并不能将花粉中的蛋白充分提取利用。

## 2.2 油菜蜂花粉蛋白质酶解条件的单因素试验

酶解条件受许多因素的影响, 主要有酶解的底物浓度、酶的用量、酶解温度、酶解时间以及最适 pH 值。本试验选用 1:10 的料水比作为底物浓度。

## 2.2.1 木瓜蛋白酶的单因素试验

木瓜蛋白酶是由木瓜的果实中提取精炼而成的, 呈白色至灰白色粉末, 有吸湿性。木瓜蛋白酶的作用位点: Arg-、Lys-、Phe-。本实验所用的木瓜蛋白酶的酶活为 50 万 U/g。

单因素试验的方法, 在其他影响因素相同的条件下, 改变所要测定因素, 测定水解度, 确定最佳条件。向蜂花粉悬浊液中加入一定量的蛋白酶, 在 pH 6~7.5, 温度 40~60℃ 下水解 3h, 以水解度为标准, 确定木瓜蛋白酶水解油菜花粉的最适条件。

## 2.2.1.1 酶量对木瓜蛋白酶作用的影响

向蜂花粉悬浊液中加入的木瓜蛋白酶与底物的比例从 2000~14000U/g 不等, 其他条件相同, 在 50℃、pH 7 的条件下水浴振荡 3h。90℃ 下加热 10 min 灭酶。4000r/min 离心 15 min, 取上清液进行凯氏定氮, 计算水解度。

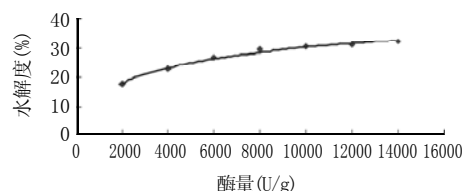


图 1 木瓜蛋白酶添加量对水解度的影响

Fig.1 Effects of papain adding amount on hydrolysis degree

由图 1 可以看出, 随着酶量的增加水解度逐渐升高, 在 2000~8000U/g 的添加量时水解度的增加比较明显, 随着酶量的增加, 从 8000U/g 的添加量开始水解度

的增长趋势变化缓慢。综合以上数据,我们选用10000U/g的添加量。

### 2.2.1.2 pH 值对木瓜蛋白酶作用的影响

木瓜蛋白酶适宜pH值为6~7.5,本实验选用pH值为6、6.5、7、7.5对其作用于油菜花粉蛋白的最适pH值进行试验,其他条件不变,选用木瓜蛋白酶与底物比例为10000U/g,温度为50℃,水浴振荡3h。90℃下加热10min灭酶。4000r/min离心15min,取上清进行凯

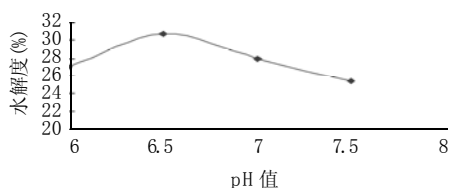


图2 pH 对水解度的影响

Fig.2 Effects of pH on hydrolysis degree

氏定氮,计算水解度。

pH 值对酶解的影响比较复杂,pH 值的变化不仅影响酶的稳定性,而且还影响酶活性中心重要基团的解离状态及底物的解离状态。由图2可以看出,pH 为6.5时木瓜蛋白酶酶解油菜蜂花粉蛋白的水解度最高,也就是说在pH 值为6.5时木瓜蛋白酶在油菜蜂花粉悬浊液中的活力最高,其水解的最适pH 值是6.5。以下研究采用pH 值6.5进行单因素试验。

### 2.2.1.3 温度对木瓜蛋白酶作用的影响

不同来源的酶最适温度不同,本实验所用木瓜蛋白酶的适用温度为40~60℃,在酶与底物浓度比为10000U/g,pH 值为6.5条件下,花粉悬浊液分别在40、50和60℃条件下水解3h,90℃下加热10min灭酶。4000r/min离心15min,取上清进行凯氏定氮,计算水解度。试验结果见图3。

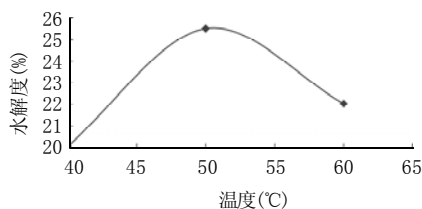


表3 温度对水解度的影响

Fig.3 Effects of temperature on hydrolysis degree

如图3所示,在一定范围内,温度升高,水解度增加,但由于酶是蛋白质,温度过低,酶处于休眠状态,活力较低;温度过高,蛋白酶就会变性,从而失去活力。因此,在其它影响因素相同的条件下,50℃是木瓜蛋白酶的最适温度。

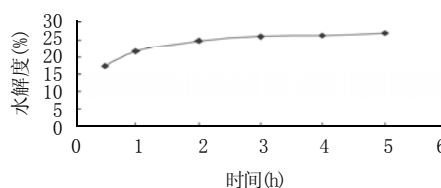


图4 时间对水解度的影响

Fig.4 Effects of time on hydrolysis degree

### 2.2.1.4 时间对木瓜蛋白酶作用的影响

蛋白质水解是个动态的过程,随着时间的推移,酶解底物浓度减小,蛋白酶作用的位点变少,酶解物浓度增加,一定时间后,水解达到平衡后,水解度增加缓慢。在酶与底物浓度比为10000U/g、pH6.5、温度50℃的条件下,测定木瓜蛋白酶的水解度随时间的变化情况,水解度测定方法如上所述。

蜂花粉蛋白在木瓜蛋白酶作用下,水解度随时间的延长呈增加趋势,2h前,水解度增加比较快,当水解2h后,其水解度变化幅度较小,时间为3h时,水解反应达到平衡。因此选用3h作为木瓜蛋白酶水解油菜蜂花粉的时间。

由以上试验结果得出,木瓜蛋白酶作用于油菜蜂花粉蛋白的最佳条件:酶与底物浓度比为10000U/g,pH6.5,温度50℃,水解时间3h。

### 2.2.2 中性蛋白酶单因素试验

中性蛋白酶是枯草芽孢杆菌经过发酵提炼而成的固体酶制剂,适用温度35~55℃,pH 值范围为6.0~7.5。中性蛋白酶的酶活为6万U/g,试验方法如上述的木瓜蛋白酶。

#### 2.2.2.1 酶量对中性蛋白酶作用的影响

中性蛋白酶与底物浓度的比例在100~1200U/g作为试验条件,控制pH 为7,50℃水浴下反应3h,其它

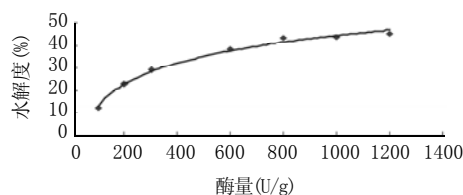


图5 中性蛋白酶酶量对水解度的影响

Fig.5 Effects of neutral protease adding amount on hydrolysis degree

条件相同。方法如木瓜蛋白酶。结果如图5所示。

从图5可知,随着中性蛋白酶酶量的增加,水解度逐渐增大,当酶与底物比例达到800U/g后增加缓慢。因此,在以后的中性蛋白酶单因素试验中采用800U/g作为酶与底物浓度的最适比例。

#### 2.2.2.2 pH 值对中性蛋白酶作用的影响

本试验所用的中性蛋白酶的 pH 值适用范围是 6.0~7.5, 因此选用 pH 值分别为: 6、6.5、7 和 7.5。酶与底物浓度比例为 800U/g, 50℃水浴下反应 3h, 其它条件相同。方法如木瓜蛋白酶。结果见图 6。

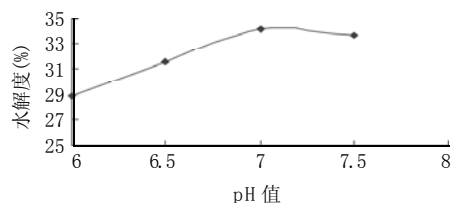


图6 pH对水解度的影响

Fig.6 Effects of pH on hydrolysis degree

由图 6 可知, 在其他相同的条件下, 中性蛋白酶对油菜花粉悬液蛋白酶解的最适 pH 为 7。在以下试验中, 将采用 pH 7 作为中性蛋白酶的最适 pH 值。

#### 2.2.2.3 温度对中性蛋白酶作用的影响

中性蛋白酶的适用温度是 35~55℃, 在酶与底物浓度比例为 800U/g、pH 7、其他相同条件下, 分别测定 30、40、50、60℃下水浴反应 3h 后花粉蛋白的水解度。

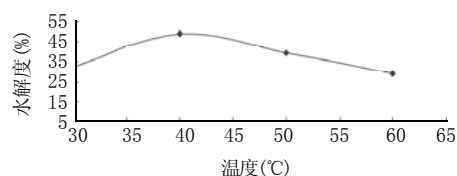


图7 温度对水解度的影响

Fig.7 Effects of temperature on hydrolysis degree

由图 7 可以看出, 温度对于中性蛋白酶水解花粉蛋白影响比较显著, 在 40℃下水解度最大, 即 40℃是中性蛋白酶水解花粉蛋白的最佳温度。

#### 2.2.2.4 时间对中性蛋白酶作用的影响

在酶与底物浓度比例为 800U/g、pH 7、其它相同条件下, 40℃下分别吸取不同反应时间的蛋白酶解液测定其中的含氮量, 并换算成水解度。结果见图 8。

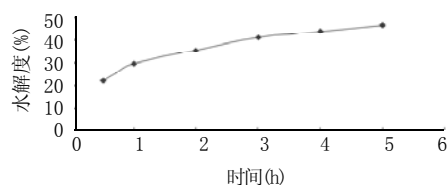


图8 时间对水解度的影响

Fig.8 Effects of time on hydrolysis degree

从图 8 可以看出, 中性蛋白酶水解花粉蛋白的水解度随时间的变化起伏比较小, 随着时间的延长, 水解度增加越来越缓慢。此试验选取 3h 作为中性蛋白酶水解油菜花粉的最佳时间。

综合以上单因素试验结果得出, 中性蛋白酶作用于

油菜蜂花粉蛋白的最佳条件: 酶与底物浓度比例为 800U/g, pH 7.0, 温度 40℃, 水解时间为 3h。

#### 2.2.3 碱性蛋白酶单因素试验

碱性蛋白酶是地衣芽孢杆菌经发酵提炼而成的蛋白质水解酶, 是一丝氨酸型的内切蛋白质酶, 水解位点: Ala-、Leu-、Val-、Tyr-、Phe-、Try-。应用 pH 范围 9~12, 适宜温度范围 40~50℃。酶活为 20 万 U/g (1g 固体酶粉在 40℃, pH 10.5 条件下, 每 min 水解酪素产生 1μg 酪氨酸为 1 个酶活力单位, 以 U/g 表示)。

##### 2.2.3.1 酶量对碱性蛋白酶作用的影响

底物浓度选择料水比为 1:10, 即蛋白质浓度时 3%, 选择不同的酶添加量, 在 pH 9, 50℃下水解 3h, 测定酶解液的含氮量, 换算为水解度。试验方法同木瓜蛋白酶。

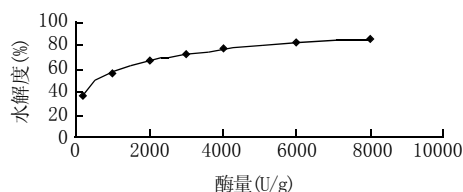


图9 碱性蛋白酶对水解度的影响

Fig.9 Effects of alcalase on hydrolysis degree

如图 9 所示, 当加入的酶量小于 3000U/g 时, 由于酶量较少, 不能将蛋白质较程度的水解, 随着酶量的增加, 酶量和底物浓度达到饱和状态, 蛋白质能够最大程度的水解, 当达到 3000U/g 时, 底物浓度相对减少, 即使再增加酶量其水解度变化也不显著, 因此, 碱性蛋白酶水解油菜花粉蛋白的最适酶量与底物浓度比例为 3000U/g。

##### 2.2.3.2 pH 值对碱性蛋白酶作用的影响

酶与底物浓度比为 3000U/g, 采用料水比 1:10 作为底物浓度, 反应温度 50℃, 其它条件相同, 选择 pH 值为 8、9、9.5、10 和 10.5 的缓冲体系, 水浴水解 3h, 测定含氮量, 换算成水解度。方法同木瓜蛋白酶。

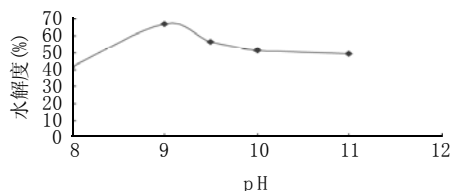


图10 pH对水解度的影响

Fig.10 Effects of pH on hydrolysis degree

由图 10 可知, 在弱碱性条件下, 蛋白酶的活性较高, 随着碱性的加强, 其活力并没有太大的变化。因此选择 pH 9 作为碱性蛋白酶水解花粉蛋白的最佳 pH 值。

##### 2.2.3.3 温度对碱性蛋白酶作用的影响

酶与底物浓度比为 3000U/g, 采用料水比 1:10 作为底物浓度, pH 值为 9, 其它条件相同, 在不同的反应温度下, 水浴水解 3 h, 测定含氮量, 换算成水解度。方法同木瓜蛋白酶。

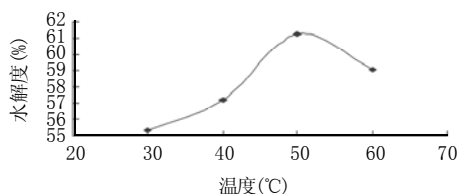


图 11 温度对水解度的影响

Fig.11 Effects of temperature on hydrolysis degree

从图 11 可知, 温度对于碱性蛋白酶水解花粉蛋白的水解度影响显著, 最佳反应温度是 50℃。

#### 2.2.3.4 时间对碱性蛋白酶作用的影响

酶与底物浓度比为 3000U/g, 采用料水比 1:10 作为底物浓度, pH 值为 9, 反应温度 50℃下, 其它条件相同, 水浴水解不同的时间, 测定含氮量, 换算成水解度。方法同木瓜蛋白酶。

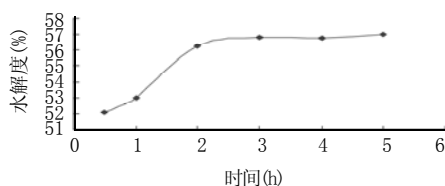


图 12 时间对水解度的影响

Fig.12 Effects of time to hydrolysis degree

由图 12 可以看出, 在适宜的条件下, 碱性蛋白酶水解花粉蛋白反应速度比较快, 反应 2 h 后已达到一个比较平稳的趋势。为了水解更充分, 本试验选择 3 h 作为最佳反应时间。

综上所述, 碱性蛋白酶作用于油菜蜂花粉蛋白的最佳条件为: 3000U/g 的酶量, pH9.0, 反应温度 50℃, 水解时间 3 h。

#### 2.3 三种蛋白酶最佳条件下水解度的比较

从图 13 所显示三种蛋白酶的水解度可以看出, 在

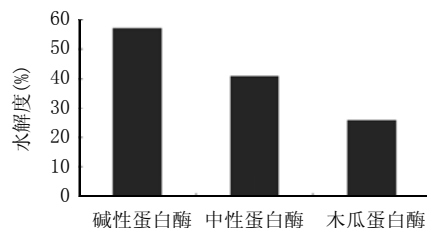


图 13 三种蛋白酶酶解能力的比较

Fig.13 Comparison of hydrolysis degrees of three proteases

这三种蛋白酶各自的最佳作用条件下碱性蛋白酶对蜂花粉蛋白的水解能力最强, 中性蛋白酶次之, 木瓜蛋白酶对于蜂花粉的作用最小。

### 3 结 论

通过对木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶这三种酶的单因素试验分析得出各自的最佳条件。

木瓜蛋白酶作用于油菜蜂花粉蛋白的最佳条件为: 酶与底物浓度比为 10000U/g, pH 6.5, 温度 50℃, 水解时间 3 h。

中性蛋白酶作用于油菜蜂花粉蛋白的最佳条件为: 酶与底物浓度比例为 800U/g, pH7.0, 温度 40℃, 水解时间为 3 h。

碱性蛋白酶作用于油菜蜂花粉蛋白的最佳条件为: 酶与底物浓度比例为 3000U/g, pH 9.0, 反应温度 50℃, 水解时间 3 h。

在木瓜蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶作用于油菜蜂花粉的实验中, 这三种蛋白酶在各自的最佳实验条件下以水解度为标准得出三种蛋白酶的水解能力由强到弱依次为碱性蛋白酶>中性蛋白酶>木瓜蛋白酶。油菜蜂花粉蛋白经碱性蛋白酶水解后, 原花粉水溶液中游离态氮的含量由 3% 提高到 50% 以上, 大大提高了蜂花粉蛋白在水中的水解度。这可能是由于蜂花粉水溶液本身呈酸性, 在碱性条件下破坏了蜂花粉的酸性体系, 更利于蛋白酶的作用。蜂花粉水解后的物质组成和生理功能还没有深入地研究, 也未见这方面报道, 在以后的实验中我们将进一步的研究花粉蛋白复合酶水解并对花粉蛋白水解后的生理功能通过体外实验对其进行评价。

#### 参考文献:

- [1] 许家喜, 缪平, 宋艳玲, 等. 几种花粉多肽和多糖的研究[J]. 北京大学学报: 自然科学版, 1999, 35(2): 179-184.
- [2] AUCLAIR J L, JAMIESON C A. A quantitative analysis of amino acids in pollen collected by bees[J]. Science 1948, 108: 357-361.
- [3] WITHERELL P. Other products of the hive[M]//The hive and the honey bee. Hamilton, IL: Dadant & Sons Inc, 1975: 34-66.
- [4] GRUNFEL E, VINCEN C, BAGNARA D. High-performance liquid chromatography analysis of nectar and pollen of strawberry flowers[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1989, 37: 290-294.
- [5] BONVEHI S J, JORDA R E. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 725-732.
- [6] 孙旻. 大豆肽的制备、分离及特性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2004: 15-16.
- [7] 农业部蜂产品质量监督检验测试中心(北京). 蜂产品检测实用技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 96.
- [8] 吴建中. 大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2003: 24-28.