

Alcalase 2.4L FG 酶解米渣蛋白动力学特性研究

李积华, 郑为完, 苏冰霞, 张 斌

(南昌大学 食品科学教育部重点实验室, 江西 南昌 330047)

摘 要: 采用 pH-stat 法对 Alcalase 2.4L FG 酶水解米渣蛋白的动力学特性进行了比较系统探讨: (1) 探讨了温度、酶浓度 ($[E]/[S]$)、底物浓度、pH 值和水解时间对水解度的影响, 并确定了比较理想的工艺参数; (2) 探讨了该酶催化水解米渣蛋白反应的动力学参数: $K_m=0.6598\text{mol/L}$, $V_{\max}=0.00351\text{mol/min}\cdot\text{L}$; (3) 探讨了该酶催化水解米渣蛋白反应的初级阶段的动力学特性, 为米渣的进一步开发提供理论依据。

关键词: 米渣; 蛋白; 酶解; 动力学

Study on Hydrolysis Kinetics Rice Dregs with Alcalase 2.4L FG

LI Ji-hua, ZHENG Wei-wan, SU Bing-xia, ZHANG Bin

(Key Laboratory of Food Science, Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: This paper discussed the hydrolysis kinetics on rice dregs with Alcalase 2.4L FG by pH-stat method: (1) The factors of reaction temperature, enzyme concentration, substrate concentration, pH value and reaction time were studied. (2) The maximum velocity and instant K_m are determined by probing into the relation of the substrate concentration and reaction velocity: $K_m=0.6598\text{mol/L}$, $V_{\max}=0.00351\text{mol/min}\cdot\text{L}$. (3) Kinetics characteristics during the initial step of the enzymatic hydrolysis were discussed.

Key words rice dregs; protein; enzymatic hydrolysis; kinetics

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0190-04

以大米为原料发酵生产乳酸、谷氨酸、柠檬酸及生化药品或水解制备糊精等工序中会产生大量的副产物——米渣。米渣中的蛋白质含量有的高达 70% 以上(干基), 远高于大米蛋白含量。大米蛋白是已知谷物中过敏性最低的蛋白质, 而且具有良好的氨基酸组成配比,

消化率极高, 其品质被公认为是粮食种子蛋白中的最佳者, 是一种优良的植物蛋白, 也是婴儿食品的良好蛋白原料^[1]。但是, 目前国内大部分米渣只是被用作饲料, 造成了蛋白质资源的极大浪费。

大米蛋白中有 75%~90% 是碱溶性谷蛋白, 分子

收稿日期: 2006-04-07

作者简介: 李积华(1979-), 男, 博士研究生, 研究方向为食品科学。

- [2] 龙雯, 陈存社. 16SrRNA 测序在细菌鉴定中的应用[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2006, 24(5): 10-12.
- [3] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [4] LEE I Y, SEO I T. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*[J]. Bioprocess Engineering, 1997(16): 71-75.
- [5] PAULUS H, GRAY E, KIM G J, et al. The biosynthesis of polymyxin B by growing cultures of *Bacillus polymyxa*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1964, 239(3): 865-871.

- [6] 刘志桓. 现代微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [7] 伊守亮, 肖林, 顾正华, 等. 管碟法测定 Nisin 效价[J]. 无锡轻工大学学报, 2003, 23(4): 41-46.
- [8] DELQADO A, BRITO D, FEVEREIRO P, et al. Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions[J]. Microbiological Methods, 2005, 62: 121-124.
- [9] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] SAMBROOK J, RUSSEL D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 东秀珠, 蔡妙瑛. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

间通过二硫键和疏水基团交联而凝聚, 结合致密, 仅溶解于 pH 值小于 3 或大于 10 的溶液中, 因此提取分离困难。目前为止, 主要提取方法有酸提法、碱提法和酶提法, 或将几种方法结合使用, 期间添加适当的变性剂以破坏二硫键可使效果更佳。然而相比之下, 酸提法得率偏低, 碱提法易产生毒肽, 所以酶法更加受到青睐, 相关研究较多, 但对其动力学等特性方面的研究较少。本文结合米渣蛋白溶解特性, 采用 Alcalase 2.4L FG 酶水解米渣蛋白, 试图对其动力学特性及水解初始阶段进行探讨, 为其深度开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Alcalase 2.4L FG 诺维信(中国); 活力 2.4AU/mL; 米渣(蛋白质含量 72.1%) 江西维尔宝生物科技有限公司; 自动电位滴定仪(ZD-2 型) 上海雷磁分析仪器厂。其它试剂均为分析纯。

1.2 pH-stat 法水解过程

用蒸馏水配制底物溶液, 在相应 pH 值和温度下平衡 15 min, 再按比例加入适量酶液。反应过程维持 pH 值恒定, 记录不同 t 时刻为维持该 pH 值恒定而消耗的碱液量, 以不加酶的底物为空白。产物水解度定义为蛋白质中被水解的肽键的比例, 由下式计算^[2]。

$$x = \frac{e}{amh_t} \times 100$$

式中, e 为所消耗的碱液的当量数; m_p 为底物中蛋白质质量, g; h_t 为单位质量蛋白质肽键当量数, 米渣蛋白的 h_t 为 7.40 meq/g^[3]; α 为 α-NH₃⁺ 的平均解离度, 可由下式计算:

$$\alpha = \frac{10^{(pH-pK)}}{1+10^{(pH-pK)}}$$

式中, pK 为 α-NH₃⁺ 的平均 pK, 计 7.0; pH 为反应起始的 pH。

1.3 低度水解过程(反应初级阶段)反应机理分析

Alcalase 2.4L FG 为非专一性内切酶, 反应过程中可以生成多种产物, 水解反应符合双底物顺序反应机理^[4], 由以下三个基元反应组成, 其中第二个为限速反应, 逆过程可以忽略。



在低度水解过程中, 相反反应速度为

$$V=[S] \frac{dx}{dt} = k_2[ES] \quad (4)$$

在稳态条件下, 有下列反应平衡式

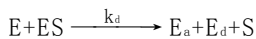
$$\frac{d[E]}{dt} = (k_{-1}+k_2)[ES] - k_1[E][S] = 0$$

具有催化活性的酶浓度

$$[E_a] = [E] + [ES] = \left(\frac{k_{-1}+k_2}{k_1[S]} + 1 \right) [ES]$$

因为 $k_1 \gg k_2$, 且 $[S] \gg k_{-1}/k_1 = K_1$, 所以有 $[E_a] \approx [ES]$

游离酶与中间过渡态结合引起酶的抑制, 即



相应失活动力学方程为

$$-\frac{d[E_a]}{dt} = k_d[E][ES] \quad (5)$$

在低水解度情况下, $[S] \approx [S]_0$, 所以由式(4)和(5)得

$$dx = \frac{-k_d[E_a]}{k_1K_1[E_a]} \quad (6)$$

对式(6)积分, 得

$$[E_a] = [E] \exp\left(-\frac{k_d}{k_1K_1}x\right)$$

代入式(4)得

$$V=[S] \frac{dx}{dt} = k_2[E] \exp\left(-\frac{k_d}{k_1K_1}x\right) = a[S] \exp(-bx) \quad \text{即}$$

$$\frac{dx}{dt} = a \exp(-bx) \quad (7)$$

2 结果与分析

2.1 Alcalase 2.4L FG 酶解米渣蛋白动力学参数的研究

2.1.1 最适 pH 值的确定

条件: 固液比=15g 渣:150g 水, 1ml 酶液, T=50℃, C_{NaOH}=2.01 mol/L。

酶的活性部位是由结合部位和催化部位所组成。活性部位只有在酶蛋白保持一定的空间构象时才能表现出最大的催化活力。活性部位的基团对反应体系 pH 值的变化比较敏感, 其解离状态随着 pH 值的变化而变化,

这些变化会影响酶分子的特殊构象;另外,底物米渣蛋白也随 pH 值的变化表现出不同的解离状态,因此 pH 值直接影响了酶与底物的结合和酶对底物的催化。从图 1 的实验结果可以看出:在 pH9 时 Alcalase 2.4L FG 酶水解玉米蛋白的水解度较高,当 pH10 时玉米蛋白的水解度反而下降,因此本实验取 pH9 为反应的最佳条件。

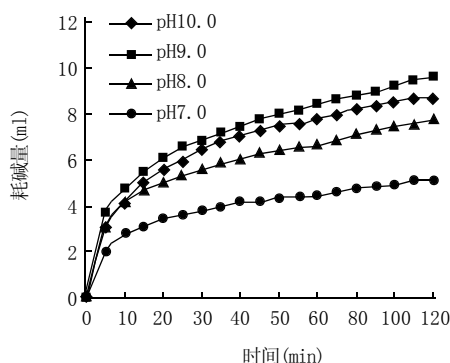


图1 不同 pH 下的耗碱量进程图

Fig.1 Amount of consumed aqueous alkali-time plot under different pH value

2.1.2 最适反应温度的确定

条件: 固液比=15g 渣:150g 水, 1ml 酶液, pH9.0, $C_{NaOH}=2.01\text{mol/L}$ 。

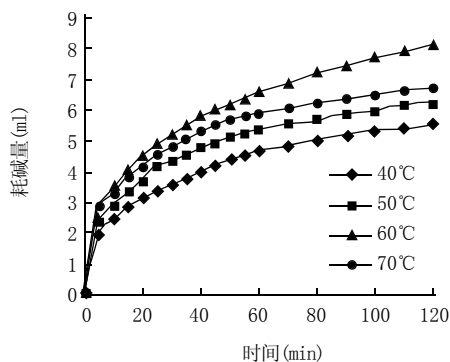


图2 不同温度下的耗碱量进程图

Fig.2 Amount of consumed aqueous alkali-time plot under different hydrolysis temperature

从图 2 可以看出,在 60℃下 Alcalase 2.4L FG 对米渣蛋白的水解度最高。温度过高或过低,都不利于提高水解度。因此本实验取 60℃为 Alcalase 2.4L FG 作用的最适酶促反应温度。

2.1.3 最适酶量的确定

条件: 固液比=15g 渣:150g 水, $T=50^\circ\text{C}$, pH8, $C_{NaOH}=2.01\text{mol/L}$ 。

理论上讲,当底物浓度一定并远高于酶浓度时,水解速度取决于酶的浓度。从图 3 可以看出:当加酶量较小时,随着加酶量的增加水解度迅速上升。当加酶量大于 0.5ml 时,水解度随酶量的增加上升的幅度开始

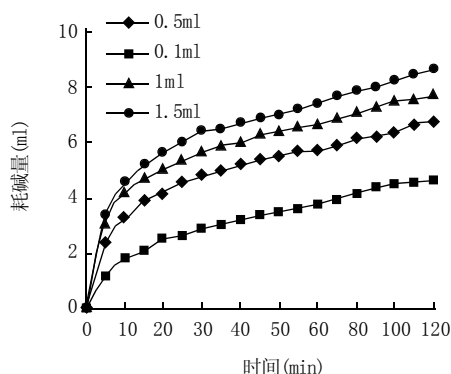


图3 不同加酶量的耗碱量进程图

Fig.3 Amount of consumed aqueous alkali-time plot when added different amount of enzyme

减小,考虑用酶成本,实验选择 0.5ml 为最适的加酶量。

2.1.4 [S]与水解度 x 的关系

条件: 0.5ml 酶液, pH9.0, $T=60^\circ\text{C}$ 。

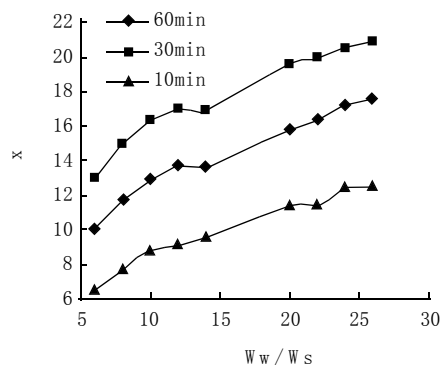


图4 [S]~x 关系

Fig.4 [S]~x plot

以水与底物质量比 (W_w/W_s) 反映底物浓度 [S]。图 4 表明, W_w/W_s 增大, x 也增大,底物浓度对水解度表现出促进和抑制双重作用。在 $W_w/W_s \leq 12$ 时, x 开始快速降低;在 $W_w/W_s \geq 12$ 之后 x 上升开始缓慢,因此确定在 $W_w/W_s = 12$ 为较好的液固比,即底物浓度为 0.0833g/ml。另外,可以发现,底物浓度对水解度的影响在一定时间范围内不受反应时间的影响,即三条曲线基本以相同的速率变化。

2.2 米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 的测定

分别称取 15.0、12.5、10.71、7.5、6.25g 米渣粉,加入 Alcalase 2.4L FG 0.5ml 和水 150ml,在温度 $T=60^\circ\text{C}$, pH9 的条件下水解 1h,滴加 2.01mol/L 的 NaOH 以维持反应体系的 pH 值恒定,实验按 Langmuir 作图法绘图,其中底物浓度以底物中肽键物质的量浓度表示结果见图 5 所示。

通过 EXCEL 统计函数回归分析,得线性方程为 $y=284.85x+187.95$, $R^2=0.9068$,说明线性相关性较

好,同时表明在该实验条件下,Alcalase 2.4L FG是一种典型的蛋白构象比较稳定的米氏酶。从方程得出该酶催化水解米渣蛋白反应的 $K_m=0.6598\text{mol/L}$, $V_{\max}=0.00351\text{mol/min}\cdot\text{L}$ 。

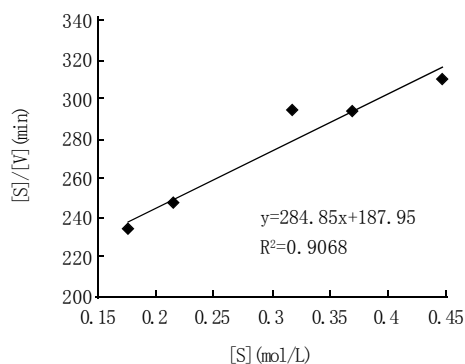


图5 Langmiur作图法求 K_m 和 V_{\max}

Fig.5 K_m and V_{\max} value by Langmiur-line method

2.3 水解初始阶段分析

从图1~4可以看出,Alcalase 2.4L FG水解米渣蛋白过程中,前10min的反应速度最快,随后逐渐降低。而且,在10min之后,底物浓度对水解度的影响基本不受时间改变。因此可以认为,前10min是反应的初始阶段。对它的探讨将有利于对整个水解反应的理解。

水解初始阶段水解度小,底物处低度水解状态,可以从有限水解角度出发进行讨论。

对式(7)积分得如下超越方程:

$$x = -\frac{1}{b} \ln(1+abt)$$

由不同 $[S]_0$ 条件下的 x 、 t 值,采用SAS V9.0统计软件进行错位拟合,求出相应的 a 和 b 值,列于表1。从表中可以看出,前4组实验中, a 值与 $[S]_0$ 具有较好的线性关系, b 值趋近一常数,符合有限水解动力学模型^[2,5-6]。但是从第5组实验开始, a 值和 b 值出现变异。表明,在实验条件下,当底物浓度低于0.0833g/ml时,其水解过程将不再服从有限水解动力学模型,即有限水解临界水解度在0.0909~0.0949之间,这与2.1.4结果吻合。

表1 a、b计算值表
Table 1 Values of a,b

项目	$[S]_0(\text{g/ml})$	$x(5\text{min})$	$x(10\text{min})$	a	b
1	0.167	0.0338	0.0473	0.0148	41.69
2	0.125	0.0585	0.0771	0.0361	33.29
3	0.1	0.0687	0.0875	0.0557	34.28
4	0.0833	0.0727	0.0909	0.0724	36.52
5	0.0714	0.0735	0.0949	0.0529	29.6743
6	0.05	0.0912	0.1139	1.25E9	677.4
7	0.0455	0.0923	0.1141	5.31E8	655.7
8	0.0417	0.0999	0.1245	2.31E8	592.6

根据上表中1~4组数据,可得 a 与 $[S]_0$ 关系图,如图6。 a 与 $[S]_0$ 存在线性关系: $a=-1.4463[S]_0+0.1835$,相关系数 $R^2=0.9767$ 。因此得到

$$\frac{dx}{dt} = (0.1835 - 1.4463[S]) \exp(-bx)$$

当 $[S]_0 \geq 0.1269\text{g/L}$ 时, $\frac{dx}{dt} \leq 0$,即,反应过程

中 x 不再提高。从表1第1组数据也可以看出,在底物浓度为0.167g/ml时,其水解度下降得非常显著,而此时 b 值也出现偏离,因此根据表1的第2~4组数据可求出 b 的平均值为34.70。

综上所述,在实验条件下的水解初始阶段(10min),米渣蛋白底物浓度范围在0.0833~0.1269g/ml时,服从有限水解动力学方程。底物浓度过高,酶主要以 ES_2 和 E_d 两种形式存在,反应难以进行;底物浓度过低,反应将进入深度水解。在实际生产中还需要结合实际情况确定底物浓度,但底物浓度不应该高于0.1269g/ml。

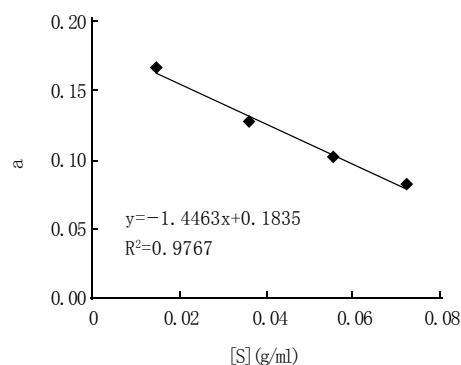


图6 $[S] \sim a$

Fig.6 $[S] \sim a$ value

3 结论

3.1 Alcalase 2.4L FG酶水解米渣蛋白的比较理想的工艺参数为:温度 $T=60^\circ\text{C}$,pH9,酶浓度 $([E]/[S])=0.5\text{ml/g}$ 渣,底物浓度 $=0.0833\text{g/ml}$,水解时间 $=1\text{h}$ 。

3.2 在实验条件下(温度 $=60^\circ\text{C}$,pH9,酶浓度 $=0.5\text{ml/g}$ 渣,水解时间 $=1\text{h}$),Alcalase 2.4L FG是一种典型的蛋白构象比较稳定的米氏酶。该酶催化水解米渣蛋白反应的动力学参数如下: $K_m=0.6598\text{mol/L}$, $V_{\max}=0.00351\text{mol/min}\cdot\text{L}$ 。

3.3 在实验条件下(温度 $=60^\circ\text{C}$,pH9,酶浓度 $=0.5\text{ml/g}$ 渣),Alcalase 2.4L FG酶催化水解米渣蛋白反应在初始阶段($\leq 10\text{min}$)符合有限水解动力学方程:

$$\frac{dx}{dt} = (0.1835 - 1.4463[S]) \exp(-34.70x)$$

酶处理对菜籽油脱胶及品质的影响

万楚筠, 黄凤洪*, 夏伏建, 李文林
(中国农科院油料作物研究所, 湖北 武汉 430062)

摘 要: 采用磷脂酶 A₁ (*Lecitase ultra*) 对菜籽油进行脱胶实验, 研究该酶对菜籽油脱胶及品质的影响。结果表明, *Lecitase ultra* 在菜籽油脱胶中发挥了重要作用, 能使菜籽油磷含量显著降低。通过正交试验得出 *Lecitase ultra* 应用于菜籽油脱胶的最佳工艺参数: pH 值 4.82、酶解温度 37℃、加酶量 150L U/kg 油, 油水混合物总含水量为 2.69%, 酶反应时间为 3h, 在此条件下脱胶油的磷含量为 6.97mg/kg。同时, 脱胶后菜籽油的酸价与过氧化值上升, 色泽变浅, 棕榈酸、油酸的含量下降, 亚油酸、亚麻酸、花生一烯酸、芥酸的含量有所上升, 其它几种脂肪酸的含量变化不大。

关键词: 磷脂酶; 菜籽油; 脱胶; 品质

Effects of Enzymatic Treatment on Rapeseed Oil Degumming and Quality

WAN Chu-yun, HUANG Feng-hong*, XIA Fu-jian, Li Wen-lin
(Oil Crops Institute, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

Abstract: An experiment of rapeseed oil degumming by phospholipase A₁ (*Lecitase ultra*) studied the effects of enzymatic treatment on the rapeseed oil degumming and quality. The results showed that the *Lecitase ultra* plays an important role in the rapeseed oil degumming. By doing orthogonal test, the optimum conditions of rapeseed oil degumming by phospholipase A₁ (*Lecitase ultra*) were obtained as follows: pH 4.82, dosage of *Lecitase ultra* 150L U/kg, temperature 37℃ and time of enzymatic treatment 3h. Under these conditions, the phosphorus content in degummed rapeseed oil is 6.97mg/kg. Meanwhile, the acid value and peroxide value of the degummed oil rise, and its color fades out. In the degummed rapeseed oil, the content of palmitic acid and oleic acid decreases, but the content of linolenic acid, linoleic acid, eicosenoic acid and erucic acid increases, while the other fatty acid content does not evidently change.

Key words: phospholipase; rapeseed oil; degumming; quality

中图分类号: TS222.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)05-0194-05

酶法脱胶是利用磷脂酶将毛油中的非水合磷脂水解掉一个脂肪酸, 生成溶血性磷脂, 溶血性磷脂具有良好的亲水性, 遇水时可形成液态水合晶体, 从油中析出脱除^[1]。目前, 可用于酶法脱胶的酶主要有磷脂酶 A₁ 和磷脂酶 A₂ 两种^[2-3]。磷脂酶 A₁ 作用于磷脂 1 位的脂肪

酸, 而磷脂酶 A₂ 作用于 2 位的脂肪酸, 如图 1 所示。经磷脂酶 A₁ 水解生成的溶血性磷脂为 2-酰基溶血性磷脂, 该溶血性磷脂 2 位上的脂肪酸有转移至 1 位继续被水解的倾向, 所以在磷脂酶 A₁ 的作用下有部分磷脂可被完全降解。

收稿日期: 2006-05-24

*通讯作者

作者简介: 万楚筠(1980-), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为食品科学。

参考文献:

- [1] HELM M, BURKS A W. Hypoallergenicity of rice bran[J]. Cereal Food World, 1996, 41(11): 839-843.
- [2] 刘粼. 大豆分离蛋白酶法有限水解工艺过程及动力学分析[J]. 食品科学, 2001, 22(4): 36-39.
- [3] 王章存, 姚惠源. 大米蛋白测定中蛋白系数的确定[J]. 食品工业科

技, 2004, 25(1): 66-67.

- [4] VOLKERT M A, KLEIN B P. Protein dispersibility and emulsion characteristics of flour soy products[J]. Food Science, 1979, 44: 93-96.
- [5] 刘粼, 叶峰, 欧志敏. 蛋白质酶法有限水解过程反应机理和动力学特性[J]. 化工学报, 2002, 53(2): 199-202.
- [6] 刘志强, 曾云龙, 金宏. 酶法有限水解含油菜籽蛋白的机理及动力学[J]. 农业工程学报, 2004, 20(1): 203-206.