

文章编号:1673-1689(2006)01-0092-04

# 类蛋白反应法改性水解明胶的原理

安广杰, 王璋

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘要:**研究了在木瓜蛋白酶的作用下,蛋氨酸月桂醇酯与水解明胶进行类蛋白反应的机理。通过对反应过程中游离氨基质量分数的变化、封闭水解明胶端基对类蛋白反应的影响、不同反应时间所得类蛋白物的疏水性变化以及氨基酸组成和质量分数变化几方面的研究得出:类蛋白反应中存在肽键缩合和转肽作用;离子相互作用和静电相互作用对类蛋白物的合成有一定贡献的;疏水相互作用能够促进类蛋白反应的进行,也说明了疏水性较强的多肽之间会更容易发生类蛋白合成反应。

**关键词:** 水解明胶;蛋氨酸月桂醇酯;类蛋白反应

中图分类号:Q 55

文献标识码:A

## Primary Studies on the Mechanism of Plastein Reaction

AN Guang-jie, WANG Zhang

(School of Food Science and Engineering, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** Mechanism of plastein reaction of methionine ester with hydrolyzed gelatin with papain as the catalyst was studied. Varieties of free  $\text{NH}_2$  group content and amino acid constituent during the plastein reaction were investigated. Effects of bonding  $-\text{NH}_2$  and  $\text{COOH}$  of hydrolyzed gelatin on plastein reaction were also studied. Hydrophobicities of plasteins produced from different reaction time were analyzed too. From these experiments, the following conclusions could be conducted: first, plastein is a product of transpeptidation and polycondensation reactions, so plastein reaction is a reverse reaction of proteinase hydrolysis. Second, electrostatic interaction and ionic interaction are contributed to plastein synthesis. Last, hydrophobic interaction is important to plastein reaction.

**Key words:** Hydrolyzed gelatin; methionine dodecanol ester; Plastein reaction

类蛋白反应的发现已有近 100 年的历史<sup>[1]</sup>,最初发现蛋白质经过蛋白酶的水解后,在一定条件下还可以通过蛋白酶的作用再形成一种胶状物,这种反应也被称为类蛋白反应。但后来在的研究都是不连续也不系统的,除了 Fujimaki 研究小组进行了较为深入的研究<sup>[2]</sup>,同时他们也认为类蛋白反应是

利用浓缩的蛋白水解物在合适的条件下(底物浓度、pH、底物类型等)经蛋白酶的作用进行的一种合成反应,此反应的机理通常被认为是蛋白水解反应的逆反应,但也存在其它不同的看法,所以反应的机理目前尚无定论。例如 Anthony T. Andrews 等以酪蛋白多肽为底物,研究了影响类蛋白反应的一

些因素以及类蛋白物的一些理化特性,认为类蛋白反应只是一种由内能驱动的物理聚集的过程<sup>[3]</sup>。最初日本人发现类蛋白反应可以较好的解决水解蛋白的苦味,所以越来越引起人们的重视。例如 Yamashita 等利用合成类蛋白反应在木瓜蛋白酶存在下,将蛋氨酸乙酯导入大豆蛋白和酪蛋白中,这种反应改变了蛋白的氨基酸组成同时也提高了其生物效价<sup>[4]</sup>。张雅丽等报道了以大豆蛋白和芝麻蛋白的胰蛋白酶水解物为原料,以胃蛋白酶为催化剂合成类蛋白物并对其进行了营养评价,结果表明利用该反应可以进行优质蛋白质资源的开发<sup>[5,6]</sup>。Watanabe 等以明胶做亲水性原料,亮氨酸酯做亲油性材料,在木瓜蛋白酶作用下进行酶反应,得到蛋白质型表面活性剂<sup>[7]</sup>。本试验的研究意义在木瓜蛋白酶的作用下,利用水解明胶和蛋氨酸酯为原料研究类蛋白反应的机理,为类蛋白反应在食品及其它行业的应用提供一定的理论基础。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 实验材料与设备

DL-蛋氨酸;生物试剂;乙醇、月桂醇、丙酮、十二烷基硫酸钠(SDS)等;均为分析纯;水解明胶、DL-蛋氨酸月桂醇酯;均为作者所在实验室自制;木瓜蛋白酶:购于 NOVO 公司;氨基酸自动分析仪:美国安捷伦 1100;超级恒温水浴锅:上海市实验仪器厂;LG-3 型多用冰冻干燥机:宁波市生化仪器厂;HL-1 型恒流泵:上海沪西仪器厂;FH8802-2 紫外检测仪:上海沪西仪器厂;3057 型便携式记录仪:上海沪西仪器厂。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 表面活性剂合成** 参考 Yamashita 等的方法并做适当改进<sup>[4]</sup>。称取一定量的水解明胶加入至一定 pH 值的缓冲溶液中,充分溶解,然后加入蛋氨酸酯,再加入木瓜蛋白酶和适量的 L-半胱氨酸进行反应。利用蛋氨酸月桂醇酯对水解明胶进行改性时须加入含有 20% 丙酮的碳酸盐缓冲溶液,其他条件同上。测定不同时间对反应进程的影响时,分别在 0, 0.5, 2, 6 h 取样,用最终体积分数 80% 乙醇沉淀样品并洗涤,沉淀产物经干燥获得干品。

**1.2.2 氨基酸组成与含量的测定方法** 采用自动氨基酸分析仪测定氨基酸的组成和含量。

**1.2.3 氨基态氮的测定** 甲醛滴定法,参见文献<sup>[8]</sup>。

**1.2.4 化学修饰水解明胶后的类蛋白反应**

1) 封闭氨基的反应<sup>[9]</sup> 将 1 mL 460 mg/mL 的水解明胶溶液稀释于 0.2 mol/L pH 值 7.5 的磷酸钠溶液,加入酸酐(乙酸酐)120  $\mu$ L,约两倍于肽量,加水定容至 1.25 mL,20  $^{\circ}$ C 放置 18 h,加入固体醋酸胺 100 mg 破坏残余的酸酐,然后调节 pH 至 5.0 再加酶进行类蛋白反应。反应 6 h 后,加入 15 mL 无水乙醇沉淀,收集沉淀得冷冻干燥样品。

2) 封闭羧基的反应 取 5 g 水解明胶,加入 10 mL 冷甲醇和 0.75 mL 体积分数为 37% 的 HCl 在室温下放置 48 h 充分反应,反应结束后,在自然通风厨晾干。然后加入 1.23 g 蛋氨酸月桂醇酯和丙酮进行类蛋白反应,反应结束后加入乙醇沉淀(操作同上)得冷冻干燥样品<sup>[10]</sup>。

**1.2.5 相对分子质量分布的测定** 凝胶过滤色谱法 色谱条件:Sephadex G-25 凝胶过滤色谱分析;色谱柱:1.6 cm $\times$ 100 cm;洗脱液:磷酸-柠檬酸缓冲溶液(pH 4, 0.2 mol/L);体积流量:19.96 mL/h;检测波长:220 nm;上样量:80 mg。

**1.2.6 疏水性的测定** ANS 荧光探针法 水解明胶样品用 pH 8.0, 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液稀释至蛋白浓度在 0.15~0.06 mg/mL 之间。取不同浓度稀释样品 2 mL,在 390 nm 的激发波长和 470 nm 的发射波长下分别测定样品的荧光强度( $FI_0$ )和样品加入 10  $\mu$ L ANS 溶液(8 mmol/L)后的荧光强度( $FI'$ ), $FI_0$  和  $FI'$  的差值记为 FI,以蛋白质浓度为横坐标,FI 为纵坐标作图,曲线初始阶段的斜率即为蛋白质的表面疏水性指数,记为  $S_0$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 反应过程中游离氨基质量分数的变化

在反应过程中,游离氨基质量分数的增加也表明了水解作用占主导地位,而类蛋白合成作用较弱。相反,游离氨基质量分数的减少,则表明类蛋白合成作用的增强。如图所示,当在反应体系中加木瓜蛋白酶,同时也加入适量的蛋氨酸月桂醇酯时,其游离氨基质量分数是逐渐下降的,说明合成作用占主导地位,并且在合成过程中氨基参与了反应。根据反应体系的底物及反应条件可知,游离氨基的减少是由于多肽与多肽,或者多肽与蛋氨酸月桂醇酯之间进行了肽键缩合反应,也是通常被人们认为的类蛋白反应机理推断。这一反应机理的存在也将在端基封闭的实验中得到进一步的证明。

对于加酶不加酯的情况,由于底物浓度较高不利于水解反应的进行,所以在前 2 h 的反应时间内,游离氨基的质量分数有所下降,可解释为多肽与多

肽之间的类蛋白反应的结果。而后游离氨基的质量分数又有所上升,说明类蛋白反应的减弱,水解反应的相对增强。

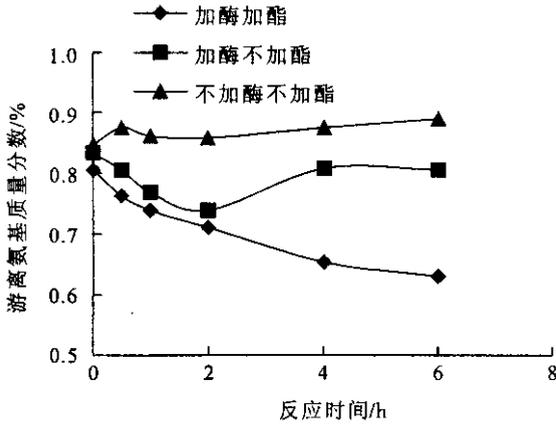


图1 木瓜蛋白酶和蛋氨酸月桂酯的添加对反应的影响

Fig. 1 Effect of papain and methionon ester on plastein reaction

2.2 反应过程相对分子质量的变化

在类蛋白反应过程中合成的类蛋白物的相对分子质量分布如图2所示。

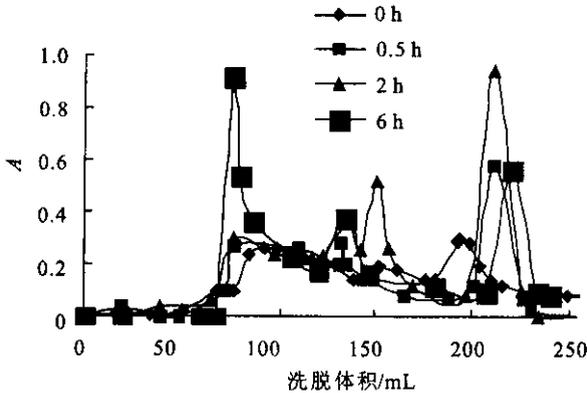


图2 不同反应时间所得水解明胶的相对分子质量分布

Fig. 2 Elution profiles of plasteins at different reaction time separated on sephadex G-25

由上图可知,在反应刚开始时,经体积分数80%乙醇沉淀的反应物相对分子质量在凝胶柱Sephadex G-25的整个分离范围内共形成3个峰,分别位于洗脱体积100 mL,150 mL,200 mL。100 mL左右洗脱体积时的峰面积较大一些,说明相对分子质量相对偏大。当反应进行半小时时,在色谱图上出现两个峰,洗脱体积分别位于100 mL和200 mL,二者分离度较大,并且洗脱体积为200 mL左右的峰面积与前面峰面积比与图2中相对应的峰面积比有所上升,说明反应在前半个小时同时存在水解作用与合成作用,并且以水解作用为主,所以

使相对分子质量分布向两个极端移动。这种反应特点在后面时间内仍在继续,如图2所示。当反应进行到6 h时,类蛋白物的相对分子质量分布发生了明显的变化,即相对分子质量较大的物质逐渐形成,其峰面积较大,说明在这段反应时间内水解作用变弱而类蛋白合成作用明显增强。

2.3 封闭端基的影响

为了研究水解明胶中的氨基和羧基对类蛋白反应的影响,本实验对水解明胶进行了一些改性,一方面利用乙酸酐在37℃条件下反应48 h来封闭水解明胶中的氨基,另一方面利用盐酸甲醇反应封闭水解明胶中的羧基,并分别利用改性后的水解明胶与对照即未改性的水解明胶为原料进行的类蛋白反应,以得率为评价指标,结果如图3所示,二者的得率均比对照的低。这说明水解明胶中的氨基和羧基含量对类蛋白反应的进行具有较大的影响,从一方面也证明了类蛋白反应中存在肽键缩合和转肽作用机理的正确性。

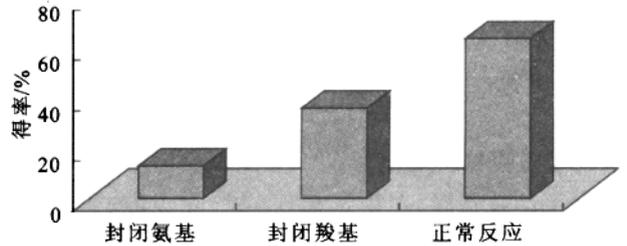


图3 水解明胶的改性对类蛋白反应的影响

Fig. 3 Effects of free groups of hydrolyzed gelatin on plastein reaction

2.4 疏水性的变化

疏水性可定义如下:在相同条件下,一种溶于水中溶质的自由能与溶于有机溶剂的相同溶质的自由能相比所超过的数值。水解明胶溶液是一种亲水性胶体,如图中反应0 h所示,其疏水性指数为9.41。由于亲水性的肽不利于进行类蛋白反应,所以在底物中加入疏水性较强的蛋氨酸月桂醇酯以提高反应的效率。另外,从水解明胶的氨基酸组成可以看出,水解明胶的亲水性较大并不是意味着其疏水性氨基酸含量较低,而是由于疏水性氨基酸被部分包裹于水解明胶内部,因为虽然水解明胶是变性的胶原蛋白,但其并非完全伸展的直链结构,所以其亲水性仍是较强的。但由图可知,随着类蛋白反应的进行,所形成的类蛋白物的疏水性指数是增大的,分析得出可能存在以下几方面的原因:其一就是在酶的作用下,水解作用会使水解明胶内部的疏水面暴露出来,暴露的疏水面间的再相互作用形成聚合物。另外,溶液中的蛋氨酸月桂醇酯以及溶

液中有有机物质丙酮的存在也会诱使疏水性氨基酸更多的暴露出来,形成疏水相互作用,从而引起类蛋白物疏水性指数的上升。总之,疏水性指数随类蛋白反应进行而有一定的提高也说明了疏水相互作用是形成类蛋白物的作用力之一。

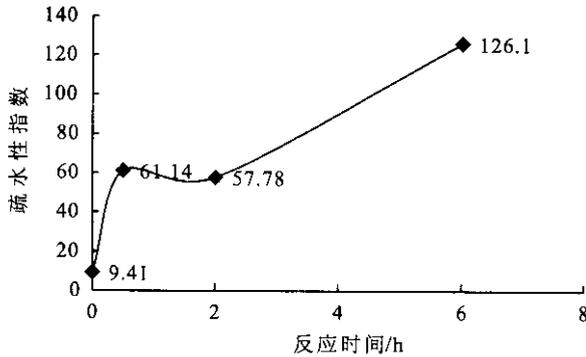


图 4 不同反应时间所得类蛋白物的疏水性变化

Fig. 4 Hydrophobicity Varieties of of plasteins produced at different reaction time

## 2.5 氨基酸组成的变化

根据侧链与水相互作用的程度可将氨基酸分成亲水性氨基酸和疏水性氨基酸。亲水性氨基酸易溶于水,它们或者带有电荷(Arg, Asp, Glu, His 和 Lys),或者不带电荷(Ser, Thr, Asn, Gln 和 Cys)。由表可知,带电荷氨基酸的相对含量均有所增加(表中上标为 bc 的氨基酸),说明静电相互作用在类蛋白合成中起了一定作用。其中 Arg 和 Lys 的侧链分别含有胍基和氨基,于是在中性 pH 是略带正电荷(是碱性氨基酸)。虽然 His 的咪唑基具有碱性的本质,然而在中性条件下它仅略带正电荷。Asp 和 Glu 的侧链含有一个羧基,因此,在中性 pH 条件下,这些氨基酸带有一个净负电荷。

不带电荷的中性氨基酸的极性处在疏水氨基酸和带有电荷的氨基酸之间。Ser 和 Thr 的极性可归于它们含有能与水形成氢键的羟基。Tyr 也含有一个在碱性条件下能解离的酚羟基,因此,可以认为它是一种极性氨基酸。在不带净电荷的亲水性氨基酸中,丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的含量都有所下降,而半胱氨酸含量的升高是因为在酶反应体系中外加入了半胱氨酸。另外,大多数 Cys 残基在蛋白质中以胱氨酸形式存在,后者是半胱氨酸通过它的巯基氧化形成二硫交联而产生的二聚体。说明类蛋白反应中同时也形成了二硫键,进一步稳定类蛋白物的结构。

含有脂肪族(Ala, Ile, Leu, Met, Pro 和 Val)和芳香族侧链的氨基酸是疏水的,因此,它们在水中的溶解度是有限的。由结果可知疏水性氨基酸含量除蛋氨酸和脯氨酸外均有所下降,这一变化的原因是比较复杂的,其中蛋氨酸含量的升高说

明蛋氨酸月桂醇酯参与了类蛋白合成反应并被导入改性水解明胶中。这也是导致类蛋白物疏水性增强,水溶性下降的重要原因。脯氨酸是蛋白质分子中唯一的一种亚氨基酸。在脯氨酸分子中,丙基侧链通过共价连接的方式同时与  $\alpha$ -碳和  $\alpha$ -氨基连接形成一个吡咯烷环状结构。脯氨酸对胶原蛋白分子结构的影响是比较大的。由表可知其含量是升高的。

表 1 氨基酸组成质量分数的变化

Tab. 1 Varieties of amino acids composition

氨基酸名称	反应时间/h				%
	0	0.5	2	6	
Asp 天门冬氨酸 <sup>bc</sup>	6.47	8.08	7.78	7.82	
Thr 苏氨酸 <sup>b</sup>	2.59	2.14	2.17	2.09	
Ser 丝氨酸 <sup>b</sup>	4.91	3.86	3.8	3.67	
Glu 谷氨酸 <sup>bc</sup>	12.99	15.04	14.77	14.82	
Gly 甘氨酸	24.05	24.55	24.46	24.26	
Ala 丙氨酸 <sup>a</sup>	10.77	8.88	8.9	8.59	
Cys 半胱氨酸 <sup>b</sup>	—	0.61	0.76	0.79	
Val 缬氨酸 <sup>a</sup>	3.55	2.18	2.09	2.08	
Met 蛋氨酸 <sup>a</sup>	1.69	1.26	2.34	3.65	
Ile 异亮氨酸 <sup>a</sup>	2.00	0.87	0.85	0.83	
Leu 亮氨酸 <sup>a</sup>	4.97	2.81	2.78	2.68	
Tyr 酪氨酸 <sup>a</sup>	2.09	0.89	0.9	0.87	
Phe 苯丙氨酸 <sup>a</sup>	3.27	1.9	1.84	1.77	
Lys 赖氨酸 <sup>bc</sup>	3.99	5.25	5.15	5.23	
His 组氨酸 <sup>bc</sup>	0.95	0.98	0.96	0.96	
Arg 精氨酸 <sup>bc</sup>	7.96	9.56	9.39	9.2	
Pro 脯氨酸 <sup>a</sup>	8.12	10.29	10.23	9.83	

注:a 代表疏水性氨基酸,b 代表亲水性氨基酸,bc 代表带有电荷的氨基酸。

## 3 讨论

类蛋白反应是一种机理较为复杂的反应,本实验从多个方面进行了反应机理的探讨并得出了一下一些结论:首先,通过对水解明胶中的氨基和羧基含量对类蛋白反应的影响可知,类蛋白反应中存在肽键缩合和转肽作用,所以说类蛋白反应是酶水解反应的逆反的说法是有一定理论根据的。第二,离子相互作用和静电相互作用对类蛋白物的合成是有一定贡献的。第三,疏水相互作用能够促进类蛋白反应的进行,也说明了疏水性较强的多肽之间会更容易发生类蛋白合成反应。

(下转第 119 页)

**Biotechnol.** 2003, 106:221—232.

- [10] Watanabe K, Khosla C, Stroud R M, et al. Crystal structure of an acyl-ACP dehydrogenase from the FK520 polyketide biosynthetic pathway: insights into extender unit biosynthesis[J]. **Mol Biol**, 2003, 334:435—444.
- [11] Mazur M T, Walsh C T, Kelleher N L. Site-specific observation of acyl intermediate processing in thiotemplate biosynthesis by Fourier transform mass spectrometry: the polyketide module of yersiniabactin synthetase[J]. **Biochemistry**, 2003,42:13393—13400.
- [13] Pharkya P, Nikolaev E V, Maranas C D. Review of the BRENDA Database[J]. **Metab Eng**, 2003, 5:71—73.
- [14] Perugino G, Trincone A, Rossi M, et al. Oligosaccharide synthesis by glycosynthases[J]. **Trends Biotechnol.**,2004, 22:31—37.
- [15] Patel R N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral pharmaceutical intermediates[J]. **Curr Opin Drug Discov Dev**, 2003,6:902—920.
- [16] Shen B. Accessing natural products by combinatorial biosynthesis[J]. **Sci STKE**, 2004, 12:23—26.
- [17] Fukui T, Abe H, Doi Y. Engineering of *Ralstonia eutropha* for production of oly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from fructose and solid-state properties of the copolymer[J]. **Biomacromolecules**, 2002, 3:618—624.
- [18] Nomura C T, Taguchi K, Taguchi S, et al. Coexpression of genetically engineered 3-ketoacyl-ACP synthase III (fabH) and polyhydroxyalkanoate synthase (phaC) genes leads to short-chain-length-medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer production from glucose in *Escherichia coli* JM109[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2004,70:999—1007.
- [19] Ohtsubo Y, Shimura M, Delawary M, et al. Novel approach to the improvement of biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation activity; promoter implantation by homologous recombination[J]. **Appl Environ Microbiol**,2003, 69:146—153.
- [20] 孟祥河,张铁华,洪伯铿.复合酶水解牛肉的研究[J]. **食品科技**,2002,(2):17—20.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 95 页)

## 参考文献:

- [1] Danielwski A, Henriquez V, Gjalda K Z. Plastein reaction[J]. **Physiol Chem**, 1911, 71: 485.
- [2] Fujimaki M, Arai S, Yamashita M. Enzymatic protein degradation and resynthesis for protein improvement. In *Food Proteins: Improvement through Chemical and Enzymatic Modification* [M]. Washington: Whiakar. American Chemical Society. 1977. 156—187.
- [3] Anthony T, Andrews, Efstathios Alichanidis. The plastein reaction revisited: evidence for a purly aggregation reaction mechanism[J]. **Food Chemisrey**,1990, 35, 243—261.
- [4] Michiko Yamashita, Soichi Arai, Yoshimasa Amano, et al. A novel one-step process for enzymatic incorporation of amino acids into proteins: application to soy protein and flour for enhancing their methione levels[J]. **Agric Biol Chem**, 1979, 43 (5), 1065—1068.
- [5] 张雅丽,王凤翼,宋世廉,等.蛋白质酶法修饰的初步探讨—大豆蛋白和芝麻蛋白的合成类蛋白研究[J]. **食品与发酵工业**,1994,(2):8—13,7.
- [6] 张雅丽,王凤翼,宋世廉,等.蛋白质酶法修饰的初步探讨—大豆蛋白和芝麻蛋白的合成类蛋白研究[J]. **食品与发酵工业**,1994,(5):67—68.
- [7] Michiko Watanabe, Atsuko Shimada, Etsuko Yazawa, et al. Proteinaceous surfactants produced from gelatin by enzymatic modification: application to preparation of food items[J]. **Journal of food science**,1981, 46: 1738—1981.
- [8] 罗平. **饮料分析与检验**[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1993. 146—147.
- [9] Klotz I M. Succinylation[J]. **Meth Enzymol XI**, 1967, 576—580.
- [10] Wilcox P E. Esterification[J]. **Meth Enzymol XI**, 1967, 605—617.

(责任编辑:杨萌)