

低苯丙氨酸山杏仁肽的制备

李志刚, 张宇靖, 张晨, 光翠娥*

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了制备低苯丙氨酸肽,山杏仁蛋白经 Alcalase2.4L 降解后,利用单因素和正交实验确定了外肽酶 Flavourzyme 1000L 的水解工艺。结果显示,在 50 ℃、pH 为 7.5、添加量为 3 000 U/g 条件下处理 2 h 水解度可达 41.23%。添加 10 g/dL 粉末活性炭,于 35 ℃、pH 2.0 条件下吸附 3 h,浓缩干燥后经氨基酸分析,产物中苯丙氨酸质量分数大幅降低。所得产物可用于为苯丙酮尿症患者制备的特殊医学配方食品。

关键词: 山杏仁蛋白;Flavourzyme 1000L;低苯丙氨酸肽;苯丙酮尿症

中图分类号:TS 201.1 文章编号:1673-1689(2019)09-0092-05 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.09.013

Preparation of Low Phenylalanine Peptides from Apricot(*Armeniaca sibirica*) Kernel Protein

LI Zhigang, ZHANG Yujing, ZHANG Chen, GUANG Cuie*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In order to prepare low phenylalanine peptides from apricot(*Armeniaca Sibirica*) kernel, the protein was degraded by Alcalase2.4L and the hydrolysis by the exopeptidase Flavourzyme 1000L was determined by single factor and orthogonal tests. The optimal parameters were found to be hydrolysis temperature 50 ℃, pH 7.5, enzyme/substrate 3000 U/g and time 120 min, which resulted in a hydrolysis degree of 41.23 %. The absorption with 10 % (W/V) active carbon powder was conducted at 35 ℃, pH 2.0 for 3 h to remove phenylalanine. The amino acids analysis showed a significant decrease for the content of phenylalanine (0.712 mg/g) in the dried sample. The resulting product could be used to prepare special medicinal formula foods for phenylketonuria.

Keywords: apricot (*Armeniaca sibirica*) kernel protein, Flavourzyme 1000L, low phenylalanine peptide, phenylketonuria

苯丙酮尿症(phenylketonuria, PKU)是一种由苯丙氨酸羟化酶(phenylalanine hydroxylase, PAH)功能障碍或四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH₄)合成酶/二氢生物蝶呤(dihydrobiopterin, BH₂)还原酶缺

陷而导致的常染色体隐性遗传氨基酸代谢障碍性疾病^[1-3]。饮食治疗即控制患者日常饮食中苯丙氨酸摄入量,是目前最主要最有效的治疗方式^[4-5]。常见的由除苯丙氨酸外的其他游离氨基酸混合而成的

收稿日期: 2016-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201289);食品科学与技术国家重点实验室自由探索项目(SKLF-ZZB-201605)。

* 通信作者: 光翠娥(1976—),女,博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事营养与功能因子研究。E-mail: guang1226@hotmail.com

引用本文: 李志刚,张宇靖,张晨,等. 低苯丙氨酸山杏仁肽的制备[J]. 食品与生物技术学报,2019,38(09):92-96.

配方食品,气味难以接受,且食用后易造成人体渗透压过高而导致腹泻^[6]。采用内肽酶和外肽酶分步水解的方法释放游离苯丙氨酸或产生苯丙氨酸处于末端的肽链,经吸附去除苯丙氨酸后产物可用于为 PKU 患者制备特殊医学配方食品。最常见最有效的吸附剂为活性炭。

日本学者 Yamashita^[7]和国内学者周志伟^[8]分别以浓缩鱼蛋白和酪蛋白为原料,通过酶法水解再经一定方式分离苯丙氨酸制备了低苯丙氨酸肽。除动物蛋白源外,小麦蛋白^[9]、大米蛋白^[9]及玉米蛋白^[10]等也被用于制备此类肽。

作者以山杏仁蛋白为原料,通过酶法水解吸附苯丙氨酸制备低苯丙氨酸肽,为山杏仁的精深加工提高附加值提供依据,同时为开发低/无苯丙氨酸肽特殊医学配方食品提供原料来源。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

脱脂山杏仁粗蛋白粉:上海问森生物科技有限公司产品;Alcalase 2.4L、Flavourzyme 1000L(食品级):丹麦诺维信(Novozymes)公司产品;粉末活性炭:食品级,江苏中远活性炭公司产品。

紫外可见分光光度计(UV-1600):上海美普达仪器公司产品;pH计、离心机:梅特勒托利多(上海)有限公司产品;HS-7集热式电磁搅拌器:IKA产品;K9840智能定氮仪、SH420石墨消解仪:海能仪器产品;DZF-6050电热真空干燥箱:上海博迅实业有限公司医疗设备厂产品;冷冻干燥机:美国 Labconco 公司产品;Agilent1100氨基酸专用高效液相色谱系统:美国 Agilent 公司产品。

1.2 山杏仁蛋白的提取工艺 脱脂山杏仁粗蛋白粉→调节 pH 至 9.0→浸提→离心(4 000 r/min, 20 min)→取上清液→调节 pH 至 4.1→离心(5 000 r/min, 15 min)→取沉淀→去离子水清洗→调节 pH 至 7.0→真空冷冻干燥 24 h→杏仁蛋白^[11]。

1.3 常规成分测定

蛋白质含量测定:GB5009.5—2010^[12],凯氏定氮法;脂肪含量测定:GB/T5009.6—2003^[13],索氏抽提法;水分含量测定:GB5009.3—2010^[14],直接干燥法;灰分含量测定:GB5009.4—2010^[15],550℃高温灼烧法;酶活测定:QB/T 1803—93^[16]。

1.4 水解度(Degree of hydrolysis, DH)的测定

水解度测定采用甲醛滴定法^[17],公式如(1)所示:

$$DH = \frac{C \times (V_1 - V_2) \times V / 10}{M \times N \times H_{\text{tot}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C 为氢氧化钠标准溶液浓度, mol/L; V₁ 为所取水溶液经甲醛滴定至终点 pH 9.2 时所消耗氢氧化钠标准溶液的体积, mL; V₂ 为空白经甲醛滴定至 pH 9.2 时所消耗的氢氧化钠标准溶液的体积, mL; V 为水解上清液体积, mL; M 为水解样品质量, g; N 为样品蛋白质质量分数, %; H_{tot} 为每克蛋白质中所含肽键毫摩尔数, 对于杏仁蛋白, 该值取 7.58 mmol/g^[18]。

1.5 Flavourzyme 1000L 水解单因素实验

配制质量分数 5% 山杏仁蛋白溶液, 添加 2 000 U/g Alcalase 2.4 L 于 60℃、pH 9.0 条件下水解 2 h 后沸水浴灭酶 10 min, 待冷却后用于外肽酶水解。外肽酶水解后沸水浴灭酶 10 min, 4 000 r/min 离心 10 min 取上清液测定不同条件下 DH。

1.5.1 pH 对 DH 的影响 于 55℃ 下添加 500 U/g Flavourzyme 1000L, 分别于 pH 6.5、pH 7.0、pH 7.5、pH 8.0、pH 8.5 下水解 120 min, 测定不同 pH 下的 DH。

1.5.2 温度对于 DH 的影响 于 pH 7.5、酶添加量为 500 U/g, 分别在 45、50、55、60℃ 温度下继续水解 120 min, 分别测定不同温度下 DH 的变化。

1.5.3 酶添加量 E/S 对 DH 的影响 于 pH 7.5、55℃ 的水解条件下, 测定 500、1 000、1 500、2 000、2 500、3 000、3 500、4 000 U/g 酶添加量下水解 120 min 后 DH 的变化。

1.5.4 水解时间对 DH 的影响 于 pH 7.5、50℃、酶添加量为 3 000 U/g 的条件下, 分别测定 30、60、90、120、150、180 min 不同水解时间的 DH, 确定水解时间。

1.6 Flavourzyme 1000L 水解正交实验

通过单因素实验发现, 水解 120 min 后 DH 基本保持不变, 因此采用三因素三水平的正交实验确定 Flavourzyme 1000L 的最佳水解条件。正交实验设计见表 1。

1.7 苯丙氨酸的吸附

经双酶分步水解后水解液 6 000 r/min 离心 20 min, 取上清液添加 10 g/dL 食品级粉末活性炭, 于

35 ℃、pH 2.0 吸附 3 h。

表 1 正交实验表

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	温度 A/℃	pH B	酶添加量 C/(U/g)
1	45	7.0	2 500
2	50	7.5	3 000
3	55	8.0	3 500

1.8 氨基酸组成分析

称取 100.0 mg 肽粉于水解管内, 加入 8 mL 6 mol/L 盐酸, 充氮封管后于 120 ℃水解 22 h, 水解完成后取出冷却加入 4.8 mL 10 mol/L 氢氧化钠溶液中和盐酸, 再转移至 25 mL 容量瓶中定容。双层滤纸过滤, 取 1 mL 滤液于 1.5 mL 离心管内 1 0000 r/min 离心 10 min, 吸取 400 μL 上清液于样品瓶中进行测定。

液相色谱条件: Agilent Hypersil ODS 柱 (5 μm, 4.0 mm×250 mm); 流动相 A (pH=7.2): 27.6 mmol/L 醋酸钠-三乙胺-四氢呋喃 (体积比为 500:0.11:2.5); 流动相 B (pH=7.2): 80.9 mmol/L 醋酸钠-甲醇-乙腈 (体积比 1:2:2); 采用梯度洗脱, 洗脱程序: 0 min, 体积分数 8% B; 17.0 min, 体积分数 50% B; 20.1 min, 体积分数 100% B; 24.0 min, 体积分数 0% B; 流动相流量为 1.0 mL/min; 柱温 40 ℃; 紫外检测器 (VWD) 检测波长为 338 nm, 脯氨酸于 262 nm 处检测。

2 结果与分析

2.1 常规成分测定结果

提取所得山杏仁蛋白基本成分见表 2。

表 2 山杏仁蛋白质基本成分

Table 2 Main composition of apricot kernel protein

指标	质量分数/%
蛋白质	63.12
水分	6.71
脂肪	4.67
灰分	3.24

蛋白酶酶活测定结果见表 3。

表 3 蛋白酶酶活

Table 3 Enzyme activity of different proteases

蛋白酶	活力/(U/mL)
Alcalase 2.4L	200 000
Flavourzyme 1000L	40 000

2.2 Flavourzyme 1000L 水解单因素实验

Alcalase 2.4L 是一种高效的细菌蛋白酶, 能够产生大量末端为疏水性氨基酸的肽类, 所得水解液往往具有很强的苦味^[19]。Flavourzyme 1000 L 是一种兼具外肽酶和内肽酶活性的复合蛋白酶, 能有效切除肽链末端的疏水性氨基酸^[20], 并且能对肽类进行进一步水解, 改善水解液的风味。

2.2.1 pH 对 DH 的影响 从图 1 可以看出, 在选定的 pH 值下, 随着 pH 的上升 DH 逐渐提高, 当 pH 达到 7.5 左右时 DH 最大, 超过 7.5 后由于蛋白酶的构象发生变化, 水解能力逐渐下降, 因此选择 pH 7.5 为其水解 pH。

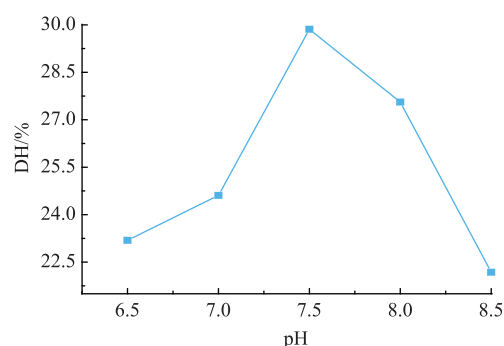


图 1 pH 对 DH 的影响

Fig. 1 Effect of pH value on DH

2.2.2 温度对 DH 的影响 从图 2 可以看出, 在选择温度参数下, DH 逐渐提高, 在 50 ℃左右时水解能力最强, 超过 50 ℃后由于高温导致酶的构象发生不可逆的改变, 活性开始下降, 因此选择 50 ℃为其水解温度。

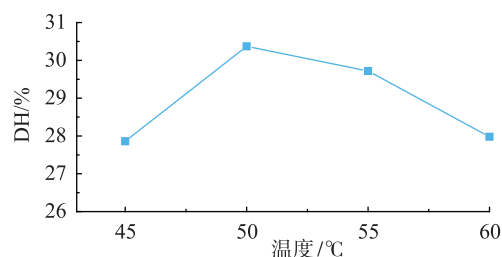


图 2 温度对 DH 的影响

Fig. 2 Effect of temperature on DH

2.2.3 酶添加量对 DH 的影响 从图 3 可以看出, 随着酶浓度的上升 DH 逐渐增大, 当添加量增加到 3 000 U/g 左右时再增加酶浓度 DH 上升变缓, 这可能是由于酶与底物的作用位点达到饱和状态, 再增大酶浓度对于 DH 的提高贡献有限, 因此酶添加量选择 3 000 U/g。

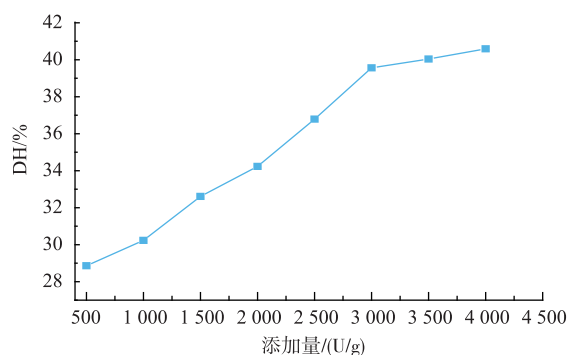


图3 酶添加量对DH的影响

Fig. 3 Effect of enzyme concentration on DH

2.2.4 水解时间对DH的影响 从图4可以看出,随着时间的推移,能够被 Flavourzyme 1000L 水解的位点逐渐减少,水解 120 min 后能够被继续水解的位点几乎没有,DH 变化平缓,因此选择 120 min 为其水解时间。

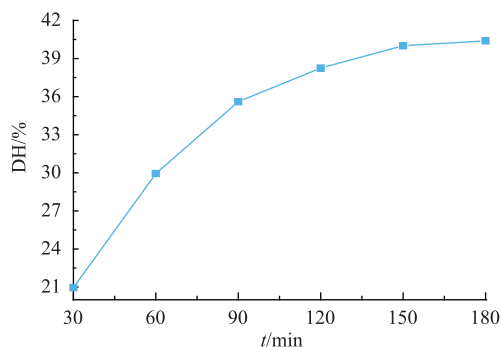


图4 水解时间对DH的影响

Fig. 4 Effect of hydrolysis time on DH

2.3 Flavourzyme 1000L 水解山杏仁蛋白最佳条件 正交实验结果见表4。

通过极差分析可知,影响 Flavourzyme 1000L 水解山杏仁蛋白的主次因素为 $B>A>C$ (pH 的影响最显著,温度次之,酶添加量影响最小),最佳因素水平组合为 $B_2A_2C_2$,即水解 pH 为 7.5,水解温度为 50 °C,酶添加量为 3 000 U/g。经测试在此工艺条件下水解 120 min DH 可达 41.23%。

2.4 苯丙氨酸的去除及肽的氨基酸分析

常见的用于分离苯丙氨酸的方法有膜分离法、离子交换法、凝胶过滤法等,而活性炭对苯丙氨酸有着特异性的吸附能力^[21],具有廉价高效的特点,因此选用食品级粉末活性炭去除苯丙氨酸。

双酶分步水解后所得水解液,经活性炭吸附苯丙氨酸后,真空抽滤去除活性炭,旋转蒸发浓缩后

真空干燥 72 h。氨基酸组成见表5。

表4 正交实验结果

Table 4 Results of the orthogonal test

实验号	水平			DH/%
	A	B	C	
1	1	1	1	31.94
2	1	2	3	34.96
3	1	3	3	32.69
4	2	1	2	41.08
5	2	2	3	36.28
6	2	3	1	29.16
7	3	1	3	31.16
8	3	2	1	34.95
9	3	3	2	27.50
k_1	33.197	34.727	32.017	
k_2	35.507	35.397	34.513	
k_3	31.203	29.783	33.377	
R	4.304	5.614	2.496	
因素	主→次			$B>A>C$
优化方案				$B_2A_2C_2$

表5 肽粉氨基酸组成

Table 5 Amino acid composition of the peptide powder

氨基酸种类	质量分数/(mg/g)	氨基酸种类	质量分数/(mg/g)
天冬氨酸(Asp)	17.683	半胱氨酸(Cys)	4.761
谷氨酸(Glu)	22.329	缬氨酸(Val)	10.823
丝氨酸(Ser)	10.319	甲硫氨酸(Met)	5.118
组氨酸(His)	19.357	苯丙氨酸(Phe)	0.712
甘氨酸(Gly)	18.789	异亮氨酸(Ile)	27.377
苏氨酸(Thr)	24.223	亮氨酸(Leu)	15.251
精氨酸(Arg)	12.063	赖氨酸(Lys)	15.049
丙氨酸(Ala)	10.806	脯氨酸(Pro)	7.232
酪氨酸(Tyr)	0.614	色氨酸(Trp)	空白

经计算,苯丙氨酸占总氨基酸质量的 0.32%,较山杏仁蛋白所含质量分数 5.01% 大幅降低,同时也低于周志伟^[6]等人利用酪蛋白制备低苯丙氨酸肽中质量分数 0.5%。由于活性炭对含苯环氨基酸吸附选择性较差,因此在利用此法生产低苯丙氨酸特殊食品时常常需要添加色氨酸和酪氨酸。此外,由于 PKU 患者饮食控制严格,导致体内缺乏矿物质和维生素,因此在利用此类肽制备低苯丙氨酸特殊食品时需要添加维生素、矿物质和碳水化合物等。

3 结 语

经过试验, Flavourzyme 1000 L 水解山杏仁蛋白的最佳工艺条件为水解温度 50 ℃、pH 7.5、添加量 3 000 U/g, 水解 120 min 后 DH 可达 41.23%。双

酶分步水解后, 水解液经活性炭吸附, 最终所得肽粉中苯丙氨酸质量分数为 0.32%。用此法所得低苯丙氨酸肽可通过补充部分氨基酸、维生素、矿物质及碳水化合物等为 PKU 患者制备低苯丙氨酸特殊医学配方食品。

参考文献:

- [1] VAN SPRONSEN F J. Phenylketonuria: a 21st century perspective[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2010, 6(9): 509-514.
- [2] BLAU N, VAN SPRONSEN F J, LEVY H L. Phenylketonuria[J]. *Lancet*, 2010, 376(9750): 1417-1427.
- [3] XU Yanhua, QIN Yufeng, ZHAO Zhengyan. Retrospective study on neonatal screening for congenital hypothyroidism and phenylketonuria in China in the past 22 years[J]. *Chinese Journal of Pediatrics*, 2009, 47(1): 18-22. (in Chinese)
- [4] STRISCIGLIO P, CONCOLINO D. New strategies for the treatment of phenylketonuria (PKU)[J]. *Metabolites*, 2014, 4(4): 1007-1017.
- [5] SINGH R H, ROHR F, FRAZIER D, et al. Recommendations for the nutrition management of phenylalanine hydroxylase deficiency[J]. *Genetics in Medicine*, 2014, 16(2): 121-131.
- [6] ZHOU Zhiwei, ZHANG Jiazhi, XU Yonghong, et al. Development of low phenylalanine peptide formula food [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 1999, 10(S1): 96-100. (in Chinese)
- [7] YAMASHITA M, ARAI S, FUJIMAKI M. A low-phenylalanine, high-tyrosine plastein as an acceptable dietetic food, method of preparation by use of enzymatic protein hydrolysis and resynthesis[J]. *Journal of Food Science*, 1976, 41(5): 1029-1032.
- [8] CARREIRA R L, SILVA M R, STARLING A L P, et al. Association of two enzymes for obtaining low phenylalanine protein hydrolysates from wheat flour[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2008, 4(7): 99-107.
- [9] SILVESTRE M P C, VIEIRA C R, SILVA M R, et al. Use of an enzymatic process for extracting and hydrolyzing rice proteins aiming at phenylalanine removal[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2009, 5(1): 64-67.
- [10] CAPOBIANGO M, LOPES D C F, CARREIRA R L, et al. Optimization of enzyme assisted processes for extracting and hydrolysing corn proteins aiming phenylalanine removal[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2007, 3(6): 1-19.
- [11] GU Xin, LI Li, HOU Yakun, et al. Optimization on extraction of protein from apricot (*Armeniaca sibirica*) kernel via response surface analysis[J]. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 2010, 25(2): 162-168. (in Chinese)
- [12] 中华人民共和国卫生部. GB5009.5—2010食品安全国家标准食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [13] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T5009.6—2003 食品中脂肪的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [14] 中华人民共和国卫生部. GB5009.3—2010 食品安全国家标准食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [15] 中华人民共和国卫生部. GB5009.4—2010食品安全国家标准食品中灰分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [16] 中华人民共和国轻工业部. QB/T1803—93 中华人民共和国轻工业行业标准工业酶制剂通用试验方法[S]. 北京: 中国轻工出版社, 1994.
- [17] 刘平. 美拉德肽的形成机理及功能特性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [18] WANG Liyuan, QIU Nongxue, LIU Ning. Enzymatic hydrolysis of apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel protein by Alcalase and its antioxidative activity[J]. *China Oils and Fats*, 2009, 34(7): 22-25. (in Chinese)
- [19] CHEUNG I W, LICHAN E C. Application of taste sensing system for characterization of enzymatic hydrolysates from shrimp processing by-products[J]. *Food Chemistry*, 2014, 145(7): 1076-1085.
- [20] YU Wancong, ZHAO Xianzheng, LIU Yutang, et al. Deodorization and decolorization of chickpea peptide[J]. *Food Science and Technology*, 2013, 38(6): 85-88. (in Chinese)
- [21] SUN Shubin, WANG Chuanhuai. Study on isolation and purification of phenylalanine by active carbon chromatography[J]. *Amino Acids and Biotic Resources*, 1995, 17(1): 9-12. (in Chinese)