

丝素肽的制备及其理化性质研究

周凤娟¹, 许时婴², 杨瑞金², 王 璋²

(1 天津大学 农业与生物工程学院, 天津 300072; 2 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

[摘 要] 为了研究丝素肽的制备工艺及其理化性质, 用沸腾的质量分数 40% CaCl_2 溶液溶解精炼的废蚕丝, 将制得的丝素蛋白盐溶液加入 Alcalase 酶进行酶解反应, 酶解液经超滤器超滤后的丝素肽溶液再用纳滤设备脱盐, 得到的溶液进行喷雾干燥即制得丝素肽粉, 同时对丝素肽粉的理化性质进行测定。结果表明, 制得的丝素肽粉中丝素肽含量为 929.6 g/kg; 当其水解度为 17% 时, 丝素蛋白水解产物中主要组分的相对分子质量分别为 249 和 762, 含量分别约占 72.9% 和 15.5%, 当水解度为 21% 时, 丝素蛋白水解产物中主要组分的相对分子质量分别为 209 和 668, 含量分别约占 84.4% 和 7.2%; 丝素肽主要氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、酪氨酸和丝氨酸)的含量之和占其氨基酸总量的 85% 左右; 其平均疏水性为 2.29 kJ/残基; 丝素肽在 pH 为 2~10 时具有很好的溶解性; 丝素肽溶液的黏度较小, 且随浓度增加, 丝素肽溶液的黏度增加不大。可见, 丝素肽具有良好的理化特性和营养特性, 应用前景广阔。

[关键词] 丝素肽; 丝素蛋白; 理化性质

[中图分类号] S881.3; TS201.2⁺1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)12-0167-05

Preparation and physical and chemical properties of silk fibroin peptide

ZHOU Feng-juan¹, XU Shi-ying², YANG Rui-jin², WANG Zhang²

(1 School of Agriculture and Bioengineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2 School of Food Sciences and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

Abstract: To study the preparation technics, and physical and chemical properties of silk fibroin peptide, refined waste silk was dissolved in 40% calcium chloride solution. The solution obtained was hydrolyzed with alcalase, then ultrafiltrated, and after these processes, desalted by nanofiltration (NF). Finally the desalted solution was sprayed dry. The physical and chemical properties of silk fibroin peptide powder were determined. The results showed that the content of silk fibroin peptide in silk fibroin peptide powder was 929.6 g/kg. The relative molecular weights of the main components of silk fibroin hydrolysate with DH 17% were 249 and 762, respectively, and the water contents took up about 72.9% and 15.5%, respectively. The relative molecular weights of the main components of silk fibroin hydrolysate with DH 21% were 209 and 668, respectively, the contents taking up about 84.4% and 7.2%, respectively. The main amino acids of silk fibroin peptide were glycine, alanine, serine and tyrosine, taking up 85% of a total amount of amino acid. The average hydrophobicity was 2.29 kJ/residues. The solubility of silk fibroin peptide was very good in the pH ranging from 2 to 10. The viscosity of silk fibroin peptide solution was low, and increased lentamente with the concentration increased. So silk fibroin peptide had good physical, chemical and nutrient properties, and would have a wide application foreground.

* [收稿日期] 2006-12-12

[作者简介] 周凤娟(1974—), 女, 辽宁辽阳人, 讲师, 博士, 主要从事生物活性物质与功能性食品研究。E-mail: fengjz0383@sina.com

Key words: silk fibroin peptide; silk fibroin; physical and chemical property

我国有大量的废蚕丝未加以利用,造成了极大的资源浪费和环境污染,因此急需对其进行综合开发和利用。蚕丝是一种纤维蛋白,主要由丝素蛋白组成。丝素肽是丝素蛋白的水解产物,极易被人体吸收,消化率较丝素蛋白大大提高^[1],且具有降低血液胆固醇含量、促进酒精代谢、降低血压、促进胰岛素分泌及预防老年性痴呆症等生理功能^[2-3]。因此,丝素肽不仅具有食用价值,而且具有药用价值,作为功能食品因子开发具有广阔的应用前景。

天然丝素蛋白不溶于水,难以被酶直接水解,一般采用酸法、碱法水解丝素蛋白;或以高浓度的中性盐溶液溶解丝素蛋白,脱盐后获得丝素蛋白溶液,再用酶水解来制备丝素肽^[4-5],但此法只能在实验室内制备丝素肽产品,还不能大规模工厂化生产。本研究拟对丝素肽的生产工艺进行改进,即将丝素蛋白用高浓度的 CaCl_2 溶液溶解后酶解,酶解液用纳滤技术脱除其中的 CaCl_2 ,得到的浓缩液喷雾干燥后制得高纯度的丝素肽粉,此工艺可实现工业化规模生产一定相对分子质量分布的丝素肽产品,目前在国内外尚未见相关报道。同时,对制备的蚕丝产品进行了性能研究,旨在为进一步扩大丝素肽在食品、化妆品、医药等领域的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

废蚕丝(落绵)由江苏海安茧丝绸集团股份有限公司提供。碱性蛋白酶 Alcalase(2.4 L)由丹麦 Novo 公司生产,其他试剂均为分析纯。超滤/纳滤系统由江苏久吾高科技股份有限公司生产,超滤膜的膜材料为聚砜,有效膜面积 2 m^2 ,截留相对分子质量为 10 000,NF200-2540 纳滤膜由美国陶氏化学公司生产,膜材料为芳香族聚酰胺,有效膜面积 2.6 m^2 ,截留相对分子质量为 150;Agilent 1100 型氨基酸自动分析仪由美国安捷伦公司生产;QZR-5 型喷雾干燥器由无锡市林洲喷雾干燥器厂生产;所用仪器还有 Waters 600 高效液相色谱仪和奥式黏度计。

1.2 方法

1.2.1 丝素肽粉的制备工艺 (1)蚕丝纤维的精炼。精炼的目的是除去蚕丝纤维上的丝胶蛋白。废蚕丝除杂后,在 $98\sim 100\text{ }^\circ\text{C}$ 下采用 50 倍体积 5 g/L 的 Na_2CO_3 溶液精炼 2 次,每次 30 min。用苦味酸胭脂红溶液检测精炼是否完全^[6]。

(2)精炼丝的溶解。将精炼后的蚕丝加入到沸腾的质量分数 40% CaCl_2 溶液中溶解 $2\sim 5\text{ min}$,溶丝液迅速用冰水冷却备用^[7]。

(3)溶丝液的酶解。将制得的丝素蛋白盐溶液加蒸馏水稀释成质量浓度为 50 g/L ,用 NaOH 溶液调节 pH 值为 8.5,在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下加入 Alcalase 酶进行酶解反应, E/S (酶与底物含量之比) = 12 AU/kg ,并用 NaOH 溶液维持水解液的 pH 值恒定,反应结束后加热灭酶。

(4)酶解液的超滤分离。采用截留相对分子质量为 10 000 的超滤膜处理物料,以除去料液中残留的相对分子质量大于 10 000 的大分子。操作条件:进料液为含 46 g/L 丝素肽和 225 g/L CaCl_2 的水溶液,进料液温度 $20\text{ }^\circ\text{C}$,操作压力由 0.08 MPa 逐渐升至 0.15 MPa 。

(5)酶解液的纳滤脱盐。将超滤后的酶解液再用纳滤设备脱盐,纳滤工艺示意图见图 1。

操作模式:若浓缩液回到原来的物料贮罐内,透过液另行收集,则为浓缩模式;渗滤时需向料液中添加渗滤溶剂,如所加渗滤溶剂的量与透过液量相等,即形成恒容渗滤模式,此模式可克服高浓度料液透过速率低的缺点,减少膜表面极化和污染。本研究将浓缩和恒容渗滤两种操作模式结合起来,即先采用浓缩模式,当达到一定浓度时,转换为恒容渗滤模式。

通过试验分别研究了操作压力、进料液温度、进料液质量浓度和进料液流量对膜渗透通量的影响,确定了较佳工艺参数为:操作压力 1.0 MPa ,进料液温度 $35\text{ }^\circ\text{C}$,进料液质量浓度 45 g/L ,进料液流量 90 L/h 。

(6)丝素肽溶液的干燥。脱盐后得到的丝素肽溶液在进风温度 $175\sim 185\text{ }^\circ\text{C}$ 、出风温度 $80\sim 85\text{ }^\circ\text{C}$ 下进行喷雾干燥,即制得丝素肽粉。

1.2.2 丝素肽粉中肽、灰分和水分含量的测定 参考文献[8]的方法进行。

1.2.3 丝素肽相对分子质量分布的测定 采用高效凝胶过滤色谱法。色谱柱为 TSKgel 2000 SWXL ($300\text{ mm}\times 7.8\text{ mm}$),流动相为体积分数 45% 乙腈水溶液(含 0.1% 三氯乙酸),流速 0.5 mL/min ,检测波长 220 nm ,柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$ 。

1.2.4 丝素肽水解度的测定 采用 pH-stat 法,水解度(DH)的计算公式^[9]为:

$$\text{DH} = B \times N_b \times 1/\alpha \times 1/\text{MP} \times 1/\text{htot} \times 100\%$$

式中: B 为碱液体积 (mL); N_b 为碱液的浓度

(mol/L); α 为 α -氨基的解离度;MP 为底物中蛋白质总量 (g); $htot$ 为底物蛋白质中肽键总数

(mmol/g),对丝素蛋白而言, $htot=12.4\text{ mmol/g}$ 。

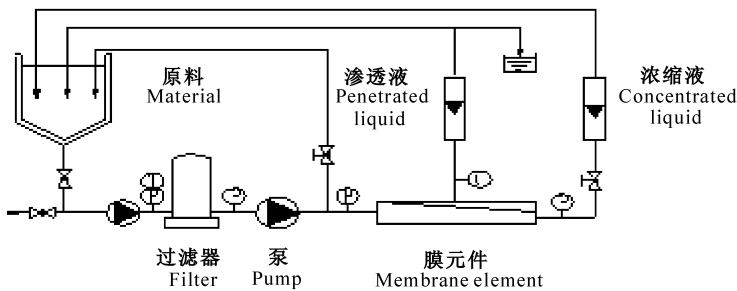


图 1 丝素蛋白酶解液的纳滤工艺示意图

Fig. 1 Nanofiltration technics sketch map of silk fibroin hydrolysates

1.2.5 丝素肽氨基酸组成的测定 将样品置于水解管中,加入 6 mol/L 的 HCl 溶液,真空封口,在 110 ℃下水解 24 h,冷却后定容、过滤、蒸干,再加入 0.02 mol/L 的 HCl 溶液在空气中放置 30 min,采用氨基酸自动分析仪测定氨基酸的含量。

1.2.6 丝素肽平均疏水性的计算 按下式求得:

$$\Delta g = \frac{\sum \Delta g_{\text{残基}}}{n}$$

式中: Δg 为蛋白质的平均疏水性, $\Delta g_{\text{残基}}$ 为每种氨基酸残基的疏水性, n 为蛋白质分子中总的残基数^[10]。

1.2.7 丝素肽氮可溶解指数(NSI)的测定 参考文献[11]的方法进行。称取 1 g 丝素肽粉于 50 mL 烧杯中,加入 40 mL 去离子水,于室温下搅拌 120 min,然后定容至 50 mL,静置几分钟,取上层液,1 500 r/min 离心 10 min,取上清液 10 mL,采用凯氏定氮法测定蛋白质的含量,另用凯氏定氮法测样品的总氮。

$$\text{氮可溶解指数(NSI)/}\% = \frac{\text{水溶性氮(g)}}{\text{总氮(g)}} \times 100\%$$

1.2.8 丝素肽溶液黏度的测定 调节恒温槽至 (25.0±0.1) ℃,用移液管取一定量待测丝素肽溶液放入奥氏黏度计中,然后将奥氏黏度计垂直固定在恒温槽中,恒温 5~10 min,利用秒表从测得一定体积的液体在毛细管中流过的时间来求得黏度。

2 结果与分析

2.1 丝素肽粉的制备工艺

废蚕丝→除杂→精炼→精炼丝→溶解→丝素蛋白的盐溶液(简称溶丝液)→酶解→超滤分离→纳滤脱盐→丝素肽溶液→喷雾干燥→丝素肽粉。

经本工艺制备的丝素肽粉为淡黄色粉末,较细腻,易吸潮,无异味,经搅拌可迅速溶解于水。

2.2 丝素肽粉的成分

测得丝素肽粉的水分含量为 44.2 g/kg,灰分含量为 23.4 g/kg,丝素肽含量为 929.6 g/kg,具有较高的营养价值。

2.3 丝素肽的相对分子质量分布

在 TSKgel 2000 SWXL 凝胶过滤色谱上,以体积分数 45%乙腈水溶液(含 0.1 %三氯乙酸)为洗脱液,以细胞色素 C(相对分子质量(MW)=12 500)、抑肽酶(MW=6 500)、杆菌酶(MW=1 450)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(MW=451)和乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸(MW=189)为相对分子质量标准品,结果表明,各标样的相对分子质量对数与各标样经 HPLC 的洗脱时间呈很好的相关性,回归方程为: $\log MW=7.20-0.8746T$, $R=0.9934$ 。据此,可以较准确地测定肽的相对分子质量分布。

不同水解度丝素肽的相对分子质量分布结果见图 2。由图 2 可见,在水解物中,各种相对分子质量的多肽含量各不相同,当水解度为 17%时,丝素肽中相对分子质量为 249 的组分所占比例最高,约占总组分的 72.9%;其次是相对分子质量为 762 的组分,约占总组分的 15.5%;相对分子质量为 42 的组分可能是一些游离氨基酸,约占总组分的 3.7%。而采用酸法制备小肽时,其酸解产物中游离氨基酸的含量会高达 60%以上^[4]。当水解度为 21%时,丝素肽中相对分子质量为 209 的组分所占比例最高,约占总组分的 84.4%;其次是相对分子质量为 668 的组分,约占总组分的 7.2%。随着水解度逐渐由 17%增加到 21%,底物丝素蛋白逐渐被水解,不同相对分子质量的峰在不断变化,水解产物以二肽或三肽为主。

有研究表明,丝素肽中含有具血管紧张素转化酶抑制活性的多肽,主要集中在相对分子质量较小

的组分(一般都小于1 500)中^[12-13]。因此,从相对分子质量较小的丝素肽中,有望进一步分离出具生物

活性功能的组分。

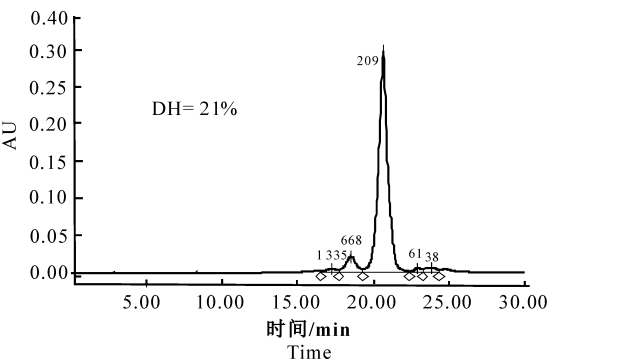
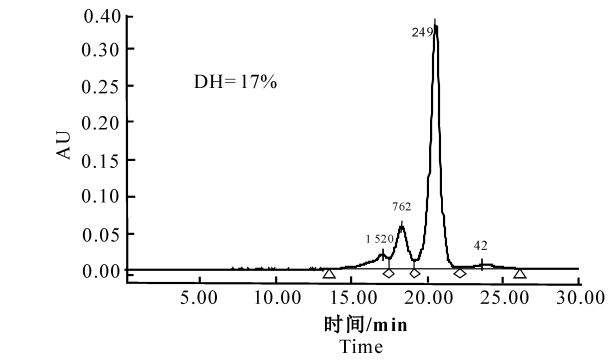


图 2 不同水解度丝素肽相对分子质量的分布图谱

Fig. 2 Gel filtration chromatography of silk fibroin peptides with different DH

2.4 丝素肽氨基酸的组成

由表 1 可见,丝素肽与丝素蛋白的氨基酸组成十分相似,这表明在温和的酶解条件下,氨基酸一般不会被破坏。丝素肽中甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸 4 种氨基酸含量之和占其氨基酸总量的 85% 左右,且丝素肽中人体所必需的 8 种氨基酸中有 6 种(苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、赖氨酸、苯丙

氨酸)含量较高,约占氨基酸总量的 15% 左右,具有较高的营养价值,是一种品质优良的新资源。在氨基酸的动物试验中发现,甘氨酸能降低血液中胆固醇的浓度,丙氨酸具有促进酒精代谢的功能,酪氨酸可预防痴呆症,丝氨酸具有防治皮肤老化、抗辐射、防止白血球下降的作用^[14]。因此,丝素肽可作为功能性食品来开发。

表 1 丝素肽和丝素蛋白的氨基酸组成比较

Table 1 Comparison of amino acid compositions of silk fibroin peptide and silk fibroin									mg/g
种类 Type	天门冬氨酸 Asp	苏氨酸 Thr	丝氨酸 Ser	谷氨酸 Glu	甘氨酸 Gly	丙氨酸 Ala	半胱氨酸 Cys	缬氨酸 Val	蛋氨酸 Met
丝素蛋白 Silk fibroin	26.3	11.0	122.9	20.3	332.6	287.7	0.55	26.9	2.6
丝素肽 Silk fibroin peptide	19.5	7.4	117.3	16.3	352.6	289.7	0.00	27.1	0.00
种类 Type	异亮氨酸 Ile	亮氨酸 Leu	酪氨酸 Tyr	苯丙氨酸 Phe	赖氨酸 Lys	组氨酸 His	精氨酸 Arg	脯氨酸 Pro	色氨酸 Trp
丝素蛋白 Silk fibroin	9.9	7.6	91.9	11.7	3.2	0.29	9.9	13.6	—
丝素肽 Silk fibroin peptide	8.2	4.9	87.6	9.6	3.5	0.00	7.1	5.2	—

注:—表示未检测。

Note: — means Trp had not been determined.

2.5 丝素肽的平均疏水性

由蛋白质的平均疏水性可以预测蛋白质的水解产物是否具有苦味,当平均疏水性大于 5.85 kJ/残基时,水解物具有苦味;当平均疏水性小于 5.43 kJ/残基时,水解物没有苦味^[7]。根据丝素肽的氨基酸组成可以计算出其平均疏水性为 2.29 kJ/残基,因此丝素肽没有苦味,这与口感结果一致。

2.6 丝素肽的溶解度

作为食品蛋白原料的首要条件是蛋白质的水溶性要好,因为蛋白质的水溶性对其在食品工业中的稳定性、风味等有直接影响。不同 pH 条件下,丝素肽的溶解度见图 3。

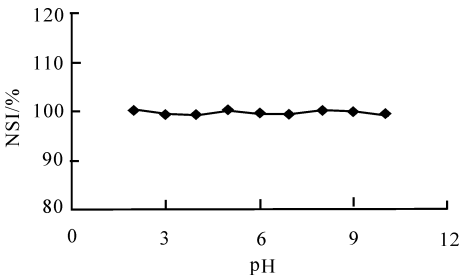


图 3 不同 pH 条件下丝素肽的氮可溶解指数

Fig. 3 Solubility of silk fibroin peptide at different pH

由图 3 可见,在 pH 值为 2~10 时,丝素肽氮可溶解指数几乎维持在 100%,表明丝素肽具有很好的溶解性,且溶液澄清透明。这是因为丝素蛋白水

解后,丝素肽的分子体积减小,离子性增强,肽链端基极性基团增加,使其溶解度增加。这对制造需要补充蛋白源的酸性饮料来说具有重要意义。

2.7 丝素肽溶液的黏度

食品工业生产中黏度是非常重要的指标,人们往往根据其黏度来设计食品配方、控制结构及适口性。

不同质量浓度丝素肽的黏度变化见图 4。从图 4 可以看出,当质量浓度为 0~600 g/L 时,随着质量浓度的增加,丝素肽溶液的黏度逐渐增大,但即使其质量浓度达到 600 g/L,其黏度仍较小,约为 10 mPa·s,流动性仍然很好。这是因为蛋白酶作用于丝素蛋白后,小分子肽类增多,使得水解产物分子的有序性增加、分子体积减小,导致黏度下降。丝素肽的这一特性适合于高蛋白流体食品使用。

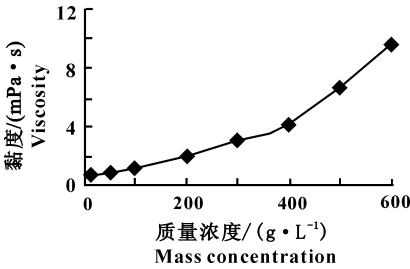


图 4 不同质量浓度丝素肽的黏度

Fig. 4 Viscosity of silk fibroin peptide at different mass concentrations

3 结 论

1)本研究确定了丝素肽的生产工艺:废蚕丝经除杂、精炼后,用沸腾的质量分数为 40%的 CaCl₂ 溶液溶解,制得的丝素蛋白盐溶液加入 Alcalase 酶进行酶解反应,反应结束后酶解液用超滤器处理,超滤后的丝素肽溶液用纳滤设备脱盐,得到的溶液进行喷雾干燥即制得丝素肽粉。

2)本研究测定了丝素肽的相对分子质量分布,当水解度为 17%时,丝素肽中主要组分的相对分子质量分别为 249 和 762;当水解度为 21%时,丝素肽中主要组分的相对分子质量分别为 209 和 668。

3)本研究测定了丝素肽的氨基酸组成,主要氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、酪氨酸和丝氨酸)的含量之和占其氨基酸总量的 85%左右。

4)丝素肽在 pH 值为 2~10 时具有很好的溶解性;丝素肽溶液的黏度较小,即使质量浓度达到 600 g/L,其黏度也不大。

[参考文献]

[1] Chen K, Iura K, Aizawa R, et al. The digestion of silk fibroin by rat[J]. J Seric Sci Jpn, 1991, 60(5): 402-403.

[2] 平林洁, 平岩阳一. 绢を食べる[J]. New Food Industry, 1993, 35(1): 17-21.

[3] 程辉铭, 译. 丝素食品化及其功能性[J]. 国外丝绸, 1994(1): 2-7.

[4] Chen Kaili, Takano Kyo, Sebata Tsuyoshi, et al. Studies on the application of waste crepe yarn and coagulated liquid silk in the silk gland as food materials[J]. Nippon Sanshigaju Zasshi, 1992, 61(1): 80-81.

[5] 刘爱莲, 荒井三雄, 平林洁. 盐酸加水分解による柞蚕绢粉末の作製[J]. 日蚕杂, 1996, 65(5): 392-394.

[6] 董炳荣. 绢纺织[M]. 北京: 纺织工业出版社, 1991: 45.

[7] 陆旋, 秋山大二郎, 平林洁. 绢粉末の作製とその物性[J]. 日蚕杂, 1994, 63(1): 21-27.

[8] 大连轻工业学院, 华南理工大学. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998: 56.

[9] Adler-Nissen Jens. Enzymic Hydrolysis of Food Protein[M]. London and New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 241.

[10] 王璋, 许时婴, 江波, 等译. 食品化学[M]. 3 版. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 322.

[11] AACC 方法 46-23.

[12] Cheung H S, Wang F L, Ondetti Miguel A, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme[J]. J Biol Chem, 1980, 255(2): 401-407.

[13] Cheung H S, Cushman D W. Inhibition of homogenous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*[J]. Bichimica et Biophysica Acta, 1973, 293: 451-463.

[14] 朱良均, 姚菊明, 李幼禄. 蚕丝蛋白的氨基酸组成及其对人体的生理功能[J]. 中国蚕业, 1997(1): 42-44.