



毕赤酵母表达不同拷贝数风味肽的呈味性比较

高应瑞¹, 白小佳¹, 赵伍英², 王艳萍¹

- (1. 食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;
2. 天津春发食品配料有限公司, 天津 300300)

摘要: 应用毕赤酵母发酵表达不同串联拷贝牛肉风味肽(4BMP、8BMP、12BMP、16BMP), 分别以不含风味肽的发酵液和牛肉汤作对照, 经过美拉德反应制备牛肉香精。对不同串联拷贝数的 BMP 制备的牛肉香精风味特性进行感官评价。结果显示: 由不含 BMP 的发酵液制备的牛肉香精特征味不明显, 总体肉香味弱; 由牛肉汤制备的牛肉香精特征味明显, 但强度弱; 以含多拷贝 BMP 发酵液制备的牛肉香精肉香味和特征味明显。其中 4BMP 总体香味不和谐; 8BMP、12BMP、16BMP 牛肉特征突出, 肉香味明显, 且权重评分方差分析显示 3 种多肽制备的牛肉香精总体风味无显著性差异。所以, BMP 作为基料进行美拉德反应可以提升产物的牛肉特征味和总体肉香味, 而拷贝数的增加对风味的影响并不显著。

关键词: 毕赤酵母; 牛肉香精; 美拉德反应

中图分类号: TQ657

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2011)03-0001-05

Comparison of Flavor on Expression of Different Copies Beefy Meaty Peptide in *Pichia Pastoris*

GAO Ying-rui¹, BAI Xiao-jia¹, ZHAO Wu-ying², WANG Yan-ping¹

- (1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. Tianjin Chunfa Food Ingredients Limited Company, Tianjin 300300, China)

Abstract: Expression of different copy number of beefy meaty peptide (4BMP, 8BMP, 12BMP, 16BMP) in *Pichia pastoris*, using beef soup and the fermentation broth without BMP for the control respectively and preparation of beef flavoring essence by Maillard reaction was studied. Sensory evaluation was done on beef flavoring essence, which is prepared by different copy number of BMP. The results showed that beef flavor characteristic of beef flavoring essence prepared by the fermentation broth without BMP is not obvious, and meat flavor is relatively weak. The beef flavor characteristic of beef flavoring essence prepared by the beef soup is obvious, but the meat flavor is also relatively weak. The beef flavor characteristic of beef flavoring essence prepared by different copies of BMP is obvious, and the meat flavor is relatively strong. Among others, the overall flavor characteristic of beef flavoring essence prepared by 4BMP did not discord, the beef flavor characteristic of beef flavoring essence prepared by 8BMP, 12BMP, 16BMP are outstanding, and the weight score variance analysis showed that these three samples produced beef flavoring essence are of no significant difference. Therefore, BMP, as the base material for products of Maillard reaction, can enhance the beef flavor and the overall characteristics of the meat flavor, while the increase in copy number did not affect the flavor significantly.

Keywords: *Pichia pastoris*; beef flavoring essence; Maillard reaction

基因工程技术的出现和发展必将为生物活性肽的开发和利用带来广阔的前景, 利用 DNA 重组技术

表达生物活性肽将成为一个新的研究方向。近年在欧洲已开始应用微生物发酵技术规模化生产香精香

收稿日期: 2010-12-16; 修回日期: 2011-02-25

基金项目: 天津市东丽区科技创新专项资金项目(20101306); 天津市科技发展计划项目(5YFGHHZ00200)

作者简介: 高应瑞(1984—), 男, 山西人, 硕士研究生; 通信作者: 王艳萍, 教授, ypwang@tust.edu.cn.

料前提物质——风味多肽。目前,风味肽的生产仍主要采用蛋白酶水解蛋白的方法^[1]。尽管人们在生产中已采用了复合酶系,但由于酶反应是一个复杂的体系,往往形成苦味肽而影响食品风味^[2]。因此,为了有目的地制备风味肽,有人采用化学法或特异性酶法制备,多年的研究表明由于工艺复杂、投资太大而未能进行大规模的工业化生产;而以 DNA 重组技术表达已知结构的物质可以克服上述缺点,得到高纯度的多肽物质。

牛肉风味肽(beefy meaty peptide, BMP)最初是从牛肉的木瓜蛋白酶水解物中分离出来的,其一级结构为:Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-leu-Ala,相对分子质量为 847。BMP 是牛肉风味的主要成分之一。本研究在前期对酵母菌表达风味强化肽的研究与开发的基础上^[3-4],分别利用携带有不同拷贝串联 BMP 基因的毕赤酵母工程菌株发酵、表达不同目的蛋白(风味肽),并对发酵液中风味肽分离纯化,通过美拉德呈味实验,比较 4 种不同串联拷贝数 BMP(4BMP、8BMP、12BMP、16BMP)表达产物的呈味特征,为风味肽热反应牛肉香精的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

分别含 4、8、12 和 16 串联拷贝 BMP 基因的毕赤酵母工程菌株(*P. pastoris* GS115-4BMP、*P. pastoris* GS115-8BMP、*P. pastoris* GS115-12BMP、*P. pastoris* GS115-16BMP),含 AOX1 启动子,mut⁺,His⁻,由本实验室构建并保存^[3]。

1.1.2 试剂

蛋白胨和酵母粉,北京奥博星生物技术有限公司;丙烯酰胺、N,N-甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠,BBI 公司;木糖、复合氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、精氨酸)、牛脂,天津春发食品配料有限公司。

1.1.3 培养基

种子培养基(YPG)、发酵培养基为改良基础盐培养基(BSM)及 PTM1 微量元素溶液^[5],接种前用浓氨水调节到初始发酵所需的 pH 5.0。

1.1.4 主要仪器设备

J-25 型高速冷冻离心机,美国 Beckman 公司,5BGZ-2002 发酵罐,上海保兴生物设备工程有限公司;中空纤维柱超滤膜(截留相对分子质量分别为 6 000 和 60 000),天津膜天膜公司;SmartsoecTM3000

型分光光度计,美国 Bio-Rad 公司;蛋白质电泳仪,北京六一仪器厂;手提式灭菌锅,山东新华医疗器械股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化

用竹签从 -80 ℃ 中的存菌管中挖取少量菌体,在 YPG 培养皿上划线,28 ℃ 恒温培养 2~3 d,待菌落长出后,存于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.2.2 种子液制备

一级种子培养:从 YPG 培养皿上挑取一单个菌落于装有 2 mL YPG 液体培养基的试管中,28 ℃、180 r/min 摇床培养 22 h,得一级种子液。

二级种子培养:一级种子液以 2% 的接种量接入含 50 mL YPG 培养液的 500 mL 三角瓶中,28 ℃、180 r/min 摇床培养 22 h,得二级种子液。

1.2.3 发酵罐培养

按发酵 BSM 基础盐培养基的配方配制一定体积的培养基,灭菌之后用浓氨水调节 pH 至 5.0,再按 1% 的量加入微量元素 PTM1 溶液。设定好转速、通气量和罐压。将培养好的种子液按 10% 的接种量接入 5 L 发酵罐中发酵。待溶氧上升时,流加甘油继续增殖培养,然后添加甲醇诱导,发酵 96 h 结束。每隔 24 h 取样,测定菌体密度和外源蛋白的含量。

1.2.4 发酵液预处理与浓缩

发酵液预处理:将收集到的发酵液在 6 000 r/min 离心 20 min,除去大部分菌体,然后加热到 100 ℃ 煮沸 5 min,使大部分蛋白酶失活,迅速降温,于 -20 ℃ 储存备用。

发酵液浓缩:将处理过的 8BMP、12BMP、16BMP 发酵液分别通过截留相对分子质量为 6 000 和 60 000 的中空纤维柱超滤膜,得到并收集相对分子质量为 6 000~60 000 的浓缩液;4BMP 仅通过截留相对分子质量为 60 000 的中空纤维柱超滤膜后,60 ℃ 旋蒸浓缩 2 h,保存于 -20 ℃ 冰箱中。

1.2.5 蛋白浓度的测定

参照考马斯亮蓝法(Bradford),以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白作标准曲线^[6]。

1.2.6 不同目标 BMP 比例的测定

分别取含不同串联拷贝数风味肽浓缩液 20 μL 进行 SDS-PAGE 电泳检测,通过蛋白分析软件 Quantity One 分析 SDS-PAGE 电泳图中目标蛋白占整条带中蛋白的比例。

1.2.7 美拉德呈味反应

准确称取美拉德反应各基液组分,各配料添加

量:木糖 10 g,复合氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、精氨酸) 0.7 g,牛脂 3 g,NaCl 2.0 g. 配料置于 500 mL 反应瓶中,加蒸馏水并调节 pH 为 5.0,总反应体系 100 mL,在 100 °C 下反应 2 h,快速冷却,冰箱保存备用.

1.2.8 有效性评价

参照文献[7]的方法,采用 SPSS 软件进行方差分析,以评价感官评价结果的有效性.

1.2.9 感官评价与统计分析

将样品用 80 °C 热水稀释至 5%,盛入大小相同的小瓶中,由 7 名评定员进行感官评定.把约 10 mL 溶液放入口中,25 s 后记录感受到的味道^[8].进行感官刺激的评价时,在不同的评价之间使用清水以恢复原感觉能力.

简单描述法:用任意词汇对每个样品的风味特性进行定性描述,主要包括香精的基本味(酸、甜、苦、咸、鲜等)、香气、口感、化学性感官因素等特性^[9].

评分检验法:评分法是最常用的一种感官分析方法,是以数字标度形式来检验产品质量,所使用的标度为等距标度或比例标度^[10].本实验中的感官评定由天津春发食品配料有限公司对样品反映出的肉香味、烤香味、硫磺味、焦糊味等的强度进行打分.根据各因素的权重及得分计算样品的总得分.评分依据及权重见表 1.

表 1 评分依据表

Tab.1 Score according to the table

因子	肉香味	烤香味	焦糊味	硫磺味	留香时间	牛肉特征味
权重	0.4	0.3	-0.2	-0.2	0.1	0.6

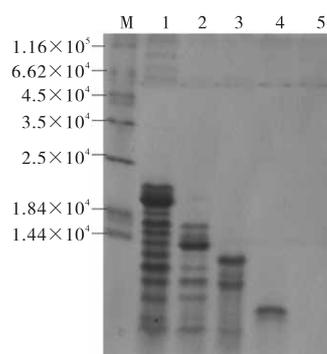
2 结果与分析

2.1 不同串联拷贝数 BMP 进行 SDS-PAGE 分析结果

图 2 为分别含不同串联拷贝数 BMP 发酵浓缩液及空质粒酵母发酵液电泳图,从图中可知 16BMP 含量明显高于其他低拷贝 BMP,对该图进行 Quantity One 等高线定量法测定不同拷贝数蛋白的比例,结果如图 3 所示.

从图 2 中可以看出不同拷贝数 BMP 在电泳图中出现不同的杂带,表达量越高杂带越多,这主要是由于毕赤酵母在发酵过程中有蛋白酶产生,致使目的蛋白部分降解的结果.根据 Quantity One 等高线定量法测定出不同串联拷贝数的 BMP 质量浓度比例为 $\rho(16BMP) : \rho(12BMP) : \rho(8BMP) : \rho(4BMP) =$

36.42 : 24.74 : 21.32 : 17.52.



M.marker; 1. 16BMP; 2. 12BMP; 3. 8BMP; 4. 4BMP; 5. 空质粒酵母发酵液

图 2 不同串联拷贝数 BMP 浓缩液电泳图

Fig.2 Electrophoresis image of different copies of BMP concentrate

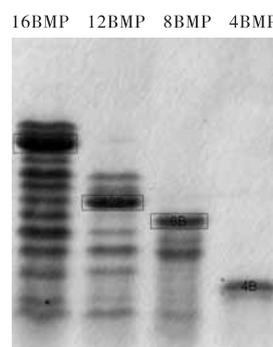


图 3 不同串联拷贝数的电泳条带分析结果

Fig.3 Results of different copy number of electrophoretic bands

2.2 不同拷贝数浓缩液进行美拉德呈味反应分析

用考马斯亮蓝法测定总蛋白标准曲线,方程为 $y = 5.4667x - 0.007$, $R^2 = 0.9986$,线性关系良好.应用 Bradford 法测定不同拷贝数 BMP 发酵浓缩液总蛋白质量浓度,结果见表 2.

表 2 不同拷贝数 BMP 发酵浓缩液总蛋白质量浓度

Tab.2 Total protein concentration of different copies of BMP concentrate

样品	4BMP	8BMP	12BMP	16BMP
总蛋白/(mg·L ⁻¹)	332.4	378.1	333.3	610.4

根据不同串联拷贝数 BMP 在浓缩液中的质量浓度比例 ($\rho(16BMP) : \rho(12BMP) : \rho(8BMP) : \rho(4BMP) = 36.42 : 24.74 : 21.32 : 17.52$),取等质量 BMP 进行美拉德呈味实验,分别以 100 mL 空质粒发酵液和 100 mL 水作为对照.不同拷贝数 BMP 在 100 mL 美拉德反应体系中的添加量见表 3.

表3 不同串联拷贝数 BMP 在美拉德反应中的添加量

Tab.3 Volume of BMP with different copy number in the Maillard reaction

样品	16BMP	12BMP	8BMP	4BMP
添加量/mL	48.1	70.8	82.2	100

2.3 不同拷贝 BMP 呈味结果感官评价与统计分析

2.3.1 有效性评价

表 4 为 7 位评价员对以上 6 组不同样品进行评分的结果,应用 SPSS 软件进行两因素无重复方差分析,评价结果的有效性.

表 4 样品评分统计表

Tab.4 Sample score tables

样品	评价员评分						
	1	2	3	4	5	6	7
水	2.7	1.2	3.8	3.0	0.0	-0.2	-0.2
空质粒	1.9	1.8	3.0	3.5	1.8	2.6	2.9
4BMP	0.0	2.8	2.1	3.6	-0.8	1.7	1.4
8BMP	1.9	3.1	2.8	4.6	2.5	2.3	1.9
12BMP	2.3	2.6	3.2	3.8	4.4	4.1	3.3
16BMP	2.5	2.1	3.6	2.3	4.1	2.0	2.6

表 5 为评分结果两因素无重复方差分析,检验结果表明:样品因素主效应 ($F = 3.616, P = 0.011 < 0.05$) 显著,评价员因素主效应 ($F = 2.140, P = 0.078 > 0.05$) 不显著.这就说明样品得分的差别并不是由评价员之间的感官差别引起的,而是由于样品本身气味的不同而得出的结论.从而也证明了此次评分的结果是有效的、可信的.

表 5 两因素无重复方差分析

Tab.5 Test of between-subjects effects

偏差来源	平方和	自由度	均方	F 值	显著水平
样品	19.628	5	3.926	3.616	0.011
评价员	13.939	6	2.323	2.140	0.078
随机误差	32.572	30	1.086		
总变异	307.100	42			

2.3.2 简单描述法评价不同样品间风味差异性

简单描述评价增加了牛肉汤为对照组实验,表 6 为样品简单描述结果,以空质粒发酵液及水做基液的美拉德反应产物牛肉特征味均不明显,而以 8BMP、12BMP、16BMP 发酵液为基液均有不同程度的牛肉特征味.而且与牛肉汤为基液相比,强度更强,效果比较明显.由此推测可知,BMP 在美拉德反应产物中能提升反应产品的牛肉风味特征.

表 6 样品品尝实验结果

Tab.6 A brief description results of the sample

样品	简单定性描述结果
水	硫磺味明显,烤香、焦糊味和特征不明显,肉香味较好但总体强度弱,口感略苦.
空质粒	特征不明显,强度较弱,口感略苦.
牛肉汤	与 12BMP 样品特征相似,但强度更弱,口感略苦.
4BMP	烤香味、焦糊味很强,硫磺味明显,口感苦味较大,闻起来有似发酵的味道,总体不协调.
8BMP	烤香味、特征味较好,肉味一般,口感略苦,闻起来有似发酵的味道.
12BMP	烤香味、特征味较好,硫磺味明显,口感略苦,闻起来有似发酵的味道.
16BMP	肉香味、特征味较好,香味和谐,口感略苦,闻起来有似发酵的味道.

注:牛肉汤的制备:取 10 g 新鲜牛肉,绞碎后置于含 100 mL 蒸馏水的三角瓶中,置于灭菌锅中 100 °C 煮沸 30 min,自然 pH.

2.3.3 对 4 种 BMP 呈味实验的统计学评分方差分析

表 7 为不同串联拷贝数 BMP 样品评分统计表,对其进行 SPSS 方差分析见表 8.方差分析结果显示:组间平方和为 10.678,组内平方和为 8.651;组间自由度为 3,组内自由度为 24;组间均方为 3.559,组内均方为 0.360;F 检验统计量的值为 9.874,对应的概率 P 值为 $0.000 < 0.05$,说明在 0.05 的显著性水平下,样品之间存在显著差异.

表 7 不同串联拷贝数 BMP 样品呈味实验评分统计表

Tab.7 Score statistics table of different copy BMP samples

样品	评价员评分						
	1	2	3	4	5	6	7
16BMP	2.5	2.5	2.8	2.3	3.7	4.2	3.4
12BMP	2.8	2.7	2.3	2.1	2.9	3.3	2.8
8BMP	3.2	3.8	2.3	2.1	3.5	2.8	2.8
4BMP	1.2	1.4	2.6	1.8	0.9	0.8	1.8

表 8 样品评分结果的单因素方差分析

Tab.8 Variance analysis of results of single factor score

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
组间	10.678	3	3.559	9.874	0.000
组内	8.651	24	0.360		
总变异	19.330	27			

上述分析结果显示,4 个组的平均值存在显著差异,为了明确究竟是哪些组之间的差异显著,采用 Tukey (Honestly 显著差异检验)方法进行单因素方差分析的多重比较,结果见表 9.

分析结果表明,在 $\alpha = 0.05$ 的显著性水平下,检验结果显示:8BMP、12BMP、16BMP 样品间 ($P =$

0.685 > 0.05) 无显著性差异, 4BMP ($P = 1.000 > 0.05$) 分别与 16BMP、12BMP 和 8BMP 差异显著. 4BMP 与 16BMP、12BMP 和 8BMP 相比, 风味明显不协调, 总体风味较差.

表 9 单因素方差分析的多重比较结果

Tab.9 Multiple comparison of variance analysis

样品	样品评价次数	平均分
16BMP	7	3.057 1
12BMP	7	2.928 6
8BMP	7	2.700 0
4BMP	7	1.500 0

3 结 论

(1) 以空质粒和水为 BMP 对照组可以得知, BMP 美拉德反应产物的牛肉特征味明显, 对照组美拉德反应产物虽有一定的肉香味, 但其牛肉特征味不明显, 因此, 与不含 BMP 美拉德反应产物相比, BMP 在美拉德反应产物中能明显提升反应产品的牛肉风味特征, 是牛肉咸味香精生产制备的有效反应原料.

(2) 通过 SPSS 13.0 方差分析结果以及简单描述结果可知, 4BMP 风味明显不协调, 8BMP、12BMP、16BMP 风味在 $\alpha = 0.05$ 显著水平下差异不显著或无明显差异. 分析其原因, 可能是由于 16BMP、12BMP 及 8BMP 这 3 种多肽相对分子质量均介于 6 000 ~ 60 000, 通过中空纤维抽滤后去除大部分杂质以及无机盐金属离子, 进行了很好的分离与浓缩, 4BMP 相对分子质量低于 6 000, 虽通过分离膜 (截留相对分子质量为 60 000) 去除一些大分子杂质, 但是一些小分子的无机盐金属离子杂质仍有残留, 而金属离子的存在, 可以影响美拉德褐变反应的进行, 使反应过度而产生如焦糊味等不好的味道. 这与文献[11]的结论一致.

(3) 通过感官评价实验结果可知, 通过基因工程表达风味肽, 对牛肉风味特征的增强作用显著, 而拷

贝数的增加对产品的风味特征的影响并不显著, 这就使得多拷贝数、表达量高的风味肽的研究与应用成为必要.

参考文献:

- [1] 黄德娟, 黄德超. 生物活性肽[J]. 生物学通报, 2006, 41(4): 17-18.
- [2] 孔令会. 新型调味基料在休闲食品中的应用[J]. 食品添加剂, 2008(S1): 278-281.
- [3] 王艳萍, 高文, 侯建华, 等. 牛肉风味强化肽(BMP)表达载体的构建[J]. 天津科技大学学报, 2008, 23(3): 16-20.
- [4] 白小佳, 高文, 王艳萍. 牛肉风味强化肽(BMP)在毕赤酵母中的高效分泌表达[J]. 中国酿造, 2008(16): 26-28.
- [5] 曾松荣, 王艳萍, 杨明. 重组毕赤酵母发酵牛肉风味肽的中试研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(10): 43-48.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1979, 72: 248-254.
- [7] 夏玲君. 反应型牛肉香精的研制及其香味活性化合物的分析[D]. 北京: 北京工商大学, 2007.
- [8] Ogasawara M, Katsumata T, Egi M. Taste properties of Maillard-reaction products prepared from 1000 to 5000 Da peptide[J]. Food Chemistry, 2006, 99(3): 600-604.
- [9] 周家春. 食品感官分析基础[M]. 北京: 中国计量出版社, 2006: 8.
- [10] Mottrajn D S, Whitfield F B. Maillard-lipid interactions in nonaqueous systems: Volatiles from the reaction of cysteine and ribose with phosphatidylcholine[J]. Journal Agric Food Chem, 1995, 43(5): 1302-1306.
- [11] Kwak E J, Lim S I. The effect of sugar, amino acid, metal ion, and NaCl on model Maillard reaction under pH control[J]. Amino Acids, 2004, 27(1): 85-90.