

脱盐、超滤处理卵白蛋白源 ACE 抑制肽及其理化性质的研究

程缘, 赵英, 迟玉杰, 孙波, 王俊彤

(东北农业大学食品学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 卵白蛋白是蛋清中的主要蛋白质, 利用卵白蛋白制备 ACE 抑制肽可为其高值利用提供参考。本文采用离子交换色谱对卵白蛋白的粗酶解物进行脱盐处理, 确定了室温 25 °C、20 mL 进样量、8 BV/h 的脱盐工艺条件。在上述条件下, 酶解物脱盐率达到 83.6%, 氮回收率和 ACE (血管紧张素转换酶) 抑制率分别为 87.71% 和 80.31%。再采用截留分子量为 10 ku 和 3 ku 的两种超滤膜将脱盐酶解物分离成 >10 ku、3~10 ku 和 <3 ku 三个组分, 最佳操作条件: 超滤时间 40 min、操作压力 1.5 bar、温度 35 °C (10 ku) 和 30 °C (3 ku)。超滤所得三个组分均具有 ACE 抑制活性, 其中分子量 <3 ku 的超滤物活性最高, 该组分与粗酶解物相比较, 总巯基和表面巯基含量显著降低 ($p < 0.05$), 同时表面疏水性显著提高 ($p < 0.05$), 热稳定性增加。因此, 卵白蛋白的粗酶解物经脱盐、超滤处理, 可以明显去除其中的盐分, 并得到 ACE 抑制活性较高的分离组分。

关键词: 卵白蛋白; ACE 抑制肽; 脱盐; 超滤

文章编号: 1673-9078(2015)10-203-209

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.10.034

Study on the Desalination and Ultrafiltration Treatment of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptides Derived from Ovalbumin and Their Physicochemical Properties

CHENG Yuan, ZHAO Ying, CHI Yu-jie, SUN Bo, WANG Jun-tong

(College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: The preparation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from ovalbumin, the main protein in egg whites, can provide a reference for their value-added application. The desalination of crude enzymatic hydrolysates from ovalbumin in this paper was performed by ion exchange chromatography, using the following desalting conditions: room temperature (25 °C), sample load of 20 mL, and flow rate of 8 BV/h. Under these conditions, the desalination rate of hydrolysates, nitrogen recovery rate, and ACE inhibition rate were 83.6%, 87.71%, and 80.31%, respectively. Two ultrafiltration membranes with molecular weight cut-offs of 10 ku and 3 ku were employed to separate the desalinated hydrolysates into three fractions: >10 ku, 3~10 ku, and <3 ku. The optimal operating conditions were as follows: ultrafiltration time of 40 min, operating pressure of 1.5 bar, and temperature of 35 °C for 10 ku or 30 °C for 3 ku. All three fractions showed ACE inhibitory activity, and the highest activity was found in the <3 ku fraction. Compared to crude hydrolysates, the total and surface hydrosulfuryl contents of the <3 ku fraction were significantly decreased ($p < 0.05$), the surface hydrophobicity was increased ($p < 0.05$), and thermal stability was improved. Therefore, desalination and ultrafiltration treatments can effectively reduce the salt content of crude enzymatic hydrolysates of ovalbumin and produce a fraction with high ACE inhibitory activity.

Key words: ovalbumin; angiotensin converting enzyme inhibitory peptide; desalination; ultrafiltration

血管紧张素转换酶 (Angiotensin I-Converting

Enzyme, ACE) 是一种分子量为 170 ku 的胞外酶和糖蛋白, 人体中的 ACE 包含 1277 个氨基酸残基, 有两个同源域、一个催化位点和一个 Zn^{2+} 结合区。血管紧张素转换酶抑制剂 (Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor, ACEI) 能够降低体循环血管阻力及其平均值、舒张压和收缩压。ACE 抑制肽 (Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor Peptide, ACEIP) 通常是

收稿日期: 2014-12-28
基金项目: 国家十二五支撑计划项目 (2012BAD33B03); 国家自然科学基金项目 (31470094)

作者简介: 程缘 (1990-), 女, 博士研究生, 研究方向: 农产品加工与贮藏
通讯作者: 迟玉杰 (1963-), 女, 博士, 博士生导师, 研究方向: 食品化学及农产品深加工

Enzyme, ACE) 是一种分子量为 170 ku 的胞外酶和糖蛋白, 人体中的 ACE 包含 1277 个氨基酸残基, 有两个同源域、一个催化位点和一个 Zn^{2+} 结合区。血管紧张素转换酶抑制剂 (Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor, ACEI) 能够降低体循环血管阻力及其平均值、舒张压和收缩压。ACE 抑制肽 (Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitor Peptide, ACEIP) 通常是

由蛋白质在温和条件下, 酶解动植物蛋白质而获得的一类具有 ACE 抑制活性的多肽物质。食源性 ACEIP 效果温和、专一、持久, 安全性高且对正常人群血压无影响^[1,2]。

我国是世界鸡蛋生产第一大国, 连续二十余年人均占有量位居世界第一。鸡蛋中的蛋白质与人体中蛋白质的氨基酸比例十分接近, 是食物中优质的蛋白质资源。卵白蛋白是鸡蛋中的主要蛋白质, 约占蛋清总重量的 54%, 等电点为 4.5。卵白蛋白中含有 385 个氨基酸残基, 分子量约为 45 ku, 且可以单独满足人体对于氨基酸的营养需求, 卵白蛋白产品在食品的加工中应用广泛, 大多作为一种功能性或者营养性原料^[3~4]。卵白蛋白的酶解既保持了其固有的营养功能, 又增加了一些生物活性。但是, 由于酶解过程的随机性和连续性, 粗酶解产物成分复杂, 而且含盐量较高, ACEIP 中过高的含盐量不仅不利于后续的深入研究和产品开发, 而且影响产品的风味和人体健康。因此, 需要对酶解产物进行脱盐、超滤处理^[5~6]。

离子交换色谱是利用固定相球形介质表面的活性基团, 将具有交换能力的离子基团结合在固定相上面, 这些离子基团可与流动相中的离子发生可逆性离子交换反应而进行分离的方法。该法可在中性条件下, 利用多肽的带电性不同分离纯化具有生物活性的多肽, 易于产业化。超滤是一种常见的分离方法, 由于其操作条件温和、成本较低、易于工业化生产, 所以在蛋白分离纯化中应用广泛。

本研究采用脱盐、超滤技术分离蛋白酶解物获得 ACE 抑制活性较高的组分。另外, 卵白蛋白酶解后, 由于其结构的变化可能导致理化性质的改变, 所以本文对卵白蛋白源 ACEIP 的理化性质进行评价, 为后续的研究奠定基础。本研究为卵白蛋白源 ACEIP 的工业化提供一定的可行性理论依据, 可有效提高卵白蛋白资源的利用率。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 主要材料

卵白蛋白, 北京索莱宝科技有限公司; 胰酶, 血管紧张素转化酶 (ACE, 兔肺), 马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL), 8-苯氨基-1-萘磺酸 (ANS, ≥97%), 5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB, ≥98%), 美国 Sigma 公司; 甲醇 (HPLC 级), 韩国 SK Chemicals 公司; 其他试剂均为分析纯。

1.1.2 主要仪器

TU-1800, 紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; FDU-1100 冻干机, 东京理化器械株式会社; Pyris6 差示量热扫描仪, 美国 Perkin Elmer; F-4500 荧光分光光度计, 日本 HITACHI 公司; Agilent1100 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; Vivaflow 50 型超滤装置, 超滤膜包 (10 ku, 3 ku), 德国 Sartorius AG 集团, Vivascience 公司。

1.2 方法

1.2.1 酶解制备 ACEIP

卵白蛋白源 ACEIP 参照张瑞东^[7]等确立的酶解条件。

1.2.2 酶解物的脱盐处理

将经过酸、碱、水处理的阴阳离子交换树脂 (001×7 (732), 201×7 (717)) 分别装入两支层析柱中 (60×1.5 cm), 在室温 25 °C 下以恒流泵分别将 20 mL 粗酶解液上清液以 4、6、8 和 10 BV/h 的双蒸馏水依次流经阳离子、阴离子交换树脂脱盐, 收集流出液, 测定氮回收率及脱盐率, 将不同流速卵白蛋白酶解液收集, 冻干, 测定其 ACE 抑制率。

1.2.3 酶解物的超滤分离

超滤过程的特性指标主要是膜通量 (J)。选取截留量为 10 ku、3 ku 的超滤膜包对卵白蛋白酶解液分级, 并根据其分子量大小将酶解液分为 F1 (>10 ku)、F2 (3~10 ku) 和 F3 (<3 ku) 三个部分, 考察超滤时间、料液温度 (25 °C、35 °C、40 °C) 和超滤系统的压力 (1.0 bar、1.5 bar、2.0 bar、2.5 bar) 对两种超滤膜膜通量的影响。同时测定各组分的氮回收率及 ACE 抑制活性。膜通量 (J) 用单位时间内通过单位膜面积的透过物的体积表示 ($L/m^2 \cdot h$)。

$$J(L/m^2 \cdot h) = \frac{V}{A \cdot T}$$

式中, V : 滤过液体积, L; A : 超滤膜面积, $5.0 \times 10^{-3} m^2$; T : 超滤时间, h。

超滤后滤过液中肽的含量用氮回收率表示。

$$\text{超滤氮回收率}(\%) = \frac{C_{U1} \cdot V_{U1}}{C_0 \cdot V_0} \times 100$$

式中, C_0 : 超滤前酶解液浓度, g/mL; V_0 : 超滤前酶解液体积, mL; C_{U1} : 滤过液浓度, g/mL; V_{U1} : 滤过液体积, mL。

1.2.4 ACE 抑制活性和半抑制浓度的测定

ACE 抑制活性的测定采用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC 法)^[8-9], 并略加以改进。取 20 μ L ACE (0.1 U/mL) 依次加入 100 μ L 5 mmol/L HHL (硼酸盐缓冲液, 含 0.3 mol/L NaCl, pH=8.3)、40 μ L 样液 (1

mg/mL), 在 37 ± 1 °C 反应 1 h, 加入 50 μ L 1.0 mol/L HCl 终止反应, 反应液经 0.45 μ m 滤膜微滤后利用反相高效液相色谱法检测马尿酸含量。对照试验利用 40 μ L 硼酸盐缓冲液代替样液; 空白试验首先利用 50 μ L 1 mol/L HCl 将 ACE 灭活。抑制率计算公式如下。

$$\text{ACE 抑制率, \%} = \frac{A_c - A_s}{A_c - A_b} \times 100$$

式中, A_s : 样液中马尿酸的峰面积 (mAU S); A_c : 对照组马尿酸的峰面积 (mAU S); A_b : 空白组马尿酸的峰面积 (mAU S)。

反相色谱柱的测定条件为: ZORBAX SB-C₁₈ 柱, 规格为 4.6×250 mm, 柱温 35 °C; 检测波长: 228 nm; 流动相: 甲醇/水=30/70(含 0.1% TFA, 三乙胺调至 pH 3.0); 流速: 1 mL/min。进样量: 20 μ L。

半抑制浓度定义为 ACE 抑制率为 50% 时所需要的样品的浓度 (IC_{50} , mg/mL)。根据样品测得的 ACE 抑制率, 以浓度为横坐标, ACE 抑制率为纵坐标绘制曲线。使用 SAS 6.12 对数据拟合, 从拟合方程中计算 ACE 抑制率为 50% 时对应的浓度即为样品的半抑制浓度。

1.2.5 ACEIP 理化性质的测定

(1) 表面巯基和总巯基含量的测定

表面巯基和总巯基含量采用 Ou 等和 Beveridge 等^[10-11]的方法, 并略加修改, 具体操作如下:

缓冲液 A (pH=8.0): 2.6 g Tris-Base、3.45 g 甘氨酸、0.3 g EDTA-Na₂ 溶于 100 mL 双蒸水中, 并定容至 250 mL; 缓冲液 B (pH=8.0): 1.0 g SDS 用缓冲液 A 溶解后定容至 200 mL; 缓冲液 C (pH=8.0): 48 g 尿素用缓冲液 B 溶解后定容至 100 mL; DTNB 试液: 80 mg DTNB 用缓冲液 B 溶解后定容至 20 mL;

样品制备液: 取 10 mg 样品两份, 分别溶于 5 mL 缓冲液 B、C 中 (s_1 、 s_2), 于 40 °C 保温 30 min。测定: 取样品制备液 s_1 、 s_2 各 5.0 mL, 加入 0.125 mL DTNB 试液, 25 °C 显色 10 min。于 412 nm 测定吸光值 (As_1 、 As_2), 以不含样品的缓冲液 B、C 为空白。

计算: 样品中的表面巯基和总巯基含量按下述公式表示:

$$\text{表面巯基}(\mu\text{mol SH/g}) = \frac{73.53 \times A_{s1} \times f}{C}$$

$$\text{总巯基}(\mu\text{mol SH/g}) = \frac{73.53 \times A_{s2} \times f}{C}$$

式中, f : 稀释因子, 5.125; μ M SH/gC: 样品浓度, 2.0 mg/mL。

(2) 表面疏水性的测定

样品的表面疏水性采用荧光探针法测定^[12], 并略加修改。将样品用 0.1 mol/L pH=7.0 PBS 分别配制一系列浓度的蛋白溶液 (范围为 0.01~0.4 mg/mL), 分别取 4.0 mL 试液加入 20 μ L 8.0 mmol/L ANS 的 PBS 溶液 (0.1 mol/L, pH=7.0)。25 °C 保温 1 h。以 PBS 溶液为空白测定样品的荧光强度, 以荧光强度对样品浓度作曲线, 并进行线性回归拟合, 直线斜率即为酶解物的表面疏水性。荧光条件如下: 激发波长: 370 nm; 发射波长: 509.4 nm ($\lambda=400\sim 600$ nm 扫描获得); 狭缝宽度: 5 nm。

(3) 差示扫描量热的分析

准确称取 5~6 mg 样品于铝皿中压片密封, 以空铝皿作对照。温度时间设置如下: 30.0 °C 保留 1.0 min; 30.0~150.0 °C, 升温速率 10 °C/min; 150 °C, 停留 1.0 min; 150.0~30.0 °C, 冷却速率 10 °C/min。通过仪器的控制软件计算变性热焓 (ΔH) 和变性温度 (T_d)。

1.2.6 统计分析

本研究涉及的试验均设计三次平行, 结果用平均值及标准偏差形式表示 ($\bar{x} \pm s$), 组间差异显著性采用 ANOVA 分析 (显著 $p < 0.05$, 极显著 $p < 0.01$)。数据分析利用 spss20.0 的统计功能处理, 图表采用 Origin 8.6 软件绘制。

2 结果与分析

2.1 ACEIP 脱盐效果的评价

表 1 洗脱流速对水解物脱盐产品指标的影响

Table 1 Effect of elution flow rate on specification of desalinated hydrolysates

洗脱流速/(BV/h)	氮回收率/%	脱盐率/%	蛋白含量/%	灰分/%	ACEI/%
粗酶解液	80.45±0.81 ^b	-	80.45±0.81 ^b	9.65±0.38 ^a	77.38±1.41 ^b
4	44.83±1.54 ^d	79.7±1.84 ^c	78.54±0.92 ^c	2.83±0.77 ^b	78.56±1.19 ^{ab}
6	66.25±1.91 ^c	81.5±1.05 ^{bc}	81.92±1.21 ^b	2.34±0.81 ^b	79.75±1.51 ^{ab}
8	87.71±2.09 ^a	83.6±1.22 ^{ab}	83.50±0.33 ^a	1.93±0.91 ^b	80.31±1.14 ^a
10	88.36±1.46 ^a	84.5±1.40 ^a	83.72±0.71 ^a	1.79±1.15 ^b	80.49±0.91 ^a

注: 在同一列数据中不同的字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

在室温 25 °C 条件下, 20 mL 酶解物上清液经过不

同洗脱流速脱盐后各项指标见表 1。不同洗脱流速对

产品的氮回收率影响较大,对脱盐率和 ACE 抑制率均有一定的影响。洗脱流速主要通过影响溶质在树脂内部的扩散来影响树脂的吸附性能^[6]。洗脱流速越高,蛋白质及肽分子与树脂的接触时间越短,损失越少。总体看来,4~10 BV/h 的洗脱流速均能够达到脱盐的目的,10 BV/h 的综合指标略高于 8 BV/h,但差异不显著 ($p>0.05$)。考虑到洗脱液成本,选择室温 25 °C、20 mL 上清液用量、8 BV/h 对粗酶解液脱盐。

2.2 ACEIP 的超滤分离条件分析

2.2.1 操作时间对膜通量影响

控制室温 25 °C、料液体积 500 mL、压力 1.0 bar,先后经 10 ku、3 ku 超滤膜处理脱盐后的卵白蛋白粗酶解物,在 10~80 min 超滤时间内,以膜通量为指标评价超滤效果,由图 1a 可知,10 ku 超滤膜的膜通量均高于 3 ku 超滤膜。随着超滤时间的增加,两种超滤膜的膜通量呈现较典型的超滤衰减模式。其中,超滤前 20 min,膜通量随时间延长下降较明显。20~40 min 期间,膜通量下降趋势较为平缓。40~50 min 期间,两膜的膜通量下降趋势又有所增加,但均低于 10~20 min 期间的膜通量变化。这是由于在超滤初始阶段膜表面及孔隙的阻力小,但随着超滤进行,蛋白及肽分子在超滤膜表面形成凝胶层并产生浓差极化现象,超滤阻力增大,导致膜通量迅速下降。随着时间的延长,膜表面凝胶层缓慢增厚并保持动态稳定,阻力增加相对平稳使膜通量变化基本趋于稳定^[5]。考虑较短时间的超滤会影响超滤液的收集,选定超滤 40 min 后,对膜进行清洗处理。

2.2.2 操作压力对膜通量影响

控制室温 25 °C、料液体积 500 mL、超滤时间 40 min,先后经 10 ku、3 ku 超滤膜处理脱盐后的卵白蛋白粗酶解物。以膜通量为指标,在操作压力 1.0、1.5、2.0、2.5 bar 条件下考察超滤效果,由图 1b 可知,10 ku 超滤膜的膜通量均高于 3 ku 超滤膜。随着压力的升高,膜通量均有所上升,其中 10 ku 在 1.5 bar 后上升较明显。当操作压力增大时,膜表面凝胶层内的多肽与切向流动及扩散的多肽呈动力学平衡,随后持续增加的压力被积累的凝胶层阻力抵消,而过高的压力导致多肽在膜孔隙中沉积,使膜的有效面积减小,甚至造成膜孔隙堵塞等不可逆破坏。因此,为保持超滤操作稳定运行并降低泵的转速,选定操作压力为 1.5 bar。

2.2.3 操作温度对膜通量影响

控制料液体积 500 mL、超滤时间 40 min、操作压力 1.5 bar,先后经 10 ku、3 ku 超滤膜分别处理脱盐后的卵白蛋白粗酶解物,以膜通量为指标,在操作温

度 20、25、30、35、40、45 °C 时考察超滤效果,如图 1(c),10 ku 超滤膜的膜通量均高于 3 ku 超滤膜,且两种膜的通量均随着脱盐液温度升高而升高。这是由于料液随着温度的升高,粘度下降,减轻了浓差极化现象并增加传质系数,但过高的温度会损伤超滤膜及其壳体和粘合剂^[13]。从防止温度对肽稳定性的影响和节约能源角度考虑,分别选择 30 °C 和 35 °C 作为 3 ku 和 10 ku 超滤分离卵白蛋白 ACEIP 的料液温度。

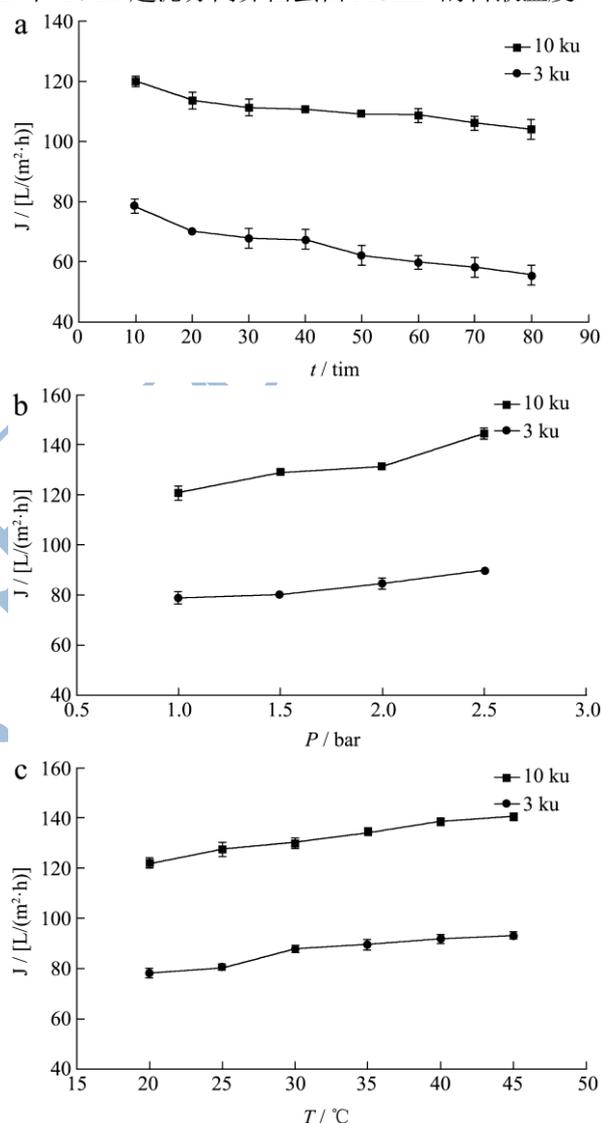


图1 超滤条件对膜通量的影响

Fig.1 Effect of ultrafiltration conditions on membrane flux

注: a: 操作时间对膜通量影响; b: 操作压力对膜通量的影响; c: 料液温度对膜通量的影响。

2.2.4 超滤物的 ACE 抑制活性

根据上述超滤条件的实验结果,在超滤时间 40 min、操作压力 1.5 bar、料液温度 35 °C (10 ku) 和 30 °C (3 ku) 条件下得到截留分子量为 <3 ku、3~10 ku、>10 ku 的三个组分。分别冻干,测定其 ACE 抑制活性,并与粗酶解物上清液及离心沉淀的冻干粉进

行比较如图 2。不同阶段卵白蛋白酶解产物的 ACE 抑制活性差异较大, 分子量 <3 ku 的超滤物对 ACE 抑制活性的贡献最大, 与其他学者的研究结果类似。目前报道的各种 ACEIP 中, 其分子量均较小, 氨基酸残基的数目一般在 15 个以内^[2]。粗酶解超滤物的离心沉淀物几乎没有活性, 该部分主要为未酶解的卵白蛋白和酶, 可见通过酶解释放的多肽具有 ACE 抑制活性。

2.3 ACEIP 的成分及氮回收率的分析

在酶解、脱盐、超滤过程中, 卵白蛋白 ACEIP 冻干粉的蛋白含量、灰分、氮回收率测定及计算结果见表 2。不同分离阶段卵白蛋白 ACEIP 的组成。卵白蛋白粗酶解液经过脱盐后, 蛋白含量及氮回收率均有所提高, 灰分含量明显下降; 两步超滤后所得到的 <3

ku 组分蛋白含量下降, 这可能由于在小分子组分中, 盐分含量较高, 导致蛋白质含量相对偏低。

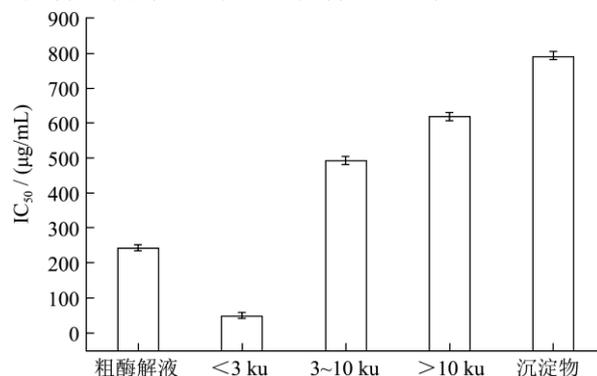


图 2 粗酶解物及超滤产物的 IC₅₀ 值 (µg/mL)

Fig.2 IC₅₀ values (µg/mL) of ultrafiltration products and crude hydrolysates of ovalbumin

表 2 卵白蛋白 ACEIP 成分分析及氮回收率

Table 2 Composition and nitrogen recovery rate of ovalbumin ACEIP

指标	蛋白/(g/100 g)	氮回收率/%	灰分/(g/100 g)	水分/(g/100 g)
粗酶解液	80.45±0.81 ^{cd}	-	3.14±0.21 ^b	-
沉淀物	82.09±1.08 ^{bc}	49.80±0.47 ^b	2.87±0.35 ^{bc}	2.54±0.16 ^c
上清液	72.95±0.65 ^e	45.01±0.82 ^c	10.84±0.53 ^a	3.08±0.21 ^a
脱盐液	83.21±0.94 ^b	51.33±0.60 ^a	2.28±0.25 ^d	2.35±0.09 ^c
>10 ku	85.35±1.36 ^a	26.32±0.15 ^d	2.02±0.17 ^d	2.68±0.24 ^{bc}
3~10 ku	83.13±1.15 ^b	25.64±0.10 ^d	2.10±0.19 ^d	2.72±0.31 ^{bc}
<3 ku	79.27±1.37 ^d	24.45±0.31 ^e	2.42±0.10 ^{cd}	3.17±0.34 ^{ab}

注: 在同一列数据中不同的字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

2.4 ACEIP 的理化特性分析

2.4.1 表面巯基和总巯基

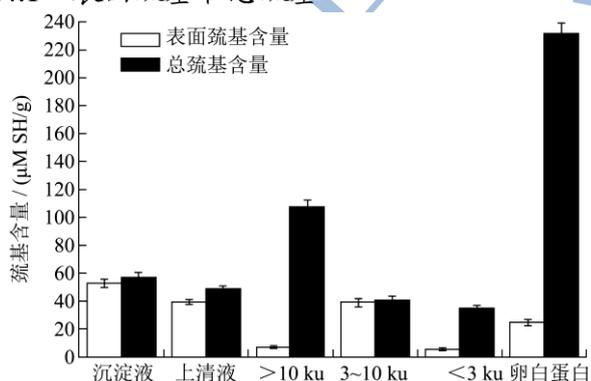


图 3 酶解物的表面巯基和总巯基含量

Fig.3 Surface and total sulfhydryl contents of hydrolysates

粗酶解物上清液、沉淀物、分子量 >10 ku、3~10 ku 及 <3 ku 的冻干粉的表面巯基和总巯基含量测定结果见图 3。总巯基含量代表了蛋白或多肽分子中的分子表面和内部巯基-SH 的总和, 而表面巯基含量是针对分子暴露在外的巯基-SH 而言。由图 3 可以看出, 卵白蛋白的总巯基含量最大, 在酶解物中分子量 >10 ku

的组分总巯基含量最高, 可见含硫氨基酸主要存在于该组分当中。卵白蛋白的表面巯基较小, 酶解过程中由于更多的巯基暴露, 酶解液中表面巯基含量整体有所增加, 其中分子量 3~10 ku 组分表面巯基含量最大, 而分子量 >10 ku 和 <3 ku 组分的表面巯基含量均较低, 可见在分子量较大和较小的组分中, 含硫氨基酸主要存在于蛋白或多肽链内部, 而在分子量 3~10 ku 组分中更多的暴露出来。

2.4.2 表面疏水性

粗酶解物上清液、沉淀物、分子量 >10 ku、3~10 ku 及 <3 ku 的冻干粉的表面疏水性的测定结果见图 4。可以看出, 酶解的结果是粗酶解物上清液和沉淀物的疏水性均有所下降, 其中沉淀物相对上清液具有较高的疏水性指数。随着超滤的进行, 分子量 >10 ku 和 <3 ku 的组分疏水性均有所增大, 其中分子量 >10 ku 组分的表面疏水性最大 ($p < 0.05$), 而分子量 3~10 ku 的组分有所下降。在蛋白质酶解初期, 蛋白质分子内部的疏水基团暴露, 疏水性会升高, 随着酶解的进行, 表面疏水性下降主要是由于更多的亲水氨基酸暴露于表面^[14]。所以, 酶解后组分的表面疏水性主要取决于

表面疏水氨基酸与亲水氨基酸的比值, 由图 4 可见, 分子量>10 ku 和<3 ku 组分表面的疏水氨基酸含量较高, 而分子量 3~10 ku 的组分表面亲水氨基酸含量较高。

2.4.3 热变性特征

不同酶解物的变性温度、变性温度范围、变性焓的结果见表 3。可见, 除卵白蛋白酶解后沉淀物的变性温度低于卵白蛋白外, 其余酶解物的变性温度均高于市售卵白蛋白。其中, 粗酶解物上清液、分子量>10 ku 和<3 ku 的 ACEIP 变性温度在一个很窄的温度范围内 (20~25 °C), 这说明它们的热稳定性更高, 有很高的协同性。而且肽的变性热焓也比分离蛋白高得多, 这也说明水溶性卵白蛋白肽在酶解过程中变性较少且

分子解聚所需的能量较高。

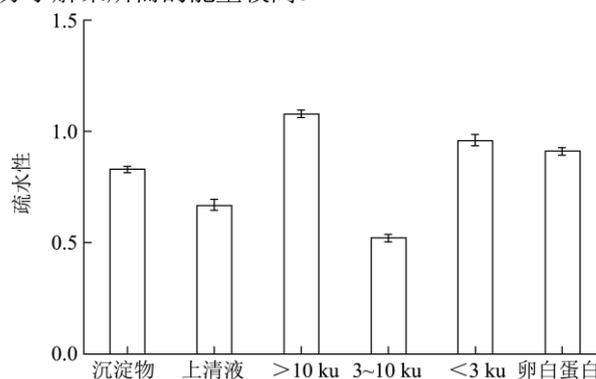


图 4 酶解物的表面疏水性

Fig.4 Surface hydrophobicity of hydrolysates

表 3 卵白蛋白酶解物的变性温度和变性焓

Table 3 Differential scanning calorimetry data of ovalbumin ACEIP

样品	沉淀物	上清液	>10 ku	3~10 ku	<3 ku	卵白蛋白
T _d /°C	105.77	120.80	101.85	113.20	117.44	107.43
T _d 范围	90~120	110~130	90~110	90~130	100~125	105~110
焓变/(J/g)	110.6	182.4	129.5	110.3	152.3	93.7

3 结论

本文研究脱盐和超滤处理卵白蛋白源蛋白酶解物, 分析了分离纯化各组分的理化性质。考虑到洗脱液成本和效果, 确定在室温 25 °C 条件下, 上样体积 20 mL、8 BV/h 对粗酶解液脱盐。通过对截留量分析, 选定超滤参数为: 时间 40min, 操作压力为 1.5 bar, 温度 30 °C。根据此超滤条件获得分子量<3 ku 的组分 ACE 抑制活性最高, 此组分与粗酶解物比较, 总巯基和表面疏基含量均降低, 尤其是表面疏基含量降低明显, 表面疏水性提高, 热稳定性增加。可见, 脱盐和超滤处理卵白蛋白源酶解物有利于进一步的实验研究和产品开发。

参考文献

[1] Ni H, Li L, Guo S S. Isolation and Identification of an angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from yeast [J]. Current Analytical Chemistry, 2012, 8(1): 180-185

[2] Chen C, Chi YJ, Zhao MY, et al. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate [J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21(1): 27-34

[3] Chen C, Chi YJ. Antioxidant, ACE inhibitory activities and functional properties of egg white protein hydrolysate[J]. Journal of Food Biochemistry, 2012, 36(4): 383-394

[4] Huang XQ, Tu ZC, Wang H, et al. Increase of ovalbumin

glycation by the maillard reaction after disruption of the disulfide bridge evaluated by liquid chromatography and high resolution mass spectrometry [J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2013, 61: 2253-2262

[5] 任增超,左伟,周春霞,等.超滤对罗非鱼下脚料蛋白酶解物功能特性的影响[J].现代食品科技,2012,28(9):1133-1135

REN Zeng-chao, ZUO Wei, ZHOU Chun-xia, et al. Effect of ultrafiltration on functional properties of protein hydrolysate from tilapia by-products [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(9): 1133-1135

[6] 夏光华,申铨日,酒志强,等.大孔树脂对罗非鱼皮胶原蛋白抗氧化肽脱盐作用的研究[J].现代食品科技,2013,29(5): 1052-1056

XIA Guang-hua, SHEN Xuan-ri, JIU Zhi-qiang, et al. Desalination of macroporous absorption resin on antioxidant peptides from tilapia skin collagen [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 1052-1056

[7] 张瑞东,迟玉杰,阮长青.酶解卵白蛋白制备 ACE 抑制肽的工艺研究[J].食品科学,2010,31(14):1-4

ZHANG Rui-dong, CHI Yujie, RUAN Chang-qing. Optimization of eggwhite protein enzymolysis for the preparation of ACE inhibitory peptides [J]. Food Science, 2010, 31(14): 1-4

[8] Cushman D W, Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung [J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20 (7): 1637-

- 1648
- [9] Kim Y K, Yoon S, Yu D Y, et al. Novel angiotensin- I -converting enzyme inhibitory peptides derived from recombinant human α_{s1} -casein expressed in *Escherichia coli* [J]. Journal of Dairy Research, 1999, 66 (3): 431-439
- [10] Ou S Y, Kwok K C, Kang Y J, et al. An improved method to determine SH and -S-S- group content in soymilk protein [J]. Food Chemistry, 2004, 88 (2): 317-320
- [11] Beveridge T, Toma S J, Naka S, et al. Determination of SH- and SS-groups in some food proteins using Ellman's reagent [J]. Journal of Food Science, 1974, 39: 49-51
- [12] Uruakpa F O, Arntfield S D. Surface *hydrophobicity* of commercial canola proteins mixed with kappa-carrageenan or guar gum [J]. Food Chemistry , 2006, 95: 255-263
- [13] 田万敏,马海乐,骆琳,等.超滤技术分离双低油菜 ACE 抑制肽及其性能研究[J].中国粮油学报,2011,26(9):87-91
- TIAN Wan-min ,MA Hai-le, LUO Lin, et al. Study on purification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from double-low rapeseed by ultrafiltration and its properties [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2011, 26(9): 87-91
- [14] Zheng XQ, Wang JT, Liu XL, et al. Effect of hydrolysis time on the physicochemical and functional properties of corn glutelin by Protamex hydrolysis [J]. Food Chemistry, 2015, 172: 407-415