

发酵乳中 ACE 抑制肽的超滤工艺研究

林璐^{1,2}, 潘道东^{1,2,*}

(1.东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030;

2.南京师范大学食品科学与营养系, 江苏 南京 210097)

摘要: 本实验采用超滤法分离发酵乳中的 ACE 抑制肽, 研究了超滤工艺的主要技术参数。结果表明: 截留分子量为 6000Da 的超滤膜, 在压力 0.10MPa, 温度 25℃ 条件下, 能得到具有较高 ACE 抑制活性的超滤液。

关键词: 发酵乳; 超滤; ACE 抑制肽

Ultrafiltration Technology of ACE Inhibitory Peptides Derived from Fermented Milk

LIN Lu^{1,2}, PAN Dao-dong^{1,2,*}

(1.Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2.Department of Food Science and Nutrition, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: In this experiment, the ultrafiltration technology of ACE inhibitory peptides derived from fermented milk was studied. The results showed that the higher ACE inhibitory activity solution with ACE inhibitory peptides were obtained with the ultrafiltration membrane of 6000 Da molecular weight cutoff at the pressure of 0.10 MPa and the temperature of 25 °C.

Key words: fermented milk; ultrafiltration technology; ACE inhibitory peptides

中图分类号: Q816

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)12-0172-04

ACE(angiotensin-I converting enzyme, EC3.4.15.1, 简称 ACE)抑制肽是一类具有抑制 ACE 活性的多肽物质, 这些多肽的氨基酸和肽链长度各不相同, 但链长一般为 3~10 个氨基酸^[1], 分子量在 300~10000 之内。ACE 抑制肽分子量都比较小, 因此, 选择经济合理的分离方法富集 ACE 抑制肽是必要的。

超滤技术是膜分离技术的一个重要分支, 广泛应用于医药、食品、化工及废水处理等领域。超滤是借助于人工合成的、具有选择透过性的膜, 在常温下以膜两侧的压力差为推动力, 基于物质能否透过膜或透过膜的速率不同, 使液体中各组分得以分离、分级、提纯和富集的技术^[2]。适应于大分子物质(蛋白质、多糖、

收稿日期: 2007-07-26

* 通讯作者

基金项目: 乳品科学教育部重点实验室主任基金项目(KLDS2006-10A); 国家高技术研究发展计划项目

(2007AA10Z320); 江苏省自然科学基金项目(BK2005137); 江苏省高校高新技术产业发展项目(JHB06-11)

作者简介: 林璐(1982-), 女, 硕士生, 主要从事乳品科学研究。

- | | |
|--|---|
| <p>[1] BUREMMER J H. Aroma substance of citrus fruits and their biogenesis [M]. In: Drawertfed; Symposium on Fragrance and Flavour Substances, Verlag Hans Carl: Nurnberg Germany, 1975: 167-176.</p> <p>[2] AHMED D M, DENNISON R A, SHAW P E. Effect of selected oil and essence volatile components on flavor quality of pumpout orange juice [J]. J Agric Food Chem, 1978, 26(2): 368-372.</p> <p>[3] 宛晓春, 汤坚. 柠檬汁中游离态和键合态萜类化合物的研究[J]. 食品与发酵工业, 1991(4): 31-37.</p> <p>[4] 孙爱东, 葛毅强, 阎红, 等. 甜橙键合态芳香组分的酶(酸)解解离方法研究[J]. 食品与发酵工业, 2000, 27(3): 33-36.</p> <p>[5] 孙爱东, 葛毅强, 倪元颖, 等. 不同来源的增香酶酶解橙汁(皮)中键合态主要芳香物质的效果分析[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(11): 1-4.</p> | <p>[6] GUNATA Y Z, BAYANOVE C L, BAUMES R L, et al. The aroma of grapes. I. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components [J]. Journal of Chromatography, 1985, 331: 83-90.</p> <p>[7] SELLI S, CABAROGLU T, CANBAS A. Volatile flavour components of orange juice obtained from the cv. Kozan of Turkey [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2004, 17: 789-796.</p> <p>[8] 王华夫, 游小青. 茶叶中 β-葡萄糖苷酶活性的测定 [J]. 中国茶叶, 1996(3): 16-17.</p> <p>[9] 李远华. β-葡萄糖苷酶的研究进展(综述) [J]. 安徽农业大学学报, 2002, 29(4): 421-425.</p> <p>[10] 许品, 张永忠, 张艳梅, 等. β-葡萄糖苷酶的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2005, 26(6): 183-186.</p> |
|--|---|

胶体等)与小分子组分及溶剂的分离^[3]。在蛋白质及生物活性物质的浓缩与分离方面具有重要的意义。

本研究利用超滤法的机械筛分原理,依据膜的截留分子量分离纯化发酵乳乳清中的 ACE 抑制肽,不仅具有分离过程不发生相变、工艺流程短、成本低等优点,而且易于实现工业化大生产^[4-5]。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

菌种:瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus* ATCC150019) 本实验室保藏。UF-4050 型超滤装置 上海摩速科学器材有限公司;生化培养箱 广东省医疗仪器厂;超净工作台 上海浦东跃欣科学仪器厂;高速冷冻离心机 赛特湘仪离心机仪器有限公司;PHS-3C 型精密 pH 计 上海雷磁分析仪器厂;Hippury-L-histidyl-L-leucine(Hip-His-Leu) Sigma 公司;ACE(来源于兔肺)日本 Wake Pure Chemicals 公司。

1.2 方法

1.2.1 膜通量的测定

膜通量是用单位内通过单位膜面积的透过液的数量来表示的。在一定压力、料液流速、温度等条件下,取样,然后记录一定时间内的透过液。按下式计算膜通量^[3]。

$$J(\%) = \frac{V}{T \times A} \times 100$$

式中, J 为膜通量(L/m²·h); V 为取样体积(L); T 为取样时间(h); A 为有效膜面积(m²)。

1.2.2 超滤工艺参数对膜通量的影响

考察不同操作压力(0.02、0.06、0.10、0.14、0.18MPa),不同的料液温度(5、25、40℃),不同的操作时间对超滤膜膜通量的影响,确定最佳工艺参数。

1.2.3 蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝法^[6]。

1.2.4 肽含量的测定

取 2.5ml 样品溶液,加入 2.5ml 10% 的三氯乙酸水溶液与之混合反应,静置 10min,在 4000r/min 下离心 15min,然后用缩脲法测定^[7]。

1.2.5 游离氨基酸的测定

采用甲醛滴定法^[6]。

1.2.6 抑制 ACE 活性的测定^[8]

用含有 0.3mol/L NaCl 的 0.1mol/L 硼酸盐缓冲液(pH8.3)将 Hip-His-Leu 配成 5.0mmol/L 的溶液。在试管中分别加入 200μl 的 5.0mmol/L Hip-His-Leu 溶液和 80μl 的样品于 37℃ 下保温 3min 后,再加入 20μl ACE 溶液(溶

解在蒸馏水中,活力为 0.1U/ml),混匀后在 37℃ 下保温 30min,再加入 250μl 1N 的盐酸溶液以终止反应,再加入 1.7ml 醋酸乙脂,经 15s 振荡混匀后,静置 5min,用移液管吸取 1.0ml 的醋酸乙脂层,真空冷冻干燥后,加入 1.0ml 蒸馏水,混匀后在 228nm 处测定吸光度。

在上述条件下,ACE 抑制率=[(B-A)/(B-C)]×100%。

式中, A 为含有发酵乳乳清(或溶于蒸馏水中的多肽溶液)和 ACE 溶液的吸光度; B 为不含有发酵乳乳清(或溶于蒸馏水中的多肽溶液),但含有 ACE 溶液的吸光度; C 为含有脱脂乳乳清(或蒸馏水),但不含 ACE 溶液的吸光度。

2 结果与分析

2.1 膜的选择

在相同压力(0.10MPa)、相同温度(25℃)下用截留分子量不同的膜对发酵乳清进行超滤,比较膜通量。

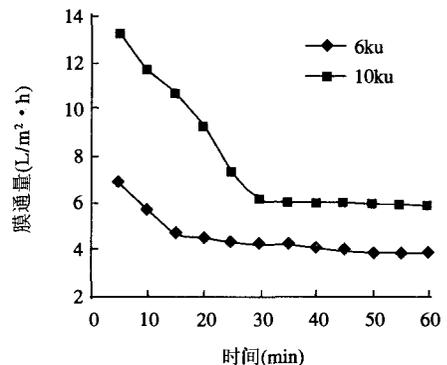


图1 不同截留分子量的膜对通量的影响

Fig.1 Effects of membranes of different molecular weight on flux

表1 超滤对 ACE 抑制活性的影响

Table 1 Effects of ultrafiltration on inhibition activity of ACE

膜分子量(ku)	ACE 抑制活性(%)		
	母液	超滤液	残液
6	57.69	75.58	44.48
10	57.69	65.08	56.67

由图 1 可知,在相同条件下,用不同截留分子量的膜对发酵乳进行超滤,对膜通量有不同的影响。分子量为 10ku 的膜在超滤的最初阶段,通量衰减很快,后来通量衰减较慢,平均膜通量为 7.82L/m²·h;分子量 6ku 的膜的通量比 10ku 的变化缓慢,平均膜通量为 4.16L/m²·h。10ku 膜的平均膜通量比 6ku 膜的平均膜通量高 3.66L/m²·h。由表 1 可得出在相同条件下分别用截留分子量为 10ku 和 6ku 的膜对超滤液进行超滤,ACE 抑制活性分别比原来提高了 7.39% 和 17.89%。从工

业化生产考虑, 可选用通量高的膜, 因为高通量的膜, 速度快, 系统内的最小残余体积减小, 膜的吸附量也减少, 易于工业化生产; 而从实验室研究考虑, 可选用通量较低的膜, 因为通量较低的膜, 可以得到较高活性的 ACE 抑制肽。因此, 本试验选用截留分子量为 6ku 的膜。

2.2 操作压力对膜通量的影响

压力是影响膜通量的一个重要因素。本试验在温度 25℃、6ku 滤膜条件下考察了滤膜两侧压力差对膜通量的影响。一般情况, 滤液的压差越大, 滤速越快, 通量也越大。但浓差极化是膜操作过程中一个不可忽视的影响因素。

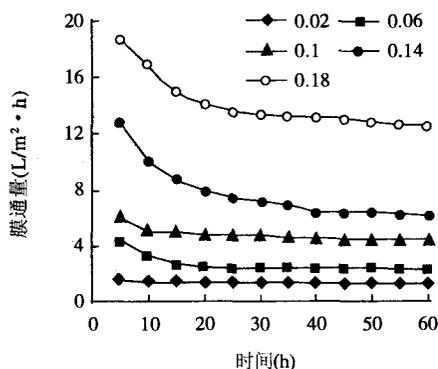


图2 不同操作压力对膜通量的影响

Fig.2 Effects of pressure on flux of the membrane

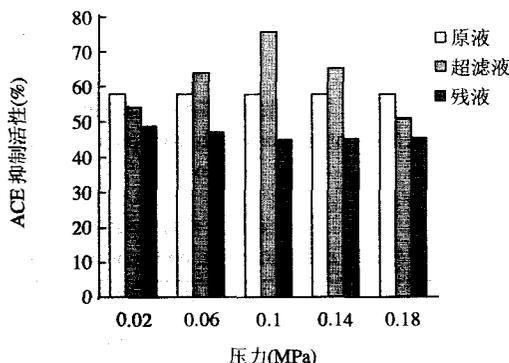


图3 操作压力对 ACE 抑制活性的影响

Fig.3 Effects of pressure on ACE inhibitory activity

从图2中可知, 在不同的时间段内, 随着操作压力的升高, 膜通量增加。在超滤初期, 在 0.14MPa 到 0.18MPa 的压力范围内, 膜通量随时间的增加显著下降, 30min 后下降缓慢。在 0.02MPa 到 0.10MPa 之间, 膜通量随时间的增加缓慢下降。这是因为在操作过程中, 操作压力增大, 迫使溶液中的溶质和溶剂穿过膜的速率增加, 其中溶剂基本上是畅通无阻, 可以全部穿过, 但是对溶质来说, 由于膜的障蔽作用, 使其绝

大部分无法通过而很快被截留在膜的高压侧表面上, 当压力达到某一临界值时, 膜面凝胶层逐渐形成并增厚, 膜通量不再增大。而图3表示不同操作压力对 ACE 抑制活性的影响。从图中可以看出, ACE 抑制活性随着操作压力的增大, 呈先上升后下降的趋势。这是因为随着操作压力的增大, 膜通量增大, 通过膜的 ACE 抑制肽也相应的增多, 因此, 超滤液的 ACE 抑制活性也增大。而当操作压力超过一定限度时, 料液和泵以及料液和膜之间的剪切力对 ACE 抑制肽有一定的影响, 使部分的 ACE 抑制肽失活, 因此, ACE 抑制活性呈下降趋势。所以本试验选择操作压力为 0.10MPa。

2.3 操作温度对膜通量的影响

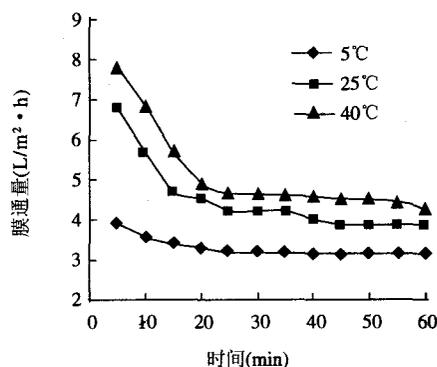


图4 操作温度对膜通量的影响

Fig.4 Effect of temperature on flux of the membrane

本实验选择 5、25 和 40℃ 三个温度来研究温度对膜通量的影响, 结果如图 4。图 4 显示料液膜通量随着温度的升高而增大, 高温料液的膜通量始终高于低温料液的膜通量。但随着超滤的进行, 温度为 25℃ 和 40℃ 的膜通量差别越来越小。这是因为温度升高, 料液黏度下降, 料液中各种分子的活化能提高, 扩散系数和传质系数增大, 浓度极差减弱^[5], 膜通量也随之增大。但较高的温度会影响肽的生物活性, 又因为蛋白质和肽都有很强的表面活性, 极易吸附在膜表面, 造成膜的污染, 它们的吸附性随着温度的升高而增大, 而且较高的温度需要耗费较多的能源, 还会缩短膜的寿命。因此本实验选择 25℃ 为操作温度。在此温度下, 可以保持肽的生物活性, 防止微生物引起的膜污染。

2.4 操作时间对膜通量的影响

操作时间也是影响超滤速度的一个重要的因素。如图 5 所示, 对于截留分子量为 6ku 的膜呈现较典型的超滤衰减模式, 其曲线比较平滑, 在超滤进行的前 20min, 膜通量随着时间的延长快速下降; 20min 以后, 料液的膜通量变化不是很大, 趋于稳定。这是因为, 在超滤初期, 由于浓度极差化, 膜表面的凝胶层增厚, 导致了料液的膜通量下降。这说明在此条件下可以进行

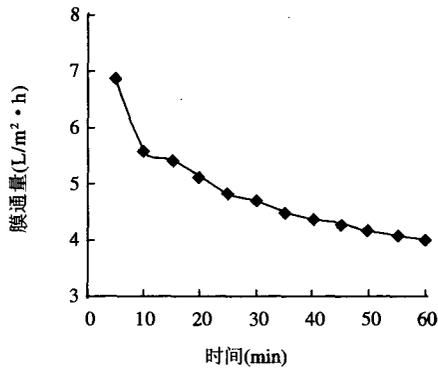


图5 操作时间对膜通量的影响
Fig.5 Effects of time on flux of membrane

表2 超滤前后溶液的变化
Table 2 Effects of ultrafiltration on solution

	原液	超滤液	残液
蛋白质(mg/ml)	0.684	0.574	0.974
肽(mg/ml)	0.043	0.040	0.051
氨基酸(mmol/ml)	0.023	0.021	0.024

长时间的操作。

2.5 超滤对发酵乳乳清蛋白质、肽和游离氨基酸的影响

超滤前后溶液的蛋白质、肽和氨基酸的含量见表2。从表2可知，超滤后溶液的蛋白质含量下降较多，而肽和氨基酸含量几乎不变。可知超滤将溶液中未完全水解的蛋白质、酶、高分子量的多肽和有机胶体杂质除掉，多肽和氨基酸得到了保存。而这些多肽和氨基酸可能与某些生物活性有关。

2.6 超滤对发酵乳乳清生物活性的影响

姜瞻梅^[9]等通过超滤富集酪蛋白酶解物中的ACE抑制肽、蒋菁莉^[10]等通过超滤富集牛乳酪蛋白酶解物中的ACE抑制肽的研究结果说明超滤可以有效地对ACE抑制肽进行分离富集。因此，本实验对超滤前后的发酵乳乳清的ACE抑制活性进行了研究，结果见表1。从表

1中可以看出，经6000Da截留分子量的膜超滤过的溶液的ACE抑制活性有显著的提高，其ACE抑制活性由57.69%升高到75.58%。超滤后溶液的ACE抑制活性提高的原因可能是超滤富集了溶液中的一些肽，而这些肽对ACE的活性具有一定的抑制作用，从而提高了溶液的ACE抑制活性。

3 结论

本实验采用超滤法分离发酵乳中的ACE抑制肽，研究了超滤的几个主要参数对膜通量的影响。研究结果表明：截留分子量为6000Da的超滤膜，在压力0.10MPa，温度25℃条件下，能得到具有较高ACE抑制活性的ACE抑制肽。证明了超滤膜对发酵乳中的ACE抑制肽具有分离纯化的作用。通过对发酵乳中的ACE抑制肽进行分离，可以获得ACE抑制活性较高、较稳定的降血压产品。

参考文献：

- [1] 潘道东. 酸乳中抗高血压肽的分离及其特性研究[J]. 食品科学, 2005, 26(1): 205-210.
- [2] 高孔荣. 食品分离技术[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1998.
- [3] 刘茉娥, 等. 膜分离技术应用手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [4] JOEN Y J. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membrane[J]. Process Biochemistry, 1999, 35: 471-478.
- [5] 华耀祖. 超滤技术与应用[M]. 北京: 化学工业出版社工业装备与信息工程出版中心, 2004.
- [6] 张水华. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004.
- [7] LEVIN BRAUER R W. The biuret reaction for the determination of proteins[J]. Biochem, 1943, 37: 354-359.
- [8] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20: 1637-1648.
- [9] 姜瞻梅, 田波, 霍贵成. 超滤法分离酪蛋白酶解物中的ACE抑制肽[J]. 食品与发酵工业, 2006(10): 59-61.
- [10] 蒋菁莉, 任发政, 蔡华伟. 牛乳中蛋白降血压肽的超滤分离[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 124-128.

信息



日本爱媛大学教授远藤弥重太研究成功一种大量合成蛋白质的技术，用它合成蛋白质产量要比用现有方法高5倍多。

据当地媒体报道，新技术的关键物质是从小麦的胚芽细胞中提取出的核蛋白体，它是细胞合成蛋白质的“工厂”。科学家将这种核蛋白体与信使核糖核酸(mRNA)、合成原料氨基酸一起放入容器里发生反应，在两、三天之内就能大量合成所要获得的蛋白质。研究发现，这种方法比使用动物的核蛋白体合成蛋白质产量要高5至10倍。

两家日本企业的实验结果证实，运用这一技术能够合成包括人、老鼠及昆虫等在内的14种蛋白质。