

## 超滤法分离酪蛋白酶解物中的 ACE 抑制肽\*

姜瞻梅 田 波 霍贵成

(东北农业大学乳品科学教育部重点实验室, 东北农业大学食品学院, 哈尔滨, 150030)

**摘 要** 采用不同截留分子质量的超滤膜对酪蛋白酶解物中 ACE 抑制肽进行初步分离, 确定了超滤的条件, 并测定超滤前后酶解物的 ACE 抑制活性。结果表明, 截留分子质量为 10 ku 和 3 ku 的超滤膜能不同程度地提高酪蛋白酶解物的 ACE 抑制活性, 但 3 ku 的超滤膜能更有效地提高其 ACE 抑制活性, 并且超滤液半抑制浓度值 ( $IC_{50}$ ) 为 0.46 mg/mL。证明超滤技术可作为一种分离 ACE 抑制肽的手段。

**关键词** ACE 抑制肽, 超滤, 酪蛋白

血管紧张素转换酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 在人体血压调节过程中起重要作用。ACE 抑制肽通过抑制血管紧张素 I 向血管紧张素 II 转换以及阻止 ACE 降解缓激肽而起降血压的作用<sup>[1]</sup>。酪蛋白经过不同蛋白酶作用后, 可以得到具有较高 ACE 抑制活性的酶解物, 由于酶解物的成分复杂并且具有 ACE 抑制活性的肽分子质量都比较小, 因此, 选择经济合理的分离方法富集 ACE 抑制肽是非常必要的<sup>[2]</sup>。超滤技术由于分离操作过程没有相变, 可在较低的温度下操作, 节省能耗, 成为分离技术中用途最广的方法之一。Mullally 等采用超滤技术分离去除大分子肽段, 可提高具有 ACE 抑制活性的肽含量<sup>[3,4]</sup>。Jang 等对牛肉酶解物进行超滤分离可提高其 ACE 抑制活性<sup>[5]</sup>。Hyun 等采用不同截留分子质量的超滤膜对血浆蛋白酶解物处理可大大提高分离物的 ACE 抑制活性<sup>[6]</sup>。

文中采用超滤技术比较了不同截留分子质量的超滤膜对分离酪蛋白酶解物中 ACE 抑制肽作用效果, 并探讨了超滤工艺条件, 为酪蛋白源 ACE 抑制肽的工业化生产提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 原 料

血管紧张素转化酶 (ACE), Sigma 公司产品, 美国; 马尿酸组氨酰亮氨酸 (HHL), Sigma 公司产品, 美国; 新鲜牛乳, 万家宝乳品有限公司提供; As.1398 中性蛋白酶, 江苏省无锡市酶制剂厂。

### 1.2 设 备

SMB-20 型超滤设备, 中国科学院上海原子能研究所; XW-80A 型旋涡混合器, 上海医科大学仪器厂制造; UV-2401PC 型分光光度计, 日本岛津; LG10-2.4A 离心机, 北京医用离心机厂。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 酪蛋白酶解物的制备

精确称取一定量的酪蛋白, 采用磷酸盐缓冲液将其溶解, 在 10L 的反应器中, 加入适量的 As.1398 中性蛋白酶, 进行水解反应。整个水解过程中不断搅拌, 并不断加入 1 mol/L NaOH 以维持 pH 值在 7 ± 0.05 范围内。当达到预定时间后, 将反应体系在 95℃ 条件下保持 20min 后中止反应。将酶解物离心 30 min, 去除沉淀, 取上清液。

#### 1.3.2 超滤分离提取

超滤过程的特性指标主要是膜通量 ( $J$ )。即单位时间内通过单位膜面积的透过物的量, 即:

$$J = \frac{G}{A \times \theta_u}$$

其中:  $G$  为透过液的量 (mL),  $A$  为膜的面积 ( $m^2$ ),  $\theta_u$  为超滤所用的时间 (min)。

#### 1.3.3 ACE 抑制活性的检测方法

参照 Nakamura<sup>[5]</sup>的方法, 根据具体情况进行了修改。

#### 1.3.4 半抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 的测定

称取一定质量样品配制成不同浓度的溶液, 按照以浓度为横坐标, 抑制活性为纵坐标绘成圆滑的曲线, 从曲线中计算出  $IC_{50}$  值<sup>[3,8]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同截留分子质量超滤膜的研究

表 1 为不同截留分子质量的超滤膜超滤前后对

第一作者: 博士, 讲师 (霍贵成为通讯作者)。

\* 国家西部开发资助项目 (No. 2002BA901A46)

收稿日期: 2006-06-27

酪蛋白酶解物 ACE 抑制活性的影响。从表 1 可知,超滤前后 ACE 抑制活性差异显著 ( $P < 0.01$ )。经截留分子质量为 10 000 u 和 3 000 u 的膜超滤后,ACE 抑制活性从原来的 54.22% 分别增加到 57.07% 和 64.22%。这表明超滤可有效地提高 ACE 抑制肽活性(超滤能够有效地去除较大分子质量的物质,这些大片段不是主要的 ACE 抑制肽类)。

表 1 超滤对酶解物 ACE 抑制活性的影响

截留分子质量/ku	种 类	抑制活性/%
10	母 液	$54.22 \pm 0.07^c$
	超滤液	$57.07 \pm 1.18^b$
	残 液	$44.72 \pm 1.34^c$
3	母 液	$54.22 \pm 0.07^c$
	超滤液	$64.22 \pm 0.89^a$
	残 液	$50.19 \pm 1.32^d$

注: a, b, c 在同一列数据中, 相同则表示差异不显著, 不同则表示差异显著 ( $P < 0.01$ )。

## 2.2 温度对超滤通量的影响(图 1)

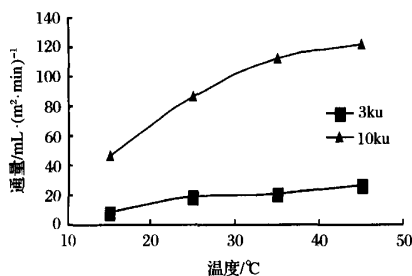


图 1 温度对通量的影响

由图 1 可知,料液温度升高,通量增加。在 15℃ 时截留分子质量为 10 000u 的膜和 3 000u 的膜的通量与其它温度时的通量比较相对较低;随着温度的提高,通量逐渐增大,主要由于温度升高,物料粘度下降,溶质在溶剂中的扩散系数增大,由膜面边界向液

相主体的反向扩散通量  $D(dc/dx)$  增加,有利于减轻浓差极化影响,传质系数增大。从提高装置生产效率方面考虑,应当尽量采用较高的料液温度运行。但是过高的温度会损伤超滤膜及其壳体和粘合剂,同时由于温度升高,能耗增加。由图 1 可知,当温度达到 35℃ 时,通量增加缓慢,与 45℃ 的通量相比差别不大,从节约能源角度考虑,试验选择 35℃ 作为分离 ACE 抑制肽的超滤温度。

## 2.3 压力对超滤通量的影响(图 2)

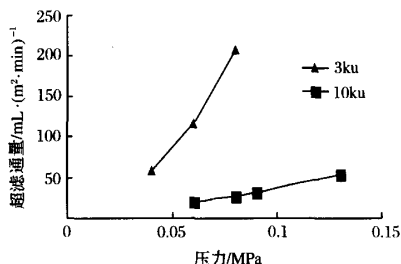


图 2 压力对超滤通量的影响

图 2 为操作压力对超滤通量的影响。从图 2 中可以看出,随着操作压力的增加,2 种分子质量截留膜的通量都逐渐增大,但压力对 10 000 u 的膜的渗透通量影响更大,这说明对于原来通量比较大的膜 ( $M_w$  为 10 000 u 的膜)而言,增加压力可大幅度提高渗透通量,但压力对膜通量比较小的膜 ( $M_w$  为 3 000 u 的膜)影响小些,随着压力的增加,膜通量增加不显著。因此,从能源经济的角度考虑,选择截留分子质量 10 000 u 的膜的操作压力为 0.06 MPa,截留分子质量 3 000 u 的膜的操作压力为 0.09 MPa 是比较科学合理。

## 2.4 超滤通量与时间的变化关系曲线(图 3)

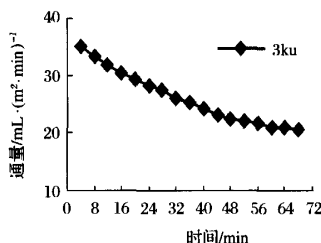
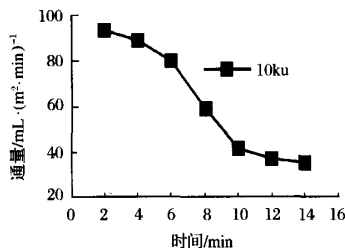


图 3 膜的衰减曲线

由图 3 可知,2 种不同截留分子质量的超滤膜呈现出较典型的超滤衰减模式,截留分子质量为 10 000

u 的膜前期衰减速度快而后期比较平缓,因此使用这种膜时应尽可能的在短时间内完成超滤操作;而对于

截留分子质量为 3 000 u 的膜,其衰减曲线比较平滑,可进行长时间的超滤分离操作。这一研究结果对实际生产有较大的指导意义。

### 2.5 超滤液 IC<sub>50</sub>的测定

在 10 ku 和 3 ku 的超滤膜的最适操作条件下,收集超滤液然后进行冷冻干燥,测定 IC<sub>50</sub>值,结果见表 2。

表 2 不同截留分子量超滤液半抑制浓度

种 类	半抑制浓度 IC <sub>50</sub> /mg·mL <sup>-1</sup>
酶解液	0.68
10 ku 超滤液	0.61
3 ku 超滤液	0.46

从表 2 可知,酪蛋白酶解液经 10 ku 的膜提取分离后 IC<sub>50</sub>由原来的 0.68 mg/mL 下降到 0.61 mg/mL,而水解物经 3 ku 的膜提取分离后 IC<sub>50</sub>由原来的 0.68 mg/mL 下降到 0.46 mg/mL。由此可见,超滤对 ACE 抑制肽的分离确实有很有效果,能显著地提高酶解物的 ACE 抑制活性,使具有较高 ACE 抑制活性的肽类富集起来。

### 3 结 论

截留分子质量为 10 ku 的膜和 3 ku 的膜能不同程度地提高酪蛋白酶解物的 ACE 抑制活性,但 3 ku 截留分子量的膜能有效地提高酪蛋白酶解物的 ACE 抑制活性。

### 参 考 文 献

1 Li Guan-Hong, Le Guo-Wei, Shi Yong-Hui, et al. An-

giotensin I- converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects[J]. Nutrition Research,2004, 24:469~486

2 Anne Pihanto-Leppala. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides [J]. Trends in Food Science and Technology, 2001 (11): 347~356

3 Mullally M M, Meisel H, FitzGerald R J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey protein[J]. Int Dairy J, 1997a, (7):299~303

4 Mullally M M, Meisel H, FitzGerald R J. Identification of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragmen bovine  $\beta$ -lactoglobulin [J]. FEBS Letters,1997b,402:99~101

5 Jang A, Lee M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates [J]. Meat Science, 2005, 69:653~661

6 Hyun Chang-Kee, Shin Heuyn-Kil. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides[J]. Process Biochemistry 2000, 36:65~71

7 Nakamura. Y, Yamamoto. N, Sakai. K, et al. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme[J]. J Dairy Sci,1995,78:1 253~1 257

8 Roy M K, Watanabe Y, Tamai Y. Yeast protease B-digested skim milk inhibits angiotensin-I-enzyme activity [J]. Biotechnol Appl Biochem,2000,31:95~100

## Study on UF for the Separation and Purification of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptide

Jiang Zhanmei Tian Bo Huo Guicheng

(Key Lab of Dairy Science(Northeast Agricultural University)Ministry of Education,Food Science & Technology of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**ABSTRACT** Angiotensin converted enzyme inhibitory peptides from casein hydrolysate were separated by ultrafiltration. Ultrafiltration(with membranes of  $M_w$  cut-off 10 kua and 3 kua). They can increase the ACE inhibitory activities of casein hydrolysates. However, permeates of 3kua membrane showed higher ACE inhibitory activities with IC<sub>50</sub> of 0.46 mg/mL.

**Key words** angiotensin converting enzyme inhibitory peptide, ultrafiltration, casein