研究论文

超声波-离子液体耦合预处理制备蚕蛹蛋白质ACE抑制肽的工艺优化

吴琼英[1]，贾俊强[2,3]，杜金娟[1]，颜 辉[1]，桂仲争[2,3]

（1. 江苏科技大学 生物与化学工程学院，江苏 镇江 212018；2. 江苏科技大学 蚕业研究所，江苏 镇江 212018；3. 中国农业科学院 蚕业研究所，江苏 镇江 212018）

摘要：为提高蚕蛹蛋白质酶解产物的ACE抑制活性，利用超声波-离子液体耦合法对蚕蛹蛋白质进行预处理。以酶解产物ACE抑制活性为指标，采用单因素结合响应面分析法，研究超声波-离子液体耦合预处理蚕蛹蛋白质的工艺条件，并通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，研究预处理前后蚕蛹蛋白质及其酶解产物相对分子质量的变化。结果表明，各因素对酶解产物ACE抑制活性的影响程度由大到小依次为：液料比、超声波功率、预处理时间。确定最佳预处理工艺条件为：液料比27.2 mL/g，处理时间31.9 min，超声波功率406.8 W。在此优化条件下，蚕蛹蛋白质酶解产物的ACE抑制率为75.7%（IC_{50}=0.071 mg/mL）。与未处理、超声波预处理的相比，超声波-离子液体耦合预处理在制备蚕蛹蛋白质ACE抑制肽上具有明显优势。超声波-离子液体耦合预处理后，蚕蛹蛋白质的分子质量无明显变化，但其酶解产物的分子质量（<1.43 ku）变小。

关键词：蚕蛹蛋白质；ACE抑制肽；超声波-离子液体耦合；预处理；工艺优化

中图分类号：TS 201.1；S 886.9　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689（2014）06—0633—08

Optimization of Preparation Technology of ACE-Inhibitory Peptides from Silkworm Pupae Protein by Coupled Ultrasound-Ionic Liquids Pretreatment

WU Qiongying[1]，*JIA Junqiang*[2,3]，*DU Jinjuan*[1]，*YAN Hui*[1]，*GUI Zhongzheng*[2,3]

（1. School of Biotechnology and Chemical Engineering，Jiangsu University of Science and Technology，Zhenjiang 212018，China；2. Sericultural Research Institute，Jiangsu University of Science and Technology，Zhenjiang 212018，China；3. Sericultural Research Institute，Chinese Academy of Agricultural Sciences，Zhenjiang 212018，China）

Abstract：With the aim to improve the ACE-inhibitory activity of hydrolysates from silkworm pupae protein，a pretreatment method of the coupled ultrasound-ionic liquids was used. Taking ACE-inhibitory activity as index，the technology conditions of silkworm pupae protein pretreatment by the coupled ultrasound-ionic liquids were determined with single factor experiments and response surface methodology. In addition，the molecular weight changes of silkworm pupae protein and its hydrolysate after pretreatment were studied by Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

收稿日期：2013-11-01

基金项目：江苏省自然科学基金项目（BK2012693）；江苏省农产品物理加工重点实验室开放基金资助项目（JAPP2013-4）。

作者简介：吴琼英（1975—），女，安徽岳西人，工学博士，副教授，主要从事天然产物的分离与纯化研究。E-mail：wuqyl@163.com

electrophoresis(SDS-PAGE). The results indicated that the effect sequence of three main factors for ACE-inhibitory activity from big to small was as follows:liquid-solid ratio,ultrasonic power, pretreatment time. The optimal pretreatment conditions were as follows:liquid-solid ratio 27.2 mL/g,pretreatment time 31.9 min,ultrasonic power 406.8 W. Under the optimal pretreatment conditions,the average ACE-inhibitory rate of silkworm pupae protein hydrolysate was 75.7% (IC_{50} =0.071 mg/mL). Compared with the un-pretreatment and ultrasound pretreatment,the pretreatment of the coupled ultrasound-ionic liquids has obvious advantages in increasing ACE-inhibitory activity of silkworm pupae protein hydrolysate. After the coupled ultrasound-ionic liquids pretreatment,the molecular weight of silkworm pupae protein has no significant change,while the molecular weight of its hydrolysate(<1.43 ku) becomes smaller.

Keywords: silkworm pupae protein,ACE-inhibitory peptides,coupled ultrasound-ionic liquids, pretreatment,technology optimization

蚕蛹是缫丝工业的主要副产物,占干蚕茧质量的 60%[1]。我国是蚕茧生产国,蚕蛹产量每年在 40 万 t 以上[2]。蚕蛹含有丰富的蛋白质,占蚕蛹质量的 48%~60%, 蚕蛹蛋白质中包含了 18 种氨基酸,蛋白质营养价值较高,是一种亟待深入开发的优质资源[1-2]。

食源 ACE 抑制肽因具有安全无毒副作用的优点,已成为科研工作者研究热点领域之一。现已从海蜇[3]、甜薯[4]和豇豆[5]等蛋白酶解产物中分离得到高活性 ACE 抑制肽。作者所在课题组在前期研究中已发现蚕蛹蛋白质酶解产物具有较高的 ACE 抑制活性,是制备 ACE 抑制肽的理想原料[6]。目前,食源 ACE 抑制肽的制备主要采用传统酶解法,该方法操作简单, 不足之处在于酶解效率和产物 ACE 抑制活性不够理想[7]。为克服传统酶解工艺的缺陷,可利用超声波预处理方法提高蛋白质酶解产物的 ACE 抑制活性[7-8],其作用机理在于通过空化作用使蛋白质表面疏水性氨基酸增多,从而利于含疏水性氨基酸的高活性 ACE 抑制肽快速释放。

离子液体是继“超临界流体”和“双水相”之后的第三种绿色溶剂,疏水性离子液体在预处理蛋白质时,会引起蛋白质分子发生伸展,聚集体疏松,表面疏水性氨基酸增多等[9],其对蛋白质的作用机理与超声波非常相似。在 ACE 抑制肽酶法制备中,为了强化预处理作用,提高酶解产物活性,降低超声波处理能耗, 作者将超声波-离子液体耦合预处理用于制备蚕蛹蛋白质 ACE 抑制肽,并对其工艺条件进行了优化,为 ACE 抑制肽的开发提供了一种新型的高效制备方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蚕蛹由农业部蚕桑产品质量监督检验测试中心(镇江)提供。蚕蛹脱脂后烘干粉碎,过 80 目筛备用。

低分子质量蛋白质 Marker (磷酸酶 b 97.2 ku,牛血清蛋白质 66.4 ku,卵清蛋白质 44.3 ku,碳酸苷酶 29.0 ku,胰蛋白酶抑制剂 20.1 ku,溶菌酶 14.3 ku),Takara 生物公司提供; 低分子质量蛋白质 Marker (肌球蛋白质 200.0 ku,β 半乳糖苷酶 116.0 ku,磷酸酶 b 97.2 ku,牛血清蛋白质 66.4 ku,卵清蛋白质 44.3 ku),Takara 生物公司提供;[Bmim]PF_6 离子液体,上海澳宇生物公司提供;碱性蛋白酶(alcalase),购自诺维信(中国)生物技术有限公司;马尿酰组氨酰亮氨酸(HHL)和血管紧张素转换酶(ACE),购自 Sigma-Aldrich 公司;其余试剂均为国产分析纯。

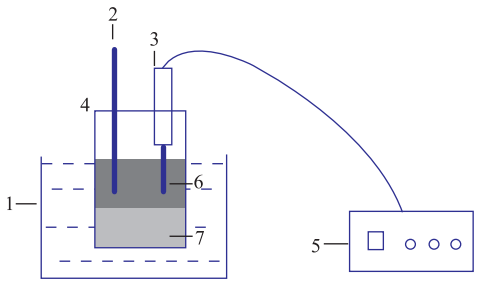
1.2 仪器与设备

JY92-II 超声波细胞粉碎机, 宁波海曙科生超声设备有限公司制造;UV-2100 型分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司制造;UV-2450 紫外吸收分光光度计,日本 Shimadzu 公司制造;SSY-H 型恒温水浴锅,上海三申医疗器械有限公司制造;LR10-24A 型离心机,北京雷勃尔有限公司制造;WH-2 型微型漩涡混合仪,上海沪西分析仪器厂制造;FDU-2100 型冷冻干燥机,上海爱朗仪器有限公司制造。

1.3 试验方法

1.3.1 蚕蛹蛋白质的提取 将蚕蛹粉用蒸馏水配制成 100 g/L 悬浮液,调节 pH 至 8.0,室温搅拌 1 h 后,5 000 r/min 离心取上清液,将上清液 pH 调节至 4.0,静置 30 min 后 5 000 r/min 离心,收集沉淀,蒸馏水将沉淀洗至中性,用截留分子量 1 000 u 规格透析袋透析 48 h 后冷冻干燥。

1.3.2 超声波-离子液体耦合预处理蚕蛹蛋白质的方法 将蚕蛹蛋白质用蒸馏水配制成悬浮液,然后加入盛有等体积离子液体(蛋白质溶液与离子液体体积比为 1:1)的烧杯中,将超声波探头浸入水相中,开启超声波,整个超声波处理过程用水浴控制预处理温度在(30±5) ℃。预处理结束后,在 3 000 r/min 下离心 10 min,除掉水相,取蛋白质层,回收下层离子液体,蛋白质层用蒸馏水洗涤,离心,反复数次除去残留离子液体,蛋白质层经冷冻干燥后用于制备 ACE 抑制肽,操作示意图见图 1。



1 水浴锅;2 温度计;3 超声波探头;4 烧杯;5 超声波控制器;6 蚕蛹蛋白质水溶液;7 离子液体([Bmim]PF_6)

图 1 超声波-离子液体耦合预处理蚕蛹蛋白质示意图

Fig. 1 Schematic diagram of silkworm pupae protein pretreatment using the coupled ultrasound-ionic liquids

1.3.3 蚕蛹蛋白质的酶解 根据前期研究结果[10],选用 Alcalase 酶解预处理后的蚕蛹蛋白质。酶解条件为:酶解温度 51 ℃,酶解 pH 9.0,加酶量 3 500 U/g,酶解时间 50 min。酶解产物用蒸馏水稀释 5 倍体积后用于测定 ACE 抑制活性(酶解产物 ACE 抑制率过高时,抑制率与酶解产物浓度不成正比,因此作者对酶解产物统一稀释后,再测定 ACE 抑制活性)。

1.3.4 ACE 抑制活性的测定 以马尿酰组氨酰亮氨酸(HHL)为底物参与 ACE 反应,在 228 nm 下,利用紫外分光光度计比色法分析产物马尿酸生成量变化,计算 ACE 抑制活性[6],计算公式如下:

$$I=((A-C)/(A-B))\times 100\% \quad (1)$$

式(1)中,I 为 ACE 抑制率;A 为空白组的吸光度;B 为反应体系中没有 ACE 参与时的吸光度;C 为反应体系中有 ACE 和酶解产物时的吸光度。

1.3.5 超声波-离子液体耦合预处理制备蚕蛹 ACE 抑制肽的工艺优化

1)单因素试验:对液料比、处理时间、超声波功率进行单因素试验,考察各因素对蚕蛹酶解产物的 ACE 抑制活性的影响。在超声波频率 24 kHz、超声波工作时间 2 s、间歇时间 2 s、超声波功率 130 W、处理时间 10 min 的条件下,液料比设为 10、20、30、40、50 mL/g;在超声波频率 24 kHz、超声波工作时间 2 s、间歇时间 2 s、超声波功率 130 W、液料比 10 mL/g 条件下,处理时间设为 10、20、30、40、50 min;在超声波频率 24 kHz、超声波工作时间 2 s、间歇时间 2 s、液料比 10 mL/g、处理时间 10 min 条件下,超声波功率设为 130、260、390、520、650 W。

2)响应面优化:在单因素实验的基础上,以酶解产物 ACE 抑制率为响应值,液料比、处理时间、超声波功率为自变量,采用 Box-Behnken 中心组合设计原理进行三因素三水平的旋转正交试验设计。

1.3.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 根据 Laemmli 报道的方法[11],采用不连续缓冲系统的凝胶配置,浓缩胶质量分数 5%,酶解产物使用分离胶质量分数 15%,蚕蛹蛋白质使用分离胶质量分数 10%,以溴酚蓝为指示剂,采用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.3.7 统计学方法 各组数据均以平均值±标准差表示,用 Excel 进行统计分析;利用 Design Expert 7.1.3 进行响应曲面试验设计及分析。

2 结果与分析

超声波-离子液体耦合预处理制备蚕蛹 ACE 抑制肽的工艺优化分析如下。

2.1 液料比对酶解产物 ACE 抑制活性的影响

在超声波频率 24 kHz、超声波工作时间 2 s、间歇时间 2 s、超声波功率 130 W、预处理时间 10 min 的条件下,不同液料比对蚕蛹蛋白质酶解产物 ACE 抑制活性的影响见图 2。可见,在相同液料比下,超声波-离子液体耦合预处理的酶解产物 ACE 抑制活性比超声波预处理的要高,优势非常明显。在液

料比在 10~30 mL/g 时,随着液料比的增加,超声波-离子液体耦合预处理的酶解产物 ACE 抑制活性迅速增加;这是由于液料比较大时,蚕蛹蛋白质溶液体系黏度较低,有利于将超声波能量传递到蛋白质物料内部,此时,超声波对蚕蛹蛋白质的空化作用增强[12]。然而,当液料比大于 30 mL/g 时,超声波-离子液体耦合预处理的酶解产物 ACE 抑制活性开始缓慢降低;可能是液料比在 30 mL/g 以上时,蚕蛹蛋白质溶液体系中水含量过高,吸收了部分超声波能量,影响了超声波对蚕蛹蛋白质的处理效果[12]。因此,选择液料比 30 mL/g 作为响应面试验的中心水平。

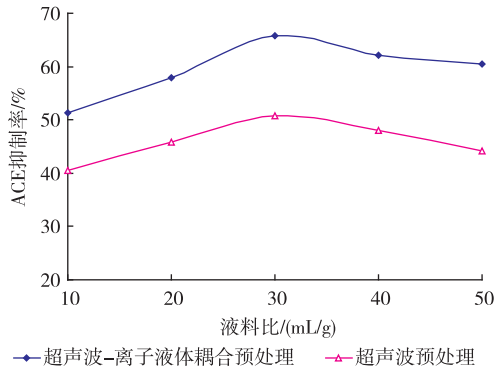


图 2 液料比对酶解产物 ACE 抑制率的影响

Fig. 2 Effects of liquid-solid ratio on ACE-inhibitory rate of hydrolysate

2.2 预处理时间对酶解产物 ACE 抑制活性的影响

在超声波频率 24 kHz、超声波工作时间 2 s、间歇时间 2 s、超声波功率 130 W、液料比 10 mL/g 条件下,不同预处理时间对蚕蛹蛋白质酶解产物 ACE 抑制活性的影响见图 3。

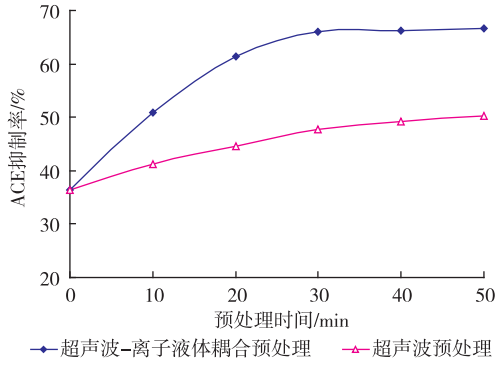


图 3 预处理时间对酶解产物 ACE 抑制率的影响

Fig. 3 Effects of pretreatment time on ACE-inhibitory rate of hydrolysate

从图 3 可以看出,与没有预处理(0 min)相比,超声波和超声波-离子液体耦合预处理均显著提高了蚕蛹蛋白质酶解产物的 ACE 抑制活性;其中,超声波-离子液体耦合预处理效果最为明显,使蚕蛹蛋白质酶解产物 ACE 抑制率从 36%提高到 50%以上。随着超声波-离子液体耦合预处理时间的增加,蚕蛹蛋白质酶解产物 ACE 抑制活性迅速增加;这是由于长时间预处理增加了蚕蛹蛋白质表面疏水性,而疏水性基团对于 ACE 抑制肽的活性扮演着重要角色[12]。但当预处理时间在 30 min 以上时,酶解产物 ACE 抑制活性增加趋于平缓,这表明在 30 min 时蚕蛹蛋白质的表面疏水性已接近极值。因此,考虑到降低成本和保护设备,选择预处理时间 30 min 作为响应面试验的中心水平。

2.3 超声波功率对酶解产物 ACE 抑制活性的影响

在超声波频率 24 kHz、超声波工作时间 2 s、间歇时间 2 s、液料比 10 mL/g、预处理时间 10min 条件下,不同超声波功率对蚕蛹蛋白质酶解产物 ACE 抑制活性的影响见图 4。

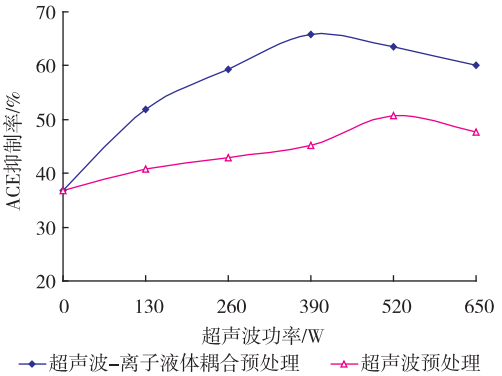


图 4 超声波功率对酶解产物 ACE 抑制率的影响

Fig. 4 Effects of ultrasonic power on ACE-inhibitory rate of hydrolysate

从图 4 可以看到,超声波和超声波-离子液体耦合预处理均显著提高了蚕蛹蛋白质酶解产物的 ACE 抑制活性;且在相同超声波功率下,超声波-离子液体耦合预处理的酶解产物 ACE 抑制活性明显高于超声波预处理的。随着超声波功率的增大,超声波-离子液体耦合预处理的酶解产物 ACE 抑制活性增大,在 390 W 时达到最大,然后酶解产物 ACE 抑制活性开始下降。原因可能是适当的超声波功率可以改变蛋白质的结构,低强度超声波产生的空化作用相对缓和且有规律性,使蛋白质内部疏水基团能够较好暴露出来,以利于 ACE 抑制肽的酶法释放,而高强度超声波产生的空化作用激烈而短

暂,使原本暴露出来的疏水基团进一步被破坏,反而不利于 ACE 抑制肽的酶法释放[7]。因此,选择超声波功率390 W 作为响应面试验的中心水平。

2.4 响应曲面试验设计及最佳预处理条件的确定

在单因素试验基础上,采用 Box-Behnken 中心组合设计原理,以 ACE 抑制率为响应值,选取液料比、预处理时间和超声波功率进行三因素三水平的旋转正交试验设计。响应面试验共 15 次试验,其中包括 3 次中心点重复试验用于估算试验误差。响应面试验因素水平设计见表 1。响应曲面设计及试验结果见表 2。

表 1 响应面试验因素水平设计

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

因素	编号	水平		
		-1	0	1
液料比/(mL/g)	X_1	20	30	40
预处理时间/min	X_2	25	30	35
超声波功率/ W	X_3	325	390	455

表 2 响应面设计和试验结果

Table 2 Design and results of response surface experiment

编号	因素			ACE 抑制率/% Y
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	0	-1	64.1
2	0	-1	1	68.5
3	1	-1	0	66.3
4	-1	0	1	70.5
5	1	0	-1	61.6
6	-1	1	0	71.5
7	0	-1	-1	64.4
8	0	0	0	75.6
9	1	1	0	63.2
10	0	1	1	72.4
11	-1	-1	0	66.4
12	0	0	0	76.2
13	1	0	1	62.9
14	0	1	-1	68.4
15	0	0	0	74.1

2.5 模型建立及显著性检验

采用 Design Expert 7.1.3 统计软件对表 2 试验数据进行多元回归拟合,建立 ACE 抑制率(Y)对液料比(X_1)、预处理时间(X_2)和超声波功率(X_3)的二次多项回归模型方程(X_1、X_2、X_3 为各因素水平的编码数)

$$Y=75.30-2.31X_1+1.24X_2+1.97X_3-2.05X_1X_2-1.28X_1X_3-0.025X_2X_3-6.05X_1^2-2.40X_2^2-4.48X_3^2 \quad (2)$$

采用 Design Expert 7.1.3 统计软件对表 2 中的试验结果进行统计分析,得到的方差分析见表 3。

表 3 响应面回归模型的方差分析

Table 3 Variance analysis of regression parameters for the response surface model

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	314.56	9	34.95	24.71	0.001 3**
X_1	42.78	1	42.78	30.24	0.002 7**
X_2	12.25	1	12.25	8.66	0.032 1*
X_3	31.20	1	31.20	22.06	0.005 4**
X_1X_2	16.81	1	16.81	11.88	0.018 3*
X_1X_3	6.50	1	6.50	4.60	0.084 9
X_2X_3	0.002 5	1	0.002 5	0.001 767	0.968 1
X_1^2	135.15	1	135.15	95.54	0.000 2**
X_2^2	21.27	1	21.27	15.04	0.011 7*
X_3^2	73.94	1	73.94	52.27	0.000 8**
残差	7.07	5	1.41		
失拟项	4.73	3	1.58	1.35	0.452 6
纯误差	2.34	2	1.17		
总和	321.63	14			
决定系数 R^2	0.9780				
调整后决定系数 R_{Adj}^2	0.9384				
变异系数/%	1.74				

注:* 显著(P<0. 05);** 极显著(P<0. 01)。

由表 3 可知,回归模型 P=0.001 3,表明该模型极显著(P<0.01),失拟项 P=0.452 6,差异不显著(P>0.05),模型决定系数 R^2=0.978 0,调整后决定系数 R_{Adj}^2 为 0.938 4,变异系数为 1.74%,这表明该模型的拟合度较好,可以用该模型分析和预测预处理后蚕蛹蛋白质酶解产物的 ACE 抑制活性变化。另外,从表 3 可知,X_1、X_3、X_1^2 和 X_3^2 对 ACE 抑制率的影响极显著(P<0.01),X_2、X_1X_2 和 X_2^2 对 ACE 抑制率的影响显著 (P<0.05),X_1X_3 和 X_2X_3 对 ACE 抑制率的影响不显著 (P>0.05),这些进一步表明 ACE 抑制率(Y)与液料比(X_1)、预处理时间(X_2)和超声波功率(X_3)之间为二次项数学关系。各因素对 ACE 抑制率的影响顺序从大到小为:液料比(X_1)>超声波功率(X_3)>预处理时间(X_2)。

2.6 最优工艺条件确定及验证

采用 Design Expert 7.1.3 统计软件获得液料比(X_1)、预处理时间(X_2)和超声波功率(X_3)之间的响应曲面,见图 5(a)(b)(c)。

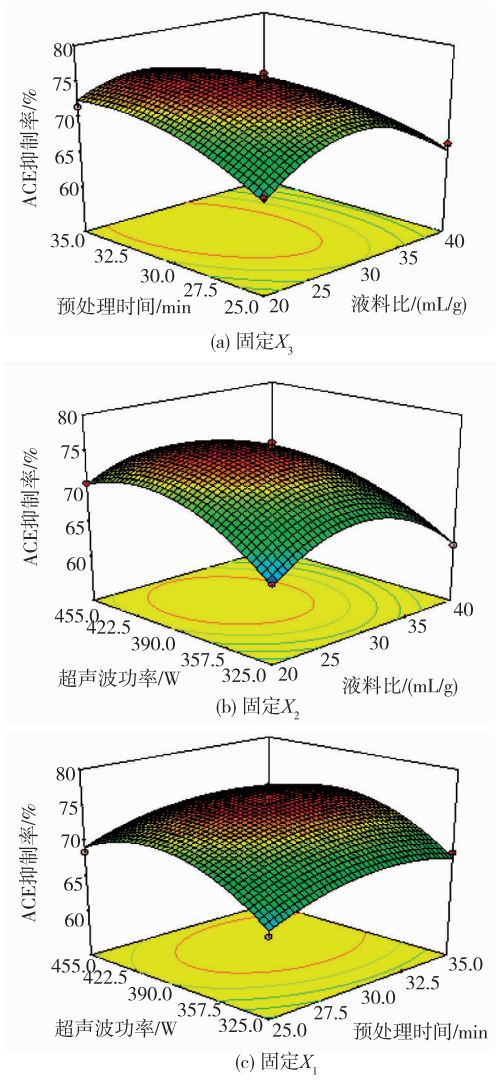


图 5 各因素及交互作用对酶解产物 ACE 抑制活性的影响

Fig. 5 Interaction of response surface factors on ACE-inhibitory activity of hydrolysates

由图 5(a)可以看出,随着液料比(X_1)和预处理时间(X_2)的增加,蚕蛹蛋白质酶解产物的 ACE 抑制活性先逐渐升高后缓慢下降,这表明在固定超声波功率(X_3)不变的情况下,液料比(X_1)和预处理时间(X_2)对 ACE 抑制率的响应曲面存在极值,在液料比(X_1) 25~30 mL/g 和预处理时间(X_2) 30~35 min 时,酶解产物 ACE 抑制率较大,且该区间的等高线呈现椭圆形状,说明液料比(X_1)和预处理时间(X_2)存在交互作用[13],结合表 3, X_1X_2 的 P=0.018 3,说明液料比(X_1)和预处理时间(X_2)交互作用显著(P<0.05)。

由图 5(b)可以看出,随着液料比(X_1)和超声波功率(X_3)的持续增加,蚕蛹蛋白质酶解产物的 ACE 抑制活性先逐渐升高到一定值后, 又呈下降的趋势,这表明在固定预处理时间(X_2)不变时,液料比(X_1)和超声波功率(X_3)对 ACE 抑制率的响应曲面存在极值,在液料比(X_1)25~30 mL/g 和超声波功率(X_3)390~455 W 时, 酶解产物 ACE 抑制率较大,且该区间的等高线接近椭圆形状,说明液料比(X_1)和超声波功率(X_3)存在一定交互作用[13],结合表 3, X_1X_2 的 P=0.084 9,说明它们交互作用不显著(P > 0.05)。

由图 5(c)可以看到,随着预处理时间(X_2)和超声波功率(X_3)的增加,蚕蛹蛋白质酶解产物的 ACE 抑制率先增后减,这表明在固定液料比(X_1)不变时,预处理时间(X_2)和超声波功率(X_3)对 ACE 抑制率的响应曲面存在极值,在预处理时间(X_2)27.5~35 min 和超声波功率(X_3)390~422.5 W 时,酶解产物 ACE 抑制率较大,另外,该区域的等高线接近椭圆形状,表明预处理时间(X_2)和超声波功率(X_3)存在一定交互作用[13],结合表 3, X_2X_3 的 P=0.968 1,说明它们交互作用不显著(P >0.05)。

综上所述,由于液料比(X_1)、预处理时间(X_2)和超声波功率(X_3)之间的响应曲面均存在极值。因此,可以通过对二次回归的数学模型取一阶偏导获得最优试验条件[14],对二次回归的数学模型取一阶偏导得以下三元一次方程组:

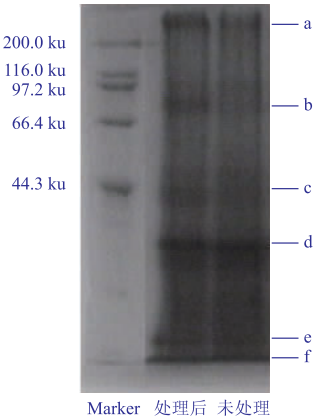
$$\begin{cases} 12.10X_1+2.05X_2+1.28X_3+2.31=0 \\ 2.05X_1+4.80X_2+0.025X_3-1.24=0 \\ 1.28X_1+0.025X_2+8.96X_3-1.97=0 \end{cases} \quad (3)$$

对上述方程组消元求解得:X_1=-0.282 29,X_2=0.377 543,X_3=0.259 139;换算成实际值为:液料比 27.2 mL/g、处理时间 31.9 min、超声波功率 406.8 W。该条件下,ACE 抑制率预测为 76.1%。为检验响应曲面法所得工艺条件的准确性和可靠性,对以上最优提取进行验证试验, 经 3 次平行试验,ACE 抑制率分别为:74.9%,75.8%,76.5%, 平均值为 (75.7±0.8)%,其 IC_{50} 为 0.071 mg/mL。与理论值相比,相对误差为 0.53%, 表明预测值和真实值之间有很好的拟合性,进一步验证了模型的可靠性。

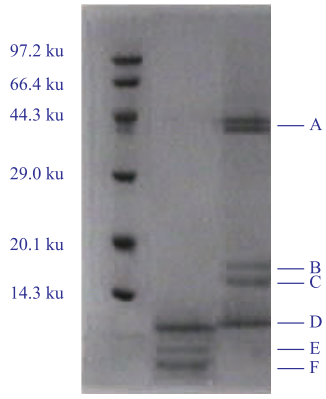
2.7 预处理对蚕蛹蛋白质及酶解产物的分子质量分布影响

蚕蛹蛋白质及其酶解产物的 SDS-聚丙烯酰胺

凝胶电泳图谱见图 6。可见,超声波-离子液体耦合预处理对蚕蛹蛋白质分子质量分布没有明显影响(图 6(a)),未处理的蚕蛹蛋白质和预处理的蚕蛹蛋白质均主要由 a、b、c、d、e、f 组分组成,这表明超声波-离子液体耦合预处理对蚕蛹蛋白质一级结构影响不大。然而,超声波-离子液体耦合预处理对蚕蛹蛋白质酶解产物的分子质量分布有明显影响(图 6(b)),预处理前(未处理),蚕蛹蛋白质酶解产物分子质量分布在 44.3 ku 以下,其中分布在 14.3~44.3 ku(A、B、C 组分)的片段较多;而经预处理后,其酶解产物分子质量则主要在 14.3 ku 以下(D、E、F 组分)。原因可能为:尽管超声波-离子液体耦合预处理没有改变蛋白质的一级结构,但对其高级结构破坏性大,造成蛋白质内部大量疏水基团暴露在表面,疏水性氨基酸比较密集,距离相对较近,当用 alcalase 酶解时,由于该酶水解位点为疏水性氨基酸碳端[8],因而造成了大量小分子肽集中释放出来;相对于未处理蛋白质,由于其表面疏水性氨基酸相对较少,且之间距离较远,当用 alcalase 酶解时,则释放出分子质量较大的肽片段。



(a) 蚕蛹蛋白质



(b) 酶解产物

图 6 预处理前后蚕蛹蛋白质及酶解产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 6 SDS-PAGE of untreated and pretreated silkworm pupae proteins and their hydrolysates

3 结 语

1)超声波-离子液体耦合预处理能够显著提高蚕蛹蛋白质酶解产物的 ACE 抑制活性,其效果明显优于超声波预处理。

2)通过单因素和响应面试验,确定了超声波-离子液体耦合预处理各因素对蚕蛹蛋白质酶解产物 ACE 抑制率的影响顺序从大到小为:液料比>超声波功率>预处理时间。优化出最佳预处理条件为:液料比 27.2 mL/g、处理时间 31.9 min、超声波功率 406.8 W,在此优化条件下,蚕蛹蛋白质酶解产物的 ACE 抑制率为 75.7%。

3)超声波-离子液体耦合预处理对蚕蛹蛋白质分子质量分布影响不大,但其酶解产物中小分子质量肽含量明显高于未经处理的蚕蛹蛋白质酶解产物的。

参考文献:

[1] Wei Z J,Liao A M,Zhang H X,et al. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of silkworm pupal oil applying the response surface methodology[J]. **Bioresour Technol**,2009,100(18):4214-4219.

[2] 王伟,何国庆,金英哲,等. 蚕蛹蛋白的综合利用现状分析和开发前景展望[J]. 食品与发酵工业,2006,32(9):112-115.
WANG Wei,HE Guoqing,KIM Yongchol,et al. The integrated using progress analyse and exploit foreground expectation of silkworm protein[J]. **Food and Fermentation Industries**,2006,32(9):112-115. (in Chinese)

[3] Liu X,Zhang M S,Jia A R,et al. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from jellyfish Rhopilema esculentum[J]. **Food Research International**,2013,50(1):339-343.

[4] Ishiguro K,Sameshima Y,Kume T,et al. Hypotensive effect of a sweetpotato protein digest in spontaneously hypertensive rats and purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides[J]. **Food Chemistry**,2012,131(3):774-779.

[5] Segura-Campos M R,Chel-Guerrero L A,Betancur-Ancona D A. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory

peptides from a cowpea (*Vigna unguiculata*) enzymatic hydrolysate[J]. **Process Biochemistry**,2011,46(4):864-872.

[6] 吴琼英,徐金玲,贾俊强,等. 蚕蛹不同溶解性蛋白的营养学评价及酶解物对血管紧张素转换酶的抑制活性[J]. 蚕业科学,2011,37(2):352-357.
WU Qiongying,XU Jinling,JIA Junqiang,et al. Nutrition evaluation and ACE-inhibitory activities of silkworm pupae protein fractions[J]. **Science of Sericulture**,2011,37(2):352-357. (in Chinese)

[7] 马海乐,耿静静,骆琳,等. 超声波预处理对燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽的影响[J]. 农业机械学报,2010,41(9):133-137.
MA Haile,GENG Jingjing,LUO Lin,et al. Effect of oat-seed protein pretreatment by ultrasonic on preparation of ACE inhibitory peptides[J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**,2010,41(9):133-137. (in Chinese)

[8] Jia J Q,Ma H L,Zhao W R,et al. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein[J]. **Food Chemistry**,2010,119(1):336-342.

[9] Byrne N,Angell C A. Protein unfolding and the "tuning in" of reversible intermediate states,in protic ionic liquid media[J]. **Journal of Molecular Biology**,2008,378(3):707-714.

[10] 贾俊强,徐金玲,吴琼英,等. 酶解蚕蛹蛋白制备血管紧张素转换酶抑制肽的工艺优化[J]. 蚕业科学,2011,37(5):872-877.
JIA Junqiang,XU Jinling,WU Qiongying,et al. Optimization of technology for preparation of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from silkworm pupae protein by enzymatic hydrolysis[J]. **Science of Sericulture**,2011,37(5):872-877. (in Chinese)

[11] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. **Nature**,1970,227:680-685.

[12] Zhang Z S,Wang L J,Li D,et al. Ultrasound-assisted extraction of oil from flaxseed [J]. **Separation and Purification Technology**,2008,62 (1):192-198.

[13] 陈晓明,李开绵,台建祥,等. 木薯皮总香豆素活性物质超声波提取工艺优化[J]. 农业机械学报,2012,43(1):158-164.
CHEN Xiaoming,LI Kaimian,TAI Jianxiang,et al. Response surface methodology on ultrasonic extraction technology of total coumarin from cassava peel[J]. **Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery**,2012,43(1):158-164. (in Chinese)

[14] 陈海华,李国强. 响应面分析法优化酶法提取谷朊粉工艺的研究[J]. 中国粮油学报,2010,25(12):106-110.
CHEN Haihua,LI Guoqiang. Optimizing enzymatic extraction of wheat gluten by response surface methodology [J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**,2010,25(12):106-110. (in Chinese)

科　技　信　息

英国食品标准局就扩大低聚异麦芽糖的使用范围征求意见

据英国食品标准局消息,加拿大 Bioneutra 公司向该局发布申请,请求扩大低聚异麦芽糖的使用范围。

低聚异麦芽糖是一种新型的糖类。加拿大 Bioneutra 公司请求将低聚异麦芽糖的使用范围扩大至甜点、饼干、酒吧营养食品、食用冰、调味饮料、甜汁、浇头和糖浆、即食开胃菜、小吃以及特殊营养用途食品等。另外,该公司还申请修订含有该配料食品的标识规定。

[信息来源]Food Standards Agency. Views wanted on novel carbohydrate [EB/OL]. (2014-5-27). http://www.food.gov.uk/news-updates/news/2014/may/isomalto-oligosaccharide#.U3mgTYGSztB