

醋蛋中 ACE 抑制肽的研究初探

马千里^{1,2}, 黄永春^{2,*}, 杨 锋², 童张法¹

(1. 广西大学化学化工学院, 广西 南宁 530004; 2. 广西工学院生物与化学工程系, 广西 柳州 545006)

摘 要: 本实验对醋蛋的浸泡工艺、ACE 抑制活性和 ACE 抑制肽的分离进行了初步研究。结果表明醋蛋适宜的浸泡条件为浸泡时间 36h, 全蛋醋蛋比 3.0ml/g、蛋黄和蛋清醋蛋比 2.5ml/g, 浸泡温度 20~25℃; 全蛋水解物的 ACE 半抑制浓度为 174.68mg/ml, 蛋黄水解物的 ACE 半抑制浓度为 183.72mg/ml; 醋蛋液经 Sephadex G-50 凝胶柱初步分离后得到两个组分, 其中第二个组分的 ACE 抑制活性较高, 并对其氨基酸组成进行了分析。

关键词: 醋蛋; ACE 抑制肽

Preliminary Study on ACE Inhibitory Peptide from Vinegar-egg

MA Qian-li^{1,2}, HUANG Yong-chun^{2,*}, YANG Feng², TONG Zhang-fa¹

(1. School of Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Technology, Liuzhou 545006, China)

Abstract: The process technology, ACE inhibitory activity and purification of ACE inhibitory peptide of vinegar-egg were studied. The results showed that the optimal process conditions of vinegar-egg are as follows: soaking time 36 h, vinegar-whole egg ratio 3.0 ml/g, vinegar-liquid egg ratio 2.5 ml/g, and temperature 20~25 °C; The IC₅₀ of vinegar-egg hydrolysates is 174.68 mg/ml and the IC₅₀ of vinegar-egg-yolk hydrolysates is 183.72 mg/ml. The hydrolysates were separated by Sephadex G-50. Two components are obtained, in which the ACE inhibitory activity of the second component is higher. The amino acid of the second component was analysed.

Keywords: vinegar-egg; ACE inhibitory peptide

中图分类号: TS253.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)10-0207-04

醋蛋是流传于我国民间的一种验方, 常用来预防及治疗高血压、高血脂等疾病。艾华^[1]等研究表明醋蛋液具有良好的调节血脂和抗氧化作用; 韦玉先^[2]等的动物实验研究表明, 醋蛋液能明显促进动物肠的蠕动, 提高细胞免疫功能, 降低脑组织的脂质过氧化作用; 吴桂贞^[3]等研究了浸蛋工艺对醋蛋中 ACE 抑制肽活性的影响, 得出了比较理想的浸蛋工艺。截至目前醋蛋仍然作为一种民间的食疗产品, 尚无大规模的工业化生产。醋蛋的开发仍有许多问题亟待解决: 首先, 传统方法制备的醋蛋液一般味道不太理想, 有很大的腥味, 适口性较差; 其次, 醋蛋液的作用机理不明确, 功效成分不清楚, 还不能从理论上充分地证实其疗效。

本实验为弄清醋蛋中的腥味及活性物质来源, 分别对全蛋、蛋黄、蛋清进行了浸泡实验, 并对其中的 ACE 抑制肽进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡蛋 市售; 9° 米醋王 广东美味鲜调味食品有限公司; 马尿酸组氨酰亮氨酸、氨基酸混合标准液 Sigma 公司; 血管紧张素转化酶 自制; 葡聚糖凝胶 Sephadex G-50 GE Healthcare 公司进口分装; 其它试剂为分析纯。

1.2 仪器与设备

微量凯氏定氮仪 江苏泰县白米玻璃制品厂; 高速组织捣碎机 江苏省金坛市医疗仪器厂; 高速离心机 上海安亭科学仪器厂; 紫外可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司; DBS-100 电脑全自动部分收集器、DHL-A 电脑恒流泵、HD-21-2 紫外检测仪 上海青浦沪西仪器厂; 3057 型便携式记录仪 重庆川仪四厂;

收稿日期: 2008-07-04

作者简介: 马千里(1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: earvin@hotmail.com

* 通讯作者: 黄永春(1974-), 男, 教授, 博士, 研究方向为碳水化合物科学与工程。E-mail: huangyc@yahoo.cn

L-8800 型氨基酸自动分析仪 日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 醋蛋的浸泡

全蛋带壳浸泡：挑选大小均一的鸡蛋洗去表面污垢，再用 75% 酒精擦拭鸡蛋表面，晾干后称量，按一定的醋蛋比加入 9 度米醋于不同温度下密封浸泡。待蛋壳全部溶解后，用纱布过滤，挑破蛋膜，弃去蛋膜后搅拌均匀，得醋蛋待用。

蛋清蛋黄分别浸泡：挑选大小均一的鸡蛋洗去表面污垢，再用 75% 酒精擦拭鸡蛋表面，晾干后敲破蛋壳，分离蛋黄和蛋清于不同烧杯中，各自称重，浸泡条件同全蛋。

1.3.2 醋蛋中蛋白水解度的测定

茚三酮显色法测定游离氨基^[4]：取醋蛋液 1.0ml 定容至 100ml，取 0.4ml 稀释液于试管中加入 1.6ml 蒸馏水、1.0ml 显色剂，混匀后置沸水浴中加热 15min，同时作空白实验。然后放入冷水中冷却，加入 5.0ml 40% 的乙醇溶液混匀，放置 15min 后以空白实验做基准调零，在 570nm 波长下测吸光度。利用标准曲线计算醋蛋液中游离氨基的含量。

微量凯氏定氮法测定鸡蛋中蛋白总量^[5]。

水解度(DH)按下式计算：

$$DH(\%) = \frac{\text{浸泡后醋蛋中的游离氨基} - \text{浸泡前醋蛋中的游离氨基}}{\text{鸡蛋中含有氨基酸}} \times 100$$

1.3.3 ACE 抑制活性的测定^[6-7]

吸取 50μl 抑制剂，加入 100μl 5mmol/L 马尿酸组氨酸亮氨酸(HHL)中，再加入 100μl 1.0mol/L 的 NaCl-硼酸缓冲液(pH8.3)，37℃ 恒温水浴 5min；立即加入 50μl ACE 启动反应，37℃ 恒温反应 30min 后，加入 0.5ml 1mol/L 的 HCl 终止反应；再加入 1.5ml 冷的乙酸乙酯，漩涡混合均匀后，4000r/min 下，离心 10min 后取出 1.0ml 酯层转入另一试管，充分烘干后，再将它重新溶于 3.0ml 去离子水中，在 228nm 波长处测光密度值。

ACE 抑制率按下式计算：

$$ACE \text{ 抑制率}(\%) = \frac{OD_a - OD_b}{OD_a - OD_c} \times 100$$

式中，OD_a 为不存在抑制剂时的光密度；OD_b 为存在抑制剂与 ACE 时的光密度；OD_c 为抑制剂与 ACE 都不存在时的光密度。

1.3.4 醋蛋的 IC₅₀ 值测定^[8]

将醋蛋配制成不同浓度的溶液，按照 1.3.3 中的检测方法测定其抑制活性，以醋蛋浓度为横坐标，ACE 抑制活性为纵坐标绘成圆滑的曲线，从曲线中计算出

IC₅₀ 值。

1.3.5 醋蛋中 ACE 抑制肽的初步分离

取醋蛋 40ml，加入等体积的 Sevag 试剂(正丁醇与三氯甲烷体积比 1:4 配成)沉淀大分子蛋白质。4000r/min 离心后取上清液，40~50℃ 真空旋转蒸发浓缩至体积 2~3ml。采用 Sephadex G-50 凝胶柱(1.6cm × 50cm)，以 0.1mol/L 的 NaCl 溶液作为流动相，流速 0.3ml/min，进行柱层析，收集不同组分。

1.3.6 醋蛋中 ACE 抑制肽的氨基酸组成分析

取 1.0ml 样品到玻璃水解管，准确移取 9ml 浓 HCl 缓缓加入水解管，充分浸泡样品后抽真空封管。将水解管置于 110℃ 恒温烘箱中水解 22h，冷却，将试液摇匀，用滤纸过滤。用移液管移取 1.0ml 滤液于蒸发皿，在 100℃ 水浴锅上蒸干浓缩。定容 25ml，用滤纸过滤后再用 0.45μm 微孔滤膜过滤。取样置氨基酸分析仪样品瓶上机测试。测试条件为：分离柱 4.6mm × 60mm(#2622)、柱温 57℃、UV 检测器温度 136℃、氮气压力 37kPa，缓冲液流速 0.40ml/min、茚三酮流速 0.35ml/min。

2 结果与分析

2.1 醋蛋的浸泡工艺

2.1.1 浸泡时间

在醋蛋比 3.0ml/g、常温下，分别浸泡 0、6、12、24、36、60h 研究醋蛋浸泡过程中蛋白质水解度的变化，结果见图 1。

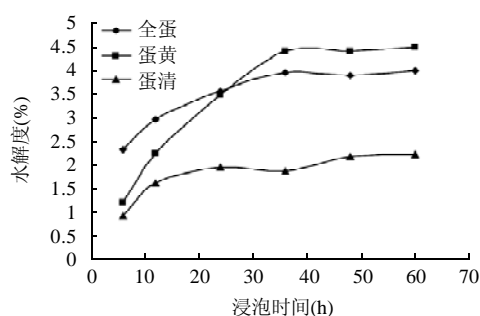


图1 浸泡时间对水解度的影响

Fig.1 Effects of soaking time on DH

由图 1 可以看出，浸泡时间对醋蛋中蛋白质的水解度有较大影响，开始时随着时间的延长蛋白质水解度增加，在浸泡时间达到 36h 后，醋蛋浸泡液水解度增幅缓慢，趋于稳定。这是因为鸡蛋中的蛋白质在酸性条件下发生了水解反应，在 36h 之后反应达到平衡，水解度不再有明显的变化。因此确定醋蛋的浸泡时间为 36h。

2.1.2 醋用量

分别以醋蛋比 2.0、2.5、3.0、4.0ml/g 于常温下浸泡 36h 后测其水解度，确定适宜的醋用量，结果见图 2。

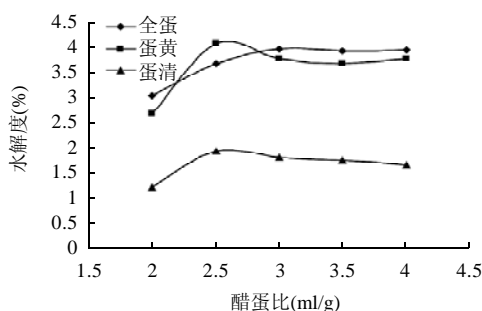


图2 醋用量对水解度的影响

Fig.2 Effects of vinegar volume on DH

由图2可以看出,用醋量较少时,反应体系的酸度较低,蛋白质水解效果不明显;而用醋量过大时,醋与鸡蛋发生更为复杂的反应,可能导致蛋白质变性,影响水解过程的进行。全蛋在醋蛋比为3.0ml/g时水解效果较好,而蛋黄和蛋清在醋蛋比为2.5ml/g时水解效果较好。全蛋浸泡比蛋黄、蛋清分开浸泡时用醋量多,可能是由于在蛋壳溶解的过程中,消耗一定量的酸,使体系的酸度降低,所以需要较高的醋蛋比。

2.1.3 浸泡温度

以全蛋醋蛋比3.0ml/g、蛋黄和蛋清醋蛋比为2.5ml/g,分别在10、20、30、40、50℃下浸泡36h,考察浸泡温度对蛋白质水解度的影响,结果见图3。

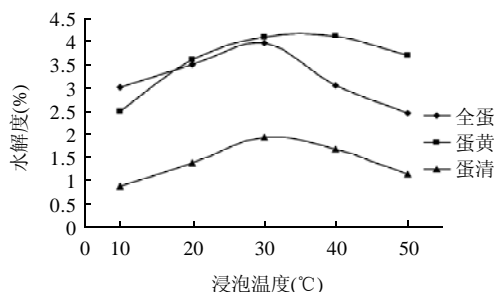


图3 浸泡温度对水解度的影响

Fig.3 Effects of temperature on DH

由图3可以看出,浸泡温度在20~25℃时,水解效果比较理想。这是因为在一定的温度范围内,反应速率随温度升高而增加,反应平衡也会发生相应的改变;当温度过高时,会造成蛋白质变性、结块,从而不利于水解过程的进行。

2.2 醋蛋的ACE抑制活性

在比较ACE抑制剂的活性时,半抑制浓度(IC₅₀)是最直观的评价指标。实验发现蛋清经醋浸泡后严重变性成凝胶状,不易进行ACE抑制活性测定,因此仅对利用全蛋和蛋黄制备的醋蛋进行了测定,实验结果见图4。

从图4可知,醋蛋的浓度增加,ACE的抑制活性增大,说明ACE抑制活性与醋蛋浓度之间有浓度-效应

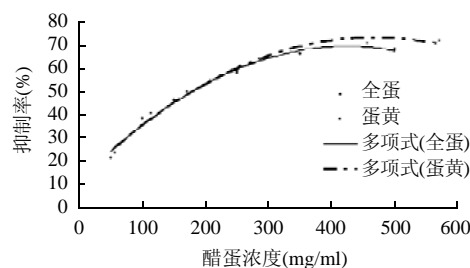


图4 醋蛋浓度与ACE抑制率关系曲线

Fig.4 Correlative curve of vinegar-egg (yolk) concentration with ACE inhibitory activity

关系;但当浓度增大到某一值时,ACE抑制率趋于平稳。通过一元二次回归分析处理可得,醋蛋(利用全蛋制备)抑制率的回归方程为: $y = -0.0003x^2 + 0.2749x + 11.134$, R^2 为 0.9851,通过回归方程计算可得,其半抑制浓度(IC₅₀)为 174.68mg/ml。同样的方法得到醋蛋(利用蛋黄制备)抑制率的回归方程为: $y = -0.0003x^2 + 0.2635x + 11.715$, R^2 为 0.9875,半抑制浓度(IC₅₀)为 183.72mg/ml。

2.3 醋蛋中ACE抑制肽的初步分离

处理后的醋蛋液进行Sephadex G-50凝胶柱层析分离,用0.1mol/L的NaCl洗脱,洗脱曲线如图5~6所示。利用全蛋制备的醋蛋和利用蛋黄制备的醋蛋都有两个明显的吸收峰,峰1是分子量比较大的蛋白水解物,峰2的分子量较小,峰2较宽,可能的原因是组分较复杂,需要进一步的分离。

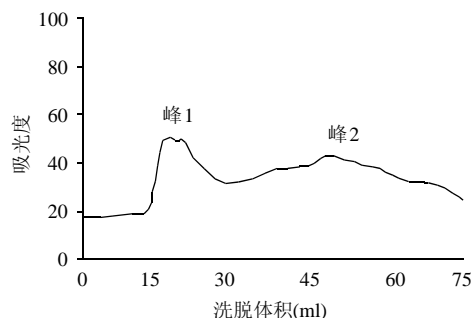


图5 Sephadex G-50分离醋蛋(利用全蛋制备)的洗脱曲线

Fig.5 Sephadex G-50 elution profile of vinegar-egg

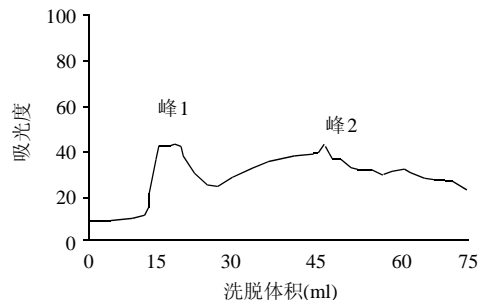


图6 Sephadex G-50分离醋蛋(利用蛋黄制备)的洗脱曲线

Fig.6 Sephadex G-50 elution profile of vinegar-yolk

表1中列出了各吸收峰的ACE抑制率,可见峰1几

乎无 ACE 抑制活性，峰 2 ACE 抑制活性较高。

表 1 各吸收峰的 ACE 抑制率
Table 1 ACE inhibitory activity of elution peaks in Fig.5 and Fig.6

吸收峰	利用全蛋制备的醋蛋			利用蛋黄制备的醋蛋		
	峰 1	峰 2 前部	峰 2 后部	峰 1	峰 2 前部	峰 2 后部
抑制率(%)	2.4	7.3	87.3	0	68.5	73.9

2.4 醋蛋中 ACE 抑制肽的氨基酸组成

对 ACE 抑制活性较高的峰 2 后部组分进行氨基酸组成分析，结果如表 2、3 所示。

表 2 醋蛋(利用全蛋制备)峰 2 后部组分氨基酸组成分析
Table 2 Amino acid analysis for back of peak 2 from vinegar-egg

氨基酸	含量(g/100ml)	氨基酸	含量(g/100ml)
Asp	0.16	Met	0.04
Thr	0.07	Ile	0.07
Ser	0.09	Leu	0.15
Glu	0.16	Tyr	0.07
Pro	0.05	Phe	0.09
Gly	0.05	Lys	0.10
Ala	0.07	His	0.02
Cys	0.03	Arg	0.13
Val	0.07	Try	0.01

表 3 醋蛋(利用蛋黄制备)峰 2 后部组分氨基酸组成分析
Table 3 Amino acid analysis for back of peak 2 from vinegar-yolk

氨基酸	含量(g/100ml)	氨基酸	含量(g/100ml)
Asp	0.34	Met	0.09
Thr	0.17	Ile	0.18
Ser	0.21	Leu	0.35
Glu	0.43	Tyr	0.15
Pro	0.19	Phe	0.16
Gly	0.10	Lys	0.30
Ala	0.17	His	0.09
Cys	0.03	Arg	0.27
Val	0.18	Try	0.01

3 结 论

3.1 醋蛋适宜的浸泡条件为浸泡时间 36h，全蛋醋蛋比 3.0ml/g、蛋黄和蛋清醋蛋比 2.5ml/g，浸泡温度 20~25℃。蛋清经醋浸泡后严重变性成凝胶状，感官分析表明醋蛋的腥味来源于蛋黄。

3.2 利用全蛋制备的醋蛋其 ACE 半抑制浓度为 174.68mg/ml，利用蛋黄制备的醋蛋其 ACE 半抑制浓度为 183.72mg/ml。

3.3 醋蛋液经 Sephadex G-50 凝胶柱初步分离后，得到两个组分，其中第一个组分几乎无 ACE 抑制活性，第二个组分的 ACE 抑制活性较强。

3.4 对 ACE 抑制活性较高的峰 2 后部组分进行氨基酸组成分析，结果表明分别利用全蛋和蛋黄制备的醋蛋中各种氨基酸的比例基本一致，因此认为醋蛋中的 ACE 抑制肽主要来源于蛋黄。

3.5 醋蛋中 ACE 抑制肽的分离、纯化有待于进一步研究。

参考文献：

[1] 艾华, 吴玲, 陈吉棣, 等. 醋蛋液调节血脂和抗氧化作用的初步实验研究[J]. 食品科学, 1997, 18(10): 3-5.

[2] 韦玉先, 周赤贞, 唐祖年, 等. 醋蛋药理作用的实验研究[J]. 桂林医学院学报, 1997, 10(6): 421-423.

[3] 吴桂贞, 陈黎斌. 醋蛋浸泡工艺的确定及醋蛋液的酶解[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(7): 2078-2079; 2130.

[4] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994(11): 65-67.

[5] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1998.

[6] 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.

[7] SUETSUNA K, MAEKAWA K, CHEN J R. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2004, 15: 267-272.

[8] 徐鑫. 酪氨酸钠制备ACE抑制肽的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2005.