食源性明胶多肽的制备、分离及其抗冻活性

汪少芸，赵立娜，周焱富，饶平凡
(福州大学生物科学与工程学院，福建 福州 350002)

摘 要：用碱性蛋白酶水解食源性明胶以制备抗冻多肽，通过控制酶解条件获得具有抗冻活性的明胶多肽酶解液，并对其进行色谱分离、质谱鉴定及氨基酸全序列测定。结果表明：当酶与底物比1:15、酶解时间30min、酶解温度45℃时，所获得的明胶多肽酶解液的抗冻活性最高；酶解制备的明胶多肽液经过冷-热循环(cold-heat-stage)后抑制冰晶生长和抗冻活性表现出特定的规律，说明酶解条件的控制优化是实现明胶多肽液抗冻活性的关键。通过Sephadex G-50、SP Sephadex C-25、C_{18}-RPLC色谱分离和MALDI-TOF质谱鉴定，确定分子质量为2107D的特异性多肽表现出显著的抗冻活性。通过Edman降解法测得其氨基酸全序列为GERGFPGERGSPGAQGLQGPR。

关键词：水解；明胶；抗冻多肽；分离

Preparation and Isolation of Food-origin Gelatin Peptide and Ice Crystal Inhibition

WANG Shao-yun，ZHAO Li-na，ZHOU Yan-fu，RAO Ping-fan
(College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

Abstract：Food-origin gelatin peptides with antifreeze activity were obtained under controlled hydrolysis conditions by alcalase. The specific antifreeze peptide was isolated by chromatography and identified by mass spectroscopy. The full amino acid sequence was also determined. The results showed that gelatin peptides prepared at [*E*]/[*S*] ratio of 1:15, hydrolysis time of 30 min and hydrolysis temperature of 45 ℃ revealed the best antifreeze activity. The antifreeze peptide on ice crystal inhibition showed specific rules during cold-heat-stage cycles. The control of hydrolysis conditions is critical. The specific antifreeze peptide was fractionated by size exclusion (Sephadex G-50), ion exchange (sulfopropyl Sephadex C-25) column and C_{18}-HPLC, respectively. The molecular mass of the specific antifreeze peptide was determined to be 2107 D by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. The purified gelatin peptide with molecular mass of 2107 D strongly inhibited the growth of ice crystal in ice cream mix. The full amino acid sequence was determined to be GERGFPGERGSPGAQGLQGPR by Edman degradation.

Key words：hydrolysis；gelatin；antifreeze peptide；isolation
中图分类号：TS201.4 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)09-0135-05
doi:10.7506/spkx1002-6630-201309028

众多食品在低温冷链上的冷冻、贮存、运输和冻融过程中的冰晶生长和重结晶问题是制约产品品质的关键[1-4]。温度的反复波动使产品不断遭受冰晶生长、冻融和重结晶，损伤细胞和组织结构，使产品失去应有的品质，其导致的质量破坏和巨大经济损失越来越受到人们的关注[1-3]。如何控制低温冷链过程中产品的冰晶生长及重结晶，是保证众多食品在低温运输和贮存过程中品质不发生劣变的关键[1-2]。

抗冻蛋白是一类附着在冰晶体表面而抑制冰晶的生长和重结晶的活性蛋白质[5-7]。近年来国内外对抗冻蛋白的研究十分活跃[8-14]。目前的研究主要集中在从极地鱼类[15-17]、陆地昆虫[18-19]、植物[20-21]和细菌[22]等生物体中分离到多种抗冻蛋白，并寻求它们在食品、医学和其他工业上的应用[6,23]。天然分离纯化得到的抗冻蛋白数量极少，限制了其在食品工业中的应用。当科学家致力于转基因技术以提高生物体来源的抗冻蛋白产量时，转基因抗冻蛋白在食品应用中的安全性顾虑则成为广大消费者、欧盟组织和食品药品管理组织(FDA)共同担忧的焦点[2,22]。研究[24-25]表明，抗冻蛋白的抗冻活性片断只存在于局部的特异多肽链结构域中，并不是整体蛋白质在起作用，因此，如何获得食品源的结构紧凑的高活性抗冻多肽，已成为抗冻蛋白新的研究方向。

本实验以食用明胶为原材料，通过控制内切蛋白酶的酶解条件，使之产生具有特定的肽链长度和结构组成

收稿日期：2013-03-11
基金项目：国家自然科学基金项目(31071498)；国家留学回国人员启动基金项目(819129)；福建省新世纪优秀人才支持计划项目(JA10012)
作者简介：汪少芸(1970—)，女，教授，博士，研究方向为食品生物化学。E-mail：shywang@fzu.edu.cn

的活性多肽，使抗冻活性得以高效实现，以期为食品源抗冻多肽的制备提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

食源性明胶(225B40牛明胶) 美国Sanofi生物有限公司；冰淇淋基体为自制，其配方为：12%乳脂、9%～12%脱脂奶粉、10%～16%蔗糖、0.1%乳化剂，其余为水。

碱性蛋白酶(EC 3.4.22.2，酶活力264U/g) 美国Sigma试剂公司；其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Sephadex G-50凝胶过滤色谱柱(100cm×2.6cm，(100～300)μm)、SP Sephadex C-25离子交换色谱(55cm×2.0cm，(40～120)μm) 美国Pharmacia公司；Bondapak C_{18}高效液相色谱柱(250mm×4.6mm，10μm) 美国Waters公司；多倍低温显微镜、自动照相系统 日本Nike公司；MALDI-TOF质谱仪 美国Applied Biosystems公司。

1.3 方法

1.3.1 抗冻活性检测体系的确定

利用抗冻活性冷-热循环(cold-heat-stage)检测系统，结合多倍低温显微镜和自动照相系统，组构抑制冰晶生长的抗冻活性检测系统。以液氮维持操作过程中的低温环境。以每3min为1个循环使其保持在－14～－12℃之间，模拟产品在低温贮存运输过程中的温度波动。利用冰淇淋基体为研究载体，将样品置于载玻片上，记录样品在冷热循环过程中的冰晶生长实时图片，并与空白对照组作比较；利用统计学分析，对冰晶的平均直径和面积进行显著性分析，计算其晶体生长差异的规律性。冰晶的数目及大小较空白对照组样品减少，则表明样品具有抑制冰晶生长的能力。共进行7次循环，显微像320倍予以记录。

1.3.2 抗冻多肽的制备条件单因素试验

配制20%的明胶溶液，根据预实验结果，控制pH9.0，分别优化酶与底物比、酶解时间、酶解温度等抗冻多肽制备条件。酶解结束后将水解液在沸水中处理5min，即终止水解。

1.3.2.1 明胶酶解制备抗冻多肽的料液比单因素试验

根据预实验结果，控制酶解温度37℃、pH 9.0、酶解时间30min，酶与底物比分别为1:100、1:50、1:25、1:15和1:10时，测定不同酶与底物比条件下酶解物抑制冰晶生长情况，计算抗冻活性大小，确定明胶酶解制备抗冻多肽的料液比。

1.3.2.2 明胶酶解制备抗冻多肽的酶解时间单因素试验

控制酶解温度37℃、pH9.0、酶与底物比1:15，酶解时间分别为10、20、30、40、60min时，测定不同酶解时间条件下的抑制冰晶生长情况，计算抗冻活性大小，确定明胶酶解制备抗冻多肽的酶解时间。

1.3.2.3 明胶酶解制备抗冻多肽的酶解温度单因素试验

控制酶解时间30min、pH9.0、酶与底物比1:15，酶解温度分别为37、45、55℃时，测定不同酶解温度条件下的抑制冰晶生长情况，计算抗冻活性大小，确定明胶酶解制备抗冻多肽的酶解温度。

1.3.3 抗冻多肽的分离纯化

1.3.3.1 凝胶色谱

抗冻多肽酶解物用Sephadex G-50凝胶过滤色谱柱进行分离，洗脱液为pH7.0 0.01mol/L的磷酸缓冲液(PBS)，以1mL/min流速收集样品(5mL/管)，测定样品在225nm波长处的吸收值，绘制洗脱曲线。分别测定所收集样品的抑制冰晶生长情况，计算冰晶尺寸，并用来表示抗冻活性大小。

1.3.3.2 离子交换色谱

收集Sephadex G-50凝胶过滤色谱分离的抗冻活性组分，采用SP Sephadex C-25离子交换色谱进一步分离，样品平衡液为pH5.4 0.01mol/L的PBS缓冲液，用0～0.5mol/L的NaCl溶液进行梯度洗脱。以1mL/min流速收集样品(5mL/管)，测定样品在225nm波长处的吸收值，绘制洗脱曲线。分别测定所收集样品的抑制冰晶生长情况，计算冰晶尺寸，并用来表示抗冻活性大小。

1.3.3.3 反相高效液相色谱

收集SP Sephadex C-25离子交换色谱的抗冻活性组分，采用C_{18}高效液相色谱柱进一步分离；进样量为100μL；流动相的A液为去离子水，B液为乙腈；流速为3.0mL/min，测定样品在225nm波长处的吸收值，绘制洗脱曲线。分别测定所收集样品的抑制冰晶生长情况，计算冰晶尺寸，并来表示抗冻活性大小。

1.3.4 质谱鉴定

收集分别通过Sephadex G-50凝胶过滤色谱、SP Sephadex C-25离子交换色谱和C_{18}高效液相色谱柱分离的强抗冻活性的特异性多肽，利用MALDI-TOF质谱，鉴定其分子质量大小。

1.3.5 氨基酸序列测定

利用蛋白质固相序列分析仪，根据Edman降解法测定强抗冻活性特异性多肽的氨基酸全序列，并分析序列结果。

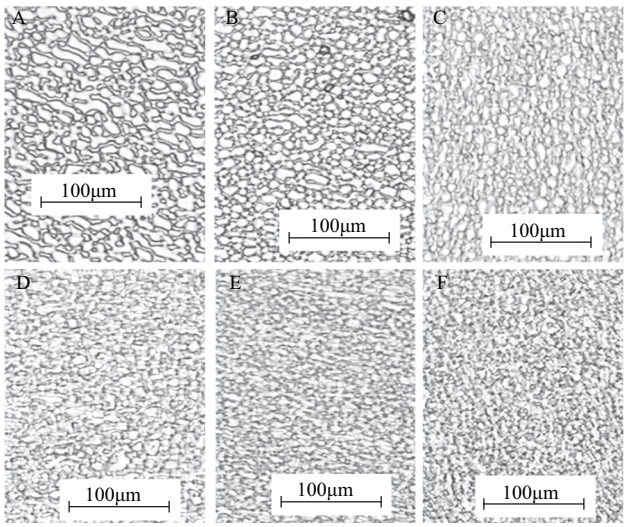
1.4 数据处理与统计

数理统计分析采用t检验，当$P<0.05$时，具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 抗冻多肽的制备条件单因素试验

2.1.1 酶解制备抗冻多肽的酶与底物比优化



A. 空白对照组；B～F.酶与底物比分别为1:100、1:50、1:25、1:15、1:10的酶解样品。

图 1 不同酶与底物比条件下酶解物的抑制冰晶生长图

Fig.1 Effect of gelatin hydrolysate from different [*E*]/[*S*] ratios on the growth of ice crystal in ice cream.

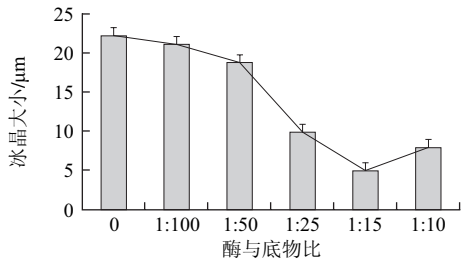


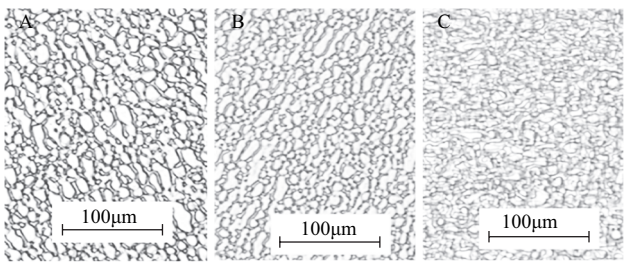
图 2 不同酶与底物比的明胶酶解物的冰晶抑制结果

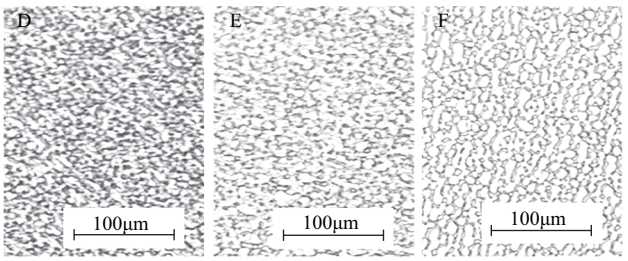
Fig.2 Inhibitory effect of gelatin hydrolysate from different [*E*]/[*S*] ratios on the growth of ice crystal

由图1、2可知，随着酶与底物比逐渐增大，产生的冰晶尺寸逐渐减少，当酶与底物比为1:10时，冰晶则出现增大趋势。采用数理统计计算冰晶尺寸的平均大小，可以直观看出抗冻活性大小。因此确定明胶酶解制备抗冻多肽的最适酶与底物比为1:15。

2.1.2 酶解制备抗冻多肽的酶解时间优化

由图3、4可知，当酶解时间从10min延长至20、30min时，冰晶的尺寸逐渐减少，抗冻活性逐渐增加；而当酶解时间继续增大至40、60min时，产生的酶解液冰晶尺寸增大，抗冻活性下降。所以明胶酶解制备抗冻多肽的酶解时间以30min为宜。





A. 空白对照组；B～F. 酶解时间为10、20、30、40、60min的酶解样品。

图 3 不同酶解时间下酶解物的抑制冰晶生长图

Fig.3 Effect of gelatin hydrolysate from different hydrolysis time on the growth ice crystal in ice cream

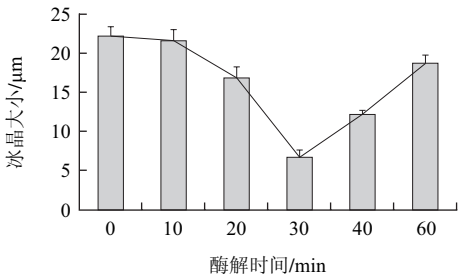
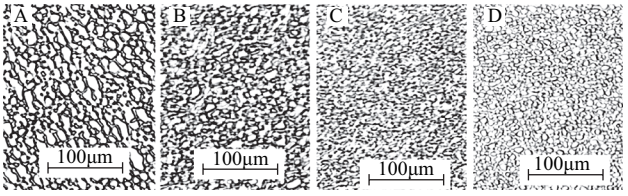


图 4 不同酶解时间的明胶酶解物的冰晶抑制结果

Fig.4 Inhibitory effect of gelatin hydrolysate from different hydrolysis time on the growth of ice crystal

2.1.3 酶解制备抗冻多肽的酶解温度优化



A. 空白对照组；B～D. 酶解温度分别为37、45、55℃的酶解样品。

图 5 不同酶解温度条件下酶解物的抑制冰晶生长图

Fig.5 Effect of gelatin hydrolysate from different temperatures on the growth of ice crystal in ice cream

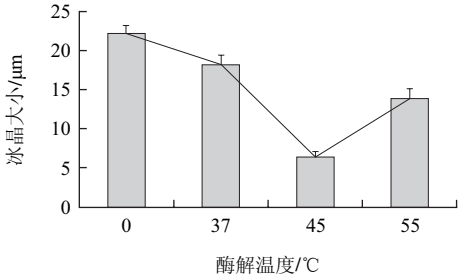


图 6 不同酶解温度条件下的明胶酶解物的冰晶抑制结果

Fig.6 Inhibitory effect of gelatin hydrolysate from different temperatures on the growth of ice crystal

由图5、6可知，45℃酶解液的冰晶尺寸最小，生长抑制能力最强。因此优化出制备抗冻多肽的酶解温度为45℃。

2.2 抗冻多肽的分离纯化

2.2.1 凝胶色谱

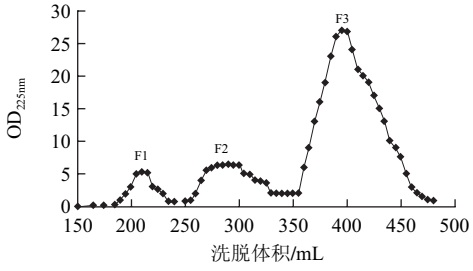
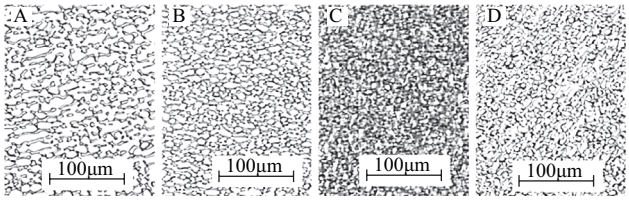


图 7 Sephadex G-50凝胶过滤色谱分离图

Fig.7 Elution pattern of Sephadex G-50



A.空白对照组；B～D分别为分离组分F1、F2、F3。

图 8 Sephadex G-50凝胶过滤色谱分离组分F1、F2和F3的抑制冰晶生长情况

Fig.8 Effect of fractions 1, 2 and 3 from Sephadex G-50 on the growth of ice crystal

由图7、8可知，根据F1、F2、F3洗脱峰的抑制冰晶生长情况，可以得到洗脱峰F3的抗冻活性最显著($P<0.05$)。

2.2.2 离子交换色谱

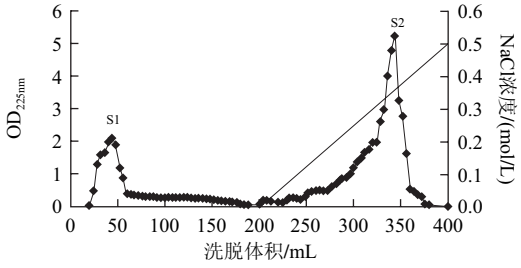
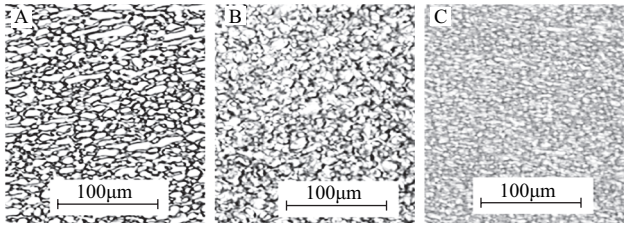


图 9 SP Sephadex C-25离子交换色谱分离图

Fig.9 Elution pattern of Sepharose SP C-25



A.空白对照组；B、C分别为分离组分S1、S2。

图 10 SP-Sephadex C-25离子交换色谱分离组分S1和S2的抑制冰晶生长图

Fig.10 Effect of fractions 1 and 2 from SP-Sephadex C-25 on the growth of ice crystal

如图9、10所示，对洗脱峰S1、S2充分透析脱盐，根据其其抑制冰晶生长情况，得到洗脱峰S2的抗冻活性最显著($P<0.05$)。

2.2.3 反相高效液相色谱

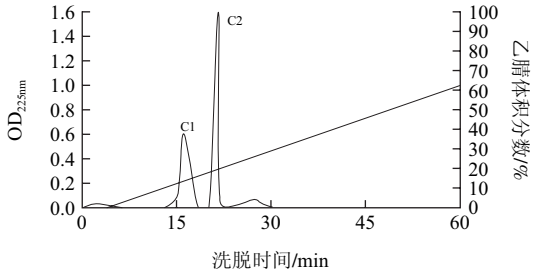
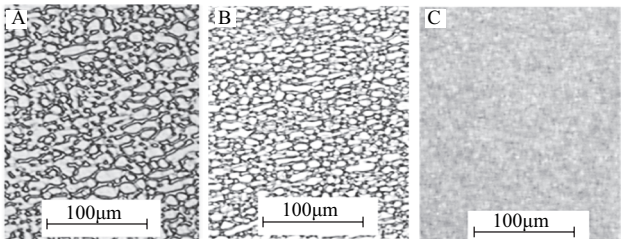


图 11 C_{18}-HPLC 色谱分离图

Fig.11 Elution pattern of C_{18}-HPLC



A.空白对照组；B、C分别为分离组分C1、C2。

图 12 C_{18} RPLC色谱分离组分C1和C2的抑制冰晶生长图

Fig.12 Effect of fractions C1 and C2 from C_{18}-HPLC on the growth of ice crystal

如图11、12所示，对收集的样品充分去除挥发性溶剂后，通过抑制冰晶生长情况计算抗冻活性大小，得到洗脱峰C2的抗冻活性最显著($P<0.05$)。

2.3 质谱鉴定

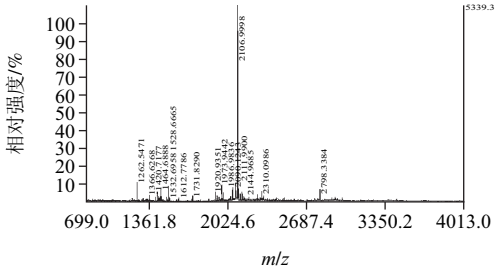


图 13 MALDI-TOF质谱鉴定抗冻多肽分子质量

Fig.13 Molecular weight (M_W) of antifreeze fraction C2 by MALDI-TOF

由图13可知，具有显著活性的抗冻多肽分子质量为2107D。

2.4 氨基酸序列分析

根据Edman降解法测定强抗冻活性特异性多肽的氨基酸全序列，并进行序列分析，获得其氨基酸全序列即一级结构为：GERGFPGERGSPGAQGLQGPR。

2.5 二级结构及作用机理推测

具有特定氨基酸长度和序列的强抗冻活性多肽C2，其来源于食源性明胶。明胶来源于胶原蛋白，胶原蛋白的结构是三股α螺旋结构，故推测明胶多肽的二级结构表现为α螺旋，具有α螺旋的强抗冻活性多肽的螺旋链中—NH基团和冰分子的—OH形成氢键—N—H…O—H(图14)，多肽通过氢键结合于冰核棱晶的表面，从而抑制了其生长。而且，分子质量2107D的肽链具有足够的亲水性、柔韧性，加上明胶多肽富含的脯氨酸和丙氨酸残基的烷基侧链可以提供部分的非极性环境通过疏水作用以稳定多肽和冰之间形成的氢键[12-13]，并能够对抗冰水之间氢键相互作用的竞争性，使之表现出显著的冰晶抑制活性。

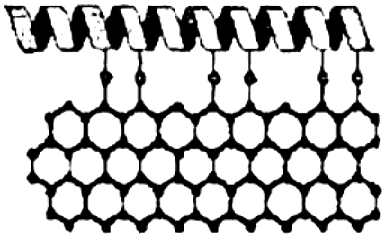


图14 抗冻多肽与冰结构分子表面形成氢键的模型

Fig.14 Model of hydrogen bonds between antifreeze peptide and the surface of ice molecules

3 结 论

以食源性明胶为原材料，通过控制碱性蛋白酶的酶解条件，使之酶切为特定的活性多肽，使得抗冻活性得以高效实现。对得到的抗冻多肽溶液通过Sephadex G-50、SP Sephadex C-25、C_{18} RPLC色谱分离和MALDI-TOF质谱鉴定，最终得到分子质量为2107D的强抗冻活性多肽。其可能的作用机理为具有α螺旋的强抗冻活性多肽在冰晶的棱晶面内与水分子形成氢键，多肽通过氢键结合于冰核棱晶的表面，从而抑制冰晶长大。本研究结果将为食源性抗冻多肽的制备及探索其在食品领域的广泛应用提供一定的依据。

参考文献：

[1] HARTEL R W. Crystallization in foods[M]. New York: Aspen Publishers Inc., 2001: 374-380.

[2] SUN D W. Emerging technologies for food processing[M]. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005: 468-556.

[3] 张娅楠, 赵利, 刘华, 等. 水产品的冷冻变性及鱼糜抗冻剂研究进展[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2011, 32(6): 88-92.

[4] WANG S Y, AGYARE K, DAMODARAN S. Optimisation of hydrolysis conditions and fractionation of peptide cryoprotectants from gelatin hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2009, 115(2): 620-630.

[5] ADAPA S, SCHMIDT K A, JEON I J, et al. Mechanisms of ice crystallization and recrystallization in ice cream: a review[J]. Food Reviews International, 2000, 6: 259-271.

[6] 汪少芸, 赵珺, 吴金鸿, 等. 抗冻蛋白的研究进展及其在食品工业中的应用[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2011, 29(4): 50-57.

[7] SIDEBOTTOM C, BUCKLEY S, PUDNEY P, et al. Heat-stable antifreeze protein from grass[J]. Nature, 2000, 406: 325-328.

[8] GRAHAM L A, DAVIES P L. Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas[J]. Science, 2005, 310: 461.

[9] WHARTON D A, BARRETT J, GOODALL G, et al. Ice-active proteins from the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*[J]. Cryobiology, 2005, 51(2): 198-207.

[10] MEISTER K, EBBINGHAUS S, XU Y, et al. Long-range protein-water dynamics in hyperactive insect antifreeze proteins[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(5): 1617-1622.

[11] 赵干, 马纪, 薛娜, 等. 新疆准噶尔小胸鳖甲抗冻蛋白基因的克隆和抗冻活性分析[J]. 昆虫学报, 2005, 48(5): 667-673.

[12] 谢文静, 刘俊杰, 李前忠. 第一类鱼抗冻蛋白对冰晶生长界面层结构的影响[J]. 生物物理学报, 2011, 27(1): 66-76.

[13] 赵珺, 汪少芸, 李晓坤. 天然抗冻多肽的制备、分离及细菌低温保护活性研究[J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2013, 41(1): 121-126.

[14] 汪少芸, 李晓坤, 周焱富, 等. 抗冻蛋白的作用机制及基因工程研究进展[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2012, 30(2): 58-64.

[15] MARSHALL C B, FLETCHER G L, DAVIES P L. Hyperactive antifreeze protein in a fish[J]. Nature, 2004, 429: 153.

[16] GRAHAM L A, MARSHALL C B, LIN F H, et al. Hyperactive antifreeze protein from fish contains multiple ice-binding sites[J]. Biochem, 2008, 47(7): 2051-2063.

[17] WANG S Y, ZHAO J, XU Z B, et al. Preparation, partial isolation of antifreeze peptides from fish gelatin with hypothermia protection activity[J]. Applied Mechanics and Materials, 2012, 140: 411-415.

[18] GRAHAM L A, DAVIES P L. Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas[J]. Science, 2005, 310: 461-462.

[19] GRAETHER S P, SYKES B D. Cold survival in freeze-tolerant insects: the structure and function of beta-helical antifreeze proteins[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271: 3285-3296.

[20] KONTOGIORGOS V, GOFF H D. Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods[J]. J Food Biochem, 2007, 31: 139-160.

[21] ZHANG Cao, ZHANG Hui, YAO Huiyyuan, et al. Purification of antifreeze protein from wheat bran (*Triticum aestivum* L.) based on its hydrophilicity and ice-binding capacity[J]. J Agri Food Chem, 2007, 19: 7654-7658.

[22] GILBERT J A, HILL P J, DODD C E. Demonstration of antifreeze protein activity in antarctic lake bacteria[J]. Microbiology, 2004, 150(1): 171-180.

[23] WANG S Y, DAMODARAN S. Ice-structuring peptides derived from bovine collagen[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(12): 5501-5509.

[24] NOBEKAWA T, HAGIWARA Y. Interaction among the twelve-residue segment of antifreeze protein, or its mutants, water and a hexagonal ice crystal[J]. Molecular Simulation, 2008, 34(6): 591-610.

[25] KUN H, MASTAI Y. Activity of short segments of type Ⅰ antifreeze protein[J]. Biopolymers, 2007, 88(6): 807-814.