

响应面法优化青蛤降血压肽酶解制备工艺

詹秋桂, 李杰煌, 施鹏飞, 雷鸣, 罗李王, 余方苗*

(浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江省海洋生物医用制品工程技术研究中心, 浙江舟山 316022)

摘要 [目的]采用响应面法优化青蛤降血压肽的酶解制备工艺。[方法]以青蛤肉为原料,木瓜蛋白酶为酶种,血管紧张素转换酶抑制率为指标,在单因素试验的基础上,选择 pH、酶解时间和料液比为影响因素,进行 3 因素 3 水平的 Box - Behnken 试验设计,采用响应面法分析 3 个因素对青蛤降血压肽制备工艺的影响。[结果]木瓜蛋白酶酶解制备青蛤降血压肽的最佳工艺条件为 pH 5.8、酶解时间 8.4 h、料液比 1:3.1,该条件下酶解产物对血管紧张素转换酶抑制率达 93.58%。[结论]该研究为青蛤的高值化利用和降血压肽的制备提供了新思路。

关键词 青蛤;木瓜蛋白酶;降血压肽;响应面法

中图分类号 S-3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)05-0007-03

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Process for Preparation of Antihypertensive Peptides from *Cyclina sinensis* by Response Surface Methodology

ZHAN Qiu-gui, LI Jie-huang, SHI Peng-fei et al (Zhejiang Provincial Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, School of Food Science and Medicine of Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316022)

Abstract [Objective] Enzymatic hydrolysis process for preparing antihypertensive peptides from *Cyclina sinensis* was optimized by using response surface methodology. [Method] Taking angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition rate as index, a 3-factor and 3-level Box-Behnken design coupled with response surface analysis was carried out to investigate the effects of pH, hydrolysis time and solid-liquid ratio on ACE inhibition rate. [Result] The optimal conditions for preparing antihypertensive peptides from *Cyclina sinensis* by using papain were as followed: pH 5.8, hydrolysis time 8.4 h and solid-liquid ratio 1:3.1, and the ACE inhibition rate of enzymatic hydrolysates were up to 93.58% under these conditions. [Conclusion] This study provides novel ideas for the high-value use of *Cyclina sinensis* and preparing antihypertensive peptides.

Key words *Cyclina sinensis*; Papain; Antihypertensive peptides; Response surface methodology

我国成年人高血压的发病率约为 30%, 血压升高易引发脑卒中、心肌梗死、肾衰竭、冠心病等心血管疾病, 每年因高血压导致死亡人数高达 200 万, 防治高血压成为研究的热点^[1]。血管紧张素转化酶 (ACE) 通过催化血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II 和使缓激肽失活调节机体血压, 降血压肽是一类具有 ACE 抑制作用的活性肽^[2]。目前, 临床广泛应用人工合成的 ACE 抑制剂普利类药物 (如卡托普利、依那普利和赖诺普利等) 具有强降血压作用, 但长期服用会产生恶心、眩晕、剧烈咳嗽、肾功能损害等副作用^[3]。因此, 开发具有 ACE 抑制活性高、安全无毒副作用的活性物质成为研究的热点。

近年来, 海洋生物蛋白通过酶解法制备 ACE 抑制肽的研究得到极大关注, 目前, 研究人员已从海洋鱼类如鲑鱼^[4]、金枪鱼^[5]、太平洋鲑鱼^[6]、贝类如贻贝^[7]、四角蛤蜊^[8]、藻类如螺旋藻^[9]、裙带菜^[10] 等不同海洋来源蛋白^[11] 中制备分离出高活性的 ACE 抑制肽。青蛤 (*Cyclina sinensis*) 是广泛分布于我国沿海常见的贝类, 属软体动物门双壳纲帘蛤目帘蛤科。青蛤提取物具有抗氧化^[12]、抗肿瘤^[13]、降血压^[14] 和提高机体免疫作用^[15] 等功效。笔者在单因素试验的基础上, 采用 Box - Behnken 设计试验对木瓜蛋白酶酶解青蛤制备 ACE 抑制肽的工艺进行了优化, 以期为进一步从青蛤中制备、分离纯化得到高活性 ACE 抑制肽奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料。青蛤购于舟山老碇菜场; 血管紧张素转换酶 ACE (来源于兔肺)、马尿酸和马尿酸 - 组氨酰 - 亮氨酸 (N - Hippuryl - His - Leu, HHL)、三氟乙酸均购于 Sigma 公司; 木瓜蛋白酶购于亚太恒信生物科技有限公司; 乙腈、甲醇为色谱纯; 硼砂、氯化钠和硼酸等为国产分析纯, 购于国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器。1260 型高效液相色谱仪 (HPLC), 美国安捷伦公司; HH - 6 型恒温水浴锅, 江苏金坛市成辉仪器有限公司; Milli - A20 型超纯水系统, 美国默克密理博公司; CF16RN 型高速冷冻离心机, 日立仪器有限公司; AUW - 120 型电子天平, 日本岛津 (上海) 有限公司; Delta - 320 型 pH 计, 梅特勒托利多仪器 (上海) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 工艺流程。青蛤 → 去壳 → 清洗 → 匀浆 → 异丙醇脱脂 → 纯水泡洗至无味 → 酶解 → 灭活 → 冷却 → 离心取上清液 → 冷冻干燥 → 青蛤降血压肽。

1.2.2 青蛤酶解工艺。青蛤去壳取肉, 洗净匀浆并用异丙醇脱脂 6 h, 于 12 000 r/min、4 °C 条件下离心 8 min, 收集沉淀, 纯水洗净至无异丙醇味备用。称取适量脱脂固体, 选用木瓜蛋白酶, 在温度 55 °C、pH 6.0、料液比 1:3.0 (g/mL)、时间 8 h、加酶量 2 000 U/g 条件下进行酶解, 酶解结束后, 于沸水浴中灭活 15 min, 冷却至室温后于 12 000 r/min、4 °C 条件下离心 10 min, 收集上清液, 冷冻干燥得到青蛤降血压肽。

1.2.3 HPLC 法检测青蛤降血压肽 ACE 抑制率。参照张艳萍等^[7] 报道的方法并根据试验条件进行修改: 取 120 μL

基金项目 浙江省大学生科技创新项目 (2015R411046); 浙江省教育厅项目 (Y201534400)。

作者简介 詹秋桂 (1993—), 男, 湖北蕲春人, 本科生, 专业: 药学。* 通讯作者, 助理研究员, 博士, 从事海洋活性物质功能研究。

收稿日期 2017 - 11 - 22

5.0 mol/L HHL 溶液于 1.5 mL 离心管中,加入 30 μ L 青蛤降血压肽冻干粉溶液(5.0 mg/mL),混合均匀后于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴中预热 5 min,加入 10 μ L 0.1 U/mL ACE 溶液,混合均匀后于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅中反应 1 h,结束后加入 150 μ L 1.0 mol/L HCl 淬灭反应,得到抑制剂反应液。用 30 μ L 硼酸缓冲盐溶液(0.1 mol/L, pH 8.3, 含 0.3 mol/L NaCl)代替抑制剂提取液作空白对照组,样品溶液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后进样到 HPLC 系统检测。ACE 抑制率计算公式为:

$$\text{ACE 抑制活性} = (E - Y) / E \times 100\%$$

式中, E 为空白组中马尿酸的峰面积(mAU \cdot s); Y 为抑制剂组中马尿酸的峰面积(mAU \cdot s)^[14]。

1.2.4 单因素试验。在 pH 6.0、加酶量 2 000 U/g、料液比 1:3、时间 8 h 的条件下考察酶解温度(45、50、55、60、65 $^{\circ}$ C)对青蛤降血压肽制备条件的影响;在 pH 6.0、加酶量 2 000 U/g、料液比 1:3.0、温度 55 $^{\circ}$ C 的条件下考察酶解时间(2、4、6、8、10 h)对青蛤降血压肽制备条件的影响;在加酶量 2 000 U/g、料液比 1:3.0、温度 55 $^{\circ}$ C、时间 8 h 的条件下考察 pH(4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0)对青蛤降血压肽制备条件的影响;在 pH 6.0、温度 55 $^{\circ}$ C、料液比 1:3.0、时间 8 h 的条件下考察加酶量(1 000、2 000、3 000、4 000 和 5 000 U/g)对青蛤降血压肽制备条件的影响;在 pH 6.0、温度 55 $^{\circ}$ C、时间 8 h、加酶量 2 000 U/g 的条件下考察料液比(1:1.0、1:2.0、1:3.0、1:4.0 和 1:5.0)对青蛤降血压肽制备条件的影响。

1.2.5 响应面试验设计。综合考虑 5 个单因素试验结果,选取影响显著的 pH(A)、酶解时间(B)和料液比(C)3 个因素进行优化,根据 Box - Behnken 试验设计原理,以 ACE 抑制率为响应值进行优化,设计因素与水平见表 1。

表 1 响应面试验设计因素及水平

Table 1 Factor and level of RSM experiment design

| 水平 Level | 因素 Factor | | |
|-------------|-----------|---------------------------------|---|
| | pH (A) | 酶解时间(B) Enzymatic time//h | 料液比(C) Solid - liquid ratio//g/mL |
| -1 | 5.5 | 7 | 1:2.5 |
| 0 | 6.0 | 8 | 1:3.0 |
| 1 | 6.5 | 9 | 1:3.5 |

表 3 二次回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for the second-order polynomial model

| 参数来源 Source | 平方和 Sum of Squares | 自由度 Degrees of Freedom | 均方 Mean Square | F 值 F-Value | P 值 Prob > F P-value |
|------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|
| 模型 Model | 1 411.10 | 9 | 156.79 | 4.93 | 0.023 5 |
| A | 285.01 | 1 | 285.01 | 8.97 | 0.020 1 |
| B | 45.94 | 1 | 45.94 | 1.45 | 0.268 3 |
| C | 80.14 | 1 | 80.14 | 2.52 | 0.156 3 |
| AB | 48.09 | 1 | 48.09 | 1.51 | 0.258 3 |
| AC | 8.100×10^{-3} | 1 | 8.100×10^{-3} | 2.549×10^{-4} | 0.987 7 |
| BC | 143.28 | 1 | 143.28 | 4.51 | 0.071 4 |
| A ² | 527.11 | 1 | 527.11 | 16.59 | 0.004 7 |
| B ² | 208.31 | 1 | 208.31 | 6.56 | 0.037 5 |
| C ² | 15.38 | 1 | 15.38 | 0.48 | 0.509 0 |
| 保留值 Retention | 222.40 | 7 | 31.78 | | |
| 失拟项 Loss of quasi item | 222.01 | 3 | 74.00 | 694.22 | <0.000 1 |
| 误差项 Error term | 0.43 | 4 | 0.11 | | |
| 总和 Sum | 1 633.54 | 16 | | | |
| R ² | | | | | 0.863 8 |

1.2.6 数据处理。利用 Design - Expert 8.0 软件对试验数据进行处理与分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果 单因素试验获得青蛤降血压的制备条件为:温度 55 $^{\circ}$ C,时间 8 h,加酶量 4 000 U/g,料液比 1:3.0, pH 6.0,其中 pH、酶解时间和和料液比 3 个因素对木瓜蛋白酶酶解青蛤制备 ACE 抑制肽的影响最大。

2.2 响应面分析结果 对木瓜蛋白酶酶解青蛤制备降血压肽的试验条件进行响应面分析,具体试验方案及结果见表 2。

表 2 响应面试验方案及结果

Table 2 Design and results of RSM experiment

| 试验号 Test No. | 因素 Factors | | | ACE 抑制率 ACE Inhibition rate//% |
|-----------------|------------|----|----|--------------------------------------|
| | A | B | C | |
| 1 | 0 | -1 | 1 | 88.01 |
| 2 | -1 | 0 | -1 | 68.38 |
| 3 | 1 | -1 | 0 | 78.17 |
| 4 | -1 | 1 | 0 | 74.88 |
| 5 | 1 | 0 | -1 | 85.78 |
| 6 | 0 | -1 | -1 | 89.52 |
| 7 | -1 | -1 | 0 | 64.67 |
| 8 | -1 | 0 | 1 | 70.67 |
| 9 | 0 | 1 | 1 | 87.12 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 91.32 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 91.64 |
| 12 | 0 | 1 | -1 | 64.69 |
| 13 | 1 | 0 | 1 | 87.89 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 91.54 |
| 15 | 1 | 1 | 0 | 74.51 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 91.02 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 90.88 |

采用 Design - Expert 8.0 软件对上述结果进行整理和数据分析,选用二次回归模型进行拟合,方差分析结果见表 3。

利用 Design - Expert 8.0 软件对试验数据进行分析处理,得到响应面法优化青蛤降血压肽的二次多元回归方程: $Y = 91.28 + 5.97A - 2.40B + 3.17C - 3.47AB - 0.045AC + 5.98BC - 11.19A^2 - 7.03B^2 - 1.91C^2$ 。由表 3 数据分析可知,回归方程因变量和自变量之间的线性关系显著($R^2 = 0.863 8$),方程的“Prob > F” = 0.023 5 (<0.05),说明该回归方程显著。失拟项的“Prob > F” = 0.000 1 (<0.05),说明方

程对试验的拟合度较好,该试验方法可靠。

2.3 酶解提取青蛤 ACE 肽参数的确定 通过软件对回归方程的数据分析,得到交互因素相应曲面图及相应的等高线(图 1~3)。利用 Design-Expert 8.0 在设定因素水平内,对数据进行相应分析,得出最佳酶解青蛤制备降血压肽的试验

条件为:pH 5.8、酶解时间 8.4 h、料液比 1:3.1,此时青蛤 ACE 肽的 ACE 抑制率达 93.58%。在此基础上进行 3 次平行试验,相对误差小于 0.50%,说明建立的回归方程能够真实地体现 pH、酶解时间和料液比 3 个因素对青蛤 ACE 肽酶解提取过程的影响,为青蛤的高效利用提供了理论依据。

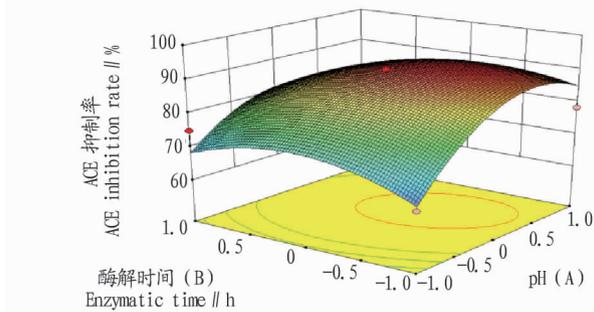


图 1 酶解时间和 pH 对 ACE 抑制率影响的响应曲面和等高线

Fig. 1 Interactive response surface figure and contour map for effects of enzymatic time and pH on ACE inhibition rate

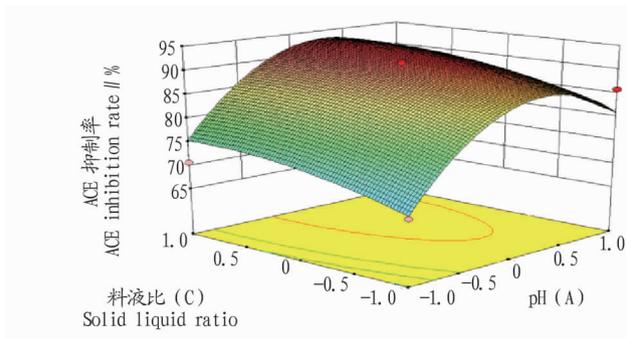


图 2 料液比和 pH 对 ACE 抑制率影响的响应曲面和等高线

Fig. 2 Interactive response surface figure and contour map for effects of solid-liquid ratio and pH on ACE inhibition rate

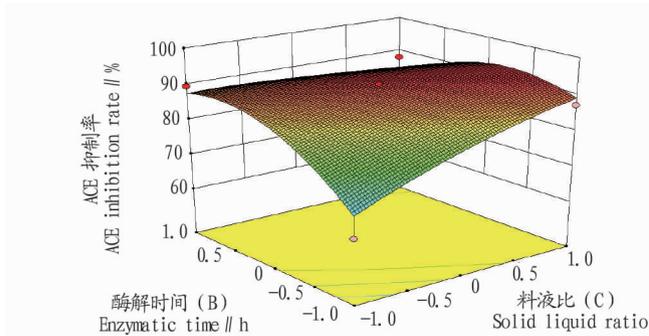


图 3 酶解时间和料液比对 ACE 抑制率影响的响应曲面和等高线

Fig. 3 Interactive response surface figure and contour map for effects of enzymatic time and solid-liquid ratio on ACE inhibition rate

3 结论

青蛤具有很好的食用价值和药用价值,该研究通过最佳酶筛选、单因素水平确定、响应面模型建立、回归方程分析等试验分析过程,研究了 pH、料液比、酶解时间等因素对青蛤降血压肽酶解提取过程的影响,得出模型回归方程: $Y = 91.28 + 5.97A - 2.40B + 3.17C - 3.47AB - 0.045AC + 5.98BC - 11.19A^2 - 7.03B^2 - 1.91C^2$ 。通过 F 检验和方差分析,证实该二次模型能够很好地反映各因素对酶解法提取青蛤降血压肽过程的影响。

优化后的最佳酶解提取青蛤降血压肽的工艺组合为 pH 5.8、酶解时间 8.4 h、料液比 1:3.1,此时青蛤 ACE 肽的 ACE 抑制率达 93.58%,在此基础上进行 3 次平行试验,相对误差小于 0.50%。

参考文献

- [1] 郑刚. 2015 年最新发表的高血压相关指南及研究进展解读[J]. 世界临床药物, 2016, 37(11): 721-724.
- [2] WIJESEKARA I, KIM S K. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: Prospects in the pharmaceutical industry [J]. Marine drugs, 2010, 8(4): 1080-1093.

(下转第 24 页)

外源激素对菊花开花的影响是通过影响其生长发育间接调控花期。但是,激素的使用量不同,对不同品种花卉的调控效果不同,这是一个极难控制的问题,且效果还不是很明显。

2.5 其他 在菊花其他影响因素中,摘心、修剪、摘蕾、拔芽可调节菊花的生长速度,剥去侧芽、侧蕾有利于主芽开花。以上栽培管理措施均可调节菊花花期。

3 结语

目前,关于菊花花期调控研究取得了一定的进展,但多为通过环境条件来控制花期,比较粗放,且多半局限于生产实践经验。菊花开花所需要的有效积温、有效光照、最佳水肥用量、最佳激素配比及其交互效应的研究报道较少,尤其是影响菊花花芽分化以及花器官发育的研究较少。另外,花卉生产规模化和标准化是提高菊花品质的基础。因此,后续研究应在菊花成花基础理论研究的基础上,进一步加强温度、光照、水肥、激素和栽培技术等交互研究和分子基因方面的深入研究,最终实现菊花花期的精准调控,从而更好地运用于生产。

参考文献

- [1] 吕晓惠.反季节栽培中光对盆栽菊花生长影响的研究[D].北京:北京林业大学,2007.
- [2] 余容,陈林.大花型秋菊的花期调控试验[J].西南园艺,2006,34(4):27.
- [3] 石万里.菊花花芽分化初步研究[J].园艺学报,1990(4):309-312.
- [4] SUGAWARA Y, MUKAE K, HATANAKA R, et al. Development of desiccation tolerance and long-term preservation after desiccation of suspension-cultured cells of *Citrus reticulata*[J]. Cryobiology, 2013, 67(3):436.
- [5] 王二虎,赵艳丽,刘金平.温度因素对菊花花期调控的影响研究[J].陕西农业科学,2016,62(11):53-55,98.
- [6] 梁芳.菊花对低温弱光胁迫的响应机理以及 ASA 和 Ca^{2+} 的缓解效应的研究[D].泰安:山东农业大学,2009.

- [7] NAKANO Y, ナカノ, ヨシヒロ, YOSHIHIRO N. In what way does de-growth reconstruct the ethical system of modernity? [J]. 社会科学ジャーナル, 2013(75):149-161.
- [8] KAUR P, SINGH K J. Synthesis and characterization of $64SiO_2 - 26CaO - 5P_2O_5 - 5CuO$ bioactive composition for the growth of hydroxyapatite layer by XRD, Raman and pH studies[J]. DAE Solid State Physics Symposium, 2016, 1731(1):562-569.
- [9] 孙静清.不同处理措施对菊花生长的影响[J].北方园艺,2008(12):130-132.
- [10] 贺玉利.菊花矮化及提前开花栽培技术[J].北方园艺,2003(3):80.
- [11] CANNON J A, SHEN L, JHUND P S, et al. Clinical outcomes according to QRS duration and morphology in the irbesartan in patients with heart failure and preserved systolic function (I - PRESERVE) trial[J]. European journal of heart failure, 2016, 18(8):1021-1031.
- [12] 闫广轩.施肥对药用菊花产量、品质的影响和大量、微量元素的肥效方程拟合[D].南京:南京农业大学,2008.
- [13] 刘大会,杨特武,朱端卫,等.不同钾肥用量对福田河白菊产量和质量的影响[J].中草药,2007,38(1):120-124.
- [14] 骞绍娟,董彦琪.日光温室花木盆景的管理[J].中国林业,2010(6):51.
- [15] 万亚楠.菊花的花期调控方法初探[J].现代园艺,2013(20):50-51.
- [16] 张静.不同外源物质对菊花两主要观赏品种形态、生理及花期调控的研究[D].新乡:河南师范大学,2011.
- [17] MOYA PÉREZ J A, GUTIERREZ A, JAIME A. Discriminating proof abilities of secondary school students with different mathematical talent [C]// KARINER K, VONDRÓVÁ N. Proceedings of the 9th conference of the European society for research in mathematics education (CERME9). [s. l.]:ERME, 2015.
- [18] 陈洪国.植物生长调节剂对菊花幼苗生长及光合作用的影响[J].安徽农业科学,2006,34(9):1852,1854.
- [19] 张亚琼.中国传统盆菊品种筛选和规模化栽培技术研究[D].北京:北京林业大学,2012.
- [20] 郭超超.独本菊反季节生产品种筛选及栽培技术研究[D].北京:北京林业大学,2009.
- [21] 冯枫.水杨酸对切花秋菊‘神马’花芽分化和开花的影响[D].保定:河北农业大学,2011.
- [22] SHARMA N, RUELENS P, D'HAUW M, et al. A flowering locus C homolog is a vernalization-regulated repressor in *Brachypodium* and is cold regulated in wheat[J]. Plant physiology, 2017, 173(2):1301-1315.

(上接第9页)

- [3] CHEN J W, LIU S S, YE R, et al. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization[J]. Journal of functional foods, 2013, 5(4):1684-1692.
- [4] AHN C B, JEON Y J, KIM Y T, et al. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis[J]. Process biochemistry, 2012, 47(12):2240-2245.
- [5] LEE S H, QIAN Z J, KIM S K. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats[J]. Food chemistry, 2010, 118(1):96-102.
- [6] HIMAYA S W A, NGO D H, RYU B M, et al. An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of Pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin-I converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress[J]. Food chemistry, 2012, 132(4):1872-1882.
- [7] 张艳萍,戴志远,张虹.贻贝中 ACE 抑制活性肽的酶解制备及表征[J].中国食品学报,2011,11(1):51-59.
- [8] LIU R, ZHU Y H, CHEN J, et al. Characterization of ACE inhibitory peptides from *Mactra veneriformis* hydrolysate by nano-liquid chromatography

electrospray ionization mass spectrometry (Nano-LC-ESI-MS) and molecular docking[J]. Marine drugs, 2014, 12(7):3917-3928.

- [9] 刘立闯,胡志和,贾静,等.螺旋藻藻胆蛋白水解产物对 ACE 抑制活性的研究[J].食品科学,2009,30(13):212-217.
- [10] SATO M, HOSOKAWA T, YAMAGUCHI T, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats [J]. Journal of agricultural & food chemistry, 2002, 50(21):6245-6252.
- [11] 周自福,张建华,郑婷婷,等.海洋生物源抗高血压肽的制备和构效关系研究进展[J].安徽农业科学,2015,43(26):336-342,345.
- [12] 郭雷,许福泉,樊鑫桐,等.青蛤多糖的提取工艺优化及其抗氧化活性[J].食品研究与开发,2014,35(21):10-14.
- [13] 胡聪聪,杨永芳,丁国芳,等.青蛤多糖提取的条件优化及其抗肿瘤活性研究[J].中国民族民间医药,2010,19(10):28-29.
- [14] 罗李王,杨最素,张亚茹,等.酶解青蛤制备 ACE 抑制肽的工艺优化[J].食品工业,2016,37(6):56-59.
- [15] 闫海强,黄芳芳,杨最素,等.青蛤的研究进展[J].中国药房,2014,25(39):3722-3724.