

翡翠贻贝降血压肽酶解制备工艺研究

安婷婷, 陈丽美, 邓长春, 林资政 (海南省药物研究所, 海南海口 570311)

摘要 [目的]研究翡翠贻贝蛋白酶解的工艺条件,为后期开发保健食品和药品提供基础。[方法]以ACE抑制率为指标,在单因素的基础上通过正交试验研究温度、pH、料液比和酶与底物的质量比确定酶解工艺。最后以ACE抑制率和水解率2个指标研究酶解时间。[结果]最佳酶解工艺为:碱性蛋白酶,酶解温度为50℃,酶解pH为9.5,料液比为1:4(g:mL),酶与底物质量比为1%,酶解时间为2h。[结论]碱性蛋白酶可以酶解翡翠贻贝得到翡翠贻贝降血压肽,此酶解方法简单、可行。

关键词 翡翠贻贝;降血压肽;酶解工艺;正交试验

中图分类号 R282.77 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)10-0137-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.10.037



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Enzymatic Hydrolysis of Antihypertensive Peptide from *Perna viridis*

AN Ting-ting, CHEN Li-mei, DENG Chang-chun et al (Pharmaceutical Institute of Hainan Province, Haikou, Hainan 570311)

Abstract [Objective] To study the conditions of enzymatic hydrolysis of *Perna viridis*, which provided a basis for the later development of medicine and health food. [Method] The temperature, pH, solid-liquid ratio, mass ratio of enzyme to substrate on enzymatic hydrolysis process was studied to obtain enzymolysis technology by orthogonal experiment on the basis of single factor experiment. Finally, the time of enzymatic hydrolysis was studied by monitoring the ACE inhibition rate and hydrolysis rate. [Result] The optimal enzymatic conditions of alkaline protease were the temperature 50℃, pH 9.5, solid-liquid ratio 1:4(g:mL), mass ratio of enzyme to substrate 1%, enzymolysis time was 2 h. [Conclusion] The alkaline protease can hydrolyze *Perna viridis* to obtain the antihypertensive peptide of *Perna viridis*. This method is simple and feasible.

Key words *Perna viridis*; Antihypertensive peptide; Enzymolysis technology; Orthogonal experiment

血管紧张素转化酶抑制肽(angiotensin converting enzyme inhibitory peptides)是一种对ACE活性具有抑制作用的多肽类物质,一般由2~20个氨基酸残基组成,一般是由蛋白质酶解而得,其通过抑制血管紧张素转换酶(ACE)的活性,阻碍血管紧张素II的生成以及抑制血管舒缓激肽的分解从而达到降血压的作用^[1-3]。由于蛋白酶的酶切位点不固定,酶切后得到的多肽也是多种多样的。翡翠贻贝(*Perna viridis* (Linnaeus)),又名绿壳菜蛤、淡菜或青口螺,广泛分布于东海南部和南海,容易人工养殖,繁殖能力很强,产量高,含有丰富的蛋白质、牛磺酸等^[4],其中粗蛋白含量占鲜肉重的9.27%、干肉重的52.31%^[5]。该研究以去壳的翡翠贻贝为原料,以水解度和ACE抑制率为指标,其中,高效液相法评价ACE^[6]抑制率,pH-stat法^[7]测定水解度。首先通过比较4种蛋白酶对翡翠贻贝的酶解效果,确定最佳用酶,然后通过单因素试验,设计优化出碱性蛋白酶水解翡翠贻贝制备ACE抑制肽的最佳反应条件。

1 材料与方法

1.1 试验试剂 中性蛋白酶(山东西亚化学工业有限公司);碱性蛋白酶(山东西亚化学工业有限公司);胃蛋白酶(国药集团化学试剂有限公司);胰蛋白酶(山东西亚化学工业有限公司);马尿酸(山东西亚化学工业有限公司);硼砂(天津市永大化学试剂有限公司);硼酸(广州化学试剂厂);TFA(三氟乙酸,广州化学试剂厂);无水乙醇(广州化学试剂厂);氢氧化钠滴定液(深圳市博林达科技有限公司);氢氧化

钠(广州化学试剂厂);氯化钠(广州化学试剂厂);乙酸乙酯(西陇科学股份有限公司);盐酸(广州化学试剂厂);乙腈(TEDIA);血管紧张素转化酶(ACE,上海源叶生物科技有限公司);翡翠贻贝(琼海采集);马尿酸组胺酰亮氨酸(HHL, SIGMA)。

1.2 试验仪器 电子天平(BP211D, Sartorius);电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);循环水式多用真空泵(SHZ-95, 巩义市予华仪器有限责任公司);超声波清洗器(SK250HP, 上海科导超声仪器有限公司);台式高速冷冻离心机(TGL-16MC, 长沙维尔康湘鹰离心机有限公司);高效液相色谱仪(LC-2010AHT, 岛津企业管理(中国)有限公司);C₁₈柱(YMC);真空干燥箱(DZF-6050, 上海博迅实业有限公司);雷磁实验pH计(PHSJ-5, 上海仪电科学仪器股份有限公司);恒温磁力搅拌器(85-2, 常州澳华仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 翡翠贻贝粗蛋白的制备。新鲜翡翠贻贝清洁后去壳及足丝,留肉并切碎,匀浆,冷冻干燥,以1:4(m/V)比例加入95%乙醇,50℃脱脂4h,重复4次,真空干燥后,粉碎,得翡翠贻贝粗蛋白粉,置-20℃冰箱中冷藏备用。

1.3.2 ACE抑制率测定方法。分别取表1所示体积的HCl、HHL、ACE抑制剂、硼酸盐缓冲液和ACE于同一离心管中,37℃下水浴反应35min,后加入150μL的1mol/L HCl溶液终止反应,过滤,即得样品溶液、对照溶液和空白溶液。

取上述样品溶液、对照溶液和空白溶液各20μL, HPLC测定马尿酸峰面积。色谱条件:色谱柱为C₁₈(250mm×4.6mm, 5μm);流动相:0.1%TFA乙腈:0.1%TFA水,流动相时间程序如表2所示。检测波长228nm^[8];流速1.0mL/min;进样量20μL。

基金项目 海南自然科学基金面上项目(817201)。

作者简介 安婷婷(1982—),女,河北新乐人,高级工程师,硕士,从事于新药研发、质量标准建立、海洋药物方面研究。

收稿日期 2019-11-19;修回日期 2019-12-03

根据马尿酸峰面积计算翡翠贻贝酶解液的 ACE 抑制率:ACE 抑制率=(A_1-A_2)/ $A_1 \times 100\%$,其中, A_1 为不加翡翠贻贝酶解液时马尿酸的峰面积, A_2 为加入翡翠贻贝酶解液时马尿酸的峰面积。

表 1 各溶液制备所需溶剂

Table 1 Solvents required for the preparation of each solution

溶液 Solution	1 mol/L HCl μL	5 mmol/L HHL μL	ACE 抑制剂 inhibitor μL	0.1 mol/L 硼 酸盐缓冲液 borate buffer μL	0.1 U/mL ACE μL
样品 Sample	0	40	30	70	10
对照 Control	0	40	0	100	10
空白 Blank	150	40	30	80	0

表 2 流动相时间程序

Table 2 Mobile phase time procedure %

时间 Time//min	0.1%TFA 水 0.1%TFA water	0.1%TFA 乙腈 0.1%TFA acetonitrile
0~5	90	10
5~35	60	40
35~36	20	80
36~46	20	80
46~47	90	10
47~51	90	10

1.3.3 酶解工艺的研究。

1.3.3.1 酶的种类对 ACE 抑制率的影响。称取翡翠贻贝粗蛋白 5 g,溶于 25 mL 超纯水(料液比为 1:5),混合均匀,分别加入表 3 中 4 种酶 0.1 g(酶与底物的质量比 2%),按照表 3 所示酶解条件,0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH,并按照最适温度在恒温水浴锅中水浴 2 h,酶解后,放入 95 °C 水浴中 10 min 终止酶解反应,离心(4 000 r/min)15 min,取上清液,分别按“1.3.2”方法测定 ACE 抑制率测定马尿酸峰面积,并计算 ACE 抑制率。

表 3 各种蛋白酶的酶解条件

Table 3 Enzymatic hydrolysis conditions of each protease

序号 No.	酶种类 Enzyme type	pH	温度 Temperature//°C
1	中性蛋白酶	7.0	50
2	碱性蛋白酶	9.0	50
3	胃蛋白酶	1.6	37
4	胰蛋白酶	8.0	50

1.3.3.2 pH 对 ACE 抑制率的影响。以 ACE 抑制率为指标,料液比为 1:5,碱性蛋白酶与底物质量比为 2%,温度为 50 °C 条件下酶解时间 4 h,用 0.5 mol/L NaOH 分别调节 pH 为 8.5、9.0、9.5、10.0、10.5 酶解,取上清液,分别按“1.3.2”方法测定 ACE 抑制率。

1.3.3.3 温度对 ACE 抑制率的影响。以 ACE 抑制率为指标,料液比为 1:5,碱性蛋白酶与底物质量比为 2%,pH 为 9.5 条件下酶解时间 4 h,分别在 45、47、50、52、54 °C 条件下酶解,取上清液,分别按“1.3.2”方法测定 ACE 抑制率。

1.3.3.4 料液比对 ACE 抑制率的影响。以 ACE 抑制率为指标,碱性蛋白酶与底物质量比为 2%,pH 为 9.5,温度 50 °C 条件下酶解时间 4 h,分别在料液比为 1:3、1:4、1:5、1:6、1:7 条

件下酶解,取上清液,分别按“1.3.2”方法测定 ACE 抑制率。

1.3.3.5 酶与底物的质量比对 ACE 抑制率的影响。以 ACE 抑制率为指标,料液比为 1:5,pH 为 9.5,温度 50 °C 条件下酶解时间 4 h,分别在碱性蛋白酶与底物质量比为 1%、2%、3%、4%、5%条件下酶解,取上清液,分别按“1.3.2”方法测定 ACE 抑制率。

1.3.3.6 翡翠贻贝 ACE 抑制肽酶解工艺条件优化。根据单因素试验结果,以酶解温度、酶解 pH、料液比、底物与酶质量比为考察因素,通过表 4 中 $L_9(3^4)$ 正交试验对酶解工艺设计进行优化。

表 4 正交试验因素水平

Table 4 Factor level tables of orthogonal experiments

水平 Level	因素 Factor			
	A (pH)	B (酶解温度 Enzymatic hydrolysis temperature °C)	C(料液比 Solid- liquid ratio//%)	D(酶与底物的质量比 Mass ratio of enzyme to substrate %)
1	9.0	47	1:4	1
2	9.5	50	1:5	2
3	10.0	52	1:6	3

1.3.3.7 水解时间对 ACE 抑制率的影响。在料液比为 1:5,碱性蛋白酶与底物质量比为 1%,pH 为 9.5,温度 50 °C 条件下酶解时间 4 h,酶解时用 0.2 mol/L NaOH 滴定维持 pH 恒定 9.5,分别记录 0.50、0.75、1.00、1.50、2.00、4.00 h 的 NaOH 滴定量,取上清液,分别按“1.3.2”方法测定 ACE 抑制率。

同时计算每一个时间段翡翠贻贝粗蛋白的水解度,水解度的计算公式如下:

$$DH = \frac{B \times N_b}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

其中, B 为 NaOH 的滴定量; N_b 为滴定所用的 NaOH 的浓度; MP 为底物中蛋白质的总量; h_{tot} 为每 1 g 原料蛋白质中肽键的毫摩尔数,在该作用条件下取 7.77 mmol/g; α 取 0.44。

2 结果与分析

2.1 酶的种类对 ACE 抑制率的影响 按“1.3.3.1”所述进行试验,结果如图 1 所示。酶的种类不同,其底物特异性及作用位点也不同,不同的酶对于同一种蛋白质酶解得到产物的组成、结构和功能也不同。目前研究表明,肽链 C 末端是脯氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸或者序列中含有疏水性氨基酸是维持高 ACE 抑制活性所必需^[1,9]。碱性蛋白酶对疏水性氨基酸-COOH 具有底物特异性^[10],此试验碱性蛋白酶的活性最高,达 100%。因此,该试验的 4 种酶中选择碱性蛋白酶为最佳用酶。

2.2 pH 对 ACE 抑制率的影响 按“1.3.3.2”所述进行试验,结果如图 2 所示。在 pH 为 8.5~9.5 时,ACE 抑制率随着 pH 的增大而增加,ACE 抑制率高达 85.16%;而在 9.5~10.5 时,ACE 抑制率反而随着 pH 的增加而减小,即碱性蛋白酶的活性与所处环境 pH 有关,越接近最适 pH,酶的活性越强,当 pH 超过最适 pH 时,碱性蛋白酶逐渐失活。因此,确定此试验的最适 pH 为 9.5。

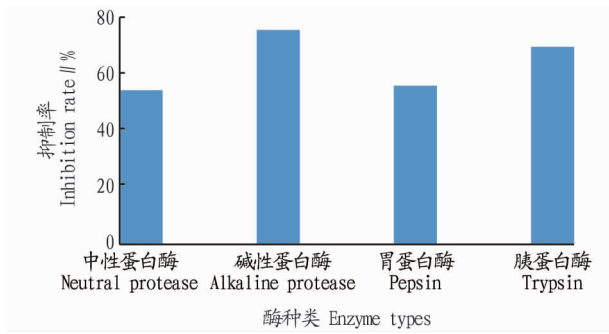


图1 4种蛋白酶对翡翠贻贝的酶解效果

Fig.1 Enzymatic hydrolysis effect of four kinds of proteases on *Perna viridis*

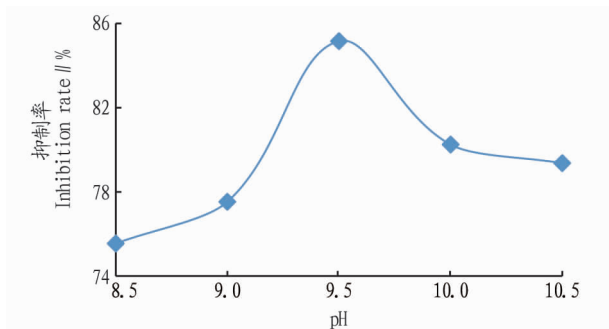


图2 酶解 pH 对 ACE 抑制率的影响

Fig.2 Effect of enzymolysis pH on ACE inhibition rate

2.3 温度对 ACE 抑制率的影响 按“1.3.3.3”所述进行试验,结果如图 3 所示。在 45~50 ℃时,酶活性随着温度的升高,ACE 抑制率增大,在 50 ℃时活性最强,而超过 50 ℃温度继续升高,酶活性反而降低。温度对酶活性的影响至关重要,在最适温度前,酶活性随着温度的升高而增大,而后随着温度的升高,酶逐渐失活,ACE 抑制率降低。所以,该试验的最佳反应温度为 50 ℃。

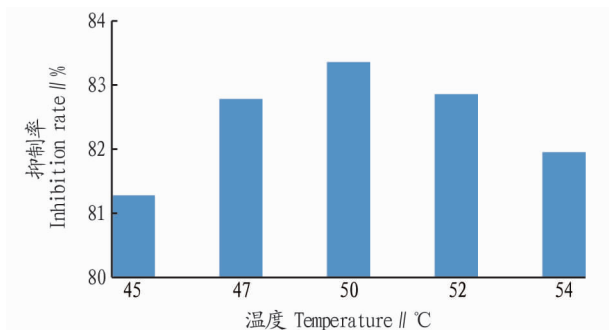


图3 酶解温度对 ACE 抑制率的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis temperature on ACE inhibition rate

2.4 料液比对 ACE 抑制率的影响 按“1.3.3.4”所述进行试验,结果如图 4 所示。随着料液比的增加,ACE 抑制率明显增加,当料液比为 1:5 时,ACE 抑制率达到最大值,为 83.3%,当料液比继续增大时,抑制率反而略微降低,推测为底物浓度过大时,影响了碱性蛋白酶和蛋白质分子的自由扩散,不利于酶解反应。因此,该试验的最适料液比为 1:5。

2.5 酶与底物的质量比对 ACE 抑制率的影响 按“1.3.3.5”所述进行试验,结果如图 5 所示。当底物和酶质量比为 3%

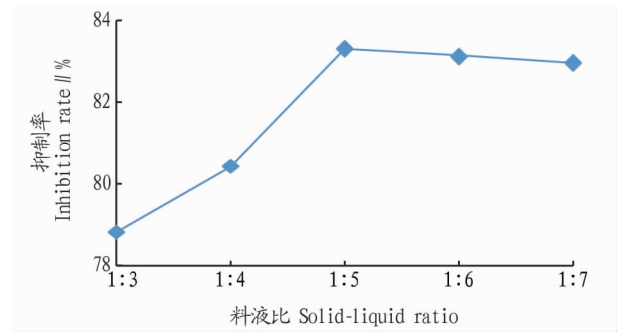


图4 料液比对 ACE 抑制率的影响

Fig.4 Effect of solid-liquid ratio on ACE inhibition rate

时,ACE 抑制率达到最大,为 82.4%,后再增加酶用量,ACE 抑制率的变化不大,原因可能为酶用量增加到一定程度,酶和蛋白质的结合达到饱和状态。当底物和酶质量比为 2%,ACE 抑制率为 82.2%,考虑到酶的价格,故该试验确定最佳底物和酶质量比为 2%。

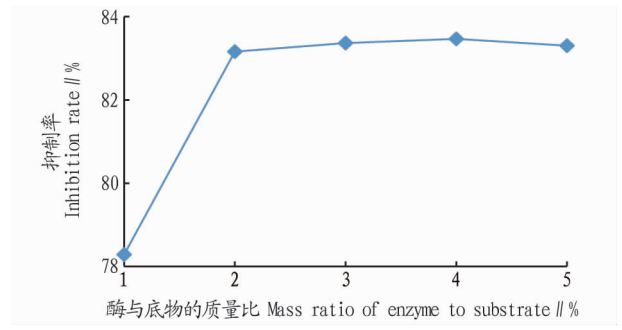


图5 酶与底物的质量比对 ACE 抑制率的影响

Fig.5 Effect of mass ratio of enzyme to substrate on ACE inhibition rate

2.6 翡翠贻贝 ACE 抑制肽酶解工艺条件优化 由表 5 中极差 R 分析得出,4 个因素对酶解产物的 ACE 抑制率影响从大到小依次为 pH、温度、酶与底物的质量比、料液比,其中,pH 为主要影响因素。最佳酶条件组合为 A₂B₂C₁D₁,即酶解 pH 为 9.5,酶解温度为 50 ℃,料液比为 1:4,酶与底物的质量比为 1%。

表 5 L₉(3⁴) 正交试验结果

Table 5 Results of L₉(3⁴) orthogonal experiments

试验号 No.	因素 Factor				ACE 抑制率 ACE inhibition rate / %
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	75.99
2	1	2	2	2	77.76
3	1	3	3	3	76.22
4	2	1	2	3	78.76
5	2	2	3	1	83.25
6	2	3	1	2	81.22
7	3	1	3	2	75.16
8	3	2	1	3	78.31
9	3	3	2	1	76.96
k ₁	76.66	76.64	78.51	78.74	
k ₂	81.08	79.77	77.83	78.05	
k ₃	78.23	78.14	78.21	77.76	
R	4.42	3.13	0.68	0.97	

2.7 水解时间对 ACE 抑制率的影响 按“1.3.3.7”所述进行试验,结果如图 6 所示。酶解时间在 2 h 内,水解率和 ACE 抑制率均随着而增加,当超过 2 h 时,两者只是略微变化,因

为在酶解过程中,翡翠贻贝蛋白质和碱性蛋白酶不断消耗减少,底物生成增加,都不利于酶解反应。故确定最佳酶解时间为2 h。

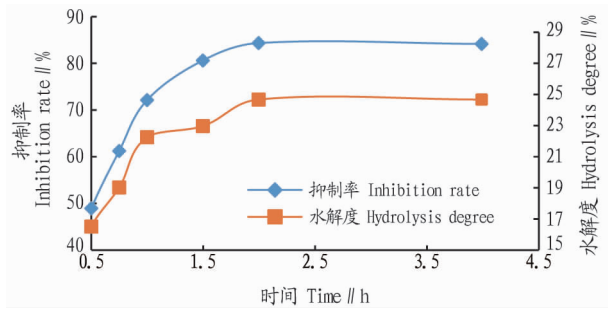


图6 酶解时间对水解度和ACE抑制率的影响

Fig.6 Effect of enzymolysis time on hydrolysis degree and ACE inhibition rate

3 结论

该研究分别用4种蛋白酶(中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶)酶解翡翠贻贝中的蛋白质制备翡翠贻贝降血压肽,以酶解液的ACE抑制率为指标,选出最佳用酶,通过单因素试验、正交试验研究选出最佳酶解工艺,结果表明,最佳酶解工艺为碱性蛋白酶、料液比为1:4、酶与底物质

量比1%、酶解pH9.5、酶解温度为50℃、酶解时间2h,此时,ACE抑制率84.34%,水解率为24.67%。此酶解方法简单、可行,可以作为酶解翡翠贻贝的酶解方法,得到高活性的ACE酶抑制剂。

参考文献

- [1] YAMAMOTO N. Antihypertensive peptide derived from food proteins [J]. Peptide science, 1997, 43(2): 129-134.
- [2] 周亚丽, 魔芋ACE抑制肽分离纯化及体外降血压活性研究[D]. 西安: 陕西科技大学, 2017.
- [3] 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.
- [4] JE J Y, PARK P J, BYUN H G, et al. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis* [J]. Bioresource technology, 2005, 96: 1624-1629.
- [5] 庆宁, 林岳光. 金启增翡翠贻贝软体部营养成分的研究[J]. 热带海洋, 2000, 19(1): 81-84.
- [6] 梁佳, 谢超, 林琳, 等. 鱿鱼(Squid)肝脏蛋白酶解物中ACE活性抑制肽的分离纯化及活性分析[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1175-1179.
- [7] ADLER-NISSEN J. Enzymic hydrolysis of food protein [M]. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986: 12-14.
- [8] MATSUI T, MATSUFUJI H, SEKI E, et al. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle [J]. Biosci Biotech Bioch, 1993, 57(6): 922-925.
- [9] YAMAMOTO N, TAKANO T. Antihypertensive peptides derived from milk proteins [J]. Molecular nutrition food research, 1999, 43(3): 159-164.
- [10] 王璋. 食品酶学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005.

(上接第136页)

3.368 g/g, 对胆酸盐的吸附量为11.79 mg/g, 对亚硝酸钠的吸附量为39.87 μg/g。

表3 膳食纤维吸附胆酸盐和亚硝酸盐的能力

Table 3 Ability of dietary fiber to adsorb cholate and nitrite

方法 Method	胆酸钠 Sodium cholate // mg/g	亚硝酸钠 Sodium nitrite // μg/g
酶法 Enzymatic method	9.64	31.46
碱法 Alkaline method	8.22	30.25
酶碱法 Enzyme-alkali method	11.79	39.87

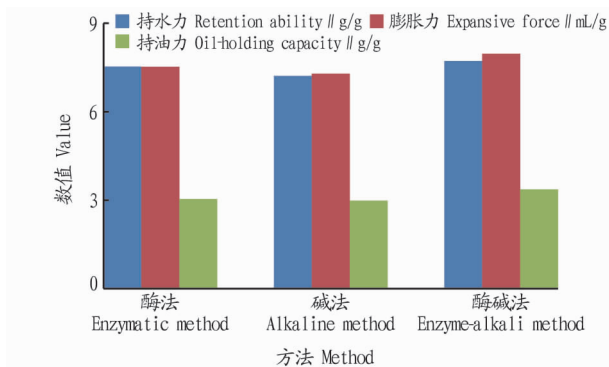


图6 理化性质测定结果

Fig.6 Results of physical and chemical properties

3 结论

通过研究确定酶碱法提取春笋膳食纤维的最佳工艺为α-淀粉酶用量0.5%、木聚糖酶用量0.4%、NaOH浓度0.6%、碱解时间120min,在此工艺条件下,春笋膳食纤维的提取率为12.70%,达到预期效果。对春笋膳食纤维的功能特性进

行研究,结果表明酶碱法制备的春笋膳食纤维具备良好的持水力、膨胀力、持油力、吸附亚硝酸盐能力和吸附胆酸盐能力,可作为良好的功能性食品原料。

参考文献

- [1] 冯爱博, 杨光, 贺亮, 等. 竹笋有效成分提取纯化技术及其生物活性的研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2018, 54(3): 46-50.
- [2] SINGHAL P, BAL L M, SATYA S, et al. Bamboo shoots; A novel source of nutrition and medicine [J]. Critical reviews in food science and nutrition, 2013, 53(5): 517-534.
- [3] 李建文, 杨月欣. 膳食纤维定义及分析方法研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 350-355.
- [4] 戚勃, 李来好. 膳食纤维的功能特性及在食品工业中的应用现状[J]. 现代食品科技, 2006, 22(3): 272-274, 279.
- [5] 李梦琴, 王跃, 徐艳艳, 等. 小麦麸皮超高压处理条件优化及SEM表征[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(9): 14-19.
- [6] 刘翔. 清水竹笋软罐头及冻干笋加工工艺优化[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [7] 付全意, 刘冬, 李坚斌, 等. 膳食纤维提取方法的研究进展[J]. 食品科技, 2008, 33(2): 225-228.
- [8] 符琼, 林亲录, 鲁娜, 等. 膳食纤维提取的研究进展[J]. 中国食物与营养, 2010(3): 32-35.
- [9] 刘达玉, 左勇. 酶解法提取薯渣膳食纤维的研究[J]. 食品工业科技, 2005, 26(5): 90-92.
- [10] 吴丽萍, 金雅娟, 吴家兴. 毛竹笋膳食纤维提取工艺优化[J]. 黄山学院学报, 2017, 19(3): 62-65.
- [11] 张艳, 何翠, 刘玉凌, 等. 超声波改性对方竹笋膳食纤维性能和结构的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(1): 150-155.
- [12] 任雨离, 刘玉凌, 何翠, 等. 微波和微粉碎改性对方竹笋膳食纤维性能和结构的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(8): 145-150.
- [13] 陈亚非, 赵谋明. 水溶性与水不溶性膳食纤维对油脂、胆固醇和胆酸钠吸附作用研究[J]. 现代食品科技, 2005(3): 58-60.
- [14] 杨士芹, 满朝新, 曲行光, 等. 不同来源胆盐水解酶基因在大肠杆菌中的表达[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 144-147.
- [15] 王旭. 米糠膳食纤维的改性制备及其特性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [16] 田星, 曹丽杰, 兰中赞, 等. 沅江芦笋膳食纤维提取工艺优化及其特性[J]. 湖南中医药大学学报, 2018, 38(11): 1336-1340.