

超声波破碎法提取瑞士乳杆菌 氨肽酶条件的优化

郭宇星, 潘道东*

(南京师范大学乳品生物技术研究, 江苏 南京 210097)

摘 要: 目的: 确定超声波破碎细胞提取瑞士乳杆菌氨肽酶的最佳条件。方法: 采用单因素试验和响应面法对菌体浓度、超声波破碎功率、破碎时间进行研究。结果: 菌体浓度、超声波破碎功率、破碎时间对超声波破碎程度都存在一定的影响, 其中破碎时间影响最为显著。超声波破碎提取氨肽酶的最适条件为菌体浓度 0.0238g/ml, 破碎功率 300W, 破碎总时间 26min(超声 3s, 间隔 5s)。破碎后得到粗酶液总酶活力为 72.99U。结论: 采用超声波破碎方法可以较好地提取氨肽酶, 运用响应面分析法优化超声波破碎条件是可行的。

关键词: 瑞士乳杆菌; 超声波破碎; 氨肽酶

Optimization of Ultrasonic Extraction Conditions of Aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus*

GUO Yu-xing, PAN Dao-dong*

(Institute of Dairy Biotechnology, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract : Objective: To optimize ultrasonic extraction conditions of aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus*. Method: Effects of cell concentration, ultrasonic power and ultrasonic time were studied through single factor test and response surface methodology. Results Cell concentration, ultrasonic power and ultrasonic time all have some effects on the extraction of aminopeptidase and the most significant factor is ultrasonic time. The optimum conditons confirmed by response surface methodology are: cell concentration 0.0238 g/ml, ultrasonic power 300 W and ultrasonic time 26 min (ultrasonic treatment for 3 s with interval of 5 s). On these conditions, the activity of aminopeptidase is 72.99 U. Conclusion Aminopeptidase can be extracted from *Lactobacillus helveticus* cells treated by ultrasonic, and it is feasible to optimize ultrasonic extraction conditions using response surface methodology.

Key words: *Lactobacillus helveticus*; ultrasonic; aminopeptidase

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)08-0027-05

近年来研究发现部分瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)制作的发酵乳制品具有较强的降高血压功能, 主要是由于发酵过程中, 瑞士乳杆菌的蛋白水解系统分解乳蛋白产生多肽, 这些多肽则对血管紧张素转移酶(angiotensin I-converting enzyme)具有抑制作用, 从而达到了降低血压的效果^[1-5]。根据已有研究报道, 瑞士乳杆菌蛋白酶系统包括细胞壁蛋白酶(CEP), 寡肽转移系统(Opp)、二肽(DtpP)和三肽(DtpT)转运系统、胞内肽酶(包括肽链内切酶、氨肽酶、pro- 特异性肽酶)^[6-7]。CEP

把乳蛋白水解成一系列的短肽, 短肽就由蛋白运输系统运输至细胞内, 然后由胞内肽酶进一步将短肽水解为氨基酸或更小的肽类以供菌体生长^[8]。在胞内肽酶中, 氨肽酶属于肽链端解酶, 可使氨基酸从多肽链的 N- 末端顺序逐个地水解, 氨肽酶对于乳酸菌的生长具有非常重要的作用^[9-10]。本研究采用超声波破碎瑞士乳杆菌细胞壁的方法提取氨肽酶, 通过单因素条件研究, 响应面分析优化超声波破碎的最佳条件。旨在为瑞士乳杆菌蛋白水解系统的研究和 ACE 抑制肽的产生的具体机制建立初步的基础。

收稿日期: 2008-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30571311); 江苏省自然科学基金项目(BK2005137);

国家高技术研究发展计划项目(2007AA10Z300)

作者简介: 郭宇星(1981-), 女, 博士, 研究方向为乳品科学。E-mail: guoyuxing1981@eyou.com

* 通讯作者: 潘道东(1964-), 男, 教授, 博士, 研究方向为畜产品加工。E-mail: daodongpan@163.com

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

瑞士乳杆菌 15019 为实验室筛选保藏菌株。

L-lysine-p-nitroanilide 瑞士 Bachem 公司；其他试剂购于南京生兴生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

超净工作台 上海上净净化食品有限公司；PHS-3C 精密 pH 计 上海雷磁仪器厂；紫外可见分光光度计 上海棱光技术技术有限公司；CL-22M 高速冷冻离心机 赛特湘仪离心机仪器有限公司；立式压力蒸汽灭菌器 上海博迅实业有限公司医疗设备厂；超声波细胞破碎仪 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌体制备

瑞士乳杆菌菌体冻干粉(-80℃冷藏)连续活化三代，按 3% 接种量，37℃ 下扩大培养至生长对数期取出，离心收集菌体沉淀(4℃ F4500r/min 离心 20min)。用 50mmol/L Tris-HCl(pH7.1)缓冲液洗涤菌体，离心(4℃ F4500r/min 离心 20min)弃上清液。重复洗涤三次，收集菌体备用。

1.3.2 氨肽酶提取方法

菌体用 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.1)重新悬浮菌体，搅匀，进行超声波破碎，破碎后离心(4℃ F4500r/min 离心 20min)，取上清液即为粗酶液。

1.3.3 氨肽酶活性测定^[11-12]

取 0.05 ml 底物 L-lysine-p-nitroanilide (16.4mmol/L)、酶液 0.1ml、2.85ml Tris-HCl 缓冲液(50mmol/L、pH7.8)混合，在 37℃ 下保温 60min。用 0.5ml，30% 乙酸终止反应，在 410nm 处测定吸光度。空白对照管：以蒸馏水代替酶液同样条件操作。酶活定义：37℃ 时，每分钟生成 1 μmol 对硝基苯氨($\epsilon_{410nm} = 8800L/M \cdot cm$)为一个活力单位。

1.3.4 蛋白含量测定^[13]

1ml 样品加入 5ml 蛋白试剂(100mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50ml 95% 乙醇中，再加 100ml 85% 磷酸，用双蒸水补至 1000ml)，充分振荡混匀，2min 后于 595nm 测定光吸收度，以 1ml 重蒸水作为空白对照。

1.3.5 超声波破碎条件确定

首先根据单因素试验，确定菌体浓度、破碎功率、破碎时间三个条件对超声波破碎的影响，然后按 Box-Behnken 原理设计试验，以菌体浓度、破碎功率、破碎时间为响应变量，根据单因素试验确定上下水平后，用 MINTAB 软件进行响应面优化分析。破碎中用冰水浴冷却样品。

2 结果与分析

2.1 单因素超声波破碎条件的研究

2.1.1 菌体浓度对超声波破碎提取氨肽酶的影响

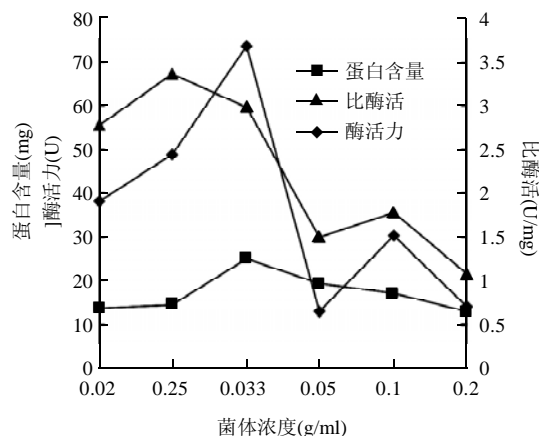


图1 菌体浓度对提取氨肽酶的影响

Fig.1 Effects of cell concentration on extraction of aminopeptidase

选取不同浓度的瑞士乳杆菌菌体悬液进行破碎，采用的超声波破碎条件为功率 300W、超声破碎总时间 26min(工作时间 3s，间隔时间 5s)。由图 1 可以看出，当菌体浓度为 0.033g/ml 时，蛋白释放量和酶活力都达到最高。随着菌体浓度升高，蛋白释放量和酶活力低，这是因为菌体浓度高的时候超声波破碎难以形成空穴效应，而能量大多被转换为热量，不但不能破碎，反而破坏样品中的酶活性。

2.1.2 破碎功率对超声波破碎提取氨肽酶的影响

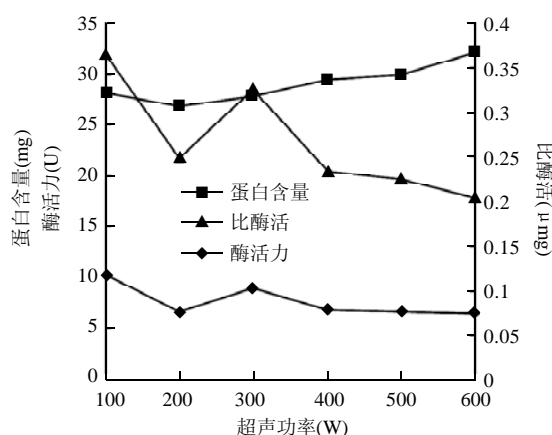


图2 超声波功率的影响

Fig.2 Effects of ultrasonic power on extraction of aminopeptidase

选取不同破碎功率进行破碎，菌体悬液浓度为 0.05mg/ml、超声波破碎时间 26min(工作时间 3s，间隔时间 5s)。由图 2 可以看出，当破碎功率为 300W 时，

比酶活力达到最高, 而随着超声波破碎功率的上升, 蛋白释放量逐渐增大, 但是酶活力趋于平衡, 比酶活力逐渐下降。估计原因是破碎功率上升导致热量增大, 破坏了酶活。

2.1.3 破碎时间对超声波破碎提取氨肽酶的影响

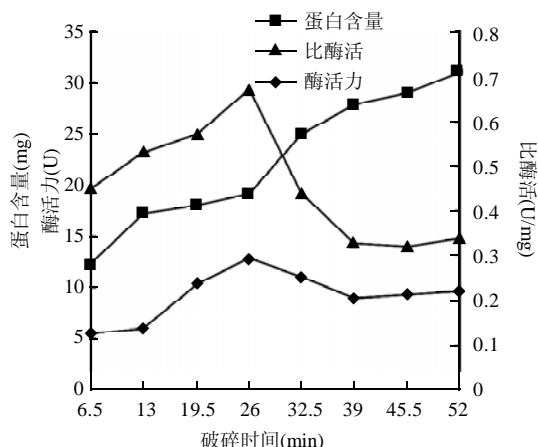


图3 超声波破碎时间的影响

Fig.3 Effects of ultrasonic time on extraction of aminopeptidase

瑞士乳杆菌为革兰氏阳性菌, 细胞壁较厚, 因此试验选用的破碎时间相对较长, 菌体悬液浓度为0.05mg/ml, 破碎功率为300W, 每次破碎工作时间3s, 间隔时间5s。由图3可以看出, 随着破碎时间的延长, 蛋白释放量逐渐增大, 说明破碎时间延长有助于细胞的破碎, 但是当时间为26min后, 酶活力则明显减少, 破碎时间延长会导致热量增加而致使酶活力受损。

2.2 提取氨肽酶超声波破碎条件的优化

以菌体浓度、破碎功率、破碎时间为响应变量, 根据单因素试验确定上下水平后, 按Box-Behnken原理设计试验, 进行优化分析。各试验组的编码与取值见表1, 试验设计及结果见表2。

表1 响应面分析试验因素水平表

Table 1 Test factors and levels of response surface analysis

因素	水平		
	-1	0	1
A 细胞浓度(g/ml)	0.033	0.025	0.020
B 超声波破碎功率(W)	100	200	300
C 超声波破碎时间(min)	6.5	13.0	26.0

以菌体浓度、破碎功率、破碎时间为响应变量, 以氨肽酶酶活力作为响应值, 利用MINTAB软件进行非线性回归的二次多项式拟合, 所得到的预测模型如下:

$Y=37.6933-0.5320A+2.1661B+20.8744C-7.4497A^2+4.6166B^2+6.0601C^2+5.0877AB-0.9737AC-1.8600BC$ 。从表

表2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Test design and results of Box-Behnken

试验次数	水平			氨肽酶活力(U)
	A	B	C	
1	-1	-1	0	38.871
2	-1	1	0	32.820
3	1	-1	0	26.725
4	1	1	0	41.025
5	0	-1	-1	20.140
6	0	-1	1	72.060
7	0	1	-1	28.400
8	0	1	1	72.880
9	-1	0	-1	17.760
10	1	0	-1	19.550
11	-1	0	1	55.005
12	1	0	1	52.900
13	0	0	0	39.360
14	0	0	0	35.720
15	0	0	0	38.000

表3 回归方程偏回归系数的估计值

Table 3 Estimate value of partial regression coefficient of regression equation

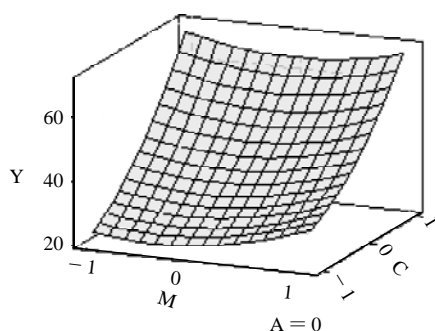
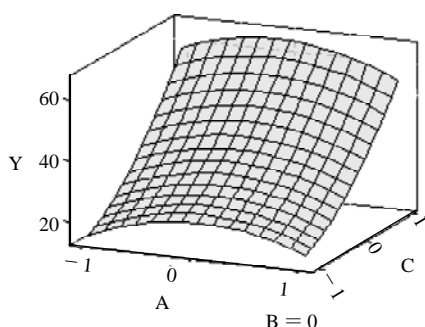
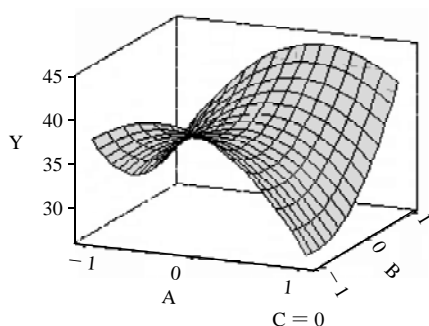
项	系数	系数标准误差	T	p
常量	37.6933	2.473	15.242	0.000
A	-0.5320	1.514	-0.351	0.740
B	2.1661	1.514	1.430	0.212
C	20.8744	1.514	13.784	0.000**
A*A	-7.4497	2.229	-3.342	0.021**
B*B	4.6166	2.229	2.071	0.093*
C*C	6.0601	2.229	2.719	0.042**
A*B	5.0877	2.142	2.376	0.064*
A*C	-0.9737	2.142	-0.455	0.668
B*C	-1.8600	2.142	-0.868	0.425

表4 方差分析表

Table 4 Analysis of variance

来源	自由度	连续平方和	校正平方和	F	p
回归	9	4098.25	455.36	24.82	0.001
线性	3	3525.72	1175.24	64.06	0.000
平方	3	451.36	150.45	8.20	0.022
交互作用	3	121.17	40.39	2.20	0.206
残差	5	91.73	18.35		
失拟	3	84.97	28.32	8.37	0.109
纯误差	2	6.77	3.38		
合计	14	4189.99			
S = 4.283 R ² = 97.8% R _{adj} ² = 93.9%					

3中可以看出, 根据p值判断($p \leq 0.05$ 时水平显著), C(破碎时间)影响程度最为显著, 其次是B(破碎功率), 最后是A(菌体浓度)。表4回归方程方差分析表明, 方程一次项和二次项影响是显著的, 交互项影响一般, 说明响应值的变化相对复杂。R_{adj}²=93.9%, 失拟项为0.109不显著, 说明回归方程拟合程度良好。

图4 $Y=f(B, C)$ 响应面立体图Fig.4 $Y=f(B, C)$ response surface stereogram图5 $Y=f(A, C)$ 响应面立体图Fig.5 $Y=f(A, C)$ response surface stereogram图6 $Y=f(A, B)$ 响应面立体图Fig.6 $Y=f(A, B)$ response surface stereogram

根据回归方程可绘出响应面分析图,如图5~7所示。可以看出,C(破碎时间)对酶活影响最为显著,A(菌体浓度)与B(破碎功率)的交互作用显著。用MINITAB软件进行分析,可以求得最适的提取条件为:A=0.23992、B=1.00000、C=1.00000,即超声波破碎条件为菌体浓度0.0238g/ml、破碎功率300W、破碎总时间26m。在此条件下破碎,可得预测值酶活为69.9811U,可信度为0.99973。在此条件下进行验证实验,最后实验得到酶活力为72.99U,证明预测值与实验值相一致。

3 讨论

本研究结果表明,超声波可以很好地破碎瑞士乳杆菌细胞壁,从而释放瑞士乳杆菌氨肽酶。超声波有强烈的生物学效应,进行超声波处理时,超声波的高频震动与微生物细胞的振动不协调,造成细胞周围环境局部真空,使细胞膜产生空穴作用,从而使之破碎^[14-15]。超声波破碎的效率取决于声频、声能、处理时间、细胞浓度及细胞类型等,使用超声波必须注意控制强度在一定限度,超声强度过高,散热比较困难容易引起酶的失活,超声强度过低的话,细胞破碎不彻底,氨肽酶不会完全释放。

响应曲面设计方法(response surface methodology, RSM)是利用合理的试验设计方法并通过试验得到一定数据,采用多元二次回归方程来拟合因素与响应值之间的函数关系,通过对回归方程的分析来寻求最优工艺参数,解决多变量问题的一种统计方法^[16-18]。MINITAB 是美国的宾西法尼亚州立大学基础统计学的学生1972年开发的,现已在工学社会学经营学等研究方面广泛使用。本研究利用MINITAB软件对超声波条件进行响应面优化设计,发现此方法精确度高,预测性能好,能以最少的试验循环提供关于变量和误差的诸多信息。

本研究采用的瑞士乳杆菌在乳酸菌中具有较强的蛋白水解能力,通过自身特殊的蛋白水解系统可以水解乳蛋白产生抗高血压多肽^[19]。如Yamamoto等对*Lactobacillus.helveticus* CP790进行研究发现*L. helveticus* CP790所分泌的蛋白酶可以水解酪蛋白后可产生多种ACE抑制肽^[20]; Nakamura等用*Lactobacillus helveticus*和*Saccharomyces cerevisiae*作为发酵剂制作了一种名为Calpis的酸乳饮料,SHR(原发性高血压小老鼠)长期服用Calpis后,可抑制血压上升^[21]。本研究中所提取的氨肽酶为瑞士乳杆菌氨肽酶中的一种,位于细胞质中,可以从多肽N-端水解出游离氨基酸为菌体生长提供所需氮源,并且这些游离氨基酸还是发酵乳制品中风味物质的来源^[22],因此国内外对于乳酸菌的氨肽酶已有相关报道^[23-25],但是还未见有对于氨肽酶在水解乳蛋白产生ACE抑制肽方面的报道。本实验进行了氨肽酶的初步提取,旨在为研究氨肽酶在水解乳蛋白产生ACE抑制肽方面提供实验基础,为发酵乳制品工业的发展提供一些基础理论。

4 结论

综上所述,采用超声波破碎的实验方法可以较好的提取瑞士乳杆菌的胞内氨肽酶,采用MINITAB软件对超声波破碎的条件进行了响应面优化,拟合了各因素对于氨肽酶活力的回归方程:

$$Y=37.6933-0.5320A+2.1661B+20.8744C-7.4497A^2+$$

$4.6166B^2+6.0601C^2+5.0877AB-0.9737AC-1.8600BC$ 。

确定了影响提取氨肽酶的因素显著性为破碎时间>破碎功率>菌体浓度,同时菌体浓度和破碎功率存在较显著的交互作用。最后确定了超声波破碎的最优条件,即取菌体浓度为0.0238g/ml的瑞士乳杆菌细胞悬液,在功率300W下进行破碎,破碎总时间为26min(工作时间3s,间隔时间5s),破碎同时采用冰浴冷却。破碎后得到粗酶液总酶活力为72.99U,与理论值69.9811U接近。

参考文献:

- [1] LECLERC P L, GZUTHIER S F, BACHELARD B H, et al. Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*[J]. International Dairy Journal, 2002, 12: 995-1004.
- [2] PAN D D, MASARU T Y L. Antihypertensive peptides from skimmed milk hydrolysate digested by cell-free extract of *Lactobacillus helveticus* JCM1004[J]. Food Chemistry, 2005, 91: 123-129.
- [3] PIHLANTO-LEPPALA A, ROKKA T, KORHONEN H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk protein[J]. International Dairy Journal, 1998, 8: 325-331.
- [4] PIHLANTO-LEPPALA A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides[J]. Trends in Food Science & Technology, 2001(11): 347-356.
- [5] MULLALLY M M, MEISEL H, FITZGERALD R J. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey protein[J]. International Dairy Journal, 1997, 7: 299-303.
- [6] BINTSIS T, VAFPOULOU-MASTROJANNAKI A, LITOPOULOU-TZANETAKI, et al. Protease, peptidase and esterase activities by lactobacilli and yeast isolates from Feta cheese brine[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 95: 68-77.
- [7] LAW J, HAANDRIKMAN A. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria[J]. International Dairy Journal, 1997, 7: 1-11.
- [8] FANG G, POOLMAN B. Production and utilization of peptides in *Lactococcus lactis*[J]. Molecular Microbiology, 1998, 27: 1107-1118.
- [9] T GONZALES, J ROBERT-BAUDOUY. Bacterial aminopeptidases: properties and functions[J]. Federation of European Microbiological Societies, 1996, 18: 319-344.
- [10] DAKO E, SODA M E, VUILLEMARD J-C, et al. Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria[J]. Food Research International, 1995, 28(5): 503-509.
- [11] PAN D D, TANOKURA M. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* JCM 1004[J]. Food Chemistry, 2004, 88: 511-516.
- [12] MAGBOLL A A A, MCSWEENEY P L H. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus curvatus* DPC2024[J]. International Dairy Journal, 1999, 9(2): 107-116.
- [13] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein using the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [14] 邓洁, 程龙, 刘谊, 等. 根肿(*Plasmodiophora brassicae*)休眠孢子的纯化和超声波破碎方法研究[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(2): 269-272.
- [15] 赵瑞香, 王大红, 牛生洋, 等. 超声波细胞破碎法检测嗜酸乳杆菌 β -半乳糖苷酶活力的研究[J]. 食品科学, 2006, 27: 1-47.
- [16] 韩玉洁, 谢应根, 王永华, 等. 响应面分析法优化L2乳酸发酵培养基的研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(4): 54-56.
- [17] 胡永红, 沈树宝, 欧阳平凯. 响应面分析法用于微生物培养基浓度的优化[J]. 工业微生物, 2002, 32(1): 9-12.
- [18] VEN DER VEN C, GRUPPEN H, D E, et al. Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology[J]. International Dairy Journal, 2002, 12(10): 813-820.
- [19] CAIRA S, FERRANTI P, GATTI M, et al. Synthetic peptides as substrate for assaying the proteolytic activity of *Lactobacillus helveticus* [J]. Journal of Dairy Research, 2003, 70: 315-325.
- [20] YAMAMOTO N, AKINO A, TAKANO T. Purification and specificity of a cell-wall associated proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790 [J]. Journal of Biochemistry, 1993, 114: 740-745.
- [21] NAKAMYRA Y, YAMAMOTO N, SAKAI K, et al. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk[J]. Journal of Dairy Science, 1995, 78: 777-783.
- [22] COURTINA P, NARDIA M, WEGMANN U. Accelerating cheese proteolysis by enriching *Lactococcus lactis* proteolytic system with lactobacilli peptidases[J]. International Dairy Journal, 2002, 12: 447-454.
- [23] GOBBETTI M, SMACCHI E A, CORSETTI A. The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(9): 3220-3226.
- [24] NEVIANI E C Y B, MONNET V, THANH L P, et al. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM2[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(9): 2308-2314.
- [25] MIYAKAWA H, SHIMAMURA S K S, TOMITA M. Purification and characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus helveticus* LHE-511[J]. Journal of Dairy Science, 1992, 75: 27-35.