

# 酶解-膜分离组合制备 ACE 抑制肽

曾庆祝<sup>1</sup>, 许庆陵<sup>2</sup>

(1. 广州大学食品工程系, 广东 广州

510006 2. 广州大学化学化工学院实验中心, 广东 广州

510006)

**摘 要:** 测试了膜分离操作压力、温度、pH 值、料液体积浓度等操作参数对酶活力、血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽分离的影响, 并建立分段酶解、分级膜分离组合模式实现从扇贝裙边酶解产物中分离 ACE 抑制肽。结果表明: 膜分离操作操作参数对酶活力、ACE 抑制肽分离均有较大影响; 二段酶解-二级膜分离组合模式制备及分离 ACE 抑制肽的得率最高, 为 5.73%, 其  $IC_{50}$  为 0.088mg/ml; 一段酶解-二级膜分离组合模式制备及分离 ACE 抑制肽的得率为 3.19%, 其  $IC_{50}$  为 0.081mg/ml; 一段酶解-单级膜分离组合模式制备及分离 ACE 抑制肽的得率只有 2.31%, 其  $IC_{50}$  为 0.078mg/ml。

**关键词:** 膜分离; 血管紧张素转换酶(ACE); 活性肽; 酶解

Preparation of ACE Inhibitor Peptides with Combination System of Hydrolysis-Membrane Separation

ZENG Qing-zhu<sup>1</sup>, XU Qing-ling<sup>2</sup>

(1. Department of Food Engineering, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China

2. Center of Experiment, College of Chemical Industry, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Effects of separation pressure, temperature, pH and the ratio of E/s on enzymic activity and separation of ACE (angiotensin converting enzyme) inhibitory peptides were investigated. The combination system of hydrolysis-membrane separation to separate ACE inhibitory peptides from hydrolysates was established. The results showed that the effects of separation parameters of membrane separation on enzymic activity and separation of ACE inhibitory peptides are prominent. The combination system of two-times hydrolysis-two-ranks membrane separation possesses the high yield of ACE inhibitory peptides as 5.73%, while  $IC_{50}$  (half inhibit concentration) as 0.088 mg/ml. The yields of ACE inhibitory peptides of the two combination system. Such as were one-time hydrolysis-two-ranks membrane separation and of one-time hydrolysis-one-rank membrane separation, are 3.19% and 2.31% respectively, while  $IC_{50}$  values are 0.081 mg/ml and 0.078 mg/ml, respectively.

**Key words** membrane separation; angiotensin converting enzyme (ACE); active peptide; hydrolysis

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)02-0229-05

寻找技术合理、经济可行的方法分离提纯酶解后的活性肽是倍受关注的课题, 也是实现活性肽产业化的关键。作为现代高新分离技术——膜分离技术可用于氨基酸、多肽或多肽混合物的分离、蛋白质水解产物的分离与脱盐等<sup>[1]</sup>。

由于酶解-膜分离组合反应器可以实现反应和分离一体化<sup>[2]</sup>, 具有使反应和分离几乎同时进行, 并及时将酶解产物——活性肽从体系中分离出来等优点, 避免活性肽受到酶的进一步分解而失去活性功能, 同时也把大分子留在反应体系内继续参加分解反应。酶解-膜分离组合不但提高酶的利用率, 加深反应进行程度, 还提

高目标产物(肽)的得率。目前, 已在实验室规模上得到了多种酶膜反应器的动力学模型, 建立了以微滤酶膜反应器、超滤酶膜反应器、反渗透酶膜反应器和膜萃取等为基础的实验型酶膜反应器<sup>[2]</sup>, 并应用酶膜反应器从酶解产物中获取功能性成分<sup>[3-4]</sup>。我国在这方面也开展了一些研究工作, 如采用超滤技术分离大豆肽<sup>[5]</sup>、动态膜分离式酶反应器连续操作特性研究<sup>[6]</sup>。许学书等<sup>[7]</sup>进行了超滤和反应器的偶联组合进行干酪素酶解反应研究, 结果表明该模型大大提高了平衡转化率。本实验拟探讨酶解-膜分离组合从扇贝裙边酶解产物中制备及分离 ACE 抑制肽的得率及抑制活性。

收稿日期: 2006-12-11

基金项目: 广州大学人才引进启动基金

作者简介: 曾庆祝(1965-), 男, 教授, 博士, 主要从事海洋生物资源综合利用研究。E-mail: qingzhuzeng@yahoo.com.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 膜分离料液

膜分离料液为胃蛋白酶在最佳条件下水解扇贝裙边所得产物。

### 1.2 设备

超滤膜装置为配备有微滤膜组件实验型, 膜材料为聚砜中空纤维, 有效膜面积  $0.5\text{m}^2$ , 截留分子量  $3\text{kD}$  和  $30\text{kD}$  两种, 操作压力不大于  $0.2\text{MPa}$ , 操作温度小于  $45^\circ\text{C}$ , 适用  $\text{pH}$  为  $2\sim 13$ 。酶解罐为自制。

### 1.3 测定方法

#### 1.3.1 残余酶活力测定

在超滤过程中, 每隔一定时间取样, 测定膜分离截留液中酶的即时活力, 即残余酶活力。测定方法按照 Folin-酚法<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.2 总氮及蛋白测定

微量凯氏定氮法<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.3 肽含量测定

按照双缩尿比色法测定<sup>[10-11]</sup>。

$$\text{肽得率}(\%) = \frac{\text{肽含量}}{\text{原料总蛋白量}} \times 100$$

$$\text{肽透过率}(\%) = \frac{\text{透过液的总肽量}}{\text{膜分离前的总肽量}} \times 100$$

#### 1.3.4 ACE 活性抑制率

间隔一定时间对膜分离透过液取样, 浓缩冻干后备用。按照 Cushman 等<sup>[11]</sup>的紫外分光光度法, 稍作适当改变。取  $1\text{mg}$  酶解产物冻干品溶解在  $1\text{ml}$  去离子水中, 配置成酶解样液。然后取  $50\mu\text{l}$  酶解样液, 加入到  $2\text{ml}$  的 Eppendorf 管中, 另加入  $50\text{ml}$  HHL 缓冲液, 置于  $37^\circ\text{C}$  保温  $5\text{min}$ , 再加入  $50\mu\text{l}$  ACE 酶液启动反应,  $37^\circ\text{C}$  保温  $60\text{min}$  后加入  $150\mu\text{l}$   $1\text{mol/L}$   $\text{HCl}$  终止反应。再加入乙酸乙酯  $1.5\text{ml}$ , 在旋涡混合器上震荡混合  $20\text{s}$ , 在  $3000\text{r/min}$  下离心  $10\text{min}$ , 用移液器吸取  $1.0\text{ml}$  脂层于另一 Eppendorf 管中, 在真空干燥箱中干燥  $120\text{min}$ , 再用移液器吸取  $1.0\text{ml}$  去离子水将其溶解, 在  $278.5\text{nm}$  紫外波长处测定该溶液的吸光度。实验分三组同时进行, 第一组为空白组 A, 用去离子水代替酶解样液, 并用配制 ACE 的缓冲液代替 ACE 酶液; 第二组为加样组 B, 加入酶解液作为抑制剂; 第三组为对照组 C, 仅用去离子水代替酶解液。

$$I(\%) = \frac{A-B}{A-C} \times 100$$

式中, A 为空白组的吸光度; B 为加样组, 即加入酶解样液抑制剂后的吸光度; C 为对照组的吸光度。

当 ACE 活性抑制率达到  $50\%$  时所需抑制剂的浓度即为半抑制浓度, 记为  $\text{IC}_{50}$ , 可根据实验测定和抑制物浓度与抑制率之间的关系计算求出  $\text{IC}_{50}$  值。

#### 1.3.5 水分含量测定

常压干燥法<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.6 氨基态氮测定

甲醛电位滴定法<sup>[8]</sup>。

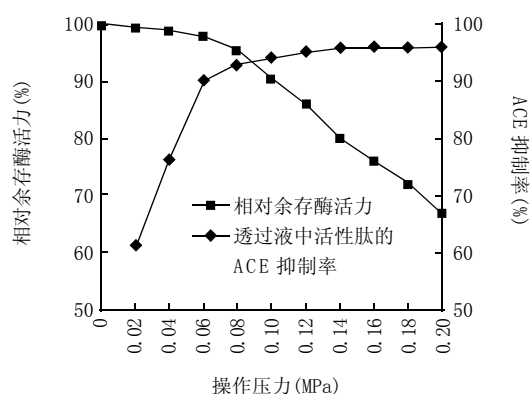
## 2 结果与分析

### 2.1 一段酶解-单级膜分离组合模式

所谓一段酶解-单级膜分离组合模式是指酶解反应全部完成后, 进行酶失活, 然后经粗过滤和离心分离获得酶解清液, 再对酶解清液进行截留分子量为  $30\text{kD}$  的膜分离。

#### 2.1.1 操作压力对酶活力及活性肽分离的影响

膜分离的操作压力对酶活力及活性肽分离的影响见图 1。



温度  $32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} 2.5$ , 膜分离时间  $30\text{min}$ 。

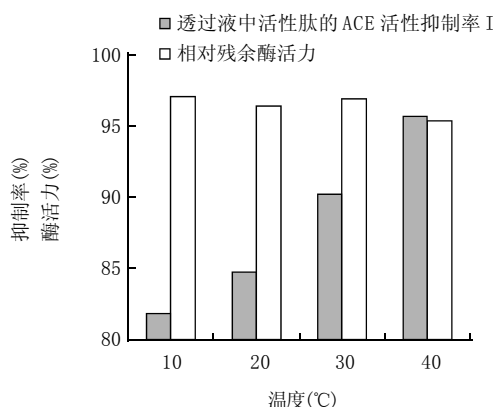
图 1 操作压力对酶活力及活性肽分离的影响  
Fig.1 Effects of pressure on enzymic activity and separation of active peptide

从图 1 可以看出, 在料液温度为  $32^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH}=2.5$  的条件下, 操作压力对酶活力和透过液中活性肽的 ACE 活性抑制率都有较大影响。经过  $30\text{min}$  的膜分离后, 截留液的残存酶活力有所降低, 操作压力大, 残存酶活力降低幅度也大。这可能是泵叶轮旋转产生的前切力导致了酶活力降低<sup>[11]</sup>。当操作压力小于  $0.08\text{MPa}$  时, 压力的变化对酶活力影响相对较小, 经过  $30\text{min}$  的膜分离后, 截留液的残存酶活力保持在  $90\%$  以上。当操作压力超过  $0.08\text{MPa}$  以后, 压力的进一段增加会导致酶活力的快速下降, 尤其是压力达到  $0.12\text{MPa}$  以后, 酶活力下降的速度更快。

经过 30min 的膜分离后, 透过液中活性肽的 ACE 活性抑制率随操作压力的提高而增大, 主要是透过液中总肽含量不断增加, 其中的活性肽组分的含量也随之增加。说明在这样的操作条件下, 操作压力不会影响活性肽的 ACE 抑制能力。综合考虑操作压力对膜透过速率、酶活力及活性肽分离的影响, 选择操作压力为 0.06MPa 比较合适。

### 2.1.2 温度对酶活力及活性肽分离的影响

操作温度(即料液温度)的选择主要取决于料液的物理化学性质、酶的稳定性, 以及膜组件的温度耐受力。文献[12]比较了 10、20、32 和 40℃ 四种温度对超滤膜透过速率的影响(由于制备 ACE 抑制肽的最佳温度是 32℃; 膜分离的工作温度要求不超过 45℃)。



操作压力 0.06MPa, pH=2.5, 膜分离时间 30min。

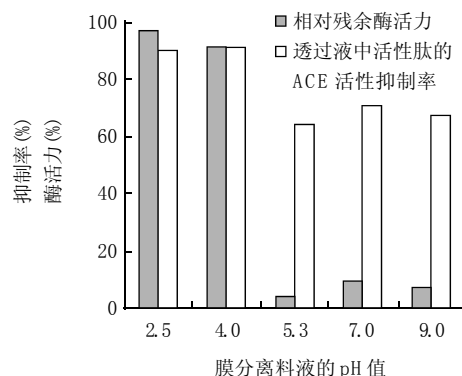
图2 料液温度对酶活力及活性肽分离的影响

Fig.2 Effects of temperature on enzymic activity and separation of active peptide

从图 2 可以看出, 在 10~40℃ 的温度范围内, 经过 30min 膜分离后, 前三种温度下的残余酶活力几乎相同, 只是在 40℃ 下的酶活力有所降低。说明给定温度范围内, 料液温度的变化对酶活力的损失不大。在较高温度下, 透过液中活性肽的 ACE 抑制率相对较高。由于温度升高, 膜的透过速率增加<sup>[13]</sup>, 使酶解液中的活性肽能够相对比较快地透过超滤膜, 增加了透过液中活性肽的含量, 因而相应地提高了活性肽的 ACE 抑制率。

### 2.1.3 料液 pH 对酶活力及活性肽分离的影响

从图 3 可以看出, 料液 pH 值对残余酶活力有非常大的影响。pH2.5 时, 残余酶活力最高, 导致酶活力的损失主要来自泵剪切力的影响; pH5.3 时, 胃蛋白酶因等电点而发生沉淀, 残余酶活力降低; pH 继续升高时, 蛋白酶发生变性, 酶活力降低。透过液中活性肽的 ACE 抑制率也受到 pH 值变化的影响, 主要是蛋白质的沉淀和变性降低了膜透过速率, 影响了肽的透过率。另一方面, 蛋白质的沉淀或聚集也会带出一些肽, 导



操作压力 0.06MPa, 温度 32℃, 膜分离时间 30min。

图3 膜分离料液 pH 对酶活力及活性肽分离的影响

Fig.3 Effects of pH on enzymic activity and separation of active peptide

致活性肽的损失。

### 2.1.4 膜分离前后的基本成分与活性比较

酶解液经过膜分离前后的基本成分及 ACE 活性抑制率的变化情况见表 1 所示。

表1 膜分离前后酶解液的基本成分与抑制活性  
Table 1 Basic component and IC<sub>50</sub> of hydrolysates before and after ultrafiltration membrane

项目	酶解清液	膜透过液	膜截留液
水分 (%)	90.83	92.04	84.87
总氮(g/100ml)	0.8219	0.6960	1.3137
氨基酸氮(mg/100ml)	13.01	14.56	4.87
肽的含量(g/100ml)	0.7308	0.6898	0.8938
肽的总含量(g)	36.54	28.97	7.15
IC <sub>50</sub> (mg/ml)	1.671	0.927	3.952

在操作压力为 0.06MPa, 温度 32℃, pH=2.5 的条件下, 5000ml 离心后的酶解清液, 经过截留分子量为 30kD 超滤膜分离 30min 后, 得到 4200ml 透过液和 800ml 截留液, 透过液量占酶解清液总量的 84%, 透过液的 ACE 抑制率为 90.2%, 半抑制浓度 IC<sub>50</sub> 为 0.927mg/ml。透过液中肽的总量占酶解液中肽总量的 80%, 大约有 20% 的肽未透过超滤膜而保留在截留液中, 不过这部分肽的 ACE 抑制能力很弱, 其中大部分是分子量大于 30kD 的肽, 也有一部分是小肽。膜分离后截留液的残余酶活力为 96.8%, IC<sub>50</sub> 为 3.952mg/ml。

### 2.2 一段酶解-二级膜分离组合模式

由于 3kD 超滤膜的孔径小, 膜通量不高, 不宜直接采用 3kD 膜对酶解液进行分离, 否则膜污染严重, 膜的透过速率及分离效率都很低。因此, 有必要采用不同切割分子量的超滤膜进行分级分离, 以提高活性肽得率。

一段酶解-二级膜分离组合模式制备及分离 ACE 抑制肽的工艺为: 在制备 ACE 抑制肽的最佳酶解条件下, 用胃蛋白酶酶解扇贝裙边 3h → 进行截留分子量

30kD 的膜分离→截留液继续被酶解和膜分离, 透过液进行二级膜分离(截留分子量3kD)→截留液返回原酶解罐继续酶解和膜分离→透过液浓缩→冷冻干燥→富含 ACE 抑制肽的酶解产物。膜分离操作条件同一段酶解-单级膜分离组合模式, 即操作压力为 0.06MPa, 温度 32℃, 料液 pH2.5。

酶解液及膜分离各组分的肽含量和残存酶活力变化情况见图 4。膜分离开始时, 透过膜的主要是酶解反应 3h 期间水解下来的小肽、氨基酸和水, 透过液肽含量较多。随着分离的继续进行, 产物抑制减轻, 酶解反应速率有上升趋势, 但由于 3kD 膜的透过速率较慢, 限制了整个组合系统的分离速度, 使大量的 3kD 膜截留液返回酶解罐中, 对酶解反应又有一定的抑制作用。因此, 大约 5h 以后, 肽产生的速率与膜透过速率基本相等, 这时透过液和截留液的总肽浓度基本保持不变。由于酶活力有所降低, 应定期向酶解罐中补充适量酶及水分。

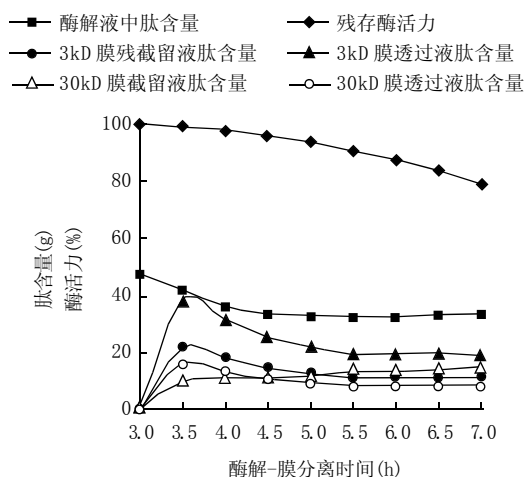


图4 一段酶解-二级膜分离过程中各分离组分的肽含量和残存酶活力

Fig.4 Content of peptide and enzymic activity remained during one-time hydrolysis-one-rank membrane separation

### 2.3 二段酶解-二级膜分离组合模式

二段酶解-二级膜分离系统制备及分离 ACE 抑制肽的工艺为: 在制备 ACE 抑制肽的最佳酶解条件下, 用胃蛋白酶酶解扇贝裙边 3h → 进行截留分子量 30kD 的膜分离→截留液继续被酶解和膜分离, 透过液进行二级膜分离(截留分子量 3kD)→截留液进入第二酶解罐进行重新二段酶解和膜分离(截留分子量 3kD)→合并透过液并浓缩→冷冻干燥→富含 ACE 抑制肽酶解产物。膜分离操作条件同一段酶解-单级膜分离组合模式, 即操作压力为 0.06MP, 温度 32℃, 料液 pH2.5。

二段酶解-二级膜分离过程中各组分的肽含量和残存酶活力变化情况见图 5。与一段酶解-二级膜分离组合模式相比, 由于 3kD 膜截留液没有返回原酶解罐, 而

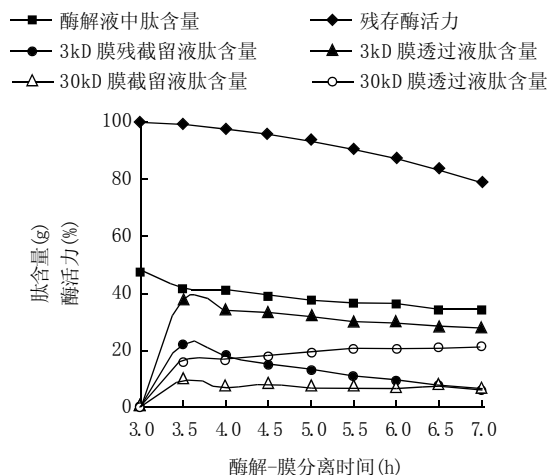


图5 二段酶解-二级膜分离过程中各分离组分的肽含量和残存酶活力

Fig.5 Content of peptide and enzymic activity remained during two-times hydrolysis-two-ranks membrane separation

是独立出来, 并补充适量酶进行单独二段酶解, 将 30kD 膜透过液连续从单级酶解-膜分离组合中隔离出来, 使分子量小于 30kD 的肽类不再返回单级酶解-膜分离组合中, 再采用 3kD 膜进行二级膜分离。3kD 膜截留液中肽的分子量分布主要在 3~30kD 之间, 这些肽在补充酶的作用下经过二段酶解, 增加了酶与肽分子的接触机会, 使分子量大于 3kD 的肽可以更快地分解为小肽。因此, 3kD 膜透过液中肽含量不断增加, 从而增加了分子量小于 3kD 的肽总含量, 同时也提高了 ACE 抑制肽的得率(见表 2)。

表2 三种酶解-膜分离组合模式下肽透过率、得率及 ACE 抑制活性比较

Table 2 Comparison of permeation rate, yield and IC<sub>50</sub> under different hydrolysis-membrane separations

分离模式	30kD 膜肽透过率 (%)	3kD 膜肽透过率 (%)	肽得率 (%)	IC <sub>50</sub> (mg/ml)
一段酶解-单级膜	78.00	42.00	2.31	0.078
一段酶解-二级膜	54.03	42.00	3.19	0.081
二段酶解-二级膜	81.16	77.22	5.73	0.088

### 3 结 论

选用适宜切割分子量的超滤膜, 在一定膜分离条件下, 可以将酶解产物中肽分离出来。建立酶解-膜分离组合模式, 可以更有效将酶解目标产物如活性肽及时从体系中分离出来, 提高酶解产物的生物生理活性。从实验结果来看, 虽然所建立的三种酶解-膜分离组合模式所获得的 ACE 活性肽的抑制率差异不大, 但是二段酶解-二级膜分离组合模式制备及分离 ACE 活性肽的得率最高。综合比较各项指标, 可以认为二段酶解-二级膜分离组合模式是制备 ACE 抑制肽的较好模式。

## 参考文献:

- [1] 姚红娟, 王晓琳. 膜分离技术在低分子量生物产品分离纯化中的应用[J]. 化工进展, 2003(2): 146-152.
- [2] PRATA-VIDAL M. An experimental study of casein macropeptide hydrolysis by trypsin in a continuous membrane reactor[J]. Biochemical Engineering Journal, 2001(8): 195-2023.
- [3] PRAZERES D M F, CABRAL J M S. Enzymatic membranes bioreactors and their applications[J]. Enzyme Microb Technol, 1994, 16: 738-743.
- [4] PEREA A, UGALDE U. Continuous hydrolysis of whey proteins in a membrane recycle reactor[J]. Enzyme Microb Technol, 1996, 18: 29-33.
- [5] 陈山, 杨晓泉, 郭祀远, 等. 大豆肽超滤分离纯化过程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(1): 49-52.
- [6] 朱宏吉, 胡金榜, 金鼎五, 等. 动态膜分离式酶反应器连续操作特性研究[J]. 化工科技, 2002, 10(2): 18-20.
- [7] 许学书, 黄慧, 廖湘海, 等. 超滤和反应器偶联组合进行干酪素酶解反应[J]. 化学反应工程与工艺, 2001, 17(2): 133-137.
- [8] 李建武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [9] 大连轻工业学院. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994.
- [10] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化试验方法和技术[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1997: 140-141.
- [11] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting anzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol, 1977, 20: 1637-1648.
- [12] 胡金榜, 宫强, 解建光, 等. 在膜分离式酶解反应器中单基质酶受叶轮剪切失活的实验研究[J]. 化学反应工程与工艺, 1999, 15(1): 19-24.
- [13] 曾庆祝, 汪涛, 叶于明, 等. 扇贝边酶解技术研究[J]. 中国水产科学, 2001, 7(1): 64-68.