

# 酶解虾壳蛋白制备 ACE 抑制剂的工艺优化

施旭丹, 罗自生\*, 那地拉·阿合买提江, 孙静静

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 浙江 杭州 310058)

**摘 要:** 以虾壳粉为原料, 以水解度和 ACE 抑制率为指标, 利用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、菠萝蛋白酶和木瓜蛋白酶进行酶解, 其中中性蛋白酶和碱性蛋白酶有较高的 ACE 抑制活性, 因此对碱性蛋白酶和中性蛋白酶的工艺条件进一步优化。结果表明: 碱性蛋白酶酶解工艺优化条件为: 温度 60℃、pH9.5、底物质量浓度 2.5g/100mL、加酶量 4000U/g、酶解时间 2.5h, 在此条件下 ACE 抑制率最高, 为 67.70%, 水解度为 69.79%; 中性蛋白酶酶解工艺优化条件为: 温度 50℃、pH7.0、底物质量浓度 2.5g/100mL、加酶量 2000U/g、酶解时间 2h, 在此条件下 ACE 抑制率最高, 为 84.04%, 水解度为 26.76%。提示中性蛋白酶酶解能够产生更多的 ACE 抑制肽, 是酶解虾壳蛋白制备 ACE 抑制肽的较优酶。

**关键词:** 虾壳; 中性蛋白酶; 碱性蛋白酶; ACE 抑制肽; 酶解工艺

## Enzymatic Preparation of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Shrimp Shell

SHI Xu-dan, LUO Zi-sheng\*, Nadila AHEMAITIJIANG, SUN Jing-jing

(School of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** In order to find the appropriate proteases for enzymatic preparation of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from shrimp shell, neutral protease, alkaline protease, bromelain and papain were evaluated for their effectiveness in hydrolyzing shrimp shell based on hydrolysis degree and ACE-inhibitory activity. It was found that both neutral protease and alkaline protease were more suitable for the preparation of ACE-inhibitory peptides from shrimp shell. The process conditions for hydrolyzing shrimp shell with neutral protease or alkaline protease were optimized by orthogonal array design method. The optimized alkaline protease hydrolysis conditions were hydrolysis temperature of 60 °C, hydrolysis pH of 9.5, substrate concentration of 2.5 g/100 mL, enzyme concentration of 4000 U/g and hydrolysis time of 2.5 h, resulting in an ACE-inhibitory rate of 67.70% and a hydrolysis degree of 69.79%. The optimized neutral protease hydrolysis conditions were hydrolysis temperature of 50°C, hydrolysis pH of 7.0, substrate concentration of 2.5 g/100 mL, enzyme concentration of 2000 U/g and hydrolysis time of 2 h, resulting in an ACE-inhibitory rate of 84.04% and a hydrolysis degree of 26.76%. In conclusion, neutral protease is a superior protease over alkaline protease for the preparation of ACE-inhibitory peptides from shrimp shell.

**Key words:** shrimp shell; neutral protease; alkaline protease; ACE inhibitory peptide; enzymatic hydrolysis

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0131-06

人体的血压调节主要是受到血管紧张素源(renin-angiotensin system, RAS)和激肽源(kallikrein kinin system, KKS)这一对拮抗体系控制, 当其失衡时将会引起人体血压的不正常。一方面, 在血管紧张素转换酶(angiotensin I converting enzyme, ACE)作用下, 血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II, 血管紧张素 II (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe)是使血压升高的主要物质。另一方面, 在 KKS 体系中, ACE 可使具有血管舒张作

用的缓激肽转化为没有活力的缓释肽。在两个系统的联合作用下, 人体内血压升高<sup>[1]</sup>。因此, 抑制 ACE 活性可以降低人体血压。目前已有的治疗高血压的药物, 例如卡托普利、依那普利等, 虽然具有很好的专一性和降血压效果, 但是长期服用会引发咳嗽、皮肤病、肾功能衰竭等毒副作用。因此寻找安全可靠、毒副作用小的食源性 ACE 抑制剂成为研究热点。通过这些年的研究, 从鲣鱼<sup>[2]</sup>、毛虾<sup>[3]</sup>、杏仁<sup>[4]</sup>、魔芋粉<sup>[5]</sup>、鸡骨蛋

收稿日期: 2011-05-21

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD29B06); 浙江省重点科技创新团队项目(2009R50036)

作者简介: 施旭丹(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品科学。E-mail: flybird\_sxd@126.com

\* 通信作者: 罗自生(1972—), 男, 教授, 博士, 研究方向为农产品贮藏加工。E-mail: luozisheng@zju.edu.cn

白<sup>[6]</sup>、乳制品<sup>[7]</sup>等动植物蛋白中均有制备分离得到 ACE 抑制肽。

虾壳是水产工业和居民日常生活中常见的一种固体废弃物。随着我国人工养殖虾、蟹的增加,这些废弃物数量也越来越多,若不及时处理,很快就腐坏对环境造成污染。虾壳多被磨成粉,制成附加值较低的动物饲料。其实,虾壳中含有丰富的甲壳素、钙等无机物,其蛋白含量更是高达 30%~40%,合理利用可以创造出更大的价值。本研究利用几种蛋白酶酶解虾壳中蛋白,以水解度和 ACE 抑制率为指标,优化酶的酶解工艺,为虾壳为原料开发的生物活性肽类提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

明虾 杭州农贸市场。

碱性蛋白酶、中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶 上海楷洋生物技术有限公司;血管紧张素转化酶(ACE)、底物 Hippuryl-His-Leu 美国 Sigma 公司。

### 1.2 仪器与设备

SHY-2 水浴恒温振荡器 江苏金坛市佳美仪器有限公司;UV-1750 紫外-可见分光光度计 日本岛津仪器有限公司;9073BS-III 电热恒温鼓风干燥箱 上海新苗医疗器械制造有限公司;Universal 320r 离心机 德国 Hettich Zentrifugen 公司;FE20 pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;L-8800 氨基酸自动分析仪 日本日立公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 原料准备

将虾壳和虾头放于烘箱中 50℃、12h,取出粉碎,过 60 目筛。

#### 1.3.2 指标测定

水分测定:采用直接干燥法<sup>[8]</sup>;脂肪含量测定:采用索氏抽提法<sup>[8]</sup>;灰分含量测定:采用 550℃干法灰化法<sup>[8]</sup>;蛋白质含量测定:称取 5g 粉碎的虾壳和虾头,加入 30mL 质量分数为 4% 的 NaOH 溶液,于 95℃水浴浸泡 60min,离心分离,滤渣重复上述实验,合并上清液,用凯氏定氮法测定上清液的蛋白质含量<sup>[9]</sup>;氨基酸分析:氨基酸专用高效液相色谱法<sup>[8]</sup>。氨基态氮测定:采用甲醛滴定法<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.3 水解度的计算<sup>[8]</sup>

$$h_{\text{NH}_2}/(\text{mmol/g}) = \frac{(V_1 - V_2) \times c}{m \times \frac{5}{V} \times \frac{20}{100}} \quad (1)$$

$$\text{DH} = \frac{h_{\text{NH}_2} - h_0}{h_{\text{tot}}} \quad (2)$$

式中:  $V_1$  为 NaOH 标准溶液的体积/mL;  $V_2$  为空白消耗的 NaOH 标准溶液的体积/mL;  $c$  为标准 NaOH 溶液的浓度/(mol/L);  $m$  为虾壳中蛋白质的质量/g;  $V$  为待测溶液体积/mL;  $h_{\text{NH}_2}$  为反应后氨基态氮浓度/(mmol/g);  $h_0$  为反应前氨基态氮浓度/(mmol/g);  $h_{\text{tot}}$  为每克原料蛋白的肽键毫摩尔数(mmol/g), 虾壳蛋白  $h_{\text{tot}} = 8.073 \text{ mmol/g}$ 。

#### 1.3.4 ACE 抑制率测定

参照 Cushman 等<sup>[10]</sup>的方法进行改进。以 Hippuryl-His-Leu 为底物,测定抑制剂对 ACE 的抑制活性。反应体系包括 pH8.3 硼酸-硼砂缓冲液、5mmol/L 的 HHL 50μL 以及 40μL 抑制剂,终体积为 140μL。加入 ACE 酶液启动反应,于 37℃恒温 1h,然后加入 1mol/L HCl 终止反应。加入 1.2mL 乙酸乙酯萃取,离心,吸取 1mL 酯层于 100℃干燥 1h,加入 3mL 蒸馏水,于 228nm 波长处测定吸光度。

$$\text{ACE 抑制率}/\% = \frac{A_1 - A}{A_1 - A_0} \quad (3)$$

式中:  $A_1$  为 ACE 与 HHL 完全反应后的吸光度;  $A$  为加入抑制剂和 ACE 酶的吸光度;  $A_0$  为加灭活 ACE 酶的吸光度。

#### 1.3.5 较优酶的选择

选用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和菠萝蛋白酶分别按照表 1 条件对虾壳粉进行水解,反应结束后,置于沸水浴中加热 5min 灭酶,将酶解液 4000r/min, 20min 离心,取上清液,检测水解度和 ACE 抑制率。

表 1 4 种酶的酶解条件  
Table 1 Hydrolysis conditions of 4 kinds of proteases

酶种类	温度/℃	pH	底物质量浓度/(g/100mL)	酶用量/(U/g)	时间/h
中性蛋白酶	45	7.0	2	5000	4
碱性蛋白酶	55	8.0			
木瓜蛋白酶	65	6.5			
菠萝蛋白酶	55	7.0			

#### 1.3.6 酶解工艺条件的优化

通过上述酶解效果的比较,选择中性蛋白酶和碱性蛋白酶进行进一步酶解优化。采用单因素试验、四因素三水平正交试验对两种酶酶解工艺进行优化。

## 2 结果与分析

### 2.1 虾壳基本组成成分及虾壳蛋白氨基酸分析

表2 虾壳基本组成成分

Table 2 Basic composition of shrimp shell

成分	水分	粗脂肪	粗蛋白	灰分
含量/%	10.95 ± 0.28	11.59 ± 0.34	41.37 ± 0.50	21.26 ± 0.17

由表2可知, 虾壳中蛋白质含量为41.37%, 并且其粗脂肪含量仅为11.59%, 蛋白含量较高且脂肪含量低, 具备制备ACE抑制肽的基本条件。ACE抑制肽的C端氨基酸是与ACE活性部位结合的关键, 活性较强的ACE抑制肽的C端氨基酸一般为具有环状结构的芳香族氨基酸(色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)或脯氨酸; N端为长链或具有支链的疏水性氨基酸(亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)<sup>[11]</sup>。经检测发现, 虾壳中6种氨基酸(酪氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)占总氨基酸含量的25.89%(表3), 可见, 虾壳是制备ACE抑制肽的较好来源。

表3 虾壳蛋白氨基酸组成

Table 3 Amino acid composition of shrimp shell

氨基酸	结构氨基酸 含量/(g/100g)	氨基酸	结构氨基酸 含量/(g/100g)
天冬氨酸(Asp)	4.427 ± 0.042	甲硫氨酸(Met)	0.232 ± 0.018
苏氨酸(Thr)	2.231 ± 0.034	异亮氨酸(Ile)	1.029 ± 0.009
丝氨酸(Ser)	2.072 ± 0.017	亮氨酸(Leu)	2.265 ± 0.019
谷氨酸(Glu)	7.229 ± 0.054	酪氨酸(Tyr)	1.174 ± 0.052
甘氨酸(Gly)	3.321 ± 0.041	苯丙氨酸(Phe)	1.974 ± 0.051
丙氨酸(Ala)	3.288 ± 0.036	赖氨酸(Lys)	2.933 ± 0.204
半胱氨酸(Cys)	0.381 ± 0.004	组氨酸(His)	1.231 ± 0.092
缬氨酸(Val)	1.994 ± 0.052	精氨酸(Arg)	3.501 ± 0.028
脯氨酸(Pro)	2.339 ± 0.395	总氨基酸含量	41.621 ± 0.313

### 2.2 不同酶的酶解效果比较

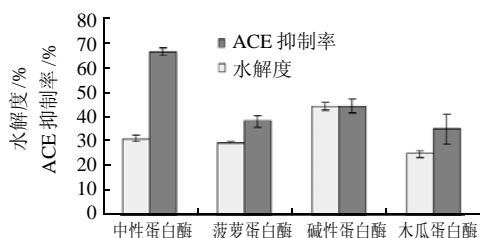


图1 不同酶酶解效果比较

Fig.1 Comparative effectiveness of 4 kinds of proteases in hydrolyzing shrimp shell

由图1可知, 中性蛋白酶的ACE抑制率最高, 为

66.32%, 水解度为30.97%; 碱性蛋白酶的水解度最高, 为44.15%, 其ACE抑制率为44.21%。中性蛋白酶和碱性蛋白酶来源稳定且成本低, 中性蛋白酶反应条件温和, 符合工业用酶要求。姜瞻梅等<sup>[12]</sup>利用中性蛋白酶酶解牛乳酪蛋白分离制得具有较高活性的ACE抑制肽。碱性蛋白酶用于制备ACE抑制肽的研究较多, 如Wijesekara等<sup>[13]</sup>利用碱性蛋白酶酶解尖嘴鱼鱼肉制备得具有较高ACE抑制活性短肽; Lin Feng等<sup>[14]</sup>通过碱性蛋白酶酶解玉米蛋白制得二肽Ala-Tyr。两种蛋白酶均具有制备高ACE抑制活性肽的能力, 因此, 选用中性蛋白酶和中性蛋白酶作为优化目标酶。

### 2.3 中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解时间优化

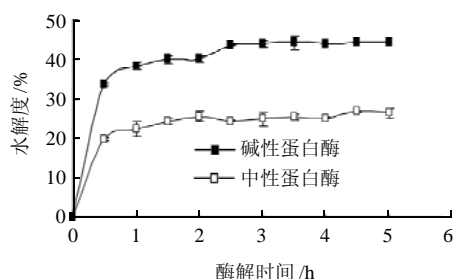


图2 中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解时间-水解度曲线

Fig.2 Hydrolysis time courses of shrimp shell by neutral protease or alkaline protease

由图2可知, 两种酶均是在最初酶解的0.5h内水解度大幅度提高, 中性蛋白酶在0.5h时水解度达到19.66%, 在2h时水解度达到25.52%, 之后水解度升高不明显, 2~5h水解度只提高了0.9%; 碱性蛋白酶则在0.5h时达到33.75%, 2.5h时水解度达到43.66%, 之后水解度基本保持一致。

这可能是在最初的0.5h内蛋白质中可断裂的肽键较多, 水解度提高快, 而随着时间的推移, 酶可作用的肽键数目减少, 水解速度下降, 水解度基本保持不变。很多文献研究发现, 随着水解度的提高, ACE抑制活性也随之提高, Theodore等<sup>[12]</sup>酶解鱼肉蛋白时发现水解度为30%时比5%时有更高的ACE抑制活性, Lignitto等<sup>[15]</sup>研究奶酪发酵时间与ACE抑制活性时得到相类似的结论, 6个月发酵的奶酪比未经发酵的奶酪有更高的ACE抑制能力。但是, 当水解度达到一定程度后仍继续酶解, 那么ACE抑制能力则有可能下降, 这可能是在酶解过程中产生了无抑制活性的小肽或是氨基酸, 从而导致ACE抑制能力下降<sup>[2]</sup>。再从工业化生产、节约能源和时间考虑, 最终选择中性蛋白酶酶解时间为2h, 碱性蛋白酶为2.5h。

## 2.4 单因素试验结果

### 2.4.1 温度对蛋白酶酶解效果的影响

碱性蛋白酶温度单因素酶解条件：底物质量浓度 2g/100mL、酶用量 5000U/g、pH9.0、反应时间 2.5h，温度分别选择 40、45、55、65、70℃。中性蛋白酶温度单因素酶解条件：底物质量浓度 2g/100mL、酶用量 5000U/g、pH7.0、反应时间 2h，温度分别选择 37、45、50、55、60℃。结果见图 3。

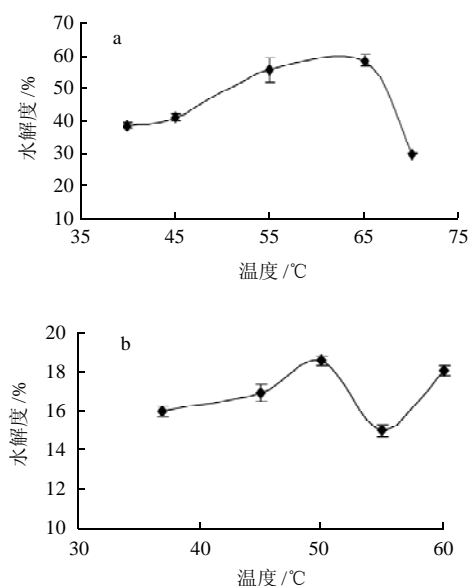


图3 碱性蛋白酶(a)、中性蛋白酶(b)反应温度对酶解效果的影响  
Fig.3 Effect of hydrolysis temperature on shrimp shell hydrolysis by alkaline or neutral proteases

由图3可知，碱性蛋白酶在65℃条件下有最高水解度，而中性蛋白酶在50℃时有最高水解度。中性蛋白酶在60℃时水解度上升可能是由于温度的升高促使蛋白质发生水解。

### 2.4.2 酶用量对蛋白酶酶解效果的影响

碱性蛋白酶确定酶用量的单因素酶解条件：底物质量浓度 2g/100mL、pH8.0、温度 55℃、反应时间 2.5h，酶用量分别为 2500、3500、5000、6500、8000U/g；中性蛋白酶确定酶用量的单因素酶解条件：底物质量浓度 2g/100mL、pH7.0、反应时间 2h、温度 45℃，酶用量分别为 2500、3500、5000、6500、8000U/g。结果见图 4。随着酶用量的增大，碱性蛋白酶水解度增加，而中性蛋白酶水解度则趋向减小，这可能是由于碱性蛋白酶与底物结合位点较多，当达到 3500U/g 时基本

达到饱和，因此再增加酶用量，水解度升高不多；而中性蛋白酶在 2500U/g 时已达到饱和，酶用量的增加反而对底物与酶的结合产生影响，因此酶用量升高而水解度下降。因此选择碱性蛋白酶酶用量为 3500U/g，中性蛋白酶酶用量为 2500U/g。

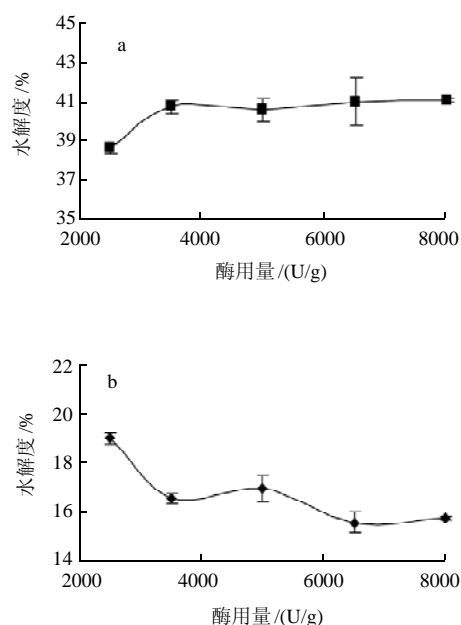
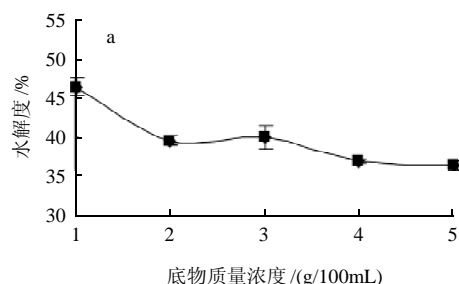


图4 碱性蛋白酶(a)、中性蛋白酶(b)酶用量对酶解效果的影响  
Fig.4 Effect of protease dosage on shrimp shell hydrolysis by alkaline or neutral proteases

### 2.4.3 底物质量浓度对蛋白酶酶解效果的影响

碱性蛋白酶所需底物质量浓度单因素酶解条件：pH8.0、酶用量 5000U/g、温度 55℃、反应时间 2.5h，底物质量浓度分别为 1、2、3、4、5g/100mL。中性蛋白酶所需底物质量浓度单因素酶解条件：pH7.0、酶用量 5000U/g、温度 45℃、反应时间 2h，底物质量浓度分别为 1、2、3、4、5g/100mL。结果见图 5。



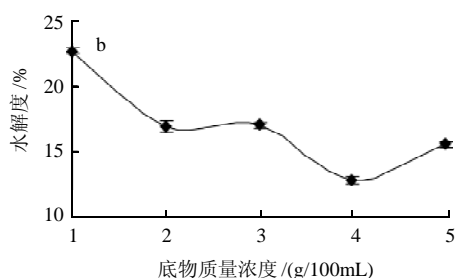


图5 碱性蛋白酶(a)、中性蛋白酶(b)所需底物质量浓度对酶解效果的影响

Fig.5 Effect of substrate concentration on shrimp shell hydrolysis by alkaline or neutral proteases

由图5可知,随着底物质量浓度的增加,水解度慢慢下降。这可能是由于随着底物质量浓度的增加,水解液浓度变稠,从而一定程度上抑制酶活性。中性蛋白酶和碱性蛋白酶在酶解底物质量浓度为3g/100mL时水解度分别为17.02%和39.91%,仍保持较高水解度,并在该点水解度下降有放缓趋势,再增加底物质量浓度时水解度下降明显,为保证一定的酶解产物浓度,两种酶底物质量浓度均选择3g/100mL。

#### 2.4.4 pH值对蛋白酶酶解效果的影响

碱性蛋白酶pH值单因素酶解条件:底物质量浓度2g/100mL,酶用量5000U/g、温度50℃、反应时间2.5h,pH值分别为6.5、7.0、8.0、9.0、10.0,结果见图6。可知碱性蛋白酶在pH9.0时有最大水解度。考虑到中性蛋白酶的最佳酶解条件在pH7左右,因此直接选择pH7进行下一步正交试验。

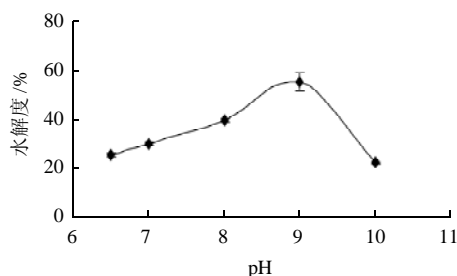


图6 碱性蛋白酶pH对酶解效果的影响

Fig.6 Effect of hydrolysis pH on shrimp shell hydrolysis by alkaline protease

#### 2.5 正交试验结果

在单因素试验结果基础上,采用四因素三水平对中性蛋白酶水解条件进行优化,以水解度和ACE抑制率为评价指标,确定中性蛋白酶和碱性蛋白酶最佳水解条件。结果见表4。可知中性蛋白酶酶解时影响ACE抑制率活性大小的因素依次为:酶用量>pH值>底物质量浓度>温度。利用中性蛋白酶酶解最佳反应条件为:温度50℃、酶用量2000U/g、底物质量浓度2.5g/100mL、pH7。

表4 中性蛋白酶酶解条件优化结果及分析

Table 4 Orthogonal array design arrangement and results for optimization of shrimp shell hydrolysis by neutral protease

试验号	因素				ACE抑制率/%	水解度/%
	酶用量/(U/g)	底物质量浓度/(g/100mL)	pH	温度/℃		
1	1(2000)	1(2.5)	1(6.5)	1(45)	73.40 ± 5.32	20.44 ± 0.01
2	1	2(3.0)	2(7.0)	2(50)	80.50 ± 3.55	22.71 ± 0.39
3	1	3(3.5)	3(7.5)	3(55)	74.65 ± 8.69	22.67 ± 0.75
4	2(2500)	1	2	3	78.68 ± 4.21	20.28 ± 1.07
5	2	2	3	1	71.85 ± 5.63	21.68 ± 0.37
6	2	3	1	2	69.66 ± 4.96	22.34 ± 0.68
7	3(3000)	1	3	2	68.55 ± 1.15	20.75 ± 0.81
8	3	2	1	3	54.57 ± 8.62	22.45 ± 0.49
9	3	3	2	1	67.25 ± 5.87	21.68 ± 0.72
K <sub>1</sub>	228.55	220.63	197.63	212.50		
ACE抑制率 K <sub>2</sub>	220.19	206.92	226.43	218.71		
K <sub>3</sub>	190.37	211.56	215.05	207.90		
R	38.18	13.71	28.80	10.81		

表5 碱性蛋白酶酶解条件优化结果及分析

Table 5 Orthogonal array design arrangement and results for optimization of shrimp shell hydrolysis by alkaline protease

试验号	因素				ACE抑制率/%	水解度/%
	pH	酶用量/(U/g)	底物质量浓度/(g/100mL)	温度/℃		
1	1(8.5)	1(3000)	1(2.5)	1(60)	53.29 ± 0.84	58.22 ± 0.66
2	1	2(3500)	2(3.0)	2(65)	38.34 ± 1.21	52.44 ± 0.28
3	1	3(4000)	3(3.5)	3(70)	65.90 ± 1.80	48.49 ± 1.14
4	2(9.0)	1	2	3	36.90 ± 1.21	65.86 ± 0.79
5	2	2	3	1	36.60 ± 8.76	60.52 ± 1.07
6	2	3	1	2	52.11 ± 4.61	71.60 ± 1.62
7	3(9.5)	1	3	2	46.76 ± 3.13	48.49 ± 0.57
8	3	2	1	3	64.32 ± 1.11	57.97 ± 0.09
9	3	3	2	1	63.65 ± 9.07	52.44 ± 0.80
K <sub>1</sub>	157.53	103.74	169.70	153.54		
ACE抑制率 K <sub>2</sub>	92.40	139.26	105.68	137.21		
K <sub>3</sub>	174.73	181.66	149.26	133.91		
R	82.33	77.92	64.02	19.63		

通过表5直观的极差分析结果发现,碱性蛋白酶酶解时影响ACE抑制率大小的因素依次为:pH值>酶用量>底物质量浓度>温度。利用碱性蛋白酶最佳反应条件为:温度60℃、酶用量4000U/g、底物质量浓度2.5g/100mL、pH9.5。

酶用量对于两种酶解产物的ACE抑制活性均有较大影响,中性蛋白酶选择酶用量为2000U/g,可能是因为中性蛋白酶与蛋白质的作用位点较少,因此酶用量较少时可使底物和酶更好的结合,而碱性蛋白酶作用位点较多,酶用量多时可以快速有效水解底物。两种酶分别酶解时,底物质量浓度均为2.5g/100mL,产生这一结果的原因可能是因为过高的底物质量浓度会导致酶解液黏度增加,影响了蛋白酶的扩散,从而抑制蛋白酶的酶

解,影响ACE抑制肽段的产生。张瑞东等<sup>[16]</sup>在酶解蛋清蛋白时也产生过相同的现象,低底物质量浓度能够产生较多ACE抑制肽。

利用碱性蛋白酶酶解的水解度9组数据的平均值为57.33%,中性蛋白酶平均值为21.67%;利用碱性蛋白酶酶解产物ACE抑制率平均值为42.83%,中性蛋白酶的为71.01%。可见水解度越高,ACE抑制活性并非越高。产生这种现象的原因一方面可能是随着水解度的增加产生了无抑制活性的小肽或是氨基酸,另一方面与酶作用位点有关,利用碱性蛋白酶酶解所得产物分子质量分布较为广泛,而中性蛋白酶所得产物分子质量分布更为集中<sup>[17]</sup>,可见碱性蛋白酶的酶切位点较多,产生了分子质量大小不一且ACE抑制活性不同的肽段,而中性蛋白酶的酶切位点则较为集中,因此得到较多具有ACE抑制活性的肽段。

## 2.6 验证实验

采用上述优化后的酶解工艺条件,即中性蛋白酶:温度50℃、酶用量2000U/g、底物质量浓度2.5g/100mL、pH7、反应时间2h;碱性蛋白酶:温度60℃、酶用量4000U/g、底物质量浓度2.5g/100mL、pH9.5、反应时间2.5h,进行验证实验,与正交试验中ACE抑制率最高组比较。结果发现中性蛋白酶酶解产物的ACE抑制率为84.04%,水解度为26.76%,正交试验抑制率最高组ACE抑制率为80.50%;碱性蛋白酶酶解产物的ACE抑制率为67.70%,水解度为69.79%,正交试验抑制率最高组ACE抑制率为65.90%。表明通过正交试验,酶解产物ACE抑制率得到了一定优化。

## 3 结 论

3.1 水产类食品来源的ACE抑制肽的研究主要集中在鱼类蛋白、贝类蛋白、虾肉蛋白等,对于水产品的废弃物的研究很少。通过虾壳成分测定和氨基酸分析,发现虾壳是一种高蛋白、低脂肪资源,并且含有较多疏水性氨基酸,是作为制备ACE抑制肽的合适原料。

3.2 通过比较4种蛋白酶酶解虾壳所得酶解产物的ACE抑制活性和水解度,中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解产物有较高的ACE抑制活性,因此选择中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解虾壳蛋白制备ACE抑制肽,进行酶解工艺进一步优化。

3.3 通过单因素试验和正交试验,以ACE抑制率为评价指标,确定中性蛋白酶最佳酶解条件为温度50℃、酶用量2000U/g、底物质量浓度2.5g/100mL、pH7、酶解

时间2h;碱性蛋白酶最佳酶解条件为温度60℃、酶用量4000U/g、底物质量浓度2.5g/100mL、pH9.5、酶解时间2.5h。优化酶解工艺后中性蛋白酶和碱性蛋白酶的ACE抑制率分别为84.04%和67.70%。基于以上结果,虾壳作为制备ACE抑制肽的原料是可行的。

## 参考文献:

- [1] 王德心. 活性多肽与药物开发[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2008: 886-893.
- [2] THEODORE A E, KRISTINSSON H G. Angiotensin converting enzyme inhibition of fish protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolate[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2007, 87: 2353-2357.
- [3] 曹文红, 秦小明, 章超桦, 等. 中国毛虾酶解产物的分子量分布及ACE抑制活性[J]. 食品科技, 2007(5): 145-148.
- [4] WANG Chunyan, TIAN Jinqiang, WANG Qiang. ACE inhibitory and antihypertensive properties of apricot almond meal hydrolysate[J]. Eur Food Res Technol, 2011, 232: 549-556.
- [5] 徐怀德, 王莉, 王兴. 酶解魔芋飞粉蛋白制备ACE抑制肽[J]. 食品科学, 2010, 31(1): 157-160.
- [6] CHENG Fuyuan, LIU Yutse, WAN Tienchun, et al. The development of angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from chicken bone protein[J]. Animal Science Journal, 2008, 79: 122-128.
- [7] AHN J E, PARK S Y, ATWAL A, et al. Angiotensin I -converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from whey fermented by *Lactobacillus* species[J]. Journal of Food Biochemistry, 2009, 33: 587-602.
- [8] 刘长虹. 食品分析及实验[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 81-110; 204-205.
- [9] 段杉, 丁慧心, 熊云. 酶法回收虾头和虾壳中的蛋白质[J]. 农产品加工, 2008(1): 43-46.
- [10] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20: 1637-1648.
- [11] 于志鹏, 赵文竹, 刘博群, 等. 血管紧张素转化酶抑制肽研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 308-311.
- [12] 姜瞻梅, 田波, 吴刚, 等. 酶解牛乳酪蛋白制备ACE抑制肽的研究[J]. 中国食品学报, 2007, 7(6): 39-43.
- [13] WIJESEKARA I, QIAN Zhongji, RYU B, et al. Purification and identification of antihypertensive peptides from seaweed pipefish (*Syngnathus schlegelii*) muscle protein hydrolysate[J]. Food Research International, 2011, 44: 703-707.
- [14] LIN Feng, CHEN Liang, LIANG Rui, et al. Pilot-scale production of low molecular weight peptides from corn wet milling byproducts and the antihypertensive effects *in vivo* and *in vitro*[J]. Food Chemistry, 2011, 124: 801-807.
- [15] LIGNITTO L, CAVATORTA V, BALZAN S, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of water-soluble extracts of Asiago d' allevo cheese[J]. International Dairy Journal, 2010, 20: 11-17.
- [16] 张瑞东, 迟玉洁, 阮长青. 酶解蛋清蛋白制备ACE抑制肽的工艺研究[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 1-4.
- [17] 张锦松, 王海鸥. 几种蛋白酶对文蛤肉的水解效果[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 83-87.