

酶解脱脂蚕蛹蛋白制备 ACE 抑制肽

李 勇^{1,2}, 王 颖^{1,2}, 黄先智³, 阚建全^{1,2,*}, 晋圣坤¹, 贺亚萍^{1,2}, 胡益侨^{1,2}, 廖 晨^{1,2}
(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 2.重庆市农产品加工及贮藏重点实验室, 重庆 400715;
3.西南大学生物技术学院, 重庆 400715)

摘 要:以实验室自制的脱脂蚕蛹蛋白为原料, 利用酶工程技术, 通过对中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶等的筛选及单因素和响应面优化试验, 对 ACE 抑制肽的制备工艺条件进行较系统的研究。结果表明: 选择碱性蛋白酶作为脱脂蚕蛹蛋白制备 ACE 抑制肽的酶, 制备 ACE 抑制肽的最佳工艺条件为料液比 11.88:100、温度 50.22℃、pH 9.46、加酶量 7.03%、酶解 4h。在此条件下制备的 ACE 抑制肽的 ACE 抑制率达到 41.98%。

关键词:蚕蛹蛋白; ACE 抑制肽; 酶解; 工艺条件

Enzymatic Preparation of ACE-Inhibitory Peptide from Pupa Protein

LI Yong^{1,2}, WANG Ying^{1,2}, HUANG Xian-zhi³, KAN Jian-quan^{1,2,*}, JIN Sheng-kun¹,
HE Ya-ping^{1,2}, HU Yi-qiao^{1,2}, LIAO Chen^{1,2}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Produce Processing and Storage, Chongqing 400715, China; 3. College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Defatted pupa protein was prepared in our laboratory and used further to prepare ACE-inhibitory peptide by enzymatic hydrolysis. The best protease for preparing ACE-inhibitory peptide from pupa protein was chosen out of neutral protease, alcalase, papain, protamex, flavourzyme and trypsin. The hydrolysis process was optimized using response surface methodology. Neutral protease was found to be the best among all investigated proteases. The optimal hydrolysis conditions were determined as follows: substrate concentration of 11.88:100, hydrolysis temperature of 50.22 °C, hydrolysis pH of 9.46, and enzyme concentration of 7.03%, hydrolysis time of 4 h. Under these conditions, pupa protein hydrolysate with an ACE-inhibitory rate of 41.98% was obtained.

Key words: pupa protein; ACE-inhibitory peptide; enzymatic hydrolysis; process conditions

中图分类号: TS218

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)11-0151-07

血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)在人体血压形成过程中起重要作用, 它催化血管紧张素 I 从 C 端裂解二肽形成血管紧张素 II(肾素-血管紧张素系统中已知最强的血管收缩剂)。同时, 它能阻抗血管舒张剂——舒缓激肽的降解^[1], 抑制 ACE 的活性, 可使血管紧张素 II 的生成和激肽的破坏均减少, 从而达到治疗高血压的目的。目前已从许多食源性蛋白质中分离得到了 ACE 抑制肽, 如牛乳酪蛋白^[2]、沙丁鱼^[3]、大豆蛋白^[4]、花生蛋白^[5]、向日葵蛋白^[6]等。

蚕蛹(silkworm pupa)含有丰富的蛋白质, 目前已有报道利用其制备蛋白小肽^[7-8]。闵建华等^[7]采用碱性蛋白酶、风味蛋白酶、复合蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶水解蚕蛹蛋白, 并研究了其产物的抗氧化活性。陈

静等^[8]以脱脂蚕蛹蛋白为原料, 采用碱性蛋白酶水解蚕蛹蛋白制备缓解体力疲劳的蛋白肽运动饮料。蚕蛹丰富的蛋白质中疏水性氨基酸的含量比较高^[9], 有研究表明, 疏水性氨基酸能提高 ACE 抑制肽的活性^[10-13]。因此, 用蚕蛹作为开发 ACE 抑制肽的原料是可行的。本实验以脱脂蚕蛹蛋白作为原料, 研究在酶解过程中其 ACE 抑制率的变化, 确定酶解脱脂蚕蛹蛋白制备 ACE 抑制肽的最佳工艺条件, 以期深入开发利用蚕蛹蛋白资源及蚕蛹蛋白深加工提供理论依据, 为开发具有降压效果的蚕蛹蛋白 ACE 抑制肽提供理论支持。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2011-06-06

基金项目: 国家现代农业(桑蚕)产业技术体系建设专项(CARS-22-ZJ0503)

作者简介: 李勇(1986—), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品化学与营养学。E-mail: frog46@126.com

* 通信作者: 阚建全(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品化学与营养学、食品生物技术。E-mail: ganjq1965@163.com

1.1.1 材料

脱脂蚕蛹蛋白粉, 实验室采用索氏-无水乙醚抽提12h自制。

1.1.2 试剂

ACE、马尿酸-组胺酰-亮氨酸(HHL) 美国Sigma公司; Neutrase 中性蛋白酶、Papain 木瓜蛋白酶、Alcalase 碱性蛋白酶、Protamex 复合蛋白酶、Flavourzyme 风味蛋白酶 南宁东恒华道生物科技有限公司; Trypsin 胰蛋白酶 北京索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器与设备

HH-6 数显恒温水浴锅 金坛市富华仪器有限公司; PB-10 酸度计 上海雷磁仪器厂; JA2003 电子天平 上海精天电子仪器有限公司; DHG-9240 电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司; ALPAAL-4LSC 真空冷冻干燥机 美国Chris公司; Milli-Qbiocel 超纯水机 美国密理博公司; 1-15PK 冷冻离心机 美国Sigma公司; LC-20AD 高效液相色谱仪 日本岛津公司。

1.3 方法

1.3.1 水解度(DH)的测定

在中性和碱性条件下采用pH-stat法^[14]计算水解度, 计算公式如式(1)所示。

$$DH/\% = \frac{c \times V}{\alpha \times m_p \times h_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

式中: c 、 V 分别为水解过程中所加NaOH的浓度/(mol/L)和体积/mL; m_p 为原料中净蛋白质质量/g; h_{tot} 为1g原料蛋白质中所含肽键的毫摩尔数, 为7.8mmol/g pro; α 为氨基的平均解离度, 可按 $\alpha = 10^{pH-pK}/(1 + 10^{pH-pK})$ 计算。其中, pH 为水解溶液的pH值; pK 为 α -氨基的解离度的负对数, 此处取值为7.0。

1.3.2 ACE抑制率的测定^[15]

在37℃反应体系中依次加入80 μ L HHL液、降血压肽液、超纯水, 每次测试的总体积为0.2mL, 把以上混合液放入37℃恒温水浴中保温3min, 然后加入10 μ L ACE酶液启动反应, 恒温保持30min后, 加入0.2mL 1mol/L HCl中止反应, 至室温, 取5 μ L反应产物进样, 通过反相高效液相色谱洗脱图谱定量马尿酸的生成量, 从而计算降血压肽的抑制率。对ACE抑制率为50%时的降血压肽浓度为半抑制浓度, 即IC₅₀。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100 \quad (2)$$

式中: A_1 为不存在降血压肽时的峰面积; A_2 为存在降血压肽与酶时的峰面积。

测定ACE抑制率的色谱条件: 检测器: SPD-M20A; 色谱柱: 岛津VP-ODS (4.6mm \times 150mm); 洗脱液: 25%乙腈-75%超纯水; 洗脱液流速: 1mL/min; 检测波长: 228nm; 进样量: 5 μ L。

1.3.3 蛋白酶的选择

分别选用6种蛋白酶水解脱脂蚕蛹蛋白, 反应在恒温水浴锅中进行。料液比1:20, 加酶量2%, 水解条件分别为: 1)Neutrase 中性蛋白酶: pH7.0、50℃; 2)Papain 木瓜蛋白酶: pH6.5、65℃; 3)Alcalase 碱性蛋白酶: pH8.0、50℃; 4)Protamex 复合蛋白酶: pH6.5、50℃; 5)Flavourzyme 风味蛋白酶: pH7.5、50℃; 6)Trypsin 胰蛋白酶: pH 7.5、50℃; 酶解6h, 计算水解度。取样, 立即置于沸水浴中加热10min灭酶, 流水冷却, 水解物在5℃、8000r/min离心10min, 收集上清液, 用于ACE抑制活性的测定。

1.3.4 Alcalase碱性蛋白酶水解的单因素试验

1.3.4.1 酶解时间对酶解效果的影响

料液比为1:20、加酶量为2%、温度50℃、pH8.0、酶解6h, 并每隔1h取样品, 分别测其ACE抑制率。

1.3.4.2 pH值对酶解效果的影响

料液比1:20、加酶量2%、温度50℃、酶解4h, 调节pH值分别为8.0、8.5、9.0、9.5、10.0, 分别测酶解液的ACE抑制率。

1.3.4.3 料液比对酶解效果的影响

加酶量2%、pH9.0、酶解4h、温度50℃, 料液比分别为3:50、9:100、3:25、3:20、9:50, 分别测酶解液的ACE抑制率。

1.3.4.4 酶解温度对酶解效果的影响

料液比1:20、加酶量2%、pH9.0、酶解4h, 酶解温度分别为45、50、55、60、65℃, 分别测酶解液的ACE抑制率。

1.3.4.5 加酶量对酶解效果的影响

料液比1:20、pH9.0、温度50℃、酶解4h, 加酶量分别为3%、5%、7%、9%、11%, 分别测酶解液的ACE抑制率。

1.3.5 Alcalase碱性蛋白酶的水解条件优化试验

根据单因素试验的结果, 采用响应面优化试验设计, 运用Box-Behnken中心组合试验设计原理, 选择对ACE抑制率有影响的4个因素: 料液比、加酶量、pH值、温度, 进行四因素三水平的响应面优化试验(表1), 以ACE抑制率作为响应变量。

表1 响应面优化试验因素与水平

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the hydrolysis conditions tested in response surface analysis

因素	编码及水平		
	-1	0	+1
X ₁ 料液比	9:100	3:25	3:20
X ₂ 酶解温度/℃	45	50	55
X ₃ pH	9.0	9.5	10
X ₄ 加酶量/%	6	7	8

1.4 数据处理方法

实验数据均是经过3次平行实验得到的平均值,并计算其误差,使用 Design Expert 分析响应面数据。

2 结果与分析

2.1 酶解的单因素试验结果

2.1.1 不同蛋白酶对 ACE 抑制率及其水解度的影响

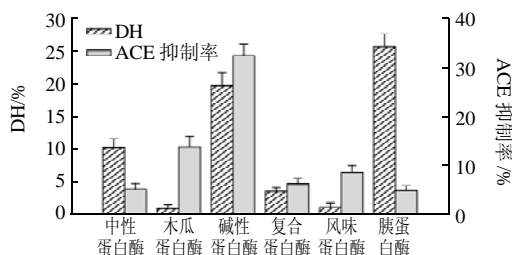


图1 6种酶解液的ACE抑制率及其水解度的比较

Fig.1 ACE-inhibitory rates and hydrolysis degrees of pupa protein hydrolysates from 6 kinds of proteases

由图1可知,在酶解6h时,使用碱性蛋白酶的脱脂蚕蛹蛋白酶解液的ACE抑制率最高,达到了32.46%,这说明酶解得到的多肽具有抑制ACE酶活的作用。而使用胰蛋白酶的酶解液的水解度最高,达到25.66%,其酶解的程度较其他酶高,但其ACE抑制率只有4.87%,这说明其酶解生成的多肽大多不具有抑制ACE酶活性的作用。由此可看出ACE抑制率与水解度并没有相关性,这与前人的研究一致。因此,之后的研究就只以ACE抑制率为指标,筛选用碱性蛋白酶生产ACE抑制肽的工艺条件。

2.1.2 酶解时间对酶解液ACE抑制率的影响

由图2可知,在前3h内,ACE抑制率增加的趋势很快,到了3h后就比较平缓。4h时,ACE抑制率为32.09%,6h为32.46%,增加不明显。考虑生产成本,选择酶解4h作为后期实验的酶解时间。

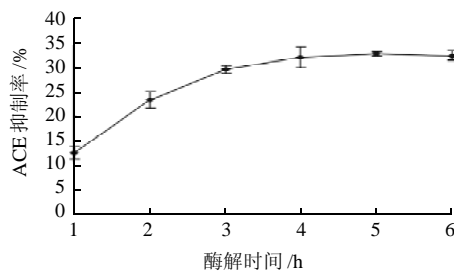


图2 酶解时间对酶解液ACE抑制率的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis time on ACE-inhibitory rate of pupa protein hydrolysate

2.1.3 pH值对酶解液ACE抑制率的影响

pH值是酶反应的主要条件之一,最适pH值是酶促反应的重要参数。过酸过碱都会使酶的空间构象发生改变,使酶活降低,而且pH值可改变底物空间解离状态,影响与酶的结合。pH值对酶解液ACE抑制率的影响见图3。在pH9.5时,其ACE抑制率达到最高,为35.42%。随着pH值的继续增加,其ACE抑制率逐渐降低。因此,选取9.5作为其最佳的酶解pH值。

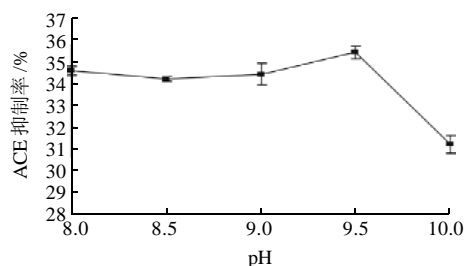


图3 pH值对酶解液ACE抑制率的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis pH on ACE-inhibitory rate of pupa protein hydrolysate

2.1.4 料液比对酶解液ACE抑制率的影响

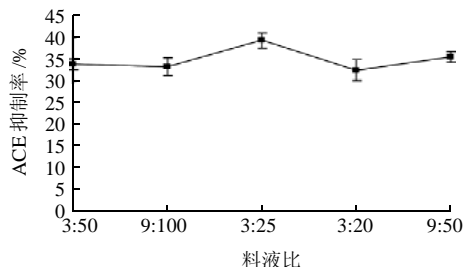


图4 料液比对酶解液ACE抑制率的影响

Fig.4 Effect of material/liquid ratio on ACE-inhibitory rate of pupa protein hydrolysate

由图4可知,随着料液比的增加,其ACE抑制率也逐渐增加,当料液比为3:25时,其ACE抑制率最高,为39.20%,之后又缓慢下降。因此,选取3:25作为其较佳的料液比。

2.1.5 酶解温度对酶解液ACE抑制率的影响

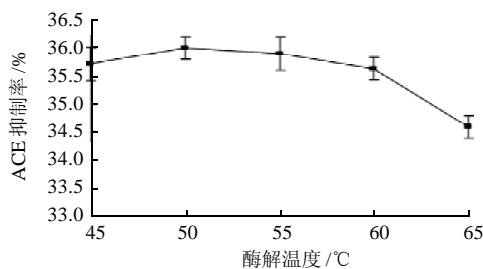


图5 酶解温度对酶解液ACE抑制率的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis temperature on ACE-inhibitory rate of pupa protein hydrolysate

由图5可知,酶解温度对酶解液的ACE抑制率的影响呈现先升高后降低的趋势,当50℃时为最大值36.00%。因此,取酶解温度为50℃。

2.1.6 加酶量对酶解液ACE抑制率的影响

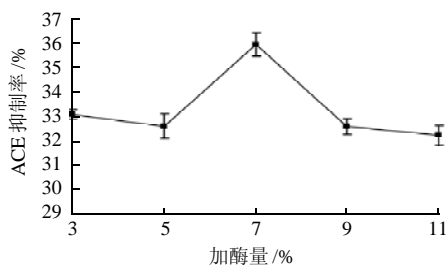


图6 加酶量对酶解液ACE抑制率的影响

Fig.6 Effect of enzyme concentration on ACE-inhibitory rate of pupa protein hydrolysate

由图6可知,加酶量为5%~7%时,其酶解液的ACE抑制率逐渐变大,在7%时达到峰值35.92%,之后随着加酶量的继续增加,其抑制率却变小。因此,选取加酶量为7%。

2.2 响应面优化试验结果与分析

2.2.1 响应面优化试验

采用Box-Behnken设计,利用Design Expert 7.0软件对试验结果进行响应面分析(表2),得出回归模型参数的方差分析,见表3。

表2 响应面分析方案及试验结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	X ₁ 料液比	X ₂ 酶解温度	X ₃ pH	X ₄ 加酶量	Y ACE抑制率/%
1	0	0	-1	1	41.03
2	0	1	-1	0	41.01
3	0	-1	0	1	41.47
4	0	1	0	-1	41.58
5	0	1	1	0	40.89
6	1	-1	0	0	41.32
7	0	1	0	1	41.21
8	0	-1	1	0	40.79
9	0	0	-1	-1	41.09
10	0	0	0	0	42.01
11	0	0	0	0	42.13
12	0	-1	-1	0	41.17
13	1	0	1	0	40.95
14	1	1	0	0	41.51
15	-1	-1	0	0	41.42
16	0	0	1	-1	40.75
17	1	0	0	-1	41.54
18	-1	0	0	-1	41.24
19	0	0	1	1	40.91
20	0	-1	0	-1	40.92
21	-1	0	1	0	41.01
22	-1	1	0	0	41.46
23	-1	0	-1	0	41.26
24	1	0	0	1	41.2
25	0	0	0	0	42.11
26	-1	0	0	1	41.65
27	0	0	0	0	42.08
28	1	0	-1	0	41.29
29	0	0	0	0	42.06

表3 二次响应模型方差分析

Table 3 ANOVA results obtained for the established regression model

来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	4.77	14	0.34	106.16	< 0.0001
X ₂	0.027	1	0.027	8.43	0.0116
X ₃	0.20	1	0.20	62.34	< 0.0001
X ₁ X ₄	0.14	1	0.14	43.79	< 0.0001
X ₂ X ₃	0.017	1	0.017	5.26	0.0378
X ₂ X ₄	0.21	1	0.21	65.88	< 0.0001
X ₁ ²	0.41	1	0.41	128.60	< 0.0001
X ₂ ²	0.99	1	0.99	306.93	< 0.0001
X ₃ ²	3.31	1	3.31	1032.02	< 0.0001
X ₄ ²	1.09	1	1.09	339.23	< 0.0001
失拟项	0.036	10	3.628 × 10 ⁻³	1.67	0.3276
误差	8.680 × 10 ⁻³	4	2.170 × 10 ⁻³		
总和	4.82	28			

注: *.差异显著($P < 0.05$); **差异极显著($P < 0.01$)。

由表3 方差分析可知,模型的 P 值显著。失拟项 $P = 0.3276 (> 0.05)$,差异不显著,未知因素对试验结果干扰小,说明残差均由随机误差引起。 $R^2 = 0.9907$,说明模型拟合程度良好,试验误差小,该模型能够反映响应值的变化。其二次方程为:

$$Y = 42.08 - 0.019X_1 + 0.047X_2 + 0.13X_3 + 0.029X_4 + 0.038X_1X_2 - 0.022X_1X_3 - 0.19X_1X_4 + 0.065X_2X_3 - 0.23X_2X_4 + 0.055X_3X_4 - 0.25X_1^2 - 0.39X_2^2 - 0.71X_3^2 - 0.41X_4^2$$

对表 2 的结果作响应面及其等高视图, 如图 8~12 所示, 可以看出, 任意两个因素间均存在比较明显的交互作用, 最佳落点在试验考察的区域内。

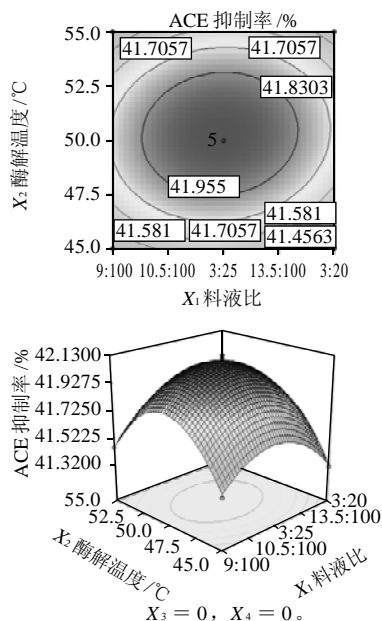


图 7 料液比和酶解温度相互作用对 ACE 抑制率影响的响应面和等高线

Fig.7 Response surface and contour plots for the effect of material/liquid ratio and hydrolysis temperature on ACE-inhibitory rate of pupa protein hydrolysate

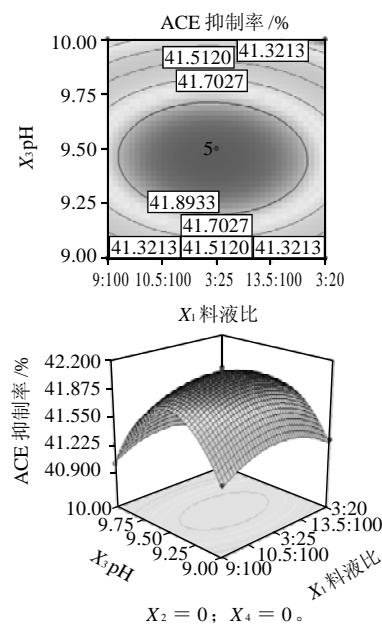


图 8 料液比和 pH 值相互作用对 ACE 抑制率影响的响应面和等高线

Fig.8 Response surface and contour plots for the effect of material/liquid ratio and enzymatic hydrolysis pH on ACE-inhibitory rate of pupa protein hydrolysate

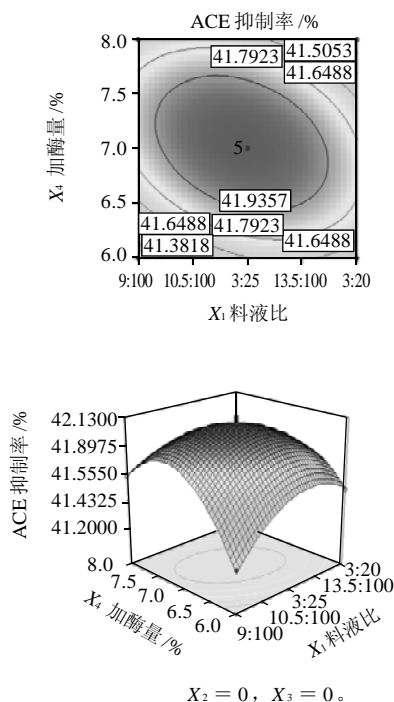


图 9 料液比和加酶量相互作用对 ACE 抑制率影响的响应面和等高线
Fig.9 Response surface and contour plots for the effect of material/liquid ratio and enzyme addition amount on ACE-inhibitory rate of pupa protein hydrolysate

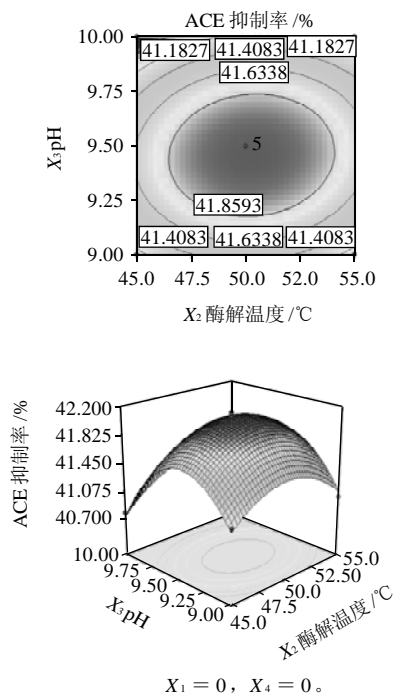


图 10 酶解温度和 pH 值相互作用对 ACE 抑制率影响的响应面和等高线

Fig.10 Response surface and contour plots for the effect of hydrolysis temperature and enzymatic hydrolysis pH on ACE-inhibitory rate of pupa protein hydrolysate

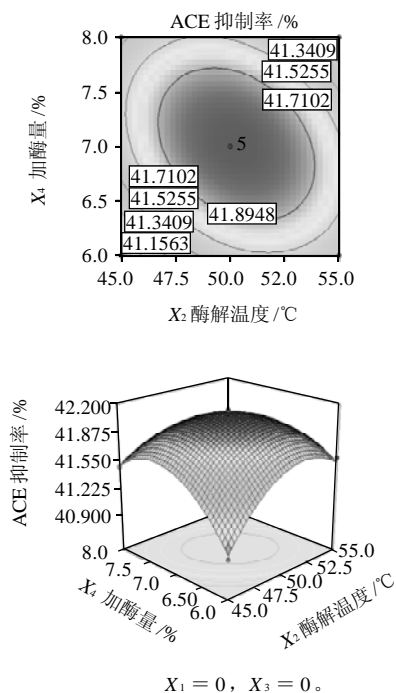


图 11 酶解温度和加酶量相互作用对 ACE 抑制率影响的响应面和等高线

Fig.11 Response surface and contour plots for the effects of hydrolysis temperature and enzyme addition amount on ACE-inhibitory rate of pupa protein hydrolysate

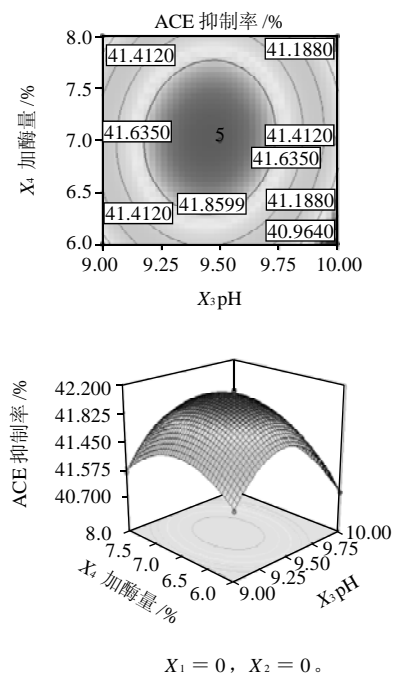
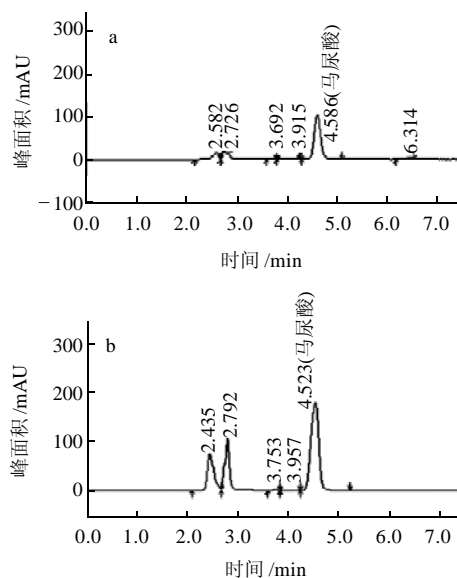


图 12 pH 值和加酶量相互作用对 ACE 抑制率影响的响应面和等高线

Fig.12 Response surface and contour plots for the effects of hydrolysis pH and enzyme addition amount on ACE-inhibitory rate of pupa protein hydrolysate

2.2.2 验证实验

利用 Design Expert 7.0 软件进行工艺参数的优化组合^[16], 对优化工艺参数进行验证, 在料液比 11.88:100、酶解温度 50.22℃、pH9.46、加酶量 7.03% 的条件下, 所得 ACE 抑制胶 ACE 抑制率的预测值为 42.09%, 实际值为(41.98 ± 0.06)%。



a. 样品组; b. 对照组。

图 13 HPLC 测定脱脂蚕蛹多肽的 ACE 抑制活性色谱图

Fig.13 HPLC chromatograms of pupa polypeptide with ACE inhibitory activity

脱脂蚕蛹多肽的 ACE 抑制活性 HPLC 色谱图如图 13 所示, 与预测值基本一致, 从而验证了回归方程的正确性, 证明了实验设计与分析方法较为准确可靠。

3 结论

比较了 6 种商业化蛋白酶水解脱脂蚕蛹蛋白所得水解产物的 ACE 抑制活性, 结果表明: 碱性蛋白酶为最适生产脱脂蚕蛹蛋白 ACE 抑制肽的生产用酶。对酶解条件进行优化, 在料液比 11.88:100、温度 50.22℃、pH9.46、加酶量 7.03%、水解 4h 时, 脱脂蚕蛹蛋白酶解产物有最大 ACE 抑制活性, 为 41.98%。

参考文献:

- [1] CUSHMANH D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20(7): 1637-1648.
- [2] MARUYAMA S, SUZUKI H. A peptide inhibitor of angiotensin I-converting enzyme in the tryptic hydrolysates of casein[J]. Agric Biol Chem, 1982, 46(5): 1393-1394.
- [3] ARIYOSHI Y. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from

- food proteins[J]. Trends in Food ScienceTechnology, 1993, 4(5): 139-144.
- [4] 孔保华. 蛋白质水解活性肽的研究现状[J]. 中国畜产与食品, 1999 (3): 135-137.
- [5] 江利华. 花生 ACE 抑制肽的分离纯化、结构鉴定及体内降血压功能研究[J]. 食品工业科技, 2009(10): 94-100.
- [6] MEGÍAS C, del MAR YUST M, PEDROCHE J, et al. Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower(*Helianthus annuus* L.)proteinisolates[J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(7): 1928-1932.
- [7] 闵建华, 李建科, 陈婷. 蚕蛹多肽的制备工艺及其体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 123-126.
- [8] 陈静, 郑明珠, 王浩. 蚕蛹蛋白肽的制备及其运动饮料研制[J]. 食品科学, 2009, 30(14): 318-320.
- [9] 王伟. 蚕蛹蛋白的综合利用现状分析和开发前景展望[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(9): 112-115.
- [10] ZHAO Yuanhui, LI Bafang, LIU Zunying, et al. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(12): 1586-1591.
- [11] MIYOSHI S, ISHIKAWA H, KANEKO T, et al. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in α -zein hydrolysate [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1991, 55(5): 1313-1318.
- [12] MIZUNO S, NISHIMURA S, MATSUURA K, et al. Release of short and proline-rich antihypertensive peptides from casein hydrolysate with an *Aspergillus oryzae* protease[J]. Journal of Dairy Science, 2004, 87 (10): 3183-3188.
- [13] SAIGA A, OKUMURA T, MAKIHARA T, et al. Action mechanism of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from chicken breast muscle[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(3): 942-945.
- [14] ADAMSON N J, REYNOLDS E C. Characterization of casein phosphopeptides prepared using alcalase: determination of enzyme specificity[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19(3): 202-209.
- [15] KUNIO S. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L. (garlic)[J]. Nutr Biochem, 1998, 9(7): 415-419.
- [16] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002: 115-154.