

响应面法优化酶解花椒籽蛋白制备降血压肽工艺

吴红洋, 姜太玲, 胡惠茗, 杨承志, 张志清*

(四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014)

摘要: 利用响应面法优化酶解花椒籽蛋白制备降血压肽的工艺条件。采用不同蛋白酶水解花椒籽蛋白, 以酶解物对血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制率为指标, 筛选出制备花椒籽蛋白降血压肽的最佳蛋白酶。在单因素试验基础上, 根据Box-Behnken中心组合试验设计原理, 考察酶解时间、加酶量、酶解温度和pH值对血管紧张素转换酶抑制率的影响。结果表明: 回归模型能较好地反映各因素水平与响应值之间的关系, 并获得酶解花椒籽蛋白制备降血压肽的最佳工艺条件为: 底物质量浓度3 g/100 mL、酶解时间4.9 h、加酶量10 200 U/g、酶解温度37.4 °C、pH 6.9, 在此条件下, 所得酶解产物的ACE抑制率为68.00%。

关键词: 花椒籽蛋白; 血管紧张素转化酶; 降血压肽; 响应面法

Response Surface Methodology for Optimization of Hydrolysis Conditions for Preparing Antihypertensive Peptides Sichuan Pepper (*Zanthoxylum bungeanum*) Seed Protein

WU Hong-yang, JIANG Tai-ling, HU Hui-ming, YANG Cheng-zhi, ZHANG Zhi-qing*

(College of Food Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: Response surface methodology was used to optimize the hydrolysis conditions of Sichuan pepper (*Zanthoxylum bungeanum*) seed protein to prepare antihypertensive peptides. Papain was found to be the best enzyme for the enzymatic preparation of antihypertensive peptides with angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity. The ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of Sichuan pepper seed protein was investigated as a function of hydrolysis time, enzyme dosage, temperature and pH. The results indicated that the obtained regression model represented the functional relationship well, and the optimal hydrolysis conditions were found as follows: substrate concentration, 3 g/100 mL; hydrolysis time, 4.9 h; enzyme dosage, 10 200 U/g; hydrolysis temperature, 37.4 °C; and pH, 6.9, resulting in an ACE inhibitory rate of 68.00%.

Key words: Sichuan pepper seed protein; angiotensin converting enzyme; antihypertensive peptides; response surface methodology

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 21-0180-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201421035

高血压是人类医学界面临的一大难题, 目前治疗高血压主要是服用化学合成的药物, 但是高血压患者长期服用合成药会产生各种不适的副作用: 如咳嗽、味觉功能紊乱、皮疹等。因此, 医务人员与患者更青睐于非化学合成药物的辅助降压, 其中利用天然蛋白质制备的降血压肽由于安全性高、无毒副作用已成为降血压研究领域的热点。降血压肽又称为血管紧张素转换酶抑制肽(angiotensin converting enzyme inhibitor peptides, ACEIPs), 是具有降血压活性的生物活性肽。它通过抑制血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)的活性从而起到降血压的效果, 对原发性高血压患者具有显著作用, 而对高血压正常者无降压作用^[1]。目前, 国内外许多研究发现大豆、紫菜、牛乳、玉米等天然蛋白水解肽对ACE具有抑制作用^[2-7]。

花椒籽中富含蛋白质, 其脱脂后的花椒籽种仁中蛋白质含量高达60.34%^[8]。脱脂花椒仁、花椒饼蛋白质中的氨基酸组成较齐全, 各种必需氨基酸的含量较高。与大豆相比, 除赖氨酸含量较低外, 其余氨基酸的含量都高于大豆, 是一种较完全的新型蛋白质资源。随着我国花椒出口量的增加, 种植面积的快速增长, 花椒籽的大量废弃造成了很大的资源浪费。目前, 对花椒籽的利用研究主要是从花椒籽中提取花椒籽油^[9-11]和优化蛋白质的提取工艺^[12-13], 而关于花椒籽蛋白制备降血压肽的研究还未见报道。以花椒籽蛋白为原料生产降血压肽成本低、安全性高, 适合大规模的工业化生产, 同时为花椒籽的高附加值利用提供了新的途径。

本实验选用5种不同蛋白酶分别对花椒籽蛋白进行酶解, 以ACE抑制率为分析指标, 通过单因素试验确定

收稿日期: 2013-12-11

作者简介: 吴红洋(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能性食品。E-mail: 751224021@qq.com

*通信作者: 张志清(1976—), 男, 教授, 博士, 研究方向为粮油副产物开发利用。E-mail: zqzhang721@163.com

制备花椒籽蛋白降血压肽的酶解条件, 并通过响应面法优化其酶解条件, 为花椒籽蛋白降血压肽的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花椒籽蛋白 实验室自制; 血管紧张素转化酶从猪肺中提取。

胰蛋白酶(酶活力为 2.5×10^5 U/g)、木瓜蛋白酶(酶活力为 2.0×10^5 U/g)、中性蛋白酶(酶活力为 6.0×10^4 U/g) 北京华迈科生物技术有限责任公司; 碱性蛋白酶(酶活力为 1.0×10^5 U/g)、复合蛋白酶(酶活力为 1.2×10^5 U/g) 南京奥多福尼生物科技有限公司; 卡托普利 上海皇象铁力蓝天制药有限公司; 马尿酸-组氨酰-亮氨酸(*N*-hippuryl-his-leu, HHL) 美国Sigma公司; 马尿酸标准品 中国药品生物制品检定所; NaOH、HCl、NaCl、硼酸、乙酸乙酯、聚乙二醇20000等均为分析纯。

1.2 仪器与设备

UV-3100紫外-可见分光光度计 上海美谱达仪器有限公司; BR4i冷冻离心机 美国Thermo公司; HH-2数显恒温水浴锅 荣华仪器制造有限公司; CP225D型电子天平、BP-20pH计 德国Sartorius公司; Scientz-N型真空冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 花椒籽蛋白酶解制备降血压肽的工艺流程

花椒籽蛋白→预处理(90~100 °C, 10 min)→不同条件下酶解→灭酶(90~100 °C, 10 min)→冷却→离心(5 000 r/min, 10 min)→收集上清液(测定ACE抑制活性)→冻干

1.3.2 血管紧张素转化酶的制备^[14]

取一定量的新鲜猪肺, 洗净, 加入预冷的硼酸盐缓冲液于组织捣碎机匀浆, 浆液在4 °C冰箱中静置5 h后离心(4 °C, 10 000 r/min, 10 min)得上清液。将上清液用硫酸铵分级沉淀后进行透析, 并用聚乙二醇20000浓缩, 真空冷冻干燥后保存备用。

酶活力定义: 37 °C条件下, 1 min内催化形成1 μmol马尿酸所需要的酶量为一个酶活力单位(U)。酶活检测采用Cushman等^[15]的方法。

酶比活力: 每毫克蛋白质所具有的酶活力, 单位是U/mg。蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法。

1.3.3 ACE抑制率的测定

参照Cushman等^[15]的体外检测法, 并进行改进。在2 mL离心管中混合40 μL样品液和80 μL 0.005 mol/L的HHL溶液(由0.3 mol/L NaCl、0.1 mol/L、pH 8.3的硼酸

盐缓冲液配制), 然后加入20 μL 0.048 U/mL ACE启动反应, 37 °C恒温保持60 min, 加入0.2 mL 1 mol/L的HCl终止反应, 再加入1.5 mL冷冻后的乙酸乙酯, 用力振荡混合, 4 000 r/min离心10 min后, 吸取1.0 mL的乙酸乙酯层(上层)移入试管中, 在80~90 °C的烘箱中烘干, 再加入4 mL 1 mol/L NaCl溶液溶解马尿酸, 溶液在228 nm波长处测定OD值。对照组除不加入抑制剂、空白组除在反应前先加入0.2 mL 1 mol/L的盐酸以终止反应外, 其余操作与反应管完全相同。ACE抑制率计算公式如下。

$$\text{ACE抑制率}/\% = \frac{\text{OD}_A - \text{OD}_B}{\text{OD}_A - \text{OD}_C} \times 100$$

式中: OD_A 、 OD_B 、 OD_C 分别为对照组、样品组、空白组体系在228 nm波长处的OD值。

1.3.4 最佳蛋白酶的选择

选择胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶和复合蛋白酶5种蛋白酶分别对花椒籽蛋白进行单酶水解。水解条件: 底物质量浓度1 g/100 mL, 加酶量10 000 U/g, 在各蛋白酶最适温度和pH值条件下, 酶解3 h, 以ACE抑制率为评价指标, 筛选出酶解花椒籽蛋白制备降血压肽的最佳蛋白酶。

1.3.5 酶解单因素试验

利用筛选出的蛋白酶酶解花椒籽蛋白, 在加酶量10 000 U/g, 酶解时间4 h, 酶解温度37 °C, pH 7.0时, 考察底物质量浓度(1、2、3、4、5 g/100 mL)对ACE抑制率的影响; 在加酶量10 000 U/g, 酶解温度37 °C, pH 7.0, 底物质量浓度为1 g/100 mL时, 考察酶解时间(3、4、5、6、7 h)对ACE抑制率的影响; 在酶解时间4 h, 酶解温度37 °C, pH 7.0时, 底物质量浓度为1 g/100 mL时, 考察加酶量(2 000、6 000、10 000、14 000、18 000 U/g)对ACE抑制率的影响; 在加酶量10 000 U/g, 酶解时间4 h, pH 7.0时, 底物质量浓度为1 g/100 mL时, 考察酶解温度(30、35、37、40、45 °C)对ACE抑制率的影响; 在加酶量10 000 U/g, 酶解时间4 h, 酶解温度37 °C, 底物质量浓度为1 g/100 mL时, 考察pH值(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5)对ACE抑制率的影响。确定最佳单因素水平。

1.3.6 响应面试验

在单因素试验基础上, 根据Box-Behnken试验设计原理, 选择对ACE抑制率影响较大的因素进行考察, 以酶解液对ACE的抑制率为响应指标, 筛选出最佳酶解工艺参数。

2 结果与分析

2.1 血管紧张素转换酶的制备

2.1.1 自制ACE活性的测定

经测定, 自制ACE的酶活力为 9.58×10^{-3} U, 蛋白质

含量为0.33%，比活力为 29.03×10^{-3} U/mg。在血管紧张素转换酶抑制剂卡托普利的抑制下，ACE酶活下降，马尿酸的生成量由无抑制剂存在条件下的 $0.46 \mu\text{mol}$ 减少到 $0.25 \mu\text{mol}$ ，测得卡托普利的抑制率为41.32%。结果表明自制ACE可用于降血压肽活性的检测。

2.1.2 自制ACE与商品ACE的比较

为了解自制ACE与商品ACE的效果差异，将木瓜蛋白酶酶解花椒籽得到的降血压肽分别对这两种ACE的活性进行抑制，抑制率分别为49.69%和59.13%。花椒籽蛋白降血压肽对自制ACE的抑制效果低于对商品ACE的抑制效果，说明自制的ACE与商品ACE存在一定差距，这可能是因为自制ACE是粗酶液，没有经过进一步的纯化，含杂质较多，影响了反应过程中降血压肽或HHL与ACE结合位点的反应。

2.2 花椒籽蛋白酶解制备降血压肽最佳蛋白酶的筛选

表1 不同蛋白酶作用下降血压肽的ACE抑制率

Table 1 ACE inhibition rates of antihypertensive peptides prepared with different enzymes

种类	最适条件	ACE抑制率/%
复合蛋白酶	pH 5.0~8.0, 40~50 °C	10.59
胰蛋白酶	pH 8.0, 37 °C	30.85
木瓜蛋白酶	pH 6.0~7.0, 35~40 °C	49.69
中性蛋白酶	pH 7.0, 40 °C	37.90
碱性蛋白酶	pH 8.0, 55 °C	21.19

由表1可知，5种蛋白酶的酶解产物对ACE均有抑制效果，其中木瓜蛋白酶的ACE抑制率最高，为49.69%，即降血压效果最好；其次为中性蛋白酶和胰蛋白酶，分别为37.90%和30.85%；效果最差的是复合蛋白酶，ACE抑制率仅为10.59%，这可能是因为复合蛋白酶在酶解花椒籽蛋白质过程中使具有ACE抑制活性的肽段降解成更小的肽段或氨基酸从而导致ACE抑制活性降低。因此确定木瓜蛋白酶为酶解花椒籽蛋白制备降血压肽的最佳蛋白酶。

2.3 木瓜蛋白酶酶解花椒籽蛋白制备降血压肽的单因素试验

2.3.1 底物质量浓度对花椒籽蛋白ACE抑制率的影响

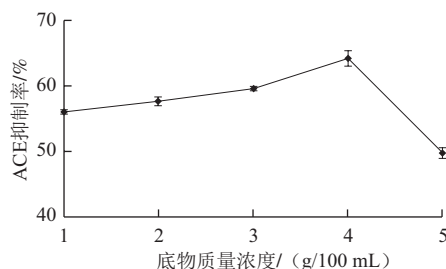


图1 底物质量浓度对花椒籽蛋白ACE抑制率的影响

Fig.1 Effect of substrate concentrations on ACE inhibitory activity of Sichuan pepper seed protein hydrolysate

由图1可知，随着底物质量浓度的增大，ACE抑制率呈先上升后下降的趋势。在底物质量浓度为4 g/100 mL时，酶解液的ACE抑制率最大，达到64.31%；当底物质量浓度继续增大，ACE抑制率反而下降，可能是因为过高的底物质量浓度易造成水解液黏度增大，影响蛋白酶的扩散，对水解反应有抑制作用^[16]。考虑到底物质量浓度对ACE抑制率的影响总体变化趋势不大，确定其酶解的底物质量浓度为3 g/100 mL。

2.3.2 酶解时间对花椒籽蛋白ACE抑制率的影响

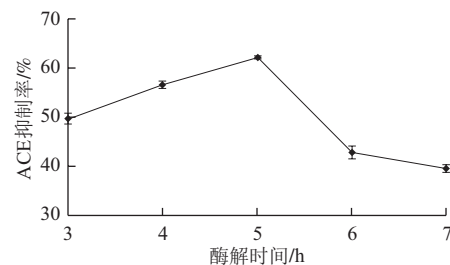


图2 酶解时间对花椒籽蛋白ACE抑制率的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis time on ACE inhibitory activity of Sichuan pepper seed protein hydrolysate

由图2可知，随着酶解时间的延长，ACE抑制率呈先上升后下降的趋势。当酶解时间为5 h时，ACE抑制率达到最大，为62.10%，之后反而下降，这可能是因为酶解时间过长，导致酶解程度太大，产物中的游离氨基酸相对含量增加，具有ACE抑制率的肽被进一步水解，而破坏了其具有ACE抑制活性的肽段结构上的完整特征^[17]。

2.3.3 加酶量对花椒籽蛋白ACE抑制率的影响

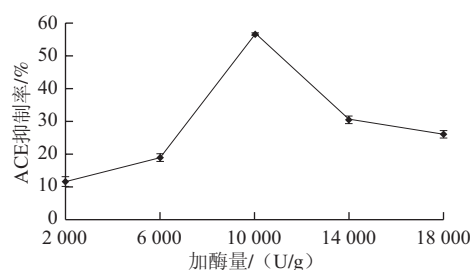


图3 加酶量对花椒籽蛋白ACE抑制率的影响

Fig.3 Effect of enzyme dosage on ACE inhibitory activity of Sichuan pepper seed protein hydrolysate

由图3可知，随着加酶量的增加，ACE抑制率呈先上升后下降的趋势。当加酶量为10 000 U/g时，ACE抑制率达到最高，为56.46%，继续增加加酶量，ACE抑制率下降，这可能是因为酶浓度较低时，酶分子所能结合的底物少，而过量的蛋白酶使一部分具有ACE抑制活性的小肽被降解为活性较小的肽或者氨基酸，从而降低对ACE的抑制性。

2.3.4 酶解温度对花椒籽蛋白ACE抑制率的影响

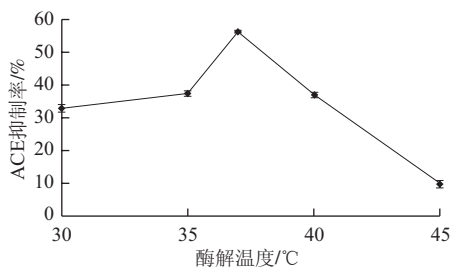


图4 酶解温度对花椒籽蛋白ACE抑制率的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis temperature on ACE inhibitory activity of Sichuan pepper seed protein hydrolysate

由图4可知,当温度从30℃升高至37℃,ACE抑制率随着温度的升高而增大,继续升高温度,ACE抑制率呈下降趋势,在45℃时ACE抑制率很低,仅为9.85%。这可能是因为在一定温度范围内温度上升有利于酶解的进一步进行,但温度过高会导致酶变性,使酶活性减弱,从而使酶水解蛋白质的反应速度下降,ACE抑制率急剧下降。

2.3.5 pH值对花椒籽蛋白ACE抑制率的影响

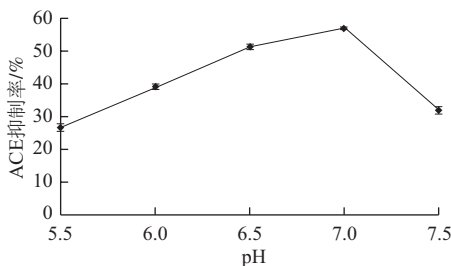


图5 pH值对花椒籽蛋白ACE抑制率的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis pH on ACE inhibitory activity of Sichuan pepper seed protein hydrolysate

由图5可知,随着pH值的升高,ACE抑制率也逐渐升高,当pH值为7.0时ACE抑制率达到最高,为56.8%,之后反而下降。这是因为pH值过高会使酶失活从而影响酶的作用效果。

通过单因素试验分析可知,酶解时间、加酶量、酶解温度和pH值这4个因素对ACE抑制率的影响较为显著。单因素试验确定酶解制备花椒籽蛋白降压肽的最适条件为:底物质量浓度3 g/100 mL,酶解时间5 h,加酶量10 000 U/g,酶解温度37℃,pH 7.0,此结果可为响应面试验因素零点设定提供参考,以此为基础来选择最低值和最高值。

2.4 响应面法优化花椒籽蛋白的酶解条件

2.4.1 响应面试验设计及结果分析

在单因素试验基础上,采用Box-Behnken中心组合设计原理,选择对花椒籽蛋白ACE抑制率影响较大的因素酶解时间(X_1)、加酶量(X_2)、酶解温度(X_3)、pH

值(X_4)为自变量,以ACE抑制率为响应值进行响应面设计。试验设计及结果见表2。

采用Design Expert 7.0.0软件对表2试验数据进行回归分析,方差分析结果见表3。

表2 Box-Behnken试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken experimental design and results

试验号	X_1 酶解时间/h	X_2 加酶量/(U/g)	X_3 酶解温度/°C	X_4 pH	Y ACE抑制率/%
1	0 (5)	0 (10 000)	0 (37.5)	0 (7.0)	66.98
2	1 (6)	0	-1 (35.0)	0	40.24
3	0	0	-1	-1 (6.5)	52.70
4	0	0	0	0	66.91
5	1	0	0	1 (7.5)	31.71
6	-1 (4)	0	0	1	35.14
7	1	1 (12 000)	0	0	39.02
8	1	0	0	-1	34.81
9	0	1	0	1	46.46
10	0	0	0	0	66.67
11	-1	0	1 (40.0)	0	44.93
12	0	1	0	-1	48.78
13	-1	1	0	0	40.24
14	-1	0	0	-1	47.83
15	0	1	-1	0	54.05
16	1	-1 (8 000)	0	0	29.13
17	0	0	0	0	65.00
18	0	0	0	0	66.93
19	-1	-1	0	0	35.28
20	0	0	1	-1	57.32
21	0	-1	0	1	37.80
22	0	-1	0	-1	46.34
23	0	0	1	1	41.46
24	-1	0	-1	0	49.28
25	0	0	-1	1	52.71
26	1	0	1	0	39.12
27	0	-1	1	0	43.97
28	0	-1	-1	0	50.00
29	0	1	1	0	55.41

表3 响应面二次模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for the response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F值	Prob>F	显著性
模型	3 497.49	14	249.82	144.80	<0.000 1	**
X_1	124.61	1	124.61	72.23	<0.000 1	**
X_2	143.11	1	143.11	82.95	<0.000 1	**
X_3	23.44	1	23.44	13.58	0.002 4	**
X_4	150.52	1	150.52	87.25	<0.000 1	**
X_1X_2	6.08	1	6.08	3.52	0.081 6	
X_1X_3	2.61	1	2.61	1.51	0.239 1	
X_1X_4	22.99	1	22.99	13.33	0.002 6	**
X_2X_3	13.65	1	13.65	7.91	0.013 8	*
X_2X_4	9.67	1	9.67	5.61	0.032 8	*
X_3X_4	62.96	1	62.96	36.50	<0.000 1	**
X_1^2	2 295.80	1	2 295.80	1 330.71	<0.000 1	**
X_2^2	834.78	1	834.78	483.86	<0.000 1	**
X_3^2	131.68	1	131.68	76.33	<0.000 1	**
X_4^2	718.12	1	718.12	416.25	<0.000 1	**
残差	24.15	14	1.73			
失拟项	21.29	10	2.13	2.98	0.152 4	
纯误差	2.86	4	0.72			
总方差	3 521.64	28				

注:*, $P < 0.05$, 表示差异显著; **, $P < 0.01$, 表示差异极显著。模型的确定系数 $R^2=0.993 1$, 模型的调整系数 $R_{adj}^2=0.986 3$ 。

通过表2响应面分析得到ACE抑制率的回归方程为:

$$Y=66.50-3.22X_1+3.45X_2-1.40X_3-3.54X_4+1.23X_1X_2+0.81X_1X_3+2.40X_1X_4+1.85X_2X_3+1.56X_2X_4-3.97X_3X_4-18.81X_1^2-11.34X_2^2-4.51X_3^2-10.52X_4^2。$$

由表3可知, 模型 $F=144.80>F_{0.01(14,4)}=14.24$, $P<0.0001$, 表明该模型极显著; 失拟项 $F=2.98<F_{0.05(10,4)}=5.96$, $P=0.1524>0.05$, 差异不显著, 说明未知因素对实验结果的干扰较小, 实验误差主要来源于随机误差。由统计学计算得出模型的确定系数 $R^2=0.9931$, 调整系数 $R_{Adj}^2=0.9863$, 说明该模型能解释98.63%响应值的变化, 因而拟合度好, 实验误差小, 可以用此模型对ACE抑制率进行分析和预测。对模型进行回归方程系数显著性检验可知: 一次项 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 , 交互项 X_1X_4 、 X_3X_4 均极显著, X_2X_3 、 X_2X_4 显著, X_1X_2 、 X_1X_3 不显著, 平方项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 显著。因此, 各个因素对ACE抑制率的影响不是简单的线性关系。

2.4.2 响应面分析与条件优化

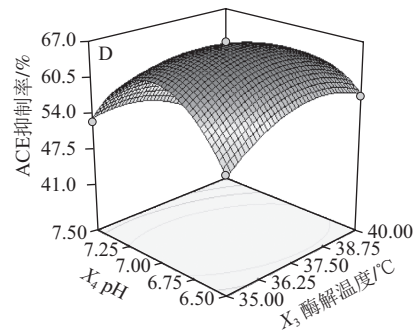
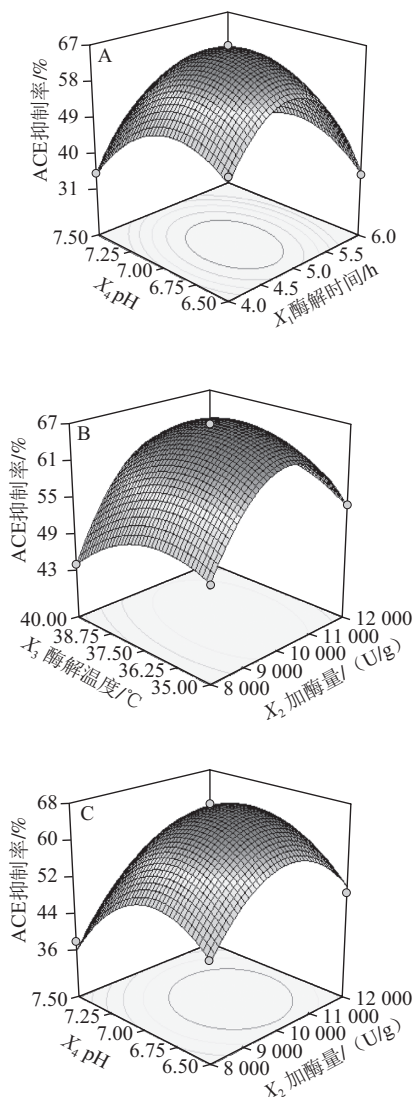


图6 各因素之间交互作用对花椒籽蛋白酶解条件影响的响应面图

Table 6 Response surface plots showing the interactive effects of hydrolysis parameters on ACE inhibitory activity of Sichuan pepper seed protein hydrolysate interactive effects between the factors

由图6A可知, 固定加酶量为10 000 U/g, 酶解温度为37.5 °C, 当pH值处于较低和较高水平时, 随着酶解时间的延长, ACE抑制率先升高后下降, 升高和下降幅度都很明显; 当酶解时间处于较低水平时, ACE抑制率随着pH值的升高先缓慢升高后下降。酶解时间和pH值之间交互作用显著。

由图6B可知, 固定酶解时间为5 h, pH值为7.0, 当加酶量处于较低水平时, 随着酶解温度的升高, ACE抑制率变化不大, 当加酶量处于中等水平时, 随着酶解温度的升高, ACE抑制率平稳升高; 当酶解温度处于较低和较高水平时, 随着加酶量的增加, ACE抑制率先急剧升高后缓慢下降。酶解温度和加酶量之间的交互作用显著。

由图6C可知, 固定酶解时间为5 h, 酶解温度为37.5 °C, 当加酶量处于较低水平时, 随着pH值的升高, ACE抑制率先缓慢升高后急剧下降, 当加酶量处于较高水平时, 随着pH值的升高, ACE抑制率先升高后下降, 变化幅度不明显; 当pH值处于较低水平时, 随着加酶量的升高, ACE抑制率先升高后缓慢下降, 当pH值处于中等水平时, 随着加酶量的升高, ACE抑制率处于较高水平。加酶量和pH值之间的交互作用显著。

由图6D可知, 固定酶解为5 h, 加酶量为10 000 U/g, 当酶解温度处于较低水平时, 随着pH值的增加ACE抑制率先升高后缓慢下降, 当酶解温度处于较高水平时, ACE抑制率随着pH值的增加先缓慢升高后急剧下降; 当pH值处于较低水平时, 随着酶解温度的升高, ACE抑制率逐渐升高并趋于平稳, 当pH值处于较高水平时, 随着酶解温度的升高, ACE抑制率先缓慢升高后逐渐下降。酶解温度和pH值之间的交互作用显著。

通过模型优化得出花椒籽蛋白的酶解最优条件为: 酶解时间4.91 h、加酶量10 262.52 U/g、酶解温度37.33 °C、pH 6.92, 此条件下ACE抑制率为67.20%。

2.4.3 酶解工艺条件的验证实验

为检验响应面法所得结果的准确性, 采用上述优化

条件进行降血压肽的制备,考虑到实操的方便,将参数修正为酶解时间4.9 h、加酶量10 200 U/g、酶解温度为37.4 ℃、pH值为6.9,测得ACE抑制率为68.00%,与理论预测值的相对误差在1.19%左右。因此,响应面法所得的优化酶解条件参数准确可靠,具有实用价值。

3 讨论

本实验以花椒籽蛋白为原料,筛选出了制备花椒籽蛋白降血压肽的最佳蛋白酶,并通过响应面实验优化了花椒籽蛋白制备降血压肽的酶解条件,获得了ACE抑制活性较高的产物,促进了花椒籽的再利用和深加工,为花椒籽高附加值的利用提供了新途径。酶解法制备花椒籽蛋白降血压肽实验条件温和,易于控制,操作方便安全,经济可行,且不产生有毒有害物质,可以为花椒籽蛋白降血压肽应用到保健食品领域提供一定的理论依据。由于酶解产物的水解度和ACE抑制率没有显著的线性关系^[18-20],所以本实验未进行水解度的测定。为了获得纯度更高、ACE抑制效果更好的降血压肽,还需进一步的深入研究,主要体现在以下几个方面:对酶解产物进行分离纯化;对纯化前后的产物进行氨基酸组成分析和测定分子质量;研究降血压肽的理化性质;分析具有ACE抑制活性的肽段结构组成和分布等。

4 结论

本实验采用硫酸铵分级法从猪肺中提取ACE,经初步纯化浓缩后ACE的酶活力为 9.58×10^3 U,蛋白质含量0.33%,酶比活力为 29.03×10^3 U/mg,与商品ACE相比存在一定差距,但可用于本实验中ACE抑制率的测定。通过比较不同蛋白酶水解花椒籽蛋白的效果,筛选出制备花椒籽蛋白降血压肽的最佳蛋白酶为木瓜蛋白酶。在单因素试验基础上,采用响应面分析法,根据Box-Behnken中心组合试验设计原理得到了ACE抑制率与酶解时间、加酶量、酶解温度和pH值的回归模型,经过验证此模型是合理有效的,可以较好地预测ACE抑制率。根据回归方程得到了酶解花椒籽蛋白制备降血压肽的最佳工艺条件为:底物质量浓度3 g/100 mL、酶解时间4.91 h、加酶量10 262.52 U/g、酶解温度37.33 ℃、pH 6.92,所得酶解产物的ACE抑制率为67.20%。考虑到实操的便利,将

酶解工艺参数进行适当修正为底物质量浓度3 g/100 mL、酶解时间4.9 h、加酶量10 200 U/g、酶解温度37.4 ℃、pH 6.9,所得酶解产物的ACE抑制率为68.00%。因此,利用响应面分析法对花椒籽蛋白降血压肽的酶解工艺进行优化,可获得最优的工艺参数,能有效减少操作的盲目性,从而为进一步的实验奠定基础。

参考文献:

- [1] 肖红,段玉峰,刘平,等.食品蛋白降血压肽及其研究进展[J].食品研究与开发,2004,25(5): 3-6.
- [2] LI Guan hong, LE Guo wei, LIU Huan, et al. Mung-bean protein hydrolysates obtained with alcalase exhibit angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity[J]. Food Science and Technology International, 2005, 11(4): 281-287.
- [3] WU Jian ping, DING Xiaolin. Characterization of inhibitor and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides[J]. Food Research International, 2002, 35(4): 367-375.
- [4] 刘淑集,王茵,吴成业,等.坛紫菜降血压活性肽的分离纯化及分子质量测定[J].食品科学,2011,32(2): 213-217.
- [5] MUGUERZA B, RAMOS M, SÁNCHEZ E, et al. Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(1): 61-69.
- [6] YANG Yan jun, TAO Guan jun, LIU Ping, et al. Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal[J]. Journal Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(19): 7891-7895.
- [7] MIGUEL M, CONTRERAS M M, RECIO I, et al. ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine case in hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2009, 112(1): 211-214.
- [8] 杨令叶,田呈瑞,权麻玉.大红袍花椒籽种仁蛋白的分类研究[J].中国油脂,2008,33(9): 16-18.
- [9] 欧阳玉祝,石爱华,陈小东,等.花椒油的超声提取及其成分分析[J].食品与发酵工业,2007,33(3): 133-135.
- [10] 李霞,刘尚军,李园园.花椒籽油的微波萃取工艺研究[J].南阳理工学院学报,2010,2(4): 77-79.
- [11] 刘春叶,张剑,苗延青,等.花椒籽油的提取及GC-MS分析[J].安徽农业科学,2012,40(6): 3594-3596; 3599.
- [12] 寇明钰.花椒籽蛋白质分离提取及功能性质的研究[D].重庆:西南大学,2006: 12-24.
- [13] 宋燕.花椒籽膳食纤维、蛋白质的分离提取及抗氧化肽的制备研究[D].雅安:四川农业大学,2012: 14-16.
- [14] 刘淑集,王茵,苏永昌,等.血管紧张素转化酶(ACE)的提取与活性验证[J].福建水产,2009(2): 2-5.
- [15] CUSHMAN 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.
- [16] 龚琴,吴莎,罗栋源,等.响应面法优化酶解制备绿豆蛋白ACE抑制肽的研究[J].食品工业科技,2011,32(7): 312-315.
- [17] 于靖,瞿爱华.制备米糠蛋白降血压肽最佳用酶的筛选[J].黑龙江八一农垦大学学报,2012,24(4): 57-60.
- [18] 范远景,姬莹莹,张焱.大豆蛋白酶解肽的分子量分布及抑制ACE活性关系研究[J].食品科学,2007,28(10): 57-61.
- [19] 王茵,刘淑集,吴成业.紫菜降血压肽酶法制备工艺的优化[J].福建水产,2008(4): 64-68.
- [20] CHIANG W D, TSOU M J, TSAI Z Y, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor[J]. Food Chemistry, 2006, 98(4): 725-732.