酶解山核桃蛋白制备降血压肽的工艺

包怡红，于阳阳，赵若诗
(东北林业大学林学院，黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要：采用碱性蛋白酶对山核桃蛋白进行水解，以水解度和水解物的ACE抑制率为考察指标，考察酶解pH值、酶解温度、酶解时间、加酶量4个因素的影响，并在此基础上通过响应面组合优化试验，确定得到ACE抑制率最佳的条件为酶解pH8.2、酶解温度56℃、酶解时间4h、加酶量5880U/g(以底物计)，此时水解度为29.03%，水解物的ACE抑制率可达到72.48%。

关键词：山核桃蛋白；降血压肽；水解度；ACE抑制率；响应面

Enzymatic Preparation of Antihypertensive Peptides from *Juglans mandshurica* Maxim Protein

BAO Yi-hong，YU Yang-yang，ZHAO Ruo-shi
(College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract：In this study, *Juglans mandshurica* Maxim protein, prepared in our laboratory using alkaline extraction and acid precipitation, was hydrolyzed with alcalase to prepare antihypertensive peptides. Operating parameters such as pH, temperature, hydrolysis time and enzyme dosage were optimized using response surface analysis based on degree of hydrolysis and ACE inhibitory rate. The optimum hydrolysis conditions for maximum ACE inhibitory rate (72.48%) were found to be hydrolysis at 56 ℃ and pH 8.2 for 4 h with an enzyme/substrate ratio of 5880 U/g. Under these conditions, the degree of hydrolysis was 29.03%.

Key words：*Juglans mandshurica* Maxim protein；antihypertensive peptide；degree of hydrolysis；ACE inhibitory activity；response surface methodology

中图分类号：TS201.1；TS218 文献标志码：A 文章编号：1002-6630(2013)01-0220-05

高血压是最常见的慢性心血管疾病之一，可造成大脑、心血管、肾脏的损害，是导致脑卒中、心力衰竭和冠心病等疾病的重要因素。高血压的主要治疗方法之一是通过降低人体内血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme，ACE)的活性，从而可防止由于ACE活性高导致的心肌收缩加强、血管平滑肌收缩、血压升高[1-2]。虽然市场上治疗高血压的药物已经较为多样成熟，但是由于这些药物在代谢过程中可能会产生毒副作用，所以，近年来国内外科学家从天然食物中研制出降压肽——利用酶制剂在温和条件下水解蛋白质，而获得的一类可以降低高血压人群体内ACE活性的多肽。研究人员已经利用酶法、微生物发酵法、基因工程法等方法从牛乳蛋白、大豆、谷物、玉米、胶原蛋白、大蒜、酒糟、米糠、油菜籽、藻类、鱼贝类、海蜇等食物源中研制出了降血压肽[3-8]。

目前未见对水解山核桃蛋白制备降血压肽的报道，本实验利用碱性蛋白酶水解实验室自制山核桃蛋白，通过单因素和响应面试验组合确定制备山核桃降血压肽的最佳酶解条件，为山核桃降血压肽的理论研究和进一步的产品开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

山核桃蛋白为采用碱提酸沉法自制。

甘氨酸、茚三酮、果糖、$Na_2HPO_4 \cdot 10H_2O$、KH_2PO、乙醇、NaCl、硼砂、硼酸、NaOH均为国产分析纯；血管紧张素转化酶(0.25UN)、马尿酰-组氨酰-亮氨酸(*N*-Hippuryl-His-Leu hydrate，HHL) 美国Sigma公司；碱性蛋白酶Alcalase(食品级) 丹麦诺维信公司。

1.2 仪器与设备

电热恒温水浴锅 上海博讯实业有限公司医疗设备厂；TU-1800PC紫外-可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司；PB-10标准型酸度计 上海精密仪器

收稿日期：2011-11-06
基金项目：东北林业大学中央高校基金项目(DL09CA14)
作者简介：包怡红(1970—)，女，教授，博士，研究方向为天然产物生物转化、功能性食品。E-mail：baoyihong@163.com

仪表有限公司；JJ-1精密增力电动搅拌器　常州国华电气有限公司；旋涡混合器　海门市其林贝尔仪器有限公司。

1.3　方法

1.3.1　山核桃蛋白的酶解

将自制山核桃蛋白冻干样品配制为2%的蛋白溶液，分别在加酶量(以底物计)3000、4000、5000、6000、7000U/g，酶解温度为30、40、50、60、70℃，酶解时间为1、2、3、4、5、6h，酶解pH值为7、8、9、10、11、12的不同条件下进行酶解[9-11]。酶解过程中用磁力搅拌器进行搅拌，同时滴加0.1mol/L NaOH维持相应pH值条件。酶解后以100℃沸水浴灭酶15min。将酶解液离心4000r/min，10min，取上清液进行水解度和ACE抑制率测定。

1.3.2　山核桃蛋白酶解制备降血压肽的响应面组合试验

在酶解单因素试验的基础上，以酶解pH值、酶解温度、酶解时间、加酶量为影响因素，以ACE抑制率作为考察指标，进行优化试验，采用Box-Behnken和SAS9.0进行试验设计和结果分析，得出制备降血压肽的最佳工艺。试验设计见表1。

表1　响应面试验因素和水平表

Table 1　Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in response surface analysis

因素	编码水平		
	−1	0	1
*A*酶解pH	7	8	9
*B*酶解温度/℃	50	55	60
*C*酶解时间/h	3.5	4.0	4.5
*D*加酶量/(U/g)	4000	5000	6000

1.3.3　水解度的测定

采用茚三酮方法[12-13]测定山核桃蛋白水解度。取水解蛋白液0.50mL定容至50mL，取0.40mL稀释液于试管中并加入1.60mL蒸馏水、1.00mL显色剂，混匀后置沸水浴中加热15min，同时作空白实验。以后操作同标准曲线。利用标准曲线计算水解蛋白液中—NH_2的含量(μmol/mL)。

$$水解度/\% = \frac{A_h - A_0}{A_{总} - A_0} \times 100 \quad (1)$$

式中：A_h为不同时间水解液中的总游离—NH_2含量/(μmol/mL)；A_0为原料蛋白中固有的游离—NH_2含量/(μmol/mL)；$A_{总}$为原料蛋白强酸水解后的总游离—NH_2含量/(μmol/mL)。

1.3.4　原料蛋白完全水解液的制备

准确称取0.10g原料山核桃蛋白粉于水解管中，加入6mol/L的盐酸20mL，于100℃回流反应24h，水解反应后，旋转蒸发除去盐酸，干涸后用蒸馏水溶解，并定容至100mL。同样采用茚三酮方法测定完全水解中总游离—NH_2数。

1.3.5　水解液ACE抑制率的测定

在Cushman[14]、Chiang[15]等所用的方法的基础上从对ACE抑制率测定方法进行改进。方法如下：将HHL溶解在0.1mol/L、pH8.3的硼酸缓冲液(含有0.3mol/L NaCl)中配成0.005mol/L的HHL溶液，取100μL该溶液于5mL的离心管中，反应管中加入40μL酶解物，在37℃恒温水浴 3～5min，再加入10μL ACE酶液启动反应，恒温反应60min。对照管中先入40μL硼酸缓冲液代替酶解物，反应结束后均加入 150μL 1mol/L盐酸终止反应。然后在反应管中加入40μL硼酸缓冲液，对照管中加入40μL酶解物。空白组为在反应前先加入150μL 1mol/L HCl以终止反应外，其余操作与反应管完全相同。最后加入1.0mL乙酸乙酯，振荡混合，4000r/min离心10min后，取出750μL酯层移入试管中，在100℃的烘箱中烘干(约30min)，再加入3mL的去离子水溶解的马尿酸，漩涡混合30s，在228nm波长处测定吸光度(*A*)。

$$ACE抑制率/\% = \frac{A_b - A_a}{A_b - A_c} \times 100$$

式中：A_b是ACE与HHL完全反应后生成物吸光度；A_a是ACE与抑制剂(酶解物)反应被抑制，又与HHL同时反应后生成物吸光度；A_c是ACE失活后，再加抑制剂，是ACE与HHL反应的空白吸光度。

2　结果与分析

2.1　酶解单因素试验

2.1.1　酶解pH值对水解度和ACE抑制率的影响

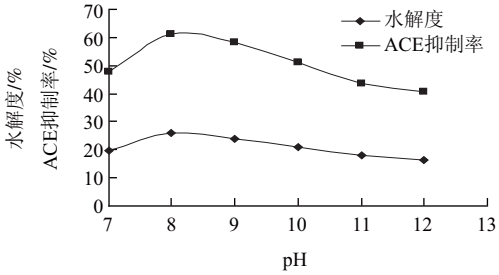


图1　pH值对水解度和ACE抑制率的影响

Fig.1　Effect of pH on degree of hydrolysis and ACE inhibitory rate

在酶解时间3h、加酶量5000U/g、酶解温度50℃的条件下，考察酶解pH值对水解度和ACE抑制率的影响。结果如图1所示。当酶解pH值增加至8时，山核桃蛋白溶液的水解度为25.78%，酶解物的ACE抑制率为61.14%，均达到最大值，随着pH值的增加，水解度和ACE抑制率均减小，说明较高pH值环境可能导致碱性蛋白酶的失活，不适于水解。pH值的变化导致的水解度和ACE抑制率的变化较为明显。

2.1.2　酶解温度对水解度和ACE抑制率的影响

在酶解pH8、酶解时间3h、加酶量5000U/g的条件

下，考察酶解温度对水解度和ACE抑制率的影响，结果如图2所示。当酶解温度由30℃逐渐增加时，山核桃蛋白溶液的水解度和酶解物的ACE抑制率也随之增加，温度40～60℃时，水解度变化不很明显，在50℃时水解度最大为25.38%；而对于酶解物ACE抑制率来说，温度在40～60℃范围变化时，ACE抑制率变化明显，当温度为50℃时，酶解物ACE抑制率达到最大为59.88%。综合考虑水解度和酶解物ACE抑制率2个因素，50℃酶解效果较好。

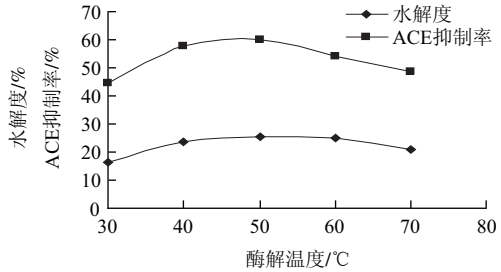


图 2 酶解温度对水解度和ACE抑制率的影响

Fig.2 Effect of temperature on degree of hydrolysis and ACE inhibitory rate

2.1.3 酶解时间对水解度和ACE抑制率的影响

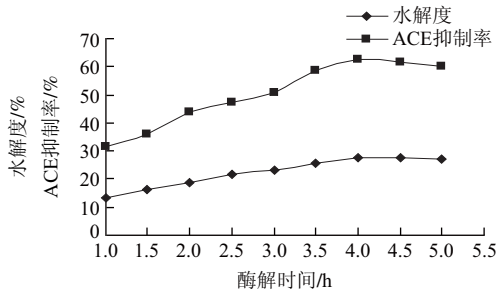


图 3 酶解时间对水解度和ACE抑制率的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis time on degree of hydrolysis and ACE inhibitory rate

在酶解pH8、酶解温度50℃、加酶量5000U/g的条件下，考察酶解时间对水解度和ACE抑制率的影响。结果如图3所示。酶解时间从1h逐渐增加时，山核桃蛋白溶液的水解度和酶解物的ACE抑制率也随之增加。当时间增加至4h后，水解度增加不明显，在4.5h水解度达到最大为27.61%；而酶解4h时，酶解物的ACE抑制率可达62.38%，随着酶解时间的延长，ACE抑制率有降低趋势。

2.1.4 加酶量对水解度和ACE抑制率的影响

在酶解pH8、酶解温度50℃、酶解时间4h条件下，考察加酶量对水解度和ACE抑制率的影响。结果如图4所示。当加酶量逐渐增加时，山核桃蛋白溶液的水解度和酶解物的ACE抑制率均随之增加，当增加至5000U/g时，水解度的增加不再明显，此时为26.25%，酶解物的ACE抑制率也达到最大为60.34%。

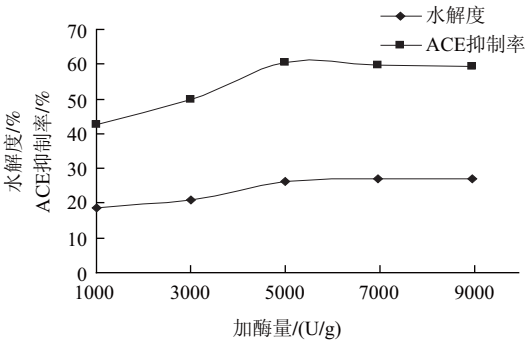


图 4 加酶量对水解度和ACE抑制率的影响

Fig.4 Effect of enzyme dosage on degree of hydrolysis and ACE inhibitory rate

2.2 山核桃蛋白酶解制备降血压肽工艺的优化

2.2.1 模型建立与方差分析

根据单因素的试验结果，采用四因素三水平对蛋白质水解度和酶解物的ACE抑制率进行响应面优化，按照表1进行试验。结果见表2。

表 2 响应面试验设计方案及分析结果

Table 2 Experimental design and results for response surface analysis

试验号	*A*	*B*	*C*	*D*	水解度/%	ACE抑制率/%
1	−1	−1	0	0	16.3684	43.12
2	1	−1	0	0	22.0182	63.83
3	−1	0	−1	0	17.0082	47.67
4	1	0	−1	0	23.1398	66.42
5	−	0	0	−1	18.2035	50.89
6	1	0	0	−1	24.1856	70.02
7	−1	0	0	1	20.0216	58.42
8	1	0	0	1	26.9305	70.47
9	−1	0	1	0	19.0003	54.25
10	1	0	1	0	25.6769	71.03
11	−1	1	0	0	20.3831	56.26
12	1	1	0	0	28.9930	67.98
13	0	−1	−1	0	19.6670	53.77
14	0	−1	0	−1	20.0055	58.86
15	0	−1	0	1	23.0442	65.97
16	0	−1	1	0	21.0620	61.83
17	0	0	−1	−1	21.5474	59.13
18	0	0	−1	1	25.0663	69.87
19	0	0	0	0	29.0748	70.57
20	0	0	0	0	27.9090	71.31
21	0	0	0	0	28.5844	71.53
22	0	0	0	0	28.9835	72.58
23	0	0	0	0	28.0296	72.91
24	0	0	1	−1	24.0210	70.73
25	0	0	1	1	29.0567	68.61
26	0	1	−1	0	22.0862	64.11
27	0	1	0	−1	23.9224	67.28
28	0	1	0	1	26.4860	72.03
29	0	1	1	0	29.0068	67.67

表3 回归分析结果

Table 3 Results of regression analysis

变异来源	自由度	平方和		方差		F		Prob>F	
		水解度	ACE抑制率	水解度	ACE抑制率	水解度	ACE抑制率	水解度	ACE抑制率
一次项	4	250.7522	1032.0393	0.5702	0.5543	81.70	86.46	<0.0001**	<0.0001**
二次项	4	168.7792	650.71731	0.3828	0.3495	54.99	43.16	<0.0001**	<0.0001**
交叉项	6	9.5142	126.4552	0.0216	0.0679	2.07	5.59	0.1234	0.0038**
总和	14	429.0455	1809.2117	0.9756	0.9717	39.94	34.29	<0.0001**	<0.0001**

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

表4 ACE抑制率的试验结果方差分析表

Table 4 Analysis of variance for the fitted regression model for ACE inhibitory rate

变异来源	平方和	自由度	均方	F	Prob>F	显著性
模型	1809.21	14	129.23	34.29	<0.0001	**
A	705.33	1	705.33	187.15	<0.0001	**
B	203.78	1	203.78	54.07	<0.0001	**
C	75.25	1	75.25	19.97	0.0005	**
D	47.68	1	47.68	12.65	0.0032	**
AB	18.02	1	18.02	4.78	0.0462	*
AC	0.97	1	0.97	0.26	0.6198	
AD	47.06	1	47.06	12.49	0.0033	**
BC	3.06	1	3.06	0.81	0.3826	
BD	1.39	1	1.39	0.37	0.5530	
CD	55.95	1	55.95	14.85	0.0018	**
A^2	524.82	1	524.82	139.25	<0.0001	**
B^2	195.95	1	195.95	51.99	<0.0001	**
C^2	85.18	1	85.18	22.60	0.0003	**
D^2	5.61	1	5.61	1.49	0.2426	
残差	52.76	14	3.77			
失拟	49.10	10	4.91	5.36	0.0600	
纯误差	3.66	4	0.92			
总和	1861.98	28				

根据以上结果进行回归分析见表3，由表分析可知试验选用的模型对于水解度和ACE抑制率具有高度的显著性（$P<0.0001$）。从表4可知，在以ACE抑制率为响应值的模型中，*A*、*B*、*C*、*D*、*AB*、*AD*、*CD*、A^2、B^2、C^2这些因素对ACE抑制率的影响显著，即酶解pH值、酶解温度、酶解时间、加酶量、酶解pH值和酶解温度的交互作用、pH值和加酶量的交互作用、酶解时间和加酶量的交互作用这些都对水解物的ACE抑制率有显著的影响。

2.2.2 响应面分析与优化

利用SAS9.0软件进行处理分析得到回归方程如下：以水解度为响应值，得方程为：

$$Y=-695.792282+65.816293A+10.781166B+45.63432C+0.014908D-4.388031A^2+0.098005AB-0.119953B^2+0.2725AC+0.55256BC-9.847373C^2+0.000232AD-0.000023755BD+0.000758CD-0.000001693D^2 \quad (R^2=0.9756)$$

由方程预测得到最佳水解度的条件为pH8.422、酶解温度57.653℃、酶解时间4.264h、加酶量5530.169U/g，此条件得到的最佳水解度为30.652%。以ACE抑制率为响应值，得方程为：

$$Y=-2175.32875+196.024167A+30.393667B+185.498333C+0.0751433D-8.995A^2-0.4245AB-0.21985B^2-0.985AC-0.355BC-14.495C^2-0.00343AD-0.000118BD-0.00748CD-0.00000093D^2 \quad (R^2=0.9717)$$

由方程分析预测得到最佳ACE抑制率的条件为pH8.227、酶解温度56.482℃、酶解时间3.919h、加酶量5882.808U/g，此条件得到的最佳ACE抑制率为73.939%。根据分析结果和实际条件确定得到ACE抑制率最佳的条件为pH8.2、酶解温度56℃、酶解时间4h、加酶量5880U/g，经验证得到该条件水解物的ACE抑制率为72.48%，与预测值接近，此时水解度为29.03%。

通过上述ACE抑制率模型的二次多项回归方程所作的响应曲面图及其等高线图见图5～7，分别是pH值与酶解温度（*AB*）、pH值与加酶量（*AD*）、酶解温度与加酶量（*BD*）交互作用对水解物ACE抑制率的影响。响应曲面坡度相对陡峭，表明响应值对于处理条件的改变非常敏感。等高线的形状反映出交互作用的强弱大小，圆形表示两因素交互作用不显著，而椭圆形则与之相反[16]。根据图可知这几个因素的交互作用对水解物ACE抑制率的影响是显著的，与表4结果一致。

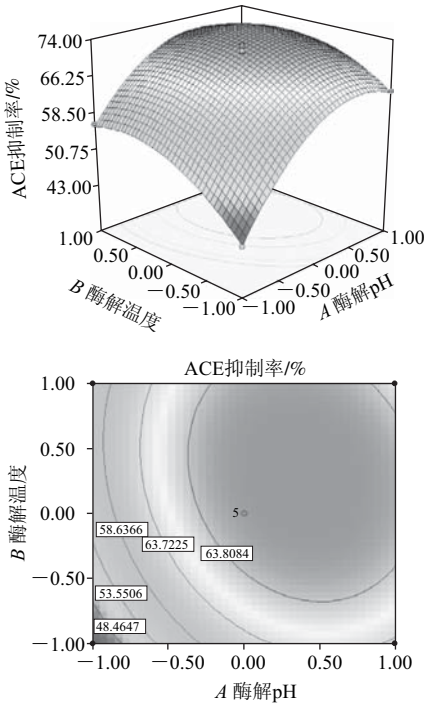
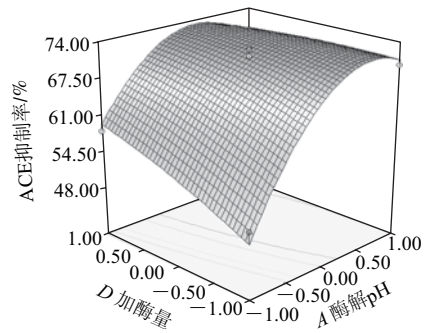


图5 酶解pH值与酶解温度交互影响水解物ACE抑制率的响应曲面图和等高线图

Fig.5 Response surface and contour plots showing the effects of hydrolysis pH and temperature on ACE inhibitory rate



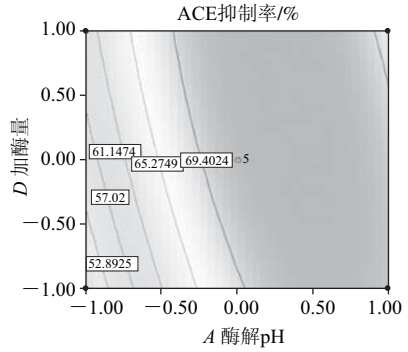


图 6 酶解pH值与加酶量交互影响水解物ACE抑制率的响应曲面图和等高线图

Fig.6 Response surface and contour plots showing the effects of hydrolysis pH and enzyme dosage on ACE inhibitory rate

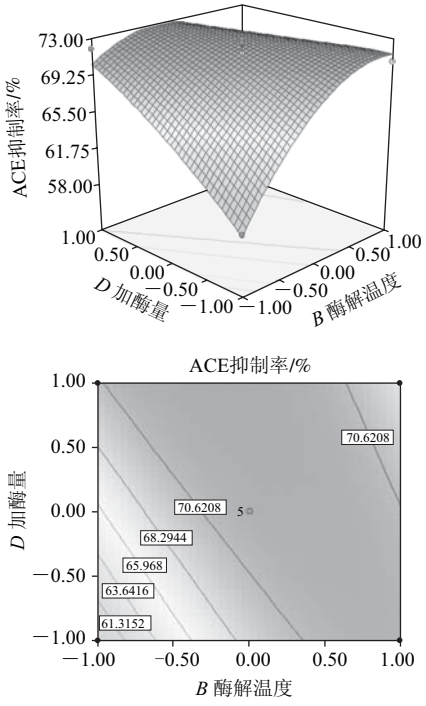


图 7 酶解温度与加酶量交互影响水解物ACE抑制率的响应曲面图和等高线图

Fig.7 Response surface and contour plots showing the effects of hydrolysis temperature and enzyme dosage on ACE inhibitory rate

3 结 论

通过单因素试验考察酶解pH值、酶解温度、酶解时间、加酶量4个因素，并在此基础上利用响应面试验优化酶解制备山核桃降血压肽的工艺。确定得到ACE抑制率最佳的条件为pH8.2、酶解温度56℃、酶解时间4h、加酶量5880U/g，此时水解度为29.03%，水解物的ACE抑制率为72.48%。本实验为山核桃降血压肽的酶法制备提供理论依据，并为其进一步开发利用奠定基础。

参考文献：

[1] LI Guanhong, LE Guowei, SHI Yonghui, et al. Angiotensin-Ⅰ-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects[J]. Nutrition Research, 2004, 24(7): 469-486.

[2] 王春艳. 改善心血管健康的食源性生物活性肽构效关系研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(13): 307-311.

[3] 赵新淮, 徐红华, 姜毓君. 食品蛋白质: 结构、性质与功能[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 272-275.

[4] 黄家音, 朱宇洁, 沈金玉. 玉米蛋白制备降血压肽的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(12): 290-293.

[5] 许金光, 杨智超, 刘长江, 等. 血管紧张素转化酶(ACE)抑制肽的研究进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(5): 425-427.

[6] 金融, 王恬, 许毅. 植物源降血压肽研究进展[J]. 中国油脂, 2007, 32(9): 22-25.

[7] 肖平, 周丽珍, 李艳, 等. 降血压肽制备工艺的研究进展[J]. 食品工艺科技, 2010, 31(8): 417-420.

[8] 姚俊, 陈庆森, 龚莎莎. 益生菌降压肽的研究现状及其国内外新产品开发趋势[J]. 食品科学, 2007, 28(9): 590-593.

[9] 刘宁, 仇农学. 碱性蛋白酶Alcalase水解杏仁蛋白制备ACE抑制肽[J]. 农产品加工, 2009(3): 149-152.

[10] 高丹丹. 棉籽抗氧化肽和ACE抑制多肽的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2010.

[11] 赵钟兴, 廖丹葵, 孙建华, 等. 蚕蛹蛋白酶解产物体外抗氧化和降血压活性筛选及响应面工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(23): 186-191.

[12] 赵新淮, 冯志彪. 大豆蛋白水解物水解度测定的研究[J]. 食品科学, 1994, 15(11): 65-67.

[13] 余勃, 陆兆新. 微生物发酵法产大豆多肽液水解度的测定[J]. 食品科学, 2005, 26(24): 104-107.

[14] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectro-photometric assay and properties of angiotensin -converting enzyme of rabbit[J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20: 1637-1648.

[15] CHIANG W D, TSOU M J, TSAIET 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: 725-732.

[16] 余勃. 枯草芽孢杆菌发酵豆粕生产大豆活性多肽的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006: 50-66.