

酶解蓝圆鲹蛋白制备降血压肽的工艺研究

舒冰, 孙建华, 伍善广, 赵钟兴, 廖丹葵

(广西大学 化学化工学院, 广西 南宁 530004)

摘要: 以蓝圆鲹(*Decapterus maruadsi*)鱼肉蛋白为原料, 选用 6 种蛋白酶在各自适宜的条件下酶解制备降血压肽, 通过检测酶解产物对血管紧张素转化酶(ACE)的体外抑制活性, 筛选出木瓜蛋白酶为制备蓝圆鲹降血压肽的最佳用酶。考察了不同水解度的酶解产物对 ACE 抑制效果, 当水解度为 13.7% 时, 产物对 ACE 的最高抑制活性可达 67.4%。在此基础上, 分别考察了酶解时间、初始酶用量、初始底物浓度、酶解温度和 pH 值对酶解工艺的影响, 得到制备蓝圆鲹降血压肽的适宜酶解工艺为: 初始酶用量为 7000 U/g, 初始底物浓度为 25 g/L, 酶解温度为 45℃, pH 为 7.0, 酶解 240 min。采用超滤技术对酶解产物活性组分进行分离富集, 发现产物中高活性部分均可富集于 10 kDa 和 5kDa 渗透液中, 且高活性组分分子量主要集中在 5 kDa 以下, 该组分对 ACE 的活性抑制率为 88.47%。

关键词: 酶解; 蓝圆鲹(*Decapterus maruadsi*); 蛋白; 降血压肽

中图分类号: S98

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2013)03-0045-05

血管紧张素转化酶(angiotension converting enzyme, ACE)在人体血压调节过程中起重要的生理作用, 它可以催化血管紧张素 I 转化为具有最强血管收缩作用的血管紧张素 II, 并使肾素失去催化活性使血压升高, 而高血压是引发心血管疾病造成动脉硬化及心肌梗塞的主要危害因素之一^[1], 因此治疗和预防高血压病是当今社会十分重要的课题。而血管紧张素转化酶抑制剂具有抑制 ACE 活性的作用, 因此 ACE 被认为是控制高血压的最有效的方法之一。

自 1977 年开发设计了化学合成的 ACE 抑制剂卡托普利以来, 人工合成的 ACE 抑制剂已得到医学界的普遍认可。然而, 人工合成 ACE 抑制剂在临床应用过程中往往会产生如咳嗽等副作用^[1]。因此, 寻找天然、安全的食物来源的 ACE 抑制剂来预防和治疗高血压引起了广大科学工作者的极大关注, 食物蛋白源 ACE 抑制肽即是这样一类降血压功能因子, 由于酶解法具有生产安全性高、能在温和的条件下进行定位水解分裂产生大量的短肽, 生产时间短, 水解过程易控制, 价廉易于推广的优点, 因此该法应用较为普遍。研究表明, 很多源于食物源蛋白如酪蛋白^[2]、乳清蛋白^[3]、大豆蛋白^[4]、谷物蛋白^[5]及鱼蛋白^[6]等水解物中已经陆续分离得到很多天然的 ACE 抑制剂。

蓝圆鲹作为一种低值海洋鱼类, 其形体小、产量

大、营养丰富, 有很大的开发价值。但由于缺少有效的加工方法而大都被加工成饲料、鱼糜和休闲食品等, 导致产品附加值低, 蛋白质资源没有充分利用^[7,8]。

本文以蓝圆鲹(*Decapterus maruadsi*)鱼肉蛋白为原料, 选用 6 种蛋白酶在各自适宜的条件下酶解制备蓝圆鲹降血压肽, 并采用超滤技术对酶解产物中活性组分进行初步分离富集, 为开发新的生物活性肽, 提高蓝圆鲹蛋白质的利用率以及为蓝圆鲹的深加工提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL)及血管紧张素转化酶(ACE)购自 Sigma 公司等。碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶由南宁庞博生物技术公司提供; 其他化学试剂为国产色谱纯或分析纯; 蓝圆鲹购于广西北海鱼市批发市场。

收稿日期: 2012-02-20; 修回日期: 2012-05-03

基金项目: 广西科技攻关项目(桂科攻 0992025-17; 10123008-20)

作者简介: 舒冰(1986-), 女, 湖北黄冈人, 硕士研究生, 研究方向: 生物加工与分离纯化, 电话: 0771-3272702, E-mail: shubingice@126.com; 廖丹葵, 通信作者, 教授, 博士生导师, 研究方向为精细化工、生物化工, E-mail: liaodk@gxu.edu.cn

A-88 型组织捣碎匀浆机, 江苏金坛市医疗仪器厂; 4K15 型低温高速离心机, Sigma 公司; Aglient 1100 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; Labscale 小型切向流仪, 美国 Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 酶解工艺

将冷冻的蓝圆鲈解冻后去头尾、骨架后匀浆, 将匀浆液于 75℃ 条件下干燥后, 再将其粉碎, 过 20 目筛后测定鱼粉蛋白质含量。取含一定质量蛋白质的鱼粉, 按料水比混合后煮沸 15 min, 冷却至酶解温度并调至酶解 pH, 加入一定量的酶启动反应。在恒温下不断加入碱或酸溶液以维持体系 pH 恒定, 酶解结束后调 pH 至中性, 煮沸 10 min 将酶灭活, 将酶解产物在 4℃、6 000 r/min 的条件下离心 10 min, 取上清液备用。

1.2.2 水解度(DH)的测定

水解度的测定, 采用 pH-stat 滴定法^[9]。

1.2.3 活性反应液的制备与检测

参考 Cushman 等的检测原理, 采用 HPLC 法检测样品的体外抑制活性^[10]。

1.2.4 酶解条件优化

以木瓜蛋白酶和蓝圆鲈蛋白为原料进行酶解, 分别考察酶用量、酶解温度、pH 值及底物浓度对水解度和抑制率的影响。

1.2.5 降血压肽的初步分离

选用 10 kDa 和 5 kDa 的超滤膜对酶解液进行初步分离, 测定分离后不同组分对 ACE 的抑制活性及各滤液蛋白回收率。

2 实验结果与分析

2.1 不同酶解产物的活性

选用 6 种蛋白酶对蓝圆鲈蛋白进行酶解, 相同质量酶解产物对 ACE 的抑制效果如图 1 所示。

由图 1 可知各种蛋白酶的酶解产物对 ACE 均有抑制作用, 其中木瓜蛋白酶酶解产物对 ACE 的抑制效果较理想, 碱性蛋白酶的酶解产物对 ACE 的抑制效果最小, 这在酶解其他蛋白质制备降血压肽的研究中也有类似结果^[11-12], 说明蓝圆鲈蛋白经上述 6 种蛋白酶酶解后均可产生具有抑制 ACE 活性的片段, 但由于酶的专一性不同, 使得产生的肽片段种类和数量存在差异, 导致酶解产物对 ACE 的抑制效果相差较大, 因此选用木瓜蛋白酶为制备蓝圆鲈降血压

肽的酶解用酶。

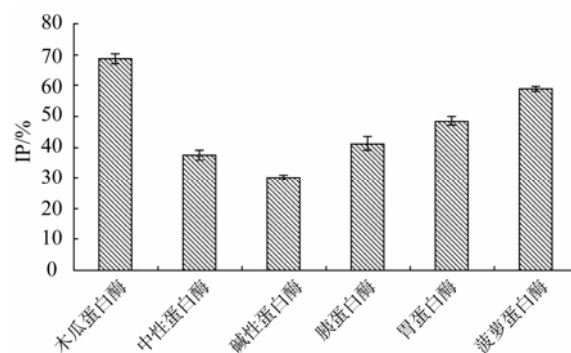


图 1 6 种蛋白酶酶解产物的抑制活性

Fig. 1 The ACE inhibitory activity of six kinds of hydrolysates

2.2 木瓜蛋白酶酶解蓝圆鲈蛋白工艺优化

2.2.1 水解度(DH)与抑制率(IP)的关系

蓝圆鲈蛋白在不同水解度下的酶解产物对 ACE 抑制效果如图 2 所示。

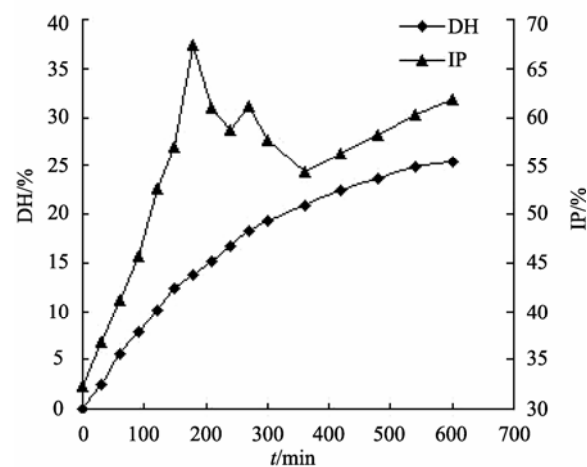


图 2 水解度与抑制率的关系

Fig. 2 The diversification for DH and ACE inhibitory ratio

由图 2 知, 随着蓝圆鲈蛋白酶解时间的延长, 水解度逐渐增大, 酶解产物对 ACE 的抑制率随水解度的增加而增大, 在水解度为 13.7% 时达到最大, 随后水解产物对 ACE 的抑制率呈降低趋势, 可能是由于水解初始阶段生成的具有 ACE 抑制活性的肽增加, 表现为随水解度的增大, 酶解产物对 ACE 的抑制活性增强, 随着水解的继续进行, 具有 ACE 抑制活性的肽被进一步水解成无活性或活性较小的短肽或氨基酸, 从而表现出总体对 ACE 的抑制活性降低^[13], 并且蛋白肽的水解度与其对 ACE 抑制率没有严格的相关性, 即水解度高

抑制活性不一定高^[14]。为确保酶解产物具有较好的 ACE 抑制活性, 确定本实验的水解度应控制在 13.0%~16.0% 之间, 酶解时间不超过 240 min。

2.2.2 初始酶用量对水解度的影响

在初始底物浓度为 20 g/L, 温度为 55 °C, pH 为 7.0, 水解时间为 4 h 的条件下, 改变初始酶加入量, 水解度随酶用量的变化如图 3 所示。

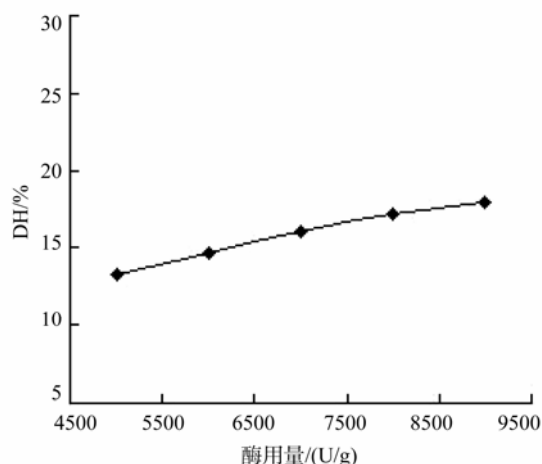


图 3 酶用量对水解度的影响

Fig. 3 Effect of different initial enzyme concentrations on DH

由图 3 可知, 在酶用量较低时, DH 随着酶用量的增加而增大, 这是因为在底物浓度一定时增加酶用量, 能有更多的酶活性位点与底物结合, 反应速率增加, 当酶用量增加到 7 000 U/g 时水解度增加的速度变缓慢, 此时底物与酶的结合几乎已经达到饱和状态, 部分酶不能与底物结合, 因此, 酶解工艺中初始酶用量选择为 7 000 U/g。

2.2.3 初始底物浓度对水解度的影响

在初始酶用量为 7 000 U/g, 温度为 55 °C, pH 为 7.0, 水解时间为 4 h 条件下, 考察初始底物浓度对水解度的影响, 结果如图 4 所示。

由图 4 知, DH 随底物浓度增大而减小, 是由于在酶用量一定时, 底物浓度增加溶液黏度增大, 使得酶的扩散和传质受到影响, 而当底物浓度增大到 30 g/L 时, 在固定时间内达不到高抑制率要求的水解度范围, 因此选择初始底物浓度为 25 g/L。

2.2.4 温度对水解度的影响

在初始酶用量为 7 000 U/g, 底物浓度为 25 g/L, pH 为 7.0, 水解时间为 4 h 条件下, 不同酶解温度对水解度的影响如图 5 所示。

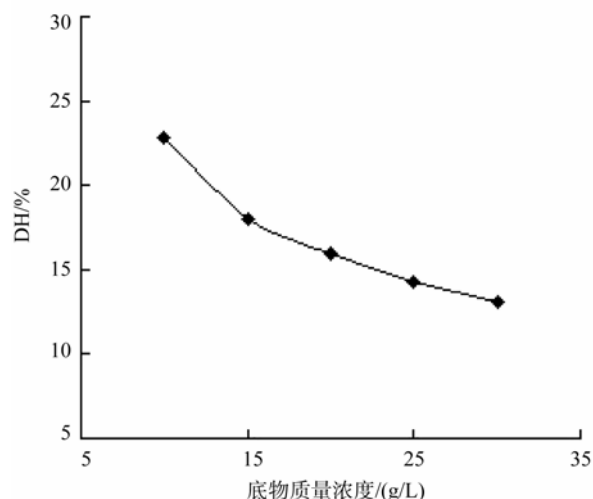


图 4 底物浓度对水解度的影响

Fig. 4 Effect of different initial substrate concentrations on DH

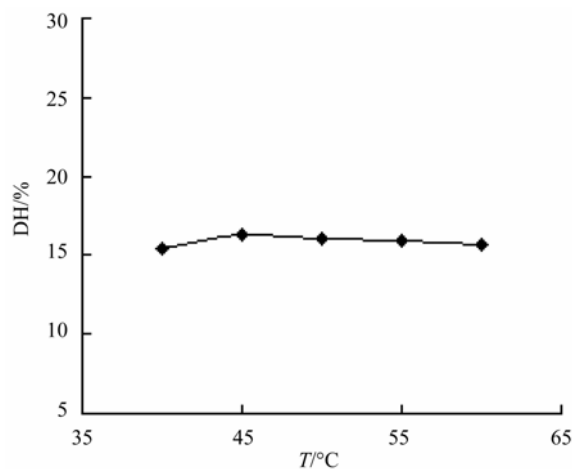


图 5 温度对水解度的影响

Fig. 5 Effect of different temperatures on DH

温度对酶促反应速度的影响是温度上升时, 反应速度加快, 随着温度的升高, 酶活性开始受到抑制, 催化速度开始下降^[15]。由图 5 知, 酶在 45 °C 水解度较其他温度的水解度高, 为使酶作用保持高效率则选择 45 °C 为酶解温度。

2.2.5 pH 对水解度的影响

在酶用量为 7 000 U/g, 底物浓度为 25 g/L, 温度为 45 °C 的条件下, 考察 pH 对水解度的影响。结果如图 6 所示。

不同 pH 值不仅可以改变酶的空间构象, 使酶发生可逆或不可逆失活, 亦可改变底物的解离状态, 影响酶分子活性部位上有关基团的解离, 从而影响底物与酶的结合, 同时, pH 可决定维持酶空间结构的有关基团的解离, 影响酶活性部位的构象, 进而

影响酶活性^[15]。图 6 显示, 在 pH 偏酸性时酶的水解度较大, 随着 pH 的增大, 水解度降低, 为方便后续工艺中的除盐步骤, 所以选择酶解 pH 为 7.0。

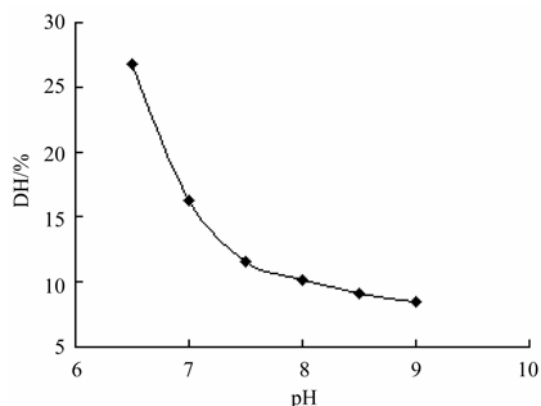


图 6 pH 对水解度的影响

Fig. 6 Effect of different pH values on DH

2.3 超滤前后多肽回收率及抑制活性

取蛋白质浓度为 22.4 mg/L 的酶解液 500 mL, 在 pH 为 7.0 的室温条件下, 分别选用 10 kDa 和 5 kDa 的超滤膜超滤至截流液不大于 50 mL, 测定超滤前后各部分滤液的 ACE 抑制活性及蛋白质回收率, 结果如表 1 所示。

表 1 超滤后不同部分滤液的 ACE 抑制活性

Tab. 1 ACE Inhibitory activity of different ultrafiltrating solutions

超滤液种类	ACE 抑制率(%)	蛋白质回收率(%)
酶解液	51.26	100
10 kDa 渗透液	62.71	31.90(以酶解液为基准)
5 kDa 渗透液	88.47	8.07(以酶解液为基准)

由表 1 可知, 酶解液经 10 kDa 和 5 kDa 滤膜超滤后均可实现对酶解产物中活性组分的分离富集。其中, 5 kDa 渗透液中活性成分对 ACE 的抑制率可高达 88.47%, 较酶解液活性提高了 1.72 倍, 而已有研究表明, 大多数 ACE 抑制肽由 2~12 个氨基酸组成, 个别由 15 个氨基酸组成^[16], 其分子质量范围约 3kDa 以下, 故用 5 kDa 的超滤膜分离是合适的, 且该结果与目前很多超滤能够有效富集降血压肽活性部分的研究结论相似^[17,18]。由此可见, 活性组分主要由分子质量小于 5 kDa 的肽组成, 可通过超滤将酶解液中活性较高的部分进行有效富集。

3 结论

(1) 比较了 6 种蛋白酶酶解蓝圆鲐鱼肉蛋白的酶解产物对 ACE 的抑制活性, 其中木瓜蛋白酶酶解产物对 ACE 的抑制活性最大。考察了木瓜蛋白酶酶解蓝圆鲐鱼肉蛋白水解度与抑制率的关系, 确定水解度在 13.0%~16.0%之间酶解产物具有较好的 ACE 抑制活性, 当水解度为 13.7%时酶解产物的 ACE 抑制活性最高为 67.4%。

(2) 考察了初始酶用量、初始底物浓度、酶解温度以及 pH 值对水解度的影响, 确定了适宜的水解条件为: 初始酶用量为 7 000 U/g, 初始底物浓度为 25 g/L, 酶解温度为 45℃, pH 为 7.0, 酶解时间为 240 min, 此时水解度为 16.0%, 酶解产物对 ACE 具有较好的抑制活性。

(3) 利用超滤对酶解产物中活性组分进行初步分离和富集, 表明产物中高活性组分主要富集于 10 kDa 和 5 kDa 的渗透液中, 而 5 kDa 渗透液中活性成分对 ACE 的抑制率最高可达 88.47%, 说明酶解液中活性组分主要由分子量小于 5 kDa 的肽组成。

参考文献:

- [1] Sang-Hoon Lee, Zhong-Ji Qian, Se-Kwon Kim. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chemistry, 2010, 118: 96-112.
- [2] Marta Miguel, María A Manso, Mercedes Salaices, et al. Vascular effects and antihypertensive properties of kappa-casein macropeptide[J]. International Dairy Journal, 2007, 17(12): 1473-1477.
- [3] Vanessa Vermeirssen, John Van Camp, Willy Verstraete. Fractionation of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein in vitro gastrointestinal digests [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005, 85(3): 399-405.
- [4] Wu Jianping, Ding Xiaolin. Hypertensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. 49(1): 501-506.
- [5] Rotimi E Aluko, Erasmus D Monu. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates[J]. Journal of Food Science, 2003, 68(4): 1254-1258.

- [6] Ali Bougatef, Naima Nedjar-Arroume, Ahmed Barkia, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle(*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 350-356.
- [7] 崔春, 赵谋明, 林伟峰, 等. 蓝圆鲹快速自溶机理研究[J]. 食品工业科技, 2005, 26(2): 85-87.
- [8] 闫发青. 低值水产品的综合开发利用[J]. 中国水产, 2010(06): 67-68.
- [9] Marquez M C, Vazquez M A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 1999, 35: 111-117.
- [10] 张政委, 刘旭辉, 廖丹葵, 等. 酶解马氏珠母贝肉制备降压肽工艺条件优化[J]. 海洋科学, 2008, 32(8): 25-29.
- [11] 韩飞, 于婷婷, 周孟良. 大豆降压肽的生产工艺研究[J]. 食品科学, 2008, 29 (11): 369-374.
- [12] 张瑞东, 迟玉杰, 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.
- [13] 管晓, 姚惠源. 燕麦麸蛋白 ACE 抑制肽的制备及性质研究[J]. 中国粮油学报, 2007, 22 (6): 58-63.
- [14] Chiang W D, Tsou M J, Chu Y H. Angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from soy protein hydrolysate and produced by using membrane reactor[J]. Food Chem, 2006, 98: 725-732.
- [15] 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002, 378-379.
- [16] Robert M C, Razaname A, Mutter M, et al. Identification of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from sodium caseinate hydrolysates produced by *Lactobacillus helveticus* NCC 2765[J]. J Agr Food Chem, 2004, 52(23): 6923-6931.
- [17] 张艳萍, 戴志远, 张虹. 紫贻贝酶解物中降压肽的超滤分离[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(9): 46-51.
- [18] 张绵松, 孟秀梅, 袁文鹏, 等. 海蜇血管紧张素转化酶抑制肽的超滤分离[J]. 食品与药品, 2010, 12(1): 20-23.

Study on technology of antihypertensive peptides production from *Decapterus maruadsi* protein with enzymatic hydrolysis

SHU Bing, SUN Jian-hua, WU Shan-guang, ZHAO Zhong-xing, LIAO Dan-kui
(School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

Received: Feb., 20, 2012

Key words: hydrolyze; *Decapterus maruadsi*; protein; antihypertensive peptides

Abstract: The protein from *Decapterus maruadsi* was hydrolyzed by six different proteolytic enzymes in their optimal conditions. The inhibition percent (IP) of Angiotensin I-converting enzyme (ACE) by the hydrolysates was examined with high performance liquid chromatography. Results showed the papain was the best enzyme for producing ACEI. When the degree of hydrolysis (DH) was 13.7%, the inhibition of ACE by the hydrolysate reached as high as 67.4%. Further on, the influence of hydrolysis time, initial enzyme concentrations ([E]), initial substrate concentrations ([S]), hydrolysis temperatures and pH values was investigated. Results showed that the optimal condition for producing ACEI was as follows: [E] at 7000 U/g-Pro, [S] at 25 g/L, hydrolysis temperature at 45°C, pH at 7.0 and hydrolysis time in 240 minutes. Then ultrafiltration technology was used to separate and enrich the active part of hydrolysates. Results showed that the higher active part of the hydrolysates can be enriched in the penetrating fluid of both 10 and 5 KDa. It was also found that the higher active hydrolysates were mainly lower than 5 KDa with an ACE inhibition rate of 88.47%.

(本文编辑: 康亦兼)