

# 酶解马氏珠母贝肉制备降血压肽工艺条件优化

张政委<sup>1</sup>, 刘旭辉<sup>1,2</sup>, 周俊峰<sup>1</sup>, 吴宁熙<sup>1</sup>, 童张法<sup>1</sup>, 廖丹葵<sup>1</sup>

(1. 广西大学 化学化工学院, 广西 南宁 530004; 2. 广西河池学院 生化系, 广西 宜州 546300)

**摘要:** 以马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*) 肉为原料, 选用 6 种蛋白酶在各自适宜的条件下进行酶解, 采用 HPLC 法分析酶解产物对血管紧张素转换酶 (ACE) 的抑制活性 (IP), 筛选出碱性蛋白酶为其制备的最佳酶种类, 并确定了水解度为 21% 时, 产物具有较好的抑制活性。在此基础上, 分别考察了加酶量, 底物浓度, 酶解温度及 pH 对水解度的影响。结果表明: 当加酶量为 0.175 g/L, 底物浓度为 35 g/L, 温度为 45℃, pH 为 9.5, 水解时间 240 min 为酶解最适宜工艺条件。通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定分子量分布, 表明酶解产物中主要为 14.4 ku 以下的多肽分子。

**关键词:** 酶解; 马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*); 降血压肽; 工艺条件优化

中图分类号: S98

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)02-0025-05

高血压是目前全球范围内重大的公共卫生问题之一, 被认为是引发动脉硬化及心肌梗塞等心血管疾病与肾衰竭的主要因素。目前, 治疗高血压的方法主要以传统化学合成的药物治疗为主, 但由于其易引起低血压、心动过缓、呕吐等副作用<sup>[1]</sup>, 因此, 近年来研究人员把目光转向于更安全的降血压药物上来, 其中来源于食物蛋白的具有降血压活性的血管紧张素转换酶抑制肽 (Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides, ACEI) 越来越引起重视, 由于其安全性高且往往附带如免疫促进、减肥及易消化吸收等生理功能, 因此备受人们青睐, 成为生物活性肽研究领域的热点之一<sup>[2]</sup>。目前, 人们已先后从多种动物蛋白和植物蛋白的酶解产物或发酵制品中分离得到血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制肽, 并通过动物实验证明了具有良好的降压效果, 这其中包括中国毛虾 (*Acetes chinensis*)<sup>[3]</sup>、太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)<sup>[4]</sup> 等动物蛋白。

马氏珠母贝 (*Pinctada martensii*), 又称合浦珠母贝, 是中国海产珍珠养殖的主要贝类, 其蛋白质含量丰富, 营养价值高<sup>[5]</sup>。近年来由于珍珠养殖业的快速发展, 珠母贝肉数量已相当可观, 仅广西、广东、海南三省的年产量就有数千吨之多, 但其主要用于饲料、调味品、罐头等, 价格低廉, 经济附加值低。因此, 开发具有降血压作用的马氏珠母贝功能食品, 这对提升其经济附加值具有重大意义。本研究以马氏珠母贝肉为原料, 通过用 6 种蛋白酶在各自适宜的条件下水解制备降血压肽, 筛选出制备马氏珠母贝降血压肽的最佳蛋白酶种类, 并对其工艺条件进行优化, 以获得具有较好体外降压效果的产品。

## 1 实验材料与方法

### 1.1 材料和仪器

马氏珠母贝肉购于广西北海珍珠养殖基地; 马尿酸、马尿酸组氨酸亮氨酸 (HHL)、血管紧张素转化酶 (ACE) 分别购于 Sigma 公司; 各种蛋白酶见表 1, 其中 Flavorzyme 风味蛋白酶由诺维信 (中国) 公司惠赠, 其他化学试剂为国产色谱纯或分析纯。

A288 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; Agilent 1100 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; DYY26C 型电泳仪, 北京六一仪器厂。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酶解工艺

贝肉解冻后, 去足丝洗净, 并匀浆至糊状。准确称取蛋白质含量为 3.5 g 的贝肉浆, 加水稀释至所需浓度, 搅匀。煮沸 15 min, 冷却至室温后, 用 2.0 mol/L NaOH 或 HCl 调至各酶作用适宜 pH 范围和作用温度 (见表 1), 并加入一定量酶启动反应。水解过程中加入 0.1 mol/L NaOH 或 HCl 标准溶液维持体系 pH 恒定, 水解结束后, 调 pH 至中性, 加热至 100℃ 灭酶 15 min, 酶解液在 5℃、8 000 r/min

收稿日期: 200802204; 修回日期: 200820216

基金项目: 广西科学基金资助项目 (桂科攻 081500621, 桂科自 0728237); 广西大学基金资助项目 (X071029)

作者简介: 张政委 (1982), 男, 浙江温州人, 硕士研究生, 研究方向: 精细化工, 电话: 07723272702, E-mail: zw0303@163.com; 廖丹葵, 通讯作者, 教授, 硕士生导师, E-mail: liaodk@gxu.edu.cn

表 1 实验所选用的酶类

Tab. 1 Protease for hydrolyzing *Pinctada martensii* protein

酶种类	适宜 pH	适宜温度 (e )	生产厂家
碱性蛋白酶	9.0~ 10.0	45~ 55	南宁市庞博生物技术公司
酸性蛋白酶	2.5~ 4.0	45~ 55	北京东盛华强生物技术公司
木瓜蛋白酶	5.0~ 7.0	50~ 60	广州远天酶制剂厂
胰蛋白酶	7.2~ 8.4	35~ 40	上海源聚生物科技有限公司
胃蛋白酶	1.5~ 2.5	35~ 40	国药集团化学试剂有限公司
风味蛋白酶	6.0~ 7.0	50~ 55	诺维信(中国)公司

离心 10 min, 取上清液冷冻干燥后冷藏备用。

采用单因素实验法考察所选的蛋白酶酶解马氏珠母贝肉蛋白制备贝肉降血压肽时各因素的影响, 即在控制其他因素条件不变的情况下, 根据要求分别改变加酶量, 底物浓度, 酶解温度及 pH, 按上述方法进行酶解实验。

### 1. 2. 2 主要成分分析

总氮测定参照 GB / T 5009. 522003。

蛋白酶活力测定参照 SB/T 1031721999。

水解度 DH 采用 pH2stat 滴定法<sup>[6]</sup>。

溶液蛋白质含量测定采用紫外分光光度法<sup>[7]</sup>。

原料及酶解产物的分子质量分布采用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定<sup>[8]</sup>, 具体条件为: 浓缩胶质量分数为 5%, 分离胶质量分数为 12%, 蛋白质标准样与样品在同一条件下电泳, 凝胶用考马斯亮兰 R2250 染色 2 h, 用脱色液(乙醇 B 乙酸 B 蒸馏水= 25 B 10 B 65)脱色, 直到背景颜色变浅, 蛋白谱带清晰为止。

### 1. 2. 3 ACE 抑制活性测定

ACE 抑制活性测定参照 Cushman 等<sup>[9]</sup>提出的检测原理, 本文采用 HPLC 法<sup>[10]</sup>分析马氏珠母贝肉酶解产物的体外抑制活性。

色谱条件如下: Hypersil ODS C18 色谱柱 (U4. 0 mm @250 mm, 5 Lm), 柱温 30 e; 甲醇2水(体积比为 15 B 85, 含 0. 5% 三氟乙酸)为流动相, 流速 1. 0 mL/ min; 检测波长 228 nm。

## 2 结果与讨论

### 2. 1 酶的筛选

实验选用 6 种蛋白酶对马氏珠母贝肉进行水解, 相同剂量的各酶解产物对 ACE 的抑制效果如图 1 所示。

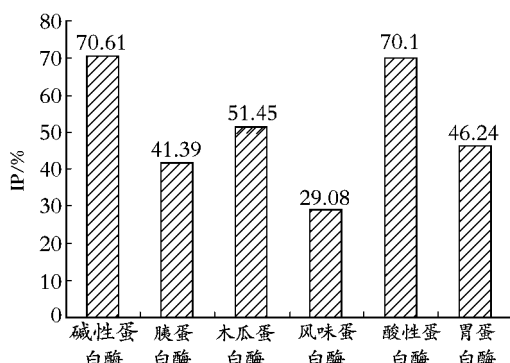


图 1 各蛋白酶酶解产物的 ACE 抑制活性

Fig. 1 The ACE inhibitory activity of 6 kinds of hydrolysates

由图 1 可知, 各种蛋白酶的水解物对 ACE 均有抑制作用, 其中碱性蛋白酶和酸性蛋白酶的水解物对 ACE 的抑制效果较理想, 风味蛋白酶的水解产物对 ACE 的抑制效果最小, 这在利用蛋白酶酶解大豆蛋白、小麦胚芽蛋白等其他种类蛋白质的研究中也具有类似的结果<sup>[11, 12, 13]</sup>, 说明马氏珠母贝肉经上述 6 种蛋白酶水解均可产生抑制 ACE 活性的肽片段, 但由于酶的特异性不同, 生成肽片的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, 这说明某些酶对马氏珠母贝蛋白可专一地产生较强 ACE 抑制活性肽类。

根据 Fujita 等<sup>[14]</sup>的研究结果, 当酶解产物对 ACE 具有体外抑制活性时, 为了确保酶解产物在进行动物体内实验时具有活性, 需对产物进行 ACE 的保温稳定性实验, 在保温稳定性实验结果中如果相同剂量的产物仍能保持对 ACE 抑制活性不变或增大时, 才能确保酶解产物的体外和动物体内实验结果的一致性, 因此本研究将上述 6 种酶解产物对 ACE 进行了保温稳定性实验<sup>[10]</sup>, 结果表明碱性蛋白酶的酶解产物对 ACE 的抑制活性增大而酸性蛋白酶对 ACE 抑制活性基本不变, 这表明碱性蛋白酶的酶解产物在体内对 ACE 的抑制效果有可能比酸性蛋白酶更好, 因此本实验确定选用碱性蛋白酶酶解

制备马氏珠母贝降血压肽。

## 2.2 碱性蛋白酶水解马氏珠母贝肉蛋白工艺条件优化

### 2.2.1 水解度与抑制率的关系

本实验分析了水解度(DH)随时间的变化以及不同水解度的酶解产物对 ACE 的抑制效果,结果如图 2 所示。

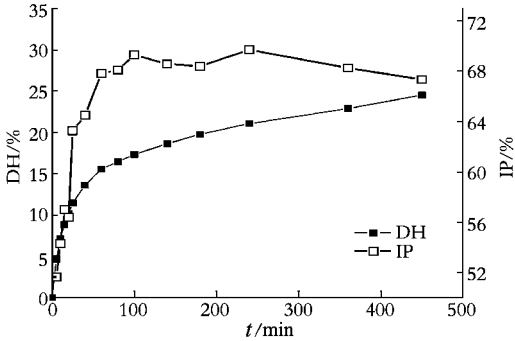


图 2 水解度与抑制率的关系

Fig. 2 The diversification for DH and ACE inhibitory ratio with time

由图 2 可知,随着时间的延长,水解度逐渐增大,当增大到一定程度时,曲线趋于平缓,而酶解产物对 ACE 的抑制率随水解度的增加而增大,在水解度为 21% 时达到最大,之后产物对 ACE 的抑制率出现降低趋势,原因可能是由于随着水解过程的进行,生成的具有降压作用的活性肽分子被进一步水解成无活性的短肽或氨基酸所致,因此,本实验确定水解度宜控制在 21% 左右,而水解时间约为 240 min 时,水解度即可达到要求,故最佳酶解时间确定为 240 min。

### 2.2.2 不同酶用量(E)时 DH 随时间的变化

改变酶用量(E),水解度随时间的变化结果如图 3 所示。

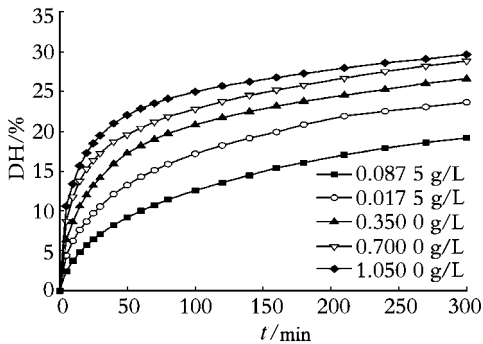


图 3 不同酶用量时 DH 随时间的变化

Fig. 3 Hydrolysis curves for different initial enzymes concentrations

从图 3 可知,随着 E 的增加,碱性蛋白酶水解马氏珠母贝肉蛋白的初速度加快,水解度增大,当达到一定酶用量时,反应均可使水解度达到 21%,且所需要的水解时间随着酶用量的增加而缩短。由 2.2.1

的结果可知,当水解度超过 21% 后,酶解产物对 ACE 的抑制活性并无提高,由于本酶解实验为间歇反应,实验所有蛋白酶为一次性使用,故宜采用较低酶浓度以降低生产成本,且在较低酶浓度条件下,产物的水解度易于控制,故选取酶用量为 0.175 g/L。

### 2.2.3 不同底物浓度(S)时 DH 随时间的变化

改变底物浓度(S),水解度随时间变化结果如图 4 所示。

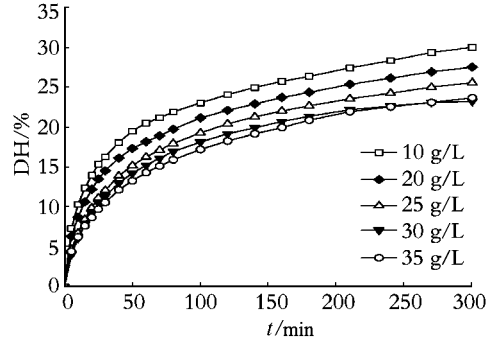


图 4 不同底物浓度时 DH 随时间的变化

Fig. 4 Hydrolysis curves for different initial substrate concentrations

从图 4 可知,酶用量一定时,底物浓度越小,相同时间内水解度 DH 越大,根据水解动力学中 DH 计算方程  $DH = \frac{1}{b} \ln[1 + abt]$  及  $A = k_2 \left( \frac{e_0}{S_0} - c_0 \right)^{[10]}$  可知,在恒温且 pH 不变时,当 S 增加,导致动力学参数 A 的减小,而水解度 DH 是与 A 成正比的,因此可知 DH 随着 S 的增加而减小,且由于底物浓度增加,溶液的黏度增大,使得酶的扩散和传质受到一定程度的影响,导致水解度降低,当 S 为 30, 35 g/L 时,相同的酶解时间其水解度均超过 21%,考虑到相同水解度时,底物浓度高的产出高,因此选用 35 g/L 为最适底物浓度。

### 2.2.4 不同温度时 DH 随时间的变化

改变水解温度,水解度随时间变化结果如图 5 所示。

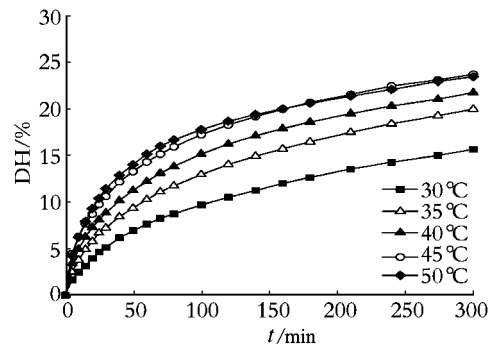


图 5 不同温度时 DH 随时间的变化

Fig. 5 Hydrolysis curves for different temperatures

由图 5 可知,相同时间内随温度上升,酶解的反

应速度加快, DH 随温度上升而增大, 在 30~ 45 e 时, 水解度随温度的增加较快, 但在 50 e 时, 水解度增大并不明显, 这可能是由于在该酶解温度下蛋白酶作用一段时间后一部分已渐渐失活, 从生产能耗和产物活性两方面考虑, 选取 45 e 为最适酶解温度。

### 2. 2. 5 不同 pH 时 DH 随时间的变化

改变 pH, 水解度随时间变化结果如图 6 所示。

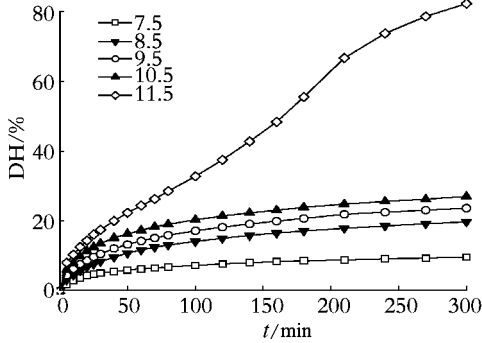


图 6 不同 pH 时 DH 随时间的变化

Fig. 6 Hydrolysis curves for different pH values

由图 6 可知, pH 在 7. 5~ 10. 5 之间, 随着 pH 的增大, 水解度依次增大。但在 pH 为 11. 5 时, 水解度急剧增加, 这是由于在强碱性条件下, 碱对贝肉蛋白水解所致。考虑到强碱条件会产生大量盐等不利因素, 选用 9. 5 为最适 pH。

### 2. 3 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

将本实验中的马氏珠母贝蛋白及其酶解产物用 SDS-PAGE 法测定其分子质量的变化, 其 SDS-PAGE 电泳图如图 7 所示。

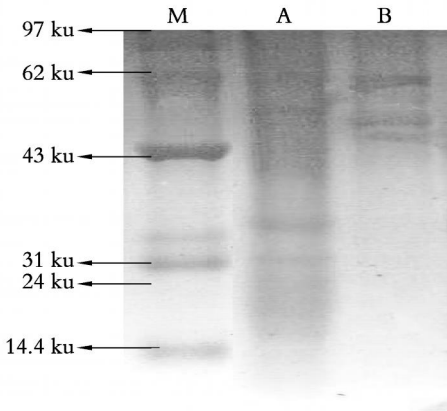


图 7 马氏珠母贝肉蛋白及酶解物 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 7 SDS-PAGE pattern of *Pinctada martensii* muscle and its hydrolysate

M. maker; A. 马氏珠母贝肉原料; B. 马氏珠母贝肉酶解产物

从图 7 中马氏珠母贝肉原料和酶解产物蛋白质分子质量分布可知, 原料中蛋白质分子质量分布范围较宽, 电泳图中明显可见的有 5 条分子质量带, 分子质量范围主要从 20 ku 至 100 ku 之间, 经酶解后,

原料中除部分 43~ 62 ku 的蛋白质分子未被酶解, 绝大部分蛋白质均被酶解成小于 14 ku 以下的小分子产物, 这说明碱性蛋白酶对马氏珠母贝肉蛋白的水解可以获得分子质量较小的多肽, 从而为进一步分离纯化低相对分子质量的降血压肽奠定了基础。

## 3 结论

本实验选用碱性蛋白酶、酸性蛋白酶等 6 种蛋白酶对马氏珠母贝肉进行酶法水解, 采用 HPLC 分析酶解产物的抑制活性, 筛选出碱性蛋白酶为制备马氏珠母贝肉降血压肽的酶种类, 并且采用单因素实验对碱性蛋白酶的水解最佳工艺条件进行了讨论, 确定了最佳酶解工艺参数为: 加酶量为 0. 175 g/L, 底物浓度为 35 g/L, 温度为 45 e, 最适 pH 为 9. 5, 水解时间 240 min, 此时水解度为 21%, 酶解物对 ACE 具有较好的抑制活性, 通过 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定其分子质量分布, 其水解产物大部分为 14. 4 ku 以下分子质量的多肽。

### 参考文献:

- [1] 安茂竹, 孙静, 高景芳, 等. 血管紧张素转换酶抑制剂的不良反应及防治[J]. 中国新药杂志, 1999, 8(5): 403-404.
- [2] Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality [J]. International Dairy Journal, 2006, 16: 945-960.
- [3] 付雪艳, 薛长湖, 宁岩, 等. 中国毛虾酶解多肽降压作用的初步探讨[J]. 海洋科学, 2005, 29(3): 20-24.
- [4] Je J Y, Park J Y, Jung W K, et al. Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas* [J]. Food Chemistry, 2005, 90: 80-84.
- [5] 章超桦, 吴红棉, 洪鹏志, 等. 马氏珠母贝肉的营养成分及其游离氨基酸组成[J]. 水产学报, 2000, 24(2): 18-24.
- [6] Adler N J. Control of proteolytic reaction and level of bitterness in protein hydrolysis processes [J]. J Chem Technol Biotechnol, 1984, 34: 215-222.
- [7] 张龙翔, 涨停芳, 李令媛. 生化实验方法和技术(第二版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997, 140-142.
- [8] 熊川男, 李伟, 李丹彤, 等. 贻贝凝集素生物活性的研究 [J]. 水产学报, 2007, 26(7): 400-404.
- [9] Cushman D W, Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung [J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20(7): 1637-1648.
- [10] 廖丹葵, 孙秀华, 万顺刚, 等. 酶法水解和筛选蛋黄蛋白质中的药物前驱型降血压肽 [J]. 精细化工, 2006,

23(8): 7572759, 792.

- [11] 吴建平, 丁霄霖. 大豆降压肽的研制(I) 生产高活性 ACEI 肽酶系的筛选 [J]. 中国油脂, 1998, 23(2): 49-51.
- [12] 辛志宏, 吴守一, 马海乐, 等. 从麦胚蛋白质中制备降血压肽的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 120-123.

- [13] Marquez M C, Vázquez M A. Modeling of enzymatic protein hydrolysis [J]. Process Biochemistry, 1999, 35: 1112-117.
- [14] Fujita H, Yoshikawa M. LKPNM: a prodrug type ACE2 inhibitory peptide derived from fish protein [J]. Immuno Pharmacology, 1999, 44: 123-127.

## Optimization technical conditions for preparing antihypertensive peptides (ACEI) from *Pinctada martensii* with alkali protease hydrolysis

ZHANG Zhengwei<sup>1</sup>, LIU Xu2hui<sup>1, 2</sup>, ZHOU Jun2feng<sup>1</sup>, WU Ning2xi<sup>1</sup>, TONG Zhang2fa<sup>1</sup>, LIAO Dan2kui<sup>1</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Chemistry and Life Science Department, Hechi University, Yizhou 546300, China)

Received: Feb., 04, 2008

Key words: hydrolyze; *Pinctada martensii*; antihypertensive peptides; optimal technological condition

**Abstract:** The protein from *Pinctada martensii* was hydrolyzed with six different proteolytic enzymes in their feasible conditions. The inhibition percent (IP) of hydrolysates to Angiotensin Converting enzyme (ACE) was detected with HPLC. While the degree of hydrolysis (DH) is 21% the hydrolysate with alkali protease was of the highest inhibition percent. Moreover, the dependence of DH on hydrolysis time at different initial enzyme concentrations ([E]), initial substrate concentrations ([S]), hydrolysis temperatures and pH values was investigated. The result showed that the optimized conditions for hydrolyzing *Pinctada martensii* muscle was as follows, hydrolysis time in 240min, [E] in 0.175 g/L, [S] in 35 g/L, hydrolysis temperature at 45 °C and pH 9.5. The range of hydrolysis molecular weight was lower than 14.4 ku using SDS-PAGE gel electrophoresis.

(本文编辑: 康亦兼)