龙须菜蛋白酶解制备 ACE 抑制肽的工艺优化

余 虹，操德群，何艳丽，徐年军*
（宁波大学 海洋学院 浙江省海洋生物工程重点实验室，浙江 宁波 315211）

摘要：通过酶解法酶解龙须菜蛋白制备 ACE 抑制肽，考察风味蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶的龙须菜蛋白酶解液对 ACE 抑制活性，并对酶解工艺进行优化。最后选出胰蛋白酶为 ACE 抑制肽的适宜蛋白酶，在单因素的基础上，采用响应面分析法对胰蛋白酶的酶解工艺进行优化。结果表明：最佳酶解工艺为：pH 为 8.0，酶底比为 6%，温度为 35℃，在此条件下，制备的多肽（2.0 mg/mL）对 ACE 的抑制率为 72.37%。

关键词：龙须菜；胰蛋白酶；响应面分析法；ACE 抑制肽
中图分类号：S 985　**文章编号：**1673-1689(2019)02-0133-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.019

Optimization of Enzymatic Hydrolysis Conditions for Production of ACE Inhibitory Peptides

YU Hong，*CAO Dequn*，*HE Yanli*，*XU Nianjun**
（Key Laboratory of Marine Biotechnology of Zhejiang Province，School of Marine Science，Ningbo University，Ningbo 315211，China）

Abstract：ACE inhibitory peptides are prepared by enzymatic hydrolysis of protein of marine red algae *Gracialriopsis lemaneiformis*. The hydrolytic activities of four kinds of enzymes of flavourzyme，alkaline protease，trypsin and papain are investigated，and the inhibitory activity of their enzymatic hydrolysates on ACE，and optimization of the digestion process are studied in the paper. Trypsin is considered as the suitable enzyme to prepare ACE inhibitory peptides. Response surface experiments are used to optimize the enzymolysis technology of trypsin based on the results of single factor experiments. Results show that the optimum condition is pH at 8.0，enzyme dosage at 6%，reaction temperature at 35 ℃. Peptides （2.0 mg/mL）prepared under the optimal condition shows a ACE inhibitory activity of 72.37%.

Keywords：*Gracilariopsis lemaneiformis*，trypsin，response surface methodology，ACE inhibitory peptides

收稿日期：2016-05-16
基金项目：宁波市科技计划项目(2016C10034)。
*** 通信作者：**徐年军(1973—)，男，博士，研究员，博士研究生导师，主要从事海洋生物活性物质研究。E-mail：xunianjun@nbu.edu.cn
引用本文：余虹，操德群，何艳丽，等. 龙须菜蛋白酶解制备 ACE 抑制肽的工艺优化[J]. 食品与生物技术学报，2019，38(02)：133-139.

龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)是一种有较大经济价值的海洋红藻。龙须菜属于温暖性海藻,最适生长温度为12~22 ℃,主要分布在我国山东半岛和辽宁沿海[1]。经过选育获得的龙须菜981品系目前已经在福建、广东、山东大面积养殖。龙须菜生长周期短,每年的春秋两季为龙须菜的快速生长期。龙须菜藻体的琼胶含胶量高达20%~30%,是目前江蓠属中最好的琼胶来源[2-3],经过碱改性的琼胶可以与石花菜媲美:凝胶强度高,半乳糖含量高,同时硫酸根含量低。龙须菜是一种可以大规模培养的物种,在我国已经成为继海带、紫菜之后的第三大栽培海藻[4]。目前,龙须菜活性物质的研究主要集中在藻红蛋白和多糖提取物上,对于其活性肽的应用研究极少。

血管紧张素转化酶(Angiotensin Converting Enzyme,ACE)是一种糖蛋白,是膜结合的二羧基酶,含有Zn^{2+}和Cl^-,主要存在于人体组织及血浆中[5-8]。ACE是多功能酶,在激肽释放酶-激肽系统(Kallikrein-Kinin System,KKS)和体内肾素-血管紧张素系统(Renin-Angiotensin System,RAS)中对血压调节有着重要的作用[9-13]。如果抑制了ACE的活性,就能有效的预防高血压,现在广泛研究的降血压肽就是ACE抑制剂[14-15]。

本试验采用胰蛋白酶酶解龙须菜粗蛋白制备多肽,并以多肽对ACE的抑制率指标对酶解工艺进行优化,为龙须菜的高效利用开发新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

龙须菜:产自于浙江温州;碱性蛋白酶Alcalase:诺维信公司;风味蛋白酶Flavourzyme:诺维信公司;木瓜蛋白酶Pepsin、胰蛋白酶、ACE:Sigma公司。

实验仪器:FD-1C-80冷冻干燥机(北京博医康);Sorvall ST 16R冷冻离心机(赛默飞世尔);SpectraMax 190全波段酶标仪(Molecular Devices,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 粗蛋白提取 新鲜龙须菜(浙江温州)→自来水冲洗(快速)→纯水清洗(快速)→沥干水分→-20 ℃冻藏→冷冻干燥→剪碎→粉碎→过筛→龙须菜粉末。

龙须菜粉末→0.01 mol/L PB缓冲液(pH 7.0,固液比为1:20)→-20 ℃冷冻6 h→常温水浴解冻后4 ℃低温浸提12 h(上述步骤重复4次)→浸提液减压抽滤后低温离心(4 ℃,8 000 r/min,15 min)→上清液-20 ℃冻藏→冷冻干燥→龙须菜粗蛋白。

1.2.2 酶解液对ACE抑制活性的测定 根据文献[16-17]计算ACE抑制率。

空白对照组:于96孔石英酶标板中将100 μL FAPGG溶液和40 μL Tris-HCl缓冲液混合;

实验组:于96孔石英酶标板中将100 μL FAPGG溶液和40 μL ACE抑制肽溶液混合;

然后将其置于37 ℃下孵育5 min,在分别加入60 μL ACE溶液,启动反应(37 ℃下),酶标板振荡10 s后,用酶标仪于340 nm处检测30 min,以时间为横坐标,吸光度为纵坐标作图,分别计算出空白对照组和实验组的斜率(取20~30 min数据),求出ACE抑制率,其中ACE抑制率公式为

$$\text{ACE抑制率}(\%)=\left(1-\frac{\text{实验组斜率}}{\text{对照组斜率}}\right)\times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 酶的筛选 将龙须菜蛋白用0.01 mol/L PB缓冲液(配成各自酶的适宜pH)进行酶解实验见表1。其中底物质量浓度为20 mg/mL,酶底比为4%。

表1 蛋白酶酶解条件

Table 1 Condition of enzymatic hydrolysis

酶的种类	温度/℃	pH	时间/h
胰蛋白酶	37	8.0	8
风味蛋白酶	50	6.0	8
木瓜蛋白酶	37	6.0	8
碱性蛋白酶	50	10.0	8

酶解反应结束后,于100 ℃水浴15 min,之后迅速冰浴30 min,再于4 ℃,8 000 r/min下冷冻离心15 min,上清液-20 ℃冻藏,冷冻干燥,冻干粉-20 ℃下保存,备用。

分别检测4种蛋白酶酶解液冻干粉(酶解得到的ACE抑制肽)的ACE抑制活性和水解度(每个样品做3次平行检测),筛选出适合的酶,然后用该酶做单因素以及响应面优化实验。

1.2.4 单因素试验 以ACE抑制率为指标,考察pH、酶解温度、酶解时间、底物质量浓度、酶与底物比5个因素对酶解效果的影响。

考察pH的影响:固定底物浓度为20 mg/mL,酶底比为4%,酶解温度为37 ℃,酶解时间为8 h,设

定酶解 pH 分别为 6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5,考察酶解 pH 对 ACE 抑制活性的影响。

考察温度的影响:固定酶解 pH 为 8.5,底物质量浓度为 15 mg/mL,酶底比为 4%,酶解时间为 8 h,设定酶解温度分别为 30、33、37、40、45、50 ℃,考察酶解温度对 ACE 抑制活性的影响。

考察时间的影响:固定酶解 pH 为 8.5,底物浓度为 15 mg/mL,酶底比为 4%,酶解温度为 37 ℃,设定酶解时间分别为 1、2、4、6、8、10、12 h,考察酶解时间对 ACE 抑制活性的影响。

考察底物质量浓度的影响:固定酶解 pH 为 8.5,酶底比为 4%,酶解温度为 37 ℃,酶解时间为 8 h,设定底物质量浓度分别为 5、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0 mg/mL,考察底物质量浓度对 ACE 抑制活性的影响。

考察酶与底物比的影响:固定酶解 pH 为 8.5,底物质量浓度为 15 mg/mL,酶解温度为 37 ℃,酶解时间为 8 h,设定酶底比分别为 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0%,考察酶底比对 ACE 抑制活性的影响。

1.2.5 响应面优化试验 在单因素试验基础上,对显著性影响因素进行响应面试验设计优化酶解工艺。采用 Design-Expert 8.0 对实验数据进行回归分析,优化酶解工艺。在计算得到最佳工艺后,进行 3 组平行实验验证响应面模型的可靠性。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的筛选

由图 1 可知,在各自适宜的条件下,胰蛋白酶的酶解效率较高,相比之下,木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶和风味蛋白酶的酶解作用显著低于胰蛋白酶($P<0.05$)。仅从 ACE 抑制率来看,胰蛋白酶适合酶解龙须菜粗蛋白。

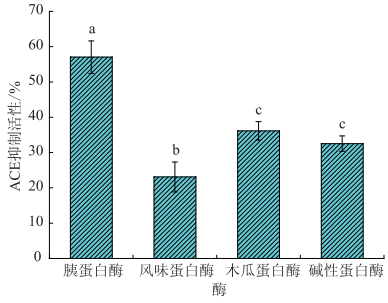


图 1 4 种酶解液 ACE 抑制活性

Fig. 1 ACE inhibitory activity of 4 kinds of enzymatic hydrolysates

2.2 单因素试验结果

2.2.1 pH 值对 ACE 抑制活性的影响 从图 2 看出,pH 对龙须菜酶解液的 ACE 抑制率影响很大,在 PH 为 8 以内,ACE 抑制率随着 pH 值升高而明显增加($P<0.05$);而在 pH 为 8 之后,ACE 抑制率变化不再明显($P>0.05$)。产生这种现象的原因是胰蛋白酶是蛋白质,过酸或过碱的环境会影响蛋白的活性[18]。所以制备 ACE 抑制肽优化试验选择最适宜 pH 8。

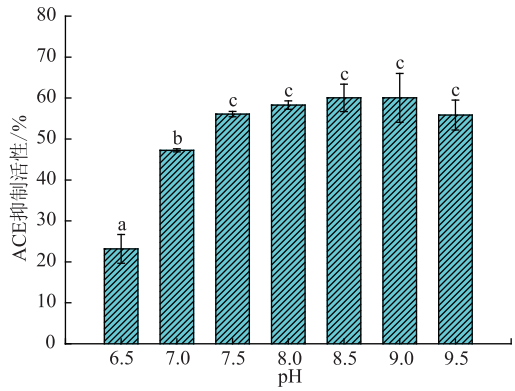


图 2 pH 值对 ACE 酶活性的影响

Fig. 2 Effect of pH on ACE inhibitory activity

2.2.2 酶解温度对 ACE 抑制活性的影响 由图 3 可知,酶解温度对龙须菜酶解液的 ACE 抑制率也有很大的影响,酶解液对 ACE 的抑制率呈先上升后下降的趋势,当温度达到 37 ℃之后,随着温度的升高,ACE 抑制率显著下降($P<0.05$),这可能是由于温度过高从而使胰蛋白酶失活,酶解效果不理想[19]。因此优化试验最佳值选择 37 ℃。

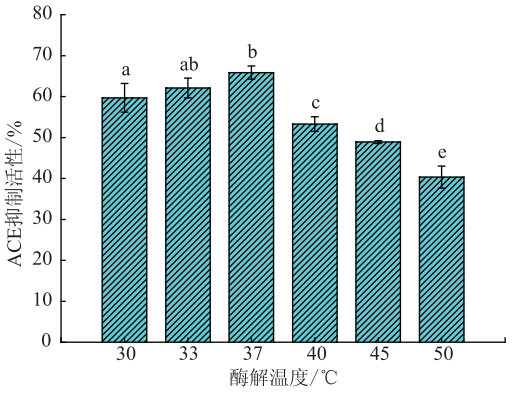


图 3 酶解温度对 ACE 酶活性的影响

Fig. 3 Effect of hydrolysis temperature on ACE inhibitory activity

2.2.3 酶解时间对 ACE 抑制活性的影响 图 4 显示的是酶解时间对龙须菜酶解液 ACE 抑制率的影

响,酶解时间对 ACE 抑制率的影响不大,在酶解时间 1~4 h 内,ACE 抑制率变化不明显(P>0.05)。当酶解时间达到 6 h 时,抑制率显著提高(P<0.05),可是随着时间的继续增加,抑制率又显著低于 6 h 时对 ACE 的抑制率(P>0.05),可能是底物浓度不够,反应已经达到平衡状态。

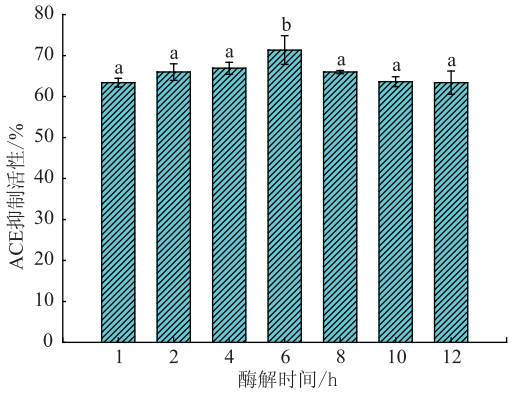


图 4 酶解时间对 ACE 酶活性的影响

Fig. 4 Effect of time on ACE inhibitory activity

2.2.4 *底物质量浓度对 ACE 抑制活性的影响* 由图 5 可知,底物质量分数在 5~15 mg/mL 时,ACE 抑制率呈现显著上升的趋势(P<0.05),当底物质量分数在 15~30 mg/mL 时,随着底物质量分数的升高,ACE 抑制率变化不明显(P>0.05)。当底物质量分数达到 15 时,ACE 抑制率达到最高值。

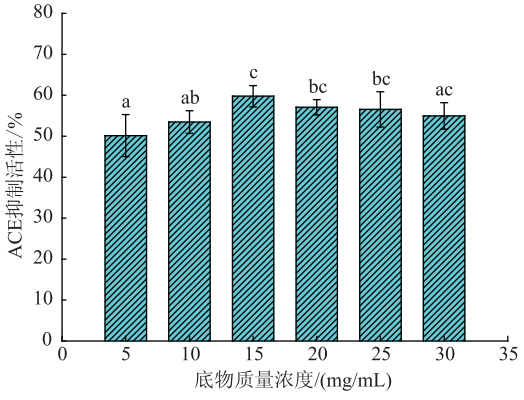


图 5 底物质量浓度对 ACE 酶活性的影响

Fig. 5 Effect of substrate concentration on ACE inhibitory activity

2.2.5 *酶底比对 ACE 抑制活性的影响* 由图 6 可以看出酶添加量与底物比对龙须菜酶解液的 ACE 抑制率的影响,随着酶添加量的增加,ACE 抑制率整体呈上升趋势,但是当酶与底物比达到 4.0%之后,随着酶与底物比的升高,ACE 抑制率增加不明显。所以优化试验选择 4.0%。

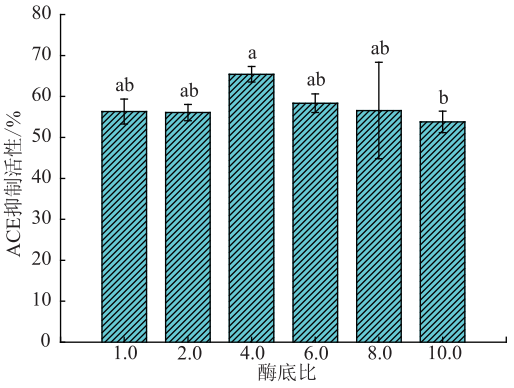


图 6 酶添加量对 ACE 酶活性的影响

Fig. 6 Effect of the adding quantity on ACE inhibitory activity

2.3 酶解工艺优化

根据单因素结果,综合 Box-Behnken 试验设计原理,固定底物质量浓度为 15 mg/mL,酶解时间为 6 h,选取酶解 pH(A),酶底比(B),酶解温度(C)这 3 个对 ACE 抑制活性影响较大的因素作为考察变量,进行三因素三水平的响应面试验,试验设计因素编码及水平见表 2。

表 2 酶解工艺 Box-Behnken 设计实验因素水平及编码

Table 2 Variables and their coded values used in the Box-Behnken design for optimizing the hydrolysis conditions

水平	pH	酶底比	酶解温度/℃
−1	7.5	2	34
0	8.0	4	37
1	8.5	6	40

响应面试验设计见表 2。具体响应面试验方案及结果见表 3。采用 design-expert 8.0 对结果进行分析,模型方差分析如表 4 所示。模型及失拟项的 P 值分别为 0.005 和 0.112 3,表明该模型为回归显著型。温度对 ACE 抑制率都有显著的影响。ACE 抑制率与各因素的回归方程为:ACE 抑制率/%=70.57+0.30A +0.41B−1.77C−1.43A ×B−1.88A ×C−3.46B×C−2.48A^2−0.60B^2−3.30C^2。

采用 Design-Expert 8.0 软件处理该响应面试验结果,见图 7~图 9。

表 3 Box–Behnken 设计方案及 ACE 抑制率的测定结果

Table 3 Box–Behnken design and response values of ACE inhibitory activity

试验号	pH	酶底比/(mg/mL)	酶解温度/℃	抑制率/%
1	0	1	−1	70.57
2	0	0	0	70.87
3	1	0	1	60.66
4	−1	1	0	69.97
5	0	−1	1	69.67
6	0	0	0	71.17
7	0	0	0	69.67
8	1	−1	0	67.87
9	−1	−1	0	64.56
10	0	−1	−1	64.56
11	−1	0	−1	65.17
12	0	1	1	61.86
13	1	1	0	67.57
14	1	0	−1	69.67
15	0	0	0	71.77
16	0	0	0	69.37
17	−1	0	1	63.66

表 4 ACE 抑制率的方差分析

Table 4 Variance analysis for ACE inhibitory activities

来源	平方和	自由度	均方	*F* 值	*P* 值	显著性
模型	176.19	9	19.58	8.49	0.005 0	**
A	0.73	1	0.73	0.31	0.592 2	—
B	1.37	1	1.37	0.59	0.466 1	—
C	24.92	1	24.92	10.81	0.013 3	*
AB	8.15	1	8.15	3.54	0.102 1	—
AC	14.06	1	14.06	6.10	0.042 8	*
BC	47.75	1	47.75	20.71	0.002 6	**
A^2	25.82	1	25.82	11.20	0.012 3	*
B^2	1.52	1	1.52	0.66	0.443 2	—
C^2	45.96	1	45.96	19.93	0.002 9	**
残差	16.14	7	2.31	—	—	—
失拟项	12.00	3	4.00	3.86	0.112 3	—
纯误差	4.14	4	1.03	—	—	—
总和	192.33	16	—	—	—	—

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

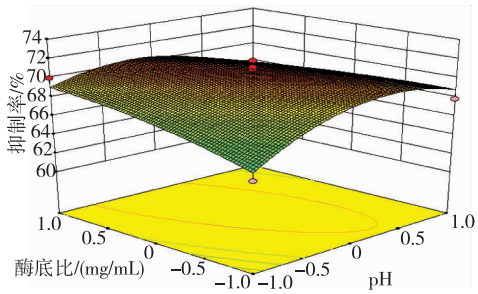


图 7　pH 和酶底比的响应曲面图

Fig. 7　Response surface plot of pectinase concentration and pH

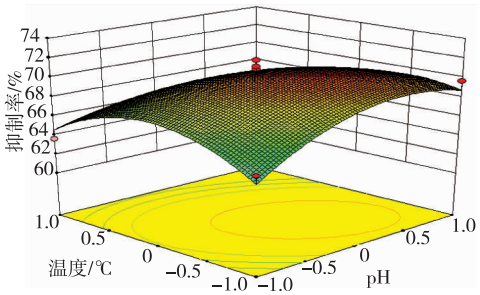


图 8　pH 和温度的响应曲面图

Fig. 8　Response surface plot of temperature and pH

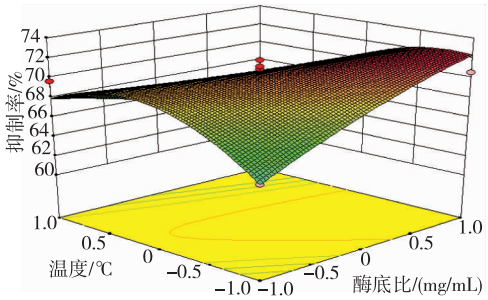


图 9　酶底比和温度的响应曲面图

Fig. 9　Response surface plot of temperature and pectinase concentration

由图 7 可知,当温度在 34~40 ℃时,pH 与酶底比的交互作用影响酶解液对 ACE 的抑制率。当酶底比一定时,ACE 抑制率随着 pH 的增大先增加后略微减小,pH 在 8.0 时，酶解液对 ACE 的抑制率较高。当 pH 一定时,ACE 抑制率随着酶底比的升高而略微增加,但是增加不明显。

由图 8 可知,当酶底比在 2~6 时,温度与 pH 的交互作用显著影响酶解液对 ACE 的抑制率的。当 pH 一定时,ACE 抑制率随着温度的增大先增加后减小，温度在 37 ℃时，酶解液对 ACE 的抑制率较高。当温度一定时,ACE 抑制率随着 pH 的增加而增加,当 pH 达到 8 时,ACE 抑制率增长趋势放缓。

由图 9 可知,当 pH 在 7.5~8.5 时,温度与酶底比的交互作用显著影响酶解液对 ACE 的抑制率的。当温度一定时,ACE 抑制率随着酶底比的升高而增大。当酶底比一定时,ACE 抑制率随着温度的增加而先增加后下降,当温度达到 37 ℃时,ACE 抑制率最大。

根据回归模型，得到最佳酶解工艺为:pH 为 8.04,酶底比为 6%,温度为 34.6 ℃,考虑实际生产情况,工艺调整为 pH 为 8.0,酶底比为 6%,温度为 35 ℃,在此条件下,酶解液对 ACE 的抑制率预测值为 72.46%。为了验证回归模型的可靠性,对最佳酶解工艺进行验证实验,抑制率为 72.37%,接近模型预测值,说明该响应面优化工艺获得的最佳酶解工艺是可靠的。

3 结　语

1)酶是具有活性的蛋白,它具有高效性和专一性,因此蛋白酶的选择就是酶解过程的关键。本实验选用 4 中常见蛋白酶酶解龙须菜蛋白，采用对 ACE 抑制率为指标,对蛋白酶进行筛选,最后发现胰蛋白酶酶解龙须菜蛋白效率最高。

2）采用酶解技术制备的多肽能很好的抑制 ACE 酶活性。胰蛋白酶是适合酶解龙须菜蛋白制备 ACE 抑制肽的蛋白酶。在最优条件下制备的多肽对 ACE 酶有很高的抑制作用。

3）经过优化的最佳制备工艺为:pH 为 8.0,酶底比为 6%,温度为 35 ℃,在此条件下,制备的多肽对 ACE 的抑制率为 72.37%。

参考文献:

[1] SANTANDER-AVANCENA S S,LUHAN M R J,FELERA-PANIZALES J. Improved growth performance of *Gracilariopsis heteroclada* via short-term nitrogen enrichment[J]. **Botanica Marina**,2015,58(6):457-463.

[2] CRAIGIE J S,WEN Z C,VAN DER MEER J P. Interspecific,intraspecific and nutritionally-determined variations in the

composition of. agars from *Gracilaria* spp[J]. **Botanica Marina**,1984,27(2):55-62.

[3] WANG Z,SUI Z,HU Y,et al. A comparison of different *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) parts in biochemical characteristics,protoplast formation and regeneration[J]. **Journal of Ocean University of China**,2014,13(4):671-676.

[4] FEI X. Solving the coastal eutrophication problem by large scale seaweed cultivation [J]. **Hydrobiologia**,2004,512(1-3):145-151.

[5] ZHAO Haizhen,LU Zhaoxin,LIU Zhanmin. Research progress of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides [J]. **Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics**,2004,25(5):315-317.(in Chinese)

[6] 尤新. 功能性发酵制品[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000.

[7] HE Hailun,CHEN Xiulan,SUN Caiyun,et al. Research progress in inhibitory peptides of angiotensin converting enzyme[J]. **China Academic Journal Electronic Publishing House**,2004,24(9):7-11.(in Chinese)

[8] LIU X,ZHANG M,ZHANG C,et al. Angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory,antihypertensive and antihyperlipidaemic activities of protein hydrolysates from *Rhopilema esculentum*[J]. **Food chemistry**,2012,134(4):2134-2140.

[9] WU Jianping,DING Xiaoling. Advances in the antihypertensive peptides derived from food proteins [J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**,1998(5):10-14.(in Chinese)

[10] CLAUSS F,CHARLOUX A,PIQUARD F,et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents myocardial infarction-induced increase in renal cortical cGMP and cAMP phosphodiesterase activities [J]. **Fundamental & Clinical Pharmacology**,2015,29(4):352-361.

[11] NAGAI N,OIKE Y,IZUMI-NAGAI K,et al. Suppression of choroidal neovascularization by inhibiting angiotensin-converting enzyme:minimal role of bradykinin[J]. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**,2007,48(5):2321-2326.

[12] JIA Junqiang,WU Qiongying,XU Jinling,et al. Stabilities of ACE-inhibitory peptides from silkworm pupae and their inhibition kinetics against ACE[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(8):875-881.(in Chinese)

[13] WU Qiongying,JIA Junqiang,DU Jinjuan,et al. Optimization of preparation technology of ACE-inhibitory peptides from silkworm pupae protein by coupled ultrasound-ionic liquids pretreatment [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(6):633-640.(in Chinese)

[14] WANG Jin,HE Hui,SUI Yujie,et al. Comparison of hypotensive effect among corn peptide,soybean peptide and compound peptide[J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**,2007,22(1):45-47.(in Chinese)

[15] IWANIAK A,MINKIEWICZ P, DAREWICZ M. Food-originating ACE inhibitors,including antihypertensive peptides,as preventive food components in blood pressure reduction [J]. **Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety**,2014,13(2):114-134.

[16] RAGHAVAN S,KRISTINSSON H G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates [J]. **Food Chemistry**,2009,117(4):582-588.

[17] HAYAKARI M,KONDO Y,IZUMI H. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme[J]. **Analytical Biochemistry**,1978,84(2):361-369.

[18] WANG S,CHEN F,WU J,et al. Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology[J]. **Journal of Food Engineering**,2007,78(2):693-700.

[19] SILVA I M D A,GONZAGA L V,AMANTE E R,et al. Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology [J]. **Bioresource Technology**,2008,99(13):5561-5566.