

酶解条浒苔蛋白制备 ACE 抑制肽

盘赛昆^{1,2}, 周鸣谦^{1,2}, 姚东瑞^{1,2}, 孙惠²

(1.江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005; 2.淮海工学院食品工程学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 为了开发利用绿藻类条浒苔中含量丰富的蛋白质, 采用可见分光光度法测定酶解物对 ACE 的抑制作用, 考察碱性蛋白酶、Alcalase 和胰蛋白酶对条浒苔蛋白的水解作用及其水解产物的 ACE 抑制活性, 筛选出 Alcalase 作为酶解条浒苔蛋白制备具有降血压活性酶解物的适宜水解酶。在单因素试验的基础上, 采用响应面分析法对该酶的酶解条件进行优化。结果表明, 最佳酶解条件为: 料液比 1:50、加酶量 2982 U/g pro、温度 47.9℃、pH 7.53、酶解时间 90 min, 在该条件下, 酶解物的 ACE 抑制率 IC₅₀ 值为 0.66 mg/mL。不同截留分子质量的组分中, 分子质量范围在 1~5 kD, 平均肽链长度为 16 的组分 ACE 抑制活性最强, 模拟体外消化实验结果表明, 分子质量小于 10 kD 的组分具有一定的对消化酶的抗性。

关键词: 条浒苔; 酶解; ACE 抑制肽; Alcalase

Preparation of ACE Inhibitory Peptides by Enzymatic Hydrolysis of Protein from *Enteromorpha clathrata*

PAN Sai-kun^{1,2}, ZHOU Ming-qian^{1,2}, YAO Dong-rui^{1,2}, SUN Hui²

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005, China;

2. School of Food Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: In order to exploit abundant proteins in the green algae *Enteromorpha clathrata*, *Enteromorpha clathrata* was enzymatically hydrolyzed and the angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of its hydrolysate was determined spectrometrically. Alcalase was found to be more suitable for the preparation of ACE inhibitory peptides from *Enteromorpha clathrata* proteins than alkaline protease and trypsin. Based on one-factor-at-a-time experiments, response surface methodology was employed to optimize the hydrolysis conditions. The optimal hydrolysis process conditions were solid/liquid ratio of 1:50, enzyme dose of 2982 U/g protein, hydrolysis temperature of 47.9 °C, hydrolysis pH of 7.53 and hydrolysis duration of 90 min. Under these conditions, a hydrolysate with an ACE inhibitory IC₅₀ of 0.66 mg/mL was obtained. The hydrolysate consisted of fractions with a MWCO (molecular weight cut-off) of 1–5 kD and the fraction with an average chain length of 16 exhibited the strongest ACE inhibitory activity. The fractions with molecular weight of lower than 10 kD showed resistance to gastrointestinal proteases *in vitro*.

Key words: *Enteromorpha clathrata*; enzymatic hydrolysis; angiotensin I -converting enzyme (ACE) inhibitory peptide; alcalase

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)09-0167-06

浒苔属(*Enteromorpha*)在分类学上属于绿藻门(Chlorophyta)、石莼目(Ulvales)、石莼科(Ulvaceae), 主要有条浒苔(*Enteromorpha clathrata*)、肠浒苔(*E. intestinalis*)、扁浒苔(*E. compressa*)、浒苔(*E. prolifera*)、缘管浒苔(*E. linza*)5种, 生长在潮间带^[1]。浒苔是一种绿海藻类, 2008年奥运会期间曾在黄海中、南部海域爆发成灾, 引起了国家的高度重视。事实上, 浒苔是一种具有很高

利用价值的藻类资源, 研究表明浒苔含有丰富的营养成分, 干缘管浒苔含蛋白质 27.0%, 碳水化合物 53.7%、粗纤维 10.2%、矿物质 8.2% 及脂肪 0.9%, 同时还含有丰富的维生素^[2]。在我国《食物营养成分表》中记载, 浒苔铁含量为我国食品之最, 含量达 283.7 mg/100g, Mg 和 Zn 的含量也较其他海藻高^[3]。浒苔蛋白质中氨基酸种类齐全, 必需氨基酸(EAA)占氨基酸总量(TAA)的

收稿日期: 2011-09-17

基金项目: 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放基金项目(2009HS07)

作者简介: 盘赛昆(1974—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品功能因子。E-mail: pskgx@163.com

38%, 必需氨基酸与非必需氨基酸的比值(EAA/NEAA)为0.62, 氨基酸评分为79~80, 高于海带(47)和紫菜(54)。此外, 缘管浒苔氨基酸中, 呈味氨基酸占50%左右, 其中谷氨酸的含量较高, 为其风味的形成奠定了良好的物质基础。各项营养指标均表明浒苔蛋白质是一种优质的蛋白质, 同时由于浒苔生长迅速, 生物量大, 因此浒苔是一种良好的植物蛋白质来源。目前, 人们的研究主要集中在浒苔中含量最大的碳水化合物上, 而对蛋白质的研究相对较少, 对其深加工的研究尚未见报道。

人们发现蛋白质除提供人体多种氨基酸和能量外, 从蛋白质原有序列中释放出的一些小肽还具有多种生理功能, 这些小肽不被肠道多种酶系降解从而具备了通过口服的方式发挥其生物功能的条件^[4]。酶解具有专一性强、作用条件温和的特点, 是制备活性肽的一种很好的技术。目前认为, 通过酶解的方式制备活性肽关键在于蛋白质来源、酶的选择及酶解工艺的控制。目前, 已从天然蛋白质中获得了各种功能性肽: 如促钙吸收肽、降血压肽、降血脂肽、免疫调节肽等。特别是降血压肽的研究更是活性肽研究的热点, 已知这些肽是血管紧张素转换酶(angiotensin- I converting enzyme, ACE, EC3.4.15.1)的抑制剂^[5]。

ACE是一种含锌的二肽羧基肽酶^[6], 是动物体内血压控制的一种关键物质^[7]。如果抑制了ACE的活性, 就能有效防止和治疗高血压的发生。降血压肽作为ACE的一种底物, 通过竞争性抑制作用影响ACE的活性, 从而达到降血压的作用。虽然很多合成的ACE抑制剂类药物在临床治疗中具有很好的专一性和良好的降血压作用, 但是会引发咳嗽、皮肤病、钾浓度上升和肾功能衰竭等副作用, 因此不适合长期使用^[8]。食源性降血压肽具有无毒副作用、安全性高的特点而倍受科研工作者的关注^[9-10]。

本实验采用可见分光光度法测定条浒苔蛋白水解物对ACE的抑制活性, 以水解度和水解产物对ACE的抑制活性为指标对酶解过程进行分析, 为条浒苔蛋白质资源高值化利用探索提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

条浒苔(*Enteromorpha clathrata*), 采于福建厦门, 用洁净海水清洗干净, 干燥备用, 粗蛋白含量为(23.46 ± 0.64)%。

Alcalase(14500U/g) 诺维信(沈阳)公司; 胰蛋白酶(15000U/g)、碱性蛋白酶(6650U/g) 广州市齐云生物技术有限公司; ACE(从兔肺提取)、N-[3-(2-呋喃基)丙烯酰]-L-苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸(FAPGG)、1-[(2S)-2-甲

基-3-巯基-1-氧化丙基]-L-脯氨酸(卡托普利) 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

CR22G 高速冷冻离心机 日本 Hitachi 公司; Biologic Duoflow™ 层析系统 美国 Bio-Rad 公司; Seveb Easy S20 pH 计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; Synergy™ HT 多功能酶标仪 美国 Bio-Tek 公司。

1.3 方法

1.3.1 酶解工艺流程

条浒苔→前处理→超微粉碎→备用→加蒸馏水匀浆→调整酶解条件→酶解→灭酶(沸水浴, 10min)→冷却→调pH值至8.3→离心(10000r/min, 30min)→取上清液→-18℃保存或冻干备用

1.3.2 酶活力测定

酶活力参照 GB/T 23527—2009《蛋白酶制剂》^[11]附录1方法进行测定。蛋白质含量参照 GB 5009.5—2010《食品中蛋白质的测定》^[12]的方法中凯氏定氮法测定。

1.3.3 水解度测定

采用 pH-stat 法, 参照文献[7]方法进行, 按式(1)计算水解度(DH)。

$$DH/\% = \frac{B \times N_b}{\alpha \times M_p \times h_{tot}} \times 100 \quad (1)$$

式中: B 为碱液体积 /mL; N_b 为碱液浓度 /mol/L; α 为氨基酸的解离度; M_p 为底物中蛋白质的含量 /g; h_{tot} 为底物中蛋白质的肽键总数 /(mmol/g), 参照植物蛋白取 8.38mmol/g。

其中, α 、 pK_a 按式(2)、(3)计算:

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK_a}}{1 + 10^{pH-pK_a}} \quad (2)$$

$$pK_a = 7.8 + \frac{298-T}{298 \times T} \times 2400 \quad (3)$$

式中: pH 值为酶水解时的 pH 值; T 为热力学温度 /K。

1.3.4 酶解物 ACE 抑制活性的测定

参照文献[13]的方法进行。IC₅₀ 定义为 ACE 抑制率达 50% 时的多肽质量浓度 /(mg/mL), 用 SPSS13.0 统计软件的概率单位法计算。多肽含量采用双缩脲法测定^[14], 以氧化型谷胱甘肽为标准。

1.3.5 酶的筛选

取条浒苔超微粉 5g, 加水 250mL, 匀浆(10000r/min, 10min), 按 1000U/g pro 分别加入碱性蛋白酶、Alcalase 和胰蛋白酶, 在上述酶的适宜条件(表 1)下进行酶解, 以

水解度及 IC_{50} 为指标考察 0~390min 内(间隔 30min)供试酶的水解进程及酶解液对 ACE 的抑制作用。

表 1 酶的作用条件

Table 1 Hydrolysis conditions of three proteases

蛋白酶	温度/℃	pH	酶用量/(U/g pro)	料液比(m/V)
碱性蛋白酶	50	9.5	1000	1:50
Alcalase	50	8.5	1000	1:50
胰蛋白酶	37	7.8	1000	1:50

1.3.6 单因素试验

以水解度和 ACE 抑制率为指标, 考察加酶量、pH 值、温度及料液比 4 个因素对指标的影响。加酶量的影响: 在 pH8.5、温度 50℃、料液比 1:50、酶解时间 150min 的条件下, 考察加酶量 500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000U/g pro 对 DH 和 ACE 抑制活性的影响; pH 值的影响: 在温度 50℃、料液比 1:50、酶解时间 150min 的条件下, 加酶量为 2500U/g pro 的条件下, 考察 pH7.5、8.5、9.5、10.5、11.5 对 DH 和 ACE 抑制活性的影响; 温度的影响: 在 pH8.5、料液比 1:50、酶解时间 150min、加酶量为 2500U/g pro 的条件下, 考察温度 40、45、50、55、60℃对 DH 和 ACE 抑制活性的影响; 料液比的影响: 在 pH8.5、温度 50℃、酶解时间 150min、加酶量为 2500U/g pro 的条件下, 考察料液比为 1:30、1:40、1:50、1:60、1:70 对 DH 和 ACE 抑制活性的影响。

在单因素试验基础上, 对显著性因素采用响应面设计进行酶解条件优化。

1.3.7 多肽分子质量大小对 ACE 抑制活性的影响

酶解物用截留分子质量为 1、5kD 及 10kD 的超滤离心管分为 4 个组分, 分别命名为条浒苔肽 I ($M_w < 1kD$)、条浒苔肽 II ($1kD \leq M_w < 5kD$)、条浒苔肽 III ($5kD \leq M_w < 10kD$)、条浒苔肽 IV ($M_w \geq 10kD$), 冻干, 配成 5mg/mL 的溶液, 参照文献[15]方法测定各组分的平均肽链长度, 比较各组分 ACE 抑制率的 IC_{50} 值。

1.3.8 体外消化稳定性实验

参照文献[16-17]的方法进行, 条浒苔蛋白肽用 0.1mol/L KCl-HCl 缓冲液(pH2.0)配成 5mg/mL 的溶液, 按酶、肽质量比 0.04:1 加入胃蛋白酶, 混匀, 在 37℃条件下作用 4h, 沸水浴 10min 灭酶, 加入 2mol/L 的 NaOH 溶液将体系中和至 pH7.0。取中和后的溶液 1mL, 离心(10000r/min, 30min), 取上清液测定 ACE 抑制活性。余下的溶液按酶、肽质量比 0.04:1 加入胰蛋白酶, 在 37℃条件下作用 4h, 沸水浴 10min 灭酶, 10000r/min 离心 30min, 取上清液测定 ACE 抑制活性。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的筛选

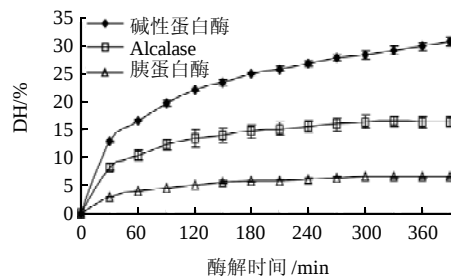


图 1 3 种供试酶对条浒苔蛋白的水解进程

Fig.1 Time-course curves of the hydrolysis of *E. clathrata* proteins by one of three proteases

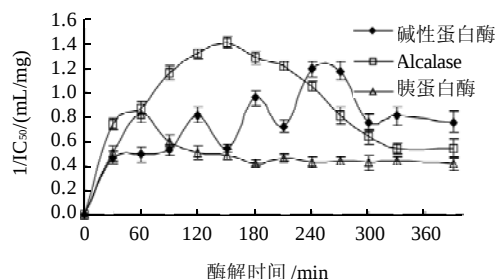


图 2 不同蛋白酶酶解物对 ACE 抑制作用的影响

Fig.2 Effect of protease type on ACE inhibitory activity of *E. clathrata* hydrolysate

由图 1 可知, 经多重比较分析(Duncan's 法, $\alpha = 0.05$)表明, 3 种酶对条浒苔蛋白的水解作用存在着显著的差异, 在碱性蛋白酶作用下水解度上升速度最快, 最终达到的水解度也最大。相比之下, 在胰蛋白酶作用下, 水解度则非常小。仅从水解角度来看, 3 种酶中碱性蛋白酶最适合于酶解条浒苔蛋白, 而胰蛋白酶水解效率最低。但图 2 显示, 碱性蛋白酶水解物的 ACE 抑制作用虽然比胰蛋白酶水解物强, 但却比 Alcalase 水解物的抑制作用弱, 并且在水解程度较大时出现很大的波动, 使得水解工艺难以控制。这种波动可能因为碱性蛋白酶是一种丝氨酸内切酶, 作用于条浒苔蛋白时随着水解的进行, 能够将原来有活性的肽水解为没有活性的更短的肽, 或者将原来没有活性的肽水解为有活性的更短的肽导致的。相比而言, 在 Alcalase 作用下虽然水解程度有限, 但水解物的 ACE 抑制活性却较高, 且随着水解程度提高, ACE 抑制活性出现先升高后下降的趋势, 水解 150min 时活性达到最高($IC_{50} = 0.71mg/mL$), 规律性较强, 通过优化可能获得比较稳定的工艺条件, 因此选择 Alcalase 作为水解条浒苔蛋白制备 ACE 抑制肽的适合酶。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 加酶量对酶解物 ACE 抑制率的影响

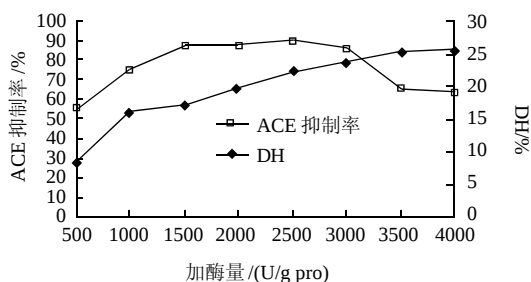


图3 加酶量对条浒苔蛋白酶解物 ACE 抑制率的影响

Fig.3 Effect of enzyme dose on ACE inhibitory activity of *E. clathrata* hydrolysate

由图3可知, DH随着加酶量的增加而增加, 当加酶量达到3500U/g pro后DH不再升高, 而酶解物则在1500~2500U/g pro之间具较高的ACE抑制活性, 之后, 加酶量及水解度的增加反而引起ACE抑制活性的降低。

2.2.2 pH 值对酶解物 ACE 抑制率的影响

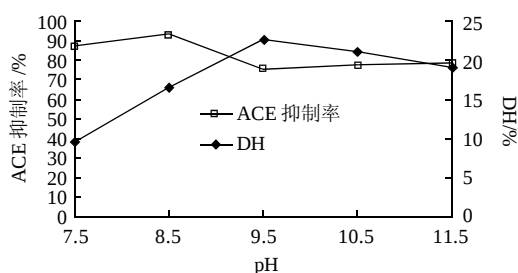


图4 pH 值对条浒苔蛋白酶解物 ACE 抑制率的影响

Fig.4 Effect of hydrolysis pH on ACE inhibitory activity of *E. clathrata* hydrolysate

由图4可知, 随pH值升高ACE抑制率及水解度均呈现先上升后下降的趋势, 但两者达到最高水平时的pH值是不一致的。当水解度最高时, ACE抑制活性则处在最低水平, 而当水解度下降后ACE抑制活性又有所回升, 故制备ACE抑制肽的较适宜pH值为8.5。

2.2.3 温度对酶解物 ACE 抑制率的影响

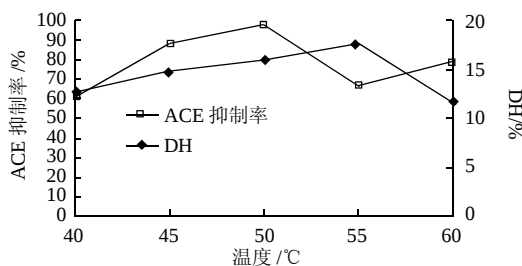


图5 温度对条浒苔蛋白酶解物 ACE 抑制率的影响

Fig.5 Effect of hydrolysis temperature on ACE inhibitory activity of *E. clathrata* hydrolysate

由图5可知, 55℃是Aclalase酶解条浒苔蛋白的最适温度, 但此时酶解物的ACE抑制率却最低, 水解度偏离最大值后ACE抑制活性有所提高, 因此制备ACE抑制肽的较适宜温度为50℃。

2.2.4 料液比对酶解物 ACE 抑制率的影响

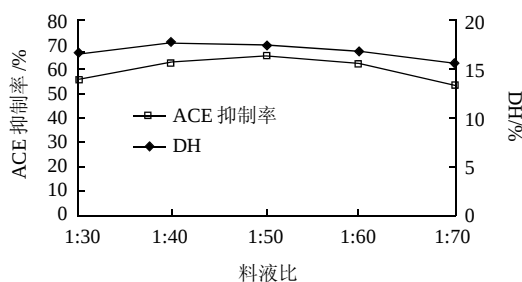


图6 料液比对条浒苔蛋白酶解物 ACE 抑制率的影响

Fig.6 Effect of solid/liquid ratio on ACE inhibitory activity of *E. clathrata* hydrolysate

由图6可知, 料液比为1:5时, 酶解物的ACE抑制率, 为时达到最高, 随着料液比的减小, 底物浓度变大, 水解度及ACE抑制率均呈下降趋势。因此, 料液比为1:50是比较适宜的, 此时DH为17.35%。

2.3 酶解工艺优化

表2 响应面设计因素与水平

Table 2 Factors and levels for response surface design

水平	A 加酶量/(U/g pro)	B 温度/°C	C pH
- 1.41421	1792	42.9	7.09
- 1	2000	45.0	7.50
0	2500	50.0	8.50
1	3000	55.0	9.50
+ 1.41421	3207	57.1	9.91
Δj	500	5.0	1.00

通过SPSS V13.0软件对单因素试验结果进行方差分析和多重比较。结果表明, 加酶量、温度、pH值3个因素对酶解物的ACE抑制率有显著影响($P < 0.05$), 而料液比对酶解物的ACE抑制率没有显著影响($P > 0.05$)。设计响应面设计因素, 因素和水平的取值见表2。响应面设计安排及结果见表3。采用二次多项式模型拟合试验数据, 经逐步回归法去除不显著项后, 模型方差分析如表4所示。模型及失拟项的P值分别为0.0013和0.5156, 表明该模型拟合良好。其中, 温度及其二次项、加酶量与pH值的交互作用对响应值有显著的影响。ACE抑制率与各因素的回归方程为:

ACE抑制率/% = $-682.61291 + 0.13056A + 19.64747B + 37.18625C - 0.21077B^2 - 0.015418AC$

根据回归模型, 得到优化的酶解条件为: 加酶量 2982U/g pro、温度 47.9℃、pH7.53、料液比 1:50、时间 90min, 在此条件下, ACE 抑制率的模型预测值为 98.40%。为了验证模型的可靠性, 在最佳工艺条件下进行 3 次平行实验, 结果为(97.69 ± 0.97)%, 采用 SPSS V13.0 进行 *t* 检验表明, 预测值与实际值无显著差异($P > 0.05$), 因此, 酶解物的实际 ACE 抑制率为 94.95%~99.80%, 酶解物的 $IC_{50} = 0.66\text{mg/mL}$, 水解度为 24.35%。

经优化后, 条浒苔蛋白酶解物的 ACE 抑制率的 IC_{50} 值由 0.71mg/mL 降至 0.66mg/mL, 说明酶解条件优化能提高酶解物中活性肽的含量, 同时酶解时间由 150min 缩短为 90min, 水解度由 16%~18% 提高到 24.35%, 水解效率有明显提高, 说明酶解条件的优化是非常必要的。水解度提高, IC_{50} 降低, 说明在优化条件下, 可以在高水解度条件下获得较多的活性肽, 可能是因为在此条件下酶能够作用于较多的位点产生较多的具有活性的肽所致。在相同的条件下测得卡托普利的 IC_{50} 为 $0.058\mu\text{g/mL}$, 条浒苔蛋白酶解物的 ACE 抑制活性虽然低于卡托普利, 但与其他植物来源的 ACE 抑制肽相比, 条浒苔蛋白酶解物的 ACE 抑制活性高于大豆肽(1.20mg/mL)^[18]、银杏蛋白水解物(0.98mg/mL)^[19], 甚至高于一些水产动物来源的蛋白水解物, 例如大西洋鲑鱼(Atlantic salmon)、银鲑(coho salmon)、阿拉斯加鳕(Alaska pollock)和南方蓝鳕(southern blue whiting)的 IC_{50} 值分别为 5.00、3.70、2.90mg/mL 和 3.60mg/mL^[20]。因此, 酶解条浒苔蛋白制备 ACE 抑制肽是可行的。

表 3 响应面试验方案及结果
Table 3 Response surface design matrix and results

试验号	因素			ACE 抑制率/%
	A 加酶量/(U/g pro)	B 温度/℃	C pH	
1	2500.00	50.00	9.91	85.39
2	3000.00	55.00	7.50	84.27
3	2500.00	57.07	8.50	65.17
4	2000.00	45.00	7.50	86.52
5	1792.89	50.00	8.50	85.39
6	3207.11	50.00	8.50	88.76
7	2500.00	50.00	8.50	84.27
8	2500.00	50.00	8.50	87.64
9	2500.00	50.00	8.50	89.89
10	2500.00	42.93	8.50	85.39
11	2500.00	50.00	8.50	84.27
12	2000.00	55.00	9.50	85.39
13	3000.00	45.00	9.50	80.90
14	2500.00	50.00	8.50	89.89
15	2500.00	50.00	7.09	89.89

表 4 优化后的模型方差分析表
Table 4 ANOVA for the established regression model

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	435.64	5	87.13	10.97	0.0013	显著
A	0.49	1	0.49	0.061	0.8100	
B	204.42	1	204.42	25.73	0.0007	显著
C	14.75	1	14.75	1.86	0.2061	
B ²	214.72	1	214.72	27.03	0.0006	显著
AC	118.85	1	118.85	14.96	0.0038	显著
残差	71.50	9	7.94			
失拟项	39.67	5	7.93	1.00	0.5156	不显著
纯误差	31.84	4	7.96			
总变异	507.14	14				

2.5 超滤组分肽分子质量大小对 ACE 抑制活性的影响

表 5 不同大小肽段的 ACE 抑制活性
Table 5 ACE inhibitory activities of *E. clathrata* hydrolysate and different MWCO fractions

截留分子质量	平均肽链长度	$IC_{50}/(\text{mg/mL})$	酶解物中所占百分比/%
酶解物		0.66	
条浒苔肽 I ($M_w < 1\text{kD}$)	5	0.13	20.5
条浒苔肽 II ($1\text{kD} \leq M_w < 5\text{kD}$)	16	0.085	55.8
条浒苔肽 III ($5\text{kD} \leq M_w < 10\text{kD}$)	34	0.95	15.3
条浒苔肽 IV ($M_w \geq 10\text{kD}$)	98	1.32	8.4

由表 5 可知, 分子质量小于 10kD 的组分均显示了相当高的 ACE 抑制活性, 其中以分子质量为 1~5kD, 平均肽链长度为 16 的组分 ACE 抑制活性最强, 且在酶解物中占的比例也最大; 小于 1kD, 平均肽链长度为 5 的组分活性次之, 分子质量大于 10kD 的组分 ACE 抑制活性显著降低。肽的 ACE 抑制活性根本地决定于氨基酸组成与排列顺序, 同时也受肽段大小的影响, 一般认为由 2~20 个氨基酸残基构成的小肽具有较强的 ACE 抑制活性, 但也有极个别的由 27 个氨基酸组成的肽具有降血压活性^[10,21]。条浒苔蛋白质水解物的 ACE 抑制活性存在于多种不同分子质量大小的组分中, 出现这种现象可能与 ACE 相对较弱的专一性有关^[22-23]。然而, 只有小肽才能直接被吸收, 而分子质量较大的肽在消化道内需要经过消化进一步降解, 其降解产物则不一定具有 ACE 抑制活性, 因此, 具有 ACE 抑制活性的小肽在功能性食品中具有特别重要的意义。

2.6 体外消化稳定性实验结果

采用体外模拟消化体系考察了条浒苔蛋白酶解物及不同分子质量范围的组分对胃肠道消化酶的抗性作用, 结果如表 6 所示。酶解物经消化酶消化后 ACE 抑制率的 IC_{50} 有所提高, 而不同超滤分离组分中 1~10kD 组分经消化酶作用后, ACE 抑制活性并没有显著差异, 只有 $M_w \geq 10\text{kD}$ 的组分经酶消化后 ACE 抑制活性有明显下降。因此, 可以推测酶解物消化后活性下降的主要原因是:

只有高分子质量的肽链经消化酶作用之后,才会有限制地降解,并且降解为不具有活性的短肽所致。这一结果与 Chiang 等^[17]的研究结果相似,该研究发现分子质量小于 10kD 的肽能够抵抗消化酶的作用,使其仍能保持原有 ACE 抑制活性。很多研究也证实低分子质量的肽对消化酶具有很好的抗性^[9,16,24],这些实验证据表明低分子质量的活性肽在作为功能性食品配料时才具有实际的意义。

表 6 条浒苔蛋白酶解物及不同大小肽段在消化酶作用前后对 ACE 抑制作用的比较

Table 6 ACE-inhibitory activities of *E. clathrata* hydrolysate and different MWCO fractions after digestion by gastrointestinal proteases *in vitro*

条浒苔蛋白肽	IC ₅₀ /(mg/mL)		
	初始值	胃蛋白酶 作用后	胃蛋白酶 + 胰蛋白酶作用后
酶解物	0.66	0.95	1.11
条浒苔肽 I ($M_w < 1\text{kD}$)	0.13	0.12	0.15
条浒苔肽 II ($1\text{kD} \leq M_w < 5\text{kD}$)	0.085	0.089	0.091
条浒苔肽 III ($5\text{kD} \leq M_w < 10\text{kD}$)	0.95	1.02	1.05
条浒苔肽 IV ($M_w \geq 10\text{kD}$)	1.32	1.58	1.47

3 结 论

3.1 采用酶水解技术可以水解浒苔蛋白制备高活性的 ACE 抑制肽。Alcalase 是一种比较适合于酶解条浒苔蛋白制备 ACE 抑制肽的水解酶,在最优条件下制备的酶解物具有很高的 ACE 抑制活性。

3.2 经优化的最佳酶解条件为:加酶量 2982U/g pro、温度 47.9℃、pH7.53、料液比 1:50、时间 90min,在此条件下,酶解物对 ACE 抑制率的 IC₅₀ 值为 0.66mg/mL。酶解物中分子质量小于 10kD 的组分占 91.6%,是主要的活性成分,其中以 1~5kD 的组分活性最强。

3.3 体外消化稳定性实验表明,分子质量小于 10kD 的条浒苔蛋白水解物具有较好的抗消化作用。

参考文献:

[1] 李剑玄,齐玉堂. 浒苔蛋白质提取工艺的研究[J]. 粮油加工, 2010

(6): 103-105.

- [2] 何清,胡晓波,周峙苗,等. 东海绿藻缘管浒苔营养成分分析及评价[J]. 海洋科学, 2006, 30(1): 34-38.
- [3] 杨月欣. 食物营养成分速查[M]. 北京: 人民日报出版社, 2006.
- [4] 封梅,覃楠,兰岚,等. 酶法水解鱼蛋白制备鱼降压肽的工艺研究[J]. 粮油加工, 2008(3): 126-128.
- [5] 吴建平,丁霄霖. 食品蛋白质降压肽的研究进展[J]. 中国粮油学报, 1998, 13(5): 10-14.
- [6] 王瑛瑶,王璋,陈尚卫. 花生 ACE 抑制活性肽的分离纯化与结构鉴定[J]. 食品科学, 2008, 29(10): 341-344.
- [7] RAGHAVAN S, KRISTINSSON H G. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2009, 117(4): 582-588.
- [8] 薛勇,薛长湖,许萍,等. 中国毛虾蛋白水解物中血管紧张素转移酶抑制肽的研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(5): 28-33.
- [9] WANG Jiabei, HU Jianen, CUI Jinzhe, et al. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats[J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 302-308.
- [10] LEE S H, QIAN Z J, KIM S K. 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: 96-102.
- [11] 诺维信(中国)生物技术有限公司, 张家港市金源生物化工有限公司, 中国食品发酵工业研究所, 等. 蛋白酶制剂[S]. 北京: 中国标准化出版社, 2009.
- [12] 卫生部食品卫生监督检验所. GB 5009.5—2010 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [13] 刘志国,吴琼,吕玲肖,等. 酶解米糠蛋白分离提取 ACE 抑制肽及其结构研究[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 223-227.
- [14] 徐娟,吕嘉彬. 乳蛋白水解液中多肽含量测定方法的研究[J]. 食品科技, 2010, 35(12): 275-277.
- [15] ADLER-NISSEN J. Determination of degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1979, 27(6): 1256-1262.
- [16] TSAI J S, CHEN J L, PAN B S. ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*)[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(7): 743-747.
- [17] 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.
- [18] 吴建平,丁霄霖. 大豆降压肽的研制(I): 生产高活性 ACE I 肽酶系的筛选[J]. 中国油脂, 1998, 23(2): 49-51.
- [19] 刘宁,仇农学,朱振宝,等. 杏仁蛋白水解物对血管紧张素转化酶抑制作用的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(5): 249-252.
- [20] NAKAJIMA K, YOSHIE-STARK Y, OGUSHI M. Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2009, 114(3): 844-851.
- [21] 孙勤,陈季旺,夏文水,等. 食品蛋白源 ACE 抑制肽的生理和生化性质[J]. 武汉工业学院学报, 2009, 28(1): 27-31.
- [22] 许庆陵,曾庆祝. 血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽的酶法制备[J]. 广州大学学报: 自然科学版, 2007, 6(6): 41-44.
- [23] 黄艳春,熊善柏,赵思明,等. 鲢肉酶解工艺及其产物对大鼠 ACE 抑制活性的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 203-206.
- [24] WU Jianping, ALUKO R E, MUIR A D. Production of angiotensin I - converting enzyme inhibitory peptides from defatted canola meal[J]. Bioresource Technology, 2009, 100(21): 5283-5287.