

双酶法制备沙丁鱼ACE抑制肽的工艺研究

黄嘉成, 彭喜春*

(暨南大学理工学院食品科学与工程系, 广东广州 510632)

摘要:本实验以广东大宗低值沙丁鱼为原料, 采用不同蛋白酶降解沙丁鱼以筛选合适的酶组合, 然后对原料的酶解制备血管紧张素转化酶(ACE)抑制肽的工艺进行研究。结果表明, 制备沙丁鱼ACE抑制肽的酶组合为: 木瓜蛋白酶与碱性蛋白酶; 酶解的最佳工艺参数为: 第一步采用木瓜蛋白酶进行酶解, 酶解温度70℃、pH7.5、反应时间2.25 h、酶添加量4000 U/g、料液比30%(w/v); 采用碱性蛋白酶进行第二步酶解, 酶解温度70℃、pH10.0、反应时间2.0 h、酶添加量5000 U/g。通过工艺优化, 沙丁鱼蛋白质的水解度提高到28.44%, 并且最终水解蛋白肽的ACE抑制率为73.44%。

关键词:沙丁鱼, 双酶法, ACE抑制肽, 酶解条件

Two-step enzymatic hydrolysis for preparation of ACE-inhibitory peptides from sardine

HUANG Jia-cheng, PENG Xi-chun*

(Department of Food Science and Engineering, College of Science and Engineering, Ji'nan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: In this experiment, different kinds of proteases were screened to prepare Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Sardine (*Sardina melamosticta*), and the process of preparing ACE-inhibitory peptides was optimized. The results showed that the combination of papain and Alcalase were the optimal enzymes for preparing ACE-inhibitory peptides from sardine. The optimal conditions of enzymatic hydrolysis were: 30% (W/V) of sardine in water was hydrolyzed with 4000 U papain per gram of sardine at 70 °C and pH7.5 for 2.25 h, in the first enzymatic step and then with 5000 U Alcalase per gram of Sardine at 70 °C and pH10.0 for 2.0 h in the second enzymatic step. After optimization, the degree of hydrolysis was up to 28.44% and the ACE-inhibitory rate of the final products was 73.44%.

Key words: sardine; two-step enzymatic hydrolysis; ACE-inhibitory peptides; enzymatic hydrolysis conditions

中图分类号: TS201.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)18-0295-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.18.051

高血压被称为“无声杀手”, 在早期没有明显症状, 直到发生临床危象, 如心脏病发作、脑血管破裂等。在我国, 高血压的发病率已达到18.8%, 而全世界每年死于高血压的人数高于其他任何一种疾病, 由高血压引发的心脑血管疾病的死亡率已排到所有疾病死亡率的第一位^[1]。目前用于高血压治疗的药物主要有血管紧张素转化酶抑制剂如卡托普利、福辛普利、依那普利等, 虽然疗效非常明显, 但其对肾脏的毒副作用以及服药后出现的低血压、干咳等症状, 使人们对其安全性产生忧虑^[2]。来源于食物的ACE抑制肽, 其食用安全性高、副作用小, 突出优点是只对高血压患者起到降压作用, 对血压正常者无降压作用, 不会有降压过度的现象发生^[3], 因此食物源ACE抑制肽成

为了研究热点。据报道, 已经有研究人员从酪蛋白^[4]、海藻^[5]、豆类^[6]、大米^[6]等食物中制备得到ACE抑制肽。

沙丁鱼(*Sardina melamosticta*), 又称萨丁鱼、鲭和鲷。我国东南沿海有丰富的沙丁鱼类资源, 其基本成分如下: 水分含量81.72%、干基蛋白质含量84.79%、干基脂肪4.02%、干基灰分4.75%^[7]。沙丁鱼属于近海小型中上层鱼类, 它具有生长快、繁殖力强的优点, 在渔获物中出现频率高^[8]。因此, 沙丁鱼作为一种丰富的动物蛋白质资源, 具有很大的开发前景。有文献报道, 通过模拟人体胃肠道消化系统, 发现源于鱼蛋白的多肽类物质是一种新型的营养价值丰富的生物活性肽^[9]。其生物活性主要表现在: 降血压、抗氧化、抗菌、抗凝血和降胆固醇等^[10-11]。

收稿日期: 2015-01-20

作者简介: 黄嘉成(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食物功能组分与肠道健康, E-mail: 419234306@qq.com。

* 通讯作者: 彭喜春(1976-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食物功能组分与肠道健康, E-mail: tpxchun@jnu.edu.cn。

近年来,已有国内外研究人员从明太鱼、金枪鱼、海鲷、黄碟鱼、鲑鱼等鱼蛋白中制备出了血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme,简称ACE)抑制肽^[10-12]。日本学者Matsui采用了单一的碱性蛋白酶对沙丁鱼肌肉进行酶解,发现酶解产物对ACE具有较强的抑制作用^[13]。基于日本学者Matsui的研究,在本研究中,以广东大宗低值沙丁鱼为原料,使用了2~3种不同的蛋白酶并结合分步酶解的方法,制备沙丁鱼ACE抑制肽,同时对分步酶解的工艺进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

沙丁鱼 广东省阳江市大开水产有限公司提供;菠萝蛋白酶(酶活力为 6×10^5 U/g) 广州市齐云生物技术有限公司;中性蛋白酶(酶活力为 6×10^4 U/g) 广州市齐云生物技术有限公司;胰蛋白酶(酶活力为 2.5×10^5 U/g) 广州市齐云生物技术有限公司;酸性蛋白酶(酶活力为 5×10^4 U/g) 广州市齐云生物技术有限公司;木瓜蛋白酶(酶活力为 5.81×10^4 U/g) 广州市华琪生物科技有限公司;Protex6L碱性蛋白酶(酶活力为 5.13×10^5 U/g) 广州柏棠贸易有限公司;血管紧张素转化酶(ACE) Sigma公司;马尿酸组胺酰亮氨酸(N-Hippuryl-His-Leu hydrate,简称HHL) Sigma公司;其他试剂 均为分析纯。

HR1844-PHILIPS高速组织搅碎机器 珠海市飞利浦家用电器有限公司;PL602-S电子天平 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;HH-4恒温水浴锅 江苏金坛市宏华仪器厂;GT16-3北利高速离心机 北京时代北利离心机有限公司;PHS-3C pH计 上海精密仪器有限公司;JB50-D增力搅拌机 上海标本模型厂;RE-52旋转蒸发器 上海嘉鹏科技有限公司;ULT1386-3-V37超低温冰箱 赛默飞世尔公司;FD-1冷冻干燥机 北京博医康实验仪器有限公司;DHG-9070A电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司;UV-1801紫外分光光度计 北京北分瑞利分析仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 筛选水解沙丁鱼蛋白肽的酶组合 沙丁鱼的预处理:将沙丁鱼清洗干净后去头去鳞,放入高速组织搅碎机里搅成肉末状,并在37℃的恒温水浴中自溶3 h。然后,将沙丁鱼肉末以30%(W/V)的浓度加入蒸馏水中并搅拌均匀,采用不同的酶组合对沙丁鱼进行分步酶解。分两步酶解的组合有:菠萝蛋白酶→碱性蛋白酶,中性蛋白酶→碱性蛋白酶,胰蛋白酶→碱性蛋白酶,酸性蛋白酶→碱性蛋白酶,木瓜蛋白酶→碱性蛋白酶,并按如上顺序分步添加各蛋白酶。分三步酶解的组合有:木瓜蛋白酶→菠萝蛋白酶→碱性蛋白酶,木瓜蛋白酶→中性蛋白酶→碱性蛋白酶,木瓜蛋白酶→胰蛋白酶→碱性蛋白酶,并按如上顺序分步添加各蛋白酶。酶解时间如下:非碱性蛋白酶的酶解时间均为1.5 h,碱性蛋白酶的酶解时间为2 h。不同酶的反应条件如表1所示。

酶解完成后,将酶解液至于恒温水浴中95℃灭

表1 不同蛋白酶的酶解条件

Table 1 Enzymatic conditions of different proteases

蛋白酶的类别	pH	温度(℃)	反应时间(h)	酶添加量(U/g)	料液比(%(w/v))
木瓜蛋白酶	7.0	50	1.5	1200	30
菠萝蛋白酶	6.5	55	1.5	1000	30
胰蛋白酶	8.0	45	1.5	1200	30
中性蛋白酶	7.0	45	1.5	300	30
酸性蛋白酶	3.5	45	1.5	1000	30
碱性蛋白酶	9.0	50	2.0	1700	30

酶15 min,冷却后10000 r/min离心20 min,取上清液置于旋转蒸发仪中旋蒸,然后冷冻干燥,得到沙丁鱼ACE抑制肽的粗制品,分别检测不同酶解液冻干粉的ACE抑制活性,筛选出最佳的酶组合。

1.2.2 酶解条件的优化 以上述分步酶解工艺为基础,以水解度DH值为指标,对酶组合中各酶的反应温度、pH、反应时间、酶添加量、料液比五个反应条件进行单因素实验,确定各反应条件的较佳范围。

1.2.2.1 木瓜蛋白酶酶解条件优化 第一步酶解使用的是木瓜蛋白酶。

设置反应的温度为:55、60、65、70、75℃,在pH7.0、酶添加量1200 U/g、1.5 h、料液比30%(W/V)的条件下进行酶解,考察温度对DH值的影响;

设置反应的pH为:6.6、6.9、7.2、7.5、7.8,在温度65℃、酶添加量1200 U/g、1.5 h、料液比30%(W/V)的条件下进行酶解,考察pH对DH值的影响;

设置反应的时间为:1.0、1.25、1.5、1.75、2.0 h,在温度65℃、pH7.2、酶添加量1200 U/g、料液比30%(W/V)的条件下进行酶解,考察时间与DH值之间的关系;

设置反应的酶添加量为:1000、2000、3000、4000、5000 U/g,在温度65℃、pH7.2、反应时间2.0 h、料液比30%(W/V)的条件下进行酶解,考察酶添加量与DH值之间的关系;

设置反应的料液比为:20%、25%、30%、35%、40%(W/V),在温度65℃、pH7.2、反应时间2.0 h、酶添加量3000 U/g的条件下进行酶解,考察料液比与DH值之间的关系。

再设计4因素3水平的正交实验(如表2所示),确定出木瓜蛋白酶的最终反应条件。

表2 木瓜蛋白酶正交实验因素水平表

Table 2 Factors and levels of orthogonal design for Papain

水平	因素			
	A 温度(℃)	B pH	C 时间(h)	D 酶添加量(U/g)
1	60	6.9	1.75	2000
2	65	7.2	2.0	3000
3	70	7.5	2.25	4000

1.2.2.2 碱性蛋白酶酶解条件优化 以经木瓜蛋白酶酶解后的沙丁鱼酶解液做为底物,第二步使用碱性蛋白酶进行酶解。

设置反应的温度为:50、55、60、65、70℃,在pH9.0、酶添加量1700 U/g、2.0 h的条件下进行酶解,考察温

度对DH值的影响;

设置反应的pH为: 8.5、9.0、9.5、10、10.5, 在温度65 °C、酶添加量1700 U/g、2.0 h的条件下进行酶解, 考察pH对DH值的影响;

设置反应的时间为: 1.5、1.75、2.0、2.25、2.5 h, 在温度65 °C、pH9.5、酶添加量1700 U/g的条件下进行酶解, 考察时间与DH值之间的关系;

设置反应的酶添加量为: 1000、2000、3000、4000、5000 U/g, 在温度65 °C、pH9.5、反应时间2.0 h的条件下, 考察酶添加量与DH值之间的关系。

再设计4因素3水平的正交实验(如表3所示), 确定出碱性蛋白酶的最终反应条件, 并验证其最终水解度和ACE抑制率。

表3 碱性蛋白酶正交实验因素水平表

水平	因素			
	A 温度(°C)	B pH	C 时间(h)	酶添加量(U/g)
1	60	9.0	1.75	3000
2	65	9.5	2.0	4000
3	70	10.0	2.25	5000

1.2.3 水解度的测定 采用甲醛滴定法测定水解度, 参考文献[14]。

1.2.4 酶活力的测定 根据GB/T 23527-2009, 采用福林法测定酶活力。

1.2.5 ACE抑制率的测定^[15] 取经冷冻干燥后的沙丁鱼蛋白肽固体粉末0.2 g溶于10 mL蒸馏水中, 离心(10000 r/min, 15 min); 依次加入离心后的上清液60 μL, 10 mmol/L的HHL溶液80 μL(用pH8.3的磷酸盐缓冲溶液配制而成), 25 mU/mL的ACE溶液10 μL, 置于37 °C的恒温水浴中反应80 min; 加入110 μL的1 mol/L的HCl, 终止反应; 然后加入1.5 mL的乙酸乙酯进行萃取, 混合均匀后离心(10000 r/min, 15 min); 吸取乙酸乙酯层1 mL, 置于烘箱中挥发溶剂(90 °C, 10 min); 用3 mL的蒸馏水溶解烘干后的物质, 于228 nm下测定吸光度。ACE抑制率的计算公式如下:

$$\text{ACE抑制率}(\%) = (\text{OD}_A - \text{OD}_B) / (\text{OD}_A - \text{OD}_C)$$

其中, OD_A为仅存在ACE和HHL时溶液的吸光度值; OD_B为存在ACE、ACE抑制肽和HHL时溶液的吸光度值; OD_C为仅存在HHL时溶液的吸光度值。

1.2.6 数据处理与分析 所有实验均重复3次, 结果以平均值±标准差的形式表示。实验数据采用SPSS 17.0软件进行处理与统计分析。

表4 不同酶组合制得的沙丁鱼蛋白肽的水解度与ACE抑制率结果

Table 4 Degree of hydrolysis and AC-inhibitory rate of sardine peptides by different proteases

酶组合	菠萝蛋白酶+ 碱性蛋白酶	中性蛋白酶+ 碱性蛋白酶	胰蛋白酶+ 碱性蛋白酶	酸性蛋白酶+ 碱性蛋白酶	木瓜蛋白酶+ 碱性蛋白酶	木瓜蛋白酶+ 菠萝蛋白酶+ 碱性蛋白酶	木瓜蛋白酶+ 中性蛋白酶+ 碱性蛋白酶	木瓜蛋白酶+ 胰蛋白酶+ 碱性蛋白酶
水解度(%)	14.39 ^a	13.44 ^b	18.13 ^c	16.03 ^d	16.70 ^d	12.20 ^e	15.29 ^f	16.43 ^d
ACE抑制率(%)	56.40 ^a	58.60 ^b	54.10 ^c	54.21 ^c	65.40 ^d	34.78 ^e	55.65 ^a	45.22 ^f

注: 不同字母表示有显著性差异(p<0.05, n=3)。

2 结果与分析

2.1 筛选水解沙丁鱼肽的酶组合

不同的蛋白酶, 其酶切位点各不相同。因此, 采用不同的蛋白酶组合对沙丁鱼进行酶解, 制备得到的沙丁鱼ACE抑制肽结构及其ACE抑制活性也有所不同。本实验以ACE抑制率为指标, 筛选出最适宜的酶解组合。

经不同酶组合酶解制得的沙丁鱼ACE抑制肽的抑制率结果如表4所示。由“木瓜蛋白酶+碱性蛋白酶”酶解制得的沙丁鱼肽的ACE抑制率最高, 达到65.40%, 且显著高于其他酶组合(p<0.05), 同时其水解度也达到了较高的水平为16.70%。虽然由“胰蛋白酶+碱性蛋白酶”酶解制得的沙丁鱼肽的水解度最高, 达到18.13%, 但其ACE抑制率仅为54.10%。可能是因为胰蛋白酶容易将一些ACE抑制活性较强的肽段切断, 虽然水解度更高, 但是产物的ACE抑制率反而下降。因此, 后面的实验选用“木瓜蛋白酶+碱性蛋白酶”这一组合的酶解工艺进行优化。

有文献指出, 水解度与ACE抑制活性存在一定的正相关关系, 即在一定范围内, 水解度的升高, 有利于ACE抑制活性的增强^[16]。从相对分子质量大小上看, 目前发现的多数ACE抑制肽是由3~9个氨基酸残基组成的短肽, 降压效果较好的乳源蛋白肽则多为含6~10个氨基酸残基的寡肽, 也有极个别的由27个氨基酸组成^[17]。所以, 以此为基础优化双酶酶解的反应条件, 提高沙丁鱼蛋白的水解度, 以制备抑制活性更高的沙丁鱼ACE抑制肽。

2.2 木瓜蛋白酶的单因素实验

2.2.1 温度对DH值的影响 结果见图1, 当温度低于65 °C时, DH值随着反应温度的升高而增大; 当温度上升至65 °C时, DH值达到最大值; 当温度超过65 °C时, DH值随着反应温度的升高而减小。温度的高低直接

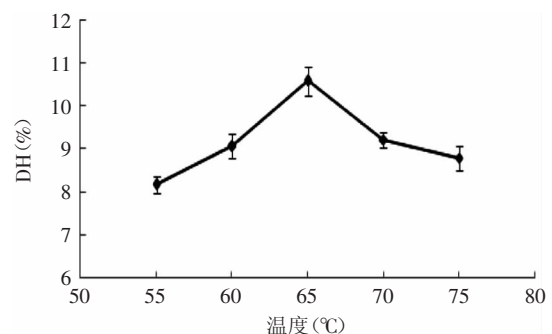


图1 反应温度对DH值的影响

Fig.1 Relationship between DH and temperature

影响到酶的活性,从而影响了木瓜蛋白酶水解沙丁鱼蛋白的能力。因此,木瓜蛋白酶的最适温度在65℃。

2.2.2 pH对DH值的影响 结果见图2,当pH小于7.2时,DH值随着反应pH的升高而增大;当pH上升至7.2时,DH值达到最大值;当pH超过7.2时,DH值随着pH的升高而减小。同样,pH的高低也直接影响到酶的活性,从而影响了木瓜蛋白酶水解沙丁鱼蛋白的能力。因此,木瓜蛋白酶的最适pH在7.2。

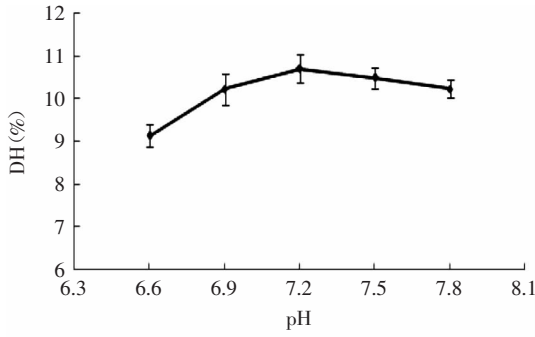


图2 反应pH对DH值的影响
Fig.2 Relationship between DH and pH

2.2.3 时间对DH值的影响 结果见图3,反应时间在1.0~1.5 h内,DH值随着酶解时间的延长而增大,其上升的幅度较大;反应时间在1.5~2.0 h内,DH值依旧随着酶解时间的延长而增大,但其上升的幅度已有所下降。显然,随着酶解时间的延长,DH值不断增大。但由于可被其水解的肽键数也随着时间的延长而减少;过长的酶解时间也使得生产效率降低、成本增加。因此,初定木瓜蛋白酶的酶解时间在2.0 h。

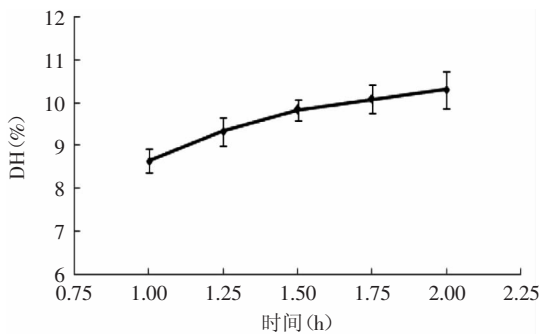


图3 反应时间对DH值的影响
Fig.3 Relationship between DH and reaction time

2.2.4 酶添加量对DH值的影响 结果见图4,随着酶添加量的增加,DH值不断增大。在酶添加量为1000~3000 U/g的范围内,DH值的上升幅度较大;而在3000~5000 U/g的范围内,DH值虽然继续上升,但上升的幅度已明显减小。若添加了过量的酶,酶与底物已经饱和,部分的酶则难以很好的发挥酶解作用,DH值上升不明显,并且过多的酶用量也增加了生产成本。因此,初定木瓜蛋白酶的添加量为3000 U/g。

2.2.5 料液比对DH值的影响 结果见图5,在料液比为20%~30% (W/V)的范围内,DH值随着料液比的增大而增大;而在30%~40% (W/V)的范围内,DH值随着料液比的增大而减小。料液比过低时,能被酶水

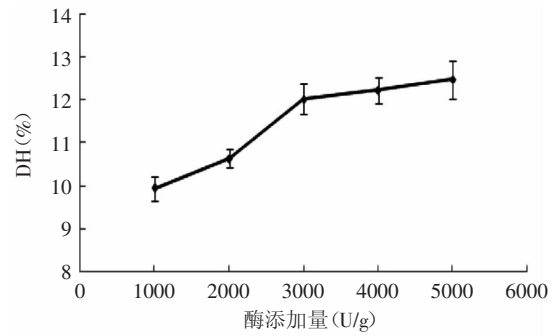


图4 酶添加量对DH值的影响
Fig.4 Relationship between DH and the amount of proteases

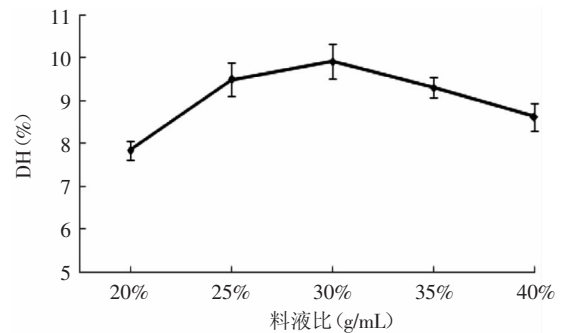


图5 料液比对DH值的影响
Fig.5 Relationship between DH and substrate concentration

解的蛋白较少,得到的沙丁鱼蛋白肽产品较少,加入的酶也难以得到充分利用;料液比过高时,会导致反应溶液体系的粘度增大,限制了酶的催化反应效率,增加了生产成本。因此,初定料液比为30% (W/V)。

2.3 木瓜蛋白酶的正交实验

对于温度、pH、反应时间和酶添加量4个因素,分别对其3个水平进行正交实验。正交实验结果如表5所示,方差分析结果如表6所示。综合极差分析结果和方差分析结果可知,在第一步酶解中,影响沙丁鱼

表5 木瓜蛋白酶正交实验结果表

Table 5 Results of orthogonal design for Papain

实验号	A	B	C	D	DH (%)
1	1	1	1	1	8.43
2	1	2	2	2	10.72
3	1	3	3	3	14.69
4	2	1	2	3	8.50
5	2	2	3	1	10.98
6	2	3	1	2	10.07
7	3	1	3	2	11.26
8	3	2	1	3	14.02
9	3	3	2	1	12.72
K ₁	33.84	28.19	32.52	32.13	
K ₂	29.55	35.72	31.94	32.05	
K ₃	38.00	37.48	36.93	37.21	
k ₁	11.28	9.40	10.84	10.71	
k ₂	9.85	11.91	10.65	10.68	
k ₃	12.67	12.49	12.31	12.40	
R	2.82	3.10	1.66	1.72	

表6 木瓜蛋白酶正交实验方差分析

Table 6 Variance analysis of the orthogonal design for Papain

方差来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	35.704	2	17.852	15.011	*
B	48.701	2	24.350	20.475	*
C	14.895	2	7.447	6.262	*
D	17.479	2	8.740	7.349	*
误差	21.407	18	1.189		
总计	3564.830	27			

注: 表示差异显著 ($p < 0.05$); 表8同。

蛋白DH值的4个因素的主次顺序为: B>A>D>C, 即pH对DH值的影响最大, 其次是温度, 而酶添加量和反应时间对DH值的影响相对较小。以DH值为指标, 可以确定出木瓜蛋白酶的最佳酶解工艺为A₃B₃C₃D₃, 即酶解温度70℃、pH7.5、酶解时间2.25h、酶添加量4000U/g, 此时沙丁鱼蛋白的水解度为14.96%。

2.4 碱性蛋白酶的单因素实验

2.4.1 温度对DH值的影响 结果见图6, 当温度低于65℃时, DH值随着反应温度的升高而增大; 当温度上升至65℃时, DH值达到最大值; 当温度超过65℃时, DH值随着反应温度的升高而减小。原因同样在于温度的高低影响了酶的活性。因此, 碱性蛋白酶的最适温度在65℃。

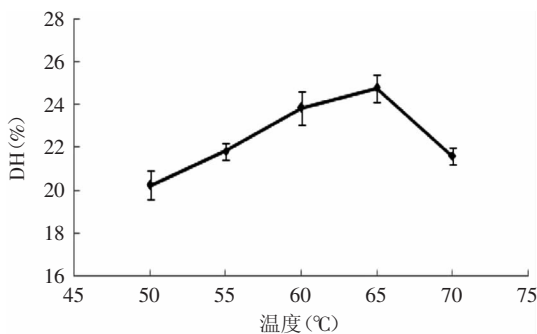


图6 反应温度对DH值的影响

Fig.6 Relationship between DH and temperature

2.4.2 pH对DH值的影响 结果见图7, 当pH小于9.5时, DH值随着反应pH的升高而增大; 当pH上升至9.5时, DH值达到最大值; 当pH超过9.5时, DH值随着pH的升高而减小。同样的, 过低或过高的pH不利于碱性蛋白

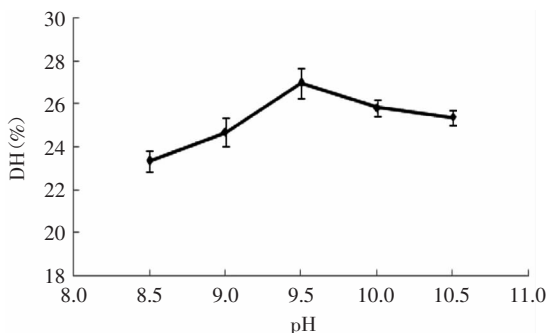


图7 反应pH对DH值的影响

Fig.7 Relationship between DH and pH

酶发挥其水解能力。因此, 碱性蛋白酶的最适pH在9.5。

2.4.3 时间对DH值的影响 结果见图8, 在1.5~2.0h内, DH值随着酶解时间的延长而增大, 其上升的幅度较大; 在2.0~2.5h内, DH值依旧随着酶解时间的延长而增大, 但其上升的幅度已有所下降。酶解时间的延长, 必然伴随着DH值的增大。同样考虑到酶活的持久性、酶的专一性、生产效率与成本, 初定碱性蛋白酶的酶解时间在2.0h。

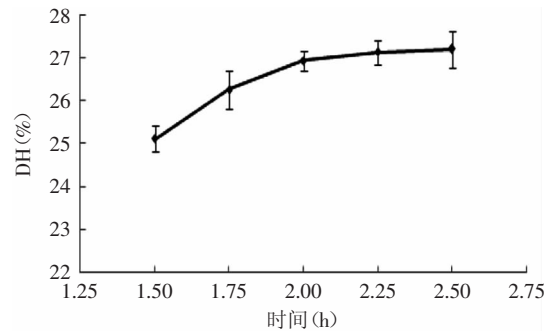


图8 反应时间对DH值的影响

Fig.8 Relationship between DH and reaction time

2.4.4 酶添加量对DH值的影响 结果见图9, DH值随着酶添加量的增加而增大。在酶添加量为1000~3000U/g的范围内, DH值的上升幅度较大; 在3000~4000U/g的区间内, DH值虽然继续上升, 但上升的幅度已有所减小; 而在4000~5000U/g的区间内, DH值仅有微弱的变化。考虑到酶与底物的饱和现象、产品的ACE抑制活性与生产成本, 初定碱性蛋白酶的添加量为4000U/g左右。

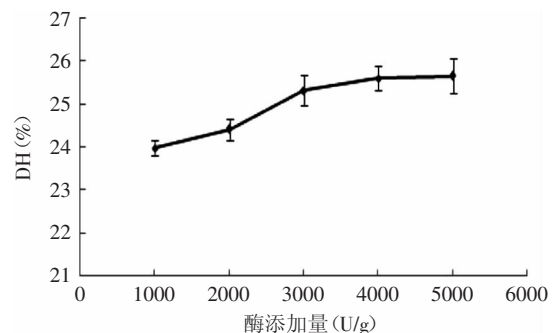


图9 反应时间对DH值的影响

Fig.9 Relationship between DH and the amount of proteases

2.5 碱性蛋白酶的正交实验

对温度、pH、反应时间和酶添加量4个因素, 进行3个水平的正交实验。正交实验结果如表7所示, 方差分析结果如表8所示。综合极差分析结果和方差分析结果可知, 在第二步酶解中, 影响沙丁鱼蛋白DH值的4个因素的主次顺序为: B>D>A>C, 即pH对DH值的影响最大, 其次是酶添加量, 而温度和反应时间对DH值的影响相对较小。以DH值为指标, 可以确定出碱性蛋白酶的最佳酶解工艺为A₃B₃C₂D₃, 即酶解温度70℃、pH10.0、反应时间2.0h、酶的添加量5000U/g, 此时沙丁鱼蛋白的水解度为28.44%。

表7 碱性蛋白酶正交实验结果表

Table 7 Results of orthogonal design for Alcalase

实验号	A	B	C	D	DH(%)
1	1	1	1	1	24.58
2	1	2	2	2	25.78
3	1	3	3	3	28.24
4	2	1	2	3	26.89
5	2	2	3	1	24.62
6	2	3	1	2	27.05
7	3	1	3	2	25.58
8	3	2	1	3	27.70
9	3	3	2	1	27.94
K ₁	78.80	77.05	79.33	77.14	
K ₂	78.56	78.10	80.61	78.41	
K ₃	81.22	83.43	78.64	83.03	
k ₁	26.27	25.68	26.44	25.71	
k ₂	26.19	26.03	26.87	26.14	
k ₃	27.07	27.81	26.21	27.68	
R	0.89	2.13	0.66	1.96	

表8 碱性蛋白酶正交实验方差分析

Table 8 Variance analysis of the orthogonal design for Alcalase

方差来源	Ⅲ型平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	4.330	2	2.165	2.327	
B	23.405	2	11.703	12.579	
C	1.998	2	0.999	1.074	
D	19.216	2	9.608	10.327	
误差	16.747	18	0.930		
总计	19039.169	27			

2.6 水解度和ACE抑制率验证

通过单因素实验和正交实验,确定出了双酶法制备沙丁鱼ACE抑制肽的最佳工艺。沙丁鱼蛋白肽的DH值和ACE抑制率结果如图10所示。工艺优化前,沙丁鱼蛋白肽的DH值为16.70%,ACE抑制率为65.40%;工艺优化后,沙丁鱼蛋白肽的DH值提高到28.44%,同时ACE抑制率提高到73.44%。

有文献报道,在一定范围内,DH值的提高有利于ACE抑制活性的增强^[6]。本实验的结果与前述报道一致。

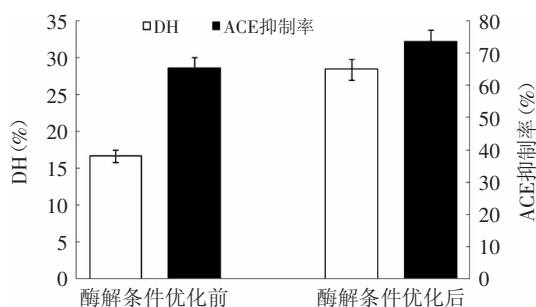


图10 工艺优化前后沙丁鱼肽的ACE抑制率对比

Fig.10 Comparison of ACE-inhibitory rate of sardine peptides between previous process and optimized process

3 结论

由于单酶法会受到酶专一性的限制,一种蛋白酶只能水解由特定氨基酸组成的肽键,使得原料蛋白的水解度偏低,产物的生物活性也易受影响。因此,本文利用不同的酶组合对沙丁鱼进行酶解,以ACE抑制率为指标,筛选出最适宜的酶组合为:木瓜蛋白酶和碱性蛋白酶。通过单因素实验和正交实验,并以DH为指标,优化了双酶分步酶解的反应条件,得到了双酶法制备沙丁鱼ACE抑制肽的最佳工艺。第一步酶解使用的是木瓜蛋白酶,最佳反应条件是:温度70℃、pH7.5、反应时间2.25 h、酶添加量4000 U/g、料液比30% (w/v);第二步酶解使用的是碱性蛋白酶,最佳反应条件是:温度70℃、pH10.0、反应时间2.0 h、酶添加量5000 U/g。经优化后,沙丁鱼蛋白的DH值从16.70%提高到了28.44%,其ACE抑制率则从65.40%提高到了73.44%。

参考文献

- [1] 刘丽娜,王文亮,徐同成,等. 降血压肽研究现状及其前景分析[J]. 中国食物与营养,2011,17(6):64-67.
- [2] Vyssoulis G P, Karpanou E A, Papavassiliou M V, et al. Side effects of antihypertensive treatment with ACE inhibitors [J]. American Journal of Hypertension, 2001, 14(4):A114-A115.
- [3] Yamada A, Sakurai T, Ochi D, et al. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from bovine casein [J]. Food Chemistry, 2013, 141(4):3781-3789.
- [4] Liu X, Zhang M S, 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.
- [5] Boschin G, Scigliuolo G M, Resta D, et al. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes [J]. Food Chemistry, 2014, 145(15):34-40.
- [6] Chen J W, Liu S S, Ye R, et al. Angiotensin-I converting enzyme(ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization [J]. Journal of Functional Foods, 2013, 5(4):1684-1692.
- [7] 张峯,曾庆孝,朱志伟,等. 罗非鱼与四种海水鱼鱼糜比较 [J]. 现代食品科技, 2009, 25(2):1222-1226.
- [8] 杨国欢,侯秀琼,孙省利,等. 应用稳定碳氮同位素分析法研究广东流沙湾海域白腹小沙丁鱼的营养级 [J]. 台湾海峡, 2011, 30(4):467-472.
- [9] Carrera M, Canas B, Gallardo J M. The sarcoplasmic fish proteome: Pathways, metabolic networks and potential bioactive peptides for nutritional inferences [J]. Journal of proteomics, 2013, 78:211-220.
- [10] Kim S K, Wijesekera I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review [J]. Journal of Functional Foods, 2010, 2(1):1-9.
- [11] 赵谋明,任娇艳. 食源性生物活性肽结构特征与生理活性的研究现状与趋势 [J]. 中国食品学报, 2011, 11(9):69-81.
- [12] 张岩,吴燕燕,李来好,等. 酶法制备海洋活性肽及其功能活性研究进展 [J]. 生物技术通报, 2012(3):42-48.

(下转第325页)

- [6] 张珣,周莹莹,李燕,等. 植物源杀虫剂对葡萄绿盲蝽和斑叶蝉的防治效果[J]. 科技导报,2014,32(12):36-40.
- [7] 吕建华,林敏刚,屠亚伟. α -萘烯对杂拟谷盗成虫的控制作用[J]. 中国粮油学报,2010(12):88-91.
- [8] 韩群鑫,黄寿山. 丁香酚对赤拟谷盗的生物活性[J]. 重庆师范大学学报,2009,26(3):16-19.
- [9] Chaubey M K. Fumigant toxicity of essential oils against rice weevil *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera:Curculionidae)[J]. Int J Biol Sci,2011,11(6):411-416.
- [10] Ebadollahi A. Essential oils isolated from *Myrtaceae* family as natural insecticides[J]. Annu Rev Res Biol,2013,3(3):148-175.
- [11] Shaaya E, Kostjukovski M, Eilberg J, et al. Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects[J]. J Stored Prod Res,1997,33(1):7-15.
- [12] 李大强,张忠,毕阳,等. 甘肃和新疆产区孜然精油成分的比较[J]. 食品工业科技,2012,33(11):141-143.
- [13] Gorun V, Proinov I, Băltescu V, et al. Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations[J]. Anal Biochem,1978,86(1):324-326.
- [14] 王光峰,张友军,柏连阳,等. 多杀菌素对甜菜夜蛾多酚氧化酶和羧酸酯酶的影响[J]. 农药学报,2003,5(2):40-46.
- [15] Sabokbar A, Millett P J, Myer B, et al. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells *in vitro*[J]. Bone Miner Metab,1994,27(1):57-67.
- [16] Van Asperen K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method[J]. Insect Physiol,1962,8(4):401-416.
- [17] Clark A G, Dick G L, Smith J N. Kinetic studies on a glutathione S-transferase from the larvae of *Costelytra zealandica* [J]. Biochem J,1984,217:51-58.
- [18] 程伟霞,柴玉鑫,王进军. 四种杀虫剂对两种书虱谷胱甘肽-S-转移酶和超氧化物歧化酶的影响[J]. 植物保护学报,2006,33(3):333-334.
- [19] Kakkar V, Muppu S K, Chopra K, et al. Curcumin loaded solid lipid nanoparticles: an efficient formulation approach for cerebral ischemic reperfusion injury in rats[J]. Eur J Pharm Biopharm,2013,85(3):339-345.
- [20] Zhu Z, Jiang W, Thompson H J. Edible dry bean consumption (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates cardiovascular risk factors and diet-induced obesity in rats and mice[J]. Brit J Nutr,2012,108(S1):S66-S73.
- [21] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem,1976,72(1):248-254.
- [22] Purohit P, Mustafa M, Osmani Z. Insecticidal properties of plant-extract of *Cuminum cyminum* Linn[J]. J Sci Food Agr,1983,49(4):101-103.
- [23] Rajendran S, Sriranjini V. Plant products as fumigants for stored-product insect control[J]. J Stored Prod Res,2008,44(2):126-135.
- [24] 尹飞,冯夏,李振宇,等. 亚致死剂量氯虫苯甲酰胺对小菜蛾体内活性酶的影响[J]. 植物保护,2014,40(2):66-69.
- [25] 李亚红,余志涛,张学尧,等. 昆虫谷胱甘肽S-转移酶农药解毒与内源代谢研究进展[J]. 山西大学学报,2014,4:49-51.
- [26] 徐汉虹,赵善欢,朱亮锋. 精油对储粮害虫种群的繁殖抑制作用研究[J]. 中国粮油学报,1993,8(2):11-17.
- [27] Nathan S S, Kalaivani K, Murugan K, et al. The toxicity and physiological effect of neem limonoids on *Cnaphalocrosis medinalis* (Guenée) the rice leaf folder[J]. Pestic Biochem Phys,2005,81(2):113-122.
- [28] Sakharov I Y, Makarova I E, Ermolin G A. Chemical modification and composition of tetrameric isozyme K of alkaline phosphatase from harp seal intestinal mucosa[J]. Comp Biochem Phys B,1989,92(1):119-122.
- [29] 张红英,赤国彤,张金林. 昆虫解毒酶系与抗药性研究进展[J]. 河北农业大学学报,2009(1):193-195.
- [30] 吕敏,刘惠霞,吴文君. 谷胱甘肽S-转移酶与昆虫抗药性的关系[J]. 昆虫知识,2004,40(3):204-207.
- [31] 蔡慧珍,沈孝兵. 德国小蠊酸性磷酸酯酶测定条件的方法研究[J]. 环境与职业医学,2007,24(3):251-254.
- [32] 尚利娜,袁海滨,魏春艳,等. 黄花蒿精油对玉米象成虫体内酶活性的影响[J]. 吉林农业大学学报,2010,32(6):616-621.
- [33] 李周直,沈惠娟,蒋巧根,等. 几种昆虫体内保护晶系统活性的研究[J]. 昆虫学报,1994,37(4):399-403.
- [34] Brattsten L B, Holyoke C W, Leeper J R, et al. Insecticide resistance: challenge to pest management and basic research[J]. Sci,1986,231(4743):1255-1260.
- [35] Sekine T, Sugano M, Majid A, et al. Antifungal effects of volatile compounds from black zira (*Bunium persicum*) and other spices and herbs[J]. Journal of Chemical Ecology,2007,33:2123-2132.
- [36] Lucia A, Audino P G, Seccacini E, et al. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae[J]. Journal of the American Mosquito Control Association,2007,23:299-303.

(上接第300页)

- [13] Matsui T, Matsufuji H, Seki E, et al. Inhibition of Angiotensin I-converting Enzyme by *Bacillus licheniformis* Alkaline Protease Hydrolyzates Derived from Sardine Muscle[J]. Biosci Biotech Biochem,1993,57(6):922-925.
- [14] 卓林霞,吴晖,刘冬梅. 枯草芽孢杆菌发酵豆粕产蛋白酶优化实验研究[J]. 粮食与饲料工业,2009(2):32-35.
- [15] Vaštag Z, Popović L, Popović S, et al. Antioxidant and angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity in the water-soluble protein extract from Petrovac Sausage (Petrovská Kolbása) [J]. Food Control,2010,21(9):1298-1302.
- [16] 胡松青,张婷婷,郭莎莎,等. 鱼鳞明胶ACE抑制肽的制备及其活性研究[J]. 现代食品科技,2012,28(11):1491-1494.