

DOI:10.3969/j.issn.1000-1298.2010.09.027

超声波预处理对燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽的影响^{*}

马海乐¹ 耿静静¹ 骆琳¹ 杨巧绒² 朱文学³

(1. 江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013; 2. 江苏大学机械工程学院, 镇江 212013;

3. 河南科技大学食品与生物工程学院, 洛阳 471003)

【摘要】 利用燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽时先利用超声波对燕麦蛋白原料进行预处理研究。以 ACE 抑制活性和水解度为指标, 考察了超声波功率、处理时间、超声波工作/间歇时间对燕麦蛋白预处理效果的影响。结果表明, 超声波预处理的最佳工艺参数为: 超声波功率 500 W, 处理时间 20 min, 超声波工作时间 2 s、间歇时间 2 s, 该条件下酶解产物对 ACE 的半抑制浓度 IC_{50} 值从 0.533 mg/mL 降到 0.299 mg/mL, 酶解时间由常规酶解的 90 min 缩短到 60 min; 超声波预处理参数变化虽然对水解度影响不显著, 但对 ACE 抑制活性的影响显著; 验证了超声波引起的蛋白疏水性增加是导致酶解产物 ACE 抑制活性显著改善的重要原因之一。

关键词: 燕麦蛋白 ACE 抑制肽 超声波 预处理 酶解

中图分类号: TS201.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2010)09-0133-05

Effect of Oat-seed Protein Pretreatment by Ultrasonic on Preparation of ACE Inhibitory Peptides

Ma Haile¹ Geng Jingjing¹ Luo Lin¹ Yang Qiaorong² Zhu Wenxue³

(1. School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. School of Mechanical Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

3. School of Food and Biological Engineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract

In order to improve enzymolysis technology for preparation of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibiting peptides from oat-seed protein by alcalase protease, ultrasonic pretreatment of oat-seed protein solution was investigated. Based on the inhibitory activity of ACE and degree of hydrolysis (DH), the effects of ultrasonic power, pretreatment time and the on-off time ratio on ultrasonic pretreatment efficacy were studied. The results show that the optimum conditions of ultrasonic pretreatment are 500 W of ultrasonic power, 20 min of pretreatment time and 2s/2s of ultrasonic on-off time ratio. Under the optimum conditions, half inhibiting concentration (IC_{50}) value of ACE decreases from 0.533 mg/mL to 0.299 mg/mL, and the time of enzymolysis reduces from 90 min to 60 min. Experiments also show that ultrasonic pretreatment parameters have made a significant impact on ACE inhibitory activity while no significant effect on the DH. It is verified that the increase of protein hydrophobicity caused by ultrasound is one of main reasons for significant improvement of hydrolysates ACE inhibitory activity.

Key words Oat-seed proteins, ACE inhibiting peptides, Ultrasound, Pretreatment, Enzymatic hydrolysis

引言

近年来, 开发安全无副作用的食源蛋白降血压

多肽得到人们的高度关注。张晓平^[1]、管骁^[2]等进行了利用燕麦蛋白制备 ACE (angiotensin-converting enzyme) 抑制肽的研究, 表明燕麦蛋白在降血压活性

收稿日期: 2009-12-24 修回日期: 2010-04-20

* 国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2007AA10Z321)、江苏省科技支撑计划资助项目(BE2008375)和高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(200802990010)

作者简介: 马海乐, 教授, 博士生导师, 主要从事功能食品生物技术研究, E-mail: mhl@ujs.edu.cn

肽的开发方面有很好的研究价值。不过,上述报道使用的制备方法均为传统的酶解技术,存在酶解效率和产物 ACE 抑制活性低等不足。近年来,本课题组为了克服传统酶解技术存在的缺点,开展了一系列超声波辅助酶解技术的研究,取得了显著的效果^[3-5]。因此,本文将超声波技术应用于燕麦蛋白的预处理,目的在于提高蛋白质酶解制备 ACE 抑制肽的反应效率、改善酶解物的 ACE 抑制活性。

1 材料和方法

1.1 试验材料

燕麦蛋白,从燕麦全粉提取,蛋白含量为 58.33%;N-[3-(2-呋喃基)丙烯酰]-L-苯丙氨酰甘氨酸(FAPGG)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(hepes),sigma 公司;血管紧张素转化酶(ACE),按照文献[6]的方法从猪肺中提取;碱性蛋白酶,酶活 339 600 U/g,诺维信生物技术有限公司。

1.2 仪器及设备

全波长酶标仪,美国 Thermo 公司;TGL-16 型高速台式冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;SPX-250B 型生化培养箱,常州国华仪器厂;PHS-3TC 型数显 pH 计,上海天达仪器有限公司;HH-S 型数显恒温水浴锅,江苏省金坛市医疗仪器厂;GA99-II D 型超声波细胞粉碎机,无锡市上佳生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 燕麦蛋白的提取方法

燕麦蛋白的提取采取碱溶酸沉法。称取一定量燕麦粉料,按料液比 1:9(燕麦粉料质量(g)与水体积(mL)的比例)加水,调 pH 值至 10、加热至 50℃,搅拌下提取蛋白 90 min;浸提液在 10 000 r/min 下离心 20 min。将上清液用 1 mol/L HCl 缓慢调溶液 pH 值至 4.0,使蛋白质沉淀,在 10 000 r/min 下离心 20 min;对沉淀物水洗 2 遍后,采取喷雾干燥法干燥沉淀物,得到燕麦蛋白。

1.3.2 常规酶解

常规酶解指未经过超声波处理的蛋白直接用于酶解。配制质量分数 3% 的燕麦蛋白溶液 100 mL,放入带转子的恒温水浴锅中,加 2% 碱性蛋白酶,在 pH 值 9.0 和 50℃ 下进行酶解 90 min,100℃ 下灭酶 10 min,离心(10 000 r/min,20 min)后收集上清液,稀释 40 倍后测定 ACE 抑制活性,并计算水解度。酶解时间 90 min 是经过单因素和正交试验优化得到最佳时间。试验以常规酶解为对照,观察超声波预处理对酶解效果的影响。

1.3.3 超声波预处理燕麦蛋白

配制 3% 的燕麦蛋白溶液 100 mL,倒入直径为 4 cm 的烧杯中,将超声探头插入反应液下 1~2 cm 位置,超声波预处理后进行酶解,酶解条件和 ACE 抑制活性测定方法同 1.3.1 节,并计算水解度。考察超声波处理时间、超声波功率和超声波工作/间歇时间对酶解工艺的影响,通过正交试验选出最佳的超声波预处理条件。

超声波预处理原料蛋白后,最佳酶解时间有可能会缩短,因此需要首先通过预备试验,确定评价蛋白超声波预处理效果的蛋白酶解时间。

1.3.4 水解度的测定

水解度的测定采用 pH-stat 法^[7]。

1.3.5 ACE 抑制肽活性的测定

ACE 抑制肽的测定用 FAPGG 作为 ACE 的底物,利用吸光度的变化,在酶标定量测定仪中测定^[8]。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶解时间对比

在超声波功率 800 W,超声波工作时间 2 s、间歇时间 2 s 的条件下,对燕麦蛋白液预处理 20 min,之后进行酶解。图 1 为常规酶解与经过超声波处理的酶解效果对比。

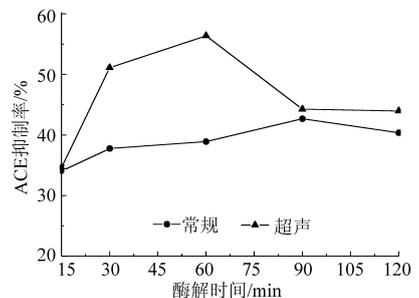


图 1 超声波预处理原料蛋白对酶解时间的影响
Fig. 1 Dependence of optimum enzymolysis time of oat-seed protein on the ultrasonic pretreatment

由图 1 中可以看到,与常规酶解相比,将原料经过超声波预处理后,最佳酶解时间从 90 min 缩短到 60 min,因此,评价超声波预处理效果的蛋白酶解时间确定为 60 min。

图 1 还显示,采用超声波预处理后,ACE 抑制率的最大值从 42.69% 提高到 56.38%,提高了 32.07%,可能是由于超声波处理提高蛋白质的溶解度、改变了蛋白质的微观结构^[3]。

2.2 超声波功率对酶解效果的影响

在超声波处理时间 20 min,超声波工作时间 2 s、间歇时间 2 s 下,超声波功率对酶解效果的影响如图 2 所示。

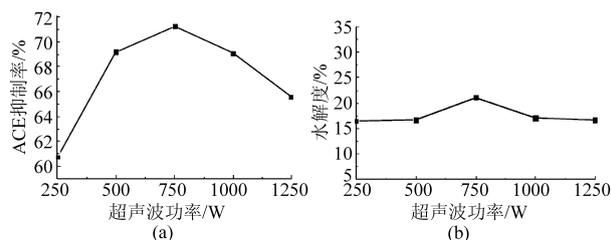


图2 超声波功率对酶解效果的影响

Fig. 2 Influence of ultrasonic power on effects of enzymolysis

(a) ACE抑制率 (b) 水解度

由图2可知,在一定功率范围内,随着超声波功率的增大,酶解产物的ACE抑制活性与水解度逐渐增大,当功率达到750 W时,抑制活性和水解度均达到最大值,继续增加超声波功率,酶解产物的抑制活性和水解度都开始降低。原因可能是适当的超声波功率可以改变燕麦蛋白的结构,低强度超声波产生的空化作用较为缓和且表现出一定的规律性^[9],使埋藏在蛋白质内部的活性部位能够暴露出来,更好地与酶结合,从而得到更有效的抑制肽,然而高强度超声波产生的空化作用激烈而短暂^[9],可能使原本暴露出来的活性部位进一步破坏,反而不利于之后酶解过程中活性肽的形成。

2.3 超声波处理时间对酶解效果的影响

在超声波功率750 W,超声波工作时间2 s、间歇时间2 s下,对原料蛋白进行不同时间的超声波处理,超声波处理时间对酶解效果的影响如图3所示。

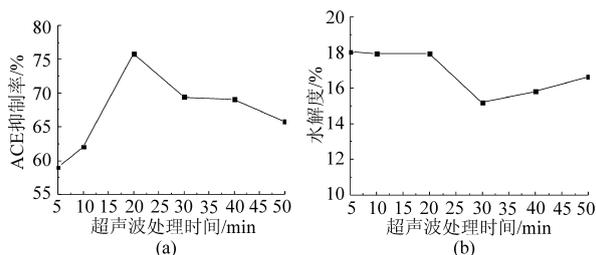


图3 超声波处理时间对酶解效果的影响

Fig. 3 Influence of ultrasonic treatment time on effects of enzymolysis

(a) ACE抑制率 (b) 水解度

由图3可知,ACE抑制活性的释放随超声波预处理时间的增长表现出先增后降的趋势,在20 min达到最大抑制活性。水解度的变化则呈现下降的趋势,但总体变化较小。原因是燕麦蛋白受超声波产生的空化作用随时间延长而加强,适当的超声波可以改变蛋白的结构,使组织结构变得稀疏,埋藏在蛋白质内部的活性部位暴露出来,在酶解中促进与酶的结合,超声波处理时间过长,蛋白长期处于高温高

压下,暴露在外的活性部位被破坏,从而活性降低或失去。

2.4 超声波工作/间歇时间对酶解效果的影响

在超声波功率750 W,处理时间20 min下,选择不同工作/间歇时间对原料蛋白进行处理,对酶解效果的影响如表1所示。

表1 超声波工作/间歇时间对酶解效果的影响

Tab. 1 Influences of the ratio of on-time and off-time of pulsed ultrasonic on effects of the enzymolysis %

超声波工作/间歇时间	参数	
	ACE抑制率	水解度
工作2 s、间歇1 s	52.27	16.66
工作2 s、间歇2 s	53.73	17.92
工作4 s、间歇2 s	78.84	17.09
工作6 s、间歇2 s	64.93	17.91
工作8 s、间歇2 s	64.77	16.67

由表1可知,水解度从最小值16.66%到最大值17.91%,基本无变化,ACE抑制活性先增大后减小,在超声波工作时间4 s、间歇时间2 s时达到最大。原因是超声波工作时间和间歇时间的长短交替,可能会影响到超声波空化作用,从而对蛋白结构造成不同程度的改变,影响反应进程,具体的作用机理尚不明确。

从图2、3和表1可以发现,从整体上讲,超声波功率、处理时间和超声波工作/间歇时间的变化对水解度的影响不显著,而对ACE抑制率的影响非常显著。贾俊强的研究认为超声波引起蛋白的疏水性增加,是导致经超声波处理后蛋白质酶解物中疏水性氨基酸含量增加的重要原因^[10],而贾俊强完成的降血压肽构效关系分析发现,降血压肽末端的疏水性氨基酸含量较多^[11],因此超声波预处理可以在不大幅度改变蛋白质水解度的前提下,显著提高水解产物的ACE抑制活性。

2.5 超声波预处理原料蛋白的优化试验

对原料蛋白预处理的参数进行分析,以超声波处理时间、超声波功率、超声波工作/间歇时间为因素,设计 $L_9(3^4)$ 的正交试验。试验安排与结果见表2、3,方差分析如表4所示。

由表3可知,正交试验选出的最优组合为 $A_2B_2C_1$,为正交试验的第5组,故最优组合为超声波功率500 W,超声波处理时间20 min,超声波工作时间2 s、间歇时间2 s。此外可以得到,影响抑制率的几个因素的主次从大到小依次为超声波处理时间、工作/间歇时间、超声波功率,由表4可知超声波处理时间对原料蛋白抑制率影响显著。

表2 因素水平

Tab.2 Factor and levels of orthogonal experiment

水平	因素		
	功率 A/W	处理时间 B/min	工作/间歇时间 C
1	250	10	工作 2 s、间歇 2 s
2	500	20	工作 4 s、间歇 2 s
3	750	30	工作 5 s、间歇 2 s

表3 超声波预处理燕麦蛋白 L₉ (3⁴) 正交试验安排与结果

Tab.3 Layout and results of orthogonal experiments for ultrasonic pretreatment on oat-seed protein

试验序号	A	B	C	ACE 抑制率/%
1	1	1	1	67.01
2	1	2	2	74.73
3	1	3	3	59.73
4	2	1	3	64.32
5	2	2	1	77.91
6	2	3	2	62.82
7	3	1	2	65.52
8	3	2	3	69.99
9	3	3	1	59.83
k ₁	67.16	65.62	68.25	
k ₂	68.35	74.21	67.69	
k ₃	65.11	60.79	64.68	
R	3.24	13.42	3.57	
最优组合		A ₂ B ₂ C ₁		
因素主次		B > C > A		

2.6 超声波预处理蛋白后酶解和常规酶解所得产物 ACE 抑制活性的比较

超声波预处理蛋白后进行酶解得到产物的 ACE 抑制活性由常规酶解的 42.69% 增大到

77.91%, 提高了 82.5%, IC₅₀ 值由 0.533 mg/mL 减小到 0.299 mg/mL, 降低了 43.9%。

表4 超声波预处理燕麦蛋白试验因素方差分析

Tab.4 Variance analysis of orthogonal experiments for ultrasonic pretreatment on oat-seed protein

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F	F	显著性
				(α=0.05)	(α=0.01)	
A	16.08	2	1.26	6.94	18.00	
B	277.18	2	21.74	6.94	18.00	*
C	3.37	2	0.27	6.94	18.00	
误差	25.50	4				

3 结论

(1) 以常规酶解为对照, 超声波预处理燕麦蛋白后, 经过酶解达到最大 ACE 抑制活性的时间由 90 min 缩短到 60 min, 酶解产物的 ACE 抑制活性由 42.69% 增大到 56.38%, 增大了 32.07%。说明超声波预处理不仅可以加快酶解反应进程, 而且可以得到高抑制活性的产物。

(2) 超声波功率、处理时间和超声波工作/间歇时间的变化对水解度的影响不显著, 而对 ACE 抑制率的影响非常显著, 验证了超声波引起蛋白的疏水性增加是引起酶解产物 ACE 抑制活性显著改善的重要原因之一。

(3) 以 L₉ (3⁴) 正交试验对超声波预处理原料蛋白进行了工艺优化, 得到了最佳条件: 超声波功率 500 W, 超声波处理时间 20 min, 超声波工作时间 2 s、间歇时间 2 s。方差分析发现, 超声波处理时间为显著影响因素。在最佳超声波预处理条件下酶解产物的 IC₅₀ 值为 0.299 mg/mL, 比常规酶解减小了 43.90%, 说明超声波预处理优于常规酶解。

参 考 文 献

- 张晓平, 赵世锋, 蒋琼, 等. 酶解燕麦蛋白制备 ACE 抑制肽的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(11): 189~193.
Zhang Xiaoping, Zhao Shifeng, Jiang Qiong, et al. Study on producing angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from oat protein by the enzymatic digest[J]. Food Science, 2009, 30(11): 189~193. (in Chinese)
- 管晓, 姚惠源. 酶法制备燕麦麸蛋白 ACE 抑制肽的研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(6): 12~15.
Guan Xiao, Yao Huiyuan. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from the enzymatic digest of oat bran protein[J]. Food and Machinery, 2006, 22(6): 12~15. (in Chinese)
- 何荣海, 马海乐, 周存山, 等. 超声波在酶法生产紫菜降血压肽过程中的应用[J]. 江苏大学学报, 2007, 28(1): 4~7.
He Ronghai, Ma Haile, Zhou Cunshan, et al. Application of ultrasound technology to enzyme hydrolysis process in producing antihypertensive peptides from *Porphyra yezoensis*[J]. Journal of Jiangsu University: Natural Science Edition, 2007, 28(1): 4~7. (in Chinese)
- 丁青芝, 马海乐, 骆琳, 等. 超声处理对菜籽蛋白酶解效果的研究[J]. 农业工程学报, 2009, 25(1): 294~299.
Ding Qingzhi, Ma Haile, Luo Lin, et al. Effect of ultrasonic treatment on rapeseed protein enzymolysis[J]. Transactions of the CSAE, 2009, 25(1): 294~299. (in Chinese)

- 5 丁青芝,马海乐,骆琳,等. 脉冲超声预处理对玉米黄粉酶解制备ACEI肽的影响[J]. 江苏大学学报:自然科学版, 2009,30(6):554~558.
Ding Qingzhi, Ma Haile, Luo Lin, et al. Effect of ultrasonic pretreatment of corn gluten meal to enhance enzymatic hydrolysis in preparing ACEI peptid[J]. Journal of Jiangsu University: Natural Science Edition, 2009,30(6):554~558. (in Chinese)
- 6 吴琼英,马海乐,崔恒林,等. 猪肺血管紧张素转化酶的提取纯化及其性质研究[J]. 食品科学, 2004,25(9):71~73.
Wu Qiongying, Ma Haile, Cui Henglin, et al. Study on extraction and characteristics of angiotensin converting enzyme-ACE of fresh hog lung[J]. Food Science, 2004,25(9):71~73. (in Chinese)
- 7 Adler-Nissen Jens. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzen sulfonic acid[J]. J. Agric. Food Chem., 1979, 27(6): 1 256~1 262.
- 8 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.
Liu Zhiguo, Wu Qiong, Lü Lingxiao, et al. Activity detection and structure analysis of ACE inhibitors derived from rice bran protein[J]. Food Science, 2007, 28(3):223~227. (in Chinese)
- 9 吕鹏,庄重,凌建亚,等. 超声对酶的影响[J]. 生物技术通讯, 2004,15(5):534~536.
Lü Peng, Zhuang Zhong, Ling Jianya, et al. Effect of ultrasound on enzyme[J]. Letters in Biotechnology, 2004,15(5): 534~536. (in Chinese)
- 10 贾俊强,马海乐,赵伟睿,等. 超声波处理对麦胚清蛋白结构和功能性质的影响[J]. 过程工程学报, 2009,9(1): 107~112.
Jia Junqiang, Ma Haile, Zhao Weirui, et al. Effect of ultrasound treatment on structure and functional properties of wheat germ albumin[J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2009,9(1):107~112. (in Chinese)
- 11 贾俊强,马海乐,王振斌,等. 降血压肽的构效关系研究[J]. 中国粮油学报, 2009,24(5):110~114.
Jia Junqiang, Ma Haile, Wang Zhenbin, et al. Structure-activity relationship of antihypertensive peptides[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009,24(5):110~114. (in Chinese)
- 12 刘静波,于志鹏,赵文竹,等. 蛋清肽酶解工艺及血管紧张素转化酶抑制活性研究[J]. 农业机械学报, 2010,41(7): 147~152,113.
Liu Jingbo, Yu Zhipeng, Zhao Wenzhu, et al. Enzymatic hydrolysis technology for ACE-inhibitory peptides from egg white [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010,41(7):147~152,113. (in Chinese)

(上接第 107 页)

- 7 Prevolnik M, Candek-Potokar M, Skorjanc D. Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality—a review[J]. Czech Journal of Animal Science, 2004, 49(11): 500~510.
- 8 Prieto N, Roehe R, Lavin P, et al. Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: a review[J]. Meat Science, 2009, 83(2): 175~186.
- 9 Brondum J, Munck L, Henckel P, et al. Prediction of water-holding capacity and composition of porcine meat by comparative spectroscopy[J]. Meat Science, 2000, 55(2): 177~185.
- 10 Barlocco N, Vadell A, Ballesteros F, et al. Predicting intramuscular fat, moisture and Warner-Bratzler shear force in pork muscle using near infrared reflectance spectroscopy[J]. Animal Science, 2006, 82(1): 111~116.
- 11 Chan D E, Walker P N, Mills E W. Prediction of pork quality characteristics using visible and near-infrared spectroscopy [J]. Transactions of the ASAE, 2002, 45(5): 1 519~1 527.
- 12 Savenije B, Geesink G H, Vander Palen J G P, et al. Prediction of pork quality using visible/near-infrared reflectance spectroscopy[J]. Meat Science, 2006, 73(1): 181~184.
- 13 Prevolnik M, Candek-Potokar M, Skorjanc D, et al. Predicting intramuscular fat content in pork and beef by near infrared spectroscopy[J]. Journal of Near Infrared Spectroscopy, 2005, 13(2): 77~85.
- 14 夏俊芳,李小昱. 脐橙VC含量近红外光谱消噪小波优化[J]. 农业机械学报, 2009, 40(4): 143~146.
Xia Junfang, Li Xiaoyu. Wavelet optimization for near-infrared spectra denoising of vitamin C content of umbilical orange [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2009, 40(4): 143~146. (in Chinese)
- 15 Zhu D Z, Ji B P, Meng C Y, et al. Study of wavelet denoising in apple's charge-coupled device near-infrared spectroscopy [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(14): 5 423~5 428.
- 16 Liang L W, Wang B, Guo Y, et al. A support vector machine-based analysis method with wavelet denoised near-infrared spectroscopy[J]. Vibrational Spectroscopy, 2009, 49(2): 274~277.