

酶解中国毛虾制备低分子肽的研究

曹文红^{1,2} 章超桦¹ 秦小明¹

1(广东海洋大学食品科技学院,湛江,524025) 2(中国科学院南海海洋研究所,广州,510301)

摘要 以中国毛虾为原料,采用酶法制备低分子肽。利用响应面法优化了 Alcalase 4 L 酶水解中国毛虾的工艺参数:温度 57.1℃、pH 8.0、加酶量为 46 mL/kg,酶解产物的平均肽链长从 0.5h 的 14.02 逐渐降低到 8 h 的 3.96。采用凝胶层析法测定了酶解产物的分子质量分布,不同时间酶解产物的 Sephadex G-15 凝胶色谱图中均出现 3 个吸收峰,前 2 个峰的分子质量在 18 722~641 u 和 641~35 u 之间。从峰值变化可以判断出,随着酶解的进行,低分子肽的量逐渐增加。

关键词 中国毛虾,酶解,水解度,低分子肽,中心组合设计

研究发现,低分子肽较氨基酸更易为人体所吸收^[1],且具有某些特殊的生理功能,如可降低血液中的胆固醇^[2],清除自由基^[3],预防和治疗高血压^[4],促进钙质吸收^[5],增强机体免疫力^[6],促进肉芽生长从而加速伤口愈合等^[7]。中国毛虾(*Acetes chinensis*)又名虾米、海米,是我国沿海虾类资源量最大的一种,丰产时年产可达 20 万 t。除少数鲜售外,大多被制成经济价值不高的虾皮、虾酱等,有相当一部分因未能得到及时有效的利用而腐败变质,造成很大的资源浪费。

本研究中尝试利用 Alcalase 2.4L 酶酶解中国毛虾蛋白质,制备低分子肽产物。Alcalase 2.4L 是一种非特异性蛋白质肽键内切酶,酶解能力强,易产生低分子肽产物。文中采用中心组合设计,建立了 Alcalase 2.4L 酶解中国毛虾的水解度与各因素之间的数学模型,并优化了工艺参数,测定了不同酶解时间产物的分子质量分布,为以中国毛虾为原料开发生物活性肽类保健品和药品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

新鲜中国毛虾,购自广东阳江,2kg 分装,于-18℃保藏备用。

碱性蛋白酶 Alcalase 2.4L,由诺维信公司提供,活力 2.4 AU/g。

分子质量标准品牛血清白蛋白(M_w 67 000u)、抑肽酶(M_w 6 500u)、杆菌肽(M_w 1 450u)、L-酪氨酸(M_w 181.19u),购自北京华美生物有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 中国毛虾的酶解

将毛虾解冻后均浆,100℃水浴 10min 使蛋白质变性,冷却后加蒸馏水调整底物质量浓度为 20%,并调节至所需要的 pH 值,在设定的恒温水浴中预热 20 min 后加入 Alcalase 2.4 L 启动反应,酶解结束后于 100℃水浴 10 min 灭酶,冷却后 4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液备用。

1.2.2 水解度的测定方法

$$DH/\% = \frac{\text{已水解的肽键数}}{\text{原料中总肽键数}} \times 100$$

$$= [(B - C)/(A - D)] \times 100$$

式中:A 为原料中总氮量,B 为水解液中的氨基酸氮量,C 为原料中游离的氨基酸氮量,D 为原料中的非蛋白氮量。

1.2.3 响应面试验设计与数据处理

采用三因素中心组合设计,考察温度、pH、加酶量等因素对水解度的影响,优化工艺参数。根据单因素试验结果(文中未列出),选择因素的水平(表 1)。

表 1 三因素中心组合设计因素编码表

编码值	X_1	X_2	X_3
	酶解温度/℃	pH 值	酶添加量/mL·(100g) ⁻¹
+1.682	63.4	8.84	5.7
+1	60	8.50	5.0
0	55	8.00	4.0
-1	50	7.50	3.0
-1.682	46.6	7.16	2.35

1.2.4 平均肽链长(MLPL)^[8]

$$MLPL = 1/DH$$

1.2.5 分子量标准曲线的绘制及酶解产物分子质量分布的测定

将 4 种分子质量标准品分别上样至 Sephadex

第一作者:博士研究生,讲师(章超桦教授为通讯作者)。

收稿日期:2006-07-27,改回日期:2006-09-08

G-15葡聚糖凝胶柱(1.6 cm×68 cm),用蒸馏水洗脱,流速为0.8 mL/min,用自动部分收集器收集,每管3 mL,测定280 nm处的吸光值。得到分子质量回归方程为: $y = -28.654x + 194.42$,其中 y 为洗脱液体积, x 为分子质量的对数,决定系数为0.988 8。将酶解液配制成为可溶性蛋白含量为10 mg/mL的样品上样,在相同的条件下进行凝胶层析,利用分子质量回归方程考察酶解产物的分子质量分布。

2 结果与讨论

2.1 采用响应面法优化 Alcalase 2.4 L 酶解工艺

响应面法是一种集合数学与统计的方法,广泛应用于生化反应过程中多因素试验的工艺参数优化^[9,10]。文中采用三因素中心组合设计,考察pH、温度、加酶量等对中国毛虾酶解的影响,酶解时间固定为3 h,考察指标为水解度,共20个试验(表2)。

表2 三因素中心组合设计的试验结果

试验编号	X_1	X_2	X_3	水解度/%
1	-1	-1	-1	16.08
2	1	-1	-1	10.38
3	-1	1	-1	14.06
4	1	1	-1	10.38
5	-1	-1	1	7.33
6	1	-1	1	24.63
7	-1	1	1	12.62
8	1	1	1	16.14
9	-1.682	0	0	12.42
10	1.682	0	0	12.65
11	0	-1.682	0	7.64
12	0	1.682	0	18.12
13	0	0	-1.682	6.11
14	0	0	1.682	20.49
15	0	0	0	20.27
16	0	0	0	23.85
17	0	0	0	25.42
18	0	0	0	27.09
19	0	0	0	22.8
20	0	0	0	24.19

利用 Design Expert 软件对表2的结果进行统计分析,得到回归方程: $Y = 23.881\ 24 + 0.866\ 00X_1 - 3.668\ 84X_1^2 + 0.908\ 35X_2 - 3.546\ 86X_2^2 + 2.489\ 90X_3 - 3.398\ 37X_3^2 - 1.470\ 00X_1X_2 + 3.775\ 00X_1X_3 - 0.147\ 50X_2X_3$ (1)

该方程表达了水解度与所选的3个因素之间的变化关系,方程的决定系数为0.819 9。由表3可知,方程的 F 值为5.06, $F > F_{0.01(9, 10)} = 4.94$,说明方

程描述各因子与响应值之间的关系时,因变量与全体自变量之间的线性关系是显著的。失拟项的 F 值也很小且不显著,表明模型与实际情况拟合较好,试验误差小,因而可用此模型对试验数据进行分析 and 预测。方程中各因素的平方项具有较高的显著性,说明响应值与试验因子之间的关系并不是简单的线性关系。一次项中的 X_3 以及交互项中的 X_1X_3 对试验指标有显著影响,其余各项不显著。

表3 回归方程的方差分析

来源	SS	df	MS	F	p
模型	689.75	9	76.64	5.06	0.009 2
X_1	10.24	1	10.24	0.68	0.430 2
X_1^2	193.98	1	193.98	12.80	0.005 0
X_2	11.27	1	11.27	0.74	0.408 7
X_2^2	181.30	1	181.30	11.96	0.006 1
X_3	84.67	1	84.67	5.59	0.039 7
X_3^2	166.43	1	166.43	10.98	0.007 8
X_1X_2	17.29	1	17.29	1.14	0.310 6
X_1X_3	114.01	1	114.01	7.52	0.020 7
X_2X_3	0.17	1	0.17	0.011	0.916 8
残差	151.54	10	15.15		
失拟	124.59	5	24.92	4.62	0.059 1
纯误差	26.95	5	5.39		
总变异	1 064.637	19			

2.2 酶解工艺参数优化

图1~图3是因素间对试验指标水解度影响的响应面投影到平面上的等值线图。3个等值线图均呈中间高周围低的梯田形,表明回归方程(1)在所选水平范围内有极大值存在。从图1可看出,当温度和pH趋近0水平时,水解度越高。这可能与酶作用的最适条件有关。从图2可以看出,温度与酶添加量的二维等高线呈椭圆型,表明二者存在显著的交互作用,这与方差分析的结果是一致的。在温度较高特别是处在0.5水平附近时,纵向的等值线较密,横向的等值线较疏。说明在酶添加量与水解温度的交互作用中,酶添加量对水解度的影响较大,而水解温度的影响则相对较小。这与方差分析的结果也是一致的。图3亦表明水解度有极大值,但是酶量与pH的等值线近似于圆形,说明二者的交互作用不显著。

由 Design Expert 软件对工艺参数进行优化,得到优化后的参数为 $X_1 = 0.42$, $X_2 = 0.003$, $X_3 = 0.60$,即温度57.1℃、pH 8.0、酶添加量46 mL/kg,水解度的预测极大值为24.822 5。

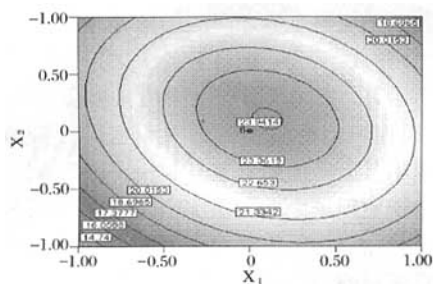


图1 温度与pH对水解度的影响

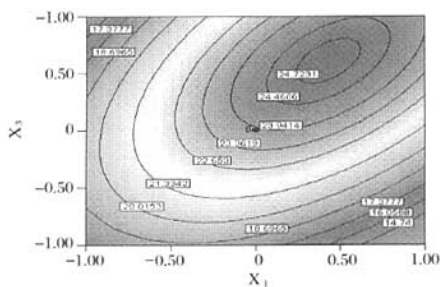


图2 温度与酶量对水解度的影响

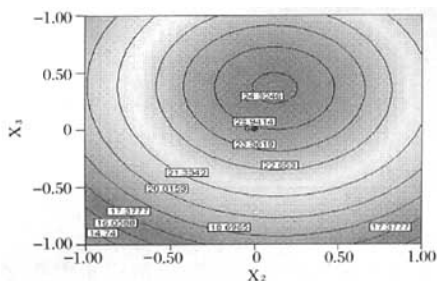


图3 pH与酶量对水解度的影响

2.3 回归方程的验证

对回归方程进行验证,按照下列试验条件进行试验,分别测定不同条件下酶解中国毛虾蛋白的水解度。利用回归方程(1)预测水解度,并与实际测得的水解度相比较,结果如表4。

表4 验证回归方程数据表

实验号	X_1	X_2	X_3	预测值	实际值	误差(100%)
1	0	1	1	20.19	21.36	5.23
2	0	-1	1	18.67	19.52	4.55
3	0.5	0	0	23.40	22.68	-3.08

平均误差=2.23

由表4可以看出,实际值与方程预测值的平均误差为2.23%,低于5%,说明回归方程(1)基本反映了Alcalase 2.4 L酶解中国毛虾水解度与所选3个因素之间的变化关系,预测值与实际情况拟合较好。

2.4 不同酶解时间的水解度及产物分子质量分布

图4为在优化条件下用Alcalase 2.4 L酶解中国

毛虾在不同酶解时间水解度的变化曲线。从图4可以看出,酶解在0~3 h内基本完成。随着酶解的进行,酶解产物的平均分子质量逐渐降低(表5),由0.5 h的平均肽链长14.03降低至8 h的3.96。而在酶解时间为3 h时,酶解产物的平均肽链程度已降低至4.27,表明酶解反应基本完成后,中国毛虾蛋白质已大部分降解成了低分子肽产物。

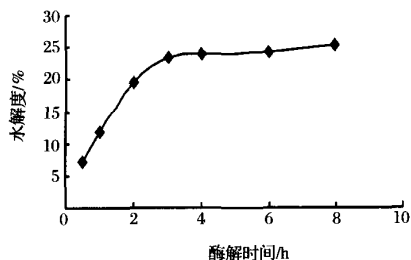


图4 不同酶解时间的水解度

表5 不同酶解时间酶解产物的平均肽链长

时间/h	平均肽链长	时间/h	平均肽链长
0.5	14.03	4	4.16
1	8.40	6	4.11
2	5.10	8	3.96
3	4.27		

图5~图7为1 h、3 h、6 h酶解产物的Sephadex G-15凝胶色谱图。可以看出,经过凝胶层析后,不同酶解时间的酶解产物均可分成3个主要的吸收峰(A、B、C)。峰A出现在24管至38管之间,峰B出现在38管至50管之间,峰C出现在64管至74管之间。根据分子质量标准曲线,前2个吸收峰的分子质量在18 722~641u和641~35u之间,峰C的分子质量已经很小,可能是其他物质。

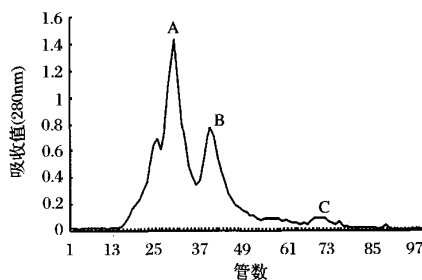


图5 1 h酶解产物的Sephadex G-15凝胶色谱图

随着酶解的进行,可以看出峰A在280nm处的吸收值逐渐减小,峰B以及峰C在280 nm处的吸收值逐渐增大,表明分子质量在650u以下的低分子肽等产物在酶解产物中的比重逐渐增大。

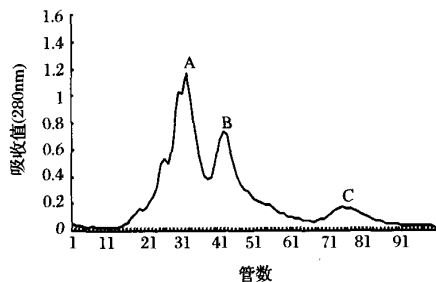


图6 3 h 酶解产物的 Sephadex G-15 凝胶色谱图

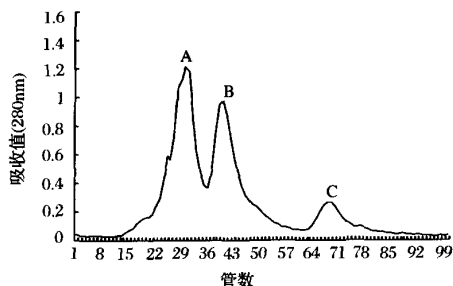


图7 6 h 酶解产物的 Sephadex G-15 凝胶色谱图

3 结 论

利用 Design Expert 软件优化后的条件为:温度 57.1℃、pH 8.0、酶添加量 46 mL/kg, 3 h 时水解度的预测极大值为 24.822 5。酶解产物的平均肽链长 14.02 逐渐降低到 8 h 的 3.96。采用 Sephadex G-15 凝胶层析法测定酶解产物的分子质量分布, 不同时间酶解产物的凝胶色谱图均出现 3 个吸收峰, 前 2 个峰的分子质量在 18 722~641u 和 641~35u 之间。从峰值变化可以判断随着酶解的进行, 低分子肽的量逐渐增加。

参 考 文 献

- 1 Ganapathy V, Brandsch M, Leibach F H. Intestinal transport of amino acids and peptides[J]. Physiology of the Gastrointestinal Tract, 1994, 52: 1 773
- 2 吉川正明, 千叶英雄. 食品由来の生理活性ペプチド[J]. 食品工业(日), 1990, 28(2): 20~25
- 3 Fujita H, Yokoyama K, Yoshikawa M. Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins [J]. Journal of Food Science, 2000, 65: 564~569
- 4 Zhu K X, Zhou H M, Qian H F. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(6): 1 296~1 302
- 5 Daniela E, Salvatore C, Giulio T. Effect of the ratio of casein phosphopeptides to calcium (w/w) on passive calcium transport in the distal small intestine of rats [J]. Nutrition, 2002, 18(9): 743~746
- 6 Takahiro T, Kyoya T, Masaaki Y. Anti-aloppecia mechanisms of soymetide-4, an immunostimulating peptide derived from soy β -conglycinin [J]. Peptides, 2005, 26(5): 707~711
- 7 王景薇. 功能食品新原料——低分子量肽[J]. 浙江食品工业, 1993, 5 (1): 1~5
- 8 Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins [M]. London: Elsevier Applied Science Publishers, 1986. 13~14
- 9 Rao K J, Kim C H, Rhee S K. Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology [J]. Process Biochemistry, 2000, 35(7): 639~647
- 10 Roseiro J C, Esgalhado M E, Amaral-Collaco, M T, et al. Medium development for xanthan production [J]. Process Biochemistry, 1992, 27(3): 167~175

Enzymatic Hydrolysis of *Acetes chinensis* to Prepare Peptides with Low Molecular Weight

Cao Wenhong^{1, 2} Zhang Chaohua¹ Qin Xiaoming¹

1(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

2(South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510301, China)

ABSTRACT This paper mainly discusses to prepare peptides with low molecular weight from *Acetes chinensis* by enzymatic hydrolysis method. Response surface methodology was employed to optimize the parameters of Alcalase 2.4L. Temperature 57.1℃, pH 8.0, enzyme/substrate 4.6mL/100g was considered the optimal condition, under which the mean length of peptide linkage of the hydrolysates decreased from 14.02 at 0.5 h to 3.96 at 8 h. The molecular weight distributions of the hydrolysates were determined by column gel chromatogram. Gel filtration of the hydrolysates on Sephadex G-15 chromatogram yielded three absorbance peaks. The molecular weight distribution of peak A located between 18722 and 641, and peak B located between 641 and 35. It can be concluded that the amount of peptides with low molecular weight was increasing during the enzymatic hydrolysis.

Key words *Acetes chinensis*, enzymatic hydrolysis, degree of hydrolysis, peptides with low molecular weight, central composite design