

酶解法制备榛子粕 ACE 抑制肽工艺研究

殷金莲¹, 靳 毓²

(1. 朔州职业技术学院 生物工程系, 山西 朔州 036002; 2. 西北农林科技大学 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以榛子粕为原料,利用中性蛋白酶酶解制备 ACE 抑制肽。以酶解产物的 ACE 抑制率为指标,采用单因素试验分别考察底物质量分数、酶用量、酶解温度、pH 和酶解时间的影响。在单因素试验基础上设计响应面 Box - Behnken 中心组合试验对酶解条件进行优化。结果表明:榛子粕最佳酶解工艺条件为底物质量分数 5%、酶用量 0.3%、酶解温度 40℃、pH 7.5、酶解时间 1.5 h,在此条件下榛子粕酶解产物的 ACE 抑制率达到 91.76%。

关键词:榛子粕;ACE 抑制肽;酶解;中性蛋白酶;ACE 抑制率

中图分类号:TS229;Q556

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2020)01-0068-05

Preparation of ACE inhibitory peptide from hazelnut meal by enzymatic hydrolysis

YIN Jinlian¹, JIN Yu²

(1. Department of Bioengineering, Shuozhou Vocational Technical College, Shuozhou 036002, Shanxi, China;

2. College of Food Science and Engineering, Northwest Sci - Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract:The hazelnut meal was hydrolyzed by neutral protease to prepare ACE inhibitory peptide. Taking the ACE inhibition rate of the enzymatic hydrolysates as an index, single factor experiment was carried out to investigate the effects of substrate mass fraction, enzyme dosage, enzymatic hydrolysis temperature, pH and enzymatic hydrolysis time. On the basis of single factor experiment, response surface Box - Behnken central combination experiment was designed to optimize the enzymatic hydrolysis conditions. The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis conditions were obtained as follows: substrate mass fraction 5%, enzyme dosage 0.3%, enzymatic hydrolysis temperature 40℃, pH 7.5 and enzymatic hydrolysis time 1.5 h. Under these conditions, the ACE inhibition rate of enzymatic hydrolysates could reach 91.76%.

Key words: hazelnut meal; ACE inhibitory peptide; enzymatic hydrolysis; neutral protease; ACE inhibition rate

榛子别名山板栗,榧子。榛子果仁营养丰富,主要含脂肪 50%~60%、蛋白质 12%~25%、糖类 9%~12%。另外,榛子果仁中胡萝卜素、维生素 B₁、维生素 B₂、维生素 E 和钙、磷、铁等微量元素含量也很丰富^[1],包含人体所需的 8 种必需氨基酸,有“坚果之王”的称号。

血管紧张素转化酶(ACE)能催化无活性的血

管紧张素 I 转化为具有血管收缩活性的血管紧张素 II^[2-3],ACE 抑制剂通过抑制此反应的进行起到降低血压的作用。具有 ACE 抑制作用的降压药物卡托普利、依那普利、贝那普利等对身体有一定副作用和限制使用范围,因而近些年来寻求安全、无副作用的食源性 ACE 抑制肽引起了国内外学者的广泛关注。经试验证实,水稻、大豆、豌豆、小麦、松仁等植物蛋白^[4-5]和一些海洋生物蛋白^[6-7]的酶解产物均对 ACE 有一定的抑制作用。

目前,国内对榛子的研究多是榛子油提取^[8]、蛋

收稿日期:2019-04-16;修回日期:2019-09-24

作者简介:殷金莲(1984),女,讲师,硕士,研究方向为天然产物提取(E-mail)yin4008@163.com。

白^[9]提取、榛子酶解抗氧化肽制备与分离^[10-11]等,而对榛子肽降血压作用的研究很少。Eroglu等^[12]初次证实了胃蛋白酶水解榛子蛋白的水解产物有一定的抗高血压活性。Gülseren^[13]研究比较了3种胃肠道蛋白酶和3种非胃肠道蛋白酶水解榛子蛋白所得产物的抗高血压效果,结果显示非胃肠道蛋白酶水解产物的ACE抑制效果较好。Liu等^[14]研究了榛子ACE抑制肽的构效关系,证实ACE抑制肽是通过非竞争模式抑制ACE活性的。这些研究为榛子蛋白和多肽具有降血压的生物活性提供了依据。

榛子粕作为榛子提油后的副产品,富含蛋白质和各种营养素,由于榛子粕的适口性差,多被用作动物饲料或作为废弃物丢掉。本试验以榛子为原料,利用超声波提取榛子油后得到副产品榛子粕,用中性蛋白酶酶解,研究其酶解产物的ACE抑制活性并对酶解条件进行优化,以期对榛子的生物功效、综合利用和深加工提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

榛子,市场采购;中性蛋白酶(酶活150 U/mg),东恒华道生物科技有限责任公司;酪蛋白磷酸肽,上海超研生物科技有限责任公司;马尿酸-组胺酰-亮氨酸(HHL),上海酶联生物研究所;ACE(酶活2 U/mg),上海倍卓生物科技有限责任公司;石油醚、硼酸钠、氯化钠,均为分析纯。

AF-I型电子恒温水箱;分析天平;PM180R高速冷冻离心机(Alc International Srl);PHS-3C精密pH计;UV-1700紫外可见分光光度计,日本岛津;KH2200DB台式数控超声仪。

1.2 试验方法

1.2.1 榛子脱脂

先将榛子去壳、干燥、粉碎处理。称取榛子粉10 g,按料液比1:8加入石油醚,在超声波功率500 W、60℃条件下提取60 min,抽滤去除有机溶剂,用少量的石油醚洗涤滤渣2~3次,滤渣冷冻干燥即为榛子粕,-18℃冰箱冷冻保存待用。

1.2.2 榛子粕ACE抑制肽的制备

取榛子粕加入蒸馏水搅拌溶解,100℃水浴预处理30 min,冷却,调节pH,加入中性蛋白酶酶解一定时间后,水解液100℃灭酶15 s,5 000 r/min离心15 min,上清液即为含ACE抑制肽的酶解液。

1.2.3 ACE抑制率的测定

采用Cushman等^[15]的方法并加以改进。分别取75 μL 5 mmol/L HHL溶液、25 μL去离子水、25 μL酶解液,混合均匀后置于37℃恒温水浴中预热5

min,加入25 μL 0.1 U/mL ACE酶液,37℃恒温保持30 min,反应结束后加入0.25 mL 1 mol/L的HCl终止反应,再加入1.5 mL乙酸乙酯混合15 s,将混合液4 000 r/min离心10 min后,吸取1 mL乙酸乙酯层溶液,120℃烘干30 min,冷却后再溶于3 mL去离子水中,混合均匀在228 nm处测定吸光度。按下式计算ACE抑制率。

$$\text{ACE抑制率} = (A_1 - A_2) / (A_1 - A_3) \times 100\%$$

式中: A_1 为不加酶解液的溶液吸光度; A_2 为加入ACE和酶解液的溶液吸光度; A_3 为不加ACE的溶液吸光度。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 底物质量分数的影响

在酶用量0.3%、酶解温度45℃、pH 7.5、酶解时间1.5 h条件下,考察底物质量分数对酶解产物ACE抑制率的影响,结果如图1所示。

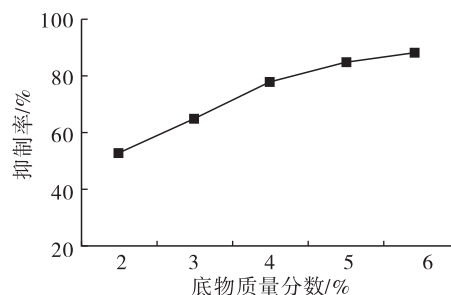


图1 底物质量分数对ACE抑制率的影响

由图1可知,随着底物质量分数的增大,酶解产物的ACE抑制率呈增大趋势,当底物质量分数达到5%后ACE抑制率增幅平缓。这是因为在一定范围内,随着底物质量分数的增大,酶解释放大量的活性肽分子,当底物质量分数过大时,一方面没有足够的酶催化底物反应,另一方面酶解液过于黏稠,整体浓度增大,影响酶解效率^[16]。

2.1.2 酶用量的影响

在底物质量分数5%、酶解温度45℃、pH 7.5、酶解时间1.5 h条件下,考察酶用量对酶解产物ACE抑制率的影响,结果如图2所示。

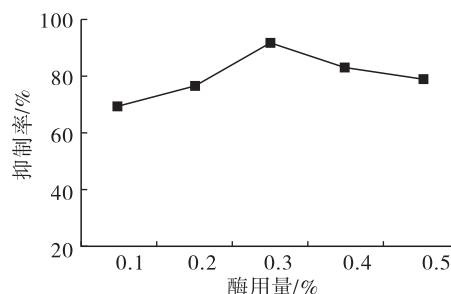


图2 酶用量对ACE抑制率的影响

由图 2 可知,随着酶用量的增大,酶解产物的 ACE 抑制率先增大后降低,当酶用量达到 0.3% 时,ACE 抑制率达到最大。原因可能是酶用量过大,酶解产物被进一步分解成更小的肽分子或者游离氨基酸,使得 ACE 抑制率降低。

2.1.3 酶解温度的影响

在底物质量分数 5%、酶用量 0.3%、pH 7.5、酶解时间 1.5 h 条件下,考察酶解温度对酶解产物 ACE 抑制率的影响,结果如图 3 所示。

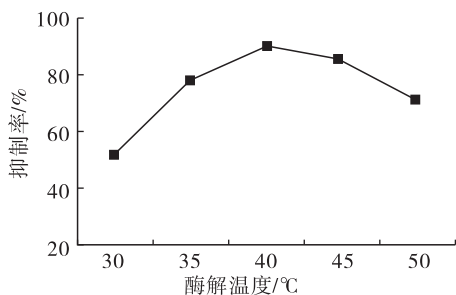


图 3 酶解温度对 ACE 抑制率的影响

由图 3 可知,随着酶解温度的升高,酶解产物的 ACE 抑制率先升高后降低,40 °C 时 ACE 抑制率达到最大。可能是由于此时酶活性较高,能水解蛋白质释放出较多的具有抑制 ACE 活性的肽分子,当酶解温度过高时,蛋白质变性,酶构象发生变化,导致酶解效率降低^[17]。

2.1.4 pH 的影响

在底物质量分数 5%、酶用量 0.3%、酶解温度 45 °C、酶解时间 1.5 h 条件下,考察 pH 对酶解产物 ACE 抑制率的影响,结果如图 4 所示。

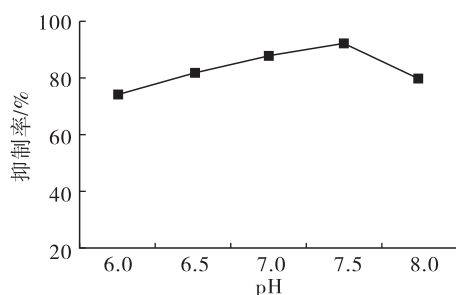


图 4 pH 对 ACE 抑制率的影响

由图 4 可知,当 pH 为 7.5 时,酶解产物的 ACE 抑制率最高。在不同 pH 条件下,酶活性不同,酶与蛋白质底物的接触位点也不同,对蛋白质的酶解效果不同,因而导致酶解产物及其生物活性不同^[7]。

2.1.5 酶解时间的影响

在底物质量分数 5%、酶用量 0.3%、酶解温度 45 °C、pH 7.5 条件下,考察酶解时间对酶解产物 ACE 抑制率的影响,结果如图 5 所示。

由图 5 可知,随着酶解时间的延长,酶解产物的

ACE 抑制率先增大,酶解 1.5 h 后略有下降趋势。这可能是因为随着酶解时间的延长,蛋白质水解度也增大,释放出大量的 ACE 抑制肽,但酶解时间过长,一些 ACE 抑制肽会被蛋白酶进一步水解为无活性的小分子肽^[18-19]或游离氨基酸,使得 ACE 抑制率下降。

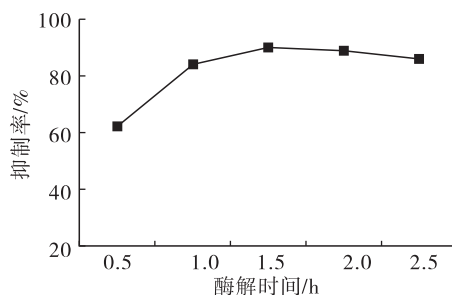


图 5 酶解时间对 ACE 抑制率的影响

2.2 响应面优化试验

根据单因素试验结果,固定酶解时间 1.5 h,选择底物质量分数(A)、酶用量(B)、酶解温度(C)和 pH(D)为自变量,ACE 抑制率(Y)为响应值,利用 Design - Expert 8.0.6 软件进行四因素三水平 Box - Behnken 中心组合试验,对酶解条件进行优化。响应面试验因素水平见表 1,响应面试验设计方案及结果见表 2,回归模型方差分析见表 3。

表 1 响应面试验因素水平

| 水平 | A/% | B/% | C/°C | D |
|----|-----|-----|------|-----|
| -1 | 4 | 0.2 | 35 | 6.5 |
| 0 | 5 | 0.3 | 40 | 7.0 |
| 1 | 6 | 0.4 | 45 | 7.5 |

表 2 响应面试验设计方案及结果

| 试验号 | A | B | C | D | Y/% |
|-----|----|----|----|----|-------|
| 1 | -1 | -1 | 0 | 0 | 85.33 |
| 2 | 1 | -1 | 0 | 0 | 83.75 |
| 3 | -1 | 1 | 0 | 0 | 85.24 |
| 4 | 1 | 1 | 0 | 0 | 87.37 |
| 5 | 0 | 0 | -1 | -1 | 78.02 |
| 6 | 0 | 0 | 1 | -1 | 82.56 |
| 7 | 0 | 0 | -1 | 1 | 82.05 |
| 8 | 0 | 0 | 1 | 1 | 88.61 |
| 9 | -1 | 0 | 0 | -1 | 81.25 |
| 10 | 1 | 0 | 0 | -1 | 83.48 |
| 11 | -1 | 0 | 0 | 1 | 88.82 |
| 12 | 1 | 0 | 0 | 1 | 90.86 |
| 13 | 0 | -1 | -1 | 0 | 78.36 |
| 14 | 0 | 1 | -1 | 0 | 80.14 |
| 15 | 0 | -1 | 1 | 0 | 84.29 |
| 16 | 0 | 1 | 1 | 0 | 86.72 |
| 17 | -1 | 0 | -1 | 0 | 78.66 |

续表 2

| 试验号 | A | B | C | D | Y/% |
|-----|----|----|----|----|-------|
| 18 | 1 | 0 | -1 | 0 | 79.35 |
| 19 | -1 | 0 | 1 | 0 | 84.31 |
| 20 | 1 | 0 | 1 | 0 | 86.57 |
| 21 | 0 | -1 | 0 | -1 | 79.02 |
| 22 | 0 | 1 | 0 | -1 | 82.16 |
| 23 | 0 | -1 | 0 | 1 | 87.33 |
| 24 | 0 | 1 | 0 | 1 | 89.41 |
| 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 90.28 |
| 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 91.06 |
| 27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 89.92 |
| 28 | 0 | 0 | 0 | 0 | 90.39 |
| 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 91.18 |

表 3 回归模型方差分析

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F | P | 显著性 |
|----------------|--------|-----|--------|--------|----------|-----|
| 模型 | 508.02 | 14 | 36.29 | 42.53 | <0.000 1 | ** |
| A | 5.03 | 1 | 5.03 | 5.90 | 0.029 2 | * |
| B | 14.00 | 1 | 14.00 | 16.40 | 0.001 2 | ** |
| C | 110.90 | 1 | 110.90 | 129.96 | <0.000 1 | ** |
| D | 137.30 | 1 | 137.30 | 160.90 | <0.000 1 | ** |
| AB | 3.44 | 1 | 3.44 | 4.03 | 0.064 3 | |
| AC | 0.62 | 1 | 0.62 | 0.72 | 0.409 7 | |
| AD | 0.01 | 1 | 0.01 | 0.01 | 0.919 5 | |
| BC | 0.11 | 1 | 0.11 | 0.12 | 0.730 2 | |
| BD | 0.28 | 1 | 0.28 | 0.33 | 0.575 2 | |
| CD | 1.02 | 1 | 1.02 | 1.20 | 0.292 7 | |
| A ² | 34.67 | 1 | 34.67 | 40.62 | <0.000 1 | ** |
| B ² | 60.16 | 1 | 60.16 | 70.50 | <0.000 1 | ** |
| C ² | 194.83 | 1 | 194.83 | 228.32 | <0.000 1 | ** |
| D ² | 40.19 | 1 | 40.19 | 47.10 | <0.000 1 | ** |
| 残差 | 11.95 | 14 | 0.85 | | | |
| 失拟项 | 10.80 | 10 | 1.08 | 3.75 | 0.107 2 | |
| 误差 | 1.15 | 4 | 0.29 | | | |
| 总和 | 519.97 | 28 | | | | |

注: * 为 $P < 0.05$, 差异显著; ** 为 $P < 0.01$, 差异极显著。

对表 2 的试验结果进行多元回归分析得到相应的二项式拟合方程:

$$Y = 90.57 + 0.65A + 1.08B + 3.04C + 3.38D + 0.93AB + 0.39AC - 0.047AD + 0.16BC - 0.27BD + 0.50CD - 2.31A^2 - 3.05B^2 - 5.48C^2 - 2.49D^2$$

由表 3 可知,该模型的 F 值为 42.53, $P < 0.000 1$, 表明该模型极显著,失拟项 $P > 0.05$, 不显著。该回归模型的总决定系数 (R^2) 为 0.977, 修正决定系数 (R_{Adj}^2) 为 0.954 (> 0.8), 说明该回归模型与试验数据的误差较小,拟合程度比较高,可信度高,可以用该模型对榛子粕 ACE 抑制肽的酶解条件进行分析

与预测。

各酶解因素影响酶解产物 ACE 抑制率的显著程度顺序为 $D > C > B > A$, 即 $pH > 酶解温度 > 酶用量 > 底物质量分数$ 。其中 B, C, D 达到极显著水平, A 达到显著水平, A^2, B^2, C^2, D^2 均达到极显著水平, 各因素交互作用对 ACE 抑制率的影响均不显著。

经 Design - Expert 软件模拟分析,得到酶解榛子粕制备 ACE 抑制肽的最佳条件为底物质量分数 5.2%、酶用量 0.32%、酶解温度 41.6℃、pH 7.35, ACE 抑制率为 92.399 4%。在实际操作过程中为了方便与可控,将最佳条件各指标数值修正为底物质量分数 5%、酶用量 0.3%、酶解温度 40℃、pH 7.5,在此条件下重复 3 次试验,ACE 抑制率的平均值为 91.76%,相对误差为 0.69% ($< 1%$)。说明用响应面模型预测得到的理论值与实际值拟合度高,用此模型对酶解条件进行优化是合理可行的,结果也是可靠的。

3 结论

榛子脱脂后得到富含蛋白质的榛子粕,经中性蛋白酶酶解后的酶解产物榛子多肽具有 ACE 抑制活性。以 ACE 抑制率为指标,利用单因素试验和响应面法分析得到的最佳酶解条件为:底物质量分数 5%,酶用量 0.3%,酶解温度 40℃,pH 7.5,酶解时间 1.5 h。在最佳条件下,ACE 抑制率为 91.76%。

参考文献:

- [1] 全梦卓,赵文恩. 榛子的综合利用[J]. 广州化工,2013, 41(21):28-30.
- [2] KESSY H N E, WANG K, ZHAO L, et al. Enrichment and biotransformation of phenolic compounds from litchi pericarps with angiotensin I - converting enzyme (ACE) inhibition activity[J]. LWT - Food Sci Technol, 2018, 87(1): 301-309.
- [3] LAFARGA T, HAYES M. Bioactive protein hydrolysates in the functional food ingredient industry: overcoming current challenges [J]. Food Rev Int, 2017, 33(3): 217-246.
- [4] RUDOLPH S, LUNOW D, KAISER S, et al. Identification and quantification of ACE - inhibiting peptides in enzymatic hydrolysates of plant proteins [J]. Food Chem, 2017, 224: 19-25.
- [5] LIU X Q, MIAO X Y, WU D, et al. Purification and identification of ACE - inhibiting peptides from wild pine nut peptide fractions (PNPF) [J]. Eur Food Res Technol, 2018, 244(6): 979-988.
- [6] 颜泽,姜燕蓉,刘畅,等. 海洋生物来源血管紧张素转换酶抑制肽的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(8): 1743-1749.

- [7] 涂丹,张益奇,叶繁,等. 酶解制备鱼鳞蛋白降血压肽的工艺优化[J]. 核农学报, 2019,33(1):120-128.
- [8] 耿鹏飞,刘家伟,胡传荣,等. 榛子油3种提取方法的对比及超临界CO₂萃取工艺优化[J]. 中国油脂,2018,43(5):7-10,15.
- [9] 李杨,江连洲,王胜男,等. 水酶法提取榛子蛋白工艺优化[J]. 食品科学,2012,33(2):143-148.
- [10] 陈艳,吕春茂,韩金晶,等. 榛子粕抗氧化肽的分离纯化及序列分析[J]. 食品工业科技,2018,39(15):114-118.
- [11] 郭庆启,张娜,姜元松,等. 榛子仁蛋白酶解工艺的优化及酶解物抗氧化能力的研究[J]. 食品科学,2013,34(9):189-193.
- [12] EROGLU E C, AKSAY S. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory effects of hazelnut protein hydrolysate prepared using pepsin[J]. Ind J Pharm Educ Res,2017,51(3):S417-S420.
- [13] GÜLSEREN İ. In silico methods to identify ACE and DPP-IV inhibitory activities of ribosomal hazelnut proteins[J]. J Food Meas Charact, 2018,12:2607-2614.
- [14] LIU C L, LI F, WEI H M, et al. Exploration of the molecular interactions between angiotensin-I-converting enzyme (ACE) and the inhibitory peptides derived from hazelnut (*Corylus heterophylla* Fisch.) [J]. Food Chem, 2018,245:471-480.
- [15] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol, 1971,20(7):1637-1685.
- [16] 温志鹏,耿予欢,许彩虹,等. 响应面法优化蛋白酶酶解海带蛋白的工艺研究[J]. 食品工业,2019,40(1):112-116.
- [17] 孙敏,李诚,刘爱平,等. 乳清蛋白抗氧化肽的制备及体外抗氧化活性研究[J]. 中国油脂,2019,44(8):22-27.
- [18] BOUGATEF A, NEDJAR-ARROUME N, RAVALLC-PLÉ R, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases [J]. Food Chem,2008,111(2):350-356.
- [19] WU Q Y, DU J J, JIA J Q, et al. Production of ACE inhibitory peptides from sweet sorghum grain protein using alcalase: hydrolysis kinetic, purification and molecular docking study[J]. Food Chem,2016,199(5):140-149.

· 广告 ·

《中国油脂》杂志社专业书籍目录

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 1007 崔洪斌主编《大豆生物活性物质的开发与应用》30.00 | 1033 卢行芳、卢荣编《天然磷脂产品的加工及利用》40.00 |
| 1012 何东平主编《浓香花生油制取技术》30.00 | 1035 油菜籽标准 12.00 |
| 1013 李里特等主编《功能性大豆食品》30.00 | 1036 刘珍主编《化验员读本:化学分析》(上册)第4版 30.00 |
| 1014 1998~2012年《中国油脂》合订本 200.00/年 | 1037 刘珍主编《化验员读本:仪器分析》(下册)第4版 40.00 |
| 1015 20世纪《中国油脂》CD光盘(1976~2002年)600.00 | 1038 王存文等编《生物柴油制备技术及实例》37.00 |
| 1017 李里特主编《大豆加工与利用》35.00 | 1039 黄凤洪主编《生物柴油制造技术》34.00 |
| 1021 陈洁主编《油脂化学》23.00 | 1040 倪培德等编《油料加工与操作技术问答》78.00 |
| 1022 刘玉兰主编《油脂工厂物料输送》45.00 | 1043 王兴国主编《食用油精准适度加工理论与实践》60.00 |
| 1024 8种食用油国标(大豆油、菜籽油、花生油、棉籽油等)65.00 | 1044 韩丽华主编《油脂工厂设计》35.00 |
| 1025 浸出油厂防火安全规范(全套)30.00 | 1045 王兴国主译《贝雷油脂化学与工艺学》第六版(6卷)720.00 |
| 1026 中国油脂工业发展史 45.00 | 1047 吴德荣主编《化工工艺设计手册》(上)210.00 |
| 1027 李桂华主编《油料油脂检验与分析》40.00 | 1048 吴德荣主编《化工工艺设计手册》(下)170.00 |
| 1028 何东平主编《油脂精炼与加工工艺学》(第2版)50.00 | 1049 王静等主编《粮油食品质量安全检测技术》45.00 |
| 1031 李全宏主编《植物油脂制品安全生产与品质控制》35.00 | 1050 何东平等主编《油脂工厂综合利用》52.00 |
| 1032 梁少华主编《植物油料资源综合利用》58.00 | 1051 刘大川等编《植物蛋白工艺学》60.00 |

邮购地址: 陕西省西安市劳动路118号

收款人: 《中国油脂》杂志社 潘亚萍

订购热线: 029-88631255

传真: 029-88625310

邮编: 710082