

Alcalase 酶解蛋清粉制备抗凝血肽的工艺优化

刘静波, 王 菲, 王翠娜, 刘 军, 王作昭, 王二雷, 张 燕, 林松毅

(吉林大学 营养与功能食品研究室,长春 130062)

摘要:采用 Alcalase 碱性蛋白酶酶解蛋清粉制备食源性抗凝血肽。结果表明:底物浓度过大会抑制水解度的增长,底物质量分数为 1% 时蛋白质完全水解后的产物抗凝血活性最佳;高温和低温均对水解度有影响,低温酶解产物的抗凝血活性较好;pH 值对水解度的影响与 Alcalase 的最适 pH 值有关;pH 值为 7 时,抗凝血活性最好;酶/底物浓度增大,但底物不变的情况下,对水解度的提高不明显,酶/底物浓度过大,导致抗凝血活性降低。考虑交互作用经试验优化设计确定的酶解最佳工艺参数为:底物质量分数为 1%,酶解温度为 50 °C,酶/底物质量分数为 5%,酶解 pH 为 8。在该条件下水解 2 h,凝血抑制率达到 68.92%。

关键词:食品加工技术;抗凝血肽;酶解;蛋清粉;Alcalase;水解度;抗凝血活性

中图分类号:TS201.4 文献标志码:A 文章编号:1671-5497(2012)01-0250-06

Optimization of preparation for anticoagulant peptide from egg white powder by Alcalase

LIU Jing-bo, WANG Fei, WANG Cui-na, LIU Jun, WANG Zuo-zhao,
WANG Er-lei, ZHANG Yan, LIN Song-yi

(Laboratory of Nutrition and Functional Food, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: Anticoagulant peptide was prepared by hydrolyzing egg white powder with Alcalase. Results show that the degree of hydrolysis (DH) was inhibited by over-high substrate concentration. Anticoagulant activity was optimum when the substrate concentration was 1%. Temperature strongly affects DH that at low temperature the hydrolyzed possesses high anticoagulant activity. The effect of pH on DH was related to the optimum pH value of Alcalase. When pH value was 7 the anticoagulant activity was the best. DH increased slowly and anticoagulant activity decreased with excessive increase in enzyme dose. The optimal technical parameters were: substrate concentration of 1%, temperature of 50 °C, enzyme concentration of 5% and pH value of 8. After 2 h hydrolization the anticoagulant activity reached 68.92%.

Key words: food processing technology; anticoagulant peptide; enzymolysis; egg white powder; Alcalase; degree of hydrolysis; anticoagulant activity

收稿日期:2010-12-19.

基金项目:“863”国家高技术研究发展计划项目(2007AA10Z329).

作者简介:刘静波(1962-),女,教授。研究方向:营养与功能食品。E-mail:ljb168@sohu.com

通信作者:林松毅(1970-),女,副教授。研究方向:营养与功能食品。E-mail:linsongyi730@163.com

凝血可诱发血栓,其导致的病理性血栓可引发肺梗塞、脑血栓、视网膜动静脉阻塞、心肌梗塞和四肢及周围血管栓塞。目前,心脑血管病是我国发病率、致残率和死亡率最高的疾病,每12 s就有一人因中风或心梗而倒下^[1]。通常使用的抗凝血物质——肝素、口服香豆素、链激酶和尿激酶等会导致血小板减少、出血等副作用。因此,研发有效的、副作用小的抗凝血产品引起了越来越多地关注^[2-6]。蛋类是人体蛋白质的重要来源之一,也是生物活性肽的原料^[7-8]。蛋清占蛋内容物质量的45%~60%左右,而蛋清中除水分外,主要成分为蛋白质,质量分数为8%~11.6%,优质蛋白含有对人体必须的8种氨基酸,比例均衡,机体利用率高。蛋清蛋白质受热变性,极大地限制了其发展。将蛋清酶解制备的活性肽具有低渗性、低致敏性、高稳定性和高溶解性^[9]。本文以金翼蛋清粉为原料,致力于提取及纯化出具有较高抗凝血活性的肽。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蛋清粉,吉林金翼蛋品有限公司;Alcalase,诺维信公司;NaOH和HCl均为分析纯,北京化工厂;凝血酶,Sigma公司;纤维蛋白原,Sigma公司。

1.2 仪器与设备

AG 204型电子天平,瑞士Mettler Toledo公司;JB-1A型磁力搅拌器,上海精密科学仪器公司;SYII-Ni型电热恒温水浴锅,北京长源实验设备厂;JJ-1型精密增力电动搅拌器,金坛市江南仪器厂;CS-501型超级恒温水浴锅,上海博讯实业有限公司;ZD-2型自动电位滴定仪,上海精密科学仪器公司;CR20B2型高速冷冻离心机,日本日立公司;R-205型旋转蒸发仪,Swizerland BuCHI;FD-1型真空冷冻干燥机,北京博医康技术公司;2ZX-2型旋片真空泵,浙江黄岩求精真空泵厂;YC7134型单相双值电容电动机,浙江温岭市速力电机厂;ELX800型酶标仪,BIO-TEK。

1.3 实验方法

1.3.1 酶解蛋清粉工艺

称取一定量金翼蛋清粉,溶解于200 mL去离子水中,磁力搅拌15 min,90 °C加热预处理10 min,调至酶解温度和pH,加入一定量的Alcalase,不断滴加氢氧化钠,保证pH值稳定,每

0.5 h记录一次耗碱量,水解一定时间。水解度测定采用pH-stat法。调节肽液pH值至中性后,沸水浴灭酶10 min,将所得的肽液在4 °C下,以9000 r/min的转速离心15 min,收集上清液。在8.9 MPa气压下、60 °C水浴中以65 r/min的转速旋转蒸发。在-45 °C的冷阱中冷冻干燥24 h。

1.3.2 蛋清肽抗凝血活性检测

参照杨万根等^[10]采用的抗凝血活性检测方法进行检测。

1.3.3 单因素试验

依次进行如下试验:酶解时间分别为1、1.5、2、2.5、3 h;酶/底物质量分数分别为3%、4%、5%、6%、7%;底物质量分数分别为1%、3%、5%、7%;酶解pH值分别为7、8、9、10、11;酶解温度分别为30、40、50、60、70 °C。记录耗碱量随时间的变化以及蛋清肽的抗凝血活性。

1.3.4 优化酶解工艺

选用底物浓度、酶解温度、酶/底物浓度、酶解pH值4个因素,每个因素3个水平,采用多重线性回归设计进行实验,因素编码表如表1所示。

表1 多元线性回归设计因素编码表

Table 1 Factors of multiple linear regression design

$z_j(x_j)$	z_1 底物 质量分数/%	z_2 酶解 温度/°C	z_3 酶/底物 质量分数/%	z_4 酶解 pH 值
$z_j(-1)$	1	30	3	7
$z_j(+1)$	5	50	5	9
$z_{0j}(0)$	3	40	4	8
Δj	2	10	1	1
编码公式	$x_1 = \frac{z_1 - 3}{2}$	$x_2 = \frac{z_2 - 40}{10}$	$x_3 = z_3 - 4$	$x_4 = z_4 - 8$

利用SPSS13.0软件对多重线性回归试验结果进行分析,并对所获得的模型进行回归系数的显著性检验、回归方程的显著性检验和偏回归系数检验及多重共线性诊断。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果分析

2.1.1 酶解时间对蛋清蛋白质水解度的影响

在底物质量分数3%、反应温度50 °C、pH值为10、酶/底物质量分数3%的条件下,每0.5 h记录一次耗碱量,通过计算得到酶解时间对蛋清蛋白质水解度的影响。

如图1所示,水解度随着时间的延长逐渐增大,但增大速率从2 h起开始平缓,故考虑效率的

因素,将酶解时间定为 2 h。

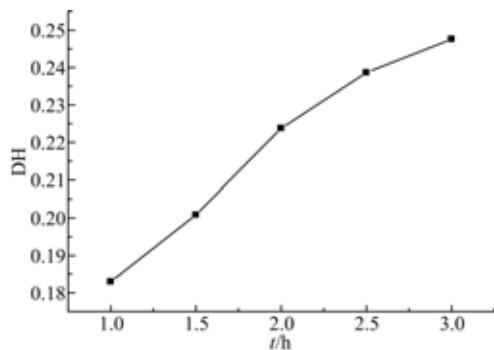


图 1 酶解时间对蛋清蛋白质水解度的影响

Fig. 1 Effects of enzymolysis time on DH of egg white protein

2.1.2 酶/底物质量分数对蛋清蛋白质水解度及酶解物抗凝血活性的影响

在底物质量分数 3%, 反应温度 50 °C, pH 值为 10 的条件下, 酶解 2 h, 每 0.5 h 记录一次耗碱量, 通过计算得到酶/底物质量分数对蛋清蛋白质水解度的影响结果并检测其抗凝血活性(见图 2)。

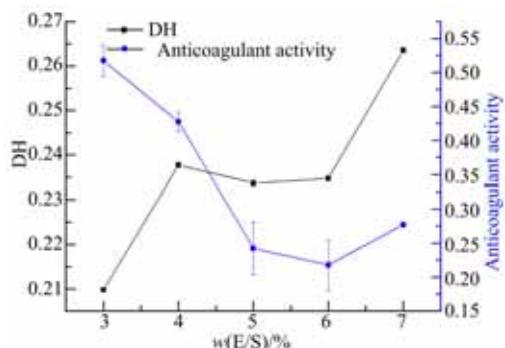


图 2 酶/底物质量分数对水解度和抗凝血活性的影响

Fig. 2 Effects of Alcalase dose on DH and anticoagulant activity

在实验范围内, 随着酶用量的增加, 蛋清蛋白质的水解度整体呈上升趋势。但在酶/底物质量分数为 4%~6% 时, 蛋清蛋白水解度变化不大。从经济角度考虑, 以水解度为指标选用酶/底物质量分数 4% 为最优用量。

从图 2 可看出, 抗凝血活性与酶/底物质量分数呈负相关, 即随着酶/底物质量分数的增加, 抗凝血活性降低。但当酶/底物质量分数大于 5% 时, 抗凝血活性无明显变化。故以抗凝血活性为指标最优的酶/底物质量分数为 3%~5% 较为合适。

综合考虑水解度与抗凝血活性两个指标, 选

择酶/底物质量分数为 3%、4% 和 5% 进行试验优化设计。

2.1.3 底物质量分数对蛋清蛋白质水解度及酶解物抗凝血活性的影响

在温度 50 °C, pH 值为 10、酶/底物质量分数 3% 的条件下, 每 0.5 h 记录一次耗碱量, 通过计算得到底物质量分数对于蛋清蛋白质水解度的影响并检测其抗凝血活性(见图 3)。

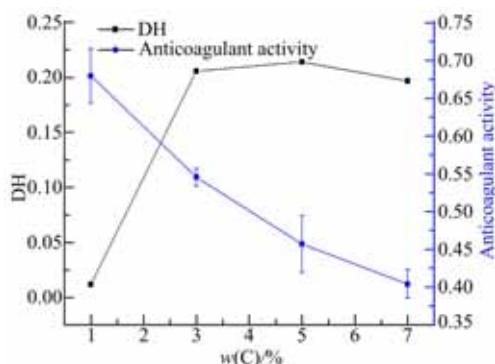


图 3 底物质量分数对水解度和抗凝血活性的影响

Fig. 3 Effects of concentration on DH and anticoagulant activity

如图 3 所示, 当底物质量分数从 1% 增至 5% 时, 水解度升高。但是超过 5%, 则会导致水解度的下降。并且当底物质量分数超过 3% 时, 水解度增加幅度不大, 故最佳水解底物质量分数为 3%。

抗凝血活性随着底物质量分数的增加而减弱。故底物质量分数为 1% 时活性最大。

综合考虑水解度与抗凝血活性, 底物质量分数为 1%~5% 较为合适。

2.1.4 pH 值对蛋清蛋白质水解度及酶解物抗凝血活性的影响

在底物质量分数 3%、温度 50 °C、酶/底物质量分数 4% 的条件下, 每 0.5 h 记录一次耗碱量, 通过计算得到 pH 值对蛋清蛋白质水解度的影响(见图 4)。

如图 4 所示, 当 pH 值小于 10 时, 随着 pH 值的增大, 水解度逐渐上升, 当 pH 值大于 10 时水解度随着 pH 值的升高而降低。表明过高或过低的 pH 值都会抑制 Alcalase 的活性, 使水解度下降。故最优的 pH 值为 10。

酶解条件中的 pH 值从 7 增至 9 时, 抗凝血活性逐渐下降, 当 pH 值从 9 增至 11 时, 抗凝血活性得到了增强。故在试验范围内 pH 值为 7 时, 抗凝血活性较强。

综合考虑水解度与抗凝血活性,选择 pH 值为 7、8、9 进行试验优化设计。

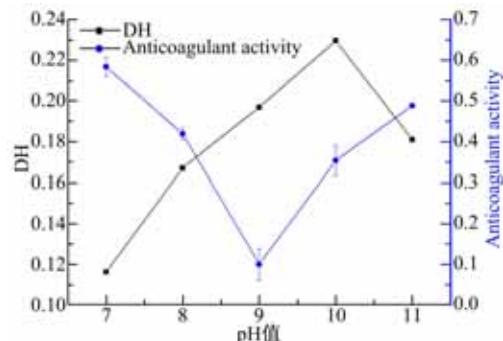


图 4 pH 值对水解度和抗凝血活性的影响

Fig. 4 Effects of pH on DH and anticoagulant activity

2.1.5 温度对蛋清蛋白质水解度及酶解物抗凝血活性的影响

在底物质量分数为 3%、pH 值为 10、酶/底物质量分数为 4% 的条件下,每 0.5 h 记录一次耗碱量,通过计算得到反应温度对水解度的影响结果(见图 5)。

如图 5 所示,随着温度的增高,水解度在不断地上升。从 40 ℃起水解度有大幅增长,但当温度升至 60 ℃后,随着温度的增加水解度无明显地升高。故最佳的水解温度为 60 ℃。

当温度从 30 ℃上升至 50 ℃时,抗凝血活性随着温度的升高降低,但当酶解温度从 50 ℃升至 70 ℃时,抗凝血活性逐渐增强。故在试验范围内 30 ℃下酶解产物活性最高。

综合考虑水解度和抗凝血活性,选择 30、40 和 50 ℃进行试验优化设计。

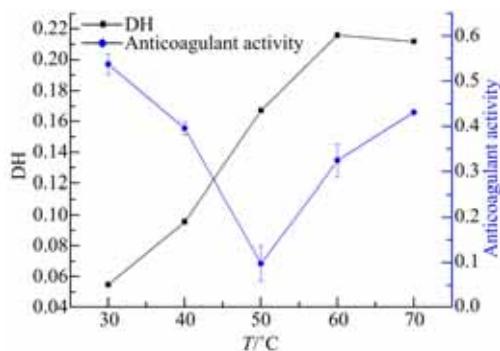


图 5 温度对水解度和抗凝血活性的影响

Fig. 5 Effect of temperature on DH and anticoagulant activity

2.2 蛋清蛋白质酶解工艺试验优化设计

2.2.1 模型的构建

回归模型系数见表 2, Unstandrdized coefficients(B 列)。

以水解度为指标酶解蛋清粉的模型为

$$\hat{y} = 0.142 - 0.018z_1 + 0.001z_2 + 0.01z_3 + 0.006z_4$$

以抗凝血活性为指标酶解蛋清粉的模型为

$$\hat{y} = -0.443 - 0.004z_1 - 0.002z_2 + 0.052z_3 + 0.087z_4$$

式中: z_1 为底物质量分数(%); z_2 为酶解温度(℃); z_3 为加酶量(%); z_4 为 pH 值。

优化酶解的最佳工艺:底物质量分数为 1%, 酶解温度为 50 ℃, 酶/底物质量分数为 5%, 酶解 pH 值为 8。验证其凝血酶抑制率达到 68.92%。

表 2 回归系数显著性检验

Table 2 Significant test of regression coefficients

模型	非标准化系数		标准化偏回归系数	显著性	共线性统计	
	偏回归系数	标准误差			容忍度	方差膨胀因子
DH	Constant	0.142	0.146	0.388		
	C	-0.018	0.007	-0.727	0.049	1.000
	T	0.001	0.001	0.268	0.415	1.000
	E/S	0.010	0.015	0.199	0.538	1.000
	pH	0.006	0.015	0.112	0.724	1.000
Activity	Constant	-0.443	0.252	0.153		
	C	-0.004	0.013	-0.072	0.758	1.000
	T	-0.002	0.003	-0.251	0.379	1.000
	E/S	0.052	0.025	0.450	0.107	1.000
	pH	0.087	0.025	0.746	0.027	1.000

2.2.2 模型的显著性检验

(1) 回归系数的显著性检验

回归系数的显著性检验分析结果见表 2;对

于水解度模型,在 4 个预测变量中,仅有一个预测变量——底物质量分数达到了显著性水平。对于抗凝血活性,仅有 pH 值达到了显著性水平。

(2)对回归模型的方差分析结果

通过方差分析检验回归方程显著性(见表3),以水解度为指标的回归方程 $F(4,4)=1.872, P=0.027 < 0.05$;以抗凝血活性为指标的回归方程 $F(4,4)=4.276, P=0.009 < 0.05$ 。说明多重回归模型与数据拟合程度比较好。

(3)偏回归系数及多重共线性诊断

从表2中可看出,所有变量的容忍度都大于0.3,无共线性问题。

通常预测的变量的VIF值大于2被认为有共线性问题。从表2看所有预测变量的VIF值都小于2,表明建立的回归方程不存在共线性问

题。

通常认为条件指数大于15表示可能存在共线性问题,大于30则表示有严重的多重共线性问题。由表4可看出无该现象发生。

表3 回归方程显著性检验

Table 3 Significant test of regression equation

模型		平方和	自由度	均方差	F	显著性
DH	回归	0.010	4	0.002	1.872	0.027
	残差	0.005	4	0.001		
	总和	0.015	8			
Activity	回归	0.066	4	0.016	4.276	0.009
	残差	0.015	4	0.004		
	总和	0.081	8			

表4 多重共线性的诊断分析结果

Table 4 Results of multicollinearity analysis

模型	维度	特征根	条件指数	变异大小				
				Constant	底物质量分数	酶解温度	加酶量	pH值
DH	1	4.739	1.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000
	2	0.194	4.947	0.000	0.970	0.010	0.010	0.000
	3	0.040	10.884	0.000	0.000	0.500	0.500	0.000
	4	0.023	14.274	0.040	0.010	0.400	0.400	0.180
	5	0.004	12.753	0.960	0.010	0.080	0.080	0.820
Activity	1	4.739	1.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000
	2	0.194	4.947	0.000	0.970	0.010	0.010	0.000
	3	0.040	10.884	0.000	0.000	0.500	0.500	0.000
	4	0.023	14.274	0.040	0.010	0.400	0.400	0.180
	5	0.004	12.753	0.960	0.010	0.080	0.080	0.820

3 结论

(1)反应时间过长,美拉德反应会影响酶解液的颜色,还会产生苦味物质,不良气味加浓,故综合考虑将最佳酶解时间设定为2 h。底物质量分数过大,阻碍了酶和底物充分接触,水解度降低,底物质量分数为1%时蛋白质完全水解后的产物抗凝血活性最佳。高温和低温均对水解度有影响,这与Alcalase碱性蛋白酶的最适温度有关,低温酶解产物的抗凝血活性好可能是由于蛋白质的空间结构受温度影响不大,故活性较好。pH值对水解度的影响与Alcalase的最适pH值有关。pH值为7时,抗凝血活性最好,可能是因为条件温和,故活性较高。在一定范围内增大酶/底物质量分数,但底物不变的情况下,对水解度的提高不明显,可能由于当反应进行到一定程度时,酶分子吸收的能量过多,引起了酶的解体,导致酶变性,所以水解进程减慢,水解度增加幅度减小,故应选择耗酶少的水平。并且酶/底物质量分数过大,对蛋白构向产生影响,导致抗凝血活性降低。

(2)多元线性回归试验优化设计的选择是在单因素试验结果基础上进行的,通过试验分别以水解度和抗凝血活性为指标确定出Alcalase酶解蛋清粉的最佳水解工艺条件,通过试验分析可知,试验结果具有很好的准确性、可靠性和可重复性。

(3)多肽的氨基酸组成及序列是决定是否具有抗凝血活性的重要因素。蛋清蛋白经水解后生成了具有抗凝血活性的多肽,但是随着水解度的加大,部分抗凝血活性很强的多肽被水解为氨基酸,这就造成了抗凝血活性的削弱。因此并不能简单地认为水解度越大,抗凝血活性越大。

(4)本研究为分离纯化食源性抗凝溶栓物质打下了良好的基础。

参考文献:

- [1] 新华社. 心脑血管病成为我国发病率死亡率最高疾病 [EB/OL]. [2009-03-23]. <http://www.ebiotrade.com/newsf/2009-3/200932393459.html>.
- [2] Magalhaes Arinos, Magalhaes Henrique P B, Rich-

- ardson Michael, et al. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *bothrops leucurus*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2007, 146(4):565-575.
- [3] Kong Yi, Huo Jian-li, Xu Wen, et al. A novel anti-platelet aggregation tripeptide from *agkistrodon acutus* venom: isolation and characterization [J]. Toxicon, 2009, 54(2):103-109.
- [4] Elda E Sanchez, Alexis Rodriguez-Acosta, Rene Palomar, et al. Colombistatin: a disintegrin isolated from the venom of the South American snake (*bothrops colombiensis*) that effectively inhibits platelet aggregation and SK-Mel-28 cell adhesion[J]. Archives of Toxicology, 2009, 83(3):271-279.
- [5] Barbouche Rym, Marrakchi Nezha, Mansuelle Pascal, et al. Novel anti-platelet aggregation polypeptides from *vipera lebetina* venom: isolation and characterization[J]. FEBS Letters, 1996, 392(1): 6-10.
- [6] Jo Hee-yeon, Jung Won-kyo, Kim Se-kwon. Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, *urechis unicinctus*[J]. Process Biochemistry, 2008, 43(2): 179-184.
- [7] 田刚,陈代文,余冰,等.酶解鸡蛋清小肽混合物对小鼠免疫功能的影响[J].中国畜牧杂志,2005,41(5):14-17.
- Tian Gang, Chen Dai-wen, Yu Bing, et al. Effects of mixtures of small peptides from enzymic hydrolysates of egg white on immune functions of mice[J]. Chinese Journal of Animal Science, 2005, 41(5):14-17.
- [8] Miguel Marta, Lopez-Fandino Rosina, Ramos Mercedes, et al. Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats[J]. Life Science, 2006, 78(25):2960-2966.
- [9] 田波,迟玉杰.蛋清蛋白水解物的水解程度与分子量关系的研究[J].食品工业科技,2002,23(11):14-15.
- Tian Bo, Chi Yu-jie. Relationship between DH and MW of the hydrolysates of egg white[J]. Science and Technology of Food Industry, 2002, 23(11): 14-15.
- [10] Yang Wan-gen, Wang Zhang, Xu Shi-ying. A new method for determination of antithrombotic activity of egg white protein hydrolysate by microplate reader[J]. Chinese Chemical Letters, 2007, 18(4): 449-451.