



引用格式:路福平,杨霁菡,王永帅,等. 蛋白酶水解中药渣制备生物活性肽工艺探讨[J]. 轻工学报,2016,31(1):12-16.

中图分类号:R282;X799 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2016.1.003

文章编号:2096-1553(2016)01-0012-05

蛋白酶水解中药渣制备生物活性肽工艺探讨

Process discussion on preparation of bioactive peptide in Chinese medicine residues by protease hydrolysis

路福平,杨霁菡,王永帅,青快,王洪彬

LU Fu-ping, YANG Ji-han, WANG Yong-shuai, QING Kuai, WANG Hong-bin

教育部工业发酵微生物重点实验室 天津科技大学,天津 300457

Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

关键词: 中药渣;生物活性肽;蛋白酶;水解

Key words: Chinese medicine residue; bioactive peptide; protease; hydrolysis

摘要: 以中成药血必净药渣为材料,研究了通过蛋白酶水解从中制备生物活性肽的工艺. 通过考察比较酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶水解药渣的效果,确定了复合蛋白酶的适宜配比;通过比较不同水解时间的蛋白提取率、水解度和 DPPH 自由基清除率等指标,确定了复合蛋白酶适宜的水解时间. 结果为,选用中性蛋白酶与碱性蛋白酶进行复配来水解制备生物活性肽,适宜配比为 3 : 1, 4 h 为复合蛋白酶适宜的水解时间. 在该条件下蛋白质提取率达 81%, DPPH 自由基清除率达 39.8%.

收稿日期:2015-10-19

基金项目:国家高技术研究发展计划项目(2012AA021303);天津市科技特派员项目(15JCTPJC56500)

作者简介:路福平(1967—),男,天津市人,天津科技大学教授,博士,主要研究方向为酶工程.

Abstract: Using the residues of Chinese medicine Xuebijing as materials, bioactive peptide was prepared by protease hydrolysis. The hydrolysis residues effect of acid protease, neutral protease and alkaline protease was investigated. On this basis, the appropriate proportion of compound protease hydrolysis residues was studied, and the suitable hydrolysis time of compound protease was confirmed by comparing the index of different hydrolysis time, such as protein extraction rate, hydrolysis degree and the antioxidant index DPPH free radical clearance rate. The results showed that the neutral protease compounded with alkaline protease was selected to prepare bioactive peptides, appropriate ratio was 3 : 1; the suitable hydrolysis time of complex protease was 4 h, under the condition, the protein extraction rate was 81%, and the antioxidant index DPPH free radical clearance rate was 39.8%.

0 引言

近些年,我国中药现代化产业发展迅速,但同时也产生了规模愈来愈庞大的中药渣废弃物^[1-4]. 统计数据显示,我国每年仅植物类药渣的排放量就已高达数百万吨,目前的处理方式以烧毁、堆放为主,不仅浪费大量的资源,也严重污染环境^[5-6]. 目前已报道的中药渣废弃物综合利用途径包括堆肥化处理、生产食用菌、加工成饲料等,但资源利用率和产品附加值都较低,影响了企业推广应用的积极性. 因此需要探索利用率更高、附加值水平更好的综合利用途径^[7].

由于现在的中药材提取工艺比较单一,尚有许多有益成分残留在药渣中. 高发奎^[8]检测甘草废渣发现,其中含有 18 种氨基酸,含量在 0.07% ~ 0.79% 之间,其中有 8 种是人体必需的氨基酸. 贾伍员等^[9]研究板蓝根药渣中的成分,结果表明,该药渣中含有大量的纤维素、淀粉、粗蛋白、磷、钾等营养成分,可用于制作有机肥. 祖庸等^[10]对太白花药渣中的氨基酸、无机元素及维生素 C 的含量进行了测定,发现总氨基酸含量为 1.985 g/100 g,其中谷氨酸含量最高,达到 0.293 g/100 g,其次为天门冬氨酸和精氨酸,还含有硅、锰、铝、锌、钡、铬、镁、铁等多种无机元素及少量维生素 C. 由此可见,药渣中不仅残留部分药用成分,而且含有丰富的蛋白质、多糖、纤维素和木质素等物质和其他营养

物质,具有很高的再利用价值.

由蛋白质水解生成的生物活性肽由于结构不同而显示出各种独特的生理活性,具有较高的营养价值和丰富的保健功能,如免疫调节、降胆固醇、降血压、抗氧化功能等,是保健功能食品的重要成分. 天津红日药业的中成药血必净由红花、赤芍、川芎、当归和丹参 5 种药材制得. 本文拟采用血必净的药渣作为原料,通过蛋白酶水解制备生物活性肽,以探索中药渣综合利用的新途径.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

材料:血必净药渣,由天津红日药业提供;酸性蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶,由天津诺奥公司提供;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)(分析纯),购于东京化成工业株式会社;茛三酮(分析纯),购于天津市恒兴化工贸易公司;硫酸、盐酸、硫酸铜、硫酸钾、硼酸,均为试剂纯,购于天津博欧特化工贸易有限公司.

仪器:FE20 型 pH 计、AB204-S 型分析天平,梅特勒-托利多仪器上海公司产;GL20A 型高速冷冻离心机,日本日立有限公司产;SCD-II 型高纯水装置,军事医学科学院卫生装备研究所产;TU-1810 型紫外分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司产;K05A 型自动定氮仪,上海晟声自动化分析仪器有限公司产.

1.2 试剂的配制

1) 茛三酮显色剂:准确移取果糖 0.3 g,茛三

酮 0.5 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 10 g, KH_2PO_4 6 g 混合均匀, 然后定容至 100 mL, 避光保存, 现用现配.

2) 混合指示剂: 甲基红乙醇溶液: 溴甲酚绿乙醇溶液 ($v:v$) = 1:5.

3) DPPH 乙醇溶液: 精密称取 DPPH 19.7 mg, 用无水乙醇溶解于 250 mL 容量瓶中, 摇匀即得 0.2 mmol/L DPPH 乙醇溶液, 0~4 °C 避光保存, 备用.

1.3 实验方法

1.3.1 药渣水解制备生物活性肽样品 称取粉碎的药渣 5 g, 用 100 mL 水溶解, 酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶水解前, 将药渣 pH 值分别调整到 5, 7 和 9. 按 800 U/g 添加蛋白酶, 50 °C 水解一定时间后沸水浴灭酶 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液为生物活性肽样品.

1.3.2 蛋白质含量的测定 采用凯氏定氮法 (GB 5009.5—1985) 测定蛋白质含量.

1.3.3 水解度的测定 水解度测定采用茚三酮比色法^[11-12], 具体步骤如下:

1) 水解度的计算公式

$$DN = \frac{n}{6.25 \times N/h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

其中, n 为样品中 $-\text{NH}_2$ 的摩尔含量/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1})$, $6.25 \times N$ 为样品的蛋白含量/ $(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$, h_{tot} 为 1 g 原料中蛋白质的肽键毫摩尔数/ $(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1})$.

2) 标准曲线的绘制: 取 0.1 g 干燥过的甘氨酸, 溶解后定容至 100 mL, 取出 10.00 mL 定容至 100 mL, 得到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甘氨酸溶液. 取此溶液再分别稀释成含量为 20~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液, 用于标准曲线的绘制. 取出 2.00 mL 测定用稀释液于试管中, 加入 1.00 mL 茚三酮显色剂, 混匀后沸水浴 15 min, 同时做空白实验; 然后冷水冷却, 加入 5.00 mL 40% 乙醇溶液混匀, 放置 15 min 后, 于 570 nm 处测定吸光度.

3) 水解液中 $-\text{NH}_2$ 摩尔含量的测定: 取蛋白水解液 1 mL 定容至 50 mL, 加入 1.00 mL 茚三酮显色剂, 混匀后沸水浴 15 min, 同时做空白实验; 然后冷水冷却, 加入 5.00 mL 40% 乙醇溶液混匀, 放置 15 min 后, 于 570 nm 处测定吸光度.

1.3.4 抗氧化能力的测定^[13-14] 1) 取药渣水解样品 0.5 mL (空白对照取水 0.5 mL), 补加无水乙醇 1.5 mL, 然后加入 1.0 mL DPPH 乙醇溶液, 混匀, 于 37 °C 条件下反应 30 min, 0.2 μm 膜过滤后于 517 nm 处测吸光度.

2) DPPH 自由基清除率

$$Y = (A_c - A_s) / A_c \times 100\%$$

其中, A_s 为加测定样品时的吸光度, A_c 为未加测定样品时空白对照的吸光度.

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶制剂的选择

选取酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶 3 种常用微生物源蛋白酶进行水解制备多肽, 图 1 为 3 种蛋白酶水解药渣 3 h 后的蛋白质提取率和水解度.

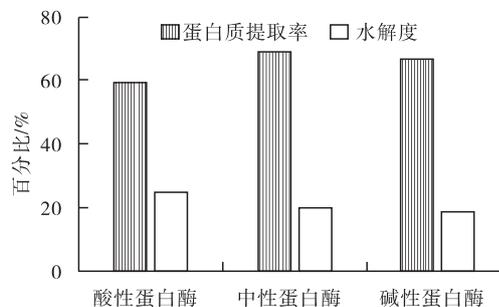


图 1 3 种蛋白酶水解药渣的蛋白质提取率和水解度
Fig. 1 The protein extraction rate and hydrolysis degree of three protease hydrolysis residues

由图 1 可知, 在 3 种酶中, 酸性蛋白酶对药渣蛋白质的水解程度最好, 但是蛋白质提取率最低, 而中性蛋白酶与碱性蛋白酶对药渣蛋白质的提取率较高. 考虑到高蛋白质提取率对原

料利用率至关重要,并且提高水解度可以通过延长水解时间实现,故本文在选择酶制剂进行多肽制备时优先采纳蛋白质提取率这个指标.中性蛋白酶与碱性蛋白酶在蛋白质提取率与蛋白质水解度方面相差不大,且碱性蛋白酶水解时 pH 值会逐渐下降到中性,因此最终选用中性蛋白酶与碱性蛋白酶进行复配来水解药渣制备多肽.

2.2 复合蛋白酶配比的确定

为了确定复合蛋白酶里中性蛋白酶与碱性蛋白酶的合适比例,本研究分别测定了不同比例条件下所得多肽的蛋白质提取率,结果如图 2 所示(水解之前药渣 pH 值调至 9,复合蛋白酶添加量为 800 U/g).

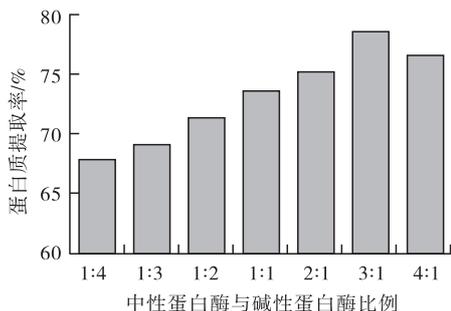


图 2 中性蛋白酶与碱性蛋白酶不同比例条件下的蛋白质提取率

Fig. 2 The protein extraction yield of neutral protease and alkaline protease under the different proportion condition

由图 2 可知,当中性蛋白酶与碱性蛋白酶的比例为 3 : 1 时,复合蛋白酶对药渣蛋白有较高的提取率,对药渣原料的利用更充分,因此选用复合蛋白酶的适宜配比为 3 : 1.

2.3 复合蛋白酶水解时间的确定

理论上不同时间对蛋白质的提取和水解程度不同,进而会导致多肽产物抗氧化能力的变化.复合蛋白酶在不同水解时间(1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h)下的蛋白质提取率和 DPPH 自由基清除率测定结果如图 3 所示.由图 3 可知,蛋白质

提取率随着水解时间的延长而逐渐增加,到 4 h 后,蛋白质提取率趋于稳定;DPPH 自由基清除率所反映出的抗氧化能力呈现先升高后降低的趋势,水解时间为 4 h 时的抗氧化能力最强.综合蛋白质提取率和自由基清除率的测定结果,适宜的水解时间选择 4 h,该条件下蛋白质提取率达到 81%,DPPH 自由基清除率达到 39.8%.

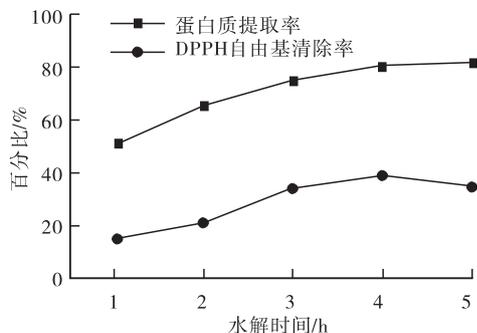


图 3 复合蛋白酶在不同水解时间下的蛋白质提取率和 DPPH 自由基清除率

Fig. 3 The protein extraction rate and eliminating free radicals rate of compound protease under different hydrolysis time

3 结论

本文以符合我国保健品生产要求的中成药血必净药渣为原料,通过蛋白酶水解法制备了生物活性肽.比较了酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶的水解效果,确定选用中性蛋白酶与碱性蛋白酶进行复配来水解制备多肽,适宜配比为 3 : 1.通过考察不同水解时间下的蛋白质提取率、水解度和 DPPH 自由基清除率等指标,确定复合蛋白酶适宜的水解时间为 4 h,在该条件下蛋白质提取率达到了 81%,抗氧化指标 DPPH 自由基清除率达到了 39.8%.本研究成果为用蛋白酶水解中药渣制备高附加值的活性多肽产品做出了有益的探索.

参考文献:

[1] SONG X Y, LI Y D, SHI Y P. Quality control of tradition-

- al Chinese medicines; a review [J]. Chinese journal of natural medicines, 2013, 11(6):596.
- [2] CHUNG V C H, HILLIER S. Referral to and attitude towards traditional Chinese medicine amongst western medical doctors in postcolonial Hong Kong [J]. Social science & medicine, 2011, 72(2):247.
- [3] ZHANG H, TAN C, WANG H Z. Study on the history of traditional Chinese medicine to treat diabetes [J]. European journal of integrative medicine, 2010, 2(1):41.
- [4] LIU H X, WANG S R, LEI Y. Characteristics and advantages of traditional Chinese medicine in the treatment of acute myocardial infarction [J]. Journal of traditional Chinese medicine, 2011, 31(4):269.
- [5] 朱国婷. 酶解补中益气丸药渣制备水不溶性膳食纤维工艺的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2014:11-12.
- [6] 庄毅, 洪净. 药用真菌双向性固体发酵工程与中成药药渣再开发[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(22):1918.
- [7] 陈缤, 贾天柱. 中药渣的综合利用[J]. 中成药, 2005, 27(10):1203.
- [8] 高发奎. 甘草废渣提取物中的氨基酸含量[J]. 甘肃环境研究与监测, 1995, 8(4):6.
- [9] 贾伍员, 秦坤, 刘林. 板蓝根药渣成分的测定及其利用研究[J]. 泰山医学院学报, 2010, 38(9):520.
- [10] 祖庸, 刘建利, 雷闰盈. 地衣类植物药渣的饲用价值研究[J]. 饲料研究, 1991(4):15.
- [11] 赵新淮, 冯志彪. 蛋白质水解物水解度的测定[J]. 食品科学, 1994, 179(11):65.
- [12] 郭兴凤. 蛋白质水解度的测定[J]. 中国油脂, 2000, 25(6):176.
- [13] YEN W J, CHANG L W, LEE C P, et al. Inhibition of lipid peroxidation and nonlipid oxidative damage by carnosine [J]. JAOCS, 2002, 79(4):329.
- [14] 林诗云, 王炯, 冯桂权, 等. 6种天然药提取物清除自由基和抗氧化活性研究[J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2010, 19(3):204.

我校荣获两项 2015 年度国家科学技术奖

2016年1月8日,2015年度国家科学技术奖励大会在北京人民大会堂隆重举行.党和国家领导人习近平、李克强、刘云山、张高丽出席大会并为获奖代表颁奖.郑州轻工业学院与牵头单位共同完成的“定向转化多元醇的生物催化剂创制及其应用关键技术”和“节能与新能源客车关键技术研发及产业化”两项科研成果分别荣获国家技术发明奖二等奖和国家科学技术进步奖二等奖.

两项奖励的获得,是我校国家级科学技术奖励方面的重大进展,标志着我校科技研发能力、科技创新能力和知识转化能力迈上新台阶,彰显了我校在特色骨干大学建设上的新跨越.

多年来,学校坚持科技兴校战略,以解决国家和地方重大战略需求为导向,以全面提升科技创新能力为目标,立足领域前沿、坚持自主创新,强化原始积累、注重重点培育,并结合科技工作发展需求制定出台了一系列激励政策和保障措施.全校广大教师、科研人员潜心科研,勇于探索,敢于攻坚,厚积薄发,为国家科技发展做出了越来越多、越来越大的贡献.

据了解,全国共有120所高校作为主要完成单位获得了2015年度国家科学技术奖三大奖174项,其中国家技术发明奖二等奖31项,国家科学技术进步奖二等奖98项.河南省今年共有6所高校获得了9项奖励,我校获奖数量在省内高校中位列第二.

(供稿:郑州轻工业学院科技处)