酶解菲牛蛭制备抗凝血肽的工艺优化

钟超，吴晖，赖富饶

（华南理工大学食品安全与检测研究中心，广东广州 510640）

摘要：以菲牛蛭为原料，采用 Alcalase 2.4 L 碱性蛋白酶酶解菲牛蛭制备抗凝血肽，通过筛选显著单因素和设计正交试验，并以抗凝血活性为指标，确定酶解的最佳反应条件为：酶解温度 55 ℃、酶解时间 2 h、底物浓度 12%、加酶量 3%、pH 8.5，在该条件下所制备的抗凝血肽的抗凝血活性可达 702 AT-U/g。

关键词：菲牛蛭；抗凝血活性；Alcalase 2.4 L；抗凝血肽

文章篇号：1673-9078(2012)2-164-167

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of *Poecilobdella manillensis Lesson* for Preparing of Ancoagulant Peptide

ZHONG Chao, WU Hui, LAI Fu-rao

(Research Center for Food Safety and Detection, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In order to obtain high activity ancoagulant peptide from *Poecilobdella manillensis Lesson*, an enzymolysis method was established through sequential steps of screening single-factor and designing orthogonal test. By selecting ancoagulant activity as index, the optimum enzymolysis reaction conditions were determined as enzymolysis temperature 55℃, enzymolysis temperature 2h, substrate concentration 12%, enzyme dosage 3% and pH8.5. The ancoagulant activity could reach 702AT-U/g under the optimized conditions.

Key words: *Poecilobdella manillensis Lesson*; ancoagulant activity; Alcalase 2.4L; ancoagulant peptide

菲牛蛭，俗称金边蚂蟥、吸血水蛭，主要分布于广东、广西等省区，是一味经典的传统中药，有破血、逐瘀、通经的功效，用于治疗症瘕痞块、血瘀闭经、跌打损伤等病症[1]。现代科学研究表明，菲牛蛭发挥药效的物质基础是其体内的天然水蛭素，天然水蛭素是迄今为止所发现的最强特异性天然抗凝血多肽，可用于对人类心脑血管疾病尤其是脑血栓等血栓性疾病的治疗[2]。天然水蛭素仅仅由菲牛蛭唾液腺分泌而来，其含量很少，再加上菲牛蛭地域分布比较窄，来源并不丰富，因此天然水蛭素的价格一直较高，降低天然水蛭素提取成本和开发新抗凝血肽成了近期研究热点。目前文献中已报道的天然水蛭素主要提取制备方法有有机试剂沉淀法、高温煮沸法、pH等电点沉淀法等[3~5]，它们都是利用水蛭素性质进行提取的，缺点是没有利用菲牛蛭体，造成了原料的浪费。本文借鉴了一些酶解胶原蛋白制备各种生物活性多肽的方法[6,7]，分别考

查酶解温度、酶解时间、底物浓度、pH对抗凝血活性

的影响，得到了酶解菲牛蛭体制备抗凝血肽的最佳工艺，从而为抗凝血肽的开发提供新参考。

收稿日期：2011-8-14

基金项目：新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-060746)

作者简介：钟超（1987-），男，硕士研究生，研究方向为食品质量与安全

通讯作者：吴晖（1967-），男，教授，博士，研究方向为食品质量与安全

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

菲牛蛭，购自广州水蛭生物科技有限公司；凝血酶、牛血纤维蛋白原，Sigma 公司；蛋白酶 Trypsin、Pepsin、Flavourzyme、Papain、Alcalase 2.4 L，诺维信公司；丙酮、无水乙醇、氯化钠、硫酸铜、碳酸钠、酒石酸钾钠、氢氧化钠、盐酸等，天津市化学试剂一厂，分析纯；Tris-HCl 试剂、福林酚乙液试剂，广州健阳生物科技有限公司，分析纯。

1.2 仪器与设备

高速组织捣碎机，飞利浦公司；紫外可见分光光度计，日本 Shimadzu 公司；SHA-C 水浴恒温振荡器，上海亚荣生化仪器厂；雷磁 PHS-3C 型精密 pH 计，上海精科仪器有限公司；5804R 型高速冷冻离心机，德国 Eppendorf 公司；HHS 型电热恒温水浴锅，上海博迅实业有限公司医疗设备厂。

1.3 实验方法

1.3.1 菲牛蛭的酶解工艺

冷冻菲牛蛭→常温解冻→加蒸馏水混合匀浆→60 ℃下水浴搅拌 1 h→10000 r/min 离心 10 min→取沉淀与蒸馏水混合配成不同底物浓度加蛋白酶酶解→灭酶→将酶解液调 pH 至 7.0→10000 r/min 离心 10 min→取上清液测抗凝血活性

1.3.2 蛋白酶的筛选

在 Trypsin、Pepsin、Flavourzyme、Papain、Alcalase 2.4 L 各种蛋白酶的最适反应条件（如表 1 所示）下，按底物浓度 9%、酶解时间 2 h、加酶量 10%条件下进行酶解，以抗凝血活性为目标，筛选出活性最强酶解液所对应的蛋白酶。

表 1 各种蛋白酶最适反应条件

Table 1 The optimal reaction conditions of the selected proteases

蛋白酶	温度/℃	pH
Pepsin	37	1.8
Flavourzyme	50	7.0
Papain	65	7.0
Trypsin	45	8.0
Alcalase 2.4L	60	8.5

1.3.3 福林-酚法测定肽含量[8]

1.3.3.1 福林-酚试剂和牛血清蛋白标准溶液的配制

福林-酚试剂甲液：A 液 10 g $CaCO_3$、2 g NaOH 和 0.5 g 酒石酸钾钠用蒸馏水溶解并定容到 500 mL 容量瓶；B 液 0.5 g 硫酸铜用蒸馏水溶解并定容到 100 mL 容量瓶；每次使用前，按体积比 50 份 A 液与 1 份 B 液混合即为福林-酚甲液。

福林-酚试剂乙液：广州健阳生物科技有限公司。

牛血清蛋白标准溶液：精确称取 12.5 mg 牛血清蛋白用少量蒸馏水溶解并定容到 50 mL 容量瓶配成浓度为 250 μg/mL 的牛血清蛋白标准溶液。

1.3.3.2 肽含量标准曲线的绘制

取 11 支比色管，1 支作空白，其余管分成两组，分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL 牛血清蛋白标准溶液，用水补足到 1.0 mL，然后每支试管加入 5 mL 福林-酚试剂甲液，在旋涡混合器上迅速混合，于室温（25 ℃左右）放置 10 min，再逐管加入 0.5 mL 福林-酚试剂乙液，立即混匀，在室温下放置 30 min，以未加蛋白溶液的第一支试管作为空白对照，于 660 nm 处测定各管中溶液的吸光度值。以蛋白质质量 m（单位 mg）为横座标，吸光度值 A 为纵座标，绘制出标准曲线。

1.3.3.3 样品肽含量测定

取 1 mL 样品溶液，按上述方法进行操作，取 1 mL 蒸馏水代替样品作为空白对照。根据所测样品的吸光度值，在标准曲线上查出相应的蛋白质量，从而计算出样品溶液的肽含量。

1.3.4 体外抗凝血活性的测定

1.3.4.1 抗凝血活性试剂的配制

Tris-HCl 缓冲溶液：精确称取 0.7980 g Tris-HCl 溶于少量蒸馏水并定容于 100 mL 容量瓶，用稀 NaOH 溶液调 pH 至 7.4。

0.5%牛血纤维蛋白原：精确称取 30 mg 溶于 6 mL Tris-HCl 缓冲溶液。

凝血酶配制：将一支 1000 U 规格的凝血酶全部溶于适量生理盐水（0.9%氯化钠溶液）并定容于 25 mL 容量瓶，得到 40 NIH/mL 凝血酶溶液，放到冰箱中冷藏。

1.3.4.2 抗凝血活性的测定[9]

精密移取 100 μL 酶解液于 1.5 mL 小离心管中，加入 200 μL 0.5%牛血纤维蛋白原溶液，振荡摇匀，置于 37 ℃水浴中预热 5 min，用 10 μL 移液枪滴加凝血酶溶液，每分钟滴 1 次，每次 5 μL，滴加后轻轻摇匀振荡，在水浴中反应直至凝固，记录凝血酶滴加次数 n，按下式计算抗凝血酶活性：

$U=C_1V_1/C_2V_2$

注：U-抗凝血活性 AT-U/g，C_1-凝血酶浓度 40 NIH/mL，C_2-酶解液肽浓度 g/mL（由 1.3.3.3 得出），V_1-消耗凝血酶体积 5n μL（其中 n 为次数），V_2-酶解液加入体积 100 μL。

2 结果与讨论

2.1 肽含量标准曲线的绘制

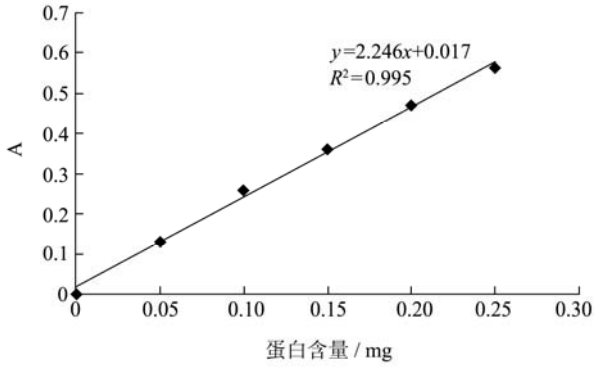


图 1 肽含量标准曲线

Fig.1 Calibration curve of the peptide

根据福林-酚法测蛋白含量的操作步骤，可作出如图 1 所示的标准曲线，其中标准曲线方程为 A=2.246m+0.0173，R^2=0.995，线性良好。从曲线趋势来看，吸光度随着肽含量的增大而呈线性增长。

2.2 蛋白酶的筛选和确定

根据各种蛋白酶在最适温度和 pH 下酶解菲牛蛭所得酶解液抗凝血活性的结果比较，如图 2 所示。

从图 2 可以看出，Alcalase 2.4 L 碱性蛋白酶酶解菲牛蛭所得酶解液抗凝血活性最高，为 658AT-U/g，这可能是因为：第一，Alcalase 2.4 L 所要求的 pH 8.5 为强碱环境，相比于 Pepsin 的强酸性环境和 Flavourzyme、Papain 的中性环境，更有利于水蛭体胶原蛋白的溶解，从而与蛋白酶更好的结合反应；第二，Alcalase 2.4 L 是液体酶，相比于粉末状酶 Trypsin，更有利于与底物的接触反应，从而释放出活性位点。

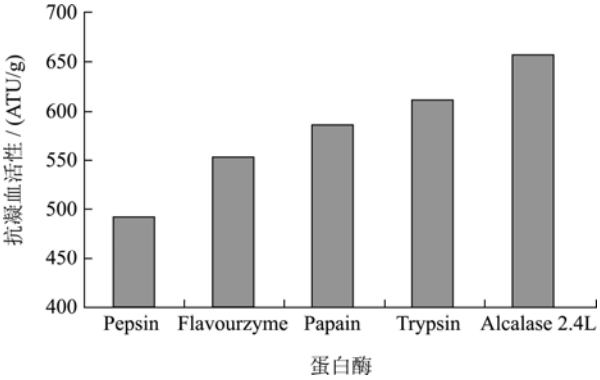


图 2 各种蛋白酶对应酶解液抗凝血活性

Fig.2 The ancoagulant activities of the peptides achieved by using different proteases

2.3 显著单因素的确定

2.3.1 加酶量对抗凝血活性的影响

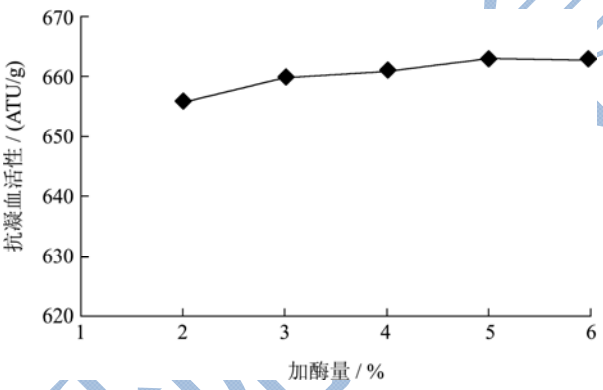


图 3 加酶量对抗凝血活性的影响

Fig.3 Effects of enzyme dosage on ancoagulant activity of the peptide

在温度 60 ℃、底物浓度 9%、pH 8.0、酶解时间 2 h 条件下，加酶量分别为 2%、3%、4%、5%、6%时对抗凝血活性的影响变化如图 3 所示。从图 3 可以看出，酶解液的抗凝血活性受加酶量影响很小，并无显著变化，于是选择加酶量 3%进行下一步实验。

2.3.2 温度对抗凝血活性的影响

在加酶量 3%、底物浓度 9%、pH 8.0、酶解时间 2 h 条件下，酶解温度分别为 50 ℃、55 ℃、60 ℃、65 ℃、70 ℃时对抗凝血活性的影响变化如图 4 所示。从图 4 可以看出，随着温度逐渐升高，抗凝血活性也逐渐增强，但超过 60 ℃后又开始逐渐下降，这可能是因为高温破坏了酶的活力，甚至影响了抗凝血肽的活性，于是选择 60 ℃左右进行下一步实验。

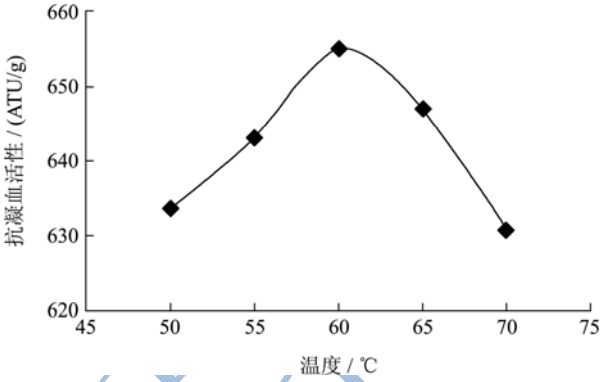


图 4 温度对抗凝血活性的影响

Fig.4 Effects of temperature on ancoagulant activity of the peptide

2.3.3 底物浓度对抗凝血活性的影响

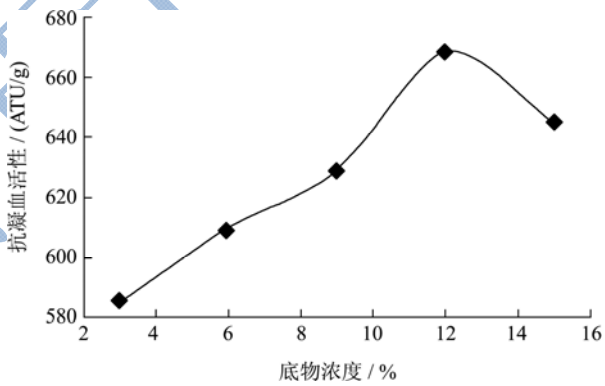


图 5 底物浓度对抗凝血活性的影响

Fig.5 Effects of substrate concentration on ancoagulant activity of the peptide

在加酶量 3%、酶解温度 60 ℃、pH 8.0、酶解时间 2 h 条件下，底物浓度分别为 3%、6%、9%、12%、15%时对抗凝血活性的影响变化如图 5 所示。从图 5 可以看出，随着底物浓度逐渐增大，抗凝血活性也逐渐增强，但超过 12%后又开始逐渐下降，这可能是因为底物浓度较低时虽然可以和蛋白酶充分接触，但生成的肽含量也低，抗凝血活性也不高，底物浓度较高时可能影响了底物蛋白的溶解，无法进行充分反应，因此抗凝血活性会降低，于是选择底物浓度 12%左右进行下一步实验。

2.3.4 pH 对抗凝血活性的影响

在加酶量 3%、酶解温度 60 ℃、底物浓度 12%、酶解时间 2 h 条件下，pH 分别为 7.5、8.0、8.5、9.0、

9.5 时对抗凝血活性的影响变化如图 6 所示。从图 6 可以看出，随着 pH 值逐渐增大，抗凝血活性也逐渐增强，但超过 pH 8.5 后趋于平缓，这可能是因为一开始在弱碱环境下，碱性蛋白酶活力受到很大影响，抗凝血活性也不高，pH 逐渐升高不仅增加了底物蛋白的溶解也增强了酶的活力，因此抗凝血活性会升高，于是选择 pH 8.5 左右进行下一步实验。

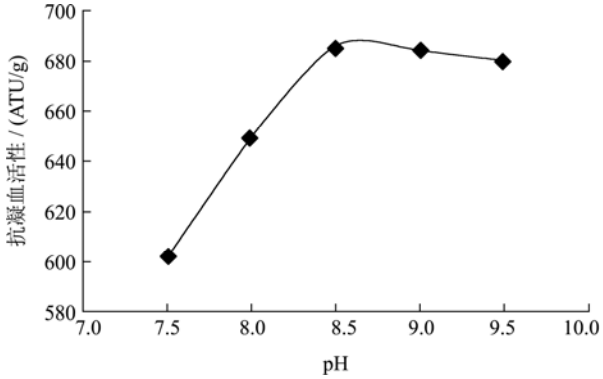


图 6 pH 对抗凝血活性的影响

Fig.6 Effects of pH on ancoagulant activity of the peptide

2.3.5 酶解时间对抗凝血活性的影响

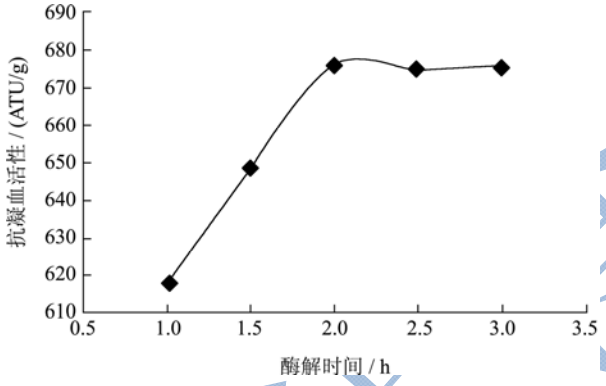


图 7 酶解时间对抗凝血活性的影响

Fig.7 Effects of enzymatic hydrolysis time on ancoagulant activity of the peptide

在加酶量 3%、酶解温度 60 ℃、底物浓度 12%、pH 8.5 条件下，酶解时间分别为 1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h 时对抗凝血活性的影响变化如图 7 所示。从图 7 可以看出，随着酶解时间值逐渐增大，抗凝血活性也逐渐增强，但超过 2 h 后趋于平缓，这可能是因为一开始反应时间短，底物蛋白内的活性位点还未完全打开，造成抗凝血活性低，时间逐渐增加使反应完全，因此抗凝血活性会升高，于是选择酶解时间 2 h 左右进行下一步实验。

2.4 最佳酶解工艺条件的确定

表 2 正交试验因素水平表

Table 2 Factors and levels of the orthogonal test

水平	因素			
	A(酶解温度/℃)	B(底物浓度/%)	C (pH)	D(酶解时间/h)
1	55	9	8.0	1.5
2	60	12	8.5	2
3	65	15	9.0	2.5

以抗凝血活性为考察目标，对酶解温度、底物浓度、pH 和酶解时间进行四因素三水平正交试验，确定酶解的最佳工艺。表 2 为正交试验因素水平表，表 3 为正交试验结果表。

由表 3 中 R 值可知，底物浓度(因素 B)对抗凝血活性的影响最大，其余依次是酶解温度（因素 A）>酶解时间（因素 D）>pH（因素 C），最佳酶解工艺条件为 $B_2A_1D_2C_2$，即底物浓度 12%、酶解温度 55 ℃、酶解时间 2 h、pH 8.5，在此条件下，所得肽抗凝血活性可达 702 AT-U/g。

表 3 正交试验结果

Table 3 Results of the orthogonal test

序号	A	B	C	D	抗凝血活性/(AT-U/g)
1	1	1	1	1	608
2	1	2	2	2	702
3	1	3	3	3	627
4	2	1	2	3	674
5	2	2	3	1	686
6	2	3	1	2	671
7	3	1	3	2	645
8	3	2	1	3	655
9	3	3	2	1	619
k1	645.67	642.33	644.67	637.67	
k2	677	681	665	672.67	
k3	639.67	639	652.67	652	
R	37.33	42	20.33	35	

由表 3 中 R 值可知，底物浓度(因素 B)对抗凝血活性的影响最大，其余依次是酶解温度（因素 A）>酶解时间（因素 D）>pH（因素 C），最佳酶解工艺条件为 $B_2A_1D_2C_2$，即底物浓度 12%、酶解温度 55 ℃、酶解时间 2 h、pH 8.5，在此条件下，所得肽抗凝血活性可达 702 AT-U/g。

3 结论

3.1 本实验采用 Alcalase 2.4 L 蛋白酶对菲牛蛭匀浆体进行酶解制备高抗凝血肽，以体外抗凝血活性为目标，通过正交试验得到了最佳酶解条件：底物浓度 12%、酶解温度 55 ℃、酶解时间 2 h、pH 8.5，在此条件下，所得肽抗凝血活性可达 702 AT-U/g。相比于目前市场上大部分类似水蛭肽产品抗凝血活性只有 500 AT-U/g，本实验所得抗凝血肽活性提高了 40%。

3.2 在酶解制备过程中，有两个问题需要注意：（1）一般酶解制备各种功能活性肽都是以水解度为目标，水解度越大越能得到满意的结果，但本实验所要制备的抗凝血肽活性与其分子量有显著关系，因此不能光以水解度为参考，而要严格控制反应时间；（2）体外抗凝血活性的测定易受环境温度影响，为了保证测定的准确性，应在低温下进行，以保持凝血酶的活力。

参考文献

[1] 李艳玲,黄荣清,崔玉,等.水蛭的研究概况及展望[J].科学技术与工程,2004,4(3):239-242

[2] Whitaker I S, Rao J, Izadi D, et al. Hirudo medicinalis: ancient origins of and trends in the use of medicinal leeches throughout history [J]. British J Oral Maxill Surg, 2004, 42: 133

[3] 林晓洋.天然水蛭素分离纯化研究[D].南宁:广西大学硕士学位论文,2007

[4] 李雪芹.水蛭素的分离纯化及其聚乙二醇修饰[D].大连:大连理工大学,2008

[5] 杨立新,秦海娜,李晓晖.水蛭素的分离纯化与检测方法研究进展[J].水产科学,2005,24(2):37-39

[6] 罗文峰,吴新良,郭勇.酶解对乌骨鸡多肽抗氧化活性影响的研究[J].食品工业科技,2010,31(4):180-182

[7] 王晨,吴晖,李晓凤等.胃蛋白酶酶解提取鸡骨胶原蛋白工艺的研究[J].现代食品科技,2008,24(12):1301-1303

[8] 高英,俞玉忠.福林酚法测定脑蛋白水解物溶液中的多肽含量[J].海峡药学,2004,16(6):57-58

[9] 中华人民共和国药典编委会.中华人民共和国药典(2010 一部)[S].北京:化学工业出版社,2010

现代食品科技