

# 胰蛋白酶水解工程菌表达产物制备重组降血压肽

卢真保<sup>1</sup>, 刘冬<sup>2</sup>, 李世敏<sup>2</sup>, 喇文军<sup>2</sup>, 梁世中<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广东 广州 510640)(2. 深圳职业技术学院化生学院, 广东 深圳 518055)

**摘要:** 本实验研究了胰蛋白酶对工程菌 *E.coli* BL21 表达产物的酶解作用, 以酶解产物降血压多肽 VLPVPR 含量为指标, 分析 pH 值、酶解温度、酶浓度和酶解时间等因素对酶解反应的影响。结果表明, 最佳酶解条件为: 酶解温度 37 °C, pH 8.0, 酶浓度 90 U/mL, 酶解时间 4 h。在此条件下酶解产物 VLPVPR 含量为 211.1 mg/L。

**关键词:** 胰蛋白酶; 酶解; VLPVPR

中图分类号: Q516; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2008)05-0412-04

## Preparation of Recombinant Antihypertensive Peptide by Trypsin-catalyzed Hydrolysis of Expressive Products of Engineering Bacteria

LU Zhen-bao<sup>1</sup>, LIU dong<sup>2</sup>, LI Shi-min<sup>2</sup>, LA Wen-jun<sup>2</sup>, LIANG Shi-zhong<sup>1</sup>

(1. School of Bioscience and Biotechnology, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. School of Chemical and Biological Engineering, Shenzhen Polytechnic College, Shenzhen 518055, China)

**Abstract:** Trypsin-catalyzed hydrolysis of expressive products of recombinant *E.coli* BL21 was studied. Results showed that the best reaction temperature, pH, enzyme dosage and reaction time were 37 °C, 8.0, 90 U/mL, and 4 h, respectively, under which the concentration of VLPVPR was up to 211.1 mg/L.

**Key words:** trypsin; enzymatic hydrolysis; VLPVPR

降血压肽 (antihypertensive peptide, AHP) 是一类降低人体血压的小分子多肽, 通过抑制肾素-血管紧张素调节系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的血管紧张素转化酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 活性而降低血压<sup>[1~2]</sup>。来源于天然动植物、微生物蛋白中的降血压肽, 具有降血压效果明显, 无毒副作用等优点。因此, 已成为目前抗高血压药物研究的热点之一<sup>[3~5]</sup>。目前, 降血压肽主要是利用蛋白酶酶解法从天然蛋白中分离纯化获得, 该方法存在天然原料降血压肽含量低、专一性蛋白酶筛选繁琐、水解产物成分复杂、分离纯化环节多、产率低、产品成本高等问题。化学合成方法具有成本高、副反应物多及残留化合物等缺点。这些问题制约了降血压肽的产业化。利用基因工程技术生产降血压肽可克服这些问题, 便于大规模生产, 发展前景广阔。

收稿日期: 2007-12-30

基金项目: 广东省科技计划工业攻关项目 (粤科计字[2006] 119 号)

作者简介: 卢真保(1982-), 男, 硕士研究生

通讯作者: 刘冬(1968-), 男, 博士, 主要从事食品生物技术研究

本课题组已成功构建基因工程菌 *E.coli* BL21 (pGEX-4T-2-AHP)<sup>[6]</sup>, 并实现了重组降血压肽的高效表达, 但表达的 AHP 需经凝血酶或胰蛋白酶水解才能获得单体 Val-Leu-Pro-Val-Pro-Arg (VLPVPR)。考虑到凝血酶价格昂贵, 本实验选择胰蛋白酶来研究其水解基因工程菌 *E.coli* BL21 (pGEX-4T-2-AHP) 表达产物制备降血压肽 VLPVPR 的工艺参数, 为后续纯化 VLPVPR 奠定基础, 降低生产成本。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

##### 1.1.1 重组降血压肽基因工程菌 *E.coli* BL21 (pGEX-4T-2-AHP) 表达产物的制备

利用已构建的 *E.coli* BL21 (pGEX-4T-2-AHP) 工程菌进行高密度发酵, 发酵液经 9000 r/min 离心 10 min, 收集菌体。每克湿菌体悬于 3 mL 含有 2 mmol/L EDTA 的 1×PBS 缓冲液中, 加溶菌酶至终浓度 20000 U/mL, 室温放置 30 min 后超声破碎 30 min, 4 °C 12000 r/min 离心 10 min 取上清液。超声破碎条件: Φ13 mm

螺纹探头和 Φ13 mm 螺纹探头可换尖端, 振幅 75%, 开 5 s, 停 5 s, 共破碎 30 min。

### 1.1.2 主要药品与试剂

VLPVPR 标准品 (纯度 95%以上), 西安美联多肽合成有限公司; 溶菌酶 (lysozyme, 20000 U/mg), 购自 BBI 公司; 胰蛋白酶 (trypsin, 1:300), 购自 BBI 公司; 三氟乙酸 (TFA), 色谱纯, 购自日本东京化学工业株式会社; 乙睛, 色谱纯, 购自天津协和昊鹏色谱科技有限公司。

### 1.2 实验仪器

高效液相色谱仪 Prominence LC-20AT, 日本岛津; 超声波破碎仪 (VC×600), Sonics & Materials 公司; 恒温水浴锅, 北京市长风仪器仪表公司; DJ-300S 电子天平, 日本 SHINKO 公司; Orion 868 型 pH 计, 美国 Orion 公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 酶解流程

取 1.1.1 所述的工程菌细胞破碎上清液 2 mL, 调节一定 pH 值, 加入一定比例的胰蛋白酶, 在一定的温度下酶解一段间后, 95 °C 条件下经 10 min 终止酶活。12000 r/min 条件下离心 15 min, 取上清液测定 VLPVPR 含量。

#### 1.3.2 重组降血压肽 VLPVPR 含量测定方法

采用 RP-HPLC 法检测所得产品中的 VLPVPR 含量, 色谱条件如下: 色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水-乙睛 (89.5:11.5), 添加 0.05% (V/V) TFA; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 199 nm, 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL。

VLPVPR 标准品标准曲线如图 1。

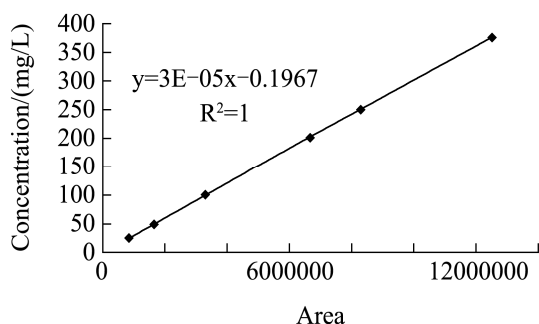


图 1 VLPVPR 标准曲线

Fig.1 Standard curve of VLPVPR

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶解温度对酶解反应的影响

水解条件: 酶浓度 120 U/mL, pH 值 7.5, 水解 4 h。在以上条件下分别选取温度 23 °C、30 °C、37 °C、

44 °C、51 °C 五个水平处理, 结果如图 2。

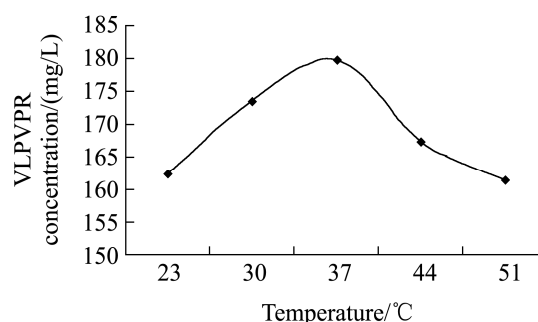


图 2 温度对 VLPVPR 浓度的影响

Fig.2 Effect of temperature on VLPVPR concentration

各种酶解反应都有最适的温度, 在蛋白质的酶解反应中, 温度是一个重要工艺参数。温度一方面影响蛋白酶的活性与蛋白酶的稳定性, 另一方面温度还影响底物的空间结构, 从而影响蛋白质的酶解效率。由图 2 可见, 温度由 23 °C 升至 37 °C 时, VLPVPR 含量呈上升趋势, 继续升高温度, 含量减少, 所以选择 37 °C 为最佳酶解温度。

### 2.2 起始 pH 值对酶解反应的影响

水解条件: 酶浓度 120 U/mL, 水解温度 37 °C, 水解 4 h。选取起始 pH 值分别为 7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 五个水平处理, 结果如图 3。

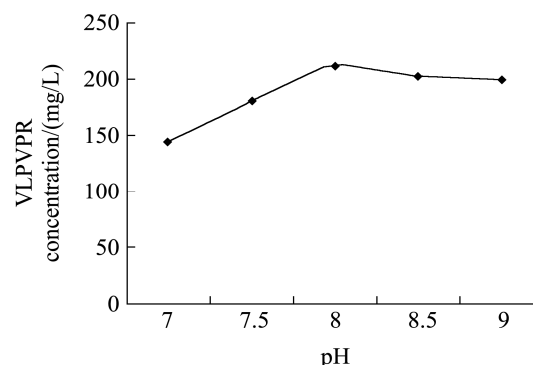


图 3 pH 对 VLPVPR 浓度的影响

Fig.3 Effect of pH on VLPVPR concentration

胰蛋白酶作用于不同底物时, 其最适 pH 值不同。一般认为 pH 值为 7~9 时, 胰蛋白酶的水解作用最强。由上图 3 可以看出起始 pH 为 8.0 时, VLPVPR 含量最高, pH 大于 8.0 时, 含量降低。  $3 \times 10^{-5}x - 0.1967$

### 2.3 酶浓度对酶解反应的影响

水解条件: pH 值 8.0, 温度 37 °C, 水解 4 h。选取酶浓度分别为 30 U/mL、60 U/mL、90 U/mL、120 U/mL、150 U/mL 五个水平处理, 结果如图 4。

由图 4 可以看出, 随着酶浓度的增加, VLPVPR 的含量快速递增, 但当酶浓度增加到 90 U/mL 时, 产物 VLPVPR 的量达到最大值, 与酶浓度为 120 及 150

U/mL 时的含量基本相同, 说明继续增加酶浓度并不能促进水解进程。考虑到成本因素, 选择酶浓度 90 U/mL 为宜。

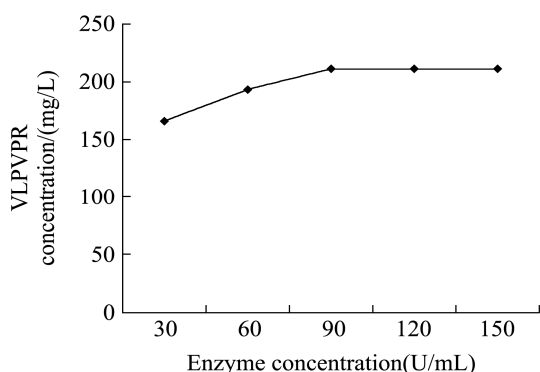


图4 酶浓度对 VLPVPR 浓度的影响

Fig.4 Effect of enzyme concentration on VLPVPR concentration

#### 2.4 酶解时间对酶解反应的影响

水解条件: 酶浓度 90 U/mL, pH 值 8.0, 温度 37 °C。选取酶解时间分别为 0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、5 h 六个水平处理, 结果如图 5。

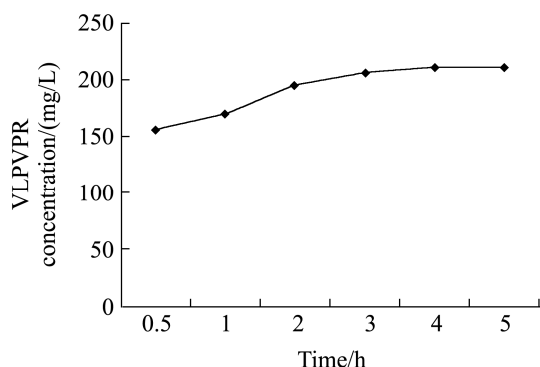


图5 时间对 VLPVPR 浓度的影响

Fig.5 Effect of time on VLPVPR concentration

从图 5 可以看出, 水解初期, VLPVPR 含量快速上升, 水解 3 h 后含量增加缓慢, 4 h 达到最大值, 而后含量基本稳定。这是因为随着水解反应的进行, 底物浓度不断减少, 酶水解速度减缓, 加之酶逐渐失活以及水解产物的积累对酶解反应可能存在反作用, 所以, 酶解时间以 4 h 为宜。

#### 2.5 胰蛋白酶水解工程菌表达产物工艺的优化

通过对水解温度、pH、酶浓度和时间等工艺参数的单因素实验, 进一步采用正交实验确定水解的最佳工艺参数。正交实验的因素和水平以及实验结果见表 1、表 2 和表 3。由表 2、3 分析可见, 本实验中影响酶解的四个因素的主次顺序为: pH>酶浓度>温度>时间; 最佳酶解条件是 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>(C<sub>2</sub>)D<sub>3</sub>, 即温度 37 °C, pH 8.0, 酶浓度 120 U/mL 或 90 U/mL, 酶解时间 4 h,

为减少酶用量, 选择酶浓度 90 U/mL。在此条件下酶解产物中 VLPVPR 含量可达 211.1 mg/L。

表 1 酶解条件因素水平表

Table 1 Factors and levels of hydrolyzing condition

因素	A(温度/°C)	B(pH)	C(酶浓度 /U·mL <sup>-1</sup> )	D(时间/h)
1	30	7.5	60	2
2	37	8.0	90	3
3	44	8.5	120	4

表 2 胰蛋白酶水解工程菌表达产物条件正交实验

Table 2 Orthogonal tests of hydrolyzation by trypsin

编号	A	B	C	D	VLPVPR 浓度 / (mg/L)
1	1	1	1	1	141.2
2	1	2	2	2	195.5
3	1	3	3	3	194.1
4	2	1	2	3	187.3
5	2	2	3	1	200.5
6	2	3	1	2	189.3
7	3	1	3	2	169.0
8	3	2	1	3	176.4
9	3	3	2	1	177.3
k <sub>1</sub>	177.0	165.8	169.0	173.0	
k <sub>2</sub>	192.4	190.8	186.7	184.6	
k <sub>3</sub>	174.2	186.9	187.9	185.93	
R	18.13	24.97	18.90	12.93	

表 3 正交实验方差分析表

Table 3 Variance analysis of orthogonal test

方差来源	偏差平方和	自由度	F 值	F <sub>0.05</sub>	显著性
温度	574.3	2	0.872	4.460	
pH	1082	2	1.644	4.460	
酶浓度	673.0	2	1.022	4.460	
时间	303.6	2	0.461	4.460	
总和	2633	8			

### 3 结论

在基因工程菌 *E.coli* BL21 中串联表达的降血压多肽经胰蛋白酶酶解能够获得单体 VLPVPR, 酶解的最优条件为: 温度 37 °C, pH 值为 8.0, 酶浓度 90 U/mL, 反应时间为 4 h。在此条件下, 单体 VLPVPR 浓度达到 211.1 mg/L。

### 参考文献

(下转第 411 页)