

文章编号: 1674-8085(2017)05-0035-04

水蛭的酶解及其产物抗凝血活性评价

刘禹尧¹, *胡爱军¹, 张雪¹, 陈喆¹, 果嘉成¹, 唐德¹, 于思雨¹,
郑捷^{1,2,3}, 高建忠^{2,3}

(1. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津, 300457; 2. 天津市泥鳅育种与高效利用技术企业重点实验室, 天津, 301800;
3. 天津金宝庄园食品有限公司, 天津, 301800)

摘要: 以水蛭为原料, 研究不同酶解因素(酶种类、酶用量、酶解时间、pH 值、酶解温度、底物浓度)对水蛭酶解产物抗凝血活性的影响规律, 优化水蛭的酶解技术参数, 并对酶解产物进行活性评价; 研究结果表明, 优化后的酶解技术条件为, 适宜的水解酶为胰蛋白酶, 酶用量 7000 U/g, 酶解时间 7 h, 酶解 pH 8.3, 酶解温度 50 °C, 底物浓度 14% (w/w)。在该条件下得到的酶解产物抗凝血酶活性最高, 达到 640 U/g。

关键词: 水蛭; 酶解; 抗凝血活性

中图分类号: TQ464.7

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2017.05.008

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF LEECH AND THE ANTICOAGULANT ACTIVITY OF THE ENZYMATIC HYDROLYSATE

LIU Yu-yao¹, *HU Ai-jun¹, ZHANG Xue¹, CHEN Zhe¹, GUO Jia-cheng¹, TANG De¹, YU Si-yu¹,
ZHENG Jie^{1,2,3}, GAO Jian-zhong^{2,3}

(1. School of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;
2. Tianjin Enterprise Key Laboratory of Loach Breeding and Efficient Utilization Technology, Tianjin 301800, China;
3. Tianjin Jinbao Manor Food Co., Ltd, Tianjin 301800, China)

Abstract: Using leech as the raw material, effects of different factors (Enzyme type, enzyme concentration, enzymatic hydrolysis time, pH value, temperature, substrate concentration) on the anticoagulant activity of enzymatic hydrolysate were investigated, the enzymatic conditions were optimized, and the anticoagulant activity of enzymatic hydrolysate was evaluated. The results showed that the optimal conditions were as follows: the suitable hydrolas was trypsin with the dosage of 7000 U/g, hydrolysis time was 7 hours, enzymatic reaction pH was 8.3, temperature was 50°C and substrate concentration was 14% (w/w). Under above conditions, the anticoagulant activity of hydrolysate was the highest and reached 640 U/g.

Key words: Leech; enzymatic hydrolysis; anticoagulant activity

收稿日期: 2017-05-10; 修改日期: 2017-08-20

基金项目: 大学生创新创业训练计划项(201510057065)

作者简介: 刘禹尧(1995-), 女, 安徽阜阳人, 天津科技大学食品工程与生物技术学院食品科学与工程 2013 级本科生(E-Mail:liuyuyao95@126.com);
*胡爱军(1968-), 男, 安徽铜陵人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事食品加工技术与功能成分研究(E-Mail:huijun@tust.edu.cn);
张雪(1994-), 女, 河北保定人, 天津科技大学食品工程与生物技术学院食品科学与工程 2013 级本科生(E-Mail:zhangxue_94@126.com);
果嘉成(1996-), 男, 河北秦皇岛人, 天津科技大学食品工程与生物技术学院食品科学与工程 2014 级本科生(E-Mail:917266847@qq.com);
唐德(1994-), 男, 安徽安庆人, 天津科技大学食品工程与生物技术学院食品科学与工程 2014 级本科生(E-Mail:2410382755@qq.com);
陈喆(1996-), 男, 河北泊头人, 天津科技大学食品工程与生物技术学院食品科学与工程 2014 级本科生(E-Mail:1293479935@qq.com);
于思雨(1992-), 女, 辽宁鞍山人, 硕士生, 主要从事食品加工技术与功能成分研究(E-Mail:356458321@qq.com);
郑捷(1971-), 女, 海南海口人, 高级工程师, 硕士生导师, 主要从事水产品与功能食品的研究(E-Mail:jane@tust.edu.cn);
高建忠(1975-), 男, 天津宝坻人, 高级工程师, 主要从事水产养殖工作(E-Mail:hongteng678@163.com).

0 引言

水蛭,又名“蚂蟥”,它是我国的传统中药。

《中国药典》2010年版将水蛭分为三类:日本医蛭(*Hirudo nipponica Whitman*)、宽体金线蛭(*Whitmania pigra Whitman*)和柳叶蚂蟥(*Whitmania acranulate Whitman*)三种。《本草纲目》曾记载:“咸走血,苦胜血。水蛭之咸苦,以除蓄血,乃肝经血分药,故能通肝经聚血^[1]。”《中药大辞典》记载水蛭具有破血、逐瘀、通经、治蓄血、症瘕、积聚、妇女经闭、干血成癆、跌扑损伤、目赤痛、云翳等作用^[2]。目前水蛭在临床上主要应用于治疗:高血压、高血脂、女子血闭、静脉曲张,急性结膜炎与角膜瘀翳、静脉曲张、心脏病、不孕及抗早孕等病症^[3]。水蛭的主要药理成分为水蛭素,水蛭素是一种单链多肽,由65个氨基酸残基组成,相对分子质量约7000 Da^[3],具有抗细胞凋亡、抗炎、抗纤维化等药理作用^[4],能对抗ADP诱导的血栓形成,并能活化纤维素系统,促使已形成的血栓化解^[5]。水蛭内的蛋白质占水蛭干重的49%以上,包括17种氨基酸,其中人体必需氨基酸有8种^[6]。此外水蛭中含有Zn、Cu、Mg、Mn、Fe、Ca等多种常见元素^[7]。

生物活性肽是涉及生物体内多种细胞功能的生物活性物质,相对分子质量小于6000 Da,来源广泛,并具有多种生理功能,如抗血栓、抗高血压、抗病毒、免疫调节、抗氧化等^[8]作用。现代营养学研究发现:肽比游离氨基酸消化更快、吸收更多,且肽的生物效价和营养价值比游离氨基酸更高。通过将水蛭进行水解,可以将水蛭蛋白质变成活性肽类物质,更利于其吸收及发挥效用。

本研究以水蛭为原料,改变传统水蛭粉的制作工艺,通过生物酶控制水解,然后对酶解物进行抗凝血活性测定,得到最佳酶解条件和抗凝血活性评价。

1 材料与方法

1.1 实验材料

市售水蛭。胃蛋白酶(1:10000)、胰蛋白酶

(1:250)、牛血清白蛋白、纤维蛋白原、凝血酶(1000 U/支)等均购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;氢氧化钠、硫酸铜、盐酸、磷酸、酒石酸钾钠等均为分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 水蛭匀浆液的制备

解冻冰箱中冷冻的水蛭,将水蛭净选后,放入不锈钢盘中,通过电热恒温鼓风干燥箱进行热风干燥,得到干品水蛭,最终含水量 $\leq 5\%$ 。

使用粉碎机将水蛭干品粉碎成粉末状。与水调匀后,放置于4℃冰箱中静置48 h后取出使用匀浆机搅拌均匀,备用。

1.2.2 水蛭酶解工艺的研究

1.2.2.1 蛋白酶种类对酶解的影响

取100 mL 10% (w/w)的水蛭浆液放入烧杯中,分别以胃蛋白酶、胰蛋白酶、两种酶共同作用三种情况进行酶解:

胃蛋白酶:将浆液调节pH=1.5,在38℃的条件下水浴,酶用量8000 U/g。

胰蛋白酶:将浆液调节pH=8.0,在50℃的条件下水浴,酶用量5000 U/g。

两种酶共同酶解:先在胃蛋白酶作用下反应1 h,再改变pH值和温度后使用胰蛋白酶进行酶解。

每2 h进行一次取样,将其在沸水浴中灭活10 min后,在4500 r/min下离心30 min,取上清液来测定抗凝血活性及肽含量。

1.2.2.2 pH值对酶解的影响

取100 mL 10% (w/w)的水蛭匀浆液,预热至50或38℃,在5000或8000 U/g酶用量的条件下将pH值在8.0或1.5左右每增减0.2进行6组对比试验,找出最适pH值。所得酶解液在沸水浴中灭活10 min,在450 r/min下离心30 min,取上清液用于测定抗凝血活性和肽含量。

1.2.2.3 温度对可控酶解的影响

取100 mL 10% (w/w)的水蛭匀浆液,调至其最适pH值,蛋白酶用量5000或8000 U/g,将水解温度在50或38℃左右每 ± 2.5 ℃进行5组对比实验找出合适温度。所得酶解液在沸水浴中灭活10 min,在4500 r/min下离心30 min,取上清液用于测定抗凝血活性和肽含量。

1.2.2.4 蛋白酶用量对酶解的影响

取 100 mL 10% (w/w) 的水蛭匀浆液, 调至其最适 pH 值, 酶用量分别在 5000 或 8000 U/g 左右每增减 1000 U/g 进行 5 组实验, 在最适酶解温度下酶解。将其在沸水浴中灭活 10 min, 在 4500 r/min 下离心 30 min, 取上清液用于测定抗凝血活性和肽含量。

1.2.2.5 底物浓度对酶解的影响

取 100 mL 浓度分别为 6.0%、8.0%、10.0%、12.0%、14.0%(w/w) 的水蛭匀浆液, 选定在上述方法下选出的最适条件进行实验。所得酶解液在沸水浴中灭活 10 min, 在 4500 r/min 下离心 30 min, 取上清液用于测定抗凝血活性和肽含量。

1.2.3 抗凝血活性的测定方法

参考武建卓 (2009 年)^[9]的方法来测定酶解物的抗凝血活性。

1.2.4 肽含量的测定

参考鲁伟, 任国谱, 宋俊梅 (2005 年)^[10]的三氯乙酸法来测定酶解物的肽含量。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶种类对酶解的影响

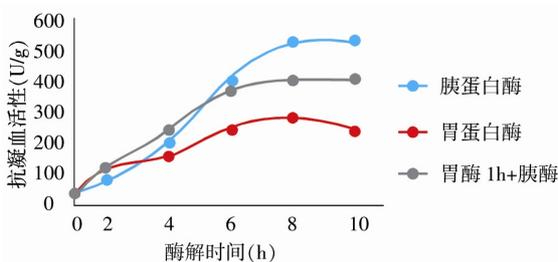


图 1 蛋白酶种类对酶解产物抗凝血活性的影响

Fig.1 Effect of protease types on the anticoagulant activity of hydrolysates

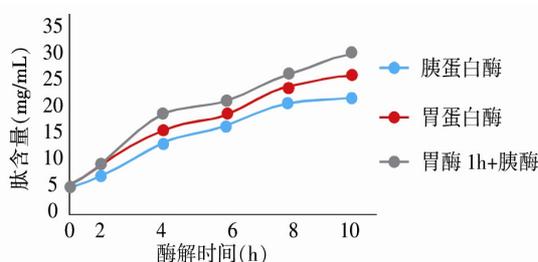


图 2 蛋白酶种类对酶解产物肽含量的影响

Fig.2 Effect of protease types on peptide content in hydrolysates

图 1 表明, 在酶解时间 7 h 前, 三种情况下的酶解产物的抗凝血活性均持续增长, 但 7 h 后,

酶解产物的抗凝血活性不再增大或者活性降低。在酶解 4 h 前, 两种酶组合使用的酶解产物的抗凝血活性较高, 在 4 h 之后胰蛋白酶酶解产物的抗凝血活性远远高于胃蛋白酶和两种酶组合使用的酶解产物的抗凝血活性。

由图 2 可知, 单一酶作用产物的肽含量比两种酶合用的产物的肽含量低一些, 这可能是因为不同蛋白酶水解的肽键有各自的特异性, 胰蛋白酶水解赖氨酸等碱性氨基酸残基提供羧基的肽键, 胃蛋白酶水解芳香族氨基酸或酸性氨基酸的氨基所组成的肽键, 两种酶结合水解的肽键更多, 所以两种酶作用得到的酶解产物的肽含量更高。

综合分析图 1、图 2, 虽然胰蛋白酶酶解产物的抗凝血活性较大, 但是其酶解产物的肽含量却较小。由于本研究的目标主要是研究水蛭酶解产物的抗凝血活性, 以抗凝血活性为主要指标, 所以后续研究将选择使用胰蛋白酶进行酶解处理, 并探讨其适宜的酶解参数。

2.2 pH 值对酶解的影响

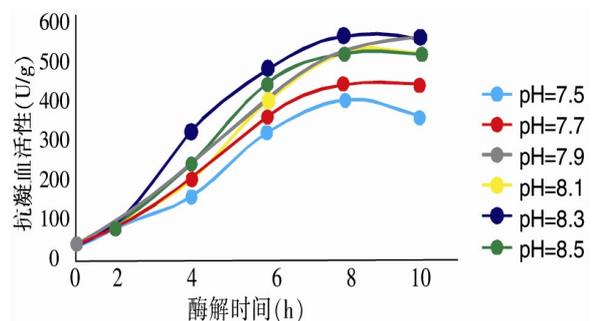


图 3 pH 值对酶解产物抗凝血活性的影响

Fig.3 Effect of pH on the anticoagulant activity of hydrolysates

图 3 表明, 在不同的 pH 值条件下, 随着酶解时间的适当延长, 酶解产物的抗凝血活性均逐渐增大; 但是在相同的酶解时间条件下, 酶解 pH 对酶解产物的抗凝血活性具有一定的影响, 当 pH 小于 8.3 时, 随着 pH 的增大, 酶解产物的抗凝血活性增大; pH 大于 8.3 时, 酶解产物的抗凝血活性开始降低。在 pH8.3 的条件下, 酶解产物的抗凝血活性达到最高, 故以 pH8.3 作为酶解的最适 pH。

2.3 水解温度对酶解的影响

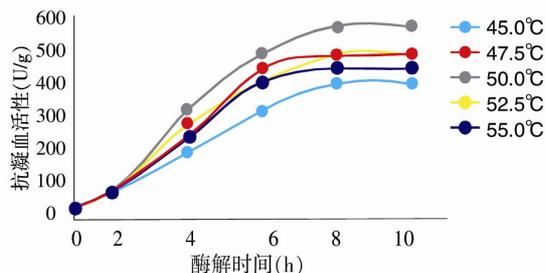


图4 酶解温度对酶解产物抗凝血活性的影响

Fig.4 Effect of enzymolysis temperature on anticoagulant activity of hydrolysates

图4表明,在不同的酶解温度条件下,当酶解时间少于7h,随着酶解时间的延长,酶解产物的抗凝血活性均呈增大趋势;当酶解时间达到7h,并继续延长酶解时间,酶解产物的抗凝血活性几乎不再增加。当酶解时间达到1h以上后,在酶解温度为50℃的条件下,酶解产物的抗凝血活性均比其他酶解温度下得到的酶解产物的抗凝血活性高。

一般来说,温度越高,活化分子数增多,反应速度越快。但是酶是蛋白质,当温度过高时酶会因为变性而失活。并且当反应时间较长时,最适温度会相对降低。图4表明,酶解温度为50℃时酶解产物的抗凝血活性相对较高。

2.3 蛋白酶用量对酶解的影响

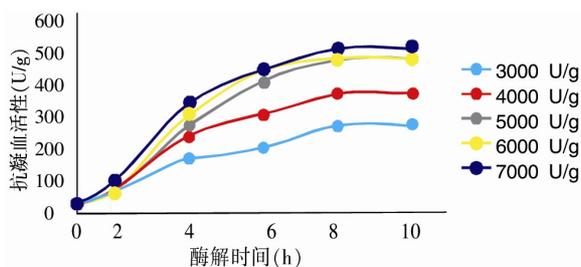


图5 酶用量对酶解抗凝血活性的影响

Fig.5 Effect of enzyme addition on anticoagulant activity of hydrolysates

图5表明,在采用不同酶用量的条件下,当酶解时间小于7h,随着酶解时间的适当延长,酶解产物的抗凝血活性逐渐增强,继续延长酶解时间,酶解产物的抗凝血活性不再明显增强。在同一酶解时间下,酶用量为7000U/g的酶解产物的抗凝血活性比其他酶用量的酶解产物的抗凝血活性更高,故以7000U/g作为最适酶用量。

2.5 底物浓度对酶解的影响

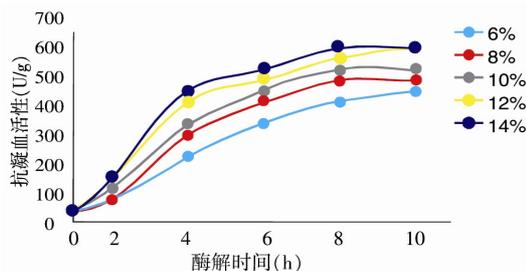


图6 底物浓度对酶解物抗凝血活性的影响

Fig.6 Effect of substrate concentration on the anticoagulant activity of hydrolysates

图6表明,在不同底物浓度条件下,当酶解时间小于7h,随着酶解时间的延长,酶解产物的抗凝血活性均逐渐增大,继续延长酶解时间,酶解产物的抗凝血活性不再发生明显变化。在同一酶解时间下,底物浓度越大,酶解产物的抗凝血活性越大,并且底物浓度为12%和14%的酶解产物可达到的抗凝血活性最大值相同,另外,底物浓度为14%的酶解产物达到最大抗凝血活性所用时间比底物浓度为12%的酶解产物所用时间更短。因此选择14%的底物浓度作为最适底物浓度。相比参考文献^[9]所报道的最适底物浓度提高40%,且酶解时间缩短1h。

在酶反应中,若酶浓度为定值,酶促反应速率随着底物浓度的增大而增大,当所有的酶都参与反应中后,即使再增加底物浓度,酶促反应速率也不会增加。因此,在酶量充足的条件下,底物浓度为14%的反应速率快于底物浓度为12%的反应速率。

综合图5和图6分析知,底物浓度为10%和14%时,其最适酶用量均为7000U/g,可能的原因是,底物浓度为10%时,加入的酶没有全部参与反应,当底物浓度为14%时,更多的酶与底物进行了反应,因此,其对应的加酶量依然是7000U/g。

3 小结

以水蛭酶解产物的抗凝血活性为指标,胰蛋白酶为适宜的水解酶。酶种类、酶用量、酶解时间、pH值、酶解温度对水蛭酶解产物抗凝血活性均会产生影响,控制其在适宜参量非常重要;胰蛋白酶水解水蛭的最佳条件为:酶用量7000U/g,酶解pH值为8.3,酶解温度为50℃,底物浓度为14%,酶解时间为7h。

(参考文献[1]-[10]转第45页)

- of AND-EXOR logic networks with universal test sets[J]. Computers and Electrical Engineering, 2009, 35(5): 644-658.
- [4] Wang P, Wang Z, Xu R, et al. Conversion algorithm for MPRM expansion[J]. Journal of Semiconductors, 2014, 35(3): 150-155.
- [5] Yu H, Wang P, Wang D, et al. Discrete ternary particle swarm optimization for area optimization of MPRM circuits[J]. Journal of Semiconductors, 2013, 34(2): 118-123.
- [6] Jiang Z, Wang Z and Wang P. Delay-area trade-off for MPRM circuits based on hybrid discrete particle swarm optimization[J]. Journal of Semiconductors, 2013, 34(6): 132-137.
- [7] 卜登立, 江建慧. 基于 Pareto 支配的 MPRM 电路面积与可靠性优化[J]. 电子学报, 2016, 44(11): 2653-2659.
- [8] He Z-X, Xiao L-M, Ruan L, et al. A power and area optimization approach of mixed polarity Reed-Muller expression for incompletely specified Boolean functions[J]. Journal of Computer Science and Technology, 2017, 32(2): 297-311.
- [9] Mishchenko A, Perkowski M. Fast heuristic minimization of exclusive-sums-of-products[C]. Proceedings of Reed-Muller Workshop, Mississippi, U.S.A., 2001: 241-249.
- [10] Yang M, Wang L, Tong J R, et al. Techniques for dual forms of Reed-Muller expansion conversion[J]. Integration, the VLSI Journal, 2008, 41(1): 113-122.
- [11] Faraj K. Minimization of OR-XNOR expressions using four new linking rules[C]. Proceedings of the 7th WSEAS International Conference on Artificial Intelligence, Knowledge Engineering and Data Bases, University of Cambridge, UK, 2008: 489-494.
- [12] Zhang H, Wang P, Gu X. Area optimization of fixed-polarity Reed-Muller circuits based on niche genetic algorithm[J]. Chinese Journal of Electronics, 2011, 20(1): 27-30.

(上接第 38 页)

参考文献:

- [1] [明]李时珍. 本草纲目[M]. 北京:人民卫生出版社,2005.
- [2] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006.
- [3] 吴喜国,肖光艳,韩志. 水蛭醇提物的抗血栓作用研究[J]. 牡丹江医学院学报,2009,2(30):35-36.
- [4] 郭晓庆,孙佳明,张辉. 水蛭的化学成分与药理作用[J]. 吉林中医药,2015,35(1):47-50.
- [5] 袁红霞,张莉芹,马瑾,等. 水蛭药用成分及主要药理功效研究进展[J]. 甘肃医药,2013,32(4): 270-273.
- [6] 李艳玲,黄荣清,崔玉芳,等. 水蛭的研究概况及展望科学技术与工程[J]. 科学技术与工程,2004,4(3): 239-243.
- [7] 王蒙蒙,杨永波. 水蛭的化学成分及药理作用[J]. 黑龙江中医药,2008(2):47-48.
- [8] 王竹清,李八方. 生物活性肽及其研究进展[J]. 中国海洋药物,2010,29(2):60-69.
- [9] 武建卓. 可控酶解水蛭制备抗凝血肽的研究[D]. 济南:山东大学,2009.
- [10] 鲁伟,任国谱,宋俊梅. 蛋白水解液中多肽含量的测定方法[J]. 食品科学,2005,22(7):169-171.