

酶法制备阿拉斯加鳕鱼降压肽的工艺优化及其产物的结构鉴定

杨贵兰^{1,2}, 秦松², 王晓艳^{1*}, 李文军^{2,*}

(1. 滨州医学院药学院, 山东烟台 264003;

2. 中国科学院烟台海岸带研究所, 山东烟台 264003)

摘要: 以体外血管紧张素转化酶(ACE)抑制率为指标, 筛选出制备阿拉斯加鳕鱼降压肽的最优酶。本研究通过正交实验以及单因素优化实验确定了阿拉斯加鳕鱼降压肽的最优酶解工艺, 考察了最优工艺降压肽的氨基酸含量与分子量分布范围。结果表明: 在菠萝蛋白酶、木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶和酸性蛋白酶 6 种蛋白酶中, 经胰蛋白酶酶解得到的降压肽 ACE 抑制率最高, 为 68.48%, 其中影响胰蛋白酶活性大小的因素依次为温度、酶与底物质量比、料液比、pH 和时间。最优酶解温度 40 °C, 酶与底物质量比 3%, 料液比 1:7, pH = 7, 酶解时间 2 h。在此工艺条件下, 降压肽 ACE 抑制率可达 79.62%, 氨基酸总含量为 83%, 分子量低于 500 Da 的降压肽可达到 70.74%。优化的阿拉斯加鳕鱼降压肽的提取工艺可行、合理, 降压肽也具有较高的体外 ACE 抑制活性。本研究结果为进一步考察食源性降压肽提供了参考。

关键词: 阿拉斯加鳕鱼皮降压肽, 酶解法, ACE 抑制率, 分子量分布, 氨基酸含量

Extraction Optimization and Structure Identification of Anti-hypertensive Peptide from Alaskan Cod by Enzymatic Method

YANG Gui-lan^{1,2}, QIN Song², WANG Xiao-yan^{1*}, LI Wen-jun^{2,*}

(1. College of Pharmacy, Bin Zhou Medical University, Yantai 264003, China;

2. Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Science, Yantai 264003, China)

Abstract: The technology for preparation of anti-hypertensive peptides from Alaska cod skins with optimum enzyme was optimized by using the index of ACE inhibitory rate *in vitro*. In this study, the optimal enzymatic hydrolysis process of anti-hypertensive peptides from Alaskan cod was determined by single-factor and orthogonal experiments, and the amino acid content and molecular weight distribution range of anti-hypertensive peptides were investigated. The results showed that the trypsin had the best hydrolyzing capacity, the ACE inhibition rate reached a constant value of 68.48%. And the optimum hydrolysis conditions were as follows: Hydrolysis temperature 40 °C, the ratio of enzyme to substrate 3%, the ratio of solid to liquid 1:7, pH7, hydrolysis time 2 h. Under these conditions, the ACE inhibition rate was 79.62%, content was 83%, the relative molecular weight below 500 Da was 70.74%, respectively. The optimized extraction process of anti-hypertensive peptides from Alaskan cod was feasible and reasonable. The results of this study could provide a reference for further investigation of food-derived anti-hypertensive peptides.

Key words: Alaska salmon cod skins; anti-hypertensive peptide; enzymatic hydrolysis; ACE inhibitory rate; molecular weight distribution; amino acid composition

中图分类号: TS254.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2020)05-0163-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020.05.027

引文格式: 杨贵兰, 秦松, 王晓艳, 等. 酶法制备阿拉斯加鳕鱼降压肽的工艺优化及其产物的结构鉴定 [J]. 食品工业科技, 2020, 41(5): 163-168, 174.

目前, 心脏与心脑血管疾病, 特别是心血管系统疾病中的高血压是威胁世界各国人们健康的重要原

收稿日期: 2019-05-30

作者简介: 杨贵兰 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药学, E-mail: yangguilan0212@163.com。

* 通讯作者: 王晓艳 (1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 药学, E-mail: wangxy@yic.ac.cn。

李文军 (1984-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 海洋生物学, E-mail: liwenjun332@163.com。

基金项目: 高值化海洋低聚肽系列产品制备技术的研究与产业化项目; 烟台市“十三五”海洋经济创新发展示范项目 (YHCX-SW-L-201705); 烟台市重点研发项目 (Y933021011)。

因。调查发现,全球高血压患者已超过 14 亿人口^[1],因此降压药物的开发已成为科学家们关注的热点。临床上常用的抗高血压药物有血管紧张素转化酶抑制剂(Angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI)和血管紧张素 II(AngII)受体拮抗剂。在肾素-血管紧张素系统中,血管紧张素转化酶(Angiotensin-converting enzyme, ACE)可以将无活性的多肽血管紧张素 I(AngI)催化酶解,得到八肽的血管紧张素 II(AngII),AngII 可以强烈收缩外周小动脉,促进肾上腺皮质激素的合成以及分泌醛固酮的作用,从而升高血压^[2-3]。

目前,临床治疗高血压大多采用无机、人工合成的 ACE 抑制剂类药物,但长期服用会产生各种副作用。近年来,食源性蛋白肽作为一种新的非合成的 ACE 抑制剂类药物,由于其副作用小、安全性高等优点^[4]受到很多研究者的青睐。人们已经从动物和植物蛋白的酶解物中获得了具有降压活性的肽片段。1986 年,Feerreira 等^[5]首次从南美蝮蛇毒液中提取得到 ACE 抑制肽。很多研究者也从大豆、麦胚中制备得到 ACE 抑制肽^[6]。相比于陆源生物活性多肽,海洋生物活性多肽更容易释放出独特的活性肽段,产生更好的降压作用^[7]。

阿拉斯加鳕鱼为冷水性近底层鱼类,鱼皮中含有丰富的蛋白质,较鱼体的其他部分蛋白含量更高,但常作为下脚料被丢弃,造成大量水产资源的浪费及环境污染。利用鳕鱼加工副产物为原料,采用酶解法制备得到降压肽,并通过体外实验验证阿拉斯加鳕鱼降压肽的 ACE 抑制活性。为鱼皮的高值化综合利用提供途径,并为进一步开发新型海洋天然降压活性物质提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

阿拉斯加鳕鱼皮 烟台嘉惠海洋生物科技有限公司;碱性蛋白酶(20 万 U/g)、胰蛋白酶(250 N.F.U/mg)、酸性蛋白酶(5 万 U/g)、菠萝蛋白酶(50 万 U/g)、木瓜蛋白酶(80 万 U/g)、复合蛋白酶(10 万 U/g) 北京索莱宝科技有限公司;马尿酸-组氨酸-亮氨酸(N-Hippuryl-His-Leu hydrate, HHL)、血管紧张素转化酶 Sigm-aldrich 西格玛奥德里奇贸易有限公司;其他试剂 均为分析纯或色谱纯。

高速离心机(Avanti JXN-26) 贝克曼库尔特有限公司;紫外分光光度计(Cary 60) 安捷伦科技有限公司;高效液相色谱仪(Agilent1260) 安捷伦科技有限公司;高效液相色谱仪(Waters 1525) 沃特世科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 阿拉斯加鳕鱼皮水提原液的制备 将鳕鱼皮清洗干净,剪成方块状(1 cm×1 cm),组织匀浆机绞碎。加入 15%的正丁醇溶液,4℃下搅拌 8 h 进行脱脂。滤出溶液,适量去离子水(鳕鱼皮体积的 3 倍)充分搅拌清洗。0.1 mol/L 的 NaOH 溶液 4℃继续搅拌 10 h 除去杂蛋白。蒸馏水搅拌清洗至无味。经脱脂和除杂蛋白处理后的鱼皮中加入适量去离子水

(料液比为 1:10),60℃水浴中搅拌提取,得到鳕鱼皮水提原液。冷冻干燥得到鳕鱼皮冻干粉,4℃储存。

1.2.2 阿拉斯加鳕鱼皮酶解液的制备 称取 72 g 阿拉斯加鳕鱼皮冻干粉(经 1.2.1 法制备得到),溶于 360 mL 去离子水(料液比为 1:5),充分混匀,以此溶液作为底物。表 1 列出了 6 种蛋白酶的最佳酶解条件。调节底物溶液为相应蛋白酶的最佳酶解温度和 pH,分别加入 3.6 g 的酶(酶与底物的质量比为 5%)酶解 3 h 后,将 6 种底物溶液经沸水水浴 15 min,终止酶解反应^[8-10]。冷却至室温,离心(4000 r/min,15 min,4℃),取上清液低温冷冻干燥得到酶解液冻干粉,4℃备用。

表 1 6 种蛋白酶的酶解条件

Table 1 Enzymatic conditions of 6 kinds of proteinases

编号	酶的种类	最适温度(℃)	最适 pH
A	菠萝蛋白酶	55	7.0
B	木瓜蛋白酶	55	7.0
C	胰蛋白酶	37	8.0
D	复合蛋白酶	55	7.0
E	碱性蛋白酶	37	8.0
F	酸性蛋白酶	37	3.0

1.2.3 ACE 抑制率的检测 ACE 抑制率的检测参照文献中的方法进行^[11-14]。将上述阿拉斯加鳕鱼酶解液冻干粉分别溶于适量蒸馏水中,0.5 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 溶液调节各溶液至相同 pH(pH=7)。将 ACE 和 HHL 分别溶解在 pH8.3,0.1 mol/L 的硼酸钠缓冲溶液(含 0.3 mol/L 的 NaCl),其中 NaCl 的浓度为 0.3 mol/L,ACE 溶液的酶活力为 0.1 U/mL,HHL 溶液的浓度为 0.005 mol/L。取 20 μL ACE 溶液和 80 μL 上述酶解液冻干粉溶液(对照组加入等量的硼酸钠缓冲溶液)于 4 mL 离心管中混合均匀。在 37℃环境下保温 5 min 后,向各个离心管中加入 0.005 mol/L HHL 溶液 170 μL,混合均匀后,在 37℃环境下保温 30 min。继续向每个离心管中加入 150 μL 1 mol/L 的 HCl 溶液,摇动使其混合均匀,终止反应。最后向每个离心管中加入 1 mL 的乙酸乙酯,漩涡振荡 30 s,离心(4000 r/min,15 min)。静置 5 min,当有机层与水层完全分层后,移取 0.8 mL 有机层于 5 mL 离心管中,将离心管置于 80℃水浴锅中挥干乙酸乙酯,最后向残渣中加入 3.2 mL 的去离子水使其充分溶解,测定该溶液在 228 nm 处的吸光度值(A_{228})。

$$I(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

其中:I 为 ACE 抑制率; A_0 为对照组的吸光度值; A_1 为供试品的吸光度值。

1.2.4 胰蛋白酶酶解阿拉斯加鳕鱼皮的工艺条件优化

1.2.4.1 pH 对 ACE 抑制肽的影响 以 ACE 抑制率为指标,在温度为 37℃,料液比为 1:5,酶解时间为 180 min,酶与底物质量比为 5% 的条件下研究不同 pH(7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)对 ACE 抑制肽的影响^[15-16]。

1.2.4.2 料液比对 ACE 抑制肽的影响 以 ACE 抑制率为指标,在温度为 37 °C, pH = 8.0, 酶解时间为 180 min 酶与底物质量比为 5% 的条件下研究不同料液比(1:4、1:5、1:6、1:7、1:8)对 ACE 抑制肽的影响^[17]。

1.2.4.3 温度对 ACE 抑制肽的影响 以 ACE 抑制率为指标,在 pH = 8.0, 酶解时间为 180 min, 料液比为 1:7, 酶与底物质量比为 5% 的条件下研究不同温度(30、37、40、50、60 °C)对 ACE 抑制肽的影响^[18、18]。

1.2.4.4 酶解时间对 ACE 抑制肽的影响 以 ACE 抑制率为指标,在料液比为 1:7, pH = 8.0, 温度为 50 °C, 酶与底物质量比为 5% 的条件下研究不同酶解时间(90、120、150、180、210 min)对 ACE 活性抑制肽的影响^[16]。

1.2.4.5 酶与底物质量比对 ACE 抑制肽的影响 以 ACE 抑制率为指标,在料液比为 1:7, pH = 8.0, 温度为 50 °C, 酶解时间为 180 min 的条件下研究不同酶与底物质量(0.5%、2%、3.5%、5%、6%)比对 ACE 抑制肽的影响^[9]。

1.2.5 正交试验设计 在上述工艺优化实验的基础上,采用 L₁₈(3⁷) 正交表对胰蛋白酶酶解阿拉斯加鳕鱼皮的条件进行进一步优化,以 ACE 抑制率为指标,确定制备阿拉斯加鳕鱼降压肽最佳酶解工艺。如下表 3 所示为正交试验的水平与因素设计^[19-20]。

表 2 正交试验设计因素水平表
Table 2 Factors and levels table of orthogonal experiment design

水平	因素				
	A 温度 (°C)	B 时间 (h)	C 料液比	D 酶与底物质量比 (%)	E pH
1	40	2	1:6	1	7.0
2	50	2.5	1:7	2	7.5
3	60	3	1:8	3	8.0

1.2.6 SDS-PAGE 分析 采用 5% 浓缩胶和 18% 分离胶对最佳酶解条件下制备的阿拉斯加鳕鱼皮酶解液的分子量进行测定^[21-22],上样量为 10 μL^[23]。

1.2.7 分子量分布考察 对最优酶解工艺下的酶解液采用 HPLC 法和三重串联四级杆液质联用仪进行分子量分布考察^[24]。

HPLC 法色谱条件: 色谱柱: TSK gel 2000 SW_{XL} 300 mm × 7.8 mm, 流动相: 乙腈-水-三氟乙酸 45:55:0.1, 等度洗脱, 检测波长: 220 nm, 流速 0.5 mL/min, 柱温: 30 °C^[25-27]。

质谱检测条件: 进样量 10 μL, 离子源: ESI, 质量扫描范围为 100~1400 u, 正离子谱检测。

1.2.8 氨基酸含量测定 采用 OPA 柱前衍生 RP-HPLC-UV 法对最佳酶解条件下的酶解液中的 17 种氨基酸的含量进行测定^[28-29]。检测条件: 色谱柱: ODS 柱(5 μm, 4.0 mm × 250 mm), 流动相: 乙酸钠-甲醇-乙腈-乙酸钠-三乙胺-四氢呋喃; 梯度洗脱: 0~17 min: 8% B~50% B; 17~20 min: 50% B~100% B;

20~24 min: 100% B~0% B; 检测波长: 338 nm; 流速: 1 mL/min, 柱温 40 °C^[30-31]。

1.3 数据处理

数据均以平均值 ± 标准差的形式表示,采用 Origin 9.0 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶的选择

本实验采用酶解法制备得到阿拉斯加鳕鱼 ACE 抑制肽,不同蛋白酶酶解阿拉斯加鳕鱼皮的能力不同,因此酶的选择对 ACE 抑制肽的制备至关重要。下表 3 为 6 种不同蛋白酶的酶解效果比较。

由表 3 可知 6 种蛋白酶的酶解物对 ACE 均有抑制作用,其中,胰蛋白酶的酶解能力最佳,ACE 抑制率为 68.48% ± 2.96%,即胰蛋白酶酶解产物对 ACE 的抑制活性最佳。因此,胰蛋白酶可作为酶解阿拉斯加鳕鱼皮的最适酶种,复合蛋白酶的活性与菠萝蛋白酶的活性次之,ACE 抑制率分别为 63.56% ± 7.87% 和 62.70% ± 4.78%;其他 3 种蛋白酶的 ACE 抑制率均小于 60%。不同的蛋白酶的酶切位点不同,6 种蛋白酶酶解出来的肽段的氨基酸组成不同,释放出来的肽段序列各异,长短不一,活性会有较大差异,对 ACE 的抑制率影响也不同。

表 3 6 种不同蛋白酶的水解效果比较

Table 3 Comparison of hydrolysis by 6 kinds of proteinases

酶的种类	ACE 抑制率 (%)
未加酶	38.81 ± 4.84
菠萝蛋白酶	62.70 ± 4.78*
木瓜蛋白酶	59.23 ± 6.34*
胰蛋白酶	68.48 ± 2.96*
复合蛋白酶	63.56 ± 7.87**
碱性蛋白酶	57.53 ± 5.42**
酸性蛋白酶	54.34 ± 9.17*

注: * : 与对照组(未加酶)比较,差异显著(P < 0.05), ** : 与对照组(未加酶)比较,差异极显著(P < 0.01)。

2.2 胰蛋白酶酶解阿拉斯加鳕鱼皮的工艺条件优化

2.2.1 pH 对 ACE 抑制肽的影响 pH 对 ACE 抑制肽的影响如图 1 所示。结果表明:在 pH7.0~9.0 的范围内,随着 pH 的增大,ACE 抑制率呈现先增大后减小的趋势,其中 pH = 7.5 时,ACE 抑制率最高,为 73.19%。分析主要原因是胰蛋白酶在过碱性条件下,酶的构象发生变化,酶出现了不可逆失活^[32]。因此,胰蛋白酶在弱碱性条件下酶解活性较高。

2.2.2 料液比对 ACE 抑制肽的影响 料液比对 ACE 抑制肽的影响如图 2 所示。结果表明:在料液比 1:4~1:7 时,随着料液比的不断升高,ACE 抑制率呈现上升的趋势。当料液比为 1:7 时,ACE 抑制率达到最大值,为 72.87%;当料液比由 1:7 增加至 1:8 时,ACE 抑制率略有下降,为 72.02%。可能是由于反应体系中底物浓度较大,酶活是一定的,随着料液比进一步增大,抑制率变化不明显^[33]。因此,选择料液比为 1:7 最为合适。

2.2.3 酶解温度对 ACE 抑制肽的影响 酶解温度对

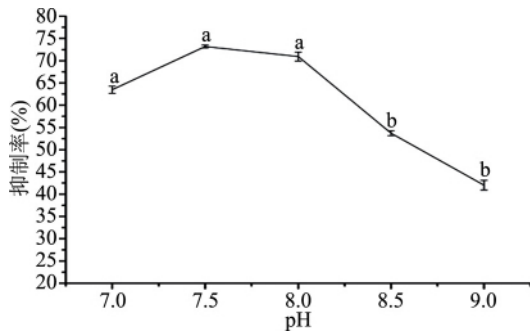


图1 pH对ACE抑制率的影响

Fig.1 Effect of different pH on ACE inhibitory rate

注:不同字母表示具有显著性差异, $P < 0.05$; 图2~图5同。

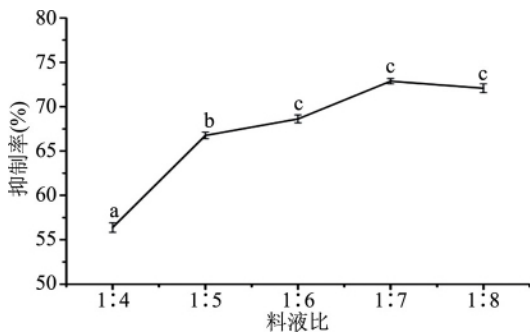


图2 料液比对ACE抑制活性的影响

Fig.2 Effect of different solid-liquid ratio on ACE inhibitory rate

ACE抑制肽的影响如下图3所示。结果表明:在30~60℃范围内,随着酶解温度的升高,ACE抑制率也随之升高。说明随着温度升高,酶的结构未变化,活性也随之升高^[18]。当温度为50℃时,ACE抑制率达到最大值,为79.26%。且随着温度升高,抑制率趋于平稳,所以50℃为优选温度。

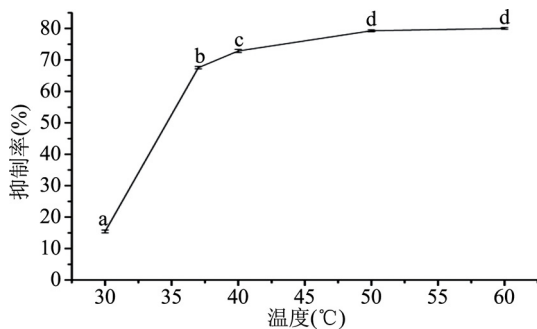


图3 酶解温度对ACE抑制率的影响

Fig.3 Effect of enzymolysis temperature on ACE inhibitory rate

2.2.4 酶解时间对ACE抑制肽的影响 酶解时间对ACE抑制肽的影响如图4所示。结果表明:随着酶解时间的增加,在酶解时间为90~210 min范围内,抑制率呈现先增大后减小的趋势。当酶解时间为150 min时,抑制率达最大值,为75.66%。这可能是因为酶解时间越长,活性肽段的释放率越高,但随着酶解时间进一步延长,一些释放出的活性肽段会在蛋白酶的作用下被进一步酶解为无活性的分子,ACE抑制率也会随之降低^[34]。

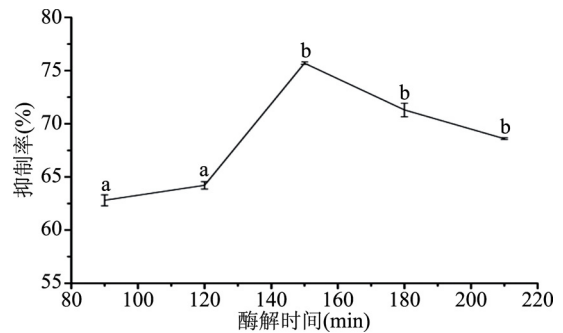


图4 酶解时间对ACE抑制率的影响

Fig.4 Effect of enzymolysis time on ACE inhibitory rate

2.2.5 酶与底物质量比对ACE抑制肽的影响 酶与底物质量比对ACE抑制肽的影响如图5所示。结果表明:在酶与底物质量比为0.5%~2%的范围内,随着酶与底物质量比的增加,阿拉斯加鳕鱼皮蛋白肽被不断降解成小分子肽段,该反应体系的ACE抑制活性随之增加。当酶与底物质量比为2%时,抑制率达最大值,为70.06%。当ACE抑制肽被酶饱和后,酶的浓度不再是影响酶解反应的主要因素。进一步增加酶与底物质量比反而降低了活性肽段占蛋白肽的比重,导致酶解速率减慢,ACE抑制率呈下降趋势^[35]。

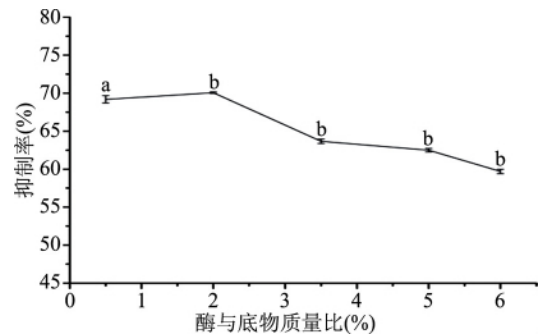


图5 酶与底物质量比对ACE抑制率的影响

Fig.5 Effect of mass ratio of enzyme to substrate on ACE inhibitory rate

2.3 正交试验结果

采用正交试验优化制备阿拉斯加鳕鱼皮的酶解条件,正交试验结果如表4所示。

由表4可知,各因素影响胰蛋白酶活性大小的顺序为 $A > D > C > E > B$,即温度对胰蛋白酶活性的影响最大,其次为酶与底物质量比、料液比、pH,时间对其影响最小。

根据结果可知,最佳的酶解组合为 $A_1B_1C_2D_3E_1$,即酶解温度40℃,酶解时间2 h,料液比1:7,酶与底物质量比3%,pH=7.0时胰蛋白酶酶解阿拉斯加鳕鱼皮的效果更好,抑制率可达79.62%。

2.4 SDS-PAGE分析

阿拉斯加鳕鱼低聚肽的SDS-PAGE电泳分析如图6所示。结果表明,未酶解的阿拉斯加鳕鱼皮水体原液的条带分布不一,经酶解的低聚肽溶液未见明显条带,需要进一步借助高效液相色谱法来测定低聚肽酶解液的分子质量分布。

表 4 正交试验设计与结果分析

Table 4 Orthogonal test design and result analysis

试验号	A	B	C	D	E	抑制率 (%)
1	1	1	1	1	1	65.58
2	1	2	2	2	2	66.50
3	1	3	3	3	3	70.36
4	2	1	1	2	2	67.27
5	2	2	2	3	3	72.72
6	2	3	3	1	1	67.73
7	3	1	2	1	3	68.99
8	3	2	3	2	1	68.60
9	3	3	1	3	2	66.04
10	1	1	3	3	2	70.43
11	1	2	1	1	3	63.56
12	1	3	2	2	1	65.58
13	2	1	2	3	1	66.28
14	2	2	3	1	2	59.12
15	2	3	1	2	3	61.27
16	3	1	3	2	3	57.57
17	3	2	1	3	1	61.23
18	3	3	2	1	2	56.10
k ₁	68.01	66.02	64.16	63.51	65.83	
k ₂	65.73	65.29	66.03	64.47	64.24	
k ₃	63.09	65.53	65.59	67.84	65.75	
R	4.92	0.73	1.87	4.33	1.59	

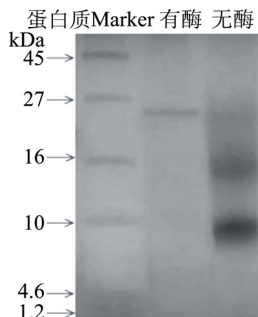


图 6 SDS-PAGE 电泳分析
Fig.6 SDS-PAGE analysis

2.5 分子量分布考察

相比大分子蛋白质和单一的氨基酸,二肽和三肽分子量较小(3~500 kDa),所以更易被人体直接吸收^[36],因此分子量分布的考察极为重要。该部分通过 HPLC 法对最优酶解条件下的酶解液进行了分子量分布考察。从表 5(由图 7 经计算分析可得)可以看出,分子量低于 1000 Da 的阿拉斯加鳕鱼降压肽占总体的 93.08%,分子量在 500 Da 以下的占总体的 70.74%,平均分子量为 457.5 Da。研究发现:最大三肽(Trp-Trp-Trp)和最小二肽(Gly-Gly)的分子量分别为 576 u 和 132 u^[37],因此处于这个区域之内的肽段主要为二肽和三肽。对最优酶解条件下的酶解液进行质谱分析(图 8)可以得出与 HPLC 法相同的结论:在图谱中可见质子峰多集中的 m/z 范围为 200~500。这说明在最佳酶解条件下,阿拉斯加鳕鱼皮酶

解得到了以二肽和三肽为主的降压肽。谱图中含有多种不同信号强度的质子峰,这说明最佳酶解条件的酶解液是含有多种不同分子量的多肽混合物。

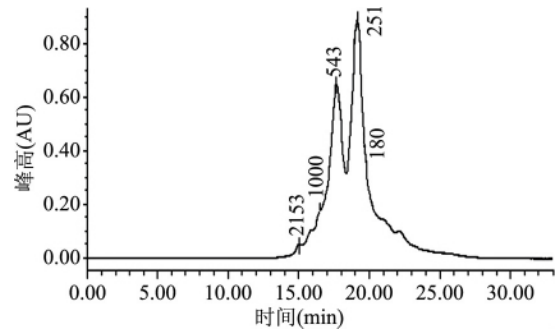


图 7 阿拉斯加鳕鱼低聚肽酶解液的液相色谱图
Fig.7 Chromatogram of enzymatic hydrolysate

注:图中数值代表 M_p 值(最高位峰的分子量)。

表 5 阿拉斯加鳕鱼低聚肽酶解液的分子量分布

Table 5 Molecular weight distribution of enzymatic hydrolysate

分子量范围 (Da)	保留时间 (min)	峰面积百分比 (% λ _{220 nm})
>2000	15.040	1.28
2000~1000	16.503	5.64
1000~500	17.671	22.34
500~180	19.147	48.19
<180	19.783	22.55

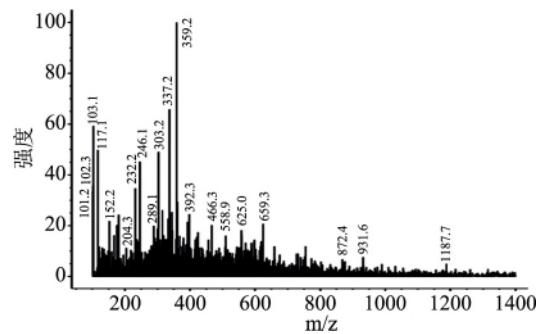


图 8 阿拉斯加鳕鱼低聚肽酶解液的质谱图
Fig.8 MS spectrum of enzymatic hydrolysate

2.6 酶解液氨基酸含量测定结果

对最优酶解工艺条件下的酶解液进行氨基酸含量测定,测定结果如表 6 所示。阿拉斯加鳕鱼皮酶解液中氨基酸总含量约为 83%,其中 Gly 含量最高,为 29.41%,Pro 含量次之,可达 16.11%;人体必需氨基酸约占氨基酸总含量的 18.9%。相比牡蛎 ACE 抑制肽,鳕鱼皮降压肽中氨基酸总含量更高^[35]。与从罗非鱼鱼鳞胶降压肽的氨基酸组成几乎相同,但鳕鱼皮降压肽中 Gly 和 Pro 含量更高^[38]。其中,在人体中枢神经系统中,Gly 是最重要的神经递质之一。甘氨酸通过 PTEN/AKT 信号通路发挥对大鼠的神经保护作用,减轻大鼠的脑出血损伤^[39]。脯氨酸是体内合成蛋白质的氨基酸之一,为细胞新陈代谢提供了物质基础^[40]。降压肽中脯氨酸的含量较高会对多肽的 ACE 抑制作用起到很好的促进作用^[38]。

表6 酶解液的氨基酸组成

Table 6 Amino acid composition of enzymatic hydrolysate

氨基酸种类	含量(%)
Asp(天冬氨酸)	6.04
Glu(谷氨酸)	11.24
Ser(丝氨酸)	4.90
His(组氨酸)	0.61
Gly(甘氨酸)	29.41
Thr(苏氨酸)*	1.71
Arg(精氨酸)	6.82
Ala(丙氨酸)	8.73
Tyr(酪氨酸)	0.23
Cys-s(胱氨酸)	0.24
Val(缬氨酸)*	1.76
Met(蛋氨酸)*	1.80
Phe(苯丙氨酸)*	1.82
Ile(异亮氨酸)*	1.75
Leu(亮氨酸)*	2.91
Lys(赖氨酸)*	3.92
Pro(脯氨酸)	16.11
合计	83

注:表中标注*为必需氨基酸。

3 结论

本研究以ACE抑制率为指标,比较了6种蛋白酶酶解阿拉斯加鳕鱼皮的能力。通过工艺优化实验确定最佳工艺为:胰蛋白酶酶解温度40℃,酶解时间2h,料液比1:7,酶与底物质量比3%,pH=7。最优工艺的酶解液ACE抑制率为79.62%。分子量在500 Da以下的占总体的70.74%;酶解液氨基酸总含量为83%,其中Gly含量最高,为29.41%,Pro含量次之,可达16.11%;酶解液中含有7种必需氨基酸,分别是Ile、Leu、Met、Val、Phe、Lys、Thr。阿拉斯加鳕鱼皮酶解液在体外研究中具有很好的ACE抑制活性,未来在功能性食品的开发应用中将具有很高的研究价值。

参考文献

- [1] Mills K T, Bundy J D, Kelly T N, et al. Global disparities of hypertension prevalence and control [J]. *Circulation*, 2016, 134(6): 441-450.
- [2] Kharazmi - Khorassani J, Asoodeh A, Tanzadehpanah H. Antioxidant and angiotensin-converting enzyme(ACE) inhibitory activity of thymosin alpha-1 (Thα1) peptide [J]. *Bioorganic Chemistry* 2019, 87: 743-752.
- [3] 杨湘华, 李江. 食源性降血压肽构效关系与制备研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(3): 217-220.
- [4] Xia S H, Wang Z, Xu S Y. Characteristics of *Bellamyia purificata* snail foot protein and enzymatic hydrolysates [J]. *Food Chemistry* 2007, 101(3): 1188-1196.
- [5] 李景, 陈定刚. 大豆蛋白源ACE抑制肽研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2018, 31(9): 7-9.
- [6] 庞婉婷, 许锋, 陈忻, 等. 海洋生物小分子肽的功能特性[J]. *广东化工*, 2018, 45(10): 155-167.

- [7] 林端权, 郭泽镇, 张怡, 等. 海洋生物活性肽的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(18): 367-373.
- [8] 汪雨亭, 黄儒强, 王娟. 鱼胶原蛋白酶解工艺及其活性肽抑制ACE酶的研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(17): 17-23.
- [9] 米顺利, 易湘茜, 高程海, 等. 深海鳕鱼皮胶原蛋白粉酶解工艺研究[J]. *食品科技*, 2018, 43(3): 117-121.
- [10] 雷桂洁, 苏国成, 江晓颖, 等. 复合酶二次酶解法制备紫菜多肽原液及其ACE抑制活性的研究[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(11): 141-146.
- [11] Eckert E, Zambrowicz A, Pokora M, et al. Egg-yolk protein by-product as a source of ACE-inhibitory peptides obtained with using unconventional proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*) [J]. *Journal of Proteomics* 2014, 110: 107-116.
- [12] Zheng Y, Li Y, Zhang Y, et al. Purification, characterization, synthesis, *in vitro* ACE inhibition and *in vivo* antihypertensive activity of bioactive peptides derived from oil palm kernel glutelin-2 hydrolysates [J]. *Journal of Functional Foods*, 2017, 28: 48-58.
- [13] Pan S, Wang S, Jing L, et al. Purification and characterisation of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) - inhibitory peptide derived from the enzymatic hydrolysate of *Enteromorpha clathrata* protein [J]. *Food Chemistry* 2016, 211: 423-430.
- [14] Yu Y, Fan F, Wu D, et al. Antioxidant and ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates from *Ruditapes philippinarum* [J]. *Molecules* 2018, 23(5): 1189.
- [15] 周逢芳, 蔡彬新, 巫鑫睿, 等. 海参体壁蛋白ACE抑制肽酶解工艺及产物分子量分布研究[J]. *食品工业科技*, 2017, 38(17): 163-167, 173.
- [16] 徐倩, 戴遥, 赵永慧, 等. 酶法制备鲷鱼降血压肽的工艺优化及其组分分析[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(20): 151-157, 164.
- [17] 宋凯强, 刘鹏莉, 郑振佳, 等. 大蒜降压肽的制备及超滤分离[J]. *食品工业科技*, 2019, 40(19): 1-15.
- [18] 马莹, 薛璐, 胡志和, 等. 双酶水解乳清蛋白ACE抑制肽的制备工艺优化[J]. *食品工业*, 2019, 40(6): 153-158.
- [19] 唐志红, 焦绪栋, 周云丽, 等. 响应面法优化酶法制备藻蓝蛋白抗氧化肽的实验研究[J]. *海洋科学*, 2012, 36(11): 50-54.
- [20] 唐志红, 周云丽, 周虹, 等. 藻蓝蛋白抗氧化肽的制备工艺研究[J]. *食品科技*, 2012, 37(11): 241-244.
- [21] 朱丽, 肖文浚, 李新霞, 等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法同时测定不同产地大蒜药材中的蒜酶与凝集素[J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(6): 948-954.
- [22] 孙克江, 张甜, 曲梅丽, 等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳法快速检测植物源性食品中的蛋白成分[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(3): 895-899.
- [23] 刘文颖, 林峰, 金振涛, 等. 深海鳕鱼皮来源ACE抑制肽的分离及鉴定[J]. *现代食品科技*, 2016, 32(6): 170-176.
- [24] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 22729-2008 海洋低聚肽粉[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [25] Furuta T, Miyabe Y, Yasui H, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from phycobiliproteins of dulse

(下转第174页)

国食物与营养 2016 22(4):65-69.

[7]刘春延,张国财,程方志,等.灵芝孢子粉破壁工艺优化及其抗肿瘤作用[J].食品科学 2016 37(14):51-55.

[8]王卫霄,吕艳茹,姚苗苗,等.灵芝孢子粉抗肿瘤活性的研究进展[J].河北医药 2015 37(1):105-108.

[9]王瑛,金捷,金祖汉,等.灵芝孢子粉增强免疫功能的研究[J].中国现代应用药学 2016 33(5):544-546.

[10]彭亮,赵鹏,李彬,等.破壁灵芝孢子粉对小鼠免疫调节作用的实验研究[J].应用预防医学 2011 17(4):241-243.

[11]朴玮,韩枫,徐维盛,等.破壁灵芝孢子粉及灵芝提取物的混合物对改善小鼠睡眠功能的研究[J].食品科技 2015 40(11):172-175.

[12]张天柱,赵婉君,吴国梁,等.灵芝孢子粉抗抑郁作用机制研究[J].时珍国医国药 2015 26(1):16-18.

[13]李子实,刘志超,张庆康.灵芝孢子粉消炎止血[J].中国民间疗法 2016 24(5):42-42.

[14]Li L,Guo H J,Zhu L Y,et al.A supercritical-CO₂ extract of *Ganoderma lucidum* spores inhibits cholangiocarcinoma cell migration by reversing the epithelial-mesenchymal transition[J]. Phytomedicine 2016 23(5):491-497.

[15]陈体强,李开本,陈朝旭,等.灵芝、紫芝担孢子及其孢壁的超微结构[J].福建农业学报 1998(4):34-39.

[16]王欣宇,车成来,林花,等.灵芝孢子粉破壁技术的研究进展[J].中国林副特产 2017(6):93-96.

[17]Yin Y G,Yan L N.Extraction of flavonoids from pine needle by high intensity pulsed electric fields(PEF) and its *in vitro* anti-oxidative effect[J]. Natural Product Research & Development, 2009 21:1032-1035.

[18]Ganeva V,Galutov B,J Teissié.High yield electroextraction of proteins from yeast by a flow process[J]. Analytical Biochemistry 2003 315(1):77-84.

[19]Mohsen Dalvilsfahan,Nasser Hamdami,Alain LeBail,et al. The principles of high voltage electric field and its application in

(上接第168页)

Palmaria palmata[J].Marine Drugs 2016 14(2):32.

[26]Eun-Yong Kim,Yhca.Identification and antioxidant activity of synthetic peptides from phycobiliproteins of *Pyropia yezoensis* [J].2018 42:789-798.

[27]滕芳芳,胡晓斐,刘晨晨,等.鲑鱼皮胶原蛋白肽制备及其对肝细胞损伤的保护作用[J].中国食品学报 2017 17(8):92-100.

[28]吴靖娜,许永安,王茵,等.罗非鱼鱼鳞胶制备降血压胶原肽的工艺及酶解物活性[J].广东海洋大学学报 2012 32(1):75-80.

[29]廖涛,黄晨曦,江洪有,等.响应面法优化鲑鱼皮胶原蛋白多肽的酶解工艺[J].食品科技 2018 43(1):141-147.

[30]中华人民共和国卫生部 中国国家教育委员会.JY/T 019-1996 氨基酸分析方法通则[S].北京:中国标准出版社,1996.

[31]国家食品药品监督管理总局 国家卫生和计划生育委员会.GB/T 5009.124-2016 食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定[S].北京:中国标准出版社,2016.

[32]张超.扇贝边多肽制备及其生物活性研究[D].烟台:烟台大学 2016.

food processing: A review[J].Food Research International 2016, 89(Pt 1):48-62.

[20]蔡光华,王晓玲.高压脉冲电场提取枸杞多糖工艺[J].食品科学 2012 33(8):43-48.

[21]金声琅,殷涌光.高压脉冲电场辅助提取番茄皮渣的番茄红素[J].农业工程学报 2010 26(9):368-373.

[22]周亚军,贺琴,吴都峰,等.高压脉冲电场辅助提取河蚌多糖工艺优化[J].农业机械学报 2014 45(S1):236-240.

[23]周连宁,刘晓东,余麟,等.不同高压脉冲电场条件对小球藻破壁的影响研究[J].科学技术与工程,2016,16(1):47-52.

[24]倪伟锋,邢增涛,赵晓燕,等.破壁灵芝孢子粉破壁率测定的研究[J].上海农业学报 2008(3):45-49.

[25]NY/T 1676-2008,食用菌中粗多糖含量的测定[S].

[26]陈冠州,梁慧敏,谢意珍.紫外分光光度法测定破壁灵芝孢子粉提取物总三萜含量[J].微生物学杂志 2011 31(1):91-94.

[27]Yin Y G,Cui Y R,Ding H W.Optimization of betulina extraction process from *Inonotus Obliquus* with pulsed electric fields[J].Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2008 9(3):306-310.

[28]Lebovka N I,Bazhal M I,Vorobiev E I.Pulsed electric field breakage of cellular tissues: Visualisation of percolative properties [J].Innovative Food Science & Emerging Technologies,2001,2(2):113-125.

[29]冯彩霞.利用高压脉冲电场对灵芝孢子破壁的试验研究[D].晋中:山西农业大学 2016:21-23.

[30]唐庆华,杨静.破壁灵芝孢子质量研究[J].基层农技推广 2017 5(2):17-20.

[31]毛健,马海乐.灵芝多糖的研究进展[J].食品科学 2010, 31(1):295-299.

[32]刘维,虎虬真,朱莉,等.灵芝三萜的研究与应用进展[J].食品科学 2019 40(5):309-315.

[33]包斐,孙丽霞,孙建华,等.长蛇鲑鱼蛋白水解制备抗氧化肽工艺研究[J].食品科技 2019(8):241-247.

[34]孙敏,李诚,刘爱平,等.乳清蛋白抗氧化肽的制备及体外抗氧化活性研究[J].中国油脂 2019 44(8):22-27.

[35]邱娟,沈建东,翁凌,等.利用牡蛎制备 ACE 抑制肽的工艺优化[J].食品科学 2017 38(16):165-172.

[36]Masanori Kohmura N N Y A. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptide fragments of human κ -casein [J]. Agricultural and Biological Chemistry,1990,3(54):835-836.

[37]刘文颖,林峰,金振涛,等.深海鲑鱼皮来源 ACE 抑制肽的分离及鉴定[J].现代食品科技 2016 32(6):170-176.

[38]孙姗姗.罗非鱼鱼皮胶原制备及其 ACE 抑制肽释放规律的研究[D].厦门:厦门大学 2018.

[39]赵丹,张志锋,袁美春.甘氨酸通过 PTEN/AKT 信号通路减轻大鼠脑出血损伤[J].湖北医药学院学报 2019 38(1):20-25.

[40]李爱军,张桂香,周福平,等.低温胁迫下高粱幼苗对外源脯氨酸的响应[J].种子 2019 38(5):44-47.