

不同蛋白酶对红娘鱼蛋白水解物的结构特性和生物活性的影响

胡学佳, 戴志远*, 金仁耀, 张晓頔, 董 烨
(浙江工商大学海洋食品研究院 杭州 310035)

摘要 以红娘鱼为原料,对木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶和风味蛋白酶水解产物的结构特性、抗氧化及 ACE 抑制活性进行比较。采用高效液相色谱、紫外光谱、内源荧光光谱和傅里叶变换红外光谱测定红娘鱼蛋白在不同蛋白酶作用下的结构变化。通过测定水解产物 ACE 抑制率和抗氧化活性表征酶解产物的生物活性。与其它蛋白酶相比,碱性蛋白酶水解产物的低分子质量(<1 000 u)占比和疏水氨基酸含量最高,分别为 88.2%和 200.5 mg/g,在结构表征中,碱性蛋白酶水解产物的 β -转角和无规则卷曲也均高于其它蛋白酶,分别为 69.68%和 23%。同时碱性蛋白酶水解产物的抗氧化活性(\cdot OH 清除能力、DPPH 自由基清除率和 Fe^{2+} 整合活性)和 ACE 抑制活性也是最高的, IC_{50} 值分别为 1.88, 1.92, 1.76, 0.77 mg/mL。结论:碱性蛋白酶是制备红娘鱼生物活性肽的最优蛋白酶。本研究为红娘鱼的多元化开发利用提供了理论支持。

关键词 蛋白酶; 红娘鱼; 结构特性; 抗氧化活性; ACE 抑制活性

文章编号 1009-7848(2023)10-0081-09 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.10.009

随着现代化捕捞技术的推广普及,大中型鱼类被大量捕获,导致生物链中的小杂鱼迅速繁殖起来^[1]。2020 年世界水产总量达 2.14 亿 t,其中小杂鱼占捕捞量的 49%^[2]。如何处理这些量大质低的渔获物成为长期困扰水产加工业的主要问题。红娘鱼为小杂鱼的典型代表,具有体型小,生长繁殖速度快,蛋白质含量丰富等特点,其主要被制作成生鱼粉,用以水产养殖和陆地畜禽养殖^[3],然而,由于加工技术落后,产品不仅得率和附加值低,还造成了严重的环境污染。近年来,越来越多的人开始利用生物活性肽改善身体健康或辅助治疗慢性疾病。海洋蛋白源成为开发生物活性肽的原料宝库,这也为解决杂鱼利用问题提供了新思路。

21 世纪是研究开发生物活性肽的黄金时代,各种具有特殊功效的活性肽被从不同食物蛋白质中分离出来,这些生物活性肽通常是由 2~20 个氨基酸组成的短氨基酸链^[3],并具有各种活性,其中抗氧化活性和降血压活性最受关注^[4-5]。抗氧化肽可有效抑制自由基活性,人体内的自由基容易与 DNA、RNA、脂质和蛋白质反应并破坏细胞结构,从而造成各种疾病^[6]。有研究表明,癌症、冠心病和阿茨海默氏症与体内自由基有一定关系^[7],因此

抗氧化肽成为研究生物活性肽的重点。高血压影响着全世界约 30% 的成年人^[8],其与心血管疾病,如心力衰竭、心肌梗死和过早死亡均有关系,每年因高血压死亡的人数高达 940 万之多^[9]。血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂是治疗高血压最有效的方法^[10]。目前临床常用的 ACE 抑制剂有依那普利、赖诺普利、福辛普利等,然而其副作用明显,如炎症反应和皮肤疹等^[11]。从食物蛋白水解物中获得高效安全的 ACE 抑制剂受到人们的追捧。

制备生物活性肽的方法主要分为直接提取法、化学合成法和酶解法 3 种。直接提取法产物产率低,费时费力且难以产业化;化学合成法操作复杂、成本昂贵;酶法水解法反应条件温和、可控、产物产率高且能耗低,是提取蛋白质水解物最常用的方法。目前很多蛋白酶均被用于制备生物活性肽,例如:木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、胃蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶等。在酶解过程中,不同蛋白酶会特异性识别不同的酶切位点,释放出不同序列、大小和功能的多肽。因此蛋白酶的选择是影响酶解产物生物活性最主要的因素。

本研究以红娘鱼为原料,利用木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶、风味蛋白酶和复合蛋白酶对其进行酶解,分析不同蛋白酶对水解产物的影响,包括其分子结构变化情况,如分子质量和二级分子结构组成等,以及其生物活性的变化,如 ACE 抑制活性和抗氧化活性,以期为红娘鱼的多元化

收稿日期: 2022-10-09

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC0311205)

第一作者: 胡学佳,女,博士生

通信作者: 戴志远 E-mail: dzy8587@126.com

生产应用中提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红娘鱼,浙江海欣水产有限公司;木瓜蛋白酶(Papain[®], 90 000 U/g)、中性蛋白酶(Neutrase[®] 0.8 L, 110 000 U/g)、复合蛋白酶(Protemax[®], 150 000 U/g)、碱性蛋白酶(Alcalase[®] AF 2.4 L, 130 000 U/g)、风味蛋白酶(Flavourzyme[®] 500 MG, 80 000 U/g),丹麦 Novozymes 公司;马尿酸(Hippuric acid, HA)、血管紧张素转换酶(ACE)、邻苯二甲醛(*O*-phthalaldehyde, OPA)、马尿酰-组氨酰-亮氨酸(*N*-hippuryl-histidyl-leucine, HHL)、抑肽酶、细胞色素 C、碳酸酐酶、杆菌肽,美国 Sigma 公司;BCA (Bicinchoninic acid)试剂盒,南京碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

E2695 高效液相色谱,美国 Waters 公司;HITACHI L-8900 氨基酸全自动分析仪,日本日立公司;EVOLUTION 60S 紫外分光光度计,美国 Thermo Fisher 公司;DSHZ-300A 旋转式恒温振荡器,太仓市实验设备厂;400Y 多功能粉碎机,永康市铂欧五金制品有限公司;Fresco 21 冷冻高速离心机,美国 Thermo Fisher 公司;DGG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱,上海森信实验仪器有限公司;QL-8bb-253 旋涡振荡器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 红娘鱼蛋白水解物的制备 将新鲜红娘鱼去除鱼骨、鱼皮及其结缔组织。将鱼肉切成小块并使用绞肉机搅碎,冷冻干燥至恒重并粉碎成粉末。向 225 mL 蒸馏水中加入 30 g 鱼肉粉,然后以 8 000 r/min 均质 60 s 后,分别以 8 000 U/g 的比例加入木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶、碱性蛋白酶和风味蛋白酶。酶解过程中通过 0.1 mol/L HCl 和 NaOH 来保持酶解液的最佳 pH。反应结束后,95 °C 加热 10 min 灭酶,8 000 r/min 离心 10 min。取上清液冷冻干燥并储存在-20 °C,待用。

1.3.2 分子质量分布 根据蒋腾川等^[12]的方法测定分子质量分布,并稍作修改。利用高效液相色谱仪测定红娘鱼水解物的分子质量分布。其中,色谱

柱为 TSKgel G2000-SWx1 (7.8 mm×300 mm, Tosoh),检测器为 UV/Vis,进样量 10 μL,流动相由体积比为 45:55 的 A 液和 B 液组成,其中 A 液为乙腈,B 液为 0.1%TFA,等度洗脱,流速 0.5 mL/min。待测样品质量浓度为 10 mg/mL,0.45 μm 的滤膜过滤,按照上述分析条件进行检测,根据校准曲线计算样品相对分子质量及其分布范围。称取适量标准品抑肽酶(6 500 u)、细胞色素 C(12 400 u)、碳酸酐酶(29 000 u)和 HHL(429 u)配制成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液,进行检测并绘制标准品谱图。

1.3.3 氨基酸组成 称取样品 10~20 mg,加入 6 mL/min 盐酸,110 °C 水解 24 h,制得水解液,将其过滤离心,用自动氨基酸分析仪 L-8900 型分析上清液的氨基酸组成^[13]。

1.3.4 水解物结构表征

1.3.4.1 紫外全波长扫描 将待测样品用 0.01 mol/L PBS(pH 7.0)配制为 1.0 mg/mL 的溶液,将其加入狭缝比色皿至体积的 2/3,在扫描波长 200~500 nm,采样间隔 1 nm 的条件下进行紫外全波长扫描^[14]。

1.3.4.2 傅里叶变换红外 (FTIR) 光谱 称取 10 mg 的样品粉末与 0.1 g 的 KBr 混合研磨放入模具中,利用油压机加压成透明薄片,在扫描范围 400~4 000 cm⁻¹,分辨率 4 cm⁻¹ 的采集条件下测定傅里叶变换红外光谱,并使用 Omnic 和 Peakfit 软件处理谱图^[15]。

1.3.4.3 内源荧光光谱测定 将样品溶解于 0.01 mol/L pH 7.0 的 PBS 中,制得质量浓度为 1.0 mg/mL 的溶液,进行荧光光谱测定。荧光光谱的分析参数为激发波长 290 nm,扫描波长范围 300~500 nm,狭缝宽度 5 nm^[16]。

1.3.5 ACE 抑制率测定 取 40 μL 的样品溶液,与 100 μL 6.5 mmol/L HHL 混合均匀并于 37 °C 孵育 10 min,随后加入 20 μL 的 ACE,混合均匀并于 37 °C 反应 30 min,最后加入 85 μL 的 1 mol/L 盐酸,终止反应,用 0.45 μm 滤膜过滤,制得最终反应产物,于 HPLC 系统自动进样分析^[17]。色谱条件:色谱柱 SunFire C18 (4.6 mm×250 mm,5 μm);检测器 UV/Vis;进样量 10 μL;流动相 70% TFA 水溶液 (0.1%,V/V)-30%乙腈,流量为 0.8

mL/min,按式(1)计算 ACE 抑制率:

$$\text{ACE 抑制率} = \left(1 - \frac{A-B}{A}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中, A ——用纯水代替酶解物参与反应条件下所产生的 HA 的峰面积(mAU·min); B ——酶解物参与反应的条件下所产生的 HA 的峰面积(mAU·min)。

1.3.6 抗氧化活性测定

1.3.6.1 ·OH 清除能力的测定 采用水杨酸法测定不同蛋白酶水解物的·OH 清除能力。取 0.1 mL 样品分别加入 0.05 mL 的 9 mmol/L FeCl_2 溶液和 9 mmol/L 水杨酸-乙醇溶液,最后加入 0.05 mL 8.8 mmol/L H_2O_2 溶液启动反应,振荡混匀后于 37 °C 条件下,反应 30 min,测定 510 nm 波长处的吸光值^[14]。根据式(2)计算·OH 清除率:

$$\cdot\text{OH 清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中, A_1 ——样品的吸光值; A_2 ——50 μL 超纯水代替 FeCl_2 溶液测得的吸光值; A_3 ——200 μL 超纯水代替样品溶液测得的吸光值。

1.3.6.2 DPPH 自由基清除率的测定 取 1.5 mL 样品溶液与 DPPH 溶液(1 mL,1 mmol/L,溶于 95%乙醇)混合均匀,室温反应 30 min,于 517 nm 波长处测定吸光值。样品的吸光度越低说明其自由基清除率越高^[18]。根据式(3)计算 DPPH 自由基清除率:

$$\text{DPPH 自由基清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_1 - A_2}{A_3}\right) \times 100 \quad (3)$$

式中, A_1 ——样品的吸光度; A_2 ——95%乙醇

与样品反应的吸光度; A_3 ——蒸馏水与 DPPH 溶液反应的吸光度。

1.3.6.3 Fe^{2+} 螯合活性的测定 取 3.7 mL 样品溶液与 FeCl_2 溶液(0.1 mL,20 mmol/L)混匀,室温反应 3 min,加入 Ferrozine(0.2 mL 5 mmol/L)已停止反应,室温孵育 10 min 后,在 562 nm 波长处测定吸光值^[19]。根据式(4)计算 Fe^{2+} 螯合活性:

$$\text{Fe}^{2+} \text{ 螯合活性}(\%) = \left(1 - \frac{A_1}{A_2}\right) \times 100 \quad (4)$$

式中, A_1 ——样品的吸光值; A_2 ——超纯水代替样品溶液测得的吸光值。

1.4 数据处理

每组试验重复 3 次,将试验结果用“平均值 \pm 标准偏差”表示,使用 Design Expert 8.0 和 Origin 2017 软件对数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 分子质量分布

图 1a 是标准品相对分子质量分布图,其标准曲线方程为 $y = -0.2025x + 6.8751$, $R^2 = 0.9758$ 。5 种蛋白酶水解产物的分子质量分布如图 1b 所示。对照组的分子质量 91.06% 分布在 $>10\,000$ u 的范围内,与其相比,酶解后的分子质量分布范围显著下降。研究表明,低分子质量肽比高分子质量肽具有更强的生物活性^[17],因此分子质量分布 $<1\,000$ u 范围的肽段较其它分子质量的肽段生物活性要高。如图 1 所示,木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、复合蛋白酶、风味蛋白酶和碱性蛋白酶水解产物中 $<1\,000$

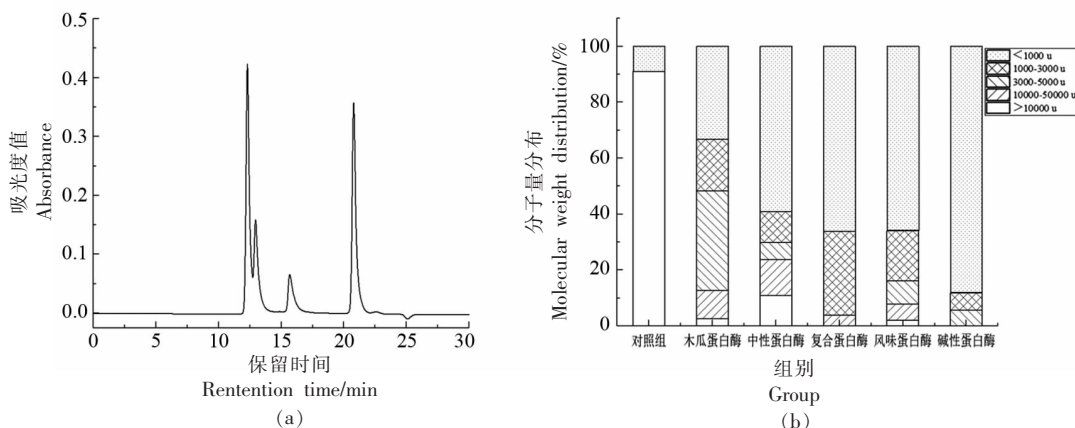


图 1 标准品相对分子质量分布色谱图(a),红娘鱼酶解产物的分子质量(b)

Fig.1 Chromatogram of relative molecular mass distribution of standard substanc(a), molecular mass distribution of *Lepidotrigla microptera* hydrolysates (b)

u 的分子质量分布比例分别为 33.29%, 59.11%, 66.11%, 65.9%, 88.2%。综上所述,碱性蛋白酶水解产物中低分子质量肽所占比例最多,推测红娘鱼蛋白中含有大量碱性蛋白酶特异识别的序列。根据酶解产物的分子质量分布,红娘鱼蛋白的酶解效率从大到小依次为碱性蛋白酶>风味蛋白酶>复合蛋白酶>中性蛋白酶>木瓜蛋白酶。

2.2 氨基酸组成

水解物的氨基酸组成直接影响其生物活性。不同酶水解产物的氨基酸含量如表 1 所示,不同蛋白酶水解产物的氨基酸含量差异显著,对照组氨基酸含量为 393.47 mg/g,木瓜、中性、碱性、复合

和风味蛋白酶组的氨基酸含量分别为 521.743, 528.2, 551.524, 539.705, 492.53 mg/g, 试验组的氨基酸含量明显高于对照组,试验组又以碱性蛋白酶组氨基酸含量最高,碱性蛋白酶的切割位点有广泛特异性,可水解红娘鱼蛋白释放大量的氨基酸。蛋白酶种类不同其切割位点也会发生变化,因此水解产物中氨基酸的组成和含量也有所不同,其中碱性蛋白酶酶解产物中芳香族氨基酸(51.66 mg/g)、疏水性氨基酸(200.50 mg/g)含量较高,芳香族氨基酸是影响抗氧化能力的关键因素之一^[20],疏水性氨基酸被认为显著提高 ACE 抑制率^[21]。

表 1 不同蛋白酶水解产物的总氨基酸组成

Total 1 Amino acid compositions of hydrolysates with different proteinases

氨基酸	含量/mg·g ⁻¹					
	对照组	木瓜蛋白酶	中性蛋白酶	碱性蛋白酶	复合蛋白酶	风味蛋白酶
天冬氨酸	37.15 ± 0.72	47.414 ± 0.12	47.684 ± 0.15	50.051 ± 0.72	48.781 ± 0.32	45.403 ± 0.26
苏氨酸	22.73 ± 0.54	26.659 ± 0.81	26.384 ± 0.51	28.173 ± 0.14	27.476 ± 0.50	24.363 ± 0.12
丝氨酸	16.26 ± 0.62	23.728 ± 0.60	23.98 ± 0.26	25.27 ± 0.09	24.6 ± 0.42	22.486 ± 0.54
谷氨酸	62.63 ± 0.63	71.593 ± 0.60	73.083 ± 0.21	74.779 ± 0.82	72.939 ± 0.66	69.401 ± 0.22
甘氨酸	14.83 ± 0.60	23.815 ± 0.01	24.232 ± 0.32	25.165 ± 0.36	23.848 ± 0.36	22.684 ± 0.45
丙氨酸	26.82 ± 0.51	32.01 ± 0.51	31.992 ± 0.69	33.489 ± 0.26	31.036 ± 0.84	29.415 ± 0.32
胱氨酸	0.91 ± 0.01	1.683 ± 0.18	1.574 ± 0.27	1.532 ± 0.90	1.333 ± 0.12	1.323 ± 0.27
缬氨酸	18.16 ± 0.63	27.956 ± 0.36	26.989 ± 0.15	29.246 ± 0.48	28.914 ± 0.53	27.175 ± 0.03
蛋氨酸	20.21 ± 0.15	27.983 ± 0.21	29.322 ± 0.30	31.695 ± 0.54	31.091 ± 0.82	26.391 ± 0.22
异亮氨酸	18.67 ± 0.12	28.988 ± 0.15	30.787 ± 0.18	32.337 ± 0.51	32.101 ± 0.30	30.626 ± 0.18
亮氨酸	36.23 ± 0.30	43.7894 ± 0.81	45.982 ± 0.57	48.28 ± 0.57	47.355 ± 0.21	42.737 ± 0.21
酪氨酸	15.56 ± 0.18	22.349 ± 0.62	21.09 ± 0.51	26.211 ± 0.03	23.585 ± 0.60	19.38 ± 0.09
苯丙氨酸	16.59 ± 0.12	22.199 ± 0.51	21.697 ± 1.17	25.449 ± 0.36	24.734 ± 0.60	20.048 ± 0.21
组氨酸	9.13 ± 0.09	16.883 ± 0.36	16.947 ± 0.51	18.055 ± 1.14	17.852 ± 0.02	14.873 ± 0.01
赖氨酸	33.66 ± 0.50	44.205 ± 0.09	44.635 ± 0.36	46.288 ± 0.75	43.561 ± 1.02	41.91 ± 0.60
精氨酸	18.34 ± 0.81	27.093 ± 1.11	29.70.21 ± 0.60	29.739 ± 0.84	27.563 ± 0.05	24.552 ± 0.60
脯氨酸	25.59 ± 0.42	33.399 ± 0.60	32.123 ± 0.91	33.764 ± 0.30	32.936 ± 0.45	29.764 ± 0.66
总计	393.47 ± 6.95	521.743 ± 7.65	528.2 ± 7.67	559.524 ± 8.81	539.705 ± 4.12	492.53 ± 4.99

2.3 水解物结构表征

2.3.1 紫外全波长扫描 用紫外光谱法检测了不同蛋白酶水解物,其吸收光谱如图 2a 所示。6 组样品在 275 nm 波长附近均有吸收峰,未处理、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶、碱性蛋白酶和复合蛋白酶组最大吸收峰值分别为 0.63, 0.81, 0.93, 0.84, 0.97, 0.86。有研究表明, Tyr 和 Trp 的吸收峰在 280 nm 附近^[22],而各组酶解产物的峰值波

长均小于 280 nm,说明部分 Tyr、Trp 与水解产物中肽形成了偶联双键,增加了 275 nm 波长附近的紫外吸收。Tyr 和色氨酸经常存在于蛋白质的疏水内部^[23],酶解过程通过暴露更多的疏水基团,改变了水解物的最大吸收波长偏移。碱性蛋白酶组的吸光度强度显著高于其它组,这表明蛋白酶不同则其酶切位点不同,进而影响酶解产物的一级结构。

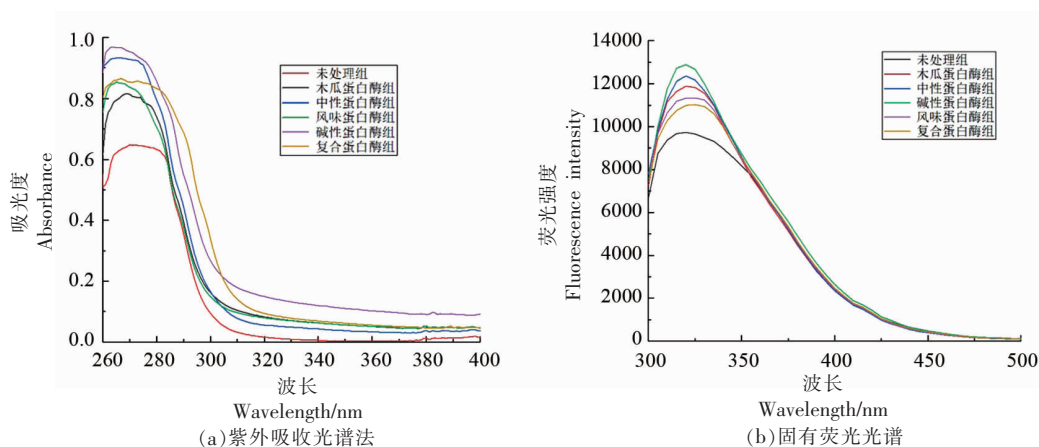


图 2 红娘鱼酶解产物的结构特征

Fig.2 The structural characteristics of *Lepidotrigla microptera* hydrolysates

2.3.2 内源荧光光谱 荧光光谱主要用来反映蛋白质中芳香族氨基酸的含量,通过测定水解产物中色氨酸残基在 348 nm 波长处产生荧光强度的变化来反映不同蛋白酶水解产物三级结构的变化。如图 2b 是不同蛋白酶水解产物的荧光光谱,荧光强度由大到小是碱性蛋白酶组>中性蛋白酶组>木瓜蛋白酶组>风味蛋白酶组>复合蛋白酶组>未处理组。碱性蛋白酶水解液的荧光强度均高于其它组,说明碱性蛋白酶水解物有更多的蛋白分子结构展开并将包埋在蛋白中的色氨酸残基暴露在水解液中,同时有更多蛋白酶结合位点显露出来,导致酶解速度加快。

2.3.3 傅里叶变换红外 (FTIR) 光谱 FTIR 可以直观的反映待测物质的分子结构,光谱图中的吸收峰和分子中各官能团振动相对应^[24]。5 种蛋白酶水解产物在 4 000~400 cm^{-1} 范围内的特征吸光度带如图 3 所示。6 组样品在范围 3 650~3 200 cm^{-1} 内均有吸收峰,其中对照组和木瓜蛋白酶水解物的峰形最宽,说明其分子聚合物中可能存在大量的分子内或分子间氢键力^[25]。对照组在 2 926 cm^{-1} 有一条吸收带,这由 -CH 拉伸振动产生。不同蛋白酶水解物在 2 938 cm^{-1} 处均有一条吸收带,说明脂肪链的组成发生了变化,这表明在酶水解过程中,水解物内部的疏水区发生了变化。

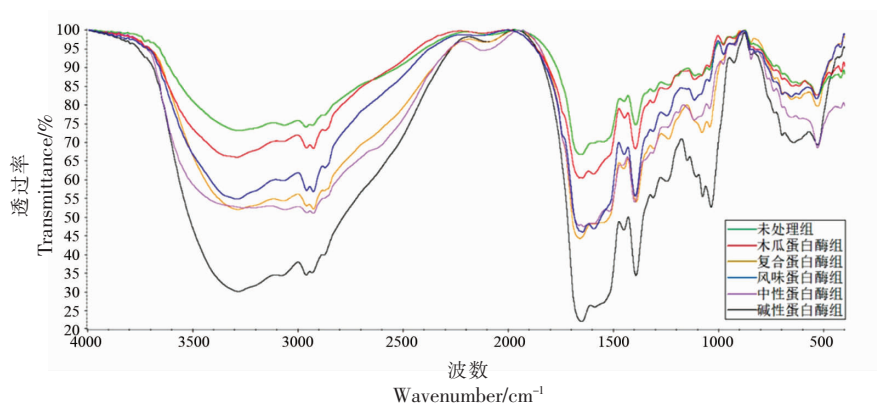


图 3 红娘鱼酶解物的傅里叶变换红外 (FTIR) 分析光谱

Fig.3 Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of *Lepidotrigla microptera* hydrolysates

通过软件分析不同蛋白酶水解产物的二级结构组成,结果如表 2 所示。与对照组相比,经不同蛋白酶处理后各组水解产物的 β -转角比例均增

加且所占比例较高,分别是 57.13% (木瓜蛋白酶)、56.09% (中性蛋白酶)、62.58% (复合蛋白酶)、69.68 (碱性蛋白酶) 和 61.76 (风味蛋白酶),各组

水解产物的 α -螺旋比例降低分别为19.67%(木瓜蛋白酶)、18.73%(中性蛋白酶)、18.65%(复合蛋白酶)、16.62%(碱性蛋白酶)和17.11%(风味蛋白酶)。各组蛋白酶水解物的二级结构中 β -转角和无规则卷曲所占比例均有所增加,且是主要组成部分。Yong等^[26]报道 β -转角和无规则卷曲与 α -

螺旋和 β -折叠相比稳定性及结构紧密性较差,这说明蛋白酶破坏了红娘鱼蛋白的有序结构,进而使分子结构疏松开放。碱性蛋白酶组 β -转角和无规则卷曲是各组中所占比例最高的,因此碱性蛋白酶更容易和红娘鱼蛋白结合,从而水解出更多生物活性肽。

表2 红娘鱼酶解产物的蛋白质二级结构含量

Table 2 Estimated secondary structures of *Lepidotrigla microptera* hydrolysates

组别	比例/%			
	β -折叠	无规则卷曲	α -螺旋	β -转角
对照组	82.38 ± 0.60 ^d	14.35 ± 0.16 ^a	31.56 ± 0.56 ^e	40.62 ± 1.12 ^a
木瓜蛋白酶组	80.25 ± 0.77 ^d	15.16 ± 0.22 ^{ab}	19.67 ± 0.33 ^d	57.13 ± 0.82 ^b
中性蛋白酶组	10.21 ± 1.06 ^b	14.96 ± 0.86 ^a	18.73 ± 1.36 ^e	56.09 ± 0.67 ^b
复合蛋白酶组	16.05 ± 0.36 ^c	21.36 ± 1.02 ^c	18.65 ± 0.76 ^e	62.58 ± 0.73 ^c
碱性蛋白酶组	7.31 ± 0.51 ^a	23.00 ± 0.46 ^d	16.62 ± 0.88 ^a	69.68 ± 1.36 ^d
风味蛋白酶组	9.93 ± 0.61 ^b	22.29 ± 0.82 ^{cd}	17.11 ± 1.05 ^b	61.76 ± 0.89 ^c

注:不同字母表示同一指标间差异显著($P < 0.05$)。

2.4 ACE抑制率

为了研究红娘鱼酶解产物的ACE抑制率,本研究在样品不同浓度下检测ACE抑制率,由表3可知,ACE抑制率与样品浓度成正相关,既ACE

抑制率随着样品浓度的增大而增加。ACE抑制活性从大到小依次为碱性蛋白酶组>中性蛋白酶组>复合蛋白酶组>风味蛋白酶组>木瓜蛋白酶组,其 IC_{50} 分别为0.77,0.98,1.4,1.8,2.31 mg/mL。

表3 红娘鱼酶解产物的ACE抑制活性

Table 3 ACE inhibitory activity of *Lepidotrigla microptera* hydrolysates

组别	蛋白质量浓度/mg·mL ⁻¹				IC_{50} /mg·mL ⁻¹
	0.1	0.3	0.7	1.2	
木瓜蛋白酶	5.4 ± 1.6 ^a	12.61 ± 0.9 ^a	24.12 ± 1.9 ^b	35.12 ± 2.3 ^b	2.31 ± 0.016 ^c
中性蛋白酶	10.23 ± 2.3 ^c	28.31 ± 1.3 ^c	30.13 ± 0.8 ^c	58.23 ± 1.2 ^c	0.98 ± 0.013 ^a
碱性蛋白酶	60.12 ± 2.5 ^d	75.21 ± 1.1 ^d	46.51 ± 1.1 ^d	69.62 ± 1.4 ^d	0.77 ± 0.015 ^a
风味蛋白酶	8.41 ± 0.8 ^b	15.15 ± 2.6 ^b	20.35 ± 1.5 ^a	31.33 ± 1.3 ^a	1.8 ± 0.011 ^b
复合蛋白酶	10.63 ± 1.2 ^c	15.53 ± 1.6 ^b	26.77 ± 2.6 ^b	38.11 ± 2.1 ^b	1.4 ± 0.018 ^b

注:不同字母表示同一指标间差异显著($P < 0.05$)。

2.5 抗氧化活性

以 $\cdot OH$ 清除能力、DPPH自由基清除率的测定和 Fe^{2+} 螯合活性为指标评价红娘鱼水解产物的体外抗氧化活性。如图4所示,6组样品的抗氧化能力与其浓度呈正比例增长,其中碱性蛋白酶组的抗氧化活性显著高于其它组,其 $\cdot OH$ 清除能力、DPPH自由基清除率和 Fe^{2+} 螯合活性的 IC_{50} 值分别为1.88,1.92,1.76 mg/mL。分析原因是碱性蛋白酶的酶切位点是C末端疏水氨基酸,使大量疏水

氨基酸暴露出来,因此其抗氧化活性高于其它组。Zhang等^[27]以鲢鱼鳍为原料,利用胰蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶和木瓜蛋白酶对其进行酶解,结果发现碱性蛋白酶产物具有显著的 Fe^{2+} 螯合活性;Sinthusamran等^[28]将鲑鱼骨酶解后,碱性蛋白酶水解物的抗氧化活性和水解度显著优于其它组,这与本研究结果相一致。风味蛋白酶的抗氧化活性最低,表明其对红娘鱼蛋白特异性较低。

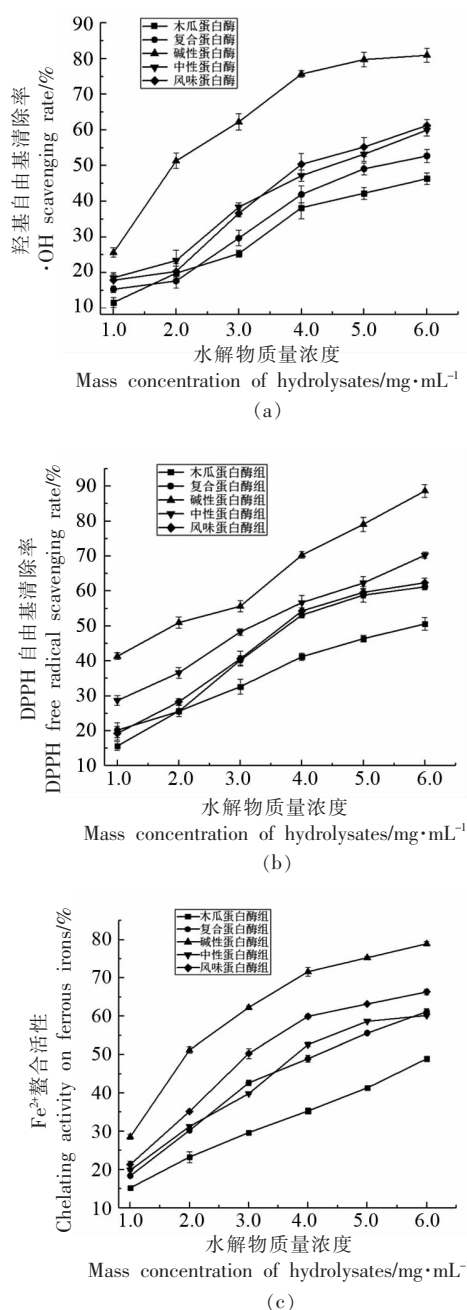


图 4 红娘鱼酶解产物浓度与抗氧化活性关系图
Fig.4 The relationship between the concentration of *Lepidotrigla microptera* hydrolysates and antioxidant activity

3 结论

本研究以红娘鱼为原料,研究 5 种蛋白酶水解产物的结构特性、抗氧化活性和 ACE 抑制活性。碱性蛋白酶水解物的低分子质量占比最高,疏水氨基酸含量最高,并且比其它组具有更强的抗

氧化活性和 ACE 抑制活性。综上所述,碱性蛋白酶水解红娘鱼制备生物活性肽可以作为功能性食品的潜在成分,此外,可分离纯化探索与抗氧化活性和 ACE 抑制活性相关的肽序列,进一步研究其作用机制。

参 考 文 献

- [1] 师晓栋, 陈秀兰, 何海伦, 等. 海洋蛋白酶解物中生物活性肽的研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2000, 22(4): 4-16.
- [2] SHI X D, CHEN X L, HE H L, et al. Outline and perspective of research and development of bioactive peptides from marine protein enzymatic hydrolysate [J]. Amino Acids and Biotic Resources, 2000, 22(4): 4-16.
- [3] Food and Agriculture Organization of the United Nations. The state of world fisheries and aquaculture in 2022[M]. Italy: Food and Agriculture Organization, 2022: 5-66.
- [4] VARET G, MONTEL F, NASRI D, et al. Gas solubility measurement in heavy oil and extra heavy oil at vapor extraction (VAPEX) conditions[J]. Energy & Fuels, 2013, 27(6): 2528-2535.
- [5] KLEEKAYAI T, HARNEDY P A, O'KEEFFE M B, et al. Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes[J]. Food Chemistry, 2015, 176(1): 441-447.
- [6] UMAPARVATHI S, MEENAKSHI V, VIMALRAJ, et al. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*) - ScienceDirect [J]. Biomedicine & Preventive Nutrition, 2014, 4(3): 343-353.
- [7] WU R B, WU C L, LIU D, et al. Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease [J]. Food Chemistry, 2018, 248(15): 346-352.
- [8] LI G, LARSON E B, SONNEN J A, et al. Statin therapy is associated with reduced neuropathologic changes of Alzheimer disease[J]. Neurology, 2008, 70(9): 2349-2359.
- [8] KEARNEY P M, WHELTON M, REYNOLDS K, et al. Global burden of hypertension: Analysis of

- worldwide data[J]. *The Lancet*, 2005, 365(9455): 217–223.
- [9] 张靖, 苏琳, 要铎, 等. 肉源血管紧张素转化酶抑制肽研究进展[J]. *食品科技*, 2020, 45(10): 241–247.
- ZHANG J, SU L, YAO D, et al. Review on blood pressure regulation of ACE inhibitory peptides in meat and meat products[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(10): 241–247.
- [10] YAMAMOTO N. Antihypertensive peptides derived from food proteins[J]. *Biopolymers*, 1997, 43(2): 129–134.
- [11] CUTLER J A, SORLIE P D, WOLZ M, et al. Trends in hypertension prevalence, awareness, treatment, and control rates in United States adults between 1988–1994 and 1999–2004[J]. *Hypertension*, 2008, 52(5): 818–827.
- [12] 蒋腾川, 宋新波, 张丽娟. 凝胶过滤色谱法测定3种不同来源多肽的相对分子量分布[J]. *食品科学*, 2014, 35(24): 312–315.
- JIANG T C, SONG X B, ZHANG L J. Determination of relative molecular weight distribution of polypeptides from three different sources by gel filtration chromatography[J]. *Food Science*, 2014, 35(24): 312–315.
- [13] CHEN X, WU J H, LI L, et al. Cryoprotective activity and action mechanism of antifreeze peptides obtained from tilapia scales on *Streptococcus thermophilus* during cold stress[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2019, 67(7): 212–235.
- [14] ZHOU C, MI S, LI J, et al. Purification, characterisation and antioxidant activities of chondroitin sulphate extracted from *Raja porosa* cartilage[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 241(3): 1–8.
- [15] ANWAR N, ABDELMONEIM H A, WEDAD Q. Structural and physicochemical characteristics of lyophilized chinese sturgeon protein hydrolysates prepared by using two different enzymes[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(10): 16–36.
- [16] LIU K L, DU R F, CHEN F S. Stability of the antioxidant peptide SeMet–Pro–Ser identified from selenized brown rice protein hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2020, 319(30): 126–140.
- [17] FAN H B, WANG J P, WANG L, et al. Identification and characterization of gastrointestinal-resistant angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white proteins[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(25): 7147–7156.
- [18] 吴伟, 蔡勇建, 吴晓娟. 不同贮藏期米糠制备的米糠蛋白酶解产物抗氧化性分析[J]. *食品科学*, 2017, 38(3): 5–16.
- WU W, CAI Y J, WU X J. Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates of rice bran proteins prepared from rice bran with different storage times [J]. *Food Science*, 2017, 38(3): 5–16.
- [19] SAMAEI S P, GHORBANI M, TAGLIAZUCCHI D, et al. Functional, nutritional, antioxidant, sensory properties and comparative peptidomic profile of faba bean seed protein hydrolysates and fortified apple juice[J]. *Food Chemistry*, 2020, 330(15): 1–13.
- [20] 任海伟, 石菊芬, 王曼琪, 等. 藏绵羊胎盘肽的抗氧化能力及结构表征[J]. *食品与机械*, 2020, 36(4): 8–19.
- REN H W, SHI J F, WANG M Q, et al. Antioxidant capacity of placental peptide from tibetan sheep and its structural characterization[J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(4): 8–19.
- [21] AHN C B, JEON Y J, KIM Y T, et al. Angiotensin I converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by alcalase hydrolysis[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 2240–2245.
- [22] ZHANG X, NOISA P, YONG J. Chemical and cellular antioxidant activities of *in vitro* digesta of tilapia protein and its hydrolysates[J]. *Foods*, 2020, 9(6): 356–368.
- [23] ZHENG Z, LI J, LI J, et al. Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes[J]. *Food Hydrocolloids*, 2019, 97(12): 105222.1–105222.9.
- [24] AI M, TANG T, ZHOU L, et al. Effects of different proteases on the emulsifying capacity, rheological and structure characteristics of preserved egg white hydrolysates[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 87(2): 933–942.
- [25] IJAROTIMI O S, MALOMO S A, FAGBEMI T N, et al. Structural and functional properties of buchholzia coriacea seed flour and protein concentrate at different pH and protein concentrations[J]. *Food Hydrocolloids*, 2018, 74(1): 275–288.
- [26] YONG Y H, YAMAGUCHI S, MATSUMURA Y.

- Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten[J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2006, 54(16): 6034.
- [27] ZHANG L, SHAN Y, HONG H, et al. Prevention of protein and lipid oxidation in freeze-thawed big-head carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) fillets using silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fin hydrolysates[J]. *LWT*, 2020, 123(4): 109050.
- [28] SINTHUSAMRAN S, IDOWU A T, BENJAKUL S, et al. Effect of proteases and alcohols used for debittering on characteristics and antioxidative activity of protein hydrolysate from salmon frames[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2019, 57(6): 6-18.

Effect of Different Proteases on Structural Characteristics and Biological Activity of *Lepidotrigla microptera* Protein Hydrolysates

Hu Xuejia, Dai Zhiyuan*, Jin Renyao, Zhang Xiaodi, Dong Ye
(*Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035*)

Abstract The objective of this study was to characterize the antioxidant activities, ACE inhibitory activity and functional properties of *Lepidotrigla microptera* which was hydrolyzed by papain, neutrase, protamex, alcalase and flavourzyme of hydrolysis. High performance liquid chromatograph, ultraviolet-visible (UV) absorption spectroscopy, intrinsic fluorescence spectroscopy and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) were used to determine the structural changes during hydrolysis. The biological activity of the hydrolysate was characterized by measuring its antioxidant capacity and ACE inhibitory activity. Compared with the other groups, alcalase hydrolysate had the largest proportion of lowest molecular weight (<1 000 u), and more hydrophobic amino acids, which were 88.2% and 200.5 mg/g, respectively. Structural characterization demonstrated that the surface hydrophobicity, random coil and β -turn of the hydrolysates were significantly higher than those of other groups, which were 69.68%, 23%, respectively. Alcalase hydrolysate showed superior ACE inhibitory activity and antioxidant activity to other hydrolysates, the IC_{50} were 1.88, 1.92, 1.76, 0.77 mg/mL, respectively. In conclusion, alcalase is the optimal protease for the preparation of *Lepidotrigla microptera* biological active peptide. This study provided data support and theoretical foundation for diversified development and utilization of *Lepidotrigla microptera*.

Keywords protein hydrolysate; *Lepidotrigla microptera*; structural characteristic; antioxidant activity; ACE inhibitory activity