

## 带鱼 ACE 抑制肽的酶法制备及分离纯化

白雪, 董焯, 胡学佳, 戴志远\*

(浙江工商大学海洋食品研究院 杭州 310012)

**摘要** 为有效利用带鱼资源,制备优质的血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽,以 ACE 抑制率和水解度为评价指标,筛选出制备带鱼 ACE 抑制肽的最适蛋白酶。通过单因素和响应面优化蛋白酶的酶解工艺条件,分析优化后的带鱼 ACE 抑制肽的分子质量和氨基酸组成。采用超滤和 Prep-HPLC 对 ACE 抑制肽分离纯化,获得具有最高 ACE 抑制率的活性组分。结果表明,复合蛋白酶是制备带鱼 ACE 抑制肽的最佳蛋白酶,优化后的最佳酶解参数为水解时间 3 h,温度 45 °C,加酶量 5 000 U/g, pH 7.0。在此条件下带鱼 ACE 抑制肽的理论抑制率为 80.15%,实际值为 80.43%,IC<sub>50</sub> 为 0.33 mg/mL,相对分子质量主要分布在 1 000 u 以下。带鱼 ACE 抑制肽的氨基酸组成模式合理,鲜味氨基酸和疏水性氨基酸含量较高。经 Prep-HPLC 分离得到 6 个组分,其中组分 5 的 ACE 抑制活性最高,IC<sub>50</sub> 为 0.11 mg/mL。本研究为带鱼 ACE 抑制肽的制备提供了技术支持。

**关键词** 带鱼; 响应面; ACE 抑制肽; 纯化

**文章编号** 1009-7848(2024)09-0216-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.09.020

高血压是因血压升高而引起的一种疾病,常伴有心、脑、肾等器官的功能或器质性损伤,容易引发中风、冠心病、心肌梗塞等疾病,且近年来受不良饮食和作息习惯的影响,患病人群趋于年轻化<sup>[1]</sup>。血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE),作为一种高度糖基化的膜结合锌金属蛋白酶,是治疗高血压的重要靶点之一。ACE 不仅能催化血管扩张剂缓激肽的水解使其失活,而且能使血管紧张素 I 转化为具有血管收缩能力的血管紧张素 II,从而使血压升高<sup>[2]</sup>。常见的 ACE 抑制剂类药物,如卡托普利、依那普利等,虽可有效降低血压,但长期服用会产生许多毒副作用,包括头痛、过敏反应和味觉障碍<sup>[3]</sup>。与传统的合成降压药物相比,食物蛋白来源的 ACE 抑制肽更加安全,成为降压药物和功能性食品领域的一大研究热点<sup>[4]</sup>。自 1965 年 Ferreira<sup>[5]</sup>首次在南美茅头蝮蛇毒液中发现 ACE 抑制肽以来,研究者们已陆续从玉米<sup>[6]</sup>、豆类<sup>[7]</sup>、核桃<sup>[8]</sup>、鱼类<sup>[9]</sup>、藻类<sup>[10]</sup>、乳制品<sup>[11]</sup>等动、植物中获得 ACE 抑制肽。

海洋拥有丰富的优质蛋白质资源,并且海洋源蛋白质的氨基酸组成和一级蛋白序列与陆地蛋

白不同,是生产 ACE 抑制肽的良好来源。在海洋生物中,鱼类是人们日常饮食中常见的蛋白质来源,在过去的几十年里,全球鱼类的生产和消费已大大增长<sup>[12]</sup>。带鱼(Hairtail)作为我国四大海产之一,分布广泛,年产量高。带鱼中蛋白质含量丰富,目前关于带鱼活性肽的研究多集中于抗氧化肽<sup>[13]</sup>和金属离子螯合肽<sup>[14]</sup>,ACE 抑制肽方面的研究较少。本研究以带鱼肉为原料,在单因素实验的基础上,通过响应面优化带鱼 ACE 抑制肽的制备工艺,并测定其分子质量以及氨基酸组成。采用超滤和制备型高效液相色谱纯化 ACE 抑制肽,以获得具有最高 ACE 抑制率的活性组分。本研究旨在为带鱼在功能性食品方面的应用提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

带鱼,舟山市慧达水产制品有限公司。复合蛋白酶(Protamax, 1.2×10<sup>5</sup> U/g)、中性蛋白酶(Neutrase, 1.0×10<sup>5</sup> U/g),上海源叶生物科技有限公司;碱性蛋白酶(Alcalase, 2.0×10<sup>5</sup> U/g)、木瓜蛋白酶(Papain, 8.0×10<sup>5</sup> U/g)、风味蛋白酶(Flavourzyme, 3.0×10<sup>4</sup> U/g),北京索莱宝科技有限公司;血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)、马脲酰-组氨酸-亮氨酸(N-hippuryl-histidyl-leucine, HHL)、抑肽酶、杆菌肽、牛血清白蛋白,美

收稿日期: 2023-09-16

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC0311205)

第一作者: 白雪,女,硕士生

通信作者: 戴志远 E-mail: dzy8587@126.com

国 Sigma 公司;乙腈(色谱纯),德国 Meker 公司;其余试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

## 1.2 仪器与设备

E2695 高效液相色谱仪,制备型高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;Freeze Zone 冷冻干燥机,美国 LABCONCO 公司;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。

## 1.3 试验方法

1.3.1 带鱼预处理 将带鱼肉于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下真空冷冻干燥 72 h,粉碎机粉碎, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 带鱼酶解产物制备 带鱼粉 8 g 溶于 100 mL 蒸馏水中,预热 10 min $\rightarrow$ 0.5 mol/L NaOH 或 HCl 调 pH 值 $\rightarrow$ 添加蛋白酶 $\rightarrow$ 95  $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min,灭活蛋白酶 $\rightarrow$ 8 000 r/min,4  $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min $\rightarrow$ 上清液冷冻干燥后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存待用。酶解过程每隔 10 min 测 pH 值,并调至酶解 pH 值。

1.3.3 蛋白酶筛选 带鱼样品分别根据表 1 中的工艺条件进行酶解试验,并依次测定 5 种蛋白酶下制得的带鱼 ACE 抑制肽的水解度和 ACE 抑制率,确定最佳蛋白酶。

1.3.4 单因素实验 分别改变 pH 值(6.5,7.0,7.5,8.0,8.5)、加酶量(3 000,4 000,5 000,6 000,7 000 U/g)、时间(1,2,3,4,5 h)和温度(35,40,45,50,55  $^{\circ}\text{C}$ )等反应条件,依次测定 ACE 抑制率和水解度。

1.3.5 响应面试验设计 基于单因素试验的结果,选取对带鱼 ACE 抑制肽活性影响最大的 3 个因素(温度、pH 值、加酶量)进一步优化酶解工艺。Design-Expert 13 软件进行试验设计。试验设计因素水平见表 2。

1.3.6 水解度(hydrolysis degree, DH)的测定 采用 pH-stat 法<sup>[15]</sup>测定带鱼酶解产物的水解度,公式如下:

$$\text{DH} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100 = \frac{B \times N_b}{\alpha \times h_{\text{tot}} \times M_p} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{其中, } \alpha = \frac{10^{(\text{pH}-\text{pK})}}{1+10^{(\text{pH}-\text{pK})}},$$

$$\text{pK} = 7.8 + \left( \frac{298-T}{298T} \right) \times 2400$$

表 1 不同蛋白酶酶解条件

Table 1 Enzymatic hydrolysis conditions of different proteases

蛋白酶种类	pH 值	温度/ $^{\circ}\text{C}$	加酶量/(U/g)	时间/h
碱性蛋白酶	10	45	5 000	3
中性蛋白酶	7.0	45		
复合蛋白酶	7.5	45		
木瓜蛋白酶	7.0	50		
风味蛋白酶	7.5	50		

表 2 响应面试验设计因素水平表

Table 2 Factors of response surface test design

水平	A(酶解温度/ $^{\circ}\text{C}$ )	B[加酶量/(U/g)]	C(pH 值)
-1	40	4 000	6.5
0	45	5 000	7.0
1	50	6 000	7.5

式中: $h$  为被裂解的肽键数,mmol/g; $h_{\text{tot}}$  为底物蛋白中总肽键数,其中带鱼蛋白<sup>[6]</sup>为 8.17 mmol/g; $B$  为消耗的 NaOH 量,mL; $N_b$  为 NaOH 的浓度, mol/L; $M_p$  为总蛋白质质量,g; $\alpha$  为氨基解离度;pK 为  $\alpha$ -氨基酸的平均 pK 值。

1.3.7 ACE 抑制率的测定 参考 Wu 等<sup>[7]</sup>的方法通过高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)分析,样品组取 40  $\mu\text{L}$  带鱼 ACE 抑制肽稀释液(1 mg/mL)加入离心管中,加入 50  $\mu\text{L}$  HHL 溶液(5 mmol/L)混合均匀,37  $^{\circ}\text{C}$  保温 5 min,加入 25  $\mu\text{L}$  ACE 溶液(0.1 U/mL)启动反应,30 min 后加入 90  $\mu\text{L}$  HCL 溶液(1 mol/L)终止反应。空白组用 40  $\mu\text{L}$  纯水代替 ACE 抑制肽稀释液。ACE 和 HHL 溶液均用 0.1 mol/L 硼酸缓冲液(pH 8.3,含有 0.3 mol/L NaCl)配制。经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后上样分析。

色谱条件:色谱柱 SunFire C18(4.6 mm $\times$ 250 mm,5  $\mu\text{m}$ ),流速 0.8 mL/min,进样量 10  $\mu\text{L}$ ,检测波长 228 nm,流动相 A(乙腈):流动相 B(纯水)=30:70,其中乙腈含 0.1% 三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)。按照以下公式计算 ACE 抑制率:

$$\text{ACE 抑制率}(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (2)$$

式中: $A$ 为空白组的马尿酸峰面积( $\text{mAU}\cdot\text{min}$ ); $B$ 为样品组的马尿酸峰面积( $\text{mAU}\cdot\text{min}$ )。

$\text{IC}_{50}$ 为ACE抑制率为50%时所需的样品浓度,通过使用SPSS统计软件进行ACE抑制率(%)与肽浓度的回归分析来确定。

1.3.8 相对分子质量分布的测定 参考 Quaisie 等<sup>[18]</sup>的方法,通过HPLC分析带鱼ACE抑制肽相对分子质量分布。色谱条件:色谱柱TSKgel G2000-SWxl (7.8 mm×300 mm, Tosoh), 流速0.5 mL/min, 进样量10  $\mu\text{L}$ , 检测波长220 nm, 流动相A(乙腈):流动相B(纯水)=45:55, 其中纯水含0.1% TFA。标准品:马尿酸-组氨酸-亮氨酸(429 u)、杆菌肽(1 422 u)、抑肽酶(6.5 ku)、牛血清白蛋白(66.446 ku)。标准品溶液(3 mg/mL)和带鱼ACE抑制肽稀释液(10 mg/mL)经0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤后上样分析。

1.3.9 氨基酸组成分析 参考 Lu 等<sup>[19]</sup>的方法,带鱼ACE抑制肽酸水解后加入衍生剂(体积比为乙醇:异硫氰酸苯酯:水:三乙胺=7:1:1:1)常温反应30 min,然后HPLC分析氨基酸组成。色谱条件:色谱柱C18 SHISEIDO (4.6 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流速1 mL/min, 进样量10  $\mu\text{L}$ , 检测波长254 nm, 流动相A为0.1 mol/L 乙酸钠, 流动相B为80%乙腈水溶液。

1.3.10 分离纯化 带鱼ACE抑制肽稀释液(10 mg/mL)先经0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,再使用1 000 u的超滤膜过滤,收集分子质量小于1 000 u的组分,经制备型高效液相色谱(Preparative High Performance Liquid Chromatography, Prep-HPLC)进一步纯化。色谱条件:色谱柱Venusil XBP C<sub>18</sub>(A)(21.2 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 流速5 mL/min, 进样量1 mL, 检测波长220 nm, 流动相乙腈由5%线性增加到45%进行梯度洗脱。收集不同组分,冷冻干燥后测ACE抑制率。

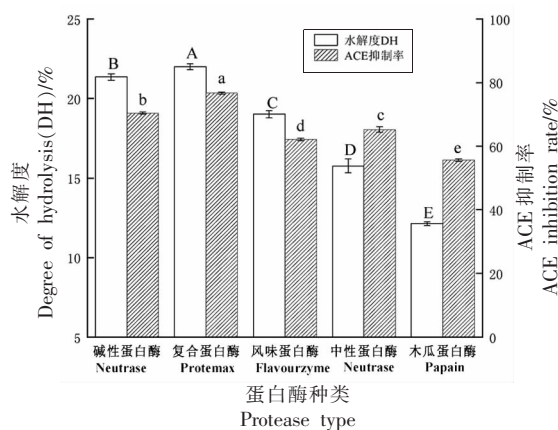
#### 1.4 数据处理

试验数据以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用SPSS Statistics 26统计软件做统计分析以及Origin 2021软件作图,用Duncan多重比较法进行显著性检验( $P < 0.05$ ),用Design Expert 13.0软件构建模型,每个试验重复3次。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白酶筛选

由图1可知,复合蛋白酶解制得的带鱼ACE抑制肽的ACE抑制率和水解度均显著高于其它4种蛋白酶( $P < 0.05$ )。蛋白酶特定切割带鱼底物蛋白中的氨基酸位点,不同蛋白酶结合位点不同,产生的肽段以及生物活性均有差异。复合蛋白酶是由多种蛋白酶复合而成的,包括外切肽酶、内切蛋白酶以及风味蛋白酶,综合了3种蛋白酶的优势,故具有较为广泛的切割位点,可以切割肽键和螺旋结构中的氢键<sup>[20]</sup>。综合考虑ACE抑制率和水解度效果,最终确定选用复合蛋白酶制备带鱼ACE抑制肽。



注:不同字母表示同一指标间差异显著( $P < 0.05$ ),下同。

图1 不同蛋白酶对ACE抑制率和水解度的影响  
Fig.1 Effect of different protease on the ACE inhibition rate and DH

### 2.2 单因素实验结果分析

由图2a可知,随着pH值的增大,ACE抑制率先升高后降低,在pH 7.0时达到最大值。水解度在pH 7.0~7.5趋于稳定,继续增大pH值,水解度降低。蛋白质的解离或聚集受pH值影响较大,pH值过高或过低会使蛋白质失去稳定性,同时改变蛋白酶与底物间的电荷分布,使彼此之间的结合能力降低,进而影响酶解效率<sup>[21]</sup>。因此选择pH 7.0为最佳酶解pH值。

由图2b可知,ACE抑制率在3 000~5 000 U/g逐渐增大,5 000 U/g达到最大值,之后逐渐降低。在加酶量大于5 000 U/g时,水解度趋于稳定状

态。这可能是由于加酶量较少时,与底物的结合有限;随着加酶量的增加,与底物的结合位点增多,释放更多的活性片段,ACE 抑制活性增加;但随着加酶量的继续增加,底物被过度酶解,活性片段被分解,从而使 ACE 抑制活性降低。因此选择 5 000 U/g 为最佳加酶量。

由图 2c 可知,随着酶解的时间增加,ACE 抑制率先升高后降低,在 3 h 达到最大值。水解度在时间大于 3 h 后趋于平缓。这是因为在酶解初始阶段,底物蛋白质浓度较高,酶促反应剧烈;随着时间的延长,酶促反应继续推进,蛋白酶可切割的

位点减少,水解度达到饱和状态,并且原本具有 ACE 抑制活性的肽段进一步分解成没有 ACE 抑制活性的小片段,所以活性降低<sup>[22]</sup>。因此选择 3 h 为最佳酶解时间。

由图 2d 可知,ACE 抑制率和水解度均在 45 °C 达到最大值。温度过低时没有达到蛋白酶最适温度,酶解反应不充分;温度升高,加速底物与蛋白酶间的分子运动,酶解反应速率加快;温度继续升高超过蛋白酶最适温度范围时,过高会使蛋白酶结构改变从而失活<sup>[23]</sup>。因此选择 45 °C 为最佳酶解温度。

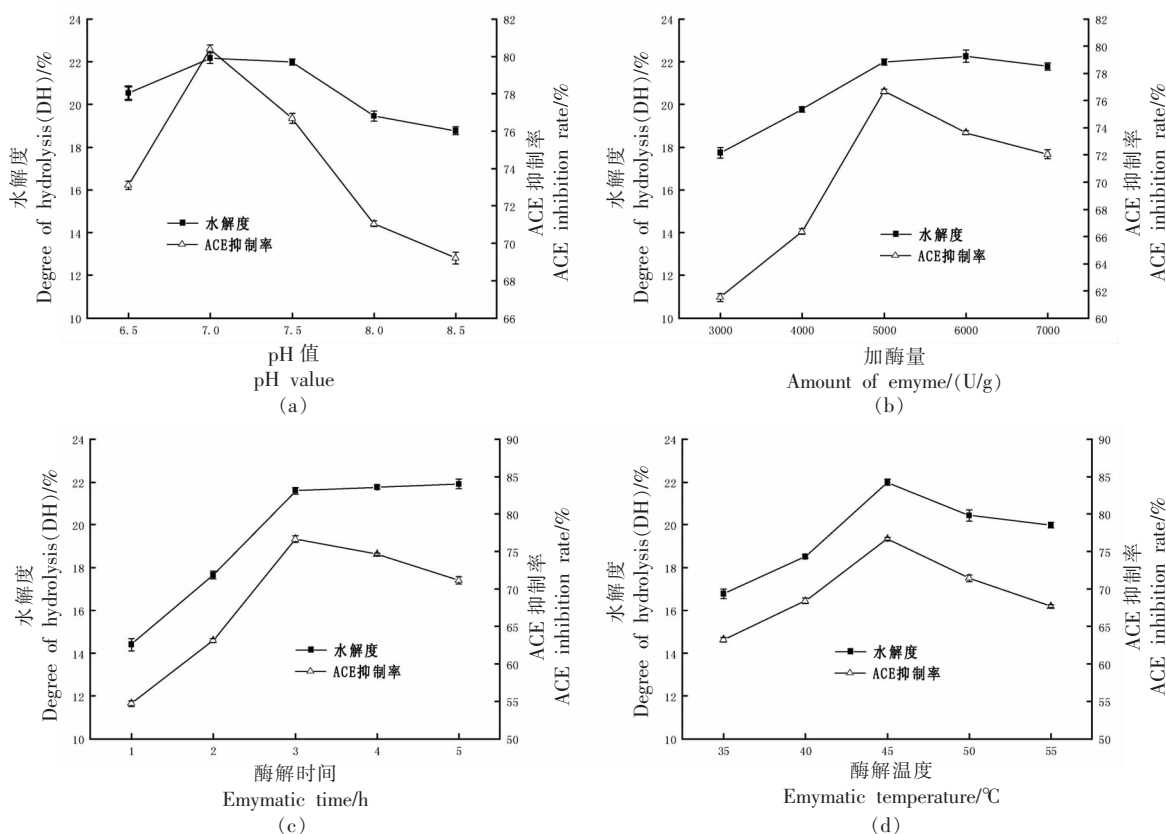


图 2 单因素条件对 ACE 抑制率和水解度的影响

Fig.2 Effects of single factors on the ACE inhibition rate and DH

### 2.3 响应面试验结果分析

2.3.1 模型拟合 基于单因素实验的结果,选取复合蛋白酶酶解 3 h 制备带鱼 ACE 抑制肽。依据 Design-Expert 13 软件设计的 17 组工艺条件进行试验。试验设计及结果见表 3。

通过对表 3 中的数据进行多元回归拟合,得到 Y (ACE 抑制率) 与 3 个因素之间的关系方程

$$Y = 80.12 - 0.1775A + 0.55B - 0.27C + 0.055AB - 0.755AC - 0.395BC - 5.62A^2 - 4.31B^2 - 2.34C^2.$$

由表 4 可知,该模型极显著 ( $P < 0.05$ ),相关系数  $R^2 = 0.99$ ,失拟项不显著 ( $P = 0.3270 > 0.05$ ),说明该模型拟合度高,置信度高,且未知因素对结果的影响不大,故该模型稳定。一次项中加酶量 (B) 显著,二次项中酶解温度、加酶量、pH ( $A^2, B^2, C^2$ )



表3 响应面试验设计及结果

Table 3 Design and results of the response surface experiments

序号	酶解温度 A/°C	加酶量 B/ (U/g)	pH 值	ACE 抑制 率/%	序号	酶解温度 A/°C	加酶量 B/ (U/g)	pH 值	ACE 抑制 率/%
1	50	5 000	7.5	74.2	10	45	6 000	6.5	78.03
2	50	4 000	7	76.55	11	50	6 000	7	76.6
3	50	5 000	6.5	76.93	12	45	5 000	7	80.02
4	45	4 000	7.5	75.77	13	45	4 000	6.5	78.35
5	40	5 000	6.5	77.15	14	40	4 000	7	77.85
6	45	5 000	7	80.36	15	45	5 000	7	79.84
7	45	6 000	7.5	77.82	16	45	5 000	7	80.69
8	40	5 000	7.5	77.02	17	45	5 000	7	80.41
9	40	6 000	7	77.74					

表4 回归模型方差分析结果

Table 4 Variance analysis results of regression model

来源	平方和	自由度 df	方差	F 值	P 值	显著性
模型	263.79	9	29.31	76.86	<0.0001	**
A	0.2520	1	0.2520	0.6609	0.4430	
B	2.42	1	2.42	6.35	0.0399	*
C	0.5832	1	0.5832	1.53	0.2561	
AB	0.0121	1	0.0121	0.0317	0.8637	
AC	2.28	1	2.28	5.98	0.0444	*
BC	0.6241	1	0.6241	1.64	0.2416	
A <sup>2</sup>	132.85	1	132.85	348.34	<0.0001	**
B <sup>2</sup>	78.11	1	78.11	204.81	<0.0001	**
C <sup>2</sup>	23.00	1	23.00	60.30	0.0001	**
残差	2.67	7	0.3814			
失拟	1.45	3	0.4822	1.58	0.3270	
误差	1.22	4	0.3057			
合计	266.46	16				

注:\*表示差异显著( $P < 0.05$ );\*\*表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

均极显著,说明这3个因素对ACE抑制率的影响并非简单的一元线性关系。交互项AC显著,说明酶解温度和pH值的交互作用较好。根据方差分析中F值的变化幅度和大小,即可以评价各试验因素对指标的影响程度,F值越大,影响越显著<sup>[24]</sup>,即各因素对ACE抑制率的影响程度表现为:酶添加量>pH值>酶解温度。

2.3.2 响应面分析 三维响应面可以直观的反映两个因素对带鱼酶解产物ACE抑制率的影响,曲面越陡峭影响越大,曲面的最高点是酶解制备带鱼ACE抑制肽的最优条件<sup>[25]</sup>。由图3可知,各工艺条件对带鱼酶解产物ACE抑制率的影响由大到

小表现为:加酶量、pH值、酶解温度,这与回归模型方差分析中的一次性显著性结果一致。

该模型预测最佳工艺条件为加酶量5 066.849 u/g,时间3 h,温度44.944 °C,pH 6.969,ACE抑制率的理论值为80.15%。结合实际操作,选取加酶量5 000 u/g,时间3 h,温度45 °C,pH 7.0进行验证,得到ACE抑制率为80.43%,IC<sub>50</sub>值为0.33 mg/mL与预测值接近,因此通过响应面优化带鱼ACE抑制肽制备工艺是可行的。

## 2.4 带鱼ACE抑制肽相对分子质量分布

标准品和带鱼ACE抑制肽的相对分子质量色谱图如图4所示。根据标准品的保留时间和相

对分子质量的对数绘制标准曲线,得到回归方程  $y = -0.2577x + 7.9062, R^2=0.9851$ 。根据该方程计算样品相对分子质量分布情况。结果显示,带鱼 ACE 抑制肽相对分子质量基本集中在 1 000 u 以

下,其中 618.9,237 u 的肽段分别占 48.51%,47.17%。说明优化后的工艺条件能够较为彻底的酶解带鱼,得到更多的小分子质量肽段。

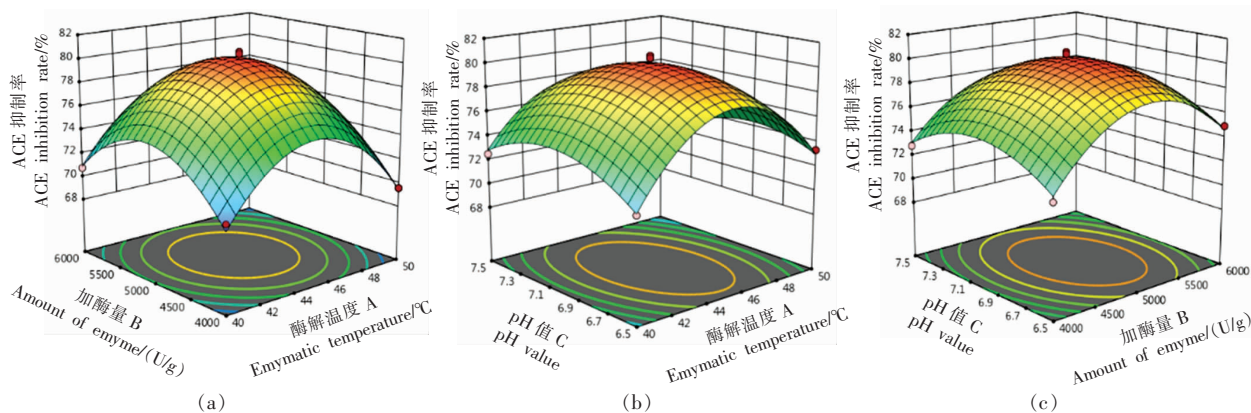


图 3 各因素交互作用对 ACE 抑制率的影响

Fig.3 Effect of interaction of various factors on ACE inhibition rate

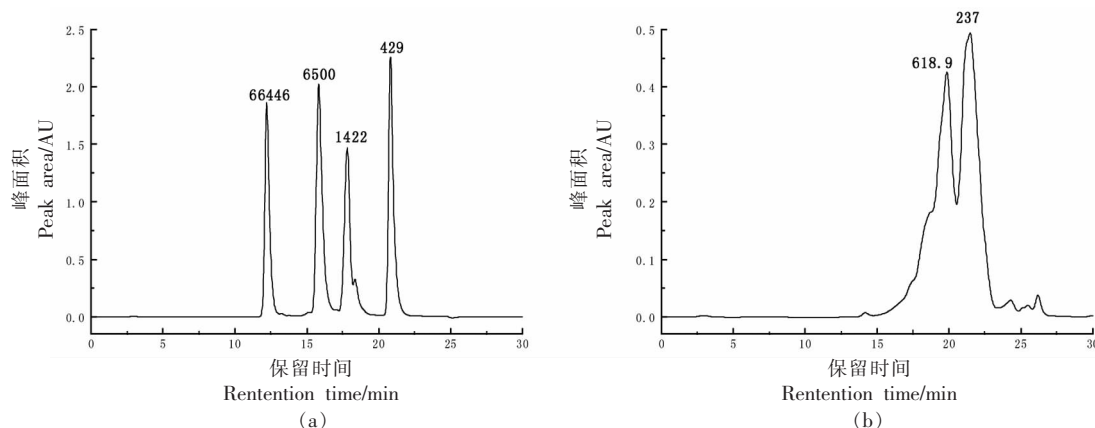


图 4 标准品(a)和带鱼 ACE 抑制肽(b)相对分子质量分布色谱图

Fig.4 Chromatography of relative molecular mass distribution of standards (a) and hairtail ACE inhibitory peptide (b)

## 2.5 带鱼 ACE 抑制肽氨基酸组成分析

由表 5 可知,带鱼 ACE 抑制肽中氨基酸种类丰富,其中谷氨酸含量最高。谷氨酸不仅是重要的鲜味氨基酸,是带鱼风味物质的来源,而且已被证明参与大脑多条代谢途径<sup>[26]</sup>。依据 FAO/WHO 的标准氨基酸理想模式,必需氨基酸的含量占总氨基酸的 40%左右,且必需氨基酸与非必需氨基酸的比值高于 60%,蛋白质为优质蛋白<sup>[27]</sup>。带鱼 ACE 抑制肽的必需氨基酸占总氨基酸的 40.91%,且必需氨基酸与非必需氨基酸的比值为 69.24%,接近

理想模式。据研究报道,多肽的生物活性与氨基酸组成相关,其中 ACE 抑制活性与疏水性氨基酸的含量正相关<sup>[28]</sup>。带鱼 ACE 抑制肽中疏水性氨基酸含量为 36.72 g/100 g,具有极大的 ACE 抑制潜力,有望通过进一步的研究(如分离纯化)得到更高活性的 ACE 抑制肽。

## 2.6 分离纯化

根据 Lee 等<sup>[29]</sup>的研究,低分子质量肽具有更高的 ACE 抑制活性,且带鱼 ACE 抑制肽分子质量集中在 1 000 u 以下,因此直接使用 1 000 u 的超

表5 带鱼 ACE 抑制肽氨基酸组成

Table 5 Amino acid composition of hairtail ACE inhibitory peptide

氨基酸		氨基酸含量/ (g/100g)
必需氨基酸(EAA)	苏氨酸(Thr)	4.18
	缬氨酸(Val)	4.30
	蛋氨酸(Met)	2.94
	异亮氨酸(Ile)	4.18
	亮氨酸(Leu)	7.27
	苯丙氨酸(Phe)	3.37
	赖氨酸(Lys)	8.68
	天冬氨酸(Asp)	8.49
非必需氨基酸(NEAA)	谷氨酸(Glu)	14.74
	甘氨酸(Gly)	5.11
	丙氨酸(Ala)	5.87
	丝氨酸(Ser)	3.66
	酪氨酸(Tyr)	3.08
	组氨酸(His)	1.83
	精氨酸(Arg)	3.97
	脯氨酸(Pro)	3.68
	胱氨酸(Cys)	—
	鲜味氨基酸	40.66
	疏水氨基酸	36.72
EAA	34.92	
NEAA	50.43	
总计(TAA)	85.35	
EAA/NEAA/%	69.24	
EAA/TAA/%	40.91	

注：鲜味氨基酸：Glu、Asp、Phe、Ala、Gly、Tyr；疏水性氨基酸：Gly、Met、Phe、Val、Leu、Ile、Pro、Ala；—表示未检出。

滤膜过滤,收集滤液备用。Prep-HPLC 将滤液进一步分离为 5 个组分(图 5a),收集这些组分并分别测其 ACE 抑制率,计算  $IC_{50}$ (图 5b)。组分 5(保留时间 30.2~31.8 min)表现出最强的 ACE 抑制活性, $IC_{50}$  值为 0.11 mg/mL。Prep-HPLC 是根据多肽的亲水性将其分离,亲水性的多肽先洗脱,疏水性多肽后洗脱<sup>[30]</sup>。组分 5 在 Prep-HPLC 中后期收集,因此疏水性氨基酸含量较高,这与 Rui 等<sup>[31]</sup>和 Tao 等<sup>[32]</sup>的研究结果一致。

### 3 结论

以带鱼为原料,ACE 抑制率和水解度为评价

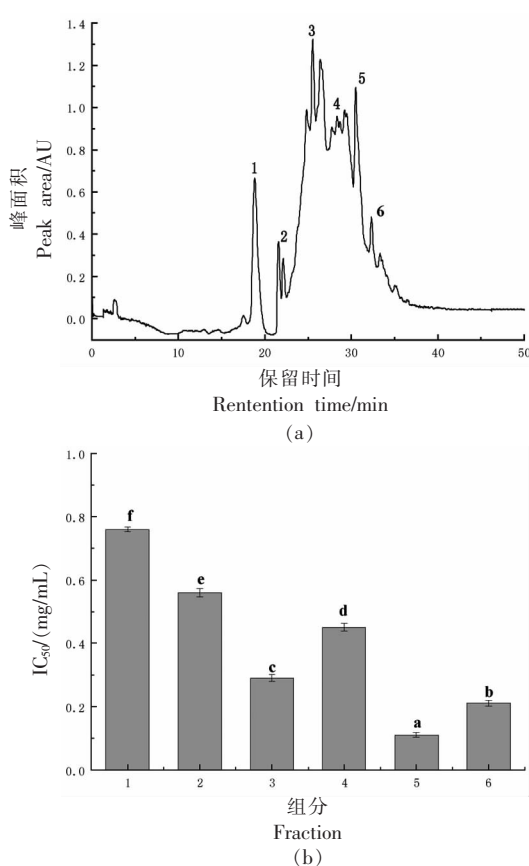


图5 Prep-HPLC 色谱以及各组分  $IC_{50}$   
Fig.5 Chromatography of Prep-HPLC and  $IC_{50}$   
of each fraction

指标,通过对复合蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶和木瓜蛋白酶等 5 种蛋白酶进行筛选,得到最佳蛋白酶为复合蛋白酶,并使用单因素试验以及响应面优化工艺条件。结果表明,最佳工艺条件为温度 45 °C、加酶量 5 000 u/g、pH 7.0、时间 3 h,此条件下 ACE 抑制率达 80.33%, $IC_{50}$  值为 0.33 mg/mL。工艺条件优化后制备的带鱼 ACE 抑制肽分子质量集中于 1 000 u 以下,且鲜味氨基酸和疏水性氨基酸含量较高,必需氨基酸与非必需氨基酸组成模式理想。通过超滤和 Prep-HPLC 进一步分离纯化带鱼 ACE 抑制肽,得到活性更高的组分, $IC_{50}$  值为 0.11 mg/mL。本研究为酶解法制备带鱼 ACE 抑制肽提供了理论依据和参考,带鱼 ACE 抑制肽活性高,在功能性食品领域有极大的应用前景。但本试验只是对 ACE 抑制肽的制备以及分离纯化进行了研究,多肽的进一步鉴定以及体内降血压机制有待深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] ABDELHEDI O, NASRI M. Basic and recent advances in marine antihypertensive peptides: Production, structure-activity relationship and bioavailability [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 88: 543-557.
- [2] CABALLERO J. Considerations for docking of selective angiotensin-converting enzyme inhibitors [J]. Molecules, 2020, 25(2): 295-314.
- [3] LEE S Y, HUR S J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants [J]. Food Chemistry, 2017, 228: 506-517.
- [4] DIAZ-GOMEZ J L, CASTORENA-TORRES F, PRECIADO-ORTIZ R E, et al. Anti-cancer activity of maize bioactive peptides [J]. Frontiers in Chemistry, 2017, 5: 1-8.
- [5] FERREIRA S H. A Bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of bothrops jararaca [J]. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy, 1965, 24: 163-169.
- [6] GUO Y, WANG K, WU B, et al. Production of ACE inhibitory peptides from corn germ meal by an enzymatic membrane reactor with a novel gradient diafiltration feeding working-mode and *in vivo* evaluation of antihypertensive effect [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 64: 103584.
- [7] BRAVO R K D, ANGELIA M R N, UY L Y C, et al. Isolation, purification and characterization of the antibacterial, antihypertensive and antioxidative properties of the bioactive peptides in the purified and proteolyzed major storage protein of pigeon pea (*Cajanus cajan*) seeds [J]. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2022, 4: 100062.
- [8] 裴璞花, 安传相, 刘晓燕, 等. 酶解核桃蛋白制备降血压肽的工艺优化 [J]. 食品研究与开发, 2018, 39(14): 69-75.
- PEI P H, AN C X, LIU X Y, et al. Enzymatic preparation of antihypertensive peptides from walnut protein [J]. Food Research and Development, 2018, 39(14): 69-75.
- [9] QUADROS C D, LATORRES J M, MICHELON M, et al. Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioactive properties of Mullet (*Mugil liza*) peptides [J]. Journal of Aquatic Food Product Technology, 2022, 31(9): 965-976.
- [10] WINDARTO S, LEE M C, NURSYAM H, et al. First report of screening of novel angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from the red alga *Acrochaetium* sp [J]. Marine Biotechnology, 2022, 24(5): 882-894.
- [11] RENDON-ROSALE M A, TORRES-LLANEZ M J, MAZORRA-MANZANO M A, et al. *In vitro* and *in silico* evaluation of multifunctional properties of bioactive synthetic peptides identified in milk fermented with *Lactococcus lactis* NRRL B-50571 and NRRL B-50572 [J]. LWT, 2022, 154: 112581.
- [12] FAO. The state of world fisheries and aquaculture 2018. Rome: Meeting the sustainable development goals, 2018.
- [13] 王晓玲, 张玉清, 贺延茏, 等. 带鱼蛋白水解肽-金属配合物制备工艺 [J]. 食品工业, 2019, 40(7): 77-80.
- WANG X L, ZHANG Y Q, HE Y L, et al. The preparation technology of hairtail hydrolyzed peptides-metal complexes [J]. The Food Industry, 2019, 40(7): 77-80.
- [14] 丁冬各. 带鱼抗氧化肽和高F值寡肽制备工艺研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2016.
- DING D G. Studies on the preparation and purification of antioxidant-peptide and high fischer ratio oligo-peptide from hairtail [D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2016.
- [15] ALAVI F, JAMSHIDIAN M, REZAEI K. Applying native proteases from melon to hydrolyze kilka fish proteins (*Clupeonella cultriventris caspia*) compared to commercial enzyme Alcalase [J]. Food Chemistry, 2019, 277: 314-322.
- [16] 林慧敏. 带鱼下脚料酶解小肽亚铁螯合物结构鉴定及其生物活性研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- LIN H M. Study on structure identification and biological activity of enzymolyzed hairtail and ferrous chelated small peptides [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2012.
- [17] WU J, ALUKO R E, MUIR A D. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 950(1/2): 125-130.
- [18] QUAISIE J, MA H, GUO Y, et al. Highly stable,



- antihypertensive, and antioxidative peptide production from *Apostichopus japonicus* by integrated enzymatic membrane reactor and nanofilter-purification mechanism[J]. *Food & Function*, 2022, 13(4): 2306-2322.
- [19] LU P Y, WANG J, WU S G, et al. Standardized ileal digestible amino acid and metabolizable energy content of wheat from different origins and the effect of exogenous xylanase on their determination in broilers[J]. *Poultry Science*, 2020, 99(2): 992-1000.
- [20] 徐永霞, 曲诗瑶, 李涛, 等. 不同蛋白酶对蓝蛤酶解液风味特性的影响[J]. *食品科学*, 2021, 42(4): 190-196.
- XU Y X, QU S Y, LI T, et al. Effects of different proteases on the flavor characteristics of aloididae aloidi muscle hydrolysates[J]. *Food Science*, 2021, 42(4): 190-196.
- [21] 刘静波, 王子秦, 于一丁, 等. 响应面法优化豆粕肽制备工艺[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(8): 216-223.
- LIU J B, WANG Z Q, WANG Y D, et al. Optimization of preparation technology of soybean meal peptides by response surface methodology[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(8): 216-223.
- [22] 任海伟, 石菊芬, 蔡亚玲, 等. 响应面法优化超声辅助酶解制备藏系羊胎盘肽工艺及抗氧化能力分析[J]. *食品科学*, 2019, 40(24): 265-273.
- REN H W, SHI J F, CAI Y L, et al. Peptides from Tibetan sheep placental protein: Optimization of ultrasound-assisted enzymatic preparation using response surface methodology and antioxidant activity evaluation[J]. *Food Science*, 2019, 40(24): 265-273.
- [23] 涂丹, 张益奇, 林亚楠, 等. 热处理对鱼鳞蛋白酶解特性的影响[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(3): 149-155.
- TU D, ZHANG Y Q, LIN Y N, et al. Effects of heating treatment on enzymolysis characteristics of fish scale protein[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(3): 149-155.
- [24] 甘文梅, 张炜, 田格, 等. 响应面法优化牦牛骨胶原蛋白的提取工艺研究[J]. *化学研究与应用*, 2020, 32(9): 1535-1540.
- GAN W M, ZHANG W, TIAN G, et al. Optimization of extraction technology of bone collagen in yak by response surface method[J]. *Chemical Research and Application*, 2020, 32(9): 1535-1540.
- [25] 王睿, 负建民, 何奎, 等. 双孢菇边角料制备 ACE 抑制肽[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(1): 125-134.
- WANG R, YUN J M, HE K, et al. Preparation of ACE inhibitory peptide from scraps of *Agaricus bis-pours*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(1): 125-134.
- [26] WANG Z, CHEN W H, LI S X, et al. Gut microbiota modulates the inflammatory response and cognitive impairment induced by sleep deprivation[J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(11): 6277-6292.
- [27] 徐世涛, 朱秋劲, 熊延敏, 等. 单-双酶法提取的苏麻多肽的呈味及氨基酸分析[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(3): 235-241.
- XU S T, ZHU Q J, XIONG Y M, et al. Analysis of taste components and amino acid of Suma polypeptides extracted by single-dual enzymatic hydrolysis[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(3): 235-241.
- [28] 蒋爽. ACE 抑制肽的设计与抗酶解、抑制机理的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- JIANG S. Study on the design, enzyme-resistant activity and inhibition mechanism of ACE inhibitory peptides[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2014.
- [29] LEE J K, JEON J K, BYUN H G. Effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate[J]. *Food Chemistry*, 2011, 125(2): 495-499.
- [30] ZHANG M, MU T H. Identification and characterization of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by alcalase under high hydrostatic pressure[J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2017, 43: 92-101.
- [31] RUI X, BOYE J I, SIMPSON B K, et al. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides of small red bean (*Phaseolus vulgaris*) hydrolysates[J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(3): 1116-1124.
- [32] TAO M, WANG C, LIAO D, et al. Purification, modification and inhibition mechanism of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein hydrolysate[J]. *Process Biochemistry*, 2017, 54: 172-179.

## Enzymatic Preparation, Isolation and Purification of ACE Inhibitory Peptide from Hairtail

Bai Xue, Dong Ye, Hu Xuejia, Dai Zhiyuan\*

(*Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012*)

**Abstract** In order to utilize the hairtail resources effectively and prepare high-quality angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide, the most suitable protease for the preparation of hairtail ACE inhibitory peptide was screened using ACE inhibition rate and hydrolysis degree as evaluation indexes. The enzymatic process conditions were optimized by single factor and response surface. The optimized hairtail ACE inhibitory peptide was analyzed for molecular weight and amino acid composition. The ACE inhibitory peptide was further purified by ultrafiltration and Prep-HPLC, and the active fraction with the highest ACE inhibition rate was obtained. The results showed that the protemax was the best protease for the preparing ACE inhibitory peptide, and the optimized process parameters were obtained as follows: enzymatic hydrolysis time of 3 h, hydrolysis temperature of 45 °C, enzyme dosage 5 000 U/g and pH 7.0. Under this condition, the theoretical ACE inhibition rate was 80.15%, the actual value was 80.43%, and the  $IC_{50}$  was 0.33 mg/mL. The relative molecular weight of the ACE inhibitory peptide was mainly distributed below 1 000 u. The amino acid composition pattern of the hairtail ACE inhibitory peptide was reasonable, with high content of fresh and hydrophobic amino acids. The six fractions were separated by ultrafiltration and Prep-HPLC, and the highest activity was obtained for fraction 5 with an  $IC_{50}$  of 0.11 mg/mL. This study provides a theoretical basis for the application of hairtail in functional foods for hypertension.

**Keywords** hairtail; response surface; ACE inhibitory peptide; purification