

## 文蛤免疫活性肽酶解条件的优化及其活性研究

惠珍珍<sup>1,2</sup>, 李娜<sup>1,2</sup>, 王晓萱<sup>1,2</sup>, 孙舒扬<sup>1,3,4</sup>, 王平<sup>1,2</sup>, 杜超<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup> 鲁东大学食品工程学院 山东烟台 264025

<sup>2</sup> 鲁东大学生物纳米技术研究院 山东烟台 264025

<sup>3</sup> 烟台市预制食品纳米科学与技术重点实验室 山东烟台 264025

<sup>4</sup> 烟台市绿色食品加工与质量控制工程研究中心 山东烟台 264025)

**摘要** 目的:采用酶解法制备文蛤中的免疫活性肽(MLIP),优化酶解条件,并对其免疫活性进行研究。方法:选用5种常用蛋白酶对文蛤进行酶解,以酶解液对RAW264.7细胞的增殖效果为评价依据,筛选最适蛋白酶。然后进行单因素实验,并选择影响较显著的3个因素,通过响应面法对酶解条件进行优化,用优化的工艺参数制备MLIP。最后,探究不同质量浓度MLIP对RAW264.7细胞相对增殖率、细胞形态及一氧化氮(NO)释放量的影响。结果:复合蛋白酶为最适用酶,优化得到的最佳酶解工艺参数为:pH 6.8、料液比1:6.2、酶添加量3493 U/g,45℃酶解3h,预测得到的酶解产物对RAW264.7细胞的相对增殖率为71.40%,验证试验得到结果与之相近。当MLIP质量浓度为0.4 mg/mL时,细胞相对增殖率最高,不同质量浓度的MLIP会引起细胞不同程度的分化且对NO的释放有一定促进作用。结论:以文蛤为原料制备的多肽具有较好的免疫活性。本研究可为文蛤免疫活性肽的制备及其进一步研究提供参考。

**关键词** 免疫活性肽;酶解条件优化;RAW264.7细胞;相对增殖率

**文章编号** 1009-7848(2023)11-0161-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.11.016

文蛤(*Meretrix meretrix* Linnaeus)又称为蛤蜊,是重要的食用贝类之一,主要分布在我国沿海地区<sup>[1]</sup>。新鲜文蛤含水量约为85%,灰分含量约为1%,总糖含量约为2%,粗蛋白质含量约为11%,其中水溶性蛋白约占45%,可作为活性组分的良好来源<sup>[2]</sup>。文蛤多肽是文蛤提取物中重要的生物活性成分,近代研究发现,它具有抗氧化、抗肿瘤、消除炎症、抗衰老,调节机体免疫功能等多种活性作用<sup>[3-5]</sup>。

免疫活性肽是指具有免疫活性的分子质量相对较小的寡肽。免疫活性肽的种类较多,包括从动植物组织器官中和微生物体内提取的生物活性肽、食源性蛋白质酶解生成的一些寡肽,以及利用化学法合成或DNA重组来生成的一些寡肽等<sup>[6-8]</sup>。目前免疫活性肽制备最常用方法是酶解法,这是因为酶解法的生产条件比较温和、安全性较高的同时又具有价格优势,且专一性强。He等<sup>[9]</sup>采用碱

性蛋白酶对波纹巴非蛤进行酶解,得到的最佳酶解条件为温度51℃,时间3.14h,酶添加量4321 U/g。刘静波等<sup>[10]</sup>用5种蛋白酶对豆粕进行酶解,筛选出复合蛋白酶为最佳用酶,并对其制备工艺进行优化,当底物质量浓度0.04 g/mL,加1%的酶,调节pH值至6.5时在50℃酶解7h,豆粕肽得率最高。胡旭阳等<sup>[11]</sup>利用日本黄姑鱼鱼肉制备多肽,确定最适用酶为木瓜蛋白酶,经过优化得到当料液比1:11,pH 6,于59℃酶解5.4h时,所得多肽对RAW264.7细胞的相对增殖率近62%。

本研究是酶解文蛤以制备免疫活性肽,先筛选最适用酶,然后对酶解条件进行优化,从而确定文蛤免疫活性肽的最佳制备条件,并对其免疫活性进行研究,为文蛤蛋白制备新型免疫活性肽提供参考依据。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 材料、试剂与amp;主要仪器

文蛤,山东省烟台市文化路市场;RAW264.7细胞(小鼠单核巨噬细胞白血病细胞),中国科学院细胞库;碱性蛋白酶、复合蛋白酶,北京Solarbio公司;木瓜蛋白酶,上海生物工程公司;胃蛋白酶、

收稿日期:2023-06-26

基金项目:山东省自然科学基金青年项目(ZR2020QC239);

2021年山东省高等学校“青创人才引育计划”项目

第一作者:惠珍珍,女,硕士生

通信作者:杜超 E-mail: ruindu@163.com

胰蛋白酶,美国 Sigma 公司;DMEM 培养基、胎牛血清,武汉普诺赛公司;CCK-8 试剂盒、一氧化氮(NO)试剂盒,碧云天生物技术有限公司。

## 1.2 仪器与设备

pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;酶标仪,瑞士帝肯集团公司;二氧化碳培养箱,美国 Thermo Fisher 公司;荧光倒置显微镜,卡尔蔡司(上海)管理有限公司。

## 1.3 方法

1.3.1 文蛤初始酶解条件 文蛤去壳后于匀浆机内搅成肉糜,取 5 g 文蛤肉糜,以料液比 1:6 加入相应溶液,对 pH 值进行调节后预热到对应水解的温度,再加入蛋白酶随后酶解 3 h,酶解结束,高温灭酶 15 min,冷却、5 000 r/min 离心 20 min,取上清液备用。

1.3.2 最适蛋白酶的筛选 参考白仁奥<sup>[12]</sup>、André 等<sup>[13]</sup>的酶解条件略作修改,分别用 5 种蛋白酶对文蛤匀浆进行酶解。利用 CCK-8 法检测不同酶解产物对细胞相对增殖率的影响,筛选出最适蛋白酶。酶解条件见表 1。

表 1 蛋白酶水解条件  
Table 1 Hydrolysis conditions of protease

	温度/℃	pH 值	酶添加量
碱性蛋白酶	50	9.0	2 600 U/g
复合蛋白酶	45	7.0	3 600 U/g
木瓜蛋白酶	50	6.5	4 000 U/g
胃蛋白酶	37	3.0	2 000 U/mL
胰蛋白酶	37	7.0	100 U/mL

1.3.3 酶解条件的单因素实验 以料液比 1:6、酶解时间 3 h、温度 45 ℃、pH 7.0、酶添加量 3 600 U/g 为基本条件,分别对酶添加量(2 600, 3 100, 3 600, 4 100, 4 600 U/g)、温度(35, 40, 45, 50, 55 ℃)、pH(5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0)、酶解时间(2, 3, 4, 5, 6 h)、料液比(1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10)5 个因素进行优化,最终以酶解产物对细胞相对增殖率的影响作为评价依据。

1.3.4 响应面优化试验 对单因素实验结果进行分析,选择 3 个影响较显著酶解条件,进行响应面优化,并对优化得到的结果进行验证。

1.3.5 细胞培养 利用含 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基,5% CO<sub>2</sub>、37 ℃下培养细胞<sup>[14]</sup>。

1.3.6 CCK-8 法测细胞增殖率 细胞密度 2.5×10<sup>5</sup> cells/mL,每孔 200 μL 加入 96 孔板中,培养 24 h 后弃上清。样品组加入一定浓度的样品,空白组加等体积的无血清培养基,培养 8 h 后用 CCK-8 法测相对增殖率,用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度值<sup>[15]</sup>。细胞相对增殖率(Relative growth rate, RGR)按式(1)计算结果:

$$\text{细胞相对增殖率}(\%)=(A-A_0)/A_0 \times 100 \quad (1)$$

式中,A——样品组吸光度,A<sub>0</sub>——空白组吸光度。

1.3.7 不同质量浓度 MLIP 对细胞相对增殖率的影响 参考 1.3.6 节的密度接种细胞,培养 24 h 后弃上清,设样品组和空白组,样品组加入不同质量浓度的 MLIP (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/mL),分别培养 8 h 和 24 h 后利用 CCK-8 法测定相对增殖率<sup>[16]</sup>。

1.3.8 细胞形态学观察 参考 1.3.6 节的方法将稀释好的细胞按每孔 1 mL 加入 12 孔板,培养 24 h 后弃上清,设样品组和空白组,样品组加入不同质量浓度的 MLIP,继续培养 24 h 后,利用倒置显微镜,进行细胞形态变化的观察及拍照<sup>[17]</sup>。

1.3.9 不同质量浓度 MLIP 对细胞 NO 释放量的影响 参考 1.3.6 节的方法将稀释好的细胞按每孔 200 μL 加入 96 孔板中,培养 24 h 后弃上清,样品组加入不同质量浓度的 MLIP,对照组加入 1 μg/mL 脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS),同时设空白组,继续培养 24 h,将各孔中的细胞上清液收集后,参考试剂盒说明书,通过酶标仪测定吸光度值,计算 NO 的释放量<sup>[18]</sup>。

1.3.10 数据统计分析 SPSS 27.0 软件进行显著性分析,Design-Expert V8.0.6 软件进行响应面模拟分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 蛋白酶的筛选

如图 1 所示,酶解产物对细胞增殖率最高的是复合蛋白酶,其后依次为碱性蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、木瓜蛋白酶。因此选择复合蛋白酶为最适蛋白酶。

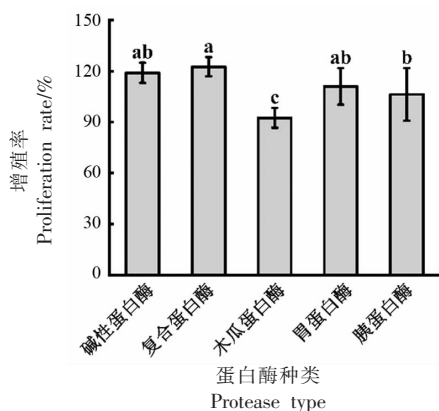
## 2.2 单因素实验结果

2.2.1 酶添加量对细胞相对增殖率的影响 如图 2 所示, 酶添加量为 2 600 U/g 到 3 600 U/g 时, 文蛤多肽对细胞的相对增殖率是越来越高的, 酶添加量达到 3 600 U/g 时, 文蛤多肽对细胞的相对增殖率最高, 这是因为酶添加量的增加, 会使酶与底物蛋白之间的相互作用增强<sup>[19]</sup>。随着酶加入量的不断提高, 文蛤多肽对细胞的相对增殖率不再随着酶加入量的提高而提高, 而是呈现出了降低的趋势, 这可能与所产生的多肽再一次被酶分解有关<sup>[20]</sup>。因而最适酶添加量选择 3 600 U/g。

2.2.2 pH 值对细胞相对增殖率的影响 如图 3 所示, pH 值从 5.0 到 9.0, 文蛤多肽对细胞的相对增殖率先升高, 当 pH 值为 7.0 时达到最高, 随后

又降低。这是因为每一种蛋白酶都有一个最适合的 pH 值范围, pH 值的变化会导致酶的作用位点产生变化, 从而直接对酶解反应产生影响<sup>[21]</sup>。因此, 酶解的最佳 pH 值选择 7.0。

2.2.3 酶解温度对细胞相对增殖率的影响 如图 4 所示, 当温度从 35 °C 升高到 55 °C 时, 文蛤多肽对细胞相对增殖率逐渐升高, 当酶解温度为 45 °C 时, 细胞相对增殖率最高, 而后有降低的趋势。这是由于在一定的温度范围内, 温度的升高会加速分子的运动速度, 因此, 酶与底物反应速率开始增加, 这对制备免疫活性肽有利<sup>[22]</sup>。然而, 如果温度太高, 则会使蛋白酶活力下降, 对免疫活性肽的制备不利<sup>[23]</sup>。因此, 最佳酶解温度选择 45 °C。



注: 不同小写字母表示组间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图 1 不同蛋白酶酶解液对细胞增殖率的影响

Fig.1 Effects of different protease enzymolysis solution on cell proliferation rate

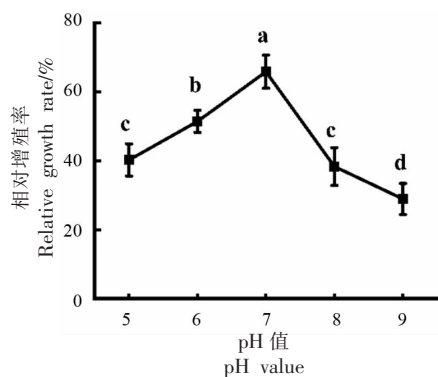
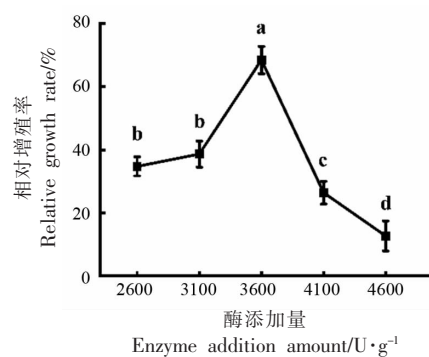


图 3 pH 值对细胞相对增殖率的影响

Fig.3 Effects of pH value on cell relative proliferation rate



注: 不同小写字母表示有组间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 下同。

图 2 酶添加量对细胞相对增殖率的影响

Fig.2 Effects of enzyme additive amount on cell relative proliferation rate

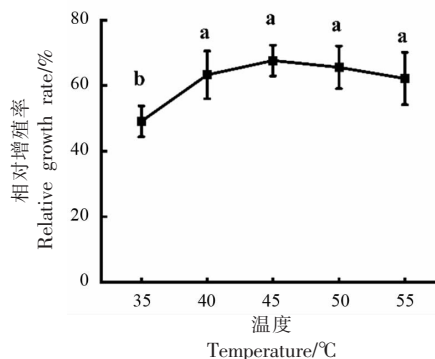


图 4 温度对细胞相对增殖率的影响

Fig.4 Effects of temperature on cell relative proliferation rate

2.2.4 酶解时间对细胞相对增殖率的影响 如图5所示,当时间在2~3 h时,文蛤多肽对细胞的相对增殖率是升高的,3 h时达到最高。超过3 h后,文蛤多肽对细胞的相对增殖率呈现逐渐降低的趋势。推测主要原因是随着酶解时间延长,所得到的产物会继续被分解,使有效活性成分减少,进而造成细胞相对增殖率反而下降<sup>[24]</sup>。故选择酶解时间为3 h左右。

2.2.5 料液比对细胞的相对增殖率的影响 如图6所示,当料液比在1:4~1:8范围内时,文蛤多肽对细胞的增殖作用先上升,当料液比为1:6时,细

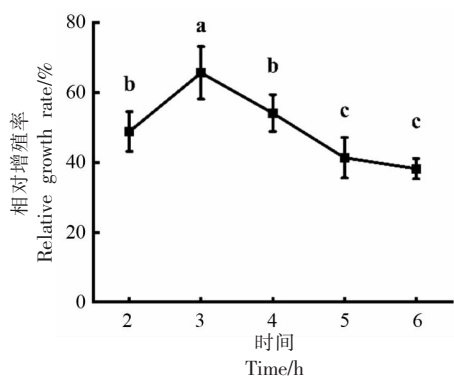


图5 时间对细胞相对增殖率的影响

Fig.5 Effects of time on cell relative proliferation rate

胞相对增殖率达到最大,随后又逐渐下降。基于文献资料推断:料液比较小时,酶与底物的接触将更加充分,酶解的程度也将越来越大;随着料液比的增加,底物被过度稀释,酶解产物浓度也会随之下降,从而对细胞相对增殖率产生影响<sup>[25-26]</sup>。因此,最佳料液比选择1:6。

单因素结果表明,最适酶解条件是:料液比1:6,酶添加量3 600 U/g时,pH 7.0,温度45℃,酶解3 h。经SPSS分析,酶添加量、pH值和料液比对酶解产物的免疫活性影响较显著,因此选择这3个因素进行进一步优化。

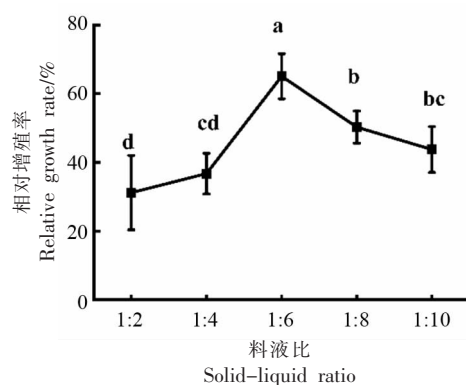


图6 料液比对细胞相对增殖率的影响

Fig.6 Effects of solid-liquid ratio on cell relative proliferation rate

## 2.3 响应面优化

2.3.1 响应面因素与水平表 单因素结果表明,本试验最适酶添加量为3 600 U/g,pH值为7.0,料液比为1:6,选择合适的范围,对响应面因素与水平表进行设计(表2)。

2.3.2 响应面优化试验结果 利用软件 Design-Expert V8.0.6 对表3进行数据分析,得到结果如表4所示。响应值选择细胞相对增殖率,经回归拟合,得到模型的回归方程: $Y = -903.57341 + 0.25411A + 121.46336B + 39.92297C + 0.010118AB + 2.41912 \times 10^{-3}AC - 0.98036BC - 4.83084 \times 10^{-5}A^2 - 11.16623B^2 - 3.34436C^2$ 。

回归方程中各变量所对应的P值越小,则相应的变量显著程度越高<sup>[27]</sup>。如表4所示,回归模型 $P < 0.001$ ,说明该模型极显著;一次项中,A、B影响极显著,C影响显著。由F值大小可得,3个因素对细胞相对增殖率影响的顺序是, $B > A > C$ ;相互

表2 响应面因素与水平

因素	水平		
	-1	0	1
酶添加量(A)/U·g <sup>-1</sup>	3 100	3 600	4 100
pH值(B)	6.0	7.0	8.0
料液比(C)	1:4	1:6	1:8

作用AB极显著( $P < 0.01$ );失拟项不显著( $P = 0.2883 > 0.05$ ), $R^2 = 0.9801$ 说明回归方程拟合度好,该模型成立。

2.3.3 各因素交互作用对RAW264.7细胞增殖率的影响 固定一个变量,考察其余2个变量对细胞增殖率的影响来绘制响应面图,结果如图7所示。如果响应面底部的等高线图呈椭圆形,说明该变量交互作用显著<sup>[28]</sup>。结果表明,酶添加量与料液比的交互作用最强,与方差分析中的结果一致。



表 3 响应面设计及结果

Table 3 Response surface design and results

试验组别	因素			相对增殖率/%	试验组别	因素			相对增殖率/%
	酶添加量 (A)	pH 值 (B)	料液比 (C)			酶添加量 (A)	pH 值 (B)	料液比 (C)	
1	1	-1	0	47.55	10	0	0	0	71.95
2	0	1	1	46.26	11	0	1	-1	43.59
3	0	0	0	70.82	12	-1	0	-1	53.26
4	0	0	0	72.60	13	-1	0	1	54.93
5	0	-1	-1	47.61	14	-1	-1	0	62.18
6	-1	1	0	42.73	15	0	-1	1	58.12
7	1	0	-1	36.20	16	0	0	0	76.52
8	1	0	1	37.14	17	1	1	0	48.33
9	0	0	0	75.31					

表 4 回归模型方差分析

Table 4 Variance analysis of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	2 629.82	9	292.2	38.26	<0.0001	***
A	140.06	1	140.06	18.34	0.0036	**
B	149.32	1	149.32	19.55	0.0031	**
C	85.74	1	85.74	11.23	0.0122	*
AB	102.38	1	102.38	13.4	0.0081	**
AC	23.41	1	23.41	3.06	0.1235	-
BC	15.38	1	15.38	2.01	0.1989	-
A <sup>2</sup>	614.13	1	614.13	80.41	<0.0001	***
B <sup>2</sup>	524.99	1	524.99	68.74	<0.0001	***
C <sup>2</sup>	753.5	1	753.5	98.65	<0.0001	***
误差	53.46	7	7.64	-	-	-
失拟项	30.64	3	10.21	1.79	0.2883	-
纯误差	22.82	4	5.71	-	-	-
总值	2 683.29	16	-	-	-	-

注：\*，差异显著(P<0.05)；\*\*，差异极显著(P<0.01)；\*\*\*，差异高度显著(P<0.001)。

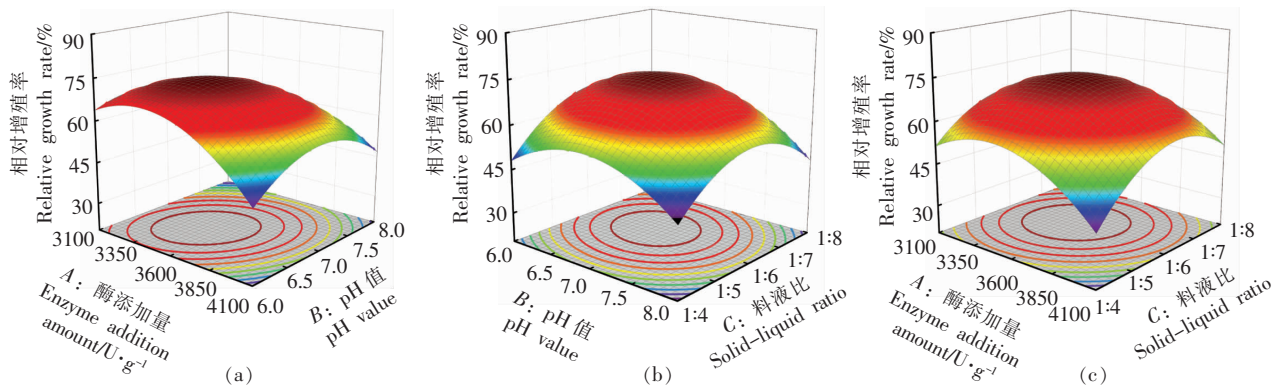


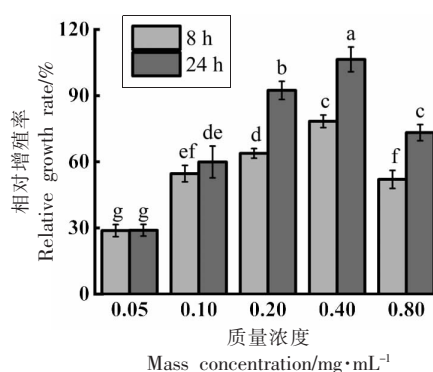
图 7 各因子交互作用的曲面图

Fig.7 Surface diagram of interaction of various factors

2.3.4 验证试验 响应面优化出的最优酶解条件为:酶添加量 3 493.03 U/g,pH 6.75,料液比 1:6.24,RAW264.7 细胞相对增殖率为 71.395%。由于需要考虑实际操作的准确性与可行性,故确定最佳的制备条件为:酶添加量 3 500 U/g,pH 6.8,料液比为 1:6.2。该条件下经过 3 次平行试验,测得 RAW264.7 细胞相对增殖率为 71.75%,与理论值基本吻合,说明响应面分析法对文蛤免疫活性肽的制备条件优化是可行的。

## 2.4 MLIP 免疫活性的研究

2.4.1 不同质量浓度 MLIP 对 RAW264.7 细胞相对增殖率的影响 由图 8 可以看出,不同质量浓度的 MLIP 对 RAW264.7 细胞的相对增殖均有一定的促进作用,当 MLIP 质量浓度为 0.4 mg/mL 时,MLIP 对 RAW264.7 细胞的相对增殖率最高,且存在一定的时间效应。MLIP 作用 24 h 后对 RAW264.7 细胞的增殖率将近 110%。叶旺盛等<sup>[29]</sup>利用青蛤制备免疫活性肽,得到的酶解产物对 RAW264.7 细胞的相对增殖率将近 80%,董晓泽等<sup>[30]</sup>利用日本黄姑鱼鱼皮制备免疫活性肽,得到的酶解产物 RAW264.7 细胞的相对增殖率将近 60%。



注:不同小写字母表示组间存在显著性差异( $P<0.05$ )。

图 8 不同质量浓度 MLIP 对 RAW264.7 细胞相对增殖率的影响

Fig.8 Effects of MLIP at different mass concentration on the relative proliferation rate of RAW264.7 cells

2.4.2 细胞形态观察 图 9 所示为不同质量浓度的 MLIP 对 RAW264.7 细胞形态的影响,空白组细胞成团生长,而经过 MLIP 处理的细胞数量和形态都发生了明显变化,在数量上相比空白组明显增多,随着 MLIP 质量浓度的增大,细胞数量增多越明显,同时发生了不同程度的分化。当 MLIP 质量浓度达到 0.8 mg/mL 时,大部分细胞已经分化。与叶蕾等<sup>[31]</sup>的研究中文蛤寡肽高剂量组会导致细胞分化的结果一致。

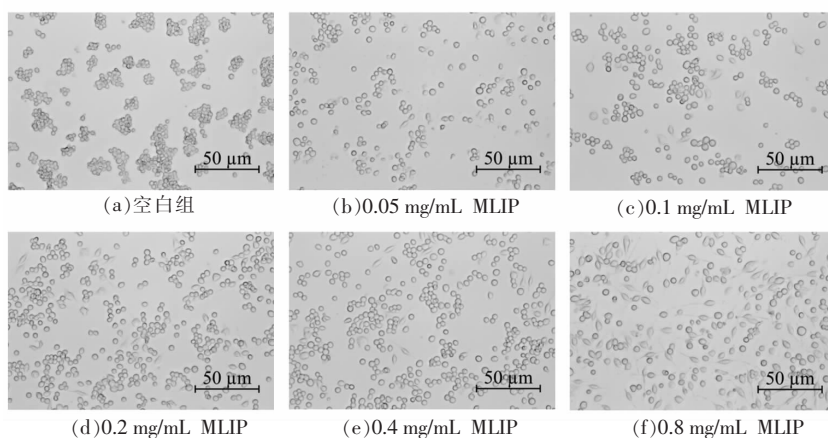


图 9 不同质量浓度 MLIP 对 RAW264.7 细胞形态的影响

Fig.9 Effects of MLIP at different mass concentrations on the cell morphology of RAW264.7 cells

2.4.3 不同质量浓度 MLIP 对 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响 LPS 可以刺激机体导致机体产生免疫反应,会使 RAW264.7 细胞被激活从而释放 NO。而 NO 是一种信号传导介质,它可以参

与一系列生理和病理代谢<sup>[32]</sup>。图 10 为不同质量浓度 MLIP 对 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响,当加入不同质量浓度的 MLIP 进行作用,NO 的释放量相比空白组有明显的增加,随着 MLIP 质量浓

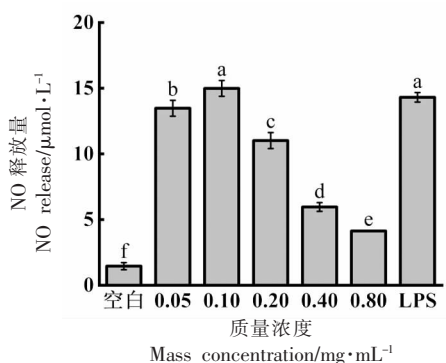


图 10 不同质量浓度 MLIP 对 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响

Fig.10 Effects of different mass concentrations of MLIP on NO release from RAW264.7 cells

度的增加,细胞的 NO 的释放量先增加后减少,当 MLIP 质量浓度为 0.1 mg/mL 时,NO 释放量达到最大值,甚至略高于 LPS 处理组,说明 MLIP 可以刺激 RAW264.7 细胞释放 NO,进而激活细胞发生免疫反应。

### 3 结论

根据试验结果分析,得到的结果为,制备文蛤免疫活性肽的最适蛋白酶是复合蛋白酶。通过响应面试验确定文蛤免疫活性肽制备的最佳酶解条件为,酶添加量 3 493 U/g、料液比 1:6.2、pH 6.8。通过验证试验得到细胞相对增殖率为 71.75%,与模型预测值接近,证明应用响应面法优化制备文蛤多肽是可行的。细胞增殖、形态学观察和 NO 释放结果表明 MLIP 可以有效促进 RAW264.7 细胞的增殖,且对 NO 的释放有一定促进作用。本文的研究结果为文蛤免疫活性肽的制备提供了理论基础,为免疫活性肽的开发及文蛤的高值化利用提供了一定思路。

### 参 考 文 献

- [1] 刘保忠,王鸿霞,柴雪良,等. 文蛤“科浙2号”[J]. 中国水产, 2022, 555(2): 107-111.  
LIU B Z, WANG H X, CHAI X L, et al. *Meretrix meretrix* Linnaeus 'Kezhe No.2'[J]. China Fisheries, 2022, 555(2): 107-111.
- [2] 唐小艳,郑惠娜,章超桦,等. 文蛤蛋白质组成分析及其分子量分布研究[J]. 食品工业科技, 2015,

36(22): 362-366.

- TANG X Y, ZHENG H N, ZHANG C H, et al. Protein composition analysis and molecular weight distribution of *Meretrix lusoria*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(22): 362-366.
- [3] LIU Z Y, ZHOU D Y, WU Z X, et al. Extraction and detailed characterization of phospholipid-enriched oils from six species of edible clams [J]. Food Chemistry, 2018, 239: 1175-1181.
  - [4] XU B T, GUO M Y, LI M, et al. Mere15, a novel polypeptide from *Meretrix meretrix*, inhibits proliferation and metastasis of human non-small cell lung cancer cells through regulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Neoplasma, 2021, 68(6): 1181-1189.
  - [5] 赵莎莎,赵玉勤,张亚茹,等. 文蛤多肽的制备及对非酒精性脂肪肝细胞模型的修复作用[J]. 中国食品学报, 2017, 17(6): 33-39.  
ZHAO S S, ZHAO Y Q, ZHANG Y R, et al. Preparation of NAFLD cell model repair polypeptide from *Meretrix meretrix*[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(6): 33-39.
  - [6] 李富强,张廷新,朱丽萍,等. 食物蛋白源免疫调节肽研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(1): 308-314.  
LI F Q, ZHANG T X, ZHU L P, et al. Advance of immunomodulatory peptides from dietary-protein source[J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(1): 308-314.
  - [7] 傅丽娟,邢路娟,张万刚. 食源性抗炎活性肽的研究进展[J]. 中国食品学报, 2022, 22(8): 343-352.  
FU L J, XING L J, ZHANG W G. Research progress on food derived anti-inflammatory peptides [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(8): 343-352.
  - [8] MARIA DEL C D H, ANABEL S D, MABEL H C, et al. A peptide derived from HSP60 reduces proinflammatory cytokines and soluble mediators: A therapeutic approach to inflammation[J]. Frontiers in Immunology, 2023, 14: 1162739.
  - [9] HE X Q, CAO W H, PAN G K, et al. Enzymatic hydrolysis optimization of *Paphia undulata* and lymphocyte proliferation activity of the isolated peptide fractions[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2015, 95(7): 1544-1553.

- [10] 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, YU 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.
- [11] 胡旭阳, 李维, 孔祥东, 等. 响应面法优化日本黄姑鱼鱼肉免疫活性肽的提取工艺[J]. 食品工业科技, 2019, 40(17): 173-178.  
HU X Y, LI W, KONG X D, et al. Optimization of extraction technology of immunologically active peptides from *Nibea japonica* by response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(17): 173-178.
- [12] 白仁奥. 酶法制备文蛤活性多肽的研究[D]. 厦门: 集美大学, 2013.  
BAI R A. Study on the preparation of active peptides from *Meretrix Meretrix* Linnaeu protein by enzymolysis[D]. Xiamen: Jimei University, 2013.
- [13] ANDRÉ B, LOTTI E, MARIE A, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion[J]. Nature Protocols, 2019, 14(4): 991-1014.
- [14] PORNPUN A, WARISARA R, SIRINTIP P, et al. The immunomodulatory activity of levan in RAW264.7 macrophage varies with its molecular weights[J]. Food Bioscience, 2023, 53: 102721.
- [15] MOUMITA H, MUKUL N, YASHVEER S. Supramolecular, nanostructured assembly of antioxidant and antibacterial peptides conjugated to naproxen and indomethacin for the selective inhibition of COX-2, biofilm, and inflammation in chronic wounds[J]. Bioconjugate Chemistry, 2023, 34(4): 645-663.
- [16] PATEL D, AMAR S, ZHENBIN L, et al. Identification and molecular mechanisms of novel antioxidative peptides from fermented camel milk (Ka chchi breed, India) with anti-inflammatory activity in raw macrophages cell lines[J]. International Journal of Dairy Technology, 2023, 76(1): 111-125.
- [17] 于莹, 宿小杰, 周德庆, 等. 响应面法优化紫贻贝免疫活性肽的制备工艺[J]. 中国海洋药物, 2021, 40(6): 21-29.  
YU Y, SU X J, ZHOU D Q, et al. Optimization of preparation technology of immunomodulatory peptides from *Mytilus edulis* by response surface methodology[J]. Chinese Journal of Marine Drugs, 2021, 40(6): 21-29.
- [18] CHAO L, JIAO S. Modulation of the secretion of mesenchymal stem cell immunoregulatory factors by hydrolyzed fish collagen[J]. Experimental and therapeutic medicine, 2020, 20(1): 375-384.
- [19] GUANGJIE A, MENG YA W, ZHANGCUN W, et al. Effects of enzymolysis method on the preparation of peptides from wheat flour[J]. Food Bioscience, 2022, 49: 101956.
- [20] LIU H, CHEN W, LI R T. Research on complex enzyme system to extract *Hibiscus sabdariffa* L. reducing sugar[J]. Food Science and Technology, 2022, 42: 1-8.
- [21] WEDAD Q, SAM A D, ANWAR N, et al. Response surface modeling and optimization of enzymolysis parameters for the *in vitro* antidiabetic activities of peanut protein hydrolysates prepared using two proteases[J]. Foods, 2022, 11(3303): 3303
- [22] XU L N, GUO S, LI Y T, et al. Ultrasound-assisted enzymatic extraction and bioactivity analysis of polypeptides from *Cordyceps militaris*[J]. Journal of Chemistry, 2023, 2023: 1-11.
- [23] LIN Y Y, PI J J, JIN P Y, et al. Enzyme and microwave co-assisted extraction, structural characterization and antioxidant activity of polysaccharides from purple-heart radish[J]. Food Chemistry, 2022, 372: 1-12.
- [24] CHEN Y, LIU Y H, CAO L P, et al. Oligosaccharide preparation from microwave-ethanol pretreated *Camellia oleifera* seed shell by enzymolysis of *Agrocybe aegerita* [J]. Industrial Crops & Products, 2021, 161: 113155.
- [25] WANG Y T, YAN M X, QIN R Q, et al. Enzymolysis-microwave-assisted hydrodistillation for extraction of volatile oil from *Atractylodes chinensis* and its hypoglycemic activity *in vitro*[J]. Journal of AOAC International, 2021, 104(4): 1196-1205.
- [26] ZENG Y, LI W N, LIUY, et al. Antifreeze peptides preparation from tilapia skin and evaluation of its cryoprotective effect on *Lactocaseibacillus rhamnosus*[J]. Foods, 2022, 11(857): 857.
- [27] 牛金鸽, 吴海玥, 马世科, 等. 响应面优化藏羊皮胶原蛋白肽超声辅助提取工艺及其体内抗氧化活性



- 分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(11): 163-170.
- NIU J G, WU H Y, MA S K, et al. Optimization of ultrasonic assisted extraction of Tibetan sheep skin collagen peptide by response surface methodology and its antioxidant activity *in vivo*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(11): 163-170.
- [28] 孙小飞, 罗国瑞, 李英美, 等. 仿刺参精酶解工艺的优化及酶解液的抗氧化活性[J]. 中国食品学报, 2022, 22(4): 217-224.
- SUN X F, LUO G R, LI Y M, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of *Apostichopus japonicus* Sperm and antioxidant activity of hydrolysate [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2022, 22(4): 217-224.
- [29] 叶盛旺, 杨最素, 李维, 等. 青蛤免疫调节肽的酶解制备工艺研究[J]. 食品工业, 2018, 39(5): 1-4.
- YE S W, YANG Z S, LI W, et al. Process optimization for preparation of immunoregulatory peptides from *Cyclina sinensis* by enzymatic hydrolysis[J]. The Food Industry, 2018, 39(5): 1-4.
- [30] 董晓泽, 徐书敏, 王丽君, 等. 日本黄姑鱼鱼皮免疫活性肽的酶解制备工艺研究[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2020, 39(2): 110-116.
- DONG X Z, XU S M, WANG L J, et al. Process optimization for preparation of immunoregulatory peptides from *Nibea japonica* by enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Zhejiang Ocean University: Natural Science, 2020, 39(2): 110-116.
- [31] 叶蕾, 阎洁, 张文, 等. 文蛤寡肽对 RAW264.7 细胞的免疫调节作用[J]. 水产学报, 2019, 43(2): 410-418.
- YE L, YAN J, ZHANG W, et al. Immunomodulatory effects of *Meretrix meretrix* oligopeptides on RAW264.7 cells[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(2): 410-418.
- [32] LIU Z D, LIU Z F, LI L H, et al. Immunomodulatory effects of the polysaccharide from *Sinonovacula constricta* on RAW264.7 macrophage cells[J]. Food Science & Nutrition, 2022, 10(4): 1093-1102.

### Studies on Optimization of Enzymatic Hydrolysis Conditions of Immunoactive Peptides from *Meretrix meretrix* Linnaeus and It's Activity

Hui Zhenzhen<sup>1,2</sup>, Li Na<sup>1,2</sup>, Wang Xiaoxuan<sup>1,2</sup>, Sun Shuyang<sup>1,3,4</sup>, Wang Ping<sup>1,2</sup>, Du Chao<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>School of Food Engineering, Ludong University, Yantai 264025, Shandong

<sup>2</sup>Bionanotechnology Institute, Ludong University, Yantai 264025, Shandong

<sup>3</sup>Yantai Key Laboratory of Nanoscience and Technology for Prepared Food, Yantai 264025, Shandong

<sup>4</sup>Yantai Engineering Research Center of Green Food Processing and Quality Control, Yantai 264025, Shandong

**Abstract** Objective: The main purpose of this paper was to prepare the immunoactive peptides from *Meretrix meretrix* Linnaeus (MLIP) by enzymatic hydrolysis, optimize the enzymolysis conditions of MLIP, and studied its immune activity. Method: MLIP was used as raw material, and five commonly used proteases were chosen to hydrolyze. The proliferation rate of RAW264.7 cells was selected as an indicator to screen the most suitable protease for enzymolysis solution. Then, the single factor test was carried out, and three factors with significant impact were selected to optimize the enzymolysis conditions by response surface method, and MLIP was prepared with the optimized process parameters. In addition, this research also studied the effects of different concentrations of MLIP on the relative proliferation rate, cell morphology and NO release of RAW264.7 cells. Results: The proliferation rate results showed that complex protease was the most suitable enzyme to prepare MLIP. The optimal enzymatic parameters obtained by response surface optimization were: pH 6.8, solid-liquid ratio 1:6.2, enzyme dosage 3 493 U/g, enzymolysis at 45 °C for 3 hours. The relative proliferation rate of RAW264.7 cells was predicted to be 71.40%, which were basically the same with the results obtained by verification experiment. In addition, RAW264.7 cells showed the best proliferation promoting effect when the concentration of MLIP was 0.4 mg/mL. All dose of MLIP caused differentiation to varying degrees of cell differentiation and had a certain promoting effect on the release of NO of RAW264.7 cells. Conclusion: The results indicated that the MLIP exhibit desirable immune activity, which might provide reference for the preparation and further study of the MLIP.

**Keywords** immunoactive peptide; optimization of enzymatic hydrolysis conditions; RAW264.7 cells; relative growth rate