

徐远芳, 王馨怡, 刘悦, 等. 超声波辅助黄鳍金枪鱼免疫活性肽酶解工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(2): 168–174. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030011

XU Yuanfang, WANG Xinyi, LIU Yue, et al. Optimization of Ultrasound-Assisted Enzymatic Hydrolysis of Immune Peptides from *Thunnus albacores* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(2): 168–174. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030011

· 工艺技术 ·

超声波辅助黄鳍金枪鱼免疫活性肽酶解工艺优化

徐远芳¹, 王馨怡¹, 刘悦¹, 杜童申¹, 杨华¹, 张慧恩¹, 王燕², 沈存宽^{1,*}

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江宁波 315100;

2. 宁波海关技术中心, 浙江宁波 315048)

摘要: 本文以黄鳍金枪鱼肉为原料, 通过超声波辅助酶解黄鳍金枪鱼肉制备免疫活性肽。以小鼠巨噬细胞相对增殖率为指标, 筛选出最适蛋白酶为胰蛋白酶, 并在单因素实验基础上, 通过响应面优化试验确定了黄鳍金枪鱼肉的酶解条件。结果表明, 酶解时间 5 h、酶解温度 37.6 °C、超声波时间为 11 min, 在此条件下, 小鼠巨噬细胞的相对增殖率最佳, 为 43.04%±2.03%, 与线性回归模型的预测值相近。对最佳酶解条件下的黄鳍金枪鱼免疫活性肽进行氨基酸组成与分子量分析, 其必需氨基酸为 41.42%±1.24%, 疏水氨基酸含量为 26.49%±0.79%, 分子量集中分布在 4.7~6.5 kDa。研究结果为黄鳍金枪鱼的高值化利用提供了理论指导与技术支持。

关键词: 黄鳍金枪鱼, 超声波, 酶解法, 免疫活性肽

中图分类号: TS254

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)02-0168-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023030011

本文网刊:



Optimization of Ultrasound-Assisted Enzymatic Hydrolysis of Immune Peptides from *Thunnus albacores*

XU Yuanfang¹, WANG Xinyi¹, LIU Yue¹, DU Tongshen¹, YANG Hua¹, ZHANG Hui'en¹, WANG Yan², SHEN Cunkuan^{1,*}

(1. College of Biological & Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. Ningbo Customs Technology Center, Ningbo 315048, China)

Abstract: Immunomodulatory peptide was prepared from *Thunnus albacores* meat assisted by ultrasonic wave. Trypsin was found to be the most suitable protease based on the relative proliferation rate of mouse macrophages. The hydrolysis conditions were determined through response surface optimization experiments. Results showed that, the optimal parameters were as follows: 5 h of enzymolysis time, 37.6 °C of temperature, and 11 min of ultrasonic time, where the relative proliferation rate of macrophages was 40.04%±2.03%. The amino acid composition and molecular weight of the peptide were also analyzed. The results showed that the essential amino acid content was 41.42%±1.24%, the hydrophobic amino acid content was 26.49%±0.79%, and the molecular weight was concentrated in 4.7~6.5 kDa. The research results would provide the theoretical and technical support for high value utilization of yellowfin tuna.

Key words: *Thunnus albacores*; ultrasound; enzymolysis approach; immune active peptide

黄鳍金枪鱼是一种大型鱼类, 具有高度洄游特性, 为无国界鱼类^[1]。我国是金枪鱼制品的生产大

国, 据《2022 中国渔业统计年鉴》统计, 我国海洋捕捞产量逐年提高, 达到了 3387.2 万吨^[2]。在金枪鱼加

收稿日期: 2023-03-02

基金项目: 浙江省重点研发计划 (2019C02071); 国家海洋局项目 (NBHY-2017-S2); 宁波市公益项目 (202002N3114)。

作者简介: 徐远芳 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品工程与营养, E-mail: 516827612@qq.com。

* 通信作者: 沈存宽 (1992-), 男, 博士, 讲师, 研究方向: 食品科学, E-mail: shenck2022@zww.edu.cn。

工过程中,产生大量的副产物同样拥有丰富的营养物质,例如氨基酸、牛磺酸、维生素与矿物质等,是开发各种功能性食品的优质原料。因此研究如何利用金枪鱼的加工副产物,对实现水产资源的高值化应用具有重要意义。

免疫活性肽是一类具有调节机体免疫力的小分子多肽,具有生物活性高、稳定性强、免疫原性弱等特点^[3-4]。另一方面,酶解法的条件温和、转移性强,是当前从鱼类蛋白中制备免疫活性肽的主要方法^[5-6]。有研究证明免疫活性肽具有刺激小鼠巨噬细胞增殖并增强吞噬作用等功能^[4,7-8],例如 LIU 等^[7]从玉米蛋白中提取出 5 种多肽,并利用人巨噬细胞中白细胞介素 6 作为标记,鉴定出 FLPPNQL 的活性最高。李桂芬等^[9]通过酶解法制备金枪鱼蛋白抗痛风活性肽,结果显示该抗痛风肽有着良好的 XOD 抑制率。超声波是一种具有能量和波动的双重机械波^[10],将超声波与酶解反应结合,可以提高酶解反应的速度从而缩短酶解时间^[11],但目前将超声波工艺与金枪鱼免疫活性肽的制备相结合的研究未见报道,所以本研究以黄鳍金枪鱼肉作为研究对象,首先通过比较酶解产物对小鼠巨噬细胞相对增殖率的影响,从胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶、碱性蛋白酶中筛选出最适蛋白酶,然后在单因素实验基础上结合超声波辅助,采用响应面试验优化水解工艺,确定制备金枪鱼肉免疫活性肽的最优酶解条件,旨在为黄鳍金枪鱼资源的进一步高值化开发利用提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

黄鳍金枪鱼 宁波今日食品提供; Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒 上海宏叶生物科技有限公司; 中性蛋白酶(5000 U/g)、酸性蛋白酶(5000 U/g)、碱性蛋白酶(200000 U/g)、胰蛋白酶(250000 U/g)、木瓜蛋白酶(100000 U/g)、无菌磷酸盐缓冲液(PBS)、低糖 DMEM 培养基 美国 Gibco 公司; 氢氧化钠(NaOH)、盐酸(HCl) 国药集团化学试剂有限公司; 杆菌肽、牛血清白蛋白、溶菌酶 上海博升生物科技有限公司; 重组人工胰岛素 上海麦克林生化科技股份有限公司; 小鼠单核巨噬细胞(RAW264.7) 中科院上海细胞所。

DKS-24 磁力搅拌水浴锅 常州市伟嘉仪器制造有限公司; CF16RX II 超低温高速离心机 日本 HITACHI 公司; 超声波清洗机 广州市科洁盟实验仪器有限公司; Forma 3111CO₂ 细胞培养箱 美国 Thermo 公司; CX31 倒置显微镜 日本 OLYMPUS 公司; PHS-29A 数显酸度计 上海虹益仪器有限公司; ZHJH-C1109C 超净工作台 上海智诚分析仪器制造公司; Spectra Max 酶标仪 美国 Bio-Rad 公司; LCJ-25C 真空冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂有限公司产品; HITACHI L-8900 氨基酸自动分析仪 日本 Hitachi 公司; UPLC-ELSD 高效液相色谱

仪 美国 Waters 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 样品预处理

取黄鳍金枪鱼碎肉中白肉部分,在无水的条件下用碎肉机搅碎后形成肉糜,去除筋膜部分,将其纯肉糜用塑封袋分装置于-60 ℃ 冰箱冷冻备用。

1.2.2 金枪鱼肉一般营养成分的测定

水分: 参考 GB 5009.3-2016 中的直接干燥法^[12]; 脂肪含量: 参考 GB 5009.6-2016 中的索氏提取法^[13]; 灰分: 参考 GB 5009.4-2016 中的高温灰化法^[14]; 蛋白质含量: 参考 GB 5009.5-2016 中的凯氏定氮法^[15]。

1.2.3 金枪鱼肉酶解最适蛋白酶的筛选

参考胡旭阳^[16]报道的方法并稍作修改,首先利用 0.1 mol/L 的 NaOH 与 HCl 按照表 1 中 pH 配制成相应的缓冲溶液,按照料液比 1:5 加入上述得到的金枪鱼肉糜,搅匀至金枪鱼肉糜匀浆液后,再分别加入酶添加量为 6000 U/g 的胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、酸性蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶按照最适酶解温度进行酶解。酶解反应参数如表 1 所示,在磁力搅拌水浴锅中酶解 6 h 后,沸水浴 15 min 灭酶,冷却至室温后离心收集上清液。真空冷冻干燥得酶解物冻干粉,置于-60 ℃ 冰箱中保存。采用 CCK-8 法测定五种酶解产物对小鼠单核巨噬细胞相对增殖率,筛选出最适蛋白酶。

表 1 不同蛋白酶酶解条件
Table 1 Respond surface experimental design and results

蛋白酶	pH	酶解温度(℃)
木瓜蛋白酶	7	60
胰蛋白酶	8	37
酸性蛋白酶	2	37
中性蛋白酶	8	50
碱性蛋白酶	10	50

1.2.4 酶解制备单因素实验

1.2.4.1 最适酶解时间筛选

实验设置 4、5、6、7、8 h 的 5 个酶解时间。按照 1.2.3 的实验步骤,以改变酶解时间为条件进行最适酶解时间筛选。

1.2.4.2 最适酶解温度筛选

实验设置 17、27、37、47、57 ℃ 的 5 个酶解温度。按照 1.2.3 的实验步骤,以改变酶解温度为条件进行最适酶解温度筛选。

1.2.4.3 最适超声时间筛选

参考周燕芳等^[10]的方法设置 1、10、20、30、40 min 的 5 个超声时间,按照 1.2.3 的实验步骤,将胰蛋白酶配制的金枪鱼肉匀液置于 120 W 超声波处理不同时间后,再酶解 6 h 进行最适超声波辅助酶解的时间筛选。

1.2.5 响应面试验

在单因素实验结果的基础上,以酶解时间、酶解温度、超声时间为优化因素,以小鼠巨噬细胞相对增殖率为响应值,设计三因素三水平 Box-Behnken 响应面优化试验,优化胰蛋白酶制备金

枪鱼肉免疫活性肽的最佳酶解工艺,实验因素水平如表 2 所示。

表 2 响应面试验因素与水平设计
Table 2 Factor and levels in response surface experiment

水平	因素		
	A 超声时间(min)	B 酶解时间(h)	C 酶解温度(℃)
-1	5	4.5	32
0	10	5	37
1	15	5.5	42

1.2.6 小鼠巨噬细胞的相对增殖率的测定 CCK-8 法是测定细胞增殖或毒性实验中活细胞数目的一种高灵敏度、无放射性的比色检测法^[17],其原理为能将活细胞中的脱氢酶还原为黄色甲瓊产物,甲瓊产物数量与活细胞成正比。收集对数生长周期的 RAW264.7 细胞,调节细胞密度为 1×10^5 个/mL,取 100 μ L 接种于 96 孔板中,每组设置 5 个复孔。为防止边缘效应,在 96 孔板最外圈每孔加入 100 μ L 的无菌(PBS)进行封边处理^[18],于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 孵箱中进行培养,24 h 后每孔均去上清液,空白对照组加入 100 μ L 的完全培养基(含有 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基),实验组加入 100 μ L 浓度为 200 μ g/mL 的样品溶液,继续培养 24 h 后再加入 10 μ L CCK-8,再置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱培养 4 h 后,于酶标仪测定其在 492 nm 处的吸光值,并根据公式(1)计算出小鼠巨噬细胞的相对增殖率。

$$X(\%) = \frac{A_1 - A_0}{A_0} \times 100 \quad \text{式 (1)}$$

式中: X 为细胞相对增殖率(%); A_1 为实验组在 492 nm 的吸光值; A_0 为空白组在 492 nm 处的吸光值。

1.2.7 氨基酸含量测定 样品中的氨基酸组成含量根据 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》^[19] 的方法进行测定。

1.2.8 分子量分布分析

1.2.8.1 测定条件 色谱柱为 BioCore-SEC-15 凝胶柱(7.8 $\times$ 300 mm, 0.5 μ m)。流动相为 150 mmol/mL 磷酸盐缓冲溶液;检测波长为 220 nm;进样量为 20 μ L;柱温为 25 $^{\circ}$ C,流速:0.6 mL/min。

1.2.8.2 分子量校正曲线 标准品为杆菌肽(M: 1422)、牛血清白蛋白(M: 66.200)、重组人胰岛素(M: 5808)、溶菌酶(M: 14400)溶解于流动相配制成 0.5 mg/mL 过滤后进样,得到标准品色谱图。以标准品的 $\lg \text{Mw}(y)$ 与洗脱时间(x)所做出的标准曲线为 $(y = -2.134x^2 + 47.754x - 31.260, R^2 = 0.903346)$ 。

1.2.8.3 样品分子量的确定 将样品溶解于流动相中,配制浓度为 0.5 mg/mL 后过滤进样,将色谱图中每个峰的保留时间代入标准曲线中计算出样品分子量大小与不同分子量所占的比例。

1.3 数据处理

所有实验至少平行 3 次,采用 IBM SPSS Statistics 25 对数据进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示存在显著性差异,Design-Expert 10.0 软件进行响应面设计,Graphpad Prism 8 进行数据处理及绘图。

2 结果与分析

2.1 黄鳍金枪鱼鱼肉的营养成分

黄鳍金枪鱼鱼肉的一般营养成分结果为水分含量: $72.3\% \pm 1.8\%$,灰分含量 $1.26\% \pm 0.05\%$,蛋白质含量: $26.95\% \pm 0.9\%$,脂肪含量: $0.049\% \pm 0.001\%$ 。该结果与洪鹏志等^[20]对黄鳍金枪的营养成分的测定结果相似。黄鳍金枪鱼鱼肉蛋白质含量高,具有作为原料进行后续酶解制备免疫活性肽的价值。

2.2 最适蛋白酶筛选

本文采用 CCK-8 法测定五种蛋白酶多肽对于小鼠巨噬细胞的相对增殖率的影响。分别选择木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶、中性蛋白酶与酸性蛋白酶对金枪鱼肉进行酶解实验研究,结果如图 1 所示,在不改变其他条件,只改变蛋白酶种类的情况下,不同蛋白酶的酶解产物对小鼠巨噬细胞的增殖率有着显著影响。其中胰蛋白酶的酶解产物对细胞的相对增殖率显著高于其他蛋白酶($P < 0.05$),可达 35.61%,这与巫楚君等^[21]利用五种蛋白酶金枪鱼肉进行酶解后,以小鼠巨噬细胞相对增殖率、NO 生成能力以及吞噬能力为指标所得出的最佳蛋白酶的结果一致。经酸性蛋白酶酶解后,其酶解产物对细胞相对增殖率最低为 6.12%,显著低于其余四组蛋白酶($P < 0.05$)。故本研究选择胰蛋白酶水解制备金枪鱼肉免疫活性肽。

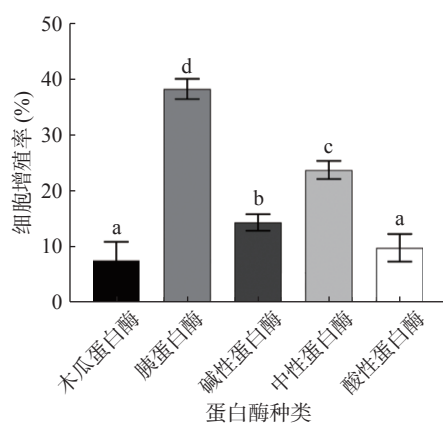


图 1 不同蛋白酶对金枪鱼酶解产物对小鼠巨噬细胞相对增殖率的影响

Fig.1 Effects of different proteases on the relative proliferation rate of mouse macrophages induced by tuna hydrolysate

注:不同小写字母表示不同蛋白酶在相同样品浓度下存在显著性差异($P < 0.05$),图 2~图 4 同。

2.3 单因素实验结果

2.3.1 酶解时间对小鼠巨噬细胞相对增殖率的影响

图 2 表示酶解时间对酶解产物对小鼠巨噬细胞相

对增殖率影响的结果。酶解时间从 4 h 到 5 h 时, 酶解多肽的免疫活性逐渐升高, 当酶解时间为 5 h 时, 小鼠巨噬细胞的相对增殖率达到了最高为 47.14%; 当酶解时间在 5 h 后, 小鼠巨噬细胞的相对增殖率逐渐下降。可能的原因是由于伴随酶解时间的延长, 一些具有免疫活性的多肽链会被再次酶解, 导致其丧失活性结构^[22-23]。故选择酶解时间为 4.5、5、5.5 h 进行后续响应面优化试验。

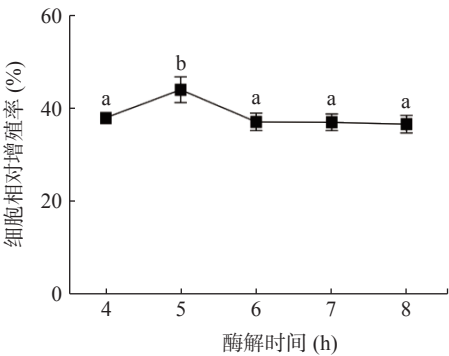


图 2 酶解时间对金枪鱼鱼肉酶解产物对小鼠巨噬细胞相对增殖率的影响

Fig.2 Effects of enzymolysis time on the relative proliferation rate of mouse macrophages induced by enzymolysis products of tuna fish

2.3.2 酶解温度对小鼠巨噬细胞相对增殖率的影响

图 3 表示酶解温度对酶解产物对小鼠巨噬细胞相对增殖率的影响。酶解产物的免疫活性随温度升高呈现先上升后下降的趋势, 当酶解温度在 17~27 ℃ 时, 细胞增殖率随着温度的上升而上升; 当酶解温度为 37 ℃ 时, 其促进小鼠巨噬细胞增殖率达到了最高, 为 37.10%, 原因是胰蛋白酶的最适合温度为 37 ℃, 蛋白鱼肉非共价键与二硫键逐渐断裂, 使更多的酶切位点逐渐暴露^[24], 从而产生更多的免疫活性肽; 当酶解温度继续升高时, 过高的温度会导致蛋白质容易变性, 使其酶活力下降从而不利于鱼肉糜的水解^[22]。因此, 选择酶解温度为 32、37、42 ℃ 进行后续响应面优化试验。

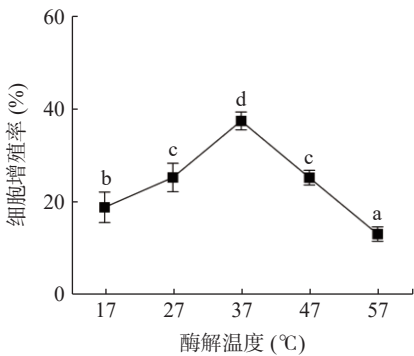


图 3 酶解温度对金枪鱼鱼肉酶解产物对小鼠巨噬细胞相对增殖率的影响

Fig.3 Effects of enzymolysis temperature on the relative proliferation rate of mouse macrophages induced by enzymolysis products of tuna fish

2.3.3 超声时间对小鼠巨噬细胞相对增殖率的影响

如图 4 表示不同超声时间下的酶解产物对小鼠巨噬细胞相对增殖率的影响。酶解产物的免疫活性在超声时间为 10 min 时达到了最大值, 为 44.56%; 在 10 min 后迅速下降, 之后趋于平缓, 这与 SENER 等^[25]结果相似。超声时间会影响到超声空化效应的产生和持续, 超声时间过长会抑制蛋白酶的活性^[11]。故选择超声时间 5、10、15 min 为后续实验条件。

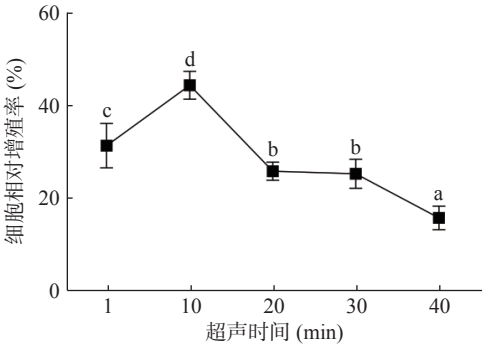


图 4 超声时间对金枪鱼鱼肉酶解产物对小鼠巨噬细胞相对增殖率的影响

Fig.4 Effect of ultrasonic time on the relative proliferation rate of mouse macrophages induced by enzymolysis of tuna meat

2.4 响应面优化试验结果

2.4.1 响应面优化试验结果 利用 Design-Expert 10.0 软件对表 3 数据进行响应面试验, 以小鼠巨噬细胞相对增殖率为响应值进行分析, 得到结果如表 3 所示, 各因素经过多元二次回归拟合后, 得到回归方程为: $Y=41.20+4.45A+2.00B+1.28C+2.75AB-0.8875AC+2.57BC-11.94A^2-5.87B^2-6.21C^2$ 。

表 3 响应面试验设计及结果				
Table 3 Respond surface experimental design and results				
实验号	A超声时间 (min)	B酶解时间 (h)	C酶解温度 (℃)	细胞相对增殖率 (%)
1	10	4.5	42	27.62±0.83
2	10	5.5	32	25.48±0.92
3	10	5	37	40.52±1.99
4	5	5	42	19.12±0.95
5	10	4.5	32	29.84±1.39
6	5	5	32	15.14±0.75
7	10	5	37	41.72±1.99
8	5	5.5	37	21.28±1.03
9	10	5	37	43.97±2.07
10	10	5.5	42	33.55±1.53
11	15	5	32	28.76±1.32
12	15	5.5	37	32.72±1.52
13	10	5	37	39.71±1.88
14	5	4.5	37	19.55±0.93
15	15	4.5	37	19.99±0.89
16	15	5	42	29.19±1.33
17	10	5	37	40.10±1.92

对模型进行显著性分析结果见表 4, 结果所示, 模型 $P<0.01$, 表明该模型极显著。同时, 该模型失拟项 $P=0.1514$, 表明失拟不显著, 在试验中没有失拟因素; 其决定系数 $R^2=0.9594$ 、 $R^2_{Adj}=0.9124$, 说明该模

型可以充分拟合超声时间、酶解时间、酶解温度与小鼠巨噬细胞之间的相互关系,因此可以用该回归方程确定金枪鱼最佳酶解条件。

表 4 回归模型方差分析
Table 4 ANOVA of regression equation

项目	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	1152.89	9	128.1	15.76	0.0016	**
A-超声时间	158.15	1	158.15	19.46	0.0045	**
B-酶解时间	32.12	1	32.12	3.95	0.094	
C-酶解温度	13.16	1	13.16	1.62	0.2504	
AB	30.25	1	30.25	3.72	0.102	
AC	3.15	1	3.15	0.3876	0.5565	
BC	26.47	1	26.47	3.26	0.1212	
A ²	583.95	1	583.95	71.83	0.0001	**
B ²	144.6	1	144.6	17.79	0.0056	
C ²	161.04	1	161.04	19.81	0.0043	*
残差	48.77	6	8.13			
失拟	38.46	3	12.82	3.73	0.1541	
误差	10.31	3	3.44			
总和	1201.66	15				

$$R^2=0.9594 \quad R^2_{Adj}=0.9124$$

注: * $P<0.05$ 为差异显著; ** $P<0.01$ 为差异极显著。

2.4.2 响应面图交互作用分析 回归模型的响应面图如图 5 所示,该曲线图较为直观的反映了回归模型中各参数之间交互作用对小鼠巨噬细胞相对增殖率的影响^[26-28]。由图 5A 曲线图的曲面坡度陡峭与等高线封闭情况可以看出,当酶解温度固定不变时,

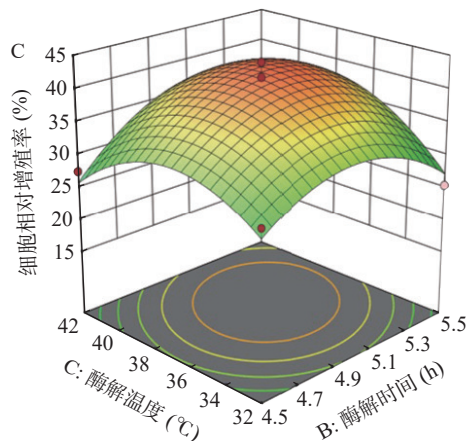


图 5 各因素交互作用的响应曲面图

Fig.5 Response surface diagrams for interaction of various factors

超声时间与酶解时间相互作用明显。当超声时间改变时,酶解时间对细胞相对增殖率的影响表现出不同程度的变化;当酶解时间改变时,超声时间对细胞相对增殖率的影响也表现出不同程度的变化。图 5B 所示,当酶解时间固定不变时,超声时间与酶解温度相互作用明显,其中超声时间对细胞增殖率的影响高于酶解温度。由图 5C 可以看出,当超声时间固定不变时,酶解温度与酶解时间两参数之间的交互作用不显著。

由回归模型分析得到的最佳酶解条件为超声时间 11.051 min、酶解时间 5.125 h、酶解温度 37.697 °C。在此条件下,金枪鱼肉多肽对小鼠巨噬细胞的相对增殖率的预测值为 42.011%。并考虑到实际操作情况,对该工艺进行修正,最终确定工艺参数为:超声时间 11 min、酶解时间为 5 h、酶解温度为 37 °C,对此进行细胞实验最终测的细胞相对增殖率为 43.039%±2.03%,与回归模型的预测值无显著差异($P>0.05$)。证明通过响应面优化条件对提取金枪鱼肉免疫活性肽较为可靠。

2.5 氨基酸组成分析

酶解多肽的氨基酸组成如表 5 所示。在检测的 16 种氨基酸中,谷氨酸含量最高,占总氨基酸含量的 17.91%±0.53%,组氨酸次之,占总氨基酸含量的 13.29%±0.39%。此外酶解多肽中必需氨基酸占总氨基酸含量 41.42%±1.24%,疏水氨基酸含量占总氨基酸的 26.49%±0.79%。氨基酸与人体免疫系统的组织、器官等发育的基本物质,参与免疫与炎症反应。有研究指出不同的氨基酸具有不同调节能力,例如天冬氨酸与谷氨酸可为免疫细胞供能^[29],组氨酸经过催化后生成的产物具有抗炎抗氧化作用^[30]。贺屹潮^[31]利用酸性蛋白酶制备大鲵肉酶解肽的进行氨基酸含量分析,结果显示其必须氨基酸含量为 32.5%,由此可见金枪鱼免疫活性肽的氨基酸含量更丰富。

2.6 分子量分布分析

酶解产物分子量分布如图 6 所示,金枪鱼免疫

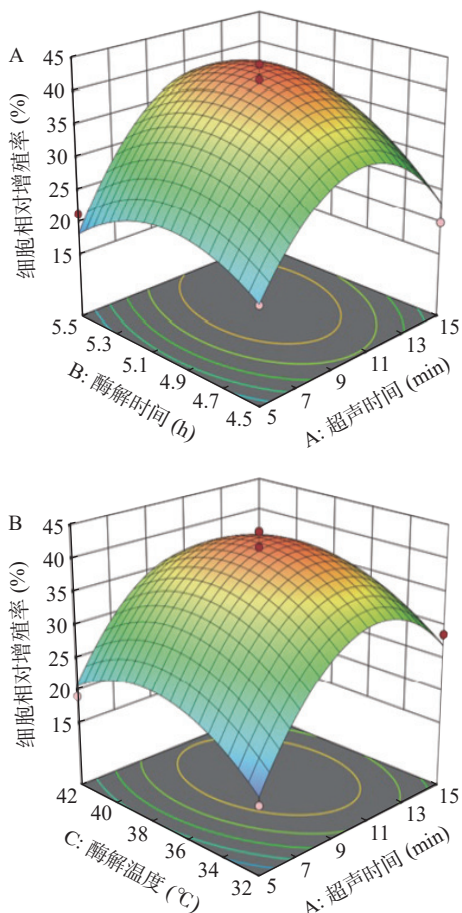


表 5 金枪鱼免疫活性肽的氨基酸组成
Table 5 Amino acid composition of immunoactive peptide in tuna

氨基酸种类	含量(g/100 g)	占比(%)
天冬氨酸(Asp)	5.57±0.16	9.35±0.28
苏氨酸(Thr*)	3.03±0.09	5.09±0.15
丝氨酸(Ser)	2.27±0.06	3.81±0.11
谷氨酸(Glu)	10.69±0.32	17.91±0.53
甘氨酸(Gly)	2.45±0.07	4.12±0.13
丙氨酸(Ala)	3.48±0.10	5.85±0.17
半胱氨酸(Cys)	0.82±0.02	1.38±0.04
缬氨酸(Val*)	2.44±0.07	4.10±0.12
蛋氨酸(Met)	1.47±0.04	2.47±0.07
异亮氨酸(Ile*)	2.13±0.06	3.58±0.1
亮氨酸(Leu*)	4.20±0.12	7.06±0.21
酪氨酸(Tyr)	1.58±0.04	2.65±0.07
苯丙氨酸(Phe*)	2.04±0.06	3.43±0.10
赖氨酸(Lys*)	5.93±0.17	9.96±0.29
组氨酸(His*)	7.91±0.23	13.29±0.39
精氨酸(Arg)	3.49±0.10	5.87±0.17
必需氨基酸总量	24.65±0.73	41.42±1.24
疏水氨基酸总量	15.16±0.45	26.49±0.79
氨基酸总量	59.51	100

注: *为必需氨基酸, 疏水性氨基酸总量为Ala、Val、Met、Ile、Leu、Phe 6种氨基酸总和。

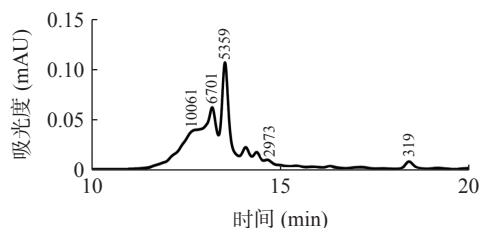


图 6 金枪鱼免疫活性肽分子量分布

Fig.6 Molecular weight distribution of tuna immunoactive peptide

活性肽经过色谱柱的分离,得到了若干个色谱峰。第一个色谱峰在 11~13 min 之间,结合标准品分子量的标准曲线分析其分子量>10 kDa,占比 11.558%。所有色谱峰在 22 min 之前均被完全洗脱。而其他色谱峰集中在 13~15 min 被洗脱出来,分子量集中分布于 4.7~6.5 kDa 中,占比 85.063%,主要集中于 5.359 kDa。剩余分子量均低于 1 kDa,占比 3.38%。有研究推测小分子肽段的免疫活性较好^[32-34],例如侯银臣等^[33]通过超滤技术对羊胎盘的发酵产物分离并进行免疫活性实验,结果表明不同分子量组分的免疫活性不同,3~10 kDa 组分的免疫活性最高;<3 kDa 组分的抗氧化性最高。通过对金枪鱼免疫活性肽进行酶解工艺优化后测定其分子量可以看出,其免疫活性肽冻干粉主要是由小分子量肽段组成,并且主要集中在分布于 4.7~6.5 kDa,可以证明经过响应面工艺优化后的金枪鱼免疫活性肽具有较强的免疫活性。

3 结论

综上所述,本研究确定制备黄鳍金枪鱼肉免疫

活性肽最适蛋白酶为胰蛋白酶,在单因素实验基础上进行响应面优化试验,得到最佳的酶解条件为超声时间 5 h、酶解温度 37.6 °C、酶解时间 11 min,在该条件下测得的小鼠巨噬细胞的相对增殖率为 43.039%±2.03%。对得到金枪鱼免疫活性肽进行氨基酸组成与分子量分析,结果显示必需氨基酸含量达 41.42%±1.24%,疏水氨基酸含量达 26.49%±0.79%;分子量集中分布在 4.7~6.5 kDa,但在酶解过程中会产生大量分子量接近的肽段,后续需进一步分离纯化。

本文探讨了采用酶解法制备黄鳍金枪鱼免疫活性肽的加工工艺,虽然目前证明酶解法是较为安全可靠的,但是在酶解制备的免疫活性肽粗肽,含有其他复杂成分,后续需进一步分离纯化。并且本研究在结合超声波辅助时,仅研究了鱼肉与蛋白酶结合后超声再酶解对于免疫活性的影响,并未研究对鱼肉进行超声后再进行酶解后对于免疫活性的影响,本研究为黄鳍金枪鱼副产物的高值化奠定了基础,期待为后续对此进行更加深入研究提供理论与技术支持。

参考文献

- [1] 张青,王锡昌,刘源. 中国金枪鱼渔业现状及发展趋势[J]. 南方水产, 2009, 5(1): 68-74. [ZHANG Q, WANG X C, LIU Y. Current situation and development trend of tuna fishery in China[J]. Southern Aquatic Products, 2009, 5(1): 68-74.]
- [2] 王丹,吴反修. 2022 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2022. [WANG D, WU F X. China Fishery Statistical Yearbook 2022[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2022.]
- [3] 周颢,陈楚央,唐云平,等. 鳕鱼皮免疫活性肽的制备[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2020, 39(6): 484-489. [ZHOU X, CHEN C Y, TANG Y P, et al. Preparation of immune active peptides from cod skin[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2020, 39(6): 484-489.]
- [4] CHALAMAIAH M, YU W L, WU J P. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review[J]. Food Chemistry, 2018, 245: 205-222.
- [5] NGOH Y Y, GAN C Y. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and alpha-amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto)[J]. Food Chemistry, 2016, 190: 331-7.
- [6] LI Y, YU J M. Research progress in structure-activity relationship of bioactive peptides[J]. Journal of Medicinal Food, 2015, 18(2): 147-156.
- [7] LIU P, LIAO W, QI X P, et al. Identification of immunomodulatory peptides from zein hydrolysates[J]. European Food Research and Technology, 2020, 246(5): 931-937.
- [8] PARIHAR A, EUBANK T D, DOSEFF A I. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death[J]. Journal of Innate Immunity, 2010, 2(3): 204-215.
- [9] 李桂芬,何定芬,郑霖波,等. 响应面法优化金枪鱼蛋白抗痛风活性肽制备工艺[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2020, 39(1): 41-50. [LI G F, HE D F, ZHENG L B, et al. Optimization of preparation technology of tuna protein anti-gout active peptide by response surface method[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2020, 39(1): 41-50.]
- [10] 周燕芳,杨启真. 超声波辅助酶解鲭鱼制备抗氧化肽的研究[J]. 天津农业科学, 2018, 24(3): 20-24. [ZHOU Y F, YANG Q Z. Study on preparation of antioxidant peptides from mackerel by ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis[J]. Tianjin Agricultural Sci-

- ence, 2018, 24(3): 20–24.]
- [11] 李莹, 周剑忠, 夏秀东, 等. 超声波辅助酶解制备泥鳅蛋白源 ACE 抑制肽[J]. 中国食品学报, 2018, 18(9): 182–187. [LI Y, ZHOU J Z, XIA X D, et al. Preparation of ACE inhibitory peptide from loach protein by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis[J]. Chinese Journal of Food, 2018, 18(9): 182–187.]
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.3-2016 食品安全国家标准 食品中水分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.3-2016 National standard for food safety-Determination of water in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016: 12.]
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.6-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. GB 5009.6-2016 National food safety standard Determination of fat in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
- [14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 5009.4-2016 食品安全国家标准 食品中灰分的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 5009.4-2016 National standard for food safety-Determination of ash in food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
- [15] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.5-2016 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. GB 5009.5-2016 National Food Safety Standard Determination of Protein in Food[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
- [16] 胡旭阳. 日本黄姑鱼肉活性肽的制备及其免疫调节作用研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019. [HU X Y. Study on the preparation of active peptides from Japanese croaker and their immunomodulatory effects[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019.]
- [17] 常娜, 杨乐. 基础医学专业《Cell Counting Kit-8 法测定贴壁细胞数》实验课程设计[J]. 继续医学教育, 2021, 35(8): 48–49. [CHANG N, YANG L. Experimental course design of 《Cell Counting Kit-8 Method for Determining the Number of Adherent Cells》 for basic medicine specialty[J]. Continuing Medical Education, 2021, 35(8): 48–49.]
- [18] 李慧娟, 张黎, 姜姗, 等. 抑制 PRR11 基因对胰腺癌细胞 SW1990 行为的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(12): 1469–1472. [LI H J, ZHANG L, JIANG S, et al. Inhibition of PRR11 gene affects the behavior of pancreatic cancer cell SW1990[J]. Chinese Journal of Immunology, 2019, 35(12): 1469–1472.]
- [19] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 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. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. GB 5009.124-2016 National food safety standard Determination of amino acids in foods[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]
- [20] 洪鹏志, 杨萍, 曾少葵, 等. 黄鳍金枪鱼背部肌肉的营养成分及评价[J]. 福建水产, 2006(2): 44–47. [HONG P Z, YANG P, ZENG S K, et al. Nutritional composition and evaluation of back muscle of yellowfin tuna[J]. Fujian Fisheries, 2006(2): 44–47.]
- [21] 巫楚君. 黄鳍金枪鱼酶解肽的制备、鉴定及其对 RAW264.7 细胞免疫调节活性研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2021. [WU C J. Preparation and identification of enzymolytic peptides from yellowfin tuna and their immuno-modulatory activity on RAW264.7 cells[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2021.]
- [22] 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, Optimization of the extraction process of immunoactive peptides from Japanese croaker flesh by response surface methodology[J]. Food Industry Technology, 2019, 40(17): 173–178.]
- [23] 赵峻露, 李春楠, 尹馨雪, 等. 响应面法优化鹿鞭肽酶解工艺及体外补肾健骨活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 213–221. [ZHAO J L, LI C N, YIN X X, et al. Response surface methodology was used to optimize the enzymatic hydrolysis process of cervicin and to analyze the activity of kidney and bone strengthening *in vitro*[J]. Food Industry Technology, 2023, 44(2): 213–221.]
- [24] 毛磊敏, 陈昱瑶, 宋洁, 等. 具有铁螯合能力的驴骨胶原肽酶解条件优化及微观形态[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(5): 188–196. [MAO J M, CHEN Y Y, SONG J, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions and micromorphology of donkey bone collagen peptide with iron chelating ability[J]. Grain, Oil and Food Technology, 2022, 30(5): 188–196.]
- [25] ŞENER N, APAR D K, ÖZBEK B. A modelling study on milk lactose hydrolysis and β -galactosidase stability under sonication[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(7): 1493–1500.
- [26] OBEROI D P S, SOGI D S. Utilization of watermelon pulp for lycopene extraction by response surface methodology[J]. *Food Chemistry*, 2017, 232(1): 316–321.
- [27] 于欢, 李露, 王思爽, 等. 响应面法优化酶法提取蜜环菌多肽及其抗疲劳活性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(23): 85–91. [YU H, LI L, WANG S S, et al. Optimization of enzymatic extraction and antifatigue activity of *Armillaria mellea* peptides by response surface methodology[J]. Food Industry Technology, 2017, 38(23): 85–91.]
- [28] MOHAMMADI R, MOHAMMADIFAR M A, MORTAZAVIAN A M, et al. Extraction optimization of pepsin-soluble collagen, from eggshell membrane by response surface methodology (RSM)[J]. *Food Chemistry*, 2016, 190: 186–193.
- [29] 程镇燕, 陈韶阳, 乔秀亭. 鱼类功能性氨基酸营养免疫研究进展[J]. 饲料研究, 2014(9): 53–57. [CHENG Z Y, CHEN S Y, QIAO X T. Advances in functional amino acid nutritional immunity of fish[J]. Feed Research, 2014(9): 53–57.]
- [30] AGYEI D, ONGKUDON C M, WEI C Y, et al. Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides[J]. *Food & Bioprocess Processing*, 2016: 244–256.
- [31] 贺屹潮. 大鲵肉酶解肽制备及抗氧化与免疫调节活性研究[D]. 西安: 陕西理工大学, 2020. [HE Y C. Study on the preparation of enzymolytic peptides from giant salamander meat and their antioxidant and immunoregulatory activities[D]. Xi'an: Shaanxi University of Technology, 2020.]
- [32] 唐宁. 玉米抗氧化肽的制备、分离纯化及结构鉴定[D]. 长春: 吉林大学, 2014. [TANG N. Preparation, purification and structure identification of corn antioxidant peptides[D]. Changchun: Jilin University, 2014.]
- [33] 侯银臣, 吴丽, 刘旺旺, 等. 羊胎盘免疫活性肽的制备及其活性[J]. 中国食品学报, 2016, 16(1): 123–129. [HOU Y C, WU L, LIU W W, et al. Preparation and activity of immune active peptide from sheep placenta[J]. China Food Journal, 2016, 16(1): 123–129.]
- [34] 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 and Agriculture*, 2015, 95(7): 1544–1553.