

纪梦雅, 万楚君, 翁凌, 等. 利用对虾消化腺丝氨酸蛋白酶制备鲍鱼外套膜 ACE 抑制肽 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 73–79. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080046

Ji Mengya, WAN Chujun, WENG Ling, et al. Preparation of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptide from Abalone(*Haliotis discus hannai*) Mantle Membrane by Serine Protease in Shrimp(*Litopenaeus vannamei*) Digestive Gland[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(10): 73–79. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080046

· 研究与探讨 ·

利用对虾消化腺丝氨酸蛋白酶制备鲍鱼外套膜 ACE 抑制肽

纪梦雅, 万楚君, 翁凌, 马婷, 张凌晶, 章 蹇, 曹敏杰*
(集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建厦门 361021)

摘 要: 利用鲍鱼加工副产物外套膜制备具有抑制血管紧张素转移酶 (angiotensin converting enzyme, ACE) 活性的生物活性肽, 为鲍鱼加工副产物的高值化利用提供新思路。采用从凡纳滨对虾消化腺中制备的丝氨酸蛋白酶, 酶解皱纹盘鲍外套膜蛋白, 以酶解物 ACE 抑制活性为评价指标优化条件。酶解液通过 3 kDa 超滤膜后, 活性组分经过 Superdex peptide 10/300 GL 凝胶过滤柱和反相高效液相色谱 (reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC) 分离纯化, 利用液相色谱-质谱 (liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 鉴定纯化肽的氨基酸序列。结果显示, 酶解液的 ACE 抑制率为 13.42%, 经 3 kDa 超滤膜初步分级后, 相同浓度下, 小于 3 kDa 的组分 ACE 抑制率为 53.25%。经凝胶过滤柱和反相高效液相色谱柱进一步分离后, 从 ACE 抑制活性最高的峰中鉴定得到 5 个肽段, 序列为 LGDSFYGGK、LVNEVTEFAK、VDEVGGEALGR、MFLSFPTTK、VATVSLPR, 说明活性峰是多肽混合物。本研究利用鲍鱼外套膜制备 ACE 抑制肽, 可以为鲍鱼及对虾加工副产物的高值化利用提供理论参考。

关键词: 皱纹盘鲍, 外套膜, 丝氨酸蛋白酶, ACE 抑制肽

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)10-0073-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080046

本文网刊:



Preparation of Angiotensin Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Peptide from Abalone(*Haliotis discus hannai*) Mantle Membrane by Serine Protease in Shrimp(*Litopenaeus vannamei*) Digestive Gland

Ji Mengya, WAN Chujun, WENG Ling, MA Ting, ZHANG Lingjing, ZHANG Qian, CAO Minjie*

(College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The abalone (*Haliotis discus hannai*) mantle processing by-products was used to prepare biologically active peptides with inhibiting the activity of angiotensin converting enzyme (ACE), which provided a new idea for the high-value utilization of abalone processing by-products. The serine protease prepared from the digestive glands of *Litopenaeus vannamei* was used to enzymatically hydrolyze the mantle proteins of *Haliotis discus hannai*. The ACE inhibitory activity of the enzymatic hydrolysate was used as the evaluation index to optimize the digestion conditions. After the enzymatic hydrolysis solution passed through the 3 kDa ultrafiltration membrane, the active components were separated and purified by Superdex peptide 10/300 GL gel filtration column and reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to identify the amino acid sequence of the purified peptide. The results showed that the ACE inhibition rate of the enzymatic hydrolysate was 13.42%. After preliminary separation by the 3 kDa ultrafiltration membrane, the ACE inhibition rate of the fractions less than 3 kDa at the same concentration was 53.25%. After further purification by gel filtration column and RP-HPLC, five peptides were

收稿日期: 2021-08-05

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0901004); 国家贝类产业技术体系 (CARS-49)。

作者简介: 纪梦雅 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工及贮藏, E-mail: jmy@jmu.edu.cn。

* 通信作者: 曹敏杰 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品深加工, E-mail: mjcao@jmu.edu.cn。

identified from the peak with the highest ACE inhibitory activity. The sequences were LGDSFYGGK, LVNEVTEFAK, VDEVGGEALGR, MFLSFPTTK, VATVSLPR, indicating that the active peak was a mixture of peptides. Preparation of ACE inhibitory peptides using abalone mantle could provide a theoretical reference for the high-value utilization of the processing by-products of abalone and prawn.

Key words: *Haliotis discus hannai*; mantle; serine proteinase; (ACE) inhibitory peptides

鲍鱼, 隶属软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、原始腹足目(Archaeogastropoda)、鲍科(Haliotidae)、鲍属(*Haliotis*)。随着人们健康意识的增强, 高档海产品的需求量也随之增长。因为具有极佳的风味、口感以及丰富的营养, 鲍鱼受到广大消费者的欢迎。据统计, 2020 年, 我国的鲍鱼总产量为 20.4 万 t, 较 2019 年增长 12.9%, 其中, 福建省为 15.5 万 t, 占全国总量的 76%^[1]。我国鲍鱼制品多为冷冻制品、干制品和罐头制品, 而在鲍鱼加工时主要取其腹足, 因此, 产生了大量的鲍鱼外套膜和内脏等副产物。鲍鱼外套膜是包被在腹足背面的一层薄膜组织, 其内缘与壳肌相连, 外缘游离于贝壳边缘^[2], 蛋白质含量达 80%(干基)^[3], 具有很高的营养价值。

另一方面, 我国是凡纳滨对虾生产大国, 2020 年产量达 186.3 万 t^[1]。同样, 在对虾加工过程中也产生了大量副产物。但一般情况下, 对虾加工副产物除了用于制备甲壳素外, 相当部分被作为垃圾直接丢弃, 不仅浪费了大量的自然资源, 还造成了环境污染。因此, 将水产加工副产物高效利用, 具有十分重要的环境和经济效益^[4-6]。虾头消化腺含丰富的内源蛋白酶, 这些内源蛋白酶以丝氨酸蛋白酶为主, Wu 等^[7]从太平洋白虾虾头中提取了丝氨酸蛋白酶并进行性质分析, 发现白虾虾头丝氨酸蛋白酶活性在 pH 为 8.0~11.0 范围内都比较稳定; 翁凌等^[8]从南美白对虾虾头中提取了丝氨酸蛋白酶, 该酶在 pH7.0~10.0, 40 ℃ 以下具有较好的稳定性。但目前虾头丝氨酸蛋白酶还未得到广泛的应用。

血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)是肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)和激肽释放酶-激肽系统(kallikrein-kinin system, KKS)的关键酶。在 RAS 中, ACE 可以将无升压活性的血管紧张素 I 水解为具有升压活性的血管紧张素 II; 同时, 在 KKS 中, ACE 可以使具有降压活性的缓激肽降解, 从而失去降血压的功能。因此, 抑制 ACE 活性是控制血压上升的一个有效途径^[9]。研究发现, 体外酶或消化道酶水解蛋白质后释放出的分子量不同的小肽, 可被人体直接吸收发挥不同的生理调节功能^[10]。迄今为止, 已有大量文献报道了 ACE 抑制肽的相关研究, 其中来源于天然食物蛋白, 尤其是从海洋食物蛋白中分离制备的 ACE 抑制肽对血压正常者无副作用, 安全性高, 是最具研究价值的功能性食品^[11-12]。近年来, 随着生物活性肽被越来越多的关注, 研究者们以动植物蛋白为原料制备了大量降压肽。Lin 等^[13]研究了军曹鱼皮水解物对 ACE

的抑制作用, 并分离出 4 种 ACE 抑制肽。Ketnawa 等^[14]利用微波和水解法从虹鳟鱼副产物中提取出了 ACE 抑制肽。Zhang 等^[15]从水母性腺中纯化得到了具有 ACE 抑制活性的二肽, 并对其进行了表征。也有研究者以鲍鱼性腺^[16]、内脏^[17]和裙边^[18]为原料制备 ACE 抑制肽, 但目前国内外还没有以鲍鱼外套膜为原料制备 ACE 抑制肽的相关报道。

本文拟以鲍鱼加工副产物外套膜为原料, 利用从凡纳滨对虾虾头消化腺提取的丝氨酸蛋白酶对其进行酶解, 制备具有 ACE 抑制活性的多肽, 并测定其氨基酸序列, 分析可能的作用机理, 以期对鲍鱼外套膜和虾头的高值化利用提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲜活皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino) 带壳平均体质量(50.0±4.0)g, 购自厦门集美菜市场, 带回实验室宰杀取其外套膜, 立即使用或暂存于-80 ℃冰箱; 凡纳滨对虾消化腺丝氨酸蛋白酶(酶活力为 76000 U/mL) 参考本实验室的方法^[8]制备; ACE 酶(A2580)、马尿酸组氨酸酰亮氨酸(Hippuryl-histidyl-leucine, HHL) 美国 Sigma 公司; 三羟甲基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)methyl aminomethane, Tris)

青岛福林生物化学公司; SDS-PAGE 标准蛋白、SDS、丙烯酰胺 美国 Bio-Rad 公司; Tris-base 德国 Roche 公司; FastBlue 蛋白染色液 中科瑞泰生物科技有限公司; 甲醇、乙酸乙酯等试剂 均为国产分析纯。

PT-2100 组织捣碎机 瑞士 Kinematica 公司; pH 计 美国 Denver 公司; 超滤膜浓缩装置 美国 Millipore 公司; 恒温水浴锅 德国 Memmert 公司; 蛋白质电泳装置 美国 Bio-Rad 公司; AKTA 蛋白纯化系统 美国 GE Healthcare 公司; GF-260 高效液相色谱仪 美国 Agilent 公司; 凝胶成像仪 英国 Syngene 公司; Lambda 35 紫外分光光度计 美国 Perkin Elmer 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 丝氨酸蛋白酶酶解鲍鱼外套膜过程分析 参照邱娟等^[19]的方法, 并略作修改。具体操作如下: 取 10 g 鲍鱼外套膜, 加入 100 mL 浓度为 20 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.0), 组织捣碎后, 在 4 ℃, 3500 r/min 下离心 3 min, 收集上清液, 并取上层细腻沉淀, 用少量 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0, 含 0.15 mol/L NaCl)复溶后, 与上清液混匀即成鲍鱼外

套膜前处理液。

取 1 mL 前处理液置于 1.5 mL PE 管中, 37 ℃ 预热 5 min 后, 加入 0.5%(v/v) 的丝氨酸蛋白酶, 保持 37 ℃, 分别在酶解 0、5、30、60、120、180、240 min 时取样, 取样后迅速在 95 ℃ 下加热 10 min, 冷却后进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.2 SDS-PAGE 分析 参考 Laemmli^[20] 的方法分析鲍鱼外套膜蛋白的酶解情况, 所用浓缩胶浓度为 5%、分离胶浓度为 10%。电泳结束后, 以 Fast Blue 蛋白染色液染色, 用凝胶成像仪记录结果。

1.2.3 鲍鱼外套膜 ACE 抑制肽的制备 鲍鱼外套膜 ACE 抑制肽的制备与 1.2.1 类似, 但鲍鱼外套膜组织捣碎后无需离心, 直接 37 ℃ 预热 5 min 后, 加入 0.5%(v/v) 的丝氨酸蛋白酶, 在 37 ℃、pH8.0 下酶解 4 h 后, 于 95 ℃ 加热 10 min 终止反应, 即得鲍鱼外套膜酶解液。用冰水冷却鲍鱼外套膜酶解液, 后将其在 6500 r/min 下冷冻离心 20 min, 弃去沉淀, 取上清液进行生物活性肽制备。

1.2.4 超滤膜分离 选用截留分子量为 3 kDa 的超滤膜, 将上清液进行超滤分级, 收集超滤膜滤过液, 冷冻干燥后, 用少量 20 mmol/L Tris-HCl 复溶, 测定对 ACE 的抑制活性。

1.2.5 凝胶色谱分离 将冷冻干燥样品用少量去离子水复溶后, 上样于 Superdex peptide 10/300 GL 凝胶过滤柱(10 mm I.D.×300 mm), 洗脱液为去离子水。在流速为 0.5 mL/min 条件下, 测定波长 220 nm 处的吸光值, 收集不同组分(1 mL/管), 冷冻干燥后复溶, 测定相应组分的 ACE 抑制活性。

1.2.6 RP-HPLC 分离 将 Superdex peptide 10/300 GL 凝胶过滤柱分离所得 ACE 抑制活性较强的组分冷冻干燥后复溶, 利用 GF-260 Agilent HPLC 纯化系统进一步分离纯化。色谱柱为 ZORBAX SB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm), 流动相为去离子水(含 0.1% TFA)和乙腈(含 0.1% TFA), 洗脱条件为 0~10 min, 5%~10% 乙腈; 10~40 min, 10%~40% 乙腈; 40~60 min, 40%~70% 乙腈。检测波长 220 nm, 在流速 1 mL/min 下, 手动收集各活性峰并冷冻干燥, 用少量 20 mmol/L Tris-HCl 复溶后, 测定相应组分的 ACE 抑制活性^[18]。

1.2.7 LC-MS/MS 鉴定氨基酸序列 将上述复溶样品在 13000 r/min 下离心 10 min, 取 7 μL 样品进行 LC-MS/MS 分析。按照流速 2 μL/min, 将样液上样到 C₁₈ 预柱(100 μm×3 cm, 3 μm, 150 Å)上, 保持 2 μL/min 冲洗脱盐 10 min, 液相为 Eksigent nanoLC-Ultra™ 2D 纳升系统(AB SCIEX)。样品脱盐后再经 C₁₈ 反相色谱柱(75 μm×15 cm, 3 μm, 120 Å, Chrom XP Eksigent)分离。质谱采用 Triple TOF 5600 系统结合纳升喷雾 III 离子源(AB SCIEX, USA), 喷雾电压为 2.3 kV, 气帘气压为 30 psi, 雾化气压为 5 psi, 加热温度为 150 ℃^[21-22]。

1.2.8 ACE 抑制活性的测定 ACE 抑制活性测定参考 Cushman 等^[23] 方法, 并略作修改。实验组将 20 μL ACE 酶液与 20 μL 待测样液充分混匀, 37 ℃ 预热 5 min, 立即加入 50 μL 6.5 mmol/L HHL 溶液(溶剂为 100 mmol/L 的硼酸盐缓冲液, pH8.3, 含 0.3 mol/L NaCl), 37 ℃ 反应 60 min。加入 50 μL 1 mol/L 盐酸终止反应, 再加入 300 μL 乙酸乙酯, 混匀后室温下 2553 r/min 离心 5 min。取上清液 200 μL, 真空浓缩除去乙酸乙酯后, 加 600 μL 去离子水充分溶解, 室温下 3610 r/min 离心 3 min, 测定上清液在波长 228 nm 处的吸光值。对照组用去离子水代替样液, 空白组加入盐酸后再加底物, 其它条件均与实验组一致。

酶活力单位(U)定义为每分钟内分解 HHL 底物释放出 1 μmol 马尿酸(Hippuric acid, HA)所需要的酶量。

$$\text{ACE抑制率(\%)} = 1 - \frac{A_s - A_0}{A_1 - A_0} \times 100$$

式中: A₁ 为对照组的吸光值; A_s 为实验组吸光值; A₀ 为空白组吸光值。

1.3 数据处理

每组 ACE 抑制率测定均重复三次, 采用 Excel 2019 对实验数据进行误差分析。

2 结果与分析

2.1 SDS-PAGE 分析

图 1 为鲍鱼外套膜蛋白在丝氨酸蛋白酶作用下的分解过程。图中, 泳道 M 为标准蛋白, 泳道 Con1 为鲍鱼外套膜全蛋白, 大部分蛋白的分子量在 30 kDa 以上, 其中在高分子量(200 kDa)、95 kDa 及 42 kDa 处存在明显的蛋白条带。泳道 Con2 无蛋白条带, 说明所添加的丝氨酸蛋白酶比活力高, 酶蛋白背景低, 不影响 SDS-PAGE 分析。鲍鱼外套膜蛋白经对虾丝

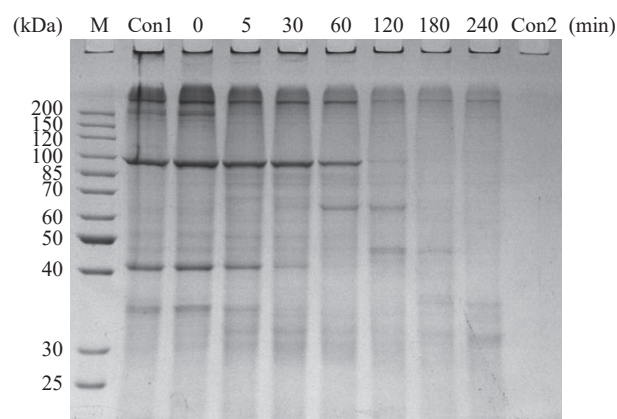


图 1 虾丝氨酸蛋白酶水解鲍鱼外套膜全蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of whole proteins in abalone mantle hydrolyzed by shrimp serine proteinase

注: M: 标准蛋白; Con1: 鲍鱼外套膜全蛋白; 0、5、30、60、120、180、240: 鲍鱼外套膜全蛋白经丝氨酸蛋白酶酶解不同时间(min); Con 2: 丝氨酸蛋白酶。

氨酸蛋白酶酶解 4 h 后,蛋白基本降解完全,只有 34 kDa 附近有少量降解产物残留,表明对虾丝氨酸蛋白酶可有效降解鲍鱼外套膜蛋白。

2.2 鲍鱼外套膜 ACE 抑制肽的分离纯化

一般地,蛋白水解产物中,低分子量的组分所含的活性多肽含量更高。Fan 等^[24]在研究废弃蛋鸡肌肉中 ACE 抑制肽和 ACE2 上调肽时,用超滤膜分离后发现,小于 3 kDa 的组分具有较高的生物活性。章禹航等^[25]以鲑鱼加工副产物为原料制备 ACE 抑制肽时发现,超滤得到分子量小于 3 kDa 的组分具有最高的 ACE 抑制活性。

本研究利用丝氨酸蛋白酶酶解鲍鱼外套膜蛋白,将酶解液用截留分子量为 3 kDa 的超滤膜进行超滤分级,测定酶解液和分子量小于 3 kDa 组分的 ACE 抑制活性。结果如图 2 所示,相同浓度下,酶解液和分子量小于 3 kDa 组分的 ACE 抑制率分别为 13.42% 和 53.25%。本研究结果表明,经过超滤膜处理后,分子量小于 3 kDa 的组分(UF-3)的 ACE 抑制活性明显高于处理前酶解液的抑制活性。

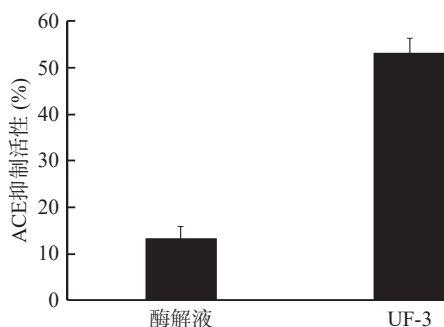


图 2 酶解液和 UF-3 的 ACE 抑制活性

Fig.2 ACE inhibitory activity of the hydrolysate and UF-3

将 UF-3 冷冻干燥后用 Superdex peptide 10/300 GL 凝胶柱分离,结果如图 3 所示。共得到 3 个峰,分别为 F1(第 8~25 管)、F2(第 26~28 管)和 F3(第 29~35 管),根据波峰分布情况,收集 3 个组分,真空冷冻干燥,复溶后测定相应的 ACE 抑制活性。其中, F2 和 F3 活性较高,而 F3 生物活性较强且分子量较低,故将其作为重点研究组分。

大量的文献报道,蛋白酶解物中混合肽的分子量及结构对其活性有一定影响,而 ACE 抑制活性是由分子量较小的肽段所赋予的,因此低分子量(1~5 kDa)组分中通常包含更多的活性肽^[26-27]。由于 ACE 是分子量为 180 kDa 的大分子,空间阻碍效应导致分子量较大的肽难于与 ACE 活性中心产生有效结合并抑制其活性。结晶学研究表明,低分子量肽更容易进入 ACE 的催化区域^[28],改变其催化活性,特别是 0.5~3 kDa 的肽对于其活性影响更大^[29]。Superdex peptide 10/300 GL 凝胶柱在分离肽时,还受如吸附作用等因素的影响,不能完全按肽的相对分子质量大小实现分离。因此,采用 RP-HPLC 依据疏水性差异对 F3 继续分离。

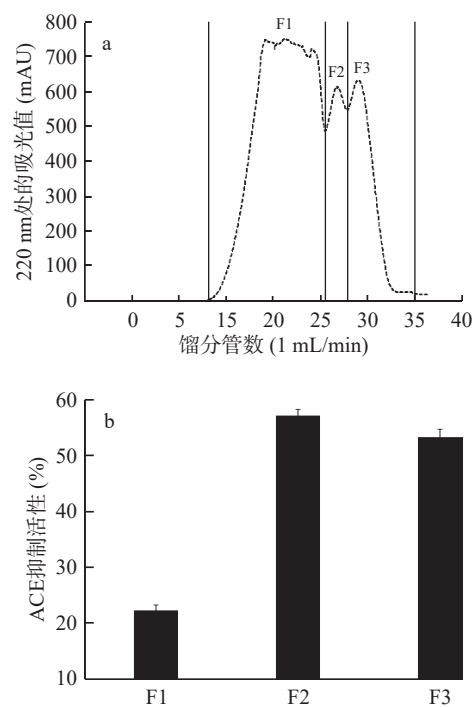


图 3 UF-3 生物活性肽的 Superdex peptide10/300 GL 凝胶过滤(a)及组分的 ACE 抑制活性(b)

Fig.3 Superdex peptide 10/300 GL gel filtration of the bioactive peptides from UF-3 (a) and ACE inhibitory activity of the fractions (b)

研究发现,多肽的亲水-疏水性也是影响其 ACE 抑制活性的重要因素。因为亲水性多肽很难接近 ACE 活性中心的疏水“口袋”,所以亲水性多肽一般活性较低或无活性^[30-32]。将分离得到的 F3 组分用 RP-HPLC 作进一步分离纯化,手动收集主峰后冷冻干燥,复溶后,测定比较相应的 ACE 抑制活性。结果如图 4 所示, F3 组分经 RP-HPLC 分离,共收集获得 9 个峰,依次标记为 a~i。结果发现,峰 d(28.0 min)、e(29.25 min)、f(29.98 min)、g(33.58 min)和 h(47.43 min)的 ACE 抑制活性较高,其中,峰 h 的 ACE 抑制活性最强,利用 LC-MS 技术对其进行氨基酸序列分析。

2.3 氨基酸序列分析

对图 4a 中 ACE 抑制活性最强的峰 h 进行质谱鉴定,结果如图 5 所示。共获得 65 个离子峰,得到 5 个肽段,序列依次为 P1: LVNEVTEFAK, P2: VDE VGGEALGR, P3: MFLSFPTTK, P4: VATVSLPR, P5: LGDSFY YGK。它们的分子量分别为 575.31、551.27、536.27、421.74 和 525.24 Da,说明峰 h 并不是由单一的肽所产生的,而是多个肽的混合物。将得到的五个肽段与 NCBI 蛋白数据库进行同源性分析得知, P1 与血清白蛋白, P2 与血红蛋白 β 链, P3 与 α 珠蛋白, P4 与肌浆钙结合蛋白, P5 与丝氨酸蛋白酶均有 100% 的同源性。由于水解鲍鱼外套膜蛋白的丝氨酸蛋白酶是高度纯化的,因此,推测 P1、P2、P3、P4 均来源于鲍鱼,而 P5 则来自对虾丝氨酸蛋白酶。利用 AHTPDB 降压肽数据库(<http://crdd.osdd>).

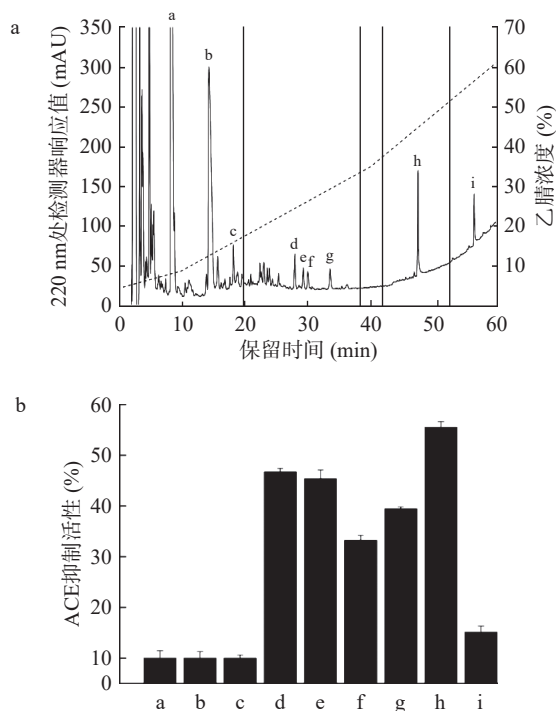


图 4 F3 生物活性肽的 RP-HPLC 分离纯化(a)及组分生物活性(b)

Fig.4 Separation and purification of bioactive peptides from F3 by RP-HPLC (a) and bioactivity of the fractions (b)

net/raghava/ahtpdb/pepsearch.php) 检索发现, 5 个肽均为新型 ACE 抑制肽。

Natesh 等^[33]通过晶体学研究证明, ACE 的活性位点不能容纳分子量较大的多肽分子。因此, 大多数 ACE 抑制肽长度较短, 一般为 2~12 个氨基酸残基。但 ACE 抑制肽的活性不仅与分子量大小有关, 还与氨基酸的组成和序列密切相关。如 C 端的 3 个氨基酸中如有一个是疏水性氨基酸, 则该 ACE 抑制肽具有较高的活性; N 端含侧链脂肪酸族氨基酸如 Val 和 Ile 等可以提高该肽的活性^[30,34]。此外, 带正电荷的 Lys(ϵ -氨基)和 Arg(胍基)作为 C 末端也有助于提高其 ACE 抑制活性^[35]。本研究纯化获得的肽 C 端均为 Lys 或 Arg, 二者虽属于亲水性氨基酸, 但均带正电荷, 且肽 N 端均含脂肪族氨基酸, 有助于提高 ACE 抑制活性。

综上, 本文所得纯化肽符合 ACE 抑制肽的氨基酸组成特点, 但其结构特性及其肽构效关系还需深入研究。接下来, 拟通过合成上述 ACE 抑制肽, 继续探究其消化吸收性能和降血压功效, 并利用分子对接技术探讨这些肽段与 ACE 的可能结合位点与结合方式, 以期对相关功能性食品的开发提供理论参考。

3 结论

本研究以水产品加工副产物虾头和鲍鱼外套膜为原料, 提取虾头消化腺丝氨酸蛋白酶酶解鲍鱼外套膜蛋白制备 ACE 抑制肽。结果表明, 虾头丝氨酸蛋白酶可有效降解鲍鱼外套膜蛋白, 酶解液中分子量低于 3 kDa 的组分 ACE 抑制率为 53.25%, 利用 Superdex

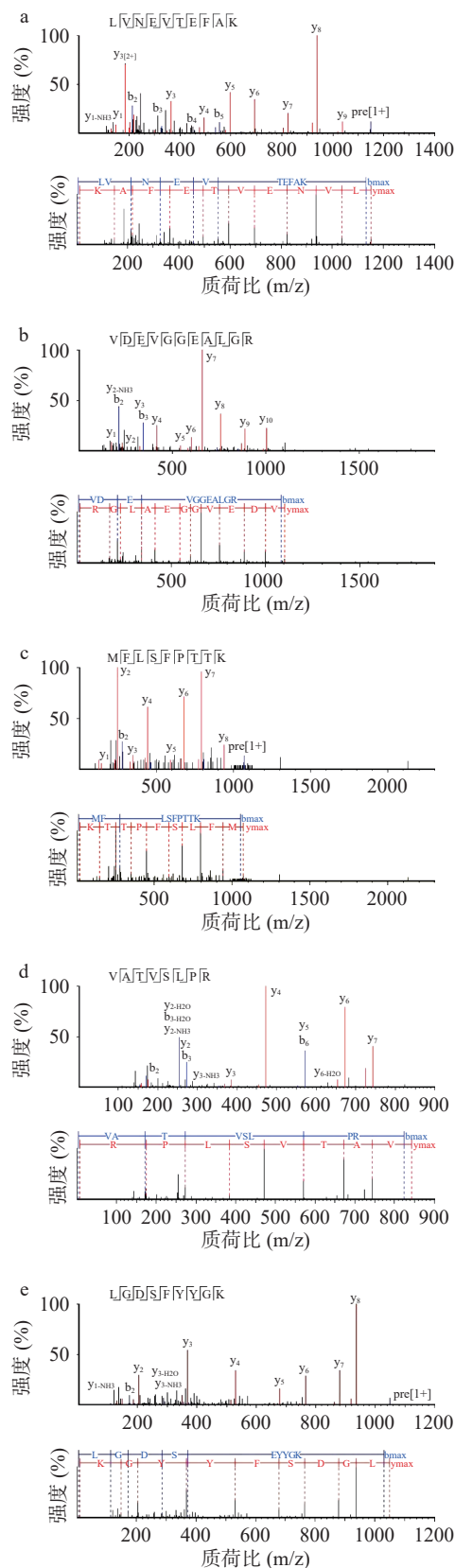


图 5 峰 h 中生物活性肽的分子量鉴定及氨基酸序列分析

Fig.5 Identification of molecular mass and amino acid sequences of peptides from peak h

注: (a): LVNEVTEFAK 质谱图; (b): VDEVGGEALGR 质谱图; (c): MFLSFPTTK 质谱图; (d): VATVSLPR 质谱图; (e): LGDSFYYGK 质谱图。

peptide 10/300 GL 凝胶柱和 RP-HPLC 对该组分进一步纯化并经 LC-MS/MS 鉴定得到 5 个肽段, 其中

4个是来源于鲍鱼的新型ACE抑制肽。本研究利用水产品加工副产物,实现虾头消化腺蛋白酶一步酶解鲍鱼外套膜,再经超滤得到具有较高ACE抑制活性的组分,这不仅有利于扩大天然ACE抑制肽的来源,实现鲍鱼、对虾加工副产物的高值化利用,还可以降低相关功能性食品的生产成本。未来,将对利用鲍鱼外套膜酶解物开发功能性食品展开研究。

参考文献

- [1] 农业部渔业渔政管理局. 中国渔业年鉴-2021[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021. [Fishery and fishery administration of the ministry of agriculture. China fishery yearbook-2021[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021.]
- [2] 朱蓓薇. 海珍品加工理论技术的研究[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 151-152. [ZHU B W. Research on the theory and technology of sea treasure processing[M]. Beijing: Science Press, 2010: 151-152.]
- [3] 张爽, 朱蓓薇, 董秀萍, 等. 不同分子质量鲍鱼外套膜酶解物抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(3): 108-111. [ZHANG S, ZHU B W, DONG X P, et al. Study on antioxidative activity of abalone (*Haliotis discus hannai*) mantle hydrolysate with different molecular weight distributions[J]. Food & Machinery, 2012, 28(3): 108-111.]
- [4] 王贺. UV-C 照射胁迫诱导凡纳滨对虾虾头内源蛋白酶激活的机制研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019. [WANG H. Activation mechanism of endogenous protease in shrimp head of *Litopenaeus vannamei* induced by UV-C irradiation stress[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2019.]
- [5] DOAN C T, TRAN T N, WANG C L, et al. Microbial conversion of shrimp heads to proteases and chitin as an effective dye adsorbent[J]. Polymers, 2020, 12(10): 2228.
- [6] GUO N, SUN J N, ZHANG Z H, et al. Recovery of chitin and protein from shrimp head waste by endogenous enzyme autolysis and fermentation[J]. Journal of Ocean University of China, 2019, 18(3): 719-726.
- [7] WU Y, WANG P, LI L, et al. Purification and characteristics of serine protease from the head of pacific white shrimp[J]. Food Science and Biotechnology, 2012, 21(4): 1129-1134.
- [8] 翁凌, 李腾, 阴利华, 等. 南美白对虾丝氨酸蛋白酶的分离纯化及性质研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2010, 15(4): 272-278. [WENG L, LI T, YIN L H, et al. Purification and characterization of serine proteinase from pacific white shrimp[J]. Journal of Jimei University (Natural Science), 2010, 15(4): 272-278.]
- [9] SOHEILA A, LAURENT B, LUCIE B. Antihypertensive and angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from fish as potential cardioprotective compounds[J]. Marine Drugs, 2019, 17(11): 613.
- [10] SHEN W, MATSUI T. Current knowledge of intestinal absorption of bioactive peptides[J]. Food & function, 2017, 8(12): 4306-4314.
- [11] 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.
- [12] SILA A, BOUGATEF A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review[J]. Journal of Functional Foods, 2016, 21: 10-26.
- [13] LIN Y H, CHEN C A, TSAI J S, et al. Preparation and identification of novel antihypertensive peptides from the in vitro gastrointestinal digestion of marine cobia skin hydrolysates[J]. Nutrients, 2019, 11(6): 1351.
- [14] KETNAWA S, SUWAL S, HUANG J Y, et al. Selective separation and characterisation of dual ACE and DPP-IV inhibitory peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) protein hydrolysates[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2019, 54(4): 1062-1073.
- [15] ZHANG Q, SONG C, ZHAO J, et al. Separation and characterization of antioxidative and angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from jellyfish gonad hydrolysate[J]. Molecules, 2018, 23(1): 94.
- [16] WU Q, CAI Q F, TAO Z P, et al. Purification and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) gonads[J]. European Food Research and Technology, 2015, 240(1): 137-145.
- [17] 陈小艺, 柯丽娟, 方婷, 等. 鲍鱼内脏胶原ACE抑制肽纯化及结构初探[J]. 食品科技, 2017, 42(4): 212-217. [CHEN X Y, KE L J, FANG T, et al. Purification and preliminary study on structure of abalone viscera collagen ACE inhibitory peptides[J]. Food Science and Technology, 2017, 42(4): 212-217.]
- [18] 肖盼盼. 鲍鱼裙边ACE抑制肽的分离纯化及作用机理的初步研究[D]. 厦门: 集美大学, 2020: 17-18. [XIAO P P. Purification and inhibition mechanism of ACE inhibitory peptides from abalone skirt[D]. Xiamen: Jimei University, 2020: 17-18.]
- [19] 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. [QIU J, SHEN J D, WENG L, et al. Optimization of preparation of angiotensin- I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from pacific oyster (*Crassostrea gigas*) [J]. Food Science, 2017, 38(16): 165-172.]
- [20] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685.
- [21] CHAI T T, SOO Z Y, HSU K C, et al. Antioxidant activity of semen cassiae protein hydrolysate: thermal and gastrointestinal stability, peptide identification, and in silico analysis[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(9): 38-48.
- [22] YU Z L, JIANG H R, GUO R C, et al. Taste, umami-enhance effect and amino acid sequence of peptides separated from silkworm pupa hydrolysate[J]. Food Research International, 2018, 108(Jun.): 144-150.
- [23] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochemical Pharmacology, 1971, 20(7): 1637-1648.
- [24] FAN H, WU J. Purification and identification of novel ACE inhibitory and ACE2 upregulating peptides from spent hen muscle proteins[J]. Food Chemistry, 2021: 345.
- [25] 章禹航, 翟雨, 韩玥颖, 等. 鲑鱼加工副产物水解液中

- ACE 抑制肽分离纯化研究[J]. 农产品加工, 2021(13): 6–8.
- [ZHANG Y H, ZHAI Y, HAN Y Y, et al. Study on isolation and purification of ACE inhibitory peptides from spanish mackerel processing byproducts hydrolysate[J]. Farm Products Processing, 2021(13): 6–8.]
- [26] ALEMÁN A, GIMÉNEZ B, MONTERO P, et al. Antioxidant activity of several marine skin gelatins[J]. LWT-Food Science and Technology, 2011, 44(2): 407–413.
- [27] MENDIS E, RAJAPAKSE N, BYUN H G, et al. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects[J]. Life Sciences, 2005, 77(17): 2166–2178.
- [28] CEREN D D, AYSUN Y, FUNDA K G, et al. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides from plants[J]. Nutrients, 2017, 9(4): 316.
- [29] SAMARANAYAKA A G P, LI-CHAN E C Y. Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications[J]. Journal of Functional Foods, 2011, 3(4): 229–254.
- [30] LI G H, LE G W, SHI Y H, et al. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects[J]. Nutrition Research, 2004, 24(7): 469–486.
- [31] 侯成杰, 聂彩清, 王彦茜, 等. α -乳白蛋白源 ACE 抑制肽快速筛选及验证[J]. 食品科学, 2021, 42(24): 100–107. [HOU C J, NIE C Q, WANG Y Q, et al. Accurate screening and verification of α -lactalbumin-derived ace inhibitory peptides[J]. Food Science, 2021, 42(24): 100–107.]
- [32] MA F F, WANG H, WEI C K. et al. Three novel ACE inhibitory peptides isolated from *Gingo biloba* seeds: purification, inhibitory kinetics and mechanisms[J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 9: 1579.
- [33] NATESH R, SCHWAGER S L, STURROCK E D, et al. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex[J]. Nature, 2003, 421(6922): 551–554.
- [34] LÓPEZFANDÍN O R, OTTE J, JVAN C. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity[J]. International Dairy Journal, 2006, 16(11): 1277–1293.
- [35] 于志鹏, 樊玥, 赵文竹, 等. 海洋蛋白源 ACE 抑制肽的研究进展[J]. 食品工业科技, 2017, 38(1): 395–400. [YU Z P, FAN Y, ZHAO W Z, et al. Progress in the angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from marine proteins[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(1): 395–400.]