

崔婷婷, 贾爱荣, 张绵松, 等. 大孔吸附树脂分离纯化海蜇 ACE 抑制肽的工艺研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 216-222. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080193

CUI Tingting, JIA Airong, ZHANG Miansong, et al. Separation and Purification of ACE Inhibitory Peptide from Jellyfish by Macroporous Resin[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(10): 216-222. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080193

· 工艺技术 ·

大孔吸附树脂分离纯化海蜇 ACE 抑制肽的工艺研究

崔婷婷^{1,2}, 贾爱荣^{1,2,*}, 张绵松^{1,2}, 刘 雪^{1,2}, 白义化³, 苗佳琳³, 刘昌衡^{1,2}

(1. 齐鲁工业大学 (山东省科学院), 山东省科学院生物研究所, 山东济南 250103;

2. 中澳特色生物资源产业技术创新联合实验室, 山东济南 250103;

3. 威海市宇王集团有限公司, 山东威海 264500)

摘要: 本文主要从分子极性角度研究了大孔吸附树脂对具有血管紧张素转化酶 (Angiotensin-I converting enzyme, ACE) 抑制活性的海蜇多肽的分离纯化作用。取海蜇酶解产物作为研究对象, 选用 HP20SS、SP20SS、SP207 三种不同型号的大孔吸附树脂分离纯化海蜇 ACE 抑制肽, 以 ACE 抑制率为评价指标, 对其分离纯化海蜇 ACE 抑制肽的工艺进行研究。结果发现, HP20SS 型大孔吸附树脂分离纯化海蜇 ACE 抑制肽效果最佳, 当海蜇酶解液的浓度为 10.0 mg/mL、上样流速为 2.0 BV/h、静置吸附 3 h、洗脱剂为 70% 的乙醇溶液、洗脱剂流速为 1.0 mL/min 的条件下, 富集后的 ACE 抑制肽分子量为 2.65×10^3 Da, 纯度为 89.16%, 抑制率高达 92.18%, IC_{50} 值为 1.02 mg/mL。经 3 次平行试验, 样品的平均回收率为 94.76%, RSD 为 0.63%。综合分析, HP20SS 大孔吸附树脂对海蜇 ACE 抑制肽有较好的分离纯化效果, 该工艺合理可行且重现性好。

关键词: 大孔吸附树脂, 海蜇 ACE 抑制肽, 分离纯化, 酶解, ACE 抑制率, IC_{50} 值

中图分类号: R284.2

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2022)10-0216-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080193



本文网刊:

Separation and Purification of ACE Inhibitory Peptide from Jellyfish by Macroporous Resin

CUI Tingting^{1,2}, JIA Airong^{1,2,*}, ZHANG Miansong^{1,2}, LIU Xue^{1,2}, BAI Yihua³, MIAO Jialin³, LIU Changheng^{1,2}

(1. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China;

2. China-Australia Joint Laboratory for Native Bioresource Industry Innovation, Jinan 250103, China;

3. Weihai Yuwang Group Co., Ltd., Weihai 264500, China)

Abstract: In this paper, the separation and purification of jellyfish polypeptide with Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity by macroporous adsorption resin was studied from the perspective of molecular polarity. The enzymatic hydrolysates of jellyfish were taken as the research object, and three different types of macroporous resin HP20SS, SP20SS and SP207 were used to isolate and purify the ACE inhibitory peptide of jellyfish. The ACE inhibitory rate was used as the evaluation index, and the separation and purification process of ACE inhibitory peptide was screened. The results showed that HP20SS macroporous resin was the best for the separation and purification of ACE inhibitory peptide. Under the conditions of 10.0 mg/mL of hydrolysate, 2.0 BV/h of sample loading, 3 h of standing adsorption, 70% ethanol solution of eluent, 1.0 mL/min of eluent, after enrichment, the molecular weight of ACE inhibitory peptide was 2.65×10^3 Da, the purity was 89.16%, and the inhibition rate was up to 92.18%, the IC_{50} value was 1.02 mg/mL. The average

收稿日期: 2021-08-19

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC0311206); 山东省科学院院地产学研协同创新基金项目 (2020-CXY12)。

作者简介: 崔婷婷 (1990-), 女, 博士研究生, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: tingtingcui@sdas.org。

* 通信作者: 贾爱荣 (1981-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: jiaar@sdas.org。

recovery was 94.76% and RSD was 0.63% after three parallel tests. Comprehensive analysis showed that HP20SS macroporous resin had a good separation and purification effect on the ACE inhibitory peptide of jellyfish, and the process was reasonable and feasible with good reproducibility.

Key words: macroporous adsorption resin; jellyfish ACE inhibitory peptide; separation and purification; enzymolysis; ACE inhibition rate; IC₅₀

高血压作为最常见的心血管疾病,已成为威胁人类健康的一大杀手。经数据统计分析可知,近年来全球高血压的平均发病率已经达到了 10%~20%,我国高血压患病人口也已超过了 1.2 亿,并且处于持续快速增长的趋势^[1-2]。血管紧张素转化酶(angiotensin-I-converting enzyme, ACE)作为生物体内一类重要的血压调节酶,其由单一肽链组成且含有大量的低聚糖,能够被 Zn²⁺和 Cl⁻激活且底物特异性较宽^[3]。在 ACE 的作用下,血管紧张素 I 会生成具有强烈血管收缩作用的血管紧张素 II,后者可作用于小动脉而引起血管平滑肌收缩,导致血压迅速升高;与此同时,其还能够促进醛固酮的分泌,增强肾脏对 Na⁺和水的重吸收,使血压升高^[4-5]。

海蜇(*Rhopilema esculentum*),根口水母科海蜇属动物,其口感美味且营养价值较高。研究证实^[6-7],海蜇具有舒张血管、降血压以及消炎等功效,深受国内外广大消费者的青睐。从海蜇中提取的海蜇 ACE 抑制肽是经蛋白酶处理后得到的具有 ACE 抑制活性的肽,它们对 ACE 活性区域的亲和力大于血管紧张素 I 和缓激肽对 ACE 的亲和力,ACE 抑制肽与活性区域相互结合可有效的抑制 ACE 的活性,降低血管紧张素 II 的生成水平,起到降血压的功效^[8]。

为了进一步筛选并富集海蜇 ACE 抑制肽的有效组分,增强降血压疗效,因此有必要对海蜇酶解液进行纯化处理。文献研究表明^[9-11],大孔吸附树脂在分离纯化多肽、蛋白质等生物活性物质时具有良好的选择性,且试验条件温和、操作方便、成本较低,近年来被广泛应用于活性物质的生产中。目前 ACE 抑制肽主要通过酶解法制备,除了选择具有较高特异性的酶之外,对酶解产物的分离纯化也是非常重要的。一般的,海蜇酶解产物成分是比较复杂的,要想得到纯度相对较高的 ACE 抑制肽则需要通过纯化技术来富集具有较高 ACE 抑制活性的肽段^[12]。HP20SS 型大孔吸附树脂是将具有良好吸附特性的 HP20 小粒径化的产品,其粒径为 63~150 μm,可以实现高纯度精密分离;SP20SS 型大孔吸附树脂是一种粒度小且分布窄的产品;SP207 是在芳香族系的骨架上结合了溴,从而强化了疏水吸附力。本研究采用复合蛋白酶酶解海蜇,首先通过分子量(M_w)为 3000 Da 的滤膜超滤,富集 M_w<3000 Da 的酶解液,然后以 ACE 抑制率为评价指标,对比分析 HP20SS、SP20SS 和 SP207 三种不同型号的大孔吸附树脂对海蜇 ACE 抑制肽的纯化效果,为综合开发利用海蜇资源提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

三矾海蜇 购自海鲜市场;复合蛋白酶(120 U/mg)、硼酸、乙腈、乙酸和乙醇 均为分析纯,上海源叶生物科技有限公司;ACE 抑制肽标准品 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;马脲酰组氨酰亮氨酸(Hippuryl-His-Leu, HHL) 上海瀚鸿科技股份有限公司;HP20SS、SP20SS、SP207 型大孔吸附树脂 北京绿百草科技发展有限公司。

JJ-1A 型电热恒温水浴锅 北京市永光明医疗仪器有限公司;LC-20AT 高效液相色谱仪、RF-20A 紫外检测器、Apollo 5u 色谱柱(250 mm×4.6 mm) 日本岛津公司;BS-100A 自动部分收集器 上海沪西分仪器厂有限公司;AB204-N 电子分析天平 上海精科实业有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 海蜇 ACE 抑制肽酶解液的制备 将三矾海蜇用清水冲洗去除盐和其他杂质,测定浸泡后海蜇的清水电导率,直至与自来水的电导率一致时停止冲洗。将浸泡后的海蜇研磨成匀浆,取 10 g 海蜇匀浆样品置于 30 mL 的蒸馏水中,用氢氧化钠(0.1 mol/L)或盐酸(0.1 mol/L)溶液调节 pH 至 7.6,加入复合蛋白酶(酶与底物比例为 2.8%)于 58 °C 的温度下酶解 3.9 h,同时伴随磁力搅拌^[13]。待酶解结束后,将酶解液置于沸水中水浴 10 min,灭活复合蛋白酶,然后冷却至室温,于 4000 r/min 条件下离心处理 15 min。将离心后的样品采用分子量为 3000 Da 的滤膜超滤,分别收集 M_w>3000 Da 和 M_w<3000 Da 的滤过部分,测定 ACE 抑制率,取抑制率相对较高(M_w<3000 Da)的部分进行下一步实验。

1.2.2 ACE 抑制率的测定 设置样品组和空白对照组,分别取 1.5 mL 的离心管,向空白对照组中加入 100 μL 浓度为 5 mmol/L 的 HHL,加入硼酸缓冲液(pH8.3)补足至 120 μL,置于 37 °C 恒温水浴锅中保温 5 min,然后加入 5 μL 浓度为 0.1 U/mL 的 ACE 抑制肽标准品开始反应;样品组则加入 100 μL 浓度为 5 mmol/L 的 HHL 和 20 μL 的酶解液,置于 37 °C 的恒温水浴中保温 5 min,然后加入 5 μL 浓度为 0.1 U/mL 的 ACE 抑制肽标准品开始反应^[14]。

上述操作完成后将两组均置于 37 °C 的恒温水浴锅中保温处理 30 min 后,加入 200 μL 浓度为 1 mol/L 的盐酸中止反应,补加 175 μL 的硼酸缓冲液。

待反应结束后,采用高效液相色谱仪测定对照

组和样品组样品的峰面积,检测条件如下:色谱柱为 Apollo 5u C₁₈(250 mm×4.6 mm);流动相为乙腈:0.5% 乙酸=35:65;流速为 1.0 mL/min;检测波长为 228 nm;柱温为 35 ℃;进样量为 20 μL。

ACE 抑制率的计算公式如下:

$$\text{ACE抑制率(\%)} = \frac{S_{\text{对照组}} - S_{\text{样品组}}}{S_{\text{对照组}}} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

1.2.3 ACE 抑制肽分子量的测定 采用高效液相色谱法测定 ACE 抑制肽分子量,液相色谱检测条件同 1.2.2。分别选用 Gly-Gly-Gly(M_w=189.17 Da)、氧化型谷胱甘肽(M_w=612.63 Da)、维生素 B₁₂(M_w=1355.37 Da)和抑肽酶(M_w=6511.51 Da)4 种标准品,配制成浓度为 0.5 mg/mL 的标准溶液,进样前经过 0.45 μm 的滤膜过滤备用,通过高效液相色谱分析上述 4 个标准品的出峰时间,以出峰时间为横坐标,分子量为纵坐标绘制分子量标准曲线。对照标准曲线,计算 ACE 抑制肽的分子量。

1.2.4 大孔吸附树脂的预处理 以 0.5 BV 的 95% 的乙醇分别浸泡 HP20SS、SP20SS 和 SP207 型大孔吸附树脂 24 h,用 2.0 BV 的乙醇以 1.0 BV/h 的流速通过树脂,并浸泡 3 h;用乙醇以 1.0 BV/h 的流速洗涤树脂直至流出液加水不呈现白色浑浊为止;再用蒸馏水以同样的流速洗净直至流出液无乙醇味道,树脂层面上保持 2~5 mm 的液体,以免干柱,备用。三种大孔吸附树脂的物理参数见表 1。

1.2.5 大孔吸附树脂的静态吸附和解吸性能考察 分别称取 2.0 g 处理好的 HP20SS、SP20SS 和 SP207 型大孔吸附树脂,用滤纸吸干表面水份,装入 100 mL 具塞磨口三角瓶中,通过移液管量取已知浓度的海蜇 ACE 抑制肽酶解液 30 mL,于转速为 110 r/min 恒温振荡器中振荡 24 h 后过滤,分别收集滤出的液体 1 mL,加入 4 mL 双缩脲试剂显色,避光反应 30 min 后测定其质量分数,计算树脂的静态吸附率;将吸附饱和的树脂用适量蒸馏水洗至洗脱液无色,滤纸吸干树脂表面残留液体,加入 30 mL 浓度为 70% 的乙醇,以 150 r/min 恒温振荡 12 h 解吸,用滤纸过滤,测定 ACE 抑制肽的质量分数,计算解吸率。吸附率和解吸率计算公式如下:

$$\text{吸附量(mg/g)} = \frac{(C_0 - C_1)V_0}{W} \quad \text{式(2)}$$

$$\text{吸附率(\%)} = \frac{(C_0 - C_1)}{C_0} \quad \text{式(3)}$$

$$\text{解吸率(\%)} = \frac{C_2 V_1}{(C_0 - C_1)V_0} \quad \text{式(4)}$$

式中: C₀ 表示吸附前溶液中 ACE 抑制肽的浓度,mg/g; C₁ 表示吸附后溶液中 ACE 抑制肽的浓度,mg/g; C₂ 表示解吸后溶液中 ACE 抑制肽的浓度,mg/g; V₀ 表示吸附溶液的体积,mL; V₁ 表示解吸液

的体积,mL; W 表示树脂的干重,g。

1.2.6 大孔吸附树脂动态吸附和解吸性能考察

1.2.6.1 酶解液上柱浓度对 ACE 抑制肽吸附效果的影响 取预处理好的 HP20SS 型大孔吸附树脂 20 g,湿法装入层析柱(1.60×20 cm)中;分别取浓度为 1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 mg/mL 的海蜇 ACE 抑制肽酶解液各 50 mL,以 2.0 BV/h 的流速上柱,室温下吸附 3 h,检测流出液的 ACE 抑制率。

1.2.6.2 酶解液上样流速对 ACE 抑制肽吸附效果的影响 取预处理好的 HP20SS 型大孔吸附树脂 20 g,湿法装入层析柱(1.60×20 cm)中;分别取浓度为 10.0 mg/mL 的海蜇 ACE 抑制肽酶解液 50 mL,分别以 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 BV/h 的流速上柱,室温下吸附 3 h,收集流出液,检测并计算 ACE 抑制率。

1.2.6.3 洗脱剂浓度对 ACE 抑制肽解吸效果的影响 取预处理好的 HP20SS 型大孔吸附树脂 20 g,湿法装入层析柱(1.60×20 cm)中;分别取浓度为 10.0 mg/mL 的海蜇 ACE 抑制肽酶解液 50 mL,按照最佳吸附方案完成吸附。待吸附完成后,分别加入浓度为 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇各 60 mL,以 1.0 mL/min 的流速进行洗脱。收集洗脱液,检测并计算 ACE 抑制率。

1.2.6.4 洗脱剂流速对 ACE 抑制肽解吸效果的影响 取预处理好的 HP20SS 型大孔吸附树脂 20 g,湿法装入层析柱(1.60×20 cm)中;分别取浓度为 10.0 mg/mL 的海蜇 ACE 抑制肽酶解液 50 mL,按照最佳吸附方案完成吸附。待吸附完成后,用 60 mL 浓度为 70% 的乙醇,分别以 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/min 的流速洗脱。收集洗脱液,检测并计算 ACE 抑制率。

1.2.7 样品平均回收率的计算 计算公式如下:

$$\text{ACE抑制肽回收率(\%)} = \frac{\text{纯化后海蜇ACE抑制肽质量}}{\text{纯化前海蜇ACE抑制肽质量}} \times 100 \quad \text{式(5)}$$

1.3 数据处理

实验进行 3 次取平均值,采用 SPSS 22.0 对实验数据进行显著性分析,用 Origin 9.1 软件作图。

2 结果与分析

2.1 大孔吸附树脂的筛选

在相同实验条件下,3 种大孔吸附树脂的静态吸附-解吸附性能结果如表 1 所示。由表 1 可以看出,3 种树脂中仅有 HP20SS 的吸附率大于 60%,且解吸附率达到了 89.51%。由于 HP20SS 型大孔吸附树脂解吸率最高,因此表现出最佳的综合性能。这是因为 HP20SS 大孔吸附树脂是一种比表面积大、平均孔径小的非极性树脂,其对多肽的吸附作用力主要是疏水性相互作用,虽然 SP207 型大孔吸附树脂的孔径小于 HP20SS 型大孔吸附树脂,但较小的孔径对大分子存在分子排阻效应。因此,选择 HP20SS 型

表 1 大孔吸附树脂静态吸附与解吸附结果比较

Table 1 Comparison of static adsorption and desorption capacity of different hydrophobic resin

型号	孔径(A)	有效粒径(μm)	比表面积(m^2/g)	吸附率(%)	解吸附率(%)
HP20SS	260	63~150	600	60.48±2.91 ^a	89.51±3.49 ^a
SP20SS	260	63~75	470	51.64±3.25 ^{bc}	80.33±2.82 ^b
SP207	120	63~150	630	53.36±2.44 ^b	79.89±4.54 ^{bc}

注: 同列中的不同字母代表差异显著, $P < 0.05$; 表 2 同。

大孔吸附树脂分离纯化海蜇 ACE 抑制肽。此外, 树脂的吸附能力还与其孔径、比表面积、孔容等物理结构参数有关^[15]。对于孔径较大的树脂有利于吸附, 且吸附率较高, 但在某些情况下, 吸附作用力强, 对解吸会造成一定的困难, 因此, 有些树脂虽然吸附率较高, 但由于解吸率太低, 故不适用于分离纯化目的产物。

2.2 HP20SS 大孔吸附树脂静态吸附曲线

从图 1 可知, HP20SS 大孔吸附树脂对海蜇 ACE 抑制肽上柱液的吸附为快速平衡型, 起始阶段的海蜇 ACE 抑制肽上柱液吸附率较低, 在 3 h 后基本达到平衡, HP20SS 大孔吸附树脂对海蜇 ACE 抑制肽上柱液具有良好的吸附动力学特性, 适用于海蜇 ACE 抑制肽的分离纯化。

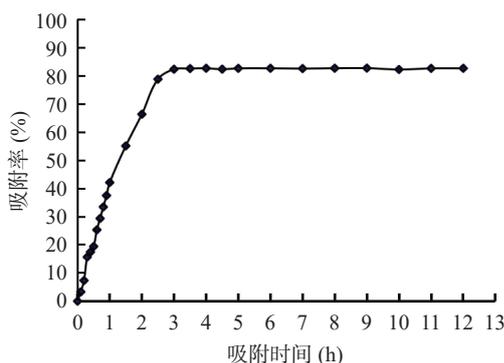


图 1 HP20SS 大孔吸附树脂静态吸附曲线

Fig.1 Static absorption curve of HP20SS hydrophobic resin

2.3 HP20SS 大孔吸附树脂的动态吸附和解吸附性能考察

由图 2A 可知, 当上样浓度为 50 和 5.0 mg/mL 时, 泄漏点出现在 40 mL 左右, 不利于疏水树脂对目标物质的吸附, 容易达到饱和吸附。而当上样浓度为 1.0、10.0、100.0 mg/mL 时, 泄漏点均出现在 70 mL 左右, 且上样浓度为 10.0 mg/mL 时, ACE 抑制率达 58.76%, 大于 1.0 mg/mL 的 47.43% 和 100.0 mg/mL 的 39.98%。因此, 本实验选取最佳上样浓度为 10.0 mg/mL。在大孔树脂的吸附过程中, 上柱液浓度对吸附效果的影响也较为显著, 这是因为海蜇酶解产物中还含有糖类、锌、镁、钙等金属元素以及海蜇毒素等, 当上样浓度过高时, 所含杂质过多, 杂质会与 ACE 抑制肽竞争吸附活性位点, 也会造成层析柱滤膜的堵塞, 从而影响吸附效果^[16]; 而上样浓度过低则会导致吸附不充分, 造成样品浪费^[17]。当上柱液浓度为 10.0 mg/mL 时, 多肽与树脂接触越充分, 单位

表面积内与大孔树脂接触的 ACE 抑制肽的含量较大, 吸附量也就越大。

由图 2B 可知, 流量为 0.5 和 1.5 BV/h, 泄漏点出现在 50 mL 左右; 当流量为 2.0 BV/h 时, 泄漏点出现在 80 mL 左右, 且 ACE 抑制率达到了 79.65%, 因此, 本实验选取最佳上样流量为 2.0 BV/h。一般的, 上样液流速越慢, 化学成分才能更有效地扩散到树脂内部和表面, HP20SS 树脂表面存在具有较强疏水性能的基团, 这些基团对疏水性较大的海蜇 ACE 抑制肽具有较强的亲和吸附作用^[18-20]。过快的流速显然不利于 HP20SS 树脂与被吸附成分的充分接触而导致泄露增加, 产率显著下降^[21]。在实际生产操作中, 需要尽量缩短吸附时间才能兼顾到生产效率。

由图 2C 可知, 50% 的乙醇洗脱液的海蜇 ACE 抑制率过低, 仅有 70.14%; 80% 的乙醇洗脱时泄漏点出现在 40 mL 左右; 60% 和 90% 的乙醇洗脱剂用量达 80 mL 左右时 ACE 抑制率仅仅达到 80% 左右。不同体积分数的乙醇, 溶解性能不同, 洗脱的物质基础也有所差异, 因而对洗脱产物的 ACE 抑制率也会存在一定的影响, 故确定浓度为 70% 的乙醇溶液为动态洗脱的最佳浓度。这可能是因为乙醇体积分数不同, 极性大小也不同, ACE 抑制肽和大孔吸附树脂之间存在一定的范德华力, 两物质的极性越相似则范德华力越大^[22-23]。乙醇的体积分数越大, 极性越小, 树脂中大量的醇溶性杂质就会越多^[24-25], 从而使 ACE 抑制肽的纯度下降, 而 70% 的乙醇可能与 ACE 抑制肽的极性相似, 洗脱效果较好。

由图 2D 可知, 当固定洗脱剂的用量时, 洗脱时流速越小, 与树脂接触时间较长, 洗脱效果越好, 可见洗脱剂流速低有利于海蜇 ACE 抑制肽的解吸, 故选择洗脱剂的流速为 1.0 mL/min。另外, 随着洗脱液流速加快, 洗脱带变窄, 拖尾现象不明显, 洗脱效果较好, 洗脱液体积相对减少; 流速过慢, 洗脱时间增加, 洗脱液的体积也相应地增加^[20,26]。

2.4 纯化前后海蜇 ACE 抑制肽的 ACE 抑制活性对比分析

以卡托普利作为阳性对照^[27], 对比分析了纯化前后海蜇 ACE 抑制肽的 IC_{50} 值和 ACE 抑制率。由表 2 可知, 纯化前海蜇 ACE 抑制肽的 ACE 抑制率显著小于纯化前海蜇 ACE 抑制肽的 ACE 抑制率 ($P < 0.05$), 纯化前海蜇 ACE 抑制肽的 IC_{50} 值为 1.02 mg/mL, 表明 HP20SS 分离纯化 ACE 抑制肽的效果较好。并且, 海蜇 ACE 的活性与多肽的极性有

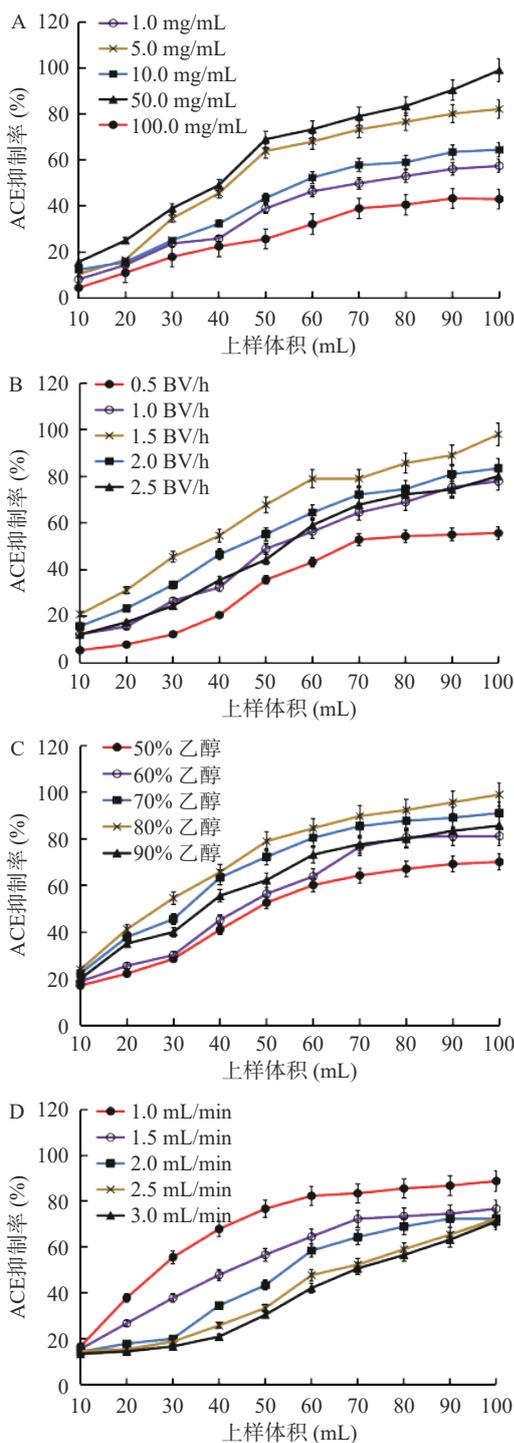


图2 HP20SS大孔吸附树脂的动态吸附和解吸附曲线

Fig.2 Dynamic adsorption and desorption curves of HP20SS macroporous adsorption resin

注: A: 上样浓度; B: 上样流速; C: 洗脱剂浓度; D: 洗脱剂流速。

表2 纯化前后海蜇ACE抑制肽的IC₅₀值和ACE抑制率对比分析

Table 2 IC₅₀ value and ACE inhibition ratio of the upper column solution and the purified sample

组别	ACE抑制率(%)	IC ₅₀ (mg/mL)
卡托普利	93.42±2.76 ^a	3.54×10 ⁻⁴
纯化前海蜇ACE抑制肽	69.21±2.09 ^c	1.41
纯化前海蜇ACE抑制肽	92.18±1.76 ^b	1.02

关,疏水性氨基酸含量越高,其ACE抑制活性也就越高^[28-29]。

2.5 验证实验

根据上述实验结果,按照最佳条件操作,即取质量浓度为10.0 mg/mL的海蜇ACE抑制肽上柱液,以2.0 BV/h上样,静置吸附3 h,用浓度为70%的乙醇按照1.0 mL/min的流速洗脱,收集洗脱液,测定其ACE抑制率为92.18%,所得色谱图见图3。同时完成3次平行试验。富集后的ACE抑制肽分子量为2.65×10³ Da,纯度为89.16%,样品的平均回收率为94.76%,RSD为0.63%,表明HP20SS大孔吸附树脂对海蜇ACE抑制肽有较好的分离纯化效果,该工艺合理可行且重现性好。

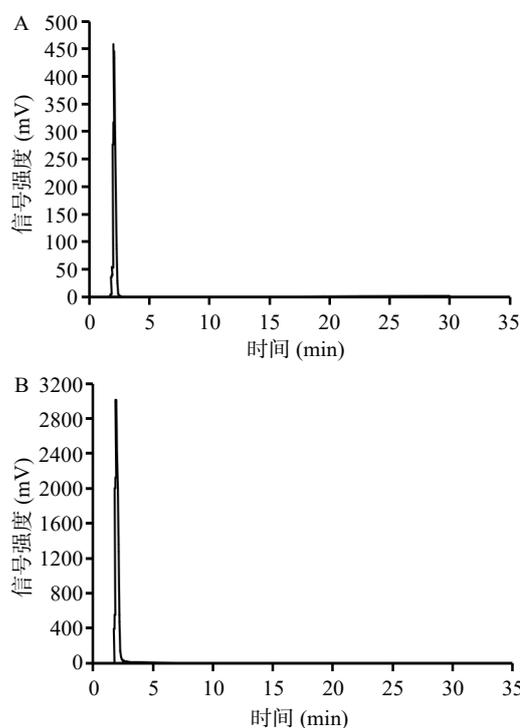


图3 对照品和海蜇ACE抑制肽上柱液高效液相色谱图

Fig.3 HPLC of reference substance and ACE inhibitory peptide from jellyfish

注: A: 对照品; B: 海蜇ACE抑制肽。

3 结论

HP20SS型大孔吸附树脂对海蜇ACE抑制肽具有良好的富集作用和解吸效果。HP20SS型大孔吸附树脂纯化海蜇ACE抑制肽最佳动态吸附和解吸条件为:海蜇酶解液的浓度为10.0 mg/mL、上样流速为2.0 BV/h、静置吸附3 h、洗脱剂为70%的乙醇溶液、洗脱剂流速为1.0 mL/min。高效液相色谱结果表明,纯化前海蜇ACE抑制肽的抑制率达到了92.18%,显著高于纯化前的69.21%($P < 0.05$),且IC₅₀值为1.02 mg/mL。该研究结果为今后探究纯化后ACE抑制肽结构变化奠定了研究基础,也为海蜇ACE抑制肽作为原料开发保健食品与药品提供了科学依据。

参考文献

- [1] 张江涛,冯晓文,秦修远,等.海洋蛋白低聚肽的抗氧化与降血压作用[J].中国食品学报,2020,20(11):63-70. [ZHANG J T, FENG X W, QIN X Y, et al. Antioxidation and blood pressure lowering effects of marine protein oligopeptides[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(11): 63-70.]
- [2] JOSEPH S L, SCOTT M. Hypertensive heart disease and obesity: A review[J]. *Heart Failure Clinics*, 2019, 15(4): 509-517.
- [3] 颜泽,姜燕蓉,刘畅,等.海洋生物来源血管紧张素转换酶抑制肽的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2018,9(8):1743-1749. [YAN Z, JIANG Y R, LIU C, et al. Review on angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from marine organisms[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2018, 9(8): 1743-1749.]
- [4] JAHANDIDEH F, CHAKRABARTI S, MAJUMDER K, et al. Egg white protein hydrolysate reduces blood pressure, improves vascular relaxation and modifies aortic angiotensin II receptors expression in spontaneously hypertensive rats[J]. *Journal of Functional Foods*, 2016, 27: 667-673.
- [5] MESSERLI F H, BANGALORE S, BAVISHI C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors in hypertension: To use or not to use?[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2018, 71: 1474-1482.
- [6] 李玉芬,郑明星,叶秀云,等.海蜇胶原蛋白肽的生物活性研究[J].食品工业科技,2018,39(8):67-72,84. [LI Y F, ZHEN M X, YE X Y, et al. The bioactive of collagen peptides from jellyfish[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(8): 67-72,84.]
- [7] LIU X, ZHANG M S, ZHANG C, et al. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory, antihypertensive and antihyperlipidaemic activities of protein hydrolysates from *Rhopilema esculentum*[J]. *Food Chemistry*, 2012, 134: 2134-2140.
- [8] 石晓梅,孙美玲,车丽萍,等.海蜇生殖腺酶解肽的抗氧化活性和 ACE 抑制活性研究[J].食品工业科技,2016,37(1):66-70,75. [SHI X M, SUN M L, CHE L H, et al. Antioxidative and ACE-inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of jellyfish *Rhopilema esculentum* kishinouye gonad[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(1): 66-70,75.]
- [9] 孙美玲,殷廷,张钦,等.海参水煮液中 ACE 抑制肽的分离纯化[J].大连工业大学学报,2019,38(1):15-18. [SUN M L, YIN T, ZHANG Q, et al. Purification and characterization of angiotensin inhibitory peptides from the sea cucumber converting enzyme cooking water[J]. *Journal of Dalian Polytechnic University*, 2019, 38(1): 15-18.]
- [10] 刘丹,吴叶红,李玮桓,等.大孔吸附树脂在天然产物分离纯化中的应用[J].中草药,2016,47(15):2764-2770. [LIU D, WU Y H, LI W H, et al. Application of macroporous adsorptive resins in separation and purification of natural products[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2016, 47(15): 2764-2770.]
- [11] 张孟凡,敬思群,郑力,等.葵花籽粕 ACE 抑制肽分离纯化及其性质研究[J].粮食与油脂,2020,33(4):44-48. [ZHANG M F, JING S Q, ZHENG L, et al. Isolation-purification and characterization of ACE inhibitory peptides from sunflower seed meal[J]. *Cereals & Oils*, 2020, 33(4): 44-48.]
- [12] 段生洲,丁保森.大孔树脂对白鲢鱼糜漂洗水蛋白的吸附研究[J].食品研究与开发,2019,40(21):1-5. [DUAN S Z, DING B M. Adsorption of macroporous resin for protein in washing water of silver carp[J]. *Food Research and Development*, 2019, 40(21): 1-5.]
- [13] 刘新,张绵松,孟秀梅,等.海蜇 ACE 抑制肽水解用酶的筛选[J].食品工业,2012,33(3):64-67. [LIU X, ZHANG M S, MENG X M, et al. Screening of proteases for hydrolysis of jellyfish ACE inhibitory peptides[J]. *Food Industry*, 2012, 33(3): 64-67.]
- [14] 张绵松,孟秀梅,袁文鹏,等.海蜇血管紧张素转化酶抑制肽的超滤分离[J].食品与药品,2010,12(1):20-23. [ZHANG M S, MENG X M, YUAN W P, et al. Separation of angiotensin-i-converting enzyme inhibitory peptides derived from jellyfish with ultrafiltration technology[J]. *Food and Drug*, 2010, 12(1): 20-23.]
- [15] 许英一,吴红艳,王宇,等.大孔树脂纯化苜蓿叶蛋白肽的工艺优化[J].食品与机械,2019,35(5):167-171. [XU Y Y, WU H Y, WANG Y, et al. Optimization on purification technology of alfalfa leaf protein peptide by macroporous adsorption resin[J]. *Food & Machinery*, 2019, 35(5): 167-171.]
- [16] ZHANG F X, WANG Z, XU S Y. Macroporous resin purification of grass carp fish (*Ctenopharyngodon idella*) scale peptides with *in vitro* angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory ability[J]. *Food Chemistry*, 2009, 117(3): 387-392.
- [17] XU Z Q, WU C P, SUN D X, et al. Identification of post-digestion angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean protein isolate: Their production conditions and *in silico* molecular docking with ACE[J]. *Food Chemistry*, 2021, 345: 128855.
- [18] 蒋爽,田许,施用晖,等.血管紧张素转化酶抑制肽的设计与抗酶解研究[J].食品工业科技,2014,35(15):63-66,71. [JIANG S, TIAN X, SHI Y H, et al. The design of ACE peptides and enzymatic hydrolysis resistance research[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2014, 35(15): 63-66,71.]
- [19] 于志鹏,樊玥,赵文竹,等.海洋蛋白源 ACE 抑制肽研究进展[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.]
- [20] JOSHI I, JANAGARAJ K, NOORANI K P M, et al. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme (ACE-I) inhibition and antioxidant peptide from by catch shrimp (*Oratosquilla woodmasoni*) waste[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 29: 101770.
- [21] CHEN J W, LIU S, RAN Y, et al. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory tripeptides from rice protein hydrolysate: Purification and characterization[J]. *Journal of Functional Foods*, 2013, 5(4): 1684-1692.
- [22] 陈雪珂,马良,黄丹丹,等.超声预处理对金枪鱼皮胶原蛋白 ACE 抑制肽消化稳定性的影响及消化产物的分离纯化、鉴定[J].食品工业科技,2018,39(22):70-74,92. [CHEN X K, MA L, HUANG D D, et al. Effects of ultrasound pretreatment on the diges-

- tion stability of ACE inhibitory peptide from tuna skin collagen and separation, purification, identification of digestion products[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2018, 39(22): 70–74,92.]
- [23] CHEN J W, WANG Y M, ZHONG Q X, et al. Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein[J]. *Peptides*, 2012, 33(1): 52–58.
- [24] BETRAINS A, VERMEERSCH P, VANDERSCHUEREN S. Appropriateness of ordering serum angiotensin-converting enzyme during renin-angiotensin-aldosterone system inhibitor therapy [J]. *European Journal of Internal Medicine*, 2019, 59: 18–19.
- [25] BALTI R, BOUGATEF A, SILA A, et al. Nine novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle protein hydrolysates and antihypertensive effect of the potent active peptide in spontaneously hypertensive rats[J]. *Food Chemistry*, 2015, 170: 519–525.
- [26] SEUNG Y L, SUN J H. Purification of novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef myofibrillar proteins and analysis of their effect in spontaneously hypertensive rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 116: 109046.
- [27] KAWAKAMI A, KAYAHARA H. Synthesis of Leu-Lys-Tyr derivatives and their interaction with angiotensin converting enzyme[J]. *Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 1993, 46: 425–428.
- [28] CHEUNG H S, WANG F L, ONDETTI M A, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin converting enzyme[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255: 401–407.
- [29] SUETSUNA K, NAKANO T. Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*) [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2000, 11: 450–454.