

金枪鱼(*Katsuwonus pelamis*)碎肉蛋白降压肽的酶解制备及活性研究*

张朋¹ 贺卯苏¹ 迟长凤¹ 王斌²

(1. 浙江海洋学院海洋科学与技术学院 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022;
2. 浙江海洋学院食品与医药学院 浙江省海洋生物医用制品重点工程技术研究中心 舟山 316022)

提要 以血管紧张素转换酶(ACE)抑制率为指标,通过正交试验 $L_9(3^4)$ 确定碱性蛋白酶(Alcalase)对金枪鱼(*Katsuwonus pelamis*)碎肉蛋白的最佳酶解条件,利用 D101 大孔树脂建立了酶解物的脱盐工艺,利用超滤、葡聚糖凝胶(G-25)色谱和反相-高效液相色谱(RP-HPLC)分离降压肽,并确定其纯度,利用氨基酸序列分析和 ESI-MS 鉴定纯化多肽的结构。结果表明,碱性蛋白酶酶解金枪鱼碎肉蛋白制备降压肽的最佳酶解条件是: pH 9.5, 酶用量 1.5%, 酶解温度 50°C, 酶解时间 5h; D101 大孔吸附树脂脱盐工艺条件为: 上样浓度 10 mg/mL、上样流速 1.5 BV/h、解吸剂为 75%乙醇; 酶解物经超滤和 Sephadex G-25 分离获得一个纯度较高的四肽,经氨基酸序列分析和 ESI-MS 鉴定结构为 Phe-Gly-Gly-Val (FGGV), ESI-MS 检测给出分子离子峰 m/z 379.50 ($[M+H]^+$)。利用碱性蛋白酶酶解并经超滤和色谱技术制备的金枪鱼碎肉蛋白降压肽具有良好的 ACE 抑制活性,可作为降压药物、保健食品或添加剂进行开发。

关键词 金枪鱼碎肉; 降压肽; 碱性蛋白酶; 大孔树脂; 血管紧张素转换酶(ACE)

中图分类号 Q516 doi: 10.11693/hyhz20140600188

血管紧张素转换酶(ACE)是一种分子量为 15kDa 膜结合糖蛋白,当人体循环或者局部组织中 ACE 活性过高,会促使血管紧张素 I(十肽,由肾素转化而来)的肽链 C 末端的组氨酸和亮氨酸残基水解形成具有增压作用的血管紧张素 II(八肽),同时促进具有促血管舒张作用的缓激肽 P 物质的水解,导致血压升高。因此,寻找合适物质,抑制体内 ACE 的活性,即可达到降低血压的目的。目前,血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)是一类发展迅速的抗高血压药物,如含巯基(-SH)或巯基(-SR)类的卡托普利(Captopril),含羧基(-COOH)类的依那普利(Enalapril),以及含次磷酸基(-POO-)类的福辛普利(Fosinopril)等。此类化学合成药物在应用过程中常引起患者咳嗽、味觉异常、粒细胞减少、皮疹、发热等不良反应,给患者带来较强的不适感。与化学合成的 ACEI 相比较,通过酶解食源

性蛋白质获得的 ACE 抑制活性肽(ACEP)具有显著优点,主要体现在: (1) 安全性高,无毒副作用; (2) 原料来源广,制备条件温和,易于产业化; (3) 降压效果专一,易于消化吸收。因此,选择合适的蛋白酶在体外降解蛋白资源,研究和开发出具有降血压作用的活性肽食品或药物,成为研究的热点(Liu *et al*, 2013)。

目前,已经成功地从多种水产资源中获得了 ACEP。如徐怀德等(2008)利用碱性蛋白酶水解甲鱼蛋白获得具有 ACE 抑制作用的酶解物,其对 ACE 的体外抑制率为 99.96%。于娅等(2004)以牡蛎为原料制备的短肽在 0.4 mg/mL 时的 ACE 抑制率为 51.4%。戴志远等(2009)利用酶解和 Sephadex G-50 柱层析从河蚌酶解物中得到 2 个分子质量分别为 14.1 (MPP1) 和 12.7 kDa (MPP2)的组分,其对 ACE 抑制作用的 IC_{50} 分别为 0.88 和 0.32 mg/mL。Fujita 等(1999)利用

*浙江省重大科技专项,2009C03017-2 号; 国家星火计划项目,2010GA700088 号。张朋, E-mail: 978526461@qq.com

通讯作者: 迟长凤, 博士, 副教授, E-mail: amycf@126.com

收稿日期: 2014-04-22, 收修改稿日期: 2014-07-27

嗜热菌蛋白酶水解鲤鱼得到 6 种降压肽, 分别为 IY、IKP、LKP、IWH、LKPNM 和 IWHHT, 均能明显降低原发性高血压大鼠的血压, ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值分别为 2.31、6.9、0.32、3.5、2.4 和 5.8 μmol/L。Enari 等(2008)酶解鲑鱼蛋白获得降压肽 IW, ACE 抑制活性检测显示其 IC₅₀ 值为 1.2 μmol/L。Jae 等(2004)利用胃蛋白酶酶解鳕鱼蛋白, 利用色谱技术制备降压肽 FGASTRGA, ACE 抑制活性检测显示其 IC₅₀ 值为 14.7 μmol/L。Liu 等(2013)利用胃蛋白酶和木瓜蛋白酶水解水母蛋白, 利用色谱技术制备降压肽 QPGPT 和 GDIGY, ACE 抑制活性检测显示其 IC₅₀ 值分别为 80.67 和 32.56 μmol/L。Lee 等(2014)利用胰蛋白酶酶解, 色谱制备, 从大马哈鱼鱼皮酶解物中制备降压肽 GLPLNLP, ACE 抑制活性检测显示其 IC₅₀ 值为 18.7 μmol/L。

金枪鱼(*Katsuwonus pelamis*)是世界远洋渔业的重要作业鱼种之一, 年产量超过 600 万吨, 占公海渔业总产量 70%以上(罗红宇等, 2013; Shyni *et al.*, 2014)。在金枪鱼加工过程中产生的碎肉、鱼头、鱼皮和鱼骨等下脚料约占总重量的 50%—70%。研究发现金枪鱼碎肉中粗蛋白含量很高, 是良好的蛋白质来源(杜帅等, 2013; 谭洪亮等, 2014)。然而, 我国金枪鱼下脚料的加工利用不尽如人意, 90%以上仍然作为饲料原料或初级饲料利用, 造成了金枪鱼资源的大量浪费, 也给生态环境带来了较大压力(杜帅等, 2013)。因此, 高效的利用金枪鱼下脚料资源具有重要的意义。因此, 本实验以金枪鱼碎肉蛋白为原料进行 ACEP 的研发, 不仅会为高血压疾病的治疗提供候选药物, 还将为金枪鱼下脚料的综合利用提供一条可行的途径。

1 材料与方 法

1.1 样品、试剂与仪器

金枪鱼(*Katsuwonus pelamis*)碎肉由宁波丰盛食品有限公司提供。Sephadex G-25 购于安发玛西亚生物技术公司, 碱性蛋白酶购于上海源聚生物科技有限公司, 色谱纯乙腈购于赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 其他试剂为分析纯, 购于上海国药集团化学试剂有限公司。

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); U-2800 紫外可见分光光度计(日本日立集团); Anke TDL-40B 离心机(上海安亭科技仪器厂); HD 21C-A 核酸蛋白检测仪(上海康华生化仪器制造有限公司);

DS-1 高速组织捣碎机(上海精密仪器仪表有限公司); SC-15 超级恒温槽(宁波江南仪器厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 金枪鱼碎肉酶解物的制备 称取金枪鱼碎肉 100g, 加入 pH 10.0 的甘氨酸-NaOH 缓冲液 500 mL, 于组织捣碎机内均质 5 min, 用 1mol/L HCl 和 NaOH 将该混和物调 pH 至设定数值, 得混和液。将混合液温度升至预定温度搅拌预热, 并于搅拌状态下保温 20 min; 然后加入预定量的碱性蛋白酶(酶活力 1.9 × 10⁴ U/g), 在设定的时间下完成酶解之后, 放入 95—100°C 水浴 15 min, 对酶灭活, 灭活液在 4°C、4500 r/min 离心 30 min, 取上清液真空浓缩后冷冻干燥, 得酶解物(TPAP), 并于-20°C 低温保存。

根据正交试验确定碱性蛋白酶水解金枪鱼碎肉蛋白的工艺条件。L₉(3⁴)正交试验设计因素和水平见表 1。

表 1 正交实验中酶解条件的因素水平表
Tab.1 The factors and levels of enzymatic hydrolysis conditions

水平	因素			
	A pH	B 酶用量(%)	C 温度(°C)	D 时间(h)
1	9	1.0	45	4
2	9.5	1.2	50	5
3	10	1.5	55	6

1.2.2 D101 大孔吸附树脂对金枪鱼碎肉蛋白酶解物的脱盐工艺研究

(1) D101 大孔吸附树脂对 TPAP 的静态吸附及解析实验 取 2.5 g 预先处理的 D101 大孔树脂加入到 250 mL 具塞锥形瓶中, 用无水乙醇充分溶胀树脂, 去离子水洗净无水乙醇, 再加入质量浓度为 10 mg/mL 的 TPAP 溶液 150mL, 将锥形瓶放入 25°C 恒温摇床振荡 12 h, 按照设定时间取样。选择水、30%乙醇、50%乙醇、75%乙醇和无水乙醇作为洗脱剂, 对已吸附 TPAP 并达到饱和的 D101 大孔树脂解吸 24 h, 洗脱, 按下式计算树脂的吸附率、吸附量和解吸率。

$$\text{吸附率}(\%) = [(\text{原液浓度} - \text{吸附液浓度}) / \text{原液浓度}] \times 100$$

$$\text{吸附量}(\text{mg/g}) = (\text{原液浓度} - \text{吸附液浓度}) \times \text{溶液体积} / \text{干树脂质量}$$

$$\text{解吸率}(\%) = \{(\text{解吸液浓度} \times \text{解吸液体积}) / [(\text{原液浓度} - \text{吸附液浓度}) \times \text{吸附液体积}]\} \times 100$$

(2) D101 大孔吸附树脂对 TPAP 的动态吸附及解吸实验 在室温条件下, 质量浓度为 10 mg/mL

的 TPAP 分别以 0.8 BV/h、1.5 BV/h、3 BV/h 的流速经过层析柱；质量浓度为 5 mg/mL、10 mg/mL 和 20 mg/mL 的 TPAP 分别以 1.5 BV/h 的流速经过层析柱，用紫外检测流出液的 A_{220} ，以 $A_{220} = 0.05$ 为透过点，比较不同流速和浓度的穿透体积和吸附量。

1.2.3 超滤分级 TPAP 用截留分子量为 3 kDa 和 1 kDa 的超滤膜超滤分级，得三个组分：TPAP-I (MW > 3kDa)、TPAP-II (3kDa > MW > 1kDa) 和 TPAP-III (MW < 1 kDa)。

1.2.4 Sephadex G-25 凝胶过滤层析 取 500.0 mg 的 TPAP-III 溶于 5 mL 双蒸水中，加入到预先平衡的 Sephadex G-25 凝胶柱(2.6 × 80cm)上，用蒸馏水以 1 mL/min 的速度洗脱，每 5 min 收集一管，并于 220 nm 检测吸光度，按峰合并，得 5 个组分(TPAP-III-1—5)。

1.2.5 TPAP-III-4 的反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析 TPAP-III-4 经 RP-HPLC 分析为一个峰。RP-HPLC 条件为：色谱柱 Zorbax, SB C-18 (4.6 × 250mm, 5μm, Agilent, USA)；流速 1 mL/min；检测波长 220 nm；流动相：乙腈/水梯度洗脱；柱温 25°C。

1.2.6 ACE 抑制率试验 紫外分光光度法参照 Cushmand(1971)和经 Toriki(1993)改进的方法检测金枪鱼碎肉蛋白酶解物、超滤分段部位、Sephadex G-25 分段部位的 ACE 抑制率。

量取 0.25 mL 反应液(K_3PO_4 100 mmol/L, pH 8.3; NaCl 300 mmol/L; 马脲酰组氨酰亮氨酸(HHL)5 mmol/L)加入到试管中，依次加入 1 mL 样品溶液(对照组加双蒸水)，0.15 mL ACE 溶液(5 mmol/L)于反应液中，37°C 水浴保温 30 min。加入 1 mol/L 的 HCl 0.25 mL，充分搅拌以终止反应。加入 1.5 mL 乙酸乙酯，充分搅拌萃取反应生成的马尿酸，收集上清液。将上清液于 100°C 水浴加热约 20 min，以蒸发掉乙酸乙酯，然后加入 3 mL 蒸馏水，充分振荡，228 nm 下测其吸光值。根据各酶解液反应值与空白样品对照，计算所得样品的 ACE 抑制率。计算公式为：

$$\text{ACE 抑制率(\%)} = [(A - A_{\text{control}}) / A] \times 100\%$$

式中， A 为添加 1 mL 样品时的吸光值； A_{control} 为 1 mL 蒸馏水代替 1 mL 样品时的吸光值。

2 结果与分析

2.1 金枪鱼碎肉蛋白酶解物的制备工艺研究

影响蛋白酶解效果的因素主要有 pH、反应温度、酶和底物浓度比(E/S)、酶解时间、底物浓度等，并且不同因素之间还存在交互作用(Pihlanto-leppälä, 2001; Ranathunga *et al*, 2006)。本实验在预实验的基础上，以 pH、酶用量、酶解温度、酶解时间为考察因素，每个因素各取 3 个水平，并以 ACE 抑制率为考察指标进行 $L_9(3^4)$ 正交试验，结果见表 2。

表 2 碱性蛋白酶酶解金枪鱼碎肉蛋白制备降压肽的正交实验结果($n=3, c=10\text{mg/mL}$)

Tab.2 Orthogonal array design matrix $L_9(3^4)$ and experimental results for optimized the enzymolysis conditions of alcalase ($n=3, c=10\text{mg/mL}$)

实验号	因素				ACE 抑制率(%)
	A pH	B 酶用量(%)	C 温度(°C)	D 时间(h)	
1	1(9)	1(1.0)	1(45)	1(4)	42.3 ± 1.33
2	1(9)	2(1.2)	2(50)	2(5)	55.7 ± 2.15
3	1(9)	3(1.5)	3(55)	3(6)	51.9 ± 1.89
4	2(9.5)	1(1.0)	2(50)	3(6)	57.8 ± 2.19
5	2(9.5)	2(1.2)	3(55)	1(4)	48.3 ± 1.38
6	2(9.5)	3(1.5)	1(45)	2(5)	64.9 ± 3.25
7	3(10)	1(1.0)	3(55)	2(5)	46.3 ± 1.57
8	3(10)	2(1.2)	1(45)	3(6)	44.6 ± 2.33
9	3(10)	3(1.5)	2(50)	1(4)	57.9 ± 2.45
k_1	149.9	146.4	151.8	148.5	
k_2	171.0	148.6	171.4	166.9	
k_3	148.8	174.7	146.5	154.3	
R	22.2	28.2	24.9	18.4	

从极差 R 值可以看出，各因素对碱性蛋白酶酶解金枪鱼碎肉蛋白的影响程度依次为 $B > C > A > D$ ，即酶用量是优化条件中影响最大的因素，酶解时间的影

响最小，最佳酶解工艺条件为 $A_2B_3C_2D_2$ ，即 pH 9.5，酶用量 1.5%，酶解温度 50°C，酶解时间 5 h。按 $A_2B_3C_2D_2$ 条件进行 3 次平行试验，酶解物在 10 mg/mL

的浓度下的 ACE 抑制率达到 $71.43\% \pm 5.19\%$ 。

2.2 金枪鱼碎肉蛋白酶解物的脱盐工艺研究

2.2.1 大孔吸附树脂对金枪鱼碎肉蛋白酶解物的静态吸附能力

D101 大孔吸附树脂对金枪鱼碎肉蛋白酶解物静态的吸附率和吸附量随时间的变化规律如图 1 和图 2 所示。结果表明: 静态吸附过程中, 2h 内的吸附率和吸附量增加非常迅速, 而 2h 后吸附率和吸附量增加明显趋缓, 吸附平衡时的吸附率为 $88.11\% \pm 4.25\%$, 吸附量为 $(228.5 \pm 8.5)\text{mg/g}$ 。

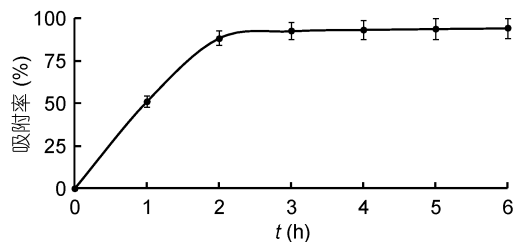


图 1 D101 大孔吸附树脂对金枪鱼碎肉蛋白酶解物吸附率随时间的变化($n=3$)

Fig.1 Absorption rate of D101 macroporous adsorption resin at varying time ($n=3$)

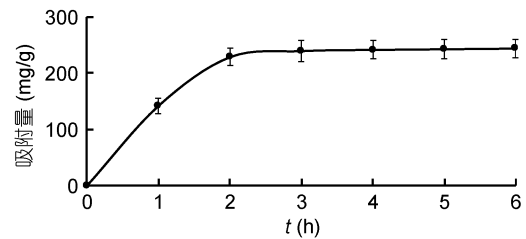


图 2 D101 大孔吸附树脂对金枪鱼碎肉蛋白酶解物吸附量随时间的变化($n=3$)

Fig.2 Absorption capacity of D101 macroporous adsorption resin at varying time ($n=3$)

2.2.2 D101 大孔吸附树脂对金枪鱼碎肉蛋白酶解物的静态解析

表 3 结果表明: 所选解析液中, 水的解吸率最低, 只有 $15.27\% \pm 1.23\%$; 而乙醇/水的解吸率随乙醇体积分数的增加而逐渐增大, 75%乙醇的解吸率可达到 $87.44\% \pm 3.29\%$, 但当采用无水乙醇时, 解吸率较 75%乙醇有所下降, 为 $82.83\% \pm 4.38\%$ 。原因可能是部分分子量较大的金枪鱼碎肉蛋白酶解物在无水乙醇中溶解性较差, 导致解吸率下降。

表 3 不同解吸剂对金枪鱼碎肉蛋白酶解物的解吸效果($n=3$)

Tab.3 Effect of different eluents on desorbing protein hydrolysate of tuna ground meat from D101 macroporous adsorption resin ($n=3$)

解吸剂	水	25%乙醇	50%乙醇	75%乙醇	无水乙醇
解吸率(%)	15.27 ± 1.23	31.17 ± 1.51	59.34 ± 3.71	87.44 ± 3.29	82.83 ± 4.38

2.2.3 流速对 D101 大孔吸附树脂动态吸附性能的影响

流速主要影响溶质向树脂表面的扩散, 从而决定了固定床动态吸附效率。不同流速对 D101 大孔吸附树脂的穿透点体积和吸附量影响如表 4 所示。结果表明: 酶解物流速从 0.8 BV/h、1.5 BV/h 增加到 3.0 BV/h 时, 穿透点体积从 $(28.33 \pm 1.13)\text{mL}$ 、 $(24.57 \pm 2.17)\text{mL}$ 下降到 $(19.45 \pm 1.36)\text{mL}$, 减小了 31.3%; D101 大孔吸附树脂对酶解物的吸附量也从 $(7.31 \pm 0.41)\text{mg/g}$ 、 $(6.41 \pm 0.25)\text{mg/g}$ 下降到 $(4.17 \pm 0.32)\text{mg/g}$, 下降了 43.0%。

实验结果表明: 随着酶解物流速的增加, 吸附速率也逐渐增大, 穿透点明显提前, 但 D101 树脂对酶解物的吸附量明显降低。因此, 金枪鱼碎肉蛋白酶解物经过 D101 大孔吸附树脂的流速确定为 1.5 BV/h。

表 4 不同流速时金枪鱼碎肉蛋白酶解物溶液的穿透点体积和吸附量($n=3$)

Tab.4 Volume of breakthrough point and adsorption capacity at different flow rates ($n=3$)

流速(BV/h)	0.8	1.5	3.0
穿透体积(mL)	28.33 ± 1.13	24.57 ± 2.17	19.45 ± 1.36
树脂吸附量(mg/g)	7.31 ± 0.41	6.41 ± 0.25	4.17 ± 0.32

2.2.4 质量浓度对大孔吸附树脂动态吸附性能的影响

金枪鱼碎肉蛋白酶解物溶液质量浓度(5, 10, 20mg/mL)对 D101 大孔吸附树脂穿透点体积和吸附量的影响如表 5 所示: 随着酶解物质量浓度的增加, 穿透点体积从 $(26.75 \pm 1.59)\text{mL}$ 、 $(20.47 \pm 1.24)\text{mL}$ 变化为 $(15.32 \pm 1.08)\text{mL}$, 说明 D101 吸附树脂随着样品质量浓度的增加, 吸附达到饱和的时间逐渐缩短, 树脂易于达到饱和。树脂对高浓度的酶解物具有高的吸附量, 酶解物浓度 10mg/mL 比 5mg/mL 时的吸附量增加了 4.10 mg/g, 而 20 mg/mL 时的吸附量比 10 mg/mL 时增加了 2.34 mg/g, 随着酶解物质量浓度的增加, 树脂的吸附量逐渐达到最大值。因此, 确定酶解物经过

表 5 不同质量浓度金枪鱼碎肉蛋白酶解物溶液的穿透点体积和吸附量($n=3$)

Tab.5 Volume of breakthrough point and adsorption capacity at different concentrations of protein hydrolysate of tuna ground meat ($n=3$)

质量浓度(mg/mL)	5	10	20
穿透体积(mL)	26.75 ± 1.59	20.47 ± 1.24	15.32 ± 1.08
树脂吸附量(mg/g)	5.13 ± 0.29	9.23 ± 0.63	11.57 ± 0.85

D101 大孔吸附树脂的质量浓度为 10 mg/mL。

2.2.5 金枪鱼碎肉蛋白酶解物脱盐制备及 ACE 抑制率 根据上述结果, 确定金枪鱼碎肉蛋白酶解物脱盐的工艺条件为: 上样质量浓度 10mg/mL、上样流速 1.5 BV/h、解吸剂 75%乙醇。在该工艺条件下对金枪鱼碎肉蛋白酶解物进行脱盐, 收集的洗脱液经真空浓缩和冷冻干燥后得到酶解物, 得率为 $65.35\% \pm 3.05\%$ 。结果表明, 脱盐后的金枪鱼碎肉蛋白酶解物在 10 mg/mL 浓度下的 ACE 抑制活性从 $71.43\% \pm 5.19\%$ 增加到 $81.76\% \pm 4.38\%$, 脱盐效果良好。

2.3 金枪鱼碎肉蛋白酶解物的超滤分级

金枪鱼碎肉蛋白酶解物(TPAP)用截留分子量为 3 kDa 和 1 kDa 的超滤膜超滤分级, 得三个组分: TPAP-I (MW > 3kDa)、TPAP-II (3kDa > MW > 1kDa) 和 TPAP-III (MW < 1kDa)。如图 3 所示: 在 5 mg/mL 浓度下, TPAP-I、TPAP-II 和 TPAP-III 的 ACE 抑制率分别为 $65.38\% \pm 3.53\%$ 、 $85.81\% \pm 2.85\%$ 和 $96.33\% \pm 3.07\%$ 。TPAP-III 的活性高于总酶解物及其他超滤分段部位。

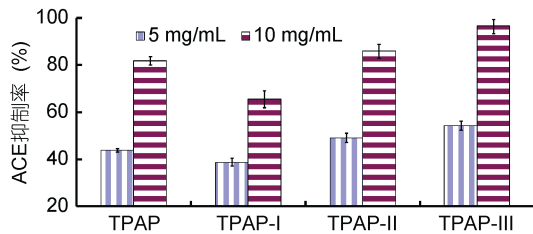


图 3 金枪鱼碎肉蛋白酶解物及其超滤分级部分的 ACE 抑制率 ($n=3$)

Fig.3 ACE inhibition ratio of TPAP and its fractions by ultrafiltration ($n=3$)

据报道, 蛋白酶解物的生物活性与其分子量具有密切关系, 小分子量的多肽易于与靶点结合或通过血脑屏障而发挥其生物活性(Pihlanto-Leppälä, 2001; Ranathunga *et al*, 2006; Wang *et al*, 2012)。因此, TPAP-III 的高活性与所含大量的低分子量多肽关系密切。

2.4 TPAP-III 的 Sephadex G-25 凝胶过滤层析

图 4 表明: TPAP-III 经 Sephadex G-25 凝胶过滤层析后得 5 个洗脱组分: TPAP-III-1、TPAP-III-2、TPAP-III-3、TPAP-III-4 和 TPAP-III-5。5 个组分的 ACE 抑制率如图 5 所示: 在 3 mg/mL 和 5 mg/mL 浓度下, TPAP-III-4 均显示出最强的 ACE 抑制率, 分别为 $43.4\% \pm 1.75\%$ 和 $73.25\% \pm 1.83\%$ 。

2.5 TPAP-III-4 的纯度检测和氨基酸序列分析

TPAP-III-4 经 RP-HPLC 检测基本为单一峰(图 6),

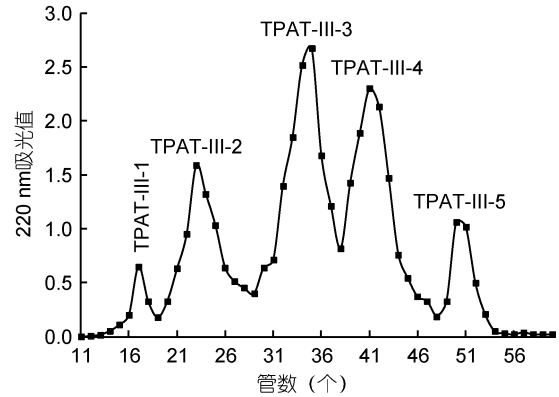


图 4 TPAP-III 的 Sephadex G-25 凝胶过滤层析
Fig.4 Gel filtration chromatography of TPAP-III on a Sephadex G-15 column

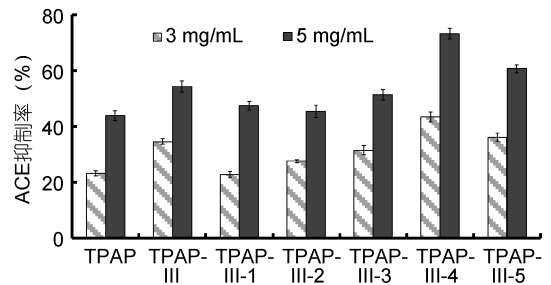


图 5 TPAP-III 的 Sephadex G-25 凝胶过滤层析分段部位的 ACE 抑制率 ($n=3$)

Fig.5 ACE inhibition ratio of fractions from TPAP-III

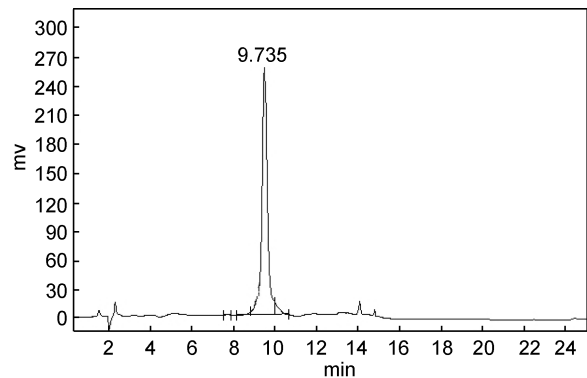


图 6 TPAP-III-4 的 RP-HPLC 图
Fig.6 RP-HPLC chromatogram of TPAP-III-4

纯度达到氨基酸序列分析的要求。利用 Edman 降解法经蛋白质序列分析仪测定 TPAP-III-4 的序列为 Phe-Gly-Gly-Val (FGGV), ESI-MS 检测给出分子离子峰 m/z 379.50 $[M+H]^+$ (图 7), 与理论分子量 378.42Da 相吻合。

3 结论

本实验以 ACE 抑制率为指标, 采用碱性蛋白酶

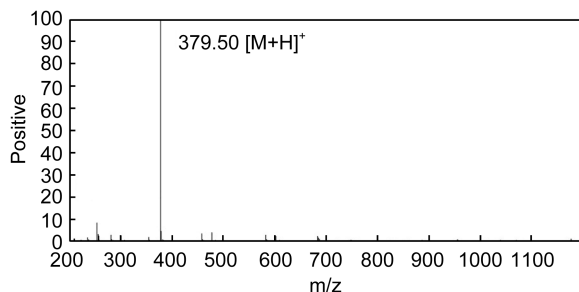


图 7 TPAP-III-4 质谱图
Fig.7 Mass spectrogram of TPAP-III-4

从金枪鱼碎肉蛋白中制备降压肽, 极差 R 分析表明: 酶用量是优化条件中影响最大的因素, 酶解时间的影响最小, 最佳酶解工艺条件为: 酶用量 1.5%, pH 9.5, 酶解温度 50°C, 酶解时间 5h。利用 D101 大孔吸附树脂对酶解物进行脱盐处理的工艺条件为: 上样质量浓度 10 mg/mL、流速 1.5 BV/h、解吸剂 75% 乙醇。

脱盐酶解物经过超滤和凝胶渗透色谱分离纯化, 得到 ACE 抑制率较好的单体降压肽 Phe-Gly-Gly-Val (FGGV)。已有的研究证明寡肽相对于蛋白质或单一氨基酸具有更强的生物活性和更易在体内吸收的优点(Wang *et al*, 2012, 2013; Luo *et al*, 2013; Chi *et al*, 2014)。Phe-Gly-Gly-Val (FGGV)为四肽化合物, 分子量小, 易于在人体内吸收, 从而更容易发挥较强的降压功效。另外, Cheung 等(2009)发现活性较强的 ACE 抑制肽 C 端氨基酸一般为具环状结构的芳香族氨基酸(如色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸等)或脯氨酸; N 端为长链或具支链的疏水氨基酸(如缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸等)或碱性氨基酸可以提高肽的抑制活性。综上分析可推知, Phe-Gly-Gly-Val (FGGV)具有强的 ACE 抑制活性是由于其分子量小、含有活性氨基酸及其氨基酸排列顺序等因素综合影响的结果。

参 考 文 献

于 娅, 杨瑞金, 王 璋, 2004. 牡蛎短肽的制备及 ACE 抑制活性. 无锡轻工大学学报, 23(2): 49—53
杜 帅, 宋 茹, 郑 斌等, 2013. 风味蛋白酶水解金枪鱼 (*Eleotridae*)碎肉蛋白的动力学模型研究. 海洋与湖沼, 44(4): 1073—1077
罗红宇, 杜 帅, 郑 斌等, 2013. 双酶分步水解金枪鱼 (*Eleotridae*)碎肉制备高 F 值酶解液的工艺研究. 海洋与湖沼, 44(4): 906—912
徐怀德, 殷金莲, 冯丽丹等, 2008. 甲鱼蛋白酶解物体外 ACE 抑制和抗氧化活性研究. 中国食品学报, 8(2): 58—64

谭洪亮, 郁 迪, 王 斌等, 2014. 金枪鱼鱼骨胶原肽的制备及抗氧化活性研究. 水产学报, 38(1): 143—148
戴志远, 朱凤仙, 张燕平等, 2009. 河蚌酶解降压肽的初步分离及性质研究. 中国食品学报, 9(4): 76—81
Cheung I W, Nakayama S, Hsu M N *et al*, 2009. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (*Avena sativa*) proteins by in silico and in vitro analyses. J Agric Food Chem, 57(19): 9234—9242
Chi C F, Wang B, Deng Y Y *et al*, 2014. Isolation and characterization of three antioxidant pentapeptides from protein hydrolysate of monkfish (*Lophius litulon*) muscle. Food Res Int, 55: 222—228
Cushmand W, 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol, 20(2): 1673—1675
Enari H, Takahashi Y, Kawarasaki M *et al*, 2008. Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from salmon muscle and their antihypertensive effect. Fish Sci, 74(4): 911—920
Fujita H, Yoshikawa M, 1999. LKPNM: a prodrugtype ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. Immunopharmacology, 44(1/2): 123—127
Jae Y J, Pyo J P, Ji Y K *et al*, 2004. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. J Agric Food Chem, 52(26): 7842—7845
Lee J K, Jeon J K, Byun H G, 2014. Antihypertensive effect of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats. J Funct Foods, 7: 381—389
Liu X, Zhang M, Jia A *et al*, 2013. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from jellyfish *Rhopilema esculentum*. Food Res Int, 50(1): 339—343
Luo H Y, Wang B, Li Z R *et al*, 2013. Preparation and evaluation of antioxidant peptide from papain hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle protein. LWT-Food Sci Technol, 51: 281—288
Pihlanto-leppälä A, 2001. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. Trends Food Sci Tech, 11(9/10): 347—356
Ranathunga S, Rajapakse N, Kim S K, 2006. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). Eur Food Res Technol, 222(3/4): 310—315
Shyni K, Hema G S, Ninan G *et al*, 2014. Isolation and characterization of gelatin from the skins of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), dog shark (*Scoliodon sorrakowah*), and rohu (*Labeo rohita*). Food Hydrocolloid, 39: 68—76
Toriki H, 1993. Inhibition of angiotensin converting enzyme by *Bacillus iicheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sardine muscle. Biosci Biotech Bioch, 67(1): 921—924
Wang B, Li Z R, Chi C F *et al*, 2012. Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle. Peptides, 36: 240—250
Wang B, Li L, Chi C F *et al*, 2013. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. Food Chem, 138: 1713—1719

**PREPARATION AND CHARACTERISATION OF AN ANTIHYPERTENSIVE
PEPTIDE FROM PROTEIN HYDROLYSATE OF ASKIPJACK TUNA
(*KATSUWONUS PELAMIS*) GROUND MEAT**

ZHANG Peng¹, HE Mao-Su¹, CHI Chang-Feng¹, WANG Bin²

(1. School of Marine Science and Technology, National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. School of Food and Pharmacy, Zhejiang Provincial Key Engineering Technology Research Center of Marine Biomedical Products, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract In this text, the conditions of alcalase hydrolysis on askipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) ground meat and desalting process of the protein hydrolysate were optimized, and the antihypertensive peptide was isolated from the hydrolysate by using ultrafiltration and gel filtration chromatography, and its structure was determined using ESI-MS and Procise Protein/Peptide Sequencer. The protein hydrolysate with high ACE inhibition ratio was gained under the optimal conditions of temperature 50°C, pH 9.5, enzymatic hydrolysis time 5 h, and amount of enzyme 1.5%. The condition for desalting process was optimized as followed: loading sample concentration of 10 mg/mL, sampling flow rate of 1.5 BV/h and 75% alcohol as eluent. The fractions and purified peptide from desalting hydrolysate were prepared by using ultrafiltration and Sephadex G-25 column, and a tetrapeptide with high ACE inhibition was isolated and identified as Phe-Gly-Gly-Val (FGGV). The present results suggested that the protein hydrolysate, fractions and purified peptide of tuna ground meat could be used as natural antihypertensive drugs, foods or additives.

Key words askipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) ground meat; antihypertensive peptide; alcalase; macroporous adsorption resin; angiotensin converting enzyme (ACE)