

龙须菜蛋白的提取工艺优化及降血压组分制备

沈嘉森^{1,2,3}, 苏永昌³, 陈晓婷³, 刘淑集³, 许 旻³, 刘智禹^{3*}, 林河通^{1,2*}

(1. 闽台特色海洋食品加工及营养健康教育部工程研究中心, 福州 350002;

2. 福建农林大学食品科学学院, 福州 350002; 3. 福建水产研究所, 国家海水鱼类加工技术研发中心, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 厦门 361013)

摘 要: **目的** 优化龙须菜蛋白的提取工艺, 并制备降血压组分。**方法** 从胃蛋白酶、中性蛋白酶、碱性蛋白酶和胰蛋白酶中筛选能获得最佳蛋白提取率的蛋白酶, 采用单因素试验考查 pH、底物浓度、酶解温度、酶底比、酶解时间对蛋白提取率和 ACE 抑制率的影响, 采用响应面法确定最佳工艺条件, 采用超滤膜分离技术龙须菜蛋白酶解液中制备血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制肽, 并考察其 ACE 抑制率。**结果** 最佳酶解工艺条件为: pH 8.4、底物浓度 18%、温度 55 °C、酶底比 2.0%、碱性蛋白酶酶解 3 h, 酶解液的蛋白提取率为(19.54±0.56)%、ACE 抑制率为(91.12±0.17)%; 将酶解液分别通过 10、5、1 kDa 超滤膜, 利用 ACE 抑制率来验证降血压活性, 1 kDa 超滤膜的酶解液 ACE 活性最高, 达到(71.37±0.22)%。**结论** 龙须菜可作为分离纯化制备龙须菜降血压肽的优质资源。

关键词: 龙须菜; 酶解; 超滤膜分离; 蛋白提取率; 血管紧张素转换酶抑制肽

Optimization of extraction technology of *Gracilariopsis lemaneiformis* protein and preparation of blood pressure lowering components

SHEN Jia-Sen^{1,2,3}, SU Yong-Chang³, CHEN Xiao-Ting³, LIU Shu-Ji³, XU Min³,
LIU Zhi-Yu^{3*}, LIN He-Tong^{1,2*}

(1. Engineering Research Centre of Fujian-Taiwan Special Marine Food Processing and Nutrition, Ministry of Education, Fuzhou 350002, China; 2. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Fisheries Research Institute of Fujian, National Research and Development Center for Marine Fish Processing, Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Xiamen 361013, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the extraction process of protein from *Gracilariopsis lemaneiformis*, and prepare blood pressure lowering components. **Methods** The protease which could obtain the optimal protein extraction rate was screened from pepsin, neutral protease, alkaline protease, trypsin. The effects of pH, substrate

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0901102)、2020 年福建省海洋与渔业结构调整专项(2020HYJG06)、福建省省属公益类科研院所基本科研专项(2020R10130015)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901102), the Fujian Province Marine and Fishery Structure Adjustment Special Project (2020HYJG06), and the Basic Scientific Research Projects of Fujian Provincial Public Welfare Research Institutes (2020R10130015)

***通信作者:** 刘智禹, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为水产品加工与综合利用。E-mail: 13906008638@163.com

林河通, 博士, 教授, 主要研究方向为果蔬保鲜。E-mail: hetonglin@163.com

***Corresponding author:** LIU Zhi-Yu, Ph.D, Professor, Fisheries Research Institute of Fujian, Dongdu Haishan Road, Xiamen 361013, China. E-mail: 13906008638@163.com

LIN He-Tong, Ph.D, Professor, Fujian Agriculture and Forestry University, Jianxin Shangxiadian Road, Fuzhou 350002, China. E-mail: hetonglin@163.com

concentration, enzymolysis temperature, enzymolysis ratio and enzymolysis time on protein extraction rates and ACE inhibition rates were investigated by single factor test. Response surface methodology was used to determine the optimal process conditions, the angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides were prepared by ultra-filtration membrane separation technique from the proteolysis solution of *Gracilariopsis lemaneiformis*, and the ACE inhibition rate was investigated. **Results** The optimal enzymatic hydrolysis process was: The pH 8.4, substrate concentration 18%, enzymolysis temperature 55 °C, ratio of enzyme to substrate 2.0%, alkaline protease enzymatic hydrolysis for 3 h. Under these conditions, the protein recovery was (19.54±0.56)% and ACE inhibition rate was (91.12±0.17)%; the hypotensive activity of the enzymolysis solution was verified by the ACE inhibition rate of 10, 5 and 1 kDa ultra-filtration membranes. The ACE activity of the enzymolysis solution of 1 kDa ultra-filtration membrane was the highest, reaching (71.37±0.22)%. **Conclusion** *Gracilariopsis lemaneiformis* can be used as a high quality resource for the separation and purification of hypotensive peptide.

KEY WORDS: *Gracilariopsis lemaneiformis*; enzymolysis; ultra-filtration membrane separation; protein extraction rate; angiotensin converting enzyme inhibitory peptides

0 引言

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)属红藻门,江蓠科,江离属,别名海草或海菜,是第3大海洋藻类植物,富含多糖和蛋白质等营养资源^[1],已开发出多糖、多肽、藻红蛋白、膳食纤维等多种生物活性物质,有极大的食用和药用价值,如龙须菜多糖有调节免疫^[2]、调节肠道菌群、降血糖等作用^[3];龙须菜多肽具有抗氧化功效^[4];提取的藻红蛋白具有清除自由基的作用^[5],并且能够制备成膳食纤维食品^[6]。目前,国内有关龙须菜多糖和藻红蛋白的研究很多,然而有关活性多肽开发的研究较少。

高血压是以肾素-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)为主的动脉收缩压或舒张压升高的疾病,患者只能服用降血压药抑制疾病,但通常伴随高烧、干咳等不良反应^[7]。血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)抑制肽能够抑制血管紧张素II和缓激肽的生成,从而降低血压,具有调节两大系统血压平衡的作用。ACE抑制肽因具有高效降压、易吸收等优势深受广大消费者青睐。

当前,通过直接提取法、酸碱法、虚拟筛选法和酶解法均能提取蛋白,酶解法(enzymatic hydrolysis)根据蛋白酶具有不同的特异性酶切位点,将蛋白质分子酶切成多个小片段的氨基酸序列,从而获得具有降血压功效的ACE抑制肽等天然产物,是目前制备活性肽最常用的方法,具有专一性和高效性。因此,本研究将从生物酶解法研究龙须菜的蛋白提取工艺。

目前,鱼类^[8]、虾类^[9]、贝类^[10]等领域在开发ACE抑制肽的研究较多,而藻类^[11]的报道集中在多糖方面,在多肽开发领域的研究较少,且目前国内关于酶解液活性成分的报道很多^[4,12],但关于蛋白提取和活性成分开发综合研究较少。基

于此,本研究使用酶解法^[13]工艺,结合超滤膜分离技术,通过单因素试验和响应面法,优化龙须菜多肽(*Gracilaria lemaneiformis* peptides, GLP)的提取工艺,制备降血压活性成分,为ACE抑制肽在功能性食品开发提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

龙须菜,产自福建诏安。

胰蛋白酶(250 U/mg,上海源叶生物科技有限公司);碱性蛋白酶(50 U/mg,庞博生物工程有限公司);中性蛋白酶(200 U/mg,北京索莱宝科技有限公司);胃蛋白酶(500 U/mg,马尿酸-组氨酸-亮氨酸(N-hippuryl-His-Leu hydrate, HHL, 100 mg)、血管紧张素转化酶(0.25 U)(美国Sigma公司);Pierce™ BCA蛋白检测试剂盒、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 2 mg/mL)(美国赛默飞世尔科技公司);三氟乙酸、乙腈、磷酸盐缓冲液、硼酸、硼砂、浓盐酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);实验用水为超纯水。

Five Easy pH计(瑞士梅特勒-托利多公司);M450型酶标仪(美国BIO-RAD公司);Waters e2695型高效液相色谱仪(中国Alliance公司);ST16R型高速冷冻离心机(美国Thermo Sorvall公司);EJ-610型分析天平(日本A&D公司);VE500型电热鼓风干燥箱(上海美墨尔特贸易有限公司);数显型恒温水浴锅(上海力辰邦西器科技有限公司);200 nm陶瓷膜、不同分子量孔径陶瓷膜和超滤膜(10、5、1 kDa)(厦门福美科技有限公司)。

1.2 酶法提取工艺

龙须菜晒干藻枝清洗→沥水→烘干→复水溶胀→在适宜条件酶解得提取液→灭酶(100 °C、10 min)→离心(8000 r/min、4 °C、20 min)→取上清液→0.45 μm滤膜过滤,所得溶液为龙须菜粗蛋白酶解液→200 nm陶瓷膜过滤→

不同孔径的超滤膜分离→冻干为龙须菜多肽(GLP)。

1.2.1 龙须菜提取液蛋白提取率测定

龙须菜蛋白含量参考林彬彬等^[14]的 BCA 法在 570 nm 波长下测定,结果以湿基计,按照公式(1)计算:

蛋白提取率/%= $\frac{\text{提取液蛋白含量(mg)}}{\text{龙须菜原料蛋白含量(mg)}} \times 100\%$ (1)

配制 0、125、250、500、1000、1500、2000 μg/mL 的牛血清蛋白溶液,以牛血清蛋白溶液质量浓度为横坐标(X, μg/mL),吸光值为纵坐标(Y),绘制 BCA 蛋白标准曲线,其 $Y=1.1256X+0.0613$, $r^2=0.09949$ 。

1.2.2 龙须菜酶解液 ACE 抑制率的测定

参照 WU 等^[15]的方法并修改:将 100 μL 的 HHL 溶液加入 100 μL 酶解液,在 37 °C 水浴锅反应 5 min,加 50 μL 血管紧张素转化酶,在水浴 37 °C 水浴锅反应 60 min,加入 200 μL 的 11.40 mol/L HCl 终止过程。同时把酶解液换成超纯水做空白对照。

ACE 抑制率/%= $\frac{A-B}{A} \times 100\%$ (2)

式中: A 为纯水的马尿酸峰面积, B 为酶解液的马尿酸峰面积。

1.3 最佳蛋白酶的选择

参照 WANG 等^[16]的酶法提取工艺,在适宜条件下酶解,详见表 1,在 1、2、3、4、5、6 h 取提取液进行蛋白提取率测定,在 6 h 测定 ACE 抑制率。

表 1 不同蛋白酶的提取条件
Table 1 Extraction conditions of different proteases

	pH	温度/°C	酶底比/%	底物浓度/%
胰蛋白酶	8	37	2	10
碱性蛋白酶	8	50	2	10
中性蛋白酶	7	50	2	10
胃蛋白酶	2	37	2	10

注:底物浓度为龙须菜质量:纯水体积, m:V,下同。

1.4 单因素试验

以碱性蛋白酶为提取酶,根据表 2 的不同单因素提取工艺进行设计,研究 pH、底物浓度、酶解温度、酶解时间、酶底比对蛋白提取率、ACE 抑制活性的影响。

表 2 单因素提取条件
Table 2 Extraction conditions of single factors

	pH	酶解温度/°C	酶底比/%	底物浓度/%	时间/h
pH 单因素试验	7.5/8.0/8.5/9.0/9.5	50	2.0	10	3
底物浓度单因素试验	8.5	50	2.0	10/12/14/16/18/20	3
酶解温度单因素试验	8.5	40/45/50/55/60	2.0	18	3
酶解时间单因素试验	8.5	55	2.0	18	1/2/3/4/5/6
酶底比单因素试验	8.5	55	1.0/1.5/2.0/2.5/3.0	18	3

1.5 响应面优化工艺

根据单因素试验结果,结合 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,将时间和酶底比作为固定量,选取 pH (A)、底物浓度(B)、酶解温度(C)为自变量,以蛋白提取率及 ACE 抑制活性作为响应值,进行三因素三水平的响应面试验,试验设计因素编码及水平见表 3^[17]。

表 3 Box-Behnken 试验设计因素编码
Table 3 Factor coding of Box-Behnken experimental design

编码	A pH	B 底物浓度/%	C 酶解温度/°C
-1	8.0	16	50
0	8.5	18	55
1	9.0	20	60

1.6 龙须菜蛋白酶解液分离

得到最佳酶解工艺的龙须菜酶解液,通过 200 nm 的陶瓷膜过滤大颗粒杂质,利用 3 个不同分子量孔径的超滤膜(10、5、1 kDa)过滤得到 4 个组分的多肽,分别为>10 kDa

的组分 GLP-1; 5~10 kDa 的组分 GLP-2; 1~5 kDa 的组分 GLP-3; <1 kDa 的组分 GLP-4。各组分溶液在真空冷冻干燥机下冻干,并配制成 2 mg/mL 的多肽溶液,考察不同组分的 ACE 抑制率。

1.7 统计分析

所得数据在 Design-Expert 8.0 进行多元回归分析,采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计和 Origin 2017 进行图片绘制,以 α=0.05 作为差异显著水平。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶筛选

由图 1 可知,碱性蛋白酶的蛋白提取率最高,从第 1 h 的 8.6%到第 6 h 的 14.32%,增加 5.72%,且 4 种酶的蛋白提取率都随着时间的增加而增大。由于蛋白酶酶切位点的专一性和高效性,随着酶解时间延长,肽链酶解越完全,酶解生物活性效果越好,可溶性蛋白提取成分也更多^[14],姚兴存等^[18]研究发现,分子量<2 kDa 的条斑紫菜活性肽水解 4 h 后

的降血压抑制活性可达30%以上。图2是第6h酶解条件下的ACE抑制率,虽然胃蛋白酶的龙须菜酶解产物ACE抑制率最高,为92.88%,但其酶解pH过低,容易破坏藻枝,阻碍蛋白提取,严重影响酶解效果,反观,利用碱性蛋白酶得到的龙须菜酶解产物完整,ACE抑制率为82.16%,高于胰蛋白酶79.78%和中性蛋白酶80.43% ($P<0.05$),具有较高的ACE抑制率。综上,碱性蛋白酶最适合提取龙须菜蛋白,有开发利用潜力。

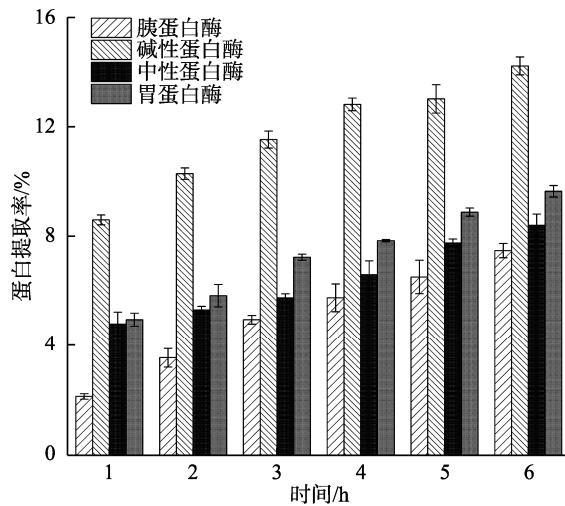
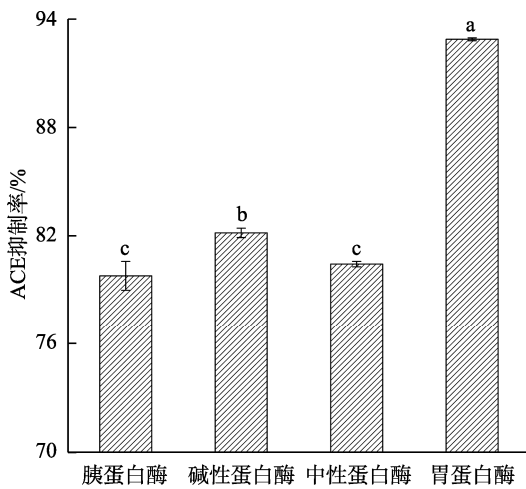


图1 不同蛋白酶的蛋白提取率($n=3$)

Fig.1 Protein extraction rates of different proteases ($n=3$)



注:龙须菜在各种酶最适的酶解条件下酶解6h,不同小写字母表示组间差异显著, $P<0.05$ 。

图2 不同蛋白酶酶解产物的ACE抑制率($n=3$)

Fig.2 ACE inhibitory activities of enzymolysis products of different proteases ($n=3$)

2.2 单因素试验结果

2.2.1 pH的选择

由图3可知,随着pH增加,pH在8.0、8.5、9.0时,蛋白提取率和ACE抑制率呈现凸型,各pH之间的ACE抑制

率有显著性差异($P<0.05$),ACE抑制率蛋白提取率和ACE抑制率均呈现先增大后减小的趋势,在pH 8.5达到最高点,蛋白提取率为13.43%、ACE抑制率为86.87%,龙须菜蛋白增加,所得酶解液的ACE抑制活性也随之增大。故以pH 8.0、8.5、9.0进行后续响应面优化试验。

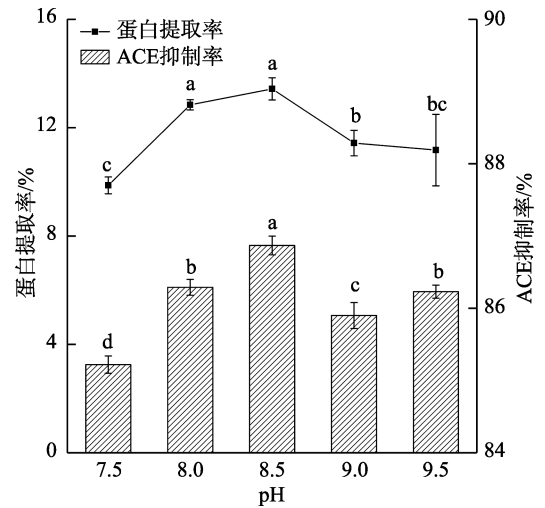


图3 pH对蛋白提取率和ACE抑制率的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of pH on protein recoveries and ACE inhibitory activities ($n=3$)

2.2.2 底物浓度的选择

由图4可知,蛋白提取率和ACE抑制率都随着底物浓度的增大而增大,尤其是在底物浓度18%时,变化幅度更为显著。蛋白提取率与底物浓度息息相关:底物浓度越低,水解得到蛋白含量减少;底物浓度越高,龙须菜酶解过程中易复水,造成藻液过少,不利于碱性蛋白酶水解^[19],从而造成酶解液蛋白提取率和ACE抑制率都偏低,在底物浓度为18%时与底物浓度16%、20%均有显著性差异。综上,选择底物浓度16%、18%和20%进行响应面优化试验。

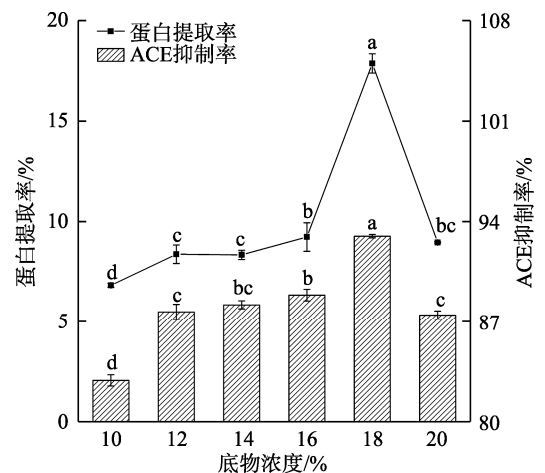


图4 底物浓度对蛋白提取率和ACE抑制率的影响($n=3$)

Fig.4 Effects of substrate concentrations on protein recoveries and ACE inhibitory activities ($n=3$)

2.2.3 温度的选择

由图5可知,在较为温和的40、45℃条件下,蛋白提取率变化不明显,在45℃之后,蛋白提取率随着温度升高而先快速增加后迅速降低,在55℃条件下可达到最高,为21.98%,温度继续升高至60℃时,对应的蛋白提取率迅速降低($P<0.05$),产生剧烈波动的可能原因是超过了酶的最适宜温度时,酶逐渐失活;而此时ACE抑制率随着温度升高却没有显著性变化。综上,选择50、55、60℃进行响应面优化试验。

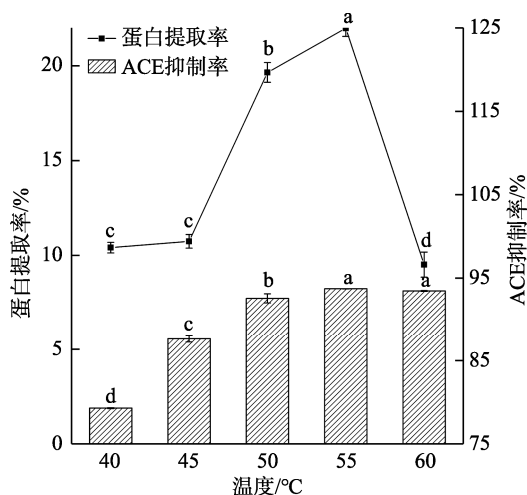


图5 酶解温度对蛋白提取率和ACE抑制率的影响($n=3$)

Fig.5 Effects of enzymolysis temperature on protein recoveries and ACE inhibitory activities ($n=3$)

2.2.4 酶底比的选择

由图6可知,蛋白提取率是随酶底比的添加而增大,加酶量越多,得到的龙须菜蛋白也越多,但ACE抑制率呈现逐渐增大后减小的趋势。在酶底比为2.0%时,ACE抑制率最高,推测原因在此反应条件下酶解充分,得到的氨基酸混合物有更高的ACE抑制活性。本研究以蛋白提取率为主,ACE抑制率为辅的工艺优化,因为蛋白提取率随酶底比增大而逐渐增大,各个酶底比条件没有呈现先升高后降低的趋势,因此酶底比作为响应面固定量,但ACE在2.0%酶底比有最佳ACE活性。综上,选择酶底比2.0%为最佳单因素酶解条件。

2.2.5 时间的选择

由图7可知,蛋白提取率随着反应时间的延长而增大,而ACE抑制率随着时间变化先增加后减小,第3h有最高抑制活性。可能原因在于:1~3h酶解初期,龙须菜蛋白快速地从胞内至胞外扩散,此时产生的酶解液活性也最高;超过3h后酶解液会有粘稠的多糖溶出^[20],不利于后续的多肽提取。因为随着时间增加,蛋白提取率越来越高,各个时间条件没有呈现先升高后降低的趋势,因此时间作为响应面固定量,但ACE抑制率在3h时ACE最高达(93.9±0.49)%。综上,选择时间3h为最佳单因素酶解条件。

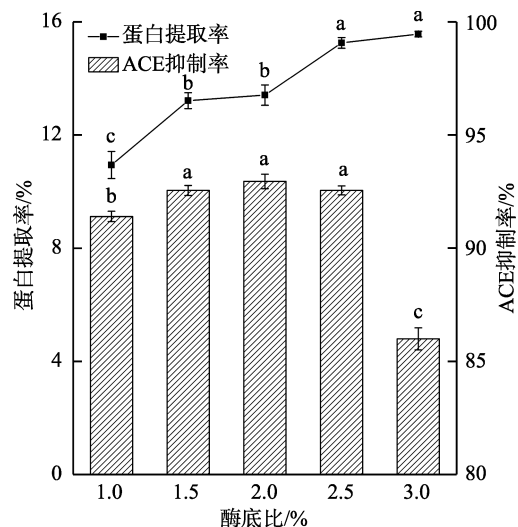


图6 酶底比对蛋白提取率和ACE抑制率的影响($n=3$)

Fig.6 Effects of ratios of enzyme to enzyme on protein recoveries and ACE inhibitory activities ($n=3$)

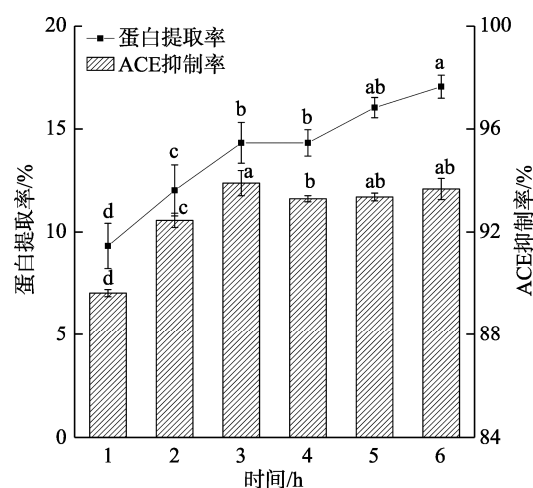


图7 酶解时间对蛋白提取率和ACE抑制率的影响($n=3$)

Fig.7 Effects of enzymolysis times on protein recoveries and ACE inhibitory activities ($n=3$)

2.3 酶解工艺响应面试验

2.3.1 Box-Behnken设计试验及结果

本研究用碱性蛋白酶提取龙须菜蛋白,根据上述单因素试验结果,选取对试验有显著影响的pH(A)、底物浓度(B)、酶解温度(C)为变量,固定酶底比和时间这两个单因素,研究三因素三水平的响应面试验,以蛋白提取率(Y_1)和ACE抑制率(Y_2)为响应值,试验结果数据处理见表4。

2.3.2 模型建立及方程拟合

建立响应面模型,结合Design Expert 8.0软件,对试验指标与各单因素数据之间进行多元回归拟合,得两条回归方程分别为: $Y_1=17.89-0.85A+0.21B+0.17C-0.40AB+0.83AC+0.097BC-3.13A^2-5.36B^2-3.96C^2$; $Y_2=92.33-0.49A+0.30B-0.53C$

+0.38AB+0.62AC-1.81BC-0.87A²-1.65B²-1.97C²; 由表 5 可知, Y₁ 方程回归模型的相关系数 R₂=0.9664, 说明模型的预测值可以解释 96.64%的试验结果, P<0.01, 模型极显著; 对于失拟项进行分析, P=0.0653, 差异不显著, 说明方程线性拟合, Y₁ 适用于该方程模型。同理, Y₂ 的相关系数 R²=0.8848, 说明模型的预测值可以解释 88.48%的试验结果, P<0.05, 模型有显著作用; 对于失拟项进行分析, P=0.2711, 差异不显著, 说明方程线性拟合, Y₂ 也适用于该方程模型。

响应值为蛋白提取率的模型中, 二次项 A²、B²、C² 对响应值影响极显著, 各单因素影响程度依次为 A>B>C, pH 对蛋白提取率的影响最大; 响应值为 ACE 抑制率的模型中, BC、C² 对响应值影响极显著, B² 对响应值有显著作用, 各单因素影响程度依次为 C>A>B, 因此温度对 ACE 抑制率的影响最大。

2.3.3 交互作用分析

图 8 为蛋白提取率和 ACE 抑制率交互作用曲面图。响应面若为开口向下的凸曲面, 说明在等高线中心有最大响应值, 能确定其单因素最佳水平范围^[17]。图 8 的蛋白提取率曲面图可知, 曲线越陡峭, 因素间相互作用越明显。底物浓度(B)和酶解温度(C)的交互作用极显著影响着酶解液 ACE 抑制率(P<0.01), 与方差分析结果一致。

表 4 Box-Behnken 设计方案及蛋白提取率、ACE 抑制率的测定结果

Table 4 Box Behnken design and determination of protein recovery and ACE inhibitory activity

序号	A pH	B 底物 浓度/%	C 酶解温度 /℃	Y ₁ 蛋白 提取率/%	Y ₂ ACE 抑制率/%
1	8.0	16	55	8.91	89.47
2	8.5	18	55	17.22	93.29
3	9.0	18	60	9.61	88.50
4	8.0	20	55	10.08	90.49
5	9.0	18	50	8.81	88.87
6	8.5	16	50	7.66	87.43
7	8.5	18	55	18.15	92.87
8	8.5	16	60	9.00	90.54
9	8.0	18	60	11.13	88.86
10	8.5	20	60	9.68	86.36
11	8.5	18	55	18.61	92.62
12	9.0	20	55	9.08	90.91
13	8.5	20	50	10.08	90.49
14	9.0	16	55	9.52	88.38
15	8.5	18	55	18.32	91.42
16	8.5	18	55	17.22	93.29
17	8.0	18	50	13.67	91.73

表 5 蛋白提取率、ACE 抑制率的方差分析
Table 5 Variance analysis of protein extraction rates and ACE inhibitory activities

方差来源	蛋白提取率/%						ACE 抑制率/%					
	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	263.02	9	29.22	22.35	0.0002	**	54.33	9	6.04	5.97	0.0139	*
A	5.73	1	5.73	4.38	0.0746	—	1.89	1	1.89	1.87	0.2135	—
B	0.36	1	0.36	0.28	0.6154	—	0.74	1	0.74	0.73	0.4210	—
C	0.22	1	0.22	0.17	0.6932	—	2.27	1	2.27	2.25	0.1777	—
AB	0.65	1	0.65	0.50	0.5041	—	0.57	1	0.57	0.56	0.4771	—
AC	2.79	1	2.79	2.13	0.1875	—	1.56	1	1.56	1.55	0.2537	—
BC	0.038	1	0.038	0.029	0.8694	—	13.10	1	13.10	12.97	0.0087	**
A ²	41.25	1	41.25	31.55	0.0008	**	3.15	1	3.15	3.12	0.1207	—
B ²	121.08	1	121.08	92.61	0.0001	**	11.47	1	11.47	11.35	0.0119	*
C ²	65.86	1	65.86	50.38	0.0002	**	16.39	1	16.39	16.22	0.0050	**
残差	9.15	7	1.31			—	7.07	7	1.01			—
失拟项	7.38	3	2.46	5.57	0.0653	—	4.15	3	1.38	1.90	0.2711	—
纯误差	1.77	4	0.44			—	2.92	4	0.73			—
总和	272.18	16				—	61.40	16				—

注: **为差异极显著, P<0.01, *为差异显著, P<0.05, —表示无显著差异。

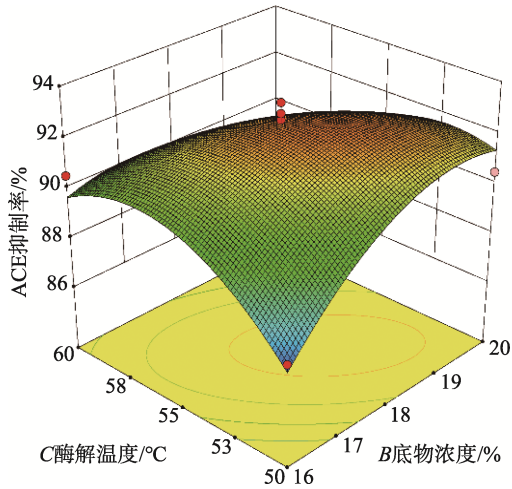


图 8 底物浓度、酶解温度的交互作用对 ACE 抑制率的影响
Fig.8 Interaction effects of substrate concentration and enzymolysis temperature on ACE inhibitory activities

2.3.4 工艺优化及模型验证

通过 Design Expert 8.0 软件分析蛋白提取率和 ACE 抑制率模型, 得出 pH 为 8.4、底物浓度 18.10%、酶解温度 54.7 °C、酶底比 2%的条件下酶法提取龙须菜 3 h, 蛋白提取率 17.92%、ACE 抑制率 92.44%。考虑到操作的可控性, 将最佳组合优化为 pH 为 8.4、底物浓度 18%、酶解温度 55 °C, 酶底比 2.0%的条件下酶法提取龙须菜 3 h, 排除其他外界因素干扰, 进行 3 组平行试验得到的龙须菜蛋白提取率为(19.54±0.56)%, ACE 抑制率为(91.12±0.17)%, 实际值与理论值相当接近, 蛋白提取率增加 1.62%, ACE 抑制率减少 1.32%。因此, 多元二次回归线性方程能直观准确地预测碱性蛋白酶提取龙须菜蛋白提取率和 ACE 抑制率。

2.4 龙须菜酶解产物的分离

超滤技术(ultra-filtration, UF)是分离蛋白、多肽等大分子物质的膜分离技术, 其作用原理是根据分子量截留的方式分离不同组分^[21], 小分子量截留液具有营养价值高、生物活性高、易被消化吸收等特点。李佳等^[22]超滤得到 3 kDa 以下的紫薯多酚复合物, 得到具有较高降血糖活性的多酚混合物, 显著增加胰岛素抵抗模型细胞对葡萄糖的消耗量。从表 6 可知, 通过最佳酶解工艺分离得到的 4 个龙须菜多肽组分, 分子量越小, 活性越高; GLP-4 组分 ACE 抑制率表征最高达(71.37±0.22)%, 因此得出结论: 龙须菜各组分多肽通过 <1 kDa 的超滤膜, 得到的 ACE 抑制率活性最高。从图 9 可知, ACE 抑制率随着各组分质量浓度的增加而增加, <1 kDa 的多肽具有较好的 ACE 抑制率。

3 结 论

本研究通过酶解技术筛选出蛋白提取率最高的碱性蛋白酶, 以蛋白提取率和 ACE 抑制率为指标, 通过单因素

试验和响应面法得到最优的酶解工艺。研究结果显示, 在 pH 8.4、底物浓度 18%、酶解温度 55 °C、酶底比 2.0%的条件下酶解碱性蛋白酶 3 h, 蛋白提取率为(19.54±0.56)%、ACE 抑制率为(91.12±0.17)%。利用超滤膜分离出<1 kDa 的多肽组分具有最高的 ACE 抑制率活性。目前, 已有以 ACE 抑制率为指标, 胰蛋白酶酶解龙须菜蛋白的报道, 本研究在此研究基础上以蛋白提取率为主, ACE 抑制率为辅, 优化龙须菜蛋白提取的条件, 在有效提取藻类植物蛋白的同时, 从生物活性方面考查提取物的效用价值。本研究为开发龙须菜蛋白、提高龙须菜资源开发利用率提供理论基础, 未来可进一步开展龙须菜蛋白纯化、龙须菜多肽的体外加工稳定性等方面的工作。

表 6 不同分子量组分 ACE 抑制率的分析(n=3)
Table 6 Analysis of ACE inhibitory activity of different molecular weight components (n=3)

组分	ACE 抑制率/%
GLP-1 (>10 kDa)	47.07±1.18 ^c
GLP-2 (5~10 kDa)	50.4±0.50 ^e
GLP-3 (1~5 kDa)	66.3±1.82 ^b
GLP-4 (<1 kDa)	71.37±0.22 ^a

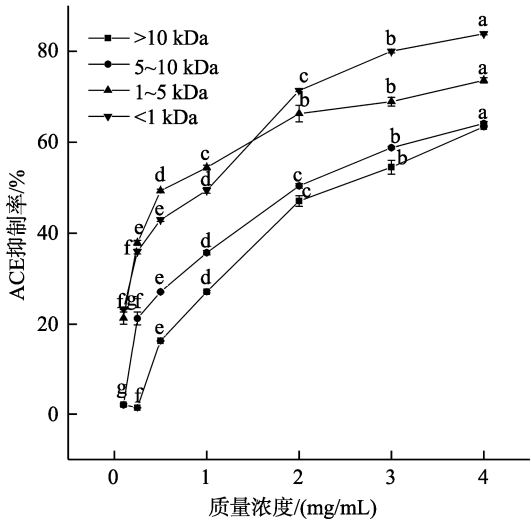


图 9 不同组分的 ACE 抑制率(n=3)
Fig.9 ACE inhibition rate of different components (n=3)

参考文献

[1] WEN X, PENG C, ZHOU H, *et al.* Nutritional composition and assessment of *Gracilaria lemaneiformis* Bory [J]. J Interg Plant Biol, 2006, 48(9): 1047–1053.
[2] FAN Y, WANG W, SONG W, *et al.* Partial characterization and anti-tumor activity of an acidic polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Carbohydr Polym, 2012, 88(4): 1313–1318.

- [3] HAN R, WANG L, ZHAO Z, *et al.* Polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* prevents colitis in Balb/c mice via enhancing intestinal barrier function and attenuating intestinal inflammation [J]. Food Hydrocolloid, 2020, 109(14): 448–458.
- [4] 于慧, 刘海梅, 李蒙娜, 等. 响应面法优化龙须菜蛋白酶解工艺及酶解液的抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2017, 38(12): 157–163, 170.
- YU H, LIU HM, LI MN, *et al.* Optimization for enzymatic hydrolysis of *Gracilaria lemaneiformis* protein and antioxidant activity of its hydrolysate [J]. Sci Technol Food Ind, 2017, 38(12): 157–163, 170.
- [5] 陈美珍, 张永雨, 余杰, 等. 龙须菜藻胆蛋白的分离及其清除自由基作用的初步研究[J]. 食品科学, 2004, (3): 159–162.
- CHEN MZ, ZHANG YY, YU J, *et al.* Studies on separation and scavenging activities on free radicals of phycobiliproteins from *Gracilaria lemaneiformis* [J]. Food Sci, 2004, (3): 159–162.
- [6] JI HY, YU J, DONG X, *et al.* Preparation of soluble dietary fibers from *Gracilaria lemaneiformis* and its antitumor activity *in vivo* [J]. J Food Meas Charact, 2019, 13(2): 1574–1582.
- [7] GU D, REYNOLDS K, WU X, *et al.* Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in China [J]. Hypertension, 2002, 40(6): 920–927.
- [8] CHEL-GUERRERO L, CUA-AGUAYO D, BETANCUR-ANCONA D, *et al.* Antioxidant and chelating activities from lion fish (*Pterois volitans* L.) muscle protein hydrolysates produced by *in vitro* digestion using pepsin and pancreatin [J]. Emir J Food Agric, 2020, 32(1): 62–72.
- [9] SUN R, LIU X, YU Y, *et al.* Preparation process optimization, structural characterization and *in vitro* digestion stability analysis of Antarctic krill (*Euphausia iasuperba*) peptides-zinc chelate [J]. Food Chem, 2021, 340: 128056.
- [10] 张雪妍. 太平洋牡蛎酶解产物分离及对小鼠睾丸间质细胞增殖和睾酮分泌的影响[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2019.
- ZHANG XY. Purification of enzymatic hydrolysate from oyster *Crassostrea gigas* and their effects on proliferation and testosterone secretion in TM3 leydigcells [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2019.
- [11] ZHENG LX, CHEN XQ, CHEONG K. Current trends in marine algae polysaccharides: The digestive tract, microbial catabolism, and prebiotic potential [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 151: 344–354.
- [12] 余虹, 操德群, 何艳丽, 等. 龙须菜蛋白酶解制备 ACE 抑制肽的工艺优化[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(2): 133–139.
- YU H, CAN DQ, HE YL, *et al.* Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for production of ACE inhibitory peptides [J]. Food Sci Biol, 2019, 38(2): 133–139.
- [13] BLEAKLEY S, HAYES M. Algal proteins: Extraction, application, and challenges concerning production [J]. Foods, 2017, 6(5): 33–67.
- [14] 林彬彬, 唐旭, 汪少芸. 龙须菜蛋白的提取及其功能性质研究[J]. 中国食品学报, 2018, 18(12): 137–143.
- LIN BB, TANG X, WANG SY. Studies on extraction of *Gracilaria lemaneiformis* protein and its properties [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2018, 18(12): 137–143.
- [15] WU JP, ALUKO RE, MUIR AD. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions [J]. J Chromatogr A, 2002, 950(1-2): 125–130.
- [16] WANG X, ZHANG X. Separation, antitumor activities, and encapsulation of polypeptide from *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Biotechnol Prog, 2013, 29(3): 681–687.
- [17] DANG TT, BOWYER MC, ALTENA IA, *et al.* Optimum conditions of microwave-assisted extraction for phenolic compounds and antioxidant capacity of the brown alga *Sargassum vestitum* [J]. Sep Sci Technol, 2017, 53(11): 1711–1723.
- [18] 姚兴存, 蒋栋磊, 盘赛昆, 等. 条斑紫菜蛋白酶解物降血压活性[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(2): 62–64, 69.
- YAO XC, JIANG DL, PAN SK, *et al.* Study on antihypertensive activity of bioactive oligopeptide from *Porphyra yezoensis* proteins [J]. Food Res Dev, 2011, 37(2): 62–64, 69.
- [19] 朱春霞, 李钟, 韩彬, 等. 海藻龙须菜化学成分及其活性的研究概况[J]. 中山大学研究生学刊(自然科学医学版), 2014, 35(3): 34–39.
- ZHU CX, LI Z, HAN B, *et al.* Overview of research on chemical constituents and pharmacological activities of *Gracilaria lemaneiformis* [J]. J Sun Yat-Sen Univ (Nat Sci Med), 2014, 35(3): 34–39.
- [20] 潘进权, 周鲜娇, 蒋边, 等. 复合蛋白酶水解螺旋藻制备多肽的工艺优化[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(11): 87–94.
- PAN JQ, ZHOU XJ, JIANG B, *et al.* Optimization on the preparation process of polypeptides from hydrolysis of *Spirulina* by compound protease [J]. J Chin Cere Oil Ass, 2019, 34(11): 87–94.
- [21] WU JP, YUAN LJ, ALUKO RE. Restriction of the *in vitro* formation of angiotensin II by leucyl-arginyl-tryptophan, a novel peptide with potent angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity [J]. Biosci Biotech Bioch, 2006, 70(5): 1277–1280.
- [22] 李佳, 帅晓艳, 李漫, 等. 紫薯多酚蛋白复合物酶解及降血糖组分制备工艺优化[J]. 食品科技, 2020, 45(9): 43–50.
- LI J, SHUAI XY, LI M, *et al.* Preparation and activity study of purple sweet potato hypoglycemic peptide [J]. Food Sci Technol, 2020, 45(9): 43–50.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介



沈嘉森, 硕士研究生, 主要研究方向
为水产品加工及贮藏工程。
E-mail: 905505974@qq.com



刘智禹, 博士, 教授级高级工程师, 主
要研究方向为水产品加工与综合利用。
E-mail: 13906008638@163.com



林河通, 博士, 教授, 主要研究方向为
果蔬保鲜。
E-mail: hetonglin@163.com