

红松仁多肽酶解制备工艺优化及降压降脂活性分析

王建成, 邢岩, 张丽梅

(新时代健康产业(集团)有限公司 国珍健康研究院, 北京 102206)

摘要: 为了对红松仁多肽的开发及应用提供参考, 以红松仁粕为原料, 采用酸浸提法提取红松仁蛋白, 然后采用酶解法制备红松仁多肽。以水解度为评价指标, 通过单因素实验和响应面实验对红松仁多肽酶解制备工艺条件进行了优化。同时, 对最佳工艺条件下制备的多肽的分子质量分布和氨基酸组成进行分析, 并测定了多肽的降压降脂活性。结果表明: 红松仁多肽的最佳酶解制备工艺条件为采用分步酶解法, 在酶解温度 50℃、底物质量浓度 6.0 g/100 mL、木瓜蛋白酶添加量 10 500 U/g、酶解 pH 6.0 条件下酶解 2.5 h, 然后在碱性蛋白酶添加量 10 970 U/g、酶解 pH 9.0 条件下酶解 2.3 h, 在此工艺条件下红松仁蛋白的水解度达 25.94%; 红松仁多肽的数均分子质量为 2 272 Da, 重均分子质量为 4 080 Da; 红松仁多肽中谷氨酸、精氨酸和天冬氨酸含量较高, 必需氨基酸含量占氨基酸总量的 30.23%; 红松仁多肽中分子质量小于 10 kDa 的多肽占 92%, 分子质量 0.5~1.0 kDa 的多肽具有最高的 ACE 抑制活性, IC_{50} 为 66.05 μ g/mL; 分子质量 1.0~5.0 kDa 的多肽具有最高的胰脂肪酶抑制活性, IC_{50} 为 194.43 μ g/mL。综上, 红松仁多肽具有较高的营养价值, 具有一定的 ACE 和胰脂肪酶抑制活性。

关键词: 红松仁; 多肽; 酶解; 降压活性; 降脂活性

中图分类号: TS229; O629.72 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2023)03-0040-07

Optimization of enzymatic hydrolysis preparation of Korean pine kernel polypeptide and analysis of its antihypertensive and lipid-lowering activities

WANG Jiancheng, XING Yan, ZHANG Limei

(Guozhen Health Research Institute, New Era Health Industry (Group) Co., Ltd., Beijing 102206, China)

Abstract: In order to provide reference for the development and application of Korean pine kernel polypeptide, the Korean pine kernel protein was extracted by acid leaching method with Korean pine kernel meal as raw materials, and then the polypeptide was prepared by enzymatic hydrolysis. Taking the degree of hydrolysis as the evaluation index, the single factor experiment and response surface methodology were used to optimize the enzymatic hydrolysis preparation process conditions of Korean pine kernel polypeptide. At the same time, the molecular mass distribution and amino acid composition of the polypeptides prepared under the optimal conditions were analyzed, and the antihypertensive and lipid-lowering activities of the polypeptides were determined. The results showed that the optimal enzymatic hydrolysis process conditions for the Korean pine kernel polypeptide was the step-by-step enzymatic hydrolysis method, and Korean pine kernel protein was hydrolyzed for 2.5 h with papain under the conditions of enzymatic hydrolysis temperature 50℃, substrate mass concentration 6.0 g/100 mL, papain dosage 10 500 U/g, and enzymatic hydrolysis pH 6.0, and then continuously hydrolyzed for 2.3

h with alkaline protease under the conditions of alkaline protease dosage 10 970 U/g and enzymatic hydrolysis pH 9.0. Under the optimal conditions, the degree of hydrolysis of Korean pine kernel protein reached 25.94%. The number average molecular mass of Korean pine

收稿日期: 2021-10-28; 修回日期: 2022-09-19

作者简介: 王建成(1993), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为植物活性成分研究与开发(E-mail) wangjiancheng3612@126.com。

通信作者: 张丽梅, 高级工程师, 博士(E-mail) 2386026898@qq.com。

kernel polypeptide was 2 272 Da, and the weight-average molecular mass was 4 080 Da. The contents of glutamic acid, arginine and aspartic acid in the Korean pine kernel polypeptide were relatively high, and the content of essential amino acids accounted for 30.23% of the total amino acids. The polypeptides with a molecular mass of less than 10 kDa accounted for 92%, and the polypeptides with a molecular mass of 0.5–1.0 kDa had the highest ACE inhibitory activity, with an IC_{50} of 66.05 $\mu\text{g/mL}$. The polypeptides with a molecular mass of 1.0–5.0 kDa had the highest pancreatic lipase inhibitory activity, with an IC_{50} of 194.43 $\mu\text{g/mL}$. In conclusion, Korean pine kernel polypeptide has high nutritional value and certain ACE and pancreatic lipase inhibitory activities.

Key words: Korean pine kernel; polypeptide; enzymatic hydrolysis; antihypertensive activity; lipid-lowering activity

红松仁为红松(*Pinus koraiensis* Sieb. et Zucc.)的种仁,含有丰富的油脂、蛋白质、矿物质、维生素等,其氨基酸种类齐全,具有较高的营养价值^[1]。目前,红松仁的开发局限于红松仁油、红松仁蛋白饮料等,对其副产物红松仁粕中蛋白质的深度开发较少,为充分利用红松仁资源,提升其附加值,可对红松仁粕中的蛋白质进行精深加工^[2-3]。

松仁多肽是由松仁蛋白在蛋白酶的作用下水解得到的小分子肽^[4],具有抗氧化、抗肿瘤、提高免疫、降血压、抗疲劳等多种生理活性^[5]。酶解法制备多肽是在温和的条件下进行定位水解分裂产生特定的肽,具有操作简单、速度快、容易调控等优点。

本研究从低脂红松仁粕中提取红松仁蛋白,再以水解度为评价指标,利用蛋白酶分步酶解方式,对红松仁多肽酶解制备工艺条件进行优化,并对红松仁多肽的分子质量分布、氨基酸组成、血管紧张素转换酶(ACE)抑制活性和胰脂肪酶抑制活性进行分析,以期对红松仁多肽的开发及应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

红松仁粕(蛋白质含量 46.22%,脂肪含量 5.76%),黑龙江省宏泰松果有限公司;牛血清白蛋白、碱性蛋白酶(酶活 200 000 U/g,最适温度 50℃,最适 pH 9.0)、木瓜蛋白酶(酶活 800 000 U/g,最适温度 50℃,最适 pH 6.0)、中性蛋白酶(酶活 200 000 U/g,最适温度 45℃,最适 pH 7.0)、胰蛋白酶(酶活 250 000 U/g,最适温度 45℃,最适 pH 8.0)、胃蛋白酶(酶活 250 000 U/g,最适温度 45℃,最适 pH 4.0),北京索莱宝科技有限公司;细胞色素 C、抑肽酶、杆菌酶、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸(Gly-Gly-Tyr-Arg),上海源叶生物科技有限公

司;ACE(2.0 U/mg),上海麦克林生化科技有限公司;胰脂肪酶(15~35 U/mg),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;考马斯亮蓝 G-250、氯化钠、盐酸、氢氧化钠等均为国产分析纯。

1.1.2 仪器与设备

ZW91-YS-20 粉碎机;Thermo TSWB27 恒温水浴锅;5424R 离心机;SP200-2T 磁力搅拌器;FLOM-TS 膜分离设备,青岛富勒姆科技有限公司;Biochrom 30 全自动氨基酸分析仪,英国 Biochrom 公司;KDY-9830 全自动凯氏定氮仪;SOX500 全自动脂肪仪;SXL-1100M 马弗炉;ALPHA 1-4/2-4 LSC 冷冻干燥机;Mettler ML802-T 电子天平;PL-GPC 220 液相色谱仪,安捷伦公司。

1.2 实验方法

1.2.1 红松仁蛋白的提取

按料液比 1:10 向红松仁粕中加入蒸馏水,调节溶液 pH 至 4.2,在室温下提取 60 min,于 3 000 r/min 下离心 10 min,收集固形物,再重复提取 1 次,离心后收集固形物,调节 pH 至中性,于 80℃ 烘箱干燥后即得红松仁蛋白粉(蛋白质含量为 68.0%)。

1.2.2 红松仁多肽的酶解制备

向红松仁蛋白粉中加入蒸馏水匀浆,配制成为一定质量浓度的蛋白溶液,将其置于 100℃ 沸水浴中 10 min,然后调节温度和 pH 至一定值,添加一定量的蛋白酶酶解一定时间后,以 100℃ 灭酶 10 min,冷却至室温,于 4 000 r/min 下离心 30 min,取上清液调节 pH 至中性,浓缩、冷冻干燥,即得红松仁多肽。

1.2.3 水解度的测定

采用甲醛滴定法测定水解度^[6-7]。取 5 mL 酶解上清液,加入 25 mL 蒸馏水摇匀,用 0.5 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 8.2,保持 1 min 无变化,之后加入 15 mL 中性甲醛溶液,用 0.1 mol/L NaOH 标准溶

液滴定 pH 至 8.2, 记录消耗的 NaOH 溶液体积, 以等量蒸馏水代替酶解上清液, 记录消耗的 NaOH 溶液体积, 按公式(1) 计算水解度(D)。

$$D = \frac{(V_1 - V_0) \times c \times 14.01 \times V}{N \times 5 \times 1000} \times 100\% \quad (1)$$

式中: V_0 、 V_1 分别为蒸馏水和酶解上清液加入甲醛后消耗的 NaOH 标准溶液体积, mL; c 为 NaOH 标准溶液浓度, mol/L; V 为酶解上清液总体积, mL; N 为底物中总氮含量, g; 5 为检测时取用酶解上清液的体积, mL; 14.01 为氮的摩尔质量, g/mol。

1.2.4 多肽含量的测定

采用双缩脲法测定多肽含量^[8]。以 Gly - Gly - Tyr - Arg 为标准品, 分别配制 0、2、4、8、10、12、16、20 mg/mL 的标准工作溶液, 各取 1 mL 标准工作溶液于 4 mL 双缩脲试剂中, 充分摇动, 并置于 25 °C 下反应 30 min, 然后在 540 nm 处测定吸光度, 以吸光度(Y)为纵坐标, 肽的质量浓度(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 拟合得到回归方程($Y = 0.036 1X + 0.085 3$)。取酶解上清液稀释至合适质量浓度后, 取 1 mL 稀释液, 按上述方法处理并测定吸光度, 根据回归方程计算多肽含量。

1.2.5 多肽分子质量分布分析

参考文献[9]的方法, 以细胞色素 C、抑肽酶、杆菌酶、Gly - Gly - Tyr - Arg 为标准品, 采用凝胶渗透色谱法(GPC)检测多肽分子质量分布。分析条件: TSKgel G2000 SWXL 色谱柱(300 mm × 7.8 mm), 流动相为水, 示差折光检测器。

1.2.6 不同分子质量范围多肽的制备

将 1.2.2 中酶解上清液经膜孔径分别为 10.0、5.0、1.0、0.5 kDa 的超滤膜/纳滤膜分离, 滤液浓缩干燥, 得到不同分子质量的多肽。

1.2.7 多肽氨基酸组成分析

按照 GB 5009.124—2016 检测多肽氨基酸组成。

1.2.8 ACE 抑制活性的测定

参考文献[10]的方法通过马尿酸的含量间接测定 ACE 抑制活性。取红松仁多肽, 用蒸馏水配制成不同质量浓度的样品溶液。取 40 μL 不同质量浓度的样品溶液, 与 25 μL 0.1 U/mL ACE 溶液(由 0.1 mol/L 硼酸缓冲液配制)混合, 然后在 37 °C 下预培养 10 min, 再加入 50 μL 6.5 mmol/L 马尿酸组氨酰亮氨酸(Hip - His - Leu, HHL)溶液, 并在 37 °C 下培养 30 min 后, 添加 85 μL 1.0 mol/L 的盐酸溶液终止反应, 离心(10 000 × g , 20 min), 过 0.45 μm 滤膜, 待液相色谱分析。用 40 μL 硼酸缓冲液

(pH 8.3, 0.3 mol/L NaCl) 替代样品溶液作为对照组, 用 25 μL 硼酸缓冲液(pH 8.3, 0.3 mol/L NaCl) 替代对照组的 ACE 溶液作为空白组。液相色谱分析条件: Waters - C18 色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 检测波长 228 nm; 流动相乙腈 - 水(体积比 1:4, 含 0.05% 乙酸)。以马尿酸质量浓度(X)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标绘制马尿酸标准曲线($Y = 64 838.0X + 4 960.6, R^2 = 1$), 再根据各组别中马尿酸的峰面积计算各组别中马尿酸含量, 按公式(2) 计算 ACE 抑制率(Y_1)。

$$Y_1 = (A_b - A_s) / (A_b - A_c) \times 100\% \quad (2)$$

式中: A_s 、 A_b 、 A_c 分别为样品组、对照组、空白组马尿酸含量。

1.2.9 胰脂肪酶抑制活性的测定

参考 Toma 等^[11]的方法测定样品对胰脂肪酶活性的抑制率。

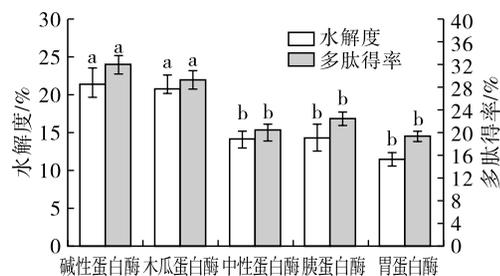
1.2.10 数据处理

所有实验数据均重复 3 次, 结果以“平均值 ± 标准偏差”表示。采用 SPSS23.0、Design - Expert 12.0、Origin 2017 软件进行数据处理分析及绘图。

2 结果与讨论

2.1 蛋白酶种类对水解度和多肽得率的影响

选用碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶 5 种蛋白酶, 在底物质量浓度 5.0 g/100 mL、酶添加量 10 000 U/g、酶解时间 4.0 h、各酶最适温度和 pH 条件下, 对红松仁蛋白进行酶解, 考察蛋白酶种类对水解度和多肽得率的影响, 结果如图 1 所示。



注: 多肽得率是以底物氮含量计; 同指标不同小写字母表示存在显著差异($p < 0.05$)。下同

图 1 蛋白酶种类对水解度和多肽得率的影响

由图 1 可知, 碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解度和多肽得率均显著大于中性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶($p < 0.05$), 而碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解度和多肽得率没有显著差异。碱性蛋白酶属于丝氨酸型的内切蛋白酶, 木瓜蛋白酶具有广泛特异性, 作用位点包括 Arg、Lys 和 Gly。综合考虑, 选择

碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶进行复合酶解。

2.2 复合酶解方式对酶解效果的影响

选择碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶对红松仁蛋白进行复合酶解,在两种酶添加量分别为10 000 U/g、酶解温度50℃、总酶解时间4.0 h条件下,分别采用方式一先加入碱性蛋白酶后加入木瓜蛋白酶(碱性蛋白酶酶解条件为酶解pH 9.0、酶解时间2.0 h,木瓜蛋白酶酶解条件为酶解pH 6.0、酶解时间2.0 h)、方式二先加入木瓜蛋白酶后加入碱性蛋白酶(各酶酶解条件同前)以及方式三将碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶同时加入(酶解pH 7.0)共3种方式进行酶解,研究酶解方式对酶解效果的影响,结果见表1。

表1 酶解方式对酶解效果的影响 %

酶解方式	水解度	多肽得率
方式一	21.7	33.8
方式二	23.2	36.2
方式三	21.4	27.7

由表1可知,采用方式二进行酶解,水解度为23.2%,多肽得率为36.2%,均高于其他2种酶解方式。方式一的酶解效果也优于碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶单一酶解效果,说明碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶二者协同使用能够更加充分地对底物蛋白进行酶解。因此,采用方式二,即先木瓜蛋白酶后碱性蛋白酶的酶解顺序,对红松仁蛋白进行酶解。

2.3 红松仁多肽酶解制备的单因素实验

2.3.1 酶添加量对水解度的影响

在底物质量浓度5.0 g/100 mL、酶解温度50℃、酶解pH 6.0、酶解时间2.0 h条件下,先考察木瓜蛋白酶添加量对单酶酶解水解度的影响,确定木瓜蛋白酶最佳添加量,然后在木瓜蛋白酶最佳添加量下进行酶解后,调节pH至9.0,添加不同量的碱性蛋白酶继续酶解2.0 h,考察碱性蛋白酶添加量对复合酶解水解度的影响,结果见图2。

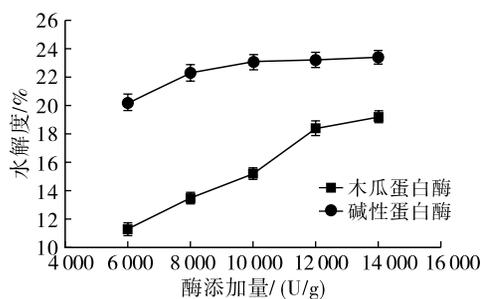


图2 木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶添加量对水解度的影响

由图2可知,随木瓜蛋白酶添加量增加,水解度增加,在木瓜蛋白酶添加量为12 000 U/g后,水解

度增加速率减缓。因此,确定木瓜蛋白酶的最佳添加量为12 000 U/g。由图2还可知,碱性蛋白酶添加量超过10 000 U/g后,水解度增加速率减缓。考虑生产需求及经济效益,选择碱性蛋白酶最佳添加量为10 000 U/g。

2.3.2 酶解时间对水解度的影响

在底物质量浓度5.0 g/100 mL、木瓜蛋白酶添加量12 000 U/g、酶解温度50℃、酶解pH 6.0条件下,先考察木瓜蛋白酶酶解时间对单酶酶解水解度的影响,确定木瓜蛋白酶的最佳酶解时间,然后在木瓜蛋白酶最佳酶解时间下进行酶解后,调节pH至9.0,添加10 000 U/g的碱性蛋白酶继续酶解不同时间,考察碱性蛋白酶酶解时间对水解度的影响,结果见图3。

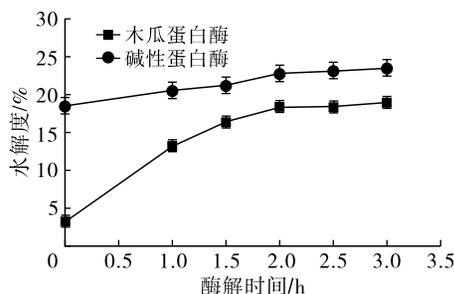


图3 木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶酶解时间对水解度的影响

由图3可知,木瓜蛋白酶酶解时间在0~2.0 h之间,水解度随酶解时间延长而增大,但2.0 h后水解度增加缓慢,可能是因为木瓜蛋白酶对底物基本酶解完全,延长酶解时间对水解度的影响程度降低。因此,确定木瓜蛋白酶的最佳酶解时间为2.0 h。由图3还可知,水解度随碱性蛋白酶酶解时间延长而增大,在2.0 h后趋于平缓,因此选择碱性蛋白酶酶解时间为2.0 h。

2.3.3 酶解温度对水解度的影响

在底物质量浓度5.0 g/100 mL、木瓜蛋白酶添加量12 000 U/g、酶解pH 6.0、酶解时间2.0 h条件下,先在不同酶解温度下采用木瓜蛋白酶进行酶解,然后调节pH至9.0,添加10 000 U/g的碱性蛋白酶继续酶解2.0 h,考察酶解温度对水解度的影响,结果见图4。

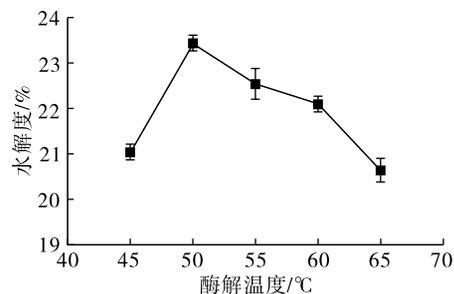


图4 酶解温度对水解度的影响

由图4可知,酶解温度为50℃时,水解度最大,

这是因为酶解过程中,每种酶都有最适温度,温度过高或过低都会影响酶活性,也可能影响酶与底物结合,50℃为碱性蛋白酶和木瓜蛋白酶的最适温度。因此,选择酶解温度为50℃。

2.3.4 底物质量浓度对水解度的影响

改变底物质量浓度,在木瓜蛋白酶添加量12 000 U/g、酶解温度50℃、酶解pH 6.0、酶解时间2.0 h条件下,对红松仁蛋白进行酶解,然后调节pH至9.0,添加10 000 U/g的碱性蛋白酶继续酶解2.0 h,考察底物质量浓度对水解度的影响,结果见图5。

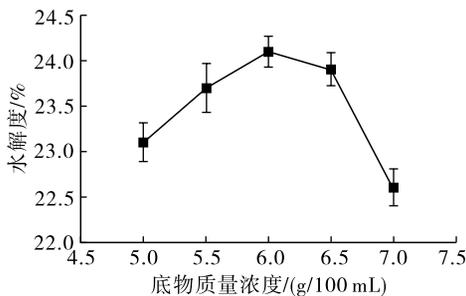


图5 底物质量浓度对水解度的影响

由图5可知,水解度随底物质量浓度的增大呈先升高后降低的趋势,在底物质量浓度为6.0 g/100 mL时水解度最大,可能是因为底物浓度在一定范围内时,随底物浓度的增大有较多的底物与酶结合,水解产物增多,但底物浓度过高则会抑制酶活性,导致水解度降低。因此,选择底物质量浓度为6.0 g/100 mL。

2.4 红松仁多肽酶解制备的响应面实验

2.4.1 响应面实验设计与结果

依据单因素实验结果,在底物质量浓度6.0 g/100 mL,酶解温度50℃,酶解pH 6.0(木瓜蛋白酶)、9.0(碱性蛋白酶)条件下,以木瓜蛋白酶添加量(A)、木瓜蛋白酶酶解时间(B)、碱性蛋白酶添加量(C)、碱性蛋白酶酶解时间(D)4个因素为自变量,以水解度(Y)为响应值,采用四因素三水平响应面实验对红松仁蛋白酶解条件进行优化。响应面实验因素水平见表2,响应面实验设计与结果见表3。

表2 响应面实验因素水平

水平	A 木瓜蛋白酶添加量/(U/g)	B 木瓜蛋白酶酶解时间/h	C 碱性蛋白酶添加量/(U/g)	D 碱性蛋白酶酶解时间/h
-1	10 000	1.5	8 000	1.5
0	12 000	2.0	10 000	2.0
1	14 000	2.5	12 000	2.5

表3 响应面实验设计与结果

实验号	A	B	C	D	Y/%
1	-1	0	1	0	25.39
2	0	0	1	1	25.20
3	0	1	1	0	23.59
4	0	-1	0	-1	20.59
5	-1	0	0	-1	23.08
6	1	1	0	0	23.11
7	0	1	0	1	23.99
8	1	0	-1	0	24.89
9	0	0	0	0	25.22
10	-1	1	0	0	25.29
11	0	-1	0	1	21.77
12	0	0	-1	1	24.56
13	-1	0	-1	0	25.41
14	-1	0	0	1	24.77
15	0	0	0	0	25.03
16	-1	-1	0	0	19.96
17	1	0	0	-1	22.13
18	0	0	0	0	25.74
19	0	0	-1	-1	23.05
20	0	0	1	-1	23.71
21	0	0	0	0	25.74
22	0	0	0	0	25.51
23	0	-1	1	0	23.71
24	1	0	0	1	25.56
25	0	-1	-1	0	21.62
26	0	1	-1	0	23.07
27	1	0	1	0	25.93
28	0	1	0	-1	21.96
29	1	-1	0	0	22.13

2.4.2 响应面分析

采用 Design - Expert 12.0 软件对表3数据进行拟合,得到4个因素与水解度之间的回归方程 $Y = 25.65 - 0.01A + 1.02B + 0.58C + 1.03D - 1.34AB + 0.27AC + 0.69AD - 0.39BC + 0.21BD - 0.01CD - 0.05A^2 - 2.54B^2 + 0.01C^2 - 1.34D^2$,回归方程的决定系数为0.9115。

对回归方程进行方差分析,结果见表4。

表4 方差分析

来源	平方和	自由度	均方	F	p
模型	90.22	14	6.44	10.26	<0.000 1**
A	0.00	1	0.00	0.00	0.957 2
B	12.46	1	12.46	19.85	0.000 5**
C	4.00	1	4.00	6.37	0.024 3*
D	12.67	1	12.67	20.18	0.000 5**
AB	7.16	1	7.16	11.40	0.004 5**
AC	0.28	1	0.28	0.45	0.514 5
AD	1.88	1	1.88	2.99	0.105 8
BC	0.62	1	0.62	0.98	0.338 7
BD	7.00	1	7.00	8.44	0.011 5*
CD	0.00	1	0.00	0.00	0.990 1

续表 4

来源	平方和	自由度	均方	F	p
A ²	0.02	1	0.02	0.03	0.864 7
B ²	41.73	1	41.73	66.46	<0.000 1**
C ²	0.00	1	0.00	0.00	0.984 9
D ²	11.63	1	11.63	18.52	0.000 7**
残差	8.79	14	0.63		
失拟项	8.05	10	0.80	4.32	0.085 6
纯误差	0.75	4	0.19		
总和	99.01	28			

注: * 表示差异显著($p < 0.05$), ** 表示差异极显著($p < 0.01$)

由表 4 可知,回归模型极显著,失拟项不显著,且决定系数为 0.911 5,表明回归方程与实际情况比较相符,误差较小,可充分反映各因素和响应值之间的关系。由表 4 还可知,B、D、AB、B²、D²影响极显著,C、BD 影响显著,而 A、AC、AD、BC、CD、A²、C²的影响均不显著,4 个因素的影响强弱顺序为 $D > B > C > A$ 。

2.4.3 最优条件确定及验证

由模型对最优条件求解,并结合实际工艺确定最优酶解工艺条件:木瓜蛋白酶添加量 10 500 U/g,酶解时间 2.5 h,碱性蛋白酶添加量 10 970 U/g,酶解时间 2.3 h。模型预测最优条件下水解度为 26.17%,经验证实际水解度为 25.94%,二者相差不大,说明建立的响应面模型分析优化红松仁蛋白的酶解工艺条件有效可行。

2.5 红松仁多肽分子质量分布

按照 1.2.5 的方法,采用 GPC 检测红松仁多肽分子质量分布,GPC 图谱如图 6 所示。经计算,红松仁多肽数均分子质量为 2 272 Da,重均分子质量为 4 080 Da,最高峰分子质量为 5 104 Da。

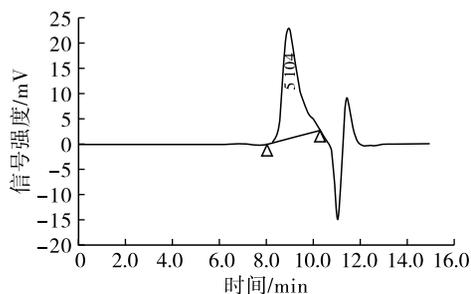


图 6 红松仁多肽 GPC 图谱

2.6 红松仁多肽氨基酸组成

红松仁多肽氨基酸组成如表 5 所示。由表 5 可知,红松仁多肽中谷氨酸、精氨酸和天冬氨酸含量较高,其中必需氨基酸含量为 160.00 mg/g,占氨基酸总量的 30.23%。

表 5 红松仁多肽氨基酸组成 mg/g

氨基酸	含量	氨基酸	含量
天冬氨酸	46.62	亮氨酸*	38.57
苏氨酸*	14.74	酪氨酸	29.98
丝氨酸	28.55	苯丙氨酸*	21.91
谷氨酸	97.64	组氨酸	11.01
甘氨酸	22.43	赖氨酸*	18.82
丙氨酸	26.16	精氨酸	77.34
胱氨酸	1.68	脯氨酸	27.90
缬氨酸*	29.51	必需氨基酸	160.00
蛋氨酸*	14.77	合计	529.30
异亮氨酸*	21.68		

注: * 为必需氨基酸

2.7 红松仁多肽对 ACE 的抑制率

按照 1.2.6 方法获得不同分子质量的多肽,并测定其对 ACE 的抑制率,计算半抑制浓度(IC₅₀),结果分别见图 7 和表 6。

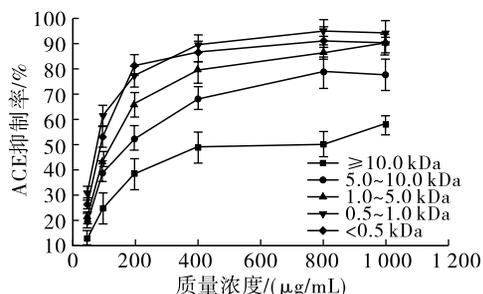


图 7 不同分子质量红松仁多肽对 ACE 的抑制率

表 6 不同分子质量红松仁多肽对 ACE 抑制率的 IC₅₀

多肽分子质量/kDa	占比/%	IC ₅₀ /(μg/mL)
≥10.0	8	580.13
[5.0~10.0)	28	171.06
[1.0~5.0)	40	119.62
[0.5~1.0)	14	66.05
<0.5	10	69.85

由图 7 可知,不同分子质量红松仁多肽对 ACE 的抑制率在 50~1 000 μg/mL 质量浓度范围内呈剂量依赖性。分子质量不小于 10.0 kDa 的多肽对 ACE 的抑制能力最低,而 0.5~1.0 kDa 和小于 0.5 kDa 的多肽对 ACE 抑制能力较高,表 6 中的 IC₅₀ 值也验证了这一结果。ACE 在肾素-血管紧张素系统中通过催化血管紧张素-1 转化为血管紧张素-2 加强心肌收缩,引起血压升高^[12]。因此,抑制 ACE 活性对降低血压具有重要意义。研究表明,低分子质量的多肽可能更容易与 ACE 位点结合,因而具有较好的 ACE 抑制活性^[13]。

2.8 红松仁多肽对胰脂肪酶的抑制率

测定不同分子质量的红松仁多肽对胰脂肪酶的抑制率,并计算半抑制浓度(IC₅₀),结果分别见图 8 和表 7。

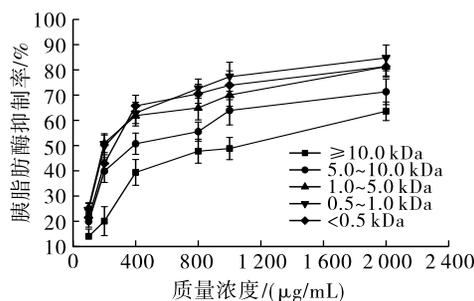


图8 不同分子质量红松仁多肽对胰脂肪酶的抑制率

表7 不同分子质量红松仁多肽对胰脂肪酶抑制率的 IC_{50}

多肽分子质量/kDa	$IC_{50}/(\mu\text{g}/\text{mL})$
≥ 10.0	941.17
[5.0 ~ 10.0)	423.65
[1.0 ~ 5.0)	194.43
[0.5 ~ 1.0)	202.21
< 0.5	236.31

由图8可知,不同分子质量红松仁多肽对胰脂肪酶的抑制率在100~2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度范围内呈剂量依赖性。分子质量不小于10.0 kDa的多肽对胰脂肪酶抑制能力最低,分子质量在1.0~5.0 kDa、0.5~1.0 kDa和小于0.5 kDa的多肽对胰脂肪酶抑制能力较高,并且相似,表7中的 IC_{50} 值也说明了这一点。机体摄食后,胰脂肪酶将膳食脂肪水解为单酰甘油和游离脂肪酸,在肠道内再吸收,合成新的脂肪^[14]。胰脂肪酶抑制剂可有效降低胰脂肪酶对脂肪的分解作用,减少脂肪再合成,抑制机体内脂肪过度堆积^[15]。

3 结论

通过单因素实验和响应面实验确定了酶解红松仁蛋白制备红松仁多肽的最优工艺条件,即用蒸馏水配制质量浓度为6.0 g/100 mL的蛋白溶液,于100℃沸水浴10 min,冷却至50℃,在木瓜蛋白酶添加量10 500 U/g、酶解温度50℃、酶解pH 6.0条件下酶解2.5 h,然后调节pH至9.0,加入10 970 U/g碱性蛋白酶继续酶解2.3 h。在最优工艺条件下,红松仁蛋白的水解度达25.94%,产品红松仁多肽的氨基酸含量为529.30 mg/g,数均分子质量为2 272 Da,分子质量小于10.0 kDa的多肽占92%。红松仁多肽中分子质量小于1.0 kDa的多肽具有较高的ACE抑制活性,分子质量小于5.0 kDa的多肽具有较高的胰脂肪酶抑制活性。红松仁多肽可以用于营养食品,也可用于具有降压降脂功效的保健食品的开发。后续可进一步分离、纯化和鉴定活性肽段,评价降压降脂活性,为松仁多肽开发及应用提供一定理论依据。

参考文献:

- [1] 徐鑫,毛文东,刘国艳,等. 松仁营养成分及松子油理化性质和活性成分分析[J]. 营养学报, 2014, 36(1): 99-101.
- [2] LIN S, LIANG R, XUE P, et al. Antioxidant activity improvement of identified pine nut peptides by pulsed electric field (PEF) and the mechanism exploration[J]. LWT - Food Sci Technol, 2017, 75:366-372.
- [3] 郑元元,井晶,王振宇,等. 红松松仁蛋白肽的分离纯化及体外抗氧化和体内抗疲劳作用[J]. 食品科学, 2019, 40(1): 143-148.
- [4] 胡楠,卞筱泓,许激扬. 抗肿瘤活性多肽的研究现状[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(9): 1155-1160.
- [5] SUN L, ZHANG S, JU H, et al. Tryptophan targeted pulsed electric field treatment for enhanced immune activity in pine nut peptides[J]. J Food Biochem, 2020, 44(6): 1-12.
- [6] 高瑞雄,闫巧珍,岳珍珍,等. 冷榨核桃粕液态发酵制备核桃多肽[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 190-196.
- [7] 周慧江,朱振宝,易建华. 核桃蛋白水解物水解度测定方法比较[J]. 粮食与油脂, 2012(2): 28-30.
- [8] RUAN S, LUO J, LI Y L, et al. Ultrasound-assisted liquid-state fermentation of soybean meal with *Bacillus subtilis*: effects on peptides content, ACE inhibitory activity and biomass[J]. Process Biochem, 2020, 91: 73-82.
- [9] 蒋腾川,宋新波,张丽娟. 凝胶过滤色谱法测定3种不同来源多肽的相对分子质量分布[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 312-315.
- [10] DAI C, MA H, LUO L, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from *Tenebrio molitor* (L.) larva protein hydrolysate[J]. Eur Food Res Tech, 2013, 236(4): 681-689.
- [11] TOMA A, MAKONNEN E, MEKONNEN Y, et al. Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves [J/OL]. BMC Complem Altern Med, 2014, 14(1): 180[2021-10-28]. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-180>.
- [12] 曹梦笛,周浩纯,李赫,等. 半固态酶解法制备全谷物多肽及其抗氧化、ACE抑制活性的研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(15): 9-16.
- [13] MIRZAEIA M, MIRDAMADIB S, REZA EHSANI M, et al. Production of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from *Kluyveromyces marxianus* protein hydrolysates: purification and molecular docking[J]. J Food Drug Anal, 2018, 26(2): 696-705.
- [14] 赵瑜,周家春,张靖伟,等. 紫娟茶提取物对血管紧张素转换酶、 α -淀粉酶和胰脂肪酶的体外抑制作用[J]. 食品工业科技, 2017, 38(19): 11-20.
- [15] 王璐,武雅珍,焦明雅,等. 卵蛋白源胰脂肪酶抑制肽的制备及其对小鼠体质量控制效果[J]. 食品与生物技术学报, 2021, 40(3): 81-88.