

酶解法制备核桃谷蛋白-1 ACE抑制肽的工艺优化

王静, 马劲, 朱柏佳, 姚嘉仪, 汪飞, 杨雯静, 冯龙丹

(陕西学前师范学院 生命科学与食品工程学院, 西安 710061)

摘要:为获得优质的核桃蛋白血管紧张素转化酶(ACE)抑制肽的制备原料及优化其制备工艺,采用连续提取法从脱脂核桃粕中依次分离出清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白-1和谷蛋白-2 5种组分蛋白,测定5种组分蛋白的占比及ACE抑制率,以ACE抑制率最大的组分蛋白作为原料采用酶解法制备ACE抑制肽,在筛选出最适酶解用酶基础上,采用单因素试验与响应面法优化酶解制备核桃蛋白ACE抑制肽的工艺。结果表明:5种组分蛋白中谷蛋白-1占比仅次于谷蛋白-2,且其ACE抑制率最高,以核桃谷蛋白-1为原料,在筛选出胃蛋白酶作为酶解用酶基础上,经工艺优化得到最优的酶解法制备核桃谷蛋白-1 ACE抑制肽的工艺条件为酶解温度46℃、酶解时间6h、酶用量4.2%(以底物质量计)、酶解pH 1.6,在该条件下所得核桃谷蛋白-1酶解液的ACE抑制率为 $(50.08 \pm 2.34)\%$ 。因此,核桃谷蛋白-1经胃蛋白酶酶解可生产ACE抑制活性较高的核桃多肽。

关键词:核桃谷蛋白-1; ACE抑制肽; 蛋白酶; 响应面法

中图分类号: TS229; TQ934

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2024)04-0013-07

Preparation of ACE inhibitory peptide from walnut glutelin-1 by enzymatic hydrolysis

WANG Jing, MA Jin, ZHU Baijia, YAO Jiayi, WANG Fei, YANG Wenjing, FENG Longdan

(College of Life Sciences and Food Engineering, Shaanxi Xueqian Normal University, Xi'an 710061, China)

Abstract: In order to obtain high-quality raw materials for the preparation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from walnut protein and optimize its preparation process, five component proteins including albumin, globulin, prolamin, glutelin-1 and glutelin-2 were separated from defatted walnut meal using continuous extraction method in turn. The proportion and ACE inhibition rates of the five component proteins were determined. The component protein with the largest ACE inhibition rate was used as raw material to prepare ACE inhibitory peptide by enzymatic hydrolysis. On the basis of selecting the optimal enzyme, the enzymatic conditions for the preparation of walnut protein ACE inhibitory peptide were optimized by single factor experiment combined with response surface methodology. The results showed that the proportion of glutelin-1 in the five component proteins was second only to glutelin-2, and its ACE inhibition rate was the highest. With walnut glutelin-1 as raw

material and pepsin as enzyme, the optimal enzymatic hydrolysis preparation conditions of walnut glutelin-1 ACE inhibitory peptide were obtained as follows: enzymolysis temperature 46℃, enzymolysis time 6 h, enzyme dosage 4.2% (based on the mass of substrate), and enzymolysis pH 1.6. The ACE inhibition rate of the enzymatic hydrolysate obtained under the optimal conditions was $(50.08 \pm 2.34)\%$.

收稿日期: 2022-11-20; 修回日期: 2023-11-25

基金项目: 陕西省教师教育改革与教师发展研究项目(SJS2022YB061); 陕西高校青年创新团队“秦岭药食同源生物资源保护与利用”; 陕西学前师范学院引进人才(博士)科研启动项目(2023DS02); 陕西学前师范学院科研创新团队(陕西特色农产品精深加工技术创新团队)

作者简介: 王静(1985), 女, 副教授, 博士, 研究方向为食品功能因子的开发与利用(E-mail)531243773@qq.com。

Enzymatic hydrolysis of walnut glutelin - 1 by pepsin can produce walnut polypeptides with higher ACE inhibitory activity.

Key words: walnut glutelin - 1; ACE inhibitory peptide; protease; response surface methodology

蛋白质是一种复杂的生物大分子,紧密包裹的分子构象致使其功能特性较差,生物活性受到抑制,严重制约了其在食品工业中的应用^[1]。将蛋白质水解制成活性肽,可改善蛋白质的功能特性和生理活性^[2],其中酶解法因具有反应条件温和、操作简单、产品性能优良、安全性高等特点被广泛应用于制备生物活性肽^[3]。目前,已从多种食品蛋白质酶解产物中分离和鉴定出对人体健康有益的生物活性肽^[4-6]。

核桃粕是核桃仁提油后的副产物,蛋白质含量高达 40%~60%,是制备生物活性肽的优质原料^[7]。目前,科研工作者们运用酶解技术已从核桃粕的蛋白质中制备出了多种生物活性肽^[8-13]。研究发现,核桃多肽具有抗疲劳、抗癌、抑菌、免疫调节以及润肠通便等多种生物活性^[14-16]。

核桃中蛋白质根据溶解性的不同可分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白^[17],其中,谷蛋白又可根据其在稀酸或稀碱溶液中溶解性的差异分为酸性谷蛋白(谷蛋白-1)和碱性谷蛋白(谷蛋白-2)^[18-20]。由于氨基酸组成与溶解性的不同,核桃各组分蛋白在营养价值、功能特性以及生理活性等方面均存在较大差异^[1]。目前,关于核桃中蛋白质的研究报道较多,但针对其组分蛋白的功能性质与生理活性等的研究较少。血管紧张素转换酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)抑制肽是一类对 ACE 有抑制作用的多肽,其在维持人体血压平衡中发挥着关键作用^[21]。食源性 ACE 抑制肽因来源丰富、安全性高,受到学者们的广泛关注。已报道的关于核桃 ACE 抑制肽的研究主要集中在总蛋白,而对各组分蛋白及起主要抑制作用的组分蛋白的相关研究较少。

本研究采用核桃蛋白制备 ACE 抑制肽,具体以脱脂核桃粕为原料,采用连续提取法提取 5 种组分蛋白,测定不同组分蛋白的 ACE 抑制活性,筛选出适宜组分并采用酶解法制备 ACE 抑制肽,在筛选出适宜的酶解用酶后,采用单因素试验和响应面法优化酶解工艺条件,以期获得一种经济高效的核桃蛋白 ACE 抑制肽的制备方法,为拓宽核桃粕中蛋白质的应用,提高其附加值提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

脱脂核桃粕,由陕西师范大学植物油脂与蛋白质工程实验室制备。

ACE(源自兔肺组织)、马尿酸-组氨酰-亮氨酸(Hippuryl-histidyl-leucine, HHL),美国 Sigma 公司;酸性蛋白酶(酶活力 5×10^4 U/g)、风味蛋白酶(酶活力 5×10^4 U/g)、中性蛋白酶(酶活力 1×10^5 U/g)、碱性蛋白酶(Alcalase 2.4L, 酶活力 1×10^5 U/g)、胰蛋白酶(酶活力 2.5×10^2 U/g)、胃蛋白酶(酶活力 3×10^3 U/g)、透析袋(截留相对分子质量 3 500),北京索莱宝科技有限公司;NaCl、石油醚、无水乙醇、冰乙酸、氢氧化钠、盐酸、乙酸乙酯等均为分析纯,西安晶博化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

78HW-1 型恒温加热磁力搅拌器,杭州仪表电机有限公司;HH-4 型数显恒温水浴锅,金坛市岸头仪都仪器厂;L550 型低速大容量离心机,湘仪离心机仪器有限公司;TGL-16gR 型高速冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;LGJ-18C 型真空冷冻干燥机,北京四环科学仪器厂;SHZ-88A 型往复水浴恒温振荡器,太仓市试验设备厂;T6 型紫外可见分光光度计,北京普析通用仪器有限责任公司;雷磁 PHS-3C pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 脱脂核桃粕基本成分的测定

参照 GB 5009.5—2016 采用凯氏定氮法测定蛋白质含量,参照 GB 5009.6—2016 采用索氏抽提法测定粗脂肪含量,参照 GB 5009.3—2016 采用直接干燥法测定水分含量,参照 GB 5009.4—2016 采用称重法测定灰分含量。

1.2.2 核桃组分蛋白的提取分离

参照文献[1]采用连续提取法从脱脂核桃粕中提取清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白-1 和谷蛋白-2。核桃粕中各组分蛋白的提取流程如图 1 所示。

1.2.3 核桃组分蛋白的酶解

称取一定量的核桃组分蛋白,配制质量分数为

2%的溶液,调整溶液 pH,加入一定量的蛋白酶,在一定酶解温度下酶解一定时间后,将酶解液置于沸水浴中灭酶 10 min,冷却,得核桃蛋白酶解液。

1.2.4 ACE 抑制率的测定

参考 Zheng 等^[22]的方法,将 50 μL 质量浓度为 1.0 mg/mL 的样品溶液和 50 μL 25 mU/mL 的 ACE 混合均匀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 10 min,冷却至室温后加入 150 μL HHL 溶液,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续反应 1 h,再次冷却至室温后加入 250 μL 1 mol/L HCl 溶液终止反应。加入 1.4 mL 乙酸乙酯,剧烈振荡 5 s,以 14 100 r/min 离心 5 min,移取 1 mL 上层溶液至玻璃试管中,将试管置于鼓风干燥箱(120 $^{\circ}\text{C}$)中干燥 0.5 h。取出试管,冷却,加入 4 mL 去离子水,混合均匀后在

228 nm 处测定吸光值。同时按上述方法测定卡托普利溶液(参比样)的吸光值。ACE 抑制率(x)按公式(1)计算。

$$x = (1 - A_s/A_c) \times 100\% \quad (1)$$

式中: A_s 、 A_c 分别为样品、参比样在 228 nm 处的吸光值。

1.2.5 数据统计分析

每组进行 3 次平行试验,结果以“平均值 \pm 标准差”表示。使用 GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA) 软件对数据进行统计分析和绘图,用单因素方差分析(ANOVA)分析组间显著性差异。用小写字母表示 5% 水平上的显著性差异,大写字母表示 1% 水平上的显著性差异。

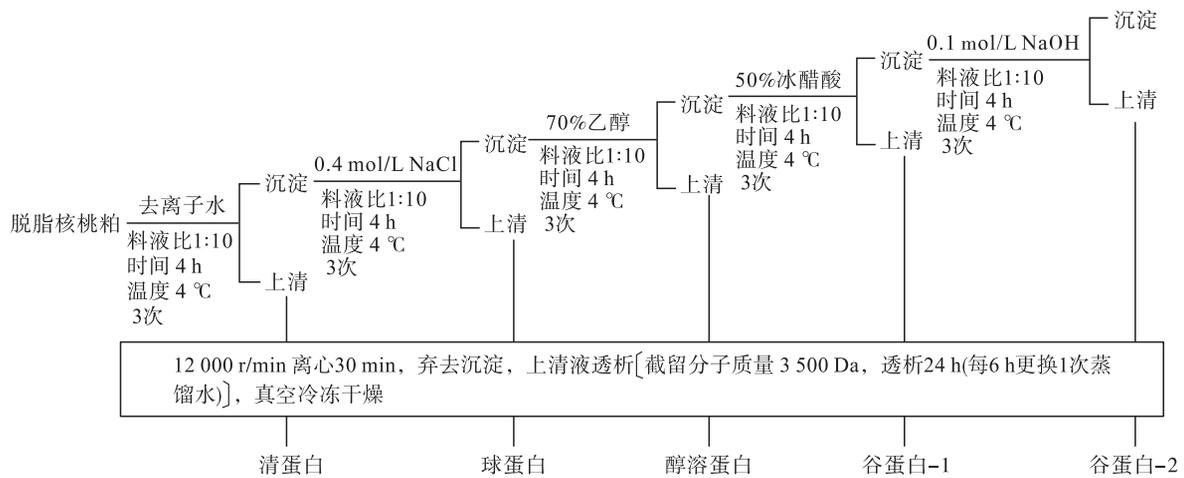


图 1 核桃粕中各组分蛋白的提取流程

2 结果与分析

2.1 脱脂核桃粕的基本成分

脱脂核桃粕的基本成分见表 1。

表 1 脱脂核桃粕的基本成分 %

蛋白质	粗脂肪	水分	灰分
61.25 \pm 0.68	2.30 \pm 0.38	8.34 \pm 0.54	3.25 \pm 0.26

由表 1 可看出,脱脂核桃粕中蛋白质含量高达

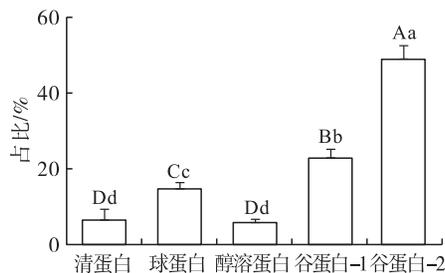


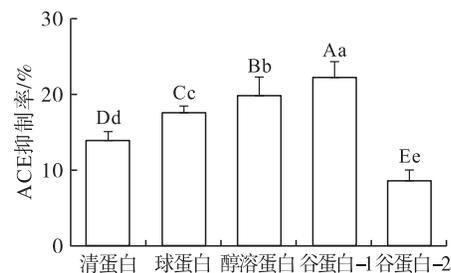
图 2 核桃粕中各组分蛋白占比及 ACE 抑制率

由图 2 可知,核桃粕中 5 种组分蛋白占比大小顺序为谷蛋白-2[(50.47 \pm 2.54)%] > 谷蛋白-1[(21.98 \pm 1.82)%] > 球蛋白[(14.92 \pm 1.02)%] > 清蛋白[(6.73 \pm 1.35)%] > 醇溶蛋白[(5.86 \pm

(61.25 \pm 0.68)%],而粗脂肪含量较低,为(2.30 \pm 0.38)%。

2.2 核桃粕中各组分蛋白的占比与 ACE 抑制活性

按 1.2.2 方法提取核桃粕中各组分蛋白,计算各组分蛋白占比,并测定各组分蛋白 ACE 抑制率,结果见图 2。



0.65)%]。5 种组分蛋白均具有 ACE 抑制活性,且以谷蛋白-1 的 ACE 抑制活性最高,醇溶蛋白次之,谷蛋白-2 的最低($p < 0.01$)。因此,综合考虑各组分蛋白占比和 ACE 抑制活性,选择谷蛋白-1

作为制备核桃 ACE 抑制肽的原料。

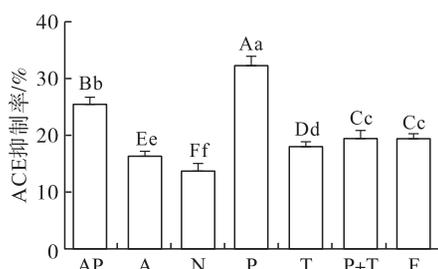
2.3 谷蛋白-1 酶解用酶的筛选

由于不同蛋白酶的最佳酶解条件、专一性和作用位点存在差异,因而多肽的构象、氨基酸的排列顺序和 C 端与 N 端氨基酸残基都会受到影响,进而直接影响肽的功能活性^[23]。按 1.2.3 方法,在酶用量 3% (以底物质量计)、酶解时间 4 h 条件下,按表 2 中各蛋白酶最适 pH 和温度条件^[24-25]对谷蛋白-1 进行酶解,测定核桃谷蛋白-1 酶解液 (DWPG-1H) 的 ACE 抑制率,结果如图 3 所示。

表 2 不同蛋白酶的最适作用条件

蛋白酶	条件
酸性蛋白酶	pH 2.0, 45 °C
中性蛋白酶	pH 7.0, 50 °C
碱性蛋白酶	pH 8.5, 55 °C
胰蛋白酶	pH 8.0, 37 °C
胃蛋白酶	pH 1.5, 37 °C
风味蛋白酶	pH 6.5, 50 °C
胃蛋白酶 + 胰蛋白酶	pH 2.0, 37 °C, pH 8.0, 37 °C

注:复合酶中两种酶的质量比为 1:1,复合酶酶解时,先在第一种蛋白酶的最适作用条件下酶解 2 h,灭酶,再在第二种蛋白酶的最适作用条件下继续酶解 2 h



注:AP. 酸性蛋白酶;A. 碱性蛋白酶;N. 中性蛋白酶;P. 胃蛋白酶;T. 胰蛋白酶;P+T. 胃蛋白酶+胰蛋白酶;F. 风味蛋白酶

图 3 不同蛋白酶处理对 DWPG-1H 的 ACE 抑制率的影响

由图 3 可看出,采用单一酶酶解时,胃蛋白酶酶解液的 ACE 抑制率最高,为 $(32.38 \pm 1.84)\%$,胃蛋白酶对某些氨基酸序列的作用具有特异性,在对蛋白质进行酶解时,主要剪切酸性氨基酸或芳香族氨基酸之间形成的肽键^[26]。金子纯^[27]分析了核桃组分蛋白的氨基酸组成,其中核桃谷蛋白-1 中酸性氨基酸和芳香族氨基酸含量较高,如谷氨酰胺的含量为 $(19.27 \pm 1.44)\text{g}/100\text{g}$,天冬氨酸的含量为 $(6.66 \pm 0.08)\text{g}/100\text{g}$,芳香族氨基酸的总含量为 $(12.34 \pm 0.22)\text{g}/100\text{g}$,这可能是胃蛋白酶酶解谷蛋白-1 后具有较强 ACE 抑制活性的主要原因。此外,胃蛋白酶可以在一定程度上模拟人体消化酶的作用,制备的活性肽在体内具有更好的耐受性^[28]。为模拟胃肠消

化,对胃蛋白酶和胰蛋白酶进行复合,考察复合酶的酶解效果,结果发现,酶解液的 ACE 抑制率低于单一胃蛋白酶酶解液的(见图 3),故选择胃蛋白酶作为制备核桃谷蛋白-1 ACE 抑制肽的最适用酶。

2.4 核桃谷蛋白-1 ACE 抑制肽制备的单因素试验

各因素的基本条件为酶解温度 37 °C、酶用量 3%、酶解 pH 1.5、酶解时间 4 h。在考察某一因素对 DWPG-1H 的 ACE 抑制率影响时,其他 3 个因素与基本条件保持一致。

2.4.1 酶解温度对 DWPG-1H 的 ACE 抑制率的影响

酶解温度对 DWPG-1H 的 ACE 抑制率的影响如图 4 所示。

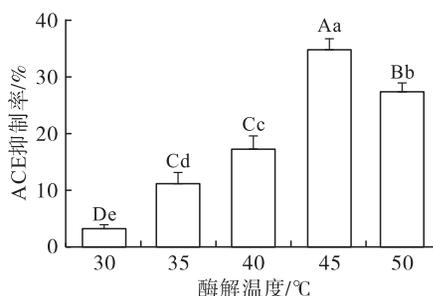


图 4 酶解温度对 DWPG-1H 的 ACE 抑制率的影响

由图 4 可以看出,酶解温度在 30~45 °C 范围内, DWPG-1H 的 ACE 抑制率随酶解温度的升高不断增大,酶解温度为 45 °C 时 DWPG-1H 的 ACE 抑制率最高。酶解温度继续升至 50 °C 时, DWPG-1H 的 ACE 抑制率显著降低 ($p < 0.01$)。这是因为酶解温度升高,酶解反应速率增大;但酶解温度过高会导致酶活性中心的构象改变,诱发酶变性,酶活力降低,进一步导致酶解反应速率减慢^[29]。因此,确定 45 °C 为胃蛋白酶酶解谷蛋白-1 的最佳酶解温度。

2.4.2 酶解时间对 DWPG-1H 的 ACE 抑制率的影响

酶解时间对 DWPG-1H 的 ACE 抑制率的影响见图 5。

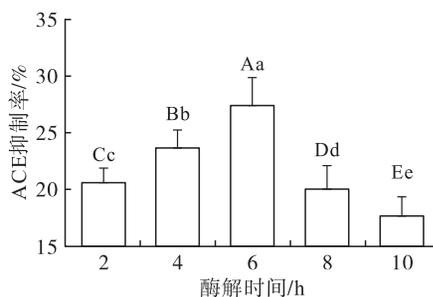


图 5 酶解时间对 DWPG-1H 的 ACE 抑制率的影响

由图 5 可知:酶解时间在 2~6 h 内, DWPG-1H 的 ACE 抑制率随酶解时间的延长逐渐提高;当

酶解时间为6 h时,DWPG-1H的ACE抑制率达到峰值;当酶解时间超过6 h时,DWPG-1H的ACE抑制率显著下降($p < 0.01$),这可能与随着酶解的进行,ACE抑制肽被进一步水解,生成活性较小的无ACE抑制活性的短肽有关^[30]。因此,选择6 h为胃蛋白酶的最佳酶解时间。

2.4.3 酶用量对DWPG-1H的ACE抑制率的影响

酶用量对DWPG-1H的ACE抑制率的影响如图6所示。

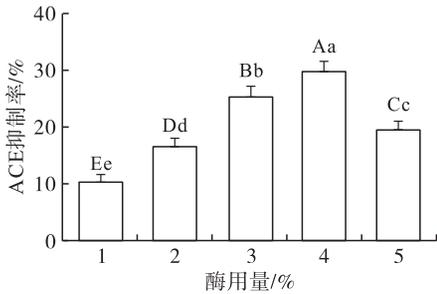


图6 酶用量对DWPG-1H的ACE抑制率的影响

由图6可知:酶用量在1%~4%范围内,随着酶用量的增加,DWPG-1H的ACE抑制率逐渐提高,酶用量超过4%时,DWPG-1H的ACE抑制率降低。这可能是因为酶用量低于4%时,增加酶用量可以直接增加酶活性中心的数量,提高两者的有效接触面积,促进核桃谷蛋白-1酶解生成ACE抑制肽,DWPG-1H的ACE抑制率逐渐增大;而体系中酶用量大于4%时,蛋白酶过量,将ACE抑制肽继续酶解为活性较小的肽或者氨基酸^[30],从而导致ACE抑制率下降。因此,选择4%为胃蛋白酶的最佳酶用量。

2.4.4 酶解pH对DWPG-1H的ACE抑制率的影响

酶解pH对DWPG-1H的ACE抑制率的影响如图7所示。

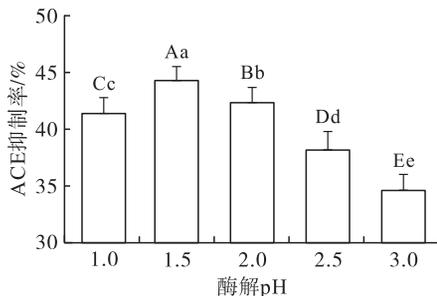


图7 酶解pH对DWPG-1H的ACE抑制率的影响

由图7可知,随酶解pH的增大,DWPG-1H的ACE抑制率先增大后减小,在酶解pH为1.5时DWPG-1H的ACE抑制率最大。酶解pH介于

1.5~2.0时,DWPG-1H的ACE抑制率大于40%,这可能是因为胃蛋白酶的最适作用pH在1.5~2.0,在此范围内时,胃蛋白酶可发挥较好的酶解作用。酶解pH大于2.0时,DWPG-1H的ACE抑制率显著下降,可能与反应体系不适宜的pH不同程度地破坏了胃蛋白酶的正常空间结构,导致酶活力降低有关^[30]。因此,选择pH 1.5作为胃蛋白酶的最佳酶解pH。

2.5 核桃谷蛋白-1 ACE抑制肽制备的响应面试验

2.5.1 响应面试验设计与结果

根据单因素试验结果,以酶解温度(A)、酶解时间(B)、酶用量(C)和酶解pH(D)为自变量,DWPG-1H的ACE抑制率(Y)为响应值,采用响应面试验优化胃蛋白酶酶解核桃谷蛋白-1制备ACE抑制肽的工艺条件。响应面试验因素水平见表3,响应面试验设计及结果见表4。

表3 响应面试验因素水平

水平	A 酶解温度/°C	B 酶解时间/h	C 酶用量/%	D 酶解pH
-1	40	5	3	1.0
0	45	6	4	1.5
1	50	7	5	2.0

表4 响应面试验设计及结果

试验号	A	B	C	D	ACE抑制率/%
1	-1	-1	0	0	25.61 ± 1.65
2	1	-1	0	0	32.47 ± 2.11
3	-1	1	0	0	17.43 ± 0.85
4	1	1	0	0	37.35 ± 1.79
5	0	0	-1	-1	39.82 ± 2.21
6	0	0	1	-1	37.64 ± 2.10
7	0	0	-1	1	33.58 ± 1.79
8	0	0	1	1	46.77 ± 2.16
9	-1	0	0	-1	23.41 ± 1.32
10	1	0	0	-1	36.27 ± 2.45
11	-1	0	0	1	24.68 ± 1.68
12	1	0	0	1	39.07 ± 2.14
13	0	-1	-1	0	42.11 ± 2.59
14	0	1	-1	0	32.76 ± 1.57
15	0	-1	1	0	38.75 ± 1.73
16	0	1	1	0	37.53 ± 2.06
17	-1	0	-1	0	21.65 ± 1.64
18	1	0	-1	0	36.63 ± 2.36
19	-1	0	1	0	30.14 ± 2.01
20	1	0	1	0	38.36 ± 2.62
21	0	-1	0	-1	38.34 ± 2.44
22	0	1	0	-1	27.86 ± 1.69

续表 4

试验号	A	B	C	D	ACE 抑制率/%
23	0	-1	0	1	33.25 ± 1.88
24	0	1	0	1	41.31 ± 2.33
25	0	0	0	0	47.22 ± 2.26
26	0	0	0	0	49.27 ± 2.31
27	0	0	0	0	50.12 ± 2.27
28	0	0	0	0	48.42 ± 2.36
29	0	0	0	0	49.51 ± 2.48

2.5.2 响应面回归方程

采用 Design expert 10.0 软件对自变量与响应值进行多元回归拟合,得到二次多项回归模型: $Y = 48.88 + 6.43A - 1.36B + 1.72C - 1.10D + 3.28AB - 1.70AC - 0.40AD + 2.05BC - 4.65BD - 3.35CD - 12.87A^2 - 7.64B^2 - 4.03C^2 - 5.75D^2$ 。

响应面回归模型的方差分析结果见表 5。

表 5 响应面回归模型的方差分析

来源	离差平方和	自由度	均方	F	p	显著性
模型	2 070.65	14	147.90	52.13	<0.000 1	**
A	495.37	1	495.37	174.58	<0.000 1	**
B	22.14	1	22.14	7.80	0.014 4	*
C	35.36	1	35.36	12.46	0.003 3	**
D	14.52	1	14.52	5.12	0.040 1	*
AB	42.90	1	42.90	15.12	0.001 6	**
AC	11.56	1	11.56	4.07	0.063 1	
AD	0.64	1	0.64	0.23	0.642 2	
BC	16.81	1	16.81	5.92	0.028 9	*
BD	86.49	1	86.49	30.48	<0.000 1	**
CD	44.89	1	44.89	15.82	0.001 4	**
A ²	1 073.57	1	1 073.57	378.36	<0.000 1	**
B ²	378.61	1	378.61	133.44	<0.000 1	**
C ²	105.22	1	105.22	37.08	<0.000 1	**
D ²	214.65	1	214.65	75.65	<0.000 1	**
残差	39.72	14	2.84			
失拟项	34.70	10	3.47	2.76	0.17	
纯误差	5.03	4	1.26			
总和	2 110.37	28				

注:**表示 $p < 0.01$,极显著;*表示 $p < 0.05$,显著

由表 5 可知,回归模型 $p < 0.000 1$,极显著,失拟项 $p = 0.17 > 0.05$,表明模型拟合程度良好,可利用此模型对 ACE 抑制率进行预测。模型决定系数 (R^2) 为 0.981 2 (> 0.9),经调整后的决定系数 (R^2_{Adj}) 为 0.962 4,即该模型可解释 96.24% 的数据,表明方程可信度较高;模型信噪比为 3.63%,小于 10%,说明数据拟合度较好,差异较小。一次项 A、C

对 ACE 抑制率有极显著影响 ($p < 0.01$), B、D 对 ACE 抑制率有显著影响;交互项 AB、BD、CD 对 ACE 抑制率具有极显著影响 ($p < 0.01$), BC 对 ACE 抑制率有显著影响 ($p < 0.05$),而 AC、AD 对 ACE 抑制率影响不显著 ($p > 0.05$);二次项 A²、B²、C²、D² 对 ACE 抑制率影响极显著 ($p < 0.01$)。各因素的主效应关系为 A(酶解温度) > C(酶用量) > B(酶解时间) > D(酶解 pH)。

2.5.3 最优酶解工艺条件验证

通过对模型回归方程进行偏导数求导后,得出核桃谷蛋白-1 ACE 抑制肽制备的最优工艺条件为酶解温度 46.21 °C、酶解 pH 1.65、酶用量 4.22%、酶解时间 6.09 h。在最优酶解工艺条件下,DWPG-1H 的 ACE 抑制率预测值为 50.10%。考虑到实际应用的可操作性,将最优酶解工艺条件调整为酶解温度 46 °C、酶解 pH 1.6、酶用量 4.2%、酶解时间 6 h,在此条件下进行 3 次重复验证试验,所得 DWPG-1H 的 ACE 抑制率为 $(50.08 \pm 2.34)\%$,与理论预测值的误差在 1% 的范围内,说明调整后的条件可用于制备核桃谷蛋白-1 ACE 抑制肽。

3 结论

本研究采用连续提取法从脱脂核桃粕中依次分离出清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白-1 和谷蛋白-2 5 种组分蛋白,其占比大小顺序为谷蛋白-2 > 谷蛋白-1 > 球蛋白 > 清蛋白 > 醇溶蛋白;5 种组分蛋白均具有一定的 ACE 抑制活性,其中谷蛋白-1 的 ACE 抑制活性最高,醇溶蛋白次之,谷蛋白-2 的最低。以核桃谷蛋白-1 为原料,通过筛选,采用胃蛋白酶酶解制备核桃谷蛋白-1 ACE 抑制肽,通过单因素试验结合响应面试验对工艺条件进行优化,得到胃蛋白酶酶解制备核桃谷蛋白-1 ACE 抑制肽的最优工艺条件为酶解温度 46 °C、酶解时间 6 h、酶用量 4.2%、酶解 pH 1.6,该条件下所得酶解液的 ACE 抑制率为 $(50.08 \pm 2.34)\%$ 。因此,该最优工艺条件可用于制备核桃谷蛋白-1 ACE 抑制肽。

参考文献:

- [1] 郑亚军. 油棕粕谷蛋白-2 血管紧张素转化酶抑制肽制备与降血压活性研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2016.
- [2] 豁银强, 刘传菊, 聂荣祖, 等. 核桃蛋白的组成、制备及特性研究进展[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(12): 191-197.
- [3] AI M, TANG T, ZHOU L, et al. Effects of different proteases on the emulsifying capacity, rheological and

- structure characteristics of preserved egg white hydrolysates [J]. *Food Hydrocolloid*, 2019, 87: 933–942.
- [4] ABDEL – HAMID M, OTTE J, DE GOBBA C, et al. Angiotensin I – converting enzyme inhibitory activity and antioxidant capacity of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of buffalo milk proteins[J]. *Int Dairy J*, 2017, 66: 91–98.
- [5] LEE J K, JEON J K, BYUN H G. Antihypertensive effect of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin in spontaneously hypertensive rats[J]. *J Funct Foods*, 2014, 7: 381–389.
- [6] CHEN H, ZHAO M, LIN L, et al. Identification of antioxidative peptides from defatted walnut meal hydrolysate with potential for improving learning and memory[J]. *Food Res Int*, 2015, 78: 216–223.
- [7] 张缓. 核桃粕水解蛋白的制备及其特性研究[D]. 河北保定: 河北农业大学, 2018.
- [8] WANG F J, YIN X Y, REGENSTEIN J M, et al. Separation and purification of angiotensin – I – converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from walnuts (*Juglans regia* L.) meal[J]. *Eur Food Res Technol*, 2016, 242(6): 911–918.
- [9] 郭琰, 马雅鸽, 张希, 等. 基于网络药理学研究核桃粕的降脂机理[J]. *粮油食品科技*, 2021, 29(4): 144–152.
- [10] JAHANBANI R, GHAFFARI M, VAHDATI K, et al. Kinetics study of protein hydrolysis and inhibition of angiotensin converting enzyme by peptides hydrolysate extracted from walnut[J]. *Int J Pept Res Ther*, 2018, 24(1): 77–85.
- [11] 赵凡睿. 核桃抗氧化肽改善学习和记忆功能障碍的分子机制研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.
- [12] 陈卉平. 核桃粕蛋白抗氧化肽的分离纯化、结构鉴定及其改善记忆的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
- [13] 乌兰, 刘睿, 杜倩, 等. 核桃肽对小鼠的抗疲劳作用[J]. *中国食物与营养*, 2018, 24(12): 50–54.
- [14] 杨胜杰, 钟少达, 崔玉梅, 等. 核桃肽免疫调节作用的研究[J]. *北方药学*, 2019, 16(7): 129–131.
- [15] 张榕. 核桃蛋白酶解物调控制备纳米硒及其抗肿瘤活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2016.
- [16] 刘东伟, 袁玮琼, 柳梅, 等. 核桃粕蛋白抑菌肽的制备工艺及纯化[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(2): 185–191.
- [17] SZE – TAO K W C, SATHE S K. Walnuts (*Juglans regia* L.): Proximate composition, protein solubility, protein amino acid composition and protein *in vitro* digestibility [J]. *J Sci Food Agric*, 2000, 80(9): 1393–1401.
- [18] 阚建全. 食品化学[M]. 3版. 北京: 中国农业大学出版社, 2016.
- [19] 郑亚军, 王贤, 侯雅馨, 等. 苜蓿谷蛋白-1酶解物螯合亚铁离子影响因素的研究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(6): 33–37.
- [20] WANG J, WANG G, CHEN N, et al. Characterization of structural, functional and antioxidant properties and amino acid composition of pepsin – derived glutelin – 1 hydrolysate from walnut processing by – products [J]. *RSC Adv*, 2021, 11(31): 19158–19168.
- [21] GONZALEZ – VILLALOBOS R A, SHEN X Z, BERNSTEIN E A, et al. Rediscovering ACE: Novel insights into the many roles of the angiotensin – converting enzyme[J]. *J Mol Med*, 2013, 91(10): 1143–1154.
- [22] ZHENG Y, LI Y, ZHANG Y, et al. Purification, characterization, synthesis, *in vitro* ACE inhibition and *in vivo* antihypertensive activity of bioactive peptides derived from oil palm kernel glutelin – 2 hydrolysates[J]. *J Funct Foods*, 2017, 28: 48–58.
- [23] ZAREI M, FORGHANI B, EBRAHIMPOUR A, et al. *In vitro* and *in vivo* antihypertensive activity of palm kernel cake protein hydrolysates: Sequencing and characterization of potent bioactive peptides[J]. *Ind Crops Prod*, 2015, 76: 112–120.
- [24] 周慧江. 核桃蛋白源 ACE 抑制剂肽的酶法制备及分离、纯化[D]. 西安: 陕西科技大学, 2013.
- [25] 卢娣. 核桃降压肽的制备及分离纯化研究[D]. 新疆石河子: 石河子大学, 2015.
- [26] FENG L, PENG F, WANG X, et al. Identification and characterization of antioxidative peptides derived from simulated *in vitro* gastrointestinal digestion of walnut meal proteins[J]. *Food Res Int*, 2019, 116: 518–526.
- [27] 金子纯. 核桃粕蛋白质组分的理化性质、抗氧化性质及 ACE 抑制率的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2017.
- [28] 石嘉怿, 梁富强, 张太, 等. 基于生物信息学稻米半胱氨酸蛋白酶抑制剂来源生物活性肽的虚拟筛选及分子对接研究[J]. *中国粮油学报*, 2021, 36(2): 1–8.
- [29] 汪东风, 徐莹. 食品化学[M]. 3版. 北京: 化学工业出版社, 2019.
- [30] 卢嵩纯, 苏嘉毅, 杨迅, 等. 富硒核桃粕蛋白降血压肽的酶解制备及硒含量分析[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(2): 161–169.