

仿刺参不同部位ACE抑制活性分析及活性肽制备工艺优化

王扬铎, 苏永昌, 王晓燕, 施文正, 刘智禹

Analysis of ACE Inhibitory Activity in Different Parts of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) and Optimization of Preparation Process of Active Peptides

WANG Yangduo, SU Yongchang, WANG Xiaoyan, SHI Wenzheng, and LIU Zhiyu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2023070015>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

海参体壁蛋白ACE抑制肽酶解工艺及产物分子量分布研究

Study on hydrolysis condition and molecular weight distribution of ACE inhibitory peptide derived from sea cucumber protein

食品工业科技. 2017(17): 163-167 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2017.17.031>

酶法制备大豆肽的相对分子量分布及降压作用研究

Study on relative molecular weight distribution and depressor effect of soybean peptide prepared by enzymatic method

食品工业科技. 2018, 39(1): 46-51 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.01.009>

大蒜降压肽的制备及超滤分离

Preparation and Ultrafiltration Separation of Garlic Antihypertensive Peptide

食品工业科技. 2019, 40(19): 73-80 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2019.19.013>

南方刺参性腺多肽酶解工艺优化及抗氧化活性分析

Optimization of the Enzymatic Hydrolysis Process and Analysis of the Antioxidant Activity of Polypeptide from *Apostichopus japonicus* Gonads

食品工业科技. 2018, 39(19): 181-187 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.19.032>

发酵大豆豆粕水提物分离纯化ACE抑制活性小肽

Isolation and purification of ACE inhibitory peptides from fermented soybean meal extracts

食品工业科技. 2018, 39(11): 74-79 <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2018.11.014>

响应面法优化微波辅助酶解制备 α -葡萄糖苷酶抑制活性肽工艺

Optimization of preparation process of α -glucosidase inhibitory activity peptide with microwave assisted enzymatic hydrolysis reaction by response surface methodology

食品工业科技. 2018, 39(4): 117-122,136 <https://doi.org/>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王扬铎, 苏永昌, 王晓燕, 等. 仿刺参不同部位 ACE 抑制活性分析及活性肽制备工艺优化 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(10): 187-197. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070015

WANG Yangduo, SU Yongchang, WANG Xiaoyan, et al. Analysis of ACE Inhibitory Activity in Different Parts of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) and Optimization of Preparation Process of Active Peptides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(10): 187-197. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070015

· 工艺技术 ·

仿刺参不同部位 ACE 抑制活性分析及活性肽制备工艺优化

王扬铎^{1,2}, 苏永昌², 王晓燕², 施文正¹, 刘智禹^{2,*}

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 202206;

2. 福建水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建厦门 361013)

摘要: 本文对仿刺参具有高降血压活性部位进行筛选并优化其活性肽制备工艺。采用酶解法对仿刺参不同部位(体壁、肠、卵)进行水解, 以血管紧张素转换酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)抑制率为指标筛选最适蛋白酶, 通过对各酶解物 ACE 抑制率的半数抑制浓度(IC₅₀)测定比较筛选出最优抑制活性部位。经单因素实验与响应面法优化确定活性肽最佳酶解制备条件, 对蛋白酶解物进行分子量测定确定其分布范围, 经超滤膜分离后对不同组分的 ACE 抑制活性分析。结果显示, 选用碱性蛋白酶为最适水解酶, 体壁、肠、卵各蛋白酶解物的 ACE 抑制率的 IC₅₀ 分别为 1.11、4.02、0.65 mg/mL, 仿刺参卵具有更好的 ACE 抑制效果, 为最优抑制活性部位。其最佳的酶解制备工艺参数为: 酶解时间 5 h, 加酶量 3.5 U/mg, 酶解温度 65.26 °C, 底物浓度 3.51%, 酶解 pH9.02, 在该条件下仿刺参卵酶解产物的 ACE 抑制率为 80.65%±0.52%, 与预测值接近。蛋白酶解产物的分子量集中分布在 3000 Da 以下, 占总含量的 98.37%, 其中 1000~3000 Da 占比 9.50%, 小于 1000 Da 占比 88.87%。超滤膜分离所得低聚肽组分 ACE 抑制活性(IC₅₀=0.30 mg/mL)显著(P<0.05)强于经工艺优化后酶解物及截留液组分。本研究结果为仿刺参副产物高值化利用提供理论依据, 可作为分离纯化制备降血压肽的优质资源。

关键词: 仿刺参, ACE 抑制活性, 降压活性肽, 响应面, 分子量分布, 超滤膜分离

中图分类号: TS254.9

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2024)10-0187-11

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023070015

本文网刊:



Analysis of ACE Inhibitory Activity in Different Parts of Sea Cucumber (*Apostichopus japonicus*) and Optimization of Preparation Process of Active Peptides

WANG Yangduo^{1,2}, SU Yongchang², WANG Xiaoyan², SHI Wenzheng¹, LIU Zhiyu^{2,*}

(1. College of Food Sciences & Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 202206, China;

2. Fujian Aquatic Research Institute, Fujian Key Laboratory of Marine Bio Enhancement and High Value Utilization, Xiamen 361013, China)

Abstract: In this paper, the active parts of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) with high antihypertensive activity were screened and the preparation process of active peptides was optimized. Different parts (body wall, intestine, and ovum) of *A. japonicus* were hydrolyzed by enzymolysis, and the ACE inhibition rate was used as an indicator to screen the optimal protease. The optimal active site for inhibition was selected by comparative screening of the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) determination of ACE inhibitory rate of each lysate. Single factor and response surface tests were used

收稿日期: 2023-07-05

基金项目: 福建省海洋经济发展专项资金项目“海参高质化开发技术及系列产品开发”(FJHJF-L-2022-1); 福建省种业创新与产业化工程项目“仿刺参种业创新与产业化开发”(2021FJSC2Y03)。

作者简介: 王扬铎(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 海洋活性物质开发, E-mail: Admit1996@126.com。

* 通信作者: 刘智禹(1972-), 男, 教授级高级工程师, 研究方向: 水产品加工与综合利用研究, E-mail: 13906008638@163.com。

to determine the optimum enzymatic hydrolysis conditions of the active peptides. The relative molecular weight of the protease hydrolysates was determined to determine its distribution range. The ACE inhibition activity of different components was analyzed after separation by ultrafiltration membrane. Search results, alkaline protease was selected as the optimal hydrolytic enzyme, and the IC_{50} values of ACE inhibition of each protease lysate from body wall, intestine and ovum were 1.11, 4.02, 0.65 mg/mL, respectively, so that *A. japonicus* ovum had a better ACE inhibition effect and were the optimal active site for inhibition. Its optimal preparation process parameters for enzymatic hydrolysis were as follows: 5 h enzymatic hydrolysis time, 3.5 U/mg enzyme added, 65.26 °C enzymatic hydrolysis temperature, 3.51% substrate concentration, pH9.02 enzymatic hydrolysis, and ACE inhibition rate of *A. japonicus* ovum was $80.65\% \pm 0.52\%$ under these conditions, which was close to the predicted value. The molecular weight of proteolytic products was concentrated under 3000 Da, accounting for 98.37% of the total content, of which 1000~3000 Da accounted for 9.50%, and less than 1000 Da accounted for 88.87%. The ACE inhibitory activity of oligopeptide components ($IC_{50}=0.30$ mg/mL) isolated by ultrafiltration membrane was significantly higher than that of hydrolysates and trapped liquid components after process optimization. The results of this study would provide a theoretical basis for high-quality utilization of the by-products of *A. japonicus*, which could be used as high-quality resources for the isolation and purification of antihypertensive peptides.

Key words: *Apostichopus japonicus*; ACE inhibitory activity; hypotensive activity peptides; response surface; molecular weight distribution; ultrafiltration membrane separation

血管紧张素转换酶抑制剂(Angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI)通过抑制人体组织中血管紧张素转换酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)的活性,从而阻碍血管收缩剂(血管紧张素 II, Ang II)的生成以及血管舒张剂(舒缓激肽, Bradykinin)的失活,起到调节人体血压,发挥心血管保护作用。目前制备食源性蛋白的 ACE 抑制肽(Angiotensin converting enzyme inhibitors peptide, ACEIP)具有更高的安全性、专一性并且无副作用,更易被人体吸收,已成为当下预防和治疗高血压非药物策略的一种非常有效的手段^[1]。其中蛋白资源丰富的海洋生物由于其生存环境的特殊性,在生物代谢过程中积累了具有特殊化学结构及功能活性的物质,相比陆生动植物蛋白具有更大的优势与特性,因此海洋源蛋白 ACE 抑制肽成为该领域研究的热点之一^[2]。

仿刺参(*Apostichopus japonicus*),属棘皮动物门(Echinodermata)海参纲的无脊椎海洋生物。作为消费市场上主要的食用海参之一,仿刺参的可食用部位除体壁外,还包括副产物肠与卵等,据此山东沿海也有“一花(精或卵)二肠三滚子(体壁)”的说法。而在我国多数区域被剔除的副产物大多被直接丢弃或用作饲料,造成环境污染和资源的浪费,副产物的有效合理利用将解决此类问题,提高仿刺参应用的附加值。仿刺参各部位营养成分丰富并表现出许多生物活性功能,包括抗氧化^[3]、抗凝血、抗肿瘤^[4]、抗衰老^[5]等作用,并被用于制造功能性食品、药品、护肤品^[6]。

目前关于仿刺参降压肽的来源主要集中在体壁,副产物性腺、内脏和水煮液等,只以初加工为主,随着副产物的高附加值逐渐被重视,也有研究表明这些副产物通过蛋白水解,同样能产生具有降压活性的多肽^[7-9]。而且关于 ACE 抑制肽研究均以其性腺、内脏整体作为主体,缺少精细化的分类和研究,并尚无报道对仿刺参不同部位降压活性进行比较分析,明确其具有较强的活性部位,国内对仿刺参卵降

压活性肽的报道也相对较少。

基于仿刺参及其加工副产物的高值化利用,对可食用的仿刺参不同部位(体壁、肠、卵)采用蛋白酶解法进行水解。通过体外 ACE 抑制率判断其降压活性,以此为指标比较筛选出最适蛋白酶及最优抑制活性部位;经单因素实验与响应面试验优化确定活性肽最佳制备条件,测定活性肽分子量分布范围,通过超滤膜分离制备具有较高活性的低聚肽。旨在为仿刺参副产物产业制备 ACE 抑制肽的创新研发和副产物资源再利用提供理论依据,为提升仿刺参产业的应用附加值,并为其综合利用开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

仿刺参 购自福建省宁德市霞浦县,均为性成熟的仿刺参原料,其体壁、肠和卵已被处理分拣并通过全程冷链运输至实验室, -20 °C 冷库以保证品质无损。原料进行真空冷冻干燥处理,冻干研磨粉碎后放置 0~4 °C 冰箱储存备用;浓盐酸、乙腈、甲醇、硼酸、硼砂、三氟乙酸等 均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶 200 U/mg, 南宁庞博生物工程有限公司;马脲酰组氨酰亮氨酸(Hippuryl-His-Leu, HHL)、血管紧张素转换酶(ACE) 美国 Sigma 公司;实验用水为超纯水。

BSA224S 分析天平 德国赛多利斯; Alpha2-4LDplus 真空冷冻干燥机 德国 Christ 公司; Five Easy pH 计 瑞士梅特勒-托利多公司; 数显型恒温水浴锅 上海力辰邦西器科技有限公司; Waters e2695 型高效液相色谱仪 美国 Alliance 公司; Sun Fire C₁₈ 色谱柱 德国 Merck 公司; TSKgel G2000 SWXL(300 mm×7.8 mm)凝胶柱 日本东曹株式会社; ST16R 型高速冷冻离心机 美国 Thermo Sorvall 公司; CeraMem-0100 陶瓷膜过滤设备(200 nm 陶瓷膜)、RNF-0460 超滤膜浓缩设备(3000 Da 超滤

膜) 厦门福美科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 仿刺参不同部位蛋白酶解物制备 分别称取一定质量的仿刺参体壁、肠、卵冻干粉,按照底物浓度 2% 添加超纯水振荡混匀,恒温水浴预热,调节 pH 后加入相应蛋白酶。在适宜温度下水解一定时间,随后立刻置于 95~100 °C 的水浴锅中进行钝化灭酶 15 min,待自然冷却后 4 °C、4000 r/min 条件下离心 15 min,上清液部分即为不同部位的蛋白酶解液,并取部分蛋白酶解液冷冻干燥成粉备用^[10]。

1.2.2 水解蛋白酶的筛选 分别选用碱性蛋白酶、中性蛋白酶、胃蛋白酶三种具有较大水解 pH 差异的蛋白酶作为水解酶。按照底物浓度 2%、加酶量 3 U/mg、酶解时间 5 h 对仿刺参体壁、肠及卵冻干粉在蛋白酶各自最适条件下密封振荡酶解(表 1)。通过测定其充分酶解后不同部位稀释 10 倍后蛋白酶解液的 ACE 抑制率,比较分析以筛选出最适宜的酶源。

表 1 不同蛋白酶最适水解条件
Table 1 Optimum enzymolysis conditions of different proteases

蛋白酶	pH	酶解温度(°C)	酶解时间(h)	底物浓度(%)	加酶量(U/mg)
碱性蛋白酶	9.0	50	5	2	3
中性蛋白酶	7.0	50	5	2	3
胃蛋白酶	2.0	37	5	2	3

1.2.3 最优降压活性部位比较筛选 分别称取适量经冷冻干燥处理后的仿刺参体壁、肠、卵粉末蛋白酶解物,加入超纯水溶解,将其分别配制成质量浓度为 0.1、0.5、1、2、4、8 mg/mL 的 6 个梯度,进行 3 组平行实验测定计算出各浓度样品的 ACE 抑制率。使用 GraphPad Prism 8 软件进行非线性曲线拟合分析,计算不同部位 ACE 抑制率的半数抑制浓度值(IC₅₀)。通过比较不同浓度下各部位 ACE 抑制率大小并结合 IC₅₀ 值验证,筛选出具有较强 ACE 抑制效果的仿刺参部位,用作降压组分活性肽的制备工艺优化。

1.2.4 ACE 抑制率测定 通过反相高效液相色谱法对蛋白酶解物 ACE 抑制活性进行测定,根据相关参考文献 [11-12] 对测定方法进行优化。

配制 pH8.3,浓度为 0.1 mol/L 硼酸-硼砂缓冲溶液(含 0.3 mol/L NaCl);将 100 mg 粉末状马尿酸组氨酸亮氨酸(HHL)加入 46.57 mL 的硼酸-硼砂缓冲溶液,充分溶解后为 5 mmol/L HHL 溶液;粉末状 0.25 unit 血管紧张素转换酶(ACE)加入 5 mL 硼酸-硼砂缓冲溶液充分溶解,即 50 mU/mL ACE 溶液。

在 2 mL 离心管内加入 100 μL HHL 溶液和 100 μL 酶解液,置于 37 °C 水浴锅中预热 10 min,加入 50 μL ACE 溶液后,37 °C 恒温水浴锅中反应

1 h。待反应完成后,迅速加入 200 μL 1 mol/L 盐酸溶液终止反应,通过 0.22 μm 水系滤膜的样液注入进样瓶,上机测定各组样液中马尿酸峰面积(μV·s)从而计算马尿酸含量,以超纯水作为空白对照组。

$$\text{ACE抑制率(\%)} = \frac{\alpha - \beta}{\alpha} \times 100 \quad \text{式(1)}$$

式(1)中,α: 空白对照组马尿酸峰面积(μV·s);β: 蛋白酶解液马尿酸峰面积(μV·s);

检测条件: 色谱柱: SunFireC₁₈ 分析色谱柱(5 μm, 4.6 mm×150 mm); 过柱流速: 1 mL/min; 单样进样体积: 10 μL; 紫外检测波长 228 nm; 流动相: 乙腈: 水(含 0.1% 三氟乙酸)=32:68(体积比)。

1.2.5 ACE 抑制肽制备工艺优化

1.2.5.1 单因素实验设计 在蛋白酶及活性部位筛选的实验结果的基础上,以最适酶源碱性蛋白酶为提取酶,对具有较高降压活性的仿刺参卵进行单因素制备工艺设计。分别对酶解温度、酶解底物浓度、pH、酶解时间、加酶量这 5 个因素不同水平进行调整,研究其对体外 ACE 抑制率的影响。

1.2.5.2 酶解温度 仿刺参卵冻干粉底物浓度为 2%,加酶量为 3.0 U/mg, pH 调为 9.0,分别在 40、45、50、55、60、65、70 °C 的酶解温度下进行恒温酶解 5 h,以蛋白酶解液 ACE 抑制率为指标,探讨温度对蛋白酶酶解效果的影响。

1.2.5.3 酶解 pH 在酶解温度为 50 °C,仿刺参卵冻干粉底物浓度为 2%,加酶量为 3.0 U/mg,酶解时间 5 h 前提下,对 pH 为 7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5 的 7 组蛋白酶解液进行 ACE 抑制率测定,探讨酶解 pH 变化对其酶解效果的影响。

1.2.5.4 底物浓度 在酶解温度为 50 °C,加酶量为 3.0 U/mg,酶解 pH 为 9.0,酶解时间 5 h 的条件下对 5 组不同含量的底物浓度 0.5%、1%、2%、3%、4% 进行 ACE 抑制率测定。

1.2.5.5 酶解时间 在仿刺参卵冻干粉底物浓度 2%,加酶量 3.0 U/mg, pH 为 9.0,温度 50 °C 条件下,分别测定酶解时间在 3、4、5、6、7 h 的 ACE 抑制率以确定最适合的酶解时间,通过对其 ACE 抑制率的测定分析酶解时间对酶解效果的影响。

1.2.5.6 加酶量 仿刺参卵冻干粉底物浓度为 2%, pH 为 9.0,温度 50 °C,分别在 2、2.5、3.0、3.5、4.0 U/mg 的酶添加量情况下酶解 5 h,通过 ACE 抑制率的变化趋势分析加酶量对酶解效果的影响。

1.2.6 响应面试验设计 以单因素实验结果为基础,基于 Box-Behnken 响应面设计方法,将时间与加酶量作为固定量。选取对 ACE 抑制率有显著影响的 3 个因素酶解温度(A)、pH(B)、底物浓度(C)为自变量,并将响应值设为蛋白酶解物 ACE 抑制率,应用 Design-Expert 8.06 软件进行三因素三水平的响应面优化试验设计。响应面试验因素水平设计见表 2。

表2 Box-Behnken 试验因素水平设计

Table 2 Factor coding of Box-Behnken experimental design

水平	因素		
	A酶解温度(°C)	B底物浓度(%)	C pH
-1	60	2	8.5
0	65	3	9
1	70	4	9.5

1.2.7 酶解产物分子量分布测定 采用高效凝胶过滤色谱法结合 Empower GPC 处理软件对经工艺优化后的仿刺参卵蛋白酶解物进行分子量分布测定^[13]。将浓度为 1 mg/mL 的 5 种不同分子量标准品按一定比例进行混合;将酶解产物冻干粉溶解配制为 10 mg/mL 溶液,经 0.22 μm 有机相微孔滤膜过滤后上样,得到混合标品及仿刺参卵酶解产物色谱图。以混合标品的分子量对数(lgMw)对其保留时间作图得到标准拟合曲线及三阶回归方程,利用 GPC 软件将酶解产物色谱图带入校正曲线方程分析计算得到分子量及多肽分布范围。

所用标准品:细胞色素 C(Mw 12384 Da)、抑肽酶(Mw 6512 Da)、杆菌酶(Mw 1423 Da)、Gly-Gly-Tyr-Arg(Mw 451 Da)、Gly-Gly-Gly(Mw 189 Da)。色谱检测条件:色谱柱:TSKgel G2000 SWXL (300 mm×7.8 mm)凝胶柱;过柱流速:1 mL/min;单样进样体积:10 μL;紫外检测波长 228 nm;流动相:乙腈:水(含 0.1% 三氟乙酸)=45:55(体积比)。

1.2.8 超滤膜分离 将最佳酶解工艺所得仿刺参卵蛋白酶解液进行超滤分离。首先将经优化后的仿刺参卵酶解液过 200 nm 的陶瓷膜对其大颗粒杂质及杂菌进行过滤,后利用相对分子质量孔径为 3000 Da 的超滤膜对其超滤分级,分为截留液和滤过液(低聚肽)两个组分。真空冷冻干燥得到活性肽粉,将经工艺优化后的酶解液冻干粉与截留液和低聚肽的 3 组活性肽粉分别加入超纯水溶解配制成质量浓度为 0.25、0.5、1、2、4 mg/mL 的 5 个梯度计算出各浓度的 ACE 抑制率,并结合 IC₅₀ 值验证分析。

1.3 数据处理

实验测定进行三次重复实验,最终数据以平均值±标准偏差表示;使用 SPSS 22.0 软件对各组单因素实验结果进行显著性差异分析;使用 Design Expert 8.06 软件对响应面优化试验进行回归性分析;使用 Origin 2023 软件对数据进行作图。

2 结果与分析

2.1 不同部位酶解物 ACE 抑制活性分析

2.1.1 水解蛋白酶的筛选 酶解法由于其操作可控性强、酶切作用位点高效专一、完全蛋白酶解物生物活性较高、反应条件温和且有较少的副产物产生,成为当下蛋白降解最常用方法之一^[14]。本研究中采用碱性、中性和胃蛋白酶分别在各自最适的蛋白酶解条件下对仿刺参不同部位进行充分水解,并测定

各组 ACE 抑制率,比较筛选出最适酶解蛋白酶。如图 1 所示,在仿刺参体壁和卵的蛋白酶解物 ACE 抑制率测定中,碱性蛋白酶酶解产物的 ACE 抑制活性更强,其抑制率分别为 79.90%±3.63%、84.32%±0.51%,而胃蛋白酶酶解产物的 ACE 抑制活性在两个部位中均为最低。在仿刺参肠的 ACE 抑制率测定中,胃蛋白酶酶解产物具有更强的 ACE 抑制活性,抑制率最高为 71.01%±1.22%,其次为碱性蛋白酶酶解产物,ACE 抑制率为 54.21%±0.63%。在全部酶解产物 ACE 抑制率测定中,抑制率最高为使用碱性蛋白酶酶解的仿刺参卵酶解物,比胃蛋白酶酶解仿刺参肠产物高出约 13.31%。有研究指出碱性蛋白酶作用于仿刺参原料的蛋白裂解产物具有较强的 ACE 抑制活性,与其特异的酶切位点相关,例如其偏好在碱性氨基酸残基(如精氨酸或赖氨酸)旁边的肽键处进行作用^[15],这种特异性切割特定肽段会导致其肽段数量、氨基酸序列等差异影响其功能活性^[16]。分析比较筛选出具有更强 ACE 抑制活性的碱性蛋白酶为最适酶源,其有利于仿刺参蛋白的成分提取,更适合作为具有较高活性的降血压活性物质制备的工具酶,有开发利用的潜力。

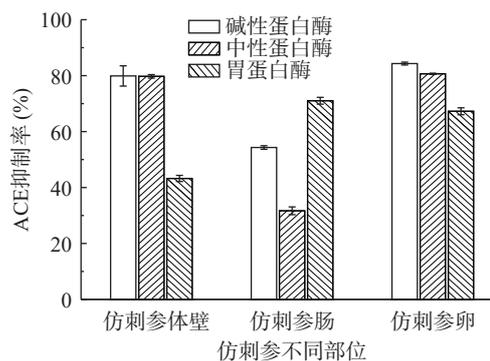


图1 不同酶源制备仿刺参各部位酶解物的 ACE 抑制率
Fig.1 ACE inhibition rate of enzymolysis from various parts of *A. japonicus* by different enzyme sources

2.1.2 最优降压活性部位的比较筛选 使用筛选出的碱性蛋白酶,在其最适的酶解条件下分别对不同浓度梯度下的仿刺参体壁、肠和卵进行充分酶解 5 h 后,测定 ACE 抑制率,结果如图 2 所示。由图 2 可

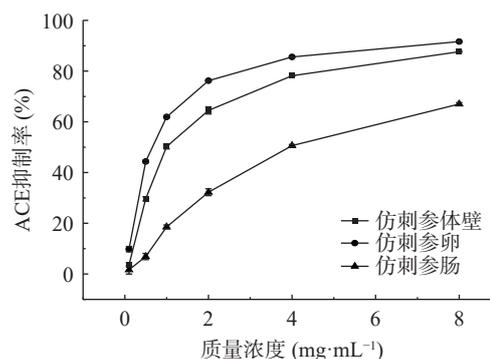


图2 仿刺参不同部位酶解物的 ACE 抑制率
Fig.2 ACE inhibition rate of enzymolysis from different parts of *A. japonicus*

知, 三种样品中, 仿刺参卵酶解产物在不同浓度均呈现出最高的 ACE 抑制率, 其次为体壁, 与 2.1.1 结果一致, 随着不同部位酶解产物质量浓度的升高, 抑制率也随即升高, 呈正相关。其中仿刺参卵酶解产物质量浓度在 8 mg/mL 时, 其 ACE 抑制率达到最高为 $91.63\% \pm 0.21\%$ 。

IC_{50} 值是通过将原始质量浓度数据转换为对数形式绘制曲线, 并由此曲线进行拟合计算得出的^[17], 常被用于评价药物诱导凋亡的能力, 即抑制能力越强, 其数值越低, 因此常被用于药物作用的科学评价。图 3 为仿刺参不同部位酶解物 ACE 抑制率的 IC_{50} 值测定结果, 由图 3 可知, 仿刺参体壁、肠、卵酶解物 ACE 抑制率的 IC_{50} 值分别为 1.11 ± 0.04 、 4.02 ± 0.09 、 0.65 ± 0.02 mg/mL, 数值较小的仿刺参卵酶解物具有最好的 ACE 抑制效果, 降压效果由高到低依次为卵>体壁>肠。比较证明仿刺参副产物卵相比于体壁与肠来说具有更好的降压活性, 具有潜在在蛋白及活性物质的开发价值, 可用于降血压功能性食品或药品的开发。

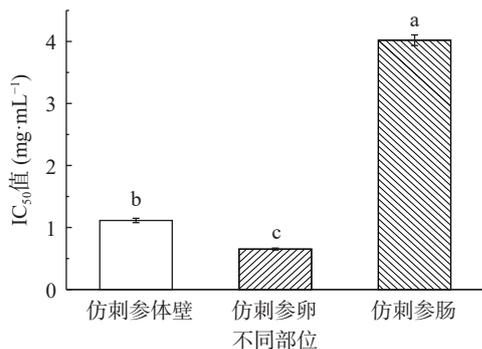


图 3 仿刺参不同部位 ACE 抑制率的 IC_{50} 值测定

Fig.3 Determination of IC_{50} values of ACE inhibition rates in different parts of *A. japonicus*

注: 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 图 4~图 8、图 10、图 14 同。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 酶解温度对 ACE 抑制率的影响 由图 4 可知, 酶解温度对仿刺参卵酶解液的 ACE 抑制率具有显著 ($P < 0.05$) 影响。测定 7 组不同温度下酶解物的

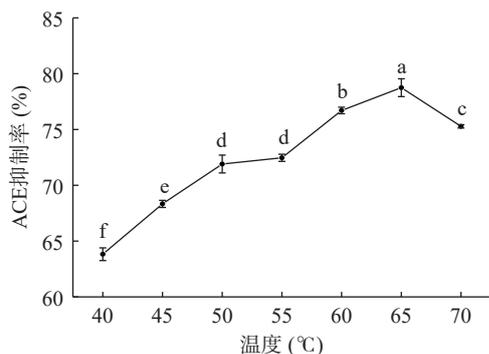


图 4 温度对蛋白酶解液 ACE 抑制率影响

Fig.4 Effects of temperature on ACE inhibition rate of protease hydrolysate

ACE 抑制率, 结果表明, 随着温度的上升, ACE 抑制率不断增加, 其中 50~55 °C 时 ACE 抑制率上升速度减缓; 随后随着温度上升, 抑制率迅速增加并在 65 °C 时达到最高值 $78.75\% \pm 1.10\%$, 升高至 70 °C 呈现下降趋势。在蛋白酶的适宜酶解温度范围内, 温度的升高促使蛋白酶活力增强, 加速酶解反应并让活性肽片段被更好地释放。但当酶解温度过高并超过其最适范围会导致酶逐渐失活, 从而使酶解液抑制活性迅速降低^[18]。综上, 确定其最佳酶解温度为 65 °C, 选取温度 60、65、70 °C 进行响应面优化设计。

2.2.2 pH 对 ACE 抑制率的影响 相对于蛋白酶最适作用范围下的 pH, 较高或较低都将对蛋白酶和样品底物的解离状态造成不同程度的负向影响, 同时会对蛋白酶空间结构造成破坏, 导致酶特异性切割位点改变, 使 ACE 抑制活性降低^[10,19]。由图 5 可知, 蛋白酶解液 pH 范围在 7.5~9.0 时, 抑制活性逐渐增强并在 pH9 时达到最高值 $69.28\% \pm 0.28\%$, 随后逐渐降低。因此, 确定 pH9 为蛋白酶较合适的酶解 pH, 选取 pH8.5、9、9.5 作为后续响应面优化设计条件。

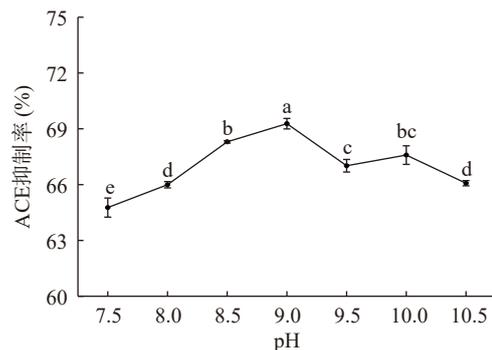


图 5 pH 对蛋白酶解液 ACE 抑制率影响

Fig.5 Effects of pH on ACE inhibition rate of protease hydrolysate

2.2.3 底物浓度对 ACE 抑制率的影响 由图 6 可知, 底物浓度对 ACE 抑制率具有显著影响并且不同浓度间均存在显著差异 ($P < 0.05$)。蛋白酶解液 ACE 抑制率随着底物浓度的不断增加呈现先迅速升高后缓慢下降的趋势, 在底物浓度为 3% 时具有最高的 ACE 抑制率 $78.10\% \pm 0.32\%$ 。这可能与其水解度有关, 当底物浓度较低, 反应物含量少, 即使完全水解酶解液中游离氨基酸及多肽的含量也相对较低, 较低水解度导致 ACE 抑制率也较低; 随底物浓度增加, 酶解过程中大量底物蛋白与蛋白酶可以充分接触, 水解度升高提高了其反应效率使 ACE 抑制率增高^[7]; 而过高的底物浓度对蛋白酶在样液的自由扩散产生阻碍作用, 其流动性减弱导致相同酶解时间下水解度下降, 酶解液中多肽含量降低, 致使抑制率平稳或下降^[20], 这与吴国宏^[21]在以水解度为指标对海参卵底物浓度对酶解效果影响的实验结果相似。综上, 确定底物浓度为 3% 为蛋白酶的最适浓度, 选取

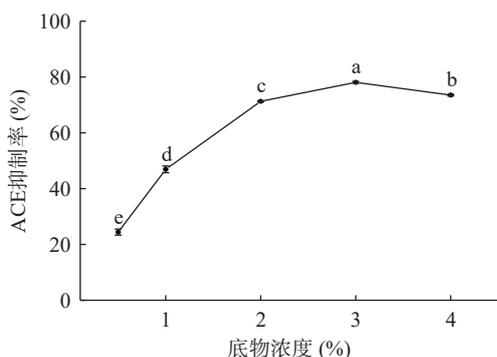


图 6 底物浓度对蛋白酶解液 ACE 抑制率影响

Fig.6 Effects of substrate concentration on ACE inhibition rate of protease hydrolysate

2%、3%、4% 三个浓度作为后续响应面优化设计条件。

2.2.4 酶解时间对 ACE 抑制率的影响 如图 7 所示, 酶解时间的改变对抑制率的影响相比其他因素较弱。酶解液的 ACE 抑制率随时间的增长先稳定升高随后缓慢下降, 酶解 5 h, 抑制率达到最高值 $71.78\% \pm 0.18\%$, 并逐渐下降, 与第 6 h 的抑制率 ($71.01\% \pm 0.10\%$) 相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。推测是由于过长的酶解时间造成酶解程度达到极限, 导致对多肽的过度降解, 生成大量肽链过短的抑制肽或游离氨基酸, 对其氨基酸组成及构象造成破坏, 丢失了发挥相关作用的活性位点, 使 ACE 抑制率下降^[22]。综上所述, 将酶解时间作为响应面优化设计固定量, 为了节约消耗、降低成本, 选取 5 h 为蛋白酶解的最适酶解时间。

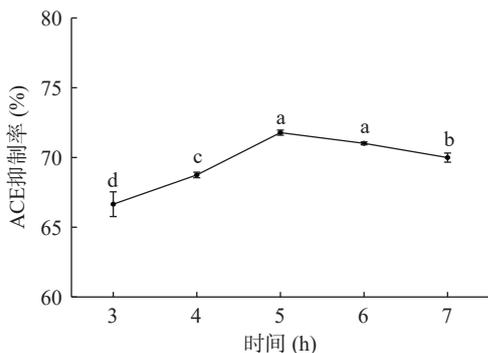


图 7 时间对蛋白酶解液 ACE 抑制率影响

Fig.7 Effects of time on ACE inhibition rate of protease hydrolysate

2.2.5 加酶量对 ACE 抑制率的影响 图 8 为加酶量对蛋白酶解液 ACE 抑制率的影响, 加酶量在 2.0~2.5 U/mg 时, ACE 抑制率并无显著变化, 随加酶量的增加呈上升趋势, 加酶量 3.5 U/mg 时, 达到最大值 $69.12\% \pm 0.27\%$, 此时相对于其他加酶量都具有显著差异 ($P < 0.05$), 当加酶量超过 3.5 U/mg, 其抑制率开始下降。推测原因为加入蛋白酶的过量致使加大酶解液中活性肽水解程度, 生成的高活性 ACE 抑制肽被继续水解丧失其活性导致 ACE 抑制率下降^[23]。

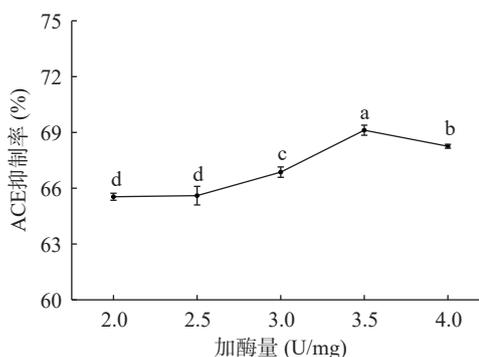


图 8 加酶量对蛋白酶解液 ACE 抑制率影响

Fig.8 Effects of enzyme addition on ACE inhibition rate of protease hydrolysate

而不同加酶量之间对抑制率的影响程度较小, 所以选择加酶量作为响应面优化设计固定量, 选取 3.5 U/mg 作为进一步优化酶解的条件。

2.3 蛋白酶解工艺响应面试验

2.3.1 Box-Behnken 实验设计及结果 根据 2.2 中单因素实验结果, 以酶解时间(5 h)和加酶量(3.5 U/mg)为固定量, 将酶解温度(A)、pH(B)、底物浓度(C)三个对 ACE 抑制率具有显著影响的因素设定为自变量, ACE 抑制率设定为响应值, 结合 Box-Behnken 的中心复合设计原理进行 3 因素 3 水平响应面试验。优化试验设计 17 组实验点, 实验方案及结果如表 3 所示。

表 3 Box-Behnken 设计方案及 ACE 抑制率的测定结果
Table 3 Box Behnken design and determination of ACE inhibitory activity

实验号	A酶解温度	B底物浓度	C pH	ACE抑制率(%)
1	0	0	0	79.45±0.78
2	-1	0	-1	73.87±0.39
3	0	1	-1	77.44±0.45
4	0	1	1	77.71±0.37
5	0	0	0	81.32±0.23
6	0	-1	1	66.03±0.23
7	-1	-1	0	68.65±0.73
8	1	0	1	75.06±0.69
9	0	0	0	78.90±0.62
10	1	0	-1	75.68±0.25
11	0	-1	-1	68.28±0.82
12	1	1	0	77.45±0.54
13	0	0	0	80.14±0.44
14	1	-1	0	65.44±1.17
15	-1	0	1	75.57±0.37
16	0	0	0	78.88±0.33
17	-1	1	0	77.01±0.56

2.3.2 模型建立及方差分析 对数学模型进行建立, 结合 Design-Expert 8.06 软件对 2.3.1 数据结果多元拟合分析后, 得到回归方程: $Y = 79.74 - 0.18A + 5.15B - 0.11C + 0.91AB - 0.58AC + 0.63BC - 2.46A^2 - 5.14B^2 - 2.23C^2$ 。

对模型做方差分析, 结果见表 4。该模型 F 值 = 40.96, P 值 < 0.0001 (极显著), 失拟项 P 值 = 0.4657 > 0.05

(不显著), 表明所建立模型达到极显著水平, 拟合精度良好, 数据可信度高, 可用于此优化设计^[24]。模型决定系数 $R^2=0.9814$, 校正系数 $R^2_{adj}=0.9574$, $R^2_{Pred}=0.8530$, 表明该模型相关性好, 预测结果可以用于解释 95.74% 的实验结果, R^2_{adj} 和 R^2_{Pred} ($R^2_{adj}-R^2_{Pred}<0.2$) 两数值均较高且差较小, 因此能充分说明工艺过程。信噪比 $C.V.\%=1.37<10\%$, 也说明数据拥有较高的可信度及精密度。底物浓度 B 以及二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 对响应值的影响都为极显著 ($P<0.001$), 根据 F 值的大小可判断各因素对实验结果影响程度大小,

表 4 响应面回归模型方差分析

Table 4 Analysis of variance for response surface regression model

方差来源	离差平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	391.52	9	43.50	40.96	<0.0001	**
A-酶解温度	0.26	1	0.26	0.25	0.6340	-
B-底物浓度	212.25	1	212.25	199.86	<0.0001	**
C-pH	0.10	1	0.10	0.096	0.7662	-
AB	3.34	1	3.34	3.15	0.1194	-
AC	1.35	1	1.35	1.27	0.2971	-
BC	1.59	1	1.59	1.50	0.2604	-
A^2	25.53	1	25.53	24.04	0.0017	**
B^2	111.24	1	111.24	104.75	<0.0001	**
C^2	20.97	1	20.97	19.75	0.0030	**
残差	7.43	7	1.06			-
失拟项	3.26	3	1.09	1.04	0.4657	-
纯误差	4.18	4	1.04			-
总相关	398.95	16				-

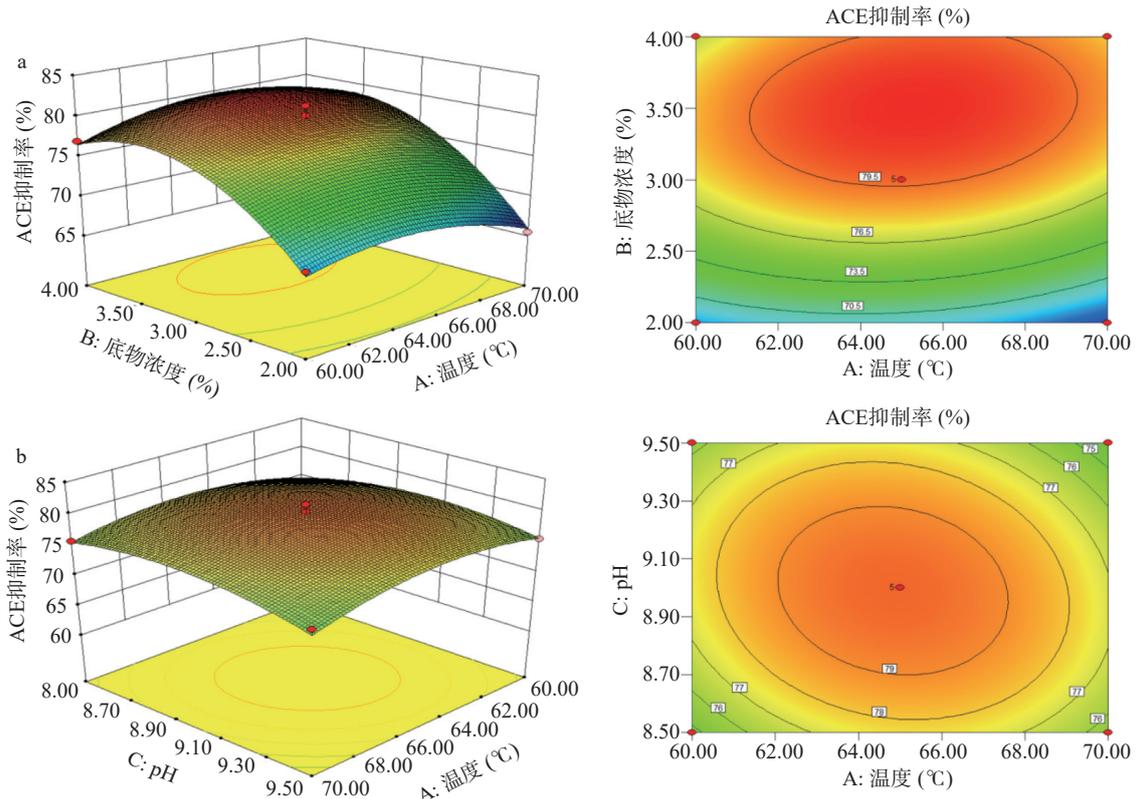
$R^2=0.9814$ $R^2_{Adj}=0.9574$ $R^2_{Pred}=0.8530$ $C.V.\%=1.37$

注: $P<0.01$ 为极显著, 用**表示; $P<0.05$ 为显著, 用*表示; -表示无显著差异。

F 值越大表明对结果的影响越大。因此, 根据各因素对 ACE 抑制率影响进行排序: 底物浓度>酶解温度>pH。

2.3.3 交互作用分析 根据所建立模型及拟合的回归方程, 结合交互影响的 3D 立体响应面图和等高线图, 分析在固定单一因素同时中心值不变时, 其他 2 个因素之间的交互作用对仿刺参卵酶解液 ACE 抑制率的影响。通过对 3D 响应曲面的陡峭程度及等高线形状进行观察使两因素交互作用对响应值的影响程度做出更直观的反应, 3D 反应曲面越陡峭, 等高线越密集越接近椭圆^[25], 表明影响越显著, 两因素交互的作用就越强。

图 9 为酶解温度(A)、底物浓度(B)、pH(C)三因素两两交互作用对响应值 ACE 抑制率影响的 3D 响应面及等高线图。如图 9A 所示, 当处于最佳酶解时间, 其底物浓度处于较低水平时, 反应体系中温度的变化对 ACE 抑制率的影响并不显著, 当酶解底物浓度水平较高时, 随温度的增加, 响应值 ACE 抑制率呈现先升高随后降低的趋势; 固定温度, 响应值随底物浓度的增加呈现先升高后缓慢降低或趋于平稳的趋势。底物浓度变化的反应曲面陡峭程度大于酶解温度, 表明酶解底物浓度对响应值的影响更为明显。由图 9B 可知, 当处于最佳底物浓度, 响应值随着 pH 和酶解温度的同时增加呈现先升高后降低的趋势, 反应曲面的陡峭程度相似。由图 9C 可知, 当处于最佳酶解温度, 底物浓度的水平较低时反应体系的 pH 对响应值的影响并不显著, 底物浓度水平较高



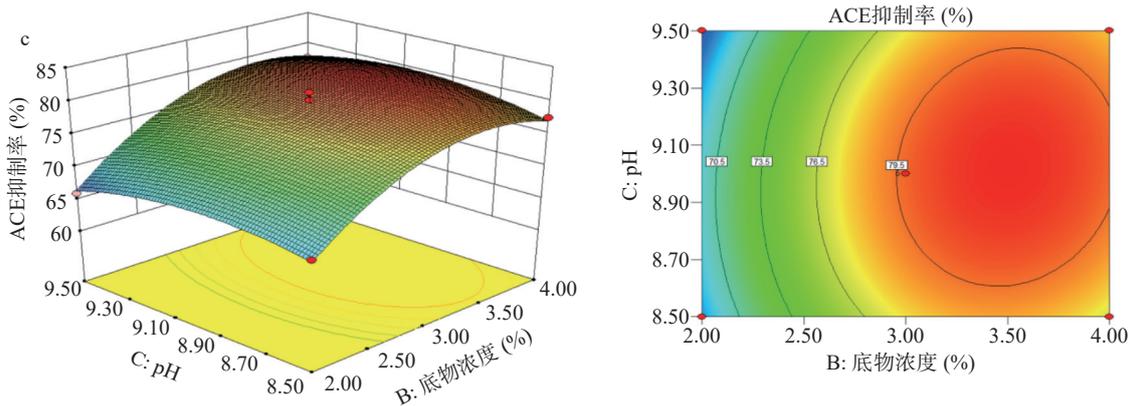


图9 三因素交互作用对 ACE 抑制率影响的 3D 响应面及等高线图

Fig.9 3D response surface and contour map of the effects of three factors interaction on ACE inhibition rate

注: 图9中 a 为底物浓度和酶解温度交互作用; b 为 pH 和酶解温度交互作用; c 为 pH 和底物浓度交互作用。

时呈现先升高后降低的趋势, 固定 pH, 响应值随底物浓度的增加呈现先升高后缓慢减小或趋于平稳的趋势。根据图9中各等高线图中椭圆程度的大小结合表4中交互项 AB、AC、BC 的 F 值大小, 对比判断出酶解温度和底物浓度的交互作用相对其他两组对 ACE 抑制率的影响更大。

2.3.4 工艺优化及模型验证 通过 Design-Expert 8.06 处理分析, 仿刺参卵 ACE 抑制肽的最佳制备工艺为: 酶解温度 65.26 °C、底物浓度 3.51%、酶解 pH9.02, 在此条件下, 软件模型预测的 ACE 抑制率为 81.04%。考虑到实验操作的可控性, 将最佳的酶解工艺调整为酶解温度 65 °C、底物浓度 3.5%、pH9.0、加酶量 3.5 U/mg、酶解时间 5 h。在该条件基础上进行 3 次重复实验验证, ACE 抑制率为 80.65%±0.52%, 与模型的预测值高度接近。对工艺优化后蛋白酶解产物的 IC₅₀ 值计算, 由图10所示, 经工艺优化后的仿刺参卵酶解产物其 IC₅₀ 值(0.59±0.03 mg/mL)最小, 且与未经优化的酶解产物 IC₅₀ 值(0.65±0.02 mg/mL)具有显著性差异(P<0.05)。证明经工艺优化后其蛋白酶解物 ACE 抑制活性具有显著性提升, 该回归模型实用性较高并具有高拟合度, 可用于对仿刺参卵 ACE 抑制肽的制备。

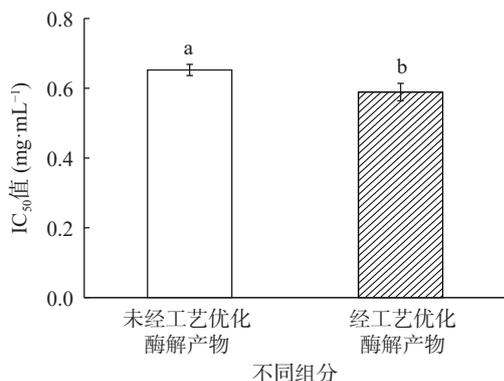


图10 工艺优化前后酶解产物 IC₅₀ 值

Fig.10 IC₅₀ values of enzymatic products before and after process optimization

2.4 工艺优化酶解产物相对分子质量分布测定

通过高效凝胶过滤色谱法测定分子量分布实验中, 由于分子量不同的多肽在色谱图中的保留时间不同, 因此利用洗脱体积与分子量对数(lgMw)做标准曲线, 从而通过 GPC 软件计算酶解液中多肽的分子量分布范围^[26]。标准线性拟合曲线为 $Y=0.005X^3-0.2364X^2+3.4398X-11.758$, R^2 为 0.998, 混合标准品随洗脱时间的分子量分布色谱图及线性拟合曲线如图11所示。

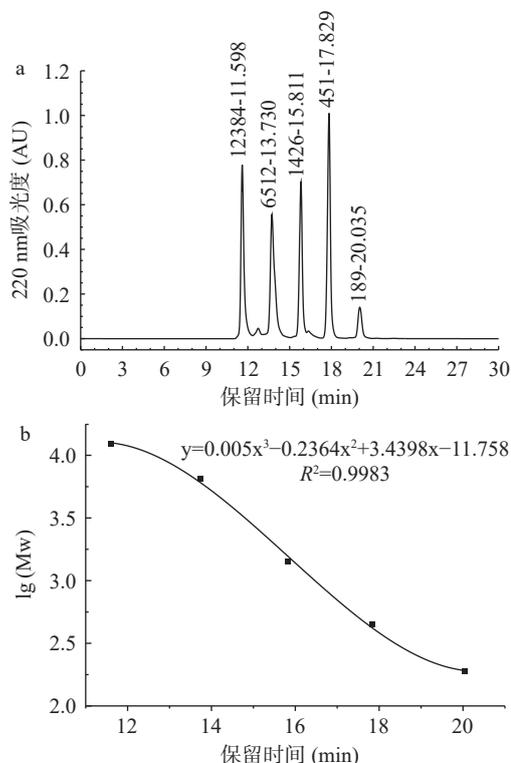


图11 混合标准品色谱图及分子量校正曲线

Fig.11 Chromatogram and molecular weight correction curve of mixed standard

注: a 为混合标准品色谱图; b 为混合标准品分子量校正曲线。

通过对多肽分子量分布范围测定, 不仅能反映出蛋白的水解程度, 同时也可作为分离制备高活性多

肽的参照条件之一^[27]。工艺优化酶解产物采用与混合标品相同的检测条件,测定其分子量分布,色谱图及分子量分布表如图 12 和表 5 所示。由图可知,酶解产物的出峰时间大多都集中在 14~22 min,利用 GPC 软件处理数据并结合分子量标准曲线计算得出:酶解产物大部分多肽分子量分布范围为<3000 Da,占总含量的 98.37%,其中 1000~3000 Da 占比 9.50%,小于 1000 Da 占比 88.87%,小于 200 Da 以下的寡肽、游离氨基酸以及酶解过度的氨基酸残基占比 25.45%。结果表明,经过工艺优化后,酶解产物水解较充分,蛋白大分子大多被水解为 1000 Da 以下易被肠道吸收的小分子肽,目前已知并被证明活性的 ACE 抑制肽大部分为分子量较小的短肽^[28]。该结果为超滤膜分离选择组分提供了数据支撑。

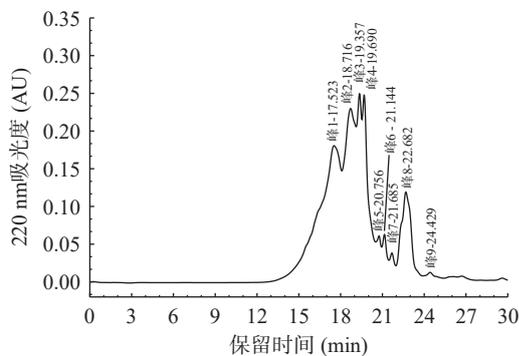


图 12 酶解产物色谱图

Fig.12 Chromatogram of enzymatic hydrolysis product

表 5 酶解产物分子量分布
Table 5 Molecular weight distribution

色谱峰序号	保留时间 (min)	峰面积 (mAu·s)	MP (Da)	Mw (Da)	比重 (%)
1	17.525	19800384	503	1014	36.42
2	18.716	12165665	272	286	22.38
3	19.357	5618944	218	220	10.34
4	19.690	7483834	200	202	13.77
5	20.756	1310459	-	-	2.41
6	21.144	1301639	-	-	2.39
7	21.685	778910	-	-	1.43
8	22.682	5717280	-	-	10.52
9	24.429	186700	-	-	0.34

注: -表示未检出。

2.5 超滤膜分离

超滤技术是以相对分子质量大小为条件,通过采用不同孔径的超滤膜,依靠滤膜前后不同压力分离不同组分的膜分离技术^[29]。为确定 ACE 抑制肽的作用效果与其分子量相关性,制备较高活性的 ACE 抑制肽,根据酶解产物分子量分布测定结果,采用截留量为 3000 Da 超滤膜将仿刺参卵酶解液分为 2 个组分,即截留液和滤过液组分,并在同一浓度梯度下与经优化工艺后制备的酶解产物进行比较分析。图 13 为同一浓度梯度下工艺优化酶解产物及超滤组分的 ACE 抑制率,由图 13 可知,三个不同组分的 ACE 抑制率与其浓度均呈现正相关,且低聚肽

组分的 ACE 抑制率在各浓度都高于其他两组分。图 14 为各组分 ACE 抑制率的 IC₅₀ 值,低聚肽组分 ACE 抑制率的 IC₅₀ 值(0.30±0.03 mg/mL)最小,拥有较强的 ACE 抑制活性,且显著($P<0.05$)强于截留液组分(IC₅₀=1.17±0.03 mg/mL)及经工艺优化后的酶解产物组分(IC₅₀=0.59±0.03 mg/mL)。目前已知被证明活性的 ACE 抑制肽中大部分为分子量较小的短肽^[30]。李文欣等^[7]发现,海参性腺酶解物超滤后分子量较低的组分 ACE 抑制活性(IC₅₀=1.37 mg/mL)同样显著强于其他组分。因此,具有 ACE 抑制活性的蛋白多肽多数集中于低聚肽组分中,并且超滤技术有助于对低分子量多肽的富集并提高酶解物的 ACE 抑制活性,可用作分离纯化制备较高活性单体肽。

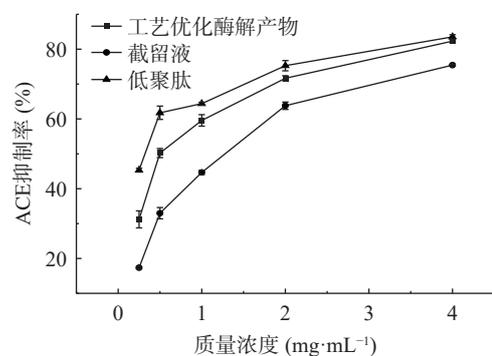
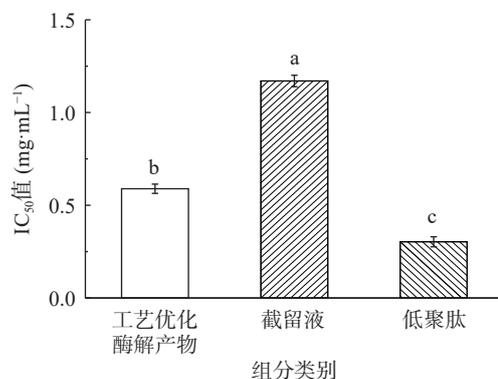


图 13 不同浓度酶解物及超滤组分的 ACE 抑制率

Fig.13 ACE inhibitory activities of enzymatic hydrolysates and ultrafiltration components at different concentrations

图 14 酶解物及超滤组分 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值Fig.14 IC₅₀ values of ACE inhibitory activities of enzymatic hydrolysates and ultrafiltration components

3 结论

碱性蛋白酶水解仿刺参不同部位所得蛋白酶解物中,仿刺参卵具有更好的 ACE 抑制活性(IC₅₀=0.65±0.02 mg/mL)。以 ACE 抑制率为评价指标,通过单因素实验和响应面优化试验,确定最佳的酶解制备工艺为:酶解时间 5 h,加酶量 3.5 U/mg,酶解温度 65.26 °C,底物浓度 3.51%,酶解 pH9.02,在该条件下仿刺参卵的 ACE 抑制率可达 80.65%±0.52%,与预测值接近。酶解产物的分子量分布主要集中在 3000 Da 以下,占比 98.37%,超滤膜分离所得低聚肽

组分拥有较强的 ACE 抑制活性($IC_{50}=0.30\pm 0.03$ mg/mL), 对于经工艺优化后的酶解产物有了显著提升($P<0.05$)。以上研究结果说明了仿刺参卵制备功能活性肽的可行性, 对仿刺参副产物的高质化利用与功能活性肽的开发提供理论依据, 未来可进一步开展仿刺参卵蛋白高活性单肽的分离制备及作用机制研究等方面的工作。

© The Author(s) 2024. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

参考文献

- [1] DAROIT D J, BRANDELLI A. *In vivo* bioactivities of food protein-derived peptides—a current review[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2021, 39(6): 120–129.
- [2] NAKAJIMA K, YOSHIE S Y, OGUSHI M. Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates[J]. *Food Chemistry*, 2009, 114(3): 844–851.
- [3] 谢兆文, 王寿昆, 林旋, 等. 高温胁迫对仿刺参抗氧化酶等指标的影响[J]. *水产科学*, 2016, 35(4): 327–333. [XIE Z W, WANG S K, LIN X, et al. Effects of high temperature stress on antioxidant enzyme activities in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. *Fisheries Science*, 2016, 35(4): 327–333.]
- [4] 刘昕, 刘京熙, 张健, 等. 仿刺参卵多糖的分离纯化及体外抗肿瘤活性[J]. *食品科学*, 2016, 37(23): 105–110. [LIU X, LIU J X, ZHANG J, et al. Purification and antitumor activity *in vitro* of polysaccharides from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) spawn [J]. *Food Science*, 2016, 37(23): 105–110.]
- [5] 钟静诗, 王共明, 张健, 等. 仿刺参雌性生殖腺皂苷的免疫增强活性研究[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(23): 378–386. [ZHONG J S, WANG G M, ZHANG J, et al. Study on Immune-enhancing activity of gonad saponins from female of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(23): 378–386.]
- [6] YUN Z Y, SUN Z, XU H Y, et al. Identifying the geographical origin of protected sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*) in China using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2017, 26(2): 357–362.
- [7] 李文欣, 李海静, 张立娟, 等. 超声辅助酶法制备海参性腺 ACE 抑制肽及其模拟体内消化稳定性的研究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(16): 83–91. [LI W X, LI H J, ZHANG L J, et al. Preparation of ACE-Inhibitory peptides from sea cucumber gonad via ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis and research on their stability in simulated internal digestion [J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(16): 83–91.]
- [8] 蔡彬新, 周逢芳, 林则圣. 复合酶法制备海参内脏 ACE 抑制肽工艺研究[J]. *广东农业科学*, 2016, 43(12): 85–89. [CAI B X, ZHOU F F, LIN Z S. Preparation of ACE inhibitory peptides from sea cucumber viscera by complex enzyme [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2016, 43(12): 85–89.]
- [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 Y, ZHANG Q, et al. Purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitory peptide from the sea cucumber cooking water [J]. *Journal of Polytechnic University*, 2019, 38(1): 15–18.]
- [10] 邵燕秋, 黄卉, 李来好, 等. 鳗鱼骨胶原蛋白 ACE 抑制肽的制备及性质研究[J]. *南方水产科学*, 2022, 18(6): 137–145. [SHAO Y Q, HUANG H, LI L H, et al. Preparation and properties of collagen ACE inhibitory peptides from bone of eel (*Anguilla japonica*) [J]. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(6): 137–145.]
- [11] XIE J L, CHEN X J, WU J J, et al. Antihypertensive effects, molecular docking study, and isothermal titration calorimetry assay of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from *Chlorella vulgaris* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(6): 1359–1368.
- [12] 张可佳. 牡蛎 ACE 抑制肽的制备工艺及活性研究[D]. 大连: 大连海洋大学, 2019. [ZHANG K J. Study on preparation process and activity of ACE inhibitory peptides from oyster [D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2019.]
- [13] 郎蒙. 脱脂南极磷虾粉降血糖肽的酶解制备及活性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021. [LANG M. Enzymatic preparation and activity study of DPP-IV inhibitory peptides derived from defatted antarctic krill powder [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021.]
- [14] MARCINIAK A, SUWAL S, NADERI N, et al. Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2018, 80(18): 187–198.
- [15] GHANBARI R, ZAREI M, EBRAHIMPOUR A, et al. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory and anti-oxidant activities of sea cucumber (*Actinopyga lecanora*) hydrolysates [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(12): 28870–28885.
- [16] 谭力铭, 曹妍, 裴海生, 等. 酸枣仁 ACE 抑制肽酶解工艺优化[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(2): 182–194. [TAN L M, CAO Y, PEI H S, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of ACE inhibitory peptide from jujube kernel [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(2): 182–194.]
- [17] 任佳伟, 宋玉. 银杏叶有效成分抗血小板聚集和清除 DPPH 自由基的量效关系和协同作用[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2015, 17(11): 2367–2372. [REN J W, SONG Y. Dose-response relation and synergy effects of bioactive components in ginkgo biloba on antiplatelet aggregation and DPPH free radical scavenging [J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2015, 17(11): 2367–2372.]
- [18] 栾俊家, 张尚悦, 李昂达, 等. 响应面法优化秋刀鱼酶解制备抗氧化活性肽的工艺[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(5): 172–181. [LUAN J J, ZHANG S Y, LI A D, et al. The optimization of the preparation process of antioxidative active peptide from the enzymatic hydrolysate of pacific saury (*Cololabis saira*) by response surface methodology [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2022, 43(5): 172–181.]
- [19] 田海娟, 王蕾, 刘名鑫, 等. 混菌发酵紫苏粕小肽提取工艺优化及体外抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(20): 219–224. [TIAN H J, WANG L, LIU M X, et al. Optimization of extraction process and antioxidant activity *in vitro* of small peptides from mixed bacteria fermented *Perilla meal* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(20): 219–224.]
- [20] 马凤, 叶灏铎, 夏珍, 等. 英红九号茶蛋白 ACE 抑制肽的制备、氨基酸组成及不同超滤组分的活性评价[J]. *现代食品科技*, 2023, 39(7): 237–245. [MA F, YE H D, XIA Z, et al. Preparation,

amino acid composition and activity evaluation of different ultrafiltration components of ACE inhibitory peptides from tea protein of Yinghong No.9[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2023, 39(7): 237–245.]

[21] 吴国宏. 海参花酶解物抗氧化和增强免疫活性研究[D]. 厦门:集美大学, 2016. [WU G H. Study on antioxidative activity and enhanced immune activity of the enzymatic hydrolysate of sea cucumber gonad[D]. Xiamen: Jimei University, 2016.]

[22] ZHENG Y J, WANG X, ZHUANG Y L, et al. Isolation of novel ACE-inhibitory peptide from naked oat globulin hydrolysates in silico approach: Molecular docking, *in vivo* antihypertension and effects on renin and intracellular endothelin-1[J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85(4): 67–74.

[23] 王睿, 负建民, 何奎, 等. 双孢菇边角料制备 ACE 抑制肽[J]. *中国食品学报*, 2022, 22(1): 125–134. [WANG R, YUN J M, HE K, et al. Preparation of ACE inhibitory peptide from scraps of *Agaricus bisporus*[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2022, 22(1): 125–134.]

[24] ZOHRE D, AMIR M M, MARYAM T, et al. Optimisation of experimental conditions for binding of divalent iron to bioactive casein phosphopeptides[J]. *International Journal of Food Science & Technology*, 2018, 53(3): 784–793.

[25] 涂宗财, 唐平平, 郑婷婷, 等. 响应面优化鱼鳔胶原肽制备工艺及其抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(5): 160–166. [TU Z C, TANG P P, ZHENG T T, et al. Optimization of swimming bladder collagen peptide preparation using response surface methodology and its antioxidant activity research[J]. *Food*

and Fermentation Industries, 2017, 43(5): 160–166.]

[26] 董焯, 张益奇, 姚洪正, 等. 鳙鱼骨酶解产物的抗氧化活性及相对分子质量分布[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(9): 281–287.

[DONG Y, ZHANG Y Q, YAO H Z, et al. Antioxidant activity and relative molecular weight distribution of enzymatic hydrolysates of bighead carp bone[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(9): 281–287.]

[27] 孙洁. 中国毛虾 DPP-IV 抑制肽的制备及作用效果研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2023. [SUN J. Preparation and effect of DPP-IV inhibitory peptides from *Acetes chinensis*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023.]

[28] 王晓丹, 薛璐, 胡志和, 等. ACE 抑制肽构效关系研究进展[J]. *食品科学*, 2017, 38(5): 305–310. [WANG X D, XUE L, HU Z H, et al. Progress in research on structure activity relationship of ACE inhibitory peptides[J]. *Food Science*, 2017, 38(5): 305–310.]

[29] 沈嘉森, 苏永昌, 陈晓婷, 等. 龙须菜蛋白的提取工艺优化及降血压组分制备[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(4): 1232–1239. [SHEN J S, SU Y C, CHEN X T, et al. Optimization of extraction technology of asparagus *Gracilariaopsis lemaneiformis* protein and preparation of blood pressure lowering components[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(4): 1232–1239.]

[30] WANG J, WANG G, ZHANG Y F, et al. Novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptides identified from walnut Glutelin-1 hydrolysates: Molecular interaction, stability, and antihypertensive effects[J]. *Nutrients*, 2021, 14(1): 137–144.