

预处理对酶解过程中胶原 ACE 抑制肽释放的影响

黄丹丹¹, 马良^{1,2}, 蔡路昀³, 刘轶¹, 杨晖¹, 韩霜¹, 张宇昊^{1,2}

(1. 西南大学食品科学学院, 重庆 400715) (2. 西南大学国家食品科学与工程实验教学中心, 重庆 400715)

(3. 渤海大学食品科学与工程学院, 辽宁锦州 121013)

摘要: 本文探究了酸、碱、热、超声、超高压五种预处理方式对胶原蛋白制备 ACE 抑制肽的影响。胶原蛋白经预处理后采用碱性蛋白酶酶解制备水解液, 对水解液的水解度、ACE 抑制率和分子量分布情况进行测定, 结果显示碱和超声处理组水解液的水解度、ACE 抑制率均高于未处理组, 表明这两种预处理方式可能利于胶原三螺旋区位点的暴露; DSC 和红外分析预处理后的胶原蛋白结构显示, 碱处理改变了胶原蛋白构象特点, 影响非共价键的平衡, 胶原三螺旋区域的位点被充分暴露, 但保持了亚基的完整性, 超声处理破坏了胶原螺旋区的共价交联, 暴露出更多疏水性位点, 利于碱性蛋白酶酶解; 而酸、热和超高压处理主要影响胶原非螺旋区, 无法在酶解过程中促进胶原 ACE 抑制活性肽段的释放。

关键词: 胶原蛋白; 预处理; 多肽; 水解度; ACE 抑制率

文章编号: 1673-9078(2016)07-85-90

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.014

Effect of Pretreatments on Release of Collagen-derived

Angiotensin-converting-enzyme Inhibitory Peptide in Enzymatic Hydrolysis

HUANG Dan-dan¹, MA Liang^{1,2}, CAI Lu-yun³, LIU Yi¹, YANG Hui¹, HAN Shuang¹, ZHANG Yu-hao^{1,2}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)(2. National Food Science and Engineering

Experimental Teaching Center, Southwest University, Chongqing 400715, China)(3. College of Food Science and Project

Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, China)

Abstract: The effects of five pretreatments (acid, alkali, heat, ultrasound, and high pressure) on the production of angiotensin-converting-enzyme (ACE) inhibitory peptide from collagen were explored. After pretreatment, collagen was hydrolyzed by Alcalase, and the degree of hydrolysis (DH), ACE inhibitory activity, and the molecular weight distribution of the hydrolysate were measured. Results showed that alkali- and ultrasound-treated groups had higher DH and ACE inhibition rate than the untreated group, which indicated that these two pretreatments can favor exposure of sites in the triple-helical region of collagen. Differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) were used to analyze the structure of collagen, and the results showed that alkali treatment changed the configuration of collagen, affected the balance of non-covalent bonds, and exposed the hydrophobic site completely in the triple-helical region of collagen. However, the integrity of the subunits was maintained. Ultrasound treatment damaged the covalent bonds in the helical region of collagen and exposed more hydrophobic sites, which was helpful for alcalase hydrolysis. In contrast, acid, heat, and high-pressure treatments mostly affected the non-helical region of collagen, and could not promote the release of ACE inhibitory peptide from collagen during enzymatic hydrolysis.

Key words: collagen; pretreatment; polypeptides; degree of hydrolysis; angiotensin-converting-enzyme inhibition rate

随着人们生活方式的改变和饮食结构的变化, 高血压病发病率逐年攀升, 据报告^[1], 我国高血压现患人

收稿日期: 2015-09-08

基金项目: 重庆市研究生科研创新项目 (CYS2015075); 国家自然科学基金项目 (31301425); 中央高校基本科研业务费重大项目 (XDJK2015A015); 中央高校基本科研业务费团队项目 (2362014xk11); 中国博士后科学基金面上项目 (2014M562267); 中国博士后科学基金特别资助项目 (2015T80951); 第四批重庆市高等学校优秀人才支持计划; 辽宁省科技攻关计划项目 (2015103020)

数为 2.7 亿, 与血压正常人相比, 高血压值人群脑中、冠心病及总的心血管病发病危险增加 50%。化学合成的降血压药^[2]虽效果显著, 但长期服用会对人体造成不良影响, 如皮肤过敏、蛋白尿等, 因此人们越来越倾向于高血压的预防和食品保健。源于天然的动植物 ACE 抑制肽具有降血压的功能, 易消化吸收, 而对血压正常者无降压、毒副作用, ACE 抑制肽通过与血管紧张素转换酶活性部位的 Zn^{2+} 竞争性结合, 阻碍血管紧张素 II 生成, 从而达到降血压的目的。

研究表明^[3], 多肽 C 末端含有脯氨酸 (Pro) 或羟脯氨酸 (Hyp) 时有较高的 ACE 抑制活性, 通常具有较强降血压的功能; 胶原蛋白是 Pro 和 Hyp 含量最多的蛋白, 总含量约为 25%, 从降血压肽构效角度分析, 胶原蛋白中可能蕴含着丰富的降血压肽活性肽段。但胶原蛋白具有特殊的三螺旋结构, 螺旋区呈现 (Gly-X-Y)_n 周期性排列, X、Y 一般分别为 Pro、Hyp, 因此胶原蛋白中 ACE 抑制肽段主要集中在三螺旋区域; 胶原的三螺旋结构通过氨基酸残基间氢键、范德华力、共价交联、疏水键等分子间作用力相连接^[4], 该结构异常稳定, 很难被基质金属蛋白酶以外的蛋白酶水解, 不易释放出具有 ACE 抑制活性的多肽。因此, 为高效释放胶原蛋白中的 ACE 抑制肽段, 必须首先松散三螺旋结构, 暴露内部酶切位点。

为破坏三螺旋结构, 提高酶解过程中胶原 ACE 抑制活性肽段的释放效率, 水解前通常需要对胶原蛋白进行预处理。目前胶原 ACE 抑制肽制备通常直接以明胶为原料^[5]或者采用长时间热处理, 但这些前处理过程繁琐、耗时长。因此急需寻找适于产业化的快速、高效胶原蛋白预处理方法, 破坏胶原的三螺旋结构, 进而提高酶解和 ACE 抑制肽段释放效率。本研究以猪皮为原料, 主要探究了酸、碱、热、超声、超高压 5 种预处理方式对酶解胶原蛋白制备 ACE 抑制肽的影响, 旨在探究出一种可高效制备胶原 ACE 抑制肽的预处理方式。

1 材料与仪器

1.1 材料与试剂

新鲜猪皮, 购于重庆永辉超市北碚区天生丽街店; 碱性蛋白酶, 诺维信公司; ACE 作用底物 (ABZ-Gly-Phe(NO₂)-Pro) (Bachem 公司); 邻苯二甲醛 (OPA)、N-乙酰半胱氨酸 (NAC)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、血管紧张素转化酶 (ACE), 细胞色素 C、Gly-Gly-Tyr-Arg、抑肽酶、Bacitracin, 均购于 Sigma 公司; 乙腈、三氟乙酸为色谱纯; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

FYL-C022 料理机, 九阳股份有限公司; FD-1-50 真空冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; DZ600/2S 真空包装机, 上海人民包装股份有限公司; JA3003B 电子天平, 上海精天电子仪器有限公司; PHS-25 型数显酸度计, 杭州雷磁分析仪器厂; HPP.L3 超高压处理设备, 天津市华泰森淼生物工程技术有限公司;

SHZ-B 水浴恒温振荡器、CJ-78-1 磁力搅拌器, 上海将任实验设备有限公司; 5810 型台式高速离心机, 德国 Eppendorf 公司; KQ-100B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; UV-2450 紫外分光光度计, 日本岛津公司; BioTEK 荧光酶标仪, 基因有限公司; QL 901 Vortex 旋涡混合器, 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; LC-20A 高效液相色谱, 日本岛津公司; Spectrun100 红外光谱, 美国 PerkinElmer 公司; Pyris4000 差示量热扫描仪, 美国 PerkinElmer 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 猪皮预处理

新鲜猪皮洗净刮去表层脂肪, 切成约 1 mm×3 mm×5 mm 的小块, 混匀, 采用超声乳化法^[6]脱脂, 1% NaCl 溶液搅拌 6 h (每 2 h 换液一次) 去除杂蛋白, 脱脂除杂后的猪皮颗粒真空包装后于 -18 °C 冻藏备用。

称取 10 g 脱脂除杂后的猪皮, 采用 5 种处理方式进行预处理, 其中, 酸处理组、碱处理组分别用 25 mL 2% HCl、2% NaOH 处理 1 h, 酸、碱处理后调节溶液 pH 至 8.0, 记录所用酸碱的量, 再加入 pH 8.0 0.2 M 磷酸盐缓冲液, 确保溶液总体积为 50 mL; 其他处理组以 25 mL 蒸馏水替代酸碱溶液, 其中热处理组于 100 °C 煮沸处理 10 min, 超声处理组于 25 °C 超声 30 min (40 kHz、120 W), 超高压处理组分别于 300 MPa、500 MPa 处理 15 min, 各处理结束后加入 25 mL pH8.0 0.2 M 磷酸盐缓冲液。以未作处理的样品作为对照组。

1.3.2 酶解液制备

将处理后的样品于 55 °C 预热 10 min 后, 加入 0.1 mL 诺维信碱性蛋白酶 (酶活 4000 U/mL), 在 55 °C 恒温摇床上酶解, 当酶解时间分别达到 1 min、30 min、60 min、120 min、180 min、240 min 后, 立即将样品沸水浴 15 min 进行灭酶处理, 冷却至室温后于 6000 r/min 离心 15 min, 取 10 mL 上清液用于水解度、ACE 抑制率测定, 剩余上清液冷冻干燥备用。

1.3.3 OPA 法测水解度

采用 OPA 法测定酶解液的水解度^[7-8]。将 10 mL 50 mM OPA 溶液、10 mL 50 mM NAC 溶液、5 mL 20% (m/V) SDS 溶液和 75 mL 0.1 M 硼酸盐缓冲液 (pH9.4) 混合配制成 5 mmol/L 工作液 (工作液现配现用, 并铝箔包裹避光保存), 取 20 μL 酶解液于 10 mL 试管, 加入 2.4 mL 5 mmol/L 工作液, 反应 10 min 达到平衡后, 将反应液转移至 3 mL 的石英比色管, 于 340 nm 处测定吸光值。

空白对照组用水代替水解液。

$$DH = \frac{100 \times n}{N}$$

$$n = \frac{(A_{340\text{样品}} - A_{340\text{空白}}) \times M \times d}{\epsilon \times c}$$

式中: n 为水解液中断裂的肽键数; N 为胶原蛋白理论肽键数; A₃₄₀ 为样品在 340 nm 处的吸光值; M 为蛋白质的分子量 (u); d 为稀释系数, 根据使用的样品量进行计算; ε 为 340 nm 处消光系数 (6000 mol cm)^[7]; c 为蛋白质浓度 (g/L)。

凯氏定氮法测得脱脂除杂后猪皮的蛋白含量为 39%; 猪皮中胶原蛋白的分子量为 300 ku, 肽键数为 2997(<http://www.uniprot.org/>)。

1.3.4 酶解液 ACE 抑制率测定

参照 Sentandreu 等的方法, 略有改动^[7,9]。取 50 μL 酶解液于 96 孔黑色微量滴定板反应孔中, 加入 6 mU/mL ACE 溶液 50 μL 后, 将微量酶标板置于荧光酶标仪中, 振荡 10 s, 于 37 °C 下反应 10 min, 之后再向微量滴定板每个反应孔中加入 200 μL 0.45mM ACE 底物反应液 (ABZ-Gly-Phe(NO₂)-Pro), 于 37 °C 开始动力学测定, 在 1h 内每隔 1min 测量一次荧光值, 其中荧光激发波长、吸收波长分别为 360 nm、415 nm。所有样品均需重复 3 次。

$$ACE\text{抑制率}(\%) = \frac{100 - 100 \times (\alpha_{\text{样品}} - \alpha_{\text{阴性对照}})}{\alpha_{\text{阳性对照}} - \alpha_{\text{空白对照}}} \times 100\%$$

式中: α 表示荧光吸收值与测定时间回归曲线的斜率。

其中, 阳性对照组用 pH 8.3 Tris 缓冲液代替酶解液, 阴性对照组、空白对照组用 Tris 缓冲液替代 ACE 溶液。

1.3.5 凝胶渗透色谱测定酶解液的分子量分布

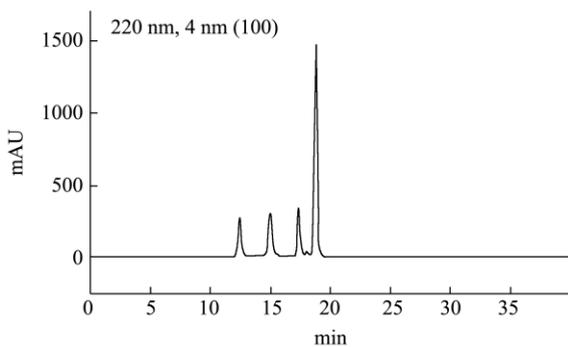


图1 标准样品的 HPLC 图谱

Fig.1 HPLC chromatogram of standards

称取 5 mg 冷冻干燥后的多肽粉末溶于 2 mL 超纯水中, 采用高效液相色谱测定各酶解时间点水解液中多肽分子量分布情况。色谱条件如下: 色谱柱 TSK gel G2000 SW_{XL} 凝胶色谱柱 (7.8 mm×300 mm); 流动相: 30% 乙腈 (含 0.1% (V/V) 三氟乙酸) 等度洗脱, 洗脱液流速 0.5 mL/min; 检测波长 220 nm; 柱温 30 °C;

上样量 10 μL。

选用 4 种分子量标准多肽样品细胞色素 C (Mw=12500 u)、抑肽酶 (Mw=6511.44 u)、Bacitracin (Mw=1422.69 u)、Gly-Gly-Tyr-Arg (Mw=451.48 u) 按照上述色谱条件进行分子量分布分析, 4 种标准品的 HPLC 图谱如图 1。

根据标准品分子量的对数 lgM 和保留时间可得到分子量测定的计算公式:

$$\lg M = -0.2271t + 6.9529 (R^2 = 0.9991)$$

1.3.6 预处理对猪皮胶原蛋白结构的影响

1.3.6.1 预处理后猪皮胶原蛋白热稳定性分析

采用 1.3.1 的方法对猪皮进行预处理, 处理后的猪皮颗粒冷冻干燥备用。将冻干的猪皮颗粒剪碎成粉末, 称取猪皮粉末约 3~5 mg, 用铝坩埚封存后, 放入 DSC 仪, 在氮气气氛下, 以 5 °C/min 的速率从 -5 °C 升温至 180 °C, 记录吸热曲线。

1.3.6.2 预处理后猪皮胶原蛋白红外光谱分析

称取 10 mg 猪皮粉末与 KBr 充分混合后研磨, 于 60 °C 下烘干、压片, 用 Spectrun100 红外光谱仪 (中红外) 测红外吸收, 扫描次数 64 次, 扫描范围 400~4000 cm⁻¹, 分辨率 4 cm⁻¹。

1.3.7 数据处理

采用 origin 8.0 和 SPSS 18.0 进行试验数据处理。酶解时间和处理方式对水解度及 ACE 抑制率的总体影响分析参照 Zhang 等^[7]的方法。

2 结果分析

2.1 各预处理组酶解液水解度及 ACE 抑制率

分析

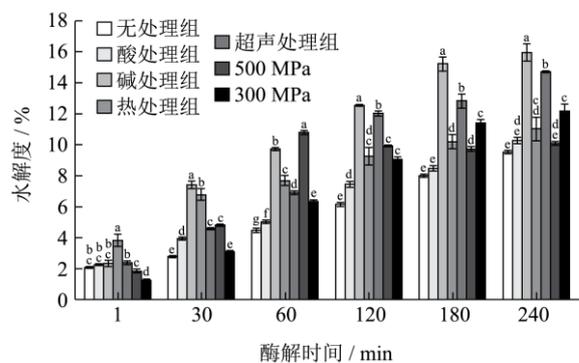


图2 预处理对猪皮胶原蛋白酶解液水解度的影响

Fig.2 Effects of pretreatment on the degree of hydrolysis of pigskin collagen hydrolysate

由图 2 可知, 酶解 1min 时, 热处理以外的其他预处理对胶原蛋白水解均无显著 ($p>0.05$) 促进作用,

随酶解时间延长, 各预处理组水解度明显高于无处理组且二者差值增大, 说明预处理对于胶原蛋白酶切位点的暴露均有一定影响。

酶解 30 min 后, 碱处理组水解度均高于其他预处理组, 且其水解度增加幅度最快, 说明碱处理较其他预处理更有利于暴露胶原的酶切位点, 有利于胶原的快速降解; 由图 3 可知, 碱处理组 ACE 抑制率在酶解 30min 时即达到 60.90%, 显著高于其他预处理组 ($p < 0.05$), 说明碱处理可在短小时内暴露更多位于三螺旋区域的位点, 进而促进 ACE 抑制肽的快速释放。酶解 30min 时, 超声处理组 ACE 抑制率仅次于碱处理组, 且在酶解 60min 后与碱处理组差异不显著 ($p > 0.05$), 说明超声处理同样有利于暴露胶原三螺旋区域位点, 利于 ACE 抑制肽的快速释放。

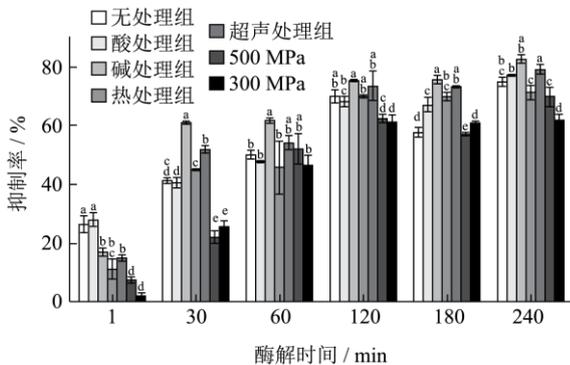


图 3 预处理对猪皮胶原蛋白酶解液 ACE 抑制率的影响

Fig.3 Effects of pretreatment on ACE-inhibitory activity of pigskin collagen hydrolysate

热处理组在酶解初期水解度最高, 随酶解进行, 其水解度在所有预处理组中仍处于较高水平, 然而其 ACE 抑制率却与无处理组无显著差异 ($p > 0.05$) 甚至低于无处理组, 由此推断, 热处理可能更多的暴露了胶原非螺旋区的作用位点。酸处理组水解度较无处理组略高, 其 ACE 抑制率却与无处理组无显著差异 ($p > 0.05$), 同样可能是因为 HCl 处理更利于蛋白酶降解胶原的非螺旋结晶区。300 MPa 和 500 MPa 的超高压处理在酶解 1 min 时水解度、ACE 抑制率均不及无处理组, 这可能是因为超高压破坏了胶原的非共价键平衡, 形成了一些新的聚集体或类三螺旋结构, 改变了胶原蛋白的构象, 造成蛋白酶攻击三螺旋区域的难度增加所致^[6,10], 随酶解时间延长, 超高压处理组水解度逐渐高于无处理组, 而 ACE 抑制率却不及无处理组, 说明超高压处理可能不利于酶解过程中三螺旋区活性肽段的释放。

从整体角度分析, 随酶解时间延长, 各预处理组水解度、ACE 抑制率总体呈上升趋势, 其中在酶解 2 h 至 3 h 时, 酶解液水解度、ACE 抑制率增幅趋缓,

可能是因为预处理所暴露的位点酶解至 2 h 时被完全消耗, 蛋白酶进一步酶解不溶性胶原, 酶解速度降低所致, 而不溶性胶原的降解导致水解液中 ACE 抑制肽百分含量降低进而其抑制率略有降低。从各预处理方式对水解度、ACE 抑制率的影响可看出, 各预处理对于胶原蛋白的水解均有促进作用, 而对 ACE 抑制率的影响因处理方式而异, 超声处理、碱处理有利于 ACE 抑制活性肽段的释放, 其他预处理方式对 ACE 抑制肽的制备无明显促进作用。其中超声组水解度明显低于碱处理, 但超声处理组 ACE 抑制率却与碱处理接近, 显著 ($p < 0.05$) 高于其他几种处理方式 (分析数据未在文中显示), 这可能是因为超声的空化作用可断裂胶原蛋白分子内或分子间的共价或非共价键^[11], 使胶原三螺旋结构松散甚至部分解旋, 内部疏水性基团外露, 而碱性蛋白酶的酶切位点为疏水性氨基酸的羧基端, 同时, 降血压肽的构效特点显示, 疏水性氨基酸有利于增强 ACE 抑制活性, 因此超声组即使水解度与其他处理组无显著差异, 其 ACE 抑制率也显著高于其他预处理组。

结合上述结果可知, 碱处理、超声处理为酶解制备 ACE 抑制肽的较适预处理方式, 其更多地暴露了胶原三螺旋区酶切位点, 热处理、酸处理及超高压处理可能主要暴露的是胶原非螺旋区, 有利于胶原水解但对于 ACE 抑制活性肽段的释放无显著促进作用。

2.2 酶解液的分子量分布

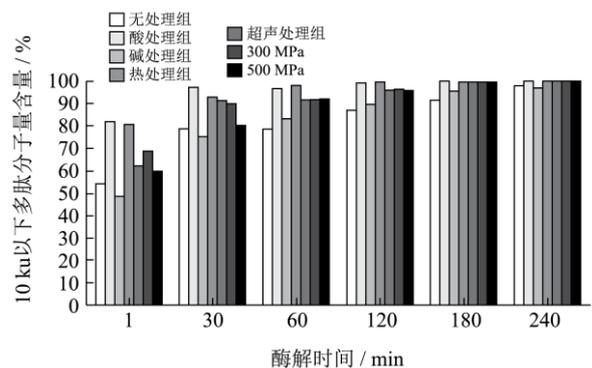


图 4 各预处理组酶解液 10ku 以下多肽分子量分布

Fig.4 Molecular weight (under 10 ku) distribution of the hydrolysates of various pretreatment groups

从图 4 可知, 酶解初期, 碱处理组水解度较大, 但 10 ku 以下组分含量最少, 说明碱处理后, 碱性蛋白酶更多作用于胶原蛋白中间位点, 即碱处理改变了胶原蛋白的构象特点, 暴露出更多三螺旋区域的酶切位点, 使不溶性胶原被降解成多肽溶于溶液中, 随着酶解时间延长, 10 ku 以下组分含量逐渐增多, 说明碱性蛋白酶不断酶解不溶性胶原多肽, 释放了大量的

ACE 抑制活性肽段,同时碱处理组水解度、ACE 抑制率在所有预处理中最高,也进一步证明碱处理能促进胶原三螺旋区域 ACE 抑制肽的释放。超声处理组分子量分布与碱处理组有相似之处,酶解过程中 10 ku 以下组分含量较少,但水解度、ACE 抑制率较高,仅次于碱处理组,说明超声处理对胶原三螺旋区酶切位点的暴露同样具有促进作用。酸处理和热处理组在整个酶解阶段,10 ku 以下组分含量最高,但随酶解时间增加分子量分布变化也不大,ACE 抑制率并不高,这说明酸处理、热处理未能有效暴露三螺旋结构中的作用位点,碱性蛋白酶主要酶解的是溶液中的可溶性小分子蛋白,对于不溶性胶原的降解能力较差,其胶原三螺旋核心区域的 ACE 抑制肽段不能得到有效释放,故 ACE 抑制率较低。对于超高压处理组,降解速率快于无处理组,小分子组分含量高于无处理组,然而其 ACE 抑制率不及无处理组,说明超高压处理虽能改变胶原蛋白结构,但暴露的位点主要位于非螺旋区,对 ACE 抑制肽的释放无促进作用。

2.3 预处理对猪皮胶原蛋白结构的影响

2.3.1 猪皮胶原蛋白热稳定性分析

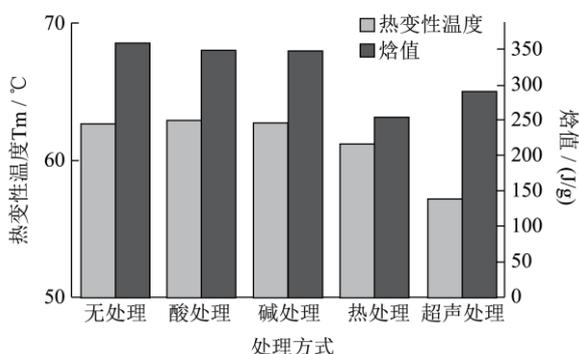


图5 各预处理组胶原的热变性温度及热焓值表

Fig.5 Tm and pH of collagen samples after different pretreatments

经过差示扫描量热法(DSC)分析可知,酸和碱处

表1 各预处理组猪皮胶原红外光谱特征峰吸收波长

Table 1 Absorption wavelength of infrared (IR) characteristic peaks of pigskin collagen samples after different pretreatments

| 特征峰 | 无处理 | 酸处理 | 碱处理 | 热处理 | 超声处理 |
|---------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 3340 cm ⁻¹ 附近酰胺 A 带 | 3336.95 | 3434.27 | 3441.83 | 3408.63 | 3426.24 |
| 2927.91 cm ⁻¹ 酰胺 B 带 | 2925.09 | 2925.08 | 2925.10 | 2924.96 | 2925.00 |
| 1660 cm ⁻¹ 附近酰胺 I 带 | 1658.40 | 1657.05 | 1639.97 | 1658.42 | 1658.89 |
| 1550 cm ⁻¹ 附近酰胺 II 带 | 1549.65 | 1547.57 | 1551.92 | 1548.80 | 1551.19 |
| 1450~1230 cm ⁻¹ 附近酰胺 III 带 | 1455.62~1237.68 | 1453.82~1237.79 | 1401.69~1237.73 | 1455.85~1239.32 | 1454.17~1238.84 |

从图 6 可知,各预处理组均有酰胺 III 带特征吸收峰,不过其吸收强度较无处理组有所降低,其中碱处理最低,说明预处理对于胶原蛋白螺旋区域有一定破

坏,且碱处理破坏强度最大。酰胺 I 带表示 C=O 伸缩振动,反映了多肽或蛋白质的特定二级结构^[15],在所有预处理组中,碱处理组在酰胺 I 带处吸收峰强度最

2.3.2 猪皮胶原蛋白红外光谱分析

采用傅里叶红外光谱 (FTIR) 分析预处理后猪皮胶原蛋白的结构变化,结果如图 6。

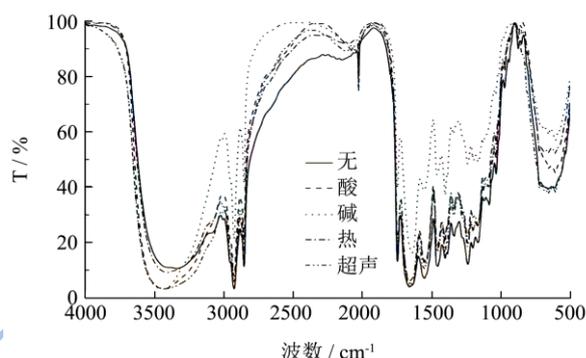


图6 各预处理组猪皮胶原的红外图谱

Fig.6 Infrared spectra of pigskin collagen samples after different pretreatments

酰胺 A 带是 N-H 或 O-H 伸缩振动的吸收峰,通常在 3400~3440 cm⁻¹,酰胺 B 带是 N-H 和 C-H 伸缩振动吸收峰,二者表明肽链间氢键的存在^[12]。对于酰胺 A 带,当含有 N-H 基团的分子肽段参与氢键形成时,N-H 伸缩振动向低频移动(3300 cm⁻¹附近)^[13]。从表 1 可知,与无处理组比较,各预处理组酰胺 A 带吸收波长蓝移,说明预处理破坏了胶原蛋白分子间的氢键;对于酰胺 I 带各预处理组吸收峰强度均低于无处理组且碱处理组最低(图 5),说明预处理破坏了酰胺 I 带,且碱较其他处理方式破坏程度更大。1243cm⁻¹ 和 1244cm⁻¹ 附近为酰胺 III 带的特征吸收区域,其强度与三螺旋结构密切相关^[14]。

坏,且碱处理破坏强度最大。酰胺 I 带表示 C=O 伸缩振动,反映了多肽或蛋白质的特定二级结构^[15],在所有预处理组中,碱处理组在酰胺 I 带处吸收峰强度最

低。由此可见,碱处理对猪皮胶原空间构象改变程度较其他处理方式更大,更有利于暴露螺旋区的酶切位点。

结合 DSC 结果可知,热处理引起胶原变性的程度仅次于超声处理组,但红外结果并不呈相同趋势,其 ACE 抑制率在所有预处理组中也不是最高,说明热处理主要破坏的是胶原的非螺旋区域。碱处理主要改变了胶原蛋白的构象特点,影响的主要是非共价键平衡,使三螺旋区域的位点被充分暴露,但并未破坏胶原亚基的完整性。超声处理对螺旋区的破坏模式与碱有所差异,超声主要破坏了胶原的共价交联,使胶原多肽链伸展或内部疏水性基团外露,暴露出更多疏水性位点,有利于碱性蛋白酶的酶解;酸处理对于胶原结构的破坏程度有限,且破坏的大多是胶原非螺旋区,蛋白酶酶解的主要是溶液中的可溶性小分子蛋白且对不溶性胶原的降解能力较差。

3 结论

本文研究了5种预处理方式对水解胶原蛋白制备 ACE 抑制肽的影响,从分子结构上分析预处理对胶原蛋白结构的影响,结合不同预处理方式的水解度、ACE 抑制率以及多肽分子量分布情况,得出超声处理和碱处理可改变胶原构象特点,可促进 ACE 抑制肽释放速率,有利于目标肽的制备。

参考文献

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.中国心血管病报告 2013 概要[J]. 中国循环杂志,2014,07:487-491
CHEN Wei-wei, GAO Rui-lin, LIU Li-sheng, et al. Report on cardiovascular disease in China (2013) abstract [J]. Chinese Circulation Journal, 2014, 07:487-491
- [2] 何荣.菜籽蛋白源肾素和 ACE 双重抑制肽的制备及其抑制机制研究[D].江苏:江南大学,2013
HE Rong. Study on the preparation and inhibition mechanism of dual rennin and ACE inhibitory peptide derived from rapeseed protein [D]. Jiangsu: Jiangnan University, 2013
- [3] Wu S, Feng X, Lan X, et al. Purification and identification of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptide from lizard fish (*Saurida elongata*) hydrolysate [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 13: 295-299
- [4] 汤克勇.胶原物理与化学[M].北京:科学出版社,2012
TANG Ke-yong. Collagen Physics and Chemistry [M]. Beijing: Science Press, 2012
- [5] Wu Q, Jia J, Yan H, et al. A novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from gastrointestinal protease hydrolysate of silkworm pupa (*Bombyx mori*) protein: Biochemical characterization and molecular docking study [J]. Peptides, 2015, 68: 17-24
- [6] 陈丽清,陈清,韩佳冬,等.猪皮超声波乳化脱脂工艺的研究[J].食品工业科技,2012, 33(16): 265-267
CHEN Li-qing, CHEN Qing, HAN Jia-dong, et al. Research on ultrasound degreasing of pigskin with emulsifying agents [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33 (16): 265-267
- [7] Zhang Yuhao, Olsen Karsten, Grossi Alberto, et al. Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides [J]. Food Chemistry, 2013, 141: 2343-2354
- [8] Spellman D, McEvoy E, O, Cuinn G, et al. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis [J]. International Dairy Journal, 2003, 13(6), 447-453
- [9] Sentandreu M A, Toldra F. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity [J]. Nature Protocols, 2006, 1(5): 2423-2427
- [10] Dufour E, Dalgalarondo M, Hervé G, et al. Proteolysis of type III collagen by collagenase and cathepsin B under high hydrostatic pressure [J]. Meat Science, 1996, 42(3): 261-269
- [11] 高芸芳.超声波处理对酪蛋白酶解特性的影响[D].河南:河南工业大学,2013
GAO Yun-fang. Effect of ultrasound treatment on enzymatic hydrolysis characteristics of casein [D]. Henan: Henan University of Technology, 2013
- [12] Li D, Mu C, Cai S, et al. Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2009, 16 (5): 605-609
- [13] Tu Z, Huang T, Wang H, et al. Physico-chemical properties of gelatin from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) scales by ultrasound-assisted extraction [J]. Journal of Food Science and Technology, 2015, 52(4): 2166-2174
- [14] Muyonga J H, Cole C G B, Duodu K G. Characterisation of acid soluble collagen from skins of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*) [J]. Food Chemistry, 2004, 85(1): 81-89
- [15] Woo J W, Yu S J, Cho S M, et al. Extraction optimization and properties of collagen from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) dorsal skin [J]. Food Hydrocolloids, 2008, 22(5): 879-887

现代食品科技