

不同蛋白酶水解牛肉蛋白产物的 ACE 抑制活力比较

李希宇^{1,2}, 林伟玲³, 杨怀谷², 叶宇游⁴, 刘忠义^{1*}

(1.湘潭大学化工学院, 湖南湘潭 411105) (2.广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东省农产品加工重点实验室, 广东广州 510610) (3.中山市黄圃镇农业服务中心, 广东中山 528400)

(4.博罗县农业农村综合服务中心, 广东惠州 516100)

摘要:以 ACE 抑制活力和水解度为指标, 考察 6 种常用蛋白酶(复合蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶)对牛肉蛋白酶解产物的影响, 比较不同蛋白酶酶解产物经模拟消化前后 ACE 抑制活力的变化, 并分析了不同蛋白酶酶解产物的分子量分布和感官评价。结果表明:碱性蛋白酶最适于酶解牛肉生产降压肽, 其酶解液 ACE 抑制率为 51.19%, 消化后活性降低幅度小, 消化后酶解液 ACE 抑制率为 39.65%, 同时水解度为 44.76%, 大分子蛋白分解程度高。其次是复合蛋白酶和中性蛋白酶, 两者的酶解液在消化前后都具有高 ACE 抑制活力, 消化前抑制率分别为 67.97%和 62.00%, 消化后抑制率分别为 37.26%和 43.12%, 水解度分别为 37.47%和 36.35%, 但大分子蛋白的分解程度较低。感官评价结果表明, 不同酶解液的外观、气味和滋味与市售商品差异不大, 无明显不良风味产生, 可用于食品辅料的生产。

关键词:牛肉蛋白; 酶解; ACE 抑制肽; 模拟胃肠消化; 感官评价

文章编号: 1673-9078(2021)10-197-204

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0212

Comparative Study on ACE Inhibitor Activity of Beef Protein Hydrolyzed by Different Proteases

LI Xi-yu^{1,2}, LIN Wei-ling³, YANG Huai-gu², YE Yu-you⁴, LIU Zhong-yi^{1*}

(1.College of Chemical Engineering, Xiangtan University, Xiangtan 411105, China) (2.Sericulture & Agri-Food Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Key Laboratory of Agricultural Products Processing, Guangzhou 510610, China) (3.Huangpu Agricultural Service Center, Zhongshan 528400, China)

(4.Boluo County Agriculture and Rural Integrated Service Center, Huizhou 516100, China)

Abstract: Beef protein was hydrolyzed by using six proteases (protamex, flavorenzyme, papain, bromelain, neutrase and alcalase) to produce beef protein hydrolysates. The change of ACE inhibitory activity of different proteases hydrolysates before and after simulated digestion was compared. The molecular mass distribution and sensory evaluation of different hydrolysates were analyzed. The results showed that alcalase was the most suitable for beef enzymolysis to produce anti-hypertension peptide. The ACE inhibitory activity of alcalase enzymolysis solution was 51.19%, and the activity decreased slightly after digestion, which was 39.65%. Meanwhile the hydrolysis degree of alcalase enzymolysis solution was 44.76%, and the beef protein was fully decomposed. The second was protamex and neutrase, their hydrolysates showed high ACE inhibitory activity before and after digestion. The inhibition rates before digestion are 67.97% and 62.00% respectively, the inhibition rates after digestion are 37.26% and 43.12% respectively, and the degree of hydrolysis is 37.47% and 36.35% respectively. However, the decomposition degree of protein was lower than that of alcalase hydrolysate. The results of sensory evaluation showed that the appearance, smell and taste of different enzymatic hydrolysates were not different from those of commercial products, and there

引文格式:

李希宇,林伟玲,杨怀谷,等.不同蛋白酶水解牛肉蛋白产物的 ACE 抑制活力比较[J].现代食品科技,2021,37(10):197-204,+161

LI Xi-yu, LIN Wei-ling, YANG Huai-gu, et al. Comparative study on ACE inhibitor activity of beef protein hydrolyzed by different proteases [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 197-204, +161

收稿日期: 2021-03-01

基金项目: 广东省现代农业产业技术推广体系创新团队(南方现代草牧业(牛)创新团队)项目(2019KJ114)

作者简介: 李希宇(1995-),女,硕士研究生,研究方向:农产品贮藏与加工, E-mail: Lixy_3351@163.com

通讯作者: 刘忠义(1964-),男,博士,教授,研究方向:食品加工技术, E-mail: lzyly08@126.com

was no obvious bad flavor, which could be used in the production of food auxiliary materials.

Key words: beef protein; enzymolysis; ACE inhibitory peptide; simulated gastrointestinal digestion; sensory evaluation

高血压是目前全世界最常见慢性疾病之一,其主要病例表征为体循环动脉血压增高(收缩压 ≥ 140 mm Hg,舒张压 ≥ 90 mm Hg),同时也是多种心脑血管疾病的主要诱因^[1]。目前,高血压的发病机制尚未明确,但高血压的发生、发展与动脉血压调节因素息息相关^[2]。血管紧张素转换酶(angiotension converting enzyme, ACE)是一种具有膜结合、含锌离子的二肽羧基肽酶,其升血压机制是:ACE催化血管紧张素I转化成血管紧张素II,引起血管收缩,同时使具有血管扩张作用的缓激肽失活,最终导致血压上升^[3,4]。因此ACE抑制剂可以通过抑制ACE的活性,减少血管紧张素II的生成,起到降低血压的作用。常见的化学合成降压药卡托普利、依那普利和赖诺普利等,它们降压效果显著但同时具有过敏、皮炎、头晕恶心、味觉迟钝等副作用。在众多的ACE抑制剂中,通过酶解制备的天然源ACE抑制肽具有安全性高、毒副作用低、可长期摄入等优势,必将成为未来降压产品开发的研究热点。目前,国内外研究学者已从海参^[5]、罗非鱼^[6]、玉米^[7]、牛奶^[8]、向日葵^[9]、海藻^[10]等中获得具有良好降压效果的ACE抑制肽。

因牛肉营养丰富、肉质鲜美,其氨基酸组成比猪肉更接近人体需求,钙、磷、铁、锌等常量、微量元素含量丰富,还具有低脂肪、低胆固醇等优点^[11,12]。本研究选择以牛肉为酶解底物,开发食源性ACE抑制肽。并且对于部分人群,不便于直接食用牛排等难消化的牛肉制品,可以根据特定人群的营养需求开发多肽产品、氨基酸补充剂等新型牛肉制品^[13]。牛肉蛋白经酶解加工,大分子量、结构复杂、不利于消化的蛋白质被降解,提高了肉的营养价值、食用口感、消化利用率,进一步酶解后能够获得高经济或具备保健功能的产品^[14]。Jang等^[15]从牛肉水解物中提取的多肽序列VLAQYK,在口服给药自发性高血压大鼠检测实验中对收缩压有显著降低作用。随着人们对保健食品的兴趣日益增加,将牛肉开发成兼具营养和保健功能的食品辅料,对牛肉高效利用和深度开发,具有重要意义和市场前景。

鉴于以牛肉为原料制备ACE抑制肽研究较少,本研究以牛肉蛋白为原料,通过复合蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶酶解牛肉,比较不同酶解产物在模拟胃肠道消化前后的ACE抑制活力变化和分子量分布,分析酶

解液感官评价,为牛肉蛋白酶解工艺应用于功能性食品的开发、利用提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 原料与试剂

市售牛肉:广州市天河区西亚兴安超市;复合蛋白酶(Protamex)、风味蛋白酶(Flavorenzyme):诺维信生物技术有限公司;木瓜蛋白酶(Papain):生工生物工程有限公司;菠萝蛋白酶(Bromelain)、中性蛋白酶(Neutrase)、碱性蛋白酶(Alcalase):源叶生物科技有限公司;牛皮胶原蛋白肽:广州市华恭生物科技有限公司;血管紧张素转换酶(ACE)、N-[3-丙烯酰]-L-苯丙氨酰-甘氨酸-甘氨酸(FAPGG)、胃蛋白酶、胰蛋白酶:美国Sigma公司;十水四硼酸钠(硼砂)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、邻苯二甲醛(OPA)、二硫苏糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT)等分析纯:国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

UV-1800紫外分光光度计,岛津仪器有限公司;SHA-B恒温振荡器,上海力辰邦西仪器科技有限公司;Kjeltec 8400全自动凯氏定氮仪,福斯(FOSS)分析仪器公司;SynergyH1多功能酶标仪,美国Biotek公司;T25高速均质机,德国IKA公司;EPS-300数显式稳压稳流电泳仪,上海Tanon科技有限公司;TGL-16M台式高速冷冻离心机,湘仪离心机仪器有限公司;PB-10台式PH计:德国Sartorius公司。

1.3 试验方法

1.3.1 蛋白酶活力的测定

参考文献^[16,17]的方法稍作修改。以275 nm波长的吸光度A为纵坐标,酪氨酸的浓度C为横坐标,绘制0~200 $\mu\text{g/mL}$ 酪氨酸溶液的标准曲线。精确称取标准酪蛋白2 g,加入100 mL 0.1 mol/L PBS(pH根据实验条件调整)缓冲溶液,适当加热,搅拌至酪蛋白全部溶解。分别称取蛋白酶样品0.1 g,溶解于10 mL相应pH值缓冲溶液,以缓冲液1:100比例稀释,得1:10000稀释比例酶液。不同蛋白酶在不同pH、温度条件下测定酶活力,正交试验设计如表1。

表1 双因素交叉设计

项目	水平	因素	
		pH	温度/°C
Protamex	1	6.0	40
	2	7.0	50
	3	8.0	60
Flavorenzyme	1	6.0	40
	2	7.0	50
	3	8.0	60
Papain	1	6.0	50
	2	7.0	60
	3	8.0	70
Bromelain	1	6.0	40
	2	7.0	50
	3	8.0	60
Neutrase	1	6.0	40
	2	7.0	50
	3	8.0	60
Alcalase	1	9.0	40
	2	10.0	50
	3	11.0	60

酶液样品：1.00 mL 酶液与 1.00 mL 酪蛋白溶液混匀，精确计时 10 min 后，加入 2.00 mL 三氯乙酸溶液，混匀静置，8000 g 离心 10 min 后取上清液。空白样品：1.00 mL 酶液与 2.00 mL 三氯乙酸溶液混匀，精确计时 10 min 后，加入 1.00 mL 酪蛋白溶液，混匀静置，8000 g 离心 10 min 后取上清液。每个样品做 3 个平行，于波长 275 nm，分别测定其吸光度。从标准曲线上读出样品最终稀释液的酶活力 A ，单位为 U/mL。样品的酶活力按下式计算：

$$\text{酶活}/(\text{U}/\text{mg}) = \frac{A}{10} \times 4 \times \frac{N}{1000}$$

式中：

A ——由标准曲线所得的样品最终稀释液的酶活力，U/mL；

N ——稀释倍数，取 10000；

4——反应试剂的总体积，mL；

10——反应时间 10 min，以 min 计。

根据酶活选择不同蛋白酶的最佳酶解条件，对牛肉蛋白进行酶解。

1.3.2 酶解工艺

取 10 g 牛肉糜，加入 40 mL 去离子水，于高速均质机中经 10000 r/min 处理 2 min。置于 100 mL 的锥形瓶中，用 3 mol/L HCl 或 NaOH 溶液调整 pH 值。不

同酶在其最佳酶解条件下进行酶解。按照 4000 U/g 牛肉加入蛋白酶，空白对照加酶量为 0，置于恒温振荡水浴锅酶解，转速 120 r/min，水解时间 4 h。酶解 1 h 时，测定酶解液 pH 值，并将其调整到指定值。100 °C 煮沸 4 min 终止酶解反应。酶解液冷却后经离心机 8000 r/min 离心 15 min，取上清液 4 °C 保存以备分析。

1.3.3 水解度 (DH) 的测定

OPA 法：参考文献^[18]的方法稍作修改。用去离子水将酶解液样品稀释 100 倍，取 400 μL 加入含有 3.0 mL OPA 试剂的石英比色皿中，充分混匀，避光反应 2 min，测定 340 nm 波长处的吸光度。计算公式如下：

$$DH = \frac{h_{\text{样品}} - h_{\text{空白}}}{h_{\text{tot}}} \times 100\%$$

式中：

h ——每克牛肉蛋白被断裂的肽键数，mmol/g；

h_{tot} ——每克牛肉蛋白质所含的总肽键数，mmol/g。

1.3.4 模拟胃肠道消化

参考文献^[19-21]的方法稍作修改。将 0.500 g 胃蛋白酶溶解于 25.0 mL 0.01 mol/L HCl 溶液，得到胃蛋白酶原液；将 0.100 g 胰蛋白酶溶解于去离子水，得到胰蛋白酶原液。胃消化：取酶解液样品 20.0 mL，用 3 mol/L HCl 溶液将 pH 值调至 3.0，加入 0.60 mL 胃蛋白酶原液，置于 37 °C 恒温振荡水浴锅，转速 120 r/min，消化时间 1 h，用 3 mol/L NaOH 溶液将 pH 值调至 7.0 终止消化；肠消化：样品中加入 0.25 mL 胰蛋白酶原液，置于 37 °C 恒温振荡水浴锅，转速 120 r/min，消化时间 1 h，煮沸 2 min 终止消化。消化液冷却后经离心机 8000 r/min 离心 15 min，4 °C 保存，以备分析。

1.3.5 ACE 抑制活性的测定

参考文献^[22,23]的方法稍作修改。分析前，用缓冲液 (50 mM Tris-HCl，含 300 mM NaCl，pH 值 7.5) 将酶解液消化前后的样品分别稀释至 1 mg N/mL。在 96 孔板中，每孔加入 10 μL ACE 溶液 (0.25 units/mL，去离子水) 和 30 μL 样品，在 37 °C 孵育 5 min 后，加入 150 μL 的 FAPGG (0.88 mM，Tris-HCl 缓冲液) 溶液。空白对照为 30 μL 的 Tris-HCl 缓冲液。

在 340 nm 波长处，监测 ACE 降解 FAPGG 引起的吸光度衰减和水解物的抑制性能 40 min。ACE 活性表示为吸光度在 340 nm 处下降的斜率，从第 10 min 到第 35 min 的线性间隔。在此时间区间内，吸光度信号稳定，无信号漂移迹象。水解物的 ACE 抑制率 (%) 计算为：

$$\text{ACE抑制率} = \left(1 - \frac{\Delta A_{\text{样品}}}{\Delta A_{\text{空白}}} \right) \times 100\%$$

式中：

$\Delta A_{\text{样品}}$ ——水解液样品的斜率;

$\Delta A_{\text{空白}}$ ——对照样品的斜率。

1.3.6 分子量分布

1.3.6.1 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳

牛肉蛋白样品: 取 10 g 牛肉糜, 加入 60 mL 6 mol/L 的尿素溶液充分溶解蛋白, 于高速均质机中经 10000 r/min 处理 2 min, 离心机 8000 r/min 离心 15 min, 取上清液。

用去离子水将酶解液样品和牛肉蛋白样品的蛋白含量稀释至 10 mg/mL。分离胶质量分数 15%, 浓缩胶质量分数 5%, 电泳后用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.3.6.2 Tricine-SDS-PAGE 超低分子量蛋白凝胶电泳

Tricine-SDS-PAGE 参照黄薇等人^[24]方法进行。用去离子水将酶解液样品蛋白含量稀释至 10 mg/mL。分离胶为 20.0%, 夹层胶为 10.0%, 分离胶为 4.0%。电泳结束后用考马斯亮蓝 G-250 染色。

1.3.7 感官评价

感官评价分析在温度为 23±2 °C 的感官评价室进行, 由 8 名专业感官评价员 (4 男 4 女) 组成感官评定小组。感官评价样品由 6 种酶解液样品和 1 种牛胶原蛋白肽 (商品) 溶液组成, 7 种样品随机排序并编号, 对其风味、外观特性进行感官评价, 对外观、

气味、牛肉特征味、鲜味及无苦味 5 个指标进行感官评价, 满分为 50 分。每个样品在口中保持 10~15 s 后吐出, 并在品尝下一个样品前用清水漱口 2 次。最后取 8 人的平均分作为最终结果。评价标准如表 2 所示。

表 2 感官评价标准

项目指标	评分标准	评分/分
外观	色泽金黄, 澄清透明, 无浮沫	8~10
	色泽浅黄/偏褐, 略有浑浊, 较少浮沫	5~7
	色泽呈褐色, 有可见浑浊, 较多浮沫	0~4
气味	牛肉香味浓郁, 无不良气味	8~10
	牛肉香味较淡, 有较淡蛋白酶气味	5~7
	无牛肉香味, 蛋白酶气味明显	0~4
牛肉特征味	牛肉味道明显, 味感丰富	8~10
	较淡牛肉味道, 味感一般	5~7
	无牛肉特征味	0~4
鲜味	鲜味浓郁, 明显咸味	8~10
	鲜味较淡, 略有咸味	5~7
	无鲜味, 无咸味, 有肉腥味	0~4
无苦味	无苦味	8~10
	稍有苦味, 可以接受	5~7
	苦味明显, 难以忍受	0~4

表 3 双因素方差分析结果

Table 3 Results of two-way ANOVA

酶活力/(U/mg)		pH 6	pH 7	pH 8
Protamex	40 °C	54.20±1.31 ^e	121.37±1.31 ^b	130.26±2.89 ^a
	50 °C	70.72±3.15 ^d	110.59±1.57 ^c	108.49±0.52 ^c
	60 °C	37.15±1.57 ^f	37.15±0.00 ^f	22.99±0.52 ^g
Flavorenzyme	40 °C	18.27±0.00 ^c	22.20±1.31 ^b	22.20±1.84 ^b
	50 °C	19.58±3.41 ^{bc}	28.76±1.05 ^a	27.97±0.79 ^a
	60 °C	20.37±0.52 ^{bc}	15.39±0.26 ^d	8.57±1.31 ^e
Papain	50 °C	747.05±5.25 ^c	832.29±1.31 ^a	773.28±13.11 ^b
	60 °C	621.16±2.62 ^f	571.33±5.25 ^g	647.39±2.62 ^e
	70 °C	678.86±5.25 ^d	564.77±1.31 ^g	647.39±13.11 ^e
Bromelain	40 °C	64.96±0.00 ^a	65.74±1.31 ^a	56.83±2.36 ^b
	50 °C	47.91±0.26 ^c	50.01±1.31 ^c	54.20±3.41 ^b
	60 °C	56.83±4.46 ^b	61.81±2.10 ^a	41.61±0.79 ^d
Neutrase	40 °C	25.09±0.00 ^g	61.02±0.79 ^c	67.32±1.31 ^b
	50 °C	34.27±1.86 ^f	73.61±0.26 ^a	74.66±1.31 ^a
	60 °C	33.48±0.52 ^e	43.71±1.31 ^d	7.25±3.15 ^h
		pH 9	pH 10	pH 11
Alcalase	40 °C	112.17±0.52 ^g	102.46±3.41 ^h	120.04±1.57 ^f
	50 °C	254.85±3.15 ^e	251.70±3.15 ^e	302.84±2.36 ^d
	60 °C	491.42±2.62 ^b	500.34±0.52 ^a	485.39±0.26 ^c

注: a、b、c、d、e、f、g 和 h 表示同一种蛋白酶在不同 pH 和温度下酶活力差异显著性 ($p < 0.05$)。

1.3.8 数据分析

采用 SPSS Statistics 软件进行统计分析和 Origin 2019 软件进行制图, 并进行多组均数相关性分析、方差齐性检验和单因素方差分析和 Duncan 多重比较; $p < 0.05$ 为具有显著性差异。数据结果以 (平均值 \pm 标准差) 标示。

2 结果与分析

2.1 蛋白酶的酶活力

六种蛋白酶在不同 pH 值和温度下酶活力如表 3。

由表 3 可见, 同一种蛋白酶在不同 pH 和温度条件下的酶活力差异显著。综合考量实际因素, 各酶选择相应的最佳酶解条件: Protamex 酶解条件为温度 40 °C, pH 8.0, 酶活力为 130.26 U/mg; Flavorenzyme 酶解条件为温度 50 °C, pH 7.0, 酶活力为 28.76 U/mg; Papain 酶解条件为温度 50 °C, pH 7.0 酶活力为 832.29 U/mg; Bromelain 酶解条件为温度 40 °C, pH 7.0, 酶活力为 65.74 U/mg; Neutrase 酶解条件为温度 50 °C, pH 7.0, 酶活力为 73.61 U/mg; Alcalase 酶解条件为温度 60 °C, pH 9.0, 酶活力为 491.42 U/mg。

2.2 不同蛋白酶酶解液在消化前后 ACE 抑制

效果

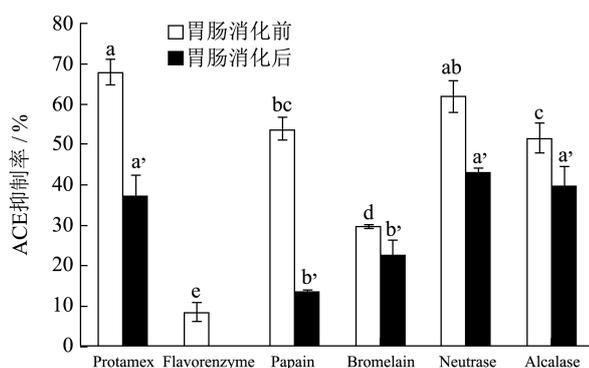


图 1 六种蛋白酶酶解液在消化前后 ACE 抑制率对比

Fig.1 ACE inhibition rates comparison of six protease hydrolysates before and after digestion

注: a、b、c、d 和 e 表示胃肠消化前 ACE 抑制率差异显著性 ($p < 0.05$); a' 和 b' 表示胃肠消化后 ACE 抑制率差异显著性 ($p < 0.05$)。

在料液比 1:4 (g/mL)、酶底物比 4000 U/g、酶解时间 4 h, 各酶在 2.1 筛选出的 pH 和温度下酶解, 并对酶解产物进行 1.3.4 模拟胃肠道消化处理, 比较 Protamex、Flavorenzyme、Papain、Bromelain、Neutrase 和 Alcalase 的牛肉蛋白酶解液 (总氮浓度调整为 1

mg/mL) 在消化前后的 ACE 抑制活性, 如图 1 所示。

在实验所选的六种蛋白酶中, 消化处理前, Protamex、Papain、Neutrase 和 Alcalase 的酶解产物有较高的 ACE 抑制率, 分别为 67.97%、53.75%、62.00% 和 51.19%, Bromelain 酶解产物 ACE 抑制活性较低 (29.24%), Flavorenzyme 酶解产物 ACE 抑制活性最低 (8.30%), 不同蛋白酶解产物 ACE 抑制率差异显著。Lee 等^[25]采用碱性蛋白酶水解牛肉肌原纤维蛋白, 获得 ACE 抑制肽 Leu-Ile-Val-Gly-Ile-Ile-Arg-Cys-Val 序列, 体内试验表明该抑制肽对大鼠自发性高血压具有明显的降压效果。Zhang 等^[26]采用碱性蛋白酶和铜绿假单胞菌蛋白酶酶解小麦面筋, 获得两个具有降压功能的肽段序列: SAGGYIW 和 APATPSFW, 并发现它们在 C 端都含有 Trp。Wu 等^[27]采用中性蛋白酶水解鳕鱼肌肉蛋白, 并通过纯化获得序列为 RVCLP 的 ACE 抑制肽 ($IC_{50} = 175 \mu\text{mol/L}$)。该多肽 C 末端的疏水性氨基酸 Pro 是使其具有较高 ACE 抑制活性的重要原因。研究发现, 对 ACE 抑制肽活性的影响程度为疏水性>空间构型>电子性质, ACE 抑制肽 C 端为疏水性结构, 其 C 端最后 3 个氨基酸中含有 Trp、Tyr、Phe 和 Pro 时, ACE 抑制率大大提高^[28,29]。Papain 能特异性对含有 Leu 和 Gly 等碱性氨基酸的肽键进行酶切, 而这些氨基酸具有疏水性侧链, 能有效提高 ACE 抑制肽的活性^[28]。因此, 不同蛋白酶的特异性酶切位点对 ACE 抑制肽的活性有很大影响, Neutrase、Alcalase、Protamex (主要成分为中性蛋白酶 CAS 9080-56-2 和枯草菌素蛋白酶 CAS 9014-01-1) 和 Papain 的酶解产物都具有高 ACE 抑制活性, 但还要考察其 ACE 抑制肽的抗胃肠酶消化的能力。

模拟消化处理后, 酶解液样品的 ACE 抑制活性都有一定程度的下降。Protamex 酶解液的 ACE 抑制活性为 37.26% (降低 45.19%), Flavorenzyme 酶解液的 ACE 抑制活性降低至未达检测限, Papain 酶解液的 ACE 抑制活性为 13.77% (降低 74.81%), Bromelain 酶解液的 ACE 抑制活性为 22.76% (降低 22.76%), Neutrase 酶解液的 ACE 抑制活性为 30.46% (降低 30.46%), Alcalase 酶解液的 ACE 抑制活性为 22.56% (降低 22.56%)。宋雪梅等^[30]牦牛乳硬干酪经消化酶降解后, 其 ACE 抑制率降低了 13.06%。刘鑫焯等^[31]将两种皮氏蛾螺 ACE 抑制肽经胃液和肠液的处理后, ACE 抑制率都有所下降, 且处理时间越长, ACE 抑制率下降程度越高。本研究中制备的牛肉蛋白酶解液经过模拟胃肠液消化后, ACE 抑制活性都有不同程度降低, 与前人研究结果一致, 可能是消化过程中肽键断裂, 活性结构被破坏, 导致功能活性降低。消化

后仍具有较高 ACE 抑制活性的是 Protamex、Neutrase 和 Alcalase 的酶解液。

2.3 不同蛋白酶酶解液的水解度

在料液比 1:4 (g/mL)、酶底物比 4000 U/g、酶解时间 4 h, 各酶在 2.1 筛选出的 pH 和温度下酶解, 比较 Protamex、Flavorenzyme、Papain、Bromelain、Neutrase 和 Alcalase 的牛肉蛋白酶解液水解度 (DH), 如图 2 所示。

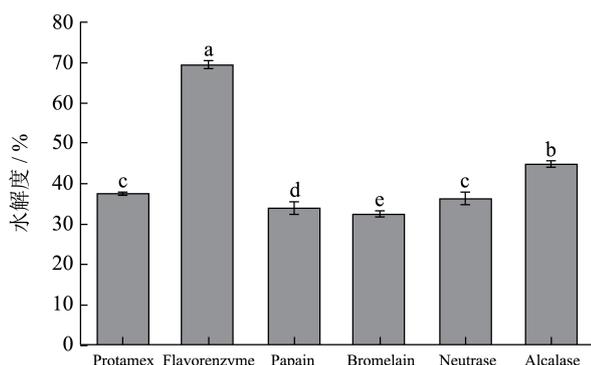


图 2 六种蛋白酶对牛肉蛋白水解度的影响

Fig.2 Effect of six types of protease on hydrolysis degree

注: a, b, c, d 和 e 表示不同蛋白酶的酶解液水解度差异显著性 ($p < 0.05$)。

由图 2 可知, 在相同的酶底物比条件下, Protamex、Papain、Bromelain 酶解液的水解度在 32%~38%之间, Alcalase 酶解液水解度稍高为 44.76%, Flavorenzyme 酶解液最高, 达到了 69.48%, 然而其酶解液的 ACE 抑制活性最低。Flavorenzyme 作为氨基肽酶, 具有外切酶作用, 主要用来解离苦味肽基端的疏水性氨基酸, 产生大量呈味游离氨基酸, 常用来增咸、脱苦。常诗洁等^[32]对比中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶和风味蛋白酶对双孢蘑菇的酶解效果, 发现 Flavorenzyme 水解液游离氨基酸总量及其中呈味氨基酸含量显著高于其他处理组。本研究中, Flavorenzyme 酶解液具有最高的水解度测定值, 说明其游离氨基酸含量最高。而 Flavorenzyme 的酶切特性导致多肽 C 端疏水性氨基酸减少, ACE 抑制活性降低。因此 Flavorenzyme 并不适用于酶解牛肉蛋白生产 ACE 抑制肽。

2.4 不同蛋白酶酶解液的分子量分布

在料液比 1:4 (g/mL)、酶底物比 4000 U/g、酶解时间 4 h, 各酶在 2.1 筛选出的 pH 和温度下酶解, 比较 Protamex、Flavorenzyme、Papain、Bromelain、Neutrase 和 Alcalase 酶解液的 SDS-PAGE 分析, 如图 3 所示。

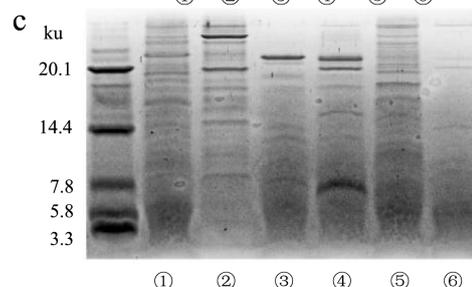
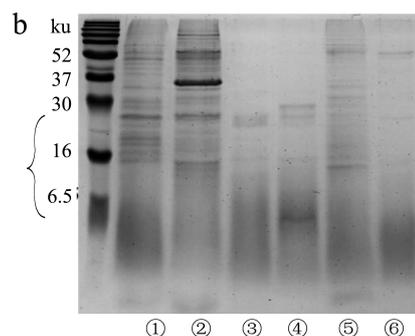
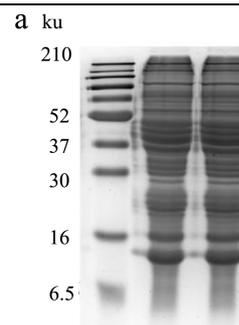


图 3 6 种蛋白酶酶解后 SDS-PAGE 图像

Fig.3 SDS-PAGE analysis of hydrolysates obtained after the hydrolysis step with six different proteinases

注: a: 牛肉蛋白样品 SDS-PAGE 凝胶电泳; b: 六种酶解液 SDS-PAGE 凝胶电泳; c: 六种酶解液 Tricine-SDS-PAGE 超低分子量蛋白凝胶电泳; 第①泳道: Protamex 酶解液; 第②泳道: Flavorenzyme 酶解液; 第③泳道: Papain 酶解液; 第④泳道: Bromelain 酶解液; 第⑤泳道: Neutrase 酶解液; 第⑥泳道: Alcalase 酶解液。

由图 3 可知, 未经酶解的牛肉蛋白中各分子量蛋白含量丰富, 其中 200 ku (肌球蛋白重链)、50~30 ku (肌动蛋白 45 ku、原肌球蛋白 35 ku) 和 15 ku 条带丰度最高。酶解后 50 ku 以上条带显著减少, 并产生大量游离氨基酸。Protamex 酶解液泳道和 Neutrase 酶解液泳道还有少量 30~50 ku 条带保留, 大部分蛋白被酶解成 16~20 ku 小分子蛋白和 6 ku 以下的多肽。Flavorenzyme 酶解液泳道有明显 200 ku、45 ku 和 35 ku 条带, 6 ku 以下多肽较其他蛋白酶酶解液少。结合图 2 六种蛋白酶酶解液水解度比较可知, Flavorenzyme 在酶解过程中主要发挥外切酶的作用, 产生大量游离氨基酸, 部分大分子蛋白结构保留。Papain 和 Bromelain 酶解液泳道相似, 30 ku 以上蛋白质被全部

酶解,生成 16 ku 以下多肽。Alcalase 酶解液泳道蛋白分解程度最高,大分子蛋白质基本全部被酶解成 6 ku 以下多肽。综上所述, Papain、Bromelain 和 Alcalase 对于牛肉蛋白有更好的酶解效果,这一结论与其他学者^[33,34]一致。

2.5 不同蛋白酶酶解液的感官评价

在料液比 1:4 (g/mL)、酶底物比 4000 U/g、酶解时间 4 h,各酶在 2.1 筛选出的 pH 和温度下酶解,比较 Protamex、Flavorenzyme、Papain、Bromelain、Neutrase、Alcalase 酶解液和胶原蛋白肽(牛皮)溶液的感官评价,如图 4 所示。

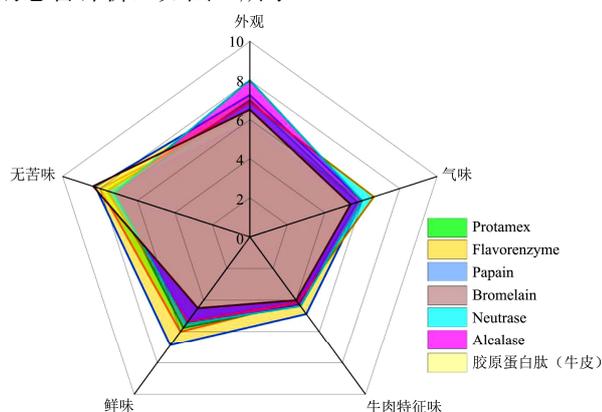


图 4 不同蛋白酶对牛肉酶解液感官评价得分的影响

Fig.4 Effects of different proteases on sensory evaluation scores of beef enzymatic hydrolysate

由图 4 可知,与市售商品胶原蛋白肽(牛皮)的溶液相比,牛肉酶解液的外观和气味得分更高。在滋味方面,牛肉酶解液的鲜味和牛肉特征味得分明显高于胶原蛋白肽溶液,这可能是牛肉蛋白酶解过程中释放大量游离氨基酸导致的,因此,且基本无苦味。其中 Flavorenzyme 的牛肉水解液鲜味最优,可能是酶解时产生大量谷氨酸等鲜味氨基酸^[35]。综合来看,六种蛋白酶的牛肉酶解液与市售商品胶原蛋白肽(牛皮)的溶液差异不大,无明显不良风味产生,可用于食品辅料的生产。

3 结论

本试验采用复合蛋白酶、风味蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶 6 种酶制备牛肉酶解液,比较其 ACE 抑制活性、水解度、分子量分布和感官等方面特性。经组间对比碱性蛋白酶解液兼具以上几个指标参数的优势,其酶解液 ACE 抑制率为 51.19%,水解度为 44.76%。基于此研究结果,本研究将继续通过单因素实验和多因素响应面分析进行优化,获得碱性蛋白酶最佳酶解参数,制备兼

具营养与活性功能的牛肉降血压肽,使人们更深入地开发牛肉的营养和功能。

参考文献

- [1] Young C N. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of hypertension [J]. *Experimental Physiology*, 2017, 102(8): 869-884
- [2] Meissner A, Miro F, Jiménezaltayó F, et al. Sphingosine-1-phosphate signalling-a key player in the pathogenesis of angiotensin II-induced hypertension [J]. *Cardiovascular Research*, 2017, 113(2): 123-133
- [3] Honest N, Kessy E, Wang K, et al. Enrichment and biotransformation of phenolic compounds from litchi pericarps with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition activity [J]. *Food Science and Technology*, 2018, 87: 301-309
- [4] 代春华.黄粉虫幼虫蛋白酶解制备降血压肽的研究[D].无锡:江南大学,2012
DAI Chun-hua. Study on antihypertensive peptides from *Tenebrio molitor* (L.) larva protein hydrolysate [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012
- [5] 何丽霞,李勇.海参肽生物学功能研究进展[J]. *食品科学*, 2015,36(9):215-218
HE Li-xia, LI Yong. Biological functions and applications of sea cucumber peptide [J]. *Food Science*, 2015, 36(9): 215-218
- [6] Chen J D, Sun S S, Li Y S, et al. Proteolysis of tilapia skin collagen: Identification and release behavior of ACE-inhibitory peptides [J/OL]. *Food Science and Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110502>
- [7] Huang W H, Sun J, He H, et al. Antihypertensive effect of corn peptides, produced by a continuous production in enzymatic membrane reactor, in spontaneously hypertensive rats [J]. *Food Chemistry*, 2011, 128: 968-973
- [8] Cui P F, Yang X, Liang Q F, et al. Ultrasound-assisted preparation of ACE inhibitory peptide from milk protein and establishment of its in-situ real-time infrared monitoring model [J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2020, 62: 104859
- [9] Dabbour M, He R, Mintah B, et al. Ultrasound pretreatment of sunflower protein: impact on enzymolysis, ACE-inhibition activity, and structure characterization [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2020, 44(1): e14398
- [10] Sun S, Xu X, Sun X, et al. Preparation and identification of ACE inhibitory peptides from the marine macroalga *Ulva intestinalis* [J]. *Marine Drugs*, 2019, 17(3): 179

- [11] 王瑶.我国不同品种黄牛肉质研究概述[J].食品与发酵工业, 2019,45(14),263-269
WANG Yao. Quality characteristics of beef from various breeds [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(14): 263-269
- [12] 张慧,丁原春,王喆,等.牛肉的营养价值及其嫩度的影响因素[J].饲料博览,2019,11:47-50
ZHANG Hui, DING Yuan-chun, WANG Zhe. The nutritional value of beef and the influencing factors of its tenderness [J]. Feed Review, 2019, 11: 47-50
- [13] 刘燕.从营养角度看肉类制品加工业的发展[J].肉类研究, 2006,20(1):3-5
LIU Yan. The development of meat product processing industry from the perspective of nutrition [J]. Meat Research, 2006, 20(1): 3-5
- [14] Crowe K M, Francis C. Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods [J]. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 2013, 113(8): 1096-1103
- [15] Jang A, Lee M. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates [J]. Meat Science, 2005, 69(4): 653-661
- [16] GBT 23527-2009,蛋白酶制剂[S]
GBT 23527-2009, Protease preparations [S]
- [17] 张兴灿,陈朝银,李汝荣.木瓜蛋白酶的活力检测标准研究[J].食品工业科技,2011,32(10):435-437
ZHANG Xing-can, CHEN Zhao-yin, LI Ru-rong. Study on determination standards of papain activity [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(10): 435-437
- [18] Nielsen P M, Petersen D, Dambmann C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis [J]. Journal of Food Science, 2010, 66(5): 642-646
- [19] Minekus M, Alminger M, Alvito P, et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus [J]. Food Function, 2014, 5: 1113-1124
- [20] Bo Lönnerdal, Jiang R, Du X. Bovine lactoferrin can be taken up by the human intestinal lactoferrin receptor and exert bioactivities [J]. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition, 2011, 53(6): 6-14
- [21] Hur S J, Lim B O, Decker E A, et al. *In vitro* human digestion models for food applications [J]. Food Chemistry, 2011, 125(1): 1-12
- [22] Adjonu R, Doran G, Torley P, et al. Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: influence of heat pre-treatment and enzyme specificity [J]. Food Chemistry, 2013, 136(3-4): 1435-1443
- [23] 罗鹏.葵花籽 ACE 抑制肽的分离纯化、结构分析与稳态化研究[D].武汉:华中农业大学,2018
LUO Peng. Separation and purification, structural analysis and stabilization of ACE inhibitory peptides derived from sunflower seeds [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2018
- [24] 黄薇,宋永康,余华,等.大豆蛋白酶解肽蛋白 Tricine-SDS-PAGE 分离体系的建立[J].中国粮油学报,2013,28(10):10-14
HUANG Wei, SONG Yong-kang, YU Hua, et al. Establishment of Tricine-SDS-PAGE isolation system for protein hydrolyzed by soybean protease [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2013, 28(10): 10-14
- [25] Lee S Y, Hur S J. Purification of novel angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef myofibrillar proteins and analysis of their effect in spontaneously hypertensive rat model [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 116: 109046
- [26] Zhang P, Chang C, Liu H J, et al. Identification of novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from wheat gluten hydrolysate by the protease of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 65: 103751
- [27] Wu S G, Feng X Z, Lan X D, 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
- [28] 林凯,韩雪,张兰威,等.ACE 抑制肽构效关系及其酶法制备的研究进展[J].食品科学,2017,38(3):261-270
LIN Kai, HAN Xue, ZHANG Lan-wei, et al. Progress in structure-activity relationship and enzymatic preparation of ACE inhibitory peptides [J]. Food Science, 2017, 38(3): 261-270
- [29] Deng B C, Ni X J, Zhai Z Y, et al. A new quantitative structure-activity relationship model for angiotensin converting enzyme inhibitory dipeptides based on integrated descriptors [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2017, 65(44): 9774-9781

(下转第 161 页)