

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

马凤¹, 叶灏铎¹, 夏珍¹, 徐燕^{2*}, 孙世利³, 曹庸¹, 苗建银^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省功能食品活性物重点实验室, 广东广州 510642)

(2. 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 安徽合肥 230036)

(3. 广东省茶树资源创新利用重点实验室, 广东省农业科学院茶叶研究所, 广东广州 510640)

摘要: 以英红九号红茶渣经碱溶酸沉提取的茶蛋白为研究对象, 血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制率为评价指标, 通过单因素试验和响应面优化得到茶蛋白 ACE 抑制肽的最佳制备工艺, 并对酶解物进行氨基酸组成分析、超滤膜分离和不同分子量组分的 ACE 抑制活性分析。结果表明, 英红九号茶蛋白 ACE 抑制肽的最优酶解工艺为酶解温度 37℃、3.20 h、pH 值 7.20、底物质量分数 3%、酶底质量比 0.40%, 在此条件下进行的验证试验 ACE 抑制率为 83.38%, 与理论值 84.48% 较相符。英红九号茶蛋白 ACE 抑制肽酶解物富含必需氨基酸 (33.03%) 和对 ACE 抑制活性有重要意义的疏水性氨基酸 (47.20%), 且经超滤膜分离所得 <3 ku 组分的 ACE 抑制活性 ($IC_{50}=0.85$ mg/mL) 要显著强于酶解物 ($IC_{50}=1.37$ mg/mL) 和 >3 ku 组分 ($IC_{50}=2.81$ mg/mL)。该研究为食源性 ACE 抑制肽的研究开发和英红九号茶蛋白的高值化利用提供了理论依据。

关键词: 英红九号茶蛋白; ACE 抑制肽; 酶解; 响应面优化; 氨基酸组成; 超滤分离

文章编号: 1673-9078(2023)07-237-245

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.7.0959

Preparation and Amino Acid Composition of ACE-inhibitor Peptides in Yinghong Tea Proteins and the Activity of Their Ultrafiltrated Components

MA Feng¹, YE Haoduo¹, XIA Zhen¹, XU Yan^{2*}, SUN Shili³, CAO Yong¹, MIAO Jianyin^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, Guangzhou 510642, China)

(2. State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

(3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Tea Plant Resources Innovation and Utilization, Tea Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Based on tea proteins extracted from Yinghong No. 9 dregs via alkali extraction and acid precipitation, single-factor and response surface designs were used to optimize the preparation of tea-protein angiotensin-converting enzyme (ACE)-inhibitor peptides and maximize the ACE inhibition rate. Protein hydrolysates were subjected to amino acid composition analysis and ultrafiltration membrane separation, and the ACE inhibitory activity of each ultrafiltrated molecular component was analyzed. Enzymolysis conditions of 37℃, 3.20 hours, pH of 7.20, substrate mass concentration of 3%, and enzyme-to-substrate mass ratio of 0.40% were found to be optimal for the preparation of

引文格式:

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 Feng, YE Haoduo, XIA Zhen, et al. Preparation and amino acid composition of ACE-inhibitor peptides in yinghong tea proteins and the activity of their ultrafiltrated components [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(7): 237-245.

收稿日期: 2022-07-31

基金项目: 安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放课题资助项目 (SKLTOF20210104); 广东省茶树资源创新利用重点实验室开放课题 (2020KF01)

作者简介: 马凤 (1998-), 女, 在读研究生, 研究方向: 食品新原料与功能性食品, E-mail: MF5730070@163.com

通讯作者: 徐燕 (1969-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 茶及天然产物开发与研究, E-mail: yanxu@ahau.edu.cn; 共同通讯作者: 苗建银 (1981-), 男, 博士,

副教授, 研究方向: 食品科学, E-mail: miaojy8181@scau.edu.cn

ACE-inhibitor peptides and resulted in ACE-inhibitor peptides with an experimentally measured ACE inhibition rate of 83.38%, which is close to the theoretical value of 84.48%. The obtained tea-protein hydrolysate was rich in essential amino acids (33.03%) and hydrophobic amino acids (47.20%), the latter of which is important for ACE-inhibiting activity. Furthermore, the ACE-inhibitory activity of the <3 ku components obtained from ultrafiltration membrane separation ($IC_{50}=0.85$ mg/mL) is significantly stronger than that of protein hydrolysate ($IC_{50}=1.37$ mg/mL) and the >3 ku components ($IC_{50}=2.81$ mg/mL). The findings of this study are expected to serve as theoretical reference for the research and development of food-derived ACE-inhibitor peptides and the value-added utilization of Yinghong No. 9 tea proteins.

Key words: Yinghong No. 9 tea protein; ACE-inhibitor peptide; enzymolysis; response surface optimization; amino acid composition; ultrafiltration-based separation

高血压是心血管疾病的主要危险因素,可诱发心绞痛、心律不齐和心肌梗塞等疾病^[1],严重危害着人类的身体健康。血管紧张素转化酶(Angiotensin-Converting Enzyme, ACE)是一种重要的血压调节酶,它通过在肾素-血管紧张素系统(Renin-Angiotensin System, RAS)中促进血管紧张素 II 的生成和在激肽释放酶-激肽系统(Kallikrein-Kinin System, KKS)中使缓激肽失活而导致人体血压升高^[2]。因此,ACE抑制剂是预防和治疗高血压的有效手段。但传统合成类药物如卡托普利、依那普利等,往往产生干咳、头晕和皮疹等毒副作用^[3]。所以,具有安全、高效、易吸收特点的食物性 ACE 抑制肽已成为当下的研究热点。目前,人们已从核桃^[4]、牡蛎^[5]、鱼类^[6]、海洋球藻^[7]中纯化分离出多种高活性 ACE 抑制肽。

茶叶是我国传统的经济农作物,其品种丰富、种植区域辽阔。近年来,随着茶饮料产业迅速发展,在加工过程中产生了大量废弃茶渣,且茶渣的开发应用仍局限于有机肥料和动物饲料等低值产品。茶渣中茶蛋白的质量占比为 18%~20%,大多为非水溶性蛋白^[8]。茶蛋白不含胆固醇,其氨基酸组成和生物活性肽种类丰富,是一种优质的可食用植物蛋白^[9],其营养和功能性成分在食品工业中有着良好的应用前景。英红九号红茶属广东省名茶,其茶黄素、茶红素和可溶性糖含量均高于其他红茶^[10]。现有研究已证明该红茶具有抗氧化^[11]、降血脂^[12]和降脂减肥^[13]等功效。但对英红九号红茶优质茶蛋白的开发研究较少,尤其是在生物活性肽方面鲜有报道。

本研究以英红九号红茶渣为原料,通过碱溶酸沉法提取茶蛋白,以 ACE 抑制率为活性指标,利用响应面法优化茶蛋白制备 ACE 抑制肽的酶解工艺,分析最优酶解物氨基酸组成和 ACE 抑制活性,并进一步评价其超滤组分的 ACE 抑制率。本研究为茶蛋白的高值开发利用提供理论基础,丰富食物性 ACE 抑制肽种类。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

英红九号红茶,由广东省农业科学院茶叶研究所提供;木瓜蛋白酶(2×10^5 U/g)、胰蛋白酶(2.5×10^5 U/g)、胃蛋白酶(3×10^6 U/g)、中性蛋白酶(1×10^5 U/g),南宁庞博生物工程有限公司;血管紧张素转化酶、羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、N-[3-(2-呋喃基)丙烯酰]-L-苯丙氨酸-甘氨酸-甘氨酸(N-[3-(2-furyl)acryloyl]-L-phenylalanyl-glycyl-glycine, FAPGG),美国 Sigma-Aldrich 公司;氢氧化钠、盐酸,天津大茂化学试剂厂;其他化学品和试剂均为分析纯。

超滤离心管(3 ku),美国密理博公司;2300 多功能酶标仪,PerkinElmer 公司;S-433D 全自动氨基酸分析仪,塞卡姆公司;L530 台式低速自动平衡离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;FD-1 型冷冻干燥机,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;DH5000BII 电热恒温培养箱,天津泰斯特仪器有限公司;HH-6 数显恒温水浴锅,常州朗越仪器制造有限公司;PHS-2C 型 pH 计,上海三信仪表厂;DH9-9245A 烘箱,广州市深华生物技术有限公司;ME204 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 英红九号茶蛋白的制备

将英红九号红茶进行多次水煮浸泡处理,水煮结束后将茶叶烘干,粉碎,于干燥容器中保存备用。参考叶灏铎等^[8]的碱溶酸沉法提取英红九号茶蛋白,取一定量茶叶,按固液比 1:40(g:mL)加入 0.1 mol/L NaOH 溶液,玻璃棒搅拌均匀,于 45℃水浴 4 h,过滤所得上清液 4 000 r/min 离心 20 min。上清液用盐酸调 pH 值至等电点 3.5,静置 15~30 min,4 000 r/min 离心收集沉淀,冷冻干燥即得英红九号茶蛋白粗提物。

1.2.2 英红九号茶蛋白酶解液的制备

取一定量英红九号茶蛋白粗提物,按底物浓度为3%加入蒸馏水,调pH值后加入蛋白酶,在适宜温度下酶解一定时间后立即加热灭酶(95℃,10 min),冷却后4 000 r/min离心10 min收集上清液,即为含ACE抑制肽的茶蛋白酶解液。

1.2.3 蛋白酶的筛选

利用胃蛋白酶(pH值2.0、温度37℃)、木瓜蛋白酶(pH值6.5、温度55℃)、胰蛋白酶(pH值8.0、温度37℃)和中性蛋白酶(pH值7.0、温度45℃)在底物浓度3%、酶底比0.30%的条件下对茶蛋白酶解3 h,通过测定各酶解液稀释30倍的ACE抑制率来确定最适蛋白酶。

1.2.4 单因素实验

在蛋白酶筛选实验结果的基础上,确定胰蛋白酶为最适蛋白酶。利用单因素实验探究酶解pH值(7.0、7.5、8.0、8.5、9.0),酶解温度(27、32、37、42、47℃),底物质量浓度(1%、2%、3%、4%、5%),酶底质量比(0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%),酶解时间(2、2.5、3、3.5、4 h)对茶蛋白酶解液ACE抑制率的影响。

1.2.5 响应面优化实验

为确定英红九号茶蛋白最佳酶解工艺,在单因素实验基础上,选取对酶解液ACE抑制率具有显著影响的因素。应用Design-Expert 8.0.6软件设计三因素三水平的实验方案,pH、酶底比、酶解时间为自变量,酶解液ACE抑制率为响应值。响应面因素和水平设计见表1。

表1 响应面实验因素水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平	因素		
	A pH值	B 酶底比/%	C 酶解时间/h
-1	7.0	0.2	2.5
0	7.5	0.3	3.0
1	8.0	0.4	3.5

1.2.6 体外ACE抑制率的测定

参考Li等^[14]的方法,FAPGG作为ACE底物时会水解成氨基酸FAP和二肽GG,两种物质的产生会减少溶液在340 nm处吸收波长,故用溶液吸收波长减少速率来测定ACE抑制率。其中基质缓冲液HEPES为80 mmol/L(pH值8.30,Cl⁻浓度为300 mmol/L);1.0 mmol/L FAPGG用基质缓冲液配置,避光保存。

在96孔板中样品孔和空白孔先分别加入40 μL样品和HEPES,再依次加入50 μL FAPGG、10 μL ACE。加样结束震荡10 s后,立即测定在340 nm处的吸光度,37℃避光孵育30 min后,再次测定溶液

在340 nm处的吸光度。ACE抑制率(Y)的计算公式为:

$$Y = \frac{A - B}{A} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

Y——抑制率, %;

A——空白孔溶液孵育30 min后在340 nm处吸光度减少值;

B——样品孔溶液孵育30 min后在340 nm处吸光度减少值。

1.2.7 氨基酸组成测定

参照GB 5009.124-2016《食品安全国家标准食品中氨基酸的测定》方法,酸水解处理最优酶解物冻干粉,测定其17种氨基酸含量^[15]。

1.2.8 超滤分离

目前,文献报道的大部分ACE抑制肽均为分子量较小的短肽,肽段氨基酸残基组成常为2~12个,这可能跟ACE活性位点不能结合大分子活性肽有关^[16]。使用3 ku超滤管对最优酶解液进行初步分离,得到>3 ku和<3 ku 2个活性组分,冻干后测定各组分ACE抑制活性的IC₅₀值(IC₅₀为ACE抑制率达50%时多肽的质量浓度,mg/mL)。

1.3 数据分析

所有实验均设置三组平行实验,最终数据以均值±标准偏差表示。统计图在Excel 2010软件下完成,响应面实验设计和结果分析在Design Expert 8.0.6下进行,实验结果用IBM SPSS Statistics 26软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 英红九号茶蛋白

以英红九号红茶为原料,茶叶经多次水煮浸泡,又基于碱溶酸沉原理提取茶蛋白,去除游离多酚和多糖类物质,其茶蛋白得率为20.04%。但已有研究证明,一些多糖能够以共价结构与多肽形成具有一定生物活性的糖蛋白^[17]。所以,本研究所得的茶叶粗蛋白中可能含有一定的糖蛋白,但其含量、及其构效关系还有待深入研究。

2.2 蛋白酶的筛选

由于蛋白酶的酶切位点具有特异性,所以酶解得到的小分子肽段数量、基团种类和氨基酸序列都存在差异,进而导致其功能活性也不同^[18]。由图1可知,胰蛋白酶ACE抑制率最高(74.09%),与其他蛋白酶酶解物ACE抑制率存在显著差异,其次为木瓜蛋白

酶 ACE 抑制率为 53.06%；中性蛋白酶（29.28%）和胃蛋白酶（27.63%）的 ACE 抑制率没有显著性差异。胰蛋白酶是一种广泛存在于生物消化系统中的丝氨酸蛋白酶，主要负责水解带正电荷的赖氨酸和精氨酸羧基端的肽键^[19]，且已有研究表明带正电荷的氨基酸有利于增强活性肽 ACE 抑制活性^[20]。所以，结合本研究的实验结果，选择胰蛋白酶酶解制备茶蛋白 ACE 抑制肽，其酶解液具有较高的抑制活性。

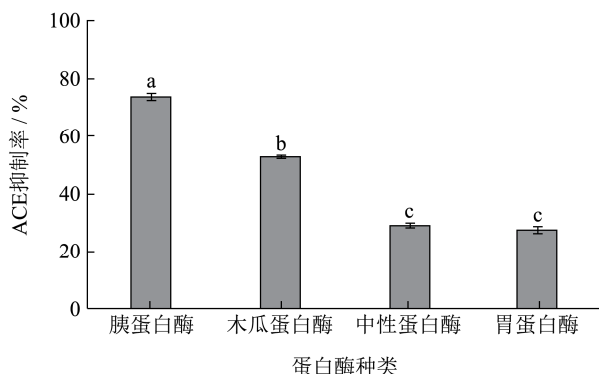


图1 蛋白酶种类对 ACE 抑制率的影响

Fig.1 Effects of protease species on ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates

注：图中不同小写字母表示显著差异， $P < 0.05$ 。下同。

2.3 单因素实验

2.3.1 pH 对 ACE 抑制率的影响

由图2可知，各组之间存在显著差异。酶解液 ACE 抑制率在 pH 值 7.5 达到最高值（78.17%）后开始呈现下降趋势，在 pH 值 9.0 处达到最低值（30.15%）。pH 值较高会改变蛋白酶活性位点的构象、酶与底物分子的结合状态，从而减弱酶活性，导致酶解液活性降低^[21]。在制备大米 ACE 抑制肽^[22]的研究中，多肽 ACE 抑制活性也是随着 pH 值的增加表现出先升高后下降的趋势。所以，结合本研究的实验结果，选择 pH 值 7.5 作为后序工艺优化的条件。

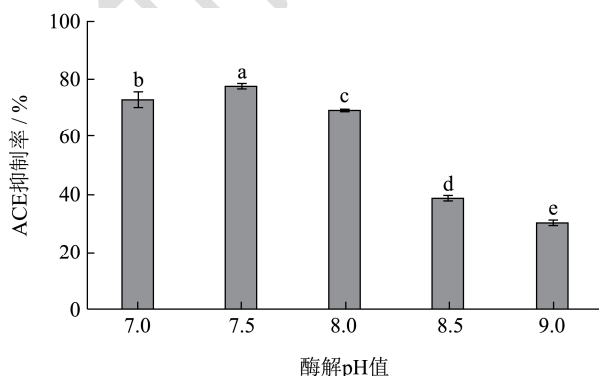


图2 pH 对 ACE 抑制率的影响

Fig.2 Effect of pH on ACE inhibitory activity

2.3.2 温度对 ACE 抑制率的影响

由图3可知，温度对 ACE 抑制率具有显著影响。随着温度的升高，酶解液 ACE 抑制率先升高后缓慢降低，在酶解温度为 37 °C 时，ACE 抑制率最大（69.53%），且与 42 °C 时的 ACE 抑制活性无显著性差异。在一定范围内，温度升高会增强蛋白酶活力，有利于酶解反应的发生，更好地释放活性肽。但温度过高会使蛋白酶结构改变，影响酶活，进而降低酶解液抑制活性^[23]。所以，结合本研究的实验结果，实验最佳酶解温度选择 37 °C。

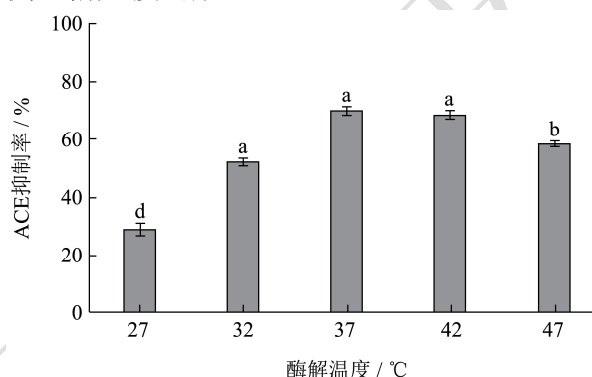


图3 酶解温度对 ACE 抑制率的影响

Fig.3 Effect of hydrolysis temperature on ACE inhibitory activity

2.3.3 底物浓度对 ACE 抑制率的影响

由图4可知，酶解液 ACE 抑制率随着底物浓度的增加表现出先稳定升高后逐渐下降的趋势，且在底物浓度为 4%（71.57%）和 3%（71.08%）时无显著性差异。底物浓度过高会阻碍蛋白酶在溶液中的自由扩散，浓度过低会降低酶的利用率。所以，一方面为了防止因底物过多导致酶解液过度粘稠，从而反向抑制蛋白酶与蛋白的相互作用，另一方面为了节约原料和降低成本，选择底物浓度 3%作为最佳酶解条件。

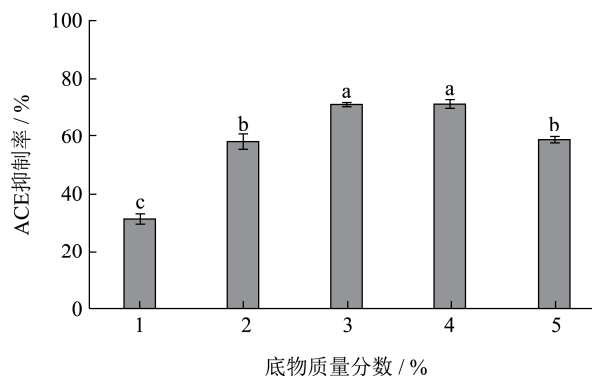


图4 底物浓度对 ACE 抑制率的影响

Fig.4 Effect of substrate concentration on ACE inhibitory activity

2.3.4 酶底比对 ACE 抑制率的影响

由图 5 可知,酶底比从 0.1%(ACE 抑制率 23.68%)增加到 0.3%(ACE 抑制率 75.00%)时,酶解液 ACE 抑制率显著增强,但酶底比进一步增加会导致酶解液 ACE 抑制活性下降,酶底比 0.5%的 ACE 抑制率仅为 40.79%。过量蛋白酶会将活性肽水解成更小的肽段或氨基酸,降低其生物活性^[24]。所以,选择酶底比 0.3%作为进一步优化酶解的条件。

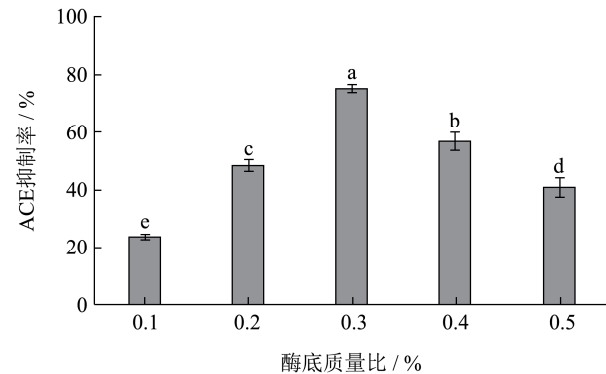


图 5 酶底比对 ACE 抑制率的影响

Fig.5 Effect of enzyme/substrate on ACE inhibitory activity

2.3.5 酶解时间对 ACE 抑制率的影响

由图 6 可知,酶解时间对酶解液 ACE 抑制活性具有显著影响。酶解液 ACE 抑制率随着酶解时间的增加呈现先升高后降低的趋势,当酶解 3 h 时,ACE 抑制率达到 70.89%。这可能是由于酶解反应刚开始时,酶解产物主要是 ACE 抑制活性不高的大分子蛋白质,随着酶解时间的延长,大分子蛋白质继续被酶解成较高活性的小分子短肽^[25]。但酶解时间过长,底物完全水解,蛋白酶会过度降解小分子短肽,破坏肽段氨基酸组成和构象,进而导致活性肽的降解程度高于活性肽的生成^[26]。所以,选择酶解 3 h 作为后序优化实验的酶解条件。

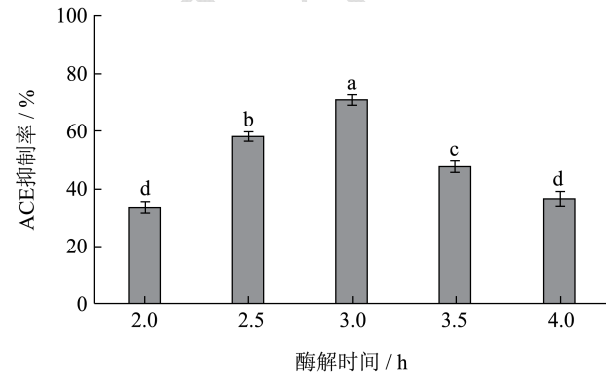


图 6 酶解时间对 ACE 抑制率的影响

Fig.6 Effect of treatment time on ACE inhibitory activity

2.4 响应面实验

2.4.1 Box-Benhnken 实验设计及结果

在单因素实验的基础上,选择 pH (A)、酶底比 (B) 和酶解时间 (C) 三因素为自变量,ACE 抑制率为响应值,对酶解条件进行优化。实验设计与结果见表 2。

表 2 响应面实验设计与结果

Table 2 The design and results of the response surface experimental

试验号	试验因素			ACE 抑制率/%
	A pH	B 酶底比/%	C 酶解时间/h	
1	1	0	1	68.15
2	0	0	0	82.53
3	0	0	0	81.96
4	0	-1	1	69.41
5	0	0	0	82.19
6	1	-1	0	76.48
7	-1	0	-1	77.40
8	0	-1	-1	83.22
9	-1	-1	0	71.58
10	0	1	-1	72.60
11	0	1	1	80.14
12	-1	1	0	83.56
13	0	0	0	82.92
14	1	0	-1	72.15
15	1	1	0	64.84
16	0	0	0	83.56
17	-1	0	1	76.03

2.4.2 回归模型和方差分析

运用 Design-Expert 8.0.6 软件对表 2 数据进行拟合分析后,得二次回归方程为:

$$Y=82.63-3.37A+0.056B-1.46C-5.9AB-0.66AC+5.34BC-5.71A^2-2.8B^2-3.49C^2$$

由表 3 方差分析可知:模型 F 值为 267.09, $P<0.0001$, 极显著;拟合项 P 值为 0.9314 >0.05 , 不显著;结果表明该模型的实验值与预测值线性相关,具有较好的拟合度^[27]。模型的相关系数 $R^2=0.99$, 校正系数 $R^2_{adj}=0.95$, 即此模型可表示 95.34%的响应值变化,可用于酶解液 ACE 抑制率的分析与预测。一次项 A、C 和二次项 AB、BC、 A^2 、 B^2 、 C^2 均为极显著,仅一次项 B 为不显著。此外,模型各因素 F 值越大,则对实验结果的影响越大。所以,各因素对酶解液 ACE 抑制率影响的主次顺序为 pH>酶解时间>酶底比。

表 3 响应面二次模型方差分析

Table 3 Analysis of variance for response surface quadratic model						
方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	607.43	9	67.49	267.09	<0.000 1	***
A-pH	90.79	1	90.79	359.28	<0.000 1	***
B-酶底比	0.03	1	0.03	0.10	0.760 9	
C-时间	16.94	1	16.94	67.02	<0.000 1	***
AB	139.48	1	139.48	551.96	<0.000 1	***
AC	1.73	1	1.73	6.84	<0.034 6	*
BC	113.96	1	113.96	450.96	<0.000 1	***
A ²	137.45	1	137.45	543.93	<0.000 1	***
B ²	33.09	1	33.09	130.96	<0.000 1	***
C ²	51.17	1	51.17	202.49	<0.000 1	***
残差	1.77	7	0.25			
拟合项	0.17	3	0.06	0.14	0.931 4	不显著
纯差	14.00	4	0.40			
总相关	609.20	16				
			$R^2=0.99$		$R^2_{adj}=0.95$	

注：*为显著（ $P<0.05$ ）；**为高度显著（ $P<0.01$ ）；***为极显著（ $P<0.001$ ）。

2.4.3 模型优化及验证实验

高，具有较高拟合度，响应面优化后的工艺条件可有效制备茶蛋白 ACE 抑制肽。

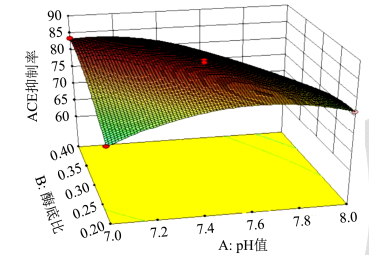


图 7 pH 和酶底比对 ACE 抑制率的影响

Fig.7 The influence of pH and enzyme/substrate on ACE inhibitory activity

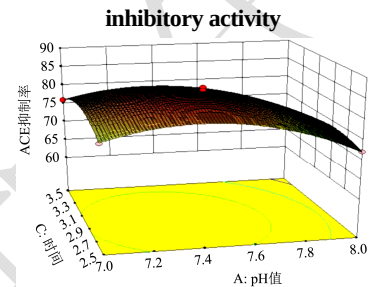


图 8 酶解时间和 pH 对 ACE 抑制率的影响

Fig.8 The influence of treatment time and pH on ACE inhibitory activity

通过 Design-Expert 8.0.6 软件对实验结果进行数据分析，模型条件下最佳酶解工艺为 pH 值 7.17、酶底比 0.38%、时间 3.21 h，ACE 抑制率预测值为 84.48%。在实验室条件下，将最佳酶解工艺调整为 pH 值 7.20、酶底比 0.4%、时间 3.20 h、温度 37 ℃和底物浓度 3%。在该条件下进行三次重复实验，ACE 抑制率为 83.38%，与模型预测值接近。故该模型实用性

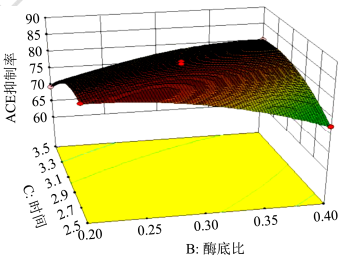


图 9 酶解时间和酶底比对 ACE 抑制率的影响

Fig.9 The influence of treatment time and enzyme/substrate on ACE inhibitory activity

2.5 酶解物氨基酸组成分析

生物活性肽的功能与其氨基酸组成密切相关。从表 4 可知，最优酶解物中疏水性氨基酸相对含量最高（47.20%），且已有研究表明 ACE 抑制肽通常含有大量疏水性氨基酸。Chen 等^[28]指出罗非鱼皮肤胶原肽中，肽链 C 末端三肽位置的疏水氨基酸会显著增加肽的 ACE 抑制活性；黎观红^[29]的研究表明酶解产物中疏水性氨基酸和芳香族氨基酸含量与 ACE 抑制活性呈正相关；同时，Xu 等^[30]对截至 2020 年在 BIOPEP 中报道的 845 个具有 ACE 抑制肽进行分析，发现出现频率最高的前 10 种氨基酸（Pro、Leu、Val、Gly、Tyr、Ala、His、Phe、Ile 和 Gln）中疏水性氨基酸占 60%。所以，由氨基酸组成分析可知英红九号茶蛋白经酶解可制备活性较好的 ACE 抑制肽。

表 4 英红九号茶蛋白酶解物的氨基酸组成

Yinghong NO.9 tea	
氨基酸种类	相对百分含量/%
天冬氨酸 (Asp)	12.28
苏氨酸 (Thr)	5.90
丝氨酸 (Ser)	6.04
谷氨酸 (Glu)	11.32
甘氨酸 (Gly)	11.56
丙氨酸 (Ala)	5.85
缬氨酸 (Val)	6.00
蛋氨酸 (Met)	0.97
异亮氨酸 (Ile)	4.79
亮氨酸 (Leu)	7.35
酪氨酸 (Tyr)	3.48
苯丙氨酸 (Phe)	4.30
组氨酸 (His)	5.75
赖氨酸 (Lys)	3.72
精氨酸 (Arg)	4.26
脯氨酸 (Pro)	6.38
疏水性氨基酸含量	47.20
碱性氨基酸含量	13.73
必需氨基酸含量	33.03

注：疏水性氨基酸 Gly、Val、Ile、Leu、Ala、Phe、Met、Pro、Trp；芳香族氨基酸 Trp、Tyr、Phe；必需氨基酸 Thr、Val、Met、Ile、Leu、Phe、Lys。

2.6 超滤分离

使用 HEPES 缓冲液将>3 ku、<3 ku 和酶解物冻干组分按同一浓度梯度配制成样品溶液，分析三种样品的 ACE 抑制活性。由图 10 可知，三种样品 ACE 抑制率均与其浓度成正相关，且最高浓度<3 ku 组分的 ACE 抑制率显著高于酶解物和>3 ku 组分的活性。汤海霞等^[31]用 10 ku 和 3 ku 超滤管对绵羊酪蛋白酶解液进行分离，其结果也表明<3 ku 组分的 ACE 抑制活性较强。同时，Yu 等^[32]和 Aleman 等^[33]的研究结果均表明小分子量肽段较大分子量肽段表现出更强的 ACE 抑制活性。所以，肽段分子量大小与 ACE 抑制活性呈反相关，且超滤膜分离能较好地富集活性物质。

此外，由图 11 可知，<3 ku 组分的 IC₅₀ 值 (0.85 mg/mL) 显著小于酶解物 (1.37 mg/mL) 和>3 ku 组分 (2.81 mg/mL)。<3 ku 组分 ACE 抑制活性要显著优于已报道的苦杏仁蛋白肽^[34] (IC₅₀=1.58 mg/mL) 和螺旋藻蛋白肽^[35] (IC₅₀=1.54 mg/mL)。由此可知，茶蛋白 ACE 抑制肽经超滤分离后<3 ku 组分具有较好

的活性潜力，可进一步分离纯化出高活性的单体肽。

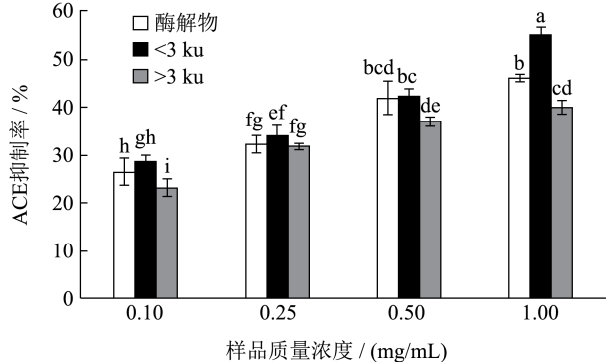


图 10 不同浓度酶解物及超滤组分的 ACE 抑制率

Fig.10 ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates and ultrafiltration components at different concentrations

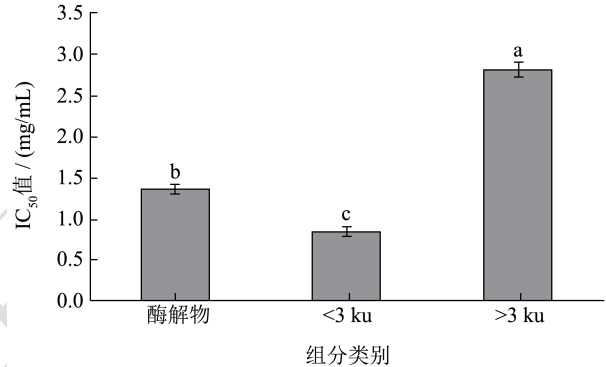


图 11 不同组分 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值

Fig.11 The IC₅₀ values of different components of ACE inhibitory activity

3 结论

本研究以英红九号茶渣为原料和 ACE 抑制率为指标，通过单因素和响应面优化得到茶蛋白制备 ACE 抑制肽的最佳酶解工艺。利用超滤膜分离对最优酶解物进行高活性组分富集，发现分子量较小的<3 ku 组分 ACE 抑制活性更高 (IC₅₀=0.85 mg/mL)。此外，最优酶解物中富含天冬氨酸、谷氨酸和疏水性氨基酸，符合高活性 ACE 抑制肽的氨基酸组成特点。本研究不仅为英红九号红茶的开发利用提供新的研究思路，丰富现有食源性 ACE 抑制肽种类，还为茶蛋白在功能食品领域的开发提供理论依据。后续将对英红九号茶蛋白 ACE 抑制肽进一步分离纯化，并在细胞及动物水平上深入探讨其具体的作用机制。

参考文献

[1] WANG Ming, HAN Wenzheng, ZHANG Min, et al. Long-term renal sympathetic denervation ameliorates renal fibrosis and delays the onset of hypertension in spontaneously hypertensive rats [J]. American Journal of Translational

- Research, 2018, 10(12): 4042-4053.
- [2] WEI Dong, FAN Wenlai, XU Yan. Identification of water-soluble peptides in distilled spent grain and its angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory activity based on UPLC-Q-TOF-MS and proteomics analysis [J]. Food Chemistry, 2021, 353(5): 129521.
- [3] PEI Jingyan, HUA Ying, ZHOU Tingyi, et al. Transport, in vivo antihypertensive effect, and pharmacokinetics of an Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptide LVLPGE [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(7): 2149-2156.
- [4] WANG Cong, TU Maolin, WU Di, et al. Identification of an ACE-inhibitory peptide from walnut protein and its evaluation of the inhibitory mechanism [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 1156.
- [5] WANG Jiawei, HU Jianen, CUI Jinzhe, et al. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats [J]. Food Chemistry, 2008, 111(2): 302-308.
- [6] Salampessy Junus, Reddy Narsimha, Phillips Michael, et al. Isolation and characterization of nutraceutically potential ACE-Inhibitory peptides from leatherjacket (*Meuschenia* sp.) protein hydrolysates [J]. LWT - Food Science and Technology, 2017, 80(1): 430-436.
- [7] Samarakoon Kalpa W, O-Nam Kwon, Ko Ju Y, et al. Purification and identification of novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae (*Nannochloropsis oculata*) protein hydrolysate [J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(5): 1595-1606.
- [8] 叶灏铎, 苗建银, 李龙星, 等. 勐库大叶茶蛋白降血脂肽的酶解制备及活性分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 212-221.
- [9] 杜梦珂. 富硒碱性茶蛋白 ACE 抑制肽的制备, 分离纯化及结构鉴定[D]. 上海: 上海师范大学, 2018.
- [10] 孙世利, 操君喜, 赖幸菲, 等. 英红九号红茶保健功效研究进展[J]. 广东茶业, 2015, 6: 18-20.
- [11] 孙世利, 郭芸彤, 陈海强, 等. 英红九号六大茶类生化成分分析及体外活性评价[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(9): 159-165.
- [12] 郭芸彤. 英红九号不同茶类的降脂减肥作用研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
- [13] 刘晨. 英红九号品种加工的六种茶类对肥胖的抑制作用及其机制[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
- [14] LI Meiqing, XIA Shanwei, ZHANG Yiyun, et al. Optimization of ACE inhibitory peptides from black soybean by microwave-assisted enzymatic method and study on its stability [J]. LWT - Food Science and Technology, 2018, 98: 358-365.
- [15] 黄文, 余可楠, 廖婉雯, 等. 响应面法优化罗非鱼鳞钙结合肽酶解工艺及其特性表征[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 190-196.
- [16] 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.
- [17] XIE Jingfan, ZHONG Guanqun, CAI Changqun, et al. Rapid and efficient separation of glycoprotein using pH double-responsive imprinted magnetic microsphere [J]. Talanta, 2017, 169: 98-103.
- [18] 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.
- [19] Jnior Evaldo C S, Santos Mateus P F, Sampaio Vanessa S, et al. Hydrolysis of casein from different sources by immobilized trypsin on biochar: Effect of immobilization method [J]. Journal of Chromatography B, 2020, 1146: 122-124.
- [20] GU Yuchen, Majumder Kaustav, WU Jianping. QSAR-aided in silico approach in evaluation of food proteins as precursors of ACE inhibitory peptides [J]. Food Research International, 2011, 44(8): 2465-2474.
- [21] 宋凯强, 刘鹏莉, 郑振佳, 等. 大蒜降压肽的制备及超滤分离[J]. 食品工业科技, 2019, 40(19): 73-80.
- [22] 封张萍, 岳阳, 刘东红, 等. 大米 ACE 抑制肽制备工艺优化和生物活性研究[J]. 食品科技, 2021, 46(2): 210-217.
- [23] 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.
- [24] 吴红洋, 姜太玲, 胡惠茗, 等. 响应面法优化酶解花椒籽蛋白制备降血压肽工艺[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 180-185.
- [25] 李露, 张普香, 韩朋岑, 等. 酶法水解牦牛皮蛋白制备抗氧化肽工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(24): 188-196.
- [26] Huang L, Liu B, Ma H, et al. Combined effect of ultrasound and enzymatic treatments on production of ACE inhibitory peptides from wheat germ protein [J]. Journal of Food Processing and Preservation, 2014, 38(4): 1632-1640.
- [27] Delshadian Zohre, Mortazavian Amir M, Tabarzad Maryam, 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.
- [28] CHEN Junde, SUN Shanshan, LI Yushuang, et al. Proteolysis of tilapia skin collagen: Identification and release behavior of ACE-inhibitory peptides [J]. LWT - Food Science and

- Technology, 2021, 139: 110502.
- [29] 黎观红.食物蛋白源血管紧张素转化酶抑制肽的研究[D]. 无锡:江南大学,2005.
- [30] XU Zhengqiu, WU Changping, SUN Dongxiao, et al. Identification of post-digestion angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean protein Isolate: Their production conditions and *in silico* molecular docking with ACE [J]. Food Chemistry, 2021, 345: 128855.
- [31] 汤海霞,王爽爽,郝果,等.一种新型绵羊乳酪蛋白 ACE 抑制肽结构鉴定及分子结合机制分析[J].食品工业科技 2022, 43(1):110-118.
- [32] YU Zhipeng, WU Sijia, ZHAO Wenzhu, et al. Identification of novel angiotensin I - converting enzyme inhibitory peptide from collagen hydrolysates and its molecular inhibitory mechanism [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2020, 55(9): 3145-3152.
- [33] Alemán A, Gómez-Guillén M C, Montero P. Identification of ace-inhibitory peptides from squid skin collagen after *in vitro* gastrointestinal digestion [J]. Food Research International, 2013, 54(1): 790-795.
- [34] 杨罡.固定化酶酶解苦杏仁谷蛋白制备 ACE 抑制肽及分离纯化的研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2021.
- [35] WANG Kai, LUO Qinwen, HONG Hui, et al. Novel antioxidant and ACE inhibitory peptide identified from *Arthrospira platensis* protein and stability against thermal/pH treatments and simulated gastrointestinal digestion [J]. Food Research International, 2021, 139: 109908.