

白酒糟中 ACE 抑制肽提取工艺优化及抗氧化活性

姚明材 李飞凤 罗 广 董 亮

(四川轻化工大学生物工程学院, 四川 自贡 643000)

摘要: [目的] 有效处理白酒糟, 研究和开发白酒糟中的高附加值成分, 探索其潜在应用途径。[方法] 采用超声波辅助碱提酸沉法从白酒糟中提取蛋白质, 利用复合酶对白酒糟粗蛋白进行酶解制备血管紧张素转换酶(ACE)抑制肽, 通过单因素试验和响应面试验优化 ACE 抑制肽的提取工艺条件, 并对其抗氧化活性进行研究。[结果] 采用复合酶法制备 ACE 抑制肽得到了最佳条件: 酶配比 ($V_{木瓜蛋白酶} : V_{中性蛋白酶}$) 3:1, 水解温度 55.41 °C, 水解 pH 7.72, 水解时间 2.38 h, 该条件下 ACE 抑制肽水解度为 66.62%; 复合蛋白酶酶解 3 h 后得到最高的 ACE 抑制活性 (79.05%); 经提取纯化后的 ACE 抑制肽对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基的清除率分别为 2.078% 和 3.226%, 总抗氧化能力分别为 1.161 $\mu\text{mol/mL}$ 和 1.255 mmol。[结论] 采用复合酶法从白酒糟中提取 ACE 抑制肽工艺可行。

关键词: 白酒糟; 复合酶法; ACE 抑制肽; 抗氧化

Optimization of the extraction process of ACE inhibitory peptides from distillery waste and their antioxidant activity

YAO Mingcai LI Feifeng LUO Guang DONG Liang

(College of Bioengineering, Sichuan University of Science and Technology, Zigong, Sichuan 643000, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to handle distillery waste effectively, research and develop high-value components within distillery waste, and explore its potential application approaches. [Methods] Proteins were extracted from distillery waste through the ultrasonic-assisted alkali extraction and acid precipitation method. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides were prepared by enzymatic hydrolysis of the crude protein of distillery waste using a compound enzyme. The extraction process conditions of ACE inhibitory peptides were optimized by single factor experiments and response surface experiments, and their antioxidant activity was investigated. [Results] The optimal conditions for preparing ACE-inhibitory peptide by compound enzymatic hydrolysis were as follows: the ratio of enzyme ($V_{\text{papainase}} : V_{\text{neutral protease}}$) was 3:1, and the hydrolysis was conducted at 55.41 °C and pH 7.72, for 2.38 h. Under the control of these conditions, the hydrolysis degree of ACE-inhibitory peptide was 66.62%; the highest ACE inhibitory activity (79.05%) was obtained after 3 h of enzymatic hydrolysis. The scavenging rates of the purified and extracted ACE inhibitory peptides against DPPH and ABTS free radicals were 2.078% and 3.226%, respectively, and the total antioxidant capacities were 1.161 $\mu\text{mol/mL}$ and 1.255 mmol. [Conclusion] The process of extracting ACE inhibitory peptide from distillery waste using the compound enzymatic hydrolysis method is feasible.

Keywords: distillery waste; composite enzymatic hydrolysis method; ACE inhibitory peptides; antioxidation

白酒糟是高粱和其他作物经过蒸煮和添加曲后, 经蒸馏等处理后的剩余物, 也称为丢糟, 是白酒工业最大的副产品, 蛋白质含量很高, 具有潜在开发利用价值^[1]。

天然的血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂肽具有快速吸收、安全性高和无明显的副作用等优点^[2], 已被证实可用于治疗高血压^[3]。Zhang 等^[4]研究发现, 白酒糟中存在

具有 ACE 抑制作用和抗氧化活性的多肽。Connolly 等^[5]从啤酒糟中分离出了具有抑制 ACE 活性的肽。Wei 等^[6]以白酒糟水溶性提取物蛋白为原料提取和分离了水溶性肽, 并对其中具有高 ACE 抑制活性的肽进行了定量分析。

研究拟采用超声波辅助碱提酸沉法从白酒糟中提取蛋白质, 再采用复合酶对白酒糟粗蛋白进行酶解制备

基金项目: 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目(编号: NJ2021-05); 四川轻化工大学研究生教学建设项目(编号: AL202309); 四川轻化工大学大学生创新创业项目(编号: S202310622021)

通信作者: 董亮(1980—), 男, 四川轻化工大学研究员, 博士。E-mail: 410898720@qq.com

收稿日期: 2023-10-12 **改回日期:** 2024-09-12

ACE抑制肽,探究酶解时间对ACE抑制肽抑制率的影响,并测定其总抗氧化能力,以期为白酒糟资源的综合利用和天然ACE抑制肽的开发提供理论依据。

1 材料、仪器和方法

1.1 材料和试剂

白酒糟:取自四川省宜宾市某酒企;
氯化钠、氢氧化钠:分析纯,成都市科龙化工试剂厂;
木瓜蛋白酶:800 U/mg,河南万邦实业有限公司;
中性蛋白酶:50 U/mg,河南万邦实业有限公司;
风味蛋白酶:20 U/mg,河南万邦实业有限公司;
胰蛋白酶:2 500 U/mg,河南万邦实业有限公司;
胃蛋白酶:1:3 000,河南万邦实业有限公司;
盐酸等:分析纯,成都市科隆化学制品有限公司。

1.2 主要仪器

低速离心机:TD-5型,天津市赛得利斯实验分析仪器制造厂;

电子天平:AR22CN型,天津市赛得利斯实验分析仪器制造厂;

鼓风干燥箱:DGX-9073B-2型,天津市赛得利斯实验分析仪器制造厂;

台式酸度计:PHS-3C型,天津市赛得利斯实验分析仪器制造厂;

冷藏冷冻箱:BCD-211TMBA型,上海齐欣科学仪器有限公司;

电热恒温水浴锅:HWS型,上海齐欣科学仪器有限公司;

数控超声波清洗器:KQ-500DE型,昆山市超声仪器有限公司;

循环水真空泵:SHZ-III型,上海亚荣生化仪器厂;

紫外分光光度计:UV1800型,上海菁华科学仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 白酒糟粗蛋白提取 根据郭宇等^[7]的方法,修改如下:使用组织搅碎机将白酒糟彻底粉碎,在烘箱中45℃烘干,并过0.425 mm标准筛。称取白酒糟10 g,按 $m_{\text{白酒糟}}:V_{\text{去离子水}}=1:10$ (g/mL)的比例加入去离子水,加入1%质量分数的NaCl,用氢氧化钠溶液提取,pH调至9.0。超声波预处理30 min,45℃水浴加热90 min,使其充分溶解,抽滤,8 000 r/min离心10 min收集上清液。将pH调至4.2,沉淀30 min,8 000 r/min离心10 min收集沉淀物,于45℃烘箱中干燥,制成酒糟蛋白粉,于4℃的冰箱中保存备用。

1.3.2 白酒糟蛋白中氨基酸态氮含量测定 使用双指示剂甲醛滴定法进行测定。根据李贺军等^[8]的方法,修改如下:称取0.05 g白酒糟粗蛋白,分别置于装有50 mL去离子水的250 mL锥形瓶中,经超声波预处理10 min至蛋白完全溶解,一部分加中性红色指示剂,溶液滴至琥珀色作

为终点,NaOH标准溶液持续30 s不褪色。另一部分加10 mL中性甲醛和酚酞指示剂,混匀,静置1 min,用NaOH标准溶液滴定白酒糟蛋白溶液至淡蓝色为终点且30 s不褪色。记录数据,根据式(1)计算氨基酸态氮含量。

$$w = \frac{C \times (V_2 - V_1) \times 0.014}{m}, \quad (1)$$

式中:

w ——氨基酸态氮含量,mmol/L;

C ——NaOH标准溶液浓度,mmol/L;

V_1 ——中性红作指示剂滴定所消耗NaOH标准溶液的体积,mL;

V_2 ——酚酞作指示剂滴定所消耗NaOH标准溶液的体积,mL;

0.014——氮摩尔质量,g/mmol;

m ——样品质量,g。

1.3.3 NaOH浓度对白酒糟粗蛋白提取效果的影响 根据石杰等^[9-10]的方法,修改如下:按 $m_{\text{白酒糟}}:V_{\text{去离子水}}=1:10$ (g/mL)的比例将白酒糟与去离子水混合,再加入不同浓度的NaOH提取液(0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12 mol/L),超声波(500 W,45℃)预处理30 min后,45℃提取120 min。经45℃鼓风干燥箱干燥后,测量白酒糟粗蛋白的质量来确定最佳NaOH提取液浓度。

1.3.4 白酒糟蛋白酶筛选 根据宋明洋等^[11]的方法,修改如下:称取0.05 g白酒糟粗蛋白,加50 mL去离子水,经超声波(500 W,45℃)预处理10 min至蛋白完全溶解,加磷酸盐缓冲液,并将溶液pH调至中性,酶解温度50℃,时间2 h。调节pH为7.5后,分别加入6 000 U/mg木瓜蛋白酶、中性蛋白酶、风味蛋白酶、胰蛋白酶和胃蛋白酶5种蛋白酶,对酒糟蛋白溶液进行酶解处理。随后使酶失活,再8 000 r/min离心10 min收集上清液,测定各蛋白酶水解白酒糟制备ACE抑制肽的水解度。

1.3.5 双酶法制备ACE抑制肽 根据郭鹏辉等^[12-13]的方法,修改如下:称取0.05 g白酒糟粗蛋白,加入50 mL去离子水,经超声波(500 W,45℃)预处理10 min至蛋白完全溶解,加磷酸盐缓冲液,并将溶解液的pH调至中性。加入6 000 U/mg的不同配比的木瓜蛋白酶和中性蛋白酶($V_{\text{木瓜蛋白酶}}:V_{\text{中性蛋白酶}}$ 分别为1:1,2:1,3:1,4:1,5:1),初始pH 7.0、酶解温度50℃和酶解时间2 h,65℃下水浴20 min灭酶,8 000 r/min离心10 min收集上清液。测定不同复合蛋白酶配比水解酒糟蛋白的水解度。

1.3.6 白酒糟蛋白制备ACE抑制肽的水解度测定 根据许腾等^[14-15]的方法,修改如下:取10 mL酶水解产物,用NaOH标准溶液调pH至8.2,加10 mL甲醛,用0.1 mol/L的盐酸溶液调pH至7.0,再用0.10 mol/L的NaOH标准溶液调pH至10.3,记录NaOH标准溶液的滴定体积。蒸馏水替代水解产物,进行空白对照组,采用同种方法进行滴定,测得氢氧化钠标准溶液的滴定体积。根据式(2)计算样品中酒糟蛋白制备ACE抑制肽的水解度。

$$h = \frac{C \times (V_1 - V_2) \times 100 - w}{7.8} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

h ——水解度,%;

C ——NaOH标准溶液浓度, mol/L;

V_1 ——中性红作指示剂滴定所消耗NaOH标液的体积, mL;

V_2 ——酚酞作指示剂滴定所消耗NaOH标液的体积, mL;

100——稀释度;

7.8——每克白酒糟中蛋白质链的当量数;

w ——白酒糟蛋白中游离的氨基酸量, mmol/g。

1.3.7 复合酶水解白酒糟蛋白单因素试验

(1) 复合酶比对ACE抑制肽水解度的影响:选取具有最高的ACE抑制肽水解程度的木瓜蛋白酶和中性蛋白酶,称取白酒糟蛋白0.05 g,加入去离子水50 mL,固定酶解时间2 h,酶解温度55℃,酶解pH 7.5,复合酶加入量6 000 U/mg,考察复合酶配比($V_{\text{木瓜蛋白酶}}:V_{\text{中性蛋白酶}}$ 分别为1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1)对ACE抑制肽水解度的影响。

(2) 酶解温度对ACE抑制肽水解度的影响:根据上一步试验过程中选择的复合酶最适配比,称取白酒糟蛋白0.05 g,加入去离子水50 mL,固定酶解时间2 h,酶解pH 7.5,考察复合酶水解温度(45, 50, 55, 60, 65℃)对ACE抑制肽水解度的影响。

(3) 酶解pH对ACE抑制肽水解度的影响:根据上一步试验过程中选择的复合酶最适配比和酶解温度,称取白酒糟蛋白0.05 g,加入去离子水50 mL,固定酶解时间2 h,考察复合酶水解pH(6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5)对ACE抑制肽水解度的影响。

(4) 水解时间对ACE抑制肽水解度的影响:根据上一步试验过程中选择的复合酶最适配比、酶解温度和酶解pH,称取白酒糟蛋白0.05 g,加入去离子水50 mL,考察复合酶解时间(1, 2, 3, 4, 5 h)对ACE抑制肽水解度的影响。

1.3.8 复合酶水解白酒糟蛋白响应面试验设计 在单因素试验的基础上,以ACE抑制肽水解度为响应值,采用Box Behnken中心组合试验设计优化复合酶水解白酒糟蛋白条件。

1.3.9 总抗氧化能力

(1) DPPH自由基清除能力:采用DPPH自由基清除能力检测试剂盒测定。

(2) ABTS自由基清除能力:采用ABTS自由基清除能力检测试剂盒测定。

2 结果与分析

2.1 NaOH浓度对白酒糟粗蛋白提取效果的影响

由图1可知,随着NaOH浓度的增加白酒糟粗蛋白提取量先显著增加,当NaOH浓度达到0.10 mol/L后,增加

NaOH浓度粗蛋白提取量增加缓慢。尽管较高浓度的NaOH提取液所提取的粗蛋白量较多,但会造成碱液浪费,考虑到后续试验的可操作性及试剂用量,采用0.10 mol/L的NaOH溶液提取白酒糟粗蛋白。

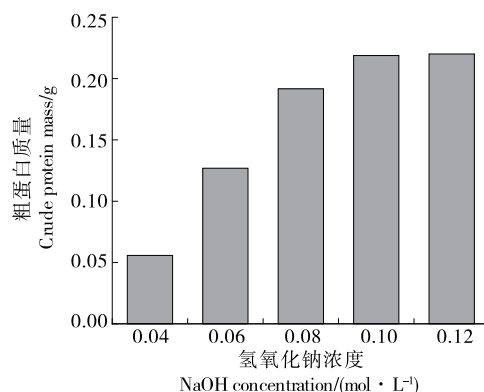


图1 不同碱液浓度下提取的白酒糟粗蛋白质量

Figure 1 The mass of crude protein extracted from distillery waste under different alkali liquor concentrations

2.2 白酒糟蛋白中游离氨基酸含量

经测定,白酒糟蛋白中游离氨基酸含量为0.181 7 mmol/L。

2.3 蛋白酶对ACE抑制肽水解度的影响

由图2可知,不同的蛋白酶对ACE抑制肽的水解度存在显著性差异,其中中性蛋白酶和木瓜蛋白酶水解酒糟蛋白制备ACE抑制肽的水解度较高,分别为55.27%, 49.21%。因此,选择这两种酶进行后续试验。

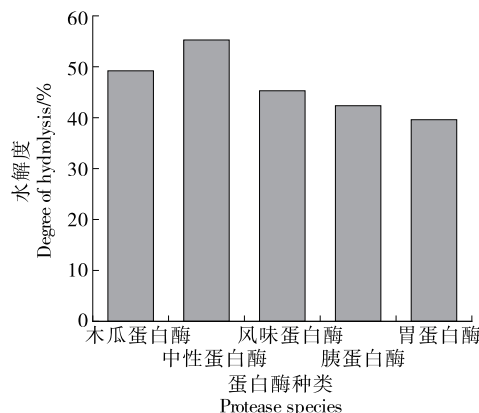


图2 蛋白酶对ACE抑制肽水解度的影响

Figure 2 Effects of proteases on the degree of hydrolysis of ACE inhibitory peptides

2.4 复合酶水解白酒糟蛋白单因素试验

2.4.1 复合酶比对ACE抑制肽水解度的影响 由图3可知,ACE抑制肽水解度随复合酶中性蛋白酶比例的增加呈先增加后减少的趋势。当 $V_{\text{木瓜蛋白酶}}:V_{\text{中性蛋白酶}}=3:1$ 时,

ACE抑制肽的水解度达最大值,为58.4%。随着复合酶中中性蛋白酶比例增加ACE抑制肽水解度下降。因此,后续试验按 $V_{\text{木瓜蛋白酶}}:V_{\text{中性蛋白酶}}=3:1$ 配制复合酶。

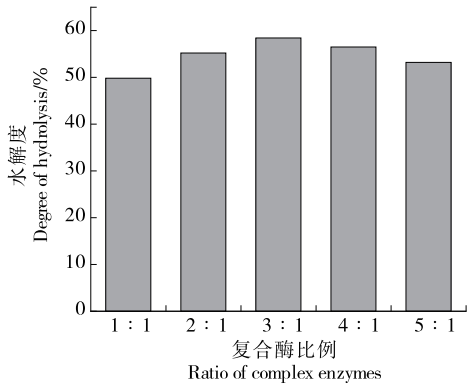


图3 复合酶比对ACE抑制肽水解度的影响
Figure 3 Effects of the ratio of compound enzymes on the degree of hydrolysis of ACE inhibitory peptide

2.4.2 酶解温度对ACE抑制肽水解度的影响 由图4可知,ACE抑制肽的水解度随着酶解温度的不断提升呈先升高后降低的趋势。当酶解温度为55℃时,其水解度最大值,为60.2%。因此,选择55℃作为响应面试验设计的中心点。

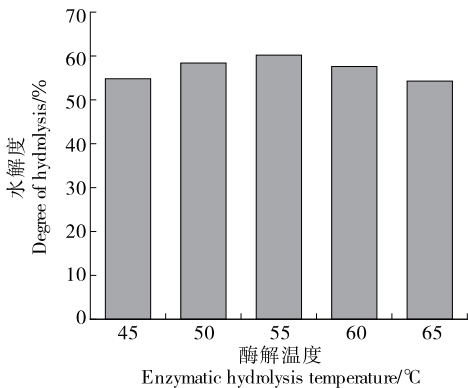


图4 酶解温度对ACE抑制肽水解度的影响
Figure 4 Effects of enzymatic hydrolysis temperature on the degree of hydrolysis of ACE inhibitory peptides

2.4.3 酶解pH对ACE抑制肽水解度的影响 由图5可知,当酶解pH从6.5增大时,ACE抑制肽水解度随酶解pH的升高而升高;当酶解pH增大到7.5时,ACE抑制肽水解度呈现最大值,为64.9%;当酶解pH继续增大时,ACE抑制肽水解度随酶解pH的升高而降低。因此,选择pH 7.5作为响应面试验设计的中心点。

2.4.4 酶解时间对ACE抑制肽水解度的影响 由图6可知,当酶解时间<2 h时,随酶解时间的增加,ACE抑制肽水解度显著增加;酶解时间2 h之后,ACE抑制肽水解度

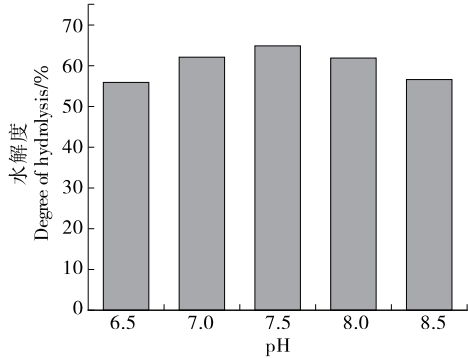


图5 酶解pH对ACE抑制肽水解度的影响
Figure 5 Effects of pH values on the degree of hydrolysis of ACE inhibitory peptides

增加不明显。尽管延长酶解时间白酒糟蛋白ACE抑制肽的水解度会较高,但考虑到试验效率及可操作性,以酶解时间2 h作为响应面设计的中心点。

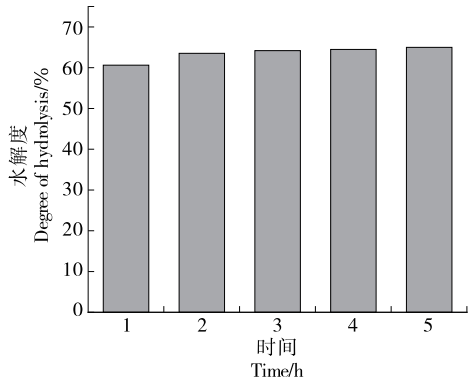


图6 酶解时间对ACE抑制肽水解度的影响
Figure 6 Effects of enzymatic hydrolysis time on the degree of hydrolysis of ACE inhibitory peptides

2.5 响应面法优化ACE抑制肽水解条件
2.5.1 多元二次方程模型的建立与检验 采用Box-Behnken中心组合试验设计变量及水平,进行17组试验,如表1、表2所示。使用Design Expert 8.0.6.1软件对试验数据进行分析 and 处理,得到回归方程:

$$Y=64.89+3.75X_1-0.49X_2+4.78X_3+0.96X_1X_2+1.15X_1X_3+1.30X_2X_3-5.77X_1^2-2.65X_2^2-6.05X_3^2。 \quad (3)$$

由表3可知,模型显著($P<0.01$),失拟项不显著($P=$

表1 Box-Behnken试验设计的变量及其水平

Table 1 Variables and levels of Box-Behnken experimental design			
水平	X ₁ 酶解温度	X ₂ 酶解时间	X ₃ 酶解 pH
—1	50	1	7.0
0	55	2	7.5
1	60	3	8.0

表2 Box-Behnken试验结果
Table 2 Box-Behnken test results

序号	X ₁	X ₂	X ₃	水解度/%
1	-1	-1	0	54.29
2	1	-1	0	59.63
3	-1	1	0	51.39
4	1	1	0	60.59
5	-1	0	-1	45.97
6	1	0	-1	51.79
7	-1	0	1	52.46
8	1	0	1	62.48
9	0	-1	-1	52.82
10	0	1	-1	48.23
11	0	-1	1	60.56
12	0	1	1	62.16
13	0	0	0	64.19
14	0	0	0	64.63
15	0	0	0	65.28
16	1	0	0	51.79
17	-1	1	0	51.39

0.303 6)。该模型的决定系数为0.996 6,修正决定系数为0.992 1。说明该模型可以解释99.21%的响应面变化。结果表明,该模型拟合良好,适用于白酒糟粗蛋白ACE抑制肽提取工艺的优化。

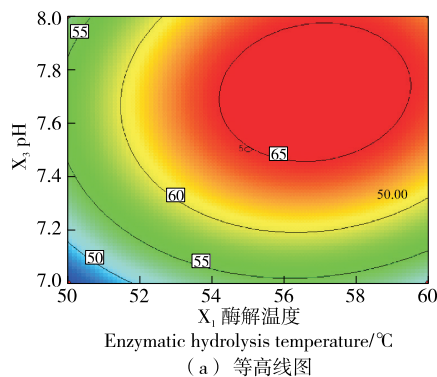


表3 方差分析†
Table 3 Variance analysis

来源	平方和	自由度	均方	F值	P值	显著性
模型	669.55	9	74.39	225.41	<0.000 1	**
X ₁	112.35	1	112.35	340.41	<0.000 1	**
X ₂	1.93	1	1.93	5.85	0.046 2	*
X ₃	182.88	1	182.88	554.12	<0.000 1	**
X ₁ X ₂	3.72	1	3.72	11.29	0.012 1	*
X ₁ X ₃	5.29	1	5.29	16.03	0.005 2	**
X ₂ X ₃	6.73	1	6.73	20.40	0.002 7	**
X ₁ ²	140.00	1	140.00	424.19	<0.000 1	**
X ₂ ²	29.54	1	29.54	89.51	<0.000 1	**
X ₃ ²	154.05	1	154.05	466.77	<0.000 1	**
残差	2.31	7	0.33			
失拟项	1.30	3	0.43	1.70	0.303 6	
纯误差	1.02	4	0.25			
总和	671.86	16				

† *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; $R^2 = 0.996\ 6$; $R^2_{Adj} = 0.992\ 1$ 。

2.5.2 响应面数据分析与优化 如图7~图9所示,酶解温度与酶解pH、酶解温度与酶解时间、酶解pH与酶解时间的等高线图均为椭圆形,表明温度与时间、pH的交互作用对ACE抑制肽水解度的影响显著。在各个影响因素中,酶解温度的响应面坡度最为陡峭,对ACE抑制肽的水解度影响最为显著,其次是酶解pH,最后是酶解时间。

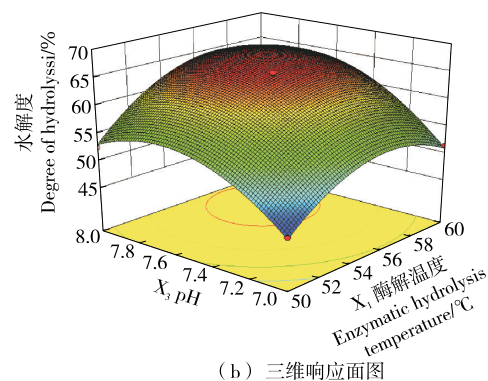


图7 酶解温度与酶解pH对ACE抑制肽水解度影响的等高线图及三维响应面图

Figure 7 Contour plot and three-dimensional response surface plot of the effects of enzymatic hydrolysis temperature and pH values on the degree of hydrolysis of ACE inhibitory peptides

2.5.3 最佳酶解参数的确定及回归模型的验证 通过响应面得到优化工艺为:酶解温度55.41 °C,酶解pH 7.72,酶解时间2.38 h,其ACE抑制肽水解度达到了66.62%。为实际操作简便性,调整酶解pH为7.5,酶解温度为55 °C,酶解时间为2 h,在此条件下进行3组平行验证实验,其ACE抑制肽水解度分别为64.250 8%,64.281 2%,64.268 0%,平均值为(64.25±0.02)%,与试验获得的理论

值接近。因此,响应面法得到的优化工艺参数准确可靠。

2.6 酶解时间对ACE抑制肽抑制活性的影响

以复合酶($V_{\text{木瓜蛋白酶}}:V_{\text{中性蛋白酶}}=3:1$)添加量,酶解温度60 °C,酶解pH 7.5的条件进行酶解,于不同时间点(0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 h)采集等体积的酶解液,并将其在-20 °C下真空冷冻干燥10 h后,取冻干品配制质量浓度为1.0 mg/mL的溶液并测定其ACE抑制率。由图10可

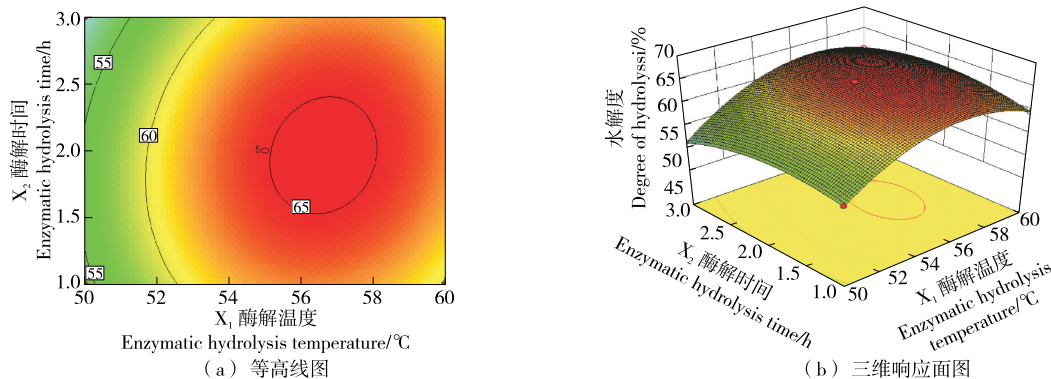


图 8 酶解温度与酶解时间对 ACE 抑制肽水解度影响的等高线图及三维响应面图

Figure 8 Contour diagram and three-dimensional response surface diagram of the effects of enzymatic hydrolysis temperature and time on the hydrolysis degree of ACE inhibitory peptide

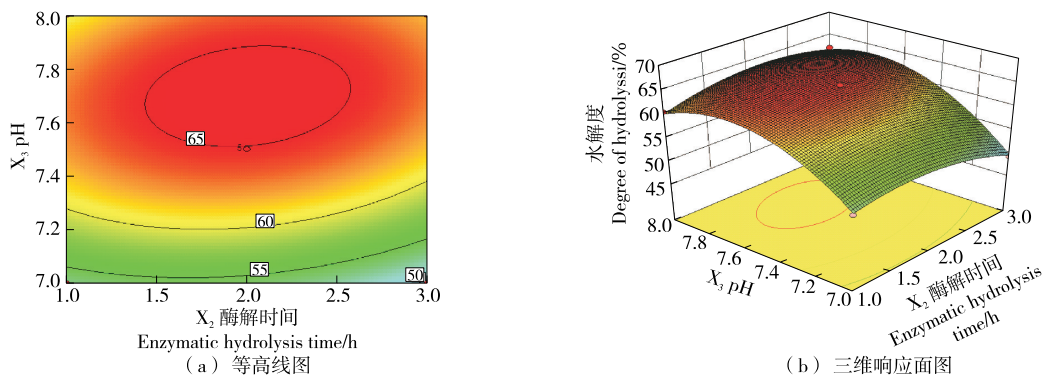


图 9 酶解 pH 与酶解时间对 ACE 抑制肽水解度影响的等高线图及三维响应面图

Figure 9 Contour plot and three-dimensional response surface diagram of the effects of enzymatic hydrolysis pH values and time on the degree of hydrolysis of ACE inhibitory peptides

知,复合酶解液的 ACE 抑制率总体上随时间延长先升高后降低,酶解 3 h 时显示最高的 ACE 抑制活性(79.05%)。在 5 h 的酶解反应过程中,复合蛋白酶酶解液的 ACE 抑制率在后期略有下降,表明白酒糟蛋白酶在酶解后释放的 ACE 抑制肽可被进一步水解为氨基酸。

2.7 白酒糟 ACE 抑制肽抗氧化活性

由表 4 可知,白酒糟 ACE 抑制肽对 DPPH 自由基清除率为 $(2.078 \pm 0.092)\%$,对 ABTS 自由基清除率为 $(3.226 \pm 0.241)\%$ 。而 DPPH 法的标准曲线为 $y = 1.4144x - 0.0081$ ($R^2 = 0.9977$),其中 x 为 Trolox 浓度($\mu\text{mol/mL}$), y 为吸光值差值 ΔA ,将 ΔA 平均数值代入得到 ACE 抑制肽的抗氧化剂 Trolox 浓度,即总抗氧化能力为 $1.161 \mu\text{mol/mL}$; ABTS 法的标准曲线为 $y = -1.1661x + 1.5022$ ($R^2 = 0.9951$),其中 x 为 Trolox 浓度(mmol/L), y 为吸光值差值 ΔA ,将 ΔA 平均数值代入得到 ACE 抑制肽的抗氧化剂 Trolox 浓度,即总抗氧化能力为 1.255 mmol/L 。

3 结论

采用超声波辅助碱提酸沉法从白酒糟中提取蛋白质,得到酒糟粗蛋白提取液浓度为 0.10 mol/L ,蛋白中游离

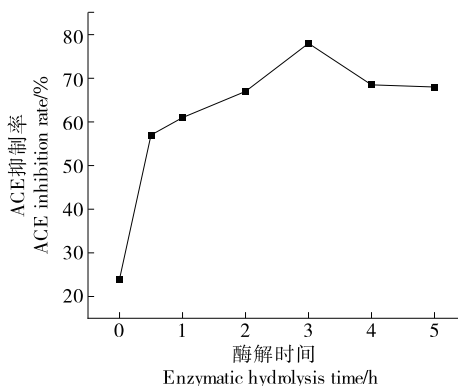


图 10 复合蛋白酶酶解时间对 ACE 抑制肽抑制活性的影响

Figure 10 The effect of enzymolysis time of composite protease on the inhibitory activity of ACE inhibitory peptides

氨基酸含量为 0.1817 mmol/L 。以血管紧张素转换酶抑制肽的水解度为指标,从 5 种蛋白酶中得出木瓜蛋白酶和中性蛋白酶有较高的血管紧张素转换酶抑制肽的水解度,将木瓜蛋白酶和中性蛋白酶采用复合酶法对白酒糟

表4 白酒糟ACE抑制肽抗氧化活性

Table 4 The antioxidant activity of ACE inhibitory peptides form distillery waste

方法	空白吸光度	测定吸光度	自由基清除率/%	平均清除率/%
DPPH法	1.668	1.635	1.978	2.078±0.092
		1.633	2.098	
		1.632	2.158	
ABTS法	1.203	1.167	2.992	3.226±0.241
		1.209	3.474	
		1.214	3.212	

粗蛋白进行酶解,通过单因素试验和响应面试验分析,确定最佳酶解参数为酶解温度 55℃,酶解 pH 7.5,酶解时间 2 h,在此条件下,血管紧张素转换酶抑制肽水解度为 64.25%。复合蛋白酶酶解 3 h后得到最高的血管紧张素转换酶抑制活性(79.05%),血管紧张素转换酶抑制肽对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基清除率分别为 2.078%, 3.226%。基于此进一步研究和开发利用白酒糟中的高附加值成分,以探索白酒糟的潜在应用。

参考文献

- [1] WANG C J, LIU Y, XU L, et al. Changes of the main components, physicochemical properties of distiller's grains after extrusion processing with focus on modification mechanism[J]. Food Chemistry, 2022, 390: 133187.
- [2] SONG W T, FU J X, ZENG Q, et al. Improving ACE inhibitory activity of hazelnut peptide modified by plastein: physicochemical properties and action mechanism[J]. Food Chemistry, 2023, 402: 134498.
- [3] BRAI A, IMMACOLATA TRIVISANI C, VAGAGGINI C, et al. Proteins from Tenebrio molitor: an interesting functional ingredient and a source of ACE inhibitory peptides[J]. Food Chemistry, 2022, 393: 133409.
- [4] ZHANG L M, JIANG Y S, YIN Z T, et al. Isolation and evaluation of two angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from fermented grains (Jiupei) used in Chinese Baijiu production[J]. RSC Adv, 2018, 8(65): 37 451-37 461.
- [5] CONNOLLY A, O'KEEFFE M B, PIGGOTT C O, et al. Generation and identification of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from a brewers' spent grain protein isolate[J]. Food Chemistry, 2015, 176: 64-71.
- [6] WEI D, FAN W L, XU Y. 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: 129521.
- [7] 郭宇,文诗雨,倪策,等. 扇贝加工副产物中蛋白质提取及其酶解物抗氧化活性分析[J]. 食品与机械, 2022, 38(11): 176-183.

GUO Y, WEN S Y, NI C, et al. Analysis of protein extraction and antioxidant activity of enzymatic hydrolysate in scallop processing by-products[J]. Food & Machinery, 2022, 38(11): 176-183.

- [8] 李贺军,张承屏. 双指示剂结合甲醛法分步测定氟化氢铵及氟化铵[J]. 磷肥与复肥, 2014, 29(2): 56-58.
- LI H J, ZHANG C P. The dual indicators combined with the formaldehyde method were used to determine ammonium bifluoride and ammonium fluoride in steps[J]. Phosphate Fertilizer & Compound Fertilizer, 2014, 29(2): 56-58.
- [9] 石杰,宋淑敏,魏连会,等. 碱提酸沉法提取汉麻籽蛋白粉的优化[J]. 食品工业, 2021, 42(9): 4-6.
- SHI J, SONG S M, WEI L H, et al. Optimization of alkali extraction acid precipitation method for extracting hemp seed protein powder[J]. Food Industry, 2021, 42(9): 4-6.
- [10] 张兆丽. 碱提米渣分离蛋白过程中赖丙氨酸的生成及超声波技术控制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020: 37.
- ZHANG Z L. Study on the generation of lysine in the process of protein isolation from alkaline rice residue and its ultrasonic technology[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2020: 37.
- [11] 宋明洋,刘晓兰. 双酶法制备豌豆肽及其抗氧化活性[J]. 食品工业, 2020, 41(4): 108-112.
- SONG M Y, LIU X L. Preparation of pea peptides and their antioxidant activity by double enzymatic method[J]. Food Industry, 2020, 41(4): 108-112.
- [12] 郭鹏辉,高丹丹,常生华,等. 双酶法水解苜蓿蛋白制备ACE抑制肽的工艺条件优化[J]. 草业科学, 2020, 37(8): 1 627-1 637.
- GUO P H, GAO D D, CHANG S H, et al. The process conditions for the preparation of ACE inhibitory peptides by double enzymatic hydrolysis of alfalfa protein were optimized [J]. Pratacultural Science, 2020, 37(8): 1 627-1 637.
- [13] 王睿,贡建民. 超声波辅助酶法水解双孢菇蛋白制备ACE抑制肽的研究[C]// 中国食品科学技术学会. 中国食品科学技术学会第十七届年会摘要集. [发布地不详]: 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 2020: 2.
- WANG R, YUAN J M. Study on the preparation of ACE inhibitory peptides by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of Agaricus bisporus protein[C]// Chinese Society of Food Science and Technology. Abstract Collection of the 17th Annual Conference of Chinese Society of Food Science and Technology. [S. l.]: College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, 2020: 2.
- [14] 许腾,卢聪,范海茹,等. 酶解法制备豆粕水解肽工艺优化[J]. 核农学报, 2019, 33(9): 1 783-1 788.
- XU T, LU C, FAN H R, et al. Optimization of the process of preparing soybean meal hydrolyzed peptides by enzymatic hydrolysis[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(9): 1 783-1 788.
- [15] LAI X F, PAN S S, ZHANG W J, et al. Properties of ACE inhibitory peptide prepared from protein in green tea residue and evaluation of its anti-hypertensive activity[J]. Process Biochemistry, 2020, 92: 277-287.