

珍珠贝水解肽的制备、氨基酸组成及抗炎活性

Preparation, amino acid composition and anti-inflammatory activity of hydrolyzed peptides from *Pinctada martensii*

沈金鹏¹ 王珂雯¹ 黄潘钊¹ 陈冰冰¹ 夏 珍¹

SHEN Jin-peng¹ WANG Ke-wen¹ HUANG Pan-tian¹ CHEN Bing-bing¹ XIA Zhen¹

李应坤² 王湘华² 曹 庸¹ 苗建银¹ 林碧敏³

LI Ying-kun² WANG Xiang-hua² CAO Yong¹ MIAO Jian-yin¹ LIN Bi-min³

(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. 北海黑珍珠海洋生物科技有限公司, 广西 北海 536000;

3. 华南农业大学基础实验与实践训练中心, 广东 广州 510642)

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Nutraceuticals and Functional Foods, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 2. Beihai Black Pearl Marine Biotechnology Co., Ltd., Beihai, Guangxi 536000, China; 3. Basic Experimental and Practical Training Center, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

摘要:目的:高值化利用马氏珠母贝肉生物活性成分及马氏珠母贝肉抗炎活性肽。方法:以马氏珠母贝肉为原料,以水解度(DH)为指标,通过单因素试验和响应面试验优化珍珠贝水解肽工艺制备,并对珍珠贝水解肽的氨基酸组成和抗炎活性进行评价分析。结果:中性蛋白酶为最适酶,酶解最优工艺条件为料液比 1:1 (g/mL),酶解温度 46.3 °C,酶解时间 1.4 h,酶底比 0.3%,此时水解度为 22.88%,与理论值无显著差异,回归模型可靠。酶解物中必需氨基酸含量达 19.84%,疏水性氨基酸含量占比 21.19%,带正电荷氨基酸含量为 10.46%。在 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 抗炎模型中,珍珠贝水解肽在 0~4.0 mg/mL 的质量浓度范围内无细胞毒性且有利于巨噬细胞增殖。质量浓度为 2.0 mg/mL 时,珍珠贝水解肽可有效抑制 NO 的产生,以及细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的生成,NO 抑制率达到 70.00%,TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 抑制率分别达到 83.01%,85.04%,83.11%。

结论:珍珠贝水解肽的氨基酸种类齐全,其能有效抑制 RAW264.7 巨噬细胞 NO 及细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的产生,表现出良好的抗炎活性。

关键词:马氏珠母贝;酶解工艺;水解肽;氨基酸组成;抗炎活性

Abstract: **Objective:** This study aimed to realize the high-value utilization of biological active ingredients and anti-inflammatory peptides from the *Pinctada martensii* meat. **Methods:** The hydrolysis process of the *P. martensii* meat was optimized by single factor test and response surface test with degree of hydrolysis (DH) as the index. The amino acid composition and anti-inflammatory activity of *P. martensii* meat hydrolysate peptides were evaluated and analyzed. **Results:** The results showed that neutral protease was the optimal enzyme, and the optimal hydrolysis conditions were solid-liquid ratio 1 : 1 (g/mL), temperature 46.3 °C, hydrolysis time 1.4 h, and substrate ratio 0.3%. The hydrolysis degree was 22.88%, which was not significantly different from the theoretical value, and the regression model was reliable. The hydrolysates including 19.84% of essential amino acids, 21.19% of hydrophobic amino acids and 10.46% of positively charged amino acids. In LPS induced RAW264.7 anti-inflammatory model of mouse macrophages, the hydrolyzed peptide of *P. martensii* had no cytotoxicity and was beneficial to the proliferation of macrophages in the mass concentration range of 0~4.0 mg/mL. At the mass concentration of 2.0 mg/mL, hydrolyzed peptide could effectively

基金项目:广西创新驱动发展专项资金项目(编号:桂科 AA19254027,桂科 AA19254027-1);广西重点研发计划(编号:桂科 AB21220065)

作者简介:沈金鹏,男,华南农业大学在读硕士研究生。

通信作者:苗建银(1981—),男,华南农业大学副教授,博士。

E-mail: miaojy8181@scau.edu.cn

林碧敏(1980—),女,华南农业大学实验师,硕士。

E-mail: linbiming007@163.com

收稿日期:2022-06-13 **改回日期:**2022-09-15

inhibit the production of NO and inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β ; the inhibition rate of NO, TNF- α , IL-6 and IL-1 β was 70.00%, 83.01%, 85.04% and 83.11%, respectively.

Conclusion: Hydrolytic peptide of *P. martensii* has a complete range of amino acids, which can effectively inhibit the production of NO and inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-1 β in RAW264.7 macrophages, showing good anti-inflammatory activity.

Keywords: *Pinctada martensii*; enzymatic hydrolysis process; hydrolytic peptides; amino acid composition; anti-inflammatory activity

炎症是机体免疫系统对创伤、微生物病原体感染或化学刺激引起的组织损伤和感染而做出的一种保护性生理防御机制^[1]。巨噬细胞是动物机体内最重要的免疫细胞,也是机体防御反应的重要组成部分,当机体受到外界因素刺激时,活化的巨噬细胞能通过 MAPK 和 NF- κ B 等通路释放多种炎症细胞因子发挥免疫调节作用,包括促炎介质,如一氧化氮(NO)以及促炎细胞因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等^[2],这些炎症因子在诱发多种炎症性疾病的过程中发挥着关键作用。炎症免疫反应的失调会导致促炎介质和细胞因子的过度积累,可能诱发机体功能性障碍以及多种急性、慢性疾病,如动脉粥样硬化、癌症、类风湿性关节炎、急性肠胃炎和过敏等。因此,抑制活化巨噬细胞中的促炎介质和细胞因子有助于炎症性疾病的治疗^[3-4]。近年来,抑制炎症细胞因子的合成或活性已成为炎症治疗的主流,促炎细胞因子抑制剂可作为抗炎药的候选药物^[5]。最常用的治疗药物是类固醇、非类固醇抗炎药和单克隆抗体^[6],但其中许多药物都伴有不良副作用,如降低组织的可修复性和损伤胃肠黏膜,且炎症相关疾病发病率的增加促使人们寻找具有抗炎特性的天然化合物。在炎症反应中发现的几种内源性多肽,如血管活性肠肽(VIP)、 α -促黑素细胞激素(α MSH)和肾上腺髓质素等已成为抗炎剂,可用于炎症和自身免疫疾病的新疗法^[5,7-8],且几种合成肽和天然肽,如鲟鱼肉水解肽^[9]、牡蛎水解肽^[10]、鸡肉蛋白水解肽^[11]等已被证实可通过抑制炎症细胞因子的产生或表达信号转导途径,来防止过度的炎症反应。

马氏珠母贝(*Pinctada martensii*)又称合浦珠母贝,是中国沿海地区珍珠养殖的主要品种之一^[12]。马氏珠母贝肉营养成分丰富,富含多种功效氨基酸和活性肽,具有抗氧化、抗衰老、抗疲劳等药理作用^[13]。然而取珠后的新鲜贝肉仅作为动物饲料,原料附加值较低,有待深入研究和高值化开发利用^[14]。

研究利用蛋白酶对马氏珠母贝肉进行酶解,探究酶解制备活性肽的最优工艺参数和条件,并利用小鼠巨噬

细胞 RAW264.7 抗炎评价模型对珍珠贝水解肽进行活性评价,以期为马氏珠母贝肉生物活性成分的高值化利用提供理论依据,为马氏珠母贝肉抗炎活性肽的开发提供技术参数。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

马氏珠母贝肉:北海黑珍珠海洋生物科技有限公司;
中性蛋白酶(10 万 U/g)、胰蛋白酶(25 万 U/g)、碱性蛋白酶(20 万 U/g)和木瓜蛋白酶(20 万 U/g):食品级,南宁庞博生物工程有限公司;

三硝基苯磺酸(TNBS):分析纯,成都化夏化学试剂有限公司;

噻唑蓝(MTT):分析纯,上海麦克林生物化学公司;
脂多糖(LPS)、二甲基亚砜(DMSO):生化试剂,美国 Sigma 公司;

DMEM 培养基、胎牛血清(FBS):生化试剂,赛默飞世尔科技公司;

小鼠巨噬细胞 RAW264.7:中科院上海细胞所;
其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

数显恒温水浴锅:HH-4 型,金坛市华城海龙实验仪器厂;

多管架自动平衡离心机:L530 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

电子天平:AL104 型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

pH 计:PHS-3CW 型,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

多功能酶标仪:Enspire2300 型,美国 PerkinElmer 公司;

微量振荡器:MH-2 型,海门其林贝尔仪器制造有限公司;

真空冷冻干燥机:FD-1 型,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;

全自动氨基酸分析仪:S-433D 型,赛卡姆(北京)科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 马氏珠母贝肉酶解物的制备 马氏珠母贝肉洗净沥干,打碎成贝肉匀浆,置于一20℃冷冻保存。试验时解冻,称取一定量贝肉匀浆,按料液比1:1(g/mL)加入一级水,用0.1 mol/L NaOH 调节溶液 pH 值至最适 pH 值,按酶底比0.3%加入蛋白酶,在恒温水浴锅中酶解3 h,酶解过程中每30 min 搅拌混匀酶解液,90℃水浴灭酶10 min,冷却至室温,4 000 r/min 离心10 min,取上清液测定水解度。将上清液置于一20℃冻结后,进行冷冻干

燥,得到珍珠贝水解肽冻干粉,于-20℃冻藏备用。

1.3.2 酶解工艺优化

(1) 最适酶的筛选:各蛋白酶最适条件见表 1,在各种蛋白酶最适条件下按 1.3.1 进行酶解。

表 1 4 种蛋白酶的最适酶解条件

Table 1 Optimal enzymolysis conditions for four kinds of proteases

种类	最适酶解温度/℃	最适酶解 pH 值
中性蛋白酶	40~45(45)	6.0~7.5(7.0)
碱性蛋白酶	45~55(50)	8.5~10.5(9.0)
木瓜蛋白酶	55~60(55)	6.0~7.0(7.0)
胰蛋白酶	35~45(45)	7.5~8.0(8.0)

(2) 单因素试验:选择水解度最高的一种蛋白酶对影响水解度的 4 个因素(酶解温度、酶解时间、酶底比和料液比)进行优化,以水解度为评价指标,初始条件选取:酶底比 0.3%、料液比 1:3 (g/mL)、酶解温度 45℃和酶解时间 3 h。主要优化条件:酶底比(0.1%,0.2%,0.3%,0.4%,0.5%),料液比[1:1,1:2,1:3,1:4,1:5 (g/mL)],酶解温度(35,40,45,50,55℃),酶解时间(1,2,3,4,5 h),各组试验均重复 3 次,数据取平均值。

(3) 响应面法优化酶解工艺:根据单因素试验结果,使用 Design-Expert V8.0.6 软件进行响应面分析,以水解度指标为响应值进行 Box-Behnken 设计,建立三因素三水平的响应面分析试验,对显著性影响因素进行优化,筛选出最优酶解工艺条件。

(4) 水解度的测定:采用 TNBS 法测定蛋白质水解度。根据 Adler-Nissen 等^[15-16]的方法,略作修改。以 L-亮氨酸作标准品绘制标准曲线。取酶解上清液 0.125 mL,加入 1 mL pH 8.2,0.2 mol/L PBS 和 1 mL 0.1% TNBS,50℃恒温避光反应 1 h,冷却至室温后加入 2 mL 0.1 mol/L HCl 并振荡使反应完全终止,340 nm 下测定吸光值。按式(1)计算水解度^[17]。

$$K = \frac{y(B-A) \times 0.16}{m \times P \times H_{\text{tot}}} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

K ——水解度,%;

y ——亮氨酸浓度,mmol/L;

B ——样品在 340 nm 下的吸光值;

A ——去离子水在 340 nm 下的吸光值;

m ——酶解样品的质量,g;

P ——酶解样品中的蛋白质含量,g/g;

H_{tot} ——蛋白质总肽键数,7.85 mmol/g 蛋白质。

1.3.3 蛋白质含量测定 按 GB 5009.5—2016 中的凯氏定氮法执行。

1.3.4 氨基酸组成分析 采用氨基酸自动分析仪。

1.3.5 抗炎活性评价

(1) 细胞培养:小鼠巨噬细胞 RAW264.7 用含 10% FBS、1% 双抗的 DMEM 培养基置于 5% CO₂、37℃细胞培养箱中培养,待细胞生长至对数生长期进行传代。当细胞铺板率大于培养瓶面积的 80%时,吸尽原培养基,3 mL PBS 缓冲液洗涤细胞两次,移液枪吸取培养液 2 mL 吹打细胞至完全脱落,细胞计数,根据计数结果调整细胞悬液浓度,接种至孔板中,置于恒温培养箱中培养。

对细胞设计试验分组:空白组以完全培养基孵育;模型组以 1 μg/mL 的 LPS 孵育;试验组以不同浓度的待测样品加 LPS(1 μg/mL)。每组设置 3 个复孔。

(2) MTT 法测定细胞存活率:采用 MTT 法评估样品对细胞的毒性作用。调整细胞浓度至 1×10^4 个/mL,按每孔 100 μL 将细胞接种于 96 孔板中,培养 24 h 后吸尽原培养液,用 PBS 洗涤细胞两次,试验组分别加入含不同质量浓度的珍珠贝水解肽的完全培养基(0.125,0.25,0.5,1.0,2.0,4.0 mg/mL) 100 μL,空白组加入等量的完全培养基,每组设 6 个复孔,继续培养 24 h 后,每孔加入 100 μL MTT 溶液(0.5 mg/mL)并在培养箱中孵育 4 h。弃去 MTT 溶液后用 PBS 洗净,每孔加入 150 μL 的 DMSO 完全溶解固体物质,震荡 10 min 使结晶充分溶解,使用酶标仪测定 490 nm 下每孔的吸光值(A),按式(2)计算细胞存活率。

$$S = \frac{A_1 - A_0}{A_2 - A_0} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

S ——细胞存活率,%;

A_0 ——空白组吸光值;

A_1 ——试验组吸光值;

A_2 ——模型组吸光值。

(3) NO 浓度测定:采用 Griess 法对 RAW264.7 细胞的 NO 释放量水平进行测定。调整 RAW264.7 细胞浓度为 1×10^5 个/mL,每孔 500 μL 接种至 24 孔板,置于培养箱孵育过夜,吸尽原培养基,空白组和模型组加入 500 μL 完全培养基,试验组加入 500 μL 含不同浓度的珍珠贝水解肽的完全培养基(0.125,0.25,0.5,1.0,2.0 mg/mL),置于培养箱中继续培养 12 h 后,吸尽原培养基并用 PBS 洗涤两次,模型组和试验组每孔加入 500 μL 1 μg/mL 的 LPS 溶液,空白组加入等量的完全培养基,继续培养 24 h,收集上清液,在 96 孔板按 50 μL/孔中加入样品上清液,各孔中分别加入 50 μL Griess Reagent I 试剂和 Griess Reagent II 试剂,震荡混合均匀,于 450 nm 测定吸光值。

(4) ELISA 法测定细胞因子含量:按照 ELISA 测定试剂盒说明书操作,测定细胞培养上清液中的各细胞因子含量。酶标板上加入 100 μL 培养上清液,贴上封板膜后在 37℃下避光孵育 90 min,弃去液体,加入 350 μL 洗涤液,静止 30 s 后弃去,在吸水纸上拍干,重复 5 次。加

入 100 μL 生物素抗体工作液,贴上封板膜后 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h,洗板 5 次。加入 100 μL 酶结合物工作液,贴上封板膜后 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min,洗板 5 次。加入 100 μL 显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 15 min 后,加入 100 μL 反应终止液,450 nm 处测定吸光值。根据浓度和 OD 值算出标准曲线的回归方程,计算样品中各细胞因子含量。

1.4 数据分析

各试验进行 3 次平行,数据取平均值。统计分析采用 SPSS 20.0 软件 (IBM SPSS, USA) 进行单因素方差 (ANOVA) 和 Duncan 法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

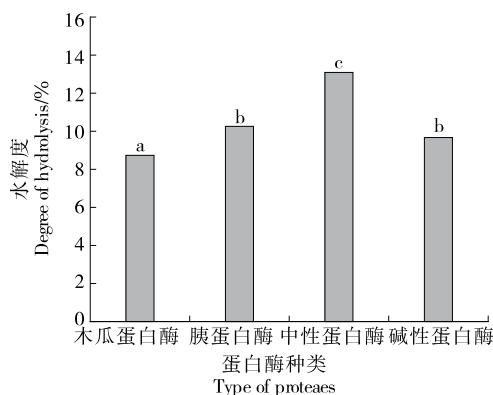
2.1 蛋白酶的筛选

由图 1 可以看出,4 种蛋白酶对贝肉的水解程度略有差异。由于酶的专一性,每种酶的酶切位点特定,酶解同一原料所得到的多肽,在肽序列、空间结构和分子量大小等方面具有很大差异,导致水解度也不同^[18]。中性蛋白酶对马氏珠母贝肉水解程度最高,为 13.09%,故选择中性蛋白酶为最适蛋白酶。

2.2 单因素试验

2.2.1 酶底比对蛋白水解度的影响 由图 2 可以看出,随着酶底比增大,水解度呈先增加后降低的趋势,该结果与马骏等^[19]在制备啤酒抗氧化肽时的酶解效果相似,出现这种趋势可能是由于酶底比小,底物与蛋白酶不能充分结合,导致反应速度慢;随着酶底比增大,底物与酶的接触率增加,反应速度随之加快;但当酶与底物结合位点趋于饱和后,过多的酶反而会出现竞争性抑制或酶自身相互水解,导致酶活力降低,影响体系反应速度,水解度下降^[20]。当酶底比为 0.3% 时,水解度最高为 13.58%,因此最适酶底比为 0.3%。

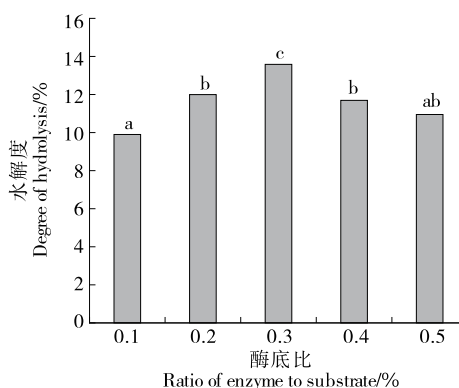
2.2.2 酶解温度对水解度的影响 由图 3 可以看出,随着温度的增加,水解度呈先增加后逐渐下降的趋势,当酶



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 1 不同蛋白酶对蛋白水解度的影响

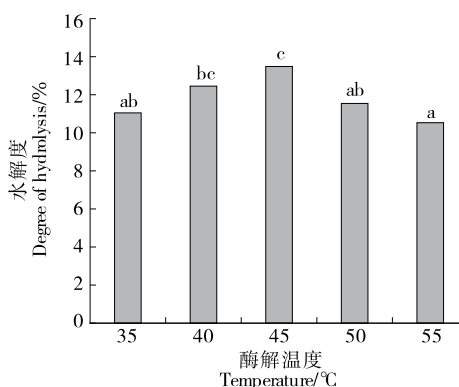
Figure 1 Effects of different proteases on the degree of proteolysis



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 2 酶底比对蛋白水解度的影响

Figure 2 Effects of enzyme-to-substrate ratio on the degree of proteolysis



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

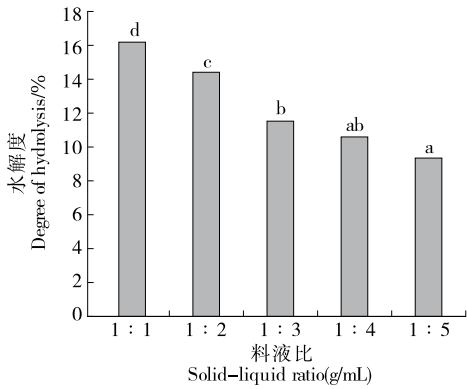
图 3 酶解温度对蛋白水解度的影响

Figure 3 Effects of temperature on the degree of proteolysis

解温度为 45 $^{\circ}\text{C}$ 时,水解度达到最大值为 13.48%,酶解温度达到 45 $^{\circ}\text{C}$ 后水解度呈逐渐降低的趋势。这是由于中性蛋白酶有其合适的反应温度范围,温度过高可能会影响酶的稳定性,破坏酶的特定空间结构,导致酶活性降低,酶解速度下降,进而使水解程度下降^[21]。因此,选择 45 $^{\circ}\text{C}$ 作为最适的酶解温度。

2.2.3 料液比对水解度的影响 由图 4 可以看出,水解度因料液比的不同而差异明显。水解度与料液比呈负相关,料液比的提高会使水解度不断下降,由于料液比增大时,酶浓度被稀释,单位体积内酶含量降低,底物与酶的结合位点变少,使酶解效果受抑制^[22],同时随着料液比的提高,单位体积内酶解出来的多肽浓度降低,从而导致水解度下降。当料液比为 1 : 1 (g/mL) 时,水解度最高,为 16.15%。因此,选择 1 : 1 (g/mL) 为最适料液比。

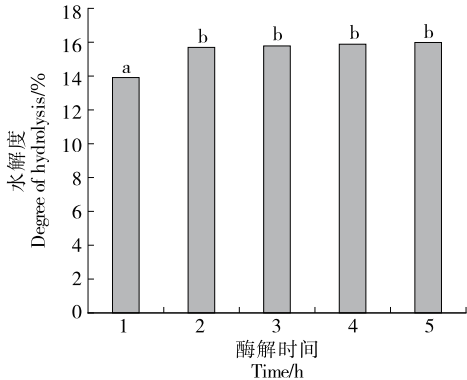
2.2.4 酶解时间对水解度的影响 由图 5 可以看出,水解度随着酶解时间的延长呈先增加后逐渐平缓的趋势,与刘东伟等^[23]和张维等^[24]的研究结果一致,酶解时间在



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 4 料液比对蛋白水解度的影响

Figure 4 Effects of solid-to-liquid ratio on the degree of proteolysis



小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)

图 5 酶解时间对蛋白水解度的影响

Figure 5 Effects of time on the degree of proteolysis

1~2 h 时对水解度的影响较为显著,之后保持稳定。这是因为酶解前期随着酶解时间的增加,酶更容易与底物接触,水解度快速增长,一定时间后,随着底物浓度的降低,可水解的特定部位也随之减少,水解度的增幅也随之降低^[25]。因此,选择 2 h 为最适酶解时间。

2.3 响应面实验

2.3.1 模型建立与显著性检验 在单因素试验结果的基础上,选取酶底比、酶解温度、酶解时间进行三因素三水平的响应面优化试验。响应面实验设计见表 2。以水解度为响应值,酶底比、酶解温度、酶解时间为自变量,分析马氏珠母贝肉酶解的最优工艺指标。试验结果见表 3。

对表 3 数据进行回归拟合,从而得到 3 个因素的二

表 2 响应面实验设计

Table 2 Code and level of factors chosen

水平	A 酶底比/%	B 酶解温度/℃	C 酶解时间/h
-1	0.2	40	1
0	0.3	45	2
1	0.4	50	3

表 3 响应面实验结果

Table 3 Results of factors chosen

试验号	A	B	C	Y 水解度/%
1	1	0	-1	19.09
2	0	-1	-1	18.63
3	-1	0	1	17.37
4	0	1	1	17.72
5	0	1	-1	20.51
6	0	0	0	22.18
7	-1	1	0	17.32
8	1	1	0	19.65
9	0	0	0	22.38
10	1	-1	0	18.48
11	0	0	0	21.02
12	0	-1	1	18.33
13	-1	0	-1	19.44
14	0	0	0	21.10
15	1	0	1	19.44
16	0	0	0	20.05
17	-1	-1	0	14.02

次多项回归模型为:

$$Y = 21.36 + 1.06A + 0.72B - 0.60C - 0.53AB + 0.61AC - 0.62BC - 1.98A^2 - 2.02B^2 - 0.55C^2$$
 (3)

为检验该回归方程的有效性,对其进行显著性分析,结果见表 4。

表 4 回归模型及方差分析[†]

Table 4 Variance analysis for regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	58.14	9	6.46	5.44	0.018 0	*
A	9.05	1	9.05	7.63	0.028 0	*
B	4.12	1	4.12	3.47	0.104 8	
C	2.89	1	2.89	2.44	0.162 5	
AB	1.13	1	1.13	0.96	0.360 9	
AC	1.46	1	1.46	1.23	0.303 5	
BC	1.55	1	1.55	1.31	0.290 7	
A ²	16.47	1	16.47	13.87	0.007 4	**
B ²	17.10	1	17.10	14.40	0.006 8	**
C ²	1.26	1	1.26	1.06	0.336 8	
残差	8.31	7	1.19			
失拟项	4.73	3	1.58	1.76	0.293 3	
纯误差	3.58	4	0.90			
总和	66.45	16				

[†] ** 表示影响极显著 ($P < 0.01$); * 表示影响显著 ($P < 0.05$); CV 为 5.67%。

由表 4 可知,回归模型 $P < 0.05$,说明试验数据与模型相符;失拟项对应的 $P = 0.293\ 3 > 0.05$,表明所得方程与实际拟合中非正常误差所占比例较小,方程可行。通过对回归方程的显著性分析可以看出,A 对响应值影响显著($P < 0.05$), A^2 和 B^2 对响应值的影响极显著($P < 0.01$),由此可知试验因子对响应值不是简单的线性关系,并且酶底比对水解度有极显著影响。

2.3.2 响应面交互作用分析 从图 6 可以看出,酶底比和酶解温度曲面坡度较大,酶解温度在 40~46 °C 时及酶底

比在 0.2%~0.3% 时坡度更陡,之后趋于平缓,说明酶解温度的二次项和酶底比的二次项对水解度的影响显著。酶解时间和酶底比、酶解时间和酶解温度曲面均有一定的坡度,但酶解时间曲面坡度趋于平缓,说明酶底比和酶解温度对水解度的影响较大,酶解时间对水解度的影响较小。

2.3.3 验证实验 经 Design-Expert V8.06 软件分析得到的最佳酶解条件为酶底比 0.32%、酶解时间 1.38 h、酶解温度 46.27 °C,在此条件下,水解度预测值为 21.71%。为了验证响应面法的可行性,采用得到的最优酶解条件进

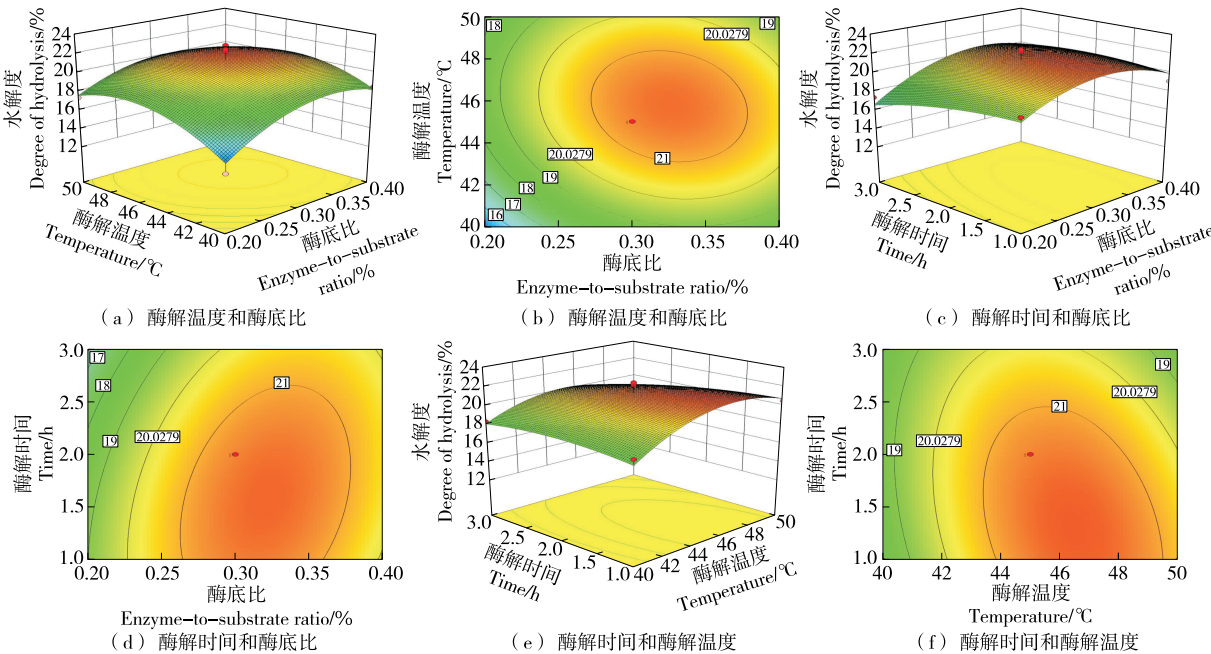


图 6 各因素之间交互作用的响应曲面图

Figure 6 Response surface diagrams for interaction of various factors

行验证实验,同时考虑到实际因素,修正工艺参数为:酶底比 0.32%、酶解时间 1.4 h、酶解温度 46.3 °C,进行 3 次重复实验得到的水解度为 $(22.88 \pm 0.90)\%$,与预测值无显著性差异。因此,通过响应面法优化提取珍珠贝水解肽的酶解条件是可行的,回归模型较可靠。

2.4 氨基酸组成分析

如表 5 所示,酶解物中氨基酸种类齐全,必需氨基酸(EAA)含量为 19.84%。活性肽的功能活性与其特殊的氨基酸以及排列顺序有关,具有抗炎活性的肽富含疏水性和带正电的氨基酸,尤其是在 N 端或 C 端,其中疏水性高的氨基酸可促进多肽与细胞膜之间的相互作用,并起到调节信号通路的作用,使多肽更容易进入靶细胞发挥抗炎细胞活性,带正电荷的氨基酸也与抗炎活性有关^[26]。在珍珠贝水解肽中,有助提高抗炎能力的氨基酸包括疏水性氨基酸(21.19%)和带正电荷氨基酸(10.45%),占比 34.65%,从物质基础层面表明珍珠贝水解肽可能具有抗炎方面的潜力。

表 5 氨基酸组成分析[†]

Table 5 Analysis of amino acid content

氨基酸种类	含量/%	氨基酸种类	含量/%
牛磺酸	5.911	亮氨酸	4.046
天冬氨酸	6.307	酪氨酸	1.713
苏氨酸	2.776	苯丙氨酸	1.985
丝氨酸	2.723	组氨酸	1.509
谷氨酸	9.707	赖氨酸	4.246
甘氨酸	4.688	精氨酸	4.711
丙氨酸	3.701	脯氨酸	2.963
胱氨酸	0.064	HAA	21.195
缬氨酸	2.924	PCAA	10.460
蛋氨酸	1.334	NCAA	16.014
异亮氨酸	2.529	EAA	19.840

[†] 疏水性氨基酸(HAA):色氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、丙氨酸和蛋氨酸;必需氨基酸(EAA):色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸;带正电荷氨基酸(PCAA):赖氨酸、精氨酸和组氨酸;带负电荷氨基酸(NCAA):天冬氨酸、谷氨酸。

2.5 珍珠贝水解肽抗炎活性

2.5.1 对小鼠巨噬细胞的毒性 如图 7 所示,在 0.125~4.0 mg/mL 的质量浓度范围内各样品均对 RAW264.7 细胞无细胞毒性,且在 0.125~2.0 mg/mL 浓度范围内对细胞生长有促进作用。

2.5.2 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放量的影响 如图 8 所示,与空白组(C-)比较,LPS 模型组(C+)的 NO 分泌显著升高,表明抗炎细胞模型造模成功。与 LPS 模型组(C+)相比,添加不同质量浓度珍珠贝水解肽处理组均能显著降低造模细胞上清液中 NO 含量,且呈浓度依赖性,其中最高质量浓度(2.0 mg/mL)处理组 NO 抑制率达 70.00%。由此表明,珍珠贝水解肽可以有效降低炎症细胞模型中的 NO 分泌,表现出显著的抗炎活性。

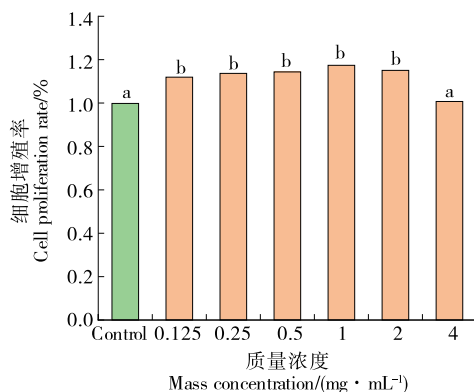
2.5.3 对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 炎症因子分泌的影响 炎症细胞因子是炎症反应的关键因素。当病原体感染机体时,巨噬细胞可以通过产生细胞因子来抵抗病原体的入侵。在某种程度上,细胞免疫因子的水平可用于

评估免疫反应^[27]。

如图 9 所示,与空白组(C-)相比,使用 LPS 诱导后的模型组(C+)细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 分泌显著上升,而使用不同多肽浓度处理组(0.125~2.0 mg/mL)干预的巨噬细胞产生的细胞炎症因子分泌均被有效抑制,且均呈浓度依赖性,与 NO 释放量的结果趋势一致。其中最高质量浓度(2.0 mg/mL)处理组能够显著抑制 RAW264.7 巨噬细胞因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的释放,抑制率分别为 83.01%,85.04%,80.43%,由此表明,珍珠贝水解肽能有效降低由 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞炎症因子的分泌。

3 结论

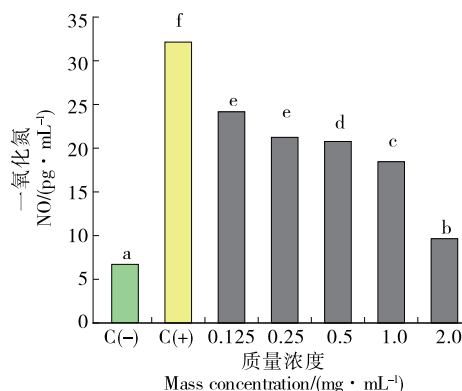
以马氏珠母贝肉为原料,以水解度为指标筛选出中性蛋白酶为最佳用酶;基于单因素结果结合响应面优化确定了最优工艺参数:酶解时间 1.4 h,酶底比 0.3%,酶解温度 46.3 $^{\circ}\text{C}$ 。在此基础上得到的酶解物氨基酸种类齐



小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 7 珍珠贝水解肽对 RAW264.7 细胞增殖率的影响

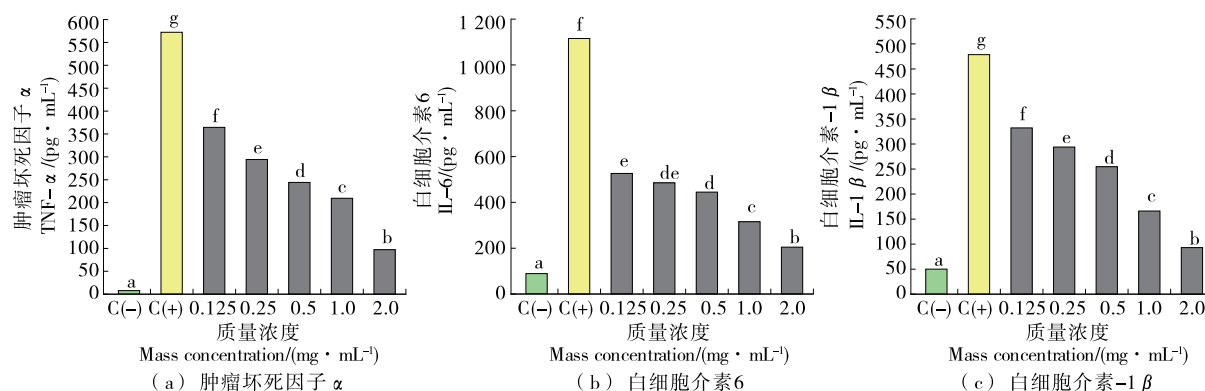
Figure 7 Effects of *P. martensii* peptides on the proliferation rate of RAW264.7 cells



小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 8 珍珠贝水解肽对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 释放的影响

Figure 8 Effects of *P. martensii* peptides on LPS-induced NO release in RAW264.7 cells



小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

图 9 珍珠贝水解肽对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 分泌的影响

Figure 9 Effects of *P. martensii* peptides on LPS-induced secretion of inflammatory factors TNF- α , IL-6 and IL-1 β in RAW264.7 cells

全,其中必需氨基酸含量为 19.84%,有助于提高抗炎活性的氨基酸(疏水性氨基酸和带正电荷氨基酸)占比达 31.65%。通过对珍珠贝水解肽的体外细胞炎症评价模型发现,珍珠贝水解肽能够有效降低由 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞的 NO 和细胞炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 分泌量,表明珍珠贝水解肽具有良好的抗炎活性。后续将对珍珠贝抗炎肽的活性成分及其抗炎机制进行深入研究。

参考文献

- [1] ABD E R, MAHGOUB S, EL-SHANBAKY H M, et al. Utility of novel 2-furanones in synthesis of other heterocyclic compounds having anti-inflammatory activity with dual COX2/LOX inhibition [J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2021, 36 (1): 977-986.
- [2] GAO R, SHU W, SHEN Y, et al. Sturgeon protein-derived peptides exert anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via the MAPK pathway [J]. Journal of Functional Foods, 2020, 72: 104044.
- [3] FENG M, WANG X, XIONG H, et al. Anti-inflammatory effects of three selenium-enriched brown rice protein hydrolysates in LPS-induced RAW264.7 macrophages via NF- κ B/MAPKs signaling pathways [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 76: 104320.
- [4] MANKHONG S, IAWSIPO P, SRISOOK E, et al. 4-methoxycinnamyl p-coumarate isolated from *Etlingera pavieana* rhizomes inhibits inflammatory response via suppression of NF- κ B, Akt and AP-1 signaling in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. Phytomedicine, 2019, 54: 89-97.
- [5] GUPTA S, SHARMA A K, SHASTRI V, et al. Prediction of anti-inflammatory proteins/peptides: An insilico approach [J]. Journal of Translational Medicine, 2017, 15(1): 1-11.
- [6] GILROY D, DE M R. New insights into the resolution of inflammation [J]. Seminars in Immunology, 2015, 27(3): 161-168.
- [7] GONZALEZ-REY E, ANDERSON P, DELGADO M. Emerging roles of vasoactive intestinal peptide: A new approach for autoimmune therapy [J]. Annals of the Rheumatic Diseases, 2007, 66 (suppl 3): iii70-iii76.
- [8] DELGADO M, GANEA D. Anti-inflammatory neuropeptides: A new class of endogenous immunoregulatory agents [J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2008, 22(8): 1 146-1 151.
- [9] GAO R, SHU W, SHEN Y, et al. Peptide fraction from sturgeon muscle by pepsin hydrolysis exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via MAPK and NF- κ B pathways [J]. Food Science and Human Wellness, 2021, 10(1): 103-111.
- [10] QIAN B, ZHAO X, YANG Y, et al. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from oyster soft tissue by enzymatic hydrolysis [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(7): 3 947-3 956.
- [11] YU W, FIELD C J, WU J. Purification and identification of anti-inflammatory peptides from spent hen muscle proteins hydrolysate [J]. Food Chemistry, 2018, 253: 101-107.
- [12] 章超桦, 吴红棉, 洪鹏志, 等. 马氏珠母贝肉的营养成分及其游离氨基酸组成 [J]. 水产学报, 2000(2): 180-184.
- [13] ZHANG C Y, WU H M, HONG P Z, et al. Nutrients and composition of free amino acid in edible part of *Pinctada martensii* [J]. Journal of Fisheries of China, 2000(2): 180-184.
- [13] 杨发明, 林海生, 秦小明, 等. 珍珠贝外套膜酶解产物促进小鼠皮肤创伤愈合作用研究 [J]. 大连海洋大学学报, 2019, 34(4): 492-498.
- [14] YANG F M, LIN H S, QIN X M, et al. Effects of enzymatic hydrolysates from mantle of pearl oyster *Pinctada martensii* on wound healing of mouse skin [J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2019, 34(4): 492-498.
- [14] 刘晓月, 黄丽, 徐羽, 等. 马氏珠母贝综合利用的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2020, 41(2): 200-204.
- [15] LIU X Y, HUANG L, XU Y, et al. Advances in research on comprehensive utilization of *Pinctada martensii* [J]. Food Research and Development, 2020, 41(2): 200-204.
- [15] ADDLER-NISSEN J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzene sulfonic acid [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1979, 27(6): 1 256-1 262.
- [16] PANASIUK R, AMAROWICZ R, KOSTYRA H, et al. Determination of α -amino nitrogen in pea protein hydrolysates: A comparison of three analytical methods [J]. Food Chemistry, 1998, 62(3): 363-367.
- [17] 焦宇知. 酪蛋白磷酸肽新生产工艺及其功能性质研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2004: 63.
- [18] JIAO Y Z. Studies on novel production technologies for CPP and its functional properties [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2004: 63.
- [18] KLOMPONG V, BENJAKUL S, KANTACHOTE D, et al. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptocephalus*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type [J]. Food Chemistry, 2007, 102(4): 1 317-1 327.
- [19] 马骏, 石晓丹, 王家林. 酶解法制备啤酒糟抗氧化肽工艺优化 [J]. 食品科技, 2021, 46(9): 73-78.
- [20] MA J, SHI X D, WANG J L. Optimization of enzymatic hydrolysis preparation of antioxidant peptide from the brewer's spent grains [J]. Food Science and Technology, 2021, 46(9): 73-78.
- [20] 尹乐斌, 刘丹, 廖聪, 等. 酶解豆清液制备抗氧化肽 [J]. 食品工业, 2021, 42(5): 177-181.
- [21] YIN L F, LIU D, LIAO C, et al. Preparation of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis of soybean wastewater [J]. The Food Industry, 2021, 42(5): 177-181.
- [21] 沈唯军, 时晨, 丁婷. 应用固定化 α -淀粉酶探究温度对酶活性的影响 [J]. 生物学教学, 2018, 43(3): 44-45.
- [22] SHEN W J, SHI C, DING T. Application of immobilized α -amylase to explore the influence of temperature on enzyme activity [J]. Biology Teaching, 2018, 43(3): 44-45.

(下转第 206 页)

- [12] 林致通, 张东霞, 雷雯, 等. 基于模糊数学与感官质构分析建立鲜凉皮食用品质评价标准[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(7): 225-233.
- LIN Z T, ZHANG D X, LEI W, et al. Establish comprehensive quality standard of fresh Liangpi based on sensory evaluation combined with fuzzy mathematics [J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(7): 225-233.
- [13] 贾庆超, 梁艳美. 模糊数学评价结合响应面法优化枸杞鸡枞菌复合饮料配方[J]. 中国酿造, 2021, 40(4): 115-121.
- JIA Q C, LIANG Y M. Optimization of *Lycium barbarum* and *Termitomyces albuminosus* compound beverage formula by fuzzy mathematics evaluation combined with response surface methodology[J]. China Brewing, 2021, 40(4): 115-121.
- [14] 王标明. 百香果的营养特性及栽培管理措施[J]. 中国果菜, 2020, 40(7): 111-113, 117.
- WANG B M. Nutritional characteristics and cultivation management measures of passion fruit[J]. China Fruit & Vegetable, 2020, 40(7): 111-113, 117.
- [15] 唐美玲, 段伟文, 段振华, 等. 超高压处理对百香果—火龙果复合饮料品质的影响及杀菌工艺优化[J]. 食品与机械, 2020, 36(2): 182-186, 236.
- TANG M L, DUAN W W, DUAN Z H, et al. Effect of ultra high pressure treatment on the quality of passion fruit-pitaya compound beverage and optimization of sterilization process [J]. Food & Machinery, 2020, 36(2): 182-186, 236.
- [16] 程宏桢, 蔡志鹏, 王静, 等. 百香果全果酒发酵工艺优化及体外抗氧化性比较分析[J]. 中国酿造, 2020, 39(4): 91-97.
- CHENG H Z, CAI Z P, WANG J, et al. Optimization of fermentation process for whole passion fruit wine and comparative analysis of antioxidant activity in vitro[J]. China Brewing, 2020, 39(4): 91-97.
- [17] 李佩佩, 颜向红, 王聪, 等. 不同发酵方式下枸杞饮料主要成分及其抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(24): 90-97.
- LI P P, XIE X H, WANG C, et al. Main components and antioxidant activities of *Lycium barbarum* L. beverages using two different fermentation processes [J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(24): 90-97.
- [18] JULIA M C O, EVANDRO L S, KAÍQUE Y G L, et al. Physicochemical parameters, phytochemical profile and antioxidant properties of a new beverage formulated with Xique-Xique (*Pilosocereus gounellei*) cladode juice[J]. Foods, 2021, 10(9): 1-17.

(上接第 139 页)

- [22] 范三红, 胡雅喃, 何亚. 响应面法优化菊芋渣酶解制备抗氧化肽工艺[J]. 食品科学, 2015, 36(8): 49-53.
- FAN S H, HU Y N, HE Y. Optimization of enzymatic hydrolysis of jerusalem artichoke residue for preparing antioxidant peptides by response surface methodology [J]. Food Science, 2015, 36(8): 49-53.
- [23] 刘东伟, 袁玮琼, 柳梅, 等. 核桃粕蛋白抑菌肽的制备工艺及纯化[J]. 食品工业科技, 2021, 42(2): 185-191.
- ZHANG D W, YU W Q, LIU M, et al. Preparation and isolation of antibacterial peptides from walnut dregs protein[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(2): 185-191.
- [24] 张维, 胡馨月, 赵行, 等. 响应面法优化紫贻贝鲜味肽酶法制备工艺[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8): 206-214.
- ZHANG W, HU X Y, ZHAO X, et al. Response surface methodology for optimization of enzymatic preparation of umami peptides from *Mytilus edulis*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(8): 206-214.
- [25] 王安凤, 赵永强, 陈胜军, 等. 响应面法优化合浦珠母贝肉水解工艺[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(11): 165-171.
- WANG A F, ZHAO Y Q, CHEN S J, et al. Optimization of hydrolysis process of *Pinctada fucata* by response surface method [J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(11): 165-171.
- [26] GUHA S, MAJUMDER K. Structural-features of food-derived bioactive peptides with anti-inflammatory activity: A brief review [J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(1): e12531.
- [27] CHEN X, CHEN Y, DAI L, et al. MiR-96-5p alleviates inflammatory responses by targeting NAMPT and regulating the NF- κ B pathway in neonatal sepsis[J]. Bioscience Reports, 2020, 40(7): BSR20201267.

(上接第 158 页)

- [27] WANG Y, LI X, CHEN X, et al. Effect of stir-frying time during *Angelica Sinensis* Radix processing with wine on physicochemical, structure properties and bioactivities of polysaccharides[J]. Process Biochemistry, 2019, 81: 188-196.
- [28] SOUSSI N, BOUGHRIBA S, ABDELHEDI O, et al. Extraction, structural characterization, and thermal and biomedical properties of sulfated polysaccharides from razor clam *Solen marginatus*[J]. RSC Advances, 2019, 9(20): 11 538-11 551.
- [29] HAJJI M, HAMDI M, SELLIMI S, et al. Structural characterization, antioxidant and antibacterial activities of a novel polysaccharide from *Periploma laevigata* root barks [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 206: 380-388.
- [30] 林军, 李高阳, 黄帆, 等. 分级醇沉紫薯多糖抗氧化活性与稳定性[J]. 食品与机械, 2022, 38(3): 189-196.
- LIN J, LI G Y, HUANG F, et al. Antioxidant and stability of polysaccharides from purple sweet potato by fractional alcohol precipitation[J]. Food & Machinery, 2022, 38(3): 189-196.
- [31] 张秋红. 超声细胞破碎仪辅助提取桑葚多糖及其抗氧化性分析[J]. 食品与机械, 2022, 38(6): 168-172.
- ZHANG Q H. Extraction of mulberry polysaccharide by ultrasonic cell crusher-assisting and its antioxidant activity analysis[J]. Food & Machinery, 2022, 38(6): 168-172.