

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20241021001

http://www.yykxjz.cn/

吴斌霞, 胡晓, 陈胜军, 吴燕燕, 戚勃, 邓建朝, 龙晓珊. 卵形鲳鲹乙酰胆碱酯酶抑制肽的酶解制备及其理化性质与生物活性. 渔业科学进展, 2025, 46(5): 244–254

WU B X, HU X, CHEN S J, WU Y Y, QI B, DENG J C, LONG X S. Preparation, physicochemical properties and bioactivity of acetylcholinesterase inhibitory peptide from *Trachinotus ovatus*. Progress in Fishery Sciences, 2025, 46(5): 244–254

卵形鲳鲹乙酰胆碱酯酶抑制肽的酶解制备 及其理化性质与生物活性*

吴斌霞^{1,2,3} 胡 晓^{2,3①} 陈胜军^{2,3} 吴燕燕^{2,3}
戚 勃^{2,3} 邓建朝^{2,3} 龙晓珊^{2,3}

(1. 上海海洋大学食品学院 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业农村部
水产品加工重点实验室 广东 广州 510300; 3. 三亚热带水产研究院 海南 三亚 572000)

摘要 以卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)为原料, 酶解制备乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)抑制肽。在 5 种蛋白酶(中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶)和不同酶解时间(1、2、4、6、8 h)条件下进行酶解, 以 AChE 抑制活性和抗氧化能力为指标, 筛选最适水解蛋白酶和酶解时间, 并测定酶解产物的水解度、分子量分布、氨基酸组成等酶解特性和金属离子螯合能力, 通过紫外和傅里叶变换红外测定其结构变化。实验结果表明, 木瓜蛋白酶 4 h 酶解物具有最高的 AChE 抑制率, 其值达到(18.02±0.78)%, 显著高于其他蛋白酶酶解物和阳性对照($P<0.05$), 该酶解产物的 ABTS 自由基清除率为(52.54±0.89)%, 水解度为 14.86%, 分子量小于 3 kDa 的组分占比达 96.87%, 相关性分析发现, AChE 抑制活性与这 3 个指标呈现显著正相关性($P<0.05$)。此外, 木瓜蛋白酶 4 h 酶解物中含量最高的 3 种氨基酸分别是谷氨酸、天冬氨酸和赖氨酸, 均为带正负电荷的氨基酸, 疏水氨基酸占比为 34.92%, 这有助于酶解产物与 AChE 和自由基形成相互作用, 提高 AChE 抑制率和抗氧化活性。金属离子结合能力测定发现该酶解产物能结合 Ca^{2+} 和 Fe^{2+} , 结合率分别为(26.28±1.20)%和(14.25±0.85)%, 且结合后 AChE 抑制活性有所提高, 紫外和红外光谱分析显示, 氨基、羧基和羰基参与了新的化合物形成。本研究可为卵形鲳鲹高值化利用与乙酰胆碱酯酶抑制剂的开发提供技术支撑。

关键词 卵形鲳鲹; 酶解; 乙酰胆碱酯酶抑制肽; 抗氧化; 金属离子结合活性

中图分类号 TS254.1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2025)05-0244-11

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)一种以认知和记忆功能障碍、日常行为能力退化为主要临床特征的神经退行性疾病, 预计到 2050 年, 全世界 AD

患者人数将增加至 1.15 亿, 对社会、经济产生重大影响(Zhang *et al*, 2021)。AD 的发病机制有胆碱能损伤、 β 淀粉样蛋白沉积、氧化应激、神经炎症、金属

* 广东省海洋经济发展专项(GDNRC[2024]29)、国家海水鱼产业技术体系(CARS-47)、海南省自然科学基金(323MS123)和中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2023TD74)共同资助。吴斌霞, Email: hibinxia@163.com

① 通信作者: 胡 晓, 研究员, Email: hnhuxiao@163.com

收稿日期: 2024-10-21, 收修改稿日期: 2024-12-04

离子稳态失衡等。针对不同病理机制, FDA 通过了相应的治疗药物, 但最主要的仍然是胆碱酯酶抑制剂。乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)是一种重要的神经递质, 参与学习和记忆相关的正常胆碱能信号通路, 由胆碱和乙酰辅酶 A 在胆碱乙酰移位酶(choline acetyltransferase, ChAT)的催化作用下合成, 后在突触间隙被 AChE 迅速分解成胆碱和乙酸, 合成和水解过程的平衡保证了记忆信号的有序传导(Ju *et al*, 2022)。然而, 在 AD 患者中, 由于受损神经元难以再生, ACh 的合成减少, 降解加速, 导致神经信号传导不足, 出现记忆障碍(Willcox *et al*, 2014)。乙酰胆碱酯酶抑制剂(acetylcholinesterase inhibitor, AChEI)可通过抑制 AChE 活性来阻断 ACh 的降解, 增加胆碱能神经传递, 达到改善记忆的效果, 但目前的 AChEI 如多奈哌齐、加兰他敏、利斯的明等多为小分子药物, 往往伴随有外周胆碱能副作用或慢性心律失常, 因而需要寻求新的安全、高效的抑制物质。

AD 不同致病因子之间还存在相互关联(Wilson *et al*, 2023), 如氧化应激会加速 A β 的形成, 诱导大脑 Tau 磷酸化和突触功能障碍, 还会提高多种炎症介质和促炎因子的表达, 加速炎症相关组织损伤(Hsieh *et al*, 2013); 过度金属离子沉积引起蛋白质折叠, 增加神经细胞氧化压力(杨悦, 2015)。这就促使药物研究从单靶点到多靶点方向转变, 多靶点治疗可以稳定复杂的网络系统, 在通过不同病理特征发挥作用增强疗效的同时, 不会过度激活或抑制某一靶点, 引起强烈的副作用。

生物活性肽是一类具有特定生理作用的肽类化合物, 相较于小分子药物有更高的靶点亲和力、特异性和安全性, 相较于大分子药物则有更好的膜穿透性, 更低的免疫原性和生产成本, 因此, 发展前景广阔(Anand *et al*, 2023)。海洋生物是生物活性肽的良好来源, 由于独特的生长环境, 存在许多特异结构和功能, 近年来, 研究人员已从海洋生物中制备分离出具有抗氧化、金属离子螯合、降尿酸、免疫调节等作用的肽类物质(李娜等, 2020; 焦奎等, 2019; 侯梦凡等, 2021; Xu *et al*, 2022), 但在神经保护、抑制 AChE 活性、协同抗氧化和金属离子调节等方面的研究相对较少。

卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus*)生长速度快、经济效益高, 是我国东南沿海重要养殖鱼类, 也是拓展深远海养殖空间的首选品种(毛美琴等, 2023; 刘思炜等, 2025), 2023 年我国养殖总产量达 29.22 万 t, 跃居全国海水养殖产量首位(农业农村部渔业渔政管理局等, 2024)。卵形鲳鲹营养丰富, 蛋白质和必需氨基

酸含量高, 是制备生物活性肽的优质原料。酶解法温和可控、成本低廉, 是最常用的制备肽方法, 本研究对卵形鲳鲹鱼肉进行酶解, 制备 AChE 抑制肽并评价其酶解特性和生物活性, 可为进一步开发海洋生物活性肽在功能型食品和药品中的潜在应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

卵形鲳鲹(质量为 350~450 g)购自广州华润万家超市, 取鱼肉, 洗净后使用绞肉机制成肉糜, 收集保存于聚乙烯袋中, 放置在-20℃冰箱备用。

中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶, 上海吉至生化科技有限公司; 复合蛋白酶、胰蛋白酶、乙酰胆碱酯酶(苍蝇头部)、5,5-二巯基-2,2-二硝基苯甲酸(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DTNB)、磷酸缓冲液(pH 8.0), 上海源叶生物科技有限公司; 碘化乙酰硫代胆碱(acetylthiocholine iodide, ATCI), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 脑活素(cerebrolysin), 阿里健康大药房; 总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(ABTS法), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 乙腈、三氯乙酸, 上海安谱实验科技股份有限公司; 氢氧化钠、盐酸、硫酸、硫酸铜、硫酸亚铁、硫酸锌、硫酸钾、氯化钙、氯化镁, 广州化学试剂厂。

1.2 仪器与设备

K1100 全自动凯氏定氮仪, 山东海能科学仪器有限公司; 916 Ti-Touch 自动电位滴定仪, 瑞士万通中国有限公司; Sunrise-basic Tacan 吸光酶标仪, 瑞士帝肯公司; H1850R 高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; SHZ-82 水浴恒温振荡器, 金坛市精达仪器制造厂; Alpha1-4 真空冷冻干燥机, 德国 Christ 公司; GB204 电子天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; LC-20AD 高效液相色谱仪、UV2550 紫外可见分光光度计、IRAffinity-1 傅里叶变换红外光谱仪, 日本岛津公司; Agilent7900 电感耦合等离子体质谱, 美国安捷伦公司。

1.3 实验方法

1.3.1 卵形鲳鲹酶解产物的制备 卵形鲳鲹取鱼肉, 搅碎成肉糜, 按料液比 1:3 (W/V)加入去离子水混合均匀, 调节至酶解最适 pH, 按鱼糜质量的 0.3% 分别加入中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合蛋白酶和胰蛋白酶, 在 55℃水浴恒温振荡器中酶解不同时间, 酶解过程中维持 pH 稳定。酶解结束后,

沸水浴灭酶 15 min，冷却，离心(10 000 r/min, 4 ℃, 20 min)取上清液，抽滤，冷冻干燥获得酶解产物。具

体酶解条件如表 1 所示，测定酶解产物的 AChE 抑制活性和抗氧化活性，筛选最适蛋白酶和酶解时间。

表 1 不同蛋白酶的酶解条件
Tab.1 Enzymatic condition for different proteases

蛋白酶 Protease	酶解条件 Hydrolysis condition				
	加酶量 Enzyme content/%	温度 Temperature/℃	pH	酶活力 Enzymatic activity/(U/mg)	酶解时间 Hydrolysis time/h
中性蛋白酶 Neutral protease	0.3	55	7.0	100	1, 2, 4, 6, 8
碱性蛋白酶 Alkaline protease	0.3	55	8.0	200	1, 2, 4, 6, 8
木瓜蛋白酶 Papain	0.3	55	6.5	800	1, 2, 4, 6, 8
复合蛋白酶 Protamex	0.3	55	7.5	120	1, 2, 4, 6, 8
胰蛋白酶 Trypsin	0.3	55	8.0	250	1, 2, 4, 6, 8

1.3.2 水解度的测定 采用 GB5009.5-2016《食品中蛋白质的测定》凯氏定氮法测定原料中的总氮质量，采用甲醛电位滴定法测定酶解液中氨基酸态氮的质量，水解度(degree of hydrolysis, DH)计算公式如下：

$$DH(\%) = \frac{\text{酶解液中氨基酸态氮的质量}}{\text{原料中的总氮质量}} \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 分子质量分布 采用高效体积排阻色谱法(high performance size exclusion chromatography, HPSEC)测定肽的分子质量分布(宋玉琼等, 2023)。色谱柱为 TSK-GEL G2000SWxL (7.8×300 mm, 5 μm)，流动相 A 为含 0.1%三氟乙酸的超纯水，流动相 B 为含 0.1%三氟乙酸的乙腈溶液，洗脱比例 V(A)：V(B)=80：20，进样体积为 10 μL (2 mg/mL)，流速为 0.5 mL/min，检测波长设置为 214 nm。标准品分别为细胞色素 C (12 400 Da)、杆菌肽(6 511.83 Da)、抑肽酶(1 422.69 Da)、氧化型谷胱甘肽(612.63 Da)、还原型谷胱甘肽(307.3 Da)，利用混合标准品制作标准曲线，根据标准品出峰时间分析样品的分子质量分布。

1.3.4 AChE 抑制活性测定 根据 Ellman 原理(Ellman *et al*, 1961)和 Zhao 等(2017)文献报道的方法稍作修改。275 μL 反应体系，于 96 孔板中依次加入 30 μL ATCI (7.5 mmol/L)、125 μL DTNB (3 mmol/L)和 50 μL 样品溶液(10 mg/mL)，37 ℃预孵 15 min 后，再加入 30 μL 乙酰胆碱酯酶(0.055 U/mL)，在 412 nm 波长处连续测定 15 min。空白对照用 PBS 溶液(pH 8.0, 50 mmol/L)代替，乙酰胆碱酯酶抑制活性计算公式如下：

乙酰胆碱酯酶抑制活性(%) =
$$\left(1 - \frac{A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{对照空白}}}\right) \times 100 \quad (2)$$

式中， $A_{\text{样品}}$ 为样品组吸光值， $A_{\text{样品空白}}$ 为不加酶样品组吸光值， $A_{\text{对照}}$ 为加酶不加样品组吸光值， $A_{\text{对照空白}}$ 为不加酶不加样品组吸光值。

1.3.5 抗氧化能力测定 根据总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒说明书测定酶解物冻干样品的总抗氧化能力。

1.3.6 金属离子结合能力测定 采用电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)测定酶解物与 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 等离子的结合能力(Abduljabbar *et al*, 2019)。将酶解物与金属盐按质量比 3：1 混合后配制成一定浓度的溶液，调节至 pH=5.0，置于 37 ℃水浴恒温震荡 90 min 使其结合。取结合液进行 48 h 透析，每 4 h 换一次水。记录透析后溶液总膨胀体积。在消化管中加入 1 mL 透析液和 5 mL 浓硝酸，进行微波消解，消解后的液体定容至 50 mL，采用 ICP-MS 测定溶液中金属离子含量。结合率公式如下：

$$R_T = \frac{c \times V \times n}{m} \times 100\% \quad (3)$$

式中， R_T 为金属离子结合率(%)； m 为加入金属的总质量(mg)； c 为透析后金属离子的质量浓度(μg/mL)； V 为总膨胀体积(mL)； n 表示稀释倍数。

1.3.7 氨基酸组成及含量测定 参考 GB/T 5009.124-2016《食品安全国家标准 食品中氨基酸的测定》。

1.3.8 紫外可见光谱扫描(UV) 制备酶解物、酶解物与 AChE、酶解物与 Fe^{2+} 、酶解物与 Ca^{2+} 的冻干样品，配制成适宜浓度，进行紫外光谱扫描，扫描波长范围为 200~500 nm。

1.3.9 傅里叶变换红外光谱扫描(FTIR) 取 1 mg

酶解物、酶解物与 AChE、酶解物与 Fe^{2+} 、酶解物与 Ca^{2+} 的冻干样品, 分别与 100 mg 干燥溴化钾研磨混合, 压片后放置于红外光谱仪进行测定, 测定波数为 $4\,000\sim 400\text{ cm}^{-1}$, 分辨率为 4 cm^{-1} , 测定结果转换为透射率曲线, 并对曲线进行光滑处理便于分析。

1.3.10 数据统计与分析 实验数据使用 SPSS Statistics 17.0 进行统计分析, 结果以“平均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ SD)”表示, 以单因素方差分析 (one-way ANOVA) 及 Duncan 多重比较分析组间差异性, $P<0.05$ 表示有显著性差异; 采用 Origin 2021 软件作图。

2 结果与分析

2.1 水解度

水解度反映蛋白酶催化断裂肽键的能力, 蛋白酶的酶切位点不同, 得到水解产物的分子量大小、肽段组成和生物活性也会存在差异 (Li *et al.*, 2025)。由图 1 可知, 木瓜蛋白酶的水解效率显著高于其他蛋白酶 ($P<0.05$), 其中, 木瓜蛋白酶 4 h 酶解物的水解度为 $(14.86\pm 0.09)\%$, 8 h 达到最高, 为 $(16.55\pm 0.11)\%$, 这可能与木瓜蛋白酶较广泛的酶切特异性有关。木瓜蛋白酶是一种含巯基的肽链内切酶, 对含疏水性氨基酸的肽键具有较强的水解作用。随着酶解时间延长, 不

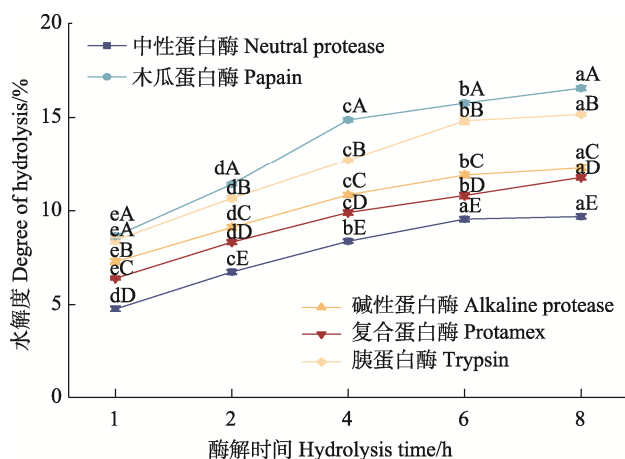


图 1 不同蛋白酶的水解度随时间的变化

Fig.1 Degree of hydrolysis of different proteases as a function of time

不同小写字母表示在不同酶解时间下同种蛋白酶酶解产物的蛋白质水解程度具有显著性差异 ($P<0.05$), 不同大写字母表示不同蛋白酶在同一酶解时间所得酶解物的蛋白质水解程度有显著性差异 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences in the degree of proteolysis of the enzymatic products of the same protease at different enzymatic hydrolysis times ($P<0.05$), and different capital letters indicated that the different protease at the same hydrolysis time had significant difference ($P<0.05$).

同蛋白酶的水解度不断增加, 4~6 h 后增长趋势变缓, 这一趋势可能是由于开始酶解时蛋白酶活性较高, 酶切位点较多, 而随着酶解进行, 酶切位点逐渐减少, 酶解受到限制。

2.2 分子量分布

卵形鲳鲹经不同蛋白酶酶解 4 h 后的 HPLC 色谱图, 以及各组分的分子量分布如图 2a、b 所示。酶解物的分子质量主要分布在 3 kDa 以下的肽段, 占比达到 93%~98%, 其中分子量小于 1 kDa 的组分占比达 80% 以上。研究表明, AChE 抑制活性较好的肽段分子量集中在 3 kDa 以下, 在核桃多肽 (黄淋, 2022)、马哈鱼肽 (石博雯, 2021)、凤尾鱼肽 (Zhao *et al.*, 2017) 等 AChE 抑制活性肽的研究中, 分子量小于 3 kDa 的组分占比均超过 90%。扇贝肽 (曹燕峰等, 2024)、牡蛎肽 (Umayaparvathi *et al.*, 2014)、金枪鱼肽 (Cai *et al.*, 2022) 等研究结果表明, 分子量小于 1 kDa 组分的抗氧化能力显著优于其他组分。

由图 2c、d 可知, 随着酶解时间延长, 木瓜蛋白酶酶解物中大分子量的肽段 ($>10\text{ kDa}$) 逐渐减少, 而小分子量 ($<3\text{ kDa}$) 的肽段逐渐增多。酶解 4 h 后, 小于 3 kDa 的组分快速增长至 96.87%, 其中小于 1 kDa 的组分占比 83.46%。对比酶解时间 6 h 和 8 h, 大于 10 kDa 的组分分别占比 0.14% 和 0.76%, 说明继续增加酶解时间, 水解能力受到限制, 可能是产生了多肽的交联物质 (Zhao *et al.*, 2017)。

2.3 不同酶解物的 AChE 抑制率、ABTS 自由基清除率及相关性分析

选用 5 种蛋白酶对卵形鲳鲹鱼肉进行酶解, 测得 10 mg/mL 酶解物的 AChE 抑制率和 1.0 mg/mL 酶解物的 ABTS 自由基清除率如图 3 所示。图 3a 结果显示, 5 种酶解物的 AChE 抑制率随着酶解时间延长呈先升高后下降的趋势, 木瓜蛋白酶酶解物的 AChE 抑制率显著高于其他蛋白酶酶解物 ($P<0.05$), 且在 4 h 达到最高, 抑制率为 $(18.02\pm 0.78)\%$, 显著高于阳性对照脑损伤治疗药物脑活素 ($2.05\pm 0.45\%$) ($P<0.05$)。黄淋 (2022) 在核桃蛋白酶解工艺优化实验中, 同样发现木瓜蛋白酶酶解物表现出最佳 AChE 抑制活性, 这可能与木瓜蛋白酶作用位点广, 主要作用在精氨酸、赖氨酸和脯氨酸有关。图 3b 结果表明, 木瓜蛋白酶 4 h 和 6 h 酶解物的 ABTS 自由基清除能力最好, 清除率分别达到 $(52.54\pm 0.89)\%$ 和 $(53.78\pm 1.03)\%$, 显著高于其他时间酶解物 ($P<0.05$)。综合考虑, 选择木瓜蛋白酶 4 h 酶解物作为最佳乙酰胆碱酯酶抑制肽进行实验。

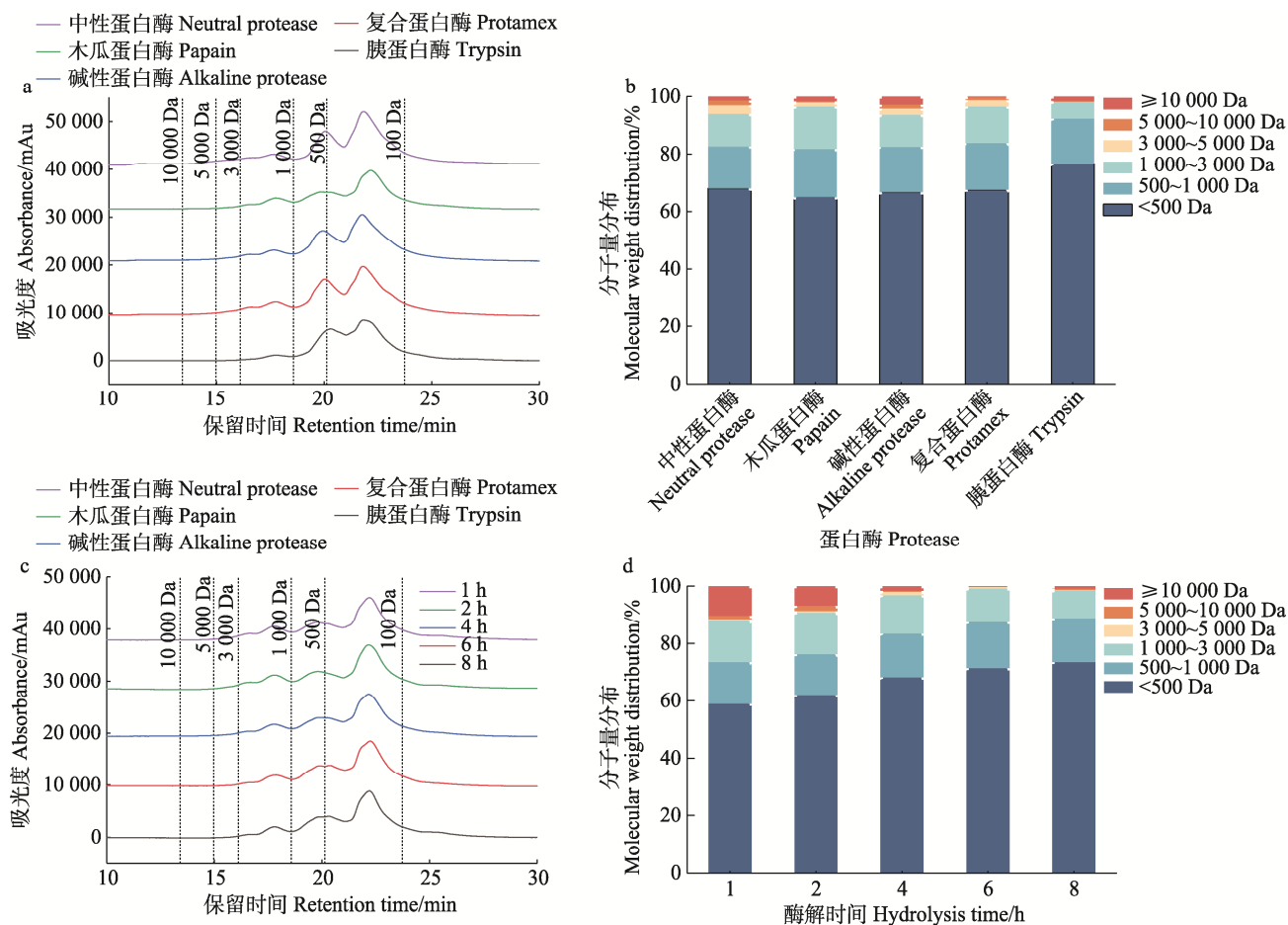


图2 不同蛋白酶酶解物的 HPLC 色谱图(a)及分子量分布(b)、木瓜蛋白酶不同酶解时间酶解物的 HPLC 色谱图(c)及分子量分布(d)

Fig.2 HPLC chromatogram (a) and molecular weight distribution (b) of different proteases hydrolysates, HPLC chromatogram (c) and molecular weight distribution (d) of the papain protease hydrolysates at different hydrolysis times

图4对不同时间木瓜蛋白酶酶解物的水解度、分子量、AChE抑制活性和ABTS自由基清除活性进行了相关性分析,发现AChE抑制率与ABTS自由基清除率呈显著正相关($P<0.05$),与水解度、分子量小于3 kDa组分占比呈极显著正相关($P<0.01$),与大于10 kDa的组分占比呈极显著负相关($P<0.01$),而与分子量在3~10 kDa的组分占比无显著相关性。

2.4 氨基酸组成及含量分析

蛋白质或多肽的氨基酸组成是影响其生物活性的重要因素(Zheng *et al.*, 2016)。由图5可知,卵形鲳鲹含量最高的3种氨基酸为Glu、Asp和Lys,且酶解后的含量比例高于酶解前,占比分别达到16.31%、10.68%和8.22%,此外,酶解前后均含有较高比例的疏水性氨基酸(Ala、Val、Met、Trp、Phe、Ile、Leu、Pro),占比分别为35.55%和34.92%。研究表明,疏水性氨基酸可通过与AChE形成疏水相互作用,提高与活性部位的结合能力,从而增强抑制活性。

也有文献报道,末端带正负电荷氨基酸的肽段可能在抑制AChE活性方面发挥了重要作用。Zhao等(2017)对比不同时间凤尾鱼酶解物的氨基酸组成,发现4 h酶解物含有最多的Val、Leu、Arg和Lys,而具有最高AChE抑制活性的8 h酶解物含有最多的Glu。Lee等(2019)在天然多肽的神经保护作用机制研究中发现,神经保护肽主要由疏水氨基酸组成,在N端最后一个位置有带负电荷的氨基酸。带正负电荷的氨基酸还可通过其侧链基团螯合金属离子从而发挥抗氧化作用(Zhao *et al.*, 2018)。

2.5 金属离子结合率分析

测定酶解物与 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} 的结合率,结果如图6a所示。酶解物与 Ca^{2+} 的结合率最高,达 $(26.28 \pm 1.20)\%$,其次是 Fe^{2+} $(14.25 \pm 0.85)\%$,而对 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 K^{+} 的结合不显著。已有研究表明, Ca^{2+} 内流增加会加速Tau磷酸化和A β 的产生(Dumbacher *et al.*, 2018),铁离子过载会加速A β 的聚集,

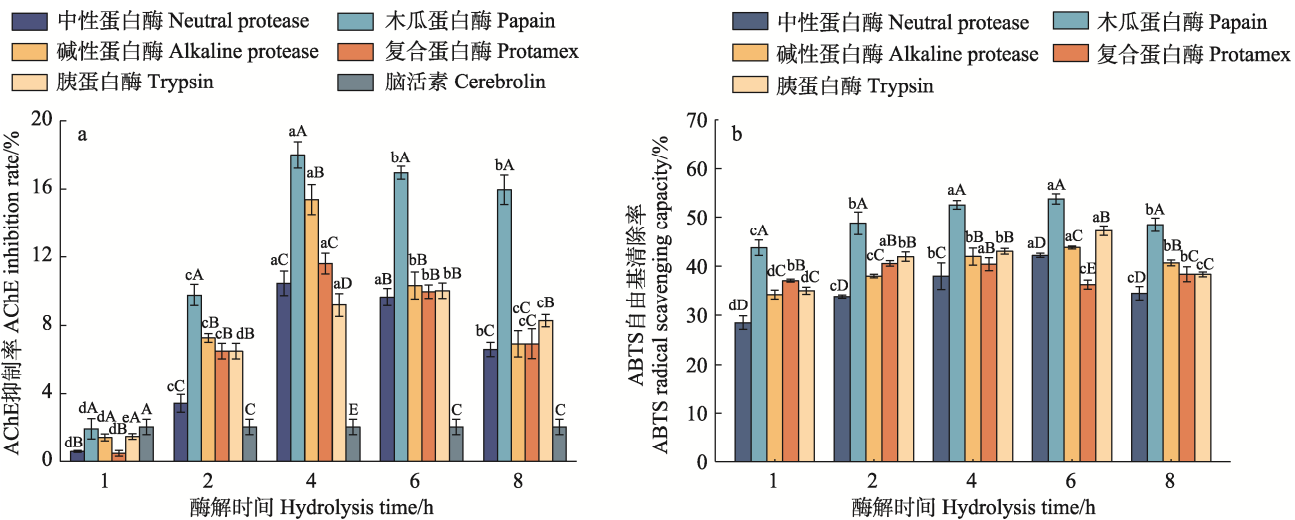


图 3 不同蛋白酶酶解物的 AChE 抑制率(a)及 ABTS 自由基清除能力(b)
Fig.3 Different proteases on degree of AChE inhibition rate (a), and ABTS radical scavenging ability (b)

不同小写字母表示在不同酶解时间下同种蛋白酶酶解产物的抑制率具有显著性差异($P<0.05$),
不同大写字母表示不同蛋白酶在同一酶解时间所得酶解物的抑制率有显著性差异($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences in the degree of inhibition rate of the enzymatic products of the same protease at different enzymatic hydrolysis times ($P<0.05$), and different capital letters indicated that the different protease at the same hydrolysis time had significant difference ($P<0.05$).

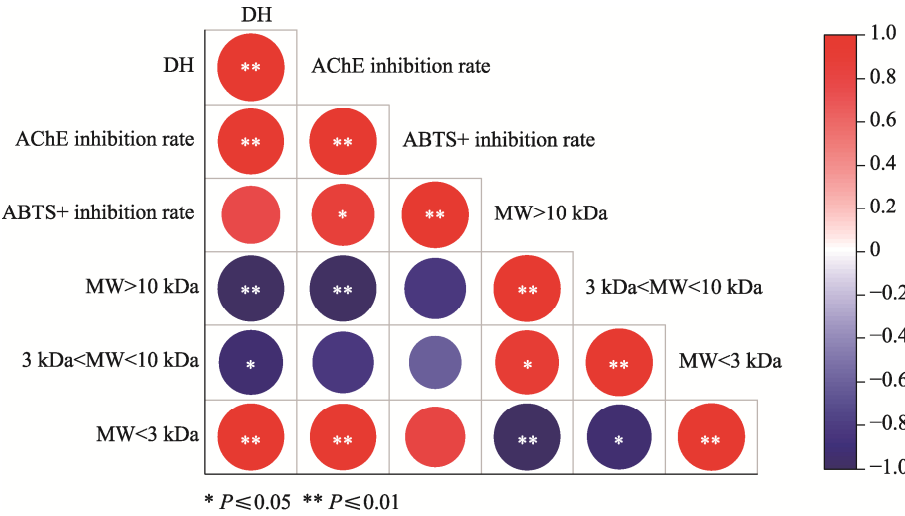


图 4 不同时间木瓜蛋白酶酶解物的水解度、分子量、AChE 抑制活性及
ABTS 自由基清除率之间的 Pearson 相关系数(r)分析
Fig.4 Pearson's correlation coefficients (r) analysis between DH, MW, AChE inhibition rate and
ABTS radical scavenging ability of papain protease hydrolysates at different hydrolysis times

红色表示正相关, 蓝色表示负相关; 颜色的强度表示相关性的大小。

Red denotes positive correlations, blue denotes negative correlations; intensity of the color represents the magnitude of the correlations.

因而其螯合活性成为 AD 治疗的靶点之一(杨悦, 2015)。

分别测定酶解物与钙、铁离子结合后的 AChE 抑制率,发现其 AChE 抑制活性均有提高。Kou 等(2021)研究发现, 乙胆碱酯酶抑制剂大黄素衍生物 a 的金属配合物同样具有更高的 AChE 抑制活性, 分析是抑制

剂与金属形成配合物时, 空间和电子性质发生变化, 与 AChE 产生相互作用。此外, 槲皮素与铁的络合物 QFe 也能直接抑制局部 AChE 活性, 显著降低乙酰胆碱诱发的神经信号传导电流, 并通过分子对接证实 QFe 复合物与活性位点的氨基酸残基有更好的相互作用(da Silva *et al*, 2020)。

2.6 紫外光谱分析

图 7 显示, 酶解产物在 250~290 nm 附近形成了芳香族氨基酸的特征吸收带。金属离子具有改变蛋白或多肽构型和生物活性的作用, 当酶解产物与 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 结合后, 特征吸收峰出现明显红移, 说明酶解产物与 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 之间均发生相互作用, 并生成新的结合物。酶解物与 AChE 结合后同样出现红移, 可能是酶解产物改变了酶的结构。

2.7 红外光谱分析

不同类型的化学基团在红外频段内会产生特定波长区域内共振吸收现象并呈现出独特可区分的“指纹”, 利用这一特性, 通过 FTIR 测量样品后产生的响应曲线来确定其成分和结构。金属离子与多肽氨基酸残基结合后, 其变化可以通过肽的羧酸酯和酰胺的特征红外吸收峰的变化观察出来。

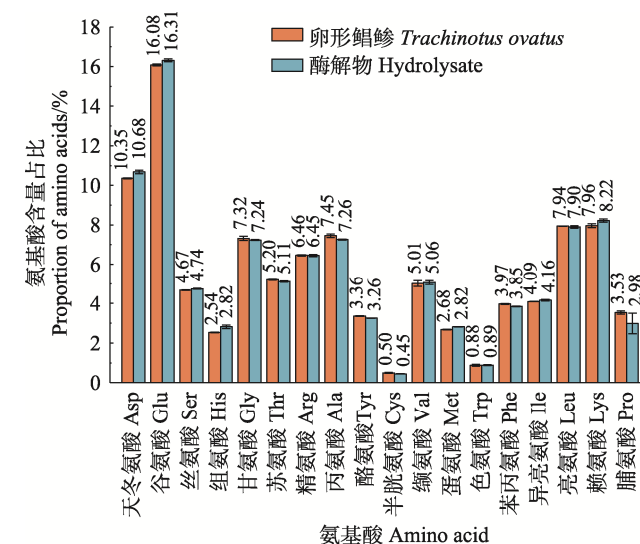
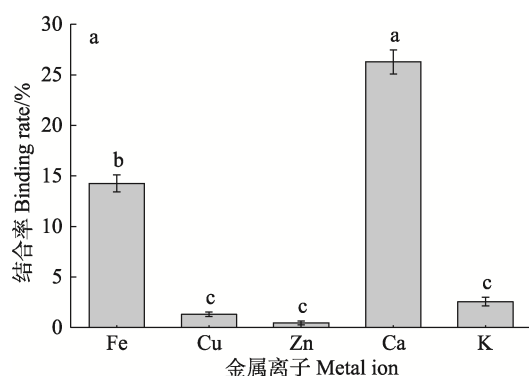


图 5 卵形鲳鲹鱼肉及其酶解物中氨基酸的组分及质量分数
Fig.5 Amino acids composition and mass fraction of *T. ovatus* and its hydrolysate

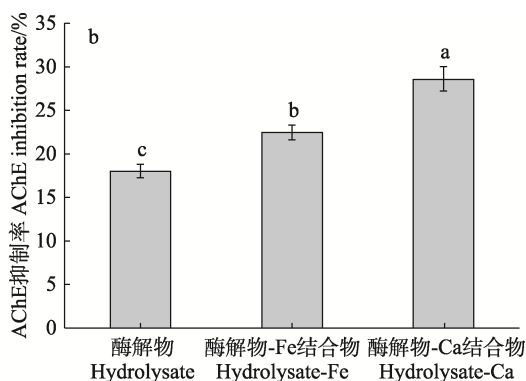


图 6 酶解物与金属离子结合率(a)、酶解物-Fe 和酶解物-Ca 的 AChE 抑制率(b)
Fig.6 Binding rate of hydrolysate to metal ions (a), AChE inhibition rate of hydrolysate-Ca and hydrolysate-Fe (b)

不同小写字母表示具有显著性差异($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图 8 为酶解物、酶解物-AChE 结合物、酶解物- Ca^{2+} 结合物和酶解物- Fe^{2+} 结合物在 400~4 000 cm^{-1} 波长处的红外光谱图。3 250~3 500 cm^{-1} 属于酰胺 A 带的 N-H 收缩振动峰, 酶解物在 3 282.84 cm^{-1} 出现特征吸收峰说明在此处有 -NH 的伸缩振动, 当与 AChE、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 结合后该峰移分别至 3 284.77、3 284.77、3 319.49 cm^{-1} , 表明 -NH 参与结合物的形成。在 2 372.44 cm^{-1} 处酶解物出现吸收峰为酰胺 B 带, 结合 AChE、 Ca^{2+} , 该峰蓝移至 2 370.51 cm^{-1} , 表明发生 CH_2 非对称伸缩振动, 而结合 Fe^{2+} , 该峰未发生变化。1 600~1 700 cm^{-1} 处出现的吸收峰属于酰胺 I 带($\text{C}=\text{O}$), 酶解物在 1 637.56 cm^{-1} 处出现吸收带是由 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动引起, 而酶解物与 AChE、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+}

结合物在此处均发生红移, 吸收峰移至 1 654.92 cm^{-1} , 表明 $\text{C}=\text{O}$ 与其发生稳定结合。1 400~1 500 cm^{-1} 属于羧基(-COOH)特征吸收峰区域, 酶解物在 1 440.83 cm^{-1} 处有吸收峰, 当其分别与 AChE、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 结合后, 吸收峰均移至 1 458.18 cm^{-1} , 表明 AChE、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 与羧基有结合。

3 结论

本研究以海水鱼卵形鲳鲹为原料, 以 AChE 抑制活性为指标, 评估了中性蛋白酶、木瓜蛋白酶、碱性蛋白酶、复合蛋白酶、胰蛋白酶 5 种常用酶以及酶解时间对酶解效果的影响。结果显示, 木瓜蛋白酶 4 h

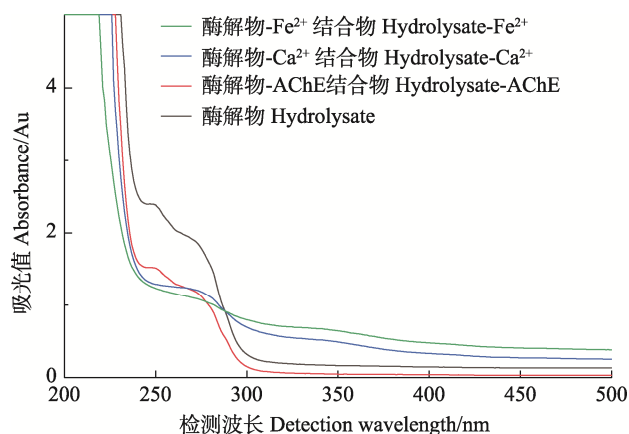


图 7 卵形鲳鲹酶解物、酶解物-AChE 结合物、酶解物- Ca^{2+} 结合物、酶解物- Fe^{2+} 结合物的紫外吸收光谱

Fig.7 UV spectrum of hydrolysate, hydrolysate-AChE, hydrolysate- Ca^{2+} and hydrolysate- Fe^{2+}

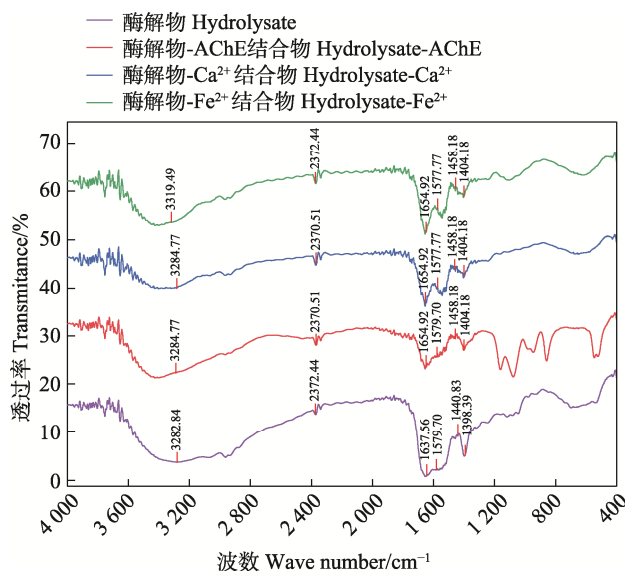


图 8 卵形鲳鲹酶解物、酶解物-AChE 结合物、酶解物- Ca^{2+} 结合物、酶解物- Fe^{2+} 结合物的红外吸收光谱

Fig.8 FTIR spectrum of hydrolysate, hydrolysate-AChE, hydrolysate- Ca^{2+} and hydrolysate- Fe^{2+}

酶解物具有最佳的 AChE 抑制活性和抗氧化能力, 此时分子量小于 3 kDa 的组分占比达到 96.87%, 疏水氨基酸占比 34.92%, Asp、Glu、Lys 等带电荷氨基酸含量较高, 而低分子量和疏水性的特点(通过被动运输进入膜内)将有助于其通过血脑屏障。酶解产物对 Ca^{2+} 和 Fe^{2+} 有较好的结合能力, 可用于调节体内金属离子平衡, 且结合后酶解产物的 AChE 抑制活性提高, 紫外光谱显示, 结合后的物质二级结构发生变化, 傅里叶变换红外光谱显示氨基、羰基和羧基参与结合物的形成。上述研究表明, 筛选得到的酶解产物具有

较好的治疗 AD 的潜在能力。未来的研究工作, 还需进一步验证卵形鲳鲹乙酰胆碱酯酶抑制肽在体内的 AChE 抑制效果, 挖掘发挥主要作用的肽段组成, 探究其作用机制, 为海洋生物活性肽在 AD 疾病改善和治疗方面提供理论支持和科学依据。

参 考 文 献

- ABDULJABBAR T N, SHARP B L, REID H J, *et al.* Determination of Zn, Cu and Fe in human patients' serum using micro-sampling ICP-MS and sample dilution. *Talanta*, 2019, 204: 663-669
- ANAND U, BANDYOPADHYAY A, JHA N K, *et al.* Translational aspect in peptide drug discovery and development: An emerging therapeutic candidate. *BioFactors*, 2023, 49(2): 251-269
- Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook 2024. Beijing: China Agriculture Press, 2024 [农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 2024 中国渔业统计年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2024]
- CAI W W, HU X M, WANG Y M, *et al.* Bioactive peptides from skipjack tuna cardiac arterial bulbs: Preparation, identification, antioxidant activity, and stability against thermal, pH, and simulated gastrointestinal digestion treatments. *Marine Drugs*, 2022, 20(10): 626
- CAO Y F, CHANG L Y, ZHANG X Z, *et al.* Protective effect of antioxidant peptides from *Argopecten irradians* against alcoholic liver injury. *Food Science*, 2024, 45(19): 87-93 [曹燕峰, 常立场, 张修正, 等. 海湾扇贝抗氧化肽对酒精性肝损伤的保护作用. *食品科学*, 2024, 45(19): 87-93]
- DA SILVA W M B, DE OLIVEIRA P S, ALVES D R, *et al.* Synthesis of quercetin-metal complexes, *in vitro* and *in silico* anticholinesterase and antioxidant evaluation, and *in vivo* toxicological and anxiolytic activities. *Neurotoxicity Research*, 2020, 37(4): 893-903
- DUMBACHER M, VAN DOOREN T, PRINCEN K, *et al.* Modifying Rap1-signalling by targeting Pde6 δ is neuroprotective in models of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 2018, 13(1): 50
- ELLMAN G L, COURTNEY K D, ANDRES V, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7(2): 88-95
- HOU M F, HU X, YANG X Q, *et al.* Preparation and process optimization of xanthine oxidase inhibitory peptides from *Trachinotus ovatus*. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(23): 185-192 [侯梦凡, 胡晓, 杨贤庆, 等. 卵形鲳鲹黄嘌呤氧化酶抑制肽的制备及其工艺优化. *食品与发酵工业*, 2021, 47(23): 185-192]

- HSIEH H L, YANG C M. Role of redox signaling in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *BioMed Research International*, 2013, 2013(1): 484613
- HUANG L. Inhibitory effect of walnut peptides and polyphenols on AChE. Master's Thesis of South China University of Technology, 2022 [黄琳. 核桃多肽及多酚对乙酰胆碱酯酶抑制作用研究. 华南理工大学硕士研究生学位论文, 2022]
- JIAO K, GAO X, YU J, *et al.* Study of the preparation of compound amino acid-chelated calcium by protease hydrolysis of scallop skirts. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(4): 178–184 [焦奎, 高翔, 于佳, 等. 酶解扇贝裙边制备复合氨基酸螯合钙的研究. 渔业科学进展, 2019, 40(4): 178–184]
- JU Y J, TAM K Y. Pathological mechanisms and therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 2022, 17(3): 543–549
- KOU X D, LIU J J, CHEN Y H, *et al.* Emodin derivatives with multi-factor anti-AD activities: AChE inhibitor, anti-oxidant and metal chelator. *Journal of Molecular Structure*, 2021, 1239: 130459
- LEE S Y, HUR S J. Mechanisms of neuroprotective effects of peptides derived from natural materials and their production and assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2019, 18(4): 923–935
- LI L L, YANG Y, MA C M, *et al.* Structure, antioxidant activity, and neuroprotective effect of black soybean (*Glycine max* (L.) merr.) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 2025, 463(Pt 4): 141390
- LI N, ZHOU D Q, LIU N, *et al.* Research on preparation of antioxidant peptides from cod swim bladder. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(2): 191–199 [李娜, 周德庆, 刘楠, 等. 鳕鱼鱼鳔抗氧化肽制备工艺研究. 渔业科学进展, 2020, 41(2): 191–199]
- LIU S W, ZHONG J M, FAN X P, *et al.* The effect of corona dormancy on the physiological stress and main nutritional components in the transport of *Trachinotus ovatus* during survival. *Progress in Fishery Sciences*, 2025, 46(1): 210–221 [刘思炜, 钟家美, 范秀萍, 等. 电晕休眠对卵形鲳鲹的生理应激和保活运输中主要营养成分的影响. 渔业科学进展, 2025, 46(1): 210–221]
- MAO M Q, LAN Z Y, HUANG F P, *et al.* Cloning, expression analysis, and subcellular localization of the TLR13 gene of golden pompano (*Trachinotus ovatus*). *Progress in Fishery Sciences*, 2023, 44(3): 85–96 [毛美琴, 蓝桢宇, 黄凤萍, 等. 卵形鲳鲹 TLR13 基因的克隆、表达分析和亚细胞定位研究. 渔业科学进展, 2023, 44(3): 85–96]
- SHI B W. Preparation and mechanism of acetylcholinesterase inhibitory peptides from salmon. Master's Thesis of Soochow University, 2021 [石博雯. 马哈鱼乙酰胆碱酯酶抑制活性肽的制备及机制研究. 苏州大学硕士研究生学位论文, 2021]
- SONG Y Q, HU X, XIANG H, *et al.* Study on tyrosinase inhibitory activity and Cu^{2+} binding activity of *Tilapia* skin peptides. *South China Fisheries Science*, 2023, 19(1): 155–164 [宋玉琼, 胡晓, 相欢, 等. 罗非鱼皮胶原肽的酪氨酸酶抑制活性与铜离子结合活性研究. 南方水产科学, 2023, 19(1): 155–164]
- UMAYAPARVATHI S, MEENAKSHI S, VIMALRAJ V, *et al.* Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2014, 4(3): 343–353
- WILLCOX D C, SCAPAGNINI G, WILLCOX B J. Healthy aging diets other than the Mediterranean: A focus on the Okinawan diet. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2014, 136: 148–162
- WILSON D M 3rd, COOKSON M R, VAN DEN BOSCH L, *et al.* Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell*, 2023, 186(4): 693–714
- XU D, LI Q F, ZHOU Y, *et al.* Functional analysis and regulation mechanism of interferon gamma in macrophages of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 194: 153–162
- YANG Y. Design and synthesis of novel metal chelator as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. Master's Thesis of Southeast University, 2015 [杨悦. 新型抗阿尔茨海默症金属离子螯合剂的设计与合成. 东南大学硕士研究生学位论文, 2015]
- ZHANG X X, TIAN Y, WANG Z T, *et al.* The epidemiology of Alzheimer's disease modifiable risk factors and prevention. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 2021, 8(3): 313–321
- ZHAO T T, XU J C, ZHAO H W, *et al.* Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities of anchovy (*Coilia mystus*) protein hydrolysates and their memory-improving effects on scopolamine-induced Amnesia mice. *International Journal of Food Science & Technology*, 2017, 52(2): 504–510
- ZHAO W H, LUO Q B, PAN X, *et al.* Preparation, identification, and activity evaluation of ten antioxidant peptides from protein hydrolysate of swim bladders of miiuy croaker (*Miichthys miiuy*). *Journal of Functional Foods*, 2018, 47: 503–511
- ZHENG L, DONG H Z, SU G W, *et al.* Radical scavenging activities of Tyr-, Trp-, Cys- and Met-Gly and their protective effects against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes. *Food Chemistry*, 2016, 197: 807–813

Preparation, Physicochemical Properties and Bioactivity of Acetylcholinesterase Inhibitory Peptide from *Trachinotus ovatus*

WU Binxia^{1,2,3}, HU Xiao^{2,3①}, CHEN Shengjun^{2,3}, WU Yanyan^{2,3},
QI Bo^{2,3}, DENG Jianchao^{2,3}, LONG Xiaoshan^{2,3}

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences;

Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510300, China;

3. Sanya Tropical Fisheries Research Institute, Sanya 572000, China)

Abstract Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized primarily by progressive memory decline, cognitive impairment, and disturbances in language and psychomotor functions. With the aging of the global population and the deterioration of the living environment, the number of patients is also increasing. The World Alzheimer's Disease Report estimates that the global population of Alzheimer's patients is expected to increase to 115 million by 2050, which could notably affect the world economy and society. The cholinergic hypothesis is a widely accepted theory describing AD pathology, which considers acetylcholine to be an important neurotransmitter involved in learning and memory. The lack of acetylcholine results in insufficient cholinergic signal transmission, consequently contributing to the development of AD. Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors can reduce the decomposition of acetylcholine by inhibiting the activity of AChE, making them one of the primary drugs for the treatment of AD. The AChE inhibitor drugs approved by the FDA include donepezil and galantamine. However, the micro-molecule drugs have strong side effects; therefore, finding new safe and efficient AChE inhibitors is necessary. Pathological protein aggregation, oxidative stress, and metal ion homeostasis imbalance exacerbate disease progression. The correlation between different pathogenic factors has shifted drug research from single to multiple targets. Bioactive peptides are peptide compounds with biological activity, which have the advantages of high selectivity, high specificity, multi-target, high safety, and low immunogenicity. In particular, bioactive peptides from marine sources have many specific structures and functions owing to their unique growth environment. Researchers have prepared and isolated peptides from marine organisms with antioxidants, anti-inflammatory, high blood pressure, uric acid, immune regulation, and other effects. *Trachinotus ovatus* has the advantages of high yield, fast growth, strong disease resistance, high nutritional value, high protein and essential amino acid content, and is a good raw material for preparing bioactive peptides. Enzymatic hydrolysis is the most commonly used method for preparing peptides owing to its mildness, controllability and low cost. In this study, the AChE inhibitory peptide was prepared by enzymolysis of *T. ovatus*. Enzymolysis was performed under five proteases (neutral protease, papain, alkaline protease, protamines, and trypsin), and different enzymolysis times (1, 2, 4, 6, and 8 h), and the optimal enzymolysis time were screened based on AChE inhibition activity and antioxidant capacity. The hydrolysis degree, molecular weight distribution, amino acid composition and chelating ability of metal ions were determined, and the structure of the products was determined by ultraviolet and Fourier transform infrared. The results showed that the 4 h hydrolysate of papain had the highest AChE inhibition rate ($18.02 \pm 0.78\%$), which was significantly higher than other

① Corresponding author: HU Xiao, Email: hnhuxiao@163.com

protease and positive control cerebrolin ($P<0.05$). The ABTS radical scavenging rate of the enzymolysis product was $(52.54\pm0.89)\%$, the degree of hydrolysis was 14.86%, and the proportion of components with molecular weight <3 kDa was 96.87%. Correlation analysis showed that AChE inhibition activity was significantly positively correlated with these three indices ($P<0.05$). In addition, the amino acids with the highest content in the 4 h papain hydrolysate were glutamic acid, aspartic acid, and lysine, all of which were positively or negatively charged. The proportion of hydrophobic amino acids was 34.92%, which contributed to the interaction between the hydrolysate products and AChE and free radicals, improving the inhibition rate of AChE and antioxidant activity. The binding ability of metal ions was determined. The enzymatic hydrolysis product could bind Ca^{2+} and Fe^{2+} ; the binding rates were $(26.28\pm1.20)\%$ and $(14.25\pm0.85)\%$, respectively, and the AChE inhibition activity was improved after binding. Ultraviolet analysis showed that the hydrolysates interacted with calcium and iron to form new compounds. Fourier transform infrared spectroscopy showed that amino and carboxyl groups participated in the formation of the complexes. Consequently, the screened hydrolysate has good potential for treating AD. In the future, the AChE inhibition effect of AChE inhibitory peptide *in vivo* will be further verified, and the primary role of peptide composition will be explored, including the mechanism of action. This provides theoretical support and scientific basis for marine bioactive peptides in the improvement and treatment of AD disease.

Key words *Trachinotus ovatus*; Enzymolysis; Acetylcholinesterase inhibitory peptide; Antioxidant; Metal ion binding activity