

文章编号:1000 - 0615(2005)01 - 0097 - 06

## 中国毛虾 ACE 抑制肽的初步研究

章超桦, 曹文红, 吉宏武, 洪鹏志, 秦小明

(湛江海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524025)

**摘要:**对以中国毛虾为原料酶法制备具有抑制血管紧张素转换酶(ACE)活性的酶解产物的方法作了探讨。以体外活性(ACE抑制率)为指标,通过正交试验确定胃蛋白酶的最佳酶解条件为pH2.4、温度41℃、酶量900U·g<sup>-1</sup>底物、底物浓度8%;酶解产物的IC<sub>50</sub>为0.65mg·mL<sup>-1</sup>,再分别利用Sephadex G-25和Sephadex G-15对其进行进一步分离提纯,IC<sub>50</sub>降至0.084mg·mL<sup>-1</sup>和0.046mg·mL<sup>-1</sup>,活性组分中的疏水性氨基酸含量增高,最终活性产物的分子量分布在700~1900。

**关键词:**中国毛虾;血管紧张素转换酶抑制肽;酶解

中图分类号:S986

文献标识码:A

### Preliminary study on enzymatic hydrolysis of *Acetes chinensis* to produce angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides

ZHANG Chao-hua, CAO Wen-hong, JI Hong-wu, HONG Peng-zhi, QIN Xiao-ming

(College of Food Science and Technology, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

**Abstract:** Preparing angiotensin I-converting enzyme inhibitors derived from the enzymatic hydrolysate of *Acetes chinensis* was discussed in this paper. To get the optimal conditions of peptic hydrolysis we did orthogonal trials with the ACE inhibitory ratio *in vitro* being the index. The hydrolysate with IC<sub>50</sub> being 0.65 mg·mL<sup>-1</sup> was gained under the conditions of pH 2.4, temperature 41℃, enzymatic hydrolysis time 3 hours, enzymatic concentration 900 U·g<sup>-1</sup> substrate and substrate concentration 8%. The hydrolysate was filtrated with a Sephadex G-25 column, the fraction with the highest ACE inhibitory activity was collected and filtrated with a Sephadex G-15 column, and the fraction with the highest activity was collected again, their IC<sub>50</sub> were found to be 0.084 mg·mL<sup>-1</sup> and 0.046 mg·mL<sup>-1</sup>, respectively. After purification the content of hydrophobic amino acids tended to increase in the amino acids composition. Molecular weight distribution of the highest ACE inhibitory activity fraction of Sephadex G-15 gel chromatography was located between 700 and 1900.

**Key words:** *Acetes chinensis*; angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides; enzymatic hydrolysis

血管紧张素转换酶(angiotensin I-converting enzyme, ACE)在血压的调节中具有重要的生理作用<sup>[1]</sup>。ACE催化血管紧张素I转化成具有强烈血管收缩作用的血管紧张素II,同时使具有血管扩张作用的缓激肽失活,引起血压上升。通过抑制ACE活性可以降低血压或阻止血压上升。在成功开发人工合成的ACE抑制剂captopril后,越来越多的合成ACE抑制剂被研究开发出来并用于临床,取得了良好的治疗效果。但化学合成的

ACE抑制剂(ACEI)都具有一定的毒副作用,所以寻找安全高效的ACE抑制剂一直是降血压药物研究中的重点课题<sup>[2]</sup>。食品科学研究者发现,某些蛋白质的氨基酸序列中可能包含具有某种生理调节功能的短肽。这些短肽对人体具有促进钙吸收<sup>[3]</sup>、降低血压<sup>[4]</sup>、降低胆固醇<sup>[5]</sup>等广泛的保健功能。特别是以食品蛋白为原料制备具有降低血压作用的降血压肽已成为保健食品研究领域的一个热点。降血压肽是一类ACE抑制剂,通过抑制

收稿日期:2004-04-16

资助项目:广东省教育厅“千百十工程”优秀人才培养基金项目(Q02111);湛江市科技攻关项目(湛财企2003[104])

作者简介:章超桦(1956-),男,福建龙岩人,教授,博士生导师,主要从事海洋生物资源综合利用研究。Tel:0759-2382049, E-mail:

zhangch@zjou.edu.cn

ACE的活性而起降血压的作用。目前已经从大豆<sup>[6]</sup>、酪蛋白<sup>[7]</sup>、沙丁鱼<sup>[8]</sup>、金枪鱼<sup>[9]</sup>等众多的食品蛋白酶解产物中分离提取了ACE抑制肽。我们以中国毛虾为原料,经胃蛋白酶酶解得到了较高ACE抑制活性的组分。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与试剂

中国毛虾(*Acetes chinensis*)由茂名市水产局提供,500 g分装后于-18℃冷冻保藏备用。

马尿酸-组氨酸-亮氨酸(hippuryl-L-histidyl-L-leucine, HHL)购自Sigma公司。猪肺ACE粗酶液,本实验室自制,活力浓度为0.18U·mL<sup>-1</sup>。胃蛋白酶(30 000 U·g<sup>-1</sup>),上海生化试剂公司。Sephadex G-25、Sephadex G-15,Pharmacia进口分装。

### 1.2 实验方法

**原料的处理** 中国毛虾加水充分匀浆,沸水浴加热10min,冷却后加酶酶解。酶解结束后,沸水浴10min灭酶,冷却后调节pH至7.0,12 000 r·min<sup>-1</sup>离心后的上清液用于ACE抑制活性的测定。

**胃蛋白酶酶解条件的优化** pH、温度、酶解时间、酶量、底物浓度为影响蛋白质酶解效果的5个主要因素。每个因素4个水平(表1),以对ACE的抑制率为指标,采用L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交表进行实验。

表1 胃蛋白酶酶解因素水平

Tab. 1 Levels and factors of peptic hydrolysis

| 因素<br>factors                      | 代号<br>codes | 水平 levels |     |     |      |
|------------------------------------|-------------|-----------|-----|-----|------|
|                                    |             | 1         | 2   | 3   | 4    |
| pH                                 | A           | 2.0       | 2.2 | 2.4 | 2.6  |
| 温度(°C)<br>temperature              | B           | 37        | 41  | 45  | 49   |
| 时间(h)<br>time                      | C           | 1         | 2   | 3   | 4    |
| 酶量(U底物g <sup>-1</sup> )<br>enzyme  | D           | 300       | 600 | 900 | 1200 |
| 底物浓度(%)<br>substrate concentration | E           | 6         | 8   | 10  | 12   |

**体外实验方法** 参照Cushman等<sup>[10]</sup>的方法,略作改进。实验在2mL的Eppendorf管中进行,分为3组,第1组为空白值,第2组为加入抑制剂组,第3组为不加抑制剂组。往Eppendorf管

中加入50 μL的抑制剂溶液,再加入50 μL的5mmol L<sup>-1</sup> HHL溶液,37℃水浴中保温6min,加入50 μL ACE粗酶液启动反应,37℃保温30min后加入150 μL的1mol L<sup>-1</sup> HCl终止反应。再加入乙酸乙酯1.5mL,在旋涡混合器上混合20s,静置后用移液器吸取1.0mL脂层于10mL试管中,置沸水浴中挥干后用移液器吸取1.0mL去离子水将之溶解,在紫外228nm波长处测定溶液的紫外吸收值。

抑制率的计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

其中:A为加50 μL HHL溶液、50 μL ACE粗酶液和50 μL去离子水的吸光值;B为加50 μL HHL溶液、50 μL ACE粗酶液和50 μL抑制剂的吸光值;C为加50 μL HHL溶液、50 μL磷酸缓冲液和50 μL去离子水的吸光值。

对ACE的抑制率为50%时ACE抑制剂的浓度即为半数抑制浓度,记为IC<sub>50</sub>。

原料及凝胶过滤收集组分之氨基酸组成比较将中国毛虾酶解液先后经Sephadex G-25凝胶柱及Sephadex G-15凝胶柱过滤制备高活性的组分,冷冻干燥后用于氨基酸组成分析。氨基酸组成分析样品经6mol L<sup>-1</sup> HCl水解后,采用日立835-50型高速氨基酸分析仪进行17种蛋白质构成氨基酸的分析。另取样品经5 mol L<sup>-1</sup> NaOH水解,同机测定色氨酸含量。

**中国毛虾ACE抑制肽的肽质谱分析** 将Sephadex G-15凝胶层析收集组分的冷冻干燥样品粉末溶于0.5%三氟乙酸,混匀后质谱分析。基质:-氰基-4-羟基肉桂酸,内标:胰岛素(分析仪器为Micromass公司TofSpec型MALDA-TOF-MS),外标:胰岛素B链(分析仪器为Bruker公司BIFLEX III型MALDI-TOF-MS)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 胃蛋白酶对中国毛虾的酶解效果

表2是胃蛋白酶酶解中国毛虾的正交试验结果。对其进行极差分析的结果表明,对酶解产物ACE抑制率影响最大的是酶量,其次是pH、温度、底物浓度和酶解时间。最佳的因素水平组合为A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>E<sub>2</sub>。因A因素的A<sub>2</sub>和A<sub>3</sub>水平无显著差异,所以A因素取A<sub>3</sub>水平,最终确定的最佳条件

是 A<sub>3</sub>B<sub>2</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>E<sub>2</sub>, 亦即 pH 2.4、温度 41 °C、酶解时间 3h、酶量 900 U · g<sup>-1</sup> 底物、底物浓度 8%。经过验证试验,在该条件下所得中国毛虾酶解液的 ACE 抑制率为 91.41%。

表 2 胃蛋白酶酶解条件的优化设计与结果  
Tab.2 Design and results of peptic hydrolysis trial conditions

| 序号<br>experiment no. | A      | B      | C      | D      | E      | ACE 抑制率(%)<br>ACE inhibitory ratio |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------------------------|
| 1                    | 1      | 1      | 1      | 1      | 1      | 70.54                              |
| 2                    | 1      | 2      | 2      | 2      | 2      | 73.02                              |
| 3                    | 1      | 3      | 3      | 3      | 3      | 78.09                              |
| 4                    | 1      | 4      | 4      | 4      | 4      | 69.18                              |
| 5                    | 2      | 1      | 2      | 3      | 4      | 77.23                              |
| 6                    | 2      | 2      | 1      | 4      | 3      | 76.24                              |
| 7                    | 2      | 3      | 4      | 1      | 2      | 72.28                              |
| 8                    | 2      | 4      | 3      | 2      | 1      | 68.19                              |
| 9                    | 3      | 1      | 3      | 4      | 2      | 75.01                              |
| 10                   | 3      | 2      | 4      | 3      | 1      | 79.08                              |
| 11                   | 3      | 3      | 1      | 2      | 4      | 70.92                              |
| 12                   | 3      | 4      | 2      | 1      | 3      | 68.56                              |
| 13                   | 4      | 1      | 4      | 2      | 3      | 60.89                              |
| 14                   | 4      | 2      | 3      | 1      | 4      | 70.41                              |
| 15                   | 4      | 3      | 2      | 4      | 1      | 59.90                              |
| 16                   | 4      | 4      | 1      | 3      | 2      | 72.28                              |
| K <sub>1</sub>       | 290.83 | 283.67 | 289.98 | 281.79 | 277.71 |                                    |
| K <sub>2</sub>       | 293.94 | 298.75 | 278.71 | 273.02 | 292.59 |                                    |
| K <sub>3</sub>       | 293.57 | 281.19 | 291.70 | 306.33 | 283.78 |                                    |
| K <sub>4</sub>       | 263.48 | 278.21 | 281.43 | 280.43 | 287.74 |                                    |
| $\bar{K}_1$          | 72.71  | 70.92  | 72.50  | 70.45  | 69.43  |                                    |
| $\bar{K}_2$          | 73.49  | 74.69  | 69.68  | 68.26  | 73.15  |                                    |
| $\bar{K}_3$          | 73.39  | 70.30  | 72.93  | 76.58  | 70.95  |                                    |
| $\bar{K}_4$          | 65.87  | 69.55  | 70.36  | 70.11  | 71.94  |                                    |
| R                    | 7.62   | 5.14   | 3.25   | 8.42   | 3.72   |                                    |

注: K<sub>i</sub> 为水平 ACE 抑制率之和,  $\bar{K}_i$  为平均水平 ACE 抑制率, i = 1, 2, 3, 4

Notes: K<sub>i</sub>: Total ACE inhibitory ratio of each level,  $\bar{K}_i$ : Average ACE inhibitory ratio of each level

胃蛋白酶是一种专一性相对较宽的蛋白酶, 能够将蛋白底降解成较小分子量的短肽。在 pH 2.4、温度 41 °C、酶解时间 3h、酶量 900 U · g<sup>-1</sup> 底物、底物浓度 8% 的条件下中国毛虾胃蛋白酶酶解液不同肽类浓度与 ACE 抑制率的关系如图 1, 表明中国毛虾的胃蛋白酶酶解产物具有较强的 ACE 抑制活性。

## 2.2 中国毛虾 ACE 抑制肽分离提取前后某些指标的变化

Cheung 等<sup>[11]</sup>的研究认为, 肽类 C 端及 N 端氨基酸对 ACE 抑制肽的活性有重大的影响, 当 C 端为芳香族氨基酸或脯氨酸, N 端为疏水性氨基酸时其抑制活性较高; Suetsuna 等<sup>[12]</sup>分析了来源于 15 种鱼贝类 ACE 抑制肽的氨基酸组成, 发现来源于鱼类的抑制肽含有丰富的 Asp、Glu、Arg、Pro、Ile、和 Lys, 来源于贝类的则富含 Asp、Glu、和

Lys。

表 3 是经过 Sephadex 凝胶过滤分离前后氨基

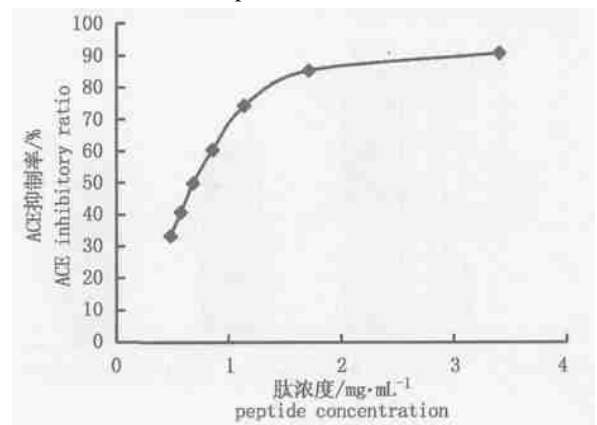


图 1 酶解液 ACE 抑制率与肽浓度关系曲线  
Fig. 1 Relationship between ACE inhibitory ratio and peptide concentration

酸氨基酸组成的变化情况。原料蛋白质氨基酸组成中芳香族(色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)及脯氨酸的含量占氨基酸总量的 13.39%,在 Sephadex G-25 和 G-15 过滤收集组分中则分别占 9.43% 和 8.95%,呈下降的趋势;而原料蛋白质氨基酸组成中疏水性氨基酸(缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸)占氨基酸总量的 17.69%,在 Sephadex G-25 和 G-15 组分中则分别占 18.45% 和 20.15%,呈上升的趋势。Asp、Glu、Arg、Pro、Ile、和 Lys 在原料蛋白质及 Sephadex G-25 和 G-15 组分中含量分别高达 51.73%、56.34% 和 56.14% (图 4),与 Suetsuna 的研究结果相符。

表 3 原料蛋白质与 Sephadex 凝胶色谱组分的氨基酸组成

Tab.3 Amino acids composition of material protein and fractions of Sephadex gel filtration chromatography %

| 氨基酸<br>amino acids | 代号<br>codes | 原料蛋白质<br>material protein | Sephadex<br>G-25 | Sephadex<br>G-15 |
|--------------------|-------------|---------------------------|------------------|------------------|
| 甘氨酸                | Gly         | 6.60                      | 5.56             | 4.63             |
| 丙氨酸                | Ala         | 7.08                      | 6.70             | 6.66             |
| 缬氨酸                | Val         | 4.87                      | 5.72             | 5.74             |
| 亮氨酸                | Leu         | 8.10                      | 7.71             | 9.04             |
| 异亮氨酸               | Ile         | 4.72                      | 5.02             | 5.34             |
| 丝氨酸                | Ser         | 2.83                      | 2.98             | 2.86             |
| 苏氨酸                | Thr         | 3.85                      | 4.20             | 4.05             |
| 甲硫氨酸               | Met         | 3.14                      | 2.97             | 3.11             |
| 胱氨酸                | Cys         | 0.55                      | 0.60             | 0.71             |
| 天门冬氨酸              | Asp         | 10.53                     | 13.05            | 12.43            |
| 谷氨酸                | Glu         | 15.49                     | 18.25            | 19.39            |
| 酪氨酸                | Tyr         | 3.30                      | 1.71             | 1.69             |
| 苯丙氨酸               | Phe         | 4.72                      | 3.23             | 3.17             |
| 脯氨酸                | Pro         | 4.17                      | 4.12             | 3.42             |
| 色氨酸                | Trp         | 1.10                      | 0.37             | 0.67             |
| 精氨酸                | Arg         | 9.04                      | 6.15             | 6.14             |
| 赖氨酸                | Lys         | 7.78                      | 9.75             | 9.39             |
| 组氨酸                | His         | 2.12                      | 1.98             | 1.52             |

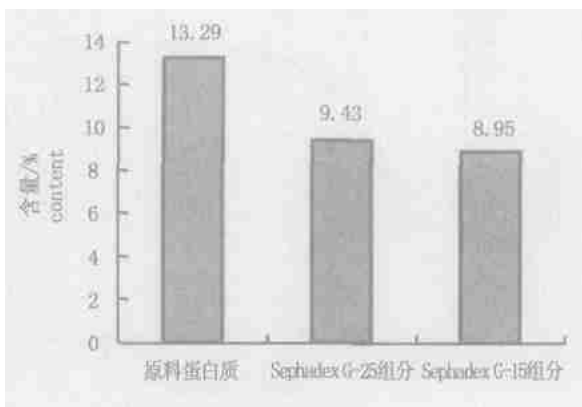


图 2 分离提取后氨基酸含量的变化 (芳香族氨基酸及脯氨酸)

Fig.2 Variation of amino acids contents after separation (Aromatic amino acids & proline)

在 ACE 抑制活性方面,经 Sephadex 凝胶层析后,活性得到了大幅度的提高(图 5),IC<sub>50</sub>由原料酶解液的 0.65 mg·mL<sup>-1</sup>降低至 Sephadex G-25 收集组分的 0.086 mg·mL<sup>-1</sup>以及 Sephadex G-15 收集组分的 0.046 mg·mL<sup>-1</sup>。

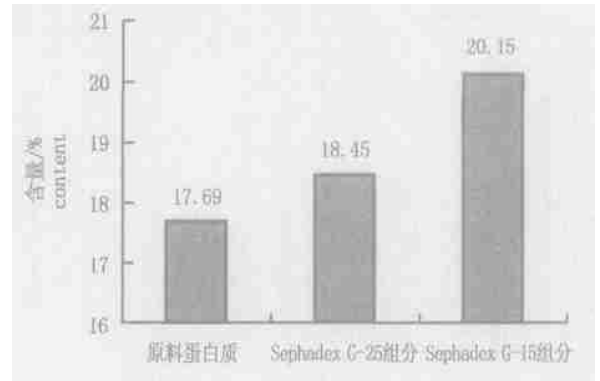


图 3 分离提取后疏水氨基酸含量的变化

Fig.3 Variation of hydrophobic amino acids after separation

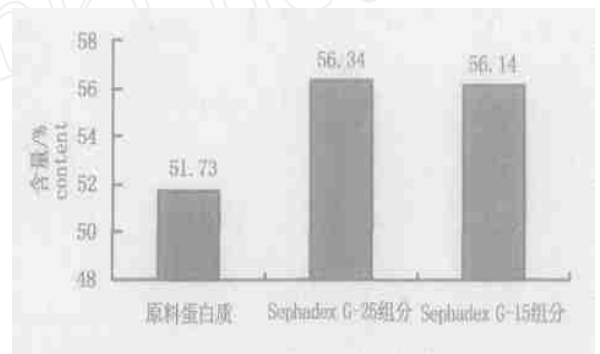


图 4 分离提取后氨基酸含量的变化 (Asp、Glu、Arg、Pro、Ile、Lys)

Fig.4 Variation of amino acids contents after separation

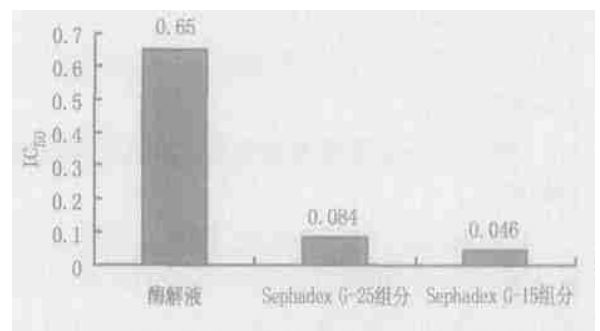


图 5 分离提取后 IC<sub>50</sub>的变化

Fig.5 Variation of IC<sub>50</sub> after separation

## 2.5 Sephadex G-15 凝胶层析组分的肽质谱分析

肽谱分析,最早称之为 fingerprinting (指纹技术)。蛋白质及多肽的肽谱分析,一般是采用高效液相(HPLC)法或毛细管电泳(CE)法。蛋白质多肽经酶解后,在 HPLC 或 CE 上分离,即所谓肽谱。但采用色谱法有一些局限性,有些肽并不能得到很好的分离。重要的是,无论 HPLC 或 CE 法均无法精确测定出肽的分子量,而肽的质谱分析可以克服这个弱点<sup>[13]</sup>。

图 6 是 Sephadex G-15 凝胶色谱收集的高活性组分的肽质谱图。图谱中纵坐标是质谱仪检测的离子信号强度,横坐标是分子量。由图可知,经 Sephadex G-15 凝胶色谱分离收集的组分分子量分布在 700 ~ 1900,仍然是分子量不同的许多肽的

混合物。

## 3 结论

在 pH 2.4、温度 41 °C、酶解时间 3h、酶量 900 U · g<sup>-1</sup>底物、底物浓度 8 % 的条件下中国毛虾的胃蛋白酶酶解产物对猪肺 ACE 具有较强的抑制活性,IC<sub>50</sub>可达 0.65 mg · mL<sup>-1</sup>。而经过 Sephadex G-25 和 Sephadex G-15 凝胶层析收集组分的活力分别达到 0.084 mg · mL<sup>-1</sup>和 0.046 mg · mL<sup>-1</sup>。疏水性氨基酸和 Asp、Arg、Pro、Ile 和 Lys 等对中国毛虾 ACE 抑制肽的活性可能具有重要的作用。Sephadex G-15 凝胶层析收集组分的分子量在 700 ~ 1900,显示酶解产物中主要的 ACE 抑制成分是分子量较低的短肽。

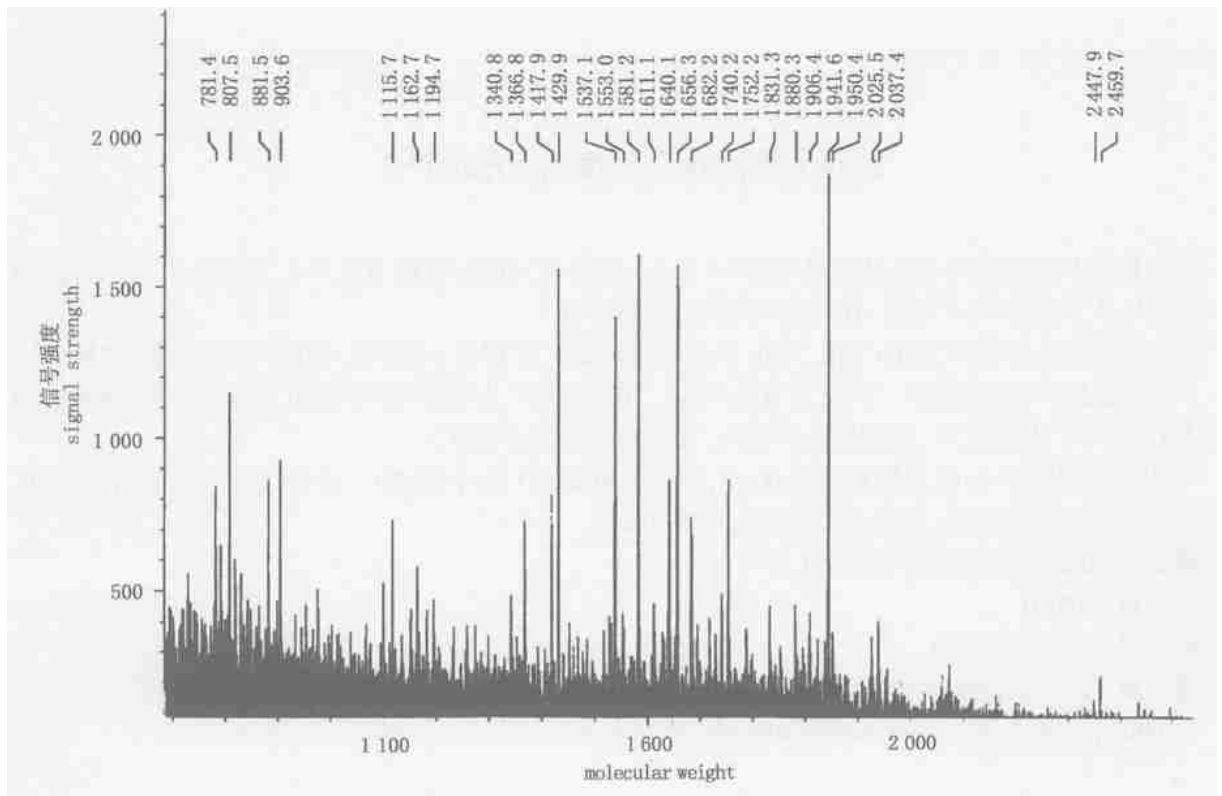


图 6 Sephadex G-15 凝胶层析组分的肽质谱图

Fig. 6 Peptide mass spectrometry of Sephadex G-15 fractions with highest ACE inhibitory activity

本文证明以中国毛虾为原料可以制备具有较强 ACE 抑制活性的肽类,但尚需进一步分离出单一高活性 ACE 抑制肽,分析其氨基酸序列,并研究其降低血压的生物学效应以及在胃肠道的安定性和吸收问题,为降血压肽保健食品的开发及合成和提取新药提供可靠依据。

## 参考文献:

- [1] Skeggs L T, Kahn J E, Shumway N P. The preparation and function of the angiotensin-converting enzyme[J]. J Exp Med, 1957, 103: 295 - 299.
- [2] 曹文红, 章超桦. 食品蛋白降血压肽及其酶法制备[J]. 食品科技, 2002, (4): 9 - 10.
- [3] Lee Y S, Noguchi T, Naoti H. Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or amino acids mixture the role of casein in phosphopeptides[J]. Br J Nutr, 1983, 49: 67 -

- 76.
- [4] Ariyoshi Y. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins[J]. Trends in Food Sci and Technol, 1993, 4:139 - 144.
- [5] Yashiyo S, Oda S, Sugano M. Hypocholesterolemic effect of soybean in rats and mice after peptic digestion[J]. J Nutr, 1985, 115:1325 - 1336.
- [6] Okamoto A, Hanagata H, Kawabura Y, et al. Antihypertensive substances in fermented soybean, natto[J]. Plant Foods Hum Nutr, 1995, 47:39 - 47.
- [7] Maeno M, Yamamoto N, Takano T, et al. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790[J]. J Dairy Sci, 1996, 79:1316 - 1321.
- [8] Matsui T, Matsufuji H, Osajima K, et al. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle[J]. Biosci Biotech Biochem, 1993, 57:922 - 925.
- [9] Kohama, Y, Matsufuji H, Seke E, et al. Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitors from tuna muscle[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1988, 155:332 - 337.
- [10] Cushman D W, Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20:1637 - 1648.
- [11] Cheung H S, Wang F L, Ondetti M A, et al. Inhibitory activity against angiotensin I-converting enzyme[J]. J Biol Chem, 1980, 255:401 - 407.
- [12] Suesuna K, Yamagami M, Kumwata K, et al. Inhibitory activity against angiotensin I-converting enzyme of peptides originating from fish and shellfish muscle[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1988, 54(10):1852 - 1856.
- [13] Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it[J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996, 13:19 - 50.

## 欢迎订阅 2005 年度《南方水产》

经科技部和国家新闻出版总署批准, 2005 年《水产文摘》改名为《南方水产》, 为综合类水产科技期刊, 双月刊, 大 16K, 页码扩增至 80 页, 印刷精美, 价格不变。

《南方水产》立足南方, 面向全国, 突出学术性、地域性、实用性、可读性, 开辟“研究论文”、“科学实验”、“专题综述”、“研究简报”、“新技术与新产品”、“市场动态”及“水产学科文摘”等专栏, 重点报道国内外渔业科研、生产的新技术、新成果及新动向。欢迎投稿, 欢迎订阅!

本刊邮发代号 46 - 65, 每期定价 8.00 元, 全年 6 期 48.00 元(含邮费)。由于接到上级的通知较迟, 为避免不必要的退款手续, 请读者直接向编辑部订阅。

编辑部地址: 广州市新港西路 231 号

邮 编: 510300

电 话: 020 - 84458694

传 真: 020 - 84451442

E-mail: nfsc @vip. 163. com; scwz @163. net