

22种海水鱼中 ACEI 的制备及其化学修饰

时 瀚^{1,2}, 孙 谡¹, 于建生², 王跃军¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 青岛科技大学, 山东 青岛 266042)

摘要:以取自中国黄海的22种鱼类为研究对象,测定其鱼肉组织上清液的酶解物对血管紧张素转化酶(ACE)的抑制作用。从6种商业用酶和1种新型海洋低温碱性蛋白酶(MLAP)中,筛选出MLAP作为酶解制备ACEI的理想水解酶。以该酶水解上述22种海水鱼鱼肉组织上清液,并将水解液经Sephadex G-25凝胶层析和DEAE Sepharose阴离子交换层析,得到ACEI纯品。测定各类ACEI体外抑制ACE的活性发现,这22种海水鱼中以鲻鱼(*Engraulis japonicus*)所产ACEI活性最高,其余鱼类无显著差异。以鲻鱼制备血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI-22),并对ACEI-22作进一步研究,结果发现,ACEI-22对自发性高血压大鼠(SHR)有降压效果,但不显著;ACEI-22经聚乙二醇化学修饰后,修饰率为68%,且给药SHR后,大鼠收缩压显著降低,与相同条件下同剂量的卡托普利的降压效果相当。故聚乙二醇修饰的ACEI-22可有效地降低SHR的血压。[中国水产科学,2006,13(1):100-105]

关键词:血管紧张素转化酶抑制剂;海洋低温碱性蛋白酶;化学修饰;海水鱼类

中图分类号:S986 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)01-0100-06

血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)在人体血压调节过程中起重要作用,它能同时作用于血管紧张素I和舒缓激肽,并产生血管收缩活性,引起血压升高。因此,通过抑制ACE的活性就可达到预防和治疗高血压的目的。近年来,人们从许多食品蛋白质中发现天然ACE抑制肽,如大豆^[1]、沙丁鱼肉^[2]、酸奶^[3]、鸡蛋蛋黄蛋白等^[4]。但有关从海水鱼鱼肉组织上清液酶解得到降压肽的报道较少,目前仅见利用鱼肉组织酶解得到降压肽的研究^[5]。

此外,碱性蛋白酶水解得到的生物活性多肽体外活性通常高于其他蛋白酶类,如胃蛋白酶和胰蛋白酶,但碱性蛋白酶酶解物直接用于人体时存在缺陷,不能被人体有效利用^[6]。然而多肽药物被修饰后,其主要的生物学功能保持不变,并可获得一系列特殊性质。因此多肽的化学修饰在生物医学和生物技术等诸多领域得到越来越广泛的应用。

目前水产品酶解主要集中在氨基酸和多肽的营养研究方面,较少报道利用海洋生物提取活性物质开发具有自主知识产权的新药。本研究以中国黄海22种海水鱼类(包括常见种和优势种)为原料,试图探讨利用酶工程技术将鱼蛋白资源转化为具有较高

的ACE抑制作用的生物活性肽——血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)的可行性,并通过化学修饰,提高其在动物体内的稳定性,达到降低血压的作用。这既为采用海水鱼深加工寻找新的生物活性物质,开发海洋药物的研究打下一定的科学基础,又可结合其他已知血管紧张素转化酶抑制剂,探讨结构与功能之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 鱼样品 22种海水鱼于2004年取自中国黄海(表1)。

1.1.2 实验动物 自发性高血压大鼠(SHR)40只,体重72~75 g,6周龄。正常血压Wistar Kyoto大鼠(WKY)10只,体重72~75 g,6周龄。

1.1.3 蛋白酶样品 胃蛋白酶(2 500 U/g)、木瓜蛋白酶(100 000 U/g)和胰蛋白酶(2 000 U/g)均为Novo公司产品;ASI,398中性蛋白酶(40 000 U/g)、537酸性蛋白酶(50 000 U/g)和2709碱性蛋白酶(100 000 U/g)均为上海生物制剂厂产品;海洋低温碱性蛋白酶(140 000 U/g)由黄海水产研究所酶工程开放实验室提供。

收稿日期:2004-12-20; 修订日期:2005-05-14。

基金项目:中国水产科学研究院科研基金资助项目(2003-青-13)。

作者简介:时 瀚(1980-),女,硕士研究生,从事天然活性物质研究。E-mail:shihans_1980@126.com

通讯作者:孙 谡。E-mail:sunsi@ysfci.ac.cn

表1 22种海水鱼酶解产物 ACEI 的抑制活性

Tab.1 Inhibitory activity of ACEI from 22 species of sea fishes

种名 Species	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)	种名 Species	IC ₅₀ /(mg·mL ⁻¹)
日本鲷 <i>Scomber japonicus</i>	0.021	小带鱼 <i>Trichiurus muticus</i>	0.015
长颌鲳 <i>Zoarces elongatus</i>	0.018	黄鲫 <i>Setipinna taty</i>	0.016
鲅鱼 <i>Coilia ectenes</i>	0.016	斑鲆 <i>Konovirus punctatus</i>	0.014
绿鳍鱼 <i>Chelidonichthys kumu</i>	0.020	恒鲧 <i>Stromateoides argenteus</i>	0.019
黑鲷梅童 <i>Collichthys niveatus</i>	0.018	黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>	0.014
海鲢 <i>Muraenox cinereus</i>	0.019	带鱼 <i>Trichiurus haumela</i>	0.019
黑鲷 <i>Sparus macrocephalus</i>	0.017	鲷 <i>Katsuwonus pelamis</i>	0.017
矛尾鰕虎鱼 <i>Chaeturichthys stigmatius</i>	0.015	细纹狮子鱼 <i>Liparis tanakai</i>	0.022
木叶鲷 <i>Tleuronichthys cornutus</i>	0.020	长条蛇鲻 <i>Saurida elongata</i>	0.021
竹荚鱼 <i>Trachurus japonicus</i>	0.019	小黄鱼 <i>Pseudociaena polyactis</i>	0.017
半滑舌鲷 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	0.018	鲷鱼 <i>Engraulis japonicus</i>	0.004

1.1.4 主要试剂 马尿酸组氨酸亮氨酸 (hippuryl-L-histidyl-L-leucine, HHL) 和兔肝丙酮粉均为 Sigma 公司产品;右旋糖酐 (Dextran, T70) 为 Pharmacia 公司产品;PEG 活性酯 PEG₂-NHS (MW 20 000) 为 Shearwater Corporation 产品;肝素 (Heparin) 为上海生物生化制药厂产品;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.5 仪器 Alliance2690-PAD2996 高效液相色谱系统购自 Waters 公司;Gilson III 型低压制备色谱;尾部血压测量器 (Softron BP 98-A, Japan)。

1.2 方法

1.2.1 蛋白酶的筛选 22 种海水鱼中选取鲅鱼 (*Coilia ectenes*)、半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 和带鱼 (*Trichiurus haumela*) 的鱼肉组织上清液, 分别以各类蛋白酶进行酶解, 测定体外 ACEI 活性。

1.2.2 体外 ACEI 活性的测定 体外 ACEI 活性检测采用紫外分光光度法^[7], 测定对 ACE 的抑制活性, 以抑制率或 IC₅₀ 表示。

1.2.3 ACEI 粗品的制备^[8] 将各类鱼洗净, 去头尾、内脏和鳞, 采肉, 加水匀浆, 离心并收集上清液。上清液在各种酶的最适温度和 pH 值下酶解 (2 000 U/g 蛋白)。酶解结束后, 酶解液煮沸 10 min 灭活, 调 pH 值至 7.0。经离心 (4 ℃, 10 000 r/min, 30 min), 微孔滤膜过滤 (0.2 μm), 收集样品, 冻干。

1.2.4 ACEI 的纯化 参照相关文献^[6], 以 Sephadex G-25 和 DEAE Sepharose 层析柱对源于各类海鱼的 ACEI 粗品进行纯化, 并脱盐制备冻干品。

1.2.5 氨基酸组成测定 取经纯化的 ACEI, 用 6 mol/L HCl 在 110 ℃ 水解 22 h, 将水解后的样品全

部转移至旋转蒸发仪内蒸干。用 0.1 mol/L HCl 溶解定容后进行柱前衍生, 用 AccQ. Tag 氨基酸分析柱 (3.9 mm × 150 mm) 进行氨基酸组成的测定。

1.2.6 ACE 抑制多肽的化学修饰 聚乙二醇修饰^[9], 右旋糖酐修饰^[10], 肝素修饰^[11]; TNBS 法测定多肽修饰率^[12]。

1.2.7 模拟人体胃肠环境对 ACEI 稳定性的影响 经聚乙二醇、右旋糖酐、肝素修饰的 ACEI 冻干粉适量, 分别放入人工胃液和人工肠液^[13]中, 37 ℃ 保温培养 3 h 后, 以所加已修饰的 ACEI 的总活性为标准, 计算活性保留率。

1.2.8 自发性高血压大鼠体内 ACE 抑制实验 SHR 分成 5 组, 每组 8 只。每天 1 次分别灌胃给予聚乙二醇、未修饰的 ACEI-22、聚乙二醇修饰后的 ACEI-22 和卡托普利 40 mg/kg 及蒸馏水。对应组别为 SHR-PEG、SHR-I、SHR-II、SHR-C 和 SHR。WKY 大鼠 10 只给予蒸馏水, 作为正常对照组 WKY。大鼠血压测量使用尾部血压测量器, 测量清醒状态下的大鼠尾部动脉收缩压。

2 结果

2.1 蛋白酶的筛选

从 22 种取自黄海鱼中选取鲅鱼 (*Coilia ectenes*)、半滑舌鲷 (*Cynoglossus semilaevis*) 和带鱼 (*Trichiurus haumela*), 鱼肉组织上清液进行酶解, 测定体外 ACEI 活性 (表 2)。由表 2 可知, 海洋低温碱性蛋白酶水解 3 种海水鱼, 得到的 ACEI 的活性均高于其他蛋白酶类。因此, 以下均采用海洋低温碱性蛋白酶进行实验。

表 2 海水鱼鱼肉上清酶溶液的 ACEI 抑制率

Tab.2 Inhibitory activity of ACEI derived from hydrolyzed supernates of sea fishes protein

酶类 Enzyme	鲎鱼 <i>Culisca extensa</i>	半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	带鱼 <i>Trichiurus haumela</i>
胃蛋白酶 Pepsin	21.46	20.12	18.56
537 酸性蛋白酶 537 Acid protease	24.76	22.55	19.82
木瓜蛋白酶 Papain	24.33	21.59	20.34
AS1.398 中性蛋白酶 AS1.398 Neutral protease	26.62	25.47	20.98
胰蛋白酶 Trypsin	25.25	23.62	20.48
2709 碱性蛋白酶 2709 Alkaline protease	32.00	30.88	30.30
海洋低温碱性蛋白酶 MLAP	40.28	48.03	48.20

2.2 源于鲎鱼 ACEI 的纯化

取源于鲎鱼的 ACEI 粗品经重蒸水稀释后,以 Sephadex G-25 (1.5 cm×60 cm)对其柱层析。以重蒸水洗脱,流速 0.5 mL/min,对流出组分进行分步收集,并对其 ACEI 活性进行检测(图 1)。活性部分浓缩后,以 DEAE Sepharose 进行柱层析(1.0 cm×15 cm)。以 10 mmol/L Tris-HCl (pH

7.5)缓冲液上样,并以含 0.5 mol/L NaCl 的 Tris-HCl(pH 7.5)缓冲液从 16 min 开始梯度洗脱,分步收集各组分,并对其进行 ACEI 活性检测,发现在 30~40 min 出现的尖峰活性最高(图 2)。合并活性部分,于 Sephadex G-25 柱上(1.5 cm×60 cm)脱盐,冻干(以后简称 ACEI-22)。

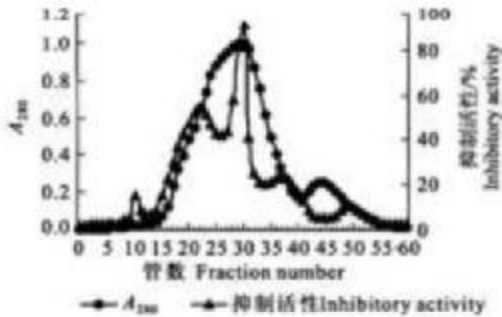


图 1 海洋低温碱性蛋白酶酶解液 Sephadex G-25 层析图
Fig.1 Sephadex G-25 column chromatogram of MLAP hydrolysates

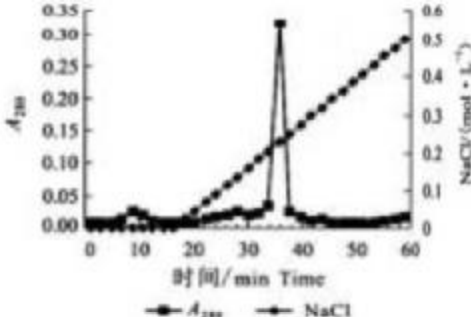


图 2 活性组分 DEAE-Sepharose 层析图
Fig.2 DEAE-Sepharose column chromatogram of activity fraction

2.3 不同种类海水鱼体外 ACEI 活性的比较

将源于 22 种海水鱼的 ACEI 纯品进行体外活性检测(表 1),可知,鲎鱼所产 ACEI 活性最高,其余鱼类无明显差异,故采用 ACEI-22 进行进一步的研究。

2.4 ACEI-22 的氨基酸组成

ACEI-22 氨基酸组成见表 3。根据表中所示数据,ACEI-22 主要包含 7 种氨基酸,其中酸性氨基酸的摩尔百分含量为 24.77%,无碱性氨基酸,极性氨基酸摩尔百分含量为 24.84%,其他氨基酸及杂质占 0.0713%。

表 3 ACEI-22 的氨基酸组成

Tab.3 Components of amino acids in ACEI-22

氨基酸 Amino acid	摩尔百分比 mol %
天冬氨酸 Asp	24.7716
丙氨酸 Ala	12.8753
缬氨酸 Val	11.7938
甲硫氨酸 Met	12.8349
亮氨酸 Leu	12.9281
苯丙氨酸 Phe	12.0797
色氨酸 Trp	12.6453
其他 Others	0.0713

2.5 化学修饰对 ACEI-22 在模拟人体胃肠环境下稳定性的影响

ACEI-22 分别用肝素,右旋糖酐和聚乙二醇修饰后,以 TNBS 法测定化学修饰率发现:聚乙二醇的修饰率达到 68%。经 3 种修饰剂修饰的 ACEI-22 分别放入人工胃液和人工肠液中,以未经修饰的多肽为对照,结果表明,未经化学修饰的 ACEI-22 活性显著降低,而经过化学修饰的 ACEI-22 活性有所保留。此外,不同的化学修饰剂对活性的影响不同,在人工胃液里,经右旋糖酐和肝素修饰的 ACEI-

22 活性分别降低了 53% 和 48%,而经聚乙二醇修饰的 ACEI-22 活性只降低了 27%;在人工肠液里,前两种 ACEI-22 只保留了 55% 和 63% 的活性,而聚乙二醇修饰的 ACEI-22 活性保留率达 82% (表 4)。

2.6 修饰前后对 SHR 血压的影响

由表 5 的结果可知,未经聚乙二醇修饰的 ACEI-22 使 SHR 血压略有降低,但修饰后的 ACEI-22 灌胃 SHR 后,大鼠血压值在给药后与未用药物处理组比较有非常显著的降低 ($P < 0.01$)。与在相同条件下同等剂量的卡托普利比较,降压效果相当。

表 4 化学修饰对 ACEI-22 在模拟人体胃肠环境下的影响

Tab.4 Effects of chemical modification on ACEI-22 in artificial gastric juice and intestinal juice $\bar{X} \pm SD$

项目 Item	未修饰的 ACEI-22 Unmodified ACEI-22	化学修饰剂修饰后的 ACEI-22 Chemically modified ACEI-22		
		PEG	Dextran	Heparin
修饰率/% Modification degree	0	68.3 ± 1.1	55.6 ± 2.1	61.5 ± 1.5
人工胃液中活性保留率/% Residual activity in artificial gastric juice	12.3 ± 0.7	73.2 ± 2.2	47.1 ± 1.0	52.6 ± 1.3
人工肠液中活性保留率/% Residual activity in artificial intestinal juice	18.6 ± 1.2	82.1 ± 2.7	55.2 ± 1.8	63.2 ± 0.9

表 5 修饰前后 ACEI-22 对大鼠血压的影响

Tab.5 Effects of unmodified and modified ACEI-22 on blood pressure of rats $\bar{X} \pm SD$, kPa

组别 Group	n	剂量/(mg·kg ⁻¹) Dose	P ₁	P ₂	P ₃
WKY	10	—	14.7 ± 1.3	15.1 ± 1.6	15.7 ± 1.3
SHR	8	—	25.5 ± 2.1	26.1 ± 1.2	26.3 ± 1.1
SHR-PEG	8	40	25.1 ± 2.4	25.9 ± 1.8	26.8 ± 0.6
SHR-I	8	40	25.2 ± 2.1	23.9 ± 1.2	24.0 ± 1.5
SHR-II	8	40	25.0 ± 2.1	20.4 ± 1.6**△△	20.3 ± 2.0**△△
SHR-C	8	40	25.3 ± 0.8	19.2 ± 1.3**△△	19.2 ± 1.3**△△

注: (1) 与 WKY 比较, * * $P < 0.01$; 与 SHR 比较, △△ $P < 0.01$; (2) P₁ - 给药前收缩压; P₂ - 给药 2 周后收缩压; P₃ - 给药 4 周后收缩压。

Note: (1) Compared with WKY, * * $P < 0.01$; compared with SHR, △△ $P < 0.01$; (2) P₁ - Systolic pressure before administration of ACEI-22; P₂ - Systolic pressure two weeks after administration of ACEI-22; P₃ - Systolic pressure four weeks after administration of ACEI-22.

3 讨论

3.1 蛋白酶的筛选

以不同种类的蛋白酶对海水鱼鱼肉组织上清液进行酶解。结果发现,在选用的诸多蛋白酶中,碱性蛋白酶水解制备的 ACEI 活性明显高于由其他蛋白酶制备的 ACEI,这与文献[6]报道一致。在所使用的两种碱性蛋白酶中,海洋低温碱性蛋白酶的制备效果又明显优于 2709 碱性蛋白酶,推测该现象可能

与它是一种新型海洋低温碱性蛋白酶,能在相对低的温度下水解鱼肉上清液,制备高活性的 ACEI 有关^[14]。

3.2 海水鱼类的筛选

以海洋低温碱性蛋白酶对 22 种海水鱼鱼肉组织上清液进行酶解,结果发现,与来源于陆生动植物的 ACEI^[5,15-17]相比,来自于海水鱼类酶解物的 ACEI 活性 (IC₅₀ 为 0.022~0.004 mg/mL) 普遍较高,例如,植物来源的玉米胶原蛋白水解物和蘑菇萃取

物 ACEI 的 IC_{50} 分别为 0.27 mg/mL 和 0.95 mg/mL, 动物来源的牛乳酪蛋白水解物和牛血浆蛋白质中的 ACEI 的 IC_{50} 分别为 0.1 mg/mL 和 0.56 mg/mL。此外, 由于鲢鱼自身水溶性蛋白及自溶作用产生的肽和氨基酸含量较高^[18], 酶解后肽类可溶性蛋白含量高于其他海水鱼类, 所以在以 22 种海水鱼鱼肉组织上清液制备得到的 ACEI 中, 来源于鲢鱼的 ACEI-22 活性最高。

3.3 ACEI-22 的氨基酸组成

源于鲢鱼的 ACEI 经纯化后得到的 ACEI-22 进行氨基酸组成分析发现, 不含碱性氨基酸, 这是由于海水鱼经碱性蛋白酶水解获得的 ACEI 肽主要由酸性氨基酸组成, 不含碱性氨基酸或碱性氨基酸含量较低^[19]。同时 Leu、Phe、Trp 含量占一定比例, 这与 Cushmen 实验室提出的竞争性抑制剂与 ACE 活性结合位点的模型假说基本一致^[20]。ACE 抑制肽活性与结构的关系认为, 芳香族的氨基酸残基 Phe、Tyr 和 Trp, 亚胺类的 Pro 及侧链为多甲基的氨基酸残基 Ile、Leu 是维持 ACE 抑制肽高活性所必需的。

3.4 人工胃肠液模拟实验与 SHR 实验

由 ACEI-22 在模拟人体胃肠环境下稳定性的影响实验发现, 采用海洋低温碱性蛋白酶酶解制备的 ACEI-22, 经 3 种修饰剂修饰后的活性保留率均显著高于修饰前。由此推测, ACEI-22 可能会被人体胃肠液中存在的酶降解, 损失部分活性, 使其降压效果不显著^[6]。当 ACEI-22 采用修饰剂修饰后, 修饰剂可以封闭蛋白酶的作用位点, 保护多肽不被降解, 增加降压效果。

通过修饰前后 ACEI-22 对大鼠血压影响的进一步研究发现, 未经聚乙二醇修饰的 ACEI-22 直接灌胃给药予 SHR, 给药 4 周后 SHR 血压与给药 2 周后比较, 无显著差异, 总体上血压略为下降与文献^[5]相符。当分别以聚乙二醇修饰的 ACEI-22 和卡托普利给药予 SHR 2 周后, 对 SHR 的降压效果显著增加, 至给药 4 周降压效果保持稳定, 该实验结果与文献报道相似^[21], 也与人工胃肠液模拟实验结果相符。此外, 由于对 ACEI-22 进行化学修饰还可增大其相对分子质量以降低肾小球的清除速率, 增加药物在体内循环半衰期, 从而进一步增强其对 SHR 的降压效果。同时发现, 海水鱼来源的 ACEI-22 在体外测得的活性低于卡托普利 ($IC_{50} = 0.022 \mu\text{mol/L}$), 但经过化学修饰后, 两者在体内实验的效力相当。

参考文献:

- [1] Kinoshta E, Yamakoshi J, Kikuchi M. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57(7): 1107 - 1110.
- [2] Matsufuji H, Matsui T, Seki E, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(12): 2244 - 2245.
- [3] Nakamura Y, Yamamoto N, Sekoi K, et al. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk[J]. *J Dairy Sci*, 1995, 78(4): 777 - 783.
- [4] Yoshii H, Tachi N, Ohba R, et al. Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolk[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001, 128(1): 27 - 33.
- [5] 陈美贞. 鲢鱼肉蛋白质水解物对血管升压素转换之抑制及其降高血压的效果[D]. 台北: 台湾海洋大学, 1998.
- [6] Mode Astawan, Mita Wahyuni, Tadeshi Yasuhara, et al. Effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitor substance derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, 59(3): 401 - 407.
- [7] Cushman D W, Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1971, 20: 1637 - 1648.
- [8] 杨东. 水解鱼蛋白及其功能特性的研究[J]. *食品科学*, 1999, 20(11): 23 - 26.
- [9] 毋敏娜, 孙力群, 张培英, 等. 应用活化 mPEG5000 修饰 HGG 及其活性研究[J]. *中国生物制品学杂志*, 1995, 8(2): 53 - 55.
- [10] 曹淑贵, 田洁, 刘红, 等. 几种因素在 L-天冬酰胺酶化学修饰中对酶活力及抗原性的影响[J]. *药物学报*, 1990, 25(10): 732 - 737.
- [11] 吴本传, 刘红, 陈明烈, 等. 化学修饰对组织型肝酯酶底物活性的肝酯活性和体内半衰期的影响[J]. *药物技术通讯*, 2003, 10(6): 368 - 371.
- [12] Hakeeb A F. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid[J]. *Anal Biochem*, 1966, 14(3): 328 - 336.
- [13] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 人民卫生出版社, 1990.
- [14] 孙道, 修朝阳, 王跃军, 等. 黄褐斑杆菌 YS-9412-130 碱性蛋白酶性质鉴定[J]. *海洋水产研究*, 2001, 22(2): 1 - 10.
- [15] 辛志宏, 马海乐, 吴守一, 等. 食品蛋白质中血管紧张素转化酶抑制肽的研究[J]. *江苏大学学报*, 2003, 24(4): 17 - 21.
- [16] 辛志宏, 马海乐, 吴守一, 等. 从小麦胚芽蛋白中分离和鉴定血管紧张素转化酶抑制肽的研究[J]. *食品科学*, 2003, 24(7): 130 - 133.
- [17] 任维栋, 李耀辉, 耿秀芳, 等. 猪肾胶原蛋白酶解物中血管紧张素转化酶抑制剂的提纯[J]. *生物化学杂志*, 1996, 12(6): 693 - 696.

- [18] 朱碧英,冯旭文,毋建超. 鲷鱼可溶性蛋白质及鱼油的开发[J]. 东海海洋,2001,19(2):60-62.
- [19] Matsui T, Matsufuji H, Seki E, et al. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sandline muscle [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, 57(6):922-925.
- [20] Zola P, Horowitz PH D. Angiotensin converting enzyme inhibitors mechanisms of action and clinical implications[Z]. Urban & Schwarzenberg Baltimore-Munich, 1981.
- [21] 顾天华,宋代军,郭霞珍,等. 血管紧张素转换酶抑制剂影响自发性高血压大鼠肾功能的机制[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(5):458-461.

Preparation and modification of ACEI from 22 species of sea fishes

SHI Han^{1,2}, SUN Mi¹, YU Jian-sheng², WANG Yue-jun¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: Twenty-two species of fishes from the Yellow Sea in China were selected as the raw materials. The supernates of sea fishes protein homogenate from *Coilia ectenes*, *Cynoglossus semilaevis* and *Trichiurus haumela* were hydrolyzed respectively by single protease in 6 kinds of protease and a marine low-temperature alkaline protease (MLAP) for antihypertensive peptide, and the activity of angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEI) was measured. The MLAP digestion showed the highest inhibitory activity (40.28%, 48.03%, 48.20%). *Engraulis japonicus* was described in detail as an example. The MLAP hydrolysate from *Engraulis japonicus* was purified by means of Sephadex G-25 and DEAE Sepharose anion-exchange chromatography by an elution with a linear gradient of 10 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing 0.5 mol/L NaCl and the inhibitory activity of the purified ACEI was determined. The result showed that the activity of hydrolysate from the supernate of *Engraulis japonicus* protein homogenate was the highest *in vitro*, but there was not yet notable difference in IC_{50} of any other MLAP hydrolysates except *Engraulis japonicus*. *Engraulis japonicus* was selected to prepare ACEI for further studies and the purified MLAP hydrolysate was named ACEI-22. ACEI-22 was composed of Asp, Ala, Val, Met, Leu, Phe and Trp according to the amino acid analysis. The stability of ACEI-22 was studied *in vitro* with artificial gastric juice and intestinal juice according to the method reported in China Pharmacopeia. The result showed that inhibitory activity of ACEI-22 was seriously affected in artificial gastric juice and intestinal juice. In order to improve the stability of ACEI-22, the chemical modifications of ACEI-22 with polyethylene glycol (PEG), dextran and heparin were conducted respectively. It was found that modification degrees of PEG, dextran and heparin were 68%, 55% and 61% respectively. But residual activity of ACEI-22 modified with PEG was higher than those of dextran and heparin in artificial gastric juice and intestinal juice. *In vivo*, ACEI-22 had slight effect on the blood pressure of spontaneously hypertensive rat (SHR) by oral administration, but the ACEI-22 modified with PEG decreased the blood pressure of SHR significantly. Though the inhibitory activity of ACEI-22 was much lower than that of Captopril ($IC_{50} = 0.022 \mu\text{mol/L}$) *in vitro*, there was equal effect on the blood pressure of SHR after the ACEI-22 was modified with PEG. The purpose of this study was to utilize enzyme engineering to convert low value biological protein resources from ocean into a series of active peptide with higher inhibitory activity of ACEI, which would be beneficial to the development of oceanic pharmaceuticals. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(1):100-105]

Key words: ACEI; MLAP; chemical modification; sea fishes

Corresponding author: SUN Mi. E-mail: sunmi@ysfri.ac.cn