

3942 中性蛋白酶酶解中国毛虾蛋白制备血管紧张素转移酶抑制肽

许 萍, 薛长湖, 张香治, 赵 雪, 李兆杰

(中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要:采用 3942 中性蛋白酶酶解中国毛虾(*Acetes chinensis*)蛋白, 制备具有抑制血管紧张素转移酶(ACE)活性的多肽。采取正交实验研究料水比、酶量、反应温度、反应时间 4 个因素对酶解中国毛虾蛋白产物的 ACE 抑制活性的影响。结果显示, 在料水比 1:3(体积比), 酶量 0.5%, 温度 45℃, 时间 8 h 的水解条件下得到的酶解产物 F7 的 ACE 抑制活性最高, 其抑制率达到 92.86%。用层析柱 Sephadex G-25、SP-Sephadex C-50 对 F7 进行分离纯化, 选取 ACE 抑制活性最高的峰进一步用反相高压液相色谱进行纯化, 得到单一组分 F I。经飞行时间质谱和碰撞诱导裂解分析确定, F I 为新型的 ACE 抑制肽 Ser-Pro, IC₅₀ 值为 272 μmol/L。

关键词:中国毛虾; 血管紧张素转移酶抑制肽; 3942 中性蛋白酶

中图分类号:TS254.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)04-0501-05

血管紧张素转移酶(ACE)抑制肽可通过抑制 ACE 的活性而使血压下降, 从而对高血压症起到较好的疗效。ACE 是与细胞膜结合的金属蛋白酶, 在肾素-血管紧张素-醛固酮系统中, ACE 水解无升压活性的血管紧张素 I, 生成具有升压活性的血管紧张素 II; 另外, 在激肽释放酶-激肽系统中, ACE 能够降解具有降压活性的缓激肽, 使之失去降压活性^[1]。ACE 通过以上两种途径参与了体内血压调节, 造成血压的升高, 引发高血压。目前人们已用蘑菇^[2]、大豆蛋白^[3]、海藻^[4]、酪蛋白^[5]、干鳕鱼^[6]及青鳕^[7]等制备得到了 ACE 抑制肽。本研究拟采用 3942 中性蛋白酶酶解中国毛虾(*Acetes chinensis*)蛋白, 制备具有抑制 ACE 活性的多肽。中国毛虾在中国沿海地区均有分布, 是产量最大的海产虾类资源。中国毛虾中蛋白含量很高, 超过大黄鱼、带鱼等水产品, 和猪肉、鸡肉等肉制品。但是毛虾极易腐败且深加工技术落后, 所以大多制成虾皮、虾米等附加值很低的产品。本研究旨在为中国毛虾高值化利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

冷冻毛虾: 山东滨州水产研究所提供。新鲜牛肺: 购自青岛农贸市场。3942 中性蛋白酶: 购自上海生工。底物 FAPGG(FA-Phe-Gly-Gly): 购自 Sigma 公司。Sephadex G-25, SP-Sephadex C-50 和 Sephadex G-10: 购自上海试剂二厂。

ACE: 参考耿秀芳^[8]的方法, 从新鲜牛肺中提取。

1.2 实验方法

1.2.1 抑制 ACE 活性的测定方法 参考 Vanessa Vermeisen 的方法测定 ACE 抑制活性^[9]。用 50 mmol/L 的磷酸钾缓冲液(pH 8.3)溶解 FAPGG, 配制成 0.001 mol/L 的底物溶液。反应体系中加入 500 μL 的底物溶液和 300 μL 的去离子水(空白)或抑制剂, 然后加入 300 μL 的 ACE 酶液启动反应, 立即测定 340 nm 下的吸光值 OD₁, 然后在 37℃ 下反应 5 min, 再测定 340 nm 的吸光值 OD₂。抑制率(I_R)计算公式为:

$$I_R = \frac{(OD_1 - OD_2)_B - (OD_1 - OD_2)_I}{(OD_1 - OD_2)_B}$$

式中: 下标 B 表示空白样品, 下标 I 表示抑制剂; 实验中定 IC₅₀ 值: 对 ACE 抑制率达到 50% 的抑制剂浓度; IC₅₀ 值: 对 ACE 抑制率达到 50% 的可溶性蛋白浓度; TIA₅₀ 值: 每毫克可溶性蛋白可抑制 ACE 的酶活单位。其中, 1 个 ACE 酶活单位的定义为 37℃、1 min 内催化 Hippuryl-His-Leu 形成 1 μmol 马尿酸所需的酶量。

1.2.2 3942 中性蛋白酶水解中国毛虾蛋白的条件 将冷冻毛虾解冻, 加水混合匀浆, 煮沸杀酶后调 pH 值至 7.0, 加入 3942 中性蛋白酶按表 1 中正交实验的条件进行水解。反应结束后煮沸杀酶, 离心, 取上清液测定抑制 ACE 的活性。

1.2.3 ACE 抑制肽的分离纯化 取冻干样品溶解, 先用 Sephadex G-25 凝胶柱(42.5 cm×98 cm)进行分离, 用蒸馏水进行洗脱, 流速为 0.5 mL/min, 在 225 nm 下测定肽的含量给

收稿日期: 2004-09-21; 修订日期: 2004-12-08。

基金项目: 国家“863”高技术研究发展项目(2004AA6250100); 国家“十五”攻关重大专项资助项目(2001BA501A26)。

作者简介: 许 萍(1980-), 女, 硕士, 主要从事水产化学研究。Tel: 0532-2032274, E-mail: duckwood008@163.com

通讯作者: 薛长湖。Tel: 0532-2032468, E-mail: xuech@mail.ouc.edu.cn

制洗脱曲线,并测定各洗脱峰抑制 ACE 的活性。将具有 ACE 抑制活性的肽峰进一步用 SP-Sephadex C-50 (42.5 cm × 45 cm) 分离,上样后先用 20 mmol/L 醋酸缓冲液 (pH 4.0) 洗脱 6 h,再用 0~1.0 mol/L NaCl 溶液进行线性梯度洗脱,流速为 0.6 mL/min,在 225 nm 下测定肽的含量,并测定各肽峰抑制 ACE 的活性。取活性最高的肽峰用 Sephadex G-10 (41.6 cm × 90 cm) 凝胶柱脱盐。最后用反相高压液相色谱 C₁₈ 制备柱 (49.2 mm × 200 mm) 进行纯化,洗脱液 A 为含 0.01% TFA 的水,洗脱液 B 为含 0.01% TFA 的乙腈溶液,先用 100%~0% A 梯度洗脱,再用 100% B 洗脱 50 min,流速为 2 mL/min,在 225 nm 下检测多肽的含量。寻找抑制 ACE 的活性峰进一步用 C₁₈ 制备柱进行纯化得到层析纯的肽。先用 100%~70% A 梯度洗脱,再用 30% B 继续洗脱 50 min,流速为 2 mL/min。将 C₁₈ 制备柱分离得到的层析纯肽用 C₁₈ 分析柱 (4.6 mm × 200 mm) 检测纯度。洗脱梯度为 100%~

90% A,流速为 0.5 mL/min。

1.2.4 ACE 抑制肽氨基酸序列的鉴定 用飞行时间质谱和碰撞诱导裂解测定层析纯肽的序列。

2 结果与分析

2.1 水解条件的优化

3942 中性蛋白酶在料水比 1:3 (体积比)、酶量 0.5%、温度 45℃、时间 4 h 的条件下酶解中国毛虾得到的酶解物的 ACE 抑制率达到 41%,而同浓度的中国毛虾水提液没有抑制 ACE 的活性,这说明采用 3942 中性蛋白酶水解中国毛虾蛋白,可以得到具有抑制 ACE 活性的多肽。

根据 3942 中性蛋白酶的作用条件,选择了料水比、酶量、时间及温度作为试验因子,以酶解产物的 ACE 抑制率指标,采用 L₁₆(4⁴) 正交表对水解中国毛虾蛋白制备 ACE 抑制肽的条件进行了正交实验优化,实验方案和结果如表 1。

表 1 正交实验的位级、结果及分析

Tab.1 Level, results and analysis of Orthogonal experiment

编号 No.	温度/℃ Temperature	料水比(V/V) Material:Water	时间/h Time	酶量*/% Dosage of enzyme*	抑制率/% Inhibitory rate
1	37	1:1	2	0.5	63.36
2	37	1:2	4	1.0	74.19
3	37	1:3	6	1.5	68.66
4	37	1:4	8	2.0	82.26
5	45	1:1	4	1.5	85.71
6	45	1:2	2	2.0	89.63
7	45	1:3	8	0.5	92.86
8	45	1:4	6	1.0	28.29
9	50	1:1	6	2.0	65.21
10	50	1:2	8	1.5	34.79
11	50	1:3	2	1.0	67.74
12	50	1:4	4	0.5	67.74
13	55	1:1	8	1.0	50.00
14	55	1:2	6	0.5	67.97
15	55	1:3	4	2.0	60.14
16	55	1:4	2	1.5	68.20
K1	288.47	288.93	264.28	291.93	
K2	276.49	287.78	266.58	200.22	
K3	235.48	210.13	289.40	257.36	
K4	246.31	259.91	226.49	297.24	
R	52.99	78.80	62.91	97.02	

* 酶量为毛虾质量的百分数。

* Dosage of enzyme is the dosage of enzyme in 100 g *Acartia chinensis*.

影响 3942 中性蛋白酶酶解中国毛虾蛋白产物的 ACE 抑制活性的 4 个因素温度、料水比、时间和酶量的 R 值分别为 52.99、78.80、62.91 和 97.02 (表 1),说明影响酶解产物 ACE 抑制活性的显著性由高到低依次为酶量、料水比、时间、温度。由表 1 可以看出,第 7 组实验(料水体积比 1:3,酶

量 0.5%,45℃,8 h)得到了抑制 ACE 活性最好的酶解产物,其 ACE 抑制率达 92.86%,记此样品为 F7。F7 对 ACE 抑制活性的 IC₅₀ 值为 7.9 g/L, TIA 值为 2.3 U/g。其溶液性状为澄清、浅黄色;无苦味。用氨基酸组成分析仪分析 F7 的氨基酸组成(结果未给出),发现鲜味氨基酸谷氨酸含量高达

18%, 这说明 F7 样品可以满足作为功能食品的风味要求。

2.2 分离纯化

F7 组经过 Sephadex G-25 洗脱得到 6 个组分(图 1), 其中仅有 F7-4 组分具有抑制 ACE 的活性, F7-4 组分抑制 ACE 的 IC_{50} 值为 3.0 g/L, TIA_s 值为 5.8 U/g。收集 F7-4 进一步通过 SP-Sephadex C-50 分离纯化后, 洗脱得到了两个峰(图 2)。其中第 2 个峰抑制 ACE 的活性较高, 记为 FB, FB

组分抑制 ACE 的 IC_{50} 值为 1.0 g/L, TIA_s 值为 20.8 U/g。

图 3a 为 C_{18} 制备柱在较大的乙腈梯度(0~100% B)下对 FB 洗脱的结果, 由图可见洗脱得到了 4 个峰, 其中第 1 个峰具有抑制 ACE 的活性。收集该峰再用 C_{18} 制备柱在较低的乙腈梯度(0~30% B)下洗脱, 又分离得到 7 个峰(图 3b), 其中第 1 个峰具有抑制 ACE 的活性, 记为 FI。FI 组分抑制 ACE 的 IC_{50} 值为 0.06 g/L, TIA_s 值为 355 U/g。

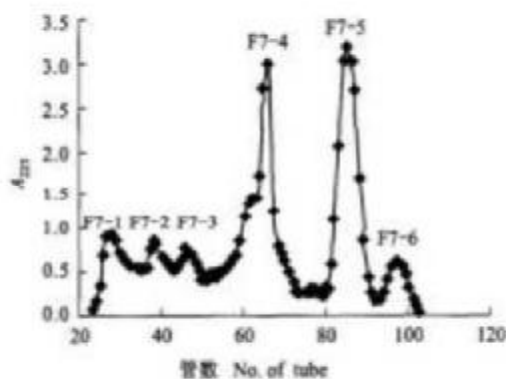


图 1 F7 在 Sephadex G-25 上的洗脱曲线

Fig.1 Sephadex G-25 elution curve of F7

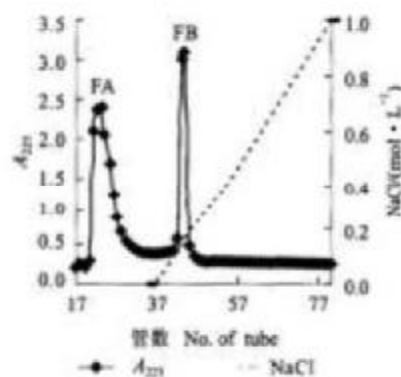
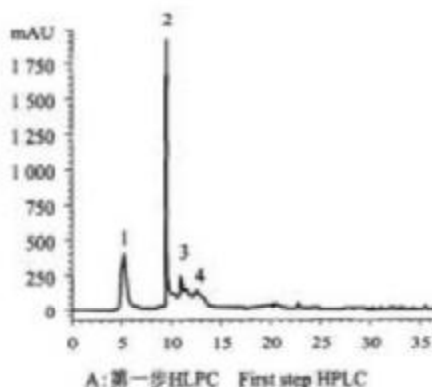
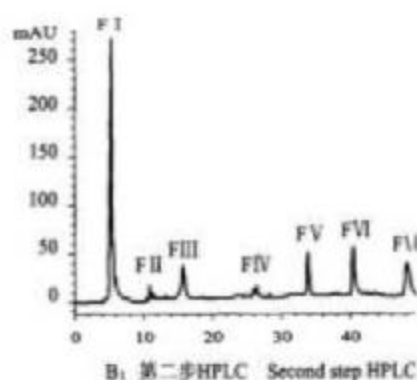


图 2 F7-4 在 SP-Sephadex C-50 上的洗脱曲线

Fig.2 SP-Sephadex C-50 elution curve of F7-4



A: 第一步 HPLC First step HPLC



B: 第二步 HPLC Second step HPLC

图 3 FB 在 C_{18} 制备柱上的洗脱曲线

Fig.3 C_{18} preparative column elution curve of FB

图 4 为 FI 组分在 C_{18} 分析柱上经 0~10% B 梯度洗脱得到的洗脱曲线, 由图可见 FI 在 C_{18} 分析柱上仅有一个对称尖峰, 说明 FI 组分已是较纯的单一组分。

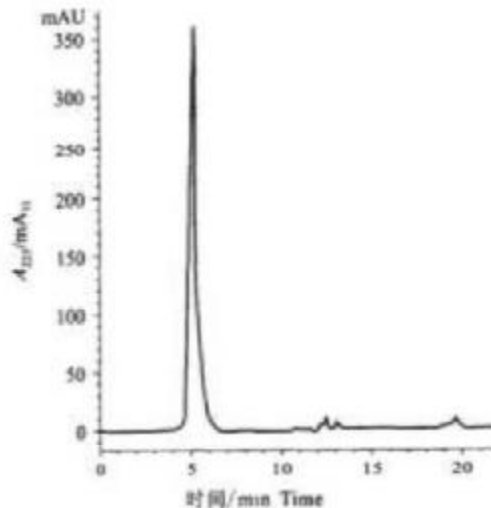
2.3 ACE 抑制肽的鉴定

经飞行时间质谱和碰撞诱导裂解分析确认 FI 为新型的 ACE 抑制肽, 其结构为 Ser-Pro。

3 讨论

目前海洋食品来源的 ACE 抑制肽研究主要集中在鱼

蛋白和贝类蛋白来源上^[20], 而虾类蛋白来源的 ACE 抑制肽研究很少。本研究采用 3942 中性蛋白酶酶解虾类(中国毛虾)蛋白制备 ACE 抑制肽。实验发现, 3942 中性蛋白酶具有很好的水解中国毛虾蛋白的活性, 水解度最高可达 96.4%。3942 中性蛋白酶酶解中国毛虾蛋白得到的多肽具有抑制 ACE 的活性, 证明可以通过 3942 中性蛋白酶酶切中国毛虾蛋白制备抑制 ACE 的多肽, 以用于功能食品或者低毒的高血压药物。这为中国毛虾的高值化利用提供了可行性途径。

图4 F1在C₁₈分析柱上的洗脱曲线Fig.4 C₁₈ analytic column elution curve of F1

虽然 Margaret 认为,酶解前热处理只能提高反应的水解度,而对产物的抑制活性没有影响^[11]。但为了缩短反应时间^[12],本实验仍然在酶解前采取了热处理。

通过正交实验显示 ACE 抑制活性最高的产物酶解条件为:料水体积比 1:3、酶量 0.5%、温度 45℃、时间 8 h,得到的酶解产物 F7 的 ACE 抑制率高达 92.86%。

由 F7 分离纯化得到的肽 Ser-Pro 抑制 ACE 的活性是未纯化的原始组分 F7 的 130 倍,说明本实验的分离纯化是成功的。由于 F1 是纯的肽组分,所以抑制 ACE 的 IC₅₀ 值可以代表 IC₅₀ 值,即 Ser-Pro 抑制 ACE 的 IC₅₀ 值为 296 μmol/L。与常规使用的合成 ACE 抑制剂药物卡托普利相比,Ser-Pro 的 ACE 抑制活性较弱,但是作为一种新型的食源 ACE 抑制肽,Ser-Pro 具有高安全性,可避免长期大量地食用引起的副作用。

目前食品来源的 ACE 抑制肽具体的构效关系尚无定论,但得到一些常见的局部结构特点。Cheung^[13] 结果发现,ACE 抑制肽氮端多为疏水氨基酸或是碱性氨基酸,碳端多具有芳香族氨基酸、杂环族氨基酸或碱性氨基酸。本研究得到的肽 Ser-Pro 碳端为 Pro,为杂环族氨基酸,这与 Cheung 的研究相符;但是氮端为 Ser,为羟基氨基酸,与 Cheung^[13] 的结果不同。目前得到的含 Ser 的食源 ACE 抑制肽很少,Suetsuna 分离的红藻来源的 ACE 抑制肽 Ala-Lys-Tyr-Ser-Tyr 的碳端第二位也为 Ser^[14]。

Pro 在食源 ACE 抑制肽中的作用很重要^[1]。Pro 的杂环结构比较适合定位在 ACE 的活性位点上,此外 Pro 还可以提高 ACE 抑制肽在肠道中的稳定性。许多体外具有高抑制活性的 ACE 抑制肽体内却检测不到活性,是因为肠道中的消化酶将 ACE 抑制肽降解^[1],而 Pro 可以抵制这种降解。

另外,Ser-Pro 活性较高;作为二肽在肠道中极易被吸收;结合上述 Pro 特性,预测 Ser-Pro 在体内可能具有较好的抑制 ACE 的活性。

参考文献:

- [1] Richard J F, Brain A M, Daniel J W. The emerging role of dairy protein and bioactive peptides in nutrition and health [J]. J Nutri, 2004, 134(4): 980-988.
- [2] Choi H S, Cho H Y, Yang H C, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor from *Gelidium frondosum* [J]. F R I, 2001, 34: 177-182.
- [3] Bernard F G, Alexandre Z, Robert M, et al. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food [J]. F R I, 2004, 37: 123-131.
- [4] Suetsuna K, Rong C J. Identification of angiotensin peptide from peptic digest of two microalgae, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* [J]. Marine Biotech, 2001, 3: 305-309.
- [5] Jerome T, Laurent M, Jean-Luc G, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from tryptic hydrolysate of bovine α₂-casein [J]. FEBS Lett, 2002, 531: 369-374.
- [6] Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M, et al. Peptide inhibitors for angiotensin I converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito [J]. Bioc Biotech Biochem, 1992, 56: 1541-1543.
- [7] Guk H B, Kwon S K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) skin [J]. Protein Biochem, 2001, 36: 1155-1162.
- [8] 耿秀芳,李耀辉,张义军,等.猪骨胶原蛋白降压成分的提取与生物活性的研究 [J]. 西安医科大学学报, 2001, 22(3): 418-421.
- [9] Vanessa V, John V C, Willy V. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides [J]. J Biochem Biophys Methods, 2002, 51: 75-87.
- [10] Suetsuna K, Yamagami M, Kumwata K, et al. Inhibitory activity against angiotensin I-converting enzyme of peptides originating from fish and shellfish muscle [J]. NSUGAF, 1988, 54(10): 1852-1856.
- [11] Margaret M M, Hara M, Richard J F. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic protease digests of whey proteins [J]. Int Dairy Journal, 1997, 7: 299-303.
- [12] 陶红,梁歧,张鸣鹤.热处理对大豆蛋白水解度的影响 [J]. 中国油脂, 2003, 28(9): 61-63.
- [13] Cheung H S, Wang F L, Ondetti M A, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the C-terminal dipeptide sequence [J]. J Biol Chem, 1980, 255: 401-407.
- [14] Suetsuna K. Purification and identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from the red alga *Porphyra yezoensis* [J]. J Mar Biotechnol, 1998, 6: 163-167.

Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from 3942 neutral proteinase digests of *Acetes chinensis* proteins

XU Ping, XUE Chang-hu, ZHANG Xiang-zhi, ZHAO Xue, LI Zhao-jie

(Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: 3942 neutral proteinase was used to hydrolyse *Acetes chinensis* protein to prepare active peptides, which could inhibit the activity of angiotensin I-converting enzyme(ACE). In order to study the influence on ACE inhibitory activity of hydrolysate, four levels of enzyme dosages, material;water (V/V), hydrolysis time, and hydrolysis temperature were changed according to the orthogonal table. The results revealed the optimum condition for active peptide were $V_{material}/V_{water} = 1/3$, enzyme dosage 0.5%, temperature 45℃, hydrolysis time 8 h. Then F7-4 was separated and purified by Sephadex G-25 and SP-Sephadex C-50. The most potent fraction was concentrated and further purified by preparative reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) to get pure sample F I. F I was identified as Ser-Pro, of which the IC_{50} value was 296 $\mu\text{mol/L}$, after the application of time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) and high-energy collision-induced dissociation (CID).

Key words: *Acetes chinensis*; ACE converting enzyme inhibitory peptide; 3942 neutral proteinase

更 正

本刊在 2005 年第 3 期(307~313 页)发表的文章《草鱼肠道中香港海鸥型菌的选择性分离与鉴定》(作者:潘厚军、吴家勤、李宁求、石存斌、李凯彬、巩 华、陶家发、常藕琴)中,图 1 和图 2 的电镜照片制版分辨率出现错误,导致图版不清晰,现将正确的图版刊载如下。本刊编辑部为此向作者和广大读者表示歉意。

Correction

In the article *Selective isolation and identification of *Laribacter hongkongensis* from the intestine of *Ctenopharyngodon idella** (2005, Vol. 12, No. 3: 307~313. PAN Hou-jun, WU Shu-qin, LI Ning-qiu, SHI Cun-bin, LI Kai-bin, GONG Hua, TAO Jia-fa, CHANG Ou-qin), figures 1 and 2 were not clear for the incorrect printing dpi. We apologise for this. Now the correct figures are shown as follows. (The editors)

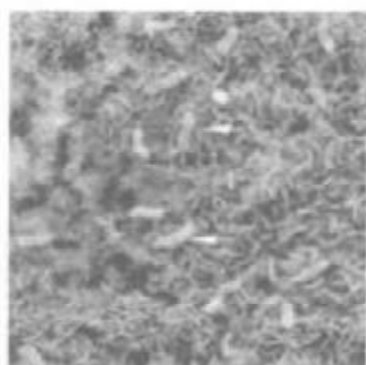


图 1 草鱼肠道选择分离细菌的扫描电镜照片
(箭头示菌体)

Fig.1 Scanning electron micrograph of selective isolates from the intestine of Grass carp (arrows showing the bacteria)

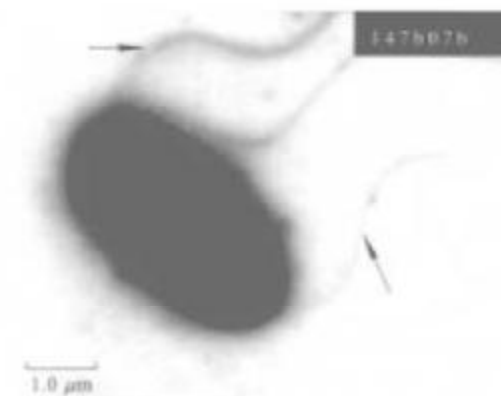


图 2 草鱼肠道选择分离细菌的透射电镜照片
(箭头示鞭毛)

Fig.2 Transmission electron micrograph of selective isolates from the intestine of Grass carp (arrows showing the flagellum).