

文章编号:1009-038X(2004)02-0049-04

# 牡蛎功能短肽的制备及 ACE 抑制活性

于 娅, 杨瑞金, 王 璋

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

**摘 要:** 以新鲜无壳牡蛎为原料, 采用酶水解的方法制备牡蛎短肽, 经 Sephadex G-15 分离, 并用 HPLC 测定其相对分子质量分布, 通过 HPLC 法定量尿酸测定各组分的 ACE(血管紧张素转化酶)抑制活性。结果表明, 牡蛎水解液中相对分子质量较大和较小部分的 ACE 抑制活性偏低, 只有相对分子质量在一定范围内的短肽, 对 ACE 具有较好的抑制作用, 质量浓度为 0.4 mg/mL 的牡蛎功能短肽的 ACE 抑制率为 51.4%。

**关键词:** 牡蛎功能短肽; ACE 抑制活性; 抑制率

中图分类号: Q 514.3

文献标识码: A

## Preparation of Oyster Functional Oligopeptides and Its ACE Activity Inhibition Capability

YU Ya, YANG Rui-jin, WANG Zhang

(School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

**Abstract:** To prepare Oyster Functional Oligopeptides (OFO) with ACE activity inhibition capability, The fresh oysters without shells was hydrolysed by a microbial protease alcalase. The OFO were separated from the hydrolyzate by Sephadex G-15, their molecular weight distribution was determined by HPLC, and the ACE activity inhibitory capability grouped with different molecular weights was assayed by HPLC method. The results showed that OFO with high and low molecular weights had low ability in inhibiting ACE activity, and only short chain peptides with a certain molecular weight range had high ability. The inhibition rate was up to 51.4% at the concentration of 0.4 mg/mL.

**Key words:** oyster functional oligopeptides; inhibiting ACE activity; inhibition rate

牡蛎是著名的海洋产品, 牡蛎肉不仅营养丰富, 而且药食兼用, 自古就有“清肺补心, 滋阴养血”之功效<sup>[1]</sup>。牡蛎功能短肽是经处理的新鲜无壳牡蛎的酶解产物, 是由相对分子质量小且具有很高活性的小肽分子组成。按干物质计, 牡蛎中蛋白质质量分数为 50% 左右, 且含有丰富的营养物质, 在日本

素有“海的玄米”之称, 在欧美亦有“sea milk”之佳誉<sup>[2]</sup>。对牡蛎的利用, 我国也以直接食用为主, 而保健品或疗效品的开发刚刚兴起, 远远落后于日本<sup>[3]</sup>。因此, 充分利用牡蛎开发新的保健品, 具有重要意义。

海洋天然活性物质是现代生物学研究热点, 而

收稿日期: 2003-06-20; 修回日期: 2003-12-05.

作者简介: 于娅(1978-), 女, 陕西安康人, 食品科学与工程硕士研究生。  
万方数据

天然海洋活性肽是海洋活性物质研究的重要组成部分。牡蛎是一种高营养价值的贝类,也是一种很有药用价值的海洋生物,所起到的药用价值和保健功能不仅在中医药领域得到推崇,近些年来同样受到国内外一些学者的重视。国内外都曾报道了牡蛎体内的抗菌肽、特异蛋白质和酶类的分离纯化和结构分析,但目前对牡蛎降血压活性物质的分离研究尚很缺乏。

作者应用分离得到的牡蛎天然活性肽,研究其对 ACE(血管紧张转化酶)的抑制活性。采用新鲜无壳牡蛎为原料,用微生物蛋白酶将原料中的蛋白质水解成短肽,利用 Sephadex G-15 进行分离,并且测定不同组分的 ACE 抑制活性,得到具有较高活性的短肽,并用 HPLC 测定了牡蛎功能短肽的相对分子质量分布。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

新鲜无壳牡蛎:市售;SephadexG-15(葡聚糖凝胶);sigma 公司产品;碱性蛋白酶(Alcalase);Novo 公司生产;血管紧张素转化酶(ACE)和马尿酸组氨酰亮氨酸(hippuryl-L-His-L-Leu);sigma 公司产;其他试剂均为分析纯。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 脱脂牡蛎粉的制备

##### 1) 牡蛎干粉的制备

新鲜牡蛎 → 打浆 → 冷冻干燥 → 磨碎 → 牡蛎干粉

##### 2) 牡蛎脱脂工艺<sup>[4,5]</sup>

牡蛎干粉 → 加石油醚浸泡 → 抽滤 → 风干

↑  
反复多次

最终得到脱脂牡蛎粉。

1.2.2 牡蛎肽的制备 取 80 g 脱脂牡蛎粉,加 800 mL 水,加碱性蛋白酶 Alcalase,于 60 ℃,pH 8.5 下恒温水解一定时间。在水解过程中不断加 NaOH 以保持反应液 pH 值恒定。牡蛎蛋白的水解度(DH)可以根据消耗的碱量进行控制。

$DH = \text{水解肽键数} / \text{总肽键数}$

根据下式计算 DH<sup>[6]</sup>:

$$DH\% = V_B \times M_b \times 1/\alpha \times 1/m_p \times 1/n_{tot}$$

式中: $V_B$  为滴定所消耗的碱体积(mL); $M$  为碱液浓度(mol/L); $m_p$  为水解反应中蛋白质总质量(g); $\alpha$  为氨基的解离度; $n_{tot}$  为每克底物蛋白质中的肽键总数,取数据

本实验通过 pH-stat 法控制 DH 为 20%,酶解完成后,将水解液加热至 90~100 ℃灭酶 10 min,然后将其离心(3 000 r/min)15 min 得到上清液,将上清液喷雾干燥后得到黄色粉末。

1.2.3 牡蛎肽的分离纯化 选择 1.6 cm×100 cm 的 Sephadex G-15 凝胶柱,加 2 mL 样液,用 0.1 mol/L,pH 4.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液进行洗脱,保持洗脱液体积流量为 21.3 mL/h,用 FH8802-2 紫外检测仪在 220 nm 检测吸收物质,用 3057 型便携式记录仪记录检测结果。

1.2.4 牡蛎功能短肽的 ACE 抑制活性的测定 实验方法见参考文献[7,9]。

1.2.5 牡蛎功能短肽的相对分子质量分布测定 在柱温 30 ℃,体积流量为 0.5 mL/min 下用 TSKge12000 SWXL 300 mm×7.8 mm 色谱柱,在检测波长 220 nm 下测定,其中流动相为 V(乙腈):V(水):V(三氟乙酸)=45:55:0.1

样品制备:吸取样品 2 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,用微孔过滤膜过滤后供进样。

## 2 结果与讨论

### 2.1 脱脂条件的选择

按干物质计,牡蛎中含有质量分数为 10% 的脂肪。脂肪的存在会对产品的风味、色泽等产生不良的影响,且易造成水解液的浑浊。为了消除这些不良影响,作者采用了有机溶剂浸提法。为了最大程度的保持原有牡蛎蛋白的性质,选择的浸提温度为 35 ℃,有机溶剂为石油醚。在保证脂肪含量降到一定程度的前提下,尽可能的降低费用。脱脂次数研究结果,见表 1。

表 1 牡蛎干粉经石油醚的脱脂结果

Tab. 1 Degreasing results of petroleum ether treatment of the dry oyster powders

浸泡次数	原脂肪质量分数/%	浸提后脂肪质量分数/%
1 次	9.82	6.02
2 次	9.82	3.18
3 次	9.82	0.97

从表 1 可看出,牡蛎粉经石油醚浸提 3 次后,脂肪质量分数降到 1% 以下,达到脱脂要求,得到脱脂牡蛎粉。

### 2.2 酶水解条件选择

酶法制备蛋白水解物大多采用蛋白水解酶。为

了能获得相对分子质量较小的牡蛎肽混合物,作者选择了一种作用范围很广的食品级碱性蛋白酶(Alcalase)。此酶最适 pH 值为 8.5,最适温度为 60 ℃。在确定酶反应的最适温度和 pH 值后,在同一体系中每千克牡蛎脱脂粉选择不同的酶量,其对反应水解能力的影响见图 1。

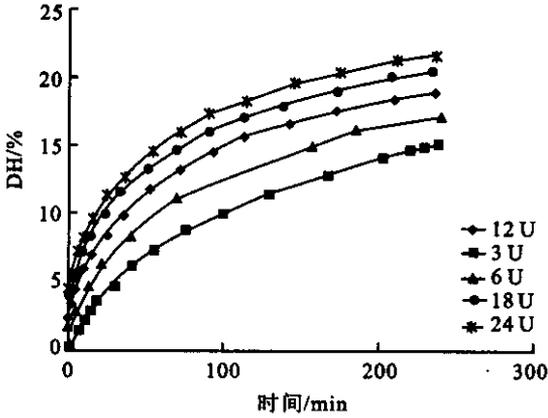


图 1 不同加酶量对牡蛎蛋白水解度的影响

Fig. 1 The effect of enzyme amounts on the DH of oyster proteins

图 1 表明,在所需水解度为 20% 的情况下,考虑其经济性,得到最适宜条件为每千克脱脂牡蛎粉加酶量 18 U,反应 4 h。

### 2.3 牡蛎肽的分离纯化

鉴于食物蛋白质经酶解后产生的 ACE 抑制肽的相对分子质量一般在 1 500 以下<sup>[10]</sup>,可以用 Sephadex G-15 凝胶色谱,根据相对分子质量大小,达到分离目的,结果见图 2。

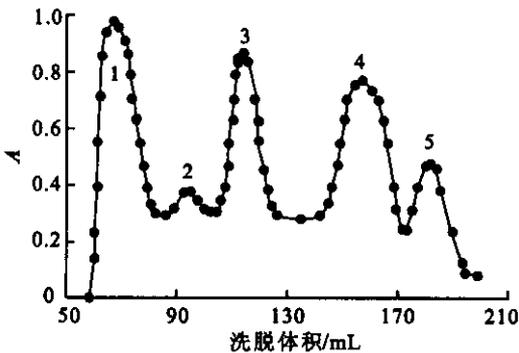


图 2 牡蛎肽的凝胶过滤图谱

Fig. 2 Gel filtration chromatography of the oyster peptides

凝胶材料:sephadex G-15;柱尺寸:1.6 cm×100 cm;体积流量:21.30 mL/h;分步收集体积:5 mL/管。

其中标样谷胱甘肽(相对分子质量 303)的洗脱万方数据

体积为 130.3 mL,酪氨酸(相对分子质量 180)的洗脱体积为 203 mL。由图 2 看出,牡蛎肽得到了较好的分离。经碱性蛋白酶 Alcalase 作用后水解度为 20% 的酶解产物中,肽的相对分子质量分布较为广泛,其中含有一部分相对分子质量较大的肽及在 220 nm 有吸收的未被显著水解的蛋白质类组分(组分 1)、游离氨基酸及相对分子质量较小的肽(组分 5)。

### 2.4 牡蛎功能短肽的 ACE 抑制活性

降血压肽通过抑制人体中血管紧张素转换酶的活性而达到降血压作用。ACE 是肾 I 血管紧张素系统中对调节血压起重要作用的酶,它通过去除血管紧张素 I 的碳末端 His-Leu 生成有血管收缩活性的血管紧张素 II,同时使舒缓激肽失活,引起血压升高<sup>[10~12]</sup>。

原料蛋白质经酶解反应后生成了众多的短肽和游离氨基酸,其中只有一部分短肽具有降血压活性。由于动物实验费用昂贵,因此建立一套体外测定降血压肽活性的实验方案尤为重要。ACE 在 37 ℃,pH 8.3 的条件下催化分解血管紧张素 I 的模拟物 Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine [HHL] 产生马尿酸,该物质在紫外 228 nm 处具有特征吸收峰;当加入 ACE 抑制剂时 ACE 对 HHL 的催化分解作用受到抑制,马尿酸的生成量减少。通过 HPLC 测定加入抑制剂前后所生成马尿酸的量即可算出抑制活性的大小。ACE 抑制活性根据下式计算:

样品的 ACE 活性抑制率 = (对照的马尿酸峰值 - 样品的马尿酸峰值) / 对照的马尿酸峰值

测定牡蛎短肽经 Sephadex G-15 分离后各组分 ACE 抑制活性,见表 2。

表 2 各组分质量浓度 0.4 mg/mL 的 ACE 抑制活性  
Tab. 2 The ACE activity inhibitory capability of the each group

组分	抑制率/%
1	23.2
2	48.6
3	47.4
4	58.3
5	21.1

由表 2 可看出,组分 1 和组分 5 对 ACE 的抑制作用较低;而组分 2,3,4 为牡蛎功能短肽分子,具有很强的 ACE 抑制活性。因此,通过 Sephadex G-15,除去 ACE 抑制活性低的大分子和小分子,得到了具有高 ACE 抑制活性的牡蛎功能短肽。

### 2.5 牡蛎功能短肽的相对分子质量分布

图 3 为各标样的相对分子质量对数与各标样经 HPLC 的洗脱时间的关系曲线,由图可知二者呈很好的相关性,回归方程为

$$\lg M_r = 7.23 - 0.238 t.$$

式中,  $t$  为洗脱时间;  $M_r$  为相对分子质量

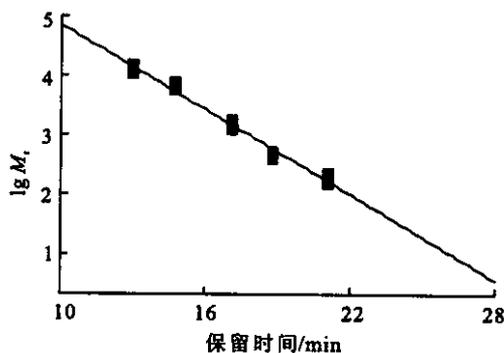


图 3 各标样的相对分子质量对数 ( $\lg M_r$ ) 与各标样经 HPLC 的洗脱时间的关系曲线

Fig. 3 Relation between  $\lg M_r$  of the standard samples and the time by HPLC

图 4, 5, 6 为牡蛎功能短肽(即组分 2, 3, 4)的 HPLC 图谱, 并根据回归方程计算出了各峰处对应的相对分子质量。

由图 4, 5, 6 可知, 组分 2 主要分布在相对分子质量在 583~210 的 2 个峰之间, 组分 3 主要分布在相对分子质量在 602~122 的几个峰之间, 组分 4 主要分布在相对分子质量为 202~97 的 2 个峰之间。由此可见, 牡蛎功能短肽的各主要组分主要分布在相对分子质量为 202~602 之间, 即牡蛎功能短肽主要由 2 肽到 5 肽的短肽组成。组分 2, 3, 4 还可能含相对分子质量较小的且在 220 nm 有吸收的非肽和非氨基酸类物质。

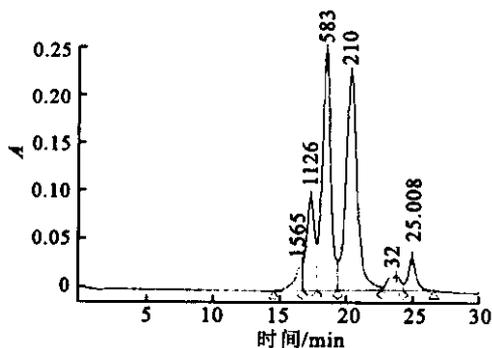


图 4 牡蛎肽经凝胶过滤色谱分离得到的组分 2 的 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC chromatogram of the group 2 separated by gel filtration chromatography

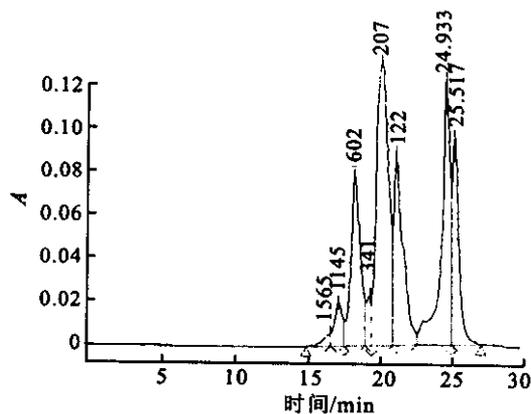


图 5 牡蛎肽经凝胶过滤色谱分离得到的组分 3 的 HPLC 图谱

Fig. 5 HPLC chromatogram of the group 3 separated by gel filtration chromatography

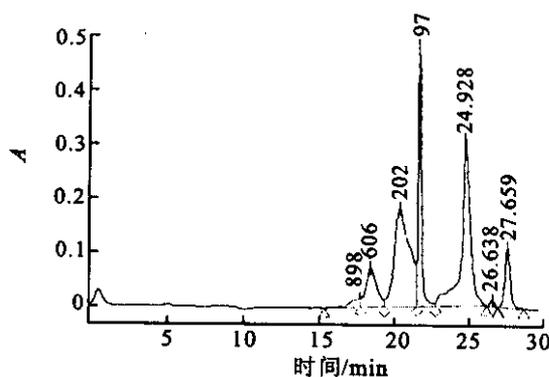


图 6 牡蛎肽经凝胶过滤色谱分离得到的组分 4 的 HPLC 图谱

Fig. 6 HPLC chromatogram of the group 4 separated by gel filtration chromatography

### 3 结 论

用碱性蛋白酶 Alcalase 将牡蛎蛋白水解成为牡蛎短肽, 并通过 Sephadex G-15 得到了具有一定 ACE 抑制活性的牡蛎功能短肽。抑制作用的强弱与短肽的相对分子质量有关, 相对分子质量较大和较小的部分抑制率均较低, 当相对分子质量在 202~602 之间, 即大致为 2 肽到 5 肽的牡蛎短肽具有很强的 ACE 抑制活性。

### 参考文献:

- [1] 张部昌, 商桂春, 袁大鹏, 等. 牡蛎口服液抗疲劳作用的研究[J]. 安徽大学学报, 1999, 23(1): 103-106.
- [2] 滕瑜, 乔向英, 曲克命. 牡蛎酶解工艺条件的研究[J]. 海洋水产研究, 1997, 18(1): 112-116.
- [3] 李青选. 牡蛎保健食品及国外开发概况[J]. 中国海洋药物, 1989, (2): 47-52.
- [4] 陈雪昌, 顾祥源, 戴志勇, 等. 浓缩鱼蛋白的研制[J]. 浙江水产学院学报, 1998, 17(1): 39-44.

生中下部竹叶(22.1%)。这说明不同竹种和同一竹种不同竹龄的竹叶维生素C的含量和类型存在一定的差异,因此在给大熊猫投放饲料时对此应有所考虑。

维生素C又名抗坏血酸,其结构为6碳的酸性多羟基化合物,在体内既可成为供氢体,又可作为受氢体,与细胞内的氧化还原过程关系密切,在参与呼吸链和能量代谢,促进铁和叶酸还原而影响造血,通过羟化酶促进胶原蛋白合成,以及抗氧化、抗衰老,提高机体免疫力等方面均有着重要作用。竹子作为大熊猫的主要食物,其中各种营养素的水平与大熊猫的生长发育密切相关,而且与野生大熊猫

相比,圈养大熊猫对竹子的种类和部位的选择性较低。因此深入系统地研究圈养大熊猫的食物成分和膳食结构,对于合理投放饲料及添加营养素有指导性意义。

本研究结果显示,淡竹上部竹叶的维生素C相对富集,并且竹子生长期长短对维生素C含量、还原型和总维生素C的比例有一定的影响;箬竹和淡竹竹叶中所测定的总维生素C含量无明显差别,箬竹竹叶还原型维生素C低于淡竹。通过本次研究,初步了解到箬竹和淡竹竹叶中维生素C的含量,为进一步深入研究大熊猫的营养结构,以及人工饲养大熊猫更好的科学配制膳食提供了实验依据。

## 参考文献:

- [1] 龙玉,曹焯,潘文石. 秦岭野生大熊猫对竹笋细胞壁的利用[J]. 北京大学学报,2002,38(4):576-581.
- [2] 胡锦矗,夏勒,潘文石,等. 卧龙的大熊猫[M]. 成都:四川科学技术出版社,1985. 51-77.
- [3] 潘文石,吕植,朱小健,等. 继续生存的机会[M]. 北京:北京大学出版社,2001. 368-405.
- [4] 刘选珍. 圈养大熊猫主食低山竹类营养特点的初步研究[J]. 兽类学报,2001,21(4):314-317.
- [5] 汤纯香,张和民. 圈养繁殖在大熊猫保护生物学中的作用[J]. 四川动物,2001,20(2):91-93.
- [6] 李军. 紫外分光光度法测定果蔬中的维生素C[J]. 河北职业技术师范学院学报,2000,14(1):41-44.
- [7] 杨森,魏国勤,吕志宏,等. 食用维生素——基础知识、定量方法[M]. 北京:中国环境科学出版社,1989. 135-139.
- [8] 《中国森林》编辑委员会. 中国森林(第4卷):竹林、灌木林、经济林[M]. 北京:中国林业出版社,2000. 50-100.
- [9] 刘志诚,于守洋. 营养与食品卫生学(第二版)[M]. 北京:人民卫生出版社,1990. 56-59.

(责任编辑:杨勇)

(上接第52页)

- [5] 陈培基,李刘东,李来好,等. 利用小杂鱼、低值鱼提取浓缩鱼蛋白[J]. 湛江海洋大学学报,1999,19(1):38-43.
- [6] Jens Adler-Nissen. Enzymic Hydrolysis of Food Protein[M]. London:London and New York Elsevier Applied Science Publishers, 1986.
- [7] 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.
- [8] 倪莉. 食品蛋白质新资源—废蚕丝蛋白的研究与开发[D]. 无锡:无锡轻工大学,1999.
- [9] 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,(5):11-13.
- [10] Nili, Daijun, Taoguanjun, et al. Preparation of a new functional food additive—ACE inhibitory peptides from libroin[A]. 第4届国际食品科学技术交流会组委会. food of 21st century—food and resource, technology, environment(II) [C]. 北京:中国轻工出版社,2000. 25-26.
- [11] Richard L Soffer. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides[J]. *Annu Rev Biochem*, 1976, 45:73-94.

(责任编辑:杨萌)