

文章编号:1000-0615(2007)02-0165-06

贻贝蛋白酶解降血压肽的降压活性及相对分子质量与氨基酸组成

毋瑾超, 汪依凡, 方长富

(国家海洋局第二海洋研究所, 浙江 杭州 310012)

摘要:以贻贝(*Mytilus coruscus*)为原料制取降血压肽,采用均匀设计试验探讨了不同酶解条件对其ACE(angiotensin-converting enzyme)抑制活性的影响,利用高效液相色谱分析了其相对分子质量分布,以氨基酸自动分析仪分析其氨基酸和游离氨基酸组成;并利用自发性高血压大鼠(SHR)饲喂试验检测其降血压活性。结果表明,对于P1酶来说,酶量从25~175 IU·mL⁻¹,酶解时间从2~7 h,随着酶解程度的提高,其ACE抑制率下降;其最高的ACE抑制率为88.08%,对应的最佳酶解条件为:酶量25 IU·mL⁻¹,酶解时间2 h,pH 7.0,酶解温度60℃。此外发现降血压肽的相对分子质量在1.6 ku以下,其中10肽以下的短肽约占50.4%,证实了降血压肽主要以分子量较小的短肽组成。降血压肽游离氨基含量为8.8 g·(100g)⁻¹,水解氨基酸总量为59.6 g·(100g)⁻¹,疏水性氨基酸含量为24.86 g·(100g)⁻¹,氨基酸组成比例平衡,必需氨基酸含量丰富,其中含量最高的氨基酸是谷氨酸,占8.57%。此外以3.0 g·kg⁻¹体重的降血压肽样品剂量饲喂SHR,在饲喂后2~6 h降压效果显著,平均降低幅度为18~28 mmHg($P=0.05$)。研究表明以贻贝等水产蛋白为原料可开发具有高ACE抑制活性和显著降血压作用的降血压肽。

关键词:酶解;降血压肽;降血压;相对分子质量;氨基酸

中图分类号:Q 819

文献标识码:A

Antihypertensive function and relative molecular weight as well as component of amino acids of antihypertensive peptide prepared from protein of *Mytilus coruscus*

WU Jin-chao, WANG Yi-fan, FANG Chang-fu

(Second Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Hangzhou 310012, China)

Abstract: The antihypertensive peptides were prepared from *Mytilus coruscus*, and the effects of different enzymolysis conditions on the ACE inhibitory activities were studied by uniform design experiments. Then the relative molecular weight and amino acids composition were identified by HPLC and amino acid analyzer respectively, and the antihypertensive effects were tested by SHR feeding experiment. The results are as follows: for the enzyme P1, when the enzyme concentration is from 25 to 175 IU·mL⁻¹, and the enzymolysis duration is from 2 to 7 h, the enzymolysis degree is improved, but the ACE inhibitory ratio is reduced. The highest ACE inhibitory ratio is 88.08%, the corresponding optimum enzymolysis condition is: enzyme concentration 25 IU·mL⁻¹, enzymolysis duration 2 h, pH 7.0, enzymolysis temperature 60℃.

收稿日期:2006-06-02

资助项目:浙江省科技计划项目(2006C23050);浙江省海洋与渔业局海洋开发管理专项(05-02)

作者简介:毋瑾超(1974-),男,陕西扶风人,副研究员,主要从事海洋生物资源开发与海洋活性物质研究。Tel:0571-88076924, E-mail:superwujc@yahoo.com.cn

The molecular weight of antihypertensive peptide is below 1.6 ku, the short peptides below decapeptide take 50.4 percent. It is proved that antihypertensive peptide is made up of short peptide with low molecular weight. The free amino acids are $8.8 \text{ g} \cdot (100\text{g})^{-1}$, and the total amino acids are $59.6 \text{ g} \cdot (100\text{g})^{-1}$, the hydrophobic amino acids are $24.86 \text{ g} \cdot (100\text{g})^{-1}$; the composition proportion of amino acids is in equilibrium and the essential amino acids are abundant. The largest content amino acid is glutamic acid, which accounts for 8.57 percent. At last, SHR fed with the antihypertensive peptide with the dose of $3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ weight can be found obvious antihypertensive function within 2 to 6 hours, the average reduced breadth is 18–28 mmHg ($P=0.05$). Results from this study indicated that the antihypertensive peptide with strong ACE inhibitory activities and obvious antihypertensive function can be prepared from *Mytilus coruscus*, and this study explores a new way of advanced exploitation of marine life resources.

Key words: enzymolysis; antihypertensive peptide; antihypertensive function; relative molecular weight; amino acid

降血压肽(antihypertensive peptide)是一种血管紧张素转换酶抑制肽,它通过抑制血管紧张素转换酶活性(ACE),阻碍有升高血压作用的血管紧张素Ⅱ的生成,同时抑制具有降血压作用的血管舒缓激肽的分解,从而使血压下降,此即降血压肽的作用机理^[1]。

近年来国际学术界对酶解降血压肽的研究较多,已报道有以牛奶、乳酪、大豆、鱼肉、蔬菜、小麦蛋白等食物为原料,经蛋白酶酶解产生了具有较好 ACE 抑制活性的酶解降血压肽^[2-7]。Eiji 等^[8]水解了 12 种食物蛋白,进一步研究发现从鱼肉、虾、蟹等水产动物蛋白中制得的酶解降血压肽其降压活性优于其它食物性蛋白。我国在酶解降血压肽领域的研究起步相对较晚,以大豆、蛇毒、老酒、茶叶为原料,对酶解降血压肽的制备工艺和活性基团等方面进行了一定研究^[9-13]。本研究以贻贝为原料,经酶解、活性修饰等方法制取降血压肽,然后利用 SHR 饲喂试验检测其降血压活性,并分析了其相对分子质量分布和氨基酸组成,以期对贻贝酶解降血压肽的开发提供理论探索。

1 材料与方 法

1.1 材料与设备

市售贻贝。ACE 标准样品:Sigma 试剂。复合生物酶 P1 (本项目组自行配制),其组分均购自上海生物化学试剂公司。降血压肽制备所需其它试剂,均为生化纯,上海生物化学试剂公司提供。降压功能试验用动物:SHR(自发性高血压大鼠),上海高血压研究所提供。仪器设备:HPLC (Waters 600 高效液相色谱仪),大鼠血压仪(RBP

-1B);氨基酸自动分析系统(Beckman system gold)及常用试验仪器若干。

1.2 实验步骤

根据本项目组前期研究经验和国际新近研究成果,结合有关蛋白酶酶解的作用特点,选取复合蛋白酶 P1,在不同酶解条件下对贻贝蛋白进行酶解,采取 Uniform Design (均匀设计)方案^[14],研究不同酶量、酶解时间、酶解温度、pH 等四大因素下对 ACE 的抑制效果,并选择最佳的酶解条件。

按上面实验所确定的酶解条件,取新鲜贻贝去壳,捣碎,酶解,纯化,然后加入活性修饰剂 MA1,提取,冷冻干燥,制备降血压肽,以备分析检测之用。

将制备的降血压肽样品利用高效液相色谱法检测其相对分子质量分布,氨基酸自动分析仪检测其氨基酸组成,并利用 SHR 饲喂试验来分析其降血压活性。

1.3 实验方法

酶解样品 ACE 抑制效果的分析 用紫外分光光度法分析不同酶解条件下制备的酶解降血压肽对应的 ACE 抑制活性。有关步骤参照 Cushman^[15]和后经 Toriki^[16]改进的方法进行。

将反应液(K_3PO_4 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 8.3; NaCl $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; HHL $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)量取 0.25 mL,加入试管。分别加入降血压肽液 1 mL (对照组加蒸馏水)。取 0.15 mL ACE 液($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)于反应液中,37 °C 水浴保温 30 min。加入 0.25 mL $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 HCl 充分搅拌以终止反应。加入 1.5 mL 醋酸乙酯,涡旋搅拌,以萃取反应生成的马尿酸,收集上清液。将上清

液于 100 °C 水浴加热约 20 min,以蒸发掉醋酸乙酯,然后加入 3 mL 蒸馏水,充分振荡。将此溶液于 228 nm 下用紫外分光光度计测定其吸光值。

将各酶解液反应值与空白样品对照,分析所得酶解降压肽的 ACE 抑制率 P。计算公式为:

$$P = \frac{A - A(\text{control})}{A} \times 100\%$$

高效液相色谱法测相对分子质量 利用标准曲线法。(1) 色谱条件: Waters 600 高效液相色谱仪; 色谱柱: TSK gel 2000; 流动相: V(乙腈): V(水): V(三氟乙酸) = 45 : 55 : 0.1, 检测波长: 220 nm, 体积流量: 0.5 mL · min⁻¹, 柱温: 30 °C。(2) 相对分子质量校正曲线所用标准品: 细胞色素 C (MW 12500), 抑肽酶 (MW 6500), 杆菌酶 (MW 1450), 乙氨酸 - 乙氨酸 - 酪氨酸 - 精氨酸 (MW 451), 乙氨酸 - 乙氨酸 - 乙氨酸 (MW 189)。取酶解降血压肽溶解, 定容, 取上清液滤纸过滤, 再用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 然后以供高效液相色谱进样。

降血压肽氨基酸组成分析 水解氨基酸检测: 取样品, 加 6 mol · L⁻¹ 盐酸水解, 110 °C, 24 h, 然后用 0.3 mm 膜微孔过滤, 定容, 进样氨基酸

自动分析系统进行检测。游离氨基酸检测: 取样品, 加水溶解, 超声波振荡混匀, 加适量盐酸调酸, 0.3 mm 膜微孔过滤, 定容, 进样氨基酸自动分析系统进行检测。

降血压肽降压功能检测 实验用动物: SHR, 均由上海市高血压研究所提供, 全部为雄性, 16 周龄, 体重为 250 ~ 300 g。实验前分析各组血压、体重、周龄等比较均无显著性差异 ($P \geq 0.05$)。用 8 只 SHR 为一组, 共分为 5 组, 另取 8 只为空白组进行对照。测量方法: 尾动脉法测量收缩压 SBP。

2 结果

2.1 酶解条件对降血压肽 ACE 抑制率的影响

将在不同的酶解条件下处理所得降血压肽样品按前述方法进行 ACE 抑制活性的检测, 分析其 ACE 活性抑制率, 研究不同酶解条件对降血压肽 ACE 抑制率的影响, 结果见表 1。

2.2 降血压肽的相对分子质量组成检测结果

应用高效液相色谱法对所得的降血压肽样品进行相对分子质量的分析, 结果见表 2。

表 1 不同酶解条件对 ACE 抑制效果影响

Tab.1 The ACE inhibitory result in different hydrolysis condition

编号 no.	酶量 (IU · mL ⁻¹) enzyme concentration X ₁	酶解时间 (h) enzymolysis duration X ₂	pH X ₃	酶解温度 (°C) enzymolysis temperature X ₄	ACE 抑制率 (%) ACE inhibitory ratio
1	25	2	7.0	60	88.08
2	50	4	8.5	55	77.49
3	75	6	6.5	50	36.83
4	100	1	8.0	45	26.28
5	125	3	6.0	40	39.02
6	150	5	7.5	35	58.47
7	175	7	9.0	65	20.46

表 2 降血压肽相对分子质量组成

Tab.2 The relative molecular weight distribution of antihypertensive peptide

相对分子质量 (u) relative molecular weight	所占比例 (%) percent
1539	49.66
608	15.73
209	7.96
97	25.93

2.3 降血压肽的氨基酸组成检测结果

依次检测降血压肽样品的水解氨基酸和游离

氨基酸组成, 分析其与酶解质量和降血压活性之间的关系, 其水解氨基酸组成见图 1, 游离氨基酸组成见图 2。

2.4 降血压肽的降压效果

降血压肽样品动物试验, 将样品以 3.0 g · kg⁻¹ 体重的剂量进行灌喂。灌喂前和灌喂之后第 2、4、6、8、10 小时分别检测收缩压 1 次, 记录各血压值。结果见表 3。数据分析: 采用各组别服用降血压肽前后收缩压的变化情况来反映降压效果, 采用 SPSS11.0 for windows 系统处理数据, 并

进行单因素方差分析,各组间进行 Dunnett *t* 多重比较。分析结果见表 4。

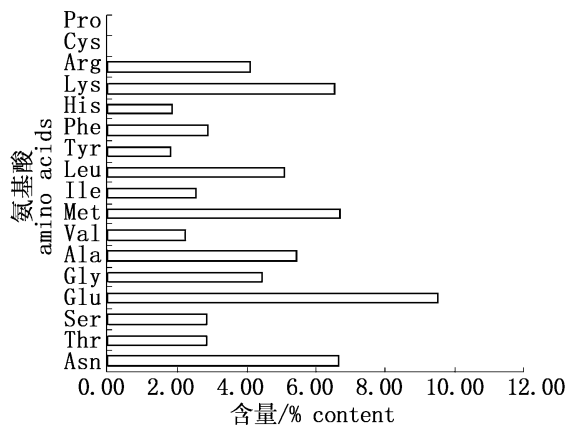


图 1 降血压肽样品氨基酸组成分析结果
Fig.1 The component of amino acids of sample

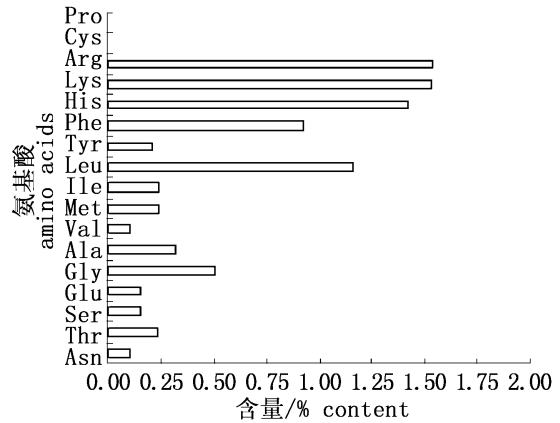


图 2 降血压肽样品游离氨基酸组成分析结果
Fig.2 The component of free amino acids of sample

表 3 降血压肽样品对收缩压降压效果

Tab.3 Antihypertensive result on SBP of samples

	血压变化情况 (mmHg) transformation of systolic blood pressure				
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
降血压肽 antihypertensive peptide	-14.00 ± 4.16	-26.00 ± 2.61	-30.75 ± 3.22	-11.50 ± 6.13	-7.25 ± 2.59
对照 control	4.00 ± 0.00	0.67 ± 1.76	-2.00 ± 1.00	-0.33 ± 1.33	1.33 ± 0.67

表 4 降血压肽收缩压降压效果多重比较结果

Tab.4 Antihypertensive result on SBP of samples by Dunnett *t* test

	对照 control	均值 mean difference	标准差 standard error	显著性 significance
2 h	空白	-18.0000 *	7.26356	0.030
4 h	空白	-26.6667 **	7.06391	0.004
6 h	空白	-28.7500 *	10.78307	0.022
8 h	空白	-11.1667	12.89246	0.305
10 h	空白	-8.5833	7.44257	0.215

* $P=0.05$ ** $P=0.01$

3 讨论

3.1 P1 酶最佳酶解条件

对于 ACE 抑制结果进行回归分析,所得回归方程为:

$$Y = 70.464 - 1.195X_1 + 15.299X_2 + 11.971X_3 - 4.310X_2^2 + 0.194 X_1X_2 - 0.141X_3X_4$$

根据方程分析最佳的 ACE 抑制活性为 90.23%。但由实验结果在此条件下的实际 ACE 抑制率为 86.55%, 所以 no. 1 为最佳条件。其

ACE 抑制率为 88.08%, 对应的最佳酶解条件为: 酶量 $25 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$; 酶解时间 2 h; pH 7.0; 酶解温度 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

具体分析 P1 的酶解情况, 酶量从 25 到 $175 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 酶解时间从 2 到 7 h, 随着酶量的增加和酶解时间的延长, 其酶解程度增加, 但所得降血压肽的 ACE 抑制率下降。这是因为随着酶解的进行, 蛋白质逐渐被水解成不同长度的肽段, 其中部分因结构上的活性基团而具有降血压活性; 但随着酶解程度提高, 部分具有 ACE 抑制活

性的短肽被酶解成氨基酸或其活性基团被破坏,从而导致其 ACE 抑制活性下降。这一点与 Kim 等^[17]通过牛皮胶制备酶解降血压肽的研究得到的结论相吻合,在酶解过程中控制酶解程度非常重要,既要使蛋白质得到充分的酶解,使更多的活性肽段被水解出来,但同时又要适当控制酶解程度,即并非酶解程度最大时其降压活性最好。

3.2 降血压肽相对分子质量组成分析

由高效液相色谱可知,降血压肽样品相对分子质量范围在 1.6 ku 以内,具体而言,从 1~1.6 ku,即 10~15、16 肽的范围,其含量为 49.66%,在相对分子质量为 1~0.6 ku,即 10 肽到 5 肽范围,样品含量为 15.73%;而在 0.2~0.6 ku 范围内为 7.96%,这一阶段主要为 2 肽到 4 肽的小肽。

降血压肽的分子量组成是一个相当复杂的问题,从已有的研究成果来看,从各种蛋白原料中应用不同蛋白酶酶解得到的降血压肽从 2、3 肽到 15、16 肽均有分布^[1,2,4,5],且活性也差别较大。但目前比较公认的是酶解降血压肽的分子量相对于蛋白质来说较小,一般在几个 ku 以内。Oshima 等^[18]用细菌胶原酶降解明胶获得六条降压活性较强的降血压肽序列,通过 Sephadex G-25 柱层析证实抑制 ACE 活性的大部分主要集中在分子量较小的片断,其分子量范围在 1.5 ku 以内。本次试验结果也表明降血压肽的分子量较小,在 1.6 ku 以内,也证实了上述结论。

3.3 降血压肽氨基酸组成分析

结果表明,样品含有较高比例的必需氨基酸。含量最高的氨基酸为谷氨酸,达 $8.57 \text{ g} \cdot (100\text{g})^{-1}$,谷氨酸被认为能促进脑细胞进行呼吸,利于脑组织中氨的排除,调节人体的新陈代谢,而这将会对血压造成一定的影响^[19]。

降血压肽样品的水解氨基酸总量为 $59.6 \text{ g} \cdot (100\text{g})^{-1}$,其中酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)总量为 $14.53 \text{ g} \cdot (100\text{g})^{-1}$;碱性氨基酸(组氨酸、赖氨酸、精氨酸)总量为 $12.84 \text{ g} \cdot (100\text{g})^{-1}$;氨基酸组成比例平衡。样品的游离氨基酸总量为 $8.8 \text{ g} \cdot (100\text{g})^{-1}$,与水解氨基酸的比值为 0.15,比例较低,说明酶解物中主要以小肽为主,而对 ACE 有抑制作用的即为一些活性寡肽,氨基酸则不具备 ACE 抑制活性,从这些数值来看,收到了较好的酶解效果。

此外,Kohmura 等^[20]研究表明降血压肽分子中的疏水性氨基酸较重要,其侧链可与 ACE 受体紧密结合,从而是维持其高活性所必需。实验分析也表明,样品中的疏水性氨基酸含量很高,达 $24.86 \text{ g} \cdot (100\text{g})^{-1}$,这与其较高的降血压活性具有密切联系。

3.4 降血压肽的降压效果

通过对自发性高血压大鼠的饲喂试验,得出了降血压肽的降压效果。通过方差分析,查表得 $F_{0.05}(2,9) = 4.26$,可知对于处理 4 h 和 6 h 血压变化的 F 值 $> F_{0.05}(2,9)$,说明服用降血压肽 4 h 和 6 h 效果有显著差异($P = 0.05$)。

同时,由上述实验结果通过 Dunnett t 多重比较可知,降血压肽在 2~6 h 之内的降压效果具有显著性($P = 0.05$),血压平均降低幅度为 18~28 mmHg。在 6 h 处降压效果达到最大值为 28 mmHg,且效果极为显著($P = 0.01$)。

根据国内外大量随机对照的临床试验结果,收缩压降低 10~14 mmHg 和舒张压降低 5~6 mmHg,冠心病减少 1/6,总的主要心血管事件减少 1/3^[21],从这个意义上讲,贻贝酶解降压肽的降压效果非常显著,随着今后进一步研究,其有望作为一种高品质的食品、药品原料而大有用途。

参考文献:

- [1] Yamamoto N. Antihypertensive peptide derived from food proteins[J], Biopoly, 1997, 43: 129-134.
- [2] Meisel H. ACE inhibitory activities in milk products[J]. Michwissenschaft, 1997, 52: 307-311.
- [3] Haileslassie W. Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese [J]. J Dairy Sci, 1999; 82, 1612-1617.
- [4] Yanewa J. Characterization of inhibitor and stability of soyprotein derived angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides [J]. Food Research International, 2002, 35(4): 367-372.
- [5] Smachi E. Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria [J]. Enzyme Microb Technol, 1998, 22: 687-694.
- [6] Eiji J, Katsuhiko M, Masatoshi S, et al. Resistance to gastrointestinal proteases of the short chain

- peptides have reductive effect in blood pressure [J]. *Nippon Shkuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 1996, 43 (5): 520 - 525.
- [7] Pihlanto-Leppala A, Komatsu H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptide[J]. *J Dairy Res*, 2000, 67, 53 - 64.
- [8] Eiji J, Komatsu S. Angiotensin converting enzyme inhibitory activity of the short chain peptides derived from various food proteins [J]. *Nippon Shkuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 1996, 43 (7): 839 - 840.
- [9] 吴建平, 丁霄霖. 大豆降压肽的研制—生产高活性 ACEI 肽酶系的筛选[J]. *中国油脂*, 1999, 23 (2): 49 - 51.
- [10] 张蓉真, 刘树浮. 福建老酒中血管紧张素转换酶抑制物质的分离鉴定[J]. *福州大学学报(自然科学版)*, 1999, 22(6): 112 - 116.
- [11] 宴会根. 蕲蛇毒中抑制 ACE 活性组份的分离纯化与表征[J]. *福州大学学报(自然科学版)*, 2001, 28(5): 114 - 117.
- [12] 倪莉, 陶冠军. 血管紧张素转换酶活性抑制剂—丝素肽的分离、纯化和结构鉴定[J]. *色谱*, 2001, 19(3): 222 - 225.
- [13] 林智, 大森正司. 氨基丁酸茶成份对大鼠血管紧张素转换酶活性的影响[J]. *茶叶科学*, 2002, 22 (1): 43 - 46.
- [14] 方开泰. 均匀设计与均匀设计表[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 6.
- [15] Cushman D W. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. *Bio Pharm*, 1971, 20(2): 1673 - 1675.
- [16] Toriki H. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, 67(1): 921 - 924.
- [17] Kim S K, Komatsu S. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelation hydrolysates [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 2992 - 2997.
- [18] Oshima H, Shimabukuro K, Nagasawa S. Peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme indigests of gelatine by bacterial collagenase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1989, 566: 128 - 137.
- [19] 曾可斌, 胡长林, 陈阳美. 谷氨酸对原代培养海马神经元的兴奋特性[J]. *中国应用生理学杂志*, 2005, 21(4): 381 - 383.
- [20] Kohmura W, Nio N, Kubo M, *et al.* Inhibition of angiotensin-converting enzyme by sythetic peptides of human β -Casein [J]. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(8): 2107 - 2114.
- [21] Harmet P, Pausova Z, Adarichev V, *et al.* Hypertension: genes and environment [J]. *J Hypertens*, 2000, 16(2): 397 - 418.