

文章编号:1000-0615(2007)06-0818-07

血管紧张素转换酶抑制肽的分离

曾庆祝¹, 许庆陵¹, 黄儒强², 邱礼平³

(1. 广州大学化学化工学院, 广东 广州 510006;

2. 华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631;

3. 广东化工制药职业技术学院, 广东 广州 510520)

摘要:采用截留分子量分别为30 ku、10 ku、6 ku、3 ku的中空纤维超滤膜对扇贝酶解产物进行分级分离,并结合凝胶柱层析分离技术测定了各分离组分的分子量分布,同时还测定了各分离组分对血管紧张素转换酶(ACE)的抑制活性。实验结果表明,不同截留分子量超滤膜可以实现酶解产物按其分子量大小的分级分离,不同分离组分的ACE抑制力活性差异较大,总趋势是截留分子量相对较小的超滤膜透过液的ACE抑制活性较强。其中,截留分子量为3 ku超滤膜的透过液具有最强的ACE抑制活性,其ACE抑制率 $I(\%) = 96.17\%$,半抑制浓度 $IC_{50} = 0.078 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。通过对截留分子量为3 ku超滤膜的透过液依次经过Sephadex G-25及Sephadex G-15凝胶柱层析分离纯化后,分离出了ACE抑制活性最强的2个组分活性肽,其平均分子量分别为1 300 u和900 u左右,其 IC_{50} 分别为 $0.026 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.012 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词:血管紧张素转换酶;膜分离;活性肽

中图分类号:S 986

文献标识码:A

Separation of angiotensin converting enzyme inhibitor peptides

ZENG Qing-zhu¹, XU Qing-ling¹, HUANG Ru-qiang², QIU Li-ping³

(1. Food Engineering Department, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China;

2. School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

3. Guangdong Vocational and Technical College of Chemical Engineering Pharmaceutics, Guangzhou 510520, China)

Abstract: Separation effect of protein hydrolysates by ultrafiltration membrane system with 3 000, 6 000, 10 000, 30 000 Daltons molecular-weight-cut-off (MWCO) membranes, and the inhibitory ability ($I\%$) of angiotensin converting enzyme (ACE) of filtrate fraction by Sephadex G-25 and Sephadex G-15 filtration chromatography were investigated, respectively. The results showed that different composition could be separated from hydrolysates with different MWCO membranes and different size peptide had great different ACE inhibitory ability. The smaller MWCO of ultrafiltration membranes, the higher ACE inhibitory ability of the fraction. The filtrate from the 3 000 Daltons MWCO membrane had a much higher ACE inhibitory ability, $I(\%) = 96.17\%$ and $IC_{50} = 0.078 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, than that from other MWCO membranes. The average molecular weight of two group peptides separated by Sephadex G-25 and Sephadex G-15 filtration chromatography followed by separation from the hydrolysates with 3 000 Daltons MWCO membrane, which

收稿日期:2007-01-08

资助项目:大连市优秀青年科技人才基金项目(2005J22JH049);广州大学校内科研启动项目

作者简介:曾庆祝(1965-),男,重庆市人,博士,教授,主要从事海洋生物资源综合利用研究。E-mail:qingzhuzeng@yahoo.com.cn,

Tel:020-31877065

possessed the highest ACE inhibitory ability (IC_{50} 0.026 mg·mL⁻¹ and 0.012 mg·mL⁻¹), were 1 300 and 900 Daltons, respectively.

Key words: angiotensin converting enzyme (ACE); membrane separation; active peptide

在蛋白质分解后的酶解液中,存在着分子量大小多种分子,是一个比较复杂的混合物体系,其中包括大小不一的肽类、氨基酸等不同的未分解的蛋白质及酶类等成分。所以,要将其中的目标组分分离出来就需要采用特殊的分离技术手段。

膜分离技术可以根据所用膜的特性及膜孔径大小,在一定程度上将分离体系中的物质按照特性或者分子量大小进行分级分离。目前,膜分离技术在氨基酸、多肽或多肽混合物的分离、蛋白质水解产物的分离与脱盐、发酵液中氨基酸的回收及废水处理等方面研究不断深入^[1]。从国内外近年的研究结果来看,膜分离技术在对不同分子量的分子进行分级分离时具有一定优势。为此,本文主要探讨超滤膜分离技术对酶解液的分级分离,并采用凝胶柱层析法对分离组分进行进一步的分离纯化,并确定分离组分的分子量分布及血管紧张素转换酶(ACE)抑制活性。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

酶解液与试剂 超滤膜分离酶解液,来自胃蛋白酶在其最佳酶解工艺条件下对扇贝裙边进行酶解所得酶解产物。Sephadex G-50、G-25 及 G-15; Pharmacia 公司; 碳酸酐酶(牛红细胞): 上海丽珠东风生物技术有限公司; 细胞色素 C (cytochrome C)、胰岛素 (insulin)、短杆菌肽 D (gramicidin D)、马尿酸组氨酰亮氨酸 (HHL)、血管紧张素转换酶(ACE)、维生素 B₁₂ (VB₁₂)、胰高血糖素 (GLP-1, C₁₅₁H₂₂₈N₄₀O₄₇): Sigma 公司; 蓝色葡聚糖 2000: 上海伯奥生物科技有限公司; 辅酶 I (NAD): 中国科学院东方仪器设备公司生产部; 5-腺嘌呤核苷-磷酸 (AMP): 中国科学院上海生物化学研究所。

HHL 缓冲液由 HHL、Na₂B₄O₇、H₃BO₃、NaCl 和超纯水配制而成。其它试剂为分析纯 (AR)。

主要仪器与设备 J-6M 型大容量冷冻离心机; Beckman 公司; UV-754 分光光度计、721 分光光度计: 上海第三分析仪器厂; 旋涡混合器 (XW-30A): 上海精科实业有限公司; 部分收集器

(250701); LABOMATIC, Switzerl and Suisse; 蠕动泵 (STA-131900); DESAGE GMBH, Heidelbe, W-German; 实验型超滤膜分离装置: 配备有截留分子量为 30 ku、10 ku、6 ku、3 ku 的中空纤维聚砜超滤膜; 凯氏定氮仪 (KDN-2C): 上海纤检仪器有限公司。

1.2 实验方法

酶解液的预处理 在制备 ACE 抑制肽的最佳酶解工艺条件下制备酶解液(制备技术另文发表),然后将酶解液于沸水浴中加热 10 min,随后快速冷却至室温,并调节 pH 值至 7.0,在离心力为 3 068 × g 下离心 40 min(离心室内温度为 10 ℃)。上清液一部分进行真空浓缩,冷冻干燥;另一部分上清液用作膜分离试验。

ACE 抑制率测定 按照 Cushman 等^[2]的紫外分光光度法,稍作适当改变。取 1 mg 酶解产物冻干品溶解在 1 mL 去离子水中,配置成酶解样液。然后取 50 μL 酶解样液,加入到 2 mL 的 Eppendorf 管中,另加入 50 mL HHL 缓冲液,置于 37 ℃ 保温 5 min,再加入 50 μL ACE 酶液启动反应,37 ℃ 保温 60 min 后加入 150 μL 1 mol·L⁻¹ HCl 终止反应。再加入乙酸乙酯 1.5 mL,在旋涡混合器上震荡混合 20 S,在离心力为 1006 × g 下离心 10 min,用移液器吸取 1.0 mL 脂层于另一 Eppendorf 管中,在真空干燥箱中干燥 120 min,再用移液器吸取 1.0 mL 去离子水将其溶解,在 228 nm 紫外波长处测定该溶液的吸光值。实验分 3 组同时进行,第 1 组为空白组 A,用去离子水代替酶解样液,并用配制 ACE 的缓冲液代替 ACE 酶液;第 2 组为加样组 B,加入酶解液作为抑制剂;第 3 组为对照组 C,仅用去离子水代替酶解液。

$$I(\%) = (A - B) / (A - C) \times 100$$

式中,A 为空白组的吸光值;B 为加样组,即加入酶解样液抑制剂后的吸光值;C 为对照组的吸光值。ACE 活性抑制率(I)都是 3 次平行实验测定结果的平均计算值。

当 ACE 活性抑制率达到 50% 时所需抑制剂的浓度即为半抑制浓度,记为 IC₅₀,可根据实验测定和抑制物浓度与抑制率之间的关系计算出

IC₅₀值。

水分测定 采用直接干燥法^[3]

总氮测定 采用微量凯氏定氮法^[3]

氨基态氮测定 甲醛电位滴定法^[3]

肽含量测定 采用双缩尿法测定法^[4-5]。

肽的百分含量(%) = 组分中的肽量/该组分的总量 × 100

肽的得率(%) = 组分中的肽量/所用原料蛋白质总量 × 100

凝胶过滤层析分离^[6] 分别取 1.0 mg 酶解产物冻干品和通过截留分子量 3 ku 超滤膜透过液冻干品配制成溶液,再各取 1.0 mL 分别进行 Sephadex G-25 和 G-15 凝胶柱层析分离(1.6 × 68 cm),使用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 7.0)洗脱,并控制恒定的洗脱速度 0.6 mL·min⁻¹。洗脱液用自动部分收集器定时定量收集,每个收集管收集洗脱液 3.0 mL。

2 结果与讨论

2.1 ACE 抑制肽的超滤膜分离

首先用截留分子量为 30 ku 的超滤膜对酶解液进行分离,所得透过液再经过截留分子量为 10 ku 的超滤膜进一步分离,随后按照同样方法分别采用截留分子量为 6 ku,3 ku 的超滤膜继续进行

逐级分离。这样,扇贝裙边酶解液就被分成如下 5 个组分:(A) 分子量范围 ≥ 30 ku、(B) 分子量范围 30 ~ 10 ku、(C) 分子量范围 10 ~ 6 ku、(D) 分子量范围 6 ~ 3 ku 和 (E) 分子量范围 ≤ 3 ku。在(A)组分中,主要成分是非透过超滤膜的分子量大于 30 ku 的大分子如未被充分酶解的蛋白质、酶类、糖类及多肽类等。在(B)、(C)和(D)组分中,主要成分是非透过超滤膜的分子量分别在 30 ~ 10 ku、10 ~ 6 ku 和 6 ~ 3 ku 区间的多肽和短肽类、氨基酸及水分等物质。在(E)组分中,主要成分是非透过超滤膜的分子量小于 3 ku 的短肽、氨基酸和水分等物质。

各分离组分中肽的含量、百分含量及肽的得率等技术指标见表 1。可以看出,在酶解液中,大约有 22.0% 的肽分子质量大于 30 ku;有 22.6% 的肽分子质量在 10 ~ 30 ku 之间;有 23.8% 的肽分子质量在 6 ~ 3 ku 之间;有 18.3% 的肽分子质量在 3 ~ 6 ku 之间;另有 13.2% 的肽分子质量小于 3 ku。说明在这种酶解条件下,蛋白质被分解成分子质量大于 6 ku 的肽的数量最多(约占总量的 68.4%),而分解成分子质量小于 3 ku 的肽的数量最少。因此,有必要对 3 ku 的超滤膜截留液进行进一步的酶解,以提高蛋白质的转化率,使蛋白质尽可能多地分解为分子质量小于 3 ku 的肽,从而提高最终产品的 ACE 抑制肽含量。

表 1 不同截留分子量超滤膜逐级分离酶解液的技术指标

Tab.1 Parameters relating to filtrate after ultrafiltration membrane

	酶解液 hydrolysate	(A)组分 ≥ 30 ku filtrate A	(B)组分 30 ~ 10 ku filtrate A	(C)组分 10 ~ 6 ku filtrate A	(D)组分 6 ~ 3 ku filtrate A	(E)组分 ≤ 3 ku filtrate A
各组分体积(mL) volume of filtrate	5000	950	972	1170	878	1030
各组分肽量(g) content of peptide	35.44	7.80	8.01	8.44	6.49	4.69
氨基酸含量(g) content of amino acid	1.10	0.04	0.07	0.16	0.25	0.42
肽的百分含量(%) (干基计) percent of peptide	-	-	99	98	96	91
肽得率(%) quantity of peptide	17.46	-	-	-	-	2.31
ACE 抑制率 I(%) I% of ACE	91.33	32.17	39.63	40.37	41.92	96.17
各组分的 IC ₅₀ (mg·mL ⁻¹) IC ₅₀ of filtrate	1.671	3.952	2.744	2.180	2.013	0.078

从表 1 还可以看出,虽然分子质量小于 3 ku 肽的含量最低,但是具有最高的 ACE 抑制率。这说明 ACE 抑制肽主要是分子质量小于 3 ku 的肽。虽然其它各分离组分的 ACE 抑制活性较弱,但这也说明了扇贝裙边经胃蛋白酶分解后生成了多种具有 ACE 抑制活性的肽。从各组分中肽的百分含量可知,透过 3 ku 超滤膜的组分中氨基酸含量相对较高,约占该组分总量的 9% 左右,肽占

91% 左右。在其它组分中也有氨基酸存在,说明并非所有分子质量小于截流分子量的物质都能通过超滤膜。

酶解液经过截留分子量为 30 ku,10 ku,6 ku,3 ku 的超滤膜逐级分离后,各分离组分的半抑制浓度 IC₅₀ 值相差较大,既 ACE 活性抑制力体现出较大差异。3 ku 超滤膜透过液组分体现出超强的 ACE 活性抑制力,说明酶解液中具有较强

ACE 活性抑制力的成分主要是分子量小于 3 ku 的肽,而非氨基酸的作用。在吴建平^[7]对大豆降血压肽的研究论文中,报道了具有降压活性的 ACE 抑制肽主要是一些分子量小于 1 500 u 的小肽。Hiroyuki 等^[8]的研究发现,分子质量在 1 ku 以下的大豆肽具有降血压的作用。Adler^[9]报道降血压肽的分子质量范围为 300 ~ 600 u。Oshima 等^[10]通过对明胶的研究表明,大分子多肽没有 ACE 活性抑制力。Matsui 等^[11]从虾、蟹和沙丁鱼的水解物中分离出二肽,具有很强的 ACE 活性抑制能力,其 IC_{50} 分别为 0.072, 0.075, 0.076 $mg \cdot mL^{-1}$ 。而 Kinoshita 等^[12]应用凝胶色谱从大豆蛋白中分离出两种肽,高分子量肽有 ACE 活性抑制力,低分子量肽则不显示 ACE 活性抑制力。Hee-Guk 等^[13]通过酶解技术从阿拉斯加青鳕明胶中,制备出了多种肽,其研究表明,分子量在 900 ~ 1 900 u 范围内的肽具有最强的 ACE 活性抑制力。Matsui 等^[11]对沙丁鱼蛋白的水解研究发现,随着水解程度的深化,水解产物的 ACE 活性抑制力将显著降低,而且,水解产物的 ACE 活性抑制力与水解工艺条件精密相关。这些研究结果也说明了 ACE 抑制肽分布比较广泛,具有多样性。

2.2 膜分离组分的分子量分布

采用 Sephadex G-50 凝胶过滤色谱分析各分离组分中肽混合物的分子质量分布,由图 1 可看出,30 ku 超滤膜透过液经过 10 ku 超滤膜进一步分离后,其透过液洗脱峰少了,而且分子量为 29 ku 左右的洗脱峰值降也降低了;6 ku 超滤膜透过液又比 10 ku 超滤膜透过液少了两个洗脱峰;最后经过 3 ku 超滤膜分离后的酶解液中,仅显示出 3 个洗脱峰,在洗脱图谱中前面的分子量较大的洗脱峰基本上不复存在,1 个洗脱峰的分子量为 3 ku 左右,另两个洗脱峰的分子量都在 2 ku 以下。表明在 30 ku 超滤膜分离后的酶解液中,含有较多种类的肽类物质(但有些肽不具有 ACE 抑制力)。随着酶解液逐级分离的超滤膜截留分子量越小,透过液经 Sephadex G-50 凝胶过滤后的第 1 个洗脱峰出现得越迟。从凝胶过滤图谱出现第一峰的位置可以确定出透过液组分的最大分子量均小于超滤膜的截留分子量。证实了超滤膜对水解液中不同分子量组分具有分离作用。

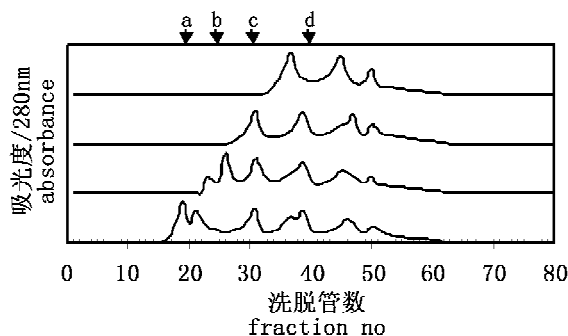


图 1 超滤膜分离液的凝胶过滤洗脱图谱
Fig. 1 GPC profiles of hydrolysates separated by ultrafiltration membranes

凝胶柱为 Sephadex G-50(1.6 cm × 68 cm),洗脱速度 3.0 $mL \cdot (5 \text{ min})^{-1}$,30 ku,10 ku,6 ku,3 ku 分别代表超滤膜的切割分子量(MWCO of membrane)。a: 碳酸酐酶(carbonic anhydrase)(MWt 29 ku); B: 细胞色素 C(cytochrome)(MWt 12.3 ku); c: 胰岛素(Insulin)(MWt 5.8 ku); d: 短杆菌肽 D(gramicidin)(MWt 2 ku)

2.3 ACE 抑制肽的凝胶层析分离

凝胶层析柱标准曲线的制作 将蓝色葡聚糖 2000 配制成浓度为 2 $mg \cdot mL^{-1}$ 的溶液,移取 1 mL 该溶液注入 Sephadex G-15 凝胶层析柱内,测量凝胶层析柱的外水体积 $V_0 = 32.8 \text{ mL}$ 。将胰高血糖素、短杆菌肽 D、VB₁₂、NAD 和 AMP 分别配制成浓度为 2 $mg \cdot mL^{-1}$ 的溶液,各取 1 mL 分别注入 Sephadex G-15 凝胶层析柱内,测定其各自的洗脱体积 V_e ,并计算出相应的分配系数 K_{av} 值。根据胰高血糖素(分子量 3 355 u)、短杆菌肽 D(分子量 2 000 u)、VB₁₂(分子量 1 335 u)、NAD(分子量 663 u)和 AMP(分子量 347 u)5 种物质的标准分子量对数 $\log M$ 值和求得的分配系数 K_{av} 值制作标准曲线,并得到分配系数 K_{av} 值与分子量对数 $\log M$ 值之间的线性关系: $K_{av} = -0.7217 \log M + 2.7104$ (图 2)。

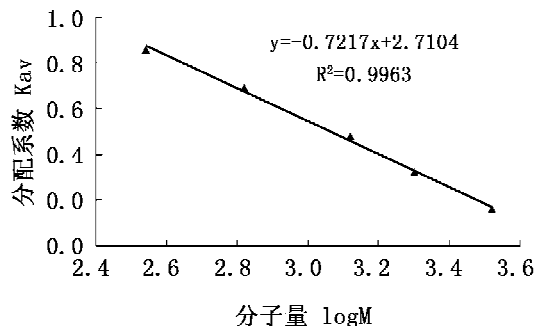


图 2 Sephadex G-15 凝胶层析标准曲线
Fig. 2 Standard molecular weight curve with Sephadex G-15 separation

膜分离前酶解液的凝胶层析分离 扇贝裙边胃蛋白酶酶解产物(膜分离前)经过 Sephadex G-25 凝胶柱分离后,在波长 280 nm 和 220 nm 下,测定各组分的洗脱吸收峰和各洗脱组分的 ACE 活性抑制率见图 3 和图 4 所示。

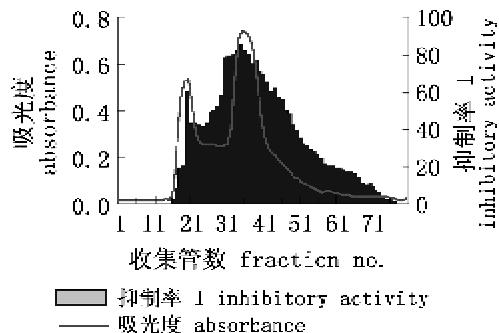


图3 酶解产物经 G-25 分离后各组分的吸光度(A)和抑制率(I) (280 nm)

Fig. 3 Absorbance at 280 nm and ACE inhibitory activity(I) of fraction isolated by Sephadex G-25 from hydrolysates

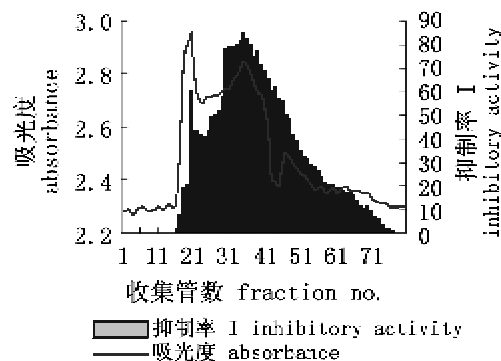


图4 酶解产物经 G-25 分离后各组分的吸光度(A)和抑制率(I) (220 nm)

Fig. 4 Absorbance at 220 nm and ACE inhibitory activity(I) of fraction isolated by Sephadex G-25 from hydrolysates

可以看出,酶解产物经 G-25 凝胶柱层析分离后,在波长 280 nm 和 220 nm 下主要有两个较大的洗脱吸收峰,这两个洗脱吸收峰分别出现在 20 管和 35 管。在第 2 个洗脱吸收峰处显示出最强的 ACE 抑制能力,在该峰附近从 30 管到 39 管也都体现出较强的 ACE 活性抑制能力。说明在 ACE 抑制肽的氨基酸组成中,包含了两类氨基酸残基,它们分别在 280 nm 和 220 nm 波长下产生较强的吸收。在洗脱后期的 220 nm 波长下测定的洗脱曲线中出现了几个小峰,这些小峰可能是由小肽或游离氨基酸的吸收而产生的。

膜分离后透过液的凝胶层析分离 将通过 3 ku 超过滤膜的透过液进行 Sephadex G-25 凝胶柱层析分离,并分别在波长 280 nm 和 220 nm 下测定各洗脱组分的吸光度和 ACE 抑制率(图 5 和图 6)。

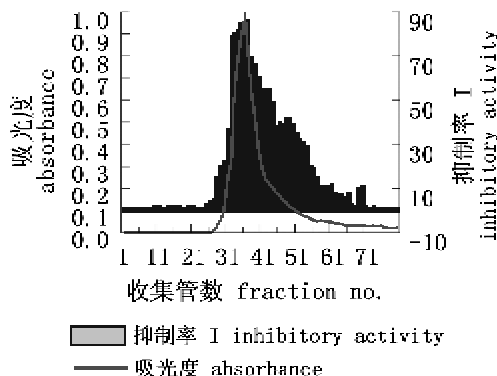


图5 3 ku 膜透过液经 G-25 分离后各组分的吸光度(A)和抑制率(I) (280 nm)

Fig. 5 Absorbance at 280 nm and ACE inhibitory activity(I) of fraction isolated by Sephadex G-25 from hydrolysates after ultrafiltration

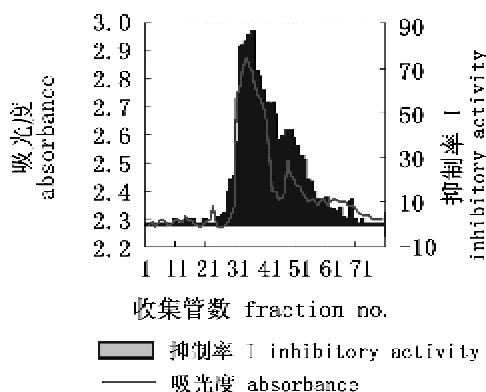


图6 3 ku 膜透过液经 G-25 分离后各组分的吸光度(A)和抑制率(I) (220 nm)

Fig. 6 Absorbance at 220 nm and ACE inhibitory activity(I) of fraction isolated by Sephadex G-25 from hydrolysates after ultrafiltration

从图 5、图 6 和图 3、图 4 的实验结果比较可以发现,超滤膜透过液经 Sephadex G-25 凝胶柱层析分离后,在洗脱曲线中靠前面的大吸收峰已不复存在了,只剩下 31 管后的洗脱吸收峰。说明超滤膜透过液组中大分子物质几乎不存在了,同时也表明酶解产物经过截留分子量为 3 ku 的超滤膜分离后,分子量较大的肽分子已被膜截留,透过液中主要是小分子肽、氨基酸和水分。

从图 5 和图 6 可知,超滤膜透过液的最大吸收峰附近的 6 个洗脱组分(从 32 管至 37 管)具有

较强的 ACE 抑制能力。分别将这 6 个具有较强 ACE 抑制能力的洗脱液组分合并,经过冻干后配制成溶液,再选用 Sephadex G-15 凝胶柱层析进行分离纯化,分离后各组分呈现的洗脱吸收峰及各组分的 ACE 抑制率见图 7、图 8 所示。

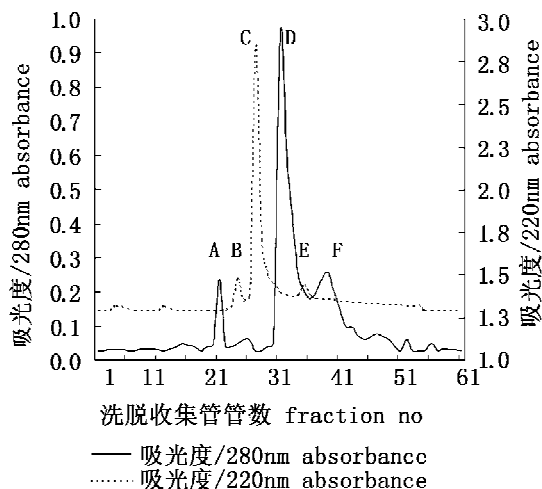


图 7 Sephadex G-25 分离后活性组分的 G-15 分离图谱

Fig. 7 Sephadex G-15 filtration chromatography of active fraction after Sephadex G-25 separation

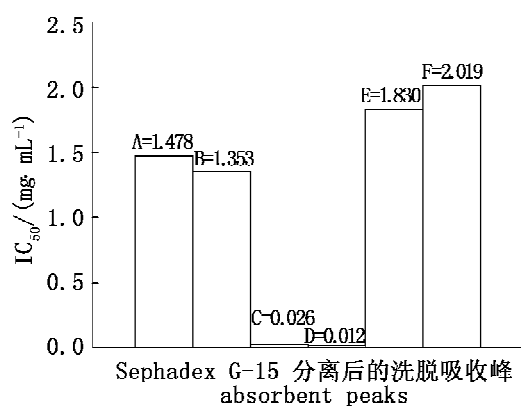


图 8 Sephadex G-15 分离后各洗脱组分的半抑制浓度 IC_{50}

Fig. 8 IC_{50} of absorbent peaks (A-F) from G-15 separation

从图 7 可以看出,ACE 活性抑制能力较强的 6 个洗脱组分再经过 Sephadex G-15 凝胶柱层析分离纯化后,出现了两个明显较大的洗脱吸收峰(C 峰和 D 峰),C 峰出现在 27 号洗脱收集管,D 峰出现在 32 号洗脱收集管。另外还有 4 个较小的洗脱吸收峰(A、B、E 和 F 峰)。C 峰组分的洗脱体积 $V_e = 81 \text{ mL}$,根据 Sephadex G-15 凝胶柱

层析分离的标准曲线(图 2)和标准分子量与分配系数 K_{av} 的关系,可推算出该组分的分子量为 1300 u 左右;D 峰组分的洗脱体积 $V_e = 96 \text{ mL}$,根据 Sephadex G-15 凝胶柱层析分离的标准曲线(图 2)和标准分子量与分配系数 K_{av} 的关系,同样可推算出 D 组分的分子量为 900 u 左右。

从图 7 和图 8 可以看出,两个较大的洗脱吸收峰同时还具有很强的 ACE 活性抑制能力,D 组分中的肽分子含有芳环或吡啶类氨基酸基团,在波长 280 nm 下产生较强吸收,C 组分中的肽分子含有在波长 220 nm 下产生特征吸收的氨基酸残基。D 组分的 ACE 抑制能力最强,其 $IC_{50} = 0.012 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;其次是 C 组分,其 $IC_{50} = 0.026 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图 8);另 4 个较小洗脱吸收峰的 ACE 抑制力都较弱。

3 结论

采用截留分子量不同的超滤膜对酶解产物进行分离,可有效地将酶解产物按分子质量大小进行分级分离。分子质量不同的酶解产物——扇贝肽具体不同的 ACE 活性抑制力,其中截留分子量为 3 ku 的超滤膜透过液具有最强的 ACE 抑制力,该透过液再经过 Sephadex G-25 及 Sephadex G-15 凝胶柱层析分离纯化后,获得了具有最强 ACE 抑制力的两组活性肽,一组活性肽的分子量分布在 1300 u 左右,另一组活性肽的分子量分布在 900 u 左右。酶解液经过多级膜分离,并通过比较膜分离各组分的 ACE 抑制力,都充分证实酶解产物中 ACE 抑制肽的分子量较小,主要分布在 2 ku 范围以内。因此,准确控制酶解程度是制备 ACE 抑制肽的关键所在。

参考文献:

- [1] 姚红娟,王晓琳.膜分离技术在低分子量生物产品分离纯化中的应用[J].化工进展,2003,2:146-152.
- [2] Cushman D W, Cheung H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting anzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol,1977, (20):1637-1648.
- [3] 大连轻工业学院.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994.
- [4] 李建武.生物化学实验原理和方法(第一版)[M].北京:北京大学出版社,1994.

- [5] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化试验方法和技术(第二版)[M].北京:高等教育出版社,1997:140-141.
- [6] 赵永芳.生物化学技术原理及其应用(第二版)[M].武汉:武汉大学出版社,2001:113-145,287-320.
- [7] 吴建平,丁霄霖.大豆降压肽的研制(II)——酶E作用条件的优化[J].中国油脂,1998,3:6-11.
- [8] Hiroyuki F, Massaki Y. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein [J]. *Immunopharmacology*, 1999, 44: 123-127.
- [9] Adler N J. Enzymic hydrolysis of food proteins [M]. New York: Elsevier Sci Pub, 1986: 74-124.
- [10] Oshima G, Shimabukuro H, Nagasawa K. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1979, 566: 128-137.
- [11] Matsui T, Matsufuji H, Seki E, *et al.* Inhibition of abgiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline proptease hydrolyzates derived from sardine muscle [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1993, 57: 922-925.
- [12] Kinoshita E, Yamakoshi J, Ikuchi M. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57: 1107-1110.
- [13] Hee-Guk B, Se-Kwon K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitor peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin [J]. *Process Biochemistry*, 2001, 36: 155-1162.

欢迎订阅 2008 年度《海洋渔业》

《海洋渔业》创刊于 1979 年,是中国科学技术协会主管、中国水产学会和中国水产科学研究院东海水产研究所主办的学术期刊。《海洋渔业》主要刊载海洋水产资源与捕捞、海水增养殖、渔业水域生态环境保护、水产品保鲜与综合利用、水产生物技术、渔业机械与仪器等方面的水产基础理论研究和水产应用基础研究的论文、综述和简报,读者对象主要为海洋水产科技工作者、水产院校师生和渔业行政管理人员等。

《海洋渔业》于 2006 年被“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)收录,还先后被《中国期刊全文数据库》(CJFD)、《万方数据—数字化期刊群》、《中文科技期刊数据库》、联合国《水科学和渔业文摘》(ASFA)等期刊数据库收录。

《海洋渔业》为国内外公开发行,国内统一刊号:CN31—1341/S,国际标准刊号:ISSN1004—2490,邮发代号:4—630。季刊,大 16 开,96 页,逢季中月 25 日出版。定价:14 元/册。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款至编辑部订阅。

编辑部地址:上海市军工路 300 号,邮编:200090,电话:021-65680116,021-65684690 × 8048,传真:021-65683926,电子信箱:haiyangyuye@126.com, haiyangyuye@tom.com,网址:www.eastfishery.ac.cn