

## 海蜇血管紧张素转化酶抑制肽的超滤分离

张绵松<sup>1,3</sup>, 孟秀梅<sup>2,3</sup>, 袁文鹏<sup>2,3</sup>, 夏雪奎<sup>1,3</sup>, 王小军<sup>2,3</sup>, 刘昌衡<sup>2,3</sup>

(1. 山东省科学院中日友好生物技术研究中心; 2. 山东省科学院生物研究所; 3. 山东省科学院海洋食品生物技术研发平台, 山东 济南 250014)

**摘要:** **目的** 探讨分离提取海蜇水解液中血管紧张素转化酶(ACE)抑制肽的有效方法。**方法** 采用超滤技术分离ACE抑制肽, 用凝胶排阻色谱Sephadex G-25分析超滤前后肽相对分子质量的分布, 用高效液相色谱法测定超滤前后肽ACE的抑制率。**结果** 超滤可明显改变水解液中肽相对分子质量的分布, 将ACE抑制率从35.05 %提高到58.85 % (测定浓度均为0.56 mg/mL)。**结论** 超滤明显改变了肽相对分子质量的分布, 截留了ACE抑制率较低的大分子肽, 提高了滤过液ACE抑制率。但是, 超滤的相对流速有待提高。

**关键词:** 超滤; 海蜇; ACE抑制肽; 相对分子质量分布

中图分类号: TS254.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-979X (2010) 01-0020-04

## Separation of Angiotensin-I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Jellyfish with Ultrafiltration Technology

ZHANG Mian-song<sup>1,3</sup>, MENG Xiu-mei<sup>2,3</sup>, YUAN Wen-peng<sup>2,3</sup>, XIA Xue-kui<sup>1,3</sup>, WANG Xiao-jun<sup>2,3</sup>, LIU Chang-heng<sup>2,3</sup>

(1. *Biotechnology Center of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China*; 2. *Biology Institute of Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China*; 3. *Platform of Marine Food Biotechnology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250014, China*)

**Abstract: Objective** To investigate the efficient method for the separation of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from the hydrolysate of jellyfish. **Methods** The ultrafiltration technology was adopted for

收稿日期: 2009-07-06

作者简介: 张绵松 (1982-), 男, 硕士, 研究方向为海洋食品生物技术 E-mail: shangao696@163.com

- [6] Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S, *et al.* Eicosapentaenoic acid prevents LPS -induced TNF- $\alpha$  expression by preventing NF- $\kappa$ B activation [J]. *J Am Coll Nutr*, 2004, 23 (1): 71-78.
- [7] Novak T E, Babcock T A, Jho D H, *et al.* NF- $\kappa$ B inhibition by omega-3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF- $\alpha$  transcription [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2003, 284(1): L84-89.
- [8] Lo C J, Chiu K C, Fu M, *et al.* Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF  $\kappa$ B activity [J]. *J Surg Res*, 1999, 82(2): 216-221.
- [9] Babcock T A, Novak T, Ong E, *et al.* Modulation of lipopolysaccharide-stimulated macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  production by omega-3 fatty acid is associated with differential cyclooxygenase-2 protein expression and is independent of interleukin-10 [J]. *J Surg Res*, 2002, 107(1): 135-139.
- [10] Billiar T R, Bankey P E, Svingen B A, *et al.* Fatty acid intake and Kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation [J]. *Surgery*, 1988, 104(2): 343-349.
- [11] Renier G, Skamene E, DeSanctis J, *et al.* Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. Modulation of macrophage secretory activities [J]. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13(10): 1515-1524.
- [12] Yaqoob P, Calder P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages [J]. *Cell Immunol*, 1995, 163 (1): 120-128.
- [13] Wallace F A, Miles E A, Evans C, *et al.* Dietary fatty acids influence the production of Th1-but not Th2-type cytokines [J]. *J Leukoc Biol*, 2001, 69 (3): 449-457.
- [14] Zhang P, Smith R, Chapkin R S, *et al.* Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids modulate murine Th1/Th2 balance toward the Th2 pole by suppression of Th1 development [J]. *J Nutr*, 2005, 135 (7): 1745-1751.

the separation of ACE inhibitory peptides. The molecular weight distribution of filtered and unfiltered peptides was investigated by Gel Exclusion Chromatography (Sephadex G-25), and the ACE inhibition rate of filtered and unfiltered peptides was determined by HPLC. **Results** The ultrafiltration could change the molecular weight distribution of peptides markedly and raise the ACE inhibition rate from 35.05 % to 58.85 % at the concentration of 0.56 mg/mL. **Conclusion** The peptides with lower ACE inhibition rate can be trapped by Ultrafiltration. Correspondingly, the ACE inhibition rate of the filtrate increases, but the relative flow rate should be improved.

**Key Words:** ultrafiltration; jellyfish; ACE inhibitory peptides; molecular weight distribution

高血压是一种全球性疾病,患病率高达10%~20%,且发病率有逐年增加的趋势。我国现有高血压患者约2亿人<sup>[1]</sup>。高血压可导致心脑血管、肾脏等病变。因此,防治高血压已成为全球医务界面临的一项艰巨任务。

取自食物蛋白的血管紧张素转化酶(angiotensin-I-converting enzyme, ACE)抑制肽用于高血压患者有降压作用<sup>[2]</sup>,血压正常者服用则无降压作用,安全性高,长期使用无副作用,特别适于作为口服药剂或功能性食品的基料制成保健食品<sup>[3]</sup>。现ACE抑制肽已成为研究的热点。

从工业化角度考虑,制定ACE抑制肽分离提取方案必须考虑进样量大及成本低等因素,可采用超滤技术提纯<sup>[4]</sup>。超滤技术具有其它分离操作方式(如蒸发、提取等)不具备的优点,如形态不变,无需加热,设备简单,占地面积小,能耗低及操作压力低等,已用于蛋白质多肽溶液的分离浓缩,如大豆肽、鱼贝类蛋白多肽<sup>[5]</sup>。

我们采用超滤法分离提取海蜇酶解物中ACE抑制肽,主要讨论了超滤的相对流速、超滤前后肽相对分子质量的变化和ACE抑制率的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

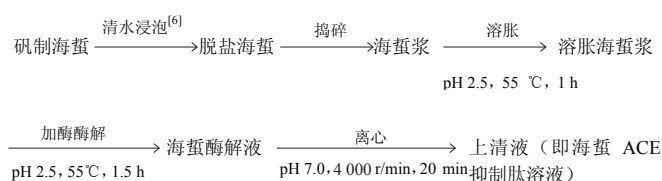
矾制海蜇(好当家集团公司);真菌酸性蛋白酶(山东隆大生物公司,酶活 $2.55 \times 10^4$  U/mL);马尿酸组氨酰亮氨酸(Sigma公司);ACE(Sigma公司)。

UF-3k聚醚砜超滤膜(上海摩速公司,80 mm);Sephadex G-25(Pharmacia公司);FK-A型组织捣碎机、JJ-1型增力电动搅拌器(金坛金城国胜仪器厂);NPCa-02氮磷钙测定仪(上海洪纪仪器设备公司);HH-S21-4S型电热恒温水浴锅(上海贺德实验公司);UV 754N紫外可见分光光度计、pHS-25型pH计(上海精密科学仪器公司);L-2000型

HPLC(日立公司);MSC300型超滤杯(上海摩速公司)。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 海蜇ACE抑制肽的制备



**1.2.2 超滤相对流速的测定** 超滤容器容积300 mL,超滤膜总面积50.24 cm<sup>2</sup>。水解液肽含量约12 mg/mL,加入量200 mL,在0.25 MPa压力下超滤。每隔一段时间用天平称量滤过液的质量,记录时间和滤过液的质量,以计算相对超滤流速。

**1.2.3 凝胶色谱条件** 柱尺寸:1.6 cm×60 cm;凝胶类型:Sephadex G-25;流动相:去离子水;流速0.4 mL/min;检测波长280 nm;柱床体积约110 mL;上样量1.0 mL。

**1.2.4 肽含量测定** 取2 mL水解液,加入2 mL 5%三氯乙酸(TCA),用双缩脲法测定肽含量<sup>[7,8]</sup>。

**1.2.5 ACE抑制率测定<sup>[9,10]</sup>** 将Cushman-Cheung(1971)方法略作修改。原理是37 °C、pH 8.3条件下,ACE催化水解血管紧张素I(Ang I)模拟物马尿酸组氨酰亮氨酸(HHL)产生马尿酸(Hip),它在紫外228 nm处具有特征吸收峰,通过生成物Hip的变化计算ACE抑制率。具体操作如下:用1.5 mL离心管,空白对照组加入100 μL 5 mmol/L HHL,用硼酸缓冲液(pH 8.3)补足至120 μL,37 °C恒温水浴保温5 min,加入5 μL 0.1 U/mL ACE启动反应;样品组加入100 μL 5 mmol/L HHL和20 μL水解液后,37 °C恒温水浴保温5 min,加入5 μL 0.1 U/mL ACE启动反应。

之后两组均37℃恒温保持30 min后,加入1 mol/L HCl 200  $\mu$ L中止反应,补加175  $\mu$ L硼酸缓冲液。用反相色谱测定Hip含量。对应的峰面积分别为 $S_{\text{对照}}$ 和 $S_{\text{样品}}$ 。

$$\text{ACE抑制率 (\%)} = \frac{S_{\text{对照}} - S_{\text{样品}}}{S_{\text{对照}}} \times 100\%$$

**1.2.6 HPLC测定条件** 色谱柱: Apollo 5u  $C_{18}$  (250 mm $\times$ 4.6 mm); 流动相: 乙腈:0.5%乙酸=35:65; 流速1.0 mL/min; 检测波长228 nm; 柱温35℃; 进样量20  $\mu$ L。

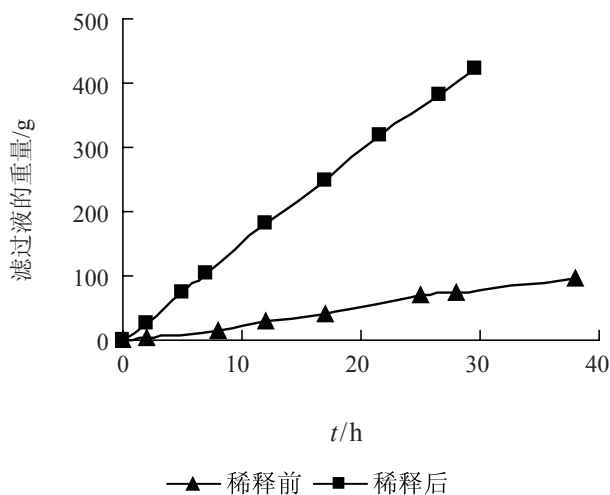


图1 滤过液重量与时间的关系

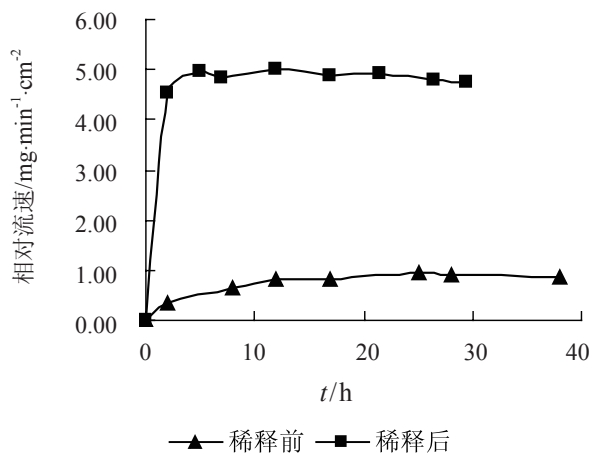


图2 超滤相对流速随时间的变化

## 2 结果与分析

### 2.1 超滤相对流速

由图1可见,滤过液重量与时间呈近线性关系。稀释前,水解液中的大分子肽浓度可能较高,容易吸附在滤膜上,使超滤速度较低;将水解液稀释一倍后,肽浓度降低一半,相对流速显著提高。由图2可

见,两条曲线的共同特点是相对流速都有快速增加的过程,然后趋于稳定。这是因超滤初期,超滤膜和底部管路里的空气会影响初始超滤的流速。随着空气排除,管道里阻力变小,相对流速逐渐增加,然后缓慢地趋于稳定。

### 2.2 超滤前后肽相对分子质量的变化

超滤前,约在洗脱体积50 mL处有一大的多肽吸收峰,且占较大的比例,见图3。超滤后,洗脱体积50 mL处的多肽吸收峰基本消失,主要吸收峰后移,表明肽相对分子质量分布向小分子段集中,图3和图4直观地显示了这一变化。具有ACE抑制作用的肽一般为相对分子质量3 000以下的短肽,小分子肽集中有利于提高ACE的抑制作用。

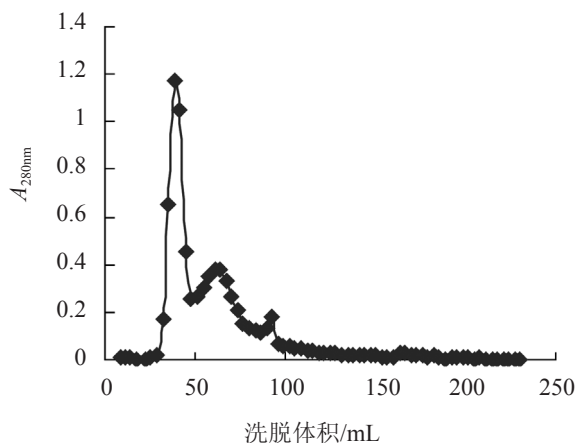


图3 超滤前肽的凝胶色谱图

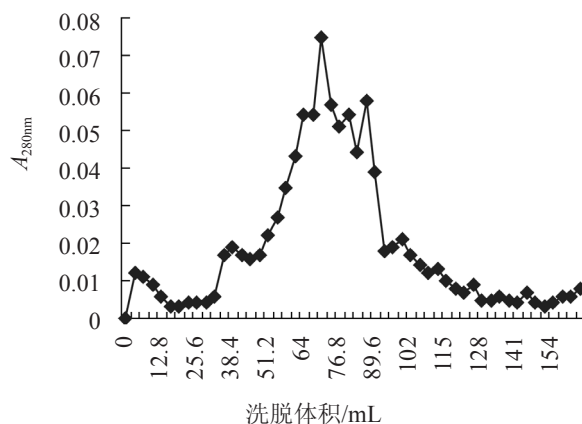


图4 超滤后肽的凝胶色谱图

### 2.3 超滤前后ACE抑制率的变化

将超滤前后溶液中的肽含量调整至0.56 mg/mL,比较其ACE抑制率,结果见图5。

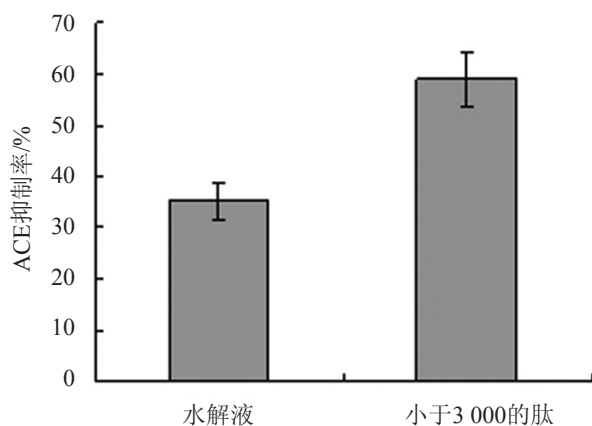


图5 超滤前后ACE抑制率比较

由图5可见,超滤后小于3 000的肽ACE抑制率明显大于超滤前水解液的ACE抑制率,从超滤前的35.05%提高到超滤后的58.85%。表明超滤对ACE抑制肽具有一定的分离作用,有ACE抑制作用的短肽得到浓缩,使其超滤液的ACE抑制率显著提高。图6、图7为ACE抑制率测定时的HPLC图。超滤前后对应的Hip峰面积(超滤前130 794,超滤后76 110)均比空白对照(213 435)小,表明它们都对ACE有抑制作用。

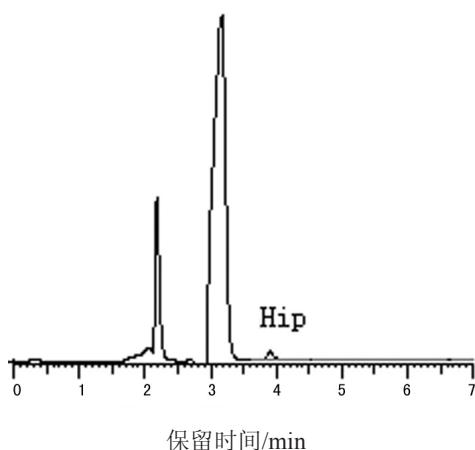


图6 超滤前ACE抑制率测定图谱

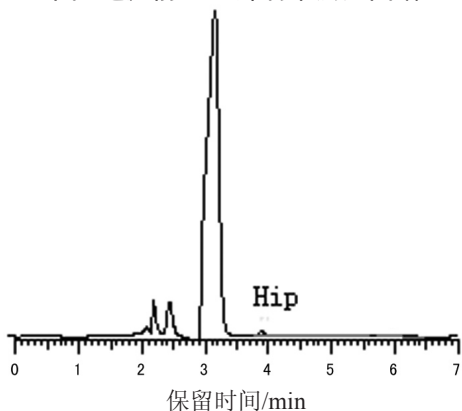


图7 超滤后ACE抑制率测定图谱

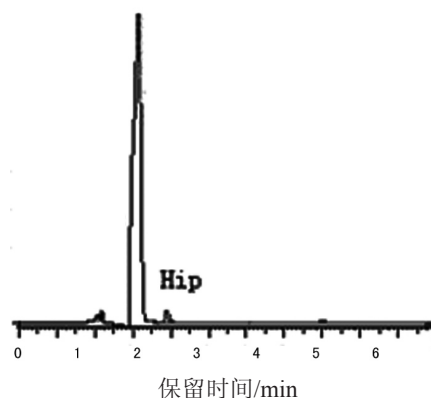


图8 ACE抑制率测定空白对照图谱

用,3 000以下的肽对应的Hip峰面积小于3 000以上的肽,表明3 000以下的肽抑制ACE的作用大于超滤前的水解液。

### 3 结论

超滤可明显改变肽的相对分子质量分布,是分离提取ACE抑制肽的简单且有效的方法,它截留了ACE抑制率较低的大分子肽,提高了滤过液ACE抑制率,但是,超滤的相对流速有待提高。

### 参考文献

- [1] 刘景峰. 我国高血压患者人数2亿, 优化联合降压势在必行 [EB/OL]. <http://health.sohu.com/20090416/n263434780.shtml>, 2009-04-16.
- [2] Hartmann R, Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(2): 163-169.
- [3] 黄家音, 朱禹洁, 沈金玉. 降血压肽研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32 (6): 81-86.
- [4] 薛向阳, 孔繁东, 祖国仁, 等. 食品抗高血压肽的研究进展和前景分析[J]. *食品研究与开发*, 2004, 25 (6): 28-33.
- [5] 蒋菁莉, 任发政, 蔡华伟. 牛乳酪蛋白降血压肽的超滤分离[J]. *食品科学*, 2006, 27 (7): 124-128.
- [6] 崔静. 预混料型方便海蜇食品的研制[D]. 江南大学食品学院, 2008: 7-19.
- [7] 大连轻工业学院, 华南理工大学. 食品分析[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1994: 224-226.
- [8] 沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1998: 110-115.
- [9] Chang B W, Chen R L, Huang I J, et al. Assays for angiotensin converting enzyme inhibitory activity[J]. *Anal Biochem*, 2001, 291(1): 84-88.
- [10] Mehanna A S, Dowling M. Liquid chromatographic determination of hippuric acid for the evaluation of ethacrynic acid as angiotensin converting enzyme inhibitor[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, 19(6): 967-973.