

# 牡蛎酶解产物的 ACE 抑制活性和清除自由基活性研究

欧成坤, 杨瑞金

(江南大学食品学院, 无锡 214036)

**摘要:** 研究了牡蛎蛋白质分别经 537 酸性蛋白酶和 Alcalase 碱性蛋白酶作用所得酶解产物的 ACE 抑制活性以及对 DPPH·、·OH、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 三种自由基的清除作用。结果表明, 两种酶的作用产物都具有一定的 ACE 抑制活性和清除自由基活性。综合评价工艺条件以及功能实验结果得出, 采用 537 酸性蛋白酶可以简化工艺, 对于水解度为 16% 的酸性蛋白酶酶解产物, 蛋白浓度为 1mg/mL 时, 对 ACE 的抑制率为 71.71%; 20mg/mL 时, 对 DPPH·、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 自由基的清除率分别为 76.23%、24.36%; 8mg/mL 时, 对·OH 自由基的清除率为 89.47%。相对分子质量分布结果表明, 体系主要存在 2 肽到 5 肽的多肽类物质, HPLC 图谱中对应峰面积约占总面积的 76.99%。

**关键词:** 牡蛎酶解产物, ACE 抑制活性, 自由基清除作用

**Abstract:** The ACE inhibiting activity and radical (DPPH·, ·OH, O<sub>2</sub><sup>-</sup>) scavenging effects of oyster hydrolysates prepared with 537 acidic protease and alcalase were investigated. The results indicated that all hydrolysates had ACE inhibiting activities and radical scavenging effects. The application of 537 acidic protease could simplify the process for the production of bioactive peptides from oyster. For the hydrolysate with a DH of 16% prepared with 537 acidic protease, the inhibiting rate on ACE was 71.71% at a protein concentration of 1mg/mL. The radical scavenging rates for DPPH· and O<sub>2</sub><sup>-</sup> were 76.23% and 24.36%, respectively at a protein concentration of 20mg/mL. The radical scavenging rate for ·OH reached 89.47% at a protein concentration of 8mg/mL. The distribution of molecular weight measured by HPLC indicated that the peptides were mainly composed of 2-5 amino acid residues, and the corresponding peak area was 76.99% on the total area.

**Key words:** oyster hydrolysates; ACE inhibiting activity; the radical scavenging effects

中图分类号: TS201.2\*5 文献标识码: A  
文章编号: 1002-0306(2005)03-0059-04

研究, 开发海洋食品及海洋药物, 有助于推动我国海洋产业的迅速发展。

近年来, 美国、欧洲、日本等采用现代生物技术及食品加工高新技术对牡蛎中功能活性成分进行了研究开发, 研制生产出了胶囊型、片剂型及液体型的功能食品、疗效品。但绝大多数研究都只是把牡蛎当作一种药用材料进行生产, 而作为食品原料来进行加工利用方面, 国内外的研究都较少。

随着蛋白质生物化学、生理学与营养学的发展, 人们发现蛋白质经消化道酶的作用后, 并非仅以氨基酸的形式吸收, 更多的是以低肽(如二肽、三肽等)的形式直接吸收, 而且二肽和三肽的吸收速度比同一组成的氨基酸快。

因此, 生物活性肽的研究就为利用生物效价不高的蛋白质资源提供了新的机遇。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

太平洋牡蛎 购自大连; Alcalase 碱性蛋白酶 购自丹麦 NOVO NORDISH 公司; 血管紧张素转化酶(ACE, 生化试剂)、马尿酸组氨酰亮氨酸(生化试剂)和 DPPH· 试剂 购自 Sigma 公司; 邻苯三酚 购自中国医药集团(上海)化学试剂公司; 邻二氮菲 购自华东师范大学化工厂; 537 酸性蛋白酶 购自无锡酶制剂厂; 其它试剂 均为分析纯或化学纯。

pHS-2 型酸度计 上海第二分析仪器厂; 喷雾干燥塔 无锡市林州喷雾干燥设备厂; 722 型分光光度计 上海精密科学仪器有限公司。

### 1.2 牡蛎生物活性肽酶法制备工艺过程

牡蛎→打浆→酶解(添加碱或酸控制酶解体系条件恒定)→灭酶→调 pH 至 4.0→静置→离心→喷雾干燥→成品

### 1.3 分析方法

1.3.1 ACE 抑制活性的测定<sup>[1,2]</sup> 采用反相高压液相色谱(RP-HPLC)定量 ACE 与三肽底物 Hip-His-Leu 反应生成的马尿酸。样品溶于超纯水中, 离心(7200×g, 15min), 保留上清液。取样品 10μL 和 ACE(0.25U 溶

牡蛎营养丰富, 生理活性物质含量高, 产量日益增加, 从中分离提取生理活性物质并对其进行功能

收稿日期: 2004-08-02

作者简介: 欧成坤(1980-), 男, 食品科学与工程硕士, 研究方向: 生物技术在食品中的应用。

基金项目: 江苏省科技攻关项目。

于 2.5mL 0.1mol/L, pH8.3、含 0.5mol/L NaCl 的硼酸缓冲液中)20 $\mu$ L 于 37 $^{\circ}$ C 保温 6min, 加入 40 $\mu$ L 6.5mmol/L 底物 (HHL 溶于相同的缓冲液中)37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 加入 80 $\mu$ L 1mol/L 的 HCl 溶液终止反应, 冷却至室温, 取 10 $\mu$ L 反应产物进样, 通过 HPLC 洗脱图谱定量马尿酸的生成量, 判断样品的 ACE 抑制活性。

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 $\times$ 100%

1.3.2 清除·OH 自由基活性的测定<sup>[3]</sup> 羟基自由基通过 Fenton 反应产生, 邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>水溶液被羟基自由基氧化为邻二氮菲-Fe<sup>3+</sup>, 其在 536nm 处的最大吸收峰消失。取 1mL 0.75mol/L 邻二氮菲无水乙醇溶液于试管中, 依次加入 2mL 0.15mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH=7.40) 和 1mL 蒸馏水, 充分混匀, 加入 1mL 0.75mmol/L 硫酸亚铁溶液 (FeSO<sub>4</sub>), 混匀后加入 1mL 0.01% 双氧水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60min, 然后在 536nm 测定吸光值, 所得数据为损伤管的吸光值 A<sub>损</sub>。以 1mL 蒸馏水代替损伤管中 1mL 0.01% 双氧水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 操作方法同损伤管, 可测得未损伤管的吸光值 A<sub>未</sub>。以 1mL 样品代替损伤管中的 1mL 蒸馏水, 操作方法同损伤管, 可测得样品管的吸光值 A<sub>样</sub>。

清除率(%)=(A<sub>未</sub>-A<sub>样</sub>)/(A<sub>未</sub>-A<sub>损</sub>) $\times$ 100%

1.3.3 清除超氧阴离子自由基活性的测定<sup>[4,5]</sup> 邻苯三酚 (PR) 自氧化法。

1.3.4 清除 DPPH· 自由基活性的测定<sup>[6,7]</sup> 按表 1 所示加样程序进行实验, 在室温反应 30min 后, 在 520nm 测定各样品的吸光度。

表 1 清除 DPPH· 活性测定的加样程序表

程序	加样
A <sub>0</sub>	4.0mL 6.5 $\times$ 10 <sup>-5</sup> DPPH· 无水乙醇溶液+0.2mL 样品的溶剂, 空白对照
A <sub>1</sub>	4.0mL 6.5 $\times$ 10 <sup>-5</sup> DPPH· 无水乙醇溶液+0.2mL 样品
A <sub>2</sub>	4.0mL 无水乙醇+0.2mL 样品

清除率(%)=[1-(A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>)/A<sub>0</sub>] $\times$ 100%

1.3.5 酶解产物的相对分子质量分布测定 高压液相色谱法 (HPLC)。

## 2 结果与讨论

### 2.1 牡蛎酶解产物对 ACE 的抑制活性

表 2 不同水解度酶解产物对 ACE 抑制活性的影响(蛋白浓度:1mg/mL)

酶类	Alcalase 碱性蛋白酶				537 酸性蛋白酶	
	12	14	16	18	16	18
水解度(%)	12	14	16	18	16	18
抑制率(%)	55.67	52.95	69.95	74.11	71.71	68.35

表 3 Alcalase 碱性蛋白酶的不同水解度酶解产物对羟基自由基的清除作用(蛋白浓度:20mg/mL)

水解度(%)	12	14	16	18
清除率(%)	61.94 $\pm$ 1.29	62.39 $\pm$ 1.02	65.57 $\pm$ 2.96	73.15 $\pm$ 1.44

注:以上结果由三次实验所得。

表 2 是牡蛎蛋白分别经 Alcalase 碱性蛋白酶和 537 酸性蛋白酶作用至不同水解度的产物当蛋白浓度为 1mg/mL 时对 ACE 的抑制活性。

从表 2 看出, 两种酶作用至不同水解度的产物都存在较高的 ACE 抑制活性, 对于 Alcalase 碱性蛋白酶, 随着水解度的提高, ACE 抑制率呈现上升趋势, 水解度为 18% 时, 其抑制率和水解度为 16% 的酸性蛋白酶酶解产物相当, 但由于 Alcalase 碱性蛋白酶在作用过程中需要不断添加碱来维持体系 pH 的恒定, 以保证酶的最佳作用条件, 这样便引入了相当多的盐, 对产品的性质造成较大的影响, 需要在后续工艺流程中增加脱盐步骤, 增加了生产成本。而对于 537 酸性蛋白酶, 水解体系的 pH 在酶的最适 pH 范围内变化, 不需要通过外界因素调节, 避免了盐的引入, 节约了生产成本, 而且产品的性状优于前者。因此, 对 537 酸性蛋白酶酶解产物进行了研究, 考察了不同浓度产物的 ACE 抑制活性, 结果如图 1 所示。

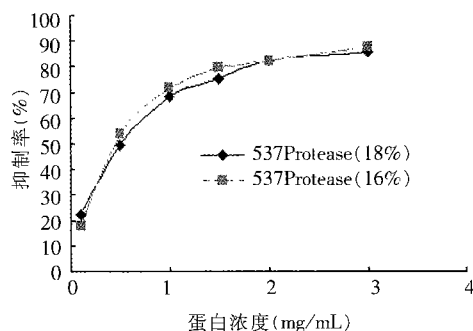


图 1 酶解产物的 ACE 抑制活性与蛋白浓度的关系曲线

由图 1 可知, 随着蛋白浓度的增加, ACE 抑制活性逐渐增加, 并最终趋于平缓。酸性蛋白酶作用至水解度 18% 和 16%、蛋白浓度为 1mg/mL 的酶解产物的 ACE 抑制率分别为 68.35% 和 71.71%, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.73mg/mL 和 0.70mg/mL, 二者没有明显的差别。吴建平<sup>[8]</sup>报道水解大豆蛋白所得水解液的 IC<sub>50</sub> 为 1.2mg/mL。

### 2.2 对羟基自由基的清除作用

将不同的酶解产物配成一定浓度的溶液, 测定其对羟基自由基的清除率, 结果如表 3 所示。

由表 3 可见, Alcalase 蛋白酶作用产物对羟基自由基的清除作用随水解度的增大而增加, 实验中发现,

表4 不同水解度酶解产物对超氧阴离子自由基的清除作用(蛋白浓度:20mg/mL)

酶类	Alcalase 碱性蛋白酶				537 酸性蛋白酶	
	12	14	16	18	16	18
水解度(%)	12	14	16	18	16	18
清除率(%)	23.20±2.65	25.44±0.91	24.08±2.62	26.97±2.76	24.36±1.97	23.58±2.63

注:以上结果由三次实验所得。

表5 不同水解度酶解产物对 DPPH·自由基的清除作用(蛋白浓度:20mg/mL)

酶类	Alcalase 碱性蛋白酶				537 酸性蛋白酶	
	12	14	16	18	16	18
水解度(%)	12	14	16	18	16	18
清除率(%)	56.34±1.34	63.66±2.18	58.94±2.04	63.25±0.85	76.23±2.14	75.17±1.97

注:以上结果由三次实验所得。

牡蛎蛋白经 537 酸性蛋白酶作用, 水解度为 18% 和 16% 的酶解产物的羟自由基清除能力明显高于 Alcalase 蛋白酶的作用产物, 在浓度为 20mg/mL 时能完全清除, 因此, 分别考察了经酸性蛋白酶作用至水解度为 18% 和 16% 的酶解产物的羟自由基清除能力与浓度的关系, 结果如图 2 所示。

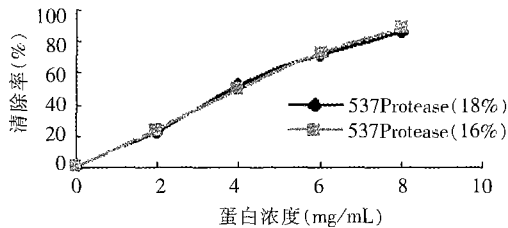


图2 酶解产物对羟自由基的清除率与蛋白浓度的关系曲线

由图 2 可知, 二者在相同的浓度下清除能力相近, 随着蛋白浓度的增加都呈现明显的上升趋势。蒋伟哲等<sup>[9]</sup>报道终浓度为 60mg/mL 的龙眼参的清除率为 28.4%; 而水解度为 18% 和 16% 的酸性蛋白酶酶解产物, 当浓度为 8mg/mL 时, 其清除率便分别达到 86.84% 和 89.47%, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 3.9mg/mL 和 4.1mg/mL, 明显优于其他产品。

### 2.3 对超氧阴离子自由基的清除作用

表 4 是牡蛎蛋白经 Alcalase 碱性蛋白酶和 537 酸性蛋白酶分别作用至不同水解度所得的酶解产物对超氧阴离子自由基的清除作用测定结果。

由表 4 可以看出, 两种酶的不同作用产物对超氧阴离子自由基的清除作用没有明显的差别。另外考察了牡蛎经 537 酸性蛋白酶作用至水解度 16% 和 18% 的酶解产物对超氧阴离子自由基的清除作用与蛋白浓度的关系, 如图 3 所示。

由图 3 可知, 随蛋白浓度的增加, 对超氧阴离子自由基的清除率呈现上升趋势, 水解度为 16% 的酶解产物略优于水解度 18% 的产物, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 58mg/mL 和 64mg/mL。

### 2.4 对 DPPH·自由基的清除作用

表 5 是牡蛎蛋白经 Alcalase 碱性蛋白酶和 537

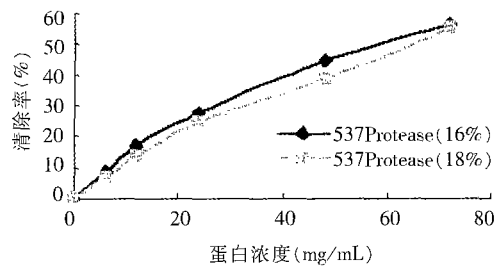


图3 酶解产物对超氧阴离子自由基的清除率与蛋白浓度的关系曲线

酸性蛋白酶分别作用至不同水解度的酶解产物对 DPPH·自由基的清除能力。

牡蛎酶解产物有很强的 DPPH·自由基清除能力。相比较而言, 在相同的蛋白浓度条件下, 537 酸性蛋白酶酶解产物的清除能力更好。因此, 考察 537 酸性蛋白酶酶解产物在不同浓度条件下对 DPPH·自由基的清除能力, 结果如图 4 所示。

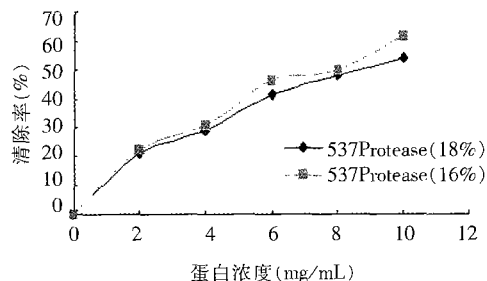


图4 对 DPPH·自由基的清除率与蛋白浓度的关系曲线

由图 4 可知, 清除率随蛋白浓度的增加呈明显的上升趋势, 当蛋白浓度为 10mg/mL 时, 水解度为 18% 和 16% 的酶解产物的清除率分别为 54.06% 和 61.88%, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 9.3mg/mL 和 8.1mg/mL。张尊听等<sup>[10]</sup>报道 4mg/mL 组培拉索芦荟的清除率为 28.0%, 而水解度为 18% 和 16% 的酸性蛋白酶酶解产物在该浓度条件下的清除率分别为 29.23% 和 30.82%, 优于芦荟的清除能力。

### 2.5 酸性蛋白酶酶解产物(水解度 16%)的相对分子质量分布曲线

酶解产物的功能性质必然与其肽链结构有密切

的关系,综合考虑工艺条件,537 酸性蛋白酶是优先选择的酶类,因此采用高压液相色谱分析了水解度为 16% 的酸性蛋白酶酶解产物的相对分子质量分布。

标准蛋白为细胞色素 C (MW12500)、抑肽酶 (MW6500)、杆菌酶 (MW1450)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (MW451)、CARBONIC ANHYDRASE (MW29000) 乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (MW189),各标样相对分子质量对数和洗脱时间的关系曲线为:  $\text{Log MolWt}=7.38-0.236T$ 。

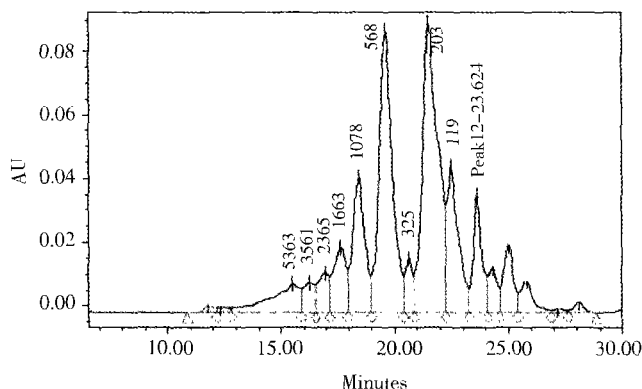


图5 酸性蛋白酶酶解产物(水解度 16%)的 HPLC 图谱

由 HPLC 实验结果可知,体系中肽的相对分子质量主要分布在 119 和 2365 之间,这部分峰面积约占总面积的 76.99%,对应相对分子质量为 568 和 203 的峰面积分别占总面积的 21.79% 和 26.37%,说明体系中主要存在 2 肽到 5 肽的多肽类物质。很多具有有效功能性质的肽类物质多数为相对分子质量较小的肽,例如, Saito 等<sup>[11]</sup>从清酒和酒糟中分离和鉴别出 9 种 ACE 抑制肽,都是具有 5 个或更少氨基酸残基的短肽, Suetsuna<sup>[12]</sup>采用反相 HPLC 色谱从大蒜中分离纯化得到 7 种具有 ACE 强抑制活性的二肽。

### 3 结论

牡蛎经酸性蛋白酶作用得到的酶解产物在 ACE 抑制活性、清除羟自由基、超氧阴离子自由基和 DPPH· 自由基方面均优于或近似于 Alcalase 碱性蛋白酶酶解产物。

通过 HPLC 分析可知,酸性蛋白酶作用能得到相对分子质量分布比较广泛的多肽物质,主要由 2~5

个氨基酸残基组成。

蛋白质水解所得的肽类物质体现出来的功能性质和其本身的结构有密切的关系,为了更清楚地了解其作用机理,有必要开展有关结构与功能对应关系方面的研究。

### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] 倪莉,王璋,等. 丝素的功能性质[J]. *无锡轻工大学学报*, 2001.
- [3] 金鸣,蔡亚欣,李金荣,赵辉,等. 邻二氮菲-Fe<sup>2+</sup>氧化法检测产生的羟自由基 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(6): 553~555.
- [4] 徐力,刘立,李相鲁,等. 玉米功能短肽的制备及其类 SOD 活性研究[J]. *中国生化医药杂志*, 2002, 23(2): 78~80.
- [5] 张英. 竹叶提取物类 SOD 活性的邻苯三酚法测定[J]. *食品科学*, 1997, 18(5): 47~49.
- [6] 彭长连,陈少薇,林植芳,等. 用清除有机自由基 DPPH 法评价植物抗氧化能力[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27(6): 658~661.
- [7] Aulejac N S, Provost C, Vivas N. Comparative Study of Polyphenols Scavenging Activities Assessed by Different Methods [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1999, 47: 425~431.
- [8] 吴建平,丁霄霖. 大豆降压肽的研制(III)-酶 E 水解进程参数的研究[J]. *中国油脂*, 1998, 23(4): 12~13, 16.
- [9] 蒋伟哲,孔晓龙. 龙眼参对肌体氧自由基清除作用的研究 [J]. *中国药房*, 2001, 12(8): 453~454.
- [10] 张尊听,杜勇军,等. 芦荟抗氧化作用的测定[J]. *天然产物研究与开发*, 13(6): 45~47.
- [11] Saito Y, Wanezaki K, Kawato A, et al. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees[J]. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 1994, 58(10): 1767~1771.
- [12] Suetsuna K. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L(garlic) [J]. *J Nutr Biochem*, 1998(9): 415~419.
- [13] Siebert K J, Trukhanova N V, Lynn P Y. Formation of protein-polyphenol interactions [J]. *Agric Food Chem*, 1996a, 44(8): 1997~2005.
- [14] 石碧,狄莹. 植物多酚[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 67~91.
- [15] Asano K, Shinagawa K, Hashimoto N. Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation[J]. *Am Soc Brew Chem*, 1982, 40: 147~154.

(上接第 58 页)

- [5] Stellmach B 著,钱嘉洲译. 酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992. 262~265.
- [6] Siebert K J, Trukhanova N V, Lynn P Y. Nature of polyphenol-protein interactions. [J]. *Agric Food Chem*, 1996b, 44(1): 80~85.
- [7] H Oh, J Hoff. PH dependence of complex formation between condensed tannins and proteins[J]. *Agri food Sci*, 1990: 337~340.