

# 鸭肝丁酰胆碱酯酶的 纯化与酶学性质研究

朱 鸿,李想韵,邓 玉,王 松,付伟丽,唐靓婷,诰赵伟,唐云明\*

(西南大学生命科学学院,三峡库区生态环境教育部重点实验室,重庆市甘薯工程研究中心,重庆 400715)

**摘 要:**目的:获得鸭肝丁酰胆碱酯酶纯品并对其酶学性质进行研究。方法:采用丙酮脱脂、酸沉淀、硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sephrose 阴离子交换层析和 Sephacryl S-200 凝胶层析方法,分离纯化鸭肝丁酰胆碱酯酶;采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法进行纯度鉴定和酶相对分子量测定。结果:从鸭肝中分离纯化获得电泳纯的丁酰胆碱酯酶,纯化倍数为 156.45 倍,酶活回收率为 23.60%,比活达 17.21U/mg。酶相对分子量为 388.85kDa,亚基相对分子量为 64.70kDa。推测该酶由六个相同亚基构成。该酶最大紫外吸收为 278nm。酶催化碘化硫代丁酰胆碱水解的最适 pH 为 8.0,最适温度为 35℃。该酶在 pH 3.0~10.0 区域较稳定,在 40℃ 以下处理 1h,酶活力保持稳定。Zn<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 和 Cu<sup>2+</sup> 对该酶具有显著的抑制作用。以碘化丁酰胆碱为底物,测定该酶的表现 K<sub>m</sub> 为 71.15μmol/L,没有过量底物抑制现象。结论:成功分离纯化获得丁酰胆碱酯酶,该酶具有较好的酸碱耐受性。

**关键词:**鸭肝,丁酰胆碱酯酶,分离纯化,性质

## Purification and characterization of the butyrylcholinesterase from duck liver

ZHU Hong, LI Xiang-yun, DENG Yu, WANG Song, FU Wei-li,  
TANG Liang-ting, GAO Zhao-wei, TANG Yun-ming\*

(School of Life Science, Southwest University, Southwest University Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region Ministry of Education, Chongqing Sweet Potato Engineering Research Center, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** Objective: To obtain butyrylcholinesterase from duck liver and study on the characterization of the purified product. Methods: The butyrylcholinesterase was extracted by acetone treatment, acid precipitation, ammonium sulfate precipitation, and ion-exchange chromatography on DEAE-Sephrose and gel filtration on Sephacryl S-200. SDS-PAGE was used to identify the purity and relative molecular of the butyrylcholinesterase. Results: The enzyme was purified to electrophoretic homogeneity. It was purified 156.45-fold and the activity recovery 23.60% was obtained. Its specific activity was 17.21U/mg. The relative molecular weight of this butyrylcholinesterase was 388.85kDa, and the weight of subunit was 64.70kDa. The butyrylcholinesterase consisted of six identical subunits. Ultraviolet spectrum showed a maximum absorption at 278nm. The optimum pH and temperature of the enzyme for the hydrolysis of S-Butyrylthiocholine iodide were 8.0 and 35℃, respectively. The enzyme was stable in the pH ranges of 3.0~10.0 under 35℃ and at temperatures below 45℃. Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> had significant inhibition on this enzyme and the enzyme could not be inhibited by excess substrate. The apparent K<sub>m</sub> of this enzyme was 71.15μmol/L at pH 8.0 and 35℃. Conclusion: The butyrylcholinesterase was successfully purified, and this butyrylcholinesterase showed good acid-base tolerance.

**Key words:** duck liver, butyrylcholinesterase, purification, characterization

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)01-0095-05

胆碱酯酶(cholinesterase, ChE)是生物体内一种重要水解酶,一般可分为乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AchE)和丁酰胆碱酯酶

(butyrylcholinesterase, BChE)<sup>[1]</sup>。丁酰胆碱酯酶能与有机磷毒剂和杀虫剂结合,并且具有比乙酰胆碱酯酶灵敏度更高的优点,是有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂的重要作用靶标,它还具有能水解许多酯类、肽类及酰胺类化合物,参与某些药物的代谢过程和促进细胞生长的特点<sup>[2-4]</sup>。Greig 等人对丁酰胆碱酯酶抑制研究表明,抑制丁酰胆碱酯酶可成为治疗阿尔

收稿日期: 2010-01-18 \* 通讯联系人

作者简介: 朱鸿(1985-)男,硕士研究生,主要从事酶与酶工程研究。

基金项目: 重庆市科委资助项目(CSCT 2004AC1012)。

茨海默病的新手段<sup>[5-7]</sup>。该酶在化学分析、食品安全、农业化工、医药卫生和环境监测等领域具有重要的应用。丁酰胆碱酯酶广泛存在于动植物组织中<sup>[8]</sup>。我们发现,鸭肝中丁酰胆碱酯酶含量较为丰富。因此,本文以来源广泛的鸭肝为原料,对丁酰胆碱酯酶进行分离纯化和酶学性质研究,为丁酰胆碱酯酶的进一步研究和应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

家鸭(*Anas platyrhynchos*)肝脏取自健康活鸭,杀死后立即取肝脏于 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冰冻保存备用;牛血清白蛋白、碘化硫代丁酰胆碱、碘化硫代乙酰胆碱、二硫代双硝基苯甲酸(DTNB) Sigma公司;DEAE-Sephrose、Sephacryl S-200、分子量标准品 GE公司;三羟甲基氨基甲烷 Farco公司;蛋白质 SDS-PAGE 标准品 genscript公司;考马斯亮蓝 R250、丙烯酰胺、甲叉-双丙烯酰胺 Fluka公司;其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 实验方法

1.2.1 丙酮干粉的制备 称取新鲜鸭肝 100g,用自来水洗净,再用消毒双蒸水清洗数次。剪碎,然后以 1:10(M:V)的比例加入已经 $-20^{\circ}\text{C}$ 预冷的丙酮,匀浆后抽滤脱脂得滤饼。两次丙酮脱脂后将滤饼冷冻干燥至恒重,研磨成干粉备用。

1.2.2 粗提液的制备 将丙酮干粉以 1:15(M:V)的比例加入已经预冷的 0.05mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)。匀浆后 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置抽提 2h,6000×g 离心 1h,收集上清液即得粗提液。

1.2.3 硫酸沉淀 粗提液加入硫酸调整 pH 至 3.0, $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 2h 后,6000×g 离心 30min,收集上清液得粗酶液。

1.2.4 硫酸铵分级沉淀 粗酶液加入固体硫酸铵至 10% 饱和度, $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 2h 后,6000×g 离心 30min,收集上清液。再加入硫酸铵至 70% 饱和度, $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 2h,6000×g 离心 30min,沉淀用 0.05mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)溶解, $4^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水透析过夜,即得到粗酶液。

1.2.5 DEAE-Sephrose 离子交换层析 DEAE-Sephrose 离子交换柱按产品说明书要求处理。装柱后,用 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)平衡 4 个柱体积,粗酶液样品上 DEAE-Sephrose 柱( $2.6 \times 14\text{cm}$ ),每次上样为 10mL,用 0~1.0mol/L 线性梯度的 NaCl 溶液(内含 0.05mol/L pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液)进行梯度洗脱,流速 30mL/h,每管收集 5mL,紫外监测波长为 280nm。最后需测定各管丁酰胆碱酯酶活性和蛋白含量,收集活性较高的各管酶液, $4^{\circ}\text{C}$ 透析过夜,冷冻浓缩后进行 Sephacryl S-200 凝胶层析。

1.2.6 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱层析 Sephacryl S-200 凝胶柱按产品说明书进行装柱( $16\text{mm} \times 835\text{mm}$ )处理后,每次上样 3mL。用 Tris-HCl 缓冲液(0.05mol/L pH8.0)进行洗脱,流速 18mL/h,每管收集 3mL。测定每管丁酰胆碱酯酶活性和蛋白质含

量,收集活性较高的各管酶液, $4^{\circ}\text{C}$ 透析,冷冻干燥,得到丁酰胆碱酯酶纯品。

1.2.7 丁酰胆碱酯酶活性的测定 参照文献[9]略有改动,以碘化硫代丁酰胆碱为底物,采用 SDS 终止法进行测定。在试管中加入 2.55mL 0.05mol/L pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液、100 $\mu\text{L}$  10mmol/L DTNB 溶液、50 $\mu\text{L}$  75mmol/L 碘化硫代丁酰胆碱,混匀, $37^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 5min,加入 200 $\mu\text{L}$  丁酰胆碱酯酶液,立即混匀,并开始计时 5min,然后加入 100 $\mu\text{L}$  3% 的 SDS 溶液终止反应,室温下在波长 412nm 处测定其 OD 值。以先加入 SDS 溶液,再加入酶液为对照。以每分钟催化分解 1 $\mu\text{mol}$  碘化硫代丁酰胆碱所需的酶量为一个酶活力单位。

1.2.8 蛋白质含量的测定 采用 Lowry 法<sup>[10]</sup>和分光光度法<sup>[11]</sup>,以牛血清白蛋白为标准样品。

1.2.9 丁酰胆碱酯酶的纯度鉴定 采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行纯度鉴定<sup>[12]</sup>,分离胶浓度为 12%。

1.2.10 丁酰胆碱酯酶的分子量测定 分子量测定采用凝胶过滤法<sup>[13-14]</sup>。鸭肝丁酰胆碱酯酶亚基分子量的确定采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测得<sup>[15]</sup>。

1.2.11 丁酰胆碱酯酶的动力学参数测定 用 pH 8.0 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液配制不同浓度的底物溶液(0.05~1mmol/L),按酶活力测定方法测定相应的酶活力,根据 Lineweaver-Burk 双倒数作图法<sup>[16]</sup>求出  $K_m$  值。

## 2 结果与分析

### 2.1 鸭肝丁酰胆碱酯酶的分离纯化

鸭肝丁酰胆碱酯酶粗酶液经 DEAE-Sephrose 柱层析(每管收集 5mL)的洗脱图谱如图 1 所示,丁酰胆碱酯酶的活性峰集中在 29~37 管之间,其中 31~35 管酶活性最高,分别收集透析冷冻浓缩后再经 Sephacryl S-200 凝胶分子筛柱层析(每管收集 3mL),洗脱图谱见图 2,丁酰胆碱酯酶的活性峰集中在 23~29 管之间,其中 25~28 管酶活性最高,分别收集透析冷冻浓缩后备用。整个纯化结果见表 1,最终可得到纯化 156.45 倍,比活力为 17.21U/mg 的酶制剂。所得丁酰胆碱酯酶经 SDS-PAGE 鉴定为单一蛋白成分,见图 3,说明该酶制剂已达到电泳纯。以该纯品为对象,进行鸭肝丁酰胆碱酯酶性质研究。

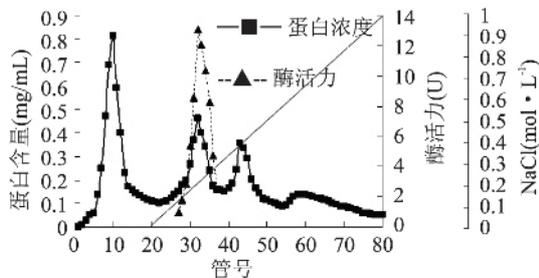


图 1 DEAE-Sephrose 离子交换层析图谱

### 2.2 鸭肝丁酰胆碱酯酶的性质

2.2.1 鸭肝丁酰胆碱酯酶相对分子量和亚基相对分子量 经 Sephacryl S-200 凝胶柱层析法测定鸭肝丁酰胆碱酯酶的全酶相对分子量为 388.85kDa。经 SDS

表1 鸭肝丁酰胆碱酯酶的纯化

| 纯化步骤                 | 蛋白含量 (mg) | 总活力 (U) | 相对活力 (U/mg) | 回收率 (%) | 纯化倍数   |
|----------------------|-----------|---------|-------------|---------|--------|
| 粗酶液                  | 16131.00  | 1698.80 | 0.11        | 100.00  | 1.00   |
| 酸沉淀                  | 2037.90   | 1568.12 | 0.72        | 91.90   | 6.55   |
| 10% 硫酸铵沉淀            | 1981.25   | 1507.69 | 0.76        | 88.75   | 6.91   |
| 40% 硫酸铵沉淀            | 700.19    | 1446.87 | 2.07        | 85.17   | 18.82  |
| DEAE-Sephrose 离子交换层析 | 144.04    | 684.62  | 4.75        | 40.30   | 43.18  |
| Sephacryl S-200 凝胶层析 | 23.30     | 400.92  | 17.21       | 23.60   | 156.45 |

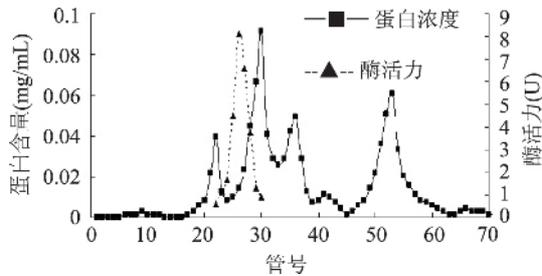


图2 Sephacryl S-200 凝胶层析图谱

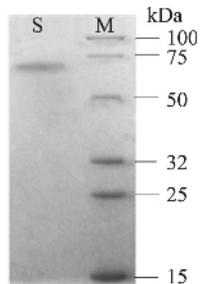


图3 SDS-PAGE 电泳图

注 M 标准蛋白 S:丁酰胆碱酯酶样品。

-PAGE 测定其亚基相对分子量为 64.70kDa,说明鸭肝丁酰胆碱酯酶由六个相同的亚基组成。

2.2.2 紫外扫描鸭肝丁酰胆碱酯酶 纯酶在  $\lambda$  为 220~360nm 之间扫描,特征峰的最大吸收  $\lambda = 278\text{nm}$ 。

2.2.3 鸭肝丁酰胆碱酯酶的最适反应 pH pH 是影响酶活的主要参数之一,在 pH3.0~11.0 的缓冲液中测定丁酰胆碱酯酶的酶活力,考察丁酰胆碱酯酶催化反应的最适 pH 范围。以酶活最高值为 100%,对不同 pH 做图,结果见图 4。由图可见,酶的最适 pH 为 8.0 pH 在 6.5~8.5 的范围内丁酰胆碱酯酶的酶活均可达到最高酶活的 50% 以上,超出该范围,酶活急剧下降。

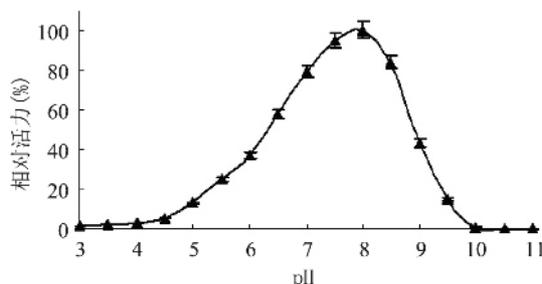


图4 pH 对鸭肝丁酰胆碱酯酶活力的影响

2.2.4 鸭肝丁酰胆碱酯酶在不同 pH 下的稳定性 酶在不同 pH 环境下的稳定性是酶应用的重要指标。将纯化的酶液与 pH3.0~11.0 的缓冲体系相混合,4℃

放置 24、48、72h 后,取适量酶液在最佳反应条件 pH8.0 时测定酶活。以酶活最高值为 100%,对不同 pH 作图,结果见图 5。该丁酰胆碱酯酶在所测 pH 范围内能较好地保持其酶活,72h 孵育后,酶活有所降低,但仍在最高酶活的 40% 以上,pH3.0~10.0 时,酶活均较稳定,表明该酶的酸碱耐受性很强。

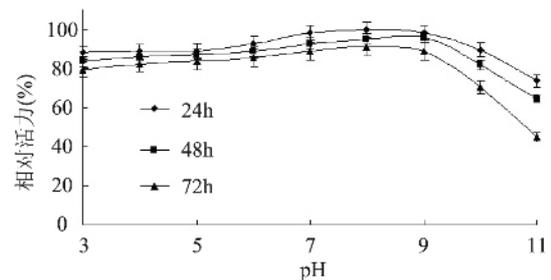


图5 不同 pH 下鸭肝丁酰胆碱酯酶的储存稳定性

2.2.5 鸭肝丁酰胆碱酯酶的最适反应温度 分别测定丁酰胆碱酯酶在 20~70℃ 下的酶活性,其他条件不变。以酶活最高值为 100%,对不同温度下酶活做图,结果见图 6,表明该酶的最适温度在 35℃ 左右。

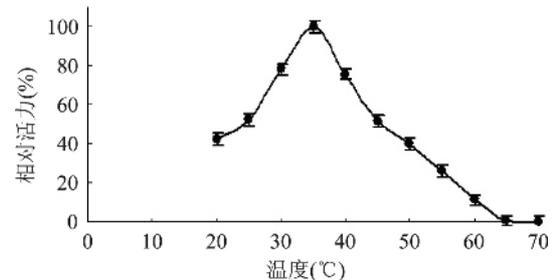


图6 温度对鸭肝丁酰胆碱酯酶活力的影响

2.2.6 鸭肝丁酰胆碱酯酶的热稳定性 酶液在 4~70℃ 温度下分别孵育 10、30、60min 后测定活性。4℃ 的酶活力为 100%,不同孵育条件下酶的相对酶活见图 7。4、20、30℃ 下,酶活性稳定,保温 60min 活性保留原有活性的 80% 以上;40℃ 保温 60min 酶活损失 50% 以上,随着温度的升高,酶活力迅速降低,温度至 70℃ 时,酶完全失活。表明该酶在 40℃ 以下具有一定的热稳定性。

2.2.7 鸭肝丁酰胆碱酯酶的反应动力学性质 用 0.05~0.6mmol/L 的碘化硫代丁酰胆碱在 pH8.0,35℃ 条件下与酶作用 5min,用 Lineweaver-Burk 双倒数<sup>[15]</sup>作图法得图 8,求得该酶的表现  $K_m$  和  $V_m$  分别为 71.15 $\mu\text{mol/L}$  和 7.73mmol/L·min。

2.2.8 底物对鸭肝丁酰胆碱酯酶活力的影响 在最适反应条件下,分别以碘化硫代丁酰胆碱和碘化硫代乙酰胆碱为底物,其他条件不变。改变反应体系

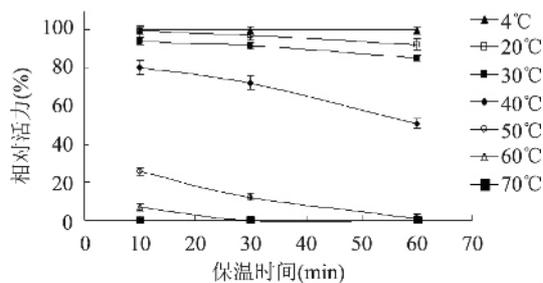


图7 鸭肝丁酰胆碱酯酶的热稳定性

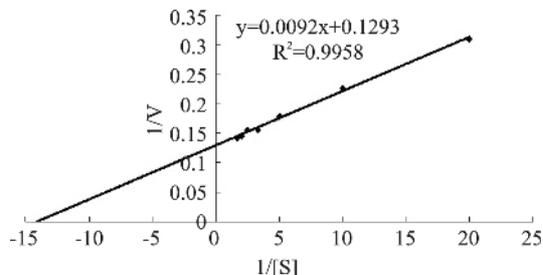


图8 丁酰胆碱酯酶催化碘化硫代丁酰胆碱的 Lineweaver-Burk 双倒数图

中的底物胆碱浓度(0.1~10mmol/L),测定对应酶活力。以最高酶活为100%作图,如图9。发现当以碘化硫代乙酰胆碱为底物时,活力很难检测。以碘化丁酰胆碱为底物,浓度较低时,该酶活力随底物浓度增加而增加;当底物浓度超过3.0mmol/L时,酶活力随底物浓度的增加而基本不变。说明鸭肝丁酰胆碱酯酶不能有效利用碘化乙酰胆碱,以碘化丁酰胆碱为底物时,没有底物过量抑制现象。

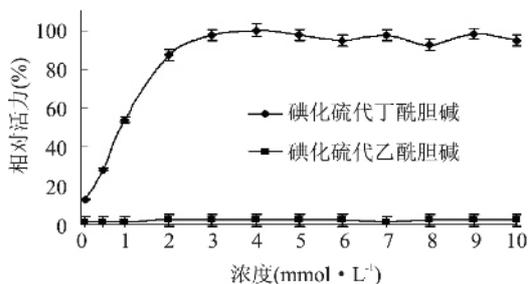


图9 底物对丁酰胆碱酯酶活力的影响

### 2.2.9 金属离子对鸭肝丁酰胆碱酯酶活力的影响

向纯化后的鸭肝丁酰胆碱酯酶酶液中分别加入不同的金属离子,使其终浓度为10mmol/L。同时以不加金属离子的酶液作为对照,测定丁酰胆碱酯酶的活力,结果如图10所示。 $\text{Ca}^{2+}$ 对丁酰胆碱酯酶有激活作用,达到138.1%。 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 和 $\text{Cu}^{2+}$ 对酶有显著的抑制作用,尤其 $\text{Cu}^{2+}$ 能完全抑制鸭肝丁酰胆碱酯酶的活力;其他离子对酶活力影响不明显。

## 3 讨论

酶的分纯化过程是对其展开全面应用和研究的基础,纯化过程的回收率和纯酶比活是衡量纯化方法可行性的重要指标。本研究通过丙酮脱脂、酸沉淀、硫酸铵分级沉淀、DEAE-Sephrose阴离子交换层析和Sephacryl S-200凝胶层析方法,从鸭肝中获得了总回收率为23.60%,纯化倍数为156.45倍,比活达17.21U/mg的酶制剂,经SDS-PAGE鉴定该酶达到电泳纯,结果肯定了本实验的分离纯化方法是

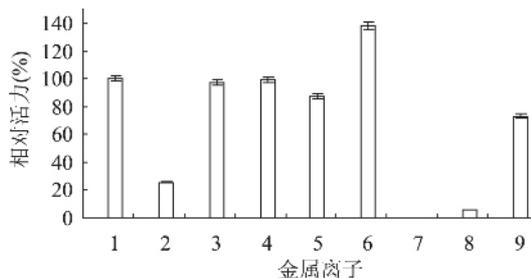


图10 不同盐离子对丁酰胆碱酯酶活力的影响

注:1 空白对照 2  $\text{ZnCl}_2$  3  $\text{FeCl}_2$  4  $\text{LiCl}$  5  $\text{KCl}$ ; 6  $\text{CaCl}_2$  7  $\text{CuCl}_2$  8  $\text{MnCl}_2$  9  $\text{MgCl}_2$ 。

可行的。

本实验采用酸沉淀杂蛋白的思路分离目的蛋白。利用目的蛋白在所用pH范围内有较强稳定性的特性,有效去除很大一部分杂蛋白,且该方法简便快速,目的酶活回收高,在本研究中为分离获得高品质丁酰胆碱酯酶打下了基础。

我们发现,鸭肝胆碱酯酶对碘化乙酰胆碱酯酶特异性低,不能以碘化乙酰胆碱为底物,说明该胆碱酯酶可能是丁酰胆碱酯酶。早在上世纪50年代,Augustinsson<sup>[17]</sup>等人经过全面研究发现,底物抑制现象是区别乙酰胆碱酯酶和丁酰胆碱酯酶的一个重要依据。本实验结果表明鸭肝胆碱酯酶没有过量底物抑制现象,为该胆碱酯酶定性为丁酰胆碱酯酶提供了有力的依据。研究所得胆碱酯酶以碘化硫代丁酰胆碱为底物时表现 $K_m$ 为71.15 $\mu\text{mol/L}$ ,高于陈久祯<sup>[18]</sup>等人以碘化硫代乙酰胆碱为底物时测得乙酰胆碱酯酶表现 $K_m$ 值44 $\mu\text{mol/L}$ ,低于吴方辉<sup>[19]</sup>等人以碘化丁酰胆碱为底物时测得丁酰胆碱酯酶表现 $K_m$ 值144 $\mu\text{mol/L}$ ,说明本实验纯化的胆碱酯酶与碘化硫代丁酰胆碱亲和力很高,能够特异水解硫代丁酰胆碱。由于肝脏是丁酰胆碱酯酶合成和分泌的主要场所<sup>[20]</sup>,且鸭肝胆碱酯酶与丁酰胆碱亲和力高,不能有效水解乙酰胆碱,没有底物过量抑制现象,说明本实验纯化的鸭肝胆碱酯酶是丁酰胆碱酯酶。

金属离子抑制研究表明,10mmol/L  $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 可显著抑制该酶活性,10mmol/L  $\text{Cu}^{2+}$ 可以完全抑制该酶活性,为该酶抑制剂的研究提供了参考。

本实验纯化的丁酰胆碱酯酶比活高于市售且价格昂贵的同类产品,并且鸭肝丁酰胆碱酯酶具有较高的酸碱耐受性,40℃以下该酶具有较好的热稳定性,说明该酶具有广泛推广应用的潜力。

## 4 结论

本研究成功地从家鸭肝脏中纯化出丁酰胆碱酯酶,性质研究表明该酶具有较高的利用价值。我国是农业大国,家禽养殖遍及全国,规模大;鸭肝材料丰富,易于收集,成本低廉,是提取丁酰胆碱酯酶的可靠来源。以鸭肝为材料从中纯化丁酰胆碱酯酶也成为提升家禽附加值,帮助农民增加收入的一条新途径。该酶在农业、食品、医药等领域具有广泛的应用前景。

### 参考文献

[1] Fournier D, Mutero A. Mini review: modification of

- acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides [ J ]. *Comp Biochemphysiol* ,1994 ,108( 1 ) :19-311.
- [ 2 ] Lockridge O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine [ J ]. *Pharmac Ther* ,1990 ,47( 1 ) :35-60.
- [ 3 ] Mattes C E ,Lynch T J ,Singh A ,et al. Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication [ J ]. *Toxicology and Applied Pharmacology* ,1997 ,145( 2 ) :372-380.
- [ 4 ] Alber R ,Sporns O ,Weikert T ,et al . Cholinesterase and peanut agglutinin being related to cell proliferation and axonal growth in embryonic chick limbs [ J ]. *Anat Embryol Berl* ,1994 ,190( 5 ) :429-438.
- [ 5 ] Greig N H ,Lahiri D K ,Sambamurti K. Butyrylcholinesterase : an important new target in Alzheimer 's disease therapy [ J ]. *Int Psychogeriatrics* 2002 ,14 :77-91.
- [ 6 ] Bullock R ,Lane R. Executive dysfunction in dementia with emphasis on subcortical pathology and the role of butyrylcholinesterase [ J ]. *Curr Alzheimer Res* ,2007 ,4( 3 ) :277-293.
- [ 7 ] Kamal M A ,Klein P ,Yu Q S ,et al. Kinetics of human serum butyrylcholinesterase and its inhibition by a novel experimental Alzheimer therapeutic ,bisnorcymserine [ J ]. *J Alzheimers Dis* ,2006 ,10( 1 ) :43-51.
- [ 8 ] 魏婉丽 ,孙曼霁.丁酰胆碱酯酶结构研究新进展 [ J ]. *生物化学与生物物理进展* 2000 ,27( 1 ) :37-40.
- [ 9 ] Ellman G L ,Kiane Courtney K ,Andres V ,et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity

- [ J ]. *Biochem Pharmacology* ,1961( 7 ) :88-95.
- [ 10 ] Lowery DH. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent [ J ]. *J Biol Chem* ,1951 ,193-267.
- [ 11 ] Layne E. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins // *Methods in Enzymology* [ C ]. New York : Academic Press ,1957 ,3 :447.
- [ 12 ] 朱广廉 ,杨中汉. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定蛋白质分子量 [ J ]. *植物生理学通讯* ,1982( 2 ) :43-47.
- [ 13 ] 杨安钢. *生物化学与分子生物学实验技术* [ M ]. 北京 :高等教育出版社 2001 :248-252.
- [ 14 ] 陈石根 ,周润琦. *酶学* [ M ]. 上海 :复旦大学出版社 2001 :174-175.
- [ 15 ] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [ J ]. *Nature* ,1970 ,227 :680-685.
- [ 16 ] 陈钧辉 ,陶力 ,朱婉华 ,等. *生物化学实验* [ M ]. 北京 :科学出版社 2004.
- [ 17 ] AUGUSTINSSON K B. Cholinesterase [ J ]. *Acta Physiol Scand* ,1948 ,52 :1-182.
- [ 18 ] 陈久祯 ,王惠芳 ,李艳军 ,等. 梭曼和沙林对电鳗电器官乙酰胆碱酯酶抑制作用动力学 [ J ]. *中国生物化学与分子生物学报* ,1998 ,12 :790-792.
- [ 19 ] 吴方晖 ,高川 ,张靖 ,等. 梭曼、沙林对鸭血清丁酰胆碱酯酶的动力学研究 [ J ]. *第三军医大学学报* ,2004( 6 ) :1058-1060.
- [ 20 ] 张秀明 ,李健斋 ,魏明竟 ,等. *现代临床生化检验学* [ M ]. 北京 :人民军医出版社 2001 :1086.

(上接第94页)

除率达到了22.6%。采用3%的活性炭脱色脱腥处理效果明显,但其中氨基酸和短肽损失较大,更好的脱色脱腥方法还有待进一步研究。

### 参考文献

- [ 1 ] 张纯丽 ,马美湖. 活性多肽提取分离方法研究进展 [ J ]. *农产品加工学刊* 2006( 3 ) :27-32.
- [ 2 ] 徐洁 ,钱爱萍 ,潘薇 ,等. 动植物产品中牛磺酸含量测定的前处理方法 [ J ]. *江西农业大学学报* 2002 ,22( 3 ) :431-433.
- [ 3 ] 陈檬 ,李和生. 超声波提取牡蛎中氨基酸工艺条件研究 [ J ]. *食品科技* 2006( 2 ) :41-43.
- [ 4 ] 谭雯文 ,周延华 ,梁海秋 ,等. 牡蛎蛋白的纯化及酶解条件的研究 [ J ]. *现代食品科技* 2006 ,22( 2 ) :79-82.
- [ 5 ] 汪何雅 ,杨瑞金 ,王璋. 牡蛎的营养成分及蛋白质的酶法水解 [ J ]. *水产学报* 2003 ,27( 2 ) :163-168.
- [ 6 ] 付猛 ,云霞 ,朱蓓薇. 牡蛎双酶水解工艺的研究 [ J ]. *食品科学* 2004 ,25( 7 ) :100-104.
- [ 7 ] Adler-Nissen J. *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins* [ M ]. London :Elsevier Applied Science Publishers ,1986 :12-14.
- [ 8 ] 宁正祥. *食品成分分析手册* [ M ]. 北京 :中国轻工业出版社 ,1998 :119-124.
- [ 9 ] 于娅 ,杨瑞金 ,王璋. 牡蛎功能短肽的制备及 ACE 抑制活性 [ J ]. *无锡轻工大学学报* 2004 ,23( 2 ) :49-52.
- [ 10 ] 王雪影 ,杨殿来 ,林海 ,等. 黄海牡蛎中锌和硒含量的测定与健康保健食用量分析 [ J ]. *食品工业科技* ,2006 ,27( 4 ) :

- 182-184.
- [ 11 ] 贾建斌 ,赵熙和. GB/T 5009.124—2003 食品中氨基酸的测定 [ S ]. 北京 :中国标准出版社 2003.
- [ 12 ] 杨祖英 ,张平伟 ,祖如松 ,等. GB/T 5009.169—2003 食品中牛磺酸的测定 [ S ]. 北京 :中国标准出版社 2003.
- [ 13 ] 金鸣 ,蔡亚欣 ,李金荣 ,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.
- [ 14 ] 王光慈. *食品营养学* [ M ]. 第二版. 北京 :中国农业出版社 2005 :51-52.
- [ 15 ] Anon G. Report on revised standard for metals in food. Appendix IV [ M ]. Canberra :Commonwealth Government Printer ,1979 :60.
- [ 16 ] Oh S ,Chang W ,Suh J. Aspartic protease analogue : intermolecular catalysis of peptide hydrolysis by carboxyl groups [ J ]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* ,2001( 11 ) :1469-1472.
- [ 17 ] 袁国平 ,陈赛贞. 牛磺酸应用研究进展 [ J ]. *海峡药学* ,2004 ,16( 3 ) :20-23.
- [ 18 ] 刘塞. 牡蛎提取物对鹤鹑实验性动脉粥样硬化的抑制作用及机制 [ J ]. *中国动脉硬化杂志* 2002 ,10( 2 ) :97-100.
- [ 19 ] 曾庆祝. 海洋贝类( 牡蛎、扇贝、文蛤等) 功能性食品的开发利用 [ J ]. *氨基酸和生物资源* 2002 ,24( 3 ) :31-34.
- [ 20 ] 郑桂富 ,徐振相. 鲑鱼蛋白水解液脱色效果的研究 [ J ]. *食品工业科技* 2002( 9 ) :25-26.