

坛紫菜降血压活性肽的分离纯化及 分子量测定

刘淑集^{1,2}, 王 茵¹, 吴成业^{1,*}, 苏永昌¹, 刘智禹¹

(1.福建省水产研究所, 福建 厦门 361012; 2.福建农林大学食品科学学院, 福建 福州 350002)

摘 要: 用 AS.1398 中性蛋白酶酶解制备坛紫菜(*Porphyra haitanensis*) ACE 抑制肽, 并经超滤膜、Sephadex G-15 凝胶层析和反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化, 纯化产物测定其氨基酸组成, 并运用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)测定分子量。结果显示: 坛紫菜酶解液经超滤分离获得分子量小于 2000D 的组分 ACE 抑制活性最高, IC₅₀ 为 0.73mg/mL; 该组分进行 Sephadex G-15 凝胶层析分离得 6 个组分, 组分 E 的 IC₅₀ 最小, 为 0.67mg/mL。组分 E 经 RP-HPLC 分离得峰 6 对 ACE 的抑制率最高, 达到 89.54%; 峰 6 再次过 RP-HPLC, 又洗出 2 个蛋白峰, 说明峰 6 并不是单一物质, 还需进行多次反复纯化。测定峰 6 的氨基酸组成主要含有 Tyr、Val 和 Phe, 同时采用 MALDI-TOF-MS 分析发现有 8 个主要的质子峰, 信号最强的质子峰为 m/z 861.17, 有 4 个峰聚集在 m/z 860 左右, 说明峰 6 平均分子量大约为 860D, 推算出紫菜降血压肽含有 3 个 Val、2 个 Phe、1 个 Tyr, N 端为 Val, 可能的排序顺序有 18 种。

关键词: 坛紫菜; 降血压肽; ACE 抑制活性; 分离; 纯化; 分子量

Isolation, Purification and Molecular Weight Determination of Antihypertensive Peptides Derived from
Porphyra haitanensis

LIU Shu-ji^{1,2}, WANG Yin¹, WU Cheng-ye^{1,*}, SU Yong-chang¹, LIU Zhi-yu¹

(1. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361012, China ;

2. College of Food Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract : *Porphyra haitanensis* was hydrolyzed with AS.1398 neutral protease, and the hydrolysate was filtrated sequentially through ultra-filtration membranes with molecular weight cutoff (MWCO) 2000 D and 8000 D to obtain the fraction with the highest ACE-inhibitory activity, of which the molecular weight was below 2000 D. The fraction was then purified by Sephadex G-15 gel permeation chromatography into 6 peaks, in which peak E had the strongest ACE inhibitory activity with an IC₅₀ of 0.67 mg/mL, and peak E was further fractionated by RP-HPLC to obtain peak No.6 with the highest ACE-inhibitory activity, reaching up to 89.54%. In the end, peak No.6 was injected into RP-HPLC system once again, and two protein peaks were observed in the chromatogram, suggesting that peak No.6 is not a single component and is still in need of further purification. The amino acid composition of peak No.6 was mainly composed of Tyr, Val and Phe. Meanwhile, the MALDI-TOF-MS spectrum of peak No.6 displayed 8 major proton peaks, the peak with the strongest signal intensity was m/z 861.17, and 4 of them were fluctuated around m/z 860, indicating that the mean molecular weight of peak No.6 is approximately 860 D. We speculated that antihypertensive peptides derived from *Porphyra haitanensis* consisted of 3 Val residues, 2 Phe residues and 1 Tyr residue, of which at the N-terminal Val was located, and that the number of possible ranking sequences was 18.

Key words : *Porphyra haitanensis* ; antihypertensive peptide ; isolation ; purification ; molecular weight

中图分类号: S985.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)02-0213-05

收稿日期: 2010-03-17

基金项目: 福建省科技计划重点项目(2008N0202)

作者简介: 刘淑集(1981—), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事海洋生物学利用研究。E-mail: cute506636@163.com

* 通信作者: 吴成业(1953—), 男, 研究员, 学士, 主要从事水产品加工利用研究。E-mail: wcy@fjscs.ac.cn

坛紫菜(*Porphyra haitanensis*)是福建省养殖的大宗藻类, 含有丰富的人体必需氨基酸, 蛋白质含量达30%左右^[1], 还含有大量维生素、矿物质、微量元素以及降血压、降低胆固醇、血脂和活化血管的生物活性物质和药用成分^[2], 是深受消费者喜爱的健康食品。当前从生物中开发活性功能肽, 特别是利用蛋白酶酶解产物制备生物活性肽正成为科学家们研究的热点。其中, 降血压活性肽是目前研究较多的一类, 即血管紧张素转换酶抑制肽(angiotensin converting enzyme inhibitory peptides, ACEIPs)。食源性蛋白降血压肽由于其无毒、无副作用、安全性高, 可开发成降压药物或者降压保健品^[3]。其研究开始于1979年 Oshima 等^[4]从明胶蛋白中获得了6条ACE抑制活性较强的多肽, 分子质量均小于1500D; Nakamura 等^[5]从日本酸奶中分离出2种降血压肽, 原发性高血压大鼠(SHR)长期服用可抑制血压上升; Saito 等^[6]从日本清酒和酒糟中分离出9种具有ACE抑制活性的多肽。据统计, 现已证实上百种天然食物蛋白中存在具有抑制ACE活性的片段, 如大豆^[7-8]、玉米^[9]、卵清蛋白^[10]、小麦^[11]、沙丁鱼^[12]、鲑鱼^[13]、海蜇^[14]、大蒜^[15]、花生^[16]、奶酪^[17]等等。

本研究以坛紫菜为原料, 利用AS.1398中性蛋白酶进行水解^[18], 制备紫菜降血压活性肽。采用超滤膜过滤、凝胶过滤色谱Sephadex G-15和反相高效液相色谱(RP-HPLC)对紫菜酶解产物进行分离纯化, 并测定氨基酸组成及分子质量, 从而为新型降血压药物或者保健品的研制提供了新途径^[19]。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

马尿酸组氨酰亮氨酸(Hip-His-Leu, HHL) 美国Sigma公司; Sephadex G-15 美国Pharmacia公司; 乙腈(色谱纯)、三氟乙酸TFA(TEDIA) 美国Tedia公司; 血管紧张素转换酶(ACE) 自制; 乙酸乙酯 国药集团化学试剂有限公司。

Prostar 240型高效液相色谱 美国Varian公司; Reflex III型MALDI-TOF质谱仪 德国Bruker公司; HD-1型核酸蛋白检测仪、SBS-100型数显自动部分收集器 上海沪西分析仪器厂有限公司; LZB-4型超滤装置 上海摩速科学器材有限公司; LGJ-2型冷冻干燥机 宁波新芝生物科技股份有限公司; R205型旋转蒸发器 上海申生科技有限公司; SP-75型紫外分光光度计 上海光谱仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 原料预处理及膜分离

坛紫菜烘干, 绞碎。取250g坛紫菜粉末用AS.1398

中性蛋白酶酶解, 料液比1:20(g/mL)、加酶量7%、温度50℃、酶解10~12h, 100℃加热15min灭活。酶解液8000r/min离心15min, 收集上清液。上清液经过孔径为10μm的微孔滤膜微滤, 然后依次通过截留分子质量8000D和2000D的超滤膜进行分级超滤, 收集3种组分: I ($M > 8000D$)、II ($2000D < M < 8000D$)、III ($M < 2000D$), 浓缩后冻干, 进行ACE抑制活性检测。

1.2.2 Sephadex G-15 柱层析分离

将样品配成质量浓度为0.5g/mL溶液, 取0.5mL上柱, 去离子水洗脱, 流速2mL/min, 280nm波长检测, 收集各峰冷冻干燥, 进行ACE抑制活性检测。

1.2.3 反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化

用20%的B液(含0.1% TFA的乙腈)平衡反相柱(Microsorb-MV 100-5 C₁₈)。将过层析柱分离出的活性组分分配成50mg/mL样品溶液。将样品溶于A液(含体积分数为0.1% TFA的超纯水), 上样量为20μL, 用体积分数为5%~30%的B液梯度洗脱40min, 流速0.5mL/min; 检测波长220nm。

1.2.4 MALDI-TOF-MS(基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱)分子质量分析

基质溶液的配制: 基质 α -CH-4-OH-肉桂酸(HCCA)溶于TA(0.1% TFA溶液:乙腈=2:1, V/V)中, 浓度为0.1mol/L。取5μL样品溶液和5μL基质溶液混合均匀, 取1μL混合液滴于样品板上, 在室温下晾干, 待生成均匀结晶后送至Reflex III MALDI-TOF质谱仪中, 采用反射模式, 离子源加速电压为20kV, 延时取出电压为16.3kV, 反射电压为23kV, N₂激光波长337nm, 真空度 1.2×10^{-5} Pa, 质量扫描范围为500~1500D, 用标准Mark峰作为外标校正质谱峰, 正离子谱检测。对肽质量指纹图谱进行标峰, 得质谱分析数据。

1.2.5 ACE抑制活性的测定

根据Cushman紫外分光光度法基本原理进行改进。在2mL的离心管中混合50μL抑制剂和200μL 0.005mol/L HHL(溶于含0.3mol/L NaCl的硼酸缓冲液, pH8.3); 37℃恒温水浴预热5min, 然后加入50μL 0.4U/mL自制的ACE启动反应, 37℃恒温保持30min, 加入0.2mL 1mol/L的盐酸终止反应; 加入1.2mL冰冷的乙酸乙酯, 用力振荡混合, 3500r/min离心5min后, 取出0.8mL酯层移入试管中, 在85℃的烘箱中烘干(约1h), 再加入4mL的去离子水振荡2min溶解马尿酸, 溶液在228nm波长处测定吸光度A; 对照组除不加入抑制剂、空白组除在反应前加入0.2mL 1mol/L的盐酸以终止反应外, 其余操作与反应管完全相同。

$$\text{抑制剂对 ACE 活性的抑制率} / \% = \frac{A_a - A_b}{A_a} \times 100$$

式中： A_a 为对照组的吸光度； A_b 为样品组的吸光度。

半数抑制浓度(IC_{50})：指当抑制率为 50% 时，所需抑制剂的质量浓度/(mg/mL)， IC_{50} 值越小说明抑制剂活性越大。计算方法为：检测多个质量浓度梯度下降血压肽的抑制率，通过 SPSS 软件的概率系统(Probit)分析获得 IC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 坛紫菜降血压活性肽的粗分离

坛紫菜经 AS.1398 中性蛋白酶酶解后，酶解产物依次通过截留分子质量为 8000D 和 2000D 的超滤膜，得 3 个组分，各组分抑制 ACE 活性的 IC_{50} 结果见表 1。从表 1 可以看出，组分 II 和 III 的 IC_{50} 均小于酶解产物的 IC_{50} ，组分 III 的 IC_{50} 最小，为 0.73mg/mL，约为酶解产物 IC_{50} 的 1/2，说明经过超滤分离，坛紫菜酶解产物中具有活性的降血压肽得到浓缩，集中分布于分子质量小于 2000D 的范围。

表 1 超滤对紫菜降血压肽活性的影响

Table 1 AC-inhibitory IC_{50} of hydrolyzed *Porphyra haitanensis* and its ultra-filtration fractions

组分	酶解产物	I ($M > 8000D$)	II ($2000D < M < 8000D$)	III ($M < 2000D$)
IC_{50} /(mg/mL)	1.27	2.02	1.09	0.73

2.2 坛紫菜降血压肽凝胶层析分离纯化

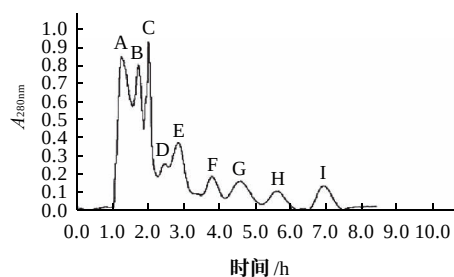


图 1 Sephadex G-15 层析分离结果

Fig.1 Sephadex G-15 separation profile

表 2 Sephadex G-15 层析分离组分的 ACE 抑制活性
Table 2 AC-inhibitory IC_{50} of Sephadex G-15 separated peaks

图 1 中组分	A	B	C	D	E	F	G	H	I
IC_{50} /(mg/mL)	9.61	7.46	6.63	4.49	0.67	1.37	0.93	5.34	13.65

将组分 III 配成 0.5g/mL 溶液，进行 Sephadex G-15 凝

胶层析柱分离，得 9 个组分 A、B、C、D、E、F、G、H、I(图 1)，每个峰抑制 ACE 的 IC_{50} 见表 2。其中组分 E 的 IC_{50} 最小，为 0.67mg/mL，反映了其 ACE 抑制活性最高；其次是组分 G，其 IC_{50} 为 0.93mg/mL。因此说明 Sephadex G-15 凝胶层析柱将超滤后小于 2000D 的组分进行了进一步的纯化，将组分 E 冷冻干燥备用。

2.3 坛紫菜降血压肽 RP-HPLC 分离纯化

将组分 E 样品经 RP-HPLC 分离，洗下多个蛋白峰，分别收集 8 个峰，标为 1、2、3、4、5、6、7、8(图 2)，进行 ACE 抑制活性测定，由于收集样品量少，活性鉴定用抑制率表示，结果见表 3。从表 3 可以看出，峰 6 对 ACE 的抑制率最高，达到了 89.54%；其次是峰 5；峰 7 和 8 的抑制率均在 60% 以上。说明 RP-HPLC 能够进一步分离纯化组分 E。将峰 6 再次进行 RP-HPLC 又可洗出 2 个峰(图 3)，说明经过一次 RP-HPLC 还未能完全纯化出单一组分的物质，需经过多次纯化。

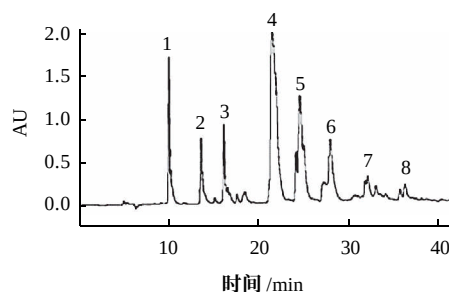


图 2 组分 E 的 RP-HPLC 图谱

Fig.2 RP-HPLC chromatogram of Sephadex G-15 separated peak E

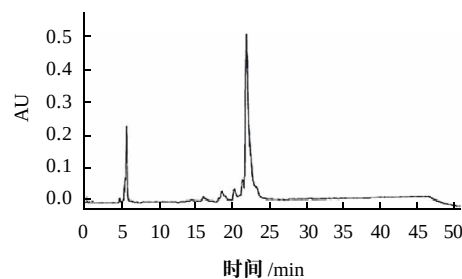


图 3 峰 6 的 RP-HPLC 图谱

Fig.3 Second RP-HPLC chromatogram of RP-HPLC separated peak No.6

表 3 RP-HPLC 分离组分 E 的 ACE 抑制活性

Table 3 ACE inhibition rate of various RP-HPLC separated fractions of peak E

图 2 中峰号	1	2	3	4	5	6	7	8
抑制率/%	6.84	6.51	20.09	31.33	72.51	89.54	65.16	61.60

2.4 坛紫菜降血压肽氨基酸组成及分子质量测定

经过 HPLC 分离到的峰 6 测定其氨基酸组成，结果

表4 氨基酸组成测定结果
Table 4 Amino acid profile of peak No. 6

氨基酸	Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	Arg	Pro	Val
含量/(mg/100mL)	1.27	0.90	1.35	1.15	2.06	2.07	1.56	0.02	0.45	0.59	25.32	14.41	0.24	0.49	0.66	13.55
总量/(mg/100mL)	66.09															

见表4。可以看出,氨基酸总量为66.09mg/100mL,其中以酪氨酸(Tyr)、苯丙氨酸(Phe)和缬氨酸(Val)为主,三者含量占了80.6%。

峰6进行MALDI-TOF-MS分析获得其质量指纹图谱,截取出峰较为集中的 m/z 范围(600~1200)反射图谱(如图4所示)。图谱中有8个主要的质子峰,其中有4个峰聚集在 m/z 860左右,信号最强的质子峰 m/z 861.17;其余的4个质子峰 m/z 694.03、747.30、952.25、1078.05。说明峰6中还含有8种以上的单质,其中分子质量为860D左右的物质含量居多。

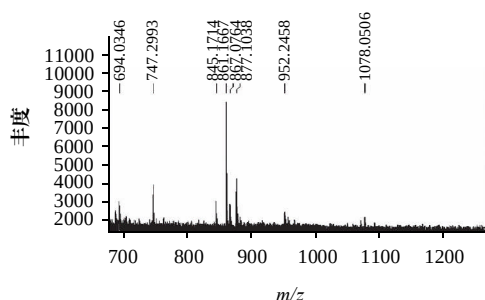


图4 峰6的MALDI-TOF-MS图谱

Fig.4 MALDI-TOF/MS spectrum of peak No. 6

据已有的研究表明,具有活性的降血压肽分子质量均在1000D左右。张宇昊等^[20]采用超滤技术对花生降血压肽进行分离发现分子质量小于1000D的组分对抑制ACE IC_{50} 为0.4mg/mL。本实验选取截留分子质量为2000D和8000D的醋酸纤维素超滤膜对紫菜酶解产物进行分离,发现各组分抑制ACE的活性随分子质量的减小而增大。小于2000D的组分抑制活性最大, IC_{50} 为0.73mg/mL,而超滤前酶解产物的 IC_{50} 1.27mg/mL。Sephadex G-15分离组分E IC_{50} 为0.67mg/mL;组分A和I的活性很低,可能是因为组分A分子质量较大,可能大于1500D,而组分I分子质量则偏小。因此,推断降血压肽对分子质量的要求有一定的范围。采用RP-HPLC进一步分离纯化,但由于制备型色谱收集的量甚少,浓度很低,不能采用冷冻干燥浓缩测定抑制ACE的 IC_{50} ,因此,氮吹浓缩后采用对ACE的抑制率为指标,测定峰6对ACE的抑制率为89.54%;再次经RP-HPLC还可形成2个峰,并非单一组分。说明RP-HPLC对于极性不同的物质起分离作用,可能存在1个洗脱峰

中含有极性相同的多种物质的情况,所以RP-HPLC还不能完全达到分离纯化单一物质的效果。

测定峰6主要氨基酸有Tyr、Val和Phe,分子质量集中在860D左右。根据蛋白质分子质量=氨基酸相对平均分子质量 $\times n - 18 \times (n - 1)$; $(n$:氨基酸数目),计算得 $n=6.16$,3种氨基酸相对分子质量分别为Val(V):117.15;Tyr(T):181.19;Phe(P):165.19。因为 $860 - V - T - P=396.47$, $2V+P=399.49$,推测紫菜降血压肽含有3个Val,2个Phe,1个Tyr。根据Cheung等^[21]提出的降血压肽模型学说,多肽的C端氨基酸为芳香族氨基酸(包括Trp、Tyr、Phe)和Pro时,降血压肽的ACE抑制活性较高;而N端氨基酸为疏水性氨基酸(如Val、Leu、Ile)或碱性氨基酸时与ACE的亲合力较强,抑制活性较高^[22],确定坛紫菜降血压肽的N端为Val;C端为Tyr或Phe。由于N端为Val,其他5个氨基酸进行排列组合计算,序列可能有 $C_4^2 \cdot C_3^1 \cdot C_2^2=18$ 种排列顺序。具体属于哪一种顺序的降血压肽,还有待于下一步研究。

3 结 论

采用AS.1398中性蛋白酶酶解制备坛紫菜ACE抑制肽,经过超滤膜、Sephadex G-15凝胶层析和反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化,获得纯化产物峰6对ACE的抑制率为89.54%,平均分子质量大约为860D,由3个Val、2个Phe、1个Tyr组成,N末端为Val,推算出紫菜降血压肽含有可能的排序顺序有18种,为人工合成ACE抑制肽新型降血压药物提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 陈人弼. 坛紫菜主要营养成分的分析[J]. 台湾海峡, 1999, 18(4): 465-467.
- [2] 张翼, 李晓明, 王斌贵. 海藻生物活性物质研究的回顾与展望[J]. 世界科技研究与发展, 2005, 27(5): 56-62.
- [3] 肖红, 段玉峰, 刘平, 等. 食品蛋白降血压肽及其研究进展[J]. 食品研究与开发, 2004, 25(5): 3-6.
- [4] OSHIMA G, SHIMABUKURO H, NAGASAWA K, et al. Peptide inhibitors of angiotensin I-converting enzyme in digest of gelatin by bacterial collagenase[J]. Biochim Biophys Acta, 1979, 566(1): 128-137.
- [5] NAKAMURA Y, MASUDA O, TAKANO T, et al. Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats[J]. J Biosci Biotech Biochem, 1996, 60

- (3): 488-489.
- [6] SAITO Y, WANEZAKI K, KAWATO A, et al. Structure and activity of angiotensin I-converting enzyme of peptides originating from sake and sake lees[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(10): 1767-1771.
- [7] 张晓梅. 降血压和降胆固醇大豆肽的分离纯化[D]. 无锡: 江南大学, 2006.
- [8] 吴建平, 丁霄霖. 大豆降压肽的研制(I): 生产高活性 ACEI 肽酶系的筛选[J]. 中国油脂, 1998, 23(2): 49-51.
- [9] 刘萍, 陈黎斌, 杨严俊. 酶解玉米蛋白制备降血压肽的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(5): 117-119.
- [10] FUJITA H, SASAKI R, YOSHIKAWA M, et al. Potentiation of the antihypertensive activity of orally, a vasorelaxing peptide derived from ovalbumin, by emulsification in egg hosphatidylchoine[J]. J Biosci Biotech Biochem, 1995, 59(12): 2344-2345.
- [11] 辛志宏, 吴守一, 马海乐, 等. 从麦胚蛋白质中制备降血压肽的研究[J]. 食品科学, 2003, 24(10): 120-123.
- [12] UKEDA H, MATSUDA H, OSAJIMA K, et al. Peptides from peptic hydrolyzate of heated sardine meat that inhibit angiotensin I -converting enzyme[J]. Nippon Nogeikagaku Kaishii, 1992, 66(1): 25-29.
- [13] FUJITA H, YOKOSHIKAWA M, LKPNM: A produg type ACE inhibitory peptide derived from fish proteins[J]. Immunopharmacology, 1999, 44(1/2): 123-127.
- [14] 安桂香. 海蛰活性肽的制备及降血压效果的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [15] SUETAUNA K. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L. (garlic) [J]. J Nutr Biochem, 1998, 9(7): 415-419.
- [16] 张宇昊, 王强, 周素梅, 等. 花生降血压肽的超滤分离研究[J]. 中国油脂, 2007, 32(7): 28-31.
- [17] OKAMOTO A, HARAGATA H, MATSUMOTO E, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of various fermented foods[J]. Biosci Biotech Biochem, 1995, 59(6): 1147-1149.
- [18] 王茵, 刘淑集, 吴成业, 等. 紫菜降血压肽酶法制备工艺的优化[J]. 福建水产, 2008, 12(4): 64-68.
- [19] 倪莉, 陶冠军, 戴军, 等. 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.
- [20] 张宇昊, 王强, 周素梅, 等. 花生降血压肽的超滤分离研究[J]. 中国油脂, 2007, 32(7): 28-31.
- [21] CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung[J]. Biochem Pharmacol, 1971, 20(7): 1637-1648.
- [22] 刘冬, 李世敏, 张丽君, 等. 降血压肽的研究进展[J]. 深圳职业技术学院学报, 2005, 4(1): 46-50.