

仿刺参(*Apostichopus japonicus*)和海地瓜 (*Acaudina leucoprocta*)体壁多肽的 响应面法酶解和 N 末端测序*

李妍妍¹ 戴娟² 胡玲萍² 江振洲¹ 尚靖¹ 张陆勇¹

(1. 国家南京新药筛选中心 中国药科大学 南京 210009; 2. 宁波大学海洋学院 宁波 315211)

摘要 为充分开发利用海参资源,优化海参体壁酶解工艺,鉴定海参多肽,本文以水解度为指标,设计了 3 因素(时间、温度和加酶量)3 水平的响应面实验,得到海参水解的最优条件是:仿刺参(*Apostichopus japonicus*)体壁在加酶量 1.97%、温度 55.7°C、水解 136.8min 的条件下,水解度为 83.39%;海地瓜(*Acaudina leucoprocta*)体壁在加酶量 1.70%、温度 55.4°C、水解 115.6min 的条件下,水解度为 63.68%。之后通过使用超滤膜、反相高效液相色谱(RP-HPLC)、基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)技术和蛋白测序仪等分析手段从水解产物中分离鉴定出 4 种多肽。其中,经 N 端序列鉴定出仿刺参多肽 S1、S2 氨基酸残基序列分别为 Gly-Pro-Val-Gly-Ala-Ser-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Gln- Gly-Leu-Ser-Ala-Leu 和 Trp-Pro-Pro-Gly-Asn-Ser-Gly-Ile-Gln-Gly。海地瓜多肽 A1 和 A2 氨基酸残基序列分别为 Gly-Ala-Asn-Gly-Asn 和 Trp-Leu-Pro-Gly-Asp-Thr-Gly-Pro-Gln-Gly-Val-Thr-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Ala-Gly。

关键词 仿刺参;海地瓜;响应面;多肽分离纯化;N 端测序

中图分类号 TS254.1 **doi:** 10.11693/hyhz20141100333

海参是棘皮动物门、海参纲动物的通称,为重要的海洋无脊椎动物,分布于世界各海洋中。仿刺参(*Apostichopus japonicus*),又名 *Stichopus japonicus*,也称刺参,属棘皮动物门(Echinodermata)、海参纲(Holothuroidea)、楯手目(Aspidochirotida)、刺参科(Stichopodidae)、仿刺参属(*Apostichopus*)动物。海地瓜俗称香参,也称白参、茄参、海茄子,属棘皮动物门、海参纲、芋参目(Molpadida)、尻参科(Caudinidae)、海地瓜属(*Acaudina*)动物。该属有两个种——白肛海地瓜(*Acaudina leucoprocta*)和海地瓜(*Acaudina molpadioides*),广泛分布于我国东南沿海。海地瓜盛产于亚热带沙质海区,在我国浙江、福建、广东、海南等沿海区域均有分布,蕴藏量十分丰富(张凤瀛等,

1964;侯付景等,2010a)。

海参是海洋中重要的食物和药物资源。含有海参多糖、海参皂苷、胶原和脂肪酸等多种生理活性物质(崔凤霞等,2006;赵芹等,2008;佟长青等,2013)。海参的营养十分丰富,位于海产品“八珍之首”,是滋补强身的名贵佳品及防治一些疾病的良药。清朝赵学敏编的《本草纲目拾遗》有这样的叙述:“海参性温补,足敌人参,故名海参;味甘咸,补肾经,益精髓,消痰涎,摄小便,壮阳疗痿,杀疮虫”,以及“生百脉血,治本息痢”。临床上先后有中医提出以海参单用或组方治疗肿瘤、再生障碍性贫血和糖尿病取得良好效果的报告,此外在慢性肾炎、高血压、肺结核、神经衰弱、慢性乙型肝炎、等常见病治疗和用于病后或

*国家科技星火计划资助项目,2010GA701063 号;国家农业科技成果转化资金资助项目,2007GB2C220359 号;浙江省重大科技专项,2008C02009 号。李妍妍,博士研究生, E-mail: yanyanlilucky@gmail.com

通讯作者:张陆勇,教授,博导, E-mail: lyzhangchina@163.com

收稿日期:2014-11-02,收修改稿日期:2014-12-19

产后康复过程中的各种药膳中频繁出现(闫冰等, 2004; 邢湘臣, 2006; 肖枫等, 2006)。海参体壁是主要的食用或药用部位。不同种类和来源的海参, 由于生活的海域、环境不同, 所摄食物各异, 其营养价值和功效存有差异, 并且为了深入研究海参的药理活性及作用机制, 寻找针对不同种海参最适的多肽制备方法是必不可少的。相对于化学法, 酶解法获得的产物活性更高, 且更为方便、易控制, 但是酶解的最适条件还未见报道。

本实验选择仿刺参和海地瓜为实验材料, 在单因素实验研究的基础上, 利用响应面设计得到复合蛋白酶(傅玉颖等, 2009; 于平等, 2013)水解海参体壁的最优水解条件, 水解液离心、超滤后冷冻干燥得到样品后, 通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化, 利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)鉴定, 再用蛋白测序仪分析氨基酸组成, 为进一步研究这些海参的活性成分的生理功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

仿刺参取于宁波奉化博旺水产养殖公司。海地瓜取自浙江象山隅山岛海域。复合蛋白酶(1.0×10^5 U/g)购于广西南宁庞博生物工程有限公司。乙腈、甲醇为色谱级, 均购于宁波奥博科学仪器有限公司; 氨基酸标准品、衍生试剂购于 SIGMA 公司, 三氟乙酸(TFA)、聚凝胺(Polybrene)等试剂均为市售, 分析纯; 玻璃纤维膜、PTFE 滤膜(日本岛津公司)。

Agilent1200 液相色谱仪(美国安捷伦科技公司), Agilent 7890 气相色谱仪(美国安捷伦科技公司), MALDI-TOF-Target(美国 Bruker Daltonics 公司), Zip TipC4(美国 Millipore 公司), 蛋白测序 PPSQ-31A(日本岛津公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 取新鲜海参洗净后解剖, 去除内脏和内壁肌肉层, 剩余体壁切成碎块。加入一定量的水和复合蛋白酶在一定条件下进行水解, 水解液于 95°C , 灭酶 5min, 冷却至室温后, 12000r/min, 4°C 冷冻离心 10min。取部分上清液检测相关指标, 另一部分上清依次用分子量为 5kDa、1kDa 的 Milipore 超滤膜抽滤, 滤液冷冻干燥得到冻干粉用于进一步分析(魏广东等, 2005; 刘程惠等, 2008; Wu *et al.*, 2012)。

1.2.2 测定方法

(1) 氨基态氮的测定 甲醛滴定法, 称取相同的两份样品溶于 50mL 去离子水中, 一瓶加入 2 滴中性红指示剂, 用 0.100 mol/L NaOH 溶液滴定终点(由红色变为琥珀色), 记录碱用量 V_1 , 另一份加入麝香草酚酞 3 滴及中兴甲醛 20mL, 摇匀, 用 0.100 mol/L NaOH 溶液滴定至淡蓝色, 记录碱用量 V_2 (魏广东等, 2005; 侯付景等, 2010b)。按下述公式计算:

氨基态氮(%) = $\{[N \times (V_2 - V_1) \times 0.014] / W\} \times 100$
式中, N 为标准碱液当量浓度; W 为样品的重量(g)。

(2) 总氮的测定 凯氏定氮法(魏广东等, 2005)。水解度的计算:

DH(%) = (水解液中氨基态氮 / 样品总氮量) $\times 100$

1.2.3 响应面设计 本实验使用复合蛋白酶, 在不同条件下水解海参制得水解液, 以水解度为指标优化水解条件。实验因素包括时间(60, 120, 180min)、温度(45, 55, 65°C)和加酶量(0.5%, 1.5%, 2.5%)。采用 Box-Behnken 中心组合设计(王霞等, 2010; 罗红宇等, 2013; 孙静等, 2013; 李云涛等, 2014)。

1.2.4 酶解产物分析

(1) RP-HPLC 分离纯化 取超滤分离所得的仿刺参和海地瓜的冻干粉各 5mg 溶于 1mL 蒸馏水(含 0.1% TFA), 配制成 5mg/mL 的样品。经 $0.45\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后, 进行 RP-HPLC 分离纯化。重复进样, 收集单一主要组分峰流出液, 冷冻干燥后 -20°C 保存, 用于质谱分析(胡文婷等, 2006)。

色谱柱: Zorbax 300SB-C18 ($4.6 \times 250\text{mm}$, $5\mu\text{m}$); 流速 0.8 mL/min; 进样量 $100\mu\text{L}$; 流动相 A 为水, 流动相 B 为乙腈(0.1% TFA), 洗脱梯度: 0%—50% B, 32min; 50%—100% B, 2min; 100%—100% B, 3min。检测波长: 280nm/254nm/214nm (Silva *et al.*, 2007; Mant *et al.*, 2009)。

(2) MALDI-TOF 质谱检测 经两步 RP-HPLC 分离纯化后所得单一活性峰冻干粉, 用蒸馏水(含 0.1% TFA)溶解。基质溶液为含有 5mg/mL 4-氰基-4-羟基肉桂酸(4-HCCA)及 0.1% TFA 的 50%乙腈(ACN)溶液。取样品溶液和基质溶液各 1mL 混合均匀, 采用 ZIP TIP C4 枪头吸取样品 $10\mu\text{L}$, 脱盐浓缩后, 用 $1\mu\text{L}$ TA 液(0.1% TFA 的 50% CAN)洗出样品, 直接点在样品靶上, 自然干燥后, 吸取 $0.6\mu\text{L}$ 基质溶液覆盖在样品及校准标准品上, 室温挥干, 送入离子源中检测(Hinke *et al.*, 2002; Villanueva *et al.*, 2004)。

检测条件: N2 激光器, 激光波长 355nm, 采用延

时引出和反射的工作方式; 加速电压 20kV, 检测器电压 1kV, 频率 220Hz, 延迟时间 190ns, 阳离子方式检测, 图形叠加 100 次单次扫描信号得到质谱图。

(3) 多肽 N 端测序 利用混合氨基酸标准品 (PTH-AA), 建立标准氨基酸图谱。取 15 μ L 聚凝胺加至玻璃纤维膜上, 氮气吹干, 上机运行 5 个循环。再将足量样品点加到玻璃纤维膜上, 氮气吹干。将加好样品的玻璃纤维膜用 PTFE 滤膜封置于蛋白测序仪 PPSQ-31A 的反应器里, 设定检测氨基酸数及其它参数。

2 结果与分析

2.1 响应面法优化

应用响应面设计, 水解度为指标, 建立数学模型。根据单因素实验设计考虑了温度、时间和加酶量 3 个因素。采用 Box-Behnken 中心组合设计, 共设计 15 个实验点, 分为析因点和零点。其中析因点为自变量取值在 A、B、C 所构成的三维顶点, 零点为区域的中心点(见表 1)。

表 1 响应面设计方案和实验结果
Tab.1 Design and experimental results of RSM (respond surface methodology)

实验号	编码			仿刺参(S)	海地瓜(A)
	A(时间, min)	B(温度, °C)	C(加酶量, %)	DH1(%)	DH2(%)
1	-1(60)	-1(45)	1(2.5)	46.42	53.17
2	1(180)	-1(45)	0(1.5)	67.74	51.17
3	-1(60)	1(65)	0(1.5)	68.75	52.69
4	1(180)	1(65)	0(1.5)	66.46	54.33
5	-1(60)	0(55)	-1(0.5)	47.86	52.49
6	1(180)	0(55)	-1(0.5)	58.59	51.49
7	-1(60)	0(55)	1(2.5)	57.72	56.72
8	1(180)	0(55)	1(2.5)	72.23	51.85
9	0(120)	-1(45)	-1(0.5)	46.41	48.50
10	0(120)	1(65)	-1(0.5)	47.47	51.73
11	0(120)	-1(45)	1(2.5)	75.28	55.65
12	0(120)	1(65)	1(2.5)	75.81	55.57
13	0(120)	0(55)	0(1.5)	83.45	63.39
14	0(120)	0(55)	0(1.5)	75.74	63.91
15	0(120)	0(55)	0(1.5)	81.36	63.03

DH1 表示仿刺参; DH2 表示海地瓜

2.2 模型建立和显著性分析

根据表 2 的结果, 用软件 Design Expert 8.0 设计的实验方案, 对数据进行多元回归拟合, 得到回归方程:

$$DH1(\%) = 80.18 + 5.53A + 2.83B + 10.09C - 5.90AB + 0.95AC - 0.13BC - 9.99A^2 - 7.85B^2 - 11.09C^2$$

$$DH2(\%) = 63.44 - 0.78A + 0.73B + 1.95C + 0.91AB - 0.97AC - 0.83BC - 5.16A^2 - 5.44B^2 - 5.14C^2$$
 式中, A、B、C 均为编码值。

据表 2 对回归线方程(沈懋文, 2010; 孙静等, 2013)进行显著性分析, 仿刺参水解度回归方程的显著性检验 $P=0.0395$ ($P<0.05$), 海地瓜水解度回归方程的显著性检验 $P=0.0025$ ($P<0.05$), 说明这两种海参水解度回归模型的预测值与实际值都非常吻合, 模型显著; 模型失拟项表示模型预测值与实际值不拟合的概率, 仿刺参回归方程的失拟项检验 $P=4.07$

表 2 响应面回归方程的方差分析结果

Tab.2 Analysis of variance results for response surface quadratic model

方差来源	F 值	P 值	方差来源	F 值	P 值
DH1	5.36	0.0395	DH2	18.68	0.0025
A	5.42	0.0674	A	2.60	0.1679
B	1.42	0.2873	B	2.28	0.1918
C	18.01	0.0081	C	16.25	0.0100
AB	3.08	0.1395	AB	1.77	0.2403
AC	0.079	0.7899	AC	2.01	0.2159
BC	1.554E-003	0.9701	BC	1.47	0.2799
A2	8.16	0.0356	A2	52.75	0.0008
B2	5.03	0.0749	B2	58.51	0.0006
C2	10.05	0.0248	C2	52.29	0.0008
失拟项	4.07	0.2034	失拟项	15.23	0.0622

$P<0.05$ 表示差异显著; $P<0.01$ 表示差异极显著

($P>0.05$), 海地瓜水解度回归方程的失拟项检验 $P=0.0622$ ($P>0.05$), 说明两个方程对实验的拟合度均较好, 因此所选的二次回归模型有效, 可用这两个模型分析和预测实验数据。

2.3 响应面分析

根据三维立体图可对任何两个因素的交互作用及各因素对响应值的影响进行分析, 确定最佳因素水平。图 1 的 a、b、c 分别表示时间和温度、时间和加酶量、温度和加酶量三组因素对水解度的影响。通过响应面三维图的等高线的形状则可以直观地反映两因素交互作用的强弱, 椭圆表示交互作用显著, 越接近圆形表示两因素交互作用越弱。

由图 1 可知, 等高线呈椭圆形, 表示温度和时

间、时间和加酶量、温度和加酶量的交互作用均比较

明显。随着加酶量的增加, 水解度呈先上升后下降的趋势。实验范围内加酶量较低时等高线排列密集, 间距较窄, 对仿刺参水解度影响较大, 反之, 影响较小。温度和时间曲线比较平缓, 在实验范围内对仿刺参水解度影响不明显。由图 2 可知, 等高线呈近似圆形, 说明各图中的两因素交互作用均不明显。随着加酶量的增加, 海地瓜水解度先上升后下降。因为酶只有与底物结合, 才能起到催化作用, 当底物一定时, 加酶量增大, 底物与酶完全结合, 从而加速降解。随着时间的增加, 海地瓜水解度出现先上升后下降的趋势。可能是由于时间过长, 部分产物进一步降解导致的。随着温度的升高, 水解度呈现先上升后下降的趋势。可能是因为酶的活性随温度升高而逐渐增强, 当超过一定范围内反而使部分酶失活。

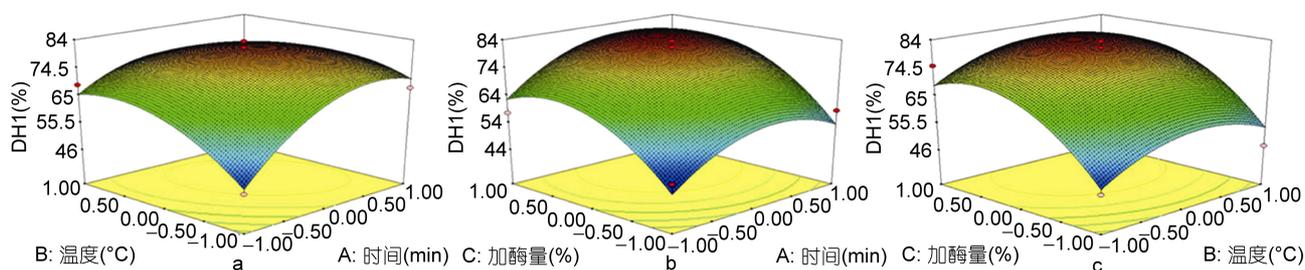


图 1 仿刺参体壁水解条件对 DH1(%)影响的响应面图

Fig.1 3-D surface and contour plots showing the effect of hydrolysis conditions on DH1

a. 温度与时间对仿刺参水解度的影响; b. 加酶量与时间对仿刺参水解度的影响; c. 温度与加酶量对仿刺参水解度的影响

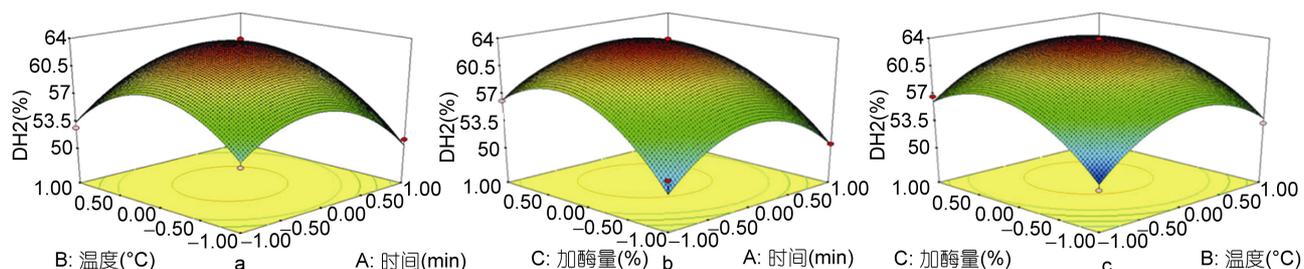


图 2 海地瓜水解条件对 DH2(%)影响的响应面图

Fig.2 3-D surface and contour plots showing the effect of hydrolysis conditions on DH2

a. 温度与时间对海地瓜水解度的影响; b. 加酶量与时间对海地瓜水解度的影响; c. 温度与加酶量对海地瓜水解度的影响

对响应面结果利用软件进行优化分析, 确定仿刺参水解的最优条件: 时间为 136.8min, 温度为 55.7°C, 加酶量为 1.97%, 响应面预测的 DH1 最大值为 83.41%。海地瓜水解的最优条件: 时间为 115.6min, 温度 55.4°C, 加酶量 1.70%。在此条件下, 响应面预测的 DH2 最大值为 63.68%。用上述优化条件进行实验, 得到的 DH1 和 DH2 分别为 83.39%、63.69%, 与理论值基本相符。

2.4 RP-HPLC 分离纯化

将超滤分离后的仿刺参多肽组分 S 和海地瓜多肽组分 A 的冻干粉溶于蒸馏水(含 0.1% TFA)配成 5mg/mL 的样品, 上 RP-HPLC 分离纯化。经第一步 RP-HPLC 分离, 组分 S 被分离成 42 个组分(图 3a, 图 3b), 组分 A 也被分离成 42 个组分(图 4c)。从色谱图可以看出, 经二次 RP-HPLC 再次纯化, 在上述色谱条件下, 仿刺参和海地瓜酶解肽段得到基线分离, 酶解肽段

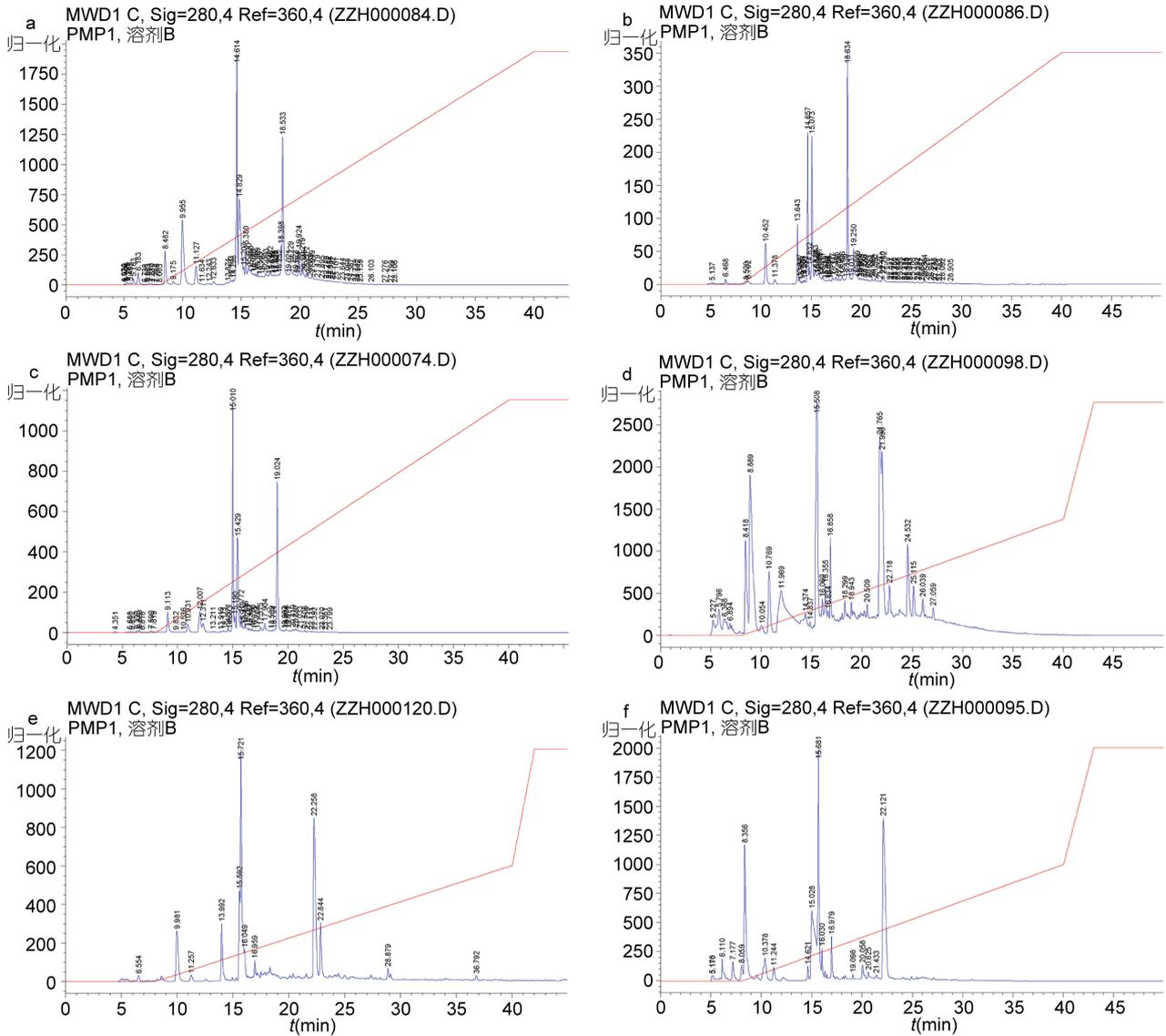


图3 多肽的 RP-HPLC 分析图谱

Fig.3 Analytical RP-HPLC chromatogram of polypeptide

a、b. 仿刺参多肽一级色谱图; c. 海地瓜多肽一级色谱图; d、e. 仿刺参多肽二级色谱图; f. 海地瓜多肽的二级色谱图

分离是较成功。另外从三批酶解肽段的色谱图谱(图谱没有给出),各批间的肽谱大致相同。组分 S 被分离成 26 个组分(图 3d)和 12 个组分(图 3e),组分 A 被分离成 18 个组分。重复进样,合并主要单一组分峰(S1、S2、A1、A2)收集起来,冷冻干燥,将得到的冻干样品用于 MALDI-TOF 质谱分析,进而对主要肽段序列进行鉴定。

2.5 MALDI-TOF 鉴定

经二次 RP-HPLC 纯化得到的主要单一组分(S1、S2、A1、A2)进行 MALDI-TOF 分析,测定其相对分子质量。各组分的质谱图如图 4(仅测 $M_r=1000-5000$)。S1 峰(图 4a)主要以 3126.732 为主,掺杂部分为干扰物。S2 峰(图 4b)以 1919.789、2004.802、

3141.300 为主,包含其它小峰杂质,及其断裂氨基酸残基后的组分。A1 峰(图 4c)含有 3 个组分,以 4370.600 为主;组分 2781.575 易脱落精氨酸,产生以 2625.412 为主较稳定的物质,组分 3035.719 与 3191.550 可能是峰组分中残余的杂质。A2 峰(图 4d)有 2 个组分: 2632.297 和 2863.417,这两个组分在质谱检测中极易丢失苏氨酸残基,从而产生较稳定的组分 2531.243 与 2762.374。

2.6 N 端测序

经 N 端序列测定仿刺参多肽 S1、S2 氨基酸残基序列分别为: Gly-Pro-Val-Gly-Ala-Ser-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Ser-Ala-Leu(图 5a)

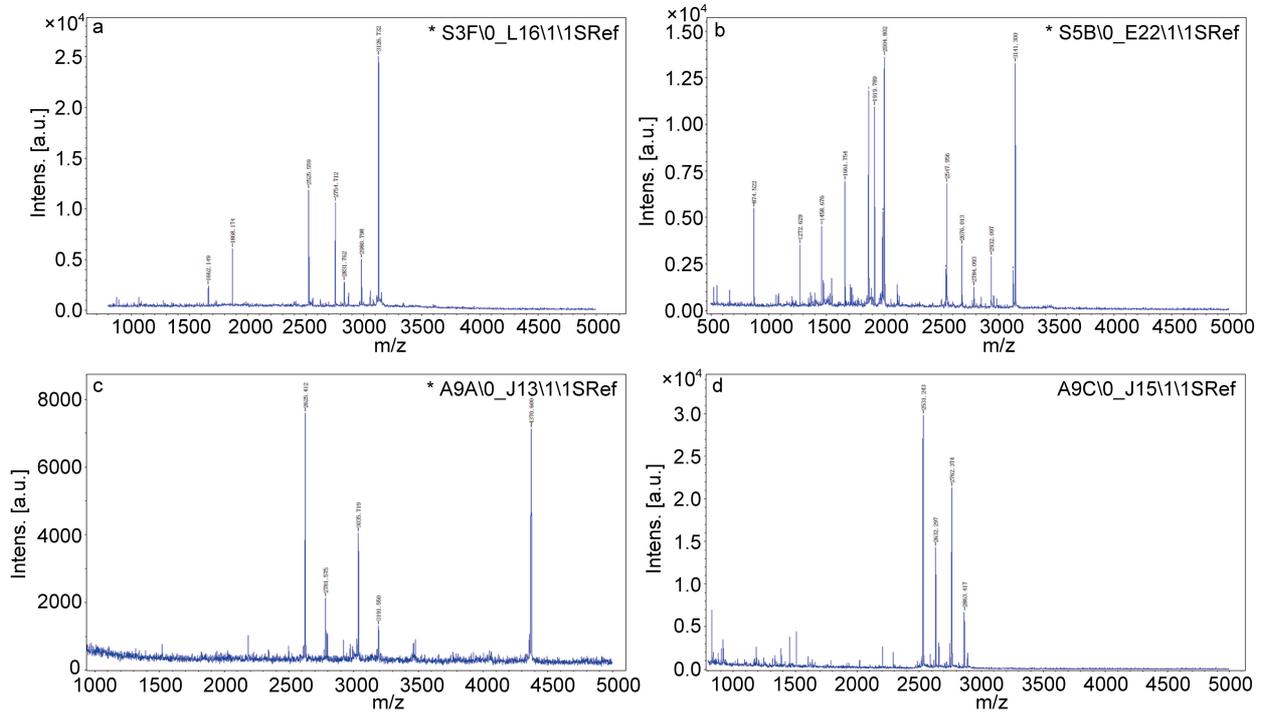


图 4 多肽的 MALDI-TOF 质谱图

Fig.4 The MALDI-TOF spectrum of polypeptide

a. 仿刺参多肽 S1 的质谱图; b. 仿刺参多肽 S2 的质谱图; c. 海地瓜多肽 A1 的质谱图; d. 海地瓜多肽 A2 的质谱图

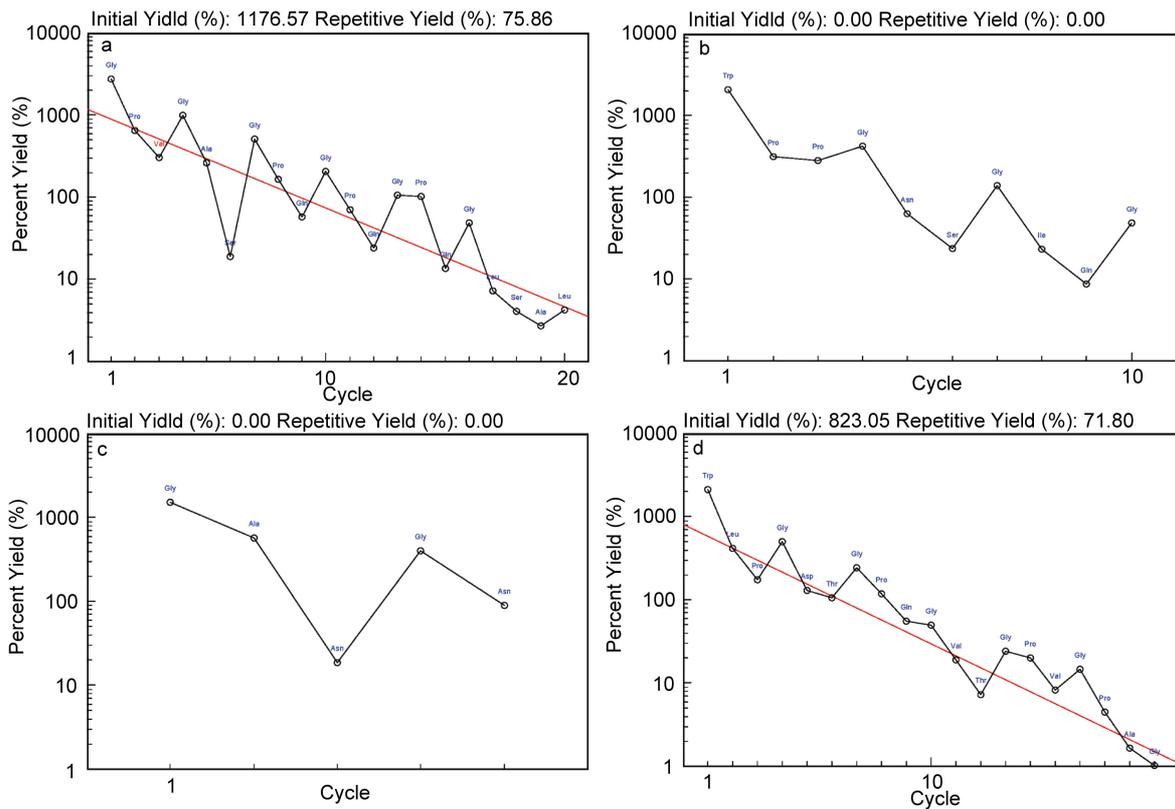


图 5 多肽 N 端测序图

Fig.5 N sequencing diagram of polypeptide

a. 多肽 S1 测序图; b. 多肽 S2 测序图; c. 多肽 A1 测序图; d. 多肽 A2 测序图

和 Trp-Pro-Pro-Gly-Asn-Ser-Gly-Ile-Gln-Gly (图 5b)。海地瓜多肽 A1 和 A2 氨基酸残基序列分别为 Gly-Ala-Asn-Gly-Asn (图 5c)和 Trp-Leu-Pro-Gly-Asp-Thr-Gly-Pro-Gln-Gly-Val-Thr-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Ala-Gly (图 5d)。

3 讨论

海参酶解得到的多肽也较为繁多且分子量较低。在色谱分析过程中部分肽段未能得到完全的分。反相分离中样品保留时间受其疏水性和分子量的影响,在分子量相同的情况下,疏水性低的分子在色谱柱中的保留时间较短;而疏水性相同的情况下,分子量低的组分保留时间较短。胶原蛋白水解物中存在许多分子量十分接近的肽段,其理论疏水性差异不明显。因此利用反相色谱完全分离这些肽段存在一定难度。另外,肽段中含有较多的甘氨酸,导致不同肽段之间紫外特征吸收差异不是很显著。因此,在反相分离过程中利用紫外检测肽段之间的差异受分离度影响很大。

在质谱分析中,不同组分的分离度对定性研究的结果影响较小,但受单位时间扫描次数的影响,以尽可能多地检测同一色谱峰中的离子。在样品分析过程中降低了液相的流速,同时将动态排除的次数和动态排除时间作了调整。实验结果也表明了该方法的有效性,不同胶原蛋白的酶法降解物中含有序列完全相同的肽段,这些肽段不能用于胶原蛋白的类型识别,而许多特征肽段只出现在特定的胶原蛋白序列中。这些特征肽段可作为胶原蛋白的类型识别的依据,因此特征肽段的识别是判断胶原蛋白类型的关键。本研究证明利用酶法降解胶原蛋白可得到多种特征肽段。通过 RP-HPLC/MALDI-TOF 质谱识别降解产物的特征组分进行胶原蛋白类型检测及多种胶原蛋白同步检测具有可行性。在实际操作中,可将待测样品热变性和酶切处理,利用液质联用技术检测特征肽段进行胶原蛋白类型别。而该方法在临床上的应用则需要使用更多类型的胶原蛋白进行更为深入的实验验证。

参 考 文 献

于平,杨卫芳,2013. 东海海参胶原蛋白提取和类型确定以及复合酶水解条件优化. 中国食品学报, 13(9): 94—98
王霞,苏秀榕,丁进锋等,2010. 响应面法优化双酶水解黄鳍金枪鱼胰脏的工艺研究. 现代食品科技, 26(11): 1229—1233
邢湘臣,2006. “海参的补益药膳”补遗. 东方药膳, 16(11):

26—27
刘程惠,朱蓓蓓,盖秀萍等,2008. 海参酶解产物的分离及其体外抗氧化作用的研究. 食品与发酵工业, 33(9): 50—53
闫冰,李玲,易杨华,2004. 海参多糖的生物活性研究概况. 药学实践杂志, 22(2): 101—103
孙静,李晔,张春丹等,2013. 响应面法优化双酶水解鳃鱼下脚料. 中国食品学报, 13(6): 104—110
李云涛,陈博,马剑茵等,2014. 虾蛄肉酶法制备抗氧化肽的工艺优化和活性研究. 海洋与湖沼, 45(2): 335—340
肖枫,曾名勇,董士远等,2006. 海参胶原蛋白的研究进展. 水产科学, 24(6): 39—42
佟长青,朱春茹,曲敏等,2013. 刺参蛋白胰蛋白酶解产物生物活性的研究. 河北渔业, 25(11): 6—9
沈懋文,邵亮亮,侯付景等,2010. 响应面法优化杭白菊花精油的提取工艺及其化学成分研究. 食品科学, 31(10): 101—105
张凤瀛,吴宝铃,程丽仁,1964. 中国动物图谱 棘皮动物门. 北京: 科学出版社, 1—142
罗红宇,杜帅,郑斌等,2013. 双酶分步水解金枪鱼 (Eleotridae)碎肉制备高F值酶解液的工艺研究. 海洋与湖沼, 44(4): 906—912
赵芹,王静凤,薛勇等,2008. 3种海参的主要活性成分和免疫调节作用的比较研究. 中国水产科学, 13(1): 154—159
胡文婷,孙谡,王跃军,2006. 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)中抗氧化肽的分离纯化及性质研究. 海洋与湖沼, 37(1): 14—19
侯付景,李妍妍,金春华等,2010a. 白肛海地瓜和刺参体壁的比较分析. 食品科学, 22(11): 38—41
侯付景,金春华,董明敏等,2010b. 响应面分析法优化海地瓜酶解工艺及其抗氧化活性的研究. 营养学报, 32(3): 276—280
崔凤霞,薛长湖,李兆杰等,2006. 仿刺参胶原蛋白的提取及理化性质. 水产学报, 30(4): 549—553
傅玉颖,陈卉卉,励建荣等,2009. 东海海参胶原蛋白酶解工艺研究. 中国食品学报, 9(3): 84—91
魏广东,蔡友琼,2005. 水产品质量安全检验手册. 北京: 中国标准出版社, 138—140
Hinke S A, Kuhn-Wache K, Hoffmann T *et al*, 2002. Metformin effects on dipeptidyl-peptidase IV degradation of glucagon-like peptide-1. Biochemical and Biophysical Research Communications, 291(5): 1302—1308
Mant Colin T, Kovas James M, Kim Hyun-min *et al*, 2009. Intrinsic amino acid side-chain hydrophilicity/ hydrophobicity coefficients determined by reversed-phase high-performance liquid chromatography of model peptides: comparison with other hydrophilicity/hydrophobicity scales. Biopolymers, 92(6): 573—595
Silva Filipe, Nogueira Luciana C, Goncalves Cristina *et al*, 2007. Electrophoretic and HPLC methods for comparative study of the protein fractions of malts, worts and beers produced from Scarlett and Prestige barley (*Hordeum vulgare* L.) varieties. Food Chemistry, 106(2): 820—829

Villanueva Josep, Philip John, Entenberg David Serum *et al*, 2004. peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 76(6): 1560—1570

Wu Mingyi, Huang Rong, Wen Dandan *et al*, 2012. Structure and effect of sulfated fucose branches on anticoagulant activity of the fucosylated chondroitin sulfate from sea cucumber *Thelecnata ananas*. *Carbohydrate Polymers*, 87(1): 862—868

ENZYMATIC HYDROLYSIS TECHNOLOGY OF *APOSTICHOPUS JAPONICUS* AND *ACAUDINA LEUCOPROCTA* BASED ON RESPONSE SURFACE METHODOLOGY AND N-TERMINAL AMINO ACID SEQUENCING

LI Yan-Yan¹, DAI Juan², HU Ling-Ping², JIANG Zhen-Zhou¹, SHANG Jing¹, ZHANG Lu-Yong¹

(1. Center for Drug Screening, National Drug Screening Laboratory, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract We optimized the hydrolytic conditions of two sea cucumber species with protamex in response surface methodology (RSM) to take full advantages of this valuable marine resources. Using hydrolysis degree (HD) as an indicator, we designed an RSM experiment with three factors of temperature, enzyme amount, and the treatment time. The best hydrolysis conditions for *Apostichopus japonicus* were at 55.7°C in enzyme amount of 1.97% for 136.8 min treatment, at which the HD reached 83.39%; and for *Acaudina leucoprocta*, there were 55.4°C, 1.70%, and 115.6 min, respectively in HD of 63.68%. In addition, after the enzyme solutions were separated and purified by centrifugation, ultra-filtrating, RP-HPLC (reverse phase high-performance liquid chromatography), MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry) and N-terminal sequencing, the main constituents of the solutions were analyzed, from which we harvested peptide S1 (Gly-Pro-Val-Gly-Ala-Ser-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Gln-Gly-Pro-Gln-Gly-Leu-Ser-Ala-Leu), S2 (Trp-Pro-Pro-Gly-Asn-Ser-Gly-Ile-Gln-Gly), *Acaudina* polypeptide A1 (Gly-Ala-Asn-Gly-Asn), and A2 (Trp-Leu-Pro-Gly-Asp-Thr-Gly-Pro-Gln-Gly-Val-Thr-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Ala-Gly).

Key words *Apostichopus japonicus*; *Acaudina leucoprocta*; response surface methodology; separation and purification of peptides; N-terminal sequence