酶解海洋生物源蛋白制备活性肽研究进展

Progress in enzymatic preparation of bioactive peptides from marine proteins

胡文婷[1]，张 凯[2]

(1. 海南大学 海洋学院，海南省热带水生生物技术重点实验室，海南 海口 570228；2. 海南海灵化学制药有限公司，海南 海口 570102)

中图分类号：Q514.3　　文献标识码：A　　文章编号：1000-3096(2010)05-0083-06

海洋是地球上最大的生物储库。辽阔的海洋生长着十几万种海洋动植物，从海洋获取的鱼、虾、贝、藻等，为人类提供了丰富的海洋蛋白资源，是人类的蛋白类食物及生物活性物质的重要来源。现在人们直接和间接食用的动物蛋白质，约有四分之一来自海洋。海洋生物源蛋白无论在种类还是数量上都远远大于陆地生物源蛋白。并且海洋生物的蛋白质结构与功能和陆地生物相比也有较大的差别，其中蕴藏着许多功能特异、结构新颖的多肽类物质。选择合适的蛋白酶对海洋生物源蛋白的多肽链进行水解切割，把具有生物活性的肽片断释放出来，就可以制备出功能多样、结构新颖的海洋生物活性肽。

1　制备工艺研究

1.1　蛋白酶的选择

对于同一蛋白底物，由于不同蛋白酶的酶切位点不同，所得到的肽片断分子质量大小和氨基酸组成也各有差异，因此水解产物的理化功能特性也会有较明显的差别。比如胰蛋白酶酶解位点较少，所以酶切产物片断较大。木瓜蛋白酶的酶切位点广泛，释放出来的肽的分子质量比较小。蛋白水解物的营养价值和风味的好坏，也很大程度上依赖于所用酶的不同。水产品在水解加工过程中往往会产生较重的苦腥味，苦腥味的存在已成为酶解物在食品及医疗保健品中应用的主要限制因素，因此制备中应尽量减少苦味，提高其风味氨基酸和呈味肽的含量。Kristinsson 等[1]比较了 4 种碱性蛋白酶对大西洋鲑鱼的水解效果及其水解物的生物化学性质和功能特性，以 Alcalase 2.4L 水解物的各项性能指标最佳。刘春娥等[2]对鱿鱼(*Loligo*)的内脏蛋白质进行酶解，发现中性蛋白酶、碱性蛋白酶、胰蛋白酶和木瓜蛋白酶具有较好的水解效果，胃蛋白酶水解效果较差，木瓜蛋白酶和中性蛋白酶在一定条件下具有显著的协同水解效应。曾庆祝等[3]探讨了胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、复合风味酶、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)蛋白酶酶解扇贝(*Placopecta magellanicus*)边所得酶解物对羟自由基(·OH) 的清除效果及酶解物的体内抗氧化作用，筛选出枯草杆菌蛋白酶为最佳水解酶。另外，在对虾壳和虾头[4]、罗非鱼(*Oreochromis* spp.)肉[5]等海洋来源蛋白的酶解中，筛选出的最佳水解酶也各不相同。目前虽然对各种蛋白酶的筛选研究较多，但是因底物蛋白和评价标准的不同，仍无哪种酶可作为普遍适用的最佳水解酶。

海洋独特环境成了新型蛋白酶开发的新源地，成为筛选蛋白酶的新焦点，海洋蛋白酶往往具有区别于陆地蛋白酶的新特性，如低温碱性、高温碱性等性质，一些研究者将其应用于海洋生物源蛋白的酶解，结果均显示出了独特的效果。美国的 Kristinsson 等[6]把从鲑鱼(*Oncorhynchus tschawytscha*)内脏中所制备的丝氨酸型蛋白酶与商品化蛋白酶(Alcalase 2.4L, Flavourzyme 1000L, Corolase PN-L 以及 Corolase 7089)对海洋鱼蛋白进行水解研究，结果表明在相同的水解条件下，从鲑鱼内脏中制备的丝氨

收稿日期：2009-05-19；修回日期：2009-09-10

基金项目：海南省热带水生生物技术重点实验室开放基金资助项目(shkyjj0809)

作者简介：胡文婷(1981-)，女，山东曹县人，讲师，研究方向：海洋生物活性物质，电话：0898-66289567，E-mail: huwenting_0@163.com

酸型蛋白酶的水解效果最好。中国水产科学研究院黄海水产研究所酶工程实验室将从海洋微生物分离到的蛋白酶应用于栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)裙边和鳕鱼(*Gadoux macrocephalus*)碎肉的酶解，发现其中海洋蛋白酶 YS-894 和 YS-80 均表现出优于一般陆地蛋白酶的水解效果，推测海洋来源的蛋白酶可以选择性的作用于亲水性氨基酸残基，对海洋生物源蛋白的水解特异性较强[7]。山东大学微生物技术国家重点实验室从 1 800 m 的深海淤泥中分离得到产低温蛋白酶的耐冷菌，并用于酶解鲨鱼、牡蛎、扇贝和毛虾，也取得了良好的效果[8]。

1.2 酶解条件优化

酶解时间是影响最终效果的重要因素，随着反应时间的延长，多肽得率呈现了三个阶段的趋势：第一阶段的水解过程中，多肽得率的上升速度很快，随后进入第二阶段的缓慢增长，第三个阶段为平衡期，此时体系中的多肽含量最高。随着反应的进一步进行，水解度进一步增加，但是多肽得率出现了轻微的下降趋势，这是因为在平衡状态的后期，蛋白酶将体系中的肽进一步水解而产生了更多的氨基酸，由于多肽的活性位点遭到破坏，同时也伴随着活性的下降。这种蛋白酶解典型的曲线在许多酶解海洋生物源蛋白的研究中被证实。

在不同的反应体系中，酶解的最适温度和 pH 受到底物种类、浓度、缓冲液等因素的影响。虽然对水解效果的最终评判标准不同，但是多数蛋白酶在水解目的蛋白时的最适温度和最适 pH 与其水解能力最强时的温度和 pH 相差不大，并且随着温度和 pH 的增加，总体效果呈现先增大后减小的趋势。

酶与底物反应速度在一定程度上取决于固液比和加酶量。Guerard 等[9]以碱性蛋白酶为催化手段，研究了黄鳍金枪鱼(*Thunnus albacares*)的加工下脚料的蛋白水解影响因素，提出可供水解键的浓度是决定水解速度的关键因素。在酶被底物饱和之前，用量大一些对于水解反应本身没有不良效果，但会引起使用成本的增加。当固液比较低时，酶与底物结合几率较少，反应速度较慢，适当增加底物浓度有利于反应向生成物方向进行，因而反应速度加快。但当所有的酶都结合了底物被饱和之后，即使固液比再增加，反应速度也已达到了饱和状态，反应速度不再增加。同样，当酶的用量较小时，水解度随着酶的加入量增大而明显增加，当酶的浓度增加到一定程度时，底物浓度已不足以使酶饱和，反应速度变小，再增加酶的浓度水解度的变化幅度已经很小了。

在单因素试验的基础上，继续考察多因素之间的相互影响，选用较多的试验方法为正交试验或均匀设计。也有学者利用其他的数学模型进行探讨，如赵梅等[10]利用响应面法对罗非鱼下脚料进行了酶解工艺的优化，结果表明利用该方法控制工艺操作参数可以优化产物的特性。在对陆地来源的蛋白，如米渣、鳙鱼(*Aristichthys nobilis*)等进行酶解时，有研究者利用神经网络实现对酶解过程的模拟仿真[11,12]，提高优化结果的精度，但是在酶解海洋生物源蛋白制备活性肽方面还未见有相关报道。

1.3 分离和分析技术

酶对蛋白质的水解作用使产物具有分子质量降低、离子性增加及疏水性基团暴露等特性，在酶解制备多肽的过程中，酶的种类、浓度，水解的时间、pH 和温度等因素均会影响水解率和最终水解液的组成。蛋白酶解物的成分非常复杂。对蛋白酶解物中的生物活性肽分离纯化技术的研究目前主要集中在各种低压柱层析、高压液相色谱、超滤(膜分离方法)、毛细管电泳等几个方面。实际操作中采用何种分离方法，则由所提取分离的物质性质决定。

利用不同截流分子质量的超滤膜对酶解液进行分段，可以同时起到浓缩和分离纯化的作用。由于其可在维持原生物体系环境的条件下实现分离，并且操作简单，能耗低，因此受到很多研究者的重视。Joen 等[13]用超滤技术对鳕鱼蛋白水解物进行分段，在获得的三部分肽片段中，分子质量介于 3～10 ku 的肽片段抗氧化性能最好，而小于 3 ku 的肽片段，具有明显的 ACEI 功能。汪涛等[14]以聚砜中空纤维为膜材料的超滤装置对扇贝边酶解液进行分离，经超滤的酶解透过液在色泽、风味、澄清度等方面均理想，营养成分保持较好，氨基酸态氮保存率较高。Vandanjon[15]用膜蛋白对蓝鳕鱼肽进行浓缩和纯化，高截留分子质量的膜用于分离多肽和未水解的蛋白，中截留分子质量的超滤膜可以对一定分子质量范围的多肽进行浓缩，最后用纳滤浓缩小分子质量的肽类，并且同时除盐。

在对多肽的进一步分离和分析中，如果要得到单一成分，一般采用几种色谱相结合或毛细管电泳的方法，然后对分离得到的组分进行氨基酸分析、序列分析或质谱进行结构确证。Wang 等[16]用 Sephadex

LH-20 凝胶层析和 RP-HPLC 从牡蛎(*Crassostrea talienwhanensis crosse)*蛋白水解液中纯化出了一个由 9 个氨基酸残基组成的具有 AECI 活性的小肽, 氨基酸序列为 VVYPWTQRF。Wu 等[17]通过超滤、凝胶层析、RP-HPLC 从鲨鱼肉的酶解液中分离出 4 个肽组分, 并且通过二次离子质谱确定其序列分别为 Cys-Phe, Glu-Tyr, Met-Phe, Cys-Glu。Zhao[18]采用离子交换层析、凝胶层析和反相高效液相色谱的方法从海地瓜(*Acaudina molpadioidea*)中分离得到 1 个分子质量为 840 u 的小肽, 由 5 种主要的氨基酸组成(Glu, Asp, Pro, Gly, Ala)。Je 等[19]从金枪鱼(*Thunnus thynnus*)骨的水解液中, 利用连续的色谱分离得到一个抗氧化肽, 并且通过 ESI-MS 确定其序列为 VKAGFAWTANQQLS(1 519 u)。He[20]通过对鱼、虾、贝和藻类等的水解液进行研究认为, 使用毛细管电泳(CE)可以得到与 HPLC 同样精确的结果, 并且毛细管电泳的方法更快速, 也更经济。

但是要从蛋白酶解物这一相对比较复杂的体系中分离纯化出具有一定生理功能的生物活性肽物质, 并且要实现大规模的工业化制备水平的分离纯化, 并不是每一种方法都是可靠的、可行的。也有研究者认为, 从应用的角度来考虑, 由于酶解液的生物活性往往是多种肽混合物共同作用的结果, 如采用色谱等技术对其进行纯化可能造成活性的部分损失且成本较高, 不适合工业化生产, 最佳的解决方法还是应通过对酶解过程的控制来实现[16]。

2 海洋生物源蛋白酶解物的主要活性及应用领域

目前酶解海洋生物源蛋白所得到的生物活性肽主要有 ACE 抑制肽、抗氧化肽、抗菌肽、提高人体免疫、抗肿瘤的肽类和胶原肽等。

2.1 降血压肽

降血压肽是一类血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI), 通过抑制 ACE 活性而达到降血压的作用。1986 年, Suesuna 等[21]最先从沙丁鱼和带鱼的水解物中发现了血管紧张素转化酶(ACE)抑制肽。在接下来的研究中, 从多种食源性海洋生物源蛋白中均分离出了降压肽类物质, Seki 等[22]用蛋白酶酶解沙丁鱼、带鱼、牡蛎、虾、蟹等 12 种食物蛋白, Matsui[23], Astawan 等[24]用蛋白酶水解沙丁鱼和鱼干, Byun 等[25]对阿拉斯加青鳕鱼(*Theragra chalcogramma*)鱼皮进行水解, Fujital 用嗜热菌蛋白酶消化鲣鱼(*Katsuwonus pelamis*)均得了较高活性的 ACEI。时瀚等[26]以黄海的 22 种鱼类为研究对象, 对酶解得到的 ACEI-22 进行聚乙二醇修饰后其对自发性高血压大鼠的降压效果与卡托普利的效果相当。很多研究均表明从鱼肉、虾、蟹等水产动物蛋白中制得的酶解降血压肽其降压活性要优于其他食物性蛋白来源, 日本已有用沙丁鱼(*Sardina melamosticta*)制取的酶解降血压肽问世[27]。

血管紧张素转化酶抑制剂是目前用于治疗高血压的重要一线药物, 食物蛋白源 ACE 抑制剂因其高安全性, 副作用小、易吸收, 成为活性肽研究领域的热点, 已经通过实验证实酶解蛋白来源的降血压肽无任何毒副作用, 并且只对高血压患者起到降压作用, 对血压正常者则无降压作用, 这些特点都是普通的化学合成降压药所不具备的, 因此 ACE 抑制肽在开发为药物和具有降血压功能的功能食品中具有广阔的应用前景。

2.2 抗氧化肽

自由基可造成机体的多种损伤和病变, 加速机体的衰老。抗氧化肽作为自由基清除剂可清除体内多余的自由基, 从而增强机体免疫力, 延缓衰老。据报道 Qian 等[28]从牡蛎(*Carnis ostreae*)蛋白、Je 等[29]从阿拉斯加鳕鱼(*Theragra chalcogramma*)骨架、Kim 等[30]从皮氏叫姑鱼(*Johnius belengerii*)骨架蛋白、Mendis 等[31]从秘鲁鱿鱼(*Dosidicus gigas*)皮肤胶原蛋白、Wu 等[32]从花腹鲭(*Scomber austriasicus*)的酶解产物中均分离得到了具有抗氧化活性的功能肽。这些抗氧化肽的抗氧化能力与α-生育酚、抗坏血酸等相比, 在清除羟自由基、超氧阴离子、DPPH 自由基, 抑制脂质自氧化方面, 均优于这些现在广泛使用的天然抗氧化剂。

此外有报道证实有些抗氧化肽还具有抗癌、抗诱导及抗衰老等其他生物活性。水解扇贝内脏团得到的抗氧化活性肽 PCF 具有明显的抗皮肤衰老及抗紫外线对皮肤损伤作用, 并且对小鼠的肝脏和胸腺淋巴细胞的活性具有促进或保护作用[33]。水解牡蛎得到的抗氧化肽对自由基引起的 DNA 损伤具有保护作用, 对人肺成纤维细胞和巨噬细胞均无细胞毒性[29]。

酶解蛋白制备的生物活性肽具有生理活性强、安全可靠等优点, 已成为新型天然抗氧化剂的主要来源。另外, 海洋生物源蛋白酶解后普遍呈现出溶解

性好，乳化性强，流动性增加等优点。因此，酶解海洋生物源蛋白制备的抗氧化肽作为天然抗氧化剂不仅在食品工业，而且在医药、化妆品和整形外科等领域中都将得到广泛应用。

2.3 抗菌肽

抗菌肽是一类具有作用迅速、抗菌力强、抗菌谱广、活性稳定、不易产生耐药性等特点的小分子短肽。最初人们对于抗菌肽的研究都集中在由细菌、植物和动物产生的内源肽，并且在海洋生物中也发现了大量的内源性抗菌肽存在，自 1988 年日本学者 Nakamura 等[34]首次从海洋生物-鲎中发现抗菌肽以来，目前已从蟹、对虾、贻贝、鱼等多种海洋生物中分离到数种抗菌肽或类似抗菌肽物质。近来的研究发现食物蛋白经酶解也有可能产生出有效的抗菌肽，如对酪蛋白、乳铁蛋白等大分子蛋白进行水解，均分离得到了抗菌肽类物质。对海洋生物源蛋白酶解制备抗菌肽的工作起步较晚，但是也已经逐步引起了关注。Liu 等[35]用碱性蛋白酶 Alcalase 和菠萝蛋白酶对牡蛎进行水解，从水解液中分离得到了富含半胱氨酸的抗菌肽 CgPep33，该肽对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌都具有抑制作用，并且对草莓灰霉病具有显著的抑制作用。贻贝(*Mytilus edulis*)酶解物中的小肽对果蔬病原菌 Botryis cinerea 有良好的体外抗菌活性，可考虑将其替代化学杀菌剂用于果蔬的保鲜[36]。

抗菌肽作为天然来源的生物活性物质，具有广谱抗菌活性和抗病毒、抗真菌、抗寄生虫及抗肿瘤等生物活性，且不易产生抗药性，目前的研究表明抗菌肽对人体无毒副作用，这些特色和广阔的用途已经激起了人们极大的兴趣，在耐抗生素病原菌株不断出现的今天，抗菌肽有望成为新型的抗菌药物。

3 展望

目前，酶解海洋生物源蛋白制备生物活性肽的开发与应用中还存在着一些问题，如：

(1)酶解的过程的精确控制。要想最终得到符合我们要求的活性肽，必须对其水解的过程进行严格的控制，蛋白酶的选择和水解度的大小等因素不但影响酶解物的组成，而且与水解物苦腥味的大小也有关系。这些因素之间往往又互相影响互相作用，很难建立一个适应面很广的理论模型来反映酶解的全过程，对现有模型的效果也仍需进一步的讨论和完善。

(2)多肽活性的深入研究。对水解的肽类活性虽然已经有了广泛的研究，但是这些研究大多数还仅仅停留在依靠简单化学方法的体外活性研究，而在体内活性和应用效果方面的研究较少。要想进一步发掘海洋生物源蛋白酶解产生的肽类物质的应用价值，必须对其现有活性进行深入探讨，如许多抗氧化活性的肽类具有抗肿瘤、增强免疫的活性，许多抗菌肽不但可以抑制细菌，也可以抑制真菌及一些农业病害菌。

(3)肽类物质的化学结构修饰。在对酶解得到的多肽进行分离纯化后，从很多酶解物中都得到了一系列具有活性的单一物质，这些物质有些在体外表现出良好的活性，可以作为潜在的药物或先导化合物进行开发利用。但是在开发过程中却往往受到多肽本身物理及生物化学性质的限制，如难以通过细胞膜、易被蛋白酶降解等因素导致了肽类药物体内半衰期短、口服生物利用度低等缺点，不利于将其用于临床治疗[37]。对肽类进行化学结构上的修饰，如聚乙二醇化、糖基化等，是用以提高肽类药物稳定性的主要策略，目前对海洋生物源蛋白酶解物的修饰研究还比较少，主要还是受到上游酶解工艺和分离技术等条件的制约。

尽管如此，蛋白水解的肽类在食品、保健品、医药、饲料、日用化工等领域的需求一直逐年迅速增长，目前市场现有量远达不到需求量。我国作为一个海洋渔业和养殖大国，利用先进的酶技术开发海洋生物源蛋白活性肽，将为海洋水产品深加工提供广阔的前景。

参考文献:

[1] Kristinsson H G, Rasco B A. Biochemical and functional properties of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases[J]. **Food chem**, 2000, **48**(3): 657-666.

[2] 刘春娥，林洪，单俊伟，等. 鱿鱼内脏蛋白质酶解工艺的研究[J]. 食品工业科技, 2004, **25**(9): 83-85.

[3] 曾庆祝，许庆陵，林鲁萍. 扇贝边酶解物抗氧化作用研究[J]. 中国生化药物杂志, 2005, **26**(2): 83-85.

[4] 段杉，丁惠心，熊云. 酶法回收虾头和虾壳中的蛋白质[J]. 农产品加工, 2008, 1: 43-46.

[5] 赵珊珊，朱志伟，曾庆孝，等. 不同蛋白酶酶解罗非

鱼肉制备蛋白水解液的过程变化规律研究[J]. 现代食品科技, 2008, **24**(2): 115-119.
[6] Kristinsson H G, Rasco B A. Kinetics of the bydrolysis of Atlantic salmon muscle proteins by alkaline proteases and a bisceral serine protease mixture[J]. **Process Biochemistry**, 2000, 36: 13l-139.
[7] 胡文婷, 孙谧, 王跃军. 栉孔扇贝中抗氧化肽的分离纯化及性质研究[J]. 海洋与湖沼, 2006, **1**(37): 14-19.
[8] 吴继卫, 何海伦, 路敬涛, 等. 海洋生物蛋白的酶解及酶解产物的抗氧化活性[J]. 海洋科学, 2005, **29**(3): 76-80.
[9] Guerard F, Dufosse L. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase[J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2001, 11: 1 051-1 059.
[10] 赵梅, 吴成业. 罗非鱼下脚料酶解工艺的响应面法优化[J]. 食品研究与开发, 2007, **28**(5): 48-53.
[11] 舒服华, 肖伯慈. 基于遗传神经网络的水解米渣制备小肽工艺优化[J]. 粮食与饲料工业, 2007, 10: 23-25.
[12] 李琳, 赵谋明, 张黎. 利用人工神经网络优化制备鳙鱼抗氧化肽[J].四川大学学报, 2006, **38**(1): 80-85.
[13] Joen Y J, Byun H G, Kim S K. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultra filtration membrane [J]. **Process Biochemistry**, 1999, **4**(35): 471-478.
[14] 汪涛, 曾庆祝, 叶于明. 采用超滤技术分离扇贝边酶解液[J]. 中国水产科学, 2002, **9**(3)255-259.
[15] Vandanjon, Johannsson, Derouiniot, *et al*. Concentration and purification of blue whiting peptide hydrolysates by membrane processes[J]. **Journal of Food Engineering**, 2007, **83**(4): 581-589.
[16] Wang Jiapei, Hu Jianen, Cui Jinzhe, *et al*, Purification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats[J]. **Food Chemistry**, 2008, **111**(2): 302-308.
[17] Wu Hao, He Hailun, Chen Xiulan, *et al*. Purification and identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from shark meat hydrolysate[J]. **Process Biochemistry**, 2008, **43**(4): 457-461.
[18] Wu Hao, He Hailun, Chen Xiulan, *et al*. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate[J]. **Process Biochemistry**, 2007, **42**(12): 1 586-1 591.
[19] Je J Y, Qian Z J, Byun H G, *et al*. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis[J]. **Process Biochemistry**, 2007, **42**(5): 840-846.
[20] He Hailun, Chen Xiulan,Wu Hao, *et al*. High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis[J]. **Bioresource Technology**, 2007, **98**(18): 3 499-3 505.
[21] 吴炜亮, 吴国杰, 梁道双, 等. ACE 抑制肽的生理功能和研究进展[J]. 现代食品科技, 2006, **22**(3): 251-254.
[22] Seki E, Osajima K, Matsufuji H, *et al*. Angi-ontensln Converting Enzyme inhibitory of the short chain peptides derived from various food proteins[J]. **Nippon Shokuhin Kagaku Hashi(In Japanese)**, 1996, **43**(7): 839-840.
[23] Matsui. Inhibition of angiotensin converting enzyme by bacillus licheniforms alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle[J]. **Bi osci Biotech Biochem**, 1995, **57**(6): 922-925.
[24] Asmwa M, Chield. Effects of angiotensin-converting enzyme ihibitory substances derived from Indonesian dried, salted fish on blood pressure of rats[J]. **Bi osci Biotech Biochem**, 1995, **59**(11): 890-897.
[25] Hee-Guk B. Purification and characterization of angiotensin I converting[J]. **Process Biochemistry**, 2001, 36: 115-116.
[26] 时瀚, 孙谧, 于建生, 等. 22种海水鱼中ACEI的制备及其化学修饰[J]. 中国水产科学, 2006, **13**(1): 100-105.
[27] Nagatani, Yukiyoshi. Antihypertensive function of Katwo. Bushio ligopeptide and utilization of Katwo-Bushi oligopeptide in food[J]. **Food processing**, 1996, **31**(8): 50-52.
[28] Qian Zhong-Ji, Jung Won -Kyo,.Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, Crassostrea gigas against free radical induced DNA damage. **Bioresouce Technology**, 2008, **99**(9): 3 365-3 371.
[29] Je Jae-Young, Park Pyo-Jam. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate[J]. **Food Research International**, 2005, **38**(1): 45-50

[30] Kim Soo-Yong, Je Jae-Young. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion[J]. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2007, **18**(1): 31-38.

[31] Mendis Eresha, Rajapakse Niranjan. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects[J]. **Life Science**, 2005, **77**(17): 2 166-2 178.

[32] Wu Huichun, Chen Huaming, Shiau Chyuan-yuan.Free amino acids and peptides as related to ant ioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel(*Scomber austriasicus*)[J]. **Food Research International**, 2003, **36**(9): 949-957.

[33] 陈海英, 周颖斌, 王春波. 扇贝多肽对 UVB 辐射小鼠胸腺淋巴细胞 PI3K/Akt 和 ASK1-JNK 信号通路的影响[J]. 中国海洋药物, 2008, **27**(1): 13-17.

[34] 管华诗, 韩玉谦, 冯晓梅. 海洋活性多肽的研究进展[J].中国海洋大学学报, 2004, 5: 761-766.

[35] Liu Zun-ying, Zeng Ming-yong, Dong Shi-yuan, *et al*. Effect of an antifungal peptide from oyster enzymatic hydrolysates for control of gray mold (Botrytis cinerea) on harvested strawberries[J]. **Postharvest Biology & Technology**, 2007, **46**(1): 95-98.

[36] Mitta G, Hubert F, Noel T, *et al*. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*[J]. **European Journal of Biochemistry**, 2008, **265**(1): 71-78.

[37] 徐晓飞, 林炜铁, 冯杰龙. 生物活性肽在药物中的应用研究进展[J]. 氨基酸和生物资源, 2003, **25**(2): 66-69

(本文编辑: 康亦兼)

(上接第 **82** 页)

[17] Voget S, Leggewie C, Usebeck A, *et al*. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2003, **69**(10): 6 235-6 242.

[18] Brady S F, Chao C J, Clardy J. New natural product families from an environmental DNA (eDNA) gene cluster [J]. **J Am Chem Soc**, 2002, **124**(34): 9 968-9 969.

[19] MacNeil I A, Tiong C L, Minor C, *et al*. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries [J]. **J Mol Microbiol Biotechnol**, 2001, **3**(2): 301-308.

[20] Gillespie D E, Brady S F, Bettermann A D, *et al*. Isolation of antibiotics turbomycins A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2002, **68**(9): 4 301-4 306.

[21] 张鹏, 段承杰, 庞浩, 等. 堆肥未培养细菌的宏基因组文库构建及新的木聚糖酶基因的克隆和鉴定 [J]. 广西科学, 2005, **12**(4): 343-346, 352.

[22] 赵广存, 段承杰, 庞浩, 等. 牛瘤胃未培养细菌中一个 β－葡萄糖苷酶基因 *umbgl3A* 的克隆及鉴定 [J]. 西南农业大学学报, 2005, **18**(4): 472-476.

[23] Tyson G W, Chapman. J, Hugenholtz.P, *et al*. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment [J]. **Nature**, 2004, 428: 37-43.

[24] Galperin M Y. Metagenomics: From acid mine to shining sea [J]. **Environ Microbiol**, 2004, **6**(6): 543-545.

[25] Venter J C, Remington K, Heidelberg J F, *et al*. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea [J]. **Science**, 2004, **304**(5667): 66-74.

[26] Yooseph S, Sutton G, Rusch D B, *et al*. The *Sorcerer* II Global Ocean Sampling expedition: Expanding the universe of protein families [J]. **PLoS Biology**, 2007, **5**(3): 432-466.

[27] Tringe S G, von Mering C, Kobayashi A, *et al*. Comparative metagenomics of microbial communities [J]. **Science**, 2005, **308**(5721): 554-557.

[28] Sebat J L, Colwell F S, Crawford R L. Metagenomic profiling: Microarray analysis of an environmental genomic library [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2003, **69**(8): 4 927-4 934.

[29] 宫曼丽, 任南琪, 邢德峰. DGGE/TGGE 技术及其在微生物分子生态学中的应用 [J]. 微生物学报, 2004, **44**(6): 845-848.

[30] 邢德峰, 任南琪. 应用 DGGE 研究微生物群落时的常见问题分析 [J]. 微生物学报, 2006, **46**(2): 331-335.

(本文编辑: 张培新)