鱼鳞明胶 ACE 抑制肽的制备及其活性研究

胡松青，张婷婷，郭莎莎，胡娟，李琳
（华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）

摘要：利用 Alcalase 2.4L 酶解鱼鳞明胶制备具有血管紧张素转化酶（ACE）抑制活性的降血压肽，通过超滤处理富集得到具有较高活性的 ACE 抑制肽，并对该组分进行分子量分布、氨基酸组成分析及抗消化性研究。结果表明：水解明胶 6 h 所得水解物的 ACE 抑制活性最高，其 IC_{50} 为 0.56 mg/mL，水解度为 15.54%；超滤膜处理分离后，分子量小于 5 kDa 的多肽组分Ⅱ的 ACE 抑制活性最高，其回收率达 90%以上；多肽中对 ACE 抑制活性贡献大的脯氨酸、羟脯氨酸、色氨酸等疏水性氨基酸的保存率高；体外消化实验显示，该抑制肽在胃肠道消化酶作用下能保持较好的 ACE 抑制活性。

关键词：鱼鳞明胶；酶解；ACE 抑制活性；氨基酸组成；体外消化试验
文章篇号：1673-9078(2012)11-1491-1494

Preparation and Properties of ACE-inhibitory Peptides from Fish Scale Gelatin

HU Song-qing, ZHANG Ting-ting, HU Juan, GUO Sha-sha, LI Lin
(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Fish scales gelatin was hydrolyzed by Alcalase 2.4L protease and concentrated by ultrafiltration to gather the bioactive peptides. The inhibitory activity, molecular weight distribution, amino acid composition and the resistance of digestive proteases were determined. The results showed that the hydrolysate has the highest ACE-inhibitory activity with an IC_{50} of 0.56 mg/mL and a DH of 15.54% after a 6-hour- hydrolysis. Component Ⅱ (peptides <5 kDa) obtained after ultrafiltration showed the strongest inhibitory activity and a high recovery rate above 90%. The hydrophobic amino acids of alanine, tryptophan and proline which contribute the most for ACE-inhibitory activity were well reserved in component Ⅱ. Artificial gastrointestinal digestion test indicated that the bioactive peptides in fish scale were resistant to digestive proteases.

Keywords: fish scales gelatin; enzymatic hydrolysis; ACE-inhibitory activity; amino acid composition

高血压是危害人类健康的三大杀手之一，全世界约有 10 亿人患有高血压且每年因高血压死亡的人数高达 710 万[1]。因此，研究预防和治疗高血压成为了一个重要的课题。血管紧张素转换酶（ACE）在人体血压调节过程中具有重要的生理作用，抑制 ACE 的活性是治疗高血压的重要途径之一。通过酶解食物源蛋白制备 ACE 抑制肽不仅在生物体内表现出较强的降血压活性，而且还具有安全无毒副作用、易消化吸收等优点[2]。已有报道利用酪蛋白、乳清蛋白、大豆蛋白、花生蛋白等制备 ACE 抑制肽[3]。鱼鳞是鱼类深加工过程中的副产物，含有丰富的胶原蛋白，因深加工技术落后，主要用作饲料，附加值低。有研究表明可将鱼鳞酶解制备具有一定生物活性的多肽[4]。目前关于酶解鱼鳞胶原蛋白制备降血压肽的研究很少，本文以鱼鳞明胶为原料，酶解和超滤分离相结合制备了具有含 ACE 抑制活性的产物，对提高水产加工废弃物的附加值提供了一条新途径。

收稿日期：2012-07-01
基金项目：新世纪优秀人才支持计划资助（NCET-10-0362），中央高校基本科研业务费专项资金资助（2012ZG0007）
作者简介：胡松青（1972-），男，教授，主要研究蛋白质的分离纯化、结构功能与应用
通讯作者：李琳，男，教授，博士生导师

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鱼鳞明胶（粗蛋白含量 90.15%），上海海青水产生物科技有限公司；Alcalase 2.4L，丹麦 Novo 公司；血管紧张素转化酶（ACE）、马尿酰组胺酰亮氨酸（HHL），Sigma 公司；马尿酸、细胞色素 C、抑肽酶、杆菌肽，上海楷洋生物技术有限公司；胃蛋白酶（酶活力 1:10000）、胰蛋白酶（酶活力 1:250），北京拜尔迪生物公司；其它试剂为国产色谱纯或分析纯。

1.2 主要仪器

PB-10 型 pH 计，赛多利斯科学仪器（北京）有限公司；602 型超级恒温水浴锅，江苏省金坛市医疗仪器厂；KjeltecTM 2300 型自动定氮仪，瑞典 FOSS 公司；KR25i 型高速冷冻离心机，法国 Jouan 公司；VirTis 冷冻干燥机，美国 SP Industries；UV-2102PC 型紫外分光光度计，尤尼柯（上海）仪器公司；MILLIPORE LabscaleTM 超滤系统，美国 Millipore 公司；高效液相色谱仪，法国 Gilson 公司；Eclipse Plus C_{18} 色谱柱，美国 Agilent 公司；TSK-GEL G2000SW_{XL} 凝胶色谱柱，日本 TOSOH 株式会社。

1.3 实验方法

1.3.1 明胶来源 ACE 抑制多肽的制备

以明胶为原料，采用商业化的蛋白酶 Alcalase 2.4L 按文献[5]的优化条件水解，将水解 6 h 的水解产物分离、浓缩后冷冻干燥，并将该冻干粉溶于 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液（含 0.3 mol/L NaCl，pH 8.3）配制成 10 mg 蛋白/mL 的多肽溶液，即为明胶来源 ACE 抑制多肽组分 I。

1.3.2 水解度（DH）的测定

采用甲醛滴定法，参考文献[5]。

1.3.3 ACE 抑制活性体外检测方法

以 HHL 为底物，参照 Cushman[6]和 Wang[7]等人的方法并进行适当改进，具体测定和抑制活性 IA 的计算方法见文献[8]。

1.3.4 水解物的超滤分离

用截留分子量（MWCO）为 10 kDa、5 kDa 的超滤膜依次分离水解产物，收集三种多肽组分，一种是透过 MWCO 5 kDa 膜的组分 II，一种是透过 MWCO 10 kDa 膜而被 MWCO 5 kDa 膜截留的组分 III，一种是被 MWCO 10 kDa 膜截留的组分 IV，采用双缩脲法[9]测定各组分中多肽含量，计算各组分占水解产物的百分比，并在相同浓度下测定其 ACE 抑制活性。

1.3.5 分子量分布测定

采用高效凝胶过滤色谱法分析多肽组分 II 中多肽分子量。取适量冻干粉样品溶于流动相中，配成 1 mg/mL 的样品溶液供进样分析。色谱条件：色谱柱为 TSK-GEL G2000SW_{XL}（300 mm×7.8 mm）体积排阻色谱柱；流动相为 0.1 mol/L P.B.+0.1 mol/L Na_2SO_4+0.05% NaN_3 (pH 6.7)；紫外检测器的波长设为 280 nm；流速 0.5 mL/min；柱温 25 ℃；进样体积为 20 μL。分子质量校正曲线所用标准品：细胞色素 C（Mw 12500 Da）、抑肽酶（Mw 6511 Da）、杆菌肽（Mw 1423 Da）、马尿酰-组胺酰-亮氨酸（429 Da）。数据处理及校正曲线的绘制由 Waters Breeze GPC 软件自动进行。

1.3.6 氨基酸组成分析

取适量样品，加入一定体积含 1%苯酚的 6 mol/L HCl 溶液，110 ℃水解 24 h 后，经异硫氰酸苯衍生，用高效液相色谱仪和 PICO.TAG 氨基酸分析柱测定除色氨酸外的氨基酸含量[10]。测定色氨酸则样品加入 4.2 mol/mL NaOH，110 ℃水解 24 h，经异硫氰酸苯衍生处理后进样分析。

1.3.7 ACE 抑制肽的体外消化实验

参照 Ali Bougatef 的方法[11]，进行组分 II 体外消化实验。

1.3.8 统计分析

采用 OriginPro 7.5 软件对数据进行统计分析，两组间的数据比较采用 T-检验。数据以平均数±S.D.表示，$P<0.05$ 表示差异有显著意义，$P<0.01$ 表示差异有极显著意义。

2 结果与讨论

2.1 水解度与 ACE 抑制活性的关系

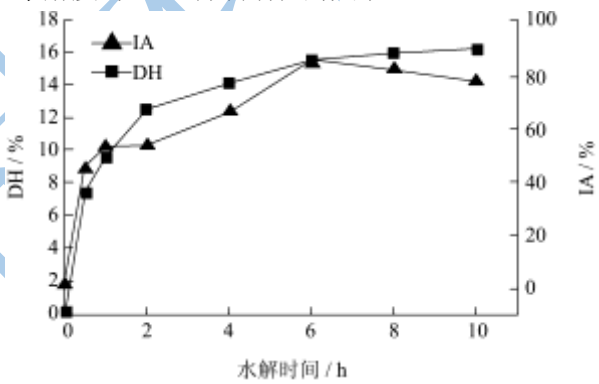


图 1 水解时间对水解度和 ACE 抑制活性的影响

Fig.1 Relationship between DH and ACE-inhibitory activity

采用 Alcalase 2.4L 在最适条件（54.5 ℃，pH 7.7，底物浓度 1.8%（*m/V*），酶用量 1%（*m/m*））下水解明胶不同时间，水解产物的 ACE 抑制活性（IA）如图 1 所示。未水解的明胶原料蛋白基本没有 ACE 抑制活性；在水解最初的 1 h 内，DH 迅速升高，同时产物的 ACE 抑制活性也迅速上升，说明在此阶段有大量 ACE 抑制肽产生。在 1~6 h 内，随着水解时间的增加，DH 上升，ACE 抑制活性也逐渐增大，在水解 6 h，ACE 抑制活性达到最大（84.3%），经线性回归水解产物浓度与 ACE 抑制活性的关系，得其半抑制浓度 IC_{50} 为 0.56 mg/mL，由此可知，在一定范围内，水解度与 ACE 抑制活性存在一定的对应关系，高水解度有利于 ACE 抑制活性的释放。水解超过 6 h 后，随着水解时间的进一步延长，DH 增加缓慢，这是因为 Alcalase 蛋白酶对肽键羧基端为疏水性氨基酸的作用有特异性，当 DH 达到一定程度时，酶对其专一肽键的水解基本完

全，而且，酶活性可能被降低。在这一阶段，水解物的 ACE 抑制活性反而随 DH 的增而下降，可能是因为活性肽被进一步水解为活性低或无活性的肽片段和游离氨基酸，导致水解物活性的降低[12]。

2.2 超滤分离多肽组分的 ACE 抑制活性和分子量分布

表 1 不同超滤组分的 ACE 抑制活性及多肽回收率

Table 1 ACE inhibitory activity and recovery yields of hydrolysates and three ultrafiltrated products

组分	分子量范围/kDa	抑制率/%	多肽回收率/%
I	原液	84.29±1.34[a]	100
II	＜5	89.86±3.05[a]	90.57
III	5~10	71.64±1.87[b]	6.81
IV	＞10	20.46±0.83[c]	2.62

注：同列肩标字母相同，表示差异不显著（P＞0.01）。

鱼鳞明胶 6 h 水解液依次经两步超滤后得到三种多肽组分，其中组分 II(透过 MWCO 5 kDa 膜的多肽组分)的回收率最高，其 ACE 抑制活性也最高（见表 1）。多肽组分 II 的 GPC 图如图 2 所示，虽然在所选色谱条件下各组分没能完全分开，但是，图中出现了三个主要组分峰，其分子量分别对应 5803、2972、703 Da，因此，多肽组分 II 中多肽的分子量分布大部分小于 5 kDa，这与超滤实验结果一致。

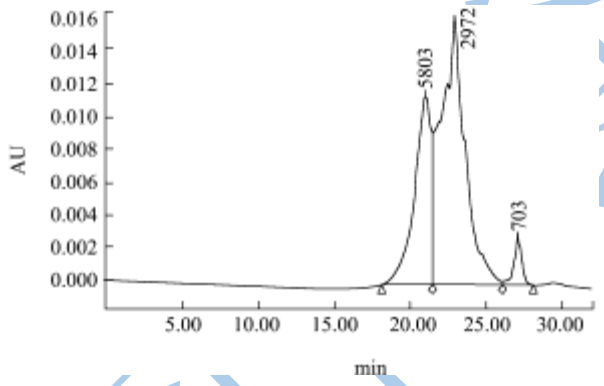


图 2 6h 水解物超滤后(截留分子量 5KDa)的分子量分布图

Fig.2 Molecular weight distribution of component Ⅱ

2.3 氨基酸组成分析

当 ACE 抑制肽 C 端的三肽片段含有疏水氨基酸（芳香族氨基酸或支链氨基酸，尤其是 Pro）时更易于与 ACE 结合，其抑制活性一般较强[13]。从蛇毒液中分离提取的 ACE 抑制肽含有许多 Pro，C 端为 Pro 的抑制肽活性最高[14]。Alcalase 蛋白酶倾向于催化裂解蛋白质中 C-端为大侧链的疏水性氨基酸形成的肽键，而且当 N-端也为疏水性氨基酸时水解更快，从而形成以疏水性氨基酸为末端的肽。由表 2 可知，与原料蛋白相比，多肽组分 II 中 Ala、Trp、Pro 等疏水性氨基酸的含量有明显提高，因此，推测此鱼鳞明胶水解物的 ACE 抑制活性主要是来源于末端含 Ala、Trp、Pro、Hyp 的寡肽。当然，除氨基酸组成本身外，多肽的氨基酸序列也是影响 ACE 抑制肽活性的重要因素。

表 2 原料蛋白及多肽组分 II 氨基酸分析

Table 2 Amino acid compositions of component Ⅱ (MWCO <5 kDa) and scale collagen without hydrolyzing

氨基酸	氨基酸含量/%		氨基酸	氨基酸含量/%	
	原料蛋白	超滤组分 II		原料蛋白	超滤组分 II
Asx	4.00	3.79	Val	2.02	1.76
Glx	9.38	10.19	Met	1.96	1.40
Ser	3.32	2.36	Cys	0.20	0.12
Gly	16.18	16.28	Ile	1.24	0.91
His	2.39	2.22	Leu	2.47	2.24
Arg	8.10	8.62	Trp	11.42	12.50
Thr	2.22	2.08	Phe	2.20	1.18
Ala	8.12	8.66	Lys	3.53	3.16
Pro	9.27	10.33	Hyp	11.24	12.50
Tyr	0.72	0.62	疏水性 AA[a]	39.43	39.59

注：Asx 包括 Asp 和 Asn；Glx 包括 Glu 和 Gln；[a]包括 Ala、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Tyr、Trp 和 Val。

2.4 消化酶对 ACE 抑制活性的影响

用胃蛋白酶、胰蛋白酶进行消化处理，测定消化酶处理前以及处理后的 ACE 抑制活性，根据 ACE 抑制率的变化来评价消化酶对 ACE 抑制活性的影响，结果见表 3，为考察鱼鳞明胶 ACE 抑制肽对胃肠道消化酶的抵抗作用以及新的 ACE 抑制肽产生的可能性。

表 3 消化酶处理对 ACE 抑制活性的影响

Table 3 ACE-inhibitory activity of component Ⅱ treated by digestive enzyme

处理方式	未处理	胃蛋白酶	胰蛋白酶	胃蛋白酶→胰蛋白酶
ACE 抑制率%	84.29±1.34[a]	85.47±0.72[a]	80.33±1.56[b]	81.68±0.85[b]

注：与未加消化酶相比，同行肩标字母相同，表示数据差异不显著（P＞0.05）。

在模拟消化道环境的条件考察了多肽组分 II 经消化酶处理后的 ACE 抑制活性的变化，如表 3 所示。经过胃蛋白酶的消化处理后，多肽组分 II 的 ACE 抑制活性没有显著变化。经过胰蛋白酶以及胃蛋白酶和胰蛋白酶的组合处理后，多肽组分 II 的 ACE 抑制活性有所降低，但降低幅度很小，这可能是因为某些 ACE 抑制肽不能抵抗消化酶的水解，从而被水解为活性低或无活性的片段和游离氨基酸[15]。总体上看，多肽组分 II 经过消化酶处理后仍然具有较高的 ACE 抑制活性，说明具有明显 ACE 抑制作用的多肽组分 II

对胃肠道消化酶具有较强的抗性，口服这种活性肽有可能在人体发挥好的降血压作用。

3 结论

3.1 在蛋白酶 Alcalase 2.4L 的最佳作用条件下，水解罗非鱼鱼鳞明胶 6 h 所得酶解产物的 ACE 抑制活性最高，水解产物透过 MWCO 5kDa 膜后的多肽组分具有较好的 ACE 抑制活性。

3.2 活性较高的多肽组分中大部分物质的分子量小于 5 kDa，相对原料鱼鳞明胶，该多肽组分含有更多的对 ACE 抑制活性贡献大的 Ala、Trp、Hyp 和 Pro。而且，该多肽组分在胃肠道消化酶处理后能保持较好的 ACE 抑制活性。

参考文献

[1] 刘建华,郑燕,田颖刚,等.泰和乌骨鸡肉模拟胃肠道消化液中 ACE 抑制肽的分离纯化及结构鉴定[J].南昌大学学报（理科版）,2011,35(2): 163-168

[2] Ni H, Li L, Guo SS. Isolation and identification of an angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from yeast [J]. Current Analytical Chemistry, 2012, 8(1): 180-185

[3] 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

[4] 曾少葵,蓝海明,章超桦,等.罗非鱼鳞胶原蛋白的提取及其酶解产物的抗氧化性[J].上海海洋大学学报,2009,18(5): 599-603

[5] 胡娟,李琳,胡松青.鱼鳞明胶酶解制备超氧阴离子清除活性肽的研究[J].食品工业科技, 2012,31(4):293-295

[6] Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric Assay and Properties of the Angiotensin Converting Enzyme of Rabbit Lung [J]. Biochem Pharmol, 1971, 20: 1637-1648

[7] Wang JP, Hu JN, Cui JZ, et al. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats [J]. Food Chemistry, 2008, 111:302-308

[8] Ni H, Li L, Liu G, and Hu SQ. Inhibition Mechanism And Model Of An Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-inhibitory hexapeptide from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) [J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e37077

[9] 余冰宾.生物化学实验指导[M].北京:清华大学出版社,2004

[10] Jimsheena VK, Gowda LR. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion. Food Chemistry, 2011, 125: 561-569

[11] Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Ravallec-Ple R, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases [J]. Food Chemistry, 2008, 111:350-356

[12] 吴晖,罗美琪,唐语谦,等.酶解丝素蛋白制备 ACE 抑制肽的研究[J].现代食品科技,2011,27(12):1461-1465

[13] Lopez-Fandino R, Otte J, van Camp J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity [J]. International Dairy Journal, 2006, 16(11): 1277-1293

[14] Chi CW, Wang SZ, Xu LG, et al. Structure-function studies on the bradykinin potentiating peptide from Chinese snake venom [J]. Peptides, 1985, 6(3):339-342

[15] 杨锋,马千里,黄永春.醋蛋中 ACE 抑制肽的分离及稳定性研究[J].食品科学,2009,30(24):77-79