猪皮胶原 ACE 抑制肽的纯化与鉴定

张莹[1]，王宏艳[2]，马良[1]，黄丹丹[1]，刘轶[1]，张宇昊[1]
（1.西南大学食品科学学院，重庆 400715）（2.河北金融学院基础教育部，河北保定 071051）

摘要：采用超声协同稀碱对猪皮实施预处理后，酶解 30 min 制得的高血管紧张素转化酶（Angiotensin converting enzyme，ACE）抑制活性水解液为原料，采用 Sephadex G-15、半制备高效液相色谱分离纯化其中胶原 ACE 抑制肽并对其序列进行鉴定。结果表明，Sephadex G-15 分离胶原 ACE 抑制肽的最佳分离条件为：样品浓度 100 mg/mL；上样量 2 mL；流速 2 mL/min；洗脱剂为蒸馏水；层析柱为 1 m×10 mm 的层析柱。在该分离条件下，混合肽被分成 AP-I、AP-II 两个组分，IC_{50} 值分别为 19.50、1.01 mg/mL。对抑制活性较强的 AP-II 进一步采用半制备高效液相色谱进行分离，得到 8 个组分峰，其中峰 2、峰 5 和峰 6 的 IC_{50} 值最小，分别为 0.73、0.44 和 0.4 mg/mL。结合 IC_{50} 值的大小及半制备收集到样品的量，对峰 2 和峰 6 采用 LC-MS/MS 进行序列分析。结果显示峰 2 的多肽序列为 QGP**P**GPAGPR（P 为 Hyp），峰 6 的序列为 AGP**P**GP**P**GPA，这两个序列位于胶原蛋白 α1 链中 526~535、730~739 位。

关键词：胶原蛋白；ACE 抑制肽；分离纯化；结构鉴定
文章篇号：1673-9078(2016)8-115-122 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.018

Purification and Identification of ACE Inhibitory Peptides from Porcine Skin Collagen

ZHANG Ying[1], WANG Hong-yan[2], MA Liang[1], HUANG Dan-dan[1], LIU Yi[1], ZHANG Yu-hao[1]
(1.College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)
(2. Hebei Finance University, Baoding 071051, China)

Abstract: After being pretreated by ultrasound combined with dilute alkali, porcine skin underwent enzymatic hydrolysis for 30 min to produce hydrolysate with ACE inhibitory activity. This hydrolysate was used as raw material, and the collagen ACE inhibitory peptides were separated and purified using Sephadex G-15 semi-preparative high performance liquid chromatography. The results showed that the optimum separation conditions were as follows: sample concentration of 100 mg / mL; injection volume of 2 mL; flow rate of 2 mL / min; distilled water as the eluent; and a 1 m × 10 mm chromatography column. Under these separation conditions, the mixed peptides were divided into two fractions, AP-I and AP-II. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values were 19.50 mg/mL and 1.01 mg/mL, for AP-I and AP-II, respectively. Fraction AP-II, with relatively strong ACE inhibitory activity, was further separated by semi-preparative high performance liquid chromatography, and eight peaks were obtained. The IC_{50} values of peaks two, five, and six were the lowest (0.44 mg / mL, 0.4 mg / mL, and 0.73 mg / mL, respectively). Based on the IC_{50} value and the weight of the samples collected from semi-preparative high performance liquid chromatographic separation, liquid chromatography tandem mass spectrometry sequence analysis was conducted for peaks two and six. The results showed that the peptide sequences of peaks two and six were QGP**P**GPAGPR and AGP**P**GP**P**GPA, respectively. Additionally, these sequences occupied amino acid positions 526-535 and 730-739 of the collagen α1 chain, respectively.

Key words: collagen; angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptide; isolation and purification; structural characterization

收稿日期：2016-01-04
基金项目：国家自然科学基金项目（31301425）；中央高校基本科研业务费重大项目（XDJK2015A015）；中央高校基本科研业务费团队项目（2362014xk11）中国博士后科学基金面上项目（2014M562267）；中国博士后科学基金特别资助项目（2015T80951）；第四批重庆市高等学校优秀人才支持计划，西南大学食品科学学院“百超”创新项目
作者简介：张莹(1995-)，女，本科，研究方向：食品科学与工程专业
通讯作者：张宇昊（1978-），男，博士，教授，研究方向：蛋白和生物活性肽研究

很多食源性多肽具有显著的抑制血管紧张素转换酶（Angiotensin converting enzyme，ACE）抑制和潜在降血压作用，与普通降压药物比较无毒副作用，且对正常的血压无影响[1]。研究表明[2~3]，多数 ACE 抑制肽 C 末端含有脯氨酸(Pro)当 Pro 位于多肽 C 末端三位中任一位置时，多肽均具有降血压活性。此外，ACE 抑制肽代谢研究显示 Pro 可抵制肠道消化酶对 ACE 抑制肽的降解作用，提高其在肠道中的稳定性，在体内起到更好的降压效果[4]。羟脯氨酸(Hyp)是 Pro 羟基化

衍生的氨基酸，对于多肽降血压活性同样具有积极意义，尤其是氨基酸长度大于 3 的多肽，Hyp 更利于其同 ACE 催化位点结合[5]。此外，亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)以及疏水氨基酸在 ACE 抑制肽 C 端时其 ACE 抑制活性也较高[6~9]。胶原蛋白是 Pro 和 Hyp 含量最多的蛋白，总含量约为 25%。此外，Arg、Lys 总含量接近 8%，疏水性氨基酸含量可达 30%以上[10]。因此，从构效角度分析，胶原蛋白中可能蕴含着丰富的 ACE 抑制活性肽段。

胶原蛋白具有特殊的三螺旋结构，每个胶原蛋白分子均由 3 条 α-肽链组成，3 条 α-肽链以右螺旋形式缠绕成三股螺旋结构[11]。螺旋区胶原蛋白链具有明显的三肽周期结构，每个三肽序列中必有 1 个氨基酸需经过三螺旋中央区，而此处空间狭窄，只有侧链基团最小的 Gly 适合于此位置[12]。因此，胶原蛋白的氨基酸呈现(G-X-Y)n 周期性排列，Gly 为三肽的固定组成，其含量几乎占 1/3，且 X 往往是 Pro，Y 更多是 Hyp[13]。但由于三螺旋区异常稳定[14~15]，不宜被大部分商业蛋白酶酶解而造成核心区活性肽段不宜释放。目前所报道的大部分胶原多肽都需要长时间预处理。胶原前处理方法主要是通过热处理、酸液、碱液处理的方式提取胶原蛋白或明胶，然而这些前处理过程繁琐、耗时长，如鱿鱼皮[16]、鳕鱼皮[17]提取明胶的时间分别长达 24、30 h。另一方面，将胶原水解为明胶的过程，链中潜在的 ACE 抑制肽序列可能被降解。因此寻求诸如热处理、超声处理、超高压处理等高效、简单易行的前处理方式提高酶解效率是该领域研究方向之一[18]。

基于此，本课题组发现采用超声协同稀碱对胶原蛋白的短时预处理，可促进胶原 ACE 抑制肽段快速释放[19]，这可能是因为超声协同稀碱预处理破坏了胶原蛋白的三螺旋结构，使之内部活性位点暴露所致。本文拟在此基础上，对其中的胶原 ACE 抑制肽进行分离纯化以及序列分析，旨在确定所得肽段的序列和位置，为超声协同稀碱预处理是否可以暴露胶原蛋白三螺旋区活性位点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜猪皮（购于重庆永辉超市北碚区天生丽街店）；碱性蛋白酶（诺维信公司）；ACE 作用底物（ABZ-Gly-Phe(NO_2)-Pro）(Bachem 公司)、葡聚糖凝胶 Sephadex G-15、ACE 购自 Sigma 公司，甲酸（迪马科技有限公司）、乙腈、三氟乙酸为色谱纯，其他试剂为国产化学纯。

1.2 仪器及设备

FYL-C022 料理机（九阳股份有限公司）；FD-1-50 真空冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司）；JA3003B 电子天平（上海精天电子仪器有限公司）；PHS-25 型数显酸度计（杭州雷磁分析仪器厂）；SHZ-B 水浴恒温振荡器、CJ-78-1 磁力搅拌器（上海将任实验设备有限公司）；5810 型台式高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；LCD 超声波细胞粉碎机（宁波新芝生物科技股份有限公司）；QL 901 Vortex 旋涡混合器（海门市其林贝尔仪器制造有限公司）；0.5 m×26 mm、1 m×10 mm 层析柱（上海琪特分析仪器有限公司）；BT1-100E 恒流泵（上海琪特分析仪器有限公司）；BSZ-100-LCD 自动部分收集器（上海琪特分析仪器有限公司）；HD-21-88 核酸蛋白检测仪（上海琪特分析仪器有限公司）；5804R 台式离心机（德国 Eppendorf 公司）；LC-20A 高效液相色谱（日本岛津公司）；日立 LC-2000 半制备液相色谱（日立高新技术公司）；Q Exactive 质谱仪（Thermo scientific 公司）；Ultimate 3000 纳升液相色谱（Dionex 公司）；Acclaim PePmap 100 Trap 柱（Thermo scientific 公司）；Agela 自制喷针一体分析柱（艾杰尔 Agela Technologies 公司）。

1.3 方法

1.3.1 猪皮胶原蛋白酶解液的制备

新鲜猪皮洗净刮去表层脂肪，切成约 1 mm×3 mm×5 mm 的小块，混匀，采用超声乳化法脱脂后去除杂蛋白[20]，得到脱脂除杂后的猪皮。称取一定量的脱脂除杂后的猪皮，加入一定量浓度为 2%的 NaOH 溶液进行超声预处理，超声条件为功率 45%（总功率 650 W），频率 25 kHz、超声 1 s 间隔 3 s，共超声 40 min。超声协同碱处理完毕后，调节 pH 值至 8.0，再加入 0.2 M 磷酸盐缓冲液（pH=8.0），确保溶液总体积为 50 mL。样品于 55 ℃预孵 10 min 后，加入 40 U/g（猪皮）诺维信碱性蛋白酶（酶活 4000 U/mL），在恒温摇床上（控制温度为 55 ℃）进行酶解，酶解过程中不断振荡，酶解 30 min 后，立即将样品在沸水中浴热 15 min 进行灭酶处理，冷却至室温后于 6000 r/min 离心 15 min，取上清液冷冻干燥备用，即得猪皮胶原蛋白酶解液。

1.3.2 Sephadex G-15 分离纯化 ACE 抑制肽

1.3.2.1 凝胶的溶胀

称取 60 g Sephadex G-15 凝胶颗粒于大烧杯中，加入 5~10 倍量去离子水，轻轻搅拌均匀，于室温下浸泡过夜，充分溶胀后对凝胶进行反复漂洗，倾斜法

除去表面悬浮的小颗粒，反复 2~3 次。

1.3.2.2 装柱

装柱前将凝胶调成稀薄的凝胶溶液于室温下超声处理 5 min 以排除凝胶空隙中的空气。将层析柱垂直固定，下端连接硅胶管并用弹簧夹夹住，向层析柱中加入适量蒸馏水，由下端排出部分水（至少剩余 1 cm 以上的水层）后再用弹簧夹夹住，凝胶悬液沿玻璃棒小心地徐徐灌入柱中（凝胶悬液尽量一次加完，避免出现分层的凝胶带），待底部凝胶沉积 1~2 cm 时，打开出口。

1.3.2.3 柱平衡

恒流泵与层析柱相连接，用 3~5 倍柱床体积的洗脱液洗脱柱子，柱床稳定后调整流速至试验所用流速。

1.3.2.4 加样

将层析柱上端打开，用移液管吸出洗脱液至与凝胶床面相切，取超声协同碱处理酶解 30 min 后的样品冻干粉配制成 100 mg/mL 的溶液，上样 1 mL，沿管壁将样品溶液加到凝胶床面上，应避免凝胶床面被冲起。待样品于床面基本相切时，分别用蒸馏水、0.05 mol/L pH 8.3 的 Tris-HCl 缓冲溶液进行洗脱，洗脱速度为 1.0 mL/min，加入少量洗脱液，按照上方法洗 1~2 次，加入适量洗脱液并拧上柱上端塞子。

1.3.2.5 洗脱

用洗脱液进行洗脱，于 220 nm 检测吸光度，每 5 min 收集一管。

凝胶过滤层析受多种因素影响，本试验研究了柱子长度、洗脱液种类及流速对分离效果的影响。确定最佳分离条件后，按最佳条件收集每个洗脱峰，冷冻干燥以备用。

1.3.3 ACE 抑制活性的测定

参照 Sentandreu 等的方法，略有改动[21~22]。取 50 μL 酶解液于 96 孔黑色微量滴定板反应孔中，加入 6 mU/mL ACE 溶液 50 μL 后，将微量酶标板置于荧光酶标仪中，振板 10 s，于 37 ℃下反应 10 min，之后再向微量滴定板每个反应孔中加入 200 μL 0.45 mM ACE 底物反应液（ABZ-Gly-Phe(NO_2)-Pro），于 37 ℃开始动力学测定，在 1 h 内每隔 1 min 测量一次荧光值，其中荧光激发波长、吸收波长分别为 360 nm、415 nm。所有样品均需重复 3 次。

$$\text{ACE抑制率}(\%)=[100-100\times(\alpha_{样品}-\alpha_{阴性对照})/(\alpha_{阳性对照组}-\alpha_{空白对照组})]\times100\%$$

注：α 表示荧光吸收值与测定时间回归曲线的斜率。其中，阳性对照组用 pH 8.3 Tris 缓冲液代替酶解液，阴性对照组、空白对照组用 Tris 缓冲液替代 ACE 溶液。

1.3.4 RP-HPLC 分离纯化 ACE 抑制肽

分析型色谱条件：ZORBAX SB-C18（4.6 mm×250 mm）色谱柱、流速 1 mL/min；样品浓度 10 mg/mL；进样量 10 μL；柱温 25 ℃；检测波长 220 nm，采用 10%乙腈（含 0.05% TFA）等度洗脱 40 min。

在上述分离方式的基础上，按照公式“放大倍数=（制备柱内径/分析柱内径）^{2}×（制备柱柱长/分析柱柱长）”进行放大，其中样品浓度、流动相比例不改变，进样量、流速按比例放大。试验所选用的半制备色谱柱为 ZORBAX 300 SB-C18(9.4 mm×250 mm)，计算得到的放大倍数为 4.35。故采用半制备 RP-HPLC 进一步分离 ACE 抑制肽，选用色谱柱为 ZORBAX 300 SB-C_{18}(9.4 mm×250 mm)，色谱条件为：流速 4.35 mL/min；检测波长 220 nm；样品浓度 10 mg/mL；进样量 43.5 μL；柱温 30 ℃；洗脱条件：10%乙腈（含 0.01%TFA）重复进样，合并每次洗脱时间相同为位置的组分峰，冷冻干燥备用。

1.3.5 LC-MS/MS 鉴定胶原 ACE 抑制肽序列

1.3.5.1 液相色谱条件

分析柱为 Agela 公司自制喷针一体柱，填料为：Venusil×BPC，C18(L)，5 μm，150 A；流动相 A 为超纯水（含 0.1% FA）、流动相 B 为乙腈（含 0.1% FA），洗脱时间 0~6 min，5~8% B；6~40 min，8~30% B；40~45 min，30~60% B；45~48 min，60~80% B；48~56 min，80~80% B；56~58 min，80~5% B；58~65 min，5~5% B；流速为 0.4 μL/min；进样量 20 μL。

1.3.5.2 质谱条件

纯化得到的 ACE 抑制肽采用 Q Exactive 质谱仪进行测序，所有测定均在正离子方式下进行，采用注射泵直接进样，流速为 0.4 μL/min，质谱分析参数如下表所示：

表 1 质谱分析参数设定

Table 1 Parameters of LC-MS/MS

参数名称	参数值
离子模式	正离子模式
一级扫描范围	350~2000 u
一级扫描分辨率	70000
二级扫描范围	依赖于一级母离子质荷比自动选择
二级碰撞能量(NCEs)	28%
二级分辨率	17500
毛细管温度	360 度
离子源电压	1800 V
碎裂模式	HCD

注：数据采集软件为布鲁克 flex Analysis 3.3；数据搜索软

件为 Mascot，LC-MS/MS 所使用的 Mascot 版本是 2.3.01。

1.3.6 数据统计分析

每次试验设置三个平行实验，获得数据计算平均值和标准偏差，并用统计软件 SPSS 17.0 进行显著性分析（Tukey；p<0.05），用 Microsoft excel 2010 作图。

2 结果与分析

2.1 Sephadex G-15 分离纯化 ACE 抑制肽

2.1.1 洗脱剂对 SephadexG-15 分离效果的影响

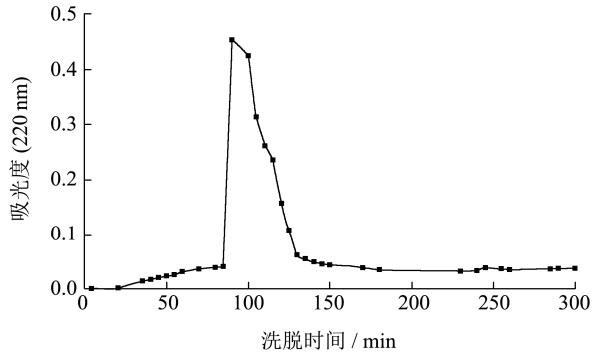


图 1 洗脱剂为 0.05 mol/L Tris-HCl（pH=8.3）的洗脱曲线

Fig.1 Elution profile with 0.05 mol/L Tris-HCl as the eluent (pH = 8.3)

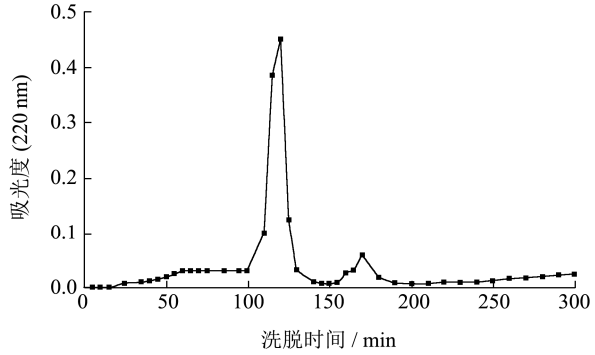


图 2 洗脱剂为蒸馏水的洗脱曲线

Fig.2 Elution profile with distilled water as the eluent

由图 1、2 可知，以 pH 8.3 的 Tris-HCl 缓冲溶液作为洗脱液仅出现一个洗脱峰，而采用蒸馏水进行洗脱可出现两个峰，Tris-HCl 缓冲溶液分离效果不及蒸馏水，可能是因为 Tris-HCl 中过高的离子强度使 ACE 抑制肽与凝胶间形成较强的疏水作用，不利于层析分离[23]，而蒸馏水离子强度低，且可促进水解物中水溶性肽的溶解[24]，故用蒸馏水作为洗脱剂分离效果较好，后续分离洗脱液均采用蒸馏水。

2.1.2 柱长对 SephadexG-15 分离效果的影响

取超声协同碱处理酶解 30 min 后的样品冻干粉配制成 100 mg/mL 的溶液，上样 1 mL，分别采用 0.5 m×26 mm、1 m×10 mm 的层析柱，用蒸馏水以 2.0 mL/min 的速度进行洗脱，每 5 min 收集一管，于 220 nm 处测定吸光度。

从图 4 可知，1 m 长的层析柱组分间分离程度好，洗脱峰更尖锐，分离效果明显优于 0.5 m 柱子，故后期分离纯化均选用 1 m 长的层析柱。

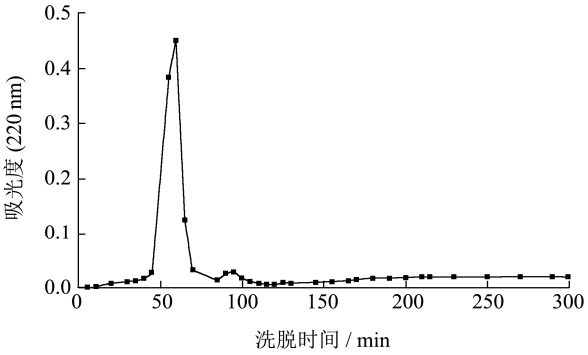


图 3 0.5 m×26 mm 层析柱的洗脱曲线

Fig.3 Elution profile with a 0.5 m × 26 mm chromatographic column

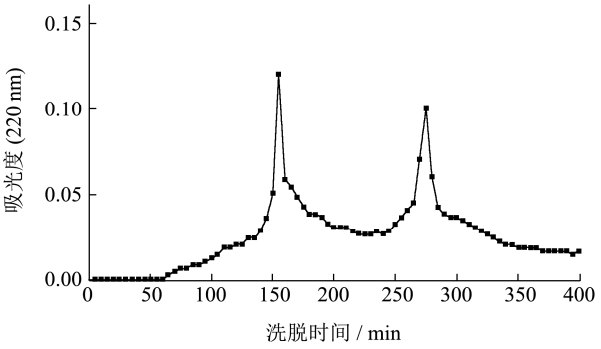


图 4 1 m×10 mm 层析柱的洗脱曲线

Fig.4 Elution profile with a 1 m × 10 mm chromatographic column

2.1.3 流速对 Sephadex G-15 分离效果的影响

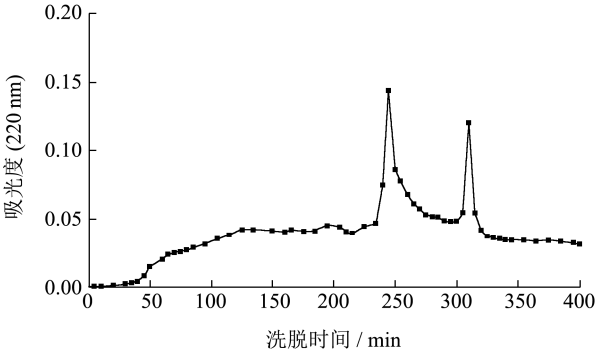


图 5 流速为 0.5 mL/min 的洗脱曲线

Fig.5 Elution profile with a flow rate of 0.5 mL / min

固定上样量 1 mL、样品浓度为 0.1 g/mL、洗脱液为水、采用 1 m×10 mm 层析柱的情况下，研究流速 2.0 mL/min、0.5 mL/min 对 Sephadex G-15 分离效果的

影响，如图 5 和图 6 所示。

从图中可看出，洗脱液流速对凝胶分离效果有较明显的影响，流速较低，各峰出峰时间后移，且分离效果不及 2 mL/min 的流速，为提高分离效率，最佳洗脱速度为 2 mL/min。

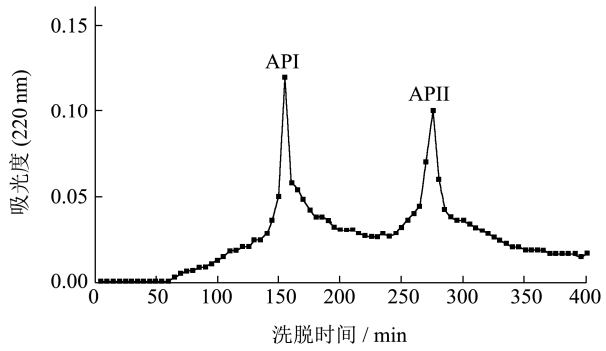


图 6 流速为 2 mL/min 的洗脱曲线

Fig.6 Elution profile at a flow rate of 2 mL / min

综合所述，SephadexG-15 分离胶原 ACE 抑制肽时，最佳分离条件为：样品浓度 100 mg/mL；上样量：2 mL；流速：2 mL/min；洗脱剂：蒸馏水；层析柱：1 m×10 mm 的层析柱。在该分离条件下，混合肽被分成 2 个组分，如图 6 所示，分别记为 AP-I、AP-II。

表 2 SephadexG-15 分离组分的 IC_{50} 值

Table 2 IC_{50} values of the components separated by Sephadex G-15

样品	IC_{50}/(mg/mL)
原样	7.46
AP-I	19.50
AP-II	1.01

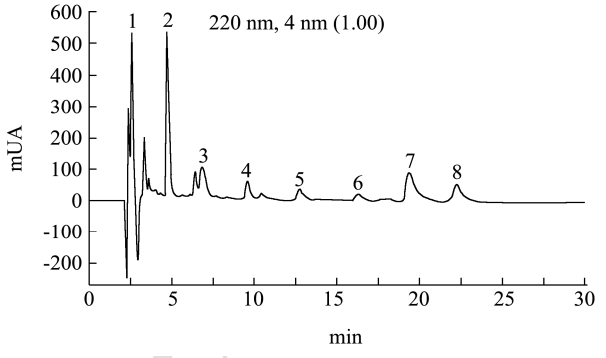


图 7 半制备液相色谱分离纯化 AP-II 图谱

Fig.7 Chromatogram of AP-II separated by semi-preparative RP-HPLC (220 nm)

测定其 IC_{50} 值，如表 2 所示。具有 ACE 抑制活性的组分主要集中在 AP-II 中，其 IC_{50} 值较原样（未经凝胶层析分离）显著降低，ACE 抑制活性增强，而 AP-I 组分抑制活性显著低于原样。根据凝胶层析的分离机制可知采用 SephadexG-15 进行凝胶层析应是分子量 1500 u 以上的组分先流出，则峰 AP-I 主要是 1500 u 以下的组分，而 ACE 抑制肽多由 2~12 个氨基酸残基组成，分子质量小于 1500 u[25,26]，故峰 AP-II 中目标 ACE 抑制肽含量更多，进而其 ACE 抑制率较强。IC_{50} 数据同时说明凝胶层析过滤起到了良好的分离效果，后期将 AP-II 组分进一步进行了分离纯化。

2.2 半制备 RP-HPLC 分离胶原 ACE 肽及各组分 IC_{50} 值

2.2.1 半制备 RP-HPLC 分离胶原 ACE 肽

在分析型高效液相色谱方法的基础上，直接放大 4.35 倍即得到半制备时最佳洗脱条件，按照该洗脱方式可得到 8 个洗脱峰，如图 7 所示。

2.2.2 半制备分离纯化后多肽组分 IC_{50} 值

各洗脱峰的 ACE 抑制率如上表所示，其中峰 6 的抑制活性最强，峰 5 次之。分离纯化后的多肽其 IC_{50} 值低于目前从鸭骨[27]、罗非鱼皮[28]、鳕鱼皮[29]、鱿鱼皮[30]中得到的胶原 ACE 抑制肽，说明采用凝胶层析、反向高效液相色谱分离也能达到较好的分离效果。结合 IC_{50} 值的大小及半制备收集到样品的量，对峰 2 和峰 6 采用 LC-MS/MS 进行序列分析。

表 3 半制备分离纯化后各组分峰 IC_{50} 值

Table 3 IC_{50} values of the components separated by semi-preparative RP-HPLC

样品	IC_{50}/(mg/mL)
峰 2	0.73
峰 3	1.36
峰 4	0.84
峰 5	0.44
峰 6	0.4
峰 7	1.15
峰 8	1.22

2.3 胶原 ACE 抑制肽序列分析

对于多肽序列的测定，目前以 Edman 降解法和 ESI MS/MS 串联质谱技术最为普遍。Edman 降解是从多肽 N 端开始，逐步降解多肽，其样品用量少，灵敏度高，但不能区分脯氨酸与羟脯氨酸，而胶原蛋白中这两种氨基酸总含量达 25%。电喷雾质谱测序时，多肽段经惰性气体碰撞诱导裂解产生一系列有规律的碎片离子，其中最重要的为 y 和 b 系列离子，根据质谱碎片可得到较完整的 y 和 b 系列离子，应用 b 离子和 y 离子互补方法，通过相邻 b 系列或 y 系列离子的质量差便可推断氨基酸序列。将电喷雾技术与串联质谱

联用即可确定多肽分子量，又可确定多肽的序列信息[31,32]。

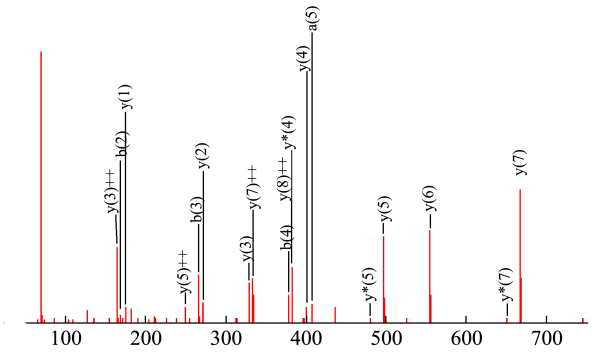


图 8 峰 2 活性肽序列图谱

Fig.8 Sequence profile of the purified peak two

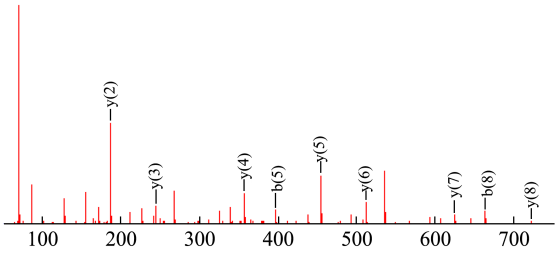


图 9 峰 6 活性肽序列图谱

Fig.9 Sequence profile of the purified peak six

峰 2、峰 6 的 Nano-ESI-MS/MS 质谱图分别如图 8、和图 9 所示。经 Mascot 2.3.01 软件对质谱所测得序列进行分析，得到其氨基酸组成如表 4 所示。

经过 LC-MS/MS 分析得到峰 2 的多肽序列为 QGP**P**GPAGPR，该序列的 N 末端氨基酸 Gln(Q)为亲水性氨基酸，C 末端 Arg(R)为部分疏水性氨基酸；峰 6 的序列为 AGP**P**GP**P**GPA，其 C 和 N 末端均为疏水性氨基酸 Ala(A)，故峰 6 序列较峰 2 序列疏水性更强，其出峰顺序符合反向液相色谱分离原理，也正因为峰 6 序列疏水性更强，更符合 ACE 抑制肽构效特点，故其 ACE 抑制肽活性更强。

ACE 抑制肽构效特点显示，当 Pro 在多肽 C 末端三位中任一位置时，多肽均具有降血压活性，且 Pro 可抵抗肠道消化酶的作用，提高降血压肽在肠道的稳定性，在体内起到良好的降压效果，所得序列 C 末端第二位均为 Pro，且都含有 Pro 羟基衍生化的氨基酸 Hyp，而对于多肽尤其是氨基酸长度大于 3 的多肽，Hyp 更有利于 ACE 抑制肽与催化位点相结合，峰 6 序列含有 2 个 Hyp，故其 ACE 抑制活性更强。

序列 QGP**P**GPAGPR 和 AGP**P**GP**P**GPA 分别源于胶原蛋白 α1 链中 526~535、730~739 的位置(UniProt database)，且目前尚未见研究报道。若 QGP**P**GPAGPR 和 AGP**P**GP**P**GPA 序列酶切位点发生变化，可以得到多种多肽，逐一分析发现序列 GP**P**GPAGPR、GP**P**GPA 在 Zhang[21]中有被报道，GPAGPR、PAGPR、AGPRGPR 均为已确证的 ACE 抑制肽。

表 4 ACE 抑制活性肽的结构鉴定

Table 4 Identification of ACE inhibitory peptides

样品	肽名称	位置	分子量/u	计算得分子量	得分
峰 2	QGP**P**GPAGPR	α1 526~535	931.4542	931.4512	50
峰 6	AGP**P**GP**P**GPA	α1 730~739	848.4054	848.4028	58

注：黑体 ***P*** 为 Hyp。

3 结论

3.1 采用 SephadexG-15 初步分离胶原 ACE 抑制肽，获得较优分离条件为：样品浓度 100 mg/mL；上样量 2 mL；流速 2 mL/min；洗脱剂为蒸馏水；层析柱为 1 m×10 mm 的层析柱。在该分离条件下，混合肽被分成 AP-I、AP-II 两个组分，IC_{50} 值分别为 19.50、1.01 mg/mL。

3.2 采用半制备高效液相色谱对抑制活性较强的 AP-II 进行进一步分离，获得到 8 个组分峰，其中峰 2，峰 5 和峰 6 的 IC_{50} 值最小，分别为 0.73、0.44 和 0.4 mg/mL。

3.2 结合 IC_{50} 值的大小及半制备收集到样品的量，对峰 2 和峰 6 采用 LC-MS/MS 进行序列分析，结果显示峰 2 的多肽序列为 QGP**P**GPAGPR，峰 6 的序列为 AGP**P**GP**P**GPA，这两个序列别源于胶原蛋白 α1 链中 526~535、730~739 的位置。

参考文献

[1] Ren F, Zhang S, Guo H, et al. Systemic screening of milk protein-derived ACE inhibitors through a chemically synthesised tripeptide library [J]. Food Chemistry, 2011, 128(3): 761-768

[2] Ichimura T, Yamanaka A, Otsuka T, et al. Antihypertensive effect of enzymatic hydrolysate of collagen and gly-pro in spontaneously hypertensive rats [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2009, 73(10): 2317-2319

[3] Oshima G, Shimabukuro H, Nagasawa K. Peptide inhibitors

of angiotensin Ⅰ-converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase [J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1979, 566(1): 128-137

[4] Richard J F, Brain A M, Daniel J W. The emerging role of dairy protein and bioactive peptides in nutrition and health [J]. Nutrition, 2004, 134(4): 980-988

[5] Kohmura M, Nio N, Kubo K et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme by synthetic peptides of human β-casein [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1989, 53(8): 2107-2114

[6] 黄家音,朱禹洁,沈金玉.降血压肽的研究进展[J].食品与发酵工业,2006,32(6):81-8
HUANG Jia-ying, ZHU Yu-jie, SHEN Jin-yu. Progress of antihypertensive peptide research [J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(6): 81-8

[7] 肖线,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):4
XIAO Xian, DUAN Yu-feng, LIU Ping, et al. Antihypertensive peptides derived from food proteins and its research advances [J]. Food Research and Development, 2004, 25(5): 4

[8] Hernandez-ledesma B, Contreras M M, Recio I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods [J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2011, 165(1): 23-35

[9] Natesh R, Schwager S L U, Sturrock E D, et al. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme -lisinopril complex [J]. Nature, 2003, 421: 551-554

[10] 宋芹,董小萍,郁小兵.部分哺乳动物和鱼类胶原蛋白中氨基酸的组成和含量的比较[J].现代食品科技,2008,24(12): 1239-1242
SONG Qin, DONG Xiao- ping, YU Xiao-bing. Comparison of components and contents of collagen amino acids in some mammal and fishes [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(12): 1239-1242

[11] 刘白玲,楚珑晟.胶原的生物合成过程及其调节[J].中国皮革,2000,29(9):5-9
LIU Bai-ling, CHU Long-sheng. The synthesis and regulation of collagen in its biosynthetic process [J]. China Leather, 2000, 29(9): 5-9

[12] 胡帅,王慧桂,但卫华,等.胶原蛋白结构的研究进展[J].西部皮革,2008,30(8):16-19
HU Shuai, WANG Hui-gui, DAN Wei-hua, et al. Progress in studying the structure of collagen [J]. West Leather, 2008, 30(8): 16-19

[13] Ichikawa S, Morifuji M, Ohara H, et al. Hydroxyproline-containing dipeptides and tripeptides quantified at high concentration in human blood after oral administration of gelatin hydrolysate [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2010, 61(1): 52-60

[14] 汤克勇.胶原物理与化学[M].北京:科学出版社,2012
TANG Ke-yong. Collagen physics and chemistry [M]. Beijing: Science Press, 2012

[15] 蒋挺大.胶原与胶原蛋白[M].北京:化学工业出版社,2006: 9-27
JIANG Ting-da. Collagen and peptide from collagen [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 9-27

[16] 林琳,李八方,吕顺,等.鱿鱼皮明胶水解物降血压活性研究[J].中国海洋大学学报,2010,40(4):43-46
LIN Lin, LI Ba-fang, LV Shun, et al. Studies on the antihypertensive activity of squid (dosidicus eschrichitii steenstrup) skin gelatin hydrolysates [J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(4): 43-46

[17] Himaya S W A, Ngo D H, Ryu B M, et al. An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress [J]. Food Chemistry, 2012, 132(4):1872-1882

[18] 刘轶,马良,张宇昊.胶原 ACE 抑制肽研究进展[J].食品科学,2013, 34(13):350-355
LIU Yi, MA Liang, ZHANG Yu-hao. Research advances in ACE inhibitory peptides from collagen [J]. Food Science, 2013, 34(13): 350-355

[19] 刘轶.预处理对酶解过程中胶原ACE抑制肽释放影响研究[D].重庆:西南大学,2015
LIU Yi. Study the effect of pretreatments on the release of ACE inhibitory peptides from collagen in the hydrolysis process [D]. Chongqing: Southwest University, 2015

[20] 陈丽清,陈清,韩佳冬,等.猪皮超声波乳化脱脂工艺的研究[J].食品工业科技,2012,33(16):265-267
CHEN Li-qing, CHEN Qing, HAN Jia-dong, et al. Study on ultrasound degreasing of pigskin with emulsifying agents [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(16): 265-267

[21] Zhang Yuhao, Olsen Karsten, Grossi Alberto, et al. Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides [J]. Food Chemistry, 2013, 141: 2343-2354

[22] Sentandreu M A, Toldra F. A fluorescence-based protocol for quantifying angiotensin-converting enzyme activity [J].

Nature Protocols, 2006, 1(5): 2423-2427

[23] 王娟.酶法制备羊乳酪蛋白 ACE 抑制肽及分离纯化[D].陕西:陕西科技大学,2014
WANG Juan. Production and purification of ACE inhibitory peptides from goat milk casein enzymatic hydrolysate [D]. Shanxi: Shanxi University of Science and Technology, 2014

[24] 王双,王昌涛,韩扬.燕麦 ACE 抑制肽的分离纯化及其活性研究[J].食品科学,2010,31(24):222-229
WANG Shuang, WANG Chang-tao, HAN Yang. Separation, purification and activity of ACE inhibitory peptides from oat [J]. Food Science, 2010, 31(24): 222-229

[25] Li Guan-hong, Le Guo-wei, Shi Yong-hui, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins and their physiological and pharmacological effects [J]. Nutrition Research, 2004, 24(7): 469-486

[26] Lee D H, Kim J H, Park J S, et al. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom Tricholoma giganteum [J]. Peptides, 2004, 25(4): 621-627

[27] 张小丽.酶解鸭骨蛋白制备 ACE 抑制肽的研究[D].成都:四川农业大学,2011
ZHANG Xiao-li. Preparation of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from duck bone protein by protease hydrolysis [D]. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2011

[28] 陈胜军,李来好,曾名勇,等.罗非鱼鱼皮胶原蛋白降血压酶解液的制备与活性研究[J].食品科学,2005,26(8):229-233
CHEN Sheng-jun, LI Lai-hao, ZENG Ming-yong, et al. Study on preparation and activity of lower the blood pressure enzymatic hydrolysate from oreochromis niloticus skin collagen [J]. Food Science, 2005, 26(8): 229-233

[29] 王海英,宋永相,孙谧.酶解鳕鱼皮制备血管紧张素转化酶以直接 ACEI 的研究[J].现代食品科技,2008,24(10): 987-991
WANG Hai-ying, SONG Yong-xiang, SUN Mi. Enzyamtic hydolysis of cod skins for ACEI preparation [J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(10): 987-991

[30] Lin Lin, Lv Shun, Li Ba-fang. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates [J]. Food Chemistry, 2012, 131(1): 225-230

[31] Roepstorff P, Fohlman J. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides [J]. Biomed Mass Spectrom, 1984, 11(11): 601

[32] 蒋菁莉,徐彦军,娄飞,等.反相高效液相色谱-电喷雾质谱法分析食源血管紧张素转换酶抑制肽[J].分析化学研究简报,2007,35(3): 427-430
JIANG JING-li, XU Yan-jun, LOU Fei, et al. Analysis of food-derived angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides by reversed phase high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007, 35(3): 427-430