

# 深海鲑鱼皮来源 ACE 抑制肽的分离及鉴定

刘文颖, 林峰, 金振涛, 陈亮, 谷瑞增, 鲁军, 蔡木易

(中国食品发酵工业研究院, 北京市蛋白功能肽工程技术研究中心, 北京 100015)

**摘要:** 为了考察海洋胶原低聚肽中 ACE 抑制肽的活性和结构, 本文以深海鲑鱼皮为原料, 采用两步酶解法制备出海洋胶原低聚肽, 在对其分子量分布进行分析的基础上, 测定了其血管紧张素转化酶 (ACE) 抑制活性。结果表明, 海洋胶原低聚肽中分子量小于 1000 u 的组分高达 90.79%, 主要分布在 132~576 u 范围内, 其 ACE 抑制活性的  $IC_{50}$  为  $1.18 \pm 0.12$  mg/mL。然后利用反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 对海洋胶原低聚肽进行分离纯化, 收集 11 个组分峰, 对其 ACE 抑制活性进行了测定。结果表明, 有 7 个组分的 ACE 抑制活性比海洋胶原低聚肽高。最后利用 Q-TOF 质谱仪对收集的 11 个组分进行了结构鉴定, 并对鉴定出的 15 个肽段进行了 ACE 抑制活性测定。结果表明, 15 个肽段均有一定的 ACE 抑制活性, 其中 Ala-Pro (AP)、Val-Arg (VR)、Gly-Arg (GR) 的 ACE 抑制率比海洋胶原低聚肽高,  $IC_{50}$  值分别为  $0.07 \pm 0.01$  mg/mL、 $0.35 \pm 0.03$  mg/mL、 $0.92 \pm 0.85$  mg/mL, 活性大约是海洋胶原低聚肽的 16.86、3.37、1.28 倍, 是具有较高 ACE 抑制活性的肽段。

**关键词:** 海洋胶原低聚肽; ACE 抑制肽; 分子量分布; 分离纯化; 结构鉴定

文章编号: 1673-9078(2016)6-170-176

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.6.027

## Separation and Identification of ACE Inhibitory Peptides Derived from Deep-Sea Salmon Skin

LIU Wen-ying, LIN Feng, JIN Zhen-tao, CHEN Liang, GU Rui-zeng, LU Jun, CAI Mu-yi

(Beijing Engineering Research Center of Protein and Functional Peptides, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100015, China)

**Abstract:** To investigate the activity and structure of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from marine collagen oligopeptides (MCOPs), MCOPs were prepared from deep-sea salmon skin by two-step enzymolysis. Based on analysis of the molecular weight distribution, the ACE inhibitory activity of MCOP was determined. The results showed that the components with a molecular weight of less than 1000 u in MCOP accounted for up to 90.79% of all proteins and were mainly distributed in the range of 132~576 u, and the corresponding  $IC_{50}$  for ACE activity was  $1.18 \pm 0.12$  mg/mL. Subsequently, MCOPs were separated and purified by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and the ACE inhibitory activity of 11 fractions was measured. Seven fractions had a higher ACE inhibitory activity than the total MCOP mixture. Finally, structural identification of peptides in the 11 fractions was performed on a quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer and the ACE inhibitory activity of the 15 identified peptides was determined. The results indicated that all peptides exhibited ACE inhibitory activity and Ala-Pro (AP), Val-Arg (VR), and Gly-Arg (GR) showed stronger activities than the total MCOP mixture. The  $IC_{50}$  values of the three peptides were  $0.07 \pm 0.01$  mg/mL,  $0.35 \pm 0.03$  mg/mL, and  $0.92 \pm 0.85$  mg/mL, respectively. Their ACE inhibitory activities were 16.86, 3.37, and 1.28 times the inhibitory activity of the MCOP mixture, respectively. Therefore, AP, VR, and GR are peptides with potent ACE inhibitory activity.

**Key words:** marine collagen oligopeptides; angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides; molecular weight distribution; separation and purification; structural identification

收稿日期: 2015-08-07

基金项目: 国家十二五科技支撑项目 (2012BAD33B04-02); 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2013AA102205-02); 北京市科委科技创新基地培育与发展工程项目 (Z121106002812040); 科技北京百名领军人才培养工程项目 (Z131110000513026)

作者简介: 刘文颖 (1984-), 女, 工程师, 研究方向为食源性低聚肽研究

通讯作者: 蔡木易 (1962-), 男, 教授级高级工程师

高血压是引发心肌梗塞、中风、冠心病等心血管疾病的重要危险因素, 全世界每年约有 15%~20% 的人因高血压而死亡, 这高于任何一种疾病, 治疗和预防高血压病是当今社会十分重要的课题之一<sup>[1,2]</sup>。血管紧张素转化酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE) 在血压调节系统中起着重要的作用, 一方面催化血管紧张素 I (Ang I) 从 C 端裂解二肽转换为活性很强的

血管收缩剂—血管紧张素 II (Ang II), 使血压升高; 另一方面也能作用于降血压物质缓激肽, 使其失活, 同样导致血压升高<sup>[3]</sup>。降血压药就是通过抑制 ACE 的活性来达到降血压的目的。然而, 人工合成的降压药物往往会引起咳嗽、味觉失调、皮疹和肾脏毒害等副作用, 不适合长期服用<sup>[4,5]</sup>。因此, 寻找天然、安全的食物来源的 ACE 抑制剂来预防和治疗高血压受到广大科学工作者的极大关注, 食物蛋白源 ACE 抑制肽即是这样一种优质的降血压功能因子, 逐渐成为研究的热点。

深海鲑鱼皮中蛋白质含量很高, 其中胶原蛋白含量最高可超过其蛋白质总量的 80%, 较鱼体的其它部位的胶原蛋白要高许多。与陆上猪、牛、羊皮骨来源的胶原蛋白产品相比, 深海鲑鱼皮胶原蛋白具有溶解性好, 无副作用, 安全性高, 无疯牛病及口蹄疫隐患等优点<sup>[6]</sup>。作为传统渔业中的下脚料, 深海鲑鱼皮除少量用于鱼蛋白的生产外, 主要用于生产鱼粉、直接作饲料和肥料或丢弃, 造成很大的资源浪费。选择深海鲑鱼皮为研究对象, 不仅可以回收和利用鱼皮中的胶原蛋白, 扩大胶原蛋白及其肽类的资源, 还可以避免鱼皮等废弃物对环境的污染, 具有重大的经济价值和良好的社会效益。海洋胶原低聚肽是以深海鲑鱼的鱼皮为主要原料, 经过酶解、分离、纯化等步骤制成的小分子肽混合物, 这种混合肽具有多种生理活性, 如降血压、抗氧化、降血脂等。目前, 国内外关于海洋鱼副产物蛋白来源 ACE 抑制肽的研究报道较多。例如, Bougatef 等<sup>[7]</sup>从沙丁鱼副产物中分离出 ACE 抑制肽, Jung 等<sup>[8]</sup>对黄鳍金枪鱼鱼骨来源的 ACE 抑制肽进行了研究。然而, 关于深海鲑鱼鱼皮来源的 ACE 抑制肽的报道较少, 并且缺乏深入和系统的研究。本研究以深海鲑鱼皮为原料, 通过两步酶解法制备出海洋胶原低聚肽, 在对其分子量分布进行分析的基础上, 利用反相高效液相色谱 (RP-HPLC)、四极杆飞行时间串联质谱仪 (Q-TOF MS) 为检测手段, 对海洋胶原低聚肽中的 ACE 抑制肽段进行分离纯化和结构鉴定, 以期明确海洋胶原低聚肽中 ACE 抑制肽的活性及其结构, 旨在为天然、安全的降血压保健食品的开发奠定一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

深海鲑鱼皮, 北京中食海氏生物技术有限公司; 碱性蛋白酶及木瓜蛋白酶 (2.4 AU/g), 诺维信生物技术有限公司; ACE (50 mU), 美国 Sigma 公司; 乙腈,

美国 Fisher 公司, 色谱纯; 三氟乙酸, 英国 Alfa Aesar 公司, 分析纯; 甲醇, 美国 Fisher 公司, 色谱纯; 乙酸、硼酸、盐酸, 北京化工厂, 分析纯; 马尿酸组氨酸亮氨酸 (HHL), 美国 Sigma 公司, 色谱纯。

### 1.2 主要仪器设备

HH-4 数显恒温水浴锅, 普瑞斯机械有限公司; YG30 喷雾干燥机, 无锡市阳光干燥设备厂; LC-20AD 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; Q-TOF2 正交加速电喷雾串联质谱仪, 英国 Micromass 公司; model 90 多肽合成仪, 美国 AAPPTec 公司; Voyager DE-Pro MALDI-TOF-MS 质谱仪, 美国 ABI 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 海洋胶原低聚肽的制备

采用本中心前期优化好的制备工艺<sup>[6]</sup>。将深海鲑鱼皮用清水洗净后, 称取 600 g 用绞肉机绞碎, 加入 1 L 蒸馏水, 用匀浆机匀浆。90 °C 水浴 10 min 后, 降温至 55 °C, 利用浓度为 10% (m/V) 的 NaOH 溶液调节蛋白溶液的 pH 值至 8.5, 以每克蛋白质 2500 单位的酶量加入碱性蛋白酶, 酶解 2 h, 不断加入浓度为 10% (m/V) 的 NaOH 溶液, 维持 pH 值为 8.5, 温度降至 50 °C, 以每克蛋白质 3000 单位的酶量加入木瓜蛋白酶, 酶解 2 h。酶解结束后, 100 °C 水浴灭酶 15 min。冷却到室温后, 10000×g 离心 30 min, 取上清液。将上清液用截留分子量为 1000 u 的超滤膜超滤, 得到分子量小于 1000 u 的滤过液, 利用喷雾干燥器进行喷雾干燥 (进口温度 220 °C, 出口温度 200 °C, 转速 40 r/min), 最终得到 100 g 海洋胶原低聚肽干粉。

#### 1.3.2 分子量分布测定

采用高效凝胶过滤色谱法对海洋胶原低聚肽的分子量分布进行测定。流动相: 乙腈:水:三氟乙酸, 45:55:0.1 (V/V/V); 流速: 0.5 mL/min; 进样体积: 10 μL; 检测波长: 220 nm; 柱温: 30 °C, 色谱柱: TSK gel G2000 SWXL (7.8×300 mm), 紫外检测器检测。称取 20.0 mg 样品, 溶解于上述流动相中, 配制成 2.0 mg/mL 样品溶液, 经孔径 0.2 μm 聚四氟乙烯过滤膜过滤后, 用高效液相色谱仪进行凝胶过滤, 使用 GPC 软件处理数据。以乙氨酸-乙氨酸-乙氨酸 (分子量 189)、乙氨酸-乙氨酸-酪氨酸-精氨酸 (分子量 451)、杆菌酶 (分子量 1450)、细胞色素 C (分子量 12500) 为肽标准品, 配制 0.1% (m/V) 溶液, 过膜后进样, 制作相对分子量校正曲线<sup>[9]</sup>。

#### 1.3.3 RP-HPLC 分离海洋胶原低聚肽

利用分析型 RP-HPLC 对海洋胶原低聚肽进行分

离纯化。色谱条件为：色谱柱：XBridge BEH130 C18 柱（4.6×250 mm），样品质量浓度：10 mg/mL；流动相 A：V（水）：V（三氟乙酸）=100:0.1；流动相 B：V（乙腈）：V（水）：V（三氟乙酸）=80:20:0.1；检测波长：UV220 nm；流速：0.6 mL/min；柱温：32 ℃；进样体积：100 μL。梯度洗脱程序：0~10 min，流动相 B：0%~5%；10~20 min，流动相 B：5%~5%；20~35 min，流动相 B：5%~9%；35~45 min，流动相 B：9%~13%；45~60 min，流动相 B：13%~13%；60~70 min，流动相 B：13%~70%。分管收集主要的组分峰，利用氮吹仪除去收集液中的三氟乙酸、乙腈等有机溶剂，冷冻干燥备用<sup>[10]</sup>。

### 1.3.4 Q-TOF MS 测定分子质量及肽序列

采用 Q-TOF2 正交加速电喷雾串联质谱仪进行结构鉴定，质谱条件为：离子化方式：纳升电喷雾正离子；雾化气体：N<sub>2</sub>；碰撞气体：Ar；源温：80 ℃；锥孔电压：50 V；TOF 加速电压：9.1 kV；MCP 检测器电压：2150 V；毛细管电压：800 V；MS 和 MS/MS 的质量准确度：0.1 u。首先进行一级质谱扫描，得到 ESI-MS 图。从 ESI-MS 图中选出待测离子，然后进行 ESI-MS/MS 分析。质谱图经 Micromass 的 MaxEnt 3 转换后，由 Peptide Sequencing 推导出肽段序列<sup>[10]</sup>。

### 1.3.5 ACE 抑制率测定

#### 1.3.5.1 样品制备

配制 0.05 mol/L 的硼酸缓冲液（H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>，含 0.3 mol/L NaCl），pH 为 8.3。用该缓冲溶液配制 50 mU/mL 的 ACE 溶液和 7.6 mmol/L 的 HHL 溶液。将 20 μL 的待检测样品（空白对照为硼酸缓冲液）与 30 μL ACE 溶液混合，37 ℃ 水浴预热 5 min。加入 50 μL 底物 HHL 液于 37 ℃ 水浴 30 min。反应结束后加入 100 μL 1 M 的 HCl 终止反应，最终加入 400 μL 硼酸缓冲液，混匀后进行 RP-HPLC 检测。每个样品平行重复 3 次。

#### 1.3.5.2 RP-HPLC 分析

色谱条件：流动相 A：V（水）：V（甲醇）：V（三氟乙酸）：V（乙酸）=70:30:0.1%:0.05%；流动相 B：V（水）：V（甲醇）：V（三氟乙酸）：V（乙酸）=20:80:0.1%:0.05%；进样体积：100 μL；流速：1.0 mL/min；柱温：30 ℃；检测波长：UV 227 nm；梯度洗脱条件：0~2.50 min，流动相 B：0%~0%；2.51~4.50 min，流动相 B：100%~100%；4.51~15 min，流动相 B：0%~0%。

#### 1.3.5.3 ACE 抑制率计算

在 RP-HPLC 图谱中，根据 ACE 的酶解产物马尿酸的洗脱峰面积与马尿酸的浓度的线性关系，通过计算

加入样品前后马尿酸峰面积的差别占加入样品后马尿酸峰面积的比率即可测定样品的 ACE 抑制率。抑制率计算公式如下：

$$\text{ACE 抑制率} = \left( \frac{M - N}{N} \right) \times 100\%$$

式中：M 为空白对照组中马尿酸的峰面积（mAU s）；N 为添加样品组中马尿酸的峰面积（mAU s）<sup>[11]</sup>。

### 1.3.6 肽段合成方法

肽段合成由北京中科亚光生物科技有限公司进行。采用多肽固相合成法（Fmoc 方法），利用多肽合成仪合成粗肽。然后利用分析型 HPLC 对粗肽进行检测，纯度为 60% 左右。用水将粗肽溶解，利用制备型 HPLC 进行纯化，冻干得到纯品，再用分析型 HPLC 进行检测，纯度为 98% 以上，利用质谱仪进行检测，保证分子量正确。

### 1.3.7 数据统计分析

每组实验重复 3 次，采用 Excel 计算不同指标的平均值和标准偏差，所有图中误差值采用 SD 值。

## 2 结果与讨论

### 2.1 海洋胶原低聚肽的分子量分布

四种分子量标准品的色谱图及相对分子量校正曲线图分别如图 1、图 2 所示。相对分子量校正曲线方程为： $\lg Mw = 6.7895 - 0.1984t$ 。海洋胶原低聚肽的凝胶色谱图如图 3 所示，使用 GPC 软件对色谱数据进行处理后，分子量分布数据如表 1 所示。由表 1 可知，海洋胶原低聚肽的分子量大多分布在 1000 u 以下（90.79%），平均分子量为 512 u。按氨基酸的平均分子量 137 u 来计算<sup>[12]</sup>，分子量 1000 u 以下的组分则多是八肽以下的低聚肽和部分游离氨基酸。两步酶解法能够使深海鲑鱼皮胶原蛋白酶解充分，再加上超滤等手段，最终得到低分子量的海洋胶原低聚肽<sup>[12]</sup>。海洋胶原低聚肽中分子量在 132~76 u 的占 69.34%，132 u 和 576 u 分别是最小二肽（Gly-Gly）和最大三肽（Trp-Trp-Trp）的分子量，因此分子量处于这个范围内的肽段主要是二肽和三肽，说明二肽和三肽是海洋胶原低聚肽的主体成分。

研究表明，二肽和三肽可不经消化被人体直接吸收，比蛋白质和单一氨基酸更易吸收，它们的吸收利用程度几乎可达到 100%<sup>[9]</sup>。四肽以上八肽以下的低聚肽同样具有多种生理功能，如降血压、降胆固醇、降血脂、抗氧化等。而且肽在微量的状态下，就能发挥强大的生理活性<sup>[13]</sup>。

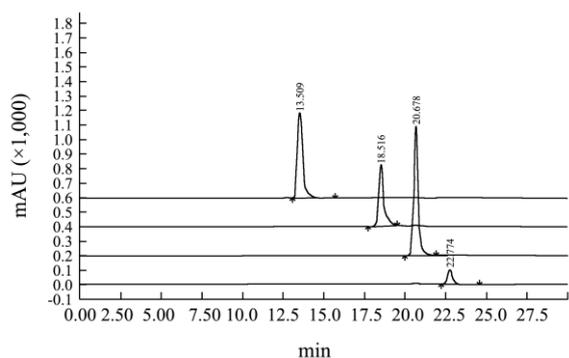


图1 四种分子量标准品的色谱多视图

Fig.1 Overlapped chromatogram of standards with four different molecular weights

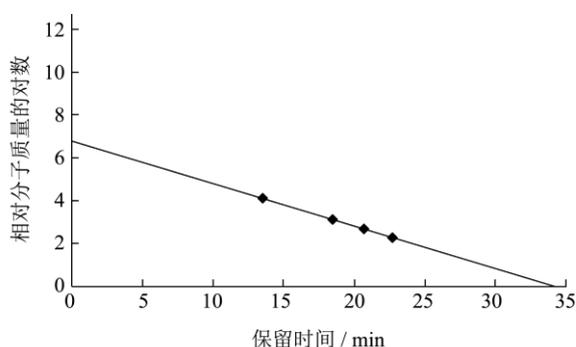


图2 相对分子质量校正曲线图

Fig.2 Molecular weight calibration curve

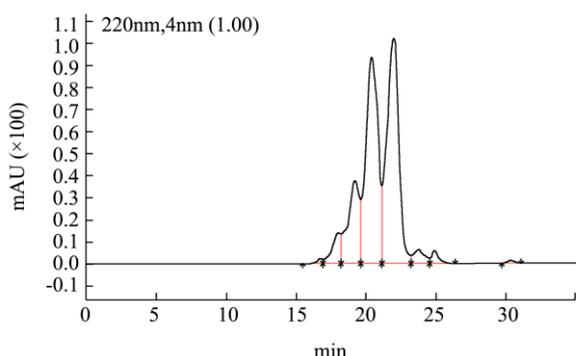


图3 海洋胶原低聚肽的凝胶色谱图

Fig.3 Gel chromatogram of the MCOP mixture

表1 海洋胶原低聚肽分子量分布

Table 1 Molecular weight distribution of the MCOP mixture

分子量范围/u	开始时 间/min	结束时 间/min	峰面积百分比 /(% , 220 nm)
10000~3000	14.018	16.628	0.11
3000~1000	16.628	19.010	9.10
1000~576	19.010	20.206	17.75
576~132	20.206	23.400	69.34
<132	23.400	29.090	3.70

## 2.2 海洋胶原低聚肽的 ACE 抑制作用

海洋胶原低聚肽的 ACE 抑制活性如图 4 所示。

在所选浓度范围内，海洋胶原低聚肽的 ACE 抑制作用不断增强，根据图 4 的 ACE 抑制曲线，计算抑制率为 50%时的浓度，得到半抑制浓度 IC<sub>50</sub> 值，结果为 1.18±0.12 mg/mL。Bougatef 等<sup>[14]</sup>对沙丁鱼副产物蛋白水解物的 ACE 抑制率进行了研究，其 IC<sub>50</sub> 值为 1.2 mg/mL，与海洋胶原低聚肽的抑制能力接近。He 等<sup>[15]</sup>研究了扇贝骨、牡蛎骨、鳕鱼骨和鳕鱼皮蛋白酶解产物的 ACE 抑制活性，IC<sub>50</sub> 均高于 10 mg/mL，比海洋胶原低聚肽的 ACE 抑制效果要弱得多。

肽的 ACE 抑制活性与其肽链长度有关。ACE 抑制肽的分子量比较低，一般低于 1000 u。例如，张宇昊等<sup>[16]</sup>将花生肽经超滤分离后，得到 3 种不同分子量范围的组分：大于 5000 u、1000-5000 u、低于 1000 u，其中分子量小于 1000u 的组分 ACE 抑制效果最好。本研究中的海洋胶原低聚肽分子量大多在 1000 u 以下这可能是其具有较高 ACE 抑制活性的原因之一。另外，肽的大小对维持其活性也有重要作用。相比长链 ACE 抑制肽来说，分子量小的 ACE 抑制肽往往在体内也具有较高抑制活性，因为小肽不易被肠道中的消化酶降解<sup>[9]</sup>。

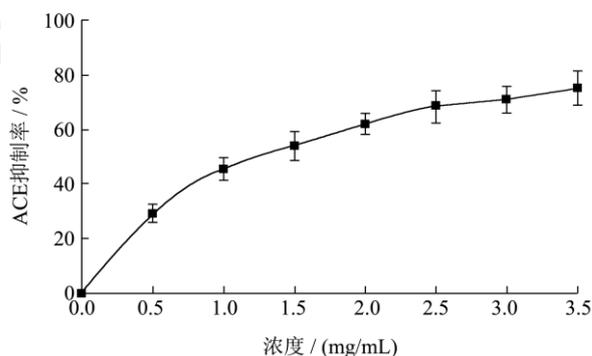


图4 海洋胶原低聚肽的 ACE 抑制作用

Fig.4 ACE inhibitory activity of the MCOP mixture

## 2.3 海洋胶原低聚肽的分离纯化

海洋胶原低聚肽是由多种肽段组成的小分子肽的混合物，经过分离纯化后，可以获得多种不同 ACE 抑制活性的组分，通过进一步研究，可鉴定出海洋胶原低聚肽的主要活性组分。分离纯化肽常用高效液相色谱、凝胶过滤色谱、离子交换层析、超滤、聚丙烯酰胺凝胶电泳等方法。其中，RP-HPLC 法是根据肽的极性大小不同而进行分离样品的，能够达到很好的分离效果，是最常用也是最有效的分离纯化方法。与其它色谱方法相比，具有操作简便、分辨率高、重复性好、色谱过程稳定等优势<sup>[17]</sup>。海洋胶原低聚肽的分离色谱图如图 5 所示，依据峰形、峰高、峰面积和分离

度四个指标,收集了 11 个组分峰,分别命名为 1#-11#,每个组分峰里含有的可能不是单一肽段,需要进一步通过质谱分析便可对肽段进行鉴定。各组分峰经过冷冻干燥后,得到干粉状样品。

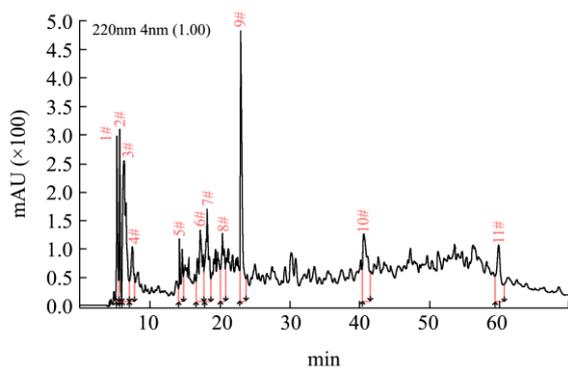


图5 海洋胶原低聚肽的RP-HPLC分离色谱图

Fig.5 RP-HPLC separation chromatogram of the MCOP mixture

#### 2.4 海洋胶原低聚肽分离组分的 ACE 抑制作用

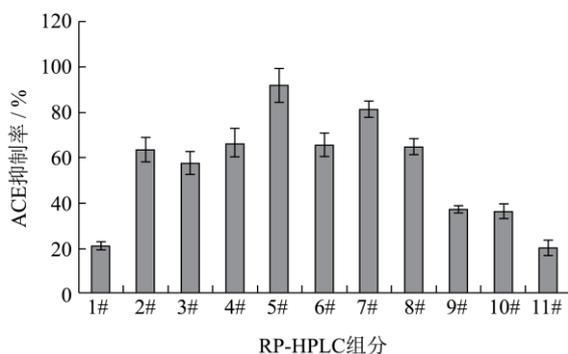


图6 海洋胶原低聚肽中RP-HPLC组分的ACE抑制活性(1.00 mg/mL)

Fig.6 ACE inhibitory activity of MCOP RP-HPLC fractions

将收集的 11 个 RP-HPLC 组分配制成 1.00 mg/mL 的溶液,测定 ACE 抑制活性,结果见图 6。从图中可看出,组分 5#和 7#的 ACE 抑制活性较高,抑制率分别为 91.12±8.41%和 80.53±4.29%,其次是组分 4#、6#、8#、2#、3#,活性相差不大(65.95±7.02%~56.76±6.15%),组分 11#的活性最低(20.11±3.68%)。与海洋胶原低聚肽的 ACE 抑制率(1.00 mg/mL, 45.69±3.88%)相比,组分 1#、9#、10#、11#的活性有所下降,其余组分活性提高,活性最高的两个组分 5#和 7#的活性分别是海洋胶原低聚肽的 1.99 和 1.76 倍,表明这些组分中可能含有高活性的 ACE 抑制肽,或者可能由于肽段间的协同作用使得活性提高。

海洋胶原低聚肽的分离组分均表现出一定的

ACE 抑制活性,并且在相同浓度条件下,大部分分离组分的 ACE 抑制活性比混合肽高。究其原因,由于 C18 柱分离使得相同或相近疏水性的多肽富集在一起,这些多肽具有较多相同的氨基酸侧链,而多肽的 ACE 抑制活性均与氨基酸侧链上的某些基团有关,最终导致总体 ACE 抑制活性增强。

#### 2.5 海洋胶原低聚肽中 ACE 抑制肽的结构鉴定

利用 Q-TOF 质谱仪对收集的 11 个 RP-HPLC 组分进行分析。Q-TOF 质谱仪采用电喷雾离子源(ESI)和飞行时间质量分析器(TOF),通过对各个组分二级质谱的碎片离子的质谱图解谱得到肽段的氨基酸序列结构。Q-TOF 的特点是能够对微量混合多肽进行序列分析及对新蛋白进行序列分析。最强大功能是能够对蛋白质进行测序,是蛋白测序的一种新方法,它的优点是样品用量少,并且能够测定肽段的序列。从海洋胶原低聚肽的 RP-HPLC 组分中鉴定出的肽段结构如表 2 所示。这些肽段序列的分子量均在 1000 u 以下,为二肽、三肽、四肽,这与分子量分布的结果是一致的。

人工合成鉴定出的肽段,并分别测定其 ACE 抑制活性(1.00 mg/mL),结果如图 7 所示。从图中可见,15 个肽段均具有一定的 ACE 抑制活性。其中,Ala-Pro (AP) 的 ACE 抑制率最高,为 95.23±6.25%,其次为 Val-Arg (VR)、Gly-Arg (GR),抑制率分别为 71.25±6.98%、52.02±5.34%,均比同等浓度下海洋胶原低聚肽抑制率(45.69±3.88%)要高。RER 抑制率为 41.09±3.02%,比海洋胶原低聚肽略低一些。其余肽段的抑制率在 0.86±0.15%~28.49±3.19%范围内,抑制效果不佳。本实验进一步对 AP、VR、GR 进行了 IC<sub>50</sub> 值分析。经计算,AP、VR、GR 抑制 ACE 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 0.07±0.01 mg/mL、0.35±0.03 mg/mL、0.92±0.85 mg/mL,海洋胶原低聚肽的 IC<sub>50</sub> 值为 1.18±0.12 mg/mL,由此可见,AP、VR、GR 的 ACE 抑制活性大约是海洋胶原低聚肽的 16.86、3.37、1.28 倍,是具有较高 ACE 抑制活性的肽段。AP、VR、GR、RER 都是本研究新发现的深海鲑鱼皮来源 ACE 抑制肽。

ACE 抑制肽构效关系研究表明,当 C 末端为芳香族氨基酸(包括 Trp、Tyr、Phe)和 Pro 时,抑制肽的抑制活性增强,当 C 末端氨基酸为带正电荷氨基酸(如 Arg、Lys)时,可提高它们对 ACE 的亲合力。N 末端为疏水性的 Val、Leu、Ile 或碱性氨基酸(Arg、Lys、

His) 的肽与 ACE 的亲合力较强, 抑制活性最高, 但是 Pro 则除外<sup>[18]</sup>。还有研究表明, 二肽的 N 端为芳香族氨基酸或 C 端为 Tyr、Try、Pro 有最强的抑制作用<sup>[19]</sup>。本研究鉴定出的高活性 ACE 抑制肽中, AP 是以 Pro 为 C 末端的二肽, 符合强 ACE 抑制肽的结构规律; VR 的 N 末端为疏水性氨基酸 Val, 能够极大地提高与 ACE 的结合作用, 此外, VR、GR 的 C 末端为 Arg, 所含胍基的正电荷对其 ACE 抑制活性具有促进作用。

表 2 Q-TOF MS 鉴定出的海洋胶原低聚肽的肽段结构

Table 2 Identification of peptides from the MCOP mixture by Q-TOF mass spectrometry

RP-HPLC 组分	肽段序列	分子量{单位}
2#	Asn-Lys (NK)	260.13
4#	Gly-Arg (GR)	231.10
5#	Ala-Pro (AP)	186.11
5#	Arg-Glu-Arg (RER)	459.26
5#	Val-Asp-Gly-Lys (VDGK)	417.21
6#	Gly-Pro-Arg (GPR)	328.18
7#	Val-Arg (VR)	273.18
7#	Leu-Asn (LN)	245.14
8#	Phe-Thr-Glu (FTE)	395.15
9#	Leu- Gln (LQ)	259.17
10#	Pro-His (PH)	251.96
10#	Pro-Asn-His (PNH)	365.96
10#	Asn-Val-Gly (NVG)	287.93
10#	Gly-Pro-Ala-Gly (GPAG)	300.13
11#	Val-Leu (VL)	230.17

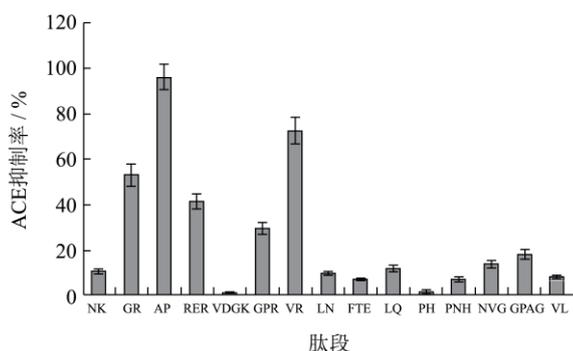


图 7 海洋胶原低聚肽中肽段的 ACE 抑制活性 (1.00 mg/mL)

Fig.7 ACE inhibitory activities of peptides from the MCOP mixture (1.00 mg/mL)

### 3 结论

本文采用两步酶解法制备出海洋胶原低聚肽, 其 ACE 抑制作用呈显著的量效关系,  $IC_{50}$  为  $1.18 \pm 0.12$  mg/mL。经 RP-HPLC 分离纯化后, 利用 Q-TOF 质谱

仪对收集的 11 个组分进行了结构鉴定, 鉴定出的 15 个肽段均具有一定的 ACE 抑制活性。其中 AP、VR、GR 的 ACE 抑制率比海洋胶原低聚肽高,  $IC_{50}$  值分别为  $0.07 \pm 0.01$  mg/mL、 $0.35 \pm 0.03$  mg/mL、 $0.92 \pm 0.85$  mg/mL, 抑制活性大约是海洋胶原低聚肽的 16.86、3.37、1.28 倍, 是具有较高 ACE 抑制活性的肽段, 并且都是本研究新发现的深海鲑鱼皮来源 ACE 抑制肽。本研究明确了海洋胶原低聚肽的 ACE 抑制活性, 并对其含有的 ACE 抑制肽进行了分离和结构鉴定, 为海洋胶原低聚肽作为降血压保健食品的开发利用提供了理论支持。

### 参考文献

- [1] 吴红洋,姜太玲,胡惠茗,等.响应面法优化酶解花椒籽蛋白制备降血压肽工艺[J].食品科学,2015,35(21):180-185  
WU Hong-yang, JIANG Tai-ling, HU Hui-ming, et al. Response surface methodology for optimization of hydrolysis conditions for preparing antihypertensive peptides sichuan pepper (*Zanthoxylum bungeanum*) seed protein [J]. Food Science, 2015, 35(21): 180-185
- [2] 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  
WU Hui, LUO Mei-qi, TANG Yu-qian, et al. Enzymatic hydrolysis of silk fibroin for production of ACE inhibitors [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(12): 1461-1465
- [3] 宋华曾,毕琳,吕顺,等.鲟鱼皮明胶 ACE 抑制肽降血压活性的研究[J].现代食品科技,2014,30(2):78-83  
SONG Hua-zeng, BI Lin, LV Shun, et al. Antihypertensive effects of angiotensin-converting Enzyme (ACE) inhibitory peptides from channel catfish skin gelatin [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(2): 78-83
- [4] Jimsheena V K, Gowda, L R. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from arachin by simulated gastric digestion [J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 561-569
- [5] Yu Z, Liu B, Zhao W, et al. Primary and secondary structure of novel ACE-inhibitory peptides from egg white protein [J]. Food Chemistry, 2012, 133(2): 315-322
- [6] 刘文颖,任玮,谷瑞增,等.海洋胶原低聚肽的制备及其稳定性研究[J].食品工业,2015,36(2):102-104  
LIU Wen-ying, REN Wei, GU Rui-zeng, et al. Study on preparation and stability of marine collagen oligopeptides [J]. Food Industry, 2015, 36(2): 102-104
- [7] Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Ravallec-Plé 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
- [8] Jung W K, Mendis E, Je J Y, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats [J]. Food Chemistry, 2006, 94: 26-32
- [9] Gu R Z, Liu W Y, Lin F, et al. Antioxidant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of oligopeptides derived from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle [J]. Food Research International, 2012, 49(1): 326-333
- [10] Gu R Z, Li C Y, Liu W Y, et al. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin [J]. Food Research International, 2011, 44(5): 1536-1540
- [11] Wang J P, Hu J Z, Bai X F, 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
- [12] Lin F, Chen L, Liang R, et al. Pilot-scale production of low molecular weight peptides from corn wet milling byproducts and the antihypertensive effects in vivo and in vitro [J]. Food Chemistry, 2011, 124: 801-807
- [13] Hsu K C, Lu G H, Jao C L. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*) [J]. Food Research International, 2009, 42: 647-652
- [14] Bougateg A, Nedjar-Arroume N, Ravallec-Plé 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
- [15] He H L, Chen X L, Wu H, 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: 3499-3505
- [16] 张宇昊,马良,王强.花生短肽降血压活性研究[J].食品科学,2008,29(6):399-403  
ZHANG Yu-hao, MA Liang, WANG Qiang. Study on antihypertensive activity of peanut oligopeptide [J]. Food Science, 2008, 29(6): 399-403
- [17] 高玲,余蓉.水蛭素 12 肽与瑞替普酶融合蛋白的反相色谱纯化及其一级结构确认[J].食品与药品,2008,10(1):8-12  
GAO Ling, YU Rong. RP-HPLC purification for primary structure confirmation of 12 peptides of hirudin and reteplase fusion protein [J]. Food and Drug, 2008, 10(1): 8-12
- [18] Cheung H S, Wang F L, Ondetti M A, et al. Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the carboxyl-terminal dipeptide sequence [J]. J. Biol. Chem., 1980, 255(2): 401-407
- [19] Cushman D W, Cheung H S, Sabo E F, et al. Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme [J]. Am. J. Cardiol., 1982, 49: 1390-1394