

虾头自溶产物中 ACE 抑制肽的分离鉴定

朱国萍¹, 章超桦^{2,3*}, 曹文红^{2,3}, 吉宏武^{2,3}

(1. 广东海洋大学分析测试中心, 广东 湛江 524025;

2. 广东海洋大学广东省水产加工与安全重点实验室, 广东 湛江 524088;

3. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524025)

摘要: 虾头在一定的条件下发生自溶作用, 其所含蛋白质以肽和氨基酸等形式释放出来, 有些肽产物具有 ACE 抑制活性。实验采用 8 000、5 000 和 3 000 u 的超滤膜分级分离虾头自溶产物, 活性检测结果表明, ACE 抑制肽主要分布在 3 000 u 超滤组分中; 3 000 u 超滤组分进一步经 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶层析、SP Sephadex C-25 离子交换层析及 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶层析纯化, ACE 抑制活性提高将近 8 倍 ($IC_{50} = 0.19 \text{ mg/mL}$); Sephadex G-15 葡聚糖凝胶层析收集的高活性成分再经两次 RP-HPLC 纯化, 分离纯化得到两条 ACE 抑制肽, 质谱分析推测其氨基酸序列为 Tyr-Pro 和 Leu-Pro/Ile-Pro, 分子量分别为 279 和 229 u。

关键词: 虾头自溶产物; ACE 抑制肽; 色谱层析; RP-HPLC; 电喷雾质谱; 氨基酸序列

中图分类号: TS 254

文献标志码: A

血管紧张素转换酶 (Angiotensin-I-converting Enzyme, ACE) 抑制肽是一种对 ACE 酶活性具有抑制作用的生物活性肽, 自 1970 年 Ferreira 等^[1]从巴西毒蛇 (*Bothrops Jararaca*) 的毒汁分离出第一种降血压肽以来, 大量的 ACE 抑制肽从食品蛋白质中分离出来, 如从水产品蛋白^[2-4]; 陆生动物蛋白^[5]; 植物蛋白^[6]等食品蛋白质中均已分离鉴定出 ACE 抑制肽。ACE 抑制肽的制备方法多以酶解法、发酵法为主, 以自溶方法制备 ACE 抑制肽的报道较少, 仅有研究利用鱼内脏中的内源性酶自溶制备 ACE 抑制肽^[7], 以自溶方法从虾头中制备 ACE 抑制肽未见报道。虾头中蛋白质含量丰富, 目前已有学者利用外源性蛋白酶酶解虾头副产物制备具 ACE 抑制活性的水解蛋白^[8], 而虾头除含有十分丰富的营养物质外, 还富含各种内源性蛋白酶^[9], 特定条件下虾头中的内源性蛋白酶可将虾头蛋白质降解, 使其以可溶性蛋白质、肽和氨基酸的形式释放出来^[9], 释放出来的肽可作为研究制备具生物活性肽的原料来源。前期的

研究表明, 虾头自溶产物具有较强的 ACE 抑制活性及较高的肽含量, 因此虾头自溶产物可能是制备 ACE 抑制肽的理想原料。

本研究以凡纳滨对虾虾头为原料, 利用虾头内源性蛋白酶自溶虾头, 通过超滤、葡聚糖凝胶、离子交换层析、反相高效液相色谱等方法分离纯化虾头自溶产物, 通过质谱鉴定所纯化 ACE 抑制肽的氨基酸序列, 探讨构效关系, 为肽类抗高血压保健食品和药物的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

新鲜的凡纳滨对虾虾头: 由湛江国联水产公司提供。

HHL (MW423Da) 购自日本 Peptide Institute; ACE (3.4 U/mg) 购自美国 Sigma 公司; 马尿酸购自美国 Sigma 公司; 葡聚糖凝胶 (Sephadex G-25、Sephadex G-15) 购自上海华蓝化学科技有限公司; SP sephadex C-25 购自上海华蓝化学科技有

收稿日期: 2012-06-12 修回日期: 2013-01-17

资助项目: 国家科技支撑计划项目 (2007BAD29B09); 教育部科学技术重点项目 (210155); 国家虾产业技术体系专项 (CARS-47)

通信作者: 章超桦, E-mail: zhangch2@139.com

限公司、福林-酚试剂购自北京鼎国生物科技有限公司、乙腈(色谱纯)购自天津市四友精细化学品有限公司。

1.2 实验方法

虾头自溶产物的制备 参考文献[9]的方法。

虾头自溶液的分离纯化

(1) 虾头自溶液的超滤分离:3 h 虾头自溶产物经 10 000 r/min 离心 20 min 后,取上清液过 0.45 μm 膜后,在温度为 20 °C、压力为 20 Psi、速度为 0.3 m/s 的条件下分别用 8 000、5 000 和 3 000 u 的超滤膜超滤,收集透过液和截留液。

(2) 虾头自溶液的层析分离:3 000 u 超滤组分上 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶层析柱作层析分离,蒸馏水作为洗脱液,收集各峰洗脱液并测定 ACE 抑制活性,活性最强的组分上 SP Sephadex C-25 离子交换层析柱进一步分离纯化,0.1 mol/L NaCl/醋酸缓冲液梯度洗脱,收集各组分洗脱液,分别上 Sephadex G-15 凝胶层析柱进一步分离纯化,蒸馏水作为洗脱液,收集各组分洗脱液并测定 ACE 抑制活性。

RP-HPLC 肽谱分析 Sephadex G-15 凝胶层析收集的各峰,用 SunFire C₁₈ (4.0 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱作肽谱分析,流动相为含 0.1% TFA 的水和 60% 乙腈,采用线性梯度,60 min 内水的浓度为 100%~40%,乙腈浓度为 0%~60%;流速为 1.0 mL/min,柱温 25 °C,220 nm 检测吸收峰,分析各峰的肽含量。

RP-HPLC 纯化 Sephadex G-15 凝胶层析收集的峰 2 II,用 SunFire C₁₈ (4.0 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱作 RP-HPLC 纯化,流动相为含 0.1% TFA 的水和 60% 乙腈,采用线性梯度,60 min 内水的浓度为 100%~40%,乙腈浓度为 0%~60%;流速为 1.0 mL/min,柱温 25 °C,220 nm 检测吸收峰,手动接收峰物质,按出峰时间的先后顺序标记,冷冻干燥,-70 °C 保存;收集得到的活性峰用同一色谱柱(SunFire C₁₈ 柱)进一步纯化,流动相及洗脱条件与前面相同,220 nm 检测吸收峰,手动接收峰物质,冷冻干燥,-70 °C 保存。

ACE 抑制活性的测定 根据姜瞻梅等^[10]的方法,适当进行修改。实验在 2 mL 的 Eppendorf 管中进行,分为二组,第一组为加入抑制剂组,第二组为不加抑制剂组。抑制剂组往

Eppendorf 管中加入 50 μL 的抑制剂溶液,再加入 50 μL 的 HHL 溶液(5 mmol/L),旋涡混合 20 s,37 °C 水浴保温 6 min,加入 50 μL ACE(5 mU),旋涡混合 20 s 启动反应,37 °C 保温 30 min 后加入 150 μL 1 mol/L HCl 终止反应,旋涡混合 20 s。静置 10 min 后再加超纯水 1 mL,旋涡混合 20 s;不加抑制剂组除了加入 50 μL 去离子水代替 50 μL 抑制剂溶液外,其余操作同抑制剂组。用针式过滤头(0.45 μm)过滤后直接上样至高效液相色谱(Waters 600 E),紫外 228 nm 波长处测定该溶液的马尿酸峰面积。

抑制率的计算公式如下:

$$\text{ACE 抑制率}(\%) = \frac{A - B}{A} \times 100$$

式中,A 为加 50 μL HHL 溶液、50 μL ACE 和 50 μL 去离子水液相检测的马尿酸峰面积;B 为加 50 μL HHL 溶液、50 μL ACE 和 50 μL 抑制剂液相检测的马尿酸峰面积;对 ACE 抑制率为 50% 时 ACEI 的浓度即为半数抑制浓度,记为 IC₅₀。

马尿酸标准的测定 称取 50 mg 马尿酸,溶于 35 mL 超纯水,45 °C 水浴,待完全溶解后冷却至室温,转移置 50 mL 定容瓶,用超纯水定容置 50 mL,此溶液为 1 mg/mL 的马尿酸标准品,4 °C 冰箱中保存,每次取 1 mL 配成 0.25 mg/mL,上样至高效液相色谱(Waters 600 E),紫外 228 nm 波长处测定其出峰时间。

氨基酸组成分析 游离氨基酸的测定:样品经过针式过滤头(0.45 μm)过滤后直接上样至日立 835-50 型高速氨基酸分析仪进行氨基酸的分析。总氨基酸的测定:样品经 6 mol/L HCl 水解后,采用日立 835-50 型高速氨基酸分析仪进行 17 种氨基酸含量测定。

ESI-MS/MS 氨基酸序列测定 RP-HPLC 纯化得到的活性成分,完全挥发有机溶剂后冷冻干燥,超纯水溶解后上 LCQ DECA XP 型质谱仪,质谱条件:气帘气流速 15 arb;喷雾电压 3.0 kV;雾化温度 250 °C;工作电压 18 V。先进行一级质谱电离,从一级质谱产生的肽段中选择母离子,进入二级质谱,经惰性气体碰撞后肽段沿肽链断裂,由所得的各肽段质量数值差值推定肽序列。

2 结果

2.1 ACE 抑制肽的超滤分离

根据前期研究结果,确定在温度为 20 °C、压

力为 20 Psi、速度为 0.3 m/s 的条件下分别用 8 000、5 000 和 3 000 u 的膜超滤对 3 h 自溶液进行超滤分级分离,收集透过液和截留液,测定各超滤组分的分子量分布和 ACE 抑制活性。Cheung 等^[11]认为 ACE 抑制肽的抑制活性主要取决于 C 端氨基酸,C 端氨基酸为芳香族氨基酸(包括色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)和脯氨酸时其抑制活性较高,另外,N 端为疏水性的缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或碱性氨基酸的肽与 ACE 的亲和力较强,抑制活性较高,但是脯氨酸则例外,因此在测定各超滤组分的分子量分布和 ACE 抑制活性的同时测定各超滤组分芳香族氨基酸(Aromatic Amino Acid, AAA)和支链氨基酸(Branched Chain Amino Acid,BCAA)的含量,实验结果如图 1 和表 1 所示,3 000 u 超滤组分中 3 000 u 以下分子物质占 61.83%,其含量高于其他超滤组分;ACE 抑制活性及肽基氨基酸中芳香族氨基酸和支链氨基酸的含量在各段超滤液中最高,经 3 000 u 超滤膜超滤后,3 h 自溶液的 ACE 抑制活性 IC_{50} 值从 1.61 mg/mL 下降至 0.61 mg/mL,肽基氨基酸中 $\Sigma AAA + BCAA$ 的含量从 24.78% 提高至 25.17%。

2.2 ACE 抑制肽的层析分离

将 3 000 u 超滤组分上 Sephadex G-25 凝胶层析柱对 ACE 抑制肽进行纯化,蒸馏水作为洗脱液,实验结果如图 2 所示,3 000 u 超滤组分经 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶层析柱分离后,透过液分成 4 个峰,测定各峰的 ACE 抑制活性,峰 2 的 ACE 抑制活性在 4 个峰中显示了最强的活性, IC_{50} 值从过柱前的 0.61 mg/mL 降至 0.27 mg/mL, $\Sigma AAA + BCAA$ 占肽基氨基酸总量的

28.53% (表 2),其中 Pro 含量增加最多,经 Sephadex G-25 凝胶层析分离后 Pro 占肽基氨基酸总量的 12.53%,增加了 4.85%。对峰 2 作进

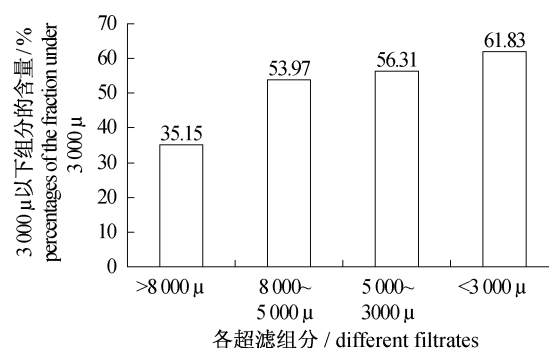


图 1 各超滤组分 3 000 u 以下组分的含量

Fig.1 Percentages of the fraction under 3 000 u in different products during purification

表 1 超滤对自溶产物的影响

Tab.1 Effects of ultrafiltration on autolysate

产物 product	ACE 抑制活性 IC_{50} 值 / (mg/mL) ACE inhibitory activity	芳香族氨基酸 + 支链氨基酸 / % $\Sigma AAA + BCAA$
3 h 自溶产物 three house autolysate	1.61 \pm 0.035	24.78
> 8 000 u 超滤组分 > 8 000 u filtrate	1.98 \pm 0.160	22.48
8 000 ~ 5 000 u 超滤组分 8 000 ~ 5 000 u filtrate	1.26 \pm 0.125	21.42
5 000 ~ 3 000 u 超滤组分 5 000 ~ 3 000 u filtrate	0.91 \pm 0.125	23.60
< 3 000 u 超滤组分 < 3 000 u filtrate	0.61 \pm 0.055	25.17

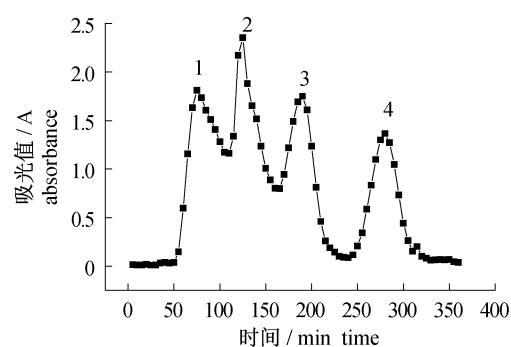


图 2 3 000 u 超滤组分的 Sephadex G-25 葡聚糖凝胶层析色谱图和各峰的 ACE 抑制活性

Fig.2 Gel filtration chromatography of 3 000 u ultrafiltration on the Sephadex G-25 column and the ACE inhibitory activity

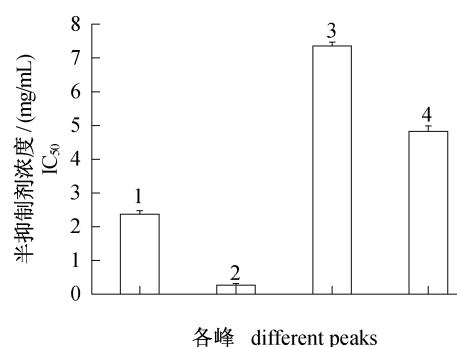


表 2 Sephadex G-25 凝胶层析峰 2 肽基氨基酸的百分含量
Tab. 2 Peptide amino acids percent composition of No. 2 peak of G-25 gel chromatography

氨基酸 amino acid	百分含量/% percentage	氨基酸 amino acid	百分含量/% percentage	氨基酸 amino acid	百分含量/% percentage
天冬氨酸 ASP	10.06	丙氨酸 ALA	5.56	苯丙氨酸 PHE	4.30
苏氨酸 THR	4.56	缬氨酸 VAL	4.18	赖氨酸 LYS	2.06
丝氨酸 SER	4.32	甲硫氨酸 MET	4.18	组氨酸 HIS	4.45
谷氨酸 GLU	22.27	异亮氨酸 ILE	4.18	精氨酸 ARG	4.18
脯氨酸 PRO	12.53	亮氨酸 LEU	2.51	Σ AAA + Σ BCAA	28.53
甘氨酸 GLY	13.91	酪氨酸 TYR			

一步纯化,经 SP Sephadex C-25 离子交换层析柱分离后,峰 2 被分为三个组分(图 3),收集各组分峰上 Sephadex G-15 葡聚糖凝胶层析柱进一步纯化,如图 4 所示,经进一步纯化后组分 2I 分成两个组分 2Ia、2Ib,组分 2II、2III 仍只有一个组分。测定各组分的 ACE 抑制活性,组分 2III 的活性较高,组分 2Ia、2Ib、2II 的活性十分接近。用 HPSEC 测定四个组分的分子量分布,并用 RP-HPLC 分析各组分的肽谱,从图 5-a 可见,组分 2II 以小分子肽为主要成分,且肽谱(图 5-b)显示其肽含量较多,因此确定对组分 2II 作进一步纯化。

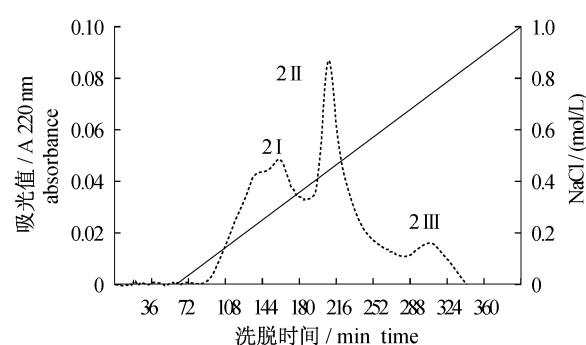


图 3 峰 2 的 SP sephadex C-25 离子交换层析色谱图
Fig. 3 Ion-exchange chromatogram on the SP-Sephadex C-25 column of No. 2 peak

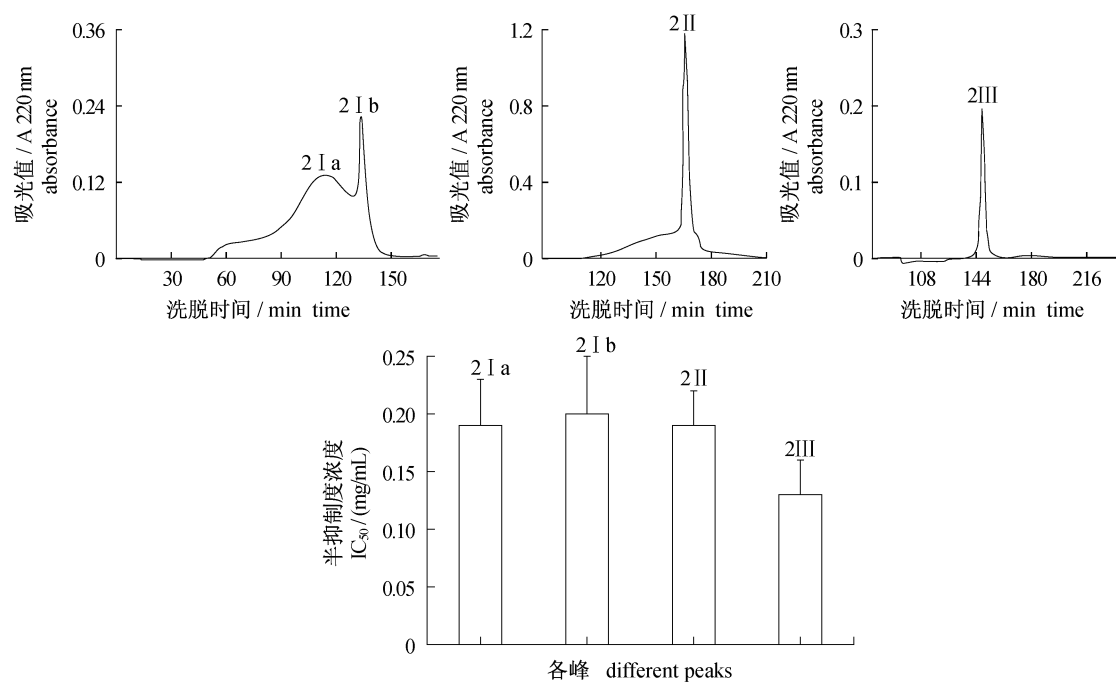


图 4 SP Sephadex C-25 离子交换层析各峰脱盐后图谱及 ACE 抑制活性
Fig. 4 Ion-exchange chromatography of active fraction on the SP-Sephadex C-25 column and ACE inhibitory activity

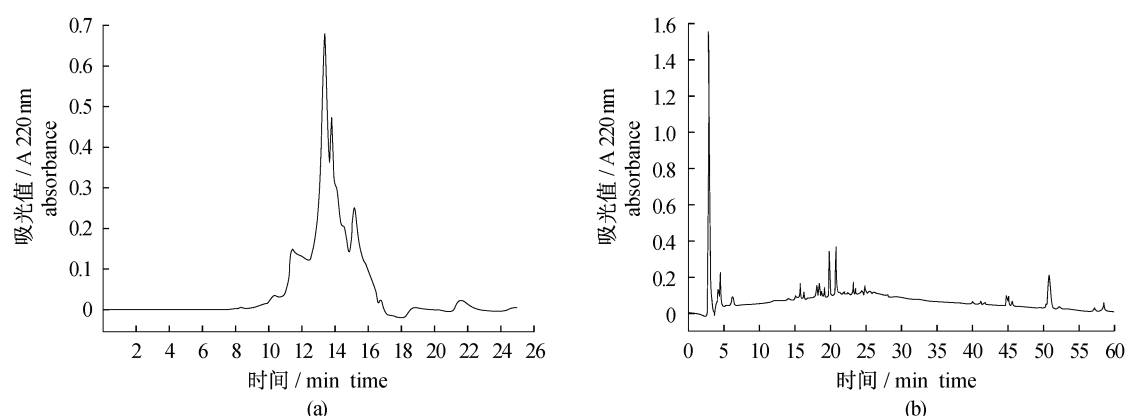


图 5 组分 2 II 的 HPSEC 图谱及肽谱图

Fig. 5 HPSEC chromatogram and peptide mapping of fraction 2 II

2.3 ACE 抑制肽的 RP-HPLC 纯化

组分 2 II 上 RP-HPLC 进一步纯化,获得四个组分(图 6)2 II a、2 II b、2 II c、2 II d,测定 ACE 抑制活性,2 II b 的活性在四个组分中最高、2 II c 和

2 II d 的 ACE 抑制活性较高,而 2 II a 活性则较低。活性较高的组分 2 II b、2 II c 和 2 II d 在同一个 RP-HPLC 上进一步纯化,获得了成分较纯的 2 II b、2 II c 和 2 II d 组分。

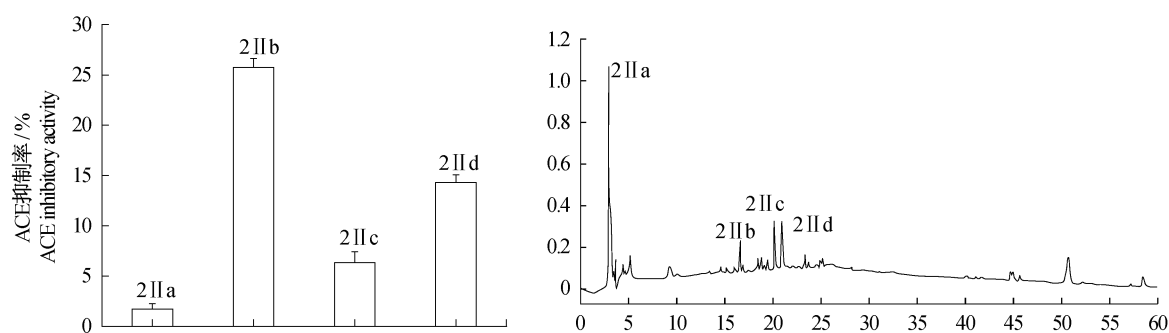


图 6 组分 2 II 的 RP-HPLC 图谱及各组分的 ACE 抑制活性(0.04 mg/mL)

Fig. 6 RP-HPLC of fraction 2 II and ACE inhibitory activity of fractions(0.04 mg/mL)

2.4 ACE 抑制肽氨基酸序列测定

利用质谱测定组分 2 II d 的氨基酸序列,2 II d 经一级质谱碎裂获得较多的离子片断,从众多离子片断中选择信号较强、分子量为 279.1、229.1 的离子片断进行二级电离(图 7、图 8),按 Roepstorff 和 Fohlman 提出的命名系统,在 279.1 离子片断二级电离离子片段中(图 7)C 端的 116.1 离子片段($y_1 = 116.1$)和 N 端的 182.0 离子片段($b_1 = 182.0$)和 Tyr-Pro 的离子片段信息吻合,因此推测 2 II d(279.1)的氨基酸序列为 Tyr-Pro(表 3);229.1 的离子片断二级电离离子片段(图 8)中 C 端的 116 离子片段($y_1 = 116$)和 N 端的 132.8 离子片段($b_1 = 132.8$)和 Leu-Pro/Ile-Pro 的离子片段信息吻合,因此推测 2 II d(229.1)的氨基酸序列为 Leu-Pro/Ile-Pro(表 4)。

表 3 2 II d(279.1)可能的几种序列及其 b 离子与 y 离子的理论值

Tab. 3 The theoretical value for b and y ion of the possible sequences of 2 II d (279.1)

肽序列 peptide sequence	b1	y1
Tyr-Pro	181	116
Pro-Tyr	132	165

表 4 2 II d(229.1)可能的几种序列及其 b 离子与 y 离子的理论值

Tab. 4 The theoretical value for b and y ion of the possible sequences of 2 II d (229.1)

肽序列 peptide sequence	b1	y1
Leu-Pro	131	116
Pro-Leu	86	155
Ile-Pro	131	116
Pro-Ile	86	155

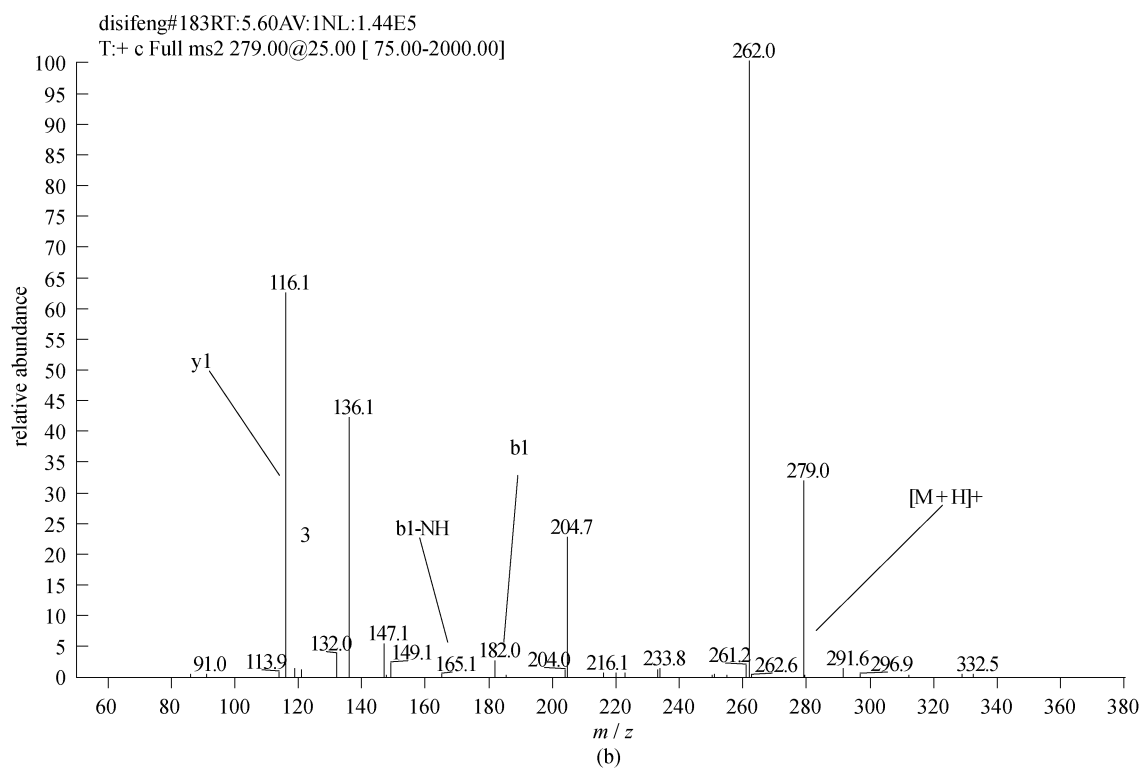
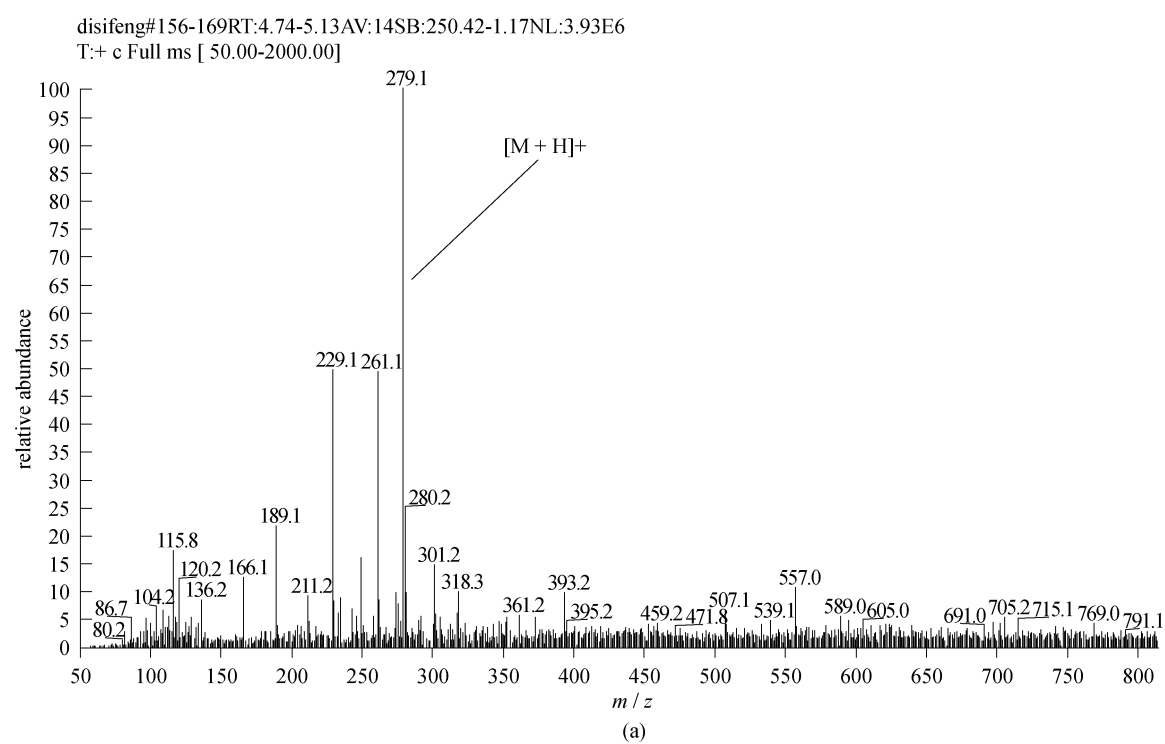


图 7 2 II d (279.1) 的 ESI 一级质谱 (a) 和二级质谱 (b)

Fig. 7 ESI-MS (a) and ESI-MS/MS (b) spectrum of fraction 2 II d (279.1)

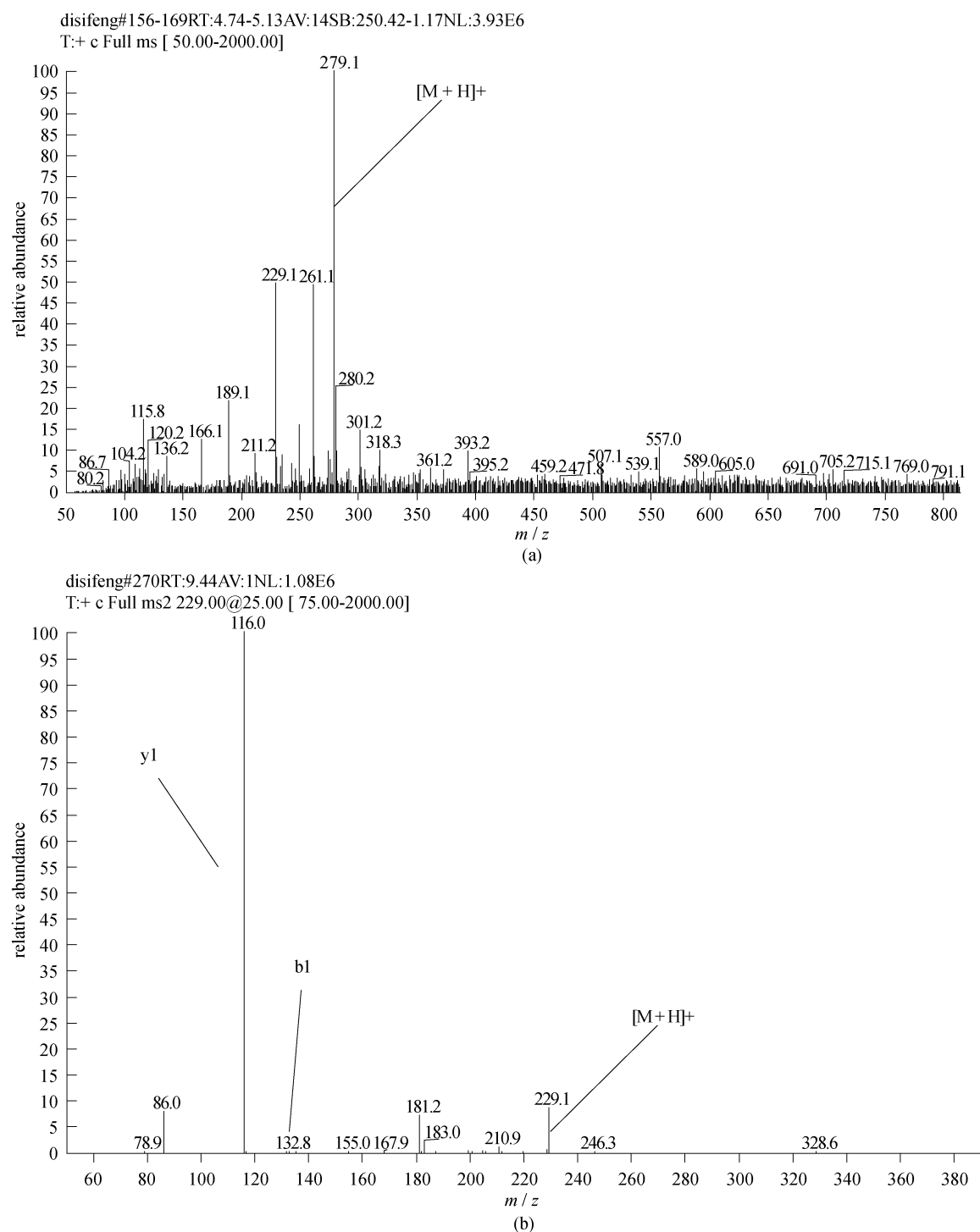


图 8 2 II d (229.1) 的 ESI 一级质谱 (a) 和二级质谱 (b)

Fig. 8 ESI-MS (a) and ESI-MS/MS (b) spectrum of fraction 2 II d (229.1)

3 讨论

3.1 自溶法制备 ACE 抑制肽

ACE 抑制肽的制备多以酶解法和发酵法为主,不同于酶解法利用外源性商品酶酶解蛋白质

制备 ACE 抑制肽,本研究自溶虾头制备 ACE 抑制肽是以虾头内源性酶自溶虾头蛋白质制备而得,由于虾头中的内源性酶是一种混合酶,含有内肽酶和外肽酶,适宜条件下,内、外肽酶在肽链的内、外端分别切割肽链,从而可将大肽链切割成更

短的小肽链。利用自溶方法制备 ACE 抑制肽已有报道,Matsumura 等^[7]从鲑鱼内脏自溶产物中分离纯化出四条 ACE 抑制肽 (Leu-Arg-Pro, Ile-Arg-Pro, Val-Arg-Pro, 和 Ile-Lys-Pro), 它们都有很强的 ACE 抑制活性。我们的前期研究也表明, 虾头自溶产物具有较强的 ACE 抑制活性及较高的肽含量, 因此虾头自溶产物是制备 ACE 抑制肽理想的原料来源。

3.2 降压肽的结构特点与其活性关系

降压肽的抑制活性与分子量大小相关^[12], 还与氨基酸结构和组成密切相关。虾头自溶产物经三种截留分子量的超滤膜超滤后, 超滤组分中低于 3 000 u 小分子物质的含量及 ACE 抑制活性随超滤膜孔径的减小而增大(如图 1、表 1 所示), 四种超滤组分中 <3 000 u 超滤组分含低于 3 000 u 小分子物质的含量最高, 其 ACE 抑制活性最强, 可见 ACE 抑制活性物质主要分布在 <3 000 u 超滤组分中, 也印证了利用截留分子量为 3 000 u 的超滤膜超滤可获得富含 ACE 抑制肽^[13-14]的产物这一说法; ACE 抑制活性除与分子量大小密切相关外, 还与其氨基酸的组成及结构有关, 虾头自溶产物经超滤后, 肽基氨基酸中 AAA 与 BCAA 的含量重新分布, <3 000 u 超滤组分肽基氨基酸中 AAA 与 BCAA 的百分含量居各超滤组分之首, 与其 ACE 抑制活性在各超滤组分中最强相对应, 据此也印证了 ACE 抑制肽的抑制活性与 AAA 和 BCAA 密切相关的关系。

3.3 ACE 抑制肽的分离纯化

虾头自溶产物经超滤分离后, 3 000 u 小分子物质得到富集, 但仍含有部分大分子物质, 要想获得较纯的 ACE 抑制肽, 必须对 3 000 u 超滤组分进一步纯化。本实验利用 Sephadex G-25 凝胶层析、SP Sephadex C-25 离子交换层析柱和 Sephadex G-15 凝胶层析柱对 3 000 u 超滤组分进一步纯化, 经 Sephadex G-25 凝胶层析柱分离后, 活性峰峰 2 的 ACE 抑制活性比 3 000 u 超滤组分的活性约提高了两倍, 同时峰 2 肽基氨基酸中 Σ AAA + BCAA 比 3 000 u 超滤组分提高了 3.36%, 峰 2 肽基氨基酸中 Pro 含量增加最多, 占肽基氨基酸总量的 12.53%, 与过柱前相比增加了 4.85%。由于 ACE 抑制肽 C 端氨基酸为芳香族氨基酸和脯氨酸时其抑制活性较高, 经 Sephadex G-25 凝胶层析分离后自溶产物的 ACE

抑制活性的提高可能与肽基氨基酸中 Pro 含量的显著增加密切相关。峰 2 再经 SP Sephadex C-25 离子交换层析柱和 Sephadex G-15 凝胶层析柱进一步纯化, ACE 抑制活性进一步提高, 获得的四个活性峰中峰 2 III 的活性最高, 峰 2 I a、2 I b、2 II 三个峰的活性稍低于峰 2 III, 但峰 2 III 是离子交换层析的最后一个峰, 盐浓度高, 可能会导致 ACE 抑制活性假阳性增高, 结合峰 2 III 的分子量分布图^[15]在 16.5 min 处开始出现倒峰的现象, 推测可能是样品中盐成分所致。剔除 ACE 抑制活性假阳性增高的峰 2 III, 我们利用 RP-HPLC 对肽含量及 ACE 抑制活性均较高的峰 2 II 进一步纯化, 最终获得了四个成分较纯的组分 2 II a、2 II b、2 II c 和 2 II d。

3.4 ACE 抑制肽氨基酸序列的质谱鉴定

质谱分析是使样品转化成离子, 将离子按质荷比(m/z)大小分离并记录的分析方法。质谱仪测定肽段氨基酸序列时, 其过程是从一级质谱产生的肽段中选择母离子, 进入二级质谱, 经惰性气体碰撞后肽段沿肽链断裂, 由所得的各肽段质量数值差值推定肽序列。根据 Roepstorff 和 Fohlman 提出的命名系统(由 Biemann 等^[16]修正), N 端碎片离子用前几个字母 a、b、c 等表示, C 端离子则用后几个英文字母 x、y、z 等表示。这些碎片可进一步形成脱水、脱氨的离子^[16], 但 b 系列和 y 系列离子出现的机率较大。由于 b 系列和 y 系列离子在质谱中的峰强相对较高, 它们是确定氨基酸序列的主要依据, 可根据这些离子片段质谱信息, 手工推断未知肽的氨基酸序列^[17-18]。组分 2 II d 经一级质谱碎裂获得较多的离子片断, 在众多离子片断中信号较强的片断分子量为 279.1、229.1 两个离子片断, 因此对它们进行二级电离(图 7、图 8)。在 279.1 离子片断的二级电离离子片段中(图 7), 离子片断 165.1 与 182 与肽链 N 端 b 系列离子片断脱氨基相符, 182 离子片断脱氨正好得到 165 离子片断, 酪氨酸的分子量为 181, 由于质谱碎片分子量允许误差为正负 1, 因此推测 N 端氨基酸为酪氨酸; 离子片断 116.1 与 113.9 与肽链 C 端 y 系列离子片断脱氨基相符, 116 离子片断脱氢得到 115 离子片断(113.9 与 115 相差 1), 脯氨酸的分子量为 115, 因此推测 C 端氨基酸为脯氨酸; 从而推测出离子片断 279.1 的肽序列为酪氨酸—脯氨酸(Tyr-

Pro)。229.1 离子片断的二级电离离子中(图 8),离子片断 116.0 与 132.8 正好与亮氨酸/异亮氨酸—脯氨酸脱氨、脱氢后的离子片断的分子量相符,因此推测离子片断 229.1 的肽序列为亮氨酸/异亮氨酸—脯氨酸(Leu-pro/Ile-Pro)。所获得的两条二肽皆是首次从虾头蛋白质中分离鉴定得到,其氨基酸序列此前未见有报道。和许多来源于食品蛋白的 ACE 抑制肽^[19-21]一样,我们分离得到的两条二肽的 C 端均为脯氨酸。Cheung 等^[11]也认为 ACE 抑制肽的抑制活性主要取决于 C 端氨基酸,C 端氨基酸为芳香族氨基酸(包括色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸)和脯氨酸时其抑制活性较高。我们鉴定的两条 ACE 抑制肽符合这一结构模式。下一步的研究工作将利用人工合成序列相同的此两条 ACE 抑制肽,通过细胞实验、生物学实验研究消化吸收性能及降血压功效评价,为进一步开发降血压保健品和药物奠定基础。

参考文献:

- [1] Ferreira S H, Bartelt D C, Greene L J. Isolation of bradykinin potentiating peptides from Bothrops jararaca venom [J]. *Biochemistry*, 1970, 9 (13): 2583 - 2593.
- [2] 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(1): 26 - 32.
- [3] Nii Y, Fukuta K, Yoshimoto R, *et al.* Determination of antihypertensive peptides from an izumi shrimp hydrolysate [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 72(3): 861 - 864.
- [4] Wang J P, Hu J N, Cui J Z, *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(2): 302 - 308.
- [5] Sentandreu M A, Toldra F. Evaluation of ACE inhibitory activity of dipeptides generated by the action of porcine muscle dipeptidyl peptidases [J]. *Food Chemistry*, 2007, 102(2): 511 - 515.
- [6] Shin Z I, Yu R, Park S A, *et al.* His-His-Leu, an Angiotensin I Converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity *in vivo* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49 (6): 3004 - 3009.
- [7] Matsumura N, Fujii M, Takeda Y, *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels autolysate [J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1993, 57 (5): 695 - 697.
- [8] Cheung I W Y, Li-Chan E C Y. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts investigated by Taguchi design [J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(4): 1003 - 1012.
- [9] 朱国萍,曹文红,章超桦,等. 凡纳滨对虾虾头自溶动力学 [J]. *水产学报*, 2010, 34(3): 395 - 403.
- [10] 姜瞻梅,田波,吴刚,等. 高效液相色谱法快速测定降血压肽的血管紧张素转换酶抑制活性 [J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(8): 122 - 126
- [11] Cheung H S, Wang F L, Ondetti M A, *et al.* Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1980, 255(2): 401 - 407.
- [12] Guerard F, Dufosse L, De la broise D, *et al.* Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase [J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, 11(4-6): 1051 - 1059.
- [13] Miguel M, Contreras M M, Recio I, *et al.* ACE-inhibitory and antihypertensive properties of a bovine casein hydrolysate [J]. *Food Chemistry*, 2009, 112(1): 211 - 214.
- [14] Quirós A, Ramos M, Muguerza B, *et al.* Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis* [J]. *International Dairy Journal*, 2007, 17(1): 33 - 41.
- [15] 朱国萍. 凡纳滨对虾虾头自溶制备降血压肽的研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学食品科技学院, 2010.
- [16] Johnson R S, Martin S A, Biemann K. Collision-induced fragmentation of $(M + H)^+$ ions of peptides. Side chain specific sequence ions [J]. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 1988, 86: 137 - 154.
- [17] Yergey A L, Coorsen J R, Backlund P S Jr, *et al.* De novo sequencing of peptides using MALDI/TOF-TOF [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2002, 13(7): 784 - 791.
- [18] Spengler B. De novo sequencing, peptide composition analysis, and composition-based

- sequencing: A new strategy employing accurate mass determination by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2004, 15 (5): 703 – 714.
- [19] Choi H S, Cho H Y, Yang H C, *et al.* Angiotensin I -converting enzyme inhibitor from *Grifola frondosa* [J]. *Food Research International*, 2001, 34 (2 – 3): 177 – 182.
- [20] Qian Z J, Je J Y, Kim S K. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide from hydrolysates of bigeye tuna dark muscle, *Thunnus obesus* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55 (21): 8398 – 8403.
- [21] Nakashima Y, Arihara K, Sasaki A, *et al.* Antihypertensive Activities of peptides derived from porcine skeletal muscle myosin in spontaneously hypertensive rats [J]. *Journal of Food Science*, 2002, 67 (1): 434 – 437.

Isolation and identification of ACE inhibitory peptides from the autolysis product of shrimp head (*Litopenaeus vannamei*)

ZHU Guoping¹, ZHANG Chaohua^{2*}, CAO Wenhong², JI Hongwu²

(1. Center of Forecasting and Analysis, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Product Processing and Safety,

Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

3. College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Shrimp head is susceptible to autolysis under certain conditions, the protein in it is degraded into soluble protein, peptides and amino acids, and some peptides are active peptides which can inhibit the ACE enzyme activity. At present, many ACE inhibitory peptides derived from food protein have been developed. In the present study, two ACE inhibitory peptides (Tyr-Pro and Leu-Pro/Ile-Pro) were highly purified from the shrimp head (*Litopenaeus vannamei*) autolysate by extra fine membrane and a series of column chromatographies. In the first autolysis solution of shrimp head was consecutively extracted through extra fine membrane with molecular weight cut-offs (MWCO) at 8, 5, 3 ku, respectively. The active results shown that filtrate through MWCO at 3 000 u had the highest ACE inhibitory activity. The crude filtrate through MWCO at 3 ku was purified by Sephadex G-25 gel chromatography, SP Sephadex C-25 anion-exchange chromatography as well as Sephadex G-15 gel chromatography, respectively. After that, the ACE inhibitory activity of purified filtrate almost increased by 8 times ($IC_{50} = 0.19 \text{ mg/mL}$) that of crude filtrate. The high active collected fraction from Sephadex G-15 gel chromatography was carried out by RP-HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) twice for the further purification and two kinds of dipeptide were obtained, and the identification of dipeptide by mass spectra showed that they were Tyr-Pro and Leu-Pro/Ile-Pro, and the molecular weight was 279 u and 229 u, respectively.

Key words: shrimp head autolysate; ACE inhibitory peptide; chromatography; RP-HPLC; electrospray ionization mass spectrometry; amino acid sequence

Corresponding author: ZHANG Chaohua. E-mail: zhangch2@139.com