

胶原ACE抑制肽研究进展

刘 轶¹, 马 良^{1,2}, 张宇昊^{1,3,*}

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400716; 2.西南大学 国家食品科学与工程实验教学示范中心, 重庆 400715;
3.农业部农产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(重庆), 重庆 400716)

摘 要: 基于胶原蛋白氨基酸组成与ACE抑制肽的构效特点, 分析胶原蛋白序列中潜在的ACE抑制活性肽段, 并对目前胶原ACE抑制肽的研究现状进行总结; 在此基础上分析胶原ACE抑制肽研究中存在的问题, 并就问题解决提出展望, 以期期为胶原ACE抑制肽开发和深入研究提供一定的参考。

关键词: ACE抑制肽; 胶原蛋白; 酶解

Research Advances in ACE Inhibitory Peptides from Collagen

LIU Yi¹, MA Liang^{1,2}, ZHANG Yu-hao^{1,3,*}

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. National Food Science and Engineering Experimental Teaching Center, Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-products on Storage and Preservation (Chongqing), Ministry of Agriculture, Chongqing 400716, China)

Abstract: Based on collagen amino acid compositions and ACE inhibitory peptide structure-activity characteristics, potential ACE inhibitory peptide sequence in collagen was analyzed, and the development of collagenic ACE inhibitory peptide was summarized. In order to provide useful reference for collagen development and in-depth exploration of ACE inhibitory peptides, we have further analyzed the current problems in the study of collagenic ACE inhibitory peptides and put forward the outlook on the solution of these problems.

Key words: ACE inhibitory peptide; collagen; enzymatic hydrolysis

中图分类号: TS209

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)13-0350-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201313073

我国畜禽和水产产量丰富, 仅2012年我国肉类总产量8384万t, 水产品产量5906万t。然而, 畜禽和水产加工业中产生大量的骨、皮等副产物大多被丢弃或加工成骨粉等低附加值产品。这些副产物中含有丰富的胶原蛋白^[1], 如在骨蛋白中其含量高达90%, 动物真皮层蛋白中也达到80%~85%^[2], 利用畜禽及水产品副产物中的胶原蛋白资源开发具有高附加值的胶原活性多肽是提高畜禽、水产加工业综合效益的有效手段。研究证明, 胶原多肽具有抑制血管紧张素转换酶(ACE)^[3-5]、抑制血小板凝集^[6]、抗氧化^[7-8]、抗肿瘤^[9]等多种活性, 其中研究报道最多的是胶原ACE抑制肽。

ACE抑制肽主要通过血管紧张素转换酶活性部位的Zn²⁺竞争性结合, 阻碍血管紧张素II生成而达到降压的目的。研究表明^[10-11], 多数天然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^[12]。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^[13]。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^[14-17]。

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^[18]。从ACE抑制肽构效角度分析, 胶原蛋白中可能蕴含着丰富的ACE抑制活性肽段, 因此以胶原蛋白为原料开发ACE抑制肽对于畜禽、水产副产物资源高值开发利用具有重要意义。目前已从猪皮、牛皮、鱼皮等原料中制备分离出具有良好ACE抑制效果的胶原多肽。然而, 相对于胶原蛋白内部蕴含的潜在ACE抑制活性肽段, 胶原ACE抑制肽尚需进一步挖掘与开发。

收稿日期: 2013-04-06

作者简介: 刘轶(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品化学与营养学。E-mail: pengliuyi@126.com

*通信作者: 张宇昊(1978—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为蛋白质与生物活性肽。E-mail: zyh1203@163.com

本文基于ACE抑制肽构效特点,对胶原蛋白中潜在的ACE抑制肽段进行分析,结合胶原ACE抑制肽研究进展总结胶原ACE抑制肽研究中存在的问题,并就问题解决提出展望,以期对胶原蛋白ACE抑制肽开发及深入研究提供一定的参考。

1 胶原蛋白潜在ACE抑制活性肽段分析

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^[19]。在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^[20]。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^[21],见图1。

GPMGPSGRGLXGPXGAXGPQGFQGPXGEXGEXG
ASGPMGRGPXGPXGKNGDDGEAGKPGRXGERGPXG
PQGARGLXGTAGLXGMKGHRGFSGLDGAKGADAGPAG
PKGEXGSXGENGAXGQMGRGLXGERGRXGAXGPAG
ARGNDGATGAAGPXGPTGPAGPXGFXGAVGAKGEGG
PQGRGSEGPQGVRGEXGPXGPAGAAGPAGNXGADG
QXGAKGANGAXGIAGAXGFXGARGPSGPQGPSGPXGP
KGNSEXGAXGSKGDTGAKGEXGPTGIQGPXGPAGEE
GKRGARGEXGPAGLXGPXGERGGXGSRGFXGADGVA
GPKGPAGERGAXGPAGPKGSXGEAGRGEAGLXGAK
GLTGSXGSXGPDGKTGPXGPAGQDGRXGPXGPXGAR
GQAGVMGFXGPKGAAGEXGKAGERGVXGPXGAVGP
AGKDGEAGAQPXGPAGPAGERGEQGPAGSXGFQGL
XGPAGPXGEAGKXGEQGVXGDLGAXGPSGARGERGF
XGERGVQGPXGPAGPRGANGAXGNDGAKGDAGAXG
AXGSQGAXGLQGMXGERGAAGLXGPKGDRGDAGPK
GADGAPGKDGVRGLTGPIGPXGPAGAXGDKGEAGPSG
PAGPTGARGAXGDRGEXGPXGPAGFAGPXGADGQXG
AKGEXGDAGAKGDAGPXGPAGPAGPXGPIGNVAXG
PKGARGSAGPXGATGFXGAAGRVPXGPSGNAGPXGP
XGPAGKEGSKGRGETGPAGRXGEVGPXGPXGPAGEK
GAXGADGPAGAXGTPGPQGIAGQRGVVGLXGQRGER
GFXGLXGPSGEXGKQGPSGASGERGPXGPMGPXGLAG
PXGESGREGAXGAEGSXGRDGSXGAKGDRGETGPAGP
XGAXGAXGAXGPVGPAGKSGDRGETGPAGPAGPIGPV
GARGPAGPQGRGDKGETGEQGDRIKGHRGFSGLQG
PXGPXGSXGEQGPSGASGPAGPRGPXGSAGSXGKDLG
NGLXGPIGXGPRGRTGDAGPAGPXGPXGPXGPXGPP

图1 牛皮I型胶原蛋白 α_1 链螺旋区氨基酸序列^[22]

Fig.1 Amino acid sequence of type I bovine collagen α_1 chain helical region^[22]

Pro与Hyp大量存在预示胶原蛋白中潜在着诸多ACE抑制活性肽段,本课题组利用Alcalase水解经不同预处理的牛皮I型胶原蛋白,活性测定结果显示各水解液均具有较强ACE抑制活性。采用LC-MS/MS分析水解物中主要多肽序列,发现大量未经报道但可能具有强烈ACE抑制活性的序列,如与GPV(IC₅₀=4.67 μ mol/L)^[5]具有相同C端氨基酸的GPIGPV,与GAPGLPGP(IC₅₀=29.4 μ mol/L)^[4]、GFPGP(IC₅₀=91 μ mol/L)^[10]C末端3个氨基酸相同的EXGPAGLPGP和LTGSPGSPGP,以及在GPAG^[10]的N末端添加Arg的RGPAGP等。此外,三螺旋区域的GDRGDAGPK、GVAGPK、MGPR、GEGGPQGP、GPSGPPGPK、GLPGPKRGPPGPMGPPGPAGPR、GPAGPPGPI在C末端第二位上均为Pro,而C末端氨基酸为Lys、Arg或极度疏水氨基酸,均与ACE抑制肽构效高度吻合,也有可能是潜在的ACE抑制肽。由此可见,胶原三螺旋结构区域存在着大量潜在ACE抑制活性肽段。

2 胶原多肽ACE抑制与降血压活性研究进展

相对于胶原蛋白三螺旋结构中潜在的活性序列,目前已报道的胶原ACE抑制肽序列并不多,但胶原多肽无论在体外ACE抑制还是体内降血压方面均表现出较强活性。

2.1 ACE抑制活性

表1中胶原ACE抑制肽序列共13个,活性范围为2.55~148 μ mol/L,其抑制活性较大豆ACE抑制肽(活性范围为4.8~850 μ mol/L)^[27-30]更强。在胶原ACE抑制肽中,Gly-Pro-Leu序列活性最高,其IC₅₀为2.6 μ mol/L,从牛皮和阿拉斯加鳕鱼皮酶解液中均分离出该肽段。

从ACE抑制肽的构效角度考虑,表1中全部序列均符合ACE抑制肽构效特点,在C末端的3个氨基酸中出现频率最高的氨基酸分别是Pro、Hyp、Lys、Arg、Leu,且Pro出现频率最高,在C末端出现4次,在C端第2位出现6次,C端第3位出现2次,当C端第2、3位为Pro时,其C末端氨基酸为Arg、Leu、Val、Met。仅Gly-Leu-Hyp-Gly-Ser-Arg-Gly-Glu-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly和Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gly-Gly-Ile-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly在C末端的3个氨基酸中未出现Pro,但其含有Hyp或有利于与结合位点结合的Arg。由此可见,C末端3位出现Pro的多肽具有较高ACE抑制活性,且Hyp、Arg、Lys及强疏水性氨基酸的存在,有利于增强其ACE抑制活性。

表1胶原ACE抑制肽序列中,有11种ACE抑制肽均来自胶原蛋白三螺旋结构区域,仅Met-Ile-Phe-Pro-Gly-Gly-Pro-Glu-Leu和Leu-Leu-Met-Leu-Asp-Asn-Asp-Leu-Pro-Pro例外,这两种ACE抑制肽可能来源于胶原蛋白的端肽,

表 1 胶原蛋白源ACE抑制肽
Table 1 ACE inhibitory peptides from collagen

原料	前处理	蛋白酶	序列	IC ₅₀ /(μmol/L)	分离纯化	参考文献
鳕鱼皮	无	α-胰凝乳蛋白酶	Pro-Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Thr-Gly-Pro	95	Sephadex-G25凝胶过滤、反相高效液相色谱(RP-HPLC)	[23]
			Gln-Leu-Gly-Phe-Leu-Gly-Pro-Arg	148		
黄鳍金枪鱼排	无	α-胰凝乳蛋白酶	Met-Ile-Phe-Pro-Gly-Gly-Pro-Glu-Leu	26	超滤、连续色谱分离	[24]
鳕鱼皮			Leu-Leu-Met-Leu-Asp-Asn-Asp-Leu-Pro-Pro	35.7	快速蛋白液相色谱、RP-HPLC	[25]
牛皮明胶	原料为明胶	胶原蛋白酶	Gly-Pro-Leu	2.55	凝胶过滤色谱、离子交换色谱、RP-HPLC	[5]
			Gly-Pro-Val	4.67		
鸡腿	蒸煮后提取胶原蛋白	曲霉属蛋白酶	Gly-Ala-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro	29.4	超滤、高效液相色谱	[4]
			Gly-Ala-Hyp-Gly-Pro-Ala-Gly-Pro-Gly-Ile-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly	45.6		
			Gly-Leu-Hyp-Gly-Ser-Arg-Gly-Glu-Arg-Gly-Leu-Hyp-Gly	60.8		
			Gly-Ile-Hyp-Gly-Glu-Arg-Gly-Pro-Val-Gly-Pro-Ser-Gly	43.4		
猪胶原蛋白	原料为胶原蛋白	曲霉属蛋白酶	Gly-Phe-Gly-Pro	91	膜分离、凝胶过滤色谱、离子交换色谱、RP-HPLC	[10]
阿拉斯加青鳕鱼皮	原料为明胶	碱性蛋白酶、链霉蛋白酶E、胶原蛋白酶	Gly-Pro-Leu	2.6		[26]
			Gly-Pro-Met	17.13		

也有可能是序列分析中存在错误。这两个序列分别采用Edman降解和飞行时间质谱分析得到，本课题组研究过程中发现，大多数分析软件分析胶原蛋白时存在两方面问题，一是Hyp在软件中没有定义，因此无法被识别；二是序列库中并无胶原蛋白序列，因此其建议的序列并不是正确的胶原蛋白序列。

2.2 降血压活性

胶原ACE抑制肽在体内具有良好的降压效果。Saiga等^[4]以3g/kg(体质量)的剂量将鸡胶原蛋白水解液口服于原发性高血压大鼠(SHR)，其血压明显降低，在8h时达到最低值。Zhao Yuanhui等^[31]将酶解海参得到的ACE抑制肽MEGAQEAQGD(IC₅₀=15.9μmol/L)以3μmol/L/kg(体质量)的剂量饲喂于每只SHR，在3h时血压达到最低值，且降压作用可维持5h。Lin Lin等^[32]将鲑鱼皮明胶水解液中分子质量小于2kD的部分(IC₅₀=0.33mg/mL)以不同剂量口服于肾血管型高血压大鼠(RHR)，生理盐水作为标准对照组，1个月后，与对照组相比，低剂量组50mg/(kg·d)降压效果不显著($P>0.05$)，而高剂量组200mg/(kg·d)大鼠的血管收缩压、舒张压均显著降低($P<0.05$)。Zhao Yuanhui等^[3]将分子质量在1kD以下的海参明胶水解液(IC₅₀=0.35mg/mL)以不同剂量作用于RHR大鼠1个月后，低剂量组40mg/(kg·d)、高剂量组120mg/(kg·d)血管收缩压分别下降93.9、73.0mmHg，血管舒张压分别下降53.0、67.9mmHg，其降压效果远优于鲑鱼降血压肽^[33]、玉米大豆复合降血压肽^[34]。

许多ACE抑制肽属于底物型，即经过体内肠道酶酶解消化后，短肽ACE抑制活性明显降低，甚至消失，如玉米^[35]、米酒^[36]ACE抑制肽等。然而，目前为止尚未见胶原ACE抑制肽属底物型方面的研究报道。Ichimura等^[10]发现，以500mg/kg的剂量将Gly-Pro口服于SHR，可显著降低血压，即使50mg/kg的剂量，也具有降压作用，而口服Pro和Gly的混合物并无降压作用，这说明进入体内的Gly-Pro可抵制肠道酶的降解而发挥降血压作用。他

们推断胶原蛋白水解液表现出的降血压作用，很大程度上因为Gly-Pro在胶原蛋白的重复序列(Gly-Pro-X)_n中广泛存在，而一些肽段即使被胃肠酶降解，产物仍然包括具有降血压活性的Gly-Pro，因此胶原蛋白是制备高降压活性ACE抑制肽的优质原料。Iwai等^[37]对具有ACE抑制作用的明胶水解液进入人体前后血液中多肽的变化进行了研究，发现摄入后，血液中含Hyp的肽如Pro-Hyp、Ala-Hyp、Ala-Hyp-Gly、Pro-Hyp-Gly、Ile-Hyp、Leu-Hyp和Phe-Hyp的含量显著增高，且Pro-Hyp的含量最高。说明由于Hyp的存在，胶原ACE抑制肽可以有效抑制肠道酶降解进而产生抗血压升高作用。

3 胶原ACE抑制肽研究中存在的问题

同目前已经报道的胶原ACE抑制肽相比，胶原蛋白中尚潜在着大量ACE抑制活性肽段；此外，胶原中富含Hyp，但很多报道中的胶原多肽序列均不含Hyp。结合课题组研究经验，认为目前胶原ACE抑制肽研究中存在以下几方面问题，包括原料的前处理、酶的选择、胶原ACE抑制肽的序列分析。

3.1 原料的前处理

胶原蛋白螺旋区3条α链借助甘氨酸、羟脯氨酸残基肽键间形成的氢键交联在一起，而端肽区域则以共价键与邻近分子的螺旋区相连接；此外，在氨基酸残基侧链极性基团产生的离子键、氢键和范德华力以及非极性基团产生的疏水键、范德华力等作用力共同作用下，三螺旋结构异常稳定^[2,19]，很难被基质金属蛋白酶以外的其他蛋白酶水解。基质金属蛋白酶(如胶原蛋白酶)可作用于胶原蛋白中特定的Gly-Leu位点或距N末端约3/4处的Gly-Ile位点，进而使三螺旋结构解旋，这对胶原蛋白进一步分解至关重要，因为只有将三股螺旋结构破坏，暴露出内部胶原链后，其他蛋白酶才能发挥作用^[38]。

为破坏三螺旋结构，胶原蛋白水解前通常需进行预

处理。目前胶原肽制备研究中(表1),大部分都要经过原料预处理,仅有黄鳍金枪鱼和鳕鱼皮未经预处理,然而,这两者酶解时间分别长达8、12h。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^[39]、鳕鱼皮^[25]提取明胶的时间分别长达24、30h。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。

3.2 酶的选择

胶原蛋白的氨基酸组成为制备高活性的ACE抑制肽提供了基础,当ACE抑制肽C末端出现某些特定氨基酸时,其抑制活性更高。为提高C末端特定氨基酸出现频率,应根据蛋白酶特异性,选择合适的蛋白酶作用于水解过程。目前已应用在ACE抑制肽生产中的蛋白酶主要有碱性蛋白酶^[40-41]、胰蛋白酶^[42]、胶原蛋白酶^[26]、胃蛋白酶^[33,43]、木瓜蛋白酶^[44-45]、中性蛋白酶^[46]、 α -胰凝乳蛋白酶^[24]等,见表2。

表2 酶作用位点
Table 2 The target sites of the enzyme

酶	作用位点	参考文献
碱性蛋白酶	专一性水解疏水性氨基酸终端	[47]
菠萝蛋白酶	Lys、Arg、Phe、Tyr羧基端	[47]
木瓜蛋白酶	Lys、Arg、Phe羧基端	[47]
中性蛋白酶	Leu、Phe氨基端	[47]
无花果蛋白酶	Phe、Tyr羧基端	[47]
胃蛋白酶	芳香族氨基酸或其他疏水性氨基酸的氨基端或羧基端	[48]
胰蛋白酶	Lys、Arg的羧基端	[48]
α -胰凝乳蛋白酶	Phe、Trp、Tyr、Leu的羧基端	[48]
嗜热菌蛋白酶	疏水残基(Leu、Ile、Phe、Val、Met、Trp)的羧基端	[49]

综合分析国内外酶解胶原蛋白制备ACE抑制肽所选用的酶^[4-5,10,23-26,42,44,50-53],发现碱性蛋白酶应用最广泛,它可特异性水解疏水性氨基酸终端,在胶原蛋白中有较多的酶切位点。其次是木瓜蛋白酶,它能作用于Lys、Arg、Phe的羧基端,而这3种氨基酸在C末端时有利于增强ACE抑制肽的抑制活性。此外, α -胰凝乳蛋白酶也常用作胶原ACE抑制肽的水解酶。从作用位点角度考虑,胃蛋白酶、胰蛋白酶也能得到符合构效特点的ACE抑制肽,这两种蛋白酶通常应用在胶原蛋白复合酶解中,可能是因为其单独降解胶原蛋白效果不佳。在复合酶解过程中需考虑酶的种类、添加顺序等因素对产物活性的影响。Kim等^[5]利用Alcalase、 α -胰凝乳蛋白酶、链霉菌蛋白酶E、中性蛋白酶、胰蛋白酶对牛皮胶原进行水解,发现前三者水解产物活性比另外两种高;将这几种蛋白酶进行组合,发现蛋白酶加入时间和顺序不同,产物活性也各不相同,Alcalase与链霉菌蛋白酶E组合产物降血压活性最高。由此

可见,胶原ACE抑制肽制备过程中,要根据酶作用位点结合胶原蛋白氨基酸组成特异性选择适宜的蛋白酶,并探究有利于制备ACE抑制肽的蛋白水解酶及其组合,从而大大提高胶原ACE抑制肽制备效率。

3.3 胶原ACE抑制肽的序列分析

分离提取与序列分析是多肽研究中的常规手段。本课题组统计发现表1所列举的胶原ACE抑制肽序列,仅有1篇报道的序列中含有Hyp,此外有2篇文献报道的序列不具备三螺旋结构的重复序列(Gly-Pro-X)_n。目前多肽序列分析通常采用Edman降解、飞行时间质谱或LC-MS/MS进行,本课题组在研究中尝试了几种分析方法,发现存在两方面问题,一是Edman降解后的氨基酸分析不识别Hyp,因为Hyp是修饰氨基酸,大多数氨基酸测序仪无法识别,进而造成序列研究结果出现偏差;二是飞行时间质谱或者LC-MS/MS研究中,序列预测与分析通常采用一些软件,如Biotools等,然而这些软件数据库中通常没有胶原蛋白序列,因此分析时会得到非源自胶原蛋白的错误序列。因此,采用软件分析时,必须先在数据库导入胶原蛋白的序列。胶原蛋白的序列可以在一些数据库如Uniprot等中查找,但这些数据库中的胶原序列同样存在一个问题,即序列中Hyp和Pro均以P的简写出现,并未区分Pro和Hyp,进而造成预测的序列只有Pro而无Hyp。由此可见,胶原ACE抑制肽序列分析研究中,若要采用Edman降解或LC-MS/MS方法测定肽段序列,则需在测定系统中专门定义Hyp,并且找到完全正确的源蛋白序列,才能得到准确的测定结果。

4 胶原蛋白制备ACE抑制肽前景展望

我国畜禽、水产资源丰富,每年都会有大量皮或骨等下脚料废弃,这些废弃物中含有丰富的胶原蛋白。胶原蛋白中氨基酸组成非常适合于ACE抑制肽的开发,利用皮、骨中的胶原蛋白制备ACE抑制肽不仅使资源得以充分利用,增加产品的附加值,同时也扩展了ACE抑制肽的原料来源。目前胶原ACE抑制肽研究中存在着不少问题,如原料前处理过程复杂、操作繁琐;蛋白酶选择与使用盲目,无法高效制备胶原ACE抑制肽;序列分析中因胶原蛋白序列获得与准确性以及Hyp识别与定义方面的问题,致使获得结果不准确。在今后的研究中,应重点集中在如下方面:1)寻找适于产业化的快速、高效胶原蛋白预处理方法,破坏胶原的三螺旋结构,进而提高酶解效率。2)在酶的选择方面,探究酶水解位点与胶原蛋白序列以及ACE抑制肽构效的关系,实现定向酶水解,有针对性地提高ACE抑制肽地释放。3)研究并构建各种胶原蛋白的准确序列,用于序列分析,同时在设备分析软件中加入Hyp定义,以利于获得更为准确的序列分析结果。

目前酶解胶原蛋白制备ACE抑制肽的研究在世界范围内尚处于起步阶段,仍有不少问题有待研究。在人们生活水平不断提高、自我保健意识不断增强、越来越倾向于通过非药物疗法达到降血压效果的时代大背景下,胶原ACE抑制肽的研究极具科研价值,亦具有良好的市场前景。

参考文献:

- [1] 李二凤, 何小维, 罗志刚. 胶原蛋白饲料粉的制备、组成分析及在饲料中的应用[J]. 粮食与饲料工业, 2006(6): 33-34.
- [2] 汤克勇. 胶原物理与化学[M]. 北京: 科学出版社, 2012: 210-279.
- [3] ZHAO Yuanhui, LI Bafang, LIU Zunying, et al. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(12): 1586-1591.
- [4] SAIGA A, IWAI K, HAYAKAWA T, et al. Angiotensin I -converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2008, 56(20): 9586-9591.
- [5] KIM S K, BYUN H G, PARK P J, et al. Angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2001, 49(6): 2992-2997.
- [6] NONAKA I, KATSUDA S, OHMORI T, et al. *in vitro* and *in vivo* anti-platelet effects of enzymatic hydrolysates of collagen and collagen-related peptides[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61(5): 772-725.
- [7] KIM S K, KIM Y T, BYUN H G, et al. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2001, 49(4): 1984-1989.
- [8] 刘小玲, 林莹, 尹秀华, 等. 罗非鱼皮胶原肽的制备及抗氧化活性研究[J]. 食品与机械, 2007, 23(3): 92-95.
- [9] GAO Xiaoyan, GROVES M J. Fibronectin-binding peptides. I. Isolation and characterization of two unique fibronectin-binding peptides from gelatin[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 1998, 45(3): 275-284.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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): 81-86.
- [15] 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): 3-7.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 蒋挺大. 胶原与胶原蛋白[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 9-27.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] HULMES D J, MILLER A, PARRY D A, et al. Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing[J]. Journal of Molecular Biology, 1973, 79(1): 137-148.
- [23] LEE J K, JEON J K, BYUN H G. Effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate[J]. Food Chemistry, 2011, 125(2): 495-499.
- [24] 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.
- [25] HIMAYA S W A, NGO D H, RYU B, et al. An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin- I converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress[J]. Food Chemistry, 2012, 132(4): 1872-1882.
- [26] BYUN H G, KIM S K. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin[J]. Process Biochemistry, 2001, 36(12): 1155-1162.
- [27] WU Jianping, DING Xiaolin. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides[J]. Food Research International, 2002, 35(4): 367-375.
- [28] KODERA T, NIO N. Identification of an angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysates by a soybean protease and the antihypertensive effects of hydrolysates in spontaneously hypertensive model rats[J]. Journal of Food Science, 2006, 71(3): 164-173.
- [29] CHEN J R, OKADA T, MURAMOTO K, et al. Identification of angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides derived from the peptic digest of soybean protein[J]. Journal of Food Biochemistry, 2002, 26(6): 543-554.
- [30] KUBA M, TANA C, TAWATA S, et al. Production of angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein with *Monascus purpureus* acid proteinase[J]. Process Biochemistry, 2005, 40(6): 2191-2196.
- [31] ZHAO Yuanhui, LI Bafang, DONG Shiyuan. A novel ACE inhibitory peptide isolated from *Acaudina molpadioides* hydrolysate[J]. Peptides, 2009, 30(6): 1028-1033.
- [32] LIN Lin, LÜ Shun, LI Bafang. Angiotensin I -converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates[J]. Food Chemistry, 2012, 131(1): 225-230.
- [33] FUJITA H, YAMAGAMI T, OHSHIMA K. Effects of an ACE-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive at and in borderline and mildly hypertensive subjects[J]. Nutrition Research, 2001, 21(8): 1149-1158.

- [34] 王进, 何慧, 郭辉, 等. 玉米大豆复合肽体内ACE 抑制活性研究[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(8): 38-41.
- [35] 刘勇, 马海乐. 玉米ACE I 活性肽体内降血压功能试验研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(6): 55-57.
- [36] SAITO Y, WANEZAKI K, KAWATO A, et al. Structure and activity of angiotensin- I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sakeLees[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1994, 58(10): 1767-1771.
- [37] IWAI K, HASEGAWA T, TAGUCHI Y, et al. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2005, 53(16): 6531-6536.
- [38] CHUNG L, DINAKARPANDIAN D, YOSHIDA N, et al. Collagenase unwinds triple-helical collagen prior to peptide bond hydrolysis[J]. Embo Journal, 2004, 23(15): 3020-3030.
- [39] 林琳, 李八方, 吕顺, 等. 鲑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.
- [40] HYUN C K, SHIN H K. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides[J]. Process Biochemistry, 2000, 36(1): 65-71.
- [41] FAHMI A, MORIMURA S, GUO H C, et al. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales[J]. Process Biochemistry, 2004, 39(10): 1195-1200.
- [42] MARCZAK E D, USUI H, FUJITA H, et al. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed[J]. Peptides, 2003, 24(6): 791-798.
- [43] 章超桦, 曹文红, 吉宏武, 等. 中国毛虾 ACE 抑制肽的初步研究[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 97-102.
- [44] NGO D H, RYU B, VO T S, et al. Free radical scavenging and angiotensin- I converting enzyme inhibitory peptides from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2011, 49(5): 1-5.
- [45] 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.
- [46] 冯雅蓉, 马丽珍. 羊骨降血压肽制备工艺的研究[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2011, 31(3): 253-256.
- [47] 刘欣. 食品酶学[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2006: 53.
- [48] 坎普R M, 威特曼-利伯德B, 乔里-帕帕多普洛T. 蛋白质结构分析、制备、鉴定与微量测序[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 44-45.
- [49] 黄家音, 朱禹洁, 沈金玉. 降血压肽研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(6): 83-84.
- [50] 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.
- [51] GU Ruizeng, LI Chenyue, LIU Wenyong, 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.
- [52] MORINAGA Y, IWAI K, TOMITA H, et al. Chemical nature of a new antihypertensive peptide derived from jellyfish[J]. Food Science and Technology Research, 2010, 16(4): 333-340.
- [53] ZENG Mingyong, CHEN Shengjun, LI Laihao, et al. Separation and partial characterization of angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptides from enzyme hydrolysates of red tilapia skin collagen[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2007, 11(2): 397-400.