

螺旋藻源血管紧张素转化酶抑制肽的纯化和鉴定*

鲁 军^{1,2)} 任迪峰^{1,2)**} 王建中¹⁾ TANOKURA Masaru²⁾

(¹⁾北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083;

²⁾Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan))

摘要 血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂通过影响肾素-血管紧张素系统,对减缓和抑制高血压具有重要的作用。该研究通过超滤、凝胶过滤色谱、反相高效液相色谱等方法,从钝顶螺旋藻的木瓜蛋白酶水解液中分离、纯化得到一种血管紧张素转化酶(ACE)抑制肽,并利用基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)和氨基酸测序对纯化肽进行鉴定。此外,对其抑制类型和体外模拟消化环境稳定性也进行了研究。结果表明,分子质量范围为0~3 000 ku的酶解液ACE抑制活性最高, IC_{50} 值为 $(1.03 \pm 0.04)g/L$ 。该部分酶解液通过纯化获得ACE抑制肽, IC_{50} 值为 $(0.0094 \pm 0.0002)g/L$,相当于 $(27.36 \pm 0.14)\mu mol/L$,序列经鉴定为Val-Glu-Pro。Lineweaver-Burk图和Dixon图表明该ACE抑制肽为非竞争性抑制剂, K_i 值为 $(23.59 \pm 0.54)\mu mol/L$ 。体外稳定性实验显示,该抑制肽在胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶等胃肠蛋白酶的消化下能够保持良好的抑制活性,表明螺旋藻源ACE抑制肽可以用于降血压功能食品和药剂方面,具有很好的发展前景。

关键词 钝顶螺旋藻,血管紧张素转化酶,ACE抑制肽,纯化,鉴定

学科分类号 Q5, Q55

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00647

血管紧张素转化酶(ACE, EC. 3.4.15.1)是肾素-血管紧张素系统中的关键酶,对高血压具有至关重要的调控作用^[1]。ACE可以从没有生理活性的血管紧张素 I (Ang I) 的 C 端切去 2 个氨基酸残基 - His-Leu, 使其转化为具有升压活性的血管紧张素 II (Ang II)。ACE 还可将血管舒缓激肽降解为失活片段,导致血管收缩,引起血压升高。ACE 抑制剂能够与 ACE 稳定地结合,阻碍 Ang II 的形成,并抑制血管舒缓激肽的降解,从而降低血压^[2]。自从卡托普利(Captopril)问世以来^[3],许多人工合成 ACE 抑制剂在高血压的防治中得到广泛的使用,但是这些人工抑制剂都不可避免地带有一定程度的副作用^[4]。由于生物蛋白质水解或酶解产物中含有的多肽通常具有有益的生物活性,而没有人工合成制剂的副作用,近些年正越来越受到人们的重视。一些研究已经从不同生物来源中获得了具有 ACE 抑制活性的多肽,在动物体内^[5-8]或病人^[9-11]中验证了这些 ACE 抑制肽的降压作用。

螺旋藻(*Spirulina platensis*)为蓝藻属的一个种,富含蛋白质、 β -胡萝卜素、 γ -亚麻酸、维生素 E 等多种营养成分^[12],具有防病毒^[13]、抗癌^[14]、抗氧化^[15]和增强免疫^[16]等生理功能,被世界粮农组织

(FAO)誉为 21 世纪人类最理想的食物^[17]。螺旋藻中的蛋白质含量是大豆蛋白质的两倍,是目前已知植物中蛋白质含量最高的一种,其中含有 18 种氨基酸,包括人体必需的全部 8 种氨基酸^[17],是获得天然活性肽的潜在宝贵资源。本研究使用凝胶过滤色谱、反相高效液相色谱等手段,从螺旋藻酶解液中提取并纯化 ACE 抑制肽,纯化后的多肽通过氨基酸测序和质谱分析进行结构鉴定。此外,本文也对所得多肽的 ACE 抑制类型和稳定性进行了研究,为将来应用于功能食品和药品领域奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)喷雾干燥粉末从内蒙古再回首生物工程有限公司获得;兔肺 ACE、牛血清白蛋白、质谱标准物血管紧张素 II 和 α -氰

* 国家留学基金([2007]3021),北京林业大学科技创新计划优秀青年教师专项(BLYX200935)和基础科学研究团队专项资助项目(TD2010-3)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62336700, E-mail: rendifeng@163.com

收稿日期: 2009-11-01, 接受日期: 2009-12-15

基-4-羟基肉桂酸购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 荧光基质 Abz-FRK(Dnp)-P 购自美国 BIOMOL 公司; 除非文中另有说明, 其他试剂均从日本 Wako 化学试剂公司购买; 全部试剂均为分析纯或色谱纯等级; 所有溶液均以 Milli-Q 高纯水(Milli-Q PLUS, 美国 Millipore 公司)配制而成。

1.2 主要仪器与设备

RF-5301PC 荧光分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; AKTA 蛋白质分离纯化系统, 瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司; F2-25SC 真空冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司; N-1000 型 Eyela 旋转蒸发仪, 日本东京理化器械株式会社; 基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱仪, 日本 Kratos Analytical Shimadzu 公司; PPSQ-31A/33A 蛋白质/多肽自动序列分析仪, 日本 Shimadzu 公司。

1.3 螺旋藻蛋白质的酶解

经喷雾干燥获得的螺旋藻粉 20 g 悬浮在 160 ml Milli-Q 水中, 悬浮液经液氮速冻、25℃~30℃ 水浴法冻融 5 次, 再用超声波破碎 3 min, 以破碎螺旋藻细胞壁使其中的蛋白质游离出来。在 4℃ 下以 6 000 g 的速率离心 30 min, 离心后去除沉淀, 得到蛋白质上清液。以牛血清白蛋白作为标准物, 采用 Bio-Rad Protein Assay Kit 测定蛋白质含量。上清液迅速真空冷冻干燥得到螺旋藻的蛋白粉。在 30 ml 底物浓度为 2% 的螺旋藻蛋白液中加入终浓度为 2.0 mmol/L 的乙二胺四乙酸、5.0 mmol/L L-半胱氨酸、300 mmol/L 氯化钠和 5.0 U 木瓜蛋白酶。在 60℃ 的条件下, 调节 pH 值至 7.0, 水解 9 h。水解液在 6 000 g、4℃ 条件下经截留分子质量(MWCO)为 10 000 ku 的 Vivascience 超滤膜(德国 Sartorius 公司)过滤去除酶, 得到具有生物活性的滤液。滤液经过不同截留分子质量(MWCO 5 000 ku、3 000 ku)的超滤膜在 4℃、6 000 g 下超滤, 获得具有不同分子质量的滤液, 并按 1.4 中所介绍方法测定各部分滤液的体外 ACE 抑制活性。滤液真空冷冻干燥后在 4℃ 下保存。

1.4 ACE 抑制活性的测定

ACE 抑制剂活性测定采用荧光共振能量转移基质 Abz-FRK(Dnp)P-OH 按 Carmona 等^[18]的方法稍加更改测定。在带有磁力转子的 2 ml 比色皿中加入 1 875 μl 包含 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 7.0)、50 mmol/L NaCl、10 μmol/L ZnCl₂ 的缓冲液, 再加入 10 μl 的 0.2 U/ml ACE 和 100 μl 抑制肽溶液, 磁力转子在 37℃ 下转动均匀加热。5 min 后, 由微

量进样器加入 15 μl 荧光基质 Abz-FRK(Dnp)-P, 使其在 2 ml 比色皿中终浓度为 4.5 μmol/L, 在 2 min 内连续记录 RF-5300-PC 荧光分光光度计(激发光波长 320 nm, 发射光波长 420 nm)的吸光度值。每次测定重复 3 次。抑制率可由下式计算:

$$\text{ACE 抑制活性} = 1 - \frac{A-B}{C-D} \times 100\%$$

其中: A 为抑制肽溶液中添加荧光基质 2 min 后的荧光值; B 为抑制肽溶液中添加荧光基质前的荧光值; C 为 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.0)替代抑制肽溶液, 添加荧光基质 2 min 后的荧光值; D 为 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.0)替代抑制肽溶液, 添加荧光基质前的荧光值。以上条件下能抑制 50% ACE 酶活性的抑制肽浓度(μmol/L)被定义为其 IC₅₀ 值, 由 ACE 抑制率对抑制肽浓度的曲线回归获得。

1.5 ACE 抑制肽的纯化

具有最高 ACE 抑制活性的冻干粉溶解在 10 ml 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.0)中, 经脱气及 0.22 μm Supor 膜(美国 Pall 公司)过滤处理, 然后经 AKTA 系统通过 Superdex Peptide HR 10/30 凝胶过滤柱分离。流动相为 10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.0, 包含 150 mmol/L NaCl), 流速为 1 ml/min。洗脱峰在 215 nm 波长处进行检测并收集, 然后检测 ACE 抑制活性, 活性最高的收集液迅速进行冷冻干燥。

具有最高活性的收集液冻干粉溶解于流动相 I (0.1%三氟乙酸溶解于 1%乙腈/水, 体积比)中, 经脱气及 0.22 μm Supor 膜过滤处理, 然后经 AKTA 系统通过 COSMOSIL MS-II C18 反相高效液相色谱柱(日本 Nacalai Tesque 公司)分离纯化。色谱柱先用流动相 I 平衡 2 循环体积(CV), 再逐渐升高流动相 II (0.1%三氟乙酸溶解于 90%乙腈/水(体积比))的浓度进行梯度分离纯化(0%~50%, 12 CV; 50%~100%, 3 CV), 流速为 1.5 ml/min。洗脱峰在 215 nm 处进行检测并收集。ACE 抑制活性最高的收集液再次反相高效液相色谱纯化, 梯度条件为流动相 II 对流动相 I 0%~15%, 1 CV; 15%~20%, 15 CV; 20%~100%, 2 CV。

1.6 质谱和氨基酸序列分析

纯化后 ACE 抑制肽的分子质量通过基质辅助激光解吸电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)进行检测。0.5 μl 样品溶液与 0.5 μl 基质(5 g/L α-氰基-4-羟基肉桂酸, 溶剂为等体积混合的乙腈和 0.1%三氟乙酸)形成的共结晶薄膜, 在激光的照射

下获得电离离子. 未知样品溶液浓度为 $1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 以确保精确测定.

氨基酸序列通过 PPSQ-31A/33A 系列全自动蛋白/多肽序列仪测定. $15 \mu\text{l}$ 的未知样品溶液(超过 50 pmol)加到 PVDF 膜上经自然干燥, 采用 Edman 降解法从蛋白质的 N 端按顺序将氨基酸切下, 切下的氨基酸与异硫氰酸苯反应, 生成易于检测的苯基乙内硫酰脲氨基酸, 再采用柱前衍生的液相色谱分析, 从而进行蛋白质的氨基酸序列分析.

1.7 ACE 抑制肽的抑制类型分析

纯化的 ACE 抑制肽以不同浓度(0、15、30、45 和 $60 \mu\text{mol/L}$)各取 $100 \mu\text{l}$, 如 1.4 中所述方法在 2 ml 的比色皿中加入 $1 \times$ 检测缓冲液和 ACE 酶, 在 37°C 下均匀加热 5 min . 5 min 后往反应液中加入不同浓度(1.05 、 1.67 和 $4.00 \mu\text{mol/L}$)的荧光基质, 连续记录 2 min 内的荧光值. 应用双倒数式, 以反应速度倒数($1/v$)对底物质浓度的倒数($1/[S]$)作图, 得到 Lineweaver-Burk 图, 并以 $1/v$ 对抑制剂浓度($[I]$)作图, 得到 Dixon 图, 对抑制肽的抑制类型进行分析.

1.8 模拟消化环境稳定性分析

纯化的 ACE 抑制肽分别通过胃蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶 3 种消化酶, 按 Kuba 等^[9]的方法稍加更改进行体外模拟消化环境稳定性分析.

a. 胃蛋白酶: 0.2 ml 的 1.5 mmol/L 肽溶液(干燥后的粉末溶解于 Milli-Q 水中)加入 0.2 ml 的 0.05% 胃蛋白酶液(溶解于 $0.1 \text{ mol/L KCl-HCl}$, $\text{pH } 2.0$, 质量体积比)中, 在 37°C 下酶解 6 h , 加入 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0 以停止反应.

b. 胰凝乳蛋白酶: 0.2 ml 的 1.5 mmol/L 肽溶液加入 0.2 ml 的 0.05% 胰凝乳蛋白酶液(溶解于 $0.1 \text{ mol/L K}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 8.0$, 质量体积比)中, 在 37°C 下酶解 6 h , 加入 6 mol/L HCl 调节 pH 值至 7.0 以停止反应.

c. 胰蛋白酶: 0.2 ml 的 1.5 mmol/L 肽溶液加入 0.2 ml 的 0.05% 胰蛋白酶液(溶解于 $0.1 \text{ mol/L K}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 8.0$, 质量体积比)中, 在 37°C 下酶解 6 h , 加入 6 mol/L HCl 调节 pH 值至 7.0 以停止反应.

d. 胃蛋白酶 $\rightarrow$ 胰凝乳蛋白酶+胰蛋白酶: 0.2 ml 的 1.5 mmol/L 肽溶液加入 0.2 ml 的 0.05% 胃蛋白酶液中, 在 37°C 下酶解 6 h , 加入 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0 以停止反应. 然后, 在真空冷冻干燥后, 加入 $0.2 \text{ ml } 0.025\%$ 胰凝乳蛋白酶和 0.025% 胰蛋白酶混合酶液(溶解于 0.6 ml 的

$0.1 \text{ mol/L K}_3\text{PO}_4$, $\text{pH } 8.0$)中, 在 37°C 下酶解 6 h , 加入 6 mol/L HCl 调节 pH 值至 7.0 以停止反应.

上述反应停止后的混合液分别测定 ACE 抑制活性, 并使用 $10\,000 \text{ MWCO}$ 超滤膜在 4°C 下以 $6\,000 g$ 离心去除酶, 取 0.2 ml 进样 RP-HPLC 系统以比较消化前后的差异. 色谱柱为 Hydrosphere C18 柱(日本 YMC 公司), 先用如 1.5 部分中的流动相 I 平衡 15 min , 再用流动相 II 对流动相 I $0\% \sim 100\%$ 梯度洗脱 30 min , 流速为 1 ml/min .

2 结 果

2.1 不同分子质量范围螺旋藻酶解液的 ACE 抑制活性

螺旋藻的木瓜蛋白酶水解液经不同截留分子质量的超滤膜过滤后, 得到不同分子质量范围的酶解液. 如表 1 所示, 酶解液浓度统一调整为在 215 nm 处的吸光度值为 0.1 吸光度单位, 分子质量范围为 $0 \sim 3\,000 \text{ ku}$ 的酶解液具有最强的 ACE 抑制活性, 抑制率为 $(47.74 \pm 0.13)\%$, 因此选择该部分酶解液纯化 ACE 抑制肽. 各部分酶解液的抑制肽得率按酶解前后 215 nm 处吸光度值的比值确定, 从表 1 可知, 分子质量范围为 $0 \sim 3\,000 \text{ ku}$ 的酶解液得率为 10.54% .

Table 1 ACE inhibitory activities of the papain digests of *Spirulina platensis*

Molecular mass/ku	$IC_{50}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	Yield/%
$0 \sim 3\,000$	1.03 ± 0.04	10.54
$3\,000 \sim 5\,000$	1.54 ± 0.07	18.21
$5\,000 \sim 10\,000$	2.83 ± 0.12	12.03

2.2 ACE 抑制肽的纯化

分子质量范围为 $0 \sim 3\,000 \text{ ku}$ 的螺旋藻酶解液首先经 Superdex Peptide HR 10/30 凝胶过滤柱分离, 从图 1 可以看出, 在 215 nm 处有 4 个主要吸收峰($I \sim 4$), 其中吸收峰 3 具有最强的 ACE 抑制活性, IC_{50} 值为 $(0.41 \pm 0.02) \text{ g/L}$, 抑制肽得率为 1.56% .

吸收峰 3 的收集液通过 COSMOSIL MS-II C18 柱进行反相高效液相色谱纯化, 如图 2 所示, 色谱图中有 5 个主要吸收峰($A \sim E$), 其中吸收峰 D 的抑制活性最高, IC_{50} 值为 $(0.019 \pm 0.003) \text{ g/L}$, 抑制肽得率为 0.31% . 吸收峰 D 的收集液再次经过反相高效液相色谱纯化, 得到如图 3 的单峰色谱图,

经检测, 其 IC_{50} 值为 $(0.0094 \pm 0.0002) \text{ g/L}$ [根据结构鉴定的分子质量结果, 该值相当于 $(27.36 \pm 0.14) \mu\text{mol/L}$], 抑制肽得率为 0.28%。

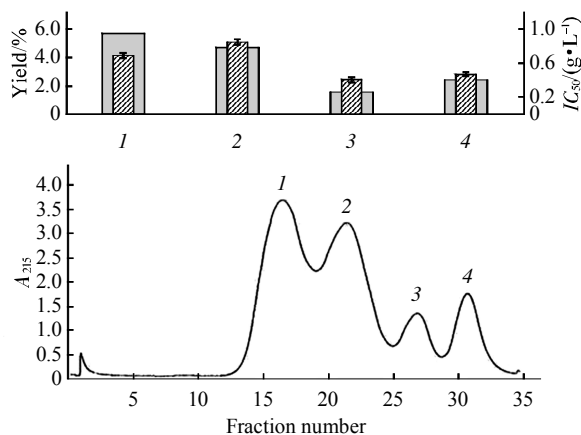


Fig. 1 Gel filtration chromatogram of the papain hydrolysates on a Superdex Peptide HR 10/30 column(lower panel) and ACE inhibitory activity of each fraction (upper panel)

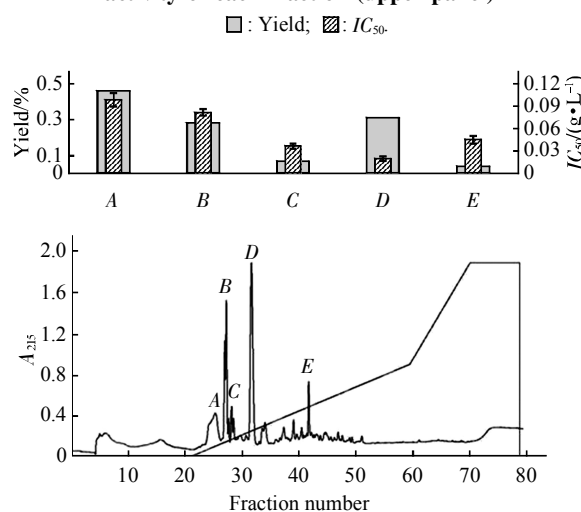


Fig. 2 First reverse-phase HPLC profile on a COSMOSIL MS-II C18 column (lower panel) and ACE inhibitory activity of each fraction (upper panel)

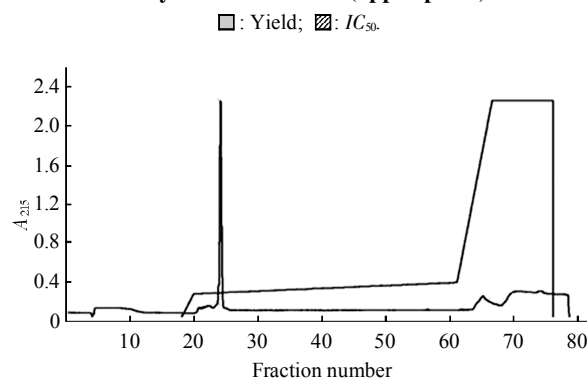


Fig. 3 Second reverse-phase HPLC profile on a COSMOSIL MS-II C18 column

2.3 ACE 抑制肽的分子质量和氨基酸序列

纯化后的 ACE 抑制肽经 MALDI-TOF-MS 检测。分析结果如图 4 所示, 检测分子质量为 343.19 ku。经氨基酸序列分析, 发现该抑制肽的序列为缬氨酸 - 谷氨酸 - 脯氨酸(Val-Glu-Pro), 其理论分子质量为 343.38 ku, 检测分子质量与之相符。

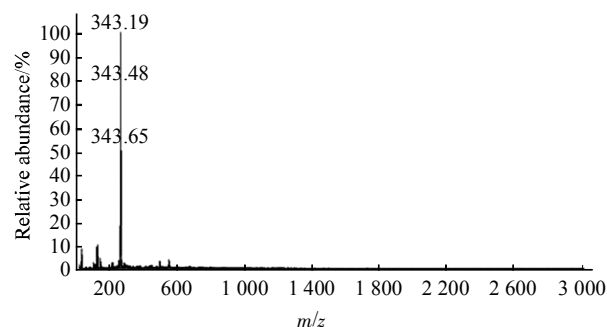


Fig. 4 Mass spectrum of the ACE inhibitory peptide derived from *Spirulina platensis*

2.4 ACE 抑制肽的抑制类型

Val-Glu-Pro 对 ACE 的抑制类型根据 Lineweaver-Burk 图和 Dixon 图确定。如图 5 所示, 在 Lineweaver-Burk 图中各系列相交于横坐标轴 $1/[S]$ 轴表明该抑制肽为非竞争性抑制剂, 而在 Dixon 图中各系列相交于 $[I]$ 轴也说明其抑制类型为非竞争性抑制, 据计算 K_i 值为 $(23.59 \pm 0.54) \mu\text{mol/L}$ 。

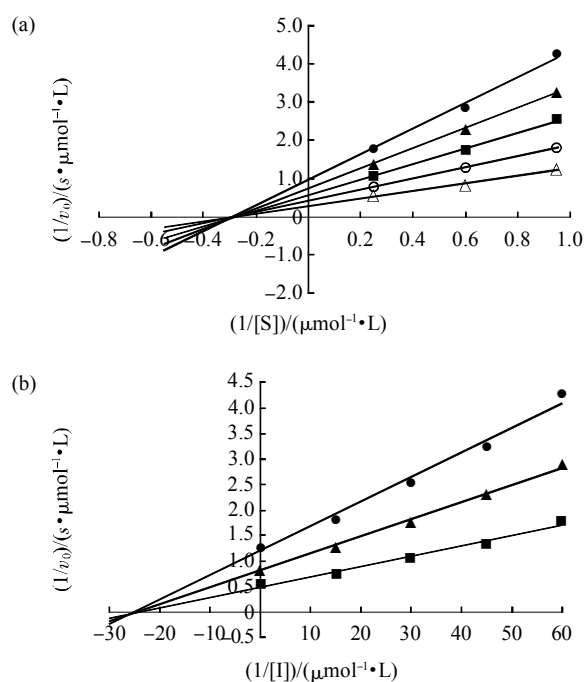


Fig. 5 The inhibition pattern of Val-Glu-Pro

(a) The Lineweaver-Burk plot. ●—●: $60 \mu\text{mol/L}$; ▲—▲: $45 \mu\text{mol/L}$; ■—■: $30 \mu\text{mol/L}$; ○—○: $15 \mu\text{mol/L}$; △—△: Buffer. (b) The Dixon plot. ●—●: $1/[S]=0.95$; ▲—▲: $1/[S]=0.6$; ■—■: $1/[S]=0.25$.

2.5 ACE 抑制肽的稳定性

文中特选择主要的胃肠蛋白酶进行了体外模拟消化环境稳定性实验, 并采用反相 HPLC 对胃肠蛋白酶消化前后的 Val-Glu-Pro 进行了分析. 如表 2 所示, Val-Glu-Pro 在分别或相继用胃蛋白酶、胰

凝乳蛋白酶和胰蛋白酶消化后, 其 ACE 抑制活性、峰面积、峰高和保留时间与消化前相比只有稍微的不同, 这些结果表明, 如果口服抑制肽 Val-Glu-Pro, 该抑制肽可以在体内消化环境中保持很好的稳定性, 从而保证其生物活性和生理作用.

Table 2 Stability of Val-Glu-Pro against digestion of main gastrointestinal proteases

Digestion	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Peak area $/(uV\cdot s)$	Peak height $/(uV)$	Retention time /min
None	27.36 ± 0.14	29 632 426	1 271 287	27.643
Pepsin	27.73 ± 0.15	28 463 248	1 222 652	27.656
Chymotrypsin	27.48 ± 0.13	28 740 863	1 232 215	27.662
Trypsin	27.90 ± 0.18	28 361 352	1 214 534	27.639
Pepsin $\rightarrow$ chymotrypsin and trypsin	28.01 ± 0.16	28 234 128	1 210 368	27.652

3 讨论和分析

近年来的研究表明, 植物和其他生物资源中的一些天然成分对人类的疾病有着独特的功效, 而无人工合成药物的副作用^[9-10, 13]. 为了从螺旋藻中获取具有 ACE 抑制活性的生物活性肽, 本研究首次从螺旋藻的不同酶解液中进行筛选, 并通过凝胶过滤色谱和 2 次反相高效液相色谱的纯化, 获得具有较高活性的 ACE 抑制肽, 经质谱分析和氨基酸测序鉴定为 Val-Glu-Pro, IC_{50} 值为 $(27.36 \pm 0.14)\mu\text{mol/L}$.

尽管不同来源的 ACE 抑制肽在氨基酸数目、序列和活性上均存在较大差异, 但一些研究总结出结构为二肽或三肽, C 端为色氨酸(Trp)、脯氨酸(Pro)或苯丙氨酸(Phe)等疏水性氨基酸, N 端为支链脂肪族氨基酸的 ACE 抑制肽活性更高^[20]. 由于 ACE 从血管紧张素 I 的 C 端切去 2 个氨基酸残基形成高血压诱导物血管紧张素 II^[2], 因此, ACE 抑制肽的 C 端结构对于与 ACE 的结合及其抑制活性至关重要. 其中, C 端为 Pro 则最有可能具有 ACE 抑制活性^[20-21]. 本研究从螺旋藻中纯化所获的 ACE 抑制肽为三肽, C 端为 Pro, N 端为 Val, 与上述规律完全相符, 可能正是其活性较高, IC_{50} 值较小的原因. 其他研究从酸奶^[22]中获得的 Val-Pro-Pro 以及从蘑菇^[8]中获得的 Gly-Glu-Pro 具有类似的结构序列, 同时 ACE 抑制活性也较高, IC_{50} 值分别为 $9.0\mu\text{mol/L}$ 和 $3.2\mu\text{mol/L}$, 这一点和上述规律相符. 然而, 关于具体氨基酸组成对 ACE 抑制活性大小的影响还有待进一步研究.

一些研究指出分子质量较小的二肽或寡肽更易

于人体吸收, 也更容易保持其生理活性^[23]. 文中对 Val-Glu-Pro 的体外稳定性试验证明, Val-Glu-Pro 在不同的胃肠蛋白酶消化下仍能保持良好的稳定性, 说明在口服后应可以防止在消化道中降解, 保持其生物活性和功能. 此外, 文中对 Val-Glu-Pro 的抑制类型也进行了研究, Lineweaver-Burk 图和 Dixon 图都显示该抑制肽为非竞争性类型. 此类抑制剂与酶的非活性中心区结合, 因此酶与抑制剂结合后, 还可结合底物, 分解缓慢, 有利于长时间保持其生理作用^[19]. 不过也有一些竞争性抑制剂在 Lineweaver-Burk 图和 Dixon 图中显示出非竞争性的特征^[20], 因此关于其详细的抑制机制, 应在将来进一步深入研究.

4 结 论

本研究采用木瓜蛋白酶水解钝顶螺旋藻, 通过超滤得到不同分子质量范围的 ACE 抑制肽混合液, 其中分子质量范围为 $0\sim 3\,000\text{ ku}$ 的酶解液活性最高, IC_{50} 值为 $(1.03 \pm 0.04)\text{ g/L}$. 该部分酶解液通过凝胶过滤色谱和反相高效液相色谱等步骤, 纯化得到高活性的 ACE 抑制肽, 经质谱分析和氨基酸测序鉴定为 Val-Glu-Pro, IC_{50} 值检测为 $(27.36 \pm 0.14)\mu\text{mol/L}$. 根据 Lineweaver-Burk 图和 Dixon 图分析, 表明 Val-Glu-Pro 为 ACE 酶的非竞争性抑制剂, K_i 值为 $(23.59 \pm 0.54)\mu\text{mol/L}$. 此外, 通过体外模拟消化环境稳定性实验, 显示该抑制肽在主要胃肠蛋白酶的消化下能够保持良好的稳定性. 上述结果表明, 螺旋藻源 ACE 抑制肽具有较高的生物活性, 在功能保健和医药制剂方面具有潜在的发展前景.

参 考 文 献

- [1] Skeggs Jr L T, Kahn J R, Shummay N P. The isolation and assay of hypertensin from blood. *J Exp Med*, 1952, **95**(3): 241-246
- [2] Matthew R W, Victor J D. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens*, 1999, **12**(12 Pt 3): 205S-213S
- [3] Ondetti M A, Rubin B, Cushman D W. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, 1977, **196**(4288): 441-444
- [4] Atkinson A B, Robertson J I. Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. *Lancet*, 1979, **2**(8147): 836-839
- [5] Nakamura Y, Masuda O Y, Takano T. Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1996, **60**(3): 488-489
- [6] Wu J, Ding X. Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem*, 2001, **49**(1): 501-506
- [7] Sipola M, Finckenberg P, Korpela R, *et al.* Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *J Dairy Res*, 2002, **69**(1): 103-111
- [8] Hyoung Lee D, Ho Kim J, Sik Park J, *et al.* Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides*, 2004, **25**(4): 621-627
- [9] Kawasaki T, Jun C J, Fukushina Y, *et al.* Antihypertensive effect and safety evaluation of vegetable drink with peptides derived from sardine protein hydrolysates on mild hypertensive, high-normal and normal blood pressure subjects. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 2002, **93**(10): 208-218
- [10] Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, *et al.* A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr*, 2003, **77**(2): 326-330
- [11] Mizushima S, Ohshige K, Watanabe J, *et al.* Randomized controlled trial of sour milk on blood pressure in borderline hypertensive men. *Am J Hypertens*, 2004, **17**(8): 701-706
- [12] Rodríguez-Hernández A, Blé-Castillo J L, Juárez-Oropeza M A, *et al.* *Spirulina maxima* prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. *Life Sci*, 2001, **69**(9): 1029-1037
- [13] Hayashi K, Hayashi T, Kojima I. A natural sulphated polysaccharide, calcium spirulin isolated from *Spirulina platensis*: *in vitro* and *ex vivo* evaluation of anti herpes simplex virus and anti human immunodeficiency virus activities. *AIDS Res Hum Retrov*, 1996, **12**(15): 1463-1471
- [14] Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair P P, *et al.* Evaluation of chemoprevention of oral cancer with *Spirulina fusiformis*. *Nutr Cancer*, 1995, **24**(2): 197-202
- [15] Piñero Estrada J E, Bermejo Besco's P, Villar del Fresno A M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Farmaco*, 2001, **56**(5-7): 497-500
- [16] Hirahashi T, Matsumoto M, Hazeki K, *et al.* Activation of the human innate immune system by *Spirulina*: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina plantensis*. *Int Immunopharmacol*, 2002, **2**(4): 423-434
- [17] 张学成, 信式祥, 李清华, 等. 螺旋藻——最完美的功能性食品. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1999: 55-89
Zhang X C, Xin S X, Li Q H, *et al.* *Spirulina* - the most perfect functional food. Qingdao: Press of Ocean University of China, 1999: 55-89
- [18] Carmona A K, Schwager S L, Juliano M A, *et al.* A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nat Protoc*, 2006, **1**(4): 1971-1976
- [19] Kuba M, Tanaka K, Tawata S, *et al.* Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from tofuyo fermented soybean food. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003, **67**(6): 1278-1283
- [20] Cheung H S, Wang F L, Ondetti M A, *et al.* Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J Biol Chem*, 1980, **255**(2): 401-407
- [21] Suetsuna K. Isolation and characterization of angiotensin I Converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). *J Nutr Biochem*, 1998, **9**(7): 415-419
- [22] Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, *et al.* Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J Dairy Sci*, 1995, **78**(4): 777-783
- [23] Chun H, Sasaki M, Fujiyama Y, *et al.* Effect of peptide chain length on absorption and intact transport of hydrolyzed soybean peptide in rat intestinal everted sac. *J Clin Biochem Nutr*, 1996, **21**(2): 131-140

Purification and Characterization of an Angiotensin I -converting Enzyme Inhibitory Peptide Derived From *Spirulina platensis**

LU Jun^{1,2)}, REN Di-Feng^{1,2)}**, WANG Jian-Zhong¹⁾, TANOKURA Masaru²⁾

¹⁾ College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

²⁾ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan)

Abstract Upon the rennin-angiotensin system, angiotensin I -converting enzyme (ACE) inhibitors play critical roles in alleviating and suppressing hypertension. The study was performed to isolate and purify an angiotensin I -converting enzyme inhibitory peptide from papain digests of *Spirulina platensis* by ultra-filtration, gel filtration chromatography and reverse-phase high-performance liquid chromatography. The purified peptide was identified by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and amino acid sequencing. Furthermore, the inhibition pattern of the peptide was also investigated and the stability was evaluated under simulated gastrointestinal condition. The results demonstrated that the digests with molecular mass ranging from 0 to 3 000 ku had the most potent ACE inhibitory activity with an IC_{50} value of (1.03 ± 0.04) g/L. An ACE inhibitory peptide with an IC_{50} value of (0.0094 ± 0.0002) g/L which was equivalent to (27.36 ± 0.14) μ mol/L was obtained from that fraction of digests, and was identified as Val-Glu-Pro. The Lineweaver-Burk plot and the Dixon plot indicated the ACE inhibitory peptide was a non-competitive inhibitor with a K_i value of (23.59 ± 0.54) μ mol/L. *In vitro* stability assay showed that the peptide could keep its inhibitory activity well after incubation with gastrointestinal proteases including pepsin, chymotrypsin, and trypsin, suggesting the ACE inhibitory peptide from *Spirulina platensis* be of great prospects as an ingredient of functional foods or pharmaceuticals in prevention and treatment of hypertension.

Key words *Spirulina platensis*, angiotensin I -converting enzyme, ACE inhibitory peptide, purification, characterization

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00647

*This work was supported by grants from The Oversea Study Program of China Scholarship Council ([2007]3021) and The Excellent Youth Scholars Special Innovation Program (BLYX200935) and The Fundamental Science Research Team Program (TD2010-3) of Beijing Forestry University.

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62336700, E-mail: rendifeng@163.com

Received: November 1, 2009 Accepted: December 15, 2009