

金华火腿中生物活性肽的血管紧张素转化酶调节功能及其分离纯化

邢路娟, 郝月静, 左庆翔, 周光宏, 张万刚*

(南京农业大学食品科技学院 国家肉品质量安全与工程技术研究中心 南京 210095)

摘要 为了探究干腌火腿中生物活性肽的降血压功能,以金华火腿为原料,提取其生物活性肽成分,并通过分离纯化鉴定具有血管紧张素转化酶(ACE)调节功能的生物活性肽。结果表明:经 Sephadex G-25 分子排阻色谱分离后,金华火腿生物活性肽可分为 A、B、C、D 共 4 个组分,其中组分 C 的 ACE 抑制活性最强,达到 31.8%。将组分 C 经离子交换柱分离后,金华火腿多肽可分为 C1、C2、C3、C4 共 4 个组分,其中 C2 组分的 ACE 抑制活性显著高于其它组分,活性高达 49.0%($P < 0.05$)。经 Nano-LC-ESI-MS/MS 鉴定得到 C2 中含有 8 条多肽,经 ACE 活性测定,序列 IESDLERAEE 在 8 条多肽中活性最强,ACE 抑制活性达到 59.1%。结论:金华火腿多肽具有良好的体外调节 ACE 活性的功能,为进一步开展其体内血压调节功能研究奠定了基础。

关键词 生物活性肽; 金华火腿; ACE 抑制活性; 分离纯化

文章编号 1009-7848(2023)05-0078-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.05.009

降血压肽是一种具有特定氨基酸序列的生物活性肽,可通过参与血管紧张素转化酶-肾素转化系统的调节过程,进而发挥降血压的功能^[1]。以鱼类^[2]、乳类^[3]、肉类^[4]、植物类^[5]等动、植物蛋白为来源的生物活性肽均呈现良好的血管紧张素转化酶(Angiotensin converting enzyme, ACE)调节功能。酶解法是制备生物活性肽的主要方法,其基本原理是通过酶的作用使蛋白质降解,从而提升肽类物质的分离和释放^[6]。其中,生物发酵主要是在微生物或蛋白内源酶的作用下,基质蛋白发生肽链断裂,最终产生氨基酸和小分子肽段的过程。根据蛋白酶添加量及酶切位点的不同,蛋白质水解后产生的肽的种类和数量也会有较大的差异^[7]。在发酵过程中,蛋白质的水解程度随发酵周期的延长而增强,由此产生的生物活性肽的种类和丰富度也逐步增加。酶解制备生物活性肽具有效率高、成本低、产量高等优势^[8]。

干腌火腿是发酵成熟的肉制品,其发酵过程可产生大量多肽、游离氨基酸等成分,赋予干腌火腿特殊的香气,因而深受国内外消费者的喜爱^[9-10]。金华火腿、宣威火腿、如皋火腿是我国最知名的三

大火腿^[11]。火腿加工中蛋白质降解主要发生在肌肉蛋白质中,如肌动蛋白、肌球蛋白、肌浆蛋白等^[12]。随着发酵周期的延长,火腿肌肉中产生的肽及氨基酸等成分变多^[13]。国内外学者对干腌火腿中生物活性肽的功能性开展了大量研究,发现火腿多肽具有清除自由基、螯合金属离子、抑制脂质氧化、抑制大肠杆菌生长、抑制 ACE 酶活性等功能^[12]。其中,血管紧张素转化酶(ACE)-血管紧张素系统是调节机体血压平衡的重要途径,血管紧张素原(Ang)经肾素的催化作用转变成血管紧张素 I(Ang I),Ang I 在 ACE 的催化下转化为有效的血管收缩剂-Ang II,同时 ACE 可将具有扩张血管作用的缓激肽裂解成无活性的肽段,从而发挥降血压的效果^[14-15]。靶向调节 ACE 的活性成为缓解高血压症状的重要环节。Dellafiora 等^[16]报道称意大利帕尔玛火腿中提取的肽类具有 ACE 抑制活性,并且确定 LGL 和 SFVTT 肽段的 ACE 抑制活性最强。火腿加工工艺、内源酶以及微生物种类都会影响最终肽的产生,中式干腌火腿与西式干腌火腿在加工原料、环境等方面存在差异^[9]。目前,对中国传统干腌火腿多肽的研究主要在抗氧化性、抗菌等方面,而对降血压肽的研究鲜见报道。

为了探究干腌火腿多肽在血压调节中的作用,选用金华火腿为原料提取生物活性肽,先、后使用尺寸排阻色谱、离子交换色谱技术进行筛选及纯化。测定 ACE 抑制率,筛选抑制活性最高的

收稿日期: 2022-05-12

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(32001720);
中央高校基本业务费项目(KJQN202155)

第一作者: 邢路娟,女,博士

通信作者: 张万刚 E-mail: wangang.zhang@njau.edu.cn

组分,富集,用 Nano-LC-ESI-MS/MS 测定分析肽段的氨基酸序列,揭示干腌火腿中生物活性肽的组成及其潜在的血压调节功能。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

金华火腿,金华金年火腿有限公司。ACE(从兔肺中提取)、马尿酰组氨酰亮氨酸(HHL),Sigma-Aldrich 公司;氯化钠、盐酸、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、邻苯二甲醛、十二烷基硫酸钠(SDS)、 β -巯基乙醇、硼砂等,国药集团化学试剂公司;合成肽(纯度 95%),强耀生物科技有限公司。

1.2 设备与仪器

刀式研磨仪 (GRINDOMIX GM200),德国 Retsch 公司;T25 高速分散机,德国 IKA 公司;Avanti J-E 多用途高效离心机,美国 Beckman Coulter 公司;ES2030 冷冻干燥机,日本 Hirachi 公司;pH 计(FE28 -Standard),瑞士 Mettler Toledo 公司;Spectral Max M2 多功能酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;Oasis HLB 固相萃取柱,美国 Waters 公司;AKTA Purifier UPC10 蛋白质纯化系统,瑞典 GE Healthcare 公司;HiPrep Q FF 16/10 强阳离子交换柱、Sephadex G-25 Superfine 100g (葡聚糖凝胶树脂 G-25),美国 GE Healthcare 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 粗肽的提取 金华火腿中多肽的提取方法参考胡亚亚等^[17]的方法。将火腿剔除脂肪和可见筋膜,分割成小块,用研磨仪绞碎,称取肉末 25 g。将肉样置 500 mL 离心瓶中,加入 100 mL 磷酸缓冲液(0.02 mol/L,pH 7.0),用匀浆机进行匀浆处理(转速 18 000 r/min,匀浆时间 12 s,间歇时间 15 s),直至匀浆液呈现均匀黏稠的状态。将离心瓶置于 4 ℃下静置 2 h,离心(温度 4 ℃,离心力 12 000 \times g,时间 20 min)后取出上清液,用滤纸过滤掉其中的脂肪滴、肉糜等杂质,随后向上清液中加入 3 倍体积的 70%乙醇,将混合液置 4 ℃下静置 8 h,离心(温度 4 ℃,离心力 12 000 \times g,时间 20 min)得到多肽上清液。上清液经旋转蒸发和冷冻干燥后得到多肽粉末样品,置于-20 ℃冰箱中保

存,备用。

1.3.2 肽浓度测定 参照 Church 等^[18]的方法测定肽浓度。在避光条件下配制邻苯二甲醛混合液,首先将 80 mg 邻苯二甲醛溶解于 1 mL 甲醇中,随后加入 50 mL 硼砂溶液(100 mmol/L)混合均匀,再依次加入 5 mL 质量分数 20% SDS 和 200 μ L β -巯基乙醇,用去离子水定容 100 mL,振荡混匀。邻苯二甲醛混合液现用现配。配制质量浓度为 1 mg/mL 的粗提物样品,取 200 μ L 肽溶液与 2 mL 邻苯二甲醛混合液混合,避光环境下常温孵育 2 min,在波长 340 nm 处测定混合溶液的吸光值。以胰酪蛋白胨为标准品,设置质量浓度梯度为 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL 的标准蛋白溶液,绘制标准曲线。根据拟合方程计算金华火腿多肽样品的浓度。

1.3.3 样品脱盐处理 参照 Escudero 等^[19]的方法使用固相萃取柱 Oasis HLB 20 cc 为样品脱盐。使用前先用蒸馏水淋洗萃取柱以活化柱体,然后取 2.5 mL 多肽溶液(1 mg/mL)以 0.5 mL/min 流速注入柱体,保证样品均匀通过萃取柱。随后使用蒸馏水洗脱以保证样品完全通过柱体,洗脱量为柱体积的 3 倍。最后用洗脱剂——体积分数为 50% 甲醇溶液将过柱的液体洗脱,收集到 5 mL 离心管中。洗脱液经旋转蒸发浓缩后冷冻干燥,得到的多肽粉置-20 ℃冰箱中保存。

1.3.4 ACE 抑制活性测定 参照 Cushman 等^[20]的方法并作适当修改。配制马尿酰组氨酰亮氨酸(HHL)溶解液,使用 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH 8.3)溶解氯化钠至其浓度为 0.3 mol/L。用配制好的溶解液溶解 HHL 至浓度为 5 mmol/L。向 10 mL 试管中加入 200 μ L HHL 溶液(5 mmol/L),将枪头伸入液面下方,加入体积 80 μ L 样品溶液(肽质量浓度为 5.0 mg/mL)将其混匀,置 37 ℃反应 3 min,反应结束后加入 20 μ L 用去离子水溶解,得到 0.1 U/mL 的 ACE 溶液,混匀后置 37 ℃下反应 40 min。孵育结束后立即加入 250 μ L 1 mol/L 盐酸溶液终止反应,向其中加入 1.7 mL 醋酸乙酯,经 15 s 涡旋振荡,充分混匀后离心(温度 4 ℃,离心力 5 000 \times g,时间 10 min)。用移液管取 1 mL 位于上层的醋酸乙酯,置真空冷冻干燥机中至液体完全变成粉末状。向粉末中加入 1 mL 蒸馏水,涡旋 30

s 使粉末充分溶解,在波长 228 nm 处测定吸光值。ACE 抑制率的计算公式:

$$\text{ACE 抑制率}(\%) = \frac{(A_b - A_a)}{(A_b - A_c)} \times 100$$

式中, A_a ——反应体系包含样品溶液、ACE 溶液的吸光度值; A_b ——反应体系不含样品溶液,含 ACE 溶液的吸光度值; A_c ——反应体系不含样品溶液及 ACE 溶液的吸光度值。

1.3.5 尺寸排阻色谱分离多肽 使用葡聚糖凝胶色谱柱 Sephadex G-25(5 cm×60 cm)进行多肽的分离,在流速为 2.5 mL/min 条件下用去离子水平衡色谱柱。随后,用去离子水将多肽质量浓度配成 10.0 mg/mL,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤肽溶液后将多肽(2.0 mL)注入色谱柱。自动上样后,设定检测波长为 280 nm,在 2.0 mL/min 流速下用去离子水洗脱,直到所有肽被洗脱出来。分别收集每个峰对应被洗脱的组分,继续上样,多次富集样品,洗脱液经冷冻干燥后得到分离纯化的多肽样品。

1.3.6 离子交换色谱分离多肽 使用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)以 2.0 mL/min 流速平衡 HiPrep Q FF 16/10 强阳离子交换柱(1.6 cm×10 cm)。将多肽用 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)溶解,配制肽质量浓度为 5.0 mg/mL 的溶液。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后,以 2.0 mL 上样量进样。洗脱液 A:磷酸盐缓冲液(20 mmol/L,pH 8.0);洗脱液 B:在盐磷酸缓冲液中(20 mmol/L,pH 8.0)溶解 NaCl 至其浓度为 1 mol/L。进样后按照 B 液 0~100%梯度洗脱 60 min,以流速 2.0 mL/min 洗脱,在波长 280 nm 处检测紫外吸收峰。分别收集每个峰经洗脱的组分,继续上样,多次收集,洗脱液经冷冻干燥,测定不同组分的 ACE 抑制能力。

1.3.7 Nano-LC-ESI-MS/MS 分离鉴定 将以上纯化得到的多肽组分进行脱盐处理后用 Nano-LC-ESI-MS/MS 分离鉴定。高效液相色谱 HPLC 条件:Agilent C18 色谱柱(75 μm×8 cm,3 μm,300Å);流动相 A:0.5%甲酸,2%乙腈,97.5%超纯水;流动相 B:0.5%甲酸,90%乙腈,9.5%超纯水;梯度洗脱:流动相 A 为 98%~10%,流动相 B 为 2%~90%,洗脱时间 60 min;20 min 上样;20 min 柱平衡;以 3 μL 上样,800 nL/min 流速过柱。ESI-MS/MS 质谱条件:样品经 HPLC 洗脱,通过电喷雾

离子化方法电离,并直接进入质谱仪。电离的电压范围 1.2~1.8 kV,毛细管温度设定为 110 ℃。质谱仪模式选用动态数据依赖性模式,通过低能碰撞诱导离解,获取二级质谱数据。显微扫描质量范围 550~1 800 amu。默认碰撞能力为 33%。动态排除功能设置为:0.3 min 内重复计数,排除时间 0.4 min,排除宽度 4 u。

1.3.8 多肽的合成及活性验证 在 BIOPE (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep>) 生物活性肽查新网站对 Nano-LC-ESI-MS/MS 鉴定到的多肽进行 ACE 抑制肽的相似度检测。检测完成后,ACE 抑制肽由苏州强耀生物科技有限公司化学合成,合成多肽的纯度均在 95%以上。配制 1 mg/mL 的多肽溶液,参考 1.3.4 节方法进行多肽的 ACE 活性检测。

1.4 数据统计与分析

数据统计分析采用 SAS 8.0 软件,方差分析选用 One-Way ANOVA,多重比较采用 Duncan's multiple range test,柱形图采用 GraphPad Prism 5 绘制,显著水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 尺寸排阻色谱分离多肽

尺寸排阻色谱是利用不同尺寸微孔的凝胶柱作为固定相,根据被分离组分分子质量的大小进行筛选分离,如分子尺寸大于凝胶颗粒则不能进入凝胶微孔中,分子质量越小通过的微孔数量越多,洗脱过程中所经过的路程越长,在固定相中停滞时间越久^[21]。经尺寸排阻色谱过滤后,金华火腿多肽的分离效果如图 1 所示,根据洗脱时间先、后分为 A、B、C、D 组分。将这 4 个组分收集后重新溶解为质量浓度为 2 mg/mL 的肽溶液,测定其 ACE 抑制能力。如图 2 所示,组分 C 的 ACE 抑制率显著高于其余组分($P < 0.05$),达到 31.8%;B 组分的 ACE 抑制率最低,为 13.2%。组分 A、D 的 ACE 抑制活性无显著差异,其 ACE 抑制率分别为 22.6%和 25.1%,两者显著高于组分 B 的 ACE 抑制率。本结果表明,经凝胶色谱柱洗脱出来的 C 组分活性最强,从洗脱顺序可知,组分 C 的分子质量小于 A 和 B。在后续分离纯化中以组分 C 为重点进行生物活性肽筛选。

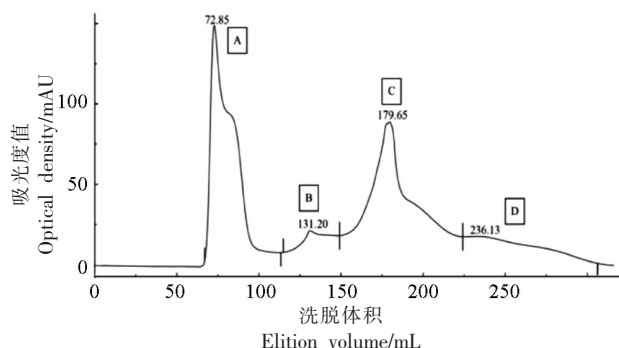
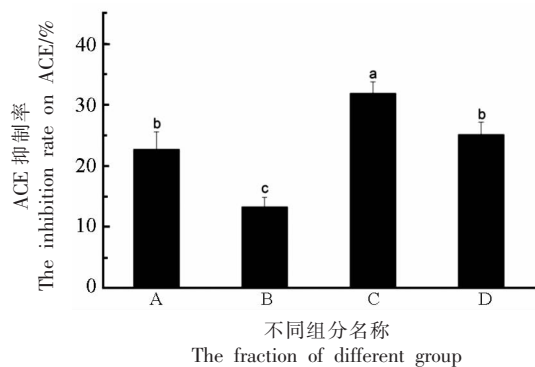


图 1 尺寸排阻色谱分离纯化金华火腿多肽
Fig.1 Separation of Jinhua ham peptides by size exclusion chromatography



注:不同小写字母 a~c 表示差异显著 ($n=6, P<0.05$)。
图 2 经尺寸排阻色谱分离得到组分的 ACE 抑制能力
Fig.2 ACE inhibitory activity of fractions separated by size exclusion chromatography

2.2 离子交换色谱分离多肽

离子交换色谱原理是利用流动相各组分所带电荷数量、种类的不同,在静电作用下,与结合在固定相上的带相反电荷的离子进行交换,固定相通常为离子交换树脂^[22]。本试验选用 HiPrep Q FF 16/10 强阳离子交换色谱柱进行样品组分的分离。分子净电荷为正或中性分子不能与固定相中的强阳离子相结合而最先洗脱出来。当流动相经过离子强度由弱到强的色谱柱时,分离组分因所带负电荷强度的不同而被先、后洗脱,带强负电荷的分子被最后洗脱。如图 3 所示,组分 C 经过离子交换色谱分离为 C1、C2、C3、C4 共 4 个组分。测定所收集组分的 ACE 抑制能力可知,4 个组分的 ACE 抑制活性呈显著差异(图 4)。组分 C2 的 ACE

抑制率活性显著高于其它组分 ($P<0.05$),活性高达 49.0%;组分 C3 (39.7%) 次之,C1、C4 的抑制活性相对较小,分别为 27.2% 和 19.5%。由于最先洗脱出的组分主要含有正电荷、中性,最后洗脱的组分带负电荷,因此金华火腿中所提取的 ACE 抑制肽活性主要集中在带负电荷的组分。选取 ACE 抑制能力最强的 C2 组分,重复收集,为后续 Nano-LC-ESI-MS/MS 测定作准备。

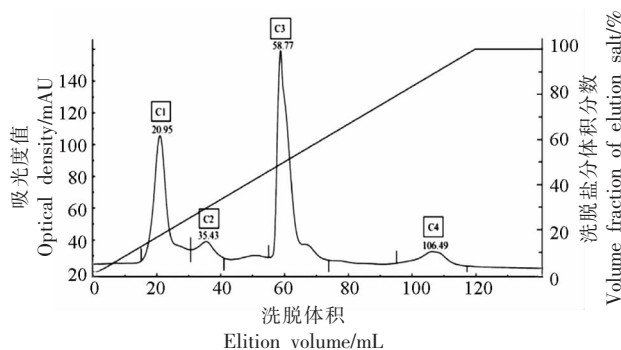
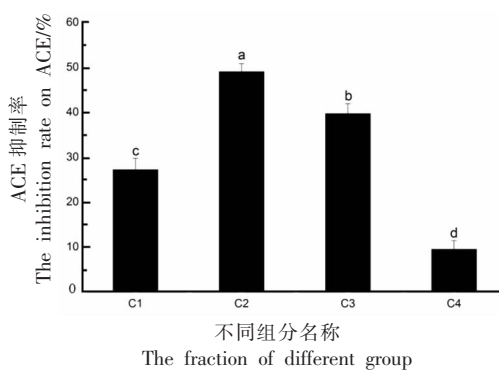


图 3 离子交换色谱分离纯化金华火腿多肽 C 组分
Fig.3 Separation of C fraction by ion exchange chromatography



注:不同小写字母 a~d 表示差异显著 ($n=6, P<0.05$)。

图 4 C 组分经离子交换色谱分离得到的各组分的 ACE 抑制能力

Fig.4 ACE inhibitory ability of each fraction obtained by the separation of fraction C by ion exchange chromatography

2.3 Nano-LC-ESI-MS/MS 分离鉴定

为进一步确定金华火腿中 ACE 抑制肽的主要成分,选用 Nano-LC-ESI-MS/MS 鉴定 C2 中含有的多肽序列。如表 1 所示,组分 C2 中含有 8 条

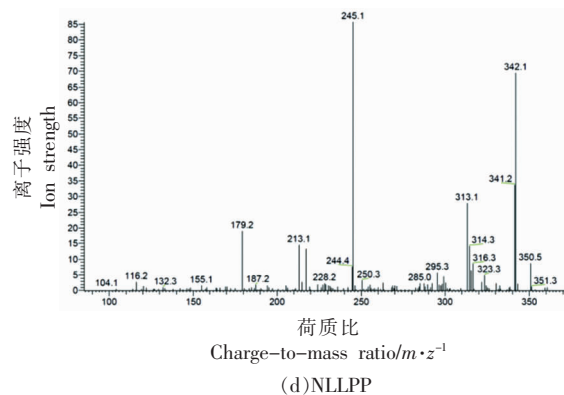
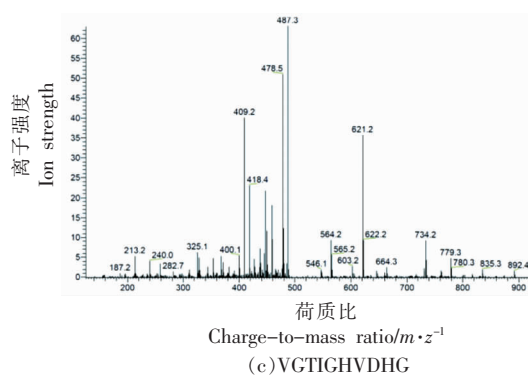
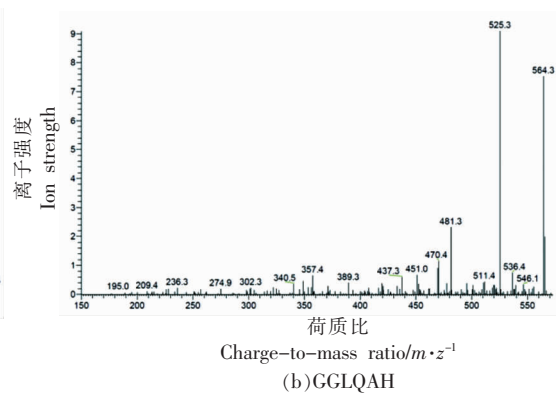
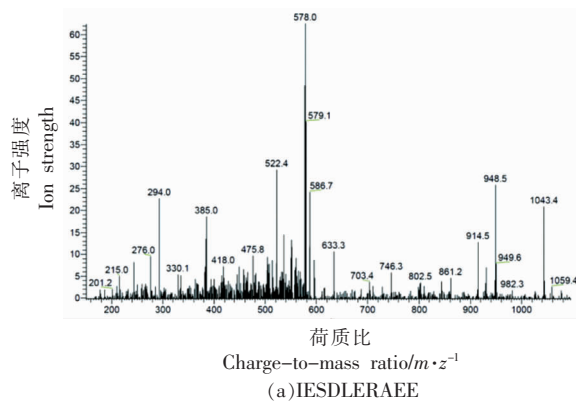
表1 组分C2经液相色谱-质谱联用鉴定得到的肽段序列

Table 1 Peptides identified by LC-MS/MS in the fraction C2

序号	肽段序列	计算分子质量/u	测定分子质量/u
1	IESDLERAEE	1 189.5	1 189.4
2	VGTIGHVDHG	990.5	990.2
3	ILLLLLAH	904.6	904.6
4	NIDVE	588.3	588.0
5	DAVLPA	584.4	584.2
6	GGLQAH	581.3	581.8
7	NLLPP	552.3	552.9
8	DEP	360.1	360.2

肽段,其分子质量分布于300~1 200 u之间,其中分子质量最小的肽段为DEP,分子质量最大的肽段为IESDLERAEE,主要由3~10个氨基酸组成,这8个肽段的质谱图如图5所示。将鉴定得到的8条多肽序列在Biopep生物活性肽数据库(<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>)中检索,未查找到8条肽段序列的相关信息,说明本次鉴定得到的多肽序列是新发现的生物活性肽。有研究表明,生物活性肽的功能与其氨基酸数量、

序列密切相关,并且大部分具有ACE抑制活性的降血压肽分子质量在3 ku以下,肽段中包含氨基酸残基的数量在2~22之间^[23-24]。在ACE的序列结构中,His-Glu-XX-His活性位点分布于酶的C和N端^[25-26]。由于该活性位点没有直接暴露在外,而是被N端氨基酸侧链遮盖,因此大分子肽很难与活性位点相结合,而小分子肽具有较小的分子结构,从而更容易与ACE相结合,减少ACE对血管紧张素I的作用,从而达到竞争性抑制^[27]。Cao等^[28]从牛骨明胶中提取出序列为RGL-(Hyp)-GL与RGM-(Hyp)-GF的强ACE抑制肽,分子模拟对接研究表明RGM-(Hyp)-GF可被包裹在ACE的活性口袋中,而RGL-(Hyp)-GL可通过降低锌结合基序HEXXH稳定性达到抑制ACE活性的目的。Zhang^[29]等从卵清蛋白水解物中鉴定出3个同时具有抗氧化和ACE抑制作用的多肽——LAPYK、SVIRW和PKSVIRW,它们均与ACE的HEXXH基序形成分子间相互作用,其中LAPYK中Tyr的苯环与HHL的苯环位置几乎相同,都与ACE的Met223、Glu403和Pro407形成分子间相互作用,这种竞争性结合作用可能是生物活性肽发挥ACE抑制作用的主要原因。



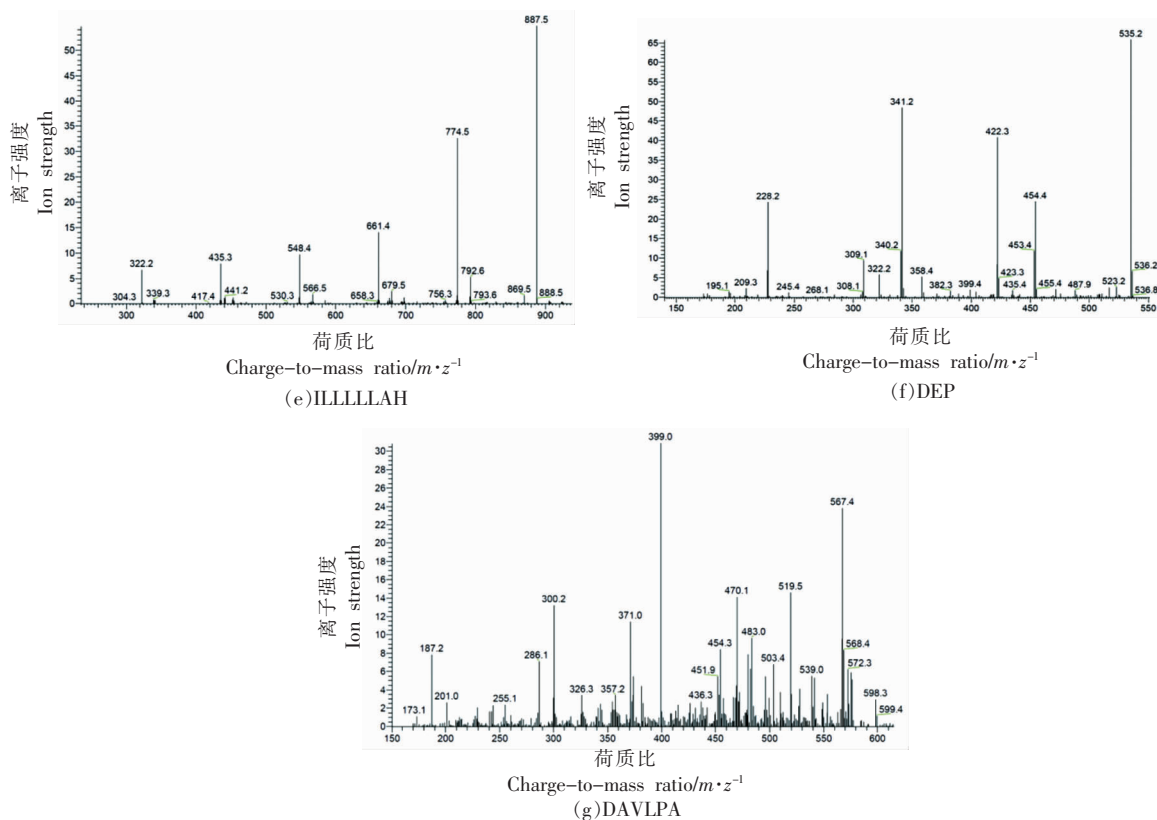
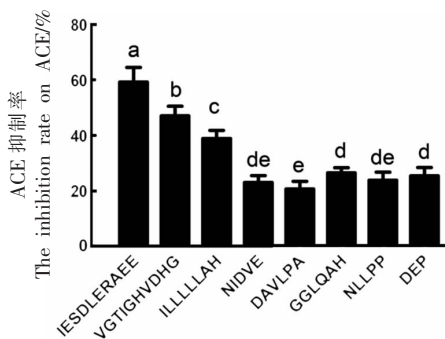


图 5 多肽序列的质谱图

Fig.5 MS/MS spectrum of identified peptides

2.4 合成后多肽的 ACE 抑制活性

根据 Nano-LC-ESI-MS/MS 法测定得到的 8 条肽段序列,使用酶法合成多肽^[30],测定其 ACE 抑制活性,结果如图 6 所示。序列 IESDLERAEE 的 ACE 抑制活性最强,为 59.1%,显著高于其余 7 条多肽($P < 0.05$),VGTIGHVDHG(46.5%)和 ILLLLLAH(38.5%) 的活性次之,序列 GGLQAH,DEP, NIDVE 和 NLLPP 的 ACE 抑制活性相近,DAVLPA 的 ACE 抑制活性最低,为 21.4%。有研究表明,具有 ACE 抑制活性的肽段通常 C 端为 Pro、Lys 或 Phe、Tyr、Trp 等为具有较强疏水性的氨基酸^[24]。可能与 ACE 在生物体内发挥作用有关。Ang I (DRVYIHPFHL)进入血循环后,在 ACE 作用下裂解为 Ang II(DRVYIHPF),继而通过促进醛固酮产生,刺激肾上腺素释放和 Na^+ 重吸收,导致血压升高^[31]。Ang I 与 ACE 结合的首要条件是 Ang I 的疏水性 C 端侧链与含 Zn^{2+} 的活性位点结合,进而被水解^[32]。由于降血压肽 C 端结构与 Ang I 相似,因此可与 ACE 活性位点相结合,降低 ACE 在



注:不同小写字母 a-d 表示差异显著($n=6, P < 0.05$)。

图 6 合成多肽的 ACE 抑制能力

Fig.6 ACE-inhibitory activity of synthetic peptides

体内的活性,从而发挥竞争性抑制作用^[33]。在组分 C2 经 Nano-LC-ESI-MS/MS 分离出的 8 条肽段中,IESDLERAEE 的体外 ACE 抑制活性最强,进而推测其在调节血压方面发挥重要功能。

3 结论

为探究金华火腿中生物活性肽的 ACE 调节

功能,采用尺寸排阻色谱和离子交换色谱对火腿多肽进行分离纯化,分析多肽的成分及其 ACE 抑制活性。经离子交换色谱分离后,C2 组分 ACE 抑制活性显著高于其余组分。将 C2 组分进行质谱鉴定得到 8 条肽段,序列为 IESDLERAEE 的 ACE 抑制活性最强。综上,从金华火腿中提取的多肽具有良好的 ACE 抑制活性,研究结果为探究干腌火腿中生物活性肽在体内调节血压功能提供参考。

参 考 文 献

- [1] BHAT Z F, KUMAR S, BHAT H F. Bioactive peptides of animal origin: A review[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(9): 5377-5392.
- [2] 杨贵兰, 秦松, 王晓艳, 等. 酶法制备阿拉斯加鳕鱼降压肽的工艺优化及其产物的结构鉴定[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(5): 163-168.
YANG G L, QIN S, WANG X Y, et al. Extraction optimization and structure identification of anti-hypertensive peptide from alaskan cod by enzymatic method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(5): 163-168.
- [3] 周会钦, 肖军霞, 荣庆军, 等. 具有临床降血压功效的乳源三肽的研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(9): 326-336.
ZHOU H Q, XIAO J X, RONG Q J, et al. Recent advances in the research of milk-derived tripeptides with clinically confirmed antihypertensive effect[J]. *Food Science*, 2022, 43(9): 326-336.
- [4] CYNTHIA G B, MARTIN V, JUAN P C, et al. Pork frankfurters prepared with hydrolyzed whey: Preliminary product quality aspects and inhibitory activity of the resulting peptides on angiotensin-converting enzyme[J]. *Meat Science*, 2020, 166: 108111.
- [5] NARDO A E, SUAREZ S, QUIROGA A V, et al. Amaranth as a source of antihypertensive peptides[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 578631.
- [6] CICERO A F G, FOGACCI F, COLLETTI A. Potential role of bioactive peptides in prevention and treatment of chronic diseases: A narrative review[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2017, 174(11): 1378-1394.
- [7] ALUKO R E. Antihypertensive peptides from food proteins[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2015, 6(1): 235-262.
- [8] RAMRAJE G R, PATIL S D, PATIL P H, et al. A brief review on: Separation techniques chromatography[J]. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020, 10(4): 231-238.
- [9] 李平, 张志, 周辉, 等. 干腌火腿中肽的形成机理研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(4): 1-7.
LI P, ZHANG Z, ZHOU H, et al. The mechanism of peptides formation in dry-cured ham: A review[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(4): 1-7.
- [10] 梁定年, 薛桥丽, 胡永金, 等. 云南干腌火腿加工工艺及其品质影响因素研究进展[J]. *肉类研究*, 2019, 33(4): 55-59.
LIANG D N, XUE Q L, HU Y J, et al. A review of processing procedures for yunnan dry-cured hams and factors influencing ham quality[J]. *Meat Research*, 2019, 33(4): 55-59.
- [11] 李莹. 我国三大干腌火腿的蛋白质体外消化特性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
LI Y. Discrimination of digestion properties of proteins from three types of dry cured ham in China[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [12] 王宝丽, 张开屏, 刘嘉琪, 等. 发酵肉制品中生物活性肽的研究进展[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(6): 350-359.
WANG B L, ZHANG K P, LIU J Q, et al. Research progress on the bioactive peptides in fermented meat products[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(6): 350-359.
- [13] 周洋, 刘姝韵, 谷大海, 等. 宣威火腿加工过程中的蛋白质降解规律[J]. *现代食品科技*, 2018, 34(8): 57-63.
ZHOU Y, LIU S Y, GU D H, et al. Protein hydrolysis of Xuanwei ham during processing[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(8): 57-63.
- [14] COELHO M S, LOPES K L, FREITAS R D A, et al. High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue[J]. *Regulatory Peptides*, 2010, 162(1/2/3): 61-67.
- [15] SIMÕES E, SILVA A C, FLYNN J T, et al. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: Role

- in hypertension and chronic kidney disease[J]. *Pediatric Nephrology*, 2012, 27(10): 1835–1845.
- [16] DELLAFIORA L, PAOLELLA S, DALL'ASTA C, et al. Hybrid *in silico/in vitro* approach for the identification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from parma dry-cured ham[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(28): 6366–6375.
- [17] 胡亚亚, 邢路娟, 周光宏, 等. 不同提取方法对金华火腿粗肽液抗氧化活性的影响[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(14): 115–118.
- HU Y Y, XING L J, ZHOU G H, et al. Effect of extraction methods on the antioxidant activity of crude peptides from Jinhua ham[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(14): 115–118.
- [18] CHURCH H F C, SWAISGOOD H E, PORTER D H, et al. Spectrophotometric assay using *o*-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins[J]. *Journal of Dairy Science*, 1983, 66(6): 1219–1227.
- [19] ESCUDERO E, ARISTOY M C, NISHIMURA H, et al. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham[J]. *Meat Science*, 2012, 91(3): 306–311.
- [20] CUSHMAN D W, CHEUNG H S. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1971, 20(7): 1637–1648.
- [21] COSKUN O. Separation techniques: Chromatography[J]. *Northern Clinics of Istanbul*, 2016, 3(2): 156–160.
- [22] ROSSOMANDO E F. Ion-exchange chromatography[J]. *Methods in Enzymology*, 1990, 182: 309–317.
- [23] PEDRO J G, F J E, ANTONIO G, et al. Production and identification of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Mediterranean fish discards[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 95–105.
- [24] 张靖, 苏琳, 要铎, 等. 肉源血管紧张素转化酶抑制肽研究进展[J]. *食品科技*, 2020, 45(10): 241–247.
- ZHANG J, SU L, YAO D, et al. Review on blood pressure regulation of ACE inhibitory peptides in meat and meat products[J]. *Food Science and Technology*, 2020, 45(10): 241–247.
- [25] AKIF M, SCHWAGER S L, ANTHONY C S, et al. Novel mechanism of inhibition of human angiotensin-I-converting enzyme (ACE) by a highly specific phosphinic tripeptide[J]. *The Biochemical Journal*, 2011, 436(1): 53–59.
- [26] MASUYER G, YATES C J, STURROCKE D, et al. Angiotensin-I converting enzyme (ACE): Structure, biological roles, and molecular basis for chloride ion dependence[J]. *Biological Chemistry*, 2014, 395(10): 1135–1149.
- [27] LOPEZ-FANDINO R, OTTE J, VAN C J. Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 16(11): 1277–1293.
- [28] CAO S M, WANG Y, HAO Y J, et al. Antihypertensive effects *in vitro* and *in vivo* of novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from bovine bone gelatin hydrolysate[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(3): 759–768.
- [29] ZHANG B Y, LIU J B, LIU C, et al. Bifunctional peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity *in vitro* from egg white hydrolysates[J]. *Journal of Food Biochemistry*, 2020, 44(9): e13347.
- [30] 于铁妹. 肽类合成方法研究进展[J]. *广州化工*, 2020, 48(16): 12–14.
- YU T M. Research progress on the synthesis of peptides[J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2020, 48(16): 12–14.
- [31] 赵爽, 刘昆仑, 陈复生. 食源性 ACE 抑制肽研究进展[J]. *粮食与油脂*, 2017, 30(3): 37–40.
- ZHAO S, LIU K L, CHEN F S. Research progress on the food-born ACE inhibitory peptides[J]. *Cereals & Oils*, 2017, 30(3): 37–40.
- [32] SEOK-CHUN K, WON-KYO J, SUNG-MYUNG K, et al. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition and nitric oxide (NO)-mediated antihypertensive effect of octaphloretol A isolated from *Ishige sinicola*: *In vitro* molecular mechanism and *in vivo* SHR model[J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 18: 289–299.
- [33] LEE S Y, HUR S J. Antihypertensive peptides from animal products, marine organisms, and plants[J]. *Food Chemistry*, 2017, 228: 506–517.

Angiotensin-converting Enzyme Regulatory Function of Bioactive Peptides in Jinhua Dry-cured Ham and Its Isolation and Purification

Xing Lujuan, Hao Yuejing, Zuo Qingxiang, Zhou Guanghong, Zhang Wangang*
(College of Food Science Technology, Nanjing Agricultural University, National Center of Meat Quality and Safety Control, Nanjing 210095)

Abstract In order to investigate the hypotensive function of bioactive peptides in Jinhua dry-cured ham, the bioactive peptide components were extracted from Jinhua dry-cured ham, and the bioactive peptides with angiotensin-converting enzyme (ACE) modulating function were identified by isolation and purification. The results showed that after separation by Sephadex G-25 molecular exclusion chromatography, the bioactive peptides of Jinhua dry-cured ham could be divided into four fractions, A, B, C and D. Among them, the ACE inhibitory activity of fraction C was the strongest, reaching 31.8%. After fraction C separation by ion exchange column, the Jinhua dry-cured ham peptides could be divided into four fractions, C1, C2, C3 and C4, among which the ACE inhibitory activity of fraction C2 was significantly higher than other fractions, with an activity as high as 49.0% ($P < 0.05$). Eight peptides were identified in C2 by Nano-LC-ESI-MS/MS, and the sequence IESDLERAEE had the highest activity with an ACE inhibitory activity of 59.1%. Conclusion: Peptides derived from Jinhua dry-cured have had good effect of regulating ACE activity *in vitro*, which lay the foundation for further research on its blood pressure regulation function *in vivo*.

Keywords Jinhua dry-cured ham; bioactive peptides; ACE inhibitory activity; isolation and purification