

红毛藻血管紧张素转化酶抑制肽的筛选及其稳定性评价

吴靖娜^{1,2}, 洪乔茜^{1,2}, 廖榕榕^{1,2}, 蔡水淋³, 陈晓婷³, 苏海燕^{1,2}, 苏筱^{1,2}, 许莉^{1,2}, 潘南³, 卓诗晴^{1,2}

(1.厦门医学院海洋生物医药资源福建省高校工程研究中心, 福建 厦门 361023; 2.厦门医学院厦门市海洋药用天然产物资源重点实验室, 福建 厦门 361023; 3.福建省水产研究所, 福建 厦门 361013)

摘要: 本实验以红毛藻为原料, 利用酶解法及超滤分级制备获得不同分子质量的肽组分, 经高效液相色谱法测定体外血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)抑制活性发现F2组分(800~2 000 Da)的ACE抑制率最高; 采用液相色谱-串联质谱技术和PEAKS Studio软件的*de novo*从头测序对F2组分进行氨基酸序列鉴定, 并结合分子对接筛选出与ACE稳定结合的6个ACE抑制肽。利用固相合成法制备预测肽并经体外ACE抑制活性验证, 发现L1(LVLLFLFGE)的ACE抑制活性最高, 半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为14.22 μg/mL。分子对接结果表明, L1对ACE的抑制主要归因于其能够与ACE的活性口袋形成氢键相互作用。最后, 探讨温度、pH值、金属离子、光照类型和模拟胃肠道酶系消化对L1稳定性的影响, 结果表明L1具有较好的热稳定性和离子强度稳定性, pH>2时抑制活性逐步减弱, 紫外光处理会影响其抑制活性, 体外模拟胃液处理后L1的ACE抑制率虽然显著降低, 但仍具有较高ACE抑制活性。

关键词: 红毛藻; *de novo*从头测序; 虚拟筛选; 血管紧张素转化酶抑制肽; 稳定性

Screening and Stability Evaluation of Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides from *Bangia fusco-purpurea*

WU Jingna^{1,2}, HONG Qiaoxi^{1,2}, LIAO Rongrong^{1,2}, CAI Shuilin³, CHEN Xiaoting³,
SU Haiyan^{1,2}, SU Xiao^{1,2}, XU Li^{1,2}, PAN Nan³, ZHUO Shiqing^{1,2}

(1. Fujian Universities and Colleges Engineering Research Center of Marine Biopharmaceutical Resources, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China; 2. Xiamen Key Laboratory of Marine Medicinal Natural Products Resources, Xiamen Medical College, Xiamen 361023, China; 3. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China)

Abstract: In this study, peptide fractions (F1-F4) with different molecular masses were obtained from *Bangia fusco-purpurea* through enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. F2, with molecular masses of 800–2 000 Da, exhibited the highest *in vitro* angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity as determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The amino acid sequence of F2 was identified through liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and *de novo* sequencing using PEAKS Studio software. Six ACE inhibitory peptides that stably bind to ACE were selected through molecular docking. The predicted peptides were synthesized by solid-phase synthesis and their *in vitro* ACE inhibitory activity was verified. Among them, L1 (LVLLFLFGE) showed the highest ACE inhibitory activity with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value of 14.22 μg/mL. Molecular docking results indicated that the inhibition of ACE by L1 was mainly attributed to its ability to form hydrogen bond interactions with the active site of ACE. Finally, the effects of temperature, pH, metal ions, light exposure, and simulated gastrointestinal digestion on the stability of L1 were investigated. The results revealed that L1 was highly stable to heat and ionic strength. However, its activity gradually decreased at pH > 2, and was affected by ultraviolet treatment. The ACE inhibitory activity of L1 decreased after simulated gastric and intestinal digestion, but was still significant.

Keywords: *Bangia fusco-purpurea*; *de novo* sequencing; virtual screening; angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides; stability

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230710-123

中图分类号: TS201.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2024)02-0188-07

收稿日期: 2023-07-10

基金项目: 厦门市海洋与渔业发展专项资金青年科技创新项目(23YYST079QCA12);

福建省大学生创新创业训练计划项目(202312631032)

第一作者简介: 吴靖娜(1984—)(ORCID: 0000-0002-2397-8904), 女, 副教授, 博士, 研究方向为海洋生物资源的高值化利用。E-mail: wjn@xmmc.edu.cn

引文格式:

吴靖娜, 洪乔茜, 廖榕榕, 等. 红毛藻血管紧张素转化酶抑制肽的筛选及其稳定性评价[J]. 食品科学, 2024, 45(2): 188-194. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230710-123. <http://www.spkx.net.cn>

WU Jingna, HONG Qiaoxi, LIAO Rongrong, et al. Screening and stability evaluation of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from *Bangia fusco-purpurea*[J]. Food Science, 2024, 45(2): 188-194. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20230710-123. <http://www.spkx.net.cn>

高血压是我国乃至全世界最为常见的一种慢性疾病, 全世界近10亿人患有高血压, 预计到2025年, 全世界将有15.6亿人患有高血压^[1]。目前, 药物仍是治疗高血压的主要手段, 其中血管紧张素转化酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)抑制剂是最常用的抗高血压药物之一, ACE是一种锌金属肽酶, 是高血压发病机制中的一个关键蛋白靶标^[2], ACE可催化无升压活性的血管紧张素(angiotensin, ANG) I脱去C末端的两个氨基酸后转化为具有较强升压活性的血管紧张素II(ANG II), 还能水解激肽-激肽释放酶系统中具有舒张血管功能的缓激肽(bradykinin, BK) C末端的Phe-Arg, 使其失去活性, 导致血压升高^[3]。而ACE抑制剂通过抑制ACE活性来阻断ANG II的生成, 减弱BK的降解, 从而达到降低血压的目的^[4]。目前已有多种合成的ACE抑制剂如卡托普利和依那普利等作为抗高血压药物被开发和临床应用, 然而, 单一使用ACE抑制剂药物不能有效地降低血压, 还可能引发干咳、瘙痒、皮疹和肾功能衰竭等副作用^[5], 因此, 安全营养的ACE抑制剂亟待研究。食源性生物活性肽作为天然的功能因子, 除了具有ACE抑制活性外, 还具有抑制胆碱酯酶^[6]、 β -分泌酶^[7]等多种生理活性, 因此, 食源性ACE抑制肽作为多功能的抗高血压物质, 具有良好的应用前景。

海洋占地球表面积的71%, 是未来的食品基地, 海洋产品更是人类摄取蛋白质的主要来源。海洋源降压肽首次在发酵鱼“bekasam”中被发现^[8], 此后, 在鱼类、甲壳类、贝类和藻类中相继被发现。如Sun Siqi等^[9]从浒苔蛋白酶解液中获得降压活性肽Phe-Gly-Met-Pro-Leu-Asp-Arg和Met-Glu-Leu-Val-Leu-Arg, 其半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)分别为219.35 μ mol/L和236.85 μ mol/L; Deng Zhenzhen等^[10]从龙须菜中分离得到ACE抑制肽FQIN[M(O)]CILR和TGAPCR, 其IC₅₀分别为9.64 μ mol/L和23.94 μ mol/L, 这两个肽均表现出pH值、温度、模拟胃肠道消化和ACE水解稳定性; Wang Kai等^[11]从钝顶节螺藻蛋白水解物中筛选出ACE抑制肽PTGNPLSP (IC₅₀=1.54 mg/mL), 其在热处理(25~100 $^{\circ}$ C)和不同pH值条件(pH 3~11)下均具有较强的稳定性。

ACE抑制肽的制备方法主要有水解法、微生物发酵法和化学合成法等^[12]。水解法主要有酸水解法、碱水

解法和酶解法, 其中酶解法是制备ACE抑制肽常用的方法^[13]。然而, 从酶解产物中分离到的活性肽组分极其复杂, 同时在反复分离纯化过程中损失严重, 更重要的是, 最终分离纯化出的肽有可能错过了活性最高的肽序列^[14]。近年来, 随着质谱技术与肽组学技术的不断改善, 多种基于不同算法的*de novo*从头测序软件(如PEAKS Studio、Novor等)问世^[15], 与数据库搜索鉴定方法不同的是, *de novo*测序的肽段鉴定方法是根据质谱图中离子峰的质量分布反映出肽及其片段的质量分布, 通过算法算出相邻离子峰的质量差从而推断出对应的氨基酸残基, 然后使用模型推断出谱图中相对应的肽段序列^[16], 能够有效鉴定没有包含于数据库内的肽序列, 克服了数据库搜索的局限性。目前, ACE抑制肽活性评价主要是采用体外活性测定和体内动物实验两种方法, 在前期活性肽的初筛一般是通过高效液相色谱法检测反应体系中加入ACE抑制肽前后马尿酸生成量的变化实现^[17], 活性初筛过程耗资较大、耗时较长。近年来, 结合计算机辅助设计活性肽的研究越来越多, 运用靶标筛选的研究方法已逐渐成为活性肽研究的重要手段, 已利用靶标筛选的方法成功地从大黄鱼^[18]、鸡蛋蛋白^[19]等食物蛋白中鉴定出新的ACE抑制肽。

因此, 本研究以红毛藻(*Bangia fusco-purpurea*)为原料, 采用酶解法及超滤法制备ACE抑制活性肽, 结合计算机辅助技术筛选获得ACE抑制肽, 并对其活性及稳定性进行评价, 以期海洋来源的降血压肽的研究提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

红毛藻 福建省莆田市汇龙海产有限公司提供。

中性蛋白酶(200 U/mg、食品级)、牛血清白蛋白 北京索莱宝科技有限公司; 磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、氯化镁、盐酸、氢氧化钠、硼酸、硼砂(均为分析纯), 胃蛋白酶、胰蛋白酶(均为食品级) 西陇科学股份有限公司; 乙腈(色谱级) 国药集团化学试剂有限公司; 马尿酸组胺酰亮氨酸(Hippuryl-His-Leu, HHL)(色谱级)、ACE(1 U)、马尿酸 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

Me204E分析天平 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司；DK-8D三孔电热恒温水槽 上海一恒科技仪器有限公司；5910R高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司；RE212-B旋转蒸发器 日本Yamato公司；Alpha 1-2冷冻干燥机 德国Christ公司；FlexStation 3钙流检测工作站 美国Molecular Device公司；FlowMen-0021-HP三联高压平板膜设备 厦门世达膜科技有限公司；E2695高效液相色谱仪 美国沃特世科技有限公司；Q Exactive四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.3 方法

1.3.1 红毛藻肽的制备

红毛藻粉碎处理后，配成质量浓度为2.5 g/100 mL的溶液，经2%中性蛋白酶酶解后(56 °C, 4 h)，8 000 r/min离心10 min去除残渣，再经超滤设备分离酶解产物，最终收集<800、800~2 000、2 000~10 000 Da和>10 000 Da 4个超滤组分，冷冻干燥后分别命名为F1、F2、F3、F4，筛选ACE抑制活性高的组分进行下一步分析。

1.3.2 ACE抑制活性的测定

将红毛藻肽F1、F2、F3、F4分别配成100 μg/mL溶液，按表1的反应体系进行反应(其中样品组加红毛藻肽溶液，空白对照组加硼酸盐缓冲液)，反应结束后过0.22 μm微孔滤膜，采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法检测马尿酸的含量。

表1 ACE抑制活性检测反应体系

Table 1 Reaction systems for ACE inhibition assay

试剂	体积/μL	
	样品组	空白对照组
5 mmol/L HHL	100	100
红毛藻肽	100	0
0.1 mol/L硼酸盐缓冲液	0	100
	37 °C水浴预热5 min	
50 mU/mL ACE	50	50
	37 °C水浴反应1 h	
1 mol/L HCl	200	200

HPLC的检测条件：Sunfire C₁₈分析用色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)；流动相：以乙腈-水(32:68, V/V, 含0.1%三氟乙酸)作为流动相，流速为1 mL/min，进样量为10 μL，在228 nm波长处检测马尿酸的含量。

ACE抑制率按下式计算：

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

式中：A为对照组马尿酸色谱峰面积；B为样品组马尿酸色谱峰面积。

1.3.3 ACE抑制肽的氨基酸序列分析

1.3.3.1 高效液相色谱串联质谱分析

将筛选得到的ACE抑制活性最强的组分用2%乙腈配制成质量浓度为100 μg/mL的多肽溶液，利用Q-Exactive四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪对其进行序列组成鉴定，质谱条件：色谱柱为PepMap RPLC C₁₈(75 μm×150 mm, 3 μm, 100 Å)，阳离子模式，扫描范围为m/z 300~1 500，发射极喷雾电压2 kV，并记录对应的二级质谱图。

1.3.3.2 de novo测序

将1.3.3.1节测定的原始数据raw文件导入到PEAKS Studio软件中，采用de novo手动测序方法进行从头测序分析，获得肽序列，并对序列结果的准确性进行打分评估，选取残差局部置信度(residue local confidence, ALC)>80%的肽序列。

1.3.4 基于分子对接的ACE抑制肽的虚拟筛选

从PDB数据库(www.rcsb.org)下载ACE的晶体结构(PDB ID: 1O86)，利用殷赋科技平台(www.yinfotek.com)中【处理PDB结构】板块对该蛋白进行以下处理：剔除水分子、溶剂分子和杂原子基团，添加氢原子和电势，保留Zn²⁺和Cl⁻。

将1.3.3节所获得肽序列文件转化为pdb格式文件，上传至殷赋科技平台中【准备多肽结构】板块，生成配体的三维结构，对其进行能量优化，保存为MDL SDfile(sdf)格式。

通过殷赋科技平台中【小分子虚拟筛选】程序对优化后的配体和受体进行半柔性对接，对接口袋中心大小为40.372、33.820、48.088 Å，对接盒子大小为35.025、40.810、37.633 Å，生成多个不同的构象取向。通过聚类分析(均方根误差(root mean square deviation, RMSD)阈值为2.0 Å)，得到对接打分和相互作用，分析结合模式。

1.3.5 虚拟筛选结果验证

选取1.3.4节虚拟筛选对接打分最低的前6个肽委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行固相化学合成，分别命名为L1、L2、L3、L4、L5和L6，然后分别配成100 μg/mL的溶液，按照1.3.2节的方法进行ACE抑制率的比较。并将ACE抑制活性前3的肽配制成不同质量浓度，以肽质量浓度为横坐标，ACE抑制率为纵坐标，进行曲线拟合，计算IC₅₀。

1.3.6 不同加热温度下ACE抑制肽稳定性分析

将1.3.5节获得的抑制活性最强的ACE抑制肽配制成100 μg/mL的溶液，分别吸取500 μL置于20、40、60、80 °C和100 °C的水浴中加热2 h，冷却至室温后，按照1.3.2节的方法测定ACE抑制率，以未处理的100 μg/mL肽溶液作对照组。

1.3.7 不同pH值下ACE抑制肽稳定性分析

用1 mol/L的HCl溶液和NaOH溶液, 分别调节溶液pH值为2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0, 在不同pH值溶液中等体积加入2 mg/mL肽溶液, 反应2 h, 将处理后的肽溶液用硼酸盐缓冲液稀释到100 $\mu\text{g/mL}$, 测定ACE抑制率, 以未处理的100 $\mu\text{g/mL}$ 肽溶液作对照组。

1.3.8 抗消化性能分析

1.3.8.1 人工胃肠液的配制

人工胃液的配制: 取浓度为1 mol/L稀盐酸16.4 mL, 加水约800 mL与胃蛋白酶10 g, 摇匀后, 加水稀释至1 000 mL, 置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

人工肠液的配制: 取磷酸二氢钾6.8 g, 加500 mL水, 用0.1 mol/L NaOH溶液调节pH值至6.8; 另取胰蛋白酶10 g, 加水适量使其溶解, 将两液混合后, 加水稀释至1 000 mL。

1.3.8.2 人工胃液单独作用下ACE抑制肽稳定性分析

参照郑志强等^[20]的方法略作修改。用人工胃液将肽配制成1 mg/mL的溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min水浴2 h。100 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴10 min灭酶, 冷却后3 000 r/min离心20 min, 将处理后的肽溶液用硼酸盐缓冲液稀释为100 $\mu\text{g/mL}$, 测定ACE抑制率。以未处理的100 $\mu\text{g/mL}$ 肽溶液作对照组。

1.3.8.3 人工肠液单独作用下ACE抑制肽稳定性分析

参照郑志强等^[20]的方法略作修改。用人工肠液将肽配制成1 mg/mL的溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min水浴2 h。100 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴10 min灭酶, 冷却后3 000 r/min离心20 min, 将处理后的肽溶液用硼酸盐缓冲液稀释为100 $\mu\text{g/mL}$, 测定ACE抑制率。以未处理的100 $\mu\text{g/mL}$ 肽溶液作对照组。

1.3.8.4 模拟人体胃肠消化下ACE抑制肽稳定性分析

用人工胃液将肽配制成2 mg/mL的溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min水浴2 h后调pH值至6.8, 添加同体积的人工肠液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min水浴2 h。100 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴10 min灭酶, 冷却后3 000 r/min离心20 min, 将处理后的肽溶液用硼酸盐缓冲液稀释至100 $\mu\text{g/mL}$, 测定ACE抑制率。以未处理的100 $\mu\text{g/mL}$ 肽溶液作对照组。

1.3.9 不同金属离子作用下ACE抑制肽稳定性分析

参照朱薪等^[21]的方法略作修改。将肽配制成200 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 分别加入等体积的NaCl、KCl和MgCl₂溶液使不同金属离子溶液的终浓度分别为10、15 g/100 mL和30 g/100 mL, 2 h后测定ACE抑制率, 以不加金属离子的100 $\mu\text{g/mL}$ 肽溶液作对照组。

1.3.10 不同光照类型作用下ACE抑制肽稳定性分析

参照相欢等^[22]的方法略作修改。将肽配制成100 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度, 室温条件下, 分别置于日光灯、紫外灯和黑暗环境中30 min后, 测定ACE抑制率。以未处理肽溶液作对照。

1.4 数据统计与分析

所有实验均重复3次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用SPSS Statistics 25软件对数据进行处理, 进行单因素方差分析, 采用Duncan法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 红毛藻肽的超滤分级及ACE抑制活性比较

如表2所示, F2 (800~2 000 Da) 和F4 (>10 000 Da) 组分的得率相对较高, 分别为25.86%和27.83%, 然而F2组分的ACE抑制率明显高于F4, 为(75.44 \pm 0.81)%。因此选择F2组分进行下一步研究。

表2 超滤分级得率及ACE抑制活性比较

Table 2 Comparison of yields and ACE inhibitory activities of fractions obtained by ultrafiltration

组分	分子质量/Da	得率/%	ACE抑制率/%
F1	<800	18.08	60.93 \pm 1.58 ^c
F2	800~2 000	25.86	75.44 \pm 0.81 ^a
F3	2 000~10 000	19.64	66.59 \pm 0.87 ^b
F4	>10 000	27.83	50.63 \pm 3.23 ^d

注: 同列肩标小写字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。表4同。

2.2 红毛藻肽序列预测及虚拟筛选

根据串联质谱数据进行的从头测序是蛋白质组学中进行蛋白质特性分析的关键技术^[23], 从头测序的任务是基于给定质谱图和肽段质量分布的情况下, 通过算法从谱图离子峰推断出肽的氨基酸序列, 并对序列结果的准确性进行打分评估。作为*de novo*结果的置信度, 当ALC>80%表示结果较为可信。本研究通过*de novo*测序, 获得ALC>80%的红毛藻肽39条。

以所预测的39条肽作为配体, 优化后的ACE晶体结构(PDB code: 1O86)为受体, 采用殷赋科技云计算平台的半柔性对接进行分子对接, 得到对接得分和相互作用, 对接得分的数值越小(绝对值越大)说明肽与ACE的结合能力越强, ACE的抑制活性也可能越强。对接结束后, 选取对接得分排名前6的红毛藻肽(表3), 进行后续ACE抑制活性的验证。

表3 对接打分结果

Table 3 Molecular docking results

序号	氨基酸序列	分子质量/Da	对接得分	范德华力贡献	静电力贡献
L1	LVLFLFGE	1 049.616 0	-153.204 6	-147.087 3	-6.117 3
L2	LLPPELYN	1 070.601 1	-149.173 3	-148.243 3	-0.929 9
L3	KFGSKAKN	878.497 4	-133.169 9	-121.296 9	-11.873 0
L4	LADGNKR	772.419 1	-132.377 6	-123.137 2	-9.240 4
L5	TTMLWFP	894.431 0	-130.877 8	-122.071 0	-8.806 8
L6	LLSTRN	702.402 4	-126.868 3	-113.599 7	-13.268 7

2.3 红毛藻ACE抑制肽活性验证

将L1、L2、L3、L4、L5、L6共6条ACE抑制肽

分别配成100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,检测各成分的ACE抑制活性,结果如表4所示,L1的抑制率最佳,L5和L3次之,L2对ACE的抑制效果最弱,各组间抑制率差异显著($P<0.05$)。

表4 红毛藻ACE抑制肽活性验证

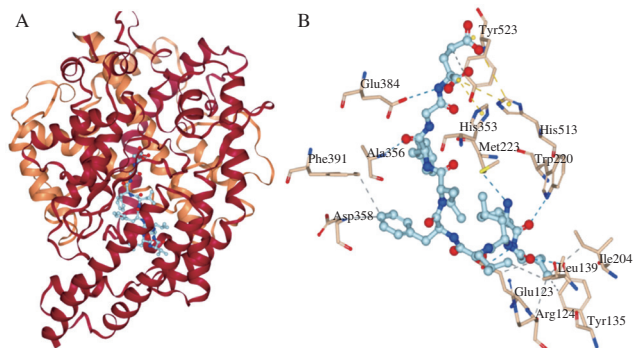
Table 4 Amino acid sequence and activity of ACE inhibitory peptides from *Bangia fusco-purpurea*

序号	氨基酸序列	ACE抑制率/%
L1	LVLLFLFGE	97.97 \pm 0.01 ^a
L2	LLPPELYN	11.18 \pm 1.27 ^f
L3	KFGSKAKN	79.15 \pm 0.27 ^c
L4	LADGNKR	37.98 \pm 2.37 ^e
L5	TTMLWFP	89.67 \pm 0.83 ^b
L6	LLSTRN	76.09 \pm 1.47 ^d

挑选抑制活性前3的红毛藻ACE抑制肽,将L1配制成6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5个质量浓度梯度,L3配制成62.5、125、250、500、1 000、2 000、4 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 7个质量浓度梯度,L5配制成62.5、125、250、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5个质量浓度梯度后,测定其ACE抑制活性并计算 IC_{50} ,结果显示L1、L3和L5的ACE抑制率的 IC_{50} 分别为14.22、183.4和152.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因此选择L1进行进一步的研究。

2.4 红毛藻ACE抑制肽L1与ACE的结合位点分析

采用分子对接的方法对L1(LVLLFLFGE)与ACE对接构象进行分析。ACE中有3种主要的活性位点残基,分别是S1(Ala354、Glu384和Tyr523)、S2(Gln281、His353、Lys511、His513和Tyr520)和S'1(Glu162)^[24]。由图1可知,L1与ACE之间共有6个氢键相互作用,与L1产生氢键作用的氨基酸残基包括Glu123、Tyr135、Trp220、Met223、Ala356、Glu384,二者之间形成的氢键网络是L1与ACE稳定结合的关键;L1还与ACE中的氨基酸残基His353、His513形成盐桥作用,这些作用为化合物的结合提供了一6.117 3 kcal/mol的静电力贡献。此外,结合口袋中具有多个疏水残基,可与L1形成较强的疏水作用,提供范德华力贡献,这些疏水性较强的氨基酸残基包括Arg124、Ile201、Asp358、Phe391、Tyr523等。



A.三维结构图; B.相互作用图。

图1 L1(LVLLFLFGE)与ACE结合模式图

Fig. 1 Binding mode of L1(LVLLFLFGE) to ACE

2.5 红毛藻ACE抑制肽L1的稳定性分析

2.5.1 不同温度处理对L1稳定性的影响

由于多肽自身的不稳定性以及在高温下容易降解等原因,往往限制了多肽类功能因子的使用,同时给多肽的生产、运输和保存造成了困难。为了确保ACE抑制肽L1在实际情况中的正常应用,本实验研究了不同温度条件下抑制肽L1的ACE抑制活性变化。

由图2可知,L1经不同温度加热处理后,ACE抑制率均在96%以上,表明L1在20~100 $^{\circ}\text{C}$ 内均能保持较好的ACE抑制活性。邵燕秋^[25]从鳗鱼骨胶原蛋白中提取多肽GPAGPAGPR和GPPGPPGL并将其在不同温度(20~100 $^{\circ}\text{C}$)进行处理,结果表明处理后ACE抑制活性没有明显的变化($P>0.05$)。杨晨^[26]以南瓜籽蛋白为原料制备ACE抑制肽,当温度为20~80 $^{\circ}\text{C}$ 时,南瓜籽ACE抑制肽的活性抑制率基本没有显著变化($P>0.05$)。总体看来,L1受温度的影响较小,能够耐受长时间高温,这对于利用活性成分制备功能性食品具有一定的实用意义。

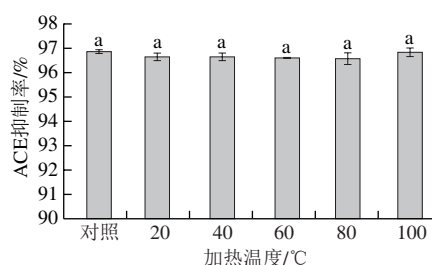
不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

图2 加热温度对L1的ACE抑制率的影响

Fig. 2 Effect of heating temperatures on the ACE inhibitory activity of L1

2.5.2 不同pH值处理对L1稳定性的影响

L1溶解于甲酸,故L1肽溶液呈酸性($\text{pH}<2$)。L1在不同pH值下分别处理2 h后,其ACE抑制率的变化情况如图3所示,对照组L1的ACE抑制率最高,为(98.32 \pm 0.07)%,随着pH值的升高,L1的ACE抑制率呈显著下降趋势($P<0.05$);pH值为10和12时,L1的ACE抑制率显著低于pH值为2、4、6和8($P<0.05$),这可能是由于在碱性条件下,多肽易发生外消旋或脱酰胺反应,导致活性减弱^[27]。因此推测L1对pH值处理较敏感,在酸性条件下ACE抑制率相对较强。

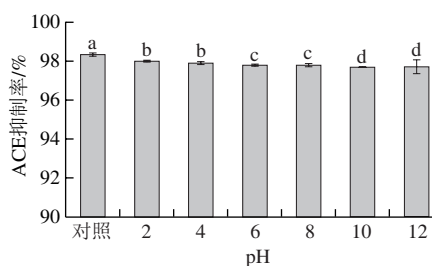


图3 pH值对L1稳定性的影响

Fig. 3 Effect of pH on the stability of L1

2.5.3 体外模拟胃肠消化对L1稳定性的影响

L1对胃肠道消化酶系的稳定性研究结果如图4所示。胃液的pH值为1~2, 且存在胃蛋白酶, 食物在胃里被排空的时间一般为1~2 h, 单独模拟胃消化反应2 h后L1的ACE抑制率下降显著 ($P < 0.05$), 但ACE抑制率仍达到 (93.54 ± 0.13) %; 单独模拟肠消化反应2 h后, L1的ACE抑制率显著下降 ($P < 0.05$), 但ACE抑制率仍达到 (93.99 ± 0.27) %; 当同时模拟胃肠消化时, L1的ACE抑制率亦显著下降 ($P < 0.05$), 但是其抑制率比单独处理时高, 为 (97.64 ± 0.51) %, 这与罗鹏等^[28]用葵花籽粕制备的ACE抑制肽在模拟胃液和肠液中活性的变化规律类似, 而王乐^[29]对杏仁分离蛋白酶解物AN4、BA6和CN6进行模拟胃消化后, ACE抑制率呈上升趋势, 但经过模拟肠消化后的ACE抑制率却显著降低。多肽的生物活性主要依靠肽链中氨基酸分子间的协同作用, 因此, 氨基酸与多肽相比活性较弱^[30], 多肽在胃肠消化过程中, 经胃蛋白酶、胰蛋白酶的作用进一步水解成分子质量更小的短肽或氨基酸, 部分具有ACE抑制活性的多肽被破坏^[31], 从而导致ACE抑制活性降低, 单独或者同时模拟胃肠消化所生成的短肽不一样, 亦会使其抑制率变化规律不一致。

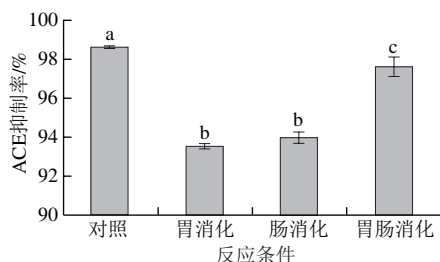


图4 体外模拟胃肠消化对L1稳定性的影响

Fig. 4 Effect of *in vitro* simulated gastric and intestinal digestion on the stability of L1

2.5.4 不同质量浓度金属离子对L1稳定性的影响

由图5可知, 随着金属离子质量浓度的升高, L1的ACE抑制率总体呈下降趋势 ($P < 0.05$), 但是ACE抑制活性相对较高, 抑制率均在96%左右; L1经10 g/100 mL和15 g/100 mL的NaCl/KCl处理后, ACE抑制率差异不显著 ($P > 0.05$), 当金属离子质量浓度增加到30 g/100 mL时, ACE抑制率显著降低 ($P < 0.05$); 不同浓度的MgCl₂处理后L1的ACE抑制活性差异显著 ($P < 0.05$)。刘鑫炯等^[32]研究发现一定浓度的NaCl对皮氏蛾螺降血压肽ACE抑制活性的影响很小, 但在高浓度NaCl条件下, 对皮氏蛾螺降血压肽ACE抑制活性的影响显著, 但Zhu Qiaonan等^[33]研究发现来源于油茶籽饼粕蛋白的ACE抑制肽在Na⁺、Mg²⁺金属离子处理过程中, ACE抑制活性无明显变化。

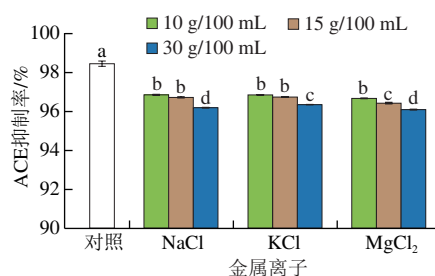


图5 不同质量浓度金属离子对L1稳定性的影响

Fig. 5 Effect of different concentrations of metal ions on the stability of L1

2.5.5 不同光照类型对ACE抑制肽稳定性的影响

由图6可知, 与对照组相比, 黑暗和日光灯照射处理对L1的ACE抑制活性无显著影响 ($P > 0.05$), 而紫外灯照射条件下, L1的ACE抑制率显著下降 ($P < 0.05$), 表明该产品在实际生产和贮藏过程中应尽量避免暴露于紫外条件下, 以减少影响其ACE抑制活性。

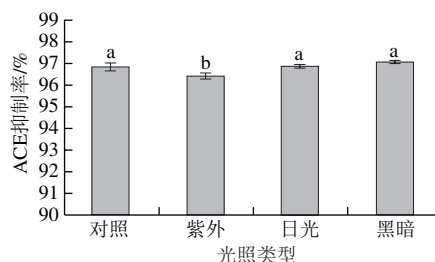


图6 不同光照类型对L1稳定性的影响

Fig. 6 Effect of different types of light exposure on the stability of L1

3 结论

海藻作为重要的海洋生物资源, 因其含有丰富的活性成分, 已成为海洋生物制品研究领域的重要发展方向之一。海洋来源降血压肽的开发极具发展前景, 本实验基于中性蛋白酶法和超滤分离获得具有ACE抑制活性的红毛藻肽组分, 利用液相色谱-串联质谱法与PEAKS Studio软件的*de novo*模块相结合, 对数据进行从头测序分析, 获得ALC高于80%的红毛藻肽39条。并以此为配体、优化后的ACE晶体结构为受体, 采用分子对接高效筛选出与ACE结合最紧密的6条ACE抑制肽L1 (LVLLFLFGE)、L2 (LLPPLELYN)、L3 (KFGSKAKN)、L4 (LADGNKR)、L5 (TTMLWFP)和L6 (LLSTRN); 通过HPLC法对所获得肽的ACE抑制活性进行验证, 发现L1 (LVLLFLFGE)的抑制活性最强, IC₅₀为14.22 μg/mL; 通过分子对接发现, 该肽与ACE之间共有6个氢键相互作用, 并与ACE中的氨基酸残基His353、His513形成盐桥作用, 与结合口袋中多个疏水残基形成较强的疏水作用。

在实际的生产加工和人体胃肠消化过程中, ACE抑制肽的活性可能会发生变化, 因此, 本实验还对L1的加工及消化稳定性进行研究。实验结果表明: 20~100 °C加热2 h对L1的ACE抑制活性无显著影响 ($P>0.05$); L1对不同pH值处理较敏感, 随着pH值的升高, ACE抑制肽活性显著下降 ($P<0.05$); 经体外模拟胃肠液处理后L1的ACE抑制率虽然低于对照组, 但仍具有较高ACE抑制活性; 随着金属离子质量浓度的升高, L1的ACE抑制率总体呈下降趋势 ($P<0.05$), 但是ACE抑制活性相对较高, ACE抑制率均在96%左右; 此外, 紫外处理会使L1的ACE抑制活性显著下降 ($P<0.05$)。

参考文献:

- [1] 周佳琪, 马春燕, 李晓晖. 多肽类ACE抑制剂的设计合成及生物活性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(23): 1-14. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2022030117.
- [2] GANGOPADHYAY N, WYNNE K, O'CONNOR P, et al. *In silico* and *in vitro* analyses of the angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates generated from crude barley (*Hordeum vulgare*) protein concentrates[J]. Food Chemistry, 2016, 203: 367-374. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.02.097.
- [3] VUKIC V R, VUKIC D V, MILANOVIC S D, et al. *In silico* identification of milk antihypertensive di- and tripeptides involved in angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity[J]. Nutrition Research, 2017, 46: 22-30. DOI:10.1016/j.nutres.2017.07.009.
- [4] HEIDARI F, VASUDEVAN R, ALI S Z M, et al. RAS genetic variants in interaction with ACE inhibitors drugs influences essential hypertension control[J]. Archives of Medical Research, 2017, 48(1): 88-95. DOI:10.1016/j.arcmed.2017.03.003.
- [5] FERNÁNDEZ-MUSOLES R, LÓPEZ-DÍEZ J J, TORREGROSA G, et al. Lactoferricin B-derived peptides with inhibitory effects on ECE-dependent vasoconstriction[J]. Peptides, 2010, 31(10): 1926-1933. DOI:10.1016/j.peptides.2010.06.024.
- [6] YU Z P, WU S J, ZHAO W Z, et al. Anti-Alzheimers activity and molecular mechanism of albumin-derived peptides against AChE and BChE[J]. Food and Function, 2018, 9(2): 1173-1178. DOI:10.1039/c7fo01462g.
- [7] YU Z P, WU S J, ZHAO W Z, et al. Biological evaluation and interaction mechanism of beta-site APP cleaving enzyme 1 inhibitory pentapeptide from egg albumin[J]. Food Science and Human Wellness, 2020, 9(2): 162-167. DOI:10.1016/j.fshw.2020.01.004.
- [8] KAUR A, KEHINDE B A, SHARMA P, et al. Recently isolated food-derived antihypertensive hydrolysates and peptides: a review[J]. Food Chemistry, 2021, 346: 128719. DOI:10.1016/J.FOODCHEM.2020.128719.
- [9] SUN S Q, XU X T, SUN X, et al. Preparation and identification of ACE inhibitory peptides from the marine macroalga *Ulva intestinalis*[J]. Marine Drugs, 2019, 17(3): 179. DOI:10.3390/md17030179.
- [10] DENG Z Z, LIU Y J, WANG J, et al. Antihypertensive effects of two novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) in spontaneously hypertensive rats (SHRs)[J]. Marine Drugs, 2018, 16(9): 299. DOI:10.3390/md16090299.
- [11] WANG K, LUO Q W, HONG H, et al. Novel antioxidant and ACE inhibitory peptide identified from *Arthrospira platensis* protein and stability against thermal/pH treatments and simulated gastrointestinal digestion[J]. Food Research International, 2021, 139: 109908. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109908.
- [12] 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. DOI:10.3969/j.issn.1008-9578.2017.03.010.
- [13] ABDELHEDI O, NASRI M. Basic and recent advances in marine antihypertensive peptides: production, structure-activity relationship and bioavailability[J]. Trends in Food Science and Technology, 2019, 88: 543-557. DOI:10.1016/j.tifs.2019.04.002.
- [14] HAN J J, TANG S S, LI Y Y, et al. *In silico* analysis and *in vivo* tests of the tuna dark muscle hydrolysate anti-oxidation effect[J]. RSC Advances, 2018, 8(25): 14109-14119. DOI:10.1039/C8RA00889B.
- [15] 成茜, 杨筱韵, 李婧. 蛋白质组串联谱图De novo测序软件比较与评估[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(8): 3431-3438. DOI:10.13417/j.gab.039.003431.
- [16] 莫凡. 蛋白质组学质谱数据分析的新方法研究开发[D]. 杭州: 浙江大学, 2011: 8.
- [17] MIRZAEI M, MIRDAMADI S, SAFAVI M, et al. *In vitro* and *in silico* studies of novel synthetic ACE-inhibitory peptides derived from *Saccharomyces cerevisiae* protein hydrolysate[J]. Bioorganic Chemistry, 2019, 87: 647-654. DOI:10.1016/j.bioorg.2019.03.057.
- [18] YU Z, WU S, ZHAO W, et al. Virtual screening and molecular docking for exploring ACE inhibitory peptides in *Larimichthys crocea* nebulin protein[J]. International Food Research Journal, 2019, 26(5): 1417-1426. DOI:10.1016/j.fshw.2022.07.026.
- [19] 于志鹏, 樊玥, 赵文竹, 等. 鸡蛋蛋白ACE抑制肽的筛选、鉴定及其作用机制[J]. 食品科学, 2020, 41(12): 129-135. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190507-050.
- [20] 郑志强, 刘晋, 魏晓娟, 等. 加工条件及模拟胃肠消化对小麦肽抗氧化稳定性的影响[J]. 农业机械学报, 2017, 48(9): 330-336. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2017.09.042.
- [21] 朱薪, 康山明, 张天雄, 等. 青刺果抗菌肽组分的分离筛选及其稳定性分析[J/OL]. 中国油脂, 2023: 1-13. DOI:10.19902/j.cnki.zgyz.1003-7969.220648.
- [22] 相欢, 崔春. 沙棘籽粕蛋白肽的稳定性及分离纯化[J]. 食品科学, 2023, 44(18): 49-57. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20221201-003.
- [23] TRAN N H, ZHANG X, XIN L, et al. *De novo* peptide sequencing by deep learning[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(31): 8247-8252. DOI:10.1073/pnas.1705691114.
- [24] YU Z P, FAN Y, ZHAO W Z, et al. Novel angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived from *Oncorhynchus mykiss* nebulin: virtual screening and *in silico* molecular docking study[J]. Journal of Food Science, 2018, 83(9): 2375-2383. DOI:10.1073/pnas.1705691114.
- [25] 邵燕秋. 鳗鱼骨胶原蛋白ACE抑制肽的制备及活性研究[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2022: 48-58. DOI:10.27747/d.cnki.gzjhy.2022.000319.
- [26] 杨晨. 南瓜籽ACE抑制肽制备及其活性的研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2021: 53-59. DOI:10.27776/d.cnki.gwhgy.2021.000228.
- [27] ZHU S, WANG S, WANG L B, et al. Identification and characterization of an angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide from enzymatic hydrolysate of rape (*Brassica napus* L.) bee pollen[J]. LWT-Food Science and Technology, 2021, 147: 111502.
- [28] 罗鹏, 张晓伟, 徐晓, 等. 葵花籽ACE抑制肽的稳定性研究[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(1): 75-77.
- [29] 王乐. 桃仁蛋白源血管紧张素转换酶抑制肽的分离纯化、消化稳定性及应用研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2022: 21-29. DOI:10.27662/d.cnki.gznlc.2022.000366.
- [30] 蔡金秀, 夏姗姗, 马佳雯, 等. 马面鱼皮ACE抑制肽的制备、分离纯化及稳定性[J]. 中国食品学报, 2022, 22(3): 225-234. DOI:10.16429/j.1009-7848.2022.03.025.
- [31] ESCUDERO E, MORA L, TOLDRA F. Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and *in vitro* digestion[J]. Food Chemistry, 2014, 161: 305-311.
- [32] 刘鑫桐, 宋铨铨, 乔变文, 等. 两种皮氏蛾蝶ACE抑制肽的稳定性和抑制活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(19): 7-12. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2020.19.002.
- [33] ZHU Q N, XUE J W, WANG P, et al. Identification of a novel ACE inhibitory hexapeptide from camellia seed cake and evaluation of its stability[J]. Journal of Functional Foods, 2023, 12(3): 501. DOI:10.3390/foods12030501.